

## 6. Zusammenfassung

Die Acetylcholinesterase (AChE) spielt bei Nematoden eine Rolle in der neuromuskulären Erregungsübertragung. In dieser Funktion bietet sie einen Ansatzpunkt für verschiedene Anthelminthika. Von einigen Nematoden konnte gezeigt werden, daß sie dieses Enzym sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sekretieren. Der AChE werden auch verschiedene Funktionen bei der Interaktion zwischen Parasit und Wirt zugeschrieben. Dabei steht die Herabsetzung der Immunantwort des Wirtes im Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine AChE-Aktivität sowohl im *A. suum*-Hautmuskelschlauch als auch in *A. suum*-Medium (Kulturmedium, in dem Ascariden gehalten wurden) gemessen werden. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms ist im Vergleich zu anderen Nematoden und anderen Organismen mit nur 25,5 nMol hydrolysiertem Acetylthiocholin (ASCh)/min/mg Protein im Rohextrakt und 4,5 nMol hydrolysiertem ASCh/min/mg Protein im *A. suum*-Medium relativ gering. Eine Konzentration von 0,1% Brij 35 erwies sich für die Solubilisierung und Aktivität der AChE aus *A. suum*-Hautmuskelschlauch als optimal. Dies ist ein Indiz für die Klassifizierung dieses Enzyms als eine globuläre Form, die eine amphipathische Abhängigkeit zu nicht-ionischen Detergenzien zeigt. Die AChE aus *A. suum*-Hautmuskelschlauch konnte mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose, Affinitätschromatographie mit Edrophonium-Sepharose und mit Gelfiltration 664fach gereinigt werden. Die Möglichkeit der Reinigung über Edrophonium-Sepharose ist ein Hinweis dafür, daß das untersuchte Enzym strukturelle Ähnlichkeit mit bekannten sekretorischen AChEs von Vertebraten besitzt.

Die Aktivität des partiell gereinigten Enzyms war bei 4°C über sechs Tage nahezu stabil. Durch eine Inkubation des Enzyms für 5 min bei 66°C wurde eine Inaktivierung des Enzyms zu 90% erreicht.

Das Molekulargewicht wurde in nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit ca. 330 000 bestimmt. Mit Gelfiltration unter Detergenzusatz wurde das Molekulargewicht mit 87 000 und mit Natriumdodecylsulfat-(SDS)-PAGE mit 78 000 bestimmt. In der SDS-PAGE, die mit <sup>3</sup>H-Diisopropylfluorophosphat

(DFP) markiertem Enzym durchgeführt wurde, trat eine weitere Bande bei 55 000 auf, die durch Fluorographie dargestellt wurde. Die ermittelten Molekulargewichte in der nativen PAGE und der Gelfiltration ergeben Grund für die Annahme, daß das Enzym als Tetramer vorkommt.

Der isoelektrische Punkt des  $^3\text{H}$ -DFP markierten Enzyms wurde mit 7,4 ermittelt. Die Michaelis-Konstante ( $K_m$ -Wert) des Enzyms war für ASCh mit  $94 \mu\text{M}$  ca. 10mal kleiner als für Butyrylthiocholin mit  $1,2 \text{ mM}$ . Dies ist ein Anzeichen dafür ist, daß es sich um eine Acetylcholinesterase handelt.

Die AChE aus *A. suum* zeigte sich mit einer Inhibitor-konstante ( $K_i$ -Wert) von  $290 \text{ nM}$  gegenüber Eserin sehr empfindlich, wodurch sie sich von anderen bekannten AChEs unterscheidet. Hier könnte ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Anthelminthika liegen.

Der Zusatz von DFP bewirkte eine irreversible Inhibierung des Enzyms. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die AChE aus *A. suum* einen Serin-Rest im aktiven Zentrum besitzt. Die Empfindlichkeit gegenüber DFP war jedoch relativ gering, wodurch das Enzym deutlich von Butyrylcholinesterase abgrenzt wird.

