

145. Über die Hemmung der Leber- und der Muskelaldolase durch Glycerinaldehyd-3-phosphat

15. Mitteilung über Aldolasen [1]

von **R. Hotz** und **F. Leuthardt**

Biochemisches Institut der Universität Zürich

(5. VI. 68)

Summary. – (1) The kinetics of the inhibition of rabbit muscle and liver aldolase by DL-glyceraldehyde-3-phosphate have been studied.

(2) The inhibition is of the non-competitive type.

(3) The ternary enzyme-substrate-GAP-complex shows a residual enzyme activity, muscle aldolase-FDP showing the highest and liver aldolase-F-1-P the lowest activity.

(4) The dissociation constant K'_0 ($ESI \rightleftharpoons ES + I$) has been determined on the assumption of quasi-equilibrium kinetics.

Nach den Versuchen von DAHLQUIST & CRANE [1a] zeigt die Leberaldolase des Kaninchens (LALD¹) gegen Fructose-1,6-diphosphat eine bedeutend höhere Aktivität (optischer Test nach RACKER [2]), wenn die Bestimmung in Gegenwart von Triosephosphatisomerase (TIM) durchgeführt wird, als wenn der Versuchsansatz dieses Enzym nicht enthält. Verwendet man Fructose-1-phosphat (F-1-P) als Substrat, so hat TIM keinen Einfluss. Offenbar wirkt das bei Spaltung der FDP entstehende D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) als Hemmstoff, während der aus dem F-1-P gebildete nicht phosphorylierte Glycerinaldehyd unwirksam ist. Ähnliche Beobachtungen bei der Muskelaldolase (MALD) waren von MEHLER [3] schon früher publiziert worden. Er benützte zur Bestimmung der Aldolaseaktivität die Kondensation von Phosphodihydroxyaceton (DHAP) mit phosphoryliertem oder nicht phosphoryliertem Glycerinaldehyd. Auch MEHLER fand eine wesentlich stärkere Hemmwirkung bei DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat als bei DL-Glycerinaldehyd. SPOLTER, ADELMAN & WEINHOUSE [4] untersuchten den Einfluss verschiedener nicht phosphorylierter Aldehyde auf Muskel- und Leberaldolase des Kaninchens. Sie fanden meistens eine mehr oder weniger ausgesprochene Hemmwirkung. DAHLQUIST & CRANE hatten ihre Versuche mit wenig gereinigten Extrakten aus Leber durchgeführt. MEHLER beschränkte sich auf Muskelaldolase, SPOLTER und Mitarb. benützten nur nicht phosphorylierte Aldehyde. Wir hielten es daher für angezeigt, die Wirkung des D-Glycerinaldehyd-3-phosphats mit hochgereinigter Leberaldolase des Kaninchens zu untersuchen, wobei auch die Muskelaldolase zum Vergleich einbezogen wurde.

Material: Kaninchen-LALD wurde nach dem in unserem Institut ausgearbeiteten Verfahren gewonnen [5]. Die spezifische Aktivität des verwendeten Präparates betrug ca. 200 BÜCHER-Einheiten/mg. Kaninchen-MALD wurde nach der Methode von TAYLOR und Mitarb. [6] dargestellt. Die spezifische Aktivität betrug ca. 1650 BÜCHER-Einheiten/mg. FDP und F-1-P (beide als Cyclo-

¹) Abkürzungen: MALD Muskelaldolase, LALD Leberaldolase, FDP Fructose-1,6-diphosphat, F-1-P Fructose-1-phosphat, GDH α -Glycerophosphatdehydrogenase, TIM Triosephosphatisomerase, NADH₂ reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, NAD⁺ Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, GAP D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP Phosphodihydroxyaceton, GA DL-Glycerinaldehyd.

hexylammoniumsalz), α -Glycerophosphatdehydrogenase, TIM, NADH_2 , GAP als Bariumsalz des Diäthylacetals wurden von der Fa. BOEHRINGER bezogen. Das Ba-Salz des GAP-Diacetals wurde mit DOWEX 50 (X 8, 200–400 mesh, H^+ -Form) in die freie Säure übergeführt. Hydrolyse während 44 Std. bei 40° . Der pH-Wert der Lösung wurde dann mittels 0,2N NaOH auf pH 7 eingestellt.

Methoden: Die Versuche wurden mit MALD und LALD vorgenommen. Die Aldolaseaktivität wurde im optischen Test nach RACKER [2] mit GDH und TIM als Hilfsenzymen bei 25° bestimmt [7]. Als Puffer diente Trishydroxymethyl-aminomethan (0,1M, pH 7,6). Die Aldolaseaktivität wurde anhand der Neigung der Tangente der Zeit-Umsatzkurve in bestimmten Zeitpunkten berechnet. Die Konzentration von GAP wurde zwischen $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ und $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ gewählt. Als Substrat wurde FDP ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) oder F-1-P ($8 \cdot 10^{-3}\text{M}$) verwendet. Im Inkubationsansatz (Endvolumen 2,5 ml) waren enthalten (Endkonzentration): Trispuffer pH 7,6 (0,1M), NADH_2 ($0,5 \mu\text{Mol/ml}$), GDH ($20 \mu\text{g}$), GAP ($3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ bis $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$).

Resultate. – 1) *Enzymkinetische Eigenschaften der LALD und der MALD in Gegenwart von GAP*²⁾. In den nun folgenden Versuchen wurde die Hemmwirkung von verschiedenen GAP-Konzentrationen auf die Aldolase-Aktivität gegen FDP und F-1-P untersucht. Die verwendeten Präparate von MALD und LALD enthielten keine TIM.

