

- [79] D. A. Dougherty, F. M. Llort, K. Mislow, J. F. Blount, *Tetrahedron* 34, 1301 (1978).  
 [80] Bicyclopropyl liegt nach Elektronenbeugung [81] und EFF-Rechnung bevorzugt in einer Konformation mit *gauche*-H-Atomen ( $\Delta H_{\text{rel. der anti-Form}} = 0.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) vor. Wegen der kleineren Bindungswinkel im Cy-

clopropan handelt es sich um eine nichtalternierende  $\text{FBF}_2\text{B}_2$ -Struktur: vgl. H. Braun, W. Lüttke, *J. Mol. Struct.* 31, 97 (1976).

- [81] O. Bastiansen, A. de Meijere, *Angew. Chem.* 78, 142 (1966); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5, 124 (1966).

## Die Rolle von Pyridoxalphosphat bei der Katalyse der Glykogen-Phosphorylasen

Von Ernst J. M. Helmreich und Helmut W. Klein<sup>[\*]</sup>

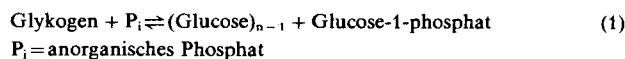
Professor Otto H. Wieland zum 60. Geburtstag gewidmet

Glykogen-Phosphorylasen katalysieren den Abbau von Glykogen durch Phosphat (oder Arsenat) zu Glucose-1-phosphat (bzw. Glucose + Arsenat). Alle Glykogen-Phosphorylasen enthalten Pyridoxal-5'-phosphat, ein Vitamin-B<sub>6</sub>-Derivat, als Cofaktor. Es ist im Enzym durch eine Doppelbindung mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes verbunden. Wird der Cofaktor vom Enzymprotein abgetrennt, erhält man inaktives Apoenzym. Das Enzym bleibt jedoch aktiv, wenn man die Doppelbindung mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert. Sollte daher Pyridoxalphosphat an der Katalyse der Glykogen-Phosphorylasen beteiligt sein, so müßte es eine andere Funktion als in allen anderen „klassischen“ Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen haben, denn diese werden durch Reduktion inaktiviert. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie hat gezeigt, daß die Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in den katalytisch aktiven Formen der Glykogen-Phosphorylasen als Dianion in einer hydrophoben Umgebung vorliegt. Die kovalente und allosterische Aktivierung der Muskel-Glykogen-Phosphorylasen wird von der Umwandlung der monoprotonierten Form der Phosphatgruppe des Cofaktors in die dianionische Form begleitet. Wir fanden nun derartige Ionisierungsänderungen auch bei den nichtregulierten *aktiven* Kartoffel- und *E. coli*-Maltodextrin-Phosphorylasen, und zwar bei der Bindung von Glucose und Oligosacchariden sowie bei katalytischem Umsatz, d. h. Arsenolyse der  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen. (Maltodextrin-Phosphorylasen gehören wie Glykogen-Phosphorylasen zur Klasse der  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen.) Versuche unserer Gruppe sowie neuere Befunde über die Raumstruktur der kristallinen Muskel-Glykogen-Phosphorylase legen es nahe, die dianionische Phosphatgruppe als Protonenacceptor beim Glucosyltransfer vom und zum Glucosylacceptor anzusehen. Wenn dies auch nicht die einzige Erklärung der Befunde sein mag, so kann doch nicht mehr daran gezweifelt werden, daß die dianionische Phosphatgruppe des Cofaktors der Glykogen-Phosphorylasen eine katalytische Funktion ausübt.

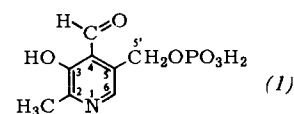
### 1. Einleitung

#### 1.1. Eigenschaften der Phosphorylase

Glykogen ist ein stark verzweigtes, aus  $\alpha$ -1,4-D-Glucosereihen aufgebautes tierisches Reservekohlenhydrat. Glykogen-Phosphorylasen (EC 2.4.1.1) katalysieren den phosphorolytischen Abbau von Glykogen; er beginnt am nichtreduzierenden Ende des Moleküls und führt zu Glucose-1-phosphat [Gl. (1)]. Außerdem katalysieren die Glykogen-Phosphorylasen die Bildung von  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen beim Aufbau von Glykogen.



Die Reaktion ist in vitro reversibel ( $K_{\text{eq}} = [\text{P}_i]/[\text{Glucose-1-phosphat}] = 3.6$  bei  $\text{pH} = 6.8$ ). In der lebenden Zelle katalysieren die Phosphorylasen nur den Glykogenabbau; hier bestimmen die geringe Konzentration an Glucose-1-phosphat und die hohe Konzentration an Phosphat (1:300) den Reaktionsablauf<sup>[1]</sup>.



[\*] Prof. Dr. E. J. M. Helmreich, Dr. H. W. Klein  
 Physiologisch-chemisches Institut der Universität  
 Koellikerstraße 2, D-8700 Würzburg

Alle bisher untersuchten Glykogen-Phosphorylasen enthalten kovalent gebundenes Pyridoxal-5'-phosphat (1), ein

Derivat von Vitamin B<sub>6</sub>. Pyridoxalphosphat ist über seine Aldehydgruppe mit der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes in der Phosphorylase verknüpft. Durch Reduktion dieser Azomethinbindung mit NaBH<sub>4</sub> wird der Cofaktor irreversibel an das Enzym gebunden, doch bleibt dessen Aktivität erhalten, wie E. H. Fischer et al. gezeigt haben<sup>[2]</sup>. Glykogen-Phosphorylasen unterscheiden sich demnach von den „klassischen“ Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen, die durch Hydrierung inaktiviert werden.

## 1.2. Struktur

Die hier besprochenen Befunde wurden an Phosphorylasen aus Kaninchen-Skelettmuskel, Kartoffeln und *E. coli* erhalten. Diese Enzyme sind aus zwei gleichen Untereinheiten aufgebaut, deren Molekulargewicht bei der Muskel-Phosphorylase durch Sequenzanalyse zu 97412 bestimmt wurde (841 Aminosäuren)<sup>[3-5]</sup>. Für die Kartoffel-Phosphorylase wird ein Molekulargewicht der Untereinheit von 103000 angegeben<sup>[6,7]</sup>, für die Untereinheit der *E.-coli*-Phosphorylase 81000<sup>[8]</sup>. Kaninchen-Skelettmuskel-Phosphorylase existiert in einer phosphorylierten Form (Phosphorylase *a*) und einer nicht phosphorylierten Form (Phosphorylase *b*). Phosphorylase *a*, die aktive Form, ist selbst in niedrigen Konzentrationen und bei erhöhter Temperatur tetramer. In hohen Konzentrationen und in Gegenwart von AMP bildet auch Phosphorylase *b* Tetramere<sup>[9]</sup>. Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, F<sup>-</sup>, niedrige Temperaturen, der allosterische Effektor AMP und die Substrate P<sub>i</sub> und Glucose-1-phosphat begünstigen die Bildung von Tetrameren<sup>[10-14]</sup>. Das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht der Phosphorylase *a* ist außer von der Ionenstärke und der Art der Ionen vom pH-Wert und von der Temperatur abhängig ( $-\Delta H = 60 \text{ kcal/mol}$ )<sup>[15-18]</sup>. Tetramere Phosphorylasen dissoziieren in Anwesenheit von Glucose, Glykogen, Coffein, 1,4-α-Glucanen (Hepta- und Pentaamylosen) etc. in Dimeren<sup>[19-22]</sup>. Die dimeren Phosphorylasen *a* (und *b* in Gegenwart von AMP) sind die enzymatisch aktiven Formen. Tetramere und Monomere sind inaktiv<sup>[23-25]</sup> oder nach Ansicht anderer Autoren partiell aktiv<sup>[18,26]</sup>.

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Ausmaße des Dimers zu ungefähr  $110 \times 65 \times 55 \text{ Å}^3$  bestimmt. Dieser Befund wird durch Röntgen-Kleinwinkelstreukurven bestätigt, die mit einem Ellipsoid der Dimensionen  $110 \times 60 \times 55 \text{ Å}^3$  erklärt werden können. Detailliertere Informationen über die räumliche Struktur der Phosphorylase erbrachte die Röntgen-Strukturanalyse<sup>[27-32]</sup>. Phosphorylase *a* und *b* kristallisieren in Gegenwart von Glucose bzw. Inosinsäure (IMP) isomorph in der Raumgruppe P<sub>4</sub><sub>3</sub>2<sub>1</sub> mit den Zellkonstanten  $a = 128 \text{ Å}$  und  $c = 116 \text{ Å}$ <sup>[29,30]</sup>. Diese Kristalle enthalten ein Monomer pro asymmetrische Einheit. Das Dimer bildet sich durch Wechselwirkung zweier Monomere über eine kristallographische zweifache Symmetrieachse hinweg. Diese Anordnung der Monomere in der vorliegenden Raumgruppe schließt die Existenz von Tetrameren im Kristall aus.

Die detaillierte und vollständige Interpretation der Beugungsdaten war jedoch erst möglich, nachdem Titani et al. die Aminosäuresequenz („Primärstruktur“) der Muskel-Phosphorylase bestimmt hatten<sup>[3-5]</sup>. So war durch die Sequenzanalyse bekannt, daß Pyridoxalphosphat die Schiff-Base mit dem Lysin in Position 679 bildet; daraufhin gelang

es, den Cofaktor im Enzymmolekül exakt zu lokalisieren<sup>[27,28]</sup>.

Die Polypeptidkette besteht zu etwa 50% aus α-Helix- und zu etwa 30% aus β-Faltblattstrukturen, die sich im Molekül abwechseln. Das Phosphorylase-Monomer kann in drei Domänen eingeteilt werden: Die N-terminale Domäne besteht aus 320, die zentrale aus 160 und die C-terminale aus 360 Aminosäuren. Die Schwerpunkte der drei Domänen bilden die Ecken eines gleichseitigen Dreiecks. Die N-terminalen Domänen fungieren bei den Dimeren als Kontaktflächen, die sich über die Symmetrieachse hinweg verzahnen und ausgedehnte Kontakte zwischen den Untereinheiten ermöglichen<sup>[28-30]</sup>. Madsen et al. hatten bereits früher gezeigt, daß in der Kontaktregion zwei Cysteinseitenketten (108 und 142) liegen, deren Carboxamidomethylierung zur Dissoziation in Monomere und Inaktivierung führt. Die restlichen SH-Gruppen werden erst nach irreversibler Denaturierung des Proteins für Iodacetamid zugänglich<sup>[33-35]</sup>. Acylierung mit Bernsteinsäureanhydrid (Succinylierung) inaktiviert Phosphorylase *b* und *a*; teilweise beruht diese Inaktivierung auf der Dissoziation in Monomere<sup>[36]1\*)</sup>.

## 1.3. Regulation

Die grundlegenden Arbeiten von G. T. und C. F. Cori (siehe<sup>[37]</sup>) zeigten, daß Glykogen-Phosphorylase aus Kaninchen-Skelettmuskel in den Formen *b* und *a* vorliegen kann; Phosphorylase *b* ist nur in Anwesenheit von 5'-AMP aktiv. E. G. Krebs und E. H. Fischer haben die Interkonversion der beiden Formen aufgeklärt<sup>[38]</sup> (siehe auch<sup>[39,40]</sup>). Zur Umwandlung von Phosphorylase *b* in *a* wird ein Serinrest (Serin-14) pro Untereinheit mit einer Phosphorylase-Kinase (EC 2.7.1.38), Mg<sup>2+</sup> und ATP phosphoryliert. Die umgekehrte Reaktion wird durch eine von P. J. Keller und G. T. Cori gefundene Enzymaktivität bewirkt<sup>[41]</sup>, die sich als Phosphorylase-Phosphatase (EC 3.1.3.17) erwies<sup>[42]</sup>. Phosphorylase war das erste Enzym, von dem gezeigt wurde, daß seine Aktivität sowohl allosterisch als auch durch kovalente Modifizierung eines Aminosäurerestes reguliert wird. Auch Phosphorylase *b'*, ein tryptisches Abbauprodukt der Phosphorylase *b* ohne die N-terminale Sequenz des nativen Enzyms mit Serin-14, wird noch durch AMP aktiviert. Das zeigt, daß die Phosphorylierungsstelle nicht für die AMP-Aktivierung benötigt wird<sup>[43-45]</sup>. Dieser Befund wird durch jüngste <sup>31</sup>P-NMR-Ergebnisse an nativer und succinylierter Phosphorylase *a* bei verschiedenen pH-Werten gestützt. In Einklang mit Röntgen-Strukturdaten ergab sich, daß Adenosin-5'-monothiophosphat (AMP-S) und der Thiophosphoserinrest auf verschiedene Stellen der Phosphorylase kooperativ einwirken<sup>[36]</sup> (vgl. Abb. 4).

Glykogen-Phosphorylasen in Muskel und Leber sind Schlüsselenzyme, deren Aktivität auf sehr komplizierte Art reguliert wird, um diese den Bedürfnissen des Zellstoffwechsels anzupassen. Sie können den α-Glucan-Phosphorylasen zugerechnet werden. Die α-Glucan-Phosphorylasen von Pflanzen und Prokaryonten werden weder allosterisch noch kovalent reguliert<sup>[6,46-48]</sup>. Glykogen-Phosphorylase aus Hefe wird kovalent, aber nicht mit Adenosin-5'-monophosphat

[\*] Zur Raumstruktur der Phosphorylase *a* und deren funktioneller Zuordnung siehe R. J. Fletterick, N. B. Madsen, Annu. Rev. Biochem., im Druck.

(AMP) reguliert<sup>[49]</sup>. Die kovalente Modifizierung ( $b \leftrightarrow a$ -Interkonversion) der Phosphorylasen wird durch ein kompliziertes Kontrollsystem (Enzymkaskade) reguliert, an dem mindestens fünf weitere, selbst wieder interkonvertierbare Enzyme sowie spezifische Inhibitorproteine beteiligt sind. Um die Charakterisierung der Regulation des Phosphorylase-Kinase-Systems, das eine Schlüsselrolle spielt, hat sich in den letzten Jahren vor allem *Philip Cohen* verdient gemacht<sup>[50]</sup>. Die Regulation der Enzymkaskade einschließlich der hormonalen Regulation wurde in mehreren Übersichten behandelt<sup>[1, 40, 50–54]</sup>.

## 2. Pyridoxalphosphat in den $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen

1957 entdeckten *Baranowski, Illingworth, Brown und Cori*<sup>[55, 56]</sup> und 1958 *Kent, Krebs und Fischer*<sup>[57]</sup>, daß Glykogen-Phosphorylase *a* aus Kaninchen-Skelettmuskel pro Untereinheit ein Molekül Pyridoxalphosphat enthält. Seither fand man Pyridoxalphosphat u. a. in  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen aus Muskeln von Katze, Ratte, Maus, Hai, Mensch, Frosch, Hummer und Insekten, in Leber und Gehirn sowie in Hefe, Kartoffeln, Mais, *Physarum polycephalum*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*<sup>[1, 6, 7, 8, 24, 37, 46, 49, 53, 58, 59, 102, 157–163]</sup>.

