

Untersuchungen über Komplexbildungen von Dehydrogenasen mit Coenzymanalogen

Investigations on Complex Formation of Dehydrogenases with Coenzyme Analogues

C. WOENCKHAUS und D. SCHERR

Institut für Vegetative Physiologie, Chemisch-Physiologisches Institut der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Abteilung für Enzymologie, Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 26 b, 106—112 [1971]; eingegangen am 11. November 1970)

The coenzyme analogue nicotinamide 5-iodouracil-dinucleotide was synthesized by condensation of the two mononucleotides with dicyclohexylcarbodiimide in aqueous pyridine. The enzymatic properties of this compound were compared with those of the nicotinamide-uracil-dinucleotide. Both coenzyme analogues reacted slowly when functioning as a hydrogen carrier in enzymatic tests. The properties were similar to those of nicotinamide-benzimidazole-dinucleotide. The difference spectrum between the intact coenzyme analogue and its mononucleotides showed that the intramolecular interaction between the functional and non-functional moiety was smaller than that in NAD. The interaction corresponded to that of nicotinamide-benzimidazole-dinucleotide. The fluorescence excitation spectrum did not show any energy transfer from the non-functional iodouracil to the dihydronicotinamide part of the analogue. Difference spectra between the coenzyme-enzyme-complex and the two isolated components indicated that the unfolded dihydrocoenzyme was bound to the active site of lactate- and alcohol-dehydrogenase, respectively. Furthermore, they showed aromatic interaction of the non-functional part with parts of the protein. Introduction of iodine into the nicotinamide-uracil-dinucleotide did not remarkably alter the behavior of the analogues. As the iodine is bound very strongly to the coenzyme analogue, it may be useful for X-Ray-investigations of the dehydrogenases.

Ergebnisse und Diskussion

Das Coenzym NAD ist aus dem funktionellen Nicotinamidribotid-Teil und dem nichtfunktionellen Adenosinmonophosphat-Teil aufgebaut. Das Fehlen des Adeninteils hat eine starke Abnahme der Cofaktoreigenschaften zur Folge^{1,2}. Die Bindung des Coenzym an das Enzym wird vorwiegend über die Pyrophosphatgruppe bewirkt. Ein adeninfreies Coenzymbruchstück wird 100-mal schwächer an Lactat-Dehydrogenase gebunden. Ein Ersatz des Adenins durch ein anderes Ringsystem führt nur dann zu einem vollwertigen Coenzymanalogen, wenn eine polarisierbare Gruppe sich anstelle des N-1-Adeninstickstoffes befindet³. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß N-1 für die Ausrichtung des nichtfunktionellen Coenzymteils im Coenzym-Enzym-Komplex wichtig ist. Untersuchungen über die enzymatische Reaktion verschiedener Dehydrogenasen mit Coenzymanalogen führten zu unterschiedlichen

Ergebnissen: LDH zeigt im Test mit verschiedenen Coenzymanalogen wenig verminderte Umsatzzahlen, wenn die Coenzymanalogen ein aromatisches Ringsystem anstelle des Adenins enthalten. Die Bindung an das Enzym ist gegenüber dem natürlichen Coenzym 10-mal schwächer³.

Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Alkohol-Dehydrogenasen empfindlicher gegenüber Veränderungen des nichtfunktionellen Coenzymteils: Ersatz des nichtfunktionellen Purins durch andere Heterocyclen führte zu einer schwächeren Komplexbildung und zu einer stark verminderten Umsatzzahl.

Wir berichten in dieser Arbeit über die Coenzym-eigenschaften des Nicotinamid-Uracil-Dinucleotids und des Nicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotids. Durch die Einführung eines Jodatoms in den heterocyclischen Ring erhält man eine Verbindung, die eine polarisierbare Gruppe enthält. Sie sollte eine veränderte intramolekulare Wechselwirkung zeigen und im Test mit Dehydrogenasen unterschiedliche Co-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. WOENCKHAUS, Institut für Vegetative Physiologie, Chemisch-Physiologisches Institut, D-6000 Frankfurt/M., Ludwig-Rehn-Str. 14.

* Abkürzungen: LDH = Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz; L-Lactat: NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.27); ADH_L = Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber; Alkohol: NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.1); ADH_H = Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe; Alkohol: NAD-Oxidoreduktase

(EC 1.1.1.1); NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; NADH = Dihydronicotinamid-Adenin-Dinucleotid.

¹ G. P. FAWCETT u. N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry **237**, 1709 [1962].

