Einfluß von Effektoren auf Molekulargewicht und Aktivität
von Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) aus Rinderleber in vitro

III. Die Substratspezifität der GluDH und ihrer Untereinheiten

The Influence of Various Effectors on Molecular Weight and Activity of Bovine Liver
Glutamate-Dehydrogenase (GluDH) in Vitro

III. The Substrate Specificity of GluDH and its Subunits

M. KEMPFFLE, K.-O. MOSEBACH und C. BLANKE

Physikalisch-chemische Abteilung des physiologisch-chemischen Instituts der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 25 b, 587—589 [1970]; eingegangen am 18. März 1970)

The activities of GluDH against glutamic acid (α -oxoglutarate) and against alanine (pyruvate) were compared under various conditions. Diethylstilbestrol (DES) inhibited the oxidative deamination of glutamic acid at all enzyme concentrations investigated but its effect on the oxidative deamination of alanine was different. At small enzyme concentrations (<0.01 mg/ml) where there are only monomers of the enzyme (mol.-weight 310 000) DES inhibited analogously to its behaviour in the glutamic acid reaction. At high concentrations where almost only aggregated enzyme molecules are present, DES stimulated the deamination of alanine and the reductive amination of pyruvate, respectively. These observations are interpreted without assuming different conformations of the monomers obtained either by simple dilution or by treatment with DES. An interpretation is possible by conceiving the inhibition and liberation of the active sites to be events influencing the enzymatic activity contrarily.

Wir haben Vorstellungen über die Wirkung von Diäthylstilböstrol (DES) auf die Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) (E.C. 1.4.1.3) gewonnen, die von den Auffassungen anderer Arbeitskreise^{3, 4} in einigen Punkten abweichen^{1, 2}.

Unsere Ergebnisse lassen sich am besten unter der Annahme deuten, daß in bezug auf ein bestimmtes Monomeres DES und die anderen Monomere konkurrierende kompetitive Inhibitoren sind⁵. Für DES wurde dies durch Lineweaver-Burk-Analysen nachgewiesen. Da diese kompetitive Hemmung durch DES nur in Gegenwart von NADH auftritt, wird als einzige Zusatz-Annahme die Auffassung vertreten, daß NADH eine Konformationsänderung der Monomeren bedingt, die die beschriebenen Effekte von DES erst ermöglicht. Daß Bindung von NADH zu Konformationsänderungen führen kann, ist für GluDH⁶ und für eine Reihe anderer Enzyme nachgewiesen worden⁷.

Wir überprüften, ob die Vorstellung sich auch bei Deutung anderer, bisher unverständlich gebliebener Phänomene bewährt. YIELDING et al.⁸ berichteten, daß durch Zusatz von DES und einiger anderer Effektoren die GluDH in Monomere zerfällt, die nicht mehr spezifisch für die oxidative Desaminierung der L-Glutaminsäure, sondern für die von L-Alanin sind. Allerdings erwies sich die L-Alanin-Dehydrogenase (AlaDH)-Aktivität als wesentlich kleiner (ca. 0,5%) als die GluDH-Aktivität.

Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob die L-AlaDH-Aktivität eine durch DES induzierte Eigenschaft oder eine latent vorhandene Eigenschaft der Monomere ist, die erst durch die Disaggregation in Erscheinung tritt.

Methodik

Untersuchungssubstanz ist eine GluDH-Kristallsuspension in 2 M Ammoniumsulfat der Fa. Boehringer,

¹ K.-O. MOSEBACH u. M. KEMPFFLE, Z. Naturforsch. 24b, 580 [1969].

² M. KEMPFFLE, K.-O. MOSEBACH u. C. BLANKE, *ibid.* 25b, 273 [1970].

³ C. FRIEDEN, Biochem. biophys. Res. Commun. 10, 410 [1963].

⁴ G. M. TOMKINS, K. L. YIELDING, N. TALAL, and J. F. CURRAN, Cold Spring harbor Symposia Quant. Biol. 28, 461 [1963].

⁵ M. KEMPFFLE u. K.-O. MOSEBACH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 116 [1970].

⁶ D. PANTALONI and P. DESSEN, European J. Biochem. 11, 510 [1969].

⁷ T. DEVENYI, P. ELÖDI, T. KELETI u. G. SZABOLCSI, in: Strukturelle Grundlagen der biologischen Funktion der Proteine, Akademiai Kiado, Budapest 1969.

⁸ G. M. TOMKINS, K. L. YIELDING, and C. F. CURRAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 270 [1961].

