

Deutsche Ausgabe

HANDBUCH DER HISTOCHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON

WALTHER GRAUMANN und KARLHEINZ NEUMANN

Göttingen

Köln

BAND VII ENZYME ERSTER TEIL

Mit 8 zum Teil farbigen Abbildungen
und 4 Tabellen



GUSTAV FISCHER VERLAG · STUTTGART

1960

BAND VII/1
ENZYME

ERSTER TEIL

HISTOCHEMISCHE METHODEN ZUM NACHWEIS
DER ENZYMAKTIVITÄT

BEARBEITET VON

H. W. DEANE - New York · R. J. BARNETT - New Haven
A. M. SELIGMAN - Baltimore

Mit 8 zum Teil farbigen Abbildungen
und 4 Tabellen



GUSTAV FISCHER VERLAG · STUTTGART
1960

©

Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1960

Alle Rechte vorbehalten

Satz und Druck: Ungeheuer & Ulmer, Ludwigsburg

Einband: H. Koch, Tübingen

Printed in Germany

HANDBUCH DER HISTOCHEMIE

BAND VII/1

HANDBUCH DER HISTOCHEMIE

MIT BEITRÄGEN VON

L. ARVY - Paris · K. ATERMAN - Halifax · W. B. ATKINSON - Louisville ·
R. J. BARNETT - New Haven · J. BRACHET - Brüssel · A. M. BRESLAU -
Los Angeles · M. S. BURSTONE - Bethesda · M. CLARA - Istanbul ·
A. M. DALCQ - Brüssel · H. W. DEANE - New York · H. DEBUCH - Köln ·
B. DE LERMA - Bari · P. DIEZEL - Heidelberg · F. DUSPIVA - Freiburg ·
H. EICHNER - Münster · M. GABE - Paris · P. GEDICK - Bonn · W.
GÖSSNER - Tübingen · G. GOTTSCHESKI - Mariensee · W. GRAUMANN -
Göttingen · E. HARBERS - Göttingen · N. A. HILLARP - Lund · F. H.
KASTEN - College Station Texas · J. KRUSZYNSKI - Liverpool · S. LAGER-
STEDT - Lund · H. MAYERSBACH - Graz · W. MONTAGNA - Providence ·
W. MÜLLER - Köln · J. MULNARD - Brüssel · D. NAIDOO - London · H.
NAORA - Tokyo · K. NEUMANN - Köln · J. PASTEELS - Brüssel · C. G.
ROSA - New Haven · R. M. ROSENBAUM - New York · F. ROSSI - Genua ·
J. H. C. RUYTER - Amsterdam · W. SANDRITTER - Frankfurt · H. G.
SCHIEMER - Frankfurt · W. J. SCHMIDT - Gießen · A. M. SELIGMAN -
Baltimore · H. SWIFT - Chicago · D. S. VAN FLEET - Amherst · J. T.
VELARDO - New Haven · C. VENDRELY · R. VENDRELY - Paris · M.
VIALLI - Pavia · M. WACHSTEIN - Brooklyn · R. WEGMANN - Paris ·
M. WOLMAN - Jerusalem

HERAUSGEGEBEN VON

WALTER GRAUMANN und KARLHEINZ NEUMANN

Göttingen

Köln



GUSTAV FISCHER VERLAG · STUTTGART

1960

Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität

VON

H. W. DEANE, R. J. BARNETT und A. M. SELIGMAN

Inhaltsverzeichnis

Einführung	1
I. Allgemeines über die Eigenschaft von Enzymen	3
A. Enzyme als Biokatalysatoren	3
B. Chemische Eigenschaften der Enzyme	5
1. Die Eiweißnatur der Fermente	5
2. Abhängigkeit der Enzymwirkung vom pH	6
3. Der Einfluß der Temperatur	6
4. Hemmung und Aktivierung	7
5. Messung der enzymatischen Aktivität	8
II. Bedingungen für den Enzym-Nachweis in situ	9
A. Die Vorbereitung des Gewebes	10
1. Unfixiertes Gewebe	11
2. Fixation	14
3. Einbettung	16
B. Die Inkubation	17
1. Das Substrat	17
2. Bedingungen der Inkubation	20
3. Das Endprodukt der Reaktion	23
III. Oxydoreduktasen	25
A. Aerobe Oxydasen	26
1. Kupferhaltige Oxydasen	26
a) Tyrosinoxidase	28
α) Dopa-Methode	29
β) Tyrosin-Methode	31
b) Polyphenoloxidasen	32
c) Pseudophenoloxidasen	32
2. Eisenhaltige Enzyme	33
a) Peroxydasen und Pseudoperoxydasen	35
α) Benzidinmethode	38
β) Alkalische Nadireaktion	39
γ) 1-Naphthol-Reaktion	39
δ) Thioindoxylmethode	40
ϵ) Kontrollreaktionen	40
ζ) Indirekte Methoden	41
b) Katalasen	41
c) Das Cytochrom-System	43
α) Die Nadi-Methode	45
β) Redox-Farbstoffe	47
B. Dehydrogenasen	51
1. Anwendung reduzierbarer Indikatoren	52
a) Ältere Methoden	52
b) Tetrazoliumsalze	53