Im Muskel findet sich Phosphorylase – und damit auch Pyridoxalphosphat – in relativ hohen Konzentrationen ( $3 \times 10^{-6}$  M; etwa 30 mg pro 100 ml intrazelluläre Flüssigkeit); da das Muskelgewebe etwa 40% der Körpermasse ausmacht, ist das Vorkommen von Pyridoxalphosphat in Muskel-Phosphorylase größer als in allen anderen Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen zusammen. Vitamin-B<sub>6</sub>-Mangel verursacht eine drastische Abnahme der Phosphorylaseaktivität im Muskel<sup>[60, 61]</sup>.

Eine Theorie, die erstmals eine umfassende Interpretation der Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktionen ermöglichte, stammt von *Braunstein und Shemyakin*<sup>[62]</sup>. Gleichzeitig und unabhängig publizierten *Metzler, Ikawa und Snell*<sup>[63]</sup> eine ähnliche, aber detailliertere Vorstellung: Aus *Snells* Modellversuchen ergab sich, daß für nichtenzymatische Reaktionen ein 3-Hydroxypyridin-4-carbaldehyd die Minimalstruktur ist. Im Verlauf der enzymatischen Katalyse und der analogen nichtenzymatischen Reaktion bildet die Formylgruppe mit einer Aminosäure (Substrat) eine Schiff-Base, die durch Chelatbildung mit einem Metall-Ion stabilisiert wird. Nach *Braunstein*<sup>[64]</sup> und *Snell et al.*<sup>[65]</sup> beruhen alle Pyridoxalphosphat-abhängigen Transformationen von Aminosäuren auf den speziellen Eigenschaften der enzymgebundenen protonierten Schiff-Basen, für die ein Gleichgewicht zwischen protoniertem Aldimin und Ketimin formuliert wird (siehe Abb. 1).

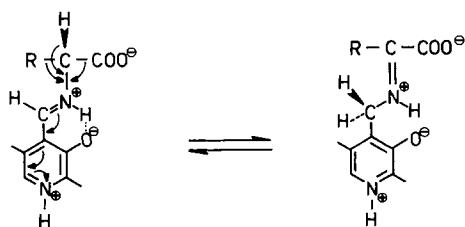


Abb. 1. Tautomerie bei protonierten Schiff-Basen aus  $\alpha$ -Aminosäuren und Derivaten von 3-Hydroxypyridin-4-carbaldehyd; die Pfeile deuten die möglichen Eliminierungsschritte an.

Die Beteiligung eines Aldimins an der Katalyse ist nicht auf Pyridoxalphosphat-haltige Enzyme beschränkt. Bei einigen Enzymen ersetzt eine Carbonylgruppe die Formylgruppe des Pyridoxalphosphats; z. B. übernimmt in der Histidin-Decarboxylase aus *Lactobacillus* und *Micrococcus* ein N-terminaler Pyruvyl-phenylalaninrest die Funktion des (über die  $\epsilon$ -Aminogruppe) enzymgebundenen Pyridoxalphosphat-lysinrestes<sup>[66]</sup>. In Aldolasen<sup>[67]</sup> und Transaldolasen<sup>[68]</sup>, der Acetoacetat-Decarboxylase<sup>[69]</sup>, der  $\delta$ -Aminolävulinäure-<sup>[70]</sup> und 2-Keto-3-desoxy-L-arabinose-Dehydratase<sup>[71]</sup> bildet eine Carbonylfunktion des Substrates ein Imin mit einer  $\epsilon$ -Aminolysinseitenkette. Die zentrale Rolle der Schiff-Base für die Katalyse konnte durch Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> erhärtet werden: Das Enzym verliert die katalytische Wirksamkeit.

Eine Klasse von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen, die  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen, zu denen auch die Glykogen-Phosphorylasen zählen, bildet jedoch eine bemerkenswerte Ausnahme. *Snell*<sup>[65]</sup> schreibt: "Phosphorylase, the most plentiful pyridoxal-P dependent enzyme of mammals does not act *via* a Schiff base mechanism as shown by the fact that the borohydride reduced enzymes still show activity" (Übersichten siehe <sup>[64, 65]</sup>).

### 2.1. Chemische Struktur des Phosphorylase-gebundenen Pyridoxalphosphats

*C. F. Cori et al.* trennten zuerst Pyridoxalphosphat von kristallinen Glykogen-Phosphorylasen *a*, *b* und *b'* aus Kaninchen-Skelettmuskel bei pH=3–4 mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ab und erhielten inaktive, kristalline, Pyridoxalphosphat-freie Apoenzyme<sup>[56]</sup>. Auf ähnliche Weise hat *Otto Warburg* 1938 Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) von einer Flavin-Dehydrogenase, dem „gelben Atmungsferment“, abgetrennt<sup>[72]</sup>. Eine hohe Ausbeute bei der Rekonstitution des Holoenzym aus Apoenzym und Pyridoxalphosphat wird jedoch nur bei der Arbeitsweise von *E. H. Fischer et al.* erhalten<sup>[73–75]</sup>. Zunächst wird die Struktur des Phosphorylase-*b*-Proteins mit Imidazoliumcitrat reversibel „deformiert“. Die freigelegte Schiff-Base des Pyridoxalphosphats kann dann stereospezifisch von L-Cystein unter Bildung eines Thiazolidins angegriffen werden. Die Ablösung gelingt unter milden Bedingungen bei pH=6.4 und 0°C während etwa 35 min. Diese Methode ermöglichte den Ersatz des natürlichen Cofaktors Pyridoxalphosphat durch chemisch modifizierte Analoga und das Studium der Eigenschaften der mit diesen Analoga rekonstituierten Phosphorylasen.

Die Art der Bindung des Cofaktors an das Phosphorylaseprotein war bis vor kurzem umstritten (siehe Abb. 2<sup>[76]</sup>). *Graves et al.*<sup>[77]</sup> sowie *Shaltiel und Cortijo*<sup>[78, 79]</sup> (siehe auch <sup>[80, 81]</sup>) nahmen an, daß die katalytisch aktive Form des Pyridoxalphosphats die Schiff-Base (4) ist, die bei 333 nm absorbiert und Tautomere (3) bildet. Nach *Kent et al.*<sup>[57]</sup> ist jedoch Pyridoxalphosphat in Phosphorylase als reduziertes und substituiertes Aldimin (2) unter Beteiligung einer unbekannten nucleophilen Gruppe XR' gebunden. Wäre diese Gruppe eine Hydroxygruppe (z. B. von Wasser), dann würde ein Aminomethanol-Derivat vorliegen, worauf *Honikel und Madsen*<sup>[82]</sup> hingewiesen haben.

Störungen der Phosphorylasestruktur durch Ansäuern, hohe Konzentrationen NaCl und/oder Kälte exponieren den Cofaktor und bringen ihn in Kontakt mit der Lösung, wobei in wäßrigen Lösungsmitteln die charakteristische Schiffba-

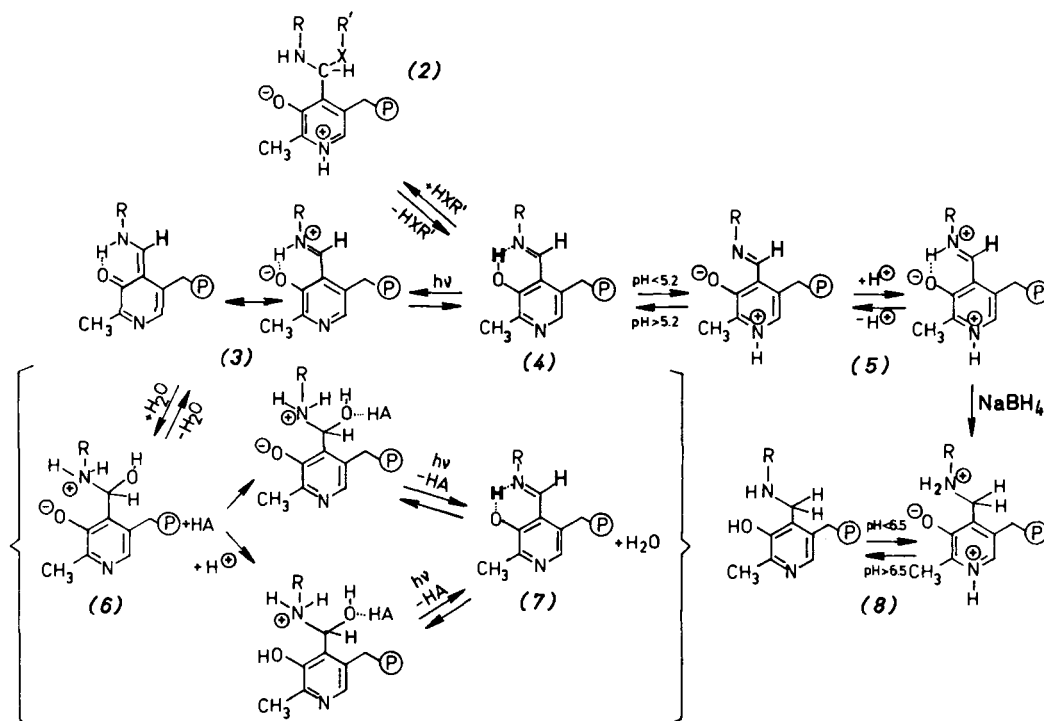


Abb. 2. Strukturen des Phosphorylase-gebundenen Pyridoxalphosphats (nach [76]). (2)–(8) siehe Text.

sen-Absorption bei 415 nm auftritt [(3) und (5)]. Die exponierte Azomethinbindung in (5) wird jetzt auch mit  $\text{NaBH}_4$  reduzierbar<sup>[2]</sup> (siehe auch [13, 83, 84]). Honikel und Madsen<sup>[82]</sup> nahmen an, daß sich die Aminomethanole (6) bei photochemischer Anregung unter Austritt von  $\text{H}_2\text{O}$  in Schiff-Basen (7) umwandeln. Die unterschiedliche Bindung des chelierenden Protons der Hydroxygruppe (fettgedruckt) in (4) und (7) beruht auf unterschiedlichen Energiepotentialen<sup>[76, 82, 85]</sup>. Die

beispielsweise eine ähnliche Absorption (290 nm) wie die  $\text{sp}^2$ -phenolische Form von Phosphorylase-gebundenem 3-*O*-Methylpyridoxalphosphat (10) (297 nm). Wir haben daher die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Schiff-Basen registriert und versucht, das Signal des „Aldehyd“-Protons mit den UV-Spektren in Beziehung zu bringen. Die chemische Verschiebung dieses Protons in DMSO (Dimethylsulfoxid) stimmte mit der in  $\text{D}_2\text{O}$  gemessenen ( $\delta = 8.9$ ) überein, was beweist, daß auch

Tabelle 1. UV-Absorptionsmaxima [nm] von Produkten aus Pyridoxalphosphat und seinen Derivaten (nach [76]). Die Messungen wurden in wäßriger Lösung bei pH = 7 durchgeführt, falls nicht anders angegeben.

Cofaktor	Reagentien für den Cofaktor und Produkte						
	L-Cystein → Thiazolidin	2-Mercaptoethanol → Hemimercaptal	$\text{H}_2\text{O}$ → Hydrat	Apoposphorylase <i>b</i> + $\text{NaBH}_4$ → reduzierte Phosphorylase <i>b</i>	<i>n</i> -Butylamin → Schiff-Base	Rinder- serum- albumin	Apoposphorylase <i>b</i> → Native Phosphorylase <i>b</i>
Pyridoxalphosphat als Phenolat	325 [148]	322 [149]	325 [150, 151]	333 [a] [152]	415 [b] [78, 153]	415 [154]	415 [a] [57]
Pyridoxalphosphat (1)	297 [c]	288 [c]	295 [150]	290 [d]	333 [c], 335 [b] [78, 153]	332 [154]	333 [a] [57]
3- <i>O</i> -Methyl- pyridoxalphosphat (10)	278 [c]	277 [c]	278	—	295 [c]	300	297

[a] pH = 5–7. [b] In Dioxan/Wasser. [c] In Dimethylsulfoxid. [d] Keine Lösungsmittel- und pH-Angaben.

Zusammenstellung der Absorptionsmaxima in Tabelle 1<sup>[76]</sup> zeigt, wie schwierig es ist, die ungewöhnlich kurzwellige Absorption des Phosphorylase-gebundenen Pyridoxalphosphats bei 333 nm durch Vergleich mit der Absorption von Schiff-Basen aus diesem Cofaktor und *n*-Butylamin zuzuordnen. Diese Absorption kann sowohl von der phenolischen Form (4) als auch von den Phenolatformen (2) und (6) herrühren. Zwar kann man durch Vergleich mit dem 3-*O*-Methyl-Analogon (10) (siehe Tabelle 2) die Phenolatform ausschließen, doch läßt sich durch UV-Spektroskopie nicht zwischen den  $\text{sp}^2$ - und  $\text{sp}^3$ -Hybriden der phenolischen Form entscheiden. Die  $\text{sp}^3$ -phenolische Form der reduzierten Phosphorylase hat

3-*O*-Methylpyridoxalphosphat und die phenolischen Formen von Pyridoxalphosphat (und Pyridoxal) Schiff-Basen bilden können. Vergleicht man das UV-Spektrum der Schiff-Base aus *n*-Butylamin und Pyridoxalphosphat in DMSO mit dem der entsprechenden Schiff-Base aus 3-*O*-Methylpyridoxalphosphat, so fällt die (hypochrome) Verschiebung (333 nm → 295 nm) auf.

Durch diese Versuche wurde bewiesen, daß Pyridoxalphosphat in der Muskel-Phosphorylase als typische Schiff-Base in der phenolischen Form vorliegt [vgl. (4)]. Sie bestätigen die Ansichten von Johnson et al.<sup>[77]</sup> sowie Shaltiel und Cortijo<sup>[78, 79]</sup>, die die ungewöhnliche Verschiebung der UV-

Absorption ins Kurzwellige (415 nm→333 nm) und die Fluoreszenz des Pyridoxalphosphats in nativer Phosphorylase auf die Protonierung der 3-Phenolatgruppe einer Schiff-Base in einer hydrophoben Umgebung zurückführen.

## 2.2. Die Position von Pyridoxalphosphat

Auch die Position des katalytischen Zentrums in der Phosphorylase war umstritten. Die ersten Röntgen-Strukturanalysen legten nahe, daß die N-terminale Domäne in der Nähe des AMP-Bindungscentrums das aktive Zentrum der Muskelphosphorylase ist. Die Nähe dieses Zentrums zu den Kontaktflächen der Untereinheiten in der gleichen Domäne war attraktiv, speziell im Hinblick auf die allosterischen Eigenschaften, die durch Wechselwirkungen der Untereinheiten induziert werden. Diese Position bot auch eine Erklärung für unsere Beobachtung, daß monomere Phosphorylase inaktiv ist<sup>[25]</sup>. Bei verbesserter Auflösung der Röntgenbeugung bis zu 3 Å und schließlich zu 2.5 Å<sup>[86,27]</sup> fand man jedoch einen zweiten (schwächeren) Bindungsbereich für den allosterischen Effektor und 5'-AMP und Bindungszentren für Glucose-1-phosphat, P<sub>i</sub> und Glucose, einen kompetitiven Inhibitor für Glucose-1-phosphat. Außerdem ließ sich Pyridoxalphosphat nun lokalisieren: Es liegt in der Nähe der anderen Bindungszentren im zentralen Bereich der Untereinheit. Das aktive Zentrum befindet sich in einer tiefen, engen Spalte etwa in der Mitte der Untereinheit, wo die drei Strukturdomänen zusammentreffen.

