Isolierung von Acetylcholinesterase und Charakterisierung der katalytisch aktiven Stelle

Von

WOLFGANG HERBERT HOPFF

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 224

Muskelendplatte, Elektrisches Organ, *Torpedo*, Modelle der katalytisch aktiven Stelle der Acetylcholinesterase, Pharmakologische Belange

Präparation und Charakterisierung von Acetylcholinesterase 225

1. Konventionelle Methoden 225
2. Affinitätschromatographie 226
3. Charakterisierung der Cholinesterasen 226
   - 3.1. Nomenklatur 226
   - 3.2. Modelle der katalytisch aktiven Stelle 227
   - 3.3. Reaktionen an der katalytisch aktiven Stelle 229
   - 3.4. Pharmakologie: Vergiftung, «Reaktivierung» 230
4. Methodik 233
   - 4.1. Quelle 233
     Das elektrische Organ von *Torpedo marmorata*, Zusammensetzung, Aktivitätsbestimmung, Klassierung des Enzyms
   - 4.2. Präparation des Rohenzyms 236
     Homogenisation, Extraktion, Phasentrennung, Ultrafiltration, Gelfiltration
   - 4.3. Präparation der Lipide 237
   - 4.4. Affinitätschromatographie 238
     Stellungnahme zum Problem der Nomenklatur der Affinitätschromatographie, Aufbau der Affinitäts-Säule, Synthesen von 1-(N,N,N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin und 1-(N,N,N-Trimethylammonium)-10-Decylamin, Synthese der substituierten Agarose, Beständigkeit, Affinitätschromatographie
5. Kinetik mit Acetylcholin-Homologen 246
   Methodik, Synthesen, Enzym-Versuche, Resultate

Allgemeine Diskussion 255

Zusammenfassung 256

Literatur 257

Einleitung

Die Muskelendplatte ist für Physiologie und Pharmakologie ein gängiges Präparat zum Studium synaptischer Wirkungen. Um biochemische Bausteine zu isolieren ist jedoch die Extraktion von Muskelendplatten wenig geeignet, da diese nur in geringer «Konzentration» im Muskel vorkommen.

Ein Modell von Muskelendplatten finden wir im elektrischen Organ der elektrischen Fische. Die elektrischen Organe sind im Laufe der Entwicklung ab- und umgewandelte Muskeln und bestehen hauptsächlich aus Endplatten.

Es war das Verdienst von LINDHARD [1], auf dieses Naturmodell hingewiesen zu haben. NACHMANSOHN [2] hat es als erster für die Extraktion von Acetylcholinesterase verwendet.

Von den Fischen mit elektrischen Organen werden heute vor allem zwei verschiedene Sorten verwendet: 1. Der elektrische Aal, *Electrophorus electricus*, aus dem Amazonas und 2. der Zitterrochen, *Torpedo marmorata*, aus tropischen und subtropischen Meeren. Für unsere Arbeiten kam, hauptsächlich aus finanziellen Gründen, praktisch nur der *Torpedo* in Frage. *Torpedos* in genügender Grösse und in entsprechender Anzahl findet man praktisch an allen südeuropäischen Küsten. Ausgewachsene *Torpedos* messen bis zu 60 cm Durchmesser. Ihr Gewicht beträgt bis zu ca. 5 kg. Elektrische Organe können bis zu 500 g wiegen. Die vom *Torpedo* abgegebene Spannung beträgt 40–60 Volt. Bei der Berührung wird der elektrische Schlag meist in einer Serie von elektrischen Entladungen abgegeben, was bei der Berührung nicht unbedingt als unangenehm empfunden werden kann. Wegen der Serienentladungen wird der *Torpedo* auch Zitterrochen, oder in Frankreich Trembleur genannt. Die Biologie der elektrischen Fische ist in zahlreichen Arbeiten gut dokumentiert [3–7].

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Acetylcholinesterase, im Hinblick auf pharmakologische Belange, näher zu untersuchen. Dazu musste das Enzym zunächst in genügender Menge und in genügender Reinheit präpariert werden. Durch Synthese geeigneter Verbindungen konnten wir das einfache, wegen seiner Form «Bra-Modell» genannte Bild der katalytisch aktiven Stelle der Acetylcholinesterase erweitern. Im Vergleich mit der katalytisch aktiven Stelle der Cholinesterase konnten Modelle erarbeitet werden, die die Unterschiede zur Acetylcholinesterase zeigen.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Prof. Dr. Dr. P. G. WASER für sein Interesse, seine Anregungen und die grosszügige Unterstützung ganz herzlich zu danken. Ferner danke ich allen denjenigen Angehörigen des Pharmakologischen Institutes der Universität Zürich, die irgendwie am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, speziell jedoch den Herren FELIX SCHEUERMANN und Dr. GAETANO RIGGIO sowie Frau ELSBETH KREIS.

Darüber hinaus fühle ich mich vor allem Herrn Prof. Dr. W. LEUZINGER, Rio de Janeiro, zu Dank verpflichtet, da er mir gerade zu Anfang dieser Studien wertvolle Starthilfe geleistet hat. Für eine erfreuliche Zusammenarbeit, speziell bei der Ausführung affinitätschromatographischer Methodik, danke ich besonders den Herren Dr. J. FRANK und Prof. Dr. R. SCHWYZER. Speziell hervorheben möchte ich jedoch

für seine selbstlose Hilfe, nicht nur bei der Beschaffung und Präparation der elektrischen Organe, sondern auch für die grosszügige Unterstützung mit technischem Material, Herrn Dr. HEINRICH MÜLDNER, Max-Planck-Institut, Göttingen.

Für die Beschaffung beziehungsweise Synthese von wasserlöslichen Carbodiimiden, ohne die eine Synthese, in den beschriebenen Ausmassen, unserer Affinitätssäulen nicht möglich gewesen wäre, danke ich den Herren Dr. A. HOFMANN, Dr. H. MÜLDNER und Dr. D. AMBROS.

Ces travaux ont commencé à l'Institut Universitaire de Biologie Marine, Station Biologique d'Arcachon. Nous aimerions remercier tous les membres de l'institut de leur aide, particulièrement d'avoir mis à notre disposition leurs laboratoires ainsi qu'un grand nombre de poissons torpilles. Notre gratitude s'adresse spécialement à Monsieur le Docteur C. CAZAUX dont nous avons apprécié l'aide, ainsi que l'intérêt porté à nos travaux. Nous remercions vivement Messieurs les pêcheurs de Piriac qui nous ont fourni bénévolement les torpilles, plus particulièrement nous pensons à Monsieur et Madame ROGER COUTANÇEAU à La Rochelle.

Nous adressons à notre ami ANDRÉ VIREY, aux Boissets, nos plus chaleureux remerciements.

Preparation und Charakterisierug der Acetylcholinesterase

1. Konventionelle Methoden

Man darf heute annehmen, dass die Acetylcholinesterase des Nervensystems hauptsächlich in den postsynaptischen Membranen cholinerger Systeme lokalisiert ist. In diesen Membranen ist sie unter anderem an Lipide gebunden. Löst man diese Lipide mit geeigneten Lösungsmitteln aus dem Gewebe heraus, so kann das Enzym solubilisiert werden. Zu diesem Zweck schlugen ROTHENBERG und NACHMANSOHN [8] die Verwendung von Toluol vor. Toluol wird auch heute noch zur Extraktion dieser Lipide verwendet, da Toluol erstens das Gewebe vor bakteriellem Angriff schützt und zweitens die Enzymaktivität, auch nach längerer Aufbewahrung, darunter nicht leidet. Grundlegende Schritte zur Solubilisierung, Reinigung, Charakterisierung und Handhabung bei der Aufarbeitung, wurden von NACHMANSOHN und Mitarbeitern [9–14] beschrieben. Aufbauend auf diese Versuche haben LEUZINGER und Mitarbeiter [15–18] Acetylcholinesterase erstmals in reiner Form dargestellt und zur Kristallisation gebracht. Die recht aufwendige Arbeitsweise bestand in fraktionierter Fällung mit Ammonsulfat und Anwendung verschiedener chromatographischer Methodik. Die konventionellen biochemischen Trennmethoden sind umständlich und erfordern einen grossen Zeitaufwand, da sie ja nur auf geringfügigen Unterschieden biophysikalischer Eigenschaften der zu trennenden Substanzen beruhen. Man kann deshalb das Verdienst von LEUZINGER nicht genug betonen. Gerade in den letzten Jahren wurde die biochemische Methodik durch verbesserte Verfahren der Ultrafiltration und Gelfiltration bereichert.

2. Affinitätschromatographie

Eine wesentliche Wende hat die Einführung der Affinitätschromatographie durch CUATRECASAS [19] gebracht. Diese Methode ist speziell für die Affinitätschromatographie der Acetylcholinesterase geeignet und wurde hauptsächlich von BERMAN und YOUNG [20] und HOPFF et al. [21] verwendet.

Die allgemeine Definition, die selbst von CUATRECASAS [19] für die Affinitätschromatographie gegeben wird ist die:

1. Ein spezifischer Agonist oder Antagonist des zu reinigenden Proteins (Enzym, Rezeptor usw.) wird an einen adäquaten Träger gebunden.
2. Eine Proteinlösung wird aufgetragen; dabei bindet sich die gewünschte Proteinfraktion spezifisch.
3. Durch Anwendung von Pufferlösungen steigender Ionenaktivität können verschiedene Proteinfraktionen, im Verhältnis ihrer Bindung, der Reihe nach eluiert werden.

Im Falle der Acetylcholinesterase können wir die Affinitätschromatographie noch besser definieren: Die Punkte 1 und 2 bleiben gleich. Wird jedoch 3. eine Pufferlösung steigender Ionenaktivität angewandt, können alle mehr oder weniger stark gebundenen Proteine aus der Kolonne ausgewaschen werden. Wegen der relativ starken spezifischen Bindung bleibt die Acetylcholinesterase allein auf der Kolonne hängen. Erst im 4. Schritt kann das Enzym mit freiem Antagonisten (der seiner Natur nach der gleiche ist wie der gebundene Antagonist) durch Austauschreaktion von der Kolonne eluiert werden. Im Eluat finden wir das Enzym in Gegenwart des Antagonisten. Dieser kann nun leicht durch Dialyse und nachfolgende Gelfiltration vom Enzym abgetrennt werden.

Das so erhaltene Enzym konnte zur Kristallisation gebracht werden. Wir haben das Enzym lediglich aus historischen Gründen kristallisiert. Heute weiss man, dass die Kristallisation von grösseren Molekülen keinen Reinheitsbeweis mehr darstellt. Ausserdem wurde bei Kristallproben, die später wieder in Lösung gebracht wurden, festgestellt, dass ein grosser Teil der Enzymaktivität verloren gegangen war. Das kann man sich so erklären: Bei der Kristallisation nimmt das Makromolekül einen Konformationszustand ein, der im Energieniveau günstig, also niedrig ist. Bei der Wiederauflösung kann der ursprüngliche höhere Energiezustand (Konformation) nicht wieder erreicht werden.

3. Charakterisierung der Cholinesterasen

3.1. Nomenklatur

Als Cholinesterasen bezeichnet man Enzyme, die in der Lage sind, die Hydrolyse von Acetylcholin zu katalysieren. Diese Esterasen können auch die Hydrolyse ähnlich gebauter Ester katalysieren. Im Organismus unterscheiden wir grob zwei Arten von Cholinesterasen: a) membrangebundene Esterasen und b) freie Esterasen.

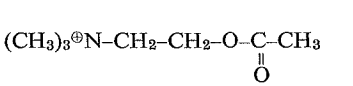
a) Die membrangebundene Esterase finden wir in der postsynaptischen Membran des cholinergen Systems und in Erythrocytenmembranen. Nach der Enzym-Nomenklatur[1] der Enzyme Commission (EC) der International Union of Biochemistry (IUB), bezeichnet man die membrangebundene Esterase als Acetylcholinesterase, oder wahre (true) Cholinesterase exakt als Acetylcholine Acetyl-Hydrolase, EC 3.1.1.7.

Sie katalysiert spezifisch die Hydrolyse des Acetylcholins, vermag aber auch die Hydrolyse sehr ähnlich gebauter Ester zu katalysieren. Sie katalysiert die Hydrolyse von Acetyl-β-Methylcholin, welche Eigenschaft die Serumesterase nicht hat.

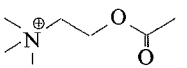
b) Die freie Esterase finden wir hauptsächlich im Blutserum, aber auch in den Geweben. Sie kommt in Isoenzymen vor [22–23] und ist relativ wenig spezifisch. Sie katalysiert die Hydrolyse vieler Ester. Da sie die Hydrolyse von Butyrylcholin katalysiert, welche Eigenschaft die Acetylcholinesterase nicht hat, wird die Serumesterase oder Cholinesterase, auch Butyrylcholinesterase, Pseudocholinesterase, oder exakt als Acylcholin Acyl-Hydrolase, EC 3.1.1.8, bezeichnet.

3.2. Modelle der katalytisch aktiven Stelle

Als Modell eignet sich das einfache «Büstenhaltermodell» von WILSON [24–25] und NACHMANSOHN [26]. Man ist dabei von der Struktur des Acetylcholins ausgegangen:



Acetylcholin



Symbol

Acetylcholin trägt mit dem quartären Stickstoff einen Kationenkopf und am anderen Ende des Moleküls eine Estergruppe [27], die beide für eine Bindung in Betracht gezogen werden können. Man darf sich die Katalyse der Hydrolyse heute folgendermassen vorstellen: Eine negative Ladung an einer definierten Stelle des Enzyms, das sogenannte anionische Zentrum, zieht die positive Ladung auf dem Stickstoff des Acetylcholins an. Dadurch kann das Acetylcholin über mehrere Moleküldurchmesser schnell an das anionische Zentrum angezogen und hydrolysegerecht angelagert werden. Ist das Molekül einmal fixiert, kann ein nucleophiler Angriff vom esteratischen Zentrum auf den Carbonyl-Kohlenstoff erfolgen, wobei in der Folgereaktion das Cholin-Ion einen Weggangsimpuls bekommt. Der alkoholische Sauerstoff protonisiert sich dabei umgehend, wozu wahrscheinlich ein vorher am esteratischen Zentrum gebundenes Proton dient. Danach ist das esteratische Zentrum acetyliert. Das acetylierte Enzym dient uns als Modell für die Phosphorylierung, beziehungsweise umgekehrt wurden Rückschlüsse über die Acetylierung aus

[1] Enzyme Nomenclature, Recommendations (1972) of the IUPAC and IUB, Elsevier, Amsterdam, 1973.

den Kenntnissen über die Phosphorylierung gezogen [28]. Eine ausführliche Beschreibung der Chemie der Katalyse an der aktiven Stelle finden wir bei WILSON [25], NACHMANSOHN [26], O'BRIEN [28], KARCZMAR et al. [29] und COHEN und OOSTERBAAN [30]. Das acetylierte Enzym wird durch katalytische Übertragung einer Hydroxylgruppe hydrolysiert. Die dabei weggehende Essigsäure gibt leicht ein Proton ab, welches bei einigen Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung dient.

Die aktive Stelle besteht, grob gesehen, aus einem «Negativ» für das Acetylcholin. Chemisch steckt mit grosser Wahrscheinlichkeit hinter dem anionischen Zentrum die Carboxylgruppe einer Aminosäure und hinter dem esteratischen Zentrum ein Imidazol-Stickstoff eines Histidins, oder ein Serin-Hydroxyl, oder beide zusammen. Die chemischen Gegebenheiten am esteratischen Zentrum kann man gut mit der Reaktionsfähigkeit eines Imidazol-Stickstoffes erklären. Eine Basis für die Annahme, dass eine solche Histidin-Gruppe am esteratischen Zentrum existiert, finden wir bei COHEN und OOSTERBAAN [30], KARCZMAR et al. [29] und GOEDDE et al. [23]. Wir haben für das anionische Zentrum das Symbol $A^{\ominus}$ und für das esteratische Zentrum das Symbol E: gesetzt. Biophysikalische Berechnungen, die die Natur des esteratischen Zentrums charakterisieren, finden sich bei NACHMANSOHN [26]. Für die Formulierung chemischer Reaktionen an der katalytisch aktiven Stelle wird das «Büstenhaltermodell» viel verwendet (Fig. 1).

