

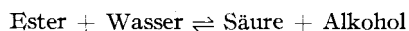
Cholinesterase*)

Von Dr. WERNER HANSKE

Aus dem Institut für Organische Chemie
der T. H., Dresden.

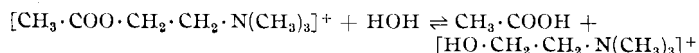
Inhalt: I. Die physiologische Stellung des Acetylcholins. — II. Vorkommen der Cholinesterase. — III. Physiologische Bedeutung. — IV. Bestimmungsmethoden. — V. Enzymatische Eigenschaften. — VI. Substratspezifität. — VII. Die synthetische Leistung der Cholinesterase.

Die Enzymgruppe der Esterasen, zu der die Lipasen, Lecithasen, die Phosphatasen, Sulfatasen u. a. gehören, katalysiert die i. allg. träge verlaufende Reaktion:



Die Natur bedient sich dieser Fermente also entweder, um Ester hydrolytisch aufzuspalten oder aber um Ester aus den Komponenten aufzubauen.

Die Cholinesterase ist, soweit wir heute wissen, in den Organismen auf das natürliche Substrat Acetylcholin eingestellt, beschleunigt demnach die Reaktion:



In diesem System ist Acetylcholin der physiologisch wichtigste Stoff und die Bedeutung der Cholinesterase eng mit diesem Substrat verknüpft.

I. Die physiologische Stellung des Acetylcholins.

Das seit 1862 bekannte Acetylcholin wurde zuerst physiologisch interessant, als 1899 Reid Hunt fand, daß es den Blutdruck in außerordentlich kleinen Mengen herabzusetzen vermag. Noch $5 \cdot 10^{-5}$ mg zeigen an der Katze eine deutliche gefäßerweiternde Wirkung. Acetylcholin wird ferner dauernd im Darm gebildet und regt diesen noch in einer Konzentration $1:10^8$ an, so daß man es als Darmhormon bezeichnet. Ganz auffällig ist auch die Eigenschaft, Muskeln noch in minimalsten Dosen zur Kontraktion zu bringen. Der Blutegelelmuskel, der deshalb oft als Testobjekt benutzt wird, spricht noch auf eine Acetylcholin¹⁾-Konzentration von $1:10^{10}$ an.

Am bedeutsamsten aber ist der Befund von O. Löwi geworden, daß ACh auf das Herz denselben Einfluß hat wie eine Vagusreizung. Nach Fühner läßt es sich am Froschherzen noch mit $1:2 \cdot 10^9$ nachweisen. Weitere Arbeiten stellten dann fest, daß bei der Reizung des Vagusnerven tatsächlich ein chemischer Stoff abgesondert wird, der nach seinem gesamten Verhalten mit ACh identisch ist. Er tritt aber nicht nur im Herzvenenblut nach Reizung des Nervus vagus auf, auch nach der Reizung des Nervus lingualis oder der Chorda tympani entsteht ACh. Alle Ergebnisse deuten darauf hin, daß beim gesamten parasymphathischen Nervensystem die Wirkung durch ACh auf die innervierten Erfolgsorgane übertragen wird. Beim sympathischen Nervensystem dagegen spielt das Adrenalin diese Rolle eines chemischen Vermittlers, so daß man heute oft von cholinergischen und adrenergischen Nerven spricht. Hat also z. B. die elektrische Reizleitung eines parasymphathischen Nerven die histologische Grenze gegen das innervierte Erfolgsorgan, die sog. Endplatte, erreicht, dann gibt diese nach außen ACh ab, dessen Moleküle, nachdem sie an die Angriffsstellen des Organs gelangt sind, wie ein Hormon auf eine noch unbekannte Weise den Erfolg auslösen. Interessant ist dabei, daß durch das ACh-Kation eine elektrische Ladung im Molekül lokalisiert ist.