² G. PFLEIDERER, E. SANN u. F. ORTANDERL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **73**, 39 [1963].

³ C. WOENCKHAUS u. P. ZUMPE, Z. Naturforsch. **23 b**, 484 [1968].

enzymeigenschaften gegenüber der nichtjodierten Verbindung aufweisen.

5-Joduridin-5'-monophosphat kann durch Behandeln von Uridin-5'-monophosphat mit Jodsuccinimid in guter Ausbeute hergestellt werden⁴. Durch Kondensation mit Nicotinamidmononucleotid mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid erhält man das Coenzymanaloge⁵. Direktes Einführen von Jod in Nicotinamid-Uracil-Dinucleotid¹ liefert die jodierte Verbindung in geringer Ausbeute. Aus diesen Ansätzen lassen sich Neben- und Zersetzungsprodukte nicht oder nur unvollständig abtrennen⁶. Im Spektrum des Nicotinamid-Uracil-Dinucleotids tritt nur ein Maximum bei 263 nm auf. Es setzt sich aus der Nicotinamid- und Uracil-Absorption zusammen. Das Doppelmaximum der Absorption des Nicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotids bei 267 und 273 nm wird durch den Nicotinamidteil, die Schulter bei 290 nm durch den 5-Joduracilteil hervorgerufen. Dihydronicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid zeigt im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 291 nm und ein zweites bei 337 nm.

Zwischen dem funktionellen und dem nichtfunktionellen Ringsystem des Coenzym bestehen intramolekulare Wechselwirkungen⁷. Die Elektronensysteme der beiden Ringe beeinflussen sich. Aussagen über die intramolekulare Wechselwirkung lassen sich durch Differenzspektren machen. Durch Spaltung der Pyrophosphatbrücke werden aus den Coenzymanalogen die beiden Mononucleotide gebildet. Deren Spektrum zeigt gegenüber der intakten Verbindung eine Veränderung, die als Differenzspektrum bezeichnet wird.

Die Spaltung der Pyrophosphatbrücke im Nicotinamid-Uracil-Dinucleotid und in der jodhaltigen Verbindung führen zu einem 5-proz. Extinktionsanstieg im Maximum der Absorption. Der Hypochromieeffekt ist halb so groß wie im natürlichen Coenzym NAD. Noch geringer ist die intramolekulare Wechselwirkung in den hydrierten Coenzymanalogen zwischen Dihydronicotinamid- und Uracil- bzw. 5-Joduracilteil. Die Aufnahme des Differenzspektrums zwischen dem intakten Dihydrocoenzym und den beiden Mononucleotidteilen zeigt, daß im Bereich der Dihydronicotinamid-Absorption bei 320 nm bei beiden Verbindungen ein geringer Extinktionsanstieg

eintritt (Abb. 1). Ein zweiter tritt bei 260 nm auf, hier absorbiert der nichtfunktionelle Uracilteil. Zwischen dem Joduracilanalogen und den beiden Mononucleotiden tritt ebenfalls ein Absorptionsanstieg bei

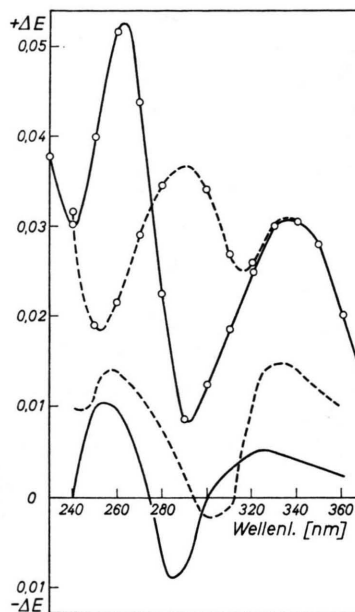


Abb. 1. Absorptionsspektrum: Dihydronicotinamid-Uracil-Dinucleotid $c = 0,5 \cdot 10^{-5}$ M, pH 8,2 (o—o—o). Absorptionsspektrum: Dihydronicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid $c = 0,5 \cdot 10^{-5}$ M, pH 8,2 (o---o---o). Differenzspektrum: Dihydronicotinamid-Uracil-Dinucleotid-Spaltung $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 8,2 (—). Differenzspektrum: Dihydronicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid-Spaltung $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 8,2 (---).