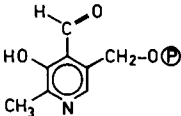
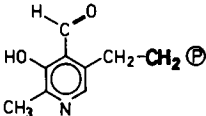
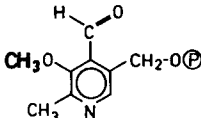
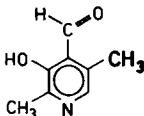
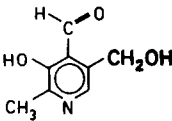
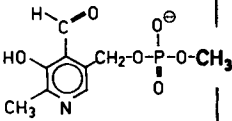
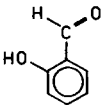
In diesem Zusammenhang sind Ergebnisse einer <sup>31</sup>P-NMR-Untersuchung unseres Arbeitskreises mit succinylierter Glykogen-Phosphorylase *b* aus Kaninchen-Skelettmuskel von Interesse, weil sie den Wert von NMR-Untersuchungen zur Sicherung der Befunde von Röntgen-Strukturanalysen zeigen. In diesem speziellen Fall konnten sie dazu beitragen, die Position von Pyridoxalphosphat zu klären<sup>[36]</sup>. Mit teilweise succinylierter, partiell dissoziierter (Monomer:Dimer=40:60) Phosphorylase *b* haben wir die Ionisierung der

Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat mit der des nativen Enzyms verglichen (Abb. 3<sup>[36]</sup>): Im succinylierten, teilweise dissoziierten Enzym liegt das <sup>31</sup>P-NMR-Signal von Pyridoxalphosphat bei  $\delta = -0.37$ , d. h. an fast der gleichen Stelle wie das Signal der protonierten Form (I) der Phosphatgruppe in der „inaktiven“ Konformation der (nativen) Phosphorylase *b* ( $\delta = -0.31$ ). Beim gegebenen pH=7.2 hätten sich mehr als 90% des Pyridoxalphosphats in die dianionische Form (III) umwandeln müssen, falls die Dissoziation in Monomere zum Kontakt mit dem Lösungsmittel führt. Die Lage des aktiven Zentrums an den Kontaktflächen der Untereinheiten im Dimer scheidet daher aus. Die Ergebnisse der <sup>31</sup>P-NMR-Untersuchungen sind daher nur mit einer Position des Cofaktors in einer vor dem Lösungsmittel geschützten Stelle im Monomer vereinbar.

## 2.3. Die für die Aktivität der Phosphorylasen nötigen funktionellen Gruppen von Pyridoxalphosphat

Bei Abspaltung von Pyridoxalphosphat dissoziiert die Phosphorylase in Monomere. Bei 35 °C ist kristalline Apophosphorylase *b* völlig monomer<sup>[87]</sup> (siehe auch <sup>[88,9]</sup>). Pyridoxalphosphat könnte demnach als struktureller Ligand die für die Regulation und Aktivität erforderliche Quartärstruktur der Glykogen-Phosphorylase stabilisieren. Wir haben diese Möglichkeit ausgeschlossen<sup>[89]</sup>: Tabelle 2 zeigt, daß die

Tabelle 2. Aktivitätsinduktion durch Aldehyde (nach [89]). Die wichtigsten Strukturänderungen sind fett gedruckt. Die Zahlen bedeuten die katalytische Aktivität eines „Dimers“ aus einem nativen Monomer und einem Monomer aus Apophosphorylase + Aldehyd.

 <p>(11), 90%.</p>	 <p>(9), 76%.</p>	
 <p>(10), 69%.</p>	 <p>(11), 45%.</p>	
 <p>(12), 50%.</p>	 <p>(13), 50%.</p>	 <p>(14), 42%.</p>

Bildung von Dimeren auch von solchen Cofaktoren bewirkt wird, die keine katalytische Aktivität ermöglichen. 50% Aktivität bedeutet, daß das Monomer mit dem inaktiven Analogon nach Hybridisierung das Monomer mit aktivem Pyrid-

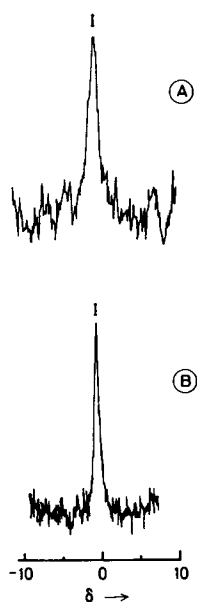


Abb. 3. <sup>31</sup>P-NMR-Spektren (72.86 MHz) von Pyridoxalphosphat in nativer (A) und succinylierter (B) Glykogen-Phosphorylase *b* aus Kaninchen-Skelettmuskel. (A) pH=7.1, Form I; (B) pH=7.23, Form I (nach [36]).

Tabelle 3. Pyridoxalphosphat-Analoga, die zur Rekonstitution und Reaktivierung von Kaninchenmuskel-Phosphorylase verwendet wurden (siehe [53]).

Nr.	Verb.	1	2	3	Änderungen an Position 4	5	6	Aktivität Bin- tät [%]	dung	Lit.
1	Apoenzym (1)							0		
2							CH <sub>3</sub>	100	+	
3	(12)					CH <sub>2</sub> OH		0	+	
4	(11)					CH <sub>3</sub>		0	+	
5						CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH		0	+	
6						CH <sub>2</sub> OSO <sub>3</sub> H		0	+	
7						CHOPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>		0	+	
8						CH <sub>3</sub>				
9	(9)					CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>		4-8	+	
10						CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>		25	+	
11						CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>		0	+	
12					CH=CH <sub>2</sub>			0	+	
13					CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>			100	+	
14					CH <sub>2</sub> -Protein			0		
15					COOH			60	+	
16	(10)			OCH <sub>3</sub>				0	+	
17			C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>					25	+	
18			H					0.5		
19		CH <sub>3</sub>						60	+	
20		→O						0		
21		→O		OCH <sub>3</sub>				0	+	[94]
22						CH <sub>2</sub> OPO <sub>2</sub> (OPO <sub>3</sub> H-Pyridoxal)H		0	+	[155]
23						CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H		0		[156]
24						CH <sub>2</sub> OPO <sub>2</sub> (OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )H		0	+	[156]
25	(13)					CH <sub>2</sub> OPO <sub>2</sub> (OCH <sub>3</sub> )H		0	+	[97]
26						CH <sub>2</sub> OPO <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )H		0	+	[156]
27						CH <sub>2</sub> OPO <sub>2</sub> [OPO <sub>2</sub> (OC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )H]H		0	+	[156]

oxalphosphat im Dimerenverband noch voll aktivieren kann.

Eine Vielzahl von Pyridoxalphosphat-Analoga, an deren Synthese E. H. Fischer et al.<sup>[90-93]</sup> maßgeblich beteiligt waren, wurden auf Bindung und Reaktivierung von Phosphorylase geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Demnach ist nur beim Stickstoffatom und bei der 5'-Phosphatgruppe die Beteiligung an der Katalyse der  $\alpha$ -1,4-Glucan-Phosphorylasen nicht auszuschließen (siehe auch [53]). Das Stickstoffatom des Pyridinrings scheint aber nur wie die Formylgruppe ein Ankerpunkt zu sein; wenn es z. B. durch eine Methylgruppe quaterniert wird (Nr. 19), kann sich der Cofaktor nicht mehr an das Apoenzym binden<sup>[92]</sup>. Das N-Oxid-Analogon (Nr. 21) des partiell aktiven 3-O-Methylpyridoxalphosphats (10) läßt eine Rekonstitution zu, aber das rekonstituierte Enzym ist inaktiv<sup>[94]</sup>. Eine Beteiligung des Stickstoffatoms ( $pK = 8.7$ <sup>[95]</sup>) an der Katalyse ist aber trotzdem unwahrscheinlich, da die Erniedrigung der Basizität durch ein Fluoratom in Position 6 oder durch Methylierung der 3-OH-Gruppe noch toleriert wird<sup>[92,96]</sup>. Eine direkte Beteiligung der Phosphatgruppe des Pyridoxalphosphats als Reaktand bei der Phosphorolyse wurde bereits durch Illingworth et al.<sup>[88]</sup> (siehe auch [37,56]) ausgeschlossen; P<sub>i</sub>-Glucose-1-phosphat-Austausch mit der 5'-Phosphatgruppe des Cofaktors wird nicht beobachtet. Jedoch wird der Cofaktor inaktiv, wenn a) die Phosphatgruppe fehlt, b) die Phosphatgruppe durch andere Säuregruppen mit anderen pK-Werten ersetzt wird, c) die Konformation der Phosphatgruppe geändert wird oder d) die zweite protonierbare Gruppe des Phosphatrestes wie im von uns synthetisierten Pyridoxalphosphat-monomethylester (13) blockiert ist<sup>[94,97]</sup>.

Graves et al.<sup>[98]</sup> haben die bemerkenswerte Beobachtung gemacht, daß mit Pyridoxal (12) rekonstituierte Kaninchen-skelettmuskel-Phosphorylase b in Anwesenheit einer hohen Phosphat-Konzentration (50 mM) einige Prozent der enzy-

matischen Aktivität des nativen Enzyms bei Synthese (und Abbau) von Glykogen entwickelt. Die Aktivität dieser Pyridoxal-haltigen Phosphorylase beträgt mit Phosphat 6%, mit Phosphit und Fluorophosphat 8% und mit Arsenat 3% der Aktivität von nativer Phosphorylase b. Thiophosphat, Hydrogencarbonat und Pyrophosphat hemmen stark, Sulfat und Nitrat schwächer. Pyrophosphat wird stöchiometrisch (ein Anion pro Untereinheit) gebunden und blockiert die Bindungsstelle für Phosphat, Phosphit, Fluorophosphat und Glucose-1-phosphat. Anionen, die in mit Pyridoxal rekonstituierter Phosphorylase b enzymatische Aktivität induzieren, scheinen sich an die Stelle zu binden, die von der 5'-Phosphatgruppe des natürlichen Cofaktors eingenommen wird. Diese Annahme von Parrish et al.<sup>[98]</sup> wird durch Versuche unserer Gruppe bekräftigt, nach denen mit Pyridoxalphosphat-monomethylester (13) rekonstituierte Phosphorylase auch in Gegenwart von 100 mmol/l Phosphat nicht aktiv wird, vermutlich, weil der inaktive Ester (13) das für die Katalyse notwendige Phosphatbindungszentrum des Cofaktors blockiert<sup>[98a]</sup>.

Da die Bindungskonstanten von Fluorophosphat und Phosphat sich nicht unterscheiden, nahmen Parrish et al.<sup>[98]</sup> an, daß beide Ionen als Dianionen  $FPO_3^{2-}$  bzw.  $HOPO_3^{2-}$  gebunden werden. Diese Annahme wird durch <sup>31</sup>P-NMR-Messungen unseres Arbeitskreises insoweit gestützt, als wir fanden, daß die 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in nativer, enzymatisch aktiver Phosphorylase als Dianion vorliegt<sup>[99-101]\*</sup>.

[\*] Die teilweise Aktivierung (8%) des Pyridoxalenzym mit Fluorophosphat, das einen viel niedrigeren pK-Wert ( $pK_{11} = 4.8$ ) als Phosphat hat ( $pK_{11} = 7.2$ ), ist nicht geklärt. Dieser pK-Wert ist nicht mit einer Funktion von Fluorophosphat als Protonenacceptor im pH-Bereich vereinbar, in dem Muskel-Phosphorylase aktiv ist. In diesem Zusammenhang muß auch Hefe-Phosphorylase erwähnt werden, weil deren pH-Optimum bei 5.8 liegt [102]. Das pH-Optimum der Muskel-Phosphorylasen liegt abhängig von Puffer und Bedingungen etwa bei 6.2 [17].

## 2.4. Funktion von Pyridoxalphosphat bei der allosterischen Regulation

Monod et al.<sup>[103]</sup> ordneten Phosphorylase *b* der Klasse der allosterisch regulierten Enzyme zu. Nach Monods Vorstellung gehört Phosphorylase *b* zu den „K“-Systemen und liegt in einer inaktiven T- und einer aktiven R-Form vor. Der allosterische Effektor, 5'-AMP, bindet sich an die R-Form. 1964 fanden Helmreich und Cori<sup>[104]</sup> mit kristalliner Kaninchenmuskel-Phosphorylase *b* positiv kooperative und reziproke, homotrope und heterotrope Wechselwirkungen zwischen Substraten und AMP und konnten somit erklären, warum 5'-AMP für die Aktivierung von Phosphorylase *b* nötig ist. Seitdem wurden mehrere Nucleotide und deren Analoga als allosterische Effektoren der Phosphorylase *b* geprüft<sup>[105–108]</sup>.

Mit AMP und IMP entstehen verschiedene Enzym-Konformere, die in unterschiedlichen Raumgruppen kristallisieren. Die Verfügbarkeit des IMP-Komplexes war schließlich für den Erfolg der Röntgen-Strukturanalyse ausschlaggebend. In Anwesenheit von 2 mM IMP kristallisiert Phosphorylase *b* tetragonal mit nur einer Untereinheit pro asymmetrischer Einheit<sup>[29]</sup>. Die Bindungszentren für den regulatorischen positiven Effektor liegen im N-terminalen Segment der Polypeptidkette, während das katalytische Zentrum einem anderen („schweren“) Segment (HS) zugeordnet wird. Beide Kettenteile sind lose über ein Segment verknüpft, das proteolytischen Enzymen leicht zugänglich ist. Die Einzelschritte der Konformationsumwandlungen als Folge der Wechselwirkungen von Muskel-Phosphorylase *b* und dem physiologischen Aktivator AMP sind auf molekularer Ebene noch nicht geklärt, doch können rasche Fortschritte erwartet werden, sobald die Strukturen der Konformere im Kristall (Röntgen-Strukturanalyse) und in Lösung (NMR-Spektren) verglichen werden können<sup>[36]</sup> (siehe<sup>[109,110]</sup>).

