



УДК 577.152.02 + 547.468

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛКИЛБОРНЫХ КИСЛОТ
С ХОЛИНЭСТЕРАЗАМИЯрв Я. Л., Спээк М. А., Лангель Ю. Л.,
Ротанова Т. В.

Тартуский государственный университет, г. Тарту, ЭССР;

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлякина
Академии наук СССР, Москва

Показано, что борорганические кислоты общей формулы $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n = 2-8$) являются обратимыми конкурентными ингибиторами ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы. В связывании ферментов с боратной группой участвуют их ионогенные группы с pK_a 6,3 и 6,4 соответственно. Углеводородные радикалы ингибиторов вступают во взаимодействие с гидрофобными участками активных центров ферментов. Зависимости эффективности связывания от длины углеводородного радикала одинаковы для обеих холинэстераз: для соединений с $n \geq 4$ и 6-8 наблюдается линейное увеличение pK_1 с ростом n . При этом инкремент свободной энергии связывания составляет примерно -700 кал/моль на одну CH_2 -группу, что характерно для гидрофобного взаимодействия. На расстоянии 4-6 метиленовых звеньев от каталитического центра проявляются менее гидрофобные участки активной поверхности ферментов. Для исследования взаимного расположения каталитических групп и анионного центра на активной поверхности холинэстераз изучена кинетика двухкомпонентного ингибирования ферментов алкилборными кислотами и хлористым тетраметиламмонием.

Борорганические кислоты общей формулы $\text{RB}(\text{OH})_2$ известны как обратимые бифункциональные ингибиторы серин-гистидиновых гидролаз [1-10], в том числе ацетил- [11] и бутирилхолинэстераз [12]. Предполагают, что эти соединения образуют в активном центре серинового фермента тетраэдрический аддукт с ОН-группой серина и имидазолом остатка гистидина [13, 14], который можно рассматривать как модель тетраэдрического промежуточного состояния в реакции гидролиза ферментом сложноэфирных субстратов.

Наличие гидрофобного радикала R в молекуле ингибитора способствует связыванию его с ферментом за счет дополнительной стабилизации фермент-ингибиторного комплекса гидрофобным взаимодействием. Это позволило использовать ряд гомологичных алкилборных кислот для исследования топографии активных центров ряда ферментов [1-5, 9, 10].

В настоящей работе изучена кинетика взаимодействия ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы с рядом n -алкилборных кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$, где n изменяется от 2 до 8.

В качестве субстратов использовали ацетилхолин, ацетилтиохолин и n -бутилацетат. Из данных табл. 1 видно, что борная и n -алкилборные кислоты практически не влияют на каталитические константы в реакциях холинэстераз с ацетилхолином и ацетилтиохолином. В то же время добавление ингибитора сильно изменяет константы Михаэлиса, что указывает

Определение типа ингибирования борной и алкилборными кислотами катализируемого ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой гидролиза ацетилхолина и ацетилтиохолина

Фермент	Субстрат	Ингибитор	[I], мМ	K_m , мМ	$k_{кат} \cdot 10^{-3}$, с ⁻¹
Ацетилхолинэстераза	Ацетилтиохолин	H_3BO_3	0	$0,101 \pm 0,009$	$6,0 \pm 0,5$
			250	$0,289 \pm 0,038$	$7,0 \pm 0,8$
			628	$0,450 \pm 0,079$	$6,8 \pm 0,8$
	Ацетилхолин	$H(CH_2)_7B(OH)_2$	0	$0,155 \pm 0,015$	$7,3 \pm 0,3$
			0,112	$0,430 \pm 0,041$	$7,8 \pm 0,6$
			0,339	$0,843 \pm 0,051$	$7,2 \pm 0,2$
Бутирилхолинэстераза	Ацетилтиохолин	H_3BO_3	0	$0,220 \pm 0,010$	$0,77 \pm 0,03$
			364	$0,329 \pm 0,016$	$0,74 \pm 0,06$
			679	$0,719 \pm 0,096$	$0,75 \pm 0,03$
	Ацетилхолин	$H(CH_2)_3B(OH)_2$	0	$0,103 \pm 0,005$	$1,19 \pm 0,14$
			3,11	$0,501 \pm 0,038$	$0,91 \pm 0,15$
			9,34	$1,570 \pm 0,130$	$1,05 \pm 0,17$
		$H(CH_2)_5B(OH)_2$	1,54	$0,597 \pm 0,038$	$1,27 \pm 0,18$
			2,18	$0,746 \pm 0,089$	$0,98 \pm 0,10$

