

Darstellung und Eigenschaften des Coenzymanalogen Nicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid

C. WOENCKHAUS, R. KALEJA * und P. HEIK

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

(Z. Naturforsch. 25 b, 1252—1258 [1970]; eingegangen am 30. Juni 1970)

Kondensation des Quecksilbersalzes von 4-Methyl-5-acetyl-imidazol ** mit 1-Chlor-2.3.5-*O*-tribenzoyl-ribofuranose liefert das geschützte Ribosid **3**. Zur Strukturaufklärung der Verbindung wurde 4-Methyl-5-acetyl-1-(β -D-*O*-2'.3'.5'-triacetyl-ribofuranosyl)-imidazol mit Methyljodid in das 3.4-Dimethyl-5-acetyl-1-(β -D-*O*-2'.3'.5'-triacetyl-ribofuranosyl)-imidazoliumjodid überführt und der Zuckerrest hydrolytisch gespalten. Das entstandene Imidazol-Derivat ist identisch mit 1.5-Dimethyl-4-acetyl-imidazol. 4-Methyl-5-acetyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol wurde mit Aceton in das Isopropyliden-Derivat **4** überführt. Die Phosphorylierung zum Nucleosid-5'-phosphat (**5**) führten wir mit β -Cyanäthyl-phosphat durch. Durch Kondensation mit Nicotinamid-mononucleotid erhielten wir das Coenzymanaloge Nicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid (**6**). Die Verbindung liegt im oxydierten Zustand in gefalteter Form vor. Das Fluoreszenz-Anregungsspektrum der Dihydroverbindung zeigt keine Energieübertragung vom nichtfunktionellen 4-Methyl-5-acetyl-imidazol-Teil auf den Dihydronicotinamid-Ring. Das Coenzymanaloge weist eine größere Michaelis-Konstante im Test mit Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz *** auf als das natürliche Nicotinamid-adenin-dinucleotid ***. Die maximale Umsatzzahl ist trotz der schwächeren Bindung vergrößert. Das unterschiedliche Verhalten des Coenzymanalogen **6** gegenüber NAD läßt, neben der π -Bindung des nichtfunktionellen Teils, eine polare Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms vermuten, die die Ausrichtung des Coenzym im Coenzym-Enzym-Komplex bewirkt.

Dihydronicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid bildet einen fluoreszierenden Komplex mit der Lactat-Dehydrogenase, der dem des NADH-LDH-Komplexes sehr ähnlich ist.

Ergebnisse

4-Methyl-5-acetyl-imidazol, dargestellt nach einer Vorschrift von OCHAI und Mitarbb.¹, bildet mit Quecksilber(II)salzen eine schwerlösliche Verbindung. Diese reagiert mit 1-Chlor-tribenzoyl-ribofuranose² unter Bildung des 4-Methyl-5-acetyl-1-(β -D-*O*-2'.3'.5'-tribenzoyl-ribofuranosyl)-imidazol **1**. Die beiden Stickstoffatome des Imidazolringes sollten mit dem Halogenzucker gleich gut reagieren. Neben dem erwähnten Nucleosid sollte das isomere 4-Acetyl-5-methyl-1-(β -D-*O*-2'.3'.5'-tribenzoyl-ribofuranosyl)-imidazol entstehen. Chromatographisch erwies sich die Verbindung als einheitlich. Auch die Abspaltung der Benzoylreste mit ammoniakalischem Methanol lieferte nur ein Nucleosid. Zur Struktur-

aufklärung wurde das Nucleosid **3** acetyliert und mit Methyljodid das Jodid des *N*-Methyl-imidazoliumnucleosids hergestellt³. Nach Austausch des Jodions durch Chlorid mit Silberchlorid isolierten wir die Verbindung als Tetrachlorgoldsäure-Komplex. Durch saure Hydrolyse wurde der Zuckerrest abgespalten. Das gebildete Dimethyl-acetyl-imidazol verglichen wir mit den beiden isomeren Verbindungen 1.5-Dimethyl-4-acetyl-imidazol und 1.4-Dimethyl-5-acetyl-imidazol.

Die Vergleichssubstanzen erhielten wir aus dem Ausgangsprodukt **1** durch Behandeln mit Dimethylsulfat⁴. Das Gemisch beider Verbindungen konnte durch Chromatographie an Sephadex LH 20 aufgetrennt werden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. C. WOENCKHAUS, Institut für Vegetative Physiologie, Chem.-Physiolog. Institut d. Johann-Wolfgang-Goethe-Univ. D-6000 Frankfurt a. M.-Süd, Ludwig-Rehn-Str. 14, Theodor-Stern-Haus.

* Teil der Dissertationsarbeit R. KALEJA, Frankfurt am Main 1970.

