

## 168. Inaktivierung der Kaninchen-muskel- und -leberaldolase in 4M Harnstofflösung

Über Aldolasen, 6. Mitteilung<sup>1)</sup>

von Ph. Christen, F. Leuthardt und A. Schmid

(21. VII. 65)

Die Kaninchenmuskelaldolase dissoziiert unter verschiedenen Bedingungen – bei saurer und alkalischer Reaktion (pH 2–3 bzw. pH 12), in 4M Harnstofflösung, oder auch bei Zusatz von Natriumdodecylsulfat, in drei Untereinheiten [1]. Die Aldolase aus Kaninchenleber zeigt ein analoges Verhalten. Auch sie dissoziiert bei saurer Reaktion [2] und in 4M Harnstofflösung in die gleiche Zahl Untereinheiten [3]. Die Dissoziation ist von einer Entfaltung der Polypeptidketten begleitet und führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Bei der MALD<sup>2)</sup> ist die Entfaltung des Enzyms unter geeigneten Bedingungen weitgehend reversibel. Je nach der verwendeten Methode werden 40–90% der Ausgangsaktivität zurückgewonnen [1]. Das regenerierte Enzym unterscheidet sich in seinen enzymatischen, physikalisch-chemischen und immunologischen Eigenschaften nicht vom nativen Enzym. Entsprechende Untersuchungen wurden bei der LALD bisher noch nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir Versuche über den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung der LALD und der MALD in 4M Harnstofflösung in Beziehung zur Denaturierung und zum Zerfall der Enzymproteine in Untereinheiten, wobei wir im besonderen den Einfluss der Substrate auf den Zerfall in Untereinheiten und die Inaktivierung der beiden Aldolasen und auf die Möglichkeit ihrer Reaktivierung untersucht haben.

**Material.** – LALD wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen nach GÖSCHKE & LEUTHARDT [4] dargestellt. Die spezifischen Aktivitäten des kristallinen Enzyms betragen 3,8 IUB Einh./mg mit FDP als Substrat und 3,5 IUB Einh./mg mit F-1-P als Substrat.

MALD wurde nach TAYLOR u. Mitarb. [5] dargestellt. Mit FDP als Substrat betrug die spezifische Aktivität unserer Präparate 30 IUB Einh./mg.

GDH, TIM, NADH<sub>2</sub>, FDP und F-1-P, die beiden letzteren als Cyclohexylammoniumsalze, wurden von der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Harnstoff vom Analar-Reinheitsgrad von der BRITISH DRUG HOUSES LTD., Poole, England, bezogen. Für alle Versuche wurden nur frisch zubereitete Harnstofflösungen verwendet.

**Methoden.** – Die Aldolaseaktivität bestimmten wir bei 25° durch den optischen Test mit GDH und TIM als Hilfsenzyme [6] [7]. Als Puffer diente Tris-hydroxymethyl-aminomethan (= Tris) 0,1M, pH 7,6.

Die Proteinkonzentration wurde mit der Biuretmethode ermittelt [7].

<sup>1)</sup> 5. Mitteilung, s. [3].

<sup>2)</sup> In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet: MALD Kaninchenmuskelaldolase, LALD Kaninchenleberaldolase, FDP Fructose-1,6-diphosphat, F-1-P Fructose-1-phosphat, GDH  $\alpha$ -Glycerophosphatdehydrogenase, TIM Triosephosphatisomerase, NADH<sub>2</sub> reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid.

