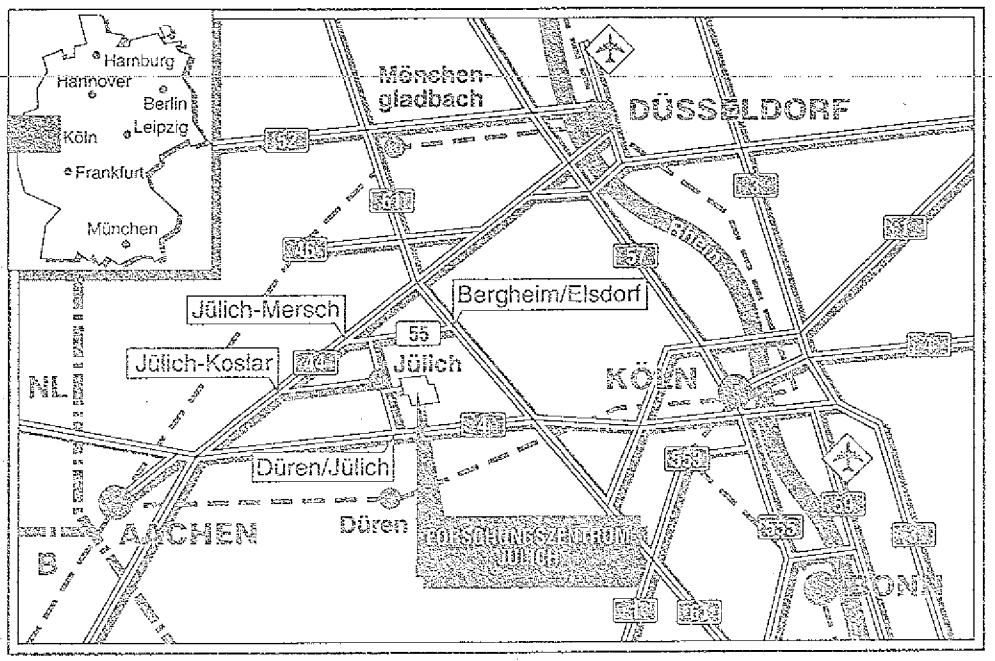
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Enzymatische und protein-chemische Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis ATCC 29191*

Gisela Miczka



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2485
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2485
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Enzymatische und protein-chemische Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis ATCC 29191*

Gisela Miczka

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. M.-R. Kula am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich erstellt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. M.-R.Kula für die Überlassung des Themas sowie ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Krämer möchte ich für die Erstellung des Korreferates danken.

Des weiteren danke ich

Frau Löslein für die Durchführung der Aminosäureanalyse,

Frau Dr. Hofmann und Herrn Dr. Hecht, GBF Braunschweig für die Durchführung der Kristallisation und die freundliche Überlassung der Kristallphotos,

Frau Gehsing und Frau Neumann für hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Enzymtests und der Elektrophorese,

Frau Dr. Bringer-Meyer, Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich für ihre Informationen zum Wachstum von Zymomonas mobilis und zur Enzymbildung,

Herrn Dr. Elling für die kritische Durchsicht des Manuskriptes,

sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Enzymtechnologie für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATZ	Anilinthiazolinon
ADH	Alkoholdehydrogenase
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
CNBr	Bromcyan
DAE	1,2-Dianilinoethan
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMPTU	N,N'-dimethyl-N'-phenylthioharnstoff
DPTU	N,N'-diphenylthioharnstoff
DTNB	5,5-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatographie
Guanidin-HCl	Guanidinhydrochlorid
HETPP	2-(1-Hydroxyethyl)-Thiaminpyrophosphat
$(HNB)SMe_2Br$	2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-dimethylsulfoniumbromid
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kD	Kilo-Dalton
Mes	2-Morpholinoethansulfonsäure
Milli-Q	mit einer Milli-Q Anlage hergestelltes Reinstwasser
mS	milli-Siemens
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert)
NEM	N-Ethylmorpholin
OD	Optische Dichte
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCMB	4-Hydroxymercurobenzoesäure-Natriumsalz
PEG	Polyethylenglycol
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PITC	Phenylisothiocyanat
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur

SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNS	2-p-Toluidino-naphthalin-6-sulfonat
TPP	Thiaminpyrophosphat (Cocarboxylase A)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Internationale Enzymeinheit (Unit) [µmol/min]
U/min	Umdrehung pro Minute
w/v	Volumenprozent
w/w	Gewichtsprozent
ZM6	Zymomonas mobilis ATCC 29191
ZM4	Zymomonas mobilis ATCC 31821

Abkürzungen der Aminosäuren (3- und 1-Buchstaben Code)

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

Das gram-negative Bakterium Zymomonas mobilis wurde bereits 1928 in Pulque, dem gärenden Saft der Agave americana, beschrieben (Lindner). Zymomonas ist ein polar begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, das Glucose, Fructose und Saccharose zu Ethanol vergären kann (Kluyver und Hoppenbrouwers 1931; Swings und DeLey 1977). Obwohl Zymomonas mobilis anaerob ist, zeichnet es sich durch eine relativ hohe Sauerstofftoleranz aus (Swings und DeLey 1977; Bringer et al. 1984a), die durch das Vorhandensein einer rudimentären Atmungskette erklärt werden kann (Strohdeicher et al.). Bei höherer Sauerstoffzufuhr wird das Wachstum von Zymomonas jedoch gehemmt (Bringer et al. 1984a).

Seit seiner Entdeckung wurde das Bakterium für eine Reihe von Untersuchungen herangezogen, wobei der Schwerpunkt auf der Ethanolproduktion mit Zymomonas liegt (Lee et al. 1979; Rogers et al. 1982; Bringer et al. 1984b). Diese verläuft mit Ausnahme des Glucoseabbaus nach dem gleichen Schema wie bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae, dem ursprünglich technisch verwendeten Ethanolproduzenten .

Zymomonas mobilis baut Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg ab. Das entstehende Pyruvat wird in einer nicht-oxidativen Decarboxylierung zu Acetaldehyd und CO_2 gespalten. Der Acetaldehyd wird in einer anschließenden Reaktion durch die Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert.

Im Vergleich zu der Hefegärung ist die Ethanolbildung mit Zymomonas um den Faktor 6 schneller (Lee et al. 1979), die Ethanolausbeute liegt ebenfalls um 5 % höher (Kluyver und Hoppenbrouwers 1931). Unter anaeroben Bedingungen bildet Zymomonas bis zu 1,9 Mol Ethanol aus 1 Mol Glucose (Rogers et al. 1982), d.h. ca. 95-98 % des Substrates werden in Ethanol und CO_2 umgesetzt, während nur ein geringer Anteile des Substrates (2-5 %) in Zellmasse überführt wird. Einige Stämme von Zymomonas können in Zuckerkonzentrationen von 30-40 % Glucose (Swings und DeLey 1977) wachsen.

Bei der Fermentation zeichnet sich Zymomonas vor allem durch die für Bakterien untypisch hohe Ethanoltoleranz aus. Einige Stämme sind in der Lage, bei Ethanolkonzentrationen bis 120 $g \cdot l^{-1}$ (Swings und DeLey 1977; Roger et al. 1982) zu wachsen, während die meisten Bakterien bereits bei Konzentrationen von 1-2 % Ethanol gehemmt werden. Diese hohe Ethanoltoleranz bedingt einen Schutzmechanismus gegen die durch Alkohol verursachte Membranfluidität. Tatsächlich kann eine stabilisierende Wirkung den in der Membran vorliegenden Hopanoiden zugeschrieben werden (Bringer et al., 1985), die Ähnlichkeiten zu den Steroiden in Hefen aufzeigen.

Die hohe Umsatzgeschwindigkeit und die Produktausbeute machen die Ethanolfermentation mit Zymomonas auch für die Biotechnologie interessant, deren Interesse an Ethanol als chemischen Rohstoff und Energieträger seit der Kostenerhöhung fossiler Brennstoffe angestiegen ist. Die Wirtschaftlichkeit einer bakteriellen Ethanolproduktion hängt aber auch in entscheidendem Maße von den Kosten des eingesetzten Substrates ab, die im Falle von reinen Zuckern sehr hoch ist, aber beispielweise bei Einsatz von Abfallprodukten erheblich verringert werden kann.
Zymomonas ist nicht in der Lage Pentosen zu vergären, was den Einsatz ökonomischer Rohstoffe wie Stroh, Zuckerrohr und Holzabfälle für die Ethanolproduktion mit Zymomonas ausschließt. Versuche eine Stammoptimierung mit genetischen und mikrobiologischen Methoden zu erreichen blieben bisher erfolglos (Goodman et al. 1982; Skotnicki et al. 1982; Rogers et al. 1984).
Dagegen können aber stärkehaltige Rückstände nach enzymatischer Verzuckerung mit Zymomonas sechsmal schneller vergoren werden als mit Hefe. Die Ausbeute bezogen auf Glucose ist um 5 % höher als bei gleichem Ansatz mit Hefe (Bringer und Sahm 1985).

Das Schlüsselenzym für die Ethanolbildung ist die Pyruvatdecarboxylase (PDC), die bereits 1911 von Neuberg und Karczag in Hefeextrakten beschrieben wurde.

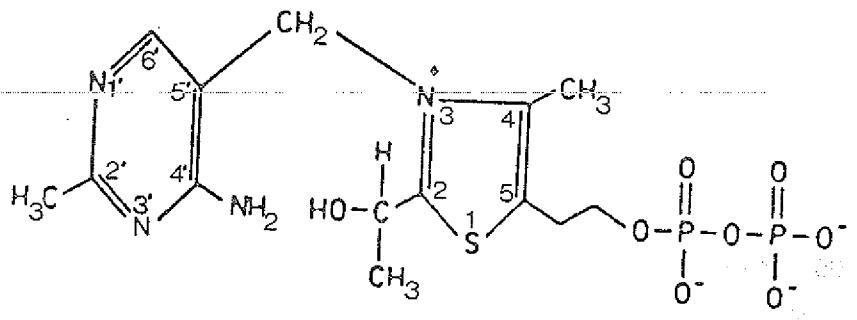
Die PDC katalysiert die nicht oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO_2 nach folgender Reaktionsgleichung:

$$\text{Pyruvat} \xrightarrow[\text{TPP, } Mg^{2+}]{\text{PDC}} \text{Acetaldehyd} + CO_2$$

Die für die Umsetzung von Pyruvat notwendigen Cofaktoren Thiaminpyrophosphat (TPP) und Mg^{2+} wurden bereits 1937 von Lohmann und Schuster identifiziert.

Zahlreiche Untersuchungen der Hefe-PDC in drei unabhängigen Arbeitsgruppen (Ullrich, Freiburg; Hopmann, Basel; Schellenberger, Halle) ergaben Hinweise auf die Struktur und Wirkungsweise des Hefeenzyms.
Die Hefe-PDC zerfällt bei pH-Werten > 8 in 2 Untereinheiten, die wiederum aus 2 unterschiedlichen Proteinketten (2αß-Struktur des Enzyms) bestehen. Mit dem Zerfall in die Untereinheiten erfolgt gleichzeitig die Dissoziation der Cofaktoren (Steyn-Parvé und Westenbrink 1944; Morey und Juni 1968; Ullrich 1974; Hopmann 1980; Schellenberger et al. 1986). Die Ergebnisse von Rekombinationsexperimenten (Steyn-Parvé und Westenbrink 1944; Schellenberger 1967; Ullrich und Wollmer 1971) zeigten, daß für die Bildung eines stabilen Enzymkomplexes die Gegenwart beider Cofaktoren notwendig ist.
Ullrich et al. (1966) fanden 4 Bindungsstellen für Thiaminpyrophosphat, die gleichmäßig auf beide Untereinheiten verteilt werden.

Aus Modellstudien zum Wirkungsmechanismus von Thiazoliumsalzen wurden Vorstellungen zum Reaktionsmechanismus des Enzyms hergeleitet. Die enzymatische Umsetzung von α-Ketosäuren erfolgt über 3 Stufen, die Substratbindung, die irreversible Decarboxylierung und die Spaltung der aktiven -C-C- Bindung (Schellenberger 1967). Als Zwischenprodukt der Decarboxylierungsreaktion wurde bereits 1961 das 2-α-Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat (HETPP) von Holzer und Beaucamp nachgewiesen und isoliert.



α-Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat

Durch Einsatz von TPP-Analogen wurde die Beteiligung einzelner Atome an der Katalyse bestimmt. Die Fixierung des Substrates erfolgt am C_2-Atom des Thiazoliumringes, während die Aminogruppe in C_4-Position des Pyrimidinrings bei der Ablösung des Acetaldehyds mitwirkt (Schellenberger et al. 1966; Schellenberger 1967).

Da bei Einsatz von Acetaldehyd als Substrat nur etwa 5-10 % der mit Pyruvat erzielten Enzymaktivität erreicht wurden, kam man zu der Annahme, daß der eigentliche Übergangszustand das α-Carbanion von HETPP (aktiver Acetaldehyd) sein muß (Ullrich 1982). Diese Annahme setzt jedoch eine hydrophobe Umgebung des aktiven Zentrums voraus, die das α-Carbanion stablisiert (Schellenberg 1967). Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-p-Toluidino-naphthalin-6-sulfonat (TNS) geben deutliche Hinweise auf eine hydrophobe Umgebung der Bindungsstellen für Substrat und Cosubstrat (Ullrich und Donner 1970b; Ullrich 1982).

Während das TPP erst in Gegenwart von Mg^{2+} oder anderer zweiwertiger Kationen fest an das Enzym gebunden wird (Schellenberger und Hübner 1967), tritt eine feste Bindung von Pyruvat an das Enzym auch schon ohne die Gegenwart von Mg^{2+} auf (Schellenberger 1967).

Die primäre Bindung des Pyruvats erfolgt unter Beteiligung der SH-Gruppen am Enzym (Schellenberg 1967; Hübner et al. 1988).
Mit Hilfe von Modifizierungsexperimenten konnten Hinweise für eine mögliche Beteiligung der Aminosäure Tryptophan an der Bindung von Substrat und Cofaktor gewonnen werden (Ullrich 1982).

Bei kinetischen Untersuchungen der Hefe-Pyruvatdecarboxylase wurde ein sigmoider Kurvenverlauf beobachtet (Ullrich und Donner 1970a; Boiteux und Hess 1970; Schellenberger und Hübner 1967). Es wurden Hill-Koeffizienten von 1,7 und 1,8 bestimmt (Ullrich und Donner 1970a), wodurch auf das Vorhandensein zweier katalytischer Zentren geschlossen wurde (Juni 1961; Ullrich und Donner 1970a; Schellenberger und Hübner 1967). Auch die von Juni (1961) durchgeführten Hemmexperimente, in denen er zeigen konnte, daß die PDC sowohl durch das Produkt Acetaldehyd, als auch durch einige Substratanaloge gehemmt werden kann, weisen darauf hin.

Eine Nebenreaktion der Pyruvatdecarboxylase ist die Acetoinbildung in Gegenwart von Pyruvat und Acetaldehyd (Singer und Pensky 1952; Schellenberger 1967). Die Bildung von Acetoin (Methylacetylcarbinol) wird durch Anreicherung von Acetaldehyd bei der Decarboxylierungsreaktion oder durch die Zudosierung von Acetaldehyd zum Nährmedium ausgelöst. Diese Reaktion ist von besonderem Interesse, wenn man, wie Hildebrandt und Klavehn bereits 1930 feststellten, den Acetaldehyd durch Benzaldehyd ersetzt. Das daraus resultierende Reaktionsprodukt, das Phenylacetylcarbinol, ist als Zwischenprodukt in der Ephedrinsynthese interessant. Bei der industriellen Herstellung von Phenylacetylcarbinol werden Hefen der Gattung Saccharomyces verwendet (Budesinsky und Protiva 1961). Das Verhältnis der Decarboxylierung zur Acyloinbildung hängt von der Stabilität des α-Carbanions und damit von der Lipophilie des aktiven Zentrums ab (Bringer-Meyer und Sahm 1988). Bei kurzer Lebensdauer des α-Carbanions erfolgt bevorzugt die Decarboxylierungsreaktion.

Die PDC wurde außer in der Hefe und in Zymomonas noch in einer Reihe von Pflanzen, besonders in keimenden Pflanzenteilen wie Sojabohnensprossen (Mee 1949) und Weizenkeimen (Singer und Pensky

1952; Zehender et al. 1987), sowie in einigen Bakterien, z.B. Erwinia amylovora (Haq und Dawes 1971), Sarcina ventriculi (Stephenson und Dawes 1971) und Acetobacter suboxydans (King und Cheldelin 1954) beschrieben. Bei Tieren und den meisten Bakterien findet dagegen eine oxidative Decarboxylierung statt.

Bei Untersuchungen zur Struktur und zum Wirkungsmechanismus der PDC aus Weizenkeimen wurden starke Ähnlichkeiten zur Hefe-PDC festgestellt (Zehender 1984; Zehender und Ullrich 1984; Zehender et al. 1987).

Die Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas wurde erstmals 1966 von Dawes et al. beschrieben. Später erschienen zahlreiche Publikationen weiterer Arbeitsgruppen, die sich mit der Reinigung (Hoppner und Doelle 1983; Bräu und Sahm 1986; Bringer-Meyer et al. 1986; Neale et al. 1987a,b; Conway et al. 1987) und der Charakterisierung des Enzyms befaßten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen bereits Unterschiede zu den Enzymen aus Hefe und Weizenkeimen erkennen, zeigen aber auch untereinander deutliche Unterschiede, was auf die unterschiedlichen Präparationen zurückgeführt wird.

Ein Vergleich der Synthese von Phenylacetylcarbinol mit Zymomonas und Hefe zeigt, daß mit Hefe die 4-5 fache Menge Phenylacetylcarbinol hergestellt werden kann (Bringer-Meyer und Sahm 1988), obwohl Zymomonas eine ca. 5-fach höhere PDC-Aktivität besitzt.

Das Strukturgen der PDC wurde sowohl aus der Hefe (Kellermann et al. 1986) als auch aus Zymomonas (Neale et al. 1987b; Conway et al. 1987; Reynen 1988; Reynen und Sahm 1988) isoliert und sequenziert. Die Clonierung und Expression des PDC-Gens in E.coli und einige andere Organismen konnte erfolgreich durchgeführt werden (Bräu und Sahm 1986; Neale et al. 1987a; Neale et al. 1988; Ingram et al. 1987; Ingram und Conway 1988 ; Tolan und Finn 1987 a,b). Damit war es nunmehr auch möglich, die PDC aus Zymomonas mobilis in E. coli (Neale et al. 1988), Erwinia chrysanthemi und Klebsiella planticola (Tolan und Finn 1987a,b) für die Alkoholproduktion aus Xylose zu verwenden.

Bei der Betrachtung der physiologischen Bedeutung der Pyruvatdecarboxylase in Zymomonas findet man neben der Katalyse des ersten Schrittes der Ethanolproduktion eine bedeutende Funktion des Enzyms bei der Aufrechterhaltung der Redoxbilanz durch die Bereitstellung großer Mengen Acetaldehyd als Wasserstoffakzeptor für die Rückgewinnung von NAD^+ in der Ethanol bildenden Reaktion der Alkoholdehydrogenase (ADH) (Abb. 1).

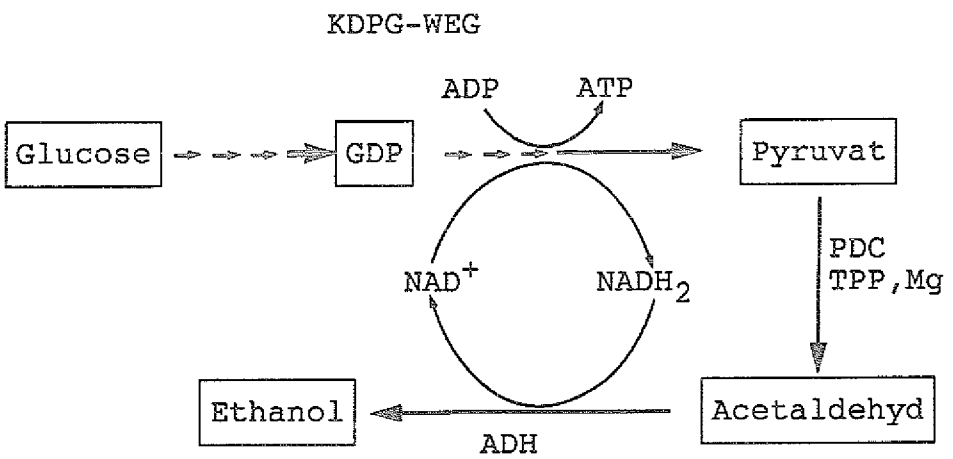


Abb. 1: Vereinfachter Stoffwechselweg für die Vergärung von Glucose zu Ethanol im Bakterium Zymomonas mobilis (GDP=Glycerinaldehyd-3-phosphat)

NAD^+ ist für die Reaktion vom Glycerinaldehyd-3-phosphat zum Pyruvat essentiell, die im KDPG-Weg den einzigen energieliefernden Schritt darstellt.
Der hohe Anteil der PDC in Zymomonas von mehr als 5 % des gesamten löslichen Proteins unterstützt die Bedeutung des Enzyms für den Organismus, stellt aber gleichzeitig die Frage, ob die PDC unter physiologischen Bedingungen noch weitere Aufgaben übernimmt, z.B. im anabolischen Stoffwechsel von Zymomonas, bei dem noch eine Reihe von Fragen wie die Synthese von Acetyl-CoA ungeklärt sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die enzymatische und proteinchemische Charakterisierung eines homogenen Enzympräparates aus Zymomonas mobilis (ATCC 29191). Die Voraussetzung für diese Untersuchungen ist die Optimierung der Aufarbeitung der Pyruvatdecarboxylase im Gramm-Maßstab, um die Bereitstellung ausreichender Enzymmengen für die Charakterisierungsstudien und die Proteinsequenzierung zu gewährleisten. Ein homogenes Enzympräparat wird ebenfalls für die in Kooperation mit der GBF, Braunschweig geplante Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse benötigt.
Die Ergebnisse der Charakterisierungs- und Homologiestudien sollen zum besseren Verständnis des Reaktionsmechanismus und zur Strukturaufklärung beitragen und damit eine Grundlage für Protein Engineering an der PDC schaffen.
Der Einsatz der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobils anstelle des bereits gut untersuchten Enzyms aus Hefe wird mit der leichteren Zugänglichkeit für das Enzym aus dem Bakterium begründet.
Hohe Proteaseaktivitäten im Rohextrakt von Hefen erschweren die Isolierung ausreichender Enzymmengen.

2. Material

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Fluka, Neu Ulm

Acrylamid
Brenztraubensäure-Natriumsalz
Bromcyan
Bromphenolblau
Cocarboxylase Tetrahydrat
Coomassie Brilliant Blue R 250
Coomassie Brilliant Blue G 250
5,5-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
1,4-Dithio-DL-threitol
Ethylendiamin
4-Ethylmorpholin
Guanidinhydrochlorid
Glyoxylsäure-Natriumsalz
4-Hydroxymercuribenzoesäure-Natriumsalz
Jodessigsäure
Lysozym
2-Morpholinoethansulfonsäure
N,N'-Methylenbisacrylamid
Naphtholblauschwarz B
Polyvinylpyrrolidon
6-(4-Toluidino)-2-naphthalinsulfonsäure
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Trichloressigsäure
Trifluoressigsäure
Trypsin, TPCK behandelt
4-Vinylpyridin

Sigma, Deisenhofen

Asparaginsäure

1,2-Dianilinoethan
Imidazol
Phenylpyruvat
V8-Protease

Serva, Heidelberg

Aminosäurestandard AS 10
Ammoniumpersulfat
Dodecylsulfat-Natriumsalz
Glycin
Kerosin
2-Hydroxy-(5-nitrobenzyl)-dimethylsulfonsäurebromid
Servalyt 3-10
Servalyt 3-7

FSA Laboratory Supplies, Loughborough

Acetonitril
Methanol

Aldrich, Steinheim

3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure

Hüls AG, Marl

Polyethylenglycol 1550
Polyethylenglycol 4000
Polyethylenglycol 6000

Boehringer, Mannheim

Alkoholdehydrogenase aus Hefe
Carboxypeptidase Y aus Hefe
Eichproteine Combithek MG 20000-340000
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
Rinderserumalbumin

Thrombin

Pharmacia/LKB, Freiburg

DEAE-Sephacel
IEF-Kit
Repel-Silan
Sephadex G25 + G 50
Sepharose Cl-4B
Fertiggele für das Phast System
Pufferstreifen für das Phast System

Deutsche ICI, Frankfurt

Procion Yellow HE4-R
Procion Green HE4-BD

Applied Biosystems, Weiterstadt

Chemikalien für die automatische Sequenzanalyse
Chemikalien für die on-line-HPLC

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

2.2 Organismus

In der vorliegenden Arbeit wurde das Bakterium Zymomonas mobilis ATCC 29191 (ZM 6) für die Isolierung und Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase eingesetzt.
Für vergleichende Untersuchungen wurde das Enzym aus einem weiteren Zymomonasstamm (Zymomonas mobilis ATCC 31821, ZM4) isoliert. Das Zellmaterial stammt in diesem Fall aus einer kontinuierlichen Fermentation und wurde freundlicherweise von Frau M. Hermans, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich, zur Verfügung gestellt.

3. Methoden

3.1. Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdecarboxylase

Die Bestimmung der PDC-Aktivität erfolgte mit einem gekoppelten enzymatischen Test (Ullrich 1970) nach folgendem Reaktionsschema:

$$\text{Pyruvat} \xrightarrow{\text{PDC}} \text{Acetaldehyd} + CO_2$$

$$\text{Acetaldehyd} + NADH{+}H^+ \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Ethanol} + NAD^+$$

Durch einen Überschuß von ADH wird die Reaktion der PDC limitierend und damit die Abnahme der NADH-Konzentration direkt proportional zu der gebildeten Menge Acetaldehyd. Man erhält so ein direktes Maß für die Aktivität der Pyruvatdecarboxylase.

Stammlösungen:

1) 0,1 M tri-Natriumcitratpuffer pH 6 (20 mM $MgSO_4$, 1,5 mM TPP)
2) 35,5 mM Na-Pyruvat in Puffer (39 mg/10 ml)
3) 0,38 mM NADH in Puffer (2,7 mg/10 ml)
4) ADH-Lösung 300 U/mg (100 mg/3,4 ml)

Die Reaktion wurde bei 340 nm (Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer UV 160 mit temperierbarem Küvettenhalter) über 1 min verfolgt.

Testansatz:

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Na-Pyruvat	0,5 ml	16,9 mM
NADH	0,49 ml	0,18 mM
ADH	0,01 ml	84 U/ml

Der Ansatz wird kräftig geschüttelt und bei 30°C inkubiert.

Start der Reaktion mit 50 µl PDC-Lösung
gesamtes Testvolumen 1,05 ml

Die Aktivität wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$U/ml = \frac{\Delta E/min * V}{\epsilon * d * v} * f$$

V = Testvolumen
v = Probevolumen
d = Schichtdicke der Küvette
ϵ = molarer Extinktionskoeffizient für NADH (6,3 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
f = Verdünnungsfaktor

Nach Berücksichtigung der Konstanten ergab sich für die Berechnung der Enzymaktivität $U/ml = \Delta E/min * 3,49 * f$.

Definition : Eine Enzymeinheit U (Unit) entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol Pyruvat in einer Minute bei 30°C umsetzt.

Die Enzymlösung mußte für den Einsatz im Test so verdünnt werden, daß die NADH-Abnahme linear erfolgte.
Um die NADH-Oxidase-Aktivität im Rohextrakt zu messen, wurde ein Meßansatz ohne ADH und Na-Pyruvat durchgeführt.
Die Stammlösungen für den Enzymtest wurden immer frisch angesetzt!

3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Der Test beruht auf dem meßbaren Farbumschlag von rot nach blau, der durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G 250 an Protein erfolgt. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte graphisch mittels einer Eichkurve (Proteinkonzentration 10-100 µg/ml) mit Rinderserumalbumin.

Herstellung des Bradford-Reagenzes:
100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 wurden in 50 ml 95 %igem Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde mit 100 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit H_2O bidest. auf 1 l Volumen aufgefüllt und in eine dunkle Flasche gefüllt. Bei unvollständiger Lösung des Farbstoffes wurde das Reagenz filtriert.

Testansatz Microprotein Assay:
0,1 ml Probe (Proteingehalt 10-100 µg/ml) wurden mit 0,9 ml Bradford-Reagenz versetzt und gut durchmischt. Nach einer Reaktionszeit von 7 min erfolgte die photometrische Proteinbestimmung bei 595 nm. Der Blindwert wurde mit 0,1 ml des jeweiligen Puffers bestimmt.

3.3 Fermentation

Die Anzucht der Zellen erfolgte in Anlehnung an die von Bringer et al. (1984b) untersuchten Bedingungen.

Zusammensetzung des Nährmediums:

1 % Yeast Extract
0,1 % KH_2PO_4
0,1 % $(NH_4)_2SO_4$
0,05 % $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

Die Glucosemenge wurde wie folgt eingesetzt:
Die Stammkultur (10 ml) enthielt 2 % Glucose, die Vorkultur 5 % und die Hauptkultur 10 % Glucose. Der pH-Wert des Mediums wurde mit HCl auf pH 5 eingestellt und während der Fermentation mit konzentrierter NaOH (6 M) konstant gehalten. Die Vorkultur wurde mit einer 16 h alten Stammkultur 10 %ig angeimpft und 8 h bei 30°C inkubiert. Die Hauptkultur wurde 1 %ig angeimpft. Die Zellernte erfolgte nach ca. 16 h (logarithmischen Wachstumsphase).

Fermentationsbedingungen:
Fermentervolumen 50 l (bzw.300 l), Arbeitsvolumen 40 l (200 l)
Rührergeschwindigkeit: 100-150 rpm

Temperatur:	30°C
Fermentationsdauer:	16 h
pH-Wert:	pH 5

Da der Organismus fakultativ anaerob ist, wurde die Fermentation ohne Sauerstoff-Begasung und mit geringer Rührergeschwindigkeit durchgeführt. Auf eine Begasung mit Stickstoff zu Beginn der Fermentation konnte verzichtet werden, da sich geringe Mengen Sauer-

stoff nicht auf das Wachstum dieses Organismus auswirken (Bringer et al. 1984a).
Nach der Fermentation wurden die Zellen in einem Separator (Westfalia KA2) vom Medium abgetrennt. Der konzentrierte Zellschlamm wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge) und zweimal mit Puffer gewaschen, um restliche Mediumreste zu entfernen. Aus den gewaschenen Zellen wurde eine 40 %ige (w/w) Zellsuspension in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 (0,1 mM TPP, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA und 2 mM Mercaptoethanol) für den Zellaufschluß hergestellt.

3.4 Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase

3.4.1 Zellaufschluß

Der Aufschluß der Bakterien erfolgte in einer Rührwerkskugelmühle zur kontinuierlichen Naßvermahlung (Typ Dyno Mill KDL-Special, Willy A. Bachofen Maschinenfabrik, CH-Basel). Die Mühle war mit einem doppelwandigen Mahlgefäß (0,6 l Volumen) für Durchflußkühlung ausgestattet.

Das Mahlgefäß wurde zu 90 % (v/v) mit Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm, Fa. Clauss, Nidderau) gefüllt. Die 40 %ige (w/w) Zellsuspension (3.3) wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 l/h bei einer Drehzahl von 3000 U/min kontinuierlich aufgeschlossen. Zur Beurteilung des Aufschlusses wurde nach jedem Durchgang ein Aliquot der Suspension mikroskopiert und die PDC-Aktivität bestimmt. Nach dem Aufschluß wurden ca. 400 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer durch die Mühle gepumpt, um die im Mahlgefäß verbliebene Suspension auszuspülen.

3.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zur Abtrennung der bei der Naßvermahlung entstandenen sehr kleinen Zelltrümmer wurde eine Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen durchgeführt. In Anlehnung an Hustedt et al (1985) und Kula (1987; 1988) wurden Polyethylenglycol (PEG)/Salz-Systeme bevorzugt, da eine Abtrennung der Zelltrümmer in die salzreiche Unterphase

verglichen mit PEG/ Dextran-Systemen einfacher und vor allem vollständig erfolgt.

Stammlösungen:

PEG :	50 %ige (w/w) PEG-Stammlösungen (verschiedene Molekulargewichte) in H_2O bidest.
Salz:	30 bzw. 50 %ige (w/w) Kaliumphosphatlösungen (verschiedene pH-Werte) in H_2O bidest.
Rohextrakt:	aufgeschlossene Zellsuspension (Biomasse 40 % w/w)

Die Optimierung der Extraktionsbedingungen erfolgte in Vorversuchen (Gesamtgewicht 4 g) in graduierten Zentrifugengläsern. Die Ansätze wurden, soweit möglich, durch Mischen entsprechender Anteile der Stammlösungen hergestellt. Die Durchführung der Experimente erfolgte bei Raumtemperatur. Folgende Parameter wurden für die Optimierung von 2-Phasensystem I variiert:

1) Molekulargewicht PEG (1550, 3000, 4000, 6000 und 20000 Dalton)
2) PEG-Konzentration (PEG 1550 10-20 %)
3) Kaliumphosphat-Konzentration (1-10 %)
4) pH-Wert der Salzlösung (pH 6-7,5)

2 g Rohextrakt wurde mit den entsprechenden Gewichtsanteilen der Phasenkomponenten versetzt und mit H_2O bidest. auf das Endgewicht gebracht. Anschließend wurden die Ansätze ca. 1 min auf einem Whirlmix (Reax 2000, Fa. Heidolph) gemischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung in einer Tischzentrifuge (Sigma 301 K) zentrifugiert (5 min bei 3000 U/min).
Die Beurteilung der Phasensysteme erfolgte mittels Enzymtest und Proteinbestimmung. Die Volumina der einzelnen Phasen wurden von der Scalierung der graduierten Zentrifugenröhrchen abgelesen.
Da beim Vergleich der verschiedenen PEG-Sorten die Stabilität der PDC nur in PEG 1550 gewährleistet war, wurden weitere Optimierschritte auch nur mit dem niedermolekularen PEG durchgeführt.

Für das zweite 2-Phasensystem wurde die Kaliumphosphatzugabe (10-16 % w/v), der pH-Wert der Salzlösung (pH 6-8) und die NaCl-Zugabe (0,2-0,4 M) optimiert.

Aus den Ergebnissen der Vorversuche ergab sich für die Aufarbeitung der PDC folgende Zusammensetzung der 2-Phasensysteme:

Extraktionssystem I:
Endkonzentration der Zusätze:

Rohextrakt	900 ml ≈ 900 g	50 % (w/w)
PEG 1550	234 g	13 % (w/w)
Kaliumphosphat pH 6	162 g	9 % (w/w)
(=24,55g K_2HPO_4+137,45g KH_2PO_4)		

Nachdem die Komponenten zusammengegeben waren, wurde das System durch Zugabe von H_2O bidest. auf das Endgewicht von 1800 g gebracht, 30 min auf einem Rührer (MR 2002, Fa. Heidolph) gemischt und anschließend 15 min bei 8000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments). Die Unterphase mit den abgetrennten Festbestandteilen des Rohextraktes wurde verworfen.

Extraktionssystem II:
Endkonzentrationen der Zusätze:

Oberphase aus System I	1170 ml	50 % (v/v)
Kaliumphosphatzusatz pH 6	304,2 g	13 % (w/v)
(=46,09g K_2HPO_4+258,11g KH_2PO_4)		
NaCl	41,02 g	0,3 M

Die Phasenkomponenten wurden zusammengegeben und das System mit H_2O bidest. auf 2340 ml aufgefüllt.
Nach kräftiger Durchmischung wurde das 2-Phasensystem II in einen 2-l-Scheidetrichter gefüllt und bis zur vollständigen Phasentrennung bei Raumtemperatur belassen (Dauer ca. 2 h). Anschließend wurde die Unterphase abgetrennt.

3.4.3 Diafiltration

Die Diafiltration wurde mit einer Ultrafiltrationsmembran (SLY 30, Fa. Amicon, Pumpe MVZ, Ismatic) durchgeführt. Die Ausschlußgrenze dieser Membran lag bei 30000 Dalton. Die Unterphase wurde auf 400 ml eingeengt und durch wiederholte Zugabe von Puffer zum Konzentrat die Leitfähigkeit auf 5,4 mS (Leitfähigkeit der Pufferlösung)

herabgesetzt.
Bei kleineren Volumina erfolgte die Diafiltration in einem Spiralmodul (Fa. Amicon) mit den Membranen YM 10 und YM 30.

3.4.4 Affinitätschromatographie

Zur Feinreinigung der PDC wurde in Anlehnung an Neale et al. (1987a) zunächst eine Farbstoffchromatographie eingesetzt. Die Bindung der PDC an die Farbstoffsäule beruht auf biospezifischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Farbstoff, wobei dieser ein Substratanaloges für das Enzym darstellt (Amicon 1980).
Für die Reinigung der PDC wurden die Farbstoffe Procion Green H-E4BD und Procion Yellow H-E4R in einem "Zwei-Säulen-Verfahren eingesetzt. Der grüne Farbstoff bindet bei pH 6 sehr viel Fremdprotein, die PDC kann die Säule unter diesen Bedingungen jedoch ungehindert passieren (Negativ-Säule). Im anschließenden Chromatographielauf bindet die PDC bei pH 5,5 an die gelbe Farbstoffsäule (Positiv-Säule).
Bei den Farbstoffen handelt es sich um Monochlor-Triazin-Farbstoffe, d.h. sie besitzen einen monosubstituierten Triazinring. Unter alkalischen Bedingungen erfolgt, ohne vorherige Aktivierung des Gels, spontan die Bindung dieses aktiven Triazinrings an die Gelmatrix (Dean 1979; Lowe 1984).

Herstellung des Gels:
Das Farbstoffgel wurde in Anlehnung an Atkinson et al. (1981) hergestellt.
900 g Gel (Sepharose CL-4B, Pharmacia) wurden in 3 l H_2O dest. suspendiert. 15 g Triazinfarbstoff wurden in 900 ml H_2O dest. gelöst und mit 450 ml 4M NaCl und 45 ml 10 M NaOH zum Gel gegeben. Nach 72 h Schütteln bei Raumtemperatur wurde das Gel in eine Säule gefüllt und zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs mit folgenden Lösungen gewaschen:

a) H_2O dest.
b) Ethanol
c) H_2O dest.
d) 1 M NaCl in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0
e) H_2O dest.

Anschließend wurde das Gel mit Puffer äquilibriert.
Bei Lagerung bei 4°C sind diese Farbstoffgele über eine Zeitspanne von ca. 6 Monaten stabil (Baird et al. 1976; Dean 1979).

Farbstoffgehalt des Affinitätgels:
Um die Affinitätschromatographie für die Reinigung der Pyruvatdecarboxylase zu optimieren, mußte zunächst die Kapazität der hergestellten Gele bestimmt werden. Die Kapazität hängt in erster Linie von der Ligandenkonzentration ab, die mittels Säurehydrolyse bestimmt wurde (Clonis et al. 1981).

Durchführung:
30 mg Gel (Feuchtgewicht) wurden mit 50 %iger Essigsäure versetzt und 15 min. bei 80°C inkubiert.
Der Farbstoffgehalt wurde durch Extinktionsmessung im Hydrolysat ermittelt. Die molaren Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe (Lowe und Pearson 1984) liegen bei 20800 l/mol•cm bei 630 nm (Procion green) und 8900 l/mol•cm bei 365 nm (Procion yellow).

Kapazität der Farbstoffsäulen:
Die anschließende Bestimmung der Kapazität erfolgte für beide Säulenmaterialien mittels Aufnahme sogenannter Durchbruchkurven (Arnold et al. 1985a+b). Zwei Säulen mit einem Gelvolumen von 5 ml wurden solange beladen, bis kein Protein mehr gebunden wurde. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und auf Aktivität und Proteingehalt überprüft. Bei der Negativ-Säule ist der Durchbruch erreicht, wenn der Proteingehalt im Eluat ansteigt, während der Durchbruch bei der Positiv-Säule durch das Auftreten PDC-aktiver Fraktionen angezeigt wird.

Zusammensetzung der Chromatographieanlage:
Säule
Peristaltikpumpe P1
Fraktionssammler Frac-100
Single Path Monitor UV 1, bestehend aus optischer Einheit und Kontrolleinheit (Filter 280 nm)
Zweikanalschreiber REC-482
Alle Geräte stammen von der Fa. Pharmacia.

Durchführung:
Die grüne Säule wurde nach Neale et al. (1987a) mit 10 mM K-Mes-Puffer pH 6 (30 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ und 0,1 mM TPP) äquilibriert und die entsalzte Probe (3.4.3) aufgetragen. Das aktive Eluat wurde aufgefangen und der pH-Wert auf pH 5,5 eingestellt.
Die gelbe Säule wurde zunächst mit 10 mM K-Mes-Puffer pH 5,5 (30 mM NaCl, 0,1 mM TPP, 2 mM $MgCl_2$) äquilibriert und mit der von der grünen Säule eluierten Probe beladen. Nach der Probenaufgabe wurde mit ca. einem Säulenvolumen Puffer pH 5,5 nachgewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu eluieren.
Anschließend erfolgte die Elution der PDC mit 10 mM K-Mes-Puffer pH 6 (0,5 M NaCl, 0,1 mM TPP 2 mM $MgCl_2$).

Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur mit einem Fluß von 12,5 $ml/cm^2 \cdot h$.
Der Nachweis der PDC im Eluat erfolgte mittels Enzymtest (3.1).
Nach der Elution wurde das Enzym in einer Diafiltration (3.4.3) entsalzt und auf ca. 100 ml konzentriert (YM 10, Amicon). Die Leitfähigkeit der Enzymlösung wurde durch wiederholte Pufferzugabe (10 mM HCL-Imidazol-Puffer pH 7, 0,1 mM TPP, 2 mM $MgCl_2$) bis auf den Pufferwert (14 mS) herabgesetzt.

3.4.5 Ionenaustauschchromatographie

Als Austauschermaterial wurde DEAE-Sephacel, ein schwacher Anionenaustauscher, verwendet. Die Säule (2,6 * 18,8 cm) wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 30 ml/h betrieben.
Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-40 mM $MgCl_2$ in 10 mM HCl-Imidazol-Puffer pH 7, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 mM TPP, (Neale et al. 1987a).

3.5 Analytische Chromatographieverfahren

3.5.1 Gelfiltration

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde eine Gelchromatographie an Sephacryl S 200 HR (Pharmacia) durchgeführt.

0,6 mg (200 µl) Protein wurden auf die Säule geladen und mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 (150 mM NaCl) eluiert. Die Chromatographie erfolgte mit der unter 3.4.4 erwähnten Chromatographieanlage. Abmessung der Säule: 1,6 * 66 cm, Gelvolumen: 133 ml, Flußgeschwindigkeit: 60 ml/h

Für die Entfernung niedermolekularer Substanzen aus Proteinlösungen wurden die Gele Sephadex G 75 (Pharmacia) und Sephadex G 25 (Pharmacia) verwendet. Für eine vollständige Abtrennung der niedermolekularen Substanzen durfte das Probevolumen maximal ein Fünftel des Gelvolumens betragen.
(Abmessung der Säulen: 1,6 * 65 cm, Gelvolumen: 130 ml)
Die Elution erfolgte mit 50 mM HCl-Imidazol-Puffer pH 7 bei einer Flußgeschwindigkeit von 200 ml/h (Handbuch Pharmacia).

3.5.2 Fast-Protein-Liquid-Chromatographie (FPLC)

Die FPLC wurde überwiegend zur Kontrolle der Reinheit des Enzyms eingesetzt. Die vollautomatisierte Anlage (Fa. Pharmacia) bestand aus folgenden Komponenten:

2 Pumpen P-500
Controller LCC-500
UV 1-Monitor bestehend aus optischer Einheit und Kontrolleinheit
Fraktionssammler Frac-100
Zweikanalschreiber REC-482
Fertigsäulen: Mono Q (Anionenaustauscher)
Superosesäulen (Gelfiltration)

Das gereinigte Enzym wurde an die mit 10 mM HCl-Imidazol-Puffer äquilibrierte Mono Q-Säule (5 mm * 100 mm) gebunden und mit einem Salzgradienten 0-1 M NaCl eluiert.
Die Trennbedingungen wurden dem Pharmacia-Handbuch entnommen und auf die jeweilige Anwendung optimiert (siehe Ergebnisteil).
Alle für die FPLC verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert (Celluloseacetatfilter 0,2 µm) und entgast.

3.5.3 High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde überwiegend für die analytische und präparative Trennung proteolytischer Fragmente eingesetzt.
Folgende Reversed-Phase-Säulen standen für die Trennung zur Verfügung:
MOS-Hypersil (C8), 5 µm Material, 100 mm * 1,6 mm, MZ Analysentechnik
Shandon WP-300-Butyl (C4), 5 µm Material, 4,6 mm * 250 mm und
Shandon ODS-Hypersil (C18), 5 µm Material, 4,6 mm * 250 mm,
Fa. Gynkotek

Die HPLC-Anlage bestand aus folgenden Komponenten:
Gradientenformer M 250 B, Gynkotek
Pumpe M 300 CS, Gynkotek
Probenaufgeber ASI 160, Gynkotek
UV-Vis Spektralphotometer SP 6 V, Shimadzu
Integrator CR 3 A, Shimadzu
Für die präparative Trennung wurde ein Fraktionssammler FRAC 100, Fa. Pharmacia angeschlossen.

Die Trennung erfolgte mittels TFA-Acetonitril-Gradienten
Puffer A: 0,1 % TFA (Trifluoressigsäure)
Puffer B: 80 % Acetonitril in 0,095-0,1 % TFA
Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert (Celluloseacetatfilter 0,2 µm) und entgast. Die Acetonitrillösung wurde in einer dunklen Flasche aufbewahrt.
Die Flußgeschwindigkeit wurde je nach Säule auf 0,1 ml/min (C8) oder 0,4 ml/min (C4) eingestellt (Zusammensetzung des Gradienten siehe Ergebnisteil).
Probemenge 50 µl, Detektion bei 214 nm.

3.6 Elektrophoretische Methoden

3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Elektrophorese nach Lämmli (1970) wurde sowohl präparativ (bei der Peptidisolierung in Verbindung mit dem Elektroblotting)

als auch analytisch angewendet. Die Durchführung der vertikalen Elektrophorese erfolgte in der Protean II-Kammer der Fa. BioRad (power supply Desatronic 3000/200, Desaga, Umwälzthermostat Multitemp II, LKB).
Die homogenen Gele (Dicke 1 mm) wurden wie folgt hergestellt:

Reagenzien:
Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8
Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8
30 % Acrylamid: 0,8 % Bis-Acrylamid + 29,2 % Acrylamid
10 %ige SDS-Stammlösung in H_2O bidest.
TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
10 %ige Ammoniumpersulfatlösung in H_2O bidest.

Laufpuffer: 6,06 g Tris
28,83 g Glycin
20 ml SDS-Stammlösung
mit H_2O deion. auf 2 l auffüllen

Probenpuffer: 10 g Glycerin
2 ml SDS-Stammlösung
12,5 ml Sammelgelpuffer
0,1 g Bromphenolblau
mit H_2O bidest. auf 100 ml auffüllen

Vor Gebrauch wurden pro ml Probenpuffer 33 µl 2-Mercaptoethanol (3 %) zugesetzt.
Die Reagenzien wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Trenngele

Gelkonzentration in %	Trenngelpuffer in ml	Acrylamid in ml	SDS in ml	H_2O/Glycerin in ml	
7,5	12,5	12,5	0,5	24,5	H_2O
10	12,5	16,7	0,5	20,3	"
12,5	12,5	20,85	0,5	16,15	Glyc.
15	12,5	25	0,5	12	"
20	12,5	33,35	0,5	3,65	"
22	12,5	36,65	0,5	0,35	"

Gelherstellung:
Die Lösungen für die Trenngele wurden nach den Angaben in der Tabelle zusammenpipettiert und entgast. Anschließend wurden 50 µl TEMED und 150 µl Ammoniumpersulfatlösung zugesetzt. Die Glasplatten wurden mit Spacer (1 mm) in einen Gießständer (Fa. BioRad) gespannt und die Kammer bis auf eine Höhe von ca. 12 cm gefüllt. Das Trenngel wurde für die Dauer der Polymerisation (ca. 30 min) mit 2-Propanol überschichtet. Danach wurde der Alkohol entfernt und mit destilliertem Wasser nachgespült.