Im hier behandelten Zusammenhang interessiert die komplexe allosterische Regulation nur insofern, als die Beschäftigung mit einer möglichen strukturellen Funktion von Pyridoxalphosphat als Voraussetzung für die Regulierbarkeit der Anlaß für einen von uns (*E. H.*) war, eine katalytische Beteiligung des Cofaktors zu erwägen. Wir<sup>[9,10]</sup> untersuchten die allosterischen Konformationsänderungen inaktiver Apophosphorylase *b* und der mit Pyridoxal (12) und 5'-Desoxy-pyridoxal (11) rekonstituierten Phosphorylase als Folge der AMP-Bindung und konnten u. a. zeigen, daß diese beiden inaktiven Derivate von Phosphorylase *b* den Effektor AMP noch allosterisch binden können. Diese Befunde wurden von Feldmann mit einer neuen Dialysemethode an der inaktiven, mit Pyridoxalphosphat-monomethylester (13) rekonstituierten Phosphorylase *b* überprüft, deren 5'-Phosphatgruppe bei  $pK=6.2$  nicht mehr protonierbar ist<sup>[111]</sup>. Obwohl dieses Phosphorylase-*b*-Derivat ebenso wie dasjenige mit 5'-Desoxypyridoxal (11) inaktiv ist, bindet es noch 5'-AMP wie das aktive Enzym positiv kooperativ mit einem Hill-Koeffizienten von etwa 2.0. Auch das Sedimentationsverhalten der inaktiven Phosphorylase-*b*-Derivate mit den Analoga (11), (12) und (13) in der analytischen Ultrazentrifuge gleicht dem der aktiven, nativen Phosphorylase *b*, unterscheidet sich aber von dem der (monomeren) Apophosphorylase *b*<sup>[10,97,112]</sup>. Als wertvolle Hilfe für einen Strukturvergleich von Phosphorylase-Derivaten erwiesen sich Untersuchungen im Würzburger Laboratorium von Weisshaar und Palm<sup>[113,114]</sup>, die den Was-

serstoff-Tritium-Austausch bei der Rekonstitution von Apophosphorylase *b* mit Pyridoxalphosphat und dessen Analoga untersuchten. Diesen Experimenten lagen die Beobachtungen von Hvidt und Nielsen<sup>[115]</sup> zugrunde, daß verschiedene Konformationen eines Proteins durch die Anzahl der austauschenden Wasserstoffatome und die Austauschgeschwindigkeit unterschieden werden können. Die Austauschgeschwindigkeiten von Phosphorylase-*b*-Derivaten, die mit Pyridoxalphosphat-monomethylester (13) rekonstituiert worden waren, lagen in der gleichen Größenordnung wie die nativer Phosphorylase *b*. Hieraus möchte man schließen, daß dieses Analogon eine ähnliche Konformationsänderung induziert wie der natürliche Cofaktor Pyridoxalphosphat<sup>[113,114]</sup>.

Diese Untersuchungen haben somit in speziellen Fällen wahrscheinlich gemacht, daß die 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat für die allosterische Regulierbarkeit der oligomeren Phosphorylase des tierischen Muskels entbehrlich ist. Wie der Wasserstoff-Tritium-Austausch lehrt, scheint das durch Ersatz des natürlichen Cofaktors Pyridoxalphosphat mit dem Ester (13) erhaltene inaktive Phosphorylase-*b*-Derivat ebenso effektiv Protonen in der hydrophoben Umgebung der Cofaktorbinderungsstelle einzufangen wie Pyridoxalphosphat im aktiven natürlichen Holoenzym<sup>[113,114]</sup>. Trotzdem ist das Pyridoxalphosphat-monomethylester (13) enthaltende Enzym inaktiv. Einer von uns (*E. H.*) hat daher bereits 1968 vorgeschlagen: „If one wishes to consider an additional role for the prosthetic group of phosphorylase, attention obviously centers on the 5'-phosphate group of pyridoxal 5'-phosphate, since the phosphate group is apparently essential for catalytic activity, whereas its role with respect to the allosteric properties of the enzyme protein is permissive“<sup>[9]</sup>. Die Beobachtung der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in ihrer natürlichen Umgebung war aber erst möglich, als ein hochauflösendes NMR-Spektrometer für Fourier-Transform-Messungen der <sup>31</sup>P-Resonanz zur Verfügung stand.

## 2.5. Änderung der Ionisation der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat beim Übergang von inaktiver zu aktiver Phosphorylase

Feldmann und Hull<sup>[99]</sup> haben durch <sup>31</sup>P-NMR-Untersuchungen gezeigt, daß 5'-AMP im Zusammenspiel mit einem anionischen Substrat die Deprotonierung der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in der Kaninchen skelettmuskel-Phosphorylase *b* ermöglicht (Abb. 4<sup>[99]</sup>). Die schwächere Wirkung von AMP allein (in Abwesenheit anionischer Substrate) erklärt sich aus den allosterischen Eigenschaften von Phosphorylase *b*: Das anionische Substrat verstärkt die Bindung des Effektors zur Muskel-Phosphorylase *b*, wie Helmreich und Cori<sup>[104]</sup> gezeigt haben. 5'-AMP hat eine Aktivierungskonstante ( $K_a$ ) von etwa  $3 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-4}$  M ohne und von  $4 \times 10^{-5}$ – $10 \times 10^{-5}$  M mit anionischem Substrat. Arsenat kann Phosphat ersetzen. Die Festigung des AMP-Phosphorylase-Komplexes durch Arsenat verschiebt das <sup>31</sup>P-NMR-Signal in Pyridoxalphosphat von etwa  $\delta = -0.2$  nach  $-3.6$ . Eine gute Trennung der <sup>31</sup>P-NMR-Signale von AMP und Pyridoxalphosphat war durch Ersatz von AMP durch AMP-S möglich, dessen Signal um etwa 40 ppm zu tieferem Feld verschoben ist. AMP-S ist sogar ein wirksamerer allosteri-

scher Effektor der Phosphorylase *b* als AMP<sup>[116,117]</sup>. Nach Zugabe von Arsenat und Verfestigung der Bindung des Nucleotids (AMP-S) an Phosphorylase *b* liegt Pyridoxalphosphat fast ausschließlich in der dianionischen Form III ( $\Delta\nu=60$  Hz) vor.  $K_d(=k_{-1}/k_1)$  für den AMP-S-Phosphorylase-*b*-Komplex mit Arsenat beträgt etwa  $1 \times 10^{-4}$  M und stimmt mit den publizierten  $K_d$ -Werten für AMP und Phos-

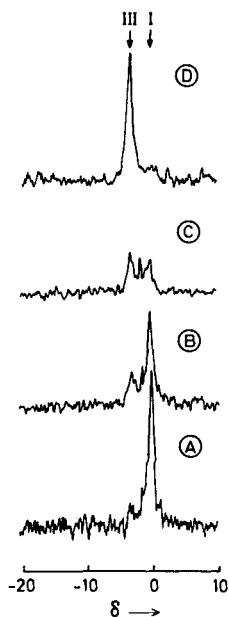


Abb. 4. Einfluß von AMP-S (Adenosin-5'-monothiophosphat) auf das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum (72.86 MHz) von Pyridoxalphosphat in nativer (D) und succinylierter (A, C) Kaninchenmuskel-Phosphorylase *b* (nach [36]). (A) ohne AMP-S und Arsenat, pH=7.12; (B) 0.7 mM AMP-S, pH=7.05; (C) 0.7 mM AMP-S und 30 mM Arsenat, pH=7.29; (D) 1.5 mM AMP-S und 36 mM Arsenat, pH=7.1. Die zwischen den Formen I und III liegende Resonanz in (B) und (C) wird wahrscheinlich durch eine (phosphathaltige) Verunreinigung verursacht.

phorylase *b* in Anwesenheit von Phosphat oder Arsenat überein<sup>[104]</sup>. Das <sup>31</sup>P-NMR-Signal des Phosphorylase-*b*-gebundenen Pyridoxalphosphats im inaktiven Zustand ohne Substrat und Effektor kann der protonierten Form I zugeschrieben werden. Zugabe von AMP oder AMP-S in Anwe-



Form I, inaktiv



Form III, aktiv

senheit hoher Arsenat-Konzentrationen bewirkt Umwandlung zur aktiven Konformation, die durch den Übergang des Cofaktorphosphats von Form I in Form III signalisiert wird. Die chemische Verschiebung entspricht der dianionischen Form der Pyridoxalphosphat-Schiff-Base. Mit Phosphorylase-*b*-Kinase,  $\text{Mg}^{2+}$  und ATP- $\gamma$ -S entstand ein aktives Phosphorylase-*a*-Derivat, das Thiophosphoserinreste enthält. Das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum dieses Phosphorylase-*a*-Präparates bei pH=7.7 stimmte bezüglich chemischer Verschiebung und Linienbreite ( $\Delta\nu=60$  Hz) mit dem des Phosphorylase-*b*-AMP-S-Komplexes in 50 mM Arsenat überein, d. h. die Resonanz war hauptsächlich Form III und einer kleineren Menge Form I zuzuordnen (Abb. 5A<sup>[99]</sup>). Nach Zugabe von

AMP-S (1 AMP-S pro Bindungszentrum) wird auch die restliche Form I in Form III umgewandelt (Abb. 5B). Hier sei

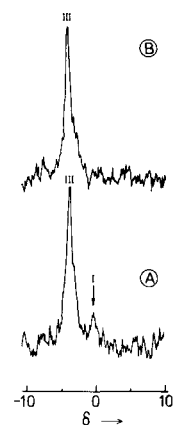


Abb. 5. <sup>31</sup>P-NMR-Spektren (72.86 MHz) von Pyridoxalphosphat in nativer Kaninchenmuskel-Phosphorylase *a* (nach [99]). (A) ohne AMP-S; (B) mit 0.35 mM AMP-S, pH=7.7.

daran erinnert, daß Muskel-Phosphorylase *a* auch ohne AMP aktiv ist, Phosphorylase *b* dagegen nur mit AMP. Diese Befunde wurden kürzlich mit succinylierter, teilweise dis-

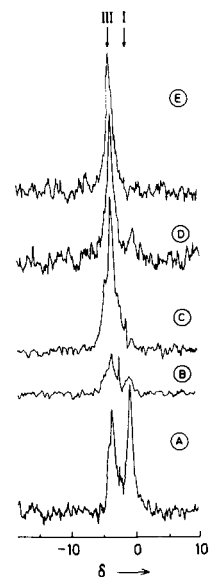


Abb. 6. <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch beobachtete Unterschiede in der Ionisation von Pyridoxalphosphat in succinylierter (A, B) und nativer (C-E) Kaninchen-Skelettmuskel-Phosphorylase *a* (nach [36]). (A) Restaktivität 12%, pH=7.35; (B) wie in A, aber mit 1.17 mM AMP-S (3 mol/mol Monomer); (C) pH=6.5; (D) pH=7.67; (E) wie in D, aber mit 0.35 mM AMP-S (1.3 mol/mol Monomer).

sozierter Phosphorylase *b* bestätigt (Abb. 6<sup>[36]</sup>). Die Umwandlung der inaktiven, protonierten Form I in die aktive, dianionische Form III, die durch das Nucleotid (AMP-S) induziert wird, ist bei der succinylierten Phosphorylase *b* nicht vollständig. Es wird etwa nur halb so viel Form III wie unter vergleichbaren Bedingungen bei nativer Phosphorylase *b* gebildet. Ebenso ist die Umwandlung der inaktiven Form I in die dianionische Form III in der succinylierten Phosphorylase *a* gestört<sup>[36]</sup>.



Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Untersuchungen von *Feldmann* und *Hull*<sup>[99]</sup> mit den kompliziert regulierten Skelettmuskel-Phosphorylasen *b* und *a* haben gezeigt, daß die Phosphatgruppe beim Übergang von der inaktiven in die aktive Form deprotoniert wird. Das entspräche im wäßrigen Milieu einer Verminderung des pK-Wertes um mindestens drei Einheiten (Verschiebung ins Saure) und demnach etwa der freien Energie ( $\approx 3.9$  kcal/mol), die für Bildung und Lösung einer  $\alpha$ -glykosidischen Bindung oder für die Hydrolyse eines Zuckerphosphates benötigt wird.

Zwar wären solche Reaktionen mit einer katalytischen Funktion der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat als Protonenacceptor in den  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen vereinbar, doch geben die Versuche keine weitergehende Auskunft, wie das dianionische Phosphat am katalytischen Geschehen teilnehmen könnte. Tiefere Einblicke ermöglichten erst  $^{31}\text{P}$ -NMR-Untersuchungen in jüngster Zeit mit nichtregulierten *E. coli*-<sup>[100]</sup> und Kartoffel-Phosphorylasen<sup>[101]</sup> nach Bindung von Glucose, Oligosacchariden und Arsenat, die im folgenden besprochen werden.

## 2.6. Wie greift die Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in die Katalyse ein?

Kristallstrukturuntersuchungen wurden bisher nur an „inaktiven Konformeren der gut charakterisierten, kristallinen Kaninchenskelettmuskel-Phosphorylasen *b* und *a* durchgeführt<sup>[28,27]</sup>. Wir haben  $^{31}\text{P}$ -NMR-Untersuchungen mit Phosphorylasen begonnen, deren Aktivität weder kovalent noch allosterisch kontrolliert wird und die wir rein, kristallin und in ausreichenden Mengen herstellen können<sup>[8,100,101]</sup>. Native Kartoffel-Phosphorylase zeigt ein  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signal bei  $\delta = -4.5$  mit einer Linienbreite von  $\Delta\nu = 35$  Hz (Abb. 7A<sup>[101]</sup>). Kartoffel-Phosphorylase und Muskel-

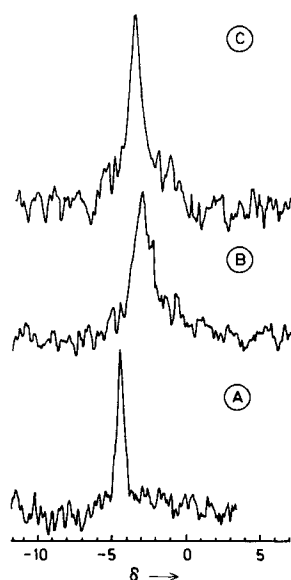


Abb. 7.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (72.86 MHz) von Pyridoxalphosphat in Kartoffel-Phosphorylase. pH-Wert bei allen Versuchen 6.5; (A) ohne Liganden; (B) mit 90 mM Glucose; (C) mit 90 mM Glucose und 100 mM Arsenat (nach [101]).

phosphorylase haben ähnliche Molekulargewichte (103000 bzw. 97412<sup>[4,6,7]</sup>), doch ist die Linienbreite des Pyridoxal-

phosphat-Signals der Kartoffel-Phosphorylase wesentlich geringer als bei der Muskel-Phosphorylase ( $\Delta\nu = 60$  Hz), was auf eine erhöhte Mobilität der 5'-Phosphatgruppe um die C—O-Bindung schließen läßt. Eine vergleichbar kleine Linienbreite ( $\Delta\nu = 35$  Hz) findet man auch bei *E. coli*-Maltodextrin-Phosphorylase, deren Molekulargewicht (83000 pro Untereinheit) allerdings kleiner ist<sup>[8]</sup>. Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signal der Kartoffel-Phosphorylase war im pH-Bereich von 6.3 bis 7.8 pH-unabhängig (als Beispiel derartiger Kurven siehe Abb. 11). Dies deutet auf eine vom Lösungsmittel abgeschirmte Bindungsstelle hin. In Analogie zur Muskel-Phosphorylase führen wir das Signal bei  $\delta = -4.5$  auf eine dianionische Form der 5'-Phosphatgruppe zurück. Das entsprechende Signal des Muskelenzyms tritt bei  $\delta = -3.76$  auf (Abb. 6C und 6D). Diese Verschiebung könnte entweder durch eine Veränderung des O—P—O-Winkels verursacht sein – bedingt durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Protein – oder Unterschiede in der hydrophoben Abschirmung der 5'-Phosphatgruppe in Muskel- und Kartoffel-Phosphorylase widerspiegeln<sup>[118–120]</sup>. Das wird später diskutiert. In Gegenwart von Arsenat als Substrat-Analogen, aber auch divalenter Ionen wie Sulfat und Methylphosphonat, die keine Substrate sind, wird das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signal des Cofaktors in Kartoffel-Phosphorylase konzentrationsabhängig zu höherem Feld verschoben. In Gegenwart von 30 mM Arsenat liegt das austauschverbreiterte Signal bei  $\delta = -3.98$  und hat eine Linienbreite von 50 Hz. Bei Sättigung mit Arsenat (60 mM) wird das Signal schärfer (Linienbreite 40 Hz) und zusätzlich nach  $\delta = -3.75$  verschoben<sup>[101]</sup>. Bisher haben wir keine befriedigende Erklärung für diese kleinen, aber reproduzierbaren und konzentrationsabhängigen Effekte gefunden, vor allem deshalb, weil auch divalente Anionen wirksam sind, die keine Substrate sind (siehe auch<sup>[99]</sup>).