** 5-(4-Methyl-imidazolyl)-methylketon.

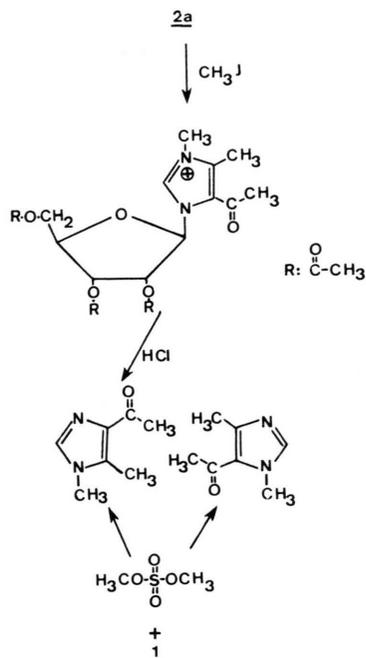
*** Abkürzungen: LDH = Lactat-Dehydrogenase, L-Lactat: NAD-Oxidoreduktase (E.C. 1.1.1.27); NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid; NADH = Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid.

¹ E. OCHAI, T. TAMAMUSHI u. F. NAGASAWA, Chem. Ber. **73**, 28 [1940].

² H. M. KISSMAN, C. P. PIDACKS u. B. R. BAKER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 18 [1955].

³ J. M. GULLAND u. T. F. MACRAE, J. chem. Soc. [London] **1933**, 662.

⁴ W. B. HUBBALL u. F. L. PYMAN, J. chem. Soc. [London] **1928**, 21.



Die Struktur der beiden Imidazol-Verbindungen bestimmten wir durch Aufnahme der NMR-Spektren. Beide Verbindungen weisen ähnliche Spektren auf. Die Protonen der Methylgruppen liefern Signale: bei 2,7 ppm (δ), das 6 Protonen zugeordnet werden muß, und ein weiteres bei 3,95 ppm (δ), das bei dem 1.4-Dimethyl-5-acetylimidazol auf 4,1 ppm (δ) verschoben ist. Dieser peak wird durch drei Protonen hervorgerufen und wird der Methylgruppe am Imidazolstickstoff zugeordnet. Das Signal des Protons (1 H) vom C-Atom 2 des Imidazolrestes liegt bei einer Verbindung bei 8,9 ppm (δ), bei der anderen bei 8,7 ppm (δ). Der Anisotropie-Effekt einer Acetylgruppe bewirkt an diesem Proton eine chemische Verschiebung des Signals zu höheren ppm-Werten. Wird die Acetylgruppe von zwei Methylresten umgeben, so wird ihr Einfluß auf die kernmagnetische Resonanz abgeschwächt. Das Signal verschiebt sich dann zu niederen ppm(δ)-Werten, von 8,9 auf 8,7 ppm (δ). Bei der Verbindung, die ein Signal bei 8,7 ppm zeigt, handelt es sich demnach um das 1.4-Dimethyl-5-acetyl-imidazol. Die andere ist das isomere 1.5-Dimethyl-4-acetyl-imidazol.

1.5-Dimethyl-4-acetyl-imidazol ist chromatographisch und elektrophoretisch identisch mit dem aus dem Ribosid isolierten Imidazol-Derivat.

Zur Synthese des Nucleosid-5'-phosphats wurden die 2'- und 3'-Hydroxylgruppen des 4-Methyl-5-ace-

tyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazols mit Aceton in das Isopropyliden-Derivat **4** überführt. Anschließend konnte die freie 5'-Hydroxylgruppe nach einer Vorschrift von TENER⁵ mit β -Cyanäthylphosphat zum Nucleotid verestert werden.

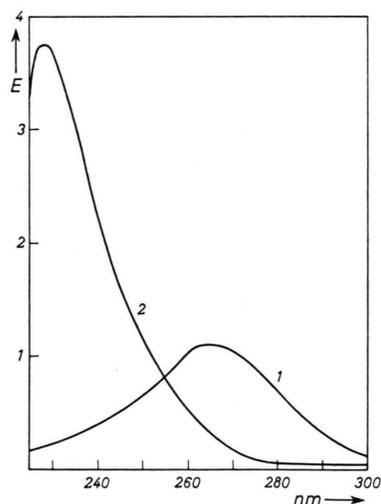
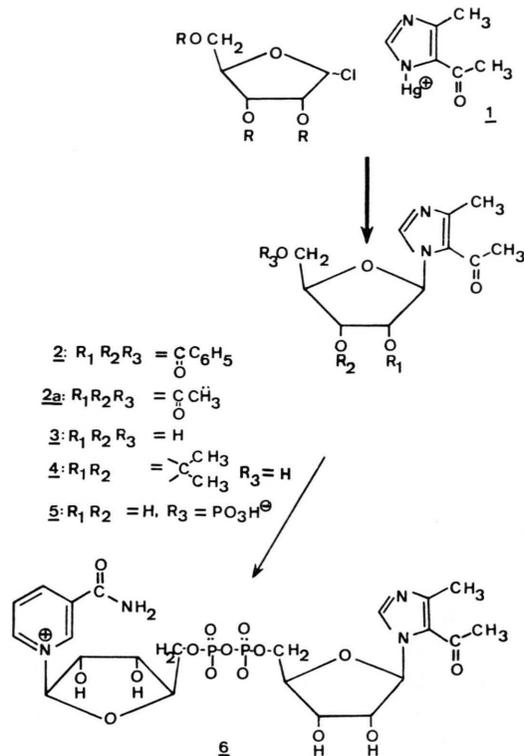


