

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 42—44, Januar 1969

Zur Frage eines Inhibitors der Benzoylcholinhydrolase (EC 3.1.1.9) im Blutplasma des Menschen¹⁾

VON HILDEGARD WEISS UND M. MEYER

Aus dem Institut für Krebsforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Bereich Robert-Rössle-Klinik (Direktor: Prof. Dr. H. Gummel)

(Eingegangen am 21. September 1968)

Für die Aktivierung der Benzoylcholinhydrolase des Gesamtplasmas durch Hydroxylamin wurde eine Konzentrationsabhängigkeit gefunden.

Der aktivitätssteigernde Alterungseffekt konnte den durch Gelfiltration isolierten Isoenzymfraktionen x , C_3 und C_2 zugeordnet werden und erwies sich für diese Fraktionen als Mg^{++} und EDTA unabhängig.

Auf die Aktivierung durch Hydroxylamin sprechen ebenfalls die Isoenzymfraktionen x , C_3 und C_2 besonders an.

Investigations of an inhibitor of benzoyl choline hydrolase (EC 3.1.1.9) in human blood plasma

The activation of benzoyl choline hydrolase of whole plasma by hydroxylamine was found to be concentration-dependent. The increase of activity with age is attributed to the isoenzyme fractions x , C_3 and C_2 , which were isolated by gelfiltration, and for these fractions the activity was independent of Mg^{++} and EDTA. The activation by hydroxylamine is also exerted especially on isoenzyme fractions x , C_3 and C_2 .

Wie wir (1) 1966 mitteilten, erfährt die enzymatische Spaltung von Benzoylcholin durch die Plasmacholinesterase des Menschen eine Erhöhung, wenn das Plasma einige Zeit bei 25° aufbewahrt wird. FRIESS und Mitarbeiter (2) beobachteten an der Acetylcholinesterase aus dem elektrischen Organ von *Electrophorus electricus* ebenfalls eine Aktivitätssteigerung durch Alternlassen in Verdünnung. Die Steigerung war aber durch Mg^{++} bzw. EDTA beeinflussbar.

1967 (3) gelang es uns, die BChH²⁾ durch Hydroxylamin, das seinerseits ein bekannter Reaktivator für carbamyliertes Enzym ist (4), zu aktivieren.

Im folgenden soll über die Fortführung unserer Untersuchungen berichtet werden: Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Hydroxylamin-Wirkung bestimmt und im weiteren das Verhalten der durch Sephadex-Gelfiltration getrennten Isoenzyme bezüglich Alterung und deren Beeinflussbarkeit durch Mg^{++} bzw. EDTA geprüft sowie ihre Aktivierbarkeit durch Hydroxylamin getestet.

Methodik

Als Enzymquelle diente Heparinplasma, das aus Spenderblut vor der Abnahme von 400 ml Blut gewonnen wurde.

Die hydrolytische Spaltung von Benzoylcholin wurde spektrophotometrisch nach KALOW (5) an einem registrierenden Unicam-Spektrophotometer SP 800 gemessen. Die Trennung der Isoenzyme erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G 200 in Anlehnung an das von HARRIS und ROBSON (6) beschriebene Verfahren.

Die benutzte Hydroxylamin-Lösung wurde aus Hydroxylaminsulfat durch Neutralisation mit $Ba(OH)_2$ hergestellt. Die Kontaktzeit zwischen Ferment und Hydroxylamin vor der Substratzu-

gabe betrug 3 Min. In den Meßansätzen der Isoenzyme lag die Konzentration für Hydroxylamin bei 25 mM. Die Endkonzentrationen für $MgCl_2$ und EDTA betragen 1 mM.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die Zunahme der Benzoylcholin-spaltung durch Nativplasma in Abhängigkeit von der zugesetzten Hydroxylamin-Konzentration. Bei einer Konzentration von 7,5 mM ist praktisch eine Sättigung des Ferments mit Hydroxylamin erreicht. Eine Erhöhung der Kontaktzeit zwischen Fermentlösung und Hydroxylamin führte nicht zu gesteigerter Aktivierung. Die Auftrennung der BChH durch Gelfiltration an Sephadex G 200 ergab 5 Isoenzymfraktionen (s. Abb. 2). Davon entsprechen 4 den von der Stärkegelelektrophorese her bekannten Fraktionen C_1 — C_4 (6, 7). Ob die 5. Fraktion — von uns mit x bezeichnet — mit einer der 7 von LAMORTA (8) durch Stärkegelelektrophorese getrennten Fraktionen identisch ist, ist nicht zu sagen.

