

# Phosphoenolpyruvatcarboxykinase aus *Phycomyces blakesleeanus* Bgff.

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Phycomyces blakesleeanus* Bgff.

Gerhard Sandmann und Willy Hilgenberg

Fachbereich Biologie-Botanik der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt

Z. Naturforsch. **33 c**, 667–670 (1978); received June 16/June 30, 1978

*Phycomyces blakesleeanus*, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase,  $K_m$  values, Nucleotid Specificity, Sulfuryl Reagents

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Phycomyces blakesleeanus* was partially purified by protamine sulfate precipitation, ammoniumsulfate precipitation, and diethylamino ethyl cellulose (DEAE) treatment. This preparation was employed for the characterization of the enzyme. The  $K_m$  values for phosphoenolpyruvate (PEP) and ADP were determined as 1.6 and 0.42 mM. The nucleotid specificity was demonstrated for ADP exclusively. The use of sulfuryl reagents showed the presence of thiol groups sensitive against *p*-hydroxymercuribenzoate but not effected by *N*-ethylmaleimide.

## Einleitung

Das Enzym Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) EC.4.1.1.32 wird als das Enzym angesehen, das bei der Synthese von Kohlehydraten aus Substraten des Citratzyklus den ersten Schritt dieses Syntheseweges katalysiert [1].

Zu den Pilzen, die in der Lage sind diesen Weg zu beschreiten, gehört *Phycomyces blakesleeanus*. Er kann bei Anzucht auf Asparagin Substanzen des Citratzyklus in Zucker umwandeln [2]. Die dazu zu fordernde PEPCK konnte bei ihm nachgewiesen werden [3]. Der Nachweis dieses Enzyms wurde auch bei anderen Pilzen erbracht [4–6]. Eine genauere Charakterisierung dieses Enzyms erfolgte aber bisher nur bei den *Ascomyceten Aspergillus niger* [7], *Saccharomyces cerevisiae* [8] und *Verticillium albo-atrum* [9], während bei *Phycomyceten* diese Untersuchungen bisher fehlten. In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen mit teilgereinigten PEPCK aus *Phycomyces blakesleeanus* berichtet.

## Material und Methoden

### a) Anzucht

Die PEPCK wurde aus *Phycomyces blakesleeanus* Stamm 1+ der Sammlung Halbsguth gewonnen. Die Kultivierung des Pilzes erfolgte nach Bürstell und Hilgenberg [10] in einer Glucose-Asparagin-Nährlösung bei 25 °C im Dunkeln.

### b) Teilreinigung der PEPCK

Alle Reinigungsschritte wurden in einem Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Zur Herstellung des zellfreien Extrakts wurden 10 g gefriergetrocknetes und in einer Kugelmühle unter CO<sub>2</sub>-Kühlung zerkleinertes Pilzmaterial mit 100 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,8 versetzt. Nach Zentrifugation (30 min mit 20 000 *g*) wurde der Überstand mit Protaminsulfat behandelt. Protaminsulfat wurde als 0,2% Lösung in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,8 im Verhältnis 1:20 zugegeben. Danach wurde erneut zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine schrittweise Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Aus dem Überstand nach der Einstellung auf 40% konnte die Hauptmenge der PEPCK nach Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 60% ausgefällt werden. Der Niederschlag wurde in 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8 aufgenommen. Dazu wurde mit dem gleichen Puffer vorbehandelte DEAE Cellulose (Merck 0,7 mval/g) gegeben und gerührt. Nach 15 min wurde die DEAE Cellulose mit dem absorbierten Protein abzentrifugiert (15 min mit 10000 *g*) und nacheinander mit 0,08 M und 0,14 M Phosphatpuffer pH 6,8 gerührt und abzentrifugiert. Aus dem Eluat mit 0,14 M Phosphatpuffer pH 6,8 wurde die darin enthaltene PEPCK zur Konzentrierung mit Ammoniumsulfat (60%) ausgefällt und in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,8 aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Diese Enzympräparation wurde für die enzymkinetischen Messungen, die Bestimmung der Nukleotidspezifität und die Hemmungsversuche mit Sulfurylreagenzien benutzt.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Willy Hilgenberg, Fachbereich Biologie-Botanik der J. W. Goethe-Universität, Siesmayerstr. 70, D-6000 Frankfurt.

c) *PEPCK Test*

Die Aktivitätsbestimmung der PEPCK erfolgte in Abwandlung der Methode von Woronick und Johnson [7] als photometrischer Test. Dabei wurde das bei der Carboxylierung des PEP gebildete Oxalacetat mit Malatdehydrogenase unter NADH Verbrauch umgesetzt. Die Abnahme der NADH Absorption bei 340 nm dient dabei als Maß für die Aktivität der PEPCK.

