



УДК 577.153.0.2

ПРОЯВЛЕНИЕ ДВУХ ОСНОВНЫХ ГРУПП В АКТИВНЫХ
ЦЕНТРАХ ХОЛИНЭСТЕРАЗ В РЕАКЦИИ
С N-МЕТИЛКАРБАМОИЛХОЛИНОМ*Гесватера Т. А., Игулнова Н. Д., Аавиксаар А. А.**Институт химической и биологической физики Академии наук ЭССР, Таллин*

Определены кинетические параметры K_Q и k_2 для реакции карбамоилирования ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) N-метилкарбамоилхолином в интервале значений pH 4–8,5 и константы скорости второго порядка для реакции ацетилхолинэстеразного гидролиза бутилацетата в интервале pH 5–8. На стадии образования обратимого сорбционного комплекса между ферментами и карбаматом проявлялась ионогенная группа с pK_a 6,3 для ацетилхолинэстеразы и 6,5 для бутирилхолинэстеразы, на стадии образования карбамоилфермента – группа с pK_a 5,4 для ацетилхолинэстеразы и 5,6 для бутирилхолинэстеразы. В реакции гидролиза бутилацетата под действием ацетилхолинэстеразы обнаруживалась одна каталитическая группа с pK_a 5,5. Эти результаты согласуются с представлением об участии в активных центрах холинэстераз двух основных групп, каталитически активных в протонированном виде.

Вопрос о соответствии между экспериментальными данными по влиянию pH среды на кинетику реакций, катализируемых холинэстеразами, и имеющимися представлениями о механизме холинэстеразного катализа обсуждается в литературе уже длительное время. В результате исследования зависимости кинетики ацетилхолинэстеразного гидролиза различных нейтральных и катионных субстратов от pH Крупкой была развита гипотеза [1–4], согласно которой в активном центре этого фермента имеются две имидазольные группы с разными значениями pK_a , одна из которых в непротонированном виде участвует в стадии ацетилирования, а другая – в стадии дезацетилирования. Экспериментальной основой этой гипотезы были данные, показывающие, что значения pK_a , полученные из pH-зависимости начальной скорости реакции гидролиза эфиров уксусной кислоты при их низких концентрациях ($[S] \ll K_m$), существенно различаются для незаряженных (pK_a 5,5) и заряженных (pK_a 6,0–6,2) субстратов [1]. При этом автор предполагает, что полученные в таких условиях pK_a отражают ионизацию групп в свободном ферменте [5].

Анализ pH-зависимостей максимальной скорости ацетилхолинэстеразного гидролиза субстратов, для которых лимитирующей стадией является дезацетилирование фермента (фенилацетат и ацетилхолин), свидетельствует о наличии каталитической группы со значением pK_a 6,3. Поскольку группа с этим же значением pK_a контролирует связывание ферментом обратимых алкиламмониевых ингибиторов [1], Крупка заключил, что имидазольный остаток, участвующий в стадии дезацетилирования, располагается по соседству с анионным центром ацетилхолинэстеразы и в протонированном виде не допускает связывания ферментом катионных реаген-

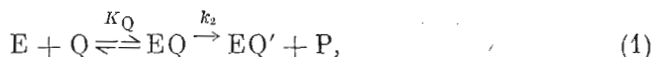
тов, приводя к проявлению pK_a этого имидазола в условиях $[S] \ll K_m$, когда $v = [S](V/K_m)$. Для незаряженного субстрата, изоамилацетата, показана независимость константы связывания от рН в промежутке 5,5–7,5 [2].

С другой стороны, в рН-зависимостях максимальной скорости гидролиза таких незаряженных и заряженных субстратов, для которых можно было предполагать, что стадией, лимитирующей скорость, является ацетилирование фермента (изоамилацетат, метиламиноэтилацетат, дипропилметиламиноэтилацетат), во всех случаях была обнаружена группа со значением pK_a 5,5 [1]. По мнению Крупки, это pK_a имидазольного остатка, контролирующего ацетилирование активного центра ацетилхолинэстеразы.

