

Halbseiten-Reaktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskel mit Strukturanalogen von NAD

Half-of-the-Sites Reactivity of Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase from Rabbit Muscle with Structural Analogs of NAD

Michael Ehrenfeld, Reinhard Jeck, Walter Klatte, Norbert Kühn und Christoph Woenckhaus

Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie, im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Theodor Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt am Main 70, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. 36 c, 545–551 (1981); received March 2/23, 1981

Alkylating NAD-Analogs, Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase, Half-of-the-Sites Reactivity

ω -(3-Bromoacetylpyridinio)alkyldiphosphoadenosines with alkyl chain lengths of 2–6 methylene groups inactivate glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. Half-of-the-Sites reactivity is observed in each case: The analogs are covalently bound to highly reactive cysteine residues in two of the four subunits. The remaining two subunits still bind NAD and the reactive SH-groups, although modified by SH-reagents of low molecular weight are not labeled by any of the brominated coenzyme models.

This behaviour may be explained by the assumption, that the modification of 2 subunits induces structural changes in the neighboured unoccupied subunits which prevent any attack on reactive cysteine residues caused by fixation and orientation of the bromoketo-coenzyme analog when bound to the active center.

Structural similarities of the covalently bound coenzyme analogs in the active center and the native ternary GAPDH-NAD-substrate complex suggest that half-of-the-sites reactivity is a natural characteristic of the enzymes catalytic mechanism.

Einleitung

Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus Kaninchenskelettmuskel zeigt gegenüber dem NAD-Analogen 3-(3-Bromacetylpyridinio)propyldiphosphoadenosin Halbseitenreaktivität; die Blockierung von 2 der 4 Untereinheiten unterdrückt die enzymatische Aktivität vollständig [1]. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der, die mit 3-ChloracetylpyridinAD am gleichen Enzym aus Störmuskel gemacht wurde [2]. Hier führt erst die Besetzung aller 4 Untereinheiten zum vollständigen Aktivitätsverlust. Die Ausgangsverbindung des von uns benutzten Inaktivators: 3-(3-Acetylpyridinio)propyldiphosphoadenosin ist kein Wasserstoffakzeptor im Test mit Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase. Der geringe Abstand zwischen dem Pyrophosphatrest des ADP-Teils und dem Acetylpyridinring erlaubt keine

exakte Einlagerung des funktionellen Teils in das aktive Zentrum. In diesem Zentrum befindet sich auch der Cysteinrest 149. Die Ketoalkylierung dieser Sulfhydrylgruppe durch komplexgebundenes 3-(3-Bromoacetylpyridinio)propyldiphosphoadenosin kann eine Verzerrung der Enzymstruktur hervorrufen; die dadurch bewirkte Halbseitenreaktion wäre somit ein Kunstprodukt dieses Inaktivators. Andererseits kann die Halbseitenreaktivität ein Charakteristikum des enzymatischen Mechanismus sein; denn sie wurde bei Inaktivierung mit verschiedenen Substratanalogen beobachtet [3–5].

Um diese Frage zu klären, haben wir eine Reihe homologer ω -(3-Bromacetylpyridinio)alkyldiphosphoadenosine dargestellt, in denen die Ausdehnung der Alkylreste zwischen 3,4 und 8,6 Å variiert, und berichten in dieser Arbeit über das Verhalten der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase gegenüber diesen Verbindungen.

Ergebnisse

Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus Kaninchenskelettmuskel wird von 3-Bromacetylpyri-

Abkürzungen: GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat: NAD-Oxidoreduktase (phosphorylierend) (EC 1.2.1.12); GAP, Glycerinaldehyd-3-phosphat; DTNB, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoësäure).

Reprint requests to Prof. Dr. Dr. C. Woenckhaus.

0341-0382/81/0700-0545 \$ 01.00/0



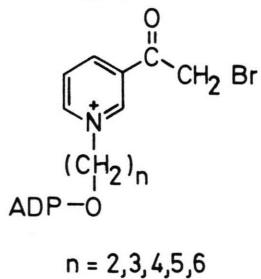
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

dinio-alkyl-Analogen des Coenzyms NAD inaktiviert. Die Länge der Kohlenwasserstoffbrücke, die in den Verbindungen von zwei bis sechs Methylengruppen variiert, ist für dieses Verhalten ohne Bedeutung, obwohl sie den Abstand zwischen dem ADP-Teil und dem Pyridiniumring in den Modellen um bis zu 5 Å ändert.



