

# Darstellung und Eigenschaften von Flavin-benzimidazol-dinucleotid

P. ZUMPE und C. WOENCKHAUS

Institut für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt/Main

(Z. Naturforschg. 21 b, 1149—1152 [1966]; eingegangen am 31. Mai 1966)

Die Synthese des Coenzymmodells Flavin-benzimidazol-dinucleotid\* gelang durch Kondensation von Benzimidazolribotid-imidazolid<sup>1</sup> oder Benzimidazolribotid-guanidiniumamidat<sup>2</sup> mit Flavinmononucleotid. Das Coenzymmodell war enzymatisch nicht aktiv und bildete keinen Enzym-Coenzym-Komplex. Im Absorptionsspektrum konnte eine Extinktionszunahme nach der Spaltung der Pyrophosphatbrücke nur im Bereich von 260 m $\mu$  beobachtet werden. Das Molekül liegt daher vermutlich in einer gefalteten Form vor. Ein Komplex zwischen Flavin- und Benzimidazolteil konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Fluoreszenzunterdrückung, die im FAD durch die Komplexbildung zwischen Flavin- und Adeninteil bedingt wird<sup>3</sup>, wurde im FBD-Coenzymmodell nicht beobachtet.

In früheren Arbeiten untersuchten wir an Coenzymen des NAD-Typs die intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem Purin- und dem Nicotinamid- bzw. Dihydronicotinamid-Teil. Purinhaltige Coenzymmodelle waren dem natürlichen NAD sehr ähnlich<sup>4, 5, 6</sup>. Die enzymatische Aktivität hatte sich in den verschiedenen Testsystemen nur wenig geändert. Auch die optischen Eigenschaften hydrierter und oxydierter Coenzymmodelle entsprachen denen des natürlichen Coenzym<sup>7</sup>. Die Beteiligung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung an der Wechselwirkung zwischen funktionellem und nichtfunktionellem Ringsystem wurde nicht festgestellt<sup>6</sup>. Der Ersatz des nichtfunktionellen Adeninringes durch die Heterocyclus 1-Desazapurin oder Benzimidazol im Coenzym NAD führte zu einem Abfall der enzymatischen Aktivität<sup>8</sup>. Die intramolekulare Wechselwirkung zwischen Nicotinamid und dem zweiten Heterocyclus in oxydierten Coenzymmodellen erschien schwächer als in purinhaltigen Verbindungen. Die Fluoreszenzanregungs-Spektren zeigten, unabhängig von der enzymatischen Aktivität, beim Dihydronicotinamid-1-desazapurin-dinucleotid und beim Benzimidazolanalogen des NADH's eine Energieübertragung vom nichtfunktionellen Ring auf den Dihydronicotinamid-Teil<sup>9</sup>.

Die meisten Purinderivate bilden mit Riboflavin Komplexe, die dem des Adenin-Riboflavin-Komplexes sehr ähnlich sind<sup>10</sup>. Uns interessierte daher der Einfluß des Benzimidazolringes im FBD, da Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid Eigenschaften aufweist, die zwischen denen des isolierten Nicotinamidmononucleotids und denen des Coenzym liegen.

Im Verlaufe dieser Arbeit veröffentlichten McCormick und Mitarbb. Modellversuche über die intramolekulare Wechselwirkung zwischen verschiedenen substituierten Purinen und Pyrimidinen und Riboflavin<sup>12</sup>. Sie fanden, daß die Bildung des Donor-Acceptor-Komplexes von der Ladungsverteilung zwischen den nichtfunktionellen und funktionellen Coenzymringen abhängt und diskutierten die Beteiligung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 6-Aminogruppe des Adenins und der 2-Carboxygruppe des Flavins. Im Coenzymmodell FBD ist eine Wasserstoffbrückenbindung ausgeschlossen, außerdem erwarteten wir einen sehr schwachen Komplex zwischen Benzimidazol- und Flavinteil. FBD unterscheidet sich chromatographisch und in seiner Wandereschwindigkeit im elektrischen Feld nicht vom FAD. Im Absorptionsspektrum fanden wir bei 260 m $\mu$  einen geringeren Extinktionswert, als theo-

\* Es werden folgende Abkürzungen verwendet: Flavin-benzimidazol-dinucleotid = FBD, Flavin-adenin-dinucleotid = FAD, Nicotinamid-adenin-dinucleotid = NAD, Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid = NADH.

