

HEFE-PHOSPHOFRUCTOKINASE: REVERSIBLE MOLEKULARE UMWANDLUNG UND AUFBAU AUS SUBEINHEITEN

St.LIEBE, G.KOPPERSCHLÄGER, W.DIEZEL,
K.NISLER, J.WOLFF und E.HOFMANN

*Physiologisch-chemisches Institut der Karl-Marx-Universität,
Leipzig, DDR*

Received 6 February 1970

Yeast phosphofructokinase exists in several enzymically active, interconvertible forms with molecular weights of 180,000, 370,000, 570,000 and 750,000. With disc-electrophoresis catalytically active aggregation products with molecular weights of more than one million can be detected.

In alkaline media fragmentation of phosphofructokinase occurs, leading to a variety of catalytically inactive products. These seem to be oligomers of subunits with 60,000 daltons. A model of the complex subunit structure of yeast phosphofructokinase is suggested. The various catalytically active forms of the enzyme are considered as polymers of 180,000 monomers, which themselves are enzymatically active and which are composed of three 60,000 subunits.

1. Einleitung

Die molekulare Struktur der Phosphofructokinase (PFK) aus Skelettmuskel und ihr Aufbau aus Subeinheiten wurde vom Arbeitskreis um Lardy eingehend untersucht [1, 2]. Auch für die PFK aus *E. coli* sind die grundsätzlichen molekularen Parameter bekannt (Blangy [3]). Die PFK aus Hefe, deren allosterische Eigenschaften von mehreren Arbeitskreisen untersucht wurden [4–6], hat nach [5] ein Molekulargewicht von 584 000 und läßt sich mit Natrium-Dodecylsulfat und Guanidin-HCl in 3,2 S- respektive 1,65 S-Einheiten spalten [5, 6].

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Hefe-PFK in mehreren enzymatisch aktiven Formen vorkommen kann und sich in verschiedene Spaltprodukte mit unterschiedlichen Molekulargewichten zerlegen läßt. Die Ergebnisse erlauben die Aufstellung eines vorläufigen Strukturmodelles der Hefe-PFK.

2. Material und Methoden

Es wurde Hefe-PFK eigener Präparation (spez. Aktivität 110–120 [7]) und von der Firma

Boehringer und Söhne, Mannheim, (spez. Aktivität 40–60) verwendet. In der analytischen Ultrazentrifuge erwies sich unser Enzym als homogen (vergl. Abb. 2), während die Boehringer-Präparation neben der Hauptfraktion (16,7 S) einen kleinen Anteil einer langsamer wandernden Komponente enthielt [6]. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde nach [8] (40 000 Upm; 7 Std.; + 5°C) im Rotor SW 50 einer Beckman-Ultrazentrifuge L2-65 B durchgeführt. Die analytische Disk-Elektrophorese (PAA-Gel-elektrophorese) und die Molekulargewichtsbestimmung im PAA-Gel-Gradienten erfolgte nach den früher mitgeteilten Angaben [9], jedoch in Abb. 3 unter Verwendung eines anderen Puffersystems (Gelpuffer: 0,25 M Imidazol/HCl, pH 7,5; Elektrodenpuffer: 0,01 M Imidazol/Diäthylbarbitursäure, pH 7,0). Die analytische Ultrazentrifugation wurde mit einer Phywe U 60 L durchgeführt. Der für die Aktivitätsbestimmung der PFK verwendete Meßansatz hatte folgende Zusammensetzung: 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,5, 10 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1,8 mM F-6-P, 0,3 mM ATP, 0,3 µg Rinderserumalbumin/Ansatz, 0,3 mM NADH₂, 12 µg Aldolase/Ansatz, 10 µg Glycerin-1-phosphatdehydrogenase/

