

Modifizierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel mit dem Coenzymanalogen [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat

Modification of Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Rabbit Skeletal Muscle by [3-(3-Bromoacetylpyridinio)-propyl]-Adenosine Pyrophosphate

Gerhard Dietz, Christoph Woenckhaus

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Enzymologie, Frankfurt a. M.

Rainer Jaenicke

Biochemie II, FBB, Universität Regensburg, Regensburg

und

Inge Schuster

Sandoz Forschungsinstitut Gesellschaft m.b.H., Abteilung für Biochemie, Wien

(Z. Naturforsch. **32 c**, 85–92 [1977]; eingegangen am 7. Oktober/22. November 1976)

Affinity Labeling, Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, Hybrid Formation

The NAD analogue [3-(3-acetylpyridinio)-propyl]adenosine pyrophosphate forms enzymically inactive complexes with glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast and rabbit skeletal muscle. In the latter enzyme four mol of the analogue are bound with equal affinity inhibiting the enzyme in a competitive way: $K_I=0.3$ mM as compared to the dissociation constant $K_D=0.6$ mM.

The brominated derivative [3-(3-bromoacetylpyridinio)-propyl]adenosine pyrophosphate is covalently bound to both enzymes causing irreversible loss of enzymic activity. Complete inactivation of the enzyme from muscle requires two moles of the analogue per mol of tetramer. The remaining two sites are still able to bind two mol of NAD^+ without regain of enzymic activity. In the case of the yeast enzyme four mol of the analogue are bound. Inactivation of the rabbit muscle enzyme is accompanied by the disappearance of two out of four highly reactive sulfhydryl groups; in the yeast enzyme the four active site cysteine residues are still able to react with DTNB, the reactivity being diminished significantly.

Hybrid formation between the native enzymes from yeast and skeletal muscle is not affected by the modification of the enzyme. Similarly the sedimentation properties of the covalently modified enzyme are indistinguishable from those of the native molecule. This indicates that both the native and the irreversibly inhibited enzyme are identical regarding their quaternary structure.

Einleitung

Die Röntgenstrukturanalyse von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Hummermuskel^{1,2} läßt eine enge Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des Enzyms erkennen, welche die Kooperativität der Bindung des Coenzym NAD^+ ³⁻⁷ und

von „Half-site“-Liganden verständlich macht⁸⁻¹⁰. Die Bindungsstellen für das Coenzym NAD^+ liegen an der molekularen R-Achse, so daß ein Coenzym-Molekül zugleich durch Wechselwirkung mit Proteinseitenresten zweier benachbarter Untereinheiten fixiert wird¹. Dabei erklärt die geringe Entfernung des Nicotinamidteils vom Cysteinrest 149 die Ausbildung eines Charge-Transfer-Komplexes zwischen Coenzym und Protein¹¹. Da dieser Rest in der enzymatischen Reaktion das natürliche Substrat 3-Phosphoglycerat als Thioester bindet, führen chemische Modifizierungen zum Verlust der katalytischen Funktion des Enzyms⁴. Dabei zeigt sich, daß alkylierende Verbindungen, die ausreichend groß sind, um nach Anlagerung mit dem flexiblen Proteinteil der Nachbaruntereinheit in Wechselwirkung

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. C. Woenckhaus, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Enzymologie, Theodor-Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt a. M. 70.

Abkürzungen: Ellman's Reagenz, DTNB, 4,4'-Dinitro-3,3'-dicarboxy-diphenyl-disulfid; TNB[⊖], 6-Thio-2-nitrobenzoat.
Enzyme: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat: NAD-Oxidoreduktase (phosphorylierend) (EC 1.2.1.12).

zu treten, bereits vollständigen Verlust der Dehydrogenaseaktivität bewirken, wenn nur 2 der 4 aktiven Zentren besetzt sind. Ein Beispiel für dies Verhalten ist das Pseudosubstrat β -(2-Furyl)-acryloyl-phosphat⁸. Ähnlich konnten Woenckhaus *et al.*¹² für das Coenzymanalogue [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat Halb-Seiten-Reaktivität nachweisen.

In den folgenden Experimenten soll die Modifikation von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat in bezug auf die physikalisch-chemischen und enzymatischen Eigenschaften des Proteins näher untersucht werden. Als Prototypen für ein unterschiedliches kooperatives Verhalten bei der Bindung des Coenzym wird dabei das Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel und aus Hefe zugrundegelegt.

