



УДК 577.152.31.03

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ,
МОДИФИЦИРОВАННОЙ N,N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЕМ.
РЕАКЦИЯ АЛКАНСУЛЬФОНИЛИРОВАНИЯ

Септ А. В., Яров Я. Л.

Тартуский государственный университет

Аффинной модификацией ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) яда кобры ионом N,N-диметил-2-фенилазиридиния получены два аналога фермента, содержащие одну или две молекулы модификатора, и изучена кинетика их ингибирования *n*-алкансульфонилхлоридами $C_nH_{2n+1}SO_2Cl$ ($n=1-4$) при 5–35° С. Показано, что включение одной молекулы модификатора в молекулу фермента не влияет на его каталитическую активность. Второй азиридиновый ион включается в молекулу белка в районе анионного центра и изменяет специфичность фермента относительно изученных необратимых ингибиторов. Наблюдаемое при этом ускорение реакции ингибирования фермента аналогично эффектам, вызываемым связыванием тетраалкиламмониевых ионов в анионном центре ацетилхолинэстеразы. Это показывает, что характер взаимодействия пространственно удаленных участков активной поверхности ацетилхолинэстеразы, связывающих ацильную часть и отщепляемую группу сложноеэфирного субстрата, не зависит от природы связи эффектора с анионным центром.

При аффинной модификации ионом N,N-диметил-2-фенилазиридиния ацетилхолинэстераз из яда кобры [1] и из эритроцитов быка [2] значительно изменяются каталитические свойства этих ферментов в реакциях с катионными субстратами и ингибиторами. Оба фермента теряют способность гидролизовать холиновые эфиры карбоновых кислот и взаимодействовать с катионными фосфорорганическими ингибиторами [3]. В то же время активность модифицированных ферментов относительно нейтральных субстратов в ряде случаев даже повышается [3]. Все эти изменения происходят в результате включения двух молекул модификатора в одну молекулу фермента [4, 5]. С другой стороны, в случае ацетилхолинэстеразы яда кобры было показано, что включение только одной молекулы модификатора в молекулу фермента не влияет на его каталитическую активность в реакции с ацетилтиохолином [4]. Таким образом, описанная методика аффинного модифицирования открывает возможности направленного изменения специфичности ацетилхолинэстеразы. В связи с этим представляет интерес исследование физико-химических основ этих изменений. Прежде всего необходимо получить данные о каталитических свойствах и специфичности производных фермента, модифицированных аффинным агентом.

При планировании экспериментов мы исходили из опубликованной ранее модели активного центра холинэстераз [6], описывающей взаимную пространственную ориентацию подцентров связывания разных частей молекул сложноеэфирных субстратов и фосфорорганических ингибиторов вокруг эстеразного центра (рис. 1а, б). Для изучения свойств модифицированных ацетилхолинэстераз использовались *n*-алкансульфонилхлориды, необратимо ингибирующие эстеразный центр этого фермента. Раньше было показано, что алкильные группы этих реагентов располагаются в подцентре p_2 активного центра ацетилхолинэстеразы, как показано на рис. 1в [7]. Реакционная способность этих ингибиторов определяется, очевидно, некоторыми дестабилизирующими стерическими взаимодействиями между алкильной группой и поверхностью белка, что приводит к уменьшению активности ингибиторов по мере увеличения длины углеводородного радикала в молекулах $C_nH_{2n+1}SO_2Cl$ [7].

