

## Differente und multiple Formen von Enzymen

VON PROF. DR. THEODOR WIELAND UND PROF. DR. GERHARD PFLEIDERER

INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE UND BIOCHEMISCHE ABTEILUNG,  
UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

*Differente Enzyme sind physikalisch, chemisch und biochemisch unterscheidbare Proteine gleicher biologischer Wirkung, aber verschiedener Herkunft. Enzyme einheitlicher Herkunft können aus mehreren sehr ähnlichen aber unterscheidbaren Proteinen bestehen, für die der Name „Isozyme“ vorgeschlagen wurde[\*]; sie werden auch als multiple Formen bezeichnet.*

### Einleitung

Durch die überraschende Entdeckung der dreißiger Jahre, daß die wichtigsten Coenzyme ungeachtet ihrer biologischen Herkunft dieselbe Struktur besitzen, hat sich in der Biochemie unbewußt das Gefühl und die Überzeugung von der Identität auch der Apoenzyme eingebürgert. So sprach man und spricht man auch heute noch in den meisten Fällen von „dem“ Enzym als von einem definierten, molekularen Individuum, z. B. dem Pepsin oder der Katalase. Man nahm dabei stillschweigend an, daß gleiche enzymatische Eigenschaften von einer gleichartigen, wenn nicht identischen Struktur herrühren.

Wie im folgenden an einigen Beispielen gezeigt wird, hat man aber in den letzten Jahren mehrfach festgestellt, daß Enzyme gleichartiger Wirkung, für die jetzt Bezeichnungen wie „isodynamische“ oder „homotrope“ Enzyme vorgeschlagen werden, je nach der Art ihres Ursprungsgewebes chemisch und physikalisch voneinander verschieden sein können. Solche Enzyme sollen hier als *differente* bezeichnet werden. Gleichzeitig mehren sich die Anzeichen dafür, daß auch ein Enzym einheitlichen Ursprungs heterogen sein, d. h. aus verschiedenen Molekülsorten bestehen kann, für die hier die Bezeichnung *multiple Formen* verwendet wird.

### Differente Enzyme

Noch heute werden in allen biochemischen Handbüchern die wichtigsten Daten fast eines jeden Enzyms ohne Berücksichtigung der Herkunft unter einem Stichwort aufgezählt. Allerdings gibt es schon seit vielen Jahren Beobachtungen und Stimmen, die auf Differen-

zen bei Enzymen gleicher Wirkung aber verschiedener Herkunft hinweisen. So regte schon am Ende des letzten Jahrhunderts *E. Fischer*, der sich wohl als erster mit der spezifischen Wirkung glykosidspaltender Enzyme befaßt hat, in einer Fußnote an: „...die verschiedenen Maltasen, welche zweifellos existieren, wären nach dem Ursprung Mais-, Hefe- usw. Maltase zu nennen“ [1].

Trotzdem vergingen 50 Jahre, bis *O. Warburg* bewies, daß Hefe-Zymohexase (Aldolase) von kristallisierter tierischer Aldolase verschieden ist. Nur jene braucht zur vollen Wirkung Schwermetall-Ionen [2]. Ebenso wurde ein deutlicher Unterschied zwischen kristallisierter Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber [3] und aus Hefe [4] gefunden. Handelte es sich bei diesem Vergleich um die Gegenüberstellung von Enzymen aus zwei entwicklungsgeschichtlich ganz verschiedenen Zellarten, so bot die Untersuchung der chemischen und biochemischen Natur gleichwirkender Enzyme aus demselben Organ verschiedenartiger Tiere besonderes Interesse. Hier sei als grundlegend eine Untersuchung an Amylasen durch die Schule von *K. H. Meyer* erwähnt [5–11]. Dort

[\*] Die Festlegung des Begriffs wird z. Zt. von einer internationalen Nomenklaturkommission beraten.

[1] *E. Fischer*, Ber. dtsch. chem. Ges. 28, 1429 (1895).

[2] *O. Warburg* u. *W. Christian*, Biochem. Z. 314, 149 (1943).

[3] *R. K. Bonnichsen*, Acta chem. scand. 4, 715 (1950).

[4] *E. Racker*, J. biol. Chemistry 184, 313 (1950); *E. Negelein* u. *H. J. Wulff*, Biochem. Z. 293, 351 (1937).

[5] *K. H. Meyer*, *E. H. Fischer* u. *P. Bernfeld*, Helv. chim. Acta 30, 64 (1947); Experientia 3, 106 (1947).

[6] *K. H. Meyer*, *E. H. Fischer*, *P. Bernfeld* u. *A. Staub*, Experientia 3, 455 (1947).

[7] *K. H. Meyer*, *M. Fuld* u. *P. Bernfeld*, Experientia 3, 411 (1947).

[8] *P. Bernfeld* u. *H. Studer-Pecha*, Helv. chim. Acta 30, 1904 (1947).

[9] *P. Bernfeld* u. *M. Fuld*, Helv. chim. Acta 31, 1420 (1948).

[10] *P. Bernfeld* u. *M. Fuld*, Helv. chim. Acta 31, 1423 (1948).

[11] *P. Bernfeld*, *F. Duckert* u. *E. H. Fischer*, Helv. chim. Acta 33, 1064 (1950).

wurde gefunden, daß die kristallisierte  $\alpha$ -Amylase aus menschlichem Speichel mit der aus menschlichem Pankreas identisch, aber von der aus Schweinepankreas deutlich verschieden ist. Diese Unterschiede beziehen sich sowohl auf physikalische als auch auf biochemische Eigenschaften (siehe Tabelle 1).

	menschliche $\alpha$ -Amylase	Schweine- amylase
Spezifische Aktivität	1000	630
pH-Optimum	6,9	6,9
Stabilitätsbereich	pH = 4,5 bis 11	pH = 7 bis 8,5
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O bei pH=8,0	0,5 %	4 %
elektrophoretische Beweglichkeit bei pH=10,14 in cm <sup>2</sup> /sec·V	$3,75 \cdot 10^{-5}$	$3,55 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 1. Vergleich der Eigenschaften menschlicher und tierischer  $\alpha$ -Amylase aus Pankreas

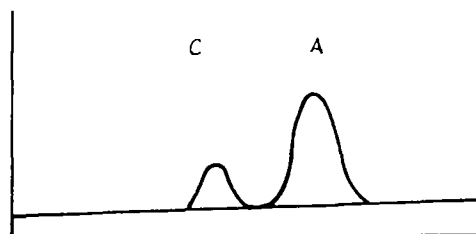
Zur gleichen Zeit stellte *R. K. Bonnichsen*[12] fest, daß sich Katalase aus Pferdeleber von der aus Menschenleber immunologisch unterscheiden läßt, daß aber Pferdeleber- und Pferdeblut-Katalase dasselbe Enzym sein müssen. Gleichwirkende Enzyme aus verschiedenen Organen desselben Lebewesens können also außerordentlich ähnlich, wenn nicht identisch sein.

Die Frage, ob es überhaupt einen Unterschied je nach Organherkunft, also eine Organspezifität bei den Enzymen gibt, war von *O. Warburg* um dieselbe Zeit folgendermaßen gestellt worden: „Wenn das Protoplasma der Zellen der Inbegriff ihrer Fermente ist, dann sollte man annehmen, daß die Fermente gleicher Funktion verschiedener Organe eines Tieres verschieden sind“ [13]. An Lactat-Dehydrogenase aus Rattenskelettmuskel und Jense Sarkom war jedoch kein Unterschied zu finden[14]. Daß aber die Lactat-Dehydrogenase aus Rattenskelettmuskel von der des Rattenherzmuskels in vielen Punkten verschieden ist, haben *G. Pfeleiderer* und *D. Jeckel* 1957 gezeigt[15]. Dies war unseres Wissens der erste Beweis für das Vorkommen differenter Enzyme in verschiedenen Organen eines Tieres.