<sup>1</sup> F. CRAMER u. H. NEUNHOEFER, Chem. Ber. 75, 1667 [1962].

<sup>2</sup> J. G. MOFFATT u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. 80, 3756 [1958].

<sup>3</sup> G. WEBER, Biochem. J. 47, 114 [1950].

<sup>4</sup> C. P. FAWCETT u. N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry 237, 1709 [1962].

<sup>5</sup> N. J. LEONARD u. R. A. LAURSEN, Biochemistry 4, 365 [1965].

<sup>6</sup> C. WOENCKHAUS, Chem. Ber. 97, 2439 [1964].

<sup>7</sup> G. PFLEIDERER, C. WOENCKHAUS, K. SCHOLZ u. H. FELLER, Liebigs Ann. Chem. 675, 205 [1964].

<sup>8</sup> C. WOENCKHAUS u. G. PFLEIDERER, Biochem. Z. 341, 495 [1965].

<sup>9</sup> G. PFLEIDERER, C. WOENCKHAUS u. M. NELBÖCK-HOCHSTETTER, Liebigs Ann. Chem. 690, 170 [1965].

<sup>10</sup> B. M. CHASSY u. D. B. MCCORMICK, Biochemistry 4, 2612 [1965].

<sup>11</sup> L. G. WHITBY, Biochem. J. 54, 439 [1963].

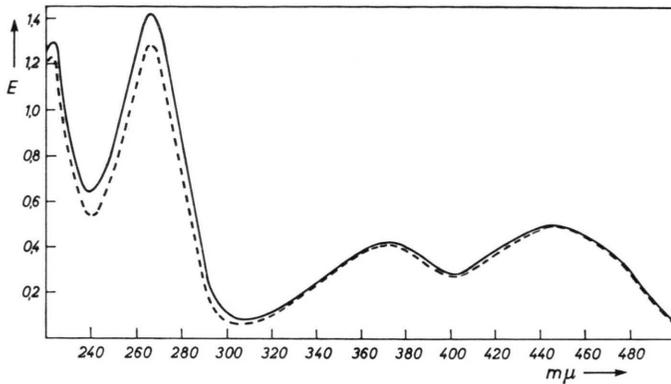


Abb. 1. FBD-Absorptionsspektrum.  $c=0,4 \cdot 10^{-4} \cdot m$ . im 0,1-m. Phosphatpuffer  $p_H$  7,0.  $\epsilon=28 \cdot 10^3$   $Mol^{-1} \cdot cm^2$  (260  $m\mu$ ),  $\epsilon=10 \cdot 10^3$   $Mol^{-1} \cdot cm^2$  (375  $m\mu$ ),  $\epsilon=12 \cdot 10^3$   $Mol^{-1} \cdot cm^2$  (450  $m\mu$ ).

retisch zu erwarten war. Erst nach Spaltung der Pyrophosphatbrücke wurde der errechnete Wert gemessen. Die Extinktion stieg nur im kurzwelligen Bereich bei 260  $m\mu$  um 10% an. Bei 450  $m\mu$  wurde kein Anstieg beobachtet<sup>11</sup>. Wir nehmen an, daß die Faltung des Coenzym nicht nur durch die Komplexbildung beider Heterocyklen bedingt wird, sondern auch von den Zuckerkomponenten, die beide Ringe verknüpfen. Die Lage der Absorptionsmaxima sind gegenüber denen des FAD ebenfalls verschoben. Das Spektrum ähnelt dem des Flavinmononucleotids.

