

Gemeinsame Präparation von drei Dehydrogenasen und zwei Kinasen in einem Arbeitsgang aus Schweineherz

The Preparation of Three Dehydrogenases and Two Kinases from Pig Heart by a Single Procedure

A. Geller und J. Berghäuser

Gustav Embden Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung Enzymologie,
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 32 c, 210 – – 218 [1977]; eingegangen am 9. Dezember 1976/12. Januar 1977)

Enzyme Preparation, Lactate Dehydrogenase, Mitochondrial and Cytoplasmic Malate Dehydrogenase, Adenylate Kinase, Pyruvate Kinase

A single procedure for the preparation of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27), the mitochondrial and cytoplasmic forms of malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37), adenylate kinase (EC 2.7.4.3) and pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) from pig heart is described. The five enzymes are obtained in preparative amounts in homogenous form with specific activities equal to or higher than those previously reported. Some molecular properties of pig heart pyruvate kinase are determined.

Einleitung

Bei Röntgenuntersuchungen der Raumstrukturen von Dehydrogenasen und Kinasen findet man eine gemeinsame Struktur der Adeninnucleotidbindungsstelle im aktiven Zentrum. Es wird deshalb vermutet, daß diese Enzyme im Laufe der Evolution aus einer gemeinsamen Vorstufe hervorgegangen sind^{1, 2}. Bei einer Entwicklung der aktiven Zentren aus einer gemeinsamen Vorstufe ist zu erwarten, daß nicht nur die Elektronendichteverteilung der Nucleotidbindungsstelle ähnlich geblieben ist, sondern auch ihr chemischer Charakter. Deshalb sollten gleiche chemische Modifizierungen an allen homologen Enzymen möglich sein³. Eine Voraussetzung für eindeutige Aussagen bei chemischen Untersuchungen sind ausreichende Mengen homogener Enzympräparate. Wir haben eine Aufarbeitungsmethode entwickelt, bei der aus Schweineherzen als Ausgangsmaterial sowohl Dehydrogenasen als auch Kinasen in reiner Form in befriedigender Ausbeute gewonnen werden. Da Pyruvat-Kinase aus dieser Quelle noch nicht genauer charakterisiert ist, werden einige Eigenschaften dieses Enzyms beschrieben.

Material und Methoden

Schweineherzen wurden von dem hiesigen Schlachthof bezogen. Sie wurden innerhalb von 2,5 Stunden

Sonderdruckanforderungen an Doz. Dr. J. Berghäuser, Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung Enzymologie, Theodor Stern Kai 7, D-6000 Frankfurt 70.

nach dem Schlachten von Fett und Sehnen befreit und bis zur Verwendung tiefgefroren aufbewahrt.

CM-Sephadex, DEAE-Sephadex und die verschiedenen Sephadex-Typen waren Produkte der Firma Pharmacia.

NADH, NADP, Oxalacetat, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bezogen wir von Boehringer, Mannheim. Imidazol der EGA-Chemie wurde 2mal aus Aceton umkristallisiert.

AMP, ADP und ATP lieferten die Papierwerke Waldhof-Aschaffenburg, Mannheim. AMP war noch mit geringen Mengen ADP verunreinigt, die sich durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50(H⁺) entfernen ließen.

Phosphoenolpyruvat wurde nach der Vorschrift von Clark und Kirby⁴ synthetisiert.

Hydrolysierte Stärke nach Smithies⁵ war ein Produkt von Connaught Medical Research Laboratories, Toronto, Canada. Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Ampholyte waren Produkte der Firma Serva, Heidelberg. Puffer wurden aus demineralisiertem Wasser hergestellt. Ihr pH-Wert wurde mit einer Glasselektrode bei Zimmertemperatur bestimmt. Für die Säulenchromatographie wurde ein 0,4 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) hergestellt. Vor der Verwendung wurde er entsprechend verdünnt; der pH-Wert der Lösung wurde kontrolliert und – wenn nötig – durch Zugabe von 2 N HCl oder 2 N KOH korrigiert.

Enzymtests

Die Geschwindigkeit der Oxidation von NADH oder der Reduktion von NADP bei 25 °C wurde bei

366 nm mit einem Photometer Eppendorf gemessen. Eine Aktivitätseinheit wurde definiert als die Bildung von $1 \mu\text{mol}$ Produkt pro min. Die spezifische Aktivität wurde definiert als die Anzahl der Einheiten pro mg Protein.

Adenylyl-Kinase

Die Aktivität von Adenylyl-Kinase wurde in einem gekoppelten Enzymtest gemessen, in dem die Bildung von ADP mit Hilfe von Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase bestimmt wird. Die Testlösung enthält in 1,2 ml 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH 7,6); 1,4 mM MgCl₂; 80 mM KCl; 0,8 mM ATP; 2,3 mM AMP; 0,2 mM NADH; 0,4 mM Phosphoenolpyruvat; 10 Einheiten Lactat-Dehydrogenase; 10 Einheiten Pyruvat-Kinase und geschwindigkeitsbestimmende Mengen Adenylyl-Kinase. Eine Aktivitätseinheit entspricht der Bildung von $2 \mu\text{mol}$ ADP pro min.