260 nm auf, der auf eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kurzwelligen Teil des Spektrums, eine Bandenverschmälerung und eine geringe Hypochromie im intakten Coenzymanalogen zurückzuführen ist. Die Änderungen im Differenzspektrum zeigen, daß beide Coenzymanaloge Dihydronicotinamid-Uracil-Dinucleotid und Dihydronicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid wie NADH in Lösung in gefalteter Form vorliegen und daß die intramolekulare Wechselwirkung in den Coenzymanalogen gegenüber der im NADH herabgesetzt ist. Das Ausmaß der intramolekularen Wechselwirkung ist mit der zwischen Benzimidazol und Nicotinamid bzw. Dihydronicotinamid im Nicotinamid-Benzimidazol-Dinucleo-

⁴ D. LIPKIN, F. B. HOWARD, D. NOWOTNY u. M. SANO, J. *biol. Chemistry* **238**, 2249 [1963].

⁵ N. A. HUGHES, C. W. KENNER u. A. R. TODD, J. *chem. Soc. [London]* **1957**, 3733.

⁶ D. SCHERR, Diplomarbeit, Frankfurt 1970.

⁷ J. M. SIEGEL, G. A. MONTGOMERY u. R. M. BOCK, *Arch. Biochem. Biophysics* **82**, 288 [1957].

tid bzw. im Dihydronicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid zu vergleichen³.

Weitere Hinweise auf intramolekulare Wechselwirkung liefert das Fluoreszenz-Anregungsspektrum⁸. Im Dihydronicotinamid-Uracil-Dinucleotid wird keine Energie nach Einstrahlen von Licht der Wellenlänge 260 nm vom Uracil- auf den Dihydronicotinamid-Teil übertragen¹. Dagegen wird beim NADH in einem strahlungslosen Prozeß fast die gesamte Energie, die vom Adeninring bei 260 nm absorbiert wird, auf den Dihydronicotinamid-Teil übertragen und von diesem als Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 460 nm emittiert. Nach WEBER⁹ beruht diese Energieübertragung auf der Richtung der Ladungspolarisation im angeregten Zustand: nur wenn der angeregte Zustand im nichtfunktionellen Teil einen ähnlichen polarisierten Zustand im Dihydronicotinamid-Teil induzieren kann, tritt dieser Effekt auf. Auch im Dihydronicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid findet keine Energieübertragung statt, obwohl durch die Einführung des Jodatoms in den nichtfunktionellen Molekülteil die Polarisation geändert ist.

Beide Coenzymanaloge reagieren mit Enzymen und Substraten als Wasserstoffüberträger. Die Michaelis-Konstanten im Test mit LDH, ADH_H, ADH_L sind gegenüber dem NAD 10-mal größer und die Umsatzzahlen, besonders bei den zinkhaltigen Alkohol-Dehydrogenasen, stark vermindert.

Auch im enzymatischen Verhalten ähneln beide Coenzymanaloge dem Nicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid. Das Jodatom scheint die Bindungseigenschaften des Coenzymanalogen wenig zu ändern. Die Umsatzzahlen liegen im Bereich der des Nicotinamid-Cytosin-Dinucleotids².

Die Bindung von Coenzymen an Enzyme ist häufig mit einer Änderung der optischen Eigenschaften verbunden. Durch Aufnahme der Differenzspektren

zwischen gebundenen und nichtgebundenen Coenzymanalogen versuchten wir, Aussagen über die Wechselwirkung zwischen den Coenzymteilen und den entsprechenden Teilen des Enzyms zu machen. Die Bindung von NADH an die LDH erfolgt unter Bildung eines Maximums im Bereich der Dihydronicotinamid-Absorption bei 330 nm (Abb. 2).

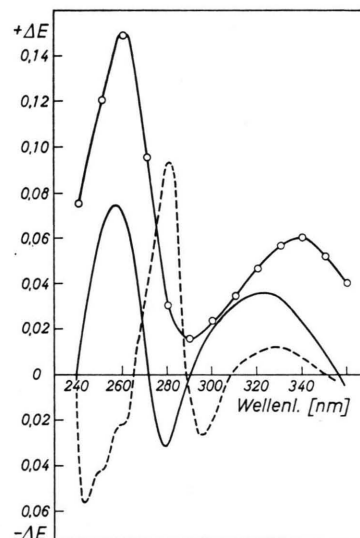


Abb. 2. Absorptionsspektrum: NADH $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M, pH 8,2 (○—○—○). Differenzspektrum: NADH-Spaltung $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 8,2 (—). Differenzspektrum des LDH-NADH-Komplexes: NADH $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, LDH $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M (bezogen auf eine Untereinheit Mol.-Gew. 36000) pH 8,2 (---).

