

DISSOZIATION DES MIKROSOMALEN ARYLAVIDASE-ALKALISCHEN PHOSPHATASE-KOMPLEXES AUS RATTENNIEREN

R. KLEINE und J. SCHUBERT

Physiologisch-chemisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle/S., Hollystrasse 1, DDR

Received 27 January 1972

The high molecular weight arylamidase-alkaline phosphatase-complex from rat kidney microsomes [1] was carefully dissociated by means of treatment with several hydrolytic enzymes or by acidification. Trypsin, chymotrypsin and pronase cause a selective solubilization of the two enzymes discernible at their different electrophoretic mobility in polyacrylamide gel. The lower migrating zone represents phosphatase, the faster migrating zone shows arylamidase activity (molecular weights 180,000 and 172,000, respectively). Incubation of the complex with papain, lipase, neuraminidase or hyaluronidase and incubation at acid conditions (pH optimum 5.0) in the absence of any enzyme also yields in the appearance of two protein bands. In contrast to the alkaline hydrolases the acid hydrolases, the pH 5-treatment and with a certain degree also the lipase liberate a second arylamidase zone lying in the phosphatase containing zone during polyacrylamide gel electrophoresis. Treatment with SDS and subsequent SDS-polyacrylamide gel electrophoresis also results in a dissociation of the complex, but only in one protein fragment (approx. molecular weight 205,000).

1. Einleitung

Vor Kurzem berichteten wir über die Isolierung und Eigenschaften eines hochmolekularen Arylamidase-Phosphatase-Komplexes aus Rattennierenmikrosomen [1]. Dieser Enzymkomplex lässt sich aus einem mikrosomalen Triton X-100-Extrakt durch Gelfiltration an Sepharose 4 B auf Grund seines hohen Molekulargewichtes ($V_e = V_0$) von den übrigen hydrolytischen Enzymen abtrennen. In vorliegender Arbeit wird gezeigt, dass sich beide Enzyme unter Beibehaltung ihrer Aktivität nach Einwirkung verschiedener hydrolytischer Enzyme bzw. durch nichtenzymatische Behandlung im sauren pH-Bereich diskelektrophoretisch trennen lassen.

2. Material und Methoden

Folgende Enzyme wurden für die Hydrolyseversuche eingesetzt: Trypsin, reinst (Serva, Heidelberg),

Häufig verwendete Abkürzungen:

PAA: Polyacrylamidgel;

SDS : Natriumdodecylsulfat.

Chymotrypsin, reinst (Spofa, Prag), Pronase, reinst (Serva, Heidelberg), Papain, reinst (Serva, Heidelberg), Lipase (Reanal, Budapest), Hyaluronidase (Forschungs-institut für Impfstoffe, Dessau) und Neuraminidase aus Vibrio cholerae (Serva, Heidelberg). Die Inkubationsbedingungen für den Enzymkomplex mit den verschiedenen hydrolytischen Enzymen sind aus der Tabelle 1 ersichtlich.

Die Inkubation erfolgte unter pH-Stat-Bedingungen (Titriator-Titrigraph TTT 1c/SBR 20, Radiometer,

Tabelle 1
Inkubationsbedingungen.

| Enzym | pH | Zusätze |
|---------------|-----|------------------------|
| Trypsin | 8,0 | 5 mM CaCl ₂ |
| Chymotrypsin | 8,0 | 5 mM CaCl ₂ |
| Pronase | 8,0 | keine Zusätze |
| Lipase | 8,5 | 5 mM CaCl ₂ |
| Papain | 6,3 | 2 mM L-Cystein |
| Neuraminidase | 6,5 | keine Zusätze |
| Hyaluronidase | 5,5 | keine Zusätze |

