

## AGGREGATIONSFORMEN DER RINDERLEBER-KATALASE

W.DIEZEL, St.LIEBE, G.KOPPERSCHLÄGER und E.HOFMANN

*Physiologisch-chemisches Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig, DDR*

Received 1 January 1970

Bovine liver catalase is separated into several distinct bands by electrophoresis in a linear concentration gradient of polyacrylamide. Apparently, disc electrophoresis under these conditions leads to a series of enzymatic active forms of catalase. Their molecular weights are: 248,000; 295,000; 368,000; 486,000; 705,000 respectively. Density gradient centrifugation separates catalase into two components with molecular weights of 252,000 and 316,000. The observed differences in molecular weight distribution between gel-electrophoresis and density gradient centrifugation are discussed.

### 1. Einleitung

Das Molekulargewicht der Rinderleberkatalase liegt zwischen 240 000 und 250 000 [1, 2]. Durch Säureeinwirkung [3–5] und Guanidin-HCl [2, 4] läßt sich das Molekül in Einheiten von etwa 120 000 zerlegen. Na-Dodecylsulfat, Succinylierung, alkalisches Milieu sowie Guanidin-HCl mit Mercaptoäthanolzusatz führt zu einer Spaltung in Subeinheiten mit einem MG von 60 000 bis 70 000 [2, 4, 5]. Es wird übereinstimmend angenommen, daß das Katalasemolekül aus vier identischen Subeinheiten aufgebaut ist [1–6]. Unterstützt wird diese Annahme durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, die eine deutliche Vierteilung des Enzymkristalls zeigten [2]. Ein ähnliches molekulares Verhalten zeigt auch Katalase aus menschlichen Erythrozyten [7]. Heidrich [8] konnte durch DEAE-Chromatographie und Polyacrylamidgel (PAA)-Elektrophorese in verschiedenen kommerziellen Katalasepräparaten bis zu fünf Katalaseformen nebeneinander nachweisen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Problem multipler Formen diese Enzyms. Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der PAA-Elektrophorese [9] und der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ergaben, daß die multiplen Katalaseformen aus Rinderleber als verschiedene Aggregationszustände des gleichen Grundmoleküls anzusehen sind.

### 2. Material und methoden

Rinderleberkatalase wurde von der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim, die für die PAA-Elektrophorese benötigten Reagenzien von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen. Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der PAA-Elektrophorese wurde, wie früher mitgeteilt, durchgeführt [9]. Ein Konzentrierungseffekt des Proteins zu Beginn der Elektrophorese wurde nach dem Prinzip von Ornstein [10] erreicht, indem das Enzym vor der Auftragung gegen Phosphatpuffer geringer Ionenstärke (pH 7,1 0,025 M) dialysiert, mit Saccharose versetzt und zwischen Gel und oberem Elektrodenpuffer unterschichtet wurde. Bei der Elektrophorese ohne Konzentrierungseffekt verwendeten wir für Gel und Elektrodenraum einen Phosphatpuffer mit gleicher Ionenstärke. Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau [11], der enzymatische Nachweis nach Thorup [12]. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde nach der Methode von Martin und Ames [13] mit einer Ultrazentrifuge vom Typ Spinco L 2-65 B durchgeführt. Die Zentrifugationszeit betrug 7 Stunden bei 40 000 Upm und + 5°C. Die Messung der Aktivitätsverteilung erfolgte nach den Angaben von Bergmeyer [14]. Die Proteinverteilung wurde durch Elution der Gradienten über ein LKB-Uvicord-System ermittelt. Die analytische Ultrazentrifugierung wurde mit einem Gerät vom Typ U 60 L der Fa. Phywe, Göttingen, durchgeführt.

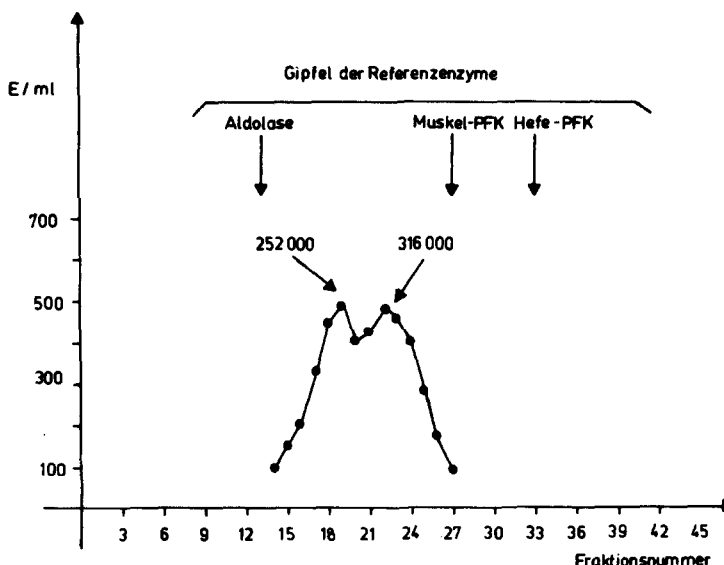


Abb. 1. Sedimentationsmuster von Rinderleber-Katalase im Dichtegradienten. 5–20% Saccharose in 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer Aktivitätsbestimmung nach [14].

