

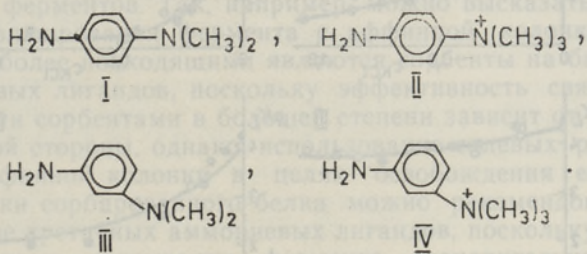
УДК 577.53.4

Резт ТООМИК, Я. ЯРВ

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ С АФФИНЫМИ СОРБЕНТАМИ НА БАЗЕ ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНИЛЕНДИАМИНОВ

(Представил О. Эйзен)

Эффективность связывания специфических субстратов и ингибиторов с холинэстеразами (КФ 3.1.1.7, 3.1.1.8) зависит от концентрации электролита в реакционной среде [1-4]. Наблюдаемый при этом первичный солевой эффект можно объяснить ион-ионным взаимодействием катионных заместителей лигандов с т. н. анионным центром холинэстераз. Естественно предположить, что аналогичный солевой эффект проявляется также при взаимодействии этих же ферментов с аффинными сорбентами, для синтеза которых в качестве лиганда использованы специфические ингибиторы с аммониевыми заместителями. В настоящей работе исследование таких закономерностей проверялось экспериментально для ацетилхолинэстеразы яда кобры и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади в случае 8 разных аффинных сорбентов, синтезированных на базе АН- и СН-агароз из мета- и парапроизводных фенилендиамин:



При этом эффективность связывания фермента с аффинными сорбентами определяли отдельно в маленьких пробах геля, что допускало расчет констант диссоциации K_L комплекса фермента с сорбентом и непосредственное сопоставление полученных при этом данных о солевом эффекте с данными о влиянии соли на взаимодействие тех же ферментов с аналогичными обратимыми ингибиторами в растворе. Полученные результаты представляют не только теоретический, но и практический интерес, поскольку градиент ионной силы нередко используется для освобождения фермента с аффинного сорбента, что связано с изменением константы диссоциации комплекса фермент—сорбент в буферном растворе повышенной ионной силы.

Определенные в равновесных условиях константы диссоциации K_L для комплекса фермента с аффинным сорбентом позволили охарактеризовать влияние электролита (KCl) на равновесие комплексообразования в виде зависимости pK_L от c_{KCl} . При этом важно отметить, что опыты проводились в 0,05 М К-фосфатном буфере, что само по себе обеспечивало достаточно высокую ионную силу реакционной среды. Тем не менее добавленная в реакционную среду KCl в значительной степени

влияла на величины pK_L . Полученные для обеих холинэстераз зависимости pK_L от c_{KCl} приведены на рис. 1 и 2. На основе этих экспериментальных данных можно сделать следующие выводы.

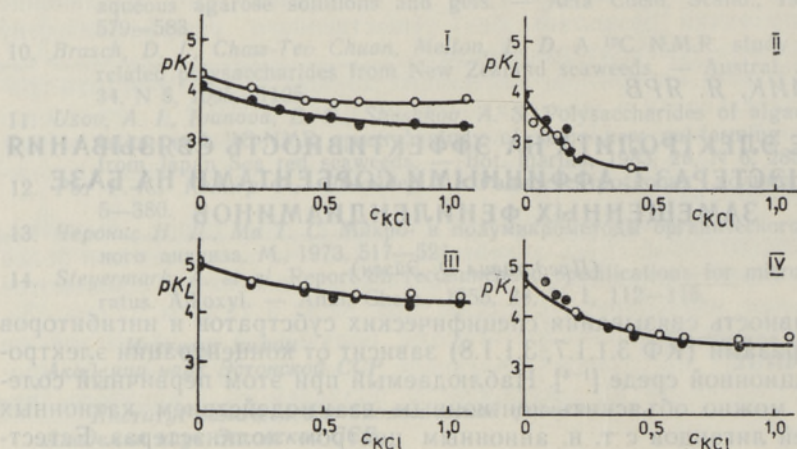


Рис. 1. Влияние концентрации электролита (KCl) на константы диссоциации комплекса ацетилхолинэстеразы с аффинными сорбентами, синтезированными на базе СН-агарозы (○) и АН-агарозы (●). Номера зависимостей соответствуют структурам лигандов I—IV (здесь и на рис. 2).

