



УДК 577.153.02

ЭФФЕКТЫ АЦИЛЬНОГО ФРАГМЕНТА СУБСТРАТОВ В РЕАКЦИИ
С БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ*Ярв Я. Л., Лангел Ю. Л.**Тартуский государственный университет, ЭССР*

Изучена кинетика катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза серии *n*-бутиловых эфиров карбоновых кислот RCOOC_4H_9 с электроотрицательными и углеводородными заместителями R в ацильном фрагменте субстратов. Полученные данные свидетельствуют о возможности проведения количественного анализа специфичности действия фермента на стадиях нековалентного связывания и образования ацилфермента. Показано, что зависимость эффективности нековалентного связывания субстратов в активном центре от их строения определяется только гидрофобностью, тогда как на стадии ацилирования проявляются стерическое, индукционное и гидрофобное взаимодействия. Для субстратов с радикалами R, способными к резонансному взаимодействию с карбонильной группой субстрата, определены соответствующие вклады в константу скорости стадии ацилирования. Результаты анализа представляют возможность выбора между альтернативными моделями активированного состояния реакции ацилирования фермента, что важно при обсуждении механизма холинэстеразного катализа.

Классификация холинэстераз по их каталитическим свойствам основывается главным образом на различной зависимости скорости ферментативного гидролиза сложноэфирных субстратов RCOOX от строения заместителя R [1, 2]. При этом бутирилхолинэстераза (КФ 3.1.1.8) способна эффективно гидролизовать эфиры уксусной, пропионовой, масляной и других кислот, тогда как ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7) обладает выраженной избирательностью к эфирам уксусной кислоты [1, 2]. Такую зависимость обычно объясняют особенностями строения активной поверхности этих ферментов, в частности неодинаковыми размерами участка связывания ацильного фрагмента субстратов. При этом, однако, не учитываются другие эффекты, также определяющие реакционную способность субстратов. В случае ацильного остатка сложноэфирных субстратов к таким эффектам можно отнести стерическое, индукционное и, в зависимости от строения R, резонансное взаимодействия.

В настоящей работе впервые сделана попытка количественно оценить эффекты строения ацильного фрагмента субстратов в катализе, осуществляемом бутирилхолинэстеразой, с целью более глубокого понимания роли собственно ферментативных факторов специфичности. К последним прежде всего следует отнести гидрофобное взаимодействие заместителя с активной поверхностью фермента.

Для учета вышеперечисленных эффектов строения составлена реакционная серия *n*-бутиловых эфиров 15 карбоновых кислот (табл. 1). В пределах этой серии отсутствует значимая парная корреляция между константами заместителей, что допускает обработку кинетических данных многопараметрическими корреляционными уравнениями. В качестве

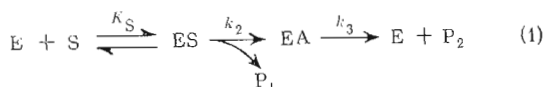
Кинетические константы катализируемого бутирахолинэстеразой гидролиза *n*-бутиловых эфиров карбоновых кислот RCOOC₄H₉ (25° С, рН 7,5; 0,15 М КСl) и постоянные π , E_s^0 и σ^* заместителей R

| Соединение | R | $k_{II} \cdot 10^{-2}$, М ⁻¹ ·с ⁻¹ | K_s (каж), мМ | $k_{кат}$, с ⁻¹ | π | $-E_s^0$ | σ^* |
|------------|---|--|-----------------|-----------------------------|-------|----------|------------|
| (I) | H | 6,31±0,04 | 100±8 | 61,7±3,6 | 0 | 0 | 0 |
| (II) | CH ₃ | 19,0±0,6 | 28,8±3,0 | 66,1±8,4 | 0,5 | 0,25 | -0,49 |
| (III) | C ₂ H ₅ | 100±9 | 6,46±0,31 | 38,9±1,6 | 1,0 | 0,52 | -0,59 |
| (IV) | C ₃ H ₇ | 254±6 | 2,40±0,42 | 56,2±8,0 | 1,5 | 0,81 | -0,61 |
| (V) | C ₄ H ₉ | 316±24 | 1,59±0,16 | 50,1±4,8 | 2,0 | 0,84 | -0,62 |
| (VI) | C ₅ H ₁₁ | 501±16 | — | — | 2,5 | 0,84 | -0,62 |
| (VII) | CH(CH ₃) ₂ | 79,4±1,3 | 2,95±0,20 | 25,1±4,0 | 1,3 | 1,10 | -0,68 |
| (VIII) | CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | 63,1±0,4 | 2,09±0,62 | 11,0±3,3 | 1,8 | 1,38 | -0,62 |
| (IX) | C(CH ₃) ₃ | 8,51±0,83 | 0,398±0,022 | 0,398±0,052 | 1,98 | 2,39 | -0,79 |
| (X) | CH ₂ Cl | 85,1±4,2 | 11,7±0,5 | 74,1±5,1 | 0,89 | 0,82 | 0,52 |
| (XI) | C ₂ H ₄ Cl | 40,7±2,1 | 5,75±0,40 | 14,5±1,8 | 1,38 | 1,35 | -0,10 |
| (XII) | CCl ₃ | 0,960±0,045 | — | — | 1,67 | 3,30 | 1,99 |
| (XIII) | CH ₂ SC ₂ H ₅ | 398±13 | 3,16±0,20 | 100±5 | 1,45 | 1,02 | 0,07 |
| (XIV) | CH=CH ₂ | 4,68±0,14 | 26,3±6,3 | 12,9±3,1 | 0,73 | 0,52* | 0,10 |
| (XV) | C(CH ₃)=CH ₂ | 2,14±0,05 | 12,0±0,8 | 2,75±0,21 | 1,03 | 1,10* | 0,10 |