Abb. 1. Absorptionsspektrum des 4-Methyl-5-acetyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-phosphats; $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; 1: gemessen bei pH 11; 2: gemessen bei pH 1; Ordinate: Extinktion.

⁵ G. M. TENER, J. Amer. chem. Soc. **83**, 3060 [1961].

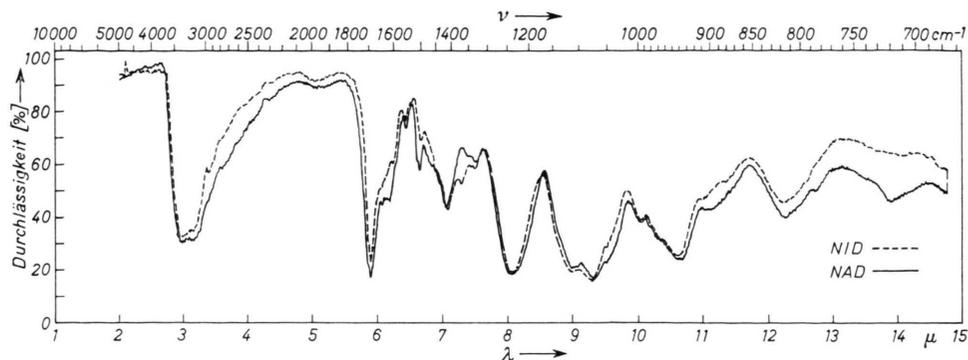


Abb. 2. IR-Spektrum von **6** (in Kaliumbromid): ----, IR-Spektrum von NAD (in Kaliumbromid): —, 1,5 mg Substanz auf 250 mg Kaliumbromid.

Nach Abspalten der Schutzgruppen konnte **5** durch Säulenchromatographie an Dowex 50 × 8 gereinigt werden. Der pK 3,6 des chromophoren Imidazolrestes konnte durch die verschiedene Lage der Imidazolabsorption in saurem und alkalischem Milieu bestimmt werden (Abb. 1).

Das Nucleotid **5** reagierte in wäßrigem Pyridin mit Nicotinamidmononucleotid **6** und Dicyclohexylcarbodiimid unter Bildung des Coenzymanalogen **6**⁷. Die Verbindung konnte durch Säulenchromatographie an Dowex 1 × 8 Formiatform gereinigt werden.

Das Coenzymanalogen **6** zeigt ein IR-Spektrum, das dem des NAD analog ist (Abb. 2).

Durch Spaltung der Pyrophosphatbindung von **6** wurde ein Extinktionsanstieg von 11% im Maximum der Absorption bei 265 nm festgestellt, der in der Größenordnung des natürlichen Coenzym liegt⁸. Dieser Anstieg wird durch das Aufheben des „base-stacking“-Effektes hervorgerufen. Beide Basen sind im Coenzym benachbart. Durch die Spaltung der Pyrophosphatbindung wird die intramolekulare Wechselwirkung zwischen beiden Ringen aufgehoben.

Im Fluoreszenz-Anregungsspektrum des Dihydro-**6** fehlt die Energieübertragung vom nichtfunktionellen Imidazolring zum Dihydronicotinamidring. Im Gegensatz dazu absorbiert der Adeninring im Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid UV-Licht der Wellenlänge 260 nm. Die Energie wird von ihm in einem strahlungslosen Prozeß auf den benachbarten Dihydronicotinamidring übertragen und als Fluoreszenzlicht emittiert⁹. Dieser Effekt ist jedoch nicht nur

von der Faltung des Coenzym abhängig, sondern beruht auf der Polarisationsrichtung der Ladungen im angeregten Zustand des nichtfunktionellen Ring-systems.

