

Fluorometrische Untersuchungen des Glutaminsäuredehydrogenase- DPNH-Komplexes

HORST SUND

*Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska
avdelningen, Stockholm, Schweden*

Boyer und Theorell beobachteten 1956 die Erhöhung der Fluoreszenz des DPNH * und eine Verschiebung seines Fluoreszenzmaximums nach kürzeren Wellenlängen in Gegenwart von Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber¹. Analoge Ergebnisse wurden mit den binären Komplexen des DPNH oder TPNH und Hefe-Alkoholdehydrogenase², Milchsäuredehydrogenase³, Äpfelsäuredehydrogenase⁴, Isocitronensäuredehydrogenase⁵ sowie Glu-DH⁶ erhalten. Glu-DH aus Rinderleber wird durch DPNH sehr stark gehemmt^{8,9} und verschiedene Verbindungen, unter anderem Adenosin, Adeninnucleotide und Derivate des Glycins können diese Hemmung verhindern⁸⁻¹⁰. Ausserdem erhöht DPNH die Dissoziation der Glu-DH, während TPNH einen gegenteiligen Effekt ausübt und keine Hemmwirkung besitzt¹¹. Um festzustellen, ob Glu-DH für DPNH verschiedene Arten von Bindungsstellen besitzt, wurde mit Hilfe der Fluoreszenztechnik der binäre Komplex Glu-DH-DPNH studiert.

Experimenteller Teil. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem registrierenden Spektrofluorophotometer vorgenommen, das früher bereits beschrieben wurde¹². Für die Berechnung von $K_{E,R}$ und der Bindungsstellen dienten die von Theorell und Winer angegebenen Gleichungen¹². Sämtliche Messungen wurden bei 20° in Na-Phosphat-Puffer ($\mu = 0,1$) pH 7,5 vorgenommen. Die Titration des Enzyms mit DPNH erfolgte durch Messen der Fluoreszenzemission bei 440 m μ , die Anregung bei 350 m μ . Die Maxima der Emissions- und Anregungsspektren sind unkorrigiert für die durch die Intensität des Anregungslichtes und der Empfindlichkeit der Fotozelle bei Änderung der Wellenlänge auftretenden Abweichungen. Für das benutzte Instrument ergibt die Korrektur eine Verschiebung der Maxima um

etwa 15 m μ nach kürzeren Wellenlängen. Glu-DH aus Rinderleber wurde von der Firma C. F. Boehringer und Soehne, Mannheim, Deutschland *, erhalten und in Gegenwart von Na₂SO₄ zweimal umkristallisiert, Wechselzahl 6 500¹³. Das Enzym war in der Elektrophorese (Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 7,4: $4,8 \times 10^{-5}$ cm².sec⁻¹.V⁻¹) und in der Ultrazentrifuge einheitlich. Proteinbestimmung auf Grund der Absorption bei 280 m μ ($\epsilon_{280} = 0,95$ cm².mg⁻¹) und des Kjeldahl-Stickstoffs (15,5 %). Verhältnis der Absorption bei 280 und 260 m μ : 1,97–2,00. Vor der Titration wurde die Glu-DH ohne Aktivitätsverlust zwei Tage gegen Na-Phosphat-Puffer ($\mu = 0,1$) pH 7,5 dialysiert. DPNH war ein Präparat der Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA, (Reinheit bezogen auf die Absorption bei 340 m μ 89 %, davon 95 % enzymatisch aktiv). Glutaminsäure wurde von E. Merck, Darmstadt, Deutschland, bezogen (Reinheit auf Grund des Kjeldahl-Stickstoffs 98,5 %, papierchromatographisch einheitlich). ZnSO₄.7H₂O war durch Extraktion mit 8-Hydroxychinolin und Acetylaceton von allen Schwermetallspuren befreit.

Ergebnisse und Diskussion. Das Maximum der Fluoreszenzemission des DPNH bei 478 m μ (korrigiert 462 m μ) wird bei gleichzeitiger Erhöhung der Fluoreszenz in Gegenwart von Glu-DH nach 468 m μ verschoben, Glutaminsäure erhöht die Fluoreszenz des ER-Komplexes ohne dessen Maximum zu verschieben⁶. Abb. 1 zeigt nebeneinander die Emissions- und Anregungsspektren von DPNH, ER, der ternären Komplexe ERS und ERZn sowie des quaternären Komplexes ERSZn. Aus der fluorometrischen Titrationskurve der Glu-DH mit DPNH wird bei einer Enzymkonzentration von 1,09 mg/ml ein Äquivalentgewicht von 59 000 pro DPNH-Bindungsstelle gefunden, $K_{E,R}$ besitzt den Wert 0,49 μ M. Erniedrigung der Enzymkonzentration führt zu einer Abnahme des Äquivalentgewichtes, Q nimmt ebenfalls etwas ab, während $K_{E,R}$ ansteigt (Tabelle 1). Anzeichen für das Vorhandensein verschiedenartiger DPNH-Bindungsstellen bei den jeweiligen Enzymkonzentrationen konnten wir nicht finden, die mit den in der Tabelle 1 angegebenen Werten berechneten Titrationskurven stimmen mit den experimentell gefundenen gut überein (Abb. 2). Die Messungen anderer Autoren ergaben bei der