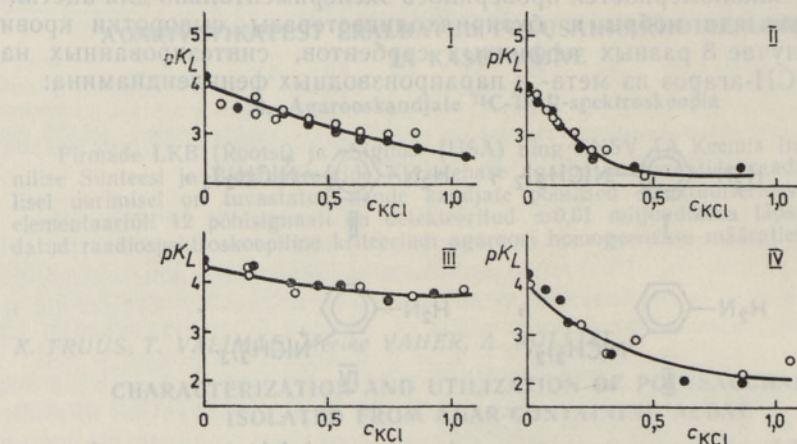


Рис. 2. Влияние концентрации электролита (KCl) на константы диссоциации комплекса бутирилхолинэстеразы с аффинными сорбентами, синтезированными на базе СН-агарозы (○) и АН-агарозы (●).

Во-первых, форма зависимости pK_L от c_{KCl} практически идентична для сорбентов, синтезированных на базе АН- и СН-агароз.

Во-вторых, эффективность связывания ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы с теми же сорбентами характеризуется зависимостями одинаковой формы, хотя количественное сопоставление этих кривых затруднено из-за сложной ионной композиции реакционной среды, что не допускает определения ионной силы раствора.

В-третьих, форма зависимости pK_L от c_{KCl} для сорбентов с четвертичным и третичным атомами азота четко различается: в случае сорбента с четвертичным атомом азота наблюдается резкое падение эффективности связывания фермента с сорбентом при увеличении c_{KCl} до 0,3 М, тогда как в присутствии более высоких концентраций соли в зависимости

pK_L от c_{KCl} образуется «плато». Такая же форма зависимости pK_L от c_{KCl} наблюдалась при взаимодействии катионных лигандов с холинэстеразами [5].

В настоящей работе в качестве модельного соединения для лиганда аффинного сорбента использовали 4-ациламино-N,N,N-триметилфенил-аммонийиодид, который является обратимым ингибитором холинэстераз. Из рис. 3 видно, что зависимость pK_i от c_{KCl} для этого вещества хорошо моделирует солевой эффект, обнаруженный в случае аффинных сорбентов. При этом изменение pK_i при переходе от 0,05 М фосфатного буфера к реакционной среде с добавкой концентрированного раствора KCl хорошо соответствует аналогичному изменению в величине pK_L . Иными словами, максимальная величина солевого эффекта одинакова для аммониевого лиганда в растворе и в составе сорбента.

Можно отметить, что качественно разный характер зависимости pK_L от c_{KCl} проявляется в случае диметиламмониевых лигандов, хотя в условиях эксперимента (рН 7,50) эти ингибиторы тоже заряжены положительно. Как видно из рис. 1 и 2, полученные для этих сорбентов зависимости имеют плоскую форму и в относительно широком интервале концентраций соли аппроксимируются в координатах pK_L и c_{KCl} прямой, соответствующей эффекту «высаливания». Важно отметить, что описанный в случае четвертичных аммониевых соединений первичный солевой эффект не обнаруживается в классической форме также при взаимодействии 4-N,N-диметиламинофенилацетанилида с ферментами в растворе. Из рис. 4 видно, что зависимость pK_i от c_{KCl} существенно отличается от аналогичной зависимости для его четвертичного аналога.

Разный характер влияния соли на эффективность взаимодействия холинэстераз с аффинными сорбентами, синтезированными на базе четвертичных и третичных аммониевых лигандов, представляет определенный практический интерес с точки зрения методики хроматографической очистки ферментов. Так, например, можно высказать предположение, что для элюирования фермента с аффинной колонки градиентом ионной силы более подходящими являются сорбенты на базе четвертичных аммониевых лигандов, поскольку эффективность связывания фермента с такими сорбентами в большей степени зависит от концентрации соли. С другой стороны, однако, использование солевых растворов для промывки аффинной колонки в целях освобождения ее от остатков неспецифически сорбированного белка можно рекомендовать для сорбентов на базе третичных аммониевых лигандов, поскольку в таком случае эффективность связывания фермента незначительно меняется с ростом ионной силы раствора.