Из этого вытекает, что в рН-зависимости константы скорости второго порядка ацетилирования активного центра ацетилхолинэстеразы под действием заряженных субстратов должно отражаться наличие одновременно двух групп с pK_a 6,3 и 5,5, контролирующими связывание катионного субстрата и ацетилирование фермента соответственно. В литературе, однако, до сих пор таких экспериментальных данных нет. Кроме того, в 1975 г. Розенбери [6] опубликовал результаты, показывающие проявление в рН-зависимости константы скорости второго порядка ацетилхолинэстеразного гидролиза некоторых субстратов $pK_a \geq 6$. Справедливость предложенного Крупкой распределения pK_a на две группы в зависимости от того, является ли субстрат заряженным или нейтральным, была поставлена Розенбери [6] под сомнение. Розенбери предполагает, что на стадии ацетилирования происходит общий основной катализ с участием одной группы с истинным значением pK 6,3. Различия в значениях pK_a он объясняет наличием особой стадии изомеризации исходного комплекса Михаэлиса, скорость которой зависит от природы субстрата и может стать лимитирующей для некоторых субстратов, что приводит к проявлению в рН-зависимости константы скорости второго порядка кажущихся pK_a со значениями ниже 6,3.

Необходимость учета диссоциации уксусной кислоты при рН ниже 5, а также то обстоятельство, что в большинстве случаев для субстратов точно не известно, какая стадия лимитирует скорость ферментативного гидролиза, значительно затрудняют исследование рН-зависимостей в случае холинэстеразного гидролиза эфиров уксусной кислоты. По этой причине физическое содержание измеряемых параметров стационарной кинетики часто не вполне ясно, особенно если рН меняется в широких пределах.

Чтобы получить однозначные экспериментальные данные о значениях pK_a групп в активных центрах холинэстераз, целесообразно использовать субстрат, моделирующий определенные стадии ферментативной реакции. В настоящей работе в качестве такого модельного субстрата использовался N-метилкарбамоилхолин, который взаимодействует с холинэстеразами по механизму «ацилирующих ингибиторов» [7]:



где E — фермент, Q — карбамат, EQ — нековалентный фермент-карбаматный комплекс, EQ' — карбамоилфермент, P — продукт реакции.

Результаты изучения влияния рН на реакцию карбамоилирования ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы показывают (табл. 1), что при увеличении рН константы K_Q для обоих ферментов уменьшаются, а значения k_2 возрастают.

Результаты анализа рН-зависимостей K_Q и k_2 на основе уравнений (3) и (4) (см. «Экспериментальную часть») приведены в табл. 2. На рис. 1 и 2 показаны теоретические кривые рН-зависимостей, которые вычислены исходя из данных этой таблицы. Из рисунков видно, что экспериментальные данные в изучаемом интервале рН согласуются с теоретическими кривыми. На рис. 3 представлены зависимости $\lg k_{11}$ (константы скорости второго порядка) от рН для реакций карбамоилирования ацетилхолинэстеразы и ацетилхолинэстеразного гидролиза незаряженного субстрата (бутил-

Влияние рН среды на кинетические параметры K_Q и k_2 для реакции карбоамилирования ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы N-метилкарбоамилохином в 0,15 и 0,60 М растворах КСl при 25° С в 5 мМ фосфатном буфере