## Multiple Formen eines Enzyms

Wird die Beschreibung einer Enzymart durch das Auftreten differenter Enzyme schon kompliziert, so verliert sie noch mehr an Übersichtlichkeit durch die Entdeckung, daß ein Enzym einheitlichen Ursprungs in multiplen Formen auftreten kann. Die erste sichere Beobachtung dieser Art machte *J. B. Neilands*[16]. Er wies nach, daß eine elektrophoretisch schon vorher beobachtete Proteinbeimengung[17] in kristallisierter Rinderherz-Lactat-Dehydrogenase[\*] eine zweite LDH-

Komponente ist. Die beiden Komponenten sind als A und C bezeichnet worden (Abb. 1). Kurz darauf teilte *E. G. Krebs* mit, daß es in Hefe vier elektrophoretisch



A 173.1

Abb. 1. Schlierendiagramm nach elektrophoretischer Trennung von kristallisierter LDH aus Rinderherz. Phosphatpuffer (pH = 5,7); Ionenstärke: 0,1; absteigend. (Nach *J. B. Neilands*, Science [Washington] 115, 144 [1952])

verschieden rasch wandernde Proteine mit Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Aktivität gibt[18]. Sie konnten durch eine fraktionierte Fällung mit Nucleinsäure weitgehend voneinander getrennt werden. Durch Elektrophorese im Stärkeblock haben *F. S. Vesell* und *A. G. Bearn*[19] 1956 menschliches Serum getrennt und danach LDH-Aktivität in drei Zonen festgestellt. Gleichzeitig wurde von den Verfassern dieser Übersicht eine groß angelegte Untersuchung: „Über die Verschiedenheit der Lactat-Dehydrogenasen“ begonnen[20], nachdem papierelektrophoretisch mehrere LDH-Proteine in verschiedenen Organextrakten entdeckt worden waren[21].

Heute ist die Zahl der diesbezüglichen Befunde so groß geworden, daß sich im Februar 1961 eine Konferenz der New York Academy of Sciences speziell mit dem Thema der multiplen Formen von Enzymen befaßte[22] und die Frage der Nomenklatur aktuell geworden ist. Zur Bezeichnung gleichwirkender (isodynamischer) Enzyme gleicher Organherkunft aber verschiedener physikalischer und biochemischer Natur wurde der Name „Isozyme“ vorgeschlagen[23].

## Unterscheidung und Trennung differenter und multipler Enzyme

Zur Charakterisierung von Enzymen sehen biochemische, physikalische, chemische und immunologische Methoden zur Verfügung. Voraussetzung für ihre Anwendung ist das Vorliegen des Proteins in maximaler Reinheit, am besten in kristallisierter Form.

Biochemische Kriterien sind: Umsatzzahl (umgesetzte Mol Substrat pro Mol Enzym und min); pH-Optimum der Wirkung; Affinität zum Substrat und Coenzym, ausgedrückt durch die Michaelis-Konstante  $K_m$ , welche die Substrat-

- [12] *R. K. Bonnichsen*, Arch. Biochem. Biophysics 12, 83 (1947).  
 [13] *O. Warburg*: Wasserstoffübertragende Fermente. Verlag Dr. Werner Sanger G.m.b.H., Berlin 1948, S. 54.  
 [14] *F. Kubowitz* u. *P. Ott*, Biochem. Z. 314, 94 (1934).  
 [15] *G. Pfeleiderer* u. *D. Jeckel*, Biochem. Z. 329, 371 (1957).  
 [16] *J. B. Neilands*, Science (Washington) 115, 143 (1952); J. biol. Chemistry 199, 373 (1952).  
 [17] *A. Meister*, J. biol. Chemistry 184, 117 (1950).  
 [\*] Für Lactat-Dehydrogenase, von der oft die Rede ist, wird die Abkürzung LDH verwendet.

- [18] *E. G. Krebs*, J. biol. Chemistry 200, 471 (1953).  
 [19] *F. S. Vesell* u. *A. G. Bearn*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94, 96 (1957).  
 [20] *Th. Wieland* u. *G. Pfeleiderer*, Biochem. Z. 329, 112 (1957).  
 [21] *Th. Wieland* u. *G. Pfeleiderer*, Angew. Chem. 69, 199 (1957).  
 [22] Vortragsbericht, Angew. Chem. 73, 246 (1961). Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 655-1030 (1961).  
 [23] *C. L. Markert* u. *F. Möller*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 753 (1959).

konzentration in Mol/l angibt, bei der die Hälfte der Enzymmenge mit Substrat beladen ist. Weiter können Temperaturkoeffizient und Ausmaß der Hemnbarkeit durch verschiedene Stoffe zur Charakterisierung dienen. Wichtig ist auch die Verwendung modifizierter Coenzyme, wie sie von *N. O. Kaplan* bei DPN-abhängigen Dehydrogenasen praktiziert wird. Hier bestimmt man das Verhältnis der Geschwindigkeiten  $v_{DPN}:v_{DPNA}$  einer durch das Apoenzym katalysierten Reaktion, wenn dieses mit DPN[\*] bzw. einem DPN-Analogen (DPNA) als Coenzym arbeitet. Stimmt diese Verhältniszahl für zwei Apoenzyme überein, so sind diese sehr wahrscheinlich identisch. Unterschiede in den Quotienten lassen auf Unterschiede in den Apoenzymen schließen[24]. An physikalischen Vergleichsmethoden stehen zur Verfügung: Molgewichtsbestimmung durch Ultrazentrifuge, Lichtstreuung, Diffusion oder Osmometrie; Bestimmung der Löslichkeit und Aufstellung eines Aussalzdigramms; UV-Absorption; potentiometrische Titration der sauren und basischen Gruppen; Bestimmung des isoelektrischen Punktes und der elektrophoretischen Beweglichkeit; Wanderungsgeschwindigkeit an Säulen von Ionenaustauschern oder ungeladenen Adsorptionsmitteln wie Calciumphosphat; Rotationsdispersion; Röntgenkristallographie.

Chemisch lassen sich bestimmen: endständige Aminosäuren; Zahl der funktionellen Gruppen ( $NH_2$ , OH, SH, SS usw.); Art und Menge der Bausteine (Aminosäuren, Coenzym, Schwermetalle); die primäre Struktur (Sequenzanalyse); die durch Proteolyse erhaltenen Oligopeptidmischungen (zweidimensionale Papierchromatographie und Elektrophorese, Fingerprint-Verfahren)[25, 26].

Sehr empfindlich sollen immunbiologische Tests die Unterscheidung oder Identifizierung zweier Proteine gestatten. Das Prinzip besteht darin, daß man mit einem der Enzyme ein Versuchstier immunisiert und Serum-Antikörper auf das zu vergleichende Enzym einwirken läßt. Bei Identität muß dieselbe Menge an Antiserum zur Inaktivierung genügen, während Unterschiede sich durch mehr oder weniger große Abweichungen, in besonderen Fällen sogar durch Ausbleiben einer Antigen-Antikörper-Reaktion kundtun. Wie bei jeder biologischen Reaktion läßt die quantitative Auswertung und Reproduzierbarkeit auch hier zu wünschen übrig, besonders wenn es sich um die Aufdeckung geringfügiger Unterschiede handelt.

## Fragen der Definition

Bei der Untersuchung multipler Enzymformen besteht immer die Gefahr, daß sich bei Aufbereitung des Gewebes und bei der Reinigung Kunstprodukte bilden. So hat man tierisches Cytochrom c, ein relativ niedermolekulares Protein, durch Chromatographie an Kationenaustauschern in mehrere Komponenten verschiedener Aktivität zerlegen können. Durch Chromatographie gereinigtes, einheitliches Enzym ließ sich durch Einwirkung denaturierender Reagentien wieder in das Gemisch multipler Formen umwandeln, so daß schließlich der Grund für das Auftreten mehrerer Formen in der bei der Cytochromgewinnung üblichen Extraktion mit wäßriger Trichloressigsäure gefunden wurde[27]. Derartige Kunstprodukte fallen nicht unter den Begriff Isozyme.

[\*] DPN und DPNH sind Abkürzungen für Diphosphopyridinnucleotid und seine hydrierte Form.

[24] *N. O. Kaplan, M. M. Ciotti, M. Hamolsky u. R. E. Bieher*, Science (Washington) 131, 392 (1960).

[25] *Th. Wieland*, Angew. Chem. 71, 417 (1959).

[26] *H. Tuppy*, Naturwissenschaften 46, 35 (1959).

[27] *E. Margoliash u. J. Lustgarten*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 731 (1961).

Wo aber liegt die Grenze zwischen Artefakt und Naturprodukt? Hefe enthält nach *K. A. Trayser* und *S. P. Colowick* [28] mehrere Hexokinasen, die in zwei Gruppen, A und B, nach Chromatographie an DEAE-Cellulose kristallisiert erhalten wurden. Trypsin in Gegenwart von Glucose führt Enzym A in Enzym B über. Eine ähnliche Wirkung, nämlich Erhöhung des Anteils B auf Kosten von A, hat die Verlängerung der Extraktion der Trockenhefe von 3 auf 24 Stunden. Trotzdem wird man geneigt sein, A und B, die sich durch sorgfältige Chromatographie sogar noch in weitere Komponenten aufspalten ließen, als Isozyme der Hexokinase zu bezeichnen.