Die Bildung von ATP wurde mit Hilfe von Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt. Die Testlösung enthält in 1,2 ml 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH 7,6); 1,4 mM MgCl₂; 80 mM KCl; 0,33 mM ADP; 1,6 mM Glucose; 0,17 mM NADP; 5 Einheiten Hexokinase; 7 Einheiten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und geschwindigkeitsbestimmende Mengen Adenylyl-Kinase.

Lactat-Dehydrogenase

Die Testlösung enthält in 1,05 ml 0,15 M Phosphatpuffer (pH 7,2) 0,5 mM Pyruvat und 0,44 mM NADH.

Malat-Dehydrogenase

Die Testlösung enthält in 1,05 ml 0,15 M Phosphatpuffer (pH 7,2) 0,9 mM Oxalacetat und 0,2 mM NADH.

Pyruvat-Kinase

Die Bildung von Pyruvat wird mit Hilfe von Lactat-Dehydrogenase bestimmt. Die Testlösung enthält in 1,2 ml 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH 7,6) 10 mM MgCl₂; 20 mM KCl; 1,5 mM ADP; 0,7 mM Phosphoenolpyruvat; 0,2 mM NADH; 10 Einheiten Lactat-Dehydrogenase und geschwindigkeitsbestimmende Mengen Pyruvat-Kinase.

Analytische Verfahren

In Säuleneluaten wurde die Absorption bei 280 nm mit einem Uvicord II gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach der Biuretmethode mit einem Faktor von 16,5⁶ bestimmt. Bei gereinigten Enzymlösungen wurde die Absorption bei 280 nm für die Konzentrationsbestimmung verwandt. Bei Adenylyl-Kinase benutzten wir $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 5,38$ ⁷, bei cytoplasmatischer Malat-Dehydrogenase $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 13,1$ ⁸ und für Pyruvat-Kinase den in dieser Arbeit bestimmten Wert.

Für die Bestimmung des Biuretfaktors für Pyruvat-Kinase wurden einige Milligramm Enzym durch Dialyse oder Gelfiltration gegen bidestilliertes Wasser von Salzen befreit. Die salzfreie Lösung wurde bis zur Gewichtskonstanz in tarierten Gefäßen bei 60 °C und einem Druck von 0,5 mm Hg über P₂O₅ getrocknet. Das Gewicht des getrockneten Proteins wurde bestimmt und anschließend die Biuretreaktion durchgeführt.

In Polyacrylamidgelen wurden die Proteinbanden durch Färben mit Coomassie Brillant Blau und in Stärkegele mit Amidoschwarz sichtbar gemacht.

Die Stärkegelelektrophorese wurde wie von Lang⁹ beschrieben durchgeführt. Bei der Discelectrophorese benutzten wir Standardmethoden¹⁰. Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat wurde nach der von Weber und Osborne¹¹ modifizierten Methode durchgeführt.

Die Isoelektrische Fokussierung wurde in einer Apparatur der Firma LKB durchgeführt.

Enzymisolierung

Die Ammoniumsulfatkonzentrationen wurden nach der Tabelle von Clark und Kirby¹² berechnet. Korrekturen für die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Ammoniumsulfat wurden nicht vorgenommen. Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Schritte bei 0–4 °C durchgeführt.

Schritt 1: Herstellung eines Extraktes

2000 g von Fett und Sehnen befreite, gefrorene Schweineherzen werden über Nacht bei 4 °C aufgetaut und in einem Fleischwolf 2mal zerkleinert. Je 100 g werden mit 300 ml kalter 10 mM KCl-Lösung 60 Sekunden mit einem Ultraturrax homogenisiert. Der pH-Wert des Homogenisats wird mit 2 N Ammoniak zwischen pH 6 und pH 7 gehalten. Nach 45 min Rühren wird das Homogenisat 50 min bei 3400 × g zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen. Eine weitere Extraktion erbringt keine wesentlich größeren Ausbeuten.

Schritt 2: Ammoniumsulfatfraktionierung

Der Extrakt wird innerhalb von 2 Stunden auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 45-prozentiger Sättigung gebracht. Danach wird noch 1 Stunde gerührt und dann 1 Stunde bei 3400 × g zentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen und der Überstand auf 80-prozentige Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht. Nach 15 Stunden Rühren wird die Suspension bei 3400 × g 1 Stunde zentrifugiert. Der Niederschlag wird in Wasser von 0 °C (20 ml pro 100 g zerkleinerte Herzen) gelöst.

Schritt 3: Chromatographie an CM-Sephadex

Der gelöste Niederschlag der 80-prozentigen Fällung wird gegen 40 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,5)

dialysiert, bis sich mit Neßlers Reagenz keine NH_4^+ -Ionen nachweisen lassen. Die dialysierte Lösung wird auf eine Säule gegeben, in der sich CM-Sephadex (K^+ -Form) befindet, das mit 40 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,5) äquilibriert ist (Säule $7,5 \times 80$ cm). Nachdem das Dialysat eingesickert ist, wird mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis im Eluat keine nennenswerte Absorption meßbar ist. Dabei wird die Fraktion F_1 eluiert, die Lactat-Dehydrogenase und cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase enthält. Anschließend wird mit einem Gradient aus je 4 Liter 0,04 M und 0,1 M K-Phosphatpuffer (pH 6,5) eluiert. Es werden damit in der Reihenfolge die Fraktionen F_{II} (Adenylat-Kinase), F_{III} (Pyruvat-Kinase) und F_{IV} (mitochondriale Malat-Dehydrogenase) eluiert. Alle Fraktionen werden mit festem Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 80 Prozent gebracht.

