

BBA 66380

BESTIMMUNG DER MOLAREN KONZENTRATION VON ACETYLCHOLIN-ESTERASE DURCH PHOSPHORYLIERUNG MIT PARAOXON ODER SOMAN

M. NENNER

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Göttingen, 34 Göttingen, Geiststr. 9 (Deutschland)

(Eingegangen am 3. März, 1971)

SUMMARY

Determination of the molar concentration of acetylcholinesterase based on phosphorylation by paraoxon or soman

1. The paper describes the determination of the molar concentration of the active sites of acetylcholinesterase (acetylcholine hydrolase, EC 3.1.1.7). The kinetic measurement uses phosphorylation by paraoxon or soman. The graphic evaluation is based on the kinetic equations for second-order reactions with equimolar concentration of reactants.

2. The determination can be done easily and quickly. During phosphorylation only measurement of diminishing acetylcholinesterase activity is necessary. Radioactive labelling and dialysis are not needed.

3. The method is suitable for the determination of very low acetylcholinesterase concentrations. Using paraoxon enzyme, concentrations to about $1 \cdot 10^{-8}$ M and using soman enzyme concentrations to about $2 \cdot 10^{-10}$ M can be determined.

EINLEITUNG

Aussagen über die Pharmakokinetik einer Organophosphatvergiftung setzen die Kenntnis der molaren Konzentrationen der Reaktionspartner voraus. Während die Bestimmung der Aktivität von Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) und Cholinesterase (EC 3.1.1.8) keine besonderen Schwierigkeiten mehr bietet¹⁻⁶, erfordert die Bestimmung der Enzymkonzentration entweder einen erheblichen experimentellen und zeitlichen Aufwand oder versagt bei Konzentrationen unter $1 \cdot 10^{-6}$ M ganz.

COHEN UND WARRINGA⁷ und COHEN *et al.*⁸ beschreiben ein Verfahren, bei dem das aktive Zentrum der Acetylcholinesterase zunächst mit Butyrylcholin blockiert wird. Anschliessend setzen sie das Enzym mit einem beträchtlichen Überschuss an Organophosphat um, wobei alle für die enzymatische Reaktion nicht spezifischen, gegenüber Organophosphaten jedoch reaktiven Stellen phosphoryliert werden. Nach Entfernung des reversibel gebundenen Butyrylcholins und des überschüssigen Organophosphats durch Dialyse wird das Enzym nochmals mit dem gleichen, jetzt

jedoch radioaktiv markierten, Organophosphat gehemmt. Die dabei durch kovalente Bindung fixierte Radioaktivität entspricht der Menge an aktiven Zentren.

WILSON UND HARRISON⁹ haben aus kinetischen Daten der enzymatischen Hydrolyse von Dimethylcarbamylfluorid die Konzentration (Normalität) der Acetylcholinesterase bestimmt. Diese Methode setzt Acetylcholinesterase-Konzentrationen von mindestens $3 \cdot 10^{-6}$ M voraus und erfordert einen beträchtlichen Zeitaufwand.

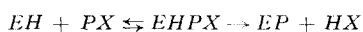
BENDER *et al.*¹⁰ bestimmen die Acetylcholinesterase-Konzentration durch "burst titration" mit *o*-Nitrophenyl-dimethylcarbamat. Das bei der Reaktion freigesetzte *o*-Nitrophenyl wird photometrisch bestimmt. Auch hier liegt die untere Grenze bei etwa $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Die hier vorgeschlagene kinetische Methode der Konzentrationsbestimmung beruht auf der Phosphorylierung der Acetylcholinesterase mit Paraoxon (Diäthyl-*p*-nitrophenylphosphat) oder Soman (Pinacolyl-methylphosphonsäure-fluorid). Die Grundlage des Verfahrens ist eine Reaktion zweiter Ordnung mit äquimolaren Konzentrationen der Reaktionspartner. Bei Verwendung von Paraoxon können Acetylcholinesterase-Konzentrationen bis zu $1 \cdot 10^{-8}$ M bestimmt werden. Für Soman liegt die untere Grenze bei $2 \cdot 10^{-10}$ M. Unter Enzymkonzentration wird die molare Konzentration der aktiven Zentren verstanden, wobei das aktive Zentrum die kleinste Einheit ist, die sämtliche für den Ablauf des enzymatischen Prozesses notwendigen funktionellen Gruppen enthält.

