

## Über die Reaktion von Protein-SH-Gruppen mit 4-Hydroxypentenal

Von

E. Schauenstein, M. Taufer, H. Esterbauer, A. Kylianek und Th. Seelich

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Graz, Österreich

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Dezember 1970)

### *Reaction of Protein SH-Groups with 4-Hydroxy-2-pentenal*

4-Hydroxy-pentenal (*HPE*) reacts with "fast" SH-groups of proteins (*PSH*) by addition of SH to the double bond of *HPE*. On the one hand, by means of treatment with 2,4-dinitrophenylhydrazine the formed protein bound 2,4-dinitrophenylhydrazones can be measured spectrophotometrically, allowing thus a quantitative estimation of protein bound *HPE*. On the other hand, the estimation of *PSH* before and after *HPE*-treatment of the protein yields the moles of SH consumed thereby. With native *GAPDH*, *ALD*, and *RSA*, larger differences between the amount of protein bound *HPE* and *DTNB* estimated loss of *PSH* are observed, good coincidence with native ovalbumin and proteins with reduced S—S-bridges. Thus, the differences named above are explained with the assumption that in some native proteins SH-groups can react somewhat differently with *HPE* or *DTNB*.

The reaction between *HPE* and *PSH* is characterized by a reversible equilibrium. After addition of a second protein the SH-groups of which having the higher reactivity towards *HPE*, a transfer of *HPE* occurs from the first to the SH-groups of the second protein. This is demonstrated with *HPE*-serum albumin adduct (or *HPE*—lactoglobulin adduct) after addition of active glyceraldehydphosphat-dehydrogenase whereby the loss of enzyme-activity indicates the transfer of *HPE* to the functional and highly reactive SH-groups of the enzyme.

4-Hydroxy-2-pentenal (*HPE*) reagiert mit den „schnellen“<sup>66</sup> SH-Gruppen von Proteinen unter Addition der SH an die Doppelbindung des *HPE*. Das an das Protein gebundene *HPE* wird nach Behandlung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin quantitativ bestimmt, der Verlust an SH-Gruppen mit *Ellmans* Reagens. Zwischen beiden Werten besteht ein linearer Zusammenhang.

Die Reaktion zwischen *HPE* und Protein-SH verläuft über ein reversibles Gleichgewicht. Bei Zugabe eines zweiten Proteins, dessen SH-Gruppen gegenüber *HPE* reaktiver sind,



Das Addukt I cyclisiert sich intramolekular in einem zweiten Reaktionsschritt zu einem Halbacetal II.

I bzw. II oder ein Gemisch von I und II reagiert mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (*DNP*H) unter Bildung eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons (*DNP*-Hydrazon) eines gesättigten Aldehyds mit charakteristischem Absorptionsmaximum, das in neutraler wäßriger Lösung bei 27 250  $\gamma'$  liegt. Der spezifische dekadische Extinktionskoeffizient  $\epsilon'$  ( $1000 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) wurde zunächst am entsprechenden Glutathion-*HPE*-Addukt zu 36 bestimmt, woraus sich der  $\epsilon'$ -Wert des 2,4-*DNP*-Hydrazons des an die SH-Gruppe gekoppelten Aldehyds\* zu 75 ergibt<sup>3</sup>.

Damit war die Voraussetzung geschaffen, das an die SH-Gruppen von Proteinen gekoppelte *HPE* nachzuweisen und quantitativ zu erfassen.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die bisher an Enzymen und anderen Proteinen erhaltenen Ergebnisse.

#### Material

4-Hydroxy-2-*trans*-pentenal, synthetisiert nach *Esterbauer* und *Weger*<sup>5</sup>;  $n_D^{20} = 1.472$ ,  $d_4^{20} = 1.004$ , Absorptionsmaximum in Wasser bei 44 800  $\gamma'$  mit  $\epsilon = 13\,800$  ( $\epsilon = 1000 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Mole}^{-1}$ ).

#### Enzyme

*GAPDH* = D-Glyceraldehyd-3-phosphat: *NAD*-Oxydoreduktase; EC 1.2.1.12 *MG* = 140 000 (Fa. Boehringer, Mannheim, GmbH.);  $\epsilon'_{\text{max}} = 1.0$  (bei 36 000  $\text{cm}^{-1}$ ).

*ALD* = Aldolase, Keto-1-phosphat-aldehydligase; EC 4.1.2.13 *MG* = 147 000 (Fa. Boehringer, Mannheim, GmbH.);  $\epsilon'_{\text{max}} = 0.91$ .

#### Proteine

*RSA* = Rinderserumalbumin, B grade, Cohn V (Fa. Calbiochem), *MG* = 66 000;  $\epsilon'_{\text{max}} = 0.63$ .

