

Холинэстеразы: структура активного центра и механизм влияния блокаторов холинорецепторов на скорость взаимодействия с лигандами

А.М.Антохин, Э.Т.Гайнуллина, В.Ф.Таранченко, С.Б.Рыжиков, Д.К.Яваева

ФГУ «27 Научный центр Министерства обороны Российской Федерации»

105005 Москва, Бригадирский пер., 13, факс (495) 267–5107

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Физический факультет

119992 Москва, Ленинские горы, факс (495) 939–1489

Рассмотрены современные представления о структуре активного центра холинэстераз и механизме их взаимодействия с фосфорорганическими ингибиторами. Основное внимание уделено механизму влияния блокаторов холинорецепторов на скорость взаимодействия ацетилхолинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами.

Библиография — 79 ссылок.

Оглавление

I. Введение	780
II. Структура активного центра холинэстераз	781
III. Механизм взаимодействия ацетилхолинэстеразы с фосфорорганическими и N-гетероциклическими ингибиторами	784
IV. Активаторы взаимодействия ацетилхолинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами	788

I. Введение

Со времени открытия ацетилхолинэстеразы (АХЭ) — фермента, катализирующего гидролиз ацетилхолина (АХ),¹ было опубликовано огромное количество статей, посвященных изучению ее свойств. Столь пристальное внимание к АХЭ исследователей различных областей знания — биохимиков, физиологов, фармакологов, медиков, экологов, химиков-аналитиков и др. — связано с ключевой ролью этого фермента (наряду с холинорецепторами) в передаче нервных импульсов в холинэргических синапсах. О значительном интересе к свойствам АХЭ свидетельствуют регулярно проводимые Международные съезды по холинэстеразе (например, материалы IX съезда опубликованы в журнале *Chemico-Biological Interactions*, см.²) Это связано с тем, что информация о структуре активного центра АХЭ и механизме ее взаимодействия с различными лигандами (субстратами, ингибиторами) открывает перспективу для успешного реше-

ния многих проблем, стоящих перед современной наукой, таких как уточнение механизма проведения нервного импульса по нервным тканям; разработка более эффективных препаратов для лечения пораженных фосфорорганическими отравляющими веществами (ФОВ); создание лекарственных средств для лечения болезни Альцгеймера; разработка высокочувствительных способов и технических устройств для экологического мониторинга объектов окружающей среды и т.д.

К настоящему времени выделено более 90 разновидностей холинэстераз из 65 различных источников (позвоночных, насекомых, моллюсков).

Интерес к структуре холинэстераз (ХЭ) и механизму их необратимого ингибирования вызван тем, что в последнее время большое внимание уделяется проведению работ по детоксикации различных фосфорорганических соединений (ФОС) с помощью биологических систем. Хорошо известно, что ФОС широко применяют в сельском хозяйстве в качестве

А.А.Антохин. Кандидат технических наук, старший научный сотрудник ФГУ «27 Научный центр Министерства обороны Российской Федерации». Телефон: (499)265–4675, e-mail: cc27007@yandex.ru

Область научных интересов: экологическая безопасность.

Э.Т.Гайнуллина. Доктор химических наук, старший научный сотрудник того же центра. Телефон: (495)734–4395, e-mail: era-gaj@rambler.ru

Область научных интересов: биохимия, спектральные и ферментативные методы исследования.

С.Б.Рыжиков. Кандидат физико-математических наук, доцент физического факультета МГУ.

Телефон: (499)138–0446, e-mail: sbr@rambler.ru

Область научных интересов: биофизика, флуоресцентные методы исследования.

Д.К.Яваева. Аспирантка того же факультета.

Телефон: (495)377–7772, e-mail: angel10329@mail.ru

Область научных интересов: биофизика, спектральные методы исследования.

Дата поступления 14 декабря 2009 г.

инсектицидов, фунгицидов и гербицидов. И хотя их применение ведется в режиме, строго регламентируемом ГОСТами, однако способность ФОС аккумулироваться в почве и сточных водах привела к тому, что во многих пищевых продуктах были обнаружены инсектициды в количествах, превышающих предельно допустимую концентрацию (ПДК). Это послужило основанием для принятия Европейским Союзом решения о сокращении производства инсектицидов.

Наибольшее число публикаций по холинэстеразам посвящено изучению влияния различных факторов на скорость их необратимого ингибирования фосфорорганическими соединениями, что связано с уничтожением химического оружия (ХО) странами, подписавшими Конвенцию о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении.³ Пункт 10 статьи IV Конвенции, ратифицированной Россией 5 ноября 1997 г. (Федеральный закон 138-ФЗ), гласит, что каждое государство-участник в ходе транспортировки, отбора проб, хранения и уничтожения ХО должно уделять первоочередное внимание обеспечению безопасности людей и защите окружающей среды. В связи с этим на объектах уничтожения ХО реализуется система мероприятий, направленных на контроль содержания токсичных соединений как на территории, где находится сам объект, так и за ее пределами в зоне возможного влияния объекта.

Особую сложность представляют вопросы контроля содержания фосфорорганических отравляющих веществ, отличающихся высокой токсичностью и кумулятивным действием, что требует создания высокочувствительных способов их определения. Предельно допустимая концентрация ФОВ в воздухе составляет 10^{-7} – 10^{-8} мг·м⁻³ (см. работы^{3,4}). Ни один из известных методов не позволяет обнаруживать ФОВ в таких низких концентрациях без их предварительного концентрирования. Наиболее высокой чувствительностью и специфичностью характеризуется ферментативный метод определения ФОВ.

Скорость катализируемой АХЭ реакции гидролиза ацетилхолина высока и приближается к предельному значению, возможному для фермент-субстратной системы, что позволило разработать чувствительный и специфичный ферментативный метод определения соединений антихолинэстеразного действия и создать на его основе методику для мониторинга объектов окружающей среды на содержание ФОС.

Для решения проблемы повышения чувствительности ферментативного метода определения ФОС необходимо знать структуру активного центра АХЭ и механизм влияния блокаторов холинорецепторов[†] на скорость взаимодействия АХЭ с фосфорорганическими ингибиторами. В данном обзоре основное внимание уделено рассмотрению механизма ускорения взаимодействия АХЭ с фосфорорганическими ингибиторами в присутствии блокаторов холинорецепторов.

II. Структура активного центра холинэстераз

В соответствии с «Правилами номенклатуры ферментов», опубликованными в 1973 г. Комиссией по номенклатуре биохимических соединений Международного союза теоретической и прикладной химии (ИЮПАК), холинэстеразы относятся к классу гидролаз.⁵ Холинэстеразы, преимущественно

гидролизующие ацетилхолин, по номенклатуре ферментов получили название ацетилхолин-ацетилгидролазы (КФ 3.1.1.7), однако в научной литературе чаще используют их тривиальное название — ацетилхолинэстеразы. Гидролазы, преимущественно гидролизующие холиновые эфиры других карбоновых кислот (пропионилхолин, бутирилхолин и др.), по номенклатуре ферментов получили название ацилхолин-ацетилгидролазы (КФ 3.1.1.8); тривиальное название — холинэстеразы.

В организме млекопитающих имеется три вида ХЭ, отличающихся функциональным назначением и субстратной специфичностью: синаптическая АХЭ (КФ 3.1.1.7), АХЭ эритроцитов (КФ 3.1.1.7) и сывороточная ХЭ (КФ 3.1.1.8). Синаптическая АХЭ (АХЭ 1) осуществляет прерывание передачи нервного импульса от пресинаптической мембраны к постсинаптической мембране нервных клеток через синаптическую щель (или от мембраны нервной клетки к скелетным мышцам) путем быстрого гидролиза ацетилхолина. Функциональное назначение холинэстераз эритроцитов (АХЭ 2) и сыворотки крови (бутирилхолинэстеразы, БХЭ) до конца не установлено. Поскольку все три вида ХЭ имеют близкие структуры активного центра и специфичных субстратов, а также являются мишенью для одних и тех же токсичных соединений, принято считать, что БХЭ предохраняет АХЭ от инактивации соединениями антихолинэстеразного действия (в частности, она с большой скоростью гидролизует бутирилхолин — ингибитор АХЭ).

Холинэстеразы АХЭ 1 и АХЭ 2 имеют сходное строение. Показана корреляция активности АХЭ 2 с активностью АХЭ 1 в синапсах передачи нервного импульса от мембраны нервной клетки к скелетным мышцам.^{6,7} Установленная корреляция может быть использована в клинических условиях для суждения об эффективности реактиваторов (например, оксимов) АХЭ. Это одна из наиболее важных терапевтических задач.

Информацию о последовательности аминокислотных остатков и трехмерной структуре многих ферментов, в том числе и холинэстераз, можно найти в базах данных, сведения о которых подробно изложены в обзорной статье⁸.

Каталитический гидролиз субстратов осуществляется в активном центре холинэстераз. С использованием метода рентгеноструктурного анализа показано, что активный центр ацетилхолинэстераз, выделенных из ряда природных источников, расположен на внутренней поверхности глобулы фермента в щели глубиной 20 Å, сужающейся по мере приближения ко «дну» щели. Активный центр «выстлан изнутри» аминокислотными остатками с гидрофобными группами (тирозин, фенилаланин и др.). Каталитический гидролиз субстрата осуществляется с участием каталитической триады Ser203-Glu334-His447 (нумерация аминокислотных остатков соответствует ацетилхолинэстеразе млекопитающих), причем атом кислорода гидроксильной группы остатка Ser203 находится на расстоянии 4 Å от «дна» активного центра.⁹

На рис. 1 представлена схема активного центра холинэстеразы. Каталитическая триада Ser203-Glu334-His447 окружена участками полипептидной цепи, важными для каталитической активности фермента. К ним относятся участки ацилирования, или «ацильный карман» (ключевыми аминокислотными остатками этого участка являются Phe295, Phe297, Phe338), участок связывания холина, или «анионная яма» (аминокислотные остатки Gly121, Gly122, Ala204), и участок связывания Me₃N⁺-группы (аминокислотные остатки Trp86 и Tyr337).^{10,11}

Известно, что одни ингибиторы ХЭ (конкурентные ингибиторы) связываются с ее активным центром, в то время как

[†] Блокаторы холинорецепторов, являющиеся антагонистами ацетилхолина, активируют ацетилхолинэстеразу.

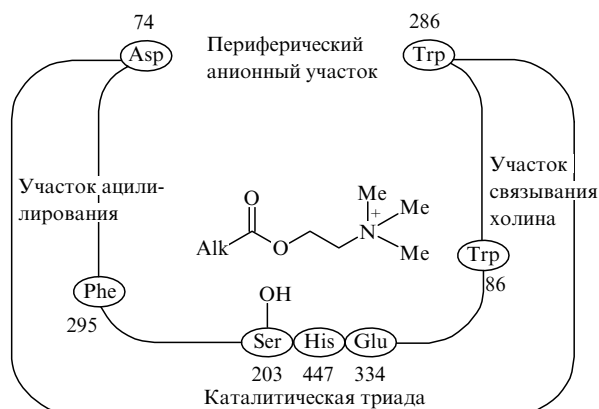


Рис. 1. Схема активного центра холинэстеразы.

другие могут влиять на активность фермента, ассоциируясь с его аллостерическим[‡] участком, который расположен у входа в активный центр.¹¹

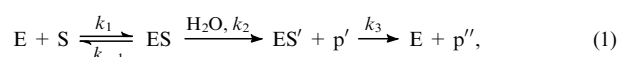
Кристаллографические исследования показали, что вход в активный центр свободной АХЭ закрыт, однако он открывается при взаимодействии с лигандами.¹¹ Форма входа в активный центр определяется четырьмя ключевыми аминокислотными остатками Р-участка — Tyr72, Leu76, Tyr337 и Tyr341 (нумерация аминокислотных остатков соответствует АХЭ млекопитающих).¹¹

[‡] Другое название аллостерического участка — периферический анионный участок (Р-участок).

Структура и различные функции Р-участка, а также перспективы разработки новых более эффективных ингибиторов АХЭ и терапевтических средств на их основе для лечения злокачественных опухолей и болезни Альцгеймера обсуждаются в обзоре¹².

