

## VERTEILUNG DER ENZYME IN DEN FRAKTIONEN DER GEWEBSPROTEINE

KAZUSHIGE TANAKA, YASUSHI HAYASHI,  
MOTOYUKI TAKAHASHI UND SHOJIRO NAKAMURA

*Institut der Protein-Chemie, Medizinische  
Yamaguchi Fakultät. Ube*

(Eingegangen am 10. Juni 1953)

Elektrophoretische Studien über den Leberextrakt wurden vielfach ausgeführt (1-4), indessen stimmen sie in den Resultaten noch nicht überein. Wir vermochten mindestens 9 Eiweissbestandteile im Leberextrakt zu unterscheiden (4). Cohn und seine Mitarbeiter unterschieden mehr als zwanzig (3). Wahrscheinlich gibt es einige zehn, ja möglicherweise sogar einige hundert von diesen Bestandteilen im Leberextrakt. Was für Arten von Proteinen diese Eiweissbestandteile darstellen, kann erst nach ihrer Reindarstellung genau erforscht werden. Es scheint aber, dass manche von ihnen Enzyme sind oder mit Enzymen in Zusammenhang stehen. Somit kommt es hier darauf an, die verschiedenen Enzymwirkungen in den einzelnen Eiweissbestandteilen festzustellen. Cohn und seine Mitarbeiter benutzten die Alkohol-Fraktionierung zu diesem Zwecke (3). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Fraktionierung der Proteine zuerst durch Ansäuern und dann durch Elektrophorese vorgenommen.

### METHODISCHES

1. Gewebsextrakte — Mit physiologischer NaCl-Lösung wäscht man einige Male die Gewebe, zerkleinert mit dem "blade homogenizer", fügt das gleiche Gewicht physiologischer NaCl-Lösung hinzu und zentrifugiert. Der bei 3,000 T. p. M. gewonnene Extrakt war trüb, der bei 16,000 T. p. M. dagegen fast klar. Alle Verfahren wurden bei niedrigen Temperaturen (0°-5°C) durchgeführt.

Vor der Elektrophorese wurden die Extrakte gegen Veronalpuffer von pH 7.8 und Ionenstärke 0.025 dialysiert.

2. Katalase — 5 ml 0.15 M Wasserstoffsuperoxyd, 5 ml 0.1 M Phosphatpuffer von pH 6.8 und 35 ml Wasser wurden in einem Erlenmeyerkolben vermischt und bis auf 0°C abgekühlt. Dann wurde 5 ml Enzymlösung, die man durch geeignete Verdünnung der gewonnenen Fraktion hergestellt hatte, hinzugefügt. Bei 0°C bewahrt, wurde je 5 ml davon sofort und nach einer bestimmten Anzahl von Stunden mit 0.02 N Permanganat titriert. Die Reaktionskonstanten wurden berechnet.

3. Phosphatase — Die Enzymlösungen wurden folgendermassen aktiviert:

1 ml Fraktion wurde mit 1 ml  $M/50$   $MgCl_2$ , 1 ml 0.15 %-iger Histidin-Lösung sowie 7 ml  $M/10$  Veronalpuffer von pH 9.0 versetzt und 30 Minuten lang im Thermostat bei 40° gehalten. 5 ml davon wurde zu 2 ml 0.5  $M$  Na-Glycerophosphat hinzugefügt, und für 150 Minuten bei 40°C stehen gelassen. Hiervon wurde je 1 ml sofort und nach 150 Minuten zur Bestimmung des anorganischen Phosphor entnommen und nach Allen (5) bestimmt.

4. Arginase — In ein Röhrchen gibt man 2 ml 0.1  $M$  Arginin-Lösung und 1 ml 0.1  $M$  Glycinpuffer von pH 9.5, worauf man im Thermostat bis zu 40°C erwärmt. Dazu fügt man 2 ml Enzymlösung, die durch Verdünnung der Fraktion gewonnen wurde, hinzu, und belässt die Mischung bei 40°C. Nach 60 Minuten erhitzt man den Ansatz 1 Minute im siedenden Wasserbad, um nach dem Erkalten mit 2 ml desselben den Harnstoff nach der Urease-Methode mittelst der Cohnway'schen Apparatur (6) zu bestimmen.

