

Fluorometrische Untersuchungen über die Bildung von Enzym-Coenzym-Komplexen der Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz mit Coenzymbruchstücken und Coenzymmodellen

Fluorometric Investigation of the Formation of Enzyme-Coenzyme-Complexes of Pig Heart Lactate Dehydrogenase with Coenzyme Fragments and Coenzyme Analogs

C. WOENCKHAUS und R. JECK

Institut für Vegetative Physiologie, Chemisch-Physiologisches Institut, Abteilung für Enzymologie der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch., **24 b**, 1436—1441 [1969]; eingegangen am 6. Mai 1969)

Fluorescence spectra of lactate dehydrogenase* (E.C. 1.1.1.27) were investigated in the presence of the coenzyme fragments dihydronicotinamide mononucleotide and dihydronicotinamide-ribose-5'-pyrophospho-(P²)-5''-ribose. The reduced mononucleotide is enzymatically less active as a hydrogen donor. However, formation of a complex with the enzyme was not observed under the conditions used. All the other substances: dihydronicotinamide-ribose-5'-pyrophospho-(P²)-5''-ribose, dihydronicotinamide-benzimidazole-dinucleotide, dihydronicotinamide-3-desazapurine-dinucleotide and dihydronicotinamide-6-mercaptopurine-dinucleotide form more or less stable complexes with lactate dehydrogenase. The complexes do not markedly differ from the complex formed with the natural cofactor. In all cases spectra indicate change in conformation of the coenzyme by forming the coenzyme-enzyme-complex which has been proposed by VELICK¹ too. The cysteine residues of the lactate dehydrogenase are not essential for binding the coenzyme to the active center; this was shown with mercury blocked enzyme.

Lactat-Dehydrogenase zeigt in Pufferlösungen nach Einstrahlen von Licht der Wellenlänge 288 m μ eine charakteristische Fluoreszenzemission mit einem Maximum bei 340 m μ . Diese Eiweißfluoreszenz wird durch Zugabe von Adenosindiphosphat, Adenosindiphosphat-ribose und Nicotinamid-adenin-dinucleotid unterdrückt. Besonders mit Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid* bildet das Enzym einen wenig dissoziierten Komplex. Das Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektrum des Coenzym-Enzym-Komplexes wurde von VELICK¹, KAPLAN und Mitarbb.² und WINER und SCHWERT³ eingehend untersucht.

Die Fluoreszenzemission des Dihydrocoenzym-Enzym-Komplexes nach Einstrahlen von Licht der Wellenlänge 300 m μ setzte sich nicht additiv aus den Fluoreszenzintensitäten der Einzelkomponenten: Enzym und Dihydrocoenzym zusammen, sondern zeigte ab 410 m μ in Richtung zum langwelligen Bereich eine Intensitätszunahme und in Richtung zu

kürzeren Wellenlängen eine Unterdrückung der Fluoreszenz. Nach VELICK¹ wird das eingestrahlte Licht von Tryptophanresten des Enzyms auf den Dihydronicotinamidring übertragen und als Fluoreszenzlicht von ca. 460 m μ emittiert. Auf Grund der fehlenden Intensitätszunahme im Absorptionsbereich des Adeninteils bei 260 m μ soll das Coenzym in einer anderen Konformation als in Lösung an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden werden. SHIFRIN⁴ zeigte durch das optische Verhalten von *N*-(β -Indolyläthyl)-3-carbamoyl-dihydropyridin, daß der funktionelle Coenzymteil einem Tryptophanrest benachbart sein kann. Bei unseren Untersuchungen über die Hemmung der LDH mit 3-Bromacetylpyridin und nach tryptischer Spaltung des denaturierten Enzyms fanden wir ein Peptid, in dem neben der modifizierten Aminosäure Histidin noch ein Tryptophanrest enthalten war⁵. Die Coenzymteile, Adenosindiphosphat, Adenosindiphosphat-ribose und NAD, verhindern den Angriff von 3-Bromacetylpyridin an

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

¹ S. F. VELICK, J. *biol. Chemistry* **233**, 1455 [1958].

² S. SHIFRIN, N. O. KAPLAN u. M. M. CIOTTI, J. *biol. Chemistry* **234**, 1555 [1958].