Ein zweites Maximum tritt bei 280 nm auf. Im Bereich von 245 nm liegt ein Minimum, das bei 250 und 260 nm zwei Schultern aufweist. Das Maximum bei 280 nm beruht sehr wahrscheinlich auf einer Verbreiterung und das Minimum bei 245 nm auf einer verstärkten Hypochromie der Adeninabsorptionsbande bei der Bildung des Komplexes. Durch die

	LDH		ADH _L		ADH _H	
	$K_M \cdot 10^{-4}$	UZ	$K_M \cdot 10^{-4}$	UZ	$K_M \cdot 10^{-4}$	UZ
NAD	0,75	17500	0,3	410	2,5	55000
NUD *	5,6	15000	3,7	230	50	2500
NJUD *	3,8	12000	5,6	280	20	3000

* Abkürzungen: NUD = Nicotinamid-Uracil-Dinucleotid NJUD = Nicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid.

Tab. 1. Enzymatische Eigenschaften der Coenzymanalogen verglichen mit NAD. UZ = maximale Umsatzzahl; K_M = Michaelis-Konstanten.

⁸ G. WEBER, Nature [London] **180**, 1409 [1957].

⁹ G. WEBER, J. chem. Physics **55**, 878 [1958].

Bindung an das Enzym wird die ursprüngliche Beziehung zwischen beiden Basen aufgehoben, der Adeninteil wird durch ein π -System des Proteins gebunden. Der Dihydrionicotinamid-Teil geht keine neue Beziehung mit π -Systemen der Eiweißkomponente ein. Die Hypochromie der Dihydrionicotinamid-Absorption ist im NADH-Enzym-Komplex vermindert.

Beim Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid und dem 5-Jod-Derivat ist die intramolekulare Wechselwirkung zwischen den beiden Ringsystemen gering, Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid zeigt nach der Bindung an die LDH im Differenzspektrum nur ein Maximum bei 280 nm, das auf einer Bandenverbreiterung nach der Bindung des nichtfunktionellen Uracilteils an das Enzym beruht.

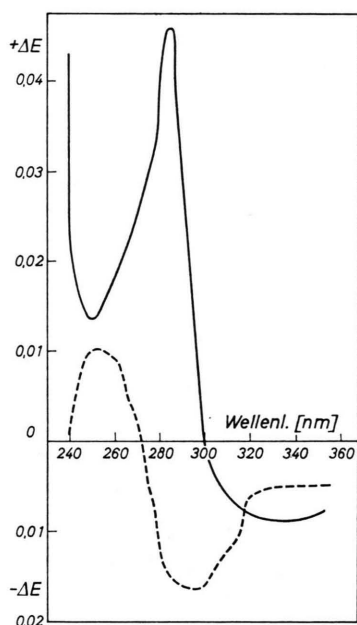


Abb. 3. Differenzspektrum: LDH-Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid-Komplex, LDH $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 8,2 (—). Differenzspektrum: LDH-Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid-Komplex, LDH $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 8,2 (---).

Im Absorptionsbereich des Uracils bei 260 nm tritt eine geringe Absorptionserhöhung auf. Eine Extinktionszunahme im Bereich der Dihydrionicotinamid-Absorption fehlt. Bei der Komplexbildung des Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotids mit LDH beobachtet man nur ein Maximum bei 250 nm und ein Minimum bei 297 nm (Abb. 3). Das Differenzspektrum ähnelt dem, das zwischen intaktem und ge-

spaltenem Coenzym auftritt. Es fehlt jedoch das Maximum bei 330 nm. Die Bandenverbreiterung, die mit der Bindung des 5-Joduracils an das Enzym auftritt, wird durch die Zunahme der Hypochromie im Maximum der 5-Joduracil-Absorption bei 291 nm unterdrückt. Eine Zunahme der Hypochromie und Bandenverbreiterung als Ausdruck der Komplexbildung finden wir auch bei der Komplexbildung des Coenzymanalogen Dihydrionicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid mit der LDH. Die Maxima bei 285 und 275 nm sind im wesentlichen durch Bandenverbreiterungen hervorgerufen (Abb. 4).