5. Kathepsin — Das Kathepsin wurde nach Northrop wie folgt bestimmt: Zuerst wurde die Enzymlösung durch HCN aktiviert (7). 4 ml 2.5 %-iger Hämoglobin-Lösung wurde mit 1 ml 1.35  $N$  Essigsäure und 1 ml 0.02  $M$  Ammonium sulfat-Lösung versetzt und auf 40°C erwärmt. Dazu fügte man 1 ml aktivierte Enzymlösung hinzu und beließ das Ganze bei 40°C. Je 3 ml davon wurde sofort und nach 60 Minuten mit 5 ml 0.3  $M$  Trichloressigsäure versetzt und filtriert. 3 ml Filtrat wurde mit 6 ml 0.75  $N$  NaOH-Lösung und 1.5 ml Phenolreagens versetzt, worauf man die blaue Farbe mit dem photoelektrischen Kolorimeter bestimmte.

6. Esterase — Die Esterase wurde bei den Ansäurefraktionen nach Willstätter und Memmen (8) stalagmometrisch bestimmt. Aktivatoren, wie Eialbumin,  $CaCl_2$  und Na-Oleat, wurden fortgelassen.

Bei den elektrophoretischen Fraktionen wurde die folgende Tropfengewichtsmethode verwendet: Zuerst wurden Eichkurven von der Tropfengewicht-Tributyrynkonzentration für jede Tropfpipette, die dem Willstätter'schen Stalagmometer ähnlich ist, ermittelt. Die Ansätze wurden wie bei der stalagmometrischen Methode hergestellt: In einem Erlenmeyerkolben vermischt man 28 ml gesättigter Tributyrin-Lösung, 1 ml 2.5  $N$  Ammoniumpuffer von pH 8.6 sowie 1 ml passend verdünnter Enzymlösung und belässt das Gemisch bei 40°C. Je 5 Tropfen wurden sofort und weiter nach 10 und 30 Minuten in einer Wageflasche entnommen und gewogen. Die Reaktionskonstanten wurden berechnet.

## ERGEBNISSE

### 1. Die durch Ansäuren gewonnenen Fraktionen

Die Gewebsextrakte werden meistens durch Ansäuren zum pH 4–5 niedergeschlagen. Leber- und Nierenextrakt wurden mit 10 %-iger Essigsäure angesäuert und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Wasser bis zum Originalvolumen verdünnt und mit 10 %-iger NaOH-Lösung neutralisiert. Der Original-

extrakt, das angesäuerte Zentrifugat und die Suspension des Niederschlages dienten als Enzymlösungen.

In Tabelle I sind die experimentellen Ergebnisse aufgeführt. Diese waren von Präparat zu Präparat etwas verschieden, in den Hauptzügen aber ähnlich. Wie aus der Tabelle ersichtlich, macht sich die Wirkung der Katalase ein wenig im Niederschlag bemerkbar. Wenn man aber die in diesem zurückgelassene Flüssigkeit berücksichtigt, kann man annehmen, dass die Katalasewirkung nicht im Niederschlag, sondern im Zentrifugat zurückbleibt.

TABELLE I  
Esterase- und Katalasewirkung der durch Ansäuren gewonnenen  
Fraktionen der Leber

| Esterase                                  | Leber | Niere |
|---|-------|-------|
| Extrakt, L (4,000 T. p. M.)               | 50    | 60    |
| Saures Filtrat                            | 13    | 16    |
| Saurer Niederschlag                       | 20    | 22    |
| Extrakt, L <sub>0</sub> (16,000 T. p. M.) | 10    | 25    |
| Saurer Niederschlag                       | 10    |       |
| Katalase                                  |       |       |
| 1-ster Extrakt, L <sub>1</sub>            | 10    | 25    |
| Saures Filtrat, S <sub>1</sub>            | 6     | 18    |
| Saurer Niederschlag, P <sub>1</sub>       | 2     | 6.4   |
| 2-ter Extrakt, L <sub>2</sub>             | 4     | 7.4   |
| Saures Filtrat, F <sub>2</sub>            | 2.3   |       |
| Saurer Niederschlag, P <sub>2</sub>       | 0.4   |       |

Der erste und zweite Extrakt, L<sub>1</sub> und L<sub>2</sub>, wurden bei 4,000 T. p. M. sukzessiv gewonnen. Der Extrakt L<sub>0</sub> wurde bei 16,000 T. p. M., sonst wie L<sub>1</sub> gewonnen. Esterase und Katalase wurden mit willkürlichen Einheiten berechnet.

