

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 552—556, November 1970

Einfluß des CO₂-Partialdrucks auf die Aktivität der Benzoylcholinhydrolase (EC 3.1.1.9) des menschlichen Blutplasmas

Von HILDEGARD WEISS¹⁾ und M. MEYER

Zentralinstitut für Biologie und Medizin der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Krebsforschung, Bereich: Robert-Rössle-Klinik (Direktor: Prof. Dr. H. Gummel) Berlin-Buch

(Eingegangen am 11. Mai 1970)

1. Bei der Präparation der Benzoylcholinhydrolase aus Blutplasma durch Gelfiltration ergaben sich für die untersuchten pH-Werte 7,2, 7,4 und 7,6 spezifische Elutionsdiagramme.
2. Die Aktivität der Benzoylcholinhydrolase wurde in Abhängigkeit vom P_{CO₂} gemessen. Dabei wurde festgestellt, daß die Aktivität mit steigendem P_{CO₂} sinkt. Dies gilt sowohl für das ungereinigte als auch für das angereicherte Ferment. Zwischen dem Hemmungsgrad der einzelnen Isoenzyme ergaben sich signifikante Unterschiede.

The influence of partial CO₂ pressure on the activity of the benzoylcholine hydrolase (EC 3.1.1.9) of human blood plasma

1. Benzoylcholine hydrolase was prepared from blood plasma by gel filtration. The elution profile was specific for the pH of the elutant at pH 7.2, 7.4 and 7.6.
2. The variation of benzoylcholine esterase activity with P_{CO₂} was measured. The activity decreased with increasing P_{CO₂}. This was observed for both the unpurified and the enriched enzyme. The degree of inhibition is significantly different for each isoenzyme.

Orientierende Versuche am ungereinigten Ferment haben gezeigt, daß die Aktivität der Benzoylcholinhydrolase mit steigendem CO₂-Partialdruck der Testlösung abnimmt (1).

Die vorliegende Arbeit untersucht das Verhalten 1. des ungereinigten Enzyms bei pH 7,2, 7,4 und 7,6 und 2. des durch Gelfiltration teilweise gereinigten, angereicherten und unvollständig in Isoenzyme getrennten Ferments bei verschiedenen CO₂-Partialdrucken innerhalb des angeführten pH-Bereichs. Außerdem beschäftigt sie sich mit dem Isoenzymmuster der Benzoylcholinhydrolase, wie es sich nach Präparation bei den verschiedenen pH-Werten darbietet.

Methodik

Präparation des Enzyms

Als Enzymquelle diente Heparinplasma, das von Blutspendern vor der Abnahme von 400 ml Spender-Blut gewonnen wurde. Die Gelfiltration an Sephadex G 200 zur Präparation der Enzymfraktionen (2) erfolgte in Anlehnung an HARRIS und ROBSON (3).

Messung der enzymatischen Aktivität

Als Substrat diente Benzoylcholinhydrochlorid [50 µM], dessen Spaltung spektrophotometrisch gemessen wurde (4).

CO₂-Perfusion und Messung des P_{CO₂}

Die dem jeweiligen Isoenzym zugehörige Fraktion wurde mit $\frac{M}{15}$ Phosphatpuffer entsprechenden pH-Wertes etwa 1:10 verdünnt — Plasma 1:200 — und ein Volumen von etwa 10 ml dieser Testlösung mit CO₂-Luft-Gemischen steigenden CO₂-Gehaltes unter pH-Stat-Bedingungen bei 25° perfundiert (1). Die einzelnen Perfusionszeiten lagen zwischen 15 Sek. und 3 Min. Sofort nach Perfusion wurde der P_{CO₂} der Enzymlösung und die enzymatische Aktivität simultan bestimmt. Die Messung der Hydro-

lyse erfolgte zur Erhaltung des P_{CO₂} in geschlossenen Küvetten. Zwischen Elution und Perfusion lag eine Zeitspanne von 12 bis 15 Std., während der das Enzym bei 4° gehalten wurde.

Ergebnisse

Ungereinigtes Ferment aus Plasma

Die enzymatische Aktivität in Abhängigkeit vom P_{CO₂} der Enzymlösung ist in Abbildung 1 dargestellt.

Da die Meßwerte stärker streuen, wurde zur Kondensierung der Information durch die Punkte einer jeden Meßreihe eine Ausgleichsparabel nach dem least square Verfahren gelegt (5). Diese Ausgleichskurven sind in die Abbildungen eingetragen.

Zur Klärung der Frage, ob zwischen zwei verschiedenen Kurven ein Unterschied besteht, wurde das statistische Modell von GEBELEIN und RUTHENSTROTH-BAUER (6) für den Fall zweier unabhängig voneinander gewonnener empirischer Kurven modifiziert.