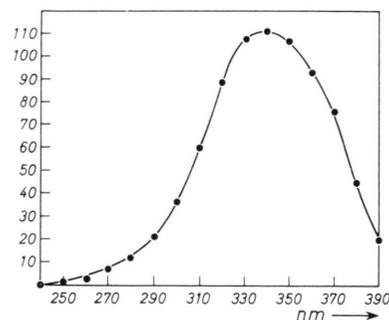


Abb. 3. Fluoreszenz-Anregungsspektrum, Emission 455 nm, von Dihydro-**6**; $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5; Abszisse: Anregungswellenlänge, Ordinate: relative Fluoreszenzintensität.

Das Absorptionsspektrum (Abb. 4) des Coenzymanalogen **6** zeigt ein Maximum bei 266 nm. Nach der Reduktion zum Dihydrocoenzym-Analogen absorbiert der Dihydronicotinamid-Ring bei 338,5 nm. Das Absorptionsmaximum der oxidierten Verbindung bei 266 nm setzt sich nicht additiv aus den Extinktionswerten der beiden Basen zusammen.

Die Hypochromie im oxidierten Coenzymanalogen und die Lage des Dihydronicotinamid-Absorptionsmaximums zeigen, daß die intramolekulare Wechselwirkung zwischen beiden Basen der im natürlichen Coenzym sehr ähnlich ist.

⁶ G. W. E. PLAUT u. K. A. PLAUT, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 189 [1954].

⁷ N. A. HUGHES, G. W. KENNER u. A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1957**, 3733.

⁸ J. M. SIEGEL, G. A. MONTGOMERY u. R. M. BOCK, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 288 [1959].

⁹ G. WEBER, Nature [London] **180**, 1409 [1957].

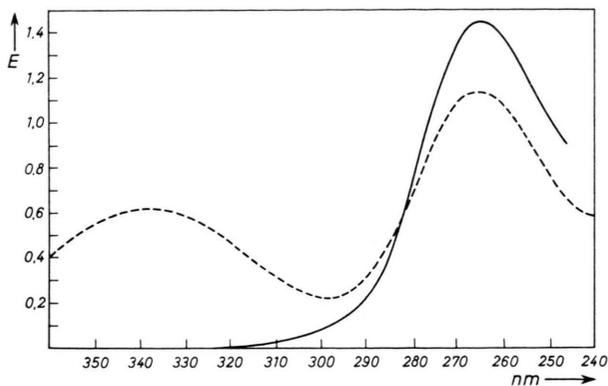


Abb. 4. Absorptionsspektrum des Coenzymanalogen **6**; $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5; oxydierte Form: ———, Dihydro-Form: - - - - -.

Der Pyrimidinteil des Adenins ist in dieser Verbindung nicht enthalten. Der Acetylimidazol-Rest scheint eine entsprechende Wechselwirkung mit dem Nicotinamid- oder Dihyronicotinamid-Ring einzugehen.

Enzymatische Eigenschaften

Das Coenzymanalogen **6** zeigt im Test mit LDH bei pH 9,5 eine Michaelis-Konstante von $5 \cdot 10^{-4}$ M; die des NAD liegt, unter gleichen Bedingungen bestimmt, bei $0,75 \cdot 10^{-4}$ M. Trotz der schwächeren Bindung liegt die maximale Umsatzzahl bei 25.000 und übertrifft die des NAD mit 17.000. Auch das Nicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid ist als Cofaktor besser geeignet als NAD¹⁰. Diese Verbindung wird ebenfalls schwächer an die LDH gebunden. Bei beiden fällt auf, daß sie, zum Unterschied zu den weniger geeigneten Coenzymanalogen: Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid, Nicotinamid-1-desazapurin-dinucleotid und Nicotinamid-phenyl-dinucleotid¹⁰, eine polarisierbare Gruppe enthalten, deren Lage mit der des N-1 im Adeninring verglichen werden kann. Im Test mit Malat-Dehydrogenase und den Alkohol-Dehydrogenasen aus Leber und Hefe zeigt das Coenzymanalogen **6** nahezu gleiche Werte, wie sie mit Nicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid erreicht werden.

Dihyronicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid bildet mit LDH einen fluoreszierenden Komplex, der sich nur wenig vom NADH-LDH-Komplex unterscheidet.

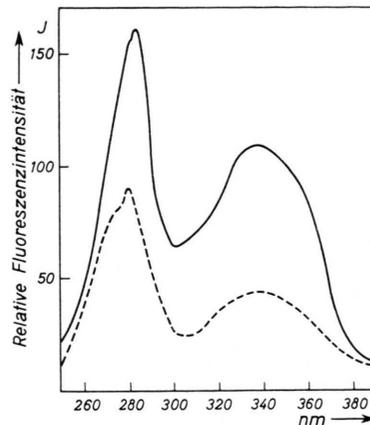


Abb. 5. Fluoreszenz-Anregungsspektrum, Emission 455 nm, des Dihyronicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid-LDH-Komplexes. - - - - LDH $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; ——— Dihydro-**6** $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und LDH $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5.

