

Über unlösliche, in Polyacrylamidgel fixierte Enzyme

THEODOR WIELAND, HELMUT DETERMANN und
KARL BÜNNIG¹

Institut für Organische Chemie der Universität
Frankfurt (Main)

(Z. Naturforsch. **21 b**, 1003 [1966]; eingegangen am 11. Juni 1966)

Viele Enzyme sind in der Zelle nicht frei beweglich, sondern an Strukturen gebunden oder in gesonderten Räumen enthalten. Als Modellsystem für solche fixierten Enzyme² haben wir den Einschluß von Katalase³, Lactatdehydrogenase (LDH), Alkoholdehydrogenase aus Hefe und Trypsin in Gele versucht, die durch dreidimensionale Polymerisation von Acrylsäureamid und *N,N'*-Bismethylenacrylamid in Gegenwart der gelösten Proteine entstanden. Wir beobachteten, daß im Gel wie bei l. c.^{2c} nach Zerkleinerung jeweils eine mehr oder weniger große Enzymmenge nicht auswaschbar zurückgehalten wird. Ein Gel mit brauchbarer LDH-Aktivität erhielten wir im folgenden Ansatz:

285 mg Acrylsäureamid und 15 mg Bismethylenacrylamid wurden in 2,3 ml 0,05-*m.* Phosphatpuffer (p_H 7,6, 10^{-3} -*m.* an Titriplex III) gelöst. Unter Reinstickstoff mit Magnetrührer wurden bei Raumtemperatur 1,0 mg Schweineherz-LDH (ca. 20 000 Bücher-E/mg) dann 0,1 ml 5-proz. wäßrige β -Dimethylaminopropionitril-Lösung und schließlich 0,1 ml 5-proz. wäßrige Ammoniumpersulfatlösung zugegeben. Nachdem nach 3 bis 4 Min. der Rührkern im erstarrenden Gel stecken blieb, wurde noch 30 Min. im Eisbad aufbewahrt. Der Gelblock wurde durch Durchpressen durch ein Sieb zerkleinert, und in Form von ca. 0,3 mm großen Körnern mit wenigstens 150 ml der oben angegebenen Pufferlösung in einer kleinen Säule ausgewaschen. Die in der Waschlösung bestimmte Eiweißmenge⁴ diente zur in-

direkten Ermittlung der im Gel verbliebenen Menge Enzym.

Die enzymatische Aktivität wurde in der Weise bestimmt, daß man durch ein definiertes Volumen der Gelpartikel in einer kleinen Säule Pyruvat und hydriertes Coenzym (NADH) in definierter Geschwindigkeit strömen ließ und die Abnahme von NADH spektrophotometrisch verfolgte. Das oben beschriebene LDH-Gel enthielt dieser Messung zufolge 57 E pro ml, d. h. 1% der ursprünglich im ml des Ansatzes enthaltenen Aktivität. Später fanden wir, daß sich bedeutend aktivere Gele erhalten lassen, wenn man das Acrylamid ohne Vernetzer in der Hälfte des Endvolumens ca. 2 Min. lang polymerisiert, dann den Vernetzer und das Enzym in der zweiten Hälfte des Ansatzes zusetzt und noch ca. 2 Min. gelieren läßt. Das so erhaltene Präparat besaß 194 E/ml Gelpartikel.

Ein im Exsikkator getrocknetes Gel zeigte nach einem Monat keinen meßbaren Aktivitätsverlust, ein anderes, das im gequollenen Zustand im Kühlschrank aufbewahrt wurde, hatte nach 6 Monaten immerhin fast noch 10% der ursprünglichen Wirksamkeit. Eine Enzymlösung gleicher Konzentration ist bereits nach wenigen Tagen inaktiv.

Von der Alkoholdehydrogenase waren 5% und vom Trypsin 11% der eingesetzten Aktivität im simultanpolymerisierten Gel wieder zu finden. Über die Natur der Bindung, ob es sich um in Hohlräume oder zwischen Molekülbündel der Matrix mechanisch eingeschlossene Enzymmoleküle handelt, oder ob das Protein bei der Polymerisation radikalisch covalent an einigen Seitenketten gebunden wird, läßt sich bisher keine sichere Aussage machen. Hierauf gerichtete Versuche sind im Gang.

Die Untersuchung wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

¹ Teil der Dissertation K. BÜNNIG, Universität Frankfurt (Main), 1966. D 30.

² Unlösliche, biologisch aktive Enzyme sind nach verschiedenen Methoden erhalten worden: a) durch Kupplung mit diazotiertem Polyaminostyrol von N. GRUBHOFER u. L. SCHLEITH, Naturwissenschaften **40**, 508 [1953], mit Carboxymethylcelluloseazid von M. A. MITZ, L. J. SUMMARI, Nature [London] **189**, 576 [1961], mit reaktionsfähigem, z. B. Isothiocyanatgruppen-haltigem Sephadex von R. AXÉN u. J. PORATH, Nature [London] **210**, 367 [1966]; b) durch Bindung an Austauschere, z. B. Dowex 50 durch L. B. BARNETT u. H. B. BULL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **36**, 244 [1959]; c) durch Ankondensieren von Poly-

aminosäureketten von E. KATCHALSKI et al., z. B. J. biol. Chemistry **236**, 1720 [1961]; d) durch Adsorption (von Papain) an eine Kollodiummembrane und anschließendes Vernetzen mit bisdiazotierter Benzidin-3,3-disulfonsäure und e) — was unseren Versuchen am nächsten kommt — durch vernetzende Polymerisation von Acrylamiden in Gegenwart von Enzymen von P. BERNFELD u. J. WAN, Science [Washington] **142**, 678 [1963] und G. P. STICKS u. S. J. UPDIKE, Analytic Chem. **38**, 726 [1966].

³ Versuche von R. LOTZ, 1965.

⁴ a) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951]; b) M. EGSTEIN u. F. H. KRENTZ, Klin. Wochenschr. **33**, 879 [1955].