

Spezifische Markierung kristallisierter Leucinaminopeptidase mit Mangan-54

S. FITTKAU, U. KETTMANN UND H. HANSON

Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Halle, Deutschland

Received on 19 October 1965

ABSTRACT

It is possible to prepare crystallized "Leucineaminopeptidase" from ox-lenses and to activate it with Mg and Mn ions. If $^{54}\text{MnCl}_2$ is added to the solution before crystallization, the enzyme crystals then formed are radio-active. At a probable leucineaminopeptidase molecular weight of 325,000 a content of 4-5 atoms of manganese per molecule of the enzyme will be found. The metal is bound tightly and can neither be separated by Sephadex G 25 nor by continuous dialysis at pH 8 against Tris-buffer.

The labelling of leucineaminopeptidase with ^{54}Mn may also be carried out by simple incubation of the solution of the enzyme with MnCl_2 . The superfluous non-protein-bound metal is separated quantitatively on a column of SEPHADEX G 25.

Subsequently the binding capacity of leucineaminopeptidase for Zn and Co ions was stated as a function of pH value and the concentration of the metal ions.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein "Leucineaminopeptidase" kann aus Rinderaugenlinsen kristallisiert werden und ist durch Magnesium- und Manganionen aktivierbar. Wird einem Kristallisationsansatz $^{54}\text{MnCl}_2$ zugesetzt, so sind die gewonnenen Enzymkristalle radioaktiv. Bei einem wahrscheinlichen Molekulargewicht der Leucineaminopeptidase von 325.000 findet man einen Gehalt von 4-5 Atomen Mangan pro Enzymmolekül. Das Metall ist fest gebunden und lässt sich weder durch Fraktionierung an Sephadex G 25 noch durch kontinuierliche Dialyse bei pH 8 gegen Trispuffer entfernen.

Die Markierung der Leucineaminopeptidase mit ^{54}Mn kann auch durch einfache Inkubation der Enzymlösung mit Manganchlorid erfolgen. Das überschüssige, nicht-proteingebundene Metall wird an einer Sephadex-Säule quantitativ abgetrennt.

Weiter wurde die Bindungsfähigkeit der Leucinaminopeptidase für Zn- und Co-Ionen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Metallionen-Konzentration bestimmt.

Leucinaminopeptidase (abgekürzt LAP) ist ein Ferment, das aus Polypeptiden N-terminale Aminosäuren abspaltet. Die enzymatische Wirksamkeit wird durch Zusatz kleiner Mengen an Mn^{++} - und Mg^{++} -Ionen erhöht. Zur Untersuchung, ob die Metallionen mit dem Fermentprotein eine stabile Bindung eingehen oder ob nur während der Spaltungsreaktion ein reaktionsfähiger Metallchelatkomplex gebildet wird, haben wir das Mangan-Isotop ^{54}Mn , einen γ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 310 Tagen, eingesetzt.

Die Markierung des Proteins mit Schwermetallionen kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen, 1. durch Einbau des Isotops während der Kristallisation oder 2. in Lösung durch Inkubation des Proteins mit Manganchlorid unter optimal erkannten Bedingungen und Abtrennung der nicht gebundenen überschüssigen Radioaktivität. Wir haben über beide Verfahren eine mit Mangan-54 radioaktiv markierte Leucinaminopeptidase erhalten.

Als Ausgangsmaterial stand ein kristallisiertes Enzym zur Verfügung, das nach dem Verfahren von Glässer und Hanson⁽¹⁾ manganfrei hergestellt war. Es wurde in Trispuffer gelöst, mit $^{54}MnCl_2$ in $2 \cdot 10^{-3}$ molarer Lösung bei pH 8 und 40° präinkubiert und mit Ammoniumsulfat zur Kristallisation gebracht. Die kristallisierte Leucinaminopeptidase enthielt nach Abzentrifugieren und Auswaschen der überschüssigen Radioaktivität eine hohe Impulsrate, aus der die spezifische Aktivität und damit der Mangangehalt bestimmt wurde.

