



УДК 541.127

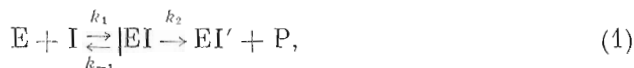
ПРЯМОЕ ИЗМЕРЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ВРЕМЕН РАСПАДА ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Лапцукый К. В., Самокин В. А., Смирнов О. И.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград*

В прямом эксперименте измерены характеристические времена распада фермент-ингибиторных комплексов, образующихся при взаимодействии бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) с тремя фосфорорганическими ингибиторами необратимого типа действия. На основе общепринятой двухстадийной схемы реакции бутирилхолинэстеразы с необратимыми фосфорорганическими ингибиторами обсуждается соотношение величин констант скорости распада фермент-ингибиторных комплексов (k_{-1}) и констант скорости фосфорилирования фермента (k_2). Делается вывод о неправомерности применения к реакциям такого типа формализма, основанного на предположении $k_{-1} \gg k_2$.

Как известно [1], взаимодействие необратимых фосфорорганических ингибиторов с бутирилхолинэстеразой описывается двухстадийной кинетической схемой, включающей ассоциативную стадию:



где EI — фермент-ингибиторный комплекс, EI' — фосфорилированный фермент, P — отщепляющаяся часть ингибитора.

До сих пор реакции, протекающие по схеме (1), анализируются с произвольным допущением $k_{-1} \gg k_2$ [2—5]. При этом используется зависимость константы скорости реакции первого порядка (K_I) от концентрации вещества, находящегося в избытке ($[I]$):

$$K_I = \frac{k_1 k_2 [I]}{k_{-1} + k_1 [I]}. \quad (2)$$

Считается, что эта формула реализуется в условиях, когда

$$[EI] / [E] = k_1 [I] / k_{-1}. \quad (3)$$

Однако, как было показано ранее [6], если в процессе реакции сохраняется постоянное по времени соотношение $[EI] / [E]$, общее выражение для K_I имеет следующий вид:

$$K_I = \frac{1}{2} [k_1 [I] + k_{-1} + k_2 - \sqrt{(k_1 [I] + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1 k_2 [I]}]. \quad (4)$$

Различия между соотношениями (2) и (4) особенно существенны в области малых значений $k_1 [I]$. Это видно, например, из сравнения производных

Константы скоростей элементарных стадий реакции бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади с фосфорорганическими ингибиторами (I) — (III)

Ингибитор	$k_1 \cdot 10^{-4}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	k_{-1}, c^{-1}	k_2, c^{-1}
О-Бутил-S-(β-фенилметиламиноэтил)-метилтиофосфонат (I)	$5,0 \pm 0,6$	$0,011 \pm 0,004$	$0,029 \pm 0,004$
О-Пропил-S-(β-фенилметиламиноэтил)-метилтиофосфонат (II)	$1,3 \pm 0,5$	$0,009 \pm 0,003$	$0,024 \pm 0,004$
О-Этил-S-(β-бутилмеркаптоэтил)фенилтиофосфонат (III)	$2,8 \pm 0,3$	$0,034 \pm 0,005$	$0,031 \pm 0,002$

функции $[I]/K_I$. Соответственно для уравнения (2) производная всегда равна $1/k_2$, а для выражения (4) при $[I] \rightarrow 0$ равна нулю. Следовательно, уравнение (2) является плохим приближением выражения (4) в области малых значений $[I]$.

Для реакций, подчиняющихся схеме (1), нами был предложен метод расчета констант скоростей элементарных стадий [6], основанный на анализе зависимости (4), которая осуществляется при достаточно больших временах течения реакции. Существенным в этом методе является тот факт, что исследуемая реакция анализируется при больших степенях накопления промежуточного комплекса.

С использованием зависимости (4) нами были определены константы скорости элементарных стадий реакции бутирилхолинэстеразы с тремя фосфорорганическими ингибиторами (таблица). В настоящей работе представлены экспериментальные данные по прямому определению характеристических времен распада фермент-ингибиторных комплексов с этими ингибиторами, что дало возможность проверить абсолютные значения констант k_{-1} и k_2 .

