

USPOREDBA BIOKEMIJSKIH SVOJSTAVA
KOLINESTERAZA

V E R A S I M E O N

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb
(Primljeno 24. III 1972)*

Prikazana su neka karakteristična biokemijska svojstva acetilkolinesteraze (EC 3.1.1.7) i kolinesteraze (EC 3.1.1.8), kao što su specifičnost prema supstratima, molekulska svojstva, te kinetičko ponašanje prema inhibitorima. Za neka svojstva dani su i broježani podaci, kako bi se usporedba tih enzima mogla provesti i na temelju kvantitativnih podataka.

Kolinesterazama naziva se skupina enzima koji hidroliziraju kolinske estere brže nego druge estere karboksilnih kiselina. Podjela enzima na skupine vrši se prema specifičnosti pojedinih enzima za neki supstrat. Svaki enzim hidrolizira više supstrata, ali se u određivanju specifičnosti tih supstrata uzima u obzir brzina kojom se oni hidroliziraju kao i oblik krivulje zavisnosti aktivnosti o koncentraciji supstrata (pS-krivulja). Upotrebom tih kriterija razlikuju se dva tipa kolinesteraza: acetilkolinesteraza i kolinestraza. Acetilkolinesteraza se prema preporuci Komisije za enzime Međunarodne unije za biokemiju (1) naziva sistematskim imenom acetilkolin-acetilhidrolaza (EC 3.1.1.7), a kolinesteraza acilkolin-acilhidrolaza (EC 3.1.1.8). Svojstva tih dvaju enzima opisana su u mnogim originalnim radovima i nizu preglednih članaka i monografija (2-10). U ovom prikazu bit će pokazana, osim raznolikosti u specifičnosti prema supstratima različitih preparata tih dvaju enzima, također i neka druga svojstva, kao što su molekulska građa, građa aktivnog mjesta, te kinetičko ponašanje tih dviju skupina enzima. Neka karakteristična svojstva tih enzima dana su i brožčano, kako bi se usporedba tih enzima mogla provesti i na temelju kvantitativnih podataka.

SPECIFIČNOST KOLINESTERAZA PREMA
SUPSTRATIMA

Acetilkolinesteraza se nalazi u tkivu centralnog nervnog sistema, simpatičkim ganglijima, motornim pločicama, u stromi eritrocita, u elek-

tričnim organima riba i u otrovu nekih zmija. Kolinesteraza se nalazi u krvnoj plazmi ljudi i viših kralježnjaka, a zatim u organima kao što su jetra, gušterača, srce i mišići. U nekim organima nalazi se smjesa acetilkolinesteraze i kolinesteraze. Tipični predstavnici tih dvaju enzima nalaze se u eritrocitima odnosno serumu sisavaca, pa se često ta dva enzima i nazivaju eritrocitna i serumska kolinesteraza.

Acetilkolinesteraza jest enzim koji najbrže hidrolizira svoj prirodni supstrat – acetilkolin. Kolinesteraza također hidrolizira acetilkolin, ali većina preparata kolinesteraze brže hidrolizira butirilkolin ili propionilkolin.

Brzina kojom enzim hidrolizira neki supstrat izražena je dvjema kinetičkim veličinama: Michaelisovom konstantom K_m i aktivnošću katalitičkog centra. Aktivnost katalitičkog centra jest broj molekula hidroliziranog supstrata u minuti po jednom katalitičkom centru (CCA = catalytic centre activity). Dobri supstrati imaju malu Michaelisovu konstantu i veliku aktivnost katalitičkog centra. Vrijednosti Michaelisove konstante K_m za različite preparate enzima i acetilkolina dane su u tablici 1.

Vrijednosti K_m za acetilkolinesterazu kreću se od 0.056–0.79 mM, a za kolinesterazu od 0.1–3.2 mM. Vrijednosti konstante K_m za te dvije skupine enzima se dakle preklapaju, ali ipak konstanta K_m za kolinesterazu je najčešće veća nego za acetilkolinesterazu, iz čega slijedi zaključak da je afinitet kolinesteraze ipak nešto manji za acetilkolin nego što je afinitet acetilkolinesteraze za isti supstrat.

