

Aus der Abteilung für Enzymchemie
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. G.F. Domagk)
des Physiologisch-Chemischen Institutes
der Georg-August-Universität zu Göttingen
(Direktor: Professor Dr. rer. nat. K. Jungermann)

EIN BEITRAG ZUR KLÄRUNG DER QUARTÄRSTRUKTUR DER
GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (EC 1.1.1 .49)
AUS CANDIDA UTILIS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jochen Lengerke
aus
Braunschweig
Göttingen 1980

Dekan: Prof. Dr. med. A. Gregl

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G.F. Domagk

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Seidel

III. Berichterstatter: /

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1982

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Benutzte Reagenzien	4
2.2.	Verwendete Geräte	6
2.3.	Methoden	7
2.3.1.	Bestimmung der Enzymaktivität	7
2.3.2.	Bestimmung_des_Proteins	8
2.3.2.1.	Biuret-Methode	8
2.3.2.2.	Lowry-Methode	9
2.3.2.3.	UV-Messung	9
2.3.3.	Enzympräparation	9
2.3.3.1.	Erste Methode (siehe 3.1.1.)	9
2.3.3.1.1.	Herstellung des Lebedev-Saftes	10
2.3.3.1.2.	Entfernung der Nucleinsäuren	10
2.3.3.1.3.	Chromatographie an Phospho-Zellulose	10
2.3.3.1.4.	Ammoniumsulfat-Fällung	10
2.3.3.1.5.	Chromatographie an CM-Sephadex	11
2.3.3.1.6.	Affinitätschromatographie_an_ADG-Sepharose	11
2.3.3.2.	Zweite_Methode (siehe 3.1.2.)	11
2.3.3.2.1.	Herstellung des Lebedev Saftes	11
2.3.3.2.2.	Entfernung_der_Nucleinsäuren	11
2.3.3.2.3.	Affinitätschromatographie an Blue-Gel	11
2.3.3.2.4.	Affinitätschromatographie an ADG-Sepharose	11
2.3.4.	Polyacrylamid-Elektrophorese	12
2.3.5.	SDS-Elektrophorese	14
2.3.6.	Radioaktive Markierung der G-6-P-DH	15
3.	ERGEBNISSE	16
3.1.	Isolierung der G-6-P-DH	16
3.1.1.	Isolierung_der_G-6-P-DH_nach_Chilla_modifiziert	16
3.1.2.	Isolierung_mit_zwei_Affinitätschromatographie-Schritten	17
3.2.	Untersuchung der Hemmbarkeit der G-6-P-DH durch Pyridoxal-5-Phosphat	18
3.3.	Untersuchungen zur Struktur der G-6-P-DH	23

3.3.1.	Elektrophorese in Polyacrylamidgel	23
3.3.2.	SDS-Elektrophorese	24
3.4.	Radioaktive Markierung der G-6-P-DH	27
4.	DISKUSSION	29
5.	ZUSAMMENFASSUNG	31
6.	LITERATURVERZEICHNIS	32

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosinbisphosphat
°C	Grad Celsius
(E)	Enzymkonzentration
E ₃₆₆	Extinktion bei 366 nm Wellenlänge
ΔE	Extinktionsänderung
g	Gramm
xg	x Erdbeschleunigung (9.81 m/sec ²)
G-6-P	D-Glucose-6-Phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
(I)	Inhibitorkonzentration
K _i	Dissoziationskonstante für Enzym und Inhibitor
K _S	Dissoziationskonstante für Enzym und Substrat
l	Liter
M	Molarität, Mol pro Liter
Min	Minute
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH ₂	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PALP	Pyridoxal-5-phosphat
PH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen Konzentration
(S)	Substratkonzentration
SDS	Natriumduodecylsulfat
TEA	Triäthanolamin
Tris-Puffer	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan Puffer
1 U	1 internationale Einheit
v	Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
Ø	Durchmesser

1. EINLEITUNG

Glucose wird im tierischen Organismus zum größten Teil über den Weg der Glykolyse abgebaut. Eine wichtige Alternative zu diesem Stoffwechselweg ist der Pentosephosphat-Cyclus. Als ersten Schritt dieses Cyclus katalysiert die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) die reversible⁽¹⁷⁾ Oxidation von D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) zu D-Glucono-6-Lakton-6-Phosphat, welches dann spontan oder mittels einer Laktonase in 6-Phosphogluconat übergeht. Bei der Dehydrierung fungiert Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP) als Wasserstoff-acceptor.

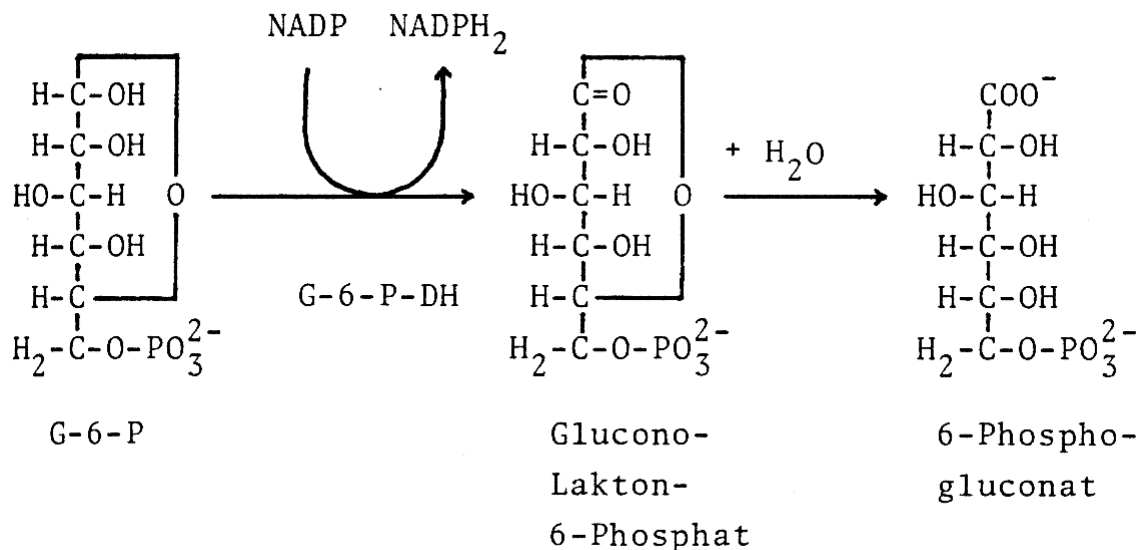


Abb. 1: Die ersten Schritte des Pentosephosphat-Cyclus

Das 6-Phosphogluconat wird durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, wiederum mittels NADP, in das labile 3-Keto-6-Phosphogluconat überführt, welches seinerseits unter Decarboxylierung spontan in D-Ribulose-5-phosphat übergeht. Die Hauptbedeutung dieses oxidativen Teils des Pentosephosphat-Cyclus liegt in der Bereitstellung von NADPH-, welches als Co-faktor für reduzierende (Biosynthese von Fettsäuren, Steroiden) und oxidative Prozesse (Oxygenasen) benötigt wird.

Wenn im menschlichen Blut G-6-P-DH nicht ausreichend oder in abartigen Varianten vorhanden ist, so ergibt sich ein typisches Krankheitsbild. Es handelt sich mit mehr als 100 Millionen Genträgern um eine der häufigsten Erbkrankheiten. Daher sind G-6-P-DH-Varianten Gegenstand intensiver Forschung. Sie werden häufig nach dem Ort ihres ersten Auftretens benannt, zum Beispiel G-6-P-DH Bielefeld(13), G-6-P-DH Hamburg(14).

Das Krankheitsbild des G-6-P-DH-Mangels unterstreicht die Bedeutung dieses Enzyms: Eine niedrige Enzymaktivität in den Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten bedingt einen Mangel an NADPH-, wodurch die Glutathionreduktion nicht in ausreichendem Maße ablaufen kann. Durch den Mangel an reduziertem Glutathion sind essentielle SH-Gruppen nicht mehr ausreichend gegen Oxidationsprozesse geschützt. Das Hämoglobin wird daher nach Einnahme von zahlreichen Medikamenten, die Radikale bilden, zu Heinzschen Innenkörpern denaturiert. Die Erythrozyten lösen sich auf oder werden im Retikuloendotheliales System sequestriert. Die Folgen sind schwere hämolytische Krisen mit Milzvergrößerung, eine schnell einsetzende Anämie mit zahlreichen Innenkörpern in den Erythrozyten, Subikterus und in schweren Fällen auch ein Nierenschocksyndrom(31,32).

Warburg und Christian entdeckten die G-6-P-DH zuerst in Pferdeerythrozyten(33,34) und später in anderen Materialien, unter anderem in Bierhefe(36). Sie waren es auch, die erkannten, daß NADP für die Reaktion notwendig ist(35,36) und daß diese "dialysierbare, hitzestabile Cozymase" in ihrer oxidierten und reduzierten Form unterschiedliche Absorptionsspektren aufweisen. Diese Tatsache ist Grundlage für den heute fast universell angewendeten "optischen Test"(30).

