

УДК 577.153

БИОХИМИЯ

А. П. БРЕСТКИН, Е. В. РОЗЕНГАРТ, И. Н. СОБОЛЕВА,
Н. В. ХРОМОВ-БОРИСОВ, М. Л. ИНДЕНБОМ, Л. Н. ТИХОНОВА,
А. А. АБДУВАХАБОВ, К. ТОРЕМУРАТОВ

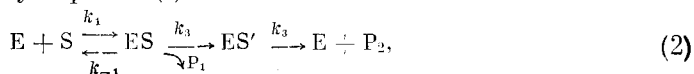
О НЕПРОДУКТИВНОМ СВЯЗЫВАНИИ СУБСТРАТОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 22 XI 1971)

Основным уравнением, описывающим зависимость скорости ферментативной реакции (v) от концентрации фермента ($[E]_0$) и субстрата ($[S]$), является уравнение Михаэлиса — Ментен

$$v = a_c[E]_0[S] / (K_M + [S]) = V[S] / (K_M + [S]), \quad (1)$$

где a_c — активность каталитического центра фермента; V — максимальная скорость реакции, равная $a_c[E]_0$; K_M — константа Михаэлиса. Уравнению (1) удовлетворяют многие схемы ферментативного катализа, в том числе и общепринятая в настоящее время трехстадийная схема взаимодействия фермента с субстратом ⁽¹⁾



где ES — комплекс Михаэлиса; ES' — ацилированный фермент; k_1 , k_{-1} , k_2 и k_3 — константы скорости соответствующих ступеней реакции; P_1 и P_2 — продукты реакции (спирт и кислота). Применительно к схеме (2) действительные значения кинетических параметров равны

$$a_c^* = k_2 k_3 / (k_2 + k_3), \quad (3)$$

$$K_M^* = (k_{-1} + k_2) k_3 / [k_1 (k_2 + k_3)]. \quad (4)$$

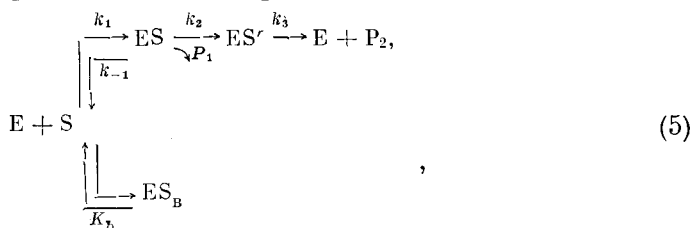
Результаты определения величин K_M и V для гидролиза различных субстратов под действием ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) привели к заключению, что в соответствии со схемой (2) лимитирующей стадией ферментативного процесса является не первая стадия (образование комплекса Михаэлиса), а последующие (ацилирование или деацилирование) ⁽²⁻⁵⁾. Если бы лимитирующей стадией была первая, то тогда при равных концентрациях субстратов быстрее всех гидролизировался субстрат с наименьшей K_M в согласии с общим принципом: «лучшее связывание — лучший катализ». В действительности же с уменьшением K_M скорость гидролиза под действием холинэстераз во многих случаях не возрастает, а уменьшается из-за более резкого падения V ⁽³⁻⁶⁾.

В согласии с этим заключением различие в скоростях холинэстеразного гидролиза субстратов, а следовательно, и специфичность холинэстераз определяется не первой, а последующими стадиями. Это противоречит представлению об определяющей роли комплементарности молекул субстрата активному центру фермента в ферментативном катализе.

Известно, что активный центр холинэстераз полифункционален (имеет по крайней мере 3 различных участка связывания). Именно этим объясняется стереоспецифичность ферментов: из 2 оптических изомеров ацетил-β-метилхолина только *L*-изомер гидролизует ацетилхолинэстера-

зой, а *D*-изомер является ее обратимым ингибитором (7). Молекула *D*-изомера сорбируется на активном центре, но не подвергается гидролизу, так как она не способна правильно ориентироваться на нем. Вероятно, вообще субстраты отличаются друг от друга не столько константами скорости ацилирования и деацилирования, сколько своей способностью правильно ориентироваться на активной поверхности, что не учитывается схемой (2). Веским аргументом в пользу такой точки зрения является комбинированное торможение холинэстераз некоторыми фосфорорганическими ингибиторами (8, 9). Этот вид торможения складывается из необратимого фосфорилирования фермента и из обратимого угнетения, обусловленного, видимо, образованием фермент-ингибиторного комплекса с неправильной ориентацией ингибитора на активном центре холинэстеразы, благодаря чему такой комплекс не способен к дальнейшему превращению в фосфорилированный фермент.

