

99. Über die Anwendung von Metallpuffern bei Fermentreaktionen. Die pMg-Aktivitätskurve der Hexokinase aus Hefe¹⁾

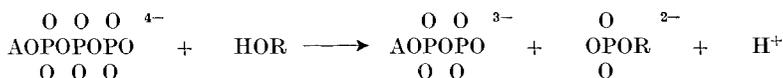
von J. Raafflaub und I. Leupin.

(13. III. 56.)

Es ist bekannt, dass die enzymatische Übertragung des terminalen Phosphatrests des ATP¹⁾ auf Glukose durch Zusatz von Magnesiumsalzen zum Inkubationsmilieu stark beschleunigt oder überhaupt erst in Gang gebracht wird. Wie diese Aktivierung zustande kommt, ist nicht sicher festgestellt. *L. Berger* und Mitarb.²⁾, die Hexokinase aus Hefe isoliert und kristallisiert haben, nehmen an, dass das aktive Ferment eine Magnesium-Protein-Verbindung ist, während andererseits *H. G. Hers*³⁾ und *C. Liébecq*⁴⁾ die Ansicht vertreten, dass das eigentliche Substrat der phosphorylierenden Reaktionen der Mg-ATP-Komplex und nicht das freie ATP ist. Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeiten sind jedoch mit beiden Ansichten über den Wirkungsmechanismus des Magnesiums gleich gut vereinbar.

Wir haben nun versucht, durch Anwendung von Metallpuffern die Abhängigkeit der Hexokinaseaktivität von der Magnesiumionenkonzentration zu bestimmen und damit zu genaueren Aussagen zu gelangen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bilden den Inhalt der vorliegenden Mitteilung.

Da bei der Übertragung eines Phosphatrests des ATP auf eine alkoholische Gruppe ein Säureäquivalent frei wird gemäss:



kann die Hexokinasereaktion im hydrogencarbonathaltigen Milieu direkt manometrisch verfolgt werden. In Fig. 1 ist eine derart gemessene Versuchsserie mit verschiedenen Enzymmengen graphisch dargestellt. Die Steigung der anfänglich linearen Kurven, bzw. die während der ersten 10 Min. entwickelte CO₂-Menge, ist ein Mass der Geschwindigkeit der Hexokinasereaktion, unter der Voraussetzung,

¹⁾ Verwendete Zeichen und Abkürzungen: ATP = Adenosintri-phosphat; AeAcDTA = β, β' -Diaminoäthyläther-N,N'-tetraessigsäure; (Z)_t = Totalkonzentration des Metallpuffers in Mol pro l; (Mg)_t = Totalkonzentration des Mg in Mol pro l; pM = negativer dekadischer Logarithmus der Metallionenkonzentration in Mol pro l bei der ionalen Stärke $\mu = 0,10$ und bei 20°; pMg = entsprechend für Magnesiumionen.

²⁾ *L. Berger, M. W. Stein, S. P. Colowick & C. F. Cori, J. gen. Physiol.* **29**, 379 (1946).

³⁾ *H. G. Hers, Biochem. biophys. Acta* **8**, 424 (1952).

⁴⁾ *C. Liébecq, Biochem. J.* **54**, Part 3, p. xxii (1953).

dass pH, pH-Pufferkapazität und Hydrogencarbonatgehalt der zu vergleichenden Ansätze identisch sind.

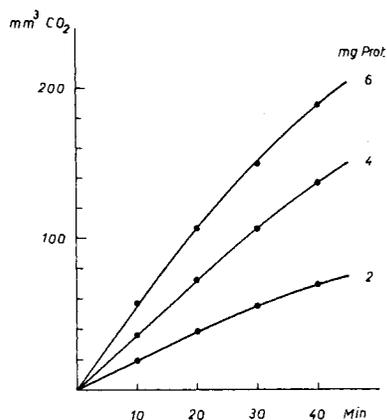


Fig. 1.