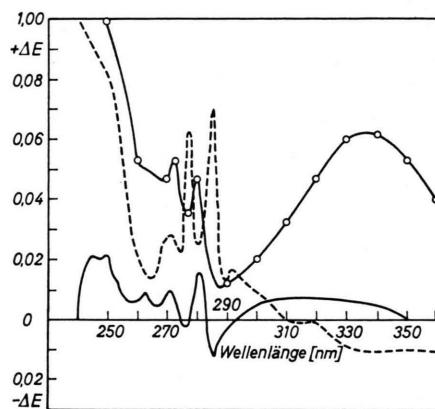


Abb. 4. Absorptionsspektrum: Dihydrionicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M, pH 8,2 (o-o-o). Differenzspektrum: Dihydrionicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid-Spaltung $c = 0,5 \cdot 10^{-5}$ M, pH 8,2 (—). Differenzspektrum: LDH-Dihydrionicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid-Komplex, LDH $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 8,2 (---).

Mit der ADH_L bildet NADH einen Komplex, der sich im Differenzspektrum gegenüber den Einzelkomponenten durch ein Absorptionsmaximum bei 265 nm auszeichnet¹⁰ (Abb. 5).

Im langwelligen Bereich liegt ein Minimum bei 350 nm. Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid und Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid bilden optisch ähnliche Komplexe mit dem Enzym (Abb. 6).

Im Differenzspektrum erkennt man ein Maximum bei 305 nm und Minima im Bereich von 350 und 280 nm. Die Spektren zeigen Ähnlichkeit mit den Spaltungs-Differenzspektren. Das Coenzym wird in aufgefalteter Form an das Enzym angelagert. Die Beziehungen zwischen dem nichtfunktionellen Teil des Coenzym und den Bindungsstellen am Enzym

¹⁰ H. F. FISHER, D. L. ADIJA u. D. G. CROSS, *Biochemistry* **8**, 4424 [1969].

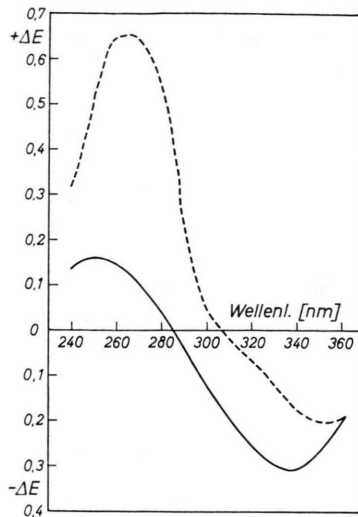


Abb. 5. Differenzspektrum: $\text{ADH}_L\text{-NADH}$ -Komplex, $\text{NADH } c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{ADH}_L c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (bezogen auf eine Untereinheit Mol.-Gew. 40000), pH 8,2 (---). Differenzspektrum: $\text{ADH}_H\text{-NADH}$ -Komplex, $\text{NADH } c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{ADH}_H c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (bezogen auf eine Untereinheit Mol.-Gew. 36000), pH 8,2 (—).

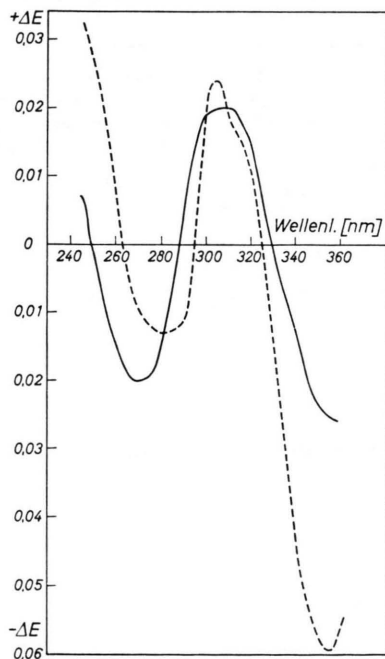


Abb. 6. Differenzspektrum: $\text{ADH}_L\text{-Dihydrocnicotinamid-Uracil-Dinucleotid-Komplex}$, $\text{ADH}_L c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, pH 8,2 (—). Differenzspektrum: $\text{ADH}_L\text{-Dihydrocnicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid-Komplex}$, $\text{ADH}_L c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, pH 8,2 (---).

lassen sich aber nicht mehr durch aromatische Wechselwirkung allein beschreiben. Bei der Verwendung der ADH_H treten unterschiedliche Spektren auf: das natürliche Coenzym NADH zeigt im Komplex mit dem Enzym gegenüber den beiden Komponenten ein Absorptionsminimum bei 340 nm und ein Maximum im Bereich von 250 nm¹⁰ (Abb. 5). Dihydrocnicotinamid-Uracil-Dinucleotid weist ein Maximum bei 280 nm auf, das durch eine Bandenverbreiterung bei der Komplexbildung mit dem Uracil entstanden sein kann (Abb. 7).