Р-Участок вносит вклад в каталитическую активность фермента благодаря его кратковременному селективному связыванию с субстратом на пути последнего к участку ацилирования, в котором осуществляется ферментативный гидролиз АХ с участием каталитической триады Ser203-Glu334-His447.^{10, 11} Скорость связывания субстрата с Р-участком фермента очень высока: практически каждое соударение является эффективным.¹³

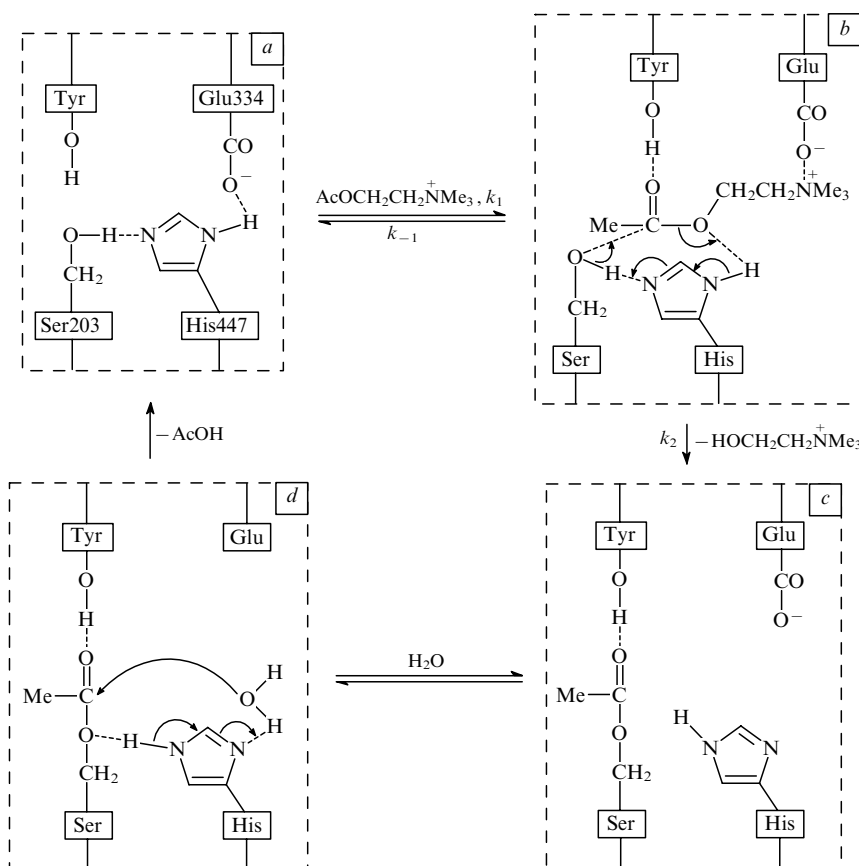
Ферментативный гидролиз АХ в активном центре фермента при относительно низких концентрациях АХ может быть представлен в виде следующих превращений:



где E — холинэстераза, S — субстрат, ES — комплекс Михаэлиса, ES' — ацетилированная холинэстераза, p' — холин, p'' — уксусная кислота.¹⁴

Механизм ферментативного гидролиза ацетилхолина в активном центре холинэстераз в соответствии с уравнением (1) представлен на рис. 2.¹⁴

Как следует из рис. 2, б, формирование комплекса Михаэлиса обусловлено связыванием ацетилхолина с функциональными группами аминокислотных остатков каталитического участка за счет кулоновского и гидрофобного взаимодействий, а также за счет образованием Н-связей с участием

Рис. 2. Механизм ферментативного гидролиза ацетилхолина в активном центре ацетилхолинэстеразы.¹⁴

эфирного и карбонильного атомов кислорода АХ.¹⁴ Выигрыш в энергии активации образования ацетилированного фермента (рис. 2,с) достигается в результате конформационных изменений каталитического участка фермента.

Предложенный на рис. 2 механизм не отвечает на вопрос, как достигается увеличение скорости гидролиза ацетилхолина в 1000 раз и более в присутствии ацетилхолинэстеразы.^{9, 15} Поиску ответа на этот вопрос посвящено огромное количество исследований.

Высокая скорость гидролиза АХ ацетилхолинэстеразой достигается благодаря высокой нуклеофильности атома кислорода остатка Ser203 каталитической триады. Увеличение нуклеофильности серинового остатка — одна из функций каталитической триады. Исследования методом ЯМР ¹H показали, что увеличение нуклеофильности атома кислорода остатка Ser203 происходит в результате перехода протона от гидроксильной группы Ser203 на атом азота имидазольного кольца остатка His447. Одновременно протон, находящийся у второго атома азота имидазольного кольца, переходит к карбоксильной группе остатка Glu334. Методами ЯМР ¹H и РСА на примере АХЭ 2 установлено наличие сильных ван-дер-ваальсовых взаимодействий между аминокислотными остатками His447, Glu334 и Ser203 каталитической триады.^{15–17} В частности, найдено, что длина водородной связи O...H—N между остатками Glu334 и His447 составляет 2.62 ± 0.02 Å. Именно благодаря образованию водородных связей обеспечивается высокая нуклеофильность остатка Ser203 каталитической триады АХЭ, участвующего в ферментативном гидролизе субстрата.¹⁷

Из анализа зависимости ферментативной активности АХЭ от пространственного строения субстрата был сделан вывод, что скорость гидролиза зависит от компактности «катионной головки» субстрата.^{9, 18} Полагают, что активный центр АХЭ содержит «анионную яму», которая локализована на месте сорбции ацилхолина и размер которой строго соответствует размеру ориентированно сорбированного ацилхолина. Ориентированная сорбция ацильных производных холина в такой «анионной яме» приводит к изменению пространственной конфигурации субстрата на стадии образования ацилированного фермента и снижению энергии активации гидролиза. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение конфигурации субстрата влечет за собой изменение пространственной конфигурации активного центра фермента, приводящее к «выталкиванию» продуктов гидролиза субстрата (реализуется механизм «push-pull» или «принцип дыбы»).^{9, 14, 18}

Роль гидрофобных участков активного центра в селективном связывании лигандов подтверждается сайт-направленным мутагенезом — заменой одного или более аминокислотных остатков в активном центре ХЭ. Так, заменой шести остатков ароматических аминокислот (Tyr72Asn/Tyr124Gln/Trp286Ala/Phe295Leu/Phe297Val/Tyr337Ala) вблизи остатка His447 активного центра БХЭ человека (БХЭ 1) был получен «гексамутант», который оказался неактивен по отношению к природному субстрату нативной БХЭ — бутирилхолину (БХ).¹⁹

Данные об участии индольного фрагмента остатка Trp84 (нумерация аминокислотных остатков соответствует АХЭ, выделенной из электрического ската *Torpedo californica* (АХЭ 3)), расположенного в активном центре АХЭ, в ферментативном гидролизе АХ получены с использованием изотопного метода и рентгеноструктурного анализа.²⁰ В качестве субстратов вместо ацетилхолина применяли модельные соединения — эдрофонийхлорид (этил(3-гидрокси-фенил)диметиламмонийхлорид), такрин (1,2,3,4-тетра-

гидро-9-аминоакридин) и декаметонийбромид (триметил(10-триметиламмонийдецил)аммонийбромид). В этих исследованиях использовали меченный тритием обратимый ингибитор АХЭ — тетрафторборат 4-(N,N-диметиламино)-фенилдиазония ([³H]DDF). Применение ингибитора [³H]DDF позволило получить информацию о роли аминокислотных остатков активного центра АХЭ в связывании АХ. Соединение [³H]DDF в темноте является обратимым ингибитором АХЭ, но при фотоактивации ковалентно связывается с каталитическим участком. Молекула [³H]DDF внедряется в активный центр и полностью блокирует ферментативную активность АХЭ.²¹ Ранее было показано, что бромид тетраметиламмония может полностью защитить АХЭ 3 от связывания с [³H]DDF при фотоактивации, что демонстрирует специфичный характер воздействия последнего на АХЭ.²²

Кристаллографическое исследование структуры комплекса такрина с АХЭ 3 показало, что такрин располагается между бензольным кольцом аминокислотного остатка Phe300 и индольным кольцом Trp84, что позволяет сделать заключение об участии индольного фрагмента Trp84 в связывании четвертичной аммонийной группы ацетилхолина.²⁰ Эти данные согласуются с результатами более ранних исследований по идентификации Trp-остатка в активном центре АХЭ.^{21, 22}

Участие остатка Trp84 в ферментативном гидролизе ацетилхолина было подтверждено также с помощью флуоресцентного зонда, в качестве которого было выбрано модельное соединение ацетилхолина — такрин. Спектральные исследования показали, что добавление холинэстеразы сыворотки крови лошади (БХЭ 2) к раствору такрина приводит к тушению флуоресценции последнего. Установлено, что степень тушения флуоресценции такрина зависит от активности БХЭ 2.²³ Предложен и исследован механизм тушения флуоресценции, связанный с образованием нефлуоресцирующего комплекса с переносом заряда с участием такрина в возбужденном состоянии и индольного цикла остатка триптофана R-участка активного центра БХЭ 2.²³

Важную роль в высокой ферментативной активности ацетилхолинэстеразы играют молекулы воды, находящиеся в активном центре фермента и его ближайшем окружении. Методом рентгеноструктурного анализа установлено, что в молекуле АХЭ 3 и ее комплексах с ингибиторами имеются 45 участков, содержащих от 36 до 41 молекул воды.²⁴ Примерно половина этих участков расположена в области, ближайшей к активному центру, причем в нем самом находится около 20 молекул воды (количество молекул воды в активном центре колеблется от 16 до 22), которые связаны с аминокислотными остатками индольного центра слабыми водородными связями. После закрепления лиганда в активном центре АХЭ часть молекул воды перемещается в другие позиции, а часть остается на тех местах, которые они занимали в природном ферменте. Возможно, что последние играют роль «смазки», обеспечивающей колебания полипептидных петель, которые формируют стенку активного центра, с большой амплитудой. Такие колебания, очевидно, облегчают продвижение субстрата, продуктов гидролиза и молекул воды к каталитическому участку фермента и от него. Молекулы воды, находящиеся в активном центре фермента, благодаря их слабой координации легко смещаются в другие позиции под действием поступающих молекул субстрата.²⁴

Рентгеноструктурный анализ АХЭ 3 четко показал наличие водородной связи между атомом кислорода молекулы воды и атомом азота аминокислотного остатка Trp279. На основании данных РСА комплекса АХЭ 3 с боевым отра-

влияющим веществом VX установлено, что значительное количество молекул воды располагается в активном центре фермента около молекулы VX в области, примыкающей к участку связывания холина (место расположения аминокислотных остатков Trp84 и Trp279).²⁴

Из-за относительно свободной упаковки молекул воды в области активного центра фермента, локализованного на «дне» узкой щели, там остаются многочисленные маленькие пустоты, которые могут обеспечивать более эффективное заполнение этой щели субстратом (ингибитором), что, возможно, является главной движущей силой закрепления субстрата (ингибитора) в активном центре.²⁴

Компьютерное моделирование динамики молекул воды в активном центре АХЭ позволило расширить представление о влиянии молекул воды на поведение лиганда (субстрата, ингибитора) в активном центре.^{25–28} Было найдено, что молекулы воды входят и выходят из активного центра через «главный» вход (периферический центр) в среднем каждые 200 пс.²⁵ Существует семь таких входов (семь локальных участков расположения кластеров из молекул воды): главный, два передних, два «черных» и два боковых входа. Функции второго переднего входа и двух «черных» входов остаются неясными, но установлено, что они иногда открываются достаточно широко, и молекулы воды могут свободно проходить через них.

Из 20 молекул воды, находящихся в активном центре АХЭ 3, 18 молекул были обнаружены с помощью рентгеноструктурного анализа.²⁴ Все молекулы воды можно условно разделить на два типа — подвижные и малоподвижные. Молекулы воды, находящиеся в середине щели, у главного входа в активный центр и около аминокислотных остатков Ser203 и Glu202, являются неупорядоченными, легко перемещаются, имеют короткие времена пребывания на одном месте и не участвуют в образовании водородных связей. Молекулы воды, располагающиеся на участке связывания холина и в «ацильном кармане», наоборот, являются упорядоченными и малоподвижными. Эти различия объясняются тем, что аминокислотные остатки участка ацилирования и ион натрия, присутствующий в участке связывания холина, сильно ограничивают подвижность находящихся на этих участках кластеров воды за счет образования водородных связей.

Размер и частота колебаний кластеров воды контролируют размер лиганда и время его вхождения в активный центр. Следует учитывать, что менее структурированные мобильные кластеры воды, находящиеся на участке связывания природного субстрата, составляют большинство и обеспечивают продвижение субстрата к каталитической триаде, т.е. облегчают диффузию последнего. Смещение кластеров воды и микропустот при вхождении субстрата в щель может усилить его сорбцию. Особенно это относится к большому участку (пустоте), находящемуся возле аминокислотного остатка Ser203.²⁸

Нужно иметь в виду, что полностью оценить влияние кластеров воды на сорбцию лиганда можно только в том случае, если сравнивать поведение лигандов в присутствии и в отсутствие воды, что в настоящее время экспериментально неосуществимо.²⁹

Упомянутые выше исследования объясняют механизм ускорения ацетилирования аминокислотного остатка Ser203 каталитической триады субстратом, но не раскрывают механизм ускорения деацетилирования ацетилированной АХЭ, а также механизм ингибирования АХЭ высокими концентрациями ацетилхолина. Исследованию этого вопроса посвящены работы^{30–32}.