II. Vorkommen der Cholinesterase.

Der Gedanke, daß ein Ferment existieren müsse, welches ACh im Organismus hydrolysiert, wurde zuerst von Dale²⁾ ausgesprochen. 1925 wiesen Aberhalden u. Paffrath³⁾ dann zum ersten Male im Dünndarm von Pferd und Schwein ein Ferment nach, das sowohl ACh verseift als auch aus Cholin und Essigsäure aufbaut. Später entdeckten Plattner u. Mitarb.⁴⁻¹¹⁾, daß

durch Blut von Mensch und Säugetieren ACh in starkem Maße gespalten wird, und Loewi u. Navratil¹²⁾ stellten fest, daß auch dem Herzextrakt das gleiche Vermögen zukommt. Diese beiden Forscher fanden gleichzeitig die außerordentlich starke und für die Cholinesterase so wichtig gewordene Hemmung durch das Alkaloid Physostigmin (auch Eserin genannt)¹³⁾.

Nachdem sich allmählich die Meinung durchgesetzt hatte, daß die Hydrolyse des ACh nicht einer Oberflächenkatalyse⁶⁻⁹⁾, sondern einer Esterasewirkung zukommt, schlugen Stedman, Stedman u. Easson¹⁴⁾ den Namen Cholinesterase¹⁵⁾ für dieses Enzym vor, denn es hatte sich gezeigt, daß nicht nur ACh, sondern auch Propionylcholin (I)^{16,17)}, Butyrylcholin (II)¹⁴⁾ und Pyruvylcholin (VI)¹⁸⁾ durch dieses Ferment gespalten werden.

Die Untersuchungen nach dem Eingreifen des ACh in physiologische Prozesse förderten gleichzeitig weitgehend die Kenntnis vom Vorkommen der ChE in den verschiedenen Organen und Geweben. Man fand es in fast allen Kalt- und Warmblüterorganen¹¹⁾, während es in pflanzlichen Organismen bisher nicht angetroffen wurde¹⁹⁾. Im Blut sind es bald die Blutkörperchen (Mensch, Kaninchen, Rind²⁰⁾, Schaf, Ziege¹¹⁾), bald das Serum (Pferd, Hund²⁰⁾, Katze, Huhn, Ente²¹⁾), die den größeren Gehalt aufweisen. Lymphe ist arm daran²²⁾, deshalb nimmt die Aktivität des Blutes nach größeren Blutverlusten ab, weil dann Lymphe zufließt. Cerebrospinalflüssigkeit enthält kein Enzym²¹⁾, im Rückenmark²³⁾ und Gehirn²⁴⁾ ist die graue Substanz viel aktiver als die weiße. Für die physiologische Bedeutung der ChE ist der Befund wichtig, daß nervenhaltige Froschmuskeln 3–5mal mehr davon enthalten als entnervte, u. zw. schätzen Marnay u. Nachmansohn²⁵⁾, daß die Nervenendplatten mehrere tausendmal mehr ChE besitzen als das übrige Muskelgewebe. Reich an Ferment sind noch Blutegelelmuskel²⁶⁾, Embryonal-extrakt²⁷⁾, das Pankreas von Hund und Meerschweinchen²⁸⁾ und das Blut der Weinbergschnecke²⁹⁾. Am reichhaltigsten aber ist das elektrische Organ vom Zitterrochen, das 3 Zehnerpotenzen aktiver ist als z. B. der Froschmuskel²⁹⁾. Da, wie man feststellte, dieses elektrische Organ auch durch ACh erregbar ist³⁰⁾, ergibt sich eine auffällige Beziehung zu der bereits oben erwähnten Entstehung von ACh im Zusammenhang mit der elektrischen Reizleitung im Nerven.

III. Physiologische Bedeutung.

Sicherlich ist es eine der wichtigsten Aufgaben der ChE, das dauernd in verschiedenen Organen gebildete ACh zu vernichten und eine Vergiftung des Körpers durch diesen Stoff zu verhüten, die Wirkung des ACh damit gleichzeitig auf ganz bestimmte Orte und eine gewisse Zeitdauer zu beschränken. Die experimentellen Untersuchungen jedoch, wie das Ferment im einzelnen in die physiologischen Vorgänge eingreift, sind

⁶⁾ Kodera, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **219**, 181 [1928].

⁷⁾ Plattner, Gahler u. Kodera, ebenda **219**, 678 [1928].

⁸⁾ Kodera, ebenda **219**, 686 [1928].

⁹⁾ Plattner u. Gahler, ebenda **220**, 606 [1928].