Die Ähnlichkeit der ω -(3-Bromacetylpyridinio)-alkyldiphosphoadenosine mit dem natürlichen Coenzym wird im enzymatischen Test nicht sichtbar, da die Fähigkeit der Verbindungen, als Komplexbildner oder als Wasserstoffakzeptor zu wirken, durch die gleichzeitig ablaufende irreversible Inaktivierungsreaktion überlagert wird.

Hinweise auf die verdeckte Coenzymfunktion der Inaktivatoren liefern die nicht bromierten Ausgangsverbindungen, die reversibel an das aktive Zentrum der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase gebunden werden.

Alle ω -(3-Acetylpyridinio)alkyldiphosphoadenosine bilden mit GAPDH binäre Komplexe aus,

deren Dissoziationskonstanten bei pH 9 zwischen 0,1 und 0,6 mM liegen. Die Komplexbildung verläuft in allen Fällen ohne Änderung der Absorption bei 360 nm.

Von den fünf Acetylpyridinderivaten sind im enzymatischen Test nur das Butyl- und das Pentylanaloge als Wasserstoffakzeptor aktiv. Die Michaelis-Konstanten und katalytischen Konstanten der beiden Verbindungen sind:

$$\begin{aligned} \text{Butyl: } K_M &= 0,13 \text{ mM, } k_k = 7 \mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \\ \text{Pentyl: } K_M &= 0,17 \text{ mM, } k_k = 4 \mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \end{aligned}$$

Die Inaktivierung der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase durch die Bromacetylpyridinverbindungen verläuft in rascher Reaktion. Da die Bromacetylgruppe der Verbindungen gleichzeitig hydrolysiert wird, ist die exakte Bestimmung der Inaktivierungskinetik erschwert. Die kinetischen Konstanten mußten durch Extrapolation aus der Anfangsgeschwindigkeit der Inaktivierungsreaktion bestimmt werden. Abb. 1 A und 1 B zeigen den zeitlichen Ablauf der Inaktivierungsreaktion nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin und die graphische Ermittlung von K_I und k_2 der Reaktion. Ähnliches Inaktivierungsverhalten beobachtet man bei Verwendung der anderen homologen Inaktivatoren, die Zahlenwerte für K_I bzw. k_2 liegen in der gleichen Größenordnung wie die Werte des Butyl-derivates.

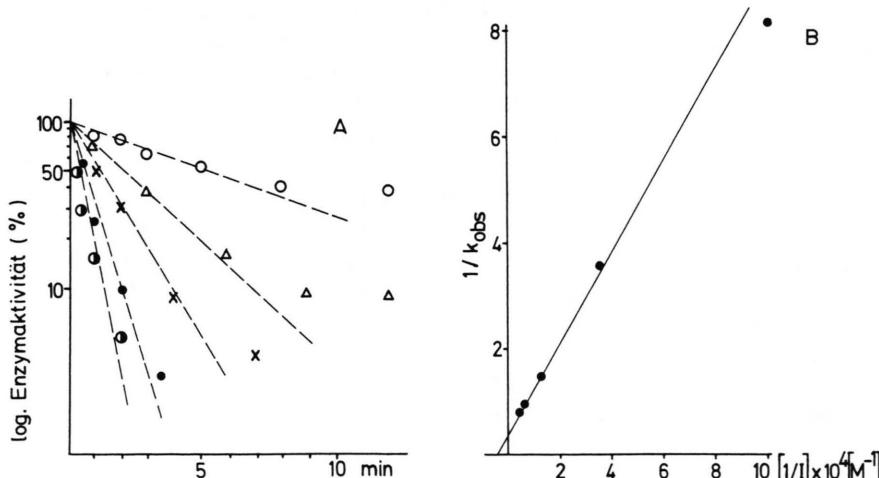


Abb. 1. Inaktivierung von GAPDH aus Kaninchenskelettmuskel (0,012 mM tetrameres Enzym) A: durch verschiedene Konzentrationen von 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin; $\circ = 0,01 \text{ mM}$, $\triangle = 0,028 \text{ mM}$, $\times = 0,08 \text{ mM}$, $\bullet = 0,14 \text{ mM}$, $\bullet = 0,202 \text{ mM}$ in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8; 25 °C; B: Diagram zur Bestimmung von K_I u. k_2 . K_{obs} -Werte wurden als $\ln 2/(t/2)$ ermittelt.

