

Isolierung und Charakterisierung eines membrangebundenen Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus dem phototrophen Bakterium *Rhodospirillum rubrum*

Isolation and Characterization of a Membrane-Bound Pyruvate Dehydrogenase
Complex from the Phototrophic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*

Rosemarie Lüderitz und Jobst-Heinrich Klemme

Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. **32 c**, 351–361 [1977]; received February 11, 1977)

Pyruvate Dehydrogenase Complex, Facultative Phototrophic Bacteria, *Rhodospirillum rubrum*

The pyruvate dehydrogenase complex from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* was associated with the membrane fraction both in heterotrophically and photosynthetically grown cells. The complex was separated from the membranes and partially purified by precipitation with MgSO_4 and gel filtration through Sepharose 4B. The purified complex had a specific activity of $1.5\text{--}2\ \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protein and contained the following partial activities: pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1), dihydrolipoamide transacetylase (EC 2.3.1.12) and dihydrolipoamide dehydrogenase (EC 1.6.4.3). Contrary to other bacterial pyruvate dehydrogenase complexes, the enzyme complex from *R. rubrum* revealed no cooperativity between pyruvate binding sites. The kinetic constants (K_m) for the overall reaction were (in mM): 0.14 (pyruvate), 0.07 (NAD) and 0.025 (coenzyme A). The K_m for thiamine pyrophosphate was dependent on the nature and the concentration of the divalent metal ion (Mn or Mg) present in the reaction mixture, the values ranging from 0.5 to $3\ \mu\text{M}$. NADH was a potent inhibitor ($K_i=5\ \mu\text{M}$) of the enzyme complex and the dihydrolipoamide dehydrogenase. The inhibition was competitive with respect to NAD. In addition to its rapid inhibitory effect, NADH also inactivated the enzyme. Cysteine partially protected the enzyme complex against NADH-inactivation. Acetyl-coenzyme A also inhibited the overall reaction ($K_i=40\ \mu\text{M}$). The inhibition was dependent on the concentration of coenzyme A, but independent of the concentration of pyruvate. Sugar phosphates, phosphoenolpyruvate, citric acid cycle intermediates and nucleosidephosphates (1 mM) had no pronounced effect on the overall reaction.

Einleitung

Der für den oxidativen Pyruvatabbau zu Acetyl-CoA und CO_2 verantwortliche Multienzymkomplex ist bisher erst aus wenigen Bakterien isoliert und eingehend charakterisiert worden: aus den fakultativ anaeroben Bakterien *Streptococcus faecalis*¹ und *Escherichia coli*^{2,3} sowie aus dem strikt aeroben *Azotobacter vinelandii*^{4–6}. Strikt anaerobe Bakterien enthalten nicht den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex, sondern eine Ferredoxin-abhängige Pyruvatdehydrogenase, die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.1)⁷. Die am Pyruvatstoffwechsel der fakultativ phototrophen Bakterien beteiligten Enzyme bzw. Enzymkomplexe

sind noch nicht eindeutig identifiziert und charakterisiert worden. In *Rhodospirillum rubrum* wurde nach anaerober Dunkeladaptation bisher die Pyruvat-Formiat-Lyase (EC 2.3.1.54)⁸ nachgewiesen; die Existenz der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde vermutet⁹.

Kulturphysiologische Studien mit Pyruvat als C-Quelle machten wahrscheinlich, daß in *R. rubrum* unter photosynthetischen Bedingungen nicht die Pyruvat-Formiat-Lyase und die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, sondern ein Pyruvatdehydrogenase-Komplex das für die Pyruvat-Photoassimilation entscheidende Enzym ist¹⁰. In der vorliegenden Arbeit wird die Anreicherung sowie die strukturelle und kinetische Charakterisierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus dem fakultativ phototrophen Bakterium *R. rubrum* beschrieben. Der Multienzymkomplex aus *R. rubrum* ist mit der Chromatophorenfraktion der Zellen assoziiert und unterscheidet sich von den bisher untersuchten bakteriellen Pyruvatdehydrogenase-Komplexen durch das Fehlen von Wechselwirkungen zwischen den Bindungsstellen für die verschiedenen Liganden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. J.-H. Klemme, Institut für Mikrobiologie der Universität, Meckenheimer Allee 168, D-5300 Bonn 1.

Abkürzungen: CoA, Coenzym A; DCPIP, 2,6-Dichlorphenol-indophenol; DNase, Desoxyribonuclease; EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure; HEPES, 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]äthansulfonsäure; PMS, Phenazinemethosulfat; TPP, Thiaminpyrophosphat; Tris, Tris-hydroxymethyl-aminomethan.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Material und Methoden

Organismus und Kulturmethoden

Die Untersuchungen wurden mit *Rhodospirillum rubrum* Stamm S1 durchgeführt. Der Organismus wurde ursprünglich von Prof. Dr. H. Gest, Indiana University, Department of Microbiology, Bloomington, Indiana (USA) zur Verfügung gestellt. Stammkulturen wurden in vollständig mit Malat-Medium nach Ormerod *et al.*¹¹ gefüllten 50 ml-Schraubdeckelflaschen anaerob im Licht (ca. 2000 lx) bei 30 °C gehalten. Die Kulturen wurden bis zu einer Trübung von $A_{660} = 1,5$ (gemessen in 1 cm-Küvetten im „Spectronic 20“-Photometer der Fa. Bausch und Lomb, München) bebrütet und anschließend im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Reinheit der Kulturen wurde mikroskopisch und durch Ausstrich auf Agarplatten mit dem vorstehend genannten Nährmedium (ergänzt durch 0,05% Hefeextrakt und 2% Agar) kontrolliert. Die Platten wurden anaerob im Licht und aerob im Dunkeln bei 30 °C bebrütet und auf ein einheitliches Koloniebild hin überprüft.

Zur photosynthetischen Anzucht größerer Zellmengen wurde der Organismus entweder in vollständig gefüllten 500 ml-Schraubdeckelflaschen oder im Fermenter „Kiel“ der Fa. L. Eschweiler und Co., Kiel, gezogen. In diesem Falle wurde Malat durch 0,5% Na-Pyruvat ersetzt. Das Kulturgefäß des Fermenters wurde mit zwei Philips-Atralux-Lampen (100 W) beleuchtet (ca. 10 000 lx auf der Oberfläche des Kulturgefäßes). Die Temperatur wurde durch Wasserkühlung und durch Ventilation konstant auf 30 °C gehalten. Der pH der Nährlösung wurde mit einer Elektrode überprüft, die zuvor 8–12 Stunden in salzsaurem Äthanol sterilisiert worden war. Um anaerobe Bedingungen zu schaffen, wurde das Kulturgefäß des Fermenters mit Stickstoff begast. Die Rührung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 150 U/min. Proben zur Bestimmung von Trübung, pH und Substratverbrauch wurden dem Fermenter über den Auslaßstutzen entnommen und sofort in Eis gekühlt. Um eine Kontamination zu verhindern, wurde der Schlauch am Auslaßstutzen nach der Probeentnahme in 96%igem Äthanol gehalten.

Die aerobe Anzucht von *R. rubrum* erfolgte im Fermenter bei 30 °C und einem O_2 -Partialdruck von etwa 100 mm Hg. Der O_2 -Partialdruck wurde manuell durch Variation der Belüftungsrate und der Rührgeschwindigkeit kontrolliert. In keinem Falle aber durfte die Rührgeschwindigkeit den Wert von 240 U/min überschreiten, da sonst die Zellerträge stark zurückgingen. Die aeroben Vorkulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben auf einem Kreisschüttler

bei 30 °C angezogen. Die Beimpfung der Kulturgefäße des Fermenters erfolgte mit einem Inoculum von 2% mit Hilfe einer sterilen 100 ml-Injektionspritze über den Impfstutzen.