Zusammensetzung des Sammelgels:
12,5 ml Sammelgelpuffer , 7,5 ml Acrylamid und 0,5 ml SDS-Stammlösung wurden mit 29,5 ml H_2O bidest. versetzt (Gelkonzentration ca. 4 %) und unter Rühren entgast. Anschließend wurden 50 µl TEMED und 150 µl Ammoniumpersulfatlösung zugegeben, die Lösung kurz gerührt, auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingeschoben. Die Polymerisation des Sammelgels erfolgte in ca. 30 min bei Raumtemperatur.

Vorbereitung der Probe:
Die Proben wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-1 mg Protein/ml) in Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Der Probenkamm wurde aus dem Gel entfernt, die Probetaschen mit Laufpuffer gefüllt und dieser anschließend mit 50 - 100 µl Probe (mit einer Hamilton-Spritze) unterschichtet.
Bei einigen Proben, z.B nach der Ameisensäurespaltung, reichte die Pufferkapazität des Probenpuffers nicht aus, was durch den Umschlag des Indikatorfarbstoffs nach gelb angezeigt wurde. Diese Proben mußten durch Zugabe von Tris oder verdünnter KOH neutralisiert werden, bevor sie in die Probetaschen gespritzt werden konnten.
Die Elektrophorese wurde mit 80-100 V gestartet. Nach ca 2 h hatte die Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht. Im Trenngel wurde die Spannung auf 200 V erhöht (Ausnahme: Spaltprodukte aus der Ameisensäurespaltung wurden bei konstant 80 V über Nacht getrennt). Der Lauf war beendet, wenn die Bromphenolblaubande das Ende der Platten erreicht hat. Die Elektrophorese wurde bei 13°C durchgeführt. Die Detektion der Protein- und Peptidbanden erfolgte mit Amidoschwarz (Towbin et al. 1979).

3.6.1.1 Horizontale Elektrophorese mit dem Phast-System

Für die horizontale SDS-Elektrophorese wurde das Phast-System (Fa. Pharmacia) benutzt. Für das Phast-System sind Fertiggele mit verschiedenen Polyacrylamid-Gradienten (10-15 % und 8-25 %) und Pufferstreifen für die SDS-Elektrophorese erhältlich. Vorteil des Phast-Systems ist der schnelle, automatische Ablauf der Trennung und der Färbung. Aufgrund der geringen Probenmenge wurde sie jedoch nur für analytische Zwecke eingesetzt. Das Programm für die Durchführung der Trennung wurde dem Handbuch der Fa. Pharmacia entnommen.

Trennprogramm:

sample application down at			4.1		1 Vh
sample application up at			4.1		10 Vh
4.1	250 V	10 mA	3.0 W	15°C	60 Vh
4.2	50 V	0,1 mA	0.5 W	15°C	0 Vh

Die Probenvorbereitung erfolgte wie bei der Vertikalelektrophorese durch Inkubation mit Probenpuffer (5 min bei 95°C).

3.6.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die analytische isoelektrische Fokussierung wurde in Anlehnung an Schickle und Horneff (1983) durchgeführt. Die Gele wurden mittels Kassettengießtechnik hergestellt, wobei das Gel auf einer Folie polymerisiert, an die es kovalent gebunden wird.

Reagenzien:

Anodenlösung: 2,5 mmol Asparaginsäure
2,5 mmol Glutaminsäure
in 100 ml H_2O bidest.

Kathodenlösung: 2 %ige Ethylendiaminlösung in H_2O bidest.

10 %ige Ammoniumpersulfatlösung in H_2O bidest.

Acrylamidlösung:	29,1 g	Acrylamid
	0,9 g	N-N-Methylenbisacrylamid
	100 ml	H_2O bidest.

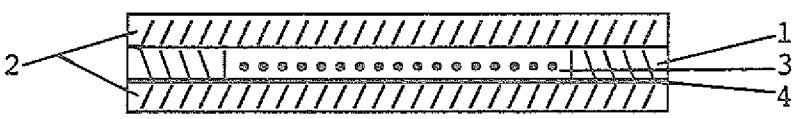
Gelherstellung:	3 ml	Acrylamidlösung
	0,91 ml	Ampholyt
	12 µl	TEMED
	8 ml	H_2O bidest.

Die Reagenzien wurden zusammengefügt, entgast und anschließend mit einer Spritze in die vorbereitete Kassette gefüllt. Für die Herstellung der verschiedenen pH-Gradienten wurden unterschiedliche Ampholyte verwendet:

Servalyt AG pH 3 - 10
Servalyt AG pH 3 - 7

Die Polymerisation erfolgte zunächst 1 h bei 60°C und anschließend über Nacht bei 4°C.

<u>Aufbau der Gießkassette</u>



1 = Spacer (2 Parafilmstreifen (U-förmig) werden aufeinandergelegt Dicke = 0,24 mm, bei Gelen für das Phast-System werden 4 Parafilmstreifen benötigt, Dicke = 0.48 mm)
2 = Glasplatten
3 = Gel
4 = Folie (Gel Bond PAG film, LKB 125 * 260 mm)

Die Glasplatten mußten vor dem Zusammenbau mehrfach mit Repel-Silane silanisiert werden, damit das Gel nicht an der Glasplatte haftet.
Maße des Gels: 20 cm * 10 cm, Trennstrecke 9 cm

Die Fokussierung erfolgte in der Flat Bed Kammer FBE 3000 der Fa. Pharmacia mit dem power supply Desatronic 3000/200 (Desaga). Die Elektrophoresekammer wurde während der isoelektrischen Fokussierung mit dem Kryostaten Multitemp II (LKB) auf 4°C temperiert. Zur besseren Kälteübertragung wurden 2-3 ml Kerosin auf die Kühlplatte aufgebracht und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Dann wurden die mit Anoden- und Kathodenlösung getränkten Elektrodenstreifen (Elektrofocusing strips, LKB) auf das Gel gelegt. Zum Auftragen der Proben wurden sogenannte Probenapplikatoren (Filterpapierstreifen 0,5 * 1 cm, Pharmacia) auf das Gel aufgebracht, auf die die Proben (20 µl) und der IEF-Standard (10 µl) pipettiert wurden. Als Standard wurde das IEF-Calibration Kit der Fa. Pharmacia verwendet.
Folgende Sollwerte wurden am Netzgerät vorgegeben:
Spannung 1000 V, Stromstärke 4 mA, Leistung 4 Watt.
Die Fokussierung wurde bei einer Stromstärke von 2 mA beendet.

3.6.2.1 Isoelektrische Fokussierung mit dem Phast-System

Für die Anwendung des Phast-Systems zur isoelektrischen Fokussierung wurden die Gele nach der unter 3.6.2 beschriebenen Methode hergestellt und anschließend auf das für das Phast-System verwendete Maß (4 * 4 cm) zurechtgeschnitten.
Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Vorschrift von Pharmacia.

Trennprogramm IEF:

sample appl. down at			2.2		0 Vh
sample appl. up at			2.3		0 Vh
2.1	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	75 Vh
2.2	250 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
2.3	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	410 Vh

3.6.3 Titrationskurve

Titrationskurven wurden mit der 2-dimensionalen Technik der isoelektrischen Fokussierung im Phast-System erstellt.

Die Gele für die Titrationskurven (Gradient pH 3 - pH 7) wurden wie bei 3.6.2 hergestellt.

Durchführung:
Der erste Elektrophoreselauf wurde ohne Probe zur Ausbildung des gewünschten pH-Gradienten durchgeführt. Anschließend wurde das Gel um 90° im Uhrzeigersinn gedreht. Die Probe wurde in der Mitte des Gels mit einem durchgehenden Probenapplikator aufgetragen und die Titrationskurve aufgenommen.

Programm für die Aufnahme der Titrationskurve (Pharmacia)

sample appl. down			at 5.3		0 Vh
sample appl. up			at 5.3		6 Vh
5.1	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	150 Vh
5.2	0000 V	000 mA	000 W	00°C	000 Vh
5.3	1000 V	2,5 mA	0,2 W	15°C	40-60 Vh

3.6.4 Färbemethoden

Färbung mit Amidoschwarz

Färbelösung: 0,1 % Amidoschwarz (Naphthol Blue Black) in Entfärber

Entfärber: 25 % Methanol
7 % Essigsäure
68 % H_2O bidest.

Amidoschwarz wurde vor allem für die Färbung von SDS-PAGE-Gelen und Transfermembranen verwendet.
Die Färbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Gel, bzw. die Membran wurde für 5 min in Färbelösung gelegt und anschließend entfärbt. Der Entfärber mußte mehrfach gewechselt werden.

Färbung von SDS-Gelen im Phast-System
Die Färbung im automatisierten Phast-System erfolgte mit Coomassie Blau.

Reagenzien:

Färbelösung:

0,02 % Coomassie Blue R 250
in Entfärber

Wasch- und Entfärbelösung:

30 % Methanol
10 % Essigsäure
60 % H_2O deion.

Schutzlösung:

5 % Glycerin
10 % Essigsäure in H_2O deion.

Färbeprogramm für SDS-Gele (Pharmacia):

	Lösung	Zuleitung	Ableitung	Zeit	Temperatur
1.1	Färbung	1	0	8 min	50°C
1.2	Entfärber	2	0	5 min	50°C
1.3	Entfärber	2	0	8 min	50°C
1.4	Entfärber	2	0	10 min	50°C
1.5	Schutzlösung	3	0	5 min	50°C

Färbung von IEF-Gelen im Phast-System

Die Coomassiefärbung von IEF-Gelen und Titrationskurven mit dem Phast-System erfolgte ebenfalls nach Vorschrift von Pharmacia.

Reagenzien:

Fixierlösung:

20 %ige Trichloressigsäure

Wasch- und Entfärbelösung:

30 % Methanol
10 % Essigsäure
60 % H_2O deion.

Färbelösung:

0,02 % Coomassie Blue R 250
in Entfärber

Programm zur Färbung von IEF-Gelen:

	Lösung	Zuleitung	Ableitung	Zeit	Temperatur
1.1	Fixierung	1	1	5 min	20°C
1.2	Waschlösung	2	2	2 min	20°C
1.3	Färbelösung	3	0	10 min	50°C
1.4	Entfärber	4	0	10 min	50°C

Färbung von Ultradünnschichtgelen mit Coomassie Blue G 250

Färbelösung: 0,1% Coomassie Brilliant Blue G 250
40 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärber: 40 % Essigsäure
10 % Methanol

Zur Färbung wurden die Gele 15 min bei 60°C (geschlossene Färbeschale!) im Trockenschrank inkubiert. Die Entfärbung erfolgte bei Raumtemperatur.
Nach dem Entfärben wurden die Gele bei Raumtemperatur getrocknet.

3.6.4.1 Aktivitätsfärbung im Gel

Die Aktivitätsfärbung der PDC (Zehender et al. 1983) erfolgte über die Fällung von 1,2-Dianilinoethan (DAE).
Die Fällung wird durch cyclische Kondensation von DAE mit Acetaldehyd hervorgerufen. Da DAE in wässrigen, leicht alkalischen Lösungen instabil ist, wurde die Reaktion in essigsaurer Lösung durchgeführt.
Nach der isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel in einem 0,3 M Citratpuffer pH 6 (20 mM TPP, 20 mM $MgSO_4$, 50 mM Na-Pyruvat) zur Rekombination der PDC mit den Cofaktoren 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DAE-Lösung (0,4 % DAE in 40 %iger Essigsäure) zugegeben.
Das im Citratpuffer vorhandene Na-Pyruvat wird von der PDC während der Inkubation decarboxyliert. Der dabei entstehende Acetaldehyd bildet ein Kondensationsprodukt mit DAE, das als weißer Niederschlag sichtbar wird. Nach ca. 5 min konnten die Enzymbanden als

weiße Präzipitationslinien vor einem dunklen Hintergrund detektiert werden.

3.7 Elektroblotting

Die Durchführung des elektrischen Transfers erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von LKB in der Nova-Blot-Kammer im Multiphor II-System der Fa. LKB mit dem power supply Desatronic 500/400, Fa. Desaga.

Blottingpuffer:
1) CAPS = 3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure

Stammlösung:
0,1 M CAPS pH 11 (eingestellt mit 2 n NaOH)
Lagerung bei RT

Vor Gebrauch werden 200 ml Stammlösung mit 200 ml Methanol und 1600 ml H_2O bidest. verdünnt.

2) NEM = N-Ethylmorpholin
Stammlösung:
0,25 M NEM pH 8,3 (eingestellt mit konz. Ameisensäure)
Lagerung bei 4°C

Die Stammlösung wurde für den Transfer 10-fach mit H_2O bidest. verdünnt.
Bei beiden Puffersystemen handelt es sich um kontinuierliche Puffer, d.h. für Anode und Kathode werden die gleichen Lösungen verwendet.

Blottingmembranen:
Beim Blotting wurden je nach Aufgabenstellung Nitrocellulose- (Porengröße 0,2 µm) oder PVDF (Polyvinyliden-Difluorid)-Membranen (Porengröße 0,45 µm) verwendet. Sowohl die Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll) als auch die PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) binden Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen (Parekh et al. 1985; Matsudaira 1987), wobei die Hydrophobizität

der PVDF-Membranen, und damit auch die Bindung der Proteine, um ein Vielfaches höher ist.

Vorbereitung von Gel und Transfermembran:
Das Gel und die Membranen mußten vor dem elektrischen Transfer in Transferpuffer inkubiert werden. Dazu wurde das Gel nach dem Elektrophoreselauf für ca. 15 min in Transferpuffer gelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde ebenfalls mit dem Transferpuffer benetzt. Die Immobilon-Membran mußte vor Gebrauch für ca. 1 min in Methanol getaucht werden (Millipore 1987). Danach wurde sie ebenfalls in Transferpuffer gelegt.

Vorbereitung und Durchführung des elektrischen Transfers:
Zunächst wurden Anoden- und Kathodenplatte mit H_2O bidest. gesättigt und drei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere auf die Anodenplatte gelegt. Auf diese Filter wurden anschließend vorsichtig die Membran, das Gel und nochmals drei puffergetränkte Filter aufgelegt. Dabei mußte sorgfältig beachtet werden, daß keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Anschließend wurde die Blottingkammer durch Auflegen der Kathodenplatte geschlossen.
Nachdem der Deckel der Multiphor II-Kammer aufgelegt war, wurde die Stromzufuhr eingeschaltet. Der Transfer wurde mit einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 durchgeführt. Die optimale Transferzeit (45 min) wurde in Vorversuchen ermittelt.
Die Färbung der Protein- und Peptidbanden erfolgte bei beiden Transfermembranen mit Amidoschwarz (3.6.4).
Nach der Färbung wurden die Blots bei Raumtemperatur getrocknet.

Optimierung der Transferzeit:
Da die Transferzeit von dem Molekulargewicht der Proteine abhängt, wurde zur Optimierung der Transferzeit der Molekulargewichtsstandard Combithek, Boehringer (Macroglobulin Pferd red. 170000, Phosphorylase b Kaninchenmuskel 97400, Glutamatdehydrogenase Rinderleber 55400, Lactatdehydrogenase Schweinemuskel 36500 und Trypsininhibitor Sojabohnen 20100) mehrfach auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Trennung wurde das Gel geteilt (je 3 Proben) und die einzelnen Gelabschnitte mit unterschiedlichen Transferzeiten (15, 30, 45, 60 und 75 min) geblottet. Anschließend wurden die Membranen und Gele mit Amidoschwarz gefärbt und der Grad des Transfers an-

hand der Färbung der Membran und der Restfärbung im Gel mit einem Scanner (Dual Wavelength Chromato Scanner CS-930 und Data Recorder DR-2, Shimadzu) bestimmt. Das Absorptionsmaximum für Amidoschwarz liegt bei einer Wellenlänge von 580 nm.

3.8 Spaltungen der PDC

Die Spaltungen der Pyruvatdecarboxylase zur Peptidherstellung für die Sequenzanalyse wurden mit verschiedenen chemischen und enzymatischen Methoden durchgeführt. Die Trennung und Isolierung der Spaltprodukte erfolgte mit SDS-PAGE und anschließendem elektrischen Transfer (Elektroblotting) oder mittels Reversed-Phase-Chromatographie an der HPLC.

3.8.1 Bromcyanspaltung

Die Bromcyanspaltung wurde nach Fontana und Gross (1986) durchgeführt.
4,5 mg Protein wurden in 1 ml 70 %iger Ameisensäure gelöst und mit 10 mg festem CNBr versetzt (Abzug!). Der Ansatz wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und nach 20 h durch Zugabe von 10 ml H_2O gestoppt. Überschüssiges Reagenz, sowie entstandene Nebenprodukte wurden in einer Vakuumzentrifuge (Univapo 150 H, Uniequip) entfernt.

3.8.2 Ameisensäurespaltung

Die Ameisensäurespaltung wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Landon (1977) durchgeführt.
2 mg Protein wurden in 75 %iger Ameisensäure gelöst und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wurde durch Entfernen der Ameisensäure im Vakuum (Vakuumzentrifuge Univapo 150 H, Uniequip) gestoppt.

3.8.3 Peptide-mapping mit limitierter Proteolyse

Die limitierte Proteolyse erfolgte in Anlehnung an Cleveland et al. (1977). Bei dieser Methode erfolgt die proteolytische Spaltung des Enzyms mit verschiedenen Proteasen während der SDS-Elektrophorese im Sammelgel (Gelherstellung und Probenvorbereitung s.3.6.1). Aus diesem Grund können nur Proteasen, die auch in Gegenwart geringer SDS-Konzentrationen noch aktiv sind, eingesetzt werden.

Konzentration der verwendeten Proteasen:

Trypsin - 0,4 mg/ml
V8-Protease - 0,1 mg/ml

Die Proteasen wurden in 125 mM Tris-HCl-Puffer pH 6,8, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA und 10^{-4} % Bromphenolblau gelöst.

Durchführung:
30-50 µl Enzym (1 mg/ml) wurden in die Probentaschen gefüllt und mit jeweils 20 µl Proteaselösung überschichtet.
Anschließend wurde der Elektrophoreselauf gestartet und kurz vor Eintritt der Bromphenolblaubande in das Trenngel für die Dauer der Proteolyse unterbrochen. Die Dauer der Unterbrechung (5-30 min) war von der jeweiligen Protease und deren Konzentration abhängig. Nach der Proteolyse wurden die Spaltprodukte im Trenngel aufgetrennt und die Banden mit Amidoschwarz gefärbt oder zur Isolation einzelner Peptide für die Sequenzanalyse auf eine PVDF-Membran geblottet.

Elektrophoresebedingungen:

Sammelgel 300 V, 25 mA, 13°C
Trenngel 300 V, 80 mA, 13°C

3.8.4 Enzymatische Spaltungen

Für die enzymatischen Spaltungen wurden die Proteasen Trypsin und V8-Protease eingesetzt (Wilkinson 1986).
Das Enzym-Substrat-Verhältnis wurde im Fall von Trypsin auf 1:100 und bei der V8-Protease auf 1:50 eingestellt.

Stammlösungen:

Trypsin: 1 mg/ml in 10 mM HCl

V8-Protease: 1 mg/ml in 0,05 M Ammoniumacetatpuffer pH 4

Spaltung mit Trypsin:

1 mg Protein wurde in 1 ml 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8 aufgenommen und mit Trypsin versetzt. Die Inkubation erfolgte 4 h bei 37°C. Durch Ansäuern mit 0,1 ml 10 %iger TFA wurde die Reaktion gestoppt.

Trypsin spaltet spezifisch Bindungen vom Typ Arg-X und Lys-X, mit Ausnahme von Arg-Pro und Lys-Pro. Diese Bindungen sind gegen den Angriff von Trypsin resistent. (Ausnahme: in bestimmten Sequenzen kann auch die Arg-Pro Bindung gespalten werden; Wilkinson 1986).

Spaltung mit V8-Protease:

1 mg Protein wurde in 1 ml 50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4 gelöst, mit V8-Protease versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die V8-Protease spaltet bei pH 4 spezifisch die Peptidbindung hinter Glutaminsäure (Drapeau 1977).

Durch Absenken des pH-Wertes auf Werte < 3,5 wurde die Reaktion gestoppt.

3.8.5 Enzymatische Spaltungen auf Nitrocellulose

Die in situ Spaltung mit Trypsin und der V8-Protease wurde in Anlehnung an die Methode von Aebersold et al. (1987) mit Trypsin und der V8-Protease durchgeführt.

Stammlösungen:

Trypsin:	1 mg/ml in 100 mM Ammomniumhydrogencarbonatpuffer pH 8,0 / Acetonitril (95:5)
V8-Protease:	1 mg/ml in 50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4 / Acetonitril (95:5)
PVP-40:	0,5 % PVP-40 in 100 mM Essigsäure
TFA/Acetonitril:	40 % Acetonitril in 0,1 % TFA

Durchführung:
Die PDC wurde zunächst einer Ameisensäurespaltung (3.8.2) unterzogen. Die so erzeugten Spaltstücke wurden mehrfach auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (3.7). Nach dem Trocknen der Blottingmembran wurden 5-10 gleiche Peptidbanden ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Um eine Anlagerung der Proteasen an die Membran zu verhindern wurden die Membranstücke mit 1,5 ml PVP-Lösung versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.
Durch mehrmaliges Waschen mit H_2O bidest. wurde die überschüssige PVP-Lösung anschließend wieder entfernt.
Für die in situ-Spaltung auf der Membran wurden die Proben mit 300 µl Proteaselösung (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:20) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die Proben eingefroren oder umgehend für die Trennung über HPLC vorbereitet.
Die (frisch hergestellte oder aufgetaute) Probe wurde mit 30 µl 10 %iger TFA angesäuert, auf einem Mixer (Reax 2000, Fa. Heidolph) gemischt und 1 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und über HPLC getrennt.
Die zurückgehaltenen Membranstücke wurden nochmals mit 500 µl TFA/Acetonitrillösung versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert und jeweils 50 µl des Überstands zur Analyse in die HPLC injiziert.

3.9 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

3.9.1 Aminosäureanalyse eines sauren Totalhydrolysates

Die Aminosäureanalyse erfolgte mit dem Aminosäureanalysator LC 5001, Fa. Biotronic.
Es wurde eine saure Hydrolyse des Proteins mit 6 N HCl durchgeführt (Moore und Stein 1963).
Die 6 N HCl wurde zur Stabilisierung der aromatischen Aminosäuren mit 1 % Phenol versetzt und mit Stickstoff begast.
Es wurden jeweils 100 µl Protein (2mg/ml) in einem Hydrolyseröhrchen eingedampft und in ein Hydrolysegefäß mit 400 µl 6 N HCl gestellt. Das Gefäß wurde entgast und anschließend bei 110°C inku-

biert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Hydrolysen abgebrochen und die restliche Salzsäure durch Evaporation (Vakuumzentrifuge Univapo 150 H, Uniequip) entfernt. Anschließend wurden die Proben in 500 µl Probenpuffer (0,1 M Citratpuffer pH 2,2) aufgenommen und in Eppendorfgefäße überführt.
Die Trennung der Aminosäuren erfolgt an einer Ionenaustauschersäule (BTC-Na^+2710, Fa. Biotronic) mittels Hydrolysat-Programm.
Die Auswertung der Aminosäureanalyse erfolgt mittels eines Standards durch Vergleich der Retentionszeiten und der Peakflächen.

3.9.2 Bestimmung des Cysteingehaltes

Die Bestimmung des Cysteingehaltes der PDC erfolgte durch photometrischen Nachweis der SH-Gruppen mit 5,5 Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) (Ellman 1959).
Je 1 ml reduziertes und unbehandeltes Protein wurde in Anlehnung an Miller und Metzger (1965) mit 5 % TCA versetzt und das Präzipitat zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in je 200 µl 5 M Guanidin-HCl-Lösung aufgenommen und der Proteingehalt (3.2) gemessen.
Für die Cysteinbestimmung wurde die Proteinlösung 1:5 und 1:10 verdünnt und jeweils 1 ml dieser Verdünnungen mit dem gleichem Volumen der folgenden Lösung versetzt:

0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 9,1
5 M Guanidin-HCl
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (0,1 g in 10 ml Puffer)

Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach 5, 10 und 20 min wurde die Extinktion der Ansätze bei 412 nm im Recording Spektrophotometer UV 160 (Shimadzu) gemessen.
Der Cysteingehalt errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Der molare Extinktionskoeffizient beträgt 13600 $l * mol^{-1} * cm^{-1}$.

3.9.3 Spektrophotometrische Bestimmung von Tryptophan

Die Bestimmung des Tryptophangehaltes erfolgte im Wesentlichen nach der abgewandelten Methode von Edelhoch (1967).
Die Messung wurde bei 280 und 288 nm durchgeführt. Sie beruht auf der absorptiven Eigenschaft von Tryptophan im UV-Bereich. Zur Überprüfung der Methode wurde zunächst der Tryptophangehalt von Lysozym bestimmt.

Denaturierungslösung:

6 M Guanidin-HCl in 10 mM HCl-Imidazol-Puffer pH 7

Zunächst wurde das Enzym mit Guanidinhydrochlorid versetzt und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Versuchsansatz Lysozym:
Es wurde eine 2,38 µM Lösung Lysozym in Denaturierungslösung hergestellt und diese 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion dieser Lösung bei 280 und 288 nm gegen die Denaturierlösung gemessen. Die Messung erfolgte in Halbmikroküvetten (Volumen 1 ml) im Shimadzu UV 160 Spectrophotometer.

Versuchsansatz PDC:
Je 200 µl Holo- und Apo-PDC-Lösung (Proteingehalt 0,81 mg/ml und 0,66 mg/ml) wurden mit 800 µl Denaturierungslösung versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Apoenzym siehe 3.13.6). Danach wurde die Extinktion der Ansätze analog zur Messung von Lysozym bei 280 und 288 nm bestimmt.

3.10 N-terminale Sequenzanalyse

Die N-terminale Sequenzanalyse wurde mittels modifiziertem Edman-Abbau (1967) am Pulsed-Liquid-Sequenzer Modell 477 A (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Vorschrift durchgeführt.
Bei der automatisierten Sequenzanalyse werden die Proben in flüssiger oder immobilisierter (an PVDF-Membran) Form in die Reaktionskammer des Gerätes eingebracht und dort die N-terminale Aminosäure nach Reaktion mit PITC abgespalten. Die so entstandene ATZ-

Aminosäure wird zur Umlagerung in die stabilere PTH-Aminosäure in die "conversion flask" übertragen. Nach der Umlagerung erfolgt "on-line" die Identifizierung der PTH-Aminosäure mittels HPLC (120 A, Fa. Applied Biosystems) durch Vergleich mit einem PTH-Aminosäurestandard (Applied Biosystems).
Vor der Probeaufgabe wird das Filter mit Polybren, einem quarternären Ammoniumsalz, behandelt (Matsudaira 1987). Damit kann das schnelle Auswaschen der Proben verhindert werden.
Flüssige Proben konnten direkt auf ein so vorbehandeltes Filter aufgegeben werden. Die Aufgabemenge lag je nach Proteinkonzentration zwischen 30 und 100 µl (ca. 10-100 pmol). Die Proben wurden auf dem Filter durch N_2-Begasung getrocknet. Bei Volumina über 50 µl mußte die Probe in mehreren Schritten aufgetragen werden.
Auf PVDF-Membranen geblottete Proben wurden ausgeschnitten (Größe 2 * 5 mm), mit einer Kanüle perforiert und auf einem mit Polybren behandelten Filter in die Reaktionskammer gelegt.

3.11 Bestimmung der C-terminalen Sequenz mit Carboxypeptidase Y

Die Bestimmung der C-terminalen Sequenz erfolgte in Anlehnung an Hayashi (1973).

Reagenzien:
Puffer: 50 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 6
Carboxypeptidase Y: 1 mg/ml CPY (aus Hefe) in H_2O bidest.

1 ml Proteinlösung (1,5 mg/ml in Ammoniumacetat-Puffer pH 6) wurde mit ca. 30 µl Carboxypeptidase Y versetzt und bei 30°C inkubiert. Nach 0, 15, 30 und 60 min wurde jeweils ein Aliquot von 250 µl entnommen und die Reaktion mit 300 µl Eisessig gestoppt. Anschließend wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge (Univapo 150 H, Uniequip) getrocknet. Als Kontrolle wurden 250 µl Puffer mit Carboxypeptidase Y inkubiert. Für die anschließende automatisierte Aminosäureanalyse mit dem Analysator LC 5001, Fa. Biotronic wurden die Proben in 0,2 ml 0,1 M Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen.

3.12 Modifizierungsreaktionen

3.12.1 Reduktion

Die Reduktion und die anschließende Carboxymethylierung wurden in Anlehnung an Waxdal et al. (1968) durchgeführt.
10-20 mg/ml Protein wurden zur Denaturierung in 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8 (6 M Guanidin-HCl und 2 mM EDTA) aufgenommen, mit N_2 begast und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde ein 50-fach molarer Überschuß an DDT zugegeben. Der Ansatz wurde erneut mit N_2 begast und 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.12.2 Carboxymethylierung

Das Protein wurde nach der Reduktion in Eis gekühlt und anschließend mit 100 µl einer 50 mM Jodessigsäurelösung versetzt. Nach Überprüfen des pH-Wertes (evt. Einstellen auf pH 8) wurde die Probe für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
Danach wurde die Reaktion mit 50 µl Mercaptoethanol gestoppt und das Protein in verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:5 und 1:10) über Nacht gegen Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8 dialysiert. Ein Teil des reduzierten, modifizierten Proteins wurde anschließend lyophilisiert, der Rest wurde durch Ultrafiltration (Centricon 10, Fa Amicon) eingeengt.

3.12.3 Tryptophan-Modifikation

Die Tryptophan-Modifikation wurde im Wesentlichen nach der Methode von Zehender (1984) durchgeführt. Die Modifizierung wurde mit dem milden Reagenz (HNB)SMe_2Br (2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-dimethylsulfoniumbromid) durchgeführt (Ullrich 1982).
Vor der Modifikation erfolgte zunächst eine Maskierung der SH-Gruppen mit p-Mercuribenzoat.
Je 3 ml Holoenzym und Apoenzym wurden mit 100 µl einer 1 mM PCMB-Lösung versetzt und 1 h im Eisbad inkubiert (Proteingehalt der Enzymlösungen: Holoenzym = 100 µg/ml; Apoenzym = 70 µg/ml).

Anschließend wurde das geschützte Protein für die Modifikation auf Raumtemperatur angewärmt, mit der fünffachen Menge (HNB)SMe_2Br (w/w) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
Danach wurden die Ansätze mit 0,5 g Ammoniumsulfat 30 min im Eisbad gefällt. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (5 min bei 8000 U/min) und anschließend in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM pH 6,8) gelöst.
Im nächsten Schritt erfolgte die Regenerierung der SH-Gruppen mit DTT. Jedem Ansatz wurden dazu 30 µl einer 0,1 M DTT-Lösung zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Ansätze gegen Puffer dialysiert.
Der Einfluß der Modifikation auf die Enzymaktivität wurde mit dem Enzymtest (3.1) ermittelt. Zur Berücksichtigung der Proteinverluste während der Modifikationsreaktion, wurde der Proteingehalt nach jedem Arbeitsschritt ermittelt und die spezifische Aktivität berechnet.

3.13 Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase

3.13.1 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

Zur Bestimmung des K_M-Wertes (Michaelis-Menten-Konstante) wurde eine Substratsättigungskurve für die PDC im Bereich von 0-100 mM Pyruvat aufgenommen. Aus einer 2 M Stammlösung Na-Pyruvat wurden entsprechende Verdünnungen für den Enzymtest hergestellt.

Testansatz:

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Na-Pyruvat	0,25 ml	0-100 mM
NADH	0,49 ml	0,18 mM
ADH	0,01 ml	84 U/ml
Citrat-Puffer	0,20 ml	100 mM
schütteln und bei 30°C inkubieren		
Start der Reaktion durch 50 µl PDC-Lösung Gesamtvolumen des Testansatzes: 1 ml		

Die Reaktionsbedingungen und die Durchführung wurden aus 3.1 übernommen.

Die Bestimmung des K_M-Wertes erfolgte sowohl graphisch als auch durch Berechnung mit dem Computerprogramm OPTI (Ullrich Giesecke, Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich).

3.13.2 Einfluß vom pH-Wert auf die PDC

Zur Messung der pH-Stabilität wurden jeweils 5 µg PDC in 1 ml der verschiedenen Puffer aufgenommen und über einen Zeitraum von 14 h (in Puffern ohne Zusatz von Cofaktoren) bzw. 28 h (in Puffern mit Cofaktoren) inkubiert. Während der Inkubation wurden nach unterschiedlichen Zeiten Proben genommen, um die Restaktivität der Enzymlösung (Enzymtest 3.1) zu bestimmen. Dem Assay wurden keine Cofaktoren zugefügt um eine Regenerierung des Enzyms auszuschließen.

Verwendete Puffer:

50 mM Citrat- Phosphat pH 4-6,5
50 mM Phosphat-Puffer pH 7-8
50 mM Tris-HCl-Puffer pH 9

Um das pH-Optimum der Enzymreaktion zu ermitteln wurde die Messung der Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.
Für den pH-Bereich zwischen pH 5 und pH 9,5 wurden folgende Pufferlösungen hergestellt:

100 mM Citrat-Puffer pH 4-6,5
100 mM Phosphat-Puffer pH 7-8,5
100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5-9
100 mM Glycin-Puffer pH 8,5-9,5

Alle Puffer enthielten 2 mM $MgSO_4$ und 1,5 mM TPP.

Stammlösungen:

Na-Pyruvat: 39 mg/ml in H_2O bidest.
NADH: 2,7 mg/ml " " "

Testansatz:

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Puffer	891 µl	100 mM
Na-Pyruvat	50 µl	16,9 mM
NADH	49 µl	0,18 mM
ADH	10 µl	84 U/ml
mischen und bei 30°C inkubieren		

Start der Reaktion mit 50 µl PDC-Lösung
Testvolumen 1,05 ml

3.13.3 Hemmung durch Phenylpyruvat

Stammlösung: 20 mM Phenylpyruvat in 0,1 M Citratpuffer pH 6

200 µl PDC wurden mit 800 µl dieser Lösung versetzt (Verdünnung 1:5) und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Endkonzentration Phenylpyruvat 16 mM). Nach der Inkubation wurde das Enzym nochmals 1:40 in 0,1 M Citratpuffer pH 6 verdünnt und die Enzymaktivität (3.1) bei zunehmender Substratkonzentration bestimmt.
Als Kontrolle wurde eine 200-fache Verdünnung der PDC in Citratpuffer hergestellt und die Aktivität bei steigender Pyruvatkonzentration gemessen.

3.13.4 Kompetitive Hemmung der PDC durch den Fluoreszenzfarbstoff 2-p-Toluidino-naphthalin-6-sulfonat (TNS)

Für die Bestimmung der Abnahme des Pyruvatumsatzes durch TNS (nach Zehender 1984) wurden folgende Lösungen hergestellt.

Stammlösungen:

TNS:	1 mM TNS in 0,1 M Citratpuffer pH 6
Na-Pyruvat:	2 mM in 0,1 M Citratpuffer pH 6
NADH:	2.7 mg in 1 ml 0,1 M Citratpuffer pH 6

Der Citratpuffer enthält 20 mM $MgSO_4$ und 1,5 mM TPP.

Testansatz:

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Na-Pyruvat	250 µl	0-50 mM
NADH	49 µl	0,18 mM
TNS	0-400 µl	0-400 µmol
Puffer	641-241 µl	100 mM
ADH	10 µl	84 U/ml
mischen und bei 30°C inkubieren		
Start der Reaktion mit 50 µl Enzym Testvolumen: 1 ml		

Reaktionsbedingungen und Durchführung siehe 3.1

3.13.5 Irreversible Blockierung der PDC durch Glyoxylsäure

Die Reaktion der PDC durch Glyoxylsäure wurde in Anlehnung an Uhlemann und Schellenberger (1976) untersucht.

Stammlösungen:

Glyoxylsäure: 0-1 M in 0,1 M Citratpuffer pH 6 (20 mM $MgSO_4$, 0,1 mM TPP)

Na-Pyruvat: 39 mg/ml Citratpuffer

NADH: 2,7 mg/ml "

Die PDC wurde im Test mit steigenden Konzentrationen Glyoxylsäure (0-50 mM) versetzt und die verbleibende Aktivität bestimmt.

Testansatz:

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Na-Pyruvat	50 µl	16,9 mM
NADH	49 µl	0,18 mM
ADH	10 µl	84 U/ml
Glyoxylsäure	50 µl	0 - 50 mM
Puffer	791 µl	100 mM
mischen und bei 30°C inkubieren		
Reaktionsstart mit 50 µl Enzym Testvolumen: 1 ml		

Meßbedingung siehe 3.1

3.13.6 Untersuchungen zur Rekombinationskinetik der PDC

Die Regenerierungsexperimente wurden bei 30°C durchgeführt.
Um eine Regenerierung der PDC während des Assays (3.1) zu vermeiden, wurden alle Aktivitätsbestimmungen während der Regenerierungsexperimente in Testansätzen ohne Cofaktoren durchgeführt.

3.13.6.1 Herstellung des Apoenzyms

Der vollständige Aktivitätsverlust der PDC durch Inkubation bei pH-Werten > 8,5 (Bringer-Meyer et al. 1986) beruht auf der Dissoziation der Cofaktoren Mg^{2+} und TPP.
Für die quantitative Abtrennung der Cofaktoren wurden je 1 ml Holoenzym (Proteinkonzentration 3 mg/ml) mit 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 versetzt und mit KOH auf pH 8,5 und 9 titriert. Die Enzymlösung wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag die Cofaktoren durch Gelfiltration (PD10, Pharmacia) abgetrennt. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen und anschließend Aktivität und Proteingehalt bestimmt.

3.13.6.2 Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Rekombination

Für die Regenerierungsexperimente wurde folgender Puffer hergestellt:

100	mM Citratpuffer pH 6
5	mM $MgSO_4$
1	mM TPP

Das Apoenzym (0,5 mg/ml) wurde mit Regenerierungspuffer verdünnt (1:200) und bei 30°C inkubiert. Nach 0.5, 2, 3, 5, 7, 10, 20 und 30 min wurden jeweils 50 µl Enzym entnommen und die Aktivität bestimmt. Ein zweiter Ansatz wurde mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 20 mM Pyruvat enthielt, durchgeführt.

3.13.6.3 Regenerierung in Abhängigkeit der TPP-Konzentration

Um die Abhängigkeit der Regenerierung von der TPP-Konzentration zu

messen (Schellenberger 1967), wurden folgende Regenerierungspuffer mit konstanter Mg-Konzentration hergestellt.

1) 2 mM $MgSO_4$ in 0,1 M Citratpuffer pH 6 mit verschiedenen TPP-Konzentrationen (0,01 mM - 4 mM)
2) 5 mM $MgSO_4$ in 0,1 M Citratpuffer pH 6 mit verschiedenen TPP-Konzentrationen (0,01 mM - 4 mM)

Rekombinationsansatz:
Das Apoenzym wurde mit den verschiedenen Puffern verdünnt (1:200) und 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität bestimmt.

3.13.6.4 Abhängigkeit der Regenerierung der PDC von der Mg-Konzentration

Die Abhängigkeit der Rekombination des Apoenzyms von der Mg-Konzentration wurde analog zu 3.13.6.3 in Regenerierungspuffer mit zwei konstanten TPP-Konzentration bestimmt. Die Puffer setzten sich wie folgt zusammen.

1) 0.1 mM TPP in 0,1 M Citratpuffer pH 6 mit verschiedenen $MgSO_4$-Konzentrationen (0,1 mM -10 mM)
2) 1 mM TPP in 0,1 M Citratpuffer pH 6 mit verschiedenen $MgSO_4$-Konzentrationen (0,1 mM - 10 mM)

3.13.7 Lagerstabilität der gereinigten PDC

Nachdem die PDC gereingt war, wurden verschiedene Lagermöglichkeiten getestet. Die Aktivität wurde über mehrere Wochen beobachtet (Enzymtest 3.1).

-Lagerung bei 4°C ohne Zusätze
-Einfrieren ohne Zusätze
-Einfrieren in 50 % Glycerin
-Sterilfiltration und Lagerung bei 4°C
-Lyophilisation

3.14 Photometrische Messungen

3.14.1 UV/VIS-Spektren von modifiziertem und unbehandeltem Protein

Sowohl vom Tryptophan-modifizierten Enzym (3.12.4) als auch vom unbehandelten Enzym wurden Absorptionsspektren im Bereich zwischen 250 und 450 nm aufgenommen. Als Leerwert wurde 10 mM HCl-Imidazol-Puffer pH 7 eingesetzt. Die Messung erfolgte im Shimadzu UV 160 Recording Spektrophotometer .

3.14.2 Messung der Tryptophan-Fluoreszenz

Die Messung der Tryptophan-Fluoreszenz wurde mit einer Anregungswellenlänge von 292 nm in Probevolumina von 3 ml durchgeführt (Ullrich 1982). Es wurden Emissionsspektren vom Apo-, Holoenzym und von modifiziertem Enzym (Proteingehalt je 50 µg/ml) aufgenommen. Die Ausführung der Messung erfolgte im Spektrofluorophotometer Modell RF 540, Fa. Shimadzu.

3.14.3 Fluoreszenzmessung von 2-p-Toluidino-naphthalin-6-sulfonat (TNS) an Apo-und Holoenzym

Zur Bestimmung der Lipophilie der Bindungsstellen der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis wurden Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff TNS an Apo- und Holo-PDC durchgeführt.
Die Messung verlief in Anlehnung an Ullrich und Donner (1970b) bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm, das Maximum der Emission liegt bei 400 nm.
Die Messung erfolgte in einer Küvette mit 200 µl Probevolumen im Fluoreszenzphotometer RF 540, Fa. Shimadzu.

Stammlösungen:
1) 1 mM TNS-Lösung in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8
2) 0,81 mg Holoenzym/ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8
3) 0,66 mg Apoenzym/ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8

Von der TNS-Stammlösung wurden Verdünnungen (0-500 µM TNS) hergestellt.
200 µl der jeweiligen Verdünnung wurden mit 50 µl Enzymlösung versetzt, gemischt und sofort gemessen. Die Fluoreszenz der verschiedenen TNS-Lösungen ohne Enzym wurde nach Zugabe von 50 µl Puffer bestimmt.

3.15 Homologiestudien

Die Suche nach homologen Sequenzen erfolgte mit dem Programm GenePro Version 4.2 1988, Copyright Riverside Scientific, Seattle. Den Daten liegen die Proteinsequenz-Datenbank PIR, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, USA sowie die Homologiematrix nach Dayhoff et al. (1983) zugrunde.
Die aus der Proteinsequenzierung ermittelte Sequenz wurde zunächst mit den aus den Gensequenzen übersetzten PDC-Sequenzen aus Zymomonas mobilis ZM6 (Neale 1987b), aus Zymomonas ZM4 (Conway 1987) und aus Hefe verglichen (Kellermann 1986). Anschließend wurde ein Vergleich mit anderen bekannten Proteinsequenzen durchgeführt. Dabei waren Enzyme, deren Reaktionsmechanismen Ähnlichkeiten zur PDC-Reaktion aufweisen von besonderem Interesse.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase

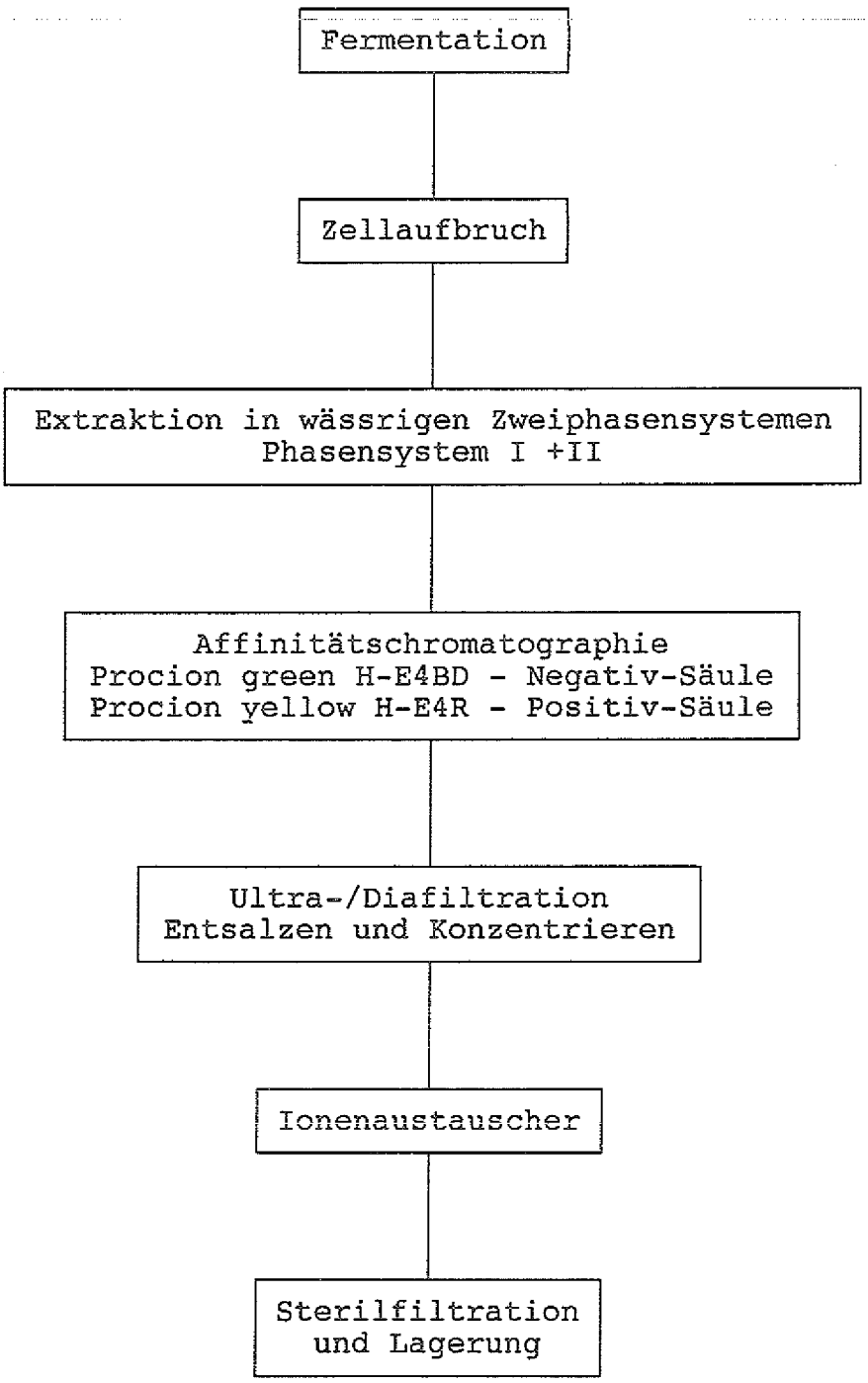


Abb. 2: Fließschema für die optimierte Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis ATCC 29191

Die Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis wurde zunächst nach der Methode von Neale et al. (1987a) durchgeführt. Die Bereitstellung großer Mengen gereinigten Enzyms für die proteinchemische Charakterisierung erforderte jedoch die Optimierung der Aufarbeitung, insbesondere des Zellaufschlusses und der Abtrennung der Zelltrümmer.
Der Ablauf des optimierten Verfahrens ist im Fließschema (Abb. 2) dargestellt.

4.1.1 Fermentation

Die Zellen für die Aufarbeitung der Pyruvatdecarboxylase wurden nach einer 16-stündigen Fermentation geerntet.

