

# Über die pH-induzierte Inaktivierung der Glycerindehydrogenase aus *Bacillus megaterium*

pH-Induced Inactivation of Glycerol Dehydrogenase from *Bacillus megaterium*

Axel Ganzhorn\*, Margrit Scharschmidt und Gerhard Pfleiderer

Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart,  
Pfaffenwaldring 55, D-7000 Stuttgart 80

Z. Naturforsch. 39c, 575–583 (1984); received January 31, 1984

Dissociation, Reassociation, Glycerol Dehydrogenase, Crosslinking, Denaturation

The kinetic of the reversible dissociation of glycerol dehydrogenase from *Bacillus megaterium* in slightly alkaline medium was measured by biochemical, chemical and physical methods. The dissociation is followed by changes in the secondary structure and can be prevented by addition of NAD or increased potassium chloride concentration. Crosslinking by suberimidate, but not by monofunctional imido esters, shows a high stabilization against alkali, urea or heat inactivation caused by hindrance of dissociation.

## Einleitung

Wie wir kürzlich berichtet haben, zeigen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften der Glycerindehydrogenase aus *B. megaterium* hohe Verwandtschaft zur Hefe-Alkoholdehydrogenase [1]. Auch hier handelt es sich um ein oligomeres Enzym, bestehend aus identischen Untereinheiten, das zahlreiche, äußerst oxidationsempfindliche SH-Gruppen und für die enzymatische Aktivität ein Zink-Ion pro Untereinheit enthält. Völlig andersartig ist die Eigenschaft, über die hier berichtet werden soll: Glycerindehydrogenase – ähnlich wie die von uns früher beschriebene Glucosedehydrogenase [2] aus demselben Mikroorganismus – wird schon im leicht alkalischen Bereich rasch inaktiviert. Im Falle der Glucosedehydrogenase handelte es sich um eine unter geeigneten Bedingungen voll reversible Dissociation in inaktive Monomere, wobei nach unseren neuesten Erkenntnissen [3] Sekundär- und Tertiärstruktur weitgehend unverändert bleiben. Die Frage nach dem Mechanismus der pH-induzierten Inaktivierung der Glycerindehydrogenase soll hier untersucht werden.

\* Dissertation Stuttgart 1983.

Abkürzungen: NAD, Nicotinamidadenindinucleotid; EDTA, Ethylenedinitrilotetraessigsäure; DTE, Dithioerythrit; SDS, Natriumdodecylsulfat; ME, Mercaptoethanol; TNBS, Trinitrobenzolsulfonsäure; LDH, Lactatdehydrogenase.

Sonderdruckanforderungen an Professor Dr. G. Pfleiderer.  
0341-0382/84/0600-0575 \$ 01.30/0

## Material und Methoden

Glycerindehydrogenase aus *B. megaterium* wurde, wie bei [1] beschrieben, isoliert und uns freundlicherweise von der Biochemischen Forschung der Fa. Merck, Darmstadt, zur Verfügung gestellt. Die spezifischen Aktivitäten lagen in der Regel zwischen 60 und 90 U/mg. NAD wurde von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. Glycerin 87-prozentig, Saccharose, EDTA, Triethanolamin, Phosphat und Natriumcarbonat waren käufliche Präparate der Firma E. Merck, Darmstadt. Mercaptoethanol wurde von der Firma Ega-Chemie, Steinheim, bezogen; Dithioerythrit von der Firma Serva, Heidelberg; Zink-p.A. von der Firma Riedel-de-Haen, Seelze und Dimethylsuberimidathydrochlorid war ein käufliches Präparat der Firma Pierce (USA). Methylacetimidat wurde nach der Methode von Pinner hergestellt [4].

Der enzymatische Aktivitätstest erfolgte wie früher beschrieben [1]. Für die Messungen bei pH 9 in Gegenwart von Dithioerythrit wurde der Testlösung 0,1 μM Zinksulfat zugesetzt. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C. Als Enzymeinheit wurde – wie üblich – die Menge an Enzym bezeichnet, die 1 μmol Substrat pro Minute umsetzt.

## Inaktivierung/Reaktivierung

Vor den Versuchen zur Inaktivierung wurde das Enzym gegen 0,2 M KCl/0,1 M Phosphatpuffer vom pH 7, der 5-prozentig an Glycerin war und 10 μM an Zinkionen sowie 10 mM an Dithioerythrit oder



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 digitalized 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.

Mercaptoethanol enthielt, dialysiert. Die pH-Umstellung von 7 auf 9 erfolgte durch Mischen (1+1) mit 0,5 M Triethanolamin pH 9,2.

Für die vergleichenden kinetischen Untersuchungen (Aktivität/CD/Fluoreszenz) wurde stattdessen Carbonatpuffer verwendet, da Triethanolamin bei 220 nm Eigenabsorption zeigt und somit für die CD-Messungen ungeeignet war. Zur Reaktivierung wurde mit einer Lösung von 0,5 M Kaliumchlorid, 0,5 M Phosphat, 5% Glycerin, 10  $\mu$ M Zinkionen, 10  $\mu$ M DTE pH 6,5 1:1 verdünnt.