на конкурентный тип торможения гидролиза в случае обоих ферментов [15]. При этом константы K_i , характеризующие диссоциацию фермент-ингибиторного комплекса, можно определить из зависимости

$$v/v_i = 1 + \frac{K_{m(кат)}}{K_{m(кат)} + [S]_0} \cdot \frac{[I]}{K_i}, \quad (1)$$

где v и v_i — скорость гидролиза субстрата в отсутствие и в присутствии ингибитора. Определяемые согласно этому уравнению константы K_i не зависят в пределах точности их определения от природы субстрата, применяемого для измерения v и v_i (рис. 1).

Нами было установлено, что при уменьшении pH реакционной среды происходит ослабление ингибирующего действия борорганических кислот. Типичные кривые зависимости pK_i от pH, представленные на рис. 2 на примере *n*-амилборной кислоты, описываются уравнением

$$pK_i = pK_i^{lim} - \lg \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right), \quad (2)$$

которое справедливо для следующей реакционной схемы:



Приведенные на рис. 2 кривые вычислены по уравнению (2) с использованием для ацетилхолинэстеразы значений pK_a $6,3 \pm 0,1$ и pK_i^{lim} $3,39 \pm 0,09$ и для бутирилхолинэстеразы pK_a $6,4 \pm 0,1$ и pK_i^{lim} $3,5 \pm 0,1$. Эти значения получены минимизацией отклонений экспериментальных точек от теоретической кривой методом Уилкинсона [16]. Таким же образом для связывания борной кислоты в активном центре бутирилхолинэстеразы определены значения pK_a $6,0 \pm 0,3$ и pK_i^{lim} $0,6 \pm 0,1$. Полученные результаты согласуются с представлением об участии некоторой основной группы (предположительно имидазольного остатка гистидина) в образовании комплекса производных борной кислоты с холинэстеразами. Кроме того, определяемые при pH 7,5 значения pK_i практически совпадают со свободными от влияния среды величинами pK_i^{lim} (рис. 2) и, следовательно,

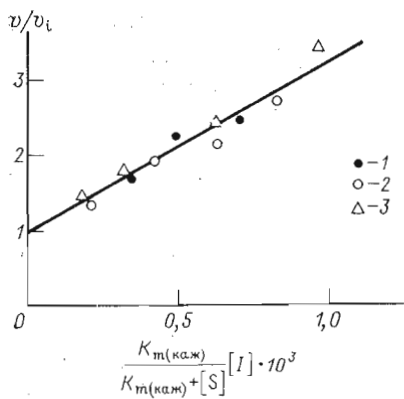


Рис. 1

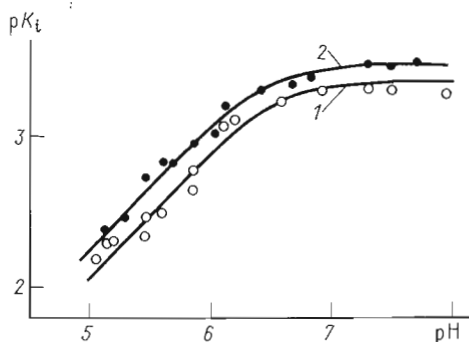


Рис. 2

Рис. 1. Ингибирование амилазной кислотой реакций гидролиза ацетилхолина (1), ацетилтихолина (2) и *n*-бутилацетата (3), катализируемых ацетилхолинэстеразой

Рис. 2. Зависимость эффективности связывания амилазной кислоты с ацетилхолинэстеразой (1) и бутирилхолинэстеразой (2) от рН

могут быть применены для изучения роли отдельных компонентов структуры этих соединений в реакциях ингибирования холинэстераз.