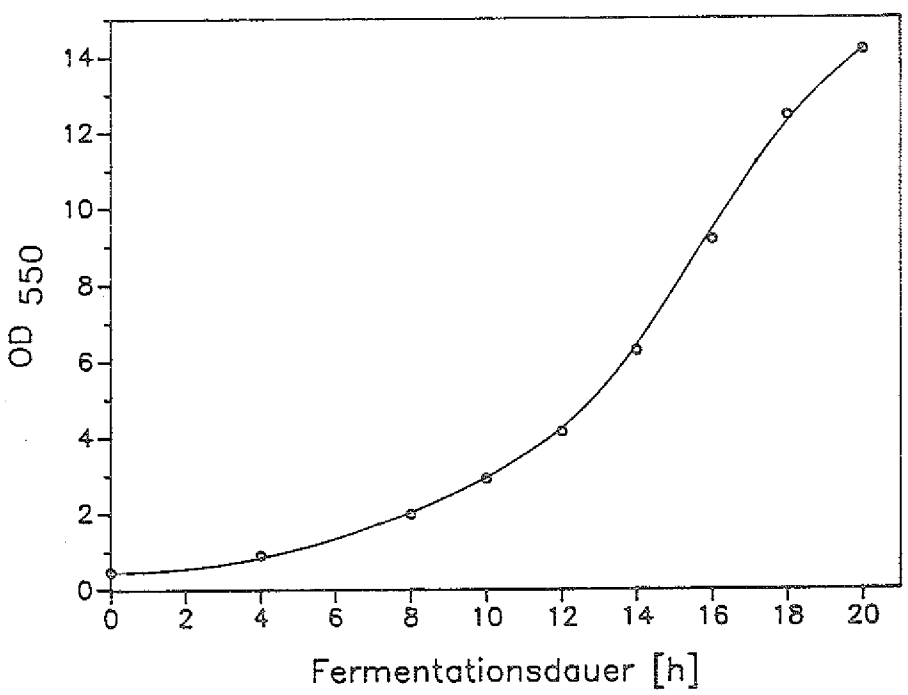


Abb. 3: Wachstumskurve von Zymomonas mobilis ZM6 (ATCC 29191), auf Mineralmedium mit 10 % Glucose, Animpfdichte 1 %
μ =0.175 h^{-1} T_d=3.96 h

Da es sich im Fall der PDC um ein konstitutives Enzym handelt, steigt die Enzymkonzentration parallel zum Anstieg der Zellmasse. Der für die Aufarbeitung der PDC optimale Erntezeitpunkt würde demnach bei maximaler Zellausbeute erreicht.

Die Fermentation von Zymomonas wird jedoch bereits nach 16 h, also in der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 3) beendet, da bei der Aufarbeitung von Zellen aus der stationären Phase nach dem Zellaufschluß eine erheblich geringere Enzymaktivität im Rohextrakt festgestellt wurde.
Dieses Resultat ist nicht wie bei Hefen (Ullrich und Freisler 1977) durch die Einwirkung von Proteinasen zu erklären, sondern auf die Wirkung von Ethanol zurückzuführen. Zellen in der stationären Phase lysieren bei hoher Ethanolkonzentration (Lee et al. 1979; Bringer-Meyer et al. 1986), wodurch die Zellinhaltsstoffe freigesetzt werden. Beim Abtrennen des Nährmediums und beim anschließendem Waschen der Zellen werden somit außer den Mediumsresten auch die freigesetzten Proteine entfernt.
Hinzu kommt die abnehmende Stabilität des Enzyms bei niedrigen pH-Werten.
Zellausbeute: 400 g Feuchtgewicht = 10 g/l Fermentervolumen

4.1.2 Zellaufschluß

Für den Zellaufschluß wurde eine 40 %ige (w/w) Zellsuspension durch Aufschwemmen der Zellen (400 g) in Kaliumphosphatpuffer hergestellt.
Diese wurde wie beschrieben (3.4.1) durch wiederholte Passage in einer Glasperlenmühle kontinuierlich aufgeschlossen. Nach dem dritten Durchgang konnten im mikroskopischen Bild keine intakten Zellen mehr beobachtet werden. Die maximale Enzymausbeute lag bei 545 U/g Zellmasse, das entspricht einer Ausbeute von 5450 U/l Fermentervolumen.
Die spezifische Aktivität der Pyruvatdecarboxylase im Rohextrakt lag bei 9 U/mg.

4.1.3 Extraktion in wässrigen 2-Phasensystemen

Das Prinzip der Extraktion in wässrigen 2-Phasensystemen ist schon länger bekannt (Albertsson 1986) und findet bereits bei einer Reihe von Enzymaufarbeitungen Verwendung (Hustedt et al. 1978; Kula et al. 1978; Kroner et al. 1982).

Die Bedeutung der Methode liegt im Bereich der Zelltrümmerabtrennung, und zeichnet sich im Vergleich zur Zentrifugation durch eine hohe Kapazität aus (Hustedt et al. 1985). Diese beruht auf der Überführung der Fest-Flüssig-Trennung in eine Flüssig-Flüssig-Trennung.
Als Phasenbildner werden wegen ihrer höheren Spezifität im Vergleich zu PEG/Dextran-Systemen überwiegend PEG und Salz eingesetzt.
Die Biomassekonzentration ist durch die Abnahme der Produktausbeute in der Oberphase bei zunehmender Biomassekonzentration limitiert, sollte aber nicht zu niedrig sein (zwischen 20 und 35 %), damit der Chemikalienverbrauch gering bleibt.
Für die folgende Aufarbeitung wurde der konzentrierte Rohextrakt mittels Extraktion in zwei aufeinander folgenden 2-Phasensystemen gereinigt, deren Zusammensetzung in Vorversuchen optimiert wurde. Als Auswahlkriterium bei der Optimierung wurde die Ausbeute der PDC-Aktivität herangezogen. Die Angabe der Aktivität in Units (U) bezieht sich auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Phase. Der Verteilungskoeffizient K (Kula 1987) errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$K = \frac{A_{oben}}{A_{unten}}$$

A_{oben} = Aktivität in der Oberphase
A_{unten} = Aktivität in der Unterphase

Tabelle 2: Verteilung der PDC-Aktivität in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des eingesetzten PEG (Konzentrationen: 20 % PEG, 12 % Salz pH 6)

PEG_{MG}	Oberphase	Unterphase	K	V_o/V_u
1550	408 U	0,15 U	2720	1,7
4000	270 U	0,75 U	360	1,5
6000	198 U	1,08 U	183	1

V_o = Volumen der Oberphase
V_u = Volumen der Unterphase

Die Aktivität der Probe für die Optimierung von Phasensystem I lag bei 233 U/ml (≈ 466 U im Ansatz). Aus den Ergebnissen in Tabelle 2 wird deutlich, daß die Ausbeute der Pyruvatdecarboxylase in der Oberphase mit steigendem Molekulargewicht von PEG abnimmt. Nur bei Verwendung von PEG 1550 kann die Aktivität nahezu verlustfrei zurückgewonnen werden.
Da in Gegenwart von höher molekularem PEG vermutlich eine Fällung der PDC eintritt, wird für alle weiteren Optimierschritte PEG 1550 verwendet.
Tabelle 3 zeigt die Abhängigkeit der Enzymausbeute von der Konzentration der Phasenkomponenten. Gute Ausbeuten werden mit 13-14 % PEG und 8-9 % Salz erhalten. Die höchste Enzymausbeute in der Oberphase zeigt das 2-Phasensystem mit 13 % PEG und 9 % Salz pH 6.

Tabelle 3: Ermittlung der optimalen PEG-Konzentration bei verschiedenen Kaliumphosphatkonzentrationen (2-10 %, pH 6)

% PEG 1550	PDC-Aktivität in der Oberphase				
	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %
12	225 U	376 U	398 U	355 U	330 U
13	254 U	384 U	450 U	463 U	290 U
14	288 U	402 U	461 U	457 U	259 U
15	298 U	420 U	439 U	397 U	194 U
16	302 U	359 U	406 U	305 U	183 U

Durch Veränderungen des pH-Wertes der Salzlösung werden durchweg schlechtere Enzymausbeuten erzielt. Während bei pH 6 die Zelltrümmer vollständig in die Salzphase separieren, kann bei pH 7 eine Verteilung über beide Phasen beobachtet werden. Mit Erhöhung des pH-Wertes wird außerdem eine Verteilung der Enzymaktivität über beide Phasen festgestellt.
Daraus ergibt sich für die Aufreinigung der PDC ein optimaler pH-Wert von 6. Dieser Wert entspricht auch annähernd dem pH-Optimum für die Enzymaktivität und -stabilität (Kapitel 4.7.3).

Für die Optimierung des zweiten Zweiphasensystems wurde die Oberphase aus Phasensystem I mit verschiedenen Mengen Kaliumphosphat

pH 6 versetzt (vgl. 3.4.2) und die Verteilung der Aktivität beobachtet. Dabei wurde der kleinste Verteilungskoeffizient (= höchste Enzymkonzentration in der Unterphase) bei Zusatz von 13 % Kaliumphosphatsalz erreicht. Die Aktivität der eingesetzten Probe für die folgenden Ansätze lag bei 155 U/ml (= 310 U im Ansatz).

Tabelle 4: Verteilung der Aktivität der PDC im zweiten Zweiphasensystem in Abhängigkeit vom Kaliumphosphatzusatz

Zusatz KPi pH 6 (%)	A_o	A_u	K
12	164 U	146 U	1,12
13	91 U	216 U	0,42
14	139 U	178 U	0,78
15	215 U	103 U	2,09

A_o = Aktivität in der Oberphase
A_u = Aktivität in der Unterphase

Trotz eines Verteilungskoeffizienten von 0,42 verbleibt ein relativ großer Anteil des Enzyms in der PEG-reichen Oberphase. Dieser kann erst durch Zusatz von 0,3 M Natriumchlorid nahezu vollständig in die Unterphase überführt werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verteilungskoeffizient der Pyruvatdecarboxylase in Gegenwart von NaCl (13 % Kaliumphosphat pH 6)

NaCl Konzentration	A_o	A_u	K	V_o/V_u
0,2 M	54 U	244 U	0,22	0,30
0,3 M	1,5 U	302 U	0,005	0,31
0,4 M	12 U	286 U	0,04	0,33

V_o = Volumen der Oberphase
V_u = Volumen der Unterphase

Für das optimierte wässrige 2-Phasensystem II müssen der Oberphase aus 2-Phasensystem I demnach 13 % Kaliumphosphat pH 6 und 0,3 M NaCl zugefügt werden.

Im Anschluß an die Optimierung der Extraktionsbedingungen wurde der durch Zellaufschluß hergestellte Rohextrakt mittels Extraktion in wässrigen 2-Phasensystemen gereinigt (vgl. 3.4.2). Der Ablauf der Extraktion ist im folgenden Schema dargestellt.

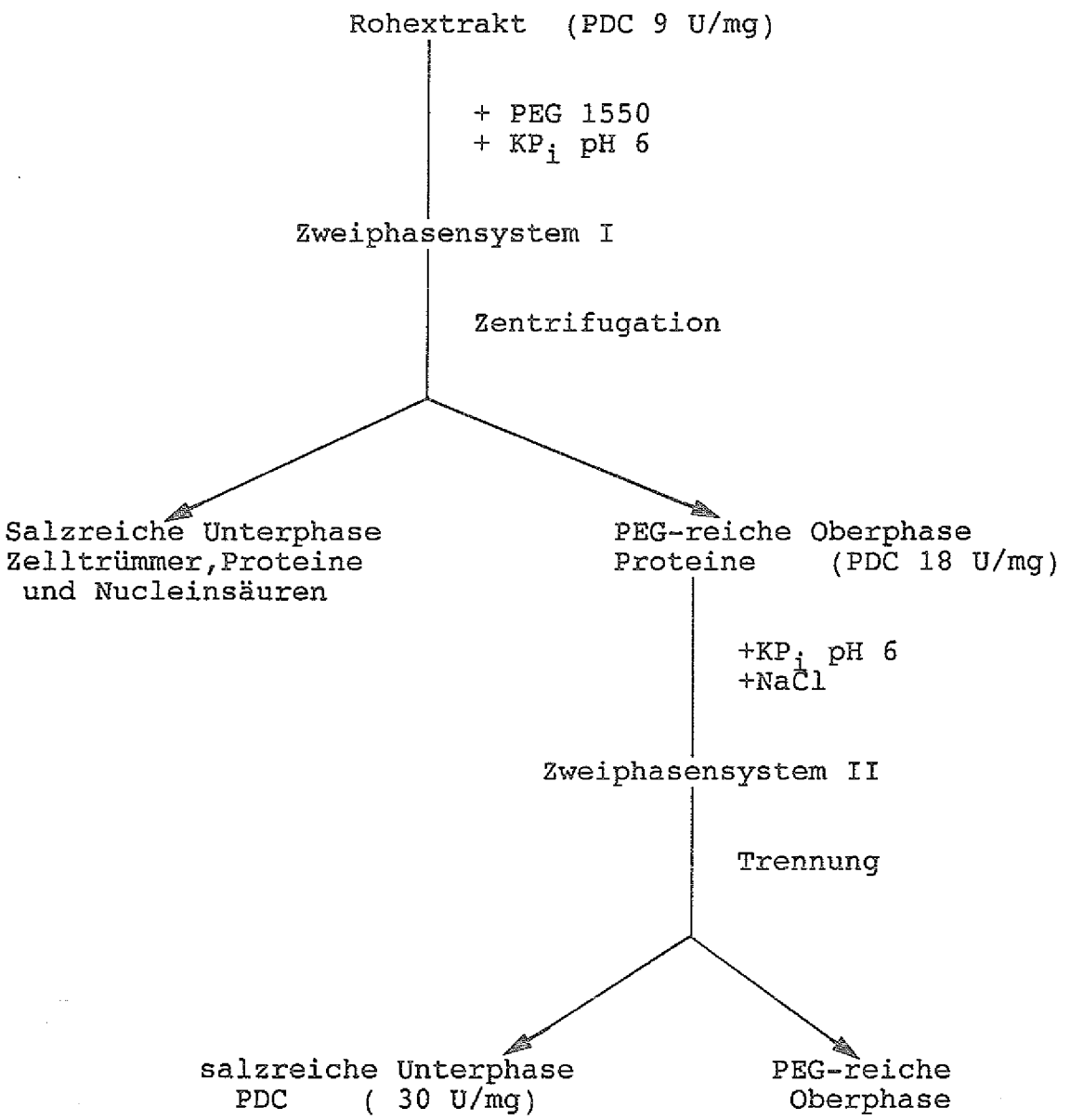


Abb. 4: Extraktionsschema für die Pyruvatdecarboxylase (PDC) aus Zymomonas mobilis ATCC 29191

Im Phasensystem I erfolgt die Abtrennung der festen Bestandteile des Rohextraktes. Die Zelltrümmer werden in der salzreichen Unter-

phase konzentriert, während ausschließlich in der klaren PEG-reichen Oberphase (Volumen 1170 ml) Enzymaktivität vorhanden ist. Die spezifische Aktivität konnte mit diesem Schritt bereits auf 18 U/mg, d.h. um den Faktor 2, gesteigert werden.
Zur Herstellung des zweiten Zweiphasensystem wurde der Oberphase I 13 % (w/v) Kaliumphosphat pH 6 und 0,3 M NaCl zugesetzt. Nach ca. 2 h war die Phasentrennung abgeschlossen und das Enzym vollständig in der salzreichen Unterphase (Volumen 1790 ml) vorhanden. Die spezifische Aktivität des Enzyms ist nach dem zweiten Extraktionsschritt auf 30 U/mg angestiegen.
Bei längerer Standzeit bildet sich an der Phasengrenze des 2. Systems eine Zwischenphase aus gefälltem Protein. Diese enthält unter den ausgewählten Bedingungen aber keine Pyruvatdecarboxylase.
Das Ergebnis der Auftrennung der Enzymlösung nach den Extraktionsschritten über Ionenaustauschchromatographie (FPLC) ist in Abb. 5 dargestellt.

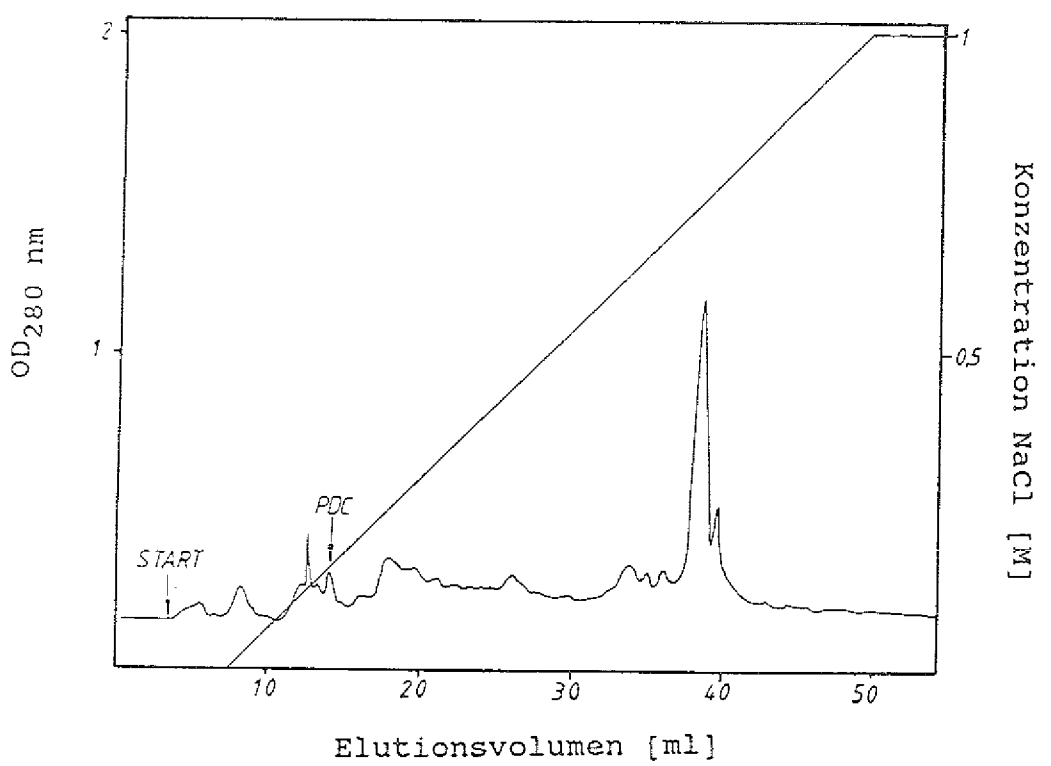


Abb. 5: Ionenaustauschchromatographie auf der Mono-Q-Säule HR 5/5 (FPLC), Probe 50 µl Rohextrakt (nach der Diafiltration), Laufmittel: HCl-Imidazol-Puffer pH 7, Flußgeschwindigkeit: 1 ml/min

4.1.4 Affinitätschromatographie an Farbstoffgelen

Die Ligandenkonzentration der in vorliegender Arbeit hergestellten Farbstoffgele lag bei 2,5 (Procion Green) und 2,6 (Procion Yellow) mg Farbstoff/ml Sepharosegel. Diese Konzentrationen liegen in der Größenordnung, die von Atkinson (1981) für die Bindung von Triazinfarbstoffen an Sepharosegele angegeben wird (1,6-2,8 mg Farbstoff/ml Sepharose Cl-4B). Die Farbstoffkonzentration ist von wesentlicher Bedeutung für die Bindungskapazität der hergestellten Farbstoffgele, die aus den aufgenommenen Durchbruchkurven (Arnold et al. 1985a+b) ermittelt wurde. Für die negative Säule (grüner Farbstoff) ergab sich eine Kapazität von 24 mg Protein/ml Gel, für die positive Säule (gelber Farbstoff) 600 U/ml Gel (Abb. 6).

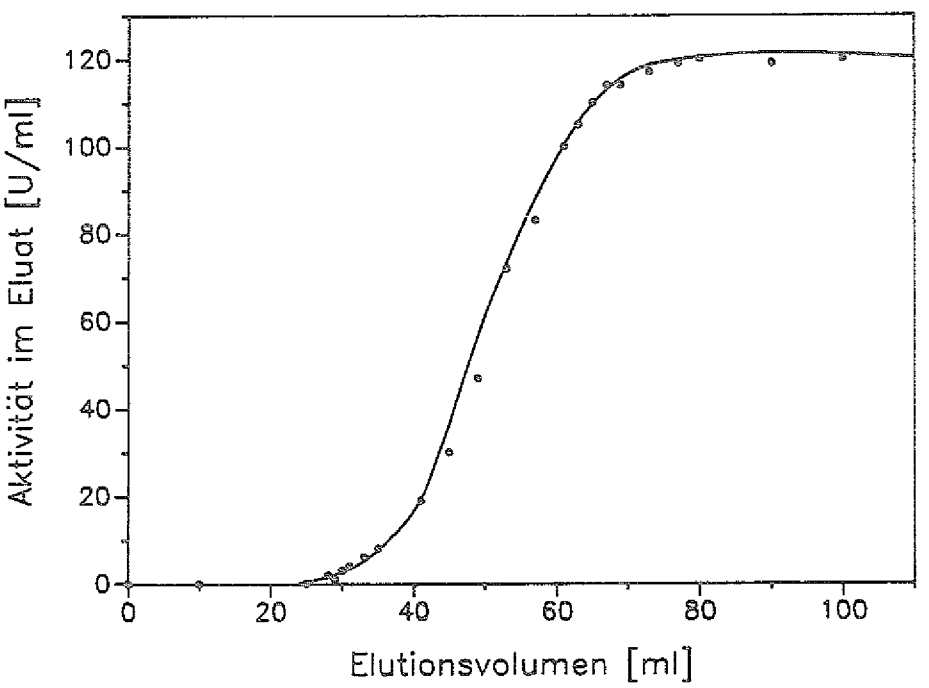


Abb. 6: Durchbruchkurve für die Affinitätschromatographie mit dem Farbstoffgel Procion Yellow HE-4R -Aktivität der Probe 120 U/ml ($V = 12,5$ ml/cm^2*h, Gelbett: 1 * 6,4 cm)

Die Säulenkapazität, vor allem der positiven Säule hängt außerdem in hohem Maße von der spezifischen Aktivität der Probe ab, da die

Farbstoffgele unter den eingestellten Bedingungen auch andere Proteine binden können. Durch Einsatz zweier hintereinandergeschalteter Säulen kann die Spezifität der Bindung jedoch erhöht werden (Clonis und Lowe 1980).

Nach der Bestimmung der Kapazität des Farbstoffgels, wurden die Säulenvolumen so gewählt, daß ein Durchbruch während der Aufarbeitung bei beiden Säulen gerade noch vermieden wurde. Damit wurde gewährleistet, daß eine maximale Anreicherung erreicht und der Enzymverlust bei diesem Reinigungsschritt gering gehalten wird.

Säulendimensionen: Procion green-Säule 11 cm • 5,5 cm
Procion yellow-Säule 5 cm • 20 cm.

Die Chromatographie erfolgte mit einer linearen Flußgeschwindigkeit von 12,5 $ml/cm^2 \cdot h$.

Nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion mußte für die anschließende Feinreinigung der Pyruvatdecarboxylase zunächst eine Entsalzung der Proteinlösung (vgl. 3.4.3) durchgeführt werden, da die Bindung an die Affinitätssäulen nur bei niedriger Ionenstärke erfolgt. Der dabei auftretende Aktivitätsverlust von ca. 5 % der Gesamtaktivität ist auf die Bindung der PDC an die Membran zurückzuführen.
Bei der anschließenden Chromatographie an der grünen Farbstoffsäule wurde ein hoher Anteil des Fremdproteins gebunden (Tab. 6). Die spezifische Aktivität steigt auf 78 U/mg. Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 5,5 (mit 5 %iger Essigsäure) wurde das aufgefangene Eluat auf die gelbe Säule aufgetragen.
Abb. 7 zeigt den Verlauf der Chromatographie an der gelben Säule. Bereits kurz nach Beginn der Probenaufgabe zeigt sich ein Anstieg des Proteingehaltes im Eluat. Aus der Aktivitätsmessung ging jedoch hervor, daß es sich dabei ausschließlich um Fremdprotein handelte und eine Elution der PDC erst nach Änderung von pH-Wert und Ionenstärke eintrat. Dabei eluiert die PDC zunächst in einer Hauptfraktion mit ca. 80 % der Gesamtaktivität, während das restliche Enzym anschließend nur sehr langsam von der Säule gewaschen werden kann. Bei ausreichender Elutionszeit kann das Enzym jedoch verlustfrei von der Säule eluiert werden. Nach der Affinitätschromatographie erreicht man eine spezifische Aktivität von 120 U/mg.

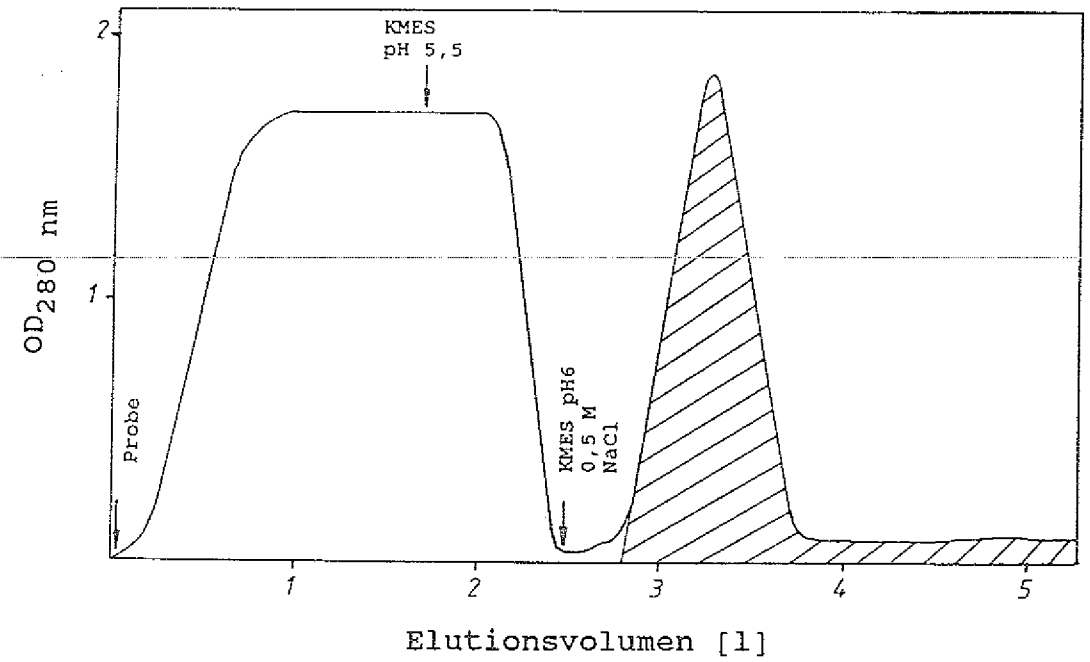


Abb. 7: Affinitätschromatographie an Sepharose CL-4B gekoppelt mit dem Triazinfarbstoff Procion Yellow HE-4R, schraffierte Kurve : Pyruvatdecarboxylaseaktivität

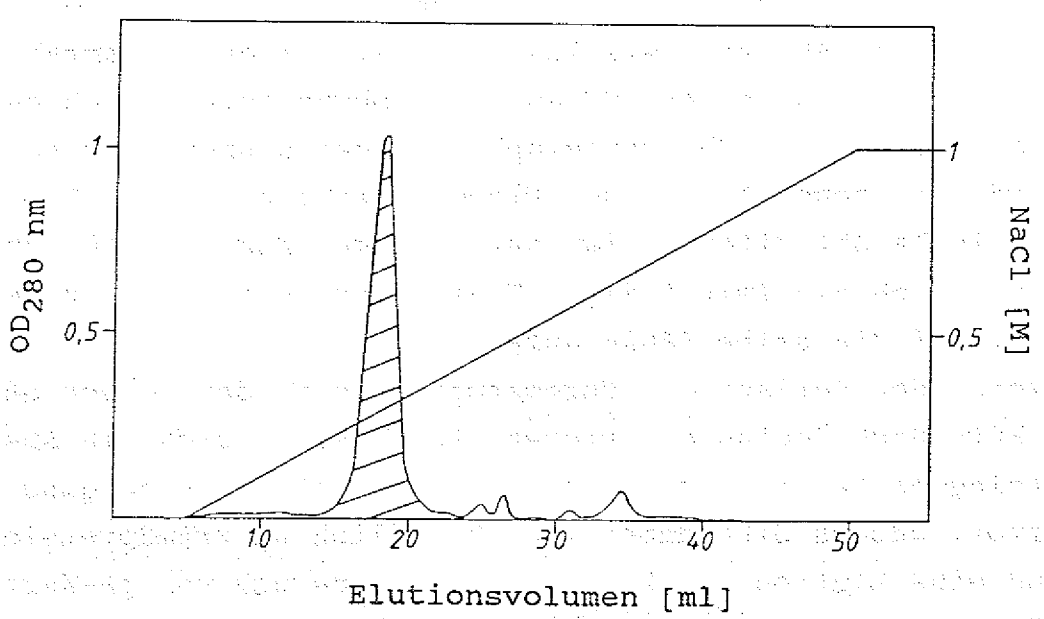


Abb. 8: Anionenaustauschchromatographie auf einer Mono Q-Säule (HR 5/5 FPLC) Laufmittel: HCl-Imidazol-Puffer pH 7, Elution mit 1 M NaCl, Flußgeschwindigkeit 1 ml/min, Probe: 50 µl PDC, 121 U/mg

Die anschließende Trennung über die Mono Q-Säule (Abb. 8) zeigt aber deutlich, daß auch nach diesem Reinigungsschritt noch kein homogenes Enzympräparat vorliegt.

4.1.5 Ionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel sollte die PDC vom restlichen Fremdprotein befreit werden. Nach Entsalzen der Proteinlösung (Volumen 100 ml) wurde diese auf die Säule geladen und mittels $MgCl_2$-Gradienten (0-40 mM) eluiert (Abb.9).

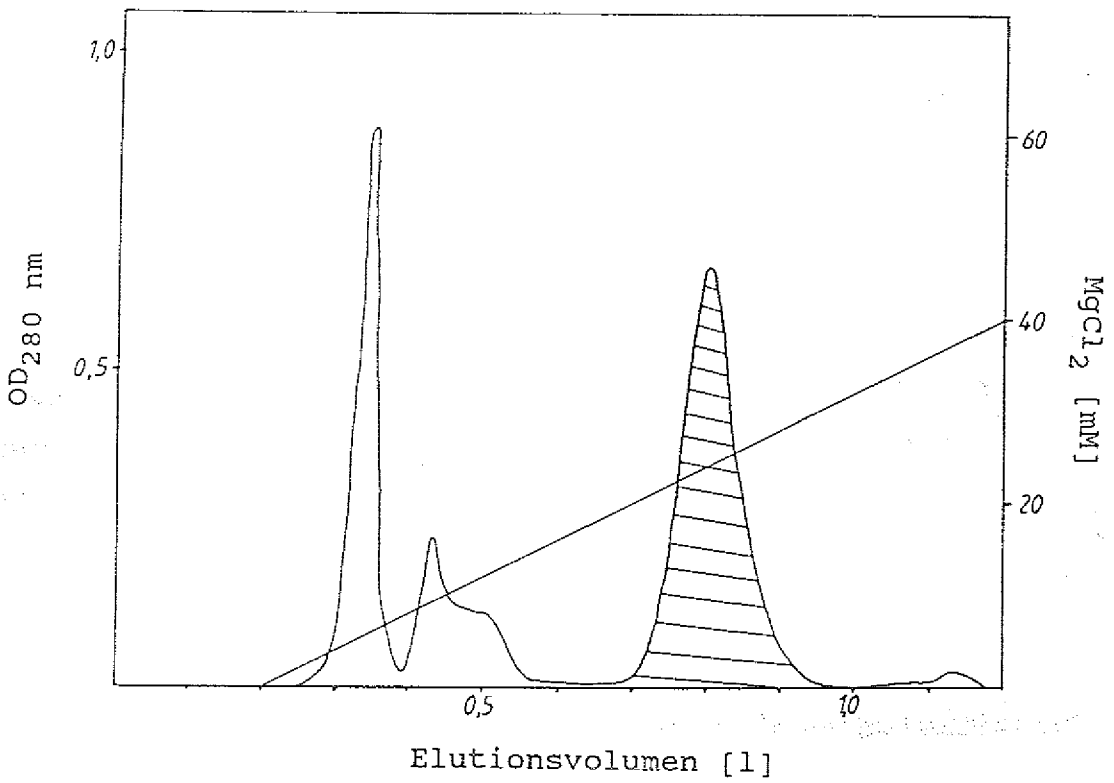


Abb. 9: Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel Laufmittel: HCl-Imidazol-Puffer pH 7, Flußgeschwindigkeit: 50 ml/h, schraffierte Kurve: PDC, Säule: 2,6 * 20 cm,

Die PDC wurde durch ca. 25 mM $MgCl_2$ von der Säule eluiert. Eine erneute Auftrennung über die Mono Q-Säule (Abb. 10) zeigte nunmehr ein homogenes Enzympräparat.

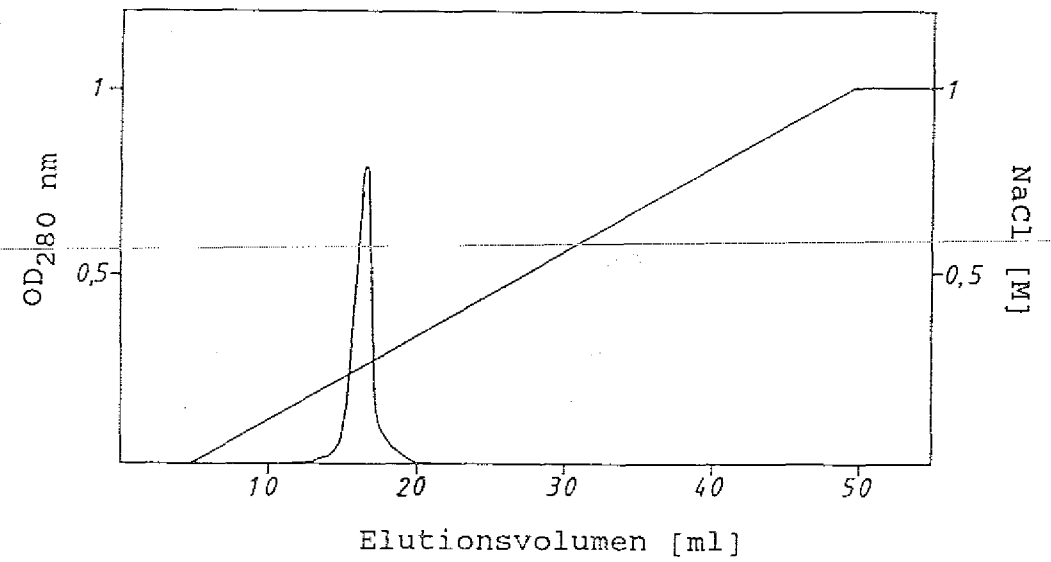


Abb. 10: Anionenaustauschchromatographie auf der Mono Q-Säule (HR 5/5), Flußgeschwindigkeit 1 ml/min, Laufmittel: HCl-Imidazol-Puffer pH 7 (ohne Cofaktoren), Probe: 50 µl gereinigte PDC (Proteingehalt 1,1 mg/ml)

Mit diesem letzten Reinigungsschritt wurde eine weitere Anreicherung erhalten. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms erreicht damit einen Wert von 167 U/mg, der im Vergleich zu den Angaben von Neale et al. (1987a), die eine spezifische Aktivität von 120 U/mg angeben, auf eine höhere Reinheit des Enzympräparates hinweist.

4.1.6 Quantitative Auswertung des Reinigungsprozesses

Die Aufarbeitungsergebnisse für die PDC ausgehend von 400 g Zellmasse sind in Tabelle 6 dargestellt.
Da die gesamte Aufarbeitung mit dem Holoenzym erfolgte, wurden die Cofaktoren Mg^{2+} und TPP in allen verwendeten Puffern zur Stabilisierung des Enzyms zugefügt.
Bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten wurden Ausbeuten von 90 - 100 % erreicht. Man erhält eine Enzymausbeute von ca. 3 mg gereinigter PDC/g Zellmasse (Feuchtgewicht) mit einer spezifischen Aktivität von 167 U/mg.

Tabelle 6: Ergebnisse der Reinigung des Enzyms Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis ATCC 29191 (eingesetzte Biomasse 400 g Feuchtgewicht)

Aufarbeitungsschritt	Proteingehalt [g]	Aktivität [U]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Zellaufschluß	24	218000	9	100	0
Zweiphasensystem I	12	220000	18	100	2
Zweiphasensystem II	7,3	220000	30	100	3,3
Diafiltration	6,5	209000	32	95	3,6
Affinitätschromato-graphie (HE-4BD)	2,7	209000	78	95	8,7
Affinitätschromato-graphie (HE-4R)	1,75	209000	120	95	13,3
Diafiltration	1,67	202000	121	92	13,4
Ionenaustauschchro-matographie	1,2	198000	167	90	18,6

Bei der Übertragung der Aufarbeitung in größere Maßstäbe (2-4 kg Zellmasse) konnten alle einzelnen Aufarbeitungsschritte problemlos für die anfallenden Mengen angepaßt werden. Die Volumina der Farbstoffsäulen wurden entsprechend der Kapazität der Gele vergrößert. Die Flußgeschwindigkeit wurde beibehalten (12,5 $ml/cm^2 \cdot h$).
Auch hier wurden für die PDC aus Zymomonas vergleichbare Enzymausbeuten von ≥ 3 mg gereinigtes Enzym/g Zellmasse erreicht. Bei allen hergestellten Präparaten wurde eine spezifische Aktivität > 160 U/mg erreicht.
Aus Gründen der Kosten- und Zeitersparnis wurden bei den weiteren Aufarbeitungen nach der Affinitätschromatographie an der gelben Farbstoffsäule nur die Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereint und in den weiteren Reinigungsschritten verwendet. Damit wurde das Volumen für die Ultrafiltration (Diafiltration) entsprechend reduziert, wodurch die Dauer des Prozesses erheblich verringert werden konnte.

4.1.7 Lagerung des gereinigten Enzyms

Nachdem das gereinigte Enzympräparat vorlag, mußte eine schonende Methode zur Lagerung der PDC gefunden werden, bei der die Aktivität des Enzyms nicht beeinträchtigt wird.
Die Lagerung der Enzymlösung bei -18°C erwies sich dabei als vollkommen ungeeignet, da das Enzym nach dem Auftauen irreversibel denaturiert war. Der Versuch durch schnelleres Einfrieren mit flüssigem Stickstoff zu besseren Ergebnissen zu gelangen, schlug ebenfalls fehl. Erst nach Zugabe von 50 % Glycerin konnte eine Lagerung bei -18°C über mehrere Monate ohne größeren Aktivitätsverlust erfolgen (Abb. 11).
Der Nachteil dieser Lagerung ist jedoch die Veränderung der Enzymoberfläche durch Glycerin. Diese Veränderung wirkt sich nicht auf die Aktivität des Enzyms aus, schließt jedoch einen Einsatz dieses Präparates für die Kristallisation aus. Bei der Proteinbestimmung mit Bradford-Reagenz (3.2) wurde in Anwesenheit von Glycerin nur noch die Hälfte der vorhandenen Proteinkonzentration angezeigt, während die photometrische Bestimmung nahezu unbeeinflußt blieb.

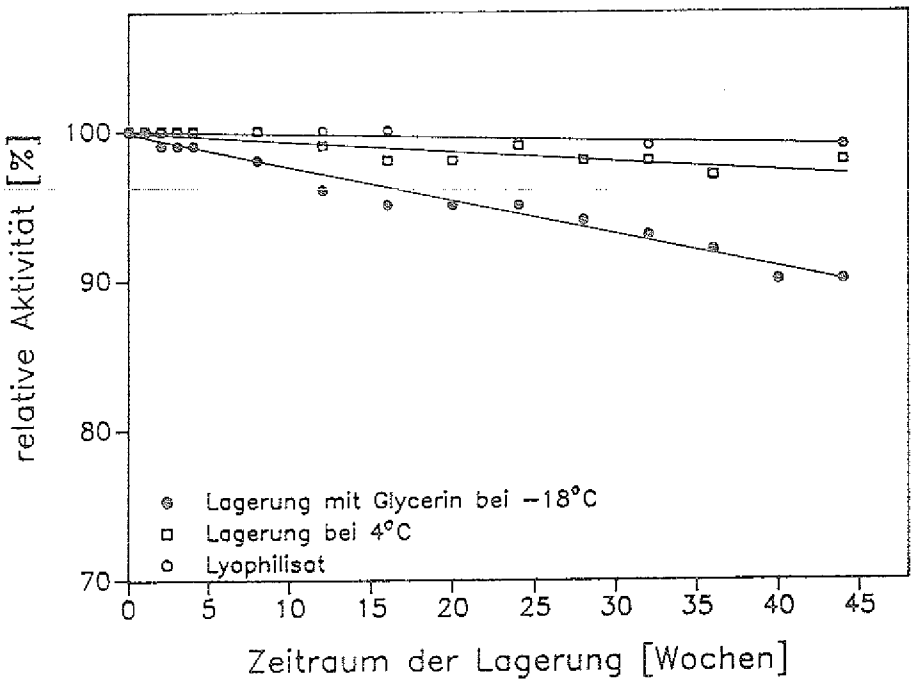


Abb.11: Stabilität der gereinigten Pyruvatdecarboxylase in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerungsbedingungen

Die Lagerung der PDC bei 4°C als Lyophilisat hatte keinen Aktivitätsverlust zu Folge. Nach Lösen der PDC in Citratpuffer pH 6 (die Cofaktoren mußten im Überschuß vorhanden sein, vergl. 4.5.7) konnte die ursprüngliche spezifische Aktivität der PDC gemessen werden. Allerdings war bei der Gefriertrocknung ein hoher Protein- und Aktivitätsverlust (ca. 30 %) zu verzeichnen, der vermutlich auf der Adsorption der PDC an der Glaswand beruht.
Als geeignete Methode erwies sich die Lagerung der PDC bei 4°C nach Sterilfiltration (Abb. 11). Diese wurde mit verschiedenen Filtern, Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Teflon, PTFE (Polytetrafluoroethylen), von Millipore und Sartorius durchgeführt. Die besten Ergebnisse ergab die Sterilfiltration der Pyruvatdecarboxylase mit Celluloseacetat-Filtern, 0,2 µm Porengröße, bei deren Verwendung zwar geringe Proteinverluste, aber keine Inaktivierung des Enzyms, wie sie bei den speziell für die Proteinfiltration angebotenen PTFE-Filtern beobachtet wurde, auftrat. Die Verwendung der anderen Filter führte zu schlechteren Ausbeuten.

4.2 Beurteilung der Reinheit der PDC

Zur Beurteilung der Reinheit des Enzympräparates wurden außer der

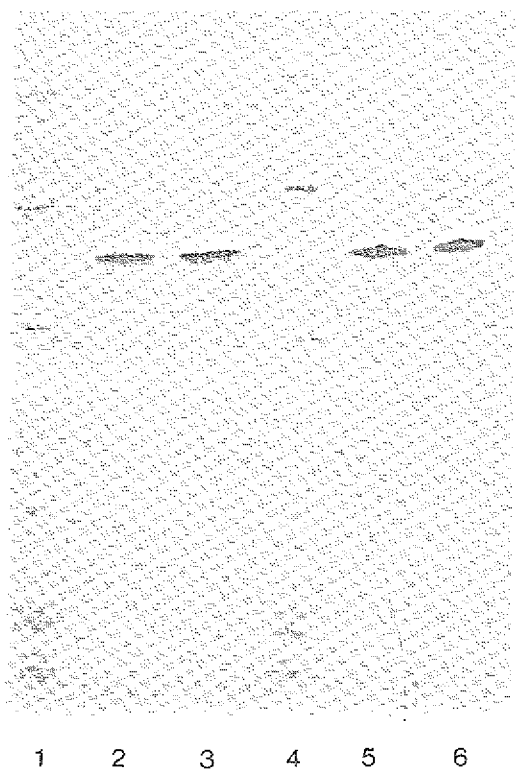
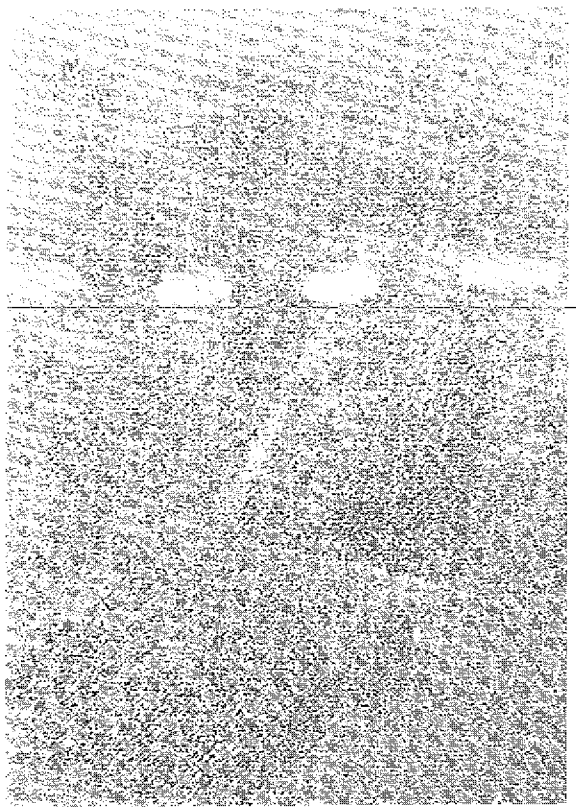


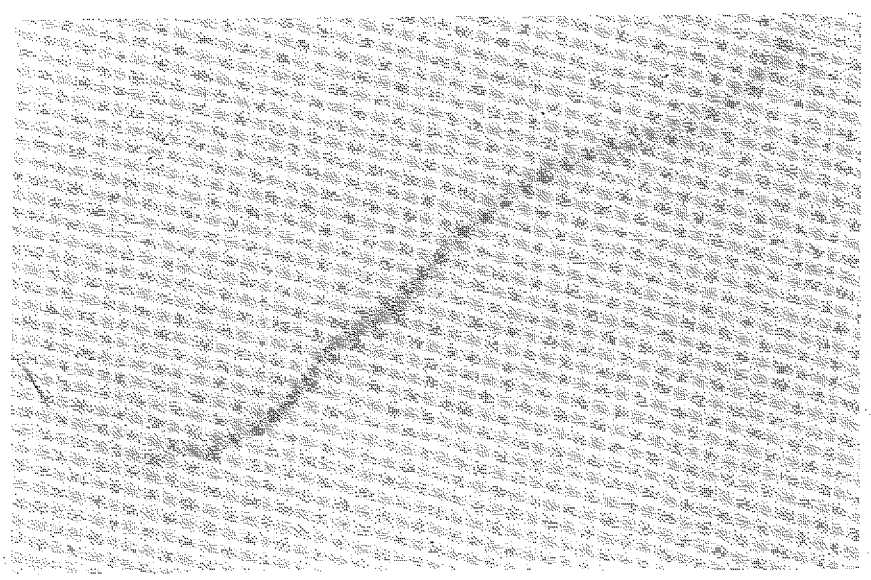
Abb. 12: Isoelektrische Fokussierung mit dem Phast System pH-Gradient pH 3-7, 1+4 IEF-Standard, 2+3 PDC ZM4, 5+6 PDC ZM6

Ionenaustauschchromatographie auf der Mono Q (Abb. 10) noch weitere Methoden angewendet. Dazu gehörte auch die **isoelektrische Fokussierung** im pH-Gradienten pH 3-7. Nach der Aufreinigung der PDC findet man mit Coomassiefärbung (Abb. 12) nur noch eine Proteinbande, die nach der Aktivitätsfärbung mit 1,2-Dianilinoethan (3.6.4.1) als weiße Präzipitationslinie (Abb.13) sichtbar wird.
Die Aufnahme der **Titrationskurve** im pH-Gradient pH 3-7 (Abb. 14) demonstriert ebenfalls die Homogenität des Enzympräparates. Auch hier erhält man, wie für ein homogenes Produkt erwartet wird, eine einzelne durchgehende Kurve, deren Wendepunkt durch den isoelektrischen Punkt der PDC bestimmt wird.