Schritt 4: Trennung von Lactat-Dehydrogenase und cytoplasmatischer Malat-Dehydrogenase. Abb. 1

Der Niederschlag der Ammoniumsulfatfällung von Fraktion F_1 wird in 200 ml 30 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,2) gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert, bis keine NH_4^+ -Ionen nachzuweisen sind. Das Dialysat wird auf eine Säule ($7,5 \times 30$ cm) gegeben, die mit DEAE-Sephadex A50 –

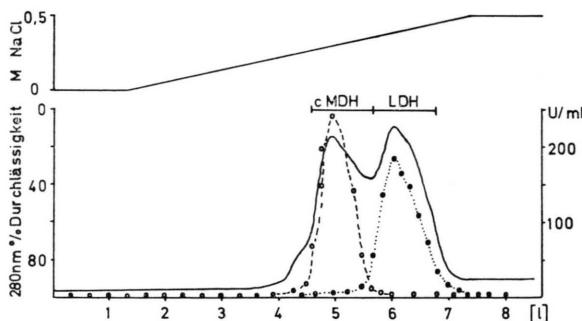


Abb. 1. DEAE-Sephadex-Chromatographie der Fraktion F_1 aus der Trennung an CM-Sephadex. Die Säule wurde mit einem NaCl-Gradienten, der im oberen Teil dargestellt ist, entwickelt. Die Absorption bei 280 nm (—) wurde gemessen und in den Fraktionen die Aktivität von Lactat-Dehydrogenase (●) und Malat-Dehydrogenase (○) bestimmt. Die Fraktionen wurden wie angezeigt vereinigt.

äquilibriert mit 33 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,2) – gefüllt ist. Es wird mit einem linearen Natriumchloridgradient von 0 nach 0,5 M im gleichen Puffer eluiert. Cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase wird als Fraktion F_{Ia} eluiert und mit Ammoniumsulfat auf 80-prozentige Sättigung gebracht. Fraktion F_{Ib} enthält Lactat-Dehydrogenase und wird auf 60-prozentige Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht.

Schritt 5: Reinigung der Fraktion F_{Ia}

Der Niederschlag von Fraktion F_{Ia} wird in 100 ml 33 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,2) gelöst und mit festem Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 35 Prozent gebracht. Der entstandene Niederschlag, der wenig Malat-Dehydrogenase-Aktivität enthält, wird verworfen. Der Überstand wird mit Ammoniumsulfat auf 80 Prozent Sättigung gebracht und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Das Präzipitat wird in 15 ml 50 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst. Die Lösung wird an Sephadex G100 (Säule $140 \times 2,6$ cm) chromatographiert. Dabei wird ein niedrigermolekulares Hämprotein von der Malat-Dehydrogenase abgetrennt.

Schritt 6: Kristallisation der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase

Zur Malat-Dehydrogenase enthaltenden Fraktion aus Schritt 5 wird Ammoniumsulfat bis zu 50-prozentiger Sättigung gegeben. Der Niederschlag wird nach 15 Stunden abgetrennt. Der Überstand wird langsam auf eine Sättigung von 60 Prozent an Ammoniumsulfat gebracht und der entstandene Niederschlag nach einer Stunde abzentrifugiert. Der Überstand, der über 90 Prozent der von der G100-Säule eluierten Malat-Dehydrogenase-Aktivität enthält, wird auf pH 6,7 eingestellt und die Ammoniumsulfatkonzentration auf 65-prozentige Sättigung erhöht. Bei 4°C bilden sich im Laufe von 20 Stunden Kristalle.

Schritt 7: Erste Kristallisation von Lactat-Dehydrogenase

Der Niederschlag der Ammoniumsulfatfällung von Fraktion F_{Ib} wird in 30 ml 40 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,5) gelöst. Durch langsame Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 40-prozentiger Sättigung wird Lactat-Dehydrogenase kristallisiert.

Schritt 8: Zweite Kristallisation von Lactat-Dehydrogenase

Die Kristalle aus Schritt 7 werden in 20 ml 50 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst. Die Lösung wird an Sephadex G100 (Säule $140 \times 2,6$ cm) chromatographiert. Die Lactat-Dehydrogenase enthaltende Fraktion wird durch langsame Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu 45-prozentiger Sättigung kristallisiert.

Schritt 9: Hitzebehandlung von Pyruvat-Kinase

Der Niederschlag von Fraktion F_{III} aus Schritt 3 wird in 25 ml 20 mM Imidazol/HCl-Puffer (pH 6,0) gelöst. Die Lösung wird in einem Wasserbad von 80°C unter Rühren auf 60°C erhitzt und 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Danach wird

in einem Eisbad abgekühlt. Das ausgefallene Protein wird abgetrennt und die Lösung auf 20-prozentige Ammoniumsulfatsättigung gebracht. Nun wird schnell unter Röhren auf 65 °C erhitzt und 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Die Suspension wird im Eisbad abgekühlt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Das Protein im Überstand wird durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu 80 Prozent Sättigung ausgefällt.