METHODIK

Kinetik der Reaktion

Bei der Phosphorylierung reagiert das Enzym *EH* mit dem Organophosphat *PX* zum phosphorylierten Enzym *EP*. Der Michaelis-Komplex *EHPX* steht im reversiblen Gleichgewicht mit *EH* und *PX*.



Nach WILSON¹¹ sowie MAIN UND IVERSON¹² gilt:

$$k_1 = \frac{k_p}{K_A} = \frac{1}{t} \left(\frac{1}{[PX]} + \frac{1}{K_A} \right) \ln \frac{v_0}{v} \quad (1)$$

k_1 = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Inhibition; k_p = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Phosphorylierung; K_A = Affinitätskonstante; v = Geschwindigkeit des Substratumsatzes.

Die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase mit Paraoxon oder Soman ist eine sehr schnelle Reaktion, deren Verlauf folglich nur bei sehr geringen Organophosphat-Konzentrationen gemessen werden kann. In diesem Fall wird $1/K_A$ gegenüber $1/[PX]$ vernachlässigbar klein und Gleichung 1 vereinfacht sich zu Gleichung 2.

$$k_1 = \frac{1}{t} \left(\frac{1}{[PX]} \right) \ln \frac{v_0}{v} \quad (2)$$

Hieraus folgt, dass man die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase mit Paraoxon oder Soman als Reaktion zweiter Ordnung behandeln kann, ohne das vorgelagerte Gleichgewicht zu berücksichtigen.

Für eine Reaktion zweiter Ordnung mit äquimolarer Konzentration der Reaktionspartner gilt:

$$k_2 t = 1/[EH] - 1/[EH]_0 \quad (3)$$

k_2 = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase. Die Auftragung von $1/[EH]$ gegen t ergibt eine Gerade mit der Steigung k_2 .

Die Enzymkonzentration $[EH]$ ist im Falle der Acetylcholinesterase der direkten Messung nicht zugänglich. Da aber v , die Geschwindigkeit des Substratumsatzes, der Acetylcholinesterase-Konzentration proportional ist, kann auch v gemessen und $1/v$ gegen t aufgetragen werden.

Die Acetylcholinesterase-Konzentration (molare Konzentration der aktiven Zentren) wird bestimmt, indem man in einer Reihe von Phosphorylierungsansätzen die Konzentration des einen Reaktionspartners konstant vorgibt und die Konzentration des anderen Partners von Ansatz zu Ansatz erhöht. Misst man für jeden Ansatz den zeitlichen Verlauf der Enzymaktivität und trägt $1/v$ gegen t auf, so erhält man eine Schar von Kurven, die bei Erreichen der äquimolaren Konzentration in eine Gerade übergehen.

Reagenzien und Enzyme

Salzlösung: 0.15 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$.

Acetylcholin-jodid: Fluka 01030, Stammlösung: $1.5 \cdot 10^{-2}$ M. 6-ml Proben dieser Stammlösung wurden in Proberöhrchen in der Tiefkühltruhe eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

Paraoxon: Diese Substanz wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. K. J. Schmidt von den Farbenfabriken Bayer AG zur Verfügung gestellt.

Acetylcholinesterase aus Rinder-Erythrozyten: Präparat der Fa. Mann Research Laboratories, New York.

Rinderblut: Das Blut wurde unmittelbar nach der Schlachtung entnommen und durch Vetren (0.15 mg/ml) ungerinnbar gemacht.

Humanblut: Jeweils frisch entnommene Proben wurden durch Vetren (0.60 mg/ml) ungerinnbar gemacht.

Erythrozyten-Suspension: Die Blutprobe wurde mit dem 20-fachen Volumen an Salzlösung verdünnt, 10 min bei $2870 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgehebert und verworfen. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Prozedur wurde auf die angegebene Verdünnung eingestellt. Die Angabe der Verdünnung bezieht sich auf das ursprüngliche Blutvolumen.