2. Nachweis der allgemeinen Dehydrogenaseaktivität	58
3. Anaerobe Dehydrogenasen	60
a) Succinodehydrogenase	60
b) l-Glycerophosphat-Dehydrogenase	65
c) An Coenzym gebundene Dehydrogenasen	66
d) Fettsäure-Dehydrogenasen	68
4. Aerobe Dehydrogenasen	68
a) Xanthin-Dehydrogenase	69
b) Aminosäure-Dehydrogenasen	70
c) Amin-Dehydrogenasen	71
α) Tetrazolium-Methode	72
β) Nachweis des Aldehyds	72
d) Lipoxydase	75
IV. Hydrolasen	76
A. Histochemische Methoden zum Nachweis von Hydrolasen	76
1. Metallsalz-Methoden	80
a) Alkalisches pH: Calciumsalz-Methode	81
b) Saures pH: Die Bleisalz-Methode	86
2. Azofarbstoff-Methoden	88
a) Substrate	88
b) Diazonium-Salze	93
c) Azofarbstoff-Substrate	96
3. Indoxylester-Methoden	97
B. Carboxylsäure-Esterasen	98
1. Esterasen und Lipasen	99
a) Vorbemerkungen	99
b) Histochemische Methoden	100
α) Vorbehandlung des Gewebes	100
β) Metallsalz-Methoden	101
γ) Azofarbstoff-Methoden	103
δ) Indoxyl-Substrate	105
2. Cholinesterasen	107
a) Vorbemerkungen	107
b) Aktivatoren und Hemmstoffe	108
c) Histochemische Methoden	109
α) Vorbereitung des Gewebes	109
β) Metallsalzmethode	109
$\alpha\alpha$) Fettsäureester des Cholin	109
$\beta\beta$) Thiocholin-Methode	110
$\gamma\gamma$) Thioessigsäure-Methode	113
γ) Azofarbstoff-Methoden	113
δ) Indoxyl-Methoden	115
C. Sulfatasen	115
a) Vorbemerkungen	115
α) Arylsulfatasen	116
β) Glycosulfatasen	116
γ) Myrosulfatasen	116
δ) Chondrosulfatasen	116
b) Histochemische Methoden	117
α) Metallsalz-Methode	117
β) Azofarbstoff-Methoden	117
D. Phosphatasen	119
1. Phosphoesterasen	119

2. Phosphomonoesterasen	122
a) Unspezifische alkalische Phosphatase (Phosphomonoesterase I)	122
α) Vorbemerkungen	122
β) Histochemische Nachweismethoden	125
$\alpha\alpha$) Metallsalz-Methoden	126
$\beta\beta$) Azofarbstoff-Methoden	130
b) Saure Phosphatasen (Phosphomonoesterasen II, III, IV)	133
α) Vorbemerkungen	133
β) Histochemische Methoden	134
$\alpha\alpha$) Metallsalz-Methoden	135
$\beta\beta$) Azofarbstoff-Methoden	137
$\gamma\gamma$) Indoxylphosphat-Methoden	139
c) Spezifische Phosphomonoesterasen	139
α) 5'-Nucleotidase	140
β) Glucose-6-phosphatase	142
3. Phosphodiesterasen	144
4. Polyphosphatasen	144
a) Thiaminpyrophosphatase	145
b) Adenosintriphosphatasen	146
c) Anorganische Pyrophosphatasen	150
d) Metaphosphatasen	150
5. Phosphoamidasen	151
E. Peptidasen	154
F. Amidasen	157
1. Urease	158
α) Metallsalz-Methoden	158
β) Indikator-Methoden	159
2. Acylamidase	159
G. Glykosidasen	160
1. β -D-Glucuronidase	160
2. β -D-Galactosidase	164
V. Verschiedene weitere Enzyme	165
A. Transferasen	165
1. Amylophosphorylase	165
α) Enzyme pflanzliche Herkunft	166
β) Enzyme tierischer Herkunft	167
B. Lyasen-Synthetasen	169
1. Aldolase	169
2. Cystein-Desulphydrase	171
3. arboanhydrase	171
α) Allgemeines	171
β) Histochemische Methoden	172
Schlußbetrachtung	173
Literatur	175
Autorenregister	206
Sachregister	213

Einführung

Die folgende Zusammenfassung¹ will über Grundlagen, Durchführung und Leistungsfähigkeit von Arbeitsmethoden berichten, deren Aufgabe der Nachweis von Enzymaktivität *in situ* ist. Der Histologe braucht vom Wert der Lokalisierung bestimmter Substanzen oder Aktivitäten in Zellen oder, falls möglich, in bestimmten Zellbereichen oder Organellen nicht überzeugt zu werden. Der Biochemie wird durch die histochemische Betrachtungsweise eine neue Dimension eröffnet. Die Möglichkeit einer genaueren Zuordnung von Stoffen an Strukturen mikroskopischer Größenordnung verspricht weitere Fortschritte bei der immer tieferen Analyse des zellulären Geschehens und damit der Physiologie des gesamten Organismus.

¹ Die Bearbeitung von Teilen dieses Werkes ist durch Stipendien der National Institutes of Health, Department of Health, Education and Welfare unterstützt worden.

Da beabsichtigt ist, durch Herausgabe von Ergänzungsbänden diesen Beitrag auf dem Laufenden zu halten, die Literatur jedoch auf zahlreiche verschiedenartige Zeitschriften verteilt ist, würde es für die Verfasser eine große Hilfe bedeuten, wenn von Veröffentlichungen auf diesem Gebiet Sonderdrucke an den als ersten genannten Autor (H. W. DEANE, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Pathology, New York 61, N.Y.), gesandt werden könnten.