Schritt 10: Erste Kristallisation von Pyruvat-Kinase

Der Niederschlag aus Schritt 9 wird in 12 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gelöst und mit festem Ammoniumsulfat bis zur ersten Trübung (35-prozentige Sättigung) versetzt. Es wird sofort zentrifugiert. Im Überstand bilden sich bei 4 °C im Laufe eines Tages Kristalle aus.

Schritt 11: Zweite Kristallisation von Pyruvat-Kinase

Die Kristalle aus Schritt 10 werden in 8 ml 50 mM Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,0) gelöst und mit festem Ammoniumsulfat bis zum Auftreten der ersten Trübung versetzt. Über Nacht bilden sich in der Lösung bei 4 °C Kristalle.

Schritt 12: Negative Adsorption von mitochondrialer Malat-Dehydrogenase an DEAE-Sephadex

Der Niederschlag der Ammoniumsulfatfällung von Fraktion F_{IV} wird in 100 ml 33 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,2) gelöst und gegen 2mal 8 Liter des gleichen Puffers dialysiert. Die Lösung wird auf eine Säule (7,5 × 35 cm) gegeben, die mit DEAE-Sephadex A50 – äquilibriert mit 33 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,2) – gefüllt ist. Mitochondriale Malat-Dehydrogenase wird unter diesen Bedingungen nicht von DEAE-Sephadex gebunden. Die Malat-Dehydrogenase enthaltende Fraktion wird mit Ammoniumsulfat auf eine Konzentration von 70-prozentiger Sättigung gebracht.

Schritt 13: Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

Der Niederschlag aus Schritt 12 wird in 100 ml 33 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,2) gelöst und langsam mit festem Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 40 Prozent gebracht. Nach 17 Stunden Stehen bei 4 °C wird das ausgefallene Protein abzentrifugiert und der Überstand langsam auf 50-prozentige Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht. Nach 2 Stunden wird zentrifugiert und die Ammoniumsulfatsättigung auf 70 Prozent erhöht.

Schritt 14: Gelchromatographie an Sephadex G100

Der Niederschlag der 70-prozentigen Fällung aus Schritt 13 wird in 10 ml 50 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst und die Lösung an Sephadex G100

(Säule 140 × 2,6 cm) im gleichen Puffer chromatographiert. Die Malat-Dehydrogenase enthaltende Fraktion wird mit Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 70 Prozent gebracht.

Schritt 15: Säurebehandlung von Adenylat-Kinase

Die Fraktionen F_{II} aus drei Präparationen werden zusammen weiter gereinigt. Die vereinigten Niederschläge werden in 180 ml 5 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Lösung wird bei 0 °C unter starkem Röhren mit 2 N HCl schnell auf pH 3 gebracht. Nach 5 min Röhren wird mit 2 N NaOH schnell pH 5 und dann langsam pH 7 eingestellt. Nach 15 min wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird auf 30-prozentige Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht. Das Ausgefällte wird nach einer Stunde abgetrennt und der Überstand auf 80-prozentige Ammoniumsulfatsättigung gebracht.

Schritt 16: Negative Adsorption an DEAE-Sephadex

Der Niederschlag der 80-prozentigen Fällung aus Schritt 15 wird in 20 ml 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH 7,6) gelöst und 24 Stunden gegen 3mal 7 Liter des gleichen Puffers dialysiert. Die dialysierte Lösung wird auf eine Säule (4 × 40 cm) gegeben, die mit DEAE-Sephadex – äquilibriert mit 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH 7,6) – gefüllt ist. Unter diesen Bedingungen wird Adenylat-Kinase nicht an DEAE-Sephadex gebunden. In der Adenylat-Kinase-Aktivität enthaltenden Fraktion wird mit 2 N HCl pH 7,0 eingestellt und das Protein durch Zugabe von 600 mg Ammoniumsulfat pro ml Lösung ausgefällt.

Schritt 17: Chromatographie an CM-Sephadex

Der Niederschlag aus Schritt 16 wird in 6 ml 40 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,5) gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert, bis die Lösung frei von NH₄⁺-Ionen ist. Das Dialysat wird auf eine Säule (19 × 4 cm) gegeben, die mit CM-Sephadex (K⁺-Form, äquilibriert mit 40 mM K-Phosphatpuffer pH 6,5) gefüllt ist. Mit dem gleichen Puffer wird Adenylat-Kinase eluiert. Das Enzym wird durch Zugabe von 600 mg Ammoniumsulfat pro ml Lösung ausgefällt.

Schritt 18: Chromatographie an Sephadex G75

Der Niederschlag aus dem vorangegangenen Schritt wird in 5 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,0) gelöst und auf einer Sephadex G75-Säule (190 × 1,8 cm), die mit dem gleichen Puffer equiliert ist, chromatographiert. In der Adenylat-Kinase enthaltenden Fraktion wird das Enzym durch Zugabe von 600 mg Ammoniumsulfat pro ml Lösung ausgefällt.

Ergebnisse

Die Trennung und Reinigung der Enzyme ist in einem Flußdiagramm dargestellt, Abb. 2. Es zeigt alle wichtigen Schritte, die notwendig sind, um jedes der fünf Enzyme zu erhalten. Die Ausbeuten und die spezifischen Aktivitäten während der Auf-

arbeitung sind für die einzelnen Enzyme in den Tabn. I bis V zusammengefaßt.