Die Wirkung der Esterase im Extrakt ist von den Bedingungen der Zentrifugierung, d. h. von der Trübung abhängig, und wenn angesäuert, schwankt die Wirkung ebenfalls zugleich mit den Bedingungen der Zentrifugierung.

Die Gesamtausbeute an Esterase, d. h. die Summe der Esterasewirkungen im angesäuerten Niederschlag und Zentrifugat ist nicht genügend. Dies muss der partiellen Denaturierung der Enzyme durch Ansäuren und Wiederneutralisieren zugeschrieben werden. Ausserdem, scheint das Niederschlagen der Eiweisse durch sehr geringe Änderung in pH, Ionenstärke und Temperatur schon stark beeinflusst zu werden. Um einen Niederschlag und ein Filtrat mit bestimmten Eiweissbestandteilen zu gewinnen, ist es folglich nötig, die Bedingungen ziemlich streng zu bestimmen. Um solche Schwierigkeiten zu umgehen, wurde die Fraktionierung durch Elektrophorese mit dem Tiselius'schen Apparat vorgenommen.

## 2. Die durch Elektrophorese gewonnenen Fraktionen

Die Zelle zur elektrophoretischen Fraktionierung wurde aus Akrylharz hergestellt. Sie hat wie aus Fig. 1 ersichtlich, vier Glieder, — wie eine gewöhnliche viergliedrige Zelle. Die vier Schenkel der zwei mittleren Glieder und ein Bodenkanal, deren man sich zur Fraktionierung bedienen kann, haben eine Schnittfläche von  $0.5 \times 4.5$  cm Grösse und sind 4.5 cm (bei 1, 2, 4, und 5) bzw. 3.5 cm (bei 3 oder dem Bodenkanal) lang.

Die zu fraktionierende Lösung wurde vorläufig gegen den Veronalpuffer von pH 7.8 und die Ionenstärke 0.025 dialysiert; sie füllt den Bodenkanal (3) und den einen Schenkel (4) des unteren Gliedes. Nach ca. fünfstündiger Elektrophorese erschien der erste Gipfel gewöhnlich in der mittleren Gegend des ersten Schenkels. Nun wurde die Elektrophorese weiter eine Stunde unter Kompensation durch Zusatz vom Puffer fortgeführt, um in dem ersten Schenkel nur den ersten Bestandteil zu hinterlassen. Zuletzt wurden die zwei mittleren Glieder so verschieden, dass die Lösung in jedem Schenkel und im Bodenkanal sich voneinander trennten. Auf diese Weise erhielt man fünf Fraktionen, die alle bei den verschiedenen Versuchsreihen ziemlich gleich waren. Das kann auch daraus erkannt werden, dass die Verteilung der Enzymwirkungen in den einzelnen Fraktionen der verschiedenen Versuchsreihen fast die gleiche ist (Tab. 2).

TABELLE II  
Enzymwirkung in den elektrophoretisch gewonnenen  
Fraktionen der Leber

| Wirkung pro ml.         |          |       |             |      |          |       |           |      |          |      |
|-------------------------|----------|-------|-------------|------|----------|-------|-----------|------|----------|------|
| Nr. Fraktion            | Katalase |       | Phosphatase |      | Arginase |       | Kathepsin |      | Esterase |      |
|                         | 4        | 5     | 4           | 5    | 4        | 5     | 4         | 5    | 4        | 5    |
| 1                       | 0        | —     | 0.21        | 0.02 | 0.031    | 0.025 | 0.10      | 0    | 0.12     | 0.14 |
| 2                       | 0.07     | 0.097 | 0           | 0.02 | 0.052    | 0.053 | 0.21      | 0.21 | 0.26     | 0.51 |
| 3                       | 1.00     | 1.00  | 1.00        | 1.00 | 1.00     | 1.00  | 1.00      | 1.00 | 1.00     | 1.00 |
| 4                       | 0.84     | 0.69  | 0.93        | 0.88 | 0.79     | 1.09  | 0.88      | 0.88 | 0.79     | 0.74 |
| 5                       | 0.14     | 0.13  | 0.42        | 0.53 | 0.70     | 0.86  | 0.43      | 0.42 | 0.12     | 0.25 |
| Wirkung pro Stickstoff. |          |       |             |      |          |       |           |      |          |      |
| 2                       | 0.46     | 0.49  | 0           | 0    | 0.36     | 0.26  | 0.44      | 1.05 | 1.75     | 2.6  |
| 3                       | 1.00     | 1.00  | 1.00        | 1.00 | 1.00     | 1.00  | 1.00      | 1.00 | 1.00     | 1.00 |
| 4                       | 1.09     | 0.85  | 1.1         | 1.1  | 1.02     | 1.33  | 1.11      | 1.09 | 1.00     | 0.93 |
| 5                       | 0.50     | 0.50  | 1.5         | 2.1  | 3.43     | 3.36  | 1.57      | 1.66 | 0.45     | 1.00 |