Najčešće se reakcija enzima sa supstratima odvija po Michaelisovoj jednadžbi, tj. s porastom koncentracije supstrata raste i aktivnost enzima do neke maksimalne brzine. Ipak, nekim enzimima aktivnost pada kada se prijede određena koncentracija supstrata, jer se enzim inhibira velikom koncentracijom supstrata, pa odnos aktivnosti prema koncentraciji supstrata daje krivulju zvonolikog oblika. Smatra se da inhibicija sa supstratom nastupa kada su na enzim vezane dvije molekule supstrata, i takav kompleks definiran je konstantom disocijacije K_{ss} .

Podjela kolinesteraza na dva tipa načinjena je s obzirom na brzinu hidrolize acetilkolina i na oblik pS-krivulje za acetilkolin. Acetilkolinesteraza iz velikog broja preparata životinjskih vrsta brže hidrolizira acetilkolin nego serumske kolinesteraze i daje zvonoliki oblik pS-krivulje za acetilkolin, dok serumska kolinesteraza daje sigmoidni oblik pS-krivulje. Serumska kolinesteraza u najvećem broju preparata brže hidrolizira butirilkolin nego acetilkolin (2, 8).

Za razlikovanje ovih dviju skupina enzima koristi se i specifičnost prema drugim supstratima. Tako je acetyl- β -metilkolin specifičan supstrat za acetilkolinesterazu, a benzoilkolin za serumske kolinesteraze. Oblik pS-krivulje za acetilkolin, aktivnost prema acetyl- β -metilkolinu i benzoilkolinu kao osnova za podjelu na dvije skupine enzima vrijedi samo za tipične predstavnike kolinesteraza, tj. za enzime iz eritrocita i seruma viših životinjskih vrsta.

Tablica 1.
Michaelisove konstante K_m i konstante inhibicije sa supstratom K_{ss} za različite preparate kolinesteraza i acetilkolin

Preparat	K_m (mM)	K_{ss} (mM)	pH, pufer	t °C	Referenca
<i>Acetilkinesteraza</i>					
Ljudski eritr.	0.34	12	0 0.5 M NaCl	15-37.5	(15)
Ljudski eritr.	0.05-0.5	11-22	0.025 M NaHCO ₃ 0-0.5 M NaCl	37.5	(16)
Ljudski eritr.	0.21	15	0.15M Na ⁺ , K ⁺	37	(17)
Ljudski eritr.	0.64	35	7.7; 0.1M NaCl	10-40	(18)
Govedi eritr.	0.63	18	7.4; Ringer	37	(2)
Govedi eritr.	0.056	11	7.4; Na-barbital	25 i 37	(19)
Govedi eritr.	0.79	12	7.4; 0.5M fosf. puf.	25	(20)
Govedi eritr.	0.15	21	7.4; 0.15M NaCl	25	(21)
Elektr. organ jeguļje	0.094	30	7.0; 0.1M NaCl	15-30	(22)
Mozak psa	0.3	50	7.4; Ringer	37	(2)
Mozak muhe	0.63	80	7.4; Ringer	25	(23)
Mozak goveda	0.55		7.5; Ringer	37	(24)
<i>Kolinesteraza</i>					
Ljudski serum	1.2	—	7.4; Ringer	15-37.5	(15)
Ljudski serum	1.2	—	7.5; Veronal	25	(25)
Konjski serum	3.2	—	7.4; Ringer	37	(2)
Konjski serum	1.2	—	7.5; Veronal	25	(25)
Konjski serum	1.2	—	8.0; 0.08M NaCl	10-25	(26)
Konjski serum	2.0	—	7.5; 0.1M KCl	25	(14)
Serum psa	0.55	—	7.5; Veronal	25	(25)
Serum morskog psa	0.1	50	7.4; Ringer	25	(2)
Žlijezde slinovnice	1.22	—	7.4; Ringer	37	(27)

Serum morskog psa hidrolizira acetilkolin i acetyl- β -metilkolin, a pS-krivulja je zvonolika (2). Također, serumska kolinesteraza ptica hidrolizira i acetyl- β -metilkolin (8). Kolinesteraza izolirana iz ganglija optičkog puta lignje ponaša se kao acetilkolinesteraza: pS-krivulja za acetilkolin zvonolika je, hidrolizira acetyl- β -metilkolin, ali također i butirilkolin gotovo jednakom brzinom kao i acetilkolin, a autori isključuju mogućnost smjese dviju kolinesteraza (11). Slično se ponaša acetilkolinesteraza izolirana iz mišića ribe list (12).