ERGEBNISSE

Das Schwermetall wird von dem Enzym fest gebunden und ist nicht nur labil in den Kristallen eingeschlossen. Das zeigen Versuche zur Fraktionierung der in Trispuffer gelösten Leucinaminopeptidase an einer Sephadex G 25-Säule. Die LAP mit einem Molekulargewicht von etwa 325,000 wird von diesem Gel nicht zurückgehalten, während freies Mangan nur sehr verzögert eluiert wird (Abb. 1).

Im Säulenauslauf wurden kontinuierlich verfolgt und registriert die Eiweißkonzentration durch Absorption im UV mit Hilfe einer Durchlaufküvette und gleichzeitig die Radioaktivität. Die ausgezogene Kurve gibt die Eiweißkonzentration, die gestrichelte Kurve die Impulsrate wieder. Beide Peaks fallen genau zusammen, was beweist, daß die Leucinaminopeptidase das Mangan chemisch gebunden enthält. Der zweite kleinere Impulsgipfel zeigt freies Mangan an, welches erst später eluiert wird.

Von dem die LAP enthaltenden Säuleneluat wurde der absolute Eiweißgehalt, der C_1 -Wert als Maß für die enzymatische Wirksamkeit, die spezifische Radioaktivität und daraus der Mangangehalt des Enzymproteins bestimmt (Tab. 1).

Bei dem angenommenen Molekulargewicht der Leucinaminopeptidase von 325,000 entspricht die gefundene Manganmenge einem Verhältnis von 4-5

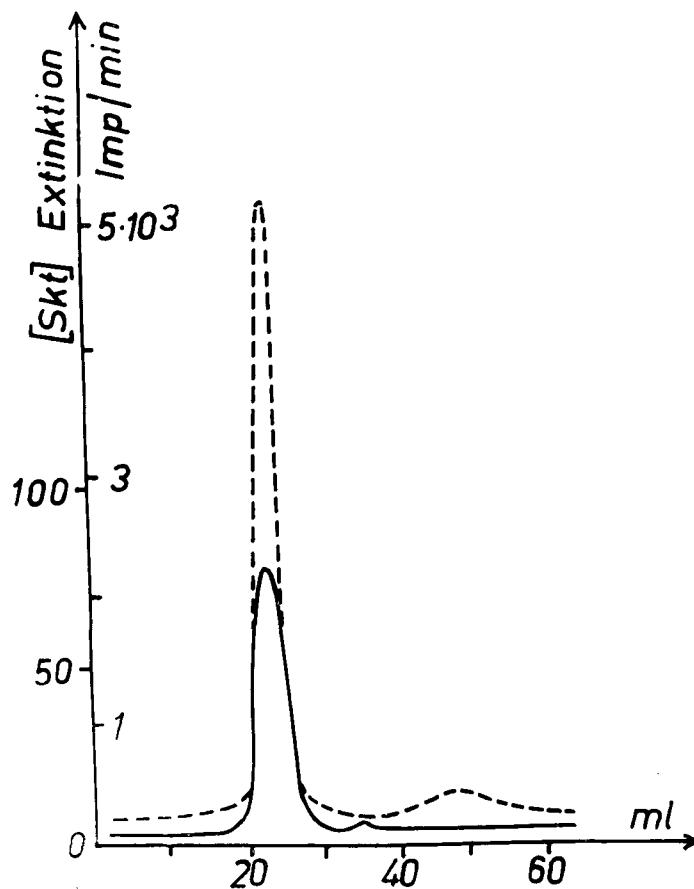


ABB. 1. — Fraktionierung von ^{54}Mn -markierter Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen an Sephadex G 25.
 - - - - Impulsrate, — Eiweißkonzentration.

TABELLE I. Quantitative Verhältnisse der Manganbindung nach Fraktionierung an Sephadex G 25.
 C_1 proteolytischer Koeffizient.

	Eiweiß (mg)	C_1	Impulsrate (1/min)	Mangan (μg)
Inkubationsansatz	120,2	145	4.750.000	1.650
Säuleneluat	57,0	153	128.000	42

Atomen Mangan pro LAP-Molekül. Dieses Verhältnis bleibt konstant und wird stets wiedergefunden, wenn man mehrfach über Sephadex fraktioniert.

