

Enzymatische Transamidierungsreaktion mit kristalliner Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase (EC 3.4.1.1)

Von HORST HANSON und JÜRGEN LASCH

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Halle a. d. Saale (Direktor: Prof. Dr. H. Hanson)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 16. August 1967)

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wird über eine durch kristalline Leucinaminopeptidase und Rattenserum-Enzym katalysierte Transamidierungsreaktion bei Verwendung von carboxylaktivierte Aminosäuren (Amid bzw. Methylcellosolve-ester) als Substrat berichtet. Es erfolgte die Identifizierung von 2 Transamidierungsprodukten: L-Leucyl-L-leucin (eingesetztes Substrat: L-Leucin-methylcellosolve-ester) und L-Leucyl-L-leucinamid (eingesetztes Substrat: L-Leucinamid).

Summary: The present work describes the transamidation of carboxyl-activated amino acids (amide or methylcellosolve ester) by crystalline leucine aminopeptidase and an enzyme from rat serum. Two transamidation products were identified: L-leucyl-L-leucine (substrate: L-leucine-methylcellosolve ester) and L-leucyl-L-leucinamide (substrate: L-leucinamide).

In der Literatur sind zahlreiche Befunde über durch Endopeptidasen in vitro katalysierte Transamidierungen, Transpeptidierungen und Peptidsynthesen durch Kondensation von Oligopeptiden niedergelegt. Eine zusammenfassende Darstellung findet sich bei FRUTON¹ sowie KATCHALSKI und SELA². Die

* Postanschrift: Prof. Dr. H. HANSON, X 402 Halle (Saale), Hollystraße 1.

Abkürz.: Mn-frei bzw. Mn-LAP s. S. 1527, Abs. 3 b; $[E]_0$ = totale Enzymkonzentration; $[Leu-NH_2]_0$ = Ausgangskonzentration von L-Leucinamid; $[Leu-Leu-NH_2]_0$ = Ausgangskonzentration von L-Leucyl-L-leucinamid.

¹ J. S. FRUTON in H. NEURATH, *The Proteins I*, p. 189, Academic Press, New York-London 1963.

² E. KATCHALSKI u. M. SELA, *Advances Protein Chem.* 13, 369 [1958].

Es konnte für die hydrolytische und die Transfer-Aktivität der gleiche Wirkungsort wahrscheinlich gemacht werden.

Im Falle der Dimerisierung von L-Leucinamid unter Ammoniakaustritt wurde die Reaktion quantitativ verfolgt, ein kinetisches Modell aufgestellt und auf dieses die „steady state“-Behandlung angewendet.

Einige kinetische Parameter werden mitgeteilt.

The same active centre is probably responsible for both hydrolysis and transfer activity.

The dimerisation of L-leucinamide with loss of ammonia was followed quantitatively, and the resulting kinetic model was converted to steady state conditions.

Some kinetic parameters are given.

lange Zeit ungeklärte Frage, ob die enzymatische Verknüpfung niedermolekularer Peptide (plasteinaktiver Peptide) zu höhermolekularen Peptiden (Plastein) durch Pepsin, Chymotrypsin und Trypsin eine Kondensationsreaktion unter Wasseraustritt ist oder durch Transpeptidierung, verbunden mit Aufspaltung einer Peptidbindung, erfolgt, konnte in neuerer Zeit durch WIELAND et al. entschieden werden. Während HOROWITZ und HAUROWITZ³ noch 1955 bei der durch Chymotrypsin katalysierten Plasteinreaktion dem Transpeptidierungsmechanismus den Vorzug gaben, da sie keine Abnahme der Zahl der Aminoendgruppen feststellen konnten,

³ J. HOROWITZ u. F. HAUROWITZ, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3138 [1955].

zeigten WIELAND u. Mitarb.⁴⁻⁸ in einer Reihe von Untersuchungen unter Verwendung von synthetischen plasteinaktiven Pentapeptiden, daß sowohl für Pepsin als auch für Chymotrypsin der Kondensationsmechanismus zutrifft.

Im Gegensatz zu den Befunden bei der Plasteinreaktion handelt es sich bei der Polymerisation von Dipeptidamiden durch Kathepsin C um einen Transpeptidierungsmechanismus^{9,10}. Dieses Enzym kann allerdings, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben^{11,12}, nicht länger zu den Endopeptidasen gezählt werden. FRUTON hat daher den Namen Dipeptidyltransferase vorgeschlagen¹¹. Über eine Transamidierung unter Polymerenbildung bei Einwirkung einer ungereinigten und physiko-chemisch nicht näher charakterisierten Rinderlungenprotease auf Aminosäureamide und -ester wurde bereits 1955 von DANNENBERG und SMITH¹³ berichtet. Eine Dimerisation von D-Aminosäureestern (D-Methionyl-isopropylester) beobachteten 1952 BRENNER et al.¹⁴, wenn sie Rattenleberhomogenat als Enzymquelle einsetzten, wofür vielleicht die Befunde von FRUTON u. Mitarb.¹⁵ über die stereospezifische Wirkung einer gereinigten Aminoacyltransferase aus Rinderleber auf D-Phenylalanyl-methylester unter Bildung von D-Phenylalanyl-D-phenylalanin eine Erklärung liefern. Die Arbeitskreise um FRUTON

und HANES^{16,17} haben schon sehr frühzeitig nach Beziehungen solcher Reaktionen zur Peptidbiosynthese gesucht. Inzwischen hat die Entdeckung der DNA-kodierten Proteinbiosynthese die Betrachtungen über die Mitwirkung von Peptidasen beim Eiweißsynthetisiervorgang stark zurücktreten lassen. Jedoch hat in neuerer Zeit die Auffindung enzymatischer Transferfaktoren, die die Übertragung des Peptidylrestes auf Aminoacyl-sRNA (die bereits codegerecht an den Komplex mRNA-Ribosom adaptiert ist) katalysieren, die Peptidasen mit gleichzeitiger Esterasefunktion wieder etwas mehr in das Gesichtsfeld proteosynthetischer Prozesse gerückt. Außerdem ist eine gewisse eigenständige Rolle der Peptidasen bei Nebenwegen, wie beispielsweise die spezifische Kettenverlängerung von bereits synthetisierten Proteinen oder die Synthese von kurzkettingen Peptiden durchaus nicht ausgeschlossen. So gelang zum Beispiel MACH¹⁸ der Nachweis einer nichtkodierten Synthese von Polypeptidantibiotika in *Bacillus brevis*. Eine Kettenverlängerung der A-Kette des Insulins durch Kathepsin C, wobei es zur Übertragung von Glycyl-L-tyrosyl-Resten auf den aminoterminalen Glycyl-Rest kommt, konnten FRUTON u. Mitarb.¹⁹ nachweisen.

Bei Untersuchungen in unserem Laboratorium über den Zeitpunkt der Nachweisbarkeit bestimmter Exopeptidasen und über die Stärke ihrer Aktivität im Verlaufe der Embryonalentwicklung des Hühnchens wurde bei Versuchen zur enzymatischen Spaltung von L-Leucinamid durch Dottersack- und Dotter-Homogenate (papierchromatographische Methodik) beobachtet, daß außer den erwarteten Flecken von Leucin und Leucinamid eine weitere ninhydrinpositive Substanz mit höherem R_F -Wert als Leucin auftrat²⁰. Es lag nahe, an ein durch die Enzymeinwirkung gebildetes Dileucin oder Dileucinamid zu denken. Da für diese Untersuchungen Rohhomogenate des Dottersackes von Hühnerembryonen oder deren Organe verwendet wurden, waren Aussagen darüber, ob die für die Leucinamidspaltung in Betracht zu ziehende Leucinamino-

⁴ T. WIELAND, H. DETERMANN u. E. ALBRECHT, Liebigs Ann. Chem. **633**, 185 [1960].

⁵ H. DETERMANN u. T. WIELAND, Makromolekulare Chem. **44/46**, 312 [1961].

⁶ H. DETERMANN u. O. ZIPP, Liebigs Ann. Chem. **649**, 203 [1961].

⁷ H. DETERMANN, O. ZIPP u. T. WIELAND, Liebigs Ann. Chem. **651**, 172 [1962].

⁸ H. DETERMANN, H.-J. TORFF u. O. ZIPP, Liebigs Ann. Chem. **670**, 141 [1963].

⁹ H. WÜRZ, A. TANAKA u. J. S. FRUTON, Biochemistry [Washington] **1**, 19 [1962].

¹⁰ J. S. FRUTON u. M. H. KNAPPENBERGER, Biochemistry [Washington] **1**, 674 [1962].

¹¹ R. M. METRIONE, A. G. NEVES u. J. S. FRUTON, Biochemistry [Washington] **5**, 1597 [1966].

¹² R. J. PLANTA, J. GORTER u. M. GRUBER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **89**, 511 [1964].

¹³ A. M. DANNENBERG u. E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **215**, 55 [1955].

¹⁴ M. BRENNER, H. R. MÜLLER u. A. VETTERLI, Helv. chim. Acta **35**, 227 [1952].

¹⁵ T. A. KRENITSKY u. J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **241**, 3347 [1966].

¹⁶ J. S. FRUTON, R. B. JOHNSTON u. M. FRIED, J. biol. Chemistry **190**, 39 [1951].

¹⁷ C. S. HANES, F. J. R. HIRD u. F. A. ISHERWOOD, Biochem. J. **51**, 25 [1952].

¹⁸ B. MACH, Schweiz. med. Wschr. **26**, 944 [1964].

¹⁹ C. ZILOUDROU, S. FUJII u. J. S. FRUTON, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 439 [1958].

