

La formazione di macro-complessi e la presenza di varianti catalitiche non sono cause frequenti per elevati valori di colinesterasi del siero

Ilenia Infusino, Anna Pagani¹, Paola Luraschi, Carlo Franzini

Università degli Studi di Milano, Istituto di Scienze Biomediche Ospedale L.Sacco, e ¹Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica

ABSTRACT

Macro-enzyme formation and occurrence of catalytic variants are not frequent causes for elevated serum cholinesterase activity

No physiopathological causes for increased serum cholinesterase (ChE) activity are known; with the exception of very rare cases of variants associated with elevated serum enzyme activity. However, such a serum enzyme activity is elevated beyond the upper reference limit in a small but significant percentage of sera. In search for possible causes for such increases, we planned to investigate the possible occurrence of either macro-forms or variant catalytic forms of the enzyme in human sera. Screening for macro-forms occurrence was performed by a precipitation procedure with two selected concentrations of polyethylenglycol (PEG, 90 and 120 g/L) on 600 sera including 255 samples with elevated ChE activity. Possible occurrence of variant catalytic forms was screened by measuring the Km of the enzyme for the substrate butyrylthiocholine in 200 sera including 100 samples with elevated activity. In neither case such screenings were positive, i.e. neither the formation of macro-enzyme nor the occurrence of catalytic variant was found to be responsible for elevated serum ChE activity. In contrast with other serum enzymes ChE seems to form macro-enzyme on very rare, if any, occasions.

RIASSUNTO

Per quanto non siano note condizioni fisiopatologiche che si accompagnino ad aumentata attività della colinesterasi (ChE) del siero, con la eccezione di rarissime varianti caratterizzate da aumentata attività enzimatica del siero, la ChE risulta aumentata oltre al limite superiore dell'intervallo di riferimento in una percentuale piccola ma significativa dei sieri. In questo lavoro abbiamo verificato se la formazione di macro-complessi dell'enzima o la presenza di varianti catalitiche potessero essere la cause dell'aumentata attività. Per evidenziare la possibile presenza di macroforme abbiamo impiegato la precipitazione con glicole a due concentrazioni preventivamente selezionate (PEG 90 e 120 g/L), applicata ad un gruppo di 600 sieri includente 255 campioni con attività aumentata. Per la seconda possibilità abbiamo misurato la Km dell'enzima per il substrato butirritiocolina in un gruppo di 200 sieri, includente 100 campioni con attività elevata. In nessun caso è stato possibile associare l'aumento di attività alla presenza di macro-forme od alla presenza di enzimi con caratteristiche catalitiche anomale. La formazione di macro-complessi della ChE, se mai si verifica, sembra essere un evento assai più raro rispetto ad altri enzimi del siero.

INTRODUZIONE

La colinesterasi del siero (acilcolina acilidrolasi, EC 3.1.1.8, ChE) ha una concentrazione di attività maggiore di altri enzimi, soprattutto se viene misurata con substrati verso cui ha elevata affinità (1). Mentre la funzione fisiologica della ChE del siero non è nota, sono noti alcuni significati clinici delle sue diminuzioni (1), come carente protidosintesi epatica, presenza di mutazioni genetiche, intossicazioni da insetticidi anticolinesterasici, ma anche sindromi da iperstimolazione ovarica (2), che rendono clinicamente utile la sua determinazione.

Una percentuale bassa ma significativa di sieri presenta invece valori aumentati di attività della ChE del siero, non associati ad alcuna patologia

Tra le possibili spiegazioni per gli aumenti di attività della ChE ci potrebbero essere la formazioni di macroenzimi

(macro-ChE) oppure la presenza di varianti catalitiche dell'enzima stesso con caratteristiche cinetiche anomale. La prima evenienza è stata dimostrata per diversi enzimi del siero (3-6), ma non per la ChE (6). La seconda possibilità è stata invece evidenziata per la ChE del siero, di cui alcune varianti genetiche, peraltro assai rare, risultano associate ad aumentata attività enzimatica (7).

