Über die Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität von *E. coli* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

THEODOR GÜNTHER

Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforschg. **24 b**, 428—432 [1969]; eingegangen am 6. September 1968)

Über Nacht auf Hexosen gewachsene Zellen von *E. coli* haben eine hohe Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität mit einem Hill-Exponenten von 1,9. Zellen, die auf anderen Substraten bzw. unter Mg-, PO₄- oder NH₄-Mangelbedingungen gewachsen sind, weisen eine niedrige Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität auf, ihr Hill-Exponent beträgt 0,9.

Während der log-Phase sinkt die Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität auf 2–5% des Ausgangswertes und steigt am Ende des Wachstums in glucosehaltigen Medien wieder an.

Die Ergebnisse werden als (vorübergehende) während der log-Phase auftretende Katabolit-Repression des durch Hexosen bzw. deren Abbauprodukte induzierbaren Enzyms gedeutet.

In früheren Versuchen konnten wir zeigen, daß Zellen von *E. coli*, die unter verschiedenen Mangelbedingungen gewachsen waren, einige Enzyme in unterschiedlicher Menge bilden^{1,2}. In der Pyruvat-Decarboxylase fanden wir ein weiteres Enzym, dessen Aktivität in der Zelle von den Wachstumsbedingungen abhängt.

Methode

Die Bakterien wurden, wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben³, gezüchtet. Die Mg-Konzentration im Medium betrug bei den Kontrollzellen 10⁻³ M, bei den Mg-armen Zellen 3 · 10⁻⁶ M. Die Zusammensetzung der K-, SO₄-, PO₄- und NH₄-armen Medien wurde bereits mitgeteilt⁴.

Die über Nacht gewachsenen Zellen wurden einmal mit bidest. Wasser gewaschen, in kalter 0,15 M KCl aufgenommen und unter Kühlen in einer Eis-Kochsalz-Mischung mit Ultraschall aufgeschlossen.

Die Decarboxylierung des Pyruvats wurde bei 37° manometrisch bestimmt. Der Ansatz enthielt: 1 ml Homogenat bzw. 1 ml Überstand, 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 (in einigen Versuchen 1 ml 0,2 M Imidazolpuffer pH 6,0), 0,2 ml 1,2 M Na-Pyruvat, 0,1 ml 1,2 · 10⁻² M Thiamin-pyrophosphat und 0,1 ml 2,4 · 10⁻² M MgCl₂. Durch 10⁻³ M Mg wird die Pyruvat-Decarboxylase nur geringfügig erhöht und durch 10⁻² M EDTA in Übereinstimmung mit dem Verhalten der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase nicht signifikant geändert⁵. Der Proteingehalt der Ansätze wurde nach LOWRY et al.⁶ ermittelt.

Ergebnisse

Kinetik der Pyruvat-Decarboxylase

Die Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität von *E. coli* zeigt einen S-förmigen Verlauf, wenn man sie als Funktion der Substratkonzentration [S] darstellt [Abb. 1, Kurve I₀]. Bei der Darstellung nach HILL⁷ ($\log \frac{v}{V_{\max} - v}$ als Funktion von $\log[S]$) erhält man für n den Wert 1,9 [Abb. 2, I]. Wird das Homogenat oder der 100 000 g Überstand 10 Min. auf 55 °C erhitzt oder in Gegenwart von 10⁻⁴ M Hg Cl₂ getestet, dann mißt man nur noch eine geringe Aktivität und die S-förmige Kurve geht in eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik über [Abb. 1, Kurve I]. Dabei nimmt n den Wert 0,9 an [Abb. 2, Kurve II].

Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität von Mangelzellen

Über Nacht in Mg-armen Medien gewachsene Zellen besitzen nur noch ca. 5% der Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität der Kontrollzellen [Tab. 1]. Während bei den Kontrollzellen die spezifische Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase im Überstand nach Zentrifugation ansteigt, nimmt sie bei Mg-arm gewachsenen Zellen im Überstand ab.

Bei der Darstellung der Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität Mg-armer Zellen als Funktion von [S] er-

¹ TH. GÜNTHER u. P. MARISS, Z. Naturforschg. **23 b**, 338 [1968].

² TH. GÜNTHER u. P. MARISS, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 623 [1968].

³ TH. GÜNTHER u. F. DORN, Z. Naturforschg. **21 b**, 1076 [1966].

⁴ TH. GÜNTHER u. P. MARISS, Z. Naturforschg. **23 b**, 334 [1968].