Schweineseren von mit *Ascaris* infizierten Schweinen enthielten Antikörper gegen *A. suum*-Medium, *A. suum*-Rohextrakt und partiell gereinigte AChE aus *A. suum*. Außerdem trat eine Kreuzreaktion von polyklonalen Antikörpern gegen sekretierte *N. brasiliensis* AChE mit partiell gereinigter AChE aus *A. suum* auf. Mit Hilfe von Western Blots mit anschließender Immunodetektion konnte eine allen Ansätzen gemeinsame Bande bei  $64 \text{ kDa}$  gefunden werden. Bei diesem Antigen könnte es sich um ein Abbauprodukt der AChE aus *A. suum* oder die sekretierte Form dieses Enzyms handeln. Damit gibt es ein Indiz für die Freisetzung von AChE durch *A. suum in vivo* und für eine Immunantwort des Wirtes auf dieses Molekül. Die Freisetzung von AChE *in vivo* kann als Ansatz für die Entwicklung eines serologischen Tests zur Diagnostik der Ascariose dienen, wie es bei Filarieninfektionen und bei der Trichostrongylidose der Schafe zur Zeit versucht wird.

## 7. Summary

Kodur, Sylvia: Examinations of acetylcholinesterase from *Ascaris suum* with emphasis upon the secreted form.

In nematodes the acetylcholinesterase (AChE) is associated with neuromuscular transmission. Several successful anthelmintics are targeted at the blockade of this activity. In addition, a number of nematodes have been shown to secrete this enzyme *in vitro* and *in vivo*. In this context, the AChE has been postulated to play a role in the host-parasite relationship and possibly inhibit a normal immune response from the host.

In this thesis AChE-activity was measured in *A. suum* cuticle-free muscle tissue and in *A. suum* medium. Compared to other organisms, including nematodes, the specific activity of this enzyme, 25.5 nmol/min/mg protein in *A. suum* muscle extract and 4.5 nmol/min/mg protein in *A. suum* medium, is relatively low. The Brij 35 concentration was optimized to obtain complete solubilization and maximal activity of the AChE in muscle preparations. The optimal concentration, 0.1%, could indicate that the AChE belongs to the globular class of enzymes which have an amphipathic dependency to interaction with non-ionic detergents. The AChE from *A. suum* muscle tissue was partially purified, by a factor of 664, by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and affinity chromatography with edrophonium-Sepharose followed by gel filtration. The suitability of edrophonium-Sepharose is an indication that the *Ascaris* enzyme analyzed has structural similarities to known secretory AChEs in vertebrates.

The partially purified enzyme was stable at 4°C over a period of six days with only a slight reduction of activity. A 90% heat inactivation of the enzyme was achieved by a 5 min preincubation at 66°C.

In polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under non-denaturing conditions the molecular weight was estimated to be 330 000. Using gel filtration, with the addition of detergent, the molecular weight was determined to be 87 000 and by sodium dodecyl sulphate-(SDS)-PAGE to be 78 000. When using <sup>3</sup>H-diisopropyl-fluorophosphate (DFP) labeled enzyme in SDS-PAGE an additional band was

detected at 55 000 by autofluorography. The determined molecular weights when using PAGE under non-denaturing conditions and gel filtration give reason to believe that the enzyme is a tetramer.

The isoelectric point of the  $^3\text{H}$ -DFP was shown to be 7.4. The Michaelis constant ( $K_m$  value) of the enzyme for ATCh (acetylthiocholiniodide) was determined to be 94  $\mu\text{M}$  which is ten times less than that for BuTCh (butyrylthiocholiniodide) which is 1.2 mM. This is further indication that the enzyme analyzed is an AChE. The AChE of *A. suum* has an inhibitor constant ( $K_i$  value) of 290 nM for eserine and thus shows much more sensitivity than other known AChEs. This could then be a target for the development of new anthelmintics.

An irreversible inhibition of the enzyme was achieved with DFP, which indicates that the AChE of *A. suum* also has a serine-residue in the active site. The AChE was relatively insensitive to DFP, which differentiates it from BuChE.

Sera of *Ascaris*-infected pigs showed an immunological reaction against *A. suum* medium and also against partially purified AChE. There was a cross-reaction between polyclonal antibodies against secreted *N. brasiliensis* AChE and partially purified *A. suum* AChE. Western blot analysis followed by immunodetection showed a band at 64 kDa in all performed experiments. This antigen could be a degradation product of the AChE from *A. suum* or perhaps the secreted form of this enzyme. There is an indication for its secretion *in vivo* and for an immune response of the host against this molecule. This could be a target for the development of a serological test for the diagnosis of ascariasis as it is currently being investigated in filarial infections and in trichostrongylidosis in sheep.