

Sonderdruck

141/1

1971

Strahlentherapie

**Archiv für klinische
und experimentelle Radiologie**

Das Muster der Esterasen und deren Michaeliskonstanten in Milz, Leber, Plasma und Erythrozyten ganzkörperbestrahlter Ratten

Günter Valet, Gerhard Ruhenstroth-Bauer

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München



URBAN & SCHWARZENBERG
MÜNCHEN - BERLIN - WIEN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1971

Das Muster der Esterasen und deren Michaeliskonstanten in Milz, Leber, Plasma und Erythrozyten ganzkörperbestrahlter Ratten

Günter Valet, Gerhard Ruhenstroth-Bauer

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

In früheren Arbeiten [1, 2] war die Esteraseaktivität in partikelfreien Milz-, Leber- und Erythrozytenextrakten sowie im Blutplasma zwischen pH 5,0 bis 8,5 von Ratten nach Röntgenganzkörperbestrahlung bestimmt worden. Jetzt haben wir geprüft, ob in diesem pH-Bereich durch die Aktivitätsmessung mehrere Esterasen erfaßt werden. Dies hat sich bestätigt.

Methodik

Versuchstiere und Bestrahlungsbedingungen waren dieselben wie bei den früheren Versuchen

[1–3]. Es wurde 500 R röntgenganzkörperbestrahlt (LD 38/30). Je Versuch wurden zehn Tiere eingesetzt. Als Substrat für die Esteraseaktivitätsmessung diente p-Nitrophenolacetat, das von Esterasen in p-Nitrophenol und Acetat gespalten wird. Die Bildung von p-Nitrophenol wurde spektrophotometrisch verfolgt. Meßtemperatur war 30°C. Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten bei pH 5,0 und 7,0 wurde derselbe Ansatz wie früher verwendet [3]. Die Substratkonzentration in der Meßküvette betrug 0,89, 1,33, 1,78, 2,67, 5,33 und $10,70 \times 10^{-1} \mu\text{Mol/ml}$, die Proteinkonzentration bei Milz, Erythrozyten und Plasma 161 $\mu\text{g/ml}$ und

Tabelle 1. Michaeliskonstanten nach Bestrahlung ($\times 10^{-4} \text{ M}$).

T.	n	Milz		Leber		Plasma		Erythrozyten	
		pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0
0	6	11,0 ± 1,7	8,1 ± 0,6	3,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2	10,0 ± 2,1	7,6 ± 0,4	17,0 ± 1,9	22,1 ± 2,9
1	3	11,8 ± 3,2	8,0 ± 1,5	4,2 ± 0,7	1,7 ± 0,1	10,8 ± 1,3	8,5 ± 1,3	11,3 ± 1,3	20,0 ± 0,1
2	3	8,2 ± 1,2	7,5 ± 0,7	4,1 ± 0,3	2,2 ± 0,5	12,8 ± 4,7	6,9 ± 0,4	10,5 ± 0,5	20,0 ± 0,1
3	3	8,8 ± 0,6	9,6 ± 1,8	2,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1	14,7 ± 2,8	8,1 ± 1,2	10,0 ± 0,1	18,4 ± 1,6
6	3	4,3 ± 0,4	7,0 ± 0,4	3,2 ± 0,8	1,4 ± 0,2	4,9 ± 0,3	5,1 ± 0,7	8,9 ± 0,6	13,8 ± 0,5
9	3	10,4 ± 0,4	6,3 ± 0,1	3,0 ± 0,3	1,7 ± 0,2	8,2 ± 0,5	5,9 ± 0,1	12,7 ± 4,0	13,4 ± 0,9
18	3	12,4 ± 2,1	7,0 ± 0,5	3,9 ± 0,5	1,7 ± 0,2	6,9 ± 0,5	5,5 ± 1,5	12,2 ± 1,1	12,5 ± 0,1