Ацетилхолинэстераза			Бутирилхолинэстераза		
рН	$K_Q \cdot 10^3$, М	k_2 , мин ⁻¹	рН	$K_Q \cdot 10^3$, М	k_2 , мин ⁻¹
0,15 М КСl					
4,40	351±24	0,169±0,013	4,55	265±16	0,098±0,006
4,55	110±8	0,264±0,021	5,10	54,8±3,3	0,188±0,012
5,10	41,7±2,5	0,673±0,047	5,45	32,1±1,9	0,348±0,021
5,50	17,5±1,4	1,16±0,07	5,90	13,9±0,8	0,551±0,030
6,04	7,14±0,42	1,56±0,08	6,06	13,1±0,9	0,568±0,029
6,58	4,36±0,27	1,96±0,12	6,50	6,25±0,29	0,719±0,039
7,00	2,67±0,13	1,92±0,15	7,00	3,95±0,16	0,879±0,038
7,50	2,86±0,19	2,13±0,14	7,50	2,80±0,15	0,895±0,031
7,75	2,78±0,16	2,08±0,12	7,89	2,05±0,09	0,985±0,038
			8,45	2,98±0,18	0,830±0,041
0,60 М КСl					
5,13	132±9	0,671±0,047	5,04	105±6	0,224±0,013
5,58	32,1±1,9	1,09±0,06	5,51	49,6±2,4	0,385±0,023
6,05	17,9±1,1	1,49±0,08	6,01	24,6±1,3	0,618±0,028
6,50	10,0±0,6	1,75±0,10	6,50	12,2±0,6	0,781±0,031
7,00	8,33±0,37	1,75±0,08	7,00	6,95±0,22	0,826±0,025
7,50	6,45±0,38	1,90±0,13	7,45	5,20±0,21	0,813±0,020
8,00	6,76±0,32	2,04±0,12	7,80	5,39±0,28	0,881±0,031

Таблица 2

Результаты анализа рН-зависимостей K_Q и k_2 для реакций карбоамилирования ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы при 25° С в 5 мМ фосфатном буфере

Фермент	[КСl], М	pK_{a1}^*	pK_{a2}^{**}	$K_Q^{opt} \cdot 10^3$, М	k_2^{opt} , мин ⁻¹
Ацетилхолинэстераза	0,15	6,29±0,12	5,40±0,18	2,71±0,20	2,05±0,15
	0,60	6,21±0,15	5,38±0,20	7,08±0,31	1,97±0,13
Бутирилхолинэстераза	0,15	6,51±0,10	5,64±0,13	2,82±0,18	0,92±0,03
	0,60	6,62±0,17	5,58±0,15	5,62±0,25	0,87±0,03

* Вычислены из данных по влиянию рН на K_Q .

** Вычислены из данных по влиянию рН на k_2 .

ацетата). Из рисунка четко видно различие в рН-зависимостях обеих констант скорости второго порядка: зависимость от рН $\lg k_{II}$ карбоамилирования, вычисленная из экспериментальных значений K_Q и k_2 в табл. 1, хорошо описывается теоретической кривой, учитывающей протонизацию двух основных каталитических групп, а рН-зависимость $\lg k_{II}$ в случае бутилацетата характеризуется наличием только одной группы со значением pK_a 5,54±0,11 ($k_{II}^{opt} = (7,25 \pm 0,17) \cdot 10^{-2} \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$). Таким образом, значение pK_a из данных по гидролизу бутилацетата в пределах точности измерений совпадает с pK_{a2} 5,4 для реакции карбоамилирования ацетилхолинэстеразы.

На основании этих результатов можно сделать вывод, что в рН-зависимости константы скорости второго порядка гидролиза бутилацетата проявляется каталитическая группа, от протонизации которой зависит протекание стадии образования карбоамилфермента. Каталитическая группа,

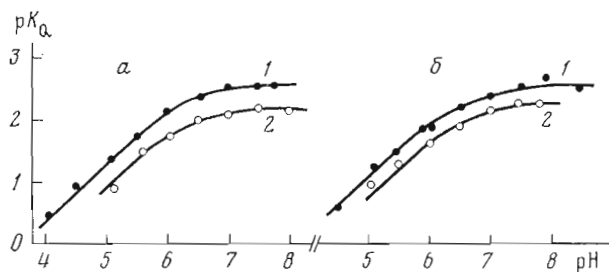


Рис. 1. Зависимость pK_a от pH для реакции ацетилхолинэстеразы (а) и бутирилхолинэстеразы (б) с N-метилкарбамоилхолином. 1 — 0,15 М КСl, 2 — 0,60 М КСl

