

## 32. Über die Reaktion der Muskel- und Leber-Aldolase mit «Dansylchlorid» und Acetylimidazol

Über Aldolasen, 7. Mitteilung<sup>1)</sup>

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

(7. N. 65)

Nach den Versuchen von HORECKER [1] bilden bei der MALD<sup>2)</sup> zwei Lysinreste pro Molekel mit Dihydroxyaceton-phosphat eine SCHIFF'sche Base, die durch Reduktion mit Natriumborhydrid zum entsprechenden Glycerinderivat stabilisiert werden kann. Kürzlich haben MORSE und Mitarb. [2] gezeigt, dass LALD ebenfalls mit zwei Molekeln Dihydroxyaceton-phosphat reagiert. Die reduzierte SCHIFF'sche Base ist inaktiv. Die Lysinreste scheinen also direkt den aktiven Zentren anzugehören; die Bildung einer SCHIFF'schen Base stellt demnach einen Schritt im Ablauf des enzymatischen Reaktionsmechanismus dar.

Bei Behandlung mit Carboxypeptidase A verliert die MALD drei Tyrosinreste und die FDP-Spaltungsaktivität fällt auf ungefähr 5% des ursprünglichen Wertes ab [3]. Die LALD verliert unter Carboxypeptidase-Behandlung 1 bis 2 Tyrosinreste und ihre Aktivität gegenüber FDP und F-1-P wird nur auf ungefähr die Hälfte herabgesetzt [4].

Die chemische Modifikation von Proteinen durch Substitution einzelner Aminosäurereste hat sich bei verschiedenen Enzymen als eine wertvolle Methode erwiesen, um Aufschlüsse über das aktive Zentrum und den Reaktionsmechanismus zu gewinnen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über Versuche, die als funktionell wichtig erkannten Reste, d. h. die erwähnten Lysin- und Tyrosin-Reste, mit gruppenspezifischen Reagentien zu substituieren. Wir verwendeten hierzu 1-Dimethylaminonaphtyl-5-sulfonylchlorid, (im folgenden als «Dansylchlorid» bezeichnet), das mit den freien Aminogruppen und phenolischen Hydroxylgruppen von Aminosäuren und Peptiden reagiert [5]. Das Reagens erlaubt also, spezifisch die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste und die Hydroxylgruppen der Tyrosinreste zu substituieren. Dansylchlorid zeigt im ultravioletten Licht eine starke Fluoreszenz. Ein anderes Reagens, das Acetylimidazol, bietet die Möglichkeit, selektiv die Hydroxylgruppen der Tyrosinreste zu acetylieren, wie dies von SIMPSON und Mitarb. bei der Carboxypeptidase A durchgeführt worden ist [6]. HORECKER und Mitarb. [7] haben kürzlich Versuche über die chemische Modifikation der MALD mit Chloro- und Fluoro-äminobenzol mitgeteilt.

**Material.** – «Dansylchlorid» (1-Dimethylaminonaphtyl-5-sulfonylchlorid) wurde von der BRITISH DRUG HOUSES LTD., Poole, England, bezogen. *Carboxypeptidase A* aus Rinderpankreas bezogen wir als mit Diisopropyl-fluorophosphat behandeltes, dialysiertes und rekristallisiertes

<sup>1)</sup> 5. und 6. Mitteilungen [11].

<sup>2)</sup> MALD = Muskelaldolase, LALD = Leberaldolase, FDP = Fructose-1,6-diphosphat, F-1-P = Fructose-1-phosphat.

Präparat von der SIGMA CHEMICAL COMPANY, St. LOUIS, USA. *Acetylimidazol* wurde nach der Methode von BOYER [8] hergestellt und bei  $-30^{\circ}$  über  $\text{CaCl}_2$  aufbewahrt. *Hydroxylamin* wurde aus dem Hydrochlorid nach LECHER & HOFMANN [9] gewonnen und bei  $-30^{\circ}$  über  $\text{CaCl}_2$  aufbewahrt. *FDP*, *F-1-P* als Natriumsalze und *Fruuctose-6-phosphat* als Bariumsalz, welches vor Verwendung mit Amberlite IR 120 in die freie Säure übergeführt wurde, bezogen wir von BOEHRINGER, Mannheim. *Glycerinaldehyd-phosphat* wurde von BOEHRINGER als Bariumsalz des Diäthylacetals bezogen, welches vor seiner Verwendung mit Dowex-50 in die freie Säure übergeführt, bei pH 2–3 und  $40^{\circ}$  während 48 Std. hydrolysiert und anschliessend mit verdünnter NaOH auf pH 7,6 gebracht wurde. *Dihydroxyaceton-phosphat* wurde als Di-cyclohexylammoniumsalz des Dimethylketals ebenfalls von BOEHRINGER bezogen und nach der Methode von BALLOU & FISCHER [10] ins freie Dihydroxyaceton-phosphat überführt.