* Использовали значение $-E_s^0$ для соответствующих насыщенных углеводородных структурных аналогов.

стандартного заместителя в шкалах E_s^0 и σ^* выбран атом водорода, как предложено для проведения корреляционного анализа с выборками заместителей, одновременно включающими электроотрицательные и насыщенные углеводородные радикалы [3]. Кроме того, применительно к ферментативным реакциям такое смешение значений E_s^0 и σ^* приводит к общему с π -константами стандартному заместителю (см. табл. 1), что значительно упрощает интерпретацию свободного члена многопараметровых корреляционных уравнений. Для количественного учета гиперконъюгации вычислили параметры $n = n_H + 0,4n_C$, где n_H и n_C — числа C—H- и C—C-связей, участвующих во взаимодействии с реакционным центром [4]. Параметры гидрофобности заместителей R вычислили по литературным данным [5] как аддитивные величины.

Согласно общепринятой для сериновых гидролаз трехстадийной реакционной схеме



(E — фермент, S — субстрат, ES и EA — нековалентный фермент-субстратный комплекс и ацилфермент, P₁ и P₂ — продукты реакции гидролиза), в стационарных условиях определяются константы

$$k_{кат} = k_2 \frac{k_3}{k_2 + k_3}, \quad (2)$$

$$K_s(каж) = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (3)$$

и при $[S] \ll K_s(каж)$

$$k_{II} = k_2 / K_s. \quad (4)$$

Без дополнительных ограничений из этих параметров в корреляционном анализе применимы только константы скорости второго порядка k_{II} ,

Результаты корреляционного анализа кинетических констант реакции гидролиза, катализируемой бутирилхолинэстеразой

| Соединения | Уравнение | Определяемые кон- станты | r | s |
|--------------------------------------|-----------|--|-------|-------|
| (I) – (IV), (VII) – (XII) | (6) | $\lg k_{II}^0$ 2,93±0,25 φ 1,87±0,46 δ^0 1,45±0,34 ρ^* 0,40±0,20 h 0,04±0,14 | 0,963 | 0,260 |
| (I) – (IV), (VII) – (XI) | (7) | $\lg k_{II}^0$ 2,97±0,18 φ 1,96±0,33 δ^0 1,52±0,24 ρ^* 0,41±0,18 | 0,962 | 0,240 |
| (I) – (IV), (VII) – (IX) | (8) | ρK_s^0 1,01±0,14 φ_b 1,09±0,11 | 0,979 | 0,178 |
| (I) – (IV), (VII) – (X), (XII) | (9) | $\lg k_2^0$ 1,91±0,14 φ_a 1,06±0,23 δ^0 1,59±0,20 ρ^* 0,66±0,16 | 0,978 | 0,185 |

отвечающие требованиям квазиэлементарности. Для $k_{кат}$ и $K_{s(кат)}$ необходимо отдельно указывать соотношение k_2 и k_3 , определяющее физическое содержание этих констант.

Общее корреляционное уравнение для учета влияния строения ацильной части субстратов на константы скорости второго порядка бутирилхолинэстеразного гидролиза можно представить в виде

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 + \varphi\pi + \delta^0 E_s^0 + \rho^* \sigma^* + hn + \psi. \quad (5)$$

Здесь $\lg k_{II}^0$ – свободный член уравнения, а остальные составляющие означают вклады гидрофобного, стерического, индукционного, гиперконъюгационного и суммарного резонансного (за вычетом гиперконъюгации) взаимодействий. Важно отметить, что резонанс между радикалом R и группой >C=O возможен только в случае двух последних соединений в табл. 1 и для остальных членов реакционной серии $\psi=0$. В результате этого для соединений (I) – (XII) можно пользоваться упрощенным вариантом уравнения (5):