Benzoilkolin se smatra specifičnim supstratom za kolinesterazu. Neki autori govore čak o benzoilkolinesterazi (13). Ipak, i tu ima izuzetaka. Kolinesteraza seruma svinje i neka tkiva preživača ne hidroliziraju benzoilkolin (8). Benzoilkolin je prikladan za određivanje kolinesteraze u nepročišćenim preparatima, jer ga ali-esteraze ne hidroliziraju (8).

Iako se butirilkolin smatra specifičnim supstratom za serumsku kolinesterazu, ipak ga većina preparata acetilkolinesteraze u znatnoj mjeri hidrolizira (8).

Zvonoliki oblik pS-krivulje za acetilkolinesterazu i sigmoidni oblik za kolinesterazu karakterističan je za te dvije skupine enzima samo ako se uzme acetilkolin kao supstrat. Za druge supstrate pS-krivulje su drugačijeg oblika. Tako je za acetilkolinesterazu i supstrate triacetin i 3-acetoksifeniltrimetil-amonium – pS-krivulja sigmoidnog oblika, a za kolinesterazu i benzoilkolin i acetylsalicilolin odnos aktivnosti prema koncentraciji supstrata zvonolika je krivulja (2, 8).

Acetilkolinesteraza govedih eritrocita i kolinesteraza konjskoga seruma daju s fenilacetatom kao supstratom slične sigmoidne pS-krivulje, pa ih podjela po tome supstratu ne bi razlikovala (14).

Kolinesteraze pokazuju također i stereospecifičnost. Tako acetilkolinesteraza hidrolizira samo d-oblik acetyl- β -metilkolina. Acetilkolinesteraza jače hidrolizira l-oblik estera bademove kiseline, a kolinesteraza d-oblik (8).

Ako se uzme brzina hidrolize i kinetičko ponašanje prema acetilkolinu, te specifičnost prema nekim drugim supstratima, kao temelj podjele kolinesteraza, onda podjela na acetilkolinesterazu i kolinesterazu vrijedi samo za više životinjske vrste. U nižih životinjskih vrsta svojstva enzimskih preparata kolinesteraza su mješovita, pa je katkad teško odlučiti u koju skupinu kolinesteraza taj preparat spada.

MOLEKULARNA SVOJSTVA KOLINESTERAZA

Posljednjih godina mnogi se autori bave čišćenjem različitih preparata kolinesteraza s ciljem da se taj enzim dobije u što čistijem stanju. Na taj će se način moći bolje upoznati molekularna svojstva tih enzima i na temelju njih utvrditi sličnosti i razlike tih dvaju enzima.

Glavni problem koji se javlja pri čišćenju kolinesteraza jest netopljivost acetilkolinesteraze iz većine izvora, osjetljivost serumske kolinesteraze na denaturaciju organskim otapalima i visoka molekulska težina tih enzima (13). U tablici 2 dane su molekulske težine i specifične aktivnosti nekih preparata kolinesteraza. Većina autora smatra da su kolinesteraze višestruki polimeri različitih molekulskih težina i da ti polimeri nastaju agregacijom jednostavnijih polipeptidnih podjedinica (28–32). Agregacija podjedinica je reversibilna i ovisi o pH i ionskoj jakosti (13), pa su vjerojatno stoga nađene različite molekulske težine podjedinica. Za acetilkolinesterazu određena je molekulska težina podjedinica

Tablica 2.
Molekulske težine i specifične aktivnosti različitih preparata kolinesteraza

Enzimski preparat	Molekulska težina	Specifična aktivnost*	Reference
<i>Acetilkolinesteraza</i>			
Električni organ jegulje	260 000	750 000	(28)
Električni organ jegulje	260 000	—	(29)
Govedi mozak	—	100 000	(24)
Glava muhe	160 000	—	(43)
Glava muhe	500 000	—	(44)
<i>Kolinesteraza</i>			
Ljudski serum	348 000	3 180	(45)
Ljudski serum	366 000	—	(46)
Ljudski serum	200 000	—	(7)
Ljudski serum	300 000	—	(47)
Ljudski serum	82 000	—	(30)
	110 000	—	
	170 000	—	
	200 000	—	
	260 000	—	
Žlijezde slinovnice svinje	368 000	74 000	(27)
Mišići ribe list	—	3 180**	(12)

* μ moli hidroliziranog acetilkolina na sat i na mg enzimskog preparata.

