

## Ein neues Isolierungsverfahren für Schweinenierenacylase. Kinetik des $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ und $\text{Cd}^{2+}$ -enzymen

### A New Isolation Procedure for Acylamino Acid Amidohydrolase. Kinetics of the $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ and $\text{Cd}^{2+}$ Enzyme

Ingrid Gilles, Hans-Gerd Löffler und Friedhelm Schneider

Institut für Physiologische Chemie II der Universität Marburg, Lahnberge, D-3550 Marburg

Z. Naturforsch. **39c**, 1017–1020 (1984);  
received June 18/July 13, 1984

Acylamino Acid Amidohydrolase, Isolation, Metall Ion Exchange, Kinetics

A new procedure for the isolation of highly purified acylamino acid amidohydrolase from hog kidney is described which allows the preparation of the enzyme with a recovery of about 45%, a 200 fold purification and a spec. activity of 350–500 U. The essential  $\text{Zn}^{2+}$  of the enzyme was exchanged for  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ , and the kinetic parameters  $K_M$ ,  $k_{\text{cat}}$  and  $k_{\text{cat}}/K_M$  of the different enzyme species for a series of acetyl-L-amino acids were determined.

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über ein neues Präparationsverfahren für Acylamino-säureamidhydrolase aus Schweineniere; dieses Verfahren liefert in wenigen Schritten ein hochreines Enzympräparat, das unter Einsatz relativ schonender Methoden erhalten wird und eine höhere spezifische Aktivität aufweist als alle bisher beschriebenen Präparate. In einer früheren Arbeit haben wir gezeigt, daß Acylaminosäureamidhydrolase aus Schweineniere ein Metalloenzym ist, das pro Enzymmolekül zwei essentielle  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen enthält, die durch Dialyse gegen Komplexbildner unter Inaktivierung des Enzyms entfernt werden können [1]. Reaktivierung des Enzyms ist möglich durch  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$ , wobei mit  $\text{Co}^{2+}$  mit den meisten Substraten eine höhere Aktivität erreicht wird als mit  $\text{Zn}^{2+}$ . In der vorliegenden Arbeit setzen wir diese Untersuchungen fort und berichten über Reaktivierungsexperimente mit  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  sowie einen Vergleich der kinetischen Parameter des mit verschiedenen Metallionen reaktivierten Enzyms für eine Serie von Acyl-L-Aminosäuren.

Reprint requests to Prof. Dr. Fr. Schneider.  
0341-0382/84/0900-1017 \$ 01.30/0

## Enzympräparation

### Herstellung eines Rohhomogenats

Rindengewebe von Schweinenieren wird im Verhältnis 1:4 mit einem 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,3, versetzt und 1 min im Ultraturax homogenisiert; beim Homogenisieren werden pro 100 ml Homogenat 1,00 ml PMSF (Serva, Heidelberg) und 0,1 ml Trasylol-Lösung (4000 Kallikrein-inaktivatoreinheiten) (Bayer, Leverkusen) zugesetzt. Das Rohhomogenat wird in Portionen aufgeteilt und 1 min gepottert, danach bei Bedarf im Methanolbad bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren und im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

### Hitzeschritt

Rohhomogenat wird in lauwarmem Wasser aufgetaut und in der Kühlzentrifuge 10 min bei 9000 Upm zentrifugiert. Nach Zugabe von 10% v/v 3 M KCl-Lösung wird das eiskalte Homogenat in dünnwandige 10 ml Zentrifugengläser überführt und innerhalb von 2 min in einem Wasserbad von  $80^\circ\text{C}$  ohne Rühren unter Thermometerkontrolle auf  $75^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach schnellem Abkühlen auf  $0^\circ\text{C}$  wird bei 9000 Upm in der Kühlzentrifuge innerhalb 10 min das ausgefallene Protein abgetrennt.