#### Dichtegradientenzentrifugation

Die Einzelheiten der Durchführung wurden früher beschrieben [1]. Als Gradientenpuffer dienten 0,1 M Kaliumphosphat mit 0,5 M Kaliumchlorid, 5% Glycerin, 10  $\mu$ M Zinkionen, 10 mM Dithioerythrit bei pH 7 bzw. 0,25 M Triethanolamin mit 0,1 M Kaliumchlorid, 0,05 M Phosphat, 2,5% Glycerin, 10 mM DTE bei pH 9. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Gradient über eine Feinpipette abgepumpt und in 25 Fraktionen zu je 3 Tropfen (150–160  $\mu$ l pro Fraktion) aufgefangen. Die Nummerierung der Fraktionen erfolgte in Richtung zunehmender Zuckerkonzentration entsprechend zunehmendem Molekulargewicht, d.h. in Sedimentationsrichtung. Die Sedimentationsbanden wurden enzymatisch oder mittels Proteinbestimmung nach Bradford [5] lokalisiert. Molekulargewichte wurden nach der Methode von Martin und Ames [6] bestimmt. Als Referenzproteine dienten Myoglobin, Ovalbumin, Rinderserum-Albumin, Lactatdehydrogenase aus Schweineherz, Aldolase und Katalase.

#### Modifizierung des nativen Enzyms

Acetamidinierung: 1 ml Enzymlösung (1 mg/ml in 0,5 M KCl/0,1 M Phosphat/5% Glycerin/10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>/10 mM DTE pH 7) wurde zur pH-Umstellung mit 1 ml 3 M KCl/0,5 M Triethanolamin/0,1 M Phosphat/40 mM NAD<sup>+</sup> pH 9,2 versetzt. Acetimidathydrochlorid wurde in 5 gleich großen Portionen (je 5,5 mg pro ml Ansatz in zehnminütige Abständen) zugegeben. Die Endkonzentration betrug demnach 250 mM Reagenz im Ansatz. Der pH-Wert wurde nach jeder Zugabe kontrolliert und mit festem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bei pH 9 gehalten. Anschließend wurde über eine Sephadex-G 25-Säule entsalzt (Elutionspuffer: 0,2 M KCl/0,1 M Phosphat/5% Glycerin/10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>/10 mM SH-Reagenz pH 7).

Suberamidinierung: Die Modifizierungsbedingungen entsprechen denen der Acetamidinierung. Suberimidathydrochlorid wurde in einer Konzentration von 10 mM (2,53 mg pro ml Reaktionsansatz) in einer Portion zugegeben. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Gelfiltration (s.o.) beendet.

#### Modifizierung mit Suberimidat unter Inaktivierungsbedingungen

Das Enzym (ca. 0,5 mg/ml im Inaktivierungsansatz) wurde wie beschrieben (vgl. Inaktivierung/Reaktivierung) bei pH 9 inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben von 0,5 ml entnommen und mit jeweils 2,53 mg Suberimidathydrochlorid versetzt (20 mM Reagenz im Ansatz). Die Reaktion wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von überschüssigem Ammoniumsulfat (100 mM im Ansatz) gestoppt und die Restaktivität gemessen. Anschließend wurden die so erhaltenen Ansätze mittels SDS-Disk-Elektrophorese in 7,5-prozentigem Polyacrylamidgel untersucht. Die quantitative Auswertung der Proteinbanden erfolgte in einem Gelscanner nach Anfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue R 250 (Serva, Heidelberg).

#### Bestimmung freier Lysin-Aminogruppen mittels TNBS-Test [12]

0,5 ml Enzymlösung (0,01–0,1 mg Protein, die Probe muß kaliumchloridfrei sein) wurden mit 0,5 ml 0,5 M Boratpuffer pH 9,5 und 0,5 ml 0,1-prozentiger TNBS-Lösung (Trinitrobenzolsulfonsäure) versetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml 10% SDS-Lösung und 0,25 ml 1 N HCl zugegeben und die Extinktion bei 342 nm gegenüber einem Blindwert gemessen ( $\epsilon_{342} = 14400 \text{ cm}^2/\text{mmol}$ ; Extinktionskoeffizient freier Aminogruppen nach Reaktion mit TNBS).

#### Denaturierung in Harnstoff

Die Enzymlösung (0,4 mg/ml in 0,1 M Phosphatpuffer/0,2 M KCl/5% Glycerin/10  $\mu$ M Zinkionen/10 mM ME pH 7) wurde mit demselben Volumen einer Lösung von 8 M Harnstoff im gleichen Puffer versetzt.

#### Messung der Thermostabilität

Die Messung erfolgten in 0,2 M KCl/0,1 M Phosphat/5% Glycerin/10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>/10 mM ME pH 7

(Enzymkonzentration: 0,2 mg/ml), wobei jeweils kleine Probemengen (0,1 ml) erhitzt wurden, um einen möglichst schnellen Temperaturausgleich mit dem umgebenden Wasserbad zu erreichen. Aliquote Proben wurden aus dem Ansatz entnommen und sofort in die vorbereitete Testküvette pipettiert.

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoreszenz-Spektralphotometer MPF 44 der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Anregungswellenlänge 278 nm; Emissionswellenlänge 305 nm.

Messungen des Circular-Dichroismus erfolgten an einem Gerät der Firma Jasco (Spectro-Polarimeter J/500 A).

## Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die Kinetik der Inaktivierung von Glyceridehydrogenase in einer Konzentration von 0,5 mg/ml nach Umstellung des pH's von 7 nach 9 sowie deren Umkehrung nach pH-Rückstellung auf 7. Die nahezu vollständige Reaktivierung wird allerdings nur in Gegenwart von Dithioerythrit erreicht; sonst wird sie durch die leichte Oxidierbarkeit der freien SH-Gruppen im Alkalischen beeinträchtigt. Da Dithioerythrit im ionisierten Zustand Übergangsmetall-Ionen zu binden vermag [7], führt das Reagenz bei pH 9 zu einer beschleunigten Inaktivierung des Enzyms durch Komplexierung der für die Aktivität notwendigen Zinkionen. Dieser Effekt kann dadurch kompensiert werden, daß die

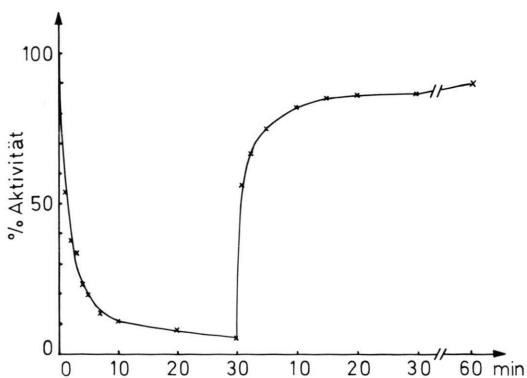


Abb. 1. pH-abhängige Inaktivierung und Reaktivierung der Glyceridehydrogenase. Inaktivierung: Enzym (ca. 1 mg/ml) in 0,2 M KCl/0,1 M PP/5% Glycerin/10 mM DTE/10  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  pH 7 + 0,5 M Triethanolamin pH 9,2 (1+1). Reaktivierung: Inaktivierungsansatz + 0,5 M PP/0,5 M KCl/5% Glycerin/10  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ /10 mM DTE pH 6,5 (1+1).

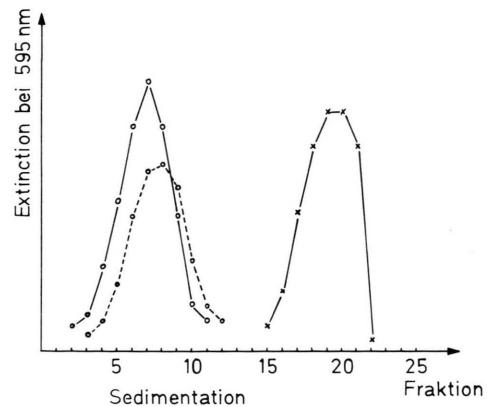


Abb. 2. Dichtegradientenzentrifugation der Glyceridehydrogenase in 4–18% Saccharose.  $\times$ — $\times$  pH 7;  $\circ$ — $\circ$  pH 9 mit Dithioerythrit;  $\circ$ — $\circ$  pH 9 ohne Dithioerythrit.

Aktivitätsmessungen in einer zinkhaltigen Testlösung ausgeführt werden.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung mittels Zonenzentrifugation im Dichtegradienten. Bei pH 7 ergibt sich eine relative Molmasse von 240000. Legt man den durch SDS-Diskelektrophorese bestimmten Wert für eine Untereinheit von 40000 zugrunde, so entspricht dies einem oligomeren Enzym bestehend aus 6 Untereinheiten. Die Diskrepanz zu früheren Messungen [1], bei denen stets eine Molmasse von 160000 gefunden wurde, ist wohl auf die Verwendung unterschiedlicher Enzymchargen zurückzuführen. Die biochemischen Eigenschaften waren in beiden Präparationen gleichartig.

Bei pH 9 erkennt man ein deutlich verschiedenes Sedimentationsverhalten entsprechend einem Molekulargewicht von 40000 Dalton. Dieser Wert befindet sich in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der SDS-Diskelektrophorese und zeigt somit den vollständigen Zerfall des Enzyms in seine Untereinheiten unter den Bedingungen der pH-induzierten Inaktivierung. Wie aus Abb. 2 weiter hervorgeht, hat die Anwesenheit von Dithioerythrit im Gradientenpuffer keinen Einfluß auf die Dissoziation. Der beobachtete Effekt ist demnach nicht auf die Komplexierung von  $Zn^{2+}$ -Ionen zurückzuführen. Unklar blieb, ob zwischen pH-induzierter Inaktivierung und der Dissoziation der Glyceridehydrogenase ein zeitlicher Zusammenhang besteht, da

hierüber die Dichtegradientenzentrifugation aufgrund ihrer langen Laufzeit keine Auskunft geben konnte.

Eine Methode zur Untersuchung der Dissoziation/Reassoziation bietet die Quervernetzung mit bifunktionellen Reagenzien [8, 9]. Hierbei wird die zu einem gegebenen Zeitpunkt vorliegende Quartärstruktur sozusagen eingefroren und das Ergebnis mittels SDS-Diskelektrophorese untersucht. Übertragen auf die Inaktivierung der Glycerindehydrogenase wurde versucht, deren Dissoziationszustand nach unterschiedlich langer Inkubation bei pH 9 durch chemische Modifizierung mit Dimethylsuberimidat zu fixieren.

Abbildung 3 zeigt die quantitative Auswertung der entsprechenden SDS-Pherogramme. Deutlich ist zu erkennen, daß die Abnahme hochmolekularer Proteinformen mit der prozentualen Zunahme der Monomer-Anteile korrespondiert.