Так, кинетические исследования ферментативного гидролиза смеси ацетилтиохолина (АТХ) (ближайшего аналога ацетилхолина) с карбамоилхолином ацетилхолинэстеразой подтвердили существенную роль Р-участка фермента в активации ферментативного гидролиза ацетилхолина. В данном эксперименте в качестве активатора выступал АТХ. Показано, что АТХ активирует ацилирование остатка Ser203 карбамоилхолином, однако он не участвует в активации деацилирования, что позволяет объяснить ингибирование АХЭ высокими концентрациями специфичного субстрата — ацетилхолина.^{30–32}

Двухстадийный ферментативный гидролиз ацетилхолина протекает с огромной скоростью:³² значения констант скоростей ацетилирования (k_2) и деацетилирования (k_3) фермента составляют примерно 10^4 с^{-1} . Исследованию механизма ускорения деацетилирования в процессе ферментативного гидролиза ацетилхолина ацетилхолинэстеразой АХЭ 4, выделенной из *Drosophila*, посвящена работа³³. Ферментативный гидролиз ацетилхолина с участием этого фермента протекает с огромными скоростями в широком интервале концентраций субстрата (от $2 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ до $300 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$), однако активность фермента резко снижается при более высоких концентрациях ацетилхолина. Для объяснения этого факта авторами была предложена модель, согласно которой активация процесса при относительно низких концентрациях субстрата является результатом ускорения деацетилирования ацетилированного фермента. Чтобы проверить эту гипотезу, авторы в качестве фермента использовали метилкарбамоилхолинэстеразу, которую они считают эквивалентом ацетилированной формы ацетилхолинэстеразы, а в качестве аналога субстрата — негидролизующийся иодид 4-оксо-*N,N,N*-триметилпентиламмония. При использовании этого соединения скорость декарбамоилирования метилкарбамоилхолинэстеразы увеличивалась в 2.2 раза. Можно предположить, что молекула субстрата, связанная с участком активирования ($K_d = 130 \pm 47 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$), будет ускорять деацилирование фермента. Эти данные согласуются с данными ферментативного гидролиза субстрата. Положение участка активирования в ферменте было установлено с помощью сайт-направленного мутагенеза. Оказалось, что он находится у входа в активный центр фермента. Таким образом, связывание субстрата в участке активирования способствует увеличению скорости деацилирования фермента, однако расположение молекул субстрата у входа в активный центр замедляет вход другой молекулы субстрата, что приводит к ингибированию фермента при высоких концентрациях субстрата.³³

Из анализа литературных данных следует, что высокая скорость ферментативного гидролиза специфичного субстрата АХ обеспечивается совокупностью ряда факторов, обусловленных уникальной структурой активного центра ацетилхолинэстеразы.

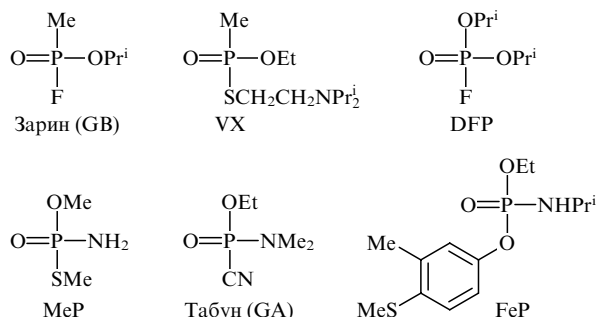
III. Механизм взаимодействия ацетилхолинэстеразы с фосфорорганическими и N-гетероциклическими ингибиторами

В основе ингибирования холинэстераз фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ) — эфирами фосфорных кислот — лежит реакция фосфорилирования гидроксильной группы аминокислотного остатка Ser203 каталитической триады активного центра фермента по механизму нуклеофильного замещения у атома фосфора.^{10,14} Взаимодействие ФОИ с активным центром холинэстераз происходит в два

этапа. На первом этапе образуется обратимый комплекс ХЭ–ФОИ, который на втором этапе превращается в необратимый комплекс («старение» фосфорилированной ХЭ, т.е. ее переход в неактивируемую форму) в результате отщепления OAlk-группы.

На примере АХЭ человека (АХЭ 2) методом спектроскопии ЯМР ^1H показано, что взаимодействие АХЭ 2 с ФОИ идет через формирование тригонально-бипирамидального переходного состояния, которое стабилизируется за счет образования короткой водородной связи между атомом водорода при атоме азота имидазольного кольца His447 и атомом кислорода непротонированного остатка Glu334, расположенного поблизости.¹⁶ Авторы полагают, что именно образование водородной связи между аминокислотными остатками His447 и Glu334 каталитической триады играет значительную роль в ингибировании ферментативной активности АХЭ 2.¹⁶

Существенную роль в необратимом ингибировании АХЭ фосфорорганическими ингибиторами играет «старение» фосфорилированной АХЭ, которое обусловлено гидролизом эфирной связи P–OAlk. Исследованию механизма старения комплексов АХЭ с фосфорорганическими ингибиторами на примере АХЭ мыши *Mus musculus* (АХЭ 5) посвящена работа¹⁰, в которой с помощью спектрофотометрического метода и рентгеноструктурного анализа были изучены структуры комплексов АХЭ 5 с изопропилметилфторфосфонатом (зарин, GB), *O*-этил-*S*-[2-(диизопропиламино)этил]метилтиофосфонатом (VX), диизопропилфторфосфатом (DFP), амидо-*O*,*S*-диметилтиофосфатом (метамидофосом, MeP), этил-*N,N*-диметиламидоцианофосфатом (табуном, GA) и этил[3-метил-4-(метилтио)фенил](*N*-изопропиламино)фосфатом (фенамифосом, FeP) до и после старения.



Исследованные комплексы можно разделить на четыре группы. К первой группе относятся комплексы АХЭ 5 с MeP и зарин, у которых структура каталитического участка до и после старения близка к структуре каталитического участка неингибированной природной АХЭ 5 (рис. 3, *a–c*). Комплекс АХЭ 5 с VX относится ко второй группе. Структура каталитического участка в фосфорилированном комплексе до старения отличается от структуры этого участка в природной АХЭ 5, тогда как после старения структура каталитического участка комплекса подобна структуре природной АХЭ 5 (рис. 3, *d*). К третьей группе относится комплекс АХЭ 5 с FeP. В нем структура каталитического участка до старения идентична структуре этого участка в неингибированной АХЭ 5, но после старения структура каталитического участка изменяется (рис. 3, *e*). И наконец, в комплексе АХЭ 5 с DFP структура каталитического участка до и после старения отличается от таковой в природной АХЭ 5 (рис. 3, *f*). Описанная ранее структура комплекса АХЭ крысы с табуном³⁴ относится ко второй группе.

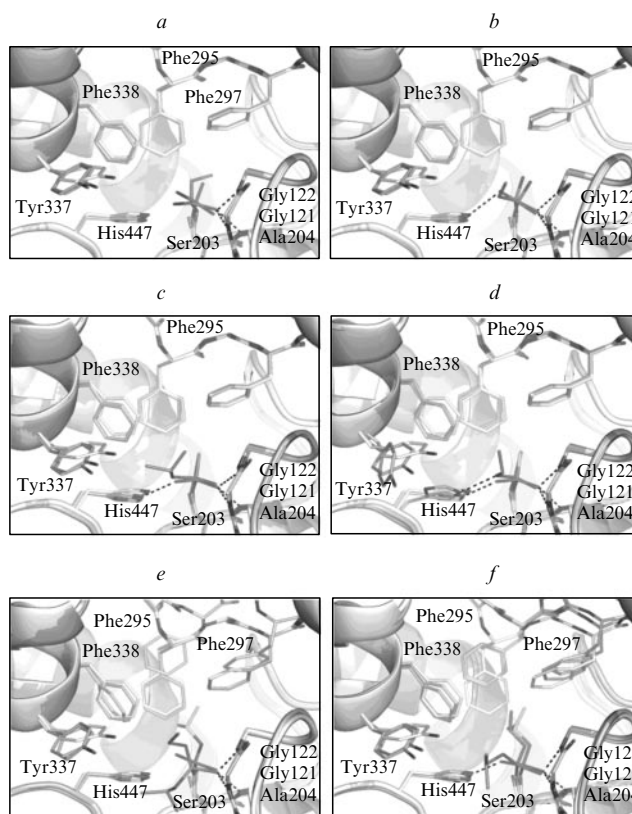


Рис. 3. Кристаллические структуры комплексов АХЭ 5 с (*R*)-метамидофосом (*a*), (*S*)-метамидофосом (*b*), зарин (*c*), VX (*d*), фенамифосом (*e*) и диизопропилфторфосфатом (*f*).¹⁰

Карты электронной плотности комплексов АХЭ 5 с MeP до и после старения, полученные с разрешением 2.74–2.50 Å, позволяют представить структуру каталитического участка неингибированной АХЭ 5.

Во всех исследованных кристаллических структурах комплексов наблюдается высокая электронная плотность в области остатка Ser203, свидетельствующая о наличии ковалентной связи между атомом кислорода аминокислотного остатка Ser203 и атомом фосфора ФОИ.

Представленные четыре группы комплексов имеют различный период старения. Например, комплексы АХЭ 2 с DFP и зарин имеют короткий полупериод старения (приблизительно 3 ч); полупериоды старения комплексов АХЭ 2 с MeP, табуном и VX составляют приблизительно 10, 19 и 37 с соответственно, а комплекс АХЭ 2 с FeP имеет относительно долгий полупериод старения — 130 ч.¹⁰

Исследованные комплексы отличаются также устойчивостью к реактивации. Комплексы АХЭ с табуном, FeP и DFP устойчивы к реактивации,³⁵ в то время как комплекс с MeP легко реактивируется большинством оксидов, а комплексы с VX и зарин относятся к промежуточной группе, они могут быть реактивированы некоторыми, но не всеми, оксимами.³⁶ Различия в скорости старения и устойчивости к реактивации зависят как от структуры комплекса, так и от структуры реактиватора.^{36, 37}

Основной особенностью комплексов АХЭ 5 с исследованными ФОИ является образование трех водородных связей с участием фосфорильного атома кислорода и функциональных групп аминокислотных остатков, принадлежащих «анионной яме», которые обеспечивают нахождение молекул ФОИ в пределах каталитического участка фермента. Эта

особенность ведет к стереохимической направленности реакций ингибирования и реактивации, как это было показано для метилфосфонатов.^{38–43} Сильное взаимодействие между фосфорильным атомом кислорода и аминокислотными остатками «анионной ямы» препятствует движению заместителей у атома фосфора в комплексе в течение реакции. Предполагается, что большие заместители в молекуле ФОИ могут находиться только в области «ацильного кармана» фермента.

В результате проведенных исследований авторы пришли к заключению, что «старение» фосфорилированной фенами-фосом АХЭ 5 протекает по механизму нуклеофильного замещения у атома фосфора и сопровождается существенным сокращением петли «ацильного кармана» каталитического участка АХЭ 5, вызванным уходом относительно большого ароксильного заместителя ФОИ (см. рис. 3,е).¹⁰

Рентгеноструктурный анализ комплексов АХЭ с ингибиторами в комбинации с кинетическими исследованиями старения этих комплексов позволили предложить два различных механизма старения, а именно, нуклеофильное замещение у атома фосфора и дезалкилирование через формирование промежуточного карбокатиона.¹⁰

С помощью конформационного анализа с использованием метода молекулярной механики показано, что ингибирующее действие ФОИ зависит от доступности атома фосфора для нуклеофильной атаки со стороны, противоположной расположению уходящей группы.⁹ Следовательно, старение по первому механизму имеет место тогда, когда атом фосфора оказывается стерически доступным.⁴⁴

Старение АХЭ, фосфорилированной зоманом — пинаколиловым эфиром метилфторфосфоновой кислоты, — происходит по другому пути, который предусматривает формирование карбокатиона, стабилизированного взаимодействием с индольным циклом аминокислотного остатка Тр86. Это связано с тем, что пинаколиловая группа создает пространственные затруднения для подхода нуклеофильных реагентов к атому фосфора.⁴⁴ Быстрое «старение» АХЭ, ингибированной зоманом ($t_{1/2} = 0.1$ ч), обусловлено высокой скоростью отщепления пинаколиловой группы.¹⁰ Уходящая в процессе «старения» фосфорилированной зоманом АХЭ пинаколиловая группа является аналогом холиновой группы в ацетилхолине.