Alle gereinigten Enzyme ergeben in der Disc-elektrophorese und in der Polyacralamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat eine Bande. Auch in der Stärkegelelektrophorese sind sie einheitlich.

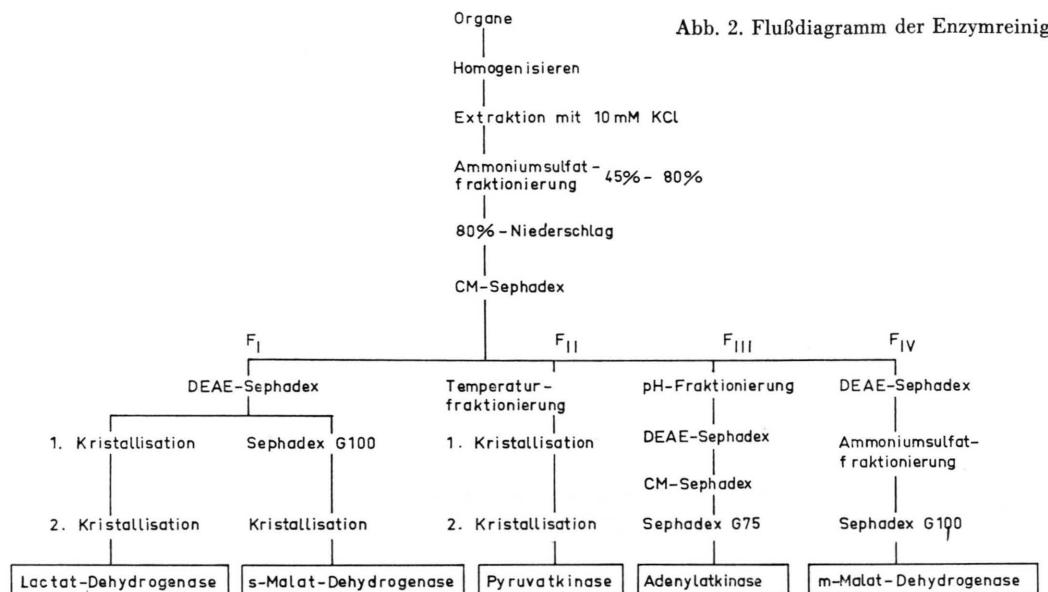


Abb. 2. Flußdiagramm der Enzymreinigung.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt-einheiten	spezifische Aktivität	Ausbeute [%]
Extrakt	6200	14	$3,2 \times 10^6$	4 **	100
45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6450	8	$2,7 \times 10^6$	5 **	85
Überstand					
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	760	60	$2,6 \times 10^6$	57 **	81
Sediment					
CM-Sephadex F _I	1120	12	$7,7 \times 10^5$	53	24
DEAE-Sephadex F _{Ia}	1580	2	$5,1 \times 10^5$	157	16
Gelfiltration G100	82	8	$2,0 \times 10^5$	310	6,2
Kristallisation			$1,9 \times 10^5$	770	5,9

Tab. I. Isolierung von cytoplasmatischer Malat-Dehydrogenase.

* Ausbeute bezieht sich auf den Gesamtgehalt an Malat-Dehydrogenase.
** Cytoplasmatische und mitochondriale Malat-Dehydrogenase.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt-einheiten	spezifische Aktivität	Ausbeute [%]
Extrakt	6200	14	$5,4 \times 10^5$	6	100
45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6450	8	$5,2 \times 10^5$	10	97
Überstand					
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	760	60	$5,1 \times 10^5$	11	95
Sediment					
CM-Sephadex F _I	1120	12	$4,4 \times 10^5$	34	81
DEAE-Sephadex F _{Ib}	1655	4	$3,9 \times 10^5$	66	72
1. Kristallisation	59	15	$3,5 \times 10^5$	390	65
2. Kristallisation			$3,2 \times 10^5$	490	58

Tab. II. Isolierung von Lactat-Dehydrogenase.

Table III. Isolierung von Pyruvat-kinase.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- einheiten	spezifische Aktivität	Ausbeute [%]
Extrakt	6200	14	$1,7 \times 10^5$	2	100
45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6400	8	$1,3 \times 10^5$	2	77
Überstand					
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	760	60	$1,1 \times 10^5$	3	67
Sediment					
CM-Sephadex F III	1682	2	$9,5 \times 10^4$	37	56
Temperatur- fraktionierung	40	8	$4,9 \times 10^4$	150	29
1. Kristallisation	15	12	$4,0 \times 10^4$	232	23
2. Kristallisation			$3,1 \times 10^4$	286	18

Tab. IV. Isolierung von Adenylyl-kinase.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- einheiten	spezifische Aktivität	Ausbeute [%]
Extrakt	6200	14	$1,20 \times 10^5$	1,4	100
45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6450	8	$1,14 \times 10^5$	2,1	95
Überstand					
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	760	60	$1,09 \times 10^5$	2,4	91
Sediment					
CM-Sephadex F II	1945	1	$0,71 \times 10^5$	30	59
pH-Fraktionierung	180	9	$1,83 \times 10^5$ *	113	51
DEAE-Sephadex	210	2,1	$1,80 \times 10^5$ *	417	50
CM-Sephadex	250	0,5	$1,50 \times 10^5$ *	1390	41
Gelfiltration G75	45	1,15	$1,00 \times 10^5$ *	1940	28

* Drei Fraktionen F II vereinigt.