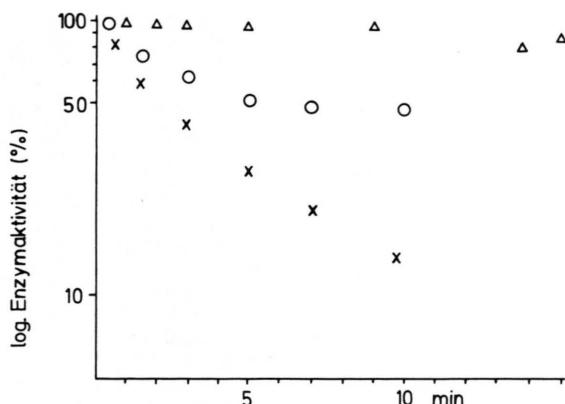


Abb. 2. Einfluß von Coenzym und Substrat auf die Inaktivierung von 0,012 mM GAPDH (tetrameres Enzym) durch 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin $c = 0,1$ mM; 25 °C. $\Delta = 1$ mM NAD in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0; $\circ = 5$ mM GAP in 0,1 M Triethanolamin-HCl-Puffer pH 7, 0,2 mM EDTA; $\times = 5$ mM GAP und 0,1 M Natriumphosphat Puffer pH 7, 0,1 mM EDTA.

Parallel zum Verlust der Dehydrogenaseaktivität nimmt bei allen Modellen auch die als Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat bestimmte Esteraseaktivität ab.

Die Inaktivierung wird durch die Gegenwart des natürlichen Coenzymes NAD sehr stark verlangsamt. In Gegenwart von 1 mM NAD⁺ oder 1 mM NADH wird bei einer Inaktivatorkonzentration von 0,1 mM kein Aktivitätsverlust innerhalb von 30 Minuten beobachtet.

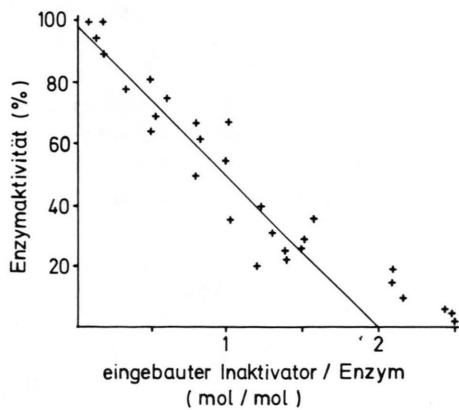


Abb. 3. Beziehung zwischen Einbau von Carbonyl-[¹⁴C] 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin und Abfall der Enzymaktivität.

Auch in Gegenwart des Substrats Glycerinaldehyd-3-phosphat verläuft die Inaktivierungsreaktion verlangsamt. Dieser Substratschutz wird jedoch durch die gleichzeitige Zugabe von Phosphat weitgehend aufgehoben (Abb. 2).

