

CHROM. 5264

Aktivitätsbestimmung der Purinnukleosid-Phosphorylase* aus Rattenhirn durch Produktauftrennung an Kationenaustauschern

Eine Zusammenstellung von Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Purinnukleosid-spaltenden Enzymen findet sich in Lit. 1. Diese Enzyme können Hydro-lasen oder Ribosyltransferasen sein, wobei eine Trennung der Gruppen oft nicht möglich ist. Ihr Nachweis basiert auf papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionsprodukte^{2,3}, reduktometrischen Verfahren zum Nachweis der Zuckerkomponente^{4,5}, differentialspektrophotometrischen Methoden⁶⁻⁸ und auf mikrobiologischer Bestimmung von Desoxyribonukleosiden⁹.

Bei unseren Untersuchungen der Purinnukleosid-Phosphorylase (PNP) und ihrer Substratspezifität in Hirnen stiessen wir bei obengenannten Methoden auf Schwierigkeiten, da die PNP des Rattenhirns nur Guanosin und Inosin, nicht aber Adenosin und Xanthosin umsetzt. Für Inosin als Substrat würde sich ein differentialspektrophotometrisches Verfahren anwenden lassen. Mit dem Substrat Guanosin ist das jedoch nicht ohne ein gekoppeltes Testsystem, etwa unter Zusatz gereinigter Guanin-Aminohydrolase, möglich. Wir erarbeiteten deshalb eine Testmethode, die auf einer chromatographischen Trennung des Inkubationsansatzes am Kationenaustauscher Dowex 50 W X8 mit diskontinuierlichem HCl-Gradienten beruht. Das Prinzip war dabei eine substanzbedingte optimale Verkürzung des Elutionsschemas. Das Verfahren wird im folgenden beschrieben und hinsichtlich seiner universellen Anwendbarkeit diskutiert.

Die Homogenate von Hirnen, Hirnarealen und Hirn-Zellfraktionen als Enzymquellen wurden in physiologischer NaCl-Lösung bereitet. Die Testansätze enthielten bei pH 7.4 1 μ Mol Guanosin, 50 μ Mol Phosphat und 0.2-1 mg Gesamteiweiss obiger Präparationen pro ml. Von dieser Mischung wurden 5 ml 20 Min. bei 37° inkubiert, danach mit 1 ml 20%-iger HClO₄ versetzt und zentrifugiert. Zu 5 ml des eiweissfreien Überstandes wurden 2 ml 2 N KOH gegeben. Nach 10 Min. wurde der Perchlorat-Niederschlag abzentrifugiert. Parallel wurde ein Blindwert gleicher Zusammensetzung, aber ohne Inkubation angesetzt. Von den zuletzt erhaltenen Überständen wurden 6 ml zur Chromatographie verwandt. Dieser Überstand muss wegen der schlechten Löslichkeit von Guanin im Neutralbereich und wegen des verwendeten Austauschers schwach sauer sein (pH 3-5). Zur Chromatographie wurden Glassäulen (0.8 cm Innendurchmesser und 27 cm Länge) verwendet. Die Füllhöhe mit Dowex 50 W X8 (200-400 mesh, H⁺-Form) betrug ca. 22 cm, die Durchflussgeschwindigkeit 120 ml/h. Die Eluate wurden bei 260 nm registriert und in 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen der einzelnen Peaks wurden anschliessend gepoolt, im jeweiligen Absorptionsmaximum spektroskopisch ausgewertet und mit dem Blindansatz verrechnet. Beispiele der Guanosinspaltung durch Hirnpräparationen zeigt Fig. 1. Nach Fig. 1 tritt in den Arealhomogenaten eine zusätzliche Spaltung des durch die PNP gebildeten Guanins zu Xanthin durch endogene, zerebrale Guanin-Aminohydrolase auf. Bestimmt man deren Aktivität in einem parallelen Ansatz über die Ammoniakfreisetzung, so sind die gefundenen NH₃-Mengen und das chromatogra-

* Purinnukleosid: Orthophosphat-Ribosyltransferase, EC 2.4.2.1.