Zum Zeitpunkt 0 sollten im Prinzip nur hochmolekulare Anteile vorliegen. Daß trotzdem in erheblichem Maße schon zu Anfang der Inaktivierung Monomere und Trimere auftreten, liegt an der zu geringen Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-Aminogruppen mit den angewandten Imidoestern. Man kann insofern diese Störung dadurch korrigieren, daß man nur die Abnahme der hochmolekularen Formen berücksichtigt. Setzt man deren anfänglichen Anteil in Höhe von 37% gleich 100 und rechnet den weiteren Verlauf entsprechend um, so zeigt die nun erhaltene Kurve eine gute Übereinstimmung mit den parallel dazu gemessenen Werten der enzymatischen Aktivität (Abb. 4). Berücksich-

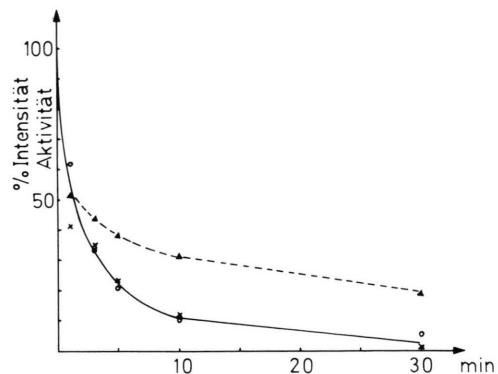


Abb. 4. Korrelation zwischen Aktivität und Quartärstruktur bei pH 9.  $\times$  Abnahme hochmolekularer Formen ( $>$  Trimer);  $\blacktriangle$  Abnahme hochmolekularer Formen ( $\cong$  Trimer);  $\circ$  Aktivitätsverlauf.

tigt man in dieser Auftragung zusätzlich die Trimeranteile, angenommen als aktive Oligomere, so gibt es keine vernünftige Korrelation mehr. Demnach treten Trimere während der Dissoziation als inaktive Zwischenstufe auf.

Die pH-induzierte Inaktivierung der Glycerindehydrogenase wurde weiterhin mit spektroskopischen Methoden auf mögliche strukturelle Änderungen untersucht. Bei diesen Messungen wurde Mercaptoethanol anstelle von Dithioerythrit als SH-Reagenz verwandt, da sich Letzteres störend auf die spektroskopischen Untersuchungen auswirkt. Darüber hinaus erwiesen sich die Komplexbildungseigenschaften von Mercaptoethanol als wesentlich geringer ausgeprägt. Allerdings waren die in Gegenwart von Mercaptoethanol durchgeführten Inaktivierungsansätze nur noch zum Teil reversibel. Dies wurde jedoch in Kauf genommen, da Oxidationsprozesse auf den Verlauf der Inaktivierung und Dissoziation offenbar keinen Einfluß ausüben (Abb. 2).

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität (Tyrosin-Fluoreszenz bei 305 nm) deutet auf einen Zerfall der Quartärstruktur bzw. eine Lockerung der Tertiärstruktur hin. Hierbei werden wahrscheinlich Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Tyrosin-OH-Gruppen und Carboxylseitenketten gelöst, was zu einer erhöhten Fluoreszenzquantenausbeute führt [10].

Außerdem wurde eine Abnahme des CD-Signals bei 220 nm auf ca. 50% des Ausgangswertes beob-

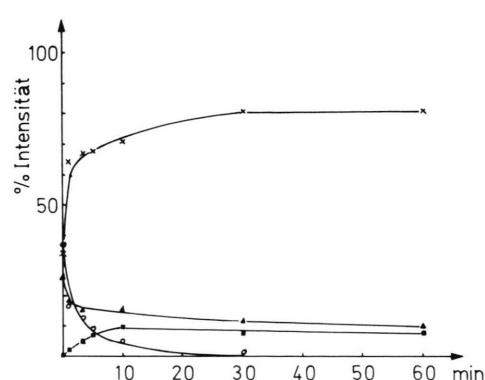


Abb. 3. SDS-Disk-Elektrophorese nach Quervernetzung unter Dissoziationsbedingungen.  $\times$  Monomer;  $\blacksquare$  Dimer;  $\blacktriangle$  Trimer;  $\circ$   $>$  Trimer.

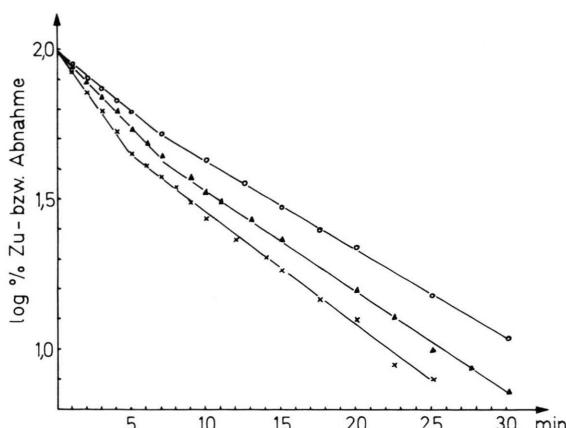


Abb. 5. Verlauf von Aktivität, Fluoreszenzintensität und CD-Signal bei pH 9 nach 1+1-Verdünnung der Enzymlösung (in 0,2 M KCl/0,1 M PP/5% Glycerin/10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>/10 mM ME pH 7) mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,5. × Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 305 nm; ▲ Abnahme des CD Signals bei 220 nm; ○ Abnahme der Enzymaktivität.

achtet. Dies lässt auf einen Übergang von  $\alpha$ -Helix-Anteilen in eine ungeordnete Struktur schließen [11], entsprechend einer teilweisen Denaturierung des Enzyms.