При учете «непродуктивного связывания» субстрата схема ферментативного гидролиза в простейшем случае принимает вид



где K_b — равновесная константа диссоциации комплекса ES_b , в котором субстрат ориентирован неправильно на активном центре фермента. Эта схема также приводит к уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \frac{K_b}{K_b + K_M^*} [E_0] [S]}{K_M^* K_b / (K_b + K_M^*) + [S]} = \frac{a_c^* p [E]_0 [S]}{K_M^* p + [S]} = \frac{a_c [E]_0 [S]}{K_M + [S]} = \frac{V [S]}{K_M + [S]}, \quad (6)$$

где K_M^* и a_c — действительные величины константы Михаэлиса и активности каталитического центра, выражаемые формулами (4) и (3); K_M и a_c — те же величины, определяемые в опыте; p — коэффициент, выражающий долю продуктивного связывания субстрата от общего количества связанного субстрата:

$$p = \frac{[\text{ES}] + [\text{ES}']}{[\text{ES}] + [\text{ES}'] + [\text{ES}]_b} = \frac{K_b}{K_b + K_M^*}. \quad (7)$$

Применительно к α -химотрипсину гипотеза о непродуктивной сорбции была выдвинута Ниманом (10). Недавно И. В. Березин с сотрудниками (11) вывели аналогичное уравнение, которое отличается от (6) только тем, что в нем не вычленен коэффициент p , имеющий, как будет показано ниже, существенное значение для анализа данных холинэстеразного гидролиза. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата не дает возможности находить p и тем более K_M и K_b . Об их численном значении можно судить лишь на основании косвенных расчетов.

Если $K_b \ll K_M^*$, то $p = K_b / (K_b + K_M^*) \approx 1$, $a_c \approx a_c^*$ и $K_M \approx K_M^*$. В этом случае непродуктивное связывание отсутствует и каждая сорбирующаяся на активном центре молекула субстрата гидролизует.

Если $K_b \gg K_M^*$, то $p = K_b / (K_b + K_M^*) = K_b / K_M^* \rightarrow 0$; $a_c = a_c^* p \rightarrow 0$. В этом случае непродуктивное связывание доминирует и такое соединение является не субстратом, а обратимым ингибитором.

Согласно современным представлениям о механизме холинэстеразного катализа (12, 13), субстраты, содержащие одинаковый ацильный остаток и обладающие близкой прочностью сложноэфирной связи, должны иметь практически равные константы скорости ацилирования и деацилирования,

а следовательно, и одинаковые величины a_c . Вероятно, отличия в скоростях их ферментативного гидролиза будут в основном связаны с различиями в величинах p . В данном случае отношение экспериментально найденных величин V для двух таких субстратов при одинаковых концентрациях фермента равно отношению величин p :

$$V_1 / V_2 = a_{c(1)} / a_{c(2)} = p_1 / p_2. \quad (8)$$

Поскольку $K_{M(1)} / K_{M(2)} = K_{M(1)}^* (p_1 / K_{M(2)}^*) p_2$, то подставляя значение p_1 / p_2 из (8) получаем отношение действительных величин константы Михаэлиса

$$K_{M(1)}^* / K_{M(2)}^* = K_{M(1)} / K_{M(2)} (V_2 / V_1). \quad (9)$$

Исходя из этих теоретических позиций, мы проанализировали данные гидролиза ацетатов различных аминоспиртов под действием холинэстеразы сыворотки крови лошади.

Субстраты. Иодметилат N-(β-ацетоксиэтил)-пиперидиния (IV). При ацилировании хлористым ацетилом N-(β-оксиэтил)-пиперидина (¹⁴) в абсолютном бензоле получали с выходом 70—75% N-(β-ацетоксиэтил)-пиперидин, который подвергали иодалкилированию без растворителя (выход 97%; т. пл. 106—108°).

Найдено %: C 38,61; H 7,10; N 4,46; J 40,62
C₁₀H₂₀NO₂J. Вычислено %: C 38,35; H 6,44; N 4,47; J 40,52

Иодэтилат N-(β-ацетоксиэтил)-пиперидиния (II) (выход 40%; т. пл. 86—88°)

Найдено %: C 40,83; H 7,04; N 4,25; J 38,80
C₁₁H₂₂NO₂J. Вычислено %: C 40,37; H 6,78; N 4,28; J 38,78

Иодметилат ацетиллупининия (V). При взаимодействии лупинина с хлористым ацетилом в присутствии триэтиламина получали ацетиллупинин (¹⁵) (выход 70%; т. кип. 80°/0,5 мм; n_D^{20} 1,4860)

Найдено %: C 68,0; H 9,9
C₁₂H₂₁NO₂. Вычислено %: C 68,2; H 10,0

который подвергали иодметилированию в абсолютном эфире (выход 62,5%; т. пл. 100—102°).

Найдено %: N 3,9
C₁₃H₂₄NO₂J. Вычислено %: N 3,9

Фермент. Холинэстераза сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производства Института им. И. И. Мечникова (Москва), активность 7,2 ед.