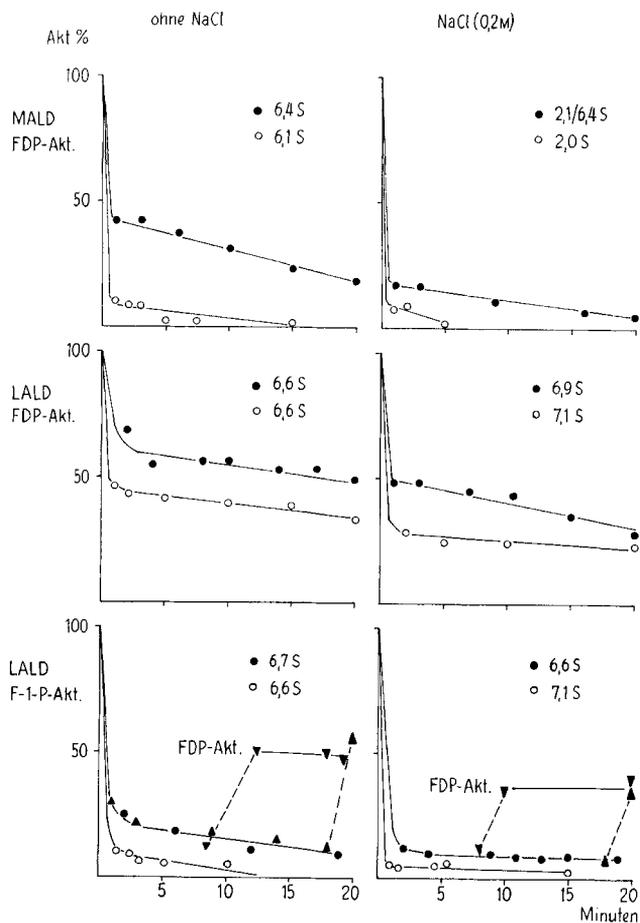


Fig. 1. Inaktivierung der Muskel- und Leber-Aldolase durch 4M Harnstoff

○ Inaktivierung der Aldolasen bei Fehlen von Substrat: 2,5 ml in einer optischen Cuvette enthielten: Harnstoff (4M), Trispuffer pH 7,6 (0,1M),  $\text{NADH}_2$  (0,0003M), EDTA (0,001M), bei den Versuchen der rechten Kolonne zusätzlich NaCl (0,2M). Darin wurden über eine bestimmte Zeit 0,0016 mg MALD bzw. LALD inkubiert, worauf als Hilfsenzyme 0,1 mg GDH und 0,01 mg TIM zugegeben wurden und durch Einpipettieren der Substratlösung (FDP 0,0004M, F-1-P 0,004M Endkonzentration) die enzymatische Reaktion ausgelöst wurde. Die aufgetragenen Aktivitätswerte beziehen sich auf die Anfangsgeschwindigkeiten.

▲▼● Inaktivierung der Aldolasen in Gegenwart von Substrat: Die Zusammensetzung der Testlösung war dieselbe wie oben, jedoch wurden alle Komponenten gleich zu Beginn des Versuches zusammengegeben. Die Aldolaseaktivität wurde anhand der Neigung der Tangente der Zeit-Umsatz-Kurve in bestimmten Zeitpunkten berechnet. Alle 7 Minuten wurde erneut GDH/TIM zugegeben (Vorversuche zeigten, dass GDH/TIM nach 10 Minuten in 4M Harnstoff noch zu 44% aktiv ist).

Die mit S benannten Zahlen innerhalb der Diagramme bezeichnen die Sedimentationskoeffizienten der Aldolase in der betreffenden Lösung, ausgedrückt in SVEDBERG-Einheiten. Die Sedimentationskoeffizienten wurden von der 80. bis 140. Minute nach Beginn der Inkubation des Enzyms in 4M Harnstoff bestimmt. Die Gipfel des Schlierendiagramms zeigten während dieser Zeit keine Veränderung ausser der üblichen Abflachung mit der Zeit, und die beobachteten Sedimentationskoeffizienten blieben konstant.

Die *Sedimentationskoeffizienten* wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge SPINCO, Modell E (Rotor An-D, Phasenplatte als Schlierenanalysator, RAYLEIGH Optik), bestimmt. Wir verwendeten Standard- und Keil-Einsektorzellen von  $4^\circ$  Sektorwinkel mit Quarzfenstern und 12 mm Lichtweg. Die Tourenzahl betrug einheitlich 56100 Upm. Alle Experimente wurden wie die Aktivitätsbestimmungen in einem 0,1M Trispuffer von pH 7,6 durchgeführt, der gegebenenfalls 4M an Harnstoff, 0,2M an NaCl,  $4 \cdot 10^{-4}$ M an FDP oder  $4 \cdot 10^{-3}$ M an F-1-P war. Die Proteinkonzentration betrug einheitlich 6 mg/ml. Die beobachteten Sedimentationskoeffizienten wurden bei Läufen in einem Harnstoff oder NaCl enthaltenden Milieu auf Lösungsmittelbedingungen entsprechend der Dichte und Viskosität einer 0,1M Trislösung umgerechnet. Die Dichte- und Viskositätsinkremente der Harnstofflösung entnahmen wir den Physikalisch-Chemischen Tabellen von LANDOLT-BÖRNSTEIN [8] und den INTERNATIONAL CRITICAL TABLES [9].

**Resultate.** – 1. *Inaktivierung, Entfaltung und Dissoziation in Untereinheiten in 4M Harnstofflösung.* In Fig. 1 ist die Aktivität der Aldolasen in Harnstofflösung in Prozent der Aktivität in einer harnstofffreien Lösung als Funktion der Inkubationsdauer des Enzyms in 4M Harnstoff aufgetragen. Als strukturelles Korrelat wurde jeweils der Sedimentationskoeffizient des Enzyms im betreffenden Milieu bestimmt. Um sicherzustellen, dass die beobachtete Aktivitätsabnahme auf die Wirkung des Harnstoffs allein zurückzuführen ist, führten wir die Versuche bei pH 7,6 durch (vgl. Legende Fig. 1). Dieser pH-Wert liegt im optimalen Bereich beider Aldolasen [10] [11].