Abbildung 5 zeigt den Verlauf von Aktivitäten, Fluoreszenzintensität und negativem CD-Effekt in halb logarithmischer Auftragung. In allen drei Fällen ergibt sich ein biphasischer Verlauf, der jeweils in beiden Phasen einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung gehorcht. Die ermittelten Halbwertszeiten stimmen weitgehend überein (Tab. I). Bei der Berechnung der Halbwertszeiten wurde die Überlagerung der beiden Prozesse im Anfangsbereich der Kurve mit berücksichtigt.

Offensichtlich werden die verschiedenen Meßgrößen durch dieselben Vorgänge beeinflußt, die pH-induzierte Inaktivierung der Glycerindehydrogenase ist demnach anders als im Fall der Glucosedehydrogenase zusätzlich mit einer Konformationsänderung verknüpft.

Durch hohe Salzkonzentrationen sowie in Gegenwart von NAD wird die pH-induzierte Inaktivierung der Glycerindehydrogenase verhindert. Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit des Aktivitätsverlaufs im Alkalischen von der KCl-Konzentration.

Die Enzymkonzentration hat, wie für eine Reaktion 1. Ordnung nicht anders zu erwarten, keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Abb. 7).

Nach dem bisher Gesagten scheint die pH-induzierte Inaktivierung der Glycerindehydrogenase sowohl von einer Dissoziation des Enzyms in seine Untereinheiten als auch von Veränderungen der Sekundärstruktur begleitet zu sein. Es handelt sich offenbar um zeitlich parallel verlaufende Vorgänge, d.h. die Frage, welcher der beiden Prozesse als

Tab. I. Halbwertszeiten von Aktivität, Circular-Dichroismus und Fluoreszenzintensität bei pH 9.

	1. Vorgang	2. Vorgang
$t_{1/2}$ Aktivität	2,1 min	10 min
$t_{1/2}$ CD	2,4 min	9 min
$t_{1/2}$ Fluoreszenz	1,8 min	8 min

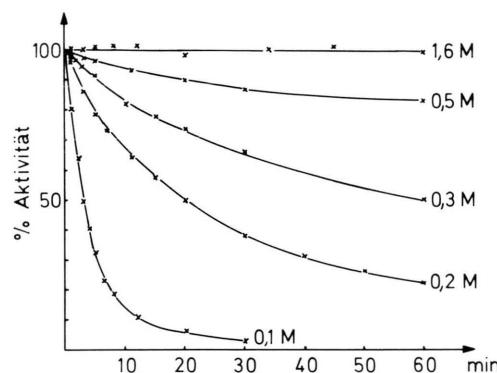


Abb. 6. Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von der KCl-Konzentration. 0,8 mg/ml Enzym in 0,2 M KCl/0,1 M PP/5% Glycerin/10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>/10 mM ME pH 7 + 0,5 M Triethanolamin/KCl pH 9,2 (1+1).

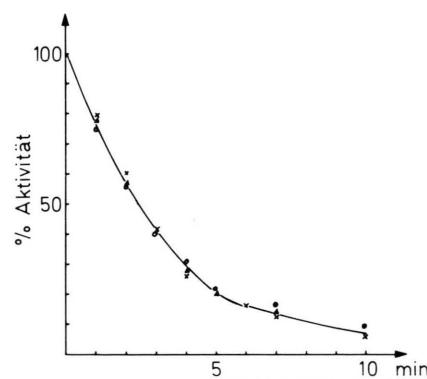


Abb. 7. Einfluß der Enzymkonzentration auf die pH-induzierte Inaktivierung. ○ 0,4 mg/ml; × 0,16 mg/ml; △ 0,08 mg/ml.

eigentlicher auslösender Faktor der Inaktivierung zu betrachten ist, kann aufgrund der geschilderten Untersuchungen nicht eindeutig beantwortet werden.

Durch Quervernetzung und Stabilisierung mit Suberimidat kann die Dissoziation des Enzyms, wie oben gezeigt wurde, teilweise verhindert werden. Sollte der Zerfall der Quartärstruktur die Voraussetzung für die Inaktivierung im Alkalischen darstellen, so müßte die Quervernetzung diese weitgehend verhindern. Dagegen würde eine unabhängig von der Dissoziation auftretende Denaturierung durch eine derartige Modifizierung wohl kaum beeinflußt werden.

Die Reaktion der Glycerindehydrogenase mit Dimethylsuberimidat wurde hier in Gegenwart von NAD und hohen KCl-Konzentrationen durchgeführt, um eine Dissoziation während der Modifizierung möglichst zu verhindern.

Reagenzkonzentrationen von 10 mm ergeben bei 20 Minuten Reaktionsdauer in der SDS-Disk-Elektrophorese neben geringen Monomer- und Trimeranteilen (8% bzw. 10% der Gesamtintensität) eine hochmolekulare Bande mit einem Molekulargewicht von über 200000 Dalton. Im Dichtegradienten bei pH 7 sedimentiert das quervernetzte Enzym genau wie das native, entsprechend einem Molekulargewicht von 240000 Dalton. Anteile mit höherem Molekulargewicht wurden nicht gefunden, die intermolekulare Verknüpfung verschiedener Oligomeren kann demnach ausgeschlossen werden.