³ A. D. WINER, G. W. SCHWERT u. D. B. S. MILLAR, J. *biol. Chemistry* **234**, 1149 [1958].

⁴ S. SHIFRIN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **81**, 205 [1964].

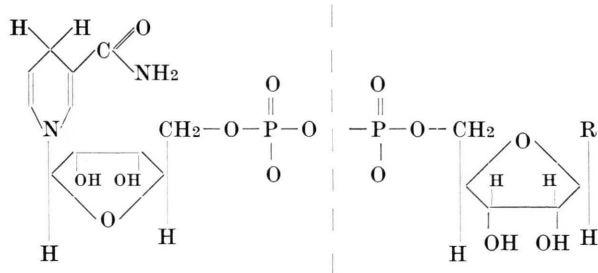
⁵ C. WOENCKHAUS, J. BERGHÄUSER u. G. PFLEIDERER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350**, 473 [1969].

das Enzym; Nicotinamidmononucleotid hatte dagegen keinen Schutzeffekt. Wir vermuteten daher, daß der Hemmstoff eine kovalente Bindung an der Haftstelle des Coenzym-adeninteils bewirkt. Durch fluorometrische Untersuchungen mit den Coenzymbruchstücken Dihydronicotinamidmononucleotid und Dihydronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose und mit den Coenzymanalogen Dihydronicotinamid-benzimidazoldinucleotid, Dihydronicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid und Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid versuchten wir Aussagen über die Bindung des nichtfunktionellen Molekülteils an das Enzym zu machen.

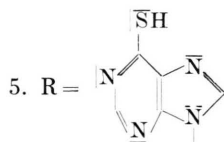
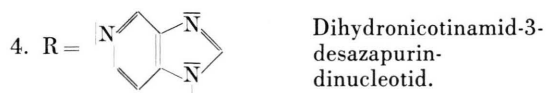
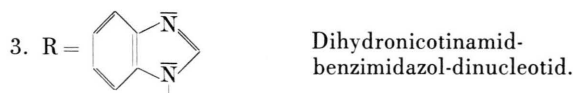
Material und Methoden

Enzyme und Coenzyme: Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz (E.C. 1.1.1.27), Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe (E.C. 1.1.1.1), NADH, NAD, Nicotinamidmononucleotid, Adenosindiphosphat-ribose wurden von der Firma Boehringer & Soehne bezogen.

Die Darstellung der Coenzymmodelle: Nicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose⁶, Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid⁷, Nicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid^{8, 14} und Nicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid⁹ haben wir an anderer Stelle beschrieben.



1. Dihydronicotinamid-mononucleotid.
2. R = OH; Dihydronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose.



Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid.

Quecksilberblockierte Lactat-Dehydrogenase: Sie wurde analog einer Vorschrift von PFLEIDERER und JECKEL¹⁰ hergestellt.

Reduktion der Coenzymmodelle: 75 mg des Coenzymanalogen wurde in 5 ml 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5 gelöst. Der pH-Wert wurde mit verdünnter Natronlauge nachgestellt, sodann der Ansatz mit 0,5 ml Äthanol und 0,05 ml einer Alkohol Dehydrogenase-Suspension (30 mg/ml) versetzt. Nach 30 Min. wurde bei einer 1:100 verdünnten Probe keine weitere Zunahme der Extinktion bei 340 m μ festgestellt. Die Abtrennung des Coenzym aus dem Reaktionsgemisch erfolgte an einer Sephadex-G 25 fine-Säule (100·2 cm) mit 0,2 M Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9,5. Konzentration und Reinheit der eluierten Coenzyme wurden jeweils durch Aufnahme der UV-Spektren bestimmt.

Dihydronicotinamid-mononucleotid und Dihydronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose: Sie wurden nach einer modifizierten Methode von STEWART und Mitarbb.^{11, 12} mit Natriumdithionit hergestellt.

Die Abtrennung von Verunreinigungen, Salzen und der oxydierten Verbindung erfolgte an einer Sephadex-G 10-Säule (150·1,5 cm) durch Elution mit 0,1-proz. Ammoniumhydrogencarbonat/Ammoniak-Puffer pH 8. Dihydronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose zersetzte sich in einigen Stdn. unter Bildung des primären Säureprodukts.

