

On fractionne la totalité des hydrolysats par électrophorèse à pH 6,5, à 26 V/cm, en 2 h 40 (voir fig. 7 et 10). Les fractions TB- γ 2/6-S1 (neutre) et TB- γ 2/6-S2, S3, S4, S5 (basiques) sont élues, puis testées quant à leur pureté, en vue de leur analyse de structure. TB- γ 2/6-S1 (neutre) et TB- γ 2/6-S2 (légèrement basique) sont fractionnés encore en S 1/1, S 1/2, S 1/3, S 1/4 et S 2/1, S 2/2, S 2/3, par électrophorèse à pH 2, à 26 V/cm, en 2 h 30 (voir fig. 7).

Les fractions TB- γ 2/5-S1 (neutre) et TB- γ 2/5-S2 (légèrement basique) sont également fractionnées par électrophorèse à pH 2, dans les mêmes conditions; elles donnent respectivement S 1/1, S 1/2, S 1/3, S 1/4 et S 2/1, S 2/2, S 2/3. Les fractions TB- γ 2/5-S3 et S4 et S5 sont basiques.

d) *Hydrolyse par la chymotrypsine.* 1,7 mg de TB- γ 2/5 sont dissous dans 0,9 ml du tampon acétate-carbonate d'ammonium 0,05M, de pH 8, contenant 100 μ g de chymotrypsine cristallisée WORTHINGTON, lot CD576 - 81. Après 26 h d'incubation, l'hydrolysat acidifié par HCOOH, débarrassé comme plus haut de l'acétate et du formiate d'ammonium, est fractionné par électrophorèse à pH 6,5, 26 V/cm, durant 3 h, en TB- γ 2/5-CH1 (neutre) et TB- γ 2/5-CH2 (basique).

4. *Quelques exemples de dosages (à la ninhydrine) des ac. aminés de peptides issus des hydrolyses partielles*, voir tableau 12.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE qui a permis la réalisation d'une partie importante de ce travail, ainsi que la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE à Bâle, dont l'aide a permis de l'achever.

SUMMARY

Two basic strepogenins have been isolated from a tryptic hydrolysate of casein, and their structures have been established.

We propose for the one (TB- γ 2/5) the sequence H. Ala. Glm. Pro. Val. Pro. Tyr. Ala. Pro. Pro. Val. Glm. Arg. OH and for the other (TB- γ 2/6) the sequence H. Val. Glm. Val. Leu. Pro. Pro. Val. Pro. Glm. Lys. OH.

Laboratoire de chimie organique et
pharmaceutique de l'Université de Genève

221. Zur biochemischen Kennzeichnung der Phosphomonoesterasen im Schwanzgewebe der *Xenopus*-Larve

von H. P. von Hahn, B. Niehus und R. Weber

(22. VIII. 60)

I. Einleitung. — Während die Phosphomonoesterasen im Säugetiergegewebe bereits ausführlich bearbeitet worden sind (siehe z. B. ROCHE¹), ist über die genaueren kinetischen und biochemischen Eigenschaften dieser Enzymgruppe im Gewebe der Amphibien noch wenig bekannt. Dies gilt besonders für das Schwanzgewebe der Amphibienlarve, welches als Modell für die Untersuchung der Biochemie der Morphogenese viel Verwendung findet. Im Verlaufe unserer Arbeiten über das Verhalten der Phosphomonoesterasen im Schwanz der *Xenopus*-Larve²⁾³⁾⁴⁾ erschien

¹⁾ J. ROCHE, in «The Enzymes», ed. J. B. SUMNER & K. MYRBÄCK, Acad. Press Inc., Publ. New York 1950, 473.

²⁾ R. WEBER, J. WEBER & B. NIEHUS, Helv. physiol. pharmacol. Acta, im Druck.

³⁾ R. WEBER & B. NIEHUS, Helv. physiol. pharmacol. Acta, im Druck.

⁴⁾ B. NIEHUS & H. P. v. HAHN, Helv. physiol. pharmacol. Acta 18, C33, 1960; H. P. v. HAHN, *ibid.* 18, C80, 1960.

es angezeigt, die kinetischen Verhältnisse der Phosphatase-Aktivität im sauren pH-Bereich genauer abzuklären.