⁵ A. SCHELLENBERGER, Angew. Chem. **79**, 1050 [1967].

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

⁷ W. E. L. BROWN u. A. V. HILL, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **94**, 297 [1922].

Abb. 1. Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität der Zellhomogenate in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration. I₀ Mg-reich gewachsene *E. coli*, I Homogenat aus Mg-reich gew. Zellen, 10 Min. auf 55° erwärmt. II₀ Mg-arm gewachsene *E. coli*, II Homogenat aus Mg-arm gew. Zellen, 10 Min. auf 55° erwärmt.

Abb. 2. Darstellung der Gleichung $\log \frac{v}{V_{\max} - v} = n \cdot \log [S] - \log K$. + Homogenat aus Mg-reich gewachsenen Zellen. □ Homogenat aus Mg-reich gewachsenen Zellen nach 10 Min. Erwärmen auf 55°, × Homogenat aus Mg-arm gewachsenen Zellen, • Homogenat aus Mg-arm gewachsenen Zellen nach 10 Min. Erwärmen auf 55°.

hält man eine Michaelis-Menten-Kinetik [Abb. 1, II₀]. Aus der Hill-Darstellung ermittelt man bei Mg-armen Zellen für n einen Wert von 0,9. Erhitzt man das Homogenat aus Mg-armen Zellen 10 Min. auf 55°, so findet man danach eine gerin-

	Homogenat	Überstand	
		3000 g	100 000 g
Mg-reich	805	1080	1620
Mg-arm	39,5	16,7	10

Tab. 1. Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität [in µl CO₂/mg Prot.·Stde.] in den Homogenaten, 3000 g- und 100 000 g-Überständen von Mg-reich und Mg-arm gewachsenen *E. coli*.

gere Abnahme der Enzymaktivität [Abb. 1, II]. Der Hill-Exponent n beträgt bei den erhitzten Mg-armen Zellen ebenfalls 0,9 [Abb., 2, II].

Abb. 3. Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität während des Wachstums in verschiedenen Medien. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, abzentrifugiert, einmal in bidest. Wasser gewaschen und eingefroren. Zur manometrischen Bestimmung der Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität wurden sie in 0,1 M KCl mit Ultraschall homogenisiert. Die Glucosekonzentration und der pH-Wert der Medien wurden während des Wachstums bei 37 °C mit Indikator-Papieren kontrolliert und durch Zugabe von Glucose und NaHCO₃ nachgestellt. I. Mg-reich gewachsene Zellen in Normalmedium. II. Mg-reich gewachsene Zellen in Mg-freiem Medium. III. Mg-arm gewachsene Zellen in Normalmedium. IV. Mg-arm gewachsene Zellen in 10⁻³ M Mg-haltigem Medium ohne Aminosäuren und NH₄. V. Mg-reich gewachsene Zellen in PO₄-freiem Medium. VI. PO₄-arm gewachsene Zellen in Normalmedium. VII. PO₄-arm gewachsene Zellen in Aminosäuren- und NH₄-freiem Medium.

Spezifität

Aus α-Ketoglutaräure wird von den Kontrollzellen nur 1 – 2% der CO₂-Menge freigesetzt, die unter gleichen Bedingungen aus Pyruvat abgespalten wird.

Durch 10 Min. Erwärmen auf 55° wird die Decarboxylierung von α -Ketoglutar säure nur wenig vermindert. Bei Mg-arm gewachsenen Zellen ist die CO_2 -Freisetzung aus α -Ketoglutar säure unmeßbar niedrig.

Die geringe CO_2 -Abspaltung aus Pyruvat ist nicht spezifisch für Zellen, die unter Mg-Mangel gewachsen sind. PO_4 - oder NH_4 -arm gewachsene Zellen hatten ebenfalls eine niedrige Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität, die sich nach 10 Min. Erwärmen auf 55° und in der Hill-Darstellung wie die von Mg-armen Zellen verhielt. Bei Zellen, die unter K- oder SO_4 -Mangelbedingungen gewachsen waren, fanden wir dagegen eine unverändert hohe Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität [Tab. 2].

K-arm	SO_4 -arm	PO_4 -arm	NH_4 -arm
820	800	44	58

Tab. 2. Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität in den Homogenaten von K-arm, SO_4 -arm, PO_4 -arm und NH_4 -arm gewachsenen *E. coli* [$\mu\text{l CO}_2/\text{mg Prot.} \cdot \text{Stde.}$].