Tab. V. Isolierung von mitochondrialer Malat-Dehydrogenase.

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- einheiten	spezifische Aktivität	Ausbeute *
Extrakt	6200	14	$3,2 \times 10^6$	4 **	100
45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6450	8	$2,7 \times 10^6$	5 **	85
Überstand					
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	760	60	$2,6 \times 10^6$	57 **	81
Sediment					
CM-Sephadex F IV	1710	3	$1,0 \times 10^6$	216	31
DEAE-Sephadex	1070	1	$8,5 \times 10^5$	675	26
Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat	28	16	$5,2 \times 10^5$	1150	17
Gelfiltration G100	48	8	$5,0 \times 10^5$	1295	15

* Ausbeute bezieht sich auf den Gesamtgehalt an Malat-Dehydrogenase.

** Mitochondriale und cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase.

Eigenschaften von Pyruvat-Kinase aus Schweineherz

Molekulargewicht

Für die Molekulargewichtsbestimmung wurden zwei Methoden verwandt. Bei nativer Pyruvat-Kinase wurde sie mit Hilfe der Gelfiltration¹³ an Sephadex G200 durchgeführt. Das Enzym wird in einem symmetrischen Peak eluiert. Das Elutionsvolumen entspricht einem Molgewicht von 260000 \pm 5000, Abb. 3. Bei Verwendung von Polyacrylamidgelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat findet man nach der Elektrophorese eine einzige scharfe Bande, deren Wanderungsstrecke einem Molekulargewicht von 63500 ± 1500 entspricht, Abb. 4.

Isoelektrischer Punkt

Der Isoelektrische Punkt wurde durch isoelektrische Fokussierung bestimmt. Der Isoelektrische Punkt von Pyruvat-Kinase aus Schweineherz liegt bei pH 9,2.

Biuretfaktor und Extinktionskoeffizient

Aus dem Trockengewicht des Proteins ergibt sich ein Biuretfaktor⁷ von 16,6 (für 10 ml Totalvolumen, 2 cm Lichtweg, $\lambda = 546$ nm). Die UV-Absorption von Pyruvat-Kinase wurde in 0,05 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 6,5) bestimmt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 279 nm. Eine 0,1-prozentige Lösung besitzt bei dieser Wellenlänge eine Extinktion von 0,55. Das Verhältnis $E_{280} : E_{260}$ beträgt 1,69.

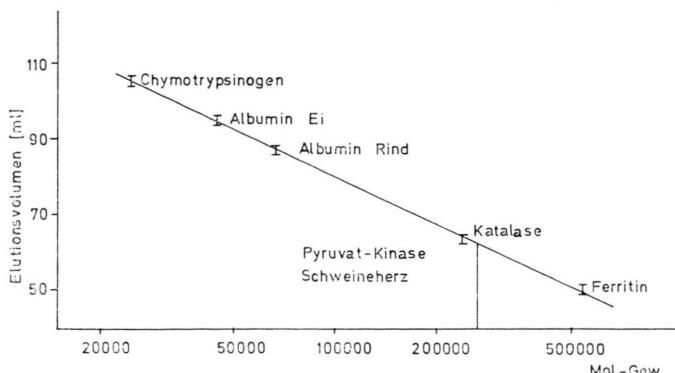


Abb. 3. Molekulargewichtbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G 200 ($1,4 \times 100$ cm) in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0.

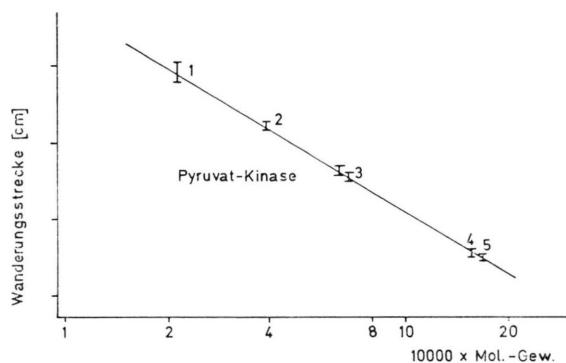


Abb. 4. Molekulargewichtsbestimmung durch Dodecylsulfat-Polyacrylamidegelektrophorese. 1, Trypsininhibitor aus Sojabohne; 2, RNA-Polymerase, α -Untereinheit; 3, Albumin vom Rind; 4, RNA-Polymerase, β -Untereinheit; 5, RNA-Polymerase, β' -Untereinheit.

Einfluß von Effektoren und Inhibitoren

Pyruvat-Kinase aus Schweineherz benötigt zur Entfaltung der maximalen Aktivität die Anwesenheit

von Mg^{2+} und K^+ . Mn^{2+} kann Mg^{2+} ersetzen, wobei 70 Prozent der maximalen Aktivität erreicht werden, während in Gegenwart von Ca^{2+} keine Aktivität gefunden wird.