Die vor kurzem von BELLINI⁵⁾ veröffentlichten Ergebnisse über Phosphatasen im Schwanz der Larve von *Bufo vulgaris* weichen nun aber erheblich von unseren Befunden am Schwanz der *Xenopus*-Larven ab, und zwar sowohl hinsichtlich des Verhältnisses der Aktivität von saurer zu alkalischer Phosphatase als auch in bezug auf die Wirkung von Mg^{++} . Es sollen daher die Befunde von BELLINI mit den unseren verglichen, und dann besonders aber die Frage nach der Anwesenheit zweier verschiedener saurer Phosphatasen im Schwanzgewebe diskutiert werden.

II. Methoden. – 1. *Tiermaterial*: Die 8–10 Wochen alten Larven von *Xenopus laevis* DAUD. stammen aus der Zucht des Zoologischen Instituts Bern. Die Tiere werden in einer Lösung 1:5000 des Narkotikums MS 222 (SANDOZ) betäubt und der ganze Schwanz im After amputiert. Die Schwänze werden sorgfältig ausgeblutet, mit Filterpapier vom anhaftenden Wasser befreit und auf einem Objekträger gewogen. Das Schwanzgewicht betrug 40–60 mg.

2. *Homogenate*: Die frisch gewogenen Schwänze werden mit der 34fachen Menge eiskalter 10-proz. Saccharose mit 0,001M Komplexon III in gläsernen POTTER-Homogenisatoren zerrieben. Diese Homogenate werden stets frisch verwendet.

3. *Substrat*: Substratstammlösung: 0,05M Na- β -Glycerophosphat (SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, Miss./USA) in dest. Wasser. 1 Teil Substratstammlösung wird mit 1 Teil Puffer gemischt. Für die pH-Reihen wurden folgende Puffersysteme verwendet:

a) pH 2,8–5,2: Acetatpuffer nach RAUEN⁶⁾. Endkonzentration im Ansatz 0,05M.

b) pH 3,5–9,3: MICHAELIS-Puffer (Veronal, Acetat, Oxalat, HCl) nach RAUEN⁶⁾. Endkonzentration 0,03M.

c) pH 7,9–11,0: Glycinpuffer nach RAUEN⁶⁾. Endkonzentration 0,02M.

Alle pH-Stufen wurden vor jedem Ansatz mit einem METROHM-pH-Meter kontrolliert. Bei Versuchen mit Effektorenzusatz werden diese ($MgCl_2$ und NaF) dem Substratgemisch beigegeben.

4. *Phosphatase-Bestimmung*: 30 μ l Substrat-Puffer-Gemisch werden mit 30 μ l Homogenat 3 Std. bei 40° inkubiert. Die Umsatzkurve verläuft linear bis 4 Std. (WEBER & NIEHUS⁸⁾). Die Reaktion wird durch Zugabe von 60 μ l 5-proz. eiskalter Trichloressigsäure gestoppt. Nach 5 Min. Zentrifugieren (18000 g) wird vom Überstehenden eine Stichprobe von 100 μ l entnommen und in ihr das freie anorganische Phosphat kolorimetrisch nach KUTTNER & COHEN⁷⁾ bestimmt: Man gibt unter Mischen 200 μ l 1,5-proz. Ammoniummolybdat in 2N Schwefelsäure und dann 100 μ l 0,08-proz. Zinnchlorid zu und misst die Extinktion nach 30 Min. bei 710 μ (Unicam S. P. 600, 400 μ l Mikrokuvetten). Die Extinktionswerte werden auf Grund einer (linearen) Eichkurve in μ mol Phosphat umgerechnet. Da sowohl Substratautolyse wie auch der Abbau endogener Substrate vernachlässigt werden können, muss einzig der endogene Phosphatgehalt des Homogenates als Korrektur bestimmt werden. Dazu gibt man zuerst Trichloressigsäure zum Substrat und fügt dann das Homogenat hinzu (t_0 -Kontrolle). Dieser Wert muss dann von den Extinktionswerten nach Inkubation abgezogen werden, um das durch Substratpaltung freigesetzte Phosphat zu erhalten.

III. Ergebnisse. – 1. *Verteilung der Phosphomonoesterase-Aktivität im Bereich pH 2,8–11,0 (ohne Effektoren-Zusatz)*. Wie Fig. 1 zeigt, sind im *Xenopus*-Schwanzgewebe zwei ausgeprägte pH-Optima zu verzeichnen: eines im sauren Gebiet bei pH 3,9 und eines im alkalischen Gebiet bei pH 8,9. Bei pH 5–6 durchläuft die Kurve ein breites Minimum. Nach der bei Säugetieren üblichen Klassifizierung der Phosphomonoesterasen (ROCHE¹⁾) sind unsere pH-Optima charakteristisch für die Enzyme I (pH 8,9) und III (pH 3,9). Die bei Säugetieren häufigere saure Phosphatase II mit pH-Optimum um pH 5 scheint in unserem Material weniger aktiv zu sein als das

⁵⁾ L. BELLINI, Boll. Soc. Eustachiana 51, 31, 1958.