Material und Methoden

Enzyme, Coenzyme und Substrate

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel (Spez. Aktivität 160–180 IU/mg) wurde nach Ferdinand¹³ angereichert; das Enzym aus Hefe (Spez. Aktivität 140 IU/mg) nach Kirschner und Voigt¹⁴.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde bei 25 °C und 366 nm die Bildung von NADH im Photometer Eppendorf gemessen¹⁵. Die Proteinkonzentration wurde nach Bestimmung des Trockengewichts¹⁶ durch Absorptionmessungen oder durch die Biuretreaktion¹⁷ ermittelt. Die Enzymproben enthielten noch Nucleotide; durch Behandlung mit Aktivkohle¹⁸ (Norit A, Fa. Serva, Heidelberg) bei 0 °C bis zu einem Extinktionsverhältnis $E_{280\text{ nm}}/E_{260\text{ nm}} = 1,75 - 2,14$ erhält man das nucleotidfreie Enzympräparat. Für Hybridisierungsversuche wurden Präparationen mit $E_{280\text{ nm}}/E_{260\text{ nm}} = 1,80$ (Kaninchen-Skelettmuskel) und 2,02 (Hefe) zugrundegelegt. NAD[⊕], Glycerinaldehyd-3-phosphat wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen, Carbonyl-[¹⁴C]-markiertes NAD[⊕] (spez. Radioaktivität 30 mCi/mmol) von der Fa. Buchler, Amersham/Braunschweig, 4,4'-Dinitro-3,3'-dicarboxy-diphenyl-disulfid (DTNB), Dithiothreitol von der Fa. Serva Heidelberg.

Carbonyl-[¹⁴C]-markiertes [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat (Mol.-Gew. 627, spez. Radioaktivität 68 μ Ci/mmol) wurde wie früher beschrieben synthetisiert¹⁹. Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Alle Puffersubstanzen waren von höchster Reinheit.

Modifizierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Zur kovalenten Verknüpfung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat wurden 40 mg Apoenzym in 5 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 bei 25 °C mit Inaktivator bis zu einer Konzentration von 2 mM versetzt. Die Abnahme der enzymatischen Aktivität wurde verfolgt und nach Erreichen des gewünschten Wertes die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 0,1 M Dithioerythrit in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 abgebrochen. Inaktiviertes Enzym wurde an einer Sephadex-Säule (G 25 fine, 2 \times 50 cm) von niedermolekularen Bestandteilen abgetrennt oder durch erschöpfende Dialyse von überschüssigem Inaktivator befreit. Als Elutionsmittel diente 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Zur Bestimmung der Stöchiometrie des kovalenten Einbaues von Carbonyl-[¹⁴C]-markiertem Analogen wurde in den Enzymproben die Radioaktivität¹² bestimmt und das molare Einbauverhältnis berechnet.

Analytik

Die Bestimmung der reaktiven SH-Gruppen im Protein erfolgte bei 25 °C mit Ellman's Reagenz anhand der zeitlichen Zunahme der 6-Thio-2-nitrobenzoat-Konzentration; gemessen wurde der Extinktionsanstieg bei 412 nm ($E_{412\text{ nm}} = 13,6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)²⁰. Dazu wurden Proben von jeweils 3 ml einer 0,1-prozentigen Enzymlösung in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,3 ml einer 0,01 M DTNB-Lösung versetzt und die Extinktion mit einer Standard-Lösung gleicher Konzentration verglichen.

Die Gesamtzahl der SH-Gruppen wurde nach Warsarman²¹ in 9 M Harnstoff bestimmt.

Die Bestimmung der kompetitiven Hemmkonstante K_I von [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat wurde bei 25 °C durchgeführt. Die Konzentration an Coenzymanalogen variierte zwischen 0,1 mM und 0,2 mM im Testpuffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ g Enzym ausgelöst und die Reaktionsgeschwindigkeit als $\Delta E_{366\text{ nm}}/\text{min}$ bestimmt²².

Die Bindung von NAD[⊕] und 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid an natives und durch [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat inaktiviertes Enzym wurde mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse bei 25 °C nach einem Verfahren von Kirschner *et al.*⁵ bestimmt. Das verwendete [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat besaß eine Radioaktivität von 0,016 mCi/mmol. Die Konzentrationen in den Kammern der Gleichgewichtsdialyse wurden zwischen 0,08 und 5,5 mM

variiert. Carbonyl- ^{14}C -markiertes NAD^\ominus mit einer spezifischen Radioaktivität von 0,137 mCi/mmol wurde in Konzentrationen zwischen 0,022 mM und 1,25 mM eingesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 5 mg/ml in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Als Dialysemembranen dienten Membranfilter SM 11536 der Membranfiltergesellschaft, Göttingen. Bei 20 Umdrehungen der Kammern pro min bei 25 °C hatte sich das Gleichgewicht innerhalb von 2 h eingestellt. Danach wurden Enzymaktivität und Extinktionsverhältnis $E_{280\text{ nm}}/E_{260\text{ nm}}$ in der Enzymkammer und in beiden Kammern die Radioaktivität bestimmt. Da Coenzymbindung und enzymatische Aktivität in linearer Beziehung miteinander stehen²⁹, kann der Bindungsverlust, der durch partielle Denaturierung eingetreten ist, durch Messung der Enzymaktivitäten vor und nach der Dialyse korrigiert werden. Die Dissoziationskonstanten wurden graphisch im Scatchard-Diagramm ermittelt²³.

