

## ZUR BEDEUTUNG DES ZINKS IN DER LEUCINAMINOPEPTIDASE AUS RINDERÄUGENLINSEN

Ursula KETTMANN und H. HANSON

*Physiologisch-chemisches Institut der Martin-Luther-Universität,  
Halle/Saale, GDR*

Eingegangen am 27. Juli 1970

Leucine aminopeptidase of bovine lens is a zinc metallo-enzyme. A zinc content of 5.0 – 7.6 g-atoms of Zn/M.W.  $3.2 \times 10^6$  was estimated by labelling with  $^{65}\text{Zn}$  and by atomic absorption spectrophotometry. By continuous dialysis against *o*-phenanthroline zinc was almost completely removed. The enzymatically inactive "apo"-enzyme could not be reactivated by addition of  $\text{Zn}^{2+}$ . The binding of cadmium, manganese and cobaltous ions was investigated. With some probability manganese is bound at an other site than zinc. The effect of pH and buffer ions on the binding of zinc to leucine aminopeptidase was demonstrated.

### 1. Einführung

Wie wir bereits berichteten [1,2], ist die Leucinaminopeptidase aus Rinderäugenglinsen ein Zink-Metall-enzym. Die enzymatische Aktivität ist an das Vorhandensein von Zink im Enzym gebunden. Unabhängig davon teilte Himmelhoch kürzlich ähnliche Befunde für eine Leucinaminopeptidase aus Schweinenieren mit [3]. Allerdings unterscheidet sich diese Leucinaminopeptidase hinsichtlich der Substrataffinität gegenüber L-Leucinamid und L-Leucin-*p*-Nitroanilid [4] von den hochgereinigten Leucinaminopeptidasen aus Rinderäugenglinsen und Schweinenieren [5].

Wir fanden für die kristallisierte Leucinaminopeptidase (EC 3.4.1.1.) aus Rinderäugenglinsen sowohl durch radioaktive Markierung mit  $^{65}\text{Zn}$  als auch durch Bestimmung mittels Atomabsorptions-spektrophotometrie einen Zink-Gehalt von 5,0 – 7,6 g-Atomen Zn/Mol Leucinaminopeptidase (MG  $3,2 \times 10^6$ ) [6]. Bei der Darstellung des kristallinen Enzyms ist zwar eine Zink- bzw. Zink-Mangan-Fällung notwendig, um die Hauptmenge der Linsenproteine zu entfernen [7], doch es spricht sowohl der konstante Zink-Gehalt der verschiedenen Enzympräparationen, der sich durch mehrfaches Umkristallisieren nicht mehr änderte, als auch die Abhängigkeit der Enzym-

aktivität vom Zink-Gehalt dafür, das das Zink ein essentieller Bestandteil des nativen Enzyms ist.

### 2. Material und Methoden

Die Präparation der rekristallisierten Leucinaminopeptidase wurde wie früher beschrieben durchgeführt [7].

Die Bestimmung des Zink-Gehaltes erfolgte durch Atomabsorptionsspektrophotometrie (Hilger und Watts; Atomspec\*) sowie durch radioaktive Markierung mit  $^{65}\text{Zn}$ . Hierfür wurde eine 5%ige Lösung des rekristallisierten, hochgereinigten Enzyms in Tris/HCl-Puffer mit einer  $1 \times 10^{-4}$  M  $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Lösung 96 Stunden bei pH 7,2 und Raumtemperatur inkubiert und anschliessend das Enzym durch Ammoniumsulfat-Zugabe wieder kristallin ausgefällt. Nach Auflösen in 0,02 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0 wurde am Enzym nichtgebundenes  $^{65}\text{ZnCl}_2$  durch Filtration an Sephadex G-25 abgetrennt.

Die  $^{65}\text{Zn}$ -Leucinaminopeptidase wurde verwendet, 1) um während der kontinuierlichen Dialyse gegen

\* Die Bestimmungen wurden von der Zentralstelle für Futtermittelprüfung und Fütterung Halle-Lettin beim Landwirtschaftsrat der DDR durchgeführt.