In questo lavoro ci siamo proposti di verificare se i due meccanismi su menzionati potessero rappresentare una possibile spiegazione per la presenza di valori elevati di ChE del siero.

MATERIALI E METODI

I prodotti chimici puri sono stati ottenuti dalla Ditta Sigma.

I sieri impiegati per la valutazione della massa mole-

colare e delle caratteristiche cinetiche dell'enzima sono stati selezionati dalla normale attività del laboratorio indipendentemente dalla situazione clinica del paziente, ma tali da coprire l'intervallo di valori normali e patologici abitualmente riscontrati, e da includere percentuali maggiori di quelle casuali di sieri con valori bassi ed aumentati. Si sono selezionati 600 campioni di siero per la valutazione della massa molecolare dell'enzima e 200 per la verifica delle sue caratteristiche cinetiche, che sono stati divisi in tre gruppi (alti, medi e bassi), in relazione alla concentrazione di attività della ChE.

Per la misura della attività totale della ChE (siero o sue frazioni) si è utilizzato un metodo automatico commerciale (strumento Hitachi 917, reagenti Roche), con butirriticolina come substrato e ditiobis-nitrobenzoato come reagente colorimetrico (8). Le misure sono effettuate a 37°C, ed i valori di attività (calcolati direttamente dall'analizzatore calibrato con materiale della medesima Ditta) sono stati espressi in U/L. L'intervallo di riferimento per questo metodo corrisponde a 5300 - 12900 U/L.

Per ricercare la presenza di macroenzimi si è utilizzata la tecnica di precipitazione con glicole polietilenico (PEG), basata sulla relazione tra massa molecolare della proteina e sua solubilità in soluzioni di PEG ad opportune concentrazioni (6). In via preliminare si sono allestite soluzioni di PEG a concentrazione di 60, 120, 180, 240 e 300 g/L. Ad aliquote (0,2 mL) di 15 differenti sieri (di attività totale di ChE normale) si sono aggiunti uguali volumi di acqua o di ciascuna soluzione di PEG, ottenendo concentrazioni finali di PEG comprese tra 0 e 150 g/L; le varie miscele sono state incubate a 37°C per 10 minuti e centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti. Nei supernatanti si è quindi misurata la attività enzimatica della ChE con metodo automatico, e la concentrazione di transferrina con immunonefelometria cinetica automatica (Image, Beckman). Aliquote dei 600 campioni di siero selezionati sono state quindi trattate come sopra, con soluzioni di PEG di concentrazione (finale) pari a 0, 90 e 120 g/L: le attività enzimatiche sono state misurate nei supernatanti con metodo automatico ed espresse in termini di "attività residua", ossia come percentuale di quella misurata a concentrazione 0 di PEG.

Come parametro delle caratteristiche cinetiche si è

valutata l'affinità dell'enzima per la butirriticolina, misurando la Km per tale substrato. Per tali misure si è impiegato lo stesso principio utilizzato nella analisi automatica per la determinazione della attività enzimatica, eseguito manualmente, come descritto in letteratura (8). Si sono preparate soluzioni di substrato (butirriticolina ioduro) a 4 diverse concentrazioni (4.5, 9.0, 18.0 e 45.0 mmoli/L), in modo da avere concentrazioni finali (nelle miscele di incubazione) pari a 0.149, 0.298, 0.596 e 1.49 mmol/L rispettivamente. L'attività di ciascuno dei 200 campioni di siero (in unità di milliassorbance al minuto) in presenza delle 4 concentrazioni di substrato è stata misurata seguendo la cinetica a 37°C, a $\lambda = 410$ nm, per 4 minuti, con uno spettrofotometro Uvikon 941 plus (Kontron, Milano). Il valore di $-1/K_m$ è stato calcolato con il metodo dei doppi reciproci (Lineweaver e Burk), ponendo $y = 0$ nella equazione della retta di regressione lineare dei reciproci della velocità misurata [$y, 1/(mAbs/minuto)$] sui reciproci della corrispondente concentrazione di substrato [$x, 1/(mmol/L)$]. La imprecisione della stima di K_m è stata calcolata effettuando dieci misure replicate della costante sul medesimo campione di siero.