Die anaerobe Dunkeladaptation von *R. rubrum* in Pyruvatmedium wurde in nicht ganz fest verschlossenen 500 ml-Schraubdeckelflaschen durchgeführt. Die Kulturen wurden mit einem Inoculum von 10% beimpft und 36 Stunden bei 30 °C im Dunkeln inkubiert.

Herstellung zellfreier Extrakte

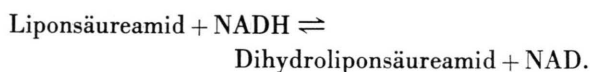
Die für enzymatische Untersuchungen benötigten Zellen wurden gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach Erreichung einer Trübung von $A_{660} = 2$ (entsprechend einer Biomasse von 1 mg/ml) geerntet. Zu diesem Zeitpunkt betrug der pH in photosynthetischen Pyruvatkulturen etwa 6,6 und die Pyruvatkonzentration im Medium war von anfänglich 45 mM auf etwa 20 mM gesunken. Die Zellen wurden im 50 mM K-Phosphatpuffer, pH 6,8, gewaschen und schließlich im gleichen Puffer mit Zusatz von 10 mM $MgCl_2$ resuspendiert (1 g Feuchtwicht/2 ml Puffer). Um einen Verlust an Pyruvatdehydrogenase-Aktivität zu vermeiden, durften weder die Zellsuspensionen noch daraus gewonnene Rohextrakte eingefroren werden. Zum Aufbrechen der Zellen wurde die Zellsuspension nach Zugabe einer Spatelspitze DNase einmal bei 80 kp/cm² durch eine French-Zelle (Aminco French-Press, American Instruments Co., Silver Springs, Maryland, USA) gepreßt. Das Homogenat wurde bei $3000 \times g$ (10 min) zentrifugiert, um intakt gebliebene Zellen zu entfernen. Der Überstand (= Rohextrakt) wurde mit 50 mM K-Phosphatpuffer auf eine Proteinkonzentration von 20–25 mg/ml eingestellt. Alle Arbeiten mit zellfreien Extrakten wurden bei 0–4 °C durchgeführt.

Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten wurden in einem geeigneten optischen Test in 1 ml-Reaktionsgemischen bei 30 °C gemessen. Die Extinktionsänderungen wurden im Spektralphotometer PM 4 (Fa. C. Zeiss, Oberkochen) verfolgt und mit einem Servogor-Schreiber (Fa. Metrawatt, Nürnberg) registriert. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten (E) pro mg Protein angegeben. Eine Einheit ist die Enzymaktivität, die einen Substratumsatz von 1 μ mol/min katalysiert. Die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes wurde in dem für *R. rubrum* optimierten Reaktionsgemisch nach Schwartz und Reed² gemessen: K-Phosphat, pH 7,0, 30 mM; NAD, 1 mM; CoA, 0,2 mM; TPP, 10 μ M; $MgSO_4$, 1 mM; $MnCl_2$, 0,1 mM; Na-Pyruvat, 0,5 mM; 9–300 μ g Protein.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Pyruvat gestartet und bei 340 nm verfolgt. Die Aktivität des Teilenzym *Pyruvatdehydrogenase* (EC 1.2.4.1) wurde nach der modifizierten Methode von Dietrich und Henning¹² mit DCPIP als H-Akzeptor gemessen. Das Reaktionsgemisch enthielt die folgenden Komponenten: K-Phosphat, pH 7,0, 30 mM; TPP, 0,15 mM; DCPIP, 0,05 mM; PMS, 1,3 mM; Na-Pyruvat, 1 mM. Messung der Reaktion bei 600 nm. Aktivität mit $K_3Fe(CN)_6$ als H-Akzeptor wurde im modifizierten Ansatz nach Schwartz und Reed² gemessen: K-Phosphat, pH 7,0, 30 mM; $MgSO_4$, 10 mM; TPP, 0,15 mM; $K_3Fe(CN)_6$, 1 mM; Na-Pyruvat, 5 mM. Messung der Reaktion bei 430 nm.

Die Übertragung der Acetyl-Gruppe von CoA auf Dihydroliponsäureamid als Maß für die *Lipoat-reductase-Transacetylase*-Aktivität (EC 2.3.1.12) wurde nach der Methode von Hall und Weitzman¹³ gemessen. Das Enzym wurde zunächst 5 min in dem folgenden Reaktionsgemisch inkubiert: K-Phosphat, pH 7,0, 40 mM; NADH, 0,1 mM; Liponsäureamid, 0,2 mM. Nach dieser Präinkubation ist durch die Aktivität der Dihydrolipoat-Dehydrogenase folgendes Gleichgewicht erreicht



Nach dieser Gleichgewichtseinstellung erfolgte der Start der Transacetylase-Reaktion durch Zugabe von 0,3 mM Acetyl-CoA und weitere Registrierung der NADH-Oxidation.

Dihydrolipoat-Dehydrogenase-Aktivität (EC 1.6.4.3) wurde in einem nach Massey¹⁴ modifizierten Reaktionsgemisch gemessen: K-Phosphat, pH 7,0, 30 mM; Dihydroliponsäureamid, 0,5 mM; NAD, 1 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Präparative und analytische Methoden

Acetyl-CoA wurde aus CoA und Essigsäureanhydrid nach der Methode von Ochoa¹⁵ synthetisiert. Dihydroliponsäureamid wurde durch Reduktion von Liponsäureamid mit Borhydrid nach den Angaben von Hishwa und Pfennig¹⁶ hergestellt. Aluminiumhydroxyd C γ -Gel wurde nach den Angaben von Collopy¹⁷ präpariert.

Protein wurde nach der Methode von Lowry *et al.*¹⁸, CoA mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)¹⁹ und Acetyl-CoA enzymatisch in einem Reaktionsgemisch mit DTNB und Citratsynthase (EC 4.1.3.7)²⁰ bestimmt. Pyruvat wurde ebenfalls enzymatisch in einem Reaktionsgemisch mit NADH und Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) analysiert. Bacteriochlorophyll in Membranfragmenten bzw. Enzympräparaten wurde durch Messung der Ex-

tinktion bei 880 nm unter Benutzung des von Clayton²¹ angegebenen Extinktionskoeffizienten ($140 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

Herkunft der Chemikalien und Biochemikalien

Adenylate und andere Nucleosidphosphate, CoA, Citratsynthase, DNase, DTNB, FAD, Lactatdehydrogenase, NAD, NADH, NADP und TPP wurden von der Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, bezogen. Folsäure, Liponsäure, Liponsäureamid, PMS und Rinderserumalbumin stammten von der Fa. Serva-Feinbiochemica, Heidelberg. Sepharose 4B wurde von der Fa. Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg, bezogen. Die übrigen Chemikalien stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

Ergebnisse

Nachweis eines membrangebundenen Pyruvat-dehydrogenase Komplexes in Rhodospirillum rubrum

Rohextrakte aus anaerob im Licht mit Pyruvat als C-Quelle gewachsenen *R. rubrum*-Zellen katalysierten eine von Pyruvat, CoA, TPP und Mg^{2+} -Ionen abhängige NAD-Reduktion mit Raten von 50–90 mE/mg Protein. Die Reaktionsraten waren nur für etwa 1 min konstant und verringerten sich dann zusehends. FAD und NADP konnten NAD als H-Akzeptor nicht ersetzen. Wurde die Reaktion mit dem Rohextrakt gestartet, war kein linearer Zusammenhang zwischen Reaktionsrate und Proteinkonzentration zu verzeichnen. Nach Präinkubation des Extraktes im Pyruvat-freien Reaktionsgemisch und Start der Reaktion mit Pyruvat aber wurde Proportionalität zwischen Proteinkonzentration und der Anfangsreaktionsrate erzielt.

