

Über das Vorkommen von Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) in der Hämolymphe der Miesmuschel *Mytilus edulis*

Occurrence of an Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) in the Haemolymph of the Mussel *Mytilus edulis*

Dettmar von Wachtendonk

Institut für Zoologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

(Z. Naturforsch. 31 c, 333–334 [1976]; received October 20, 1975/February 9, 1976)

Mytilus edulis, Hemolymph, Acetylcholinesterase, Specificity, Inhibition

A cholinesterase deriving from the hemolymph of the mussel *Mytilus edulis* was partially purified by use of gel-permeation and ion-exchange chromatography; the specificity to different substrates or inhibitors indicates clearly the occurrence of a "true" acetylcholinesterase.

Bei Untersuchungen an verschiedenen Geweben der Miesmuschel *Mytilus edulis*¹ wurde in der Proteinfraction der Hämolymphe eine Substanz mit estereseähnlichen Eigenschaften gefunden (Abb. 1).

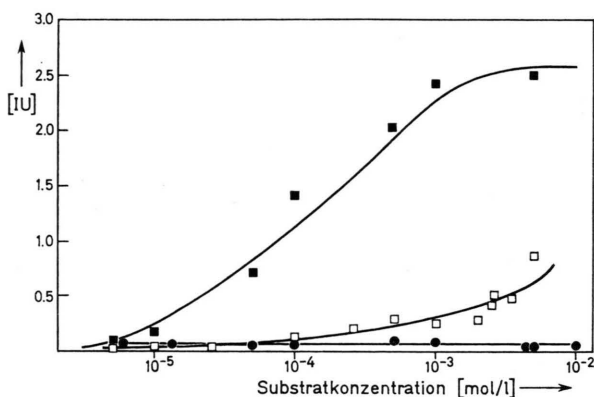


Abb. 1. Enzymatische Hydrolyse der Substrate (ausgedrückt in IU) durch je 100 µl roher Hämolymphe in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration (in mol/l). Substrate: ■—■, Acetylthiocholin; □—□, Propionylthiocholin; ●—●, Butyrylthiocholin; (0,085 M Phosphatpuffer, pH 7,2 bei 37 °C).

Da es sich um ein globuläres Protein handelt, erschien eine Anreicherung und Isolierung der enzymatisch aktiven Substanz sinnvoll, zumal die meisten bisher durchgeführten Isolierungen von Esterasen mit der Ablösung von Membranen² oder mit der Zerstörung anderer Zellstrukturen^{3,4} beginnen mußten.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Dettmar von Wachtendonk, Institut für Zoologie, TH Aachen, Kopernikusstr. 16, D-5100 Aachen.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der Methode von Ellman⁵, wobei Acetyl-, Propionyl- und Butyrylthiocholin-Jodid als Substrate dienten. Die Überprüfung der Reinigungsschritte erfolgte mittels Disk-Elektrophorese nach Maurer⁶; Proteine wurden durch Coomassie G 250 angefärbt, Enzymaktivitäten durch Verwendung von Indoxylacetat dargestellt.

Enzymaktivitäten wurden in internationalen Einheiten (international units, IU) ausgedrückt; eine IU entspricht 1 µmol gespaltenes Substrat pro mg Protein pro min.

Die Hämolymphe wurde aus der Miesmuschel durch Punktierung gewonnen und nach 24-stündiger Dialyse (0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,6; 0 °C) 30 min bei 33500 × g abzentrifugiert.