*LG* =  $\beta$ -Lactoglobulin, 3mal kristallisiert, 95%, *MG* = 35 000,  $\epsilon'_{\text{max}} = 0.885$  (Fa. Koch-Light Lab. Ltd.).

*OA* = Ovalbumin, 5mal kristallisiert, 89%, *MG* = 45 000 (Fa. Koch-Light Lab. Ltd.).

#### Methoden

##### Umsetzung der Proteine mit *HPE*

*GAPDH*: 2.5 ml Enzymlösung (etwa 5 mg/ml), 2.5 ml *HPE*-Lösung (1.78 mg/ml), 30 Min. bei 4° C (entspricht dem 500fachen molaren Überschuß, 30fach in bezug auf SH) inkubieren, sodann 10 Stdn. bei 4° C gegen 1000 ml destill. Wasser, das stündlich gewechselt wurde, dialysieren.

\*  $36 \times \overline{MG}$  des Glutathion-*HPE*-2,4-*DNP*-Hydrazons

$\overline{MG}$  des *HPE*-2,4-*DNP*-Hydrazons

<sup>5</sup> H. Esterbauer und W. Weger, Mh. Chem. 98, 1884, 1994 (1967).

*ALD*: 0.7 ml Enzymlösung (etwa 10 mg/ml), 0.7 ml Wasser, 1.4 ml *HPE*-Lösung (1.78 mg/ml) (entspricht dem 500fachen Überschuß, 18fach in bezug auf SH) inkubieren und weitere Verarbeitung wie bei *GAPDH*.

*RSA*: 2.0 ml Proteinlösung (36 mg/ml), 2.0 ml *HPE*-Lösung (1.5 mg/ml) (entspricht etwa dem 30fachen Überschuß, 60fach im bezug auf SH) inkubieren und weitere Verarbeitung wie bei *GAPDH*.

*LG*: Die Lösung des reduzierten Proteins wird mit dem 10fachen auf SH-Gruppen bezogenen Überschuß versetzt und 5 Stdn. bei 20° C reagieren gelassen. Dialyse: 24 Stdn. gegen fließendes Leitungswasser und 3mal 2 Stdn. gegen das 100fache Volumen destill. Wasser.

*OA*: 1.0 ml Proteinlösung (23 mg/ml) in 0.9proz. NaCl-Lösung, 1.0 ml *HPE*-Lösung (3.9 mg/ml) (entspricht dem 80fachen Überschuß, 20fach in bezug auf SH) 30 Min. bei 4° C inkubieren: Dialyse wie bei *GAPDH*, jedoch gegen 0.45proz. NaCl-Lösung.

#### *Reduktion der Protein-Disulfidbrücken*

*LG*: 6.0 ml Wasser, 2.0 ml Triäthanolaminpuffer pH 8.5, 2.0 ml 2.5*m*-neutralisiertes Thioglykolat; darin 4.8 g Harnstoff lösen.

Wenig *ÄDTA* zugeben, 5 Min. mit N<sub>2</sub> spülen, 100 mg *LG* zusetzen und bei Raumtemp. stehenlassen. In entsprechenden Zeitabständen werden Proben entnommen und über Sephadex G 25 getrennt (Elutionsmittel: N<sub>2</sub>-gesätt. 6*m*-Harnstofflösung). Die Proteineluate werden unter N<sub>2</sub> in einem Meßzylinder aufgefangen und Proteingehalt und SH-Gehalt spektrometrisch gemessen. Bei Konvergenz der Protein-SH-Werte gegen einen Grenzwert wurde die Reduktion abgebrochen und das reduzierte Protein wieder über Sephadex isoliert.

*RSA*: 1.4 ml Triäthanolamin-Puffer, pH 8.5, 13,6 ml 2.5*m*-neutralisiertes Thioglykolat, darin 7.2 g Harnstoff lösen, wenig *ÄDTA* zusetzen, mit N<sub>2</sub> sättigen und darin 660 mg *RSA* auflösen. Weitere Aufarbeitung, wie bei *LG* beschrieben.

#### *Umsetzen der nativen bzw. der HPE-behandelten Proteine mit DNPH*

*Reagens*: 600 mg *DNPH* in 4.5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lösen, Zusatz von 45 ml Äthanol. Vor Gebrauch 1 : 2 mit H<sub>2</sub>O verdünnen.

Die wäbr. Lösungen der Proteine wurden mit dem 3- bis 10fachen molaren Überschuß (bezogen auf die Protein-SH-Gruppen) versetzt, die Mischungen 24 Stdn. bei Raumtemp. im Dunklen stehengelassen und anschließend 20 Stdn. lang gegen destill. Wasser dialysiert.

Kontrollversuche ergaben, daß nach dieser Zeit im Dialysat kein freies *DNPH* mehr nachweisbar war.