Fig. 1 zeigt, dass unter diesen Bedingungen die Aldolasen wohl inaktiviert werden, dass jedoch keine Dissoziation in Untereinheiten eintritt. Die Sedimentationskoeffizienten halten sich im Bereich derjenigen der nativen Enzyme. In einem Milieu ohne Harnstoff, mit 0,2M NaCl und 0,1M Trispuffer von pH 7,6 bestimmten wir bei der LALD einen Sedimentationskoeffizienten von 7,3 S, bei der MALD einen solchen von 6,8 S. Bei pH 5,5 in einem 0,05M Acetatpuffer, der 4M an Harnstoff ist, dissoziieren beide Aldolasen in Untereinheiten. Der auf Wasser korrigierte Sedimentationskoeffizient beträgt in diesem Fall bei der MALD 1,8 S, bei der LALD 1,9 S.

Wird das Harnstoffmilieu von pH 7,6 auf eine Konzentration von 0,2M NaCl gebracht (rechte Kolonne der Fig. 1), so dissoziiert die MALD in Untereinheiten. Wenn der Lösung kein FDP zugesetzt wird, zeigt sich beim Sedimentationslauf ein einziger Gipfel, der entsprechend einem Sedimentationskoeffizienten von 2,0 S wandert. Enthält das Milieu zusätzlich noch FDP, treten bei der Ultrazentrifugation zwei Gipfel auf, die mit einer Geschwindigkeit von 2,1 S und 6,4 S sedimentieren (vgl. Fig. 2). Im Gegensatz zur MALD zeigt die LALD auch bei Zusatz von NaCl keine Dissoziation in Untereinheiten.

Die Inaktivierung verläuft in allen Fällen in zwei Phasen: einer ersten, raschen, und einer zweiten, wesentlich langsameren. Der Zusatz von NaCl bewirkt allgemein einen grösseren Aktivitätsverlust in der ersten, raschen Phase, während die Geschwindigkeit der zweiten Phase nicht wesentlich verändert wird. Auch der Zusatz von Substrat in Sättigungskonzentration beeinflusst nur die erste Phase: das Ausmass der Inaktivierung ist geringer als in den entsprechenden Ansätzen ohne Substrat<sup>3)</sup>. Bei der LALD wird die Aktivität gegen FDP und gegen F-1-P während der ersten, raschen Phase der Inaktivierung in verschiedenem Ausmass beeinflusst. Die Aktivität gegen F-1-P wird bei der Denaturierung des Proteins stärker herabgesetzt als die

<sup>3)</sup> Die Substrate wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt: FDP in  $4 \cdot 10^{-4}$ M, F-1-P in  $4 \cdot 10^{-3}$ M Endkonzentration. Die MICHAELIS-Konstante der MALD mit FDP als Substrat beträgt  $6 \cdot 10^{-5}$ M [12]; bei der LALD beträgt sie mit FDP als Substrat  $5 \cdot 10^{-7}$ M, mit F-1-P als Substrat  $6 \cdot 10^{-4}$ M [3].

Aktivität gegen FDP. Auch bei Gegenwart von F-1-P nimmt die F-1-P-Aktivität stärker ab als die FDP-Aktivität. Wird jedoch die FDP-Aktivität des bei Gegenwart von F-1-P inkubierten Enzyms bestimmt, so zeigt sich, dass sie durch das letztgenannte Substrat ebenso gut geschützt worden ist wie durch FDP. Die auf 0,1 M Trislösung bezogenen Sedimentationskonstanten sind in Gegenwart von Harnstoff in allen Fällen etwas niedriger als die Kontrollwerte in einem Milieu ohne Harnstoff (siehe oben), was durch eine Entfaltung der Peptidketten zu erklären ist. Kontrollproben beider Aldolasen, die ohne Harnstoff unter denselben Bedingungen gehalten wurden, zeigten nach 24 Stunden keine Aktivitätseinbusse.

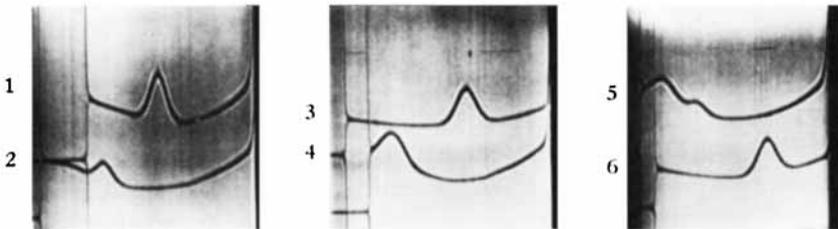


Fig. 2. Sedimentation von MALD und LALD in 4 M Harnstoff mit und ohne Zusatz von NaCl (0,2 M) und von FDP (0,0004 M), pH 7,6

Nähere Bedingungen siehe unter Methoden und Legende der Fig. 1. Aufnahmen 70 Minuten nach Erreichen der Arbeitsgeschwindigkeit von 56100 Upm. Schlierendiaphragmawinkel 70°.