Die übrigen Substanzen waren von derselben Herkunft, wie sie in einer vorangehenden Arbeit angegeben wurde [11]<sup>3)</sup>.

**Methoden.** – Die *Aldolaseaktivität* und die *Proteinkonzentration* bestimmten wir, wie in früheren Arbeiten angegeben, nach der Methode von RACKER [12] und BEISENHERZ und Mitarb. [13]. Im optischen Test verwendeten wir die Cyclohexylammoniumsalze von FDP und F-1-P.

*Reaktion der Aldolasen mit Dansylchlorid.* Ein 10 mg Protein entsprechendes Volumen einer Suspension kristalliner Aldolase in 2M Ammoniumsulfatlösung wurde zentrifugiert und das Sediment in 2 ml 0,1N NaCl gelöst. Auf einer mit 0,1N NaCl äquilibrierten Sephadex G-25-Säule (40 ml) wurde das Protein vom Ammoniumsulfat getrennt und anschliessend mit 0,1N NaCl auf ein Volumen von 5,0 ml gebracht. Das Reaktionsgefäss wurde auf einer Temperatur von  $20^{\circ}$  gehalten. Das pH wurde mit 0,2N NaOH auf 8,0 gebracht und 5 mg Dansylchlorid in Substanz zugegeben. Diese Menge entspricht einem 1,6fachen molaren Überschuss, bezogen auf den Totalgehalt an substituierbaren Gruppen der Aldolasen (Lysin- und Tyrosin-Reste nach Angaben von RUTTER und Mitarb. [14]). Die Lösung wurde während der ganzen Dauer des Versuches im pH-Stat mit 0,2N NaOH auf pH 8,0 gehalten und mit einem Magnetrührer intensiv gerührt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde zu bestimmten Zeiten ein aliquotes Volumen entnommen.

Die *Acetylierung der Aldolasen* erfolgte im wesentlichen nach der Methode, wie sie von SIMPSON und Mitarb. [6] bei der Carboxypeptidase angewandt worden war. Als Puffer diente 0,02M Na-Veronal in 0,1M NaCl, pH 7,5. Die übrigen Bedingungen waren dieselben wie für die Reaktion mit Dansylchlorid. 3,5 mg Acetylimidazol wurden in Substanz zugegeben. Diese Menge entspricht einem 12-fachen molaren Überschuss, bezogen auf die Gesamtzahl der Tyrosinreste der Aldolasen [14]. Die Halbwertszeit des spontan hydrolysierenden Acetylimidazols beträgt unter den gegebenen Bedingungen 113 Min. (Bestimmung mit Hydroxylamin und  $\text{FeCl}_3$  [15]).

Zur *Deacetylierung* der acetylierten Aldolasen wurden 400 mg Hydroxylamin in 200  $\mu\text{l}$  Puffer gelöst und nach Aufhören der Blasenbildung in die Reaktionslösung einpipettiert.

Die *Carboxypeptidase* wurde bei  $3^{\circ}$  in 10-proz. LiCl gelöst. Von dieser Lösung wurde ein dem Gewichtsverhältnis Aldolase: Carboxypeptidase = 100:1 entsprechendes Volumen in die Reaktionslösung einpipettiert.