Die Restaktivität nach Modifizierung betrug 40% der spezifischen Aktivität des nativen Enzyms bei Bindung von 2–3 Amidinogruppen pro Untereinheit.

Geringere Reagenzkonzentration bzw. kürzere Reaktionszeiten führten zu höheren Restaktivitäten, gleichzeitig aber auch zu unvollständiger Vernetzung (Bandenmaximum der SDS bei 120000 Dalton, entsprechend einem Oligomer aus drei Untereinheiten). Bei höheren Konzentrationen trat Denaturierung ein, was sich in einer Trübung des Reaktionsansatzes äußerte.

Die nachfolgenden Untersuchungen mit der quervernetzten Glycerindehydrogenase wurden jeweils im direkten Vergleich mit dem nativen Enzym unter exakt gleichen Milieu-Bedingungen durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt die drastische Erhöhung der Alkalistabilität nach Quervernetzung. Während native Glycerindehydrogenase bei pH 9 mit einer Halbwertszeit von 2,5 Minuten inaktiviert wird,

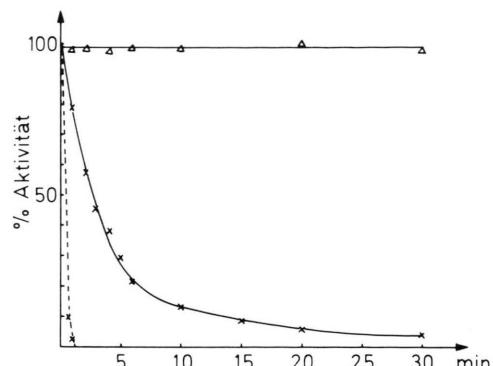


Abb. 8. Aktivitätsverlauf bei pH 9. Enzyslösung (ca. 0,2 mg/ml in 0,2 M KCl/0,1 M Phosphat/5% Glycerin/10 mM ME/10  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  pH 7) + 0,5 M Triethanolamin.  $\times$ — $\times$  native Glycerindehydrogenase;  $\times$ — $\times$ - $\times$  acetamidinierte Glycerindehydrogenase;  $\triangle$ — $\triangle$  quervernetzte Glycerindehydrogenase.

weist das modifizierte Enzym auch nach 30 Minuten noch volle Aktivität auf, nach 24 h betrug die Restaktivität immer noch 75%. Ansätze, die in Gegenwart geringerer Reagenzkonzentrationen (s.o.) modifiziert wurden, zeigten eine deutlich geringere Stabilisierung.

Am Beispiel der Lactatdehydrogenase wurde berichtet, daß schon die einfache Acetamidinierung zu einer beträchtlichen Stabilitätsverhöhung von Enzymen führen kann [13]. Dieser Effekt wird mit der Bildung eines zusätzlichen Ionenpaares zwischen der entstehenden Pseudo-Argininfunktion sowie einer Aspartatseitenkette der benachbarten Untereinheit erklärt [14]. Auch im Fall der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* konnten wir eine erhöhte Stabilität der Quartärstruktur nach Acetamidinierung feststellen.

Abbildung 8 zeigt, daß die einfache Acetamidinierung mit monofunktionellen Imidoestern zu einer deutlichen Destabilisierung der Glycerindehydrogenase führt. Die erhöhte Alkalistabilität der quervernetzten Glycerindehydrogenase ist demnach eindeutig auf die kovalente Verknüpfung ihrer Untereinheiten und nicht auf die Modifizierung von Lysinen zurückzuführen.

Native und acetamidinierte Glycerindehydrogenase zerfallen im Dichtegradienten bei pH 9 vollständig in Monomere, die keinerlei enzymatische Aktivität mehr aufweisen (Abbn. 2 und 6). Dagegen zeigt das quervernetzte Enzym zwei getrennte Sedimentationsbanden (Abbn. 9): eine hochmolekulare

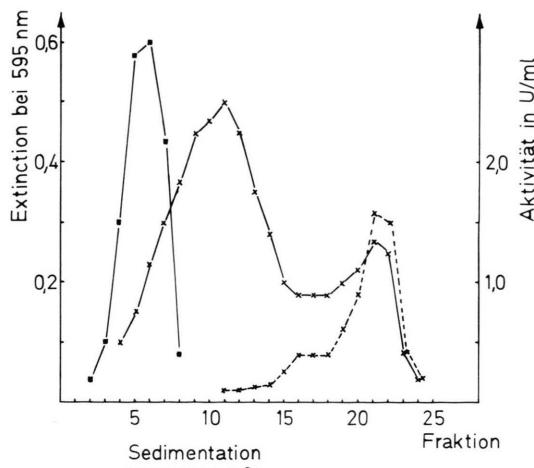


Abb. 9. Dichtegradientenzentrifugation modifizierter Glycerindehydrogenase bei pH 9. ■—■ acetamidinierte Glycerindehydrogenase; ×—× quervernetzte Glycerindehydrogenase (Protein); ×—× quervernetzte Glycerindehydrogenase (Aktivität).

