

Die Alkoholdehydrogenase Ihre Wirkungsweisen und Komplexverbindungen*

Von HUGO THEORELL

Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska Avdelningen, Stockholm (Sweden)

Im Jahre 1906 führten BUCHNER und GAUNT¹ den Namen «Alkoholoxidase» für das alkoholoxidierende System in Essigsäurebakterien ein, und 1909 studierten in der Schweiz BATELLI und seine russische Mitarbeiterin LINA STERN² die Wirkung der «Alkoholdehydrogenase» in verschiedenen animalen Geweben und fanden, dass sie weitaus am stärksten in der Leber war, eine Beobachtung die seitdem öfters bestätigt worden ist. Zu dieser Zeit war die Unterscheidung zwischen «Oxydase» und «Dehydrogenase» rein terminologisch, da vom eigentlichen Mechanismus sehr wenig bekannt war. Man nahm an, die Oxydasen würden Sauerstoff aktivieren, der sich dann mit dem Substrat unter «Verbrennung» zu Kohlensäure und Wasser verbinde; die Dehydrogenasen dagegen würden dem Substrat Wasserstoff entziehen und Wasser zuführen, so dass das Substrat sauerstoffreicher und wasserstoffärmer würde, wie dies bei jeder Verbrennung zutrifft. In den Zwanzigerjahren stritten sich OTTO WARBURG einerseits und HEINRICH WIELAND und TORSTEN THUNBERG andererseits heiss über die Frage «oxydatische» oder «dehydrogenatische» Verbrennung. Gelöst wurde das Problem von WARBURG, als er nach der Entdeckung des sauerstoffübertragenden Atmungsferments 1925 auch die wasserstoffübertragenden Vitamine, Flavin (1932) und Nikotinsäureamid (1934) entdeckte. Damit war der Streit zu Ende gekommen, und zwar in der salomonischen Weise, dass beide Seiten recht gehabt hatten.

Es ist ein Vergnügen, bei dieser Gelegenheit an die bedeutsame Rolle zu erinnern, die PAUL KARRER bei der Aufklärung der Konstitution und Wirkungsweise der wasserstoffübertragenden Vitamine spielte. Für die Konstitutionsermittlung der Flavine war u.a. seine Entdeckung des Bestrahlungsprodukts Lumichrom wichtig. Als ich selbst, im Jahre 1934 in Dahlem, das Flavinmononucleotid (FMN) als Wirkungsgruppe des alten gelben Ferments festgestellt hatte, glaubte man einige Zeit, dass dies das einzige flavinhaltige Coenzym wäre. Ein paar Jahre später isolierte aber KARRER aus anderem Material ein adeninhaltiges Flavinnucleotid

und hatte damit als erster ein Flavinadenindinucleotid (FAD) in seinen Händen.

Nachdem WARBURG das Nikotinsäureamid aus Triphosphopyridinnucleotid 1934 isoliert und seine Konstitution ermittelt hatte, klärte KARRER den Mechanismus der Reduktion auf. Unter Sättigung einer der drei Doppelbindungen des Pyridinrings tritt ein Wasserstoffatom in den Ring ein, das zweite übernimmt die positive Ladung des ternären Stickstoffs und erscheint als Wasserstoffion. Diese Feststellung war sehr wichtig, denn da ein Proton an der Reaktion mitbeteiligt ist, werden alle Reaktionen mit Pyridincofermenten vom pH abhängig.

Die Coenzyme wirken in einem sehr komplizierten Zusammenspiel – das den Biochemikern für unabsehbare Zeit faszinierende Probleme darbieten wird – immer nur in Verbindung mit Enzymproteinen. Da wir noch am Anfang stehen, kann man sich noch Systeme auswählen, die für das Experimentieren günstige Eigenschaften besitzen. Das ist der Grund, warum wir seit vielen Jahren mit Vorliebe mit den Leberalkoholdehydrogenasen (LADH) arbeiten. Das Enzym wurde 1948 von meinen damaligen Mitarbeitern BONNICHSEN und WASSÉN³ aus Pferdeleber kristallisiert (Figur 1). Es ist verhältnismässig einfach rein darzustellen und hält sich unter geeigneten Bedingungen fast unbegrenzt.

