

Ein vereinfachtes Verfahren zur Anreicherung der Pyridinnucleotid-Transhydrogenase

Von

F. Salvenmoser und R. Kramar

Aus dem Institut für Medizinische Chemie der Universität Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 14. Dezember 1964)

Es wird eine Methode zur Isolierung von NADPH_2 — NAD -Transhydrogenase (NADPH_2 — NAD -Oxydoreduktase, „TD-Transhydrogenase“, EC 1.6.1.1.) beschrieben. Aus Rinderherzmitochondrien werden durch Homogenisieren in starken Digitoninlösungen* Lipoproteidkomplexe herausgelöst, die das Ferment enthalten, dessen Aktivität jedoch schnell absinkt. Durch hochoouriges Zentrifugieren und Gelfiltration durch Sephadex G-100 wird ein digitoninfreies, in der Ultrazentrifuge einheitlich sedimentierendes Fermentpräparat hergestellt. Gegenüber dem bisherigen Verfahren¹ weist das beschriebene folgende Vorteile auf: Die Methode ist einfacher und das auf diese Weise gewonnene Protein läßt sich lyophilisieren; auch ist die Beimengung der zweiten Transhydrogenaseaktivität (NADH_2 — NAD -Transhydrogenase, „DD-Transhydrogenase“) geringer als in Präparaten, die mit der Methode nach Kaplan¹ hergestellt werden.

A method for the isolation of NADPH_2 — NAD -transhydrogenase is described. By homogenisation in strong digitonin solutions lipoprotein complexes are dissolved from beef heart mitochondria containing the enzyme, the activity of which is yet diminishing rapidly. By High speed centrifugation and gel filtration on Sephadex G-100 a stable digitonin-free enzyme preparation uniformly sedimenting is produced.

* Da es vor allem auf die Grenzflächenaktivität des Digitonins ankommen dürfte, sind nach erfolgreichen Vorversuchen mit Teepol (Wz, Shell) dies bezügliche Untersuchungen mit anderen Detergentien vorgesehen.

¹ B. Kaufman und N. O. Kaplan, J. biol. Chem. **236**, 2133 (1961).

Von *Kaplan* und Mitarbeitern¹ wurde eine Anreicherung von Pyridin-nucleotid-Transhydrogenase [NAD(P)-Transhydrogenase, NADPH₂—NAD-Oxydoreductase, EC 1.6.1.1.] aus Rinderherzmitochondrien beschrieben. Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten: Herstellen eines 100 000 *g*-Überstandes aus digitonisierten Mitochondrien, Alkoholfällung, fraktionierte Adsorption an Calciumphosphat-Gel und Ammonsulfatfällung. Der isolierte Komplex zeigt zwei verschiedene Fermentaktivitäten, eine NADPH₂—NAD-Transhydrogenase („TD-Transhydrogenase“) und eine NADH₂—NAD-Transhydrogenase („DD-Transhydrogenase“). Die reinsten Fraktionen haben eine spezifische Aktivität von 1,13 für die TD-Wirkung, beziehungsweise von 2,56 für die DD-Wirkung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Anreicherung auf kürzerem Weg zu erreichen, wobei es auch von Interesse erschien, ob sich bei einem geänderten Trennverfahren eventuell eine Abspaltung der TD-Aktivität von der DD-Aktivität erzielen ließe. Durch Einwirkung von Digitonin entstehen Mitochondrienbruchstücke unterschiedlicher Größe; daher schien uns die Methode der Gelfiltration geeignet, den 100 000 *g*-Überstand der mit Digitonin behandelten Mitochondrien zu fraktionieren. Weiters kann die Abtrennung des Digitonins, das besonders die TD-Transhydrogenase schon nach kurzer Zeit inaktiviert², mittels dieses Verfahrens rasch und gründlich erreicht werden.

