

# Zonen-Elektrophorese von Aminopeptidasen in Stärkegel

Von

**E. Wintersberger und H. Tuppy**

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 28. März 1960)

Aminopeptidasen, die im normalen menschlichen Blutserum, im Serum schwangerer Frauen und im Serum leberkranker Patienten vorkommen, lassen sich mit Hilfe der Elektrophorese in Stärkegel voneinander trennen und unterscheiden. Zu ihrem Nachweis im Gel eignet sich eine Modifikation von Gomoris histochemischer Aminopeptidase-Reaktion.

Die von *Smithies*<sup>1, 2</sup> beschriebene Methode der Zonenelektrophorese von Serumproteinen in Stärkegel zeichnet sich durch eine außerordentliche Trennschärfe aus. Sie wurde in den letzten Jahren mit Erfolg nicht nur zur Untersuchung von Seren, sondern auch von anderen Proteingemischen, Enzymen, Hormonen und Gewebsextrakten, herangezogen<sup>3, 4</sup>.

Im folgenden berichten wir über die Anwendung der Stärkegel-Elektrophorese zur Trennung und Unterscheidung verschiedener Amino-peptidasen, vor allem solcher, die im menschlichen Serum vorkommen. Serum besitzt eine beträchtliche Aminopeptidase-Wirksamkeit<sup>5</sup>. Während der Schwangerschaft erfährt der Aminopeptidasespiegel eine bedeutende Erhöhung<sup>6</sup>, die — wenigstens zum Teil — auf das Auftreten eines zusätzlichen Ferments zurückzuführen ist. Diese neuauftretende Aminopeptidase ist durch ihre Fähigkeit, Cystinylpeptide zu hydrolysieren, gekennzeichnet<sup>6</sup> und mit der erstmals vom *Fekete*<sup>7</sup> im Schwan-

<sup>1</sup> *O. Smithies*, Biochem. J. **61**, 629 (1955).

<sup>2</sup> *O. Smithies*, Adv. Prot. Chem. **14**, 65 (1959).

<sup>3</sup> *R. L. Hunter* und *C. L. Markert*, Science [New York] **125**, 1249 (1957).

<sup>4</sup> *J. de Grouchy*, Rev. franç. études clin. biol. **3**, 881 (1958).

<sup>5</sup> *M. N. Green*, *K. Tsou*, *R. Bressler* und *A. Seligman*, Arch. Biochem. Biophys. **57**, 458 (1955).

<sup>6</sup> *H. Tuppy* und *H. Nesvadba*, Mh. Chem. **88**, 977 (1957).

<sup>7</sup> *K. Fekete*, Endokrinol. **7**, 1 (1930).

gerenserum gefundenen, das Hypophysenhinterlappen-Hormon Oxytocin spaltenden „Serum-Oxytocinase“ identisch<sup>8</sup>.

Zur Auffindung der Amino-peptidasen auf den Stärkegel-Streifen bedienten wir uns einer spezifischen und empfindlichen Methode, die auf *Gomori*'s histochemischen Amino-peptidase-Nachweis<sup>9</sup> zurückgeht. Nach *Gomori* werden Gewebeschnitte mit einer Lösung inkubiert, die ein Aminosäure- $\beta$ -naphthylamid als Enzymsubstrat und ein Diazoniumsalz enthält; das  $\beta$ -Naphthylamin, das aus dem Substrat unter der Einwirkung der Amino-peptidase freigesetzt wird, kuppelt mit dem Diazoniumsalz zu einem unlöslichen Farbstoff und die Stellen der Farbstoffablagerung bezeichnen die Stellen der Enzymaktivität. Diese histochemische Reaktion, deren Methodik von *Burstone* und *Folk*<sup>10</sup> sowie *Nachlas*, *Crawford* und *Seligman*<sup>11</sup> vervollkommenet worden ist, ließ sich für eine Anfärbung von Amino-peptidasen auf Stärkegel-Streifen adaptieren. Als Substrat kamen L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid oder DL-Alanin- $\beta$ -naphthylamid, als Kupplungskomponente Fast Garnet Salt GBC<sup>10</sup> zur Verwendung. Zur Beschleunigung der Azo-Kupplung wurde der Inkubationsmischung Percain zugesetzt<sup>12</sup>. Eine Verwendung von L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid als Substrat zur selektiven Anfärbung der Serum-Oxytocinase im Stärkegel scheiterte an seiner geringen Löslichkeit.