Die kovalente Bindung der verschiedenen homologen Inaktivatoren an GAPDH bewirkt keinen Extinktionsanstieg bei 360 nm. Verwendet man [¹⁴C]-Carbonyl markiertes 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin, so beobachtet man, daß ein Einbau von 2 mol Inaktivator in 1 mol tetrameres Enzym den vollständigen Verlust der Enzymaktivität bewirkt (Abb. 3). Einen gleichartigen Kurvenverlauf erhält man, wenn die Restaktivität verschieden stark inaktivierter Enzympräparate gegen die Anzahl hochaktiver Sulfhydrylgruppen pro Mol tetrameres Enzym aufgetragen wird: Von den 4 SH-Gruppen, die rasch mit DTNB reagieren, sind nach der Inaktivierung noch 2 erfaßbar. Die Änderung des Abstandes zwischen Pyrophosphat und reaktiver Bromacetylgruppe durch die Verwendung der verschiedenen Homologen ändert dieses Verhalten wenig (Abb. 4 A, B, C). Nur unter Verwendung extrem hoher Inaktivatorkonzentrationen, wie sie zur Erreichung geringer Restaktivitäten notwendig sind, nimmt die Zahl der SH-Gruppen stärker ab. Dieses Verhalten ist bei den Modellen mit besonders langer oder besonders kurzer Alkylkette stärker ausgeprägt als bei den Verbindungen, in denen die Länge der Kohlenwasserstoffkette mit der Ausdehnung eines Ribosesystems annähernd übereinstimmt. Vollständig inaktivierte Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase bindet noch 2 mol NAD⁺ pro mol tetrameres Enzym, ohne daß meßbare Dehydrogenase- oder Esteraseaktivität auftritt (Abb. 5). Ein Abweichen von der Linearität des Einbaus wird nur beobachtet, wenn zur Erreichung kleiner Restaktivitäten extrem hohe Inaktivatorkonzentrationen notwendig waren. Dies trifft besonders für das Ethyl- und Hexylanaloge zu (Abb. 5 A). Die Inaktivierung der GAPDH durch ω -(3-Bromacetylpyridinio)alkyl-diphosphoadenosin ist durch die Ketoalkylierung eines essentiellen Aminosäureseitenrestes bewirkt. Die kovalente Bindung der Inaktivatoren zu diesem Rest kann durch NaBH₄-Reduktion der Ketogruppe stabilisiert werden [6]. Aus GAPDH, die mit [¹⁴C]Carbonyl 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin inaktiviert wurde, wird nach Reduktion und Totalhydrolyse ein ¹⁴C-markiertes Produkt erhalten, das sich in allen Eigenschaften verhält

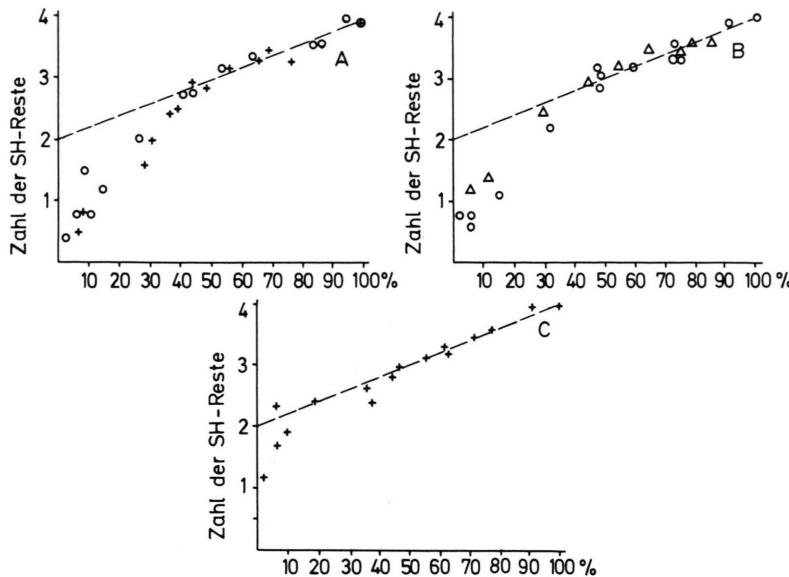


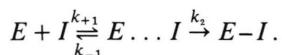
Abb. 4. Beziehung zwischen Enzymaktivität und Abnahme von schnell reagierenden SH-Gruppen in GAPDH aus Kaninchenskelettmuskel, gemessen mit 0,01 M DTNB in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,1; 25 °C; A: Inaktivierung mit (+): 6-(3-Bromacetylpyridinio)hexyldiphosphoadenosin, (○): 2-(3-Bromacetylpyridinio)ethyldiphosphoadenosin. B: Inaktivierung mit ○: 5-(3-Bromacetylpyridinio)pentylidiphosphoadenosin und △: 3-(3-Bromacetylpyridinio)propyldiphosphoadenosin; C: Inaktivierung mit +: 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin; Abzisse: % Restaktivität; Ordinate: Zahl der SH-Reste pro mol tetrameres Enzym. Einzelheiten siehe Text.