Phosphorylierung mit Paraoxon

Versuchsbedingungen: pH 7.4, 37° , 0.15 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, Stickstoffspülung: 50 ml/min. Die Paraoxon-Konzentration betrug einheitlich $1 \cdot 10^{-8}$ M. Die dem Phosphorylierungsansatz entnommene Probe wurde so verdünnt, dass innerhalb einer Versuchsserie stets die gleiche Enzymmenge zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt wurde.

Phosphorylierung mit Soman

Versuchsbedingungen wie unter *Phosphorylierung mit Paraoxon*, jedoch ohne

Stickstoffspülung. In diesem Falle wurde die Verdünnung der Erythrozyten mit 1:100 konstant vorgegeben und die Soman-Konzentration zwischen $4 \cdot 10^{-10}$ und $6 \cdot 10^{-10}$ M variiert.

Aktivitätsbestimmung

Die Acetylcholinesterase-Aktivität wurde mit dem automatischen Titrator der Fa. Radiometer bestimmt. Als Substrat diente Acetylcholin-jodid. Versuchsbedingungen: pH 7.4, 37° , 0.15 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, $3 \cdot 10^{-3}$ M Acetylcholin-jodid. Stickstoffspülung: 50 ml/min. Titrant: 0.01 M NaOH.

Das Volumen des Messansatzes betrug einheitlich 25 ml und bestand aus 15 ml Salzlösung, 5 ml Substratlösung und 5 ml Probe.

ERGEBNISSE

(1) Acetylcholinesterase-Präparat aus Rinder-Erythrozyten

Um die Acetylcholinesterase-Konzentration in dem von uns für Phosphorylierungen und Reaktivierungen häufig benutzten Standardansatz zu bestimmen, wurde zunächst ein Acetylcholinesterase-Präparat aus Rinder-Erythrozyten verwendet. Die Konzentration im Phosphorylierungsansatz wurde zwischen 0.04 und 4.0 mg Präparat/ml variiert. Die Umsatzgeschwindigkeit v wird in Mol Acetylcholin/l·min angegeben.

Wie Abb. 1 zeigt, nimmt bei 0.04 mg/ml die reziproke Umsatzgeschwindigkeit $1/v$ rasch zu. Dies lässt darauf schliessen, dass Paraoxon in beträchtlichem Überschuss vorhanden ist, so dass aufgrund der schnell fortschreitenden Phosphorylierung die Enzymaktivität v rasch abnimmt. Bei 4.0 mg/ml erreicht $1/v$ nach etwa 100 min einen konstanten Wert. Hier ist die Enzymkonzentration grösser als die Paraoxon-

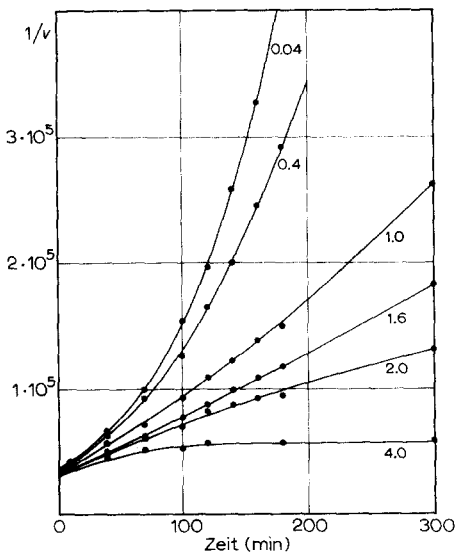


Abb. 1. $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase aus Rinder-Erythrozyten mit $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraoxon bei pH 7.4 und 37° . Die Enzymkonzentration (mg Präparat/ml) ist für jede Kurve angegeben.

Konzentration, so dass sich nach Verbrauch des Paraoxons ein konstantes v einstellt. Die äquimolare Konzentration wird bei 1.7 mg/ml erreicht.