²⁰ E. MÜLLER, Dissertat. Math.-Nat. Fak., Univ. Halle 1965.

peptidase eine eventuelle Verknüpfungsreaktion katalysieren könne, nicht möglich. Deswegen wurde zur Klärung dieser Frage kristalline Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen²¹ auf L-Leucinamid und einige andere Substrate zur Einwirkung gebracht. Die in diesen Untersuchungen bei Leucinamidzusatz auftretende ninhydrinpositive Substanz mit hohem *R_F*-Wert wurde angereichert und konnte als L-Leucyl-L-leucinamid identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird über diese In-vitro-Transferreaktionen in Systemen mit L- oder D-Leucinamid, L-Valinamid, L-Phenylalaninamid bzw. gewissen L-Aminosäure-methylcellosolveestern als Aminoacyldonor und -acceptor unter Verwendung von kristallisierter Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase berichtet. Erste kinetische Ansätze werden mitgeteilt.

Material und Methoden

1. Reagenzien

Tris[hydroxymethyl]aminomethan, p. a. (Arco); zur Bereitung von Tris-HCl-Puffer im pH-Bereich 7,0–9,1.

Borsäure, p. a.; zur Bereitung von Borat-NaOH-Puffer im pH-Bereich von 9,2–10,0.

Diisopropylfluorophosphat (Uhlein Chemie, Berlin-Wilmersdorf).

2-Mercapto-äthanol puriss. p. a. (Fluka AG).

p-Chlormercuri-benzoat (Fa. Light & Co.).

Fließmittelsysteme für die aufsteigende Papierchromatographie:

System I: sec. Butanol/Ameisensäure/Wasser (80:10:10)

System II: Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser (6:7:6)

2. Substrate und Referenzsubstanzen

L-Leucinamidacetat, dargestellt nach CHAMBERS und CARPENTER²²:

Schmp. Lit.²² 125–126°C N ber. 14,65

$[\alpha]_D^{20}$ Lit. + 9,25²³

Schmp. gef. 124°C N gef. 14,74

$[\alpha]_D^{20}$ gef. + 9,0 (*c* = 5; in Wasser)

L-Valinamidacetat, in Analogie zum Leucinamidacetat dargestellt²²:

papierchromatographisch N ber. 15,92

nicht völlig rein N gef. 15,70

²¹ H. HANSON, D. GLÄSSER u. H. KIRSCHKE, diese Z. **340**, 107 [1965].

²² R. W. CHAMBERS u. F. H. CARPENTER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1522 [1955].

²³ O. K. BEHRENS u. M. BERGMANN, J. biol. Chemistry **129**, 587 [1939].

L-Phenylalaninamidacetat, in Analogie zum Leucinamidacetat dargestellt²²:

Schmp. gef. 110°C N ber. 12,50

N gef. 12,41

L-Leucyl-L-leucinamidacetat^{a*} wurde nach der Azidmethode in Anlehnung an²⁴ dargestellt:

Schmp. gef. 125–130°C N ber. 13,88

N gef. 13,80

$[\alpha]_{546}^{20}$ + 6,6 (*c* = 3; in Wasser)

Glycyl-L-tyrosinamidacetat, dargestellt nach VAUGHAN und OSATO²⁵:

Schmp. gef. 145°C N ber. 14,10 $[\alpha]_D^{20}$ Lit. + 28,0²⁶

N gef. 13,80 $[\alpha]_D^{20}$ gef. + 29,0

(*c* = 10; in Wasser)

Weiterhin wurden verwendet:

L-Leucyl-L-leucin^b (Schuchardt), D-Leucinamidacetat^c und die Methylcellosolveester^d von L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin^a.

3. Enzympräparationen

a) Rattenserum

Durchschnittlich 200 g schweren weiblichen Albino-Ratten wurde in Äthernarkose durch Herzpunktion Blut entnommen und das Serum bei 2–3°C Rotortemperatur in einer Kühlzentrifuge („Espirouette“, Phywe AG, Göttingen) bei einer Normalbeschleunigung von 3000 bis 5000 × *g* abgetrennt. Das so gewonnene nicht hämolytische Serum kam stets unmittelbar nach der Zentrifugation zur Verwendung.

b) Kristalline Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase

Es wurden rekristallisierte, an unserem Institut nach l.c.²¹ routinemäßig hergestellte Enzympräparationen eingesetzt. Dabei fanden sowohl Präparationen, die durch kombinierte Zink-Hitze-Behandlung in Abwesenheit von Mangan-Ionen gewonnen wurden (mit „Mn-frei“ bezeichnet), als auch solche, die unter gleichzeitiger Zugabe von Mn-Ionen kristallisiert worden waren (mit „Mn-LAP“ bezeichnet) Verwendung. In der Transferaktivität zeigte sich allerdings keinerlei Unterschied, wenn bei den Mn-freien Präparationen nachträglich mit Mn²⁺ oder Mg²⁺ aktiviert wurde. Da für die an un-

* Die hochgestellten Buchstaben sind Hinweise auf die entsprechende Stelle im Dank am Schluß der Arbeit.

²⁴ E. L. SMITH, D. H. SPACKMAN u. W. J. POLGLASE, J. biol. Chemistry **199**, 801 [1952].

²⁵ J. R. VAUGHAN u. R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **73**, 5553 [1951].

²⁶ M. BERGMANN u. J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **145**, 253 [1942].

rem Institut aus Rinderaugenlinsen isolierte Leucinaminopeptidase alle bisher durchgeführten Reinheitsprüfungen ein homogenes Enzym gezeigt hatten^{27,28}, konnte bei kinetischen Auswertungen und Aktivitätsvergleichen unter Zugrundelegung einer Molmasse von 325900²⁸ die nach LOWRY bestimmte Konzentration an Enzymeiweiß in molaren Konzentrationen ausgedrückt werden.

4. Definitionen

I. Prozent Hydrolyse vom Gesamtumsatz:

$$\frac{\mu\text{Mol Aminosäure freigesetzt}}{\mu\text{Mol Substrat umgesetzt}} \cdot 100$$

II. Prozent Transfer vom Gesamtumsatz:

$$\frac{\mu\text{Mol Dimerisat gebildet}}{\mu\text{Mol Substrat umgesetzt}} \cdot 200$$

III. Prozent Substrat umgesetzt:

$$\frac{\mu\text{Mol Substrat umgesetzt}}{\mu\text{Mol Substrat eingesetzt}} \cdot 100$$

Die freigesetzte Menge Aminosäure und die Menge an Dimerisationsprodukt wurden jeweils experimentell bestimmt und daraus die umgesetzten Mikromole Substrat errechnet.

Es ist zu beachten, daß der hier gebrauchte Begriff Prozent Hydrolyse nicht mit dem in der Literatur häufig anzutreffenden Ausdruck der prozentualen Hydrolyse für den Gesamtumsatz eines Substrates identisch ist. Vielmehr wurden Prozent Hydrolyse und Prozent Transfer so gewählt, daß sie sich, wie aus der Definition hervorgeht, immer zu 100% ergänzen, so daß in jedem Zeitpunkt ersichtlich ist, in welchem Ausmaße Hydrolyse und Transfer am Substratumsatz beteiligt sind.

5. Isolierung und Identifizierung der Transferprodukte L-Leucyl-L-leucin und L-Leucyl-L-leucinamid

a) Isolierung

Die Inkubationsansätze besaßen folgende Zusammensetzung:

- 0,1 ml Enzymverdünnung (krist. Leucinaminopeptidase, 10^{-3} mg N/ml)
- 0,2 ml MgCl_2 ($5 \cdot 10^{-2}$ M)
- 0,1 ml Substrat (1M): L-Leucinamid für die Isolierung von L-Leucyl-L-leucinamid und L-Leucylmethylcellosolveester für L-Leucyl-L-leucin
- 0,6 ml Tris-HCl-Puffer (pH 8,5)

Diese Ansätze wurden bei 37°C 5 Min. lang im Thermostaten inkubiert, danach wurden 0,8–1,2 ml strichförmig auf 4–5 Chromatogramme aufgetragen (Chro-

matographiepapier FN 13 des VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag/Erzgeb.). Nach aufsteigender Chromatographie (Fließmittel I) und Markierungsfärbung mit Ninhydrin wurden gleich große Papierstreifen, auf denen das jeweilig interessierende Produkt lokalisiert war, zusammen mit benachbarten Kontrollstreifen ausgeschnitten und die Substanzen mit Methanol eluiert. Versuche, das Fließmittel auch als Elutionsmittel zu verwenden, führten zu starken Substanzverlusten durch Humifizierung und Diketopiperazinbildung beim freien Dipeptid. Die stets mitgeführten Kontrollstreifen wurden auf Peptidfremdmateriale in den verwendeten Papierchargen geprüft.

Durch dieses mikropräparative Verfahren ließen sich im Durchschnitt 30–50 µg Transferprodukt pro Chromatogramm isolieren. Die Eluate wurden für die weiteren Versuche zur Identifizierung im Kaltluftstrom eingengt und ihr Gehalt an Dipeptidamid bzw. Dipeptid durch quantitative Papierchromatographie bestimmt.

b) Identifizierung

Die Identifizierung erfolgte durch Referenzläufe mit den synthetisch dargestellten Substanzen in den Fließmittelsystemen I und II, Prüfung der Alkalistabilität (da zunächst Verdacht auf Bildung eines Aminosäureesters bestand), Ermittlung der Extinktionsvervielfachung des Ninhydrinfarbstoffes nach enzymatischer Totalhydrolyse mit kristalliner Leucinaminopeptidase, wobei als einziges ninhydrinpositives Endprodukt Leucin entstand, sowie durch Vergleich des experimentellen und theoretischen Quotienten Gesamtstickstoff: Amidstickstoff. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes erfolgte nach einer an unserem Institut entwickelten Mikromethode^{29d}. Zur Ermittlung des Amidstickstoffes wurde ebenfalls die enzymatische Totalhydrolyse in Verbindung mit einer Mikro-Conway-Diffusionstechnik³⁰ und der Indophenolblaureaktion³¹ herangezogen. Die Zuverlässigkeit der Amidstickstoff-Bestimmung von Aminosäureamiden wurde mit bekannten Einwaagen von L-Leucinamid nach Totalhydrolyse mit Leucinaminopeptidase ($5 \cdot 10^{-2}$ mg N/ml) überprüft. Der Prozentsatz der Wiedergewinnung lag zwischen 97 und 100.