Schwierigkeiten ergeben sich auch für die Anwendung der Begriffe „differente oder multiple Form“, wenn man Enzyme mit großem Spezifitätsbereich zu vergleichen hat. So wäre es möglich, alle Esterasen eines Organs, die sich durch die oben genannten Kriterien unterscheiden lassen, als multiple Formen zu bezeichnen, solange man sie an einem Universalsubstrat testet. Erst eine eingehende Betrachtung der Spezifität führt zu der Erkenntnis, daß es sich um Enzyme mit verschiedenen Funktionen handeln kann, wie etwa eine Lipase und eine Acetylcholin-Esterase. Dasselbe gilt für Proteinasen und die meisten Phosphatasen. Man wird also von verschiedenen Formen eines Enzyms erst bei völliger Kenntnis der physiologischen Bedeutung und der Spezifität sprechen können. Auch die Spezifität gegenüber dem Coenzym muß hier berücksichtigt werden. So betrachten wir die beiden in Leber vorhandenen Isocitronensäure-Dehydrogenasen nicht als multiple Formen, da die eine mit DPN, die andere mit TPN arbeitet[29].

## Unterschiede zwischen differenten Enzymen

Da alle Organismen ihre Energie prinzipiell in gleicher Weise gewinnen können (Glykolyse, Citronensäurecyclus), muß jede so geartete Zelle über gleichartig wirkende Enzyme verfügen. Es nimmt nicht wunder, daß differente Enzyme in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung große Unterschiede aufweisen und auch in anderen Eigenschaften sehr stark voneinander abweichen können, wie z. B. die Phosphoglucose-Isomerase aus der Milchdrüse der Kuh und aus Hefe[30]. Die eine hat ein Molgewicht von 48000, die andere von 145000.

Andererseits ist es fast erstaunlich, daß es auch Fälle gibt, in denen differente Enzyme sehr verschiedener Herkunft große Ähnlichkeit aufweisen. So unterscheiden sich Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase aus Hefe und tierischem Muskel in der Aminosäure-Zusammensetzung nur sehr wenig[31]. Die chemischen Unterschiede zwischen  $\alpha$ -Amylasen sind von *E. A. Stein*, *J. M. Junge* und *E. H. Fischer* an *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, Schweinepankreas und menschlichem

[28] *K. A. Trayser u. S. P. Colowick*, Arch. Biochem. Biophysics 94, 177 (1961).

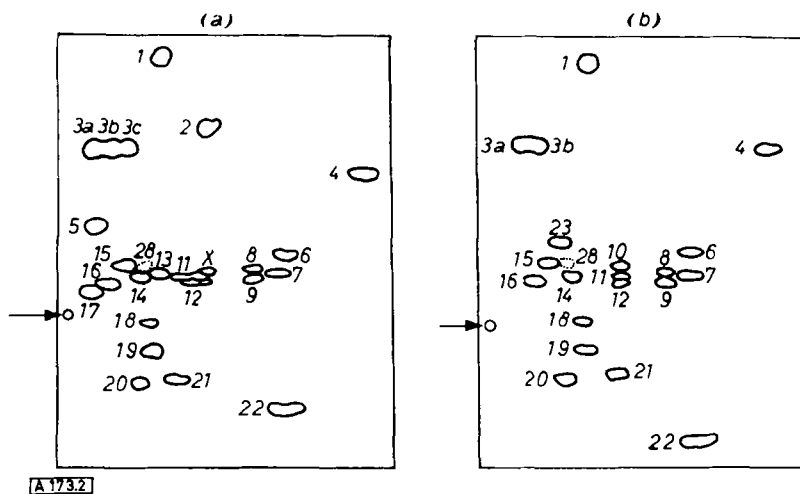
[29] *A. Kornberg u. W. Pricer*, J. biol. Chemistry 189, 123 (1951).

[30] *A. Baich, R. G. Wolfe u. F. J. Reithel*, J. biol. Chemistry 235, 3130 (1960).

[31] *S. F. Velick u. S. Udenfriend*, J. biol. Chemistry 203, 575 (1953).

Speichel festgestellt worden[32]. Obwohl alle vier Enzyme etwa dasselbe Molgewicht (50000), dieselbe prosthetische Gruppe (Calcium-Ion) und eine ähnliche Umsatzzahl haben, weisen sie doch in ihrer Primärstruktur ganz bedeutende Unterschiede auf, wobei die chemische Verschiedenheit zwischen den Enzymen vom Schwein und vom Menschen ebenso groß ist wie die

hat beim gesamten Cytochrom c aus Pferdeherz, Walherz und Hefe sehr nahe Übereinstimmung, beim Cytochrom c aus *Desulfovibrio desulfuricans* erhebliche Unterschiede ergeben[34]. Neuerdings sind von C. B. Anfinsen und Mitarb. vergleichende Untersuchungen an Ribonucleasen verschiedenen Ursprungs bekannt geworden. Dort bestehen zwischen den Pankreasenzymen



zwischen den Enzymen vom Mensch und aus Bakterien oder wie die zwischen den Enzymen aus *Bacillus subtilis* und *Aspergillus oryzae* (Tabelle 2).

	$\alpha$ -Amylase aus			
	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Schweinepankreas	menschl. Speichel
Lysin	33	51	34	43
Arginin	17	35	33	50
Histidin	12	25	25	21
Asparaginsäure + Glutaminsäure	174	197	180	210
davon als Amid	99	103	94	96
Alanin	66	60	77	50
Cystein	17	—	19	36
Glycin	75	80	89	91
Isoleucin	48	35	—	44
Leucin	58	47	88	44
Methionin	14	10	14	16
Phenylalanin	25	37	61	44
Prolin	37	29	31	31
Serin	58	49	39	74
Threonin	71	47	33	38
Tyrosin	60	49	29	30
Valin	52	51	67	59
Gesamtzahl	836	833	852	916

Tabelle 2. Zusammensetzung von  $\alpha$ -Amylasen verschiedener Herkunft. Die Zahlen geben Aminosäuremoleküle pro 100000 g Protein an.

Oft aber liegen die Unterschiede zwischen differenten Enzymen tiefer verborgen. So wie bei den Insulinen von Rind, Schwein, Schaf, Pferd und Wal nur Variationen der drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten 7 und 11 der A-Kette gefunden wurden[26], so unterscheiden sich auch die Hämopeptide des Cytochroms c trotz ganz verschiedener Herkunft überraschend wenig[26,33]. Die chromatographische Bausteinanalyse

[32] E. A. Stein, J. M. Junge u. E. H. Fischer, J. biol. Chemistry 235, 371 (1960).

[33] J. I. Harris, F. Sanger u. M. A. Naughton, Arch. Biochem. Biophysics 65, 427 (1956).

Abb. 2. Zweidimensionale Trennung der durch Einwirkung von Trypsin und Chymotrypsin aus oxidiertem Pankreas-Ribonuclease entstandenen Spaltprodukte. (a) Enzym vom Rind, (b) Enzym vom Schaf.

Papierchromatographie von links nach rechts (Startpunkt durch Pfeil am linken Rand angedeutet).

Papierelektrophorese von oben (Kathode) nach unten (Anode).

(Nach C. B. Anfinsen et al., J. biol. Chemistry 234, 1118 (1959).)

von Schwein und Rind nur kleine, zwischen den Pankreasenzymen von Rind und Schaf beträchtliche Unterschiede[35,36]. Diese wurden durch die Anwendung der oben genannten Fingerprint-Technik aufgefunden (Abb. 2). Mit dieser Technik konnte V. Ingram die außerordentlich geringfügigen Unterschiede zwischen dem normalen Menschenhämoglobin A und den abnormalen Formen C und S aufdecken. Unter den 300 Aminosäureresten einer Molekülhälfte ist ein Glutaminsäurerest des Hämoglobins A im Hämoglobin C gegen Lysin und im Hämoglobin S gegen Valin ausgetauscht [37,38].