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 + \varphi\pi + \delta^0 E_s^0 + \rho^* \sigma^* + hn. \quad (6)$$

При обработке данных табл. 1 согласно этому уравнению было обнаружено, что исключение из анализа констант скорости k_{II} для производных валериановой и капроновой кислот повышает значение коэффициента корреляции от 0,91 до 0,96 и уменьшает стандартное отклонение от 0,38 до 0,25. Улучшение качества корреляционной зависимости в результате исключения некоторых данных может быть связано с ограниченными размерами гидрофобной области, способной размещать радикалы R только с определенной длиной углеводородной цепи. Такое изменение связывающих свойств гидрофобных центров в зависимости от длины заместителей известно для обеих холинэстераз [6–8], а также для других ферментов, как, например, α -химотрипсина [9]. Учитывая этот факт, в расчете параметров уравнения (6), приведенных в табл. 2, опускали значение k_{II} для эфира меркаптоэтилуксусной кислоты, что практически не влияло на результаты анализа.

Из табл. 2 видно, что в данной реакционной серии можно также пренебречь гиперконъюгационной составляющей. В результате уравнение

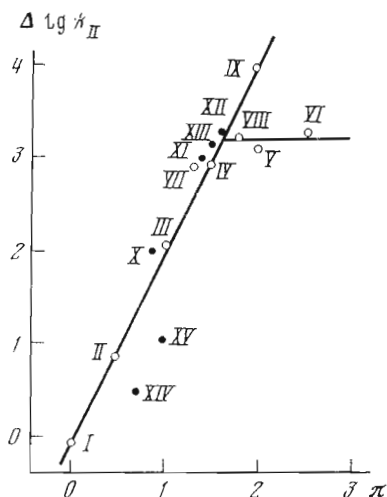


Рис. 1

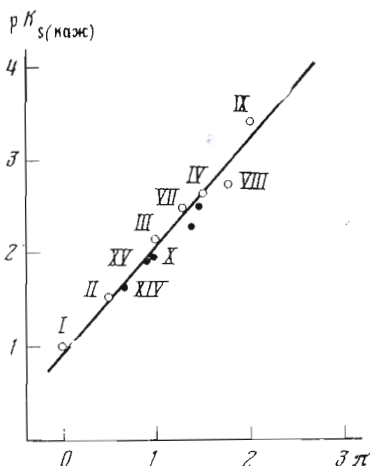


Рис. 2

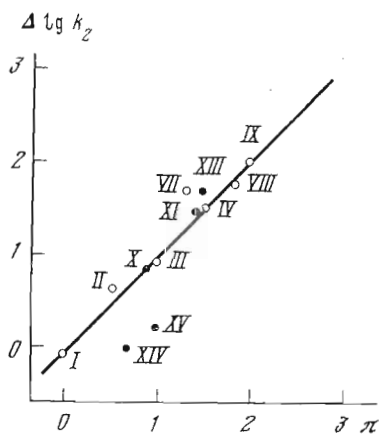


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость $\Delta \lg k_{II} = \lg k_{II} - \lg k_{II}^0 - \delta^0 E_s^0 - \rho^* \sigma^*$ от константы гидрофобности π в реакции катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза субстратов $RCOOC_4H_9$. Номера соединений здесь и на рис. 2, 3 соответствуют табл. 1

Рис. 2. Влияние строения ацильной части субстратов $RCOOC_4H_9$ на эффективность связывания в активном центре бутирилхолинэстеразы

Рис. 3. Зависимость $\Delta \lg k_2 = \lg k_2 - \lg k_2^0 - \delta^0 E_s^0 - \rho^* \sigma^*$ от π в реакции субстратов $RCOOC_4H_9$ с бутирилхолинэстеразой

(6) упрощается до вида

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 + \varphi \pi + \delta^0 E_s^0 + \rho^* \sigma^*. \quad (7)$$

Соблюдение такой зависимости показано на рис. 1. Там же приведены данные, опущенные при обработке результатов. Как видно, точки для эфиров валериановой и капроновой кислот отклоняются от общей для других субстратов прямой. Эти отклонения достоверно превышают возможные погрешности определения k_{II} и тем самым согласуются с представлениями об ограниченных размерах гидрофобной области. При этом не помещающийся в ней фрагмент субстрата, по-видимому, не взаимодействует с ферментом. Такое же положение было раньше обнаружено для гидрофобных областей связывания отщепляющейся части субстратов в активных центрах обеих холинэстераз [7, 8].