** specifična aktivnost odnosi se na butirilkolin.

64 000 (28) i 21 500 (29), te 30 000 za podjedinicu kolinesteraze (30).

Neki autori smatraju da acetilkolinesteraza molekulske težine oko 260 000 ima dvije aktivne strane i četiri podjedinice (28, 33, 34). *Millar* i *Grafius* (29) smatraju da je acetilkolinesteraza barem heksamer, ali da svaka podjedinica ne mora imati aktivnu stranu.

Za acetilkolinesterazu električnog organa jegulje i kolinesterazu žlijezda slinovnica svinje načinjena je analiza aminokiselina (27, 35), ali primarna struktura određena je samo oko aktivnog mjesta enzima (36):

Acetilkolinesteraza . . . Glu-Ser-Ala

Kolinesteraza . . . Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-

Primarna struktura oko aktivnog mjesta je slična za obje kolinesteraze,

a zajednička je i s drugim hidrolitskim enzimima. U aktivnom mjestu tih enzima prisutni reaktivni serin i vjerojatno tercijarnom strukturom prisutni histidin igraju glavnu ulogu u procesu hidrolize.

Smatra se, da se aktivni centar kolinesteraza sastoji od dva aktivna mjesta: anionskog i esteraznog. Na esteraznoj strani aktivnog centra zbiva se hidroliza esterske veze na supstratu. Anionski položaj orijentira supstrat i određuje specifičnost kolinesteraza (4).

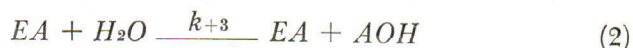
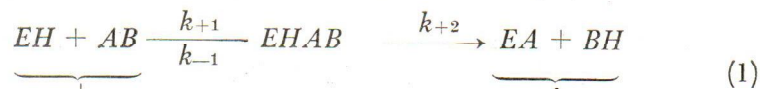
Postojanje anionske strane dokazuje se činjenicom da se tercijarni amonijevi spojevi kao supstrati brže hidroliziraju u kiselom mediju, gdje su ti spojevi protonirani nego u neutralnim otopinama (4). Neki autori smatraju da acetilkolinesteraza ima jednu anionsku stranu, a kolinesteraza nema uopće anionske strane (4).

Noviji radovi, koji istražuju kinetiku interakcije različitih inhibitora i supstrata na acetilkolinesterazu i kolinesterazu pokazuju da su u anionskoj strani acetilkolinesteraze dominantne *Coulombove* sile privlačenja, dok kolinesteraza posjeduje jednu necstersku stranu, analognu anionskoj strani kod acetilkolinesteraze, ali koja veže inhibitore i supstrate *Van der Waalsovim* silama (36-41).

Čini se dakle da postoji razlika u molekulskoj strukturi acetilkolinesteraze i kolinesteraze. Daljnji napredak u čišćenju i istraživanju strukture tih enzima pokazat će koliko je razlika u molekulskim svojstvima važna za razliku u biokemijskom ponašanju acetilkolinesteraze i kolinesteraze.

INTERAKCIJA KOLINESTERAZA S INHIBITORIMA

Objе skupine kolinesteraza hidroliziraju estere karboksilnih kiselina, organofosforne spojeve i karbamate, a hidroliza tih estera može se obuhvatiti općom reakcijskom jednadžbom (10, 48-50):



EH označuje enzim, AB označuje ester koji je ili supstrat ili inhibitor, $EHAB$ Michaelisov kompleks enzima s AB , EA označuje acilirani enzim, BH i AOH produkti hidrolize estera AB . k_{+1} , k_{+2} , k_{-1} su konstante brzine pojedinačnih reakcija, k_a je konstanta aciliranja (inhibicije), a k_{+3} je konstanta hidrolize (spontane reaktivacije).