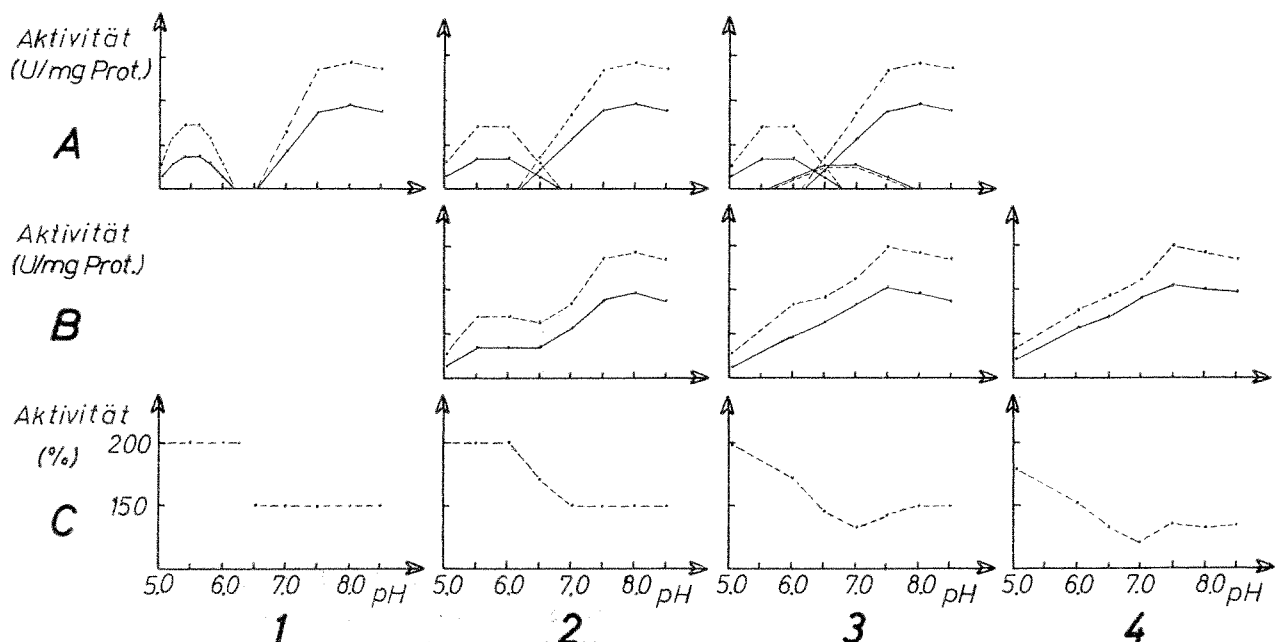


Abb. 1. Enzymaktivitätskurven bei Überlagerung mehrerer Enzyme im pH-Bereich 5,0 bis 8,5. A1–A3 Aktivitätskurven der Einzelenzyme vor (—) und nach (---) Bestrahlung. B1–B3 Summationskurven der Einzelenzymaktivitäten vor (—) und nach (---) Bestrahlung. C1–C3 Aktivität in Prozent der Ausgangswerte.

bei der Leber 32,3 $\mu\text{g/ml}$. Die Aktivitätswerte wurden nach *Lineweaver-Burk* [4] aufgetragen und aus dem Diagramm graphisch die Michaeliskonstante ermittelt. Die Veränderungen des Esterasemusters in den Extrakten wurden folgendermaßen bestimmt: Von den früheren Versuchen waren die Aktivitätskurven im pH-Bereich 5,0 bis 8,5 in Schritten zu 0,5-pH-Einheiten bekannt. Es wurden die Aktivitätskurven nach Bestrahlung auf die Kontrollkurve bezogen und der Prozentsatz der Aktivitätsänderung für alle pH-Werte berechnet. Würde es sich bei der Esteraseaktivität im gesamten pH-Bereich um ein einziges Enzym handeln, so müßten sich in der graphischen Darstellung Parallelen zur 100%-Linie ergeben. Würde es sich

um zwei Enzyme mit nicht überlappendem Aktivitätsbereich handeln (Abb. 1, 1 A), die sich unterschiedlich verändern, so würden sich Parallelen zur 100%-Linie in verschiedenem Abstand ergeben (Abb. 1, 1 C). Überlappen sich die Enzyme (Abb. 1, 2 A), so würden in den nicht überlappenden Bereichen wieder Parallelen zur 100%-Linie entstehen, während sich für den Überlappungsbereich Zwischenwerte ergeben würden (Abb. 1, 2 C). Nicht auftreten könnten dagegen Kurvenminima (Abb. 1, 3 C). Sie sind nur erklärbar durch ein drittes Enzym (Abb. 1, 3 A), das weniger zu- bzw. mehr abnimmt als die beiden anderen. Anstatt eines Enzyms ist auch das gleiche Verhalten einer ganzen Enzymgruppe denkbar.