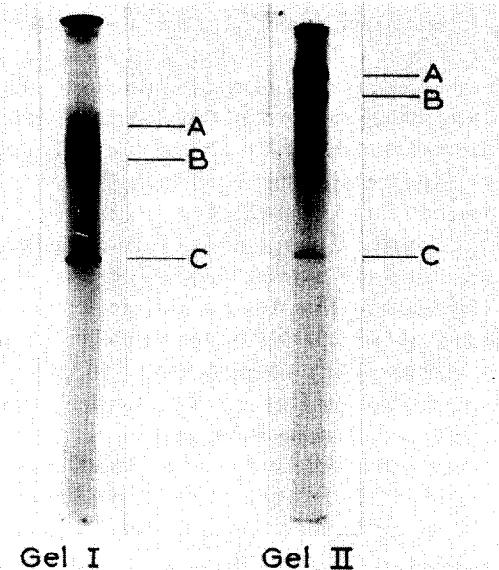


Fig. 1. PAA-Elektrophorese des trypsinbehandelten (Gel I) und des bei pH 5,0 ohne Enzymzusatz inkubierten Enzymkomplexes (sogenannte Säuredissoziation = Gel II) in 7,5%igem Gel bei pH 8,3. Proteinfärbung mit Coomassie G-250. A = alkalische Phosphatase. B = Arylaminidase. C = niedermolekulare Komponente. Der unbehandelte Enzymkomplex dringt mit Ausnahme der niedermolekularen Komponente (= C) nicht ins Gel ein.

Kopenhagen) bei 37° in Vorversuchen zunächst für 10 bis 15 Stunden. Da der gleiche Effekt bereits nach einer einstündigen Inkubation bei 37° eintrat, wurde für alle weiteren Versuche nur 1 Stunde inkubiert. Titrant: 0,1 N NaOH bzw. 0,1 M Essigsäure. Das Verhältnis Enzym zu Enzymkomplex in den Inkubationsansätzen betrug 1:25 bis 1:30. Die Auswertung erfolgte durch analytische PAA-Elektrophorese (Näheres siehe in den Fig. 1 und 2).

Analytische PAA-Elektrophorese: Sie wurde nach den Angaben von Mauer [2] durchgeführt (Nähere Angaben finden sich bei [1]). Die Elektrophorese im SDS-haltigen PAA wurde nach Shapiro [3] durchgeführt. Als Puffersystem wurde jedoch 5 mM Tris-Glycin (pH 8,3), 0,1%ig an SDS, gewählt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach Hedrick und Smith [4].

3. Ergebnisse

Sämtliche eingesetzten Hydrolasen bewirkten eine

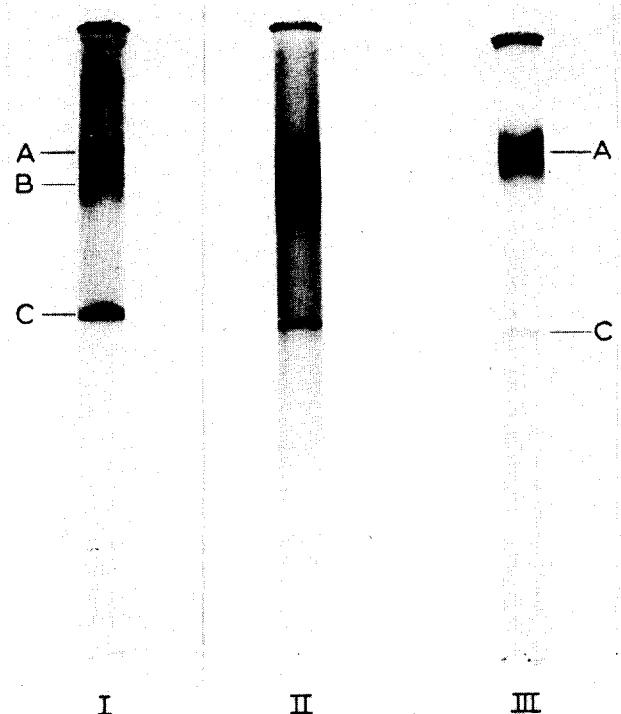


Fig. 2. PAA-Elektrophorese des lipasebehandelten Enzymkomplexes in 5%igem Gel (pH 8,3). I = Proteinfärbung mit Coomasie G-250. II = Arylaminidasanalysen mit L-Leucin- β -naphthylamid als Substrat. III = Test auf alkalische Phosphatase mit α -Naphthylphosphat als Substrat. A, B und C = siehe Legende zu Fig. 1. Ausser B besitzt auch A unter diesen Bedingungen eine geringe Arylaminidaseswirkung.