1 2 3 4

Abb. 13: Aktivitätsanfärbung der PDC nach der isoelektrischen Fokussierung im pH-Gradienten pH 3-7, 1+4 PDC (ZM6), 2+3 PDC (ZM4)



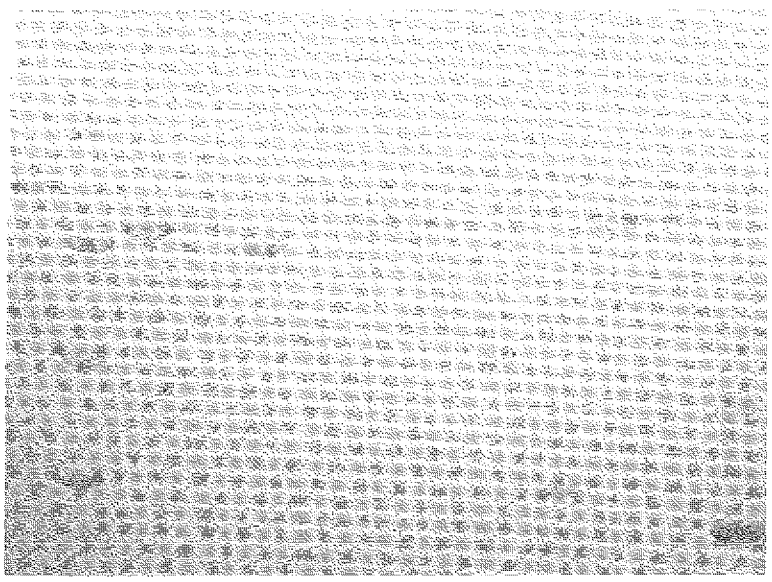
(+)

(-)

pH 3 pH 7

Abb. 14: Titrationskurve der gereinigten Pyruvatdecarboxylase pH-Gradient: pH 3-7

Auch bei der SDS-PAGE in einem homogenen 12,5 %igen Trenngel (Abb. 15) wird nach der Färbung mit Amidoschwarz nur eine Proteinbande sichtbar. Außer dem Beweis für die Homogenität des Enzympräparates erhält man mit diesem Ergebnis auch einen Hinweis auf die Quartärstruktur des Enzyms.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Abb. 15: SDS-PAGE der gereinigten PDC im Vergleich mit verschiedenen Molekulargewichtsmarkern: 1 Rinderserumalbumin, 2 Eichprotein Combithek, 3,4,7,8,11+12 verschiedene PDC-Fraktionen (ZM6), 5 Glutamat-DH, 6 Phosphorylase b, 9 Lactat-DH, 10 Trypsininhibitor, 13 Cytochrom C

Bei der SDS-Elektrophorese werden die Proteinuntereinheiten aufgetrennt. Die Anzahl der Untereinheiten des Enzyms kann aus dem Verhältnis der Molmassen der Untereinheiten zum Molekulargewicht des nativen Proteins berechnet werden (4.4.2).
Für die PDC ergeben sich somit vier Untereinheiten, die zumindest das gleiche Molekulargewicht besitzen, da sonst weitere Proteinbanden aufgetreten wären.
Die Annahme, daß im Fall der Zymomonas-PDC homologe Untereinheiten vorliegen, wird durch das Ergebnis der Aminosäureanalyse (vgl. 4.4.3) gestützt. Den Beweis für eine α_4-Struktur, im Gegensatz zur

$\alpha_2\beta_2$-Struktur von Hefe- und Weizenkeim-PDC (Kuo et al. 1986; Zehender und Ullrich 1984; Zehender et al. 1987), liefert letztlich die Sequenzanalyse (vgl.4.5.6).

4.3 Kristallisation der PDC

Für die Reinheit des Enzympräparates spricht auch die Kristallisierbarkeit des Enzyms.
Bei den Versuchsansätzen mit der "hanging drop"-Methode (Dr. Hecht und Dr. Hofmann, Institut für Makromolekulare Strukturforschung, GBF Braunschweig) traten zunächst jedoch immer zwei unterschiedliche Kristallformen auf, kleine nadelförmige Kristalle, sowie kleinere räumliche Kristalle, die für eine Röntgenstrukturanalyse unbrauchbar waren. Das Auftreten dieser beiden Kristallformen wurde nach den bisherigen Ergebnissen durch die beiden Cofaktoren Mg^{2+} und TPP beeinflußt.
Erst durch Zugabe von $CaCl_2$ zum Kristallisationsansatz konnten größere, für die Röntgentrukturanalyse geeignete Kristalle gezüchtet werden (Abb. 16).

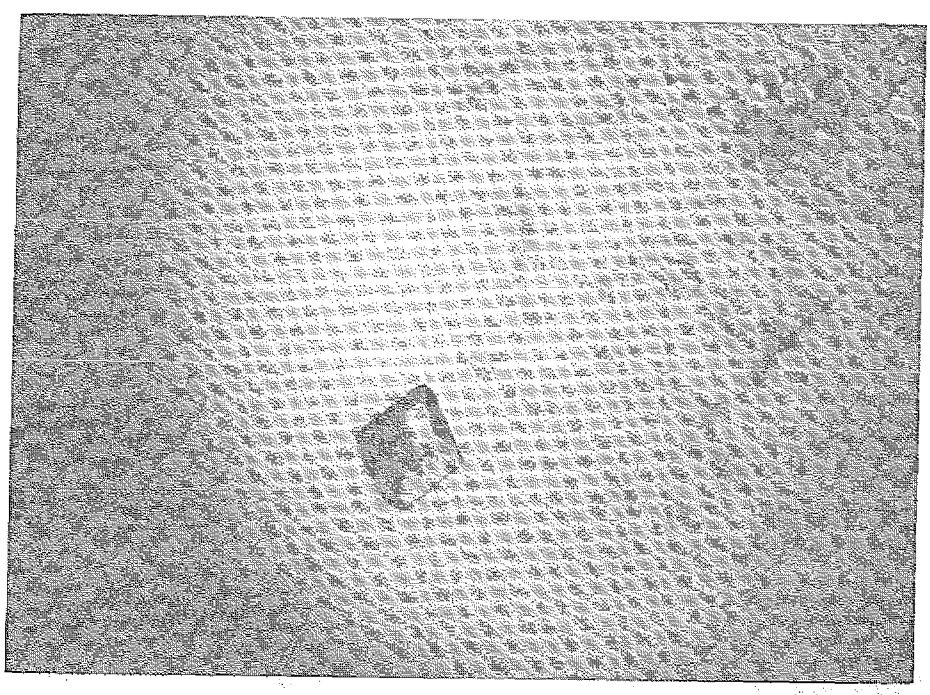


Abb. 16: Kristalle der PDC bei 64-facher Vergrößerung, Durchmesser der Kristalle ca. 0,2 mm, Kristallisationsbedingungen: 1,8 M Ammoniumsulfat in 50 mM Imidazolpuffer pH 8, 5 mM $CaCl_2$

Das Alter des Enzympräparates spielt offensichtlich bei der Kristallisation ebenfalls eine große Rolle. Bei einem mehrere Monate alten Enzympräparat kann keine Kristallbildung mehr beobachtet werden. Dafür findet man bei der Trennung über SDS-PAGE zwei Enzymbanden, von denen die eine ein geringfügig niedrigeres Molekulargewicht aufweist. Diese Bande liegt in sehr geringerer Konzentration vor und unterscheidet sich von der ursprünglichen PDC-Bande nicht bezüglich der Anfangssequenz.
Die Versuche zur Kristallisation, sowie die Röntgenstrukturanalyse, werden in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Abteilung Molekulare Strukturforschung weitergeführt.

4.4 Proteinchemische Charakterisierung der PDC

Im Anschluß an die Reinigung der PDC erfolgte zunächst eine Überprüfung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes.

4.4.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt eines Proteins bezeichnet den pH-Wert, bei dem die Gesamtladung des Proteins, und damit die Beweglichkeit in einem elektrischen Feld, Null ist.
Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde wegen der Schnelligkeit und Einfachheit der Methode (Andrews 1986) mit der isoelektrischen Fokussierung in der Flachbettelektrophorese (3.6.2) mit einem pH-Gradienten von pH 3-7 durchgeführt. Als IEF-Standard wurde das pI Calibration Kit von Pharmacia verwendet.

Tabelle 7: Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) der PDC

Protein	R_f-Wert	pI
Amyloglucosidase	0,88	3,50
Trypsininhibitor (Sojabohnen)	0,70	4,55
ß-Lactoglobulin A	0,51	5,20
Carbonsäureanhydrase B (Rind)	0,24	5,85
Carbonsäureanhydrase B (Mensch)	0,09	6,55
Pyruvatdecarboxylase	0,64	4,8

In Abb. 17 sind die R_f-Werte gegen die isoelektrischen Punkte aufgetragen. Für die Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis erhält man aus dieser Auftragung einen pI von 4,8, der mit dem Literaturwert von 4,87 (Bringer-Meyer et al. 1986) übereinstimmt.

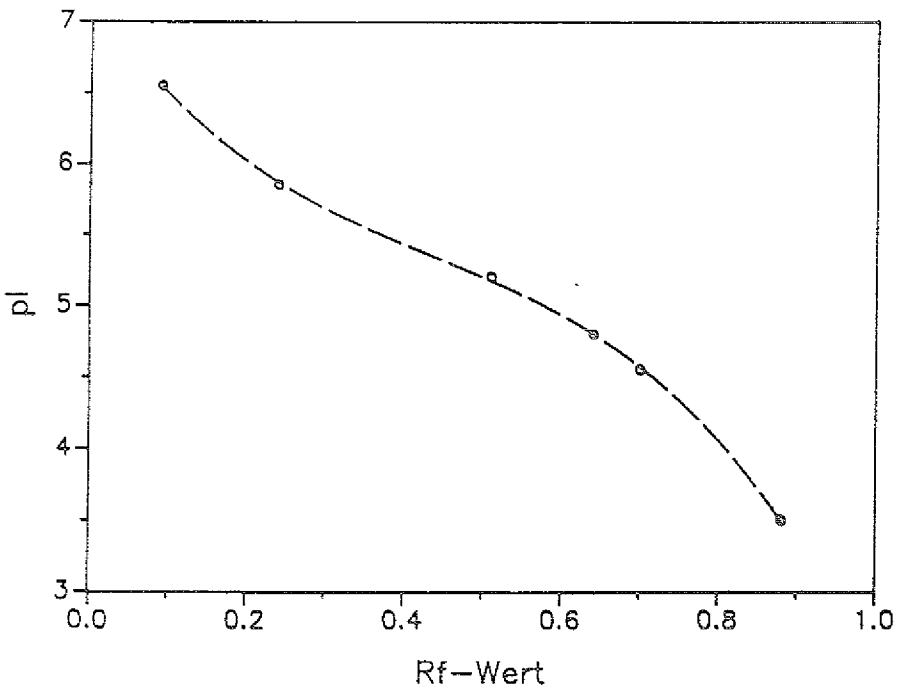


Abb. 17: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der PDC durch IEF im pH-Gradienten pH 3-7
Regressionsgleichung:
$Y = 7{,}16 - 7{,}88\ X + 12{,}8\ X^2 - 9{,}75\ X^3$

4.4.2 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Pyruvatdecarboxylase wurde mit zwei verschiedenen Methoden, der Gelfiltration und der SDS-PAGE, bestimmt. Für den Einsatz der Gelfiltration (3.5.1) zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der PDC erfolgte zunächst die Kalibrierung der Säule mit den Standardproteinen Aldolase-Dimer (316000), Aldolase (158000), R-Oxinitrilase (72000), Carboxyanhydrase B (29000), Pferde-Myoglobin (17800), Wal-Myoglobin (17000) und Cytochrom C (12300). Die Verteilungskoeffizienten (K_{av}) der Proteine verhalten sich bei der Gelfiltration proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes (Abb. 18).

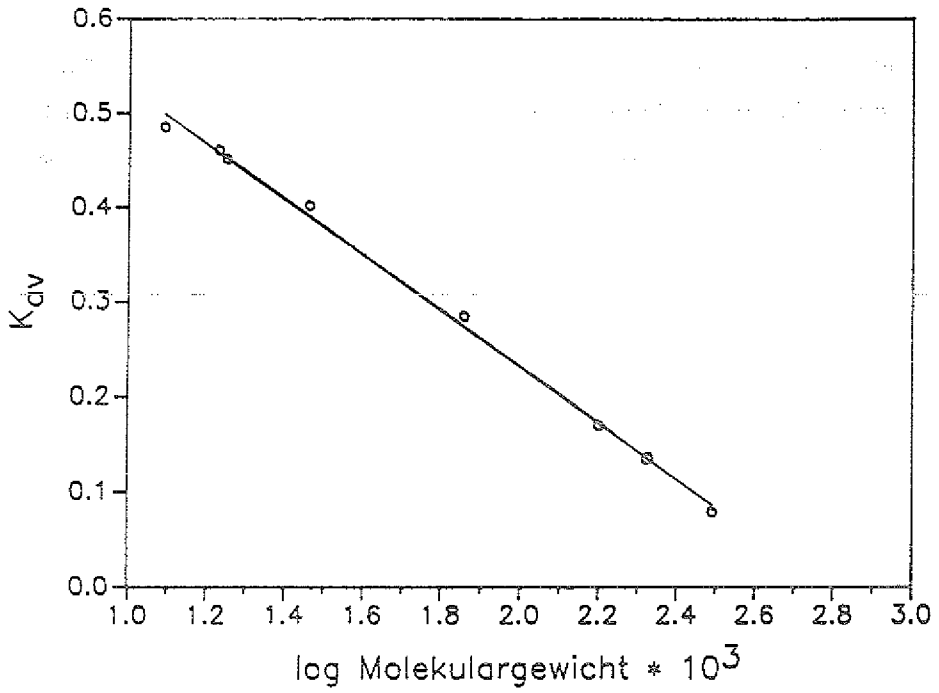


Abb. 18: Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen PDC mittels Gelfiltration an Sephacryl S-200 HR, Regressionsgleichung: Y= 0,821 - 0,295* X, Korrelation -0,998

Die Berechnung von K_{av} erfolgt nach der Gleichung (Pharmacia):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

(V_e = Elutionsvolumen, V_0 = Ausschlußvolumen, V_t = Säulenvolumen)

Das Ausschlußvolumen der Säule (49 ml) wurde mit Dextranblau bestimmt.
Aus der Eichkurve ergibt sich für die native PDC ein Molekulargewicht von 209 +/- 10 kD (K_{av} = 0,138). Der Vergleich mit dem von Bringer-Meyer et al. (1986) an Sephadex G 200 ermittelten Wert von 200 +/- 10 kD zeigt auch hier wieder gute Übereinstimmung.
Dagegen fanden Neale et al. (1987a) mittels Chromatographie an Sephacryl S 200 ein Molekulargewicht von 240 kD +/- 5 kD.

Die Ermittlung des Molekulargewichtes in der SDS-PAGE erfolgt

unter denaturierenden Bedingungen. Vorteil dieser Methode ist, daß durch die Denaturierung die proteineigene Struktur verloren geht und die Eigenladung der Proteine durch SDS überdeckt wird. Somit hängt die Trennung der Proteine nur noch von ihrem Molekulargewicht ab.

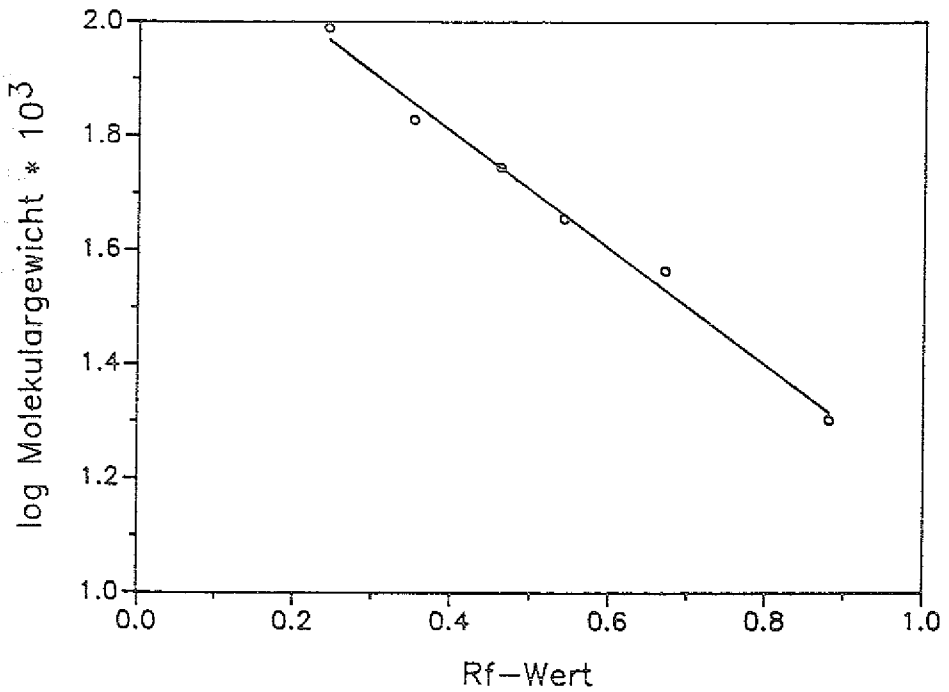


Abb. 19: Molekulargewichtsbestimmung mit SDS–PAGE
Regressionsgleichung: Y= 2,22 – 1,03 * X
Korrelation –0,995

Trägt man den Logarithmus des Molekulargewichtes gegen die R_f-Werte der Proteine auf (Abb.19), so stellt man fest, daß diese sich umgekehrt proportional zum Molekulargewicht verhalten. Mit Hilfe einer Eichkurve ist es möglich das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen. Der Fehler der Methode liegt zwischen 5 und 10% (Weber und Osborn 1969).
Bei der Molekulargewichtsbestimmung im homogenen SDS-Gel (Abb. 19) erhält man für die PDC-Untereinheiten (R_f-Wert 0,41) ein Molekulargewicht von 59000 +/- 3000 Dalton (59000+/-1000 D bei Neale et al. 1987a, 56500+/-4000 D bei Bringer-Meyer et al. 1986).
Ein Vergleich der Molekulargewichte aus der SDS-PAGE mit dem Molekulargewicht der nativen PDC zeigt einen ca. 4-fach höheren Wert für das native Enzym, der auf vier Untereinheiten pro Enzymmolekül schließen läßt.

Der relativ niedrige Wert bei der Gelfiltration ist vermutlich durch eine Abweichung der Proteinstruktur von der idealen Kugelform (Stoke'scher Radius) zu erklären.

4.4.3 Ergebnis der Aminosäureanalyse

Die Aminosäurezusammensetzung der PDC konnte für die meisten Aminosäuren durch saure Totalhydrolyse mit anschließender Aminosäureanalyse ermittelt werden (Moore und Stein 1963). Für die Aminosäuren Tryptophan und Cystein mußte auf andere Methoden (vgl. 4.4.3.1 und 4.4.3.2) ausgewichen werden, da diese bei der sauren Hydrolyse zerstört, oder wie im Fall von Cystein partiell zur Cysteinsäure oxidiert werden (Darbre 1986). Auch die Aminosäuren Threonin und Serin werden unter den Bedingungen bereits teilweise zerstört (Serin bis zu 10 % und Threonin ca 5 % innerhalb 24 h).

Tabelle 8: Aminosäurezusammensetzung der PDC aus Zymomonas mobilis Ergebnisse der sauren Totalhydrolyse im Vergleich mit den aus der Gensequenz (Neale et al. 1987b) und der Proteinsequenz errechneten Konzentrationen

Aminosäure	DNA-Sequenz (Neale)	DNA-Sequenz (Reynen)	Protein-sequenz	Totalhydrolyse 24 h	48 h	72 h
Ala	85	85	86	85	85	86
Arg	17	18	17	19	20	19
Asx	58	58	59	59	60	60
Cys	7	7	7			7*
Glx	49	47	49	48	48	49
Gly	46	44	45	46	45	45
His	12	13	11	13	12	11
Ile	28	28	28	22	24	24
Leu	50	49	50	48	48	49
Lys	36	37	36	35	36	36
Met	11	11	11	14	11	11
Phe	18	18	18	17	19	18
Pro	27	27	26	23	25	26
Ser	24	25	24	25	24	24
Thr	27	27	28	27	26	27
Trp	7	7	7			7*1
Tyr	21	22	21	22	18	20
Val	44	44	44	39	42	42

* der Cysteingehalt wurde mit Ellman-Reagenz bestimmt

*1 photometrische Bestimmung des Tryptophangehaltes

Andere Aminosäuren werden innerhalb von 24 h nur unvollständig hydrolysiert, da Peptidbindungen, an denen die Carboxylgruppe von Aminosäuren mit sperrigen Seitengruppen beteiligt ist (Valin und Isoleucin), langsamer gespalten werden. Dieser Umstand erfordert eine Verlängerung der Hydrolysedauer auf 48 und 72 h.
Die automatisierte Analyse erfolgte mit der Ninhydrin-Methode, die darauf beruht, daß α-Aminosäuren bei Erhitzen mit jeweils zwei Molekülen Ninhydrin ein intensiv rot gefärbtes Produkt (Ruhmann's Purpur) bilden. Aminosäuren mit substituierter α-Aminogruppe (Prolin und Hydroxyprolin) bilden ein gelb gefärbtes Derivat (Hirs 1967).
Das Ergebnis der Aminosäureanalyse ist in Tabelle 8 dargestellt. Die ermittelten Werte wurden mit den aus den Gensequenzen (Neale et al. 1987b; Reynen 1988) errechneten Werten und der Aminosäurezusammensetzung nach der in dieser Arbeit ermittelten Proteinsequenz verglichen. Dabei zeigen sich Abweichungen der Konzentrationen einiger Aminosäuren, die insbesondere auf die unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit zurückzuführen sind (Ile, Val). Der relative Fehler der eingesetzten Methode liegt bei ca. 3 %.
Die relativ hohe Abweichung beim Arginin kann nur mit einer Störung in der Basislinie erklärt werden.

4.4.3.1 Berechnung des Tryptophangehaltes

Für die Bestimmung des Tryptophangehaltes nach Edelhoch (1967) wurde die Absorption des denaturierten Proteins bei 280 und 288 nm gemessen.
Tryptophan absorbiert bei diesen Wellenlängen aufgrund seines Indolringes. Außer Tryptophan absorbiert aber auch das Tyrosin, dessen Anteil bei der Berechnung des Tryptophangehaltes berücksichtigt werden muß.
Zur Kontrolle wurde die Methode zunächst am Lysozym angewendet. Die Molarität der Probe errechnete sich aus dem Proteingehalt. Bei der PDC wurde ein Molekulargewicht von 240000 (Neale et al. 1987b) für die Berechnung zugrunde gelegt.
Die Extinktion bei den beiden Wellenlängen ergibt sich aus der Anzahl der einzelnen Aminosäure (N_{Trp}, M_{Tyr}) multipliziert mit dem jeweiligen Extinktionkoeffizienten (ϵ). Diese wurden von Edelhoch

(1967) mit Modellsubstanzen aufgenommen.

Tabelle 9: Meßergebnisse für die Tryptophanbestimmung

Probe	Proteingehalt	E_{288}	E_{280}
Lysozym	2,38 µM	0,067	0,083
Holo-PDC	0,69 µM	0,118	0,199
Apo-PDC	0,57 µM	0,097	0,159

Für die Berechnung der Tryptophankonzentration ergeben sich somit folgende Gleichungen:

$$E_{288} = N_{Trp}\ 4815 + M_{Tyr}\ 385 \qquad (1)$$

$$E_{280} = N_{Trp}\ 5690 + M_{Tyr}\ 1280 \qquad (2)$$

Nach Umformung erhält man

$$N_{Trp} = \frac{E_{288}}{3103} - \frac{E_{280}}{10318} \qquad (3)$$

Setzt man die gemessenen Werte in Gleichung 3 ein, so ergibt sich für Lysozym ein Tryptophangehalt von $1{,}35 \cdot 10^{-5}$ mol, der mit Hilfe der eingesetzten Molarität umgerechnet werden kann.

$$N_{Trp} = \frac{0{,}067}{3103} - \frac{0{,}083}{10318} = 2{,}16 \cdot 10^{-5} - 8{,}04 \cdot 10^{-6}$$

$$= 1{,}35 \cdot 10^{-5}\ \text{mol}$$

eingesetzte Lysozymmenge = 2,38 µmol

$$N_{Trp}/\text{mol Lysozym} = \frac{1{,}35 \cdot 10^{-5}}{2{,}38 \cdot 10^{-6}} = 5{,}7\ \text{Trp/mol Lysozym}$$

Der für das Lysozym errechnete Wert von 5,7 Trp/mol Lysozym stimmt gut mit dem Literaturwert von 6 Trp/mol Lysozym (Zehender 1984) überein.

Für die Pyruvatdecarboxylase ergeben sich aus den Meßergebnissen

Werte von 27,2 Trp/mol Holo-PDC und 27,8 Trp/mol Apo-PDC.
Da die PDC aus 4 identischen Untereinheiten aufgebaut ist, liegt der wahrscheinlichere Wert für den Tryptophangehalt bei der nächsten durch 4 teilbaren Zahl, d.h. bei 28 Trp/mol PDC und entsprechend 7 Tryptophan pro Untereinheit.

4.4.3.2 Bestimmung des Cysteingehaltes mit Ellman-Reagenz

Die Cysteinbestimmung für die PDC wurde mittels Ellman-Reagenz (Ellmann 1959) durchgeführt. Sowohl reduziertes als auch unbehandeltes Enzym wurden mit DTNB versetzt. Bei der Reaktion entsteht das gelb gefärbte 2-Nitro-5-Thiobenzoat, das bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch bestimmt werden kann.
Die Cysteinkonzentration errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Der molare Extinktionskoeffizient ist ϵ = 13600 $mol^{-1} * cm^{-1}$ (Means und Feeny, 1971).

$$C = \frac{E}{\epsilon \circ d} \quad mol$$

Die Reaktion war nach 10 minütiger Inkubationszeit beendet. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das reduzierte Enzym eine Extinktion von 0,462, das unbehandelte Enzym von 0,464. Daraus errechneten sich folgende Cysteinkonzentrationen:

$$C = \frac{0,464}{13600} = 3,4 \circ 10^{-5} \text{ mol Cystein im Test}$$

Umgerechnet auf 1 mol PDC ergibt sich daraus für das nicht reduzierte Enzym (1,63 µM) ein Wert von

$$\frac{3,4 \circ 10^{-5}}{1,63 \circ 10^{-6}} = 20,8 \text{ mol Cystein/mol PDC,}$$

das entspricht 5 Cysteinmolekülen pro Untereinheit.

Nach gleicher Rechnung erhält man für das reduzierte Enzym (1,18 µM) einen Cysteingehalt von

$$C = \frac{0,462}{13600} = 3,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol Cystein im Test}$$

$$\frac{3,4 \cdot 10^{-5}}{1,18 \cdot 10^{-6}} = 28,8 \text{ mol Cystein/mol PDC,}$$

entsprechend 7 Cysteine/Untereinheit.

Die Berechnung der Cysteine erfolgte, wie bereits beim Tryptophan beschrieben, unter der Annahme homologer Untereinheiten. Die Differenz von 2 Cysteinen/Untereinheit zwischen dem reduzierten und nativem Enzym läßt den Schluß zu, daß pro Untereinheit eine Disulfidbrücke vorhanden ist.

4.4.4 C-terminalen Sequenz der PDC

Zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuresequenz wurde das Enzym Carboxypeptidase Y (Hayashi 1976) eingesetzt.
Die Carboxypeptidase Y aus Hefe ist ein unspezifisches Enzym, das die meisten Aminosäuren, eingeschlossen Prolin, bei pH 5,5-6,5 vom C-terminalen Ende eines Proteins abspalten kann.
Bei aromatischen und aliphatischen Resten erfolgt die Spaltung sehr schnell, während der K_M-Wert von Arginin, Lysin und Histidin um ein Vielfaches höher liegt, d. h. die Spaltung wesentlich langsamer erfolgt.
Ein wichtiger Vorteil der Carboxypeptidase Y ist ihre Aktivität in Gegenwart von 6 M Harnstoff (Hayashi et al. 1973). Diese Tatsache ermöglicht es, auch bei verborgenen C-Termini die Sequenz nach Auffalten des Proteins zu bestimmen.

Bei der PDC erfolgte der Spaltungsansatz ohne denaturierendes Reagenz (3.11). Nach der bekannten Gensequenz des Enzyms wurde folgende Endsequenz erwartet: -Val-Asn-Lys-Leu-Leu

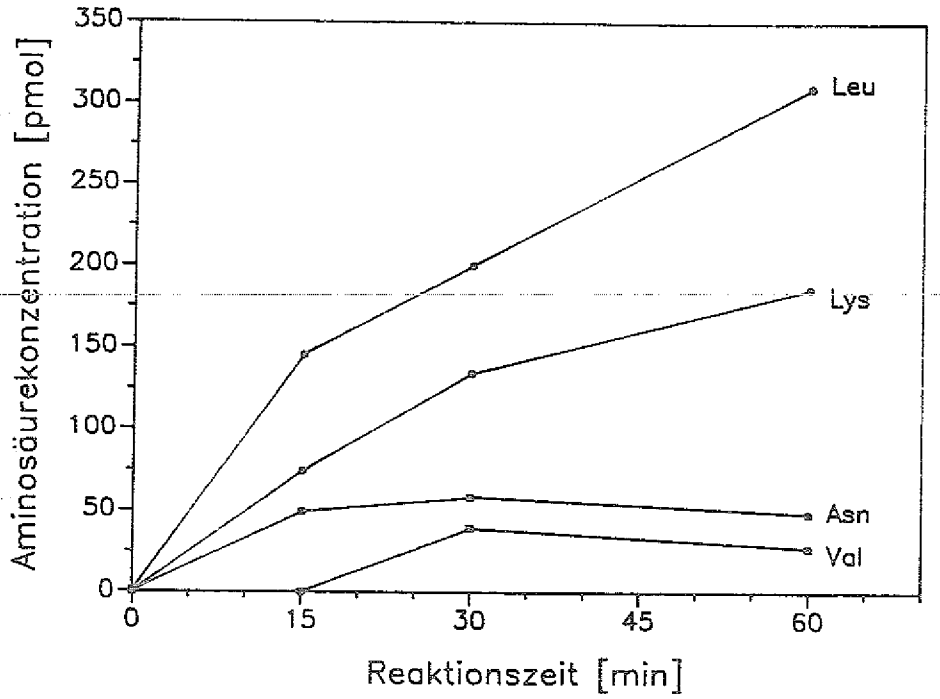


Abb. 20: Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren mit Carboxypeptidase Y

Aus dem Ergebnis der C-terminalen Aminosäureanalyse (Abb.20) konnte die Sequenz -Val-Asn-Lys-Leu-Leu abgeleitet werden. Die Identifizierung des zweiten Leucinrestes mit der enzymatischen Bestimmung des C-Terminus ist unsicher, da bei dieser Methode nur die Freisetzungsraten der einzelnen Aminosäuren verglichen werden können. Da Lysin langsamer gespalten wird und das Verhältnis Leu:Lys ungefähr 2:1 beträgt, spricht jedoch nichts gegen diese Interpretation.
Die Sequenz des C-Terminus konnte außerdem durch das Ergebnis der Sequenzanalyse von Peptid "V8-6" (4.5.6) bestätigt werden.

4.4.5 N-terminalen Sequenz der PDC

Für die automatisierte Sequenzierung mittels Edman-Abbau ist bei verschiedenen Methoden eine Immobilisierung der Probe erforderlich, um den Verlust der Probe bei Wasch- und Extraktionsschritten möglichst gering zu halten. Dieser bestimmt weitgehend die minimal erforderliche Probemenge für eine erfolgreiche Sequenzanalyse.

Während die Probenmengen bei der Flüssigfilmsequenzierung noch bei ca. 25 µmol Protein lagen (Edman und Begg 1967), konnten diese durch Neuentwicklungen drastisch reduziert werden. Für die Analyse mittels Gasphasensequenator sind beispielsweise nur noch Mengen von wenigen pmol erforderlich.
Die Erhöhung der Reaktionsrate und die Abnahme der Reaktionsdauer beim Pulsed-Liquid Sequenator im Vergleich zum Gasphasensequenator sind eine Folge der kurzen Flüssigkeitsimpulse, die gerade soviel Reagenz transportieren, daß das Probenfilter benetzt wird. Die Probe muß bei diesem Verfahren im Gegensatz zum Gasphasensequenator nicht mehr kovalent gebunden sein, da kein konstanter Reagenzienstrom fließt, der eine schnelle Auswaschung der Probe bewirkt. Unmittelbar nach der Reaktion werden die flüchtigen Reagenzien durch Begasung mit Argon entfernt.

Die Sequenzanalyse von 30 µl gereinigter Proteinlösung (120 pmol) ermöglichte die Auswertung der ersten 45 Aminosäuren der PDC-Sequenz wie folgt:

Ser-Tyr-Thr-Val-Gly-Thr-Tyr-Leu-Ala-Glu-Arg-Leu-Val-Gln-Ile-Gly-
Leu-Lys-His-His-Phe-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Tyr-Asn-Leu-Val-Leu-Leu-
Asp-Asn-Leu-Leu-Leu-Asn-Lys-Asn-Met-Glu-Gln-Val-Tyr-

Die steigende Hintergrundaktivität und das langsame Auswaschen des Peptids führten dazu, daß ab dem 45. Zyklus eine eindeutige Auswertung nicht mehr möglich war. Die Sequenzanalyse wurde abgebrochen.

4.5 Primärstruktur der PDC

Die Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis setzt sich aus 4 identischen Untereinheiten mit einem aus der Gensequenz kalkulierten Molekulargewicht von jeweils 60746 Dalton zusammen. Da jede Untereinheit aus 567 Aminosäuren besteht, wird eine Fragmentierung durch die begrenzte Cyclenzahl bei der automatischen Sequenzanalyse unumgänglich.

Für die Fragmentierung wurden mehrere enzymatische und chemische Methoden verwendet und die Peptide anschließend über HPLC oder

mittels elektrophoretischer Verfahren aufgetrennt. Mit Hilfe der verschiedenen Spaltungen erhält man überlappende Sequenzen, die die Reihenfolge der Peptide, und damit die Primärstruktur des Enzyms aufzeigen.

4.5.1 Ameisensäurespaltung

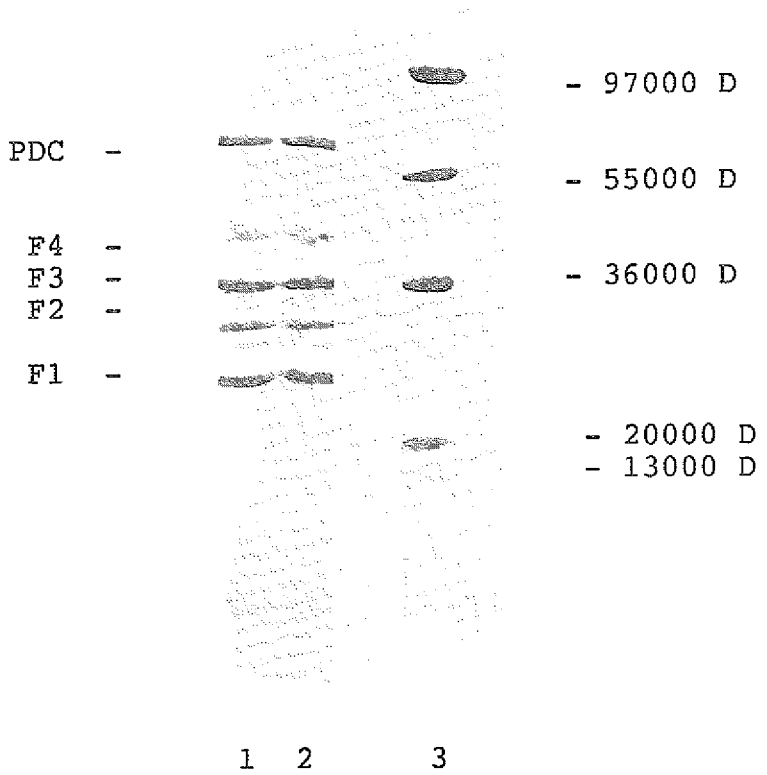


Abb. 21: Immobilonmembran - Peptide einer Ameisensäurespaltung nach Trennung mit SDS-PAGE in 12.5 % igem Trenngel und anschließendem elektrischen Transfer, Färbung mit Amidoschwarz, 1+2 Peptide der PDC, 3 Molekulargewichtstandard (F1-F4: sequenzierte Peptide)

Die Spaltung mit Ameisensäure ist eine relativ milde Methode mit der lediglich säurelabile Bindungen wie die Asp-Pro Bindung gespalten werden können. Nach der Gensequenz der PDC (Neale et al. 1987b) werden zwei solcher Spaltstellen erwartet.
Die PDC wurde mit Ameisensäure inkubiert und die Spaltprodukte anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgte ein 45- minütiger elektrischer Transfer auf eine PVDF-Membran. Nach der Färbung mit Amidoschwarz erhält man 5 Hauptbanden (die PDC-

Bande und 4 Spaltprodukte F1-F4), was auf eine unvollständige Spaltung des Enzyms schließen läßt (Abb. 21). Nach dem Trocknen der Membran wurden die Peptide für die Sequenzanalyse ausgeschnitten.

4.5.2 Bromcyanspaltung

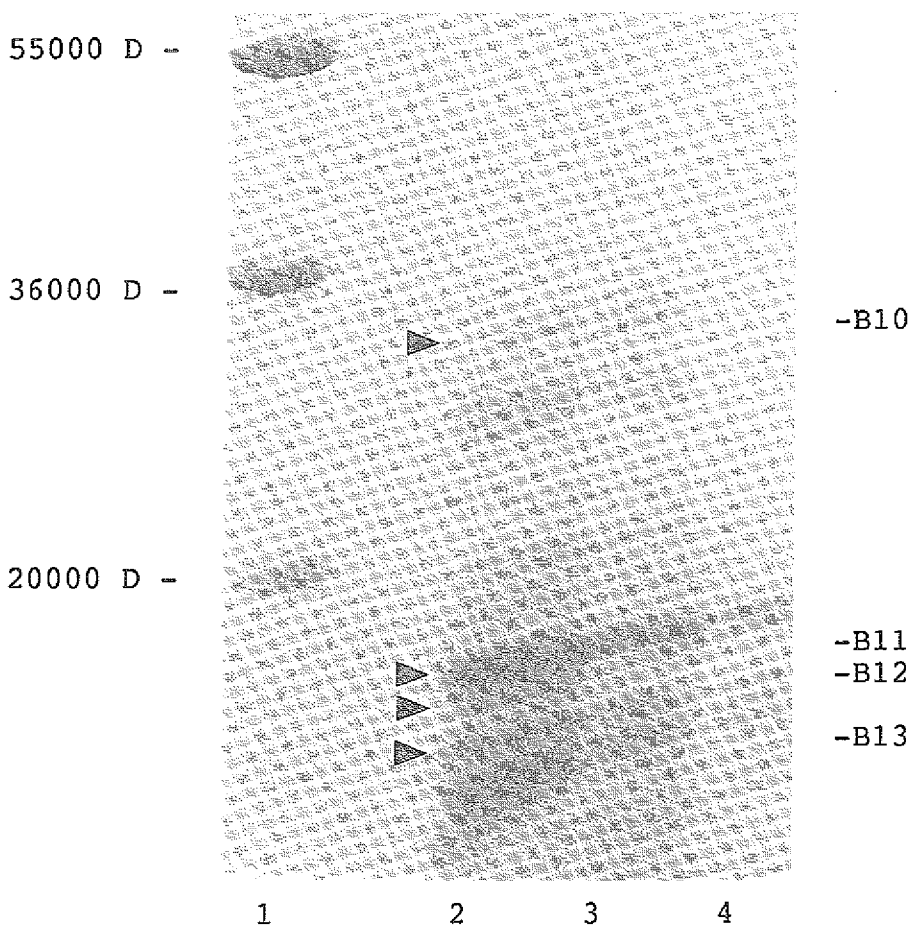


Abb. 22: SDS-Page einer Probe nach Spaltung mit Bromcyan in 15 %igem Trenngel nach Färbung mit Amidoschwarz, 1 Molekulargewichtstandard, 2,3+4 Probe in verschiedenen Konzentrationen (B10-13: sequenzierte Peptide)

Die chemische Spaltung hinter Methionin unter Einwirkung von Bromcyan ist eine spezifische Spaltung mit wenigen Nebenreaktionen. Bromcyan reagiert unter milden Bedingungen mit dem Schwefelatom der Methioninseitengruppe zum Iminolactonbromid unter Freisetzung von Methylthiocyanat. Bei der anschließenden Hydrolyse des Imino-

lactonbromids entsteht das Peptidylhomoserinlacton und C-terminal ein Peptid mit freier Aminogruppe (Means und Feeny, 1971). Außer mit Methionin reagiert Cyanbromid auch mit Cystein. Diese Reaktion wurde durch vorhergehende Carboxymethylierung verhindert. Für die Trennung der Peptide wurden die Proben nach der Lyophilisation in 0,5 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und HPLC getrennt. Die Abbildungen 22+23 zeigen die Ergebnisse der beiden Trennverfahren.

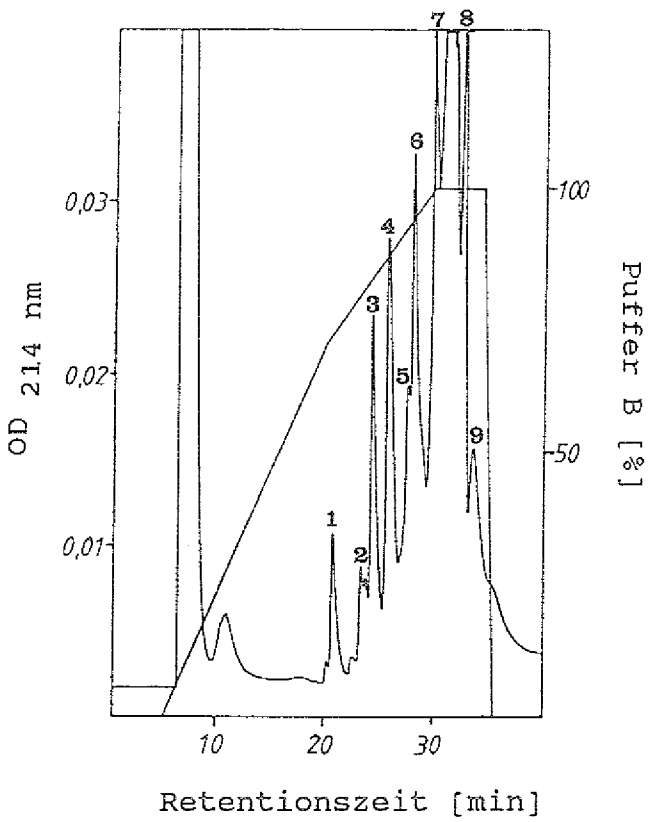


Abb. 23: Reversed-Phase Chromatographie einer Probe nach Spaltung mit Bromcyan, die Elution erfolgte mit einem Gradientenprogramm, Puffer A: 0,1 % TFA, Puffer B: 70 % Acetonitril in 0,1 % TFA, Säule: Shandon-WP-300-Butyl (C4) (B1-B9: sequenzierte Peptide)

Die 11 Methionine in der Pyruvatdecarboxylase-Untereinheit führen zu einer Reihe kurzkettiger Peptide, die sich gut für die Sequenzanalyse eignen. Bei der Elektrophorese (Abb. 22) wurde im Gegensatz zur HPLC jedoch keine vollständige Trennung der Peptide erreicht. Nach der Trennung über HPLC konnten die einzelnen Peptide sequenziert werden (Anhang A).

4.5.3 Enzymatische Spaltungen

Für die enzymatischen Spaltungen der PDC-Untereinheiten wurden verschiedene Proteasen eingesetzt, um möglichst viele unterschiedliche Peptide, und damit ausreichend Überlappungssequenzen, zu erhalten.
Die Auswahl der Proteasen erfolgte nach der Spezifität der Enzyme.

Trypsin:

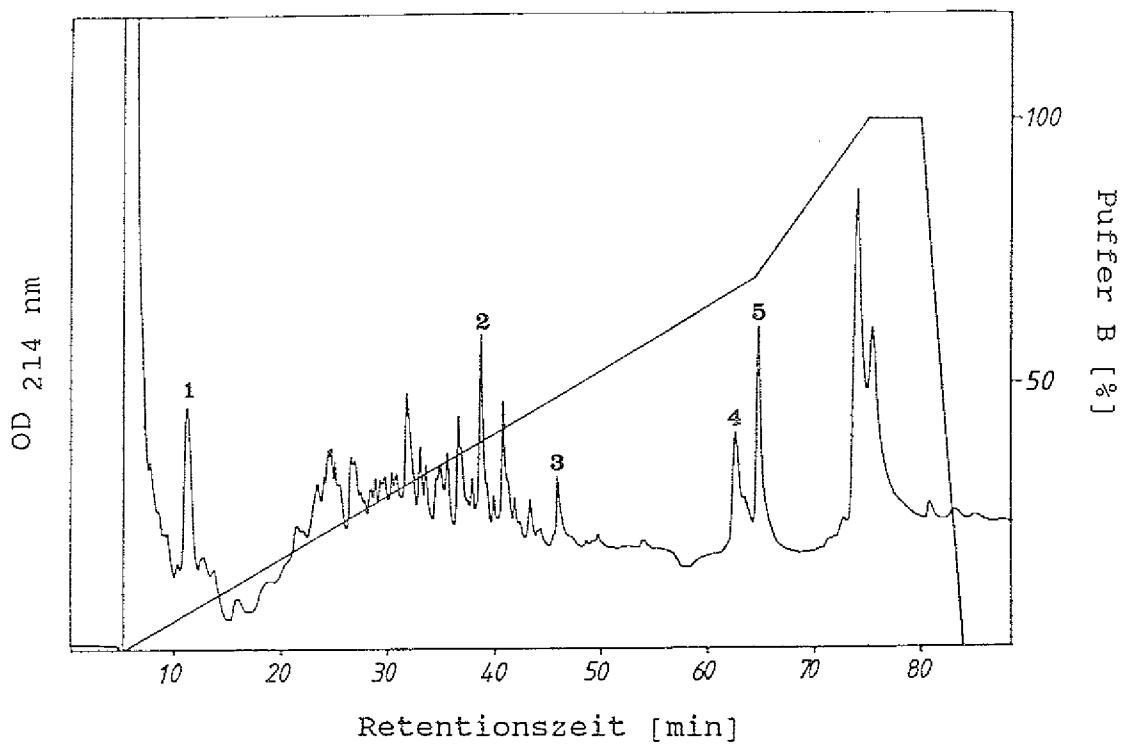


Abb. 24: Reversed-Phase Chromatographie tryptischer Peptide die Elution erfolgte mit einem Gradientenprogramm, Puffer A: 0,1 % TFA, Puffer B: 70 % Acetonitril in 0,1 % TFA, Säule: Shandon-WP-300-Butyl (C4) (T1-T5: sequenzierte Peptide)

Trypsin spaltet die Peptidbindung spezifisch hinter Arginin und Lysin, mit Ausnahme der Bindungen Arg-Pro und Lys-Pro (Wilkinson 1986). In der Enzymuntereinheit sind laut Aminosäurezusammensetzung 17 Arginin- und 36 Lysinmoleküle vorhanden, d.h. bei vollständiger Spaltung der PDC entstehen bis zu 54 verschiedene Peptide mit geringem Molekulargewicht.

Die Trennung dieser hohen Anzahl kleiner Peptide birgt eine Reihe von experimentellen Schwierigkeiten, wie die starke Aggregationsneigung der Peptide nach der Spaltung. Erst nach Verdünnung der PDC auf 1 mg/ml konnten gelöste Peptide isoliert werden.
Trennt man die Spaltprodukte über HPLC (Abb. 24), so erhält man eine Vielzahl von Peptidfraktionen, die zum Teil mehrere Peptide enthalten. Auch mit elektrophoretischen Methoden konnte aufgrund des geringen Molekulargewichtes keine ausreichende Trennung der Peptide erzielt werden.