6. Bestimmung der Hydrolyse- und Transferaktivität

Es wurde von 2 miteinander nicht in Beziehung stehenden Bestimmungsmethoden Gebrauch gemacht: a) Mikroinkubationen in Verbindung mit der quantitativen Papierchromatographie und b) spektrophotometrische Bestimmung der Ultraviolettabsorption der Peptid-(Säureamid)bindung bei 225 nm. Die getrennte Bestimmung von Hydrolyse und Transfer in einem In-

²⁹ P. BOHLEY, diese Z. **348**, 100 [1967].

³⁰ H. FASOLD, P. LINHART u. F. TURBA, Biochem. Z. **336**, 182 [1962].

³¹ H. WELLER, Röntgen- u. Laboratoriumsprax. XV. Jahrg., Heft 14, L 77, L 142 [1962].

²⁷ H. HANSON, D. GLÄSSER, M. LUDEWIG, H.-G. MANNFELDT, M. JOHN u. H. NESVADBA, diese Z. **348**, 689 [1967].

²⁸ K. KRETSCHMER u. H. HANSON, diese Z. **340**, 126 [1965].

kubationsansatz war nur mit der quantitativen Papierchromatographie möglich.

Bei den spektrophotometrischen Untersuchungen wurde zur Klärung bestimmter Befunde in der Zeit-Umsatz-Kurve (s. dort) im betreffenden Zeitabschnitt diskontinuierlich Inkubationsgemisch entnommen und qualitativ durch Papierchromatographie auf Bildung von Transamidierungsprodukt untersucht.

a) *Quantitative Papierchromatographie*

Die Auswertung erfolgte durch Probeentnahmen aus den Mikroinkubationsansätzen (0,1 ml Gesamtvolumen) und aufsteigende Papierchromatographie im Fließmittelsystem I, wobei die Entwicklung der Chromatogramme und die Elution des Dioxohydrindylidendioxohydrindamin-Farbstoffes nach³² vorgenommen wurde. Die Anzahl der freigesetzten Mikromole Aminosäure bzw. Transamidierungsprodukt L-Leucyl-L-leucinamid wurden über die auf jedem Chromatogramm mitgeführten Eichwerte, bei L-Leucyl-L-leucinamid in einigen Fällen auch über den molaren Extinktionskoeffizienten erhalten.

Die Extinktionsmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578$ nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm oder $d = 2$ cm an einem Eppendorf-Photometer.

b) *Spektrophotometrische Bestimmungen im UV-Bereich*

Die Aminosäureamid- und die Peptidbindung zeigen im UV zwischen 200 und 240 nm eine je nach Art der Seitenketten unterschiedlich starke, im allgemeinen jedoch gegenüber den freien Aminosäuren deutlich erhöhte Absorption, so daß deren Hydrolyse durch Verfolgung der Extinktionsänderung meßbar ist.

Für die Bestimmung der Peptidaseaktivitäten mit niedermolekularen synthetischen Substraten, wobei in der Meßküvette je nach Reinheit der Enzympräparation stets eine mehr oder weniger hohe störende Eiweißkonzentration vorliegt (Streulichteffect), ist eine Messung bei kürzeren Wellenlängen als 220 nm kaum noch sinnvoll, zumal dort die Absorption der freien Aminosäuren steil ansteigt. Über die Bestimmung von Peptidaseaktivitäten durch Absorptionsmessungen zwischen 200 und 240 nm ist bereits mehrfach berichtet worden³³⁻³⁵.

Mit L-Leucinamid als Substrat haben BINKLEY und TORRES³³ die Messungen bei 235 und 240 nm ausgeführt. Wenn jedoch die Proteinkonzentration niedrig gehalten werden kann, wie im Fall der hier verwendeten hochgereinigten kristallisierten Leucinaminopeptidase, so empfiehlt sich die Bestimmung bei 225 nm, da bei dieser

³² P. BOHLEY, *Naturwissenschaften* **14**, 326 [1962].

³³ F. BINKLEY u. C. TORRES, *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 201 [1960].

³⁴ A. SCHMITT u. G. SIEBERT, *Biochem. Z.* **334**, 96 [1961].

³⁵ L. I. SLOBIN u. F. H. CARPENTER, *Biochemistry* [Washington] **5**, 499 [1966].

Wellenlänge die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{Leu-NH}_2} - \epsilon_{\text{Leu}}$) größer ist als bei 235 nm. Sie betrug 104 unter Versuchsbedingungen, unter denen der molare Extinktionskoeffizient für Leucin zu 30 bestimmt wurde. Die Messungen wurden im „Uvispek“-Spektrophotometer der Fa. Hilger & Watts, London, bei einer Schichtdicke von 0,5 cm, einer Spaltbreite von 1,15 mm und einem Endvolumen von 1,0 ml ausgeführt.

Die Inkubation erfolgte bei $38 \pm 0,1^\circ\text{C}$ nach ausreichender Vortemperierzeit. Die Vergleichsküvette enthielt den jeweiligen Puffer, eine dem Hauptansatz äquivalente Enzymkonzentration und gegebenenfalls die im Hauptansatz verwendete Menge an Effektor. Der Extinktionsabfall in der Meßküvette nach Start mit Enzym wurde 10–15 Min. lang verfolgt und die Initialgeschwindigkeit der Reaktion ($\Delta E/\text{Min.}$) aus der Neigung des linearen Teiles der Extinktions-Zeit-Kurve bestimmt. Der $\Delta E/\text{Min.}$ -Wert, bezogen auf 1 cm Schichtdicke ergab nach Division durch die Differenz ($\epsilon_{\text{Leu-NH}_2} - \epsilon_{\text{Leu}}$) die umgesetzten Mole Substrat pro Liter und Minute.

7. *Test auf Kathepsin-C-Aktivität*

Der Nachweis einer durch Leucinaminopeptidase katalysierten Transferreaktion, der unseres Wissens bisher trotz gezielter Versuche³⁶, noch nicht gelungen ist, ließ zunächst eine Spurenverunreinigung unserer Enzympräparation mit Kathepsin C, von dem man weiß, daß es zahlreiche Reaktionen dieser Art katalysiert, möglich scheinen. Es wurde deshalb Glycyl-L-tyrosinamid (Endkonzentration 0,05M) bei pH 4,9 (Citratpuffer 0,05M) unter Zusatz von Mercaptoöthanol (Endkonzentration 10^{-2}M) mit rekristallisierter Leucinaminopeptidase inkubiert. Die Auswertung erfolgte auch hier papierchromatographisch, wobei als Referenzen Glycin, Glycyl-L-tyrosin, L-Tyrosinamid und Tyrosin mitgeführt wurden.

Unter den gegebenen Bedingungen traten keine papierchromatographisch nachweisbaren Spaltprodukte auf.

Bei einem pH-Wert von 8,1 und sonst gleichen Bedingungen erfolgte die Spaltung, wie erwartet, schrittweise vom Aminoende her.

Ergebnisse

1. *Identifizierung von L-Leucyl-L-leucin und L-Leucyl-L-leucinamid*

Nach präparativer Isolierung im Mikromaßstab der im Fließmittelsystem I aus dem Inkubationsgemisch abgetrennten Substanzen wurden diese bei Zimmer-temperatur mit 1N NaOH 30 Min. lang der alkalischen Hydrolyse unterworfen. Beide Verbindungen erwiesen sich unter diesen Bedingungen als alkali-

³⁶ R. L. HILL u. E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* **224**, 209 [1957].

stabil. Die enzymatische Totalhydrolyse ergab die erwartete Extinktionsverdoppelung, wenn man in Rechnung setzt, daß die papierchromatographisch ermittelten millimolaren Extinktionskoeffizienten für Leucin im Mittel rund 20 ($\pm 1\%$) und für synthetisches L-Leucyl-L-leucin und L-Leucyl-L-leucinamid 10 ($\pm 5\%$ betragen (s. Tab. 1).)

Tab. 1. Vergleich der Extinktionen nach Ninhydrinreaktion der enzymatisch totalhydrolysierten Substanzen und der nichthydrolysierten Verbindungen (Vergleichsinkubation) bei 1 cm Schichtdicke und 578 nm.

Enzymatisches Totalhydrolysat		Vergleichsinkubation	
<i>Leucyl-leucinamid</i>			
0,293	} Meßwerte	0,078	} Meßwerte
0,277		0,070	
0,284		0,073	
0,285	Mittelwert	0,073	Mittelwert
-0,032	mittl. Leucinleerwert des Eluates + Papierleerwert	-0,017	Papierleerwert
= 0,255* korrig. Wert		= 0,056* korrig. Wert	
<i>Leucyl-leucin</i>			
0,212	} Meßwerte	0,055	} Meßwerte
0,204		0,054	
0,230		0,055	
0,215	Mittelwert	0,055	Mittelwert
-0,026	mittl. Leucinleerwert des Eluates + Papierleerwert	-0,014	Papierleerwert
= 0,189**korrig. Wert		= 0,041**korrig. Wert	

* Extinktionsverhältnis vor Hydrolyse: nach Hydrolyse = 0,056 \times 2:0,255 = 1:2,28 (der Korrekturfaktor 2 ergibt sich aus dem Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{Leu-Leu-NH}_2}:\epsilon_{\text{Leu}} = 1:2$).