Исследованные в работе¹⁰ фосфорорганические ингибиторы с меньшими по размеру заместителями (по сравнению с пинаколиловым заместителем в зомане) размещаются дальше от остатка Тр86, поэтому образование карбокатиона в случае MeP, зарина, VX и DFP маловероятно.^{10, 11}

Таким образом, механизм старения АХЭ, фосфорилированных заринном, MeP, VX, DFP и FeP, включает нуклеофильную атаку молекулы воды на атом фосфора с образованием тригонально-бипирамидального переходного состояния. Авторы пришли к выводу, что петля ацильного кармана изменяет скорость старения, способствуя конформационным превращениям лигандов у атома фосфора.^{10, 11}

Реактивация фосфорилированной ацетилхолинэстеразы оксимом и спонтанная реактивация также происходят через формирование тригонально-бипирамидального переходного состояния, при этом петля ацильного кармана играет в этом процессе аналогичную роль.¹⁰

Основной причиной необратимого ингибирования АХЭ фосфорорганическими ингибиторами является крайне медленное дефосфорилирование, что обусловлено стерическими факторами. Каталитический участок АХЭ оптимизирован на дезацетилирование ацетилированного остатка серина каталитической триады, а не на дефосфорилирование. Переход-

ное состояние реакции дезацетилирования отлично от тригонально-бипирамидального переходного состояния нуклеофильного замещения у атома фосфора. Другая причина — быстрое старение фосфорилированного фермента.¹⁰

Посредством сайт-направленного мутагенеза с заменой одного или двух остатков аминокислот в полипептидной цепи БХЭ 1 были определены аминокислотные остатки каталитического участка, ответственные за необратимое ингибирование холинэстераз. С этой целью были получены три мутанта: G117H, E197Q и G117H/E197Q.^{45, 46} В результате компьютерного моделирования показано, что размещение остатка His около «анионной ямы» в активном центре БХЭ 1 (замена Gly117 на His117) должно существенно повлиять как на скорость ее ингибирования ФОИ, так и на ее ферментативную активность. Действительно, мутант G117H с меньшей скоростью ингибировался рядом ФОИ, включая зарин и VX, и даже катализировал их гидролиз.⁴⁵

С целью подтверждения важной роли гистидина в уменьшении скорости ингибирования был получен мутант G117K. В табл. 1 приведены значения констант диссоциации (K_d) комплексов БХЭ 1 и ее мутантов G117H и G117K с заринном и VX, а также значения констант скорости ингибирования этих ферментов.⁴⁵ Из приведенных в табл. 1 данных следует, что значения констант скорости ингибирования мутанта G117H заринном и VX соответственно на четыре и три порядка меньше, чем значение константы скорости ингибирования природной БХЭ 1. Важная роль гистидина в устойчивости мутанта G117H к ингибированию заринном подтверждает довольно близкими значениями k_i для мутанта G117K и природной БХЭ 1.

С целью выявления аминокислотного остатка, ответственного за высокую скорость дезалкилирования зомана, было проведено компьютерное моделирование активного центра БХЭ 1, фосфорилированного этим ингибитором.⁴⁶ Путем сайт-направленного мутагенеза были получены мутанты G117H, E197Q и G117H/E197Q. Все мутанты были устойчивы к ингибированию зоманом, а последний фермент в соответствии с результатами компьютерного моделирования проявлял сразу две запрограммированные функции (синергизм): совмещал очень низкую скорость «старения», характерную для фосфорилированного мутанта E197Q, с высокой скоростью дефосфорилирования, как у мутанта G117H.⁴⁶

Авторы работы⁴⁶ пришли к заключению, что введение сразу двух аминокислотных остатков — His и Gln — в активный центр БХЭ 1 позволило превратить этот фермент в эстеразу, способную катализировать гидролиз такого сильного необратимого ингибитора, как зоман. Значения констант скорости ингибирования БХЭ 1 и ее мутантов зоманом

Таблица 1. Константы диссоциации (K_d) комплексов БХЭ 1 и ее мутантов G117H и G117K с фосфорорганическими ингибиторами и константы скорости ингибирования (k_i) этих ферментов.⁴⁵

Ингибитор	Фермент	Концентрация ингибитора, мкмоль · л ⁻¹	K_d , мкмоль · л ⁻¹	k_i , л · моль ⁻¹ · с ⁻¹
Зарин	БХЭ 1	0.05–0.13		22000 ± 400
	G117H	1.25–200	110 ± 10	2.7 (2.4–3.4)
	G117K	1.6–50	13 ± 2	3400 (800–3500)
VX	БХЭ 1	0.05–0.13		30400 ± 2800
	G117H	40–150	50 ± 9	25 (20–35)
	G117K	20–101	300 ± 100	50 (30–100)

Таблица 2. Сравнение констант скорости ингибирования БХЭ 1 и ее мутантов R_R, C_R -стереоизомером зомана.⁴⁶

Фермент	Концентрация зомана, мкмоль · л ⁻¹	k_i , л · мкмоль ⁻¹ · мин ⁻¹
БХЭ	0.04–0.2	6 ± 2
E197Q	1–10	0.35 ± 0.05
G117H	8–80	0.033 ± 0.004
G117H/E197Q	8–200	0.0021 ± 0.0002

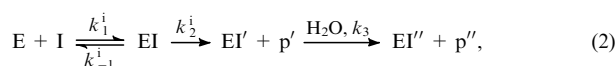
Примечание. Кинетические параметры для ферментов в растворах были определены с использованием методики Элмана при pH 7.5 и 25°C.

приведены в табл. 2. Как видно из приведенных в табл. 2 данных, значение константы скорости ингибирования мутанта G117H/E197Q зоманом в 3000 раз меньше, чем природной БХЭ 1.

Эстераза G117H/E197Q катализировала гидролиз зарина, VX и всех стереоизомеров зомана. Реакции фосфорилирования и дефосфорилирования были стереоспецифичны, причем лимитирующей стадией являлась стадия дефосфорилирования. Спонтанная реактивация (без применения оксимо) ингибированного заринном мутанта G117H/E197Q показала, что разрушение «анионной ямы» в каталитическом участке БХЭ 1 прямо влияет на «старение» фосфорилированного фермента и его ферментативную активность.

Холинэстеразы, полученные в работах^{45,46} сайт-направленным мутагенезом БХЭ 1, могут быть использованы в технологии уничтожения химического оружия наряду с органофосфатгидролазами.⁴⁷

Взаимодействие ФОИ с холинэстеразами можно представить в виде следующих превращений:



где I — фосфорорганический ингибитор, EI — нековалентный комплекс холинэстеразы–ингибитор, EI' — фосфорилированная холинэстераза, p' — уходящая группа, EI'' — фосфорилированная холинэстераза после старения, p'' — продукт реакции «старения», k_1^i , k_{-1}^i , и k_2^i — константы скорости промежуточных стадий ингибирования холинэстеразы, k_3 — константа скорости «старения» фосфорилированной холинэстеразы.¹⁴ Значение константы скорости ингибирования холинэстеразы (k_i) зависит от значений констант скоростей промежуточных стадий, приведенных в уравнении (2).

На рис. 4 представлен механизм взаимодействия ФОИ с холинэстеразой.¹⁴ Образование комплекса холинэстеразы–ингибитор (рис. 4,b) в результате атаки атомом кислорода гидроксильной группы Ser203 атома фосфора фосфорорганического ингибитора сопровождается конформационными изменениями в области активного центра холинэстеразы, приводящими к формированию переходного состояния тригонально-бипирамидальной структуры.¹⁴ Стадия образования фосфорилированного фермента представлена на рис. 4,c.

Теоретическим исследованиям взаимодействия ФОИ с холинэстеразами посвящена статья⁴⁸, в которой предложены новые методы моделирования такого взаимодействия.

Таким образом, основной вклад в необратимое ингибирование холинэстераз фосфорорганическими соединениями вносят следующие факторы: высокая скорость ингибиро-

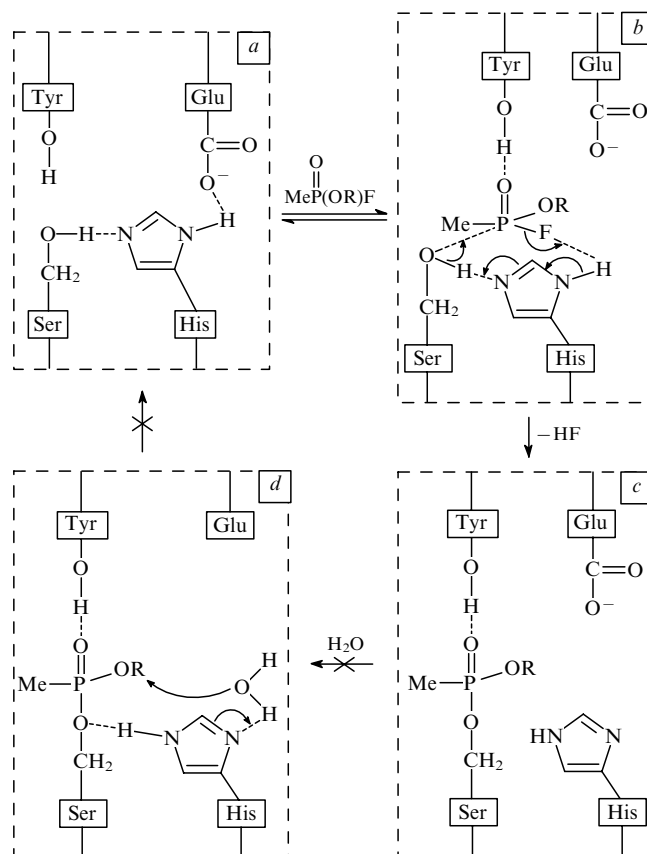
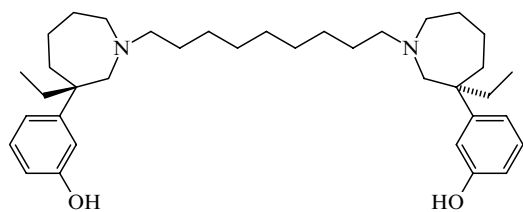


Рис. 4. Механизм взаимодействия ФОИ с холинэстеразой.¹⁴ *a* — функциональные группы, входящие в активный центр холинэстеразы; *b* — образование нековалентного комплекса фермент–ингибитор; *c* — образование фосфорилированного фермента; *d* — дефосфорилирование (не реализуется).

вания фермента, высокая скорость «старения» и низкая скорость дефосфорилирования фосфорилированного фермента.¹⁰

Необратимое ингибирование АХЭ новым классом ингибиторов — производными 6-метилурацила, аллоксанина и ксантина, содержащими *N*-ω-тетраалкиламмониевые группы в пиримидиновом кольце, — осуществляется по механизму, отличному от классического фосфорилирования. Ингибиторы этого класса лишены функций ацилирования. Было высказано предположение, что они взаимодействуют с остатками аминокислот, расположенными у входа в активный центр.⁴⁹ Эти ингибиторы характеризуются высокой активностью и селективностью по отношению к АХЭ млекопитающих. В работах^{49,50} приведены результаты исследования антихолинэстеразной активности таких ингибиторов. Из исследованных соединений наиболее высокой скоростью необратимого ингибирования АХЭ обладают соединения, содержащие две этильные группы и замещенный фенильный фрагмент в тетраалкиламмониевой группе при одном или обоих атомах азота пиримидинового кольца. Эти соединения ведут себя как типичные необратимые ингибиторы по отношению к АХЭ 2: значения констант скорости ингибирования составляют от $7.6 \cdot 10^8$ до $3.5 \cdot 10^9$ л · моль⁻¹ · мин⁻¹. В то же время они являются обратимыми ингибиторами БХЭ.

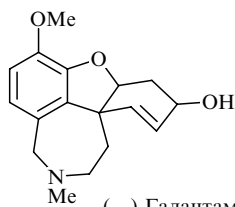
По иному механизму ингибирует АХЭ и производное бис-(–)-*nor*-мептазинола, в котором два мептазиновых фрагмента связаны нонаметиленовым спейсером.⁵¹



Производное бис-(—)-нор-мептазина

Это соединение ингибирует сразу два участка связывания лигандов в ферменте. Один мептазиновый фрагмент связывается с остатком His440 в «анионной яме», разрушая тем самым каталитическую триаду. Атом кислорода фенольного заместителя в мептазиноле образует водородную связь с остатком His440 (2.55 Å), который в нативном ферменте связан водородной связью с атомом кислорода остатка серина каталитической триады. Второй фрагмент мептазина связывается с Р-участком у входа в активный центр.⁵¹

Исследования кристаллической структуры комплекса галантамина с активным участком АХЭ 3 показали, что этот алкалоид также ингибирует АХЭ.⁵²



(—)-Галантамин

(—)-Галантамин взаимодействует с аминокислотным остатком Trp84 в участке связывания холина и с остатками Phe288, Phe290, располагающимися в ацильном кармане. Взаимодействие галантамина с аминокислотным остатком Trp84 осуществляется не с участием его третичной аминогруппы, а скорее, посредством стэкинг-взаимодействия двойной связи циклогексенового кольца с индольным циклом Trp84, а третичная аминогруппа участвует в образовании водородной связи (3.4 Å) с остатком Asp72. Гидроксильная группа галантамина связана сильной Н-связью (2.7 Å) с остатком Glu199.