I calcoli sono stati eseguiti con l'applicativo Excel (Microsoft).

RISULTATI

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche dei sieri utilizzati.

Nella figura I sono confrontati i "profili di precipitazione" (ottenuti negli esperimenti preliminari) della attività di ChE e della concentrazione di transferrina, entrambe riportate come frazione percentuale di quella misurata a concentrazione 0 di PEG, in funzione della concentrazione (finale) di PEG. Nella Tabella 2 sono riportati i valori medi, e relative deviazioni standard, delle percentuali di attività residua dopo precipitazione con PEG alle due concentrazioni utilizzate (90 e 120 g/L) nel gruppo di 600 sieri selezionati per questo scopo.

Nella figura II è riportato un esempio di grafico dei doppi reciproci, ottenuto con tre campioni di differente attività enzimatica, utilizzato per il calcolo della K_m nei 200

Tabella 1

Attività della ChE nei tre gruppi di sieri utilizzati nelle due sperimentazioni

Gruppo	Campioni utilizzati per la valutazione della			
	Massa molecolare		Km per butirriticolina	
	Attività misurata (kU/L) #	N°	Attività misurata (kU/L) #	N°
Alti (>12 kU/L)	12.0-20.2	255	11.2-16.0	100
Medi (5,3 - 11,9 kU/L)	5.3-11.9	305	5.6-9.0	50
Bassi (< 5,2 kU/L)	1.2-5.2	40	1.2-4.7	50
Totali		600		200

#Con metodo automatico

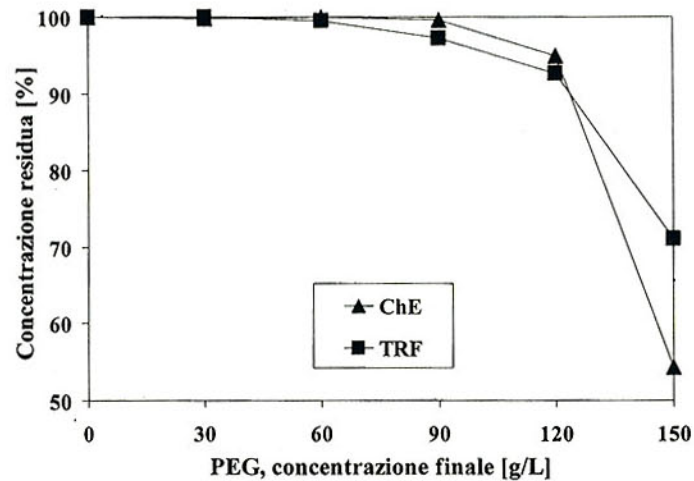


Figura 1
"Profili di precipitazione" della colinesterasi (ChE, massa molecolare del monomero 85 kDa) e della transferrina (TRF, massa molecolare 79,6 kDa) del siero

Tabella 2
Valori di attività residua dopo precipitazione con PEG a due concentrazioni, e di Km per la butiriltiocolina misurati nei sieri dei tre gruppi della tabella 1. Valori medi \pm deviazione standard

Gruppo di sieri	Attività residua [%]		Km per butiriltiocolina [mmol/L]
	PEG 90 g/L	PEG 120 g/L	
Alti	100 \pm 2,7	94 \pm 6,1	4,2 \pm 0,34
Medi	101 \pm 2,4	96 \pm 5,1	3,9 \pm 0,28
Alti	102 \pm 12,4	95 \pm 12,4	3,7 \pm 0,31

sieri con metodo matematico/statistico come descritto. La imprecisione della stima di Km, per un valore medio di 3.42 mmol/L, è pari a CV % = 5.5. I valori di Km (media e deviazione standard) ottenuti nei tre gruppi di sieri sono riportati nella tabella 2. Nella Figura III sono riportati i singoli valori di Km ottenuti nei 200 sieri in funzione dei rispettivi valori di velocità massima, ricavati dalle medesime equazioni di regressione di 1/V su 1/[S], ponendo x = 0, e convertiti in valori di kU/L con il fattore 11,1 (8).