Die Phosphorylierung der Glukose durch Hefe-Hexokinase. Die pro Zeiteinheit entwickelte CO₂-Menge, manometrisch nach Warburg gemessen, ist ein Mass der Reaktionsgeschwindigkeit. Die drei Kurven entsprechen verschiedenen Fermentkonzentrationen: 2 mg, 4 mg und 6 mg Protein pro cm³ Ansatz. — Ordinate: mm³ CO₂. Abszisse: Zeit in Min. Zusammensetzung der Ansätze siehe Exp. Teil.

Ein geeigneter Mg-Puffer, mit dem sich bei pH 7,5 der pMg-Bereich 3,5–5,5 einstellen lässt, ist β , β' -Diaminoäthyläther-N, N'-tetraessigsäure (AeAeDTA). Da das pMg¹ in der Regel nicht wie das pH direkt gemessen werden kann, sondern berechnet wird, ist es wichtig, dass die Konzentration des Metallpuffers und damit die Mg²⁺-Pufferkapazität des Systems gross genug ist, um pMg-Verschiebungen durch andere Komplexbildner (wie ATP, ADP usw.) abzufangen. Nach den bisherigen Erfahrungen mit Metallpuffern sind Konzentrationen von 10⁻³ – 3 · 10⁻²-m. geeignet. Die Metallpuffermolekeln selbst – sowohl die freien Anionen als auch die Proton- und Metallkomplexe – sind den Enzymen gegenüber bemerkenswert indifferent.

In Fig. 2 ist die mit AeAeDTA erhaltene pMg-Aktivitätskurve der Hexokinase wiedergegeben (Kurve a). Der Aktivitätsabfall erfolgt zwischen pMg 4 und 6. Dieser Befund legte den Gedanken nahe, ATP selbst als Mg-Puffer zu gebrauchen. Da die Mg-Komplexbildungskonstante von ATP = 10^{4,0} ist⁵⁾, sollte es möglich sein, den Aktivitätsabfall der Hexokinase bis zu einem pMg von etwa 5,3 zu verfolgen. Kurve b in Fig. 2 gibt die mit 10⁻²-m. ATP als Mg-Puffer ermittelte Relation zwischen Enzymaktivität und pMg wieder. Dieselbe Kurve wird erhalten, wenn ATP in kleinerer (5 · 10⁻³-m.) oder grösserer Konzentration (2 · 10⁻²-m.) verwendet wird. Wie in der mit AeAeDTA gepufferten Versuchsserie fällt der Aktivitätsabfall in den pMg-Bereich

⁵⁾ A. E. Martell & G. Schwarzenbach, Helv. 39, 653 (1956).

4–6. Die geringfügige Verschiebung in Richtung kleinerer pMg-Werte im Vergleich zur Kurve a ist methodisch bedingt. Wie sie zustande kommt und dass die Kurve b methodisch einwandfreier ist, wird im experimentellen Teil näher auszuführen sein.

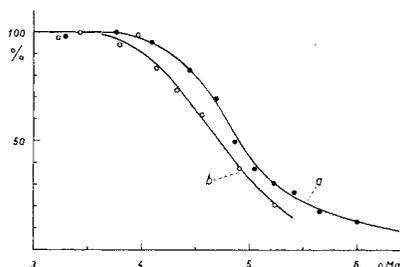


Fig. 2.

pMg-Aktivitätskurve von Hefe-Hexokinase bei pH 7,5. Ordinate: Initiale Reaktionsgeschwindigkeit in Prozenten, wobei 100% gleich der maximalen initialen Reaktionsgeschwindigkeit bei kleinem pMg gesetzt werden. Abszisse: pMg.

Kurve a: pMg mit Diaminoäthyläther-tetraessigsäure gepuffert.

Kurve b: pMg mit ATP gepuffert.

Zusammensetzung der Ansätze siehe Exp. Teil.