Erst 1961 wurde G-6-P-DH von Noltmann in homogener Form aus Bierhefe isoliert(24). Inzwischen ist das Enzym aus zahlreichen Tiergeweben und Mikroorganismen gewonnen worden. 1973 veröffentlichten Chilla und Mitarbeiter ein Verfahren zur Anreicherung der G-6-P-DH aus *Candida utilis*, das in guter Ausbeute einfach und schnell zur Enzymkonzentrierung und -kristallisation führt(7).

Wie verschiedene andere Enzyme ist G-6-P-DH in einer Quartärstruktur organisiert, das heißt es treten mehrere Untereinheiten zu einer Funktionseinheit zusammen. In den meisten rein dargestellten G-6-P-DH Präparaten wurden identische Untereinheiten gefunden⁽²⁰⁾. Domagk, Chilla und Doering fanden jedoch in der G-6-P-DH aus *Candida utilis* zwei Untereinheit-Typen, die sich eindeutig in ihrem Molekulargewicht unterschieden⁽⁸⁾.

Ziel dieser Arbeit ist es, dieses aus der Reihe fallende Ergebnis genauer zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Benutzte Reagenzien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
ADP-Sepharose	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chymotrypsinogen A	Boehringer, Mannheim
CM-Sephadex	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Coomassie Blue	Bayer, Leverkusen
DEAE-Sephadex A-50	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
2,5 Diphenyloxazol	Merck, Darmstadt
Polin Cioalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Gel Blue A Matrex	Amicon, Massachusetts, USA
Glucose-6-Phosphat	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Mann Research Laborato- ries, New York, USA
³ H Borhydrid	Buchler-Amersham, Braun- schweig
Kaliumnatriumtartrat	Merck, Darmstadt
Malonat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoäthanol	Schuchardt, München
N,N1-Methylen-bis-acrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumduodecylsulfat (=SDS)	Merck, Darmstadt
Nicotinamidadenindi- nucleotidphosphat	Boehringer, Mannheim
p-Nitroblautetrazolimchlorid	Serva, Heidelberg
Ovalbumin	Sigma, St. Louis, USA
Phenazinmethosulfat	Serva, Heidelberg
Phospho-Zellulose	Serva, Heidelberg
Protaminsulfat	Sigma, St. Louis, USA
Pyridoxal-5-Phosphat	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Behring, Marburg

Röntgenfilm Curix,	Afga Gevaert
RP1 Gevat, Polyester Base	
N,N,N',N' Tetramethyl-	Serva, Heidelberg
äthylendiamin	
Triäthanolamin	Merck, Darmstadt
Tris(-hydroxymethyl)-	Merck, Darmstadt
aminomethan	
Toryla Hefe YCU 566-7440	Sigma, St. Louis, USA

2.2. Verwendete Geräte

Photometer

Beckmann Spektralphotometer, Modell 24;
Beckmann, München

Eppendorf Filterphotometer mit temperiertem Küvettenhalter und Kompensationsschreiber;
Netheler und Hinz GmbH, Hamburg

Isco UA5 Absorbance Monitor;
Isco, Lincoln, Nebraska, USA

Zentrifugen

Laborzentrifuge UJ2, Zeta 20;
Christ, Osterode/Harz

Sorvall Superspeed Centrifuge SS1;
Sorvall, Newton, Connecticut, USA

Fraktionssammler

Minirac 17.000;
CKB, Bromma, Schweden

pH-Meter

Knick Digital pH-Meter;
Knick, Berlin

PHM 62 Radiometer;
PHM, Kopenhagen, Dänemark

Elektrophorese

Aldophor Plattenelektrophorese;
Schutt, Göttingen

LKB 2103 Power supply;

CKB, Bromma Schweden

2.3. Methoden

2.3.1. Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivität der G-6-P-DH wurde mittels des optischen Tests bestimmt. Wie schon einleitend erwähnt, geht er auf Otto Warburg zurück. Der Test macht sich zunutze, daß NADPH ein Absorptionsmaximum bei 340 nm hat, während die oxidierte Form, nämlich NADP, keine Absorption zwischen 300 und 400 nm zeigt.

In dieser Arbeit wurde bei 366 nm gemessen. Für die Berechnungen wurde ein Extinktionskoeffizient von $3,4 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ eingesetzt⁽⁴⁾. Eine G-6-P-DH-Einheit (= 1 U) ist nach internationaler Übereinkunft als diejenige Aktivität festgesetzt, die 1 μmol G-6-P in 1 min unter Standardbedingungen umsetzt. Aus stöchiometrischen Erwägungen ist offensichtlich, daß pro μmol G-6-P, das umgesetzt wird, 1 μmol NADPH₂ anfällt.

Die Extinktionsänderung als Maß für das anfallende NADPH₂ wurde in einer 1 ml-Küvette mit 1 cm Schichtdicke mittels Photometer und Schreiber ermittelt. Die Küvette enthielt 1 ml G-6-P-DH Standardgemisch mit einer Temperatur von 25°C bestehend aus:

0,95 ml 0,1 M TEA-Puffer, pH 7,6/10 mM Mg Cl₂

0,02 ml 20 mM NADP

0,03 ml 20 mM G-6-P

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe des Enzyms.

Die Aktivität bei den Hemmversuchen wurde analog ermittelt:

Hochgereinigte G-6-P-DH wurde mit verschiedenen Mengen 20 mM G-6-P und 10 mM PALP versetzt und mit 0,1 M TEA-Puffer, pH 7,6/10 mM Mg Cl₂ auf 0,98 ml aufgefüllt und 10 min bei 25 °C inkubiert. Hier wurde die Reaktion mit 20 µl 20 mM NADP gestartet und dann sofort anhand der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 366 nm verfolgt.

2.3.2. Bestimmung des Proteins

2.3.2.1. Biuret-Methode

Biuret-Reagenz bildet mit Peptidbindungen einen Farbkomplex, dessen Extinktionsmaximum bei 546 nm liegt (Beisenherz et al.⁽³⁾)

Die Proteinproben wurden auf 1 ml mit H₂O aufgefüllt. Nach Zugabe von 0,15 ml 50 % Trichloressigsäure fällt das Protein aus. Es wurde bei 2.000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5 ml Biuret-Reagenz gelöst und 10 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde die Extinktion gemessen und diese mittels Eichkurve auf die Proteinmenge bezogen.

Biuret-Reagenz:

9 g Kaliumnatriumtartrat, 3 g Kupfersulfat und 5 g Kaliumjodid werden nacheinander in 1.000 ml 0,2 M Natronlauge gelöst. Das Reagenz ist lichtempfindlich.

2.3.2.2. Lowry-Methode

Diese empfindliche Methode der Proteinbestimmung geht auf Lowry zurück⁽²²⁾. Der Proteinniederschlag wird wie bei der Biuret-Methode gewonnen. Diesem Präzipitat wurden 5 ml der folgenden frisch angesetzten Lösung hinzugegeben:

3 % Na ₂ CO ₃ in 0,1 M NaOH	100 ml
2 % K-Na-Tartat	2 ml
1 % CuSO ₄ x 5H ₂ O	2 ml

Nach Schütteln wurden die Proben 10 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann mit 0,15 ml Folin-Cioaltes-Reagenz versetzt. Nach 20 min Inkubation bei 20 °C wurde die Extinktion bei 546 nm und 1 cm Schichtdicke abgelesen. Der Proteingehalt wurde wiederum mittels einer Eichkurve berechnet.

2.3.2.3. UV-Messung

Es wurden die Extinktionen bei 1 cm Schichtdicke und 260 bzw. 280 nm gemessen. Mittels eines Nomogramms, das auf Warburg und Christian⁽³⁵⁾ zurückgeht, wurde der Proteingehalt bestimmt.

2.3.3. Enzympräparation

2.3.3.1. Erste Methode (siehe 3.1.1.)

2.3.3.1.1. Herstellung des Lebedev-Saftes

Ausgangsmaterial war ein Handelspräparat getrockneter *Candida utilis*. 250 g dieser Hefe wurden mit 1.250 ml 50 mM Tris HCl-Puffer pH 7,5 bei 37°C autolysiert. Nach 4 Stunden wurde die Suspension 25 min lang bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Oberstand bildet den Lebedev-Saft. Rührt man das Präzipitat noch einmal mit dem Tris-Puffer auf und zentrifugiert ein zweites Mal, so läßt sich die Ausbeute um etwa 10 % steigern.

2.3.3.1.2. Entfernung der Nucleinsäuren

Dem so gewonnenen Rohextrakt wurden 90 mg Protaminsulfat pro 10g Hefe als 2 %-ige wässrige Lösung tropfenweise unter ständigem Rühren zugesetzt. Um die vollständige Ausfällung der Nucleinsäuren zu gewährleisten, wurde der Rohextrakt mit dem Protaminsulfat 5 min im Eisbad belassen. Anschließend wurde 30 min bei 15.000 x g zentrifugiert und der Niederschlag verworfen.