* Abkürzungen: DPNH, R: reduziertes Diphosphopyridinnucleotid; Glu-DH, E: Glutaminsäuredehydrogenase; Q: Fluoreszenz ER/R; S: Glutaminsäure; TPNH: reduziertes Triphosphopyridinnucleotid; $K_{E,R} = [E][R]/[ER]$.

* Der Firma C. F. Boehringer und Soehne danken wir sehr für die grosszügige Überlassung der Glu-DH.

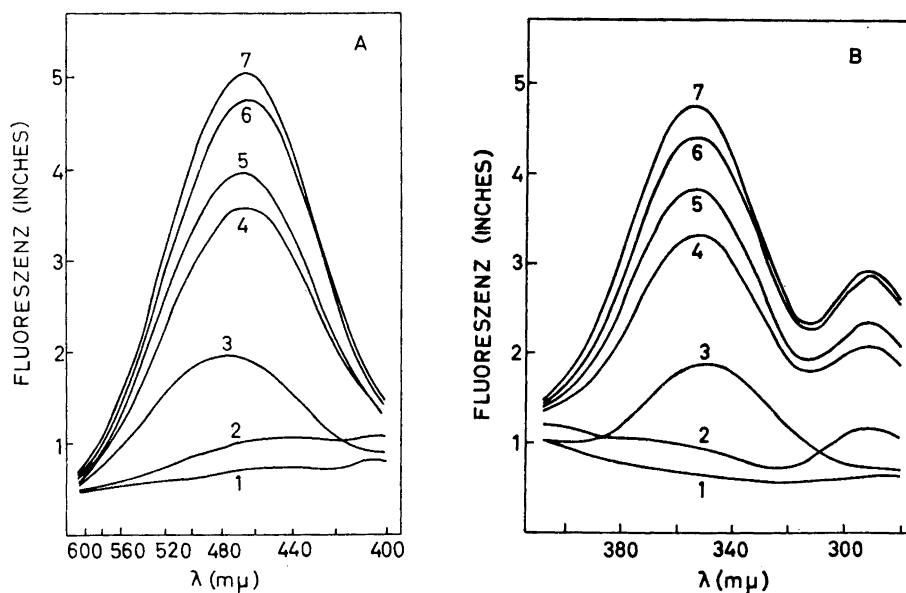


Abb. 1. Fluoreszenzspektren der Komplexe von Glu-DH aus Rinderleber mit DPNH, Glutaminsäure und Zn^{++} in Na-Phosphat-Puffer ($\mu=0,1$) pH 7,5 bei 20°. A: Emissionsspektren (Anregung bei 350 $m\mu$), B: Anregungsspektren (gemessen bei 468 $m\mu$). 1: Puffer; 2: 0,64 mg/ml Glu-DH; 3: 0,90 μM DPNH; 4: 0,64 mg/ml Glu-DH, 0,90 μM DPNH; 5: 0,64 mg/ml Glu-DH, 0,90 μM DPNH, 254 μM Glutaminsäure; 6: 0,64 mg/ml Glu-DH, 0,90 μM DPNH, 47,7 μM $ZnSO_4$; 7: 0,64 mg/ml Glu-DH, 0,90 μM DPNH, 254 μM Glutaminsäure, 47,7 μM $ZnSO_4$.

direkten Bestimmung in der Ultrazentrifuge in Gegenwart von 5,1 mg/ml Glu-DH ein Äquivalentgewicht von 66 000¹⁴, bei der fluorometrischen Titration mit TPNH oder DPNH in Gegenwart von 1 mg/ml einen Wert von etwa 100 000⁷. Bemerkenswert ist die Erhöhung der Fluoreszenz des ER-Komplexes in Gegenwart von Zn-Ionen (Q etwa 3,1) und bei der Bildung des quaternären Komplexes ERSZn (Q etwa 3,4), bei der das Maximum des binären

Tabelle 1. Abhängigkeit der DPNH-Bindungsstellen und $K_{E,R}$ von der Glu-DH-Konzentration.