In Abbildung 3 sind die typischen Aktivitätsveränderungen der einzelnen Enzymfraktionen, die sich durch die Alterung ergeben, aufgetragen. Die Eluate wurden 165 Min. bei 25° gehalten und zur Zeit t_0 und t_{165} gemessen. Die BChH des Gesamtplasmas erfährt in dieser Zeit nur eine Aktivitätssteigerung von 9%. Dagegen ist der in einer Aktivitätssteigerung entstehende Alterungseffekt bei verschiedenen Isoenzymfraktionen sehr viel ausgeprägter. Er ist typisch für die Fraktionen x , C_3 und C_2 .

In dem hier aufgezeigten Fall beträgt er 43%, 18% bzw. 93%. Die Fraktionen C_4 und C_1 verlieren dagegen an Aktivität. Etwas beeinflussbar ist das Ausmaß der Aktivierung durch den Grad der Verdünnung der Eluate; eine höhere Verdünnung bewirkt eine höhere Aktivierung.

¹⁾ Teilweise vorgetragen auf der IV. Jahrestagung der Biochemischen Gesellschaft der DDR (22.—24. 9. 1967) in Rostock.

²⁾ *Abkürzungen:* BChH = Benzoylcholinhydrolase (EC 3.1.1.9.)

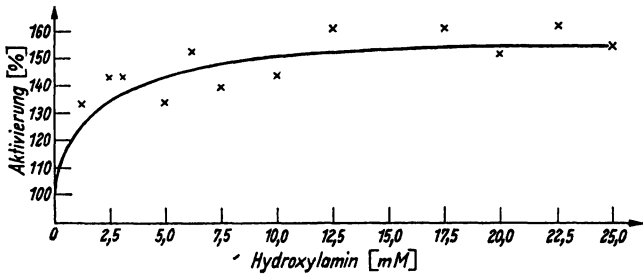


Abb. 1
Abhängigkeit der Aktivierung der BChH von der Hydroxylamin-Konzentration

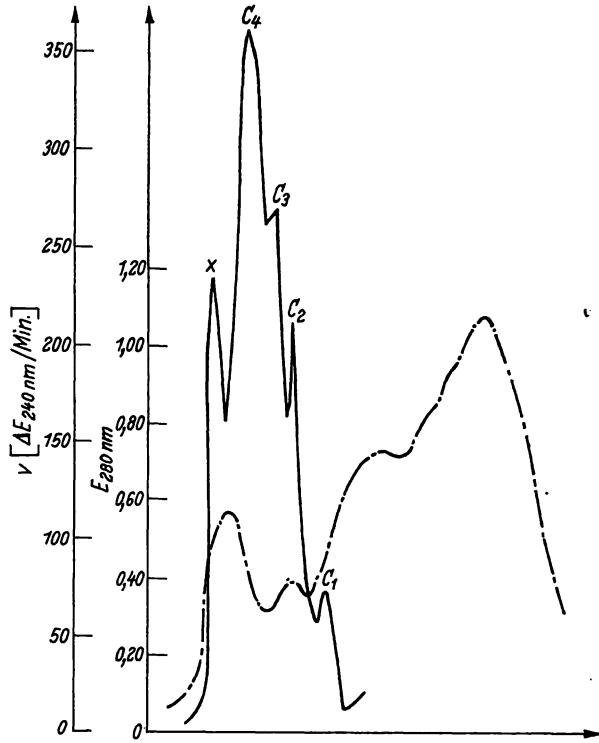


Abb. 2
Ergebnis der Trennung von 2 ml Plasma auf einer Sephadex G 200-Säule (50 cm lang, 2,5 cm Durchmesser). Elutionsmittel: M/15 Phosphatpuffer pH 7,4, Elutionsgeschwindigkeit 1,0 ml/6,7 Min, 1,8 ml Eluat/Fraktion, hydrostatischer Druck 12 cm — — — Eiweiß (Ext.₂₈₀)
— BChH-Aktivität