Fluorimetrische Messungen ergaben, daß weder im Fluoreszenzanregungs- noch im Emissions-Spektrum Unterschiede zum Flavinmononucleotid auftreten. FAD zeigt dagegen bei  $p_H$  7,0 nur 15% der Flavinmononucleotid-Fluoreszenz. Im Dihydrionicotinamid-benzimidazol-dinucleotid findet man im Fluoreszenz-Anregungsspektrum eine Energieübertragung im Bereich der beiden Absorptionsbanden des Benzimidazolteils. Dieser Effekt war beim FBD nicht zu beobachten. Da zwischen Benzimidazol- und Flavinteil kein Komplex gebildet wird, entspricht die Fluoreszenzintensität der des Flavinmononucleotids. Änderungen des Fluoreszenz-Anregungsspektrums durch die Benzimidazolabsorption werden nicht erkannt, da gleichzeitig der stark fluoreszierende Flavinring angeregt wird. Im enzymatischen Test erwies sich FBD als Coenzym nicht wirksam. Es wird auch nicht an das aktive Zentrum des Enzyms, D-Aminosäureoxidase, gebunden. Hierbei ist zu beobachten, daß — im Gegensatz zu den Coenzym-

modellen des NAD-Typs — Coenzymmodelle des FAD-Typs bei chemischen Änderungen an der Adenosinseite unter großem Aktivitätsverlust im enzymatischen Test als Coenzym funktionieren<sup>13</sup>. An der Riboflavinseite führen Änderungen am Ribitylrest und am Benzolring nicht immer zur Inaktivität<sup>14</sup>. Nach THEORELL<sup>15</sup> wird Flavinmononucleotid salzartig durch den Phosphatrest außerdem über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Iminogruppe des Flavinringes und einer phenolischen OH-Gruppe des Enzyms im aktiven Zentrum des Proteins gebunden. Die gleiche Bindung soll auch für den FAD-Enzymkomplex gelten. Gegen diese Annahme spricht aber, daß Flavin-inosin-dinucleotid und andere purin- oder pyrimidin-haltige Flavincoenzymmodelle als Coenzym nur schwach wirksam sind<sup>13</sup> und FBD unwirksam ist, obwohl in allen Modellen die Flavinseite unverändert geblieben ist.

## Beschreibung der Versuche

### Coenzyme

Flavinmononucleotid-dinatriumsalz bezogen wir von der Firma Sigma. Flavin-adenin-dinucleotid und Dihydrionicotinamid-adenin-dinucleotid waren Coenzyme der Firma Boehringer & Soehne, Mannheim.

### Darstellung von FBD

#### A) Imidazolid-Methode<sup>1</sup>

500 mg Benzimidazolribosid-5'-phosphat werden in 40 ml Dimethylformamid gelöst und mit 1 g Carbonyldiimidazol<sup>16</sup> versetzt. Die Lösung ließ man drei Wochen bei Zimmertemperatur gut verschlossen stehen.

<sup>12</sup> J. C. M. TSIBIS, D. B. McCORMICK u. L. D. WRIGHT, Biochem. J. **4**, 504 [1965].

<sup>13</sup> D. B. McCORMICK, B. M. CHASSY u. J. C. M. TSIBIS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **89**, 447 [1965].

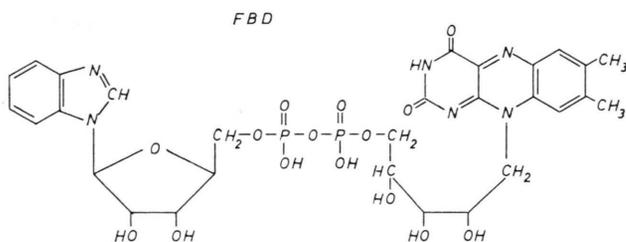
<sup>14</sup> B. M. CHASSY u. D. B. McCORMICK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **110**, 91 [1965].

<sup>15</sup> H. THEORELL, Proc. 4. interntl. Conge. Biochem. Wien 1958. Pergamon Press, Bd. **8**, 172 [1960].

<sup>16</sup> H. A. STAAB, Liebigs Ann. Chem. **609**, 75 [1957].