Diskussion

Coenzymmodelle mit Veränderungen auf der Adeninsseite¹⁰ werden um den Faktor 5–10-mal schwächer als NAD an das Enzym angelagert. KAPLAN und Mitarbb.¹¹ vermuteten, daß eine Wasserstoffbrücke zwischen Aminosäureresten des Enzyms und dem N-1 des Adenins die Bindung des Coenzym an das aktive Zentrum unterstützt. Unsere Untersuchungen lieferten für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke keinen Hinweis. Diese Bindungsart wird durch den Vergleich der Michaelis-Konstanten zwischen Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid und den Coenzymanalogen Nicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid und Nicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid an der LDH unwahrscheinlich. Bei den ersten Coenzymanalogen ist eine Wasserstoffbrücke wegen des Fehlens von N-1 unmöglich. Alle Coenzymanalogen weisen jedoch gleichgroße Michaelis-Konstanten auf.

Die Eigenschaften der Coenzymanalogen Nicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid und Nicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotid im Test mit LDH höhere Umsatzzahlen zu erreichen als mit dem natürlichen Coenzym, muß mit der unterschiedlichen Polarisierbarkeit der verschiedenen nichtfunktionellen Molekülteile im Enzym-Coenzym-Komplex zusammenhängen.

¹⁰ C. WOENCKHAUS u. P. ZUMPE, Z. Naturforsch. **23b**, 484 [1968].

¹¹ C. P. FAWCETT u. N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry **237**, 1709 [1962].

Der Adeninteil wird durch hydrophobe Beziehung im aktiven Zentrum gebunden; durch eine polare Gruppe des Enzyms, die in Höhe von N-1 des Adenins liegt, kann der nichtfunktionelle Teil ausgerichtet werden. Coenzymanaloge, denen eine polare Gruppe in Höhe des N-1-Atoms des Purinteils fehlt, werden nur durch hydrophobe Wechselwirkungen im aktiven Zentrum gebunden. Von RABIN und Mitarbb.¹² wurde durch Untersuchungen der Differenzspektren zwischen Alkohol-Dehydrogenase und NADH eine Protonisierung des Adeninrestes am N-1 angenommen. 4-Methyl-5-acetyl-imidazol-ribosid-5'-phosphat zeigt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 266 nm bei pH 10 auf 228 nm bei pH 2. Die Verschiebung kann jedoch nur durch eine Protonisierung des basischen Imidazolstickstoffs erklärt werden.

Mit Brom reagiert **6** unter Bildung des Bromacetyl-Derivats. Das bromierte Coenzymanaloge inaktiviert die LDH nicht¹³. Dieses Ergebnis macht die Anwesenheit eines polaren Lysinium- oder Argininium-Restes im aktiven Zentrum des Enzyms unwahrscheinlich. Andererseits schließt der Inaktivierungsversuch die Anwesenheit einer polaren, wenig reaktiven Gruppe am Enzym nicht aus.

Material und Methoden

4-Methyl-5-acetyl-imidazol¹ (**1**)

Zur Bildung des Quecksilberkomplexes lösten wir 20 g **1** in 800 ml 50-proz. wäßrigem Äthanol und versetzten die Lösung mit 44 g Quecksilber(II)chlorid, das zuvor in 300 ml 50-proz. wäßrigem Äthanol gelöst war. Die Mischung wurde mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und das unlösliche, farblose Quecksilbersalz abgesaugt. Nach dem Waschen mit Wasser, Äthanol und Äther wurde es über P₄O₁₀ getrocknet.

4-Methyl-5-acetyl-1-(β-D-O-tribenzoyl-ribofuranosyl)-imidazol (**2**)

55 g des Quecksilbersalzes von **1** wurden in 600 ml Xylol suspendiert und azeotrop getrocknet. Anschließend wurden 65 g 1-Chlor-2.3.5-O-tribenzoyl-ribofuranose² — in 400 ml Xylol gelöst — zugegeben. Die Mischung wurde 1 Stde. unter Rückfluß gekocht, heiß filtriert und das Filtrat i. Vak. zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 200 ml Chloroform gelöst. Quecksilbersalze wurden durch Ausschütteln mit 100 ml 30-proz. Kaliumjodidlösung entfernt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde die Chloroformlösung mit Na-

triumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft. Die Ausbeute an **2** betrug 35 g eines sirupösen Produkts.