wie eine Verbindung, hergestellt aus N-Acetylzystein und 4-(3-Bromacetylpyridinio)butylphosphat nach gleicher Behandlung mit NaBH_4 und Säurehydrolyse. Beide Verbindungen zeigen in der Hochspannungselektrophorese gleiche Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit und zeigen positive Ninhydrin- und Schwefelreaktion.

Diskussion

Die Reaktivität der Bromacetyl-Coenzymanalogen bei vergleichsweise geringer Affinität der Verbindungen zum aktiven Zentrum der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase erschwert eine genaue

Messung der Inaktivierungskinetik. Die fast vollständige strukturelle Übereinstimmung der bromierten Verbindungen mit den nichtbromierten Ausgangsverbindungen, wie auch die Ähnlichkeit mit NAD, machen aber die Bildung eines reversiblen Inaktivator-Enzym-Komplexes als ersten Schritt der Reaktion sehr wahrscheinlich. Die eigentliche Inaktivierungsreaktion erfolgt dann unter Ketoalkylierung des Enzyms, so daß für die Inaktivierung ein Mechanismus analog dem von Michaelis und Menten angenommen werden kann.



Die Schutzwirkungen von NAD^+ und NADH unterstützen diese Theorie. Ein eindeutiger Beweis für eine Sättigungskinetik ist jedoch recht schwierig; denn wie Abb. 1 zeigt, verläuft die Inaktivierung sehr schnell. Messungen in Konzentrationsbereichen $1/5 K_I < I < 5 K_I$ sind nicht möglich. Bei sehr hohen Inaktivatorkonzentrationen $I \gg E$ sollte die Inaktivierung nach einer Pseudo-1.-Ordnungsreaktion verlaufen.

Die jeweils wenige Minuten nach Start der Inaktivierung sichtbar werdenden Abweichungen von dieser Kinetik werden durch gleichzeitige Hydrolyse des Bromacetylrestes bewirkt; denn die nichtreaktiven Hydrolyseprodukte weisen Coenzymstruktur auf und können reversibel an das aktive Zentrum des Enzyms angelagert werden. Sie verhindern, ähnlich wie zugesetztes NAD, den Angriff des Brom-

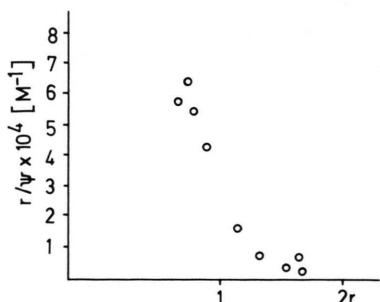


Abb. 5. Scatchard Diagramm der Bindung von $[^{14}\text{C}]$ -Carbonyl NAD^+ an GAPDH inaktiviert mit 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin auf 5% Restaktivität, 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 25 °C. ψ = freies NAD^+ [M]; r = mol NAD^+ gebunden an ein mol (tetrameres GAPDH).

acetyl-Inaktivators an der Sulfhydrylgruppe. Die Hydrolyse der Bromacetylgruppe wird durch die Gegenwart des Enzyms beschleunigt; 10 min nach Beginn der Inaktivierungsreaktion ist ein weiterer Verlust an Aktivität nicht mehr zu beobachten.

Diese Zeit ist kürzer als die Halbwertzeit der Inaktivatoren von 300 min bei pH 7 [6].

Die Schutzfunktion von NAD^+ und NADH , der Einfluß der Substrate GAP und anorganisches Phosphat auf die Inaktivierungsreaktion sowie die Identifizierung von Cystein als angegriffene Aminosäure sind Hinweise dafür, daß vermutlich Cystein 149 des Enzyms mit der Bromketogruppe unter Ausbildung eines Ketothioethers reagiert.

