

Komplexbildung von Dehydrogenasen mit Coenzymanalogen und Coenzymbruchstücken

Complexformation of Dehydrogenases with Coenzyme Analogues and Coenzyme Fragments

DIETMAR SCHERR, REINHARD JECK, JÜRGEN BERGHÄUSER und CHRISTOPH WOENCKHAUS

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

(Z. Naturforsch. **28 c**, 247–254 [1973]; eingegangen am 17. November 1972/27. Februar 1973)

Coenzyme analogues, dehydrogenases, difference spectra

The spectral properties of binary complexes of NAD-analogues and fragments therefrom with LDH from pig heart or ADH from liver and yeast have been investigated. The NADH-analogues were modified by replacing adenine through benzimidazole, benzene or dihydronicotinamide. Additionally adenosine diphosphate ribose, dihydronicotinamide and dihydronicotinamide-ribose pyrophosphate-5'-ribose have been studied.

It has been shown by means of difference spectra that complexes between ADH from horse liver and analogues cause spectral changes in the region of aromatic absorption at 280 nm even when adenine is absent in the analogues. Spectral changes in the other enzymes mentioned are probably due to changes of the $n-\pi^*$ absorption of the adenine ring. The spectral changes upon complexing indicate hydrophobic interaction of the adenine with the enzyme protein. Fluorescence spectra vary in the intensity of the energy transfer band as well as in coenzyme emission depending on variation of the coenzyme analogue. Changing of complex formation between protein and analogues at different pH-values are investigated. ADH from yeast, especially, shows a pK around 6 which suggests interaction with histidine imidazole.

Einleitung

NAD ist als Wasserstoffüberträger in Gegenwart verschiedener Dehydrogenasen wirksam. In wässriger Lösung liegt das Coenzym in gefalteter Konformation vor¹. Diese Struktur wird durch intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem funktionellen

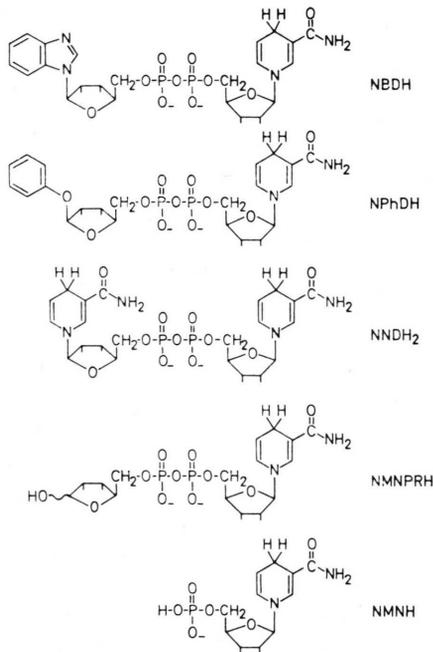
Nicotinamidteil und dem nicht funktionellen Adeninning des Coenzym aufrechterhalten. Die Wechselwirkung zwischen den Elektronensystemen beider Ringe äußert sich in Hypochromie und Verschiebung der Absorptionsbanden. Aus dem Differenzspektrum zwischen Coenzym und den Mononucleotidteilen AMP und NMN kann ihr Ausmaß bestimmt werden². Bei der Bildung des Enzym-Coenzym-Komplexes treten Aminosäurereste des Enzyms in enge Wechselwirkung mit Teilen des Coenzym und bewirken eine Auffaltung³. Hierbei wird nicht nur die Konformation des Coenzym, sondern auch die des Proteins im aktiven Zentrum geändert³. Durch Aufnahme von Differenzspektren zwischen dem Enzym-Coenzym-Komplex und den isolierten Komponenten werden Änderungen im Absorptionsbereich des Adenins, Proteins und Nicotinamidteils beobachtet. Da alle drei Systeme Licht im gleichen Bereich zwischen 280 und 240 nm absorbieren, sind Zuordnungen von Absorptionsänderungen zu einer der Komponenten schwierig. In der reduzierten Form des Coenzym absorbiert der Dihydronicotinamidteil bei 340 nm, so daß sich Pro-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. CHRISTOPH WOENCKHAUS, Institut für Vegetative Physiologie, Chemisch-Physiologisches Institut, Abteilung für Enzymologie, D-6000 Frankfurt am Main, Theodor-Stern-Kai 7.

Abkürzungen: Enzyme: LDH, Lactat-Dehydrogenase; L-Lactat: NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.27); ADH_{Hefe} und ADH_{Leber}, Alkohol-Dehydrogenase; Alkohol: NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.1); Nucleotid-Pyrophosphatase, Dinucleotid-Nucleotidhydrolase (EC 3.6.1.9).

Coenzyme: NADH = Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid; NBDH = Dihydronicotinamid-benzimidazol-dinucleotid; NNDH = Nicotinamid-dihydronicotinamid-dinucleotid; NNDH₂ = Bisdihydronicotinamid-dinucleotid; NPhDH = Dihydronicotinamid-phenyl-dinucleotid; NMNPRH = Dihydronicotinamid-ribose-5'-pyrophosphat-5"-ribose; NMNH = Dihydronicotinamidmononucleotid; ADPR = Adenosindiphosphat-ribose.

tein und Adeninabsorption überlagern. Durch Verwendung von Coenzymanalogen, in denen der nichtfunktionelle Adeninring durch andere Ringsysteme ersetzt ist, lassen sich Anteile des Proteins an der Absorptionsänderung bei der Komplexbildung deutlich machen. Dafür verwandten wir das Analoge NNDH₂, dessen Dihyronicotinamidringe bei 335 nm absorbieren⁴. Die Verwendung der Coenzymbuchstücke ADPR und NMNPRH⁵ zeigen die Anteile der Änderung optischer Eigenschaften auf, die durch Anlagerung der einzelnen Ringsysteme an das aktive Zentrum bewirkt werden. Während der Komplexbildung treten Änderungen der Enzym- und Coenzymfluoreszenz ein. Durch Verwendung von Coenzymanalogen und Coenzymbuchstücken als Komplexpartner versuchen wir Aussagen über die Art und Größe der Wechselwirkung zwischen Enzym und Coenzym zu machen.



