Zur Kenntnis des Molekulargewichtes von Peptidsynthetasen aus Leber und Hefe

J. DIMIGEN, F. KLINK und D. RICHTER

Institut für physiologische Chemie und Physikochemie der Universität Kiel

(Z. Naturforsch. 20 b, 924—925 [1965]; eingegangen am 23. Juli 1965)

Die polysomale Peptidsynthese wird durch mindestens zwei verschiedene Enzyme katalysiert. Aus *E. coli*¹, Reticulocyten², Leber³⁻⁵ und Hefe⁶ wurden bisher je ein sehr labiler und ein wesentlich weniger empfindlicher Transferfaktor angereichert. Bei Reticulocyten² und Leber⁷ scheint der labile Faktor die Anlagerung von tRNS¹¹ an Ribosomen zu beeinflussen, so daß man dem stabileren Enzym die unmittelbar Peptidknüpfende Wirkung zuschreiben darf. Keiner dieser Faktoren wurde bisher soweit gereinigt, daß eine Bestimmung physikochemischer Konstanten möglich war. Gelfiltration an Dextrangelen erlaubt jedoch bei vielen globulären Proteinen eine recht genaue Abschätzung der Molekülgröße auch ohne Reindarstellung^{8,9}. Wir wendeten diese Methode auf stark angereicherte Präparationen des stabileren Faktors (FI) aus Leber und Hefe an.

Methoden

Zur Abtrennung des Enzyms von dem labileren Faktor (FII) und zur weiteren Anreicherung verwendeten wir neben den früher beschriebenen chromatographischen Verfahren mit TEAE-Zellulose⁵ mehrere Ammoniumsulfat-Fraktionierungsschritte und Gelfiltration an Sephadex G 25 und G 200⁷.

Abb. 1. Mit Standardproteinen gewonnene Eichkurve zur Bestimmung von Mol.-Gew. durch Gelfiltration an Sephadex G 200. Das durchbrochene Kästchen gibt den Bereich, in dem die für FI aus Ratten- und Kalbsleber in verschiedenen Experimenten ermittelten Werte liegen.

Protein	Reinheitsgrad	Bezugsquelle	Mol.-Gew.
γ-Globulin (Rind)	trocken, reinst	Behring (Marburg)	160 000
Serumalbumin, dimer (Rind)	trocken, reinst	Behring (Marburg)	134 000
Creatinphosphokinase	p. a.	Boehringer (Mannheim)	81 000
Serumalbumin (Rind)	trocken, reinst	Behring (Marburg)	67 000
Eieralbumin	5-mal krist., reinst	Serva (Heidelberg)	45 000
Rennin	Krist.	Nutr. Bioch. Corp., Cleveland, Ohio	34 500

Tab. 1. Standardproteine mit Mol.-Gew. (Literaturwerte), die zur Eichung der Sephadexsäulen verwendet wurden.

Die Aktivitätsbestimmung von FI wurde durch Inkubation mit Polysomen aus Leber, ¹⁴C-Aminoacyl-tRNS, den notwendigen Cofaktoren und Ionen sowie einem Überschuß von FII durchgeführt (Einzelheiten s. Abb. 2).

Abb. 2. Trennung von FI aus Rattenleber, CPK, γ-Globulin und Adenosin an Sephadex G 200. Transparenz —; Transferenzymaktivität ○—○. Das Testsystem¹¹ enthielt in 1 ml: 8 μMol Mg(CH₃COO)₂; 100 μMol KCl; 50 μMol Tris (pH 7,6); 30 μMol MEA; 2 μMol ATP; 0,33 μMol GTP; 4 μMol PEP; 25 μg PK; 5,0 Ext. Einh. (260 nm)/1 cm Rattenleber-Polysomen; 50 μg ¹⁴C-Aminoacyl-tRNS = 3000 Ipm/min; 0,2 ml FII aus Hefe; 0,3 ml der bezeichneten Eluatfraktionen. Aufarbeitung der markierten Proteine durch TCE-Fällung, Waschung mit heißer TCE, Alkohol-Äther, Äther; Aktivitätsmessung im Methandurchflußzähler.

