

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DER PYRUVATDEHYDROGENASE AUS SCHWEINEHERZMUSKEL*

E. JUNGER UND H. REINAUER

Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie und Institut für physiologische Chemie der Universität Düsseldorf, 4000 Düsseldorf, Moorenstrasse 5 (Deutschland)

(Received June 17th, 1971)

SUMMARY

Investigations on the structure of pyruvate dehydrogenase complex of pig heart muscle

The pyruvate dehydrogenase complex has been isolated from pig heart muscle. The enzyme preparation had a specific activity up to 154 μmoles/mg protein per h. After sucrose density gradient centrifugation the oxoglutarate dehydrogenase (2-oxoglutarate:lipoate oxidoreductase (acceptor acylating), EC 1.2.4.2) activity was less than 4%. No other enzyme activities could be measured. Purity was also controlled by analytical ultracentrifugation, isoelectric focusing, and by electron microscopy. The purified pyruvate dehydrogenase (pyruvate:lipoate oxidoreductase (acceptor acylating), EC 1.2.4.1) sample regularly shows pyruvate decarboxylase-kinase activity, but only a negligible amount of pyruvate decarboxylase-phosphatase activity. The latter regulating enzyme is evidently lost during preparation. The reconstitution of the enzyme complex with pyruvate decarboxylase-phosphatase was functionally possible, but was not yet demonstrable by electron microscopy. The dihydrolipoate acetyltransferase (acetyl-CoA:dihydrolipoate S-acetyltransferase, EC 2.3.1.12), the core of the enzyme complex, has been isolated by a reductive dissociation of the complex in an alkaline medium and was then purified by sucrose density gradient centrifugation. As shown by the negative staining technique, this enzyme is an isometric particle with a diameter of 230–240 Å and determines the structure of the total complex. The pentagonal dodecahedral symmetry of the dihydrolipoate acetyltransferase was proved by correlation of electron micrographs with appropriate models. The other enzymes are attached to the dihydrolipoate acetyltransferase core resulting in an isometric particle with a diameter of 400 Å. The comparison with models indicates a pentagonal dodecahedral core surrounded by a shell with icosa-hedral symmetry.

EINLEITUNG

Der Pyruvatdehydrogenase-Komplex besteht aus vier bzw. fünf verschiedenen

* Ein Teil dieser Arbeit wurde auf dem VII. Internationalen Kongreß für Elektronenmikroskopie 1970 in Grenoble und dem VIII. Internationalen Kongreß für Biochemie 1970 in Montreux vorgetragen.

Enzymen: Pyruvatdecarboxylase (2-oxosäure carboxy-lyase, EC 4.1.1.1), Dihydro-lipoatacetyltransferase (acetyl-CoA:dihydrolipoat S-acetyltransferase, EC 2.3.1.12), Lipoamiddehydrogenase (NADH:lipoamid oxidoreductase, EC 1.6.4.3) und zwei regulierenden Enzymen, Pyruvatdecarboxylase-Kinase und Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase. Diese fünf verschiedenen Strukturelemente sowie die geringe Stabilität des Enzymkomplexes erschweren die Aufklärung der Struktur. So ist bis jetzt die absolute Zahl der Untereinheiten, sowie das molare Verhältnis der Teilenzyme unsicher, insbesondere ist der strukturelle Anteil der beiden regulatorischen Enzyme ungeklärt^{1,2}. Dementsprechend differieren die Angaben über die Größe bzw. das Molekulargewicht des Enzymkomplexes: Während von REED und COX³ ein Molekulargewicht von $5 \cdot 10^6$ gefunden wurde, geben HAYAKAWA *et al.*⁴ ein Molekulargewicht von $7.4 \cdot 10^6$ an. Da der Enzymkomplex bisher nicht kristallisiert werden konnte und somit keine Strukturanalyse durch Röntgenbeugung in Frage kommt, ist derzeit die Kombination von morphologischen Methoden, die die Enzympartikel in Lösung erfassen können, wie Elektronenmikroskopie, Ultrazentrifugation und Röntgenkleinwinkelstreuung am aussichtsreichsten, um brauchbare Hinweise auf die Komplexstruktur zu bekommen. Auffallend bei den bisherigen Untersuchungen ist, daß die elektronenmikroskopischen Darstellungen des Enzymkomplexes zu klein im Vergleich zu den bisher ermittelten Molekulargewichten und Modellvorstellungen sind²⁻⁴ und auf einen präparationsbedingten partiellen Zerfall des Multienzymkomplexes durch Phosphorwolframsäure schließen lassen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Präparationsmöglichkeiten untersucht werden, um einen kompletten Enzymkomplex zu erhalten und elektronenmikroskopisch darzustellen. Weiterhin soll versucht werden, die Symmetrie des Multienzymkomplexes durch Korrelation von elektronenmikroskopischen Abbildungen und Modellen zu beweisen. In einer weiteren Arbeit werden diese Ergebnisse mit Untersuchungen der Röntgenkleinwinkelstreuung verglichen bzw. ergänzt.

MATERIEL UND METHODEN

Reagenzien

Äthylacetat, L-Cystein · HCl, Glutathion reduziert, Natriumpyruvat, Natrium-2-oxoglutarat, Phosphorwolframsäure, Thiaminpyrophosphat, Toluol von der Firma Merck, Darmstadt.

Acetylphosphat-Lithiumsalz, Antimycin A, Dithioerythritol (Cleland's Reagenz), Glutaraldehyd 25%, DL- α -Liponsäureamid, Natriumdodekylsulfat von der Firma Serva, Heidelberg.

ATP, Coenzym A, freie Säure, Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) aus Kaninchennmuskel, Lipoamiddehydrogenase aus Schweineherz, NAD⁺, NADH, Phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8) aus *Clostridium kluyveri* von der Firma Boehringer, Mannheim.

Dimethyl-POPOP [1,4-bis-2-(4-Methyl-6-phenyloxazolyl)benzol], Hyamine 10-X^R, POPOP [1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)benzol], PPO [2,5-Diphenyloxazol], Soluene-100^R von der Firma Packard, Frankfurt.

