

PRELIMINARY NOTES

BBA 61138

Isolierung und Reinigung einer löslichen O-Acetyl-Aryl-Esterase aus Ratten-nieren

Im Gegensatz zur Leber ist die Niere bezüglich ihres Esterasegehalts wenig untersucht. Aus den vorliegenden Ergebnissen der Literatur ist zu entnehmen, daß sowohl die Leber¹ als auch die Nieren²⁻⁴ Esterasen partikelgebunden (vorwiegend microsomal), also in nicht löslicher Form in der Zelle vorliegen. 1963 berichteten wir erstmals über das Vorkommen einer löslichen, also cytoplasmatischen Esterase in Rattennieren, die bevorzugt *N*-Acylaminosäure-ester (z.B. *N*-Acetyl-L-tyrosin- und *N*-Benzoyl-L-argininäthylester) nur im sauren Milieu (pH-Optimum 6.0) hydrolysiert⁵. In vorliegender Arbeit wird der Nachweis einer zweiten löslichen Rattennierenesterase erbracht sowie über ihre Eigenschaften und Reinigung kurz berichtet. Ausgangspunkt hierfür war der bereits 1958 von uns erkannte Befund, wonach außer der Leber und dem Serum die Nieren von Ratten eine als "O-Acetyl-Esterase"

TABELLE I

EIGENSCHAFTEN DER O-ACETYL-ESTERASE DES RATTENNIERENCYTOPLASMAS

Substrat: 0.01 M O-Acetyl-L-tyrosin; pH 7.0; Inkubationszeit: 30 Min bei 37.5°; danach papierchromatographische Bestimmung des freigesetzten Tyrosins nach Ref. 7. pH-Optimum: 7 und 8-8.5 (mit dem analogen, jedoch N-freien Ester O-Acetyl-*p*-hydroxyphenylpropionsäure wurde nur ein zwischen pH 8 und 9 liegendes Optimum titrimetrisch (nach Ref. 8) erhalten). Temperatur-Optimum: 45-50°. Stabilität bei pH 7.0: nach 6tägigem Stehen bei 0°: 16% Aktivitätsverlust. K_m -Wert (bestimmt mit der über Sephadex G-150 gereinigten Esterase): $8 \cdot 10^{-3}$ M. Prozentuale Aktivitätsverteilung auf die Zellfraktionen (Ausgangshomogenat = 100; Kern-Fraktion = 0.7; Mitochondrien-Fraktion = 12.6; Mikrosomen-Fraktion = 8.7; Cytoplasma-Fraktion = 78.0).

| Effektoren | Konzentration (M) im Ansatz | Rel. Aktivität (Kontrollwert = 100)* |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| NaF | $5 \cdot 10^{-2}$ | 5.8 |
| NaF | $1 \cdot 10^{-2}$ | 39.2 |
| NaF | $1 \cdot 10^{-3}$ | 80.2 |
| Chinin | $1 \cdot 10^{-3}$ | 94.7 |
| DFP | $1 \cdot 10^{-4}$ | 14.1 |
| DFP | $1 \cdot 10^{-5}$ | 28.9 |
| Eserin | $1 \cdot 10^{-3}$ | 100.0 |
| <i>N</i> -Äthylmaleimid | $1 \cdot 10^{-3}$ | 100.0 |
| Jodacetat | $1 \cdot 10^{-3}$ | 100.0 |
| PCMB | $5 \cdot 10^{-4}$ | 121.3 |
| PCMB | $1 \cdot 10^{-4}$ | 115.2 |
| Cystein | $1 \cdot 10^{-3}$ | 97.0 |
| EDTA | $1 \cdot 10^{-2}$ | 73.6 |
| Ca ²⁺ | $1 \cdot 10^{-3}$ | 83.4 |
| Co ²⁺ | $1 \cdot 10^{-3}$ | 100.0 |
| Mn ²⁺ | $1 \cdot 10^{-3}$ | 114.8 |
| Zn ²⁺ | $1 \cdot 10^{-4}$ | 104.4 |

* Durchschnittswerte von 4 Meßreihen; Präinkubationszeit: 30 Min bei 20 bis 22°.

Abkürzung: PCMB, *p*-Chlormercuribenzoat.

