

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus glykosidspaltender Enzyme, VIII<sup>[1]</sup>

## Anzahl der aktiven Zentren der $\beta$ -Glucosidasen A und B aus dem Süßmandel-Emulsin durch Fluoreszenzmessungen\*

Günter Legler und Felix Witassek\*\*

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. September 1973)

**Zusammenfassung:** Die  $\beta$ -Glucosidase A aus dem Süßmandel-Emulsin bildet mit 1,8-Anilinonaphthalinsulfonsäure (ANS) einen 1:1-Komplex, die  $\beta$ -Glucosidase B mit 2,6-Toluidinonaphthalinsulfonsäure (TNS) einen Komplex, wahrscheinlich im Verhältnis 1:4 (nichtäquivalente Bindungsstellen). Beide Komplexe fluoreszieren stark. Die Bindungsstellen für diese Reagenzien fallen nicht mit den Substratbindungsstellen zusammen. Bei der Bindung des kompetitiven Inhibitors D-Glucono- $\delta$ -lacton an die Enzym-Farbstoff-Komplexe wird deren Fluoreszenz erhöht (bei Glucosidase A) bzw. erniedrigt (Glucosidase B). Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzänderung wurde die Anzahl der Lactonbindungsstellen für A zu 2.2 und für B zu 0.9 bezogen auf  $\mu_r = 135000$  bzw. 90000 bestimmt. Die auf Grund der Fluoreszenzänderung ermittelten Dissoziationskonstanten für die Bindung des Lactons von 0.016mm bzw. 0.20mm stehen in guter Übereinstimmung mit den kinetisch bestimmten Inhibitor-Konstanten von 0.019mm bzw. 0.22mm.

Die Inaktivierung der beiden Glucosidasen mit 6-Brom-6-desoxycondurit-B-epoxid in Gegenwart von ANS bzw. TNS führt zu einer zeitabhängigen Fluoreszenzzunahme bzw. -abnahme, deren Verlauf der Aktivitätsabnahme parallel geht, wenn man die vor der Inaktivierungsreaktion stattfindende Bildung eines nichtkovalenten Enzym-Epoxid-Komplexes berücksichtigt.

Folgende Verbindungen wurden auf ihr Hemmverhalten gegenüber der  $\beta$ -Glucosidase A untersucht: 5-Amino-5-desoxy-D-gluconsäurelactam, 2-Desoxy-*scyllo*-inosose, *scyllo*-Inosose, *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-1-thioglucoopyranosid, *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucose. Während *scyllo*-Inosose und Glucose praktisch nicht hemmten, zeigten die anderen Verbindungen  $K_i$ -Werte von 1.2 bis 3.2mm. Die im Vergleich zum D-Glucono- $\delta$ -lacton sehr viel schwächere Hemmung durch die beiden ersten Verbindungen zeigt, daß der Ring-sauerstoff des Lactons nicht durch sterisch äquivalente Gruppen ersetzbar ist und wahrscheinlich an der Bindung zum Enzym beteiligt ist.

*Investigations on the mechanism of glycoside-splitting enzymes, VIII. Number of active sites of the  $\beta$ -glucosidases A and B from sweet almond emulsin determined by fluorescence measurements*

**Summary:**  $\beta$ -Glucosidase A from sweet almonds forms a 1:1 complex with 1,8-anilinonaphthalene sulfonic acid (ANS),  $\beta$ -glucosidase B a complex

with 2,6-toluidinonaphthalene sulfonic acid (TNS) probably 1:4, non-equivalent binding sites. Both complexes show strong fluorescence. The binding

*Postanschrift:* Prof. Dr. G. Legler, Institut für Biochemie der Universität, D-5 Köln, Zülpicher Straße 47.

\* Auszugsweise vorgetragen auf der 8. FEBS-Tagung, Amsterdam 1972.

\*\* Dissertation F. Witassek, Bonn 1972.

*Enzym:*  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -D-Glucosid-Glucohydrolase (EC 3.2.1.21).

*Abkürzungen:* ANS: 1,8-Anilinonaphthalinsulfonsäure, TNS: 2,6-Toluidinonaphthalinsulfonsäure, Nph- $\beta$ -D-Glcp: *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid.

sites for these reagents do not coincide with the binding sites for substrate. Binding of the competitive inhibitor D-glucono- $\delta$ -lacton increases (with A) or decreases (with B) the fluorescence of the enzyme-dye complex. The number of lacton binding sites based on a molecular weight of 135000 and 90000 respectively was determined as 2.2 for A and 0.9 for B from the change in fluorescence with lacton concentration. The dissociation constants for lacton binding as determined from the change in fluorescence (0.016mM for A and 0.20mM for B) are in good agreement with the inhibitor constants determined by kinetic measurements in the absence of dye (0.019 and 0.22mM respectively). Inactivation of both glucosidases by 6-bromo-6-deoxyconduritol B epoxide in the presence of ANS or TNS caused a time-dependent increase (with A) or decrease (with B) of fluorescence. This change in

fluorescence parallels the loss of activity if the formation of a non-covalent enzyme-epoxide complex before the inactivation reaction is taken into account.

The following compounds were tested for their inhibitory properties with  $\beta$ -glucosidase A: 5-amino-5-deoxy-D-gluconolactam, 2-deoxy-*scyllo*-inosose, *scyllo*-inosose, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-1-thiogluco-pyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside,  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucose. The inhibitor constants of these compounds ranged from 1.2 to 3.2mM with the exception of *scyllo*-inosose and glucose, which were practically non-inhibitory. The inhibition by the first two compounds is much less than that by D-glucono- $\delta$ -lacton. This shows that the ring oxygen of the lacton cannot be replaced by other sterically equivalent groups. The oxygen is probably involved in the binding of the lacton to the enzyme.