⁶⁾ H. M. RAUEN, Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag Berlin 1960.

⁷⁾ T. KUTTNER & H. R. COHEN, J. biol. Chemistry 75, 517, 1927.

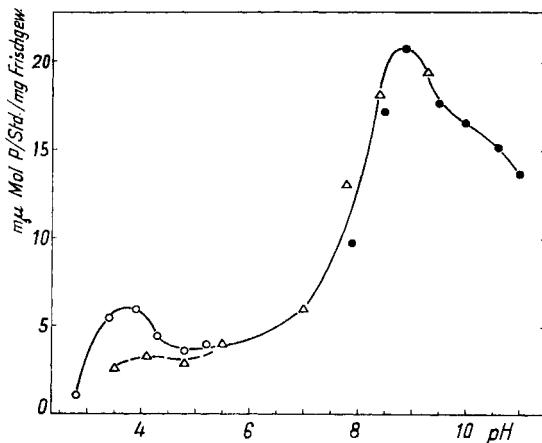
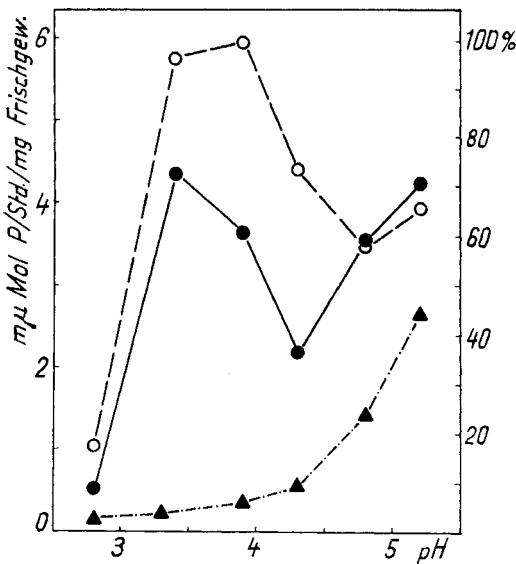


Fig. 1. Abhängigkeit der Phosphomonoesterase-Aktivität

im Schwanzgewebe von *Xenopus-Larven* vom pH. Keine Effektoren zugesetzt.

○—○ = mit Acetatpuffer △—△ = mit MICHAELIS-Puffer ●—● = mit Glycinpuffer

Fig. 2. Wirkung von 0,01M Mg^{++} und 0,01M F^- auf die Phosphomonoesterase-Aktivität im sauren pH-Gebiet. Acetatpuffer

○—○ = ohne Effektoren ●—● = mit Mg^{++} ▲—▲ = mit F^-

Enzym III. Es gilt nun zu zeigen, dass wir es hier bei pH um 4 und pH um 5 wirklich mit zwei verschiedenen Enzymen und nicht mit der Restaktivität des gleichen Enzyms zu tun haben. Dies sollen die folgenden Versuche mit Effektoren und die Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten zeigen.

BELLINI⁵⁾ hat ihre Bestimmungen mit Phenylphosphat bei pH 4,2 und 9,6 vorgenommen und dabei für die (nichtaktivierte) alkalische Phosphatase etwa 23% der Aktivität der sauren gefunden (Schwanz beinahe ausgewachsener Larven von

Bufo vulgaris). Aus Fig. 1 lässt sich errechnen, dass bei *Xenopus* die Aktivität bei pH 9,6 etwa 350% derjenigen bei pH 4,2 beträgt. Wir haben also erheblich mehr Aktivität im alkalischen Gebiet als im sauren, während bei BELLINI das Verhältnis gerade umgekehrt liegt.

Unterhalb pH 5 wird die Enzymaktivität durch den MICHAELIS-Puffer teilweise gehemmt (gestrichelter Teil der Kurve in Fig. 1). Dies dürfte auf das in diesem Puffer enthaltene Oxalat zurückzuführen sein (ROCHE¹)). Die unterschiedliche Hemmwirkung des Puffers bei pH 5 und pH 4 ist ein weiterer Hinweis darauf, dass wir es bei diesen pH-Werten mit der Wirkung zweier verschiedener Enzyme zu tun haben dürften.