Эффективность связывания алкилборных кислот с ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой в значительной степени зависит от размера углеводородного радикала в молекуле ингибитора и изменяется в пределах изученной серии ингибиторов более чем на четыре порядка (табл. 2). Этот эффект обусловлен взаимодействием радикала R с активной поверхностью ферментов.

Для оценки гидрофобности радикалов в молекулах борорганических кислот были использованы π -константы Ханша [17] (для CH_2 - и CH_3 -групп $\pi_R = 0,5$ [17]). При рассмотрении зависимости pK_i *n*-алкилборных кислот от констант гидрофобности для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы (рис. 3) можно выделить по два линейных участка ($n \leq 4$ и $n = 6-8$) с наклоном, близким к единице. Величина этого наклона соответствует инкременту свободной энергии связывания около -700 кал/моль на одну метиленовую группу, что характерно для переноса углеводородного радикала из воды в гидрофобную фазу. Таким образом, на активной поверхности обеих холинэстераз выявляются две гидрофобные области, разделенные менее гидрофобным участком.

Таблица 2

Взаимодействие производных борной кислоты $\text{RB}(\text{OH})_2$ с ацетил- и бутирилхолинэстеразой

R	K_i, M	
	Ацетилхолинэстераза	Бутирилхолинэстераза
ОН	$0,15 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,11$
C_2H_5	$(3,26 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	$(2,86 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$
C_3H_7	$(2,03 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$	$(6,28 \pm 0,12) \cdot 10^{-4}$
C_4H_9	$(5,81 \pm 0,20) \cdot 10^{-4}$	$(3,80 \pm 0,12) \cdot 10^{-4}$
C_5H_{11}	$(4,86 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	$(2,71 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$
C_6H_{13}	$(2,89 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$	$(1,74 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$
C_7H_{15}	$(7,80 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$	$(4,27 \pm 0,35) \cdot 10^{-5}$
C_8H_{17}	$(2,93 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}$	$(1,17 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$

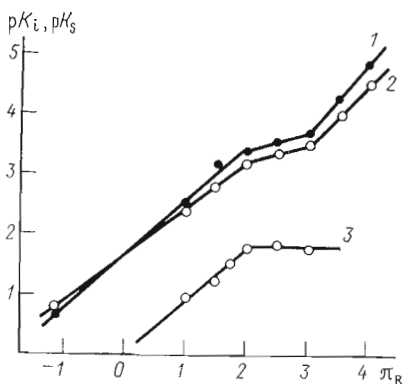


Рис. 3

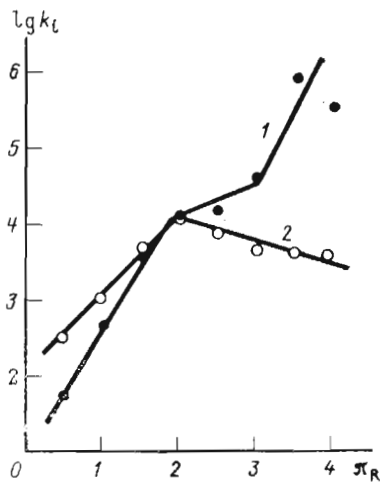


Рис. 4

Рис. 3. Влияние гидрофобности радикала R на эффективность связывания производных борной кислоты $B(OH)_2$ с бутирилхолинэстеразой (1), ацетилхолинэстеразой (2), а также субстратов CH_3COOR с ацетилхолинэстеразой (3), по данным работы [18]

Рис. 4. Зависимость бимолекулярной константы скорости ингибирования k_i бутирилхолинэстеразы (1) и ацетилхолинэстеразы (2) от гидрофобности нормальной алкильной группы ингибиторов $(C_nH_{2n+1})(CH_3)P(O)SC_4H_9$, по данным работы [20]

Эффективность связывания ингибиторов с ферментом в пределах каждой из гидрофобных областей можно описать уравнением

$$pK_i^R = pK_i^0 + \phi_b \pi_R, \quad (4)$$

где ϕ_b — количественная мера гидрофобности данного участка фермента [18], а pK_i^0 — значение pK_i^R при «нулевой» гидрофобности заместителя R. Из рис. 3 видно, что на общую прямую с данными для алкилборных кислот ложатся также точки для борной кислоты ($\pi_{OH} = -1,16$ [17]), в молекуле которой место радикала R занимает гидрофильная группа OH. Это говорит о том, что участвующие в образовании комплекса с остатком борной кислоты функциональные группы фермента локализованы в гидрофобном окружении или непосредственно примыкают к этой области.