Ergebnisse

Im Differenzspektrum des NADH-LDH-Komplexes treten Minima bei 260, 310 und 360 nm auf und Maxima bei 280 und 330 nm. Die Hypochromie bei 360 nm wird durch die Komplexbildung des Dihyronicotinamidteils mit dem Enzym hervorgerufen⁶. Um die Absorptionsänderungen, die durch An-

lagerung des Coenzyms an das Enzym entstanden sind, zu erklären, haben wir Differenzspektren der Enzym-Komplexe mit Coenzymanalogen und Bruchstücken aufgenommen. Das Minimum bei 360 nm tritt auch im Differenzspektrum des LDH-NMNPRH-Komplexes gegen die beiden Komponenten auf und kann auf Wechselwirkung des Dihyronicotinamidringes mit dem Enzym zurückgeführt werden. Der ADPR-LDH-Komplex zeigt im Differenzspektrum ein Maximum bei 280 nm. Im Komplex mit NNDH₂ ist dieses nur schwach angedeutet (Abb. 1). Im langwelligeren Spektralbereich ist das Differenzspektrum des NNDH₂-LDH-Komplexes dem des LDH-NADH-Komplexes sehr ähnlich. Das Maximum bei 360 nm weist auf Hypochromie und Blauverschiebung der Dihyronicotinamidabsorption nach der Komplexbildung hin. Die Absorptionsänderung im Bereich der Proteinabsorption von 250–290 nm ist sehr gering.

Bei der ADH_{Leber} stellt man nach der Komplexbildung mit NADH eine Blauverschiebung der Dihyronicotinamidabsorptionsbande von 340 nm auf 325 nm und Hypochromie fest⁷. Im Differenzspektrum tritt

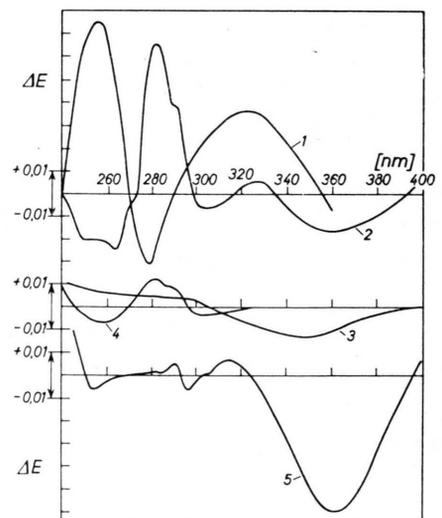


Abb. 1. Spektrale Änderungen bei Ausbildung von LDH-Komplexen.

1. Differenzspaltungsspektrum von NADH, $c = 0,05$ mM. 2. Differenzspektrum des NADH-LDH-Komplexes, NADH $c = 0,05$ mM; LDH $c = 0,05$ mM. 3. Differenzspektrum des NMNPRH-LDH-Komplexes, NMNPRH $c = 0,20$ mM. 4. Differenzspektrum des ADPR-LDH-Komplexes, ADPR $c = 0,10$ mM; LDH $c = 0,05$ mM. 5. Differenzspektrum des NNDH₂-LDH-Komplexes, NNDH₂ $c = 0,20$ mM; LDH $c = 0,05$ mM. Ordinate: $\Delta E =$ Extinktionsänderungen, gemessen in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2.

als Folge davon ein ausgeprägtes Minimum bei 360 nm auf. Mit den verwendeten Coenzymanalogen beobachteten wir nach Komplexbildung eine geringe Blauverschiebung. Sie ist auch dann gering, wenn das Coenzymanaloge kovalent an das Enzym gebunden ist⁹. In den Differenzspektren der Komplexe mit den Coenzymbruchstücken ADPR, NMNPRH und dem Analogon NNDH₂ mit ADH_{Leber} findet man einen Extinktionsanstieg bei 280 nm, das Minimum bei 360 nm tritt nur in Differenzspektren der Komplexe auf, in denen der Coenzym-Komplexpartner einen Dihyronicotinamidteil enthält.

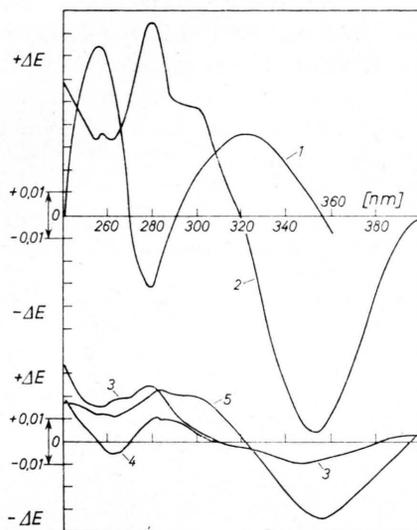


Abb. 2. Spektrale Änderungen bei Ausbildung von ADH *Leber*-Komplexen.