*o*-Phenanthrolin die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Zink-Gehalt zu untersuchen; 2) um die pH-Abhängigkeit der Zink-Bindung zu prüfen und 3) um enzymgebundenes Zink gegen andere Metalle auszutauschen. Bei der kontinuierlichen Dialyse konnte die Änderung des Zink-Gehaltes des Enzyms unmittelbar und quantitativ verfolgt werden, da die Dialysezelle direkt in einem Bohrlochsintillationsmesskopf eingebaut war [1].

Die enzymatische Aktivität wurde aus der Hydrolyse der Substrate L-Leucinamid nach [7,8] und L-Leucinhydrazid in Anlehnung an die Angaben von [9,10] durch Kupplung des freigesetzten Hydrazins mit *p*-Aminobenzaldehyd und spektrophotometrischer Bestimmung des Aldazins ermittelt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Der Zink-Gehalt der hochgereinigten Leucinaminopeptidase wurde sowohl in Enzympräparationen bestimmt, bei denen die Fällung der Linsenproteine nur mit Zinksulfat durchgeführt wurde (Zn-LAP), als auch von solchen, bei denen ausserdem Mangansulfat zugegeben worden war (Zn/Mn-LAP) [7]. Sie unterscheiden sich im Zink-Gehalt wie auch in der enzymatischen Aktivität nicht voneinander (Tab. 1).

Tabelle 1

	Zink-Gehalt (g Atome Zn/Mol LAP)	
	Radioaktive Markierung mit $^{65}\text{Zn}$	Atomabsorptions-spektroskopie
Zn/Mn-LAP	5,2 – 6,0	5,4 – 7,2
Zn-LAP	5,0 – 6,9	5,7 – 7,6

Die Werte für die Zn-LAP liegen hierbei etwas niedriger als durch Aktivierungsanalyse von Böttger et al. gefunden worden war [11].

Durch kontinuierliche Dialyse von Zn- bzw.  $^{65}\text{Zn}$ -Leucinaminopeptidase gegen metallfreien  $2 \times 10^{-2}$  M Tris/HCl-Puffer pH 8,0, der  $1 \times 10^{-3}$  M *o*-Phenanthrolin und 1 M NaCl enthielt, konnte das Zink fast vollständig aus dem Enzym entfernt werden (Fig. 1). Die enzymatische Aktivität fiel dabei parallel zum Zink-Gehalt bis auf 5% der Ausgangsaktivität ab.

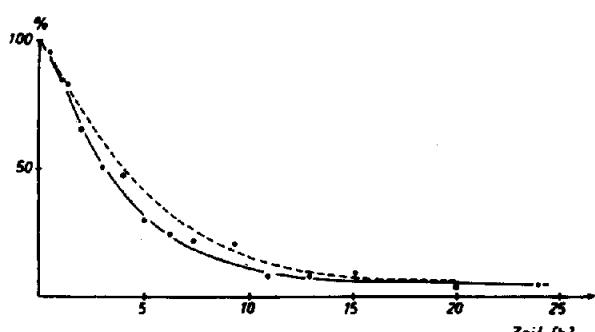


Fig. 1. Änderung von  $^{65}\text{Zn}$ -Gehalt und Enzymaktivität der Leucinaminopeptidase während kontinuierlicher Dialyse gegen  $1 \times 10^{-3}$  M *o*-Phenanthrolin,  $2 \times 10^{-2}$  M Tris/HCl, 1,0 M NaCl pH 8,0.  
 -----  $^{65}\text{Zn}$ -Gehalt in %, Enzymkonzentration: 1 mg LAP/ml  
 ●—● Enzymaktivität, bezogen auf die Ausgangsaktivität = 100. Die Enzymkonzentration im Bebrütungsansatz war so gewählt, dass jeweils eine 5 – 10%ige Substrathydrolyse erfolgte. Substrat: L-Leu-NH-NH<sub>2</sub> 0,05 M im Ansatz. Die Inkubationen erfolgten ohne Mn-Aktivierung.