Следует отметить, что в этом отношении обе холинэстеразы отличаются от некоторых других ферментов, ранее изученных с применением борорганических ингибиторов. Так, например, в случае α -химотрипсина [3] и щелочной мезентерикопептидазы [5] константы K_i для $H(CH_2)_nB(OH)_2$ с короткими углеводородными радикалами ($n \leq 2$) лишь незначительно отличаются от величины K_i для борной кислоты. При анализе этих данных было сделано заключение, что каталитический и сорбционный участки в активных центрах этих ферментов пространственно разобщены и алкилборные кислоты с короткими углеводородными радикалами не могут вступать в гидрофобное взаимодействие с сорбционным участком. В этом случае значения констант ингибирования α -химотрипсина и мезентерикопептидазы борной (или, что то же, этилборной) кислотой можно сопоставить с величиной pK_i^0 в уравнении (4). Для начальных участков кривых 1 и 2 на рис. 3 получены значения pK_i^0 $1,71 \pm 0,06$ (ацетилхолинэстераза) и $1,67 \pm 0,08$ (бутирилхолинэстераза), которые хорошо согласуются со значением pK_i борной кислоты для мезентерикопептидазы (pK_i 1,7 [5]). Это может свидетельствовать об одинаковой эффективности взаимодействия указанных ферментов с борным остатком в молекуле борорганической кислоты. Константа pK_i 1 для комплекса борной кислоты с α -химотрипсином, однако, несколько ниже значения pK_i^0 для холинэстераз.

Известно, что борная кислота ингибирует катализируемый α -химотрипсином гидролиз субстратов по неконкурентному типу торможения [19]. Это означает, что связывание ингибитора с функциональными группами фермента в удалении от сорбционной области не препятствует связыванию субстрата. В отличие от химотрипсина торможение холинэстеразного гидролиза борной кислотой носит конкурентный характер. Этот факт согласуется с представлением о непосредственной близости функциональных групп и гидрофобного участка, так как связывание борной кислоты в таком компактном активном центре может препятствовать связыванию субстрата.

Интересно сопоставить данные по ингибированию холинэстераз алкилборными кислотами с результатами изучения топографии их активных центров с помощью фосфорорганических ингибиторов



которые необратимо фосфорилируют активный центр фермента [20], и с результатами исследования влияния размера углеводородного заместителя R в субстратах CH_3COOR на их реакционную способность [18]. Было показано [21], что спиртовая часть субстратов взаимодействует с той гидрофобной областью ацетилхолинэстеразы, в которой располагается заместитель RO фосфорорганических ингибиторов. Эта гидрофобная полость способна размещать заместители R не длиннее *n*-бутильной группы, дальнейшее увеличение длины и гидрофобности радикала (до $n = 6$ и $\pi = 3$) не оказывает влияния на эффективность связывания. Форма зависимости $\text{p}K_S$ от $\text{p}K_R$ для субстратов CH_3COOR (рис. 3, 3) аналогична начальным участкам зависимостей $\text{p}K_i$ от $\text{p}K_R$ для алкилборных кислот. При этом наклон φ_b $0,88 \pm 0,06$ для связывания субстратов [18] практически совпадает с величиной φ_b $0,8 \pm 0,1$ для алкилборных кислот.