Solubilisierung der Phosphatase und Arylaminidase aus dem hochmolekularen Enzymkomplex. Als Kriterien dienten die elektrophoretische Mobilität der liberen Enzyme und ihre Aktivität in der PAA-Elektrophorese. Jedoch existieren qualitative Unterschiede. Während durch die Trypsin-, Chymotrypsin- und Pronasebehandlung jeweils nur eine Phosphatase- und Arylaminidasebande unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit aus dem Komplex freigesetzt wurden (siehe Fig. 1, Gel I), tritt nach Inkubation mit Lipase und den anderen Enzymen (siehe Tabelle 1) ausser der einheitlichen Phosphatase- und der schneller wandernden Arylaminidasebande zusätzlich eine zweite, geringer aktive Arylaminidasebande auf, welche die gleiche Lokalisation wie die Phosphatase im PAA besitzt. Wie aus Fig. 1 (Gel II) weiter hervorgeht, lässt sich der gleiche Effekt, die Freisetzung zweier enzymatisch aktiver Proteinbanden, bereits durch Ansäuern

Tabelle 2
Säuredissoziation des Phosphatase-Arylamidase-Komplexes in Abhängigkeit vom pH.

| pH | mg Protein pro ml | Arylamidase <i>v</i> | <i>Q</i> | alkal. Phosphatase <i>v</i> | <i>Q</i> |
|-----|-------------------|-------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| 3,5 | 1,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4,0 | 0,41 | 9,50 | 11,00 | 0 | 0 |
| 4,5 | 0,41 | 17,75 | 20,60 | 2,80 | 1,87 |
| 5,0 | 0,43 | 41,40 | 48,20 | 21,00 | 14,00 |
| 5,5 | 1,00 | 10,20 | 13,90 | 12,20 | 8,15 |
| 6,0 | 3,40 | 1,09 | 1,27 | 3,10 | 2,60 |
| 6,5 | 3,50 | 0,86 | 1,00 | 1,50 | 1,00 |
| 7,0 | 3,50 | 0,86 | 1,00 | 1,50 | 1,00 |
| 7,5 | 3,50 | 0,86 | 1,00 | 1,50 | 1,00 |

v = $\mu\text{Mol Spaltprodukt}/\text{ing Protein}/30 \text{ Min}$; *Q* = Anreicherungsgrad. Inkubation erfolgte beim jeweiligen pH für 30 Min bei 37°. Zur Protein 5'-und Aktivitätsbestimmung (Arylamidase bei pH 7,5; alkalische Phosphatase bei pH 9,5) diente der durch Zentrifugation gewonnene klare Überstand.

des Enzymkomplexes auf schwach saure pH-Werte erzielen mit dem Unterschied, dass die elektrophoretische Mobilität der Proteinbanden A und B deutlich vermindert ist. Die quantitative Vervolgung dieser pH-abhängigen Säuredissoziation des Enzymkomplexes ergab, dass beide Enzyme bei pH 5,0 optimal solubilisiert werden (siehe Tabelle 2).

Da hierbei mit zunehmender Ansäuerung des Komplexes die Freisetzung löslicher, enzymatisch inaktiver Proteine kontinuierlich abnimmt, führt der Säuredissoziationsschritt gleichzeitig zu einer signifikanten Anreicherung der zwei freigesetzten Enzyme (ca. 50- bzw. ca. 15-fach für die Arylamidase bzw. alkalische Phosphatase), die sich in der löslichen Phase befinden. Eine Abschätzung des Molekulargewichtes der durch enzymatische Behandlung solubilisierten Enzyme wurde aus ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in der PAA-Elektrophorese verschiedener Acrylamidkonzentrationen (5, 7,5 und 10%) vorgenommen. Wie aus Fig. 3 hervorgeht, wurden nach diesem Verfahren Molekulargewichte von 172 000 für die Arylamidase und 180 000 für die alkalische Phosphatase erhalten. Diese eng beieinander liegenden Molekulargewichte sind der Grund für die Nichtabtrennbarkeit beider Enzyme mittels Sepharose 6 B-Gelfiltration. Die in dieser Richtung noch nicht abgeschlossenen