Hybridisierungsversuche mit Kaninchen-Skelettmuskel- und Hefe-Enzym wurden mit nucleotidfreien Enzympräparationen bei Konzentrationen von ca. 20 mg/ml Protein in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt. Je 10 mg Hefe- und Muskel-Enzym wurden mit [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat bis auf 7–10 IU/mg Restaktivität inaktiviert. Je 0,1 ml (2 mg) des nativen und inaktivierten Enzyms in 0,1 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 wurden gemischt und die spezifischen Enzymaktivitäten nach 10 min, 3, 11, 15 und 30 h gemessen. Aliquote Teile wurden der Gelelektrophorese unterworfen. Dazu wurden 0,02 ml der verschiedenen Mischungen mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 und mit etwas Bromphenolblau versetzt und die Mischung in Taschen einer 5-prozentigen Polyacrylamidgelplatte aufgetragen. Die vertikale Gelelektrophorese nach Raymond²⁴ erfolgte in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 60 min bei 400 V und 2–4 °C. Proteinbanden wurden im Gel durch Anfärben mit Amidoschwarz 10 B in 7-prozentiger Essigsäure sichtbar gemacht.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde ein Packard Tricarb- β -Liquid-Scintillation-Spectrophotometer 3003 verwendet. Als Scintillationslösung dienten 500 ml Dioxan, in dem 60 g Naphthalin, 2 g 2,5-Diphenyloxazol und 37,5 mg 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol gelöst waren²⁵.

Sedimentationskoeffizienten und das Gewichtsmittel des Molekulargewichts wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge, Spinco E, von Beckman Instruments bei 20–22 °C gemessen: „Charcoal-filled Epon“ Doppelsektorzellen, Schichtdicke 12 mm. Zur numerischen Berechnung von $s_{20,w}$ wurde die Wanderung des Gradienten (Schlieren oder Scans bei 280 nm) aus $\log r$ versus t Diagrammen ermittelt.

Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts wurde nach der Methode des „High-Speed-Sedimentation-Equilibrium“ aus der Steigung im $\log c$ versus r^2 Diagramm bestimmt^{26,27}. Als Lösungsmittel dienten: 8 M Harnstoff, 6 M Guanidinium-HCl und 0,1 M Kalium-Natriumphosphatpuffer, alle bei pH 7,0 und 5 °C.

Das partielle spezifische Volumen des Enzyms (V_p) und die Dichte der Lösungsmittel (ρ_0) wurden pyknometrisch²⁸ und mit Hilfe einer Dichtemeß-Apparatur DMA 2 nach Kratky, Leopold und Stabinger (Anton Paar, Graz) bestimmt.

UV-Spektren wurden im Cary-14 Spektralphotometer und Fluoreszenzspektren im Fluorometer MPF 4 der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen.

Ergebnisse

Reaktion von [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Das Coenzymanaloge [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat zeigt im Test mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase sowohl in der oxidierten als auch in der reduzierten Dihydro-Form keine Coenzymfunktionen. Seine Anwesenheit hemmt die natürliche enzymatische Reaktion kompetitiv gegenüber NAD^\ominus . Die Inhibitorkonstante, K_I , beträgt für das Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel 0,3 mM. Untersuchungen mit Hilfe der Gleichge-

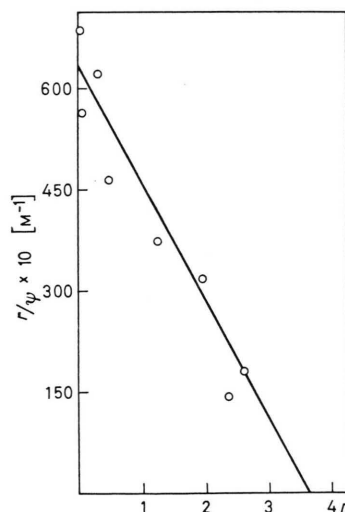


Abb. 1. Scatchard-Diagramm. Bindung von [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel. Abszisse: r = Zahl der gebundenen Mole Coenzymanalogen an 1 mol Tetramer. Ordinate: r/ψ = Konzentration des ungebundenen Coenzymanalogen.

chitsdialyse ergeben, daß $3,6 \pm 0,5$ mol des Coenzymanalogen an das tetramere Enzym gebunden werden (Abb. 1). Im Unterschied zu NAD^{\oplus} erfolgt die Bindung ohne Auftreten signifikanter positiv oder negativ kooperativer Effekte⁴ an vier Stellen des Enzyms. Die Dissoziationskonstante des Komplexes beträgt 0,6 mM. Im Gegensatz zum Enzym- NAD^{\oplus} - oder Enzym-Acetylpyridin-Adenosin-Dinucleotid-Komplex tritt bei der Bildung des Komplexes aus Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat keine Absorptionsbande bei 360 nm auf²⁹.

Inaktivierung der Enzyme aus Hefe und Kaninchen-Skelettmuskel mit [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat

In Gegenwart von 1 mM [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat verliert Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel bei pH 7,0, 37 °C, innerhalb von 30 min die katalytische Aktivität vollständig¹². Die Inaktivierung wird in Anwesenheit von 1 mM NAD^{\oplus} stark verlangsamt. Der Verlust der enzymatischen Aktivität verläuft parallel zum Einbau des Carbonyl-[¹⁴C]-markierten Analogons, wobei vollständige Inaktivierung bei Bindung von 2 mol des Coenzymanalogen pro Tetramer erreicht ist. Die Größe dieses Einbaues ist unabhängig von der Ausgangsaktivität des Enzyms und davon, ob es als Apo- oder Holoenzym vorliegt. Höherer Einbau findet sich auch nicht nach längerer Inkubation oder bei größerem Überschuß des Analogons.