** Extinktionsverhältnis vor Hydrolyse: nach Hydrolyse = 0,041 \times 2:0,189 = 1:2,3 (der Korrekturfaktor 2 ergibt sich aus dem Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{Leu-Leu}}:\epsilon_{\text{Leu}} = 1:2$).

Obwohl die erhaltenen Extinktionsverhältnisse 1:2,28 und 1:2,3 beide über dem theoretischen Wert 1:2 liegen, was als systematischer Fehler bewertet werden könnte, glauben wir uns doch berechtigt, von einer ungefähren Extinktionsverdoppelung zu sprechen, zumal umfangreiche Untersuchungen der papierchromatographischen Methodik einen nicht unbeträchtlichen statistischen Fehler in den betreffenden Extinktionsbereichen

ergeben: Leucin 1%, mittlerer Leucinleerwert des Eluates 6%, L-Leucyl-L-leucin 10%, L-Leucyl-L-leucinamid 14% (detailliertere Angaben siehe³⁷).

In späteren Versuchen wurde von einer hinsichtlich der Farbausbeute methodisch verbesserten quantitativen Papierchromatographie Gebrauch gemacht³⁸, wobei besonders durch die 2- bis 3fach verlängerten Trockenzeiten des durch die Entwicklerlösung (0,5proz. Ninhydrin in Aceton) gezogenen Chromatogrammes die Ninhydrinreaktion auf dem Papier vollständiger abläuft. Nach diesem Verfahren lag bei gleichbleibendem Wert für Leucin der millimolare Extinktionskoeffizient für L-Leucyl-L-leucinamid bei 13,5, was bei den Berechnungen entsprechend Berücksichtigung fand.

Ein weiterer Identitätsnachweis war von der Bestimmung des Quotienten Gesamtstickstoff : Amidstickstoff zu erwarten.

Bei den geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen kamen für die Analysen nur Mikromethoden in Frage. Die im methodischen Teil genannten und auf ihre Brauchbarkeit getesteten Methoden wurden auf die mikropräparativ isolierten fraglichen Substanzen angewendet, wobei sich folgende Werte ergaben:

a) *Leucyl-leucinamid*:

Gesamtstickstoff (Vierfachbestimmungen): 50 μ l Eluat ergaben 2,46 μ g N (nach Abzug eines Papierleerwertes entsprechend 0,74 μ g N).

Amid-N: 50 μ l Eluat ergaben 0,8 μ g Amid-N.

Gesamt-N: Amid-N = 3,08:1.

b) *Leucyl-leucin*:

Kein Amidstickstoff nachweisbar.

2. Bedingungen für eine Transferaktivität in vitro mit L-Leucinamid als Substrat

Wird L-Leucinamid in einer Endkonzentration von 0,05M unter Optimalbedingungen für die hydrolytische Aktivität²¹ mit kristalliner Leucinaminopeptidase (Konz.: 1,74 $\cdot 10^{-10}$ Mol/l) inkubiert, so läßt sich im allgemeinen außer dem Endprodukt Leucin (R_F -Wert = 0,5; System I) papierchromatographisch keine weitere ninhydrinpositive Substanz nachweisen. Nur inkonstant und schlecht reproduzierbar kann man bei Substratumsätzen von 5% und weniger bzw. bei Verringerung der Enzym-

³⁷ J. LASCH, Dissertat. Med. Fak., Univ. Halle 1967.

³⁸ S. ANSORGE u. P. BOHLEY, unveröffentlichte Befunde.

konzentration die Bildung einer ninhydrinpositiven Substanz (R_F -Wert = 0,62) beobachten. Es konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um L-Leucyl-L-leucinamid handelt.

Verwendet man jedoch Rattenserum ohne Metallionenzusatz als Enzymquelle, so läßt sich konstant eine beträchtliche enzymatische Transamidierung feststellen (Abb. 1).

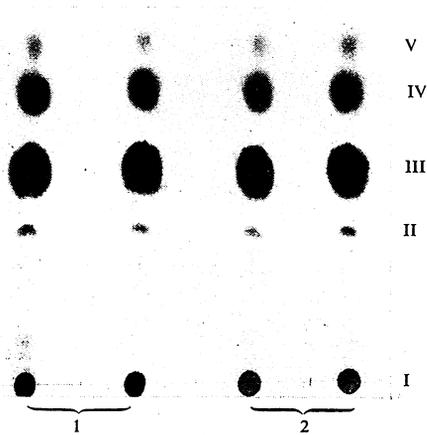


Abb. 1. Inkubation von L-Leucinamid (Endkonz. 0,05M) bei einem pH-Wert von 8,5 (HCl-Tris-Puffer) mit Rattenserum in einer Endverdünnung von 1:5 (1) und 1:10 (2).

- I = Serumproteine;
- II = Verunreinigung im zur Synthese von L-Leucinamid verwendeten Leucin (VEB Berlin-Chemie);
- III = L-Leucinamid;
- IV = Leucin;
- V = L-Leucyl-L-leucinamid.

Der gleiche Befund wurde in anderen Laboratorien des Institutes bei Verwendung von Homogenaten von Leber, Milz, Lunge sowie von Dotter und Dottersack des bebrüteten Hühnereies wie auch bei der Anreicherung von Schweinenieren-Leucinaminopeptidase erhoben^{20,39}.

Als entscheidender Faktor für die Begünstigung der Transamidierung gegenüber der Hydrolyse konnte auch bei Inkubationen unter Zusatz von proteinfreiem Rattenserumwasser das vorhandene bzw. zugesetzte $Mg^{2\oplus}$ als Aktivator anstelle von $Mn^{2\oplus}$ ermittelt werden. Erhöht man jedoch die Substratkonzentration auf 0,1M und hält den Substratumsatz durch Verminderung der Enzymkonzentration oder besser durch stark verkürzte Inku-

³⁹ H. KIRSCHKE u. H.-J. HÜTTER, unveröffentlichte Befunde.

bationszeiten kleiner als 5%, so läßt sich auch unter den Optimalbedingungen der hydrolytischen Aktivität eine meßbare Transamidierung erzielen. Für weitere Untersuchungen wurde wegen der besseren Reproduzierbarkeit jedoch $Mg^{2\oplus}$ -aktiviertes rekristallisiertes Enzym bei einem pH-Wert von 10,0 bzw. 8,5 verwendet. Unter diesen Bedingungen ließen sich, wie Abb. 2 zeigt, recht gut meßbare Transamidierungen erreichen.

Die Komplexität des vorliegenden Systems erschwerte quantitative Aussagen beträchtlich. Das ist einmal auf die Tatsache zurückzuführen, daß das Transamidierungsprodukt L-Leucyl-L-leucinamid als kompetitives Substrat schneller als L-Leucinamid umgesetzt wird (z. B. ist das L-Leucyl-L-leucinamid bei einer maximalen intermediären Konzentration von 0,9 mMol/l und einer 55,6mal so hohen Konzentration an L-Leucinamid schon wieder zu 100% hydrolysiert, wenn erst 64% des L-Leucinamids umgesetzt sind (Abb. 4), zum anderen darauf, daß das „pH-Optimum“ des Transfers als scheinbares Optimum durch eine gegensinnige pH-Abhängigkeit der L-Leucyl-L-leucinamid-Hydrolyse vorgetäuscht werden kann und vice versa.

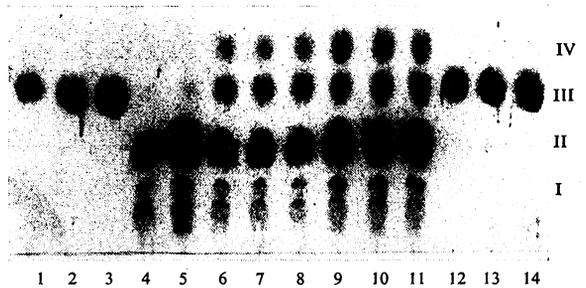


Abb. 2. Kurzzeitinkubationen von L-Leucinamid, pH 8,5, mit krist. Leucinaminopeptidase (Mn-LAP), $[E]_0 = 9,8 \cdot 10^{-9}$ Mol/l, Präinkubation mit $Mg^{2\oplus}$ ($10^{-2}M$) 30 Min.

- 1–3 und 12–14 = Leucinreferenzen;
- 4 = Substratleerwert $[L\text{-Leucinamid}]_0 = 0,05M$;
- 5 = Substratleerwert $[L\text{-Leucinamid}]_0 = 0,125M$;
- 6–8 = Substratkonz. 0,05M; Inkubationszeiten: 5, 15 und 25 Sek.;
- 9–11 = Substratkonz. 0,125M; Inkubationszeiten: 5, 15 und 25 Sek.;
- I = Verunreinigungen (s. Legende zu Abb. 1);
- II = L-Leucinamid;
- III = Leucin;
- IV = L-Leucyl-L-leucinamid.

3. Transferaktivitätstestungen mit anderen Substraten

a) D-Leucinamid

Setzt man D-Leucinamid als Substrat ein, so kann man selbst bei Endkonzentrationen von 0,125 Mol/l weder Leucin noch L-Leucyl-L-leucinamid nachweisen. Diese zu erwartende praktisch absolute Stereospezifität findet man nicht bei der gelegentlich beobachteten nichtenzymatischen Transamidierung in konzentrierten, alkalischen, wäßrigen Lösungen von L-Leucinamid, bei welcher das Enantiomerenpaar gleichartig reagiert.

b) L-Valinamid

Mit L-Valinamid war unter identischen Bedingungen wie für den L-Leucinamidtest bisher mit der hier verwendeten Methodik kein Transamidierungsprodukt nachweisbar.

c) L-Phenylalaninamid

Es war eine beträchtliche Transamidierung zu einem Produkt, in dem wir zunächst per analogiam Phenylalanyl-phenylalaninamid vermuten, konstant nachweisbar (Papierchromatographie im Fließmittel I). Auch hier waren höhere Polymere nicht auffindbar.

d) L-Aminosäure-methylcellosolveester

Diese relativ energiereichen Aminosäureester, die man als Modell-Substanzen für die Aminosäure-Riboseester betrachten kann, wurden mit L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin als Aminosäure-Komponenten eingesetzt.