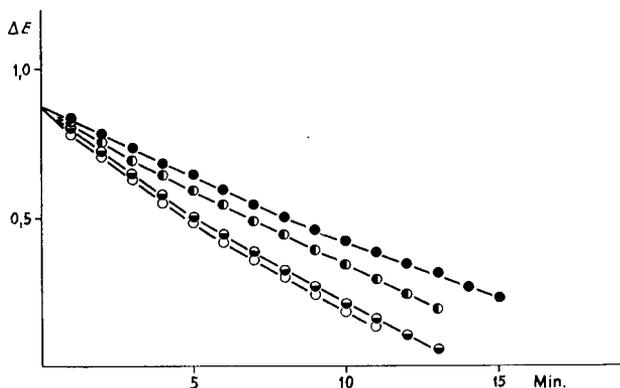


Fig. 1. Hemmwirkung von GAP auf die FDP-Aktivität der Muskelaldolase

Endvolumen des Ansatzes 2,5 ml; Trispuffer pH 7,6 0,1M; NADH_2 0,003 M; GDH/TIM (BOEHRINGER) 0,004 mg; FDP $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$; 0,002 mg Muskelaldolase. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Aldolase ausgelöst. Ordinate: Extinktion. Abszisse: Zeit in Minuten. ○ ohne GAP; ◐ $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$ GAP; ◑ $15 \cdot 10^{-4}\text{M}$ GAP; ● $30 \cdot 10^{-4}\text{M}$ GAP

Wie aus Fig. 1 ersichtlich ist, nimmt bei der MALD die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Konzentration des zugesetzten GAP ab. Die GAP-Konzentration bleibt aber in den Versuchsansätzen nicht konstant, da bei der Spaltung zusätzlich GAP entsteht. Daher nimmt die Hemmung, wie aus dem Verlauf der Kurve ersichtlich ist, während der Reaktion zu, auch in dem Ansatz zu welchem kein GAP zugesetzt wurde.

Die LALD zeigt je nach Substrat ein entgegengesetztes Verhalten der Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Reaktion. Wird FDP als Substrat verwendet, so ist wie bei der MALD die Geschwindigkeit zu Beginn der Reaktion am grössten. Beim F-1-P dagegen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Spaltung zu, besonders bei höheren Konzentrationen des GAP (Fig. 2 und 3). Da in diesem Fall bei

²⁾ Alle Versuche wurden mit DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat durchgeführt.

der Spaltung nicht phosphorylierter DL-Glycerinaldehyd entsteht, prüften wir, ob eventuell der letztere für die erwähnte Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit verantwortlich sei. Es wurde daher folgender Versuch vorgenommen: die F-1-P-Aktivität der LALD wurde in Gegenwart einer konstanten Konzentration von GAP ($3 \cdot 10^{-4}$ M) bei steigendem Zusatz von GA ($4,4 \cdot 10^{-3}$ M bis $2,2 \cdot 10^{-2}$ M) gemessen. Es zeigte sich aber, dass GA keine Steigerung der Spaltungsaktivität der Aldolase bewirkt,

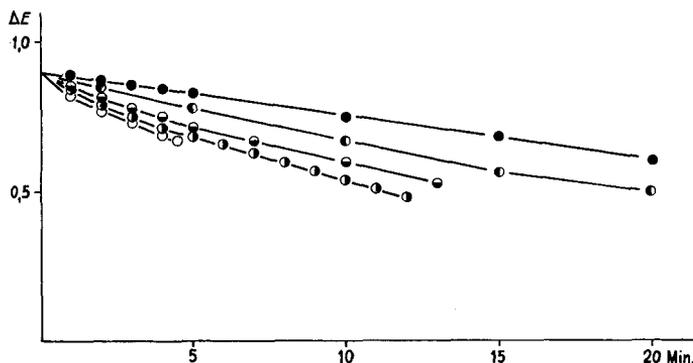


Fig. 2. Hemmwirkung von GAP auf die FDP-Aktivität der Leberaldolase

Zusammensetzung der Testlösung siehe Fig. 1. Konzentration von FDP $2 \cdot 10^{-3}$ M; 0,02 mg Leberaldolase. ○ ohne GAP; ● $1,5 \cdot 10^{-4}$ M GAP; ◐ $3 \cdot 10^{-4}$ M GAP; ◑ $15 \cdot 10^{-4}$ M GAP; ◒ $30 \cdot 10^{-4}$ M GAP

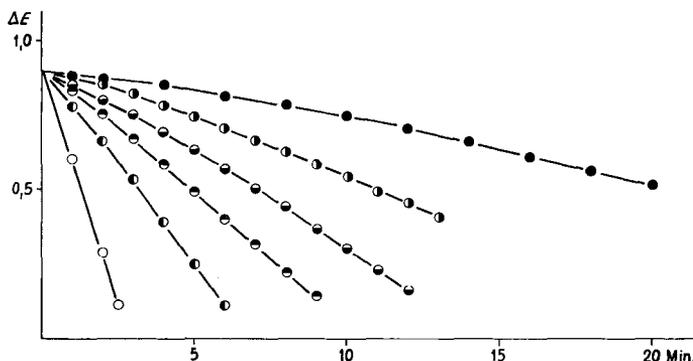


Fig. 3. Hemmwirkung von GAP auf die F-1-P-Aktivität der Leberaldolase

Zusammensetzung der Testlösung siehe Fig. 1. Konzentration von F-1-P $8 \cdot 10^{-4}$ M; 0,02 mg Leberaldolase. ○ ohne PGA; ● $6 \cdot 10^{-5}$ M PGA; ◐ $15 \cdot 10^{-5}$ M PGA; ◑ $60 \cdot 10^{-5}$ M PGA; ◒ $150 \cdot 10^{-5}$ M PGA; ◓ $300 \cdot 10^{-5}$ M PGA

also für den beobachteten Effekt nicht verantwortlich sein kann. GA zeigt vielmehr eine Hemmwirkung, die aber viel schwächer ist als diejenige des GAP. Eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Versuchsdauer wurde auch bei Gegenwart von GA beobachtet (Fig. 4).

Die Empfindlichkeit der LALD gegenüber GAP ist sehr gross. Bei einer GAP-Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ M ist die FDP-Aktivität auf 20%, die F-1-P-Aktivität auf

9% herabgesetzt (Fig.5), während unter denselben Bedingungen bei der MALD noch 52% FDP-Aktivität vorhanden ist.

In den Versuchsansätzen, die keine Triosephosphatisomerase enthalten (siehe folgenden Abschnitt), werden die Resultate insofern etwas gefälscht als während der Reaktion GAP gebildet wird. Da aber zur Bestimmung der Aktivität die Neigung der Nullpunkt tangente benützt wird, kann dieser Fehler klein gehalten werden.

