

Struktur und Wirkungsweise der Glutaminsäuredehydrogenase

I. Grösse und Gestalt der Glu-DH aus Rinderleber*

HORST SUND

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br., Deutschland

In the aggregated state the particle weight of Glu-DH from beef liver is 1.99 millions. This value is derived from $s_{20,w}^{\circ} = 31.19$ S, $D_{20,w}^{\circ} = 1.52$ F, and a partial specific volume of 0.75. From the frictional ratio (1.67), the intrinsic viscosity ($[\eta] = 14.89$ ml/g), and the parameter β according to Scheraga and Mandelkern it was concluded that Glu-DH possesses a prolate shape with an axial ratio of 13–14.

Aus Sedimentations- und Diffusionsmessungen hatte man geschlossen, dass Glu-DH** aus Rinderleber ein Molekulargewicht von 1 Million besitzt und bei Konzentrationen unterhalb 4 mg/ml in kleinere Teilchen dissoziiert¹. Bei unseren Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonylharnstoffderivaten, Harnstoff und Schwermetallionen auf die molekulare Struktur der Glu-DH erhielten wir Ergebnisse^{2,3}, die darauf schliessen liessen, dass dieses Enzym im aggregierten Zustand ein höheres Teilchengewicht besitzt, als es bisher angenommen wurde. Um weitere Informationen über Grösse und Gestalt dieses Enzymmoleküls zu erhalten, haben wir seine hydrodynamischen Eigenschaften eingehend untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die untersuchten Präparate von kristallisierter Glu-DH aus Rinderleber entsprechen in ihren Eigenschaften den früher verwendeten⁴. Vor den Untersuchungen wurde das Protein 4 Tage gegen M/15 K-Na-Phosphat-Puffer, pH 7,6 ($\mu = 0,17$), dialysiert, nach jeweils 24 und 48 Stunden wurde die Aussenflüssigkeit gewechselt. Zur Methodik und Auswertung der Diffusions-, Sedimentations- und Viskositätsmessungen siehe⁵. Die Proteinbestimmung erfolgte auf Grund des Kjeldahl-Stickstoffs (15,50 %) bzw. der UV-Absorption bei 280 m μ ($\epsilon_{280} = 0.95$ cm²·mg⁻¹). Weitere Einzelheiten werden demnächst in der Biochem. Z. veröffentlicht.

* Ein Teil der hier mitgeteilten Versuche wurde in den Jahren 1960 und 1961 in Stockholm während eines Aufenthaltes in der biochemischen Abteilung des Medizinischen Nobelinstitutes durchgeführt. Herrn Professor Hugo Theorell danke ich sehr für seine Unterstützung und die mir gewährte Gastfreundschaft.

** Abkürzungen: Glu-DH: Glutaminsäuredehydrogenase; Tris: Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan.

ERGEBNISSE

Sedimentation. Infolge des Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichtes beobachtet man bei Glu-DH aus Rinderleber einen anomalen Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten und unsymmetrische Konzentrationsgradienten in der analytischen Ultrazentrifuge¹. Unsere Sedimentationsmessungen (Abb. 1) haben prinzipiell die Werte von Olson und Anfinsen bestätigt. Diese Autoren fanden für $s_{20,w}^{\circ}$ 26,6 S, unser Wert liegt um etwa 15% höher. Die Kurve A der Abb. 1 ($s_{20,w}^{\circ} = 29,04$ S) wurde durch Versuche in einer Normalzelle erhalten, Kurve B durch Versuche in einer Überschichtungszelle ($s_{20,w}^{\circ} = 31,19$ S). Bei diesen Versuchen wurde aber nicht mit Pufferlösung überschichtet, sondern mit einer Enzymlösung niedriger Konzentration. Der Grund hierfür war folgender: Während der Sedimentation bildet sich in der Ultrazentrifugenzelle eine Grenzschicht Lösung-Lösungsmittel aus. In dieser Grenzschicht fällt die Konzentration der Glu-DH entsprechend dem Konzentrationsverlauf auf null ab, so dass das Molekül in kleinere Teilchen dissoziieren kann. Für den Fall, dass die Geschwindigkeit der Dissoziation gross, diejenige der Assoziation dagegen klein ist, würde man bei einer bestimmten Enzymkonzentration nicht den Sedimentationskoeffizienten des bei dieser Konzentration vorliegenden Teilchens bestimmen, sondern denjenigen eines Dissoziationsproduktes.