In den Elektropherogrammen gesunder Männer und nichtschwangerer Frauen tritt regelmäßig hinter den mit Amidoschwarz anfärbbaren Serumalbumin- und Postalbumin-Banden eine nach Inkubation mit L-Leucin- oder DL-Alanin- $\beta$ -naphthylamid und Garnet GBC rote Amino-peptidasebande (I) auf (Abb. 1). In Seren schwangerer Frauen wird ebenso regelmäßig noch eine zweite, bei der Elektrophorese langsamer wandernde Amino-peptidase (II) gefunden; in den Seren von Hochschwangeren übertrifft diese Bande an Intensität (bei Anfärbung mit L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid) bei weitem die Bande der auch in Nichtschwangerenserum vorhandenen Amino-peptidase (Abb. 2). Nach ihrer Lage zu schließen, kann

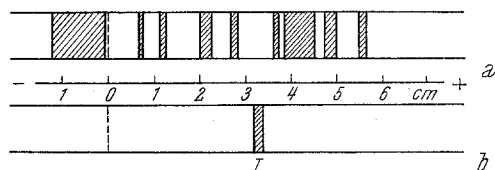


Abb. 1. Stärkegel-Elektrophorese eines Nichtschwangerenserums. a) Anfärbung der Proteinbanden mit Amidoschwarz 10 B; b) Darstellung der Amino-peptidase mit L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid und Fast Garnet Salt GBC

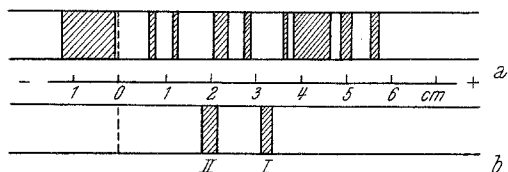


Abb. 2. Stärkegel-Elektrophorese eines Schwangerenserums. Vgl. Abb. 1

<sup>8</sup> E. Stoklaska und E. Wintersberger, Arch. exper. Path. Pharmacol. **236**, 358 (1959).

<sup>9</sup> G. Gomori, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **87**, 559 (1954).

<sup>10</sup> M. S. Burstone und J. E. Folk, J. Histochem. Cytochem. **4**, 217 (1956).

<sup>11</sup> M. M. Nachlas, D. T. Crawford und A. M. Seligman, J. Histochem. Cytochem. **5**, 264 (1957).

<sup>12</sup> J. F. Burton, Nature [London] **173**, 642 (1954).

diese Bande nicht mit der „pregnancy-zone“ identisch sein, die *Smithies*<sup>2</sup> in den Elektropherogrammen einiger Hochschwangerenserum festgestellt hat. Außer der Rotfärbung der Aminopeptidase-Banden tritt bei allen Seren eine Gelbfärbung der Serumalbumin-Bande, wahrscheinlich auf Grund ihres Bilirubingehaltes, ein.

Der Beweis, daß die Aminopeptidase-Aktivität der zweiten, langsameren Bande (II) der Serum-Oxytocinase zuzuschreiben ist, konnte auf zwei Wegen erbracht werden: 1. Ein aus Retroplacentarserum gewonnenes, weitgehend gereinigtes Oxytocinase-Präparat<sup>13</sup> wurde der Stärkegel-Elektrophorese unterworfen; es verhielt sich ebenso wie die in Schwangerenserum auftretende zweite Bande. In einem zweiten Versuch wurde das Serum einer nichtschwangeren Frau mit einer hochgereinigten Oxytocinaselösung vermischt und, Seite an Seite mit einem Schwangerenserum, durch Stärkegel-Elektrophorese aufgetrennt; die miteinander verglichenen Proben erwiesen sich als ununterscheidbar. 2. Nach der Elektrophorese des Serums einer Schwangeren im 10. Lunarmonat wurden aus dem Gelstreifen jene zwei Abschnitte ausgestanzt, die die Aminopeptidasebanden I und II enthielten, und zur Auflösung der Stärke mit Diastase inkubiert. Die erhaltenen Lösungen wurden auf beschriebene Weise<sup>6</sup> sowohl mit Leucin- als auch mit Cystin- $\beta$ -naphthylamid auf ihre Amino-peptidase-Wirksamkeit geprüft. Es zeigte sich (Tab. 1), daß die langsam wandernde Aminopeptidase Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid hydrolysierte, so wie es von der Oxytocinase des Schwangerenserums zu erwarten war, während die raschere, auch im Nichtschwangerenserum vorkommende Aminopeptidase dieses Substrat nur in äußerst geringem Maße spaltete. Beide Aminopeptidaselösungen hydrolysierten Leucin- $\beta$ -naphthylamid. Die aus der Bande II eluierte Oxytocinase setzt  $\beta$ -Naphthylamin aus Leucin- $\beta$ -naphthylamid mit mehrfach größerer Geschwindigkeit frei als aus Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid.