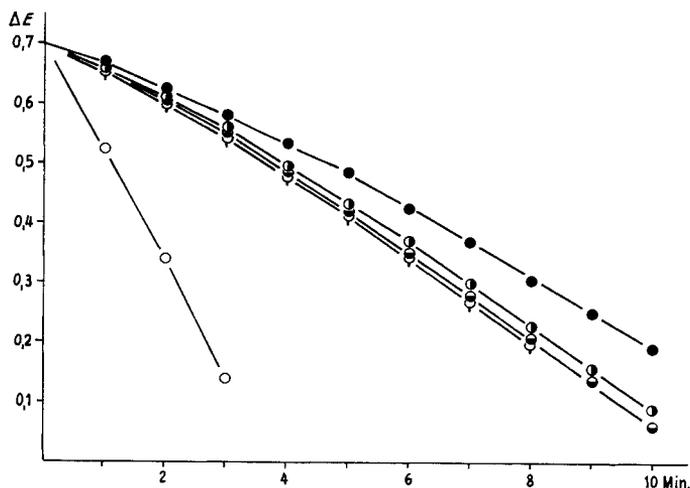


Fig. 4. Hemmwirkung von GA auf die F-1-P-Aktivität der Leberaldolase bei gleichzeitiger Gegenwart von GAP ($3 \cdot 10^{-4}$ M)

Zusammensetzung der Testlösung siehe Fig. 1. Konzentration von F-1-P $8 \cdot 10^{-4}$ M; 0,02 mg Leberaldolase. ○ ohne GA und ohne GAP; ◯ $3 \cdot 10^{-4}$ M GAP, kein GA; ● $3 \cdot 10^{-4}$ M GAP + $4,4 \cdot 10^{-3}$ M GA; ◐ $3 \cdot 10^{-4}$ M GAP + $8,8 \cdot 10^{-3}$ M GA; ● $3,3 \cdot 10^{-4}$ M GAP + $22 \cdot 10^{-3}$ M GA

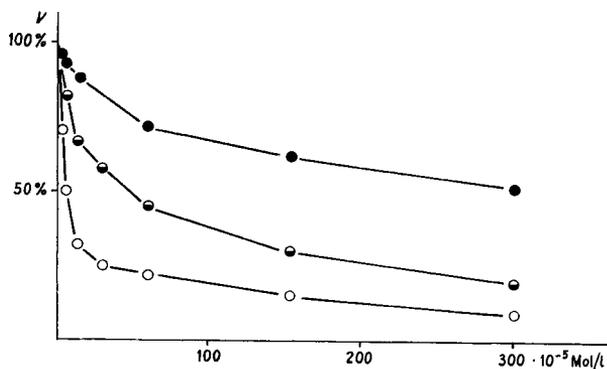


Fig. 5. Inaktivierung der Aldolasen bei verschiedenen GAP-Konzentrationen

Die Aktivitäten wurden aus der Anfangstangente der Zeit-Umsatzkurven bestimmt. Zusammensetzung der Testlösung siehe Fig. 1. Abszisse: GAP-Konzentration. Ordinate: Relative Aktivität (Aktivität ohne GAP = 100). ● Muskelaldolase (140 BE/ml), FDP $2 \cdot 10^{-3}$ M; ◐ Leberaldolase (260 BE/ml), FDP $2 \cdot 10^{-3}$ M; ○ Leberaldolase (260 BE/ml), F-1-P $8 \cdot 10^{-3}$ M

2. Einfluss der Triosephosphatisomerase auf die FDP- und F-1-P-Aktivität der Aldolase: Wir untersuchten die Enzymaktivität bei der MALD und bei der LALD mit oder ohne Zugabe von 50 μg TIM.

Die MALD und die LALD wurden 16 Std. gegen Tris-puffer 0,1M, pH 7,6 dialysiert. Die Zusammensetzung der Testlösung war dieselbe wie in den vorhergehenden Versuchen. Als Substrat wurde FDP ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) oder F-1-P ($8 \cdot 10^{-3}\text{M}$) verwendet.

In den Versuchen, bei denen FDP als Substrat verwendet wurde, ist die Reaktionsgeschwindigkeit ohne TIM geringer als mit TIM. Dieser Unterschied ist bei MALD viel kleiner als bei LALD. Im letzteren Fall beträgt der Substratverbrauch nach 210 s mit TIM $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, während ohne TIM nur $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l umgesetzt werden (Fig. 6 und 7). Da in Gegenwart von TIM pro Mol umgesetztes FDP 2 Mole reduzierbare Spaltprodukte, ohne TIM aber nur 1 Mol entstehen, wurden die ohne TIM erhaltenen Werte mit 2 multipliziert.

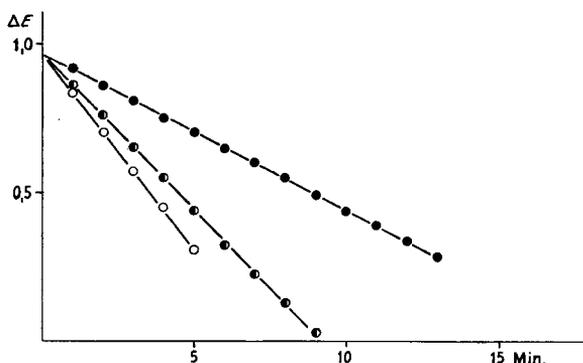


Fig. 6. Einfluss der TIM auf die Aktivität der Muskelaldolase gegen FDP

Zusammensetzung der Testlösung siehe Fig. 1. FDP $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$. ● ohne TIM; ○ mit TIM. Im Ansatz ohne TIM entsteht pro Mol umgesetzter FDP nur 1 Mol DHAP. Um die Aktivität der Aldolase mit und ohne TIM-Zusatz vergleichen zu können, muss der Umsatz der FDP ohne TIM verdoppelt werden. ● korrigierte Umsatzkurve. Abszisse: Zeit in Min., Ordinate: ΔE