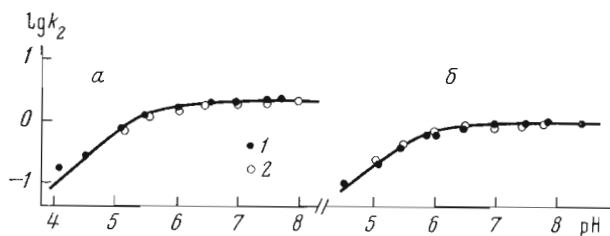


Рис. 2. Зависимость $\lg k_2$ от pH для реакции карбамоилирования ацетилхолинэстеразы (а) и бутирилхолинэстеразы (б) N-метилкарбамоилхолином в 0,15 М КСl (1) и 0,60 М КСl (2)

характеризуемая pK_{a1} 6,3, которая проявляется на стадии связывания катионного карбамата, связана с присутствием ионного заряда в карбамате, так как эта группа не обнаруживается в случае незаряженного реагента — бутилацетата. Проявление на стадии декарбамоилирования N, N'-диметилкарбамоилхолинэстеразы каталитической группы с pK_a 6,3, аналогичное проявлению этой группы в реакции деацетилирования, было показано ранее [8].

Таким образом, в настоящей работе получены экспериментальные данные, показывающие, что pH-зависимость константы скорости второго порядка реакции холинэстераз с катионным карбаматом описывается с учетом двух констант ионизации, что указывает на возможность контролирования реакции карбамоилирования двумя каталитическими группами, ионизирующимися в свободном ферменте. Этот результат подтверждает выводы Крупки [1—4] и не согласуется с предположением Розенбери [6] о лимитирующей скорости стадии изомеризации комплекса Михаэлиса, обнаруживаемой в pH-зависимости константы скорости второго порядка гидролиза некоторых субстратов в величинах кажущихся pK_a со значениями меньше 6,3.

Результаты настоящей работы показывают, что по влиянию pH на реакцию карбамоилирования активного центра под действием N-метилкарбамоилхолина ацетилхолинэстеразу и бутирилхолинэстеразу практически невозможно отличить друг от друга. Это согласуется с представлением о сходстве в механизме действия холинэстераз двух типов [9], в пользу чего говорят также данные, согласно которым расхождения в количественных характеристиках специфичности ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы относительно уходящей группы субстратов [10, 11] и фосфорорганических ингибиторов [12, 13] весьма незначительны. Необходимо отметить сходство кинетических параметров K_Q и k_2 в оптимальной активности этих ферментов в реакции карбамоилирования N-метилкарбамоилхолином (табл. 2).

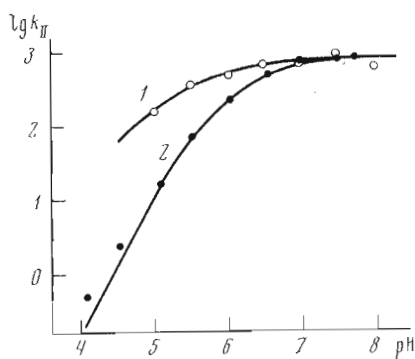


Рис. 3. Зависимость $\lg k_{II}$ от pH для реакции ацетилхолинэстеразы с бутилацетатом (1) и N-метилкарбамоилхолином (2) в присутствии 5 мМ фосфатного буфера при 25° С в 0,15 М растворе KCl

холинэстеразой незаряженного необратимого ингибитора нафталина обнаруживалась группа с pK_a 6,0 [16].

Таким образом, вопрос о влиянии pH на взаимодействие холинэстераз с различными реагентами требует дальнейшего изучения. Такие исследования могут дать новую информацию о механизме действия холинэстераз.