Wurden Rohextrakte einer Zentrifugation bei $140\,000 \times g$ (90 min) unterzogen, befand sich die gesamte noch meßbare Enzymaktivität in der Chromatophoren-Fraktion, also der Fraktion der intracytoplasmatischen Membranen. Etwa 40% der Gesamtaktivität war verlorengegangen. Um den Enzymkomplex von den Chromatophoren zu lösen, wurde das Sediment in Phosphatpuffer (pH 7) verschiedener Molarität resuspendiert, homogenisiert und erneut bei $140\,000 \times g$ abzentrifugiert. In den Ansätzen mit Phosphatkonzentrationen höher als 20 mM verblieb die gesamte Enzymaktivität mit der Chromatophorenfraktion assoziiert. Mit 1 mM Phosphat aber wurde bis zu 20% der Enzymaktivität solubilisiert. Durch mehrmaliges Waschen der Chromatophoren mit 1 mM Phosphat konnte praktisch die ge-

samte membrangebundene Pyruvatdehydrogenase-Aktivität freigesetzt werden. Das solubilisierte Enzym zeigte die gleiche Abhängigkeit von Cofaktoren wie das membrangebundene Enzym und konnte durch Zusatz von 10 mM MgSO_4 stabilisiert werden.

Mit einem solubilisierten Enzympräparat wurden Sättigungskurven für alle Liganden aufgenommen. Folgende Konzentrationen erwiesen sich als optimal: 1 mM NAD; 10 μM TPP; 0,2 mM CoA; 1 mM MgSO_4 und 0,5 mM Pyruvat. Wurde außer MgSO_4 noch 0,1 mM MnCl_2 zugesetzt, wurde eine Aktivitätssteigerung von 20% erzielt. Zusatz von SH-Verbindungen (Cystein, Dithioerythrit, reduziertes Glutathion) zum Reaktionsgemisch erhöhte die Reaktionsraten ebenfalls um 10–15%. Die Ermittlung der optimalen Konzentration von Puffer und Enzymliganden im Reaktionsgemisch zeigte, daß die Aktivität des Enzymkomplexes in starkem Maße von der Ionenstärke abhängt (Abb. 1). Maximale

Enzymaktivität wurde bei einer Ionenstärke von $\mu = 0,05$ (entsprechend 30 mM K-Phosphat) gemessen. Der unterschiedliche Aktivitätsverlust bei höheren Ionenstärken als 0,05 (vgl. Abb. 1) zeigt aber auch, daß die Aktivität des Enzymkomplexes nicht allein von der Ionenstärke im Reaktionsgemisch, sondern auch von der Art der zur Einstellung der Ionenstärke verwendeten Ionen (K^+ , Na^+) abhängt. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten in Tris-, HEPES- und Phosphat-Puffer bei einer Ionenstärke von $\mu = 0,05$ zeigte, daß der Enzymkomplex in Phosphat-Puffer die höchste Aktivität aufwies (vgl. Tab. I). Da Zusatz von 2 mM Phosphat zu Tris- oder HEPES-Puffer aber eine deutliche Aktivitätssteigerung bewirkte, kann Phosphat als Aktivator des Enzyms betrachtet werden.

Tab. I. Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes in verschiedenen Puffern bzw. Puffergemischen.

| Puffer bzw. Puffergemisch | % Aktivität |
|---------------------------|-------------|
| 30 mM K-Phosphat, pH 7 | 100 |
| 30 mM Tris-HCl, pH 7 | 66 |
| 30 mM HEPES, pH 7 | 56 |
| 30 mM Tris-HCl | |
| + 30 mM K-Phosphat, pH 7 | 95 |
| 30 mM Tris-HCl | |
| + 10 mM K-Phosphat, pH 7 | 90 |
| 30 mM Tris-HCl | |
| + 2 mM K-Phosphat, pH 7 | 85 |
| 30 mM HEPES | |
| + 2 mM K-Phosphat, pH 7 | 76 |

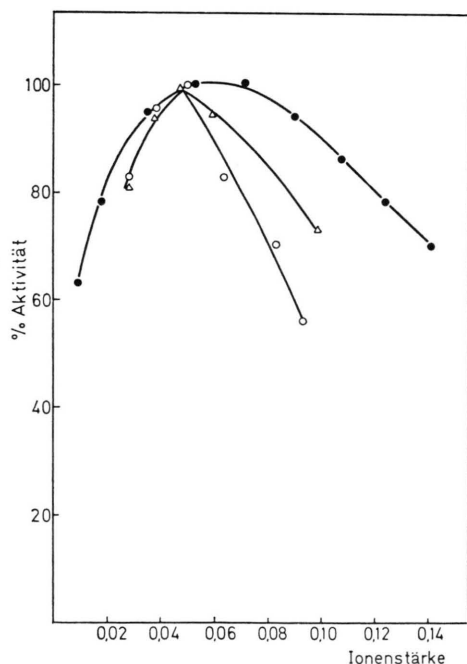


Abb. 1. Einfluß der Ionenstärke auf die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes. Die Enzymaktivität eines solubilisierten Enzympräparates (spez. Aktivität: 40 mE/mg Protein) wurde in Reaktionsgemischen (pH 7) mit 1 mM NAD; 10 μM TPP; 0,2 mM CoA; 1 mM MgSO_4 ; 0,5 mM Na-Pyruvat und 0,36 mg Protein als Funktion der Ionenstärke gemessen. In einer Meßserie wurden die verschiedenen Werte der Ionenstärke mit K-Phosphat (●) eingestellt. Reaktionsgemischen mit steigenden KCl(○)- oder NaCl(△)-Konzentrationen wurde jeweils 10 mM K-Phosphat, pH 7, zugefügt. Die Ionenstärke wurde berechnet nach der Formel $\mu = 0,5 \cdot \sum c_i \cdot k_i^2$ (c_i , Konzentration; k_i , Ladung des i -ten Ions).

90 μg Protein eines solubilisierten Enzympräparates in 50 mM Tris-Puffer wurden zur Aktivitätsbestimmung in Reaktionsgemische mit verschiedenen Puffer bzw. Puffergemischen eingesetzt. Die Ansätze enthielten außerdem 1 mM NAD; 0,2 mM CoA; 10 μM TPP; 1 mM MgSO_4 ; 0,1 mM MnCl_2 und 0,5 mM Na-Pyruvat. 100% Aktivität entspricht 160 mE/mg Protein.

Die niedrigste Aktivität des Enzymkomplexes im Rohextrakt (6–10 mE/mg Protein) wurde nach anaerober Dunkelanzucht von *R. rubrum* in Pyruvat- und Fructose-Medium gemessen. Mittlere Aktivitäten (15–95 mE/mg Protein) wurden nach photosynthetischer Zellanzucht mit Succinat, Malat, Lactat und Pyruvat erzielt. Die höchsten Aktivitäten (180–200 mE/mg Protein) wurden nach aerober Anzucht der Zellen in Pyruvat-Medium erreicht.

Das im Zuge der Enzymreaktion gebildete Acetyl-CoA, NADH und CO_2 wurde in einem Reaktionsgemisch mit 30 mM K-Phosphat, pH 7; 10 μM TPP;

2 mM NAD; 1 mM CoA; 1 mM MgSO_4 und 0,1 mM MnCl_2 bestimmt. Wie die Daten in Tab. II zeigen, entsprachen die Mengen der im Zuge der Reaktion gebildeten Produkte der Menge des verbrauchten Pyruvats. Da die im Bestimmungsansatz als Hilfsenzym eingesetzte Citratsynthase spezifisch für Acetyl-CoA ist, kann Acetyl-Phosphat als Endprodukt der Reaktion ausgeschlossen werden.