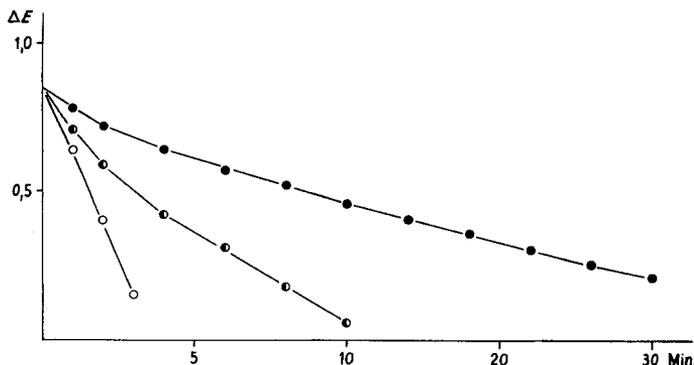


Fig. 7. Einfluss der TIM auf die Aktivität der Leberaldolase gegen FDP

Versuchsbedingungen siehe Fig. 6. ● ohne TIM; ○ mit TIM. ● korrigierte Kurve

In der Arbeit von DAHLQUIST [1] wurde die LALD gegen Acetatpuffer (0,01M), pH 4,5 dialysiert; wir verwendeten Trispuffer. Das Verhältnis der Hemmwirkungen mit und ohne TIM bei der gegen Acetatpuffer (0,01M, pH 4,5) dialysierten LALD entspricht demjenigen der gegen Trispuffer (0,1M, pH 7,6) dialysierten LALD. Ein linearer Verlauf der Zeit-Umsatzkurve ist bei fehlender TIM nur bei der MALD (Fig. 6) zu beobachten, während unter denselben Bedingungen bei den Versuchen mit LALD und FDP als Substrat eine zunehmende Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit eintritt (Fig. 7). Wenn F-1-P als Substrat verwendet wird, so besteht mit oder ohne TIM kein Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit; die pro Zeiteinheit umgesetzte Substratmenge ist dieselbe, und die Zeit-Umsatzkurven verlaufen linear (Fig. 8).

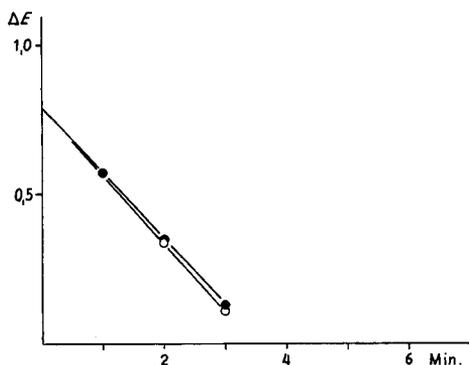


Fig. 8. Einfluss der TIM auf die Aktivität der Leberaldolase gegen F-1-P

Konzentration von F-1-P $8 \cdot 10^{-3}$ M. Versuchsbedingungen wie Fig. 6 u. 7. ○ ohne TIM;
● mit TIM

Fig. 6 und 7 bestätigen die Beobachtung von DAHLQUIST & CRANE [1], dass ohne TIM die Spaltung langsamer verläuft als mit TIM. Dies beruht darauf, dass während der Reaktion GAP entsteht, welches wegen der fehlenden TIM nicht in DHAP übergeführt werden kann, und wie wir oben direkt gezeigt haben, die Enzymaktivität hemmt. Während der Reaktion nimmt die Konzentration an GAP zu, was zu der sich abflachenden Kurve führt (am deutlichsten bei der LALD). Wie zu erwarten, zeigt die TIM keinen Einfluss auf die F-1-P-Aktivität der LALD (Fig. 8), da bei der Spaltung kein GAP sondern GA entsteht, das in kleinen Konzentrationen nur geringe Hemmwirkung zeigt.

3. Natur der Hemmung von MALD und LALD durch GAP.

Die Versuche wurden mit MALD und LALD, welche 16 Std. gegen Tris-puffer (0,1M, pH 7,6) dialysiert wurden, durchgeführt. Als Substrat wurden FDP in abnehmender Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ M bis $3 \cdot 10^{-6}$ M und F-1-P von $8 \cdot 10^{-3}$ M bis $1,25 \cdot 10^{-5}$ M verwendet. Die Werte K_M und V_{max} wurden nach der Methode von LINEWEAVER & BURK [8] bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch Anlegen der Tangente am Nullpunkt der Zeit-Umsatzkurve ermittelt.

Aus den Fig. 9 bis 11 ist ersichtlich, dass sich die für verschiedene GAP-Konzentrationen dargestellten Geraden bei $-1/K_M$ schneiden. Es handelt sich hier also um eine nicht kompetitive Hemmung. MALD und LALD verhalten sich gleich.

Um sicherzustellen, dass die durch GAP bedingte Aktivitätsabnahme nur die MALD und LALD betraf und keinen Einfluss auf das Hilfsenzym GDH zeigte, wurde folgender Versuch durchgeführt: Im optischen Test wurde bei *drei* Konzentrationen von GAP ($5,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$, $2,8 \cdot 10^{-3} \text{M}$) die Aktivität von GDH gemessen. Als

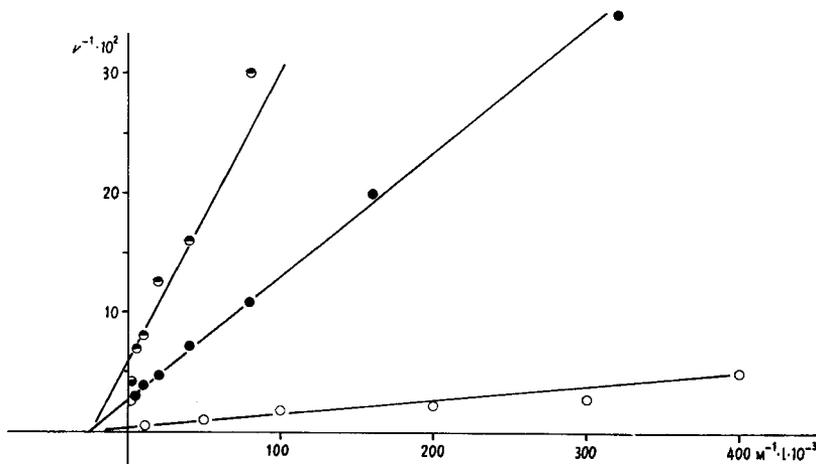


Fig.9. Muskelaldolase mit FDP als Substrat, Hemmung durch GAP; LINEWEAVER-BURK-Darstellung