Lactat-Dehydrogenase: 2 ml Kristallsuspension 10 mg/ml wurden zentrifugiert, der Niederschlag in 0,5 ml 0,2 M Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9,5 aufgenommen und durch Chromatographie an der Sephadex-G 25 fine-Säule (100·2 cm) von Salzen befreit. Die Enzymkonzentration wurde durch die Biuretmethode mit dem Faktor 16,5 bestimmt. Die Enzymkonzentration in der Küvette betrug 0,36 mg/ml (1·10⁻⁵ M), bezogen auf die Untereinheit LDH Mol.-Gew. 36 000. Die Coenzymkonzentrationen sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Alle Messungen wurden in 0,2 M Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9,5 durchgeführt.

Die Bestimmung der *Dissoziationskonstanten* der Coenzym-Enzym-Komplexe erfolgte nach der Vorschrift von VELICK¹.

Die *Absorptionsspektren* wurden im Zeiss PMQII Spektralphotometer aufgenommen. Zur Messung der Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren verwendeten wir ein Beckman Gitterfluorometer mit einer 450 Watt Xenon-Lampe. Die Temperatur betrug 25 °C.

Enzymatische Oxydation des Dihydronicotinamid-

⁶ C. WOENCKHAUS u. M. VOLZ, Chem. Ber. **99**, 1712 [1966].

⁷ C. WOENCKHAUS, Chem. Ber. **97**, 2439 [1964].

⁸ C. WOENCKHAUS u. G. PFLEIDERER, Biochem. Z. **341**, 495 [1965].

⁹ G. PFLEIDERER, C. WOENCKHAUS, K. SCHOLZ u. H. FELLER, Liebigs Ann. Chem. **675**, 205 [1964].

¹⁰ G. PFLEIDERER u. D. JECKEL, Europ. J. Biochem. **2**, 171 [1967].

¹¹ G. PFLEIDERER, C. WOENCKHAUS u. M. NELBÖCK-HOCHSTETTER, Liebigs Ann. Chem. **690**, 170 [1965].

¹² S. GUTCHO u. E. D. STEWART, Analytic. Chem. **20**, 1185 [1948].

mononucleotids: In einer Kuvette $D=1$ cm befanden sich in 3 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0, 0,1 mMol Pyruvat und 0,2 μ Mol Dihydrinicotinamid-mononucleotid. Die Reaktion wurde mit 1,0 mg LDH ausgelöst und die Abnahme der charakteristischen Fluoreszenz bei 460 $m\mu$ und die der Absorption bei 340 $m\mu$ bei 22° gemessen. Blindwerte, denen das Enzym oder das Pyruvat nicht zugesetzt war, zeigten innerhalb einer Stde. nur eine geringe Verminderung der Extinktion oder Fluoreszenz.

Ergebnisse

Dihydrinicotinamid-mononucleotid ist im Test mit LDH als Wasserstoffüberträger schwach wirksam. Etwa 50% des eingesetzten Coenzymbruchstückes wurden in Gegenwart von 0,1 M Pyruvat bei pH 7 innerhalb von 30 Min. durch LDH oxidiert. Die größere Aktivität der hydrierten Coenzymbruchstücke gegenüber den oxidierten wurde von SIEBERT¹⁵ an der unspezifischen Alkohol-Dehydrogenase aus Leber beobachtet. Im Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektrum konnten wir auch nach Zugabe von Pyruvat keine Änderung außer einer langsamen Intensitätsabnahme feststellen. Die Proteinfluoreszenz nach Anregung bei 290 $m\mu$ und die entsprechende Emission bei 340 $m\mu$ wurde auch bei einem 50-fachen Überschuß gegenüber dem Enzym nicht verändert. Die Fluoreszenzemissions- und -anregungsspektren setzten sich additiv aus den beiden Komponenten LDH und Coenzymbruchstück zusammen (Abb. 1 und 2).