Auch die Trypsine von Rind, Schaf und Schwein, die sich in mancher Hinsicht sehr ähneln, zeigen im elektrophoretischen Verhalten und in der Stabilität im alkalischen Medium deutliche Unterschiede. Das Schweine-Enzym wandert bei  $ph = 4,8$  am langsamsten und weist eine größere Alkalistabilität auf als das rascher wandernde Schafs- und das am schnellsten wandernde Rinder-Enzym[39]. Eigene Untersuchungen an Lactat-Dehydrogenasen bezogen sich früh auf dieselbe Frage. Da-

[34] K. Takahashi, K. Titani u. S. Minakani, Biochemistry (Tokio) 46, 1323 (1959).

[35] C. B. Anfinsen, S. E. G. Aqvist, J. P. Cooke u. B. Jönsson, J. biol. Chemistry 234, 1118 (1959).

[36] A. M. Katz, J. Dreyer u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 234, 2897 (1959).

[37] V. M. Ingram, Nature (London) 180, 326 (1957).

[38] V. M. Ingram, Vortrag, IV. Internationaler Kongreß für Biochemie, Wien 1958.

[39] A. J. Vithayathil, F. Buck, M. Bier u. F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophysics 92, 532 (1961).

mals wurden elektrophoretische Unterschiede zwischen den Lactat-Dehydrogenasen aus Rinderherz und Schweineherz sowie zwischen denen aus Kaninchen-skelettmuskel und Rattenskelettmuskel gefunden [15]. Später sind diese differenten Enzyme tryptisch abgebaut und durch Hochspannungselektrophorese der Spaltpeptide miteinander verglichen worden [40]. Dabei zeigten sich geringe, aber deutlich wahrnehmbare Unterschiede. Daß es sich um Unterschiede in der Primärstruktur handelt, haben Aminosäureanalysen ergeben, die im Laboratorium von Prof. M. Brenner in Basel mit den von uns gewonnenen Enzympräparaten von Dr. H. Weber ausgeführt wurden [41]. In Tabelle 3 sind die Unterschiede zwischen den Lactat-Dehydrogenasen aus Herz vom Schwein und Rind und aus Skelettmuskel von Ratten und Kaninchen wiedergegeben.

	LDH aus Herzmuskel				LDH aus Skelettmuskel		
	Schwein (2 Best.)		Rind (2 Komponenten) [16]		Ratte (2 Extremwerte von 4 Best.)		Ka- nin- chen
	1	2	A	C			
Lysin	87	86	97—98	98	99	103	98
Arginin	28	32	34	36	38	38	35
Histidin	25	27	27—28	28	21	23	37
Asparaginsäure	125	125	126—127	125	117	119	108
Glutaminsäure	115	116	120	117—118	104	106	106
Alanin	70	70	74	74	71	73	76
Glycin	87	87	91	93	90	91	94
Isoleucin	76	80	79	80	83	87	79
Leucin	128	125	135	134	130	134	130
Methionin	30	33	34—35	31—32	25	26	32
Phenylalanin	19	21	19—20	21	25	26	26
Prolin	45	47	43	45	44	47	38
Serin	86	92	90	88	88	94	74
Threonin	55	57	53	52	42	43	41
Tyrosin	25	27	27	27	25	26	26
Valin	139	132	131	132	130	132	126

Tabelle 3. Zusammensetzung von Lactat-Dehydrogenasen verschiedener Herkunft in Aminosäuremolekülen pro 130 000 g Protein (= Molgewicht)

Auf den ersten Blick zeigt sich hier eine prinzipiell gleichartige Verteilung aller Reste, die vielleicht für die Eigenschaft „LDH“ maßgebend und bezeichnend sein mag, wie etwa die äußeren Merkmale eines Gegenstands oder Fahrzeugs gleichen Zweckes aber verschiedenen Fabrikates. Der Gehalt an einigen Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Tyrosin oder Cystein (dessen Wert auf anderem Weg, aber nicht in allen Fällen, zu 14 Resten bestimmt wurde) ist von auffällender Konstanz, andere aber, vor allem Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Threonin sind in den verschiedenen Enzymen in deutlich verschiedenen Mengen enthalten. Im ganzen gesehen sind die Herzmuskel-Enzyme und die Skelettmuskel-Enzyme jeweils untereinander ähnlicher als mit denen aus den anderen Organen. Der Mindergehalt an kationischen und der Mehrgehalt an anionischen Resten kann die größere Mobilität der Schweineherz-LDH bei  $pH = 8,6$  zur Anode erklären. Die Lactat-Dehydrogenasen aus Skelettmuskel enthalten weniger anionische Seitenketten und bleiben demgemäß bei der Elektrophorese am Startplatz zurück.

Der analytische Vergleich erstreckte sich auch auf die kristallisierten Lactat-Dehydrogenasen aus verschiede-

[40] Th. Wieland, G. Pfeleiderer u. K. Rajewsky, Z. Naturforsch. 15b, 434 (1960).

[41] Th. Wieland, u. G. Pfeleiderer, Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 691 (1961). Einige der dort veröffentlichten Bausteinanalysen haben sich bei der Wiederholung mit noch weiter gereinigten LDH-Formen etwas, aber nicht prinzipiell geändert.

nen Organen ein und desselben Tieres. Zwischen der LDH aus Rattenleber und Rattenmuskel, die elektrophoretisch nicht zu unterscheiden sind, ergaben sich nur geringfügige, aber signifikante Abweichungen im Gehalt an Leucin und Valin, von denen das Muskelpräparat durchschnittlich 3 bis 5 Mol pro Mol Enzym mehr enthält. Viel deutlicher sind die organbedingten Unterschiede zwischen den Lactat-Dehydrogenasen aus Rattenskelettmuskel und Rattenherz (Bande I). Wie Tabelle 4 zeigt, erstrecken sie sich auf alle Aminosäuren. Auch hier wird das stark abweichende elektrophoretische Verhalten auf Grund der verschiedenen Ladungen verständlich, da die rasch zur Anode wandernde Herz-LDH Nr. I erheblich mehr Asparaginsäure und weniger Lysin und Arginin enthält als die elektrophoretisch unbeweglichen Lactat-Dehydrogenasen aus Leber und Skelettmuskel.

So stark ausgeprägte Organspezifitäten wie hier können auch immunologisch festgestellt werden: der gegen das Kaninchen-Skelettmuskel-Enzym vom Huhn produzierte

	Ratten-LHD aus Leber (2 Extremw. von 4 Best.)		Skelettmuskel (2 Extremw. von 4 Best.)		Herzmus- kel (Bande I, s. S. 267)
Lysin	98	100	99	103	95
Arginin	37	40	38	38	34—35
Histidin	23	25	21	23	26
Asparaginsäure	113	117	117	119	141
Glutaminsäure	106	110	104	106	108—109
Alanin	74	79	71	73	81
Glycin	90	95	90	91	89
Isoleucin	79	82	83	87	83
Leucin	124	129	130	134	130
Methionin	25	26	25	26	33
Phenylalanin	28	30	25	26	21
Prolin	48	51	44	47	40
Serin	86	91	88	94	92
Threonin	44	47	42	43	53
Tyrosin	26	27	25	26	27
Valin	116	124	130	132	134

Tabelle 4. Zusammensetzung von Lactat-Dehydrogenasen aus Leber, Skelettmuskel und Herzmuskel der Ratte in Aminosäuremolekülen pro 130 000 g Protein (= Molgewicht)

Antikörper inaktiviert das Kaninchen-Herz-Enzym sehr viel weniger als sein Antigen (d.h. das Skelettmuskelenzym)[42].

Schließlich seien auch die zwei Malat-Dehydrogenasen erwähnt, die sich im Ochsenherz und in der Rattenleber in den gleichen Zellen finden, aber aus verschiedenen Zellbezirken stammen. Man unterscheidet zwischen einer mitochondrialen und einer cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase[43-45], am besten durch Elektrophorese auf Membranfolie, wo letztere bei  $pH \approx 8,6$  schneller zur Anode wandert[46]. Hier scheint der Unterschied darin zu liegen, daß das Mitochondrien-Enzym zusätzlich einen Lipoidanteil trägt. Beim Behandeln mit n-Butanol läßt sich das eine Enzym in das andere überführen[47]. Es fragt sich, ob man hier schon von differenten Enzymen sprechen soll, weil man in diesem bisher einzigen Fall die verschiedene Lokalisation der Enzyme in der Zelle kennengelernt hat, oder ob angesichts der Herkunft der beiden Enzyme aus der gleichen Zellart die Bezeichnung multiple Formen angebracht wäre.