4-Methyl-5-acetyl-1-(β-D-ribofuranosyl)-imidazol (**3**)

35 g **2** wurden bei -18 °C in 1000 ml Ammoniakgesättigtem Methanol gelöst. Die Mischung wurde in einem festverschlossenen Gefäß 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufgehoben. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. bei 25 °C entfernt und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Die Ausbeute an **3** betrug 13 g eines farblosen kristallinen Produkts.

Schmp. 179 °C. $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$, $\epsilon = 11 \cdot 10^3$ (pH 9,5).

C₁₁H₁₆N₂O₅ (256)

Ber. C 51,60 H 6,25 N 10,95,

Gef. C 51,74 H 6,29 N 10,93.

4-Methyl-5-acetyl-1-(β-D-O-2'.3'.5'-triacetyl-ribofuranosyl)-imidazol (**2a**)

3,2 g **3** wurden in 50 ml abs. Pyridin suspendiert und unter Rühren mit 20 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 90 Min. wurde die klare Lösung i. Vak. bei 50 °C eingengt und der Rückstand in 50 ml Chloroform gelöst. Zur Entfernung der restlichen Essigsäure wurde die Chloroformphase mit 10 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung ausgeschüttelt und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Chloroform i. Vak. abgedampft. Der Rückstand kristallisierte aus Äthanol. Die Ausbeute an **2a** betrug 3,2 g. Schmp. 116 °C.

C₁₇H₂₂N₂O₈ (382)

Ber. C 53,40 H 5,76 N 7,34,

Gef. C 53,25 H 5,81 N 7,39.

4-Methyl-5-acetyl-1-(β-D-O-2'.3'-isopropyliden-ribofuranosyl)-imidazol (**4**)

3,2 g **3** wurden in 400 ml trockenem Aceton suspendiert und mit 25 g Toluolsulfonsäuremonohydrat versetzt. Nach 3 Stdn. Stehen bei Raumtemperatur gab man die Lösung in 1000 ml Eiswasser, das mit 50 ml 28-proz. wäßrigem Ammoniak versetzt war, und engte die Lösung i. Vak. bei 35 °C zur Trockene ein. Der Rückstand wurde mit warmem Aceton extrahiert. Nach Abdampfen des Acetons erhielt man 3,5 g **4**. Die Verbindung konnte nicht kristallin erhalten werden.

4-Methyl-5-acetyl-1-(β-D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-phosphat (**5**)

3,5 g **4** wurden in 40 ml abs. Pyridin gelöst und mit 60 ml β-Cyanäthylphosphat-Lösung⁵ (aus 16,1 g Barium-β-cyanäthylphosphat nach Behandeln mit Dowex-50-H⁺-Form und Lösen in 50 ml Pyridin) versetzt. Das Gemisch wurde bei 30 °C i. Vak. zur Trockene eingengt und Reste von Feuchtigkeit durch wiederholtes

¹² R. F. FISHER, A. C. HAINE, A. P. MATHIAS u. B. R. RABIN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **19**, 169 [1967].

¹³ J. BERGHÄUSER, persönliche Mitteilung.

Abdampfen mit je 50 ml abs. Pyridin entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in 150 ml abs. Pyridin gelöst und mit 25 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 24 Stdn. Stehen bei Raumtemperatur wurden 150 ml Wasser zugesetzt und das Lösungsmittel i. Vak. bei 30 °C entfernt. Zum Rückstand gab man 500 ml 0,4 N LiOH und ließ das Gemisch 4 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs wurde die Lösung neutralisiert und auf eine Dowex 50 × 8-Säule (2 · 80 cm, 200–400 mesh, H⁺-Form) gegeben. **5** wurde mit Wasser von der Säule eluiert und erschien nach Durchfluß von ca. 7 l. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt, bei 30 °C i. Vak. auf 5 ml eingengt und **5** mit Aceton als amorphes farbloses Produkt gefällt. Die Ausbeute betrug 2,85 g.

$$\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}, \epsilon = 10,8 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)}.$$

C₁₁H₁₈O₈P₁ · 0,33 Aceton (336,2)

Ber. C 40,5 H 5,36 N 7,90 P 8,75,
Gef. C 40,25 H 5,24 N 8,10 P 8,75.