### Ammoniumsulfatfällung

100 ml der nach dem Hitzeschritt erhaltenen Lösung werden innerhalb 1 Std. bis zu 30% Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt; der inaktive Niederschlag wird in der Kälte abzentrifugiert und bei 45% Sättigung das aktive Protein mit Ammoniumsulfat gefällt. Das abzentrifugierte Enzym wurde in 5 ml Puffer (0,05 M Phosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,3) gelöst und über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert.

### Gelfiltration

Eine mit Fractogel TSK HW-55F (Merck, Darmstadt) gefüllte Säule ( $750 \times 26$  mm) wurde mit Puffer (0,05 M Phosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,3) äquilibriert. Das im selben Puffer gelöste Enzym wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 60 ml/Std. über die Säule filtriert und das Eluat in 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Filtration findet bei  $5^\circ\text{C}$  statt.

### Chromatographie an Phenylsepharose

Eine Phenylsepharose-Säule ( $150 \times 26$  mm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) wird mit Phosphatpuffer



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.

(0,05 M Phosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,3) äquilibriert, mit den vereinten aktiven Fraktionen der Gelfiltration beschickt und mehrere Std. mit demselben Puffer gespült, bis kein Protein mehr eluiert wurde. Die Entwicklung der Säule und Elution des Enzyms erfolgte mit einem von 0–50% linear ansteigenden Gradienten von Ethylenglykol innerhalb von etwa 8 Std. Das aktive Enzym wurde zwischen 40–50% Ethylenglykol eluiert.

#### Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung im kontinuierlichen Test erfolgte mit Chloracetyl-alanin [2] als Substrat; die Hydrolyse wurde in einem 0,1 M Phosphat/Boratpuffer, pH 8,3 bei 40 °C im Zeiss PMQ II bei 238 nm verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient des Substrats bei 238 nm beträgt  $185 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Die Aktivitätsbestimmung mit Acetylaminosäuren erfolgte im diskontinuierlichen Test mit *o*-Phthalaldehyd-Reagenz [3]. Die entnommenen Proben wurden ohne Vorverdünnung mit 2,5 ml *o*-Phthalaldehyd-Reagenz in der Küvette gemischt und nach 30 s die Absorption bei 340 nm gemessen.

#### Herstellung des metallfreien Enzyms

Enzymlösung wird über Nacht gegen 1 mM Phenanthrolin in 20 mM Ammonacetatpuffer pH 7,5 dialysiert, danach 3 mal gegen Ammonacetat ohne Phenanthrolin. Alle für den Aktivitätstest verwendeten Lösungen wurden mit Chelex 100 (Bio-Rad, Richmond, USA) von Metallen befreit, der pH-Wert der Lösungen wurde nachgestellt. Nach der Dialyse zeigte das Enzym ohne Zusatz von Metallionen keine Aktivität.

#### Ergebnisse und Diskussion

Die bisherigen Verfahren zur Isolierung und Reinigung der Acylase schlossen eine Säurefällung und Ionenaustauschchromatographie ein, beides Schritte, die das Enzym nach unseren Erfahrungen nicht gut verträgt. Das hier vorgestellte Verfahren verwendet an deren Stelle eine Hitzefällung, Chromatographie an Fractogel und Phenylsepharose. Die Fractogelfiltration und die Chromatographie an Phenylsepharose sind im wesentlichen frei von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägermaterial. Das Enzym wird selbst bei

relativ niedrigen Ionenstärken sehr fest an Phenylsepharose gebunden; wir nehmen an, daß eine Mischung von hydrophoben Wechselwirkungen und Affinitätsbeziehungen an der Bindung beteiligt sind. Unter 40% Ethylenglykol wird daher keine Enzymaktivität eluiert; diese hohe Konzentration an Ethylenglykol wird von dem Enzym nicht nur problemlos vertragen sondern erweist sich auch als besonders geeignet zur Aufbewahrung. So kann man Acylase in einer Lösung von 50% Ethylenglykol bei Zimmertemperatur über Tage ohne Aktivitätsverlust stehen lassen. Zur Entfernung des Ethylenglykols wird gegen Puffer ausreichender Ionenstärke dialysiert; dabei sollte ein Wert von 0,2 M nicht unterschritten werden, da das Enzym bei Ionenstärken  $< 0,2 \text{ M}$  rasch seine Aktivität verliert.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Reinheitsprüfung zeigt Abb. 1. Die Banden unterscheiden sich durch eine größere Schärfe von denen der nach früheren Verfahren isolierten Enzympräparate.