Mannheim. Die Substrate (Glutaminsäure, Alanin, α -Ketoglutarinsäure und Brenztraubensäure) und die Coenzyme (NAD und NADH) wurden ebenfalls von Boehringer bezogen. DES erhielten wir bei der Fa. Calbiochem, Luzern, Schweiz.

GluDH wurde unmittelbar vor den kinetischen Messungen 12 bis 24 Stdn. gegen einen frischen 0,025 M Tris-HCl-Puffer (mit 0,1 M NaCl- und 0,1 mM EDTA-Zusatz), pH 8 dialysiert. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen wurden photometrisch bestimmt.

Die enzymatische Aktivität wurde bei 25 °C mit Hilfe der Reaktionen

verfolgt. Als Maß diente die Zu- bzw. Abnahme der NADH-Extinktion bei 340 nm pro Min. ($= \Delta OD/\text{min}$).

Als Photometer diente das PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, mit einem zusätzlichen Linienschreiber (Papiervorschub = 15 cm/min). Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet. 10 Sek. nach Enzymzusatz wird der Anstieg der vom Schreiber registrierten Absorptionskurve als Maß für die Aktivität genommen.

Ergebnisse

AlaDH-Aktivität der GluDH

Nach STRUCK und SIZER⁹ werden eine Reihe von Aminosäuren durch die GluDH oxydiert, insbesondere L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin. Allerdings beträgt die relative Reaktionsgeschwindigkeit nur etwa 1–2% gegenüber der beim Vorliegen von L-Glutaminsäure. Die Aktivität gegenüber L-Alanin ist noch wesentlich kleiner (0,27%).

Abb. 1 zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit der reduktiven Aminierung von Brenztraubensäure in Ab-

Abb. 1. Reaktionsgeschwindigkeit in $\Delta OD/\text{min}$ für Pyruvat als Funktion der GluDH-Konzentration. 0,025 M Tris-HCl-Puffer (0,1 M NaCl- und 0,1 mM EDTA-Zusatz) pH 8,0, 25 °C, 2 ml; $5 \cdot 10^{-5}$ M NADH, $1 \cdot 10^{-2}$ M NH_4Cl ; $1 \cdot 10^{-2}$ M Pyruvat.

⁹ J. STRUCK, JR. and I. W. SIZER, Arch. Biochem. Biophys. **86**, 260 [1960].

hängigkeit von der GluDH-Konzentration. Um die AlaDH-Aktivität sicher zu erfassen, wurde im Substratüberschuß gearbeitet. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten gegenüber Brenztraubensäure und α -Ketoglutarinsäure hängt selbstverständlich u. a. von der verwendeten GluDH-Konzentration ab.

Einfluß von DES auf die AlaDH-Aktivität bei verschiedenen GluDH-Konzentrationen

Untersucht man die Abhängigkeit der AlaDH-Aktivität als Funktion der Substratkonzentration (Brenztraubensäure) bei verschiedenen Enzymkonzentrationen in Gegenwart und Abwesenheit von DES, so ergibt sich ein überraschendes Bild (Abb. 2).

Abb. 2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit in $\Delta OD/\text{min}$ von der Pyruvat-Konzentration bei zwei verschiedenen GluDH-Konzentrationen (a) und (b) ohne (o) und mit (m) Zusatz von DES ($2.5 \cdot 10^{-5}$ M). Bedingungen wie in Abb. 1. (a) 0,5 mg GluDH/ml, (b) 0,01 mg GluDH/ml.

DES hemmt die reduktive Aminierung von Brenztraubensäure bei kleiner GluDH-Konzentration und steigert sie bei großer GluDH-Konzentration.

In Abbn. 3 und 4 sind die Abhängigkeiten der Reaktionsgeschwindigkeiten von der DES-Konzentration bei Vorliegen von Brenztraubensäure und α -Ketoglutarinsäure miteinander verglichen. In Gegenwart von α -Ketoglutarinsäure beobachtet man mit zunehmender DES-Konzentration einen monotonen Abfall der reduktiven Aminierung. Das gilt für alle eingesetzten GluDH-Konzentrationen (Abb. 3, a und b). In Gegenwart von Brenztraubensäure tritt dagegen bei einem bestimmten Bereich der DES-Konzentration ein sprunghafter Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit auf. Ein solcher Sprung wird nur bei genügend hoher GluDH-Konzentration gefunden (Abb. 4 a). Bei GluDH-Konzentrationen, die so klein sind, daß ausschließlich Monomere vorliegen, findet

Abb. 3. Abhängigkeit der GluDH-Aktivität in $\Delta OD/\text{min}$ von der molaren DES-Konzentration. Bedingungen wie in Abb. 1. $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ α -Ketoglutarat. (a) 0,25 mg GluDH/ml, (b) 0,01 mg GluDH/ml.