¹⁰⁾ Plattner u. Bauer, ebenda **220**, 180 [1928].

¹¹⁾ Plattner u. Hintner, ebenda **225**, 19 [1930].

¹²⁾ Ebenda **214**, 678 [1926].

¹³⁾ Ebenda **214**, 689 [1926].

¹⁴⁾ Biochemie. J. **26**, 2056 [1932].

¹⁵⁾ Im weiteren Text mit ChE abgekürzt.

¹⁶⁾ Simonart, Rev. belge Sci. med. **5**, 73 [1933].

¹⁷⁾ White, Biochemie. J. **27**, 1055 [1933].

¹⁸⁾ Matthes, J. Physiology **70**, 338 [1930].

¹⁹⁾ Francioli, Enzymologia [Den Haag] **3**, 200 [1937].

²⁰⁾ Ammon u. Voß, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **235**, 393 [1935].

²¹⁾ Stedman u. Stedman, Biochemie. J. **29**, 2107 [1935].

²²⁾ c. Verebely jr., Klin. Wschr. **16**, 851 [1937].

²³⁾ Nachmansohn, Nature [London] **140**, 427 [1937].

²⁴⁾ Pighini, Biochim. Terap. speriment. **25**, 347 [1938].

²⁵⁾ J. Physiology **92**, 37 [1938].

²⁶⁾ Ammon, Ergebn. Enzymforsch. **4**, 102 [1935].

²⁷⁾ Ammon u. Schütte, Biochem. Z. **275**, 216 [1935].

²⁸⁾ Marnay, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **128**, 519 [1938].

²⁹⁾ Marnay, ebenda **128**, 573 [1937].

³⁰⁾ Nachmansohn, Yale J. Biol. Med. **12**, 565 [1940].

* Zusammenfassende Darstellungen über Cholinesterase:

Ammon, diese Ztschr. **47**, 447 [1934].

Ammon, Ergebn. Enzymforsch. **4**, 102 [1935].

Ammon in: Nord-Weidenhagen: Handbuch der Enzymologie. Akad. Verlagsges., Leipzig 1940, S. 394.

Ammon in: Die Methoden der Fermentforschung. Georg Thieme, Leipzig 1940, S. 1585.

¹⁾ Im weiteren Text mit ACh abgekürzt.

²⁾ J. Pharmacol. exp. Therapeut. **6**, 147 [1914].

³⁾ Fermentforsch. **8**, 229 [1926].

⁴⁾ Plattner, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **214**, 212 [1926].

⁵⁾ Gahler u. Plattner, ebenda **218**, 488 [1927].

noch spärlich. Die Anhäufung der ChE an den Nervenendplatten kann man deuten als die Aufgabe, wie ein Schutzwall das umgebende Gewebe vor dem ACh zu bewahren³¹⁾, das von seinem eigentlichen Wirkungsbereich fortgediffundiert. Wahrscheinlicher aber ist es, daß die ChE das an den Endplatten der Nerven freigesetzte ACh sofort angreift und in der refraktären Phase wieder vernichtet. Jedenfalls würde die an den motorischen Endplatten vorhandene Enzymmenge dafür völlig ausreichen. *Martini* u. *Torda*³²⁾ zeigten, daß der ChE-Gehalt des Musculus Gastrocnemius der Ratte abnimmt, wenn der Nervus ischiadicus durchschnitten wurde, ebenso die Aktivität des Lumbarmarks, wenn man das Thoraxmark im 7.—9. Segment durchtrennte³³⁾.

Auch von der klinischen Seite her wurden noch keine grundlegenden Ergebnisse gewonnen. Der günstige Einfluß von Physostigmin bei der Behandlung von Myasthenia gravis legt den Gedanken nahe, daß diese Krankheit, die sich in einer abnorm raschen Ermüdbarkeit der Muskeln äußert, auf einer Störung des ACh—ChE-Systems beruht. Die Blutuntersuchung zeigt zwar, daß die ChE-Werte bei Myasthenikern durchaus im Streubereich der normalen liegen³⁴⁾. Jedoch ist es wenig wahrscheinlich, daß das im Blut enthaltene Ferment an den cholinergischen Prozessen im Muskel beteiligt ist. Erst eine Untersuchung an den Nervenendplatten selbst kann wesentliche Erkenntnisse bringen.

