

BBA 65690

# ÜBER DIE CHROMATOGRAPHISCHE AUFTRENNUNG SOWIE AKTIVIERUNG UND INAKTIVIERUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE AUS HÜHNERDARM

HELGA SCHÜSSLER

*Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, Karlsruhe (Deutschland)*

(Eingegangen am 18. September, 1967)

---

## SUMMARY

*The chromatographic separation, the activation and inactivation of alkaline phosphatase from chicken intestine*

A procedure for purification and separation of four isoenzymes of alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) from chicken intestine is described. Gel filtration on Sephadex G-200 and ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25 with NaCl-gradient in Tris buffer were used. In the presence of  $Mg^{2+}$  all four of the isoenzymes are activated, while  $Na_2H_2EDTA$  inhibits them in a two-step process. This result provides further proof that two metal atoms per enzyme molecule are present. Only one of the isoenzymes is inactivated by  $Na_2CaEDTA$ . Since the other three phosphatases are not inhibited by  $Na_2CaEDTA$ , it is supposed that  $Ca^{2+}$  is exchanged for  $Zn^{2+}$  and that the calcium phosphatases are more active than the original enzymes.

---

## EINLEITUNG

Die alkalische Phosphatase (Orthophosphorsäure Monoester Phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) ist sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Geweben weit verbreitet und dient häufig als Objekt für Untersuchungen über die Aktivierung und Inaktivierung der enzymatischen Katalyse durch Metallionen und Chelatbildner. Allerdings sind wegen der mangelnden Reinheit der Enzympräparate und der unterschiedlichen Verunreinigungen häufig eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse kaum möglich. Außerdem konnten mehrere Autoren<sup>1-7</sup> nachweisen, daß die alkalische Phosphatase bei Chromatographie an Ionenaustauscher-Cellulose oder bei Elektrophorese sich als heterogen erweist und eine Auftrennung in Isoenzyme möglich ist. Es schien sehr wahrscheinlich, daß diese chromatographisch trennbaren Enzyme sich auch bei der Hemmung und Aktivierung verschieden verhalten und daß folglich die Gewinnung chromatographisch einheitlicher Enzymfraktionen eine wesentliche Voraussetzung für eine Untersuchung über die Einwirkung von Metallionen bzw. Chelatbildner ist.

Da eine aus Hühnerdarm gewonnene Phosphatase als weitgehend gereinigtes Präparat im Handel ist, kommt ihrer Reindarstellung und Auf trennung, die bis jetzt, soweit uns bekannt ist, noch nicht beschrieben ist, größere Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur präparativen chromatographischen Auftrennung eines kommerziell erhältlichen Phosphatasepräparates aus Hühnerdarm in vier Isoenzyme angegeben. Das Verhalten der gewonnenen Enzyme bei Einwirkung von  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen sowie von Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) wird beschrieben.

#### MATERIALIEN UND METHODEN

Alkalische Phosphatase aus Hühnerdarm von Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J. Sephadex G-25 fein, G-100, G-200 und DEAE-Sephadex A-25 von der Deutschen Pharmacia, Frankfurt. Biochemica-Test-Combination für alkalische Phosphatase TC-P von Boehringer, Mannheim. Alle übrigen Chemikalien von Merck, Darmstadt.

Die chromatographischen Trennungen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einem Kühlaum ( $4^\circ$ ). Die Pufferlösungen und Dextrangele wurden 20 Min bei  $120^\circ$  autoklaviert. Zur Prüfung auf Keimfreiheit wurden 0.1 ml der Lösung auf Agarplatten aufgetragen und 24 Std bei  $37^\circ$  inkubiert.

#### Gelfiltration über Sephadex G-200

200 mg des Rohenzyms wurden in 15 ml 0.01 M Trispuffer, der einen Salzgehalt von 0.05 M NaCl und einen pH-Wert von 8.0 hat, gelöst, auf eine Säule von G-200 (2.5 cm  $\times$  120 cm) aufgetragen und mit dem bereits genannten Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in 3.0 ml-Fraktionen aufgefangen, in denen die Absorption bei  $280\text{ m}\mu$ , die enzymatische Aktivität und der Kohlenhydratgehalt bestimmt wurden. Die Fraktionen mit hoher enzymatischer Aktivität wurden gesammelt und über Ionenaustauscher-Sephadex weiter aufgetrennt. Die Gelfiltration über G-100 wurde entsprechend ausgeführt.

#### Chromatographische Trennung über DEAE-Sephadex A-25

Das durch Gelfiltration vorgereinigte Enzym wurde auf eine Säule von DEAE-Sephadex A-25 (2.0 cm  $\times$  120 cm), die 10 Std mit dem Anfangspuffer (0.01 M Tris + 0.05 M NaCl) vorgespült worden war, aufgetragen. Als Elutionsgradient diente 0.01 M Trispuffer (pH 8.0), dessen NaCl-Gehalt von 0.05 bis 0.16 M linear anstieg. Die Größe der Fraktionen betrug 3 ml. Es wurden die Absorption bei  $280\text{ m}\mu$  und die enzymatische Aktivität nach den beiden angegebenen Methoden bestimmt. Die Fraktionen einer Komponente mit hoher Enzymaktivität wurden gesammelt und rechromatographiert.