Характеристические времена распада фермент-ингибиторных комплексов определялись путем измерения кинетики распада этих комплексов по схеме



Процесс, протекающий по схеме (5), наблюдается, очевидно, если исходную реакционную смесь, составленную так, чтобы $k_1 [I] \gg (k_{-1} + k_2)$, сильно разбавить в момент времени $t \gg 1/k_1 [I]$. Степень разбавления должна быть такой, чтобы в конечной смеси выполнялось условие $k_1 [I] \ll (k_{-1} + k_2)$.

По кривизне экспериментальной кривой накопления продукта гидролиза субстрата после разбавления инкубационной смеси (рис. 1) определяется сумма $(k_{-1} + k_2)$. Действительно, после разбавления изменение концентрации продукта гидролиза субстрата $[P]_{(t)}$, пропорциональное изменению концентрации свободного фермента $[E]_{(t)}$ при ненасыщающих фермент концентрациях субстрата, описывается следующим образом:

$$[P]_{(t)} = A \cdot e^{-(k_{-1}+k_2)t} + Bt + C, \quad (6)$$

где $A = k_{-1}/(k_{-1} + k_2)^2$, $B = k_{-1}/(k_{-1} + k_2) + \alpha$, $C = -k_{-1}/(k_{-1} + k_2)^2$; α — поправка на спонтанный гидролиз субстрата и остаточную в момент разбавления активность фермента. При достаточно больших временах, когда $e^{-(k_{-1}+k_2)t} \rightarrow 0$, график накопления продукта гидролиза субстрата представляет собой прямую (рис. 1); значит, после разбавления действительно выполняется условие $k_1 [I] \ll k_{-1} + k_2$. Из уравнения (6) видно, что линейной по t частью будет функция $[P]_{1(t)}$:

$$[P]_{1(t)} = Bt + C. \quad (7)$$

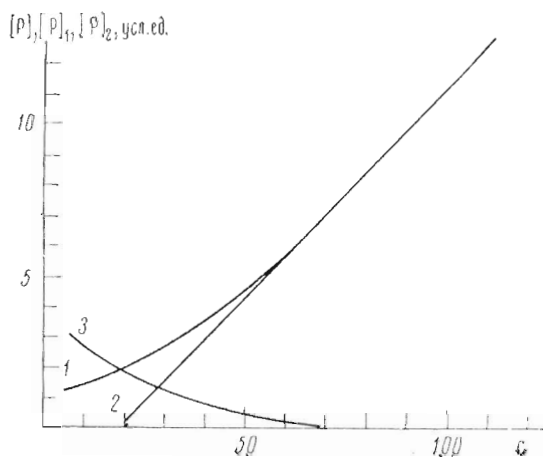


Рис. 1. Накопление продукта гидролиза субстрата после сильного разбавления реакционной смеси: 1 — функция $[P]_{(t)}$; 2 — функция $[P]_{1(t)}$ — линейная часть функции $[P]_{(t)}$; 3 — функция $[P]_{2(t)} \equiv [P]_{(t)} - [P]_{1(t)}$

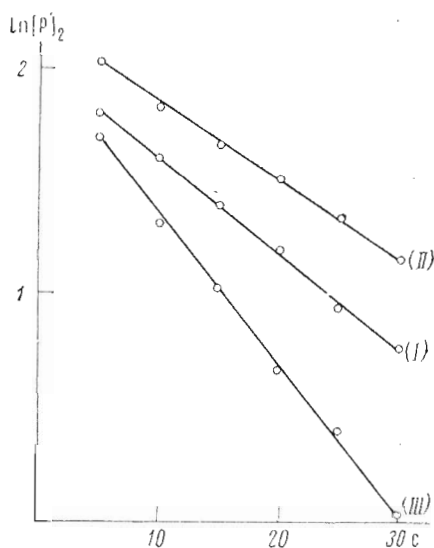


Рис. 2. Обработка экспериментальных зависимостей $[P]_{(t)}$ от t в координатах $\ln [P]_{2(t)}$ от t для О-бутил-S-(β -фенилметиламиноэтил)метилтиофосфоната (I), $(k_{-1} + k_2) = 0,041 \text{ c}^{-1}$, О-пропил-S-(β -фенилметиламиноэтил)метилтиофосфоната (II), $(k_{-1} + k_2) = 0,034 \text{ c}^{-1}$, О-этил-S-(β -бутилмеркаптоэтил)фенилтиофосфоната (III), $(k_{-1} + k_2) = 0,065 \text{ c}^{-1}$