**Resultate und Diskussion.** – 1. *Substitution der Aldolasen mit Dansylchlorid.* Fig. 1 und 2 zeigen den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung während der Substitution der MALD und der LALD mit Dansylchlorid. Nach einer Latenzperiode von ungefähr 20 Min., die wahrscheinlich durch die verzögerte Sättigung des Reaktionsgemisches mit dem schlecht wasserlöslichen Dansylchlorid bedingt ist, werden beide Aldolasen rasch inaktiviert. Kontrollversuche zeigten, dass die Aldolasen ohne Zusatz von Dansylchlorid unter den gegebenen Bedingungen über 6 Std. ihre volle Aktivität beibehalten. Die MALD wird wesentlich rascher inaktiviert als die LALD. Bei der Inaktivierung der LALD können deutlich zwei Phasen unterschieden werden: einem

<sup>3)</sup> Die spezifischen Aktivitäten der Aldolase wurden in früheren Mitteilungen [11] auf ein halbes Mol Substrat bezogen, sind also um den Faktor 2 zu hoch.

raschen Abfall der Aktivität auf ungefähr 30% des Anfangswertes folgt eine langsamere Inaktivierungsphase. Bei der Hydrolyse des dansylierten Enzyms mit Trypsin und Auftrennung der Peptide durch kombinierte Papier-chromatographie und -elektrophorese [16] erhält man 20–25 fluoreszierende Flecke. Es werden also ausser den beiden dem aktiven Zentrum angehörenden Lysinresten noch andere Aminosäuren substituiert.

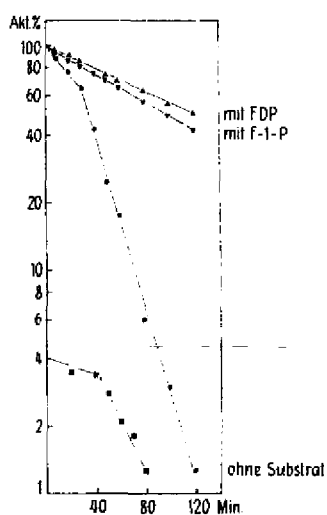


Fig. 1

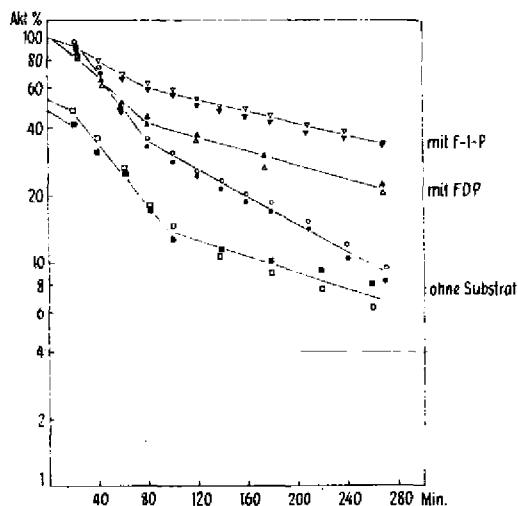


Fig. 2

Fig. 1. Inaktivierung der Muskelaldolase durch Substitution mit Dansylchlorid

Reaktionsbedingungen siehe unter Methoden. Die Spaltungsaktivität gegen FDP ist in Prozent der Ausgangsaktivität aufgetragen.

- MALD ohne Substratzusatz
- ▲ MALD mit Zusatz von FDP in Sättigungskonzentration
- ▼ MALD mit Zusatz von F-1-P in Sättigungskonzentration
- mit Carboxypeptidase A vorbehandelte MALD ohne Substratzusatz

Fig. 2. Inaktivierung der Leberaldolase durch Substitution mit Dansylchlorid

- ▲ ▼ ■ FDP-spaltungsaktivität
- △ ▽ □ F-1-P-spaltungsaktivität
- ○ LALD ohne Substratzusatz
- ▲ △ LALD mit Zusatz von FDP in Sättigungskonzentration
- ▼ ▽ LALD mit Zusatz von F-1-P in Sättigungskonzentration
- □ mit Carboxypeptidase A vorbehandelte LALD ohne Substratzusatz

Die Substitution, gemessen an der Inaktivierung des Enzyms folgt einer Kinetik pseudo-erster Ordnung, wie dies bei verschiedenen Enzymen beobachtet worden ist (vgl. z. B. HIRS und Mitarb. [17]). Wir nehmen an, dass die Inaktivierung im wesentlichen durch die Substitution der beiden kritischen  $\epsilon$ -Aminogruppen bedingt wird, und dass die Substitution weiterer Reste entweder die Aktivität nicht beeinflusst, oder erst nach der Reaktion der beiden für die Bindung des Substrats verantwortlichen  $\epsilon$ -Aminogruppen erfolgt.