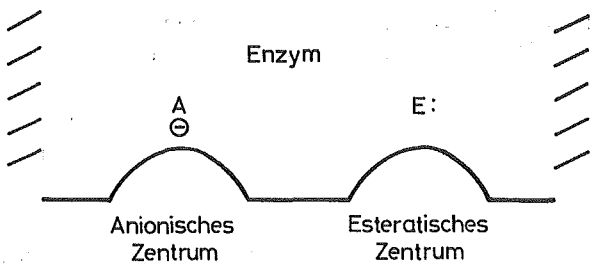


Fig. 1. Katalytisch aktive Stelle der Cholinesterasen.

Dieses Modell kann für die Erklärung chemischer Reaktionen an der Acetylcholinesterase, der Cholinesterasen und mit Einschränkungen auch für cholinergische Rezeptoren [31] herangezogen werden. Die früher öfters aufgeworfene Frage, ob Cholinesterase und cholinergisches Rezeptorprotein identisch seien, darf heute ziemlich sicher dahingehend beantwortet werden, dass dies nicht der Fall ist, da es sich um zwei verschiedene Proteine handelt. Es muss aber festgestellt werden, dass WASER [32] bereits 1962 eindeutig die Verschiedenheit bewiesen hat. Man darf heute annehmen, dass die katalytisch aktive Stelle des Enzyms und das Bindungsprotein (Cholinergischer Rezeptor) nicht einmal auf der gleichen Protein-Kette liegen, sondern, dass es sich um verschiedene Proteine handelt. Neben reinen Cholinesterasen [15, 20, 21, 33] wurden ebenfalls von vielen Autoren [34–40] cholinergische Bindungsproteine isoliert, deren physikalisch-chemische Eigenschaften deutlich von denen der Cholinesterasen verschieden sind.

3.3. Reaktionen an der katalytisch aktiven Stelle

Die Katalyse der Hydrolyse läuft in folgenden Schritten ab (Fig. 2 bis 4). Zusammenstellungen der grundlegenden Literatur finden sich bei zahlreichen Autoren [25–30, 41, 42].

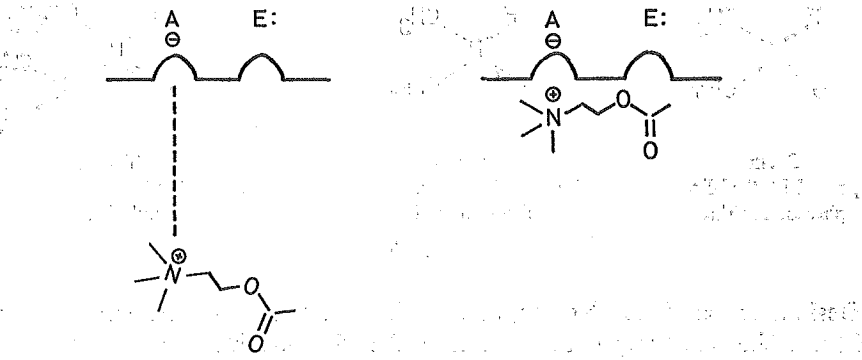


Fig. 2. Elektrostatische Anziehung und Fixation von Acetylcholin an der aktiven Stelle.

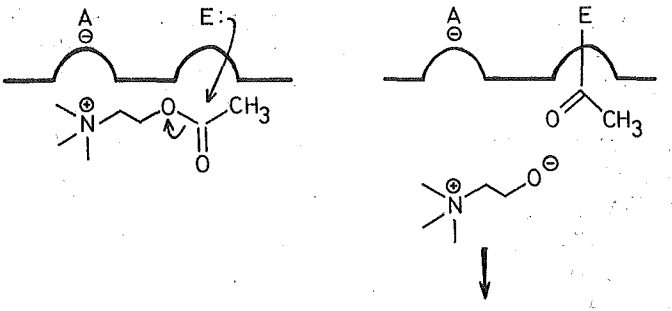


Fig. 3. Nucleophiler Angriff des esteratischen Zentrums, Weggang des Cholins und damit Acetylierung des Enzyms.

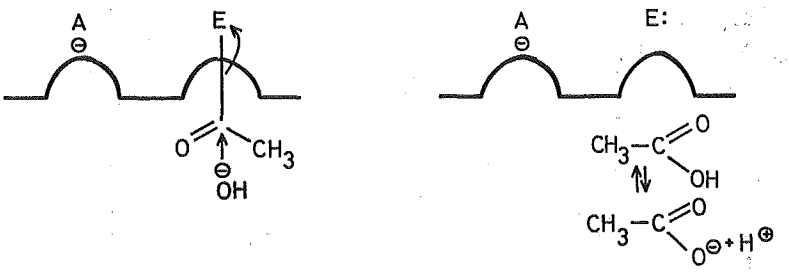
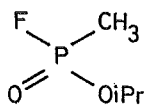


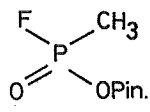
Fig. 4. Katalytischer Angriff eines aktivierten Hydroxyls. Ablösung der Essigsäure bewirkt «Reaktivierung» der aktiven Stelle.

3.4. Pharmakologie: Vergiftung, «Reaktivierung»

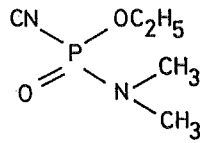
Die weitaus stärksten Gifte für Cholinesterasen kommen aus der Gruppe der Organophosphate. Von diesen sind Sarin und ähnliche, wie Soman und Tabun, die wirksamsten. Es handelt sich dabei um Flüssigkeiten mit hohem Dampfdruck (Fig. 5).



Sarin
Isopropyl-Methyl-Phosphonofluoridat



Soman
Pinakolyl-Methyl-Phosphonofluoridat



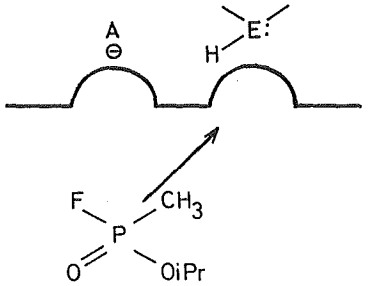
Tabun
Dimethylamino-Ethoxy-Phosphonyl-Cyanid

Fig. 5.

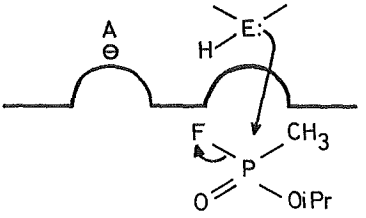
Deshalb tragen diese «Nervengifte» auch den Namen «Nervengase». Sie werden nicht nur über die Lungen, sondern auch über die Schleimhäute und die Haut aufgenommen. Sie diffundieren schnell an die esteratischen Zentren der Cholinesterasen und werden kovalent gebunden. Daneben sind auch Interaktionen mit anderen Enzymen, wie zum Beispiel Carboxypeptidase, bekannt. Das phosphorylierte Enzym kann nun, im Gegensatz zum acetylierten Enzym, nicht mehr, oder nicht mehr schnell genug, reaktiviert werden. Die Esterasen sind blockiert, das synaptisch freigesetzte Acetylcholin häuft sich an und der Organismus vergiftet sich selbst mit seinem körpereigenen Acetylcholin. In Kenntnis der Modellreaktion Acetylcholin-Hydrolyse liegt nun die Frage nahe, warum man als Blocker keine Phosphorylcholine verwendet. Diese sollten doch schneller wie die erwähnten Nervengifte wirken! In der Tat gelang es TAMMELIN [43–45] solche Phosphorylcholine herzustellen und FREDRIKSSON [46–47] hat diese Substanzen pharmakologisch untersucht. Es erstaunt nicht, dass einige Phosphorylcholine ca. 100- bis 1000mal aktiver sind als die erwähnten Phosphate. Da sie jedoch wenig stabil sind (in wässriger Lösung beträgt die Halbwertszeit praktisch nur wenige Minuten), kann man sie praktisch kaum verwenden. Die einzelnen Schritte der Organophosphatvergiftung formuliert man gemäss Fig. 6 und 7.

Das phosphorylierte Enzym hydrolysiert in wässriger Lösung. Die Hydrolyse ist allerdings viel zu langsam, um in vivo genügend aktive Stellen freizusetzen [28], damit der Abbau des überschüssigen Acetylcholins katalysiert werden kann. Bei dieser Hydrolyse können hauptsächlich zwei Reaktionen ablaufen: a) Die gewünschte Hydrolyse mit Freisetzung des Phosphatrestes und Reaktivierung des esteratischen Zentrums. b) Eine Hydrolyse in dem Sinne, dass eine relativ gute Weggangsgruppe, bei Sarin die O-Isopropylgruppe, durch Hydroxyl ersetzt wird. Es kann sich dann ein Austausch-Gleichgewicht einstellen, bei dem nur noch Hydroxyl gegen Hydroxyl ausgetauscht wird (Fig. 8).

Das gebildete Phosphat (Isopropyl-Methyl-Phosphat) hat die ursprüngliche Giftigkeit der Ausgangssubstanz (Sarin) verloren (Fig. 9).

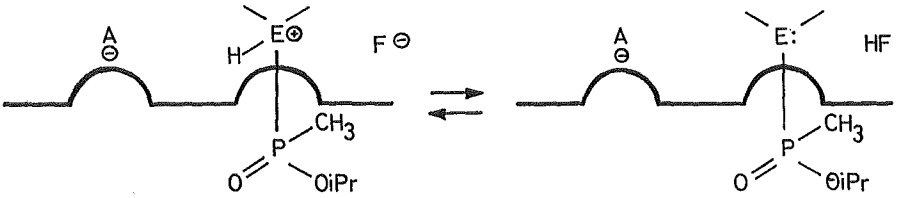


1. Diffusion von Sarin an das esteratische Zentrum.



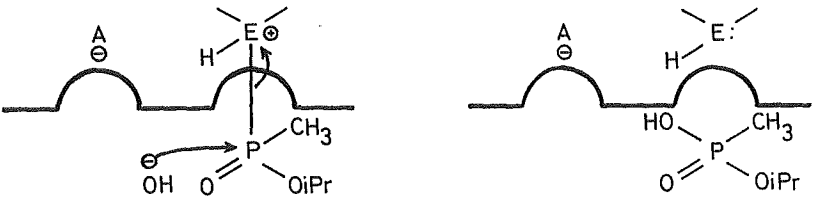
2. Nucleophiler Angriff des esteratischen Zentrums und Freisetzung der Weggangsgruppe (Fluorid).

Fig. 6.



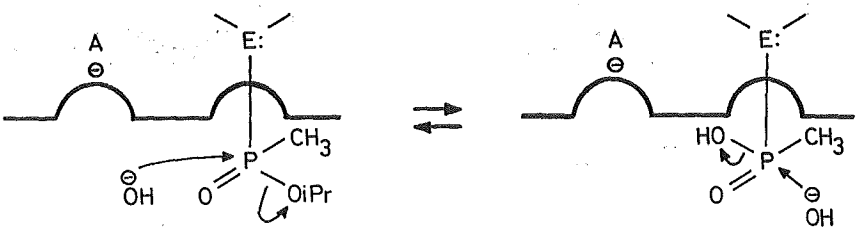
3. Phosphoryliertes Enzym.

Fig. 7.



4. Freisetzung des Phosphatrestes.

Fig. 8.



5. Hydoxyl-Austausch.

Fig. 9.

Dieser Vorgang wird neben anderen in der gängigen Literatur als «Alterung» (aging) [28–29, 49] bezeichnet. Liegt eine noch bessere Weggangsgruppe vor, wie zum Beispiel die O-Pinakolylgruppe im Soman, tritt diese Alterung noch wesentlich rascher ein. «Gealterte» Cholinesterasen konnten bis heute nicht reaktiviert werden.

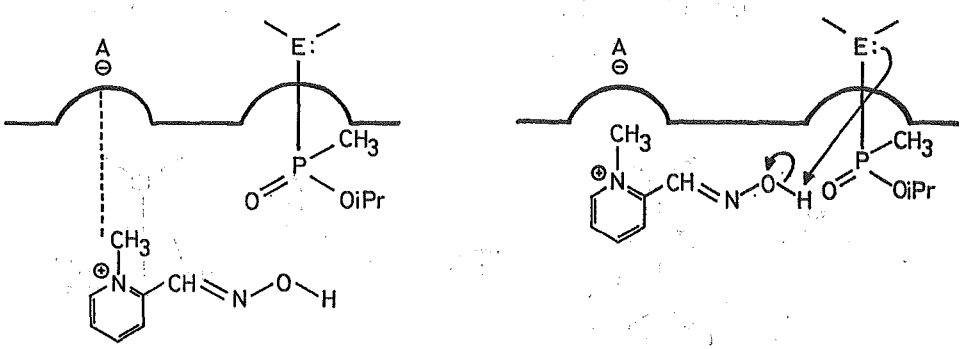
Die ursprüngliche Idee von WILSON [50–52] mit stärkeren Nucleophilen den Phosphatrest vom esteratischen Zentrum abzulösen, führte schliesslich zur Entwicklung der Oxime durch CHILDS et al. [53] und CREASY und GREEN [54]. Eine Zusammenfassung der entsprechenden Literatur finden wir bei HEILBRONN [49]. Die Mechanismen der Vergiftung haben wir gemäss Figur 10 formuliert [42].

So kann der Angriff des Oxims auf den Phosphatrest, der zur Bildung der Oxim-Phosphatverbindung führt, verstanden werden (Fig. 11).

Es kann aber auch, ähnlich wie bei der Spontanhydrolyse, nicht nur das Enzym, sondern auch die O-Isopropylgruppe des Sarins, oder die O-Pinakolylgruppe des Somans als Weggangsgruppe dienen. Damit wäre dann der Oximrest erst richtig fest an das Enzym gebunden. Eine Reaktivierung wäre kaum noch möglich (Fig. 12).

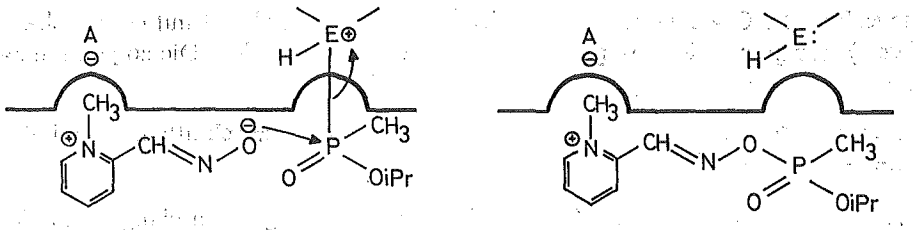
Tatsächlich ist für Soman beschrieben worden [55–56], dass die Zugabe von Oximen zur blockierten Cholinesterase dessen Giftigkeit erhöht.