In der Reaktionsküvette befinden sich in 2 ml: PEP- $\text{Na}_2$  (Sigma) 7,6 mM, ADP (Boehringer Mannheim) 7,6 mM, KCl 100 mM, Aspartat 10 mM,  $\text{KHCO}_3$  40 mM, NADH- $\text{Na}_2$  (Boehringer Mannheim) 0,35 mM, MDH (Sigma) 50 U/ml, Na-Pyruvat (Boehringer Mannheim) 10 mM, Tris-HCl-Puffer pH 7,5 und Enzymextrakt. Die Messungen wurden gegen eine Vergleichsküvette durchgeführt, in der sich alle Komponenten des Testansatzes außer ADP befanden. Durch diese Anordnung wird es möglich, nur die ADP abhängige Phosphoenolpyruvatcarboxylierung zu registrieren.

In ungereinigten Enzymextrakten kann neben der PEPCK Reaktion eine Umsetzung von PEP und ADP über Pyruvat zu Lactat unter NADH Verbrauch ablaufen. Durch den Zusatz von Pyruvat in Meß- und Vergleichsküvette kann diese störende Nebenreaktion kompensiert werden. Eine zusätzliche ATP abhängige Carboxylierung des Pyruvats durch das Enzym Pyruvatcarboxylase kann bei *Phycomyces* durch Zusatz von Aspartat unterdrückt werden [3].

Die Einheiten (U) der PEPCK Reaktion sind als Mikromol oxidiertes NADH pro Minute bei 25 °C und einem pH-Wert von 7,5 angegeben.

d) *Proteinbestimmung*

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry *et al.* [11] durchgeführt, nachdem das Protein zuvor mit 20% alkoholischer Trichloressigsäure gefällt wurde.

**Ergebnisse und Diskussion**

Durch die verschiedenen Reinigungsschritte wie Protaminsulfatfällung, Ammoniumsulfatfällung und DEAE Cellulose Behandlung, konnte gegenüber dem Rohextrakt eine Anreicherung der spezifischen Aktivität der PEPCK auf das 25fache erzielt werden. Aus dieser teilgereinigten Enzympräparation wurde die Abhängigkeit des Enzyms von PEP und ADP demonstriert. In Abb. 1 und 2 sind die entsprechenden Kurven bis zur Substratsättigung aufgetragen. Aus den erhaltenen Werten wurden die  $K_m$ -Werte aus der Lineweaver Burk Darstellung bestimmt. Die  $K_m$ -Werte liegen für die PEPCK aus *Phycomyces* bei 1,6 mM für PEP und 0,24 mM für ADP. Tabelle I zeigt die  $K_m$ -Werte im Vergleich mit den Werten aus tierischen, bakteriellen und anderen pflanzlichen Quellen. Die  $K_m$ -Werte für PEP aus Tieren und Pflanzen unterscheiden sich etwa um den Faktor 10. Der Wert für die PEPCK aus *Escherichia coli* übertrifft den von *Phycomyces* noch um eine Zehnerpotenz. Die  $K_m$ -Werte für ADP liegen