¹ J. E. ALLENDE, R. MONRO u. F. LIPMAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **51**, 1211 [1964].

² R. ARLINGHAUS, J. SHAEFFER u. R. SCHWEET, Proc. nat. Acad. Sci. USA **51**, 1291 [1964].

³ J. M. FESSENDEN u. K. MOLDAVE, J. biol. Chemistry **238**, 1479 [1963].

⁴ S. SLAPIKOFF, J. M. FESSENDEN u. K. MOLDAVE, J. biol. Chemistry **238**, 3670 [1963].

⁵ F. KLINK, A. M. NOUR u. K. F. AEPINUS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **72**, 654 [1963].

⁶ F. KLINK u. D. RICHTER, in Vorbereitung.

⁷ G. KRAMER, F. KLINK u. H. G. PETERSEN, in Vorbereitung.

⁸ P. ANDREWS, Biochem. J. **91**, 222 [1964].

⁹ F. AURICCHIO u. C. B. BRUNI, Biochem. Z. **340**, 321 [1964].

¹⁰ J. BISHOP u. R. SCHWEET, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **49**, 235 [1961].

Gelfiltration: Sephadex G 200 wurde 72 Std. in Puffer (0,05-*m.* Tris, 0,1-*m.* KCl, 0,008-*m.* $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pH 7,6) gequollen. Die Säule (Vol. 90 ml; 550 · 14 mm) wurde nach dem Gießen 48 Std. mit Puffer durchströmt, das äußere Volumen mit Ribosomen oder Dextransblau, das innere mit Adenosin bestimmt, die Extinktion des Eluates im Durchflußphotometer bei 254 nm gemessen und die Lage der Gipfel durch zusätzliche Messung bei 280 bzw. 260 nm präzisiert. Zur Kalibrierung der Säulen wurden reine Proteine mit bekanntem Mol.-Gew. verwendet (s. Tab. 1). Bei logarithmischer Auftragung⁸ der Mol.-Gew. gegen das Elutionsvolumen (Abb. 1) ergab sich eine über weite Bereiche lineare Abhängigkeit.

Ergebnisse

Abb. 2 zeigt eine Auftrennung eines Gemisches von F I, Creatinphosphokinase (CPK), γ -Globulin und Adenosin an Sephadex G 200. Die Transfer-Enzymaktivität

wurde in einem einheitlichen Gipfel eluiert. Die aktiven Fraktionen hatten in Abwesenheit von F II keine Wirkung im Testsystem. Die Elutionsvolumina für F I-Präparate aus Ratten- und Kalbsleber ergaben Mol.-Gew. zwischen 89 000 und 95 000. Bei Anwesenheit von 0,005-*m.* MEA¹¹ im Elutionsmedium zeigte sich keine Verschiebung des Aktivitätsgipfels. Ein Einfluß der für die Transferreaktion unentbehrlichen Sulfhydrylsubstanzen¹⁰ auf die Molekulargröße (etwa durch Desaggregation) ist somit nicht feststellbar. Die deutlich geringeren Werte — etwa 80 000 — die an F I aus Hefe gemessen wurden, bedürfen der Sicherung durch weitere Experimente.

Frl. I. LANGE sind wir für sorgfältige technische Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

¹¹ Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat. GTP = Guanosintriphosphat. PEP = Phosphoenolpyruvat. PK = Pyruvatkinase. tRNS = Transfer-Ribonucleinsäure. TCE = Trichloressigsäure. MEA = 2-Mercaptoethylamin.