#### Rechromatographie

Um die getrennten Enzyme rechromatographieren zu können, wurden sie durch Gelfiltration über eine Säule von Sephadex G-25 fein (3 cm  $\times$  40 cm) wieder in den Anfangspuffer überführt. Die Enzymlösung wurde dann ohne vorhergehendes Einengen auf eine A-25-Säule aufgetragen und mit dem oben genannten Gradienten rechromatographiert.

*Bestimmung der enzymatischen Aktivität*

(A) Die enzymatische Aktivität bestimmten wir nach der Methode von BESSEY, LOWRY UND BROCK<sup>8</sup> mit *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat in Glycinpuffer (Testlösung von Boehringer & Söhne, Mannheim): 0.02 ml Enzymlösung wurden in 1.0 ml Substratlösung bei 37° inkubiert. Nach 30 Min wurde die Reaktion mit 10 ml 0.05 M NaOH abgestoppt und die Absorption des freigesetzten *p*-Nitrophenol bei 400 m $\mu$  bestimmt.

(B) Die Bestimmung hoher Enzymaktivitäten erfolgte nach der Methode von GAREN UND LEVINTHAL<sup>9</sup>. Als Substrat diente eine 5 mM *p*-Nitrophenylphosphatlösung in 0.01 M Trispuffer, der 1 mM Magnesiumacetat enthielt. Der Verlauf der Hydrolyse bei pH 10.2 innerhalb 1 Min durch 0.05 ml Enzymlösung bei 25° wurde bei 400 m $\mu$  gemessen und automatisch registriert.

*Bestimmung des Kohlenhydratgehalts*

Der Kohlenhydratgehalt der Enzymlösung wurde in je 0.5 ml einer Fraktion mit Anthron nach der Methode von LOEWUS<sup>10</sup> bestimmt. Durch Inkubieren der Reaktionslösung bei 100° konnte die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht werden. Nachweisgrenze: 5  $\gamma$ /ml.

*Bestimmung des Proteingehalts*

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch Messung der Ultraviolett-Absorption bei 280 m $\mu$  in 1 cm-Küvetten bestimmt. Nach dem Rechromatographieren wurde der Proteingehalt durch die Messung der Intensität der Ninhhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse bestimmt (HIRS, MOORE UND STEIN<sup>11</sup>). 0.5 ml einer Probe wurde mit 1.0 ml 2.5 M NaOH 2.5 Std bei 90° hydrolysiert, mit 0.3 ml Essigsäure conc. neutralisiert und mit 1.0 ml Ninhhydrinlösung<sup>12</sup> versetzt. Nachdem die Reaktionslösung 15 Min auf 100° erhitzt und mit 2.0 ml 50% Äthanol verdünnt wurde, bestimmten wir die Extinktion bei 570 m $\mu$ .

*Messung der Aktivierung bzw. Inaktivierung durch Metallionen oder Chelatbildner*

Um die Einwirkung von Metallionen und Chelatbildnern auf die alkalische Phosphatase zu prüfen, wurde die Enzymbestimmung nach GAREN UND LEVINTHAL<sup>9</sup> ausgeführt. Zur Substratlösung (5 mM *p*-Nitrophenylphosphat in 0.01 M Tris pH 10.0) wurde die entsprechende Menge der zu prüfenden Substanz angegeben. Der Verlauf der Hydrolyse bei 30° durch 0.1 ml Enzymlösung wurde bei Gegenwart von Metallionen nach 1 Min eine Minute lang und bei Einwirkung von Chelatbildnern nach 2 Min zwei Minuten lang verfolgt und registriert.

## ERGEBNISSE

*Chromatographische Auftrennung*

Als ersten Schritt für die Reinigung des Rohenzyms benutzten wir die Gelfiltration. Wird Sephadex G-100 für diese Trennung verwendet, so hält das Dextrangel nur geringe Mengen an Verunreinigungen zurück, und das Enzym wird mit der Hauptmenge der Verunreinigungen ohne Verzögerung eluiert. Benutzt man hingegen zur Gelfiltration Sephadex G-200, so wird eine Trennung der Hauptmenge des verunreinigenden Ultraviolett-absorbierenden Materials und des Kohlenhydrats von dem

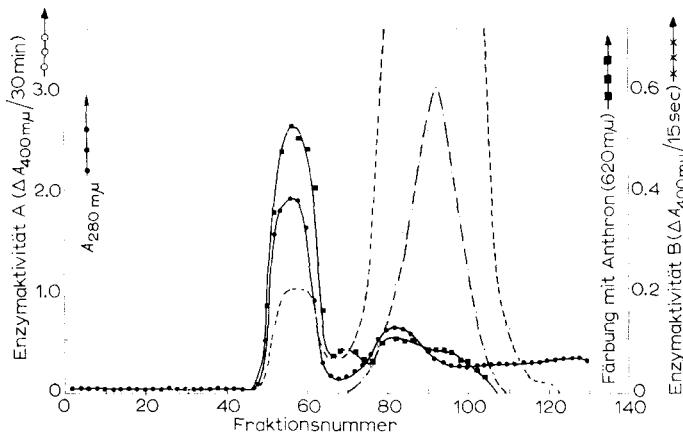


Abb. 1. Gelfiltration von 200 mg alkalischer Phosphatase (Rohenzym) über Sephadex G-200 (2.5 cm  $\times$  200 cm).