Abszisse: Reziproke FDP-Konzentration $\text{M}^{-1} \cdot 1 \cdot 10^{-3}$. Ordinate: Reziproke Aktivität (in BÜCHNER-Einheiten pro ml der benützten Enzymlösung) $v^{-1} \cdot 10^2$. ○ ohne GAP; ● $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ GAP; ◐ $6 \cdot 10^{-3} \text{M}$ GAP. Die Ansätze enthielten 0,002 mg Aldolase. $K_M = 4 \cdot 10^{-5} \text{M}$

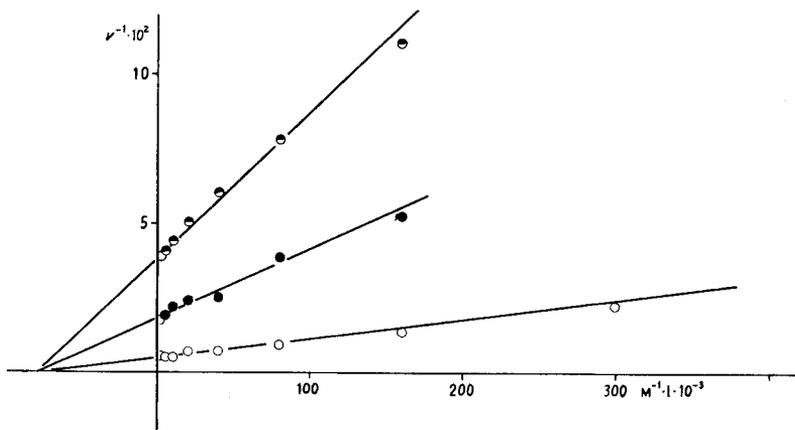


Fig.10. Leberaldolase mit FDP als Substrat, Hemmung durch GAP; LINEWEAVER-BURK-Darstellung
Koordinaten siehe Fig.9. ○ ohne GAP. ● $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ GAP; ◐ $6 \cdot 10^{-3} \text{M}$ GAP. Die Ansätze enthielten 0,02 mg Aldolase. $K_M = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$

Substrat wurde DHAP in einer Konzentration von $4,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ verwendet. Ausgelöst wurde die Reaktion in Anwesenheit von NADH_2 (0,5M) mit 1,25 γ GDH. Die Enzymaktivität wurde wie oben anhand der Neigung der Tangente der Zeit-Umsatzkurve

berechnet. Alle drei Kurven ergeben dieselbe Aktivität. Irgendein Einfluss von GAP auf GDH konnte damit ausgeschlossen werden.

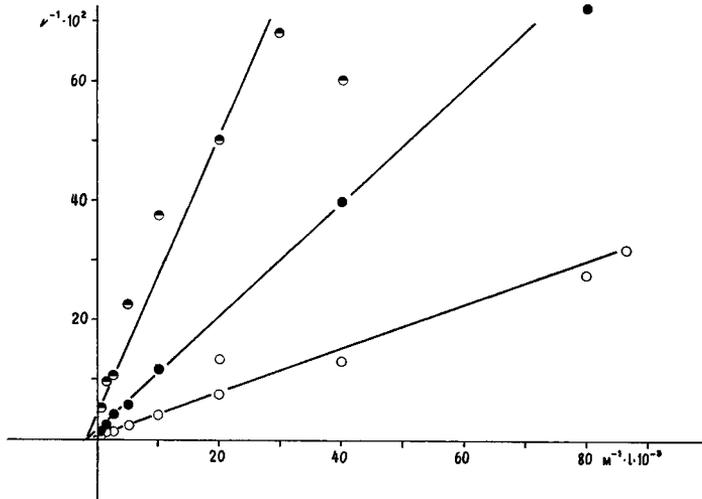


Fig. 11. Leberaldolase mit F-1-P als Substrat, Hemmung durch GAP; LINEWEAVER-BURK-Darstellung

Koordinaten siehe Fig. 9. ○ ohne GAP; ● $3 \cdot 10^{-3}$ M GAP, ◐ $6 \cdot 10^{-3}$ M GAP. Die Ansätze enthielten 0,02 mg Aldolase. $K_M = 5 \cdot 10^{-4}$ M.

Wir führten ferner noch einige Versuche über die Hemmung der durch Carboxypeptidase abgebauten Muskel- und Leberaldolase durch. Durch Inkubation der MALD mit Carboxypeptidase A, welche eine Abspaltung der Carboxyl-endständigen Tyrosinreste bewirkt, wird die Aktivität der MALD gegenüber FDP auf 5% herabgesetzt (DRECHSLER *et al.* [9]). Die Hemmung der mit Carboxypeptidase A vorbehandelten MALD durch Glycerinaldehyd-3-phosphat entsprach dabei derjenigen des unveränderten Enzyms. Auch die Leberaldolase, deren Aktivität durch Abbau mit Carboxypeptidase nur wenig herabgesetzt wird (RUTTER *et al.* [3] [10]) wurde durch GAP in gleicher Weise gehemmt wie das unveränderte Enzym. Die Tatsache, dass nach Abspaltung der Carboxyl-endständigen Tyrosinreste die enzymatische Aktivität der MALD durch GAP in gleicher Weise gehemmt wird wie bei der unbehandelten MALD zeigt, dass die C-terminalen Tyrosinreste offenbar keinen Einfluss auf die Bindungsstelle des GAP am Enzym haben.