От прямой на рис. 1 отклоняются также точки для производных акриловой и метакриловой кислот. Эти отклонения свидетельствуют о резонансном взаимодействии π -электронных систем заместителей $CH_2=CH-$ и $CH_2=C(CH_3)-$ с группой $>C=O$ в реакционном центре субстрата. Вклады резонансного взаимодействия для обоих заместителей практически одинаковы: $-0,97$ и $-1,02$ соответственно. Как видно, резонанс стабилизирует исходное состояние реакции, уменьшая скорость гидролиза субстратов.

При этом в ферментативной реакции резонансное влияние существенно слабее соответствующего эффекта в органических реакциях, для которых можно ожидать уменьшения или увеличения кинетических констант от 10^3 до 10^5 раз [4]. Например, по данным таблиц [3, 10] можно вычислить для реакции щелочного гидролиза соединений $\text{CH}_2=\text{CHCOOC}_2\text{H}_5$ и $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOC}_2\text{H}_5$ (25°C , вода) значения ψ , равные $-2,9$ и $-3,0$ соответственно.

Хотя не существует определенной количественной взаимосвязи между величинами ψ и h , в грубом приближении обычно имеем $h \approx 0,1 \psi$ [4]. Такое соотношение может соблюдаться и в данной реакционной серии, однако надежное определение величины $h \leq 0,1$ оказывается невозможным в пределах точности эксперимента (см. табл. 2). В гетеролитических реакциях отмечено также соответствие между знаками ψ и ρ^* [4]: при резонансной стабилизации исходного состояния ($\psi < 0$) имеем положительное значение ρ^* . Как видно, эти закономерности соблюдаются и при ферментативном гидролизе сложных эфиров, хотя оба эффекта имеют весьма скромную величину.

В отличие от этого стерическое взаимодействие имеет относительно большое значение. При описании стерического эффекта можно дать четкое предпочтение шкале E_s^0 перед константами E_s , поскольку последние величины включают также гиперконъюгационную составляющую. Последняя, однако, в данной реакции не проявляется. В результате применение констант E_s вместо E_s^0 приводит к сильному отклонению точки для заместителя Н— от корреляционной зависимости и коэффициент корреляции уменьшается.

При выборе *n*-бутиловых эфиров карбоновых кислот в качестве субстратов было учтено, что в реакции бутирилхолинэстеразы с *n*-бутилацетатом стадией, лимитирующей скорость, является ацилирование фермента [7]. Это упрощает анализ кинетических данных, так как при $k_2 \ll k_3$ имеем $k_{\text{кат}} = k_2$ и $K_{s(\text{наж})} = K_s$. Исходя из представления, что механизмы реакций ацилирования и дезацилирования фермента аналогичны, можно на обеих стадиях ожидать также похожие эффекты ацильной части субстрата и, следовательно, симбатного изменения констант k_2 и k_3 в зависимости от строения заместителя R. На этом основании при планировании данного исследования было предположено, что соотношение $k_2 < k_3$ может соблюдаться и в случае других *n*-бутиловых эфиров карбоксильных кислот.

Полученные экспериментальные данные не противоречат такому предположению. Так, из рис. 2 видно, что между величинами $\rho K_{s(\text{наж})}$ и константами гидрофобности π соблюдается хорошая линейная зависимость, которая распространяется на субстраты с электроотрицательными и углеводородными радикалами, в том числе и на соединения с ненасыщенными группами R. Соблюдение такой простой зависимости можно понять при условии $K_{s(\text{наж})} = K_s$:

$$\rho K_s = \rho K_s^0 + \varphi_b \pi. \quad (8)$$

Из рис. 2 видно, что от этой зависимости отклоняется точка для *n*-бутилвалериата, как это наблюдалось и в случае k_{11} .

На основании зависимостей (7) и (8) можно записать корреляционное уравнение для стадии ацилирования:

$$\lg k_2 = \lg k_2^0 + \varphi_a \pi + \delta^0 E_s^0 + \rho^* \sigma^*, \quad (9)$$

поскольку константы k_2 , согласно соотношению (4), можно представить как комбинацию k_{11} и K_s . Из табл. 2 видно, что уравнение (9) достаточно хорошо описывает зависимость $k_{\text{кат}}$ от строения заместителя R. Значения δ^0 и ρ^* в этом уравнении хорошо согласуются с соответствующими величинами для констант скорости второго порядка. Кроме того, хорошо соблю-

даются соотношения $\lg k_{11}^0 = \lg k_2^0 + pK_s^0$ и $\varphi = \varphi_a + \varphi_b$, также прямо вытекающие из соотношения (4).

Применимость уравнения (9) для констант $k_{кат}$ проиллюстрирована на рис. 3. Из этого рисунка видно, что от корреляционной зависимости (9) отклоняются точки для заместителей, способных к сопряжению. Численные значения резонансного эффекта для эфиров акриловой и метакриловой кислот равны $-0,8$ и $-0,9$ соответственно.