Enzym erreicht (s. Abb. 1). Der erste Peak (Frakt. 50–65) enthält bei sehr geringer enzymatischer Aktivität große Mengen an Kohlenhydrat und zeigt starke Absorption bei  $280\text{ m}\mu$ . Ein zweiter kleiner Peak der Ultravioletts-Absorption (Frakt. 72–94) hat nur einen geringen Gehalt an Kohlenhydrat, jedoch hohe enzymatische Aktivität.

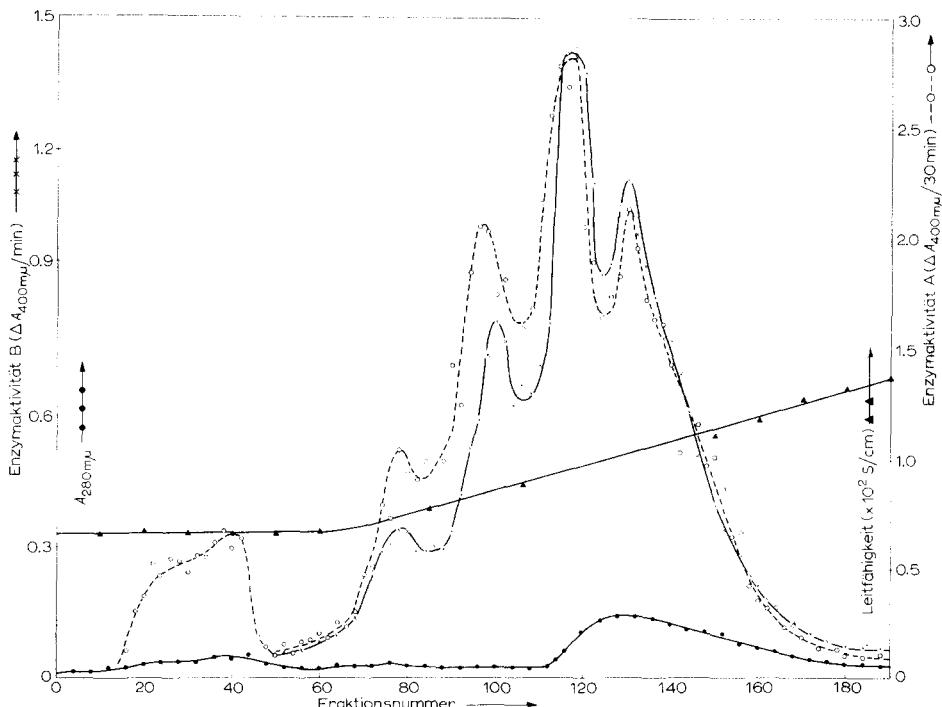


Abb. 2. Auftrennung des vorgereinigten Enzyms über DEAE-Sephadex A-25 (2.0 cm  $\times$  120 cm) mit einem NaCl-Gradienten von 0.05 bis 0.16 M in 0.01 M Trispuffer von pH 8.0.

Das Maximum des Aktivitätspeaks tritt erst auf, wenn der größte Teil des Ultraviolett-absorbierenden Materials eluiert ist.

Da beim Gefriertrocknen eine starke Denaturierung des Enzyms auftrat, wurde die vorgereinigte alkalische Phosphatase ohne vorhergehendes Einengen auf eine Säule von DEAE-Sephadex A-25 aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten in Tris-Puffer vom pH 8.0 eluiert (s. Abb. 2). Eine geringe Enzymmenge wurde unter diesen Bedingungen nicht absorbiert. Mit Anstieg des Gradienten beginnt die Elution des Enzyms, das sich in diesem Verfahren in 4 Peaks auftrennen lässt. In den Fraktionen, die maximale Enzymaktivität zeigten, konnte mit der Anthronmethode kein Kohlenhydrat mehr nachgewiesen werden. Alle vier Isoenzyme, die mit AP I, AP II, AP III und AP IV bezeichnet werden, ließen sich in dem gleichen Trennsystem rechromatographieren.