Als Beweis für die Beständigkeit der Mangan-Proteinbindung wurde die markierte Leucinaminopeptidase einer kontinuierlichen Dialyse unterworfen (Abb. 2).

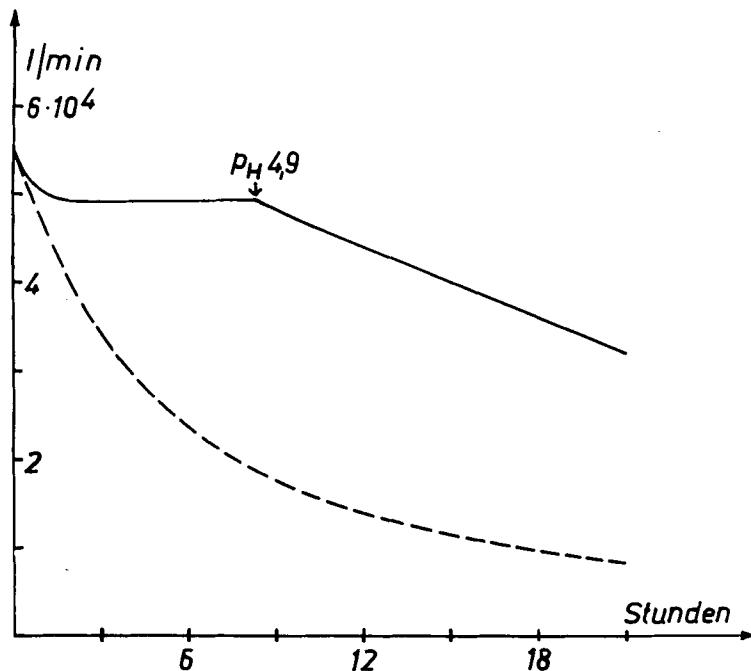


ABB. 2. — Kontinuierliche Dialyse von ^{54}Mn -markierter Leucinaminopeptidase.
 — ^{54}Mn -LAP-Lösung, - - - $^{54}\text{MnCl}_2$ -Lösung.

Der Verlauf der Dialyse wurde mit einem Eintauchzählrohr, das sich innerhalb des Dialyseschlauches befand, über einen Impulsdichteschreiber verfolgt. Als Dialysegefäß diente eine abgeschirmte Durchflußkammer. Die ausgezogene Kurve zeigt den Dialyseverlauf zunächst gegen Trispuffer pH 7,9 bei $+6^\circ\text{C}$. Der anfängliche Abfall der Impulsrate ist auf freies Mangan zurückzuführen. Bei mehrwöchigem Stehen radioaktiv markierter LAP bei $+4^\circ\text{C}$ kommt es zu einer geringfügigen Dissoziation des Enzym-Metallkomplexes. Nach zweistündiger Dialyse bleibt die Impulsrate konstant, das heißt, die nunmehr vorhandene Aktivität ist bei pH 8 fest am Eiweiß gebunden. Die Stabilität der Mangan-Eiweißbindung ist pH-abhängig: bei Dialyse gegen Wasser pH 5 setzt ein kontinuierlicher Abfall der Impulsrate entsprechend einer laufenden Dissoziation des Enzym-Metallkomplexes ein. Die gestrichelte Kurve in Abbildung 2 gibt als Vergleich den Dialyseverlauf einer reinen Mn^{++} -Lösung etwa gleicher spezifischer Aktivität wieder.

Nachdem in weiteren Versuchen gefunden wurde, daß sich die Leucinaminopeptidase auch ohne Rekristallisation, nämlich durch einfache Inkubation mit ^{54}Mn markieren ließ, untersuchten wir die Manganbindungsähigkeit der LAP in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur, Inkubationszeit und dem pH. Die Abtrennung des nicht eiweißgebundenen Mangans erfolgte wieder an SEPHADEX G 25. Von allen Präparationen wurde der Mangangehalt pro Enzymeiweiß bestimmt (Abb. 3).