Da somit Leucin- $\beta$ -naphthylamid ein ausgezeichnetes Substrat auch für die Oxytocinase darstellt, ist die Wirksamkeit dieses Enzyms keineswegs auf Cystinylpeptide beschränkt. Die Besonderheit der Oxytocinase ist folglich nicht darin zu erblicken, daß sie nur Cystinylpeptide spaltet, sondern daß zu ihren Substraten auch Cystinylpeptide zählen. — Die Spaltbarkeit des L-Leucin- $\beta$ -naphthylamids durch Oxytocinase ist von Bedeutung nicht nur im Hinblick auf die Anfärbung des Enzyms in Elektropherogrammen, sondern auch für seine mikroskopisch-histochemische Lokalisierung. In Anbetracht der Mehrzahl von Aminopeptidasen, die Leucin- $\beta$ -naphthylamid-spalten, ist ein positiver Nachweis der Oxytocinase in Gewebsschnitten mit Hilfe dieses Substrates nicht ohne weiteres möglich. Wohl aber kann der Befund, daß bestimmte Zellen oder Gewebe L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid nicht spalten, als Hinweis auf die Abwesenheit von Oxytocinase gelten.

<sup>13</sup> H. Tuppy und E. Wintersberger, Mh. Chem. **91**, in Vorbereitung (1960).

Tabelle 1. Enzymatische Wirksamkeit der durch Stärkegel-Elektrophorese getrennten Aminopeptidasen des Schwangerenserums

1,2 ml der Enzymlösungen, die aus den die Aminopeptidasen I und II enthaltenden Gelstücken durch Behandlung mit Diastase gewonnen worden waren, wurden mit 0,3 ml einer 12proz. Lösung von Gummiarabicum versetzt. Von diesen Mischungen wurden je 0,75 ml mit je 0,25 ml Aminosäure- $\beta$ -naphthylamid-Lösung 2 Stdn. bei 37° inkubiert. Die kolorimetrische Auswertung der Aminopeptidase-Aktivität erfolgte auf beschriebene Art<sup>6</sup>. Die in der Tabelle angeführten Werte ( $E_{565}$ ) sind die im Beckman-Spektrophotometer gemessenen Extinktionswerte (Wellenlänge 565 m $\mu$ , 1 cm Schichtdicke). Die Blindwerte wurden dadurch erhalten, daß aminopeptidasefreie Gelstücke auf gleiche Weise wie die aminopeptidasehaltigen mit Diastase verdaut und die verflüssigten Proben mit den Substraten inkubiert und kolorimetrisch ausgewertet wurden.

| Aminopeptidase | Substrat                           | $E_{565}$ | Blindwert | $E_{565}$ kor. |
|----------------|------------------------------------|-----------|-----------|----------------|
| Bande I        | L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid    | 1,986     | 0,096     | 1,890          |
| Bande I        | L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid | 0,162     | 0,029     | 0,133          |
| Bande II       | L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid    | 0,534     | 0,096     | 0,438          |
| Bande II       | L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid | 0,033     | 0,029     | 0,004          |