Bei der Markierung des aktiven Zentrums der  $\beta$ -Glucosidasen A und B aus dem Süßmandel-Emulsion mit radioaktivem 6-Brom-6-desoxyconduritol-B-epoxid hatten wir festgestellt, daß A, bezogen auf ein Molekulargewicht von 135000 zwei aktive Zentren enthält während bei B ( $\mu_r = 90000$ ) ein aktives Zentrum gefunden wurde<sup>[2]</sup>. Inzwischen erschienen zwei Arbeiten von Kleinschmidt et al.<sup>[3,4]</sup> in denen die Aufspaltung dieser Glucosidasen durch Natriumdodecylsulfat untersucht wird. In bezug auf die Glucosidase A stimmen die Ergebnisse mit unseren Befunden überein, während bei B Unterschiede vorhanden waren.

Wir haben deshalb versucht, das Problem durch eine Untersuchung der Bindungs-Stöchiometrie geeigneter kompetitiver Inhibitoren zu klären. Solche Inhibitoren müssen eine Bindungskonstante von über  $10^4 M^{-1}$  haben, da man sonst gezwungen ist, mit sehr hohen Enzymkonzentrationen zu arbeiten. Diese Voraussetzung erfüllt von den bekannten Inhibitoren nur das D-Glucono- $\delta$ -lacton<sup>[5]</sup>. Da dieses Lacton für Bindungsstudien mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse oder Gelchromatographie zu instabil ist, versuchten wir, seine Struktur durch Austausch des Ring-Sauerstoffs gegen -NH- oder -CH<sub>2</sub>- so abzuwandeln, daß eine Ringöffnung nicht mehr stattfinden kann. Die geschilderte Modifizierung führte jedoch zu einer so starken Herabsetzung der Inhibitorwirkung, daß wir auf das Gluconolacton zurückgreifen und für die Untersuchung der Bindungs-Stöchiometrie eine andere Methode heranziehen mußten.

Bei der Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor ist damit zu rechnen, daß Konformationsänderungen nicht nur am aktiven Zentrum stattfinden sondern, wenn auch in viel geringerem Ausmaß, an anderen Stellen des Enzymmoleküls. Ein Nachweis so kleiner Konformationsänderungen ist in vielen Fällen dadurch möglich, daß sich das Fluoreszenzverhalten von adsorbierten Farbstoffmolekülen bei der Komplexbildung mit dem Inhibitor ändert<sup>[6]</sup>. Solche Fluoreszenzfarbstoffe zeigen meist in wäßriger Lösung eine sehr niedrige Fluoreszenz während in einem Medium mit niedriger Dielektrizitätskonstante die Quantenausbeute stark erhöht ist und sich das Fluoreszenzmaximum nach kleineren Wellenlängen verschiebt. Bei der Bindung des Farbstoffs an eine hydrophobe Stelle des Proteinmoleküls wird man also eine Fluoreszenzverstärkung beobachten. Ihr Ausmaß kann durch Konformationsänderungen beeinflusst werden, wenn diese eine Veränderung der Umgebung der Bindungsstelle zur Folge haben. Sind die Bindungsstellen des Proteinmoleküls nicht mit Farbstoff gesättigt, so kann zusätzlich eine durch die Konformationsänderung bedingte Veränderung der Dissoziationskonstante des Enzym-Farbstoff-Komplexes zu einer Fluoreszenzänderung führen.

Die Überprüfung einiger handelsüblicher Fluoreszenzfarbstoffe ergab, daß 1,8-Anilidonaphthalinsulfonsäure (ANS) sowohl mit der Glucosidase A als auch mit B einen fluoreszierenden Komplex bildet. 2,6-Toluidinonaphthalinsulfonsäure (TNS) reagierte mit A nicht, bildete aber mit B einen stark

fluoreszierenden Komplex. Da dessen Fluoreszenz stärker war als die mit ANS wurde für die weiteren Messungen ANS in Verbindung mit der Glucosidase A verwendet während B zusammen mit TNS untersucht wurde. In beiden Fällen wurde die Fluoreszenz verändert durch die Komplexbildung mit *D*-Gluconolacton und durch die Reaktion des Enzyms mit dem am aktiven Zentrum angreifenden 6-Brom-6-desoxycondurit-B-epoxid. Über die Auswertung dieser Versuche zur Ermittlung der Bindungsstöchiometrie von *D*-Gluconolacton soll in der vorliegenden Arbeit berichtet werden.

### Beschreibung der Versuche

**Reagentien:** *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*D*-glucopyranosid<sup>[7]</sup>, *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*D*-xylopyranosid<sup>[8]</sup>, *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*D*-1-thioglucopyranosid<sup>[9]</sup>, *scyllo*-Inosose<sup>[10]</sup>, 6-Brom-6-desoxycondurit-B-epoxid<sup>[2]</sup>, *D*-Glucono- $\delta$ -lacton (Merck, Darmstadt), ANS, Magnesiumsalz und TNS, Kaliumsalz (Serva, Heidelberg).

#### *5-Amino-5-desoxy-D-gluconsäure- $\delta$ -lactam*

Da nach der von Inouye et al.<sup>[11]</sup> angegebenen Vorschrift zur Oximierung der 5-Ketogluconsäure kein Oxim erhalten werden konnte, wurde wie folgt verfahren: 3.5 g Kaliumsalz der 5-Keto-*D*-gluconsäure (Merck, Darmstadt) gelöst in 30 ml Wasser wurden mit 1.4 g Hydroxylamin-hydrochlorid und 2.3 g Natriumacetat 4 h auf 50°C erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 0.5 g frisch bereitetem Raney-Nickel wurde bei Normaldruck hydriert, bis die Wasserstoffaufnahme beendet war. Die vom Katalysator befreite Lösung wurde wie i.c.<sup>[11]</sup> angegeben von anorganischen Salzen befreit, das so erhaltene Gemisch der Methylester-hydrochloride der 5-Amino-5-desoxy-*L*-idonsäure und 5-Amino-5-desoxy-*D*-gluconsäure in die Lactame umgewandelt, die dann durch fraktionierte Kristallisation getrennt wurden. Ausbeute 47 mg (14.5% bezogen auf das Gemisch der Methylester-hydrochloride), Schmp.: 190–5°C (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ : 57° ( $c = 1.0$ , in Wasser). Literaturwerte<sup>[11]</sup>: Schmp. 202–4,  $[\alpha]_D^{25}$  60° (in Wasser).