### Unterschiede zwischen multiplen Formen eines Enzyms

Die historisch wichtigsten Entdeckungen multipler Enzymformen sind in den vorhergehenden Abschnitten geschildert worden. Seither hat man an vielen weiteren Enzymen ähnliche Beobachtungen gemacht, auf die hier nicht vollständig eingegangen werden kann. Es sollen nur solche Beispiele gebracht werden, bei denen die multiplen Formen deutlich getrennt, sichtbar gemacht oder sogar isoliert untersucht worden sind. Hierzu hat sich in den meisten Fällen die Elektrophorese bewährt, wobei die Trägerelektrophorese immer mehr in den Vordergrund getreten ist. Man ist übereingekommen, die am schnellsten zur Anode wandernde der multiplen Formen eines Enzyms mit I, die nächste mit II usw. zu bezeichnen.

Wir haben zwischen analytischer und mikropräparativer Zielsetzung zu unterscheiden. Für analytische Arbeiten eignet sich die Papierelektrophorese. Von entscheidender Bedeutung war die Ausarbeitung von Methoden zur Sichtbarmachung der getrennten Enzyme. Für DPN-abhängige Enzyme wurde ein sehr empfindlicher Sprühtest entwickelt, der auf dem Verschwinden der DPNH-Fluoreszenz beruht[21]. Viele andere Enzymreaktionen lassen sich mit Reaktionen DPN-spezifischer Enzyme koppeln, so daß dieser Technik eine ziemlich weite Anwendung zukommt. Bei Redoxreaktionen kann

auch die Indikation mit Tetrazoliumsalzen gute Dienste leisten, bei der unter Reduktion stark gefärbte Formazane entstehen[48,49]. Andere Enzyme lassen sich mit den in der Histochemie üblichen Farbreaktionen erkennen. Stärkegel-Elektropherogramme, auf denen Enzyme mit histochemischen Methoden nachgewiesen wurden, bezeichnen *R. L. Hunter* und *C. L. Markert* als Zymogramme[50]. Zur quantitativen Bestimmung in situ hat *R. J. Wieme*[51] eine spektrophotometrische Methode angegeben, bei der Substrat und Coenzym der LDH in Agar mit den getrennten Enzymen in Berührung gebracht und die Umsetzungen optisch verfolgt werden.

Nachteilig bei der Papierelektrophorese ist, daß sich die getrennten Banden der multiplen Enzyme im Papier nicht quantitativ bestimmen lassen und auch nicht verlustlos daraus isoliert werden können. Die Elution gelingt jedoch vollständig von Membranfolien, die auch eine vorzügliche und rasche Trennung der LDH-Komponenten bei höheren Spannungen gestatten (Abb. 3).

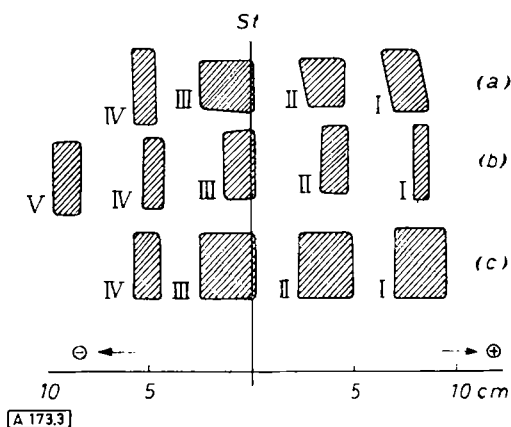


Abb. 3. Elektropherogramme gereinigter Lactat-Dehydrogenasen aus (a) Gehirn, (b) Niere und (c) Herz der Ratte. Membranfolie; M/15 Veronalpuffer ( $pH = 8,6$ ); 30 V/cm; 90 min. St: Startlinie. (Nach Th. Wieland et al., Biochem. Z. 331, 103 [1959]).

0,01 ml Gewebeeextrakt kann man in 1 Stunde bei ca. 40 V/cm auf mit Veronalpuffer getränkter Folie elektrophoretisch trennen, die getrennten LDH-Enzyme durch Besprühen mit der Coenzym- und Substratlösung aus einer Hochleistungsmetalldüse als scharfe dunkle Banden sichtbar machen und diese nach dem Durchschneiden der Folie direkt in der Meßkuvette eluieren.

Zur mikropräparativen Elektrophorese arbeitet man entweder in Stärkegel nach *O. Smithies*[52], in Stärkebrei im Block[53], oder in der Säule[54]. Aus dem Gel werden die Enzyme am besten durch Auspressen des

- [42] J. S. Nisselbaum u. O. Bodansky, J. biol. Chemistry 234, 3276 (1959).
- [43] G. S. Christie u. J. D. Judah, Proc. Roy. Soc. (London) 141, 420 (1953).
- [44] A. Delbrück, H. Schimassek, K. Bartsch u. Th. Bücher, Biochem. Z. 331, 297 (1959).
- [45] C. J. R. Thorne, Biochim. biophysica Acta 42, 175 (1960).
- [46] Th. Wieland, G. Pfeleiderer, I. Haupt u. W. Wörner, Biochem. Z. 332, 1 (1959).
- [47] A. J. Sophianopoulos u. C. S. Vestling, Biochim. biophysica Acta 45, 400 (1960).

- [48] R. Kuhn u. D. Jerchel, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 949 (1941).
- [49] R. Kuhn u. F. Linke, Liebigs Ann. Chem. 578, 155 (1952); R. Kuhn, G. Pfeleiderer u. W. Schulz, ebenda 578, 159 (1952).
- [50] R. L. Hunter u. C. L. Markert, Science (Washington) 125, 1294 (1957).
- [51] R. J. Wieme: Studies on Agar Gel Electrophoresis. Arscia Uitgaven N.V., Brüssel 1959; Ann. N. Y. Acad. Sci. 94, 898 (1961).
- [52] O. Smithies, Biochem. J. 61, 629 (1955).
- [53] H. G. Kunkel u. R. J. Slater, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 42 (1951).
- [54] P. Flodin u. J. Porath, Biochim. biophysica Acta 13, 175 (1954).

vorher eingefrorenen Segmentes mit einer Injektions-spritze isoliert. Aus dem Stärkebrei läßt man die Enzyme in Glaspulver[55] einwandern.

Auch die Chromatographie an Ionenaustauschern eignet sich zur Trennung multipler Enzymformen. Schon 1953 gelang es *Hirs, Moore* und *Stein*, ein kristallisiertes Ribonucleasepräparat an Amberlite IRC-50 in zwei aktive Formen zu trennen[56]. Für empfindlichere Proteine eignen sich Austauscher auf Cellulosebasis besser, vor allem die Diäthyl-aminoäthyl-cellulose, DEAE[57]. An einer solchen Säule lassen sich nach *B. Hess* LDH-Isozyme aus verschiedenen Organen durch fraktionierte Elution mit Puffern verschiedenen *pH*-Wertes und NaCl-Gehaltes trennen[58]. Noch günstigere Resultate bringt nach eigenen Erfahrungen (mit *H. Determann* und *F. Ort-anderl*) die Verwendung des Austauschers DEAE-Sephadex, der eine wesentlich höhere Beladungskapazität besitzt. Abb. 4 zeigt die Trennung eines einheitlich kristallisierten Rattenherzenzyms in vier Komponenten.

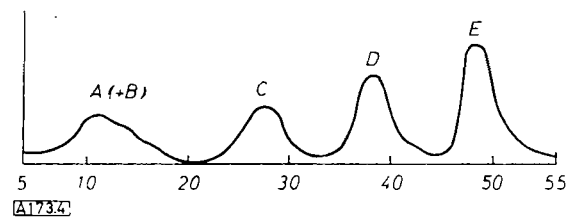


Abb. 4. Chromatographische Trennung der Isozyme von kristallisierter Rattenherz-LDH an DEAE-Sephadex. Elution mit M/20 Phosphatpuffer (*pH* = 6,0) bei bis auf 0,5 M ansteigender NaCl-Konzentration. Am spätesten erscheint Komponente E im Eluat. E = I, D = II usw. Ordinate: Ausschlag des Schreibers am Durchflußphotometer Uvicord Abszisse: Fraktionsnummer.

Eluiert wurde mit Phosphatpuffer (*pH* = 6,0) mit steigendem NaCl-Gehalt. Nach der Reihenfolge des Erscheinens im Eluat werden chromatographisch trennbare multiple Formen mit A, B usw. bezeichnet. Das zuletzt geschilderte Verfahren scheint uns das beste zur analytischen und präparativen Trennung von multiplen Enzymformen zu sein und hat sich auch bei deren Isolierung bewährt.