Experimenteller Teil

A. Bestimmungsmethoden

1. *Messung der Transhydrogenaseaktivität.* Die „TD-Aktivität“ und die „DD-Aktivität“ wurden nach *Kaplan*³ gemessen. Das verwendete Acetyl-analoge wurde von der Firma Sigma Chemical Company bezogen, NADPH₂ und NADH₂ von der Firma Boehringer & Söhne (Mannheim). Die Messung wurde bei 20° C durchgeführt.

2. *Digitoninbestimmung.* Diese erfolgte photometrisch mit Anthron nach *Nakata*⁴.

3. *Proteinbestimmung.* In den einzelnen Fraktionen erfolgte die Messung nach *Lowry*⁵, proteinreichere Lösungen wurden zur Kontrolle auch nach *Kjeldahl* analysiert.

² *N. O. Kaplan, S. P. Colowick und E. F. Neufeld, J. biol. Chem. 205, 1 (1953).*

³ *A. M. Stein, N. O. Kaplan und M. M. Ciotti, J. biol. Chem. 234, 979 (1959).*

⁴ *T. Nakata, Tokyo Jikeikai Ika Daigaku Zasshi 72, 456 (1957); Chem. Abstr. 52, 15 835 i (1958).*

⁵ *O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, J. biol. Chem. 193, 265 (1957).*

B. Isolierung des Ferments

400 g reines Muskelgewebe von einem schlachtfrischen Rinderherz wurden bei tiefer Temperatur während 5 Min. mit einem „Ultraturrax“ homogenisiert und daraus nach den Angaben von *Kaufman* und *Kaplan*¹ die Mitochondrien isoliert. Nach Suspendieren dieser in 0,25*m*-Saccharose (0,01*m*-KH₂PO₄, pH 7,0, 0,005*m*-EDTA) wurde ein Anteil entsprechend 500—600 mg Protein nach Abzentrifugieren bei 20 000 *g* zur weiteren Verarbeitung entnommen. Diese Mitochondrien wurden in einem *Potter-Elvehjem*-Homogenisator mit 15 ml einer übersättigten 8proz. Digitoninlösung (0,05*m*-KH₂PO₄, pH 7,0, 0,005*m*-EDTA, 0,001*m*-Mercaptoäthanol) suspendiert und unter Eiskühlung während einer Stunde wiederholt gründlich homogenisiert. Nach einstündigem Zentrifugieren der trüben Suspension bei 100 000 *g* wurden 7 ml des klaren Überstandes auf eine mit Sephadex G-100 beschickte Säule aufgetragen (3,8 cm innerer Durchmesser, 44,5 cm Gelhöhe). Das Gel war in 0,05*m*-KH₂PO₄, pH 7,0 (0,005*m*-EDTA) gequollen; mit dem gleichen Puffer wurden anschließend etwa 100 Fraktionen zu je 5 ml eluiert. Sobald das Digitonin die Säule verlassen hatte, wurde die Gelfiltration beendet. Die Analyse der Fraktionen zeigte nur ein Proteinmaximum, welches mit den Maxima der beiden Fermentaktivitäten zusammenfällt. Der Digitoninextrakt dürfte also nur Eiweißkörper enthalten, die, soweit sie im Trennbereich von Sephadex G-100 liegen, von ziemlich einheitlicher Größe sind. Durch die fast vollständige Entfernung des Digitonins, die durch die Gelfiltration erreicht wird, sinkt die Löslichkeit der Eiweißkörper so stark, daß die Fraktionen trüb sind und das Protein beim Stehen teilweise ausflockt. Ein typisches Trennergebnis ist in Tab. 1 und Abb. 1 dargestellt.