Nr.	Aldolasetyp	Zusatz von Harnstoff	NaCl	FDP	S <sub>20</sub> , 0,1 M Tris (S)
1	LALD	+	–	–	6,6
2	MALD	+	–	–	6,1
3	MALD	–	–	–	7,0
4	MALD	+	+	–	2,0
5	MALD	+	+	+	2,1/6,7
6	MALD	–	+	–	6,8

2. *Reaktivierung.* Um die Reaktivierung des denaturierten Enzyms zu verfolgen, wurde die Harnstoffkonzentration durch rasche Verdünnung auf unwirksame Werte herabgesetzt (vgl. Legende zu Fig. 3). Die Aktivität steigt unter diesen Bedingungen wieder an, doch erreicht sie nicht mehr den vollen Wert des nativen Enzyms. Ein Teil der Aldolase wird also auf irreversible Weise denaturiert. Die Aktivitäten der beiden Aldolasen werden mit verschiedener Geschwindigkeit regeneriert. Bei der LALD dauert es 20–30 Sekunden, bei der MALD ungefähr 4 Minuten, bis der in Fig. 3 aufgetragene Höchstwert der regenerierten Aktivität erreicht wird. Die MALD ist nach einer Inkubation von 20 Minuten in 4 M Harnstofflösung völlig inaktiv (vgl. Fig. 1), lässt sich aber nach Verdünnung des Harnstoffs bis auf 30–40% der ursprünglichen Aktivität reaktivieren (vgl. Fig. 3A). Die LALD zeigt nach 20 Minuten Inkubation in 4 M Harnstofflösung noch eine FDP-Aktivität von 35% des ursprünglichen Wertes und keine F-1-P-Aktivität mehr (Fig. 1). Bei der Reaktivierung errei-

chen beide Aktivitäten denselben Wert von 85% (Fig. 3B). Die irreversible Inaktivierung, d. h. der Verlust an nicht regenerierbarer Aktivität, tritt während der ersten 5–10 Minuten der Inkubation in Harnstofflösung ein; sie nimmt später nur noch langsam zu.

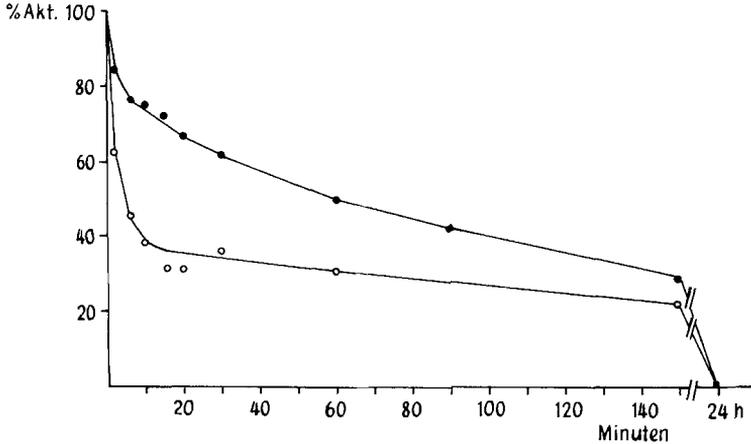


Fig. 3A. *MALD*: FDP-Aktivität: ○ kein FDP in Harnstoffmilieu, ● FDP in Harnstoffmilieu (Substrate in Sättigungskonzentration).

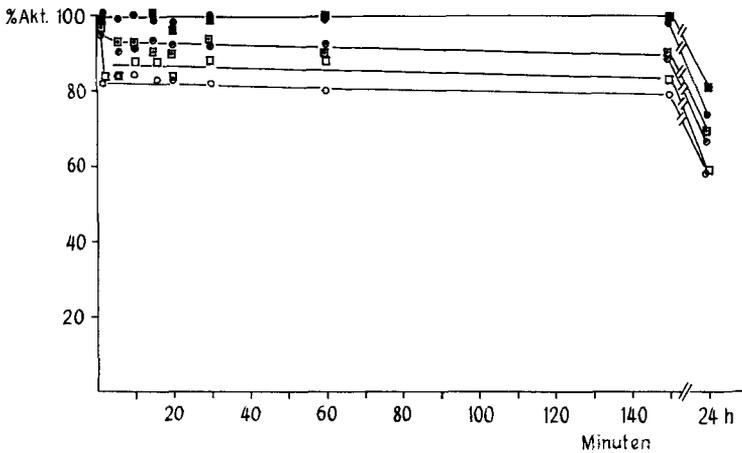


Fig. 3B. *LALD*: ○ ● ○ FDP-Aktivität, □ ■ □ F-1-P-Aktivität, ○ □ kein Substrat, ● ■ FDP, ○ □ F-1-P überall in Harnstoffmilieu (Substrate in Sättigungskonzentration).

Fig. 3. *Reaktivierung der Aldolasen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in 4M Harnstoff* Die Aldolasen wurden in einer Konzentration von 0,2 mg/ml in einem 0,1M Trispuffer von pH 7,6, der 4M an Harnstoff war, bei 20° inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurde ein aliquoter Teil entnommen und direkt in die Lösung für den optischen Test einpipettiert. Der Harnstoff wurde dadurch auf folgende Konzentrationen verdünnt: bei der *MALD* auf 0,016M, bei der *LALD* auf 0,08M. Ordinate: Maximale, nach Verdünnung des Harnstoffs erreichbare Aktivität, in % der Aktivität des nativen Enzyms.