За счет значительной разницы в скоростях включения первой и второй

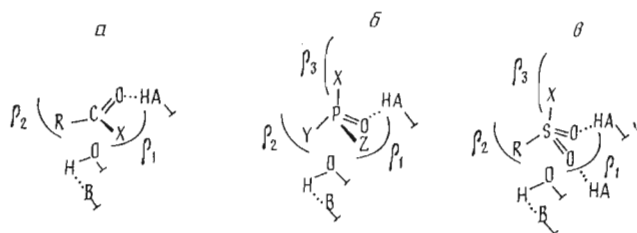


Рис. 1. Схема расположения сложноэфирного субстрата (а), фосфорорганического ингибитора (б) и *n*-алкансульфонилхлоридов (в) в активном центре ацетилхолинэстеразы

молекул азиридинового иона в молекулу фермента [4] были синтезированы два аналога ацетилхолинэстеразы. Кратковременная инкубация фермента в растворе модифицирующего реагента приводила к включению одной молекулы модификатора в белок, при этом каталитические свойства ацетилхолинэстеразы в реакции с алкансульфонилхлоридами не менялись. Например, бимолекулярная константа скорости ингибирования модифицированного фермента этансульфонилхлоридом $k_i = (6,1 \pm 0,3) \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ статистически неотличима от значения $(6,0 \pm 0,2) \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для нативного фермента (25°C). Такой результат согласуется со сделанным ранее выводом о том, что первая молекула модификатора реагирует с некоторой функциональной группой белка, которая не имеет влияния на активность фермента [4].

Длительная инкубация фермента в растворе модифицирующего реагента приводит к реакции ацетилхолинэстеразы с двумя молекулами модификатора [4]. Это изменяет каталитические свойства фермента в реакции с алкансульфонилхлоридами. Так, при 25°C модифицированный фермент реагирует с этими ингибиторами быстрее, чем нативный (рис. 2). Более всего ускоряется реакция с метан- и этансульфонилхлоридами — наиболее активными ингибиторами. Такая закономерность соблюдается при всех изученных нами температурах. Таким образом, можно сделать общий вывод о том, что аффинная модификация ацетилхолинэстеразы ионом *N,N*-диметил-2-фенилазиридиния приводит к проявлению ферментом более выраженной специфичности относительно структуры функциональных групп реагентов, взаимодействующих с участком ρ_2 на активной поверхности фермента. Примечательно, что причина изменения — химическая модификация некой функциональной группы белка, пространственно удаленной от центра ρ_2 , так как реакция модифицирования белка происходит в районе подцентра ρ_1 , где, по всей вероятности, расположен так называемый анионный центр ацетилхолинэстеразы. Последний вывод подтверждается также тем, что ионы тетраалкиламмония не ингибируют модифицированную азиридиновым ионом ацетилхолинэстеразу. Например, при 25°C константа скорости сульфонилирования модифицированной ацетилхолинэстеразы $k_i = (14,1 \pm 0,9) \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, что практически неотличимо от значения $k_i = (13,4 \pm 1,3) \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, полученного в присутствии 50 мМ бромида тетраэтиламмония (концентрация эффектора, превышающая в 4 раза значение константы диссоциации комплекса нативного фермента с этим лигандом).

Ускорение реакции сульфонилирования фермента наблюдается также в случае нативной ацетилхолинэстеразы в результате обратимого связывания *n*-тетраалкиламмониевых ионов $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_4\text{N}^+$ при $n=1-4$ в ее анионном центре. В случае тетраметил- и тетраэтиламмониевого попов наибольший эффект ускорения наблюдается при реакции фермента с метансульфонилхлоридом [8]. Дальнейшее увеличение длины углеводородных заместителей алкиламмониевых ионов приводит к наибольшему эффекту ускорения в случае этансульфонилхлорида [8]. Реакция этого же сульфонила хлорида с ацетилхолинэстеразой ускоряется больше всего и в случае химической модификации ее анионного центра азиридиновым ионом. Такой результат свидетельствует о том, что характер структурной