Enzympräparation und Aktivitätsmessungen

Die Pyruvatdehydrogenase wurde im wesentlichen nach den Angaben von

ISHIKAWA *et al.*⁵ aus Schweineherzmuskel angereichert. Hierzu wurden die noch körperwarmen Schweineherzen im Schlachthof in eiskalt gepufferte 0.3 M Saccharoselösung gebracht und im Labor mit Hilfe eines Fleischwolfs und eines Starmix zerkleinert. Der weitere Aufschluß des Gewebes erfolgte in 0.02 M Phosphatpuffer, pH 7.0, durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen. Anschließend wurde die Suspension 2 Min mit einem Ultraturrax behandelt. Nach der pH-Fällung wurde das Enzym im Saccharosedichtegradienten (0.4 bis 2.0 M Saccharose, 300 000 × g, 240 Min) weiter gereinigt. Der Saccharosedichtegradient wurde durch Anstechen der Röhrchen fraktioniert. Die enzymhaltigen Saccharoseschichten wurden vereinigt, dialysiert und die Pyruvatdehydrogenase durch Fällung am isoelektrischen Punkt konzentriert. Z. Zt. wird die Pyruvatdehydrogenase mit höherer Ausbeute unter Weglassen der Protaminsulfatfällung präpariert. Enzymaktivitätsmessungen: Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) und 2-Oxoglutaratdehydrogenase (EC 1.2.4.2) nach REINAUER *et al.*^{6,7}; Dihydrolipoatacetyltransferase (EC 2.3.1.12) nach HAGER UND GUNSALUS⁸ bzw. nach HAYAKAWA *et al.*⁹; Lipoamiddehydrogenase (Diaphorase, EC 1.6.4.3) nach MASSEY¹⁰; Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4) nach ALLMANN *et al.*¹¹; β-Hydroxybutyratdehydrogenase (EC 1.1.1.30) nach BERRY¹²; Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) nach DELBRÜCK *et al.*¹³; Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.2) nach SCHMIDT¹⁴.

Die Auflösung des Enzymkomplexes wurde durch Behandlung mit einer Lösung aus 0.2 M Glycinpuffer, pH 9.0–2 mM Dithioerythritol–2 M NaCl innerhalb von 15 Min erreicht. Das inkubierte Präparat wird 1:2 mit 0.02 M Phosphatpuffer, pH 7.0, verdünnt. Die Auf trennung der Enzyme erfolgte im Saccharosedichtegradienten (0.2–1.6 M Saccharose, 300 000 × g, 240 Min), wobei die Saccharose in 0.02 M Phosphatpuffer gelöst war. Außer durch reduktive Spaltung im alkalischen Milieu gelingt die Aufspaltung des Enzymkomplexes auch mit Natriumdodekylsulfat (20–100 μM).

Elektronenmikroskopische Präparation

Für die elektronenmikroskopische Darstellung wurden Proteinkonzentrationen von 0.1 bis 0.2 mg/ml verwendet. Die Proteinlösung wurde auf ein befilmtes Kupfernetzchen gebracht und in Glutaraldehyddampf innerhalb von 10 Min eingetrocknet¹⁵. Saccharose und Puffersubstanzen wurden durch Eintauchen in Aqua dest. entfernt. Anschließend wurde das Präparat mit 2%iger Phosphorwolframsäure, die mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 6.8 eingestellt worden war, negativ kontrastiert. Für routinemäßige Kontrollpräparate wurden Formvar-Kohle-Filme verwendet. Die Primärvergrößerung im Elektronenmikroskop betrug 40 000:1. Für elektronenmikroskopische Aufnahmen unter Hochauflösungsbedingungen wurden goldbedampfte Lochfolien verwendet, über die ein maximal 50 Å dicker Kohlefilm gezogen wurde. Die Aufnahmen wurden bei 100 kV, mit einer 200 μm Kondensor- und einer 50 μm Objektivaperturblende gemacht. Die Primärvergrößerung betrug 100 000:1 bzw. 150 000:1.

Zur Deutung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Strukturen mit Modellen verglichen, die den spezifischen elektronenmikroskopischen Gegebenheiten angepaßt wurden. Die Modelle wurden aus Holzkugeln angefertigt. Um ebenfalls, wie im Elektronenmikroskop, Parallelprojektionen von 3-dimensionalen Strukturen zu bekommen, wurden davon Röntgenbilder hergestellt, photographisch verkleinert und definiert verunschärft, wobei die Auflösungsgrenze von Struktur-

details, die sich aus dem lichtoptischen Beugungsbild des elektronenmikroskopischen Negativs ergibt, berücksichtigt wurde.

ERGEBNISSE

Die Aktivität des reinen Enzyms beträgt bei 35° 58 bis 154 $\mu\text{Mol}/\text{mg}$ Protein pro Std, je nach Aktivitätszustand des Enzymkomplexes. Das gewonnene Enzympräparat war frei von Thiaminpyrophosphat und häufig ein maximal aktiviertes Enzym. Die Aktivitätsmessung des Gesamtkomplexes erfolgte gewöhnlich bei einer MgCl_2 -Konzentration von 10 mM, daher entsprechen diese Messungen dem Aktivitätszustand des aktivierten Gesamtkomplexes. Bei dem letzten Reinigungsschritt im Saccharosedichthegradienten (Abb. 1) werden die Enzyme mit niedrigem Molekulargewicht wie Malatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase, Monoaminoxydase, β -Hydroxybutyratdehydrogenase abgetrennt, hingegen kann die 2-Oxoglutaratdehydrogenase nicht völlig vom Pyruvatdehydrogenase-Komplex isoliert werden. Die

