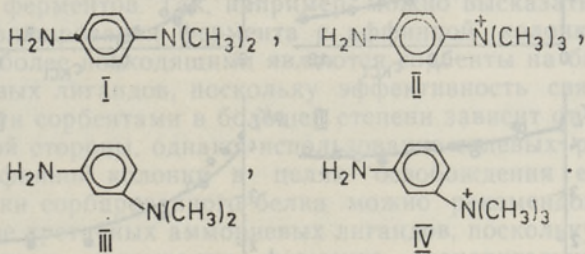


Реэ́т ТООМИК, Я. ЯРВ

## 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 рассмотрено влияние 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 фенилендиамина:



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.

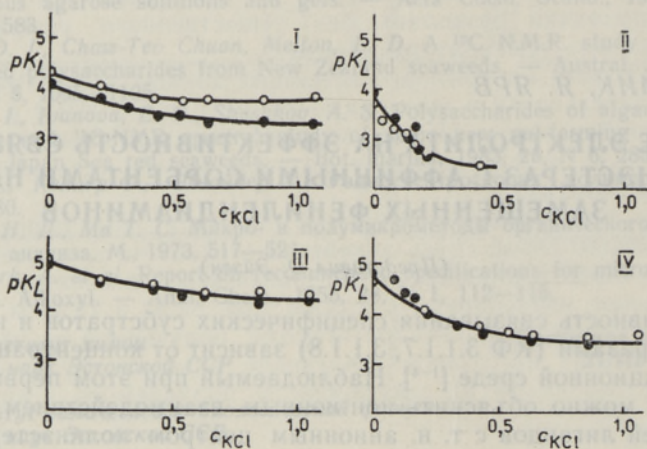


Рис. 1. Влияние концентрации электролита (KCl) на константы диссоциации комплекса ацетилхолинэстеразы с аффинными сорбентами, синтезированными на базе СН-агарозы (○) и АН-агарозы (●). Номера зависимостей соответствуют структурам лигандов I—IV (здесь и на рис. 2).

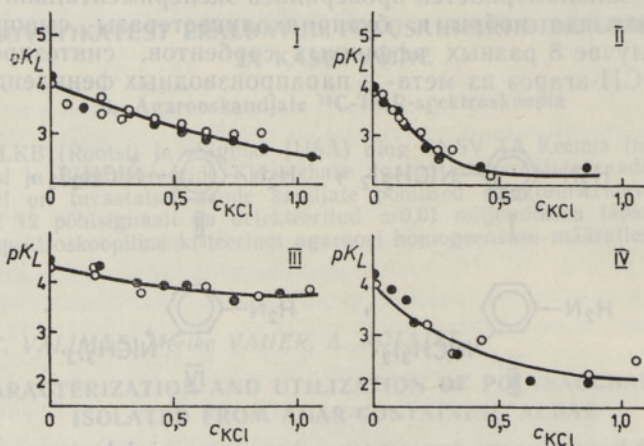


Рис. 2. Влияние концентрации электролита (KCl) на константы диссоциации комплекса бутирилхолинэстеразы с аффинными сорбентами, синтезированными на базе СН-агарозы (○) и АН-агарозы (●).

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.

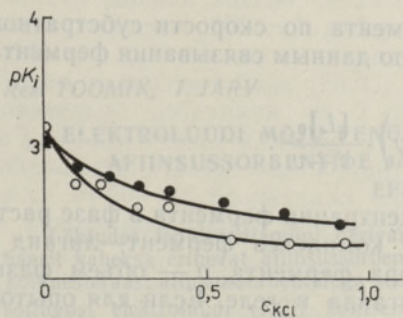


Рис. 3. Зависимость ингибиторных свойств 4-ациламино-N,N,N-триметилфенил-аммонийиодида от концентрации электролита (KCl) для ацетилхолинэстеразы (○) и бутирилхолинэстеразы (●).

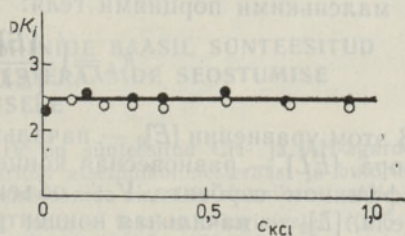


Рис. 4. Зависимость ингибиторных свойств 4-N,N-диметиламинофенилацетанилида от концентрации электролита (KCl) для ацетилхолинэстеразы (○) и бутирилхолинэстеразы (●).

## Экспериментальная часть

В качестве источника ацетилхолинэстеразы использовали яд среднеазиатской кобры (*Naја паја охiana*). 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 ацетилтихолина 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).

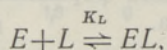
Аффинные сорбенты синтезировали исходя из гранулированной агарозы, выпускаемой Опытным заводом органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР. Присоединение производных фенилендиамина (I—IV) к СН-агарозе 4В (количество активных групп 15 мкмоль/мл) проводили с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимиды 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 фенилендиамина 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 ацетилтихолиниодид (Рсахим). Наличие соли не оказывало заметного влияния непосредственно на скорость ферментативного гидролиза ацетилтихолиниодида, 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, рН 7,50, 25 °С), 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., Шагаева 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., Шагаева 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

Reet TOOMIK, J. JÄRV

#### ELEKTROLÜÜDI MÕJU FENÜLEENDIAMIINIDE BAASIL SÜNTEESITUD AFIINSUSSORBENTIDE JA KOLIINESTERAASIDE SEOSTUMISE EFEKTIIVSUSELE

Lähtudes fenüleendiamiini derivaatidest I—IV on sünteeditud 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, рН 7,50, 25 °С). Tulemusi on võrreldud elektrolüüdi kontsentratsiooni mõjuga vastavate atsuülaniilidide 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 tertsiarsete ja kvaternaarsele 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.

*(This section contains a large amount of mirrored text from the reverse side of the page, which is difficult to decipher and largely illegible due to the quality of the scan.)*

$$K_L = \frac{E+L}{EL}$$

*(This section contains mirrored text from the reverse side of the page, likely serving as a legend or additional information for the data presented.)*

*(This section contains mirrored text from the reverse side of the page, likely containing a conclusion or summary of the findings.)*