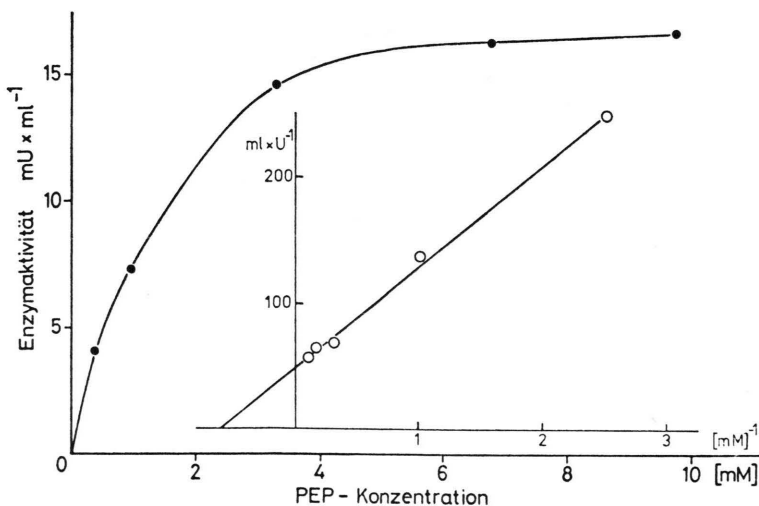


Abb. 1. Abhängigkeit der PEPCK aus *Phycomyces blakesleeanus* von der PEP-Konzentration.

Darstellung nach Michaelis Menten

(—●—);

Darstellung nach Lineweaver Burk

(—○—).

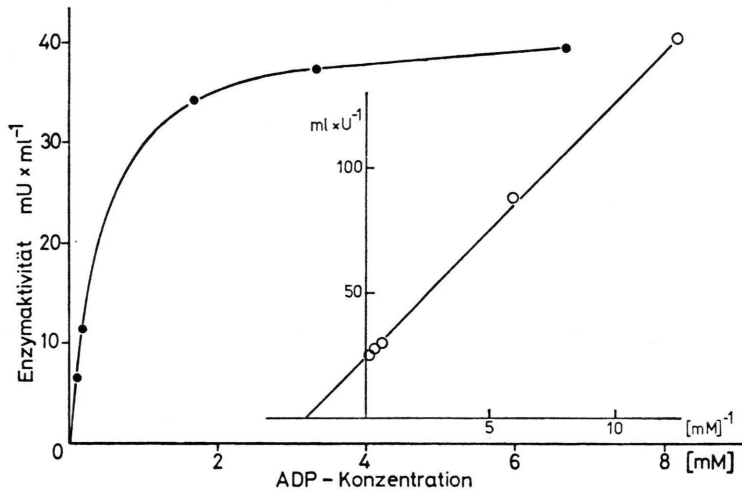


Abb. 2. Abhängigkeit der PEPCK aus *Phycomyces blakesleeanus* von der ADP-Konzentration.  
Darstellung nach Michaelis Menten (—●—);  
Darstellung nach Lineweaver Burk (—○—).

Tab. I.  $K_m$ -Werte für die Substrate der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase aus verschiedenen Organismen.

Quelle	$K_m$ (PEP)	$K_m$ (ADP bzw. GDP)	Literatur
Meerschweinchenleber	0,4	0,14	[12]
<i>E. coli</i>	14,0	0,23	[13]
Ananas	5,0	0,14	[14]
<i>Agaricus</i>	4,6	—	[15]
<i>Phycomyces</i>	1,6	0,42	

Tab. II. Abhängigkeit der Aktivität der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase von verschiedenen Nukleotiden.

Eingesetztes Nukleotid-diphosphat (7,6 mM)	Volumenaktivität [U/ml]
ADP	17
IDP	< 1
GDP	< 1

alle, einschließlich des Wertes von *Phycomyces*, in der gleichen Größenordnung.

Die PEPCK aus Wirbeltieren arbeitet mit Guanosin- oder Inosinphosphaten [16]. Bei Bakterien ist die Nukleotidspezifität sehr uneinheitlich. Aus *Rhodospseudomonas spheroides* isolierte PEPCK reagiert nur mit Adenosinderivaten [17]. Von *Arthrobacter globiformis* ist eine Guanosin- und Inosinphosphat abhängige PEPCK bekannt [18]. Die PEPCK aus *Phycomyces* ist nur mit ADP reaktiv (Tab. II). Hier kann das ADP nicht teilweise durch IDP ersetzt werden, wie dies bei *Aspergillus niger* der Fall ist [7]. Auch die PEPCK aus *Saccharomyces cerevisiae* ist streng an ADP gebunden [19]. Dagegen ist die PEPCK aus *Ananas comosum* am wenigsten nukleotidspezifisch, bei ihr kann ADP durch IDP und GDP ersetzt werden [14].