#### *Bestimmung der Proteinkonzentration*

a) In allen Fällen nach *HPE*-Behandlung des Proteins und erschöpfender Dialyse, auf Grund des jeweiligen  $\epsilon'_{\max}$ -Wertes bei 36 000  $\gamma'$  an einem Aliquot der Lösung.

b) Bei *RSA* und *LG* noch zusätzlich durch Trockenrückstandsbestimmung an der Lösung nach Hydrazin-Behandlung und vollständiger Dialyse (Trocknen über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im Vak. bei 40° C).

*Bestimmung der SH-Gruppen*

a) Mit p-Chlor-mercuribenzoat (p-CMB) nach Boyer<sup>6</sup>.

b) Mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) nach Ellman<sup>7</sup> ( $\varepsilon = 13\,600$ ).

*Aktivitätsbestimmung an GAPDH*

Informationen der Fa. Boehringer, Mannheim, GmbH.; kein Cystein-zusatz zum Testansatz, Gesamtvolumen 3.13 ml, Gesamtmenge an Enzymprotein 0.01 mg.

## Ergebnisse

## 1. Reaktion mit Enzymproteinen

*Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase*<sup>8</sup>

Abb. 1, Kurve 1 bringt das Absorptionsspektrum des erst mit HPE vorinkubierten und sodann mit 2,4-DNPH behandelten Enzyms. Die Wellenzahl des langwelligeren Maximums (27 250  $\gamma'$ ) entspricht genau den bei 2,4-DNP-Hydrazonen gesättigter Aldehyde gefundenen. Zur quantitativen Auswertung muß der bei 27 250  $\gamma'$  gemessene Extinktionsmodul

$m \left( = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{d} \right)$  erst korrigiert werden, da auch native GAPDH nach Behandlung mit 2,4-DNPH eine meßbare Absorption bei 27 250  $\gamma'$  ergibt (Abb. 1, Kurve 2).

$$\text{Korrektur: } m_{\text{korrr}} = m_2 - \varepsilon_1' \cdot c_2'$$

$\varepsilon_1'$  = spez. Extinktionskoeffizient der nativen, mit 2,4-DNPH behandelten GAPDH bei 27 250  $\gamma'$ ,  $\varepsilon_1' = 0.064 \pm 0.005$ .  $m_2$  = Extinktionsmodul bei 27 250  $\gamma'$  und  $c_2'$  = Konzentration, der mit HPE vorinkubierten und mit 2,4-DNPH behandelten GAPDH.  $\frac{m_{\text{korrr}}}{75} =$  = Konzentration der Lösung 2 an proteingebundenem 2,4-DNP-Hydrazon, das dem gebundenem HPE zuzuordnen ist [75 =  $\varepsilon'$  des 2,4-DNP-Hydrazons, das an eine SH-Gruppe gekoppelt ist (S. 520)].

Im Mittel aus 4 Ansätzen ergab sich, daß GAPDH unter den genannten Versuchsbedingungen  $4.63 \pm 0.07$  Moleküle HPE bindet. Zur Bestimmung des zu erwartenden Verlustes an freien SH-Gruppen mußte mit DTNB gearbeitet werden, da p-CMB den Aldehyd erwiesenermaßen aus seiner Bindung an SH-Gruppen verdrängt.

<sup>6</sup> P. D. Boyer, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4331 (1954).

<sup>7</sup> G. E. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70 (1959).

<sup>8</sup> A. Kylianeck, Diss. Univ. Graz 1968.

*GAPDH* nach Inkubation in destill.

Wasser (Kontrolle)	: 9.22 ± 0.33 Mole SH/Mol Enzym
<i>GAPDH</i> nach <i>HPE</i> -Inkubation	: 6.02 ± 0.42 Mole SH/Mol Enzym
<hr/>	
— Δ SH	: 3.20 ± 0.11 Mole/Mol Enzym

*Aldolase*<sup>8</sup>

Die spektrometrischen Befunde entsprechen im wesentlichen den bei *GAPDH* erhaltenen. Der für die quantitative Auswertung notwendige

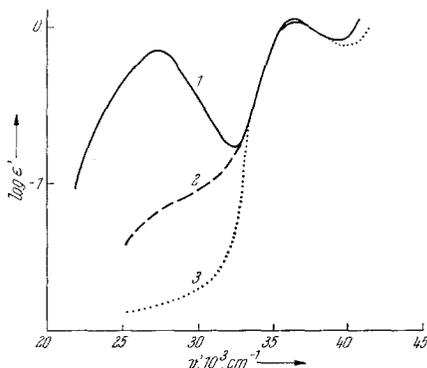


Abb. 1. Absorptionsspektren von *GAPDH*. Kurve 1: *GAPDH* mit *HPE*, sodann mit 2.4-*DNP*H behandelt. Kurve 2: Native *GAPDH* nach Behandlung mit 2.4-*DNP*H. Kurve 3: Natives Enzym

Korrekturwert  $\epsilon_1'$  (vgl. *GAPDH*) beträgt hier 0.085. Nach der analog wie bei *GAPDH* durchgeführten Korrektur ergaben sich im Mittel 0.84 Mole Hydrazon bzw. Mole *HPE* pro Mol Enzymprotein.