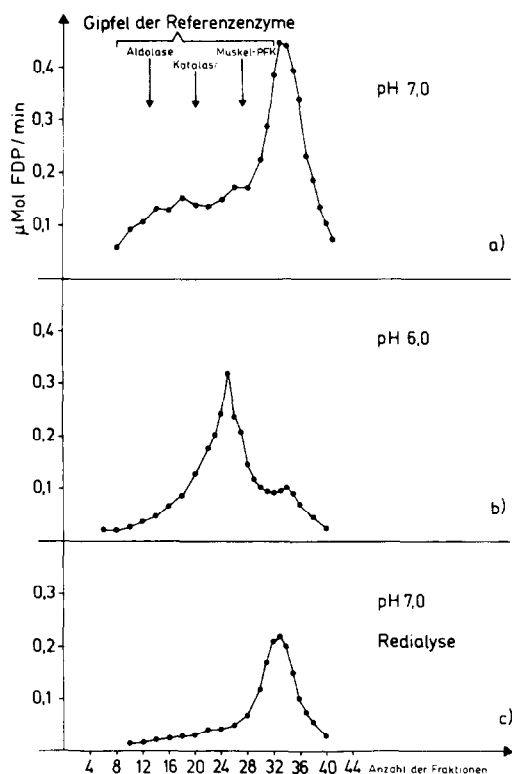


Abb. 1. Sedimentation von Hefe-Phosphofructokinase im Dichtegradienten bei verschiedenen pH-Werten. Gradient (a) und (b): Jeweils 250 μ g Hefe-PFK 15 Std. gegen Gradientenpuffer dialysiert und auf einen Rohrzuckergradienten (5–20%; 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7 oder 6; 0,5 mM EDTA; 3 mM 2-Mercaptoethanol) aufgetragen. Gradient (c): Fraktionen 23 bis 28 vom Gradienten (b) wurden konzentriert, gegen pH 7 1 Std. redialysiert und aufgetragen.

Triosephosphatisomerase-Gemisch/Ansatz, Endvolumen 1,6 ml.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Abb. 1 a zeigt die Verteilung der Enzymaktivität von Hefe-PFK (Boehringer) im Dichtegradienten unter verschiedenen Bedingungen. Aus der Position des Hauptgipfels errechnet sich bei pH 7,0 ein Molekulargewichtsmittelwert ($\overline{MG} \pm S.D.$) von $570\,000 \pm 28\,000$ (Anzahl der Versuche $n = 12$). Dieser Wert stimmt mit dem von Lindell und Stellwagen gefundenen [5] gut überein. Die Verteilungs-

kurve zeigt eine Asymmetrie in Richtung kleinerer Molekulargewichte. Eine einstündige Dialyse des Boehringer-Enzyms gegen Phosphatpuffer pH 6,0 führt zu einer drastischen Erniedrigung des Molekulargewichtes zu $370\,000 \pm 26\,000$ ($n = 14$) mit einem geringen molekularen Anteil bei 570,000. Die gleiche Aktivitätsverteilung wurde auch nach 15stündiger Dialyse gegen pH 6 gefunden (Abb. 1 b). Der Aktivitätsverlust nach 15stündiger Dialyse des Enzyms gegen pH 6,0 und anschließender Zentrifugation betrug gegenüber dem Versuch bei pH 7,0 durchschnittlich 50%. Redialyse der Gipelfractionen (Nr. 23–28) von Abb. 1 b gegen Phosphatpuffer pH 7,0 und anschließende Proteinkonzentrierung führt zur Rückverwandlung des Moleküls von 370 000 zu 570 000 (Abb. 1 c). 2 mM F-6-P verhindert bei pH 6,0 die Umwandlung des Enzyms von MG 570 000 zu 370 000. Dieser Versuch zeigt, daß die Hefe-PFK einer pH-abhängigen reversiblen Umwandlung zwischen zwei enzymatisch aktiven Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht unterliegt. Die Umwandlung der Hefe-PFK bei pH 6,0 und ihre Verhinderung durch F-6-P ist vergleichbar mit der pH-abhängigen Veränderung der Herz- [10] und der Skelettmuskel-PFK [1]. Im Bereich von pH 6,5 bis 8,0 liegt die Hefe-PFK vorwiegend mit einem Molekulargewicht von 570 000 vor. 2 mM ATP, F-6-P oder FDP sind ohne Einfluß auf das Enzymverteilungsspektrum im Dichtegradienten bei pH 7,0.