2.3.3.1.3. Chromatographie an Phospho-Zellulose

Phospho-Zellulose wurde mit 0,25 M Na-acetat, pH 6,3, gewaschen. 600 ml der feuchten Phospho-Zellulose wurden mit dem Überstand aus dem Protaminsulfat-Schritt versetzt und über Nacht langsam bei 4°C gerührt. Um eine gute Adsorption zu erreichen, war der Überstand auf pH 6,2 eingestellt worden. Gewaschen wurde auf einer Nutsche mit 0,25 M Na-acetat, pH 6,3, bis E_{280} der Waschflüssigkeit niedriger als 0,100 war. Anschließend wurde das Material in eine Säule, 0 50 mm, gegossen und mit 0,2 M Ammoniumsulfat in 0,2 M KPO_4 , pH 6,5 fraktioniert eluiert. Die G-6-P-DH enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

2.3.3.1.4. Ammoniumsulfat-Fällung

Das Eluat der Phospho-Zellulose wurde durch langsame Zugabe von Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren bei 4°C auf eine Sättigung von 75 % gebracht. Dann wurde 40 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 10 mM Malonat, pH 6,0, gelöst und anschließend gegen denselben Puffer dialysiert.

2.3.3.1.5. Chromatographie an CM-Sephadex

Das Dialysat wurde auf eine CM-Sephadex-Säule (5 x 30 cm) aufgetragen und mit 10 mM Malonat, pH 6,0, gewaschen, bis E₂₈₀ unter 0,015 abgesunken war. Das Photometer war gegen den Malonatpuffer geeicht worden. Die fraktionierte Elution erfolgte mittels eines linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M im oben beschriebenen Malonatpuffer. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit 50 mM Tris HCl, pH 7,5, auf 1 l verdünnt.

2.3.3.1.6. Affinitätschromatographie an ADP-Sepharose

Das verdünnte Eluat vom CM-Sephadex wurde auf eine ADP-Sepharose-Säule (0,9 x 10 cm) gezogen und anschließend mit 2 Bettvolumen 50 mM Tris HCl, pH 7,5, gewaschen. Eluiert wurde mit 0,4 mM NADP im Tris HCl-Puffer, pH 7,5.

2.3.3.2. Zweite Methode (siehe 3.1.2.)

2.3.3.2.1. Herstellung des Lebedev Saftes

Es wurde wie in 2.3.3.1.1. vorgegangen. Lediglich der Puffer wurde dem Blue-Gel angepaßt. Das heißt, es wurde 20 mM Tris HCl, pH 6,4, verwendet.

2.3.3.2.2. Entfernung der Nucleinsäuren

siehe 2.3.3.1.2.

2.3.3.2.3. Affinitätschromatographie an Blue-Gel

Der von Nucleinsäuren befreite Rohextrakt wurde auf eine Blue-Gel-Säule (1,5 x 10 cm) gegeben. Die Säule wurde mit 20 mM Tris HCl, pH 6,4, / 0,5 M NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1,2 M NaCl im gleichen Puffer.

2.3.3.2.4. Affinitätschromatographie an ADP-Sepharose

Das Eluat des Blue-Gels wurde durch Dialyse auf 0,1 M Tris HCl-Puffer, pH 7,6, eingestellt und dann auf die ADP-Sepharose-Säule (0,9 x 10 cm) gegeben. Eluiert wurde mit 0,4 mM NADP in 0,1 M Tris HCl, pH 7,6.

2.3.4. Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden grundsätzlich als Plattenelektrophoresen durchgeführt. Das eigentliche Trenngel wurde mit einem Sammelgel, das sich in pH und Dichte vom Trenngel unterscheidet, überschichtet. In vorgeformte Aussparungen dieses Sammelgels wurden die Proteinproben gegeben.

Trenngel:

1) 1,4 M Tris HCl, pH 8,9	7,5 ml
2) 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N1 Methylenbisacrylamid	7,5 ml
3) Wasser	15 ml
4) Tetramethyläthylendiamin	40 µl
5) 5 % Ammoniumpersulfat	0,4 ml

Sammelgel:

1) 1,2 M Tris HCl, pH 6,7	0,5 ml
2) 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N' Methylenbisacrylamid	1 ml
3) Wasser	8 ml
4) Tetramethyläthylendiamin	10 µl
5) 5 % Ammoniumpersulfat	0,2 ml

Laufpuffer:

30 mM Tris/190 mM Glycin pH 8,55

Proteinproben:

Proteinlösung in Wasser	60 µl
25 mM Tris HCl, pH 6,8/0,54 M Glycerin	20 µl
0,04 % Bromphenolblau	5 µl

Die Auftragungsmenge dieser Proben - bis zu 40 µl sind möglich richtet sich wie das Proteinlösung-Wasser Verhältnis nach der Proteinkonzentration der zu untersuchen- den Lösung. Es wurden, je nach Anzahl der erwarteten Ban- den, 5 bis 20 µg Protein eingesetzt.

Die durch einen U-förmig eingelegten Siliconschlauch abgedichtete Gelkammer der Elektrophorese-Apparatur wurde bis auf circa 2 cm unterhalb des Randes mit Trenngel gefüllt. Nach Ablauf der Polymerisation wurde mit Sammelgel überschichtet. In dieses Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, der die Aussparungen formt. Nach Verfestigung des gesamten Gels wurde der Dichtungsschlauch entfernt, der Kamm gezogen und die Pufferbehälter mit dem Laufpuffer so gefüllt, daß sich zwischen Gel und Puffer keine Blasen bildeten. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Bei einer Stromstärke von 30 mA dauerte die Elektrophorese 2 1/2 Stunden.

Nach Entnahme der Gelplatte wurde eine Protein- oder G-6-P-DH-Aktivitäts-Färbung durchgeführt.

Lösung zur Proteinfärbung:

Trichloressigsäure	6 g
Eisessig	7 ml
Methanol	20 ml
Wasser	70 ml
1 l Coomassie Blue	3 ml

Nach 1 1/2-stündiger Färbung wurde mit folgendem Gemisch entfärbt:

Entfärbelösung:

Eisessig	250 ml
Methanol	1.500 ml
Wasser	3.500 ml

Die Aktivitätsfärbung wurde mit folgender Lösung, frisch angesetzt, durchgeführt:

0,1 M TEA-Puffer, pH 7,6/0,01 M MgCl ₂	0,7 ml
0,02 M G-6-P	0,3 ml
0,02 M NADP	0,05 ml
Nitroblautetrazoliumchlorid (10 mg/ml)	0,05 ml
Phenazinmethosulfat (5 mg/ml)	0,005 ml

Die Lösung hat eine Temperatur von 30°C.

Die nach der einen oder anderen Methode gefärbten Gele wurden entweder in 7 \ Essigsäure aufgehoben oder bei 100°C und Wasserstrahlpumpenvakuum auf Papier völlig entwässert, wobei sich farbechte Dokumente in Originalgröße ergeben.

2.3.5. SDS-Elektrophorese

Die hier angewendete Methode der SDS-Elektrophorese geht im

f 37") wesentlich auf Weber und Osborn⁽³⁷⁾ zurück.

Die Tris HCl-Puffer von Trenn- und Sammelgel wurden mit 0,4 \ SDS angesetzt. Ansonsten erfolgte die Herstellung der Gele wie in 3.3.4. beschrieben. Der Laufpuffer wurde dahingehend variiert, daß 0,1 l SDS und 1 \ Mercaptoäthanol hinzugefügt wurden.

Das Protein wurde mit dem SDS wie folgt inkubiert:

Wasser	900 µl
5 % SDS	100 µl
2-Mercaptoäthanol	10 µl
Proteinlösung	100 µl

Inkubation: 20 min bei 95 °C.

Dieser Ansatz wurde folgendermaßen für die Elektrophorese vorbereitet:

SDS-Proteinlösung	200 µl
25 mM Tris HCl, pH 6,8/0,54 M Glycerin/1 % SDS	60 µl
0,04 % Bromphenolblau	15 µl

Die Elektrophorese-Apparatur wurde, wie schon beschrieben, mit Gel und SDS-haltigem Puffer beschickt. Nach Auftragung der Proben wurde die Elektrophorese 2 1/2 Stunden bei 30 mA durchgeführt.

Proteinfärbung und Trocknung des Gels erfolgten wie beschrieben.

2.3.6. Radioaktive Markierung der G-6-P-DH

2,3 mg des nach Chilla isolierten Enzyms, das sind bei einem Molekulargewicht von 110.000 etwa 0,02 μ Mol, wurden mit 2 μ Mol PALP und 2 μ Mol ^3H Borhydrid versetzt. Die entstandene Lösung hatte ein Volumen von 600 μl . Sie wurde der schon beschriebenen SDS-Elektrophorese unterzogen.