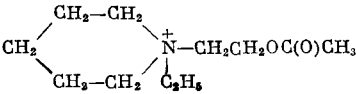
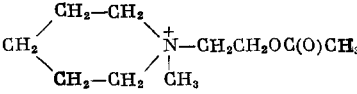
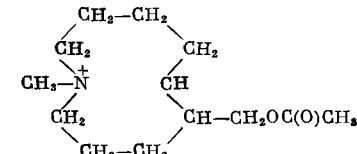
Скорость ферментативного гидролиза субстратов измеряли методом потенциометрического титрования (⁴). Кинетические параметры (K_M и a_c) определяли либо графическим методом (⁴), либо рассчитывали аналитически (¹⁶).

Все исследованные нами субстраты (табл. 1) являются ацетатами, и, согласно схемам (5) и (2), они должны иметь одинаковую константу скорости деацетилирования (k_3). Кроме того, исходя из их строения, эти соединения должны обладать практически одинаковой прочностью сложно-эфирной связи, что подтверждается близкими значениями скоростей спонтанного гидролиза (при pH 7,5). Следовательно, эти субстраты можно рассматривать как равные по силе ацетилирующие агенты, т. е. величины k_2 для них должны быть одинаковы. Тогда, как указывалось выше, к этим субстратам применимы уравнения (8) и (9).

Из табл. 1 видно, что все исследованные ацетаты имели по сравнению с ацетилхолином более низкие величины K_M и a_c . Чтобы оценить порядок величин K_M^* и K_v для изученных соединений, допуская, что для ацетилхолина $p = 1$ ($K_M = K_M^*$), и, тем самым, пренебрегаем его непродуктивной сорбцией. Тогда из уравнений (8), (9) и (7) можно рассчитать для

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза ацетатов различного строения под действием холинэстеразы сыворотки крови лошади (25°, pH 7,5)

№ соединения	Формула	K_M , М	a_c , мин ⁻¹	p	a_c^* , мин ⁻¹	K_M^* , М	K_B , М
I	$(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OC(O)CH_3$	$1 \cdot 10^{-3}(5)$	$6 \cdot 10^4(4)$	1	$6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-3}$	—
II		$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^4$	0,30	$0,6 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$
III	$C_6H_5(CH_3)_2N^+CH_2CH_2OC(O)CH_3$	$3 \cdot 10^{-4}(5)$	$1 \cdot 10^4$	0,15	$0,15 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$
IV		$3,7 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^3$	0,05	$0,015 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$
V		$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^3$	0,04	$0,008 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$

каждого из ацетатов величины K_M^* , K_B , a_c^* и p (табл. 1). Из приведенных в табл. 1 данных следует, что и величина действительной константы Михаэлиса (K_M^*) сама по себе еще не дает возможности делать заключение о каталитической активности фермента в реакции с данным субстратом. Так, при холинэстеразном гидролизе подметилата ацетиллупининия (V) величина K_M^* в 2,5 раза ниже, чем для ацетилхолина. Тем не менее ацетилхолин гидролизуеться в 25 раз быстрее, поскольку для ацетиллупининия процент продуктивной сорбции (4% от ацетилхолина) мал.

Таким образом скорость холинэстеразного гидролиза исследованных субстратов находится в прямой зависимости от доли продуктивного связывания (p), величина которой зависит от соотношения K_M^* и K_B .

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

Поступило
28 X 1971

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Ташкентский государственный университет
им. В. И. Ленина

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, М., 1961, стр. 102. ² I. B. Wilson, I. E. Sabib, J. Am. Chem. Soc., 78, 202 (1956). ³ В. А. Яковлев, Р. С. Агабекян, Биохимия, 32, 293 (1967). ⁴ В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», 1965. ⁵ А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Н. Е. Теплов, Биохимия, 33, 1059 (1968). ⁶ D. I. Escobichen, J. Israel, Canad. J. Biochem., 45, 1099 (1967). ⁷ A. H. Beckett, N. J. Harper, J. W. Clitherow, J. Pharm. Pharmacol., 15, 362 (1963). ⁸ W. N. Aldridge, E. Reiner, Biochem. J., 115, 147 (1969). ⁹ А. П. Бресткин, И. Л. Брик и др., ДАН, 200, 103 (1971). ¹⁰ Н. Т. Huang, C. Niemann, J. Am. Chem. Soc., 74, 4634 (1952). ¹¹ И. В. Березин, Н. Ф. Казанская, А. А. Клесов, Биохимия, 36, 227 (1971). ¹² А. Р. Brestkin, E. V. Rozengart, Nature, 205, 388 (1965). ¹³ А. П. Бресткин, И. Л. Брик и др., Биохимия, 35, 382 (1970). ¹⁴ A. Ladenburg, Ber., 14, 1877 (1881). ¹⁵ К. Торемуратов, А. А. Абдувахабов и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1972, № 4. ¹⁶ A. R. Brestkin, E. V. Rozengart et al., Biochim. biophys. acta, 191, 155 (1969).