Im Gegensatz zur Boehringer-PFK zeigt Hefe-PFK eigener Präparation bei pH 6,0 ein anderes Verhalten. Sowohl im Hefeextrakt als auch auf verschiedenen Stadien der Reinigung wurde im Dichtegradienten bei pH 6,0 stets ein Molekulargewicht von 740 000 bis 770 000, d.h. die doppelte Mol-Masse des Boehringer-Enzyms unter gleichen Bedingungen, gefunden. Bei pH 7,0 beträgt das Molekulargewicht 600 000 bis 640 000. Hochgereinigte Hefe-PFK (spezifische Aktivität 110) zeigt in der analytischen Ultrazentrifuge ebenfalls eine unterschiedliche Sedimentation bei pH 6,0 und pH 7,0 (Abb. 2). Der bei pH 7,0 bestimmte Wert (16,9 S) stimmt mit dem von Lindell und Stellwagen [5], unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration sowie mit dem von uns früher ermittelten Wert [6] gut überein. Bei pH 6,0 wurde in qualitativer Übereinstimmung mit den Messungen im Dichtegradienten ein höherer Sedimentationskoeffizient gemessen (18,1 S). Ursache des unter-

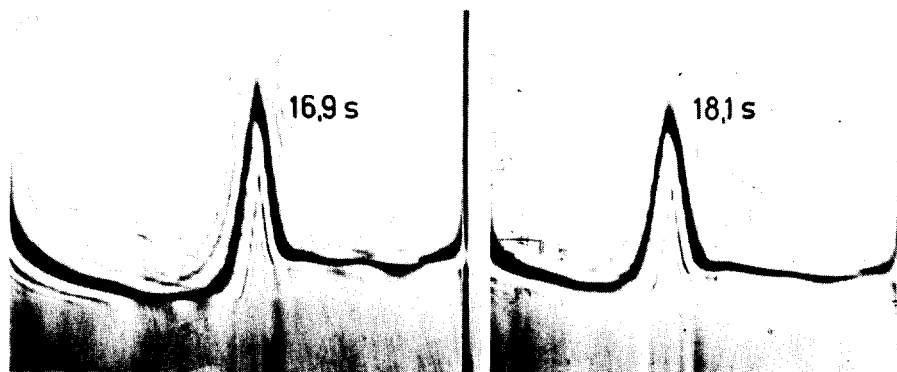


Abb. 2. Schlierendiagramme von Hefe-Phosphofructokinase bei pH 7 und pH 6. (a) 5,9 mg Protein/ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,1; 0,25 mM FDPi 3 mM 2-Mercaptoäthanol; spez. Aktivität der eigenen Präparation 110 E/mg; Schlierenwinkel 19° ; Temp. 20° C. (b) Probe von (a) 20 Std. gegen 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0 und Zusätzen wie bei (a) dialysiert. Schlierenwinkel 20° . Aufnahmen wurden 20 min nach Erreichen der max. Umdrehungszahl (49550 Upm) gemacht.

schiedlichen Verhaltens der beiden PFK-Präparate könnte sein, daß die Umwandlung der Boehringer-PFK bei pH 6,0 zum Molekül von 370 000 über eine in diesen Fall instabile Einheit von etwa 750 000 eingeleitet wird, welche schnell in zwei gleich große enzymatisch aktive Teilmoleküle zerfällt. Natürlich ist auch der umgekehrte Vorgang möglich: primär könnte die Form mit 370 000 entstehen, die in der eigenen Präparation, nicht aber beim Boehringer-Enzym aggregiert. Das unterschiedliche Verhalten ist entweder durch die Art der Präparation bedingt, oder tritt als Folge einer Alterung im Verlauf der Aufbewahrung des Enzyms ein. Es sei vermerkt, daß auch Veränderungen der kinetischen Eigenschaften des Enzyms (z.B. Verminderung der ATP-Hemmbarkeit und Schwächung der kooperativen Wechselwirkungen zwischen den F-6-P-bindenden Stellen) im Verlauf der Lagerung beobachtet wurden [11].

Qualitative Änderungen im Verhalten der beiden PFK-Präparationen wurden bei Variation der Proteinkonzentration im Dichtegradienten um den Faktor 10 nicht beobachtet.