Besonderes Interesse beanspruchen Änderungen der Ionisation der 5'-Phosphatgruppe des Cofaktors in Kartoffel-Phosphorylase nach Bindung von Glucose und Oligosacchariden: In Muskel-Phosphorylase *a* bindet sich Glucose (frei oder mit Phosphat verestert) an das  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat-Bindungszentrum<sup>[121]</sup>. Da Glucose auch in Kartoffel-Phosphorylase ein kompetitiver Hemmstoff für  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat ist, nehmen wir an, daß sich Glucose in diesem Enzym ebenfalls nur an das Glucose-1-phosphat-Bindungszentrum anlagert. Röntgen-Strukturuntersuchungen bei einer Auflösung von 2.5 Å ermöglichten bei Muskel-Phosphorylasen die Zuordnung der anionischen Substrate  $\text{P}_i$ , Arsenat, Glucose-1-phosphat und des Inhibitors Glucose zum aktiven Zentrum.

Substrate und Inhibitor werden nur wenige Å von der 5'-Phosphatgruppe in Pyridoxalphosphat entfernt gebunden<sup>[27,28,86]</sup>. Allerdings beruht die Annahme einer weitgehenden Ähnlichkeit der Raumstruktur des katalytischen Zentrums der Muskel-Phosphorylase und der nicht regulierten *E. coli*-Maltodextrin- und Kartoffel-Phosphorylasen bisher nur auf Sequenzhomologien (siehe Tabelle 4 und<sup>[8]</sup>) und ist solange nicht bewiesen, bis Röntgen-Strukturdaten vorliegen. Mit den Arbeiten ist begonnen worden<sup>[121a]</sup>.

Versuche mit Glucose sind auch deshalb von Interesse, weil Kaninchenmuskel-Phosphorylase *a*, deren Raumstruktur am eingehendsten untersucht wurde, als Glucosekomplex in der tetragonalen „T“-Struktur vorliegt<sup>[122]</sup>. Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signal von Pyridoxalphosphat in Kartoffel-Phosphorylase wird in Gegenwart von 90 mM Glucose um 1.5 ppm zu höhe-

rem Feld ( $\delta = -3.0$ ) verschoben und ist deutlich linienverbreitert (vgl. Abb. 7A und 7B)<sup>[101]</sup>. Vernachlässigt man durch Glucose induzierte Konformationsänderungen, für die es bisher bei Kartoffel-Phosphorylase keine Anhaltspunkte gibt, ließe sich die Hochfeldverschiebung durch Änderung des pK-Wertes der 5'-Phosphatgruppe erklären. Mit 90 mM Glucose und 100 mM Arsenat wird das Signal nach tieferem Feld ( $\delta = -3.45$ ) verschoben. Die Linienbreite wird geringer ( $\Delta\nu = 65$  Hz; Abb. 7C). In Analogie zur  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopisch verfolgten Titration einer Schiff-Base aus Pyridoxalphosphat und  $\epsilon$ -Aminohexansäure in wässriger Lösung (vgl. Abb. 11) würde man folgern, daß Arsenat die durch Glucose protonierte Phosphatgruppe des Cofaktors wieder teilweise deprotoniert und mobilisiert. Die Verschiebung des Protonierungsgleichgewichtes auf die Seite der Deprotonierung scheint spezifisch zu sein. Weder Sulfat noch Methylphosphonat sind wirksam. Jedoch sind Sulfat,  $\text{pK}_{\text{II}} = 1.9$ , und Methylphosphonat,  $\text{pK}_{\text{II}} = 7.8$ , keine Substrate, doch ist Methylphosphonat ein kompetitiver Inhibitor für Phosphat. Bei der aktiven, mit Pyridoxal-5'-desoxymethylenphosphonat (9) rekonstituierten Kaninchenmuskel-Phosphorylase *a* wandelt Glucose die „aktive“ dianionische Form III (R-Form) teilweise in die „inaktive“ protonierte Form I (T-Form) um (vgl. Abb. 8<sup>[36,121]</sup>). Zwar fehlt, wie zu erwarten,

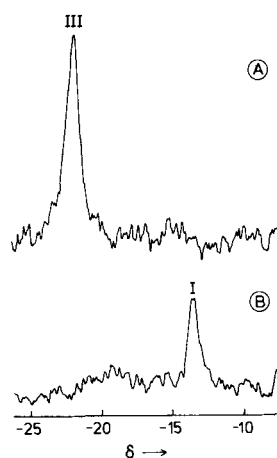


Abb. 8.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (72.86 MHz) von Pyridoxal-5'-desoxymethylenphosphonat (9) in Kaninchenmuskel-Phosphorylase *a*. (A) pH = 7.07; ohne Glucose; (B) wie in A, aber mit 100 mM Glucose (nach [36]).

dieser allosterische Übergang in Kartoffel-Phosphorylase, doch findet in beiden Phosphorylasen – der Skelettmuskel- und der Kartoffel-Phosphorylase – in Anwesenheit von Glucose ein schneller Austausch der dianionischen Form III des Phosphats im Cofaktor mit einer unbekannten, beweglichen Form statt<sup>[\*]</sup>.

[\*] Die Zuordnung des Cofaktorphosphats zu Form I und III wurde bei der aktiven, mit Pyridoxal-5'-desoxymethylenphosphonat (9) rekonstituierten Phosphorylase *a* aufgrund der Analogie mit dem Verhalten von Pyridoxalphosphat (1) in nativer Kaninchenmuskel-Phosphorylase *a* vorgenommen. Bei der Titration einer Modell-Schiff-Base aus (1) und  $\epsilon$ -Aminohexansäure im wässrigen Lösungsmittel (Abb. 11) verschieben sich allerdings die Signale der dianionischen und der monoprotinierten Formen weniger stark und in entgegengesetzter Richtung als bei (9) in Phosphorylase *a*. Diese Unterschiede bedürfen weiterer Untersuchungen. Sie sprechen dafür, daß (9) eine andere Geometrie als (1) in der aktiven Muskel-Phosphorylase hat. Darüber hinaus sind diese Resultate von allgemeinem Interesse im Hinblick darauf, wie die Geometrie der Phosphatgruppe des Cofaktors im Enzym die chemischen Verschiebungen beeinflusst.

In der *E. coli*-Maltodextrin-Phosphorylase läßt sich im Gegensatz zur Kartoffel- und Muskel-Phosphorylase die 5'-Phosphatgruppe des Cofaktors in Abwesenheit von Substraten oder Substrat-Analoga pH-abhängig titrieren<sup>[100]</sup>. Wie

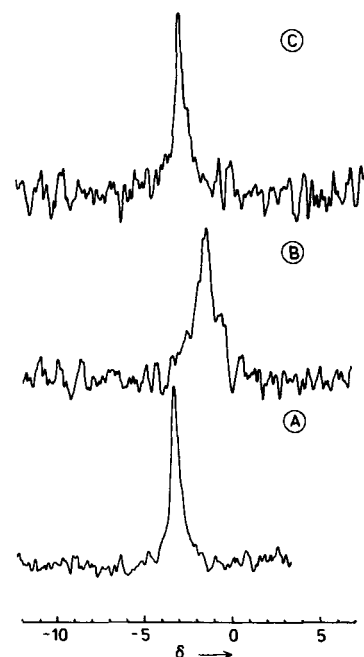


Abb. 9.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (72.86 MHz) von Pyridoxalphosphat in *E. coli*-Maltodextrin-Phosphorylase. (A) pH = 6.92, ohne Liganden; nur in diesem Falle ist die chemische Verschiebung pH-abhängig (siehe Abb. 11). (B) pH = 6.59, mit 100 mM Glucose; (C) pH = 7.05, mit 50 mM Glucose und 100 mM Arsenat (H. W. Klein, unveröffentlichte Versuche).

wir anschließend zeigen (vgl. Abb. 11), verhält sich die Phosphatgruppe wie die Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in *E. coli*-D-Serin-Dehydratase<sup>[123]</sup>. Mit Glucose beobachtet man aber auch bei *E. coli*-Phosphorylase eine chemische Verschiebung zu höherem Feld; die 5'-Phosphatgruppe des Cofaktors wird protoniert und damit pH-unabhängig (vgl. Abb. 9A und 9B). Mit Arsenat und Glucose werden die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der *E. coli*-Maltodextrin- und der Kartoffel-Phosphorylase zumindest qualitativ ähnlich. Beide Spektren deuten auf ein Gleichgewicht zwischen monoprotinierten und dianionischer Form (vgl. Abb. 7C und 9C). Unter diesen Bedingungen ist auch bei Maltodextrin-Phosphorylase das Ionisationsgleichgewicht im Bereich von 100–75% der enzymatischen Aktivität bei pH = 6.1–7.4 pH-unabhängig<sup>[\*]</sup>.

$\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen benötigen (im Gegensatz zu Saccharose-Phosphorylase<sup>[124]</sup>) ein Oligosaccharid als Primer<sup>[125]</sup> (siehe aber auch<sup>[126,127]</sup>). Tierische Phosphorylasen bevorzugen  $\alpha$ -1,6-verzweigte  $\alpha$ -1,4-Polysaccharide, Glykogen und Amylopektin, Maltodextrin-Phosphorylasen aus *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* dagegen nicht verzweigte  $\alpha$ -Glucane, Maltodextrine und Amylose<sup>[8,37,46,47]</sup>. Kartoffel-Phosphorylase macht zwischen verzweigten und nichtverzweigten Polysacchariden keinen Unterschied<sup>[6,7]</sup>. Durch Röntgen-Strukturanalyse<sup>[27,30,86]</sup> wurde in den Muskel-Phosphorylasen *a* und *b* eine Oligosaccharid-Bindungsstelle ge-

[\*] Das pH/Aktivitäts-Profil der *E. coli*-Maltodextrin-Phosphorylase ist von der Natur der Pufferbase und der Richtung der Reaktion (Synthese oder Abbau) abhängig. Die Angaben gelten bei Verwendung von [4-(2-Hydroxyethyl)piperazin]ethansulfonsäure (HEPES) als Puffer und für die Synthese.

funden, die 33–25 Å vom katalytischen Zentrum entfernt ist. *Kasvinsky et al.*<sup>[128]</sup> bezeichnen diese Stelle als Glykogenspeicherstelle, da sie die Bindung des Enzyms an die Glykogenpartikel der lebenden Zelle bewirken soll<sup>[129–131]</sup>. Da die Glykogenspeicherstelle in der regulatorischen Domäne und entfernt vom katalytischen Zentrum liegt, ist ihre Beteiligung an der Glykogenaktivierung der Phosphorylasen wahrscheinlich, die zur Bildung der aktiven Dimere und zu heterotroper Kooperativität mit Bindungsstellen anderer Substrate und der Bindungsstelle des allosterischen Effektors AMP führt; eine Funktion der Glykogenspeicherstelle bei der Katalyse ist unwahrscheinlich, auch wenn im Kristall bisher noch kein Oligosaccharid oder Glykogen im katalytischen Zentrum entdeckt werden konnte. *Kasvinsky et al.*<sup>[128]</sup> postulieren ein kinetisches Modell, das verlangt, daß zuerst die Glykogenspeicherstelle besetzt sein muß, bevor Heptaamylose (oder Glykogen) sich an das aktive Zentrum (in Abwesenheit von Glucose-1-phosphat) binden kann. Eine „compulsory order of addition“ für Glykogen haben *Michaelides* und *Helmreich* aufgrund der Schutzwirkung von Glykogen gegen Hemmung durch Anti-Phosphorylase-Fab-Fragmente postuliert<sup>[132, 133]</sup>. Ersetzt man Glucose, die nur eine geringe Affinität zur Kartoffel-Phosphorylase besitzt, durch 1 mM Heptaamylose (1 mM = 1/90 der Glucose-Konzentration), so beobachtet man im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum bei pH=6.5 das ursprüngliche, vor der Zugabe des Oligosaccharids auftretende Signal (Abb. 10A) und ein um etwa 4 ppm zu höherem Feld verschobenes Signal (Abb. 10B)<sup>[101]</sup>. Linienbreite und Auflö-

nat und Glucose, und man erhält ein ähnliches Spektrum wie mit Glucose und Arsenat (vgl. Abb. 7C und 10D).

Wir konnten durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie zeigen, daß Glucose in *E.-coli*-Maltodextrin-Phosphorylase und Glucose sowie Oligosaccharide in Kartoffel-Phosphorylase den pK-Wert der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat ändern. Diesen Effekt kann man als Protonierung der 5'-Phosphatgruppe interpretieren. An Kartoffel-Phosphorylase konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Protonierung von der Oligosaccharid-Konzentration abhängt. Die partielle Protonierung scheint spezifisch, da weder 2-Desoxy-D-Glucose noch D-Glucose die Ionisation der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat beeinflussen. Gegen eine ausschließlich oder hauptsächlich ligandeninduzierte Ionisationsänderung durch Strukturanpassung im Bereich des aktiven Zentrums („induced fit“)<sup>[134]</sup> spricht u. a., daß Cyclodextrine, die gebunden werden und bezüglich Glykogen und Oligosacchariden kompetitive Inhibitoren, aber keine Substrate der Kartoffel-Phosphorylase sind<sup>[135]</sup>, die Ionisation der 5'-Phosphorgruppe nicht ändern. Werden aber Arsenat und Glucose oder Heptaamylose zugegeben, stellt sich schnell ein Gleichgewicht zwischen protonierter und dianionischer Form der 5'-Phosphatgruppe des Cofaktors ein (vgl. Abb. 7 und 10). Will man jedoch die Änderung der Protonierung der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat als Protonentransfer bei der Katalyse interpretieren, so muß man die Funktion der 5'-Phosphatgruppe bei der Katalyse der klassischen Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzyme kennen.