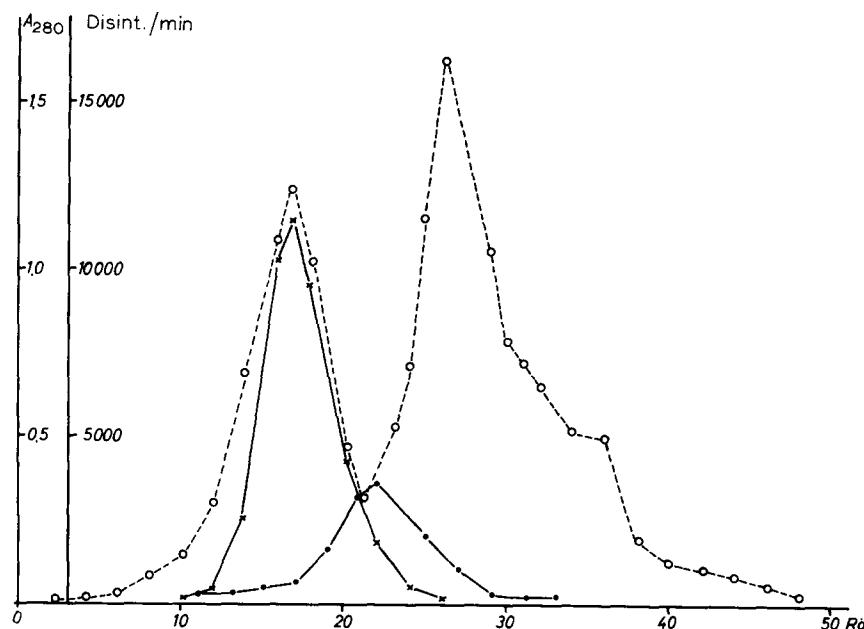


Abb. 1. Reinigung der Pyruvatdehydrogenase im Saccharosedichthegradienten. 0,4–2,0 M Saccharose in 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,0, $300\ 000 \times g$, 240 Min. ○---○, A_{280} nm; ●—●, α -Oxoglutaratdehydrogenase (Disint./Min.); ×—×, Pyruvatdehydrogenase (Disint./Min.).

Fremdaktivität der 2-Oxoglutaratdehydrogenase beträgt nach der pH-Fällung noch 3–12%, im Gradienten zwischen 0 bis maximal 4% der Pyruvatdehydrogenaseaktivität. In reinen Enzympräparaten ist das Verhältnis der Aktivitäten Lipoamiddehydrogenase:Dihydrolipoatacetyltransferase bei den angegebenen Meßbedingungen 21,9:1. Eine gute Auf trennung der beiden 2-Oxosäuredehydrogenasen gelingt mit Hilfe der Elektrophorese im pH-Gradienten. Diese Methode ist wegen der geringen Löslichkeit

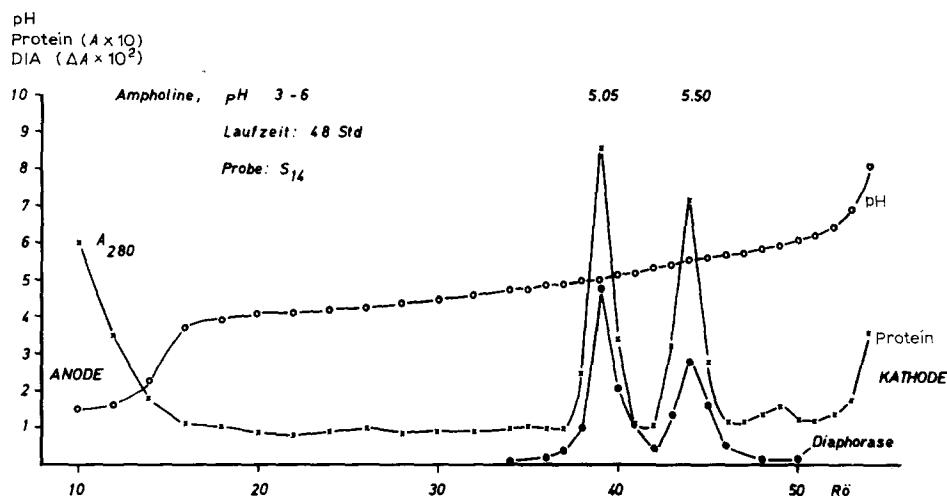


Abb. 2. Isoelektrische Fokussierung eines Gemisches aus Pyruvatdehydrogenase und 2-Oxoglutaratdehydrogenase. pH-Gradient: 3–6, LKB 8101, Temperatur 40°, Ampholine 1%, Säulenvolumen: 110 ml. PDH, Pyruvatdehydrogenase; DIA, Diaphorase = Lipooamiddehydrogenase.

der beiden Enzyme am isoelektrischen Punkt für präparative Auftrennung nicht brauchbar und wurde hier lediglich als Reinheitskriterium verwendet (Abb. 2).

Die Reinheitsprüfung in der analytischen Ultrazentrifuge ergibt einheitliche Fraktionen, die sich jedoch je nach Präparation in den Sedimentationskonstanten z.T. erheblich unterscheiden. Es werden Werte zwischen 50 und 78 S gefunden (Abb. 3).

Als ein weiteres brauchbares Reinheitskriterium hat sich die elektronenmikroskopische Darstellung des Enzymkomplexes erwiesen. Die Untersuchungen im Negativkontrast lassen sich mit den Analysen in der Ultrazentrifuge, zum Teil auch mit den biochemischen Befunden gut korrelieren.

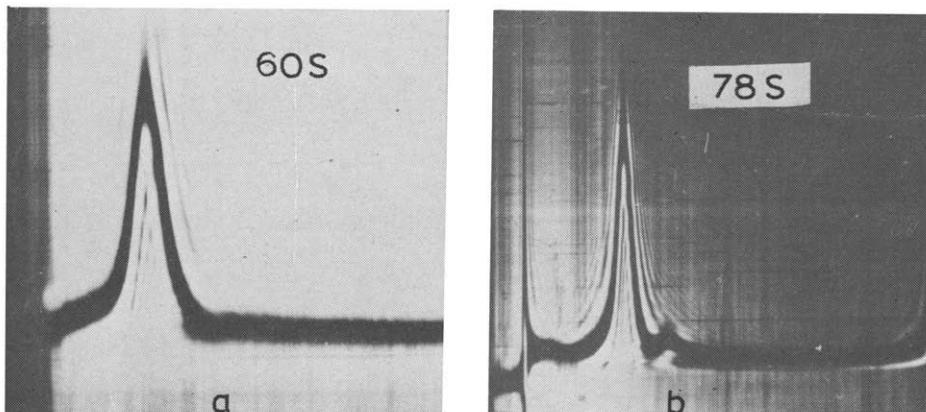


Abb. 3. Reinheitsprüfung der Pyruvatdehydrogenase Präparation in der analytischen Ultrazentrifuge. (a) 60 S-Enzym, Proteinkonzentration 9,6 mg/ml, 20 410 Umdrehungen/Min bei 20°, Aufnahme nach 33 Min. (b) 78 S-Enzym, Proteinkonzentration 6,5 mg/ml, 20 410 Umdrehungen/Min bei 20°, Aufnahme nach 27 Min. (Analysen Dr. O. Wetter, Tumorforschung, Essen.)