gelchromatographischen Versuche haben weiter ergeben, dass im Falle der Trypsinbehandlung nur annähernd 25% des Enzymkomplexproteins solubilisiert und als einheitlicher Peak mit Arylamidase- und Phosphataseaktivität deutlich nach dem Enzymkomplex ($V_e = V_0$) im Säuleneluat erscheinen. Die sowohl im unbehandelten wie im behandelten (siehe Fig. 1 und 2) Enzymkomplex stets vorhandene schnellwandernde Proteinbande war frei von Phosphatase- oder Arylamidaseaktivität. Ihre Anfärbbarkeit in den mit chromogenen Substraten inkubierten Gelen beruht auf einer unspezifischen Adsorption mit dem verwendeten Kupplungsfarbstoff Fast blue B (in Kontrollversuchen ohne Substrat ebenfalls anfärbar).

Abschließende Versuche mit SDS als Dissoziationsmittel oligomerer Proteine [3, 6] sollten zeigen, ob die schnellwandernde Komponente eine Subunit der alkalischen Phosphatase und/oder Arylamidase darstellt. Zu diesem Zweck wurde der native und der mit Trypsin inkubierte Enzymkomplex nach Shapiro [3] behandelt und elektrophoretisiert. Weder der native noch der trypsinisierte Enzymkomplex lassen in der SDS-PAA-Elektrophorese eine deutliche Zunahme der schnellwandernden Komponente erkennen. Dagegen bewirkt die SDS-Inkubation (mit oder ohne β -Mercaptoäthanol) sowohl beim nativen wie beim trypsinisierten Enzymkomplex eine Dissoziation in eine Proteinbande, welche im Bereich des Serumalbumintrimer (MG = 200 000 bis 210 000) liegt. Das Molekulargewicht der schnellwandernden Komponente liegt unter diesen Bedingungen bei 68 000.

3. Diskussion

Über das Vorkommen hochmolekularer Enzymkomplexe zwischen Arylamidase und alkalischer Phosphatase liegen außer einer kurzen Mitteilung über eine durch Sialinsäure bedingte Assoziation beider Enzyme im Kückenplasma [7] bislang keine Befunde vor. Die bisher aus Organen wie Niere, Leber oder Dünndarm isolierten Phosphatasen und Arylamidasen wurden ausnahmslos durch vorhergehende Autolyse [8, 9, 10] oder Heterolyse [11, 12] voneinander getrennt. Diese im Molekulargewichtsbereich von 136 000 bis 128 000 ([13, 14] für die Arylamidase) bzw. 150 000 bis 180 000 ([15] für die alkalische Phosphatase) liegenden Enzyme stellen daher höchstwahrscheinlich nicht die physiologisch wirksame Form dar.