Die Reaktionen mit dem Coenzym NAD⁺ (Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid) und Substrat können mit spektrophotometrischen und fluorimetrischen Methoden verfolgt werden. Da nicht nur das Enzym, sondern auch verschiedene Komplexe schöne Kristalle bilden, haben wir in letzter Zeit auch röntgenkristallographische Arbeiten angefangen, auf die ich noch zurückkommen werde.

* 7. PAUL-KARRER-Vorlesung, gehalten am 30. Juni 1965, an der Universität Zürich (Schweiz).

¹ E. BUCHNER und R. GAUNT, Liebigs Ann. 349, 140 (1906).

² F. BATELLI und L. STERN, C. r. Soc. Biol. 67, 419 (1909).

³ R. K. BONNICHSEN und A. M. WASSÉN, Arch. Biochem. Biophys. 18, 361 (1948).

Alkoholdehydrogenasen sind in der Natur weit verbreitet; aus Brauereihefe kristallisierten NEGELEIN und WULFF⁴ 1937 die Hefe-ADH (YADH). In der Literatur sind der Nachweis der ADH-Wirkung, sowie die teilweise Reinigung der aus verschiedenen Materialien gewonnenen Enzyme beschrieben, wie z.B. aus Leber von Mensch, Schwein, Kaninchen, Schaf, Ratte, Fisch, Retina von Frosch und Vieh, Erythrocyten von niedrigen Vertebraten und vielen Pflanzen und Samen. In Erbsen z.B. treten am fünften Tag der Keimung plötzlich 0,5% Äthanol und starke ADH-Wirkung auf⁵. In keimenden Reis ruft Zusatz von Äthanol eine Biosynthese von ADH hervor⁶.

Pferdeleber-ADH ist ein farbloses Protein vom Molekulargewicht 84000⁷. Die Aminosäurezusammensetzung ist nur insofern auffallend, als von den 45 S/Mol 15 in Methioninresten, die übrigen in Cystein vorhanden sind. Disulfid ist nicht vorhanden. LADH enthält Zink^{8,9}. Die Analysen variierten bis vor kurzem zwischen 2 und 3,2 Zn/Mol. ÅKESON hat aber jetzt den Wert 4 Zn/Mol festgestellt¹⁰. Wenigstens zwei von diesen gehören zu den zwei aktiven Gruppen.

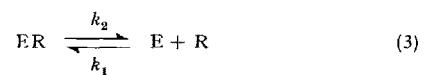
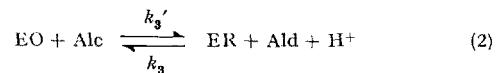
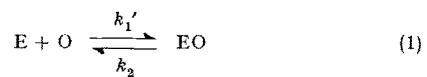
Kinetik. Die Bestimmungen der Reaktionsgeschwindigkeit unter systematisch variierten Bedingungen ergeben gute Informationen über den Mechanismus des Zusammenwirkens zwischen Enzym, Coenzym und Substrat. Beim Experimentieren kann man entweder die bei der Reduktion des NAD⁺ auftretende Bande bei 340 nm¹¹ spektrophotometrisch oder die von derselben Bande herrührende Fluoreszenz spektrofluorimetrisch messen. Die letzte Methode zeichnet sich gegenüber der ersten durch die grössere Empfindlichkeit aus. Außerdem ändert sich die Fluoreszenzintensität des NADH bei der Bildung des binären Komplexes mit LADH. Kommen Ternärliganden hinzu, treten meistens noch weitere Veränderungen ein. Diese Erscheinungen erwiesen sich für die Bestimmung von Dissoziationskonstanten und anderen Eigenschaften der Komplexe als ausserordentlich nützlich, zumal die Fluoreszenzvariationen manchmal sehr gross sind. Zum Beispiel ist die Fluoreszenzintensität des ADH-NADH-Isobutyramidkomplexes bei 410 nm 40-mal höher als die der freien NADH¹².