Banden, die dem Hexamerzustand zugeordnet werden kann sowie eine breite Bande bei Molekulargewichten um 120000. Dieser Befund widerspricht dem Ergebnis der SDS-Elektrophorese, nach welchem man fast ausschließlich die höhernmolekulare Form erwarten sollte. Diese Diskrepanz konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise setzt sich die obere Sedimentationsbande (scheinbar geringeres Molekulargewicht) ebenfalls aus Hexameren zusammen, die nicht mehr die ursprüngliche globuläre Gestalt des nativen Enzyms aufweisen und dadurch im Dichtegradienten ein zu geringes Molekulargewicht vortäuschen.

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, wurde die noch vorhandene Restaktivität (28% der eingesetzten Gesamtkaktivität nach 24 Stunden Zentrifugation) praktisch ausschließlich in der unteren Sedimentationsbande gefunden. Die enzymatische Aktivität der Glycerindehydrogenase steht demnach in unmittelbarem Zusammenhang mit dem vollständigen Erhalt der Quartärstruktur.

In jedem Fall zeigt die Identität des CD-Spektrums der quervernetzten Glycerindehydrogenase mit dem des nativen, daß die Tertiärstruktur weitgehend erhalten geblieben ist und kaum – wenn überhaupt – denaturierte Artefakte beteiligt sind.

Die eingangs gestellte Frage nach dem auslösenden Faktor der pH-induzierten Inaktivierung kann

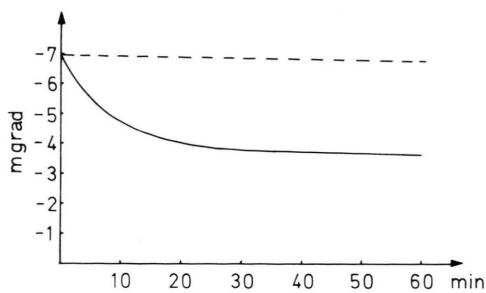


Abb. 10. Abnahme des CD-Signals (220 nm) bei pH 9 (Carbonatpuffer) Enzymkonzentration wie Abb. 8. — native Glycerindehydrogenase; --- quervernetzte Glycerindehydrogenase.

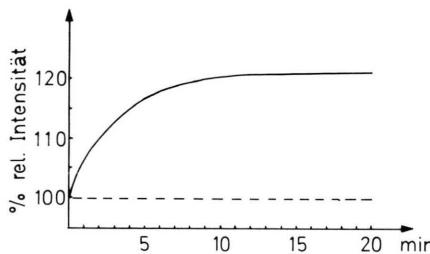


Abb. 11. Verlauf der Fluoreszenzintensität bei pH 9 (Triethanolaminpuffer). — nativ; --- quervernetzt.

nunmehr dahingehend beantwortet werden, daß der Aktivitätsverlust durch die Dissoziation des Enzyms verursacht wird. Wird diese durch Quervernetzung verhindert, so bleibt auch die enzymatische Aktivität erhalten.

Darüber hinaus konnten jedoch auch Auswirkungen auf die Stabilität der Sekundärstruktur festgestellt werden. In Abb. 10 ist der Verlauf des CD-Signals nativer und quervernetzter Glycerindehydrogenase bei pH 9 gegenübergestellt. Die normalerweise beobachtete Entfaltung tritt nach Modifizierung nicht mehr auf. Auch die Zunahme der Tyrosinfluoreszenz wird durch die Quervernetzung vollständig verhindert (Abb. 11). Dieser Befund legt den Schluß nahe, daß die als Folge der pH-Erhöhung einsetzende Denaturierung der Glycerindehydrogenase an die vorausgehende Dissoziation des Enzyms gebunden ist. Solange hingegen die intakte Quartärstruktur vorliegt, ist auch die Aufaltung der Sekundärstruktur erschwert.

Experimente mit denaturierenden Agentien bestätigen diese Annahme (Abb. 12). In 4 M Harnstoff

behält das quervernetzte Enzym im Gegensatz zur nativen Form auch nach mehreren Stunden noch seine volle Aktivität.

Die Thermostabilität der Glycerindehydrogenase konnte durch die Modifizierung ebenfalls erheblich gesteigert werden. Abbildung 13 zeigt den Aktivitätsverlauf bei 70 °C für das native bzw. quervernetzte Enzym. Auch bei höheren Temperaturen bleiben erhebliche Unterschiede sichtbar. So wird die native Form bei 75 °C praktisch momentan inaktiviert, während die modifizierte nach 10 Minuten noch ca. 50% Restaktivität aufweist.

Native Glycerindehydrogenase unterliegt schon bei 60 °C einer langsamten Inaktivierung. Die Thermostabilität des Enzyms kann demnach durch Quervernetzung um wenigstens 10 °C erhöht werden.