Nicotinamid-4-methyl-5-acetyl-dinucleotid (6)

650 mg Nicotinamidmononucleotid und 1,1 g **5** wurden in 15 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Pyridin versetzt. Zu der Lösung gab man 8 g Dicyclohexylcarbodiimid. Die Mischung wurde 24 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Anschließend saugte man den ausgefallenen Cyclohexylharnstoff ab, wusch den Rückstand mit 2 ml heißem Wasser und gab zu den vereinigten Filtraten erneut 8 g Dicyclohexylcarbodiimid. Dieser Vorgang wurde alle 24 Stdn. wiederholt. Nach 7 Tagen gab man den Ansatz in 400 ml Wasser, filtrierte nach 3 Stdn. vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und schüttelte das Filtrat 3-mal mit je 150 ml Chloroform aus. Die wäßrige Phase wurde bei 30 °C i. Vak. auf 10 ml eingengt und auf eine Dowex 1 × 8-Säule (Formiatform, 100–200 mesh, 2 · 30 cm) gegeben. Mit Wasser wurde Nicotinamidmononucleotid eluiert. Anschließend wurde 0,25 M Ameisensäure als Gradient aufgegeben. Das Mischgefäß enthielt 500 ml Wasser. Das Coenzymanalogue **6** erscheint nach Durchfluß von 500 ml. Entsprechende Fraktionen wurden gesammelt und bei 20 °C i. Vak. auf 3 ml eingengt. **6** wurde mit Aceton gefällt. Die Ausbeute betrug 320 mg.

$\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}; \epsilon = 13,7 \cdot 10^3 \text{ (pH 8,2)}$; Dihydro-**6**
 $\lambda_{\max} = 338,5 \text{ nm}; \epsilon = 6,2 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)}$; $\lambda_{\max} = 265 \text{ nm};$
 $\epsilon = 10,9 \cdot 10^3 \text{ (pH 9,5)}$.

6 C₂₂H₃₁O₁₅N₄P₂ · 0,33 Aceton (652,4)

Ber. C 41,30 H 5,02 N 8,02 P 8,95,
Gef. C 41,45 H 4,93 N 7,64 P 9,62.

Strukturbestimmung von **3**

1,5 g **2 a** werden mit 8 g Methyljodid im geschlossenen Rohr 20 Stdn. auf 125 °C erhitzt. Die braune Lösung wurde mit 50 ml Chloroform versetzt und mit Wasser extrahiert, die wäßrige Phase zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser aufgenommen. Er ist elektrophoretisch einheitlich. Eine absorbierende Verbindung wanderte im elektrischen

Feld (30 V/cm) bei pH 8,2 zur Kathode. Die wäßrige Lösung wurde mit frisch gefälltem Silberchlorid versetzt. Vom Silberchlorid und Silberjodid wurde abfiltriert und das Filtrat mit 5 ml einer wäßrigen Tetrachlorgoldsäure-Lösung (hergestellt durch Auflösen von 500 mg Gold in Königswasser und wiederholtes Abdampfen mit konzentrierter Salzsäure) versetzt. 300 mg eines gelbgefärbten, schwerlöslichen Goldkomplexes wurden erhalten. Der Goldkomplex wurde mit 10 ml konz. Salzsäure im geschlossenen Rohr 14 Stdn. auf 150 °C erhitzt. Vom ausgefallenen Gold wurde abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Etwa 30 mg einer öligen Verbindung wurden erhalten. In der Elektrophorese wanderte die Verbindung bei pH 6,5 und 30 V/cm nach 4 Stdn. etwa 3 cm zur Kathode. Im Dünnschichtchromatogramm konnte nur eine UV-Licht absorbierende Verbindung nachgewiesen werden.

Zur Herstellung der möglichen Isomeren erhitzen wir 1 g **1** 40 Min. mit 2 ml Dimethylsulfat auf 100 °C. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung gerührt und anschließend die Lösung mit 100 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde nach dem Trocknen über Natriumsulfat abgedampft. Der Rückstand, ein leicht gelbes Öl, enthielt neben wenig Ausgangsmaterial die beiden isomeren Verbindungen. Durch Säulenchromatographie an einer Sephadex-LH-20-Säule (140 · 2 cm) mit 20-proz. Methanol als Elutionsmittel konnten wir das Isomerengemisch auftrennen und das Ausgangsmaterial fast vollständig entfernen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 15 ml/Stunde. Die zuerst eluierte Verbindung war 1,5-Dimethyl-4-acetyl-imidazol, anschließend erschien 1,4-Dimethyl-5-acetyl-imidazol und diesem folgte nicht umgesetztes Ausgangsprodukt.

1,5-Dimethyl-4-acetyl-imidazol und das aus dem Ribosid erhaltene Imidazol-Derivat unterscheiden sich nicht im chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten.

Spaltung des Coenzymanalogen **6**

In einer Tandemküvette $D = 2 \cdot 0,45 \text{ cm}$ befanden sich in der Kammer (1) $1 \cdot 10^{-4} \text{ M } \mathbf{6}$ in 1 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,2, 0,3 mM CaCl₂. In der Kammer (2) der Küvette befanden sich 5 mg Pyrophosphatase im gleichen Puffer. Nach Aufnahme der Null-Linie gegen eine ebenso beschickte Vergleichsküvette wurde der Inhalt der beiden Kammern der Meßküvette gemischt und das Spektrum gegen die nicht gemischte Vergleichsküvette aufgenommen. Die Extinktion stieg im Bereich von 266 nm auf 0,13 an.