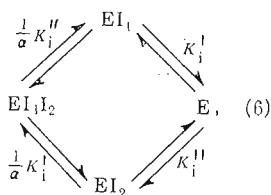
Таким образом, можно представить, что углеводородные радикалы R молекул $\text{RB}(\text{OH})_2$ и CH_3COOR сорбируются в одном и том же месте на активной поверхности ацетилхолинэстеразы. К такому же выводу можно прийти при анализе данных для бутирилхолинэстеразы, так как в зависимости эффективности взаимодействия ингибиторов $(\text{RO})(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{X}$ от длины радикала R также наблюдается излом при переходе от *n*-бутильной к *n*-амильной группе [20] (рис. 4.) При этом мы принимаем, что группа RO фосфорорганических ингибиторов и отщепляющаяся часть субстратов располагаются одинаковым образом в активном центре бутирилхолинэстеразы, как и в случае ацетилхолинэстеразы [21].

Для обеих холинэстераз характерно наличие гидрофильного участка, расположенного за гидрофобной полостью, связывающей отщепляющуюся часть субстрата. Уменьшение гидрофобности активной поверхности фермента в этом районе, вероятно всего, связано с влиянием так называемого анионного центра, существование которого постулировано на основании высокой специфичности холинэстераз относительно катионных реагентов [14]. С этим представлением согласуются также данные по ингибированию ацетилхолинэстеразы бромидом триметиламмонийпропилметилборной кислоты, которая является структурным аналогом специфического субстрата этого фермента — ацетилхолина [11]. Полученная для этого соединения константа ингибирования K_i $2,8 \cdot 10^{-8}$ М (рН 7,5; 25°, 0,2 М NaCl) более чем на три порядка превышает значение K_i для алкилборной кислоты с углеводородным радикалом соответствующей длины (табл. 2).

Для решения вопроса о взаимном расположении каталитического и анионного центров на активной поверхности холинэстераз нами использовался метод двухкомпонентного обратимого ингибирования фермента [3]. В качестве реагента, специфически взаимодействующего с анионным цент-

ром холинэстераз, был выбран хлористый тетраметиламмоний. Известно, что тетраметиламмониевые катионы конкурентно ингибируют катализируемый обеими холинэстеразами гидролиз ацетилхолина [22, 23].

Взаимодействие с ферментом двух обратимых ингибиторов можно представить схемой



где α характеризует степень взаимозависимости связывания ингибиторов с активным центром фермента. При $\alpha = 0$ связывание одного из ингибиторов полностью препятствует связыванию второго ингибитора (взаимозависимый тип ингибирования). При $\alpha = 1$ ингибиторы взаимонезависимы и, следовательно, связываются в разных, пространственно разделенных участках активного центра. Для расчета α использовали уравнение

$$v/v_1 = 1 + \frac{K_{m(\text{важ})}}{K_{m(\text{важ})} + [S_0]} \left(\frac{[I_1]}{K_1'} + \frac{[I_2]}{K_1''} + \alpha \frac{[I_1][I_2]}{K_1' K_1''} \right), \quad (7)$$

где K_1' и K_1'' — ингибиторные константы для алкилборной кислоты (I_1) и тетраметиламмониевого катиона (I_2). Последние величины для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы определяли отдельно по уравнению (1); полученные значения K_1'' $1,8 \pm 0,1$ и $4,0 \pm 0,2$ мМ соответственно (рН 7,5; 25°; 0,15 М фосфатный буфер) хорошо согласуются с приведенными в литературе данными [22, 23].

Согласно рис. 5, связывание с активным центром холинэстераз алкилборных кислот с короткими углеводородными радикалами R не мешает связыванию тетраметиламмониевого катиона с анионным центром. Однако при переходе к производным с более длинными радикалами α уменьшается, и связывание двух ингибиторов в активном центре холинэстераз становится взаимозависимым. При этом характер взаимодействия ингибиторов в случае бутирилхолинэстеразы резко изменяется при переходе от *n*-бутилборной кислоты ($n = 4$) к *n*-амилборной кислоте ($n = 5$). Для ацетилхолинэстеразы этот переход более плавный, однако α быстрее приближается к нулю. Таким образом, результаты двухкомпонентного торможения холинэстераз показывают, что каталитический и анионный центры пространственно отдалены друг от друга и расстояние между ними соответствует длине полиметиленовой цепочки из четырех атомов углерода. Это согласуется с представлением, что уменьшение гидрофобности активной поверхности холинэстераз, наблюдаемое в зависимости от строения углеводородного радикала в алкилборных кислотах $H(CH_2)_nV(OH)_2$ при $n = 4 - 6$ (рис. 3), может быть связано с расположением вблизи этой области ионогенной группы анионного центра.