Die SH-Bestimmung wurde wieder mit *DTNB* durchgeführt. Die Extinktion stieg innerhalb der ersten 10 bis 20 Min. rasch an (entsprechend dem Gehalt an den sogenannten „schnellen“ SH-Gruppen); anschließend erfolgte ein gleichmäßiger Extinktionsanstieg um nur mehr geringe Beträge, bis nach etwa 3 Stdn. *Tyndall*trübung auftrat. Zu diesem Zeitpunkt hatten im Kontrollansatz rund 15 SH-Gruppen reagiert, im *HPE*-Ansatz rund 14.

Im Mittel ergab sich:

<i>ALD</i> , Kontrolle	: 14.6 Mole SH/Mol Enzym (5 Best.)
<i>ALD</i> nach <i>HPE</i> -Inkubation	: 13.5 Mole SH/Mol Enzym (4 Best.)
<hr/>	
— Δ SH	: 1.1 Mole/Mol Enzym

Nach dem zweiseitigen *Student*test unterscheiden sich die beiden Mittelwerte (Kontrolle und nach *HPE*-Inkubation) signifikant ( $2a = 0.05$ ).

## 2. Reaktion mit anderen Proteinen

*Rinderserumalbumin*<sup>8</sup>

*RSA* ergibt nach *HPE*-Behandlung und anschließender Umsetzung mit 2.4-*DNP*H das Absorptionsspektrum Kurve 1 der Abb. 2. Kurve 2 stellt das Absorptionsspektrum von *RSA* dar, das ohne vorherige *HPE*-Einwirkung mit 2.4-*DNP*H umgesetzt worden war. Zum Unter-

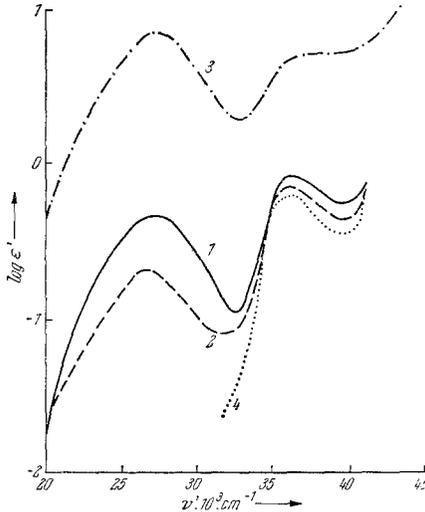


Abb. 2. Absorptionsspektren von *RSA*. Kurve 1: *RSA* mit *HPE*, sodann mit 2.4-*DNP*H behandelt. Kurve 2: Natives *RSA* nach Behandlung mit 2.4-*DNP*H. Kurve 3: Reduziertes *RSA* mit *HPE*, sodann mit 2.4-*DNP*H behandelt. Kurve 4: Natives Protein

schied von den bisher untersuchten Enzymproteinen tritt bereits beim nativen *RSA* nach Hydrazinbehandlung ein charakteristisches und relativ intensives Absorptionsmaximum des proteingebundenen 2.4-*DNP*-Hydrazons gesättigter Carbonylverbindungen auf. Die quantitative Auswertung erfolgte in prinzipiell gleicher Weise wie bereits beschrieben.

Aus 12 Einzelbestimmungen ergab sich für den Korrekturwert  $\epsilon_1' 0.2 \pm 0.01$  und daraus im Mittel  $0.60 \pm 0.03$  Mole Hydrazon pro Mol natives *RSA*.

Die analoge Auswertung von Kurve 1 der Abb. 2 liefert im Mittel aus 4 Bestimmungen:

$1.30 \pm 0.05$  Mole proteingebundenes Hydrazon pro Mol *RSA*.

Abzüglich des Korrekturwertes für die Hydrazonbildung am nativen *RSA* (0.60) ergibt sich, daß pro Molekül *RSA* 0.7 *HPE*-Moleküle gebunden wurden.