1. Differenzspektrum der NADH-Spaltung, NADH $c = 0,05$ mM. 2. Differenzspektrum des NADH-ADH-Komplexes, NADH $c = 0,05$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. 3. Differenzspektrum des NMNPRH-ADH-Komplexes, NMNPRH $c = 0,2$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. 4. Differenzspektrum des ADPR-ADH-Komplexes, ADPR $c = 0,1$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. 5. Differenzspektrum des NNDH₂-ADH-Komplexes, NNDH₂ $c = 0,2$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. Gemessen in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2. Ordinate: $\Delta E =$ Extinktionsänderung.

Die binären Komplexe aus ADH_{Hefe} und Coenzymanalogen und Coenzymbruchstücken unterscheiden sich von denen der ADH_{Leber}. Stärkere Absorptionsänderungen treten beim Hefeenzym im Differenzspektrum nur beim NADH-Komplex auf, während die Coenzymbruchstücke und -analogen nur geringe Absorptionsänderungen hervorrufen.

Die Differenzspektren der NBDH-Dehydrogenase-Komplexe zeichnen sich durch das Auftreten von

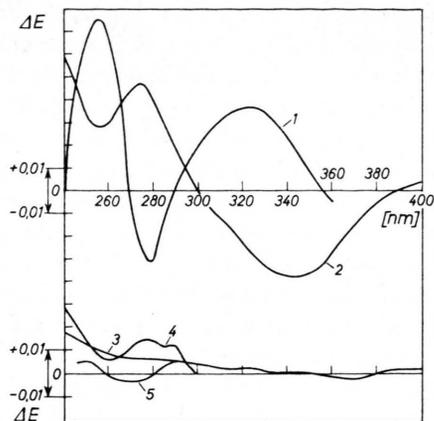


Abb. 3. Spektrale Änderungen bei Ausbildung der ADH *Hefe*-Komplexe.

1. Differenzspektrum der NADH-Spaltung, NADH $c = 0,05$ mM. 2. Differenzspektrum des NADH-ADH-Komplexes, NADH $c = 0,05$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. 3. Differenzspektrum des NMNPRH-ADH-Komplexes, NMNPRH $c = 0,2$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. 4. Differenzspektrum des ADPR-ADH-Komplexes, ADPR $c = 0,1$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. 5. Differenzspektrum des NNDH₂-ADH-Komplexes, NNDH₂ $c = 0,2$ mM, ADH $c = 0,05$ mM. Gemessen in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2. Ordinate: $\Delta E =$ Extinktionsänderung.

Absorptionsbanden bei 295 und 275 nm aus⁹. Sie liegen im Bereich der Minima der Benzimidazolabsorption (Abb. 4).

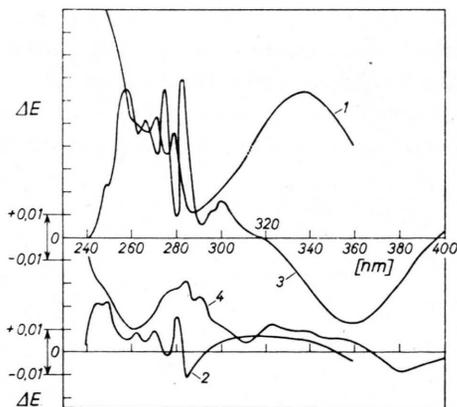


Abb. 4. Spektrale Änderung bei der Ausbildung von Dehydrogenase-Komplexen mit NBDH. 1. Absorptionsspektrum von NBDH $c = 0,01$ mM. 2. Differenzspektrum der NBDH-Spaltung, NBDH $c = 0,05$ mM. 3. Differenzspektrum des NBDH-ADH_{Leber}-Komplexes, NBDH $c = 0,05$ mM, ADH_{Leber} $c = 0,05$ mM. 4. Differenzspektrum des NBDH-ADH_{Hefe}-Komplexes, NBDH $c = 0,05$ mM, ADH_{Hefe} $c = 0,05$ mM. Gemessen in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2; Ordinate: $\Delta E =$ Extinktionsänderungen.

Zugabe von NMNH zu Dehydrogenasen bewirkt keine Änderung der Absorption im Differenzspektrum.

Die Proteinfluoreszenz der Dehydrogenasen wird im wesentlichen durch Tryptophanreste bedingt. Tyrosin- und Phenylalaninreste haben geringere Bedeutung¹⁰. Im Protein wird durch die Fixierung der Aminosäurereste eine Steigerung der Quantenausbeute der Tryptophanfluoreszenz bewirkt¹¹. Das Emissionsmaximum der Proteinfluoreszenz liegt bei 340 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm. Ein schwächer ausgeprägtes zweites Fluoreszenzmaximum liegt zwischen 310 und 400 nm. NADH emittiert Fluoreszenzlicht bei 455 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlängen 260 oder 340 nm¹². Bei der Bildung binärer Coenzym-Enzym-Komplexe wird die Proteinfluoreszenz bei 340 nm vermindert und gleichzeitig die Coenzymfluoreszenz gesteigert und deren Maximum von 455 nm um 20-30 nm nach kürzeren Wellenlängen hin verschoben¹³. Im Fluoreszenzanregungsspektrum tritt eine neue Bande bei 290 nm auf^{13, 14}. Das Emissionsspektrum dieser Anregungsbande liegt bei 425 nm und entspricht dem des komplexgebundenen Dihydronicotinamidsystems. Bei 290 nm absorbiert von den beiden Komplexpartnern NADH nur sehr wenig. Diese charakteristische Bande und die Änderung der Coenzymfluoreszenz werden nach dem FÖRSTER-Mechanismus mit einer Energieübertragung von Tryptophanresten des Proteins zum Dihydronicotinamidring des NADH erklärt¹⁵.