Bei Zusatz von Substrat in Sättigungskonzentration<sup>4)</sup> ist die Inaktivierung wesentlich verzögert. Im Fall der LALD erweisen sich Dihydroxyaceton-phosphat und 3-Phosphoglycerinaldehyd als ebenso wirksame Hemmstoffe wie FDP und F-1-P. Fructose-6-phosphat in derselben Konzentration wie FDP hemmt die Inaktivierung nicht.

Die Kinetik erster Ordnung wird auch bei Gegenwart des Substrats beibehalten (Fig. 1 und 2). Die Interpretation der Resultate wird dadurch kompliziert, dass das Enzym zwei aktive Zentren enthält, die mit dem Dansylchlorid und dem Substrat in verschiedener Weise reagieren könnten. Wir vermuten aber, dass die beiden Bindungsstellen funktionell identisch sind.

Die Tatsache, dass die Aktivität der LALD gegen FDP und gegen F-1-P während des ganzen Fortschreitens der Substitution in gleichem Masse herabgesetzt wird, bestätigt die Annahme, dass die beiden Substrate an den gleichen aktiven Stellen gespalten werden. Die enzymatische Aktivität des Enzyms bei gleichzeitiger Gegenwart beider Substrate führt zur selben Schlussfolgerung [3] [18].

2. *Substitution der mit Carboxypeptidase A vorbehandelten Aldolasen mit Dansylchlorid.* Durch Inkubation mit Carboxypeptidase A wird die Aktivität der MALD gegen FDP auf 4–5% herabgesetzt, die Aktivität der LALD gegen FDP wird auf ungefähr 40%, die gegen F-1-P auf ungefähr 45% herabgesetzt. Die Aktivitätsverluste treten innert 10 Min. ein und bleiben bei fortgesetzter Inkubation mit Carboxypeptidase über 6 Std. konstant. Wenn man zu den Aldolasen, die 30 Min. mit Carboxypeptidase vorinkubiert worden waren, Dansylchlorid zugibt und die Aktivität des vorbehandelten Enzyms = 100% setzt, so zeigen die resultierenden Inaktivierungskurven ungefähr denselben Verlauf wie im Falle der Substitution der unveränderten Enzyme (vgl. Fig. 1 und 2).

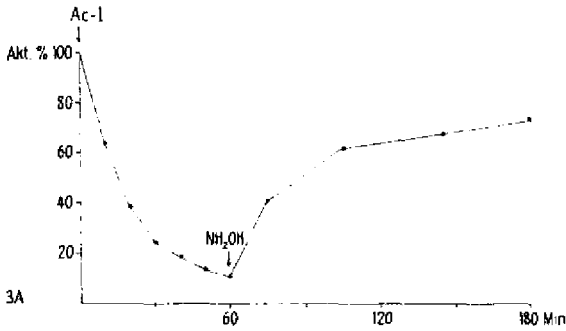
Eine Substitution der Carboxyl-endständigen Tyrosinreste scheint demzufolge nicht wesentlich an der Inaktivierung durch Dansylchlorid beteiligt zu sein. Insbesondere ist sie nicht die Ursache des zweiphasischen Verlaufes der Inaktivierung der LALD.

3. *Acetylierung der Aldolasen mit Acetylimidazol.* Die Acetylierung mit Acetylimidazol bei pH 7,5 hat den gleichen Effekt wie die Carboxypeptidase-Behandlung

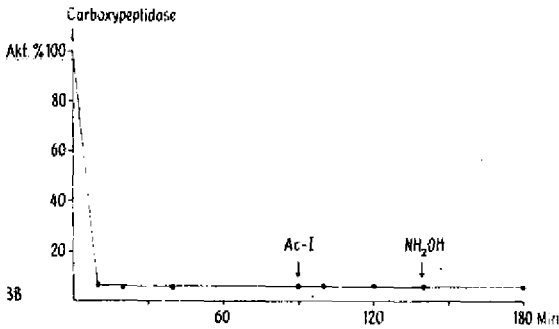
<sup>4)</sup> Die bei den Versuchen verwendeten Substratkonzentrationen und die zugrunde liegenden MICHAELIS-Konstanten sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