Da der Enzymkomplex in Gegenwart von Phosphorwolframat zerfällt, wurden die Präparate in Glutaraldehyddampf vorfixiert. Unter diesen Bedingungen konnten reproduzierbare Strukturen dargestellt werden. Eine Vernetzung von unspezifischem Protein mit dem Enzymkomplex durch die Glutaraldehydfixation ist nicht möglich, da in der entsprechenden Saccharoseschicht des Gradienten die Pyruvatdehydrogenase hochgereinigt vorliegt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen mitunter neben komplett

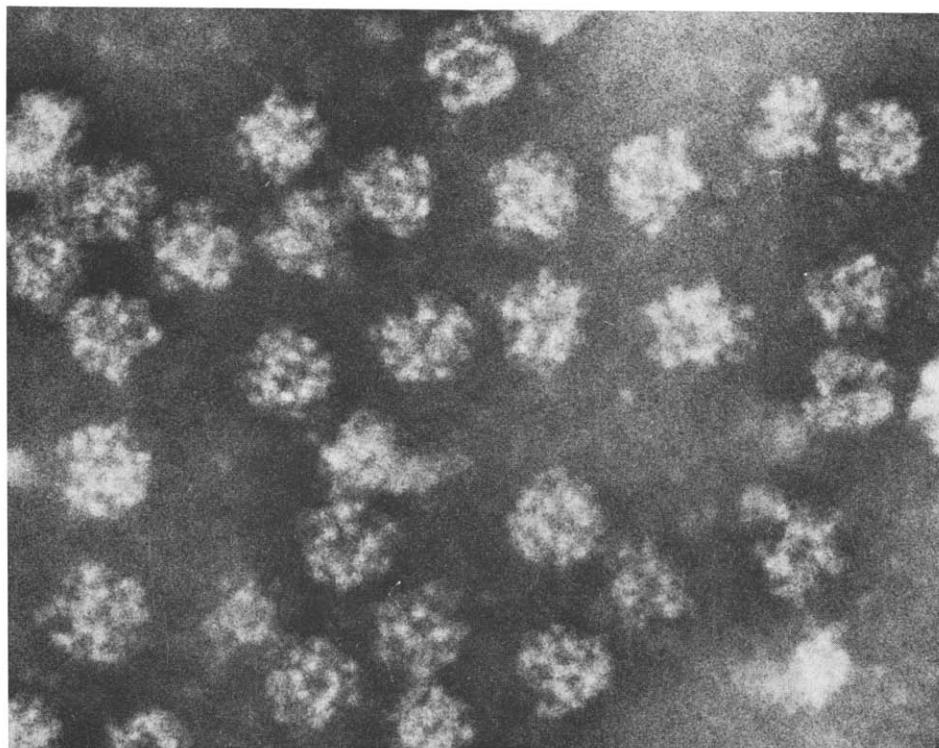


Abb. 4. Pyruvatdehydrogenase-Komplex, negativ kontrastiert. Vergrößerung 300 000:1.

erscheinenden Enzymkomplexen auch zerfallende Pyruvatdehydrogenase und die abgelösten Teilenzyme (Abb. 4). Der frischpräparierte, gut erhaltene Multienzymkomplex ist ein isodiametrisches Partikel mit einem Durchmesser von rund 400 Å. Charakteristische Projektionsrichtungen lassen auf eine ikosaedrische Symmetrie schließen (Abb. 8). Auch zwischen der Größe des Enzymkomplexes im Elektronenmikroskop und den Sedimentationskonstanten ergibt sich eine relativ gute Übereinstimmung. Leider konnten aus organisatorischen Gründen die Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge nicht simultan mit den elektronenmikroskopischen Präparationen durchgeführt werden. Aus diesen morphologischen Befunden allein lassen sich jedoch noch keine Aussagen über die Vollständigkeit des Enzymkomplexes machen.

In parallel durchgeführten biochemischen und elektronenmikroskopischen

TABELLE I

AKTIVITÄTSÄNDERUNG DER GEREINIGTEN PDH DURCH PYRUVATDECARBOXYLASE-KINASE UND PYRUVATDECARBOXYLASE-PHOSPHATASE

Überstand 1 enthält Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase-Aktivität (... Überstand eines Herzmuskelhomogenats nach 30 min Zentrifugation bei 30 000 × g).

Inkubationsbedingungen	n	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität (% der Kontrolle)
0.5 mM ATP, 1 mM Glutathion, 1 mM Mg ²⁺	5	-80.6 ± 16.8
1 mM Glutathion, 10 mM Mg ²⁺	5	0 (gesetzt)
0.5 mM ATP, 1 mM Glutathion, 1 mM Mg ²⁺ , Überstand 1	8	-76.2 ± 17.8
1 mM Glutathion, 10 mM Mg ²⁺ , Überstand 1	8	+288.2 ± 258

Analysen wurde zunächst die Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase gemessen, aber auch hier keine direkte Korrelation mit der Größe des Enzymkomplexes gefunden. Daher wurden die Aktivitäten der regulatorischen Enzyme als Kriterien der Vollständigkeit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes mit herangezogen. In allen unseren Enzympräparationen wurde Pyruvatdecarboxylase-Kinase-Aktivität auch