2. Die Wirkung von 0,01M Mg^{++} . Mg^{++} ist ein starker Aktivator der Phosphomonoesterasen im alkalischen Bereich (Enzym I). Das Enzym II soll nicht beeinflusst, das Enzym III dagegen gehemmt werden (ROCHE¹)).

Im *Xenopus*-Schwanz finden wir (Fig. 2) zwischen pH 3,4 und 4,3 25–50% Hemmung, und zwischen pH 4,8 und 5,2 keine Wirkung. Im alkalischen Gebiet (pH 9,5) ergibt bereits 0,001M Mg^{++} über 200% Aktivierung (Tab. 1).

Tabelle 1. Aktivierung der Phosphomonoesterase durch Mg^{++} bei pH 9,5 (Xenopus-Schwanz).
Glycinpuffer, Homogenat 1:70, 0,012M $Na\beta$ -Glycerophosphat

(Mg^{++})	0	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-2} M
Aktivität in %	100%	124%	319 %	333%

Wir haben also in den drei pH-Bereichen (um 4, 5 und 9) starke Unterschiede in der Wirkung von Mg^{++} . Die gemessenen Effekte entsprechen ganz den für Säugergewebe beschriebenen Verhältnissen (siehe oben) und erlauben eine deutliche Differenzierung der Enzyme I, II und III in unserem Material.

Erstaunlicherweise hat BELLINI⁵) bei Wachstumsstadien von *Bufo* weder bei pH 9,6 noch bei pH 4,2 eine signifikante Wirkung von Mg^{++} (0,02M) gefunden. Die Aktivierung bei pH 9,6 beträgt nur etwa 10%, die Hemmung bei pH 4,2 ist nur im späten Vormetamorphosestadium (Stad. II von BELLINI), auch zu etwa 10%, festzustellen.

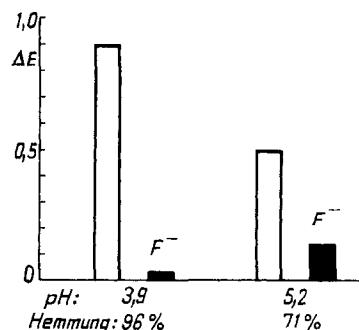


Fig. 3. Direkter Vergleich der F^- -Wirkung auf die Phosphomonoesterase-Aktivität bei pH 3,9 und 5,2. Acetatpuffer

□ = Aktivität ohne Zusatz ■ = Aktivität mit 0,01M F^-

3. Die Wirkung von 0,01 M F^- im sauren Gebiet. Der Effekt von F^- auf Phosphatase-Aktivität ist im sauren Bereich nur für das Enzym II (pH 5) eindeutig bekannt: es wird stark gehemmt. Für das Enzym III (pH 4) sind die Ergebnisse widersprechend (ROCHE¹)). Wie Fig. 2 an den pH-Reihen zeigt, finden wir bei *Xenopus* eine fast totale Aktivitätshemmung unterhalb pH 4. Um pH 5 scheint die Hemmung weniger stark zu sein. Dieses Verhältnis wird belegt durch die in Fig. 3 dargestellte Versuchsanordnung, bei der für die pH-Optima mit dem gleichen Homogenat die Aktivität mit und ohne F^- gemessen wurde: Der Abnahme der (ungehemmten) Aktivität von pH 3,9 nach pH 5,2 steht die Zunahme der gehemmten Aktivität gegenüber, so dass bei pH 3,9 eine relativ viel stärkere Hemmung resultiert. Auch dies scheint die Annahme einer Differenzierung der Enzyme II und III in unserem Material zu unterstützen.

4. Die MICHAELIS-Konstanten für saure Phosphatasen. Die Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstanten (K_m) erfolgte in Acetatpuffer bei pH 4,15 und 4,90. Die Auswertung der Diagramme nach LINEWEAVER & BURK⁸) ergab die in Tabelle 2 zusammengestellten Werte. Diesen ist zu entnehmen, dass bei pH 4,15 K_m etwa doppelt so gross ist wie bei pH 4,9, so dass offenbar für den pH-Bereich mit grösserem Ausmass der Spaltung eine kleinere Affinität zum Substrat anzunehmen ist. Der deutliche Unterschied in den K_m lässt seinerseits auf die Anwesenheit von *zwei* Enzymen schliessen.