Unter Verwendung niedriger Inaktivatorkonzentrationen, Bedingungen, die einen unspezifischen bimolekularen Angriff benachteiligen, zeigt sich, daß der Inaktivierung in jedem Falle die Modifizierung von zwei der vier hochreaktiven Sulfhydrylreste zugrunde liegt. Dies wird in Abb. 5 A–C durch die ausgezogenen Linien verdeutlicht. Obwohl der Abstand zwischen dem Pyrophosphatteil und dem Bromacetylrest innerhalb der homologen Reihe um 5 Å variiert, läßt sich kein wesentlicher Unterschied im Inaktivierungsverhalten erkennen. Die Abweichungen von der Linearität im Bereich niedriger Restaktivitäten werden auf unspezifischen Einbau – bedingt durch hohe Inaktivatorkonzentrationen – zurückgeführt. Sie sind besonders ausgeprägt bei den coenzymatisch unwirksamen Analogen (Abb. 5 A u. B). Die unterschiedlichen Längen und die Flexibilität der Alkylketten schließen sterische Verspannungen zwischen Coenzym- und Substratbindungsstellen als Ursache der Halbseitenreakтивität aus. Allgemeine Ursache der Halbseitenreakтивität von Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase gegenüber den reaktiven Coenzymanalogen kann eine Umlagerung im Enzym sein, ausgelöst durch die Besetzung der Coenzymbindungsstelle und die kovalente Bindung an die Substratbindungsstelle. Damit übereinstimmend findet Rossmann [7], daß mit 1-Tri fluor-3-bromacetone modifizierte GAPDH aus Hühnermuskel mit NAD^+ Kristalle bildet, deren Struktur sich von der des Apoenzyms, wie auch von der des binären NAD-Enzym-Komplexes, unterscheidet. Die Röntgenstrukturanalyse zeigt eine asymmetrische Struktur von zwei Dimeren im tetrameren Enzym. Eine solche Asymmetrie zweier Dimerer wird auch von anderen Arbeitsgruppen postuliert [3, 4, 8–11].

Durch die Verwendung der homologen Coenzymverbindungen gelang es uns nicht, das Ausmaß der Konformationsänderung zu ermitteln. Eine ausgeprägte Proteinumfaltung steht im Widerspruch zur geringen Änderung in der Röntgenstrukturanalyse [5, 7] und ist zur Erklärung nicht notwendig; denn ein einfaches Verdrehen der Peptidkette vermag die Orientierungsrichtung der beiden reaktiven Cystein-sulfhydrylreste in den nicht modifizierten Untereinheiten so zu ändern, daß sie von der NAD-Bindungsseite her unzugänglich werden.

Experimenteller Teil

Coenzyme und Enzyme

GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) aus Kaninchenskelettmuskel (180 U/mg), wurde nach einer Methode von Ferdinand isoliert [12]. ω -(3-Acetylpyridinio)alkyldiphosphoadenosin mit Ethyl bis Hexylketten und die entsprechenden Bromacetylverbindungen wurden wie vorher beschrieben hergestellt [6]. $[^{14}\text{C}]$ Carbonyl markiertes 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin wies eine spezifische Radioaktivität von 43,7 GBq/mol auf. NAD^+ , NADH und Glycerinaldehyd-3-phosphat erhielten wir von der Firma Boehringer, Mannheim, und Norit A sowie 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoësäure) (DTNB) von der Firma Serva, Heidelberg.

Die Enzymaktivität wurde durch die Bildung von NADH bei 366 nm und 25 °C in einem Photometer Eppendorf gemessen [13]. Die Proteinkonzentration konnte spektrophotometrisch mit einem Absorptionskoeffizienten $A_{276\text{ nm}}^{0,1\%} = 0,92$ oder durch die Biuretreaktion mit einem Faktor von 16,5 [14] bestimmt werden. Das nucleotidfreie Apoenzym mit einem Absorptionsverhältnis $A_{280}/A_{260} = 1,8$ erhielten wir durch Behandeln des Enzyms mit Kohle [15]. Zur Bestimmung der Coenzymfunktion von ω -(3-Acetylpyridinio)alkyldiphosphoadenosin-Verbindungen wurde das natürliche Coenzym im Enzymtestansatz durch die Analogen ersetzt. Die Konzentrationen variierten zwischen 1/5 bis 5 K_M bzw. K_D -Werten. K_M und K_D wurden wie vorher beschrieben bestimmt [16].