Im Gegensatz zu den Versuchen in der Normalzelle beobachtet man nach Überschichten mit Glu-DH-Lösung symmetrische Konzentrationsgradienten auch

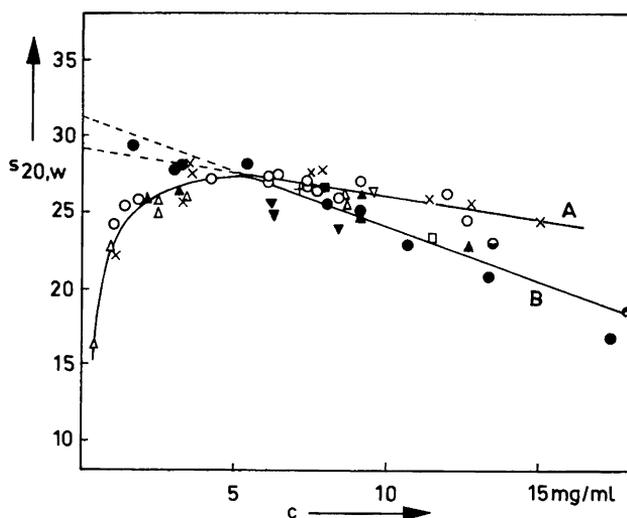


Abb. 1. Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w}$ (in Svedberg-Einheiten) von der Proteinkonzentration c bei Glu-DH aus Rinderleber. Messungen in 0,05 M Tris-Puffer pH 7,6 (\times) bzw. M/15 K-Na-Phosphat-Puffer pH 7,6 (alle anderen) bei 20°C in der Spinco-Ultrazentrifuge bei 4 197 (\blacksquare), 12 590 (\bullet , \ominus , \oplus , \square , $+$), 42 040 (∇), 50 740 (\triangle , \blacktriangledown) und 59 780 (\blacktriangle , \circ , \times) UpM. A: Versuche in der Normalzelle. B: Versuche in der Überschichtungszelle. Überschichtung mit Glu-DH-Lösung: $c = 45\%$ (\ominus), 48% (\bullet), 53% (\square), 67% (\blacksquare , \bullet , \blacktriangle , \blacktriangledown) bzw. 86% ($+$) der Konzentration der Enzymlösung in der Zelle.

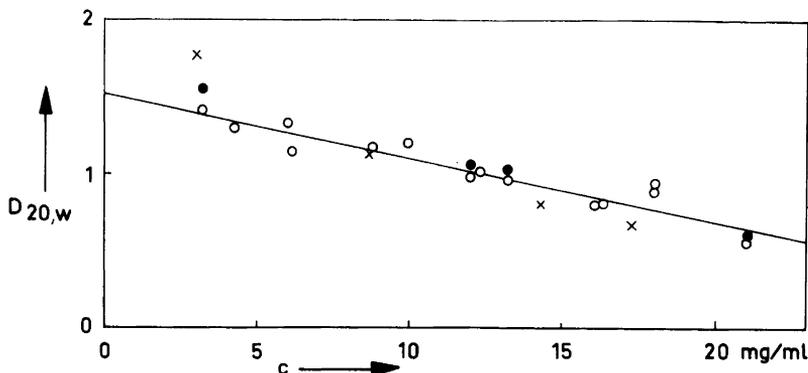


Abb. 2. Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten $D_{20,w}$ (in Fick-Einheiten) von der Proteinkonzentration c bei Glu-DH aus Rinderleber. Messungen bei 20°C in M/15 K-Na-Phosphat-Puffer pH 7,6. x, o: Nach der Flächenmethode berechnet. •: Nach der Momentmethode berechnet. Versuche in der Meyerhoff-Zelle⁶ (o, •) bzw. in der Ultrazentrifuge bei 4 197 UpM (x).

bei solchen Konzentrationen, bei denen in der Normalzelle unsymmetrische auftreten. In diesem Fall ist die sonst bei der Diffusion des Proteins in das Lösungsmittel erfolgende Dissoziation nicht zu beobachten. Abb. 1 zeigt, dass nach Extrapolation auf die Konzentration null für die Versuche bei Konzentrationen oberhalb 5 mg/ml nach beiden Methoden ähnliche Sedimentationskoeffizienten erhalten werden. Das bedeutet, dass auch die in der Normalzelle bestimmten Sedimentationskoeffizienten richtige Resultate liefern.