Die grundlegende Reaktion bei der «Reaktivierung» ist die Bildung eines Phosphoryloximes. TAMMELIN [43–45], FREDRIKSSON [46–47] und HACKLEY et al. [48] haben aber gezeigt, dass solche Ester, die ja dem Acetylcholin ähneln, eine grössere Affinität zur katalytisch aktiven Stelle haben als die ursprünglichen Organophosphate. Das «reaktivierte» esteratische Zentrum kann also sofort von dem gebildeten Phosphoryloxim wieder besetzt werden. Dabei gibt es mechanistisch wiederum zwei Möglichkeiten: a) Ein nukleophiler Angriff des esteratischen Zentrums auf den Phosphor und Weggang des Oxims führt wieder zur Ausgangssituation und b) bei gleichem Angriff, aber Weggang des O-Isopropylrestes wird die katalytisch aktive Stelle irreversibel blockiert. Die einzige Chance für eine schwache Reaktivierung ist die, dass das frisch gebildete Phosphoryloxim hydrolysiert. Unter diesen Umständen kann man in vitro tatsächlich eine Reaktivierung zeigen. Für die praktische Anwendung im Organismus darf die Tatsache nicht ausser Betracht gelassen



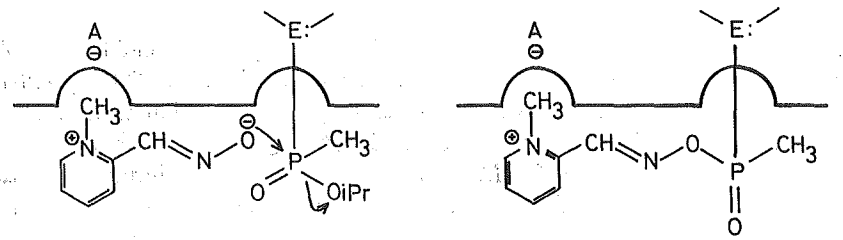
6. Pralidoxim wird vom anionischen Zentrum angezogen und fixiert. Dabei kann das relativ saure Proton vom esteratischen Zentrum aufgenommen werden.

Fig. 10.



7. Bildung der Oxim-Phosphat-Verbindung unter «Weggang» des Enzyms.

Fig. 11.



8. Weggang einer relativ guten Weggangsgruppe in Konkurrenz zum Enzym.

Fig. 12.

werden, dass die zur Therapie verwendeten Oxime (Pralidoxim und Obidoxim) wegen ihrer positiven Ladung kaum Membranen passieren können. Sie dringen deswegen nicht in das zentrale Nervensystem ein [57–58] und können auch schlecht in die Synapsen gelangen, nämlich an die Stellen, wo sie ihre Wirkung eigentlich entfalten sollten. Tierversuche bestätigen dies nur allzugut. Zwar können Mäuse oder Ratten, die mit der mehrfachen letalen Dosis von zum Beispiel Sarin vergiftet waren, überleben, wenn sie vorher mit Oximen behandelt wurden, doch ist es in noch keinem Fall gelungen, Mäuse mit einer Behandlung nach der letalen Vergiftung zu retten [59–60]. Bei Ratten wurde beobachtet, dass Oxime, auch wenn sie prophylaktisch gegeben wurden, keinen therapeutischen Effekt zeigen konnten [61–62].

4. Methodik

4.1. Quelle

Das elektrische Organ von Torpedo marmorata

Die für unsere Versuche verwendeten Fische stammten von der französischen Atlantik-Küste, aus der Gegend von Piriac s. M., von La Rochelle und von Arcachon[2]. Sie wurden mit Boden-Schleppnetzen in den küstennahen Gebieten gefangen.

[2] Institut Universitaire de Biologie Marine, F-33120 Arcachon, France.

Das elektrische Organ lässt sich (nach Wegpräparieren der Haut mit einem scharfen Messer) stumpf mit dem Finger aus seinem Bett herausschälen. Die so gewonnenen Organe lassen sich auf folgende Arten lagern:

1. Fein mit dem Messer, oder mit einem Homogenisator zerschnitten, unter Toluol.
2. Bei −25 bis −35° C in der Tiefkühltruhe.

Auf beide Arten bleibt die Acetylcholinesterase im Organ jahrelang, ohne signifikanten Aktivitätsverlust erhalten.

Zusammensetzung

Die Zusammensetzung entspricht derjenigen des Organs des elektrischen Aales, *Elektrophorus elektricus* [17] von 3% Protein und 92% Wasser. 500 g elektrisches Organ von *Torpedo marmorata*, das bei −25° C gelagert worden war, wurden mit dem Messer in kleine Würfel geschnitten und mit insgesamt 1,2 Liter destilliertem Wasser in zwei Portionen, je 20 Minuten im Sorvall-Mixer[3] homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle[4] filtriert. Der Filterinhalt wurde jeweils auf kleine Volumina eingeengt und mehrfach durch Zugabe destillierten Wassers gewaschen, bis das Filtrat salzfrei war. Insgesamt wurden so vier Liter Filtrat erhalten. Der Filterinhalt wurde bei 0,01 mmHg an der Ölpumpe gefriergetrocknet und so eine Menge von 13,7 g (2,74%) Protein erhalten. Die vier Liter Filtrat wurden zuerst am Rotationsverdampfer bei 11 mmHg Wasserstrahlvakuum auf ca. 500 ml eingeengt und dann bei 0,01 mmHg an der Ölpumpe bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Es wurden so 24,58 g (4,97%) hygroskopische Salze (mit einem bedeutenden Anteil von Acetylcholin und Cholin) erhalten.

Das elektrische Organ von *Torpedo marmorata* hat dementsprechend folgende Zusammensetzung:

2,74% Protein (makromolekulare Substanzen mit einem MG über 100000).
4,97% Salze (niedermolekulare Substanzen).
92,29% Wasser.

Diese für den *Torpedo* gefundenen Werte stimmen gut mit den von LEUZINGER [17] für den elektrischen Aal gefundenen Werten überein.

Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der Acetylcholinesterase wurde mit dem Metrohm-Autotitrierstand[5] unter folgenden Bedingungen bestimmt: 4×10^{-3} M Acetylcholinchlorid als Substrat, Temperatur 37° C, pH 7,4 und Titration mit 0,01 M NaOH (Titrisol®)[7]. Die mikromolekulare Einheit (μME) ist diejenige Menge Acetylcholin, ausgedrückt

---

[3] «Omni-Mixer», I. Sorvall, Inc. Norwalk, Conn., USA.

[4] Model 2000, Filter XM-100, Amicon Corp., Lexington, Mass., USA.

[5] pH-Meter 512, Impulsomat E 473 und Dosimat-Schreiber. Metrohm, CH-9100 Herisau, Schweiz. Elektrode: Typ Lot-401-M8-NS, Fa. Ingold, Urdorf, Schweiz.

in mikromol, deren Hydrolyse bezogen auf 1 mg Protein, unter den gegebenen Bedingungen, durch Katalyse, in einer Minute umgesetzt wird. Dabei werden die Protonen, die sich von der freigesetzten Essigsäure abspalten, durch kontinuierliche Titration mit der NaOH, bei konstantem pH-Wert (7,4) erfasst.

Die katalytische Aktivität der elektrischen Organe ist von Fisch zu Fisch verschieden. Man darf annehmen, dass dafür in erster Linie der unterschiedliche Gehalt an Acetylcholinesterase verantwortlich ist.

Zur Bestimmung der Aktivität der elektrischen Organe haben wir je 10 g gefrorenes Organ aufgearbeitet. Man schnitt es mit dem Messer in kleine Stückchen und homogenisierte in dem jeweiligen Puffer, zu gleichen Teilen, in einem Teflon-Homogenisator. Wir haben dann einmal das vollständige Homogenisat und zweitens, nach Zentrifugation bei $30000 \times g$, den Überstand auf Enzymaktivität untersucht.

Es wurden folgende Puffer verwendet:

1. 1,5 M (20%) Ammonsulfat[6].
2. 0,5 M Natriumchlorid[7].
3. 1% Cirrasol ALN-WF[8], ein nicht ionogenes Detergens (aliphatisches Alkohol-Äthylenoxid-Kondensat).

Alle in: 0,002 M Phosphat-Puffer[7], ph 7,2.

Damit untersuchten wir die Organe von 10 verschiedenen Fischen. Jeder Einzelwert wurde sechsmal bestimmt und das Mittel daraus zur Berechnung der Standard-Abweichung verwendet (Tab. 1).

Tabelle 1. Enzymaktivität elektrischer Organe unter Verwendung verschiedener Puffer: Grundlage für alle drei Puffer ist 0,002 M Phosphat-Puffer. Es enthalten 1. Ammonsulfat, 2. Natriumchlorid, 3. Cirrasol

Homogenat			
Puffer	1	2	3
μME ($\times 10^{-2}$)	$17{,}70 \pm 8{,}74$	$17{,}30 \pm 7{,}63$	$22{,}90 \pm 5{,}70$
Zentrifugat			
Puffer	1	2	3
μME ($\times 10^{-2}$)	$14{,}00 \pm 7{,}83$	$12{,}10 \pm 6{,}38$	$22{,}00 \pm 7{,}04$

Klassierung des Enzyms

Die Esterase aus dem Organ von *Torpedo marmorata* katalysiert die Hydrolyse von Acetylcholin und Acetyl-β-Methylcholin. Sie katalysiert jedoch die Hydrolyse von Butyrylcholin nicht. Eine 4×10^{-3} M Butyrylcholin-Lösung zeigte nach Zugabe von der reinsten Esterase keine Zunahme der Hydrolysegeschwindigkeit. Sie entspricht somit dem Enzym aus dem elektrischen Aal sowie dem Enzym aus Erythro-

[6] «Merck», für biochemische Zwecke.

[7] «Merck», kristallin, zur Analyse.

[8] «ICI», für die Überlassung einer Probe danken wir der Vertretung: Bleicherweg 33, 8002 Zürich, Schweiz.

cytenmembranen. Man nennt deshalb die Esterase aus dem elektrischen Organ von *Torpedo* analog: Acetylcholin Acetyl-Hydrolase, EC 3.1.1.7.

4.2. Präparation des Rohenzyms [67]

Die uns zur Verfügung stehenden elektrischen Organe wurden auf folgende Art behandelt:

1. Das elektrische Organ wurde unmittelbar nach dem Fang aus dem Fisch herauspräpariert und bei −25 bis −35° C tiefgefroren.
2. Das elektrische Organ wurde unmittelbar nach dem Fang aus dem Fisch herauspräpariert, in kleine Stücke geschnitten und unter Toluol bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.
3. Der ganze Fisch wurde unmittelbar nach dem Fang auf −25 bis −35° C tiefgefroren und bei dieser Temperatur aufbewahrt.

Auf alle drei Arten konserviert, bleibt die Enzymaktivität in bezug auf die Katalyse der Hydrolyse des Acetylcholins, mindestens ein Jahr lang erhalten.

Wir schnitten im allgemeinen 2 kg tiefgefrorenes Organ mit dem Messer in kleine Stücke und homogenisierten anschliessend mit etwa der gleichen Menge Toluol und Ammonsulfatpuffer im Küchenmixer.

Der Ammonsulfatpuffer hat folgende Zusammensetzung: 1,5 M Ammonsulfat[6], 0,5 M Kochsalz[7], 0,002 M Phosphat (di-Natriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat[7]) und 0,0001 M Calciumchlorid[7]. Der pH-Wert wird jeweils auf 7,2 eingestellt. Zur Konservierung der Proteinlösungen eignet sich entweder Toluol, oder die Zugabe von 0,01% Natriumazid[7]. Weder Toluol noch Natriumazid (welches bis zu einem 100fachen Überschuss dosiert werden kann) haben einen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Die so erhaltenen 6 Liter Emulsion können längere Zeit bei 4° C aufbewahrt werden. Man rührte diese Emulsion bei Zimmertemperatur 2 Tage lang, um die Lipide herauszulösen, von denen man annimmt, dass sie zwischen Acetylcholinesterase und Zellmembran als Bindeglieder dienen. Die Emulsion ist bei Zimmertemperatur mehrere Tage lang haltbar. Man kann sie durch Zentrifugation[9] bei 7000 × g in drei Schichten trennen.

1. Wässrige Phase (Ammonsulfat) am Boden.
2. Eine quarkartige Phase (Protein) in der Mittelschicht.
3. Toluol-Phase (Lipide) in der höchsten Schicht.

Die wässrige Phase enthält das gelöste Enzym. Sie ist leicht trübe, wird aber nach Filtration durch einen Faltenfilter[10] klar. Drei Liter dieser klaren Lösung ergeben nach Ultrafiltration[11] ca. 200 ml. Eine leichte Trübung kann durch Ultrazentri-

[9] Sorvall RC 3, I. Sorvall Inc., Norwalk, Conn., USA.

[10] LS 17 1/2, Durchmesser 27 cm, Schleicher und Schüll AG, Vertrg. Feldbach-ZH, Schweiz.

[11] Sartorius-Filter SM 16520 mit SM 12134 Filterplatten, Sartorius-Membranfilter GMBH, D-34 Göttingen, BRD.

fugation[12] bei 30000 × g entfernt werden. Diese klare Lösung diente uns als Ausgangsmaterial für die Gelfiltration.

Die quarkartige Phase wurde gesammelt und anschliessend mit Toluol und Ammonsulfatpuffer in analoger Weise noch weitere 5mal extrahiert. Die Endprodukte der Zentrifugation wurden in Phasen getrennt gesammelt und zur weiteren Verarbeitung mit der entsprechenden Phase kombiniert.

4.3. Präparation der Lipide

Die Toluolphase enthält hauptsächlich Membran-Lipide und ist gelblich gefärbt. Das Toluol wurde im Rotationsverdampfer bei reduziertem Druck (12 mmHg) und 36 bis 38° C zurückgewonnen. Dieses Toluol wurde für weitere Extraktionen verwendet.

Die gelben Membran-Lipide wurden von H. Müldner, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, untersucht und ergaben folgende Analyse:

Sphingomyelin	3,5%
Lecithin	26 %
Phosphatidylinositol	13 %
Äthanolamin und Serin	22 %
Polyglyceryl	3 %
Cholesterintriglycerid	16 %
nicht ident. Rest	16,5%

Die Toluol-Extraktion kann als Indikator für die Enzym-Extraktion verwendet werden. Mit dem Abnehmen der Gelbfärbung der Toluol-Phase nimmt auch der Enzymgehalt in der wässrigen Phase ab.

Verarbeitung der Enzymlösung

Die gesammelten und konzentrierten Enzymlösungen wurden auf einer Säule von 10 cm Durchmesser und 1 m Länge[13] mit Sephadex G-100[14] filtriert. Diese Säule wurde vorher mit 0,5 M NaCl[7], 0,02 M Phosphat[7] und 0,0001 M $CaCl_2$ bei pH 7,2 equilibriert. Zur Kontrolle wurde die Leitfähigkeit von zufliessendem und abfliessendem Puffer gemessen[15] (3,95 kΩ). Das Enzym trug man in dem gleichen Puffer auf und eluierte ebenfalls mit dem gleichen Medium. Die Fraktionen wurden zuerst mit UV-Kontrolle bei 280 nm identifiziert, können aber auch von Auge erkannt werden. Die erste Fraktion ist opal, praktisch farblos und enthält die höchste Enzymaktivität. Die zweite Fraktion ist von rötlicher Farbe und enthält noch etwas Enzymaktivität. Sie kann wiederum gelfiltriert werden, wobei noch ein Teil des Enzyms gewonnen werden kann. Die dritte Fraktion ist gelblich und enthält kein Enzym mehr. Alle ersten Fraktionen sammelte man, konzentrierte sie durch

[12] Beckmann Spinco L 50, Vertrg. Kontron AG, Zürich, Schweiz.
[13] K 100/100-Säule, Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-751 25 Uppsala 1, Schweden.
[14] Pharmacia.
[15] Metrohm-Konduktometer, Type E 382, Serie 2, Metrohm AG, CH-9100 Herisau, Schweiz.

Ultrafiltration[16] auf ein kleines Volumen und zentrifugierte bei 30000 × g[10]. Die so erhaltene Lösung diente uns als Startmaterial für die Affinitätschromatographie.

Bei einem typischen Lauf werden 300 ml Enzymlösung im vorerwähnten Puffer mit einer Aktivität von 264000 E auf die Kolonne appliziert und in der ersten Fraktion 247500 E (94%) zurückgewonnen. Wenn die applizierte Enzymlösung zu konzentriert ist, kann die Ausbeute an getrenntem Enzym über 100% liegen. Wir führen das darauf zurück, dass im konzentrierten Enzym Aggregationen vorliegen, bei denen nicht alle aktiven Stellen zur Wirkung kommen können. In verdünnteren Lösungen liegen die einzelnen Proteinmoleküle frei, und da nun alle aktiven Stellen arbeiten können, resultiert eine höhere Enzymaktivität.