In diesem Beitrag werden einheitlich folgende Bezeichnungen benutzt:

1. Temperaturen werden in Grad Celsius ($^{\circ}$ C) ausgedrückt.
2. Elemente, Ionen und anorganische Bestandteile werden mit den gebräuchlichen chemischen Formeln bezeichnet.
3. Mol bedeutet Molekulargewicht in Gramm pro Liter, n bedeutet normale Konzentration (Konzentration einer Lösung in Grammäquivalent pro Liter).
4. o bezeichnet die ortho-, m die meta- und p die para-Stellung bei Phenolkörpern.
5. α und β wird nur zur Bezeichnung sterischer Formeln von Glykosiden benutzt. Dagegen werden zur Kennzeichnung der 1- und 2-Position statt α und β Ziffern verwendet.
6. Die Bezeichnung -SH-Verbindung gilt für Substanzen mit einer freien -SH-Gruppe (Sulfhydrylgruppe) wie z. B. Cystein. Die Bezeichnung -SH-Reagens bezeichnet Substanzen, die ihrerseits mit freien -SH-Gruppen reagieren (wie z. B. p-Chlormercuribenzoat). Entsprechend wird als Carbonyl-Verbindung eine Verbindung mit einer freien C=O-Gruppe bezeichnet, während Carbonyl-Reagens eine Substanz ist, die mit solchen Gruppen reagiert.
7. Vereinzelt sind Enzyme und in einigen Fällen auch ihre Substrate im Text durch Abkürzungen bezeichnet worden, wie sie fast allgemein in die Literatur Eingang gefunden haben. So z. B. DPN (Diphospho-pyridinnucleotid, Coenzym I), TPN (Triphospho-pyridinnucleotid, Coenzym II), Dopa (L-3,4-Dioxyphenyl-alanin), Nadi-Reagens (1-Naphthol und Dimethyl-p-phenyldiamin). Im übrigen wurde in der deutschen Ausgabe des Handbuchbandes auf die Anwendung von Abkürzungen soweit wie möglich verzichtet.
8. In einigen Fällen wurden an Stelle der chemischen Benennung allgemein übliche Handelsbezeichnungen eingesetzt, z. B. Versene (Komplexon), Veronal, Janusgrün B, Eserin, Aquaffin, Neotetrazolium und Tetrazolpurpur. Soweit wie möglich wurden die durch HOFFMANN-OSTENHOF (1950, 1953) vorgeschlagenen Bezeichnungen und Klassifikationen benutzt.

Dennoch haben unvermeidliche Irrtümer, die stets mit neuen Methoden Hand in Hand gehen, gelegentlich zu einer grundsätzlichen Ablehnung der ganzen Arbeitsrichtung geführt, besonders durch Spezialisten aus Nachbardisziplinen, die bereits über exakteres methodologisches Rüstzeug verfügten. Ein Blick auf die Entwicklung anderer Fachgebiete lehrt jedoch, daß der Fortschritt oft ebenso durch Irrtümer wie durch korrekte Befunde gefördert worden ist. Bestätigt wird diese These durch die Schwierigkeiten und Widersprüche bei der Zellfraktionierung, einem Arbeitsgebiet, das gleichzeitig mit unserem entwickelt wurde (DUVE und BERTHET 1954).

Das Wiedererwachen des Interesses an der Enzym-Histochemie begann 1936 mit der Veröffentlichung von LISONS „Histochemie animale“. Die Entdeckung einer histochemischen Nachweismethode für ein hydrolytisches Enzym, der alkalischen Phosphatase, gleichzeitig durch TAKAMATSU und GOMORI, gab 1939 dieser Forschungsrichtung weiteren Auftrieb. Das große Interesse an diesen Methoden geht sicher auch darauf zurück, daß die Biochemie der Enzyme sich bis zum Jahre 1940 soweit entwickelt hatte, daß nicht nur vereinzelte Histologen zur Arbeit auf diesem Gebiet ermutigt wurden.

Die schnelle Entwicklung der Enzym-Histochemie nach dem Erscheinen von LISONS Monographie wird durch die rasch anwachsende Zahl neuer Methoden deutlich (DEMPSEY und WISLOCKI 1946; LILLIE 1948; GLICK 1949; BRADFIELD 1950; DOUNCE 1950; PEARSE 1951; GOMORI 1952a; LISON 1953; PEARSE 1953a; VAN FLEET 1952, LILLIE 1954; NOVIKOFF 1955). Man kann damit rechnen, daß die Ausbreitung dieses Arbeitsgebietes sich weiter fortsetzt, gefördert durch die ständig wachsende Zahl von Publikationen und Erkenntnissen in diesem Bereich. Der rasche Fortschritt spiegelt sich in der Gründung mehrerer der Histochemie gewidmeter Zeitschriften in verschiedenen Ländern (z. B. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1953; *Acta histochemica* 1954; *Rivista di Istochimica normale e patologica* 1954; *Journal of biophysical and biochemical Cytology* 1955; *Annales d'Histochemie und Histochemie*).

Vor 1939 befaßten sich die Versuche zum Nachweis von Enzymen fast ausschließlich mit den Oxydoreduktasen. Erst später hat sich das Interesse auf eine andere große Gruppe von Enzymen, die Hydrolasen, konzentriert. Abgesehen von den Dehydrogenasen sind die Oxydoreduktasen in den letzten Jahren vernachlässigt worden, wodurch eine bedauerliche Ungleichmäßigkeit unserer Kenntnisse entstanden ist.

Die vorliegende Darstellung ist in verschiedene Abteilungen gegliedert. Im folgenden Abschnitt (I) werden die allgemeinen Charakteristika der Enzyme behandelt. Danach werden die Bedingungen für die Lokalisation der Enzymaktivität zunächst unter allgemeinem Gesichtspunkt betrachtet (II). In den weiteren Kapiteln werden die speziellen Methoden zum Nachweis der verschiedenen Oxydoreduktasen (III) und der Hydrolasen (IV) dargestellt. Als letztes werden die Enzyme abgehandelt, die außerhalb der beiden Kategorien stehen (V).