Durch PAA-Gel-Elektrophorese konnte unter Verwendung eines linearen Gel-Konzentrationsgradienten Hefe-PFK in mehrere enzymatisch aktive Banden aufgetrennt werden (Abb. 3). Im Bereich einer diffusen hochmolekularen Proteinbande sind drei Aktivitätsmaxima nachweisbar; zwei weitere Aktivitätsgipfel können zwei scharf abgegrenzten Proteinbanden mit Molekulargewichten von MG 570 000 \pm 16 000 ($n = 9$) und 170 000 \pm 19 000 zugeordnet

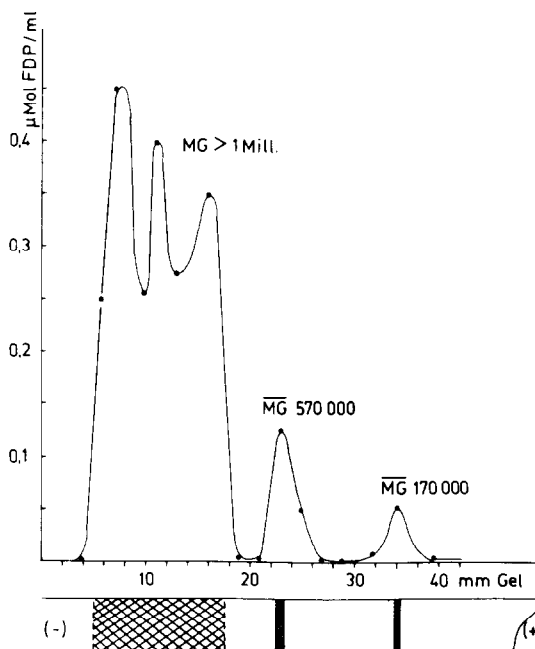


Abb. 3. Aktivitäts- und Protein-Verteilung von Hefe-Phosphofructokinase in der PAA-Diskelektrophorese. Oben: Aktivitätsverteilung in einem geschnittenen Gelröhrchen: 150 μg PFK 1 Std. gegen 0,025 M Phosphatpuffer, pH 7,1 dialysiert und aufgetragen. Elektrophorese im Kühlschrank (3 Std., 200 V, 4 mA/Röhrchen). Danach Gel in 3 mm Scheiben zerschnitten, diese verkleinert und 1 Std. im Reaktionsansatz bei 30° C inkubiert. Das gebildete FDP wurde im gekoppelten enzymatischen Test bestimmt. Unten: Proteinverteilung im Parallelröhrchen.

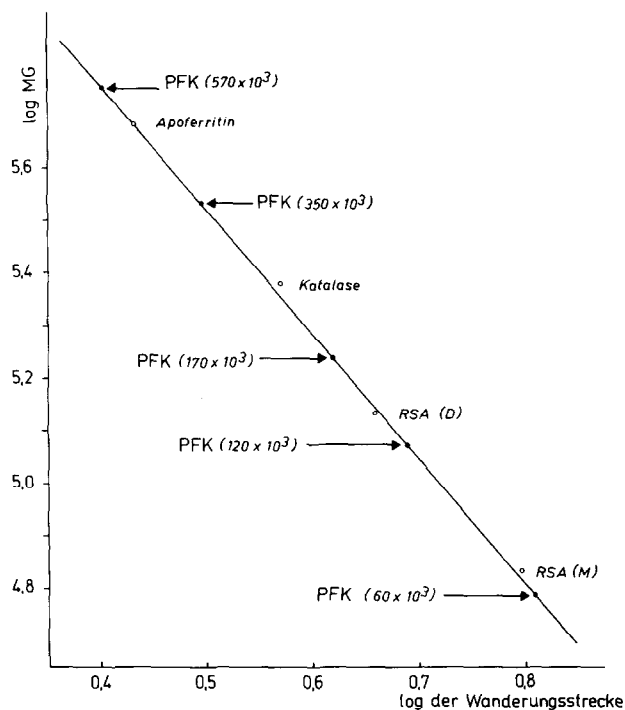


Abb. 4. Molekulargewichte der Spaltprodukte der Hefe-Phosphofructokinase. Fraktionen 28 bis 38 der Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Abb. 1 a) 14 Std. im Phosphatpuffer (0,25 M), pH 11 inkubiert, mit Sartorius-Kollodiumhüllen konzentriert und aufgetragen. Elektrophorese und Molekulargewichtsbestimmung nach [9] bei pH 9, 5.

werden. Es ist wahrscheinlich, daß die hohen Molekülaggregate (Molekulargewichte > 1 Million) unter den Bedingungen der Disk-Elektrophorese entstehen. Sie stellen offenbar enzymatisch aktive Polymere der Hefe-PFK dar. Eine ähnliche Proteinaggregation konnte auch kürzlich bei Rinderleberkatalase [12] und bei Uridindiphosphatglucose-Phosphorylase beobachtet werden [13].

