

PRÄPARATIVE GEWINNUNG HOCHGEREINIGTER LYSOSOMENENZYME AUS RATTENLEBERN

P. BOHLEY, Heidrun KIRSCHKE, J. LANGNER und S. ANSORGE

*Physiologisch-chemisches Institut der
Martin-Luther-Universität, Halle (Saale)*

Received 11 August 1969

By means of a relatively simple procedure lysosomal enzymes from rat livers with 20% yield and a 50-fold enrichment were prepared. Density gradient centrifugation or tissue-preloading with triton VR 1339 is not necessary. Up to several liters of 50% liver homogenate may be used. Intact lysosomes are *not* obtained, because the crucial step in the tissue fractionation scheme is the selective release of lysosomal enzymes from a crude lysosome pellet by water extraction. The presence of neutral endopeptidases with high specific activities in lysosomes (estimated using azocasein and other proteins as substrates) is demonstrated.

1. Einleitung

Wie wir kürzlich gezeigt haben, treten neutrale Endopeptidasen in der Leber der Ratte mit der höchsten spezifischen Aktivität in der Lysosomenfraktion auf [1]. Zur weiteren Charakterisierung der Bedeutung dieser Endopeptidasen für die intrazelluläre Proteolyse [2] ist es notwendig, die Lysosomenenzyme von ihren Substratproteinen zu trennen. Wir beschreiben im folgenden ein Verfahren, welches diesen Anforderungen entspricht, jedoch keine intakten Lysosomen liefert. Es gestattet in einem Fraktionierungsgang die 50fache Anreicherung von lysosomalen Enzymen bei 20% Ausbeute und zugleich die Darstellung einer Cytosolproteinfraktion mit geringen Verunreinigungen an Partikelendopeptidasen. Auf die Vorbehandlung mit Triton-WR-1339 sowie auf den Einsatz von Dichtegradienten wurde verzichtet. Infolgedessen können die genannten Fraktionen frei von Detergentien in großem Massstab erhalten werden. Um die Substratproteine [2a] in hoher Konzentration und Reinheit zu gewinnen, geht das Verfahren von einem 50%igen, äusserst schonend aufgeschlossenen Leberhomogenat aus.

2. Methodik

Die Lebern von jeweils 50 männlichen 300–400 g schweren Wistarrratten (18–20 Std. nüchtern) wurden in Äthernarkose von der Pfortader aus mit 0,9%iger NaCl-Lösung sorgfältig blutfrei gespült (dieser und alle folgenden Schritte bei $< 8^{\circ}\text{C}$), mit 0,25 M Saccharose gewaschen, mit Messern schonend von Hand zerkleinert (Stücke < 3 mm), durch ein Perlonisieb (0,8 mm Maschenweite) gerieben, mit dem gleichen Volumen 0,25 M Saccharose vermischt und in Glashomogenisatoren (180 ml) mit Teflonstempeln (40 mm ϕ , 30 mm hoch, Spaltbreite 0,07 mm) homogenisiert. Das Homogenat (953 ± 5 ml mit $11,4 \pm 0,3$ g Protein-N und $0,65 \pm 0,06$ g Rest-N – Mittelwerte von drei Fraktionierungen mit je 50 Ratten –) wurde den im Schema angegebenen Zentrifugierungs- und Waschschritten unterworfen. Jede Endfraktion wurde danach bei -15°C eingefroren, Sedimente wurden vorher mit dem gleichen Volumen H_2O rehomogenisiert.

3. Analysen

Leitenzyme für (1) Mitochondrien: Glutamatdehydrogenase nach [3–5]; (2) endoplasmatische

Tabelle 1

Angegeben sind Mittelwerte von drei Fraktionierungen mit je 50 Rattenlebern (in Klammern jeweils die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert).

