

N-Terminale Sequenz einer Porphobilinogen-Synthase*

N-Terminal Sequence of a Porphobilinogen-Synthase

Birgit Lingner und Traute Kleinschmidt

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, D-8033 Martinsried bei München

Z. Naturforsch. **38c**, 1059–1061 (1983); eingegangen am 10. Oktober 1983

Porphobilinogen-Synthase, N-Terminal Sequence

The N-terminal sequence of porphobilinogen-synthase (EC 4.2.1.24) from bovine liver up to position 44 is given. After tryptic hydrolysis two N-terminal peptides with identical amino acid composition were isolated in the ratio 1:1. One peptide was blocked whereas the other one started with methionine and showed the same primary structure which had been estimated by automatical degradation of the enzyme. Four of the eight subunits of PBG-S have free methionine as N-terminal amino acid whereas the other half is blocked.

Einleitung

Die Porphobilinogen-Synthase (EC 4.2.1.24) ist ein Enzym aus dem Biosyntheseweg der Porphyrine, das zwei Moleküle 5-Aminolävulinsäure zu Porphobilinogen kondensiert. Das aktive Enzym ist ein aus acht bisher als identisch geltenden Untereinheiten aufgebautes Oktamer mit einem Molekulargewicht von etwa 280000 [1]. Der N-Terminus der Untereinheiten vom Molekulargewicht 35 000 wurde als acetyliert beschrieben [2]. Unsere Untersuchungen zur Aufklärung der Primärstruktur von PBG-S aus Rinderleber bestätigen diesen Befund teilweise, zeigen aber auch, das 50% der Untereinheiten nicht blockiert sind.

Material und Methoden

PBG-S aus Rinderleber

Das Enzym wurde in Anlehnung an bereits beschriebene Methoden [3] im Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung isoliert.

Abkürzung: PBG-S, Porphobilinogen-Synthase (EC 4.2.1.24).

* Auszug Dissertation B. Lingner, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München, 1983.

Sonderdruckanforderungen an Dr. T. Kleinschmidt.

0341-0382/83/1100-1059 \$ 01.30/0

Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide

Das native Enzym wurde bei pH 11 beginnend bei Raumtemperatur 3,5 h mit TPCK-Trypsin gespalten. Nach Ausfällen einer Core-Fraktion bei pH 6,5 wurde der lösliche Anteil des tryptischen Hydrolysates an Sephadex G-25 in 0,1 M Essigsäure vorgetrennt. Die Isolierung der Peptide erfolgte durch Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie der Sephadex-Gipfel an LiChrosorb RP2 [4].

Analysen

Die Proben wurden 20 h bei 110 °C in 5,7 M HCl hydrolysiert und im Beckman-Analysator, Modell 121 C, analysiert.

Sequenz

Die Sequenzanalyse erfolgte ausschließlich durch automatischen Edman-Abbau nach der Filmtechnik, wofür Beckman-Sequencer der Typen 890 B und 890 C eingesetzt wurden. Die Polypeptidkette und das mit Reagenz IV [5] umgesetzte Peptid Tp2 wurden mit einem modifizierten Quadrolprogramm nach Edman und Begg [6] sequenziert. Bei der Sequenzierung von Tp1 fand die Kupplungsreaktion in 3-Diethylaminopropin [7] statt. Die Identifizierung der Phenylthiohydantoinderivate erfolgte durch Dünnschichtchromatographie [7] oder Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie [8].

Ergebnisse und Diskussion

Erste Untersuchungen zur Aufklärung der Primärstruktur der Porphobilinogen-Synthase aus Rinderleber ergaben, daß der N-Terminus der Untereinheiten nicht – wie bisher angenommen [2] – vollständig blockiert ist. Durch automatischen Edman-Abbau an der *nativen* Polypeptidkette konnten 29 Aminosäurereste identifiziert werden. Die mit Methionin beginnenden Ketten erwiesen sich als einheitlich mit der Ausnahme, daß in Position 2 neben Histidin auch Glutaminsäure gefunden wurde.

Aus dem löslichen Anteil des tryptischen Hydrolysates konnten durch Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie nach Vortrennung auf Sephadex G-25 in 1 M Essigsäure 18 Peptide in reiner Form isoliert und sequenziert werden (insgesamt 228 Reste). Unter diesen Peptiden war auch das N-terminale Peptid Tp1, das in drei Gipfeln A, B



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 digitized 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.

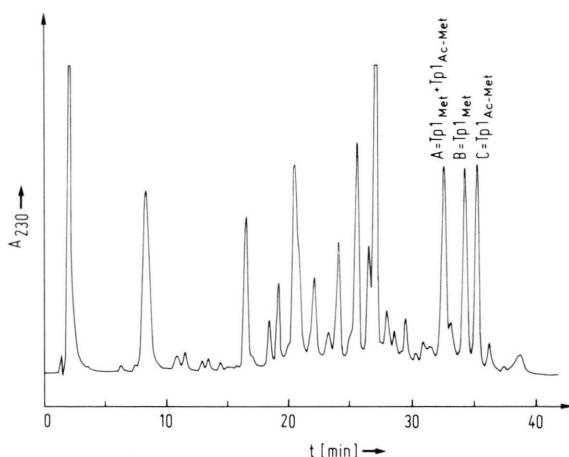


Abb. 1. Trennung der N-terminalen tryptischen Peptide durch Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie. Säule: 4,6 × 250 mm LiChrosorb RP2; Puffer: 50 mM Ammoniumacetat/Essigsäure, pH 6,0; linearer Gradient: 0–50% Acetonitril in 50 min; Durchfluß: 2 ml/min.