Tab. II. Stöchiometrie zwischen Pyruvatverbrauch und Produktbildung in einem Pyruvatdehydrogenase-Reaktionsgemisch.

| Substrat bzw. Produkt | Umsatz [$\mu\text{mol/ml}$] |
|-----------------------|----------------------------------|
| Pyruvat | 0,090 |
| Acetyl-CoA | 0,088 |
| CO_2 | 0,083 |
| NADH | 0,090 |

In Reaktionsgemischen mit 30 mM K-Phosphat, pH 7; 1 mM Na-Pyruvat; 10 μM TPP; 2 mM NAD; 1 mM CoA; 1 mM MgSO_4 ; 0,1 mM MnCl_2 und 50 μl Enzympräparat (0,64 mg Protein) wurde die NAD-Reduktion spektrophotometrisch verfolgt. Nach 10 min wurde die Reaktion durch 0,5 ml 3 N HClO_4 abgestoppt. Die Neutralisation erfolgte mit KHCO_3 . Der nach Zentrifugation bei 4000 U/min erhaltene Überstand wurde zur Pyruvat- und Acetyl-CoA-Bestimmung eingesetzt (vgl. Abschnitt Material und Methoden). CO_2 wurde in einem entsprechend zusammengesetzten 5 ml-Reaktionsgemisch mit der 10-fachen Enzymmenge manometrisch bestimmt. Nachdem keine Druckänderung am Manometer mehr ablesbar war, wurde das im Reaktionsgemisch verbliebene HCO_3^- mit Säure ausgetrieben. Die in einem Parallelansatz mit gekochtem Extrakt gebildete Gasmenge wurde von dem erhaltenen Wert abgezogen. In einem dritten Ansatz mit KOH im Zentralzylinder wurde keinerlei Gasbildung gemessen.

Anreicherung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes

Zur Anreicherung des Enzymkomplexes aus *R. rubrum* wurde die Chromatophorenfraktion aus photosynthetisch auf Pyruvat gewachsenen Zellen eingesetzt. Die Loslösung des Enzymkomplexes von den Chromatophoren wurde durch Homogenisation der Membranfraktion in Mg^{2+} -freiem Phosphatpuffer (1 mM, pH 7) erreicht. Für maximale Ausbeuten an solubilisiertem Enzymkomplex erwies sich eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml als optimal. Durch wiederholte Homogenisation und Sedimentation der Membranfraktion konnte 60–100% der Gesamtaktivität solubilisiert werden. Sowohl die Mg^{2+} -Konzentration als auch die Proteinkonzentration waren kritisch: Mg^{2+} in einer Konzentration von höher als 1 mM verhinderte die Dissoziation des

Enzymkomplexes von der Membran; bei Proteinkonzentrationen von weniger als 4 mg/ml war eine Inaktivierung des Enzymkomplexes zu verzeichnen. Bei solch geringen Proteinkonzentrationen war stets ein Verlust der Pyruvat-NAD-Reduktase-Aktivität bei gleichzeitigem Erhalt der Aktivitäten von Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) und Dihydrolipoat-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3) zu messen.

Die bei Enzymanreicherungen übliche Fällung mit Ammoniumsulfat führte bei dem solubilisierten Pyruvatdehydrogenase-Komplex aus *R. rubrum* zu hohen Aktivitätsverlusten. Der Enzymkomplex aber konnte durch Zusatz von 10 mM MgSO_4 zum Solubilisat präzipitiert und durch Zentrifugation bei $40\,000 \times g$ sedimentiert werden. Eine genauere Analyse des Fällungsvorganges ergab, daß sich auch bei relativ geringen Proteinkonzentrationen (< 4 mg/ml) stets 80–100% der Pyruvat-NAD-Reduktase-Aktivität im Sediment wiederfanden, wenn das Solubilisat mit 10 mM MgSO_4 versetzt und mindestens 10 Stunden bei 0–4 °C gelagert worden war. War bei der Solubilisierungs-Prozedur ein Aktivitätsverlust des Enzymkomplexes erfolgt, wurde ein Teil der verlorengegangenen Aktivität im Zuge der Präzipitation wiedergewonnen. Zur weiteren Reinigung des Enzymkomplexes wurde das Mg-Präzipitat in einem kleinen Volumen Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gelöst und durch eine Sepharose 4B-Säule ($1,6 \times 60$ cm) filtriert.

Ein typisches Elutionsdiagramm ist in Abb. 2 dargestellt. Das durch MgSO_4 aus dem Solubilisat gefällte Protein wurde in zwei Banden von der Säule eluiert. Die Pyruvat-NAD-Reduktase befand sich in der ersten Proteinbande, die auch noch Photopigment-Protein-Komplexe mit einer Bacteriochlorophyll-Konzentration von etwa 4 ng/mg Protein enthielt (zum Vergleich: Die Chromatophorenfraktion aus *R. rubrum* enthält etwa 30 μg Bacteriochlorophyll/mg Protein, also etwa das 10^4 -fache der Restmenge im Sepharose 4B-Filtrat). Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wiesen das gleiche Verhältnis Aktivität/Protein auf. Da nur etwa 30% der auf die Säule aufgetragenen Gesamtaktivität eluiert wurde, war zu vermuten, daß während der Gelfiltration eine teilweise Dissoziation des Komplexes in seine Teilenzyme stattgefunden hatte. Diese Annahme wurde durch den Befund bestätigt, daß sich auch vom ersten Teilenzym des Komplexes, der Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1), nur ca. 30% in der ersten Proteinbande wiederfanden. Von die-

Tab. III. Reinigung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus photosynthetisch gewachsenen Zellen von *Rhodospirillum rubrum*.

| Fraktion | Volumen [ml] | Protein [mg] | Gesamt-Einheiten | spez. Aktivität [E/mg Protein] | Anreicherung |
|-------------------------------|--------------|--------------|------------------|--------------------------------|--------------|
| Rohextrakt | 50 | 1300 | 90 | 0,069 | 1 |
| Membranfraktion | 178 | 890 | 50 | 0,056 | 0,8 |
| Solubilisat | 495 | 190 | 34 | 0,180 | 2,6 |
| MgSO ₄ -Präzipitat | 7 | 31 | 30 | 0,970 | 14 |
| Sepharose 4B-Filtrat | 29 | 5,5 | 7,3 | 1,31 | 19 |

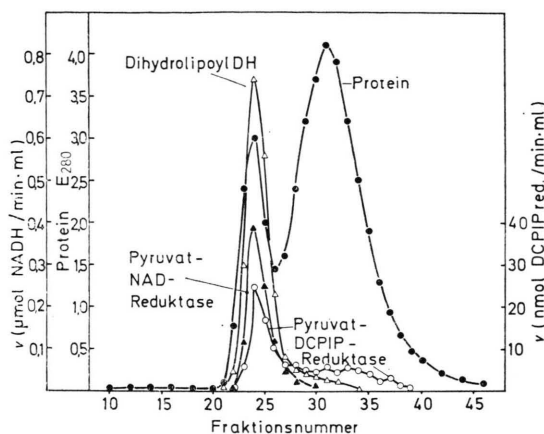


Abb. 2. Gelfiltration des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch Sepharose 4B. 1,5 ml eines MgSO₄-Präzipitats (6,3 mg Protein) wurden auf eine Sepharose 4B-Säule (1,6 × 60 cm) aufgetragen, mit 50 mM K-Phosphat, pH 7, eluiert und in Fraktionen zu je 20 Tropfen (= 1,55 ml) aufgefangen. Pyruvat-NAD-Reduktase- und Dihydrolipoat-Dehydrogenase-Aktivität wurde mit 50 μ l-Proben, die DCPIP-abhängige Pyruvatdehydrogenase mit 200 μ l-Proben aus den jeweiligen Fraktionen bestimmt.