(Das Eluat wurde entsprechend seiner Aktivität mit Phosphatpuffer verdünnt, bei hoher Aktivität bis 1:50)

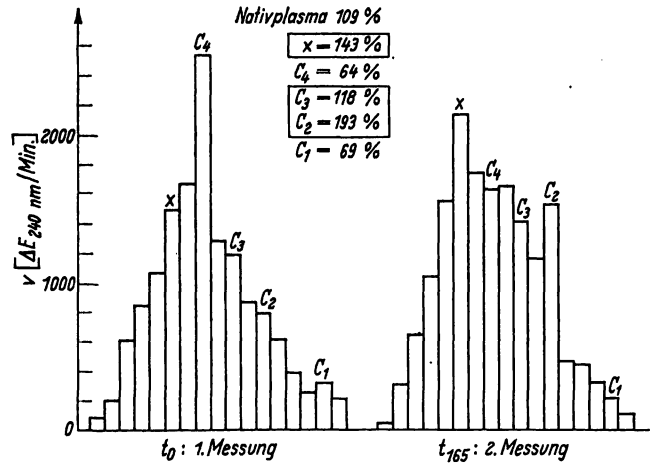


Abb. 3
Aktivitätsveränderungen der Isoenzymfraktionen nach Alterung (165 Min. bei 25°). Meßwerte von t₀ = 100%

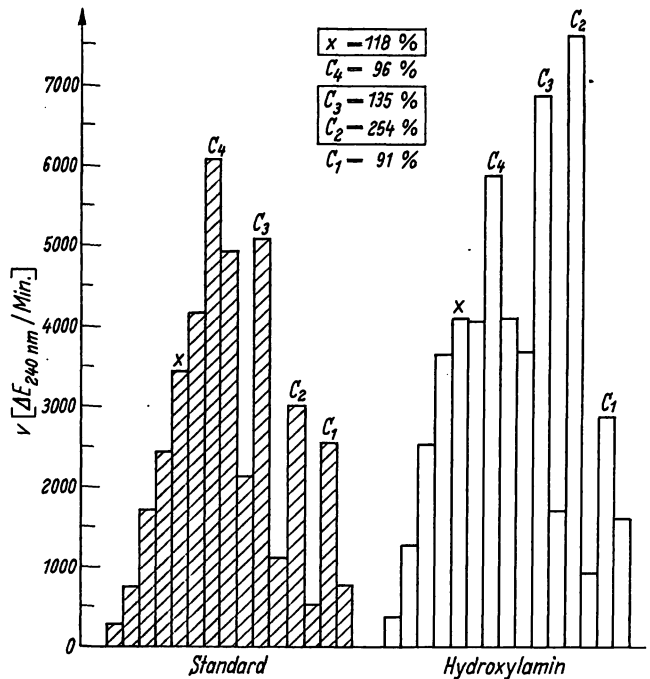


Abb. 5
Verhalten der Isoenzymfraktionen in Anwesenheit von Hydroxylamin (25 mM). Standardmessungen = 100%

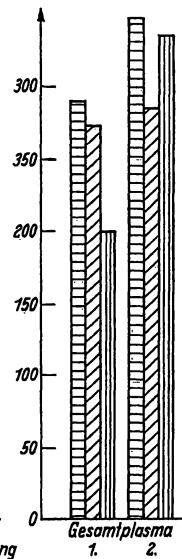
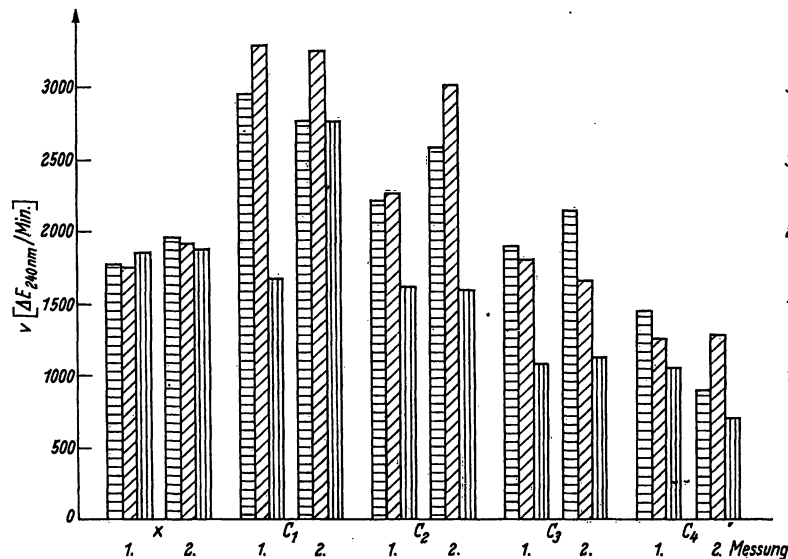