$C_6H_{11}NO_5$  (179.2) Ber. C 40.7 H 6.3.  
Gef. C 40.5 H 6.3

#### *2-Desoxy-scyllo-inosose*

a) 6-Desoxy-*DL*-chiro-inosit: 0.3 g (1, 2, 4/3, 5, 6)-6-Bromcyclohexanpentol<sup>[12]</sup> wurden in 20 ml Wasser gelöst und mit 3 g amorphem Nickel<sup>[13]</sup> und 0.5 g Amberlite IR 4 B (freie Base) bei Normaldruck hydriert, bis kein Wasserstoff mehr aufgenommen wurde. Das Filtrat wurde mit Dowex 50 ( $H^+$ -Form) von gelöstem Nickel befreit, mit Amberlite IR 4 B neutralisiert und auf 2 ml eingengt. Auf Zusatz von 10 ml Äthanol trat Kristalli-

sation ein. Ausbeute: 0.18 g. Die Substanz enthielt kein Brom.

Zur Charakterisierung über das NMR-Spektrum wurde mit Acetanhydrid/1% konz.  $H_2SO_4$  das Pentaacetat dargestellt. Schmp. 120–121°C (aus Äthanol/Wasser).

b) 2-Desoxy-*scyllo*-inosose: 0.2 g 6-Desoxy-*chiro*-inosit gelöst in 30 ml Wasser wurden mit 150 mg Platinkatalysator bei 90°C durch Einleiten von Sauerstoff oxidiert<sup>[10]</sup>. Nach ca. 6 h war die Hauptmenge des Ausgangsmaterials verbraucht (papierchromatische Kontrolle im System Aceton/Wasser 6:1, Anfärbung mit Silbernitrat/Natronlauge<sup>[14]</sup>). Da durch Eindampfen im Vak. keine kristalline Substanz erhalten werden konnte und noch mehrere unpolare Nebenprodukte entstanden waren, wurde das Oxidationsprodukt durch Chromatographie an 40 g Cellulosepulver (Whatman, Standard Grade) in Aceton/Wasser 6:1 gereinigt. Chromatographisch einheitliche Fraktionen wurden vereinigt und im Vak. eingedampft. Kristallisationsversuche aus wenig Wasser und Zusatz von Methanol, Äthanol oder Aceton waren ohne Erfolg. Ausbeute: 95 mg an glasig amorpher Substanz. Der Inososegehalt, bestimmt mit Fehling-scher Lösung<sup>[10]</sup>, betrug 92%. Tetraacetat, hergestellt wie oben, Schmp. 147–150°C (Zers.) (aus Äthanol/Wasser).

$C_{14}H_{18}O_9$  (330.3) Ber. C 50.9 H 5.49  
Gef. C 50.7 H 5.5

Das Desoxyinositpentaacetat zeigte folgendes NMR-Spektrum (Varian A 60, Lösungsmittel  $CDCl_3$ , innerer Standard Tetramethylsilan, Integration normiert auf 15 Acetylprotonen):

Multipllett bei 8.7 $\tau$	1.9 Protonen -CH <sub>2</sub> -Gruppe
Singulett bei 8.0 $\tau$	11.8 Protonen äquatoriales Acetyl
Singulett bei 7.85 $\tau$	3.2 Protonen axiales Acetyl
Multipllett bei 4.5–5.2 $\tau$	4.9 Protonen CH-O-Gruppen

Im NMR-Spektrum des Desoxyinososetetraacetats war das Signal der CH<sub>2</sub>-Gruppe wegen der benachbarten Carbonylgruppe verschoben auf etwa 7.9  $\tau$  und dadurch nicht mehr getrennt von den Acetylsignalen integrierbar. Die Integration wurde deshalb normiert auf 14 Protonen im Bereich von 7.7–8.1  $\tau$ . Gefunden wurden 3.6 Protonen im Bereich von 4.3 bis 5.2  $\tau$  (berechnet 4.0) und 14 Protonen von 7.67 bis 8.1  $\tau$ . Im Bereich der Acetylprotonen fanden sich Singulett bei 7.83, 7.98 und 8.03  $\tau$  im Verhältnis 1:2:1, die wir den Acetoxygruppen an C-6, C-3 und C-5 und an C-6 zuordnen.

#### *Isolierung der $\beta$ -Glucosidasen A und B*

Es wurde wie bei i.c.<sup>[2]</sup> verfahren, wobei das gleiche Rohenzym als Ausgangsmaterial diente. Für die reinen Enzyme wurden folgende spezifische Aktivitäten gefunden: A 72 U/mg, B 610 U/mg (mit 0.02M *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*D*-glucopyranosid bei pH 5.0 bzw. 6.0 und 35°C).

### Fluoreszenzmessungen

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren von ANS und TNS und ihre Wechselwirkung mit den  $\beta$ -Glucosidasen erfolgte mit einem Zeiss-Spektrophotometer PMQ II mit Fluoreszenzzusatz ZMF 4; Anregung bei 365 nm (Filter M 365). Zur reproduzierbaren Einstellung von Spaltbreite und Verstärkung diente der zum Gerät gehörende Fluoreszenzkörper, dessen Fluoreszenzintensität durch ein gelochtes Metallblech auf die Hälfte reduziert war.

Die Messungen erfolgten in 0,05M Natriumacetat/HCl, pH 5,0, (Glucosidase A) bzw. pH 6,0 (Glucosidase B). Volumenänderungen, die bei der Zugabe konzentrierter Farbstoff- bzw. -Enzymlösung zur vorgelegten zweiten Komponente auftraten, wurden rechnerisch berücksichtigt. Die Fluoreszenz wurde außerdem korrigiert bezüglich der Absorption des anregenden Lichtes in der Lösung:

$$F_{\text{korr}} = \frac{F_{\text{gem}} \times 2,3 \times E \times x}{10^{-E \cdot d} (1 - 10^{-E \cdot x})}$$

$E$  = Extinktion der Lösung bei 365 nm;  $d$  = Schichtdicke der Küvette;  $x$  = Breite der Austrittsöffnung für das Fluoreszenzlicht.