Anschließend wurden 800 mg Flavinmononucleotid als *tri-n*-Octylammoniumsalz, in 10 ml Pyridin und 20 ml Dimethylformamid gelöst, zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage auf 35° erwärmt. In dieser Zeit fiel ein farbloser Niederschlag aus. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels bei 30° i. Vak. nahm man den Rückstand in 20 ml Methanol auf und zentrifugierte vom Ungelösten. Der Überstand wurde mit 220 mg Natriumperchlorat, in 10 ml Aceton gelöst, versetzt und Aceton bis zur vollständigen Fällung zugegeben. Nach drei Stdn. Stehen im Eisbad filtrierte man den Niederschlag ab. Nach dem Waschen mit Aceton wurde er im Vakuum getrocknet. Zur Abtrennung von Ausgangs- und Nebenprodukten wurde das Substanzgemisch in wenig Wasser gelöst und auf eine DEAE-Säule (NM-DEAE 2100, 14·3 cm, Chloridform) gegeben. Man eluierte mit Wasser Lactoflavin und mit 0,01-*m*. LiCl-Lösung Flavinmononucleotid.

Das Coenzymmodell erschien nach Aufgabe von 0,05-*m*. LiCl-Lösung im Eluat. Diese Fraktion wurde zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit 30 ml Methanol unter Eiskühlung aufgenommen. Vom Ungelösten wurde filtriert, das Filtrat mit 20 ml einer 2-proz. Natriumperchlorat-Acetonlösung zusammengegeben. Durch Zugabe von Aceton fiel das FBD vollständig aus. Zur Abtrennung von mitgefallenem Natriumchlorid wurde der Niederschlag filtriert, in wenig Wasser gelöst und auf eine Dowex-50-Lithium-Säule (2·30 cm, 200–400 mesh) gegeben. Mit Wasser



eluierte man das Lithiumsalz. Nach Eindampfen der Lösung bei 30° i. Vak. wurde der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und FBD als Lithiumsalz mit Aceton und Äther 75:25 vollständig gefällt. Man zentrifugierte es ab, löste es in 5 ml Methanol und fällte das Natriumsalz nach Zugabe der berechneten Menge Natriumperchlorat mit Aceton. Das Natriumsalz ist im Gegensatz zum Lithiumsalz nicht hygroskopisch. Ausbeute 60 mg = 5 Prozent.

#### B) Guanidiniumamidat-Methode<sup>2</sup>

1 g Benzimidazolribotid wurde in 7,5 ml 2*n* Ammoniak gelöst, mit 5 ml Dimethylformamid und 3,09 g Dicyclohexylcarbodiimid, in 20 ml *t*-Butanol gelöst, versetzt. Die Mischung wurde 7 Stdn. auf 80° erwärmt, über Nacht ließ man das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur stehen. Der Harnstoff wurde anschließend

abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Tertiär-Butanol wurde im Vakuum bei 30° entfernt. Die wäßrige Formamidlösung extrahierte man dreimal mit dem gleichen Volumen Äther. Wasser und restliches Formamid wurden im Vakuum 1 mm Hg und bei 30° entfernt. Den Rückstand versetzte man tropfenweise mit Aceton. Benzimidazolribotid-guanidiniumamidat fiel amorph aus. Es wurde abgesaugt und getrocknet.

297 mg Flavinmononucleotid-pyridiniumsalz und 90 mg Benzimidazolribotid-guanidiniumamidat wurden getrennt, bei 100° i. Vak. getrocknet und anschließend unter gelindem Erwärmen in 10 ml *o*-Chlorphenol gelöst. Zur Lösung gab man 10 ml trocknes Pyridin. Nach 4-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur destillierte man das Lösungsmittel i. Vak. bei 30° und nahm den Rückstand in Wasser auf. *o*-Chlorphenol wurde mit Chloroform extrahiert, der erste Chloroformextrakt mit Wasser rückextrahiert, die orangegefärbte wäßrige Lösung auf *p*<sub>H</sub> 7 eingestellt und wie vorher beschrieben aufgearbeitet. Ausbeute 30 mg = 30 Prozent.

Na<sub>2</sub>C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub> (812,5)

Ber. C 42,87 H 3,97 N 10,34 P 7,62,

Gef. C 43,14 H 4,09 N 10,94 P 7,8.