[Glu-DH] mg/ml	Äquivalentgewicht pro DPNH- Bindungsstelle	$K_{E,R}$ (μM)	Q
1,09	59 000	0,49	2,3
0,60	45 000	1,42	2,1
0,31	31 000	1,96	1,8

Komplexes ER nicht verändert wird (Abb. 1). Das Maximum des Anregungsspektrum von DPNH bei 350 $m\mu$ wird nur unwesentlich nach 353 $m\mu$ verschoben, wenn der binäre ER-Komplex oder die höheren Komplexe gebildet werden (Abb. 1). Imidazol ($4,8 \times 10^{-2}$ M), das mit Leber-Alkoholdehydrogenase Komplexe bildet¹⁵, und NH_4Cl ($2,0 \times 10^{-3}$ M) verändern die Fluoreszenz des ER-Komplexes nicht. Zn-Ionen haben unter den angegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die Fluoreszenz des Enzyms oder DPNH.

Aus Diffusionsmessungen geht hervor, dass die durch Dissoziation der Glu-DH beim Verdünnen entstehenden Untereinheiten symmetrischer sind als die Assoziate¹⁶. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen zeigen, dass Dissoziation und Formveränderung der Glu-DH zu einer Vermehrung der Bindungsstellen für DPNH führen. Möglicherweise sind die hierbei auftretenden neuen Bindungsstellen verantwortlich für die starke Hemmung der En-

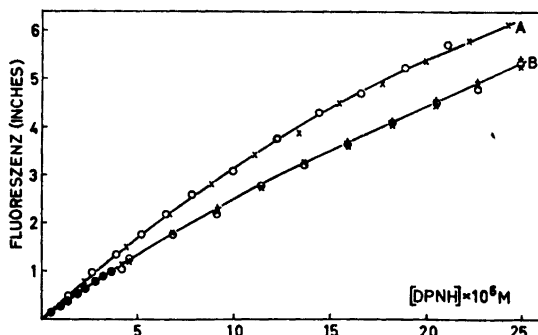


Abb. 2. Titration von Glu-DH mit DPNH. [Glu-DH] = 0,60 mg/ml (A) und 0,31 mg/ml (B). Ausgezogene Kurven berechnet mit den in der Tabelle 1 angegebenen Werten. O, ×, +, experimentelle Werte verschiedener Titrationen.

zymaktivität durch DPNH. Dieser Befund ist von Bedeutung für die Betrachtung der Verhältnisse *in vivo*, da die Konzentrationen der Glu-DH in der Leber und in unseren Versuchen etwa gleich sind. Über die Natur der Enzym-Coenzym-Bindung kann noch nichts ausgesagt werden, doch ist der Zinkgehalt¹⁷ zu niedrig, um eine Beteiligung des Zinks an der Bindung zwischen DPNH und Glu-DH annehmen zu dürfen. Die Untersuchungen werden fortgesetzt und später in dieser Zeitschrift in extenso publiziert und diskutiert.

Herrn Professor Hugo Theorell danke ich sehr für wertvolle Diskussionen und Hinweise und für die mir gewährte Gastfreundschaft. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ein Auslandsstipendium.

1. Boyer, P. D. und Theorell, H. *Acta Chem. Scand.* **10** (1956) 447.
2. Duysens, L. N. M. und Kronenberg, G. H. M. *Biochim. et Biophys. Acta* **26** (1957) 437.
3. Winer, A. D., Novoa, W. B. und Schwert, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 6571.
4. Theorell, H. und Langan, T. A. *Acta Chem. Scand.* **14** (1960) 933.

5. Langan, T. A. *Acta Chem. Scand.* **14** (1960) 936.
6. Winer, A. D. und Schwert, G. W. *Biochim. et Biophys. Acta* **29** (1958) 424.
7. Frieden, C. *Biochim. et Biophys. Acta* **47** (1961) 428.
8. Wallenfels, K. und Summ, H. D. *Klin. Wochschr.* **35** (1957) 849.
9. Wallenfels, K. und Sund, H. *Arzneimittelforsch.* **9** (1959) 81.
10. Sund, H. und Müller-Hill, B. *Biochem. Z. In Vorbereitung.*
11. Frieden, C. *J. biol. Chem.* **234** (1959) 809.
12. Theorell, H. und Winer, A. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **83** (1959) 291.
13. Wallenfels, K., Sund, H. und Diekmann, H. *Biochem. Z.* **329** (1957) 48.
14. Kubo, H., Yamano, T., Iwatsubo, M., Wateri, H., Soyama, T., Shiraishi, J., Sawada, S., Kawashima, N., Mitani, S. und Ito, K. *Bull. soc. chim. biol.* **40** (1958) 431.
15. Theorell, H. und McKinley McKee, J. S. *Acta Chem. Scand.* **15** (1961). *Im Druck.*
16. *Unveröffentlichte Versuche.*
17. Vallee, B. L., Adelstein, S. J. und Olson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955) 5196.

Eingegangen am 19. Mai 1961.