Michaelisov kompleks sa supstratom ili inhibitorom adicijski je kompleks, koji disocijacijom daje slobodni enzim i nepromijenjeni inhibitor (konstanta k_{-1} u jednadžbi 1). Acilirani enzim nastaje kovalentnim vezanjem supstrata ili inhibitora na enzim (k_{+2} u jedn. 2), a zna

se da ta veza nastaje na hidroksilnoj skupini serina, koji se nalazi u aktivnom centru kolinesteraza, kao i nekih drugih srodnih enzima (4). Postojanje aciliranog enzima (EA) u interakciji obih kolinesteraza pokazano je i u interakciji s organofosornim spojevima i karbamatima (5, 48–52). Postojanje Michaelisova kompleksa ($EHAB$) bilo je postulirano već pred 20 godina (53), a tek u posljednjih nekoliko godina je taj međuprodukt kinetički dokazan. Konstante aciliranja (k_{+2}) i Michaelisova konstanta (K_a) za acetilkolinesterazu i organofosorne spojeve određene su u radovima (50, 54–58), a u interakciji acetilkolinesteraze s karbamatima u radovima (57, 59–62).

Za serumsku kolinesterazu te su konstante određene u interakciji s organofosornim spojevima (55, 63). Neki organofosorni spojevi, koji s acetilkolinesterazom stvaraju izrazite reversibilne komplekse (fosfostigmin i halokson) (50, 20), sa serumskom kolinesterazom u jednakim eksperimentalnim uvjetima kinetički ne pokazuju takve komplekse (*Simeon* i *Reiner*, neobjavljeno). Takvo ponašanje acetilkolinesteraze i kolinesteraze ne mora uvijek značiti razliku u mehanizmu reakcija tih dvaju enzima, ali je možda ipak afinitet stvaranja takvih reverzibilnih kompleksa s kolinesterazom manji, a brzina aciliranja (k_{+2}) veća nego u reakcijama acetilkolinesteraze.

Neki autori iznose eksperimentalne podatke koji govore za to da je acetilkolinesteraza alosterički enzim (20, 64–66), dok za serumsku kolinesterazu nema takvih podataka.

Poznato je da je konstanta brzine inhibicije (k_a) za većinu organofosornih spojeva veća za serumsku kolinesterazu nego za acetilkolinesterazu (5, 67), dok za brzinu inhibicije karbamatima vrijedi – čini se – obrnuti odnos. Vrijednosti konstante brzine reaktivacije (k_{+3}) fosforilirane i karbamilirane acetilkolinesteraze i kolinesteraze variraju od preparata do preparata i od spoja do spoja i – čini se – da nema neke bitne zakonitosti s obzirom na ta dva enzima (68).

Organofosorni spojevi i karbamati koriste se kao pesticidi, i njihovo djelovanje bazira se na inhibiciji kolinesteraza u kukcima. Da bi njihovo djelovanje bilo što bolje potrebno je da je konstanta aciliranja (k_{+2}) za kolinesteraze insekta što veća, a Michaelisova konstanta (koja je recipročna vrijednost mjere afiniteta) i konstanta reaktivacije (k_{+3}) što manja (69).

Da bi takav pesticid bio što sigurniji za upotrebu, potrebno je da je konstanta aciliranja kolinesteraza ljudi što manja, a Michaelisova konstanta i konstanta brzine reaktivacije inhibiranog enzima što veća (69). Stoga je s toksikološkog gledišta od bitne važnosti poznavanje ovih konstanti za različite preparate kolinesteraza ljudi i životinja.

ZAHVALE

Zahvaljujem dr E. Reiner za kritičko čitanje ovog rukopisa.