Die Test-Statistik beruht auf dem Prinzip der χ^2 -Approximation. Fällt der quadratische Koeffizient sehr klein aus, so ist die Kurve nicht von einer Geraden zu unterscheiden.

Dies gilt für alle Darstellungen, die die Beziehung zwischen enzymatischer Aktivität und P_{CO₂} der Meßlösung demonstrieren²⁾.

Die Aktivität sinkt mit steigendem P_{CO₂}. Der Hemmungsgrad ist bei den 3 gewählten pH-Werten verschieden. Er nimmt in der Reihenfolge pH 7,4 < pH 7,2 < pH 7,6 zu. Die Unterschiede sind mit P < 0,1% signifikant.

Angereichertes und partiell in Isoenzyme getrenntes Ferment

Bei pH 7,4

Das typische Elutionsdiagramm für pH 7,4 ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die aus der Stärkekelektro-

²⁾ Alle Berechnungen wurden vom Rechenzentrum des Zentralinstituts für Biologie und Medizin der DAW vorgenommen. Wir möchten den Mitarbeitern des Rechenzentrums dafür sowie für freundliche Beratung danken.

¹⁾ Teilweise vorgetragen auf der Jahrestagung der Biochemischen Gesellschaft der DDR (5.—7. 12. 1969).

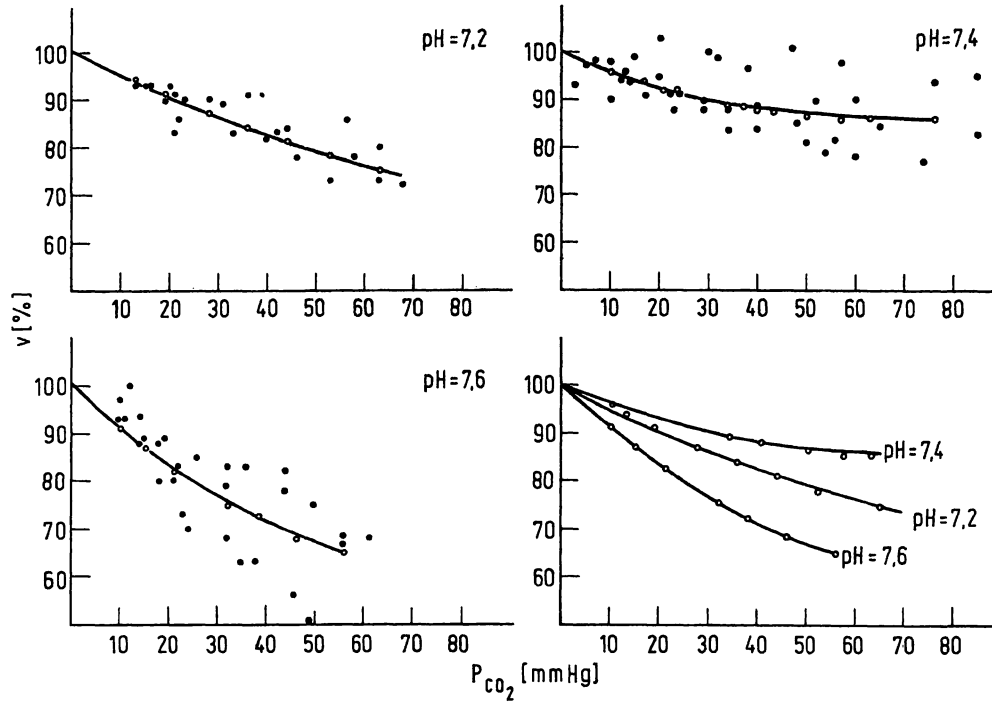


Abb. 1

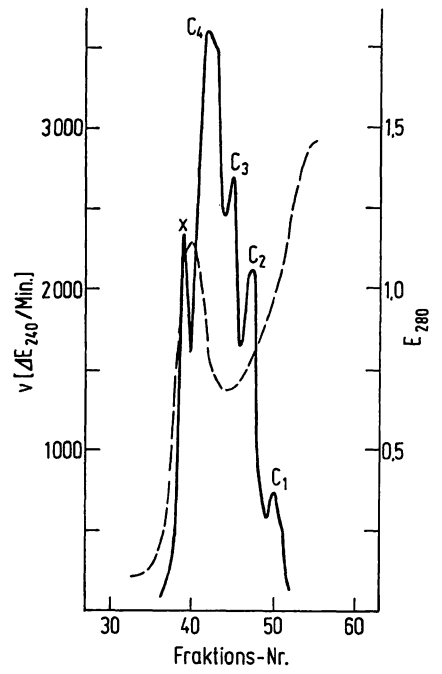


Abb. 2

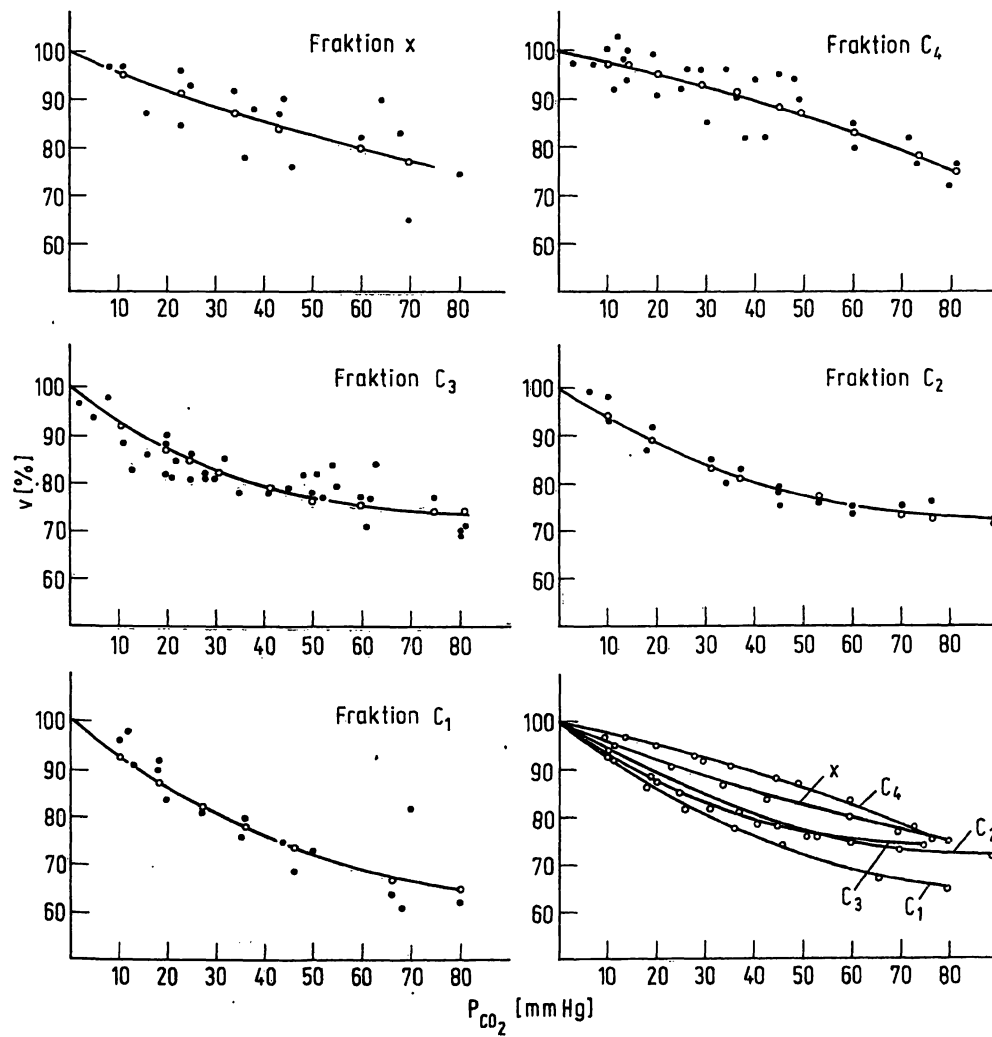


Abb. 3

Abb. 1

Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der ungereinigten Benzoylcholinhydrolase des Blutplasmas vom CO₂-Partialdruck bei den pH-Werten 7,2, 7,4 und 7,6

Der Wert der Hydrolysegeschwindigkeit (v) vor Perfusion wird gleich 100% gesetzt, alle perfundierten Werte wurden darauf bezogen

• = Meßpunkte, ○ = errechnete Werte

Abb. 2

Elutionsdiagramm von 2 ml Plasma auf einer Sephadex-G 200-Säule (50 cm lang, 2,9 cm Durchmesser)

Elutionsmittel: $\frac{M}{15}$ Phosphatpuffer pH 7,4, Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/4,7 Min., 1,8 ml Eluat/Fraktion, hydrostatischer Druck 10 cm, Temperatur 4°. v = ΔE₂₄₀/Min.