Komplexe zwischen Cozymanalogen und Dehydrogenasen zeigen meist eine geringe Intensitätssteigerung der Coenzymfluoreszenz verglichen mit NADH-Enzym-Komplexen. Besonders gering ist die Fluoreszenzsteigerung bei ADH_{Hefe} als Komplexpartner.

Tab. I. Relative Fluoreszenzsteigerungen (Skalenteile) nach Bildung binärer Komplexe (Emission 455 nm).

	ADH _{Leber}		ADH _{Hefe}		LDH	
	290 nm	340 nm	290 nm	340 nm	290 nm	340 nm
Anregungswellenlänge						
NADH	100	90	80	80	140	150
NBDH	90	210	18	16	130	120
NPhDH	10	10	0	0	30	30

NNDH und NNDH₂ bilden mit LDH und ADH_{Leber} fluoreszierende Komplexe. Einen Anstieg der Fluoreszenz beobachtet man bei den isolierten Analogen nach Aufheben der intramolekularen Wechsel-

wirkung durch Spaltung der Pyrophosphatbrücke¹⁶. NBDH bildet mit ADH_{Leber} einen Komplex, dessen Coenzymfluoreszenzintensität doppelt so groß ist, wie die des entsprechenden NADH-Komplexes (Tab. I). Die Fluoreszenz des NPhDH-Komplexes ist dagegen nur noch gering gesteigert und ist vergleichbar mit der der NNDH₂-Dehydrogenase-Komplexe. Bei Verwendung der Coenzymbruchstücke NMNPRH und NMNH tritt keine Steigerung der Coenzymfluoreszenz nach Enzymzugabe auf. Im Fluoreszenzanregungsspektrum dieser Komplexe fehlt die Energieübertragungsbande. Komplexe mit Dihydrocozymanalogen, in denen der nichtfunktionelle Adeninring durch andere Ringsysteme ersetzt war, zeigen gegenüber den natürlichen NADH-Enzym-Komplexen eine verminderte Proteinfluoreszenz bei 340 nm, besonders gering ist sie bei Komplexen mit Coenzymbruchstücken, die kein Ringsystem auf der nichtfunktionellen Coenzymseite besitzen (Tab. II).

Tab. II. Änderung der Proteinfluoreszenz bei 340 nm nach Komplexbildung und Anregung mit Licht der Wellenlänge 290 nm.

	ADH _{Leber}	ADH _{Hefe}	LDH
	relative Fluoreszenzintensität bei 340 nm [Skalenteile]		
NADH	180	150	130
NBDH	200	270	200
NPhDH	200	270	230
NNDH	200	—	200
NNDH ₂	250	—	220
NMNPRH	300	300	230
ohne Coenzym	350	300	260

Auch das Ausmaß der Energieübertragung ist von der nichtfunktionellen Seite abhängig und ist am geringsten ausgeprägt bei NNDH₂ und NPhDH-Dehydrogenase-Komplexen.

In Komplexen aus ADH_{Leber} und NADH beobachtet man im Fluoreszenzanregungsspektrum eine Verschiebung des Maximums der Dihydronicotinamidfluoreszenz von 340 auf 325 nm. Sie entspricht einer gleichgerichteten Änderung im Absorptionsspektrum von NADH beim Übergang vom freien zu komplexgebundenem Coenzym¹⁷.

Bei der Komplexbildung wird das Coenzym durch Wechselwirkung mit einzelnen Aminosäureresten an das Protein gebunden. Besitzen diese Reste dissoziierbare Gruppen, so wird die Komplexstabilität bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich sein. Aus der pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstante lassen sich Aussagen über Aminosäuren machen, die an der

Bindung beteiligt sind¹⁸. NADH, NBDH und NMNPRH bilden mit LDH verschieden stark dissoziierte Komplexe. Die pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten ist gleich.

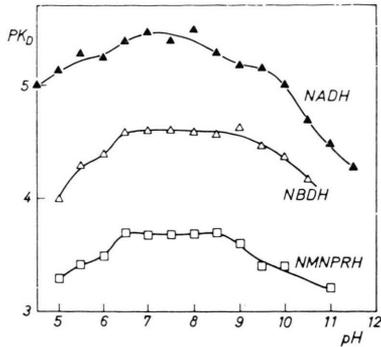


Abb. 5: pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten der Coenzym-Enzym-Komplexe von LDH mit NADH (▲), NBDH (△) und NMNPRH (□). Ordinate: $-\log K_D$ [Mol/l], Abszisse: pH.

Im Bereich von pH 5-7 nimmt die Bindungsfähigkeit zu, bleibt dann konstant und nimmt ab pH 9 wieder ab. Auch ADH_{Leber} bildet mit NADH und NBDH von pH 6-9 verschieden stark und ab pH 9 gleich stark dissoziierte Komplexe.

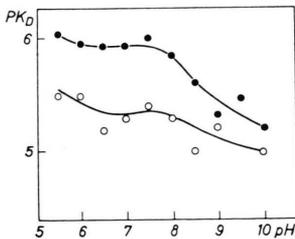


Abb. 6: pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten des Enzym-Coenzym-Komplexes von ADH_{Leber} mit NADH (●) und NBDH (○). Ordinate: $-\log K_D$ [Mol/l], Abszisse: pH.