Логарифмируя функцию $[P]_{2(t)} \equiv [P]_{(t)} - [P]_{1(t)}$, получаем для зависимости $\ln [P]_{2(t)}$ от t прямую с наклоном $-(k_{-1} + k_2)$:

$$\ln [P]_{2(t)} = \ln A - (k_{-1} + k_2)t, \quad (8)$$

так как A не зависит от t . На рис. 2 такие зависимости представлены для процессов распада комплексов бутирилхолинэстеразы с тремя ингибиторами.

Нетрудно видеть, что при использовании абсолютных значений измеряемой функции $[P]_{(t)}$ можно вычислить значения k_{-1} и k_2 отдельно, од-

нако точность таких оценок относительно невелика из-за малой величины объемов исходной смеси при разбавлении. Гораздо точнее оценки величины $(k_{-1} + k_2)$, так как в этом случае используется лишь кривизна функции $[P]_{(I)}$, на которую, очевидно, не влияют ошибки разбавления.

Важно отметить, что, согласно данным таблицы и рис. 2, имеет место удовлетворительное совпадение величин $(k_{-1} + k_2)$, полученных двумя совершенно различными методами.

Соотношение величин k_{-1} и k_2 с наибольшей точностью может быть установлено сравнением минимальной оценки $k_{2\min}$ и разности $(k_{-1} + k_2) - k_{2\min}$. В качестве величин $k_{2\min}$ нами приняты максимальные значения K_I , наблюдавшиеся в эксперименте, поскольку, согласно (4), K_I (II) — монотонно возрастающая функция и

$$\lim_{[I] \rightarrow \infty} K_I([I]) = k_2, \quad (9)$$

а суммарные величины $(k_{-1} + k_2)$ определены в настоящей работе (рис. 2). Соответственно для ингибитора (I) $k_{2\min} = 0,031 \text{ с}^{-1}$, $(k_{-1} + k_2) = 0,041 \text{ с}^{-1}$, для ингибитора (II) $k_{2\min} = 0,028 \text{ с}^{-1}$, $(k_{-1} + k_2) = 0,034 \text{ с}^{-1}$, для ингибитора (III) $k_{2\min} = 0,032 \text{ с}^{-1}$, $(k_{-1} + k_2) = 0,065 \text{ с}^{-1}$. Таким образом, во всех исследованных случаях соотношение величины k_{-1} и k_2 имеет вид $k_{-1} \lesssim k_2$.

Из полученных результатов следует, что широко распространенные априорные предположения о соотношении характеристических времен распада фермент-ингибиторного комплекса на исходные и конечные реагенты, или, другими словами, констант скоростей процесса десорбции ингибитора с фермента и процесса фосфорилирования фермента, неверны. В связи с этим уместно подчеркнуть, что, согласно данным прямых измерений времен десорбции малых молекул с макромолекул ферментов, эти времена могут быть очень велики [7, 8].

Соотношение $k_{-1} \gg k_2$ постулируется, как правило, и для обычных химических реакций, идущих с образованием промежуточных ассоциативных комплексов [3]. Однако имеются данные, опровергающие это положение для классических примеров таких реакций [9].

В заключение отметим, что зависимость, представленная на рис. 1, по-видимому, наиболее прямо из существующих до сих пор кинетических доказательств наличия ассоциативной стадии в реакциях холинэстераз с необратимыми фосфорорганическими ингибиторами.

Следует иметь в виду, что интерпретация характеристических времен процессов, наблюдавшихся в изученных нами системах, как величины $(k_{-1} + k_2)$, основана на использовании схемы (1). В литературе нет данных о том, что реакция бутирилхолинэстеразы с необратимыми фосфорорганическими ингибиторами протекала бы по более сложному механизму. Тем не менее эта возможность, безусловно, не исключена. В таком случае измеряемая экспериментально временная характеристика будет иметь более сложный смысл и может рассматриваться как приближенная (вероятно, максимальная) оценка времени жизни наиболее стабильного промежуточного соединения реакции.