Enzymmodifizierung

Die Inaktivierung der GAPDH führten wir bei 25 °C in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7 durch. Die Enzymkonzentration betrug ca. 4 mg/ml. Die

Inaktivatorkonzentration variierte zwischen 0,01 bis 0,2 mM. Die Enzymaktivität wurde in kurzen Zeitabständen bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von Mercaptoethanol bis zu einer Konzentration von 1 mM gestoppt.

Zur Bestimmung der modifizierten Aminosäure wurden 3 ml der Enzymlösung (14,4 mg/ml) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 mit 0,5 ml 0,01 M [¹⁴C]Carbonyl 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin (43,7 GBq/mol) in wäßriger Lösung versetzt. Den Abfall der enzymatischen Aktivität bestimmten wir in kurzen Zeitabständen. Beim Erreichen der gewünschten Restaktivität unterbrach man durch Zugabe von 0,1 ml 0,1 M Mercaptoethanol-Lösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 die Inaktivierungsreaktion. Zur Proteinlösung wurden 2 mg Natriumborhydrid gegeben und die Mischung 12 h bei 0 °C belassen. Der Überschuß an Nucleotiden, Mercaptoethanol und Borat wurde durch 24-stündige Dialyse gegen 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 entfernt, der Puffer anschließend durch 8 M Harnstofflösung, die 2 g Iodacetat pro l enthielt, ausgetauscht. Der Harnstoff wurde dann durch Dialyse gegen Wasser entfernt. Die Proteinlösung wurde gefriergetrocknet und in 5 ml 6 N HCl gelöst. Die Hydrolyse erfolgte im geschlossenen Rohr durch 24 Stunden Erwärmen auf 110 °C, die Salzsäure entfernte man anschließend bei 22 °C im Vakuum und trocknete den Rückstand über Kaliumhydroxid. Das Aminosäuregemisch wurde in 1 ml Wasser gelöst. 0,05 ml wurden durch Hochspannungselektrophorese, Schleicher & Schüll-Papier mgl 2043 b, bei 30 V/cm aufgetrennt. Als Puffer diente ein Gemisch pH 1,9 aus 100 ml Ameisensäure, 300 ml Essigsäure und 1,6 l Wasser. Die Radioaktivität wurde durch Autoradiographie bestimmt und die Aminosäure durch Ninhydrin und die Iod-Azid-Methode nachgewiesen.

Eine Modellverbindung konnte durch Umsatz von 500 mg N-Acetylcystein und 300 mg 4-(3-Bromacetylpyridinio)butylphosphat in 0,5 ml Wasser bei 22 °C hergestellt werden. Nach 2,5 Stunden wurde die Mischung auf eine Dowex 50 WX 8 Säule (H⁺-Form, 200–400 mesh, 1 × 15 cm) gegeben und nach Waschen mit 400 ml Wasser die Verbindung in

340 ml eluiert. Die Lösung wurde bei 30 °C i. Vak. zur Trockene eingeengt. Die Ausbeute betrug 220 mg (27% d. Th.) eines gelben amorphen Produkts.



Ber. C 42,48 H 5,33 N 6,19 O 31,86 P 6,86 S 7,08
Gef. C 42,19 H 5,35 N 5,97 O 32,51 P 7,00 S 7,16.

45 mg dieser Verbindung löste man in 5 ml Wasser und versetzte mit 10 mg Natriumborhydrid. Die Lösung wurde anschließend im Vakuum bei 30 °C getrocknet und der Rückstand mit 5 ml 6 N Salzsäure 24 h auf 110 °C im geschlossenen Rohr erhitzt. Die dephosphorylierte Verbindung diente als Vergleichssubstanz für die markierte Aminosäure.