Die SH-Bestimmungen mit *DTNB*, ohne Detergens, ergaben:

<i>RSA</i> , Kontrolle	:	0.47 ± 0.03 Mole SH/Mol Protein
<i>RSA</i> nach <i>HPE</i> -Inkubation	:	ca. 0.05 Mole SH/Mol Protein
— Δ SH		: ca. 0.42 Mole/Mol Protein

Bei Reduktion der 17 *Cys*-S—S-Gruppen des nativen *RSA*<sup>9</sup> mit Thioglykolat findet man, daß die mit *DTNB* gemessenen SH-Gehalte nach 8 bis 10 Tagen gegen einen Grenzwert von 25 bis 28 Molen SH/Mol Protein konvergieren. In diesem Stadium wurde das reduzierte Protein über Sephadex isoliert, mit *HPE* 5 Stdn. bei 20° C stehengelassen und sodann erschöpfend dialysiert. Nach Behandlung eines Aliquots mit 2.4-*DNP*H in üblicher Weise ergaben sich Absorptionsspektren, wie sie in Abb. 2, Kurve 3 dargestellt sind. Man erkennt den erwartungsgemäß beträchtlichen Intensitätsanstieg des Hydrazonmaximums gegenüber der Kurve 1 und 2. Der Vergleich mit der Absorption von 2.4-*DNP*-Hydrazonen gesätt. Aldehyde ergibt, daß die Absorption von Kurve 3 bei Wellenzahlen zwischen ca. 33 000 und 44 000  $\gamma'$  bereits das Spektrum der genannten Hydrazone darstellt, worin die Proteinabsorption offenbar infolge der hohen Hydrazon-Bindung nicht mehr zur Ausprägung kommen kann.

Die Auswertung lieferte bei 2 Ansätzen mit je 3 Einzelbestimmungen (Streuung etwa 2%) im Mittel 25.0 Hydrazongruppen pro Mol Protein, woraus sich nach Subtraktion des Korrekturwertes (Hydrazonbindung des nativen *RSA* = 0.60) 24.4 Mole *HPE*/Mol Protein ergaben.

Die SH-Bestimmung lieferte folgende Werte:

<i>RSA</i> <sub>red</sub> , Kontrolle	:	25.3 ± 1.6 Mol SH/Mol Protein
<i>RSA</i> <sub>red</sub> nach <i>HPE</i> -Inkubation	:	0.4 ± 0.034 Mol SH/Mol Protein
— Δ SH		: 24.9 ± 1.57 Mole/Mol Protein

### $\beta$ -Lactoglobulin<sup>9</sup>

Das aus 2 Teilketten mit je 2 *Cys*-S—S-*Cys* und einer *Cys*-SH-Gruppe bestehende Protein wurde mit Thioglykolat reduziert (vgl. exper. Teil) und anschließend säulenchromatographisch isoliert. Nach 240 Stdn. wird ein Endwert von 8 bis 10 Gruppen pro Molekül erreicht, der somit etwa 80 bis 100% der Theorie entspricht.

Das reduzierte Protein wurde 5 Stdn. bei 20° C mit dem 7fachen Überschuß an *HPE*, bezogen auf SH, inkubiert und anschließend dialysiert.

Ein Aliquot dieser Lösung wurde mit 2.4-*DNP*H behandelt. Die Ergebnisse der Auswertung von zwei getrennten Versuchsansätzen

<sup>9</sup> *Th. Seelich*, Diss. Univ. Graz 1969.

mit je drei Einzelbestimmungen zeigten im Mittel 9.3 Mole *HPE* pro Mol reduziertes Protein an.

Die SH-Bestimmungen ergaben:

$\beta$ -Lactoglobulin <sub>red</sub> , Kontrolle	: 9.1 $\pm$ 0.34 Mol SH/Mol Protein
$\beta$ -Lactoglobulin <sub>red</sub> nach <i>HPE</i> - Inkubation	: 0.38 $\pm$ 0.07 Mol SH/Mol Protein
<hr/>	
— $\Delta$ SH	: 8.72 $\pm$ 0.27 Mole/Mol Protein

Auch hier stimmen die Molzahlen des pro Mol Protein gebundenen *HPE* und der verschwundenen SH-Gruppen überein.

#### *Ovalbumin*<sup>8</sup>

*OA* besitzt, nach der Mehrzahl der Literaturangaben, 4 SH-Gruppen pro Molekül, die reaktionsträge bzw. teilweise auch maskiert im Inneren des Moleküls eingebaut sind.

Somit erschien es von Interesse, das Verhalten von *OA* gegenüber *HPE* zu untersuchen. Nach der unter definierten Bedingungen durchgeführten *HPE*-Behandlung (siehe exper. Teil) ließ die spektrometrische Untersuchung der Dialyseflüssigkeit bereits erkennen, daß der gesamte eingesetzte Aldehyd im Dialysemantel nachzuweisen war. Den endgültigen Beweis für das Ausbleiben einer chemischen Reaktion zwischen *HPE* und den maskierten SH-Gruppen des *OA* lieferte das Spektrum des Umsetzungsproduktes mit 2.4-*DNPH*, das praktisch vollständig dem entsprach, das unbehandeltes *OA* nach Reaktion mit 2.4-*DNPH* ergab. Vgl. hierzu Abb. 3, Kurven 1, 2 und 3.