4.4. Affinitätschromatographie

Stellungnahme zum Problem der Nomenklatur der Affinitätschromatographie

In seinen grundlegenden Arbeiten definierte CUATRECASAS [19, 63]: «Affinitätschromatographie macht sich die spezifischen biologischen Wechselwirkungen einer Vielzahl von Protein-Liganden-Systemen zunutze.» Er hat somit die Grundlage für die Definition: «Biospezifische Trennung», oder «Biospezifische Chromatographie» gegeben. Diese Trennung wird folgendermassen durchgeführt: Ein Proteingemisch, das ein Protein mit spezifischen Eigenschaften enthält, wird auf eine Säule aufgetragen. Diese Säule enthält einen spezifischen Inhibitor, oder Liganden, der an einen unlöslichen Träger (Matrix) gebunden ist. Somit haftet das spezifische Protein, je nach Affinität zu dem Liganden, mehr oder weniger stark auf der Säule. Mit einem Gradienten steigender Ionenstärke können einzelne Proteinfraktionen eluiert werden. Bei höheren Ionenstärken können auch relativ spezifisch gebundene Proteinfraktionen unspezifisch eluiert werden. Im Falle der Acetylcholinesterase sind wir in der glücklichen Lage, dass wir die aktive Stelle und deshalb auch spezifische Inhibitoren relativ gut kennen. Das Haftvermögen des Enzyms am Inhibitor, der kovalent am Träger gebunden ist, ist so gut, dass mit einem Puffer steigender Ionenstärke nur die unspezifischen Proteine, aber diese dafür vollständig, von der Säule abgewaschen werden können. Für Acetylcholinesterase verwenden wir 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin-Bromid, also «Tetrametyhl»-Ammonium, das an einem entsprechend langen Stiel fest an Agarose gebunden ist. Wenn nach dem «Abwaschen» kein Protein mehr im Eluat nachweisbar ist, darf man annehmen, dass nur noch Enzym auf der Säule hängt. Jetzt kann man mit freiem Inhibitor, der mit dem gebundenen Inhibitor identisch ist, das Enzym eluieren. Bei diesem freien Inhibitor handelt es sich um Tetramethylammonium-Ion (Bromid oder Chlorid), das mit dem gebundenen Inhibitor um das anionische Zentrum konkurriert und so das Enzym freisetzt. Man braucht dann nur noch den freien Inhibitor (Tetramethylammonium) vom Enzym abzutrennen. Da es sich bei Tetramethylammonium im Vergleich zur Acetylcholinesterase um ein sehr kleines Molekül handelt, kann die Trennung leicht durch Sephadex-Gelfiltration und nachfolgende Ultrafiltration be-

[16] Amicon Model 402, Membran PM-30, Amicon Corp., Lexington, Mass. 02173, USA.

werkstelligt werden. Wir können also im Falle der Acetylcholinesterase den Begriff «Affinitätschromatographie» exakt definieren:

1. Kovalente Bindung eines spezifischen Enzyminhibitors an einen festen Träger.
2. Auftragen eines Proteingemisches und damit ionische Bindung eines spezifischen Proteins (des Enzyms) an den Inhibitor.
3. Elution aller unspezifischen Proteine mit Puffer steigender Ionenstärke.
4. Elution des spezifischen Proteins mit freiem Inhibitor, der mit dem gebundenen Inhibitor «identisch» ist.
5. Abtrennung des Inhibitors vom spezifischen Protein. (Spezifischer Ionen-Austausch.)

Aufbau der Affinitäts-Säule

Nach theoretischen Überlegungen und Auswertung der Ergebnisse, der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen zur Charakterisierung der aktiven Stellen der Cholinesterasen, kamen wir zu dem Schluss, dass als Ligand für die Affinitätschromatographie dieser Enzyme die Tetramethylammoniumgruppe geeignet sein sollte. Schwyzer und Frank [35, 36] hatten bereits ε-Aminocaproylcholin als gebundenen Inhibitor und Tetramethylammoniumchlorid zur Elution der spezifischen Proteine (Acetylcholinesterase und Bindungsprotein) vorgeschlagen. Wir wollten prüfen, ob für den speziellen Fall der Acetylcholinesterase nicht eventuell die Tetramethylammoniumgruppe des ε-Aminocaproylcholins alleine für die gute Trennung verantwortlich war. Aus diesem Grunde verwendeten wir 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin. Somit verfügten wir über «Tetramethyl»-Ammonium an einem apolaren Stiel.

Cuatrecasas [64] hatte bereits in seinen grundlegenden Arbeiten darauf aufmerksam gemacht, dass man einen Inhibitor nicht direkt an einen festen Träger, in unserem Falle Agarose, anhängen sollte. Damit nämlich der gebundene Inhibitor mit dem spezifischen «Rezeptor» des biologischen Makromoleküls in Wechselwirkung treten kann, ist es erforderlich, dass man den Inhibitor an einen genügend langen Arm anhängt. Für die Acetylcholinesterase hat man festgestellt, dass der Inhibitor ca. 45 bis 58 Å vom Träger entfernt liegen sollte [64, 20, 21]. Dieser «Arm» ist später unter dem Namen «Spacer» in die Literatur eingegangen [35, 65, 66].

Die feste Verankerung, das Trägermaterial (Matrix) sowie der Spacer sollten möglichst keine Wechselwirkungen mit den zu trennenden Proteinen eingehen [64]. Dafür ist die Agarose, von der Firma «Pharmacia[14]» unter dem Namen Sepharose» in den Handel gebracht, geeignet.

Diese Agarose lässt sich gut an verschiedenen Stellen mit Bromcyan aktivieren. An diesen Stellen kann durch fortlaufende schonende Synthese ein Spacer aufgebaut werden. Am Ende des Spacers kann dann der Inhibitor angehängt werden. Den Inhibitor 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin synthetisierten wir auf folgende Weise: 3 Mol 1,6-Dibromhexan wurden mit 1 Mol Phthalimid-Kalium unter Bedingungen der Gabriel-Synthese gekoppelt und so das 1-Bromhexyl-Phthalimid-6 gewonnen. Dann wurde mit Trimethylamin an Stelle des Broms die Trimethyl-

ammoniumgruppe eingeführt und so das 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Phthalimidohexan gewonnen. Schliesslich wurde mit 48% wässrigem Hydrobromid Phthalsäure abgespalten und so das gewünschte 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin in Form des Bromid-Hydrobromides erhalten (Fig. 13).

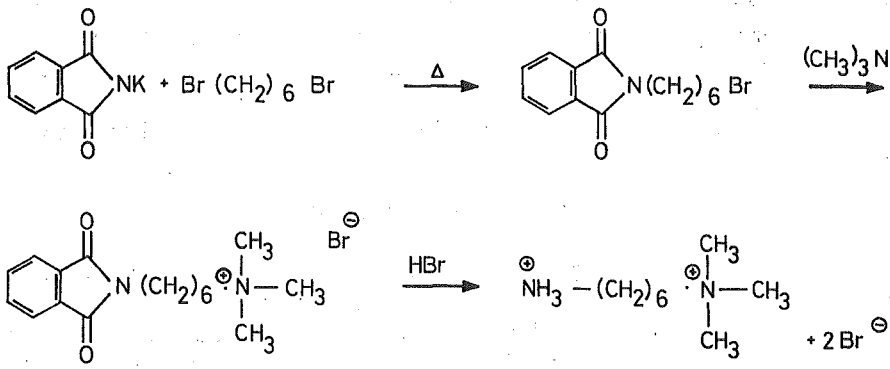
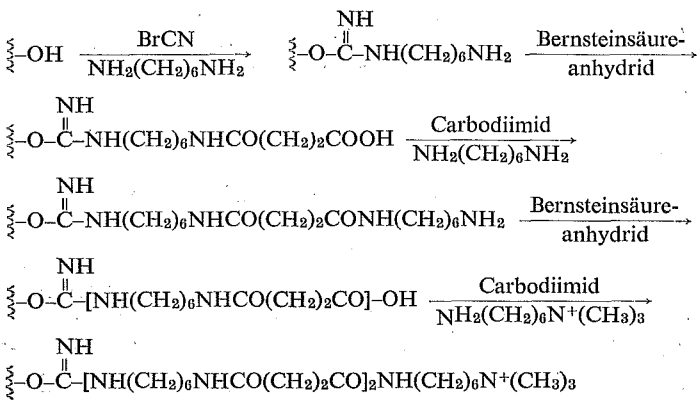


Fig. 13. Syntheseschema für die Darstellung von 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin.

Den Spacer synthetisierten wir auf folgende Weise: Nach Bromcyanaktivierung koppelten wir Hexamethylendiamin an und kondensierten die freie Aminogruppe mit Bernsteinsäureanhydrid. Die somit freiwerdende Carboxylgruppe konnte nun durch regelrechte Peptidsynthese mit Hexamethylendiamin, mit Hilfe von wasserlöslichem Carbodiimid, N-Cyclohexyl-N'-[β-(N-Methylmorpholino)-Äthyl]-Carbodiimid-p-Toluolsulfonat, verbunden werden. Die freie Aminogruppe wurde wiederum mit Bernsteinsäure kondensiert. An die frei werdende Carboxylgruppe wurde nun ebenfalls durch Peptidsynthese mit Hilfe von Carbodiimid, der Inhibitor 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin angehängt. Die gebundene «Tetramethyl»-Ammoniumgruppe ist somit 46 Å (33 Atomabstände) von der Agarose entfernt.

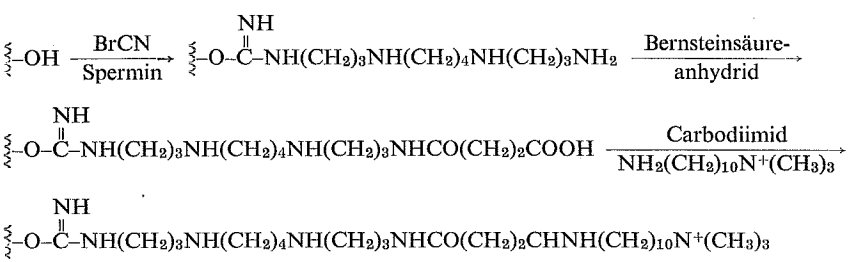
Die Synthese verläuft nach folgendem Schema:



Synthese-Schema für die Spacer-Synthese mit Hexamethylendiamin, Bernsteinsäureanhydrid und 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin.

Die klassische Spacer-Synthese lässt sich so vereinfachen, dass durch ein geeignet langes Diamin die erste Peptid-Synthese überflüssig wird. Als Diamin schlugen SCHMIDT und RAFTERY [37] für ähnliche Synthesen zur Affinitätschromatographie von cholinergischen Bindungsproteinen das Spermin vor. Damit entfällt auch die zweite Succinylierung. Der Spacer wäre dann mit 28 Atomabständen zu kurz. Man kann aber die Tetramethylammoniumgruppe leicht an einen «Stiel» von grösserer Länge anhängen. Dazu verwendeten wir für die Inhibitorsynthese an Stelle des Dibromhexans das Dibromdekan [68]. Somit ergibt sich für die Distanz von der Agarose bis zur Tetramethylammoniumgruppe eine Länge von 32 Atomabständen, oder 45 Å.

Die Synthese verläuft nach folgendem Schema:



Synthese-Schema für die Spacer-Synthese mit Spermin und 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-10-Decylamin.

Synthesen von 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin und 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-10-Decylamin [67–72]

1. 1-Bromhexyl-Phthalimid-6, I

56 g (0,3 M) Phthalimidkalium in 244 g (1 M) 1,6-Dibromhexan wurden 24 Stunden lang auf 180–200° C vor Rückfluss erwärmt. Das feste Reaktionsprodukt wurde mit 300 ml und anschliessend noch mit kleineren Volumina kaltem Benzol extrahiert. Das Filtrat wurde eingedampft und bei Wasserstrahlvakuum (10 mmHg, 100 bis 130° C) zunächst 160 g nicht umgesetztes Dibromhexan abdestilliert. Der Rückstand wurde anschliessend bei Ölpumpenvakuum (0,01–0,02 mmHg, 180–190° C) abdestilliert. Dabei wurde das Kühlwasser auf ca. 60° C erwärmt, da sonst das Destillat im Kühler auskristallisierte. Das Produkt 84,2 g (89,7%) wurde in Äthanol umkristallisiert und hatte einen Schmelzpunkt von 54–56° C.

2. 1-Bromdecyl-Phthalimid-10, II

Analog 1. wurden 300 g 1,10-Dibromdecan umgesetzt. 201 g Dibromdecan wurden zurückgewonnen und anschliessend bei Ölpumpenvakuum (128° C, 0,001 mmHg) zunächst 25,5 g Phthalimiddecen-1 und dann bei 220° C und 0,03–0,06 mmHg 48,3 g (39%) 1-Bromdecyl-Phthalimid-10 gewonnen. Das erstarrte Produkt kristallisierte man aus Äthanol um (Smp. 58,5–60° C).

3. 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Phthalimid-Bromid, III

In 300 ml absolutem Benzol wurden 90,6 g (0,29 M) I in einem mit Gummiballon verschlossenen Rundkolben gelöst und im Eis-Wasser-Bad auf 5° abgekühlt. 20 ml wasserfreies Trimethylamin wurden zugegeben und nach 6 Stunden bei 5°C wurde die Lösung noch 2 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat nochmals mit 10 ml Trimethylamin versetzt und nochmals 2 Tage stehengelassen. Die Niederschläge wurden mit Benzol gewaschen und gereinigt, indem sie in absolutem Methanol gelöst und mit Diäthyläther ausgefällt wurden.

Ausbeute an 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylphthalimidobromid III, 91,8 g (85,2%) mit Schmelzpunkt 178–179°C.

4. 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-10-Decylphthalimid-Bromid, IV

Analog 3. wurden 60,9 g (0,165 M) II umgesetzt und 44,7 g (70,7%) 1-(N, N, N- Trimethylammonium)-10-Decylphthalimid-Bromid, IV nach dreimaligem Umfällen aus Methanol/Äther, mit Smp. 149–151°C, gewonnen.

5. 1-(N N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin-Bromid-Hydrobromid, V

In 100 ml 48% wässrigem Hydrobromid wurden 91,8 g (0,25 M) IV gelöst und vor Rückfluss 50 Stunden gekocht. Nach Abkühlen mit Eiswasser wurde die ausgefallene Phthalsäure (38,5 g; 93,45%) abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockne, zuletzt am Ölpumpenvakuum, eingedampft. Das Endprodukt wurde aus absolutem Isopropanol umkristallisiert und dabei bei −20°C ausfallen gelassen. Im Kühlschrank bei 4°C wurde schnell abgenutscht. Das 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin-Bromid-Hydrobromid wurde dann bei Ölpumpenvakuum bei 60°C getrocknet. Ausbeute 62,2 g (78%). Es handelt sich um weisse, hygroskopische Kristalle mit Smp. 159–160°C.

Analyse:	$C_9H_{24}Br_2N_2$ (320,113)	
Berechnet:	C 33,76%	H 7,56%
Gefunden:	C 33,56%	H 7,82%

6. 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-10-Decylamin-Bromid-Hydrobromid, VI

Analog 5. wurde aus 43,6 g (0,102 M) IV, mit ähnlicher Ausbeute (23,5 g; 61,4%) VI hergestellt.

Synthese der substituierten Agarose

Nach dem vorausgehend beschriebenen Schema synthetisierten wir 600 g substituierte Agarose mit dem Inhibitor 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin-Bromid. Da die Bromcyanakativierung mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nur höchstens mit 300 g Agarose innert nützlicher Frist durchgeführt werden kann, teilten wir den ersten Schritt in zwei Stufen auf.