Die Messungen von ADH_{Hefe} gestalteten sich schwierig. Nach Zugabe von NADH zu einer Enzymlösung läuft unter Verlust der Coenzymfluoreszenz und Abnahme der Absorption bei 340 nm eine ungeklärte Reaktion ab. Ein Teil des Coenzym wird vermutlich nach der Bindung an das aktive Zentrum zerstört¹⁹. Bei Messung des Fluoreszenzanstieges konnte ein Sättigungswert nicht erreicht werden. Die Fluoreszenzintensität des binären Dihydrocoenzym-Enzym-Komplexes nimmt von pH 6 zum alkalischen Bereich hin

ab. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz beobachtet man am LDH-NADH-Komplex²⁰. Durch Messung des Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Coenzym konnten wir die Dissoziationskonstanten der binären Komplexe der ADH_{Hefe} zwischen pH 5-9 bestimmen. Sättigung wurde bei einer NADH-Konzentration von 1 mM erreicht.

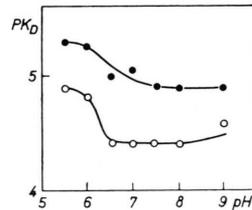


Abb. 7: pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten des Enzym-Coenzym-Komplexes von ADH_{Hefe} mit NADH (●) und NBDH (○). Ordinate: $-\log K_D$; Abszisse: pH.

Die gefundenen Werte stimmen mit denen nach anderen Methoden erhaltenen überein²¹.

Diskussion

Vergleicht man die spektralen Veränderungen, die beim Übergang von Mononucleotiden zum Dinucleotid auftreten, mit denen bei der Bildung des Coenzym-Enzym-Komplexes, so findet man gleichartige Effekte. Es ist deshalb anzunehmen, daß im binären Enzym-Coenzym-Komplex ähnliche Wechselwirkungen auftreten, wie im gefalteten Coenzym zwischen Adeninring und Dihydronicotinamidring. Im Coenzym NADH liegt der Absorptionsbereich des Adeninteils im Bereich der Proteinabsorption. Bei 280 nm liegt die langwellige Flanke der Absorptionsbande, die gegen Lösungsmittel und Umgebungseinflüsse sehr empfindlich ist und sich ändert, wenn N 1 protonisiert wird²². NBDH besitzt keinen Stickstoff im Sechsring des Benzimidazols, so daß $n-\pi^*$ -Übergänge durch Protonisierung wie beim Adenin nicht stattfinden können. Die Absorptionsbanden des Benzimidazols liegen im Spektralbereich der Proteinabsorption. Im hydrophoben Milieu werden sie verbreitert und ihre Feinstruktur gelöscht, so daß Absorptionsänderungen nach Komplexbildung bei 280 nm bei diesem Analogen nicht eindeutig auf Umlagerungen von aromatischen Aminosäureresten des Proteins zurückgeführt

werden können, da gleiche Effekte bei Anlagerung an hydrophobe Aminosäuren auftreten.

Das Coenzymanalogue NMNPRH besitzt keinen Ring auf der nichtfunktionellen Seite und im NNDH_2 absorbieren beide Dihyronicotinamidringe bei 335 nm. Deshalb eignen sich beide Verbindungen, um Änderungen der Absorption aromatischer Aminosäuren im Protein bei der Bildung des Enzym-Coenzym-Komplexes nachzuweisen. NMNPRH bildet stark dissoziierte Komplexe mit Dehydrogenasen, so daß hohe Konzentrationen dieses Coenzymfragments für die Komplexbildung notwendig sind. Nur bei Komplexen mit $\text{ADH}_{\text{Leber}}$ beobachtet man mit beiden Analogen eine Zunahme der Extinktion bei 280 nm, die auf Absorptionsänderungen des Proteins bei der Komplexbildung zurückzuführen sind, während bei LDH und ADH_{Hefe} kein Anstieg bei 280 nm mit NNDH_2 und NMNPRH als Komplexpartner auftritt. Dagegen findet man ihn mit ADPR und NADH. In diesen Fällen ist der Extinktionsanstieg auf Änderung des $n-\pi^*$ -Überganges am N1 des Purinringes zurückzuführen²³.

Bei der Bildung der Dihydrocoenzym-Enzym-Komplexe treten im Differenzspektrum im Bereich der Dihyronicotinamidabsorption Hyper- und Hypochromieerscheinungen und Rot- oder Blauverschiebungen der Absorptionsbanden auf, die mit der Stereospezifität der Wasserstoffübertragung in Zusammenhang gebracht werden können⁶. Die Hypochromieeffekte bei 360 nm werden durch die Anlagerungen des Dihyronicotinamidteils an die Enzyme bewirkt. Bei Verwendung von NNDH_2 als Coenzym wird ein Dihyronicotinamidring an das Adeninbindungszentrum angelagert. Im Komplex mit LDH bedingt dieser Dihyronicotinamidteil einen zusätzlichen Beitrag zur Hypochromie bei 360 nm, der dem Anteil entspricht, der im NADH-LDH-Komplex bei 260 nm vom Adeninteil aufgebracht wird (Abb. 1). Die starke Hypochromie bei 360 nm deutet wie auch das Fluoreszenzverhalten des NNDH -LDH-Komplexes auf einen ähnlichen Bau von Adenin- und Dihyronicotinamid-Bindungsstelle bei LDH¹⁶. In diesem Komplex scheint der Dihyronicotinamidring an der Adeninbindungsseite der LDH angelagert zu sein¹⁶. Wird NADH an $\text{ADH}_{\text{Leber}}$ gebunden, so tritt eine Blauverschiebung der Dihyronicotinamidabsorption von 340 nm nach 325 nm ein²⁴. Der Effekt wurde von KOSOWER²⁵ durch die Nachbarschaft einer positiv geladenen Gruppe des Proteins zum Dihyronicotinamid im NADH- $\text{ADH}_{\text{Leber}}$ -Komplex erklärt. Bei