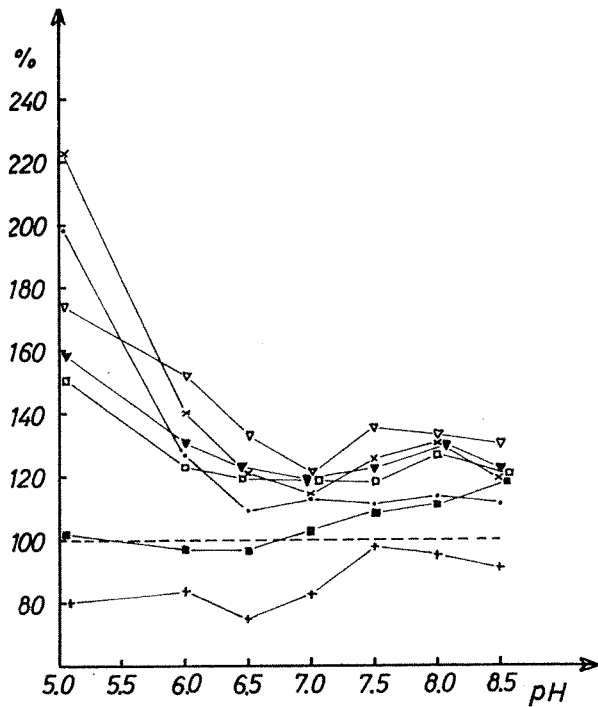


Abb. 2. Milz.

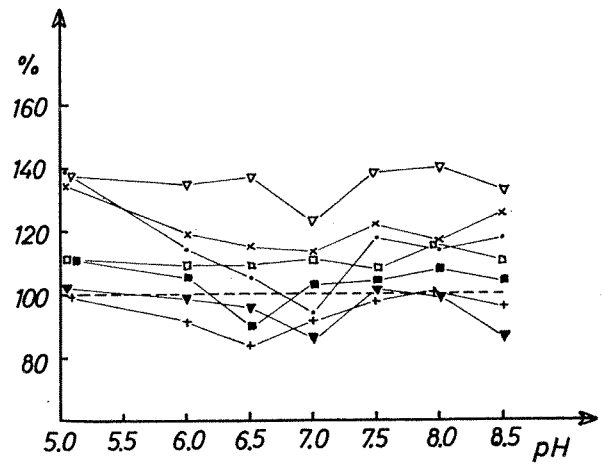


Abb. 3. Leber.

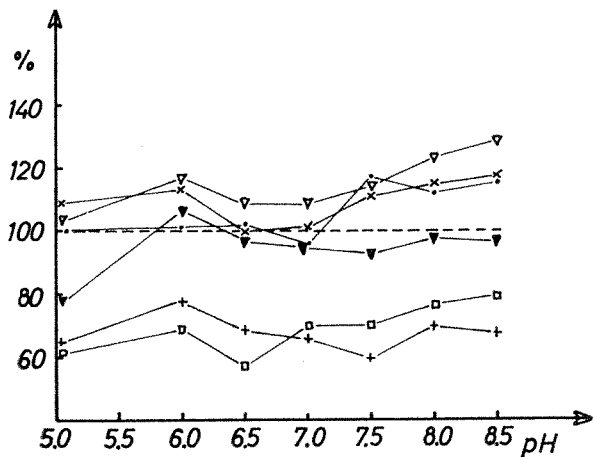


Abb. 4. Plasma.

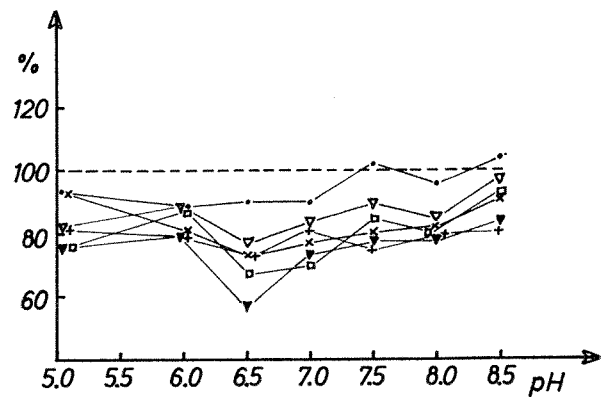


Abb. 5. Erythrozyten.

