

98. Über die Anwendung von Metallpuffern bei Fermentreaktionen.

Die pCa-Aktivitätskurve einer Adenosindiphosphat spaltenden Phosphatase aus Kartoffeln¹⁾

von J. Raafaub.

(13. III. 56.)

Enzymatische Prozesse, bei denen Adenosinpolyphosphate umgesetzt werden, sind in der Regel aktivierbar durch Erdalkalione. Insbesondere Magnesiumionen sind für die meisten Reaktionen, bei denen der terminale Phosphatrest von Adenosinpolyphosphaten abgespalten oder transphosphoryliert wird, unentbehrlich. Über den Wirkungsmechanismus der Erdalkalione bei diesen Reaktionen weiss man noch wenig Sichereres. Da Adenosinpolyphosphate gute Komplexbildner für Erdalkalione sind²⁾, ist die Möglichkeit, dass der Metallphosphatkomplex das eigentliche Enzymsubstrat darstellt, in Betracht zu ziehen. Diese Hypothese kann durch Anwendung von Metallpuffern, mit deren Hilfe definierte und konstante Metallionenkonzentrationen eingestellt werden, experimentell geprüft werden. Wenn nämlich das Vorhandensein der Metallsubstratverbindung ausschlaggebend ist, ist zu erwarten, dass der Aktivitätsabfall des Enzyms in den pM-Bereich¹⁾ fällt, in dem der Metall-Substrat-Komplex dissoziiert.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse von Untersuchungen über die enzymatische Spaltung von Adenosindiphosphat in Adenosinmonophosphat und Phosphat mitgeteilt werden. Insbesondere sind die Beziehungen zwischen der Enzymaktivität und dem pCa studiert worden. Das katalysierende Ferment ist eine Phosphatase, die aus Kartoffeln gewonnen worden ist. Die Geschwindigkeit der ADP-Spaltung kann bequem spektrophotometrisch gemessen werden durch laufende Desaminierung der gebildeten Adenosinmonophosphorsäure mittelst im Überschuss vorhandener Adenylsäuredeaminase. Man macht sich dabei nach *H. Kalckar*³⁾ die bei 265 m μ maximale Absorptionsdifferenz zwischen der Adenylsäure und der durch Desaminierung entstehenden Inosinsäure zunutze. Da die Desaminierung ein

¹⁾ Verwendete Zeichen und Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosin-5-monophosphat, P = anorganisches Phosphat, AeDTA = Äthylen-diamin-N,N'-tetraacetat, GIAeDTA = Äthylenglykol-bis- β -aminoäthyläther-N,N'-tetraacetat, (Z)_t = Totalkonzentration des Metallpuffers in Mol pro Liter, (Ca)_t = Totalkonzentration des Calciums in Mol pro Liter, pM = negativer dekadischer Logarithmus der Metallionenkonzentration in Mol pro Liter, bei der ionalen Stärke $\mu = 0,10$ und bei 20°, pCa = entsprechend für Calciumionen.

²⁾ *A. E. Martell & G. Schwarzenbach*, Helv. **39**, 653 (1956).

³⁾ *H. M. Kalckar*, J. biol. Chemistry **167**, 461 (1947).

Metallionen-unabhängiger Vorgang ist, ist die bei $265 \text{ m}\mu$ gemessene Extinktionsabnahme ein Mass für die Geschwindigkeit der Dephosphorylierungsreaktion. In Fig. 1 ist eine Serie von drei in dieser Weise erhaltenen Extinktionskurven dargestellt, die drei Ansätzen mit verschiedenem pCa entsprechen. Nach der Zugabe von Phosphatase kommt es zu einem augenblicklich einsetzenden Extinktionsabfall.

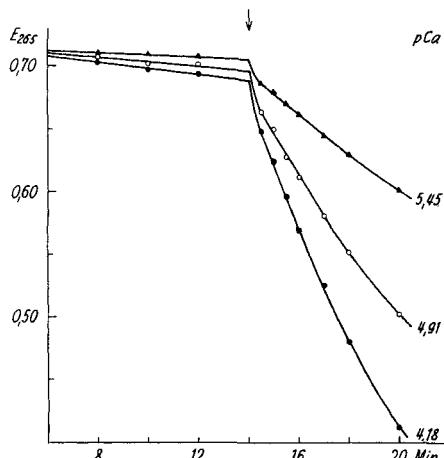


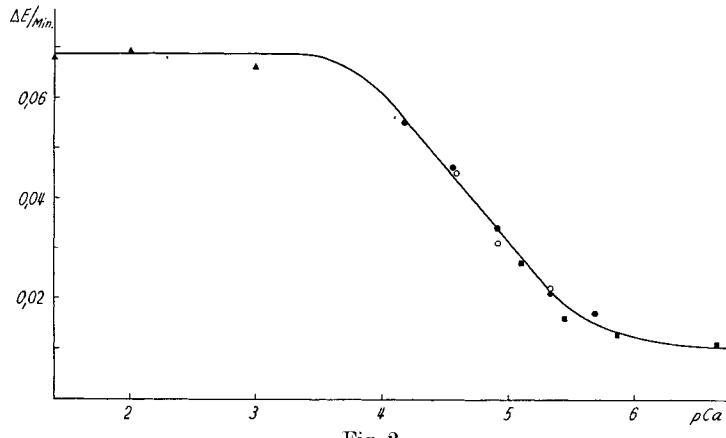
Fig. 1.