Die im folgenden beschriebene Methode der Autoradiographie geht auf Bonner und Laskey zurück(5):

Das gefärbte oder ungefärbte Gel wird durch zweimalige 30-minütige Inkubation im 20-fachen seines Volumens an Dimethylsulfoxid vom Wasser befreit.

Anschließend wird das Gel für 3 Stunden in 4 Volumen von 20 % 2,5-Diphenyloxazol in Dimethylsulfoxid inkubiert.

Das so behandelte Gel wird dann für 1 Stunde in 20 Volumen Wasser gebracht. Wodurch das Diphenyloxazol in sich präzipitiert.

Die sich anschließende Trocknung in Vakuum erfolgt wie beschrieben.

Das getrocknete Gel wird bei einer Temperatur von -70°C 12 Tage lang in engem Kontakt mit einem Röntgenfilm gelagert. Die Entwicklung des Films dauert 7 Minuten.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung der G-6-P-DH

Bei Beginn der Arbeit, im Jahre 1978, erfolgte die Isolierung des Enzyms weitgehend nach der Methode von Chilla und Mitarbeitern⁽⁷⁾. Durch die Einführung der Affinitäts-Chromatographie an Blue-Gel wurde dann ein Verfahren gefunden, das schneller zum hochgereinigten Enzym führt.

3.1.1. Isolierung der G-6-P-DH nach Chilla modifiziert

Getrocknete *Candida utilis* wurde mit hypotonischem Puffer nach Lebedev⁽¹⁹⁾ autolysiert. Der Überstand nach Zentrifugation bildet den Rohextrakt.

Durch Zugabe von Protaminsulfat fallen die Nuclein-Säuren aus und lassen sich abzentrifugieren.

Phospho-Zellulose fungiert als Ionenaustauscher. Die Abhängigkeit der elektrischen Ladung des Enzymproteins von dem pH wird hier ausgenutzt.

Die Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat hat zum einen den Vorteil der Volumeneinengung. Andererseits läßt sich durch Festlegung der Ammoniumsulfat-Konzentration die hier untersuchte G-6-P-DH Variante AS75 von der Variante AS95 trennen⁽⁹⁾.

Durch Chromatographie an CM-Sephadex wurde eine weitere Anreicherung des Enzyms erreicht.

Die Affinitätschromatographie an ADP-Sepharose stellt die wesentlichste Abweichung von Chillas Methode dar. Dieses Verfahren, zuerst beschrieben von Brodelius, Larsson und Mosbach⁽⁶⁾ ist sehr effizient, da es die Affinität der G-6-P-DH zu NADP ausnutzt. Proteine, die keine solche Affinität aufweisen, werden nicht gebunden.

Die hier beschriebene Isolation führte zum elektrophoretisch reinem, kristallisierbarem Enzym. Das beste Resultat von mehreren Präparationen war eine Ausbeute von 88%.

Unter dem Mikroskop zeigten sich nadelförmige Kristalle, wie sie schon Chilla und Mitarbeiter gesehen haben⁽⁷⁾ (Abb. 2).

Noltmann und Mitarbeiter haben demgegenüber eine Doppelpyramidenform an ihrer aus Brauereihefe isolierten G-6-P-DH beobachtet⁽²⁴⁾. Julian und Mitarbeiter fanden bei der Isolation von G-6-P-DH aus Rinderbrustdrüsengewebe stäbchenförmige Kristalle⁽¹⁸⁾.

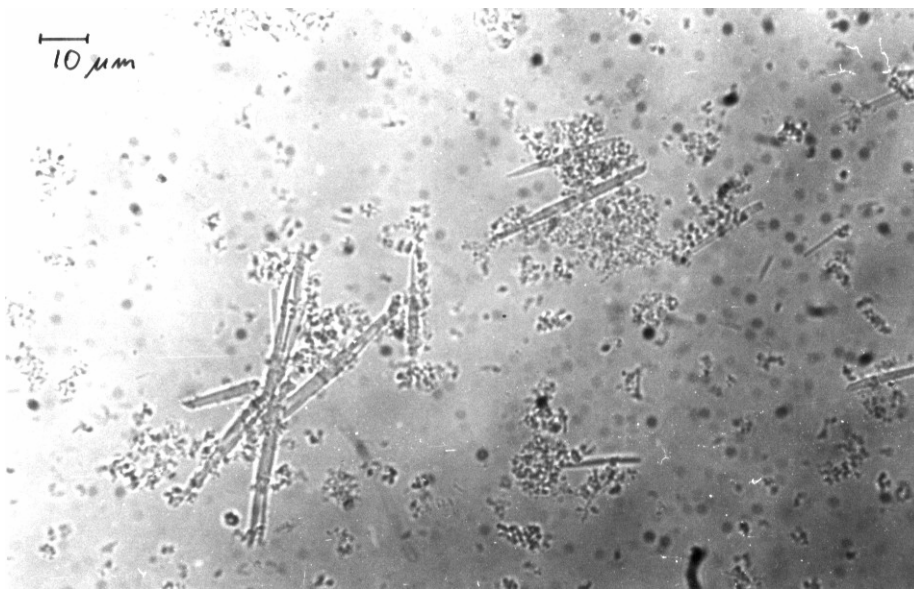


Abb. 2: Kristallisierte G-6-P-DH
Vergrößerung 1:1600

3.1.2. Isolierung mit zwei Affinitätschromatographie-Schritten

Die Gewinnung des Rohextraktes und die Fällung der Nuclein-Säuren erfolgte wie zuvor beschrieben.

Das so gewonnene Material wurde dann an Blue-Gel gebunden. Dieses Blue-Gel ist ein gruppenselektives, auf Agarose basierendes Affinitätschromatographiemedium, das ei-

nen Triazinyl Farbstoff als Liganden benutzt. Diese Art der Affinitätschromatographie wurde von Easterday beschrieben⁽¹¹⁾. Die Ausbeute an Enzymaktivität lag nach diesem Schritt bei 88 %.

Anschließend erfolgte der ADP-Sepharose-Schritt, nachdem das Eluat auf den entsprechenden Puffer umgestellt worden war. Nach diesem Schritt betrug die Ausbeute 84 %.

Hier wurden also zwei Affinitätschromatographie-Verfahren miteinander gekoppelt. Diese Prozedur ist bedeutend kürzer als die zuvor beschriebene. Das Produkt ist elektrophoretisch rein und hat, wie noch gezeigt wird, andere Eigenschaften als das nach herkömmlicher Isolierung.

3.2. Untersuchung der Hemmbarkeit der G-6-P-DH durch Pyridoxal-5-Phosphat

Pyridoxalphosphat (PALP) ist die Coenzymform des Vitamins B₆, das heißt, es gehört in die Pyridoxingruppe. Es ist das wesentlichste Coenzym des Aminosäurenstoffwechsels. Bei allen der über 25 Reaktionen, an denen PALP beteiligt ist, liegt ein prinzipiell gleicher Reaktionsmechanismus zugrunde: Zwischen der Aldehydfunktion des Coenzym und der Aminogruppe der Aminosäure bildet sich eine Schiff'sche Base aus^(27,28). Die elektrophile Wirkung des Pyridinstickstoffes führt zu Elektronenverschiebungen und schließlich zur Schwächung einzelner Bindungen am α -C-Atom der Aminosäure.

Daß PALP in der Lage ist, verschiedene Enzyme zu hemmen, zeigten 1966 Anderson et al.⁽²⁾ zunächst an der Glutamat-Dehydro-genase.

Domschke und Domagk fanden, daß von 15 untersuchten Enzymen des Kohlehydratstoffwechsels 13 durch PALP gehemmt werden. Für die G-6-P-DH beschrieben sie einen kompetitiven Hemmungscharakter⁽¹⁰⁾.

In dieser Arbeit wird der Hemmungstyp noch einmal untersucht.