Экспериментальная часть

В качестве фермента использовалась бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производства Пермского НИИ вакцин и сывороток, 3-го класса очистки с уд. акт. 8,9 МЕ/мг. Фосфорорганические ингибиторы синтезированы в лаборатории биоорганической химии Института элементоорганических соединений АН СССР С. А. Трифионовой и М. Х. Бекановым под руководством проф. Н. Н. Годовикова и описаны ранее [10, 11].

Экспериментальная процедура определения констант скоростей элементарных стадий реакции бутирилхолинэстеразы с необратимыми ингибиторами по зависимости K_I от $[I]$ подробно описана ранее [6].

С целью прямого измерения характеристических времен распада фермент-ингибиторных комплексов в отдельном сосуде, термостатированном при 25°, исследуемый ингибитор инкубировался с ферментом при рН 7,5 (фосфатный буфер М/150). Концентрация ингибиторов соответствовала условию $k_1 [I] \gg (k_{-1} + k_2)$ и подбиралась экспериментально, исходя из значений k , k_{-1} и k_2 (таблица). После кратковременной инкубации (15—20 с) из реакционной смеси отбирали пробу объемом 0,01 мл и помещали в кювету флуориметра [12], где уже находился раствор флуорогенного субстрата — α -нафтилацетата — в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М ($K_m = 3 \cdot 10^{-4}$ М) в фосфатном буфере М/150 при 25°, рН 7,5. При объеме кюветы 3 мл достигалось разбавление в 300 раз, что в каждом случае было достаточным для выполнения условия $k_1 [I] \ll (k_{-1} + k_2)$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабачник М. И. (1964) Вестн. АН СССР, № 10, 60—68.
2. Aldridge W. H., Reiner E. (1969) *Biochem. J.*, 115, 147—162.
3. Гаммет Л. П. (1972) Основы физической органической химии, с. 106—112. «Мир», М.; Hammett L. P. (1970) *Physical Organic Chemistry*, Second Edition, McGraw — Hill Book Co.
4. Wilkinson G. N. (1961) *Biochem. J.*, 80, 324—332.
5. Hart G. I., O'Brien R. D. (1973) *Biochemistry*, 12, 2940—2945.
6. Вресткин А. П., Лапццкий К. В., Самокиш В. А., Смирнов О. И. (1974) Докл. АН СССР, 219, 999—1002.
7. Varman B. G., Tollin G. (1972) *Biochemistry*, 11, 4746—4754.
8. Taylor P. W., King R. W., Burgen A. S. W. (1970) *Biochemistry*, 9, 2638—2645.
9. Bunnett J. F., Cermann D. H. (1970) *Biochemistry*, 9, 816—822.
10. Годовиков Н. Н., Тейлов П. Е., Трифонова С. А., Кабачник М. И. (1974) Ж. общ. химии, 44, 30—34.
11. Годовиков Н. Н., Беканов М. Х., Берхамов М. Х., Кабачник М. И. (1974) Ж. общ. химии, 44, 34—37.
12. Умецкая М. Н. (1970) Биохимия, 35, 736—739.

Поступила в редакцию
25.VIII.1975

После переработки
28.I.1976

DIRECT DETERMINATION OF CHARACTERISTIC BREAKDOWN TIMES OF ENZYME-INHIBITOR COMPLEXES

LAPITSKY K. V., SAMOKISH V. A., SMIRNOV O. I.

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Characteristic breakdown time constants of enzyme-inhibitor complexes formed on butyrylcholinesterase (BuChE) interaction with O-butyl-S-(β -phenylmethylaminoethyl)methylthiophosphonate (I), O-propyl-S-(β -phenylmethylaminoethyl)methylthiophosphonate (II), and O-ethyl-S-(β -butylmercaptoethyl)phenylthiophosphonate (III) have been determined to be 24, 29, and 15 sec, respectively. In terms of commonly used two-stage mechanism of BuChE interaction with irreversible organophosphorus inhibitors, the ratio of rate constants k_{-1} and k_2 was discussed (k_{-1} characterizes breakdown of enzyme-inhibitor complex, and k_2 relates to enzyme phosphorylation). A conclusion was drawn that the schemes based on $k_{-1} \gg k_2$ assumption do not hold for reactions of the above type.