Bei der Titration des Enzym-Farbstoffkomplexes mit D-Gluconolacton wurde für jeden zweiten Meßpunkt eine frisch hergestellte Lactonlösung verwendet, um den durch die Hydrolyse des Lactons bedingten Fehler möglichst klein zu halten (Hydrolysegeschwindigkeit unter den Versuchsbedingungen 0,9%/min).

Bei der Untersuchung der Reaktion der Glucosidasen mit 6-Desoxy-6-bromcondurit-B-epoxid wurden Enzym, Farbstoff und Inaktivator unter den in Abb. 9 angegebenen Bedingungen in der Fluoreszenzküvette inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben zur Aktivitätsbestimmung entnommen und die Fluoreszenz gemessen. Da die Fluoreszenz des Enzym-Farbstoff-Komplexes bei länger andauernder Belichtung nicht stabil war, wurde die Küvette bei jeder Fluoreszenzmessung nur für wenige Sekunden in den Strahlengang des Gerätes gebracht. Die Strahlenbelastung während der Versuchsdauer konnte so auf ein nicht mehr störendes Ausmaß reduziert werden.

### Ergebnisse und Diskussion

#### Hemmwirkung der Inhibitoren

Bei der kinetischen Untersuchung mit *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid als Substrat zeigten die in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen im Lineweaver-Burk-Diagramm mit Ausnahme der *scyllo*-Inosose das für kompetitive Inhibitoren charakteristische Hemmverhalten. Ein Vergleich des D-Gluconolactons mit den anderen Inhibitoren deutet

Tab. 1. Kompetitive Hemmung der  $\beta$ -Glucosidase A. Inhibitorkonstanten ermittelt aus Lineweaver-Burk-Diagrammen mit *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Nph- $\beta$ -D-Glcp) als Substrat bei 35°C und pH 5,0.

Inhibitor	$K_i$ [mmol/l]
D-Glucono- $\delta$ -lacton	0.031
D-Glucono- $\delta$ -lacton (bei 25°C)	0.019
5-Amino-5-desoxy-D-gluconsäurelactam	1.2
2-Desoxy- <i>scyllo</i> -inosose	1.6
<i>scyllo</i> -Inosose	> 10
<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-1-thioglucopyranosid	1.3
<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid	3.2
$\beta$ -Glucose	15
$\alpha$ -Glucose	35
Nph- $\beta$ -D-Glcp ( $K_m$ )	1.3

darauf hin, daß der Austausch des Ringsauerstoffs gegen eine NH- oder CH<sub>2</sub>-Gruppe mit einer starken Beeinträchtigung der Affinität zum Enzym verbunden ist. Wie aus der Dissoziationskonstanten für das *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid hervorgeht, liefert die CH<sub>2</sub>-OH-Gruppe der Glucose keinen wesentlichen Beitrag zur Bindung, so daß ein Vergleich von Glucose- und Inosidderivaten berechtigt ist. Allerdings wird sowohl beim Xylosid als auch beim Thioglucosid die Bindung an das Enzym durch den Arylrest stark begünstigt, da Arylglucoside trotz leichter Spaltbarkeit eine sehr viel kleinere Michaelis-Konstante haben als die niederen Alkylglucoside\*.

#### Wechselwirkung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Wie bei der Bindung an andere Proteine führt auch die Wechselwirkung mit den  $\beta$ -Glucosidasen des Süßmandel-Emulsins bei ANS und TNS zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums nach kürzeren Wellenlängen und zu einer beträchtlichen Steigerung der Quantenausbeute verglichen mit der wäßrigen Lösung (Tab. 2). Man wird also hier ähnliche Bindungsverhältnisse annehmen können, wie sie von McClure und Edelman<sup>[6]</sup> diskutiert werden.

Um zu prüfen, ob die Fluoreszenzfarbstoffe in direkter Nachbarschaft des aktiven Zentrums gebunden werden, wurde die Beeinflussung der Enzymaktivität durch ANS und TNS untersucht. Die

\* Legler, G. (1972) unveröffentlicht.

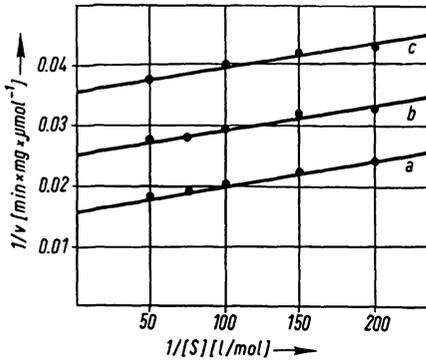


Abb. 1. Einfluß von ANS auf die Hydrolyse von Nph- $\beta$ -D-Glcp durch Glucosidase A bei pH 5.0 und 25°C a) ohne ANS, b) 0.1 mM ANS, c) 0.206 mM ANS.

mit der Glucosidase A und ANS erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Die Aktivität der Glucosidase B wurde durch TNS bis zu einer Konzentration von  $2 \times 10^{-4}$  M nicht beeinflusst. Das in Abb. 1 dargestellte Hemmverhalten entspricht eigentlich der klassischen unkompetitiven Hemmung, bei der der Inhibitor nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex reagiert. So wie die Beeinflussung der Fluoreszenz durch das Enzym zeigt, tritt jedoch eine Komplexbildung auch in Abwesenheit von Substrat ein. Ein analoges Verhalten wurde von Christian und Janetzko<sup>[15]</sup> bei der Acetyl- und Butyrylcholinesterase und ANS beobachtet und durch eine allosterische Beeinflussung des Enzyms gedeutet, bei der die geschwindigkeitsbestimmende Abspaltung des Reaktionsproduktes gehemmt wird.