Abb. 4. Wachstum von *E. coli* in verschiedenen Medien. Die Wachstumskurven entsprechen den Versuchen in den Abb. 3 und 5. Das Wachstum wurde durch Extinktionsmessung bei 405 nm bestimmt.

Die Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität ist außerdem abhängig vom Substrat des Wachstumsmediums. Auf Hexosen gewachsene Bakterien besaßen die höchste Aktivität, gefolgt von Glycerin. Die auf den übrigen Substraten gewachsenen Zellen hatten eine niedrige Decarboxylase-Aktivität [Tab. 3] und einen Hill-Exponenten von 0,9.

Substrat	Mg-reich	Mg-arm
Glycerin	420	49
Pyruvat	96	91
Lactat	48	47
Fructose	735	
Galaktose	820	
Mannose	730	
Citrat	90	
α -Ketoglutarat	14	
Succinat	58	
Alanin	78	
Asparaginat	51	
Glutamat	51	

Tab. 3. Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität [$\mu\text{l CO}_2/\text{mg Prot.} \cdot \text{Stde.}$] in den Homogenaten von *E. coli*, die über Nacht in Wachstumsmedien mit verschiedenen Substraten [Konzentration jeweils 0,5%] gezüchtet wurden.

Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität während des Wachstums

Inkubiert man über Nacht in glucosehaltigem Medium gewachsene Kontrollzellen mit hoher Pyruvat-Decarboxylase in normalem Wachstumsmedium, dann nimmt die spezifische Aktivität des Enzyms während der Wachstumsphase unabhängig von der C-Quelle des Mediums stark ab, erst wenn die Zellen aufhören zu wachsen und Glucose im Medium vorhanden ist, steigt sie wieder an [Abb. 3, 4, Kurve I]. Läßt man Mg-arm [Kurve III] oder PO_4 -arm [VI] gewachsene Zellen in normalem Medium (mit Glucose) wachsen, dann steigt ihre von vornherein niedrige Pyruvat-Decarboxylase ebenfalls

Abb. 5. Änderung des Hill-Exponenten während des Wachstums in verschiedenen Medien (s. Leg. Abb. 3).

erst an, wenn die logarithmische Wachstumsphase zu Ende geht. Wachsen Bakterien mit hoher Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität in Mg-freiem [Kurve II] oder PO_4 -freiem [V] Medium weiter, wobei es noch zu einer geringen Zellvermehrung kommt, sinkt ihre

Decarboxylase-Aktivität sehr schnell auf den für diese Zellen charakteristischen niedrigen Wert ab.

Die Zunahme der Decarboxylase-Aktivität erfolgt nur, wenn Proteinsynthese möglich ist. Bringt man Mg-arm bzw. PO_4 -arm gewachsene Zellen in ein Mg-haltiges [Kurve IV] bzw. PO_4 -haltiges [VII] Medium ohne Aminosäuren und Stickstoffquelle, so bleibt die Pyruvat-Decarboxylase auf ihrem niedrigen Niveau.

Das Absinken und Ansteigen der Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität ist mit einer gleichsinnigen Änderung des Hill-Exponenten verbunden [Abb. 5].

Diskussion

In *E. coli* gibt es verschiedene Enzyme, die CO_2 aus Pyruvat freisetzen und zwar einen Liponsäure- und FAD-haltigen Multienzymkomplex [E.C. 1.2.4.1] bestehend aus Pyruvat-Decarboxylase, Lipoylreduktase-Transacetylase und Dihydrolipoyl-Dehydrogenase^{8,9} sowie verschiedene DPN-, CoA- und Liponsäure-unabhängige Enzyme^{9,10} [E.C. 1.2.2.2, 1.2.3.3, 4.1.1.1].

Das unter den gewählten Bedingungen erfaßte Enzym benötigte kein DPN, CoA, O_2 , PO_4 und keine Liponsäure. Außer CO_2 wurde kein weiteres Gas freigesetzt. Als Endprodukt der Reaktion fanden wir Acetoin [Bestimmung nach WESTERFELD¹¹]. Das Enzym entsprach auch in seinem Verhalten gegenüber Mg und EDTA sowie in seinem pH-Optimum [bei pH 5,5–6], seiner K_m für Thiaminpyrophosphat [$K_m = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$] und seiner halbmaximalen Aktivität mit Pyruvat [$3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$] der nichtoxydativen Pyruvat-Decarboxylase aus Hefe [E.C. 4.1.1.1]¹⁰.