Innerhalb jedes Kapitels der Abschnitte III bis V werden zunächst kurz die aus biochemischen Untersuchungen bekannten Eigenschaften der Enzyme aufgeführt. Es folgen die bisher vorgeschlagenen histochemischen Methoden. Dabei haben wir uns bemüht, die Erhaltung des Enzyms in seiner aktiven Form, die Spezifität des Enzyms, die Bedingungen der Reaktion und vor allem die Verlässlichkeit der Lokalisation kritisch zu diskutieren. Soweit sie der histochemischen Fragestellung dienlich sind, haben auch biochemische Methoden oder andere zusätzliche Verfahren zur Lokalisation von Enzymen Erwähnung gefunden.

I. Allgemeines über die Eigenschaft von Enzymen

A. Enzyme als Biokatalysatoren

Der ständige Ablauf einer Vielzahl chemischer Reaktionen ist für die lebende Zelle charakteristisch. Es mag erlaubt sein, die Gesamtheit dieser Vorgänge als das Wesentliche des Lebens aufzufassen. Der lebende Organismus besitzt die Fähigkeit zum Aufbau wie zum Abbau komplizierter organischer Verbindungen. Diese chemischen Reaktionen laufen zum größten Teil nicht spontan ab, sondern sind an das Mitwirken von Zellen oder Zellbestandteilen gebunden. Voraussetzung für ihr Zustandekommen ist ein System von Katalysatoren, welche als Enzyme oder Fermente bezeichnet werden.

Diese Katalysatoren wirken nicht nur, indem sie Reaktionen überhaupt ermöglichen, sondern auch, indem sie sie beschleunigen oder ihren Ablauf in eine bestimmte Richtung lenken, so daß andere, an sich mögliche Reaktionswege nur noch in unbedeutendem Ausmaß beschritten werden. Die Bedeutung der Enzyme wird klar, sobald man sich vor Augen führt, daß die Existenz lebenden Gewebes nicht so sehr von der Tatsache abhängt, daß *überhaupt* Energie freigesetzt wird, sondern daß die Freisetzung von Energie in *kontrollierter* Weise erfolgt. Lebende Organismen sind fähig, komplizierte chemische Verbindungen durch ein System von Katalysatoren in solcher Weise hindurchzuführen, daß nicht nur die Energieausbeute nutzbar wird, sondern darüber hinaus die molekularen Bauelemente auch beim strukturellen Aufbau des Organismus Verwendung finden.

Allgemein gesprochen sind *Katalysatoren* anorganische oder organische Substanzen, welche die *Geschwindigkeit* chemischer Reaktionen beeinflussen. Sie erscheinen nicht in der Summenformel der Reaktion und werden nicht Bestandteil des Endproduktes. Katalysatoren nehmen an der Reaktion selbst teil, kehren jedoch in ihre ursprüngliche Form zurück, sobald der Reaktionsablauf beendet ist. Katalysatoren sind durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

1. Sie sind in äußerst kleinen Konzentrationen wirksam.
2. Sie unterbinden nicht die Umkehrung einer reversiblen Reaktion, führen jedoch dazu, den chemischen Prozeß in einer Richtung zu beschleunigen.
3. Sie sind spezifisch auf bestimmte chemische Reaktionen gerichtet.

Die Biokatalysatoren oder *Enzyme* unterscheiden sich von anorganischen Katalysatoren in mehrfacher Hinsicht (FRUTON und SIMMONDS 1953; WHITE et al. 1954). Dies geht in erster Linie auf die Tatsache zurück, daß Enzyme Eiweißkörper sind und infolgedessen die für Proteine charakteristischen Eigenschaften zeigen. Hierüber soll im folgenden Abschnitt (S. 5) gesprochen werden.

Es gibt jedoch noch andere Unterschiede: Enzyme besitzen die Fähigkeit, chemische Reaktionen bei verhältnismäßig niedrigen Temperaturen und in annähernd neutralen wäßrigen Lösungen herbeizuführen. Die Mehrzahl der sonst bei anorganischen oder organischen Reaktionen beteiligten Katalysatoren bleibt unter diesen Bedingungen wirkungslos. Naturgemäß laufen die im Organismus von Biokatalysatoren gesteuerten Umsetzungen viel langsamer ab, als katalytisch gesteuerte Reaktionen die mit dem Rüstzeug der Chemie unter Hitze oder unter Druck vorgenommen werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen Enzymen und Katalysatoren besteht darin, daß Enzyme zumeist extrem *spezifisch in ihrer Aktivität* sind, während Kataly-

satoren bei weitem nicht diesen Grad an Spezifität besitzen. Die Spezifität der Enzyme äußert sich nicht nur in der Beschränkung auf bestimmte Substanzen, mit denen sie reagieren (Substrate), sondern auch in der Festlegung auf eine bestimmte Art der Reaktion. Es muß jedoch betont werden, daß das Ausmaß der *Substratspezifität* bei den verschiedenen Enzymen in weiten Grenzen schwankt. Beispielsweise vermögen die unspezifischen Esterasen Carbonsäureester zu hydrolysieren, die sowohl hinsichtlich ihres alkoholischen Restes wie ihrer Säuregruppe weit voneinander abweichen. Andererseits gibt es Glykosidasen (beispielsweise die α -D-Glucosidase), die nur ein bestimmtes Glykosid-Derivat eines bestimmten Zuckers hydrolysiert. Die *Reaktionsspezifität* ist dagegen mit wenigen Ausnahmen absolut (HELFERICH 1950). Es gibt jedoch auch hier einzelne Peptidasen, die den entsprechenden Ester schneller hydrolysieren als das Amid (E. SMITH 1951).

Außerdem katalysieren Enzyme verschiedener Herkunft (z. B. aus verschiedenen Organen desselben Tieres oder dem gleichen Organ verschiedener Spezies) ein und dieselbe Reaktion mit dem gleichen Substrat ungleich schnell. Man nennt dies *Organspezifität* bzw. *Artspezifität*. Weiterhin können sich Enzyme unterschiedlichen Ursprungs auch in ihrer Substratspezifität unterscheiden.