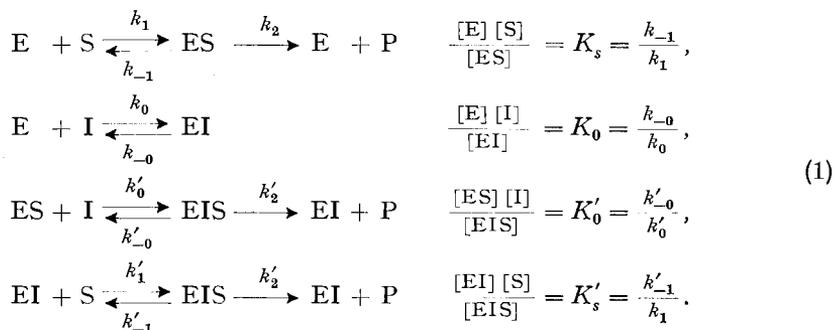
Diskussion. – Die Befunde von DAHLQUIST & CRANE [1] über den Einfluss der TIM auf die Aktivität der Aldolase gegen FDP konnten bestätigt werden. Unsere Versuche zeigten, dass bei fehlender TIM die Hemmung der Aldolase tatsächlich durch den sich anhäufenden Phosphoglycerinaldehyd bewirkt wird. Bei der hochgereinigten und keine TIM enthaltenden Kaninchenmuskelaldolase nimmt der Umsatz von FDP bei Zusatz von GAP ab. Eine wesentlich stärkere Hemmung durch GAP beobachteten wir bei der Leberaldolase mit FDP als Substrat. Die grösste Hemmung durch GAP zeigt sich aber bei der Leberaldolase mit F-1-P als Substrat. Diese

tritt natürlich beim optischen Test nach RACKER nicht in Erscheinung, weil bei der Spaltung von F-1-P kein GAP entsteht.

Fig. 9, 10 und 11 zeigen, dass es sich bei der Hemmung der Aldolasen durch Phosphoglycerinaldehyd offenbar um eine nicht kompetitive Hemmung handelt. Der Verlauf der Kurven in Fig. 5, in welcher die relative Anfangsgeschwindigkeit (Geschwindigkeit ohne Inhibitor = 1) gegen Konzentration des Inhibitors (Phosphoglycerinaldehyd) aufgetragen ist, deutet ferner darauf hin, dass mit wachsender Konzentration des Inhibitors die Aktivität des Enzyms nicht gegen Null geht, sondern einem endlichen Grenzwert zustrebt. Dies bedeutet, dass der Enzym-Inhibitor-Komplex noch eine gewisse Restaktivität besitzt. Es handelt sich offenbar um einen Hemmungstypus, bei welchem der Inhibitor zwar die Enzymaktivität beeinflusst, aber nicht direkt mit dem aktiven Bezirk des Enzyms reagiert.

Um die Kinetik dieser Reaktion abzuleiten (vgl. z.B. [11]), gehen wir von der Voraussetzung aus, dass sowohl das Enzym als auch der Komplex Enzym-Inhibitor katalytisch aktiv sind.

Wir bezeichnen mit E das Enzym, mit S das Substrat, mit I den Inhibitor, mit ES, EI und EIS die entsprechenden Komplexe und mit P das Reaktionsprodukt. Die Reaktion wird dann durch die folgenden Gleichungen (1) beschrieben:



Zwischen den Gleichgewichtskonstanten besteht die Beziehung $K_0 K'_s = K_s K'_0$.

Unter der Voraussetzung, dass sich die Gleichgewichte gemäss den Gleichungen (1) einstellen, die aber nur dann streng erfüllt ist, wenn $k_{-1} \gg k_2$, $k'_{-0} \gg k'_2$ und $k'_{-1} \gg k'_2$ («quasi-equilibrium assumption») ergibt sich für die Geschwindigkeit v der Reaktion der folgende allgemeine Ausdruck (E_0 = Summe aller Formen des Enzyms):

$$v = \frac{[\text{E}_0] \left(k_2 + k'_2 \frac{[\text{I}]}{K'_0} \right) / \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K'_0} \right)}{1 + \left[K_s \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_0} \right) / \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K'_0} \right) (\text{S}) \right]}. \quad (2)$$

Wenn nun der Komplex EI Enzymaktivität besitzt, so wird sich das Enzym in Gegenwart eines genügenden Überschusses von I wie ein neues Enzym mit einer anderen Affinität zum Substrat verhalten: Man erhält für genügend grosses [I] die Geschwindigkeit

$$v = \frac{[\text{E}_0] k'_2}{1 + \frac{K_s K'_0}{K_0} \cdot \frac{1}{[\text{S}]}} = \frac{[\text{E}_0] k'_2}{1 + K'_s \frac{1}{[\text{S}]}}. \quad (3)$$

Dies ist der Fall bei der von DIXON & WEBB [9] «partiell kompetitiv» bezeichneten Hemmung. Ist andererseits das Substrat in grossem Überschuss vorhanden, so liegt das Enzym ausschliesslich in Form der beiden Komplexe ES und EIS vor, welche durch die kinetischen Konstanten k_2 und k'_2 gekennzeichnet sind. Gleichung (4) gilt für grosse Werte von [S].

$$v = \frac{[E_0] \left(k_2 + k'_2 \frac{[I]}{K'_0} \right)}{1 + \frac{[I]}{K'_0}} \quad (4)$$

Für $[I] = 0$ wird $v = [E_0] k_2 = v_m$, d.h. gleich der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion in Abwesenheit des Inhibitors; für genügend grosses $[I]$ erhält man $v = [E_0] k'_2 = v'_m$, d.h. die Maximalgeschwindigkeit bei Substratsättigung des EI-Komplexes. Gleichung (4) umfasst auch die Fälle, bei denen das Enzym durch Bindung von I nicht gehemmt, sondern aktiviert wird; in diesem Fall wäre $v'_m > v_m$.

Im vorliegenden Fall bedeutet v'_m die Aktivität des mit I (Phosphoglycerinaldehyd) gesättigten Enzym-Substratkomplexes. Führen wir v_m und v'_m in Gleichung (4) ein und bezeichnen wir die Differenz $v_m - v$ als Hemmung h , so lässt sich Gleichung (4) auf die folgende einfache in $1/[I]$ und $1/h$ lineare Form bringen:

$$K'_0 \frac{1}{[I]} = (v_m - v'_m) \frac{1}{h} - 1. \quad (5)$$

Bezieht man die Geschwindigkeit, bzw. die Hemmung auf v_m und setzt $v'_m/v_m = V'$, $h/v_m = H$, so erhält man

$$K'_0 \frac{1}{[I]} = (1 - V'_m) \frac{1}{H} - 1. \quad (5a)$$

Wenn man also $1/H$ gegen $1/[I]$ aufträgt, so gibt der Schnittpunkt der Geraden mit der $1/[I]$ -Achse die Affinitätskonstante $1/K'_0$ des Inhibitors zum ES-Komplex, während der Schnittpunkt mit der $1/H$ -Achse den reziproken Wert der maximalen relativen Hemmung $1/(1 - V'_m)$ und daraus die maximale relative Enzymaktivität V'_m des EI-Komplexes ergibt.