V8-Protease:

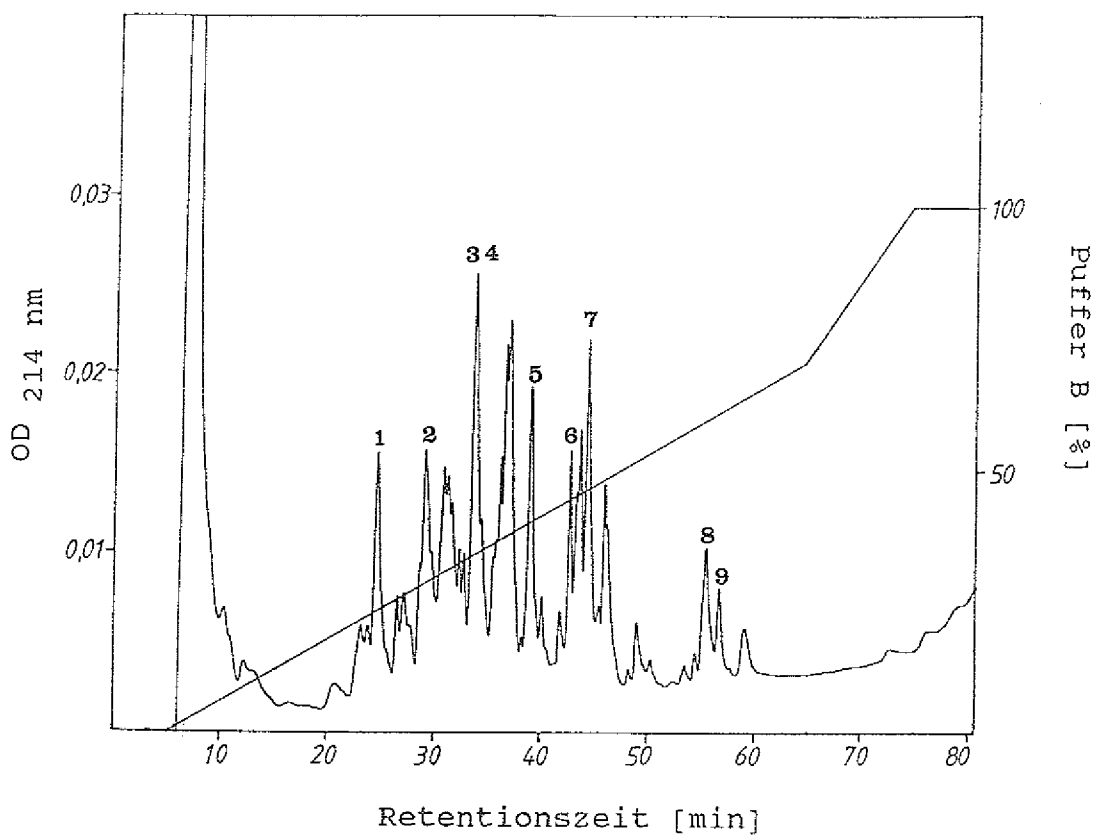


Abb. 25: Reversed-Phase Chromatographie einer Probe nach Spaltung mit der V8-Protease, Elution erfolgte mit einem Gradientenprogramm, Puffer A: 0,1 % TFA, Puffer B: 70 % Acetonitril in 0,1 % TFA, Säule: Shandon-WP-300-Butyl (C4) (V1-V9: sequenzierte Peptide)

Durch Spaltung mit der V8-Protease bei pH 4 erhält man maximal 40 verschiedene Peptide. Die V8-Protease spaltet im sauren Milieu spezifisch die Peptidbindung am C-Terminus der Glutaminsäure mit

Ausnahme der Bindungen Glu-Glu und Glu-Pro (Wilkinson 1986). Bei der Trennung über HPLC (Abb. 25) konnten verschiedene Peptide einzeln isoliert werden. Leider gab es auch bei dieser Methode einige Fraktionen, die mehr als ein Peptid enthielten.

4.5.3.1 "Peptide mapping" mit limitierter Proteolyse

Wie bereits erwähnt (4.5.3), entstehen beim Einsatz der Proteasen Trypsin und V8-Protease im allgemeinen viele kleine Peptide, die bei ihrer Reindarstellung Schwierigkeiten bereiten. Um diese Problematik zu umgehen, wurden die Proteasen mit dem Ziel größere Peptide zu gewinnen, in einer limitierten Proteolyse (Cleveland 1977) eingesetzt.

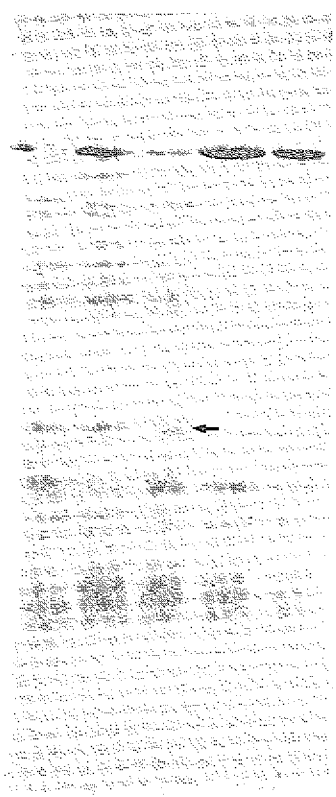


Abb. 26: Immobilon "Blot" von Peptiden aus der limitierten Proteolyse mit Trypsin (22 %iges Trenngel), Färbung mit Amidoschwarz, (sequenziertes Peptid T6)

Die Fragmente, die bei der Unterbrechung des Trennlaufs im Sammelgel durch Proteolyse entstehen (vgl. 3.8.3), werden bei der Fortsetzung der Elektrophorese aufgetrennt und anschließend durch elektrophoretischen Transfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Da-

bei erhält man nach Anfärben der Membran mit Amidoschwarz je nach Protease und Proteolysedauer ein spezifisches Bandenmuster im Bereich von 60000 Dalton bis ca. 5000 Dalton (Abb. 26 + 27).
Nach dem Trocknen der Membran werden auch hier wieder einzelne Peptidbanden ausgeschnitten und für die Sequenzanalyse verwendet.

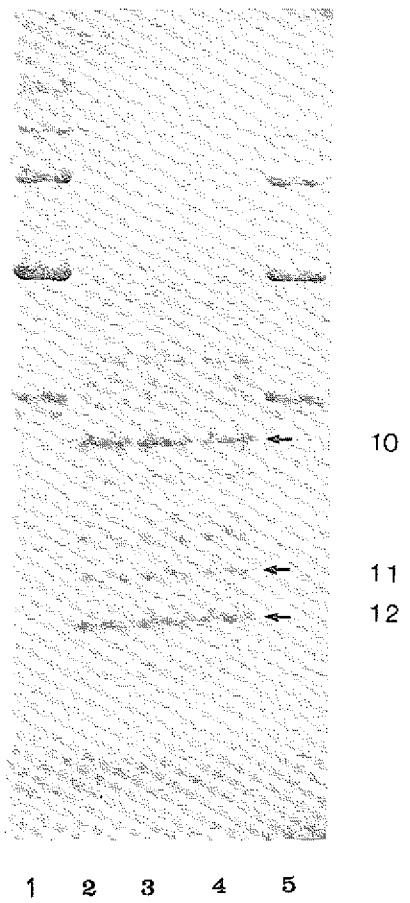


Abb. 27: Amidoschwarz gefärbter Immobilon "Blot" von Peptiden aus der limitierten Proteolyse mit der V8-Protease (22 %iges Trenngel), 1+5 Molekulargewichtstandard (sequenzierte Peptide V10-V12)

4.5.3.2 <u>In situ Spaltung mit der V8-Protease und mit Trypsin</u>

Die in situ Spaltung nach Aebersold et al.(1987) bietet eine Möglichkeit, große Peptide nach elektrophoretischer Trennung nochmals einer Spaltung zu unterziehen. Auch schwer lösliche Peptide können mit dieser Methode weiteren Spaltungen zugänglich gemacht werden, wenn sie über SDS-PAGE auftrennbar sind.

Nach der Trennung werden die Peptide auf eine Membran (Nitrocellulose) transferiert, mit Amidoschwarz gefärbt und die Einzelbanden in der in situ Spaltung eingesetzt.
Die bei dieser Spaltung entstehenden Peptide werden von der Membran eluiert und über HPLC getrennt.

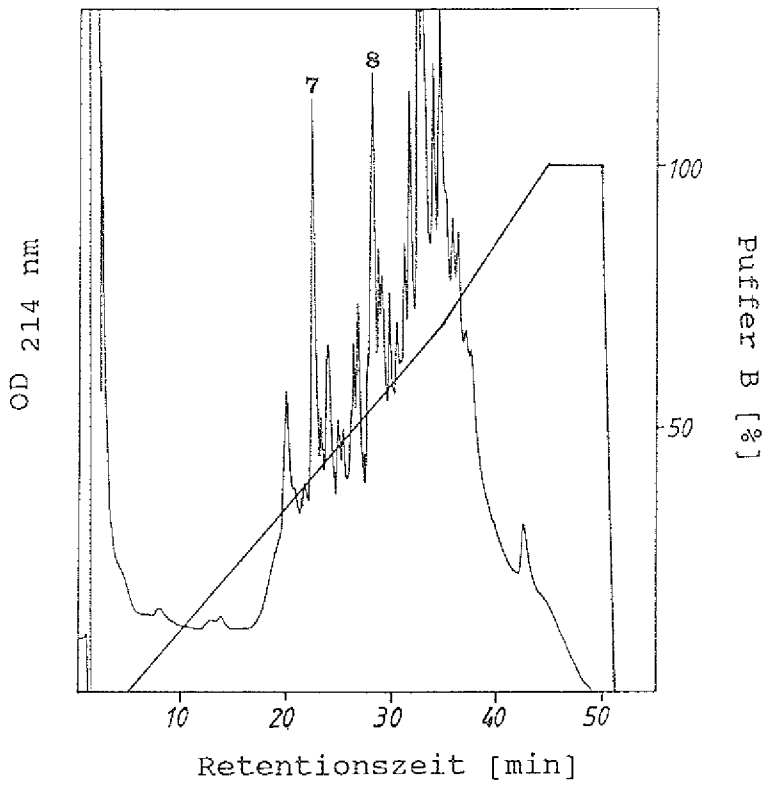


Abb. 28: HPLC-Trennung der Spaltprodukte aus der in situ Spaltung von Peptid F1 (Abb. 21) mit Trypsin, Säule: Shandon-WP-300-Butyl (C4), die Elution erfolgte mit einem Gradientenprogramm, Puffer A: 0,1 % TFA, Puffer B: 70 % Acetonitril in 0,1 % TFA, (sequenzierte Peptide T7+T8)

Entgegen der Angabe von Aebersold et al. (1987) reichte das Ansäuern der Proben im Fall der PDC jedoch nicht für die Elution der Peptide von der Membran aus.
Es wurden verschiedene andere Elutionsmittel (Anhang B) getestet, aber erst eine 3-stündige Inkubation der Nitrocellulosemembran mit 40 % Acetonitril in 0,1 % TFA, bei 37°C führte zur Elution der Peptide.
Eine Elution von der Immobilon-Membran konnte selbst unter diesen Bedingungen nicht erzielt werden, was wahrscheinlich auf die

starke Bindung der Proteine an die PVDF-Membran (Matsudaira 1987) zurückzuführen ist.

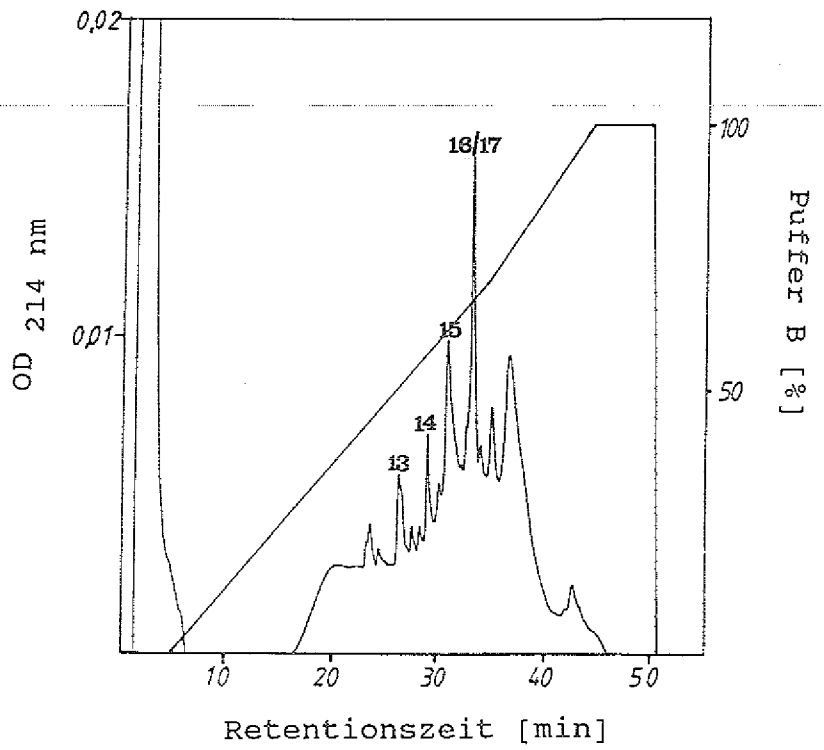


Abb. 29: HPLC-Trennung der Spaltprodukte aus der in situ Spaltung von Peptid F1 (Abb. 21) mit der V8-Protease, Säule: Shandon -WP-300-Butyl (C4), die Elution erfolgte mittels Gradientenprogramm, Puffer A: 0,1 % TFA, Puffer B: 70 % Acetonitril in 0,1 % TFA, (sequenzierte Peptide: V13-V17)

Die in situ Spaltung wurde an Peptiden aus der Ameisensäurespaltung (4.5.1) durchgeführt. Die Ergebnisse der Peptidtrennung nach einer solchen Spaltung sind am Beispiel vom Ameisensäurepeptid F1 (Molekulargewicht ca. 25000 Dalton) in den Abbildungen 28 + 29 für die Proteasen Trypsin und V8-Protease dargestellt.

Auch bei dieser Methode zeigt sich deutlich die höhere Anzahl Spaltstellen für Trypsin, die wiederum eine Reindarstellung der Peptide erschwerte.
Bei der Sequenzanalyse wirkt sich dieses Ergebnis vor allem dadurch aus, daß bei tryptischen Peptiden im Gegensatz zu den V8-Peptiden häufig mehrere Peptide in einer Fraktion vorhanden sind

und diese somit nur in einzelnen Fällen (bei ausreichender Konzentrationsdifferenz) ausgewertet werden können.

4.5.4 Übersicht zur Peptidgewinnung

Außer der Peptidtrennung über HPLC und Elektrophorese wurden noch weitere chromatographische Verfahren (z.B. Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration) eingesetzt.
Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch nicht überzeugend, da entweder Probleme mit der Löslichkeit der Peptide auftraten, oder aber keine ausreichende Trennung der Peptide erreicht wurde.

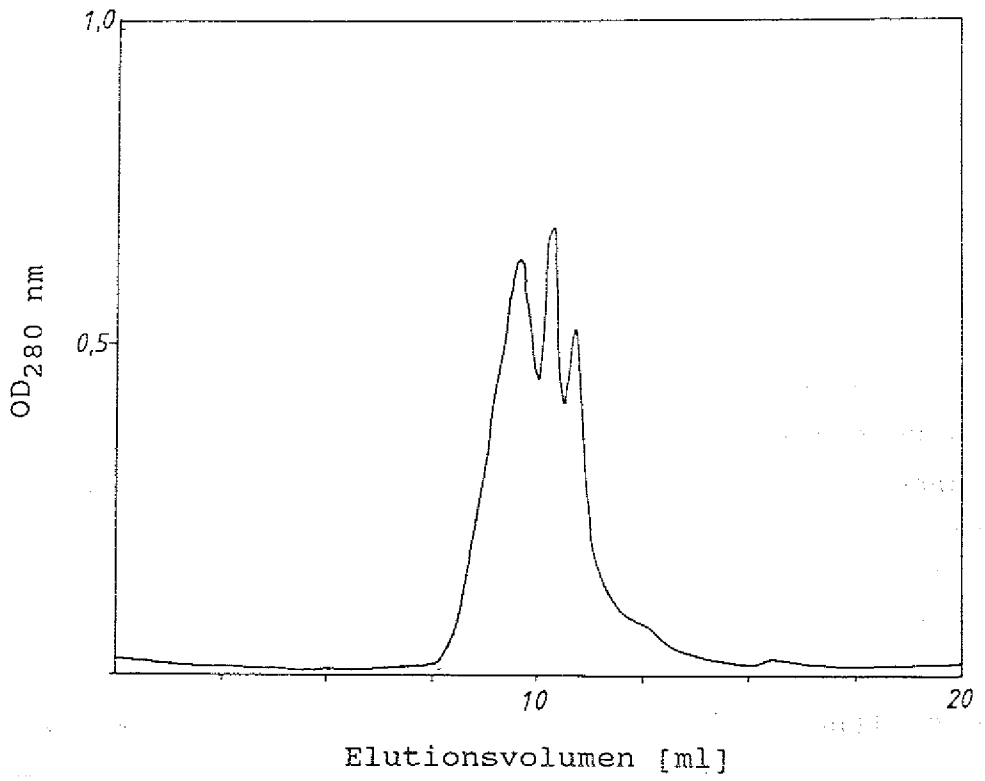


Abb. 30: Gelfiltration der Peptide aus der Ameisensäurespaltung an einer Superose 12-Säule an der FPLC, Eluent 9 %ige Ameisensäure, Flußgeschwindigkeit 0,5 ml/min

Abb. 30 zeigt das Ergebnis einer Trennung von Peptiden aus der Ameisensäurespaltung über Gelfiltration. Auch hier treten anstelle der 4 zu erwartenden Peptide nur 3 Peaks auf, wobei in keiner der aufgefangenen Fraktionen ein einzelnes Peptid isoliert werden konnte.
Versuche, Peptide aus der Ameisensäurespaltung nach Tarr und Crabb

(1983) mit einem Gradienten aus 6 M Ameisensäure/0,13 M Trimethylamin, pH 1,5 und 4 M Ameisensäure/0,09 M Trimethylamin in Propanol über HPLC zu trennen, blieben ebenfalls erfolglos.

Somit verbleiben für die Peptidisolierung im Fall der PDC die bereits beschriebenen Trennungen über HPLC und über Elektrophorese in Verbindung mit Elektroblotting. Die kombinierte Anwendung beider Methoden führte für das Enzym Pyruvatdecarboxylase zur Isolierung einer ausreichenden Anzahl verschiedener Peptide für die Bestimmung der Primärstruktur. Die Bedingungen zur Isolierung sequenzierbarer Peptide wurden für beide Methoden optimiert.
Für eine erfolgreiche Trennung von Peptiden über HPLC wird in der Literatur häufig die Anwendung eines TFA-Acetonitril Gradienten vorgeschlagen (Steffensen und Anderson 1987; Aebersold et al. 1987), der auch bei der Trennung der PDC-Peptide erfolgreich eingesetzt werden konnte, wenn gewährleistet wurde, daß die Löslichkeitsgrenze der Peptide nicht überschritten wurde. Die Steilheit des Gradienten mußte für die jeweiligen Proben (siehe Abbildungen) optimiert werden.
Der beste Trennerfolg konnte mit einer C4-Säule bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,4 ml/min erzielt werden.

Die Auswahl der Transfermembran bei anschließender Sequenzierung wurde zugunsten der Immobilon-Membran getroffen, deren erfolgreiche Anwendung bereits mehrfach publiziert wurde (Matsudaira 1987; Nokihara 1988; Miczka und Kula 1989; Yuen et al. 1988).
Da die Transferrate größerer Proteine in Gegenwart von Methanol herabgesetzt wird (Eckerskorn et al. 1988), wurde in der vorliegenden Arbeit vorwiegend NEM-Puffer für den Transfer verwendet. Dieser zeichnet sich vor allem durch eine geringe Hintergrundaktivität aus (Yuen et al.1988).
Eine ausreichende Übertragung größerer Proteine konnte nach einer Blottingzeit von 45 min erreicht werden. Kleinere Peptide sind bereits nach 15 - 30 min vollständig übertragen (Abb. 31).
Eine Verlängerung der Blottingdauer auf 75 Minuten führt zu keiner wesentlichen Erhöhung des Transfers großer Proteine.
Aus dem Verlauf der Kurve für die Nitrocellulosemembran (Abb. 31a) wird deutlich, daß bei kleinen Peptiden eine Verlängerung der

Blottingzeit zu einem Verlust führen kann. Bei Verwendung der Immobilonmembran traten solche Verluste nicht auf.

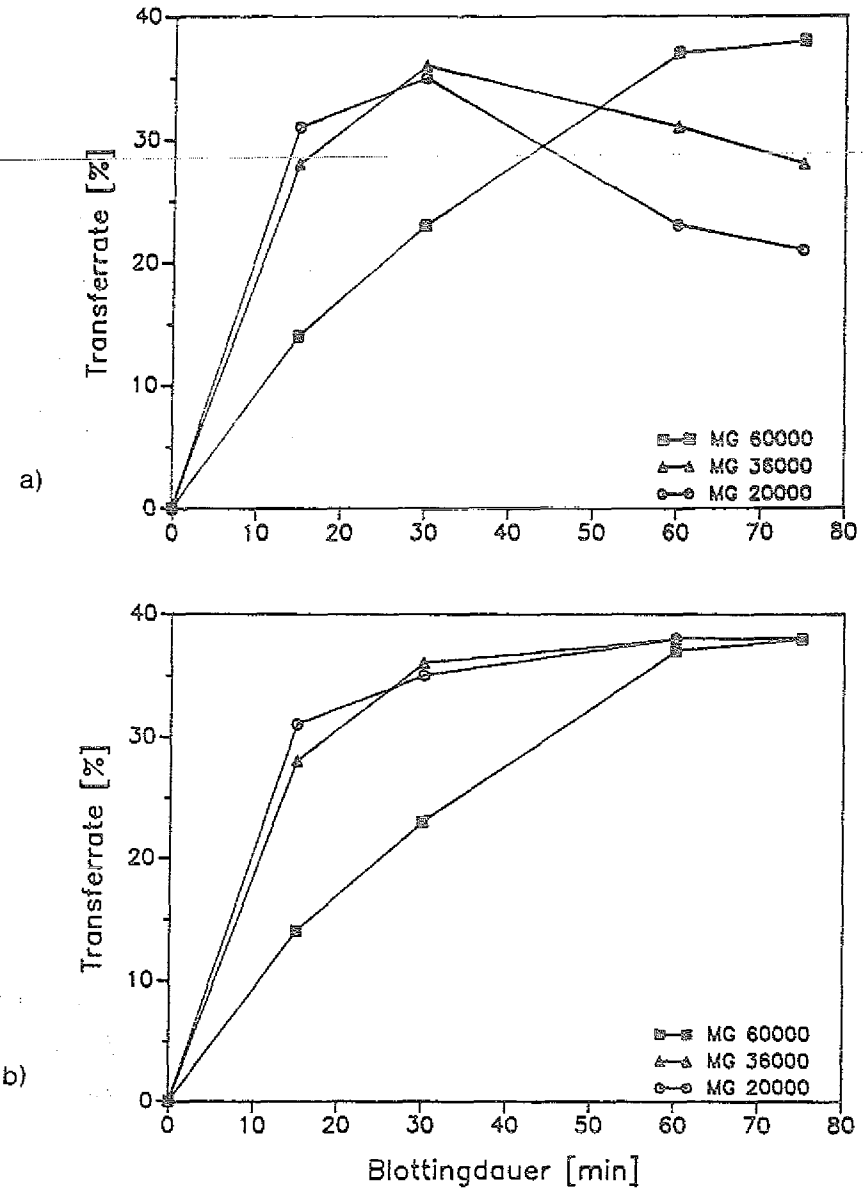


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf der Übertragung von Proteinen mittels elektrischem Transfer, a: auf Nitrocellulose, b: auf Immobilon

Für die Detektion der Peptide auf der Membran wurde Amidoschwarz ausgewählt, da mit dieser Methode eine vollständige Entfärbung des Hintergrundes erreicht werden kann.

Abb. 32 gibt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten proteolytischen Verfahren und der Methoden zur Isolierung der einzelnen Peptide für den Einsatz in der Sequenzanalyse.

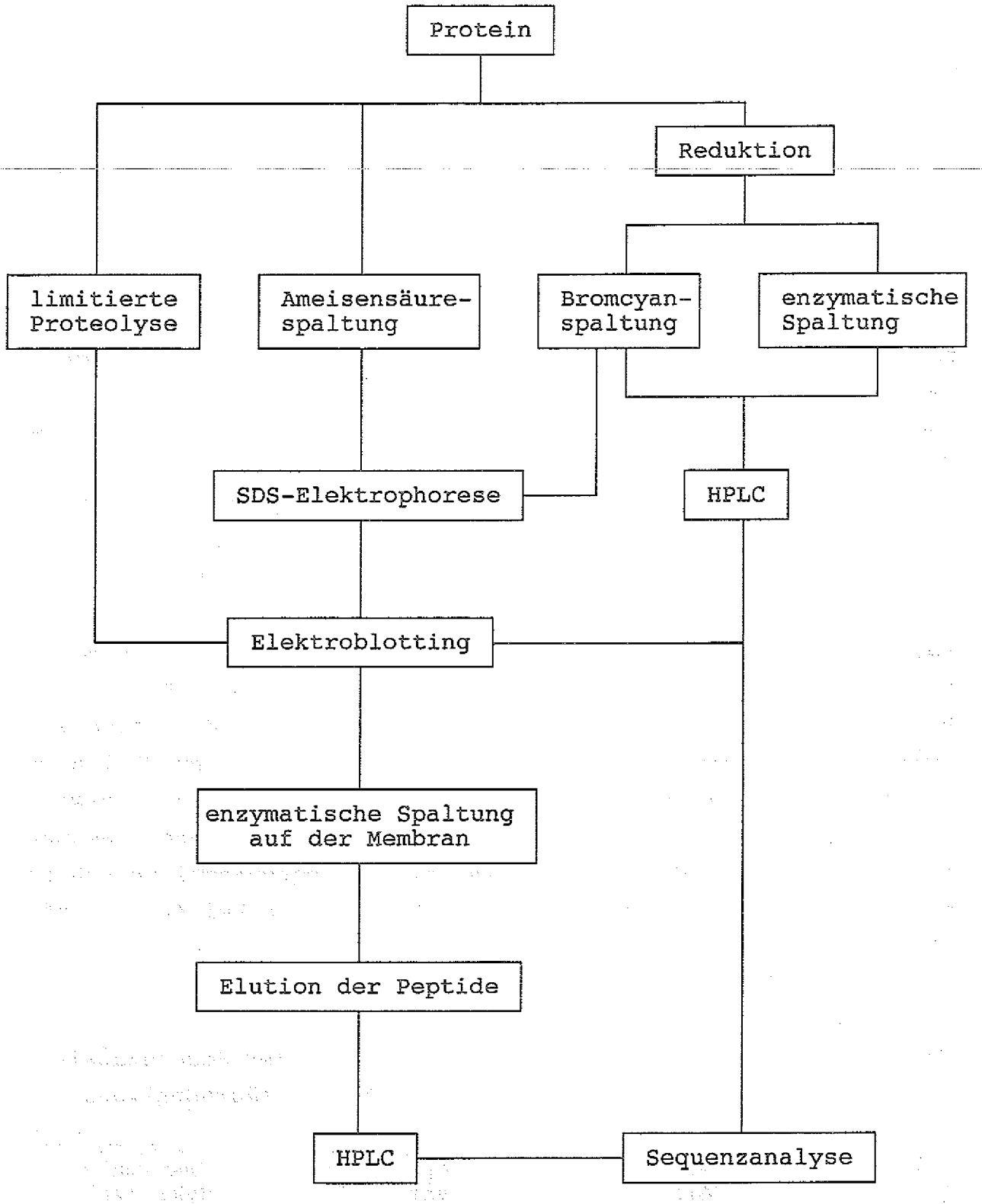


Abb. 32: Schematische Übersicht der Peptidgewinnung für die Sequenzanalyse

4.5.5 Sequenzierbarkeit der isolierten Peptide

Die Sequenzierung der Peptide erfolgte wie unter 4.4.5 beschrieben mit dem automatisierten Edman-Abbau im Pulsed-Liquid-Sequenzer. Die Analyse der PTH-Aminosäuren erfolgt mittels on-line HPLC.
Je nach Spaltung und Trennungsmethode konnten in Bezug auf die Sequenzierbarkeit der Peptide deutliche Unterschiede beobachtet werden.
Während nach der Trennung über "reversed phase" an der HPLC gerade bei den enzymatischen Spaltungen aufgrund der Vielzahl von kleinen Peptiden (Abb. 24+25) häufig Fraktionen mit mehreren Peptiden auftraten, konnten bei den geblotteten Proben fast immer einzelne Peptide isoliert werden, die reproduzierbare Ergebnisse bei der Sequenzanalyse lieferten.
Die Länge der resultierenden Sequenzen wurde bei beiden Methoden durch die Probenkonzentration vorgegeben. Proben, die über HPLC gereinigt wurden, enthielten häufig kurze Peptide (bis zu 20 Aminosäuren), die vollständig sequenziert werden konnten.
Bei Vorhandensein mehrerer Peptide in einer Fraktion bestimmte die Konzentrationsdifferenz die Sequenzierbarkeit dieser Probe. Nur bei deutlichen Konzentrationsunterschieden konnte die Sequenz von zwei Peptiden parallel ausgewertet werden. In anderen Fällen war die Auswertung nicht durchführbar und die Proben wurden verworfen.
Bei den geblotteten Proben traten im allgemeinen längere Sequenzen auf. Die maximale Cyclenzahl, die bei der Sequenzanalyse von geblotteten Proben ausgewertet werden konnte, lag bei 40 Aminosäuren (Miczka und Kula 1989) mit einer errechneten Probemenge (initial yield) von 18 pmol.

Tabelle 10: Repetitive und initial yield bei der Sequenzanalyse geblotteter Proben aus der Ameisensäurespaltung

Proben	theoretical initial yield (pmol)	repetitive yield (%)	maximale Zyklenzahl
F 1	85	91	21
F 2	26	80*	19
F 3	33	94	33
F 4	18	95	40

* Probelauf ohne Polybren

Die Ausbeute der einzelnen Aminosäuren im Verlauf der Sequenzanalyse (repetitive yield) lag bei > 90 %. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch auch bei geblotteten Proben nur nach Vorbehandlung der Glasfaserfilter mit Polybren (vgl. 3.10) erzielen. Proben auf unbehandelten Filtern wurden im Gegensatz zu Angaben von Matsudaira (1987) innerhalb kurzer Zeit ausgewaschen. Bei diesen Proben erreichte die repetitive yield nur 80 % (Tabelle 10).

Die Anwendung polybrenbehandelter Filter zeigt aber auch einen Nachteil. Einige Aminosäuren, dazu gehören Arginin, Tryptophan, Histidin, Glutaminsäure und Asparaginsäure, werden nicht optimal übertragen (vgl. PTH-Standard, Anhang D).
Eine Ausbeutesteigerung dieser Aminosäuren kann jedoch durch Einsatz von Polyethylenimin anstelle von Polybren erreicht werden (Le Caer und Rossier 1988).

Eine Beeinträchtigung der Sequenzanalyse durch die vorausgehende Färbung der Blottingmembran mit Amidoschwarz konnte nicht beobachtet werden. Hingegen ermöglicht eine vorherige Detektion der Banden sogar die Präparation dicht beieinander liegender Peptidbanden (insbesondere bei der limitierten Proteolyse) für die Sequenzanalyse.

4.5.6 Ergebnis der Sequenzanalyse

Bei der Sequenzierung der verschiedenen Peptide der PDC wurde die Aminosäure Cystein nicht nachgewiesen. An Positionen, wo Cystein erwartet wurde, konnte keine Aminosäure identifiziert werden, da die Ausbeute an PTH-Cystein nicht für eine Detektion ausreicht. Das durch den Verlust der H_2S-Seitenkette entstehende PTH-Dehydroalanin kann bei einer Wellenlänge von 313 nm nachgewiesen werden (Hunkapiller 1985). Aufgrund der kurzen Lebensdauer dieses Derivates fällt es aber auch für eine Identifizierung von Cystein aus. Hinzu kommt, daß PTH-Dehydroalanin auch aus Serin gebildet werden kann.
Ein stabiles Cysteinderivat, das ß-4-Pyridylethylcystein (PTH-M), entsteht hingegen bei der Alkylierung mit 4-Vinylpyridin. Die Elution dieses Derivates zwischen PTH-Valin und DPTU muß durch ge-

eignete Pufferzusammensetzung optimiert werden (Zum Zeitpunkt der Sequenzierung aus technischen Gründen nicht möglich).

Die Identifizierung von PTH-Tryptophan war, vor allem aufgrund der in allen Zyklen auftretenden relativ hohen Hintergrundadsorption (laut Auskunft von Applied Biosystems liegt eine Verunreinigung der Reagenzien vor), nicht immer eindeutig möglich.
Eine Auswertung von Tryptophan ist nur über das Verhältnis vom Tryptophan-Peak zum DPTU-Peak (Diphenylthioharnstoff) möglich. Dieses liegt in Abwesenheit von Tryptophan bei 1:100 und steigt in bei Vorhandensein von Tryptophan im Zyklus auf ca. 1:30 an. Probleme bei der Identifizierung von Tryptophan in geblotteten Proben resultieren aus der Zerstörung von Tryptophan während der Elektrophorese oder beim elektrophoretischen Transfer (Matsudaira 1987). Auch in diesem Fall bricht die Sequenzanalyse nicht ab, sondern zeigt, wie beim Cystein, den weiteren Abbau des Peptids.

Der Nachweis von Homoserinlacton, das bei der Bromcyanspaltung aus Methionin entsteht, konnte in der Sequenzanalyse nicht geführt werden. Die Konzentrationen der Aminosäuren am Ende des Peptids reichen aufgrund des zunehmenden Peptidverlust durch Extraktion mit Abnahme der Peptidgröße für eine exakte Zuordnung bei der chromatographischen Analyse nicht mehr aus.

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen sind in Anhang A dargestellt.

Außer den aufgeführten Sequenzen wurden eine Reihe weiterer Sequenzanalysen gestartet, die aber aus Kostengründen nach den ersten 5 Zyklen abgebrochen wurden, wenn der Abbau mehrerer Peptide (in gleicher Konzentration) oder eine Übereinstimmung mit bereits vorhandenen Daten festgestellt wurde.
Dieses Vorgehen war besonders bei Peptiden aus der limitierten Proteolyse notwendig, da hier, im Gegensatz zu den Erwartungen, bei der Sequenzanalyse mehrfach die Anfangssequenz der PDC (Miczka und Kula 1989) identifiziert wurde.

```
SYTVGTYLAERLVQIGLKHHFAVAGDYNLVLLDNLLLNKNMEQVYCCNELNCGFSAEGYA   60
<------------Ameisensäure 3+4--------------------->
                                          <-------CNBr 9-----
<---Trypsin 4---->
<-------------V8-Protease 10----->
RAKGAAAAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAENLPVILISGAPNNNDHAAGHVLHHALGKTDY  120

------------------------------>
                                                          <--
                                 <----------V8-Protease 8-------
HYQLEMAKNITAAAEAIYTPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPGPA  180

      <---------------CNBr 4---------------------> <-------
-T 1--> <---Trypsin 2--->
---><--V8-12->       <---V8-7------><-V8-1>
SALFNDEASDEASLNAAVEETLKFIANRDKVAVLVGSKLRAAGAEEAAVKFADALGGAVA  240

------CNBr 7--------------------->

                      <-----V8-Protease 9------><----V8-5-----
TMAAAKSFFPEENPHYIGTSWGEVSYPGVEKTMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWTDIPDP  300
                                                            <-
  <------------CNBr 11---------> <----------CNBr 10-------->
                   <--T 3---->
>
KKLVLAEPRSVVVNGIRFPSVHLKDYLTRLAQKVSKKTGALDFFKSLNAGELKKAAPADP  360
-Ameisensäure 2-->                                          <-

         <-----Trypsin 6------------><---Trypsin 8->
                                                  <----V8-4
SAPLVNAEIARQVEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQWGHIGWSVPA  420
---Ameisensäure 1--->
                                       <--CNBr 2-> <--CNBr 6--

------->      <--V8-3---><-V8-Protease 11->    <---V8-17-->
AFGYAVGAPERRNILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLKLPVIIFLINNYGYTIEVMIHDGPY  480

------------->  <---CNBr 5----> <------CNBr 8-------> <-----
            <---Trypsin 5--->
                                                        <---
NNIKNWDYAGLMEVFNGNGGYDSGAGKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDGPTLIECFIGR  540

-CNBr 1---> <-----CNBR 3----------->

-V8-Protease 13>                      <-V8-15--------><V8-16
             <-----V8-Protease 2+14--->
EDCTEELVKWGKRVAAANSRKPVNKLL                                   567


<--T 7-->
>     <---V8-Protease 6--->
```

Abb. 33: Ordnung der sequenzierten Peptide mit Hilfe der Gensequenz (Neale et al. 1987b)

Häufig trat mit zunehmendem Alter der Laufpuffer eine Verschiebung der Retentionszeiten auf. Eine Auswertung der Chromatogramme konnte aber auch in diesen Fällen durchgeführt werden, da alle Chromatogramme (Anhang D) neben den Aminosäuren immer zwei zusätzliche Peaks enthalten, deren Lage zu den Aminosäuren konstant bleibt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um zwei Nebenprodukte des Edman-Abbaus, den N,N-Dimethyl-N-Phenyl-Thioharnstoff (DMPTU) (Retentionszeit ca. 10 min) und N,N-Diphenyl-Thioharnstoff (DPTU) (Retentionszeit ca. 22 min).

Abb. 33 zeigt die Anordnung der ermittelten Teilsequenzen an Hand der bekannten Gensequenz der Pyruvatdecarboxylase (Neale et al. 1987b). Bis auf wenige Stellen (z.B. Position 170 ff) ist die Primärsequenz durch unabhängige, überlappende Peptiddaten repräsentiert und abgesichert.

4.6 Homologiestudien

Nach der Bestimmung der Proteinsequenz der PDC wurde diese mit den aus der Gensequenz (Neale et al. 1987b) übersetzten Daten der PDC aus Zymomonas mobilis ATCC 29191 verglichen. Das Alignment zeigt 99 % Übereinstimmung (Abb. 34).
In den Position 232, 254, 255 und 506 konnte die übersetzte Sequenz jedoch nicht bestätigt werden. Ein Vergleich der für die jeweiligen Aminosäuren codierenden Tripletts im genetischen Code zeigt, daß sich diese in allen 4 Fällen lediglich in einer Base unterscheiden, was auf mögliche Fehler bei der DNA-Sequenzierung hinweist.
Die später publizierte PDC-Gensequenz (Reynen 1988, Reynen und Sahm 1988) vom gleichen Zymomonasstamm weicht ebenfalls in den Positionen 254 und 255 von der Proteinsequenz ab, die in diesen Positionen ein eindeutiges Ergebnis aufweist (Anhang E).
Daneben findet man noch weitere Abweichungen der aus der Gensequenz abgeleiteten Primärstruktur in den Positionen 77, 156, 157, 199 und 340.

```
SYTVGTYLAERLVQIGLKHHFAVAGDYNLVLLDNLLLNKNMEQVYCCNELNCGFSAEGYA    60
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SYTVGTYLAERLVQIGLKHHFAVAGDYNLVLLDNLLLNKNMEQVYCCNELNCGFSAEGYA    60

RAKGAAAAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAENLPVILISGAPNNNDHAAGHVLHHALGKTDY   120
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
RAKGAAAAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAENLPVILISGAPNNNDHAAGHVLHHALGKTDY   120

HYQLEMAKNITAAAEAIYTPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPGPA   180
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
HYQLEMAKNITAAAEAIYTPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPGPA   180

SALFNDEASDEASLNAAVEETLKFIANRDKVAVLVGSKLRAAGAEEAAVKFADALGGAVA   240
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::
SALFNDEASDEASLNAAVEETLKFIANRDKVAVLVGSKLRAAGAEEAAVKFTDALGGAVA   240

TMAAAKSFFPEENPHYIGTSWGEVSYPGVEKTMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWTDIPDP   300
::::::::::::  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TMAAAKSFFPEENANYIGTSWGEVSYPGVEKTMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWTDIPDP   300

KKLVLAEPRSVVVNGIRFPSVHLKDYLTRLAQKVSKKTGALDFFKSLNAGELKKAAPADP   360
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
KKLVLAEPRSVVVNGIRFPSVHLKDYLTRLAQKVSKKTGALDFFKSLNAGELKKAAPADP   360

SAPLVNAEIARQVEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQWGHIGWSVPA   420
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAPLVNAEIARQVEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQWGHIGWSVPA   420

AFGYAVGAPERRNILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLKLPVIIFLINNYGYTIEVMIHDGPY   480
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AFGYAVGAPERRNILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLKLPVIIFLINNYGYTIEVMIHDGPY   480

NNIKNWDYAGLMEVFNGNGGYDSGAGKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDGPTLIECFIGR   540
::::::::::::::::::::::::::.::::::::::::::::::::::::::::::::
NNIKNWDYAGLMEVFNGNGGYDSGAAKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDGPTLIECFIGR   540

EDCTEELVKWGKRVAAANSRKPVNKLL                                    567
::::::::::::::::::::::::::
EDCTEELVKWGKRVAAANSRKPVNKLL                                    567
```

Abb. 34: Alignment der ermittelten Proteinsequenz an die aus der Gensequenz (Neale et al. 1987b) übersetzte Sequenz

Homologiestudien mit bekannten PDC-Sequenzen anderer Organismen zeigten geringere Homologien, selbst dann, wenn wie beim Enzym aus dem Stamm Zymomonas mobilis ATCC 31821 (ZM4) bei der Charakterisierung der beiden Enzyme keine nennenswerten Unterschiede feststellbar sind (4.8), oder wie bei der Hefe-PDC große Ähnlichkeiten beim Reaktionsmechanismus vorhanden sind (Hoppner und Doelle). Mit der Sequenz aus ZM4 (Conway et al. 1987) findet man noch 95 % Übereinstimmung (Abb. 35), wogegen der Vergleich mit den Sequenzdaten aus Hefe (Kellermann et al. 1986) nur noch 28 % Homologie (Abb. 35a) zeigt.

```
SYTVGTYLAA-LVQIGLKHHFAVAGDYNLVLLDNLLLNKNMEQVYCCNELNCGFSAEGYA     59
:::::::::  :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SYTVGTYLAERLVQIGLKHHFAVAGDYNLVLLDNLLLNKNMEQVYCCNELNCGFSAEGYA     60

RAKADAAAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAENLPVILISGAPNNNDHAAGHVLHHALGKTDY    119
:::. :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
RAKGAAAAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAENLPVILISGAPNNNDHAAGHVLHHALGKTDY    120

HYQLEMAKNITAAAEAIYTPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPGPA    179
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
HYQLEMAKNITAAAEAIYTPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPGPA    180

SALFNDEASDEASLNAAVEETLKFIANRDKVAVLVGSKLRAAGAEEAAVKFADALGGAVA    239
:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::
SALFNDEASDEASLNAAVEETLKFIANRDKVAVLVGSKLRAAGAEEAAVKFTDALGGAVA    240

TMAAAKSFF-QKKTALHRYLMGEVSYPGVEKTMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWTDIPDP    298
:::::::::             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TMAAAKSFFPEENANYIGTSWGEVSYPGVEKTMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWTDIPDP    300

KKLVLAEPRSVVVNGVRFPSVHLKDYLTRLAQKVSKKTGALDFFKSLNAGELKKAAPADP    358
:::::::::::::::.::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
KKLVLAEPRSVVVNGIRFPSVHLKDYLTRLAQKVSKKTGALDFFKSLNAGELKKAAPADP    360

SAPLVNAEIARQVEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQWGHIGWSVPA    418
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAPLVNAEIARQVEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQWGHIGWSVPA    420

AFGYAVGAPERRNILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLKLPVIIFLINNYGYTIEVMIHDGPY    478
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AFGYAVGAPERRNILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLKLPVIIFLINNYGYTIEVMIHDGPY    480

NNIKNWDYAGLMEVFNGNGGYDSGAGKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDGPTLIECFIGR    538
:::::::::::::::::::::::::.::::::::::::::::::::::::::::::::::
NNIKNWDYAGLMEVFNGNGGYDSGAAKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDGPTLIECFIGR    540

EDCTEELVKWGKRVAARQQP                                             558
::::::::::::::: .
EDCTEELVKWGKRVAAANSRKPVNKLL                                      567
```

Abb. 35: Alignment der Proteinsequenz von Zymomonas mobilis ZM6 mit der aus der Gensequenz (Conway et al. 1987) übersetzten PDC-Sequenz aus Zymomonas mobilis ZM4

Weitere Homologiestudien mit bekannten Sequenzen zeigten vor allem Übereinstimmungen mit Teilsequenzen der Acetolactat-Synthase und der Pyruvatdehydrogenase, wobei der Hauptanteil der Übereinstimmung im C-terminalen Ende der PDC zu finden ist, der 4 der 7 Tryptophanreste enthält.

```
  SYTVGTYLAERLVQIGLKHHFAVAGDYNLVLLDNLLLNKNMEQVYCCNELNCGFSAEG     58
    :.: :: ::: :. .   :.. ::.:: ::: .     :      :::: .. :.:
MSEITLGKYLFERLKQVNVNTVFGLPGDFNLSLLDKIYEVEGMRWAGNANELNAAYAADG     60

YARAKGAAAAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAENLPVILISGAPNNNDHAAGHVLHHALGKT    118
::: ::    . :. :: :::  .:.: ::: . :. . : :     :   .: : ::
YARIKGMSCIITTFGVGELSALNGIAGSYAEHVGVLHVVGVPSISSQAK-QLLLHTLGNG    119

DYHYQLEMAKNITAAAEAIYTPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPG    178
:.     :  ::.    :     : :: :.:   .:::: .  :.     :
DFTVFHRMSANISETTAMITDICTPQAEIDRCIRTTYVTQRPVYLGLPANLVDLNVPAKL    179

PASALFNDEASDEASLNAAVEETLKFIANRDKVAVLVGSKLRA-AGAEEAAVKFTDALGG    237
  . .       .:     : .:.  .    :  :...              :  :
LQTPIDMSLKPNDAESEKEVIDTILVLVKDAKNPVILADACCSRHDVKAETKKLIDLTQF    239

AVATMAAAKSFFPEENANYIGTSWGEVSYPGVEKTMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWTDI    297
      .:    :    : :   : .: : :      :: .. .. .  :. :   .
PAFVTPMGKGSISEQHPRYGGVYVGTLSKPEVKEAVESADLILSVGALLSDFNTGSFSYS    299

PDPKKLVLAEPRSVVVNGIRFPSVHLKDYLTRLAQKVSKKTGALDFFKSLNAGELKKAAP    357
   : .:         .    :: :  :  : .:   .     .   .: .       :
YKTKNIVEFHSDHMKIRNATFPGVQMKFVLQKLLTNIADAAKG---YKPVAVPARTPANA    356

ADP-SAPLVNAEIARQVEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQWGHIGW    416
: : : :: .     :.   :     :::::: : :  .    ::          :: ::
AVPASTPLKQEWMWNQLGNFLQEGDVVIAETGTSAFGINQTTFPNNTYGISQVLWGSIGF    416

SVPAAFGYAVGA-----PERRNILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLKLPVIIFLINNYGYTIE    472
.  :  : : .:    : .: :: .:::: ::: ::.  :.:  :   .:..:: :::::
TTGATLGAAFAAEEIDPKKRVILFIGDGSLQLTVQEISTMIRWGLKPYLFVLNNDGYTIE    476

VMIHD--GPYNNIKNWDYAGLMEVFNGNGGYDSGAAKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDG    530
  ::   . :: :  ::   :   : :   :..   .        :
KLIHGPKAQYNEIQGWDHLSLLPTF-GAKDYET--HRVATTGEWDKLTQDK--SFNDNSK    531

PTLIECFIGREDCTEELVKWGKRVAAANSRKPVNKLL                           567
   ::  .   ::.  :
IRMIEVMLPVFDCSTKLG                                               549
```

Abb. 35a: Alignment der Proteinsequenz von Zymomonas mit der PDC-Sequenz aus Hefe (Kellermann et al. 1986)

Einen Hinweis auf die Beteiligung von Tryptophan am Reaktionsmechanismus der PDC erhält man durch den Aktivitätsverlust nach der Modifikation von Tryptophan (vgl.4.7.5).
Bezüglich der Tryptophane gibt es bei der PDC-Sequenz von Zymomonas und der Hefe Übereinstimmungen in den Position 411 und 486 (Abb. 35a), die, wegen der großen Ähnlichkeit des Reaktionsmechanismus der beiden Enzyme, auf eine mögliche Beteiligung dieser beiden Aminosäuren an der katalytischen Aktivität hinweisen.
Eine Beteiligung von Tryptophan 261 kann weitgehend ausgeschlossen werden, da diese Aminosäure in der PDC aus ZM4 durch die Aminosäure Methionin substituiert ist (Abb. 34), sich die Aktivitäten der beiden Enzyme aber praktisch nicht unterscheiden.