TABELLE II

REINIGUNGSSCHEMA DER *O*-ACETYL-ESTERASE AUS RATTENNIEREN

Substrat: 0.01 M *O*-Acetyl-L-tyrosin. $v_s = \mu\text{Mol}$ hydrolysiertes Substrat $\cdot \text{Std}^{-1} \cdot \text{mg}$ Eiweiß⁻¹ bei 37.5° (spezifische Aktivität); $v_G = \mu\text{Mol}$ hydrolysiertes Substrat $\cdot \text{Stunde}^{-1} \cdot \text{Fraktion}^{-1}$; Q = Anreicherungsgrad.

| | <i>Eiweiss</i> (mg) | v_s | Q | v_G | <i>Ausbeute</i> (%) |
|------------------------------------|------------------------|-------|------|-------|------------------------|
| Ausgangshomogenat | 1360 | 4.93 | 1.0 | 6693 | 100.0 |
| Cytoplasma | 563 | 7.07 | 1.4 | 3972 | 59.4 |
| DEAE-Cellulose-Eluat, $I = 0.1$ | 114 | 12.8 | 2.6 | 1460 | 21.8 |
| Ultrafiltrat | 75 | 19.2 | 3.9 | 1440 | 21.5 |
| Aktivste Sephadex-G-150-Fractionen | 7.5 | 95.7 | 19.4 | 713.1 | 10.6 |

bezeichnete Enzymwirkung aufweisen, die selektiv im alkalischen Bereich (pH-Optimum 8.0 bis 8.4) die Esterbindung zwischen Essigsäure und der phenolischen OH-Gruppe des *O,N*-Diacetyl-L-tyrosinäthylesters verseift⁶. Da weiterhin nur in der Niere die alkalische *N*-Acylaminosäureesterasewirkung fehlt, wurden die im Folgenden beschriebenen Charakterisierungs- und Anreicherungsversuche der "*O*-Acetyl-Esterase" mit Rattennieren durchgeführt. Als Leitsubstrat diente das ninhydrinpositive *O*-Acetyl-L-tyrosin, dessen Hydrolyse entweder durch papierchroma-

TABELLE III

SUBSTRATSPEZIFITÄT DER GEREINIGTEN CYTOPLASMATISCHEN *O*-ACETYL-ARYL-ESTERASE AUS RATTENNIEREN

Die Hydrolyse sämtlicher aufgeführten Estersubstrate wurde durch automatische Titration der bei pH 8.0 und 37.5° freigesetzten Säure mittels 0.1 M NaOH nach dem pH-Stat-Verfahren⁸ im pufferfreien Milieu verfolgt. Substratkonzentration $5 \cdot 10^{-3}$ M. Die spezifische Aktivität der gereinigten Esterase gegenüber *O*-Acetyltyrosin beträgt 1.6 μMol gebildetes Tyrosin $\cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{mg}$ Protein⁻¹ bei 37.5°. Dieser Wert wurde gleich 100 gesetzt. Die Aktivität der übrigen Substrate wurde als relative Aktivität zur *O*-Acetyltyrosinhydrolyse angegeben.

| <i>Substrat</i> | <i>Relative</i> <i>Aktivität</i> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>O</i> -Acetyl-L-tyrosin | 100 |
| <i>O</i> -Acetyl- <i>p</i> -Hydroxyphenylpropionsäure | 190 |
| Phenylacetat (Essigsäurephenylester) | 252 |
| 2-Naphthylacetat (Essigsäurenaphthylester) | 121 |
| <i>O,N</i> -Diacetyl-L-tyrosinäthylester | 184 |
| <i>O</i> -Acetyl, <i>N</i> -Benzoyl-L-tyrosinäthylester | 163 |
| <i>O</i> -Acetyl, <i>N</i> -Carbobenzoxyl-L-tyrosinäthylester | 69 |
| <i>O,N</i> -Dibenzoyl-L-tyrosinäthylester | 45 |
| <i>O,N</i> -Dibenzoyl-L-tyrosin | 66 |
| Äthylacetat (Essigsäureäthylester) | 10.5 |
| Äthylbutyrat (Buttersäureäthylester) | 10.5 |
| Acetylcholin, Phenylbutyrat, Tributyrin, <i>N</i> -Acetyl-L-tyrosinäthylester, L-Tyrosinäthylester, L-Tyrosin- <i>O</i> -Sulfat und 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat (Di-Kaliumsalz) sowie Phenylphosphat, L-Leucinamid, L-Leucin- β -naphthylamid, Glycyl-L-leucin und Carbobenzoxylglycylphenylalanin | —* |