Enthält die denaturierende Harnstofflösung zusätzlich die Substrate in Sättigungskonzentration, so liegen die Ausbeuten der Reaktivierung bei beiden Aldolasen höher. Im Falle der LALD erweist sich FDP als etwas wirksamer als F-1-P. Auf Verdünnung der Harnstofflösung erreichen beide Enzyme innert weniger Sekunden den Höchstwert der regenerierbaren Aktivität.

**Diskussion.** – Der zweiphasische Verlauf der Inaktivierung der beiden Aldolasen in 4M Harnstofflösung zeigt, dass die Denaturierung der Enzyme in mindestens zwei Stufen erfolgt. In einer ersten, rasch ablaufenden Phase wird eine metastabile Zwischenform gebildet, die als Faltungsisomeres des nativen Enzyms noch eine gewisse enzymatische Aktivität aufweist. In einer zweiten, wesentlich langsameren Phase wird direkt oder über weitere Zwischenformen das endgültige, inaktive Denaturierungsprodukt gebildet. Zu dieser Vorstellung gelangten FRATTALI u. Mitarb. [13] bei der Untersuchung des Pepsinogens in 7,7M Harnstofflösung. Ohne die enzymatische Aktivität zu verfolgen, stellten sie mit physikalisch-chemischen Methoden (Viskosität, Fluoreszenz-Polarisation, UV.-Absorptionsspektren, optische Drehung, UV.-Fluoreszenz) das Auftreten einer «quasistabilen» Zwischenform, die rasch gebildet wird und langsam in eine endgültige Denaturierungsform übergeht, fest. Auf Grund theoretischer Überlegungen fordert auch TANFORD [14] das Vorkommen von stabilen Zwischenformen bei der Denaturierung von Proteinen durch Harnstoff. DEAL u. Mitarb. [1] zeigten mit Ultrazentrifugen-Experimenten bei verschiedenen pH-Werten und anhand der Feststellung, dass die Reaktivierung einer Kinetik erster Ordnung folgt, dass die Dissoziation der MALD in Untereinheiten wahrscheinlich über ein entfaltetes Trimeres als Zwischenstufe geht. Unter den Bedingungen unserer Experimente dissoziierte in 4M Harnstofflösung, welche 0,2M an NaCl war, nur die MALD in Untereinheiten. In allen andern Fällen liegen die Sedimentationskoeffizienten ungefähr 0,5 S unter dem Koeffizienten des nativen Enzyms, was darauf hinweist, dass nur eine Vorstufe, das entfaltete Trimere, erreicht wurde. Die Inaktivierung ist also nicht notwendigerweise von einer Dissoziation in Untereinheiten begleitet.

Der durch das Substrat bewirkte Schutz des Enzyms gegen Inaktivierung im Laufe der ersten Konformationsänderung lässt sich auf verschiedene Weise interpretieren: Die Möglichkeit, dass das Substrat die Geschwindigkeit der ersten, raschen Phase der Denaturierung beeinflusst, ist auszuschliessen, denn man beobachtet bei Gegenwart von FDP oder F-1-P keine Verzögerung im Ablauf dieser Reaktionsstufe. Es wäre auch denkbar, dass bei der ersten Phase sich ein Gleichgewicht zwischen dem denaturierten und dem nativen Protein einstellt, welches durch das Substrat zugunsten des nativen Proteins verschoben würde. Gegen diese Möglichkeit spricht aber die allgemein anerkannte Annahme, dass die Denaturierung von Proteinen einem «Alles oder Nichts»-Gesetz folgt [15]. Dies will heissen, dass unter der Einwirkung des Harnstoffs nicht ein Gemisch von völlig inaktivierten und völlig aktiven Fermentmolekeln entsteht, sondern dass alle Enzymmolekeln unter teilweiser Entfaltung ihrer Peptidketten in eine neue, aber weniger aktive Form übergehen.

Gegen die Vorstellung, dass sich unter der Einwirkung des Harnstoffs ein Gleichgewicht zwischen inaktiver und intakter Aldolase einstellt, sprechen auch unsere Beobachtungen über die Veränderung der Aktivität der LALD gegenüber FDP und F-1-P. Diese beiden Substrate werden vom nativen Enzym mit annähernd gleicher