Wurde zum Dialysepuffer kein NaCl zugesetzt, präzipitierte das Enzym, wenn der Zink-Gehalt unter 20% des Ausgangswertes absank, und konnte nicht mehr in Lösung gebracht werden. Auch Behandlung der Leucinaminopeptidase mit chelatbildenden Harzen (Dow Chelating resin A 1) bei pH 8,0, wie sie Csopak für die alkalische Phosphatase aus *E. coli* beschrieben hat [12], bewirkte einen Zink-Verlust des Enzyms, verbunden mit der Verminderung der enzymatischen Aktivität (Fig. 2). Es ist bisher nicht gelungen, das Zn-freie "Apo"-Enzym durch Redialyse oder Inkubation mit Zn<sup>2+</sup>- oder Mn<sup>2+</sup>-haltigem Puffer zu reaktivieren. Das Zn-freie Enzym unterscheidet sich immunologisch nicht von der nativen Leucinaminopeptidase\*. Es scheinen bei der Entfernung des Zinks konformative Änderungen stattzufinden, die einen Wiedereinbau des Zinks und damit die Reaktivierung verhindern, die immunologisch determinanten Gruppen jedoch nicht beeinflussen.

Die Bedeutung des Zinks für die Leucinaminopeptidase zeigte auch der Versuch, Zink durch andere Metalle zu ersetzen. Dialyse des Enzyms gegen einen  $2 \times 10^{-2}$  M Tris/HCl-Puffer pH 7,3, der  $1 \times 10^{-4}$  M

\* Die Immunelektrophorese wurde von Herrn Dipl. Chem. M. Ludewig, wiss. Assistent am Physiologisch-chemischen Institut Halle, durchgeführt.

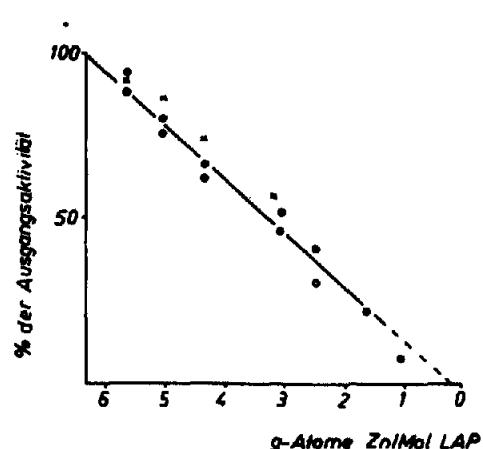


Fig. 2. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Zink-Gehalt der Leucinaminopeptidase. Die Zinkentfernung erfolgte durch:

- Dialyse gegen *o*-Phenanthroline 1,0 M NaCl;
- Dialyse gegen *o*-Phenanthroline ohne NaCl;
- ×—× Behandlung mit Dow Chelating Resin A 1.

Die Enzymaktivität ist bezogen auf die Ausgangsaktivität = 100. Substrat: L-Leu-NH-NH<sub>2</sub> für die *o*-Phenanthroline-Dialysen, L-Leu-NH<sub>2</sub> für die Chelatharz-Behandlung, jeweils 0,05 M im Ansatz. Die Inkubationen erfolgten ohne Mn-Aktivierung.

an CdCl<sub>2</sub> und 1 M an NaCl war, führte zu einem schnellen Verlust von <sup>65</sup>Zn und der enzymatischen Aktivität. Da die Austauschdialyse von <sup>65</sup>Zn-LAP gegen Zn<sup>2+</sup> bei analoger Puffer- und Enzymkonzentration den gleichen Verlauf zeigte wie die Cd-Dialyse

(Fig. 3), wobei sich jedoch der Gesamtgehalt an Zink und die Enzymaktivität kaum änderten, kann man bei der Cd-Dialyse auf einen direkten Austausch von <sup>65</sup>Zn gegen Cd schließen. Im Gegensatz zu den Befunden von Himmelhoch [3] an einer Präparation von Aminopeptidase aus Schweinenieren ist es uns bei der Linsen-LAP nicht gelungen, das Cd-Enzym durch nachfolgende Dialyse gegen zinkhaltigen Puffer zu reaktivieren. Wurde die Cd-Dialyse abgebrochen, solange Zn-Gehalt und Enzymaktivität noch über 50% des Ausgangswertes lagen, konnte durch Dialyse gegen Zn<sup>2+</sup> eine Erhöhung der Enzymaktivität erreicht werden, jedoch nicht die Ausgangsaktivität.