Из приведенных данных видно, что на каталитической стадии бутирилхолинэстеразного гидролиза проявляются те же эффекты, которые характерны для k_{11} . Так как константы k_{11} и $k_{кат}$ определены независимым путем в разных условиях эксперимента, вышенеречисленные соответствия результатов обработки этих констант дополнительно проверяют и подтверждают соблюдение условия $k_2 < k_3$ в данной реакционной серии.

Таким образом, специфичность бутирилхолинэстеразы относительно ацильной части субстратов можно количественно описать, учитывая гидрофобное, стерическое, индукционное и резонансное влияния. Раньше подобный количественный анализ эффектов строения был проведен для отщепляющейся части субстратов бутирилхолинэстеразы, что вместе с результатами настоящей работы открывает возможность количественного анализа субстратной специфичности фермента.

Как следует из уравнения (8), гидрофобность является единственным фактором строения ацильного фрагмента субстрата, определяющим эффективность его нековалентного связывания в активном центре бутирилхолинэстеразы. Аналогичное однопараметровое уравнение (7) описывает также влияние отщепляющейся части непонных заместителей в стадии нековалентного связывания. Близкое к единице значение φ_b в обоих случаях хорошо согласуется с общепринятыми представлениями, рассматривающими распределение органических молекул в системе вода — октанол в качестве модельного процесса для феноменологического определения гидрофобного взаимодействия [5]. Согласно такому определению, гидрофобное влияние полярных групп не является однородным взаимодействием и может включать сольватационные эффекты, наблюдающиеся при переходе полярного заместителя из водной среды в гидрофобную фазу, например в октанол. Учитывая такую возможность, в настоящей работе выбирали субстраты с заместителями, не способными к специфической сольватации, т. е. к образованию водородной связи. Этого, однако, нельзя сказать о реакционном центре молекулы субстрата, который является центром основности и может участвовать в образовании водородной связи как в воде, так и в среде насыщенного водой октанола. Интересно, что такая гидрофобная фаза по сольватационным свойствам близка к гидрофобной области активного центра фермента. Об этом свидетельствуют близкие значения pK_s и логарифмов коэффициента распределения ($\lg P$) сложных эфиров в системе вода — октанол. Так, например, для этилацетата имеем pK_s 1,08 [7] и $\lg P$ 0,7 [5]. Кроме того, можно отметить, что вычисленное для соединения RCOOH со стандартными заместителями (атом водорода) значение pK_s $-0,5$ хорошо согласуется с $\lg P$ $-0,54$ для муравьиной кислоты [5].

Из уравнения (9) следует, что гидрофобность заместителя R проявляется также на реакционной стадии ацилирования фермента. При этом константы φ_b и φ_a , характеризующие чувствительность к гидрофобному влиянию двух следующих друг за другом стадий ферментативной реакции, практически равны между собой. Такое симметричное проявление гидрофобности на стадиях нековалентного связывания и катализа было раньше обнаружено в реакциях α -химотрипсина [11, 12], ацетилхолинэстеразы [8, 13] и также в случае отщепляющейся части субстратов бутирилхолинэстеразы [7]. Согласно высказанным в работе [12] представлениям, подобные эффекты в ферментативном катализе можно объяснить

конформационным изменением, которое заключается в «закрытии» гидрофобной полости активного центра фермента.

Наряду с гидрофобным влиянием на стадии ацилирования фермента проявляется стерический эффект. Чувствительность к этому фактору одинаково высока в случае ацильной и отщепляющейся частей субстратов RCOOH и значительно превышает соответствующий эффект при кислотном и щелочном гидролизе сложных эфиров в воде [3]. В отличие от стерического эффекта закономерности индукционного влияния групп R и X в RCOOH значительно различаются и индукционное влияние радикала R характеризуется примечательно низким значением ρ^* , тогда как для заместителя X получено значение $\rho^* 2,5 \pm 0,2$ [7]. В то же время в реакции щелочного гидролиза, часто рассматриваемой в качестве модели действия сериновых гидролаз, индукционное влияние обоих заместителей R и X можно характеризовать весьма близкими значениями ρ^* , например $2,30 \pm 0,04$ для RCOOC₂H₅ [3] и $2,20 \pm 0,09$ для CH₃COOH [14] (25°C, H₂O). Эти различия в закономерностях индукционного влияния, а также высокая чувствительность к стерическому эффекту и отсутствие гиперконьюгационной составляющей в рассматриваемой реакции согласуются с представлением о ферменте как особой реакционной среде и прямо указывают на существенные различия в механизме ферментативного и неферментативного гидролиза сложных эфиров. В свете этих различий необходимо весьма тщательно относиться ко всем попыткам проанализировать причины высокой эффективности ферментативного катализа простым сопоставлением кинетических данных для ферментативных и неферментативных процессов, хотя это является весьма заманчивой процедурой именно в случае гидролаз. Сделанный вывод распространяется также на аддитивные члены корреляционных уравнений k^0 , поскольку выбор стандартного заместителя является сугубо произвольной процедурой и эта величина соответствует только одной из возможных комбинаций заместителей в данной реакционной серии.

