

# Trennung von Enzymaggregaten in Dichtegradienten

Von

RALF HÜTTER

Mikrobiologisches Institut der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich

Die Sedimentationskoeffizienten (und damit das ungefähre Molekulargewicht) von Proteinen lassen sich mit Hilfe der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation bestimmen. Zur Vereinfachung kann der Sedimentationskoeffizient eines unbekanntenen Proteins durch das Verhältnis der relativen Mobilitäten von Probe und Referenzsubstanzen bestimmt werden (MARTIN und AMES 1961; Fig. 1, Fig. 2). Dabei wird

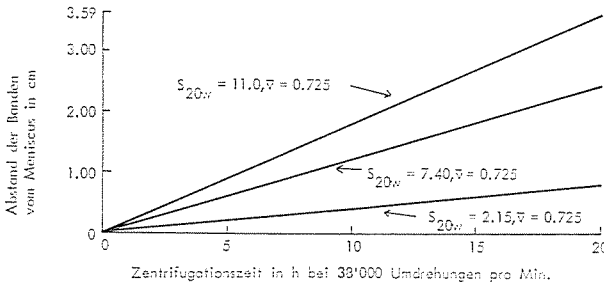
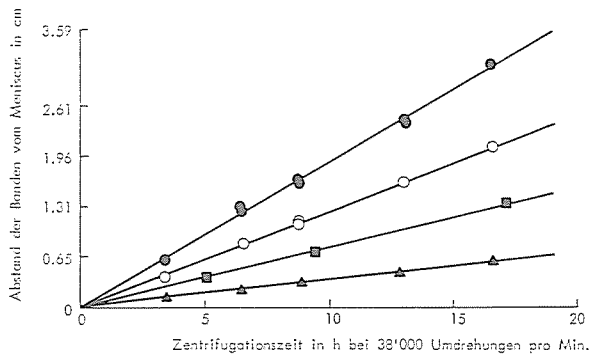


Fig. 1. Theoretisches Sedimentationsverhalten von Makromolekülen in einem 5-20% w/v Saccharose-Gradienten bei 3°C.  $\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen in  $\text{cm}^3$  per g;  $S_{20,w}$  = Sedimentationskonstanten bei 20°C in Wasser in Svedbergeinheiten (nach MARTIN und AMES, 1961).

Fig. 2. Sedimentationsverhalten von Referenzsubstanzen im Saccharose-Gradienten. Jeder Punkt stellt das Ergebnis eines gesonderten Zentrifugationsexperimentes dar. Die Linien bezeichnen das theoretische Sedimentationsverhalten von Makromolekülen mit dem partiellen spezifischen Volumen von  $0,725 \text{ cm}^3$  pro g. Die Zahlen geben die Svedberg-Einheiten  $S_{20,w}$  an (nach MARTIN und AMES, 1961).

- = Katalase
- = Alkohol-Dehydrogenase
- = Kaninchenleber sRNS
- ▲ = Lysozym



als partielles spezifisches Volumen unbekannter Proteine ein Mittelwert von  $\bar{v}=0,725$  angenommen.

Die Güte der Methode hängt wesentlich von der Wahl geeigneter Referenzsubstanzen (Standard-Proteine) ab. Besonders gut eignen sich wegen der leichten Nachweisbarkeit z. B. Alkohol-Dehydrogenasen, Milchsäure-Dehydrogenasen, Katalase, Lysozyme, Hämoglobin. Diese Proteine zeigen als reine Substanzen oder in Gemischen mit anderen Proteinen das gleiche Sedimentationsverhalten. Eine Schätzung des Molekulargewichtes kann anhand der Sedimentationskonstanten vorgenommen werden:

$$\frac{S_1}{S_2} = \left( \frac{M W_1}{M W_2} \right)^{2/3}$$

Die angeführte Methode ist für die Analysen von Tryptophan-Biosynthesenzymen aus Mikroorganismen erfolgreich angewendet worden (DEMOSS 1965, HÜTTER und DEMOSS 1967). Bei diesen Untersuchungen hat nicht die exakte Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteinkomponenten, sondern die Feststellung von Enzymaggregaten im Vordergrund gestanden. Eine Reihe verschiedener Aggregationstypen