В литературе имеются указания на зависимость значений pK_a ионогенных групп в активных центрах холинэстераз от ионной силы среды [6, 8, 9, 15, 17]. В настоящей работе влияния ионной силы на значения pK_a не наблюдали, так как в 0,15 и 0,60 М растворах KCl значения pK_a практически совпадают (табл. 2). Ионная сила оказывала влияние только на константы связывания катионного карбамата, по-видимому, в результате уменьшения кулоновского взаимодействия между анионным центром фермента и катионным зарядом реагента. Влияние ионной силы на константу связывания N-метилкарбамоилхолина бутирилхолинэстеразой в литературе подробно описано [18].

Экспериментальная часть

Ацетилхолинэстераза яда среднеазиатской кобры (*Naja naja oxiana*) была очищена гель-хроматографическим методом на колонке с сефадексом G-75. Использовали ферментный препарат с удельной каталитической активностью 3,3 кат·кг⁻¹. Высушенный в эксикаторе яд кобры был получен от Среднеазиатского зоокомбината (Ташкент). Бутирилхолинэстераза — лиофильно высушенный препарат холинэстеразы сыворотки крови лошади производства НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (Москва) с удельной каталитической активностью 0,11 кат·кг⁻¹. Исходные растворы ферментов приготавливали в 5 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,15 М KCl, и хранили при 4° С. Активность ферментов в этих условиях в течение месяца не менялась. Синтез и свойства подистого N-метилкарбамоилхолина описаны ранее [19]. Ацетилхолин подистый марки ч. (Chemapol, Чехословакия) использовали после перекристаллизации из смеси спирт — эфир. Бутилацетат («Союзреактив») был очищен перегонкой. Использовали KCl и KН₂РO₄ марки ос.ч., Na₂НРO₄ и КОН марки х.ч.

Кинетические измерения активностей холинэстераз проводили на pH-стате фирмы «Radiometer» (Дания), комплект ТТТ2/АВU1/СВR3. Карбамоилирование фермента осуществляли в термостатируемом сосуде при 25° С в 5 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,15 или 0,60 М KCl. Через различные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы

При рассмотрении более широкого круга реагентов в поведении двух холинэстераз обнаруживаются, однако, различия. Недавно Лангелем и Ярвом [14] было показано, что в pH-зависимости константы k_2 для реакции ингибирования бутирилхолинэстеразы O,O-диэтилтиофосфатами вообще не обнаруживается pK_a в промежутке pH от 5 до 9, а в константе связывания обнаруживается pK_a 6,2 для незаряженного ингибитора и pK_a 6,8 для заряженного. Кроме того, в pH-зависимости константы скорости второго порядка фосфорилирования активного центра бутирилхолинэстеразы заряженным ингибитором проявлялась еще pK_a 4,5, которую авторы приписали карбоксильной группе анионного центра фермента [15], а в pH-зависимости константы связывания бутирил-

по 0,2 мл в термостатированную при 25° С ячейку рН-стата с 15 мл 2,3 мМ водного раствора ацетилхолина в случае ацетилхолинэстеразы или 20 мМ раствора ацетилхолина в случае бутирилхолинэстеразы, содержащих 0,15 М КСl. Остаточную активность фермента в пробе оценивали по начальной скорости ферментативного гидролиза ацетилхолина, которую определяли титрованием выделяющейся кислоты 0,05 М раствором КОН.

Константы скорости псевдопервого порядка карбамоилирования фермента (k_1) вычисляли из наклонов линейных зависимостей в координатах $\ln A_t$ от t , согласно уравнению (2):

$$\ln A_t = \ln A_0 - k_1 t, \quad (2)$$

где A_0 и A_t — соответственно активности фермента в нулевой момент времени и в момент времени t . Константы K_Q и k_2 вычисляли из линейных зависимостей в координатах $1/k_1$ против $1/[Q]$, соответствующих линейной трансформации уравнения $k_1 = k_2[Q]/(K_Q + [Q])$ [7] для реакции карбамоилирования холинэстераз по схеме (1). Константу скорости карбамоилирования второго порядка вычисляли как соотношение $k_{11} = k_2/K_Q$.