Dimerisationsprodukte traten nur beim L-Leucyl- und L-Phenylalanyl-methylcellosolveester auf, wobei es sich bei ersterem um L-Leucyl-L-leucin handelte und bei letzterem vermutlich um L-Phenylalanyl-L-phenylalanin, wofür die Identifizierung allerdings noch aussteht. Ein Leucyl-leucinester war wohl wegen der beträchtlichen Instabilität bisher nicht faßbar.

Der L-Tyrosinester lieferte bei den bisherigen Versuchen keine Syntheseprodukte, doch bedarf dieser Befund weiterer Überprüfung mit anderen Trennverfahren.

4. Ergebnisse der spektrophotometrischen Messungen

Verfolgt man die Extinktionsabnahme (bei 225 nm) während der Einwirkung von kristalliner Leucinaminopeptidase auf L-Leucinamid bei verschiedenen Substratkonzentrationen, so zeigt sich das schon 1959 von BINKLEY und TORRES³³ in ihren Versuchen mit Leucinamid-hydrochlorid beschrie-

bene, aber von ihnen nicht näher geklärte paradoxe Phänomen einer inversen Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Abb. 3).

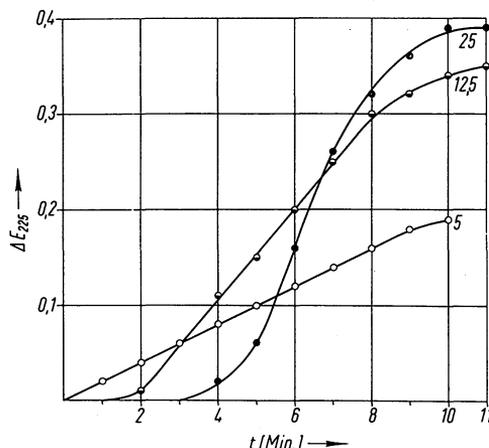


Abb. 3. Inkubation von L-Leucinamid mit Leucinaminopeptidase (Mn-frei), pH 8,2, 38°C, Mg²⁺-Aktivierung (2 · 10⁻³M). Leucinamid-Ausgangskonzentrationen: ●—● : 25 mMol/l; ○—○ : 12,5 mMol/l und ○—○ : 5 mMol/l.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, vergrößert sich mit steigender Substratkonzentration die „lag-phase“ der Reaktion. Im linearen Teil der Kurven zeigen die Reaktionsgeschwindigkeiten jedoch die zu erwartende Abhängigkeit von der Substratkonzentration und liefern in diesem Bereich einen K_m-Wert in guter Übereinstimmung mit dem papierchromatographisch gewonnenen Wert. Es handelt sich bei diesem scheinbar paradoxen Verhalten der Initialgeschwindigkeiten offensichtlich um eine die Extinktionszunahme verzögernde Knüpfung einer Peptidbindung, da papierchromatographische Kontrollen des Inkubationsgemisches in der Küvette im Zeitintervall der „lag-phase“ die Bildung von L-Leucyl-L-leucinamid anzeigen.

5. Beeinflussbarkeit des Transfers durch „gruppenspezifische“ Reagenzien

Um eine enzymkinetische Modellvorstellung von der Transferreaktion entwickeln zu können, schien die isolierte Beeinflussung der Hydrolyse- und Transferaktivität wünschenswert. Darüber hinaus galt es, die Frage eines Acyl-Enzyms (z. B. Leucyl-Serin-Enzym) als Intermediat des Transfers zu

prüfen, zumal für alle bisher bekannt gewordenen analogen Transferierungsreaktionen hydrolytischer Enzyme diese Zwischenverbindung postuliert und in der Mehrzahl der Fälle auch nachgewiesen wurde.

Nachdem bereits in einer früheren Arbeit mit Rinderlinsenhomogenat⁴⁰ weder mit DFP noch mit anderen klassischen Esteraseinhibitoren eine Hemmung der hydrolytischen Aktivität nachgewiesen werden konnte, ließ sich zeigen, daß auch die Transferaktivität kristalliner Leucinaminopeptidase mit DFP nicht beeinflussbar ist (Tab. 2).

Durch neuere Untersuchungen in unserem Institut konnte erwiesen werden, daß Sulfhydryl-Reagenzien zu einer beträchtlichen Hemmung der hydrolytischen Leucinaminopeptidase-Wirkung führen⁴¹, obwohl Sulfhydryl-Gruppen nicht im Sinne eines Thiol-Enzyms am „make up“ des aktiven Zentrums beteiligt zu sein scheinen. Beim Vergleich von Transfer- und hydrolytischer Aktivität nach Einwirkung von *p*-Chlormercuri-benzoat läßt sich eine gleichsinnige Hemmung nachweisen (Tab. 3).

Auch mit „gealterter“ Leucinaminopeptidase^{6e}, d. h. einer in 1proz. Konzentration 6 Monate bei Zimmertemperatur in Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, keimfrei aufbewahrten, die bei der Polyacrylamid-elektrophorese etwas weiter wanderte als simultan aufgetragenes, frisch präpariertes Enzym, was als gewisser Hinweis auf bereits erfolgten Selbstabbau gewertet werden kann⁴², ließ sich eine Differenzierung zwischen den beiden Aktivitäten nicht vornehmen.

Darüber hinaus zeigten die beiden Aktivitäten keine merklichen Unterschiede in der Thermolabilität.

Tab. 2. Beeinflussbarkeit der Hydrolyse- und Transferaktivität kristalliner Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase durch DFP.

Präinkubation mit DFP: 15 Min., 25°C, pH 7,5 (Tris-HCl-Puffer 0,05M); DFP-Konzentration: 10^{-3} M; Enzymkonzentration: $[E]_0 = 1,34 \cdot 10^{-8}$ Mol/l.

Zusammensetzung des Inkubationsansatzes: 20 μ l Enzymlösung (mit und ohne DFP-Präink.), 20 μ l $MgCl_2$ ($5 \cdot 10^{-2}$ M), 20 μ l Substrat (L-Leucinamidacetat, 0,25M), 40 μ l Puffer, pH 10,0 und pH 7,5; Inkubation: 37°C, 30 Min., Enzymkonz.: $[E]_0 = 2,66 \cdot 10^{-9}$ Mol/l; Substratkonz.: 50 μ Mol/ml.

Die Bestimmung der Anzahl umgesetzter Mikromole Substrat sowie der Mikromole freigesetzten Leucins, bzw. gebildeten L-Leucyl-L-leucinamids erfolgte mit der quantitativen Papierchromatographie wie im methodischen Teil (S. 1529) angegeben.

	pH 7,5		pH 10,0	
	ohne DFP	mit DFP	ohne DFP	mit DFP
μ Mol Substrat/ml umgesetzt	5,40	4,82	17,1	16,0
μ Mol Leu/ml freigesetzt	3,10	2,68	13,1	12,0
μ Mol Leu-Leu-NH ₂ pro ml gebildet	1,15	1,07	2,0	2,0
% Umsatz	10,80	9,65	34,2	32,0
% Hydrolyse	57,40	55,60	76,6	75,0
% Transfer	42,60	44,40	23,4	25,0

Tab. 3. Beeinflussbarkeit der Hydrolyse- und Transferaktivität kristalliner Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase durch *p*-Chlormercuri-benzoat (pCMB). Mikroinkubationen bei pH 10,0, 30 Min., 37°C, $[E]_0 = 3,27 \cdot 10^{-9}$ Mol/l; Aktivierung mit Mg^{2+} : 10^{-3} M; Endkonzentration an L-Leucinamid: 50 μ Mol/ml.

pCMB	freigesetztes Leucin	gebildetes Leu-Leu-NH ₂	umgesetztes Substrat Summe aus Spalte 2 und 3	Hydrolyse	Transfer	Umsatz
[Mol/l]	[μ Mol/ml]	[μ Mol/ml]	[μ Mol/ml]	[%]	[%]	[%]
—	7,40	1,09	9,58	77,4	22,6	19,20
10^{-8}	5,35	0,63	6,61	81,0	19,0	13,20
10^{-6}	0,99	0,17	1,33	74,5	25,5	2,66
10^{-4}	0,38	unter der Nachweisgrenze	(0,38)	—	—	0,76

⁴⁰ R. KLEINE u. H. HANSON, Acta biol. med. german. 9, 606 [1962].

⁴¹ M. FROHNE u. K. KRETSCHMER, Vortrag, 3. Tagung d. Biochem. Ges. d. DDR vom 18.—20. 9. 1966 in Suhl (Thür.).

⁴² Nach Beobachtungen unseres Laboratoriums.

6. *Quantitative Verfolgung der enzymatischen Transamidierung und einige enzymkinetische Parameter*

Für die quantitative Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Entstehung und simultanen Hydrolyse von L-Leucyl-L-leucinamid wurde die papierchromatographische Bestimmungsmethode verwendet. Abb. 4 demonstriert einen typischen Konzentrationsverlauf des intermediär gebildeten L-Leucyl-L-leucinamids bei einer L-Leucinamid-Ausgangskonzentration von 0,05 Mol/l.