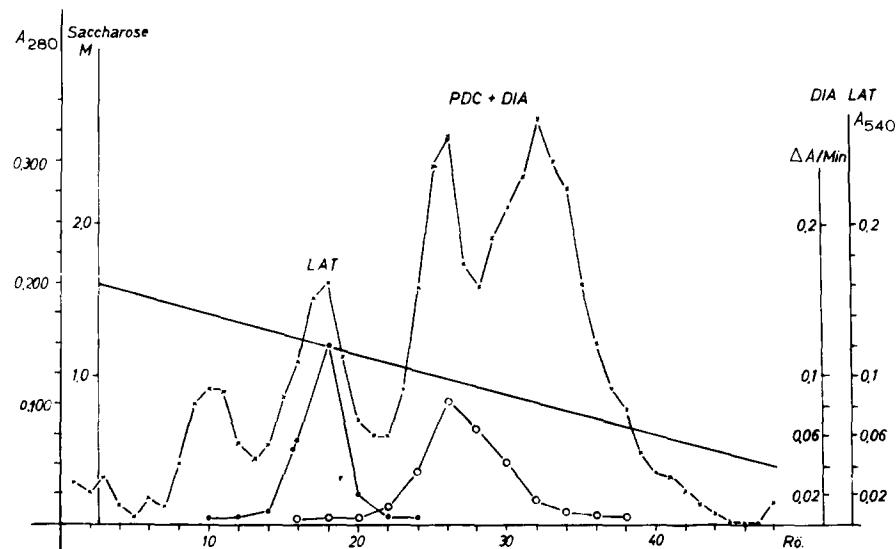


Abb. 5. Auflösung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes nach Behandlung mit 0.2 M Glycinpuffer-2 mM Dithioerythritol-2 M NaCl, pH 9. Nach 15 Min 1:2 verdünnt und im Saccharose-dichtegradienten (0.2-1.6 M in 0.02 M Phosphatpuffer, pH 7.0-1 M NaCl, 300 000 × g, 240 Min) aufgetrennt. —×—, $A_{280 \text{ nm}}$; ●—●, Dihydrolipoatacetyltransferase (LAT); ○—○, Lipoamid-dehydrogenase (DIA). PDC, Pyruvatdecarboxylase.

nach Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten im Enzymkomplex gefunden. Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase Aktivität wurde dagegen nach der Reinigung im Saccharosedichtegradienten nur in wenigen Präparationen angetroffen. Eine Kontrolle der Präparationsschritte hinsichtlich der regulatorischen Enzyme ergab, daß die angereicherte Pyruvatdehydrogenase mitunter in einem maximal aktivierten Zustand vorliegt und daß die Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase bei der Protaminsulfatfällung vom Komplex abgetrennt wird. Eine Differenzierung erhält man durch Inkubation des angereicherten Enzyms mit 10 mM Mg²⁺ und einem ungereinigten Überstand aus dem Herzmuskel (30 000 × g Überstand), der die Phosphatase enthält. Erfolgt jetzt eine Aktivierung des Enzyms durch 10 mM Mg²⁺, dann ist die Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase vorher abgetrennt worden und der Enzymkomplex lag noch nicht im maximal aktivierten Zustand vor (Tabelle I).

Eine auch morphologisch nachweisbare Komplettierung des Multienzymkomplexes mit Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase ist bisher nicht gelungen.

Anhaltspunkte für den symmetrischen Aufbau der Pyruvatdehydrogenase ergeben sich aus der Zerlegung des Enzymkomplexes und der Isolierung der Teilenzyme, wobei vor allem die Dihydrolipoatacetyltransferase von Bedeutung ist, da sie der strukturbestimmende Kern des Enzymkomplexes ist. Die Auflösung des Enzymkomplexes wurde mit verschiedenen Methoden versucht. Die beste Ablösung der Teilenzyme von der Dihydrolipoatacetyltransferase erhält man mit 2 M NaCl-2 mM Dithioerythritol-0.2 M Glycinpuffer, pH 9.0, oder mit 20-100 μM Natrium-dodekylsulfat. Nach Zerlegung des Enzymkomplexes werden die Teilenzyme im

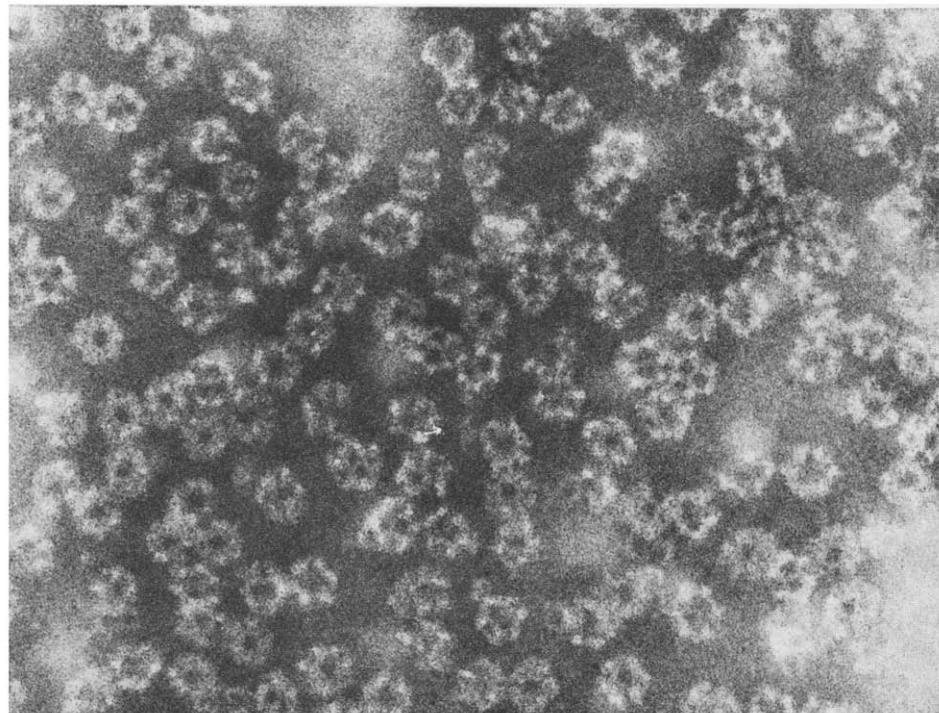


Abb. 6. Dihydrolipoatacetyltransferase, negativ kontrastiert. Vergrößerung 300 000:1.