### 3. Protein—Enzym-Transfer von *HPE*

Die Vorstellung eines reversiblen Gleichgewichtes zwischen Protein-SH, *HPE* und dem Protein—*HPE*-Addukt gab die Anregung, eine Mischung aus einem *HPE*-empfindlichen SH-Enzym und einem Protein—*HPE*-Addukt zu untersuchen.

Insbesondere sollte dabei die Frage geprüft werden, ob die unterschiedlichen Affinitäten der Protein-SH- und funktionellen Enzym-SH-Gruppen gegenüber *HPE* eine Aldehydübertragung vom Trägerprotein auf das Enzym ermöglichen. Kriterium für einen solchen Transfer wäre die im optischen Test nach *Warburg* zu messende Enzymaktivität.

Wir wählten zunächst als Trägerprotein das reduzierte  $\beta$ -Lactoglobulin, das (siehe exper. Teil) mit dem 10fachen *HPE*-Überschuß (bezogen auf SH) inkubiert und schließlich erschöpfend dialysiert worden war. Nach spektrometrischer Messung der Proteinkonzentration bei 36 000  $\gamma'$  und Zugaben entsprechender Volumina und Proteinkonzentrationen wurde mit *GAPDH* inkubiert. Hierbei wurde sowohl die Temperatur als auch die Dauer der Inkubation variiert. Für die jeweiligen

Kontrollen wurde das Enzym bei sonst gleichen Bedingungen mit destill. Wasser inkubiert. Zunächst wurde sichergestellt, daß reines, reduziertes  $\beta$ -Lactoglobulin im vorliegenden Konzentrationsbereich von  $2 \cdot 10^{-5}$  bis  $2 \cdot 10^{-3}$  Mol/l keine meßbare Enzymhemmung bewirkt.

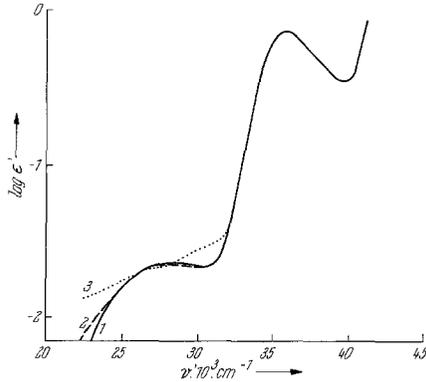


Abb. 3. Absorptionsspektren von Eialbumin. Kurve 1: Eialbumin mit *HPE*, sodann mit 2,4-*DNP*H behandelt. Kurve 2: Natives Eialbumin nach Behandlung mit 2,4-*DNP*H. Kurve 3: Natives Protein

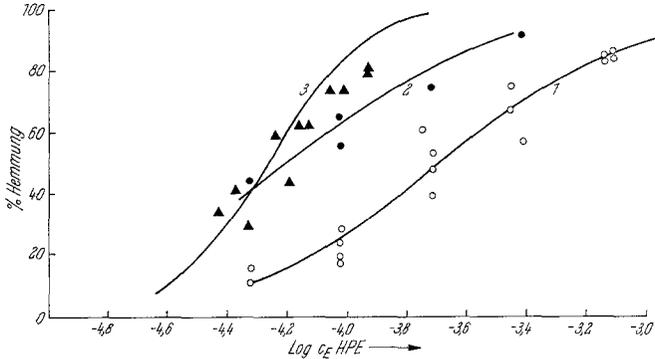


Abb. 4. Konzentrationsabhängige Inaktivierung der *GAPDH* durch *HPE* bzw. durch das reduzierte  $\beta$ -Lactoglobulin-*HPE*-Addukt und *RSA*-*HPE*-Addukt. Kurve 1: Inkubation: 7 Stdn.,  $0^{\circ}\text{C}$  ( $\beta$ -Lactoglobulin-*HPE*-Addukt). Kurve 2: Inkubation: 7 Stdn.,  $23^{\circ}\text{C}$  ( $\beta$ -Lactoglobulin-*HPE*-Addukt).  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$  Inkubation: 2 Stdn.,  $0^{\circ}\text{C}$  (*RSA*-*HPE*-Addukt). Kurve 3: Inkubation: 2 Stdn.,  $0^{\circ}\text{C}$  (*HPE*).  $c_E\text{HPE}$  = Molare Endkonzentration an *HPE* bzw. an Prot-S-*HPE*

Wie Abb. 4 zeigt, ist eine gesetzmäßig konzentrationsabhängige und außerdem mit zunehmender Dauer und Temperatur der Inkubation stark zunehmende Inaktivierung der *GAPDH* unzweifelhaft. Die Dosis-effektkurve für 30 Min. Inkubation bei  $23^{\circ}\text{C}$  fällt mit der für 7 Stunden

Inkubation bei 0° C praktisch zusammen. Abb. 5 zeigt die Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung für einige Konzentrationen. Zusatz von Cystein oder Thioglykolat in etwa 100fachem Überschuß, bezogen auf die Endkonzentration an gebundenem *HPE*, hebt die Hemmung glatt und vollständig wieder auf. Um sicherzustellen, daß die Lösung des eingesetzten Protein—*HPE*-Adduktes praktisch keine Anteile an überschüssigem freien *HPE* (aus der *HPE*-Vorinkubation) enthielt, wurde das Protein—*HPE*-Addukt auch durch eine Sephadex G 25-Säule isoliert.