Da bei dem Acetylcholinesterase-Präparat 1.7 mg/ml mit $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraoxon äquimolar sind, folgt für den Standard-Messansatz mit 0.01 mg/ml eine Acetylcholinesterase Konzentration von $5.9 \cdot 10^{-11}$ M. Unter Standardbedingungen haben wir bei $2 \cdot 10^{-3}$ M Acetylcholin einen Substratumsatz von $2.66 \cdot 10^{-5}$ M/min gemessen, so dass sich für Acetylcholinesterase aus Rinder-Erythrozyten eine Umsatzzahl von 4.5 Mol Acetylcholin/Mol aktive Zentren \cdot min ergibt.

Weiterhin folgt aus der Äquivalenz von $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraoxon mit 1.7 mg Acetylcholinesterase-Präparat/ml, dass 1 g Präparat $5.9 \cdot 10^{-9}$ Mol Acetylcholinesterase enthält. Nimmt man nach KREMNER UND WILSON¹³ das Molekulargewicht des Enzyms mit 230 000 an, so zeigt sich, dass dieses Präparat nur 0.14% Acetylcholinesterase enthält.

(2) Acetylcholinesterase in intakten Rinder-Erythrozyten

Nachdem die Methode ihre Brauchbarkeit für ein Acetylcholinesterase-Präparat (s. (1)) bewiesen hatte, sollten die Messungen auf Rinderblut und Humanblut ausgedehnt werden. Um festzustellen, ob Paraoxon teilweise durch die Plasmaproteine gebunden und auf diese Weise der Phosphorylierungsreaktion entzogen wird, wurde ein Versuch mit steigenden Plasmazusätzen durchgeführt. Da die Verwendung von menschlichem Plasma wegen der darin enthaltenen Acetylcholinesterase keine sicheren Aussagen erlaubt hätte, wurde Rinderplasma, das bekanntlich keine Acetylcholinesterase-Aktivität aufweist, eingesetzt. Zur Plasmagewinnung wurde das gleiche Rinderblut verwendet, dem auch die Erythrozyten entstammten.

Tabelle I gibt die Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration wieder; k_1 wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden berechnet.

TABELLE I

k_1 (min^{-1}) FÜR DIE PHOSPHORYLIERUNG VON ACETYLCHOLINESTERASE IN RINDER-ERYTHROZYTEN MIT $1 \cdot 10^{-8}$ M PARAOXON BEI pH 7.4 UND 37°

Vol. % Plasma	$k_1 \times 10^2$	$s \times 10^2$	r	Gebundenes Paraoxon (%)
0	1.42	0.05	0.998	0.0
2	1.16	0.07	0.993	18.3
4	0.88	0.04	0.996	38.0
8	0.31	0.08	0.894	78.2
16	0.05	0.05	0.501	96.5

s, Standardabweichung; r, Korrelationskoeffizient.

Wie Tabelle I zeigt, nimmt die Geschwindigkeitskonstante für die Phosphorylierung der Acetylcholinesterase mit steigender Plasmakonzentration rasch ab. Da k_1 der effektiven Paraoxon-Konzentration proportional ist, kann daraus der Anteil des gebundenen Paraoxons berechnet werden. Wie Abb. 2 zeigt, besteht von 0–8 Vol.% Plasma eine lineare Abhängigkeit der Bindung von Paraoxon an die Plasmaproteine, die sich bei höheren Werten asymptotisch 100% nähert.

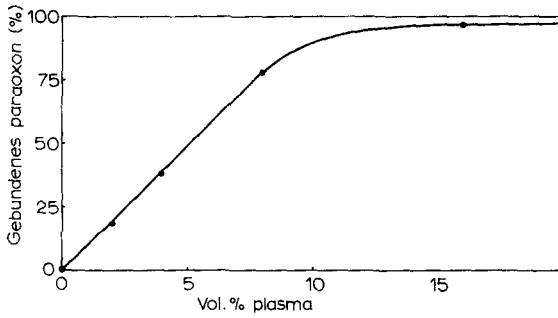


Abb. 2. Anteil des gebundenen Paraoxons in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration. Phosphorylierung von Acetylcholinesterase in Rinder-Erythrozyten mit $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraoxon bei pH 7.4 und 37° .

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung der molaren Acetylcholinesterase-Konzentration in Vollblut und Vollblut-Verdünnungen nicht möglich ist, da ein Teil des Paraoxons vom Plasma absorbiert und somit der Phosphorylierungsreaktion entzogen wird. Folglich kommen für die Bestimmung der molaren Konzentration der aktiven Zentren nur Erythrozyten-Suspensionen in Frage.