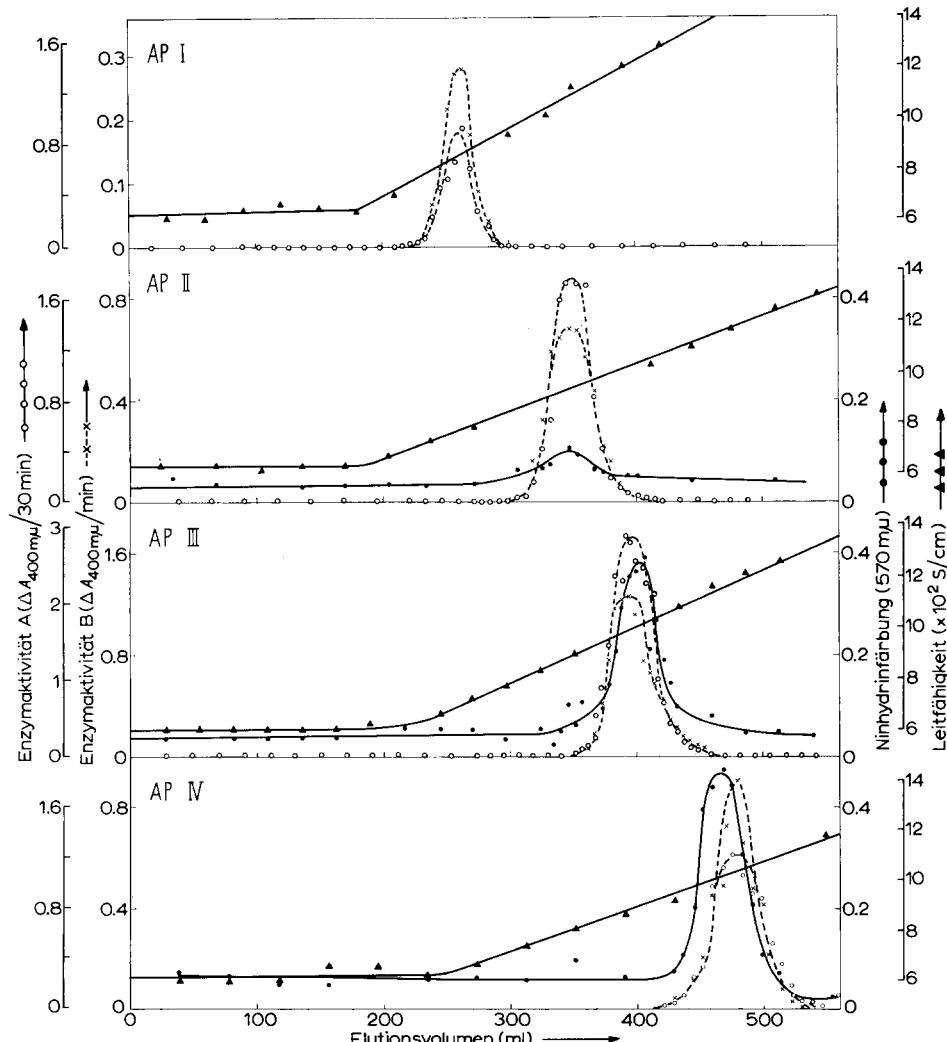


Abb. 3. Rechromatographie der getrennten Phosphatasen über DEAE-Sephadex A-25 (2.0 cm × 120 cm) mit einem NaCl-Gradienten von 0.05 bis 0.16 M in 0.01 M Trispuffer von pH 8.0.

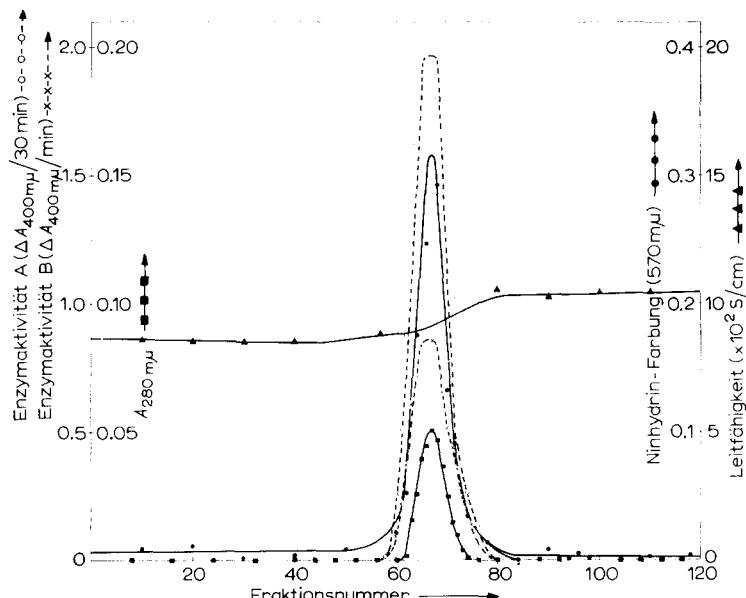


Abb. 4. 2. Rechromatographie von AP III über DEAE-Sephadex A-25 (2.0 cm × 120 cm) mit einem NaCl-Gradienten von 0.05 bis 0.086 M in 0.01 M Trispuffer von pH 8.0.

matographieren und eluieren in der gleichen Reihenfolge mit steigender Salzkonzentration (s. Abb. 3). Da die Fraktionen nur noch geringe Ultraviolett-Absorption hatten, wurde der Proteingehalt mit der Ninhydrinmethode nach alkalischer Hydrolyse bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die alkalische Phosphatase III und IV noch Verunreinigungen von Proteinen aufwies, die mit einer Salzkonzentration von etwa 0.1 M von der Säule eluiert wurden. Durch nochmaliges Chromatographieren über DEAE-Sephadex A-25 mit einem Gradienten, dessen Endkonzentration von 0.16 M auf 0.086 M NaCl herabgesetzt worden war, ließ sich auch die alkalische Phosphatase III, die den größten Anteil an der Gesamtaktivität hat, als chromatographisch einheitliches Enzym erhalten (s. Abb. 4).