Abb. 2 bis 5. Änderungen des Esterasemusters am 1. (·-·), 2. (×-×), 3. (-), 6. (▼-▼), 9. (□-□), 15. (■-■) und 18. Tag (+-+) nach 500 R Röntgenganzkörperbestrahlung.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie früher [2, 3]. In der Tabelle 1 sind Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Signifikanz wurde für ein $2P < 0,05$ angenommen und ist im folgenden durch Kursivdruck gekennzeichnet.

Ergebnisse

Esterasemuster

In den Abbildungen 2 bis 6 sowie in Tabelle 1 sind die Veränderungen des Esterasemusters und der Michaeliskonstanten in Milz, Leber, Plasma und Erythrozyten dargestellt.

Besprechung

Die Michaeliskonstanten haben in den einzelnen Extrakten für pH 5,0 und 7,0 durchweg verschiedene Werte. Dies läßt jedoch noch keinen Schluß auf das Vorliegen mehrerer Esterasen zu, da die Werte der Michaeliskonstanten häufig pH-abhängig sind [4]. Wichtiger sind die prozentualen Veränderungen der Michaeliskonstanten bei beiden pH-Werten nach Bestrahlung: Sind sie verschieden, so ist dies als Zeichen für verschiedene Enzyme zu werten. Aus der Abbildung 6 ergibt sich für Milz und Erythrozyten verschiedenartiges Verhalten der Michaeliskonstanten bei pH 5,0 und 7,0, bei Leber und Plasma sind die Unterschiede weniger klar ausgeprägt.

Bei den Esterasemustern (Abb. 2 bis 5) ergeben sich für alle Extrakte zeitweise Minima in den Kurven. Die Kurven gehen von Tag zu Tag stetig ineinander über. Die Minima sprechen für das Bestehen von mindestens drei Enzymen oder Enzymgruppen, im Plasma und den Erythrozyten infolge der noch mehr gegliederten Kurvenverläufe auch für mehr Enzyme. Allen Extrakten gemeinsam ist das relative Zurückbleiben der Enzymaktivität im pH-Bereich 6,5 bis 7,0.

Beide Auswerteverfahren ergeben Anhaltspunkte für das Vorliegen mehrerer Esterasen. Da von verschiedenen rein dargestellten Enzymen wie Carboanhydrase [5–7], Chymotrypsin [8–11], Cholinesterase [12], Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase [13] und Transglutaminase [14] bekannt ist, daß sie p-Nitrophenolacetat spalten, ist der Schluß gerechtfertigt, daß in den Extrakten von Milz-, Leber- und Erythrozyten sowie im Plasma der ganzkörper-