4.7 Enzymatische Untersuchungen

Neben der Sequenzierung der Pyruvatdecarboxylase wurden eine Reihe enzymatischer Untersuchungen mit dem gereinigten Enzym durchgeführt.
Zunächst wurde eine Substrat-Sättigungs-Kurve für die gereinigte PDC (70 U/ml) im Bereich von 0-100 mM Pyruvat aufgenommen (Abb. 36). Während bereits bei einer Substratkonzentration > 20 mM Pyruvat Substrathemmung auftritt, kann bei kleinen Substratkonzentrationen ein sigmoider Kurvenverlauf beobachtet werden (Abb. 36a), der auf kooperative Eigenschaften des Enzyms hinweist.
In der doppelt reziproken Auftragung der Werte (Lineweaver-Burk-Auftragung) wird der Effekt der Substrathemmung durch die Abweichung der Kurve bei hoher Substratkonzentration verdeutlicht (Abb.37). Diese Auftragung eignet sich jedoch nicht für die Bestimmung des K_M-Wertes, da hier bei niedriger Substratkonzentration bereits kleine Fehler zu großen Abweichungen in der Abbildung führen (Cornish-Bowden 1979a+b).

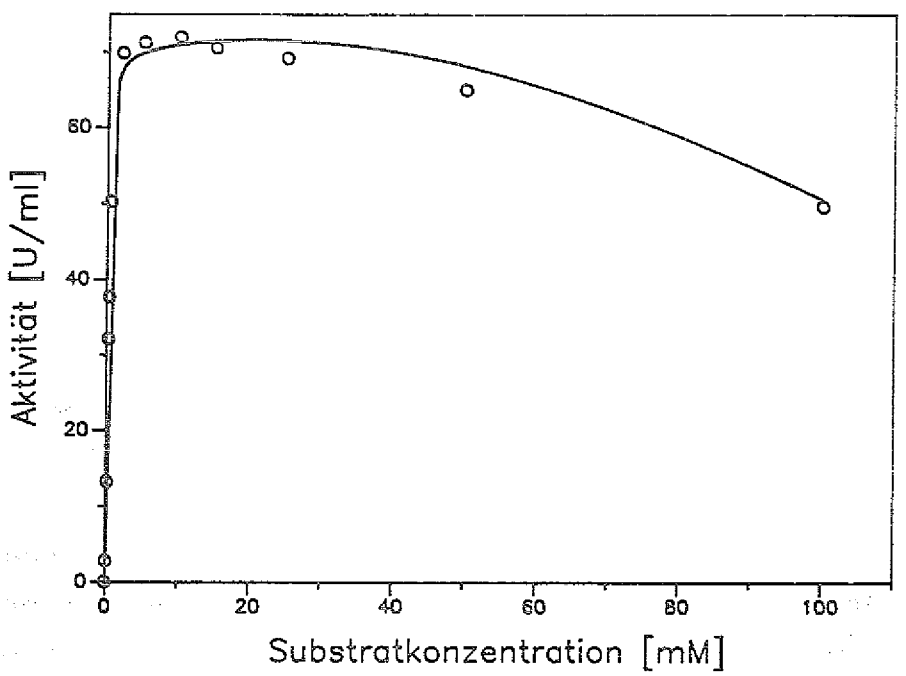


Abb. 36: Bestimmung der Michaeliskonstanten von Pyruvat im V/S-Diagramm PDC (ZM6) Aktivität = 70 U/ml

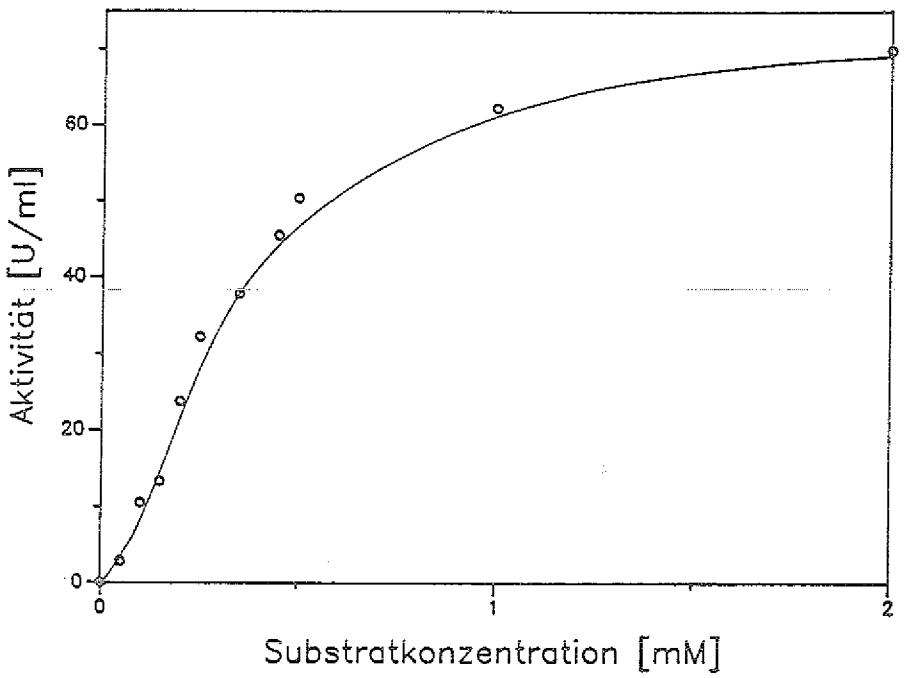


Abb. 36a: Bestimmung der Michaeliskonstanten von Pyruvat im V/S-Diagramm – Ausschnittvergrösserung für geringe Substratkonzentrationen – PDC (ZM6) = 70 U/ml

Die bessere Form der linearisierten Darstellung der Michaelis-Gleichung ist die Auftragung nach Hanes (1932). Aus dieser Auftragung erhält man $-K_M$ als Schnittpunkt mit der X-Achse.
Nach der Regressionsgleichung erhält man für die PDC aus dieser Auftragung einen K_M-Wert von 0,36 (Abb. 38), der gut mit dem mittels Gauss-Newton-Algorithmus errechneten Wert von 0,38 mM übereinstimmt.
Die Abweichungen der Werte bei niedrigen Substratkonzentrationen im Hanes-Plot zeigen kooperative Effekte an. Diese wurden in der Literatur bereits für das Hefeenzym (Juni 1961; Boiteux und Hess 1970; Ullrich und Donner 1970a) und auch für das Weizenkeimenzym (Zehender et al. 1983, Zehender 1984) beschrieben. Hier wurden Hillkoeffizienten (n_H) von 1,7-1,8 für das Hefeenzym und 1,95 für das Enzym aus Weizenkeimen angegeben.
Aus dem Hill-Plot für die PDC aus Zymomonas (Abb. 39) wurde graphisch ein Hillkoeffizient von 1,8 ermittelt (Hill 1913). Ein Hillkoeffizient > 1 deutet auf eine Aktivierung des Enzyms durch das Substrat hin.

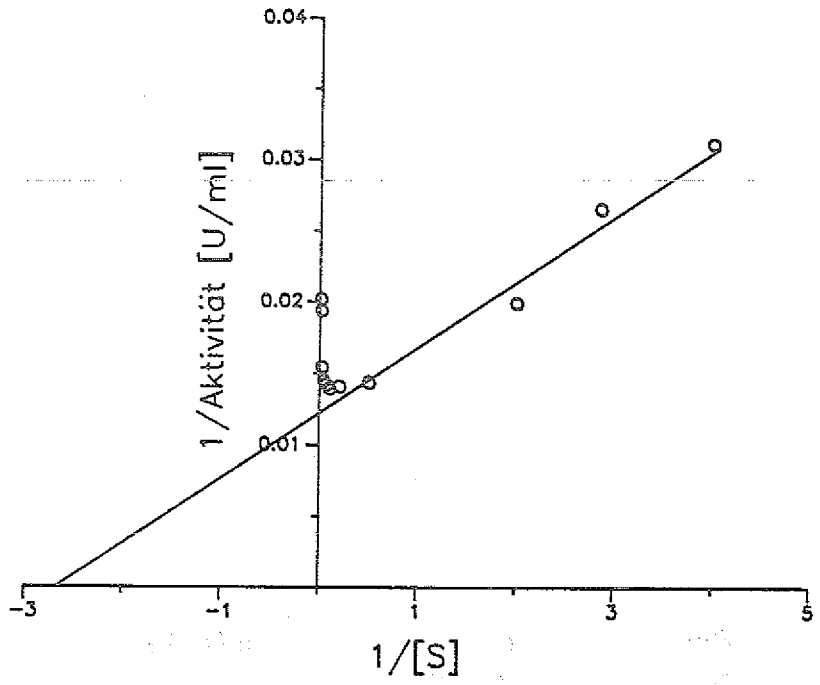


Abb. 37: Doppelt–reziproke Auftragung der Daten nach Lineweaver–Burk

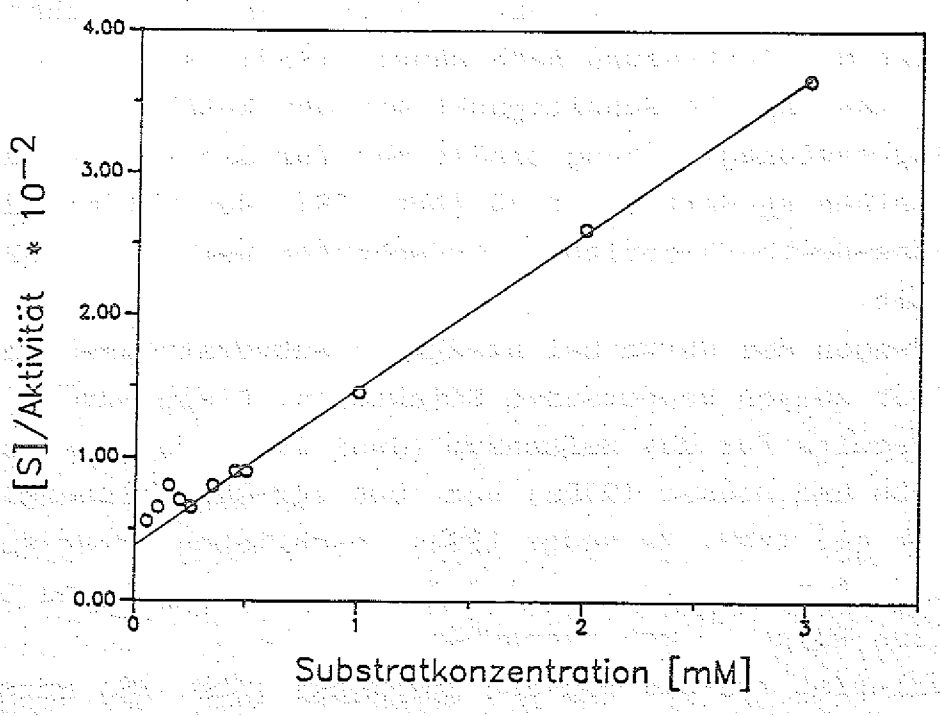


Abb. 38: Hanes–Diagramm der PDC–Aktivität
Regressionsgleichung: Y=0,387 + 1,09 X

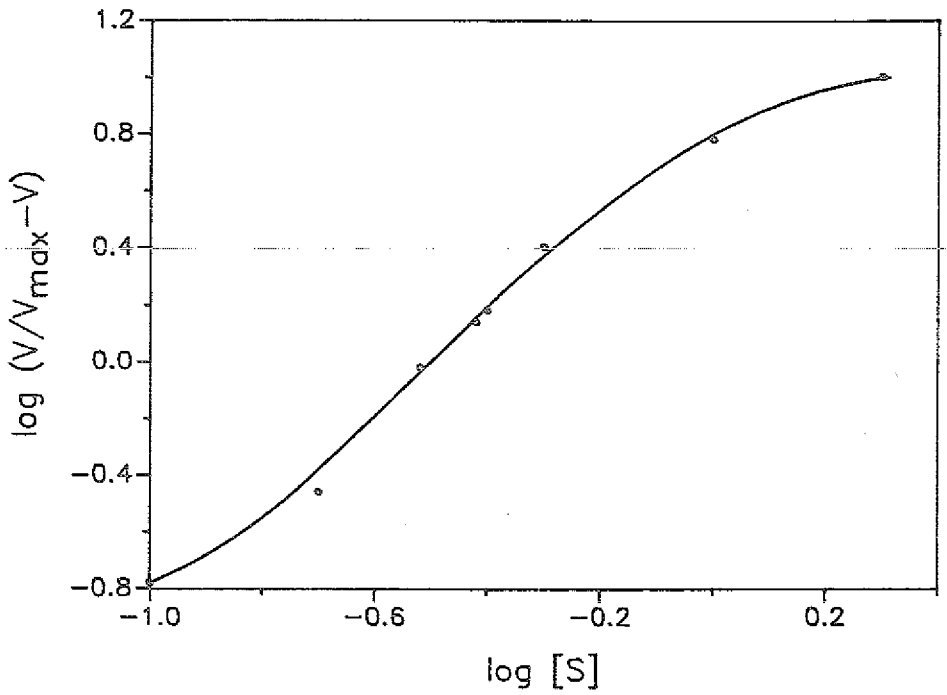


Abb. 39: Hill-Plot für den Pyruvatumsatz mit dem Enzym Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis (ZM6)

Bei seinen Versuchen mit dem Substratanalogen Pyruvamid konnte Schellenberger (1986) eine Aktivierung der Hefe-PDC durch das Substratanaloge zeigen. Dabei stellte er fest, daß das Enzym in Gegenwart von Pyruvamid von der sigmoiden Kinetik zu einer hyperbolen Kinetik wechselt. Pyruvamid selbst wird nicht durch die PDC umgesetzt.

4.7.1 Fluoreszenzmessungen mit 2-p-Toluidino-naphthalin-6-sulfonat

Der lipophile Farbstoff TNS wurde in vorliegenden Studien (Ullrich und Donner 1970b; Zehender 1984) als kompetitiver Hemmstoff für die Hefe-und die Weizenkeim-PDC beschrieben.

TNS ist ein Fluoreszenfarbstoff, der erst in lipophiler Umgebung fluoresziert. Inkubiert man das Holo- und Apo-Enzym aus Zymomonas mobilis mit steigender Menge TNS, so stellt man auch hier eine Zunahme der relativen Fluoreszenz fest, die auf das Vorliegen hydrophober Gruppen an der "active site" hinweist.

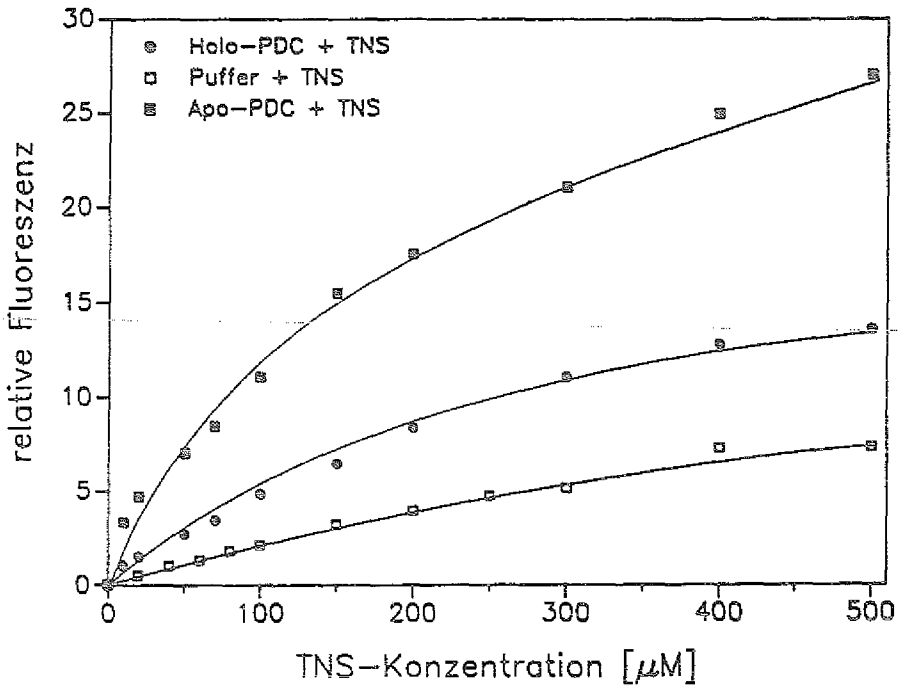


Abb. 40: Fluoreszenzmessung an Apo- und Holo-PDC mit dem Fluoreszenzfarbstoff TNS

Dabei ist die relative Fluoreszenz in Gegenwart des Apoenzyms doppelt so hoch wie beim Holoenzym (Abb. 40).

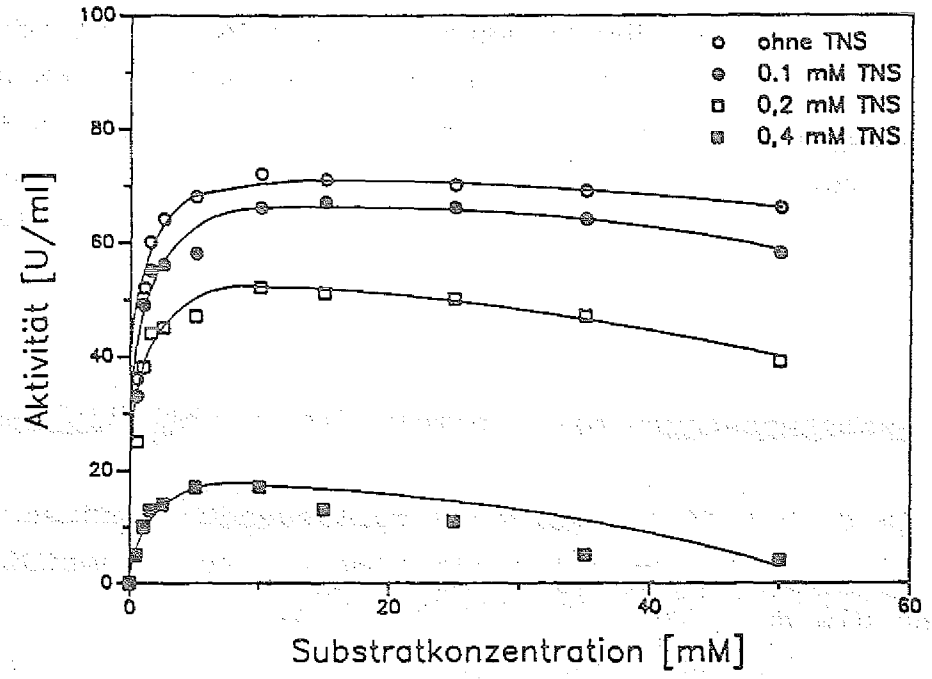


Abb. 41: Hemmung der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis (ZM6) mit dem Fluoreszenzfarbstoff TNS (2-p-Toluidino-Naphthalin-6-Sulfonat)

Abb. 41 zeigt den Verlauf der Hemmung des Zymomonas-Enzyms durch den Fluoreszenzfarbstoff TNS.
Durch die Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors wird der K_M-Wert des Enzyms erhöht (Abb. 42), d.h. das Enzym braucht mehr Substrat,

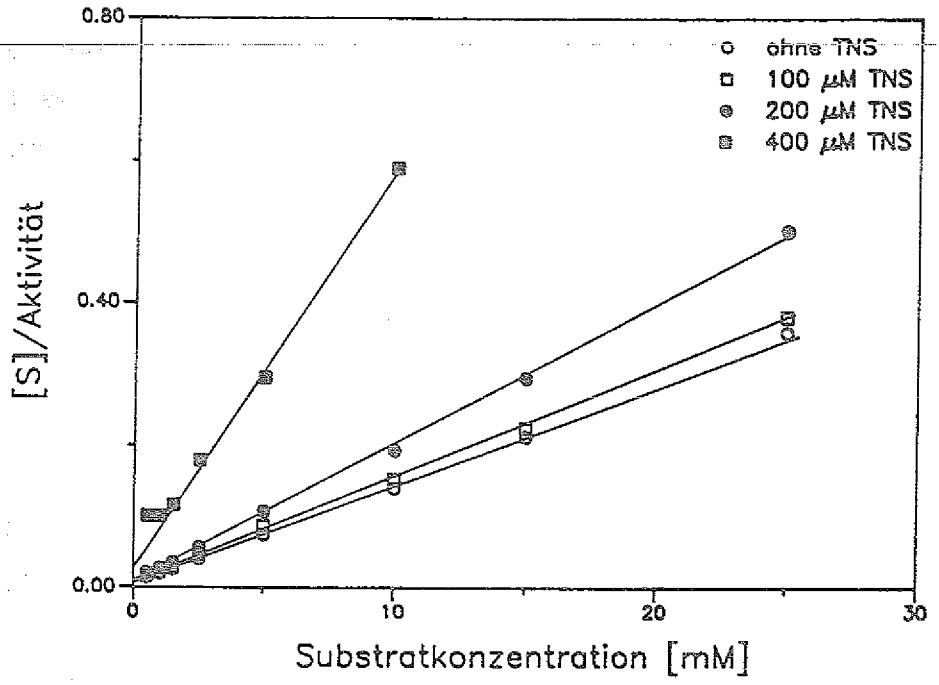


Abb. 42: Hanes–Diagramm – Hemmung des Pyruvatumsatzes durch den Fluoreszenzfarbstoff TNS

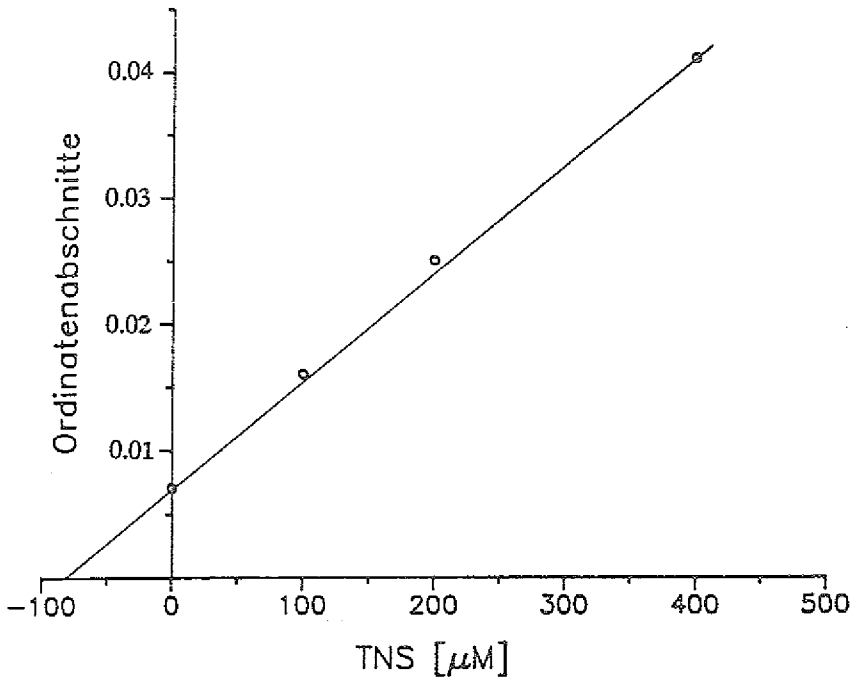


Abb. 43: Sekundärdiagramm zum Hanes–Diagramm der Hemmung mit TNS

um sein Aktivitätsmaximum zu erreichen. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann der hemmende Effekt aufgehoben werden. Im Fall der PDC kann v_{max} wegen der auftretenden Substrathemmung jedoch nicht mehr erreicht werden. Aus dem Sekundärdiagramm des Hanes-Plots (Abb. 43) erhält man die Dissoziationskonstante des Inhibitorkomplexes K_i. Sie beträgt 80 µM TNS für das Enzym aus Zymomonas, und liegt damit im Vergleich zu den Enzymen aus Hefe (K_i=30 µM TNS) und Weizenkeimen (K_i=39 µM TNS) mehr als doppelt so hoch, d.h. das Enzym besitzt weniger hydrophobe Anteile in der Bindungsstelle als die entsprechenden Enzyme aus Hefe und Weizenkeimen.

4.7.2 Hemmung der PDC durch Substratanaloge

Verschiedene Arbeitsgruppen (Schellenberger, Universität Halle und Ullrich, Universität Freiburg) beschrieben die irreversible Hemmung der PDC aus Hefe und aus Weizenkeimen durch Inkubation mit Glyoxylsäure. Die Glyoxylsäure bindet an das katalytische Zentrum und wird von der PDC decarboxyliert. Dabei bildet sich analog zur Reaktion mit Pyruvat ein "aktiver Formaldehyd" (Uhlemann und

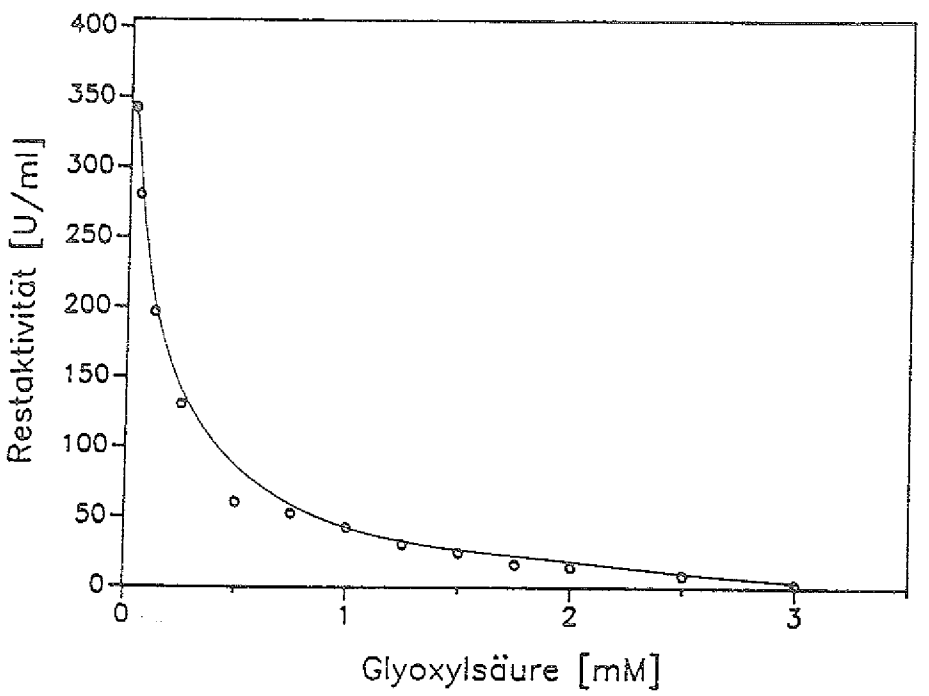


Abb. 44: Verlauf der Hemmung der PDC-Aktivität bei Inkubation mit steigenden Konzentrationen Glyoxylsäure

Schellenberger 1967). Da keine Ablösung des Formaldehyds erfolgt, bleibt das Coenzym für die weitere Aufnahme von Substratmolekülen blockiert.
Eine Inkubation der PDC aus Zymomonas mobilis mit steigenden Konzentrationen Glyoxylsäure führte ebenfalls zum Verlust der Enzymaktivität (Abb. 44). Eine nahezu vollständige Hemmung der PDC ist bei Inkubation mit 3 mM Glyoxylsäure zu beobachten. Auch bei Zugabe hoher Pyruvatkonzentrationen erfolgte keine Reaktivierung.
Thomas et al. (1990) untersuchte die Hemmung der PDC aus Zymomonas mobilis bei einer Reihe weiterer Substratanaloge. Neben der irreversiblen Hemmung des Bakterienenzyms durch Glyoxylsäure (98 %) stellte er eine Hemmung der Enzymaktivität durch 3-Hydroxypyruvat (60 %), 3-Brompyruvat (26 %), 3-Fluorpyruvat (13 %), 2-Oxo-4-Methylvalerat (33 %), 2-Oxo-3-Methylvalerat (11 %), 2-Oxobutyrat (26 %) und Aceton (12 %) fest. Im Fall vom 3-Hydroxypyruvat konnte er durch Entfernen des Substratanalogen eine vollständige Reaktivierung des Enzyms messen.
Auch in Gegenwart von Phenylpyruvat kann eine Beeinträchtigung der PDC-Aktivität beobachtet werden (Abb. 45). Sie führt zu einer 56 %igen Hemmung des Enzyms. Der Verlauf der Substratsättigung ändert sich jedoch nicht durch die Anwesenheit von Phenylpyruvat.

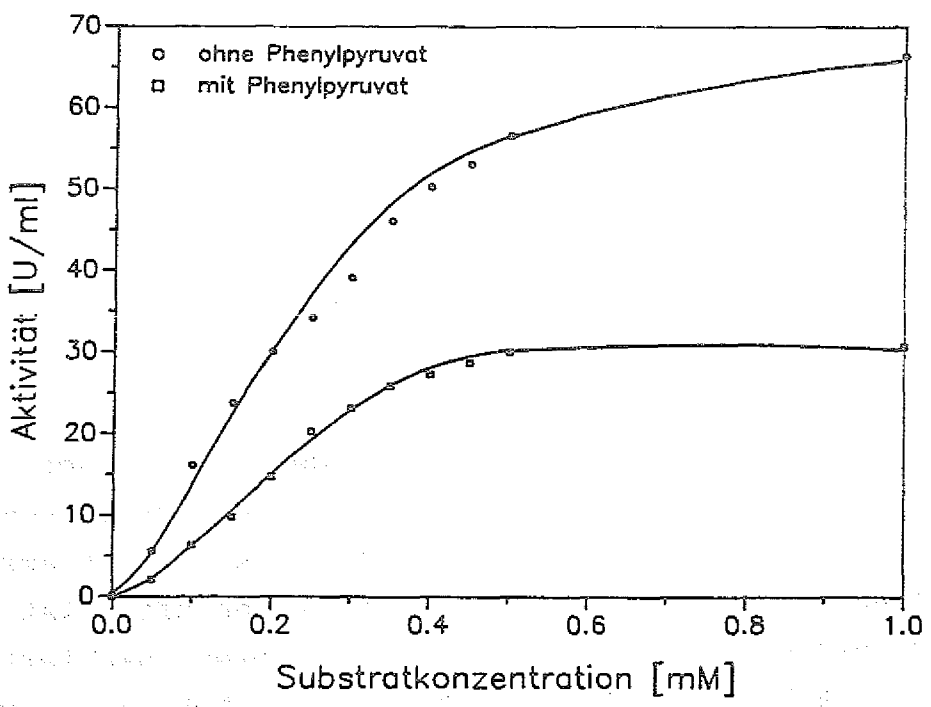


Abb. 45: Hemmung der Pyruvatdecarboxylase durch Vorinkubation mit Phenylpyruvat

4.7.3 pH-Optimum und pH-Stabilität der PDC

Für die Lagerung, die Kristallisation sowie die Aktivitätsbestimmungen und die Regenerierungsexperimente ist eine Untersuchungen der pH-Wert-Abhängigkeit des Enzyms unerläßlich.
Bei der Bestimmung des pH-Optimums für das Zymomonas-Enzym erhält man in Übereinstimmung mit den Angaben von Neale et al. (1987a) ein pH-Optimum von pH 5,5-6,5 (Abb. 46). Messungen bei pH-Werten < pH 5 konnten nicht ausgewertet werden, da die Trübung des Assays im Sauren eine photometrische Auswertung nicht zuläßt.
Einen vollständigen Verlust der Enzymaktivität beobachtet man bei pH-Werten > pH 8,5.

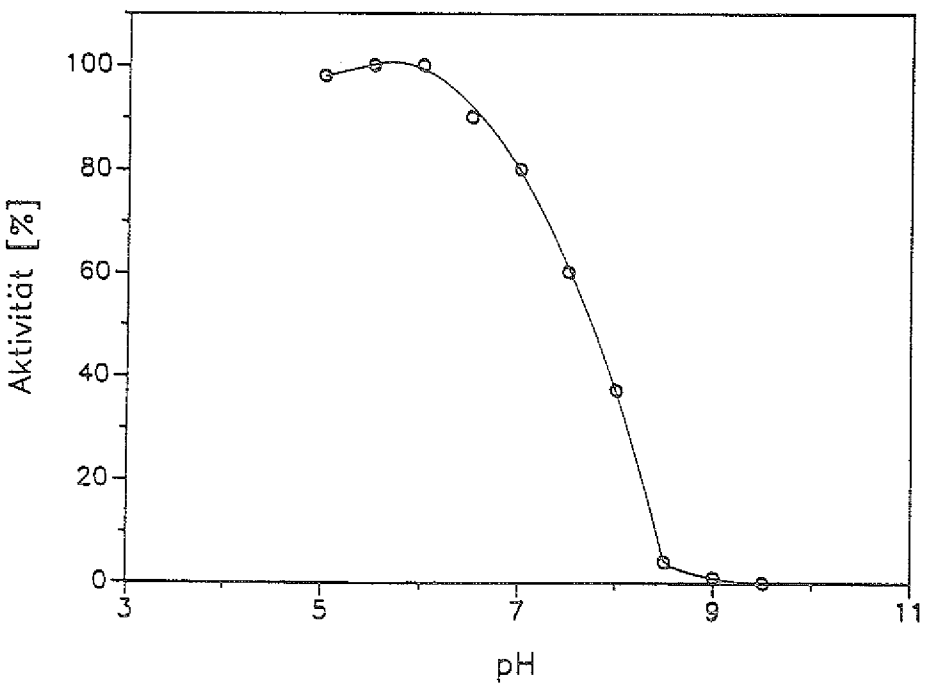


Abb. 46: pH-Optimum der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis (ZM6)

Bei der Untersuchung der pH-Stabilität des Enzyms (Abb. 47+47a) zeigt sich, daß die Stabilität der PDC bei pH-Werten von pH 5-6, also im Bereich des pH-Optimums, ihren höchsten Wert erreicht.
Die Anwesenheit der Cofaktoren im Inkubationspuffer ist dabei von großer Bedeutung. Wird die PDC ohne Cofaktoren inkubiert, so nimmt ihre Aktivität bereits nach kurzer Zeit ab (Abb. 47a), während das Enzym in Anwesenheit von Mg^{2+} und TPP über einen Zeitraum von mehreren Monaten stabil bleibt (vergl. Abb. 11).

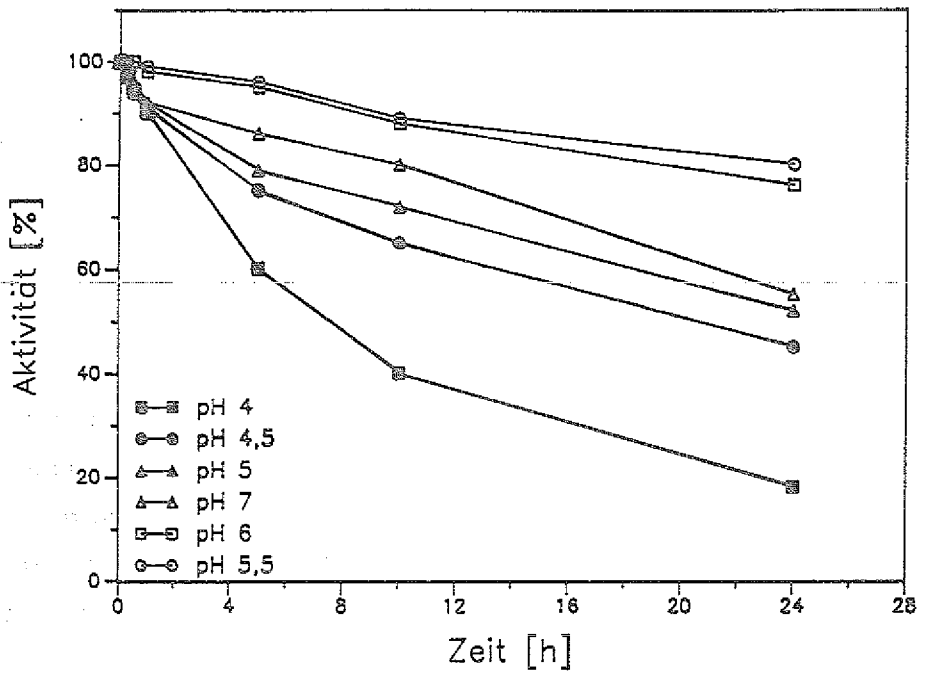


Abb. 47: Bestimmung der pH-Stabilität der PDC in Puffer mit den Cofaktoren TPP + Mg^{2+}

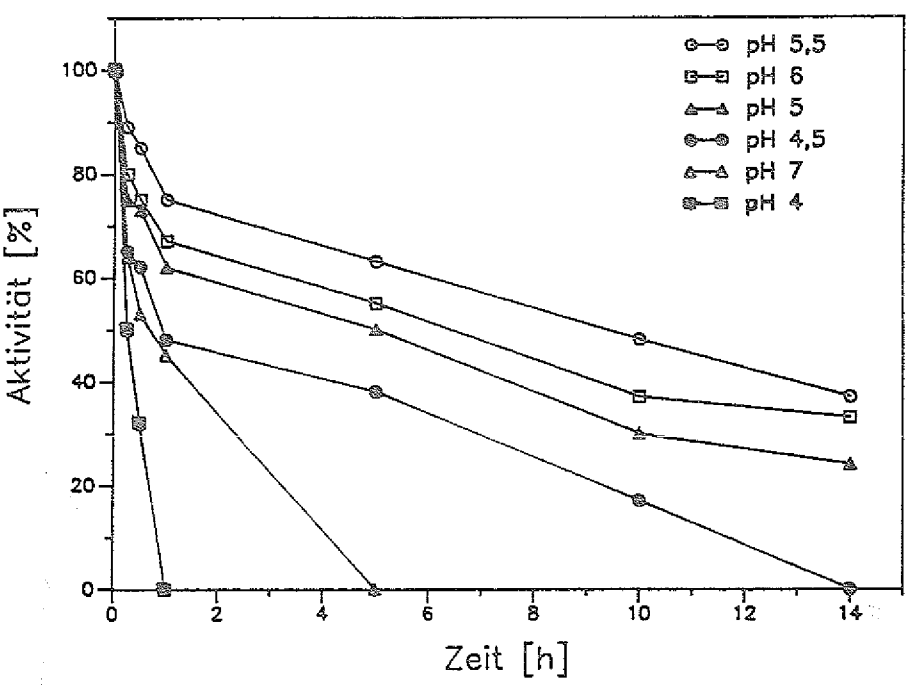


Abb. 47a: Bestimmung der pH-Stabilität in Puffer ohne Cofaktoren

4.7.4 Rekombinationsexperimente

Steyn-Parvé und Westenbrink beschrieben bereits 1944 die reversible Dissoziation der Holo-PDC aus Hefe bei pH-Werten > pH 8.

Die Rekombination des Holoenzyms erfolgt in Gegenwart von Cofaktorüberschuß bei pH 6,8 in einer sehr schnellen Reaktion. Bereits in den ersten 5 Minuten konnte 90 % der Aktivität regeneriert werden. Bei der Hefe-PDC werden 3-4 TPP-Moleküle und ebenso viele Mg-Ionen pro Proteinmolekül gebunden (Ullrich 1966). Die Regenerierung des Hefeenzyms wird neben den Cofaktoren auch durch das Substrat beeinflußt (Schellenberger et al. 1966; Ullrich und Wollmer 1971).
Auch im Fall der PDC aus Zymomonas konnte das Apoenzym durch Inkubation bei pH-Werten > 8,5 gewonnen werden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Entfernen der Cofaktoren durch Gelfiltration war keine Aktivität mehr meßbar. Der Proteingehalt lag bei 0,65 mg/ml.

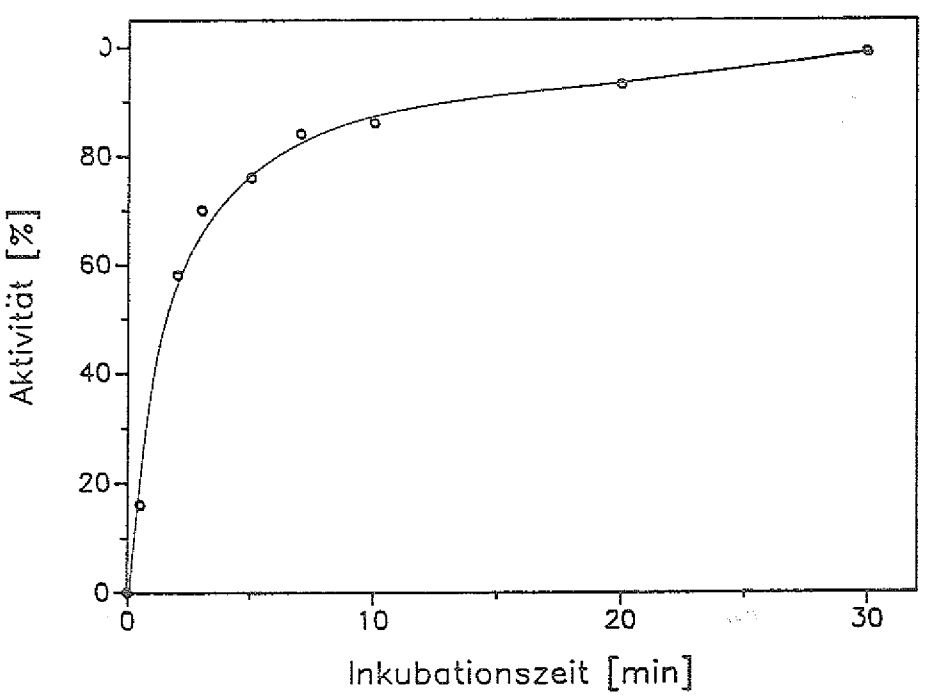


Abb. 48: Regenerierung der Pyruvatdecarboxylase
Inkubation 30 min bei 30°C

Beobachtet man den zeitlichen Verlauf der Regenerierung des Zymomonasenzyms (Abb. 48), so zeigt sich auch hier, wie bei der Hefe-PDC, zunächst ein schneller Anstieg der Aktivtät in den ersten 5 Minuten bis auf ca. 85 % der Aktivität. Eine vollständige Reaktivierung des Enzyms ist aber erst nach ca. 30 Minuten erreicht. Der Verlauf der Rekombination der PDC zeigt eine hyperbole Kinetik. Mit steigender Cofaktor-Konzentration steigt die Aktivität auf ihren maximalen Wert an, d.h. das Apoenzym liegt wieder vollständig als Holoenzym vor. Alle Bindungsorte am Enzym sind gesättigt. Eine Regenerierung erfolgt aber bei der Zymomonas-PDC nur in Gegenwart eines Cofaktorüberschusses (5 mM $MgSO_4$, 1mM TPP). Ein Ansatz mit äquimolaren Mengen der Cofaktoren zeigte, wie schon beim Hefeenzym (Schellenberger 1967), auch nach einer Inkubationszeit von 20 h noch keine Aktivität.

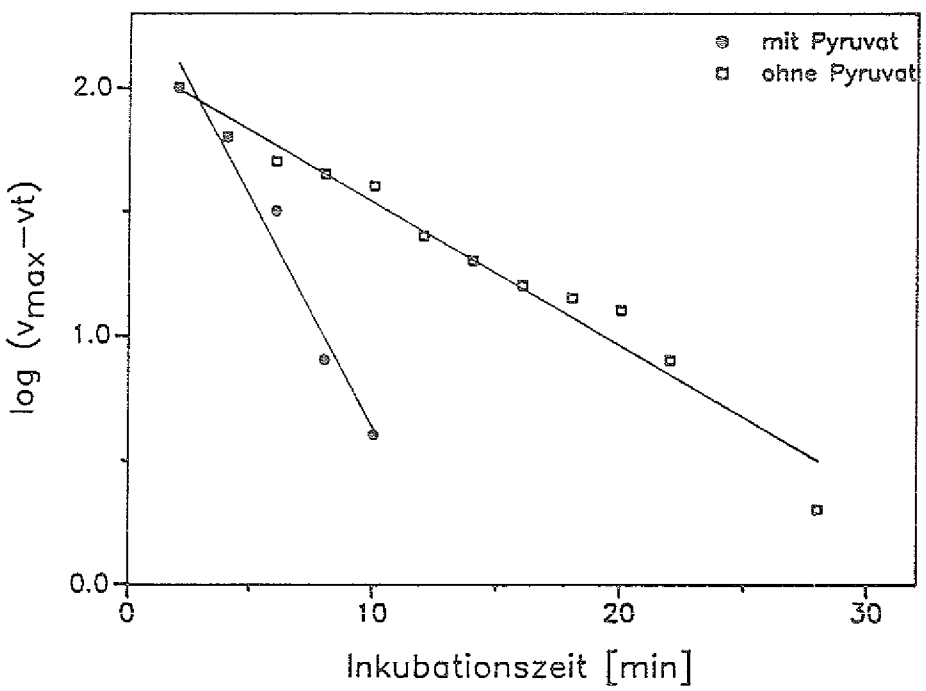


Abb. 48a: Vergleich der Rekombinationsgeschwindigkeit mit und ohne Pyruvat

Der Einfluß von Pyruvat auf die Rekombination der PDC macht sich durch den Anstieg der Rekombinationsgeschwindigkeit (Abb. 48 a) um den Faktor 3 bemerkbar.

In den Abbildungen 49+50 ist der Verlauf der Regenerierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen dargestellt. Die apparenten K_M-Werte für die Regenerierung ändern sich sowohl für Mg^{2+} als auch für TPP, mit der Konzentration des zweiten Cofaktors, d.h. die Regenerierung bezüglich der Cofaktoren verläuft, anders als bei dem Hefeenzym (Schellenberger 1967), nicht unabhängig voneinander.
Der Vergleich der ermittelten K_M-Werte mit den von Bringer-Meyer et al. (1986) bestimmten Werten zeigt wiederum die Abhängigkeit der Regenerierungsgeschwindigkeit vom Substrat. In Gegenwart von 17 mM Pyruvat betragen die ermittelten K_M-Werte von TPP und Mg^{2+} 1,28 und 24 µM, während unter vergleichbaren Bedingungen ohne Pyruvat (Abb. 49+50) die K_M-Werte eine Zehnerpotenz höher sind ($K_{M\ TPP}$= 60 µM, $K_{M\ Mg^{2+}}$ = 490 µM).