Hefe-Enzym wird ebenfalls durch [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat rasch inaktiviert. Der Einbau ist jedoch höher als im Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel und läßt bei vollständiger Inaktivierung eine Stöchiometrie von 4 mol Inaktivator je Tetramer erwarten (Tab. I).

Inaktiviertes Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel kann noch 2 Moleküle Coenzym, NAD^{\oplus} , oder [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat binden (Abb. 2). Die Dissoziationskonstanten sind für beide Bindungsstellen gleich und betragen für das natürliche Coenzym, NAD^{\oplus} , 12 μM und für das Coenzymanalogue 1,0 mM. Eine Zunahme der UV-Absorption wird bei der Komplexbildung von inaktiviertem Enzym mit NAD^{\oplus} nicht beobachtet (Tab. II).

Die Inaktivierung beider Enzyme erfolgt unter Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Inaktivator und Protein. Im nativen Enzym aus Kanin-

Tab. I. Eigenschaften von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe vor und nach Inaktivierung mit [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat.

	natives	inaktiviertes Enzym *	
Restaktivität:	100%	27% a	12% b
Einbau: [mol Inaktivator pro mol Tetramer]	0	2,6	3
Anzahl rasch reagierender SH-Gruppen pro mol Tetramer	3,8–4	1,2	0,5

* Die Inaktivierung wurde bei 0 °C in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer pH 8,5, der 1 mM an [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat war, durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug bei ^a 10 mg/ml und bei ^b 3,7 mg/ml.

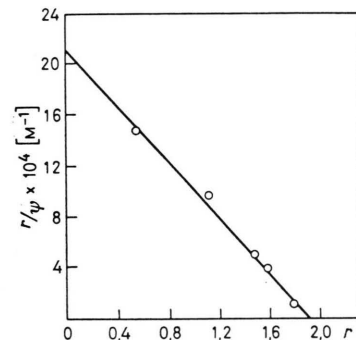


Abb. 2. Scatchard-Diagramm. Bindung von NAD^+ an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel. Das Enzym war durch [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat auf 2,8% Restaktivität inaktiviert.

chen-Skelettmuskel reagieren 4 der insgesamt 16 Sulfhydrylgruppen in schneller Reaktion mit Ellman's Reagenz. Nach vollständiger Inaktivierung durch das Coenzymanalogue werden nur noch zwei rasch reagierende SH-Reste erfaßt (Abbn. 3 a + b). In entsprechender Weise vermindert sich nach Aufaltung die Gesamtzahl von 16 SH-Gruppen im nativen Tetrameren auf 14 nach der Modifizierung des Enzyms. Die Abnahme titrierbarer Sulfhydrylreste steht in linearem Zusammenhang sowohl mit der Abnahme der enzymatischen Aktivität als auch mit dem Einbau von ¹⁴C-markiertem Coenzymanalogen. Im nativen Enzym aus Hefe reagieren 4 der insgesamt 8 Sulfhydrylgruppen schnell mit Ellman's Reagenz³⁰. Nach der Inaktivierung des Enzyms bleibt die Fähigkeit der Protein-SH-Gruppen mit DTNB zu reagieren erhalten, jedoch ist die Reak-

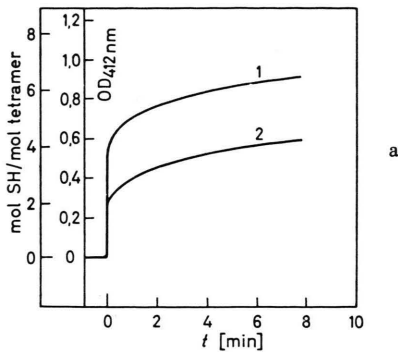


Abb. 3 a. Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Sulfhydrylgruppen mit DTNB. 1, natives Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel; 2, nach Inaktivierung auf 6% Restaktivität. Ordinate: Extinktion bei 412 nm.

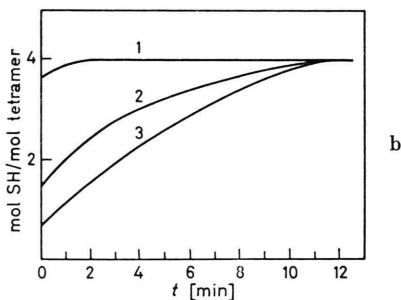


Abb. 3 b. Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Sulfhydrylgruppen mit DTNB. 1, natives Enzym aus Hefe; 2, nach Inaktivierung auf 27% Restaktivität; 3, nach Inaktivierung auf 12% Restaktivität.

tionsgeschwindigkeit der schnell reagierenden stark herabgesetzt. Der Verlust der schnell reagierenden SH-Gruppen korrespondiert dabei mit dem Inaktivierungsgrad des Enzyms (Tab. I und Abb. 3 b).