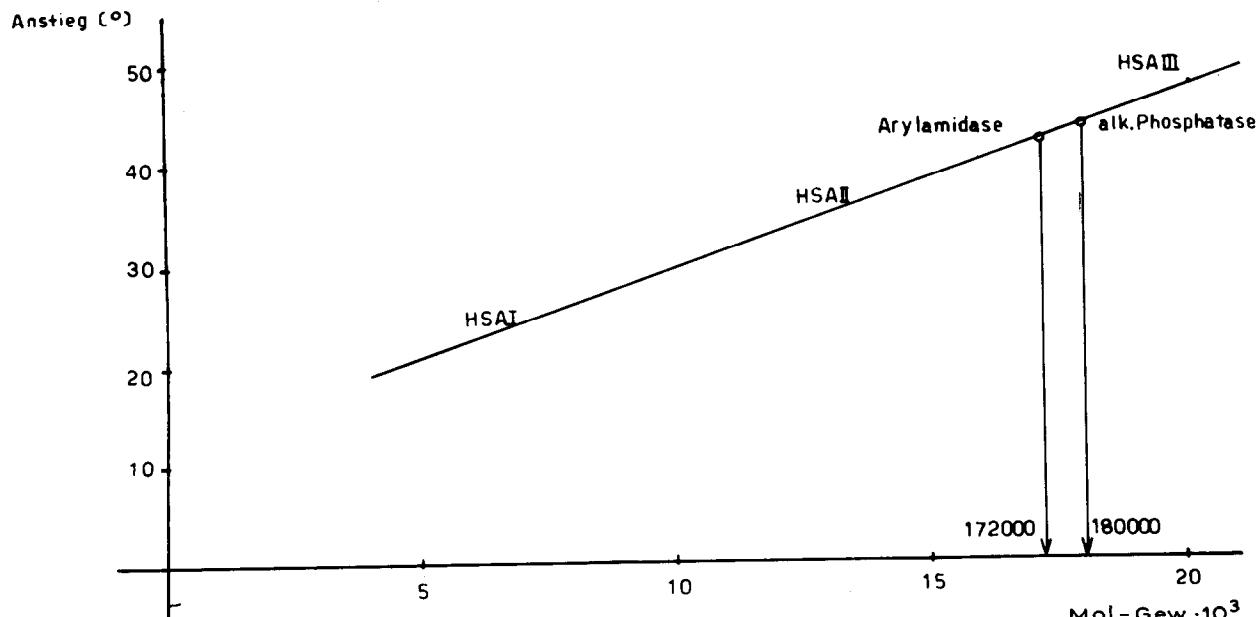


Fig.3. Bestimmung des Molekulargewichtes der durch Lipasebehandlung aus dem Enzymkomplex freigesetzten Arylamidase und alkalischen Phosphatase nach Hedrick und Smith [4]. HSA_I, HSA_{II} und HSA_{III} = Humanserumalbumin-Monomer-, Dimer und -Trimer.

Dagegen dürfte der in vorliegender Untersuchung eingesetzte hochmolekulare Enzymkomplex der physiologischen Form am nächsten kommen. Da sich dieser Enzymkomplex sowohl durch Inkubation mit hydrolytischen Enzymen als auch durch Ansäuern auf pH 5,0 schonend in Phosphatase und Arylamidase auftrennen lässt, sind zur Aufrechterhaltung seiner Konformation offensichtlich keine kovalenten sondern nichtkovalente Bindungen wie elektrostatische oder/und hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich. In diese Richtung weisen auch die Ergebnisse mit SDS hin.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Hanson danken wir für das Interesse an vorliegender Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Literatur

- [1] R. Kleine und J. Schubert, Acta biol. med. germ. 28 (1972) 269.

- [2] H.R. Maurer, Diskelektrophorese (W. de Gruyter, Berlin, 1968).
- [3] A.L. Shapiro, E. Vinuela and J.V. Maizel, Jr., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28 (1967) 815.
- [4] J.L. Hedrick and A.J. Smith, Arch. Biochem. Biophys. 126 (1968) 155.
- [5] D. Glässer und R. Kleine, Pharmazie 17 (1962) 32.
- [6] K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406.
- [7] G.R.J. Law, Science 156 (1967) 1106.
- [8] F. Binkley, V. Alexander, F. Bell and C. Lea, J. Biol. Chem. 228 (1957) 559.
- [9] A.T. Matheson, S. Bjerre and C.S. Hanes, Can. J. Biochem. 41 (1963) 1741.
- [10] H. Hanson, H.-J. Hütter, H.-G. Mannsfeldt, K. Kretschmer und C. Sohr, Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 680.
- [11] F. Binkley, F. Leibach and N. King, Arch. Biochem. Biophys. 128 (1968) 397.
- [12] P. Emmelot and A. Visser, Biochim. Biophys. Acta 241 (1971) 273.
- [13] A.J. Kenny, S.G. George and S.G.R. Aparicio, Biochem. J. 115 (1969) 18p.
- [14] H. Wacker, P. Lehky and E. Stein, Experientia 26 (1970) 688.
- [15] P.J. Butterworth, Biochem. J. 107 (1968) 467.