Tabelle 1

Eluat, ml	Protein, mg/ml	TD-Aktivität		DD-Aktivität	
		pro ml	spezif.	pro ml	spezif.
125.	0,190	0,110	0,58	0,135	0,71
130.	0,383	0,206	0,54	0,383	1,00
135.	0,650	0,380	0,59	0,440	0,68
140.	0,590	0,360	0,61	0,440	0,75
145.	0,550	0,330	0,60	0,382	0,70
150.	0,380	0,206	0,54	0,265	0,70
155.	0,260	0,100	0,38	0,210	0,84
160.	0,259	0,094	0,36	0,206	0,80
165.	0,180	0,059	0,33	0,106	0,59
Digitonin- extr., ml	4,55	1,41	0,31	2,90	0,64

Wie daraus ersichtlich ist, verteilt sich die Transhydrogenaseaktivität auf wenige Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität von etwa 0,6 für die NADPH₂—NAD-Transhydrogenase („TD-Aktivität“), die nur ganz wenig hinter der NADH₂—NAD-Transhydrogenase („DD-Aktivität“) mit etwa 0,7 zurücksteht. Die spezif. Aktivitäten stellen Mindestwerte dar, in mehreren Versuchen erreichten die Aktivitäten Werte bis zum Doppelten der angegebenen. Insgesamt verlief die Filtration, bezogen auf den eingesetzten Digitoninextrakt, fast ohne Verluste an Protein und Fermentaktivität. Die fermenthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegen 0,05*m*-Tris-Puffer

(pH 7,5) dialysiert. Dabei sinkt die Löslichkeit weiter ab, und das Eiweiß fällt zum größten Teil aus, ohne jedoch seine Aktivität einzubüßen. Versuche, die Löslichkeit durch Erhöhen der Ionenstärke bis auf 3 zu verbessern, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Das Dialysat kann ohne Aktivitätsverluste tiefgefroren werden. Wir konnten aber auch durch Lyophilisieren ein lager-

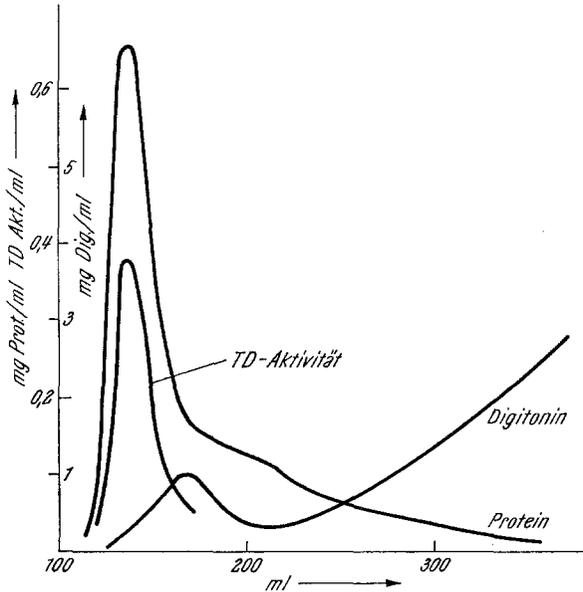


Abb. 1. Elutionsdiagramm von Transhydrogenase und Digitonin an Sephadex G-100 (das Digitoninmaximum liegt außerhalb des Diagramms, bei ca. 450 ml, und mißt ca. 8 mg/ml)

fähiges Präparat gewinnen, welches eine nur mäßige Aktivitätsabnahme gegenüber dem frisch fraktionierten Produkt zeigte. In der Substanz konnte mit der von *Kielley*⁶ beschriebenen Methode keine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden. Weiters erwies sich die Fermentpräparation nach Aufnahme in 2proz. Digitoninlösung in der Ultrazentrifuge als vollkommen einheitlich ($s_{25} = 8,4$)*.

* Für die Durchführung der Sedimentationsanalyse danken wir herzlich Frau Dipl. Ing. *A. Gonzales* und Herrn Dr. *W. Doleschel* vom Physiologischen Institut der Universität Wien.

⁶ *W. W. Kielley* in: *Methods in Enzymology* (ed. *S. P. Colowick* und *N. O. Kaplan*, Vol. II, p. 583, Acad. Press).