Durch Behandeln des inaktivierten Enzyms mit Natriumdithionit¹⁹ wird der Pyridinring des kova-

Tab. II. Bindung von NAD⁺ und [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat an Kaninchen-Skelettmuskel-Enzym.

Coenzym:	NAD ⁺		[3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat	
	nativ	inaktiviert	nativ	inaktiviert
Enzym:				
Bindung: [mol Ligand pro mol Enzym]	4	2	4	2
K _D	7 μM	12,0 μM	0,6 mM	1,0 mM
Absorption bei 360 nm	+	--	--	--

lent gebundenen Analogon in die 1,4-Dihydroform überführt. Die Reduktion wird durch das Auftreten einer UV-Absorptionsbande bei 380 nm angezeigt. Die Fluoreszenzeigenschaften der reduzierten Enzym-Coenzym-Verbindung entsprechen denen des NADH-Enzym-Komplexes: Die Fluoreszenz bei 340 nm wird bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm gelöscht. Die Intensität der Coenzymfluoreszenz bei 480 nm ist vermindert.

Quartärstruktur von inaktivierter Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Die Sedimentationsanalyse des chemisch modifizierten Enzyms führt zu einem Wert des Molekulargewichtes, der mit dem des Apoenzyms im Rahmen der Fehlergrenzen übereinstimmt (Tab. III); dieser Befund gilt für alle untersuchten Zwischenstufen der Inaktivierung. Für den Sedimentationskoeffizienten ergibt sich mit zunehmender Inaktivierung eine dem Molverhältnis Inaktivator/Enzym etwa proportionale Erhöhung von $s_{20,w}$. Wie im Falle des

Tab. III. Quartärstruktur von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel^a

		Apoenzym		inaktiviert ^d	
		$s_{20,w}^{\circ}$	M_w	$s_{20,w}^{\circ}$	M_w
Phosphat	pH 7,0	7,00 ± 0,05	144 000	7,30 ± 0,05 ^b	146 000
Borat	pH 8,6	7,0 ± 0,1	140 000	6,1 ± 0,1	<120 000 ^c
Borat	pH 10,0	6,5 ± 0,1	<120 000 ^c	4,7 ± 0,1	<90 000 ^c
8 M Harnstoff		1,3 ± 0,2	39 000	1,4 ± 0,2	42 000
6 M Guanidinium·HCl		1,0 ± 0,2	39 000	~1,2 ± 0,4	40 000

^a $s_{20,w}^{\circ}$ für $c=0,5$ mg/ml; M_w =Gewichtsmittel des Molekulargewichts aus high speed sedimentation equilibrium. $V_p^{20^\circ} = 0,737 \pm 0,002$ ml/g, $V_p^{50^\circ} = 0,730 \pm 0,005$ ml/g.

^b Mit zunehmendem Molverhältnis Inaktivator/Enzym steigt $s_{20,w}^{\circ}$ stetig an: Restaktivität 90%, $s_{20,w}^{\circ}=7,10$ S; 60%, 7,20 S; 30%, 7,28 S. Mittlerer Fehler $\Delta s < 1\%$

^c Konzentrationsabhängiges Dissoziationsgleichgewicht (für das Apoenzym vgl. ²⁸).

^d 5% Restaktivität, Molverhältnis des Einbaus: Inaktivator/Tetramer = $2,0 \pm 0,1$.

Apoenzym²⁸ tritt auch für das inaktivierte Enzym unter den gegebenen Bedingungen keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit von $s_{20,w}$ auf (Abb. 4). Weder das native noch das chemisch modifizierte Enzym zeigen bei Sedimentationsgleichgewichtsversuchen im Bereich $0,01 < c < 2,0$ mg/ml konzentrationsabhängige Dissoziation (Abb. 5).

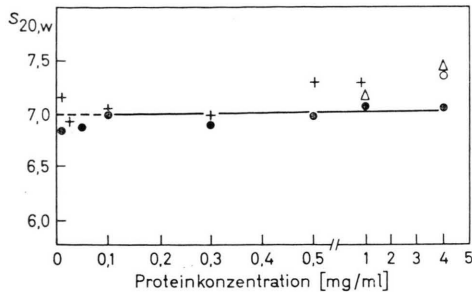


Abb. 4. Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel von der Proteinkonzentration. Phosphatpuffer pH 7,1, Ionenstärke 0,1; 20–23 °C; 44000 rpm. Apoenzym (●); inaktiviertes Enzym mit einer Restaktivität von 40% (○), 10% (△) und 2% (+).