Tab. 2. Fluoreszenzverhalten von ANS und TNS.

	Fluoreszenzmaximum [nm]		Relative Fluoreszenz <sup>a</sup>	
	ANS	TNS	ANS	TNS
0.05M Na-Acetat/ HCl pH 6.0	525	510	1	1
+ Glucosidase A	490	455	1000	350
+ Glucosidase B	525	450	1	140 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Die Zahlen in Gegenwart von Enzym beziehen sich auf die Fluoreszenz der gebundenen Farbstoffmoleküle, deren Anteil auf Grund der Dissoziationskonstanten und der Anzahl der Bindungsstellen berechnet wurde.  
<sup>b</sup> Berechnet mit  $K_{Diss} = 2.1 \mu\text{M}$ .

Eine andere Erklärung für das Auftreten eines parallelen Hemm-Musters im Lineweaver-Burk-Diagramm wurde von Frieden<sup>[16]</sup> gegeben. Es tritt danach immer dann auf, wenn das Verhältnis der Dissoziationskonstanten von Enzym-Inhibitor- und Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex gleich ist dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Produktbildung aus Enzym-Substrat-Komplex und dem ternären Komplex. Unabhängig von der Deutung der Ergebnisse läßt sich jedoch sagen, daß eine direkte Konkurrenz zwischen Substrat bzw. kompetitivem Inhibitor und den Fluoreszenzfarbstoffen nicht stattfindet. Die Titration der beiden Glucosidasen mit ANS und TNS hatte das in Abb. 2 wiedergegebene Ergebnis. Die trotz Absorptionskorrektur beobachtete

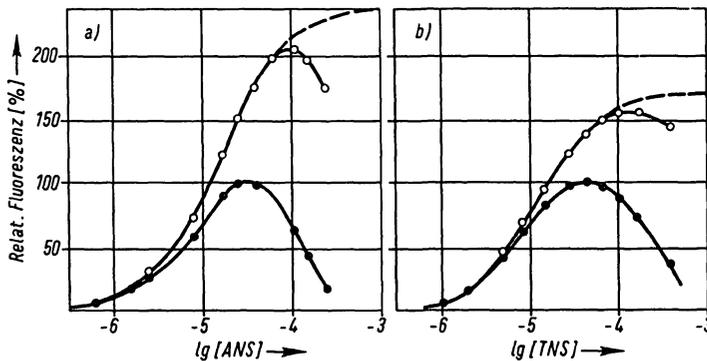


Abb. 2. Titration der Glucosidasen mit Fluoreszenzfarbstoffen. a) 1.2  $\mu\text{M}$  Glucosidase A mit ANS (mol/l), b) 2.0  $\mu\text{M}$  Glucosidase B mit TNS (mol/l). —●— Gemessene Werte, —○— nach Korrektur für Absorption des anregenden Lichtes durch ANS bzw. TNS.

Abnahme der Fluoreszenz mit steigender Farbstoffkonzentration kann durch Energieübertragung von adsorbierten auf gelöste Farbstoffmoleküle oder durch Bildung angeregter Farbstoff-Dimere (Excimere) bedingt sein<sup>[17]</sup>. Nimmt man an, daß die Fluoreszenz bei Sättigung des Enzyms mit Farbstoff den extrapolierten Wert von Abb. 2 erreicht, so erhält man bei der Darstellung nach Abb. 3 eine

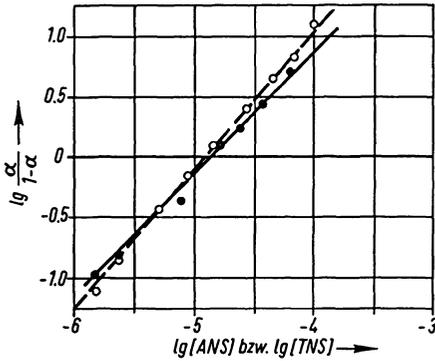


Abb. 3. Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Enzym-Farbstoff-Komplexe.

Dissoziationsgrad berechnet nach  $\alpha = \frac{F_{\text{kor.}}}{F_{\infty}}$ ;  $F_{\text{kor.}}$  = korrigierte Fluoreszenz,  $F_{\infty}$  = extrapolierte Fluoreszenz (vgl. Abb. 2).

—●— 1.2  $\mu\text{M}$  Glucosidase A und ANS, —○— 2.0  $\mu\text{M}$  Glucosidase B und TNS.

$K_{\text{Diss}} = 1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ . ANS bzw. TNS in mol/l.

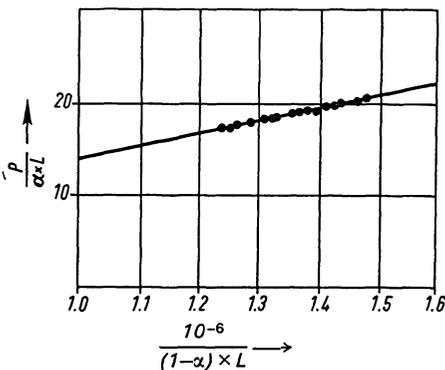


Abb. 4. Bindung von ANS an Glucosidase A, Darstellung nach Klotz et al.<sup>[18]</sup>.

$P$  = Enzymkonzentration (mol/l),  $L$  = ANS-Konzentration (mol/l),  $\alpha$  = Sättigungsgrad ermittelt durch Titration von  $8.8 \times 10^{-7}\text{M}$  ANS mit Glucosidase A.

Die berechnete Regressionsgerade liefert  $K_{\text{Diss}} = 1.3 \times 10^{-5}\text{M}$ , Anzahl der Bindungsstellen  $n = 1.1$ .

Gerade mit der Steigung 1.0, aus deren Abszissen-schnittpunkt die Dissoziationskonstanten der Enzym-Farbstoff-Komplexe ermittelt wurden. Die Richtigkeit dieser Berechnung wird für die Glucosidase A bestätigt durch die bei der Bestimmung der Anzahl der Farbstoffbindungsstellen nach Klotz et al.<sup>[18]</sup> erhaltenen Dissoziationskonstante (Abb. 4). Die Fluoreszenz ( $F$ ) der gebundenen Farbstoffmoleküle wurde hier durch Titration einer 0.88  $\mu\text{M}$  ANS-Lösung mit Glucosidase A ermittelt (Extrapolation im praktisch linearen Diagramm  $1/F$  gegen  $1/[\text{Enz}]$ ).