Bei Einsatz von Mn<sup>2+</sup>- und Co<sup>2+</sup>-haltigen Puffern erfolgte die Entfernung des Zinks bei der Dialyse wesentlich langsamer (Fig. 3). Eine signifikante Änderung der enzymatischen Aktivität wurde bei den Versuchen mit Mn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> nicht beobachtet.

Nach zweitägigem Inkubieren von normal präparierter Zn-Leucinaminopeptidase mit 2 × 10<sup>-3</sup> M <sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub>, anschließender Rekristallisation und Reinigung des <sup>54</sup>Mn-markierten Enzyms an Sephadex G-25 wurde eine Bindung von 4 – 5 g-Atomen Mn/Mol Leucinaminopeptidase ermittelt. Der Zink-Gehalt, bestimmt durch Atomabsorptionsspektroskopie, betrug trotzdem noch 5,2 g-Atome Zn/Mol (Zn-Gehalt vor Mn-Inkubation 6,3 g-Atome/Mol). Die enzymatische Aktivität, mit und ohne Mn<sup>2+</sup>-Aktivierung bestimmt, war im Vergleich zum nicht <sup>54</sup>Mn-markierten Enzym praktisch unverändert. Das

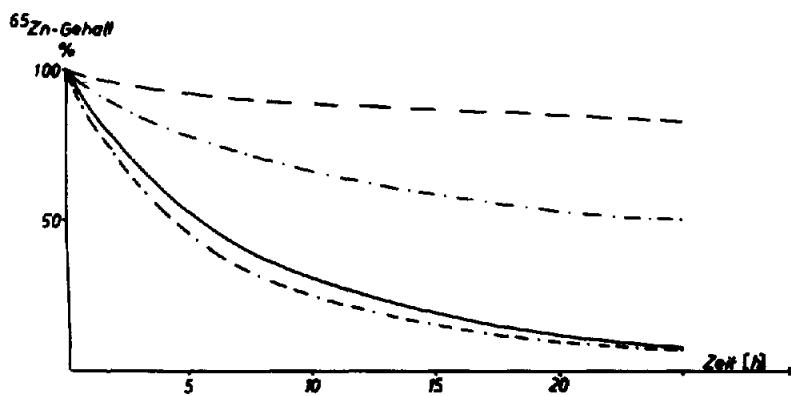


Fig. 3. Abnahme des <sup>65</sup>Zn-Gehaltes der Leucinaminopeptidase bei Dialyse gegen Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> enthaltenden 2 × 10<sup>-2</sup> M Tris/HCl-Puffer pH 7,5.  
 ----- 10<sup>-3</sup> M Mn<sup>2+</sup>; ..... 10<sup>-3</sup> M Co<sup>2+</sup>; —— 10<sup>-4</sup> M Cd<sup>2+</sup>; -·-·- 10<sup>-4</sup> M Zn<sup>2+</sup>.  
 Enzymkonzentration: 1 mg LAP/ml.

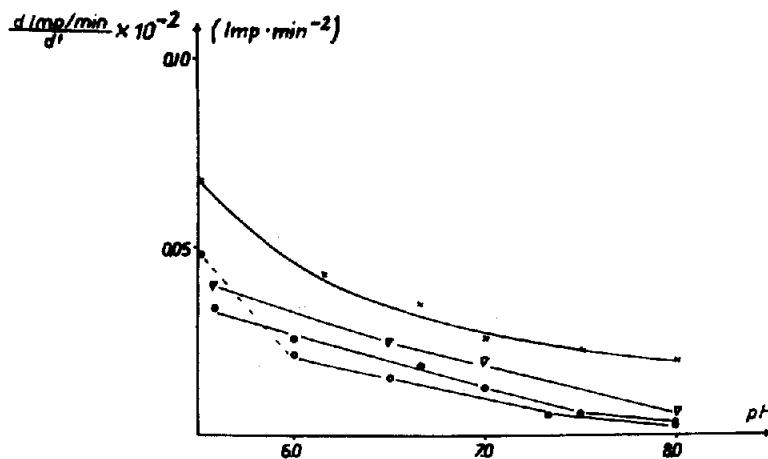


Fig. 4. Abhängigkeit der Zink-Bindung vom pH-Wert verschiedener Pufferlösungen. Es ist die initiale Änderung des  $^{65}\text{Zn}$ -Gehaltes der LAP (ausgedrückt in Impulsen/Minute) bei kontinuierlicher Dialyse aufgetragen gegen den pH-Wert. Enzymkonzentration bei allen Dialyseversuchen:  $10^{-5}$  M.