Abb. 3 zeigt die Auftragung von $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung von Rinder-Erythrozyten. Gemessen wurden unverdünnte Erythrozyten (bezogen auf Vollblut) und eine 1:5 verdünnte Suspension. Die zur Aktivitätsmessung eingesetzte Menge entsprach den Erythrozyten aus $500 \mu\text{l}$ Rinderblut. v wird in μMol Acetylcholin/ml \cdot min angegeben.

Vergleicht man die einzelnen Messungen in Abb. 3, so wird deutlich, dass bei der unverdünnten Erythrozyten-Suspension von Tier 2 keine Gerade, sondern eine nach unten gekrümmte Kurve vorliegt. Wie Tabelle II zeigt, hat dieses Tier eine deutlich höhere Acetylcholinesterase-Aktivität, so dass die Vermutung naheliegt, dass diese auf einer vergleichsweise höheren Acetylcholinesterase-Konzentration beruht.

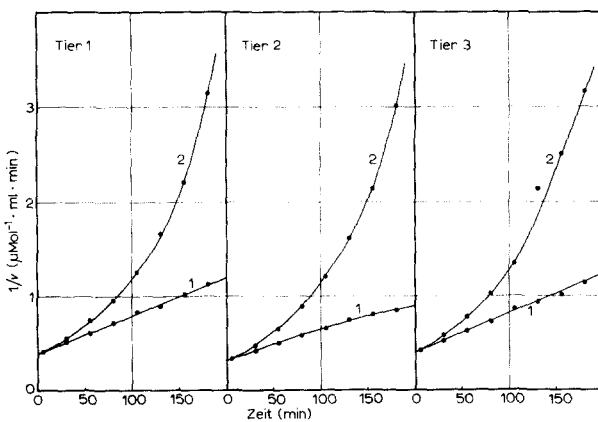


Abb. 3. $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase in Rinder-Erythrozyten mit $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraoxon bei pH 7.4 und 37° . 1, unverdünnte Erythrozyten; 2, 1:5 verdünnte Erythrozyten.

TABELLE II

ACETYLCHOLINESTERASE-AKTIVITÄT IN μMol ACETYLCHOLIN/ml \cdot min BEI pH 7.4, 37° UND $3 \cdot 10^{-8}$ M ACETYLCHOLIN FÜR 3 RINDER

Tier:	1	2	3
Hämatokrit:	38.0 %	36.5 %	40.0 %
Akt.v	2.64	3.33	2.66
Akt.p	0	0	0
Akt.E	6.95	9.12	6.65

Aus Abb. 3 folgt, dass die durch die Erythrozyten bedingte Acetylcholinesterase-Konzentration im Rinderblut etwa $1 \cdot 10^{-8}$ M beträgt.

(3) Acetylcholinesterase in intakten menschlichen Erythrozyten

Auch für Humanblut wurde die Konzentrationsbestimmung zunächst nur mit Erythrozytensuspensionen ausgeführt, da hier ebenfalls mit der störenden Plasmapbindung von Paraaxon gerechnet werden musste. Spätere Messungen mit einer Blutverdünnung bestätigten diese Vermutung: es ergab sich ein falscher, etwa um den Faktor 2–3 zu hoher Wert.

Die folgende Abb. 4 zeigt die Auftragung von $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung menschlicher Erythrozyten mit Paraaxon. Gemessen wurden 1:5 und 1:50 verdünnte Erythrozyten-Suspensionen. Auch hier ist die Verdünnung auf Vollblut bezogen. Die zur Aktivitätsmessung eingesetzte Menge entsprach den Erythrozyten aus 200 μl Blut. v wird in μMol Acetylcholin/ml \cdot min angegeben.