dieser Anordnung sollte auch eine Fluoreszenzverminderung auftreten²⁶, die jedoch nicht beobachtet wird. Die Hypochromie und Blauverschiebung ist außerdem vom nichtfunktionellen Teil des Coenzyms abhängig; denn der Ersatz des Adenins durch ein anderes Ringsystem führt zu einer starken Abnahme der Hypochromie und Blauverschiebung. Die Änderungen des Fluoreszenzverhaltens von Coenzymanalogen und Enzymen nach der Bildung der binären Komplexe sind ebenfalls vom nichtfunktionellen Coenzymteil abhängig. Die unterschiedliche Dissoziation der Komplexe aus Dehydrogenasen und Coenzymanalogen und -fragmenten erklärt das unterschiedliche Verhalten nicht; denn die Coenzymkonzentrationen wurden bei den Versuchen so gewählt, daß 40% des Enzyms in der Komplexform vorlagen. Steigerung der Coenzymfluoreszenz nach Komplexbildung und die Intensität des Energietransfers hängt vielmehr von der Ausrichtung des Coenzyms im Coenzym-Enzym-Komplex ab. Ist der nichtfunktionelle Ring ein Benzolrest wie im Falle des NPhDH oder ein Dihyronicotinamidrest wie beim NNDH_2 , so ist eine ausreichende Fixierung der nichtfunktionellen Ringe im Adeninbindungszentrum nicht mehr möglich und die beobachtete Energieübertragung und Fluoreszenzsteigerung sind nur gering ausgeprägt. Fehlt auf der nichtfunktionellen Seite ein Ringsystem, so wird das Coenzymfragment nur sehr locker an das aktive Zentrum gebunden. Die K_D -Werte sind stark vergrößert. Eine Ausrichtung des Dihyronicotinamidrestes ist erschwert, was im Fehlen der Energietransferbande und der Coenzymfluoreszenzsteigerung zum Ausdruck kommt. Die schwache Wasserstoffdonatoreigenschaft und die geringe Unterdrückung der Proteinfluoreszenz bei Verwendung von NMNH als Komplexpartner zeigt, daß der Pyrophosphatrest für die Bindung an das Enzym wichtig ist. Die Beteiligung bestimmter dissoziierbarer Aminosäureresten an der Bindung des nichtfunktionellen Teils konnte durch Messung der pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten nicht nachgewiesen werden. Im alkalischen Bereich werden NADH und NBDH von $\text{ADH}_{\text{Leber}}$ fast gleich fest gebunden. ADPR zeigt gleiche pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten¹⁸. Für die Bindung des Pyrophosphatrestes scheint ein basischer Aminosäurerest verantwortlich zu sein. ADH_{Hefe} bildet mit NBDH nur gering fluoreszierende Komplexe. Ab pH 6 zum alkalischen Bereich hin, nehmen die Dissoziationskonstanten für NBDH wie auch für NADH zu. In diesem Bereich liegt der pK-Wert

eines Histidinrestes, der nach unseren Untersuchungen an der Bindung des Nicotinamidteils des Coenzym beteiligt ist²⁷. Aus den Differenzspektren, dem Fluoreszenzverhalten und der pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten der binären Komplexe aus ADH_{Leber}, ADH_{Hefe} und LDH und den Cozymanalogen und -fragmenten können wir über die Bindung und Bedeutung des nichtfunktionellen Teils folgende Aussagen machen: Der Adeninring bedingt eine Ausrichtung des funktionellen Teils im katalytischen Zentrum. Er wird vorwiegend durch hydrophobe Kräfte fixiert und durch eine polare Gruppe in Höhe von N 1 des Puringerüsts ausgerichtet²². Der Ersatz des Adenins durch ein anderes Ringsystem im Coenzym führt zu einer Verminderung der Komplexfestigkeit. Die polarisierbare Gruppe ließ sich bei ADH_{Leber} durch Nicotinamid-[5-bromacetyl-4-methylimidazol]-dinucleotid chemisch modifizieren⁸. Der Pyrophosphatteil tritt durch ionische Beziehungen in Wechselwirkung mit entsprechenden Teilen des Enzyms. Durch Fixierung von Adenin- und Ribose-pyrophosphat-ribose wird der funktionelle Teil an das katalytische Zentrum gebracht und durch Wechselwirkung mit Aminosäureresten aktiviert.

Material und Methoden

Coenzyme: Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid²⁸, Bisnicotinamid-dinucleotid⁶, Nicotinamid-phenyl-dinucleotid²⁹ stellten wir durch Kondensation der Mononucleotide nach einer Methode von Todd und Mitarb. her³⁰. NAD und ADPR waren Produkte der Firma Boehringer und Soehne, Mannheim. Nicotinamidmononucleotid gewannen wir durch enzymatische Spaltung von NAD³¹, Nicotinamid-ribose-5'-pyrophosphat-5''-ribose erhielten wir durch Behandeln von Bisnicotinamid-dinucleotid mit NAD-Glykohydrolase⁶. Dihyronicotinamidmononucleotid erhielten wir durch Reduktion mit Natriumdithionit³². Die Darstellung und Reinigung der Dihydrocoenzymanalogen erfolgte nach l. c.³³. Die Konzentrationen der Dihydrocoenzyme bestimmten wir aus der Dihyronicotinamidabsorption. Die molaren Extinktionskoeffizienten sind für: NADH 6220 bei 340 nm², NBDH 6610, NPhDH 6680, NMNH und NMNPRH 6800 und für NNDH₂ 13260, jeweils bei 335 nm.