Um die Schnittpunkte der LINEWEAVER-BURK-Geraden mit den Achsen exakt zu erhalten, haben wir die Regressionsgeraden der Messpunkte bestimmt. Setzen wir für die Gleichung der Regressionsgeraden ($x = 1/[I]$, $y = 1/H$):

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$$

(\bar{x} und \bar{y} Mittelwerte) so ergibt sich für den Schnittpunkt mit der $1/[I]$ -Achse

$$-1/K = -\bar{y}/b + \bar{x}$$

und für den Schnittpunkt mit der $1/H$ -Achse

$$1/(1 - V'_m) = \bar{y} - b \bar{x}.$$

Die Messpunkte für Muskelaldolase mit FDP und für Leberaldolase mit FDP und mit F-1-P, wie sie sich aus den Versuchen Abb. 5 ergeben, sind in Fig. 12, 13 und 14 eingetragen.

Die Werte von K'_0 und V'_m sind in einer Tabelle zusammengestellt:

Werte von K'_0 und V'_m				
	K'_0	V'_m	K_M (FDP, F-1-P)	K_M (PGA)
Muskalaldolase-FDP	$2,8 \cdot 10^{-4}$	0,608	$6 \cdot 10^{-5}$	MALD $1 \cdot 10^{-3}$
Leberaldolase-FDP	$2,1 \cdot 10^{-4}$	0,246	$4,7 \cdot 10^{-7}$	LALD $3 \cdot 10^{-4}$
Leberaldolase-F-1-P	$6,2 \cdot 10^{-5}$	0,075	$5,7 \cdot 10^{-4}$	

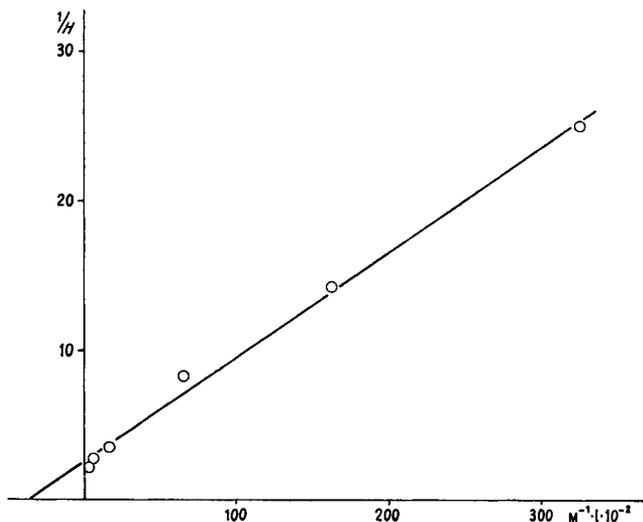


Fig.12. Bestimmungen von K'_0 bei Muskelaldolase mit FDP als Substrat ($2 \cdot 10^{-3}M$) und GAP als Inhibitor

Abszisse: Reziproke GAP-Konzentration $Mol^{-1} \cdot 1 \cdot 10^{-2}$; Ordinate: Reziproke relative Hemmung $1/H$. $K'_0 = 2,77 \cdot 10^{-4}M$

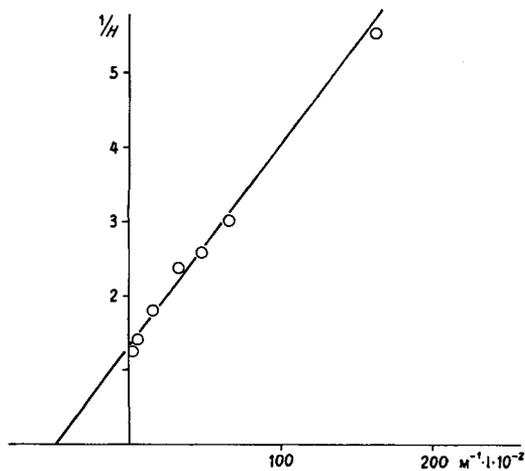


Fig.13. Bestimmung von K'_0 bei Leberaldolase mit FDP als Substrat ($2 \cdot 10^{-3}M$) und GAP als Inhibitor