Die PEPCK aus *Phycomyces* ist ein Thiolenzym, sie wird durch 0,1 mM *p*-Hydroxymercuribenzoat zu mehr als 80% gehemmt (Tab. III). Bei *Saccharomyces* [19] und *Verticillium albo-atrum* [9] wird

Tab. III. Einfluß von Sulfhydrylreagenzien auf die Aktivität der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase.

Zusatz	Volumenaktivität [U/ml]	Umsatz [%]
— — —	25	100
Dithioerythrit (40 mM)	24	96
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat (0,1 mM)	3	12
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoat (0,1 mM) + Dithioerythrit (40 mM)	17	68
N-Äthylmaleimid (0,5 mM)	29	116

die PEPCK mit der gleichen *p*-Hydroxymercuribenzoatkonzentration fast vollständig gehemmt. Die PEPCK aus allen drei Pilzen kann durch einen Überschuß an Dithioerythrit oder Glutathion teilweise wieder reaktiviert werden. Das Sulfurylreagenz N-Äthylmaleimid übt auf die PEPCK aus Hühnerleber, ähnlich wie *p*-Hydroxymercuribenzoat, eine starke Hemmung aus [1]. N-Äthylmaleimid zeigt bei *Phycomyces* keine Hemmung der PEPCK Aktivität (Tab. III). Ebenso ist dies bei *Saccharomyces* der Fall [19]. Eine schwache Hemmung liegt bei der PEPCK aus *Verticillium* vor [9].

Die PEPCK aus *Phycomyces* zeigt hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften nur geringe Unterschiede zu dem Enzym aus anderen Pilzen. So ist sie mit *p*-Hydroxymercuribenzoat nicht vollständig hemmbar und wird, im Gegensatz zu *Verticillium*, nicht durch N-Äthylmaleimid gehemmt. Eine ge-

ringere Nukleotidspezifität als die PEPCK aus *Phycomyces* besitzt das Enzym aus *Aspergillus*.

An  $K_m$ -Werten liegt lediglich für PEP ein Wert aus einem anderen Pilz (*Agaricus bisporus*) vor [15], der sich in der Größenordnung nicht vom  $K_m$ -Wert der PEPCK aus *Phycomyces* unterscheidet.

- [1] M. F. Utter u. H. M. Kolenbrander, The Enzymes, Bd. 6 (P. D. Boyer, Hrsg.) p. 117, Acad. Press, New York 1972.
- [2] W. Hilgenberg u. G. Sandmann, Exp. Mycology 1, 265 (1977).
- [3] G. Sandmann, Dissertation Universität Frankfurt (1977).
- [4] M. Ruiz. Amil, G. de Torrontegui, E. Palacian, L. Catalina u. M. Losada, J. Biol. Chem. 240, 3485 (1965).
- [5] R. E. Beever, J. Gen. Microbiol. 86, 197 (1975).
- [6] G. A. Clarke u. R. E. Hartman, J. Gen. Microbiol. 92, 237 (1976).
- [7] C. L. Woronick u. M. J. Johnson, J. Biol. Chem. 235, 9 (1960).
- [8] J. J. Cannata u. A. O. M. Stoppani, J. Biol. Chem. 238, 1196 (1963).
- [9] R. E. Hartman u. N. T. Keen, J. Gen. Microbiol. 81, 21 (1974).
- [10] H. Bürstell u. W. Hilgenberg, Biol. Zbl. 94, 389 (1975).
- [11] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- [12] D. D. Holden u. R. C. Nordlie, Biochemistry 4, 723 (1965).
- [13] J. A. Wright u. B. D. Sanwal, J. Biol. Chem. 244, 1838 (1969).
- [14] L. S. Daley, T. B. Ray, H. M. Vines u. C. C. Black, Plant Physiol. 59, 618 (1977).
- [15] R. Bachofen u. D. Rast, Arch. Mikrobiol. 60, 217 (1968).
- [16] H. G. Wood u. M. F. Utter, Essay in Biochemistry 1, 1 (1965).
- [17] K. Uchida u. G. Kikuchi, J. Biochem. 60, 729 (1966).
- [18] E. S. Bridgeland u. K. M. Jones, Biochem. J. 104, 90 (1967).
- [19] J. J. Cannata u. A. O. M. Stoppani, J. Biol. Chem. 238, 1208 (1963).