#### Aktivierung und Inaktivierung

Um zu prüfen, ob die vier erhaltenen Isoenzyme Unterschiede in ihren enzymatischen Eigenschaften aufweisen, wurde die Einwirkung von Magnesium- und Calciumacetat sowie von den Natrium- und Calciumverbindungen der EDTA auf die Aktivität der Enzyme bei pH 10.0 untersucht.

Durch Zusatz von Magnesiumacetat zur Substratlösung wird die enzymatische Hydrolyse aller alkalischen Phosphatasen beschleunigt (s. Abb. 5). Die stärkste Aktivierung erfährt AP I, bei der die Anfangsgeschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung den 18-fachen Wert der Kontrolle annimmt. Im Gegensatz zu den übrigen alkalischen Phosphatasen wird bei AP III mit 0.1 mM Magnesiumacetat bereits das Maximum der Aktivierung erreicht. Bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration tritt eine Abnahme der Aktivität ein. Die Steigerung der Katalyse von AP II und IV durch Magnesiumacetat ist bedeutend geringer als die bei AP I und III; am schwächsten ist die Aktivierung des Rohenzyms.

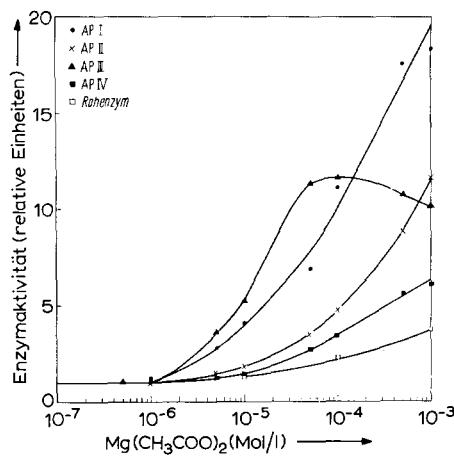
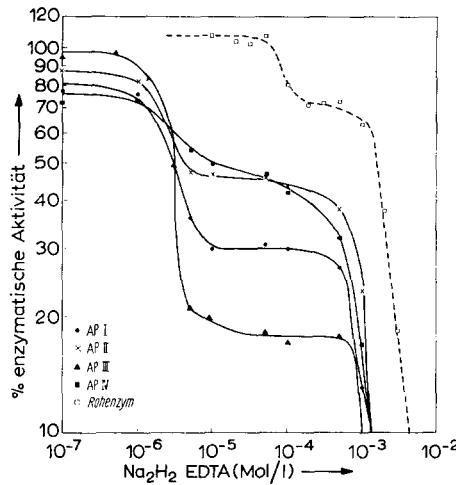


Abb. 5. Einwirkung von Magnesiumacetat auf alkalische Phosphatase bei pH 10.0.

Abb. 6. Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  auf alkalische Phosphatase bei pH 10.0.

In Gegenwart von  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  wird die Katalyse aller alkalischen Phosphatasen gehemmt, und zwar ist der Verlauf der Inaktivierungskurve mit zunehmender Konzentration an Chelatbildner sehr ähnlich (s. Abb. 6). Bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M} \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  beträgt der Aktivitätsverlust aller alkalischen Phosphatasen etwa 20 %. Bei Erhöhung der Chelatbildnerkonzentration auf  $5 \mu\text{M}$  tritt eine starke Hemmung auf, die bei den einzelnen Isoenzymen einen unterschiedlichen Wert erreicht und bis zu einer Konzentration von  $0.5 \text{ mM} \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  unverändert bleibt. Erst wenn der Gehalt an Chelatbildnern über  $0.5 \text{ mM}$  ansteigt, tritt bei allen Enzymen erneut ein weiterer Abfall der Aktivität ein. Das Rohenzym zeigt bei  $50 \mu\text{M}$  noch keinen Aktivitätsverlust, erst oberhalb von  $0.1 \text{ mM} \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  tritt eine Hemmung von 30 % auf, die dann bei einer Konzentration von  $5 \text{ mM} \text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  90 % erreicht.

Die einzelnen Enzyme weisen ein sehr unterschiedliches Verhalten bei der Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  auf (s. Abb. 7). Nur AP III wird durch das Calciumchelat der EDTA stark gehemmt. Diese Hemmung tritt aber erst bei Konzentrationen auf, die um eine Größenordnung höher liegen als die des Natriumsalzes und erreicht ebenfalls bei  $1 \text{ mM}$  einen Wert von etwa 90 %. AP I und II werden mit  $0.1 \text{ mM} \text{Na}_2\text{CaEDTA}$  geringfügig aktiviert, bei Erhöhung der Chelatbildnerkonzentration geht diese Aktivierung jedoch wieder zurück. AP IV zeigt bei Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  eine Aktivierung, die ab  $0.1 \text{ mM}$  meßbar ist und bei  $1 \text{ mM}$  das 2.3-fache der Ausgangsaktivität erreicht.  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  bewirkt bei dem Rohenzym eine bedeutend stärkere Aktivierung als bei AP IV, bei  $1 \text{ mM}$  ist die Hydrolysegeschwindigkeit des Rohenzyms 6 mal so groß wie bei der Kontrolle.