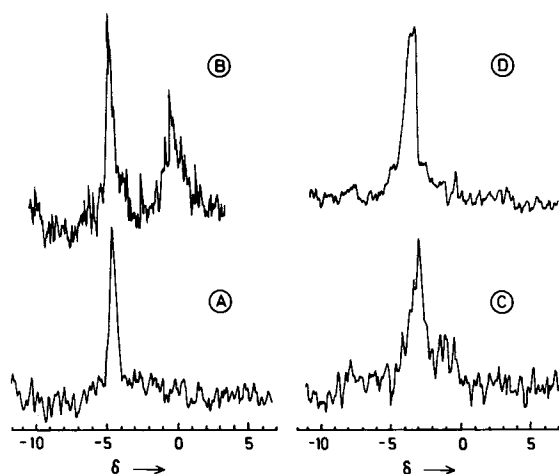


Abb. 10. <sup>31</sup>P-NMR-Spektren (72.86 MHz) von Pyridoxalphosphat in Kartoffel-Phosphorylase. (A) ohne Substrate; (B) mit 1 mM Heptaamylose; (C) mit 15 mM Heptaamylose; (D) mit 15 mM Heptaamylose und 100 mM Arsenat; alle Spektren bei pH=6.5 aufgenommen (nach [101]).

sung zeigen, daß die beiden Formen nicht oder sehr langsam miteinander austauschen. Das linienverbreiterte Signal bei höherem Feld deutet jedoch seinerseits auf einen Austausch mit einem Signal, das bei höheren Oligosaccharid-Konzentrationen (15 mM Heptaamylose, Abb. 10C) schließlich dominiert. Dieses Signal bei  $\delta = -3$  entspricht der durch 90 mM Glucose induzierten chemischen Verschiebung (Abb. 7B). 100 mM Arsenat und 15 mM Heptaamylose bilden Arse-

## 2.7. Vergleichende <sup>31</sup>P-NMR-Untersuchungen mit typischen Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen

*Martinez-Carrion*<sup>[136]</sup> hat erstmals bei Aspartat-Aminotransferase aus Schweineherz-Cytosol (EC 2.6.1.1) das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum von enzymgebundenem Pyridoxalphosphat registriert und mit dem Spektrum des freien Cofaktors verglichen. Demnach liegt die Phosphatgruppe des enzymgebundenen Cofaktors als salzverbrücktes Dianion vor, das sich an einer dem Lösungsmittel nicht zugänglichen Bindungsstelle befindet. Diese Interpretation könnte die hohe Stabilität des Coenzym-Apoenzym-Komplexes im Vergleich mit Komplexen des Apoenzym mit Pyridoxal-Analoga ohne 5'-Phosphatgruppe erklären. Das <sup>31</sup>P-NMR-Signal blieb bei Zugabe von Substraten oder Substrat-Analoga unverändert, was eine Beteiligung der Phosphatgruppe an der Katalyse, die *Furbish et al.*<sup>[137]</sup> postuliert haben, unwahrscheinlich macht. In Aspartat-Aminotransferase ist die 5'-Phosphatgruppe nur ein Ankerpunkt. Das trifft auch für D-Serin-Dehydratase aus *E. coli* (EC 4.2.1.14) zu, ebenfalls ein klassisches Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym, das *Schnackerz et al.*<sup>[123]</sup> untersucht haben. Im Gegensatz zu Aspartat-Aminotransferase ist hier das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des enzymgebundenen Pyridoxalphosphats pH-abhängig. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung ist ungefähr so groß wie bei einer Schiff-Base aus  $\epsilon$ -Aminohexansäure und Pyridoxalphosphat in wäßriger Lösung (siehe Abb. 11<sup>[100, 123]</sup>). Bindung des Substrat-Analogen Isoserin verschiebt das Signal zu tieferem Feld: Die Bildung des für die Katalyse erforderlichen Transaldiminierungskomplexes wird durch Fixierung der dianionischen Phosphatgruppe des Co-

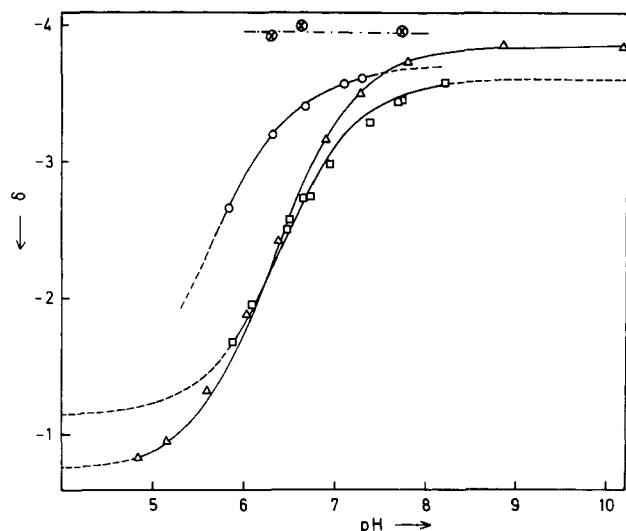


Abb. 11. Vergleich von  $^{31}\text{P}$ -NMR-Titrationskurven.  $\circ$ — $\circ$ : Pyridoxalphosphat in *E.-coli*-Maltodextrin-Phosphorylase;  $\triangle$ — $\triangle$ : Schiff-Base aus  $\epsilon$ -Aminohexansäure und Pyridoxalphosphat;  $\square$ — $\square$ : Pyridoxalphosphat in D-Serin-Dehydratase;  $\boxtimes$ — $\boxtimes$ : Pyridoxalphosphat in D-Serin-Dehydratase mit 25 mM Isoserin (siehe [100, 123]).

faktors unterstützt. Bei der Bildung des Azomethinkomplexes aus Substrat und Formylgruppe des enzymgebundenen Pyridoxalphosphats wird das Phosphat des Cofaktors als Dianion durch elektrostatische Wechselwirkungen an einen kationischen (Arginin-)Rest angelagert und somit der wäßrigen Umgebung entzogen. Die Phosphorresonanz wird im Stabilitätsbereich des Enzyms pH-unabhängig. In D-Serin-Dehydratase dient die Phosphatgruppe des Cofaktors nur dazu, den Transaldehydierungskomplex zu verankern und zu stabilisieren. Hier unterscheiden sich D-Serin-Dehydratase und *E.-coli*-Maltodextrin-Phosphorylase.

### 3. Interpretation und Synopsis

H. Neurath, E. H. Fischer et al. haben kürzlich die Indizien zusammengefaßt, die für eine Beteiligung von Pyridoxalphosphat an der Katalyse der  $\alpha$ -1,4-Glucan-Phosphorylasen sprechen<sup>[4]</sup>:

- 1) Die Aminosäuresequenzen der Bindungsstellen von Pyridoxalphosphat in Muskel-<sup>[3, 5]</sup>, Hefe-<sup>[49]</sup>, Kartoffel-<sup>[138]</sup> und *E.-coli*-Maltodextrin-Phosphorylase<sup>[8]</sup> sind im Ver-

lauf der Evolution von Prokaryont zu Eukaryont erhalten geblieben (siehe Tabelle 4<sup>[8]</sup>). Das steht im Gegensatz zur N-terminalen Sequenz, die phosphoryliert wird und die die kovalente und allosterische Kontrolle bewirkt. Die phosphorylierte Sequenz ist z. B. in Hefe-Phosphorylase<sup>[49]</sup> anders als in Kaninchenmuskel-Phosphorylase. Auch die N-terminalen Sequenzen der Kaninchenmuskel-Phosphorylase, der Pflanzenenzyme, z. B. der Kartoffel-Phosphorylase, und der bakteriellen Maltodextrin-Phosphorylasen unterscheiden sich, wenn auch in unterschiedlichem Maße<sup>[3, 4, 5, 48]</sup>. Bisher sind Phosphorylierung und allosterische Aktivierung von Phosphorylasen aus Pflanzen und Bakterien nicht beschrieben worden.

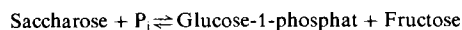
- 2) Bei der Lokalisierung des katalytischen Zentrums der Skelettmuskel-Phosphorylasen ergab sich, daß die Pyridoxalphosphat-Bindungsstelle sich in der Nähe der Bindungsstellen für die beiden anionischen Substrate Phosphat (Arsenat) und Glucose-1-phosphat befindet. (Auch Glucose, ein kompetitiver Inhibitor für Glucose-1-phosphat, wird dort gebunden.) Die van-der-Waals-Radien der Sauerstoffatome in der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat und in den Hydroxygruppen der Glucose überlappen dabei. Dies macht eine Beteiligung der Phosphatgruppe an der Katalyse möglich.
- 3)  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studien unserer Gruppe haben gezeigt, daß die Ionisierung der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat den Übergang von inaktiver Muskel-Phosphorylase *b* in aktive Phosphorylase *b* und *a* signalisiert. Diese Befunde werden ergänzt und erweitert durch unsere Untersuchungen an *E.-coli*-Maltodextrin- und Kartoffel-Phosphorylase, die beweisen, daß in den nichtregulierten *aktiven* Phosphorylasen ebenso wie in den allosterisch und kovalent *aktivierten* Muskel-Phosphorylasen dianionisches Phosphat vorliegt. Diese Ergebnisse sprechen ebenso wie die Inaktivität der Pyridoxalphosphat-Analoga, deren 5'-Phosphatgruppe im pH-Bereich der Enzymkatalyse nicht protoniert werden kann<sup>[53]</sup>, und die Befunde von Parrish et al.<sup>[98]</sup> über partielle Reaktivierung von Apophosphorylase mit Pyridoxal und Phosphat für eine Beteiligung der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat bei der Katalyse der  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen.

Jedes Modell, das eine Beteiligung der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat an der Katalyse erwägt, muß die Reaktion von Saccharose-Phosphorylase<sup>[124, 139]</sup> berücksichtigen: Saccharose-Phosphorylase (EC 2.4.1.7) aus *Pseudomonas saccharophila* katalysiert die Phosphorolyse von Saccha-

Tabelle 4. Vergleich der Aminosäuresequenz der Pyridoxalphosphat-bindenden Zentren in folgenden Phosphorylasen: (A) Kaninchenmuskel-, (B) Kartoffel-, (C) Hefe-, (D) *E.-coli*-Maltodextrin-Phosphorylase [3–5, 138, 49, 8]. PPxy bedeutet einfach gebundene Pyridoxalphosphatgruppe (nach [8]).

	5	10	15	20
A	Glu - Ala - Ser - Gly - Thr - Gly - Asn - Met - Lys (P Pxy) - Phe	Met - Leu - Asn - Gly - Ala - Leu - Thr - Ile - Gly - Thr - Met - Asp - Gly		
B	Glu - Ala - Ser - Gly - Thr - Ser - Asn - Met - Lys (PPxy) - Phe - Ala - Met	Asx - Gly - (Cys, Ile, Thr, Ile, Gly, Glx) - Leu - Asp - Gly		
C	Glu - Ala - Ser - Gly - Thr - Ser - Asn - Met - Lys (P Pxy) - Phe - Val - Met			
D	(Glu) - Ala - Ser - Gly - Thr - Gly - Asn - Met - Lys (P Pxy) - Leu - Ala	Leu - Asp - Gly - Ala - Leu - Thr - Val - Gly - Thr - Leu - Asp		

rose, wobei die  $\alpha$ -Konfiguration in Glucose-1-phosphat erhalten bleibt:



Diese Reaktion verläuft über ein Glucosyl-Enzym-Intermediat<sup>[124]</sup>. In Saccharose-Phosphorylase wurde kein Pyridoxalphosphat gefunden. Im Gegensatz zur Glykogen-Phosphorylase katalysiert die Saccharose-Phosphorylase jedoch keinen Glucosyltransfer auf Oligo- oder Polysaccharide und ist demnach nicht Primer-abhängig. Diese grundsätzlichen Unterschiede von Saccharose- und  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen veranlassen dazu, für den Cofaktor in den  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen eine Funktion beim Glucosyltransfer vom und zum Oligo- oder Polysaccharidacceptor zu postulieren. Nimmt man an, daß der Glucosyltransfer von einem Zuckerphosphat auf ein Oligosaccharid – oder die Phosphorolyse eines Oligosaccharids unter Bildung eines Zuckerphosphats – energetisch aufwendiger sind, weil ein Oligosaccharid anstelle eines Disaccharids gebunden und positioniert werden muß, mag man die Beteiligung einer dianionischen Phosphatgruppe eines Cofaktors anstelle einer monoanionischen Aminosäureseitenkette an der Katalyse der  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen verstehen. Dies könnte die unterschiedlichen Reaktionen von Saccharose- und  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylase erklären. Die Beteiligung eines Dianions wäre auch in Einklang mit dem außerordentlich hydrophoben Milieu des katalytischen Zentrums der Glykogen-Phosphorylasen, auf das besonders Shaltiel et al. hingewiesen haben<sup>[78, 81]</sup>: Eine hydrophobe Umgebung sollte Phosphorolyse gegenüber Hydrolyse begünstigen. Die ungewöhnlich starke Hydrophobie der Umgebung des substituierten Pyridinrings in den Phosphorylasen läßt sich aus den besonderen spektralen Eigenschaften des Phosphorylase-gebundenen Cofaktors ableiten<sup>[76, 77]</sup>. Da UV- und Fluoreszenz-Studien keine Auskünfte über die Umgebung der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in den  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen geben können, wurden die <sup>31</sup>P-NMR-Versuche durchgeführt.

Die Protonierung der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in den nichtregulierten  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen nach Bindung von Glucose und Oligosacchariden kann als pK-Änderung interpretiert werden. Diese pK-Änderungen indizieren eine Verstärkung der Hydrophobie in der Umgebung der Phosphatgruppe. Änderungen des scheinbaren „pK“-Wertes der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in Dioxan-Wasser-Mischungen in vergleichbarer Größenordnung wurden bereits beschrieben<sup>[97]</sup>. Hier sei daran erinnert, daß das katalytische Zentrum der *E.-coli*-Maltodextrin-Phosphorylase vom Lösungsmittel abgeschirmt wird, sobald Glucose gebunden worden ist (siehe Abb. 9 und 11).

Die Annahme, daß die dianionische Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in den *aktiven* und den *aktivierten* Konformeren der Glykogen-Phosphorylasen bei der Katalyse als Protonenacceptor fungiert, ist eher eine zusätzliche als eine alternative Interpretation: An Kartoffel-Phosphorylase konnten wir ein Protonierungs-Deprotonierungs-Gleichgewicht nach katalytischem Umsatz zeigen, an dem die Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat beteiligt ist (siehe Abb. 7, 9 und 10). Das Ionisierungsgleichgewicht ist bei etwa 100–75% der enzymatischen Aktivität und pH = 6.1–7.4 vom pH-Wert unabhängig.

Hier sei an die 2500fache Beschleunigung der Hydrolyse

des *endo*-5-[4(5)-Imidazolyl]bicyclo[2.2.1]hept-*endo*-2-ylzimtsäureesters in einer hydrophoben Umgebung (H<sub>2</sub>O:Dioxan = 1:4 (mol/mol)) durch 0.5 M Benzoat-Ionen erinnert. Die Beschleunigung deuteten Bender et al.<sup>[164]</sup> mit einer Deprotonierung der Imidazolylgruppe durch das Benzoat-Ion, gefolgt von einer Protonenaufnahme der Imidazolylgruppe aus dem Wasser. Eine analoge Beschleunigung einer Phosphorolyse im hydrophoben Milieu unter Beteiligung des dianionischen Phosphats in Pyridoxalphosphat als Base ist plausibel. Als Säure wäre eine Glutaminsäure in Betracht zu ziehen, die Sprang und Fletterick durch Röntgen-Strukturanalyse bei 2.5 Å Auflösung außer einem Histidin im aktiven Zentrum von Phosphorylase *a* lokalisieren konnten. Benachbart ist der Glucosylrest des Substrates Glucose-1-phosphat<sup>[27]</sup>.