Enzyme: Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz, Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber und Hefe bezogen wir von der Firma Boehringer & Soehne, Mannheim.

Vorbereitung der Enzyme: 2 ml Kristallsuspension Lactat-Dehydrogenase 10 mg/ml wurden zentrifugiert und der Niederschlag in 3 ml 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5 aufgenommen und die Lösung auf eine Sephadex-G 50 fine Säule (2 · 60 cm) gegeben.

Mit 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5 wurde die Säule eluiert. 2 ml Kristallsuspension der Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber 10 mg/ml wurden bei 4 °C 3 · 4 h gegen je 4 l 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5 dialysiert. 1 ml Kristallsuspension Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe 30 mg/ml wurde zentrifugiert und der Niederschlag in 2 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen und auf eine Sephadex-G 50 fine Säule (2 · 60 cm) gegeben. Mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0 wurde eluiert. Vor Durchführung von Fluoreszenzmessungen wurden die Enzymlösungen bei 0 °C 30 min bei 20000 x g zentrifugiert.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Biuretmethode mit einem Faktor 16,5 bestimmt³³. Die Konzentrationen wurden auf das Molekulargewicht der Enzymuntereinheiten bezogen: für Lactat-Dehydrogenase 36000 und Alkohol-Dehydrogenase aus Leber 42000 und Hefe 38000.

UV-Licht absorbierende Säuleneluate wurden im LKB-Uvicord 4700 erkannt. UV-Spektren wurden im Cary 14 Spectrophotometer gemessen.

Zur Messung der pH-Abhängigkeiten der Dissoziationskonstanten wurde im Bereich von pH 5-6,5, 0,2 M Phosphatpuffer, im Bereich von 7,0-8,5, 0,2 M Tris/HCl-Puffer und im Bereich von pH 9-11, 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer verwandt. Die Dissoziationskonstanten der Enzym-Coenzym-Komplexe sind definiert als:

$$K_D = \frac{[\text{Enzym-Coenzym}]}{[\text{Enzym}] \cdot [\text{Coenzym}]}$$

und wurden fluorimetrisch¹³ bestimmt. In einer Küvette D = 1 cm befanden sich in 3 ml der oben angegebenen Puffer 0,01 mM LDH, 0,01 mM ADH_{Leber} oder 0,02 mM ADH_{Hefe}. Zu der Lösung wurde eine 0,1 mM Dihydrocoenzymlösung im Falle der LDH und ADH_{Leber} und eine 1 mM Dihydrocoenzymlösung bei der ADH_{Hefe} in 2 µl-Schritten titriert. Die Änderungen der Coenzymfluoreszenz bei 440 nm nach Anregung mit 340 nm und die Änderung der Proteinfluoreszenz bei 340 nm nach Anregung 290 nm wurden bestimmt. Blindwerte wurden in Proben, die kein Enzym enthielten, gemessen und Verdünnungsfehler durch Vergleich ermittelt. Die Punkte in Abb. Nr. 6, 7 und 8 sind aus je vier Messungen für jeden pH-Wert gemittelt.

Fluoreszenzspektren wurden im Beckman Gitterfluorimeter 1076 gemessen. Die Coenzymkonzentrationen lagen zwischen 10-150 µM, die Enzymkonzentrationen 10-50 µM. Beide Konzentrationen wurden jeweils so gewählt, daß 40% des zugegebenen Enzyms im Enzym-Coenzym-Komplex gebunden war. Die Konzentrationen des Enzym-Coenzym-Komplexes wurden aus den Dissoziationskonstanten¹⁶ nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\frac{[E] \cdot [Co]}{[E \cdot Co]} = K_D \quad (1)$$

$$[E] = [E_t] - [E \cdot Co] \quad (2a)$$

$$[Co] = [Co_t] - [E \cdot Co] \quad (2b)$$

hierbei bedeutet $[E]$ die Enzymkonzentration, $[E_t]$ die Gesamtzymkonzentration, $[Co]$ die Coenzymkonzentration, $[Co_t]$ die Gesamtcoenzymkonzentration, $[E \cdot Co]$ die Enzym-Coenzym-Komplex-Konzentration und K_D die Dissoziationskonstante. Durch Einsetzen von (2a) und (2b) in (1) erhält man die Gleichung:

$$\frac{([E_t] - [E \cdot Co]) ([Co_t] - [E \cdot Co])}{[E \cdot Co]} = K_D$$

und

$$[E \cdot Co] = \frac{1}{2} ([E_t] + [Co_t] + K_D) - \frac{1}{2} \sqrt{([E_t] + [Co_t] + K_D)^2 - 4 [E_t] \cdot [Co_t]}$$

Die *Differenzspektren* zwischen gespaltenem und intaktem Coenzym wurden bei 25°C in einem Cary 14-Spektralphotometer aufgenommen. In einer Tandemküvette $D = 2 \cdot 0,45$ cm befanden sich in Kammer 1 0,1 mM Dihydrocoenzym in 1 ml 0,2 M Tris/

HCl-Puffer pH 8,2, der 0,03 M an $MgSO_4$ war. In Kammer 2 waren 1 mg Pyrophosphatase in 1 ml des gleichen Puffers gelöst. Nach Aufnahme der Null-Linie gegen eine gleichbeschickte Küvette wurde der Inhalt der beiden Kammern der Meßküvette gemischt, und das Spektrum gegen die ungemischte Vergleichsküvette aufgenommen.