## Lactat-Dehydrogenasen

Weitaus am besten untersucht sind die Verhältnisse bei den Lactat-Dehydrogenasen. Nachdem wir schon 1956 papierelektrophoretisch in verschiedenen Organen der Ratte fünf LDH-Komponenten beobachtet hatten[21], gelang es später, eine solche Heterogenität auch bei anderen Tieren und beim Mensch festzustellen[46, 59]. Hieraus ergaben sich bald mehrere Fragen:

1. Enthalten alle Organe dieselbe Zahl von LDH-Isozymen?

[55] *Th. Wieland, G. Pfeiderer u. H. L. Rettig*, *Angew. Chem.* 70, 341 (1958).

[56] *C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein*, *J. biol. Chemistry* 200, 493 (1953).

[57] *E. A. Peterson u. H. A. Sober*, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 751 (1956).

[58] *B. Hess u. S. I. Walter*, *Klin. Wschr.* 38, 1080 (1960).

[59] *I. Haupt u. H. Giersberg*, *Naturwissenschaften* 45, 268 [1958].

2. Ist die Verteilung der Gesamtaktivität über die Einzelkomponenten in allen Organen gleich?

3. Worin bestehen die physikalischen und biochemischen Unterschiede?

4. Stimmen elektrophoretisch gleichartige Lactat-Dehydrogenasen aus verschiedenen Organen in ihrer Primärstruktur überein?

Die Beantwortung der ersten Frage hängt vom Stand der Analysenmethodik ab. Früher betrachteten wir die Schweineherz-LDH als eine der wenigen Lactat-Dehydrogenasen, die auch im Organ ein reines Einkomponenten-Enzym ist. Bei der Elektrophorese auf Membranfolie findet man jedoch immer, auch im kristallisierten Präparat, eine zweite Komponente, deren Menge allerdings nur etwa 1% der ersten beträgt. Ähnlich ging es mit der Skelettmuskel-LDH aus Ratten, die wir früher als einheitliche, von der Herzmuskel-LDH verschiedene LDH betrachten mußten. Heute wissen wir, daß beide LDH-Präparate fünf Isozyme enthalten, von denen allerdings beim Skelettmuskelenzyzen vier (I–IV) nur einen kleinen Bruchteil der Gesamtaktivität ausmachen. Trotzdem ist anzunehmen, daß die Zahl der LDH-Komponenten nicht in allen Organen eines Tieres gleich ist.

Organ	Mensch Enzym Nr.				
	I	II	III	IV	V
Herzmuskel	60	30	5	3	2
Niere	28	34	21	11	6
Großhirn	28	32	19	16	5
Kleinhirn	39	34	20	7	—
Erythrocyten	36	35	9	—	—
Leber	0,2	0,8	1	4	94
Skelettmuskel	3	4	7	10	76
Epidermis	0	0	4	17	79

Ratte					
Herzmuskel	34	43	15	5	2
Niere	36	27	7	9	20
Gehirn	25	23	18	24	10
Skelettmuskel	0,5	1	1,5	3	94
Leber	0	0	0	3	97

Tabelle 5. Durchschnittliche prozentuale Aktivitätsverteilung der LDH-Komponenten in verschiedenen Organen des Menschen und der Ratte

Zur zweiten Frage ist zu sagen, daß im Enzymverteilungsmuster verschiedener Organe große Unterschiede bestehen. In Tabelle 5 sind die prozentualen Mengen an Isozymen in den Organen der Ratte und des Menschen angegeben. Man sieht daraus, daß es sicher zwei organotypische Verteilungsmuster gibt, wobei der Schwerpunkt der Konzentration bei Mensch und Säugetier entweder auf den ersten oder den letzten Isozymen liegt. Untersuchungen zur Altersabhängigkeit dieser charakteristischen Verteilung haben ergeben, daß beim Menschen im embryonalen Zustand der Organe diese Differenzierung noch nicht vorhanden ist, sondern alle multiplen Formen eine gleichartige Verteilung mit Schwerpunkt in Komponente II zeigen[60]. Auch bei Tieren wurden Unterschiede in der Bandenzahl und Verteilung zwischen embryonalem und erwachsenem Zustand gefunden[23, 61].

[60] *G. Pfeiderer u. E. D. Wachsmuth*, *Biochem. Z.* 334, 185 (1961).

[61] *L. B. Flexner, J. B. Flexner, R. B. Roberts u. G. De la Haba*, *Devel. Biol.* 2, 313 (1960).

In den Organen des Erwachsenen sind die Verteilungsmuster sehr konstant und charakteristisch. Extreme sind Herzmuskel und Leber. Normalerweise befindet sich im Blutserum nur eine winzige LDH-Aktivität, die von elektrophoretisch rasch wandernden LDH-Formen herrührt (Erythrocyten). Dagegen tritt bei Schädigungen des Herzmuskels oder der Leber das vorwiegende in diesen Organen Isozym im Serum sehr stark auf, so daß eine Analyse wertvolle diagnostische Möglichkeiten bietet[61a]. Nach *B. Hess* und *S. I. Walter* kann die beim Herzinfarkt im Serum auftretende Herz-LDH (I) durch Einrühren von DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher) völlig adsorbiert werden, während die bei Leberentzündungen auftretende Leber-LDH (V) nicht adsorbiert wird[62].

Zu Frage 3: Die Unterschiede zwischen den Isozymen der LDH wurden bekanntlich erstmals im elektrophoretischen Verhalten beobachtet. Sie kommen also mit Sicherheit in verschiedenen Nettoladungen der Proteinmoleküle zum Ausdruck. Darüber hinaus sind bei verschieden rasch wandernden Proteinen Zusammenhänge zwischen dem elektrophoretischen Verhalten und anderen Eigenschaften gefunden worden. Zuerst beobachteten wir an isolierten Isozymen aus Rattenniere, daß die Hemmbarkeit durch Sulfid mit der Zunahme der negativen Ladungen des Proteins ansteigt[20]. So läßt sich die Bande I unter bestimmten Bedingungen zu 80 %, Bande V unter denselben Bedingungen nur zu 50 % hemmen. Das bedeutet, daß die Affinität von Coenzym und Sulfid zum Enzym I größer ist als zum Enzym V. Später zeigte sich, daß die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit dazwischen liegenden Banden II–IV auch in ihrer Sulfidempfindlichkeit zwischen den Extremwerten liegen[63]. In Tabelle 6 ist dieser Zusammenhang wiedergegeben. Zur selben Zeit wurde festgestellt, daß sich auch andere Eigenschaften der Enzyme im gleichen Maße ändern[64, 65]. So fällt die optimale Pyruvat-Konzentra-

tion von V nach I um eine Zehnerpotenz ab (von  $1,2 \cdot 10^{-3}$  M auf  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M), der Temperaturkoeffizient steigt von 1,5 bei V gleichmäßig auf 2,1 bei I an. Besonders große Unterschiede werden bei der Hitzestabilität der verschiedenen Proteine beobachtet: Die Halbwertszeit der Denaturierung bei 55 °C beträgt für I fast  $\infty$ , für II ca. 100 min, für III 40 min, für IV 10 min und für V 3 min. Diese Zusammenhänge zwischen ganz verschiedenen physikalischen Daten werden vielleicht einmal einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Adsorption und Umsetzung von Substrat und Coenzym geben.

Die Ladungsunterschiede zwischen Isozymen können davon herrühren, daß im rascher wandernden Protein weniger positive Seitenketten, etwa durch Acylierung eines Teils der  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins, oder mehr Carboxylat-Seitenketten vorliegen, als im weniger rasch wandernden Protein, in dem einige Carboxylgruppen durch Amidbildung neutralisiert sein können. Unter mehreren Beispielen dieser Art sei auf zwei Pilzgiftstoffe,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amanitin, hingewiesen, die sich in dieser Weise unterscheiden[66]. Der Ladungsunterschied kann weiterhin durch chemisch gebundenes Phosphat, Sulfat oder andere mehrwertige Reste bedingt sein. Nach unseren Analysen kommt zumindest kein unterschiedlicher Phosphatgehalt in Betracht. Auch ein unterschiedlicher Gehalt an Metallen könnte für die verschiedene Beweglichkeit im elektrischen Feld verantwortlich sein. Der Strukturunterschied kann aber auch viel tiefgreifender sein und die Aminosäurezusammensetzung, d. h. die Primärstruktur betreffen. Eine eindeutige Antwort ist hier nur von der chemischen Bausteinanalyse zu erwarten, die bisher allerdings erst an wenigen Beispielen ausgeführt wurde. Verglichen wurden die durch präparative Stärkeelektrophorese oder Chromatographie an DEAE-Sephadex getrennten LDH-Isozyme I–III aus Rattenherz, die deutliche Unterschiede der Zusammensetzung aufweisen. Der stark von I nach III hin abfallende Gehalt an Asparaginsäure kann die Wanderungsunterschiede im elektrischen Feld erklären (Tabelle 7). Zwischen LDH I und II aus Rinderherz ließ sich da gegen kein deutlicher Unterschied feststellen (siehe die Werte in Tabelle 3).