Die Bestimmung des *pK*-Wertes von **5** erfolgte mit einer Pufferreihe nach THEORELL und STENHAGEN¹⁴. Zu 3 ml Pufferlösung, deren pH von 2–12 reichte, unterteilt in ganze pH-Einheiten, wurden 0,03 ml einer $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ Lösung von **5** gegeben. Die Änderung der Extinktion bei 275 nm wurde bestimmt und gegen den pH-Wert aufgetragen. Aus dem Wendepunkt der Kurve wurde der *pK*-Wert ermittelt.

¹⁴ T. THEORELL u. E. STENHAGEN, Biochem. Z. **299**, 417 [1939].

Die Bestimmung der optischen Dichte der Säuleneluate erfolgte im Uvicord L 2 der Firma LKB-Produkters Stockholm, Schweden. Zur *Papierelektrophorese* verwandten wir ein Hochspannungsgerät der Firma Hormuth & Vetter, Wiesloch. Als Elektrophoresepuffer dienten folgende Lösungen:

Ameisensäure/Essigsäure pH 1,9 (50 ml Ameisensäure und 150 ml Eisessig auf 1 l mit Wasser verdünnt); Pyridin/Essigsäure pH 6,5 (500 ml Pyridin, 50 ml Eisessig und 4,45 l Wasser; 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0.

Als Laufmittel zur *Dünnschichtchromatographie* verwandten wir ein Gemisch aus 30 ml tert. Amylalkohol, 20 ml Ameisensäure, 10 ml H₂O. Die *Dünnschichtchromatographie* erfolgte auf Platten, die mit DEAE-Celulose, Schichtdicke 0,325 mm, der Firma Macherey, Nagel und Co, Düren, beschichtet waren.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian A 60-Gerät aufgenommen. Als Lösungsmittel diente D₂O und als Standard Hexamethyl-disiloxan.

Darstellung des Dihyronicotinamid-4-methyl-5-acetyl-imidazol-dinucleotids, Dihydro-6 aus der oxydierten Verbindung

15 mg **6** wurden in 3 ml 0,5 M Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5 gelöst, mit 0,3 ml Äthanol und 0,1 ml Alkohol-Dehydrogenase-Suspension (30 mg/ml) versetzt. Die Bildung der Dihydroform wurde 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 Elutionsmittel diente 0,05 M Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5. Die Konzentration der Dihydrocoenzym-Lösung wurde im Hitachi-Perkin-Elmer-Double-Beam-Spektrometer 124 durch Aufnahme des Absorptionsspektrums bestimmt.

NADH, LDH, Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe und Leber waren Produkte der Firma Boehringer, Mannheim.

Die Bestimmung der Michaelis-Konstante des Coenzymanalogen an der LDH erfolgte bei 25 °C im Photometer Eppendorf mit registrierendem Schreiber. In einer 1-cm-Küvette befanden sich in 2 ml 0,2 M Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5, 0,2 ml 1 M Lithiumlactat-Lösung. Die Coenzymmenge variierte zwischen 1 · 10⁻⁴ bis 1 · 10⁻³ M. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,02 ml einer LDH-Lösung, 2 γ Enzym gestartet. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde als \bar{E}/min bestimmt.

Hefe-Alkohol-Dehydrogenase-Test

In 2 ml 0,2 M Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5 befanden sich 1,2 mMol Äthanol und 0,5 – 5 μ Mol Coenzym. Die Reaktion wurde mit 1 · 10⁻³ mg Enzym ausgelöst. Der gleiche Ansatz wurde zum *Leber-Alkohol-Dehydrogenase-Test* verwandt. Mit 0,2 mg Enzym wurde die Reaktion ausgelöst.

Die Michaelis-Konstanten wurden nach LINEWEAVER und BURK¹⁵ bestimmt. Die maximalen Umsatzzahlen sind definiert als $UZ = \text{Mole Dihydrocoenzym/Mole Enzym} \cdot \text{Minute}$.

Die Aufnahme der *Fluoreszenzspektren* erfolgte an einem Beckman-Gitter-Fluorometer. Die Spaltbreite betrug 0,5 mm, die Empfängerempfindlichkeit 8. Die Spektren sind nicht korrigiert.

Frau G. KÖHLER danken wir für die Aufnahme der NMR-Spektren und Herrn Prof. Dr. H. FRITZ für die Hilfe bei der Auswertung der Spektren. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

¹⁵ H. LINEWEAVER, D. BURK, J. Amer. chem. Soc. **56**, 658 [1934].