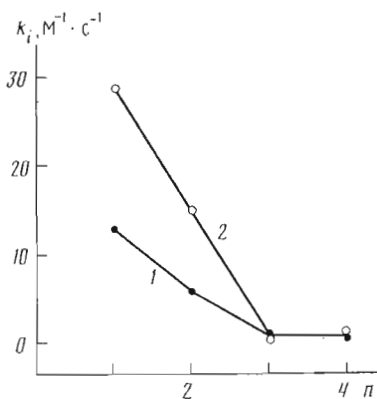


Рис. 2

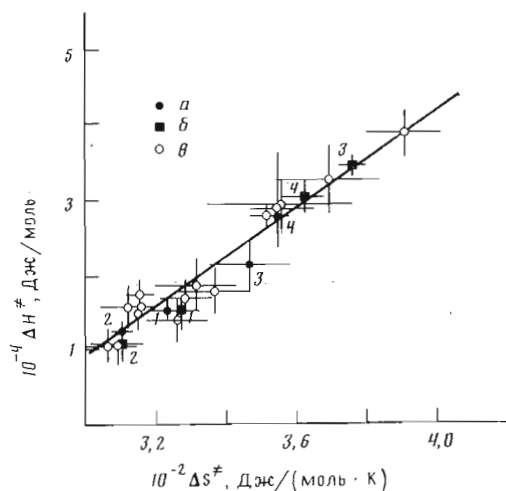


Рис. 4

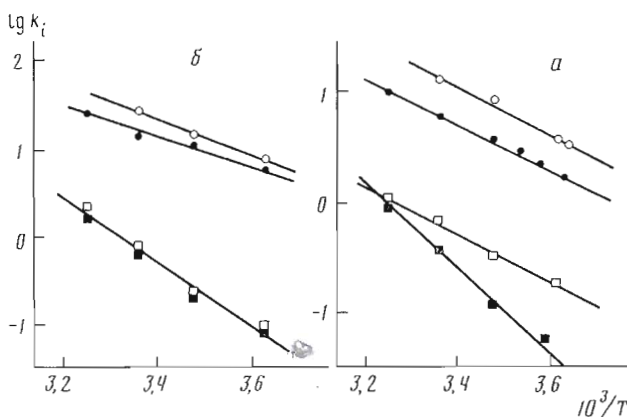


Рис. 3

Рис. 2. Ингибирование нативной (1) и модифицированной (2) ацетилхолинэстеразы n -алкансульфонилхлоридами $C_nH_{2n+1}SO_2Cl$ ($n=1-4$) при $25^\circ C$

Рис. 3. Температурная зависимость реакций сульфонилования нативной (a) и модифицированной (b) ацетилхолинэстеразы с метан- (○), этан- (●), пропан- (□) и бутансульфонилхлоридом (■)

Рис. 4. Изовнетическая зависимость реакций метан- (1), этан- (2), пропан- (3) и бутансульфонилхлоридов (4) с нативной (a) и модифицированной (b) ацетилхолинэстеразой, а также с комплексом нативной ацетилхолинэстеразы с n -тетраалкиламмониевыми ионами $(C_nH_{2n+1})_4N^+$ при $n=1-4$ [9] (a)

зависимости эффекта ускорения определяется размерами молекулы фактора, взаимодействующего с анионным центром фермента.

Чтобы получить более детальную информацию о механизме эффекта ускорения, было изучено влияние температуры на реакцию ацетилхолинэстеразы с алкансульфонилхлоридами. Оказалось (рис. 3), что зависимость Аррениуса

$$\ln k_i = \ln A - E_a/RT$$

хорошо соблюдается для ингибирования алкансульфонилхлоридами как модифицированной, так и нативной ацетилхолинэстераз. Полученные зависимости по величинам наклонов делятся на две группы. В случае нативного фермента практически одинаковые значения активационной энергии характеризуют реакции метан-, этан- и пропансульфонилхлоридов ($dH^{\ddagger} = (15 \pm 3)$ кДж/моль), в то время как для бутансульфонилхлорида активационная энергия более высока ($dH^{\ddagger} = (29,4 \pm 4)$ кДж/моль).

Для модифицированного фермента близкие значения активационной энергии характеризуют реакции метан- и этансульфонилхлоридов ($dH^\ddagger = (14 \pm 3)$ кДж/моль), с одной стороны, и пропан- и бутансульфонилхлоридов ($dH^\ddagger = (31 \pm 2)$ кДж/моль) — с другой. Таким образом, в результате ковалентного модифицирования ацетилхолинэстеразы ионом азиридина значительные изменения в активационных параметрах имеют место только в случае пропансульфонилхлорида.