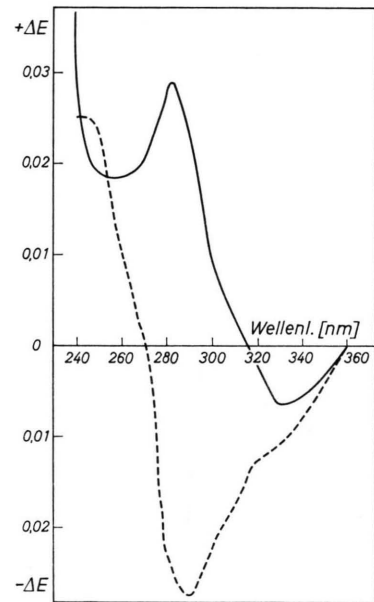


Abb. 7. Differenzspektrum: $\text{ADH}_H\text{-Dihydrocnicotinamid-Uracil-Dinucleotid-Komplex}$, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{ADH}_H c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, pH 8,2 (—). Differenzspektrum: $\text{ADH}_H\text{-Dihydrocnicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid}$, Dihydrocoenzym $c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{ADH}_H c = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, pH 8,2 (---).

Dihydrocnicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid bildet mit dem Enzym einen Komplex, dessen Differenzspektrum bei 290 nm ein Minimum, bei 250 nm ein Maximum aufweist. Beide Spektren ähneln denen, die zwischen den Coenzymanalogen und LDH und dem LDH-Komplex auftreten. Vermutlich wird beim jodierten Coenzymanalogen ein Maximum, das durch Bandenverbreiterung auftritt, durch eine stärkere Hypochromie überdeckt. Der nichtfunktionelle Teil wird an die ADH_H ähnlich wie im Komplex mit LDH durch eine aromatische Wechselwirkung gebunden. Die geringeren Extinktionsänderungen in Differenzspektren zwischen Enzymen und Coenzym-

analogen gegenüber dem natürlichen Coenzym werden durch schwächere Bindung hervorgerufen. Bei der Auswertung der Spektren wurden Änderungen, die durch die Eiweißkomponente hervorgerufen werden, nicht berücksichtigt. Es liegen aber Hinweise vor, daß mit der Komplexbildung die Enzymstruktur verändert wird¹¹. Fluorimetrische Untersuchungen des Coenzym-Lactat-Dehydrogenase-Komplexes zeigen im Anregungsspektrum eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität nach Anregen mit Licht der Wellenlänge 290 und 340 nm¹². Gegenüber den NADH-Enzym-Komplexen unterscheiden sich die Spektren der Komplexe mit Coenzymanalogen nur durch eine geringere Fluoreszenzintensität bei 460 nm.

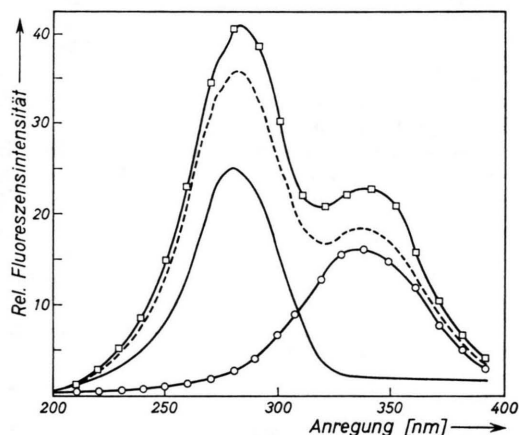


Abb. 8. Fluoreszenz-Anregungsspektrum: Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M (Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid zeigt gleiches Spektrum) (o—o—o), LDH $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M (—). Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid-LDH-Komplex, Dihydrocoenzym $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M, LDH $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M (---). Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid-LDH-Komplex gemessen in 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,5 (□—□—□).

Die Intensität ist nach Anregen mit Licht der Wellenlänge 340 nm dann vermindert, wenn das Coenzymanaloge, das den Komplex mit der LDH bildet, keinen Purinheterocyclus als nichtfunktionellen Teil enthält¹³. Bei 340 nm absorbiert vornehmlich der Dihydrionicotinamidring.

Mit der ADH_L bilden Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid und das jodhaltige Coenzymanaloge

Komplexe, die ähnliche Fluoreszenz-Anregungsspektren aufweisen¹⁴.