Abb. 4. Abhängigkeit der AlaDH-Aktivität in $\Delta OD/\text{min}$ von der molaren DES-Konzentration. Bedingungen wie in Abb. 1. (a) 0,5 mg GluDH/ml, $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Na-Pyruvat, (b) 0,006 mg GluDH/ml, $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ Na-Pyruvat. Die unterschiedlichen Na-Pyruvat-Konzentrationen in (a) und (b) wurden gewählt, um vergleichbare Aktivitäten zu erhalten.

man anstelle des sprunghaften Anstiegs ebenfalls einen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender DES-Konzentration (Abb. 4 b).

Diskussion

Wie in der Einführung erwähnt wurde, nehmen verschiedene Autoren an, daß DES nicht nur eine Aufspaltung der GluDH in Monomere verursacht, sondern auch eine Konformationsänderung dieser Monomere. Damit soll eine Verschiebung der Substratspezifität von der Glutaminsäure zum Alanin verbunden sein. Diese Auffassung könnte durch unsere in Abb. 4 a dargestellten Ergebnisse eine Stütze finden.

Diese Vorstellung ist dagegen ohne weitere Zusatzannahmen kaum aufrecht zu erhalten, wenn man die Ergebnisse in Abb. 4 a mit denen in Abb. 2 und Abb. 4 b vergleicht. Abb. 2 läßt erkennen, daß bei

einer genügend kleinen GluDH-Konzentration sich DES genau so als Inhibitor gegenüber Brenztraubensäure wie gegenüber α -Ketoglutarat verhält. Würde die Rolle von DES nur darin bestehen, die Substratspezifität zu verändern, wäre diese Hemmung nicht verständlich. Hier müßte bereits eine Doppelrolle von DES postuliert werden.

Zu einem ähnlichen Widerspruch führt der Vergleich der Abbn. 4 a und 4 b. Bei genügend kleiner GluDH-Konzentration findet mit zunehmender DES-Konzentration der sprunghafte Anstieg der AlaDH-Aktivität nicht statt, im Gegenteil, man findet einen ständigen Abfall. Der sprunghafte Anstieg sollte aber gerade das Kriterium für eine durch DES stimulierte Konformationsänderung und Änderung der Substratspezifität sein.

Es ist nicht erforderlich, sich um Zusatzannahmen zu bemühen, um die Hypothese einer Konformationsänderung durch DES aufrecht zu erhalten. Alle bisher aufgewiesenen Verhaltensweisen lassen sich einfach deuten, wenn man die in der Einführung angeführte Vorstellung zugrundelegt. Durch Aggregation der Monomeren kommt es infolge sterischer Behinderung zu Aktivitätsverlusten² (gegenüber Glutaminsäure und Alanin gleichermaßen). DES drängt die Monomeren auseinander, so daß nunmehr alle aktiven Zentren der Monomeren wirksam werden können. Andererseits entpuppte sich bei unseren Versuchen DES als ein kompetitiver Inhibitor¹⁰, der dementsprechend die Aktivität herabzusetzen vermag. Wenn man bei Bezug auf ein bestimmtes Monomeres DES und die anderen Monomere als um die aktiven Zentren konkurrierende kompetitive Inhibitoren ansieht, kann erwartet werden, daß DES je nach den Bedingungen in unterschiedlicher Größe und Richtung wirkt. Bei hoher Enzymkonzentration, bei der die Moleküle weitgehend aggregiert sind, steht die durch die Disaggregation erreichte Freilegung aktiver Zentren im Vordergrund; bei sehr niedrigen Enzymkonzentrationen, bei denen im wesentlichen Monomere vorliegen, tritt die kompetitive Inhibitoreigenschaft von DES in Erscheinung. Daß sich dieses Nebeneinander von Aktivierungen und Hemmungen nur bei Alanin bzw. Brenztraubensäure vorführen läßt, mag daran liegen, daß bezüglich der Reaktion mit α -Ketoglutarat sich keine so hohen GluDH-Konzentrationen erreichen lassen, bei der ein Anstieg entsprechend Abb. 4 a zu erwarten ist. Die beiden Kurven 3 a und 3 b entsprechen dann der Abb. 4 b.

¹⁰ M. KEMPFLER u. K.-O. MOSEBACH, in Vorbereitung.