Geschwindigkeit gespalten. Würde ein Teil des Enzyms in Harnstofflösung vollständig inaktiviert, während der Rest seine Konformation unverändert beibehalten würde, so dürfte sich auch das Verhältnis der beiden Aktivitäten nicht ändern. Tatsächlich wird die Spaltung der beiden Substrate in sehr verschiedenem Ausmass beeinflusst: die F-1-P-Aktivität wird viel stärker herabgesetzt als die FDP-Aktivität (10% bzw. 50%, vgl. Fig. 1). Es wird also eine neue Konformation des Enzyms mit veränderter Spezifität gebildet. Die FDP-Aktivität des Enzyms im Harnstoffmilieu könnte nur zu  $\frac{1}{5}$  (10%/50%) auf der Anwesenheit von nativem Protein beruhen. Daher scheint uns zur Erklärung des Substratschutzes die Annahme am wahrscheinlichsten, dass der Aldolase-Substrat-Komplex bei der Einwirkung des Harnstoffs eine seine Aktivität weniger beeinträchtigende Veränderung seiner Konformation erleidet als das nicht mit dem Substrat verbundene Fermentprotein. Es kann hier auch an die Theorie des «induced fit» von KOSHLAND [16] erinnert werden, nach der die aktive Konformation des Fermentproteins überhaupt erst durch Anlagerung des Substrats entsteht, also durch das letztere mitbestimmt wird. Es ist durchaus möglich, dass im vorliegenden Fall die Konformation der Aldolasemolekel durch Anlagerung des FDP oder F-1-P bis zu einem gewissen Grade fixiert und dadurch gegen die Einwirkungen des Harnstoffs weniger empfindlich wird. LUMRY & EYRING [17] nehmen an, dass ein sog. «Reaktionssegment» existiert, welches diejenigen Teile der Proteinemolekel umfasst, die an der Bildung des aktivierten Zustandes für eine gegebene Reaktion teilnehmen. Der Schutz durch Substrate gegen eine Denaturierung wäre gemäss dieser Vorstellung dadurch zu erklären, dass das Reaktionssegment für die Konformationsänderung mit dem Reaktionssegment für die enzymatische Funktion einige, möglicherweise alle, Gruppen gemeinsam hat. Eine Schutzwirkung der Substrate gegen die denaturierende Wirkung des Harnstoffs wurde bei anderen Enzymen mehrfach beschrieben [18].

Eindeutig ist bei der MALD die Einwirkung des Substrates auf die Dissoziation des Proteins in Untereinheiten zu erkennen. Ohne Substratzusatz dissoziiert die MALD in einer Harnstofflösung, welche zusätzlich 0,2M an NaCl ist, vollständig in die Untereinheiten. Bei Zusatz von FDP beobachtet man, dass bei der Sedimentation zwei Gipfel auftreten (6,4 S und 2,1 S). Man kann unter gewissen vereinfachenden Bedingungen die Theorie der Sedimentation von Systemen entwickeln, deren makromolekulare Komponenten miteinander in Wechselwirkung stehen [19]. Bilder wie in Fig. 2 können entstehen, wenn ein Gleichgewichtssystem folgender Art vorliegt:  $A_n \rightleftharpoons nA$ , wobei  $n > 2$  sein muss und Dimere als Zwischenprodukte ausgeschlossen sind. Für  $n = 2$  oder bei Vorkommen von Dimeren als Zwischenprodukte bildet sich nur ein Gradient. Das abgebildete Sedimentationsdiagramm kann dahin interpretiert werden, dass bei Gegenwart des Substrats Untereinheiten und Trimere miteinander im Gleichgewicht vorkommen. Das Gleichgewicht der Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes in Untereinheiten liegt stärker auf der Seite des undissoziierten Trimeren (was sich im Auftreten des zweiten, schnelleren Gipfels äussert), als es der Fall ist bei der Dissoziation des Proteins ohne Substratzusatz.

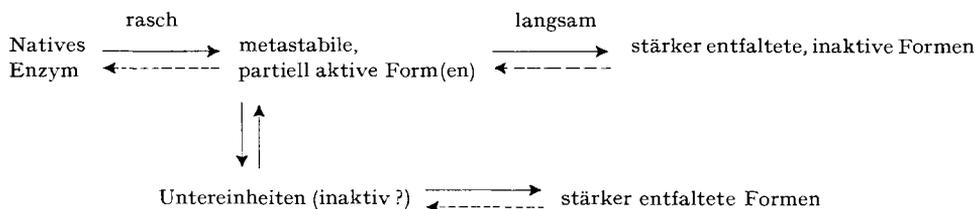
Die Konformation, die das Enzym in 4M Harnstofflösung unter Substratzusatz annimmt, bewahrt also nicht nur eine höhere Restaktivität (s. oben), sondern ist auch resistenter gegen Zerfall in Untereinheiten als die Faltungsisomeren, die sich in 4M Harnstofflösung ohne Substratzusatz bilden.

Wie Fig. 3 zeigt, wird ein Teil des Enzyms bei Gegenwart von Harnstoff irreversibel inaktiviert. Dieser nicht mehr reaktivierbare Anteil des Enzyms wird zum grössten Teil während der raschen, ersten Phase der Denaturierung gebildet und nimmt nachher nur langsam zu. Der erste, rasch erfolgende Verlust an reaktivierbarer Aktivität muss durch die nur partiell mögliche Umkehr der ersten, raschen Konformationsänderung bedingt sein, da die zweite Konformationsänderung zu langsam verläuft, um in der kurzen Zeit zu dem beobachteten Verlust an reaktivierbarer Aktivität zu führen. Die weitere, langsame Abnahme der reaktivierbaren Aktivität ist auf die nur teilweise mögliche Reversibilität der fortschreitenden zweiten Konformationsänderung zurückzuführen.