Более ценную информацию о механизме каталитической стадии можно получить при анализе факторов чувствительности к различным структурным эффектам. При этом только в случае индукционного эффекта известна количественная связь между строением реакционного центра в активированном состоянии и значением ρ^* :

$$\rho^* = \frac{\alpha^* (\sigma_y^* - \sigma_{y \neq}^*)}{2,3 RT} \quad (10)$$

Здесь α^* обозначает универсальную постоянную индукционного взаимодействия, численное значение которой, по данным для различных химических процессов, составляет $2,62 \pm 0,08$ ккал/моль [15]. Индукционные

постоянные σ_y и $\sigma_{y \neq}$ характеризуют реакционный центр в исходном и активированном (конечном) состояниях соответственно. Зная ρ^* и σ_y , с помощью уравнения (10) легко оценить $\sigma_{y \neq}^*$, которое характеризует строение активированного комплекса и таким образом может быть использовано в качестве количественного критерия для выбора между альтернативными механизмами (структурами активированного комплекса).

При варьировании заместителя R в ацильной части субстратов реакционным центром служит группа -COOC₂H₅. Используя для этого заместителя значение $\sigma^* 2,11$ [3], получим по уравнению (10) для реакции ацилирования фермента $\sigma_{y \neq}^* 1,9$. Как видно, индукционные постоянные реакционного центра в исходном и активированном состояниях практически не различаются. В случае отщепляющейся части субстратов CH₃COOH реакционным центром является группа CH₃COO-, для которой $\sigma^* 2,45$ [3]. Используя эту величину и $\rho^* 2,5$, получим по уравнению (10) $\sigma_{y \neq}^* 1,3$. На

основании обеих величин σ_{y^*} можно предложить модель активированного состояния реакции ацилирования бутирилхолинэстеразы, которая предполагает переход протона от некоторой протондонорной группы фермента на отщепляемую группу субстрата и практически соответствует строению ацилфермента.



Согласно такой модели, в качестве реакционного центра в активированном состоянии выступают группы ---C(=O)--- фермент и HO--- , так как при определении ρ^* для кислотной и отщепляющейся частей использовали σ^* — постоянные для заместителей R и X соответственно. При этом для группы HO имеем $\sigma^* 1,37$ [3], что практически совпадает с вышеприведенной величиной $\sigma_{y^*}^* 1,3$, вычисленной из ρ^* для заместителя X. С другой

стороны, для сложноэфирной группы ---C(=O)--- фермент можно в первом приближении использовать значение $\sigma^* 2,1$ для группы COOAlk [3], что также близко к $\sigma_{y^*}^* 1,9$, вычисленной из ρ^* для R.

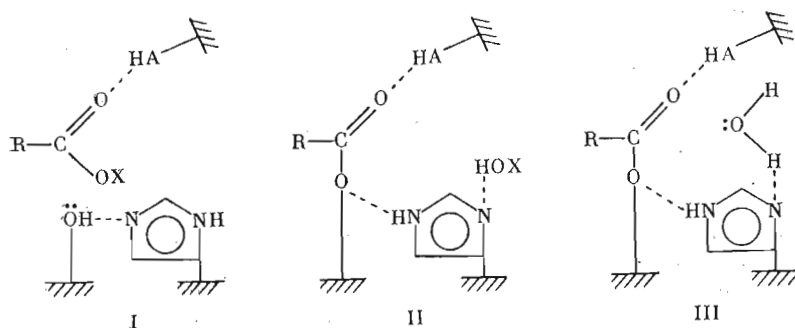
Согласно предложенной модели (11), π -электронная система карбонильной группы субстрата в активированном состоянии не нарушена и, следовательно, вклады резонансного взаимодействия заместителей R с карбонильной группой в исходном и активированном состояниях одинаковые и не должны проявляться в кинетике. Весьма скромный эффект резонанса в реакции ацилирования свидетельствует о некотором искажении электронной структуры карбонильной группы, возможно, в результате образования дополнительной водородной связи с функциональной группой фермента. Все это, однако, не противоречит основным выводам о характере активированного состояния. Можно также сказать, что возможные альтернативные модели активированного состояния не удовлетворяют основным требованиям, вытекающим из величин ρ^* и ψ в обсуждаемых реакционных сериях.