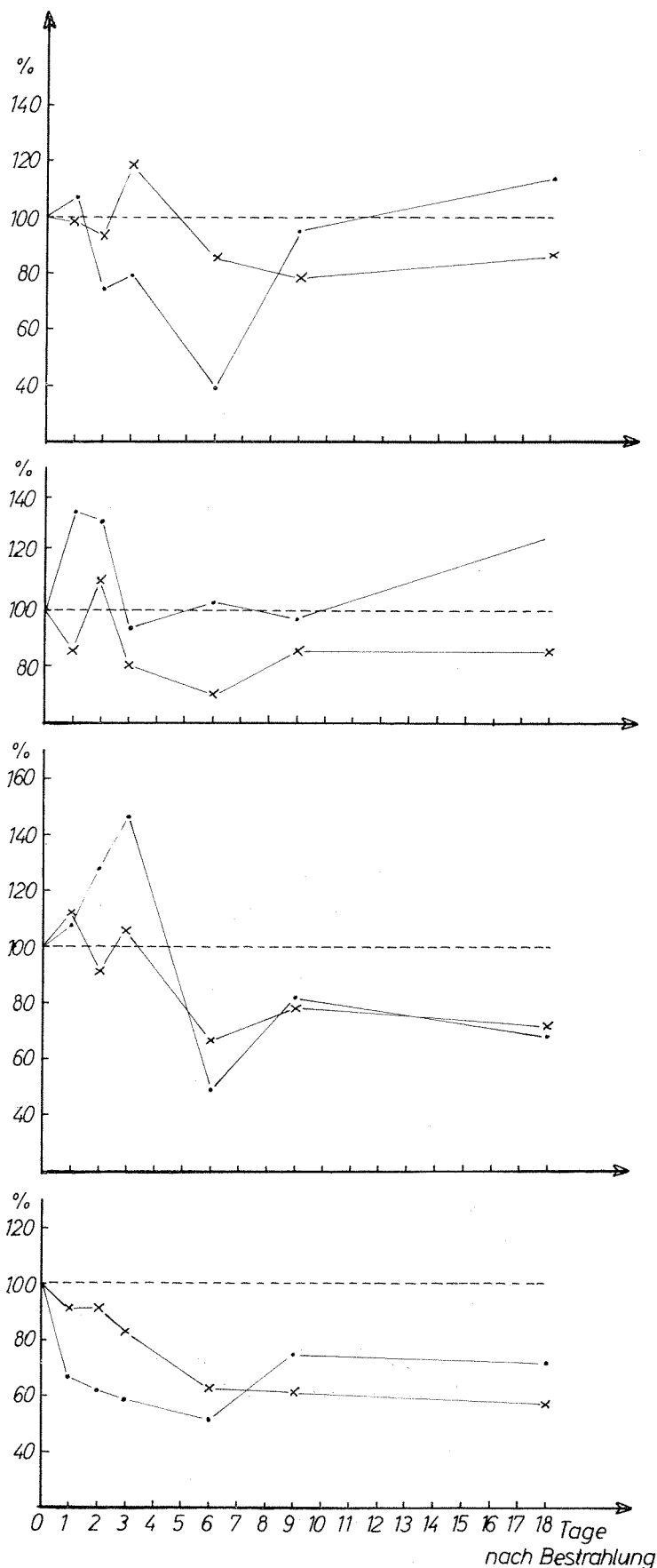


Abb. 6. Änderungen der Michaeliskonstanten K_m bei pH 5,0 (·-·) und 7,0 (x-x) in Milz, Leber, Plasma und Erythrozyten (von oben nach unten) nach 500 R Röntgenganzkörperbestrahlung.

bestrahlten Ratten mehrere Esterasen im pH-Bereich 5,0 bis 8,5 gemessen wurden. Bei den Erythrozytenesterasen fällt die Ähnlichkeit der Michaeliskonstanten mit denen der Erythrozytencarbonanhydrasen [5] auf.

Dem Leibniz-Rechenzentrum der Bayerischen Akademie der Wissenschaften sei für die Überlassung von Rechenzeit gedankt. Die Programmierung verdanken wir Herrn Referendar der Mathematik *Hans-Wolfgang Valet*.

Zusammenfassung

Das Muster der Esterasen und deren Michaeliskonstanten in Milz, Leber, Plasma und Erythrozyten ganzkörperbestrahlter Ratten

1. Es wurden die Michaeliskonstanten der Esterasen für pH 5,0 und 7,0 sowie die Änderungen des Esterasemusters im pH-Bereich 5,0 bis 8,5 in partikelfreien Milz-, Leber- und Erythrozytenextrakten sowie im Blutplasma von 500 R röntgenganzkörperbestrahlten Ratten (LD 38/30) vom 0. bis 18. Tag nach Bestrahlung untersucht.
2. Es ergaben sich Anhaltspunkte dafür, daß durch die Aktivitätsmessung mit p-Nitrophenolacetat in den Extrakten und im Plasma mehrere Esterasen oder Esterasegruppen erfaßt wurden.

Summary

The Pattern of Esterases and their Michaelis Constants in Spleen, Liver, Plasma, and Erythrocytes of Whole-Body Irradiated Rats

1. The following items were examined between day 0 and 18 after X-irradiation: *Michaelis'* constants of the esterases for pH 5.0 and 7.0 and the changes of the pattern of esterase activity in pH range 5.0 to 8.5 in particle-free spleen-, liver-, and erythrocyte extracts, as well as in the blood plasma of rats that were total-body X-irradiated by 500 R (LR 38/30).
2. By the activity determination by means of p-nitro-phenol-acetate there is evidence that several esterases or esterase groups in the extracts and in the plasma have been measured.