Reaktivierung des metallfreien inaktiven Enzyms durch  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ .

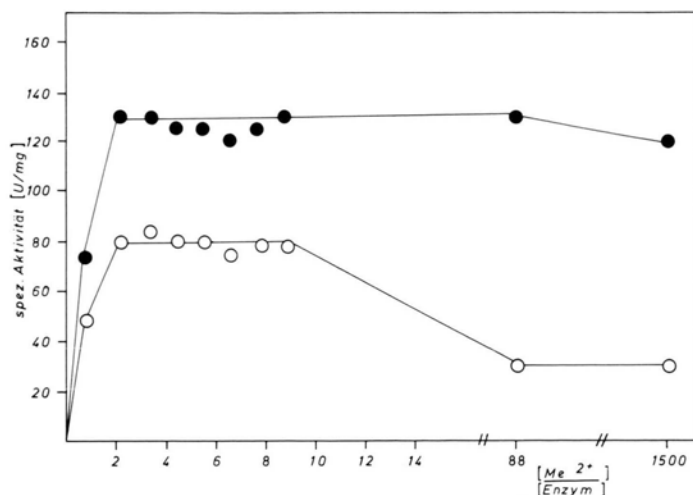
Das durch Dialyse gegen Phenanthrolin inaktivierte Enzym läßt sich durch Zugabe von Metallionen reaktivieren. Die Beziehungen zwischen der Enzymaktivität und dem molaren Verhältnis von Enzym zu Metallionen für  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  sind in Abb. 2 wiedergegeben. Dieses Diagramm läßt erkennen, daß zur maximalen Reaktivierung 2 Metallionen pro Enzymmolekül erforderlich sind; die Aktivität des  $\text{Co}^{2+}$  Enzyms mit Chloracetylalanin als Substrat ist höher als die des  $\text{Zn}^{2+}$  Enzyms.



Abb. 1. Platten-Disk-Elektrophorese nach Maurer [5], Gelsystem Nr. 1, Trennstrecke 10 cm. Aufgetragen wurden verschiedene Fraktionen der Phenylsepharosesäule (bis zu 130 µg Protein). Die Fraktionen 8 und 9 entstammen einem zweiten Aktivitäts- und Protein-peak, der stets noch ein zweites inaktives Protein enthält.

Tab. I. Kinetische Parameter der  $\text{Zn}^{2+}$ -,  $\text{Co}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Acylase für verschiedene Acetyl(N-A)-L-Aminosäuren.