Verringerte Aktivität des Blutes fand man bei latenten Allergikern³⁵⁾, bei fortgeschrittener Tuberkulose und Carcinomen³⁶⁾, bei Gallen- und Lebererkrankungen³⁷⁾. Erhöhte Werte fanden sich bei unbehandeltem Hyperthyreoidismus³⁸⁾ und schwerem Diabetes. Aber alle diese Angaben sind vorsichtig zu bewerten, denn systematische Untersuchungen ergaben, daß zwar der ChE-Gehalt im Blut eines Menschen wochenlang konstant bleibt³⁹⁾ und auch beim Hund durch monatelange tägliche ACh-Einspritzungen nicht verändert wird⁴⁰⁾, daß aber die Werte zwischen den einzelnen Menschen rechte Unterschiede aufweisen und irgendwelche Beziehungen zu Alter, Geschlecht, Diät⁴¹⁾, zu Körpertemperatur, Fasten, Muskelmasse³⁹⁾ u. a. nicht erkennen lassen.

IV. Bestimmungsmethoden.

Zur Bestimmung der ChE in Organen werden diese zunächst mit Quarzsand zerrieben und dann mit *Ringer-Lösung*⁴²⁾ oder Glycerin⁴³⁾ extrahiert. Bei der Prüfung des Bluteserums verdünnt man mit *Ringer-Lösung*⁴²⁾.

Zu quantitativen Vergleichen der Enzymmenge mißt man ausschließlich die Hydrolysegeschwindigkeit von zugesetztem ACh. Die ersten Verfahren verfolgten dabei das Verschwinden kleiner ACh-Mengen an seinen biologischen Wirkungen, durch die Kontraktionen, die am Froschrektus⁴⁴⁾ oder am Blutegel-muskel⁴⁵⁾ auftraten oder den Einfluß auf das Froschherz⁴⁶⁾.

Heute bestimmt man fast ausschließlich die bei der Hydrolyse frei gewordene Essigsäure. Dies geschieht durch Titration mit Lauge unter Benutzung eines Farbstoffindicators^{6, 46)} oder, moderner, mit Hilfe der Glaselektrode^{47, 48)}. Noch bequemer ist es, die Verseifung in bicarbonathaltiger Lösung vorzunehmen und das frei gewordene Kohlendioxyd in der *Warburg-Barkroft*-^{49, 50)} oder *van-Slyke-Apparatur*⁵¹⁾ zu messen. Schließ-

lich wird auch eine colorimetrische Bestimmung der Essigsäure mit Ferrichlorid benutzt⁵²⁾. Mikromethoden geben *Glick*⁵³⁾ und *Linderström-Lang* u. *Glick*⁵⁴⁾ an.

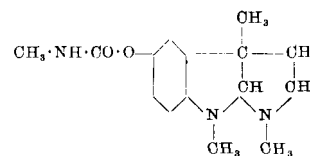
V. Enzymatische Eigenschaften.

Das Wirkungsoptimum der ChE liegt bei 37—40°^{55, 56)}. Über 50° beginnt das Ferment seine Wirksamkeit allmählich einzubüßen⁵⁶⁾ und verliert sie ganz bei 70—75°⁵⁷⁾. Als p_H-Optimum der ACh-Spaltung ermittelte *Glick*⁵³⁾ p_H = 8,5. Mit steigender Wasserstoffionenkonzentration nimmt dann die Aktivität des Enzyms ab und verschwindet ganz bei p_H = 6⁵⁷⁾.

Versuche, die ChE zu reinigen und anzureichern, sind bisher nur von *Siedman* u. *Siedman*⁵⁸⁾ unternommen worden. Da das Ferment nicht direkt aus Bluteserum an Aluminiumhydroxyd adsorbiert werden kann, müssen zunächst durch Ammoniumsulfat die Begleitstoffe fraktioniert gefällt und durch Essigsäure denaturiert werden. Durch Adsorption an Eisen- oder Aluminiumhydroxyd in essigsaurer Lösung und nachfolgende Elution mit 0,025 n-Ammoniak erhält man Präparate, in denen die ChE 50—100fach angereichert ist.