Auf Grund der Assoziationskonstante des Mg-ATP-Komplexes ($= 10^{4,0}$) wäre zu erwarten, dass, wenn ausschliesslich der Mg-ATP-Komplex als Enzymsubstrat funktioniert und dies die Magnesiumionenabhängigkeit der Hexokinase bedingt, der Abfall der pMg-Aktivitätskurve zwischen 3 bis 5 erfolgt. Aus Fig. 2 ist ersichtlich, dass der Abfall in Wirklichkeit in einem um eine Einheit höheren pMg-Bereich liegt. Trotzdem kann die Hypothese, dass der Mg-ATP-Komplex das Enzymsubstrat darstellt, aufrechterhalten werden unter der Voraussetzung, dass die Mg-ATP-Konzentration bei kleinen pMg-Werten von ≤ 3 beträchtlich über der Enzym-sättigenden Konzentration liegt, so dass der ganze Abfall der pMg-Aktivitätskurve zwischen pMg 4 und 6 nur einem Teil der Mg-ATP-Dissoziationskurve (in Richtung höherer pMg-Werte) entsprechen würde. Die pMg-Aktivitätskurve müsste dann aber von der ATP-Konzentration abhängig sein, bzw. mit wachsender ATP-Konzentration nach höheren pMg-Werten wandern. Dies ist jedoch nicht der Fall. Man darf daher schliessen, dass die Aktivität der Hefehexokinase nicht eine Funktion der MgATP-Konzentration, sondern der Magnesiumionenkonzentration ist. Das Fermentprotein oder allenfalls die Ferment-Substrat-Verbindung reagiert direkt mit Magnesiumionen, wobei der Logarithmus der Komplexassoziationskonstante etwa 5,0 beträgt. Der Wert von $2,6 \cdot 10^{-3}$, den *L. Berger* und Mitarb.²⁾ als Dissoziationskonstante des Mg-Protein-Komplexes angeben, kann nicht zum Vergleich herangezogen werden, da er auf Grund der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der absoluten Magnesiumsalzkonzentration aufgestellt worden ist.

Dieses Vorgehen führt aus leicht einzusehenden theoretischen Gründen zu falschen Werten, besonders dann, wenn die Lösungsgemische wie im vorliegenden Fall neben den Proteinen starke Komplexbildner wie ATP enthalten.

Interessant ist der Befund, dass der Aktivitätsabfall in einem μMg -Bereich liegt, in dem auch ATP als Mg -Puffer verwendet werden kann. Dass dies kaum zufällig, sondern von physiologischer Bedeutung ist, wird an anderer Stelle auseinandergesetzt werden⁶⁾.

Die bisher untersuchten μM -Aktivitäts-Relationen von Fermenten, bei denen Adenosinpolyphosphate umgesetzt werden (siehe ⁷⁾⁸⁾), zeigen übereinstimmend, dass der Aktivitätsabfall in einem μM -Bereich von 4–6 liegt, unabhängig davon, ob ATP oder ADP das Substrat und Ca^{2+} oder Mg^{2+} aktivierendes Kation ist. Die Vermutung ist nahelegend, dass dies einer allgemeineren Gesetzmässigkeit entspricht, bzw. dass auch die anderen, bisher nicht untersuchten Enzyme, die Reaktionen mit Adenosinpolyphosphaten katalysieren, sich ähnlich verhalten und dass keine Beziehungen zwischen dem Vorhandensein von einfachen Metall-Adenosinphosphat-Komplexen und der Metallabhängigkeit dieser Fermentreaktionen bestehen.

Experimenteller Teil.

Chemikalien: Na_2ATP kristallisiert, *Sigma Chemical Company*, St. Louis. $\text{B}_1\text{B}'$ -Diaminoäthyläther- $\text{N}_1\text{N}'$ -tetraessigsäure, *J. R. Geigy A.G.*, Basel.

Hexokinase: Von *Sigma Chemical Company*, St. Louis. Das Präparat (crude, Type II) ist von mittleren Reinheitsgrad und besitzt eine Aktivität von 12000 *Berger* units per Gramm. Vor jedem Versuch wird eine frische Lösung in 0,15-m. KCl zubereitet.