Abb. 5 illustriert die Ergebnisse des gleichen Versuches nach Umrechnung der L-Leucyl-L-leucinamid-Konzentrationen in % Transfer.

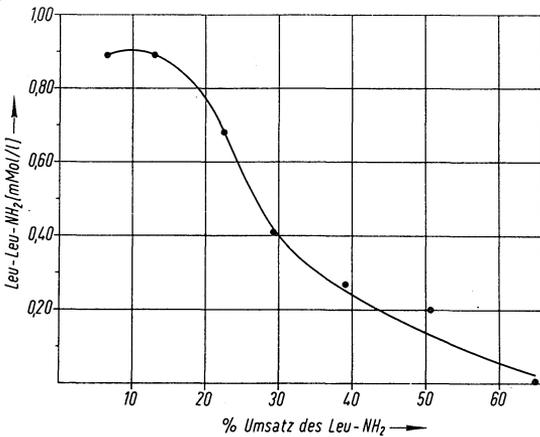


Abb. 4. Inkubation von L-Leucinamid mit Mg²⁺-aktivierter (10⁻³M) Leucinaminopeptidase (Mn-frei), pH 10,0, 37°C. Der Umsatz von Leucinamid wurde aus dem Gehalt von Leucin und Leucyl-leucinamid errechnet.

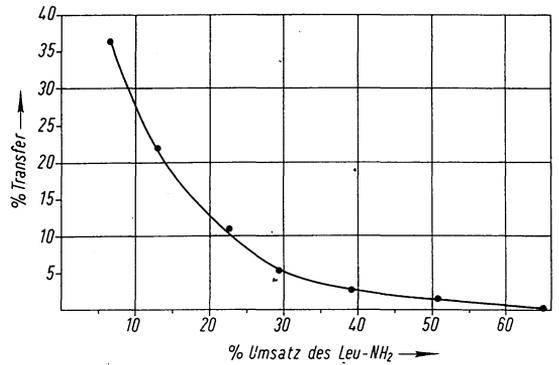


Abb. 5. Darstellung der in % Transfer umgerechneten Werte aus Abb. 4.

Messungen der effektiven L-Leucyl-L-leucinamid-Konzentrationen (Resultante der simultanen Synthese und Hydrolyse) in Abhängigkeit von der umgesetzten Anzahl der Mole L-Leucinamid bei verschiedenen L-Leucinamid-Ausgangskonzentrationen, konstanter Enzymmenge und unter Einbeziehung initialer Meßwerte (ab 30 Sek. nach Start der Reaktion mit Enzym) ergaben die in Abb. 6 dargestellten Kurvenverläufe.

Der Verlauf der Kurven der Abb. 6 erweckt den Verdacht eines 100proz. Transfers bei [Leu-NH₂]_t → [Leu-NH₂]_{t=0}. Dieser ließ sich tatsächlich mehrfach nachweisen, allerdings nur bei den mit der verwendeten Methode kürzest möglichen Inkubationszeiten von 5–6 Sek. (zuzüglich 5–6 Sek. Antrocknungszeit auf dem Papierchromatogramm im Warmluftstrom). Ein typisches Beispiel zeigt Tab. 4.

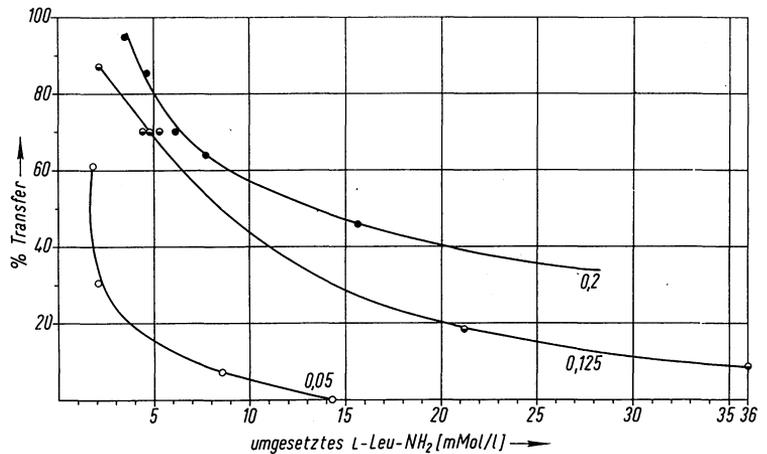


Abb. 6. Inkubation von L-Leucinamid verschiedener Ausgangskonzentration mit Leucinaminopeptidase bei pH 8,5, 37°C und Mg²⁺-Aktivierung (5 · 10⁻³M). Leucinamid - Ausgangskonzentrationen:
 ○—○: 0,05 Mol/l; ○—○ : 0,125 Mol/l und ●—●: 0,2 Mol/l.

Tab. 4. Nachweis eines 100proz. Transfers durch Kurzzeitinkubation (5 Sek.) und geeignet hoch gewählter Leucinamid-Ausgangskonzentration (200 $\mu\text{Mol}/\text{ml}$). Mikroinkubationen bei pH 8,5, $[\text{E}]_0 = 1,15 \cdot 10^{-8} \text{Mol}/\text{l}$, 37°C, Mg^{2+} -Aktivierung (10^{-3}M).

umgesetztes Substrat	$[\mu\text{Mol}/\text{ml}]$	3,05
freigesetztes Leucin	$[\mu\text{Mol}/\text{ml}]$	0,00
gebildetes L-Leucyl-L-leucinamid	$[\mu\text{Mol}/\text{ml}]$	1,53
Umsatz	$[\%]$	1,53
Hydrolyse	$[\%]$	0,00
Transfer	$[\%]$	100,00

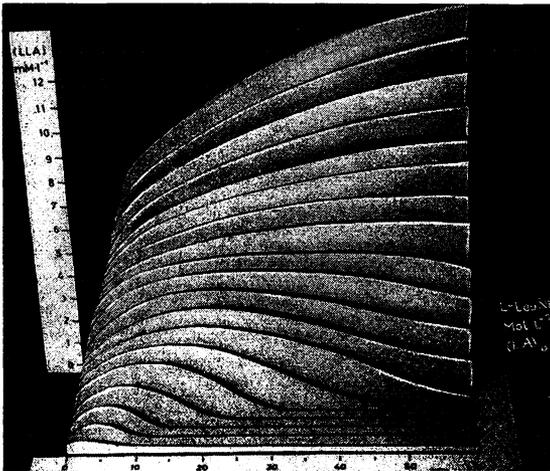


Abb. 7. Verläufe der effektiven Konzentrationen an L-Leucyl-L-leucinamid als Funktion der Zeit und der Leucinamid-Ausgangskonzentration bei konstanter Enzymgesamt-konzentration $[\text{E}]_0 = 1,15 \cdot 10^{-8} \text{Mol}/\text{l}$. pH 8,5; Aktivierung durch $\text{Mg}^{2+} 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$. Abszisse: Zeit in Min.; linke, senkrechte Ordinate: Leucyl-leucinamid-Konzentration $[\text{mMol}/\text{l}]$; rechte, waagerechte Ordinate: Leucinamid-Ausgangskonzentration $[\text{Mol}/\text{l}]$.

Für die kinetischen Untersuchungen war es erforderlich, eine Serie von Zeit-Umsatzkurven des L-Leucyl-L-leucinamids bei verschiedenen Leucinamid-Ausgangskonzentrationen $[\text{Leu-NH}_2]_0$ zu ermitteln, aus der sich auch die initiale Transamidierungsgeschwindigkeit als Funktion von $[\text{Leu-NH}_2]_0$ gewinnen ließ. Die erhaltenen Kurvenverläufe sind in Abb. 7 dargestellt.

Die experimentell zugänglichen kinetischen Parameter (K_m -Wert und k_{kat} *) der hydrolytischen Leucinaminopeptidase-Wirkung mit L-Leucinamid

* $k_{\text{kat}} = V/[\text{E}]_0$ (entspricht der molekularen Aktivität); (kat. = katalytisch).

als Substrat wurden graphisch nach LINEWEAVER und BURK und/oder EADIE gewonnen (Tab. 5). Die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten ließen sich mit der papierchromatographischen Methode über die Initialtangente bzw. spektrophotometrisch aus dem linearen Teil der Extinktions-Zeit-Kurve (E_{225}) gewinnen.

Tab. 5. Einige kinetische Parameter der kristallinen Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase (LAP). (Substrat: L-Leucinamid).

	$10^2 \cdot K_m$ $[\text{Mol}/\text{l}]$	$10^{-4} k_{\text{kat}}$ $[\text{Sek.}^{-1}]$	Akti- vator	Methode
pH 10,0 38°C LAP („Mn-frei“)	1,0	2,56	Mg^{2+}	spektro- photo- metrisch
pH 8,2 38°C LAP („Mn-frei“)	3,33	3,78	Mn^{2+}	spektro- photo- metrisch
pH 10,0 38°C LAP („Mn-LAP“)	3,33	1,12	—	spektro- photo- metrisch
pH 8,7 37°C LAP („Mn-LAP“)	3,33	2,24	Mn^{2+}	papier- chromato- graphisch

Die bei den graphischen Auswerteverfahren vorgenommenen Extrapolationen $[\text{Leu-NH}_2]_0 \rightarrow \infty$, die die bei hohen Substratkonzentrationen beträchtliche L-Leucyl-L-leucinamid-Bildung unberücksichtigt lassen, führen zwar zu reproduzierbaren K_m - und k_{kat} -Werten, wenn man nur die auf einer Geraden liegenden Punkte der linearen Transformation verwendet, doch lassen sich diese so gewonnenen scheinbaren K_m - und k_{kat} -Werte, wie aus dem folgenden vorgeschlagenen Modell hervorgeht, nicht im Rahmen eines einfachen MICHAELIS-MENTEN-Mechanismus interpretieren. Sie sind Grenzwerte für die Hydrolyse bei nicht meßbar kleiner Transamidierung, d. h. bei genügend kleiner Substratkonzentration. In Abb. 8 ist eine typische LINEWEAVER-BURK-Auftragung gezeigt. Die Aufkrümmung der Kurve wird durch die starke Zunahme der Transamidierungsgeschwindigkeit auf Kosten der Hydrolysegeschwindigkeit in diesem Konzentrationsbereich verursacht.