Koordinaten wie Fig.12. $K'_0 = 2,08 \cdot 10^{-4}M$

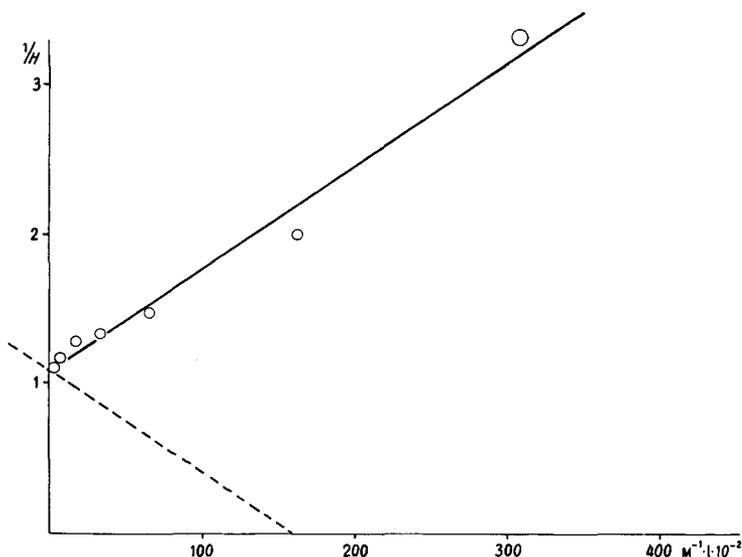


Fig. 14. Bestimmung von K'_0 bei Leberaldolase mit F-1-P als Substrat ($8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) und GAP als Inhibitor
Koordinaten wie Fig. 12. $K'_0 = 6,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Man erkennt, dass Glycerinaldehyd-3-phosphat die grösste Hemmwirkung gegen Leberaldolase mit F-1-P als Substrat zeigt. Hier ist auch die Restaktivität des vollständig mit dem Inhibitor gesättigten Enzyms am kleinsten. Wir haben in der Tabelle zum Vergleich auch die MICHAELIS-Konstanten angeführt. Bei der Leberaldolase ist K'_0 für 3-Phosphoglycerinaldehyd ca. 10mal kleiner als K_M für F-1-P (K'_0 ist definiert als Dissoziationskonstante des ternären Komplexes ESI in $\text{ES} + \text{I}$). Die in der Tabelle angeführten Werte zeigen, dass die Affinität des Inhibitors, Glycerinaldehyd-3-phosphat, zum Aldolase-F-1-P-Komplex etwa 3,5mal grösser ist als zum Aldolase FDP-Komplex. Wie wir früher erwähnt haben, ist die Hemmwirkung des nicht phosphorylierten Glycerinaldehyds viel geringer als diejenige des Glycerinaldehydphosphats. Bei der Bindung der letzteren an das Enzym muss also die Phosphatgruppe eine wichtige Rolle spielen. Wodurch der Unterschied in der Bindung des Glycerinaldehydphosphats an den Enzym-F-1-P-Komplex und den Enzym-FDP-Komplex bedingt ist, lässt sich z. Zt. nicht angeben. Es wäre denkbar, dass die Anlagerung des FDP mit seinen beiden Phosphatgruppen eine stärkere Veränderung der Konformation des Proteins bewirkt als die Anlagerung von F-1-P und daher zu einer Vergrösserung des Wertes von K'_0 , d. h. einer Verringerung der Affinität des Phosphoglycerinaldehyds zum Enzym führt.

Wir danken dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 14. Mitteilung: O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* 51, 1130 (1968).
- [1a] A. DAHLQUIST & R. CRANE, *Biochim. biophys. Acta* 85, 132 (1964).
- [2] E. RACKER, *J. biol. Chemistry* 167, 843 (1947).
- [3] E. H. MEHLER, *J. biol. Chemistry* 238, 100 (1963).

- [4] P. D. SPOLTER, R. ADELMAN & S. WEINHOUSE, *J. biol. Chemistry* **240**, 1327 (1965).
 [5] H. GÖSCHKE, F. LEUTHARDT & A. SCHMID, *Helv.* **46**, 1791 (1963).
 [6] J. F. TAYLOR, A. GREEN & G. CORI, *J. biol. Chemistry* **173**, 591 (1948).
 [7] G. BEISENHERZ, J. BOLTZE & Th. BÜCHER, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
 [8] H. LINEWEAVER & D. BURK, *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
 [9] E. R. DRECHSLER, P. D. BOYER & A. G. KOWALEWSKY, *J. biol. Chemistry* **234**, 2627 (1959).
 [10] W. S. RUTTER, O. C. RICHARDS & B. M. WOODFIN, *J. biol. Chemistry* **236**, 3193 (1960).
 [11] M. DIXON & E. C. WEBB, «*Enzymes*», Kap. 8, London 1964; CH. WALTER, «*Steady-state Applications in Enzyme Kinetics*», Kap. 8, New York 1965.

146. Herzwirksame Glykoside aus der weissen Meerzwiebel. Konstitution des Scilliphäosids und des Glucoscilliphäosids

55. Mitteilung über Herzglykoside [1]

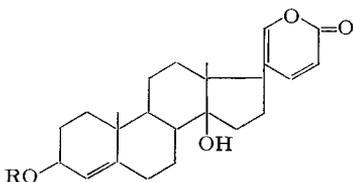
von A. von Wartburg, M. Kuhn und K. Huber

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG, Basel

(17. VI. 68)

Summary. Scilliphaeoside (I), $C_{30}H_{42}O_9$, and glucoscilliphaeoside (III), $C_{36}H_{52}O_{14}$, represent two minor glycosides which occur in the bulbs of the white sea onion or squill [*Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (BAKER) L.]. Glucoscilliphaeoside is easily converted into scilliphaeoside and D-glucose by selective enzymatic cleavage with β -glucosidases (e. g. strophanthobiase). Acid hydrolysis splits glucoscilliphaeoside into anhydroscilliphaeosidin (IV) and scillabiose (= β -D-glucosyl-L-rhamnose), scilliphaeoside yields the same anhydro-aglycone IV and L-rhamnose. The true genin scilliphaeosidin (VI), $C_{24}H_{32}O_5$, has now been gained by a combined oxidative and hydrolytic cleavage of the rhamnose residue of scilliphaeoside. By chemical evidence and spectroscopical data scilliphaeosidin is characterized as a trihydroxy- A^4 -steroid of the bufadienolide type. The assumed locations of the three hydroxylic functions at C-3, C-12 and C-14 are established by permanganate degradation of the lactone ring of di-O-acetyl-scilliphaeosidin (VII) to the etianic acid derivatives XIII and XIV, which are also available from digoxigenin. These correlations prove the structure of scilliphaeoside (I) as 12 β -hydroxy-proscillaridin A, glucoscilliphaeoside (III) representing 12 β -hydroxy-scillaren A.

Die weisse Meerzwiebel, *Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (BAKER) L., enthält eine Reihe herzaktiver Steroidglykoside, die in der Therapie Verwendung finden. Als erste Reinstoffe isolierten STOLL und Mitarb. [2] Scillaren A, das Hauptglykosid der Droge, sowie die entsprechende Desglucoverbindung Proscillaridin A. Die untenstehenden Konstitutionsformeln konnten u. a. durch Überführung des Scillarens A in Cholensäure-Derivate [3] und durch Verknüpfung des Aglykons Scillarenin mit dem Krötengift Telocinobufagin [4] ermittelt werden.



R = H: Scillarenin
 R = L-Rhamnose: Proscillaridin A
 R = Scillabiose: Scillaren A