In einer früheren Arbeit<sup>14</sup> wurde festgestellt, daß die Aminopeptidaseaktivität des Serums gegenüber L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid nicht nur während der Gravidität stark erhöht ist, sondern daß eine deutliche Erhöhung über den niedrigen Normalwert auch bei manchen Lebererkrankungen auftritt. Bei der chemischen Bestimmung der Oxytocinaseaktivität im Serum mit Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid als Substrat<sup>6, 14</sup> war es daher nicht möglich, zwischen einer frühen Schwangerschaft und einer Lebererkrankung zu unterscheiden. Es wurde vermutet, daß es sich bei der in Seren Leberkranker gefundenen Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid spaltenden Aminopeptidase nicht um die Serum-Oxytocinase, sondern um ein anderes, im normalen Serum nicht vorkommendes proteolytisches Ferment ähnlicher Spezifität handelt. Durch Elektrophorese in Stärkegel konnte nun gezeigt werden, daß die Erhöhung des Serum-Aminopeptidasespiegels bei Lebererkrankungen tatsächlich auf ein von der Aminopeptidase des normalen Nichtschwangerenserums und von der Serum-Oxytocinase verschiedenes Enzym zurückzuführen ist. Diese Aminopeptidase wandert etwas langsamer als die Serum-Oxytocinase und ist dadurch von ihr deutlich unterscheidbar. Im Serum eines Hepatitis-Patienten wurden sogar zwei Aminopeptidasen, zusätzlich zu der im normalen Nichtschwangerenserum vorhandenen, gefunden; keines von diesen Fermenten war mit der Oxytocinase identisch.

<sup>14</sup> W. Müller-Hartburg, H. Nesvadba und H. Tuppy, Arch. Gynäkol. **191**, 442 (1959).

Werle, Semm und Enzenbach<sup>15</sup> beschrieben ein in Erythrocyten vorkommendes, Oxytocin spaltendes Enzym, welches von der Oxytocinase des Schwangerenserums verschieden ist. Erythrocytenlysate besitzen auch eine beträchtliche Cystin- und Leucin- $\beta$ -naphthylamid spaltende Wirksamkeit. Dadurch erklärt es sich, warum die Verwendung hämolytischer Seren bei der chemischen Oxytocinase-Bestimmung mit Cystin- $\beta$ -naphthylamid zu Fehlern führen kann<sup>14</sup>. Überraschenderweise konnte jedoch bei der Stärkegel-Elektrophorese serumfreier, hämolyzierter Erythrocyten keine Amino-peptidase-Aktivität gefunden werden. Auch bei Zusatz von Erythrocytenlysat zu Schwangerenserum trat weder eine zusätzliche Bande noch eine Veränderung der Serumoxytocinase-Bande auf. Eine Störung machte sich allerdings bei der Durchführung der Elektrophorese bei pH 8,7 insofern bemerkbar, als das aus den Erythrocyten stammende Hämoglobin mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Oxytocinase wanderte und mit seiner Farbe die bei dem Amino-peptidase-Nachweis entstehende Rotfärbung überdeckte. Wurde die Elektrophorese hingegen bei pH 8,0 vorgenommen, so blieb das Hämoglobin hinter der Oxytocinase beträchtlich zurück und störte deren Auffindung nicht; da auch unter diesen Bedingungen eine Anfärbung von Erythrocyten-Fermenten nicht eintritt, stellt die Verwendung hämolytischer Seren bei dem elektrophoretischen Nachweis der Serum-Oxytocinase — im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der chemischen Aktivitätsbestimmung — keine Fehlerquelle dar.

Die von Smith und Mitarb.<sup>16, 17</sup> eingehend untersuchte Leucinamino-peptidase aus Schweinenieren wandert bei der Elektrophorese in Stärkegel bei pH 8,0 und unter Verwendung eines Magnesiumionen enthaltenden Puffers nur wenig langsamer als die raschere, im Schwangeren- wie im Nichtschwangerenserum vorkommende Amino-peptidase (I); sie läßt sich im Stärkegel ohne Schwierigkeiten durch Anfärbung mit L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid und Fast Garnet Salt GBC sichtbar machen. In Abwesenheit von  $Mg^{++}$  läßt sich die Leucinamino-peptidase elektrophoretisch nur sehr schwer nachweisen, was gegen die Identität dieses Enzyms mit einer der in vorliegender Arbeit untersuchten Amino-peptidasen des menschlichen Blutserums spricht.

## Experimenteller Teil

### 1. Stärkegel-Elektrophorese

Käufliche Kartoffelstärke wurde nach den Angaben von Smithies<sup>1</sup> mit Aceton/HCl partiell hydrolysiert; die günstigste Hydrolysendauer war von Stärke zu Stärke verschieden und mußte jeweils in Vorversuchen bestimmt

<sup>15</sup> E. Werle, K. Semm und R. Enzenbach, Arch. Gynäkol. **177**, 211 (1955).