Die Sulfhydrylgruppen im aufgefaltenen inaktivierten oder nativen Protein wurden mit DTNB in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,1 bestimmt [1, 17]. Der Gesamtgehalt an Sulfhydrylgruppen konnte nach dem Auffalten des Proteins in 8 M Harnstoff gemessen werden [1, 17]. Die Dissoziationskonstanten wurden mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse nach Scatchard [18] ermittelt. Die Stoichiometrie des Einbaus bei 25 °C wurde durch Inaktivieren mit [¹⁴C]-Carbonyl-markiertem 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosin (3,15 GBq/mol) in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7 bestimmt. Die Lösung enthielt 2,15 mg Enzym/ml, die Inaktivatorkonzentration betrug 0,14 mM. Durch Zugabe von Mercaptoethanol bis zu 5 mM wurde die Reaktion unterbrochen, Protein durch Zugabe von Trichloressigsäure 3 M gefällt und die Lösung durch Whatman Glasfilter GFC filtriert. Die Filter wurden in ein Szintillatorglas gegeben und mit 10 ml Szintillatorlösung [19] versetzt. Die Radioaktivität bestimmten wir in einem Packard Tricarb- β -Liquid-Scintillation-Spectrophotometer.

Zur Bestimmung des Einflusses von NAD wurde die Inaktivierungsmischung mit dem natürlichen Coenzym bis zu 1 mM versetzt.

Substratschutz führten wir in Triethanolamin/HCl-bzw. Phosphatpuffer pH 7,0 durch, welcher 5 mM an Glycerinaldehyd-3-phosphat war. Die Esteraseaktivität bestimmte man mit *p*-Nitrophenylacetat [20].

- [1] G. Dietz, C. Woenckhaus, R. Jaenicke u. I. Schuster, *Z. Naturforsch.* **32 c**, 85–92 (1977).
- [2] J. F. Biellmann, G. Branlant, B. Y. Foucaud, L. Wallén, C. Woenckhaus u. R. Jeck, In: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 249–262, Walter de Gruyter, Berlin New York 1977.
- [3] O. P. Malhotra u. S. A. Bernhard, *J. Biol. Chem.* **243**, 1243–1252 (1968).
- [4] S. A. Bernhard, O. Pfenninger, O. P. Malhotra u. B. Schwendimann, In: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 118–132, Walter de Gruyter, Berlin New York 1977.
- [5] M. G. Rossmann, R. M. Garavito u. W. Eventoff, In: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 3–28, Walter de Gruyter, Berlin New York 1977.
- [6] C. Woenckhaus u. R. Jeck, In: *Methods Enzymol.* **46**, 249–258 (1977).
- [7] R. M. Garavito, D. Berger u. M. G. Rossmann, *Biochemistry* **16**, 4393–4398 (1977).
- [8] F. Seydoux, O. P. Malhotra u. S. A. Bernhard, C. R. C. Critic. Rev. Biochem. **1974**, 227–257.
- [9] J. Bode, M. Blumenstein u. M. A. Raftery, *Biochemistry* **14**, 1153–1160 (1975).
- [10] M. R. Hollaway, H. H. Osborne u. G. M. L. Spotorno In: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 101–117, Walter de Gruyter, Berlin New York 1977.
- [11] N. Kellershohn u. F. J. Seydoux, In: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (H. Sund, ed.), pp. 133–139, Walter de Gruyter, Berlin New York 1977.
- [12] W. Ferdinand, *Biochem. J.* **92**, 578–585 (1964).
- [13] W. A. Bloch, R. A. McQuarrie u. S. A. Bernhard, *J. Biol. Chem.* **246**, 780–790 (1971).
- [14] G. Beisenherz, H. J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer, *Z. Naturforsch.* **8 b**, 555–577 (1953).
- [15] S. F. Velick, J. E. Hayes u. J. Harting, *J. Biol. Chem.* **203**, 527–544 (1953).
- [16] C. Woenckhaus u. H. Duchmann, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 562–564 (1975).
- [17] P. M. Wasserman u. J. P. Major, *Biochemistry* **8**, 1076–1082 (1969).
- [18] G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
- [19] J. Berghäuser, *Biochem. Biophys. Acta* **397**, 370–376 (1975).
- [20] J. H. Park, B. P. Meriwether, P. Clodfelter u. L. W. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **236**, 136–141 (1961).