Менее четкие соображения можно высказать о стерическом влиянии, дестабилизирующем активированное состояние. В соответствии с моделью (11) большой стерический эффект может быть связан с заменой заместителя OX на значительно более объемистую группу при образовании ковалентной связи с ферментом. При этом активный центр бутирилхолинэстеразы характеризуется, по-видимому, весьма плотной и жесткой упаковкой полипептидных цепей.

Таким образом, на основании результатов корреляционного анализа можно сделать определенные выводы о механизме каталитической стадии, характеризуя строение субстрата в активированном состоянии, степень разрыва связей и возможные места взаимодействия с функциональными группами фермента. При этом важно иметь в виду, что в ферментативной реакции активированному комплексу соответствует состояние, которое характеризуется наибольшей величиной свободной энергии всей системы фермент — субстрат при ее передвижении по координате реакции. При этом положение максимума не обязательно определяется только химическим превращением молекулы субстрата, а может также соответствовать некоторой конформационной перестройке фермента. Возможно, что проявление конформационных перестроек в реакции, катализируемой бути-

рилхолинэстеразой, и объясняет особенности строения модели (11), выведенной на основании анализа результатов эксперимента.

Для более подробного обсуждения вопроса о каталитическом механизме действия фермента требуются дополнительные данные о природе функциональных групп и их роли в катализе. Для бутирилхолинэстеразы соответствующие вопросы обсуждались многократно (см. обзор [16]). Недавно была также предложена общая схема учета эффектов pH в реакциях бутирилхолинэстеразы с субстратами [17], согласно которой в обеих каталитических стадиях могут участвовать как основная, так и кислотная группы фермента. Первой из этих групп является, вероятно, остаток имидазола, активирующий гидроксильную группу серина [16]. На основании таких представлений можно предложить следующую схему действия активного центра бутирилхолинэстеразы:



Здесь в ES-комплексе I происходит связывание и ориентация молекулы субстрата в активном центре вследствие нековалентных взаимодействий и образования водородной связи с кислотной группой фермента АН. В реакции ацилирования фермента имидазольная группа активирует ОН-группу серина и в результате нуклеофильной атаки образуется ацилфермент. Одновременно остаток имидазола выполняет роль переносчика протона на отщепляемую группу субстрата. При этом строение активированного состояния стадии ацилирования II соответствует схеме (11). В ацилферменте III остатком имидазола активируется молекула воды и в процессе деацилирования протон передается обратно на остаток серина. Как было отмечено раньше, участие одной и той же основной группы при активировании остатка серина и молекулы воды согласуется со стереохимическими представлениями о реакции нуклеофильного замещения у карбонильной группы [18].

Важно подчеркнуть, что некоторые детали этой схемы могут иметь альтернативные решения, выбор между которыми представляет определенные трудности. Кроме того, в настоящее время отсутствуют также данные о специфичности фермента на стадии деацилирования, необходимые для проверки представления о симметрии механизмов ацилирования и деацилирования.

Одновременное участие в каталитической стадии двух функциональных групп, взаимодействующих с атомами кислорода карбонильной и спиртовой групп сложноеэфирного субстрата посредством водородных связей, обсуждается также в случае других гидролаз, в частности в случае α -хитотрипсина [19]. При этом считают, что их образование приводит к стабилизации тетраэдрического переходного состояния, чего, однако, не обнаружено в реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой.

Согласно полученным результатам, способность бутирилхолинэстеразы гидролизовать сложные эфиры различных карбоксильных кислот связана с компенсацией гидрофобным влиянием стерических эффектов, препятствующих протеканию реакции ацилирования активного центра фермента. Соотношение вкладов гидрофобного и стерического эффектов в катализи-

руемых ацетилхолинэстеразой реакциях может оказаться иным и тем самым может быть причиной выраженной специфичности этого фермента относительно ацетатов. Более подробное сопоставление специфичности бутирилхолинэстеразы и ацетилхолинэстеразы требует получения количественно интерпретируемых кинетических данных также и для последнего фермента.

Экспериментальная часть

Препарат бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производства НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова использовали после дополнительной очистки на сефадексе G-200 [20]. Удельная активность полученного препарата фермента 160 нкат/мг. Исходные растворы фермента готовили в 0,15 М КСl и хранили при 4° С. Растворы фермента титровали по методу Берри [21], используя О,О-диэтил-*n*-нитрофенилфосфат. Константы и методика очистки ингибитора приведены ранее [22].

Бутиловые эфиры карбоновых кислот марки ч. («Союзреактив») или синтезированные по стандартной методике из бутилового спирта и соответствующей кислоты [23] использовали после ректификации. Физические константы препаратов соответствовали литературным данным [24].