Metallpuffer: Als solche sind Äthyläther-diamin-tetraessigsäure (AeAeDTA) bzw. ATP verwendet worden. Die Mg^{2+} und H^+ -Assoziationskonstanten dieser Verbindungen sind von *G. Schwarzenbach*⁹⁾ bzw. *A. E. Martell & G. Schwarzenbach*⁵⁾ gemessen worden. Eine ausführliche Beschreibung der Berechnung und Herstellung von Metallpuffern, speziell im Hinblick auf biochemische Probleme, ist in „Methods of Biochemical Analysis“¹⁰⁾ publiziert worden. Daher sollen hier bloss Einzelheiten, die mit der speziellen Methodik dieser Versuche zusammenhängen, besprochen werden.

Die Fehlerbreite der μMg -Werte. Da die μMg -Werte nicht experimentell bestimmt, sondern errechnet werden, hängt die Exaktheit der Werte davon ab, ob die Bedingungen, die an die verwendeten Konstanten geknüpft sind, experimentell erfüllt sind. Dabei sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen, in erster Linie die pH -Schwankungen, die Abweichung der Ionenstärke von 0,10 und die Abweichung der Temperatur von 20°.

Der pH -Effekt: Bei der Anzahl und der teilweise wechselnden Konzentration der H^+ -puffernden Verbindungen ist es praktisch unmöglich, in allen Ansätzen einer Serie ein exakt identisches pH einzuhalten. Dazu kommt, dass während des Versuchs durch

⁶⁾ *J. Raaflaub*, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **14**, im Druck (1956).

⁷⁾ *J. Raaflaub*, *Helv.* **39**, 828 (1956).

⁸⁾ *J. Raaflaub*, Unveröffentlichte Versuche über die Dismutation von $2\text{ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$ durch Myokinase.

⁹⁾ *G. Schwarzenbach*, in: „Die komplexometrische Titration“, Die chemische Analyse, Band 45, S. 87, F. Enke Verlag, Stuttgart 1955.

¹⁰⁾ *J. Raaflaub*, in: „Methods of Biochemical Analysis“, Vol. III, p. 301–325, Interscience Publishers, New York 1956.

die Hexokinasereaktion eine leichte pH-Verschiebung nach sauer eintritt. Experimentell ist festgestellt worden, dass während der ersten 15 Min. der CO_2 -Produktion die maximalen pH-Abweichungen von einem mittleren Wert, sowohl innerhalb eines Ansatzes als auch zwischen den Ansätzen einer Serie, $\pm 0,10$ nicht übersteigen.

Bei pH 7,5 bewirkt eine Variation des pH von $\pm 0,1$ eine Variation der $\log K'$ des AeAeDTA¹¹⁾ von $\pm 0,2$, beim ATP jedoch eine Variation der $\log K'$ von $\pm 0,01$. Die pH-bedingte Fehlerbreite der errechneten pMg-Werte, die von der gleichen Grössenordnung ist wie die Variation der $\log K'$, ist demnach sehr abhängig von der Art des verwendeten Mg-Puffers und bei Kurve b der Fig. 2 wesentlich geringer als bei Kurve a.

Der Ionenstärke-Effekt: Die geringfügige Verschiebung der pMg-Aktivitätskurven a und b der Fig. 2 dürfte darauf beruhen, dass, trotzdem die ionale Stärke der Versuchsserie der Kurve a $\mu = 0,17$ bis $0,23$ beträgt, auch hier bei der Berechnung der pMg-Werte die bei einer Ionenstärke $\mu = 0,10$ ermittelten Konstanten eingesetzt worden sind. Da die Komplexkonstanten mit zunehmender Ionenstärke kleiner werden, sind die so errechneten pMg-Werte um schätzungsweise $0,3$ zu gross (vgl. ¹²⁾). Diese Unexaktheit ist schwer vermeidbar, weil einerseits die Abhängigkeit der Konstanten von AeAeDTA von der Ionenstärke nicht bekannt ist und andererseits die Ionenstärke der Ansätze der Serie Kurve a infolge der notwendigerweise hohen Metallpufferkonzentration stark von $0,10$ abweicht. Bei der mit ATP gepufferten Serie der Kurve b beträgt die Ionenstärke $0,11 \pm 0,02$. Die pMg-Aktivitätskurve b der Fig. 2 ist daher auch aus diesem Grunde methodisch einwandfreier.