Aldolase	Substrat	$K_m$ (M)	Endkonzentration im Reaktionsgemisch (M)
MALD	FDP	$5,1 \cdot 10^{-6}$ [14]	$5,1 \cdot 10^{-6}$
	F-1-P	$1,2 \cdot 10^{-6}$ [14]	$1,2 \cdot 10^{-6}$
LALD	FDP	$2,3 \cdot 10^{-6}$ [15]	$2,3 \cdot 10^{-6}$
		$5 \cdot 10^{-7}$ [11]	
	F-1-P	$8,7 \cdot 10^{-4}$ [14]	$8,5 \cdot 10^{-3}$
		$6 \cdot 10^{-4}$ [11]	
	Glycerinaldehyd-phosphat Dihydroxyaceton-phosphat	$3 \cdot 10^{-4}$ [14]	$3 \cdot 10^{-3}$
	$4 \cdot 10^{-4}$ [14]	$4 \cdot 10^{-3}$	

(vgl. Fig. 3A mit 3B, 4A mit 4B). Die Aktivität mit Carboxypeptidase vorbehandelter Aldolasen wird durch die Acetylierung nicht beeinträchtigt. Die Inaktivierung scheint also durch die Acetylierung der Carboxyl-endständigen Tyrosinreste zustande zu kommen.



3A: Acetylierung mit Acetylimidazol (Ac-I) und nachfolgende Deacetylierung durch Hydroxylamin



3B: Inkubation mit Carboxypeptidase A, anschliessend Acetylierung und Deacetylierung

Fig. 3. Acetylierung von Muskellaldolase. Reaktionsbedingungen siehe unter Methoden. Die FDP-spaltungsaktivität ist in Prozent der Ausgangsaktivität aufgetragen.

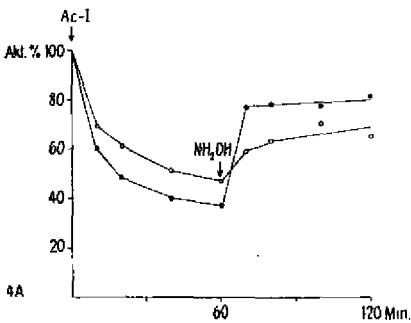


Fig. 4A

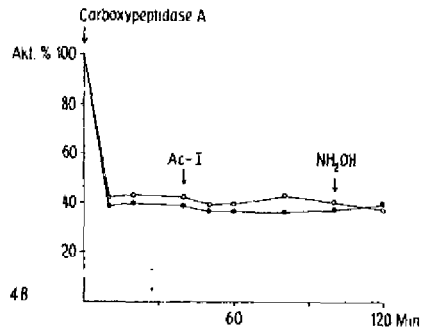


Fig. 4B

Fig. 4. Acetylierung von Leberaldolase

- FDP-spaltungsaktivität
- F-1-P-spaltungsaktivität

4A: Acetylierung mit Acetylimidazol (Ac-I) und nachfolgende Deacetylierung durch Hydroxylamin

4B: Inkubation mit Carboxypeptidase A, anschliessend Acetylierung und Deacetylierung

Die Tatsache, dass sowohl die Abspaltung der Carboxyl-endständigen Tyrosinreste als auch deren Acetylierung die enzymatische Aktivität gleichermaßen beeinflussen, spricht für eine direkte Beteiligung der C-terminalen Tyrosinreste am aktiven Zentrum des Enzyms. Es ist allerdings noch die zweite Möglichkeit denkbar, dass die Abspaltung oder die Substitution der fraglichen Tyrosinreste zu einer Konformationsänderung der Peptidkette unter teilweisem Verlust der Enzymaktivität führt. Doch scheint uns diese zweite Möglichkeit weniger wahrscheinlich als die erste.

Durch Deacetylierung mit Hydroxylamin ist es möglich, die inaktivierten, acetylierten Aldolasen partiell (70–80% der Ausgangsaktivität) zu reaktivieren.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG ausgeführt, dem wir für die Hilfe bestens danken.

#### SUMMARY

1) Muscle and liver aldolase are inactivated by reaction with "Dansyl chloride" (1-dimethylaminonaphtyl-5-sulfonyl chloride). Inactivation is inhibited by the presence of substrates. The inactivation follows first-order kinetics both in the absence and in the presence of substrate.

2) The activities of liver aldolase towards fructose-1,6-diphosphate and fructose-1-phosphate are decreasing during the reaction at the same rate. Obviously the two substrates are split at the same active site.

3) Acetylation of both aldolases by acetylimidazole imitates the effect of the treatment with Carboxypeptidase A. By deacetylation with hydroxylamine the enzymes are reactivated to 70–80% of the initial activity.