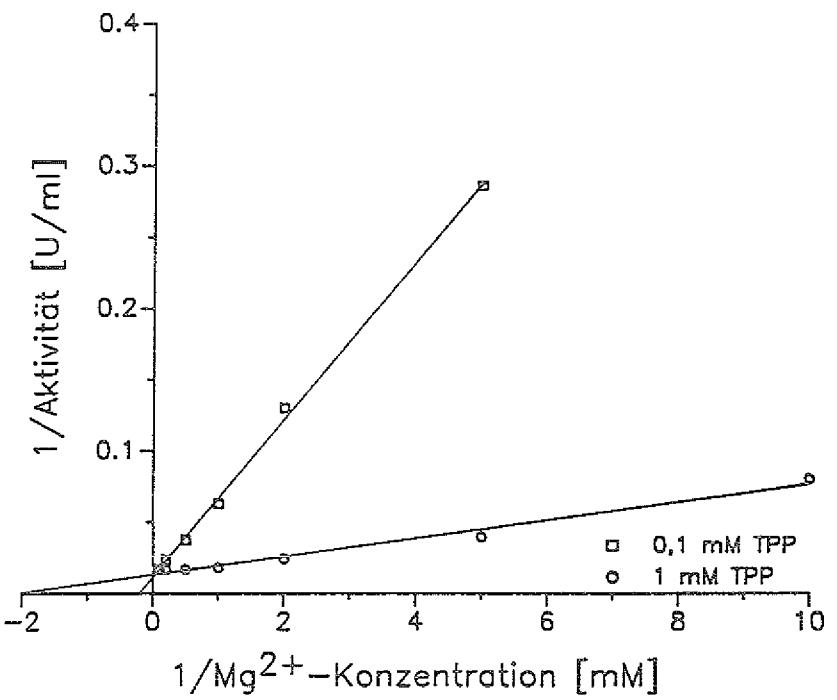


Abb. 49 : Doppelt-reziproke Auftragung der Regenerierung der PDC in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration

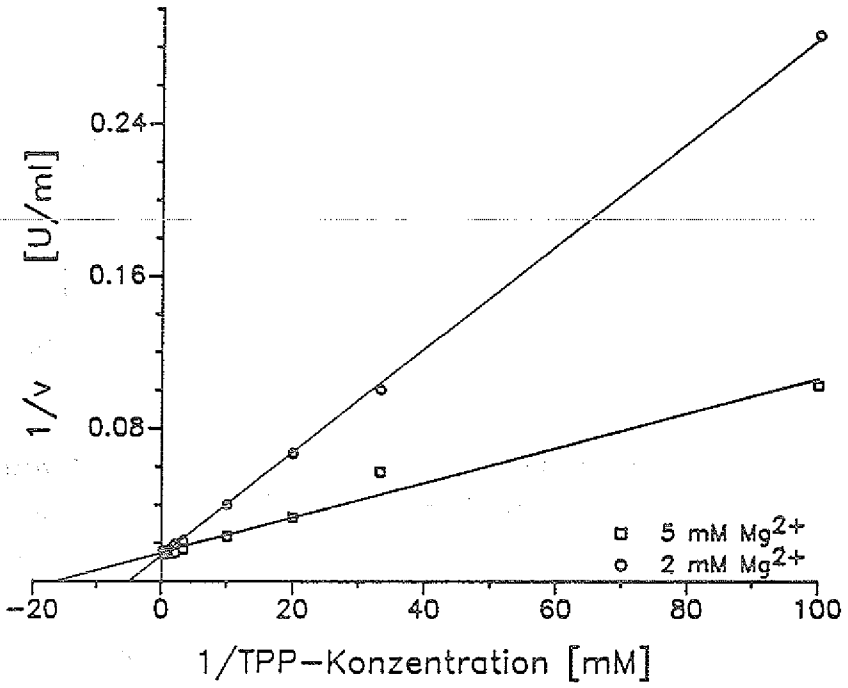


Abb. 50 : Doppelt-reziproke Auftragung der Regenerierung der PDC in Abhängigkeit der TPP-Konzentration

4.7.5 Einfluß der Modifikation von Cystein und Tryptophan auf die Enzymaktivität

In der Literatur wird für die Hefe-PDC und für das Weizenkeimenzym der Einfluß von Cystein und Tryptophan auf die katalytische Aktivität beschrieben (Ullrich 1982; Zehender 1984). Eine Beeinflussung des Zymomonas-Enzyms sollte daraufhin auch zunächst für diese beiden Aminosäuren untersucht werden.

Zunächst wurde eine Modifizierung von Tryptophan mit (HNB)SMe_2Br durchgeführt. 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-dimethyl-sulfoniumbromid ist ein mildes Reagenz für die spezifische Modifizierung von Tryptophan. Die häufig auftretende Nebenreaktion mit Cystein wurde durch Maskierung der SH-Gruppen mit PCMB ausgeschlossen.
Nach der Modifizierung zeigt das Absorptionsspektrum des Enzyms zwei neue Maxima bei ca. 320 und 410 nm (Abb. 51), die den bei der Modifikation entstandenen Tryptophanderivaten zuzuordnen sind (Ullrich 1982).

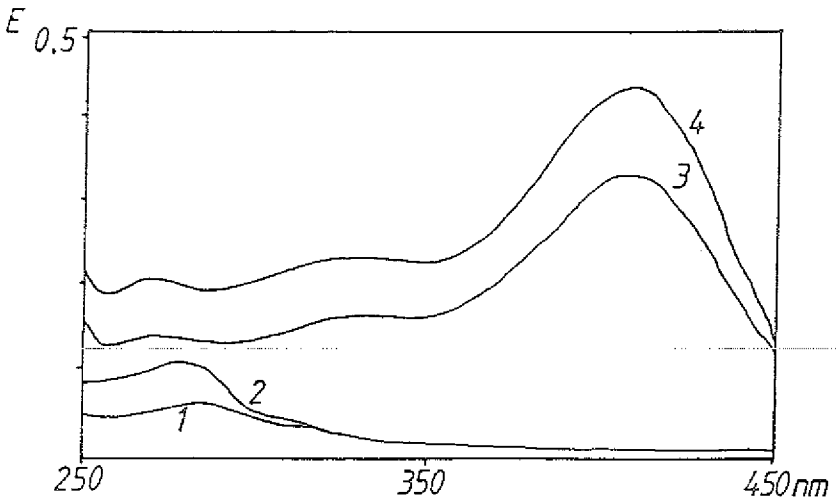


Abb. 51: Absorptionsspektren von Apo- und Holo-PDC aus Zymomonas mobilis - 1 natives Holoenzym, 2 natives Apoenzym 3 modifiziertes Holoenzym, 4 modifiziertes Apoenzym

Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten nach den einzelnen Modifikationsschritten zeigt, daß sowohl Tryptophan als auch Cystein für die katalytische Funktion der PDC wichtig sind.

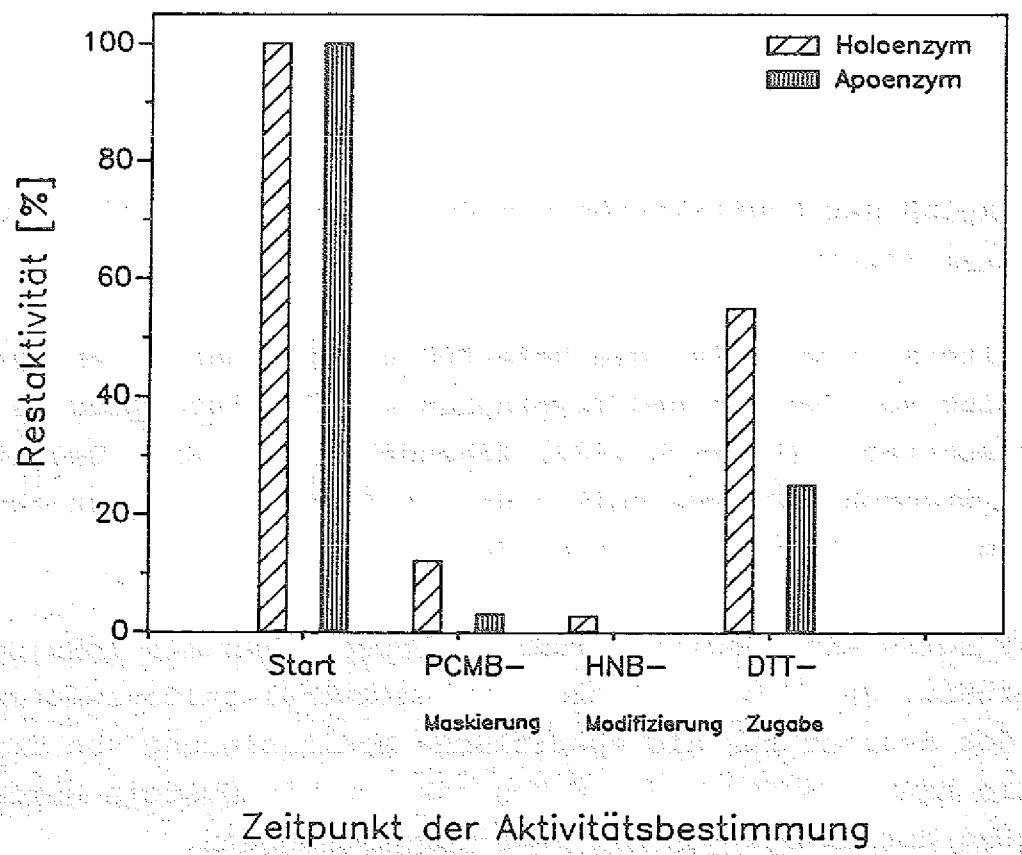


Abb. 52: Einfluß der Modifizierung von Cystein und Tryptophan auf die Enzymaktivität der PDC aus Zymomonas mobilis (ZM6)

Bereits nach Maskierung der SH-Gruppen ist ein erheblicher Aktivitätsverlust zu verzeichnen (Abb. 52), während nach der Modifizierung der Tryptophan-Reste die Aktivität fast vollständig verschwindet. Ein Vergleich der Modifikation bei Apo- und Holo-PDC zeigt beim Apoenzym einen deutlich höheren Aktivitätsverlust. Das Holoenzym aus Weizenkeimen (Zehender 1984) konnte nach der Abspaltung der SH-Schutzgruppe wieder vollständig reaktiviert werden. Offensichtlich bieten die Cofaktoren dem Holoenzym einen Schutz vor dem Angriff des Modifizierungsreagenzes. Allerdings konnte bei der Zymomonas-PDC im Gegensatz zu den Erwartungen keine vollständige Reaktivierung beobachtet werden. Nach Abspaltung der SH-Schutzgruppen mit DTT wurde beim Apoenzym nur noch 25 % der Ausgangsaktivität gemessen, während das Holoenzym zu 55 % reaktiviert werden konnte.

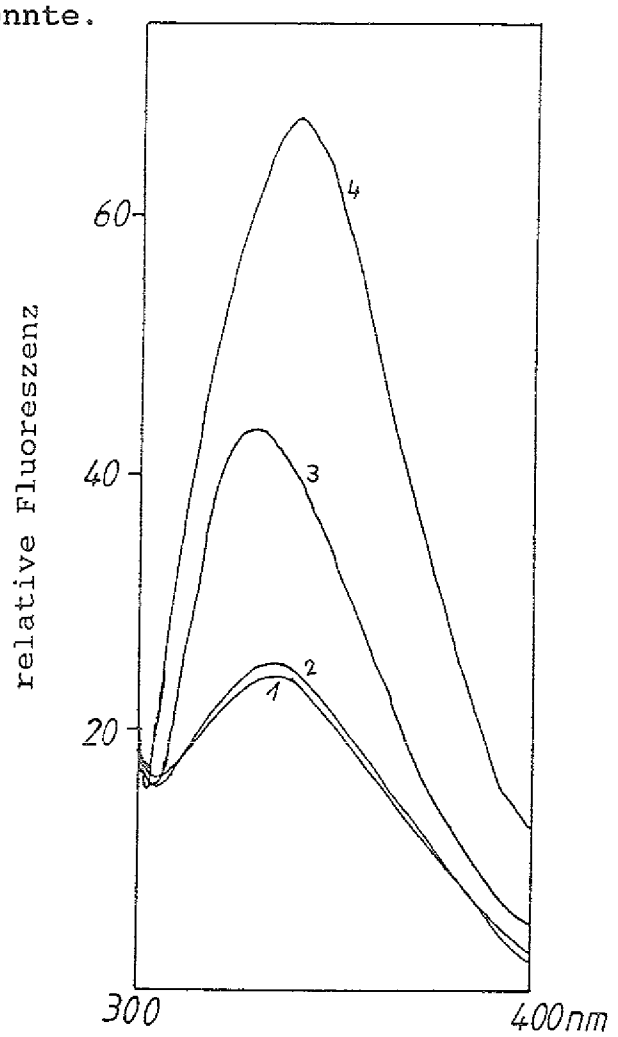


Abb. 53: Tryptophan-Fluoreszenzspektren von nativer und Tryptophan-modifizierter Apo- und Holo-PDC, 0,05 mg Protein/ml, - 1 modifiziertes Holoenzym, 2 modifiziertes Apoenzym, 3 natives Holoenzym, 4 natives Apoenzym

Der Vergleich der Tryptophan-Fluoreszenz von Apo- und Holoenzym vor und nach der Modifikation zeigt eine deutlich höhere Fluoreszenz beim Apoenzym. Nach der Modifikation der Tryptophan-Moleküle sinkt die Fluoreszenz auf das Niveau des modifizierten Holoenzym ab (Abb. 53).

Die höhere Tryptophan-Fluoreszenz vom Apoenzym macht die Beteiligung der Aminosäure Tryptophan an der Bindung der Cofaktoren deutlich. Für das Hefeenzym wurden analoge Ergebnisse von Ullrich (1982) beschrieben.

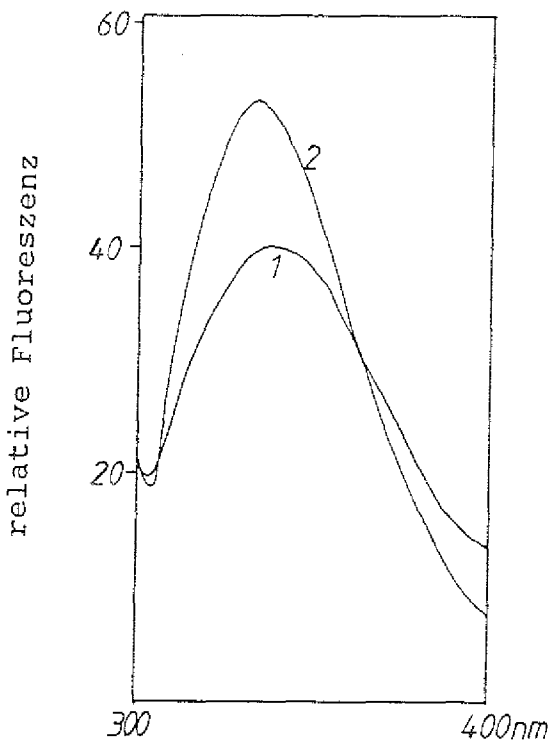


Abb. 53a: Tryptophan-Fluoreszenz vom Holoenzym (2) im Vergleich zur irreversibel gehemmten PDC (1), Proteingehalt: 0,05 mg/ml

Auch die irreversible Bindung von Glyoxylsäure bewirkt eine Erniedrigung der Tryptophan-Fluoreszenz (Abb. 53a).

4.8 Untersuchungen der PDC aus Zymomonas mobilis ATCC 31821

Die Unterschiede der Gensequenzen der beiden Zymomonasenzyme aus den Stämmen ZM4 und ZM6 führen zu Abweichungen der Primärstruktur

und sogar zu einer unterschiedlichen Länge der Proteinuntereinheiten. Diese Unterschiede führen nicht zu einer Inaktivierung des Enzyms, können aber einen Einfluß auf die Eigenschaften der PDC haben, der in folgenden Ergebnissen dargelegt werden soll.

Das Enzym aus ZM4 wurde zunächst nach dem für die PDC aus ZM6 optimierten Verfahren gereinigt. Für die Aufarbeitung standen 70 g Zellmasse aus einer kontinuierlichen Kultur zur Verfügung.
Die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse zeigen den Verlauf der Reinigung.

Tabelle 11: Ergebnisse der Reinigung der PDC aus Zymomonas mobilis ATCC 31821 im Vergleich zum Stamm ATCC 29191

Reinigungsschritt	Reinigungsfaktoren		spez. Aktivität U/mg	
	ZM4	Zm6	ZM4	ZM6
Zellaufschluß	1	1	8	9
Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen	2,5	3,3	20	30
Diafiltration	3	4	25	32
Affinitätschromatographie an H-E4BD	9,5	9	76	78
Affinitätschromatographie an H-E4R	15	13,4	120	120
Ionenaustauschchromatographie	22,5	18,6	180	167

Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms aus ZM4 konnte mit 180 U/mg bestimmt werden. Die Gesamtausbeute des Enzyms lag mit 0,5 mg/g Zellmasse im Vergleich zum Enzym aus ZM 6 (3 mg/g) jedoch sehr niedrig. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich in der starken Schleimbildung der Zellsuspension zu suchen, die einem optimalen Aufschluß entgegenwirkt.
Die anschließende enzymatische Charakterisierung der PDC aus ZM4 erfolgte nach gleichen Ansätzen wie bei dem Enzym aus ZM6.
Einen Vergleich der kinetischen Daten beider Enzyme zeigt Tab. 12.

Tabelle 12: Vergleich der Daten für die Enzyme aus ZM4 und ZM6

	ZM4	ZM6
K_M-Wert	0,47 mM	0,38 mM
K_i-Wert	70 mM	80 mM
Hillkoeffizient	1,78	1,8
pI	4,75	4,8

Trotz der strukturellen Unterschiede der beiden Enzyme findet man viele Übereinstimmungen der kinetischen Daten. Die PDC aus ZM4 zeigt einen sigmoiden Kurvenverlauf und wird ebenfalls durch Substratkonzentrationen > 20 mM gehemmt.
Ein deutlicher Unterschied ist jedoch hinsichtlich der K_M-Werte feststellbar.

5. Diskussion

Reinigung der PDC

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Aufreinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis im Gramm-Maßstab. Die Feinreinigung basiert auf der von Neale et al. (1987a) entwickelten Methode, die hinsichtlich der Ausbeute und der Homogenität des Produktes überarbeitet wurde.
Tabelle 13 zeigt die Gegenüberstellung der Methode nach Neale et al. (1987a) mit dem in dieser Arbeit optimierten Verfahren.

Tabelle 13: Vergleich der Aufreinigungsverfahren nach Neale et al. (1987a) mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode

Arbeitsschritt	Neale et al.	optimiertes Verfahren
Zellaufbruch	enzymatisch	mechanisch durch Naßvermahlung
Abtrennung der Zellfragmente	Zentrifugation	Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen
Abtrennung von Fremdprotein	Affinitätschromatographie an H-E4BD	Affinitätschromatographie an H-E4BD
Affinitätsbindung der PDC	Affinitätschromatographie an H-E4R	Affinitätschromatographie an H-E4R
Konzentrierung der Enzymlösung	Ammoniumsulfatfällung	Ultra/Diafiltration
Abtrennung des Fremdproteins	Ionenaustauschchromatographie	Ionenaustauschchromatographie

Die wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Methoden sind der Zellaufbruch durch Einsatz der Naßvermahlung in einer Rührwerkskugelmühle und die daran anschließende Extraktion in wässrigen 2-Phasensystemen.
Der Einsatz der Extraktion in wässrigen Phasensystemen zur Abtrennung der festen Bestandteile nach dem Zellaufschluß hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber der bei Neale et al. (1987a) verwendeten

Zentrifugation. Die Anwendung der Flüssig-Flüssig-Extraktion erfordert keinen großen apparativen Aufwand und das Kosten-Leistungsverhältnis liegt im Vergleich zu anderen Methoden deutlich günstiger (Kula 1987).
Ein wesentlicher Vorzug ist jedoch die gleichzeitig mit der Abtrennung der Zelltrümmer stattfindende Separierung von DNA, Polysacchariden und Fremdprotein (Kroner et al. 1982, Kula 1988). Der Einsatz der Extraktionssysteme in "Downstream-Prozessen" ist ohne große Probleme möglich (Kula 1987+1988).
Im Fall der PDC erweist sich die Extraktion in wässrigen Phasensystemen für die Abtrennung der Zellfragmente als Methode der Wahl. Der Verteilungskoeffizient K (A_{oben}/A_{unten}) nimmt für die Pyruvatdecarboxylase Werte größer 100 (Phasensystem I), bzw. kleiner 0,01 (Phasensystem II) an, d.h. die Pyruvatdecarboxylase kann, wie es für große Makromoleküle beschrieben wird (Kula et al.1978), in beiden Extraktionssystemen vollständig in einer der beiden Phasenkomponenten nachgewiesen werden (einseitige Verteilung). Die Ausbeute bei Einsatz der Extraktion liegt im Fall der PDC in beiden Phasensystemen bei 100 % (Tabelle 6).

Die anschließende Affinitätschromatographie an den Farbstoffsäulen, sowie die Ionenaustauschchromatographie wurden unverändert übernommen.

Die Anreicherung der PDC um den Faktor 3, die durch Einsatz der Extraktion in wässrigen 2-Phasensystemen erreicht wurde, bewirkt eine Erhöhung der Kapazität der Farbstoffsäulen. Dadurch können im Vergleich zu Neale et al. (1987a) die Reinigungsfaktoren für die grüne Affinitätssäule von 4 auf 8,7 und entsprechend für die gelbe Affinitätssäule von 9 auf 13,3 erhöht werden.
Erklärbar ist diese Erhöhung mit den Bindungseigenschaften der Farbstoffe. Triazinfarbstoffe besitzen keine hohe Spezifität, sondern können als gruppenspezifische Adsorbenzien für die Proteinreinigung eingesetzt werden, wobei der polysulfonierte Ring die natürlichen biologischen Heterocyclen ersetzt (Clonis und Lowe 1980; 1981). Je geringer der Anteil an bindungsfähigem Fremdprotein in der Enzymlösung ist, umso mehr Bindungsstellen stehen für die Reinigung des Enzyms zur Verfügung.

Für die Konzentrierung des Enzyms nach der Farbstoffchromatographie wurde anstelle der von Neale et al. (1987a) verwendeten Ammoniumsulfatfällung der Einsatz der Ultrafiltration bevorzugt, die einen zusätzlichen Reinigungseffekt (z.B. Entsalzung) erzielt (Flaschel et al. 1983), während Fällungsreaktionen oft schlecht reproduzierbar sind und im technischen Maßstab zudem häufig Aktivitätsverluste aufweisen. Zudem erspart man im Vergleich zum Verfahren nach Neale et al. einen Arbeitsschritt, da gleichzeitig die für die darauffolgende Ionenaustauschchromatographie notwendige Entsalzung erfolgt.
Das in dieser Arbeit optimierte Reinigungsverfahren erforderte einen Zeitaufwand von 6-7 Tagen und führte zu einem homogenen Präparat. Die Enzymausbeuten lagen bei 3 mg PDC/g Zellmasse.
Die Homogenität des Enzyms konnte durch chromatographische und elektrophoretische Methoden, sowie durch die Aminosäureanalyse belegt werden, wenngleich alle diese Verfahren keinen eindeutigen Beweis für die Reinheit des Präparates liefern. Gleiches gilt auch für die Kristallisierbarkeit des Enzyms, die aber eine hohe Reinheit des Enzyms bedingt. Der zwingende Beweis für ein homogenes Präparat konnte letztendlich durch die homogene N-terminale Sequenzanalyse erbracht werden.
Dennoch konnte die von Neale et al. (1987a) beschriebene Bildung von Mikrokristallen nach Zugabe von Ammoniumsulfat zum konzentrierten gereinigten Enzym (30mg Protein/ml) in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, obwohl eine höhere spezifische Aktivität des Enzympräparates erreicht wurde.

Ein Vergleich verschiedener Reinigungsverfahren für die Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis (Tabelle 14) zeigt deutliche Unterschiede hinsichtlich Ausbeute und Reinheit der Produkte.
Der hohe Anreicherungsfaktor bei der Aufarbeitung von Hoppner und Doelle (1983) geht auf die sehr niedrige spezifische Aktivität des Rohextraktes zurück.
Dieses Ergebnis ist jedoch nicht unmittelbar mit den anderen Daten vergleichbar, da in dieser Arbeit der Stamm Zymomonas mobilis ATCC 10988 verwendet wurde, während bei allen anderen Arbeiten der Stamm ATCC 29191 zugrunde lag.

Tabelle 14: Ergebnisse verschiedener Reinigungsverfahren für das Enzym Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis

Aufarbeitung	spez. Aktivität des Rohextraktes	spez. Aktivität der PDC	Anreicherungs-faktor	Ausbeute %
Hoppner+Doelle	0,3 U/mg	134 U/mg	447	75
Neale et al.	8 U/mg	120 U/mg	15	88
Bringer et al.	10,9 U/mg	181 U/mg	16,6	22,6
eigene Daten	9 U/mg	167 U/mg	18,6	90

Betrachtet man die Enzymausbeuten in den verschiedenen Aufarbeitungsverfahren so zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede. Bringer-Meyer et al. (1986) erreicht nur eine Enzymausbeute von 22,6 %, während in den anderen Aufarbeitungen Ausbeuten zwischen 75-90 % erreicht werden konnten. Die höhere spezifische Aktivität dieses Enzympräparates ist möglicherweise auf Unterschiede der Genauigkeit von Proteinassays bei verschiedenen Proteinkonzentrationen zurückzuführen.

Sequenzanalyse

Die Kenntnis der Primärstruktur von Proteinen ist eine wichtige Voraussetzung für angestrebte Studien zum Protein Engineering und für die Auswertung der Röntgenstrukturanalyse. Die Bestimmung der Primärstruktur kann sowohl durch Analyse der Gensequenz (Maxam und Gilbert 1977; Sanger 1977) als auch mittels Proteinsequenzierung nach dem Edman-Abbau erfolgen.
Obwohl die Methode der Gensequenzierung schneller Ergebnisse liefert, muß vielfach auf die automatisierte N-terminale Sequenzanalyse nach Edman ausgewichen werden, vor allem, wenn das Gen noch nicht isoliert werden konnte, oder wenn, wie im Fall der Pyruvatdecarboxylase die Gensequenzen, bestimmt in zwei voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen (Neale et al. 1987b; Reynen und Sahm 1988), Unterschiede aufweisen.

Mit dem N-terminalen Edmanabbau können durch die unvollständige Ausbeute der einzelnen Abbauschritte (repetitive yield) und aufgrund des zunehmenden Hintergrunds nur Teilsequenzen mit begrenzter Länge bestimmt werden. Die optimale Größe der Sequenzen wird neben der aktuellen Sequenz auch durch das Gerät und die Methode zur Peptidisolierung vorgegeben und variiert je nach Alter der Chemikalien und der Säule bei flüssigen Proben zwischen 40 und 60 Aminosäuren. Im Vergleich dazu können bei der Sequenzierung geblotteter Proben maximal 40 Zyklen ausgewertet werden (Miczka und Kula 1989).
Das Hauptproblem der Proteinsequenzierung ist trotz großer Fortschritte nach wie vor die Isolierung ausreichender Mengen sequenzierbarer Peptide, wogegen der automatisierte Ablauf der N-terminalen Sequenzanalyse im Allgemeinen problemlos verläuft.
Durch die Bestimmung der Sequenz überlappender Peptide kann die vollständige Sequenz des Enzyms ermittelt werden.

Die meisten bisher publizierten Arbeiten beschreiben die Trennung der Peptide über reversed phase Chromatographie an der HPLC (Steffenson und Anderson 1987; Tarr und Crabb 1983; Aebersold et al. 1987). Erst in den letzten Jahren wurde eine neue Methode, die Trennung über SDS-Elektrophorese mit anschließendem elektrophoretischen Transfer (Matsudaira 1987; Eckerskorn et al. 1988; Nokihara 1988, Yuen et al. 1988; Miczka und Kula 1989) für die Isolierung sequenzierbarer Peptide beschrieben. Diese konnte auch im Fall der PDC erfolgreich eingesetzt werden.

Besonders wichtig war diese Methode bei der Trennung von Peptiden aus der Ameisensäurespaltung. Da pro Untereinheit nur zwei Spaltstellen vorhanden sind, entstehen sehr große Peptide, die sich dadurch auszeichnen, daß sie nur in konzentrierter Ameisensäure löslich sind. Die Trennung der Peptide konnte weder mit HPLC (Tarr und Crabb 1983), noch mittels Gelfiltration (Abb. 28) erreicht werden. Weitere chromatographische Verfahren erwiesen sich aufgrund des sauren pH-Wertes als ebenso ungeeignet. Eine erfolgreiche Trennung war nur mittels SDS-PAGE möglich. SDS und Mercaptoethanol verhindern die Aggregation der Peptide und ermöglichen damit auch eine Auftrennung schlecht löslicher Peptide. Der

Einsatz solcher Peptide für die Sequenzanalyse wird durch den elektrophoretischen Transfer auf eine inerte Membran ermöglicht. Dabei wird das SDS vollständig entfernt, so daß bei der anschließenden Sequenzanalyse keine Störungen hervorgerufen werden. Die für die Lagebestimmung der Peptide auf der Membran hilfreiche Färbung mit Amidoschwarz kann problemlos angewendet werden, da Amidoschwarz keine Artefakte bei der Auswertung der Aminosäuresequenz verursacht.
Aufgrund ihrer Länge konnten die Peptide aus der Ameisensäurespaltung nicht vollständig analysiert werden. Erst die in situ Spaltung mit Trypsin und der V8-Protease ermöglichte die Sequenzierung genügend kleiner Peptide und damit die Ermittlung der vollständigen Sequenz. Bei der Auswahl der in der in situ Spaltung verwendeten Proteasen muß vor allem die Aktivität in Gegenwart von Acetonitril gewährleistet sein, da die Spaltung in Puffer mit 5 % Acetonitril erfolgt, um einer schnellen Aggregation der entstehenden Peptide entgegen zu wirken.

Die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungen waren nicht in allen Fällen zufriedenstellend. Bei der Spaltung der ganzen PDC-Untereinheit entstehen aufgrund der zahlreichen vorhandenen Spaltstellen so viele Peptide, daß bei Trennversuchen mit HPLC nur wenige Einzelpeptide isoliert werden konnten, die direkt sequenzierbar waren. Erst bei Vorschalten einer weiteren Spaltung konnte wie im Fall der in situ Spaltung der Ameisensäurepeptide die Anzahl der Fragmente so stark reduziert werden, daß eine erfolgreiche Trennung der Peptide an reversed-phase-Säulen möglich wurde.
Versuche die enzymatischen Peptide elektrophoretisch zu trennen scheiterten an dem niedrigen Molekulargewicht der Peptide. Nur bei der limitierten Proteolyse konnten sowohl tryptische als auch V8-Peptide mit höheren Molekulargewichten mittels Elektrophorese isoliert werden.
Thrombin besitzt eine höhere Spezifität als die beiden anderern Proteasen, was zu einer geringeren Anzahl längerer Peptide führen sollte. Leider wird häufig beobachtet, daß Thrombin je nach vorliegendem Protein selbst unter extremen Bedingungen nicht alle möglichen Bindungen spaltet (Uehara et al. 1979). Spaltungsversu-

che an der PDC lieferten keine Peptide, obwohl laut Gensequenz mehrere spaltbare Sequenzen vorhanden sein sollten.

Außer den bereits aufgeführten Spaltungen konnte bei der PDC auch die Bromcyanspaltung erfolgreich durchgeführt werden. Die entstandenen Peptide ließen sich sowohl mit HPLC als auch mittels Elektrophorese auftrennen und anschließend sequenzieren. Aufgrund des relativ kleinen Molekulargewichtes der Bromcyanpeptide konnte bei fast allen die Gesamtsequenz, mit Ausnahme vom Homoserinlacton, bestimmt werden.

Der Versuch, Peptide aus einer konzentrierten Enzymlösung zu gewinnen, scheiterte an der schlechten Löslichkeit der Peptide. Erst der Einsatz verdünnter Enzymlösungen (max. Proteinkonzentration ≤ 1mg/ml) führte zu einer erfolgreichen Isolierung von Peptiden.
Die geringere Löslichkeitsgrenze der Peptide im Vergleich zur nativen PDC (Löslichkeitsgrenze ca. 30 mg/ml) kann mit dem recht hohen Anteil hydrophober Aminosäuren (1/3 der gesamten Aminosäuren = 187) erklärt werden. Dieser setzt die Löslichkeit in wässriger Umgebung deutlich herab, vor allem dann, wenn die hydrophoben Reste nach Auffaltung des Proteins oder durch Fragmentierung des Proteins mit dem wässrigen Lösungsmittel in Kontakt kommen.

Mit Hilfe der isolierten Peptide konnte die Sequenz in weiten Teilen durch überlappende Sequenzen bestätigt werden. Das Ergebnis zeigt, mit Ausnahme der Aminosäuren in den Positionen 232, 254, 255 und 506, eine deutliche Übereinstimmung mit der aus der Gensequenz nach Neale et al. (1987b) abgeleiteten Primärstruktur des Enzyms. Auch zur später publizierten Gensequenz (Reynen und Sahm 1988) wurden einige Abweichungen festgestellt.
Ein Vergleich der Primärstruktur der beiden Zymomonasstämme ATCC 29191 (ZM6) und ATCC 31821 (ZM4), zeigt dagegen nur 95 % Homologie. Dennoch konnten bei der enzymatischen Charakterisierung dieser beiden Enzyme keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Reaktionsmechanismus festgestellt werden, woraus gefolgert werden kann, daß der abweichende Bereich der Sequenz keine wichtige Funktion für den Reaktionsmechanismus besitzt.

Der Sequenzunterschied zur Hefe-PDC ist mit nur 28 % Homologie noch größer, obwohl auch hier große Ähnlichkeiten im Reaktionsmechanismus beobachtet wurden (Bringer-Meyer et al. 1986; Hoppner und Doelle 1983; Neale et al. 1987a+b).
Die Homologie zur Hefe beschränkt sich fast ausschließlich auf die Anfangs- und die Endsequenz der Enzyme (Abb. 35a), wobei der Endsequenz aufgrund des Tryptophangehaltes wahrscheinlich mehr Bedeutung zukommt. Eine Beteiligung von Tryptophan an der katalytischen Aktivität wurde bei der PDC aus Hefe und Weizenkeimen beobachtet (Ullrich 1982; Zehender 1984).

Auch bei der PDC aus Zymomonas mobilis konnte durch Modifikation der Aminosäure Tryptophan eine Abnahme der Enzymaktivität gemessen werden.
Die Beteiligung von Tryptophan in Position 261 (Abb. 35+35a) wird aber ausgeschlossen, da hier keine Übereinstimmung mit den Sequenzen aus Zymomonas mobilis ZM4 und aus Hefe festgestellt wurde, während das Auftreten der Tryptophanmoleküle in den Positionen 411 und 486 in allen drei Sequenzen für eine Beteiligung dieser Aminosäuren am Reaktionsmechanismus spricht.

Die Bedeutung der Endsequenz der PDC wird durch weitere Homologiestudien hervorgehoben. Ein Vergleich mit den Sequenzen anderer TPP-abhängiger Enzyme wie die Acetolactatsynthase, die Pyruvatoxidase, die Komponente E1 aus dem Pyruvatdehydrogenasekomplex von E. coli, die 2-Oxoglutaratdehydrogenase und die Formaldehydtransketolase (Green 1989; Hawkins et al. 1989) zeigt einen ca. 50 Aminosäuren umfassenden Bereich, der in allen Sequenzen stark konserviert ist. Dieser Bereich umfaßt in der Proteinsequenz der Zymomomas-PDC die Aminosäuren 429-472.
Hawkins et al. (1989) schlossen aus der gemeinsamen TPP-Abhängigkeit der untersuchten Enzyme, daß es sich bei dem homologen Bereich möglicherweise um die TPP-Bindungsstelle handelt.

Charakterisierung der PDC

Trotz der erheblichen Unterschiede in der Struktur, besonders im Vergleich zum Hefeenzym, sind bei den Ergebnissen der enzymati-

schen Charakterisierung bezüglich der kooperativen Effekte, der Hemmbarkeit und des Dissoziations- und Rekombinationsverhaltens viele Übereinstimmungen (Tabelle 15) feststellbar, die auf einen zumindestens sehr ähnlichen Reaktionsmechanismus schließen lassen.

Das Zymomonas-Enzym ist, wie die Enzyme aus Hefe und Weizenkeimen, ein tetrameres Enzym. Die PDC aus Zymomonas besteht allerdings aus vier homologen Untereinheiten (4α-Struktur) mit einem Molekulargewicht von 60749 Dalton, während die beiden anderen Enzyme aus unterschiedlichen Proteinuntereinheiten ($\alpha_2\beta_2$-Struktur) aufgebaut sind, deren Molekulargewichte sich geringfügig unterscheiden (63000+65000 bei Hefe- (Ullrich und Freisler 1977) und 61000+65000 bei Weizenkeim-PDC (Zehender 1984)).
Allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, ob die kleinere ß-Untereinheit durch proteolytische Aktivität aus der α-Untereinheit entsteht (Ullrich 1982) oder auf das Vorhandesein von einer zweiten, teilweise unterschiedlichen DNA-Sequenz zurückzuführen ist (Zehender und Ullrich 1984). Die relativ großen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung von α- und ß-Kette deuten zwar darauf hin, bisher konnte aber kein eindeutiger Hinweis auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen PDC-Genen gefunden werden.
Kellermann et al. (1986) gelang die Isolierung und Sequenzierung eines PDC-Gens aus Hefe. Das daraus resultierende Molekulargewicht der Untereinheit ergab sich zu 60008 Dalton.

Hinsichtlich der K_M-Werte zeigen die Enzyme mehr oder weniger große Unterschiede (Tabelle 15). Die PDC aus Zymomonas zeichnet sich (Ausnahme Stamm ATCC 10988) im Vergleich zu den Enzymen aus Hefe und Weizenkeimen durch sehr geringe K_M-Werte aus. Die höhere Affinität zum Substrat kann mit der wichtigen Funktion der PDC im Organismus bei der Aufrechterhaltung der Redoxbilanz erklärt werden.
Eine Hemmung des Enzyms durch das Substrat wird bei allen Enzymen beobachtet. Bei dem bakteriellen Enzym tritt sie bereits bei Pyruvatkonzentrationen > 20 mM ein, während bei den Enzymen aus Hefe und Weizenkeimen erst Pyruvatkonzentrationen oberhalb 100 mM eine Substrathemmung hervorrufen (Zehender 1984).

Tabelle 15 : Vergleich der charakteristischen Enzymdaten der PDC aus verschiedenen Organismen, bzw. verschiedenen Aufarbeitungen

Organismus (Quelle)	Molekulargewicht nativ[1]	Molekulargewicht denaturiert[2]	K_M mM	pI	spezifische Aktivität	Hill-koeffizient
Zymomonas ATCC 29191 (Miczka)	209000	59000	0.38	4.8	167 U/mg	1.8
Zymomonas ATCC 29191 (Bringer)	200000	56000	0.4	4.87	181 U/mg	n.b.
Zymomonas ATCC 29191 (Neale)	240000	59000	0.3	n.b.	120 U/mg	1.0
Zymomonas ATCC 31821 (Miczka)	n.b.	55000	0.47	4.75	180 U/mg	1.78
Zymomonas ATCC 10988 (Hoppner)	219700	31000	4.4	n.b.	134 U/mg	1.0
Weizenkeim (Zehender)	252000	61+65000	3.0	4.9	80 U/mg	1.9
Hefe (Ullrich)	256000	63+65000	1.0	4.8	60 U/mg	1.8

die Molekulargewichte wurden mittels Gelfiltration[1] und SDS-Elektrophorese[2] bestimmt
(n.b.=nicht bestimmt)

Kooperative Effekte wurden für die Hefe-PDC (Juni 1961; Boiteux und Hess 1970; Ullrich und Donner 1970a) und auch für die PDC aus Weizenkeimen (Zehender et al. 1983; Zehender 1984) beschrieben. Neale et al. (1987a) und Hoppner und Doelle (1983) beschreiben für die Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas eine Michaelis-Menten-Kinetik.
In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen auch bei der PDC aus Zymomonas eine sigmoide Kinetik der Substratsättigung beobachtet. Dieses gilt sowohl für das Enzym aus ZM6 als auch für die PDC aus ZM4. In der Auftragung nach Hanes (Abb. 38) werden kooperative Effekte durch Abweichungen der Kurve bei niedrigen Substratkonzentration angezeigt (Cornish-Bowden 1979a+b). Die aus dem Hill-Plot resultierenden Hillkoeffizienten unterscheiden sich nur unwesent-

lich von den für Hefe-PDC und Weizenkeimenzym beschriebenen Daten (Tabelle 15).

Untersuchungen mit Substratanalogen zeigten, daß bei der PDC aus Zymomonas, ebenso wie bei den Enzymen aus Hefe und Weizenkeimen, eine irreversible Hemmung durch Glyoxylsäure auftritt. Die Ablösung des bei der Decarboxylierung entstehenden Formaldehyds wird vermutlich, wie für das Hefeenzym beschrieben (Uhlemann und Schellenberger 1967), durch die hydrophobe Umgebung des katalytischen Zentrums verhindert. Somit bleibt das katalytische Zentrum für die Aufnahme weiterer Substratmoleküle blockiert.
Daneben wird das Zymomonas-Enzym durch eine Reihe weiterer Substratanaloge, wie z.B. das 3-Hydroxypyruvat, reversibel gehemmt (Thomas et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erniedrigung von V_{max} für den Pyruvatumsatz in Gegenwart von Phenylpyruvat beobachtet werden.
Eine kompetitive Hemmung des Enzyms tritt in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffs 2-p-Toluidinonaphthalin-6-sulfonat auf. Die erhöhte Fluoreszenz vom Apoenzym im Vergleich zum Holoenzym deutet auf eine Bindung an das katalytische Zentrum hin.
Der kompetitive Hemmeffekt durch TNS wurde auch schon für das Hefeenzym (Ullrich und Donner 1970b) und die PDC aus Weizenkeimen (Zehender 1984) beschrieben. Es wurden Inhibitorkonstanten von 30 und 39 µM TNS festgestellt. Die Inhibitorkonstante für das Enzym aus Zymomonas ist mit 80 µM TNS ungefähr doppelt so hoch. Bringer-Meyer und Sahm (1988) beschreiben sogar einen 3-fach höheren K_i-Wert (100 µM) für TNS.
Die Bindung von TNS an die "active site" weist auf eine hydrophobe Umgebung des katalytischen Zentrums der PDC hin. Diese hat eine wesentliche Funktion bei der Stabilisierung des α-Carbanions, das bei der Decarboxylierungsreaktion und auch bei der Acetoinbildung als Zwischenprodukt gebildet wird. Bei kurzer Lebensdauer des α-Carbanions erfolgt bevorzugt die Hauptreaktion der PDC (Schellenberger 1967). Für die Acetoinbildung ist eine längere Lebenszeit der aktiven Zwischenverbindung erforderlich. Durch die geringere Hydrophobizität wird diese jedoch verkürzt, was möglicherweise die schlechtere Acetoinbildung bei Zymomonas mobilis im Vergleich zur Hefe bewirkt. Die geringere Lipophilie des aktiven Zentrums geht

auch aus den im Vergleich zur Hefe-PDC höheren K_M-Werten für längerkettige α-Ketosäuren hervor (Bringer-Meyer und Sahm 1988).

Hinsichtlich der Dissoziation und Regenerierung der Enzymaktivität findet man deutliche Übereinstimmungen mit den für die Hefe-PDC veröffentlichten Daten.
Beide Enzyme zeigen den vollständigen Aktivitätsverlust durch Dissoziation der Cofaktoren bei Inkubation in Puffern mit pH-Werten > pH 8,5. In Rekombinationsexperimenten kann durch Inkubation in Puffer (pH 6) mit Cofaktorüberschuß eine schnelle Rekombination des Enzyms in den ersten 5 Minuten beobachtet werden. Die Ausgangsaktivität kann vollständig wiederhergestellt werden.
Kinetische Untersuchungen der Rekombination der Hefe-PDC haben ergeben, daß die beiden Cofaktoren in sehr schnellen reversiblen Reaktionen an das Apoenzym gebunden werden. Anschließend erfolgt in einer langsamen irreversiblen Reaktion die Zyklisierung dieses Adduktes zum stabilen Holoenzymkomplex. Durch die Gegenwart von Pyruvat wird diese Zyklisierungsreaktion begünstigt (Schellenberger und Hübner 1966; Schellenberger 1967).
Bezüglich der Cofaktoren verläuft die Rekombination des Holoenzyms bei der PDC aus Hefe in unabhängigen Reaktionen (Schellenberger 1967).
Bei dem Enyzm aus Zymomonas konnte dagegen eine abhängige Regenerierung bezüglich der Cofaktoren beobachtet werden. Diese zeigt sich bei der Auswertung der apparenten K_M-Werte für TPP und Mg^{2+} in Abhängigkeit der Mg^{2+}-, bzw. der TPP-Konzentration.
Der Vergleich der apparenten K_M-Werte für die Cofaktoren mit den in der Literatur publizierten Werten (Bringer-Meyer et al. 1986) läßt einen beschleunigenden Einfluß von Pyruvat auf den Verlauf der Regenerierung erkennen.
Eine Erhöhung der Rekombinationsgeschwindigkeit der PDC aus Zymomonas mobilis durch Pyruvat kann mit der bereits für das Hefeenzym beschriebenen Begünstigung der Zyklisierungsreaktion bei der Regenerierung des Holoenzyms erklärt werden.

Mit Hilfe von Modifizierungsexperimenten kann die Rolle einzelner Aminosäuren bei der Enzymreaktion untersucht werden.

Solche Untersuchungen wurden bereits für die Pyruvatdecarboxylase aus Hefe und Weizenkeimen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen eine Beteiligung der Aminosäuren Tryptophan und Cystein an der katalytischen Aktivität der PDC (Ullrich 1982; Zehender 1984). Der Verlust der Aktivierbarkeit durch das Substrat nach Modifikation der SH-Gruppen weist auf eine Funktion im Mechanismus der Substrataktivierung hin. Eine Beteiligung an der Bindung der Cofaktoren wird aufgrund der gleichzeitigen Inaktivierung von Apo- und Holoenzym durch Modifikation der SH-Gruppen ausgeschlossen (Schellenberger et al. 1986; Hübner et al. 1988). Dagegen deuten die Ergebnisse der Untersuchungen tryptophan-modifizierter PDC auf eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Bindung der Cofaktoren hin. Das Holoenzym wird durch die Tryptophan-Modifikation nicht beeinträchtigt. Das Apoenzym, bei dem die Bindungsstellen für die Cofaktoren nicht geschützt sind, wird hingegen bei der Hefe-PDC vollständig und bei dem Enzym aus Weizenkeimen zu 50 % inaktiviert.
Auch beim Enzym aus Zymomonas wird eine Inhibierung der Enzymaktivität durch Modifizierung von Cystein und Tryptophan beobachtet. Die Hemmung der Enzymaktivität durch Maskierung der SH-Gruppen kann, wie erwartet, bei Apoenzym und Holoenzym beobachtet werden. Nach der Modifizierung von Tryptophan weist das Holoenzym im Gegensatz zu den Erwartungen aber nur noch eine Restaktivität von 55 % auf. Die Aktivität vom Apoenzym geht auf 25 % zurück. Schließt man eine Schädigung des Enzyms durch die Modifikation aus, so kann das Ergebnis für das Holoenzym eine mögliche Beteiligung von Tryptophan an der Bindung vom Substrat bedeuten. Diese Hypothese wird auch durch das Ergebnis der Fluoreszenzmessung vom Holoenzym im Vergleich zur irreversibel gehemmten PDC gestützt.

Die vorliegenden Ergebnisse der Homologiestudien und Modifizierungsexperimente können jedoch nur Hinweise auf die mögliche Funktion einzelner Aminosäuren und Strukturen geben. Eine vollständige Auflösung der Struktur des aktiven Zentrums kann nur durch die Röntgenstrukturanalyse erfolgen. Diese wird, nachdem es gelungen ist ausreichend große Kristalle der PDC zu züchten, in der Arbeitsgruppe für makromolekulare Strukturforschung der GBF Braunschweig durchgeführt.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Isolierung und Reinigung des Enzyms Pyruvatdecarboxylase aus Zymomonas mobilis ATCC 29191 im Gramm-Maßstab sowie die enzymatische und proteinchemische Charakterisierung des gereinigten Enzyms.

Das optimierte Reinigungsverfahren basierte auf dem von Neale et al. (1987a) entwickelten Verfahren, das im Wesentlichen die Anwendung von Triazinfarbstoffen in der Affinitätschromatographie beinhaltet.
Das Verfahren wurde hinsichtlich der Enzymgewinnung im großen Maßstab erweitert. Dazu wurde zunächst der enzymatische Zellaufbruch durch den effektiveren mechanischen Zellaufbruch (Naßvermahlung in einer Rührwerkskugelmühle) ersetzt. Daran anschließend erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen, die eine gleichzeitige Anreicherung des Enzyms bewirkte. Die Feinreinigung des Enzyms erfolgte durch Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie.
Die optimierte Aufarbeitung führte zu Enzymausbeuten im Grammbereich. Die Ausbeuten der einzelnen Aufarbeitungsschritte lagen mit Ausnahme der Diafiltration bei annähernd 100 %.
Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms konnte im Vergleich zum ursprünglichen Verfahren von 120 U/mg auf 167 U/mg gesteigert werden.