Zur Aktivitätsmessung wurde das Eluat entsprechend seiner Aktivität verdünnt (etwa 1:5)

— = Enzym --- = Eiweiß

Abb. 3

Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der einzelnen Isoenzyme vom CO₂-Partialdruck bei pH 7,4

Erklärung für v siehe Abbildung 1

• = Meßpunkte, ○ = errechnete Werte

phorese bekannten Isoenzymfraktionen (3, 7) sowie die von uns mit x bezeichnete Fraktion (2) sind in fast allen durchgeführten Gelfiltrationen vorhanden. Die Hemmung ihrer enzymatischen Aktivität durch CO₂ zeigt Abbildung 3. Die Reihenfolge im Hemmungsgrad läßt sich mit $C_4 < x < C_3 = C_2 < C_1$ ablesen. Zwischen C₁ und C₃ (P < 1%), C₃ und x (P < 5%) und C₃ und C₄ (P < 0,1%) sind die Unterschiede statistisch signifikant.

Bei pH 7,2

Im Elutionsdiagramm (Abb. 4) stellen sich die Isoenzyme in Form von Schultern dar. In den meisten

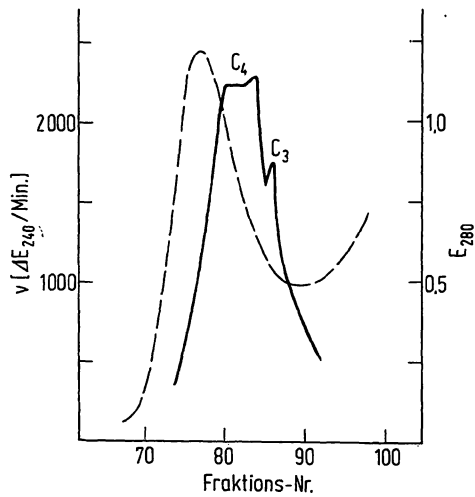


Abb. 4

Elutionsdiagramm von 2 ml Plasma auf einer Sephadex-G 200-Säule. Elutionsmittel: $\frac{M}{15}$ Phosphatpuffer pH 7,2, Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/6,6 Min., Fraktionen zu 1,2 ml. Sonstige Bedingungen wie bei Abbildung 2 beschrieben. — Enzym — — Eiweiß

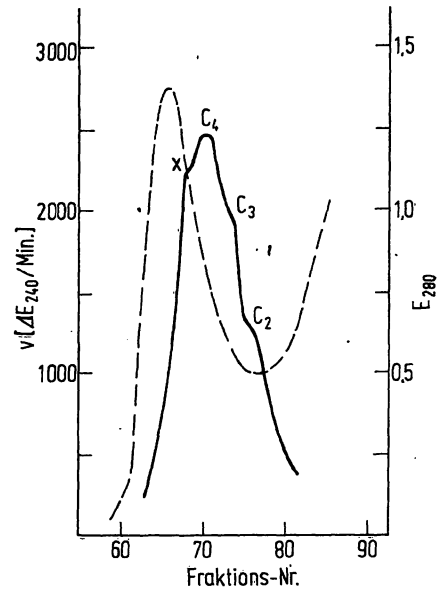


Abb. 6

Elutionsdiagramm von 2 ml Plasma auf einer Sephadex-G 200-Säule. Elutionsmittel: $\frac{M}{15}$ Phosphatpuffer pH 7,6. Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/5,6 Min. Fraktionen zu 1,25 ml. Sonstige Bedingungen wie bei Abbildung 2 beschrieben. — Enzym — — Eiweiß

Fällen finden sich nur die Fraktionen C₄ und C₃, gelegentlich x.

Wird die Aktivität der den Isoenzymen zuzuordnenden Eluatfraktionen vor und nach Perfusion gemessen, so ergibt sich für C₃ eine signifikant stärkere Hemmung als für C₄ (Abb. 5). Dieser Unterschied ist mit P < 2,5% gesichert.

Bei pH 7,6

Bei der unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Gelfiltration sind die typischen Schultern der Isoenzymfraktionen (Abb. 6) nur angedeutet vorhanden.