IV. Активаторы взаимодействия ацетилхолинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами

Известен ряд аллостерических ингибиторов Р-участка ацетилхолинэстераз, активирующих взаимодействие лигандов с каталитическим участком активного центра АХЭ.^{11, 53–56} Участие индольной группы остатка триптофана Р-участка в связывании аллостерического ингибитора доказано с использованием бромида этидия (бромида 3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридина (BET)).^{57, 58} Последний обратимо ингибирует БХЭ ($K_d = 52$ мкмоль $\cdot$ л⁻¹). Бромид этидия обладает интенсивной флуоресценцией в красной области спектра, значительно отдаленной от области флуоресценции триптофана и других ароматических аминокислот, что позволяет использовать его в качестве флуоресцентного зонда.

Спектральные исследования бромида этидия в фосфатном буфере (рН 8) показали, что в присутствии БХЭ 2 в спектре этого соединения появляется новая интенсивная полоса поглощения ($\lambda_{\max} = 410$ нм) в более коротковолновой области спектра относительно полосы поглощения свобод-

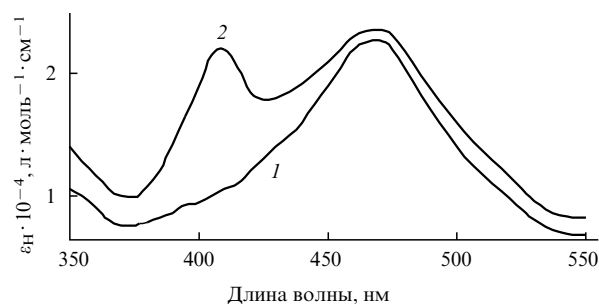


Рис. 5. Спектры поглощения бромида этидия (1) и его комплекса с БХЭ 2.⁵⁷

ε_H — коэффициент экстинкции. Концентрация BEt — 7.5 мкмоль $\cdot$ л⁻¹, активность фермента — 0.25 Е $\cdot$ мл⁻¹.

ного бромида этидия, которая находится в области 470 нм (рис. 5).⁵⁷

При возбуждении бромида этидия светом с длиной волны 470 нм в спектре флуоресценции появляется полоса в области 610 нм (рис. 6, спектр 1). В присутствии БХЭ 2 наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции BEt без смещения максимума (рис. 6, спектр 2). Например, относительный квантовый выход флуоресценции BEt в области 610 нм при добавлении БХЭ 2, активность которой составляла 0.36 Е $\cdot$ мл⁻¹, возрастал в 2.5 раза. Добавление к бромиду этидия бутирилхолинэстеразы с активностью 0.50 Е $\cdot$ мл⁻¹ приводило к появлению новой полосы флуоресценции в области 550 нм (рис. 6, спектр 3). Интенсивность новой полосы флуоресценции увеличивалась пропорционально увеличению активности фермента. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния АХЭ быка и пропионилхолинэстеразы ганглиев кальмара на флуоресценцию BEt. В то же время при добавлении к бромиду этидия АХЭ угря новая полоса флуоресценции не появлялась.⁵⁸

Новые полосы поглощения и флуоресценции были отнесены к комплексам БХЭ 2 с бромидом этидия, образующимся в результате связывания последнего с остатком триптофана. Увеличение интенсивности флуоресценции BEt на длине волны 610 нм в присутствии исследованных ферментов можно объяснить резонансным переносом энергии от возбужденного комплекса фермент – ингибитор на молекулу

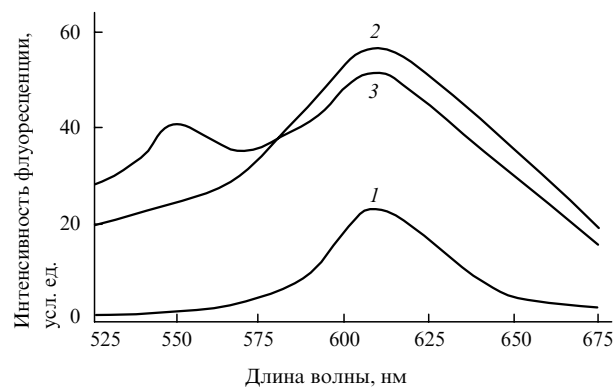


Рис. 6. Спектры флуоресценции BEt (1) и его комплекса с БХЭ 2 (2, 3).⁵⁷

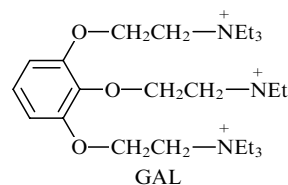
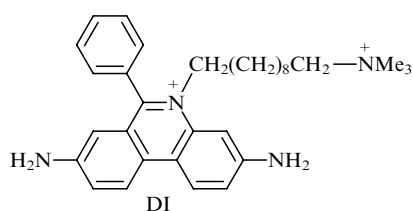
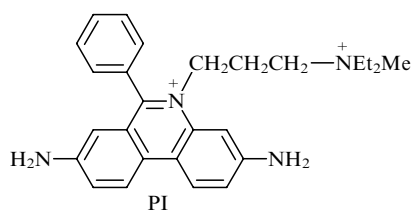
Активность БХЭ 2 равна 0.36 (2) и 0.50 Е $\cdot$ мл⁻¹ (3); концентрация BEt — 0.6 мкмоль $\cdot$ л⁻¹.

свободного ВЕт. В рассматриваемом случае соблюдаются основные условия, необходимые для реализации резонансного переноса энергии: значительная степень перекрытия спектра флуоресценции донора (комплекса фермента с ВЕт; см. рис. 6, спектр 3) со спектром поглощения акцептора (свободного ВЕт, $\lambda_{\text{max}} = 470$ нм, см. рис. 5, спектр 1); небольшое расстояние между донором и акцептором (меньше радиуса Ферстера (20–50 Å)), поскольку ВЕт является обратимым ингибитором рассматриваемых ферментов и система фермент–ингибитор находится в динамическом равновесии. Основанием для такого заключения являются структурные данные, полученные для обратимого ингибитора-флуорофора — такрина, близкого по структуре к бромиду этидия. Известно, что кратчайшее расстояние между такрином и индольным циклом триптофана в Р-участке активного центра АХЭ составляет менее 5 Å.^{59–61} Таким образом, результаты спектральных исследований позволяют сделать заключение о связывании бромидида этидия с индольным фрагментом триптофана Р-участка.

Роль Р-участка в активировании взаимодействия лигандов с каталитическим участком активного центра АХЭ обусловлена особенностями его структуры. Р-Участок фермента расположен около входа в активный центр фермента и представляет собой «карман» для связывания лигандов с катионной группой.⁶² Кинетическими исследованиями и методом компьютерного моделирования установлено, что лиганды, специфично взаимодействующие с остатком серина каталитической триады активного центра, сначала взаимодействуют с аминокислотными остатками Р-участка. На примере АХЭ 2 показано, что первым этапом в процессе ферментативного гидролиза субстрата АТХ является его связывание с остатком Asp74 Р-участка, несущим отрицательный заряд.⁶³ Некоторые аминокислотные остатки Р-участка связаны с поверхностными петлями полипептидной цепи, что обеспечивает их высокую конформационную гибкость (аллостерическая модуляция).

Исследованию механизма аллостерической модуляции каталитического участка в активном центре АХЭ при гидролизе субстрата и взаимодействии с ингибиторами посвящена работа¹¹.

Спектрофотометрические исследования и рентгеноструктурный анализ комплекса димера АХЭ 5 с пропидием (PI), децидием (DI) и галламином (GAL) — аллостерическими ингибиторами фермента — позволили уточнить структуру Р-участка АХЭ 5 и прилегающих фрагментов, вовлеченных в регулирование взаимодействия АХЭ с субстратами, ацилирующими остаток серина каталитической триады активного центра фермента.¹¹



Полициклические соединения DI и PI имеют спектры поглощения и флуоресценции в области, отличной от области поглощения белков. Эта особенность позволила не только проанализировать комплексы АХЭ 5 с DI и PI в растворах и оптимизировать заселение Р-участка в течение комплексообразования, но и выбрать те комплексы, которые показали самую высокую заселенность Р-участка.

Поскольку молекулы децидия и пропидия имеют близкое строение, кристаллические структуры их комплексов с АХЭ также имеют существенное сходство.¹¹ В комплексе DI с АХЭ 5 две одинаково ориентированные молекулы DI связаны с двумя Р-участками димерной молекулы АХЭ. Взаимодействие молекулы DI с аминокислотным остатком Trp286 Р-участка фермента осуществляется за счет π - π взаимодействия немного согнутого фенантридиниевого кольца DI с индольным кольцом Trp286, благодаря их почти параллельному расположению (фенантридиниевое кольцо находится на расстоянии 3.7 Å от индольного кольца Trp286). На картах электронной плотности комплекса DI с АХЭ 5 наблюдается делокализация электронов между индольным кольцом Trp286 и фенантридиниевым кольцом DI, что позволяет предположить образование комплекса с переносом заряда между электронодефицитным фенантридином и электрононасыщенным индолом остатка Trp286. Между атомом азота фенантридиниевого цикла и имидазольным заместителем His287 образуется водородная связь. Алкильная цепь, посредством которой катион триметиламмония связан с фенантридиниевым циклом, участвует в многочисленных ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с аминокислотными остатками Leu289 и Glu292 примыкающей цепи, внося существенный вклад этой области петли в связывание DI с Р-участком. Одна молекула растворителя и один хлорид-ион располагаются на расстоянии ~ 3.7 Å от двух бензольных колец фенантридиния напротив индольного кольца Trp286 (в отсутствие связанной молекулы DI хлорид-ион располагается выше индольного кольца Trp286). Их расположение позволяет объяснить, почему в условиях высокой ионной силы связывание лигандов Р-участком затруднено.

Из карты распределения электронной плотности комплекса PI с АХЭ 5 следует, что в области Р-участков размещаются две молекулы PI в разных конформациях, различающихся расположением фенильного и метилдиэтиламмонийалкильного заместителей. В одном конформере алкильная цепь располагается вдоль поверхности Р-участка АХЭ 5 и MeEt_2N^+ -группа взаимодействует с имидазольным кольцом остатка His287, тогда как фенильный заместитель ориентирован в направлении аминокислотных остатков Gly342 и Glu292 примыкающих цепей, которые формируют поверхностный гидрофобный карман.

В другом конформере MeEt_2N^+ -группа располагается между бензольным кольцом PI и функциональными группами аминокислотных остатков His287 и Ser293, при этом образуется петля, подобная наблюдаемой в комплексе АХЭ 5 с DI.

Из трех исследованных аллостерических ингибиторов наибольшее влияние на конформацию Р-участка фермента

оказывает галламин, структура которого существенно отличается от структур комплексов АХЭ с DI и PI.

Меньшее по размеру бензольное кольцо GAL (по сравнению с фенантридиниевым) занимает центральное положение у входа в активный центр фермента. Оно равно удалено от индольного кольца остатка Trp286, расположенного на одной стороне входа, и фенольного кольца остатка Tyr341 на другой стороне. Эти два аминокислотных остатка участвуют в ван-дер-ваальсовом взаимодействии с GAL. Кроме того, имеются дополнительные взаимодействия между молекулой GAL и остатками Tyr72 и Tyr124 прилегающих цепей.

Две из трех алкильных цепей (крайняя и средняя) в молекуле GAL разупорядочены, в то время как третья цепь (в направлении остатка His287) частично видна. Один из эфирных атомов кислорода галламина участвует в связывании иодид-иона. Иодид-ион расположен между этим атомом кислорода и атомом азота остатка Phe295, где в природном ферменте располагается молекула растворителя. Основываясь на электростатических вычислениях, можно предположить, что иодид-ион, присутствующий в активном центре АХЭ, будет корректировать функционирование фермента.¹¹

Закрепление молекулы GAL на Р-участке драматично влияет на стабильность верхних частей двух полипептидных петель — Val340–Gly342 и Asp74–Pro78, — расположенных у входа в активный центр. Низкая стабильность этих двух петель, по-видимому, связана с относительно большими колебаниями алкильных цепей GAL. Важно то, что прилегающие к этим петлям полипептидные цепи могут принимать различные конформации, что придает им гибкость. Это, вероятно, приводит к некоторому увеличению входа в активный центр и облегчает доступ в него лиганда. Такая уникальная структура комплекса АХЭ 5 с GAL отличает его от комплексов с DI и PI и от структуры природной АХЭ 5.

Сравнительный анализ строения АХЭ 5 и трех ее комплексов с лигандами DI, PI и GAL свидетельствует о существенной подвижности прилегающих к Р-участку полипептидных цепей, включающих остатки Tyr72, Leu76, Tyr337 и Tyr341, т.е. четырех ключевых аминокислотных остатков, которые очерчивают форму входа в активный центр. В частности, фенольное кольцо остатка Tyr337, расположенного поблизости от входа в активный центр, может отклоняться на расстояние до 2 Å. Этого движения достаточно, чтобы расширить вход в активный центр и облегчить доступ лиганда к остатку серина каталитической триады. Функциональные группы в остатках Leu76 и Gly79 в присутствии связанного GAL также подвижны и отклоняются на расстояния до 0.75 Å. Таким образом, совместные движения верхней части большой ω-петли Cys69–Cys96 и петли Val340–Gly342, в которую включен остаток Tyr341, могут значительно увеличить вход в активный центр.