Der Temperatur-Effekt: Es ist zu beachten, dass die Versuchstemperatur 30° beträgt. Der hieraus entstehende Fehler bei der pMg-Berechnung mit Konstanten gültig für 20° ist aber relativ gering und dürfte $\pm 0,05$ nicht übersteigen (vgl. ¹³⁾).

Zusammensetzung der Ansätze (Angabe in Endkonzentrationen): *Versuchsserie der Fig. 1*: NaHCO_3 $0,02\text{-m.}$; Glucose $0,017\text{-m.}$; Na_4ATP $0,01\text{-m.}$; MgCl_2 $0,01\text{-m.}$; Veronal pH 7,4 $0,01\text{-m.}$; Hexokinase 2 bzw. 4 bzw. 6 mg/cm^3 . Ionenstärke $\mu = 0,10$; pH nach Sättigung mit 5-proz. CO_2 : 7,5.

Versuchsserie der Fig. 2, Kurve a: NaHCO_3 $0,02\text{-m.}$; Glucose $0,017\text{-m.}$; Na_4ATP $0,003\text{-m.}$; Hexokinase 6 mg/cm^3 ; Veronal, pH 7,4, $0,01\text{-m.}$ bis $0,001\text{-m.}$; $\text{Na}_2\text{H}_2\text{AeAeDTA}$, pH 7,4, 0 bis $0,03\text{-m.}$; $\text{Na}_4\text{AeAeDTA} + \text{MgCl}_2$, pH 7,4, $0,033$ bis $0,0033\text{-m.}$

Die Mischung der variierenden Komponenten erfolgt derart, dass $(\text{AeAeDTA})_t = (\text{Z})_t = 0,033\text{-m.} = \text{konstant und } (\text{Mg})_t \text{ von } 0,033\text{-m. bis } 0,0033\text{-m.}$ variiert. Da das dritte Proton von $\text{Na}_2\text{H}_2\text{AeAeDTA}$ bei pH 7,4 schon merklich dissoziiert, wird der abnehmende Anteil von $\text{Na}_2\text{H}_2\text{AeAeDTA}$ bei kleiner werdendem pMg durch steigende Zugaben von Veronal pH 7,42 kompensiert, so dass die H^+ -Pufferkapazität (und damit die Proportionalität zwischen pH-Verschiebung durch ATP-Umsatz und CO_2 -Produktion) für alle Ansätze identisch ist. Dies ist der Fall, wenn Veronal (Konzentration direkt proportional $(\text{Mg})_t$) variiert zwischen $0,01\text{-m.}$ (für $(\text{Mg})_t = 0,033\text{-m.}$) und $0,001\text{-m.}$ (für $(\text{Mg})_t = 0,003\text{-m.}$).

Ionenstärke $\mu = 0,17\text{--}0,23$. pH nach Sättigung mit 5% CO_2 : $7,53 \pm 0,07$.