Da wegen der leichten Zersetzlichkeit der Zwischenprodukte schnell gearbeitet werden muss (das bromcyanaktivierte Produkt ist nur wenige Minuten beständig), haben wir jeweils eine Zusammenstellung des Zubehörs und der Chemikalien im voraus gegeben.

Zubehör

1. Gut belüftete Kapelle (Giftigkeit des Bromcyans!).
2. 2-Liter-Dreihalskolben mit Teflon-Rührer Thermometer und pH-Elektrode.
3. Eisbad für den Dreihalskolben.
4. Metrohm-Autotitrator: pH-Meter E 512, Impulsomat E 473[5], Schaltschütz[17] und Guldener-Vario-Perpex-Pumpe[18].
5. Glasfilternutsche «Schott» 151 D, Porosität 2, 175 mm Durchmesser.
6. 5-Liter-Absaugflasche.
7. Wasserstrahlpumpe.
8. Messzylinder 200 ccm, im Eisbad für die Lauge.

Chemikalien

1. 300 ml (2×) Sepharose 2 b[14].
2. 70 g (2×) Bromcyan «Merck» (MG 105,93)[7].
3. 3000 ml eisgekühlte 8 N NaOH (MG 40,00)[7].
4. 5000 ml eisgekühlte 0,1 N $NaHCO_3$ (MG 84,01)[7], pH 10 (NaOH).
5. 78 g (2×) Hexamethylendiamin (MG 116,21)[7]. Das Hexamethylendiamin wird in 100 ml Wasser gelöst, mit Eisbad gekühlt und mit konz. HCl auf pH 10 gebracht.

300 ml Sepharose 2B wurden in der grossvolumigen Glasfilternutsche 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 300 ml destilliertem Wasser in den Dreihalskolben gespült. Der pH-Wert wurde mit wenige Tropfen Lauge auf 11 gebracht und die Elektrode mit Autotitrator (auf pH 11 eingeschaltet) zugeschaltet. Bei 20° C wurde 70 g Bromcyan in Bröckeln im Verlaufe von 5 Minuten zugegeben und dabei die Temperatur, durch gelegentliches Kühlen mit dem Eisbad, konstant gehalten. Nach 15 Minuten kühlte man mit dem Eisbad bis auf 5° C, wobei die Reaktion vollständig zum Stillstand kam. Durch Einfüllen von Eisbröckeln wurde die Temperatur auf 0° C gebracht und der Kolbeninhalt auf der Glasfilternutsche scharf abgesaugt. Nach viermaligem Waschen mit eiskalter 0,1-N-$NaHCO_3$-Lösung (je 300 ml) wurde die Glasfilternutsche am Ablauf verkorkt, der Inhalt mit wenig $NaHCO_3$ aufgeschlemmt und die Hexamethylendiamin-Lösung mit 100 ml 0,1-N-$NaHCO_3$-Lösung unter Rühren mit der Gummifahne zugegeben. Die so gewonnene Reaktionsmischung rührte man über Nacht im Kühlschrank bei 4° C mit dem Magnetrührer.

Unmittelbar anschliessend wurde ein zweiter Ansatz von 300 ml Sepharose auf die gleiche Art behandelt und mit dem ersten Ansatz kombiniert.

[17] Eigene Konstruktion von Herrn Buchmann: Steuerkontakt 35 V, 4 mA/Schaltkontakt 220 V, 6 A.

[18] Vertretg.: W. Meyer, CH-6000 Luzern, Schweiz.

Nach 14 Stunden wurde die derivatisierte Sepharose auf der Glasfilternutsche scharf abgesaugt und 5mal mit eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen.

Um die Aminkupplung zu beweisen, wurde die qualitative Probe von INMAN und DINTZIS [73] durchgeführt.

Herstellung der Reagentien

1. Dinatriumtetraborat ($Na_2B_4O_7$ 10 H_2O). 50 g Borax werden in 200 ml heissem destilliertem Wasser gelöst und nach dem Abkühlen mit wenigen Impfkristallen versetzt. Aus der übersättigten Lösung kristallisiert das überschüssige Borax aus und die klare Lösung kann dann filtriert werden.

2. Trinitrobenzolsulfonsäure. 3 g 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 10 gebracht. Bei pH 7 tritt ein Farbumschlag auf dunkelrot ein.

Durchführung der Probe

In einem kleinen Reagenzglas werden einige Krümel der derivatisierten Sepharose mit ca. 1 ccm gesättigter Boraxlösung übergossen und drei Tropfen einer 0,1-M-2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Lösung zugegeben. Nach kurzer Zeit setzt sich die rotorange gefärbte Sepharose ab. Daneben erscheint eine Probe mit nicht derivatisierter Sepharose, oder Sepharose, die keine Aminogruppen trägt, nur schwach gelblich. Die Probe kann schon nach wenigen Minuten positiv sein, erreicht aber ihr Maximum nach ca. 1 Stunde.

Succinylierung

600 ml der mit Hexamethylendiamin derivatisierten Sepharose wurden mit 600 ml Wasser im Dreihalskolben übergossen. Unter Rühren wurde mit dem Eisbad bis auf 2°C abgekühlt. Durch Zugabe von wenig Bernsteinsäureanhydrid wurde der pH-Wert auf 5,5 gebracht und dort mit dem Autotitrator durch Zugabe von 8 N NaOH konstant gehalten. Bei laufender Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid wurde die Temperatur auf 4°C und der pH-Wert auf 5,5 konstant gehalten. Nach insgesamt 260 g Bernsteinsäureanhydrid kommt die Reaktion nach ca. 6 Stunden praktisch zum Stillstand. Die derivatisierte Sepharose wurde mit zimmerwarmem, destilliertem Wasser fünfmal gewaschen.

Die anschliessend durchgeführte INMAN- und DINTZIS-Probe [73] war negativ.

Amin-Kupplung mit Carbodiimid

116,21 g Hexamethylendiamin wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 5 eingestellt. Die 600 ml derivatisierte Sepharose wurden mit 600 ml destilliertem Wasser in einem 2-Liter-Erlenmeyerkolben gespült und die Hexamethylendiaminlösung zugegeben. Unter Rühren mit dem Magnetrührer gab man 191,71 g N-Äthyl-N'-(Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid zu. Nach zwölfstündigem Rühren wurde auf der Glasfilternutsche scharf abgesaugt und fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die anschliessend durchgeführte INMAN- und DINTZIS-Probe [73] war positiv.

Zweite Succinylierung

Die zweite Succinylierung wurde analog der ersten durchgeführt. Da man annehmen darf, dass bis hierher höchstens 80% der ursprünglichen Substanz reagiert haben, wurden für die zweite Succinylierung 160 g Bernsteinsäureanhydrid verwendet. Die anschliessend durchgeführte INMAN- und DINTZIS-Probe [73] war negativ.

Inhibitor-Kupplung

600 ml derivatisierte Sepharose und 600 ml destilliertes Wasser wurden in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben gegeben und mit dem Magnetrührer gerührt. 140 g (0,5 M) 1-(N, N, N-Trimethylammonium)-6-Hexylamin-Bromid-Hydrobromid wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, mit wenigen Tropfen Natronlauge auf pH 5,5 gebracht, auf einmal zugegeben, dann löffelweise 100 g (0,5 M) N-Äthyl-N'-(Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid Hydrochlorid eingetragen und schliesslich über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Anschliessend wurde auf der Glasfilternutsche abgesaugt, viermal mit zimmerwarmem Wasser gewaschen, dann mit Trispuffer pH 8 und anschliessend mit einem Puffer folgender Zusammensetzung: 0,5 M NaCl, 0,002 M Phosphat, 0,0001 M $CaCl_2$[7], pH 7,2. Die so präparierte Sepharose wurde direkt für die Füllung der Affinitätssäule verwendet. Sollte die Füllung längere Zeit aufbewahrt werden, wusch man mit Walpole-Acetat-Puffer pH 4,5, schlemmte die Sepharose darin auf, fügte 0,02% Natriumazid zu und bewahrte das Ganze bei 4° C im Kühlschrank auf.

Beständigkeit

Wird die Säulenfüllung nach Gebrauch gründlich mit Kochsalzphosphat-Puffer gespült und unter Walpole-Puffer unter den beschriebenen Bedingungen aufbewahrt, so ist sie nach unseren bisherigen Erfahrungen über ein Jahr lang haltbar. Dabei haben wir 22 Trennungen durchgeführt.

Affinitätschromatographie

Eine Chromatographie-Säule von 5 cm Durchmesser und 60 cm Länge[19] wurde mit 600 ml derivatisierter Sepharose 2B,

gefüllt und mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,2 gewaschen. Die folgenden Puffer für die Affinitätschromatographie wurden alle auf pH 7,2 eingestellt. Das vorgereinigte Rohenzym wurde unmittelbar vor der Chromatographie bei 30000 × g zentrifugiert. Insgesamt wurden 1 190000 Einheiten in 100 ml 0,02 M Phosphatpuffer aufgetragen. Der austretende Puffer wurde mit einer UV-Zelle bei 280 nm analysiert und mit einem Frak-

[19] Pharmacia K 50/60-Säule, Pharmacia[14].

tionensammler[20] gesammelt. Zunächst wurde mit 0,02 M Phosphatpuffer ein breiter Protein-Peak isoliert, der keinerlei Enzymaktivität zeigte. Eine weitere Elution mit 0,5 M NaCl und 0,02 M Phosphat ergab ebenfalls einen Protein-Peak ohne signifikante Enzymaktivität. Eine dritte Elution mit 0,2 M Tetramethylammonium-Chlorid im vorerwähnten Puffer ergab einen dritten Protein-Peak mit hoher Enzymaktivität. Diese Enzymaktivität lässt sich zum Teil direkt in Gegenwart von Tetramethylammonium bestimmen. Zur endgültigen Bestimmung der Enzymaktivität verwendeten wir allerdings nur Enzym, das vollständig vom Inhibitor befreit worden war. Dazu sind folgende Schritte nötig:

1. Ultrafiltration mit Spülen des Ultrafilters[21] mit 0,5 M Kochsalz-, 0,02 M Phosphatpuffer.
2. Gelfiltration.
   Die in Schritt 1 konzentrierte Enzymlösung wurde mit 0,5 M Kochsalz-, 0,02 M Phosphatpuffer auf Sephadex G 200[22] filtriert.

Ausbeute: Von den 1190000 Einheiten, die aufgetragen worden waren, konnten wir 850000 Einheiten (72%) zurückgewinnen. Die spezifische Aktivität dieser Präparation betrug 17013 μME.

Kristallisation

In einem kleinen Reagenzglas wurde 1 ml in der Kälte gesättigte Ammonsulfatlösung mit 1 ml konzentrierter Enzymlösung gemischt und im Kühlschrank bei $+2°$C bis $+4°$C aufbewahrt. Die Idealbedingungen, bei denen gerade noch keine Trübung nach dem Mischen auftritt, wurden in zahlreichen Vorversuchen ermittelt. Nach drei Monaten konnte am Grunde des Reagenzglases eine leichte Trübung festgestellt werden. Der Bodensatz wurde unter dem Mikroskop ($\times 400$) als Kristalle identifiziert. Entsprechende mikrophotographische Bilder wurden von uns früher publiziert [67].

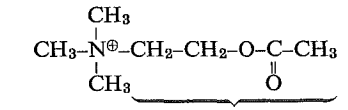
5. Kinetik mit Acetylcholin-Homologen

Das einfache Modell der katalytisch aktiven Stelle von WILSON et al. [24–26] kann zur Erklärung fast aller chemischer Vorgänge in bezug auf die Katalyse herangezogen werden. Allein über die sterischen Grenzen im Bereich beider Zentren sagt es wenig aus. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, durch einfache Modifikationen des Acetylcholinmoleküls die Umgebung der aktiven Stelle abzutasten, um so die sterischen Grenzen festzustellen, beziehungsweise um ein «Negativ» des verantwortlichen Bereichs des Enzyms zu erhalten. Dabei haben wir gleichzeitig die Enzyme Acetylcholinesterase und Cholinesterase mit den Substanzen der Tabelle 2 untersucht.

---

[20] Uvicord II, 3400B Radirac, LKB Produkter AB, Box 12220, Stockholm 12, Schweden.
[21] Amicon, Model 402, Filter PM 10, Vertretg. W. Meyer[18].
[22] Sephadex G 200, Pharmacia[14].

Tabelle 2. Acetylcholin-Homologe



Acetylcholin

Kationischer Kopf — Rest (= R)

$(C_2H_5)_2\overset{\oplus}{N}(CH_3)$–R	S 1	$(C_2H_5)_3\overset{\oplus}{N}$–R	S 2
$(C_3H_7)_2\overset{\oplus}{N}(CH_3)$–R	S 3	$(C_3H_7)_3\overset{\oplus}{N}$–R	S 4
$(CH_3)_2\overset{\oplus}{N}(C_4H_9)$–R	S 5	$(CH_3)_2\overset{\oplus}{N}(C_6H_{13})$–R	S 6

Zusätzlich zu diesen Substanzen haben wir TEA (Tetraäthylammoniumchlorid) und TPA (Tetrapropylammoniumchlorid) geprüft, um die Umgebung des anionischen Zentrums zu untersuchen. Um die Umgebung des esteratischen Zentrums zu diskutieren, konnten wir auf Ergebnisse zurückgreifen, die bereits von AUGUSTINSSON [74–76] in der Literatur dokumentiert sind und die wir ohne Schwierigkeiten reproduzieren konnten.

Methodik

Für die Versuche mit Acetylcholinesterase verwendeten wir Enzym von *Torpedo marmorata*[2], das wir nach unserem Verfahren [21, 67] hergestellt hatten. Für die Versuche mit Cholinesterase verwendeten wir «Pseudocholinesterase[23]» aus Pferdeserum. Alle Titrationen zur Enzymaktivitätsbestimmung führten wir mit der pH-Stat-Methode [77] durch. Dazu benützten wir den Metrohm-Autotitrator[5]. Als Medium verwendeten wir eine Lösung mit 0,15 M NaCl[7] und 0,02 M $MgCl_2$[7] ohne Puffer und titrierten mit 0,01 M NaOH (Titrisol®[7]). Beide Enzyme standardisierten auf 1 μM-Einheit mit Acetylcholinbromid[24] 4×10^{-3} M. Dreiding-Modelle und die dazu empfohlene Angströmskala[25] dienten als Basis für unsere räumlichen Überlegungen und um die Atomabstände zu messen.

Die Substanzen S 1 bis S 6 synthetisierten wir nach den Methoden von HOLTON und ING [78] sowie MEHROTRA und DAUTERMANN [79].

Synthesen

1. 2-n-Dipropylaminoäthanol

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 45 ml (0,34 M) n-Dipropylamin portionenweise mit 17 ml (0,25 M) 2-Chloräthanol versetzt und acht Stunden lang am Rück-

[23] Pseudocholinesterase Type IV, «Sigma», St. Louis, Mo., USA.
[24] Acetylcholinbromid «reinst», Siegfried AG, CH-4800 Zofingen, Schweiz.
[25] Dreiding-Modelle: W. Büchi, Glasapparatefabrik, CH-9230 Flawil, Schweiz.

fluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 150 ml 10% NaOH zugegeben, viermal mit Benzol extrahiert und die benzolische Lösung mit $MgSO_4$ getrocknet. Eindampfen am Rotationsverdampfer und anschliessende zweimalige Destillation bei 71–73° und 9–10 mmHg ergaben 18,45 g (50,9%) 2-n-Dipropylaminoäthanol.