	Protein-N		Azocaseinabbau bei pH 7			β -Galaktosidase			β -Glycero- phosphatase			
	%	\pm	%	\pm	Q	%	\pm	Q	%	\pm	Q	\pm
1. G	91.6	(4.2)	114.0	(5)	1.0	95.4	(4)	1.0	105.9	(7)	1.0	
2. KMP	39.1	(2.1)	22.3	(4)	0.6 (0.1)	10.6	(2)	0.3 (0.1)	16.2	(2)	0.4 (0.1)	
3. KMÜ	10.6	(0.5)	25.2	(7)	2.4 (0.8)	30.9	(3)	2.9 (0.2)	27.8	(4)	2.6 (0.3)	
4. L 2	1.7	(0.2)	21.2	(2)	12.7 (1.8)	14.2	(4)	8.0 (1.5)	13.0	(2)	7.6 (1.6)	
5. WP	3.8	(1.5)	28.0	(6)	8.6 (2.2)	15.8	(7)	4.0 (0.6)	14.5	(4)	3.9 (0.4)	
6. L 3	3.8	(1.3)	43.8	(9)	11.9 (2.0)	26.4	(9)	6.8 (0.1)	27.4	(4)	7.7 (1.6)	
7. LÜ	0.4	(0.1)	19.1	(5)	48.5 (9.5)	20.4	(6)	49.3 (1.6)	13.7	(2)	35.2 (8.3)	
8. LM	3.2	(0.8)	14.5	(3)	5.9 (1.0)	6.1	(2)	2.0 (0.5)	11.2	(3)	3.6 (0.8)	
9. WÜ	13.1	(0.8)	6.2	(2)	0.5 (0.1)	10.3	(2)	0.8 (0.1)	10.0	(1)	0.8 (0.1)	
10. LW 1	2.5	(0.3)	2.0	(0)	0.8 (0.2)	6.2	(1)	2.4 (0.2)	6.0	(1)	2.4 (0.1)	
11. LW 2	1.3	(0.3)	1.0	(0)	0.8 (0.1)	1.9	(1)	1.5 (0.2)	2.3	(1)	1.9 (0.1)	
12. R	12.3	(0.6)	6.3	(3)	0.5 (0.2)	10.8	(6)	1.0 (0.5)	10.4	(4)	0.8 (0.3)	
13. C	16.7	(0.7)	4.1	(1)	0.2 (0.0)	3.3	(1)	0.2 (0.1)	3.3	(0)	0.2 (0.0)	

	Glukose-6-phosphatase			Glutamat-dehydrogenase			6-Phospho-glukonat- dehydrogenase		
	%	\pm	Q	%	\pm	Q	%	\pm	Q
1. G	122.1	(11)	1.0	90.0	(6)	1.0	97.9	(4)	1.0
2. KMP	29.2	(5)	0.8 (0.1)	86.8	(4)	2.2 (0.2)	2.3	(1)	0.1 (0.1)
3. KMÜ	25.5	(4)	2.4 (0.3)	4.9	(1)	0.5 (0.1)	7.6	(1)	0.7 (0.1)
4. L 2	1.5	(0)	0.9 (0.2)	1.4	(1)	0.8 (0.1)	0.5	(0)	0.3 (0.1)
5. WP	3.4	(1)	0.9 (0.2)	5.8	(3)	1.4 (0.4)	0.6	(0)	0.2 (0.1)
6. L 3	1.8	(1)	0.4 (0.1)	3.4	(1)	0.9 (0.2)	0		0
7. LÜ	0.2	(0)	0.6 (0.2)	0.1	(0)	0.4 (0.2)	0.2	(0)	0.4 (0.0)
8. LM	1.3	(0)	0.4 (0.1)	3.8	(1)	1.2 (0.6)	0.2	(0)	0.1 (0.1)
9. WÜ	23.1	(3)	1.8 (0.2)	1.4	(0)	0.1 (0.0)	22.4	(3)	1.7 (0.2)
10. LW 1	5.0	(1)	2.0 (0.3)	0.4	(0)	0.2 (0.0)	3.9	(1)	1.6 (0.1)
11. LW 2	2.5	(1)	2.1 (0.4)	0.3	(0)	0.3 (0.1)	0.6	(0)	0.5 (0.1)
12. R	12.3	(2)	1.0 (0.2)	1.1	(0)	0.1 (0.0)	6.2	(2)	0.5 (0.2)
13. C	0.3	(0)	0.02 (0)	0.5	(0)	0.03 (0)	56.1	(5)	3.3 (0.3)