Менее ясной представляется роль второй гидрофобной области в проявлении специфичности холинэстераз, обнаруживаемая при изучении взаимодействия с ферментами алкилборных кислот с $n > 6$. Аналогичное увеличение эффективности гидрофобного связывания в случае длинных

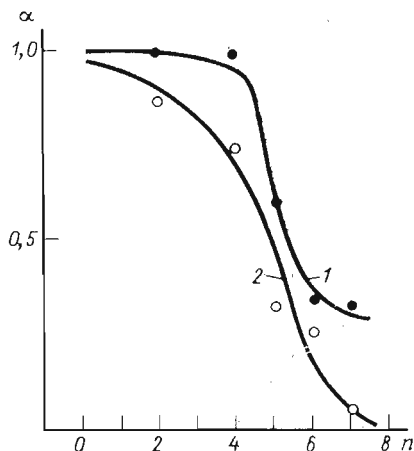


Рис. 5. Зависимость α от длины углеводородного радикала в $H(CH_2)_nV(OH)_2$ при совместном ингибировании с тетраметиламмониевым катионом гидролиза ацетилхолина бутирилхолинэстеразой (1) и ацетилхолинэстеразой (2)

углеводородных радикалов было обнаружено раньше только для реакции бутирилхолинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами [19]. В реакциях ацетилхолинэстеразы с теми же фосфорорганическими ингибиторами с протяженными углеводородными радикалами подобного эффекта не было обнаружено (рис. 4). Наблюдаемое различие пока труднообъяснимо, и требуется дополнительное исследование для выяснения его природы.

Экспериментальная часть

Использовали препарат бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8; Московский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова) с уд. акт. 2,8 мкмоль/мин·мг (рН 7,5; 0,15М КСl, 0,012 М бутирилхолинхлорид) и очищенный гель-хроматографией препарат ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) яда кобры *Naja naja oxiana* с уд. акт. 180 мкмоль/мин·мг (рН 7,5; 0,15 М КСl, 2,3 мМ ацетилхолинхлорид). Исходные растворы ферментов с концентрацией 10^{-6} — 10^{-7} М готовили в 0,15 М водном растворе КСl и хранили при 4°. В этих условиях активность ферментов в течение месяца практически не менялась.

Синтез и свойства алкилборных кислот $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ с n 2—8 описаны ранее [3]. Борную кислоту марки ч.д.а. использовали без дополнительной очистки.

Хлористые ацетилхолин и ацетилтиохолин марки х.ч. использовали после перекристаллизации из смеси этапола и диэтилового эфира, *n*-бутилацетат очищали перегонкой (т. кип. 126,4°/754 торр, n_D^{20} 1,3950).

Скорость холинэстеразного гидролиза ацетилхолина и бутилацетата измеряли методом потенциометрического титрования образующейся в реакции кислоты на рН-стате ТТТ1, SBR2, АВU1 (Radiometer, Дания). Реакции проводили в термостатированных при 25° кюветах в среде 0,15 М КСl при рН 7,5; объем реакционной смеси 5,0 — 6,0 мл. За реакцией ферментативного гидролиза ацетилтиохолина следили спектрофотометрическим методом, подробно описанным Элманом и др. [24]. Для контроля за освобождением тиохолина в качестве индикатора использовали 5,5-дितिобис-2-нитробензойную кислоту, оптическую плотность реакционной смеси измеряли при 412 нм. Реакции проводили в термостатированных при 25- кюветах (l 1 см) спектрофотометра Perkin-Elmer 402 в среде 0,15 М фосфатного буфера при рН 7,5. Концентрации субстрата при определении K_i не превышали $K_{m(\text{каж})}$.