2. Essigsäure-β-Dialkylaminoäthylester

Zu einer eisgekühlten Lösung von 0,125 M Dialkylaminoäthanol in 200 ml absolutem Chloroform fügte man unter Rühren mit dem Magnetrührer 10 ml (0,14 M) Acetylchlorid in 100 ml absolutem Chloroform zu. Nach zwei Stunden fügte man genug Wasser zu, um den Niederschlag aufzulösen, gab 15 g Kaliumcarbonat[7] zu und rührte zwei weitere Stunden lang. In einem Scheidetrichter wurde die Chloroformlösung abgetrennt und die wässerige Phase noch sechsmal mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen trocknete man mit $MgSO_4$ und dampfte mit dem Rotationsverdampfer ein. Die Daten der Essigsäure-β-Dialkylaminoäthylester sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3. Essigsäure-β-Dialkylaminoäthylester

R	Siedepunkt	Ausbeute
$-CH_3$	40–43°C/10 mmHg	70%
$-C_2H_5$	76°C /18 mmHg	74%
$-C_3H_7$	85–90°C/10 mmHg	68%

3. Acetoxyäthyl-N, N, N-Trialkylammoniumhalogenid

3 g Essigsäuredialkylaminoäthylester wurden in 20 ml absolutem Benzol gelöst und das Alkylhalogenid in kleinen Portionen zugegeben. Die Niederschläge wurden abfiltriert, mit absolutem Benzol gewaschen und umkristallisiert. Die einzelnen Daten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. Chemische Daten der Acetylcholin-Homologen.

Substanz	Schmelzpunkt °C und Umkristallisations-Medium	Ausbeute in %	SF	Analyse berechnet C%	berechnet H%	gefunden C%	gefunden H%
S1	66–68 Methyläthylketon	78,7	$C_9H_{20}NO_2I$	35,89	6,70	36,18	6,74
S2	120,5–121 Aceton	80,1	$C_{10}H_{22}NO_2I$	38,10	7,05	37,99	7,02
S3	123,5–125 Aceton	77,6	$C_{11}H_{24}NO_2I$	40,13	7,35	40,19	7,26
S4	137–139 Methyläthylketon	61,3	$C_{13}H_{28}NO_2I$	43,69	7,89	43,53	7,88
S5	105–106 Aceton	54,7	$C_{10}H_{22}NO_2Br$	44,78	8,27	44,67	7,99
S6	73–74,5 Aceton/Benzol	64,3	$C_{12}H_{26}NO_2I$	41,99	7,64	42,24	7,69

Enzym-Versuche

Mit dem Metrohm-Autotitrierstand[5] wurden 5 ml einer 4×10^{-3} M Acetylcholinbromid[24]-Lösung in 0,15 M NaCl, 0,02 M $MgCl_2$ mit 0,01 M NaOH titriert. Das Enzym wurde so standardisiert, dass 1 μl Enzymlösung 1 μM Einheit ergab.

Die jeweiligen Konzentrationen der homologen Substanzen sind aus den Kurven ersichtlich. Jeder einzelne Wert wurde sechsmal gemessen und der Mittelwert und die Standard-Abweichung mit einem hp-45-Computer[26] berechnet. Die Substratkonzentrationen (pS) wurden als neg. Logarithmus gegen die Aktivität aufgetragen.

Resultate

Ersetzt man im Acetylcholin-Molekül nach und nach die Methylgruppen, welche um den Stickstoff gruppiert sind, durch Äthylgruppen und verwendet die Homologen als Substrate, kann man beobachten, dass unter Enzymkatalyse beider Enzyme die Hydrolysegeschwindigkeit verlangsamt wird. Je mehr Methylgruppen durch Äthylgruppen ersetzt sind, desto langsamer die Hydrolyse. Die Hydrolyse der Verbindung mit drei Äthylgruppen (S2) wird immer noch durch beide Enzyme katalysiert. Ersetzt man die Methylgruppen durch n-Propylgruppen, wird die Hydrolyse der Verbindung mit einer Methyl- und zwei n-Propylgruppen (S3) gerade noch von der Acetylcholinesterase katalysiert. Dies steht in gutem Einklang mit Untersuchungen von KRUPKA und HELLENBRAND [80] für die Erythrocyten-Acetylcholinesterase. Die Serum-Cholinesterase vermag jedoch die Hydrolyse dieser Verbindung praktisch nicht mehr zu katalysieren.

MEHROTRA und DAUTERMANN [79] hatten die Verbindung mit drei n-Propylgruppen (S4) früher untersucht und eine schwache Aktivität festgestellt. Das verwendete «Enzym» war jedoch Rattenhirn-Pulver und die Aktivität wurde mit der Warburg-Technik festgestellt. Bei unseren Versuchen mit der Verbindung S4 mit der pH-Stat-Technik konnten wir feststellen, dass weder die Cholinesterase noch die Acetylcholinesterase die Hydrolyse zu katalysieren vermag.

Es ist nun erstaunlich, dass die Verbindung S4 in Gegenwart von Acetylcholin als Inhibitor für beide Enzyme wirkt. Dieser Befund führte uns, neben den erwähnten Ergebnissen, zu den erweiterten Modellen der Enzymoberfläche an den aktiven Stellen. Die entsprechenden Daten sind in Figur 14 dokumentiert.

Acetylcholin-Homologe mit einer Kohlenwasserstoffkette von zunehmender Länge C_4H_9- (S5) und C_6H_{13}- (S6) am kationischen Kopf zeigen folgende relative Hydrolyse-Geschwindigkeiten, wenn diese durch Acetylcholinesterase katalysiert wird: S5: $52{,}00 \pm 2{,}79$ und S6: $36{,}78 \pm 2{,}79$ (Tab. 5).

Dieser Befund kann der langsameren Rotationsgeschwindigkeit der N^+CH_2-Bindung im S-6-Rotamer, verglichen mit dem S-5-Rotamer zugeschrieben werden (Fig. 15).

Weiterhin untersuchten wir die homologe Reihe des Tetramethylammonium-Ions. In dieser Reihe sind experimentelle Daten durch die Arbeiten von BERGMANN und WURZEL [81], LONG [82] und KRUPKA und HELLENBRAND [80] gut fundiert.

---

[26] Hewlett Packard, 10900 Wolfe Road, Cupertino, Ca. 95014, USA.

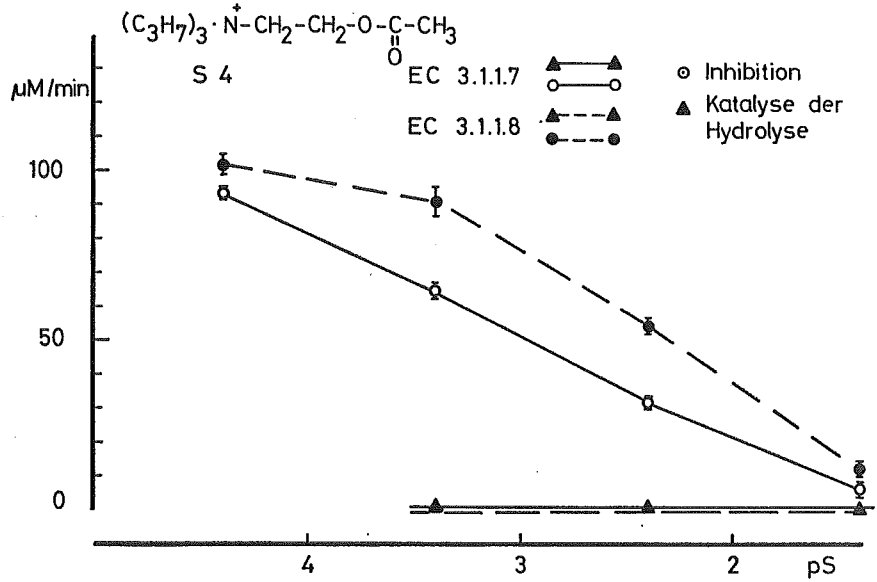


Fig. 14. Inhibition der Katalyse der Hydrolyse von Acetylcholin. ACHE und CHE vermögen die Hydrolyse von S4 nicht zu katalysieren.

Tabelle 5. Relative, durch ACHE katalysierte Hydrolysegeschwindigkeiten

		V rel.
$(CH_3)_3N^+-$	Acetylcholin	100,00
$(C_2H_5)_2N^+-CH_3$	S1	77,87±7,09
$(C_2H_5)_3N^+-$	S2	61,85±5,99
$(C_3H_7)_2N^+-CH_3$	S3	28,14±2,09
$(C_3H_7)_3N^+-$	S4	0
$C_4H_9-N^+(CH_3)_2-$	S5	52,00±2,79
$C_6H_{13}-N^+(CH_3)_2-$	S6	36,78±2,79

Fügt man diese kompetitiven Inhibitoren zu Acetylcholin zu, wird dessen Hydrolyse, welche von beiden Enzymen katalysiert wird, verlangsamt. Betrachtet man die Reihe Tetramethylammonium-Ion, Tetraäthylammonium-Ion und Tetra-n-Propylammonium-Ion, so nimmt die Inhibitorwirkung entsprechend der Verlängerung der Alkylgruppen zu (Fig. 16).

Diese Zunahme der Inhibitorwirkung wurde «hydrophoben» Wechselwirkungen

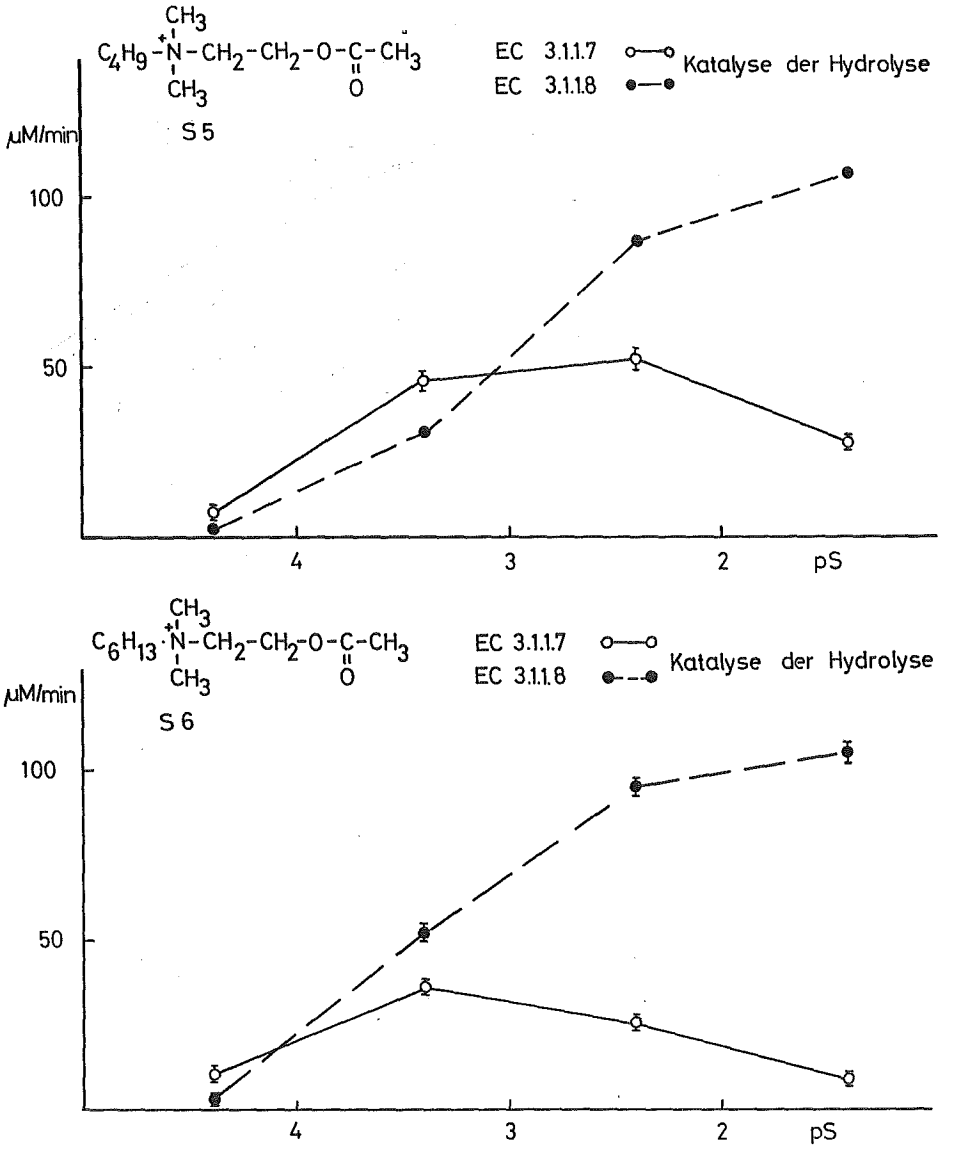


Fig. 15. Langsamere Katalyse der Hydrolyse bei längerem aliphatischem Rest (S5 oben, S6 unten).

zugeschrieben. Tetra-n-Butylammonium-Ion und Tetra-n-Pentylammonium-Ion sind zwar immer noch Inhibitoren, aber mit zunehmender Kettenlänge nimmt ihre Inhibitorwirkung ab. Dieser Befund spricht gegen Argumente der Befürworter der «hydrophoben» Theorie. Auf der anderen Seite können diese Befunde gut mit DREIDING-Modellen[25] und mit unserem Modell der aktiven Stelle erklärt werden. Diese Moleküle können so dargestellt werden, dass der quartäre Stickstoff oben

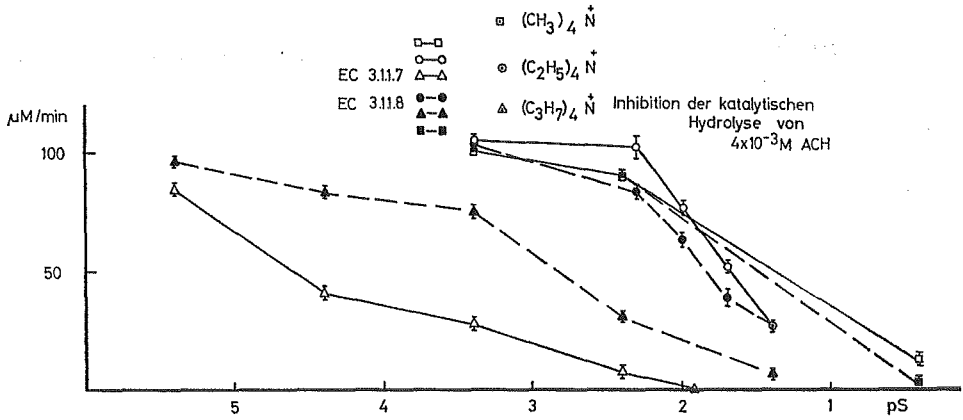


Fig. 16. Inhibition der katalytischen Hydrolyse von 4×10^{-3}M Acetylcholin. Vergleich der drei Homologen Tetramethylammonium-, Tetraäthylammonium- und Tetra-n-Propylammonium-Ion.

sitzt und die vier Alkylketten wie Zweige einer Trauerweide herabhängen. Der grösste Umfang rund um den Stickstoff ist dann 4,5 Å, was etwa dem Umfang des Tetramethylammonium-Ions entspricht.

Diskussion

Aufgrund früherer Befunde [24–26, 78–80] und mit Hilfe der eigenen Untersuchungen schlagen wir für unser Modell der katalytisch aktiven Stelle von Acetylcholinesterase und Cholinesterase sterische Grenzen vor. Grundlage für unser Modell sind katalytische Hydrolysegeschwindigkeiten der Acetylcholin-Homologen. Ausserdem verwendeten wir Inhibitoren aus der homologen Reihe des Tetramethylammonium-Ions und untersuchten deren Wirkungen auf die Acetylcholinhydrolyse.

Aufgrund seiner Studien über die Acetylcholin-Konformationen kommt PETER PAULING zu folgendem Schluss: «The conformation relevant to esterase is a fairly open structure» [83]. Dies ist in guter Übereinstimmung mit unserem Modell, denn nur eine «offene» Struktur passt und kann unsere Ergebnisse erklären. Nach Anziehung des Acetylcholin-Moleküls durch Coulomb-Kräfte zwischen anionischem Zentrum des Enzyms und kationischem Kopf von Acetylcholin wird es ferner noch durch eine δ^-/δ^+-Bindung fixiert, die sich zwischen Ester-Sauerstoff und Enzym ausbildet. Die resultierende Konformation in Figur 17 und 18 dargestellt, fordert engen Kontakt zwischen Ester-Sauerstoff und Enzym und kann zum Beispiel einer Wasserstoff-Brückenbindung zugeschrieben werden.