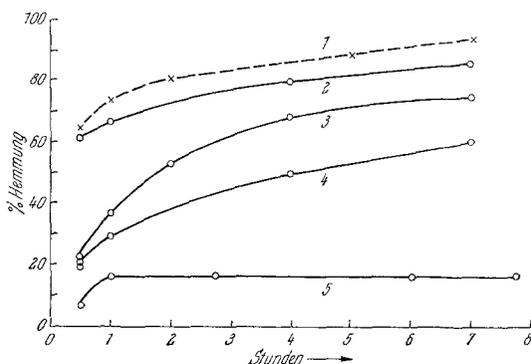


Abb. 5. Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung von *HPE*— $\beta$ -Lactoglobulin-Addukt gegenüber *GAPDH* bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen, inkubiert bei 0° und 23° C. Kurve 1:  $C_{EHPE} = 3.8 \cdot 10^{-4}$  bei 23° C. Kurve 2:  $C_{EHPE} = 7.1 \cdot 10^{-4}$ , Kurve 3:  $C_{EHPE} = 3.5 \cdot 10^{-4}$ , Kurve 4:  $C_{EHPE} = 1.8 \cdot 10^{-4}$ , Kurve 5:  $C_{EHPE} = 4.8 \cdot 10^{-5}$ , Kurven 2 bis 5 bei 0° C

Diese Operation ermöglicht eine Abtrennung von freiem, überschüssigem *HPE* so wirksam, daß eventuelle Restanteile nur mehr *HPE*-Konzentrationen im Bereich von  $c \leq 1 \cdot 10^{-5}$  Mol/l ergeben könnten, die eine Größenordnung unterhalb des hemmwirksamen Bereiches liegen würden. Derartige Präparate von *HPE*—Protein-Addukten enthalten somit nur mehr den freien Aldehyd, der dem Adduktgleichgewicht entstammt. Auch solche Präparationen waren gegenüber *GAPDH* analog hemmwirksam.

### Diskussion

An sechs Beispielen wird gezeigt, daß *HPE* mit Proteinen eine chemische Bindung eingehen kann, wobei das pro Mol Protein gebundene *HPE* durch Umsetzen des *HPE*-behandelten Proteins mit 2,4-DNPH als Hydrazone quantitativ bestimmt werden kann. Wird *HPE* an ein Protein gebunden, so tritt auch stets ein Verlust an Protein-SH-Gruppen ein, der mit *DTNB* gemessen wird. *HPE*-Bindungszahl

und jeweiliger Verlust an Protein-SH stimmen bei *ALD* und reduziertem *RSA*, reduziertem  $\beta$ -Lactoglobulin und Ovalbumin gut miteinander überein, während bei *GAPDH* und nativem *RSA* größere Abweichungen auftreten. Gleichwohl besteht zwischen beiden Größen ein eindeutiger linearer Zusammenhang, wie der Stichprobenkorrelationskoeffizient  $r$  aus den insgesamt 6 Wertepaaren von  $+0.9977$  anzeigt. Daraus wird geschlossen, daß *HPE* an die SH-Gruppen der Proteine gebunden wird.

Die Wellenzahl des Absorptionsmaximums des proteingebundenen 2.4-*DNP*-Hydrazons zeigt an, daß *HPE* mit Protein-SH-Gruppen wie mit niedermolekularen SH-Verbindungen gemäß einer *Michael*-Addition reagiert (vgl. Schema auf S. 1). Die *GAPDH* bindet 4.6 Mole *HPE* und verliert dabei 3.2 Mole SH/Mol; aus vorangegangenen Untersuchungen folgt, daß *GAPDH*, unter den gleichen Bedingungen mit *HPE* inkubiert, ihre Aktivität vollständig einbüßt<sup>1</sup>. Daraus ist zu schließen, daß *HPE* von den insgesamt 12 bis 16 Enzym-SH-Gruppen nur mit den 4 funktionellen reagiert hat.

Von den 28 bis 29 SH-Gruppen der *ALD* reagieren nach *Anderson* und *Perham*<sup>10</sup> nur 43% mit *DTNB*, nach unseren Messungen etwa 50%. Für die Enzymaktivität verantwortlich sind nach *Anderson*<sup>10</sup> 4 SH, die jedoch reaktionsträge sind. Nach *HPE*-Behandlung bindet die *ALD* rund 1 Mol *HPE* und verliert rund 1 SH-Gruppe/Mol. Diese dürfte zu den „schnellen“ SH-Gruppen des Moleküls gehören und nicht für die Aktivität verantwortlich sein. Dem entspricht der Befund, daß *ALD* bei *HPE*-Behandlung keinen meßbaren Aktivitätsverlust erfährt<sup>1</sup>.