Der Verlust an reaktivierbarer Aktivität während der ersten und zweiten Phase der Konformationsänderung kann bei der Denaturierung und während der Reaktivierung eintreten: Während der Denaturierung kann sich eine Population von einander ähnlichen Faltungsisomeren bilden, von der ein Teil bei Verdünnung des Harnstoffs nicht mehr reaktivierbar ist. Analog kann sich bei der Rückreaktion, der Reaktivierung durch Verdünnung des Harnstoffs, aus einem einheitlichen Entfaltungsprodukt eine Population von Faltungsisomeren bilden, von der nur ein Teil die Konfiguration des nativen Enzyms besitzt, während der Rest eine weniger aktive oder inaktive Konfiguration aufweist.

Die LALD zeigt nach Reaktivierung dasselbe Verhältnis der FDP- zur F-1-P-Aktivität wie das native Enzym. MALD, die nach Dissoziation in Untereinheiten wieder regeneriert wurde, lässt sich mit physikalisch-chemischen und immunologischen Methoden nicht vom ursprünglichen, nativen Protein unterscheiden [1]. Die beobachtete Restitution des spezifischen Aktivitätsverhältnisses ist ein weiteres Indiz, dass sich nach Entfernen des denaturierenden Agens das Enzym wieder in die Konformation des nativen Zustandes zurückfindet.

Zusammenfassend lässt sich die Denaturierung der Aldolasen durch 4 M Harnstoff mit folgendem Schema darstellen:



Die punktierten Pfeile zeigen keine Gleichgewichtsreaktionen an. Sie deuten an, dass die Reaktion nach Entfernung des denaturierenden Agens z. T. reversibel ist.

Die Frage, ob die Untereinheiten enzymatisch aktiv sind, kann anhand der bisher bekannten Daten nicht entschieden werden.

DRECHSLER u. Mitarb. [20] und SPOLTER u. Mitarb. [21] kamen auf Grund kinetischer Untersuchungen zum Schluss, dass FDP und F-1-P bei beiden Aldolasen durch das gleiche aktive Zentrum angegriffen werden. Versuche über die Substitution bestimmter Gruppen der Aldolasen (Behandlung mit 1-Dimethylamino-naphtyl-5-sulfonylchlorid («Dansylchlorid») und Acetylierung mit Acetylimidazol führten uns

zum gleichen Schluss [22]. Die Tatsache, dass F-1-P die FDP-Aktivität gegen Inaktivierung durch Harnstoff ebensogut schützt, wie FDP selbst, spricht ebenfalls dafür, dass die beiden Substrate mit dem gleichen aktiven Zentrum reagieren.

Allerdings wird in 4M Harnstofflösung die F-1-P-Aktivität der LALD in wesentlich stärkerem Ausmass herabgesetzt als die FDP-Aktivität. Dies bedeutet, dass die Konformationsänderung des Fermentproteins sich in ungleicher Weise auf die Spaltung der beiden Substrate auswirkt. Wir vermuten, dass dieser Unterschied auf die durch ihre Struktur bedingte, verschiedenartige Bindung des F-1-P und des FDP zurückzuführen ist (eine, bzw. zwei Phosphatgruppen).

In Homogenaten von Leberpunkaten von Patienten mit hereditärer Fructose-Intoleranz erweist sich die F-1-P-Aktivität ebenfalls als wesentlich stärker herabgesetzt als die FDP-Aktivität (vgl. Tabelle).

*Aktivität der Aldolasen in Fällen von Fructose-Intoleranz, bezogen auf die mittleren Aktivitäten in der normalen menschlichen Leber*  
(in der letzteren ist das Verhältnis F-1-P-Aktivität zu FDP-Aktivität ungefähr = 1).

	WOLF & FROESCH [23] Fall I      Fall II		HERS & JOASSIN [24]	NIKKILÄ u. Mitarb. [25]
F-1-P-Aktivität	8	13	4	0%
FDP-Aktivität	50	85	25	10%

Vergleicht man diese Befunde mit den Aktivitätsbestimmungen der LALD in 4M Harnstoff (10% F-1-P-, 50% FDP-Aktivität, vgl. Fig. 1) findet man recht gute relative und, mit den Resultaten von WOLF & FROESCH, auch absolute Übereinstimmung [23]. Das für die hereditäre Fructose-Intoleranz typische Aktivitätsverhältnis kann also *in vitro* durch eine Konformationsänderung des reinen Enzymproteins phänokopiert werden. Die Befunde bei der hereditären Fructose-Intoleranz zwingen also nicht zur Postulierung von zwei Leberaldolasen [23] oder einer pathologischen Persistenz eines fetalen Enzyms [24], sondern könnten auf einer mutationsbedingten Konformationsänderung der Leberaldolase beruhen.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG durchgeführt, dem wir für seine Unterstützung bestens danken möchten.

#### SUMMARY

1) Muscle and liver aldolase from rabbit are reversibly inactivated in 4M urea at pH 7,6, without being split into sub-units. At the same pH value muscle aldolase, but not liver aldolase, dissociates into three sub-units, if the ionic strength is increased by the addition of NaCl to a final concentration of 0,2M. At pH 5,5 and low ionic strength (in the absence of NaCl) both aldolases dissociate into sub-units.