Результаты исследования кристаллической структуры комплексов АХЭ 5 с DI, PI и GAL раскрывают механизм влияния аллостерических ингибиторов Р-участка фермента на скорость взаимодействия АХЭ с субстратами, ацилирующими остаток серина каталитической триады.

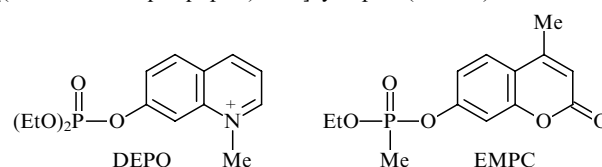
Приведенные данные согласуются с результатами исследований влияния аллостерических ингибиторов на конформационные изменения в Р-участке, полученными с помощью флуоресцентного зондирования.^{64–66}

С использованием акрилодана (флуоресцентной метки), селективно взаимодействующего с аминокислотными остатками Cys69–Cys96 ω-петли АХЭ 5 с ее внешней стороны, показано, что ассоциация обратимых лигандов с Р-участком вызывает конформационные изменения в этой петле, а именно, смещение ω-петли из гидрофобной области в более

гидрофильную.⁶⁴ Эти изменения приводят к изменению флуоресценции акрилодана, ковалентно связанного с Р-участком фермента.^{64–66} Конформационные изменения, вызванные взаимодействием ингибитора с активным центром и Р-участком фермента, свидетельствуют о гибкости ω-петли.⁶⁵ Более того, фосфорилирование остатка Ser каталитической триады вызывает особые изменения в спектре флуоресценции акрилодана, что может быть использовано для обнаружения фосфорорганических ингибиторов.

Таким образом, лиганд, связанный с Р-участком фермента, вызывает серьезные конформационные изменения в ω-петле фермента.^{64–66}

Ниже приведены примеры влияния аллостерических ингибиторов на скорость фосфорилирования остатка серина каталитической триады фосфорорганическими соединениями. В частности, установлено увеличение скорости взаимодействия АХЭ 2 с ФОС в присутствии аллостерического обратимого ингибитора PI.^{53, 54} В качестве ФОС были использованы флуорогенные соединения — иодид 1-метил-7-[(диэтоксифосфорил)окси]хинолина (DEPQ) и 4-метил-7-[(метилэтоксифосфорил)окси]кумарин (EMPC).



В табл. 3 приведены константы скорости фосфорилирования АХЭ 2 ингибиторами EMPC и DEPQ в отсутствие и в присутствии PI.⁵³ Из приведенных данных видно, что в присутствии PI значение константы скорости ингибирования АХЭ 2 нейтральным соединением EMPC увеличивается в 6 раз, а скорость ингибирования положительно заряженным соединением DEPQ незначительно снижается.

Предполагается, что увеличение скорости фосфорилирования остатка серина каталитического участка ацетилхолинэстеразы соединением EMPC вызвано молекулярным напряжением, обусловленным близостью расположения молекул PI и EMPC в тройном комплексе.⁵³ Отсутствие увеличения скорости ингибирования АХЭ 2 соединением DEPQ, молекула которого несет положительный заряд, авторы объясняют электростатическим отталкиванием молекул DEPQ и пропидия, также несущего положительный заряд.⁵³ Скромный эффект увеличения скорости ингибирования согласуется с предложенной стерической моделью блокады АХЭ.^{54, 67}

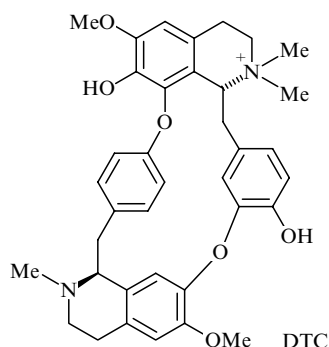
Более эффективное влияние на скорость взаимодействия АХЭ с ФОИ оказывают блокаторы холинорецепторов —

Таблица 3. Значения констант скорости ингибирования АХЭ 2 флуорогенными ингибиторами EMPC и DEPQ в присутствии и в отсутствие пропидия.⁵³

Ингибитор	k_1 , мин ⁻¹ (см. ³)	
	в отсутствие PI	в присутствии PI
EMPC	149 ± 9	900 ± 500
DEPQ	1600 ± 300	1100 ± 500

^a Константы скорости ингибирования определялись по скорости увеличения интенсивности флуоресценции реакционного раствора в результате выделения флуорофора — продукта расщепления ингибитора.

антагонисты ацетилхолина (далее по тексту активаторы) — в частности d-тубокурарин (DTC) и галламин.^{55, 56} Эти соединения являются обратимыми ингибиторами АХЭ, селективно связывающимися с Р-участком активного центра АХЭ.^{55, 56, 68}



Влияние ряда активаторов на скорость ингибирования АХЭ 5 параоксоном представлено на рис. 7.⁵⁶ Из приведенных данных следует, что наибольшее влияние на скорость ингибирования АХЭ 5 параоксоном оказывает d-тубокурарин. Скорость взаимодействия АХЭ 5 с параоксоном в присутствии d-тубокурарина и галламина возрастает в широком диапазоне концентраций активатора и достигает максимального значения при концентрации 1 ммоль · л⁻¹. В интервале концентраций активатора от 0.001 до 1 ммоль · л⁻¹ влияние d-тубокурарина и галламина выше, чем влияние атропина и пропидия.

В результате исследования влияния указанных выше активаторов на скорость ингибирования АХЭ 5 рядом ФОИ установлено, что скорость взаимодействия АХЭ 5 с нейтральными ФОИ возрастает, в то время как скорость взаимодействия с ФОИ, содержащими катионную группу (например, с *O*-алкил-*S*-2-(*N,N,N*-триметиламмонийэтил)-метилтиофосфонатами), уменьшается.^{55, 56}

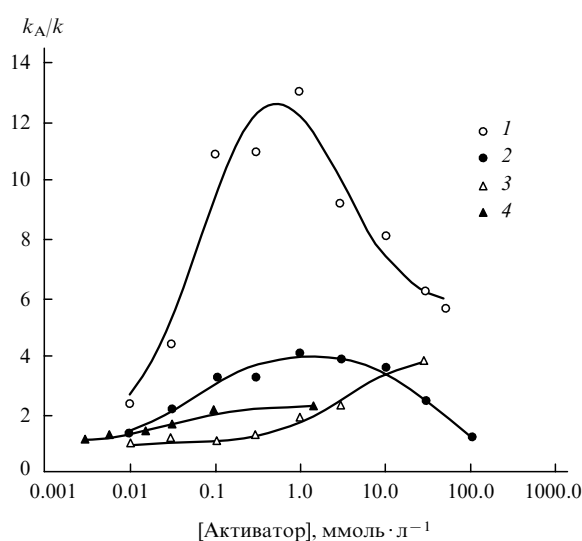


Рис. 7. Зависимость отношения констант скоростей ингибирования АХЭ 5 параоксоном в присутствии (k_A) и в отсутствие (k) активатора от концентрации активатора: d-тубокурарина (1), галламина (2), атропина (3) и пропидия (4).⁵⁶

Таблица 4. Пределы обнаружения ряда инсектицидов в присутствии и в отсутствие d-тубокурарина.⁶⁹

Наименование инсектицида	Предел обнаружения ФОИ, мг · мл ⁻¹	
	в присутствии DTC	в отсутствие DTC
Параоксон	$(2.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-10}$	$(1.1 \pm 0.6) \cdot 10^{-8}$
Дихлофос	$(4.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$	$(2.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$
Хлорофос	$(3.8 \pm 0.5) \cdot 10^{-7}$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$

Аналогичное увеличение скорости фосфорилирования АХЭ 2 в присутствии d-тубокурарина наблюдали авторы работы.⁶⁹ В табл. 4 приведены пределы обнаружения ряда ФОИ — диметил(2,2-дихлорвинил)фосфата (дихлофоса), (*n*-нитрофенил)диэтилфосфата (параоксона), диметил-(1-гидрокси-2,2,2-трихлорэтил)фосфоната (хлорофоса) — ферментативным методом в присутствии и в отсутствие d-тубокурарина. Из приведенных данных следует, что при проведении анализа в присутствии d-тубокурарина достигается снижение предела обнаружения ФОИ на два порядка. Результаты проведенных исследований позволяют сделать предварительное заключение об общем характере влияния d-тубокурарина на скорость необратимого ингибирования АХЭ 2 и АХЭ 5.

Для объяснения ускорения фосфорилирования АХЭ нейтральными ФОИ в присутствии активаторов предложена гипотеза, согласно которой связывание активатора с Р-участком ведет к изменению конформации каталитического участка АХЭ, что, в свою очередь, приводит к увеличению скорости фосфорилирования остатка Ser203.⁵⁶ Об изменении конформации, в частности, свидетельствует ориентация уходящей группы ФОИ, благоприятная для ее гидролиза. Таким образом, данная гипотеза предусматривает конформационное взаимодействие между Р-участком и каталитическим участком активного центра АХЭ 5.⁵⁶

Определенный вклад в ускорение фосфорилирования АХЭ 5 нейтральными ФОИ в присутствии активаторов, очевидно, вносит связывание последних с Р-участком, которое приводит к увеличению входа в активный центр и облегчает доступ лиганда к остатку серина каталитической триады.¹¹

Более эффективное влияние галламина, по сравнению с пропидием, на скорость взаимодействия АХЭ с ФОИ также можно объяснить большим влиянием GAL на конформацию Р-участка, а следовательно, и большей доступностью остатка Ser каталитической триады для лиганда.¹¹

Кинетическим исследованиям высокой эффективности влияния d-тубокурарина на необратимое ингибирование АХЭ 4 посвящены работы^{70, 71}. Согласно данным статьи⁷⁰, первым актом ферментативного гидролиза АХ является его взаимодействие с отрицательно заряженным остатком Asp413 Р-участка. Показано, что мутация фермента, в результате которой происходит смещение заряда от входа в активный центр, препятствует активации.⁷⁰ На рис. 8 представлена зависимость константы скорости гидролиза (k) ацетилхолина природной АХЭ 4 (а) и ее мутантом D413G/F414L (б) от концентрации АТХ в присутствии и в отсутствие DTC. Из приведенных данных видно, что как в отсутствие, так и в присутствии DTC скорость гидролиза субстрата мутантом значительно выше, чем природной АХЭ 4. Это противоречие авторы объясняют менее эффективным ингибированием фермента DTC благодаря более короткому времени нахождения субстрата в Р-участке фермента.⁷⁰

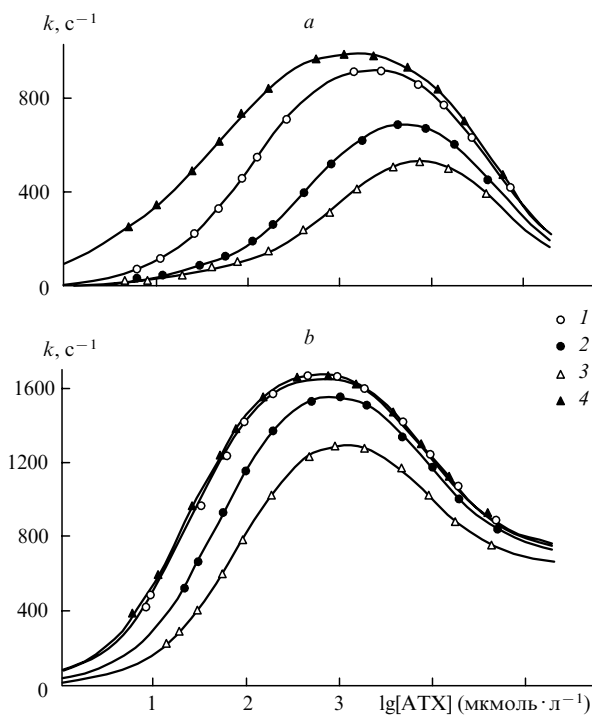


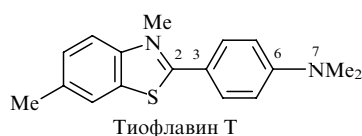
Рис. 8. Зависимость константы скорости гидролиза (k) ацетилтиохолина природной АХЭ 4 (а) и ее мутантом D413G/F414L (б) от концентрации АТХ в присутствии (кривые 1–3) и в отсутствие (кривая 4) d-тубокурарина.⁷⁰

Концентрация d-тубокурарина, $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$: а — 0 (4), 2 (1), 20 (2), 100 (3); б — 0 (4), 1 (2), 20 (2), 100 (3).

d-Тубокурарин в определенном интервале концентраций проявляет себя как активатор необратимого ингибирования метансульфонилирования мутанта АХЭ 4 небольшим по размеру метансульфонилфторидом, но не оказывает влияния на скорость метансульфонилирования природной АХЭ 5.⁷¹

На основании полученных результатов авторы пришли к заключению, что в определенных условиях DТС может проявлять себя как активатор ацилирования остатка Ser каталитической триады.⁷¹ Об ускорении ацилирования остатка Ser каталитической триады фермента при связывании аллостерического ингибитора (d-тубокурарина) с Р-участком фермента за счет конформационного взаимодействия между Р-участком и участком ацилирования свидетельствуют результаты работы.⁷²

На примере рекомбинантной АХЭ эритроцитов человека (АХЭ 6) с использованием в качестве флуорогенного зонда тиофлавина Т установлено увеличение интенсивности его флуоресценции в присутствии АХЭ более чем в 1000 раз на длине волны 490 нм при возбуждении светом с длиной волны 448 нм. Тиофлавин Т является аллостерическим флуорогеным ингибитором, который селективно связывается с Р-участком АХЭ 6 (значение константы диссоциации комплекса ингибитор–фермент составляет $0.89 \mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$).⁷¹



Тиофлавин Т относится к группе «молекулярных роторов».[§] Для молекулы тиофлавина Т характерно независимое вращение бензотиазольного и бензольного колец друг относительно друга вокруг оси, проходящей через атомы С(2), С(3), С(6) и N(7). Интенсивность флуоресценции молекулярных роторов зависит от полярности растворителя: с увеличением полярности растворителя интенсивность флуоресценции молекулярных роторов возрастает, что объясняется снижением их торсионной подвижности в средах с высокой полярностью в результате сольватации.⁷³ Это было подтверждено спектрами флуоресценции тиофлавина Т в присутствии различных растворителей.