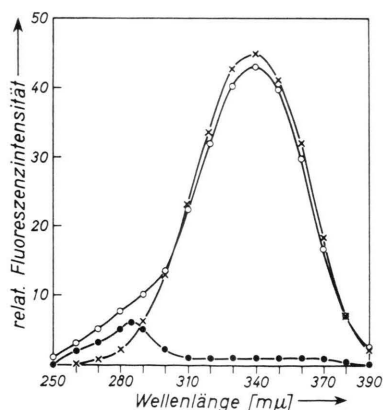


Abb. 1. Fluoreszenzanregungs-Spektrum: Emission 460 $m\mu$. x-x-x-x Dihydrinicotinamidmononucleotid, $c = 5 \cdot 10^{-4}$ M; ●-●-●-● LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; ○-○-○-○ Dihydrinicotinamidmononucleotid, $c = 5 \cdot 10^{-4}$ M und LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Empfängerempfindlichkeit: Stufe 7.

¹³ G. WEBER, Nature [London] **180**, 1409 [1957].

¹⁴ C. WOENCKHAUS u. P. ZUMPE, Z. Naturforschg. **23b**, 484 [1968].

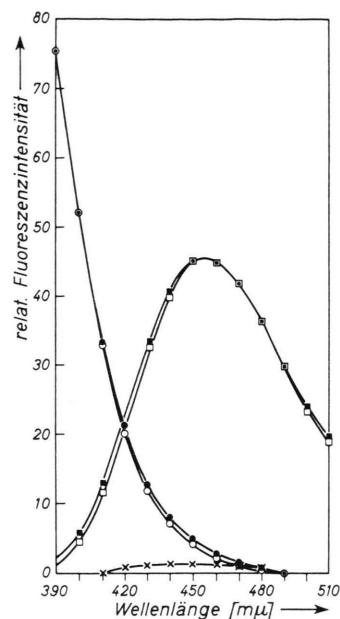


Abb. 2. Fluoreszenzemissions-Spektrum: Anregung 280 $m\mu$. ○-○-○-○ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; ●-●-●-● LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Dihydrinicotinamidmononucleotid, $c = 5 \cdot 10^{-4}$ M; Fluoreszenzemissions-Spektrum: Anregung 340 $m\mu$. x-x-x-x LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; □-□-□-□ Dihydrinicotinamidmononucleotid, $c = 5 \cdot 10^{-4}$ M; ■-■-■-■ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Dihydrinicotinamidmononucleotid, $c = 5 \cdot 10^{-4}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Empfängerempfindlichkeit: Stufe 7.

Die Fluoreszenzintensität des Dihydrinicotinamid-mononucleotids bei 460 $m\mu$ bei Anregung mit Licht von 340 $m\mu$ ist etwas geringer als im intakten Coenzym. Dieser Befund wurde schon von WEBER¹³ beobachtet und liegt sehr wahrscheinlich im Auftreten einer zusätzlichen Deformationsschwingung des Mononucleotideils nach Spaltung der Pyrophosphatbildung. Bei der Verwendung des Coenzymbruchstückes Dihydrinicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose trat dagegen die Ausbildung eines Coenzym-Enzym-Komplexes ein. Dieser Komplex hatte eine Dissoziationskonstante $K = 18 \cdot 10^{-6}$ M, pH 9,5. Sie ist etwa 60-mal größer als die des NADH-LDH-Komplexes $K = 0,30 \cdot 10^{-6}$ M. Die schwächere Bindung steht im Einklang mit der größeren Michaelis-Konstanten¹⁴. Das Fluoreszenzemissions-Spektrum nach Anregung bei 280 $m\mu$ (Abb. 3 Teil A) des Komplexes zeigte eine Intensitätsverminderung ab 410 $m\mu$ zu kürzeren Wellenlängen, wie sie von VELICK¹ für den NADH-LDH-Komplex beschrieben wurde (Abb. 3 Teil B).

¹⁵ K. KESSELRING u. G. SIEBERT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **337**, 79 [1964].

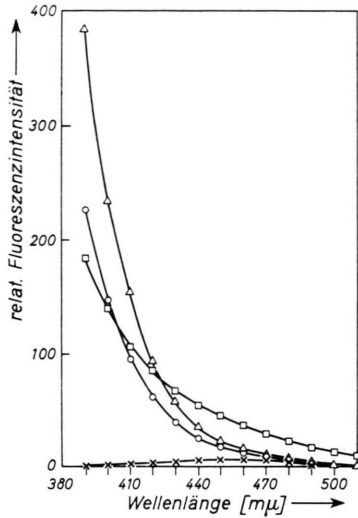


Abb. 3 A. Fluoreszenzemissions-Spektrum: Anregung 280 $m\mu$. \triangle — \triangle LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; \circ — \circ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Adenosindiphosphat-ribose $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; \square — \square LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Dihyronicotinamid-ribosid-5'-pyrophospho-(P^2)-5''-ribose, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; \times — \times Dihyronicotinamid-ribosid-5'-pyrophospho-(P^2)-5''-ribose, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Empfängerempfindlichkeit: Stufe 8.