Die resultierende Konformation am kationischen Kopf mit der niedrigsten Energie ist so ein wenig verschieden von derjenigen «idealen» Konformation, welche den engsten Kontakt zwischen anionischem Zentrum und kationischem Kopf erlauben würde, denn eine Methylgruppe ist direkt gegen das Enzym gerichtet. Zieht man die Konformation in Betracht, bei welcher zwei Methylgruppen gegen das Enzym gerichtet sind, kann allerdings der engst-mögliche Kontakt hergestellt werden.

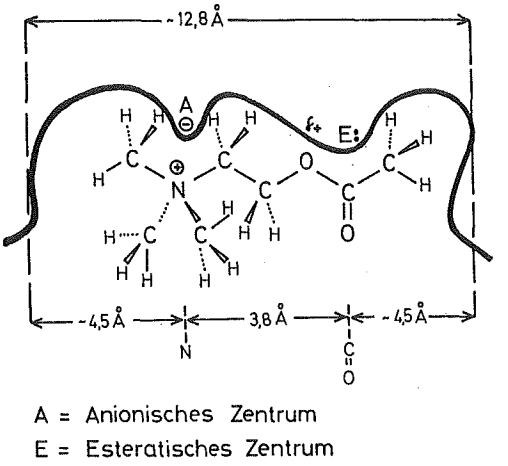


Fig. 17. Katalytisch aktive Stelle der Acetylcholinesterase. EC 3.1.1.7.

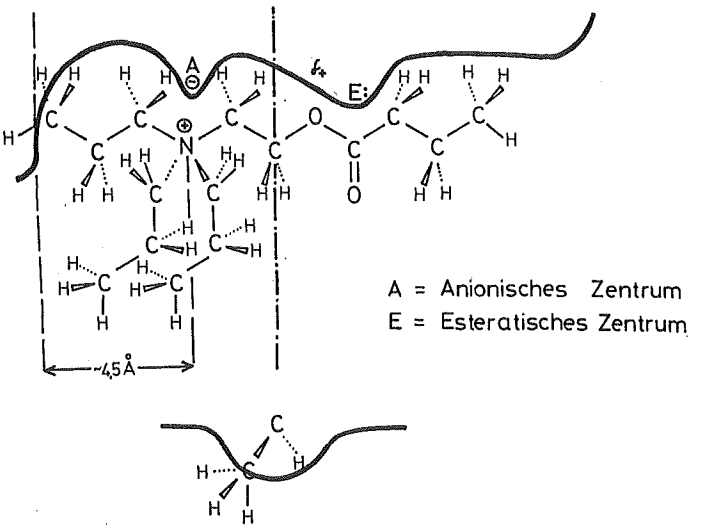


Fig. 18. Katalytisch aktive Stelle der Cholinesterase. EC 3.1.1.8.

Diese Überlegungen können am besten mit Dreiding-Modellen veranschaulicht werden. Zunächst wollen wir nun die Verhältnisse mit dem Tetra-n-Propylammonium-Ion betrachten. Dieses Ion passt in die anionische Höhle und der engste Kontakt des anionischen Zentrums mit dem quartären Stickstoff ist möglich, wenn zwei Alkylketten gegen das Enzym gerichtet sind. Die Propylgruppen passen nun rein mechanisch knapp in die anionische Höhle (bei den Äthylgruppen des Tetra-n-Äthylammonium-Ions ist bei der gleichen Konformation noch ein wenig Platz). Dies ist auch eine Erklärung für die Tatsache, dass Tetra-n-Propylammonium-Ion der

stärkste Inhibitor in der Reihe der Alkylammonium-Ionen ist. Auf der anderen Seite beobachten wir, dass das Acetylcholin-Homologe S4 mit den drei n-Propylgruppen am kationischen Kopf nicht hydrolysiert werden kann, wenn es hydrolysegerecht (das heisst in Acetylcholinkonformation) angelagert werden sollte, denn dann passt die gegen das Enzym gerichtete Alkylgruppe nicht mehr in die anionische Höhle beider Enzyme. Wird nun die N^+-CH_2-Bindung gedreht, dass der N^+ die kürzeste Distanz zum anionischen Zentrum erreicht, zeigen zwei der drei gleichartigen Substituenten (n-Propyl) gegen das Enzym, die α-C-Atome und β-C-Atome passen in die anionische Höhle, während beide γ-C-Atome herausragen. Das Molekül selbst wird aber dabei nach rechts geschoben, aus seiner hydrolysegerechten Lage herausgedreht, die δ^-/δ^+-Bindung kann nicht walten und das esteratische Zentrum kann seine Funktion nicht mehr ausüben. Damit kann mit dem Modell erklärt werden, warum die Katalyse der Hydrolyse nicht möglich, aber die Verbindung S4 trotzdem ein Inhibitor ist.

Das Modell der aktiven Stelle der Cholinesterase kann weiterhin limitiert werden, wenn man die Tatsache miteinbezieht, dass die Hydrolyse von Acetyl-β-Methylcholin nicht durch dieses Enzym katalysiert wird. In einem zweidimensionalen Modell, wie wir es in Fig. 18 dargestellt haben, schlagen wir vor, dass die Höhle am anionischen Zentrum sich gegen die $-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{CH}}-$ -Gruppe zu verschmälert.

Dies ist nicht der Fall bei Acetylcholinesterase (Fig. 17), wo die aktive Stelle eine «offene» Struktur hat. Der Unterschied in der Katalyse, wenn man Acetylcholin mit Acetyl-β-Methylcholin vergleicht, kann vollständig der langsameren Rotationsgeschwindigkeit der β-homologen Verbindung zugeschrieben werden.

Fig. 17 kann ebenso die Substrathemmung erklären. Wenn beide quartäre Stickstoffe der gleichzeitig ankommenden Acetylcholin-Moleküle vom anionischen Zentrum angezogen werden, kann ein Molekül hydrolysegerecht angelagert werden, während das zweite Molekül nur mit seinem Kopf von dem anionischen Zentrum angezogen wird und so den Cholinrest des anderen bereits hydrolysierten Moleküls am Weggang hindert. Dadurch kann die Katalysegeschwindigkeit verlangsamt werden. Eine andere Ursache der Substrathemmung könnte sein, wenn die Hydrolyse des Acetyl-Enzyms durch ein zweites Acetylcholin-Molekül behindert würde. Ein Reaktionsschema für mögliche Mechanismen bei der Katalyse der Hydrolyse und Substrathemmung haben wir in Tabelle 6 zusammengestellt.

Für die sterischen Grenzen im Bereich des esteratischen Zentrums konnten wir auf Daten zurückgreifen, die gut in der Literatur dokumentiert sind und die erstmals von AUGUSTINSSON und NACHMANSOHN [84] publiziert wurden. Die Hydrolyse von Propionylcholin wird noch von der Acetylcholinesterase katalysiert, obwohl die Geschwindigkeit gegenüber dem Acetylcholin merklich verlangsamt ist. Die Hydrolyse von Butyrylcholin wird jedoch durch die Acetylcholinesterase nicht mehr katalysiert. Dies kann durch eine Höhle in der Umgebung des esteratischen Zentrums mit etwa dem Durchmesser des anionischen Zentrums erklärt werden.

Die Struktur der Cholinesterase am esteratischen Zentrum, welches die Hydrolyse von Butyrylcholin sogar besser katalysiert wie diejenige von Acetylcholin, ist augenscheinlich eine «offene» Struktur, wie wir sie in Fig. 18 vorschlagen.

Tabelle 6. Reaktionsschema für mögliche Reaktionen bei der Katalyse der Hydrolyse von Acetylcholin durch Acetylcholinesterase

E = Enzym, ACH = Acetylcholin, EACH = Enzym-Acetylcholin-Komplex, EACHACH = Enzym-Acetylcholin-Acetylcholin-Komplex, CH = Cholin, EAc = Acetylenzym, EAcACH = Acetylenzym-Acetylcholin-Komplex, HAc = Essigsäure, H^+ = Proton

$$\begin{array}{ccccc} E+ACH & & & & \\ \uparrow\downarrow & & & & \\ EACH & \rightleftarrows & EACHACH & & \\ \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow & & \\ CH+EAc & \rightleftarrows & EAcACH & & \\ \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow & & \\ E+HAc & \rightleftarrows & H^+ & \rightleftarrows & HAc+EACH \end{array}$$

Allgemeine Diskussion

Zwar kann man heute Acetylcholinesterase von verschiedenen Quellen kaufen, doch lässt die Reinheit und damit auch die Aktivität, was feinere enzymatische Untersuchungen anbetrifft, noch Wünsche offen.

Es war deshalb unser erstes Ziel, Acetylcholinesterase in genügender Reinheit und in genügender Menge zu beschaffen. Für die Reinigung von Acetylcholinesterase mit konventioneller Technik standen bereits die Methoden von NACHMANSOHN und Mitarbeitern, besonders diejenigen von LEUZINGER, zur Verfügung. Bei diesen Methoden wurde als Ausgangsmaterial hauptsächlich der elektrische Aal verwendet.

Wir haben zunächst aus finanziellen Überlegungen den *Torpedo* verwendet, da er billig zu bekommen ist und die Transportkosten nicht so sehr ins Gewicht fallen. Später haben wir auch elektrische Aale präpariert und finden auch aus diesen Versuchen, dass der *Torpedo* günstiger ist. Zwar besteht der elektrische Aal, wenn man von dem kurzen Anfangsteil mit den lebenswichtigen Organen absieht, praktisch nur aus elektrischem Organ, doch ist dieses relativ schwer von der zentralen Wirbelsäule wegzupräparieren.

Der *Torpedo* besteht nur ca. zu ¼ bis ⅓ aus elektrischem Organ, doch lässt sich dieses gut mit dem Finger aus seinem Bett herausschälen und die anschliessende Weiterverarbeitung ist einfach, da das Organ kein festes Stützgewebe besitzt. Versucht man das Enzym auf konventionelle Art zu reinigen, verliert man sich bald in einer Unzahl von Reinigungsschritten, die jeweils von Stufe zu Stufe einen Verlust von Ausgangsmaterial bedeuten. Man kam und kommt nur so zum Ziel, wenn man mit beträchtlichen Mengen Ausgangsmaterial anfängt und mit extrem kleinen Mengen an reinem Enzym am Ende der Reinigung zufrieden ist. (Nach Überschlagsrechnungen wären so aus ca. 10 kg elektrischem Organ etwa 10 mg reines Enzym zu gewinnen.)

Die biochemische Technik wurde gerade in den letzten Jahren durch wesentliche Neuerungen bereichert. Dazu haben die Methoden der verfeinerten Chromatographie, der Ultrafiltration und als wichtigste, die Affinitätschromatographie, beigetragen. Die Affinitätschromatographie erlaubt heute, in einem Reinigungsschritt, Anreiche-

rungen von spezifischen Proteinen um 1 : 1000 zu erreichen. Um die Affinitätschromatographie aber wirkungsvoll einzusetzen, müssen die zu trennenden Proteine aber entsprechend vorgereinigt und vor allem: solubilisiert sein, das heisst um grundlegende Solubilisierungs- und Reinigungsschritte kommen wir auch heute noch nicht herum. Gerade bei diesen grundlegenden Reinigungsschritten konnten wir vereinfachen, so dass man nun relativ schnell (in drei bis vier Wochen nach der Präparation des elektrischen Organs) zu dem Rohenzym kommt, das wir als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie verwenden. Wir haben zur Nomenklatur der Affinitätschromatographie ausführlich Stellung genommen und möchten hier nur betonen, dass wir zur spezifischen Bindung auch eine spezifische Elution fordern. Das heisst: Das gewünschte spezifische Protein, das auf der Säule an einen spezifischen Inhibitor gebunden ist (Acetylcholinesterase an «Tetramethylammonium»), kann unspezifisch, das heisst durch Puffer steigender Ionenstärke nicht wieder von der Säule abgewaschen werden. Erst durch Austausch eines freien Inhibitors (Tetramethylammonium) mit dem gebundenen Inhibitor (die in unserem Falle «identisch» sind) wird das gewünschte Protein freigesetzt. Dies kann man nur erreichen, wenn der «Spacer» genügend lange ist (ca. 45 Å von der Matrix entfernt), da sonst die katalytisch aktive Stelle gar nicht mit dem gebundenen Inhibitor in Wechselwirkung treten kann. Mit unserer Methode gelang es, ein Enzym mit der spezifischen Aktivität von 17013 μME zu gewinnen.

Nachdem wir genügend Enzym gewonnen hatten und die Präparationsverfahren auch von anderer Seite reproduziert werden konnten, war die Charakterisierung der katalytisch aktiven Stelle möglich geworden.

Unser zweites Ziel war, ein möglichst genaues Bild der katalytisch aktiven Stelle zu erhalten. Dazu «tasteten» wir die katalytisch aktiven Stellen beider Enzyme: Acetylcholinesterase und Cholinesterase, chemisch ab, um das WILSON-Modell zu verfeinern. Um kinetische Daten von Struktur/Wirkungsbeziehungen zu erhalten, haben wir das Acetylcholinmolekül chemisch modifiziert. Zunächst haben wir versucht den kationischen Kopf so «dick» zu machen, dass er nicht mehr in die anionische Höhle passte. Das ist uns mit der Tripropylammoniumgruppe gelungen. Die Hydrolyse der entsprechenden Acetylcholin-Homologen-Verbindung wird durch Acetylcholinesterase nicht mehr katalysiert. Dies gilt ebenso für die unspezifische Cholinesterase. Da die Verbindungen zur Charakterisierung des esteratischen Zentrums schon relativ gut untersucht worden waren, haben wir somit ein «Negativ» der katalytisch aktiven Stelle von beiden Enzymen, was wir in Fig. 17 für Acetylcholinesterase und in Fig. 18 für Cholinesterase dokumentiert haben.

Zusammenfassung

Acetylcholinesterase ist ein Enzym, das in den Synapsen an Membranen gebunden ist und die Hydrolyse des Neurotransmittors Acetylcholin katalysiert.

Das erste Ziel unserer Arbeiten war, Acetylcholinesterase rein zu isolieren und eine genügende Menge davon herzustellen.

In der Natur findet man Acetylcholinesterase hauptsächlich in den neuromuskulären Synapsen. Für die Präparation dieses Enzyms eignen sich speziell die elektrischen Organe von elektrischen Fischen, da diese Organe entwicklungsgeschichtlich von Muskeln abstammen und praktisch nur noch aus Entplatten bestehen.

Im Zitterrochen fanden wir die ideale Quelle für unser Vorhaben. In Zusammenarbeit mit dem Institut Universitaire de Biologie Marine der Universität Bordeaux, Station Biologique d'Arcachon, konnten genügend Zitterrochen, *Torpedo marmorata*, beschafft werden.

Die Darstellung des Rohenzyms wurde soweit vereinfacht, dass nun grössere Mengen davon zur Verfügung stehen. Die Reindarstellung wurde mit der jüngsten Errungenschaft der Biochemie, der Affinitätschromatographie, durchgeführt. Dazu synthetisierten wir einen neuen aliphatischen, geradkettigen, wenig polaren Inhibitor.

Das Reinenzym konnte zur Kristallisation gebracht werden.

Das zweite Ziel unserer Arbeiten war, die aktive Stelle des Enzyms zu charakterisieren. Dazu synthetisierten wir Acetylcholin-Homologe und untersuchten damit die Kinetik der Hydrolyse sowie die Inhibitor-Wirkungen auf die enzymkatalysierte Hydrolyse des Acetylcholins.