Photometrische Messung der enzymatischen Spaltung von ADP zu AMP + P. Ordinate: Extinktion bei $265 \text{ m}\mu$. Abszisse: Zeit in Min. Bei Min. 14 wird $0,01 \text{ cm}^3$ Phosphatase zugegeben. Der Extinktionsabfall ist proportional dem entstehenden AMP. Die drei Kurven entsprechen Ansätzen mit verschiedenem pCa . Versuchsbedingungen und Zusammensetzung der Ansätze siehe Exp. Teil.

Der geringfügige Extinktionsabfall vor der Zugabe von Phosphatase beruht auf Spuren von in der Deaminase enthaltenen ADP spaltenden Fermenten. Die pCa -Aktivitätskurve der Kartoffelphosphatase erhält man, wenn der lineare Extinktionsabfall pro Minute nach Phosphatasezugabe vermindert um den Extinktionsabfall pro Min. vor Phosphatasezugabe aufgetragen wird gegen das pCa . Eine solche Kurve ist in Fig. 2 wiedergegeben. Dass die Aktivität nur eine Funktion des pCa und durch den Metallpuffer selbst unbeeinflusst ist, ergibt sich daraus, dass die gemessenen Aktivitäten bei einer Totalkonzentration des Metallpuffers von $3 \cdot 10^{-3}$ -m. und 10^{-3} -m. auf derselben Kurve liegen.

Der Aktivitätsabfall der untersuchten Phosphatase liegt innerhalb des pCa -Bereichs von $3,8 - 5,5$. Dies lässt den Schluss zu, dass nicht eine Komplexverbindung zwischen ADP- und Calciumionen das eigentliche Substrat darstellt und die Calciumionenabhängigkeit der Reaktion bedingt. Wie *Martell & Schwarzenbach*²⁾ ermittelt haben, beträgt die Assoziationskonstante für $\text{Ca-ADP} = 10^{2,78}$. Die scheinbare Komplexkonstante bei $\text{pH } 6,0$ lässt sich bei bekannten pK -Werten er-

rechnen und beträgt = $10^{2,27}$. Aus diesem Wert kann ersehen werden, dass die pCa-Aktivitätskurve um ca. 2–3 pCa-Einheiten nach kleineren pM-Werten verschoben sein müsste, wenn die Bildung des Ca-ADP-Komplexes der Reaktionsgeschwindigkeit-limitierende Faktor wäre.



pCa-Aktivitätskurve der ADP spaltenden Phosphatase aus Kartoffeln bei pH 6,0. Ordinate: Geschwindigkeit der Substratspaltung in willkürlichen Einheiten (Extinktionsabfall pro Minute). Abszisse: pCa. Jeder Punkt der Kurve wird aus einem Versuch, wie in Fig. 1 deren drei dargestellt sind, ermittelt. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen (siehe Exp. Teil) wird einzig das pCa variiert, wobei bedeuten:

- Calciumpuffer AeDTA ($Z_t = 3 \cdot 10^{-3} \text{-m}$).
- Calciumpuffer GLAeDTA ($Z_t = 3 \cdot 10^{-3} \text{-m}$).
- Calciumpuffer GLAeDTA ($Z_t = 10^{-3} \text{-m}$).
- ▲ Calciumchlorid ohne Calciumpuffer. Hier ist die angenähert zutreffende Annahme gemacht worden, dass $\text{pCa} = -\log(\text{Ca})_t$ ist.

Die pCa-Aktivitätskurve, insbesondere der pCa-Bereich des Aktivitätsabfalls, ist demnach dahin zu interpretieren, dass die Bildung eines Calcium-Enzym-Komplexes oder eines Calcium-Enzym-Substrat-Komplexes die Calcium-Abhängigkeit der Reaktion bedingt. Da die Aktivität auch bei hohen Calciumkonzentrationen von beinahe 10^{-1}-m . nicht abnimmt, darf angenommen werden, dass es für den katalytischen Prozess gleichgültig ist, ob das ADP als freie Molekel oder als Metallkomplex in Lösung vorliegt.