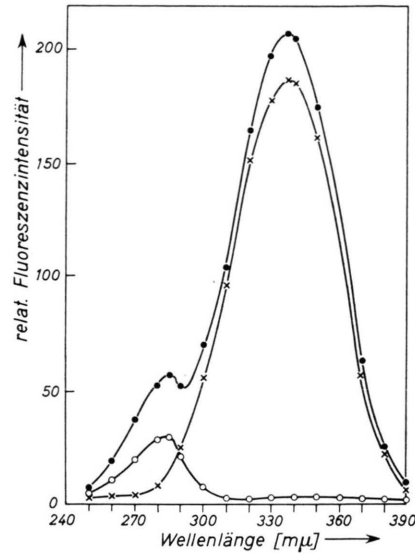


Abb. 4. Fluoreszenzanregungs-Spektrum: Emission 460 $m\mu$. \times — \times Dihyronicotinamid-ribosid-5'-pyrophospho-(P^2)-5''-ribose, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; \circ — \circ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; \bullet — \bullet LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Dihyronicotinamid-ribosid-5'-pyrophospho-(P^2)-5''-ribose, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Empfängerempfindlichkeit: Stufe 8.

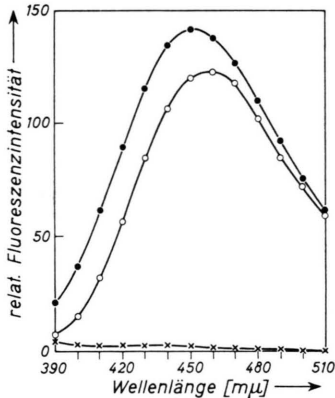


Abb. 3 B. Fluoreszenzemissions-Spektrum: Anregung 340 $m\mu$. \times — \times LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; \circ — \circ Dihyronicotinamid-ribosid-5'-pyrophospho-(P^2)-5''-ribose, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; \bullet — \bullet LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Dihyronicotinamid-ribosid-5'-pyrophospho-(P^2)-5''-ribose, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5.

Mit einer gleichgroßen Konzentration Adenosindiphosphoribose erhielten wir eine ebenso starke Unterdrückung der Fluoreszenzemission.

Das Fluoreszenzanregungs-Spektrum von Dihyronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P^2)-5''-ribose im Komplex mit LDH zeigte Steigerung der Fluoreszenzintensität sowohl im Anregungsbereich von 290 $m\mu$ wie auch bei 340 $m\mu$ (Abb. 4).

Dihyronicotinamid-benzimidazol-dinucleotid bildete einen Komplex mit LDH, die Dissoziationskonstante betrug $K = 6 \cdot 10^{-6}$ M. Im Fluoreszenzanregungs-Spektrum stellten wir nur einen geringen Unterschied in der Fluoreszenzintensität bei 460 $m\mu$

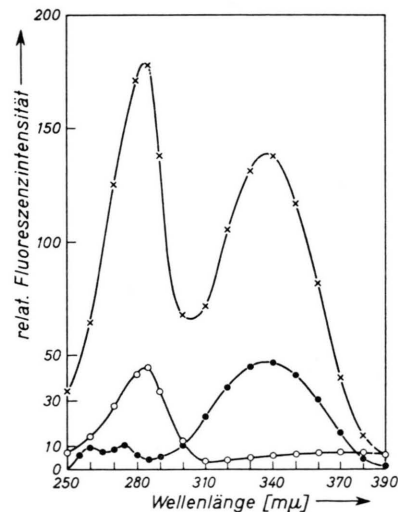


Abb. 5. Fluoreszenzanregungsspektrum: Emission 460 $m\mu$. \bullet — \bullet Dihyronicotinamid-benzimidazol-dinucleotid, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; \circ — \circ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M; \times — \times LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ M und Dihyronicotinamid-benzimidazol-dinucleotid, $c = 1 \cdot 10^{-4}$ M; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Empfängerempfindlichkeit: Stufe 8.

gegenüber dem natürlichen NADH-LDH-Komplex fest. Das Doppelmaximum des freien Coenzymmodells im Fluoreszenzanregungs-Spektrum bei 260 und 275 $m\mu$ wurde im Komplex mit dem Enzym nicht mehr beobachtet (Abb. 5).