Diffusion. Den Diffusionskoeffizienten untersuchten wir im Bereich von 3 bis 21 mg/ml (Abb. 2). Bei Konzentrationen oberhalb 4 mg/ml gehorcht die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten der Gleichung

$$D_{20,w} = 1,52 - 0,0417 c$$

in der c die Enzymkonzentration in mg/ml bedeutet und 1,52 den auf die Konzentration null extrapolierten Diffusionskoeffizienten ($D_{20,w}^{\circ}$) darstellt. Die Bestimmungen in der Diffusionsschieberzelle sowie in der Ultrazentrifuge ergaben übereinstimmende Werte. Ebenso lieferte die Berechnung nach der Momentmethode⁷ die gleichen Ergebnisse wie diejenige nach der Flächenmethode. Unterhalb einer Konzentration von 4 mg/ml treten Abweichungen – wahrscheinlich infolge der Dissoziation – von der oben angegebenen Gleichung auf.

Viskosität. Die Viskositätsmessungen sind der Abb. 3 zu entnehmen. Für Konzentrationen oberhalb 6 mg/ml besitzt $[\eta]$ einen Wert von 14,89 ml/g, für Konzentrationen von 1 bis 6 mg/ml etwa 7,2 ml/g. Für das Viskositätsinkrement ν errechnen sich daraus Werte von 19,85 bzw. 9,6.

DISKUSSION

Nach der Svedberg-Formel⁸ errechnet sich mit einem partiellen spezifischen Volumen von 0,75¹ aus $s_{20,w}^{\circ} = 31,19$ S und $D_{20,w}^{\circ} = 1,52$ F das Teilchengewicht der Glu-DH zu 1,99 Millionen (verschiedene Versuchsergebnisse lassen vermu-

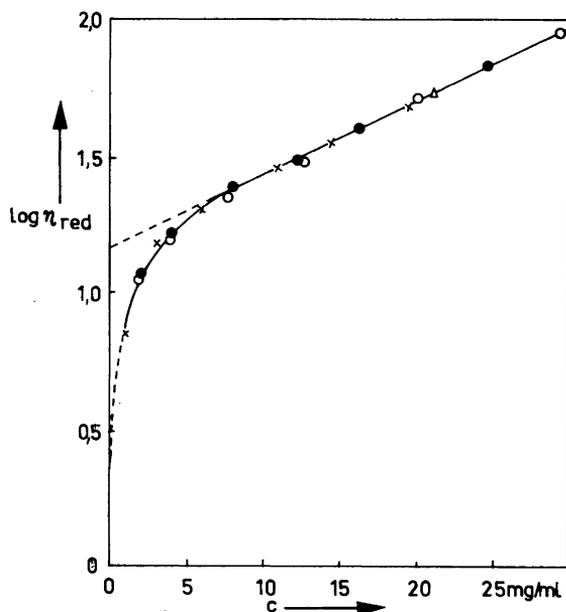


Abb. 3. Abhängigkeit der reduzierten Viskosität η_{red} ($= \eta_{sp}/c$, c in g/ml) von der Proteinkonzentration c bei Glu-DH aus Rinderleber. Messungen bei 20°C in M/15 K-Na-Phosphat-Puffer pH 7,6.

ten, dass auch Teilchen mit noch höheren Teilchengewichten auftreten). Für das Reibungsverhältnis f/f_0^8 erhält man aus s° und D° 1,67 und aus $[\eta]$ 1,69. Berechnet man unter Einbeziehung der Viskositätsdaten aus s° und D° den von Scheraga und Mandelkern⁹ aus der Theorie für starre Rotationsellipsoide entwickelten Gestaltsparameter β

$$\beta_s = \frac{N_L s^\circ [\eta]^{1/3} \eta_0}{M^{2/3} (1-V_Q)} \quad \text{bzw.} \quad \beta_D = \frac{D^\circ [\eta]^{1/3} M^{1/3} \eta_0}{k T}$$