ser Teilaktivität war ein deutlich meßbarer Anteil in der zweiten Proteinbande lokalisiert. Demgegenüber ließ sich von der Dihydrolipoat-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3) praktisch die gesamte aufgetragene Aktivität in der ersten Proteinbande wiederfinden. Während das Aktivitätsverhältnis von Pyruvat-NAD-Reduktase und Dihydrolipoat-Dehydrogenase in den Fraktionen der ersten Proteinbande zwar annähernd konstant, aber gegenüber dem MgSO₄-präzipitierten Enzymkomplex deutlich verringert war, nahm das Verhältnis Pyruvat-NAD-Reduktase zu Pyruvatdehydrogenase mit steigender Fraktionsnummer ab. Diese Befunde erlauben die Schlußfolgerung, daß der Aktivitätsverlust an Pyruvat-NAD-Reduktase während der Gelfiltration wenigstens teilweise auf einer Dissoziation des Enzymkomplexes in seine Teilenzyme beruht. Die schlechte Ausbeute an Pyru-

vat-NAD-Reduktase im Sepharose 4B-Eluat konnte leicht verbessert werden durch Auftragung einer größeren Proteinmenge und durch Zusatz von 5 mM MgSO₄ und 20 μ M TPP zum Elutionspuffer (50 mM K-Phosphat, pH 7).

Es wurde versucht, durch weitere bzw. andere Chromatographiemethoden die kontaminierenden Photopigment-Komplexe bzw. Membranfragmente vom Pyruvatdehydrogenase-Komplex abzutrennen. Chromatographie des Mg-Präzipitats auf Ca-Phosphatgel (vgl. ref. 22) zeigte nicht den gewünschten Erfolg. Auch nach Chromatographie auf Hydroxyapatit konnten nur ca. 10% der Gesamteinheiten wiedergewonnen werden. Eine Chromatographie des Mg-Präzipitats auf Aluminiumhydroxyd C₇-Gel resultierte zwar in einer Abtrennung der kontaminierenden Photopigment-Komplexe bzw. Membranfragmente, ließ aber die spezifische Aktivität des Enzympräparates weit unter den für das Mg-Präzipitat charakteristischen Wert sinken. Der Pyruvatdehydrogenase-Komplex aus *R. rubrum* wurde deshalb routinemäßig nur durch Solubilisierung von der Chromatophoren-Fraktion, Präzipitation mit MgSO₄ und Filtration durch Sepharose 4B gereinigt. Dieses Verfahren erlaubte eine Anreicherung des Enzymkomplexes im Vergleich zum Rohextrakt um einen Faktor von etwa 20 bis zu einer spezifischen Aktivität von 1–1,5 E/mg Protein. Ein typischer Anreicherungsangang ist in Tab. III zusammengefaßt.

Das Anreicherungsverfahren ließ sich ohne Modifikation auch auf aerob gewachsene Zellen übertragen. Die hier erzielten Enzympräparate wiesen spezifische Aktivitäten bis zu 2,5 E/mg Protein auf und waren – nicht zuletzt wegen des viel geringeren Photopigmentgehalts des Zellmaterials – praktisch frei von Bacteriochlorophyll.

Der gereinigte Enzymkomplex konnte durch Zusatz von 10 mM MgSO₄ nicht stabilisiert werden. Nach Zusatz von Rinderserumalbumin (10 mg/ml)

aber konnte der Enzymkomplex bei -18°C mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust eingefroren werden. Ein in Abwesenheit von Rinderserumalbumin durch Einfrieren inaktiviertes Enzympräparat ließ sich wie der Enzymkomplex aus *E. coli*²³ durch Präinkubation mit einem zweiwertigen Metallion und TPP reaktivieren (Abb. 3). Um von vornherein eine Inaktivierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes zu vermeiden, wurde deshalb dem Phosphatpuffer routinemäßig $20\ \mu\text{M}$ TPP zugesetzt.

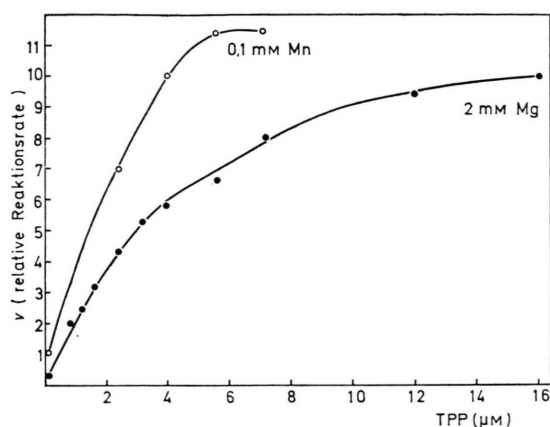


Abb. 3. Reaktivierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch Thiaminpyrophosphat. Das durch Einfrieren inaktivierte Eluat ($0,7\ \text{mg/ml}$) von einer Alumina C γ -Säule wurde bei 0°C in Puffergemischen mit $0,1\ \text{mM}$ MnCl_2 (○) bzw. $2\ \text{mM}$ MgSO_4 (●) in Gegenwart verschiedener TPP-Konzentrationen präinkubiert. Aus diesem Gemisch wurden nach 2 min $20\ \mu\text{l}$ -Proben ($14\ \mu\text{g}$ Protein) entnommen und im Standardgemisch auf Pyruvat-NAD-Reduktase-Aktivität getestet. Die mit MnCl_2 gemessene Maximalrate entspricht $0,83\ \text{E/mg}$ Protein.

Kinetische Eigenschaften des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes

Die in den Vorversuchen ermittelte Abhängigkeit der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in *R. rubrum* von den Cofaktoren CoA und TPP ließ einen Aufbau des Enzymkomplexes ähnlich dem *E. coli*-Enzym² oder dem *A. vinelandii*-Enzym⁴⁻⁶ aus den drei Teilenzymen Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1), Lipoatreduktase-Transacetylase (EC 2.3.1.12) und Dihydrolipoatdehydrogenase (EC 1.6.4.3) erwarten. Einer Charakterisierung dieser drei Teilaktivitäten im Pyruvatdehydrogenase-Multi-enzymkomplex aus *R. rubrum* ging die Bestimmung der kinetischen Parameter der Gesamtreaktion (Pyruvat-NAD-Reduktase) voraus.

Die Rate der NAD-Reduktion wurde in Standard-Reaktionsgemischen mit $1\ \text{mM}$ MgSO_4 bzw. $0,1\ \text{mM}$ MnCl_2 als Funktion der Pyruvat-Konzentration gemessen. In beiden Fällen wurden hyperbolische Sättigungskurven mit einem übereinstimmenden K_m -Wert von $0,14\ \text{mM}$ erzielt. Mit MnCl_2 wurden im Vergleich zu den mit MgSO_4 erhaltenen Reaktionsraten um etwa 15% höhere v_{max} -Werte gemessen. Im Gegensatz zu den Pyruvatdehydrogenase-Komplexen aus *E. coli*^{23, 24} und *A. vinelandii*⁵ weist das Enzym aus *R. rubrum* keine sigmoide Pyruvat-Sättigungskurve auf. Da die Kooperativität zwischen den Pyruvat-Bindungsstellen am Enzymkomplex aus *E. coli* mit abnehmender TPP-Konzentration ansteigt²³, wurde geprüft, inwieweit das kinetische Verhalten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus *R. rubrum* von der TPP-Konzentration im Reaktionsgemisch abhängt. Selbst mit TPP-Konzentrationen von weniger als $5\ \mu\text{M}$ wurden jedoch stets hyperbolische Pyruvat-Sättigungskurven mit einem K_m von $0,14 \pm 0,02\ \text{mM}$ gemessen. Weiterhin bestand die Möglichkeit, daß die K_m - bzw. $S_{0.5}$ -Werte der Pyruvatsättigungskurven von der Art des Puffers im Reaktionsgemisch bzw. der Konzentration von Liganden wie NADH und Acetyl-CoA abhingen. In Gegenwart von Tris-HCl- oder HEPES-Puffer (anstelle von Phosphat) aber war die Form der Pyruvat-Sättigungskurve unverändert. Auch der Zusatz von NADH oder Acetyl-CoA (vgl. Abschnitt Inhibitoren und Aktivatoren) war in dieser Hinsicht wirkungslos.