В условиях, при которых реакционная способность алкансульфонилхлоридов определяется взаимодействием поверхности белка с углеводородным радикалом ингибитора, активационные параметры реакции зависят от интенсивности и характера этих взаимодействий. Изменения в активационных параметрах в свою очередь характеризуют изменения механизма этих взаимодействий. Таким образом, увеличение $dH^\ddagger$ для реакций пропансульфонилхлорида с модифицированным ферментом указывает на то, что в районе подцентра ρ_2 (рис. 1) на удалении трех метилепоновых групп от гидроксильного остатка каталитического серина при химической модификации анионного центра происходят существенные конформационные изменения, в результате которых стерические препятствия для реакции сульфонилирования эстеразного центра становятся одинаковыми для пропил- и бутилзамещенных реагентов. Обнаруженный эффект — специфический результат ковалентного модифицирования ацетилхолинэстеразы, так как ничего подобного не наблюдалось в экспериментах с ионами тетраалкиламмония [8].

Такие различия, однако, не дают основания рассматривать эти процессы в рамках разных реакционных серий, так как данные по алкансульфонилированию нативной и модифицированной ацетилхолинэстераз, включая нековалентные комплексы фермента с алкиламмониевыми ионами, свидетельствуют в пользу существования единой зависимости $dH^\ddagger$ от $dS^\ddagger$ (рис. 4).

Таким образом, взаимодействие эффектора с так называемым анионным центром ацетилхолинэстеразы может изменять связывающие свойства подцентра ρ_2 , которые определяют специфичность фермента относительно структуры углеводородных заместителей в ацильной части сложноефирных субстратов. Так как анионный центр в районе подцентра ρ_1 и участок ρ_2 пространственно разделены, это влияние передается посредством конформационного изменения, характер которого не зависит от природы связи эффектора с анионным центром. С другой стороны, предполагаемые конформационные изменения в активном центре ацетилхолинэстеразы, очевидно, зависят от некоторых геометрических особенностей катионного эффектора, прежде всего от его объема. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что специфичности ацетилхолинэстеразы относительно ацильной части субстратов, имеющих катионные или неионные уходящие группы, могут оказаться разными. Это нужно учесть при анализе зависимостей структура — активность в случае исследования ферментов данного класса.

Экспериментальная часть

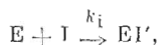
Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7) из яда кобры *Naja naja oxiana* была очищена методом аффинной хроматографии в Институте химической и биологической физики АН СССР. Препарат фермента был любезно предоставлен канд. хим. наук Р. Раба.

Все алкансульфонилхлориды $C_nH_{2n+1}SO_2Cl$ ($n=1-4$; Kodak, США) были очищены перегонкой, их растворы в ацетонитриле были приготовлены непосредственно перед использованием. N,N-Диметил-2-фенилазиридиний синтезировался *in situ* из N,N-диметил-2-хлор-2-фенилэтиламина. Синтез последнего вещества описан раньше [1]. Все остальные реактивы были марки ч.д.а. (Союзреактив).

Реакции сульфонилирования фермента проводились в 0,15 М фосфатном буфере, pH 7,5 (буфер А), содержащем 2,5% ацетонитрила. Реакции ингибирования фермента останавливали разбавлением 15 мкл реакционной смеси в 3 мл буфера А в кювете спектрофотометра.

Активность холинэстераз определяли в буфере А спектрофотометрическим методом по Элману [10], измеряя начальные скорости ферментативного гидролиза 1 мМ раствора ацетилтиохолина. Все кинетические измерения проводили в термостатированных кюветах при 25°С на спектрофотометре Perkin — Elmer 402 (Великобритания).