Um zu untersuchen, inwieweit diese Effekte auf der Wirkung des  $\text{Ca}^{2+}$  beruhen, wurden Messungen in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ , jedoch bei Abwesenheit von EDTA durchgeführt. Dabei ergab sich für alle alkalischen Phosphatasen mit Ausnahme der AP III eine Aktivierung, die bei  $1 \text{ mM} \text{Ca}^{2+}$  etwa das Dreifache der ursprünglichen Aktivität erreicht und somit nur ein Zehntel der Aktivierung beträgt, die durch  $\text{Mg}^{2+}$  bewirkt wird. Die enzymatische Katalyse des AP III wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  nicht beeinflußt.

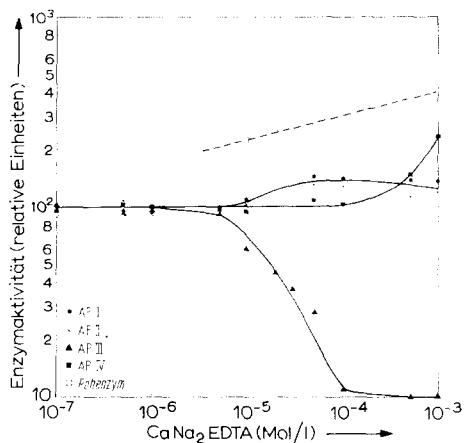


Abb. 7. Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  auf alkalische Phosphatase bei pH 10.0.

Abb. 8. Einwirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  auf alkalische Phosphatase bei pH 10.0

### Weitere Eigenschaften

Das Verhalten der vier Enzyme gegenüber Änderungen des pH-Wertes ist weitgehend ähnlich. Im neutralen pH-Bereich zeigen sie nur geringe enzymatische Aktivität, die mit Anstieg des pH-Wertes bis auf 10.2 stark zunimmt. Denaturierung der alkalischen Phosphatasen tritt sehr schnell beim Ansäuern wie auch beim Gefriertrocknen der neutralen und alkalischen Enzymlösungen ein.

### DISKUSSION

Das Molekulargewicht der alkalischen Phosphatase wird nach den bisherigen Bestimmungen mit 80 000 angegeben<sup>9,13</sup>. Den gleichen Wert fanden wir auch nach der Methode von WHITAKER<sup>14,15</sup>. Mit dem für diesen Bereich empfohlenen Dextransiegel Sephadex G-100 konnte aber keine Trennung zwischen höhermolekularen Verunreinigungen und Enzym erzielt werden, wie auch CSOPAK<sup>16</sup> bei Anwendung des gleichen Trennverfahrens auf alkalische Phosphatasepräparate aus Bäckerhefe zeigen konnte. Ein Grund dafür kann die starke Assoziation des Enzyms an Verunreinigungen, besonders an Kohlenhydrate, sein. Bei der beschriebenen Trennung über Sephadex G-200 enthielt der erste Peak geringe enzymatische Aktivität, die von kleinen Mengen an Verunreinigungen assoziierter Enzyms oder von aggregierten Enzymmolekülen herrühren kann. Vergleichbar mit diesem Ergebnis ist die Auftrennung der alkalischen Phosphatase aus Rindergalle (PETERLIK<sup>17</sup>). Die in der Auftrennung über DEAE-Sephadex nachgewiesene Heterogenität der alkalischen Phosphatase kann auf Grund der Gelfiltration nicht auf unterschiedlichem Molekulargewicht beruhen; auch die Möglichkeit, daß unterschiedlicher Kohlenhydratgehalt das Vorhandensein von Isoenzymen bewirkt, wie es von PORTMANN<sup>18</sup> angenommen wird, muß ausgeschlossen werden. Es ist vielmehr anzunehmen, daß geringe chemische Änderungen in der Sequenz des Enzyms, die evtl. auch durch die Aufarbeitung des Präparats hervorgerufen werden könnten, vorliegen.

Die aktivierende Wirkung der  $Mg^{2+}$  auf verschiedene alkalische Phosphatasen ist schon vielfach nachgewiesen worden<sup>5,9,19-23</sup>. Von CLARK UND PORTEUS<sup>23</sup> wie auch von PLOCKE UND VALLEE<sup>21</sup> wurde gezeigt, daß es nicht möglich ist alkalische Phosphatase, die mit EDTA inaktiviert wurde, allein mit  $Mg^{2+}$  zu reaktivieren. Dies ist nur durch Zugabe von Metallionenpaaren wie  $Zn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Co^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  und  $Co^{2+}$  möglich. Eine Steigerung der enzymatischen Aktivität durch Magnesium ist nur bei dem nativen Zn-haltigen Enzym zu erzielen. Da alle vier von uns isolierten Isoenzyme durch  $Mg^{2+}$  aktiviert werden können, müssen sie alle bereits als Bestandteil ihres Moleküls zweiwertige Metallionen enthalten. Damit ist auch die Annahme von CLOETENS<sup>24,25</sup> sowie CLARK UND PORTEUS<sup>23</sup> bestätigt, daß zur Entfaltung der vollen Aktivität außer den zur Aufrechterhaltung der Struktur notwendigen Metallen noch weitere metallbindende Gruppen besetzt sein müssen. Die geringe Aktivierung des Rohenzyms, aber auch von AP II und AP IV, könnte ihren Grund darin haben, daß die metallbindenden Gruppen bereits durch Fremdionen besetzt oder aber für Magnesium schwer zugänglich sind.