Literatura

1. Report of the commission on enzymes of the International union of biochemistry, I. U. B. Symposium series, Vol. 20, Oxford, 1961.
2. *Augustinsson, K. B.*: Cholinesterases. A Study in Comparative Enzymology, *Acta Physiol. Scand.*, 15, Suppl. 52 (1948) 1.
3. *Augustinsson, K. B.*: Butyryl- and Propionylcholinesterase and Related Types of Eserin-Sensitive Esterases, u: *Boyer, P. D., Lardy, H. i Myrbäck, K.*: The Enzymes, 2. izd., Acad. Press, New York, Vol. 4A (1960) 521.
4. *Wilson, I. B.*: Acetylcholinesterase, u knjizi: *Boyer, P. D., Lardy, H. i Myrbäck, K.*: The Enzymes, 2. izd., Acad. Press, New York, Vol. 4A (1960) 501.
5. *Heath, D. F.*: Organophosphorus Poisons, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1961.
6. *Koelle, G. B.*: Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, u: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Springer-Verlag, Berlin, 1963.
7. *Svensmark, O.*: Molecular Properties of Cholinesterases, *Acta Physiol. Scand.*, 64, Suppl. 245 (1965), 1.
8. *Hardegg, W.*: Cholinesterases, u knjizi: *Lang, K. i Lehnarts, E.*: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Hoppe-Seyler / Thierfelder, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 10. izd., Vol. VI, Enzyme, dio B., 1966.
9. *Goedde, H. W., Doenicke, A., Atlund, K.*: Pseudocholinesterasen. *Pharmakogenetic Biochemie, Klinik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
10. *Aldridge, W. N., Reiner, E.*: Interaction of Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids with Esterases. Inhibitors as Substrates, North Holland, Amsterdam, 1972., u tisku.
11. *Turpaev, T. M., Abashkina, L. I., Brestkin, A. P., Brick, I. L., Grigorjeva, G. M., Pevzner, D. L., Rozengart, U. J., Rozengart, E. U., Sakharov, D. A.*: Cholinesterase of Squid Optical Ganglia, *European J. Biochem.*, 6 (1968) 55.
12. *Lundin, S. J.*: Purification of a Cholinesterase from the Body Muscles of Plaice (*Pleuronectes platessa*): *Acta Chem. Scand.*, 21 (1967) 2663.
13. *Augustinsson, K. B.*: Comparative Aspects of the Purification and Properties of Cholinesterases, *Bull. Wld. Hlth Org.*, 44 (1971) 81.
14. *Brestkin, A. P., Brick, I. L., Volkova, R. I., Maizel, E. B., Rozengart, E. U.*: Influence of Ionic Strength and Organic Solvents on Interaction of Cholinesterases with Substrates and Organophosphorus Inhibitors, *Biohimia*, 35 (1970) 317.
15. *Shukuya, R.*: On the Kinetics of the Human Blood Cholinesterase. II. The Temperature Effect Upon Cholinesterase Activity, *J. Biochem.*, 40 (1953) 135.
16. *Myers, D. K.*: Effect of Salt on the Hydrolysis of Acetylcholine by Cholinesterase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 37 (1952) 469.
17. *Wright, C. I., Sabine, J. C.*: Cholinesterases of Human Erythrocytes and Plasma and Their Inhibition by Antimalarial Drugs, *J. Pharm. Exp. Therap.*, 93 (1948) 230.
18. *Scherer, J. R.*: L'activité acetylcholinérasique d'érythrocytes humaines en fonction de la température, *Biochim. Biophys. Acta*, 105 (1965) 137.
19. *Winteringham, F. P. W., Fowler, K. S.*: Substrate and Dilution Effect on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Carbamates, *Biochem. J.*, 101 (1966) 127.
20. *Aldridge, W. N., Reiner, E.*: Acetylcholinesterase. Two Types of Inhibition by an Organophosphorus Compound: One the Formation of Phosphorylated Enzyme and the Other Analogous to Inhibition by Substrate, *Biochem. J.*, 115 (1969) 147.
21. *Simeon, U.*: Uvođenje titrigrafske metode za mjerenje aktivnosti kolinesteraze pri niskim koncentracijama supstrata, III. simpozij o kolinesterazama i antikolinesteraznim supstancijama, Beograd, 1966, Saopćenja, str. 12.