Mittels PAA-Gel-Elektrophorese konnten alkalische Spaltprodukte des Enzyms nachgewiesen werden: mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die Fraktionen mit Molekulargewichten von 500 000 bis 700 000 isoliert und bei pH 11,0 inkubiert. Die anschließende elektrophoretische Trennung bei pH 9,5 ergab 5 Proteinbanden mit Molekulargewichten von 570 000, 350 000, 170 000, 120 000 und 60 000 (Abb. 4). Die Molmasse der kleinsten Einheit von 60 000 wurde bisher nur mit dieser Methode ermittelt.

Unter Zugrundelegung der mit den verschiedenen Methoden ermittelten Molekulargewichte und der Annahme der kleinsten Einheit von 60 000 wurde ein vorläufiges Aggregationschema für Hefe-PFK entwickelt, welches in Abb. 5 dargestellt ist. Dem Modell liegt die Annahme zugrunde, daß die ineinanderumwandelbaren Formen der Hefe-PFK Polymere eines Monomeren sind, dessen Partikelgewicht 180 000 ist.

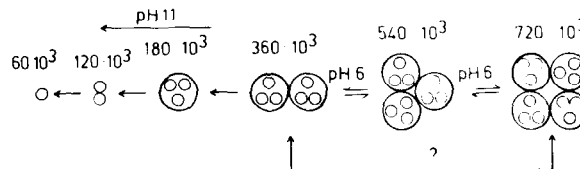


Abb. 5. Aggregationschema der Hefe-Phosphofructokinase. Die dick umrandeten Kreise stellen enzymatische aktive Formen des Enzyms dar.

Dieses wiederum ist aus drei Subeinheiten zusammengesetzt. Als kleinste enzymatisch aktive Einheit wurde das Molekül mit 180 000 Dalton gefunden. Ungeklärt ist jedoch die Frage, ob unter den Bedingungen des optischen Testes sekundäre molekulare Umwandlungen des Enzyms eintreten.

Danksagung

Fräulein L. Walter, Fräulein S. Grosse und Herrn St. Friedrich danken wir herzlich für die saubere und zuverlässige technische Mitarbeit.

Literatur

- [1] V.H. Paetkau und H.A. Lardy, J. Biol. Chem. 242 (1967) 2035.
- [2] V.H. Paetkau, E.S. Younathan und H.A. Lardy, J. Mol. Biol. 33 (1968) 721.
- [3] D. Blangy, FEBS Letters 2 (1968) 109.
- [4] A. Ramaiah, J.A. Hathaway und D.E. Atkinson, J. Biol. Chem. 239 (1964) 3619.
- [5] T.J. Lindell und E. Stellwagen, J. Biol. Chem. 243 (1968) 907.
- [6] G. Kopperschlager, R. Freyer, W. Diezel und E. Hofmann, FEBS Letters 1 (1968) 137.
- [7] K. Nissler, K.W. Wenzel und J. Wolff, unveröffentlicht.

- [8] R.G.Martin und B.N.Ames, J. Biol. Chem. 236 (1961) 1372.
- [9] G.Kopperschläger, W.Diezel, B.Bierwagen und E.Hofmann, FEBS Letters 5 (1969) 221.
- [10] T.E.Mansour und Ch.E.Ahlfors, J. Biol. Chem. 243 (1968) 2523.
- [11] E.Hofmann, Studia Biophys. 14 (1969) 1.
- [12] W.Diezel, St. Liebe, G.Kopperschläger und E.Hofmann, FEBS Letters 6 (1970) 166.
- [13] S.Levine, T.A.Gillett, E.Hagemann und R.G.Hanson, J. Biol. Chem. 244 (1969) 5729.