Субстраты растворяли в 0,15 М КСl, эти же растворы использовали в качестве реакционной среды. Водные растворы бутиловых эфиров карбоновых кислот имели нейтральное значение рН, и количество кислоты, освобождающейся при полном гидролизе субстратов, соответствовало вычисленному исходя из концентрации растворов. Все растворы субстратов готовили непосредственно перед употреблением.

Кинетические измерения проводили на рН-стате фирмы «Radiometer» (Дания, ТТТ-1, SBR-2, АВU-1) титрованием кислоты, образующейся при ферментативном гидролизе субстратов 0,01 М раствором КОН. Реакцию проводили в 0,15 М КСl при рН 7,5 и 25° С. Методика определения и расчета констант $k_{кат}$, $K_s(наж)$ и k_{II} описана ранее [7].

Расчеты и статистическую обработку данных проводили на ЭВМ «Наири-2».

Авторы благодарны Т. Ю. Юриадо за предоставление специальной программы многопараметрического корреляционного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Whittaker V. P. (1951) *Physiol. Rev.*, 31, 312—343.
2. Яковлев В. А. (1965) Кинетика ферментативного катализа, с. 139—246, «Наука», М.
3. Таблицы констант скорости и равновесия гетеролитических органических реакций (1979) Пальм В. А., ред., т. 5, полутом II, ВИНТИ, М.
4. Пальм В. А. (1977) Основы количественной теории органических реакций, с. 190—225, «Химия», Л.
5. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) *Chem. Revs.*, 71, 525—616.
6. Кабачник М. И., Абдувахобов А. А., Агабекова И. И., Бресткий А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В. (1970) *Успехи химии*, 39, 1050—1073.
7. Ярв Я. Л., Лангель Ю. Л. (1979) *Биоорган. химия*, 5, 746—755.
8. Järvi J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 67, 315—322.
9. Сякк П. Ф., Абдувахобов А. А., Аавиксаар А. А. (1975) *Реакц. способн. орган. соедин.*, 12, 425—437.
10. Таблицы констант скорости и равновесия гетеролитических органических реакций (1975) Пальм В. А., ред., т. 1, полутом II, ВИНТИ, М.
11. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. (1971) *FEBS Letters*, 15, 125—128.
12. Aaviksaar A., Paris J., Palm V. (1971) *Organic Reactivity (Tartu)*, 8, 817—832.
13. Järvi J., Langel Ü. (1979) *Abstracts FEBS Special Meeting on Enzymes S1—41, Dubrovnik — Savit.*
14. Пальм В. А., Пюсса Т. О., Нуммерт В. М., Тальвик И. В. (1973) *Реакц. способн. орган. соедин.*, 10, 243—267.

15. Коппель И. А., Карельсон М. М., Пальм В. А. (1973) Реакц. способн. орган. соедин., 10, 497-514.
16. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Асланов Х. А. (1976) Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия, с. 13-18, «ФАН», Ташкент.
17. Лангель Ю. Л., Спээк М. А., Ярв Я. Л. (1980) Биохимия, 45, 2130-2138.
18. Järv J., Aaviksaar A., Godovikov N., Lobanov D. (1977) Biochem. J., 167, 823-825.
19. Hawkins H. C., Williams A. (1976) J. S. C. Perkin II, 723-730.
20. Lee J. C., Harpst J. A. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 145, 55-63.
21. Berry W. K. (1951) Biochem. J., 49, 615-620.
22. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лангель Ю. Л., Паст У. Е. (1976) Биохимия, 41, 827-835.
23. Общий практикум по органической химии (1965) Кост А. Н., ред., с. 389, «Мир», М.
24. Handbook of Chemistry and Physics (1956) Hodgman C. D., ed. in chief, CRC, Cleveland - Ohio.

Поступила в редакцию
9.IV.1980

После доработки
6.V.1980

SUBSTRATE ACYL FRAGMENT EFFECTS IN BUTYRYLCHOLINESTERASE CATALYZED REACTION

JÄRV J. L., LANGEL Ü. L.

Tartu State University, Tartu

The kinetics of the butyrylcholinesterase catalyzed hydrolysis of *n*-butyl esters of 15 carboxylic acids (RCOOC_4H_9) has been studied. The presence in the acyl fragment of the substrates of hydrocarbon or electronegative substituents allowed to distinguish the hydrophobic, steric, inductive and resonance effects in the butyrylcholinesterase specificity. Hydrophobicity is the determining factor at the stage of non-covalent binding, whereas steric, inductive and hydrophobic effects are operative at the acylation stage. For substrates wherein resonance interaction between R and carbonyl group may be realized, the respective contributions into the acylation rate constant were determined. The results allow to choose among alternative models of the activated states for enzyme acylation.