Nella figura IV è riportata la distribuzione di frequenza dei valori di concentrazione di attività della ChE misurata in 2900 sieri, con metodo automatico, nella normale attività del laboratorio. Alla curva di frequenza è sovrapposta la funzione logaritmica derivata della frequenza, secondo Bhattacharya (9).

DISCUSSIONE

La distribuzione di frequenza dei valori di attività della colinesterasi del siero (Fig. IV) osservata in 2900 campioni appartenenti ad una popolazione ospedaliera mista (ricoverati e ambulatoriali, sani e malati), mostra una porzione centrale a distribuzione normale, dove la funzione di Bhattacharya assume un andamento lineare che corrisponde circa all'intervallo 5000 - 12000 U/L, simile all'intervallo di

riferimento per i valori di ChE misurati con il metodo impiegato (5300 - 12900 U/L). La curva di distribuzione di frequenza mostra due ulteriori gruppi, con valori aumentati e diminuiti.

Come menzionato, esistono diverse possibili cause per i valori bassi, ma non per quelli aumentati, se si esclude la rara presenza delle varianti molecolari accompagnate da aumento della attività (7).

Nel presente lavoro ci siamo occupati di verificare se le cause di questi incrementi fossero la formazione di macroenzimi o la presenza di varianti catalitiche, valutando la massa molecolare della ChE del siero mediante precipitazione con PEG, e l'affinità dell'enzima per la butiriltiocolina.

La precipitazione con PEG è risultata in grado di evidenziare la presenza di "macroforme" della amilasi, della creatina chinasi, di altri enzimi e di proteine non-enzimatiche del siero (10), ma non della ChE in un numero inizialmente limitato di campioni (6). In esperimenti preliminari abbiamo confrontato (figura I) il "profilo di precipitazione" della ChE con quello della transferrina in modo da valutare il comportamento dell'enzima (massa molecolare del monomero 85 kDa) (11) rispetto a quello di una proteina di massa molecolare (79.6 kDa) simile (12). Da questi esperimenti abbiamo selezionato le due concentrazioni di

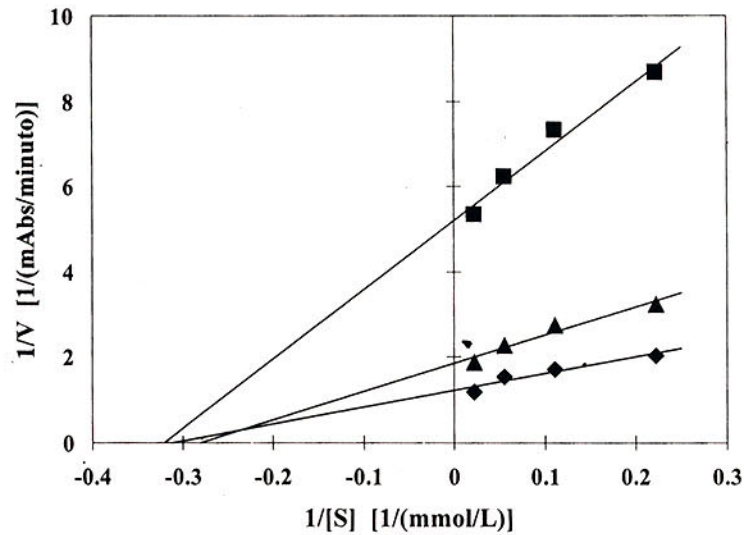


Figura II

Esempio di grafico dei doppi reciproci, con tre sieri a differente attività colinesterasica, utilizzato per la determinazione della K_m per la butiriltiocolina [S]. Le rette rappresentano le rette di regressione lineare, con il metodo dei minimi quadrati