2) The denaturation of both aldolases in 4M urea proceeds in two steps: in a first rapid phase, a metastable, partially active intermediary product is formed, which is transformed, in a second phase, into the inactive product. No evidence for an equilibrium between native and denaturated aldolase molecules has been obtained; the denaturation seems to be an all or none reaction. Both phases of denaturation may partially be reversed by decreasing the concentration of urea.

3) The metastable intermediary product obtained by denaturation in the presence of fructose-1,6-diphosphate or fructose-1-phosphate has a higher activity than the one obtained in the absence of these substrates.

4) The dissociation into sub-units proceeds *via* the metastable intermediary product. The dissociation is an equilibrium reaction, fructose-1,6-diphosphate shifting the equilibrium in favour of an undissociated metastable trimer.

5) 4M urea decreases the activity of liver aldolase towards fructose-1-phosphate much more than that towards fructose-1,6-diphosphate. The ratio of activities towards the two substrates, typical for hereditary fructose intolerance, may thus be copied *in vitro* by a conformational change of the enzyme.

Aus dem Biochemischen Institut  
der Universität Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. STELLWAGEN & H. K. SCHACHMANN, *Biochemistry* **1**, 1056 (1962); W. C. DEAL, W. J. RUTTER & K. E. VAN HOLDE, *ibid.* **2**, 246 (1963); E. W. WESTHEAD, L. BUTLER & P. D. BOYER, *ibid.* **2**, 927 (1963); L. F. HASS & M. S. LEWIS, *ibid.* **2**, 1368 (1963).
- [2] W. J. RUTTER, B. M. WOODFIN & R. E. BLOSTEIN, *Acta chem. scand.* **17**, Suppl. 1, 226 (1963).
- [3] PH. CHRISTEN, H. GÖSCHKE, F. LEUTHARDT & A. SCHMID, *Helv.* **48**, 1050 (1965).
- [4] H. GÖSCHKE & F. LEUTHARDT, *Helv.* **46**, 1791 (1963).
- [5] J. F. TAYLOR, A. A. GREEN & G. T. CORI, *J. biol. Chemistry* **173**, 591 (1948).
- [6] E. RACKER, *J. biol. Chemistry* **167**, 843 (1947).
- [7] G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDET & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
- [8] LANDOLT-BÖRNSTEIN, *Physikalisch-Chemische Tabellen*, Bd. 1, S. 462, 5. Aufl., Berlin 1923.
- [9] *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*, Bd. V, S. 22, 1. Aufl., New York 1929.
- [10] W. J. RUTTER, *Fed. Proc.* **23**, 1248 (1964).
- [11] H. P. WOLF, *Inaug.-Diss. Univ. Zürich* 1956.
- [12] H. P. WOLF & F. LEUTHARDT, *Helv.* **40**, 237 (1957).
- [13] V. FRATTALI, R. F. STEINER & H. EDELHOCH, *J. biol. Chemistry* **240**, 112 (1965).
- [14] C. TANFORD, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 2050 (1964).
- [15] R. LUMRY in: P. D. BOYER, H. LARDY & K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 1, p. 206ff., 2. Aufl., New York 1959.
- [16] D. E. KOSHLAND JR., *Science* **142**, 1533 (1963).
- [17] R. LUMRY & H. EYRING, *J. physical Chemistry* **58**, 110 (1954).
- [18] G. PFLEIDERER, D. JECKEL & TH. WIELAND, *Arch. Biochem. Biophysics* **83**, 275 (1959); E. A. BARNARD, *J. molec. Biol.* **10**, 235 (1964); G. DI SABATO & N. O. KAPLAN, *J. biol. Chemistry* **240**, 1072 (1965).
- [19] G. A. GILBERT, in: *The Physical Chemistry of Enzymes*, *Discuss. Faraday Soc.* **20**, 68 (1955); M. S. NARASINGA RAO & G. KEGELES, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 5724 (1958); L. W. NICHOL, J. L. BETHUNE, G. KEGELES & E. L. HESS in: H. NEURATH, *The Proteins*, Vol. II, p. 305, 2. Auflage, New York und London 1964.
- [20] E. R. DRECHSLER, P. D. BOYER & A. G. KOWALSKY, *J. biol. Chemistry* **234**, 2627 (1959).
- [21] P. D. SPOLTER, R. C. ADELMAN & S. WEINHOUSE, *J. biol. Chemistry* **240**, 1327 (1965).
- [22] PH. CHRISTEN, F. LEUTHARDT & A. SCHMID (wird in *Helv.* erscheinen).
- [23] H. P. WOLF & E. R. FROESCH, *Biochem. Z.* **337**, 328 (1963).
- [24] H. G. HERS & G. JOASSIN, *Enzym. biol. Clin.* **1**, 4 (1961).
- [25] E. A. NIKKILÄ, O. SOMERSALO, E. PITKÄNEN & J. PERHEENTUPA, *Metabolism* **11**, 727 (1962).