Tabelle 2. Abhängigkeit der K_m vom pH

Ansatz	pH	$K_m \pm S.E.^a)$ $\cdot 10^{-3}$	N ^{b)}
Schwanzhomogenat 1:50 in 10-proz. Rohrzuckerlösung + 0,01M Komplexon III	4,90	$3,86 \pm 0,33$	6
Schwanzhomogenat 1:50 in 10-proz. Rohrzuckerlösung + 0,01 bzw. 0,001M Komplexon III	4,15	$7,80 \pm 0,54$	6

a) S. E. = Standard Error b) N = Anzahl der Bestimmungen

IV. Diskussion und Schlussbetrachtung. — Für Schwanzhomogenate von *Xenopus*-Larven haben wir mit Na- β -Glycerophosphat zwei ausgesprochene Maxima der pH-Aktivitätskurve nachgewiesen, und zwar liegen diese im alkalischen Gebiet um pH 9 (Phosphomonoesterase I) und im sauren Gebiet um pH 3,9. Dieses letztere Aktivitätsmaximum entspricht wahrscheinlich der Phosphomonoesterase III nach ROCHE¹). Eine solche Annahme wird noch gestützt durch die Ergebnisse mit Effektoren (Mg^{++} , F^-), die ein für die Phosphomonoesterase III typisches Verhalten erkennen liessen. Auf Grund der Wirkung von Mg^{++} und F^- bei pH 5 konnten wir überdies Anhaltspunkte dafür gewinnen, dass im *Xenopus*-Schwanz noch eine weitere, vermutlich mit dem Enzym II nach ROCHE¹) identische Phosphomonoesterase vor kommt.

⁸⁾ H. LINEWEAVER & D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658, 1934.

Obwohl wir bei pH 5 eine kleinere Aktivität gemessen haben, ist an diesem Punkte, wie die Bestimmung der MICHAELIS-Konstante zeigt, die Affinität des Enzyms zum Na- β -Glycerophosphat doppelt so gross wie in der Nähe des pH-Optimums von 3,9. Dies erlaubt den Schluss, dass vom pH-3,9-Enzym ganz erheblich grössere Mengen im Gewebe vorhanden sein müssen, damit trotz der geringeren Affinität eine grössere Substratspaltung erzielt wird.

Da auch BELLINI⁶⁾ bei *Bufo vulgaris* ein pH-Optimum bei pH 4,2 gefunden hat, könnte man annehmen, dass im Schwanzgewebe der Amphibienlarven (Kaltblüter) die Phosphomonoesterase III überwiegt, im Gegensatz zu den Geweben der Säuger (Warmblüter), wo das Enzym II vorzuheerrschen scheint.

Es ist daher unerwartet, dass BELLINI ganz im Gegensatz zu unseren hier beschriebenen Ergebnissen mit Mg⁺⁺ keine signifikante Effekte erhalten konnte. Besonders erstaunlich erscheint uns, dass sie bei pH 9,6 nur eine ganz geringfügige Aktivierung erhielt, während wir mit erheblich kleineren Mg-Konzentrationen Aktivitätserhöhungen auf über 300% fanden. Auch im Bereich des sauren pH-Optimums, wo wir für Enzym III eine deutliche Hemmung durch Mg⁺⁺ fanden, erhielt sie keinen Effekt. Auffallend ist ebenfalls, dass die (nichtaktivierte) alkalische Phosphatase bei *Xenopus* ca. die 4fache Aktivität der sauren erreicht, während sie bei *Bufo* kaum $\frac{1}{4}$ der sauren Aktivität aufzuweisen scheint. Es fragt sich, ob darin ein artspezifischer Unterschied zum Ausdruck kommt, oder ob nicht z. B. die Verwendung verschiedener Substrate (Na- β -Glycerophosphat bzw. Phenylphosphat) und die verschiedenen Methoden der Homogenisierung (Saccharose-Komplexon bzw. dest. Wasser als Suspensionsmedium) wenigstens teilweise dafür verantwortlich sein könnten.

Ausgeführt mit Unterstützung des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG.

SUMMARY

The distribution of phosphomonoesterase activity in the tail tissue of larvae of *Xenopus laevis* has been determined in the pH-range 2.8–11.0. Two pH optima, at pH 3.9 and 8.9, were found. The optimum at pH 8.9 as well as the strong activation by Mg⁺⁺, at this pH are characteristic for phosphomonoesterase I. By studying the effects of Mg⁺⁺ and F⁻ and determining the MICHAELIS constants, evidence was obtained for the presence of two more enzymes, acting at pH 3.9 and 5 respectively; they are assumed to correspond to the phosphomonoesterases III and II, respectively. These results are compared with those obtained by BELLINI on larval tail tissue of *Bufo vulgaris*.

Zoologisches Institut der Universität Bern (Schweiz)