22. *Wilson, I. B., Cabib, E.*: Acetylcholinesterase: Enthalpies and Entropies of Activation, *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 202.
23. *Wolfe, L. S., Smallman, B. N.*: The Properties of Cholinesterase from Insects, *J. Cellul. Comp. Physiol.*, **48** (1956) 215.
24. *Kaplay, S. S., Jagannathan, U.*: Purification and Properties of Ox Brain Acetylcholinesterase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **138** (1970) 48.
25. *Grégoire, J., Grégoire, J., Limozin, N.*: Sur l'activité des cholinésterases. II. Application de la méthode spectrophotométrique à l'étude cinétique de l'activité des cholinésterases purifiées aux très faibles concentrations en substrat, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37** (1955) 81.
26. *Jakovlev, V. A., Agabekian, R. S.*: The Kinetic Constants of Cholinesterase and Its Substrate Specificity, *Biohimia*, **31** (1966) 258.
27. *Tucci, A. F., Seifter, S.*: Preparation and Properties of Porcine Parotid Butyrylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, **244** (1969) 841.
28. *Leuzinger, U., Goldberger, M., Cauvin, E.*: Molecular Properties of Acetylcholinesterase, *J. Mol. Biol.*, **40** (1969) 217.
29. *Millar, D. B., Grafius, M. A.*: The Subunit Molecular Weight of Acetylcholinesterase, *FEBS Letters*, **12** (1970) 61.
30. *LaMotta, R. F., Woronick, Ch. L., Reinfrank, R. F.*: Multiple Forms of Serum Cholinesterase: Molecular Weights of the Isoenzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **136** (1970) 448.
31. *Massoulié, J., Rieger, F., Bon, S.*: Espèces acetylcholinésterasiques globulaires et allongées des organes électriques de poissons, *Europ. J. Biochem.*, **21** (1971) 542.
32. *Massoulié, J., Rieger, F. et Shigeru Tsuji*: Solubilisation de l'acetylcholinésterase des organes électriques de gymnote. Action de la trypsine, *Europ. J. Biochem.*, **14** (1970) 430.
33. *Froede, H. C., Wilson, I. B.*: On the Subunit Structure of Acetylcholinesterase, *Isr. J. Med. Sci.*, **6** (1970) 179.
34. *Leuzinger, U.*: The Number of Catalytic Sites in Acetylcholinesterase, *Biochem. J.*, **123** (1971) 139.
35. *Leuzinger, U., Baker, A. L.*: Acetylcholinesterase, I. Large-scale Purification, Homogeneity and Amino Acid Analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57** (1967) 446.
36. *Oosterbaan, R. A.*: Constitution of DFP-sensitive Enzymes, u knjizi: (Ed.) E. Heilbronn, Structure and Reactions of DFP-sensitive Enzymes, Stockholm, 1967, str. 25.
37. *Augustinsson, K. B.*: The Nature of an »Anionic« Site in Butyrylcholinesterase Compared with that of a Similar Site in Acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta*, **128** (1966) 351.
38. *Purdie, J. E., McIvor, R. A.*: Modification of the Esteratic Activity of Acetylcholinesterase by Alkylation with 1,1-Dimethyl-2-phenylaziridinium Ion, *Biochem. Biophys. Acta*, **128** (1966) 590.
39. *Purcell, U. P., Beasley, J. G.*: The Nature of Inhibitor Binding Sited in Butyrylcholinesterase, *Mol. Pharmacol.*, **4** (1968) 402.
40. *Purdie, J. E.*: The Properties of Acetylcholinesterase Modified by Interaction with the Alkylating Agent N,N-dimethyl-2-phenyl-aziridinium ion, *Biochem. Biophys. Acta*, **185** (1969) 122.
41. *O'Brien, R. D.*: Binding Sites of Cholinesterases. Alkylation by an Aziridinium Derivative, *Biochem. J.*, **113** (1969) 713.
42. *McIvor, R. A.*: Inhibition and Reactivation of Acetylcholinesterase Modified by Reaction with 1,1-dimethyl-2-phenylaziridinium ion, *Biochem. Biophys. Acta*, **198** (1970) 143.
43. *Krysan, J. L., Chadwick, L. E.*: The Molecular Weight of Cholinesterase from the House Fly, *Musca domestica* L., *J. Insect. Physiol.*, **12** (1966) 781.
44. *Eldefrawi, M. E., Tripathi, R. K., O'Brien, R. D.*: Acetylcholinesterase Isozymes from the Housefly Brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **212** (1970) 308.