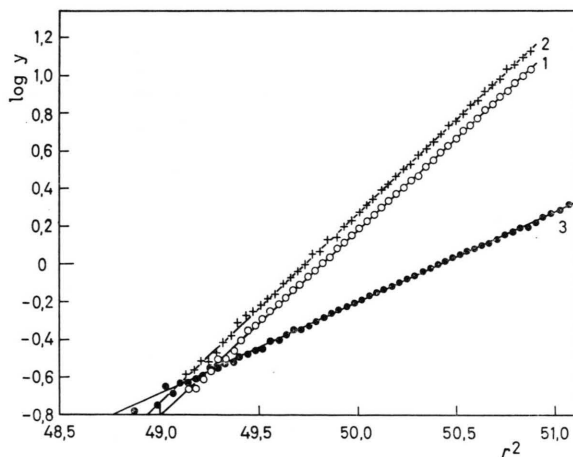


Abb. 5. High-speed-sedimentation equilibrium von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel ($\log y/r^2$ Diagramm, y in cm; scans bei 280 nm, Lösungsmittel-Referenz nach Zentrifugation bei 60000 rpm). 1, Apoenzym in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, 21,7 °C, $c = 1$ mg/ml, 16000 rpm; 2, inaktiviert, 5% Restaktivität, 21,7 °C, $c = 1$ mg/ml, 16000 rpm; 3, inaktiviert in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 20,0 °C, $c = 1$ mg/ml, 28000 rpm.

Andererseits führt die Inkubation in 8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidinium-HCl zur Stufe der Monomeren, während schwach alkalisches Medium intermediär zur Bildung des Dimeren mit 4,5 S führt (Tab. III). In qualitativer Übereinstimmung

mit früheren Messungen am nativen Holoenzym^{31, 32} zeigt $s_{20,w}$ mit zunehmender Inaktivierung einen Anstieg von ca. 2%.

Das Hefe-Enzym wurde im gegebenen Zusammenhang nur zu Hybridisierungsexperimenten mit dem Kaninchen-Skelettmuskel-Enzym herangezogen. Daher konnte auf eine Sedimentationsanalyse des chemisch modifizierten Enzyms verzichtet werden. Wegen des Dissoziationsverhaltens des nativen Enzyms vgl. ³³. In der Gelelektrophorese zeigen die Enzyme aus Kaninchen-Skelettmuskel und Hefe unterschiedliche Mobilität, die im Verlauf der Inaktivierung mit [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosinpyrophosphat keine signifikante Änderung erfährt. Mischungen der beiden Enzyme in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 führen zur Ausbildung einer hybriden Spezies mit einer zwischen den Elternproteinen liegenden elektrophoretischen Mobilität, die auf das symmetrische R_2Y_2 aus je 2 Untereinheiten der beiden Ausgangsproteine schließen läßt ^{34, 35}.

Wie die entsprechenden Experimente mit inaktivierten Tetrameren zeigen, ist die als Voraussetzung der Hybridisierung zu folgender intermediäre Dissoziation in Dimere R_2 bzw. Y_2 auch für die chemisch modifizierten Enzyme erfüllt: Mischungen der beiden inaktivierten Enzyme aus Kaninchen-Skelettmuskel und Hefe führen ebenso zur Ausbildung der R_2Y_2 -Species wie die Mischungen der nativen Enzyme (Abb. 6 *).

Diskussion

[3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosinpyrophosphat unterscheidet sich vom Coenzymanalogen 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid durch den Ersatz der Ribose durch den kürzeren Propylrest im funktionellen Teil des Moleküls. Diese Substitution bewirkt, daß die Verbindung zwar noch in das aktive Zentrum eingelagert wird und so die Bindung von NAD^{\oplus} inhibiert, doch findet in Gegenwart von Substrat keine Wasserstoffübertragung statt, obgleich das Redoxpotential von [3-(3-Acetylpyridinio)-propyl]-adenosinpyrophosphat mit dem von NAD^{\oplus} übereinstimmt ³⁶.

Die großen Dissoziations- und Inhibitions-Konstanten und das Ausbleiben der Bildung des Charge-Transfer-Komplexes ¹¹ lassen darauf schließen, daß im Vergleich zu NAD^{\oplus} und Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid die Wechselwirkungen des Pyridinium-

* Abb. 6 siehe Tafel auf Seite 92 a.

teils mit Aminosäureseitenresten des aktiven Zentrums stark verringert sind.

[3-(Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat besitzt einen reaktiven Bromacetylrest auf der funktionellen Seite des Coenzymanalogen, der nach früheren Befunden¹² an Cysteinresten des Enzyms aus Kaninchen-Skelettmuskel angreift. Der Einbau von nur 2 Molekülen des Coenzymanalogen pro Tetramer steht mit Röntgendaten des Holoenzym aus Hummermuskel in Übereinstimmung, die zeigen, daß die Untereinheiten paarweise verschieden sind¹. Offensichtlich ist nach kovalenter Bindung des Inaktivators in zwei aktiven Zentren die Struktur des Proteins so fixiert, daß in den unbesetzten Zentren die Cysteinreste für den Inaktivator unzugänglich sind, während DTNB weiter zu reagieren vermag. In ähnlicher Weise kann die vollständige Blockierung der katalytischen Aktivität der nicht modifizierten Untereinheiten als Folge der Fixierung der Proteinstruktur erklärt werden. Im Gegensatz zum Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel zeigt Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe gegenüber dem Coenzymanalogen [3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl]-adenosin-pyrophosphat keine Halbseitenreaktivität. Es werden 4 Moleküle des Coenzymanalogen pro Tetramer eingebaut, wobei die 4 reaktiven SH-Gruppen des Apoenzyms nach der Inaktivierung stark verlangsamt mit DTNB reagieren. Dies kann durch eine erschwerte Zugänglichkeit der SH-Gruppen in Anwesenheit des Coenzymanalogen bedingt sein, oder durch eine von der Inaktivierung herrührende Änderung der Struktur des Enzyms.