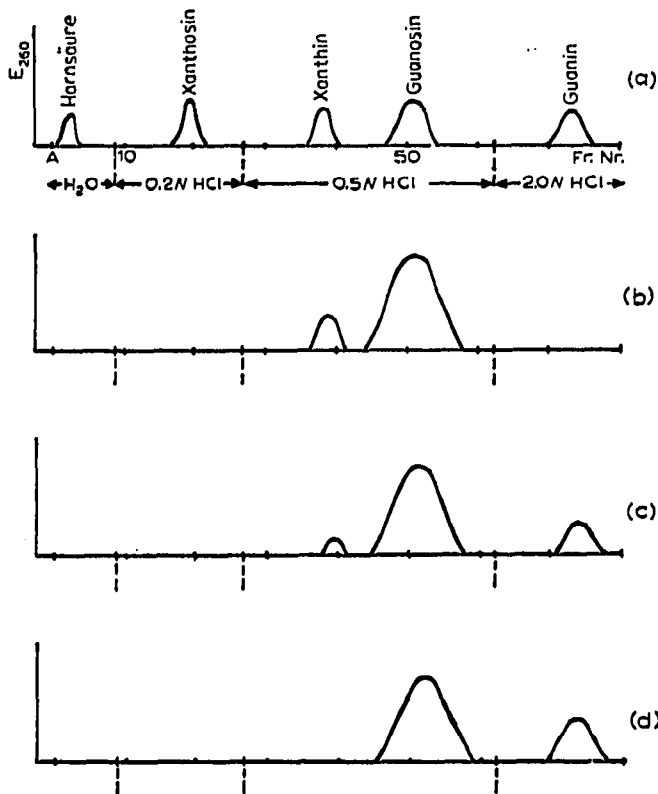


Fig. 1. Chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte der Guanosinspaltung durch Rattenhirnpräparationen. Bedeutung der Kurvenzüge: (a) Chromatogramm der Modellsubstanzen; (b) Guanosinspaltung mit Kortexhomogenaten; (c) Guanosinspaltung mit Zerebellumhomogenaten; (d) Guanosinspaltung mit PNP-Präparation aus Gesamthirn-Hyaloplasma (frei von Guanin-Aminohydrolase).

phisch bestimmte Xanthin äquivalent. Die wahre Aktivität der PNP in Guanin-Aminohydrolase-haltigen Ansätzen errechnet sich also aus der Summe von Guanin und Xanthin. Das Xanthin kann nur auf dem Wege Guanosin \rightarrow Guanin \rightarrow Xanthin entstehen, da Xanthosin durch die PNP des Hirns nicht gespalten wird¹⁰. Die Maximalaktivitäten der PNP im Gesamthirnhomogenat von Ratten (Alter 100 Tage) wurden mit $12.2 \pm 3.9 \mu\text{Mol}$ Guanosinspaltung pro g Homogenateiweiss und pro Min. bei 37° ermittelt ($n = 10$). Mit Inosin als Substrat liegen die PNP-Aktivitäten *ca.* 30% niedriger. Hier entsteht Hypoxanthin als Endprodukt. Dabei kann das Elutionsschema wesentlich vereinfacht werden (Fig. 2).

Durch die Einwirkung von Hirnhomogenaten auf Guanosin und Inosin entstand unter den verwendeten Inkubationsbedingungen in keinem Falle das Endprodukt Harnsäure, wodurch die vernachlässigbar geringen Aktivitäten zerebraler Xanthinoxidase bestätigt werden¹¹. Mit der beschriebenen Methode und unserer derzeitigen Verfahrenstechnik liegt die untere quantitative Nachweisgrenze pro Nukleoverbindung bei *ca.* $0.05 \mu\text{Mol}$. Bei geringen Enzymaktivitäten im Untersuchungsmaterial oder bei kinetischen Untersuchungen müssen die Auftragsmengen entsprechend variiert werden. Nach dem Prinzip optimal möglicher Verkürzung und Vereinfachung der Elutionsschemata kann das beschriebene Verfahren für alle Aktivitätsbestimmungen von Nukleosid- und Nukleobasen-abbauenden Enzymen einge-

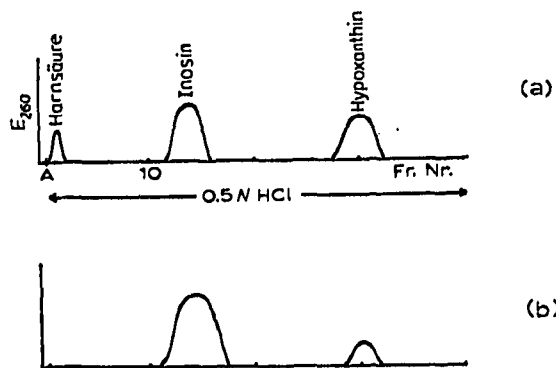


Fig. 2. Chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte aus der Spaltung von Inosin durch Gesamthirnhomogenat. Bedeutung der Kurvenzüge: (a) Modellsubstanzen; (b) Substrat Inosin.

setzt werden. Die Methode übertrifft papierchromatographische Verfahren sowohl hinsichtlich des Zeitaufwandes, als auch der Genauigkeit. Sie ist gegenüber differentialspektrophotometrischen Verfahren exakter und universeller anwendbar, was auch im Vergleich mit Reduktionsproben zutrifft.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft und Technik der D.D.R. angefertigt.

*Klinik für Psychiatrie und
Neurologie "Hans Berger" der
Friedrich-Schiller-Universität
Jena (D.D.R.)*

H. KLUGE
W. HARTMANN
W. ZAHLTEN
U. RING

- 1 Hoppe-Seyler/Thierfelder, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., VI. Band/Teil B, Enzyme, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 1278ff.
- 2 W. S. MAC NUTT, *Biochem. J.*, 50 (1952) 384.
- 3 J. L. OTT UND C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 69 (1957) 264.
- 4 L. A. MANSON UND J. O. LAMPEN, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 95.
- 5 W. S. BECK UND M. LEVIN, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 702.
- 6 H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 429.
- 7 C. E. CARTER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1508.
- 8 B. K. KIM, S. CHA UND R. E. PARKS, JR., *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1771.
- 9 E. HOFF-JÖRGENSEN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 400.
- 10 H. KLUGE, W. HARTMANN, W. ZAHLTEN UND V. WIECZOREK, in Vorbereitung.
- 11 G. G. VILLELA, *Experientia*, 24 (1968) 1101.

Eingegangen am 19. Januar 1971