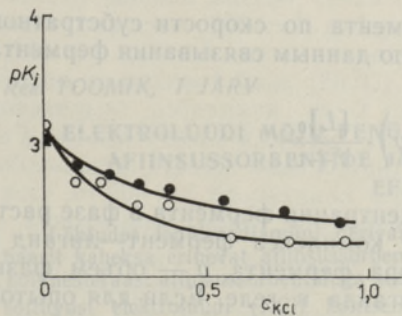


Рис. 3. Зависимость ингибиторных свойств 4-ациламино-N,N,N-триметилфениламмонийиодида от концентрации электролита (KCl) для ацетилхолинэстеразы (○) и бутирилхолинэстеразы (●).

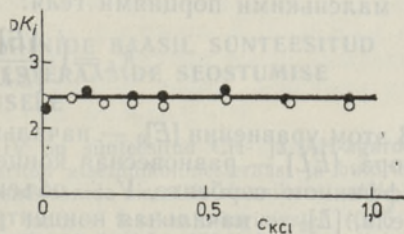


Рис. 4. Зависимость ингибиторных свойств 4-N,N-диметиламинофенилацетанилида от концентрации электролита (KCl) для ацетилхолинэстеразы (○) и бутирилхолинэстеразы (●).

Экспериментальная часть

В качестве источника ацетилхолинэстеразы использовали яд среднеазиатской кобры (*Naја паја охiапа*). Препарат VI класса бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади был получен из Московского НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. Концентрацию фермента в обоих препаратах определяли по скорости гидролиза ацетилтиохолина в оптимальных условиях реакции [6].

Синтез аффинных лигандов 3-амино-N,N-диметиламинобензена (III), хлористого 3-амино-N,N,N-триметилфениламмония (IV), хлористого 4-амино-N,N,N-триметилфениламмония (II) описан в [7]. 4-Амино-N,N-диметиламинобензен (I) использовали в виде сульфата (Рсахим).

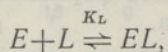
Аффинные сорбенты синтезировали исходя из гранулированной агарозы, выпускаемой Опытным заводом органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР. Присоединение производных фенилендиаминa (I—IV) к СН-агарозе 4В (количество активных групп 15 мкмоль/мл) проводили с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимидa при рН 4,5 на основе методики [8].

Для получения аффинного сорбента на базе АН-агарозы 4В (количество активных групп 18 мкмоль/мл) сначала проводили сукцинилирование носителя [9]. Присоединение производных фенилендиаминa к этому носителю осуществляли карбодимидным методом, как описано выше в случае СН-агарозы.

Для определения концентрации связанного с гелем лиганда использовали спектрофотометрический метод [10]. УФ-спектры сорбентов снимали на спектрофотометре «Perkin Elmer 420», используя суспензию геля в этиленгликоле (1 : 10 по объему).

Связывание холинэстераз с аффинными сорбентами в присутствии соли (KCl) и без нее определяли по уменьшению активности фермента в пробах после добавления порций геля [7]. Активность холинэстераз определяли спектрофотометрическим методом [6], используя в качестве субстрата ацетилтиохолинйодид (Рсахим). Наличие соли не оказывало заметного влияния непосредственно на скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолинйодида, что связано с разбавлением реакционной смеси в 300 раз, а также с использованием 0,15 М К-фосфатного буфера при определении активности фермента.

Данные равновесного связывания ферментов с аффинными сорбентами анализировали исходя из равновесной схемы связывания



определяя количество несвязанного фермента по скорости субстратной реакции. Расчет констант K_L проводили по данным связывания фермента с маленькими порциями геля:

$$K_L = \left(\frac{[E]_0}{[EL]} \cdot V - v \right) \cdot \frac{[L]_0}{V + v}.$$

В этом уравнении $[E]_0$ — начальная концентрация фермента в фазе раствора, $[EL]$ — равновесная концентрация комплекса фермент—лиганд в аффинном сорбенте, V — объем раствора фермента, v — объем фазы геля, $[L]_0$ — начальная концентрация лиганда в геле. Если для опытов выбраны оптимальные соотношения концентраций фермента и сорбента, точность такой методики анализа составляет 15—20% [7].