Бимолекулярные константы скорости реакции сульфонилирования k_i определяли в соответствии со схемой



где E — пассивный фермент, I — алкансульфонилхлорид, EI' — необратимо ингибированный фермент. Бимолекулярную константу скорости рассчитывали по уравнению

$$k_i = - \frac{1}{t[I]_0} \ln \frac{v_0}{v_t},$$

где v_0 — начальная скорость ферментативного гидролиза, v_t — скорость реакции в момент времени t , $[I]_0$ — начальная концентрация ингибитора. Времена инкубаций не превышали 25% от времени полураспада алкансульфонилхлорида [7] в данной среде.

Реакцию модифицирования белка проводили в буфере А. Ацетилхолинэстеразу, модифицированную одной молекулой реагента, получали после инкубации фермента с 0,5 мМ раствором N,N-диметил-2-фенилазиридиниевого иона в течение 4 мин, что соответствует 100% глубины реакции [4]. Реакцию останавливали быстрой гель-фильтрацией пробы на колонке Sephadex G-25 Medium (0,6×5 см; Pharmacia, Швеция). Ацетилхолинэстеразу, меченную двумя молекулами реагента, получали после трехкратной инкубации (по 8 ч) фермента в растворе модификатора с исходной концентрацией 0,5 мМ. Глубина реакции составляла 95–97%. Продукты сольволиза удаляли гель-фильтрацией.

Статистическую обработку данных проводили на ЭВМ PC/XT с использованием пакета программ Statgraphics Ver. 2.1 (Graphical Statistics Corp., США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Палумаа П. Я., Клямбре Т. Х., Ярв Я. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 10.
2. Purdie J. E., McIvor R. A. // Biochim. et biophys. acta. 1966. V. 128. P. 590.
3. O'Brien R. D. // Biochem. J. 1969. V. 113. P. 713–719.
4. Палумаа П. Я., Райдару Г., Ярв Я., Шевченко В. В., Мясоедов Н. Ф. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1348–1352.
5. Belleau B., DiTullio V. // Can. J. Biochem. 1971. V. 49. № 10. P. 1131–1133.
6. Järv J. L. // Bioorg. Chem. 1984. V. 12. P. 259–278.
7. Sepp A. V., Polumaa P. J., Langel U. L., Järv J. L., Zorko M. // Bioorg. Chem. 1989. V. 17. P. 79–85.
8. Sepp A. V., Järv J. L. Bioorg. Chem. 1989. V. 17. P. 131–141.
9. Pavlic M. R. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 327. P. 393–397.
10. Ellmann G. L., Courtney K. D., Andus Jr. V., Featherstone R. M. // Biochem. Pharm. 1961. V. 7. P. 88–95.

Поступила в редакцию 22.II.1989

CATALYTIC PROPERTIES OF ACETYLCHOLINESTERASE CHEMICALLY MODIFIED WITH N,N-DIMETHYL-2-PHENYLAZIRIDIUM ION. THE REACTION OF ALKANESULFONYLATION

SEPP A. V., JÄRV J. L.

Tartu State University

By means of affinity labelling with N,N-dimethyl-2-phenylaziridinium ion (DPA) two forms of acetylcholinesterase were synthesized that contained one or two molecules of the label covalently attached to the enzyme. The reaction of native and covalently modified acetylcholinesterases with n -alkanesulfonyl chlorides $C_nH_{2n+1}SO_2Cl$ at $n=1-4$ was used to characterize the reactivity and properties of the enzymes. It was found that labelling of acetylcholinesterase with one molecule of DPA did not affect the enzyme's reactivity. Acetylcholinesterase containing two labels (the second one presumably located at the anionic centre of the enzyme) displayed enhanced and more specific reactivity towards alkanesulfonyl chlorides. It was found that the phenomenon of acceleration caused by affinity modification is analogous to the influence of n -tetraalkylammonium ions on the same reaction. Therefore, the mechanism of regulation of the properties of the esteratic centre, caused by affinity labelling of the enzyme at the anionic centre, is the same as in the case of n -tetraalkylammonium ions.