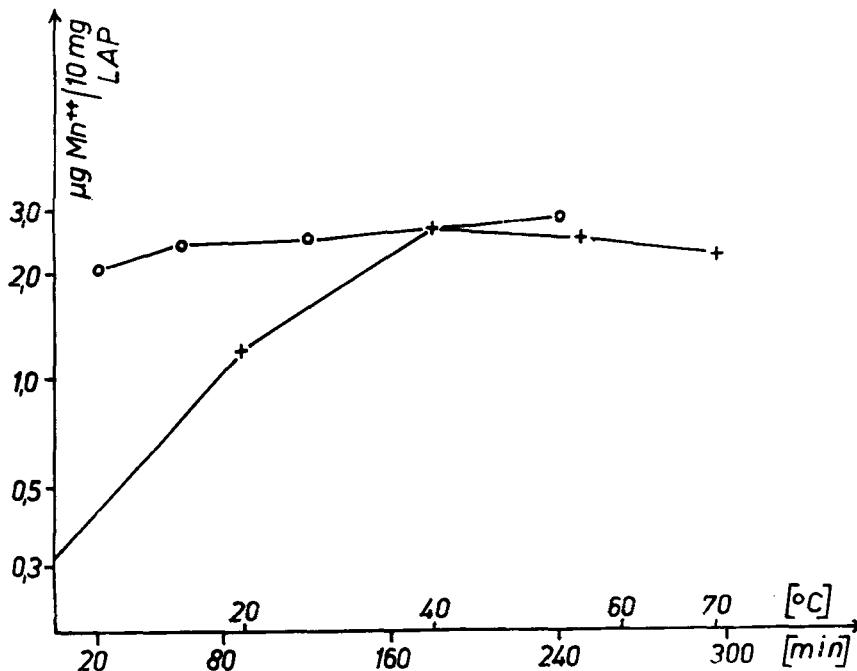


ABB. 3. — Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Manganbindung.
○ — ○ — ○ Zeitkurve, + — + — + Temperaturkurve

Die Zeitsdauer der Inkubation beeinflußt die Manganbindung nicht wesentlich; die Bindungsähigkeit der Leucinaminopeptidase ist dagegen stark temperaturabhängig und erreicht bei 40 bis 56°C ein Maximum. Die pH-Abhängigkeit wurde im Bereich von pH 5 bis 9 untersucht. Der Gehalt an proteingebundenem Mangan steigt mit zunehmendem pH-Wert stark an, sodaß man bei pH 9 einen Mangangehalt von 38 Atomen pro LAP-Molekül findet. Ob es sich hier jedoch noch um eine spezifische Bindung handelt, bleibt zu klären.

Analoge Experimente mit Zink-65- und Kobalt-60-Lösungen in wechselnder Konzentration und unter Variation der Inkubationsbedingungen führten eindeutigen zu keiner Markierung. Inkubationsansätze von Leucinaminopeptidase mit $^{60}\text{CoCl}_2$ ließen sich an Sephadex nicht fraktionieren. Das das Eiweiß

enthaltende Säuleneluat war in allen Fällen kolloidal getrübt und enthielt die gesamte im Überschuß eingesetzte Radioaktivität. Entsprechende Markierungsversuche mit ^{65}Zn scheitern daran, daß Zinksalz-Lösungen noch in 10^{-4} molarer Konzentration im pH-Bereich zwischen 6 und 8 zu einer Eiweißfällung führen und die spezifische Aktivität des Überstandes für eine exakte Bestimmung des Metall-Enzymverhältnisses zu gering ist. Eine Fortsetzung der Versuche bietet der Einsatz von trägerfreien ^{65}Zn -Lösungen.

SCHRIFTTÜM

1. HANSON, H., GLÄSSER, D. und KIRSCHKE, H. — Leucinaminopeptidase aus Rinderaugengläsern. Kristallisation, Eigenschaften und optimale Wirkungsbedingungen des Enzyms, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 340, 107 (1965).