<sup>16</sup> D. H. Spackman, E. L. Smith und D. M. Brown, J. Biol. Chem. **212**, 255 (1955).

<sup>17</sup> E. L. Smith und D. H. Spackman, J. Biol. Chem. **212**, 271 (1955).

werden. Zur Herstellung des Gels wurden 14 g hydrolysierte Stärke mit 100 ml Puffer aufgeköcht; für die Trennung der Amino-peptidasen des Serums verwendeten wir 0,025 m Boratpuffer (pH 8,7), für die Versuche mit Erythrocytenlysaten 0,025 m Boratpuffer (pH 8,0) und für die Elektrophorese von Leucinamino-peptidase einen 0,02 m Tris-Puffer pH 8,0, der  $MgCl_2$  (0,004 m) enthielt. Die heiße Stärkelösung wurde durch Evakuieren von Luftblasen befreit, in eine geeignete Form ( $25 \times 2,5 \times 1,0$  cm) gegossen und in dieser erkalten und erstarren gelassen. 1 bis 2 Stdn. später wurde ein mit dem zu untersuchenden Serum bzw. der Enzymlösung getränktes Stück Filtrierpapier in der von *Smithies* beschriebenen Weise in den Gelstreifen eingeführt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 12 bis 14 Stdn., das Spannungsgefälle 2 bis 3 V/cm.

## 2. Anfärbung der Gelstreifen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gelstreifen mit einer Rasierklinge horizontal durchgeschnitten. Die eine Hälfte kam zur Anfärbung der Proteinbanden für einige Min. in eine gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10 B in Methanol/Eisessig/Wasser (5:1:5); das überschüssige Amidoschwarz wurde mit farbstofffreiem Lösungsmittelgemisch ausgewaschen. Die andere Hälfte des Gels wurde zur Darstellung der Amino-peptidasen mit einer Mischung von 10 ml Substratlösung (2,6 mg L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid in 0,2 ml heißem Methanol gelöst und mit warmen Wasser auf 10 ml verdünnt) und 5 ml Diazoniumsalzlösung (10 mg Fast Garnet Salt GBC und 40 mg Nupercain in 5 ml 0,2 m Triäthanolaminpuffer pH 7,0) 1 Stde. bei 37° inkubiert und sodann mit Wasser gewaschen. Das zur Anfärbung der Leucinamino-peptidase verwendete Inkubationsgemisch enthielt außerdem noch  $MgCl_2$  in 0,004 m Konzentration. — Da die Gelstreifen während ihrer Anfärbung, vor allem im Methanol/Essigsäure-Gemisch, stark schrumpfen, wurden noch vorher in ihren Rand in Abständen von 1 cm kleine Einschnitte gemacht; diese Skala diente nach der Anfärbung zur Messung der von den verschiedenen Proteinen während der Elektrophorese durchlaufenen Strecken.

## 3. Untersuchung der elektrophoretisch getrennten Amino-peptidasen des Schwangerenserums

Nach der Stärkegel-Elektrophorese von 0,15 ml Schwangerenserum wurde auf einem schmalen, vom Elektropherogramm abgetrennten Längsstreifen die Lage der Amino-peptidase-Banden durch Anfärbung festgestellt. Aus dem Rest des Stärkegels wurden sodann die die Banden I und II enthaltenden Gelstücke herausgeschnitten, zerkleinert und mit 2 ml einer 1proz. Lösung käuflicher hochgereinigter Diastase (Merck) 3 Stdn. bei 37° unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Nach Zentrifugieren der verflüssigten Proben wurde die Amino-peptidase-Aktivität der klaren Lösungen unter Verwendung der Substrate L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid und L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid bestimmt (Tab. 1). Bei der Elektrophorese und bei der nachfolgenden Diastase-Behandlung der Amino-peptidasen erlitt deren Aktivität eine nur geringfügige Einbuße.

Der Rockefeller-Foundation danken wir für hilfreiche Unterstützung.

Herrn Dr. W. Müller-Hartburg, II. Universitäts-Frauenklinik, Wien, sind wir für die Bereitstellung der untersuchten Seren, Herrn Dr. M. S. Burstone, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, für die Überlassung von Fast Garnet Salt GBC zu Dank verpflichtet.