Substratspezifität und Reaktionsspezifität bilden die Grundlagen für die *Klassifizierung der Enzyme*. Es hat sich eingebürgert, zur Benennung der Fermente den Wortstamm des Substrates mit dem Suffix *-ase* zu verbinden, wie beispielsweise bei Esterase oder Glucose-6-phosphatase. Es gibt jedoch einige Ausnahmen, wobei teilweise traditionsbedingte Trivialnamen Verwendung finden, z. B. Pepsin, Ptyalin oder Lysozym.

Obleich Hunderte von Enzymen bekannt sind, lassen sie sich in 5 Klassen aufteilen, wenn man die von ihnen gesteuerte Reaktion zur Grundlage der Einteilung macht (HOFFMANN-OSTENHOF 1953). Diese Klassen sind:

1. Fermente, welche die Übertragung von Elektronen oder Wasserstoffionen katalysieren und bei biologischen Oxydationen und Reduktionen eine Rolle spielen (Oxydasen und Dehydrogenasen bzw. Oxydoreduktasen).
2. Enzyme, welche Abspaltung oder Anlagerung von Wasser bewirken (Hydrolasen und Hydrasen).
3. Enzyme, die ein Radikal von einem Molekül auf ein anderes, das nicht Wasser sein darf, übertragen (Transferasen).
4. Enzyme, welche die Aufspaltung oder Bildung der C-C, C-N, C-O oder C-S-Bindung ohne eine Übertragung von Molekülgruppen bewirken (Lyasen und Synthetasen bzw. Desmolasen).
5. Enzyme für die sterische Umgruppierung eines Moleküls (Isomerasen und Racemasen).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind die histochemischen Untersuchungsmethoden im wesentlichen auf den Nachweis der ersten beiden Klassen von Fermenten beschränkt. Vereinzelte Reaktionen auf Enzyme der zweiten Klasse gelten jedoch auch für Fermente der Klasse 3. Einige histochemische Methoden sind auch zur Erfassung von Enzymen der Klasse 3 und 4 vorgeschlagen worden.

Enzyme gibt es in *allen* lebenden Zellen. Dagegen unterscheidet sich die *Verteilung* der Fermente in verschiedenen Geweben und bei verschiedenen Spezies weitgehend. Durch die Anwendung histochemischer Methoden konnten die Kenntnisse über die Verteilung der Fermente in Geweben und Zellen wesentlich erweitert werden.

B. Chemische Eigenschaften der Enzyme

1. Die Eiweißnatur der Enzyme

Es steht heute fest, daß Fermente in die Klasse der Proteine gehören (SUMNER und MYRBÄCK 1950). Der Eiweißcharakter der Enzyme ist schon vor längerer Zeit erkannt worden, nachdem sich herausstellte, daß Fermente nicht dialysierbar sind und dementsprechend ein hohes Molekulargewicht besitzen müssen. Das Verhalten der Fermente in Lösung, beim Sedimentieren, ihre Bewegung bei Elektrophorese, die Angreifbarkeit durch proteolytische Enzyme und ihre hydrolytische Aufspaltbarkeit, sowie nicht zuletzt die charakteristische Zusammensetzung aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel, stellen ihre Eiweißnatur sicher. Zusätzliche Gewißheit in dieser Frage brachten immunbiologische Untersuchungen (MARRACK 1950). Mehrere Enzyme konnten in reiner, kristallisierter Form isoliert werden. Stets erwies sich hierbei das Präparat als Protein (SCHWIMMER und PARDEE 1953). Somit verstehen wir gut, daß die katalytische Aktivität der Enzyme vor allem von der Unversehrtheit des Proteinmoleküls abhängig ist. Auch die schon erwähnte Organspezifität und Artspezifität läßt sich aus der Eiweißnatur der Fermente leicht erklären, da kleinere Abweichungen zwischen homologen Proteinen eher die Regel als eine Ausnahme sind.

Bei vielen Enzymen, am häufigsten bei den Oxydoreduktasen, ist mit dem Eiweißbestandteil des Fermentes, dem Apoenzym eine *prothetische Gruppe* oder *Cofaktor* verbunden. Die chemische Natur des Cofaktors kann unterschiedlich sein; es handelt sich jedoch nicht um einen Eiweißkörper. Meist sind es relativ kleine, hitzeresistente und oft dialysierbare Verbindungen, die als *Coferment* bezeichnet werden. Häufig enthalten Cofermente ein Vitamin oder dessen Derivate. Ein Beispiel hierfür ist Thiamin-pyrophosphat, die Cocarboxylase. Die Aktivität des Cofermentes allein ist gering. Die volle Aktivität des Enzymes ist nur bei Bindung des Coenzym an das Apoenzym gegeben. Auch die Pyridinnucleotide werden als Coenzyme für Dehydrogenasen betrachtet (SINGER und KEARNEY 1954a). Dem steht jedoch die Meinung von HOFFMANN-OSTENHOF (1953) gegenüber, der sie als sekundäre Acceptoren auffaßt und lieber als Enzym-Komplemente bezeichnet wissen möchte. Außer diesen organischen Cofaktoren sind häufig auch *metallische Cofaktoren* oder anorganische Komplemente für die Enzymaktivität bedeutungsvoll (SUMNER und MYRBÄCK 1950; LENINGER 1950). Beispiele hierfür sind das Magnesium-Ion bei manchen Phosphoesterasen und das Kupfer-Ion bei Phenoloxidasen.