Die Quervernetzung wird vielfach zur Untersuchung der Quartärstruktur von Proteinen [15, 16] angewandt, selten zur möglichen Stabilisierung von Enzymen [17]. In letzterem Fall sollte korrekterweise nicht nur das vernetzte Molekül mit dem nativen verglichen werden, sondern auch monofunktionell nach demselben Reaktionstyp modifizierte Präparate, oder bei spaltbarem Reagenz nach Spaltung der Brücke. So finden wir z. B. bei der LDH H<sub>4</sub> die früher beschriebene Hitzestabilisierung nach Amidi-

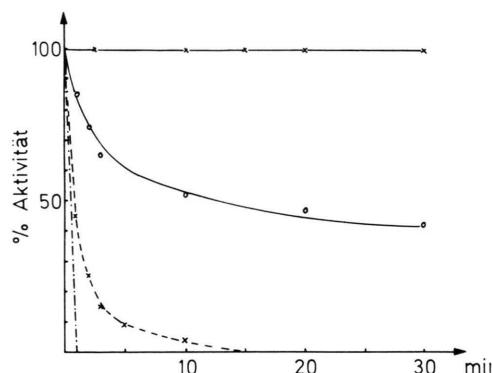


Abb. 13. Thermostabilität der Glycerindehydrogenase.  $\times \cdots \times$  native Glycerindehydrogenase 70 °C;  $x \cdots x$  quervernetzte Glycerindehydrogenase 70 °C;  $\cdots \cdots \cdots$  native Glycerindehydrogenase 75 °C;  $\circ \cdots \circ$  quervernetzte Glycerindehydrogenase 75 °C.

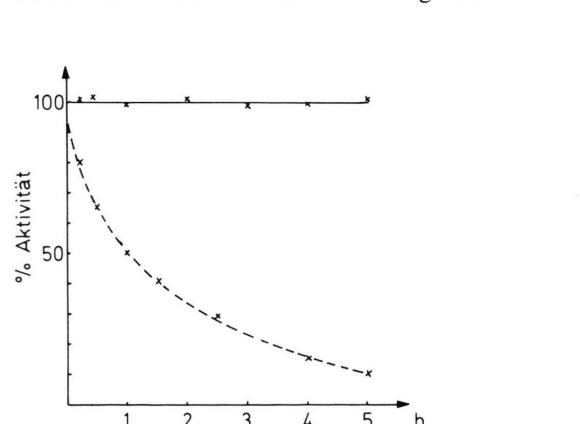


Abb. 12. Aktivitätsverlauf in 4 M Harnstoff.  $\times \cdots \times$  native Glycerindehydrogenase;  $x \cdots x$  quervernetzte Glycerindehydrogenase.

nierung mit Acetimidoester, aber keine weitere Steigerung bei Vernetzung mit Suberimidat [18].

Schließlich sollten bei systematischen Untersuchungen über Einfluß der Quervernetzung vorrangig enzymatisch aktive und in ihrer Quartärstruktur identische Enzympräparate in die physikalischen und biochemischen vergleichenden Untersuchungen einbezogen werden.

Olsen hat kürzlich aus dem Vergleich der Primärstrukturen von 2 thermophilen und 5 mesophilen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen und nach ihrer Einordnung in die bekannte Tertiärstruktur nachgewiesen, daß die Steigerung der Thermostabilität insbesondere bei *Th. aquaticus* aus Änderungen an der Kontaktregion der Untereinheiten abzulesen ist, die eine Dissoziation der Tetrameren erschwert [19].

Wir glauben, an unserem Modell den Zusammenhang zwischen Verhinderung der Dissoziation und Verhinderung der Denaturierung bzw. Inaktivierung deutlich gemacht zu haben. Weitere Modelle sind in Bearbeitung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieses Vorhabens.

- [1] M. Scharschmidt, G. Pfleiderer, H. Metz und W. Brümmer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie **364**, 911 (1983).
- [2] H. E. Pauly und G. Pfleiderer, Biochemistry **16**, 4599 (1977).
- [3] E. Maurer, Dissertation Stuttgart (1984).
- [4] A. Pinner, Die Imidoäther und ihre Derivate, Oppenheim, Berlin 1892.
- [5] M. M. Bradford, Anal. Biochem. **72**, 680 (1970).
- [6] R. G. Martin und B. N. Ames, J. Biol. Chem. **236**, 1372 (1961).

- [7] P. Tuengler und G. Pfleiderer, *Biochim. Biophys. Acta* **284**, 1 (1977).
- [8] H. N. Po und K. D. Legg, *Anal. Letters* **6**, 659 (1973).
- [9] R. Hermann, R. Rudolph und R. Jaenicke, *Nature* **277**, 243 (1979).
- [10] R. Hermann, R. Jaenicke und R. Rudolph, *Biochemistry* **20**, 5195 (1981).
- [11] J. W. Longworth, in: *Excited States of Protein and Nucleic Acids*, 319, Plenum, New York 1971.
- [12] S. N. Timasheff, in: *The Enzymes* (Paul D. Boyer, 3rd ed.), **Vol. 2**, 371, Academic Press, New York 1970.
- [13] A. F. S. A. Habeeb, *Anal. Biochem.* **14**, 328 (1966).
- [14] J. Müller, *Biochim. Biophys. Acta* **669**, 219 (1981).
- [15] M. Friedman, *Protein crosslinking*, Plenum Press, New York 1979.
- [16] T. H. Ti, *Methods in Enzymology*, **Vol. 91**, 580, Acad. Press, New York 1983.
- [17] E. Dziember-Gryszkiewich, A. W. Maksimenko, V. P. Torchilin, and W. S. Ostrowski, *Bioch. Int.* **6**, 627–633 (1983).
- [18] M. F. Manent und G. Pfleiderer (unveröffentlicht).
- [19] K. W. Olsen, *Peptide and Protein Research*, **Vol. 22**, 469 (1981).