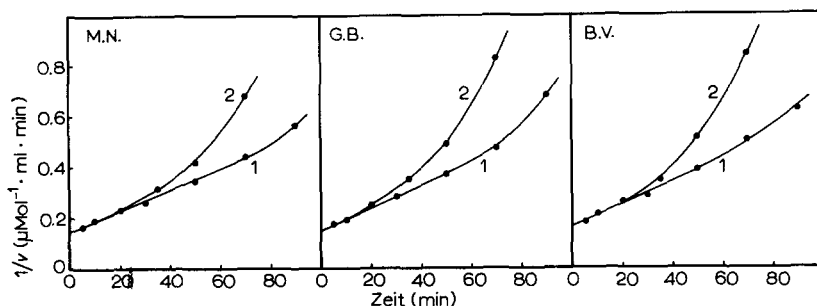


Abb. 4. $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase in menschlichen Erythrozyten mit $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraaxon bei pH 7.4 und 37° . 1, 1:5 verdünnte Erythrozyten; 2, 1:50 verdünnte Erythrozyten.

Aus Abb. 4 ist zu ersehen, dass bei einer Verdünnung von 1:5 die äquimolare Konzentration nicht ganz erreicht ist, da die Gerade nach einer Phosphorylierungszeit von 70 min nach oben abbiegt. Um den Versuchspersonen nicht noch grössere Blutproben abnehmen zu müssen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Phosphorylierungen bei niedrigeren Organophosphat-Konzentrationen durchzuführen. Hier erwies sich Soman wegen seiner gegenüber Paraaxon etwa 100-fach grösseren Reaktionsgeschwindigkeit als das geeignete Phosphorylierungsmittel.

Abb. 5 zeigt die Auftragung von $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung mensch-

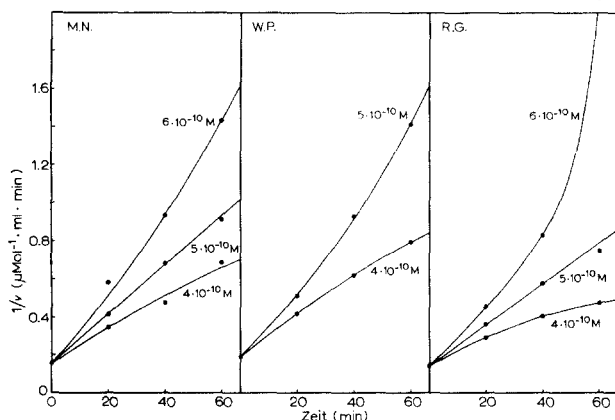


Abb. 5. $1/v$ gegen t für die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase in menschlichen Erythrozyten mit verschiedenen Somankonzentrationen bei pH 7.4 und 37° . Die Verdünnung der Erythrozyten im Phosphorylierungsansatz betrug einheitlich 1:100.

licher Erythrozyten mit Soman. Im Gegensatz zu den Messungen mit Paraoxon wurde hier die Verdünnung der Erythrozyten-Suspension mit 1:100 konstant gehalten und dafür die Soman-Konzentration zwischen $4 \cdot 10^{-10}$ und $6 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ variiert.

Aus Abb. 5 folgt, dass die von den Erythrozyten herrührende Acetylcholinesterase-Konzentration im menschlichen Blut zwischen $4 \cdot 10^{-8}$ und $6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ liegt. Berechnet man die Geschwindigkeitskonstante nach Gleichung 3, so ergibt sich aus den obigen Messungen ein Mittelwert von $1.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

DISKUSSION

Die hier beschriebene Methode erlaubt die einfache und rasche Bestimmung der molaren Konzentration von Acetylcholinesterase in Präparaten und biologischen Medien. Aus den bei der Aktivitätsbestimmung erhaltenen Umsatzgrößen und der Acetylcholinesterase-Konzentration lässt sich ausserdem die Umsatzzahl (turnover number) des Enzyms berechnen. Die Möglichkeit, mit Paraoxon Acetylcholinesterase-Konzentrationen bis zu $1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ und mit Soman Acetylcholinesterase-Konzentrationen bis zu $2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ zu bestimmen, bringt eine beträchtliche Erweiterung des zugänglichen Bereiches. Damit ist auch für kleine Versuchstiere, bei denen naturgemäß nur geringe Blutmengen zur Verfügung stehen, die Bestimmung der Acetylcholinesterase-Konzentration experimentell möglich geworden.