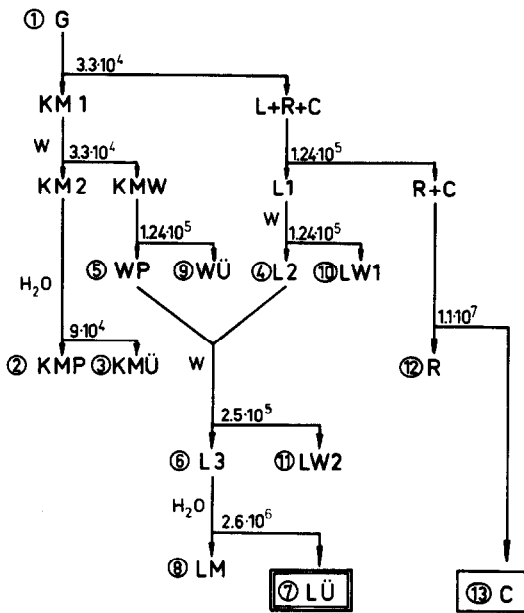
%-Angaben beziehen sich auf den Anteil der jeweiligen Fraktion an der Summe der Fraktionen Nr. 2 und 3 sowie 7 bis 13; unter 1. G jedoch ist die Ausbeute (Summe dieser Fraktionen als %-Anteil des eingesetzten Gesamthomogenats) aufgeführt.

Q = Anreicherungsfaktor (spezifische Aktivität, bezogen auf Protein-N, in Vielfachen der spezifischen Aktivität des Ausgangshomogenates G).

Weitere Abkürzungen siehe Legende zum Zellfraktionierungsschema.

Membranen: Glukose-6-phosphatase nach [6], dabei jedoch Phosphatbestimmung nach [7]; (3) Cytosol: 6-Phospho-glukonatdehydrogenase in Anlehnung an [8]; (4) Lysosomen: β -Glycerophosphatase nach [9], dabei jedoch Phosphatbestimmung nach [7],

β -Galaktosidase nach [10] und Azocaseinspaltung in Anlehnung an [11]: 100 μ l geeignet verdünnter Zellfraktionen (1 : 3 bis 1 : 12) wurden mit 100 μ l 1%iger Azocaseinlösung in 0.15 M KCl und 0.01 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 6.9) vermischt, 60 Min



Fraktionierungs Schema: Aufgeführt sind jeweils unter dem linken Pfeil die Sedimente, auf dem waagerechten Balken die integrierten [14] g.Min-Werte, unter dem rechten Pfeil die Überstände. Soweit Zahlen vor den Buchstaben der Fraktionen stehen, beziehen sie sich auf die Reihenfolge in der Tabelle. W bedeutet Waschung durch Zentrifugation nach Homogenisieren mit dem >10fachen Volumen des Sediments an 0.25 M Saccharose, H₂O bedeutet Homogenisieren mit dem 2½fachen Volumen des Sediments (KM2 bzw. L3) and H₂O.

Die Fraktionen L2 und WP wurden vor dem Waschvorgang vereinigt. Von Fraktion L3 wurde die locker aufsitze Schicht ins Waschwasser L2 abgossen. Bis einschliesslich 124.000 g.Min wurde an der grossen S-52-Schwingbecherzentrifuge (3000 U/Min, 30–32 cm Radius), bei den hohen Tourenzahlen an der präparativen VAC 60-Ultrazentrifuge der Fa. Janetzki (Leipzig) gearbeitet.

Abkürzungen: G = Gesamthomogenat; KM1 = 1. Kern-Mitochondrien-Sediment; KM2 = 2. Kern-Mitochondrien-Sediment; L = Lysosomen (L1–L3 = Lysosomensedimente); R = Ribosomen und Retikulum; C = Cytosol; KMW = Waschlösung von KM1; WP = Sediment aus KMW (enthält Lysosomen); WÜ = Überstand aus KMW; KMP = Kern-Mitochondrien-Sediment nach H₂O-Behandlung; KMÜ = Überstand aus KM2 nach H₂O-Behandlung; LM = Sediment aus L3 nach H₂O-Behandlung (Mitochondrien, Mikrosomenfraktion, Membrantrümmer); LÜ = Überstand aus L3 nach H₂O-Behandlung, enthält die gereinigten Lysosomenproteine; LW1,2 = 1. und 2. Lysosomenwaschwasser.

bei 37°C inkubiert, mit 200 µl 10%iger Trichloressigsäure gefällt, zentrifugiert und der Überstand bei 366 nm photometriert.