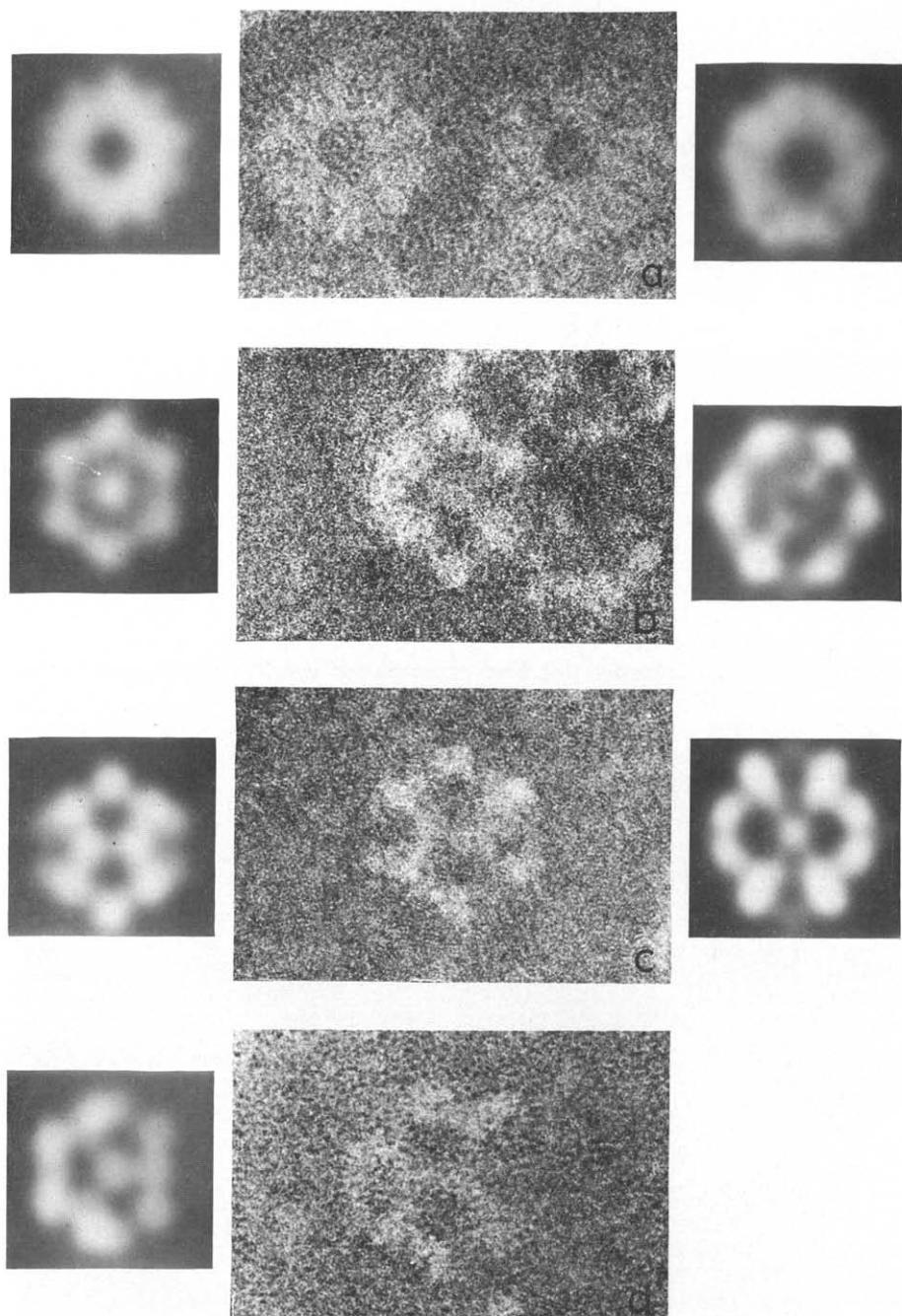


Abb. 7. Korrelation der elektronenmikroskopischen Abbildungen mit einem pentagonalen Dodekaeder-Modell, bestehend aus 20 morphologischen Untereinheiten (links) und einem Ikosaeder-Modell, bestehend aus 30 morphologischen Untereinheiten (rechts). (a) Fünfzählige Achse, (b) dreizählige Achse, (c) zwölfzählige Achse, (d) Dodekaeder Kalotte, dreizählige Achse. Vergrößerung: 1 000 000:1.

Saccharosedichtegradienten (Saccharosekonzentration 0.2–1.6 M in 1 M NaCl, pH 7.0) aufgetrennt. Mit beiden Methoden erhält man reine Dihydrolipoatacetyltransferase und zwei weitere sich überlappende Proteinfaktionen, in denen hohe Lipoyamiddehydrogenase-Aktivität gemessen wird (Abb. 5). Die Abtrennung der Lipoyamiddehydrogenase von der Pyruvatdecarboxylase gelingt im Saccharosedichtegradienten nicht, hingegen in der Polyacrylamidgelektrophorese oder durch Ammoniumsulfatfällung⁴. Leider ist die Haltbarkeit der Dihydrolipoatacetyltransferase gering. Die Proteinlösung wird beim Stehen im Kühlschrank nach einigen Tagen trüb. Lyophilisiert man das Enzympräparat nach Dialyse, so kann nur noch ein kleiner Teil des Enzyms erneut in Lösung gebracht werden.

Die elektronenmikroskopische Aufnahmen der Dihydrolipoatacetyltransferase zeigen isodiametrische Partikel (Abb. 6), in denen pentagonale Einheiten erkennbar sind, so daß eine ikosaedrische Symmetrie für den Aufbau der Dihydrolipoatacetyltransferase sehr wahrscheinlich ist. Ein Vergleich mit weitgehend analogen Modellen von verschiedenen Polyedern zeigt, daß die Dihydrolipoatacetyltransferase als ein pentagonales Dodekaeder vorliegt (Abbn. 7a–7d).

DISKUSSION

Obgleich der Pyruvatdehydrogenase-Komplex im elektronenmikroskopischen Bild weitgehend charakteristisch dargestellt ist, gibt es bis heute keine endgültige Strukturvorstellung von seinen Aufbau. Die Schwierigkeiten ergeben sich in erster Linie dadurch, daß das molare Verhältnis und die absolute Zahl der Teilenzyme des Komplexes nicht bekannt sind. Die Bestimmungen dieser beiden Größen scheitern daran, daß es offenbar nicht gelingt, einen vollständigen Pyruvatdehydrogenase-Komplex aus den Mitochondrien zu isolieren.