Bei der Glucosidase B ergab die entsprechende Titration (Abb. 5) einen Grenzwert für die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs, aus dem nach

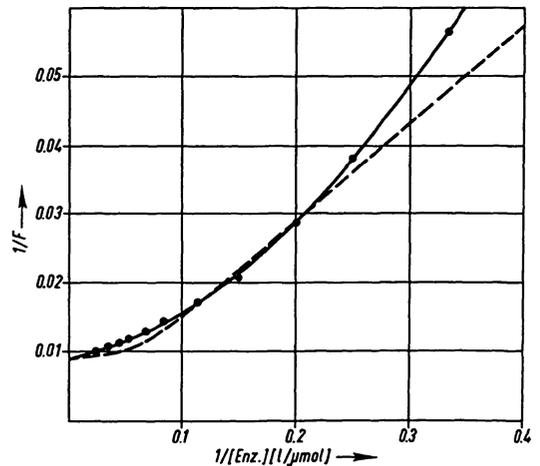


Abb. 5. Reziproke Darstellung der Fluoreszenztitration von 45  $\mu\text{M}$  TNS mit  $\beta$ -Glucosidase B in 0.05M Acetatpuffer, pH 6.0.

—●— gemessene Werte, --- berechneter Verlauf mit vier identischen und unabhängigen Bindungsstellen mit  $K_{\text{Diss}} = 8.1 \mu\text{M}$ .

Daniel und Weber<sup>[19]</sup> die Anzahl der Bindungsstellen zu 2.9 ermittelt wurde (Abb. 6). Dieses Verfahren ist jedoch nur für Bindungsstellen mit gleichem Fluoreszenzverhalten anwendbar. Bei unterschiedlicher Affinität der Bindungsstellen werden diese bei großem Überschuß an Protein (Bestimmung von  $F_{\infty}$ ) im umgekehrten Verhältnis ihrer Dissoziationskonstanten besetzt. Zeigen die Ligandenmoleküle bei der Bindung an Stellen hoher Affinität eine geringere Fluoreszenzverstärkung als an Stellen niedriger Affinität, so ist der Grenzwert

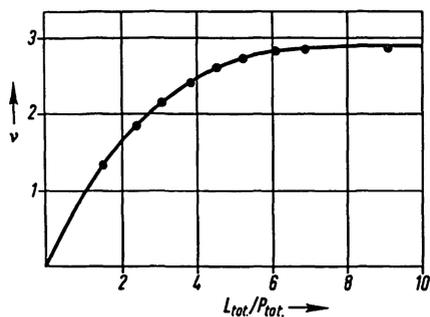


Abb. 6. Bestimmung der TNS-Bindungsstellen der  $\beta$ -Glucosidase B nach Daniel und Weber<sup>(19)</sup> aus den Daten der Fluoreszenztitration Abb. 5.

Anzahl der pro Enzymmolekül gebundenen Farbstoffmoleküle  $v = (F/F_{\infty})/(L_{tot.}/P_{tot.})$ .  $L_{tot.}$  und  $P_{tot.}$  Gesamtkonzentration von TNS bzw. Enzym.

$(F/F_{\infty})/(L_{tot.}/P_{tot.})$  kleiner als  $v$  und umgekehrt. Die in Abb. 3 gefundene Steigung von 1.17 an Stelle von 1.0 spricht für den zuerst genannten Fall. Auch der Unterschied zwischen berechnetem und gefundenem Fluoreszenzverlauf (Abb. 5) stimmt mit dieser Interpretation überein.

Wäre die größere Steigung in Abb. 3 bedingt durch positive Kooperativität bei der TNS-Bindung, so führt das Verfahren von Daniel und Weber ebenfalls nur zu korrekten Werten von  $v$ , wenn die Fluoreszenzverstärkung unabhängig von der kooperativen Erhöhung der Affinität und für alle Bindungsstellen gleich ist. Eindeutige Aussagen sind nur unter Zuhilfenahme anderer Methoden, z. B. Gleichgewichtsdialyse, möglich, für die jedoch nicht genügend Enzymmaterial zur Verfügung stand.

Die Titration der Enzym-Farbstoff-Komplexe mit D-Glucono- $\delta$ -lacton hatte das in Abb. 7 wiedergegebene Ergebnis. Wegen der starken Absorption des anregenden Lichtes durch die Farbstoffe wurde nicht bei Farbstoffsättigung gearbeitet sondern bei der Farbstoffkonzentration, die dem gemessenen Fluoreszenzmaximum (Abb. 2) entsprach. Der Sättigungsgrad des Enzyms betrug dabei 80% (Glucosidase A) bzw. 92% (Glucosidase B). Die aus den Titrationskurven ermittelten Dissoziationskonstanten für den Enzym-Inhibitor-Komplex stehen in sehr guter Übereinstimmung mit dem durch kinetische Messungen mit *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid in Abwesenheit der Farbstoffe erhaltenen Werte. Wie schon bei der Untersuchung der Hemmwirkung der Farbstoffe festgestellt wurde,