Abb. 4
Beeinflussbarkeit der Aktivitätssteigerung durch Alterung mit Mg⁺⁺ und EDTA (0,1 mM)

Standard
Mg⁺⁺
EDTA

Die Wirkung von Mg^{++} und EDTA auf das Gesamtplasma und die einzelnen Isoenzymfraktionen ist in Abbildung 4 dargestellt. EDTA verstärkt den Alterungseffekt bei Gesamtplasma und der C_4 -Fraktion. Mg^{++} aktiviert nur die C_4 -Fraktion in geringem Ausmaß.

Die einzelnen Isoenzymfraktionen wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch Hydroxylamin geprüft (s. Abb. 5). Die Fraktionen x, C_3 und C_2 zeichnen sich wieder durch besondere Aktivierbarkeit aus; in dem hier gezeigten Fall beträgt sie 18%, 35% bzw. 154%.

Diskussion

Das Ergebnis der Trennung der BChH in Isoenzyme läßt sich in die von LAMOTTA (8) erhobenen und zitierten Befunde einordnen. Ob es sich bei der Aktivitätsänderung durch Altern bei den einzelnen Isoenzymen um eine der von ihm besprochenen Umwandlung der verschiedenen Komponenten der BChH handelt, ist nicht zu sagen.

Klar unterschieden werden konnten die Befunde gegen die FRIESS'schen Beobachtungen (2), indem die Verstärkung der Alterung durch EDTA bei Gesamtplasma und der C_4 -Fraktion bestätigt werden konnte, EDTA sich dagegen auf die Fraktionen x, C_3 und C_2 — die die für unseren Befund charakteristischen Fraktionen darstellen — als wirkungslos erweist. Die von FRIESS gefundene Aktivierung durch Mg^{++} auf einen konstanten Wert, konnte von uns nicht nachgewiesen werden.

Entsprechend der von uns schon früher vertretenen Auffassung (3) scheint es sich sowohl bei der Aktivitätserhöhung durch Altern als auch bei der Aktivierung durch Hydroxylamin um den Zerfall eines Ferment-Inhibitor-Komplexes zu handeln. Mit aller Vorsicht denken wir dabei an eine CO_2 -Kontrolle des Ferments in vivo; unter Umständen wird über die Bildung von Carbamaten die BChH gehemmt.

Aktivitätsmessungen der BChH unter verschiedenem pCO_2 laufen zur Zeit in unserem Laboratorium.

Literatur

1. MEYER, M. und H. WEISS, *Naturwissenschaften* 53, 279 (1966). —
2. FRIESS, S. L., J. B. WILSON und E. CALEIB, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 5156 (1954). —
3. WEISS, H. und M. MEYER, *Naturwissenschaften* 54, 493 (1967). —
4. WILSON, I. B., M. A. HARRISON und S. GINSBURG, *J. biol. Chemistry* 236, 1498 (1961). —
5. KALOW, W. und H. A. LINDSAY, *Can. J. Biochem. Physiol.* 33, 568 (1955). —
6. HARRIS, H. und E. B. ROBSON, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 73, 649 (1963). —
7. HARRIS, H., D. A. HOPKINSON und E. B. ROBSON, *Nature London* 196, 1296 (1962). —
8. LAMOTTA, R. V., R. B. MCCOMB, C. R. NOLL jr., H. J. WESTSTONE und R. F. REINFRANK, *Arch. Biochem. Biophysics* 124, 299 (1968).

Dr. H. Weiß
X 1115 Berlin-Buch
Lindenberger Weg 80