	LDH				
	V	IV	III	II	I
Wanderung zur Anode bei pH = 8,6 [cm]	0	2	4	6	8
Hemmung durch Sulfid [%]	31–37	42–48	47–53	62–78	69–75
Hitzestabilität (Halbwertszeit der Denaturierung bei 50 °C) [min]	3	10	40	ca. 100	fast $\infty$
Optimale Pyruvat-Konzentration [Mol/l]	$1,2 \cdot 10^{-3}$	—	—	—	$0,15 \cdot 10^{-3}$
Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Temp.-Erhöhung um 10 °C	1,5	—	—	—	2,1

Tabelle 6. Zusammenhang zwischen elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit und anderen physikalischen oder chemischen Eigenschaften der fünf multiplen Formen der Lactat-Dehydrogenase beim Säugetier

[61a] Ausführliche Darstellung: *F. W. Schmidt* et al. in *H. U. Bergmeyer*: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962.

[62] *B. Hess* u. *S. I. Walter*, Klin. Wschr. 39, 213 (1961).

[63] *Th. Wieland*, *G. Pfeleiderer* u. *F. Orlanderl*, Biochem. Z. 331, 103 (1959).

[64] *P. W. G. Plagemann*, *K. F. Gregory* u. *F. Wroblewski*, J. biol. Chemistry 235, 2288 (1960).

[65] *P. W. G. Plagemann*, *K. F. Gregory* u. *F. Wroblewski*, Biochem. Z. 334, 37 (1961).

	LDH-Komponente		
	I	II	III
Lysin	95	96	94–95
Arginin	34–35	36	40
Histidin	26	25	25–26
Asparaginsäure	141	136	130
Glutaminsäure	108–109	109	111
Alanin	81	79	81
Glycin	89	89	93
Isoleucin	83	85	83
Leucin	130	131	129
Methionin	33	32	29
Phenylalanin	21	22	26
Prolin	40	45	46
Serin	92	87	89
Threonin	52–53	50	49
Tyrosin	27	26	27
Valin	134	134	131

Tabelle 7. Zusammensetzung der Lactat-Dehydrogenasen I–III aus Rattenherz in Aminosäuremolekülen pro 130 000 g Protein

[66] *Th. Wieland* u. *W. Boehringer*, Liebigs Ann. Chem. 635, 178 (1960).



Was die Molgewichte betrifft, so ist bei den bisher verglichenen Präparaten kein Unterschied gefunden worden. Die Beobachtung, daß viele Isozymgemische in der Ultrazentrifuge einheitlich sedimentieren, würde gleichfalls für ein einheitliches Molgewicht sprechen.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bisher auch noch auf dem Gebiet, welches die Frage 4 betrifft. Mit Sicherheit läßt sich nur sagen, daß sich die LDH-Isozyme V aus allen Rattenorganen elektrophoretisch gleich verhalten und auch dieselbe Sulfithemmbarkeit haben. Trotzdem sind die LDH-Isozyme V aus Skelettmuskel und Leber nicht identisch (siehe Tabelle 4). Vergleiche anderer Isozyme verschiedener Organe konnten bisher noch nicht angestellt werden, sollen aber jetzt nach Auffindung der bequemen und wirksamen chromatographischen Trennung über DEAE-Sephadex in Angriff genommen werden.

### Multiple Formen anderer Enzyme

In den letzten Jahren ist die Zahl der Beobachtungen multipler Formen bei anderen Enzymen stark angestiegen. In manchen Fällen wurden nach elektrophoretischer Trennung mehrere Banden beobachtet, diese aber nicht isoliert oder näher charakterisiert. Im folgenden sollen deshalb nur solche Beispiele behandelt werden, bei denen eingehendere Untersuchungen neue Gesichtspunkte zutage gefördert haben.

Aus dem Tierreich ist eine umfassendere Untersuchung der Heterogenität von Gewebs-Dehydrogenasen der Ratte zu erwähnen. Nach Zonenelektrophorese in Stärkegel wurden die Streifen in Lösungen, die das spezifische Substrat, ein Tetrazoliumsalz, Methylenblau und das spezifische Pyridinnucleotid enthielten, inkubiert. Durch direkte Anfärbung zeigten sich dabei Isozyme der Lactat-, Malat-, Isocitrat-, Glucose-6-phosphat- und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase, wobei je nach Organherkunft verschieden viele Banden auftraten [67].

An der Ribonuclease aus Pankreas, deren Heterogenität schon oben erwähnt wurde, ist neuerdings eine Beobachtung gemacht worden, die auf eine nähere Verwandtschaft dieser Isozyme hindeutet: Aus Mäuse- und Rinderpankreas erhielten *S. R. Dickman*, *G. A. Morell* und *K. M. Trupin* [68] durch Chromatographie an Amberlite IRC-50 drei Komponenten, wenn die Drüsen mit Saccharose- oder Phosphatlösung extrahiert wurden. Die ursprünglich beobachteten zwei Isozyme treten bei der Extraktion mit 0,25 M Schwefelsäure auf. Es stellte sich heraus, daß die zusätzliche, native Komponente, die chromatographisch einheitlich gewonnen wurde, nachträglich durch Behandlung mit Schwefelsäure in die beiden anderen übergeht, und zwar unter Gewinn an Gesamtaktivität, so daß man ihr die Eigenschaften eines Zymogens oder einer durch Hemmstoff modifizierten Ribonuclease zuschreiben kann.

Nach *A. Meister* und Mitarb. [69] besteht auch die aus Schlangengift (*Crotalus adamanteus*) kristallisierte L-

Aminosäure-Oxydase aus zwei Komponenten gleicher Sedimentationsgeschwindigkeit und gleicher spezifischer Aktivität, die elektrophoretisch getrennt werden können. Bei Verarbeitung eines Sammelgiftes trat eine zusätzliche Komponente gleicher Wirkung auf. Dies weist mit Deutlichkeit darauf hin, daß für Vergleiche möglichst einheitliches Ausgangsgewebe verwendet werden sollte. Der Idealfall der Untersuchung genetisch einheitlicher, künstlich gezüchteter Zellen läßt sich bei den heute verfügbaren Kulturmethoden noch nicht verwirklichen.

Etwas bessere Möglichkeiten hat man bei einzelligen Organismen, aus deren Bereich im folgenden einige Beispiele erwähnt seien. *B. G. Malmström* [70] hat schon 1957 durch Zonenelektrophorese und Chromatographie an Austauschern aus Hefe vier Proteine mit Enolasewirkung isoliert. In unserem Labor sind ähnliche Versuche in den letzten Jahren aufgenommen worden, wobei *A. Wörner* [71] durch Elektrophorese auf Membranfolie in Bierhefen fünf Enolase-Isozyme nachgewiesen und quantitativ bestimmt hat. Durch Vereinzelung gewonnene einheitliche Stämme zeigten stets dieselbe Anzahl von Enolase-Komponenten, aber verschiedene Aktivitätsverteilung. Bäckerhefe enthält im Gegensatz dazu nur drei enolase-wirksame Eiweißkomponenten.

Auch die Multiplizität der Hexokinase aus Hefe, die in der bereits zitierten, sehr beachtlichen Untersuchung von *Trayser* und *Colowick* beschrieben wurde [28], ist in einheitlichen Zellkulturen vorhanden.