NAD-Sättigungskurven wurden bei verschiedenen CoA- und Pyruvat-Konzentrationen aufgenommen. In allen Fällen wurde für NAD eine hyperbolische Sättigungskurve mit einem K_m von $0,07\ \text{mM}$ gefunden. Auch der K_m -Wert für CoA erwies sich als unabhängig von der Pyruvat- und NAD-Konzentration. Die hyperbolischen CoA-Sättigungskurven wiesen übereinstimmend einen K_m von $0,025\ \text{mM}$ auf. Demgegenüber waren die K_m -Werte für TPP abhängig von der Art und der Konzentration des zweiwertigen Metallions im Reaktionsgemisch. Mit $1\ \text{mM}$ MgSO_4 bzw. $0,02\ \text{mM}$ MnCl_2 wurde für TPP ein K_m von $0,5\ \mu\text{M}$, mit $0,01\ \text{mM}$ MgSO_4 aber ein K_m von $3,3\ \mu\text{M}$ gemessen. Da in Reaktionsgemischen ohne zusätzliches Metallion bis zu 60% der maximalen Aktivität gemessen wurde (auch dann, wenn das Enzympräparat praktisch frei von MgSO_4 war), konnten exakte K_m -Werte für Mg^{2+} und Mn^{2+} nicht bestimmt werden. Da die Pyruvat-NAD-Reduktase-

Aktivität aber durch 1 mM EDTA vollständig gehemmt wurde, ist anzunehmen, daß der Enzymkomplex ein fest gebundenes zweiwertiges Metallion enthält.

Nachweis und Charakterisierung der Teilenzyme des Komplexes

Wegen der geringen Empfindlichkeit der manometrischen Methode kam für den Nachweis der Pyruvatdehydrogenase-Komponente (EC 1.2.4.1) nur ein optischer Test in Frage. Die Rate der Reduktion von Ferricyanid lag — zumindest mit den Enzympräparaten aus photosynthetisch gezogenen Zellen — an der unteren Nachweisgrenze der optischen Methode. Die Reaktionsrate mit Ferricyanid als H-Akzeptor entsprach maximal 0,6% der Rate der NAD-Reduktion. DCPIP erwies sich als ein weitaus besserer H-Akzeptor zur Messung der Pyruvatdehydrogenase-Teilreaktion. Im Testsystem nach Dietrich und Henning¹² wurden Reaktionsraten gemessen, die etwa 16% der Rate der NAD-Reduktion entsprachen. Beim gereinigten Enzymkomplex, nicht aber im Rohextrakt, war die Reaktionsrate mit DCPIP der Proteinkonzentration proportional. Im Gegensatz zur Gesamtreaktion (Pyruvat-NAD-Reduktase) war die Reaktionsrate mit DCPIP nicht abhängig von der Ionenstärke des Puffers im Testgemisch. Auch hatte der Zusatz von Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} keinen Einfluß auf die Aktivität des Teilenzym. Der K_m -Wert für Pyruvat betrug 0,25 mM; der für TPP 0,05 mM.

Der Nachweis der Teilaktivität der Lipoatreduktase-Transacetylase (EC 2.3.1.12) erfolgte nach der Methode von Hall und Weitzman¹³ (vgl. Abschnitt Material und Methoden). Bei dieser Methode wird die Bildung von S-Acetyl-Lipoamid aus Dihydrolipoamid und Acetyl-CoA mit der im Überschuß vorhandenen Dihydrolipoat-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3) gekoppelt. Durch das letztere Enzym wird Lipoamid in Gegenwart von NADH bis zur Gleichgewichtseinstellung reduziert. Dann wird die Transacetylierungs-Reaktion mit Acetyl-CoA gestartet und anhand der weiteren NADH-Oxidation verfolgt. Die mit dem *R. rubrum*-Enzymkomplex nach Zugabe von Acetyl-CoA gemessene Rate der NADH-Oxidation war der eingesetzten Proteinkonzentration proportional. Ein Enzympräparat mit einer Pyruvat-NAD-Reduktase-Aktivität von 1,4 E/mg Protein wies eine Transacetylase-Aktivität von nur 0,22 E/mg Protein auf. Es ist anzunehmen, daß die relativ ge-

ringe Aktivität der Dihydrolipoat-Dehydrogenase im *R. rubrum*-Enzymkomplex die Transacetylase-Reduktion limitiert.

Die Aktivität der Dihydrolipoat-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3) wurde sowohl in physiologischer (NAD-Reduktion durch Dihydrolipoamid), als auch in umgekehrter Richtung (Oxidation von NADH in Gegenwart von Liponsäureamid) gemessen. Die nach Reed und Willms²⁵ gemessene Rate der NADH-Oxidation entsprach nur etwa 30% der Rate der Gesamtreaktion. Durch Präinkubation des Enzympräparates mit Liponsäureamid konnte allerdings eine Verdopplung der Reaktionsrate erzielt werden. Mit Liponsäure wurde lediglich 10% der Reaktionsrate mit Liponsäureamid erreicht. Diese geringe Aktivität des Teilenzym in der unphysiologischen Richtung erklärt die niedrigen Raten der Transacetylierung im Gleichgewichts-System nach Hall und Weitzman¹³ (siehe oben). Die Aktivität des Enzyms in der physiologischen Richtung entsprach dem 1,6-fachen der Rate der Gesamtreaktion. Durch Zusatz von 1 mM Dithioerythrit konnte die Aktivität noch um 20% gesteigert werden. Das Teilenzym hatte einen K_m von 0,22 mM für NAD und 0,18 mM für Dihydroliponsäureamid.

Inhibitoren und Aktivatoren des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes

Die Reaktionsrate der Gesamtreaktion (Pyruvat-NAD-Reduktase) wurde bei drei verschiedenen, nicht sättigenden NAD-Konzentrationen als Funktion der NADH-Konzentration gemessen (Abb. 4). Es zeigte sich, daß das Ausmaß der Hemmung des Enzymkomplexes durch NADH von der NAD-Konzentration abhängt. Mit steigender NAD-Konzentration wurde das Ausmaß der Hemmung verringert. Auftragung der Reaktionsdaten im Dixon-Diagramm ($1/v = f[I]$) ergab einen K_i für NADH von 5 μ M und verdeutlichte den kompetitiven Charakter der Hemmung bei niedrigen NADH-Konzentrationen. Der Angriffspunkt der NADH-Hemmung ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Dihydrolipoat-Dehydrogenase, denn die von diesem Teilenzym des Komplexes aus *R. rubrum* katalysierte Reaktion wurde durch NADH in ähnlicher Weise wie die Gesamtreaktion gehemmt (vgl. ref. 26).