Zur Abhängigkeit der photosynthetischen NADP-Reduktion von Plastocyanin

A. TREBST und E. ELSTNER

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen,
Abt. Biochemie der Pflanzen

(Z. Naturforsch. 20 b, 925—926 [1965]; eingegangen am 3. August 1965)

Hinweise für eine Funktion des von KATOH und TAKAMIYA isolierten Plastocyanins¹ in der Photosynthese ergaben sich aus einer Reihe von Ergebnissen. Die photosynthetischen Reaktionen isolierter Chloroplasten wurden durch Cu-Komplexbildner, insbesondere Salicylaldehyd², gehemmt, die Cytochrom c-Photooxydation in Digitonin-fragmentierten, Plastocyanin-freien Chloroplasten ist Plastocyanin-abhängig³, die Absorption bei 600 m μ (Absorptionsmaximum des Plastocyanins) ändert sich bei Belichtung der Algen unter verschiedenen Bedingungen⁴ und reduziertes Plastocyanin wird durch das Pigmentsystem 1 der Photosynthese oxidiert⁵. Diese Versuche stimmten darin überein, daß

Plastocyanin als „electron carrier“ zwischen den beiden Lichtreaktionen der Photosynthese einzuordnen ist.

Wir möchten hier über eine einfache Methode berichten, die Plastocyanin-Abhängigkeit der NADP-Reduktion zu zeigen. Sie baut auf den Versuchen von NIEMAN und VENNESLAND⁶, KATOH³ und KOK⁵ mit Detergenz-fragmentierten Chloroplasten auf. Solche Chloroplasten haben die Fähigkeit zur O₂-Entwicklung verloren, können aber — im Gegensatz zu unbehandelten Chloroplasten — reduziertes Cytochrom c photooxydieren. WHATLEY⁷ zeigte, daß diese Cytochrom c-Oxydation fragmentierter Chloroplasten auch zur Reduktion von NADP verwendet werden kann, wenn Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Reduktase zugesetzt werden. NIEMANN und VENNESLAND⁶ fanden, daß Äthanol-Fällung solcher fragmentierter Chloroplasten zu Partikeln führt, die Cytochrom c erst nach Zugabe eines Faktors aus dem Überstand photooxydierten, den KATOH und TAKAMIYA³ als Plastocyanin identifizierten. Die Arbeiten von KOK⁵ zeigen deutlich, daß das Pigmentsystem 1 der Photosynthese nach Detergenz-Behandlung intakt geblieben ist und daß es Plastocyanin und Cytochrom f bei Belichtung oxidiert. Wir zeigten kürzlich⁸,

¹ S. KATOH, Nature [London] **186**, 533 [1960]; S. KATOH u. A. TAKAMIYA, Nature [London] **189**, 665 [1961]; S. KATOH, I. SUGA, I. SHIRATORI u. A. TAKAMIYA, Arch. Biochem. Biophysics **94**, 136 [1961].

² A. TREBST, Z. Naturforsch. **18b**, 817 [1963]; A. TREBST, H. ECK u. S. WAGNER, in: „Photosynthetic Mechanism of Green Plants“, National Academy of Sciences — National Research Council, Washington 1963.

³ S. KATOH u. A. TAKAMIYA, in: „Photosynthetic Mechanisms of Green Plants“, National Academy of Sciences — National Research Council, Washington 1963; S. KATOH u. A. TAKAMIYA, Plant Cell Physiol. **4**, 335 [1963].

⁴ J. DE KOUCHKOVSKY u. D. C. FORK, Proc. nat. Acad. Sci. USA **52**, 232 [1964]; D. C. FORK u. W. URBACH, Proc. nat. Acad. Sci. USA **53**, 1307 [1965].

⁵ B. KOK, in: „Photosynthetic Mechanisms of Green Plants“, National Academy of Sciences — National Research Council, Washington 1963; B. KOK, H. J. RURAŃSKI u. E. A. HARMON, Plant Physiol. **39**, 513 [1964]; B. KOK u. H. J. RURAŃSKI, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **94**, 588 [1965].

⁶ R. H. NIEMAN u. B. VENNESLAND, Plant Physiol. **34**, 255 [1959]; R. H. NIEMAN, H. NAKAMURA u. B. VENNESLAND, Plant Physiol. **34**, 262 [1959].

⁷ F. R. WHATLEY, in: „Photosynthetic Mechanisms of Green Plants“, National Academy of Sciences — National Research Council, Washington 1963.

⁸ A. TREBST u. E. PISTORIUS, in: „Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen“, Festschrift zum 65. Geburtstag v. K. MOTHES, VEB Fischer Verlag, Jena 1965.