Bei Bakterien, besonders *E. coli*, ist in den letzten Jahren vom Vorkommen multipler Formen verschiedener Enzyme berichtet worden. So hat man 1957 in *E. coli*-Extrakten mindestens zwei Threonin-Desaminasen (TD) nachgewiesen. Die erste, sogenannte biosynthetische TD ist für die Biosynthese des Isoleucins notwendig, bei der  $\alpha$ -Ketobuttersäure als Baustein benützt wird. Sie läßt sich durch L-Isoleucin hemmen und enthält Pyridoxalphosphat als Coenzym [72]. Die zweite TD, die bereits von *W. A. Wood* und *I. C. Gunsalus* beschrieben wurde [73], benötigt ebenfalls Pyridoxalphosphat, aber zusätzlich Adenosin-triphosphat und Glutathion zur maximalen Aktivität. Sie läßt sich nicht durch Isoleucin hemmen. Hierbei muß man sich wieder die Frage vorlegen, ob die beiden Enzyme noch als multiple Formen anzusprechen sind, da sie in ihrem Coenzymbedarf verschieden zu sein scheinen.

Zweifellos aber dürfen die in neuester Zeit von *Stadtman* und Mitarb. [74] in *E. coli* entdeckten Aspartokinase als Isozyme bezeichnet werden, von denen zwei durch Ammoniumsulfatfällung getrennt werden konnten. Die Phosphorylierung der  $\beta$ -Carboxylgruppe von Asparaginsäure durch Adenosintriphosphat und eine Kinase (Aspartokinase) ist eine Grundreaktion der Biosynthese von Lysin, Threonin und Methionin in *E. coli*.

[69] *D. Wellner* u. *A. Meister*, J. biol. Chemistry 235, 2013 (1960).

[70] *B. G. Malmström*, Arch. Biochem. Biophysics 70, 58 (1957).

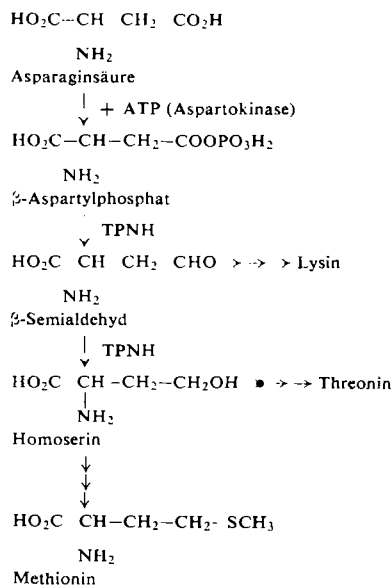
[71] *A. Wörner*, unveröffentlicht.

[72] *H. E. Umbarger* u. *B. Brown*, J. Bacteriol. 73, 105 (1957).

[73] *W. A. Wood* u. *I. C. Gunsalus*, J. biol. Chemistry 181, 171 (1949).

[74] *E. R. Stadtman*, *G. N. Cohen*, *G. Le Bras* u. *H. de Robichon-Szulmajster*, J. biol. Chemistry 236, 2033 (1961).

Diese verläuft, wie das Formelschema zeigt, über zwei gemeinsame Schritte, um sich dann zu verzweigen. Es wurde nun gefunden, daß eine der beiden isolierten Aspartokinasen spezifisch und nicht kompetitiv durch L-Lysin gehemmt wird. Die Bildung desselben Enzyms



wird beim Wachstum von *E. coli* in  $10^{-2}$  M Lysinlösung völlig unterdrückt (Repression). Die zweite Aspartokinase wird durch L-Threonin spezifisch gehemmt. Die biologische Bedeutung dieser Isozyme dürfte darin liegen, daß die spezifische Hemmung durch das jeweilige Endprodukt dessen Überproduktion verhindert (feedback-Steuerung). Für eine analoge Steuerungsfunktion fehlt bei den übrigen hier zusammengestellten Isozymen bisher noch jeder Beweis.

## Schlußbetrachtung

Die heute als sicher erwiesene chemische Differenz zwischen vielen gleichwirkenden Enzymen verschiedener Herkunft wird man als einen Ausdruck der Entwicklung der Organismen anzusehen haben. So wie sich die Lebewesen im Lauf der Geschichte, vielleicht aus einer Urzelle zu der Vielheit der gegenwärtigen Formen differenziert haben, so kann sich auch die Zusammensetzung ihrer Eiweißkörper voneinander entfernt haben. Diese Tatsache war, soweit sie mit sicht- und fühlbaren Konsequenzen verbunden ist, schon lange bekannt, wie man von den  $\gamma$ -Globulinen der Säugetiere weiß, die an verschiedenen Arten gegenseitig Antikörper provozieren und bei unsachgemäßer passiver Schutzimpfung ihre Artverschiedenheit kundtun. Ebenso ist es verständlich, daß die Hämoglobine der vielen bis heute verglichenen Tierarten deutliche Unterschiede aufweisen [75]. Die Erwartung, daß auch hier die Fingerprint-Technik zum scharfen Werkzeug der Unterscheidung werden könnte, wird allerdings gedämpft durch die Er-

[75] H. Neurath u. K. Bailey: The Proteins. Academic Press, New York 1954, Bd. II, S. 317.

gebnisse einer vergleichenden Untersuchung von L. Pauling und Mitarb.[76], die zwischen den Hämoglobinen von Menschen, Gorilla und Schimpansen keine Unterschiede fanden.

Das Hämoglobin zeigt auch Heterogenität, d. h. es läßt sich durch Zonenelektrophorese [77] oder Chromatographie an Amberlite IRC-50 [78, 79] in multiple Formen trennen, was besonders eingehend am Ferrihämoglobincyanid des Menschen untersucht wurde [79]. Dabei konnten regelmäßig zwei Komponenten, A<sub>I</sub> und A<sub>II</sub>, etwa im Verhältnis 1:9 gewonnen werden, die sich chemisch vor allem dadurch unterscheiden, daß A<sub>II</sub> im Gegensatz zu A<sub>I</sub> kein Isoleucin enthält. Auch das foetale Hämoglobin F ließ sich in zwei Komponenten trennen. Beim Myoglobin vom Spermwale, das analytisch [80] und durch Röntgenkristallographie [81] bis auf seine Aminosäuresequenz untersucht wurde, sind fünf Komponenten durch Chromatographie an Amberlite IRC-50 voneinander getrennt worden, die etwa die selbe Aminosäurezusammensetzung haben. Man sollte jedoch beim chemischen Vergleich von Proteinen nicht allein auf die Aminosäure-Summenformel achten; wie A. Akeson und H. Theorell [82] gerade an zwei Myoglobinen aus Pferdemuskel gezeigt haben, bietet nur die sachgemäß ausgeführte Fingerprint-Analyse (oder ein ähnlich wirksames Verfahren) die Gewähr, daß Unterschiede der Primärstrukturen bei Proteinen gleicher Zusammensetzung mit Sicherheit erkannt werden.

Das Vorkommen multipler Formen ist also nicht an die Klasse der enzymatischen Wirkstoffe gebunden, von denen in diesem zusammenfassenden Aufsatz die Rede war. Die lebende Natur bedient sich vielleicht bei viel mehr Proteinen der Aufspaltung in isofunktionelle Einheiten, als man bis heute erkannt hat. Man könnte solche Proteine als „Homoproteine“ bezeichnen. Die Vorstellungen der Genetiker, wonach für die Bildung einer Proteinart ein Gen zuständig sei, bedürfen vielleicht einer Revision, wenn sich die Unterschiede der Bausteinzusammensetzung auch als wesentliche Abweichungen der Aminosäuresequenzen herausstellen sollten. Die Aufklärung solcher Struktur-Unterschiede und eines etwaigen biologischen Sinnes dieser Vielfältigkeit wird ein wichtiges Ziel der künftigen biochemischen Forschung sein.

Eingegangen am 2. November 1961 [A 173]

[76] E. Zuckerkandl, R. T. Jones u. L. Pauling, Proc. Soc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1349 (1960).

[77] H. G. Kunkel u. G. Wallenius, Science (Washington) 122, 288 (1955).

[78] M. Morrison u. J. L. Cook, Science (Washington) 122, 920 (1955).

[79] D. W. Allen, W. A. Schroeder u. J. Balog, J. Amer. chem. Soc. 80, 1628 (1958).

[80] A. B. Edmundson u. C. H. W. Hirs, Nature [London] 190, 663 (1961).

[81] J. C. Kendrew, H. C. Watson, B. E. Strandberg u. E. R. Dickerson sowie D. C. Phillips u. V. C. Shore, Nature (London) 190, 666 (1961).

[82] A. Akeson u. H. Theorell, Arch. Biochem. Biophysics 91, 319 [1960].