Der Komplex aus Lactat Dehydrogenase und Dihydronicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid weist eine Dissoziationskonstante von $K = 2 \cdot 10^{-6} M$ auf und ähnelt, wie der, den Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid mit der LDH bildet, $K = 1 \cdot 10^{-6} M$, dem natürlichen NADH-LDH-Komplex. Im Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid absorbiert der 6-Mercaptapurinring bei 315 $m\mu$. Eine Energieübertragung von dem 6-Mercaptapurin auf den Dihydronicotinamid-Teil konnte nicht beobachtet werden (Abb. 6).

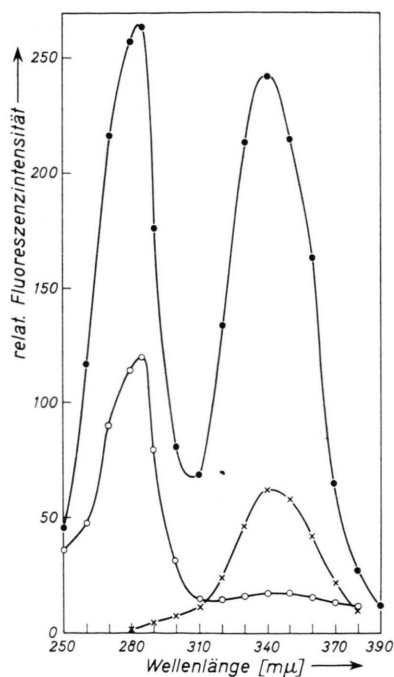


Abb. 6. Fluoreszenzanregungsspektrum: Emission 460 $m\mu$. $\times - \times$ Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid, $c = 1 \cdot 10^{-5} M$; $\circ - \circ$ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5} M$; $\bullet - \bullet$ LDH, $c = 1 \cdot 10^{-5} M$ und Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid, $c = 1 \cdot 10^{-5} M$; gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5. Empfängerempfindlichkeit: Stufe 9.

Bei Blockierung der Sulfhydrylreste der LDH durch Quecksilber(II) Ionen¹⁰ beobachteten wir das gleiche Fluoreszenzverhalten des NADH-Enzym-Komplexes wie in Gegenwart nativer LDH.

¹⁰ K. H. GÖBBELER u. C. WOENCKHAUS, Liebigs Ann. Chem. 700, 180 [1966].

Diskussion

Für die Wasserstoffdonator-Wirkung des Dihydronicotinamidmononucleotids kann man nur eine sehr schwache Bindung des Coenzymbruchstückes an das Enzym annehmen, denn bei einer Mononucleotid-Konzentration von $5 \cdot 10^{-4} M$ konnte weder bei pH 9,5 noch bei pH 7,0 in Gegenwart von Pyruvat eine Komplexbildung beobachtet werden. Eine feste Bindung aller Reaktionspartner tritt nicht ein. Eine ähnliche Beobachtung machten wir schon früher bei Verwendung des Coenzymmodells Dihydronicotinamid-pentamethylen-adenosin-diphosphat¹⁶. Diese Verbindung zeigte keine Komplexbildung, reagierte aber langsam mit einem Überschuß an Substrat mit Dehydrogenasen. Alle Teile des Coenzymmodells, die für die Einlagerung in das „aktive Zentrum“ als Voraussetzung angenommen wurden: Adenosin-, Pyrophosphat- und der Dihydronicotinamidteil, waren vorhanden. Wir schlossen daraus, daß eine Wechselwirkung zwischen den 2'.3'-Hydroxylgruppen des Nicotinamidribosids mit entsprechenden Stellen des Proteins eintritt. Nicotinamid-2'.3'-didesoxyribotid reagierte jedoch im Test mit Alkohol in Gegenwart der Alkohol-Dehydrogenase aus Leber unter Bildung des Dihydronicotinamid-2'.3'-didesoxyribotids¹⁷. Für die Bildung eines Coenzym-LDH-Komplexes ist die Ribose-diphosphat-Brücke zwischen nichtfunktionellem und funktionellem Molekülteil verantwortlich. Beide Coenzymbruchstücke, Adenosin-diphospho-ribose und Dihydronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose unterdrücken in gleichem Ausmaß die Fluoreszenzemission. Vermutlich wird der symmetrische Pyrophosphorsäureester an das „aktive Zentrum“ angelagert und ändert die Konformation in diesem Teil des Proteins. Dihydronicotinamid-ribose-5'-diphospho-(P²)-5''-ribose bildet einen schwachen Komplex mit der LDH aus. Das Fehlen des Adeninringes in dieser Verbindung drückt sich in der hohen Dissoziationskonstanten aus. Der Ersatz des Adeninringes durch Benzimidazol führt zu einer 20-fachen Vergrößerung der Dissoziationskonstanten gegenüber dem NADH-LDH-Komplex, während beim Dihydronicotinamid-3-desazapurin-dinucleotid nur noch eine 8-fach schwächere Bindung festzustellen ist. Dieses Coenzymmodell erwies sich in den enzymatischen Eigenschaften dem NADH sehr ähnlich¹⁴. Die An-