Durch Zugabe von 30 g festem gepulvertem (NH₄)₂SO₄ pro 100 ml Dialysat konnte eine das Enzym enthaltende Proteinfraction ausgefällt und nach 4-stündigem Stehen bei 0 °C abzentrifugiert werden. Der Bodenkörper wurde im gleichen Phosphatpuffer gelöst (Endkonzentration 0,5–1 mg/ml) und zur Entfernung von anhaftendem (NH₄)₂SO₄ dialysiert. 20 ml dieses Dialysats wurden auf eine mit Sephadex G 100 normal gefüllte Säule (46 × 3 cm, äquilibriert mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,6) gegeben und mit dem gleichen Puffer eluiert. Enzymhaltige Fraktionen wurden durch Ultrafiltration (Amicon-Zelle, versehen mit PM 30-Membranfilter) auf 1/5 des Elutionsvolumens konzentriert; je 1 ml dieses Konzentrates wurden nun auf eine mit Sepharix DEAE A 25 gefüllte Säule (20 × 2,5 cm, äquilibriert mit dem üblichen Phosphatpuffer) gegeben. Nach Auswaschen nicht adsorbierter Proteine mit dem gleichen Puffer wurde nun mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten im 0,02 M Phosphatpuffer bei einer Flußrate von 40 ml/h und einem Fraktionsvolumen von 3,9 ml eluiert; das gesuchte Enzym wurde bei einer NaCl-Konzentration von 0,1–0,15 M vom Austauscher desorbiert. Die Enzymfraktion, die disk-elektrophoretisch nur noch eine Bande zeigte, wurde 24 h wie üblich dialysiert und durch Ultrafiltration auf 2 ml konzentriert; die Endaktivität betrug 100 IU.

Die bereits in der rohen Hämolymphe demonstrierte Substratspezifität (Abb. 1) zeigt sich auch bei dem gereinigten Enzym. Das Enzym greift spezifisch S-Acetyl-Thiocholin an, während S-Propionyl- und S-Butyryl-Thiocholin nur in minimalen Mengen hydrolysiert werden. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch selektive Inhibitoren (Abb. 2). So wird die Enzymwirkung völlig unterbunden durch Neostigmin-Bromid, Eserin-Salicylat und BW 284 C 51 ([1,5-bis(4-N-Allyl-N,N-Dimethylam-

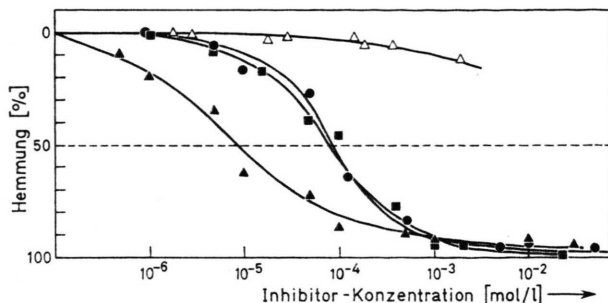


Abb. 2. Hemmung der Enzymwirkung durch verschiedene Inhibitoren in Abhängigkeit von der zugesetzten Inhibitor-konzentration. Inhibitoren: $\triangle$ — $\triangle$, Iso-OMPA; $\bullet$ — $\bullet$, Eserinsalicylat; $\blacksquare$ — $\blacksquare$, Neostigminbromid; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, BW 284 C 51. (pH 7,2 des 0,085 M Phosphatpuffers bei 37 °C; 0,103 M Acetylthiocholin als Substrat; 100 μ l Enzymlösung mit einer Spaltungsaktivität von 10 μ mol/min.)

monium-phenyl)-pentan-3-on]-Dibromid⁷) bei Konzentrationen von mehr als 10^{-3} mol/l, während das unspezifische, Cholinesterasen blockierende Tetramonoisopropylpyrophosphotetramid (Iso-OMPA) hier völlig wirkungslos ist. Es handelt sich um ein Glykoprotein⁸, das durch Zusatz chelatisierender Substanzen (EDTA, EGTA) oder durch Dialyse nicht in seiner Wirkungsweise beeinträchtigt wird.