ADH_L scheint auf Grund der stärkeren Intensität mit Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid einen stabileren Komplex zu bilden als mit dem Uracilanalogen.

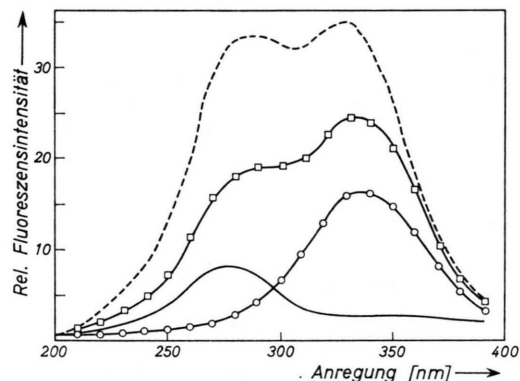


Abb. 9. Fluoreszenz-Anregungsspektrum: Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M (Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid zeigt gleiches Spektrum) (o—o—o), ADH_L $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M (—). Dihydrionicotinamid-Uracil-Dinucleotid- ADH_L -Komplex, Dihydrocoenzym $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M, ADH_L $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M (□—□—□). Dihydrionicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid- ADH_L -Komplex, Dihydrocoenzym $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M, ADH_L $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M, gemessen in 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,5 (---).

Durch die Verwendung des Nicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotids als Komplexbildner mit Dehydrogenasen ist die Möglichkeit gegeben, in der Röntgenstrukturanalyse Aussagen über die Lage des nichtfunktionellen Teils zu machen, da das große Jodatome bei größerer Auflösung noch erkannt werden kann.

Material und Methoden

Enzyme und Coenzyme: LDH, ADH_H , ADH_L , NAD und NADH waren Produkte der Fa. Boehringer Mannheim. Pyrophosphatase aus Schlangengift: Naja Nivea stellten wir nach der Vorschrift von KAPLAN und Mitarbeiter¹⁵ her.

Die Synthese von 5-Joduridin-5'-Monophosphat gelang durch Umsetzung von Uridin-5'-Monophosphat mit *N*-Jodsuccinimid⁴ in 63-proz. Ausbeute.

¹¹ M. J. ADAMS, A. MCPHERSON, JR., M. G. ROSSMANN, R. W. SCHEVITZ, J. E. SMILEY u. A. J. WONACOTT, in: Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenase p. 157, H. SUND, Hrsg., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970.

¹² S. F. VELICK, J. biol. Chemistry **233**, 1455 [1958].

¹³ C. WOENCKHAUS u. R. JECK, Z. Naturforsch. **24b**, 1436 [1969].

¹⁴ P. D. BOYER u. H. THEORELL, Acta chem. scand. **10**, 447 [1956].

¹⁵ P. D. WANG, L. SHUSTER u. N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry **206**, 299 [1954].

Nicotinamid-5-Joduracil-Dinucleotid wurde analog vorher beschriebener Synthesen¹⁶ aus den beiden Mononucleotiden Nicotinamid- und dem nichtfunktionellen Mononucleotid durch Kondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid in wäßrigem Pyridin hergestellt. Nach Entfernen des Dicyclohexylharnstoffes wurde das Coenzymanalogue durch Chromatographie an einer Dowex-1 × 8-Säule (Chloridform, 100–200 mesh, 2·15 cm) gereinigt. Nach Auswaschen der Säule mit Wasser wurde mit 0,02 M LiCl als Gradient eluiert (Mischgefäß 500 ml Wasser). Die Verbindung erschien nach Durchfluß von 200 ml der Lithiumchlorid-Lösung. Die Lösung wurde bei 25° auf 4 ml i. Vak. konzentriert und zur Entfernung überschüssiger Salze an einer Sephadex-G-10-Säule (150·2 cm) chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Wasser. Das Coenzymanalogue erschien nach Durchfluß von 120 ml Wasser. Das Eluat wurde lyophilisiert. 120 mg eines farblosen Produkts wurden erhalten, das sich an Licht braun verfärbte.

LiC₂₀H₂₅N₄O₁₆JP₂ (Mol.-Gew. 772,98)

Ber. N 7,24 J 16,41 P 7,95,

Gef. N 7,16 J 15,07 P 8,12.