При каждом значении рН k_1 определяли при 7–8 концентрациях карбамата с таким учетом, чтобы K_Q при данном значении рН по возможности оставалась в пределах изучаемого промежутка концентрации карбамата. Во избежание изменения ионной силы среды в результате добавления карбамата это требование не соблюдалось при значениях рН < 5, где концентрации карбамата были взяты ниже значения K_Q . Этим обусловлены большие погрешности при определении кинетических параметров при низких значениях рН. Относительная ошибка определения констант, однако, нигде не превышала 7–8% (табл. 1).

Константы скорости второго порядка ацетилхолинэстеразного гидролиза бутилацетата вычисляли из данных измерения скоростей реакции при концентрации субстрата $5,0 \cdot 10^{-4}$ М, значительно меньшей по сравнению с кажущейся константой Михаэлиса. В таких условиях соблюдается кинетика первого порядка согласно уравнению для начальной скорости реакции $v = k_{11}[E]_0[S] = k_{набл}[S]$, где $[E]_0$ — исходная концентрация фермента и $[S]$ — концентрация субстрата. Константы скорости первого порядка, $k_{набл}$, вычисляли дифференциальным методом Рудакова [20], константы скорости второго порядка — согласно уравнению $k_{11} = k_{набл}/[E]_0$. Реакцию гидролиза бутилацетата проводили в термостатированной при 25° С ячейке рН-стата в присутствии 0,15 М КСl.

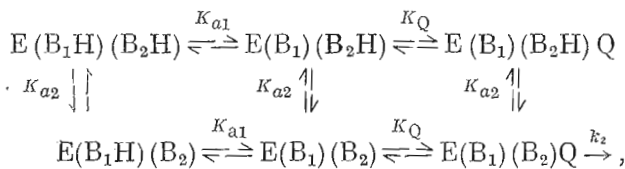
Концентрацию активных центров ацетилхолинэстеразы вычисляли из начальной скорости гидролиза 2,3 мМ ацетилхолина при 25° С и рН 7,5 в растворе 0,15 М КСl, используя значение молекулярной активности фермента $a_m = 6,33 \cdot 10^3$ с⁻¹ [21].

Значения констант диссоциации протонированных основных групп активного центра фермента, K_{a1} и K_{a2} , были определены из линейных зависимостей K_Q от $[H^+]$ и $1/k_2$ от $[H^+]$ на основе уравнений

$$K_Q = K_Q^{опт} + (1 + [H^+]/K_{a1}), \quad (3)$$

$$k_2 = k_2^{опт} + (1 + [H^+]/K_{a2})^{-1}, \quad (4)$$

соответствующих схеме реакции карбамоилирования



учитывающей независимую протонизацию двух основных каталитических групп B_1 и B_2 .