Ausserdem verfolgten wir den Abbau von nativen Cytosolproteinen und anderen Substraten über Amino-N- und Rest-N-Bestimmungen und mit anderen Verfahren [1].

Gesamt-N- und Rest-N-Bestimmungen erfolgten nach [12].

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1 (vgl. mit Abb. 1) zeigt, dass das Verfahren für die Anreicherung von Lysosomenenzymen geeignet ist und dass man auch die neutralen Endopeptidaseaktivitäten gegenüber Azocasein Enzymen mit typisch lysosomaler Lokalisierung zuschreiben kann: bei jeweils 50facher Anreicherung werden und 20% der Gesamtaktivität sowohl der β-Galaktosidase als auch der Azocaseinspaltung in der LÜ-Fraktion gefunden. Der geringere Anteil an β-Glycerophosphatase in LÜ beruht zumindest zum Teil auf der besseren Haftung dieses Enzyms an der Lysosomenmembran (siehe Fraktion LM, vgl. [13]). Die Fraktion LM besteht zum grössten Teil aus Mitochondrien, die man zu rund zwei Dritteln vor der Sedimentation der Lysosomenmembranen durch einen gesonderten Zentrifugierungsschritt (100.000 g.Min) aus L3 abtrennen kann. Die Lysosomenmembranen (bzw. ihre durch die Lyse entstandenen Bruchstücke) sedimentieren erst bei $2.600.000 \text{ g.Min}$ (oder besser bei noch grösseren Schwerefeldern) und lassen sich mit unserem Verfahren nicht in reiner Form gewinnen.

Ein Vergleich der Ausbeuten lysosomaler Enzyme in L2 und WP zeigt, dass die Rückgewinnung von Lysosomen aus KM1 durch Auswaschen und Sedimentieren wesentlich zur Erhöhung des Lysosomengehalts in L3 beiträgt. Die geringere spezifische Aktivität in WP wird zugunsten der Ausbeute in Kauf genommen, weil die entscheidende Anreicherung (4–7fach) bei der Lyse (LÜ-Gewinnung aus L3) erfolgt. Die Analysen von KMÜ lassen allerdings erkennen, dass auch nach dem Auswaschen noch fast die Hälfte der lysosomalen Enzyme (in sekundären Lysosomen?) in KM geblieben und

nur mit H₂O (aber auch so nicht vollständig) extrahierbar sind. Eine derartige H₂O-Behandlung löst weniger als 5% der Glutamatdehydrogenase (ähnlich bei Succinodehydrogenase und Cytochromoxydase) aus den Mitochondrien. Auch die endoplasmatischen Membranen sind nach der schonenden Homogenisierung noch ungenügend aus KM abgetrennt, lassen sich aber zum grössten Teil durch das Waschen (vgl. WÜ) und die H₂O-Behandlung (vgl. KMÜ) daraus entfernen. Wir müssen besonders auf die Gewinnung einer lysosomenenzymarmen Cytosolfraktion (vgl. Einleitung) achten und deshalb so schonend homogenisieren. Nach schärferem Homogenisieren (Spaltbreiten < 0,03 mm) lassen sich die endoplasmatischen Membranen leichter abtrennen und auch die Ausbeute an Lysosomen in L2 bzw. WP könnte wesentlich verbessert werden. Dass sich nach dem schonenden Homogenisieren ein besonders reines Cytosol gewinnen lässt, zeigt der Anreicherungsfaktor von 3.34 für 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, der auch vermuten lässt, dass das Cytosol der Rattenleber nur rund 30% (und nicht, wie bisher angegeben, 40%) der Proteine der Zelle enthält.