¹⁷ R. JECK, Diplomarbeit, Frankfurt am Main 1968.

nahme, daß neben der hydrophoben Bindung des nichtfunktionellen Teils noch eine Wasserstoffbrücke zum N1 bei der Bildung des Coenzym-Enzym-Komplexes eine Bedeutung besitzt, wird durch unsere Untersuchungen unterstützt.

An isolierten Coenzymmodellen wird häufig Energie vom nichtfunktionellen Molekülteil auf den Dihydronicotinamid-Ring übertragen. Man beobachtet dann im Fluoreszenzanregungs-Spektrum Doppelmaxima im Absorptionsbereich beider Coenzymteile. Während beim NADH das Ausbleiben des Effektes mit einer Änderung der Ladungspolarisation durch eine Wasserstoffbrückenbindung an das Enzym erklärt werden kann, ist im Coenzymmodell Dihydronicotinamid-benzimidazol-dinucleotid eine Wasserstoffbrücke an den nichtfunktionellen Molekülteil nicht möglich. Im Dihydronicotinamid-6-mercaptapurin-dinucleotid fallen die Absorptionsmaxima des 6-Mercaptopurinteils und des Dihydronicotinamidteils weitgehend zusammen. Im Absorptionsspektrum konnten wir eine Wechselwirkung zwischen beiden Ringsystemen feststellen⁹. Im Komplex mit der LDH fehlt in beiden Fällen eine Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei 460 m μ nach Einstrahlen von Licht der Absorptionswellenlängen-

Maxima. Die fehlende Energieübertragung im Komplex mit dem Enzym weist auf die aufgefaltete Form des Coenzyms nach der Anlagerung an das „aktive Zentrum“, die schon von VELICK¹ für den NADH-LDH-Komplex gefordert wurde.

Durch Quecksilber(II)ionen wird die katalytische Eigenschaft der LDH reversibel aufgehoben. PFLEIDERER und Mitarbb.^{10, 18} beobachteten schon vor einiger Zeit, daß die essentiellen Cysteinreste der LDH nicht an der Coenzym-Enzym-Bindung beteiligt sind. Im Fluoreszenzanregungs- und -emissions-Spektrum konnten wir keinen Unterschied zwischen nativem und gehemmtem Enzym feststellen. Die Blockierung der Sulfhydrylreste führt zu keiner Änderung der räumlichen Struktur des „aktiven Zentrums“. Beobachtungen von KAPLAN² über das Verhalten der mit *p*-Chloromercuribenzoat blockierten LDH zeigten, daß die charakteristische Enzymfluoreszenz bei Verwendung des Hemmstoffs nicht verändert wird. Für die Verhinderung der NADH-Enzym-Komplexbildung kann nur der große aromatische Rest des Hemmstoffes verantwortlich gemacht werden. Die Zuordnung der essentiellen Cysteinreste der LDH zum „aktiven Zentrum“ des Enzyms konnte bisher nicht geklärt werden.

Dem Verband der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

¹⁸ J. J. HOLBROOK, Biochem. Z. **344**, 141 [1966].