Die Tatsache, daß manche Enzyme aus Zellen oder Geweben leicht extrahiert werden können oder von Drüsen aktiv sezerniert werden (beispielsweise als Verdauungssäfte), während andere Fermente nur sehr schwer extrahierbar sind, läßt zwei Arten von Fermenten unterscheiden. Die einen sollen in löslichem, unorganisiertem Zustand vorkommen (*Lyo-enzyme*). Der andere Typ der Fermente soll an bestimmten Zellstrukturen gebunden sein, wodurch die Freisetzung des Enzyms in aktiver Form schwierig oder unmöglich wird (*Desmo-enzyme*). Nach der gegenwärtigen Anschauung ist es für die Aktivitätsmessung eines Enzyms unwesentlich, ob es in Lösung gebracht werden kann oder nicht. Auch wenn es fest an unlösliche Zellstrukturen gebunden bleibt (z. B. an Mitochondrien), vermag es seine volle Aktivität zu entfalten (SUMNER und MYRBÄCK 1950; LINDBERG und ERNSTER 1954; SIEBERT 1955). Dies berührt eng die Frage der exakten cytologischen Lokalisation der Enzyme und ist für das Verständnis ihrer biologischen Bedeutung von entscheidender Wichtigkeit.

2. Abhängigkeit der Enzymwirkung vom p_H

Die Aktivität der Enzyme hängt in charakteristischer Weise vom p_H des umgebenden Milieus ab. Für jedes Enzym gibt es einen verhältnismäßig schmalen Bereich maximaler Aktivität, das sogenannte p_H -*Optimum*. An beiden Seiten dieses Bereiches fällt die Aktivität gegen Null ab. Bei einzelnen Enzymen ist das p_H -Optimum konstant (beispielsweise bei einzelnen Glykosidasen), bei anderen verändert es sich, abhängig von dem verwendeten Substrat (so z. B. bei den unspezifischen, alkalischen Phosphatasen oder der Myeloperoxydase). Auch kann ein gleiches Enzym je nach seiner Herkunft aus verschiedenen Organen oder verschiedenen Spezies gegenüber dem gleichen Substrat Unterschiede im p_H -Optimum zeigen.

Proteine sind polyvalente bipolare Ionen, deren Dissoziation vom p_H des Mediums abhängt. Vom Ausmaß der Dissoziation bzw. von der elektrischen Ladung des Proteins wird wiederum die enzymatische Aktivität bestimmt. Es scheint, daß eine Veränderung des p_H zu einer Änderung der Substrataffinität des Enzyms führen und die Geschwindigkeit der enzymatisch gesteuerten Reaktion beeinflussen kann, wenn der in die chemische Reaktion einbezogene Teil des Enzymmoleküls eine dissoziierbare Gruppe enthält (FRUTON und SIMMONDS 1953). Da Proteine Zwitterionen sind, können Fermente dementsprechend in unterschiedlich ionisierter Form vorliegen. Nur einer der möglichen Zustände wird optimale katalytische Eigenschaften besitzen. Die dieser Ionisationsform entsprechende Wasserstoffionenkonzentration entspricht dem p_H -Optimum. Außer der Aktivität werden auch andere Eigenschaften eines Enzyms durch das p_H beeinflusst, so beispielsweise die Löslichkeit, welche vom isoelektrischen Punkt abhängig ist.

Die Einstellung eines bestimmten p_H macht die Anwesenheit von Pufferlösungen erforderlich, die ihrerseits die Enzymaktivität beeinflussen können. Bei gleichem p_H -Optimum mehrerer Enzyme kann aus diesem Grunde die Anwendung unterschiedlicher Pufferlösungen erforderlich werden.

3. Der Einfluß der Temperatur

Bei den meisten chemischen Reaktionen erhöht sich die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes mit dem Ansteigen der Temperatur. Enzymatisch gesteuerte Reaktionen bilden hier keine Ausnahme. Jedoch sind Enzyme als Eiweißkörper sehr empfindlich gegen zu starke Erwärmung und Denaturierung. Eine Steigerung der Temperatur führt zwar zunächst zu einer Reaktionsbeschleunigung, beschleunigt jedoch auch die thermische Inaktivierung des Enzyms. Für jedes Enzym gibt es ein *Temperatur-Optimum*. Bei Temperaturen unter dem Optimum bleibt das Enzym stabiler und länger aktionsfähig, doch ist die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt.

Das Temperaturoptimum der Enzyme entspricht gewöhnlich, aber nicht immer, der Körpertemperatur des Organismus. Beispielsweise liegt das Temperaturoptimum vieler Enzyme in Pflanzen oder Invertebraten niedriger als in Säugetieren. Am höchsten ist es bei den Enzymen thermophiler Bakterien.

Inaktivierung durch zu hohe Temperatur kann auf eine Steigerung der Wärmebewegung der Moleküle zurückgeführt werden, die eine Zerstörung der intramolekularen Ordnung zu Folge hat. Andere physikalische Eingriffe, wie heftiges Schütteln, hoher Druck oder Strahlungseinwirkung können zu ähnlichen Effekten führen.

4. Hemmung und Aktivierung

Es sind zwei Formen der Hemmung enzymatischer Aktivität bekannt (MASSART 1950; WHITE et al. 1954). Ein *competitiver Inhibitor* tritt mit dem Substrat des Enzyms in Konkurrenz. Das Ausmaß der Hemmung hängt vom Verhältnis der Inhibitorkonzentration zur Substratkonzentration ab. Auch die Reaktionsprodukte des enzymatisch gesteuerten Vorganges können als competitive Inhibitoren in Betracht kommen (beispielsweise Phosphat-Ionen bei Phosphatasen). Ebenso können Substanzen, die dem Substrat strukturchemisch verwandt sind, als competitive Hemmstoffe wirken, wie z. B. Salze der Malonsäure für Succinodehydrogenase. Die Voraussetzung für das Zustandekommen einer competitiven Hemmung ist die Verdrängung des Substrates aus seiner zeitweiligen Bindung an das aktive Zentrum des Enzymmoleküls durch eine andere Substanz. Die Affinität kompetitiver Inhibitoren zu den Enzymen kann sehr verschieden sein.