Experimenteller Teil.

Chemikalien: NaH_2ADP : *Pabst Lab.*, Milwaukee, Wisc. Äthylendiamin-N, N'-tetraessigsäure: *A.G. vorm. B. Siegfried*, Zofingen. Äthylenglykol-bis- β -amino-äthyläther-N, N'-tetraessigsäure: *J. R. Geigy AG.*, Basel.

Apparate: Spektrophotometer *Beckman*, Modell DU; pH-Meter *Beckman*, Modell G.

Fermente: a) Adenylsäuredeaminase aus Kaninchenmuskel nach *Kalckar*³) gemäss Präparation A. b) Phosphatase aus Kartoffeln nach *Kalckar*³). Verwendet wird die wässrige Lösung der Fraktion, die zwischen 0,17–0,30 Ammonsulfatsättigung ausfällt.

Die Melanine der Kartoffeln werden nicht nach *H. Kalckar* mit Aluminiumhydroxyd ausgefällt, sondern die Trübung der (polymerisierten?) Melanine, die sich beim Stehenlassen der Enzymlösung nach Tagen jeweils bildet, kann ohne weitere Zusätze wegzentri-fugiert werden. Beim Aufbewahren bei 0° sind beide Fermente monatelang haltbar.

Metallpuffer: Als Metallpuffer sind Äthylendiamin-N, N'-tetraessigsäure (AeDTA) und Äthylenglykol-bis- β -aminoäthyl-äther-N, N'-tetraessigsäure (GLAeDTA) verwendet worden. Die Konstanten dieser Metallpuffer, die von *G. Schwarzenbach*⁴⁾ bestimmt worden sind, sind derart, dass bei pH 6 der pCa-Bereich 4–6 gepuffert werden kann. Eine aus-führliche Beschreibung der Berechnung und Herstellung von Metallpuffern, speziell im Hinblick auf biochemische Probleme, ist an anderer Stelle veröffentlicht worden⁵⁾.

Zusammensetzung der Ansätze und Versuchsbedingungen: Ein Versuchs-ansatz enthält folgende Komponenten (angegeben ist die Endkonzentration): H-Puffer: Succinat 0,03-m., pH = 6,0. Ca-Puffer: AeDTA oder GLAeDTA, wobei $(Z)_t = 3 \cdot 10^{-3}$ -m. (bzw. 10^{-3} -m.) und $(Ca)_t = 0 \text{--} 2,7 \cdot 10^{-3}$ -m. (bzw. $0 \text{--} 0,9 \cdot 10^{-3}$ -m.) sind.

Substrat: ADP = $5 \cdot 10^{-5}$ -m.

Enzyme: Phosphatase (0,08 mg Protein pro ml) und Deaminase (0,05 mg Protein pro ml). Die Konzentration der Phosphatase ist derart gewählt, dass der Extinktions-abfall bei kleinem pCa, wo die Phosphatase-Aktivität also maximal ist, noch exakt mess-bar ist.

Die Konzentration der Deaminase ist genügend gross, so dass die Desaminierung der gebildeten Adenylsäure als limitierender Faktor des Extinktionsabfalls nicht be-rücksichtigt zu werden braucht. Während die Deaminase vom Versuchsbeginn an im Ansatzgemisch enthalten ist, wird die Phosphatase (0,01 cm³) mit Hilfe der Mikrometer-bürette „Agla“ (hergestellt von *Burroughs, Wellcome & Co.*, London) bei Min. 14 zugegeben. Das Totalvolumen des Ansatzgemisches beträgt 3,0 cm³; Ionenstärke $\mu = 0,105 \pm 0,05$; pH = 6,0 $\pm 0,05$, Versuchstemperatur 20°.

Für wertvolle technische Assistenz und Hilfe bei der Vorbereitung dieser sowie frü-herer Versuche möchte ich Herrn *J. Schiller* und Herrn *E. Baumann* an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

Die Abhängigkeit der Aktivität einer ADP-spaltenden Phosphatase aus Kartoffeln von der Calciumionenkonzentration wird mit Hilfe von Calciumpuffern untersucht. Die pCa-Aktivitätskurve des Ferments zeigt, dass der Aktivitätsabfall im pCa-Bereich 3,8–5,5 erfolgt. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Calcium-Protein-Verbin-dung (eventuell ein Calcium-Protein-ADP-Komplex) und nicht der Calcium-ADP-Komplex die Calciumabhängigkeit der Reaktion be-dingt.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Zürich.

⁴⁾ *G. Schwarzenbach*, Die komplexometrische Titration, in Die chemische Analyse, Band 45, Seite 87, Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart 1955.

⁵⁾ *J. Raaflaub* in Methods of Biochemical Analysis, Vol. III, p. 301 (1956).