Nun ist seit langem bekannt, daß die Hämolymphe von Mollusken Cholinesterasen enthalten^{9,10}, jedoch handelte es sich stets um „unspezifische“ Cholinesterasen (E.C. 3.1.1.8). Das Auffinden einer „wahren“ oder „spezifischen“ Acetylcholinesterase in löslicher Form ist von besonderem Interesse, weil eine lösliche Acetylcholinesterase bisher nur in Schlangengift¹¹ nachgewiesen und daraus

isoliert wurde; über das Vorkommen einer gelösten Acetylcholinesterase in der Hämolymphe von *Aplysia* wurde während dieser Untersuchung berichtet¹². Alle übrigen Isolierungen und Untersuchungen sind mit Acetylcholinesterasen durchgeführt worden, welche die Autoren von einer Membran ablösen mußten (*Electrophorus electricus*, *Torpedo marmorata*, Kopfganglien von *Loligo Pealii*, *Sepia officinalis*^{2,13–15}).

Aufgrund bekannter Unterscheidungskriterien^{16,17} handelt es sich offenbar um eine spezifische Acetylcholin-Acetylhydrolase (E.C. 3.1.1.7), denn einmal weist

die unterschiedliche Hemmbarkeit durch selektive Inhibitoren auf eine AChE hin, zum anderen entspricht

in der Reihe der homologen S-Acylcholins die relative Acetylcholinesterase-Aktivität der Reihenfolge Acetyl $\gg$ Propionyl $>$ Butyryl-Thiocholin.

Allerdings wird die hier beschriebene AChE im Gegensatz zu den meisten bisher bekannten Acetylcholinesterasen nicht durch höhere Acetylcholin-Konzentrationen (ca. 3×10^{-3} mol) gehemmt; dieses Phänomen zeigten bisher nur unspezifische Cholinesterasen, die auch durch wesentlich höhere Acetylcholin-Konzentrationen (10^{-1} mol) noch nicht gehemmt werden.

Aufgrund der bei hohen Konzentrationen von Acetylthiocholin auftretenden starken Eigenhydrolyse des Thioesters ist die letztgenannte Charakterisierung nicht eindeutig und bedarf noch weiterer Bestätigungen durch andere Meßverfahren der Enzymkinetik.

¹ M. Käßler u. D. von Wachtendonk, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **356**, 1803 [1975].

² W. Leuzinger, A. L. Baker u. E. Cauvin, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **59**, 620 [1968].

³ B. M. Twarog, J. Cell. Comp. Physiol. **44**, 141 [1954].

⁴ K. Sihotang, Biochim. Biophys. Acta **370**, 468 [1974].

⁵ G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr., u. R. V. Featherstone, Biochem. Pharmacol. **7**, 88 [1961].

⁶ H. R. Maurer, Disk-Elektrophorese, pp. 41, W. de Gruyter & Co., Berlin 1968.

⁷ Ich danke Herrn Dr. Larsson, Uppsala, für die Überlassung dieses Präparates.

⁸ D. von Wachtendonk u. J. Neef, in Vorbereitung.

⁹ H. Bockendahl u. Th.-M. Müller, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **341**, 185 [1965].

¹⁰ R. Voigtman u. G. Uhlenbruck, Z. Naturforsch. **26b**, 1374 [1971].

¹¹ V. Kumar u. W. B. Elliott, Prep. Biochemistry **3**, 569 [1973].

¹² F. A. Bevelacqua, K. S. Kim, M. H. Kumarasiri u. H. J. Schwarz, J. Biol. Chem. **250**, 731 [1975].

¹³ G. Cilin u. P. T. Özand, Biochim. Biophys. Acta **284**, 136 [1972].

¹⁴ J. D. Berman u. M. Young, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **68**, 394 [1971].

¹⁵ K. B. Augustinsson, Bull. Wld. Hlth. Org. **44**, 81 [1971].

¹⁶ N. Engelhard, K. Prchal u. M. Nenner, Angew. Chem. **79**, 604 [1967].

¹⁷ K. B. Augustinsson, Acta Physiol. Scand. **15**, Suppl. 52, 27 [1948].