Interessant ist, daß die Lösungen des Ferments, wenn man sie durch Dialyse von Elektrolyten befreit, die Aktivität verlieren⁵⁹⁾. Sie kehrt erst nach Zugabe von Metallionen zurück, u. zw. nimmt die Wirkung in der Reihenfolge Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ab, während die einwertigen Ionen erst in viel größeren Konzentrationen wirksam sind⁶⁰⁾. Eine Lösung von Mn⁺⁺ mit 1 γ/cm³ erhöht z. B. die ACh-Spaltung von 0,08 auf 13 mg/h. *Massart* u. *Dufait*⁵⁹⁾ halten das Ca⁺⁺ für den physiologischen Aktivator. Da die ChE von Stoffen, die mit SH-Gruppen reagieren, wie Jodessigsäure, oxydiertem Glutathion, Alloxan u. a. inaktiviert wird, vermuten *Nachmansohn* u. *Lederer*⁶¹⁾ eine SH-Gruppe in dem Ferment. Sie konnten zeigen, daß durch Jod inaktiviertes Ferment durch reduziertes Glutathion reaktiviert wird.

Die Hydrolyse des ACh bei p_H = 7,5 verläuft als Reaktion 1. Ordnung⁵²⁾. Temperaturkoeffizient⁵²⁾, Dissoziationskonstante⁶²⁾ bzw. *Michaelis-Konstante*⁶³⁾ werden angegeben. Ein Substratüberschuß hemmt nicht⁶³⁾, wohl aber das Reaktionsprodukt Cholin⁶⁴⁾. Diese Verdrängung des ACh durch das Cholin ist sehr aufschlußreich für die auffälligen Hemmungen, die ChE durch viele N-haltige Verbindungen erfährt. Am bekanntesten ist wohl die außerordentlich starke Hemmung durch Physostigmin (= Eserin)¹³⁾, ein Alkaloid der Kalabarbohne, geworden.



So ermittelten z. B. *Ammon* u. *Voss*²⁶⁾, daß eine bestimmte Enzymlösung noch durch 0,005 γ des Alkaloids zu 50% gehemmt wird. Die Hemmung ist dabei reversibel, denn durch Dialyse wird sie wieder aufgehoben¹⁸⁾. Stark hemmen ferner Ergotamin^{26, 65)}, Miotin^{18, 66)}, Prostigmin^{26, 67, 68)}, Muskarin²⁶⁾, aber auch Chinin^{11, 26)}, Cocain²⁶⁾, Strychnin²⁶⁾. Interessanterweise hemmt auch Methylenblau schon in 1/500 000 mol. Lösung. *Massart* u. *Dufait*⁶⁹⁾ haben in einer kürzlich erschienenen Arbeit

³¹⁾ *Feldberg* u. *Vartiainen*, J. Physiology **83**, 103 [1934].

³²⁾ C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **124**, 446 [1937].

³³⁾ Boll. Soc. ital. Biol. speriment. **13**, 447 [1938].

³⁴⁾ *Freudenberg* u. *Redlich*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **188**, 645 [1938].

³⁵⁾ *Albus*, Klin. Wschr. **18**, 58 [1939].

³⁶⁾ *Jones* u. *Stadie*, Quart. J. exp. Physiol. **29**, 63 [1939].

³⁷⁾ *Antopol*, *Schiffrin* u. *Tuchmann*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 363 [1938].

³⁸⁾ *Antopol*, *Tuchmann* u. *Schiffrin*, ebenda **38**, 46 [1937].

³⁹⁾ *Milhorat*, J. clin. Invest. **17**, 649 [1938].

⁴⁰⁾ *Hall* u. *Etinger*, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **59**, 29 [1937].

⁴¹⁾ *Hall* u. *Lucas*, ebenda **59**, 34 [1937].

⁴²⁾ *Ammon*, in: „Die Methoden der Fermentforschung“. Verlag Thieme, Leipzig 1940, S. 1586.

⁴³⁾ *Glick*, J. gen. Physiol. **21**, 297 [1938].

⁴⁴⁾ *Mahal*, Indian J. med. Res. **25**, 703 [1938].