Wurde ein Enzympräparat mit NADH (0,01 – 0,15 mM) für 1 min präinkubiert, trat eine irreversible Inaktivierung der Gesamtreaktion ein. Der Grad der Inaktivierung war von der NADH- und

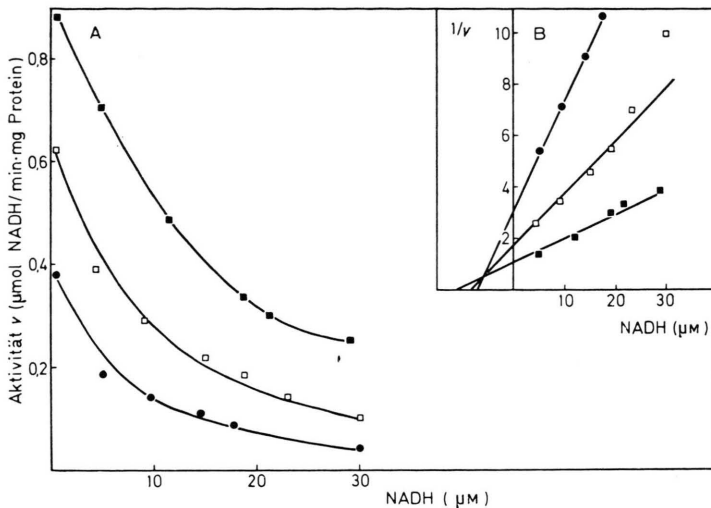


Abb. 4. Hemmung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch NADH. Die Raten der NAD-Reduktion wurden in Reaktionsgemischen mit 0,2 mM CoA; 10 μM TPP; 1 mM MgSO_4 ; 22 (\blacksquare , \square) bzw. 44 (\bullet) μg Protein; 0,5 mM Na-Pyruvat und verschiedenen, konstanten NAD-Konzentrationen (\bullet , 0,04 mM; \square , 0,08 mM; \blacksquare , 0,20 mM) als Funktion der NADH-Konzentration gemessen. A. Reaktionsraten als Funktion der NADH-Konzentration. B. Dixon-Diagramm der Daten aus A.

der Proteinkonzentration abhängig. Je geringer der Proteingehalt des Präinkubationsgemisches war, um so stärker war der irreversible Aktivitätsverlust. Divalente Metallionen (Cu, Zn, Fe, Ni, Co) in einer Konzentration von 10^{-5} – 10^{-4} M verstärkten den inaktivierenden Effekt von NADH. SH-Verbindungen wie Cystein, Dithioerythrit und reduziertes Glutathion schützten den Enzymkomplex teilweise vor der Inaktivierung. Diese Befunde stehen in Einklang mit dem Mechanismus, der für die NADH-Inaktivierung der Dihydrolipoat-Dehydrogenase aus dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex aus höheren Organismen vorgeschlagen wurde²⁷.

Außer NADH ist für die bisher beschriebenen Pyruvatdehydrogenase-Komplexe auch Acetyl-CoA

ein potenter Inhibitor. Die Aktivität des Enzymkomplexes aus *R. rubrum* wurde bei zwei konstanten CoA-Konzentrationen als Funktion der Acetyl-CoA-Konzentration gemessen. Wie Abb. 5 zeigt, ist die Hemmung des Enzymkomplexes abhängig vom Verhältnis CoA/Acetyl-CoA. Unter den in Abb. 5 genannten Reaktionsbedingungen wurde 50-prozentige Hemmung bei einem Verhältnis CoA/Acetyl-CoA = 0,2 erzielt. Im Dixon-Diagramm ($1/v = f[\text{Acetyl-CoA}]$) ergeben die Daten aus Abb. 5 einen K_i für Acetyl-CoA von 40 μM . Im Gegensatz zu den Enzymkomplexen aus *E. coli*² und *A. vinelandii*⁵ war der K_m -Wert des *R. rubrum*-Enzyms für Pyruvat unabhängig von der Acetyl-CoA-Konzentration, so daß es fraglich ist, ob wie bei dem Komplex aus

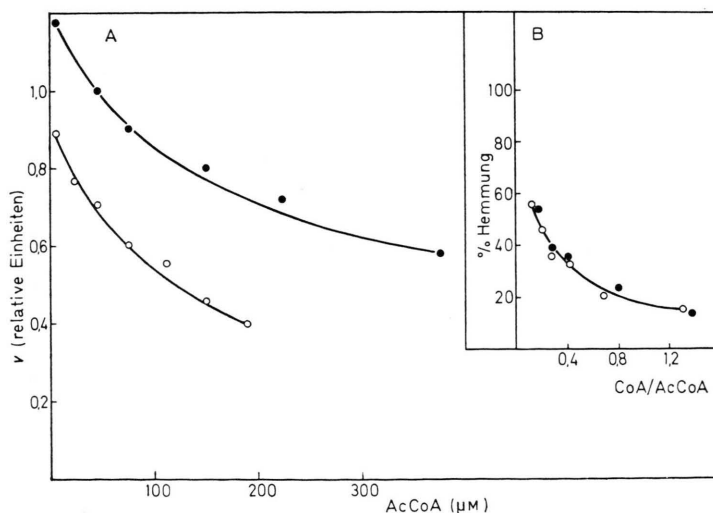


Abb. 5. Hemmung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch Acetyl-CoA. Die Rate der NAD-Reduktion wurde in Reaktionsgemischen mit 1 mM NAD; 10 μM TPP; 1 mM MgSO_4 ; 0,1 mM MnCl_2 ; 15 μg Protein und zwei verschiedenen, konstanten CoA-Konzentrationen (\circ , 30 μM ; \bullet , 60 μM) als Funktion der Acetyl-CoA-Konzentration gemessen. Das Enzympräparat hatte eine spezifische Aktivität von 1,3 E/mg Protein. Die relative Aktivität ist als das 10-fache der Extinktionsänderung bei 340 nm/min angegeben. A. Enzymaktivität als Funktion der Acetyl-CoA-Konzentration. B. Ausmaß der Hemmung (in %) als Funktion des CoA/Acetyl-CoA-Verhältnisses.

*E. coli*²⁴ die Pyruvatdehydrogenase-Komponente der Angriffspunkt der Hemmung ist.

Eine Aktivierung des *R. rubrum*-Enzymkomplexes durch Nucleosidmonophosphate bzw. Guanosindiphosphat konnte — im Gegensatz zum *E. coli*-Enzym² — nicht nachgewiesen werden. Auch die Hemmung des *R. rubrum*-Enzyms durch Nucleosidtriphosphate (maximal 25% Hemmung mit 3 mM Nucleosidtriphosphat) war zu schwach, um eine Regulation des Enzymkomplexes durch die „Energy Charge“ des Adenylatsystems (vgl. ref. 3) annehmen zu können. Von anderen getesteten Intermediärprodukten (in einer Konzentration von jeweils 1 mM) wie z. B. Zuckerphosphaten, Phosphoenolpyruvat, und Tricarbonsäure-Cyclus-Intermediäre, hatte keines eine meßbare Wirkung auf den Enzymkomplex.

Diskussion

Der aus dem phototrophen Bakterium *R. rubrum* isolierte Pyruvatdehydrogenase-Komplex unterscheidet sich von den bisher beschriebenen bakteriellen Enzymen durch seine feste Assoziation mit dem intracytoplasmatischen Membransystem. Darin kann eine Parallele zu der Lokalisation des Enzymkomplexes der Eukaryonten in der äußeren Membran der Mitochondrien²⁸ gesehen werden. Es läßt sich aber nicht abschätzen, inwieweit dieser Kompartimentierung des Enzymkomplexes in *R. rubrum* eine regulatorische Bedeutung zukommt.