Außerdem ermittelten wir auch bei kristallisierter Hefepyruvat-Decarboxylase [E.C. 4.1.1.1., Fa. Boehringer] [im optischen Test mit Alkoholdehydrogenase] einem etwa gleich großen Hill-Exponenten [$n = 1,7$].

Die S-förmige Kinetik und der Hill-Exponent von 1,9 erinnern an einen positiven homotropen co-

operativen Effekt, der für die Kinetik allosterischer Enzyme typisch ist. Die Erniedrigung des Hill-Exponenten auf 0,9 durch Hitzebehandlung, die wir auch bei kristallisierter Hefepyruvat-Decarboxylase fanden, könnte der „Desensibilisierung“ allosterischer Enzyme entsprechen. Es ist uns jedoch nicht gelungen, einen für allosterische Enzyme charakteristischen Effektor nachzuweisen, so daß eine Zuordnung des Enzyms zu den allosterischen Enzymen fraglich ist, denn eine S-förmige Kinetik ergibt sich auch, wenn ein Enzym mehrere Substratmoleküle bindet¹², aus mehreren Untereinheiten besteht¹³, oder wenn [ohne cooperativen Effekt] für die enzymatische Reaktion mehrere Reaktionswege existieren¹⁴.

Die Abnahme der Pyruvat-Decarboxylase bei den Mangelzellen und während der log-Phase des Wachstums ist nicht auf einen Inhibitor zurückzuführen. Wenn man die Homogenate aus Decarboxylase-reichen und Decarboxylase-armen Zellen mischt, erhält man eine Aktivität, die dem arithmetischen Mittel entspricht. Ein Mg-Mangel des Enzyms ist auch auszuschließen, da die Bestimmung in Gegenwart von Mg erfolgte.

Die Abnahme der spezifischen Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase während der log-Phase kommt zustande, weil während dieser Zeit keine Nettosynthese des Enzyms erfolgt. Als Ursachen kämen (vorübergehende) Katabolit-Repression oder eine unterbrochene Induktion in Frage. Weil die Enzymaktivität beim Wachsen unter Mangelbedingungen stärker abnimmt als der Zellvermehrung entspricht, kann die Enzymaktivität unter Mangelbedingungen wahrscheinlich noch zusätzlich verringert werden. Da an der niedrigen Decarboxylase-Aktivität von Mangelzellen ein Hill-Exponent von 0,9 ermittelt wurde, kann man diskutieren, ob die geringe Restaktivität von einem anderen decarboxylierenden Enzym stammt. Hierfür spräche, daß wir bei der niedrigen Decarboxylase-Aktivität Mg-armer Zellen kein Acetoin nachweisen konnten. Eine Entscheidung ist erst nach Isolierung der Enzyme möglich.

⁸ L. J. REED u. D. J. COX, Ann. Rev. Biochem. **35**, 57 [1966].

⁹ D. R. SANADI, in: The Enzymes, **7**, 307 [1963], Hrsg. P. D. BOYER, W. LARDY u. K. MYRBÄCK, Acad. Press, New York 1963.

¹⁰ M. F. UTTER, in: The Enzymes, **5**, 319 [1961], Hrsg. P. D. BOYER, W. LARDY u. K. MYRBÄCK, Acad. Press, New York 1961.

¹¹ W. W. WESTERFELD, J. biol. Chemistry **161**, 495 [1945].

¹² B. D. SANWAL, C. S. STACHOW u. R. A. COOK, Biochemistry **4**, 410 [1965].

¹³ J. MONOD, J. WYMAN u. J. P. CHANGEUX, J. molecular Biol. **12**, 88 [1965].

¹⁴ J. R. SWEENEY u. J. R. FISHER, Biochemistry **7**, 561 [1968].

Durch die Aktivitätsabnahme während des Wachstums unterscheidet sich das erfaßte Enzym ebenfalls von der Pyruvat-Decarboxylase des Multienzym-Komplexes [E.C. 1.2.4.1], deren Aktivität während des Wachstums konstant bleibt¹⁵ oder sogar etwas ansteigt¹⁶. Eine ähnliche Aktivitäts-Abnahme während des Wachstums wurde auch beim Pyruvatoxydase- [E.C. 1.2.2.2] und phosphorklastischen System von *E. coli* gefunden¹⁵.

Die Beziehungen der Pyruvat-Decarboxylase zur C-Quelle im Wachstumsmedium lassen sich mit einer Induktion des Enzyms durch abbaubare Hexosen bzw. eines ihrer Abbauprodukte erklären. Diese Induktion erfolgt aber erst, wenn die Bakterien das Ende ihrer log-Phase erreichen.