⁴⁵⁾ *Mintz*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **168**, 292 [1932].

⁴⁶⁾ *Renshaw* u. *Bacon*, J. Amer. chem. Soc. **48**, 1726 [1926].

⁴⁷⁾ *Glick*, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **21**, 225 [1937].

⁴⁸⁾ *Alles* u. *Hawes*, J. biol. Chemistry **133**, 375 [1940].

⁴⁹⁾ *Ammon*, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **233**, 486 [1933].

⁵⁰⁾ *Siedman* u. *Siedman*, Biochemie. J. **29**, 2107 [1935].

⁵¹⁾ *Rinkel* u. *Pijon*, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **64**, 228 [1938].

⁵²⁾ *Abdon* u. *Uvnäs*, Skand. Arch. Physiol. **76**, 1 [1937].

⁵³⁾ J. gen. Physiol. **21**, 289 [1938].

⁵⁴⁾ C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **22**, 300 [1938].

⁵⁵⁾ *Pighini*, Boll. Soc. ital. Biol. speriment. **15**, 237 [1940].

⁵⁶⁾ *Glick*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **40**, 140 [1939].

⁵⁷⁾ *Kahane* u. *Levy*, C. R. heb. Séances Acad. Sci. **202**, 781 [1936].

⁵⁸⁾ Biochemie. J. **29**, 2563 [1935].

⁵⁹⁾ Enzymologia [Den Haag] **6**, 282 [1939].

⁶⁰⁾ *Nachmansohn*, Nature [London] **145**, 513 [1940].

⁶¹⁾ Bull. Soc. Chim. biol. **21**, 797 [1939].

⁶²⁾ *Roecke*, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **59**, 264 [1937].

⁶³⁾ *Glick*, Biochemie. J. **31**, 521 [1937].

⁶⁴⁾ J. Amer. chem. Soc. **60**, 178 [1938].

⁶⁵⁾ *Engelhart* u. *Loewi*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **150**, 1 [1930].

⁶⁶⁾ Methylurethan des α-m-Oxy-phenyläthylidimethylamins.

⁶⁷⁾ Dimethylurethan des m-Oxy-phenyltrimethylammoniumchlorids.

⁶⁸⁾ *Feldberg* u. *Rempel*, zit. nach *Mintz*, S. Fußnote 45.

⁶⁹⁾ Natuurwetensch. Tijdschr. **22**, 243 [1940].

festgestellt, daß sauer reagierende Farbstoffe nicht hemmen, sondern nur basische, u. zw. dann, wenn es sich um eine stark dissoziierte quaternäre Ammoniumbase handelt. Z. B. ist die Wirkung von Methylenblau stärker als die des *Lauthschen* Violett und des Chrysoidins. Die Pseudobase des Kristallviolett und die Leukobase des Methylenblaus hemmen nicht mehr, weil bei ihnen kein quaternäres Ammoniumion mehr vorliegt. Danach ist es also das Ammoniumion, das an die aktiven Stellen der ChE angelagert wird. Je nach Art der Stickstoffverbindungen kann es dabei mit dem ACh in Wettbewerb treten, dies mehr oder weniger verdrängen. *Zisch, Jahn u. Renshaw*⁶⁴⁾ haben die relative Affinität verschiedener Cholinverbindungen zur ChE durch den Grad der Hemmung enzymatischer ACh-Hydrolyse ermittelt. Er steigt in der Reihenfolge Cholinbromid (87), Acetylcholin (100), Äthoxycholinbromid (148), Butoxyformocholinbromid (1110). Auch F-Ion erweist sich als stark hemmend¹¹⁾.

Die Blockierung der ChE durch Physostigmin ist sehr wichtig für die physiologischen Untersuchungen geworden, da es auch in vivo seine Wirkung entfaltet und gestattet, das ACh vor dem überall anwesenden Ferment zu schützen, so daß die ACh-Wirkung erst dadurch richtig sichtbar wird.