Ein *nicht kompetitiver Inhibitor*, z. B. ein Schwermetallion oder Cyanid, führt zu einer Inaktivierung des Enzyms, ohne daß an diesem Vorgang das Substrat beteiligt ist. Das Ausmaß der Hemmung hängt ausschließlich von der Konzentration des Hemmstoffes ab.

Die Bindung eines nicht competitiven Hemmstoffes an das Enzym kann reversibel oder irreversibel sein. Ist die Bindung reversibel, so muß der Hemmstoff der Inkubationslösung zugesetzt werden und nicht nur während der Vorbehandlung des Gewebes zur Anwendung kommen. Das gilt z. B. für Cyanide bei der Hemmung eisenhaltiger Oxydoreduktasen. Bei irreversibler Bindung genügt eine Vorbehandlung des Gewebes mit dem Inhibitor zur Hemmung der Reaktion. Ein Beispiel hierfür sind gegen -SH-Gruppen gerichtete Reagenzien zur Inaktivierung von Dehydrogenasen.

Im Hinblick auf die Hemmung muß auf die für die Enzymreaktion wichtigen Molekülgruppen eingegangen werden. Einige Fermente enthalten genau definierte Radikale als Vermittler der enzymatischen Reaktion. Einzelne dieser Gruppen wirken durch Bindung des Substrates an das Enzym. Andere sind für die strukturchemische Konfiguration des Proteins entscheidend. Von Bedeutung sind vor allem diejenigen Teile des Proteinmoleküls, deren Veränderung einen Verlust der Aktivität zur Folge hat. Eine solche Inaktivierung ist durch zahlreiche Reagenzien möglich und kann spezifisch oder unspezifisch sein. Eine unspezifische Inaktivierung beeinflußt den Status des Proteinmoleküls ganz allgemein. Die spezifische Hemmung führt zu einer Blockierung der Bindungsstellen. So konnten Sulfhydryl (-SH)-Gruppen als wesentlich für die Aktivität zahlreicher Enzyme nachgewiesen werden (BARRON 1951) und in einigen Fällen können sie als Bindungsstellen gelten. Oft geht die Inaktivierung auf die Blockierung dieser Sulfhydrylgruppen zurück: so beispielsweise bei Oxydation der -SH Gruppen zu -S-S Gruppen. Oft ist hier eine Reaktivierung oder ein Schutz durch reduzierende Stoffe möglich. Bei anderen Enzymen gilt das gleiche für die freien Carboxyl-, Amino- und Carbonyl-Gruppen. Eine unspezifische Inaktivierung kann durch eine Veränderung des Proteinmoleküls durch Hitze oder andere physikalische Maßnahmen erfolgen, wobei keine Beziehungen zu solchen spezifischen Gruppen bestehen.

Es muß betont werden, daß viele Enzyme hochempfindlich gegen Kationen sind, vor allem gegen Schwermetall-Ionen, basische Farbstoffe oder große organische Kationen. Kleinste Mengen solcher Hemmstoffe (die spezifisch oder unspezifisch wirken können) im Wasser oder in Reagenzien können schwere Veränderungen der Enzymaktivität verursachen (MASSART 1950). Aus diesem Grunde muß große Sorgfalt aufgewandt werden, um Spuren solcher Hemmstoffe, bei-

spielsweise von Zink, aus den Reaktionslösungen fernzuhalten (vgl. S. 58, Succinodehydrogenase). Erst in der letzten Zeit ist dieser Gesichtspunkt genügend gewürdigt worden.

Es gibt Enzyme, deren Aktivität durch bestimmte Methoden der Eiweißdenaturierung (wie z. B. die Behandlung mit Äthanol oder Aceton) nicht zerstört wird. Die Eiweißdenaturierung durch physikalische Eingriffe oder durch Reagenzien, wie positiv geladene Schwermetallionen oder negativ geladene, eiweißfällende Verbindungen, (z. B. Trichloressigsäure oder Phosphorwolframsäure) führt stets zu einer völligen Inaktivierung.

Untersuchungen über die Beeinflussung von Enzymen durch Eiweißdenaturierende Stoffe von Metallcharakter haben zu der Ansicht geführt, daß der größte Teil des Proteinmoleküls mit der katalytischen Aktivität des Fermentes sehr wenig zu tun hat. Maßgebend sind bestimmte, scharf lokalisierte und spezifisch aktive Zentren im Molekül. Dementsprechend können Enzyme schon durch viel kleinere Konzentrationen von Metallionen vollständig gehemmt werden, als zur Ausfällung des Proteins erforderlich wären.