In Tabelle II sind die Enzymwirkungen in den einzelnen Fraktionen angegeben, wobei die in der 3-ten Fraktion als Masstab genommen ist. Da der Stickstoffgehalt in der ersten Fraktion einige Zehntel von dem der dritten beträgt, werden die gefundenen Enzymwirkungen dementsprechend multipliziert, um

die Wirkungen pro Stickstoff zu berechnen. Daher hielten wir es für richtig, die Enzymwirkungen pro Stickstoff in der ersten Fraktion beiseitezulassen, da ein unbedeutender Fehler sich dennoch sehr bemerkenswert gelten machen könnte. Die Abtrennung der Enzymwirkungen in den Fraktionen ist nicht bedeutend, vielmehr ist ein ziemlicher Anteil in der dritten und vierten Fraktion unbewegt geblieben. Das kann zum Teil darauf beruhen, dass die Elektrophorese der Eiweissbestandteile ungenügend war.

Da die Zahl der gewonnenen Fraktionen sehr gering ist, lässt sich noch nichts über die Verteilung der Enzyme in den Eiweissbestandteilen sagen. Nur ist die Wirkung der Arginase in der fünften Fraktion erhöht, so dass die Abtrennung der Arginase möglich sein dürfte. Die Kathepsinwirkung pro Stickstoffgehalt bleibt in jeder Fraktion fast die gleiche. Jedenfalls ist es nötig, weiter möglichst viele Fraktionen zu untersuchen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Leberextrakt mit physiologischer NaCl-Lösung wurde durch Ansäuern fraktioniert. Die Katalase war in der Flüssigkeit und die Esterase im Niederschlag bereichert, und zwar um die Partikelchen im Extrakte.

Fünf durch Elektrophorese gewonnene Fraktionen von Leberextrakt wurden auf die Wirkung der Katalase, Esterase, Phosphatase und des Kathepsins hin untersucht. Wegen der sehr geringen Anzahl der Fraktionen jedoch ist es bisher noch nicht möglich, irgendeinen Schluss in bezug auf die Verteilung der Enzyme in den einzelnen Eiweissbestandteilen zu ziehen.

*Diese Arbeit wurde zum Teil mit für die wissenschaftliche Forschung vom Kultusministerium dargebotenen Mitteln ausgeführt.*

#### LITERATUR

- 1) SOROG, S. UND COHEN, P. P.: *J. Biol. Chem.*, **190**, 303; 311, 1951.
- 2) GJESSING, E. C., FLOYD, C. S. UND CHANUTIN, A.: *Ibid.*, **188**, 155, 1951.
- 3) COHN, E. J., SURGENOR, D. M. UND HUNTER, M. J.: *Enzyme Systems*, 105, 1951.
- 4) NAKAMURA, S., TANAKA, K. UND HAYASHI, Y.: *J. Biochem.*, **41**, 13, 1954.
- 5) ALLEN, R. J. L.: *Biochem. J.*, **34**, II, 858, 1940.
- 6) COHNWAY, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, London, 1950.
- 7) WILLSTÄTTER, R. UND GRASSMANN, W.: *Z. physiol. Chem.*, **138**, 184, 1924.
- 8) WILLSTÄTTER, R. UND MEMMEN, F.: *Ibid.*, **129**, 1, 1923.