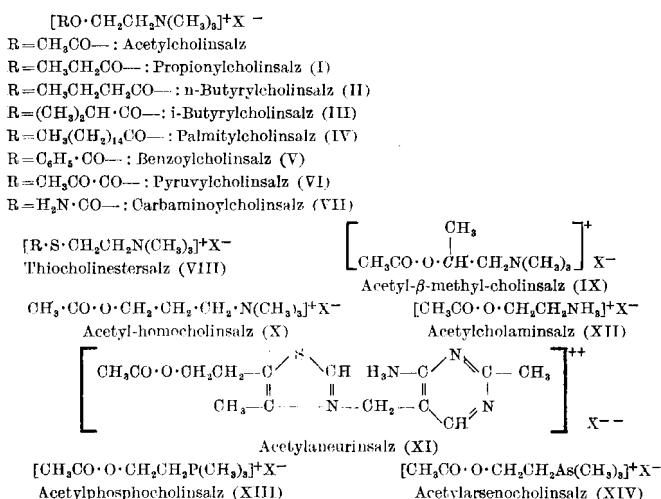
VI. Substratspezifität.

Von vielen Enzymen wissen wir, daß sie streng auf ein ganz bestimmtes Substrat eingestellt sind. Bei der ChE ist dies aber nicht der Fall. Schon wenn man das ACh-Molekül dadurch variiert, daß man den Acetylrest durch den Propionyl- (I) oder den n-Butylrest (II) ersetzt, wird die enzymatische Spaltbarkeit verstärkt, obgleich die nichtenzymatische in derselben Reihenfolge gerade abnimmt⁷⁰⁾. Erst dann, wenn die verlängerte Fettsäurekette den Ester wasserunlöslich macht, wie beim Palmitylcholinchlorid (IV)⁷¹⁾, muß die Verseifung durch ChE natürlich verschwinden. Cholinester mit verzweigter Fettsäurekette werden langsamer gespalten als solche mit gerader: der Isobutyrylester (III) weniger als der n-Butyrylester (II)⁷⁰⁾. Benzoylcholin (V) wird langsamer zersetzt als ACh⁷⁰⁾. Baut man Halogen in die saure Komponente ein, dann erhöht sich die Spaltbarkeit⁷²⁾. Denselben Effekt erzielt man, wenn man den Sauerstoff durch Schwefel ersetzt, also Ester des Thiocholins (VIII) als Substrat verwendet⁷³⁾. Nach Einführen von Methylgruppen in das Cholin greift die ChE, besonders wenn das Methyl in der β -Stellung steht, viel schlechter an. Hier beim Acetyl- β -methyl-cholin (IX) läßt sich auch entscheiden, ob die ChE als ein auf optisch nicht aktives Substrat eingestelltes Ferment eine stereochemische Spezifität besitzt. Dies ist nun in der Tat der Fall, denn *Glick*⁷¹⁾ konnte zeigen, daß nur die (+)-Form gespalten wird, während das Enzym die (—)-Form nicht angriff. Man sieht daraus, daß die Natur ihren Fermenten oft größere Spezifität gibt, als es eigentlich notwendig wäre.

Ist der Acylrest und die nächste Umgebung der Esterbrücke für die eigentliche Hydrolyse maßgebend, so bestimmt das substituierte Ammoniumion offenbar das zunächst notwendige Zustandekommen des Ferment-Substrat-Zwischenstoffs. Es ist deshalb verständlich, daß das Anion ohne Einfluß ist, wie der Austausch von Cl' gegen Br', J', ClO₄' ergeben hat⁷¹⁾. Aber schon die Trennung der Esterbrücke vom Stickstoff um eine weitere CH₂-Gruppe setzt, wie man bei einem Vergleich zwischen ACh und Homoacetylcholin (X) findet, die Spaltbarkeit stark herab¹⁴⁾. Doch auch Acetylcholin (XI) wird noch von ChE angegriffen⁷³⁾. Die enzymatische Esterverseifung verschwindet dagegen ganz, wenn die Methylgruppen am Stickstoff fehlen wie im Acetylcholin (XII). Dagegen können die Methylgruppen durch CH₂-Ringe kurzgeschlossen sein: Piperidin- und Pyrrolidinanaloga der Cholinester werden, wenn auch langsamer, gespalten⁷²⁾. Sehr interessant ist jedoch der Ersatz von Stickstoff durch Phosphor und Arsen in den Verbindungen Acetylphospho- (XIII) und Acetylarsocholin (XIV). Auch diese Ester, die übrigens, wenn auch schwächer,

Acetylcholinwirkung im Organismus aufweisen, werden von ChE hydrolysiert⁷⁵⁾.