Auch in unseren Präparationen hat sich gezeigt, daß bei der Reinigung des Multienzymkomplexes ein Teil der regulatorischen Enzyme (Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase) verloren geht². Inwieweit auch andere Enzyme teilweise abgelöst werden, ist unklar. Eine nachträgliche Komplettierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch Inkubation mit bestimmten Fraktionen erscheint funktionell möglich; morphologisch wurden keine Größenzunahmen im Elektronenmikroskop gefunden. Bisher gelang es uns nur einmal, den gereinigten Enzymkomplex durch Inkubation mit 10 mM Mg²⁺ allein zu aktivieren und dadurch die Anwesenheit von Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase nachzuweisen. Im Gegensatz zur Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase zeigt die Pyruvatdecarboxylase-Kinase eine enge Bindung an den Multienzymkomplex. Ihre Aktivität konnte bisher in allen Enzympräparationen nachgewiesen werden.

Die in der Literatur dargestellten Aufnahmen vom Multienzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase sind ausnahmslos unvollständig^{2–4}. Die abgebildeten Enzymkomplexe sind zu klein und unterscheiden sich in ihrer Größe und Form teilweise kaum von der Dihydrolipoatacetyltransferase. Eine verbesserte Strukturdarstellung des Multienzymkomplexes wurde erst dadurch möglich, daß in unseren Präparationsmethoden eine Vorfixation im Glutaraldehyddampf erfolgte.

Die Interpretation der Struktur des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes geht von der Quartärstruktur der Dihydrolipoatacetyltransferase aus, die den Kern des Enzymkomplexes bildet. Die elektronenmikroskopischen Abbildungen der Dihydro-

lipoatacetyltransferase zeigen ein aus Untereinheiten aufgebautes isodiametrisches Partikel. Aus den biochemischen Daten läßt sich schließen, daß die Untereinheiten identisch sind und somit sogenannte quasi-äquivalente Bindungen¹⁶ ausbilden können, was notwendigerweise über einen self-assembly-Prozess zu einer symmetrischen Struktur führt. Nach den Überlegungen von CRICK UND WATSON¹⁷ kommen nur wenige kubische Symmetrietypen in Frage, die sowohl isodiametrische Partikel ergeben, als auch den unsymmetrischen Molekülbau der Proteine und die geforderten Toleranzen für die sogenannten "combining regions" zwischen den einzelnen Proteinuntereinheiten berücksichtigen¹⁸. Der Vergleich der elektronenmikroskopischen Bilder mit unscharf kopierten Röntgen-Aufnahmen von aus Kugeln zusammengesetzten Dodekaedern und Ikosaedern ergibt eine deutliche Übereinstimmung nur mit dem pentagonalen Dodekaeder, womit die von REED¹⁹ vorgeschlagene Struktur bewiesen wird. Diese Zuordnung ist eindeutig möglich auf Grund der charakteristischen Projektion parallel zur zweizähligen Achse. Daß es sich bei der elektronenmikroskopisch dargestellten Dihydrolipoatacetyltransferase um vollständige sphärische Partikel handelt, beweisen wiederum die elektronenmikroskopischen Abbildungen, die der dreizähligen Achse entsprechen (Abb. 7b), während Projektionen parallel zu den fünf- bzw. zweizähligen Achsen des vollständigen Dodekaeder von den Dodekaederkalotten (bAb. 7d) praktisch kaum unterscheidbar sind. Mitunter finden sich in Dihydrolipoatacetyltransferase-Präparaten derartige kalottenförmige Dodekaeder-Bruchstücke.

Schwieriger ist die Interpretation der Struktur des Gesamtkomplexes. Da dieser relativ leicht zerfällt, stellt sich primär die Frage, wann man einen vollständigen Enzymkomplex vorliegen hat.

Es ist daher anzunehmen, daß die elektronenmikroskopisch abgebildeten größten Partikel die vollständigsten Komplexe darstellen. Sie sind ebenfalls isodiametrisch und haben einen Durchmesser von durchschnittlich 400 Å. Die gleichen Werte wurden auch mit der Röntgenkleinwinkelstreuung erhalten (H. WAWRA, persönliche Mitteilung 1971), so daß man durch die Schwermetallkontrastierung bedingte Artefakte, eine starke Deformation der Partikel und eine artefizielle Vernetzung mit abgespaltenem Protein von zerfallenen Komplexen durch Glutaraldehyd praktisch ausschließen kann. Da die Dihydrolipoatacetyltransferase, der Kern des Enzymkomplexes, ein Körper mit hoher Symmetrie ist, ist anzunehmen, daß die anderen Teilenzyme um diesen Kern eine ein- oder mehrschichtige Hülle bilden, indem sie Flächen und Kanten, eventuell auch Scheitelpunkte des pentagonalen Dodekaeders besetzen. Diese Schale müßte trotz der Verschiedenartigkeit der Strukturelemente zumindest eine "statistische ikosaedrische" Symmetrie besitzen¹⁶. Nach dem Vorschlag von REED¹⁹ wurden die 12 Flächen und 30 Kanten des Dodekaedermodells mit Kugeln besetzt. Während die Kontrastverteilung in bestimmten Projektionsrichtungen sehr gut übereinstimmt (Abbn. 8a und 8b), differieren die Durchmesser von Modell und Komplex um rund 10%. Das heißt: die Proteinöhle, die den Dihydrolipoatacetyltransferase-Kern umgibt, ist um etwa 10–20 Å (etwa 15%) dicker als im Modell mit dichtest möglicher Kugelpackung. Da in unseren Modellen die verwendeten Kugeln der wahren Form der Proteinaggregate nur näherungsweise entsprechen und außerdem ein Vergrößerungsfehler von $\pm 5\%$ sowie ein Projektionsfehler der Modelle mit einbezogen werden muß, läßt sich diese Differenz von Modell und Komplexdurchmesser erklären. Die Übereinstimmung von Modellen mit elektronen-