Résumé

Le dessin des estérases et de leurs constantes Michaelis dans la rate, le foie, le plasma et dans les érythrocytes des rats irradiés au corps entier

1. Les détails suivants ont été examinés entre les jours 0 et 18 après l'irradiation: les constantes de *Michaelis* des estérases au pH 5,0 et 7,0 et les changements des types d'estérases dans l'intervalle entre pH 5,0 et 8,5 dans les extraits sans particules de la rate, du foie et des érythrocytes, ainsi que dans le plasma des rats, qui furent entièrement irradiés aux rayons-X de 500 R (LD 38/30).
2. Ceci indique, que plusieurs estérases ou plusieurs groupes d'estérases furent relevés dans les extraits et dans le plasma au moyen des mesures de l'activité par le p-nitro-phenol-acetate.

Schrifttum

- [1] Valet, G., G. Ruhenstroth-Bauer: Esteraseaktivität, Proteingehalt und Gewicht der Milz ganzkörperbestrahlter Ratten unter Berücksichtigung funktionsmorphologischer Befunde. *Virchows Arch. Abt. B* 2 (1969), 326.
- [2] Valet, G., G. Ruhenstroth-Bauer: Gewicht, Proteingehalt und Esteraseaktivität der Leber von ganzkörperbestrahlten Ratten unter Berücksichtigung funktionsmorphologischer Gesichtspunkte. *Strahlentherapie* 137 (1969), 734.
- [3] Valet, G.: Esteraseaktivität und Proteingehalt der Milz ganzkörperbestrahlter Ratten unter Berücksichtigung funktionsmorphologischer Gesichtspunkte. Diss. München 1968.
- [4] Dixon, M., E. C. Webb: *Enzyme Kinetics*. In: *Enzymes*, p. 54. Longmans, London 1964.
- [5] Verpoorte, J. A., S. Mehta, J. T. Edsall: Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *J. Biol. Chem.* 242 (1967), 4221.
- [6] Thorlund, A., S. Lindskog: Studies of the Esterase Activity and the Anion Inhibition of Bovine Zinc and Cobalt Carbonic Anhydrases. *Europ. J. Biochem.* 3 (1967), 117.
- [7] Pocker, Y., J. T. Stone: The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase VIII Deuterium Solvent Effects and Apparent Inactivation Parameters for

- the Enzyme-catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenolacetate. *Biochem. J.* 7 (1968), 4139.
- [8] *Gutfreund, H., J. M. Sturtevant*: The Mechanism of the Reaction of Chymotrypsin with p-Nitrophenylacetate. *Biochem. J.* 63 (1956), 656.
- [9] *Dixon, G. H., H. J. Neurath*: Acylation of the Enzymatic Site of δ -Chymotrypsin by Esters, Acid Anhydrids and Acid Chlorids. *J. biol. Chem.* 225 (1957), 1049.
- [10] *Hartley, B. S., B. A. Kilby*: The Inhibition of Chymotrypsin by Diethyl-Nitrophenylphosphate. *Biochem. J.* 50 (1952), 672.
- [11] *Hartley, B. S., B. A. Kilby*: The Reaction of p-Nitrophenyl Esters with Chymotrypsin and Insulin. *Biochem. J.* 56 (1954), 288.
- [12] *Bergmann, F., S. Rimon, R. Segal*: Effect of pH on the Activity of Eel Esterase towards Different Substrates. *Biochem. J.* 68 (1958), 493.
- [13] *Lindquist, R. N., E. H. Cordes*: Solvent Deuterium Isotope Effects on the Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Catalysed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate. *J. biol. Chem.* 243 (1968), 5837.
- [14] *Folk, J. E., P. W. Cole, J. P. Mullody*: Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase 3. The Metal Dependant Hydrolysis of p-Nitrophenylacetate, further Observations on the Role of Metal in Enzyme Action. *J. biol. Chem.* 242 (1967), 2615.

Anschrift d. Verff.: Dr. G. Valet, Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer, Max-Planck-Institut für Biochemie, 8 München 15, Goethestraße 31.