Die Quartärstruktur wird durch den Einbau des Inaktivators nicht signifikant beeinflußt. Die dem Inaktivierungsgrad proportionale Zunahme der Sedimentationskoeffizienten ist dem Verhalten des nicht modifizierten Holoenzym vergleichbar³¹⁻³³. Der Effekt ist auf den vermehrten Einbau und damit verbundene mögliche Konformations- und/oder Solvatationsänderungen zurückzuführen. Einflüsse auf

das Dissoziations-Assoziations-Verhalten können aufgrund der Sedimentationsgleichgewichtsmessungen ausgeschlossen werden. Auch die Bildung von Hybriden aus chemisch modifizierten Enzymen, die gleiche elektrophoretische Mobilität aufweisen wie die aus nativen Enzymen, deutet auf unverändertes Dissoziationsverhalten hin. In den beschriebenen Experimenten war die spezifische Radioaktivität nur gering. Daher konnte das Ausmaß der Hybridisierung nur mit der unempfindlichen Protein-Anfärbemethode erfaßt werden, so daß eine quantitative Bestimmung der Gleichgewichte nicht möglich war. Die Beteiligung der Monomeren am Gleichgewicht kann ausgeschlossen werden, da unter der Annahme vergleichbarer Affinität der reagierenden Spezies die Hybridisierung zu einem bestimmten Anteil an katalytisch aktivem Enzym führen sollte; dies um so mehr als im Falle des Enzyms aus Kaninchen-Skelettmuskel nur zwei der vier aktiven Zentren durch den Inaktivator besetzt sind. In den untersuchten Enzymmischungen wurde auch nach 30-stündigem Stehen kein Auftreten von Dehydrogenaseaktivität beobachtet. Die fehlende Reaktivierung der Dehydrogenaseaktivität widerspricht nicht dem Ergebnis der Hybridisierungsversuche, da sie durch symmetrische Dissoziation in Dimere erklärt werden kann. In jedem Dimer des vollständig inaktivierten Enzyms aus Kaninchen-Skelettmuskel ist danach eine kovalent blockierte und eine nichtbesetzte Coenzymbindungsstelle vorhanden. Die Dissoziation gelingt erst vollständig nach Inkubation in dissoziierenden Medien, wiederum in Übereinstimmung mit dem nativen Enzym.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch Unterstützung von seiten der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Fonds der Chemischen Industrie ermöglicht. Herr G. Dietz dankt der Friedrich-Ebert-Stiftung für die Gewährung eines Promotionsstipendiums. Frau Marianne Laepple sei an dieser Stelle für ihre Unterstützung bei den Sedimentationsanalysen gedankt.

¹ D. Moras, K. W. Olsen, M. N. Sabesan, M. Buehner, G. C. Ford u. M. G. Rossmann, *J. Biol. Chem.* **250**, 9137–9162 [1975].

² M. Buehner, G. C. Ford, D. Moras, K. W. Olsen u. M. G. Rossmann, *J. Mol. Biol.* **90**, 25–49 [1974].

³ A. Conway u. D. E. Koshland, jr., *Biochemistry* **7**, 4011–4023 [1968].

⁴ J. J. M. DeVijlder u. E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 23–34 [1968].

⁵ K. Kirschner, E. Gallego, I. Schuster u. D. Godall, *J. Mol. Biol.* **58**, 29–50 [1971].

⁶ L. D. Byers u. D. E. Koshland, jr., *Biochemistry* **14**, 3661–3669 [1975].

⁷ J. Herzfeld u. P. A. Schlesinger, *J. Mol. Biol.* **97**, 483–517 [1975].

⁸ O. P. Malhotra u. S. A. Bernhard, *J. Biol. Chem.* **243**, 1243–1252 [1968].

⁹ R. A. MacQuarrie u. S. A. Bernhard, *Pyridine-Nucleotide Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 187–197, Springer-Verlag, Heidelberg-Berlin-New York 1970.

¹⁰ A. Levitzki, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **54**, 889–893 [1973].