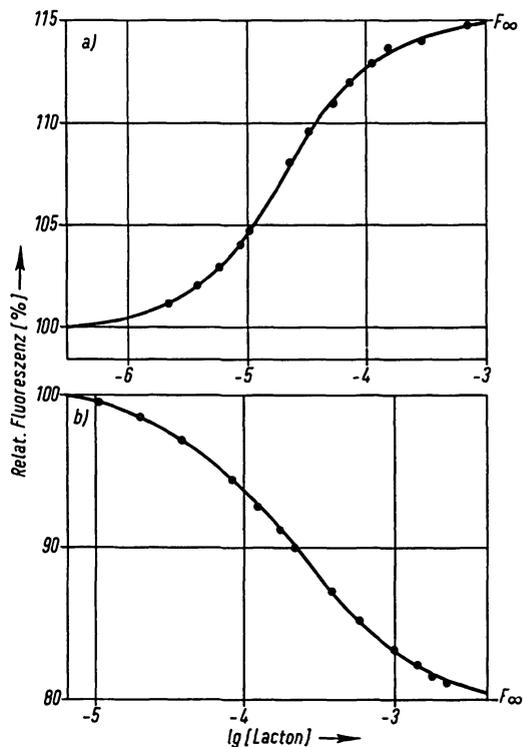


Abb. 7. Titration von  $7\mu\text{M}$   $\beta$ -Glucosidase A (a) bzw.  $8\mu\text{M}$   $\beta$ -Glucosidase B (b) mit D-Glucono- $\delta$ -lacton (mol/l) in Gegenwart von  $42\mu\text{M}$  ANS bei pH 5.0 (a) bzw.  $35\mu\text{M}$  TNS bei pH 6.0 (b) und  $25^{\circ}\text{C}$ .

$K_{Diss} = 0.016\text{mM}$  (a) und  $0.20\text{mM}$  (b). Die kinetische Bestimmung der Inhibitorkonstanten in Abwesenheit von ANS (a) bzw. TNS (b) mit *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid als Substrat ergab  $K_i = 0.019\text{mM}$  (a) bzw.  $0.22\text{mM}$  (b).

hat die Komplexbildung mit ANS bzw. TNS eine nur geringfügige, an der Grenze der Meßgenauigkeit liegende Wirkung auf die Substratbindungsstelle.

Um festzustellen, ob die bei der Lactonbindung auftretende Fluoreszenzänderung evtl. durch eine Änderung der Bindungskonstante des Farbstoffs bedingt ist, wurde die Titration des Enzyms mit Farbstoff in Gegenwart von  $3 \times 10^{-3}\text{M}$  Lacton wiederholt. Die Titrationskurven waren, wenn man die höhere bzw. niedrigere Fluoreszenz des ternären Komplexes berücksichtigt, die gleichen wie die in Abb. 2 dargestellten. Die durch eine Änderung der Fluoreszenz erkennbare Veränderung der Farb-

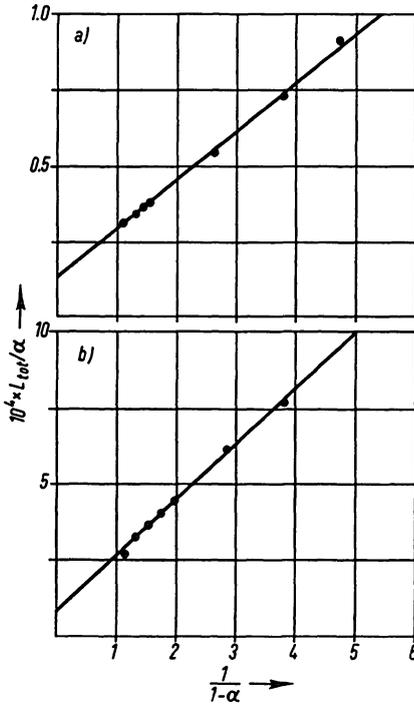


Abb. 8. Modifiziertes Scatchard-Diagramm der Lactonbindungsdaten für  $\beta$ -Glucosidase A (a) und für  $\beta$ -Glucosidase B (b) (vgl. Abb. 7a und b).

Gesamte Lactonkonzentration  $L_{tot.}$   
 Sättigungsgrad  $\alpha = \frac{F_0 - F}{F_0 - F_{\infty}}$ .

Aus dem Ordinatenabschnittspunkt erhält man für die Anzahl der Lactonbindungsstellen  $n = 2.2$  (a) bzw.  $0.9$  (b).

stoffbindungsstelle hat also keinen meßbaren Einfluß auf die Komplexbildung.

Die Bestimmung der Anzahl der Lactonbindungsstellen erfolgte nach Scatchard<sup>[20]</sup> (Abb. 8). Das Ergebnis von zwei Bindungsstellen bei der Glucosidase A und einer Bindungsstelle bei der Glucosidase B bestätigt die bei der Markierung der beiden Glucosidasen mit 6-Desoxy-6-bromcondurit-B-epoxid erhaltenen Ergebnisse. Die bei der Glucosidase B vorhandenen Differenzen gegenüber den Ergebnissen von Kleinschmidt et al.<sup>[3]</sup> lassen sich noch nicht erklären. Möglicherweise zeigt dieses Enzym bei der Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat ein anomales Verhalten, das eine Dissoziation in Untereinheiten vom  $\mu_r = 67000$

vortäuscht, denn die Autoren finden für das native Enzym sowohl in der Ultrazentrifuge als auch bei der Gelelektrophorese nach Hedrick und Smith<sup>[21]</sup> ein  $\mu_r = 90000$  bzw.  $88000$  und  $85000$ .

Zu diskutieren bleibt noch der Befund, daß für die aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaute Glucosidase A<sup>[3]</sup> nur eine Bindungsstelle für ANS gefunden wurde. Es ist anzunehmen, daß diese Bindungsstelle von beiden Untereinheiten gemeinsam gebildet wird. Eine Dissoziation in die Untereinheiten tritt erst bei der Behandlung mit Natriumdodecylsulfat ein. Analoge Verhältnisse wurden von Dickinson<sup>[22]</sup> bei der Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe gefunden, die aus vier identischen Untereinheiten besteht und nur zwei Bindungsstellen für ANS besitzt.