Biochemisches Institut  
der Universität Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] B. L. HORECKER, P. T. ROWLY, E. GRAZI, T. CHENG & O. TCHOLA, *Biochem. Z.* **338**, 36 (1963); C. Y. LAI, O. TCHOLA, T. CHENG & B. L. HORECKER, *J. biol. Chemistry* **240**, 1347 (1965).
- [2] D. MORSE, C. Y. LAI, B. L. HORECKER, T. RAJRUMAR & W. J. RUTTER, *Biochem. biophysical Res. Commun.* **18**, 679 (1965).
- [3] E. R. DRECHSLER, P. D. BOYER & A. G. KOWALSKY, *J. biol. Chemistry* **234**, 2627 (1959); A. KOWALSKY & P. D. BOYER, *ibid.* **235**, 604 (1960).
- [4] W. J. RUTTER, O. C. RICHARDS & B. M. WOODFIN, *J. biol. Chemistry* **236**, 3193 (1961).
- [5] W. R. GRAY & B. S. HARTLEY, *Biochem. J.* **89**, 59P, 379 (1963).
- [6] K. I. SIMPSON, J. F. RIORDAN & D. L. VALLEE, *BIOCHEMISTRY* **2**, 610 (1963).
- [7] P. T. ROWLEY, O. TCHOLA & B. L. HORECKER, *Arch. Biochem. Biophysics* **107**, 305 (1964); J. KOWAL, T. CREMONA & B. L. HORECKER, *J. biol. Chemistry* **240**, 2485 (1965).
- [8] J. H. BOYER, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 6274 (1952).
- [9] H. LECHER & J. HOFMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **55**, 912 (1922).
- [10] C. E. BALLOU & H. O. L. FISCHER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1659 (1956).
- [11] PH. CHRISTEN, H. GÖSCHKE, F. LEUTHARDT & A. SCHMID, *Helv.* **48**, 1050 (1965); PH. CHRISTEN, F. LEUTHARDT & A. SCHMID, *Helv.* **48**, 1546 (1965).
- [12] E. RACKER, *J. biol. Chemistry* **167**, 843 (1947).
- [13] G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).

- [14] W. J. RUTTER, B. M. WOODFIN & R. E. BLOSTEIN, *Acta chem. scand.* 17, Suppl. 1, 226 (1963).  
 [15] S. HESTRIN, *J. biol. Chemistry* 180, 249 (1949); A. K. BALLS & H. N. WOOD, *ibid.* 219, 245 (1956).  
 [16] V. M. INGRAM, *Biochim. biophysica Acta* 28, 539 (1958).  
 [17] C. M. W. HIRS, M. HALMANN & J. H. KYCIA, *Biol. Structure and Function* (Symp. Stockholm 1960) Vol. 1, S. 41 (1962).  
 [18] P. D. SPOLTER, R. C. ADELMAN & S. WEINHOUSE, *J. biol. Chemistry* 240, 1327 (1965).

### 33. Sur quelques dérivés de la morphanthrinone

par Louis Chardonnens et Giacomo Gamba

(7. X. 65)

Il a été montré récemment [1] que l'acylation du bromo-4-xylène-1,2 (I) se fait en position 5. La condensation du chlorure de l'acide fluorénone-carboxylique-1 (II) avec le bromo-4-xylène-1,2 devait donc donner, de manière semblable, la (diméthyl-4',5'-bromo-2'-benzoyl)-1-fluorénone (III) et la cyclisation de celle-ci, p. ex. par élimination d'acide bromhydrique, le diméthyl-2,3-dioxo-11,12-dihydro-11,12-indéno-[2,1-a]fluorène (IV) (diméthyl-2,3-*endo-cis*-fluorénaphène-dione en nomenclature abrégée [2]). La condensation de II sur I se fait normalement, bien qu'avec quelques difficultés, et l'on obtient la cétone III avec un rendement médiocre de 46% de la théorie. Les tentatives d'une cyclisation directe utilisant l'action en autoclave d'une solution aqueuse de soude caustique en présence de quinoléine [3] ayant échoué, nous avons essayé d'échanger d'abord le brome contre le groupe aminé; l'amine attendue V aurait ensuite donné, par la méthode bien connue qui conduit des *o*-amino-benzophénones aux fluorénones [4], la diméthyl-2,3-*endo-cis*-fluorénaphène-dione (IV). En