Versuchsserie der Fig. 2, Kurve b: NaHCO_3 $0,02\text{-m.}$; Glucose $0,017\text{-m.}$; Hexokinase 6 mg/cm^3 ; Na_4ATP , pH 7,4, $0,001$ bis $0,0095\text{-m.}$ und $(\text{Na}_4\text{ATP} + \text{MgCl}_2)$ pH 7,4, $0,009$ bis $0,0005\text{-m.}$; Veronal, pH 7,4, $0,009$ bis $0,0005\text{-m.}$ Dabei ist $(\text{ATP})_t = (\text{Z})_t = 0,01\text{-m.} = \text{konstant und } (\text{Mg})_t \text{ variiert von } 0,0005 \text{ bis } 0,009\text{-m.}$ Da das vierte Proton von ATP bei pH 7,4 nicht gänzlich abdissoziiert ist, wird die abnehmende H^+ -Pufferkapazität der Ansätze bei kleiner werdendem pMg durch Veronal pH 7,4 kompensiert. Die Veronal-Konzentration (direkt proportional $(\text{Mg})_t$) variiert zwischen $0,0005\text{-m.}$ (für $(\text{Mg})_t = 0,0005\text{-m.}$) und $0,009\text{-m.}$ (für $(\text{Mg})_t = 0,009\text{-m.}$).

Ionenstärke $\mu = 0,11\text{--}0,13$. pH nach Sättigung mit 5-proz. CO_2 : $7,53 \pm 0,05$.

¹¹⁾ K' ist die scheinbare Komplexkonstante $= (\text{MZ})/[(\text{M})(\text{Z})]$, worin $(\text{Z}) = (\text{Z}) + (\text{HZ}) + (\text{H}_2\text{Z}) + \dots + (\text{H}_3\text{Z})$.

¹²⁾ F. F. Carini & A. E. Martell, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5745 (1952).

¹³⁾ F. F. Carini & A. E. Martell, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2153 (1954).

Das Endvolumen beträgt bei allen Versuchen 3 cm³. Nach Sättigung der Ansätze (Flüssigkeit- und Gasraum) mit 5-proz. CO₂ wird bei 30° inkubiert; 5 Min. vor der ersten Ableseung wird die Reaktion durch Einkippung der Glucose aus dem Anhang ausgelöst.

Herrn Prof. *F. Leuthardt* sei auch an dieser Stelle für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit zuteil werden liess, bestens gedankt.

Zusammenfassung.

Die Mg²⁺-Abhängigkeit der durch Hexokinase katalysierten Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Glucose wird mit Hilfe von Metallpuffern untersucht. Die pMg-Aktivitätskurve fällt im pMg-Bereich 4–6 ab. Die Interpretation dieses Befundes führt zum Schluss, dass das aktive Ferment eine Mg-Protein-Verbindung ist, die bei abnehmender Magnesiumionenkonzentration in Mg²⁺ und inaktives Protein dissoziiert.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Zürich.

100. Über das Cu²⁺-Bindungsvermögen von Proteinen

von G. H. Wolff und S. Fallab.

(13. III. 56.)

Bei unseren Untersuchungen über das Cu²⁺-Bindungsvermögen von Aminosäuren und Peptiden¹⁾ zeigte sich, dass die Komplexbildung der Peptide nicht ohne weiteres aus dem Verhalten ihrer Aminosäure-Bausteine erklärt werden kann. Bei der Peptid-artigen Verknüpfung gewisser Aminosäuren können Konfigurationen entstehen, die zur Ausbildung von Metallehelaten besonders befähigt sind.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir, mit der gleichen Messmethode unsere Untersuchungen auf Proteine auszudehnen. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, dass bei hochmolekularen Stoffen zwei grundlegend verschiedene Arten der Komplexbildung möglich sind. Einmal kann das Metall an eine endständige basische Gruppe gebunden sein (Fig. 1). Da sich die Konzentration endständiger Aminogruppen angenähert umgekehrt proportional zum mittleren Molekulargewicht verhält, ist hier zu erwarten, dass bei einer Verkleinerung der Molekeln – immer bei konstanter Gewichtskonzentration der Protein-Lösung – das Metall-Bindungsvermögen steigt, *et v. v.* Zweitens kann im Protein eine räumliche Konfiguration ausgebildet sein, die als 3- oder mehrzähliger Ligand ein besonders starkes Komplexbildungsvermögen besitzt, wie dies z. B. beim Histidyl-histidin der Fall sein muss¹⁾.

¹⁾ G. Wolff, S. Fallab & H. Erlenmeyer, *Experientia* **11**, 440 (1955).