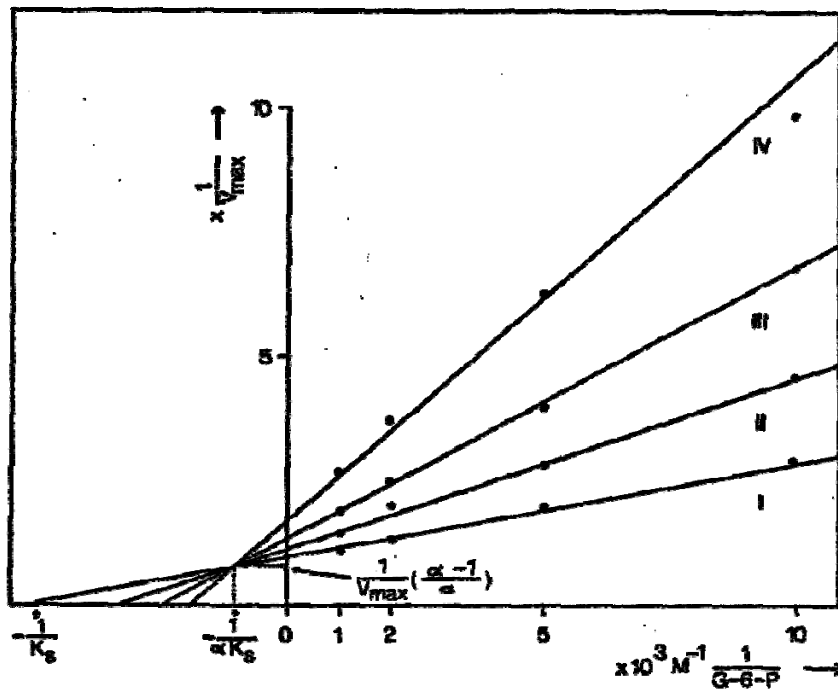


Abb.3: Lineweaver-Burk Diagramm

I. ohne PALP	III. 50 μ M PALP
II. 2 μ M PALP	IV. 100 μ M PALP

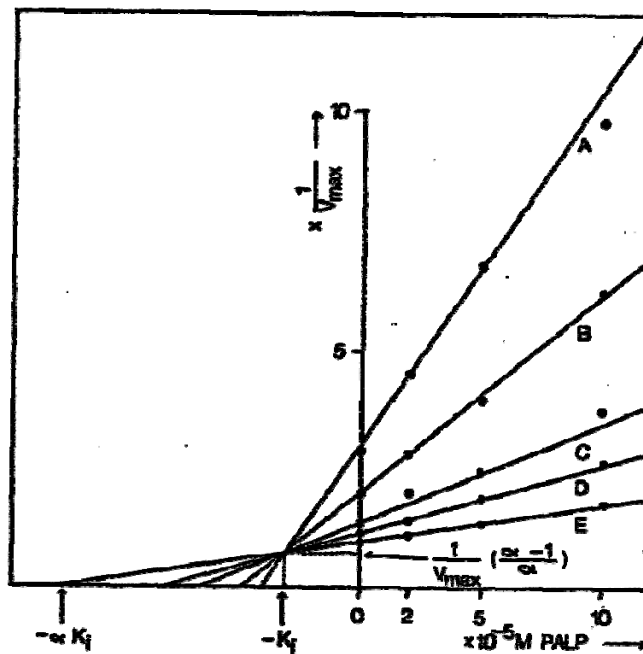


Abb.4: Dixon Diagramm

A 100 μ M G-6-P	B 200 μ M G-6-P
C 500 μ M G-6-P	D 100 μ M G-6-P
E μ M G-6-P	

Bei der Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die reziproken Substratkonzentrationen bei variierten Hemmstoffkonzentrationen nach Lineweaver und Burk⁽²²⁾ schneiden sich alle Geraden im 4. Quadranten (Abb. 2). Die Enzymhemmung durch PALP hat also keinen kompetitiven Charakter. Dem würde nämlich ein Schnittpunkt auf der 1/v-Achse entsprechen.

Das vorliegende Hemmungsverhalten entspricht vielmehr einer

f 291 "linear mixed-type inhibition"⁽²⁹⁾. In der üblichen Henri-Michaelis-Menten Form lautet die Gleichung dieser Kinetik:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{(S)}{K_s \left(1 + \frac{(I)}{K_i} + (S) \left(1 + \frac{(I)}{\alpha K_i} \right) \right)}$$

Hierbei bedeuten:

v	Geschwindigkeit der Reaktion
(S)	Substratkonzentration (G-6-P)
(I)	Inhibitorkonzentration (PALP)
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit, das heißt die Geschwindigkeit der Reaktion bei uneingeschränktem Substratangebot bei Abwesenheit von Inhibitor

$K_s = \frac{(E)(S)}{(ES)}$	Gleichgewichtskonstante für den Enzym-Substrat Komplex. Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.
-----------------------------	--

$K_i = \frac{(E)(I)}{(EI)}$	Gleichgewichtskonstante für den Enzym-Inhibitor Komplex. Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Inhibitor.
-----------------------------	--

α	ist der Faktor, um den sich K verändert, wenn das Enzym bereits Inhibitor gebunden hat und auch der Faktor, um den sich K. ändert, wenn das Enzym bereits Substrat gebunden hat. Es ist ein Maß für die Größe des kompetitiven Anteils der Hemmung.
----------	---

Die Konstanten wurden bestimmt als:

V_{\max} im Versuch der Abb.2+3: 0,375 ($\Delta A_{E366}/\text{min}$)

$K_S = 2,01 \times 10^{-4} \text{ M G-6-P (pH = 7,6)}$

$K_i = 2,94 \times 10^{-5} \text{ M PALP}$

$\alpha = 4,71$

V_{\max} und K_S können am Lineweaver-Burk Diagramm ($1/v$ gegen $1/(S)$,

Abb. 2), K_i und αK_i am Dixon Diagramm ($1/v$ gegen (I) , Abb. 3) abgelesen werden.

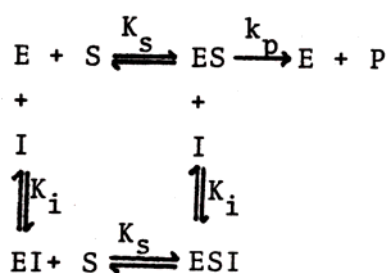
Die Michaelis-Menten Konstante für G-6-P ($= K_S$) stimmt größenordnungsmäßig überein mit den Werten, die für G-6-P-DH aus unterschiedlichsten Quellen gefunden wurden. Als Beispiel seien angeführt:

Bacterium licheniformis	$K_S = 2 \times 10^{-4} \text{ M}(25)$
Penicillium duponti	$K_S = 1,6 \times 10^{-4} \text{ M}(25)$
Penicillium notatum	$K_S = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}(25)$

In anderen Materialien findet sich allerdings G-6-P-DH mit einer deutlich differenten Michaelis-Menten Konstante. Sie liegt zum Beispiel bei der Bierhefe, die mit *C. utilis* näher verwandt ist als die oben angeführten Organismen, um eine Zehnerpotenz höher⁽¹⁵⁾.

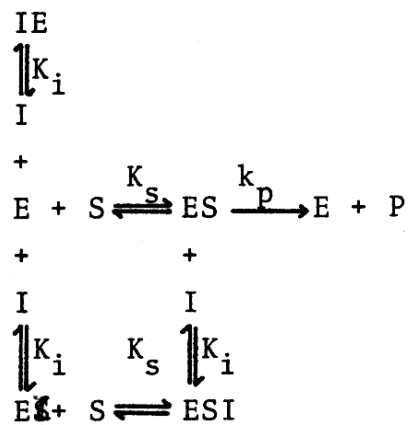
Für *C. utilis* wurde vorher ein K_S von $2,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ und $2,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ gefunden^(12,9).

Diesem "linear mixed-type" können nun mehrere Gleichgewichtsverhältnisse zugrunde liegen:



Diese Hemmung unterscheidet sich also von der reinen kompetitiven Hemmung durch die Affinität des Enzym-Inhibitor Komplexes zum Substrat und die Affinität des Enzym-Substrat Komplexes zum Inhibitor. Diese Affinitäten sind allerdings kleiner ($K_i > 1$) als die Affinitäten des freien Enzyms, was diese Hemmung von der einfachen nichtkompetitiven Hemmung unterscheidet.

Es gibt allerdings noch ein Gleichgewichtsverhältnis, das im Rahmen dieser Arbeit besonderes Interesse verdient:



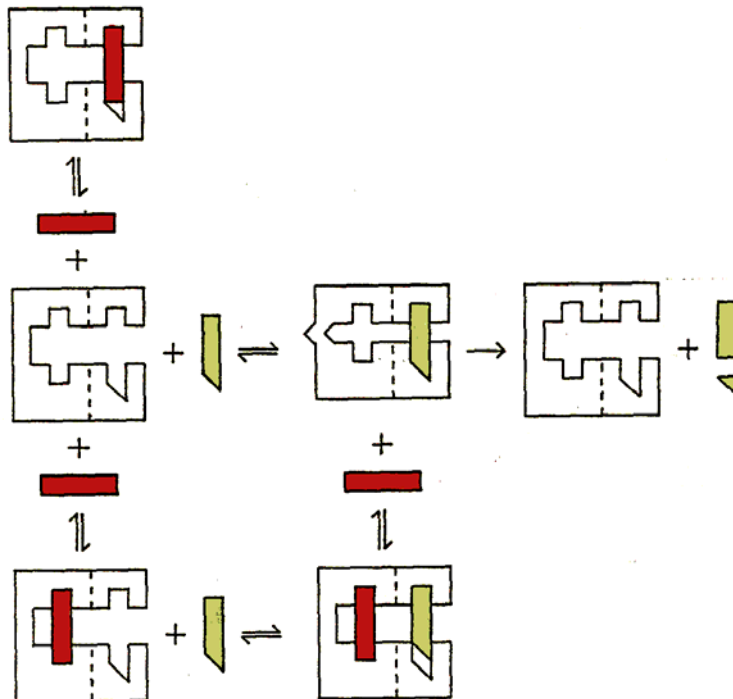


Abb. 5: Schema zur Andeutung der Bindungsstellen von Substrat und Inhibitor an das Enzym

Wie aus dem Schema ersichtlich, bindet sich hier der Inhibitor an zwei verschiedene Stellen des Enzyms. Er wirkt dann je nach Bindungsort einmal kompetitiv (als IE angedeutet) und einmal einfach nichtkompetitiv (als EI angedeutet). Es ergibt sich auch hier ein "mixed-type" mit genau der gleichen mathematischen Funktion wie im erstbeschriebenen Gleichgewichtsverhältnis.

