

## Nachweis von Enzymen der Glycolyse und des Tricarbonsäurecyclus in Amöben (*Chaos chaos* L.)

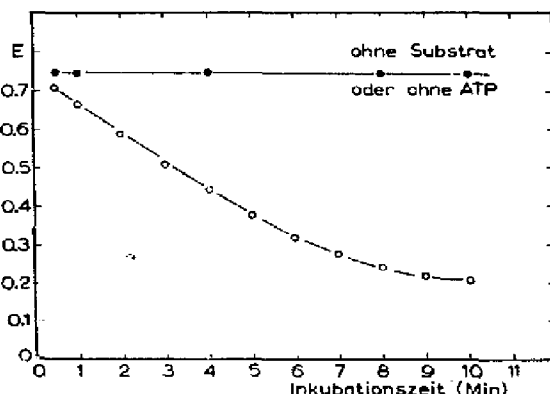
Amöben sind ein geeignetes Objekt zum Studium der Lokalisation von Enzymen in der Zelle. Durch Zentrifugation intakter Amöben lassen sich die Zellpartikel schichten<sup>1</sup>, und durch Auseinanderschneiden kann die Zelle in kernhaltige und kernlose Teile zerlegt werden, die mehr oder weniger lange lebensfähig sind. BRACHET<sup>2</sup> benutzte diese Technik um den Einfluss des Kerns auf den Stoffwechsel der Amöbe zu untersuchen. Glycolyse und Tricarbonsäurecyclus konnten hierbei nicht entsprechend berücksichtigt werden, da die Enzyme bis auf wenige Ausnahmen (Succino-dehydrogenase<sup>3</sup> und Enolase<sup>2</sup>) nicht nachgewiesen und zudem geeignete Mikromethoden noch nicht ausgearbeitet waren. Vom Abbau von Glucose in Amöben war bisher lediglich bekannt, dass [<sup>14</sup>C]Glucose zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> abgebaut wird<sup>4</sup>. In Versuchen mit H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> wurde ferner nachgewiesen, dass Phosphatester gebildet werden<sup>5</sup>, die inzwischen als Zuckerphosphate identifiziert wurden.

Wir untersuchten einige der in Amöben bisher nicht nachgewiesenen Enzyme und wählten die Technik des einfachen und zusammengesetzten optischen Tests, der auf WARBURG<sup>6</sup> zurückzuführen ist und leicht als Mikromethode ausgeführt werden kann. Die Gesamtvolumina unserer Versuchsansätze betragen 100–300 µl. Die Tests können mit Enzymmengen durchgeführt werden, die 2 Amöben entsprechen (s. Fig. 2), und sind damit für die oben zitierten Untersuchungen geeignet.

Gemessen wird der Substratumsatz an der Bildung oder am Verbrauch von DPNH (TPNH). Wir verwenden spaltförmige Mikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke und einem Fassungsvermögen von ca. 400 µl und eine in eigener Werkstatt hergestellte Zusatzeinrichtung zum Zeiss-Opton Spektralphotometer (nach Angaben von LOWRY<sup>7</sup> für das Beckman-Gerät). Zum Pipettieren werden Konstriktionspipetten<sup>8</sup> und ein neu entwickelter Typ von Mikropipetten aus Polyäthylen<sup>9</sup> benutzt.

Amöben (*Chaos chaos* L.) werden in Pringsheimlösung kultiviert und mit Tetrahymena gefüttert. Zum Versuch werden Homogenate aus gut mit bidest. Wasser gewaschenen, 3 Tage gehungerten Amöben verwendet. Unlösliche Zellreste werden abzentrifugiert und die klaren Überstände auf geeignete Enzymkonzentrationen mit bidest. Wasser verdünnt. In einigen Versuchen wurde von Gefriertrockenpulvern aus

Fig. 1. Gekoppelter Test auf Phosphoglyceratkinase und Glycerinaldehyd-phosphat-dehydrogenase. Führung der Reaktion von 3-Phosphoglycerinsäure zu Glycerinaldehyd-phosphat durch Abfangen des Letzteren mit Cystein. Versuchsansätze: Gesamtvolumen 300 µl. 250 µl Triäthanolaminpuffer pH 7.4 mit  $4 \cdot 10^{-3}$  M Mg<sup>++</sup>,  $3 \cdot 10^{-3}$  M Cystein,  $6 \cdot 10^{-3}$  M 3-Phosphoglycerinsäure, 10 µl ca.  $1.2 \cdot 10^{-2}$  M DPNH, 20 µl ATP (30 rig/ml), 20 µl Amöbenenzymlösung, ca. 30 Amöben entsprechend. Messung bei 366 mµ.  $\Delta E = 0.100 = 9 \cdot 10^{-3}$  µMol DPNH umgesetzt.