Die bei nativem *RSA* nach Behandeln mit 2.4-*DNP*H beobachtete Hydrazonbildung liefert mit 0.6 Molen/Mol Protein einen auffallend hohen Wert, er dürfte jedoch mit dem in der Literatur wiederholt erwähnten Kohlehydratanteil des Serumalbumins, 0.36 bis 1.83 Molen/Mol Protein, seine Erklärung finden.

Die tatsächlich durch *HPE*-Bindung bewirkte Hydrazonbildung von 0.7 Molen/Mol Protein entspricht genau der in der Literatur<sup>11, 12</sup> angegebenen Anzahl von SH-Gruppen bei amperometrischer Bestimmung mit  $\text{AgNO}_3$  in Gegenwart von Laurylsulfat als Detergens.

Mit *DTNB* ohne Detergens sind die SH-Gruppen offenbar nicht quantitativ bestimmbar; daraus erklärt sich die Differenz zwischen SH-Abnahme und *HPE*-Bindung.

Die bei der Reduktion der S—S-Bindungen bei *RSA* und  $\beta$ -Lactoglobulin freigesetzten SH-Gruppen sind offenbar besonders reaktionsfähig und reagieren stets quantitativ mit *HPE*.

<sup>10</sup> P. J. Anderson und R. N. Perham, *Biochem. J.* **117**, 291 (1970).

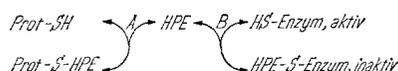
<sup>11</sup> L. O. Anderson, *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 115 (1966).

<sup>12</sup> Masaru Sogami, H. A. Petersen und J. F. Foster, *Biochem. J.* **8**, 49 (1969).

Bei *OA* hängt die quantitative Erfäßbarkeit sehr stark vom verwendeten SH-Reagens und von Denaturierungsmitteln ab: *p-CMB*<sup>6</sup> erfäßt ohne Denaturierungsmittel 3 bis 4, N-Äthylmaleinimid<sup>13</sup> nur 0.4 bis 0.6 SH-Gruppen. Die von uns ausgeführte Bestimmung mit *DTNB* ergab in Übereinstimmung mit Literaturangaben<sup>13</sup>, daß ohne Verwendung von Denaturierungsmitteln praktisch keine SH-Gruppen nachweisbar sind; es erscheint somit verständlich, daß auch *HPE* mit diesen SH-Gruppen nicht reagiert.

Zusammenfassend ergibt sich, daß sich *HPE* nur mit hochreaktiven Protein-SH-Gruppen umsetzt (z. B. den 4 funktionellen SH-Gruppen der *GAPDH*<sup>14</sup> oder den durch Reduktion mit Thioglykolat aus *Cys*-SS freigesetzten SH); „maskierte“ SH-Gruppen (z. B. 4 im Ovalbumin bzw. 12 in der *GAPDH*) werden jedoch nicht angegriffen.

Der Befund, daß ein Protein ( $\beta$ -Lactoglobulin, Serumalbumin), an dessen SH-Gruppen sich *HPE* addiert hat, ein *HPE*-empfindliches SH-Enzym (*GAPDH*) inaktiviert, läßt sich durch folgende Gleichgewichte erklären,



nachdem bereits in vorangegangenen Untersuchungen<sup>4</sup> festgestellt werden konnte, daß die Reaktion von *HPE* mit SH-Verbindungen stets reversibel verläuft. Die Einstellung des Gleichgewichtszustandes zwischen System **A** und **B** ist unter den gewählten Bedingungen mit reduziertem  $\beta$ -Lactoglobulin als Trägerprotein im Bereich zwischen 0° C und etwa 20° C nach etwa 7 Stdn. erreicht (Abb. 5), mit nativem Serumalbumin bereits nach etwa 2 Stdn. (vgl. Abb. 4, ▲▲).

Das Ausmaß der Enzymaktivierung hängt bei gegebenen Bedingungen (Konzentration, Temperatur) nur von den Gleichgewichtskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  ab. Da in den jeweiligen Endzuständen die Dosis-Effektkurven beider Träger-Proteine bereits im Bereich der Dosis-Effektkurve des freien *HPE* liegen (Abb. 4, Kurve 3), muß  $K_A \ll K_B$  sein.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, durchgeführt.

<sup>13</sup> N. J. Fernandez Diez, D. T. Osuga und R. E. Feeney, Arch. Biochem. Biophys. **107**, 448 (1964).

<sup>14</sup> L. Boross, E. Cseke und M. Vas, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **4**, 301 (1969).