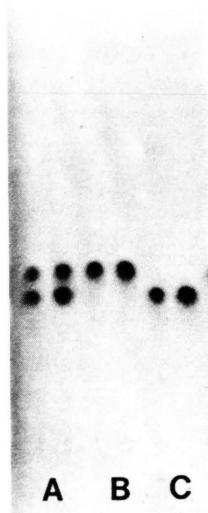


Abb. 2. Elektrophorese der N-terminalen tryptischen Peptide auf DC-Fertigplatten Cellulose bei pH 5,35. A = $\text{Tp1}_{\text{Met}} + \text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$; B = Tp1_{Met} ; C = $\text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$.

und C eluiert wurde (Abb. 1), die alle die gleiche Aminosäurezusammensetzung haben (Tab. I). Die elektrophoretische Untersuchung (Abb. 2) zeigte einen Ladungsunterschied für die Peptide der Gipfel B und C, der darauf schließen läßt, daß Gipfel B das Tp1_{Met} mit freiem N-Terminus und Gipfel C das $\text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$ enthält. Gipfel A erwies sich

als Mischung aus beiden Peptiden im Verhältnis 1:1. Die Detektion erfolgte mit einem Histidintest [9], da sich $\text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$ mit Ninhydrin nicht anfärben läßt. Tp1_{Met} konnte sequenziert werden und lieferte die schon an der Kette ermittelte Primärstruktur mit Histidin in Position 2, während ein Abbau von $\text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$ – wie zu erwarten – nicht möglich war. Beide Peptide lagen in gleicher Menge vor. Ein Peptid Tp1 mit Glutaminsäure anstelle von Histidin in Position 2 wurde nicht gefunden.

Unter den weiteren isolierten und sequenzierten Peptiden befand sich auch Tp2 , das durch die Überlappung mit Hilfe der Kettensequenz zugeordnet werden konnte. Abb. 3 zeigt die N-terminale Sequenz der PBG-S bis zur Position 44.

Die übrigen tryptischen Peptide wichen in ihrer Zusammensetzung und Sequenz stark voneinander

Tabelle I. Aminosäureanalysen der 3 HPLC-Gipfel von Tp1 und von Tp2 .

	$\text{Tp1}_{\text{Met}} +$ $\text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$	Tp1_{Met}	$\text{Tp1}_{\text{Ac-Met}}$	Tp2
Asp				4,50 (5)
Thr				3,00
Ser	2,11	1,94	1,96	2,76
Glu	1,09	1,09	1,08	1,12
Pro	2,11	1,85	2,08	1,96
Gly	1,16	1,09	1,04	
Ala				3,03
Val	1,11	1,01	1,05	1,99
Met	0,81	0,66	0,72	
Ile				1,86
Leu	3,09	2,94	2,90	2,23
Tyr	0,90	1,08	1,19	1,12
Phe	1,04	1,02	1,06	1,04
Trp				(1)
His	2,61	3,02	2,69	
Lys	0,93	0,97	0,93	0,93
Arg				

10
Met-His-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-His-Ser-Gly-Tyr-Phe-His-
 Tp1

20
Pro-Leu-Leu-Arg-Asn-Trp-Gln-Thr-Ala-Ala-Thr-Ser-Leu-
 Tp2

30
Ser-Ala-Ser-Asn-Leu-Ile-Tyr-Pro-Ile-Phe-Val-Thr-Asp-
40
Val-Pro-Asp-Asp-Lys-

Abb. 3. N-terminale Sequenz der PBG-S-Untereinheiten. 50% der Ketten sind blockiert. In Position 2 wurde beim Abbau der Ketten neben His auch Glu gefunden.

ab, was auf eine völlige oder zumindest weitgehende Identität der Primärstruktur von blockierten und nicht blockierten Ketten schließen läßt.

Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten darauf hin, daß vier der acht Untereinheiten der Porphobilinogen-Synthase einen freien, mit Methionin beginnenden N-Terminus haben, während die anderen vier blockiert sind, was eventuell mit der Tatsache in Zusammenhang steht, daß nur die

Hälften der Untereinheiten Substrat binden kann (Halbseiten-Reaktivität) [10].

Danksagungen

Herrn Professor Dr. G. Braunitzer und Herrn Dr. H. J. Zeitler danken wir für die Förderung dieser Arbeit, Herrn Professor Dr. W. Wilmanns für die wohlwollende Unterstützung.

- [1] D. Shemin, δ -Aminolevulinic Acid Dehydrase, in The Enzymes (P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, eds.), Vol. 7, S. 323, Academic Press, New York-London 1972.
- [2] M. Kreutzer, M. Schmidt, E. Stadler und H. J. Zeitler, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 1081 (1977).
- [3] M. Kreutzer, Dissertation, Technische Universität München 1978.
- [4] H. Kratzin, C. Yang, J. U. Krusche und N. Hilschmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **361**, 1591 (1980).
- [5] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Ruhfus, S. Petersen und U. Petersen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 1730 (1971).
- [6] P. Edman und G. Begg, Eur. J. Biochem. **1**, 80 (1967).
- [7] G. Braunitzer, B. Schrank, A. Stangl und U. Scheithauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 137 (1978).
- [8] C. L. Zimmermann und J. J. Pisano, Methods Enzymol. **47**, 45 (1977).
- [9] H. Frank und H. Petersen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **299**, 1 (1955).
- [10] D. Shemin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, **273**, 109 (1976).