При исследовании рН-зависимости ингибиторной константы помимо фосфатного буфера использовали также ацетатные буферные смеси. Предварительно было показано, что замена буферного раствора не приводит к систематическому отклонению результатов измерения. Буферные растворы готовили по описанию [25].

Значения K_i рассчитывали из зависимости v/v_i от $[I]$ согласно формуле (1), используя соответствующие значения $K_{m(\text{каж})}$. Расчет кинетических констант, значений pK_a ионогенных групп и статистическую обработку данных проводили на ЭВМ «Наири 2». Методы расчета pK_a и данные по зависимости констант $k_{\text{кат}}$ и $K_{m(\text{каж})}$ от рН реакционной среды для катализируемого холинэстеразами гидролиза ацетилтиохолина будут обсуждаться отдельно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1968) Докл. АН СССР, 183, 1435—1438.
2. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. (1970) FEBS Lett., 7, 23—25.
3. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1970) Молекулярн. биология, 4, 558—569.
4. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. (1972) FEBS Lett., 20, 37—40.

5. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. (1976) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **8**, 225—232.
6. Philipp M., Bender M. L. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 478—480.
7. Nakatani H., Hanai K., Uehara Y., Hiromi K. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)*, **77**, 905—908.
8. Lindquist R. N., Terry C. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **160**, 135—144.
9. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман М. М., Антонов В. К. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 694—698.
10. Ротанова Т. В., Клаус Г., Иванова А. Т., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 837—845.
11. Koehler K. A., Hess G. P. (1974) *Biochemistry*, **13**, 5345—5350.
12. Trossell K. (1957) *Arkiv kemi*, **10**, 529—536.
13. Rawn J. D., Lienhard G. E. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3124—3130.
14. Яковлев В. А. (1956) в кн. *Кинетика ферментативного катализа*, с. 138—242, «Наука», М.
15. Уэбб Л. (1956) в кн. *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, с. 156—194, «Мир», М.
16. Wilkinson G. N. (1961) *Biochem. J.*, **80**, 324—330.
17. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) *Chem. Revs.*, **71**, 526—616.
18. Березин И. В., Коломийцева Т. Я., Левашов А. В., Мартинек К. (1976) *Молекулярн. биология*, **1**, 67—72.
19. Кабачник М. И., Абдувахабов А. А., Агабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В. (1970) *Успехи химии*, **39**, 1050—1073.
20. Järv J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 315—322.
21. Järv J., Aaviksaar A., Godovikov N., Lobanov D. (1977) *Biochem. J.*, **167**, 823—825.
22. Розенгарт Е. В., Соболева И. Н. (1970) *Биохимия*, **35**, 574—578.
23. Волкова Р. И. (1968) *Биохимия*, **33**, 604—611.
24. Ellman C. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Fearherstone R. M. (1961) *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88—95.
25. *Biochemist's Handbook* (1961) Long C., ed., D. van Nostrand Company Inc., Princeton, N. Y.

Поступила в редакцию
24.IV.1978

INTERACTION OF ALKYLBORONIC ACIDS WITH CHOLINESTERASES

JÄRV J. L., SPEEK M. A., LANGEL Ü. L., ROTANOVA T. V.

*Tartu State University, Tartu, Estonian SSR;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Kinetic analysis showed the alkylboronic acids of the general formula $H(CH_2)_nB(OH)_2$, where $n = 2-8$, to be reversible competitive inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The ionogenic groups of pK_a 6.3 and 6.4 participated in the interaction of the enzymes with the borate grouping. The inhibitor hydrocarbon chains were involved in binding to the hydrophobic regions of the enzyme active sites. The dependences of binding efficiency on the hydrocarbon chain length were similar for both cholinesterases: a linear increase in pK_i was observed for compounds with $n \leq 4$ or $n = 6-8$, the increment of binding free energy being -700 cal/mole per one CH_2 -group. The indication of less hydrophobic regions in the active site was provided by the studies of inhibitors having 4-6 methylene units. The kinetics of two-component inhibition with alkylboronic acids and tetramethylammonium chloride were studied in order to probe the mutual arrangement of catalytic groups and the anionic center in cholinesterases.