Увеличение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при связывании с Р-участком активного центра АХЭ 6 можно объяснить замедлением вращения бензотиазольного и бензольного колец. В результате комплементарного соответствия функциональных групп тиофлавина Т функциональным группам аминокислотных остатков периферического участка АХЭ 6 молекула тиофлавина Т становится плоской, в ней возникает система сопряженных связей, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции. На рис. 9 представлена зависимость интенсивности флуоресценции тиофлавина Т от его концентрации при фиксированной активности АХЭ 6.⁷² Видно, что интенсивность флуоресценции тиофлавина Т возрастает по мере увеличения его концентрации до значения $10 \mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Последующее увеличение концентрации не приводит к росту интенсивности флуоресценции, что объясняется насыщением центров связывания аллостерических ингибиторов на Р-участке АХЭ 6.

Аналогичное увеличение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в присутствии АХЭ 2 и пропионилхолинэстеразы ганглиев кальмара наблюдали авторы работ^{74–77}.

При добавлении к комплексу АХЭ 6 с тиофлавином Т хлорида (3-гидроксифенил)диметиламмония (хлорида эдрофония, Ed) наблюдается снижение интенсивности флуоресценции комплекса. Установлено, что эдрофоний селективно связывается с каталитическим участком фермента с образованием тройного комплекса.⁷² На рис. 10 представлена зависимость интенсивности флуоресценции комплекса АХЭ 6 с тиофлавином Т от концентрации хлорида эдрофония.⁵⁶ Аналогичное снижение интенсивности флуоресценции комплекса пропионилхолинэстеразы ганглиев кальмара с тиофлавином Т происходит и в присутствии параоксона.⁷⁷

Снижение интенсивности флуоресценции комплексов АХЭ 6 и пропионилхолинэстеразы с тиофлавином Т в присутствии Ed и параоксона обусловлено, по-видимому, увеличением торсионной подвижности связанной молекулы тиофлавина Т, что можно объяснить изменением локальной конформации Р-участка.^{72, 77}

Изменением локальной конформации Р-участка фермента можно объяснить и результаты, полученные в ходе исследования взаимодействия тиофлавина Т с АХЭ 6, предварительно ингибированной фосфорорганическими инсектицидами — диэтил(3,5,6-трихлорпиридин-2-ил)фосфатом и дихлофосом. Так, например, интенсивность флуоресценции комплексов тиофлавина Т с предварительно ингибированной каждым из указанных инсектицидов (в концентрации $50 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) АХЭ 6 снижается более чем на 50% относи-

§ Соединения, относящиеся к группе «молекулярных роторов», способны при подаче энергии совершать однонаправленные вращательные движения.

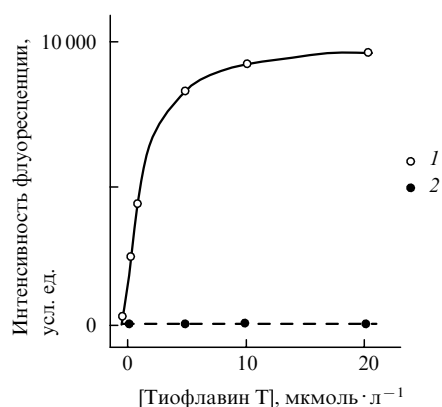


Рис. 9. Зависимость интенсивности флуоресценции тиофлавина Т от его концентрации при фиксированной концентрации АХЭ 6 ($0.87 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$).⁷²

1 — интенсивность флуоресценции тиофлавина Т в присутствии АХЭ, 2 — интенсивность флуоресценции свободного тиофлавина Т.

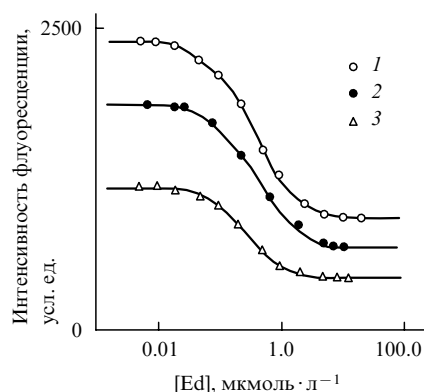


Рис. 10. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса АХЭ 6 с тиофлавином Т от концентрации хлорида эдрофония.⁷² Концентрация тиофлавина Т, $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$: 10 (1), 3 (2) и 1 (3).

тельно интенсивности флуоресценции комплекса тиофлавина Т с неингибированной АХЭ 6.⁷⁸ Это связано с тем, что фосфорилирование АХЭ 6 изменяет сродство тиофлавина Т к Р-участку и ведет к изменению значения K_d : введение $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})$ -группы в остаток Ser203 сопровождается возрастанием значения K_d , а введение $(\text{MeO})_2\text{P}(\text{O})$ -группы — снижением значения K_d . Результаты этих исследований позволяют сделать заключение, что эти два ингибитора не связываются с Р-участком, а наблюдаемый эффект их влияния на сродство тиофлавина Т к Р-участку можно объяснить фосфорилированием остатка Ser203.⁷⁸

Увеличение скорости фосфорилирования остатка Ser каталитической триады в присутствии активатора, обусловленное изменением конформации каталитического участка АХЭ 5 в результате связывания активатора с Р-участком фермента,⁵⁶ доказано с помощью рентгеноструктурного анализа комплекса тиофлавина Т с АХЭ 3.⁷⁹

На рис. 11 приведены карты электронной плотности комплекса тиофлавина Т с АХЭ 3 (рис. 11,а) и тройного комплекса тиофлавин Т–хлорид эдрофония–АХЭ 3 (рис. 11,б).⁷⁹

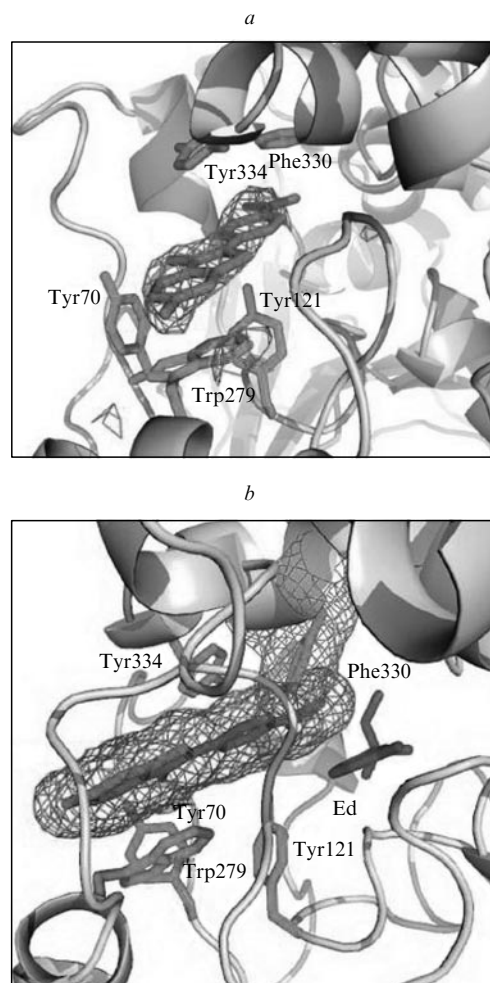


Рис. 11. Карты электронной плотности комплекса тиофлавина Т с АХЭ 3 (а) и тройного комплекса тиофлавин Т–хлорид эдрофония–АХЭ 3 (б).⁷⁹

Из рис. 11,а следует, что молекула тиофлавина Т плоская. Она располагается в пределах Р-участка фермента и участвует в стэкинг-взаимодействиях с ароматическими заместителями аминокислотных остатков активного центра. Установлено, что конфигурация аминокислотных остатков полипептидной цепи в активном центре комплекса тиофлавина Т с АХЭ 3 соответствует их конфигурации в свободной АХЭ 3. Молекула тиофлавина Т занимает пространство в пределах активного центра, которое ранее было занято четырьмя молекулами воды. Бензотиазольное кольцо тиофлавина Т располагается напротив остатка Trp279, а диметиламинофенильное кольцо практически параллельно фенильной группе Phe330 и располагается от него на расстоянии $3.5 \text{ \AA}$. Диметиламинофенильное кольцо тиофлавина Т взаимодействует также с остатком Tyr121, находящимся на расстоянии $3.2 \text{ \AA}$ от него, а бензотиазольное кольцо — с остатками Tyr70 и Tyr334, находящимися от него на расстояниях 3.4 и $3.7 \text{ \AA}$ соответственно. Именно планарность тиофлавина Т обеспечивает столь высокую интенсивность флуоресценции его комплекса с АХЭ 3.

На рис. 11,б представлена карта электронной плотности в тройном комплексе тиофлавин Т–хлорид эдрофония–АХЭ 3. Если конформация участка полипептидной цепи фермента, в которую включен остаток Phe330, в комплексе тиофлавин Т–АХЭ 3 аналогична конформации этого

участка в природной АХЭ 3, и заместитель Phe330 располагается параллельно диметиламинофенильной группе тиофлавина, то в структуре тройного комплекса тиофлавина Т–хлорид эдрофония–АХЭ 3 бензольное кольцо в остатке Phe330 повернуто примерно на 115° от его позиции в природном ферменте. Из рис. 11, *b* видно, что если бы остаток Phe330 в тройном комплексе имел конформацию, как в свободном ферменте, то это приводило бы к столкновению бензольного кольца Phe330 с ближайшим кольцом тиофлавина Т, при условии, что последний занимает ту же позицию, что и в комплексе тиофлавина Т–АХЭ 3. Поэтому бензольное кольцо остатка Phe330 в тройном комплексе развернуто. Это приводит к нарушению планарности ароматических колец в тиофлавине Т в составе тройного комплекса и к частичному тушению флуоресценции тиофлавина Т. Следовательно, ключевую роль в тушении флуоресценции комплекса тиофлавина Т–АХЭ 3 в присутствии хлорида эдрофония, связывающегося с каталитическим участком фермента, играет остаток Phe330, вовлеченный во взаимодействие с тиофлавином Т.⁷⁹

Приведенные рентгеноструктурные исследования⁷⁹ подтверждают гипотезу о конформационном взаимодействии Р-участка и каталитического участка АХЭ в присутствии аллостерического ингибитора Р-участка.

* * *

Результаты исследований влияния блокаторов холинорецепторов — антагонистов ацетилхолина — на скорость фосфорилирования АХЭ необратимыми ингибиторами имеют концептуальное и прикладное значение. В концептуальном плане — это уточнение структуры активного центра АХЭ, установление конформационного взаимодействия периферийного и каталитического участков активного центра АХЭ и механизма влияния активаторов фосфорилирования остатка Ser каталитической триады на селективность и скорость взаимодействия АХЭ с ингибиторами. Прикладное значение — перспектива разработки более чувствительных способов и технических средств, предназначенных для мониторинга объектов окружающей среды на содержание фосфорорганических токсикантов.