3.3. Untersuchungen zur Struktur der G-6-P-DH

3.3.1. Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Die Elektrophorese eignet sich zur Prüfung von Proteinen auf ihre Homogenität. Es wurde ein pH-Bereich für das Gel gewählt, der höher als der isoelektrische Punkt des Proteins liegt. Das bedingt, daß das Protein zur Anode wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist von mehreren Größen abhängig, so zum Beispiel vom Dissoziationsgrad, Größe und Gestalt des wandernden Teilchens und vom pH-Wert, Konzentration und Temperatur des Mediums. Unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten bedingen eine Trennung

eines Proteingemisches in einzelne Banden. Ornstein⁽²⁶⁾, Allen und Maurer⁽¹⁾ und Garden⁽¹⁶⁾ gehen ausführlich auf Theorie und Praxis der Elektrophorese ein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Elektrophoresetechniken gemäß den unterschiedlichen Fragestellungen ausgeführt. Die Elektrophorese in einfachem Polyacrylamid-Gel diente bei der Färbung mit Coomassie Blue zum Nachweis der Homogenität des Enzympräparates.

Das Erscheinen nur einer Bande war das Kriterium für eine ausreichende Reinheit des Enzyms.

Bei Erscheinen mehrerer Banden läßt sich diejenige, die G-6-P-DH darstellt, durch eine spezielle Aktivitätsfärbung kenntlich machen.

3.3.2. SDS-Elektrophorese

Das Detergens Natriumsduodecylsulfat (SDS) tritt mit seinem aliphatischen Anteil in hydrophobe Wechselwirkung mit Peptidketten. Die Sulfat-Gruppen sind nach außen gerichtet. Die dadurch bedingte Störung der Tertiärstruktur bedingt die Auflösung der Quartärstruktur des behandelten Proteins, das heißt, die Untereinheiten werden voneinander getrennt. Führt man mit so behandelten Proteinen eine Elektrophorese in SDS-haltigem Gel durch, so wandern die Untereinheiten entsprechend ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell. Trägt man die Wanderungstrecke der Proteine, bzw. derer Untereinheiten gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichtes auf, so ergibt sich eine Gerade. Unbekannte Molekulargewichte lassen sich durch Auftragen von Eichproteinen, deren Daten man kennt, bestimmen⁽³⁷⁾.

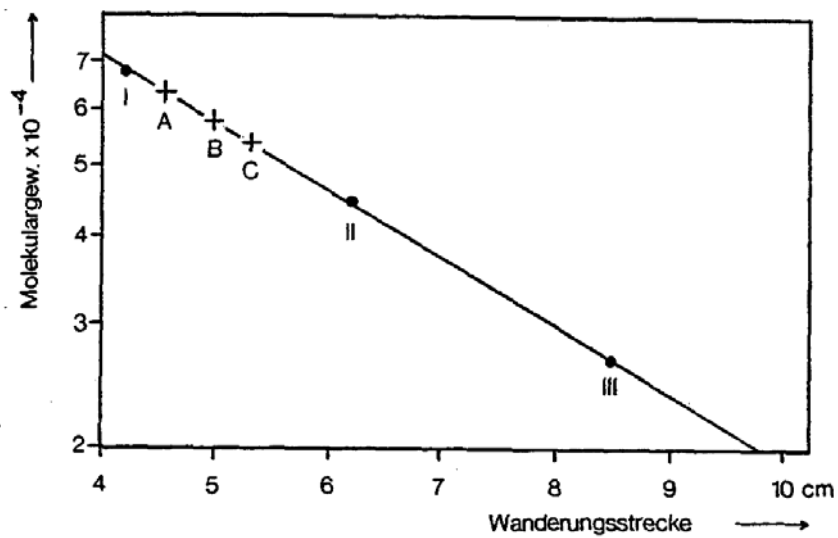


Abb. 6: SDS-Elektrophorese des nach Chilla präparierten Enzyms

- | | | |
|-----|---------------------------------|-------------------------|
| I | Rinder-Serumalbumin | Molekulargewicht 68.000 |
| II | Ovalbumin | Molekulargewicht 45.000 |
| III | Chymotrypsinogen | Molekulargewicht 25.700 |
| E | G-6-P-DH nach Chilla präpariert | |
| S | gekaufte G-6-P-DH (Sigma) | |
| A+C | starke Banden der G-6-P-DH | |
| B | schwache Bande der G-6-P-DH | |

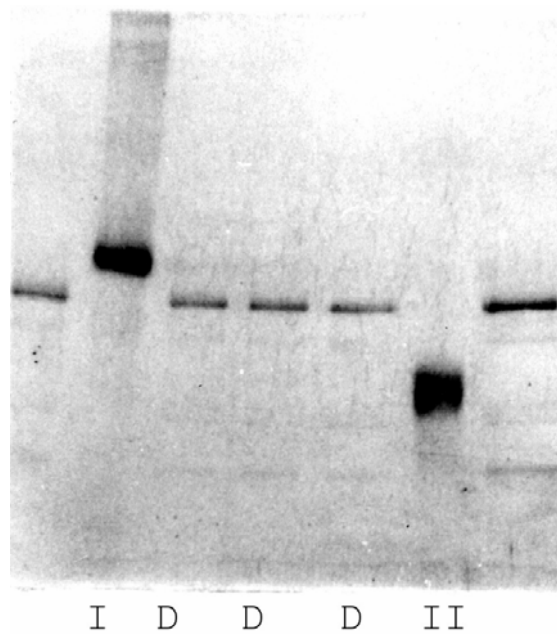
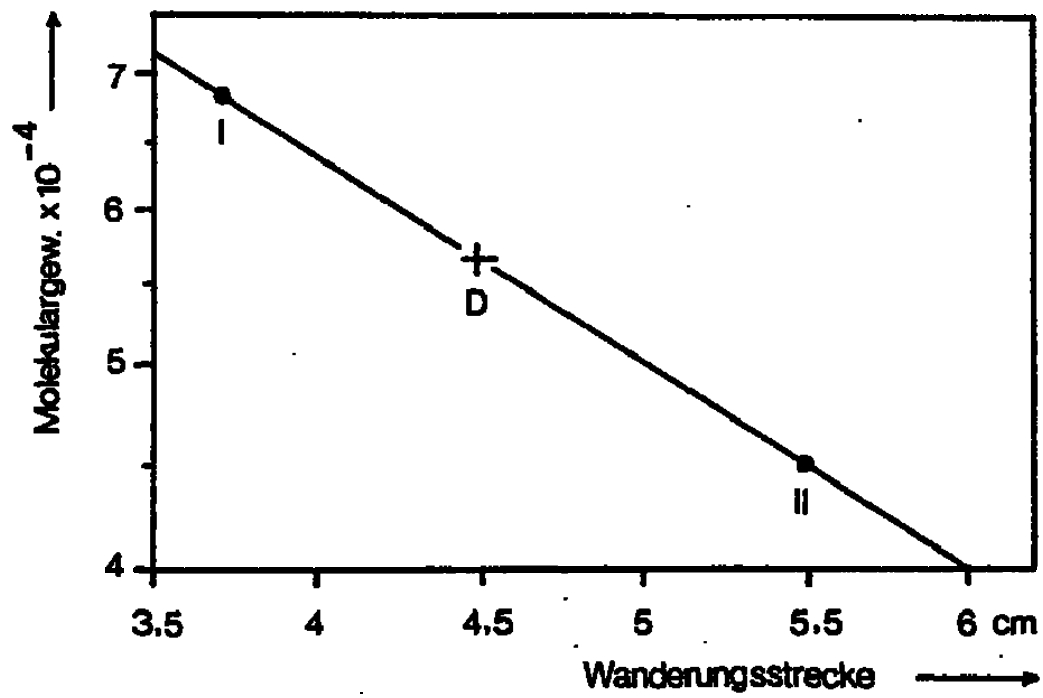


Abb. 7: SDS-Elektrophorese des mittels zweier Affinitätschromatographie-Schritte präparierten Enzyms

I Rinder-Serumalbumin
II Ovalbumin
D G-6-P-DH

Zunächst wurde das Enzym, das mit der Methode von Chilla (siehe 2.1.1.) isoliert worden war, mittels der SDS-Elektrophorese untersucht. Es ergaben sich, wie Domagk, Chilla und Doering bereits beschrieben haben, zwei starke Banden, die einem Molekulargewicht von 62.500 und 54.000 entsprechen. Bei genauer Betrachtung läßt sich jedoch eine schwache Bande zwischen den beiden starken erkennen, deren Molekulargewicht sich zu 57.000 errechnet (Abb. 6).