* Wurden von dem gereinigten Enzym nicht angegriffen.

tographische Bestimmung des freigesetzten Tyrosins analog der Tyrosinesterolyse⁷ oder titrimetrisch nach dem pH-Stat-Verfahren⁸ quantitativ verfolgt wurde; auf die gleiche Weise⁸ wurde die Hydrolyse der übrigen Ester quantitativ bestimmt. Die Eigenschaften der *O*-Acetyl-Esterase sind in Tabelle I zusammengestellt. Es handelt sich um eine relativ thermo- und zeitstabile, im neutralen bis alkalischen Bereich wirksame, nicht partikelgebundene organophosphatsensitive Esterase (DFP hemmt stark!), also eine B-Typ-Esterase⁹. Da Eserin auch in hohen Konzentrationen keine Hemmwirkung zeigt, sind Cholinesterasen an der *O*-Acetyltyrosin-Esterolyse nicht beteiligt. Bemerkenswert ist die leichte Aktivatorwirkung des *p*-Chlormercuribenzoats (PCMB) bei fehlendem Einfluß anderer SH-Gruppen-Reagentien wie *N*-Äthylmaleimid und Jodacetat. Die Reinigung der *O*-Acetyl-Esterase erfolgte von der Cytoplasmafraktion (durch zweimaliges Zentrifugieren in der MSE-Zentrifuge bei $40\,000 \times g$ für je 60 Min erhalten) ausgehend in zwei Schritten. Im 1. Schritt wurde durch DEAE-Cellulosechromatographie das bei pH 6.5 (Phosphatpuffer; $I = 0.025$) adsorbierte Cytoplasma-Protein im diskontinuierlichen Phosphatpuffer-Kochsalz-Gradienten ($I = 0.025, 0.1$ und 0.5 ; pH 6.5–7.2) schrittweise eluiert. Die höchste *O*-Acetyl-Esterase-Aktivität findet sich im Eluat der Ionenstärke $I = 0.1$. Das bei $I = 0.5$ eluierte Enzym besaß nur 35% der spezifischen Aktivität des vorhergehenden Peaks ($I = 0.1$) und war außerdem mit den restlichen Esterasen und Peptidasen des Ausgangscytoplasmas vermischt. Zur weiteren Reinigung wurde das $I = 0.1$ -Eluat schonend eingeengt (lyophilisiert oder ultrafiltriert) und auf Sephadex G-150 gelfiltriert. Tabelle II gibt das Ergebnis eines Repräsentativversuches wieder. Die auf diese Weise ungefähr 20fach gereinigte Esterase besaß die in Tabelle III zusammengefaßte Substratspezifität.

Auf Grund der bevorzugten Hydrolysewirkung der Esterase auf Ester, die aus Essigsäure und einem aromatischen Alkohol oder Arylrest gebildet werden, kann das Enzym als *O*-Acetyl-Aryl-Esterase bezeichnet werden.

*Physiologisch-chemisches Institut der Universität,
Halle, Saale (D.D.R.)*

ROLF KLEINE
DETLEF JOSWIG
HORST HANSON

- 1 P. BOHLEY, R. KLEINE, M. FROHNE, H. KIRSCHKE, J. LANGNER UND H. HANSON, *Z. Physiol. Chem.*, **344** (1966) 55; dort unter dem Zitat 50 weitere Literaturhinweise.
- 2 CH. R. SHAW AND A. L. KOEN, *Science*, **140** (1963) 70.
- 3 R. KLEINE, Vortrag auf der Tagung der Biochemischen Gesellschaft der D.D.R. am 25. Juli 1965 in Magdeburg.
- 4 S. SHIBKO AND A. L. TAPPEL, *Biochem. J.*, **95** (1965) 731.
- 5 R. KLEINE, Vortrag auf der Tagung der Arbeitsgemeinschaft Biochemie am 17. December 1963 in Jena; *Verhandl. Ges. Exptl. Med. D.D.R.*, **6** (1964) 171.
- 6 R. KLEINE, Dissertation Halle, Saale, 1958.
- 7 H. HANSON UND R. KLEINE, *Z. Physiol. Chem.*, **315** (1959) 208.
- 8 R. KLEINE UND H. HANSON, *Acta Biol. Med. Ger.*, **9** (1962) 606.
- 9 W. N. ALDRIDGE, *Biochem. J.*, **53** (1953) 110, 117.

Eingegangen am 24. März, 1967