Вычисления кинетических констант и статистическую обработку экспериментальных данных по методу наименьших квадратов осуществляли на ЭВМ «Наири-2».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Krupka R. M.* Are identical catalytic groups involved in the acetylation and deacetylation steps of acetylcholinesterase reactions? — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1965, v. 19, № 4, p. 531–537.
2. *Krupka R. M.* Hydrolysis of neutral substrates by acetylcholinesterase. — *Biochemistry*, 1966, v. 5, № 6, p. 1983–1988.
3. *Krupka R. M.* Chemical structure and function of the active center of acetylcholinesterase. — *Biochemistry*, 1966, v. 5, № 6, p. 1988–1998.
4. *Krupka R. M.* Evidence for an intermediate in the acetylation reaction of acetylcholinesterase. — *Biochemistry*, 1967, v. 6, № 4, p. 1183–1190.
5. *Krupka R. M., Laidler K. J.* The influence of pH on the rates of enzyme reactions. Part 5. The case of several enzyme-substrate intermediates. — *Trans. Faraday Soc.*, 1960, v. 56, p. 1467–1476.
6. *Rosenberry T. L.* Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, № 10, p. 3834–3838.
7. *Aldridge W. N., Reiner E.* Enzyme inhibitors as substrates. Amsterdam — London: North-Holland Publishing Company, 1972, p. 27.
8. *Kitz R. J., Braswell L. M., Ginsburg S.* On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? — *Molec. Pharmacol.*, 1970, v. 6, № 2, p. 108–121.
9. *Бресткин А. П., Брук И. Л., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В.* Влияние ионной силы и органических растворителей на взаимодействие холинэстераз с субстратами и фосфорорганическими ингибиторами. — *Биохимия*, 1970, т. 35, вып. 2, с. 382–393.
10. *Järv J., Kesvatera T., Aaviksaar A.* Structure-activity relationships in acetylcholinesterase reactions. Hydrolysis of non-ionic acetic esters. — *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 67, p. 315–322.
11. *Ярэ Я. Л., Лангель Ю. Л.* Эффекты отщепляемой группы субстратов в реакции с бутирилхолинэстеразой. — *Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 5, с. 746–756.
12. *Ярэ Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лобанов Д. И.* Индукционное влияние отщепляющейся группы в реакции фосфорорганических ингибиторов с ацетилхолинэстеразой. — *Биоорган. химия*, 1976, т. 2, № 7, с. 978–985.
13. *Langel U., Järv J.* Leaving group effects in butyrylcholinesterase reaction with organophosphorus inhibitors. — *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 525, p. 122–133.
14. *Langel U., Järv J.* Influence of pH on butyrylcholinesterase reaction with organophosphorus inhibitors. — *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 526, p. 450–456.
15. *Лангель Ю. Л., Ярэ Я. Л.* Константа диссоциации анионного центра бутирилхолинэстеразы. — *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1352–1357.
16. *Лангель Ю. Л., Ярэ Я. Л.* Влияние pH на гидрофобное связывание нафталина в активном центре бутирилхолинэстеразы. — *Реакц. способн. орг. соедин.*, 1978, т. 15, вып. 4(56), с. 456–463.
17. *Wang E. I. C.* Ionization of horse serum butyrylcholinesterase. — *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 198, p. 236–241.
18. *Игумнова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В.* Влияние неорганических солей на взаимодействие бутирилхолинэстеразы с N-метилкарбамонхолоином. — *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 5, с. 961–971.
19. *Игумнова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В.* Специфичность бутирилхолинэстеразы в реакции с N-метилкарбатами. — *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1401–1406.
20. *Рудаков Е. С.* Дифференциальные методы расчета констант скоростей неосложненных химических реакций. — *Кинетика и катализ*, 1960, т. 1, вып. 2, с. 177–187.
21. *Ярэ Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лангель Ю. Л., Паст У. Э.* Ацетилхолинэстераза яда кобры. Определение концентрации активных центров. — *Биохимия*, 1976, т. 41, вып. 5, с. 827–835.

Поступила в редакцию
3.VII.1980
После доработки
14.XI.1980

MANIFESTATION OF TWO BASIC GROUPS IN THE ACTIVE SITES
OF CHOLINESTERASES IN THE REACTION WITH N-METHYLCARBAMYLCHOLINE

KESVATERA T. A., IGUMNOVA N. D., AAVIKSAAR A. A.

*Institute of Chemical and Biological Physics, Academy
of Sciences of the Estonian SSR, Tallin*

The kinetic parameters K_Q and k_2 were measured for carbamylation of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) with N-methylcarbamylcholine over the pH range 4-8,5, and the second-order rate constants of acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of butyl acetate were determined over the pH range 5-8. At the stage of reversible complex formation between the enzyme and carbamate, ionogenic group of pK_a 6,3 was detected in acetylcholinesterase and of pK_a 6,5 in butyrylcholinesterase; at the carbamylation step a group of pK_a 5,4 for the former and 5,6 for the latter was operative. In acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of butyl acetate one catalytic group with pK_a 5,5 manifested itself. The results agree with the idea of two basic groups belonging to the active sites of cholinesterases and catalytically active in deprotonated state.