Die zunehmende Transamidierungsgeschwindigkeit mit steigender L-Leucinamid-Ausgangskonzentration ließ eine „Quasi-Substrathemmung“ der Hydrolyse erwarten. Diese konnte auch nachgewiesen werden (Abb. 9).

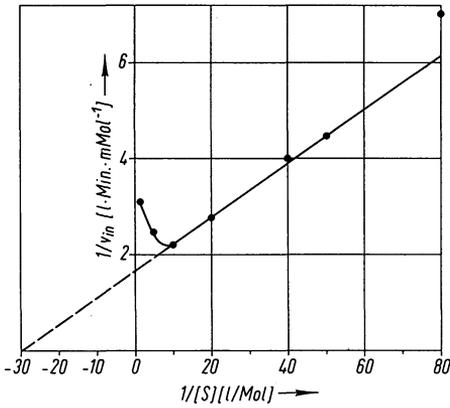


Abb. 8. LINEWEAVER-BURK-Auftragung $1/v_{in}$ (Hydrolyse) gegen $1/[Leu-NH_2]_0$ (v_{in} = Initialgeschwindigkeit).

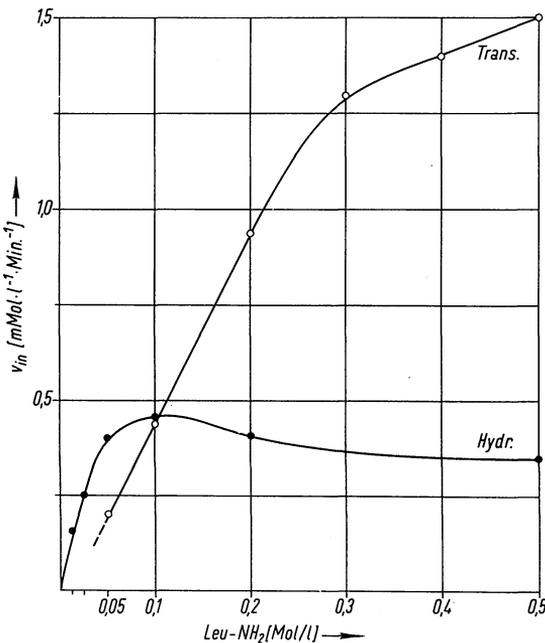


Abb. 9. Mikroinkubationen von Leucinamid in steigenden Ausgangskonzentrationen mit LAP („Mn-LAP“) bei pH 8,5, 37°C, Mg^{2+} -Aktivierung ($10^{-3}M$), graphische Ermittlung (Initialtangente) der Initialgeschwindigkeiten aus Zeit-Umsatz-Kurven im Zeitbereich 0,5 bis 30 Min., bei höheren Substratkonzentrationen bis maximal 120 Min. ●—●: Hydrolyse, $[E]_0 = 9,8 \cdot 10^{-9} Mol/l$; ○—○: Transamidierung, $[E]_0 = 1,15 \cdot 10^{-8} Mol/l$.

Durch Co-Inkubationen mit D-Leucinamid ließ sich sichern — Ausbleiben der Substrathemmung und Transamidierung —, daß die „Quasi-Substrat-

hemmung“ nicht auf eine Verringerung der Wasserkonzentration oder auf unspezifische Hemmung durch die hohen Substratkonzentrationen zurückgeführt werden kann.

7. Aufstellung eines kinetischen Modells

a) Verwendete Symbole

Größe	Chemisches Symbol	Mathematisches Symbol
Freies Enzym	E	e
Totale Enzymmenge	E_0	e_0
Substrat (Leu-NH ₂)	S-x	a
Substrat zur Zeit t = 0	S-x ₀	a ₀
Dimerisat (Leu-Leu-NH ₂)	S-S-x	b
Dimerisat zur Zeit t = 0	S-S-x ₀	b ₀
Substrat-Enzym-Komplex I (ES-x)	(ES-x)	p
Substrat-Enzym-Komplex II (ES-S-x)	(ES-S-x)	q
Endprodukt I (Leucin)	y	y
Endprodukt II (NH ₃)	x	x

Die zu den einzelnen Reaktionspartnern gehörenden Reaktionsgeschwindigkeiten werden wie folgt bezeichnet:

$$dp/dt = \dot{p}; \quad dq/dt = \dot{q}; \quad da/dt = \dot{a}; \quad \text{usw.}$$

Plateaukonzentration an L-Leucyl-L-leucinamid = $+b = -\dot{b}$.

b) Reaktionsschema (Abb. 10)

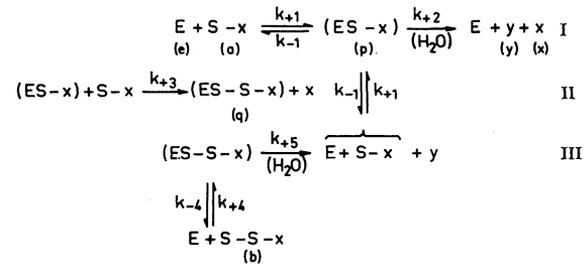


Abb. 10. Enzymkinetisches Modell der L-Leucyl-L-leucinamid-katalysierten Transamidierung und Hydrolyse von L-Leucinamid.

c) Anwendung der „steady state“-Behandlung auf das Modell und Vergleich berechneter mit experimentell gewonnenen Konzentrationsverläufen

Da unseres Wissens über die Kinetik des hier mitgeteilten oder eines ähnlichen Systems noch nicht

berichtet wurde, seien erste kinetische Ansätze kurz mitgeteilt.

Aus der Differentialgleichung für den Umsatz von b

$$\dot{b} = k_{-4} q - k_{+4} b e$$

wobei in q noch p enthalten ist, erhält man durch Substitution von p und q aus den „steady state“-Ansätzen ($\dot{p} = \dot{q} = 0$) und der Forderung für das Konzentrationsplateau: $\dot{b} = -b$, also $b = 0$, für die Plateaukonzentration folgenden Ausdruck:

$$b_{\text{Plateau}} = \frac{k_{+1} k_{+3} k_{-4} a^2}{(k_{-1} + k_{+2} + k_{+3} a) k_{+4} k_{+5}} \quad (1)$$

Da, wie aus den Ausführungen auf Seite 1531 hervorgeht, die Hydrolyse von L-Leucyl-L-leucinamid wesentlich schneller verläuft als diejenige von L-Leucinamid, wird es zum Auftreten von freiem L-Leucyl-L-leucinamid erst kommen, wenn $k_{+3} a > k_{-1} + k_{+2}$ ist, d. h. aber auf Gleichung (1) angewendet, daß die Plateaukonzentration an L-Leucyl-L-leucinamid (b_{Plateau}) gegen $[\text{Leu-NH}_2]_0$ aufgetragen, eine Gerade ergeben müßten (da die Plateaukonzentrationen schon nach sehr geringen L-Leucinamid-Umsätzen erreicht werden, kann für diese Betrachtung $a \approx a_0$ gesetzt werden). Wie die Abb. 11 zeigt (experimentell bestimmte Kurve), ergeben sich Abweichungen vom geradlinigen Verlauf bei den niederen Substratkonzentrationen. Es darf mit gutem Grund angenommen werden, daß bei so geringen intermediären L-Leucyl-L-leucinamid-Konzentrationen die „steady state“-Forderung $q = 0$ (quasistationärer Zustand) nicht mehr erfüllt ist. Wesentlich besser wird, wie noch gezeigt werden wird, der Verlauf der initialen Transamidierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der L-Leucinamid-Ausgangskonzentration wiedergegeben.

Versucht man den gesamten Zeitverlauf der L-Leucyl-L-leucinamid-Konzentration mit dem aufgestellten Modell mathematisch zu simulieren, so führt, wenn man außer der „steady state“-Forderung keine weiteren Annahmen und Näherungen macht,

$$\dot{b}_{t \rightarrow 0} = \frac{k_{+1} k_{+3} k_{-4} a_0^2 e_0}{(k_{-1} + k_{+2} + k_{+3} a_0)(k_{-4} + k_{+5}) + k_{+1} a_0 (k_{-4} + k_{+5}) + k_{+1} k_{+3} a_0^2} \quad (3)$$

Zur Anhäufung von meßbaren Mengen L-Leucyl-L-leucinamid wird es erst kommen, wenn $k_{+3} a_0 > k_{-1} + k_{+2}$ ist; damit vereinfacht sich die Gleichung (3) zu:

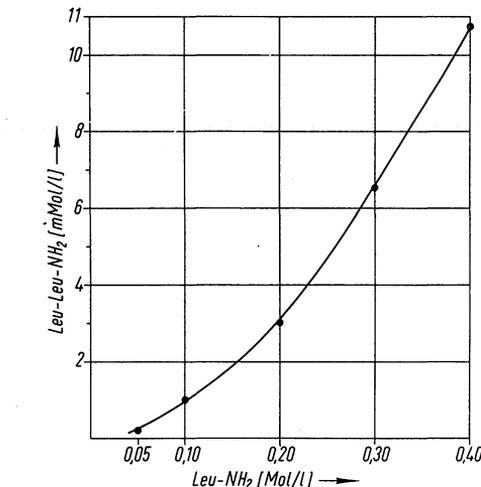


Abb. 11. Plateaukonzentrationen von L-Leucyl-leucinamid in Abhängigkeit von der L-Leucinamidkonzentration, $[E]_0 = 1,15 \cdot 10^{-8}$ Mol/l.

die Rechnung auf ein System nichtlinearer Differentialgleichungen, das für $a = a(t)$ und $b = b(t)$ nicht in geschlossener Form lösbar ist.