Das nach Zugabe von Arsenat und Heptaamylose erhaltene <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum gleicht dem Spektrum nach Zugabe von Arsenat und Glucose. Es sei daran erinnert, daß das bei der Arsenolyse gebildete Glucose-1-arsenat spontan in Glucose und Arsenat zerfällt<sup>[141]</sup>. Aufgrund der chemischen Verschiebung der 5'-Phosphatgruppe kann man z. B. unter diesen Bedingungen etwa ein 1:1-Gleichgewicht monoprotonierter und dianionischer Formen der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat annehmen. Die Beobachtung, daß Heptaamylose und Arsenat die Ionisation der Cofaktor-Phosphatgruppe in gleicher Weise wie Glucose und Arsenat ändern, scheint zunächst widersprüchlich: Glucose bindet sich zwar an das Glucose-1-phosphat-Bindungszentrum (das sich in unmittelbarer Nähe der 5'-Phosphatgruppe des Cofaktors befindet), wird aber nicht katalytisch umgesetzt. Poly- und Oligosaccharide, deren  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen zwar arsenolytisch gelöst werden, binden sich aber an ein (nicht überlappendes) anderes Bindungszentrum<sup>[27, 28]</sup>. Postuliert man aber eine „Transferstelle“, die sowohl vom „Substrat Glucosyl“ des Glucose-1-phosphats auf dem Weg zum Poly- oder Oligosaccharidacceptor als auch vom „Produkt Glucosyl“ beim Abgang durchlaufen wird, wäre der Widerspruch gelöst. Glucose-1-phosphat würde (im Gegensatz zur nichtaktivierten Glucose) dann über eine „energiereiche“ Form des Glucosylrestes weiter zu einem Glucosyl-Enzym-Komplex reagieren.

Der Protonentransfer beim katalytischen Glucosyltransfer verläuft schnell<sup>[143]</sup> und dürfte im normalen Temperaturbereich in der NMR-Zeitskala nicht nachweisbar sein. Jedoch sollte sich der Protonierungs-Deprotonierungs-Zustand der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat in Kartoffel-Phosphorylase in Anwesenheit von Cyclodextrin und einem Glucosephosphat als Substrat registrieren lassen, d. h. wenn mangels Acceptor kein Glucosyltransfer stattfindet. Bei diesem Teilschritt sollte sich ein Protonierungs-Deprotonierungs-Zustand einstellen, der sich von dem bei Glucosyltransfer beobachteten Gleichgewicht (siehe Abb. 7, 9 und 10) unterscheidet. Allerdings verlangt dieser Versuch ein Glucosyl-Analogon für den Übergangszustand oder ein Substrat-Analogon für Glucose-1-phosphat, das nicht mit dem <sup>31</sup>P-NMR-Nachweis von Pyridoxalphosphat interferiert. Auch wären <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen an enzymgebundenem <sup>13</sup>C-Glucose-1-phosphat zu erwägen. Eine besonders attraktive und dankbare Aufgabe wäre aber, nach einem Glucosyl-Enzym-Intermediat zu suchen (siehe Abb. 12).

Gold und Osber<sup>[142]</sup> versuchten vergeblich, die reversible Lösung der Phosphatesterbindung in <sup>18</sup>O-markiertem Glu-

cose-1-phosphat mit Muskel-Phosphorylase nachzuweisen. Diese reversible Reaktion ist dann zu erwarten, wenn eine enzymgebundene Phosphatgruppe, die ungehindert rotiert,

$^{14}\text{C}$ -Glucose-1-phosphat, aber ohne  $\alpha$ -Cyclodextrin, fand sich keine Radioaktivität in den Peptiden. Jedoch kann unspezifische Bindung erst dann mit Sicherheit ausgeschlossen

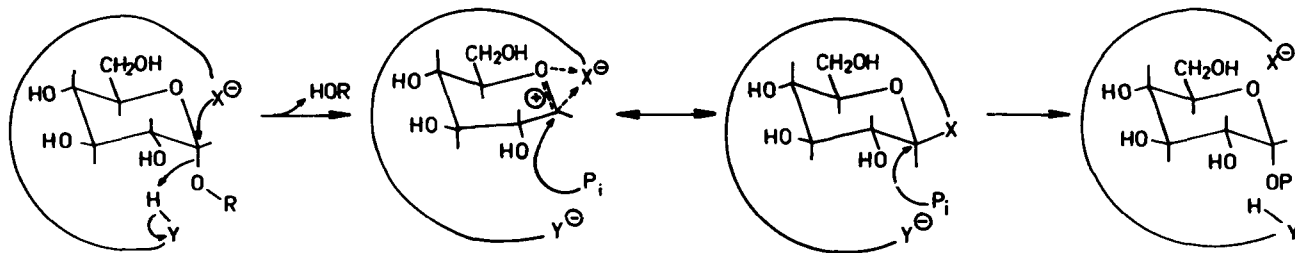
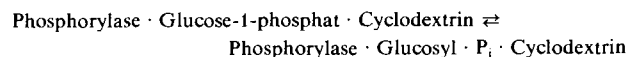


Abb. 12. Glucosyl-Enzym-Intermediat, schematisch. X: Elektronendonator, nucleophile Gruppe; HY: Protonendonator, elektrophile Gruppe; R: (Glucosyl)<sub>n</sub>; P<sub>i</sub>: Phosphat (nach [147]).

in einem ternären Komplex aus Phosphorylase, Glucosylrest und Phosphat enthalten ist. *Kokesh und Kakuda*<sup>[135]</sup> wiederholten dieses Experiment mit Kartoffel-Phosphorylase, die im Gegensatz zur Muskel-Phosphorylase Cyclodextrine bindet, die kompetitive Inhibitoren der Stärke sind. Stärkeähnliche Cyclodextrine können aber im Gegensatz zu Glykogen und Oligosacchariden kein Glucosyl akzeptieren, da sie keine freie 4-Hydroxygruppe besitzen. Tatsächlich katalysiert Kartoffel-Phosphorylase in Gegenwart von Cyclodextrin und Glucose-1-phosphat, dessen Esterposition (wie im Experiment von *Gold und Osber*<sup>[142]</sup>) mit  $^{18}\text{O}$  markiert war, einen Austausch zwischen dem Ester und den peripheren Sauerstoffatomen des Phosphats; die Geschwindigkeit ist mit derjenigen der Stärkesynthese vergleichbar<sup>[135]</sup>:



Über die Art der Bindung des Glucosyl-Intermediats an die Phosphorylase kann das Experiment nichts aussagen; es ist sowohl mit einem Glucosyl-Kation als auch mit einem kovalent gebundenen Glucosylrest vereinbar. Jedoch sprechen kinetische Untersuchungen mit Phosphorylase *b* von *Firsov et al.*<sup>[144]</sup> (siehe aber <sup>[145]</sup>), die keinen sekundären Isotopeneffekt mit C-1[ $^3\text{H}$ ]- und C-1[ $^2\text{H}$ ]-markiertem Glucose-1-phosphat fanden, eher für ein kovalent gebundenes Intermediat. Bei der reversiblen Bindung eines Glucosyl-Kations wäre ein meßbarer sekundärer Isotopeneffekt zu erwarten<sup>[144]</sup>. Ein kovalentes Glucosyl-Intermediat war im Falle der Saccharose-Phosphorylase bereits von *Doudoroff*<sup>[139]</sup> postuliert und von *DeToma und Abeles*<sup>[146]</sup> als  $\beta$ -glykosidisch gebundenes Glucose-Intermediat (wie aufgrund eines „double displacement“ zu erwarten) isoliert worden (siehe Abb. 12<sup>[147]</sup>). Mit dem Ziel, ein kovalentes Glucosyl-Intermediat in der Kartoffel-Phosphorylase nachzuweisen, haben wir<sup>[165]</sup> das Enzym in Gegenwart von  $\alpha$ -Cyclodextrin mit  $^{14}\text{C}$ -uniform markiertem Glucose-1-phosphat inkubiert. Anschließend wurde das radioaktive Protein durch einen Sepharose-G-25-Chromatographie-Schritt von den Substraten getrennt, mit 5proz. Trichloressigsäure denaturiert und solange gewaschen, bis der Überstand frei von Radioaktivität war. Nach chymotryptischer Spaltung und elektrophoretischer Vortrennung wurden radioaktive  $^{14}\text{C}$ -Peptide gefunden. Nach Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose oder  $^{14}\text{C}$ -markiertem Glucose-6-phosphat (anstelle von  $^{14}\text{C}$ -Glucose-1-phosphat) oder mit

werden, wenn die chemische Struktur der enzymgebundenen Glucose aufgeklärt und die Glucose im katalytischen Zentrum des Enzyms lokalisiert ist.

Selbstverständlich ist die Annahme, daß die dianionische Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat als Protonenacceptor an der Katalyse beteiligt ist, nicht die einzig mögliche. So haben *L. N. Johnson et al.* vorgeschlagen, daß diese Gruppe als nucleophile Gruppe in die Katalyse eingreift<sup>[140]</sup>. Dieser Vorschlag beruht hauptsächlich auf einem Modell der Raumstruktur des aktiven Zentrums der Muskel-Phosphorylase *b*, das aufgrund der verfügbaren Kristallstruktur-Daten (3 Å Auflösung) konstruiert wurde. Aber wenn auch noch Probleme zu lösen sind, so ist doch an einer obligaten Rolle der Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat als Dianion bei der Katalyse der  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen kaum mehr zu zweifeln. Es ist zu hoffen, daß es weitere Fortschritte in nicht allzu langer Zeit ermöglichen werden, einen präzisen chemischen Reaktionsmechanismus mit Beteiligung der 5'-Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat zu formulieren. Dann sollte sich erweisen, ob unsere Voraussage zutrifft, daß „nature may have found it advantageous to utilize in the case of glycogen phosphorylase protonatable groups of a vitamine rather than those of amino acid side chains to facilitate catalysis“<sup>[97]</sup>.

An den Arbeiten über die Rolle von Pyridoxalphosphat in den  $\alpha$ -Glucan-Phosphorylasen hatten außer den in den Publikationen genannten die folgenden Würzburger Kollegen besonderen Anteil: Priv.-Doz. Dr. Knut Feldmann, Professor Dieter Palm, Dr. George R. Philips, Dr. Klaus Schnackerz, Dr. Emil Schiltz und Dr. Manfred Bühner. Den Professoren Louise N. Johnson, Oxford, Niels B. Madsen und Richard J. Fletterick, Edmonton, Donald J. Graves, Ames, Sh. Shaltiel und A. Kupfer, Rehovot, Henri Buc, Paris, und T. Fukui, Osaka, danken wir für wichtige Informationen, bevor diese publiziert wurden. Unser besonderer Dank gilt Dr. William E. Hull, Karlsruhe, Professor Edmond H. Fischer, Seattle, und Professor Esmond E. Snell, Austin, für Kritik und wertvolle Anregungen. Die hier veröffentlichten eigenen Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Stiftung Volkswagenwerk und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Eingegangen am 4. Februar 1980 [A 320]