¹⁵ M. O. OSTER u. L. P. HAGER, *Bacteriol. Proc.* **1964**, 101.

¹⁶ U. HENNING, C. HERZ u. K. SZOLYVAY, *Z. Vererbungsl.* **95**, 236 [1964].

Über Proteine aus Tumor- und Normalgewebe

7. Zur elektrophoretischen Charakterisierung basischer Proteine in cytoplasmatischen Säureextrakten aus Rattenhepatom und normaler Rattenleber*

K.-D. SCHWENKE

Institut für Ernährung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Potsdam-Rehbrücke

(*Z. Naturforsch.* **24 b**, 432—435 [1969]; eingegangen am 26. August 1968)

Ungepufferte Lösungen von KCl/KOH eignen sich für die elektrophoretische Trennung säureextrahierter, cytoplasmatischer Organproteine. Mit Hilfe der freien Elektrophorese im System 0,05-*m*. KCl/KOH wurde der isoelektrische Punkt einer basischen Leberproteinfraction (h-Protein) bei pH 8,3—8,4 bestimmt. Diese Fraktion ist in den Extrakten aus Hepatom Berlin und DAENA-Hepatom nur schwach vertreten oder fehlt ganz.

Mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese in 0,01-*n*. HCl wurden die säurelöslichen Cytoplasmaproteine aus Rattenleber und 2 Hepatomen in 5—6 scharfe Zonen getrennt.

Elektronenphoretische Methoden wurden wiederholt zu vergleichenden Untersuchungen von Organproteinen aus Tumor- und Normalgeweben herangezogen^{1—4}. Dabei konnten charakteristische Unterschiede besonders bei den basischen Cytoplasmaproteinen, die durch Säureextraktion angereichert wurden, festgestellt werden⁵. Die Verwendung konventioneller Puffersysteme zur freien Elektrophorese der säureextrahierten Proteine ergab zwar eine relativ gute Trennung der Hauptfraktionen, führte aber zur Ausfällung eines hohen Proteinanteils.

In der vorliegenden Arbeit wird über eine verbesserte Auftrennung säureextrahierter, cytoplasmatischer Proteine aus normaler Rattenleber und zwei Hepatomen und die Charakterisierung der basischen Hauptfraktion mit Hilfe der Elektrophorese in ungepufferten Elektrolytlösungen berichtet.

Experimenteller Teil

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir neben normaler Rattenleber die Tumoren Hepatom Berlin und DAENA 7330, zwei ursprünglich im Institut für Krebsforschung der DAW zu Berlin, Berlin-Buch, aus Buttergelb bzw. Diäthylnitrosamin erzeugte transplantable Rattenlebercarcinome. Die Aufarbeitung der Gewebe und ihre Fraktionierung wurde nach dem bereits beschriebenen^{3,5}, jedoch leicht modifizierten Verfahren durchgeführt. Die Gewinnung des hochtourigen Überstandes erfolgte durch 1-stdg. Zentrifugation bei 120 000 *g* und 0° in der präparativen Ultrazentrifuge VAC 60 (Fa. Janetzki, Engelsdorf b. Leipzig **), die Säureextraktion mit 0,25-*n*. H₂SO₄ (Endkonzentration). Nach Dialyse gegen Wasser und 0,01-*n*. Essigsäure wurde der Säureextrakt im Rotationsverdampfer bei +25° eingengt und gefriergetrocknet. Ausbeute (pro 100 *g* gewaschenes Gewebe): Leber 400—500 mg, Hepatom Berlin 600—700 mg, DAENA 500—600 mg.

¹ S. SOROF u. P. P. COHEN, *Cancer Res.* **11**, 376 [1951].

² S. SOROF, P. P. COHEN, E. C. MILLER u. J. A. MILLER, *Cancer Res.* **11**, 383 [1951].

³ K. D. SCHWENKE, *Z. Krebsforsch.* **68**, 112 [1966].

⁴ K. D. SCHWENKE, R. PLASS u. M. KUJAWA, *Z. Krebsforsch.* **68**, 234 [1966].

⁵ K. D. SCHWENKE u. M. KUJAWA, *Z. Naturforsch.* **22 b**, 961 [1967].

* 6. Mitt. s. l. c. ⁵.

** Für die Möglichkeit zur Benutzung der Ultrazentrifuge möchte ich Herrn Dr. habil. H. KOBLITZ, Institut für Faserstoff-Forschung der DAW zu Berlin in Teltow-Seehof, verbindlichst danken.