Wie die Strukturformel zeigt, ist Soman ein Gemisch von vier Stereoisomeren. Theoretisch wären demnach vier verschiedene Geschwindigkeitskonstanten für die Phosphorylierung von Acetylcholinesterase mit Soman möglich. KEIJER UND WOLRING¹⁴ haben Acetylcholinesterase aus Rindererythrozyten mit den reinen Soman-Isomeren umgesetzt und dabei beträchtliche Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten für die Phosphorylierung mit dem $(R)_C(R)_P$ - und dem $(R)_C(S)_P$ -Isomeren gefunden. Bei der Phosphorylierung von "Butyrylcholinesterase" aus Pferdeserum konnten sie bei Verwendung der gleichen Isomeren keinen Unterschied in den Geschwindigkeitskonstanten feststellen. Die eigenen Messungen mit intakten

menschlichen Erythrozyten haben keinen Hinweis auf unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten für die Phosphorylierung mit Soman gebracht, denn bis zu einem Umsatz von 80% des eingesetzten Enzyms zeigte die Auftragung von $1/v$ gegen t keine Abweichung von der ursprünglichen Geraden. Zur endgültigen Klärung dieses Sachverhalts bedarf es weiterer experimenteller Untersuchungen. Die grundsätzliche Möglichkeit mit Soman Acetylcholinesterase-Konzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^{-10}$ M zu bestimmen, wird davon jedoch nicht berührt. Vergleicht man das hier beschriebene Verfahren mit der Methode von COHEN UND WARRINGA⁷, die mit ³²P-markiertem DFP phosphorylieren und vor der Bestimmung der kovalent gebundenen Radioaktivität dialysieren müssen, so liegt der apparative und zeitliche Vorteil klar auf der Hand. Auch WILSON UND HARRISON⁹ benötigen Reaktionszeiten von 10–14 std bei Acetylcholinesterase-Konzentrationen von $3 \cdot 10^{-6}$ M. Mit der Methode von BENDER *et al.*¹⁰ können Konzentrationen unter $1 \cdot 10^{-6}$ M nicht erfasst werden.

Gegen die hier gezeigte Methode lässt sich einwenden, dass die Phosphorylierung unspezifischer Stellen des Enzyms bei dieser Bestimmung der Enzymkonzentration eventuell zu Fehlern führt. Derartige Fehler können durch die folgenden Kontrollen ausgeschlossen werden: Man berechnet k_1 , die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung, für einen Phosphorylierungsansatz, bei dem das Organophosphat gegenüber der Acetylcholinesterase in beträchtlichem Überschuss vorliegt. Zeigt k_1 während der gesamten Messung (Endwert etwa 90% Umsatz) keinen Gang zu niedrigeren Werten, so ist eine Nebenreaktion, die ebenfalls Paraoxon verbraucht, nicht zu erwarten. Eine weitere Kontrollmöglichkeit liegt in dem aus k_1 berechneten k_2 . Stimmt dieses mit k_2 aus der Steigung der Geraden nach Gleichung 3 überein, so heisst das, dass sich die Geschwindigkeitskonstante auch bei einer beträchtlichen Änderung des Konzentrationsverhältnisses Paraoxon/Enzym nicht ändert. Ein Beispiel möge diesen Sachverhalt erläutern:

Bei der Phosphorylierung von Acetylcholinesterase aus Rinder-Erythrozyten mit $1 \cdot 10^{-8}$ M Paraoxon erhält man für den Ansatz mit 0.04 mg Präparat/ml für k_1 den Wert $1.39 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ($s = 0.04 \cdot 10^{-2}$). Die Messwerte zeigen keinen Gang. Für k_2 folgt daraus der Wert $1.39 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Bestimmt man k_2 aus der Geraden nach Gleichung 3, so erhält man für den Ansatz mit 1.6 mg Präparat/ml den Wert $1.41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, d.h., obwohl sich das Konzentrationsverhältnis um den Faktor 40 geändert hat, tritt keine Änderung von k_2 ein.

Es ist nicht zu leugnen, dass diese Methode nicht die Bestimmung eines exakten Wertes, sondern nur die Festlegung eines Bereiches zulässt. Da bei biologischen Systemen aber grundsätzlich mit einer natürlichen Streuung gerechnet werden muss, schränkt dieser Umstand die Brauchbarkeit der Methode kaum ein.