45. Haupt H. von, Heide, K., Zwisler, O., Schwick, H. G.: Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung der Cholinesterase aus Humanserum, Blut, *14* (1966) 65.
46. Das, P. K., Liddell, J.: Purification and Properties of Human Serum Cholinesterase, *Biochem. J.*, *116* (1970) 875.
47. Surgenor, D. M., Ellis, D.: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. Plasma Cholinesterase, *J. Am. Chem. Soc.*, *76* (1954) 6049.
48. Aldridge, W. N.: The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-Esters of Phosphoric Acid, *Biochem. J.*, *54* (1953) 442.
49. Wilson, I. B., Hatch, M. A., Ginsburg, S.: Carbamylation of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, *235* (1960) 2312.
50. Reiner, E., Aldridge, W. N.: Effect of pH on Inhibition and Spontaneous Reactivation of Acetylcholinesterase Treated with Esters of Phosphorus Acids and Carbamic Acids, *Biochem. J.*, *105* (1967) 171.
51. Wilson, I. B., Harrison, M. A., Ginsburg, S.: Carbamyl Derivatives of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, *236* (1961) 1498.
52. Reiner, E., Simeon-Rudolf, U.: Kinetics of Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Monomethylcarbamates, *Biochem. J.*, *98* (1966) 501.
53. Aldridge, W. N., Davison, A. N.: The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-Esters of Phosphoric acid, *Biochem. J.*, *51* (1952) 62.
54. Main, A. R.: Affinity and Phosphorylation Constants for the Inhibition of Esterases by Organophosphates, *Science*, *144* (1964) 992.
55. Main, A. R., Iverson, F.: Measurement of the Affinity and Phosphorylation Constants Governing Irreversible Inhibition of Cholinesterases by Di-Isopropyl Phosphorofluoridate, *Biochem. J.*, *100* (1966) 525.
56. Chiu, Y. C., Main, A. R., Dauterman, W. C.: Affinity and Phosphorylation Constants of a Series of 0,0-dialkyl Malaoxons and Paraoxons with Acetylcholinesterase, *Biochem. Pharmacol.*, *18* (1969) 2171.
57. Chiu, Y. C., Dauterman, W. C.: Effect of Tetraethylammonium Ions on the Affinity and Phosphorylation or Carbamylation Constants of Malaoxon, Tetram and Temik with Acetylcholinesterase, *Biochem. Pharmacol.*, *19* (1970) 1856.
58. Mehrotra, K. N., Phokela, A.: A Comparison of the Affinity, Phosphorylation and Bimolecular Rate Constants of Cholinesterase by Organophosphates, *Arch. Int. Physiol.*, *77* (1969) 799.
59. Main, A. R.: Evaluation of Phosphorylation and Carbamylation Rate Constants, u knjizi: (Ed.) E. Heilbronn: Structure and Reactions of DFP-sensitive Enzymes, Stockholm, 1967, str. 129.
60. Main, A. R., Hastings, F. L.: Carbamylation and Binding Constants for the Inhibition of Acetylcholinesterase by Physostigmine (Eserine), *Science*, *154* (1966) 400.
61. O'Brien, R. D., Hilton, B. D., Gilmour, L.: The Reaction of Carbamates with Cholinesterase, *Mol. Pharmacol.*, *2* (1966) 593.
62. Hastings, F. L., Main, A. R., Iverson, F.: Carbamylation and Affinity Constants of Some Carbamate Inhibitors of Acetylcholinesterase and Their Relation to Analogous Substrate Constants, *J. Agr. Food Chem.*, *18* (1970) 497.
63. Main, A. R.: Kinetic Evidence of Multiple Reversible Cholinesterases Based on Inhibition by Organophosphates, *J. Biol. Chem.*, *244* (1969) 829.
64. Kitz, R. J., Braswell, L. M., Ginsburg, S.: On the Question: Is Acetylcholinesterase an Allosteric Proteins, *Mol. Pharmacol.*, *6* (1970) 108.
65. Davies, J. H., Campbell, W. R., Kearns, C. W.: Inhibition of Fly Head Acetylcholinesterase by bis-[(m-hydroxyphenyl)-trimethylammonium Iodide] Esters of Polymethyleinedicarbamic Acids, *Biochem. J.*, *117* (1970) 221.
66. Gridelet, J., Foidart, J. M., Wins, P.: Contribution à l'étude des propriétés allostériques de l'acétylcholinestérase, *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, *78* (1970) 259.

67. *Hobbiger, F.*: Anticholinesterases, A Comparison Between the *in vitro* Activity and the *in vivo* Action of Certain Organic Phosphates, *Chem. Ind.*, (1954) 1574.
68. *Reiner, E.*: Spontaneous Reactivation of Phosphorylated and Carbamylated Cholinesterases, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44 (1971) 109.
69. *Aldridge, W. N.*: The Nature of the Reaction of Organophosphorus Compounds and Carbamates with Esterases, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44 (1971) 25.

Summary

COMPARISON OF BIOCHEMICAL PROPERTIES
OF CHOLINESTERASES

The paper deals with some characteristic biochemical properties of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) and cholinesterase (EC 3.1.1.8) such as specificity for substrates, molecular properties and kinetic behaviour towards inhibitors. To enable a quantitative comparison of these enzymes some numerical data are presented in tabular form.

*Institute for Medical Research
and Occupational Health,
Yugoslav Academy of Arts and
Sciences, Zagreb*

*Received for publication
March 24, 1972*