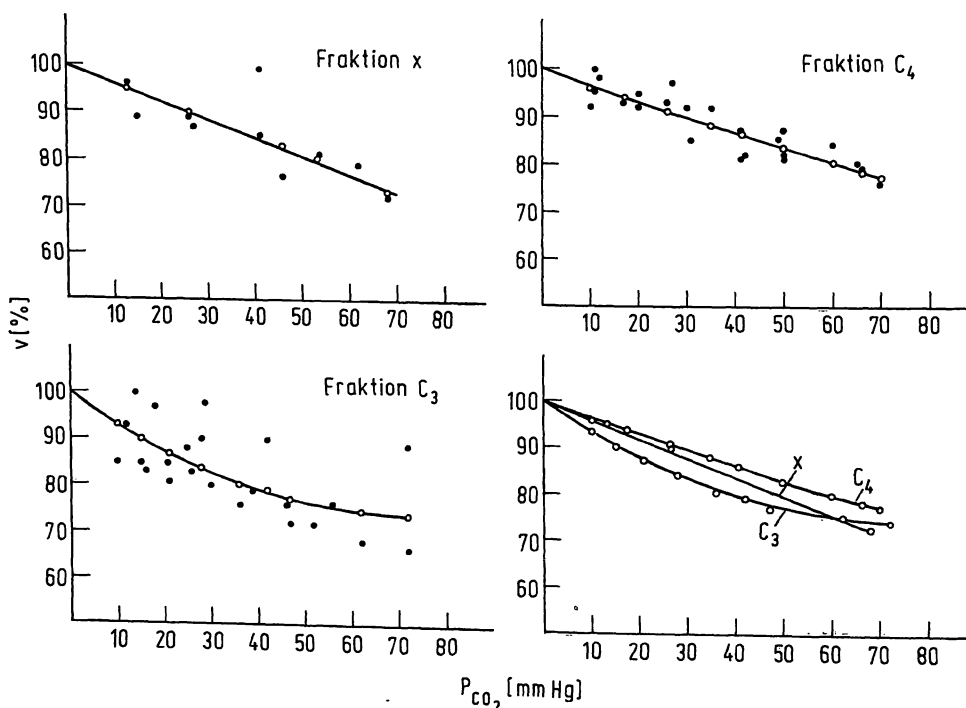


Abb. 5

Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der einzelnen Isoenzyme vom CO₂-Partialdruck bei pH 7,2. Erklärung für v siehe Abbildung 1. • = Meßpunkte, ○ = errechnete Werte

und Hydroxylaminzusatz eine Aktivierung, durch CO₂ eine Hemmung, also eine Labilität des Enzyms gegenüber Carbamat und dem zugehörigen Reaktivator erkennen. Das Verhalten der Fraktion C₁ in Anwesenheit der geprüften Effektoren läßt keine Deutung zu.

Abschließend kann die von LA MOTTA (8) aufgestellte Hypothese von einem in vivo regulierten Gleichgewicht der Isoenzyme dahingehend erweitert werden, daß ihre Aktivität auch durch den im Blut herrschenden P_{CO₂} kontrolliert wird.

Literatur

1. WEISS, H. und M. MEYER, *Acta biol. med. german.* 22, 435 (1969). — 2. WEISS, H. und M. MEYER, *diese Z.* 7, 42 (1969). — 3. HARRIS, H. und E. B. ROBSON, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 73, 649 (1963). — 4. KALOW, W. und H. A. LINDSAY, *Canad. J. Biochem.* 33, 568 (1955). — 5. ZURMÜHL, R., in: *Prakt. Math. f. Ingenieure u. Physiker*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1965). — 6. RUTHENSTROTH-BAUER, G., *Naturwissenschaften* 39, 457 (1952). — 7. HARRIS, H., D. A. HOPKINSON und E. B. ROBSON, *Nature* (London) 196, 1296 (1962). — 8. LA MOTTA, R. V., R. B. Mc COMB, C. R. NOLL, jr., H. J. WESTON und R. F. REINFRANK, *Arch. Biochem. Biophysics* 124, 299 (1968). — 9. MAIN, A. R., *J. biol. Chemistry* 244, 829 (1969). — 10. ECOBICHON, D. J., *Canad. J. Biochem.* 46, 1131 (1968). — 11. WILSON, J. B., M. A. HARRISON und S. GINSBURG, *J. biol. Chemistry* 236, 1498 (1961). — 12. HENRIQUES, O. M., *Erg. Physiol.* 28, 625 (1929). — 13. ROUGHTON, F. J. W., *Physiol. Rev. Baltimore* 15, 341 (1935). — 14. ROUGHTON, F. J. W. und L. ROSSI-BERNARDI, *Proc. Royal Soc., London* 164, 381 (1966). — 15. KERNOHAN, J. C. und F. J. W. ROUGHTON, *J. Physiol.* 197, 345 (1968). — 16. BERGMANN, F., *Discuss. Faraday Soc.* 20, 126 (1955). — 17. WILSON, J. B. und F. BERGMANN, *J. biol. Chemistry* 185, 479 (1950).

Dr. Hildegard Weiß
 Lab. exper. Anaesthesiologie
 Robert-Rössle-Klinik
 1115 Berlin-Buch
 Lindenberger Weg 80