Auch die Untersuchung der Inaktivierung durch  $Na_2H_2EDTA$  führt zu der Annahme, daß das Rohenzym noch viele Fremdionen enthält. Da zunächst die nicht an Protein gebundenen Metallionen durch EDTA abgefangen werden, muß die Konzentration an Chelatbildnern, die einen meßbaren Abfall der Aktivität verursacht, bedeutend höher sein als bei den gereinigten Enzymen. Die Abhängigkeit der Inaktivierung der gereinigten alkalischen Phosphatasen von der  $Na_2H_2EDTA$ -Konzentration bei pH 10.0 zeigt zwei Stufen (s. Abb. 6). Der erste Verlust der Aktivität aller gereinigten Enzyme tritt bei einer Konzentration von 5  $\mu M$  auf, und eine weitere Hemmung wird bei  $>0.5$  mM gemessen, die dann 90% erreicht. Diese zweistufige Kurve legt die Annahme nahe, daß die isolierten alkalischen Phosphatasen pro Molekül zwei Metallatome mit unterschiedlicher Stabilitätskonstante enthalten. Dabei könnte es sich entweder um zwei verschiedene Metallatome handeln oder um zwei gleiche Metallatome, deren Bindung an das Protein verschieden stark ist. Da bereits von KUNITZ<sup>26</sup> nachgewiesen wurde, daß die alkalische Phosphatase des Hühnerdarms ein Zinkenzym ist, liegt es nahe die Ergebnisse dieser Versuche in Analogie zu den Befunden von PLOCKE UND VALLEE<sup>21</sup> sowie SCHLESINGER UND BARRETT<sup>13</sup> bei der alkalischen Phosphatase aus *Escherichia coli* zu deuten, daß nämlich pro Enzymmolekül zwei Zinkatome gebunden werden. Geht man von der Annahme aus, daß die Enzymaktivität dem Zinkgehalt proportional ist, so müßte nach Entfernung des ersten Zinkatoms noch 50% Aktivität vorhanden sein. Bei allen gereinigten Enzymen tritt aber eine Hemmung auf, die größer als 50% ist. Daraus kann man schließen, daß das Zink nicht nur eine Rolle im enzymatischen Prozeß spielt, sondern—da es eine Quervernetzung im Molekül bildet—auch von Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Struktur ist. Durch Entfernen eines Zinkatoms könnte sich die Konformation verschieden stark ändern, und zwar in Abhängigkeit davon, in welchem Maße sie durch weitere Quervernetzungen, wie Disulfid-, Salz- oder Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Bindungen stabilisiert sind. Da die Erhaltung der Struktur durch das umgebende Medium und durch Fremdstoffe stark beeinflußt wird, kann durch Entfernen eines Zinkatoms auch eine schwächere Inaktivierung auftreten. Unsere Resultate werden durch Arbeiten und Ergebnisse von SCHLESINGER über die alkalische Phosphatase aus *E. coli* unterstützt. In diesen Untersuchungen<sup>13</sup> wird die Säuredenaturierung studiert, die unter Freisetzung des Zinks verläuft, und zwar stellt diese Inaktivierung

ebenfalls wie bei der Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  einen zweistufigen Prozeß dar. Bei weiteren Versuchen<sup>27</sup> über die Aktivierung einer mutationsveränderten Form der alkalischen Phosphatase, die kein Zink enthält, wird keine Korrelation zwischen gebundenem Zink und erhaltener Aktivität, sondern eine Abhängigkeit des Aktivitätsgrades bei einer konstanten Zinkkonzentration von dem pH-Wert und der Ionenkonzentration gefunden. Diese Ergebnisse führen auch zu der Ansicht, daß die wesentliche Aufgabe des Zinks die Aufrechterhaltung der nativen Konformation ist.

Weiteren Aufschluß über das Metall im Molekül der alkalischen Phosphatase geben die Versuche über die Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$ . In diesem Fall tritt nur bei AP III eine Inaktivierung auf, während die anderen drei Isoenzyme eine geringe Aktivierung zeigen. Eine Inaktivierung durch  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  sollte nur dann möglich sein, wenn das Metall eine höhere Affinität zu EDTA hat als  $\text{Ca}^{2+}$ . Da bei den Versuchen mit  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  gezeigt werden konnte, daß die Stabilitätskonstanten des Metallproteinkomplexes in den vier gereinigten Enzymen ungefähr gleich ist, muß man annehmen, daß nicht nur bei AP III das ursprüngliche Metall aus dem Enzymmolekül, sondern auch bei den anderen Enzymen entfernt wird. Im Gegensatz zu AP III scheint bei den anderen Isoenzymen ein Ersatz des Zinks durch Calcium ohne Verlust der enzymatischen Aktivität möglich zu sein. Daß diese Erhaltung der Aktivität nicht auf einer Aktivierung von natürlichem Enzym durch  $\text{Ca}^{2+}$  beruhen kann, wodurch die Inaktivierung durch EDTA kompensiert würde, ergibt sich aus den Versuchen über die Einwirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Um eine meßbare Aktivierung zu erreichen, muß eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  vorliegen, die aber bei der Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  wegen der hohen Stabilitätskonstanten und bei Annahme eines Austausches von  $\text{Ca}^{2+}$  gegen das Zink wegen der niedrigen Enzymkonzentration nicht erreicht wird. So bleibt nur die Erklärung, daß bei den alkalischen Phosphatasen außer bei AP III bei Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{CaEDTA}$  das Zink im Enzym gegen Calcium ausgetauscht wird und daß die Calcium-phosphatase etwas höhere Aktivität als das native Enzym zeigt. Die Aktivierung des Rohenzyms erklärt sich durch Komplexierung von Fremdionen und gleichzeitigen Ersatz von Calcium.