Differenzspektren zwischen Enzym-Coenzym-Komplexen und den beiden Komponenten wurden in ähnlicher Anordnung aufgenommen. In der Kammer 1 befanden sich in 1 ml einer 0,1 mM Dihydrocoenzym-Lösung in 0,5 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,2, in Kammer 2 1 ml einer 0,1 mM Enzym-Lösung im gleichen Puffer gelöst. Nach Aufnahme der Null-Linie wurde der Inhalt der Meßküvette gemischt und das Spektrum gegen die nichtgemischte Vergleichsküvette aufgenommen. Bei der Aufnahme von Differenzspektren der Komplexe zwischen Coenzymfragmenten und Enzymen wurden höhere Coenzymfragmentkonzentrationen verwandt.

- 1 N. J. OPPENHEIMER, L. J. ARNOLD u. N. O. KAPLAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **68**, 3200–3205 [1971].
- 2 J. M. SIEGEL, G. A. MONTGOMERY u. R. M. BOCK, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 288–299 [1959].
- 3 M. G. ROSSMANN, M. J. ADAMS, M. BUEHNER, G. C. FORD, L. HACKERT, P. J. LENTZ, A. MCPHERSON, R. W. SCHEVITZ u. J. E. SMILEY, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **36**, 179–191 [1971].
- 4 G. PFLEIDERER, E. SANN u. F. ORTANDERL, Biochim. Biophysica Acta [Amsterdam] **73**, 39–49 [1963].
- 5 L. SHUSTER, N. O. KAPLAN u. F. E. STOLZENBACH, J. biol. Chemistry **215**, 195–209 [1955].
- 6 H. F. FISHER, D. L. ADIJA u. D. G. GROSS, Biochemistry **8**, 4424–4430 [1969].
- 7 H. THEORELL u. R. BONNICHSON, Acta chem. Scand. **5**, 1105–1126 [1951].
- 8 C. WOENCKHAUS u. R. JECK, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 1417–1423 [1971].
- 9 C. WOENCKHAUS u. D. SCHERR, Z. Naturforsch. **26b**, 106–112 [1971].
- 10 F. W. J. TEALE u. G. WEBER, Biochem. J. **72**, 15 P. [1959].
- 11 R. H. MCKAY u. N. O. KAPLAN, Biochim. Biophysica Acta [Amsterdam] **79**, 273–283 [1964].
- 12 G. WEBER, Nature [London] **180**, 1409–1410 [1957].
- 13 S. F. VELICK, J. biol. Chemistry **233**, 1455–1467 [1958].
- 14 H. THEORELL u. K. TATEMOTO, Arch. Biochem. Biophysics **142**, 69–82 [1971].
- 15 T. FÖRSTER, Fluoreszenz organischer Verbindungen, Verlag Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1951.
- 16 C. WOENCKHAUS u. D. SCHERR, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 53–59 [1973].
- 17 D. G. GROSS u. H. F. FISHER, Biochemistry **8**, 1147–1155 [1969].
- 18 H. THEORELL u. T. YONETANI, Arch. Biochem. Biophysics **106**, 252–258 [1964].
- 19 J. E. HAYES u. S. F. VELICK, J. biol. Chemistry **201**, 225–244 [1954].
- 20 A. D. WINER, The Mechanism of Action of Dehydrogenases, G. W. SCHWERT u. A. D. WINER eds. pp. 1–21, the University Press of Kentucky 1969.
- 21 A. P. NYGAARD u. H. THEORELL, Acta chem. Scand. **9**, 1551–1552 [1955].
- 22 R. F. FISHER, A. C. HAINE, A. P. MATHIAS u. B. R. RABIN, Biochem. Biophysica Acta [Amsterdam] **139**, 169–170 [1967].
- 23 A. DEAVIN, R. F. FISHER, C. M. KEMP, A. P. MATHIAS u. B. R. RABIN, European J. Biochem. **7**, 21–26 [1968].
- 24 H. THEORELL, Experientia [Basel] **21**, 553 [1965].
- 25 E. M. KOSOWER, Biochim. Biophysica Acta [Amsterdam] **56**, 474–479 [1962].
- 26 S. SHIFRIN, Biochemistry **3**, 829–833 [1964].
- 27 C. WOENCKHAUS, M. ZOLTOBROCKI, J. BERGHÄUSER u. R. JECK, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 60–66 [1973].
- 28 C. WOENCKHAUS u. G. PFLEIDERER, Biochem. Z. **341**, 495–501 [1965].
- 29 C. WOENCKHAUS u. M. VOLZ, Chem. Ber. **99**, 1712–1717 [1966].
- 30 N. A. HUGHES, G. W. KENNER u. A. R. TODD, J. Chem. Soc. [London] 3733–3738 [1957].
- 31 G. W. E. PLAUT u. K. A. PLAUT, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 189–192 [1963].
- 32 G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDE u. G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. **8b**, 555–577 [1953].
- 33 C. WOENCKHAUS u. R. JECK, Z. Naturforsch. **24b**, 1436–1441 [1969].