Vom Pyruvatdehydrogenase-Komplex wird das für den Tricarbonsäure-Cyclus (TCC) benötigte Acetyl-CoA bereitgestellt. In Organismen, die ihre Energie nicht aus der Oxidation von C-Verbindungen beziehen, muß die Aktivität des Enzymkomplexes soweit gedrosselt sein, daß in den TCC nur das zur Aufrechterhaltung der Biosynthese-Reaktionen notwendige Acetyl-CoA eingespeist wird. Dieser Vorstellung entsprechend darf man eine strenge metabolische Kontrolle der Pyruvatdehydrogenase erwarten. In photosynthetischen Kulturen von *R. rubrum* ohne „Selbstbeschattung“ (also bei sättigender Lichtintensität) ist das der Fall. Erst dann, wenn gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase die Selbstbeschattung der Kultur beginnt, und zwar bei Unterschreitung des Wertes 10^4 für das Verhältnis Lichtintensität (lx)/OD₆₆₀ (vgl. ref. 29), werden Acetat und Formiat in das Kulturmedium ausgeschieden¹⁰. Das Auftreten von Formiat unter den Ausscheidungsprodukten erlaubt den

Schluß, daß nicht die Pyruvatdehydrogenase, sondern die unter anaeroben Dunkelbedingungen induzierte Pyruvat-Formiat-Lyase (EC 2.3.1.54)⁸ für den nunmehr einsetzenden „fermentativen“ Pyruvatabbau verantwortlich ist.

Aus den kulturphysiologischen Daten kann eine Rate der Pyruvat-Photoassimilation durch *R. rubrum* von etwa 0,09 µmol/min·mg Protein berechnet werden. Dieser Wert entspricht etwa der maximalen Pyruvat-NAD-Reduktase-Aktivität in Rohextrakten aus Pyruvat-gewachsenen Zellen von *R. rubrum*. Da aber nur ein Teil des aufgenommenen Pyruvats in den TCC eingeschleust wird (der überwiegende Teil wird *via* Phosphoenolpyruvat zur Aminosäuresynthese und Gluconeogenese verwendet), muß die *in vivo*-Rate der Pyruvatdehydrogenierung auf jeden Fall geringer als der voranstehend genannte Wert sein.

Hinweise für eine Regulation des Enzymkomplexes aus *R. rubrum* durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung, die für den Pyruvatdehydrogenase-Komplex in den Mitochondrien der höheren Organismen charakteristisch ist³⁰, wurden — wie bei *E. coli*² und *A. vinelandii*⁴ — nicht gefunden. Als mögliche Effektoren des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes in *R. rubrum* kommen Phosphat (Aktivator) sowie Acetyl-CoA und NADH (Inhibitoren) in Betracht. Die physiologische Bedeutung der Phosphat-Aktivierung des Enzymkomplexes ist schwer abzuschätzen, da über die Schwankungen des intrazellulären Phosphat-Pools in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen keine Daten vorliegen.

In vitro ist Acetyl-CoA ein potenter Inhibitor des *R. rubrum*-Enzyms ($K_i = 40$ µM). Im Gegensatz zu den Befunden mit den Enzym-Komplexen aus *E. coli*²⁴, *A. vinelandii*⁵ und *Saccharomyces carlsbergensis*³¹ hemmt Acetyl-CoA nicht kompetitiv in bezug auf Pyruvat, sondern kompetitiv in bezug auf CoA. Über das Verhältnis von CoA/Acetyl-CoA in phototrophen Bakterien liegen keine Daten vor. Sollte der Wert aber ähnlich wie in *E. coli*²⁶ zwischen 7 und 9 liegen, ist eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase in *R. rubrum* durch Acetyl-CoA unwahrscheinlich (vgl. Abb. 5).

Ein Vergleich der kinetischen Konstanten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus *R. rubrum* für NAD ($K_m = 0,07$ mM) und NADH ($K_i = 5$ µM) zeigt, daß die Affinität des Enzymkomplexes zum Inhibitor NADH etwa 10mal höher ist als diejenige zum Substrat NAD. Da das Verhältnis von NADH

zu NAD in fakultativ phototrophen Bakterien in charakteristischer Weise von den Kulturbedingungen abhängt³², liegt die Schlußfolgerung nahe, daß der Pyruvatdehydrogenase-Komplex in *R. rubrum* durch das Verhältnis von NADH zu NAD reguliert wird.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Ministers für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen unterstützt.

- ¹ L. J. Reed, F. R. Leach u. M. Koike, J. Biol. Chem. **232**, 123 [1958].
- ² E. R. Schwartz u. L. J. Reed, Biochemistry **9**, 1434 [1970].
- ³ L. C. Shen u. D. E. Atkinson, J. Biol. Chem. **245**, 5974 [1970].
- ⁴ T. W. Bresters, R. A. de Abreu, A. de Kok, J. Visser u. C. Veeger, Eur. J. Biochem. **59**, 335 [1975].
- ⁵ T. W. Bresters, A. de Kok u. C. Veeger, Eur. J. Biochem. **59**, 347 [1975].
- ⁶ H. J. Grande, T. W. Bresters, R. A. de Abreu, A. de Kok u. C. Veeger, Eur. J. Biochem. **59**, 355 [1975].
- ⁷ S. Raeburn u. J. C. Rabinowitz, Arch. Biochem. Biophys. **146**, 21 [1971].
- ⁸ K. Jungermann u. G. Schön, Arch. Mikrobiol. **99**, 109 [1974].
- ⁹ R. L. Uffen, J. Bacteriol. **116**, 874 [1973].
- ¹⁰ R. Lüderitz, Die Rolle des membrangebundenen Pyruvatdehydrogenase-Komplexes im Pyruvatstoffwechsel des fakultativ phototrophen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum*. Dissertation, Universität Bonn 1977.
- ¹¹ J. G. Ormerod, K. S. Ormerod u. H. Gest, Arch. Biochem. Biophys. **94**, 449 [1961].
- ¹² J. Dietrich u. U. Henning, Eur. J. Biochem. **14**, 258 [1970].
- ¹³ E. R. Hall u. P. D. J. Weitzman, Anal. Biochem. **62**, 286 [1974].
- ¹⁴ V. Massey, Biochim. Biophys. Acta **38**, 447 [1960].
- ¹⁵ S. Ochoa, Methods in Enzymology (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan, Hrsg.), Vol. **I**, S. 685, Academic Press, New York 1955.
- ¹⁶ F. Hashwa u. N. Pfennig, Arch. Mikrobiol. **81**, 36 [1972].
- ¹⁷ S. P. Colowick, Methods in Enzymology (S. P. Colowick und N. O. Kaplan, ed.), Vol. **I**, S. 90, Academic Press, New York 1955.
- ¹⁸ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 [1951].
- ¹⁹ H. Berndt u. H. G. Schlegel, Arch. Mikrobiol. **103**, 21 [1975].
- ²⁰ V. Oeding u. H. G. Schlegel, Biochem. J. **134**, 239 [1973].
- ²¹ R. K. Clayton, Bacterial Photosynthesis (H. Gest, A. San Pietro u. L. P. Vernon, Hrsg.), S. 495, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio 1963.
- ²² O. Vogel, H. Beikirch, H. Müller u. U. Henning, Eur. J. Biochem. **20**, 169 [1971].
- ²³ H. Bisswanger, Eur. J. Biochem. **48**, 377 [1974].
- ²⁴ H. Bisswanger u. U. Henning, Eur. J. Biochem. **24**, 376 [1971].
- ²⁵ L. J. Reed u. C. R. Willms, Methods in Enzymology (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan, Hrsg.), Vol. **IX**, S. 247, Academic Press, New York 1966.
- ²⁶ R. G. Hansen u. U. Henning, Biochim. Biophys. Acta **122**, 355 [1966].
- ²⁷ G. Palmer u. V. Massey, Biochim. Biophys. Acta **58**, 349 [1962].
- ²⁸ S. M. Shuster u. M. S. Olson, J. Biol. Chem. **249**, 7159 [1974].
- ²⁹ P. A. Ketchum u. S. C. Holt, Biochim. Biophys. Acta **196**, 141 [1970].
- ³⁰ T. C. Linn, F. H. Pettit u. L. J. Reed, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **62**, 234 [1969].
- ³¹ U. Wais, U. Gillmann u. J. Ulrich, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 1378 [1973].
- ³² G. Schön u. G. Drews, Arch. Mikrobiol. **61**, 317 [1968].