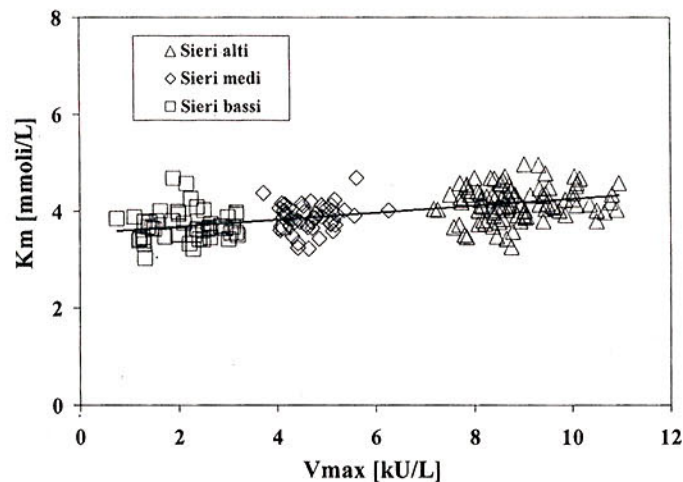


Figura III

Relazione tra K_m per la butiriltiocolina e V_{max} nell'insieme dei 200 sieri utilizzati per la verifica della K_m dell'enzima. La retta rappresenta la retta di regressione (regressione ordinaria, metodo dei minimi quadrati) per il totale dei 200 sieri

PEG pari a 90 e 120 g/L (finali) come quelle in grado di meglio evidenziare la presenza di attività enzimatica associata a complessi di massa molecolare maggiore, risultanti dalla eventuale interazione dell'enzima con una immunoglobulina. I profili della figura I mostrano un comportamento della ChE simile a quello della trasferrina, proteina di massa molecolare assai vicina a quella del monomero dell'enzima.

I dati della tabella 2 suggeriscono che, alle due concentrazioni di PEG utilizzate, i valori medi di precipitazione dell'enzima in sieri ad attività aumentata, come pure in quelli ad attività diminuita, non si discostano significativamente dai valori osservati per i sieri ad attività rientrante

nell'intervallo di riferimento.

Queste due osservazioni ci permettono di concludere che la ChE del siero, anche quando presente in concentrazione più alta della norma, sembra mantenere inalterata la propria massa molecolare. Pertanto, a differenza di quanto è stato dimostrato per diversi enzimi del siero misurati a scopo diagnostico (6), per la ChE la formazione di macroenzimi è un evento raro, se mai si verifica, anche in presenza di valori elevati di attività.

I risultati delle misure della costante di Michaelis-Menten (K_m) dimostrano che nell'ambito di ciascuna classe di sieri la variabilità della misura è abbastanza ristretta, essendo il coefficiente di variazione (CV) al massimo al di