Abkürzungen: DPNH, TPNH, reduzierte Diphosphopyridin und Triphosphor pyridin-nucleotide; ATP, Adenosin triphosphat.

Amöben ausgegangen. Alle Tests werden bei pH 7–7.4 und Zimmertemperatur (20–22°) ausgeführt, unter Verwendung von Reagentien zum optischen Test der Fa. C. F. Boehringer, Mannheim.

Folgende Enzyme wurden von uns bisher mit der beschriebenen Technik in Amöben nachgewiesen: Hexokinase, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Hexose-phosphat-isomerase, Aldolase, Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase, Phosphoglyceratkinase, Enolase, Pyruvatkinase, Isocitrat-dehydrogenase, Fumarase, Äpfelsäure-dehydrogenase und "Malic-Enzyme".

Zwei Tests seien als Beispiele wiedergegeben. Fig. 1: Gekoppelter Test auf Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase und Phosphoglyceratkinase. Fig. 2: Äpfelsäure-dehydrogenase.

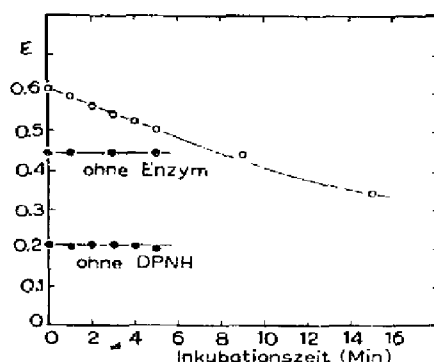


Fig. 2. Äpfelsäure-dehydrogenase-Test. Versuchsansätze: Gesamtvolumen 100  $\mu$ l. 85  $\mu$ l Tris-(Oxyäthyl)aminomethanpuffer pH 7.2, 7.5  $\mu$ l  $7.6 \cdot 10^{-3}$  M Oxalacetat, 2.5  $\mu$ l ca.  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M DPNH, 5  $\mu$ l Amöbenenzymlösung genau 2 Amöben entsprechend. Messung bei 340 m $\mu$ . 1E = 0.100 =  $1.6 \cdot 10^{-3}$   $\mu$ Mol DPNH umgesetzt.

Enzyme, die Pyruvat zu Lactat reduzieren oder zu Acetaldehyd decarboxylieren, konnten in Amöben von uns nicht nachgewiesen werden.

K. BORNER

Physiologisch-chemisches Institut der Freien Universität,  
Berlin (Deutschland)

H. MATTENHEIMER

<sup>1</sup> H. HOLTER UND W. L. DOYLE, *Compt. rend. Lab. Carlsberg, Serie chim.*, 22 (1938) 219.

N. ANDRESEN, *ibid.*, 24 (1942) 140.

<sup>2</sup> J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 247.

<sup>3</sup> N. ANDRESEN, FR. ENGEL UND H. HOLTER, *Compt. rend. Lab. Carlsberg, Serie chim.*, 27 (1951) 408.

<sup>4</sup> C. CHAPMAN-ANDRESEN UND H. HOLTER, *Exptl. Cell Res.*, Suppl. 3 (1955) 52.

<sup>5</sup> H. MATTENHEIMER, *Acta biol. et med. Germanica*, 1 (1958) 405.

<sup>6</sup> O. WARBURG, *Wasserstoffübertragende Fermente*, Verlag Dr. Werner Saenger G.M.B.H., Berlin, 1948.

<sup>7</sup> C. H. LOWRY, *J. Biol. Chem.*, 218 (1946) 23.

<sup>8</sup> K. LINDERSTROM-LANG UND H. HOLTER, in E. BAMANN UND K. MYRBÄCK, *Methoden der Fermentforschung*, Goerg Thieme Verlag, Leipzig, 1941, S. 1138.

<sup>9</sup> H. MATTENHEIMER, *Mikrochim. Acta*, im Druck.

Eingegangen den 28. Mai 1959