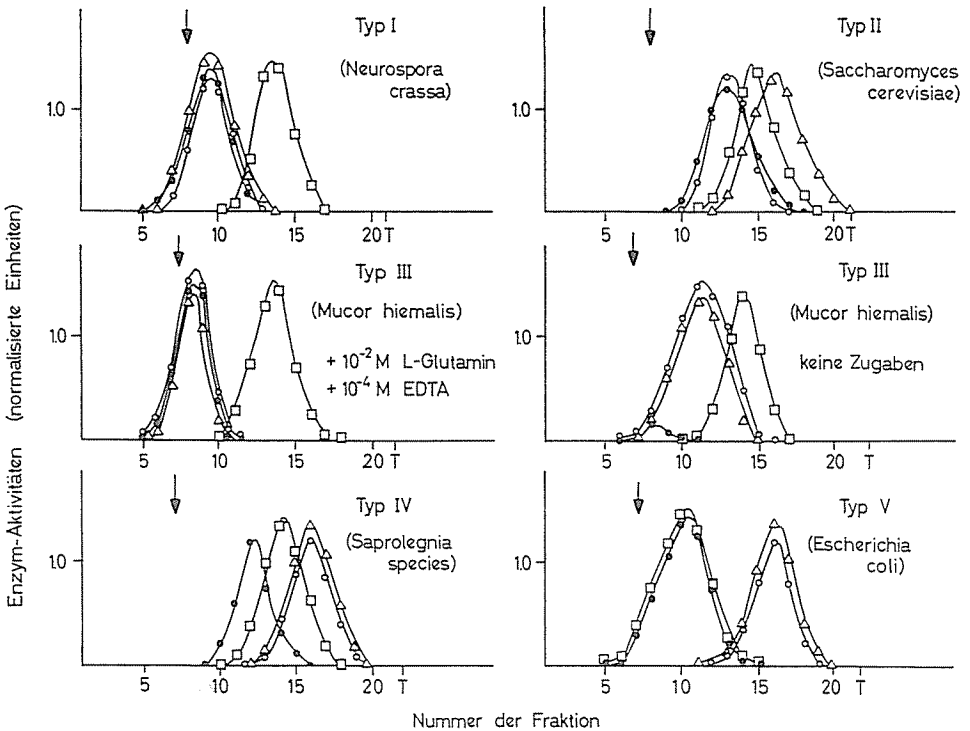


Fig. 3. Verteilung der Enzymaktivitäten nach Zentrifugation im Saccharose-Gradienten. Die Aktivitäten von ● Anthranilsäure-Synthetase, □ PR-Transferase, △ PRA-Isomerase und ○ InGP-Synthetase sind in normalisierten Einheiten angegeben. Experimentelle Angaben und Erklärung der Abkürzungen vgl. HÜTTER und DEMOSS (1967).

konnte festgestellt werden (Fig. 3). Verschiedene Mikroorganismengruppen zeigen verschiedene Enzym-Assoziationstypen. Es lassen sich Rückschlüsse ziehen einerseits auf die Evolution von Enzymaggregaten und andererseits auf die phylogenetische Verbindung zwischen Mikroorganismengruppen (HÜTTER und DEMOSS 1967).

### Literatur

- DEMOSS, J. A.: Biochemical diversity in the tryptophan pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 850–857 (1965).
- HÜTTER, R. and J. A. DEMOSS: Organization of the Tryptophan Pathway: a Phylogenetic Study of the Fungi. *J. Bacteriol.* 94, 1896–1907 (1967).
- MARTIN, R. G. and B. N. AMES: A Method for Determining the Sedimentation Behavior of Enzymes: Application to Protein Mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372–1379 (1961).