Константы K_i для обратимых ингибиторов определяли в бимолекулярных условиях субстратной реакции, где

$$v = k_{II}[S][E] = k_I[S].$$

В присутствии обратимого ингибитора наблюдаемая псевдомономолекулярная константа скорости гидролиза зависит от концентрации ингибитора:

$$k_I^{\text{набл}} = \frac{k_I^0}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Константы K_i рассчитывали из зависимости $k_I^0/k_I^{\text{набл}}$ от $[I]$ методом линейных наименьших квадратов. Опыты проводили на спектрофотометре «Perkin Elmer 420» (0,05 М К-фосфатный буфер, pH 7,50, 25 °C), используя в качестве субстрата ацетилтихолиниодид для обоих типов холинэстераз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Myers, D. K. Effect of salt on the hydrolysis of acetylcholine by cholinesterase. — Arch. Biochem. and Biophys., 1952, 37, N 2, 469—487.
2. Бресткин А. П., Шатаева Г. А. Влияние хлоридов калия и кальция на антихолинэстеразную активность эфиров дифенилфосфиновой и дифенилтиофосфиновой кислот. — Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 6, 1337—1341.
3. Бресткин А. П., Шатаева Г. А. О влиянии хлоридов щелочных и щелочноземельных металлов на скорость ингибирования холинэстераз фосфорорганическими ингибиторами. — Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 7, 1538—1544.
4. Myers, D. K. Effect of electrolytes on cholinesterase inhibition. — Arch. Biochem., 1950, 27, N 2, 341—347.
5. Игумнова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В. Влияние неорганических солей на взаимодействие бутирилхолинэстеразы с N-метилкарбамоилхолином. — Био-орган. хим., 1978, 4, № 5, 961—971.
6. Ellmann, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. — Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 88—95.
7. Тоомик Р., Эллер М., Ярв Я. Взаимодействие холинэстераз с аффинными сорбентами на базе производных фенилендиаминов. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1988, 37, № 1, 30—36.
8. Practical Guide for Use in Affinity Chromatography and Related Techniques. Réactifs IFB-Société Chimique Pointet-Girard, 1983, 134, 126.
9. Cuatrecasas, P. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. — J. Biol. Chem., 1970, 245, N 12, 3059—3065.
10. Туркова Я. Аффинная хроматография. М., 1980, 62—103.

Тартуский государственный
университет

Поступила в редакцию
1/XII 1987

Reel TOOMIK, J. JÄRV

ELEKTROLÜÜDI MÕJU FENÜLEENDIAMINIIDE BAASIL SÜNTEESITUD AFIINSUSSORBENTIDE JA KOLIINESTERAASIDE SEOSTUMISE EFEKTIIVSUSELE

Lähtudes fenüleendiamiini derivaatidest I—IV on sünteesitud CH- ja AH-agaroosi baasil kaheksa erinevat afiinsussorbenti ning uuritud atsetüülkoliinesteraasi ja butüüülkoliinesteraasi afiinsussorbentidega seostumise reaktsioonide dissotsiatsioonikonstantide K_L sõltuvust elektrolüüdi (KCl) kontsentratsioonist lahuses tasakaalutingimustel (0,05 М К-фосfaatpuhver, pH 7,50, 25 °C). Tulemusi on võrreldud elektrolüüdi kontsentratsiooni mõjuga vastavate atsuülalaniliidide inhibeerimiskonstantidele K_i , mis määrati atsetüülkoliini hüdrolyüsireaktsioonil ning näidatud, et dissotsiatsioonikonstantide ja elektrolüüdi kontsentratsiooni vahelist sõltuvust ei mõjuta sorbendi loomus (CH- või AH-agaros) ega atsetüülkoliinesteraasi asendamine butüüülkoliinesteraasiga. K_L -i sõltuvus soola kontsentratsioonist nihästi lahuses kui ka afiinsussorbendi koostises on märgatavalt erinev tertsiaarsete ja kvaternaarse ligandide puhul.

THE INFLUENCE OF ELECTROLYTE ON THE BINDING EFFECTIVENESS OF CHOLINESTERASES WITH AFFINITY SORBENTS ON THE BASIS OF PHENYLENDIAMINE DERIVATIVES

Proceeding from CH- and AH-agaroses 8 different affinity sorbents were synthesized, using phenyldiamine derivatives I—IV as affinity ligands. Binding of acetyl cholinesterase and butyrylcholinesterase with these sorbents has been studied under the equilibrium conditions (0.05 M K-phosphate buffer, pH 7.50, 25°C) and the appropriate dissociation constants K_L were determined as a function of salt (KCl) concentration. These results were compared with the effects of salt concentration on the inhibitory constants K_i for the model compounds, the acetylanilides of ligands I and II, determined from the inhibition by these compounds of the cholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylthiocholine. It has been shown that the interaction of the enzymes with affinity sorbents does not depend on the nature of the sorbent (CH- or AH-agarose). In the case of both cholinesterases the effectiveness of enzyme interaction with the ligands strongly depends on the presence of electrolyte for quaternized derivatives of phenyldiamine, while the dependence is weak in case of ligands with dimethylamino group. This conclusion is valid concerning the ligands both in solution and in the sorbent-bound state.