Es ist bekannt, daß der L-Typ von Pyruvat-Kinase durch Fructose-1,6-diphosphat, Phosphoenolpyruvat und ATP allosterisch reguliert werden kann¹⁴, der M-Typ dagegen nur durch L-Phenylalanin in hoher Konzentration¹⁵. Es wurde der Einfluß dieser Verbindungen auf Pyruvat-Kinase aus Schweineherz untersucht. Dabei wurde nur in Anwesenheit von L-Phenylalanin eine Veränderung der enzymatischen Aktivität beobachtet. Bei 10 mm L-Phenylalanin erniedrigt sich die Aktivität maximal bei pH 8,5 auf 70 Prozent der ungehemmten Aktivität.

Michaelis-Konstanten für ADP und Phosphoenolpyruvat

Abb. 5 zeigt Lineweaver-Burk-Diagramme für ADP und Phosphoenolpyruvat. Bei 2 mm ADP be-

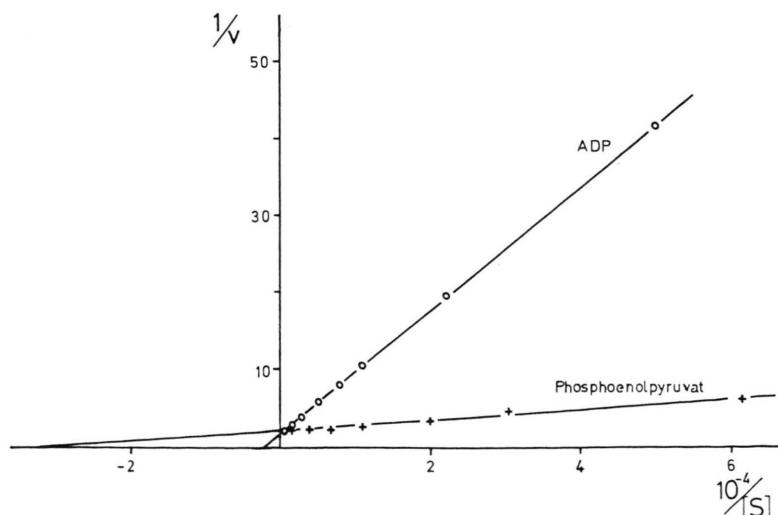


Abb. 5. Lineweaver-Burk-Diagramm für \circ ADP (Phosphoenolpyruvat 0,67 mm), $K_m = 0,49$ mm, und $+$ Phosphoenolpyruvat (ADP 2 mm), $K_m = 0,03$ mm, gemessen bei 25 °C in 0,2 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH 7,6), der 10 mm Mg^{2+} und 20 mm K^+ ist.

trägt die K_m für Phosphoenolpyruvat 0,03 mM. Bei 0,67 mM Phosphoenolpyruvat beträgt die K_m für ADP 0,49 mM.

Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit gab es verschiedene Vorschriften, um Lactat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Schweineherzen zu isolieren. Adenylat-Kinase ist aus den Muskeln von verschiedenen Tierarten isoliert worden¹⁶, darunter auch aus Schweineskelettmuskel⁷. Während unserer Untersuchungen wurde eine Methode zur Isolierung dieses Enzyms aus Schweineherzen¹⁷ beschrieben und gezeigt, daß zwei Formen von Adenylat-Kinase im Herzmuskel vorhanden sind, von denen eine säurelabil ist und die andere dem Enzym aus Schweineskelettmuskel entspricht. Eine Isolierung dieser Dehydrogenasen und Kinasen in einer Simultanpräparation wurde noch nicht beschrieben.

Bei der hier beschriebenen Präparationsmethode werden die Enzyme zuerst auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladung an CM-Sephadex in saure, neutrale und basische Fraktionen getrennt. Die saure Fraktion enthält sowohl cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase als auch Lactat-Dehydrogenase. Beide Enzyme lassen sich mit einem Salzgradienten an DEAE-Sephadex trennen. Die anderen Enzyme werden schon bei der Chromatographie an CM-Sephadex voneinander getrennt. Der erste Präparationsabschnitt, der bis zur Isolierung dieser Fraktionen führt, erfordert einen Zeitaufwand von einer Woche. Alle gereinigten Enzyme sind in der Disc-elektrophorese einheitlich. Beide Formen der Malat-Dehydrogenase ergeben auch in der Stärkegelelektrophorese jeweils nur eine Proteinbande. Alle bisherigen Methoden der Isolierung, bis auf eine, die vor kurzem veröffentlicht wurde⁸, führen zu Malat-Dehydrogenase-Präparaten, die in der Stärkegelektrophorese nicht einheitlich sind.

Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme lassen sich zum Teil nur schwer mit den in der Literatur beschriebenen vergleichen, da dort die Testbedingungen stark variieren. So erhält man z. B. mit dem von vielen Autoren benutzten Adenylat-Kinase-Test nach der Titrormethode¹⁸ Aktivitätswerte, die um den Faktor 1,5 größer sind als die mit dem von uns benutzten gekoppelten optischen Test bestimmten Werte. Die spezifischen Aktivitäten von allen fünf Enzymen sind aber zumindest genauso groß wie die in der Literatur angegebenen Werte. Bei cytoplas-

matischer Malat-Dehydrogenase und Adenyl-Kinase sind sie größer.