Diese Beobachtung gewinnt an Interesse, wenn man das Ergebnis der SDS-Elektrophorese des Enzyms, das durch zwei Affinitätschromatographie-Schritte gewonnen wurde (siehe 2.1.2.), berücksichtigt. Hier zeigt sich nämlich nur eine Bande, deren Lage ebenfalls dem Molekulargewicht von 57.000 entspricht (Abb. 7). Um auszuschließen, daß die SDS-Behandlung des Protein etwa nicht ausreichend war, wurden Zeit und Temperatur der Inkubation variiert. Außerdem wurde Mercaptoäthanol versuchsweise weggelassen. Diese Variationen ergaben alle das gleiche Resultat einer einzelnen Bande.

3.4. Radioaktive Markierung der G-6-P-DH

Die zwei Typen von Untereinheiten, die bei der SDS-Elektrophorese gefunden wurden, wurden in Hinsicht auf ihre Rolle bei der Hemmung der G-6-P-DH durch PALP genauer untersucht. Es stellte sich die Frage, ob PALP sich an beide oder nur an eine der Untereinheiten bindet. Hierbei wurde ausgenutzt, daß die sich ausbildende Schiffscche Base zwischen G-6-P-DH und PALP sich durch Borhydrid reduzieren läßt. Statt normalen Borhydrids wurde Tritiummarkiertes NaBH verwendet und so das Protein, das PALP bindet, radioaktiv markiert.

Das so kovalent modifizierte Enzym wurde durch SDS-Elektrophorese in seine Untereinheiten getrennt. Die Gelplatte wurde dann mit einem Szintillator, einem Stoff, der auf radioaktive Zerfälle mit Lichtblitzen reagiert, behandelt. Diese Lichtblitze sind in der Lage, einen Röntgenfilm zu schwärzen (Autoradiographie).

Das Resultat war das Auftauchen zweier Banden etwa gleicher Schwärzung. Jede der beiden Untereinheiten-Typen ist also in der Lage, mit PALP eine Schiffssche Base zu bilden.

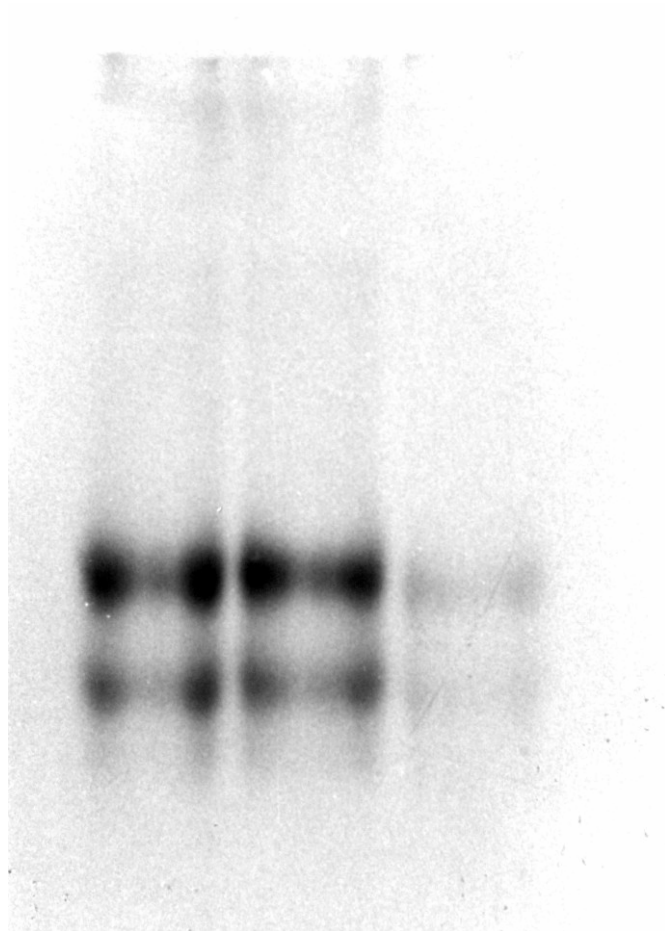


Abb. 8: Autoradiographie der SDS-Elektrophorese radioaktiv markierter G-6-P-DH

4. DISKUSSION

Die Entdeckung von Domagk, Chilla und Doering⁽⁸⁾, daß die SDS-Elektrophorese der G-6-P-DH aus *Candida utilis* auf zwei verschiedene Untereinheiten hinweist, steht mit den Ergebnissen anderer Autoren in sofern in Widerspruch, als daß diese bei G-6-P-DH-Präparation aus zahlreichen anderen Materialien immer nur eine Art von Untereinheiten gefunden haben. Diese Tatsache veranlasst zu einer gewissen Skepsis gegenüber dem Postulat unterschiedlicher Untereinheiten.

Die Wiederholung der Versuche bestätigte zunächst die Entdeckung von Domagk und Mitarbeitern. Es ergaben sich bei der SDS-Elektrophorese zwei deutlich voneinander getrennte Banden. Dieses spricht für ein unterschiedliches Molekulargewicht der Untereinheiten. Es wurde versucht, weitere Unterschiede zwischen den beiden Proteinen zu finden.

Nachdem sich herausgestellt hatte (siehe Seite 18), daß die Hemmung der G-6-P-DH durch PALP keineswegs einen kompetitiven Charakter hat, sondern den Schluß auf zwei verschiedene Bindungsstellen für PALP offen läßt, lag es nahe, zu untersuchen, ob beide Untereinheiten PALP binden. Die radioaktive Markierung des Enzyms-PALP-Komplexes mit tritium-markiertem Borhydrid und die Autoradiographie der SDS-Elektrophorese der reduzierten Schiff-Basen bestätigt eine Bindung des Hemmstoffes an beide Untereinheiten der G-6-P-DH. Ein Unterschied liegt also in dieser Hinsicht nicht vor. Es wurde versucht, eine Interpretation dieses Ergebnisses im Schema der Abb. 5 (siehe Seite 23) zu geben. Die gestrichelte Linie deutet die Grenze zwischen den Untereinheiten an.

Überraschenderweise zeigte G-6-P-DH, die mit unserem neuen Verfahren, nämlich durch die Anwendung zweier Affinitätschromatographie-Schritte, isoliert wurde, ein anderes Verhalten in der SDS-Elektrophorese: es wurde nur eine einzige Bande sichtbar. Dieser Bande entspricht ein Mole-

kulargewicht, das zwischen denen der beiden bisher bekannten Untereinheiten liegt. Unter diesem Aspekt gewinnt die schwache zwischen den beiden starken Banden in der zuvor erwähnten Elektrophorese an Bedeutung. Sie war vorher, wenn sie überhaupt auftauchte, als Artefakt abgetan worden. Es lassen sich zur Klärung dieses Phänomens verschiedene Hypothesen formulieren, ohne daß hier die Richtigkeit der einen oder anderen bewiesen werden könnte.

Theorie I: Die Isolierung der G-6-P-DH nach Chilla ist nicht so schonend wie die neue Methode. Es werden von einem Teil der ursprünglich gleichen Untereinheiten Peptidfragmente abgelöst. Danach zeigt die SDS-Elektrophorese Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes.

Theorie II: Es gibt in *Candida utilis* Isoenzyme, die unterschiedliche Untereinheiten aufweisen.

Möglichkeit II a: Es gibt zwei Isoenzyme. Das eine, bevorzugt isoliert durch die Chilla-Methode, hat zwei unterschiedliche Untereinheiten. Das andere, bevorzugt dargestellt durch die Methode der doppelten Affinitätschromatographie, hat nur eine Art von Untereinheiten.

Möglichkeit II b: Es gibt drei Isoenzyme, die jeweils eine Art von Untereinheiten aufweisen.

Die erste These überzeugt am wenigsten, da man danach erwarten sollte, daß die später ausschließlich gefundene Untereinheit dem Molekulargewicht der schwereren der beiden früher regelmäßig erhaltenen Untereinheiten entspricht.