Table 1  
Molekulargewichte der verschiedenen Katalaseformen.  $s$  = Berechnete Standardabweichung von durchschnittlich 4–6 Versuchen.

Ektrophorese	Dichtegradient
$\text{MG} \pm s \times 10^{-3}$	$\text{MG} \pm s \times 10^{-3}$
$248 \pm 13$	$252 \pm 17$
$295 \pm 11$	$316 \pm 22$
$368 \pm 20$	
$486 \pm 22$	
705	

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Rinderleberkatalase läßt sich durch Dichtegradientenzentrifugation und durch PAA-Elektrophorese unter Verwendung eines Gelgradienten im homogenen Puffersystem in zwei enzymatisch aktive Einheiten auftrennen (Abb. 1 und Abb. 2a). Molekulargewichtsbestimmungen ergaben für die kleinere der beiden Ein-

heiten im Dichtegradienten Werte von 252 000 und in der PAA-Elektrophorese von 248 000. Dieses Molekulargewicht stimmt gut mit den in der Literatur für Katalase angegebenen Werten überein. Für die andere Einheit ermittelten wir ein Molekulargewicht von 316 000 bzw 295 000. Diese Molekülgröße ist für Katalase bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Wird die PAA-Elektrophorese unter Ausnutzung des "Konzentrierungseffektes" durchgeführt, lassen sich bei Verwendung des gleichen Enzymmaterials fünf Banden nebeneinander nachweisen, die alle enzymatische Aktivität besitzen (Abb. 1b und 2c). Diese Beobachtung zeigt große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen von Heidrich [8] an Rinderleberkatalase und Cantz und Mitarb. [15] an Katalase aus menschlichen Erythrozyten. Die Autoren konnten nachweisen, daß die verschiedenen Katalaseeinheiten keine Isoenzyme sind. Es werden verschiedene Conformationzustände des gleichen Conformers diskutiert. Die in unserem elektrophoretischen PAA-Trennsystem [9] nachgewiesenen Banden (Abb. 2) repräsentieren Katalaseformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten. In diesem System (Gelkonzentrationsgradient 3–20%) werden Proteine auf Grund des unterschiedlichen Porendurchmessers des Gels nach ihren Molekulargewichten ge-