Aufgrund der kinetischen Daten, die wir aus unseren Versuchen erhalten hatten, konnten wir Modelle der katalytisch aktiven Stellen der Acetylcholinesterase und der Cholinesterase erarbeiten.

Literatur

1. Lindhard, J.: Die Funktion der motorischen Endplatte. Ergebn. Physiol. *33:* 364–374 (1931).
2. Nachmansohn, D.: Biochemistry as part of my life. Annual Rev. Biochem. *41:* 1–28 (1972).
3. Biedermann, W.: K. Die elektrischen Fische, 748–842, in: Elektrophysiologie, G. Fischer, Jena, 1895.
4. Fessard, A.: Les organes electriques, in: P. P. Grassé, Traité de Zoologie, Tome XIII 2e fsc. Poissons, Massault, Paris, 1958.
5. Dawson, H.: Electric organs, 1223–1229, in: A textbook of general physiology, 4. edit. Vol. II. J. and A. Churchill, London, 1970.
6. Schimkewitsch, W.: C. Elektrische Organe, 88–91, in: Lehrbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. Schweizerbarth, Stuttgart, 1921.
7. Fischer, H.: Acetylcholin im elektrischen Organ der elektrischen Fische. Pharmakologie des elektrischen Organs, 490–495, in: Heffter-Heubner, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXVI, Springer, Berlin, 1971.
8. Rothenberg, M. A. and D. Nachmansohn: Studies on cholinesterase. J. Biol. Chem. *168:* 223–231 (1947).
9. Nachmansohn, D. et E. Lederer: Sur la biochimie de la cholinestérase. Bull. Soc. Chim. Biol. *21:* 797–808 (1939).
10. Nachmansohn, D. et E. Lederer: Sur quelques propriétés chimiques de la cholinestérase. Compt. Rend. *130:* 321–324 (1939).
11. Lawler, H. C.: Turnover time of acetylcholinesterase. J. Biol. Chem. *236:* 2296–2301 (1961).
12. Lawler, H. C.: A simplified procedure for the partial purification of acetylcholinesterase from electric tissue. J. Biol. Chem. *234:* 799–801 (1958).

13. LAWLER, H. C.: Purification and properties of an acetylcholinesterase polymer. J. Biol. Chem. *238:* 132–137 (1963).
14. KREMZNER, L. T. and I. B. WILSON: A partial characterization of acetylcholinesterase. Biochemistry *3:* 1902–1905 (1964).
15. LEUZINGER, W. and A. L. BAKER: Acetylcholinesterase I. Large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. *57:* 446–451 (1967).
16. LEUZINGER, W., A. L. BAKER and E. CAUVIN: Acetylcholinesterase II. Crystallization, absorption spectra, isoionic point. Proc. Natl. Acad. Sci. *59:* 620–623 (1968).
17. LEUZINGER, W.: Structure and function of acetylcholinesterase, 241–245, in: AKERT, K. and P. G. WASER, Progress in brain research *31:* Elsevier, Amsterdam, 1969.
18. LEUZINGER, W., M. GOLDBERG and E. CAUVIN: Molecular properties of acetylcholinesterase. J. Molec. Biol. *40:* 217–225 (1969).
19. CUATRECASAS, P. and C. ANFINSEN: Affinity Chromatography, 345–378, in: COLOWICK, S. P. and N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, edit. W. B. Jacoby, XXII, Acad. Press N.Y., 1971.
20. BERMAN, J. D. and M. YOUNG: Rapid and complete purification of acetylcholinesterase of electric eel and erythrocyte by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. *68:* 395–398 (1971).
21. HOPFF, W. H., G. RIGGIO and P. C. WASER: Affinity chromatography of acetylcholine acetylhydrolase EC 3.1.1.7. A new straight chain aliphatic inhibitor. FEBS LETTERS *35:* 220–222 (1973).
22. BERGMEYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, I, 11, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
23. GOEDDE, H. W., A. DOENICKE und K. ALTLAND: Pseudocholinesterasen. Springer, Berlin, 1967. (1973).
24. WILSON, I. B. and F. BERGMANN: Acetylcholinesterase. J. Biol. Chem. *186:* 683–692 (1950).
25. WILSON, I. B.: The mechanism of enzyme hydrolysis studied with acetylcholinesterase, 642–657, in: The mechanism of enzyme action, edit. W. D. MCELROY and B. GLASS, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954.
26. NACHMANSOHN, D.: Chemical and molecular basis of nerve activity, 105–118, Acad. Press, N.Y., 1959.
27. WASER, P. G.: Über die Wirkungsweise von cholinergischen und anticholinergischen Stoffen. Schweiz. Med. Wo. *87:* 577–605 (1957).
28. O'BRIEN, R. D.: Toxic phosphorus esters. Acad. Press, N.Y., 1960.
29. KARCZMAR, A. G., E. USDIN and J. H. WILLS: Anticholinesterase agents. Internatl. Encycl. Pharm. Ther. Section 13/I. Pergamon Press, Oxford, 1970.
30. COHEN, J. A. and R. A. OOSTERBAAN: The active site of acetylcholinesterase and related esterases and its reactivity towards substrates and inhibitors, 299–373, in: G. B. KOELLE, Cholinesterases and anticholinesterase agents. Handbuch der experimentellen Pharmakologie XV, A. Heffter und W. Heubner, edit. O. Eichler und A. Farah, Springer, Berlin, 1963.
31. WASER, P. G.: Relation between enzymes and cholinergic receptors. CIBA Foundation Symp. on Enzymes and Drug Action, 206–217, in: J. L. MONGAR and A. V. S. DE REUCK. J. and A. Churchill Ltd., London, 1962.
32. WASER, P. G.: Über die Wirkungsweise von cholinergischen und anticholinergischen Stoffen. Schweiz. Med. Wo. *87:* 577–606 (1957).
33. MAIN, A. R., W. G. SOUCIE, T. L. BUXTON and E. ARINC: The purification of cholinesterase from horse serum. Biochem. J. *143:* 733–744 (1974).
34. HEILBRONN, E.: Biochemistry of cholinergic receptors, 343–364, in: Cholinergic Mechanisms, edit. P. G. WASER. Raven Press, N.Y., 1975.
35. SCHWYZER, R. and J. FRANK: Affinity chromatography with ϵ-aminocaproylcholine derivatives. Helv. Chim. Acta *55:* 2678–2682 (1972).
36. FRANK, J.: Dissertation Nr. 5086, ETH Zürich (1973). Charakterisierung und affinitätschromatographische Isolierung von Acetylcholin-Bindungsproteinen (potentiellen Rezeptormolekeln) mit Cholinderivaten: Synthese und Eigenschaften von Diazoacetylcholin und ϵ-Aminocaproylcholin.

37. Schmidt, J. and M. A. Raftery: Purification of acetylcholine receptors from *torpedo californica electroplax* by affinity chromatography. Biochemistry *12:* 852–856 (1973).
38. Olsen, R., J. C. Meunier, M. Weber and J. P. Changeux: Charaterization, isolation and purification of the cholinergic receptor protein from electrophorus electric organ. FEBS LETTERS *28:* 96–100 (1972).
39. Klett, R. P., B. W. Fulpius, D. Cooper, M. Smith, E. Reich and L. D. Posani: The acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. *248:* 6841–6853 (1973).
40. Biesecker, G.: Molecular properties of the cholinergic receptor purified from *Electrophorus electricus.* Biochemistry *12:* 4403–4409 (1973).
41. Engelhard, H., K. Prchal und M. Nenner: Acetylcholin-Esterase. Angew. Chemie *79:* 604–616 (1967).
42. Hopff, W. H. und P. G. Waser: Warum können Reaktivatoren schädlich sein? Abgehandelt am Beispiel der Reaktivierung der blockierten Acetylcholinesterase. Pharmazeut. Acta Helv. *45:* 414–423 (1970).
43. Tammelin, L. E.: Organophosphorylcholines and cholinesterases. Arkiv Kemi *12:* 287–298 (1958).
44. Tammelin, L. E.: Dialkoxy-phosphorylthicholines, alkoxy-methyl-phosphorylthiocholines and analogous choline esters. Acta Chem. Scand. *11:* 1340–1349 (1957).
45. Tammelin, L. E.: Choline Esters. Svensk Kem. Tidsk. *70:* 157–181 (1958).
46. Fredriksson, T.: Pharmacological properties of methyl-fluoro-phosphorylcholines. Arch. int. pharmacodyn. *113:* 101–113 (1957).
47. Fredriksson, T.: Further studies on fluoro-phosphorylcholines. Arch. int. pharmacodyn. *115:* 474–482 (1958).
48. Hackley, B. E. jr., G. M. Steinberg and J. C. Lamb: Formation of potent inhibitors of Acetylcholinesterase by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (GB). Arch. Biochem. *80:* 211–214 (1959).
49. Heilbronn, E.: Phosphorylated Cholinesterases. Svensk Kem. Tidsk. *77:* 3–35 (1965).
50. Wilson, I. B.: Acetylcholinesterase XI. J. Biol. Chem. *190:* 111–117 (1951).
51. Wilson, I. B. and E. K. Meislich: Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates. J. Amer. Chem. Soc. *75:* 4628 (1953).
52. Wilson, I. B. and S. Ginsburg: A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. Biochem. Biophys. Acta *18:* 168–170 (1955).
53. Childs, A. F., D. R. Davies, A. L. Green and J. P. Rutland: The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. Brit. J. Pharmacol. *10:* 462–465 (1955).
54. Creasy, N. H. and A. L. Green: 2-Hydroxyiminomethyl-N-methylpyridinium methansulphonate (P2S), an antidote to organophosporus poisoning. Its preparation, estimation and stability. J. Pharm. Pharmacol. *8:* 485–490 (1959).
55. Schoene, K.: Phosphonyloxime aus Soman; Bildung und Reaktion mit Acetylcholinesterase in vitro. Biochem. Pharmacol. *22:* 2997–3003 (1973).
56. Oldiges, H. und K. Schoene: Pyridinium- und Imidazoliumsalze als Antidote gegenüber Soman- und Paraoxonvergiftungen bei Mäusen. Arch. Toxicol. *26:* 293–305 (1970).
57. Loomis, T. A.: Distribution and excretion of pyridine-2-aldoxime methiodite (PAM); Atropine and PAM in sarin poisoning. Tox. Appl. Pharmacol. *5:* 489–499 (1963).
58. Ohnesorge, F. K. und H. S. v. Kreudenstein: Hemmung der Cholinesterase-Aktivitäten von Erythrocyten, Ventrikelmuskulatur und Gehirn von Meerschweinchen. Arch. Toxicol. *26:* 102–116 (1965).
59. Junod, U. B., W. H. Hopff und P. G. Waser: Problems in oxime therapy. Experientia *31:* 27 (1975).
60. Borbély, A. A., U. Junod, W. Hopff, A. Hofmann, R. Vaney and P. G. Waser: Studies on the protective action of atropine and obidoxime against sarin poisoning in mice, 427–432, in: Cholinergic Mechanisms, edit. P. G. Waser, Raven Press, N.Y., 1975.
61. Oldiges, H.: Untersuchungen zur Antidotbehandlung percutaner Vergiftungen mit Alkylphosphaten an Ratten. Arzneim.-Forschg. *21:* 1028–1030 (1971).

62. FLEISHER, J. H., L. W. HARRIS, G. R. MILLER, N. C. THOMAS and W. J. CLIFF: Antagonism of sarin poisoning in rats and guinea pigs by atropine, oximes and mecamylamine. Toxicol. and appl. pharmacol. *16:* 40–47 (1970).
63. CUATRECASAS, P., M. WILCHEK and C. B. ANFINSEN: Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. *61:* 636–643 (1968).
64. CUATRECASAS, P. and C. B. ANFINSEN: Affinity Chromatography, in: COLOWICK, S. P. and N. O. KAPLAN, Methods in enzymology, 345–378, edit. W. B. Jacoby, Acad. Press, N.Y. 1971.
65. FEINSTEIN, G.: Affinity Chromatography of Biological Macromolecules. Naturwissenschaften *58:* 389–396 (1971).
66. BRÜMMER, W.: Affinitätschromatographie I. Kontakte «Merck» *1/74:* 23–29 (1974).
67. HOPFF, W. H., G. RIGGIO and P. G. WASER: Progress in isolation of acetylcholinesterase, 293–298 in: Cholinergic Mechanisms, edit. P. G. WASER, Raven Press N.Y., 1975.
68. HOPFF, W. H., G. RIGGIO and P. G. WASER: Progress in isolation of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) by affinity chromatography. Experientia *30:* 695–696 (1974).
69. BARLOW, R. B., H. BLASCHKO, J. H. HIMMS and U. TRENDELENBURG: Observations on omega-amino-polymethylene-trimethylammonium compounds. Brit. J. Pharmacol. *10:* 116–123 (1955).
70. ELSLAGER, E. F., A. M. MOORE, F. W. SHORT, M. J. SULLIVAN and F. H. TENDICK: Synthetic amebicides II. J. Amer. Chem. Soc. *79:* 4699–4703 (1957).
71. LEDOCHOWSKI, A., C. WASIELEWSKI, G. BLOTNY, J. F. BIERNAT, J. PERYT, B. HOROWSKA and B. STEFANSKA: Research on tumor inhibiting compounds. Rocz. Chem. Ann. Soc. Chim. Polon. *43:* 1083–1087 (1969).
72. LOTT, W. A. and J. KRAPKO: Monoquaternized diamines. US Patent 2813904, Nov. 19, 1957.
73. INMAN, J. K. and H. M. DINTZIS: The derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. Biochemistry *8:* 4074–4082 [4076!] (1969).
74. AUGUSTINSSON, K. B.: Cholinesterases. Acta Physiol. Scand. *15:* Suppl. 52, 1–182 (1948).
75. AUGUSTINSSON, K. B.: Substrate concentration and specificity of choline estersplitting enzymes. Arch. Biochem. *23:* 111–126 (1949).
76. AUGUSTINSSON, K. B.: Classification and comparative enzymology of the cholinesterases and methods for their determination, 89–128, in: Cholinesterases and anticholinesterase agents, edit. G. B. KOELLE, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XV, A. HEFFTER und W. HEUBNER, edit. O. EICHLER und A. FARAH, Springer, Berlin, 1963.
77. NEILANDS, J. B. and M. D. CANNON: Automatic recording pH instrumentation. Industrial Chemistry, Analytical *27:* 29–33 (1955).
78. HOLTON, P. and H. R. ING.: The specificity of the trimethylammonium group in acetylcholine. Brit. J. Pharmacol. *4:* 190–196 (1949).
79. MEHROTRA, K. N. and W. C. DAUTERMANN: The specificity of rat brain acetylcholinesterase for N-alkyl analogues of acetylcholine. J. Neurochem. *10:* 119–123 (1963).
80. KRUPKA, R. M. and K. HELLENBRAND: Specific versus non specific interactions of mammalian and insect acetylcholinesterase with substrates and reversible inhibitors. Biochim. Biophys. Acta *370:* 208–215 (1974).
81. BERGMANN, F. and M. WURZEL: The active surface of pseudocholinesterase and the possible role of this enzyme in conduction. Biochim. Biophys. Acta *11:* 440–441 (1953).
82. LONG, J. P.: Structure activity relationships of the reversible anticholinesterase agents, 374–427, in: Cholinesterases and anticholinesterase agents, edit. G. B. KOELLE, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XV, HEFFTER, A. und W. HEUBNER, O. EICHLER und A. FARAH, Springer, Berlin, 1963.
83. PAULING, P.: The shapes of cholinergic molecules, 241–249, in: Cholinergic Mechanisms, edit. P. G. WASER, Raven Press, N.Y. 1975.
84. AUGUSTINSSON, K. B. and D. NACHMANSOHN: Distinction between acetylcholine-esterase and other choline ester-splitting enzymes. Science: *110:* 98–99 (1949).

Adresse des Autors: PD Dr. med. et phil. II WOLFGANG HERBERT HOPFF, Langäristrasse 13, 8117 Fällanden.