$\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}, \epsilon = 8,9 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)}$

Dihydroform:

$\lambda_{\max} = 291 \text{ nm}, \epsilon = 7,5 \cdot 10^3 \text{ (pH 8,2)},$

$\lambda_{\max} = 337 \text{ nm}, \epsilon = 6,2 \cdot 10^3 \text{ (pH 8,2)}.$

Nicotinamid-Uracil-Dinucleotid

$\lambda_{\max} = 263 \text{ nm}, \epsilon = 11,9 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)}.$

Dihydroform:

$\lambda_{\max} = 263 \text{ nm}, \epsilon = 9,4 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)},$

$\lambda_{\max} = 337 \text{ nm}, \epsilon = 6,2 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)}.$

Zur Aufnahme von *UV-Spektren* verwandten wir ein Cary-14-Spektrophotometer. *Fluoreszenzspektren* wurden im Beckman Gitterfluorimeter 1076 aufgenommen.

Zur *Darstellung der Dihydrocoenzym-Analogen* wurden 7 mg der oxydierten Verbindung im 1,5 ml 0,5 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5 gelöst, mit 0,15 ml Äthanol und 0,1 ml ADH_H-Suspension (30 mg/ml) versetzt. Die Bildung der Dihydroform wurde bei 25°C im Photometer Eppendorf bei 366 nm in einer 1 : 100 verdünnten Probe verfolgt. Anschließend wurden Enzym, Alkohol und Acetaldehyd sowie Spuren nicht umgesetzten Coenzym und Zersetzungsprodukte durch Gelchromatographie an einer Sephadex-G-10-Säule (120·2 cm) vom Dihydrocoenzym abgetrennt. Als Elu-

tionsmittel diente 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Die Konzentration des Dihydrocoenzym im Eluat wurde im Hitachi-Perkin-Elmer Double Beam Spektrophotometer 124 durch Aufnahme des Absorptionsspektrums bestimmt.

Zur *Vorbereitung der Dehydrogenasen* wurden 20 mg der Kristallsuspension zentrifugiert, der Niederschlag im 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,2 aufgenommen. Durch Gelchromatographie an einer Sephadex-G-25-Säule (30·2 cm) wurden Salze entfernt. Als Elutionsmittel verwandten wir 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,2. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Biuret-methode bestimmt.

Die *Differenzspektren* zwischen gespaltenem und intaktem Dihydrocoenzym wurden bei 28° in einem Cary-14-Spektrometer aufgenommen. In einer Tandemküvette $D = 2 \cdot 0,45 \text{ cm}$ befanden sich in Kammer-1 $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Dihydrocoenzym in 1 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2. In der Kammer-2 der Küvette waren 1 mg Pyrophosphatase aus Naja Nivea in 1 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 gelöst. Nach der Aufnahme der Null-Linie wurde der Inhalt beider Kammern gemischt und das Spektrum gegen die nichtgemischte Vergleichsküvette aufgenommen.

Differenzspektren zwischen Enzym und Dihydrocoenzym und dem Komplex wurden bei 28° in ähnlicher Anordnung aufgenommen. In der Kammer-1 der Meßküvette befand sich 1 ml einer $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Dihydrocoenzym-Lösung in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2. In Kammer-2 waren 1 ml einer $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Dehydrogenase-Lösung (3,6 mg Enzym/bezogen auf die Untereinheit Mol.-Gew. 36000) im gleichen Puffer gelöst. Nach Aufnahme der Null-Linie wurde der Inhalt der Meßküvette gemischt und das Spektrum gegen die nichtgemischte Vergleichsküvette aufgenommen.

Die Bestimmung der *Coenzymeigenschaften* erfolgte im Photometer Eppendorf mit registrierendem Schreiber bei 25°. In einer 1-cm-Küvette befanden sich 2 ml 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5 und 0,2 ml 1 M Lithiumlactat-Lösung. Die Cozymmenge variierte zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ bis $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,02 ml LDH-Lösung ($c = 6,3 \cdot 10^{-2} \text{ mg/ml}$) gestartet. Im Test mit Alkohol-Dehydrogenasen wurden anstelle des Lithiumlactats 0,05 ml Äthanol zugeetzt. Die Reaktion wurde mit 0,02 ml einer Suspension von ADH_L (10 mg/ml) bzw. 0,02 ml einer Lösung von ADH_H ($c = 0,3 \text{ mg/ml}$) ausgelöst.

Für die Unterstützung der Arbeit danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Für die wertvollen Hinweise bei der Auswertung der Differenzspektren danken wir Herrn Professor Dr. H. WITZEL.

¹⁶ C. WOENCKHAUS u. G. PFLIEDERER, Biochem. Z. **341**, 495 [1965].