In dieser Arbeit wird gezeigt, wie stark die Verunreinigungen eines Enzympräparates die Ergebnisse bei Prüfung der enzymatischen Eigenschaften verfälschen können und daß der Grad der Aktivierbarkeit und Hemmung vom Reinheitsgrad abhängt. Die vier isolierten Isoenzyme aus der alkalischen Phosphatase des Hühnerdarms zeigen Unterschiede in ihrem Verhalten gegen Metallionen und Chelatbildner. Auf Grund der beschriebenen Versuche kann angenommen werden, daß jedes Enzymmolekül zwei Metallatome, wahrscheinlich Zink, enthält, die sich durch die Festigkeit ihrer Bindung an das Protein unterscheiden. Aus dem Verhalten der alkalischen Phosphatasen gegen Metallionen und Chelatbildner kann man schließen, daß die wesentliche Aufgabe der Metallionen die Stabilisierung der Proteinstruktur ist.

#### DANK

Herrn Prof. Dr. A. CATSCH danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für sein förderndes Interesse, Fräulein H. RECKERT, R. MODEST und E. KUSSING für ihren großen Fleiß und ihre Sorgfalt bei der Durchführung der Experimente.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur Reinigung und Trennung von vier Isoenzymen aus alkalischer Phosphatase von Hühnerdarm mittels Gelfiltration über Sephadex G-200 und anschließender Ionenaustauscherchromatographie über DEAE-Sephadex A-25 mit einem NaCl-Gradienten in Trispuffer angegeben. Alle vier Isoenzyme werden in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  aktiviert, während  $Na_2H_2EDTA$  bei allen Enzymen einen Inaktivierungsprozeß hervorruft, der in zwei Stufen verläuft und damit einen weiteren Beweis für das Vorhandensein von zwei Metallatomen pro Enzymmolekül liefert. Bei einer Phosphatase erfolgt durch  $Na_2CaEDTA$  ebenfalls Verlust der enzymatischen Aktivität. Drei der alkalischen Phosphatasen zeigen bei Einwirkung von  $Na_2CaEDTA$  keine Hemmung. Es muß angenommen werden, daß in diesen Fällen Zink gegen Calcium ausgetauscht wird und daß die Calcium-Phosphatase eine etwas höhere Aktivität als das native Enzym hat.

## LITERATUR

- 1 A. L. GROSSBERG, E. H. HARRIS UND M. SCHLAMOWITZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, 93 (1961) 267.
- 2 W. LANDAU UND M. SCHLAMOWITZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, 95 (1961) 474.
- 3 D. W. MOSS, *Biochem. J.*, 94 (1965) 458.
- 4 D. W. MOSS UND E. J. KING, *Biochem. J.*, 84 (1962) 192.
- 5 L. ENGSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 36.
- 6 F. J. BEHAL UND M. CENTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 110 (1965) 500.
- 7 D. DABICH UND O. W. NEUHAUS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 415.
- 8 O. A. BESSEY, O. H. LOWRY UND M. J. BROCK, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 321.
- 9 A. GAREN UND C. LEVINTHAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 470.
- 10 F. A. LOEWUS, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 219.
- 11 C. H. W. HIRS, S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 623.
- 12 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 13 M. J. SCHLESINGER UND K. BARRETT, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4284.
- 14 J. R. WHITAKER, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1950.
- 15 A. A. LEACH UND P. C. O'SHEA, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 245.
- 16 H. CSOPAK, *Acta Chem. Scand.*, 18 (1964) 2414.
- 17 M. PETERLIK, *Monatsh. Chem.*, 96 (1965) 1261.
- 18 P. PORTMANN, *Z. Physiol. Chemie*, 309 (1957) 87.
- 19 J. C. MATHIES, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1121.
- 20 S. TRUBOWITZ, D. FELDMAN, S. W. MORGENSTERN UND V. M. HUNT, *Biochem. J.*, 80 (1961) 369.
- 21 D. J. PLOCKE UND B. L. VALLEE, *Biochemistry*, 1 (1962) 1039.
- 22 D. J. PLOCKE, C. LEVINTHAL UND B. L. VALLEE, *Biochemistry*, 1 (1962) 373.
- 23 B. CLARK UND J. W. PORTEUS, *Biochem. J.*, 95 (1965) 475.
- 24 R. CLOETENS, *Biochem. Z.*, 308 (1941) 37.
- 25 R. CLOETENS, *Biochem. Z.*, 310 (1941) 42.
- 26 M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 43 (1960) 1149.
- 27 M. J. SCHLESINGER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3181.