Um die ChE abzugrenzen gegen andere Esterasen des Blutes, das ja außerdem die Fähigkeit besitzt, Methylbutyrat und Tributyrin zu verseifen, hat man das Physostigmin herangezogen. Da es die Spaltung des ACh durch ChE schon in γ -Dosen völlig aufhebt, die Spaltung von Methylbutyrat und Tributyrin dagegen erst durch mg-Dosen gehemmt wird, da ferner die Wirkungen von den verschiedensten Fermentpräparaten auf die drei Substrate nie parallel gehen, ist der Nachweis erbracht, daß die ChE nicht mit den übrigen Esterasen identisch ist^{26, 76, 77)}. *Stedman u. Stedman*⁵⁸⁾ bewiesen dann noch, daß ihr angereichertes ChE-Präparat kein Methylbutyrat verseift.



Auch ein praktisches Interesse hat die Frage nach der Substratspezifität, u. zw. für die Therapie. Da die ChE im Blut sofort zugesetztes ACh hydrolysiert, müssen Cholinester gefunden werden, die durch das Ferment nicht verseift werden, aber doch ACh-Wirkung besitzen. Im Doryl (auch Lentin genannt), einem Carbaminylcholin (VII), ist ein derartiger Stoff geschaffen worden²⁶⁾.

VII. Die synthetische Leistung der Cholinesterase.

Da ein Katalysator sowohl Reaktion als auch Gegenreaktion gleichmäßig beeinflusst, ist auch eine Beschleunigung der Veresterung von Cholin durch Essigsäure zu erwarten. Allerdings wird dabei infolge der Beziehungen der H- bzw. OH-Ionen zu den Reaktionspartnern der p_H-Wert Gleichgewichtslage und Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen.

Schon *Abderhalden u. Paffrath*³⁾ stellten experimentell fest, daß in alkalischer Lösung keine Synthese von ACh nachweisbar ist. Erst in neutralem und saurem Medium wird sie merkbar. Die beiden Forscher fanden, daß in schwach essigsaurer Lösung von Cholin + Natriumacetat durch die im Schweinedünndarm enthaltene Cholinesterase 0,2–0,8% Ausbeute erzielt wurden. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde das gebildete ACh bestimmt. *Ammon u. Kwiatkowski*⁷⁸⁾ wiederholten den Versuch mit Blutserum bei p_H = 6 und benutzten die einfache Ausschaltung der ChE durch Physostigmin, um dann das gebildete ACh biologisch am Blutegeßmuskel zu ermitteln, eine Methode, die für die Bestimmung von ACh neben Cholin in kleinen Mengen am geeignetsten ist.

An der biologischen Entstehung von ACh scheint die ChE nicht beteiligt zu sein, denn *Stedman u. Stedman*⁷⁹⁾ fanden, daß die ACh-Bildung durch Gehirnbrei auch nach Zusatz von Physostigmin vor sich geht, und daß zugesetztes acetessigsäures Natrium die Ausbeute um 50% steigert.

Eingeg. 22. Mri 1941. [A. 34]

⁷⁰⁾ *Esson u. Stedman*, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B. **121**, 142 [1936].

⁷¹⁾ *Glick*, J. biol. Chemistry **125**, 729 [1938].

⁷²⁾ *Glick*, ebenda **130**, 527 [1939].

⁷³⁾ *Birkhäuser u. Süllmann*, Schweiz. med. Wschr. **70**, 34 [1940].

⁷⁴⁾ *Beznak u. Chain*, Quart. J. exp. Physiol. **26**, 201 [1937].

⁷⁵⁾ *Welch u. Roepke*, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **55**, 118 [1935]; **56**, 319 [1936].

⁷⁶⁾ *Esson u. Stedman*, Biochemic. J. **31**, 1723 [1937].

⁷⁷⁾ *Stedman, Stedman u. White*, ebenda **27**, 1055 [1933].

⁷⁸⁾ *Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* **234**, 269 [1934].

⁷⁹⁾ *Biochemic. J.* **31**, 817 [1937].