In LÜ sind 40 ± 7% des Stickstoffs trichloressigsäurelöslich. Wir fanden nach Aufarbeitung von 50 Rattenlebern (≈ 70 g Protein) in LÜ 320 mg Protein. Wenn rund 2% des Leberproteins (hier also 1.4 g) Lysosomenprotein ist [14], entspricht diese Ausbeute von 22% gut den für Azocaseinspaltung und Galaktosidase (vgl. Tab.) ermittelten Ausbeuten.

Die bisher beschriebenen Verfahren [14–22] erlauben die Gewinnung peroxisomenarmer, intakter Lysosomen in begrenzter Menge. Bei unserem Verfahren ist die Trennung von Peroxisomenproteinen noch nicht vollständig; wir fanden in der Lysosomenüberstands-Fraktion noch bis zu 2% der Katalaseaktivität [23] der Zelle. Trotzdem scheint uns das geschilderte Verfahren hinsichtlich der Anreicherung lysosomaler Enzyme den bei Anwendung von Triton-WR-1339 und/oder Zonalzentrifugen erzielten Ergebnissen nicht unterlegen zu sein.

Obwohl es hier als erster Schritt der Reindarstellung von neutralen Peptidasen eingesetzt wurde, eignet es sich auch zur Reinigung anderer lysosomaler Enzyme in größerem Massstab.

Literatur

- [1] P.Bohley, H.Kirschke, J.Langner, S.Ansorge und H. Hanson, Vortrag auf der Tagung der Dt. Ges. für exp. Medizin, 30-9-1968 in Leipzig.
- [2] P.Bohley, Naturwiss. 55 (1968) 211.
- [2a] S.Ansorge, P.Bohley, H.Kirschke und J.Langner, Abstracts V FEBS Meeting, Prag (1968) No. 66.
- [3] K.-H.Bässler, in: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. VI/A (Springer-Verlag, Berlin, 1964) 638.
- [4] Th. Bücher, W.Luh und D.Pette, in: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. VI/A (Springer-Verlag, Berlin, 1964) 292.
- [5] H.Beaufay, D.S.Bendall, P.Baudhuin und C.de Duve, Biochem. J. 73 (1959) 623.
- [6] C.de Duve, B.C.Pressman, R.Gianetto, R.Wattiaux und F.Appelmans, Biochem. J. 60 (1950) 606.
- [7] H.H.Taussky und E.Schorr, J. Biol. Chem. 202 (1953) 675.
- [8] G.E.Glock und P.Mc Lean, Biochem. J. 55 (1953) 400.
- [9] R.Gianetto und C.de Duve, Biochem. J. 59 (1955) 433.
- [10] J.C.Caygill, C.P.J.Roston und F.R.Jevons, Biochem. J. 98 (1966) 405.
- [11] J.Charney und R.M.Tomarelli, J. Biol. Chem. 171 (1947) 501.
- [12] P.Bohley, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 100.
- [13] P.L.Sawant, J.D.Desai und A.L.Tappel, Arch. Biochem. Biophys. 105 (1964) 247.
- [14] F.Leighton, B.Poole, H.Beaufay, P.Baudhuin, J.W. Coffey, S.Fowler und C.de Duve, J. Cell Biol. 37 (1968) 482.
- [15] H.Ragab, C.Beck, C.Dillard und A.L.Tappel, Biochim. Biophys. Acta 148 (1967) 501.
- [16] P.L.Sawant, S.Shibko, U.S.Kumta und A.L.Tappel, Biochim. Biophys. Acta 85 (1964) 82.
- [17] J.R.Corbett, Biochem. J. 102 (1967) 43P.
- [18] B.Withers, I. ab I. Davies und C.H.Wynn, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 (1968) 227.
- [19] H.Schuel, R.Schuel und N.J.Unakar, Analyt. Biochem. 25 (1968) 146.
- [20] D.H.Brown, Biochim. Biophys. Acta 162 (1968) 152.
- [21] R.Stahn, Dissertation Nat. Fak. München, 1969.
- [22] K.Hanning, R.Stahn und K.-P.Maier, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 784.
- [23] R.K.Bonnichsen, B.Chance und H.Theorell, Acta Chem. Scand. 1 (1947) 685.