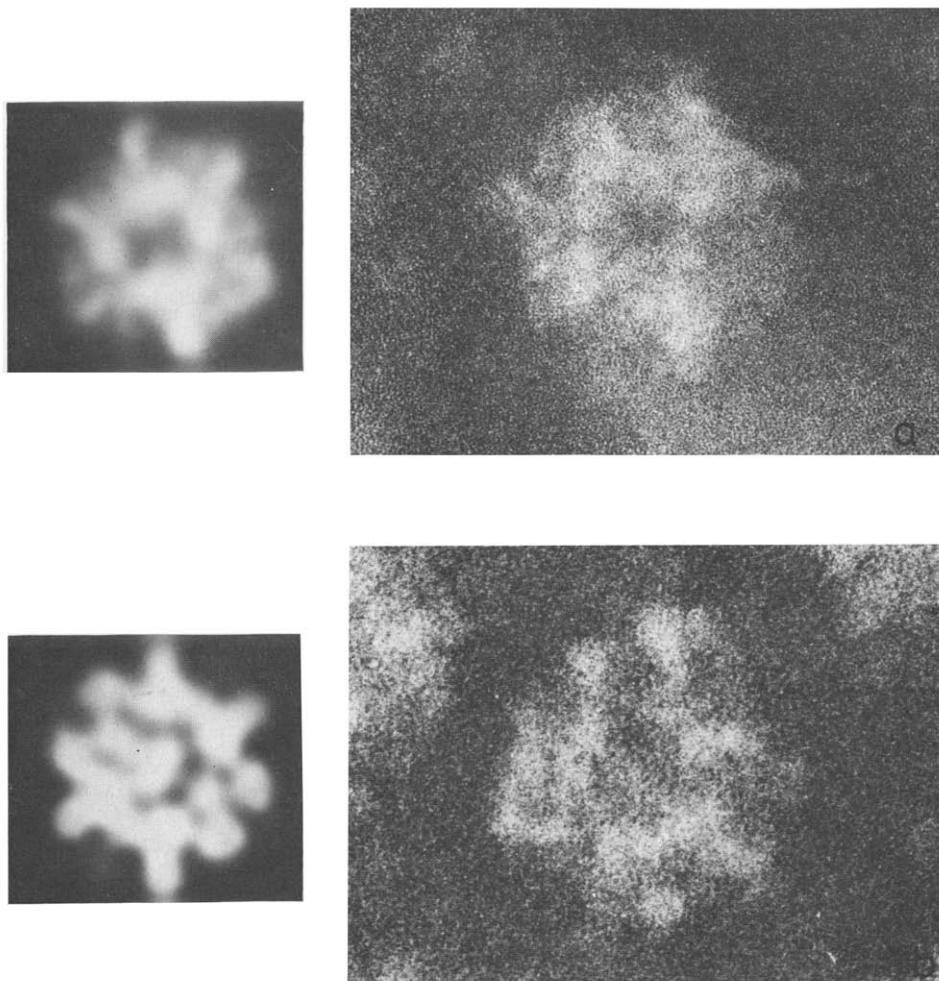


Abb. 8. Korrelation der elektronenmikroskopischen Abbildungen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes mit Modellen (siehe Text). (a) Dreizählig Achse, (b) zweizählig Achse. Vergrößerung 1 000 000:1.

mikroskopischen Abbildungen läßt demnach auf folgenden Aufbau des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes schließen: der Dihydrolipoatdehydrogenase-Kern hat die Form eines pentagonalen Dodekaeders, bestehend aus 20 morphologischen Einheiten. Die Teilenzyme Lipoamiddehydrogenase, Pyruvatdecarboxylase und Pyruvatdecarboxylase-Kinase bilden aus 42 morphologischen Einheiten eine Hülle mit ikosaedrischer Symmetrie, indem sie Kanten und Flächen des Dodekaeders besetzen. Dieses Bauprinzip läßt außerdem den Aufbau weiterer Proteinschichten zu, so daß beispielsweise die Pyruvatdecarboxylase-Phosphatase an den Komplex noch angelagert werden kann.

Diese Vergleichsmethode gibt allerdings keinen Aufschluß über das Verteilungsmuster der Enzyme in der Proteinhülle, denn die in den Enzymkomplex integrierten Proteinpertikel sind in ihrer Gestalt und Größe wegen der begrenzten Präparat-

auflösung nicht mehr differenzierbar²⁰. Man kommt jedoch sicher noch zu exakteren Aussagen über den Aufbau des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, wenn man detailliertere Kenntnisse über die Molekulargewichte und die Strukturen der Teilenzyme sowie deren molares Verhältnis zur Verfügung hat.

DANK

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Für technische Assistenz danken wir Fräulein A. Bujnowski und Frau M. Kleybrink.

LITERATUR

- 1 T. C. LINN, F. H. PETTIT UND L. J. REED, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 62 (1969) 234.
- 2 O. WIELAND UND E. SIESS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 65 (1970) 947.
- 3 L. J. REED UND D. J. COX, *Annu. Rev. Biochem.*, 35 (1966) 57.
- 4 T. HAYAKAWA, T. KANZAKI, T. KITAMURA, Y. FUKUYOSHI, Y. SAKURAI, K. KOIKE, T. SUEMATSU UND M. KOIKE, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 3660.
- 5 E. ISHIKAWA, R. M. OLIVER UND L. J. REED, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56 (1966) 534.
- 6 H. REINAUER, G. GRASSOW UND S. HOLLMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 969.
- 7 H. REINAUER, W. JANSEN UND S. HOLLMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 352 (1971) 125.
- 8 L. P. HAGER UND I. C. GUNSLAS, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5767.
- 9 T. HAYAKAWA, M. HIRASHIMA, S. S. IDE, M. HAMADA, K. OKABE UND M. KOIKE, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4694.
- 10 V. MASSEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 447.
- 11 D. W. ALLMANN, E. BACHMANN, N. ORME-JOHNSON, W. C. TAUX UND D. E. GREEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 981.
- 12 M. N. BERRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 92 (1964) 156.
- 13 A. DELBRÜCK, E. ZEBE UND TH. BÜCHER, *Biochem. Z.*, 331 (1959) 273.
- 14 E. SCHMIDT, IN H.-U. BERGMEYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, 1962.
- 15 H. REINAUER UND E. JUNGER, *Z. Physiol. Chem.*, 350 (1969) 1161.
- 16 D. L. D. CASPAR UND A. KLUG, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27 (1962) 1.
- 17 F. H. C. CRICK UND J. D. WATSON, *Nature*, 177 (1956) 473.
- 18 L. PAULING, *Disc. Faraday Soc.*, 13 (1953) 170.
- 19 L. J. REED, Ciba Foundation, Study Group No. 28, *Thiamine Deficiency*, Churchill, London, 1967, S. 67.
- 20 B. V. BORRIES UND G. A. KAUSCHE, *Kolloid-Z.*, 90 (1940) 132.

Biochim. Biophys. Acta, 250 (1971) 478-490