Da die Initialgeschwindigkeit der Transamidierung mit der Initialtangente-Methode zugänglich ist, war es jedoch möglich, deren Abhängigkeit von den L-Leucinamid-Ausgangskonzentrationen mit dem theoretischen Kurventyp zu vergleichen.

Substituiert man in der Differentialgleichung für die initiale Bildungsgeschwindigkeit von L-Leucyl-L-leucinamid

$$\dot{b}_{t \rightarrow 0} = k_{-4} q \quad (2)$$

unter Beachtung der Anfangsbedingung $b_0 = b(0) = 0$, p und q aus den „steady state“-Ansätzen (q enthält p) und e aus der Konservationsgleichung:

$$e_0 = e + p + q$$

so folgt für die initiale Transamidierungsgeschwindigkeit:

$$\dot{b}_{t \rightarrow 0} = \frac{k_{-4} a_0 e_0}{\frac{k_{-4} + k_{+5}}{k_{+1}} + \frac{k_{-4} + k_{+5}}{k_{+3}} + a_0} \quad (4)$$

Solange

$$\frac{k_{-4} + k_{+5}}{k_{+1}} + \frac{k_{-4} + k_{+5}}{k_{+3}} \gg a_0 \quad (5)$$

ist, liefert die Gleichung (4) eine Gerade; mit wachsendem a wird sich die Kurve krümmen, um schließlich bei Umkehr der Ungleichung (5) in eine Konstante überzugehen, die die Größe $\dot{b}_{t \rightarrow 0}(\max) = k_{-4}e_0$ hat. Den Verlauf der zugehörigen experimentellen Kurve zeigt Abb. 12.

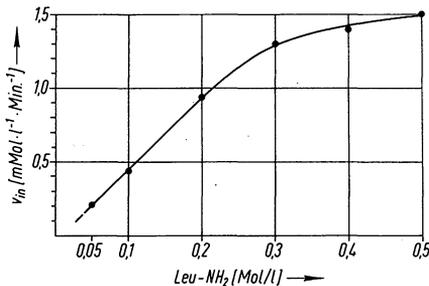


Abb. 12. Initiale Bildungsgeschwindigkeit von L-Leucyl-L-leucinamid in Abhängigkeit von der L-Leucinamid-Konzentration, bei einer Enzymkonzentration von $[E]_0 = 1,15 \cdot 10^{-8}$ Mol/l.

Der sehr einfach scheinende Weg einer direkten Bestimmung der kinetischen Parameter des Schrittes III des Modells mit synthetischem L-Leucyl-L-leucinamid ist leider nicht gangbar, da es offenbar, weil jetzt das Enzymmolekül nicht mehr von L-Leucinamid okkupiert ist, zur Bildung zweier weiterer im Lösungsmittel I sehr hoch wandernder ninhydrinpositiver Substanzen kommt, deren Identifizierung noch nicht gelungen ist. Es kann jedoch vermutet werden, daß es sich um höhere Polymere handelt.

Diskussion

Ob der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Transferreaktion mit kristalliner Rinderaugenlinsen-Leucinaminopeptidase eine physiologische Bedeutung zukommt, läßt sich nach den bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig entscheiden. Die für die Erfassung benötigten, relativ hohen Substratkonzentrationen sprechen nicht unbedingt gegen eine solche Reaktion in vivo. Aus Abb. 6 ist klar ersichtlich, daß initial der Transfer bevorzugt gegenüber der Hydrolyse abläuft. Würde in vivo das Syntheseprodukt aus der Reaktion entfernt, so

wäre die Transfereffektivität unter Umständen beträchtlich. Hinzu kommt, daß das isolierte kristallisierte Enzym hinsichtlich der Konformation und der Anwesenheit von Aktivitätsmodulatoren durchaus nicht mit dem in vivo vorliegenden Enzym identisch sein muß. Die wesentlich stärkere Transferaktivität von Rattenserum zum Beispiel läßt vermuten, daß es entweder andere Aminopeptidasen mit höherer Transferaktivität geben muß, oder daß die gleichen Enzyme intrazellulär und im Serum in modifizierten Zuständen vorliegen. Es ist auch denkbar, daß physiologischere, bisher nicht getestete Substrate, wie beispielsweise Riboseester von Aminosäuren oder Aminoacyl-Nucleoside, für den Transfer geeigneter sind. Zu dieser Frage sind im Institut Untersuchungen im Gange.

Abgesehen von einer möglichen biologischen Bedeutung ist die durch Leucinaminopeptidase katalysierte Transamidierung an sich eine interessante Reaktion, die zusätzliche Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat liefern kann.

Die Ergebnisse der Einwirkung von gruppenspezifischen Reagenzien und der Autodigestion machen eine Beteiligung des gleichen Wirkungsortes bei der Hydrolyse und beim Transfer sehr wahrscheinlich. Für die „Quasi-Substrathemmung“ der Hydrolyse bei Zunahme der Transamidierungsgeschwindigkeit wäre die plausibelste qualitative Erklärung die Annahme eines Bindungsortes für Wasser, der mit steigenden Substratkonzentrationen von einer zweiten Leucinamidmolekel besetzt wird. Das hätte eine Transamidierung anstelle der Hydrolyse zur Folge. Der Befund, daß sowohl die zunächst fallende initiale Hydrolysegeschwindigkeit (Abb. 9) als auch die steigende initiale Transamidierungsgeschwindigkeit limitierenden Werten zustreben, ließe sich dann zwanglos dadurch erklären, daß dieser Wasserbindungsort durch Leucinamid voll besetzt ist und die Resthydrolyse durch nicht gebundenes Wasser aus dem Lösungsmittel erfolgt. Verwendet man Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+} als Aktivator des Enzyms, so wird die Relation Hydrolyse: Transfer zugunsten der Hydrolyse verschoben.

Dieser Befund läßt sich nur sehr schwer mit der Annahme der Chelatisierung des Substrates durch Metallionen am aktiven Zentrum erklären. Da bei der Hydrolyse der Leucylrest auf die nucleophile Verbindung Wasser, bei der Transamidierung hingegen auf die nucleophile α -Aminogruppe eines zweiten Leucinamidmoleküls übertragen wird, muß

das Verhältnis von Hydrolyse zu Transfer im wesentlichen davon abhängen, in welchem Maße der jeweilige Acylacceptor Zugang zum aktiven Zentrum hat bzw. in welchem Ausmaß er in sterisch günstige Nachbarschaft zu der aktivierten Leucinamidmolekel gebracht werden kann.

Von diesen Überlegungen ausgehend scheint es viel wahrscheinlicher, daß die Differenzen in der Transferaktivität zwischen $Mn^{2\oplus}$ - und $Mg^{2\oplus}$ -aktiviertem Enzym Ausdruck einer durch die Metallionen verursachten konformativen Änderung des Proteinmoleküls sind. Auffällig ist, daß, wie schon in einer früheren Mitteilung unseres Institutes²¹ festgestellt wurde, die Werte für K_m (Hydrolyse) und k_{kat} (Hydrolyse) für eine Exopeptidase sehr hoch liegen. Eine befriedigende umfassende Interpretation ist zur Zeit noch nicht möglich. Bedenkt man, daß der Hydrolyse eine Transamidierung vorausgehen kann, wobei bei kleineren Substratkonzentrationen das Transamidierungsprodukt nur in unmeßbar kleinen Mengen vom Enzymmolekül abdissoziieren braucht, so wird klar, daß der K_m -Wert, der hier bestimmt wurde, eine sehr komplexe Größe sein muß, die sich aus allen individuellen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten des enzymkinetischen Modells zusammensetzt, wobei wir zunächst noch nicht wissen, welche Konstanten die Größe von K_m im wesentlichen festlegen.

Für den hohen k_{kat} -Wert der Hydrolyse bietet sich die Erklärung an, daß das für die Berechnung ver-

wendete Molekulargewicht von 325900 g/Mol, das mit der Ultrazentrifuge in einem Konzentrationsbereich von rund 0,3–1,0% bestimmt wurde²⁸, erheblich größer ist als das der katalytisch aktiven Enzymeinheit. Die automatische Titration der Leucinamidspaltung zeigte nämlich beim Start der Reaktion mit Enzym eine von der Größe des Verdünnungssprunges abhängige Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit, was als Hinweis auf ein konzentrationsabhängiges Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht des Enzyms gewertet werden könnte.

An dieser Stelle sei folgenden Damen und Herren für die freundliche Überlassung von Substraten und für Mitwirkung gedankt:

- a) Fräulein Dipl.-Chem. R. KOELSCH (wiss. Ass. am Physiol.-Chem. Inst.),
- b) Herrn Dipl.-Chem. D. FELICETTI (wiss. Ass. am Patholog. Inst. der Universität Halle),
- c) Frau Dipl.-Chem. M. FRITSCH (ehemalige wiss. Ass. am Physiol.-Chem. Inst.),
- d) Herrn Dr. med. P. BOHLEY (wiss. Ass. am Physiol.-Chem. Inst.) für die Ausführung der Mikrostickstoffbestimmungen,
- e) Herrn Dipl.-Chem. M. LUDEWIG (wiss. Ass. am Physiol.-Chem. Inst.) für die Überlassung gealterter Leucinaminopeptidase,
- f) Für die technische Mithilfe danken wir dem wiss. Graphiker Herrn G. OHNESORGE (Anatomisches Inst. der Med. Akademie Magdeburg).