

Изучение механизмов ингибирования холинэстераз высокими концентрациями положительно заряженных субстратов при конкурирующей кинетике

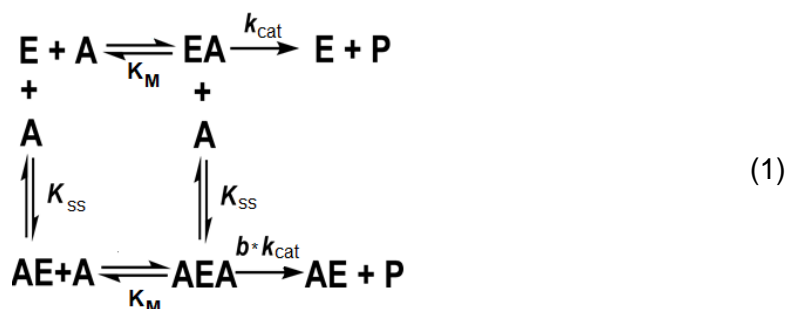
© Мухаметгалиева А.Р.^{*}, Массон П.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Россия, Республика Татарстан, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

^{*}Email: aliya_rafikovna@mail.ru

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, типы ингибирования

Положительно заряженные субстраты холинэстераз (ХЭ) не подчиняются михаэлевскому поведению при взаимодействии высоких концентраций из-за активации / ингибирования фермента [1; 2]. Такое каталитическое поведение описывается моделью Вебб-Радича (1). Так как каталитический центр связан с периферическим анионным сайтом (ПАС) с помощью Ω -петли, при взаимодействии избытка субстрата с ПАС происходит аллостерическое взаимодействие и, как следствие, изменяется активность ХЭ (константа k_{cat} преобразуется в $b \cdot k_{cat}$).

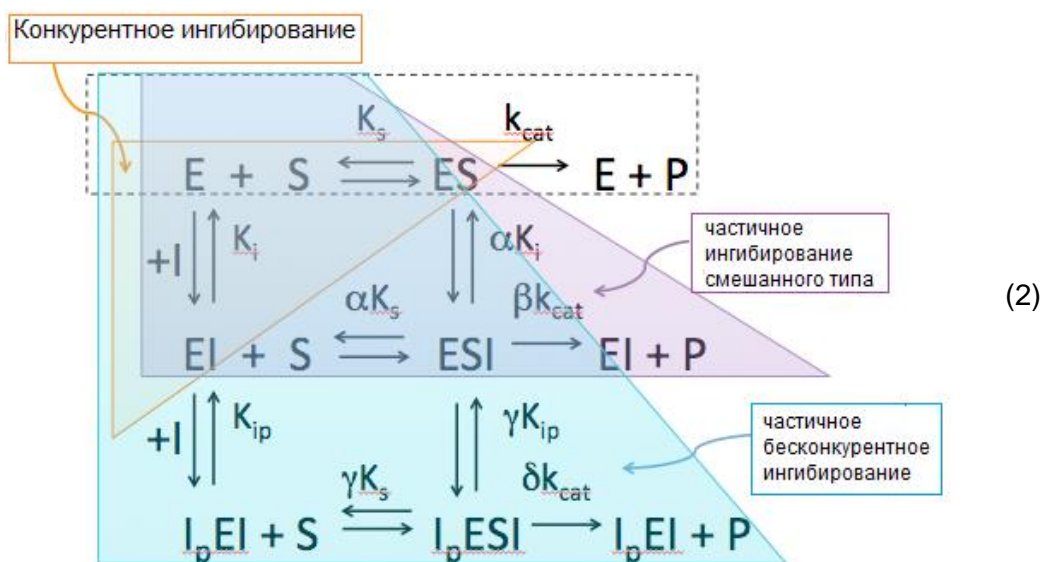


Так как среди природных лигандов положительно заряженным является нейромедиатор ацетилхолин, гидролизующийся ацетилхолинэстеразой (АХЭ), а в некоторых случаях и бутирилхолинэстеразой (БХЭ) [3], данное исследование направлено на изучение выявления механизмов нежелательных конкурирующих взаимодействий (например, с совместно вводимыми лекарственными средствами). Целью работы являлось, установить влияние аллостерического эффекта, вызванного связыванием второй молекулы ацетилтиохолина, как положительно заряженного субстрата, с ПАС АХЭ и БХЭ при конкурирующей кинетике.

Гидролиз сложных эфиров (тио)холина сопровождается двуступенчатым процессом: образование ацилферментного комплекса и деацилирование ацилферментного комплекса [4]. Чтобы изучить воздействие высоких концентраций положительно заряженных субстратов на механизмы ацилирования и деацилирования и описать механизмы активации/ингибирования, мы использовали пару фенилацетат и ацетилтиохолин, в качестве пары конкурирующих субстратов. Оба исследуемых субстрата имеют ацильный фрагмент – уксусную кислоту, поэтому константа скорости деацилирования для обоих субстратов была одинаковой.

Кинетическое поведение нехромогенного в ходе анализа субстрата — ацетилтихолина определяли по гидролизу репортерного субстрата — фенилацетата, так как два субстрата будут конкурировать за связывание в активном центре фермента. При использовании широких диапазонов концентраций конкурирующих субстратов было установлено 3 случая ингибирования с помощью кинетики в стационарных условиях (графики Диксона и Корниша-Боудена) [5] и с помощью метода конкурирующих субстратов [6].

Гидролиз фенилацетата в присутствии различных концентраций ацетилтихолина показал последовательное переключение в связывании субстратов в активном сайте ХЭ. Для обоих ферментов при низких концентрациях ацетилтихолина (0,025-0,2мМ) наблюдали конкурентное ингибирование; при средних концентрациях ацетилтихолина (0,5-1,8мМ) было выявлено частично смешанное ингибирование; при высоких концентрациях ацетилтихолина (2-10мМ) было показано частичное бесконкурентное ингибирование. Три фазы ингибирования в зависимости от концентрации конкурента можно описать следующей схемой (2) [7]:



Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект 20-14-00155).

Литература

1. Masson P. и др. Role of Aspartate 70 and Tryptophan 82 in Binding of Succinylthiocholine to Human Butyrylcholinesterase // *Biochemistry*. 1997. Т. 36. № 8. С. 2266–2277. doi: 10.1021/bi962484a.
2. Radic Z. и др. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors // *Biochemistry*. 1993. Т. 32. № 45. С. 12074–12084. doi: 10.1021/bi00096a018.
3. Duysen E. G. и др. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (–)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer’s disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission // *Toxicology*. 2007. Т. 233. № 1. С. 60–69. doi: 10.1016/j.tox.2006.11.069.

4. Zhang Y., Kua J., McCammon J.A. (2002) Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 10572—10577. doi: 10.1021/ja020243m.
5. Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors (Short Communication) // *Biochem J.* 1974. Т. 137. № 1. С. 143–144. doi:10.1042/bj1370143
6. Mukhametgalieva A. R. и др. Time-course of human cholinesterases-catalyzed competing substrate kinetics // *Chemico-Biological Interactions.* 2019. Т. 310. С. 108702. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.015.
7. Mukhametgalieva A. R. и др. Steady-state kinetic analysis of human cholinesterases over wide concentration ranges of competing substrates // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2021 (в печати).