#### Enzyme

*D*-Aminosäureoxidase, Lactatdehydrogenase und Katalase waren Präparate der Firma Boehringer & Soehne, Mannheim.

Durch Behandeln der *D*-Aminosäureoxidase in Ammonsulfatlösung mit 0,1-*n*. Schwefelsäure erhielten wir das Apoenzym<sup>17</sup>.

Die enzymatische Reaktion bestimmten wir nach einer Vorschrift von KAPLAN und DELUCA<sup>18</sup>. In diesem Test wird *D*-Alanin im Enzymsystem *D*-Aminosäureoxidase-FAD mit Sauerstoff zu Brenztraubensäure oxidiert. Die Brenztraubensäure wird durch das Hilfsenzym Lactatdehydrogenase-NADH in Milchsäure überführt, die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Abnahme der NADH-Absorption bei 366 *m*μ gemessen. Das Hilfsenzym wird in großem Überschuß zugesetzt, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional, wie im manometrischen Test, der zugesetzten FAD-Menge ist.

In einer 3-ml-thermostatisierten Cuvette *D* = 1 cm befanden sich in einem Gesamtvolumen von 3 ml 0,03-*m*. Phosphatpuffer *p*<sub>H</sub> 7,5, 0,1 ml Lactatdehydrogenase 10 mg/ml, 150 Einheiten Katalase, 0,3 mg NADH, 0,15–0,9 *γ* FAD bzw. FBD und 0,05 mg *D*-Aminosäureoxidase (Apoenzym). Zur Rekombination des FAD-*D*-Aminosäureoxidase-Komplexes ließ man das Substanzgemisch 15 Min. bei 25° vorinkubieren und löste die Reaktion mit 9 mg *DL*-Alanin oder 4,5 mg *D*-Alanin aus.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde im Photometer Eppendorf mit registrierendem Schreiber durch Abnahme der Absorption bei 366 *m*μ bestimmt. FBD wirkte in diesem Testsystem nicht als Coenzym. Die

<sup>17</sup> O. WARBURG u. W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* **298**, 150 [1938].

<sup>18</sup> C. DELUCA, M. M. WEBER u. N. O. KAPLAN, *J. biol. Chemistry* **223**, 559 [1956].

Rekombination des Holoenzym nach gleichzeitiger Zugabe von FAD und FBD war nicht vermindert.

Das Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum wurde im Beckman-Fluorimeter aufgenommen.

Zur Messung der Absorptionsspektren verwandten wir ein Spektralphotometer Zeiss PQM II.

Die Spaltung des Coenzymmodells führten wir nach einer Methode von WHITBY durch <sup>11</sup>.

Herrn Prof. Dr. G. PFLEIDERER danken wir für das Interesse und die Unterstützung dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft schulden wir Dank für eine Sachbeihilfe.

## Strahlenchemische Reduktion aromatischer Nitroverbindungen mit Fe(CO)<sub>5</sub>

E. KOERNER VON GUSTORF <sup>1</sup>, M. C. HENRY, R. E. SACHER und C. DI PIETRO

U.S. Army Natick Laboratories, Natick/Massachusetts

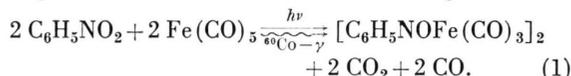
(Z. Naturforschg. **21 b**, 1152—1158 [1966]; eingegangen am 22. Juli 1966)

Mixtures of aromatic nitro compounds and Fe(CO)<sub>5</sub> are reduced by the action of light or <sup>60</sup>Co-γ to the corresponding nitroso compounds, which simultaneously form monomeric or dimeric irontricarbonyl complexes. The influence of substituents on the structure of these complexes is discussed on the basis of IR and UV data.

Die direkte Reduktion aromatischer Nitroverbindungen zu den entsprechenden Nitrosoverbindungen ist ein bislang nur unbefriedigend gelöstes Problem der präparativen organischen Chemie und gelingt lediglich in Sonderfällen <sup>2, 3</sup> mit akzeptablen Ausbeuten. Zumeist geht die Reduktion über die empfindliche Nitrosostufe hinaus, so daß eine partielle Rückoxydation erforderlich wird.