Литература

1. O.Loewi, E.Navratil, E.Pflugers. *Arch. Ges. Physiol.*, **214**, 689 (1926)
2. *Chem. Biol. Interact. (Proceedings of the IX International Meeting on Cholinesterases)*, **175** (1–3) (2008)
3. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. Гаага, Нидерланды, 1994
4. К.В.Кондратьев, Д.К.Яваева, Э.Т.Гайнуллина. В кн. *Четвертая научно-практическая конференция «Научно-технические аспекты обеспечения безопасности при уничтожении, хранении и транспортировке химического оружия».* (Сборник материалов). Москва, 2008. С. 66
5. *Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the Commission on Biochemical Nomenclature of the Nomenclature and Classification of Enzymes.* Elsevier, Amsterdam, 1973
6. H.Thiermann, L.Szinicz, P.Eyer, T.Zilker, F.Worek. *Chem. Biol. Interact.*, **157–158**, 345 (2005)
7. L.Szinicz, F.Worek, H.Thiermann, K.Kehe, S.Eckert, P.Eyer. *Toxicology*, **233**, 23 (2007)
8. С.Д.Варфоломеев, И.А.Гариев, И.А.Упоров. *Успехи химии*, **74**, 67 (2005)
9. S.N.Moralev, E.V.Rozengart. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **40**, 1 (2004)
10. A.Hörnberg, A.-K.Tunemalm, F.Ekström. *Biochemistry*, **46**, 4815 (2007)
11. Y.Bourne, P.Taylor, Z.Radić, P.Marchot. *EMBO J.*, **22**, 1 (2003)
12. G.Johnson, S.W.Moore. *Curr. Pharm. Des.*, **12**, 217 (2006)
13. H.Soreq, S.Seidman. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 294 (2001)
14. Н.А.Лошадкин, Б.А.Курляндский, Г.В.Беженарь, Л.В.Дарьина. В кн. *Военная токсикология.* (Под ред. Б.А.Курляндского). Медицина, Москва, 2006. С. 69
15. C.Viragh, T.K.Harris, M.A.Massiah, A.S.Mildvan, I.M.Kovach. *Biochemistry*, **39**, 16200 (2000)
16. M.A.Massiah, C.Viragh, P.M.Reddy, I.M.Kovach, J.Johnson, T.L.Rosenberry, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **40**, 5682 (2001)
17. C.Viragh, R.Akhmetshin, I.M.Kovach, C.Broomfield. *Biochemistry*, **36**, 8243 (1997)
18. Е.В.Розенгарт, Н.Е.Басова. *Докл. АН*, **426**, 122 (2009)
19. A.Shafferman, D.Barak, D.Kaplan, A.Ordentlich, C.Kronman, B.Velan. *Chem. Biol. Interact.*, **157**, 123 (2005)
20. M.Harel, I.Schalk, L.Ehret-Sabatier, F.Bouet, M.Goeldner, C.Hirth, P.H.Axelsen, I.I.Silman, J.L.Sussman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9031 (1993)
21. C.Weise, H.J.Kreienkamp, R.Raba, A.Pedak, A.Aaviksaar, F.Hucho. *EMB J.*, **9**, 3885 (1990)
22. L.Ehret-Sabatier, I.Schalk, M.Goeldner, C.Hirth. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 475 (1992)
23. Д.О.Веткин, Э.Т.Гайнуллина, В.А.Караваяев, Р.Н.Нурмухаметов, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко. *Изв. АН. Сер. биол.*, 157 (2004)
24. G.Koellner, G.Kryger, C.D.Millard, I.Silman, J.L.Sussman, T.Steiner. *J. Mol. Biol.*, **296**, 713 (2000)
25. T.Shen, K.Tai, R.H.Henchman, J.A.McCammon. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 332 (2002)
26. R.H.Henchman, K.Tai, T.Shen, J.A.McCammon. *Biophys. J.*, **82**, 2671 (2002)
27. R.H.Henchman, J.A.McCammon. *Protein Sci.*, **11**, 2080 (2002)
28. K.Tai. *Pure Appl. Chem.*, **76**, 295 (2004)
29. K.Tai, T.Shen, U.Börjesson, M.Philippopoulos, J.A.McCammon. *Biophys. J.*, **81**, 715 (2001)
30. J.L.Johnson, J.L.Thomas, S.Emani, B.Cusack, T.L.Rosenberry. *Chem. Biol. Interact.*, **157–158**, 384 (2005)
31. T.L.Rosenberry, L.K.Sonoda, S.E.Dekat, B.Cusack, J.L.Johnson. *Chem. Biol. Interact.*, **175**, 235 (2008)
32. T.L.Rosenberry, J.L.Johnson, B.Cusack, J.L.Thomas, S.Emani, K.S.Venkatasubban. *Chem. Biol. Interact.*, **157–158**, 181 (2005)
33. L.Brochier, Y.Pontié, M.Willson, S.Estrada-Mondaca, J.Czaplicki, A.Klaébé, D.Fournier. *J. Biol. Chem.*, **276**, 18296 (2001)
34. F.Ekström, C.Akfur, A.K.Tunemalm, S.Lundberg. *Biochemistry*, **45**, 74 (2006)
35. F.Ekström, Y.Pang, M.Boman, E.Artursson, C.Akfur, S.Börjegen. *Biochem. Pharmacol.*, **72**, 597 (2006)
36. F.Worek, H.Thiermann, L.Szinicz, P.Eyer. *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 2237 (2004)
37. F.Worek, G.Reiter, P.Eyer, L.Szinicz. *Arch. Toxicol.*, **76**, 523 (2002)
38. Z.Kovarik, Z.Radić, H.A.Berman, V.Simeon-Rudolf, E.Reiner, P.Taylor. *Biochemistry*, **43**, 3222 (2004)
39. P.Taylor, L.Wong, Z.Radić, I.Tsigelny, R.Bruggemann, N.A.Hosea, H.A.Berman. *Chem. Biol. Interact.*, **119–120**, 3 (1999)
40. Z.Kovarik, Z.Radić, H.A.Berman, V.Simeon-Rudolf, E.Reiner, P.Taylor. *Biochem. J.*, **373**, 3340 (2003)
41. A.Ordentlich, D.Barak, G.Sod-Moriah, D.Kaplan, D.Mizrahi, Y.Segall, C.Kronman, Y.Karton, A.Lazar, D.Marcus, B.Velan, A.Shafferman. *Biochemistry*, **43**, 11255 (2004)
42. A.Ordentlich, D.Barak, C.Kronman, H.P.Benschop, L.P.De Jong, N.Ariel, R.Barak, Y.Segall, B.Velan, A.Shafferman. *Biochemistry*, **38**, 3055 (1999)

43. L.Wong, Z.Radić, R.J.Bruggemann, N.Hosea, H.A.Berman, P.Taylor. *Biochemistry*, **39**, 5750 (2000)
44. C.Viragh, I.M.Kovach, L.Pannell. *Biochemistry*, **38**, 9557 (1999)
45. C.B.Millard, O.Lockridge, C.A.Broomfield. *Biochemistry*, **34**, 15925 (1995)
46. C.B.Millard, O.Lockridge, C.A.Broomfield. *Biochemistry*, **37**, 237 (1998)
47. Е.Н.Ефременко, И.В.Лягин, В.В.Завьялов, С.Д.Варфоломеев, Н.В.Завьялова, В.И.Холстов. *Рос. хим. журн.*, **51**(2), 24 (2007)
48. M.M.Hurley, A.Balboa, G.H.Lushington, J.Guo. *Chem. Biol. Interact.*, **157–158**, 321 (2005)
49. K.A.Anikienko, E.A.Bychikhin, V.S.Reznik, I.V.Galyametdinova. *Chem. Biol. Interact.*, **175**, 286 (2008)
50. В.В.Зобов, К.А.Петров, В.Э.Семенов, Р.Х.Гиниятуллин, А.Е.Николаев, В.Д.Акасин, И.В.Галяметдинова, А.А.Нафикова, И.Е.Исмаев, В.Е.Катаев, Ш.К.Латыпов, В.С.Резник. *Современные проблемы токсикологии (Киев)*, (2), 13 (2006)
51. A.Paz, Q.Xie, H.M.Greenblatt, W.Fu, Y.Tang, I.Silman, Z.Qiu, J.L.Sussman. *J. Med. Chem.*, **52**, 2543 (2009)
52. H.M.Greenblatt, G.Kryger, T.Lewis, I.Silman, J.L.Sussman. *FEBS Lett.*, **463**, 321 (1999)
53. W.D.Mallender, T.Szegletes, T.L.Rosenberry. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8491 (1999)
54. T.Szegletes, W.D.Mallender, T.L.Rosenberry. *Biochemistry*, **37**, 4206 (1998)
55. G.Petroianu, C.Roth, U.Beha, J.Fesher, W.Bergler, R.Rüfer. *J. Appl. Toxicol.*, **21**, 13 (2001)
56. Z.Radić, P.Taylor. *Chem. Biol. Interact.*, **119–120**, 111 (1999)
57. Д.О.Веткин, Д.Н.Власкин, Э.Т.Гайнуллина, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко. *Биофизика*, **50**, 793 (2005)
58. Э.Т.Гайнуллина, В.А.Караваев, О.В.Клюстер, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко. *Изв. АН. Сер. биол.*, 292 (2006)
59. P.Wu, L.Brand. *Anal. Biochem.*, **218**, 1 (1994)
60. P.R.Selvin. *Methods Enzymol.*, **246**, 300 (1995)
61. B.Valeur. In *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002. P. 402
62. J.L.Johnson, B.Cusack, T.F.Hughes, E.H.McCullough, A.P.Romanovskis, A.F.Spatola, T.L.Rosenberry. *Biol. Chem.*, **278**, 38948 (2003)
63. W.D.Mallender, T.Szegletes, T.L.Rosenberry. *Biochemistry*, **39**, 7753 (2000)
64. J.Shi, A.E.Boyd, Z.Radić, P.Taylor. *J. Biol. Chem.*, **278**, 38948 (2003)
65. J.Shi, Z.Radić, P.Taylor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43301 (2002)
66. J.Shi, A.E.Boyd, Z.Radić, P.Taylor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 42196 (2001)
67. T.L.Rosenberry, W.D.Mallender, P.J.Thomas, T.Szegletes. *Chem. Biol. Interact.*, **119–120**, 85 (1999)
68. Э.Т.Гайнуллина, А.М.Антохин, К.В.Кондратьев, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко. *Рос. хим. журн.*, **51**(2), 131 (2007)
69. А.М.Антохин, Э.Т.Гайнуллина, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко, Д.К.Яваева. В кн. *3-й Съезд токсикологов России. (Тез. докл.)*. Москва, 2008. С. 43
70. M.Goličnik, D.Fournier, J.Stojan. *Biochemistry*, **40**, 1214 (2001)
71. M.Goličnik, D.Fournier, J.Stojan. *Chem. Biol. Interact.*, **139**, 145 (2002)
72. G.V.De Ferrari, W.D.Mallender, N.C.Inestrosa, T.L.Rosenberry. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23282 (2001)
73. A.A.Maskevich, V.I.Stsiapura, V.A.Kuzmitsky, I.M.Kuznetsova, O.I.Povarova, V.N.Uversky, K.K.Turoverov. *J. Proteome Res.*, 1392 (2007)
74. А.М.Антохин, Э.Т.Гайнуллина, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко, Д.К.Яваева. *Бюл. эксперим. биол.*, **147**, 119 (2009)
75. А.М.Антохин, Э.Т.Гайнуллина, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко, Д.К.Яваева. В кн. *3-й Съезд токсикологов России. (Тез. докл.)*. Москва, 2008. С. 41
76. А.М.Антохин, Э.Т.Гайнуллина, С.Б.Рыжиков, В.Ф.Таранченко, Д.К.Яваева. В кн. *Труды Международной конференции по химии «Основные тенденции развития химии в начале XXI века»*. Санкт-Петербург, 2009. С. 211
77. А.М.Антохин, Э.Т.Гайнуллина, В.Ф.Таранченко, Д.К.Яваева. В кн. *Четвертая научно-практическая конференция «Научно-технические аспекты обеспечения безопасности при уничтожении, хранении и транспортировке химического оружия»*. (Сборник материалов). Москва, 2008. С. 207
78. L.G.Sultatos, R.Kaushik. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **230**, 390 (2008)
79. M.Harel, L.K.Sonoda, I.Silman, J.L.Sussman, T.L.Rosenberry. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7856 (2008)

CHOLINE ESTERASES: STRUCTURE OF THE ACTIVE SITE AND MECHANISM OF THE EFFECT OF CHOLINERGIC RECEPTOR BLOCKERS ON THE RATE OF REACTIONS WITH LIGANDS

A.M.Antokhin, E.T.Gainullina, V.F.Taranchenko, S.B.Ryzhikov, D.K.Yavaeva

Federal State Agency «27 Scientific Centre of Ministry of Defence of the Russian Federation»

13, Brigadirskii pereulok, 105005 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)267–5107

Department of Physics, M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)939–1489

The modern views on the structure of choline esterase active site and the mechanism of their interaction with organophosphorus inhibitors are considered. The attention is focused on the mechanism of the effect of cholinergic receptor blockers, acetylcholine antagonists, on the rate of reactions of acetylcholine esterase with organophosphorus inhibitors.

Bibliography — 79 references.

Received 14th December 2009