Für die Möglichkeit II b der verschiedenen Isoenzyme spricht, daß Chilla, Doering, Domagk und Rippa bei der isoelektrischen Fokussierung reiner G-6-P-DH aus *Candida utilis* drei Peaks gefunden haben⁽⁷⁾.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. G-6-P-DH aus *Candida utilis* wurde mittels zweier Methoden dargestellt. Zum einen wurden Autolyse, Protaminsulfat-fällung, Chromatographie an Phospho-Zellulose, Ammoniumsulfat-Fällung, Chromatographie an CM-Sephadex und Affinitätschromatographie an ADP-Sepharose durchgeführt. Diese Methode ist im wesentlichen schon von Chilla beschrieben worden. Im anderen Verfahren erfolgten Autolyse, Protaminsulfat-Fällung, Affinitätschromatographie an Blue-Gel und Affinitätschromatographie an ADP-Sepharose. Diese Methode ist neu.
2. G-6-P-DH ist durch PALP hemmbar, der Hemmungstyp entspricht einer "linear mixed-type inhibition".
3. In Bestätigung früherer Befunde ergab die SDS-Elektrophorese bei der nach Chilla isolierten G-6-P-DH zwei verschiedene Typen von Untereinheiten mit den Molekulargewichten von 54.000 und 62.500. Die nach der neuen Methode isolierte G-6-P-DH ergab einen Typ von Untereinheiten mit dem Molekulargewicht von 57.000.
4. Durch die radioaktive Markierung der Bindung von PALP an das nach Chilla präparierte Enzym und die anschließende Autoradiographie der SDS-Elektrophorese konnte nachgewiesen werden, daß PALP sich an beide Untereinheiten bindet.
5. Von den verschiedenen Erklärungsversuchen für die beschriebenen Ergebnisse erscheint am wahrscheinlichsten, daß es in *Candida utilis* mehrere Isoenzyme gibt, deren unterschiedliche Untereinheiten bei der SDS-Elektrophorese auffallen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allan, R.C. und H.R. Maurer: Elektrophoresis and iso electric focusing in polycrylamid gel.
de Gruyter, Berlin-New York, 1974
2. Anderson, B.M., C.D. Andersen und J.E. Churchich: Inhibition of Glutamic Dehydrogenase by Pyridoxal 5'-Phosphate.
Biochemistry, 5 (1966) 2893-2900
3. Beisenherz, G. et al.: Diphosphofructose-Aldolase, Phospho-glyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskeln in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 86 (1953) 555-577
4. Bergmeyer, H.U. : Neue Werte für die molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium.
Z. klin. Chem. 11 (1975) 507-508
5. Bonner, W.B. und R.A. Laskey: A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Poliacrylamide Gels.
Europ. J. Biochem. 46 (1974) 83-88
6. Brodelius, P., P.-O. Larsson und K. Mosbach: The synthesis of three AMP-analogues: N -(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N -(aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate and N -(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity Chromatographie. Europ.
J. Biochem. 47 (1974) 81-89

7. Chilla, R., K.M. Doering, G.F. Domagk und M. Rippha: A simplified procedure for the Isolation of a highly active glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*.
Arch. Biochem. 159 (1973) 235-239
8. Domagk, G.F., R. Chilla und K.M. Doering: Evidence for an allosteric control of the pentose phosphate pathway in *Candida utilis*.
Life Sci. 13 (1973) 655-662
9. Domagk, G.F., R. Chilla, W. Domschke, H.J. Engel und N. Sörensen: Darstellung und Eigenschaften kristallisierter Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Candida utilis*. Hoppe-Seylers
Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 626-634
10. Domschke, W. und G.F. Domagk: Die Hemmbarkeit der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und anderer Enzyme des Zuckerstoffwechsels durch Pyridoxal-5-phosphat. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 1111-1116
11. Easterday, R.L. und I. Easterday: Affinity chromatography of kinase and dehydrogenases on Sephadex and Sepharose dye derivatives.
In: Immobilized biochemicals and affinity chromatography, hrsg. v. Dunlap, R.B., New York 1974, 123-134
12. Engel, H.J., W. Domschke, M. Alberti und G.F. Domagk: Protein Structure and enzymatic activity. II. Purification and properties of a crystalline Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Candida utilis*.
Biochem. biophys. Acta 191 (1969) 509-561
13. Gahr, M., D. Bornhalm und W. Schröter: Biochemische Eigenschaften einer neuen Variante des Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-PD)-Mangels mit Favismus: G-6-PD Bielefeld.
Klin. Wschr. 55 (1977) 379-384

14. Gahr, M. and W. Schröter: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6-PD) Hamburg, a new variant with chronic non-spherocytic haemolytic anaemia.
Europ. J. clin. Invest. 4 (1974) 187-191
15. Glaser, L. und D.H. Brown: Purification and Properties of D-Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase.
J. biol. Chem. 216 (1955) 67-79
16. Gordon, A.H.: Electrophoresis of protein in polyacrylamide and starch gels.
North-Holland Publishing Comp., Amsterdam 1975
17. Horecker, B. L. und P. Z. Smyrniotis: Reversibility of Glucose-6-Phosphate Oxidation.
Biochem. biophys. Acta 12 (1963) 98-102
18. Julian, G.R., R. G. Wolfe und F.J. Reithel: The Enzymes of Mammary Gland; II. The Preparation of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase.
J. biol. Chem. 236 (1961) 754-758
19. Lebedev, H.V. : Darstellung des aktiven Hefesaftes durch Maceration.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 73 (1911) 447-452
20. Levy, H.R.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases.
Advan. Enzymol. 48 (1978) 97-192
21. Lineweaver, H. und D. Burk: The determination of dissociation constants.
J. Amer. chem. Soc. 56 (1934) 658-666
22. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275

23. Malcolm, A.A. und M.G. Shepherd: Purification and Properties of Penicillium Glucose-6-phosphate Dehydrogenase.
Biochem. J. 128 (1972) 817-831
24. Noltmann, E.A., C.J. Gubler und S.A. Kuby: Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (Zwischenformat). I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast.
J. Biol. Chem. 236 (1961) 1225-1230
25. Opheim, D. und R.W. Bernlohr: Purification and Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Bacillus licheniformis.
J. Bact. 116 (1973) 1150-1159
26. Ornstein, L.: Disc electrophoresis I; background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 321-349
27. Rippa, M., L. Spanio und S. Pontremoli: A specific Interaction of Pyridoxal 5'-Phosphate and 6-Phosphogluconic Dehydrogenase.
Arch. Biochem. 118 (1967) 48-57
28. Rippa, M., M. Signorini und S. Pontremoli: Purification and Properties of two Forms of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Candida utilis.
Europ. J. Biochem. 1 (1967) 170-178
29. Segel, I.H.: Enzyme kinetics.
Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto 1975
30. Schmidt, E., F.W. Schmidt, H.D. Hörn und U. Gerlach: Die Bedeutung der Messung von Enzymaktivitäten in der Medizin.
In: Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. v. Bergmeyer, H.U., Weinheim/Bergstr. 1962, 651-712

31. Waller, H.D., G.W. Löhr und M. Tabatabai: Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in roten Blutzellen.
Klin. Wschr. 35 (1957) 1022-1027
32. Waller, H.D. et al.: Glutathionreduktasemangel mit hämatologischen und neurologischen Störungen (autosomal dominant vererbliche Bildung eines pathologischen Enzyms).
Klin. Wschr. 43 (1965) 413-426
33. Warburg, O. und W. Christian: Aktivierung von Kohlenhydrat in roten Blutzellen.
Biochem. Z. 238 (1931) 131-134
34. Warburg, O. und W. Christian: Ober die Aktivierung der Robinsonschen Hexose-Monophosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.
Biochem. Z. 242 (1931) 206-227
35. Warburg, O. und W. Christian: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.
Biochem. Z. 310 (1941) 348-421
36. Warburg, O. und W. Christian: Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum.
Biochem. Z. 254 (19) 438-458
37. Weber, K. und M. Osborn: Measurement of molecular weights by elektrophoresis on SDS-acrylamid gel.
Methods in Enzymologie 26 (1972) 3-27

Herrn Prof. Dr. G.F. Domagk gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas; seine freundliche Betreuung hat mir sehr geholfen.

Außerdem ist es mir ein Bedürfnis, Fräulein Gabriele Runge für ihre stetige, sachverständige Mitarbeit zu danken.

LEBENS LAUF

Am 21.11.1955 wurde ich, Jochen Lengerke, als erster Sohn des Mediziners Dr. Hermann Lengerke und seiner Frau, der Juristin Helga Lengerke, geb. Schmiedecke, in Braunschweig geboren. Ich habe noch einen Bruder, Thomas, Jahrgang 1957.

Ich besuchte die Volksschule in Hamburg und Osnabrück. 1967 kam ich in den mathematisch-naturwissenschaftlich ausgerichteten Zweig des Ernst-Moritz-Arndt Gymnasiums in Osnabrück. Dort erhielt ich 1975 das Zeugnis der Reife.

Seit dem Sommersemester 1976 bin ich in der Georg-August-Universität zu Göttingen als Humanmediziner immatrikuliert, Im März 1978 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, im März 1979 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Ich beabsichtige, nach dem Staatsexamen eine Facharztausbildung zu absolvieren und mich dann niederzulassen.

(Jochen Lengerke)