Aus Schweineherz wurde von Coon¹⁹ ein Enzym mit Hydroxylamin-Kinase-Aktivität isoliert, von dem später gezeigt wurde, daß es sich um Pyruvat-Kinase handelt²⁰. Die spezifischen Aktivitäten unserer Pyruvat-Kinase-Präparate liegen, wenn wir die unterschiedlichen Proteinbestimmungsmethoden berücksichtigen, um den Faktor 1,7 höher.

Es soll noch erwähnt werden, daß die hier beschriebene Methode auch benutzt werden kann, wenn nur eines der fünf Enzyme benötigt wird. Dabei kann bei der ersten CM-Sephadex-Chromatographie der lineare Gradient durch schrittweise Eluion ersetzt werden. Wenn nur die beiden Kinasen isoliert werden sollen, hat es sich bewährt, zuerst die Chromatographie an DEAE-Sephadex vorzunehmen.

Über die Eigenschaften von Pyruvat-Kinase aus Schweineherz ist wenig bekannt. Die Lage des isoelektrischen Punkts des Enzyms läßt auf einen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren schließen, wie er für Pyruvat-Kinase aus Ochsenskelettmuskel, die einen isoelektrischen pH von 8,9 hat, gefunden wurde²¹. Die Molekulargewichte von 260000 für das native Enzym und von 63500 für das mit Natriumdodecylsulfat dissozierte Protein legen einen Aufbau des nativen Enzyms aus vier Untereinheiten nahe.

Pyruvat-Kinase aus Schweineherz muß auf Grund ihres Verhaltens dem M-Typ zugerechnet werden. Die Michaelis-Konstanten für ADP und Phosphoenolpyruvat entsprechen denen der Enzyme aus Kaninchenskelettmuskel²², Ochsenskelettmuskel²¹ und Meerschweinchengehirn²³, die alle dem M-Typ gehören. ATP und Fruktose-1,6-diphosphat beeinflussen die enzymatische Aktivität nicht; die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Phosphoenolpyruatkonzentration genügt der Michaelis-Menten-Kinetik. Dies und die Hemmung durch Phenylalanin unterstützen die Zuordnung zum M-Typ.

Herrn Prof. Dr. Dr. C. Woenkhaus möchten wir für sein Interesse an der Durchführung dieser Arbeit danken.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch ein Stipendium (A. G.) der Friedrich Naumann Stiftung unterstützt.

In dieser Arbeit sind Teile einer Dissertation (A. G.) im Fachbereich Biochemie und Pharmazie der J. W. Goethe Universität, Frankfurt, enthalten.

- ¹ M. Buehner, G. D. Ford, D. Moras, K. W. Olsen u. M. G. Rossmann, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **70**, 3052 [1973].
- ² M. G. Rossmann, D. Moras u. K. W. Olsen, Nature **250**, 194 [1974].
- ³ J. Berghäuser u. A. Geller, FEBS-Letters **38**, 254 [1974].
- ⁴ V. M. Clark u. A. J. Kirby, in Biochem. Preparations Vol. II, 101, Wiley, New York 1966.
- ⁵ O. Smithies, Biochem. J. **61**, 629 [1955].
- ⁶ G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1953].
- ⁷ I. Schirmer, R. H. Schirmer, G. E. Schulz u. E. Thuma, FEBS-Letters **10**, 333 [1970].
- ⁸ B. E. Glatthaar, G. R. Barbarasak, B. E. Noyes, L. J. Banaszak u. R. A. Bradshaw, Anal. Biochem. **57**, 432 [1974].
- ⁹ V. Lang, Biochem. Z. **333**, 503 [1961].
- ¹⁰ H. R. Maurer, Disc Electrophoreses, de Gruyter, Berlin 1971.
- ¹¹ K. Weber u. M. Osborne, J. Biol. Chem. **244**, 4406 [1969].
- ¹² A. A. Green u. W. L. Hughes, in Methods in Enzymology Vol. I, 67, Academic Press, New York 1955.
- ¹³ P. Andrews, Biochem. J. **96**, 595 [1965].
- ¹⁴ F. J. Kayne, in The Enzymes Vol. VIII, 353, Academic Press, New York 1973.
- ¹⁵ H. Carminatti, L. Jiminez de Asua, B. Leiderman u. E. Rozengurt, J. Biol. Chem. **246**, 1481 [1969].
- ¹⁶ L. Noda, in The Enzymes Vol. VIII, 279, Academic Press, New York 1973.
- ¹⁷ S. Kubo u. L. H. Noda, Europ. J. Biochem. **48**, 325 [1974].
- ¹⁸ T. A. Mahowald, E. A. Noltmann u. S. A. Kuby, J. Biol. Chem. **237**, 1535 [1962].
- ¹⁹ B. K. Bachawat u. M. J. Coon, J. Biol. Chem. **231**, 625 [1958].
- ²⁰ F. P. Kupiecki u. M. J. Coon, J. Biol. Chem. **235**, 1944 [1960].
- ²¹ J. M. Cardenas, R. D. Dyson u. J. J. Strundholm, J. Biol. Chem. **248**, 6931 [1973].
- ²² P. F. Hollenberg, M. Flashner u. M. J. Coon, J. Biol. Chem. **246**, 946 [1971].
- ²³ P. C. Nicholas u. H. S. Bachelard, Biochem. J. **141**, 165 [1974].