Aktivatoren sind Substanzen, welche die Enzymaktivität erhöhen (Aktivierung eines Enzyms darf nicht mit der enzymatisch bewirkten „Aktivierung“ des Substrates durch Vereinigung mit dem Enzym verwechselt werden). Einzelne Enzyme existieren zunächst in einer inaktiven Form als Proenzym und werden erst durch Änderung des pH oder durch Einwirkung anderer Enzyme aktiviert. Das gilt z. B. für die Überführung von Pepsinogen in Pepsin. Manche Enzyme, wie z. B. die Phosphatasen, werden durch zweiwertige Metallionen aktiviert. Hierzu gehören Mg^{++} , Mn^{++} oder Co^{++} . Man kann diese Enzyme auch als Metall-Proteide bezeichnen, die vorzugsweise in Chelatform vorliegen, so daß die Vereinigung mit dem Substrat unter Beteiligung des Metallions zustande kommt (MAHLER und GREEN 1954). In einzelnen Fällen kann das Metall auch als integrierender Bestandteil des Substrates wirken. Anionen, wie Cl^- oder PO_4^{---} können ebenfalls als Aktivatoren in Frage kommen. Eine Enzymaktivierung kann schließlich auch durch Blockierung eines Hemmstoffes erfolgen. Das gilt z. B. für die Verbindung von Glutathion mit Schwermetallen. Obgleich Coenzyme an sich unwirksame Reaktionssysteme aktivieren, werden sie dennoch im obengenannten Sinne nicht als Aktivatoren bezeichnet, da sie nach der Aktivierung des Enzyms am chemischen Prozeß beteiligt sind (BALDWIN 1952; HOFFMANN-OSTENHOF 1953).

5. Messung der enzymatischen Aktivität

Nur wenige Enzyme können unmittelbar durch physikalische oder chemische Methoden identifiziert werden. Voraussetzung hierfür ist zumeist, das Enzym in möglichst reinem Zustand isolieren zu können. Fast immer wird die Anwesenheit und Konzentration eines Enzyms indirekt durch Erfassung der enzymatischen Aktivität bestimmt. Diese kann man bei gleichartigen Reaktionsbedingungen am Ausmaß der durch das zu untersuchende Ferment katalysierten chemischen Veränderungen erfassen. Es wird also die Geschwindigkeit ermittelt, mit welcher das Enzym das Substrat in das Reaktionsprodukt überführt. Gleichzeitig sollten immer Kontrollen mit inaktiviertem Enzym durchgeführt werden.

Während des Ablaufes einer enzymatisch gesteuerten Reaktion kommt es zu einer allmählichen Verlangsamung des Prozesses. Das Substrat nimmt an Menge ab und das Reaktionsprodukt häuft sich an. Dabei kann es zu Veränderungen des pH kommen, indem Säure bzw. Alkali gebildet oder verbraucht werden.

Diese Faktoren beeinflussen die Stabilität und Aktivität des Enzyms. Solche Veränderungen der Reaktionsbedingungen müssen ausgeschaltet werden. Aus diesem Grunde sind für eine zuverlässige Messung der Enzymaktivität verschiedene Vorkehrungen nötig.

Als Maß der Enzymaktivität können zwei Größen verwendet werden:

1. Die Zeit, die erforderlich ist, um eine vorgegebene Menge von Substrat aufzubrauchen oder eine bestimmte Menge des Reaktionsproduktes zu bilden.
2. Die Verminderung des Substrates oder die Anreicherung des Reaktionsproduktes in einer vorgegebenen kurzen Zeitspanne.

Beide Wege können jedoch nur dann beschritten werden, wenn die Überführung von Substrat in Reaktionsprodukt während der gewählten Zeitspanne zeitproportional erfolgt (SUMNER und MYRBÄCK 1950).

Wie oben gesagt, beeinflußt die Konzentration des Substrates das Ausmaß der enzymatischen Aktivität. Bei gleichbleibender Konzentration des Enzyms führt eine Erhöhung der Substratkonzentration zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, bis schließlich eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Gelegentlich beobachtet man sogar eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, wenn die Konzentration des Substrates weiter gesteigert wird. Diese Korrelation zwischen der Konzentration des Substrates und der Reaktionsgeschwindigkeit geht wahrscheinlich auf die bei einer bestimmten Konzentration erreichte Sättigung des Enzymes mit Substrat zurück. Eine ausführliche Diskussion erfährt dieser Fragenkreis durch VAN SLYKE (1942).

Weitere Einzelheiten über den quantitativen Nachweis von Enzymen und der Kinetik der enzymatischen Reaktionen bringen die Arbeiten von MOELWYN-HUGHES (1950), BALDWIN (1952), FRUTON und SIMMONDS (1953), WHITE et al. (1954) sowie COLOWICK und KAPLAN (1955).

II. Bedingungen für den Enzym-Nachweis in situ

Für die Untersuchung der Enzymaktivität in Geweben oder Zellen sind verschiedene Wege beschritten worden. Im biochemischen Arbeitsbereich werden größere Stücke möglichst gleichartigen Gewebes oder Gewebshomogenate untersucht. Im cytochemischen Sektor unterteilt man Gewebshomogenate durch Zentrifugierung in verschiedene einzeln zu untersuchende Fraktionen. Ganz ähnliche Gedankengänge verfolgt die Mikrodisektion mit der mikrochirurgischen Zergliederung kleinster Gewebebereiche. Die Aktivitätsbestimmung in solchen Proben erfolgt zumeist mit quantitativ arbeitenden Methoden. Eine Besprechung dieser Verfahren erfolgt hier nicht. Es kann auf die Publikationen von GLICK (1949), BRADFIELD (1950), DUVE und BERTHET (1954), HOLTER (1954) und CLAUDE (1954) verwiesen werden.

In die Reihe dieser Methoden gehört auch die Arbeitsweise der Histochemie, die der alleinige Gegenstand der vorliegenden Abhandlung ist. Viele sonst schwer zu erschließende Kenntnisse können mit einer in situ-Technik gewonnen werden. So können beispielsweise qualitative Unterschiede im Enzymgehalt benachbarter Zellen eines an sich einheitlich aufgebauten Organes (z. B. der Leber) gewonnen werden; man kann Unterschiede im Enzymgehalt verschiedener anatomischer Regionen eines Organes (z. B. der verschiedenen Tubulusabschnitte in der Niere) feststellen, schließlich kann der Sitz von Enzymen in einzelnen Bezirken oder