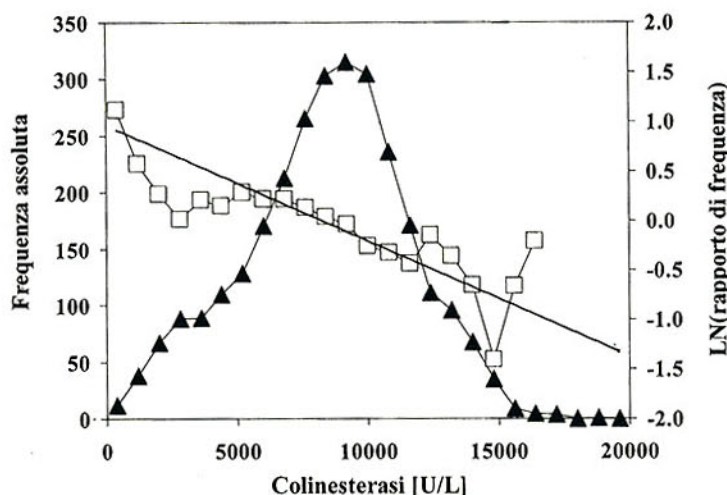


Figura IV

Distribuzione di frequenza dei valori di colinesterasi misurati (con metodo automatico) in 2900 campioni di siero nella "routine" ospedaliera. E' riportata la frequenza assoluta (triangoli) e la funzione logaritmica derivata della frequenza di Bhattacharya (quadrati); la retta rappresenta la retta di regressione lineare della porzione lineare di tale funzione

poco superiore all'8%, e che i valori medi del parametro di affinità, misurati nei tre gruppi di sieri, differiscono poco se pur in maniera statisticamente significativa.

Peraltro, se si riportano in grafico i valori di Km in funzione di Vmax (figura III) si osserva una tendenza all'aumento dei valori di Km con il crescere di Vmax. Questo effetto può essere dovuto ad un artefatto sperimentale, legato alla difficoltà a stimare correttamente la velocità iniziale della reazione enzimatica in presenza di basse concentrazioni di substrato.

Sembra pertanto possibile concludere che nell'ambito dei 200 sieri analizzati non si sono riscontrati casi nei quali la Km dell'enzima si discostasse abbastanza dai rimanenti per giustificare il sospetto di presenza di varianti catalitiche.

Concludendo, non si è potuto dimostrare che l'aumento di attività fosse riconducibile ad una delle due ipotesi avanzate come cause di tali incrementi. Il motivo della presenza di sieri ad attività aumentata resta pertanto sconosciuto, come pure sono la funzione fisiologica della ChE e la sua presenza in così elevate concentrazioni nel siero. La apparente incapacità della ChE del siero a formare complessi macro-enzimatici, od a formarli con frequenza assai minore di quella riscontrata per altri enzimi del siero (6) rimane un fatto non spiegato. La misura della Km per la butiriltiocolina può peraltro rappresentare un approccio non sufficientemente sensibile per la dimostrazione di varianti catalitiche dell'enzima.

BIBLIOGRAFIA

1. Franzini C. Colinesterasi del siero: Laboratorio e Clinica.

Biochim Clin 1997;21;242:-51.

2. Southgate HJ, Anderson SK, Lavies NG, Rymer MJ. Pseudocholinesterase deficiency: a dangerous, unrecognized complication of the ovarian hyperstimulation syndrome, *Ann Clin Biochem* 1999;36:256-8.
3. Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem* 1989;35:2261-70.
4. Sturk A, Sanders GTB. Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;18:65-81.
5. Galasso PJ, Litin SC, O'Brien JF. Macro enzymes: a clinical review. *Mayo Clinic Proc* 1993;68:349-54.
6. Luraschi P, Pagani A, Brambilla S, Franzini C. Precipitazione con glicole polietilenico (PEG) per evidenziare i macroenzimi nel siero. *Biochim Clin* 1998;22:650-8.
7. La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, et al. Phenotyping and molecular biological analysis of human serum cholinesterase variants. *Clin Biochem* 1990;23:423-31.
8. Whittaker M. Cholinesterases. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. HU Bergmeyer), 3^a Edition. Vol IV. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1984: 52-74.
9. Oosterhuis WP, Moddermann TA, Pronk C. Reference values: Batthacharya or the method proposed by IFCC? *Ann Clin Biochem* 1997;34:252-258.
10. Vieira JGH, Tachibana TT, Obara LH, Marciel RMB. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1988;44:1758-9.
11. Mac Gillivray RTA, Mendez E, Shewale JG; Sinha SK, Line-back-Zins J, Brew K. The Primary structure of human serum transferrin. *J Biol Chem* 1983;258:3543-3553.
12. Lockridge O, La Du BN. Loss of interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 1982;257:12012-8.