so ergibt sich sowohl β_s als auch β_D zu $2,51 \cdot 10^6$. Dieser Wert überschreitet den charakteristisch engen Variationsbereich von $2,12 - 2,15 \cdot 10^6$ für ein abgeplattetes Rotationsellipsoid, und es darf daher aus diesen Werten abgeleitet werden, dass das Glu-DH-Molekül eine gestreckte Form besitzt. Aus dem Reibungsverhältnis und den β -Werten erhalten wir für das Achsenverhältnis des Glu-DH-Moleküls 12,5 aus s° und D° ; 13,7 aus β_s und β_D und 12,9 aus $[\eta]$. Im aggregierten Zustand, bei Konzentrationen oberhalb 6 mg/ml, liegt Glu-DH als stäbchenförmiges Teilchen mit einem Achsenverhältnis von 13 bis 14 vor. Für Konzentrationen unterhalb 6 mg/ml ergibt sich aus $[\eta]$ von etwa 7,2 ml/g ein Achsenverhältnis von 7,7. Bei diesen Konzentrationen tritt Dissoziation ein^{1,10,11}, die zu symmetrischer aufgebauten Teilchen führt¹².

Das nach der Svedberg-Formel berechnete Teilchengewicht von 2 Millionen ist doppelt so hoch wie das bisher angenommene von 1 Million. Die Differenz

beruht in der Hauptsache in den unterschiedlichen Werten für den Diffusionskoeffizienten $D_{20,w}^0$, der früher zu 2,54 F¹, jetzt dagegen zu 1,52 F bestimmt wurde. Der Grund ist neben den unterschiedlichen Versuchstemperaturen wohl in der Hauptsache in den differierenden Versuchszeiten (4 Tage gegenüber einigen Stunden bei den vorliegenden Messungen) zu suchen, die einen wesentlichen Einfluss auf den Gehalt an den durch Verdünnung und anschließende Dissoziation entstehenden kleineren Teilchen ausüben. Bei Konzentrationen oberhalb von 4 mg/ml erhalten wir für die nach der Flächen- sowie Momentmethode berechneten Diffusionskoeffizienten gleiche Werte (Abb. 2). Dies lässt darauf schliessen, dass sich bei diesen Konzentrationen die Dissoziation noch nicht bemerkbar macht (bei Uneinheitlichkeit $D_m \neq D_A^7$).

Im reversiblen Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht der Glu-DH aus Rinderleber werden als kleinste Teilchen solche mit Teilchengewichten von 250 000 gebildet¹¹, die – nach bisher vorliegenden Ergebnissen nur irreversibel – in 4 bis 8 Teilchen aufgespalten werden können^{11,13,14}. Im aggregierten Zustand liegt das Enzym mit einem Teilchengewicht von 2 Millionen demnach als Oktamerer der Einheit eines Teilchengewichtes von 250 000 vor, das im reversiblen Gleichgewicht mit den tetrameren, dimeren und monomeren Formen steht.

Herrn Professor Dr. Kurt Wallenfels danke ich sehr für seine grosszügige Unterstützung. Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* danke ich für ein Stipendium und für Sachbeihilfen.

LITERATUR

1. Olson, J. A. and Anfinsen, C. B. *J. Biol. Chem.* **197** (1952) 67.
2. Sund, H. *Verh. 4^e Congrès de la Fédération intern. du Diabète* (publ. par M. Demole), Éditions Médecine et Hygiène, Genf, 1961, Vol. I, p. 726.
3. Sund, H. *Biochem. Z.* **333** (1960) 205.
4. Sund, H. *Acta Chem. Scand.* **15** (1961) 940.
5. Sund, H. und Weber, K. *Biochem. Z.* **337** (1963) 24.
6. Meyerhoff, G. *Makromol. Chem.* **6** (1951) 197.
7. Gralén, N. Dissertation, Uppsala, 1944.
8. Svedberg, T. und Pedersen, K. O. *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig, 1940.
9. Scheraga, H. A. and Mandelkern, L. *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 179.
10. Kubo, H., Yamano, T., Iwatsubo, M., Watari, H., Soyama, T., Shiraishi, J., Sawada, S., Kawashima, N., Mitani, S. et Ito, K. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40** (1958) 431.
11. Frieden, C. *J. Biol. Chem.* **237** (1962) 2396.
12. Sund, H. In *Mechanismen enzymatischer Reaktionen*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963. *Im Druck*.
13. Jirgensons, B. *J. Am. Chem. Soc.* **83** (1961) 3161.
14. Fisher, H. F., McGregor, L. L. and Power, U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8** (1962) 402.

Eingegangen am 2. April 1963.