Wir haben dann noch die Reaktion des 6-Desoxy-6-bromcondurit-B-epoxids mit den Glucosidasen A und B in Gegenwart der Fluoreszenzfarbstoffe untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 darge-

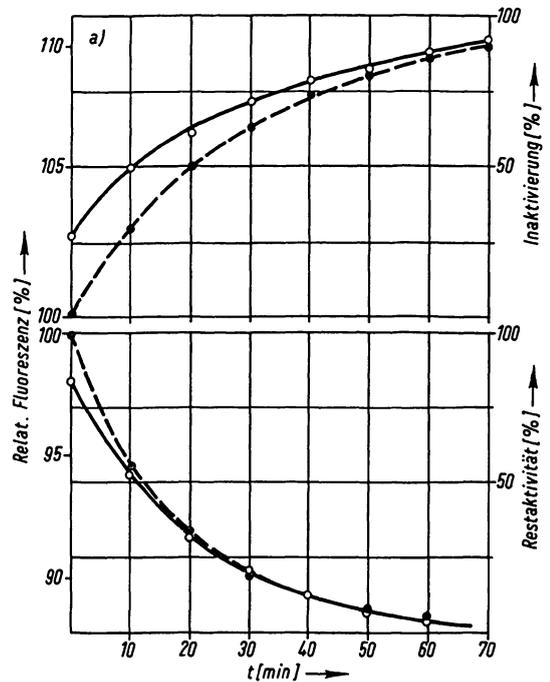


Abb. 9. Reaktion von  $2.5\mu\text{M}$   $\beta$ -Glucosidase A (a) bzw.  $2.0\mu\text{M}$   $\beta$ -Glucosidase B (b) mit  $0.1\text{mM}$  (a) bzw.  $0.2\text{mM}$  (b) 6-Brom-6-desoxycondurit-B-epoxid in Gegenwart von  $42\mu\text{M}$  ANS bei pH 7.0 (a) bzw.  $50\mu\text{M}$  TNS bei pH 6.0 (b) und  $25^\circ\text{C}$ .  
 ○—○ Relative Fluoreszenz, --●-- % Inaktivierung bzw. Restaktivität.

stellt. Die scheinbar schlechte Korrelation zwischen Aktivitätsabnahme und Fluoreszenzänderung ist wahrscheinlich auf die sehr rasche Bildung eines nichtkovalenten Enzym-Epoxid-Komplexes zurückzuführen, an die sich die eigentliche Inaktivierungsreaktion anschließt. Mit den früher<sup>[\*,2]</sup> bestimmten Dissoziationskonstanten für diesen Komplex von 0.4mM (Glucosidase A) und 1.0mM (Glucosidase B) ergibt sich, daß zu Beginn der Reaktion 24% bzw. 17% des Enzyms in Form des Komplexes vorliegen. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit der raschen Fluoreszenzänderung zu Beginn der Reaktion. Die im Vergleich zum D-Glucono- $\delta$ -lacton geringere Fluoreszenzänderung auch nach vollständiger Umsetzung dürfte auf die abweichende Struktur des Epoxids bzw. seines Umwandlungsproduktes zurückzuführen sein.

Bei den orientierenden Versuchen mit ANS und der Glucosidase B hatte sich gezeigt, daß die Fluoreszenz dieses Komplexes bei der Bindung des D-Glucono- $\delta$ -lactons erhöht und nicht wie die des TNS-Komplexes erniedrigt wurde. Dies zeigt, daß trotz der relativ geringen strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Komplexbildnern eine spezifische Bindung an verschiedenen Stellen des Enzymmoleküls stattfindet, die von der Lactonbindung unterschiedlich beeinflußt werden.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

\* Legler, G. (1972) unveröffentlicht.

#### Literatur

- <sup>1</sup> VII. Mitteil.: Legler, G. & Lotz, W. (1973) *diese Z.* **354**, 243–254.
- <sup>2</sup> Legler, G. & Hasnain, S. N. (1970) *diese Z.* **351**, 25–31.
- <sup>3</sup> Kleinschmidt, T., Glossmann, H. & Horst, J. (1970) *diese Z.* **351**, 349–358.
- <sup>4</sup> Kleinschmidt, T. & Horst, J. (1971) *diese Z.* **352**, 603–614.
- <sup>5</sup> Conchie, J., Gelman, A. L. & Levvy, G. A. (1967) *Biochem. J.* **103**, 609–615.
- <sup>6</sup> Edelman, G. M. & McClure, W. O. (1968) *Accounts Chem. Res.* **1**, 65–70.
- <sup>7</sup> Glaser, E. & Wulwek, W. (1924) *Biochem. Z.* **145**, 514–534.
- <sup>8</sup> Loontjens, F. G. & Bruyne, C. K. de (1964) *Naturwissenschaften* **51**, 359.
- <sup>9</sup> Jermyn, M. A. (1957) *Aust. J. Chem.* **10**, 448–454.
- <sup>10</sup> Heyns, K. & Paulsen, H. (1953) *Chem. Ber.* **86**, 833–840.
- <sup>11</sup> Inouye, S., Tsuruoka, T., Ito, T. & Niida, T. (1968) *Tetrahedron* **24**, 2125–2144.
- <sup>12</sup> McCasland, G. E. & Horswill, E. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4020–4026.
- <sup>13</sup> Brown, Ch. & Brown, H. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 1003–1005.
- <sup>14</sup> Trevelyan, W. E., Procter, D. P. & Harrison, J. S. (1950) *Nature (London)* **166**, 444–445.
- <sup>15</sup> Christian, S. T. & Janetzko, J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 169–178.
- <sup>16</sup> Frieden, C. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 3522–3531.
- <sup>17</sup> Wehry, E. L. & Roger, L. B. (1966) in *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* (Hercules, D. M., Hrsg.) S. 113–118, Interscience, New York.
- <sup>18</sup> Klotz, I. M., Walker, F. M. & Bivan, R. B. (1946) *J. Amer. Chem. Soc.* **68**, 1486–1490.
- <sup>19</sup> Daniel, E. & Weber, G. (1966) *Biochemistry* **5**, 1893–1900.
- <sup>20</sup> Scatchard, G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672.
- <sup>21</sup> Hedrick, J. L. & Smith, A. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 155–164.
- <sup>22</sup> Dickinson, F. M. (1971) *FEBS Lett.* **15**, 17–20.