▽ —▽  $2 \times 10^{-2}$  M Tris/Maleat-Puffer; x —x  $2 \times 10^{-2}$  M Tris/Maleat-Puffer/0,5 M NaCl;  
 ● —● M/150 Phosphat-Puffer; ○ —○  $2 \times 10^{-2}$  M Na-Acetat/Essigsäure.

weist darauf hin, dass ein Austausch von Zinc gegen Mangan in kleinem Umfang vielleicht möglich ist, dass aber das Mangan auch noch an anderen Stellen im Enzym gebunden werden kann, zumal die Aktivierbarkeit durch weitere Zugabe von  $\text{Mn}^{2+}$  zum Bebrütungsansatz erhalten bleibt.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Zink-Bindung wurde durch kontinuierliche Dialyse unter Einsatz verschiedener Puffersysteme bestimmt, da auf Grund eigener Befunde über die Wirkung von Anionen [13] anzunehmen war, dass die Art und Konzentration des Puffers die Metallbindung ebenfalls beeinflusst. Wie Fig. 4 zeigt, ist die Abtrennung des Zinks vom Enzym zwar eine Funktion des pH-Wertes, jedoch sehr stark abhängig von der Pufferzusammensetzung, insbesondere der Anionenkonzentration. So kann man die Entfernung des Zinks bei Verwendung eines Tris/Maleat-Puffers erheblich beschleunigen, wenn unter Zusatz von Natriumchlorid dialysiert wird. Die Untersuchung der Enzymaktivität während der Dialyse ergab die erwartete Abhängigkeit vom Zink-Gehalt.

Alle Ergebnisse bestätigen den essentiellen Charakter des Zinks für die Leucinaminopeptidase, für die Aufrechterhaltung einer enzymatisch aktiven Konformation. Ob das Zink dabei direkt an der Substratbindung und Substratumsetzung beteiligt ist, ist bisher noch nicht erwiesen.

## Referenzen

- [1] U. Kettmann und S. Fittkau, Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig 18 (1969) 617.
- [2] a) H. Hanson, S. Fittkau, M. Frohne, U. Kettmann und H.-G. Mansfeldt, Internationales Symposium: Molekulare Mechanismen der Funktion und Wirkung von Proteinen und Peptiden unter besonderer Berücksichtigung ihrer Metallkomplexe (Halle, Mai 1969) Abstracts.
- b) H. Hanson, VII. Jahrestagung des Verbandes Polnischer Biochemiker, Symposium: Peptidases and Peptides (Wroclaw, September 1969) Abstracts.
- c) H. Hanson, 2. Allunionskongress für Biochemie (Taschkent, Oktober 1969) Abstracts.
- [3] S.R. Himmelhoch, Arch. Biochem. Biophys. 134 (1969) 597.
- [4] S.R. Himmelhoch und E.A. Peterson, Biochemistry 7 (1968) 2085.
- [5] H. Hanson, D. Glässer, M. Ludewig, H.-G. Mansfeldt und M. John, Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 689.
- [6] K. Kretschmer und H. Hanson, Z. Physiol. Chem. 340 (1965) 126.
- [7] H. Hanson, D. Glässer und H. Kirschke, Z. Physiol. Chem. 340 (1965) 107.
- [8] P. Bohley, Naturwissenschaften 49 (1962) 326.
- [9] A. Wergin, Naturwissenschaften 52 (1965) 34.
- [10] G.W. Watt und J.D. Chriss, Anal. Chem. 24 (1952) 2006.
- [11] M. Böttger, S. Fittkau, S. Niese und H. Hanson, Acta Biol. Med. Germ. 21 (1968) 143.
- [12] H. Csopak, European J. Biochem. 7 (1969) 186.
- [13] M. Ludewig, J. Lasch, U. Kettmann, M. Frohne und H. Hanson, Veröffentlichung in Vorbereitung.