- [1] E. Helmreich, *Compr. Biochem.* 17, 17 (1969).
- [2] E. H. Fischer, A. B. Kent, E. R. Snyder, E. G. Krebs, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2906 (1958).
- [3] K. Titani, A. Koide, J. Hermann, L. H. Ericsson, S. Kumar, R. D. Wade, K. A. Walsh, H. Neurath, E. H. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4762 (1977).
- [4] K. Titani, A. Koide, L. H. Ericsson, S. Kumar, J. Hermann, R. D. Wade, K. A. Walsh, H. Neurath, E. H. Fischer, *Biochemistry* 17, 5680 (1978).
- [5] A. Koide, K. Titani, L. H. Ericsson, S. Kumar, H. Neurath, K. Walsh, *Biochemistry* 17, 5657 (1978).
- [6] Y. P. Lee, *Biochim. Biophys. Acta* 43, 18 (1960).
- [7] A. Kamagawa, T. Fukui, Z. Nikumi, *J. Biochem. (Tokyo)* 63, 361 (1968).
- [8] K. H. Schächtele, E. Schiltz, D. Palm, *Eur. J. Biochem.* 92, 427 (1978).
- [9] L. L. Kastenschmidt, J. Kastenschmidt, E. Helmreich, *Biochemistry* 7, 3590 (1968).
- [10] L. L. Kastenschmidt, J. Kastenschmidt, E. Helmreich, *Biochemistry* 7, 4543 (1968).
- [11] E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 24, 263 (1962).
- [12] N. B. Madsen, *Muscle Proc. Symp.* 1965, 122.
- [13] D. J. Graves, R. W. Sealock, J. H. Wang, *Biochemistry* 4, 290 (1965).
- [14] R. W. Sealock, D. J. Graves, *Biochemistry* 6, 201 (1967).
- [15] J. H. Wang, D. J. Graves, *J. Biol. Chem.* 238, 2386 (1963).
- [16] J. H. Wang, D. J. Graves, *Biochemistry* 3, 1437 (1964).
- [17] E. Helmreich, C. F. Cori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 647 (1964).
- [18] C. Y. Huang, D. J. Graves, *Biochemistry* 9, 660 (1970).
- [19] J. H. Wang, M. L. Shonka, D. J. Graves, *Biochemistry* 4, 2296 (1965).
- [20] J. H. Wang, M. L. Shonka, D. J. Graves, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 131 (1965).
- [21] E. Helmreich, M. C. Michaelides, C. F. Cori, *Biochemistry* 6, 3695 (1967).
- [22] S. G. Withers, B. D. Sykes, N. B. Madsen, P. J. Kasvinsky, *Biochemistry* 18, 5342 (1979).
- [23] B. E. Metzger, E. Helmreich, L. Glaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 994 (1967).
- [24] B. E. Metzger, L. Glaser, E. Helmreich, *Biochemistry* 7, 2021 (1968).
- [25] K. Feldmann, H. Zeisel, E. Helmreich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2278 (1972).
- [26] J.-I. Tu, D. J. Graves, *J. Biol. Chem.* 248, 4617 (1973).
- [27] S. Sprang, R. J. Fletterick, *J. Mol. Biol.* 131, 523 (1979).
- [28] I. T. Weber, L. N. Johnson, K. S. Wilson, D. G. R. Yeates, D. L. Wild, J. A. Jenkins, *Nature* 274, 433 (1978).
- [29] P. A. M. Eagles, M. Iqbal, L. N. Johnson, J. Mosley, K. S. Wilson, *J. Mol. Biol.* 71, 803 (1972).
- [30] R. J. Fletterick, J. Sygusch, N. Murray, N. B. Madsen, L. N. Johnson, *J. Mol. Biol.* 103, 1 (1976).
- [31] D. A. Chignell, W. B. Grazer, R. C. Valentine, *Biochemistry* 7, 1082 (1968).
- [32] G. Puchwein, O. Kratky, C. F. Gölder, E. Helmreich, *Biochemistry* 9, 4691 (1970).
- [33] M. L. Battell, C. G. Zarkadas, L. B. Smillie, N. B. Madsen, *J. Biol. Chem.* 243, 6202 (1968).
- [34] M. L. Battell, L. B. Smillie, N. B. Madsen, *Can. J. Biochem.* 46, 609 (1968).
- [35] O. Avramovic-Zikic, L. B. Smillie, N. B. Madsen, *J. Biol. Chem.* 245, 1558 (1970).
- [36] M. Hörl, K. Feldmann, K. D. Schnackerz, E. J. M. Helmreich, *Biochemistry* 18, 2457 (1979).
- [37] D. H. Brown, C. F. Cori, *Enzymes* 5B, 207 (1961).
- [38] E. H. Fischer, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 216, 121 (1955).
- [39] E. W. Sutherland, Jr., W. D. Wosilait, *Nature* 175, 169 (1955).
- [40] E. G. Krebs, J. A. Beavo, *Annu. Rev. Biochem.* 48, 923 (1979).
- [41] P. J. Keller, G. T. Cori, *J. Biol. Chem.* 214, 127 (1955).
- [42] E. G. Krebs, A. B. Kent, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* 231, 73 (1958).
- [43] G. T. Cori, C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* 158, 321 (1945).
- [44] E. H. Fischer, D. J. Graves, E. R. Snyder, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 234, 1698 (1959).
- [45] C. Nolan, W. B. Novoa, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Biochemistry* 3, 542 (1964).
- [46] D. Linder, G. Kurz, H. Bender, K. Wallenfels, *Eur. J. Biochem.* 70, 291 (1976).
- [47] M. Schwartz, M. Hofnung, *Eur. J. Biochem.* 2, 132 (1967).
- [48] E. Schiltz, D. Palm, H. W. Klein, *FEBS Lett.* 109, 59 (1980).
- [49] K. Lerch, E. H. Fischer, *Biochemistry* 14, 2009 (1975).
- [50] P. Cohen, *Curr. Top. Cell. Regul.* 14, 117 (1978).
- [51] E. H. Fischer, L. M. G. Heilmeyer, Jr., R. H. Haschke, *Curr. Top. Cell. Regul.* 4, 211 (1971).
- [52] C. Villar-Palasi, J. Lerner, *Vitam. Horm. (New York)* 26, 65 (1969).
- [53] J. H. Wang, D. J. Graves, *Enzymes* 7, 435 (1976).
- [54] S. J. W. Busby, G. K. Radda, *Curr. Top. Cell. Regul.* 10, 89 (1976).
- [55] T. Baranowski, B. Illingworth, D. H. Brown, C. F. Cori, *Biochim. Biophys. Acta* 25, 16 (1957).
- [56] C. F. Cori, B. Illingworth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43, 547 (1957).
- [57] A. B. Kent, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* 232, 549 (1958).
- [58] P. Cohen, T. Duwener, E. H. Fischer, *Biochemistry* 10, 2683 (1971).
- [59] E. H. Fischer, A. Pocker, J. C. Saari, *Essays Biochem.* 6, 23 (1970).
- [60] B. Illingworth, R. Kornfeld, D. H. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* 42, 486 (1960).
- [61] E. H. Fischer, E. G. Krebs, *Vitam. Horm. (New York)* 22, 399 (1964).
- [62] A. E. Braunstein, M. M. Shemyakin, *Biokhimiya* 18, 393 (1953).
- [63] D. E. Metzler, M. Ikawa, E. E. Snell, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 648 (1954).
- [64] A. E. Braunstein, *Enzymes* 9, 379 (1973).
- [65] E. E. Snell, S. J. Di Mari, *Enzymes* 2, 335 (1970).
- [66] P. Recsei, E. E. Snell, *Biochemistry* 9, 1492 (1970).
- [67] E. Grazi, T. Cheng, B. L. Horecker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 250 (1962).
- [68] B. L. Horecker, S. Pontremoli, C. Ricci, T. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1949 (1961).
- [69] W. Tagaki, F. H. Westheimer, *Biochemistry* 7, 901 (1968).
- [70] D. L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* 243, 1236 (1968).
- [71] D. Portsmouth, A. C. Stoolmiller, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* 242, 2751 (1967).
- [72] O. Warburg, W. Christian, *Biochem. Z.* 298, 368 (1938).
- [73] S. Shaltiel, J. L. Hedrick, E. H. Fischer, *Biochemistry* 5, 2108 (1966).
- [74] J. L. Hedrick, S. Shaltiel, E. H. Fischer, *Biochemistry* 8, 2422 (1969).
- [75] J. L. Hedrick, S. Shaltiel, E. H. Fischer, *Biochemistry* 8, 2429 (1969).
- [76] K. Feldmann, E. J. M. Helmreich, *Biochemistry* 15, 2394 (1976).
- [77] G. F. Johnson, J. I. Tu, M. L. S. Bartlett, D. J. Graves, *J. Biol. Chem.* 245, 5560 (1970).
- [78] S. Shaltiel, M. Cortijo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 594 (1970).
- [79] M. Cortijo, S. Shaltiel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 212 (1970).
- [80] M. Cortijo, I. Z. Steinberg, S. Shaltiel, *J. Biol. Chem.* 246, 933 (1971).
- [81] S. Weinberg, S. Shaltiel, I. Z. Steinberg, *Isr. J. Chem.* 12, 421 (1974).
- [82] K. O. Honikel, N. B. Madsen, *J. Biol. Chem.* 247, 1057 (1972).
- [83] E. H. Fischer, A. W. Forrey, J. L. Hedrick, R. C. Hughes, A. B. Kent, E. G. Krebs, in E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, A. Rossi-Fanelli: *Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*. Pergamon Press, Oxford 1963, S. 543.
- [84] P. H. Strausbauch, A. B. Kent, J. L. Hedrick, E. H. Fischer, *Methods Enzymol.* 11, 671 (1967).
- [85] E. Daltrozzo, K. Fritz, G. Kollmannsberger, *Chimia* 27, 652 (1973).
- [86] J. Sygusch, N. B. Madsen, P. J. Kasvinsky, R. J. Fletterick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4757 (1977).
- [87] J. L. Hedrick, S. Shaltiel, E. H. Fischer, *Biochemistry* 5, 2117 (1966).
- [88] B. Illingworth, H. S. Jansz, D. H. Brown, C. F. Cori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 1180 (1958).
- [89] K. Feldmann, H. Zeisel, E. J. M. Helmreich, *Eur. J. Biochem.* 65, 285 (1976).
- [90] S. Shaltiel, J. L. Hedrick, A. Pocker, E. H. Fischer, *Biochemistry* 8, 5189 (1969).
- [91] E. H. Fischer, A. W. Forrey, A. Pocker, J. C. Saari, C. L. Sevilla, J. Vidgoff, *Abstr. 8. Int. Congr. Biochem. Interlaken 1970*, S. 102.
- [92] A. Pocker, E. H. Fischer, *Biochemistry* 8, 5181 (1969).
- [93] J. M. Vidgoff, A. Pocker, T. L. Hullar, E. H. Fischer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 1166 (1974).
- [94] Th. Pfeuffer, J. Ehrlich, E. Helmreich, *Biochemistry* 11, 2125 (1972).
- [95] M.-L. Ahrens, G. Maass, P. Schuster, H. Winkler, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 6134 (1970).
- [96] D. J. Graves, R. F. Parrish, R. J. Uhing, W. Koryntnyk, in V. Essmann: *Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism*. Pergamon Press, Oxford 1978, S. 195.
- [97] Th. Pfeuffer, J. Ehrlich, E. Helmreich, *Biochemistry* 11, 2136 (1972).
- [98] R. F. Parrish, R. J. Uhing, D. J. Graves, *Biochemistry* 16, 4824 (1977).
- [98a] K. Feldmann, unveröffentlicht.
- [99] K. Feldmann, W. E. Hull, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 856 (1977).
- [100] D. Palm, K. Schächtele, K. Feldmann, E. J. M. Helmreich, *FEBS Lett.* 101, 4031 (1979).
- [101] H. W. Klein, E. J. M. Helmreich, *FEBS Lett.* 108, 209 (1979).
- [102] M. Fosset, L. W. Muir, L. D. Nielsen, E. H. Fischer, *Biochemistry* 10, 4105 (1971).
- [103] J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 12, 88 (1965).
- [104] E. Helmreich, C. F. Cori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 131 (1964).
- [105] M. Morange, F. Garcia Blanco, B. Vandenbunder, H. Buc, *Eur. J. Biochem.* 65, 553 (1976).
- [106] D. Guénard, M. Morange, H. Buc, *Eur. J. Biochem.* 76, 447 (1977).
- [107] T. Okazaki, A. Nakazawa, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* 243, 5266 (1968).
- [108] D. M. Mott, A. L. Bieber, *J. Biol. Chem.* 245, 4058 (1970).
- [109] P. J. Kasvinsky, N. B. Madsen, J. Sygusch, R. J. Fletterick, *J. Biol. Chem.* 253, 3343 (1978).
- [110] N. B. Madsen, P. J. Kasvinsky, R. J. Fletterick, *J. Biol. Chem.* 253, 9097 (1978).
- [111] K. Feldmann, *Anal. Biochem.* 88, 225 (1978).
- [112] J. L. Hedrick, S. Shaltiel, E. H. Fischer, *Biochemistry* 5, 2117 (1966).
- [113] D. Palm, H. D. Weisshaar, in: *Internat. Symposium on Reaction-mechanisms and Controlproperties of Phosphotransferases*. Reinhardtbrunn. Akademie-Verlag, Berlin 1973, S. 297.
- [114] H. D. Weisshaar, D. Palm, *Biochemistry* 11, 2146 (1972).
- [115] A. Hvidt, S. O. Nielsen, *Adv. Protein Chem.* 21, 287 (1966).
- [116] A. W. Murray, M. R. Atkinson, *Biochemistry* 7, 4023 (1968).
- [117] D. Gratecos, E. H. Fischer, *Biochim. Biophys. Acta* 58, 960 (1974).

- [118] F. E. Evans, N. O. Kaplan, *FEBS Lett.* 105, 11 (1979).
- [119] D. G. Gorenstein, D. Kar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 1073 (1973).
- [120] J. Feeney, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen in R. A. Dwek, I. D. Campbell, R. E. Richards, R. J. P. Williams: *NMR in Biology*. Academic Press, London 1977, S. 111.
- [121] E. Helmreich, M. C. Michaelides, C. F. Cori, *Biochemistry* 6, 3695 (1967).
- [121a] M. Bühner, noch unveröffentlicht.
- [122] R. J. Fletterick, J. Sygusch, H. Semple, N. B. Madsen, *J. Biol. Chem.* 251, 6142 (1976).
- [123] K. D. Schnackerz, K. Feldmann, W. H. Hull, *Biochemistry* 18, 1536 (1979).
- [124] J. J. Mieyal, R. H. Abeles, *Enzymes* 7, 515 (1972).
- [125] M. Abdullah, E. H. Fischer, M. Y. Qureshi, K. N. Slessor, W. J. Whelan, *Biochem. J.* 97, 9P (1965).
- [126] B. Illingworth, D. H. Brown, C. F. Cori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 469 (1961).
- [127] B. Illingworth, D. H. Brown, C. F. Cori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 479 (1961).
- [128] P. J. Kasvinsky, N. B. Madsen, R. J. Fletterick, J. Sygusch, *J. Biol. Chem.* 253, 1290 (1978).
- [129] F. Meyer, L. M. G. Heilmeyer, Jr., R. H. Haschke, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* 245, 6642 (1970).
- [130] L. M. G. Heilmeyer, Jr., F. Meyer, R. H. Haschke, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* 245, 6649 (1970).
- [131] R. H. Haschke, L. M. G. Heilmeyer, Jr., F. Meyer, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* 245, 6657 (1970).
- [132] M. C. Michaelides, E. Helmreich, *Enzymol. Biol. Clin.* 7, 130 (1966).
- [133] M. C. Michaelides, R. Sherman, E. Helmreich, *J. Biol. Chem.* 239, 4171 (1964).
- [134] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 98 (1958).
- [135] F. C. Kokesh, Y. Kakuda, *Biochemistry* 16, 2467 (1977).
- [136] M. Martinez-Carrion, *Eur. J. Biochem.* 54, 39 (1975).
- [137] F. S. Furbish, M. L. Fonda, D. E. Metzler, *Biochemistry* 8, 5169 (1969).
- [138] K. Nakano, S. Wakabayashi, T. Hase, H. Matsubara, T. Fukui, *J. Biochem. (Tokyo)* 83, 1085 (1978).
- [139] M. Doudoroff, *Enzymes* 5, 229 (1961).
- [140] L. N. Johnson, J. A. Jenkins, K. S. Wilson, G. Zanotti, *J. Mol. Biol.*, im Druck; L. N. Johnson, persönliche Mitteilung.
- [141] J. Katz, W. Z. Hassid, *Arch. Biochem. Biophys.* 30, 272 (1950).
- [142] A. M. Gold, M. P. Osber, *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 784 (1972).
- [143] M. Eigen, G. G. Hammes, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 25, 22 (1963), dort Tabelle III.
- [144] L. M. Firsov, T. I. Bogacheva, S. E. Bresler, *Eur. J. Biochem.* 42, 605 (1974).
- [145] J.-I. Tu, G. R. Jacobson, D. J. Graves, *Biochemistry* 10, 1229 (1971).
- [146] F. DeToma, R. H. Abeles, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 461 (Abst. 1214) (1970).
- [147] K. Feldmann, M. Hörl, H. W. Klein, E. J. M. Helmreich in V. Essmann: *Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism*. Pergamon Press, Oxford 1978, S. 205.
- [148] M. V. Buell, R. E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 6042 (1960).
- [149] P. Schuster, H. Winkler, *Tetrahedron* 26, 2249 (1970).
- [150] Yu. V. Morozov, N. P. Bazhulina, L. P. Cherkashina, M. Ya. Karpeiskii, *Biofizika* 12, 773 (1967).
- [151] D. E. Metzler, C. M. Harris, R. J. Johnson, D. B. Siano, J. A. Thomson, *Biochemistry* 12, 5377 (1973).
- [152] K. Feldmann, B. J. M. Gaugler, H. Winkler, E. J. M. Helmreich, *Biochemistry* 13, 2222 (1974).
- [153] M. Arrio-Dupont, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 653 (1971).
- [154] W. B. Dempsey, H. N. Christensen, *J. Biol. Chem.* 237, 1113 (1962).
- [155] S. Shimomura, K. Nakano, T. Fukui, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 462 (1978).
- [156] S. Shimomura, T. Fukui, *Biochemistry* 17, 5359 (1978).
- [157] C. L. Sevilla, E. H. Fischer, *Biochemistry* 8, 2161 (1969).
- [158] A. A. Yunis, E. H. Fischer, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 235, 3163 (1960).
- [159] S. A. Assaf, D. J. Graves, *J. Biol. Chem.* 244, 5544 (1969).
- [160] C. C. Childress, B. Sacktor, *J. Biol. Chem.* 245, 2927 (1970).
- [161] B. Burr, O. E. Nelson, *Eur. J. Biochem.* 56, 539 (1975).
- [162] D. P. Wolf, E. H. Fischer, E. G. Krebs, *Biochemistry* 9, 1923 (1970).
- [163] W. Nader, J.-U. Becker, *Eur. J. Biochem.* 102, 345 (1979).
- [164] M. Komiyama, M. L. Bender, M. Utaka, A. Takeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2634 (1977).
- [165] H. W. Klein, E. Schiltz, E. J. M. Helmreich, unveröffentlicht.