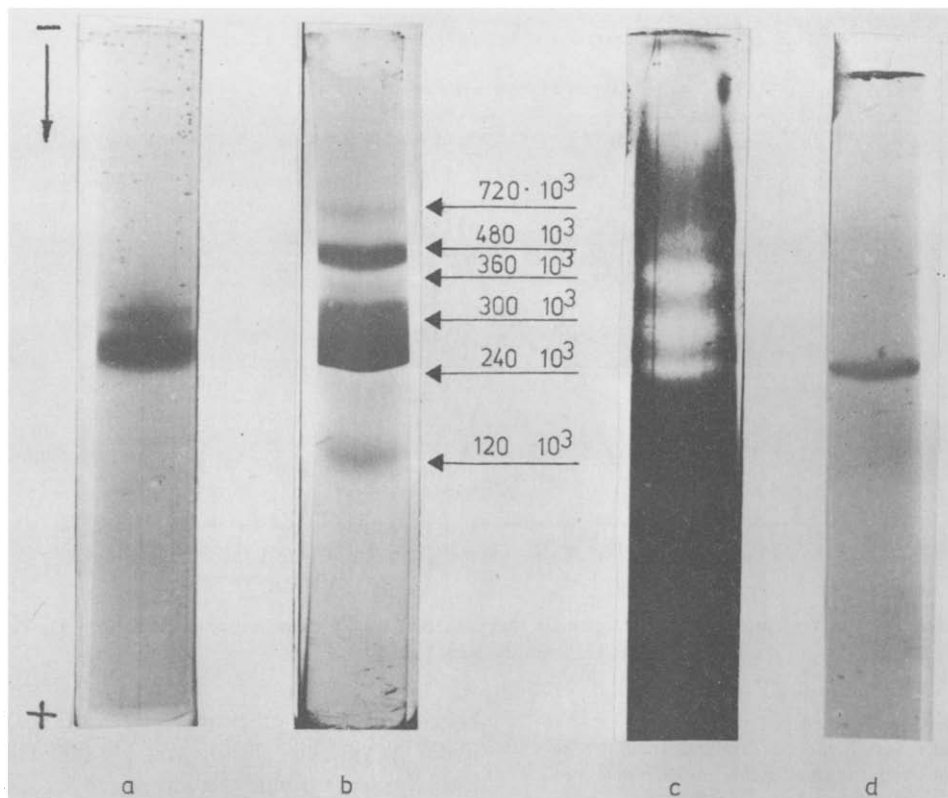


Abb. 2. PAA-Gelelektrophorese von Rinderleber-Katalase (Gelkonzentrationsgradienten 3–20%). a) Kontinuierliches Puffersystem (ohne Konzentrierung): Trengel- und Elektrodenpuffer: K-Phosphat pH 8,0 0,025 M. Elektrophorese: 20°C, 100 V, 5 mA/Röhrchen, 20 Stunden. b) Proteinfärbung [11]. Diskontinuierliches Puffersystem (mit Konzentrierung): Trengel-Puffer: Tris-HCl pH 8,9, Elektroden-Puffer: Tris-Glycin pH 8,3. Elektrophorese: 20°C, 300 V, 5 mM/Röhrchen, 6 Stunden. Proteinfärbung [11]. c) Experimentelle Bedingungen wie bei b. Enzymatische Anfärbung [12]. d) Experimentelle Bedingungen wie bei b. 2stündige Dialyse bei pH 3,0, 2stündige Redialyse bei pH 7,0.

trennt. Es werden Katalaseformen mit Molekulargewichten von 248 000–705 000 erhalten (tabelle 1). Diese Molekulargewichtsverteilung ließ uns vermuten, daß diese fünf Katalaseformen Polymere einer Grundeinheit sein könnten. Zur Prüfung dieser Annahme wurden die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Fraktionen 17–24 (Abb. 1), die Katalasemoleküle von 240–316 000 Daltons enthielten, konzentriert und anschließend diskelektrophoretisch getrennt. Das erhaltene Bandenspektrum entspricht der Abb. 2b: 240 000, 300 000, 360 000, 480 000 und 720 000. Diese beweist, daß eine Aggregation und eine Umverteilung des Molekulargewichtes im Verlauf der Elektrophorese eingetreten ist. Säureeinwirkung führt zu

einer Aufspaltung des Enzyms in Untereinheiten [3]. Nach 15stündiger Dialyse bei pH 3,0 und anschließender Dichtegradientenzentrifugation entstanden Bruchstücke von 60 000 und 20 000. Dies zeigte die Bestimmung der Proteinverteilung im Dichtegradienten (Abb. 3). Die Fraktionen 3–15 wurden gesammelt, konzentriert und gegen pH 7,0 redialysiert. Nach dieser Aufbereitung konnten in der Diskelektrophorese mit Konzentrierungseffekt zwei Banden von 60 000 und 240 000 dargestellt werden. Nach kürzerer Dialyse gegen pH 3,0 (2 Stunden) und Redialyse bei pH 7,0 fanden wir in der Diskelektrophorese mit Konzentrierungseffekt nur eine Bande mit einem Molekulargewicht von 240 000 (Abb. 1d). In Übereinstimmung

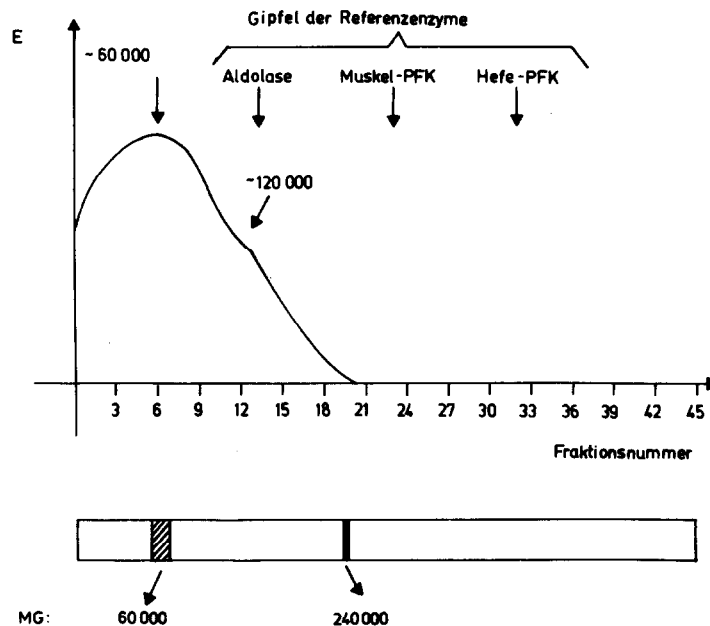


Abb. 3: Sedimentationsmuster und Elektrophorese von säuredenaturierter Katalase. Sedimentation: 1 mg Rinderleber-Katalase, 15 Stunden gegen 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 3 dialysiert. Dichtegradient 5–20% Saccharose in 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 3. Elektrophorese: Fraktionen 3–15 des Dichtegradienten 2 Stunden gegen 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7,0 redialysiert. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 2a.