Der aus den Erythrozyten stammende Anteil der Acetylcholinesterase-Konzentration im Rinderblut liegt nach unseren Messungen bei $1 \cdot 10^{-8}$ M. Da Rinderplasma keine Acetylcholinesterase-Aktivität besitzt, ist damit die gesamte Acetylcholinesterase-Konzentration im Rinderblut erfasst. COHEN UND WARRINGA⁷ finden einen Wert von $6 \cdot 10^{-9}$ M. Für Humanblut folgt aus unseren Messungen mit Paraoxon und Soman ein Wert von $4 \cdot 10^{-8}$ bis $6 \cdot 10^{-8}$ M. Auch hier ist lediglich der aus den Erythrozyten stammende Anteil der Acetylcholinesterase-Konzentration erfasst. Die Acetylcholinesterase-Konzentration im Plasma kann mit dieser Methode wegen der Plasmabindung des Organophosphats nicht bestimmt werden. Um die Grössenordnung dieses Anteils zu veranschaulichen, sei erwähnt, dass die enzymatische Hydro-

lyse von Acetylcholin (Substratkonzentration $3 \cdot 10^{-3}$ M) im menschlichen Blut zu 84% durch die Acetylcholinesterase der Erythrozyten erfolgt¹⁵.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wird die Bestimmung der molaren Konzentration der aktiven Zentren von Acetylcholinesterase beschrieben. Die kinetische Methode bedient sich der Phosphorylierung mit Paraoxon oder Soman. Die graphische Auswertung basiert auf den kinetischen Gleichungen für Reaktionen zweiter Ordnung mit äquimolarer Konzentration der Reaktionspartner.

2. Die Bestimmung ist einfach und schnell auszuführen, da lediglich die Abnahme der Acetylcholinesterase-Aktivität im Verlauf der Phosphorylierungsreaktion gemessen werden muss. Radioaktive Markierung und Dialyse sind nicht notwendig.

3. Die Methode erlaubt die Bestimmung sehr geringer Acetylcholinesterase-Konzentrationen. Mit Paraoxon können Enzymkonzentrationen bis zu $1 \cdot 10^{-8}$ M, mit Soman bis zu $2 \cdot 10^{-10}$ M bestimmt werden.

LITERATUR

- 1 R. F. WITTER, *Arch. Environ. Health*, 6 (1963) 537.
- 2 W. KALOW UND K. GENEST, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 (1957) 339.
- 3 H. WEBER, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 91 (1966) 1927.
- 4 M. KNEDEL UND R. BÖTTGER, *Klin. Wochenschr.*, 45 (1967) 325.
- 5 D. P. NABB UND F. WHITFIELD, *Arch. Environ. Health*, 15 (1967) 147.
- 6 M. NENNER, *Zschr. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 8 (1970) 537.
- 7 J. A. COHEN UND M. G. P. J. WARRINGA, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 52.
- 8 J. A. COHEN, R. A. OOSTERBAAN UND M. G. P. J. WARRINGA, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 228.
- 9 I. B. WILSON UND M. A. HARRISON, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2292.
- 10 M. L. BENDER, M. L. BEGUÉ-CANTON, R. L. BLAKELEY, L. J. BRUBACHER, J. FEDER, C. R. GUNTER, F. J. KÉZDY, J. V. KILLHEFFER, JR., T. H. MARSHALL, C. G. MILLER, R. W. ROESKE UND J. K. STOOPS, *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 5890.
- 11 I. B. WILSON, in P. D. BOYER, H. LARDY UND K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. IV, Academic Press, New York-London, 1960, S. 501.
- 12 A. R. MAIN UND F. IVERSON, *Biochem. J.*, 100 (1966) 525.
- 13 L. T. KREMZNER UND I. B. WILSON, *Biochemistry*, 3 (1964) 1902.
- 14 J. H. KEIJER UND G. Z. WOLRING, *Biochim. Biophys. Acta*, 185 (1969) 465.
- 15 M. NENNER, unveröffentlicht.