Die Reinheit des hergestellten Enzympräparates konnte durch elektrophoretische und chromatographische Trennverfahren belegt werden. Weitere Hinweise ergaben die Kristallisierbarkeit des Enzyms und die Aminosäureanalyse. Den zwingenden Beweis für die Homogenität des Enzyms lieferte letztendlich die N-terminale Sequenzanalyse.

Die Sequenzanalyse erfolgte mittels automatisiertem Edman-Abbau an einem pulsed-liquid Sequenator. Das Enzym wurde mittels chemischer und enzymatischer Methoden, u.a. in der limitierten Proteolyse und der in situ Spaltung, fragmentiert und die entstandenen Peptide über reversed-phase Chromatographie an der HPLC oder durch SDS-

PAGE und Elektroblotting auf PVDF-Membranen isoliert. Nach Färbung der Membranen mit Amidoschwarz konnten die Peptide ausgeschnitten und direkt in die Sequenzanalyse eingesetzt werden. Proben aus der HPLC wurden in flüssiger Form aufgegeben.
Löslichkeitsprobleme bei der Peptidherstellung konnten durch gezielte Kombination der beiden Trennverfahren gelöst werden.
Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren nach dem Edman-Abbau erfolgte mittels on-line HPLC.

Durch den Vergleich mit der Proteinsequenz kann die von Neale et al. (1987b) publizierte Sequenz bis auf 4 Positionen bestätigt werden.
Die Ergebnisse von Homologieuntersuchungen ergeben besonders große Übereinstimmung mit der Sequenz der PDC aus Zymomonas mobilis ATCC 31821, während trotz großer Ähnlichkeit des Reaktionsmechanismus nur noch geringere Homologie zum Hefeenzym gefunden wird.

Aus den Molekulargewichtsbestimmungen ergaben sich für das native Enzym ein Molekulargewicht von 209000 +/- 10000 Dalton und für die Untereinheit 59000 +/-3000 Dalton. Aus der Sequenz errechneten sich die Molekulargewichte für die Untereinheit zu 60749 und für das tetramere Enzym zu 242996 Dalton. Der große Unterschied bei der Gelfiltration ist mit der Abweichung des Enzyms von der idealen Kugelform zu erklären.
Der isoelektrische Punkt der PDC liegt im Sauren bei pH 4,8.
Das Stabilitätsoptimum des Enzyms liegt bei pH 5,5, während das Optimum der Enzymaktivität zwischen pH 5,5 und 6,5 gemessen wird.

Die ermittelte Michaelis-Menten-Konstante der PDC für Pyruvat weicht mit 0,38 mM nur geringfügig von der bereits von Bringer-Meyer, Schimz und Sahm (1986) bestimmten Konstante ab. Eine Hemmung durch das Substrat konnte bereits bei Substratkonzentrationen von 20 mM Pyruvat beobachtet werden. Aus dem Hill-Diagramm ergab sich für das Enzym ein Hill-Koeffizient von 1,8.
Regenerierungsexperimente zeigten, daß nach einer vollständigen Inaktivierung bei pH-Werten > pH 8,5 die Aktivität durch Inkubation bei Cofaktorüberschuß nahezu vollständig zurückgewonnen werden kann. Die Regenerierungsgeschwindigkeit wird durch die Gegen-

wart vom Substrat erhöht. Ebenso beobachtet man in Gegenwart von Pyruvat eine erhöhte Affinität des Enzyms zu den beiden Cofaktoren TPP und Mg^{2+}.

Das Enzym läßt sich, wie auch für das Hefeenzym beschrieben (Uhlemann und Schellenberger 1967) durch Glyoxylsäure irreversibel hemmen. Ein kompetitiver Hemmeffekt wird bei Zugabe vom Fluoreszenzfarbstoff TNS, der vor allem an lipophile Bereiche bindet, beobachtet. Dieser weist auf eine lipophile Umgebung des aktiven Zentrums hin.
Durch Modifizierungsexperimente konnte eine Beteiligung der Aminosäuren Cystein und Tryptophan an der katalytischen Reaktion ermittelt werden.

Parallele Untersuchungen zur Enzymaktivität aus den Stämmen ZM4 und ZM6 ergaben trotz gewisser Unterschiede in der Struktur keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kinetik der Enzymreaktion. Die Ergebnisse zeigten auch bei der PDC aus ZM4 den für allosterische Enzyme typischen sigmoiden Kurvenverlauf. Der ermittelte Hill-Koeffizient lag bei 1,78. Lediglich der K_M-Wert lag mit 0,47 mM höher als beim Enzym aus ZM6.

Ein Vergleich mit Daten vom Hefeenzym zeigt trotz der geringen Homologie der Primärstruktur Übereinstimmungen, die auf einen ähnlichen Reaktionsmechanismus bei beiden Enzymen schließen lassen.

Literaturverzeichnis

Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, P.A., Hood, L.E. and Kent, St.B.H.:
Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 6970-6974

Albertsson, P.A.:
Partition of cell particles and macromolecules.
3rd ed., Whiley Interscience, London, 1986

Amicon:
Dye-ligand chromatography.
Amicon Corporation, Lexington 1980

Andrews, A.T.:
"Iso-Electric Focusing", in: Peacocke,A.R. und Harrington, W.F. (Ed.), Electrophoresis. 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1986; pp 241-288

Applied Biosystems:
Manual Sequencing

Arnold, F.H., Blanch, H.W. and Wilke C.R.:
Analysis of affinity separations. I: Predicting the performance of affinity adsorbers.
Chem. Eng. J. 30 (1985a) B9-B24

Arnold, F.H., Chalmers, J.J., Saunders, M.S., Croughan, M.S., Blanch, H.W. and Wilke, C.R.:
"A rational approach to the scale-up of affinity chroma tography", in: Purification and Fermentation Products.
ACS Symp. S 271 (1985b) 113-122

Atkinson, T., Hammond, P.M. Hartwell, R.D., Hughes, P., Scawen, M.D. Sherwood, R.F., Small, D.A.P., Bruton, C.J., Harvey, M.J., Lowe, C.R.:
Triazine-dye affinity chromatography.
Biochem. Soc. Trans. 9 (1981) 290-293

Baird, Sherwood, Carr and Atkinson (1976)
Enzyme purification by substrate elution chromatographie from procion-dye polysaccharidmatrices.
FEBS Lett. 70 (1976) 61-66

Boiteux, A. and Hess, B.:
Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase.
FEBS Lett. 9 (1970) 293-296

Bradford, M.M.:
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein untilizing the principle of protein-dye binding.
J. Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254

Bräu, B. and Sahm, H.:
Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of Zymomonas mobilis in Escherichia coli.
Arch. Microbiol. 144 (1986) 296-301

Bringer, S. und Sahm, H.:
Ethanolproduktion mit Bakterien.
Jahresbericht 1984/85 der Kernforschungsanlage Jülich GmbH, (1985) 31-36

Bringer, S., Finn, R.K., Sahm, H.:
Effect of oxygen on the metabolism of Zymomonas mobilis.
Arch. Microbiol. 139 (1984a) 376-381

Bringer, S., Sahm, H. and Swyzen, W.:
Ethanol production by Zymomonas mobilis and its application on an industrial scale.
Biotechnol. Bioeng. Symp. 14 (1984b) 311-319

Bringer, S., Härtner, T., Poralla, K. and Sahm, H.:
Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of Zymomonas mobilis.
Arch. Microbiol 140 (1985) 312-316

Bringer-Meyer, S. and Sahm, H.:
Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylases of Zymomonas mobilis and Saccharomyces carlsbergensis.
Biocatalysis 1 (1988) 321-331

Bringer-Meyer, S., Schimz, K.-L. and Sahm, H.:
Pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis. Isolation and partial characterization.
Arch. Microbiol. 146 (1986) 105-110

Budesinsky, Z. and Protiva, M.:
"Ephedrin." in: Knobloch, W. (Ed.), Synthetische Arzneimittel. Akademie Verlag, Berlin, 1961; pp 24-27

Cleveland, D.W., Fischer, St.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K.:
Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 252 (1977) 1102-1106

Clonis, Y.D. and Lowe, Ch.R.:
Triazine dyes, a new class of affinity labels for nucleotide-dependent enzymes.
Biochem. J. 191 (1980) 247-251

Clonis, Y.D. and Lowe, Ch.R.:
Affinity chromatography on immobilised triazine dyes. Studies on the interaction with multinucleotide-dependent enzymes.
Biochim. Biophys. Acta 659 (1981) 86-98

Clonis, Y.D., Goldfinch, M.J. and Lowe Ch.R.:
The interaction of yeast hexokinase with Procion Green H-4G.
J. Biochem. 197 (1981) 203-211

Conway, T., Osman, Y.A., Konnan, J.I., Hoffmann, E.M. and Ingram, L.O.:
Promoter and nucleotide sequences of the Zymomonas mobilis pyruvate decarboxylase.
J. Bacteriol. 169 (1987) 949-954

Cornish-Bowden, A.:
"Introduction to enzyme kinetics", in: Fundamentals of Enzyme Kinetics. Butterworths, London , 1979a; Kapitel 2

Cornish-Bowden, A.:
"Control of enzyme activity", in: Fundamentals of Enzyme Kinetics. Butterworths, London, 1979b; Kapitel 8

Darbre, A.:
"Total hydrolysis of proteins for amino acid analysis", Kapitel 8.6 in: Darbre, A. (Ed.), Practical Protein Chemistry. Whiley, London, 1986; pp 67-120

Dawes, E.A., Ribbons, D.W. and Large, P.J.:
The route of ethanol formation in Zymomonas mobilis.
Biochem. J. 98 (1966) 795-803

Dayhoff, M.O., Barker, W.C. and Hunt, L.T.:
Meth. Enzymol. 91 (1983) 524-545

Dean, P.D.G.:
Protein purification using immobilised triazine dyes.
J. Chromatogr. 165 (1979) 301-319

Drapeau, G.R.:
"Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease", in: Meth. Enzymol. 47 (1977) 189-191

Eckerskorn, Ch., Mewes, W., Goretzki, H. and Lottspeich, F.:
A new siliconized-glass fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins.
Eur. J. Biochem. 176 (1988) 509-519

Edelhoch, H.:
Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins.
Biochemistry 6 (1967) 1948-1954

Edman, P. and Begg, G.:
A Protein Sequenator.
Eur. J. Biochem. 1 (1967) 80-91

Ellman, G.L.:
Tissue sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70-77

Flaschel, E., Wandrey, Ch., Kula, M.R.:
"Ultrafiltration for the separation of biocatalysts", in: Fiechter, A. (Ed.), Adv. Biochem. Eng. 26 Springer Verlag, Berlin, 1983; pp 74 ff

Fontana, A. and Gross, E.:
"Fragmentation of polypeptides by chemical methods", in: Darbre, A. (Ed.), Practical Protein Chemistry. Whiley, London, 1986; pp 67-120

Goodman, A.E., Rogers, P.L. and Skotnicki, M.L.:
Minimal medium for isolation of auxotrophic Zymomonas mutants.
Appl. Env. Microbiol. 44 (1982) 496-498

Green, J.B.A.:
Pyruvate decarboxylase is like acetolactate synthase (ILV2) and not like the pyruvate dehydrogenase E1 subunit.
FEBS Letters 246 (1989) 1-5

Hanes, CH. S.:
Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley.
Biochem. 26 (1932) 1406-1421

Haq, A. and Dawes, E.A.:
Pyruvic Acid Metabolism and Ethanol Formation in Erwinia amylovora.
J. Gen. Microbiol. 68 (1971) 295-306

Hawkins, C.F., Borges, A. and Perham, R.N.:
A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes.
FEBS 255 (1989) 77-82

Hayashi, R.:
"Carboxypeptidase Y",
Meth. Enzymol. 45 (1976) 568-587

Hayashi, R., Moore, St., and Stein, W.H.:
Carboxypeptidase from Yeast.
J. Biol. Chem. 248 (1973) 2296-2302

Hildebrandt, G. und Klavehn, W.:
D.R.P 548459; A.P. 1956950, (1930)

Hill, A. V.:
The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I.
J. Biochem. 7 (1913) 471-480

Hirs, C.H.W.:
"Amino acid analysis and related procedures",
Meth. Enzymol. 2 (1967) 59-62

Holzer, H. und Beaucamp, K.:
Nachweis und Charakterisierung von α-Lactyl-Thiaminpyrophosphat ("aktives Pyruvat") und α-Hydroxyäthyl-Thiaminpyrophosphat ("aktiver Acetaldehyd") als Zwischenprodukte der Decarboxylierung von Pyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe.
Biochim. Biophys. Acta 46 (1961) 225-243

Hopmann, R.F.W.:
Hydroxyl-ion-induced subunit dissociation of yeast cytoplasmic pyruvate decarboxylase.
Eur. J. Biochem. 110 (1980) 311-318

Hoppner, T. C. and Doelle, H. W.:
Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from Zymomonas mobilis in relation to ethanol production.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17 (1983) 152-157

Hübner, G., König, St. and Schellenberger, A.:
The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast.
Biomed. Biochim. Acta 47 (1988) 9-18

Hunkapiller, .W.:
PTH amino acid analysis.
User bulletin Applied Biosystems Issue no. 14, Protein Sequencer (1985)

Hustedt, H., Kroner, K.H., Stach, W. and Kula, M.-R.:
Procedure for the simultaneous large-scale isolation of pullulanase and 1,4-α-glucan phosphorylase from Klebsiella pneumoniae involving liquid-liquid separations.
Biotechnol. Bioeng. 20 (1978) 1989-2005

Hustedt, H., Kroner, K. und Kula, M.-R.:
"Applications of phase partitioning in biotechnology", in: Walter, H., Brooks, D.E. and Fischer, D. (Eds.), Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology.
Academic Press, New York, 1985; pp 529-587

Ingram, L.O. and Conway, T.:
Expression of different levels of ethanologenic enzymes from Zymomonas mobilis in recombinant strains of Escherichia coli.
Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 397-404

Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J.F.:
Genetic engineering of ethanol production in Escherichia coli.
Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 2420-2425

Juni, E.:
Evidence for a two-site mechanism for decarboxylation of α-keto acids by α-carboxylase.
J. Biol. Chem. 236 (1961) 2302-2308

Kellermann, E., Seeboth, P.G., Hollenberg, C.P.:
Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from Saccharomyces cerevisiae.
Nucleic Acids Res. 14 (1986) 8963-8977

King, T.E. and Cheldelin, V.H.:
Pyruvic Carboxylase of Acetobacter suboxydans.
J. Biol. Chem. 208 (1954) 821-831

Kluyver, A.J., Hoppenbrouwers, W.J.:
Ein merkwürdiges Gärungsbakterium Lindners Thermobakterium mobile.
Arch. Microbiol. 2 (1931) 2745

Kroner, K.H., Schütte, H., Stach, W. und Kula, M.R.:
Scale-up of formate dehydrogenase by partition.
J. Chem. Techn. Biotechnol. 32 (1982) 130

Kula, M.-R.:
"Use of phase partitioning to scale-up protein purification", in: Protein Purification: Micro to Macro, Alan R. Liss. Inc. (1987) pp 99-115

Kula, M.-R.:
Downstream Processing for Bioproducts.
Chem. Biochem. Eng. Q 2 4 (1988) 179-183

Kula, M.-R., Bückmann, A., Hustedt, H., Kroner, K.H. and Morr, M.:
"Aqueous two-phase systems for the large-scale pufification of enzymes", in: Broun, G.H., Menecke, G. and Wingard, L.B. (Eds.), Enzyme Engineering 4, Plenum Publishing Corporation (1978) pp 47-53

Kuo, D.J., Dikdan, G. and Jordan F.:
Resolution of brewers' yeast decarboxylase into two isoenzymes.
J. Biol. Chem. 7 (1986) 3316-3319

Lämmli, U.K:
Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of Bacteriophage T4.
Nature 227 (1970) 680-685

Landon, M.:
"Cleavage at aspartyl-prolyl bonds",
Meth. Enzymol. 47 (1977) 145-149

Le Caer, J.P., Rossier, J.:
On the use of polyethylenimine as a carrier for protein sequencing: comparison with polybren.
Anal. Biochem. 169 (1988) 246-252

Lee, K.J., Tribe, D.E. and Rogers, P.L.:
Ethanol production by Zymomonas mobilis in continuous culture at high glucose concentrations.
Biotechnol. Lett. 1 (1979) 421

Lindner, P.:
Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde.
Tafel 68, 3rd Edn. Berlin (1928)

Lohmann, K. und Schuster, P.:
Untersuchungen über die Cocarboxylase
Biochem. Z. 294 (1937) 188-214

Lowe, Ch.R.:
New developments in downstream processing.
J. Biotechnol. 1 (1984) 3-12

Lowe, Ch.R. and Pearson, J.C.:
"Affinity chromatography on immobilized dyes",
Meth. Enzymol. 104 (1984) 97-113

Matsudaira, P:
Sequence from picomole quantities of proteins eltroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes.
J. Biol. Chem. 262 (1987) 10035-10038

Maxam, A.M. und Gilbert, W.:
A new method for sequencing DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74 (1977) 560-564

Means, G.E., Feeney, R.E.:
"Reducing and Oxidizing reagents", in: Chemical Modification of Proteins. Holden-Day Inc., San Francisco, 1971; pp 149-174

Mee, S.:
A Study of Carboxylase in Soybean Sprouts.
Arch. Biochem. 22 (1949) 139-148

Miczka, G. und Kula, M.R.:
The use of polyvinylidene-difluorid-membranes as blottingmatrix in combination with sequencing: Application to pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis.
Anal. Lett. 22 (1989) 2771-2782

Millar, D.G., Griffiths-Smith, K., Algar, E. and Scopes, R.K.:
Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol.
Biotechnol. Lett. 4 (1982) 601-606

Miller, F. and Metzger, H.:
Characterization of a human macroglobulin.
II: Distribution of the disulfide bonds.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 4740-4745

Millipore:
Immobilon-Tech Protocoll

Moore, St. and Stein, W.H.:
"Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment",
Meth. Enzymol. 6 (1963) 819-831

Morey, A.V. and Juni, E.:
Studies on the nature of the binding of thiamine pyrophosphate to enzymes.
J. Biol. Chem. 243 (1968) 3009-3019

Neale, A.D., Scopes,R.K., Wettenhall, R.E.H. and Hoogenraad, N.J.:
Pyruvate decarboxylase of Zymomonas mobilis: Isolation, properties, and genetic expression in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 169 (1987a) 1024-1028

Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E.H. and Hoogenraad, N.J.:
Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from Zymomonas mobilis.
Nucleic Acids Res. 15 (1987b) 1753-1761

Neale, A.D., Scopes, R.K. and Kelly, J.M.:
Alcohol production from glucose and xylose using Escherichia coli containing Zymomonas mobilis genes.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1988) 162-167

Neuberg, C. and Karczag, L.:
Über zuckerfreie Hefegärungen. IV. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe.
Biochem. Z. 36 (1911) 68-81

Nokihara, K.:
Improved primary structure determination for peptides and proteins by electroblotting in combination with sequencing.
Anal. Lett. 21 (1988) 1371-1382

Parekh, B.S., Mehta, H.B., West, M.D. and Montelar, R.C.:
Preparative elution of proteins from nitrocellulose membranes after separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal. Biochem. 148 (1985) 87-92

Pharmacia:
Gelfiltration, theory and practice
Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, 1982

Pharmacia:
Phast-System, Owners Manual

Pharmacia:
The Pharmacia Chromatographie Media File

Reynen, M:
Entwicklung eines Expressionsvektors für das gram-negative Bakterium Zymomonas mobilis.
Dissertation Universität Düsseldorf (1988)

Reynen, M. and Sahm, H.:
Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different Zymomonas mobilis strains.
J. Bacteriol. 170 (1988)

Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L. and Tribe, D.E.:
Ethanol Production by Zymomonas mobilis.
Adv. Biochem. Eng. 23 (1982) 37-84

Rogers, P.L., Skotnicki, M.L., Lee, K.J. and Lee, J.H.:
Recent developments in the Zymomonas process for ethanol production.
Crit. Rev. Biotechnol. 1 (1984) 273-288

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.:
DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74 (1977) 5463-5467

Schellenberger, A.:
Struktur und Wirkungsweise des aktiven Zentrums der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase.
Angew. Chem. 79 (1967) 1050-1061

Schellenberger, A. und Hübner, G.:
Mechanismus und Kinetik der Rekombination und daraus abgeleitete Bindungsverhältnisse im aktiven Zentrum der Hefe-Pyruvatdecarboxylase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 491-500

Schellenberger, A., Winter, K., Hübner, G., Schwaiberger, R., Helbig, D., Schumacher, S., Thieme, R., Bouillon, G. und Rädler, K.P.:
Rekombinations- und Funktionskinetik der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346 (1966) 123-147

Schellenberger, A., Hübner, G., Atanassowa, M., Sieber, M. und König, St.:
Beiträge zum Funktionsmechanismus von Thiaminpyrophosphat-Enzymen.
Wiss. Z. Univ. Halle 35 (1986) 37-49

Schickle, H.P. und Horneff, F.:
Ultradünnschicht-Isoelektrische Fokussierung.
LKB-Instruments GmbH, Gräfeling, 1983

Singer, T.P. and Pensky, J.:
Isolation and properties of the a-carboxylase of wheat germ.
J. Biol. Chem. 196 (1952) 375-388

Skotnicki, M.L., Lee, K.J., Tribe, D.E. and Rogers, P.L.:
Comparison of ethanol production by different Zymomonas mobilis strains.
Appl. Env. Microbiol. 41 (1982) 165-170

Steffensen, R. and Anderson, J.J.:
Reversed-phase separation of proteins.
Biochromatogr. 2 (1987) 85-89

Stephenson, M.P. and Dawes, E.A.:
Pyruvic Acid and Formic Acid Metabolism in Sarcina ventriculi and the Role of Ferredoxin.
J. Gen. Microbiol. 69 (1971) 331-343

Steyn-Parvé, E.P. and Westenbrink, H.G.K.:
A study of dissociation and resynthesis of carboxylase in various yeasts.
Zeitschrift für Vitaminforschung 15 (1944) 1-52

Strohdeicher, M., Neuß, B., Bringer-Meyer, S. and Sahm. H.:
Electron transport chain of Zymomonas mobilis: Interaction with the membrane-bound glucose dehydrogenase and identification of ubiquinone 10.
Arch. Microbiol. (in press)

Swings, J. and DeLey, J.:
The biology of Zymomonas.
Bacteriol. Rev. 41 (1977) 1-46

Tarr, G.E. and Crabb, J.W.:
Reverse-phase high-performance liquid chromatography of hydrophobic proteins and fragments thereof.
Anal. Biochem. 131 (1983) 99-107

Thomas, G., Diefenbach, R. und Duggleby, R.G.:
Inactivation of pyruvate decarboxylase by 3-hydroxypyruvate.
J. Biochem. 266 (1990) 305-308

Tolan, J.S. and Finn, R.K.:
Fermentation of d-xylose and l-arabinose to ethanol by Erwinia chrysanthemi.
Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987a) 2033-2038

Tolan, J.S. and Finn, R.K.:
Fermentation of d-xylose to ethanol by Klebsiella planticola.
Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987b) 2039-2044

Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J.:
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 4350-4354

Uehara, H., Ewenstein, B.M., Martinko, J.M., Nathenso, S.G., Kindt, T.J. and Coligan, J.E.:
Primary structure of murine major histocompatibility alloantigens - amino acid sequence of the cyanogen bromide fragment Ia (position 139-228) from the H-2KB molecule.
Biochem. 19 (1979) 6182-6188

Uhlemann, H. and Schellenberger, A.:
Glyoxylic acid as an active site marker of yeast pyruvate decarboxylase.
FEBS Letters 63 (1976) 37-39

Ullrich, J.:
Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylyase, EC 4.1.1.1). Assay of thiamine pyrophosphate.
Meth. Enzymol. 18 (1970) 109-115

Ullrich, J.:
"Thiaminpyrophosphat", in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methoden der enzymatischen Analyse, Band 2, Verlag Chemie, Weinheim (1974) 236-243

Ullrich, J.:
Structure-function relationships in pyruvate decarboxylase of yeast and wheat germ.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 378 (1982) 287-305

Ullrich, J. and Donner, I.:
Kinetic evidence for two active sites in cytoplasmic yeast pyruvate decarboxylase.
Hoppe-Seyler's Zeitung Physiol. Chem. 351 (1970a) 1026-1029

Ullrich, J. and Donner, I.:
Fluorimetric study of 2-p-toluidinonaphthalene-6-sulfonate binding to cytoplasmic yeast pyruvate decarboxylase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351 (1970b) 1030-1034

Ullrich, J. and Wollmer, A.:
Yeast pyruvate decarboxylase: Spectral studies of the recombination of the apoenzyme with thiamine pyrophosphate and magnesium.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1971) 1635-1644

Ullrich, J. und Freisler, H.:
Gehalt und Effekt von Proteinasen bei Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiol. Chem. 358 (1977) 318

Ullrich, J., Wittorf, J.H. and Gubler, C.J.:
Molecular weight and coenzyme content of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast.
Biochim. Biophys. Acta 113 (1966) 595-604

Waxdal, M.J., Königsberg, W.H., Henley, W.L. and Edelman, G.M.:
Covalent structure of a human gamma immunglobulin 2. Isolation and characterization of cyanogen bromide fragments.
Biochem. 7 (1968) 1959-1966

Weber, K. and Osborn, M.:
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis.
J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406-4412

Wilkinson, J.M.:
"Fragmentation of polypeptides by enzymatic methods", in: Darbre, A. (Ed.), Practical Protein Chemistry.
Whiley, London, 1986; pp 121-148

Yuen, S.W., Chui, A.H., Wilson, K.J. and Yuan, P.M.:
Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins.
User Bulletin Protein Sequencer, Applied Biosystems 1988

Zehender, H.:
Pyruvatdecarboxylase aus Weizenkeimen: Reinigung, Charakterisierung und Vergleich mit dem Hefe-Enzym.
Dissertation Universität Freiburg (1984)

Zehender, H. und Ullrich, J.:
Amino acid composition of α- and ß-chains of yeast and wheat germ pyruvate decarboxylase
FEBS Lett. 180 (1984) 51-54

Zehender, H., Trescher, D. and Ullrich, J.:
Activity stain for pyruvate decarboxylase in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 135 (1983) 16-21

Zehender, H., Trescher, D. and Ullrich, J.:
Improved purification of pyruvate decarboxylase from wheat germ. Its partial characterisation and comparison with the yeast enzyme.
Eur. J. Biochem. 167 (1987) 149-154

Anhang A

Ergebnisse der Sequenzanalysen:

Peptide aus der "in situ-Spaltung" sind mit *1 gekennzeichnet. *2 kennzeichnet Peptide, die durch Elekrophorese mit anschließendem elektrischen Transfer, bzw. mittels limitierter Proteolyse gewonnen wurden.

Tryptische Peptide:

T 1) Thr-Asp-Tyr-His-Tyr-Gln-Leu-Glu-Met-Ala-

T 2) Asn-Ile-Thr-Ala-Ala-Ala-Glu-Ala-Ile-Tyr-Thr-Pro-Glu-Glu-Ala-Pro-Ala-

T 3) Ser-Trp-Gly-Glu-Val-Ser-Tyr-Pro-Gly-Val-Glu

T 4) Ser-Tyr-Thr-Val-Gly-Thr-Tyr-Leu-Ala-Glu-Arg-Leu-Val-Gln-Ile-Gly-Leu-Lys

T 5) Asn-Ile-Leu-Met-Val-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Gln-Leu-Thr-Ala-Gln-Glu-Val-

T 6) Ser-Val-Val-Val-Asn-Gly-Ile-Arg-Phe-Pro-Ser-Val-His-Leu-Lys-Asp-Tyr-Leu-Thr-Arg-Leu-Ala-Gln-Lys-Val-Ser-Lys-Lys (*2)

T 7) Glu-Asp-(-)-Thr-Glu-Glu-Leu-Val-Lys (*1)

T 8) Thr-Gly-Ala-Leu-Asp-Phe-Phe-Lys-Ser-Leu-Asn-Ala-Gly-Glu-Leu-(*1)

V8-Peptide:

V 1) Lys-Lys-Pro-Val-Tyr-Leu-Glu

V 2) Val-Phe-Asn-Gly-Asn-Gly-Gly-Tyr-Asp-Ser-Gly-Ala-Ala-Lys-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Thr-Gly-Gly-Glu

V 3) Ala-Leu-Leu-Thr-Pro-Asn-Thr-Thr-Val-Ile-Ala-Glu

V 4) Leu-Lys-Lys-Ala-Ala-Pro-Ala-Asp-Pro-Ser-Ala-Pro-Leu-Val-Asn-Ala-Glu

V 5) Ala-Ala-Val-Lys-Phe-Thr-Asp-Ala-Leu-Gly-Gly-Ala-Val-Ala-Thr-

V 6) Leu-Val-Lys-Trp-Gly-Lys-Arg-Val-Ala-Ala-Ala-Asn-Ser-Arg-Lys-Pro-Val-Asn-Lys-Leu-Leu-

V 7) Ala-Pro-Ala-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ile-Lys-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu

V 8) Asn-Leu-Pro-Val-Ile-Leu-Ile-Ser-Gly-Ala-Pro-Asn-Asn-Asn-Asp-His-Ala-Ala-Gly-His-Val-Leu-His-His-Ala-Leu-Gly-Lys-Thr-Asp-Tyr-His-Tyr-Gln-Leu-Glu

V 9) Thr-Leu-Lys-Phe-Ile-Ala-Asn-Arg-Asp-Lys-Val-Ala-Val-Leu-Val-Gly-Ser-Lys-Leu-Arg-Ala-Ala-Gly-Ala-Glu-Glu

V10) Ser-Tyr-Thr-Val-Gly-Thr-Tyr-Leu-Ala-Glu-Arg-Leu-Val-Gln-Ile-Gly-Leu-Lys-His-His-Phe-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Tyr-Asn-Leu-Val-Leu-Leu-Asp-Asn- (*2)

V11) Thr-Gly-Asp-Ser-Trp-Phe-Asn-Ala-Gln-Arg-Met-Lys-Leu-Pro-Asn-Gly-Ala-Arg- (*2)

V12) Met-Ala-Lys-Asn-Ile-Thr-Ala-Ala-Ala-Glu (*2)

V13) Asp-Gly-Pro-Tyr-Asn-Asn-Ile-Lys-Asn-(-)-Asp-Tyr-Ala-Gly-Leu-Met-Glu-Val-Phe-Asn- (*1)

V14) Val-Phe-Asn-Gly-Asn-Gly-Gly-Tyr-Asp-Ser-Gly-Ala-Ala-Lys-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Thr-Gly-Gly-Glu-Leu-Ala-Glu (*1)

V15) Ala-Ile-Lys-Val-Ala-Leu-Ala-Asn-Thr-Asp-Gly-Pro-Thr-Leu-Ile-Glu (*1)

V16) (-)-Phe-Ile-Gly-Arg-Glu (*1)

V17) Met-Gln-Trp-Gly-His-Ile-Gly-Trp-Ser-Val-Pro-Ala- (*1)

Peptide aus der Ameisensäurespaltung:

F1) Pro-Ser-Ala-Pro-Leu-Val-Asn-Ala-Glu-Ile-Ala-Arg-Gln-Val-Glu-Ala-Leu-Leu-Thr-Pro-Asn-Thr- (*2)

F2) Pro-Lys-Lys-Leu-Val-Leu-Ala-Glu-Pro-Arg-Ser-Val-Val-Val-Asn-Gly-Ile-Arg-Phe- (*2)

F3) Ser-Tyr-Thr-Val-Gly-Thr-Tyr-Leu-Ala-Glu-Arg-Leu-Val-Gln-Ile-Gly-Leu-Lys-His-His-Phe-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Tyr-Asn-Leu-Val-Leu-Leu-Asp- (*2)

F4) Ser-Tyr-Thr-Val-Gly-Thr-Tyr-Leu-Ala-Glu-Arg-Leu-Val-Gln-Ile-Gly-Leu-Lys-His-His-Phe-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Tyr-Asn-Leu-Val-Leu-Leu-Asp-Asn-Leu-Leu-Leu-Asn-Lys-Asn-Met-(-)-Gln-Val-Tyr-(-)-(-)-Asn-Glu-Leu- (*2)

Peptide aus der Bromcyanspaltung:

B 1) Ile-His-Asp-Gly-Pro-Tyr-Asn-Asn-Ile-Lys-Asn-Trp-Asp-Tyr-Ala-Gly-Leu-(Met)

B 2) Lys-Leu-Pro-Asn-Gly-Ala-Arg-Val-Glu-Tyr-Glu-(Met)

B 3) Glu-Val-Phe-Asn-Gly-Asn-Gly-Gly-Tyr-Asp-Ser-Gly-Ala-Ala-Lys-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Thr-Gly-Gly-Glu-

B 4) Ala-Lys-Asn-Ile-Thr-Ala-Ala-Ala-Glu-Ala-Ile-Tyr-Thr-Pro-Glu-Glu-Ala-Pro-Ala-Lys-Ile-Asp-His-Val-Ile-Lys-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu-Lys-Lys-Pro-Val-Tyr-Leu-Glu-Ile-Ala-(-)-Asn-Ile-Ala-Ser-(Met)

B 5) Val-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Gln-Leu-Thr-Ala-Gln-Glu-Val-Ala-Gln-(Met)

B 6) Gln-Trp-Gly-His-Ile-Gly-Trp-Ser-Val-Pro-Ala-Ala-Phe-Gly-Tyr-Ala-Val-Gly-Ala-Pro-Glu-Arg-Arg-Asn-Ile-

B 7) Pro-(-)-Ala-Ala-Pro-Gly-Pro-Ala-Ser-Ala-Leu-Phe-Asn-Asp-Glu-Ala-Ser-Asp-Glu-Ala-Ser-Leu-Asn-Ala-Ala-Val-Glu-Glu-Thr-Leu-Lys-Phe-Ile-Ala-Asn-Arg-Asp-Lys-Val-Ala-Val-Leu-

B 8) Val-Arg-Leu-Lys-Leu-Pro-Val-Ile-Ile-Phe-Leu-Ile-Asn-Asn-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Ile-Glu-Val-(Met)

B 9) Glu-Gln-Val-Tyr-(-)-(-)-Asn-Glu-Leu-Asn-(-)-Gly-Phe-Ser-Ala-Glu-Gly-Tyr-Ala-Arg-Ala-Lys-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Val-Val-Thr-Tyr-Ser-Val-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Phe-Asp-Ala-Ile-Gly-Gly-Ala-Tyr-Ala-Glu-Asn-Leu-

B10) Lys-Glu-Ala-Asp-Ala-Val-Ile-Ala-Leu-Ala-Pro-Val-Phe-Asn-Asp-Tyr-Ser-Thr-Thr-Gly-(-)-Thr-Asp-Ile-Pro-Asp-Pro- (*2)

B11) Ala-Ala-Ala-Lys-Ser-Phe-Phe-Pro-Glu-Glu-Asn-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Thr-Ser-(-)-Gly-Glu-Val-Ser-Tyr-Pro-Gly-Val-Glu-Lys-Thr-(Met) (*2)

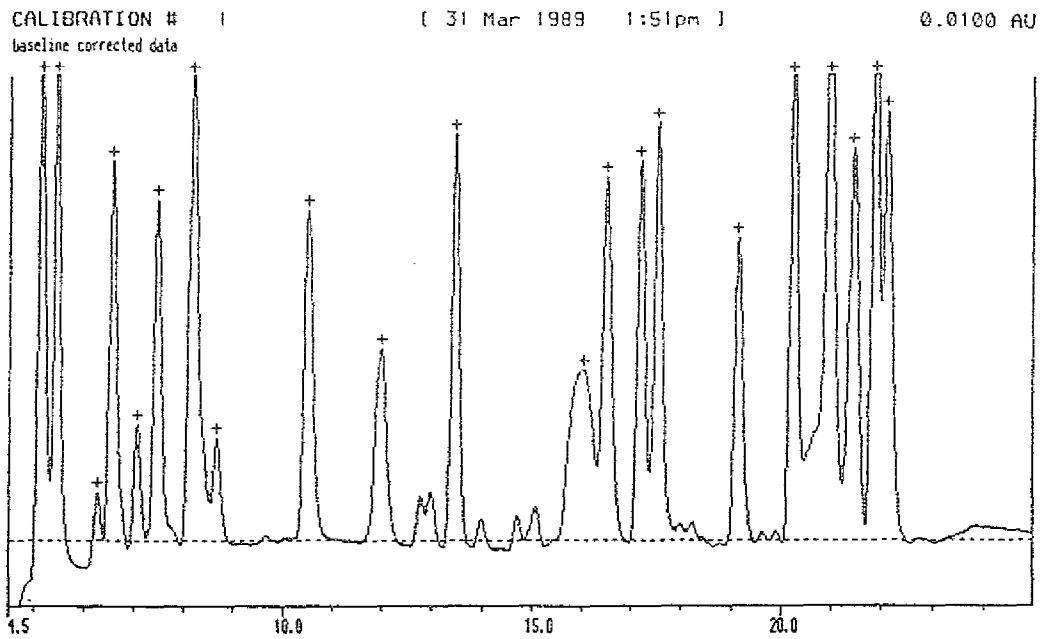
Anhang B

Lösungsmittel für die Elution der Peptide nach der in situ Spaltung

Eluent	Inkubationszeit	Elutionserfolg bei Immobilon-Membran	Elutionserfolg bei Nitrocellulose
HCl	30 min	negativ	negativ
20 % Acetonitril in 0,1 % TFA, RT	30 min	negativ	negativ
40 % Acetonitril in 0,1 % TFA, RT	30 min	negativ	gering
20 % Propanol RT	30 min	negativ	negativ
40 % Propanol RT	30 min	negativ	gering
40 % Propanol 30 °C	3 h	negativ	gering
40 % Acetonitril in 0,1 % TFA 30°C	3 h	negativ	vollständig
20 % Aceton 30°C	3 h	Membran ist geschrumpft negativ	Membran aufgelöst

Anhang C

PTH-Standard - Calibrierungslauf für die on-line HPLC bei der Sequenzanalyse

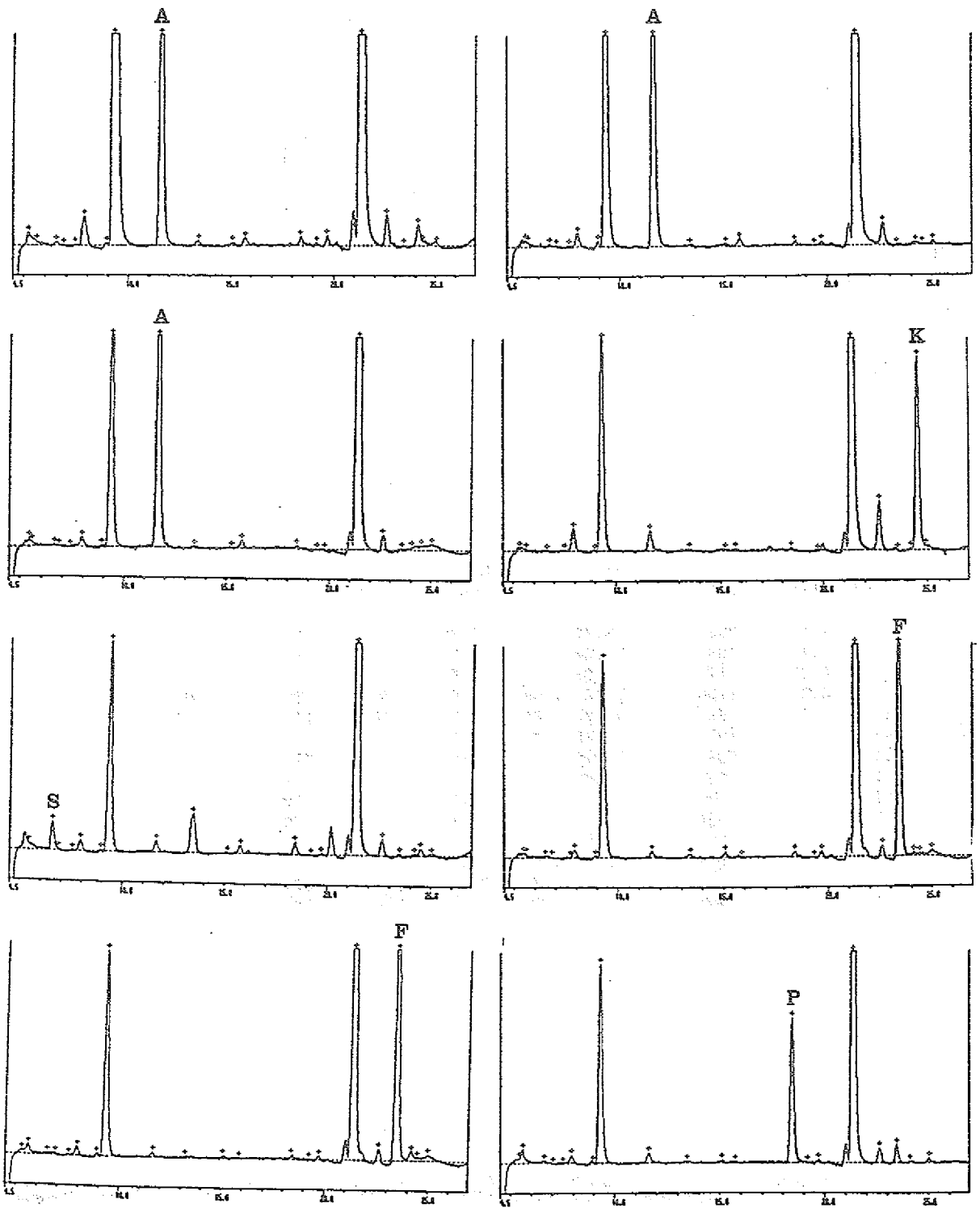


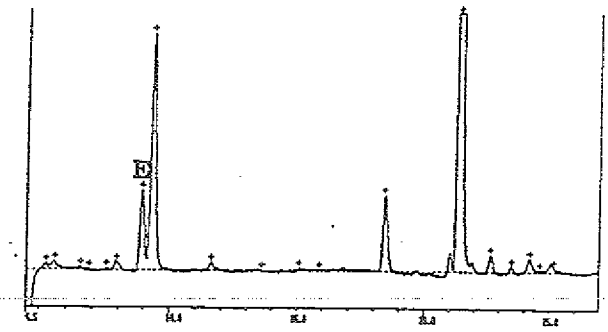
PEAK TABULATION : (100% injection) Calibration : NORMAL-1

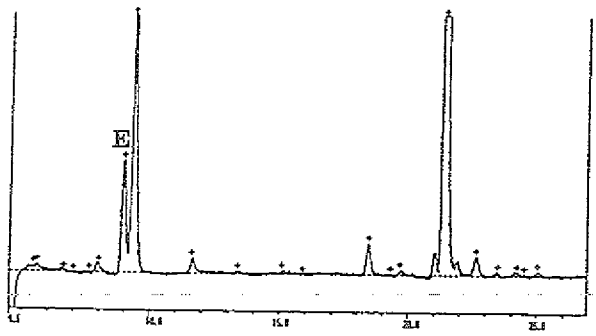
Peak ID	R.Time (min)	C.Time (min)	Height (uAU)	Pmol	Peak ID	R.Time (min)	C.Time (min)	Height (uAU)	Pmol
ASP	5.15	5.15	26955	75.00		13.98		1233	
ASN	5.47	5.47	29337	75.00		14.70		1446	
SER	6.28	6.28	2760	75.00		15.08		1953	
GLN	6.57	6.57	21369	75.00	ARG	16.03	16.03	9636	75.00
THR	7.07	7.07	6540	75.00	PRO	16.50	16.50	20481	75.00
GLY	7.47	7.47	19203	75.00	MET	17.18	17.18	21351	75.00
GLU	8.17	8.17	26946	75.00	VAL	17.53	17.53	23517	75.00
DMP	8.65	8.65	5784	75.00		17.98		912	
	9.67		300			18.22		1017	
	10.25		201		DPT	19.13	19.13	17010	75.00
ALA	10.52	10.52	18546	75.00		19.62		453	
HIS	12.00	12.00	10740	75.00		19.88		531	
	12.77		2520		TRP	20.25	20.25	30105	75.00
	12.98		2712		PHE	20.97	20.97	30948	75.00
TYR	13.47	13.47	22932	75.00	ILE	21.43	21.43	22074	75.00

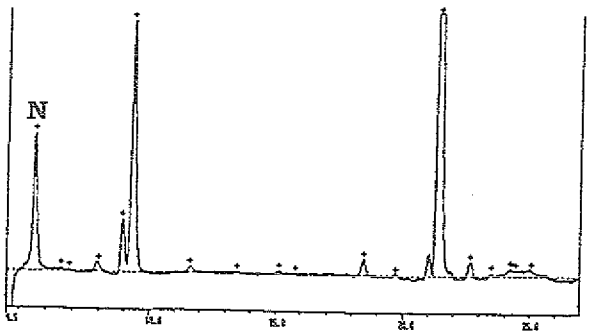
Anhang D

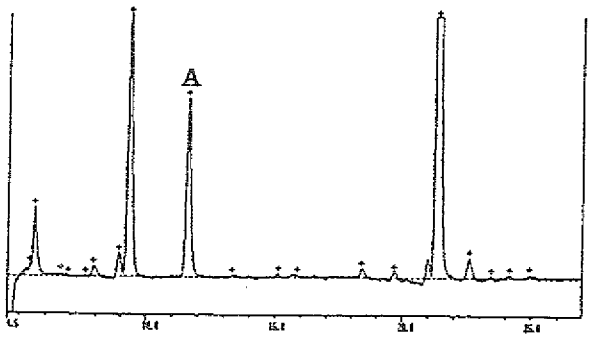
N-terminale Sequenzanalyse (Zyklus 1- 15) des geblotteten Peptids B11 aus der Bromcyanspaltung

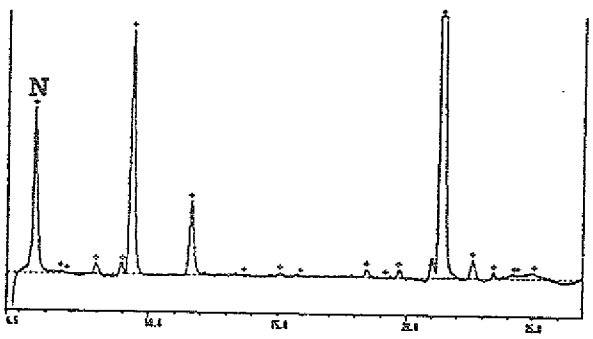


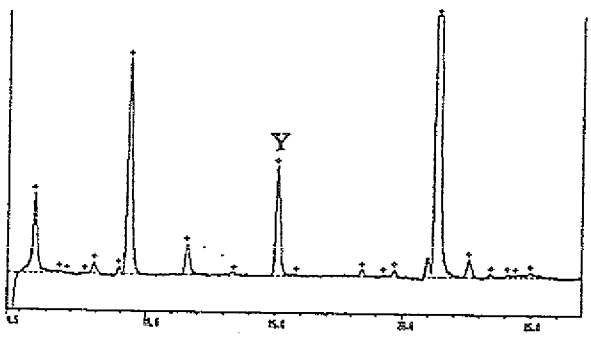

E

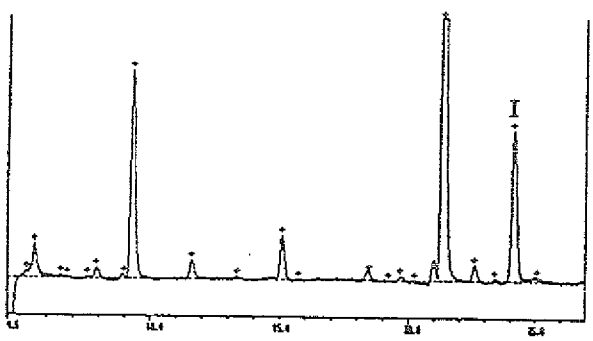

E


N


A


N


Y


I

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

JÜL-2485
Juni 1991
ISSN 0366-0885