Im Verlauf einiger photochemischer Umsetzungen mit Nitroaromaten wurden die entsprechenden Nitrosoverbindungen als Neben- oder Zwischenprodukte beobachtet <sup>4</sup>; die beschriebenen Verfahrensweisen sind jedoch für die präparative Gewinnung der Nitrosoverbindungen ungeeignet.

Im Zusammenhang mit strahlenchemischen Untersuchungen an Übergangsmetall-Verbindungen haben wir kürzlich die Bildung des dimeren Nitrosobenzol-eisentricarbonyls gemäß (1) bei der Bestrahlung von Fe(CO)<sub>5</sub> und Nitrobenzol in benzolischer Lösung mit Licht oder <sup>60</sup>Co-γ-Strahlen aufgefunden <sup>5a</sup>.



<sup>1</sup> Neue Anschrift: Department of Chemistry, Boston College, Chestnut Hill, Massachusetts 02167.

<sup>2</sup> F. GLASER u. R. VAN BENEDEN, *Chemie-Ing.-Techn.* **29**, 512 [1957]; M. F. ABIDOVA, V. K. PITSAKIS, A. S. SULTANOV u. L. KH. FREIDLIN, *Uzbeksk. Khim. Zh.* **7**, 60 [1963], vgl. *C. A.* **59**, 5049 [1963].

<sup>3</sup> J. H. BOYER, R. S. BURKIS u. U. TOGGWEILER, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 2213 [1960]; J. H. BOYER u. R. S. BURKIS, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 2216 [1960].

<sup>4</sup> S. H. HASTINGS u. F. A. MATSEN, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3514 [1948]; M. L. SCHEINBAUM, *J. org. Chemistry* **29**,

Als reduzierendes Agens fungiert CO in diesem System; das gebildete Nitrosobenzol entgeht einer weiteren Reduktion durch die Bildung des schwerlöslichen Komplexes. Die Verbrückung des dimeren Komplexes erfolgt ausschließlich durch die Nitrosogruppen. Dieser Komplextyp ist demnach dem dimeren Phenylisocyanat-eisentricarbonyl <sup>6</sup> vergleichbar. Dimeres Nitrosobenzol-eisentricarbonyl ließ sich z. B. mit aromatischen Aminen wie freies Nitrosobenzol zu den entsprechenden Azoverbindungen umsetzen <sup>5a</sup>. Dieser Komplextyp kann also als „Speicher“ für Nitrosoverbindungen dienen.

Im Hinblick auf eine mögliche präparative Anwendung haben wir nun untersucht, welchen Einfluß Substituenten am aromatischen Rest auf den Verlauf einer Umsetzung gemäß (1) und auf die Struktur und Stabilität der resultierenden Komplexverbindungen haben <sup>5b</sup>. Aromatische Nitroverbindungen und Fe(CO)<sub>5</sub> wurden in Benzol mit Licht <sup>7a</sup> oder mit <sup>60</sup>Co-γ bestrahlt. Unter Dunkelfärbung der Lösungen und Gasentwicklung schieden sich die festen Eisentricarbonyle der entsprechenden Nitrosoverbin-

2200 [1964]; C. ELLIS u. A. A. WELLS, *The Chemical Action of Ultraviolet Rays*, Reinhold Publishing Corporation, New York 1941, S. 470, 474 und 495.

<sup>5</sup> a) E. KOERNER VON GUSTORF u. M.-J. JUN, *Z. Naturforschg.* **20 b**, 521 [1965]. b) E. KOERNER VON GUSTORF, *Angew. Chem.* **78**, 780 [1966].

<sup>6</sup> T. A. MANUEL, *Inorg. Chem.* **3**, 1703 [1964].

<sup>7</sup> a) Quecksilberhochdruckbrenner Philips HP 125 W in Tauchlampenanordnung; Apparatur aus Solidex-Glas. b) Osmometrisch gemessen in Benzol bei 37 °C.