- ¹¹ I. Krinski u. E. Racker, *Science* **122**, 319 [1955].
- ¹² C. Woenckhaus, R. Jeck, E. Schättle, G. Dietz u. G. Jentsch, *FEBS-Letters* **34**, 175–178 [1973].
- ¹³ W. Ferdinand, *Biochem. J.* **92**, 578–583 [1964].
- ¹⁴ K. Kirschner u. B. Voigt, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 632–644 [1968].
- ¹⁵ W. Bloch, R. A. MacQuarrie u. S. A. Bernhard, *J. Biol. Chem.* **246**, 780–790 [1971].
- ¹⁶ A. L. Murdock u. O. J. Koeppe, *J. Biol. Chem.* **239**, 1983–1988 [1964].
- ¹⁷ G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555–577 [1953].
- ¹⁸ S. F. Velick, J. E. Hayes, jr., u. J. Harting, *J. Biol. Chem.* **203**, 527–544 [1953].
- ¹⁹ C. Woenckhaus, M. Zoltobrocki, J. Berghäuser u. R. Jeck, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 60–66 [1973].
- ²⁰ H. G. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–72 [1959].
- ²¹ P. M. Wassarman u. J. P. Major, *Biochemistry* **8**, 1076–1082 [1969].
- ²² M. Dixon u. E. C. Webb, "Enzymes" (M. Dixon u. E. C. Webb, eds.), Acad. Press New York 3rd ed. Chapter 2, 4, 8 u. 9, 1967.
- ²³ G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 [1949].
- ²⁴ S. Raymond, *Clin. Chem.* **8**, 455–470 [1962].
- ²⁵ F. E. Butler, *Analyt. Chem.* **33**, 409–414 [1962].
- ²⁶ D. A. Yphantis, *Biochemistry* **3**, 297–317 [1964].
- ²⁷ D. E. Roark u. D. A. Yphantis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **164**, 245–278 [1969].
- ²⁸ R. Jaenicke, D. Schmid u. S. Knof, *Biochemistry* **7**, 919–926 [1968].
- ²⁹ D. Eby u. M. E. Kirtley, *Biochemistry* **10**, 2677–2682 [1971].
- ³⁰ G. von Ellenrieder, K. Kirschner u. I. Schuster, *Eur. J. Biochem.* **26**, 220–236 [1972].
- ³¹ R. Jaenicke, *IUPAC Int. Symp. Macromol. Chem. Toronto* [1968], B1.
- ³² G. D. Smith u. K. H. Schachman, *Biochemistry* **12**, 3789–3801 [1973].
- ³³ R. Jaenicke, *Pyridine-Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 71–88, Springer-Verlag, Heidelberg-Berlin-New York 1970.
- ³⁴ K. Kirschner u. I. Schuster, *Pyridine-Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 217–228, Springer-Verlag, Heidelberg-Berlin-New York 1970.
- ³⁵ G. M. L. Spotorno u. M. R. Hollaway, *Nature* **226**, 756–757 [1970].
- ³⁶ C. Woenckhaus u. R. Jeck, "Methods in Enzymology", in press.

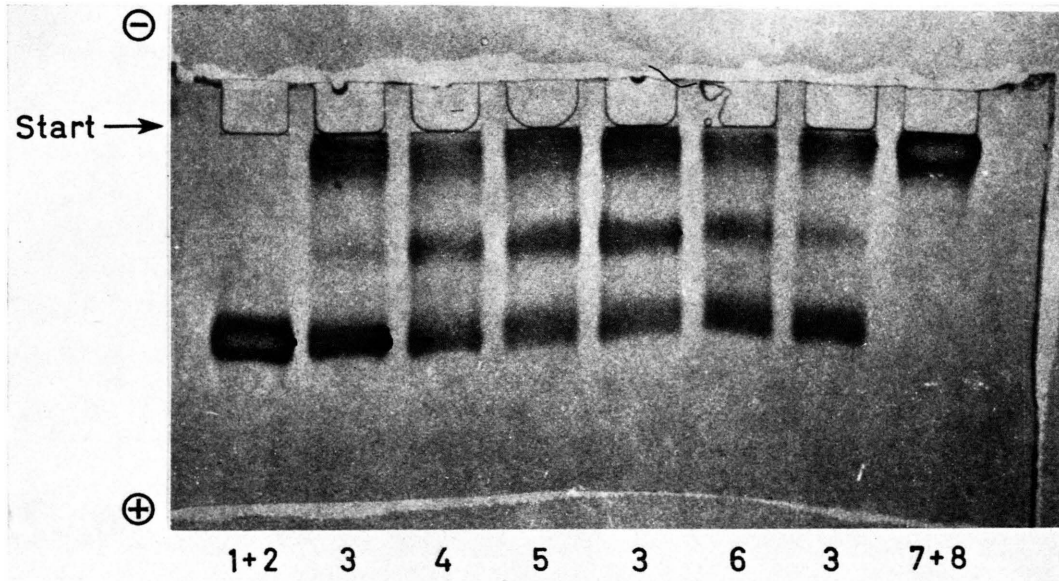


Abb. 6. Gelelektrophorese zum Nachweis der Hybridbildung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe und Kaninchen-Skelettmuskel. 1, natives Enzym aus Hefe; 2, inaktiviertes Enzym aus Hefe; 3, Mischung von nativem Enzym aus Hefe und nativem Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel; 4, Mischung von nativem Enzym aus Hefe und inaktiviertem Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel; 5, Mischung von inaktiviertem Enzym aus Hefe und nativem Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel; 6, Mischung von inaktiviertem Enzym auf Hefe und inaktiviertem Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel; 7, inaktiviertes Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel; 8, natives Enzym aus Kaninchen-Skelettmuskel. Einzelheiten siehe unter Material und Methoden.