mit Samejima und Yang [3] nehmen wir an, daß die bei kurzzeitiger Säureeinwirkung entstehenden Katalasesubeinheiten von vorwiegend 120 000 bei Redialyse gegen pH 7,0 zu einem Molekül von 240 000 reaggregieren. Die Einheit mit 60 000 Dalton hingegen scheint unter diesen Bedingungen keine Reaggregation zu zeigen. Die Ergebnisse zeigen, daß die in dieser Arbeit nachgewiesenen Katalaseformen unterschiedlichen Molekulargewichtes anscheinend aus einer einheitlichen Molekülgrundeinheit aufgebaut sind. Es lassen sich sowohl Oligomere des Molekulargewichtes von 240 000 nachweisen, als auch Zwischenformen, die sich im Molekulargewicht um 60 000 unterscheiden. Die aggregation der Rinderleberkatalase ist demnach folgendermaßen zu formulieren:



Eine genaue Erklärung für die Bildung dieser verschiedenen oligomeren Katalaseformen im Verlauf der Disklektrophorese mit Konzentrierungseffekt kann vorerst

nicht gegeben werden. Möglicherweise ist die Bildung der höheren Aggregate auf die Enzymkonzentrierung sowie auf die während des Konzentrierungsvorganges einwirkenden pH- und Ioneneinflüsse zu Beginn der Elektrophorese zurückzuführen. Bei längerer Elektrophorese (20 Std.) kommt es wieder zu einer Deaggregation. Aus dem Verhalten der renaturierten gegenüber der nativen Katalase (Abb. 2b und 2d) ist zu erkennen, daß das Reaggregationsvermögen des renaturierten Enzyms über die Form von 240 000 hinaus anscheinend verloren gegangen ist. Ein prinzipiell gleiches Verhalten zeigt auch die Rinderleberkatalase der Fa. Reanal, Ungarn. Jedoch ist hier die Tendenz zur Oligomerbildung geringer. Vielleicht haben Art der Präparation und Alter einen Einfluß auf das Ausmaß der Aggregation des Enzyms. Die Dichtegradientenzentrifugation und die PAA-Elektrophorese (Abb. 1 und 2a) zeigen, daß auch native Katalase sehr wahrscheinlich aus zwei Molekülspezies besteht. In der analytischen Ultrazentrifuge können wir in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Sund et al. [2] nur eine Fraktion nachwei-

sen (10,4 S, 4,5 mg Protein/ml, 20°C). Möglicherweise werden die beiden Enzymformen in der analytischen Ultrazentrifuge nicht ausreichend getrennt, so daß die beiden Formen mittels Schlierenoptik nicht nachweisbar werden.

### Literaturverzeichnis

- [1] J.B.Summer und H.Gralen, Science 88 (1938) 33.
- [2] H.Sund, K.Weber und E.Mölbart, European J. Biochem. 1 (1967) 400.
- [3] T.Samejima und J.T.Yang, J. Biol. Chem. 238 (1963) 3256.
- [4] H.Sund, Angew. Chem. 79 (1967) 423.
- [5] K.Weber und H.Sund, Angew. Chem. 77 (1965) 621.
- [6] C.Tanford und R.Lovrien, J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 1892.
- [7] V.L.Shpitzberg, Biofizika 11 (1966) 766.
- [8] H.G.Heidrich, Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 873.
- [9] G.Kopperschlager, W.Diezel, B.Bierwagen und E.Hofmann, FEBS Letters 5 (1969) 221.
- [10] L.Ornstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 321.
- [11] T.S.Meyer und B.L.Lamberts, Biochim. Biophys. Acta 107 (1965) 144.
- [12] O.A.Thorup, W.B.Strole und B.S.Leavell, J. Lab. Clin. Med. 58 (1961) 122.
- [13] R.G.Martin und B.N.Ames, J. Biol. Chem. 236 (1961) 1372.
- [14] H.U.Bergmeyer, Biochem. Z. 327 (1955) 255.
- [15] M.Cantz, St.Mörkofer-Zwez, E.Bossi, H.Kaufmann und J.P.von Wartburg, Experientia 24 (1968) 119.