Substrat	$K_m \times 10^3$ [mol/l]	$k_{\text{cat}} \cdot 10^{-3}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \cdot 10^{-3}$ [l · mol <sup>-1</sup> · sec <sup>-1</sup> ]	Metallion	Bestimmtheitsmaß <sup>a</sup>
N-Ac-L-Leu	34,8 ± 0,7	5,4	155	$\text{Zn}^{2+}$	0,99
N-Ac-L-Ala	82,1 ± 20	7,3	90	$\text{Zn}^{2+}$	1,0
N-Ac-L-Phe	10,3 ± 3	0,19	20	$\text{Zn}^{2+}$	0,97
N-Ac-L-Met	3,9 ± 0,7	13,0	3327	$\text{Zn}^{2+}$	0,98
N-Ac-L-Leu	20,4 ± 3	20,4	983	$\text{Co}^{2+}$	1,0
N-Ac-L-Ala	8,6 ± 0,9	6,9	823	$\text{Co}^{2+}$	1,0
N-Ac-L-Phe	30,3 ± 4	1,5	50	$\text{Co}^{2+}$	0,94
N-Ac-L-Met	4,0 ± 0,2	9,4	2343	$\text{Co}^{2+}$	0,99
N-Ac-L-Leu	13,8 ± 5	1,46	106	$\text{Ni}^{2+}$	1,00
N-Ac-L-Ala	7,3 ± 0,6	0,24	32,9	$\text{Ni}^{2+}$	0,99
N-Ac-L-Phe	24,4 ± 3	0,053	2,2	$\text{Ni}^{2+}$	0,89
N-Ac-L-Met	3,7 ± 0,07	1,86	503	$\text{Ni}^{2+}$	0,99
N-Ac-L-Leu	9,8 ± 2	0,57	58,3	$\text{Mn}^{2+}$	0,96
N-Ac-L-Ala	6,9 ± 0,5	0,14	20,3	$\text{Mn}^{2+}$	0,99
N-Ac-L-Phe	44,2 ± 4	0,077	1,7	$\text{Mn}^{2+}$	0,82
N-Ac-L-Met	4,9	1,10	222,1	$\text{Mn}^{2+}$	0,98
N-Ac-L-Leu	50,9 ± 10	0,16	3,2	$\text{Cd}^{2+}$	0,96
N-Ac-L-Ala	34,5 ± 4	0,103	3,0	$\text{Cd}^{2+}$	0,94
N-Ac-L-Phe	68,6 ± 5	0,024	0,35	$\text{Cd}^{2+}$	0,93
N-Ac-L-Met	4,0 ± 0,6	0,79	195,1	$\text{Cd}^{2+}$	0,95

<sup>a</sup> lineare regression.Abb. 2. Beziehung zwischen Enzymaktivität und molarem Metallion/Enzym Verhältnis für  $\text{Zn}^{2+}$  —○— und  $\text{Co}^{2+}$  —●—. Substrat Chloracethyl-L-alanin. Enzymkonzentration 0,5 mg/ml = 5,8  $\mu\text{M}$  ( $M_r = 86\,000$ ).

Diese Befunde stützen die aus früheren Experimenten gewonnene Erkenntnis [4], daß das Enzym zwei aktive Zentren besitzt. Das Diagramm zeigt ferner, daß die Enzymaktivität gegen steigende  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen empfindlicher ist als gegen steigende  $\text{Co}^{2+}$ -Konzentrationen.

Reaktivierung des metallfreien Proteins ist nicht nur mit  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  möglich sondern auch mit

$\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ .  $K_M$ ,  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Werte des durch verschiedene Metallionen aktivierten Enzyms für eine Auswahl von Substraten sind in Tab. I zusammengefaßt.  $k_{\text{cat}}/K_M$  ist ein Maß für die relative Substratspezifität bzw. für die Präferenz eines Enzyms für ein bestimmtes Substrat. Aus den Werten dieser Tabelle sind folgende Schlüsse zu ziehen: Mit Ausnahme von Acetyl-L-methionin

werden die untersuchten Substrate vom  $\text{Co}^{2+}$  Enzym mit höherer Aktivität umgesetzt als vom  $\text{Zn}^{2+}$  Enzym. Acetyl-L-methionin ist für alle Enzyme das beste Substrat.  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/K_M$  für dieses Substrat nehmen in der Reihenfolge  $\text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ -Enzym ab; für Acetyl-L-Leucin, Acetyl-

L-alanin und Acetyl-L-phenylalanin lautet die Reihenfolge  $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ . Für jedes der Metalloenzyme werden die Substrate mit abnehmender Geschwindigkeit in folgender Reihenfolge Acetyl-Met  $>$  -Leu  $>$  -Ala  $>$  -Phe umgesetzt.

- [1] W. Kördel u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **32 c**, 342–344 (1977).
- [2] S. M. Birnbaum, L. Levintow, R. Kingsley u. J. P. Greenstein, J. Biol. Chem. **194**, 455–470 (1952).
- [3] V. J. Svedas, J. Galaev, J. L. Borisov u. J. V. Berezin, Anal. Biochem. **101**, 188–195 (1980).
- [4] W. Kördel u. Fr. Schneider, Biochim. Biophys. Acta **445**, 446–447 (1976).
- [5] H. R. Maurer, Disc. Electrophoresis and related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin 1971.