Bei Komplexbildung treten auch Lichtabsorptionsänderungen in UV-Licht auf. Die zuerst beobachtete Veränderung war die Verschiebung der Bande des NADH bei 340 nm nach 325 nm bei der Kupplung mit LADH¹³. Seitdem sind andere Lichtabsorptionsänderungen, auch in NAD⁺-Komplexen, beschrieben worden, die sehr aufschlussreich sind, besonders wenn man doppelte Differenzspektrophotometrie verwendet.

Die Reaktion zwischen ADH, Coenzym und Substrat ist reversibel, bei pH 7 aber weit nach der NAD-Alkoholseite verschoben, wie aus der Gleichgewichtskonstante ersichtlich ist¹⁴:

$$\frac{[\text{NADH}] [\text{Ald}] [\text{H}^+]}{[\text{NAD}^+] [\text{Alk}]} = 0,80 \cdot 10^{-11}$$

Mischt man äquivalente Mengen NAD⁺ und Alkohol bei pH 7 mit einer katalytischen Menge ADH, so ist das Gleichgewicht bereits eingestellt, wenn 1% reagiert hat. Entfernt man Aldehyd und NADH, so verläuft die Reaktion natürlich weiter. Bei Reaktionen zwischen drei Teilnehmern gibt es viele Möglichkeiten für die Reihenfolge der Einzelreaktionen. Wir stellten mit CHANCE¹⁵ 1951 für das LADH-System die folgende Hypothese auf:



Es dauerte über zehn Jahre, und Tausende von Experimenten waren notwendig, um zu zeigen, dass dieser sogenannte «Theorell-Chance»-Mechanismus formal richtig ist, sofern man mit Äthanol-Aldehyd arbeitet und die Reaktionsgeschwindigkeit am Anfang misst.

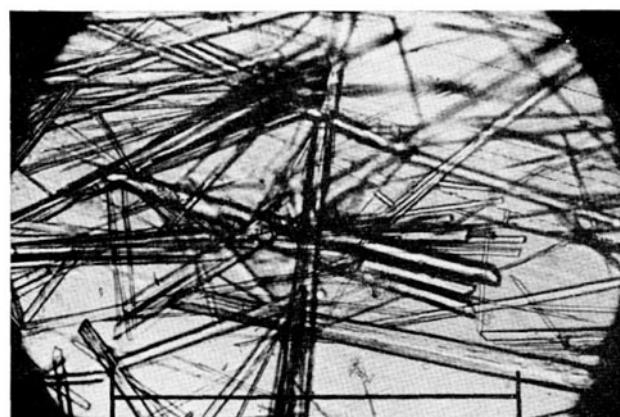


Fig. 1. LADH-Kristalle (Skala 1,0 mm). T. YONETANI und H. THEORELL, Arch. Biochem. Biophys. 100, 554 (1963).

⁴ E. NEGELEIN und H. J. WULFF, Biochem. Z. 289, 436 (1937); 290, 445 (1937); 293, 351 (1937).

⁵ J. GOKSÖYR, E. BOERI und R. K. BONNICHSEN, Acta chem. scand. 7, 657 (1953).

⁶ A. A. APP und A. N. MEISS, Arch. Biochem. Biophys. 77, 181 (1958).

⁷ A. EHRENBERG und K. DALZIEL, Acta chem. scand. 12, 65 (1958); A. EHRENBERG, Acta chem. scand. 11, 1257 (1957).

⁸ H. THEORELL, A. P. NYGAARD und R. K. BONNICHSEN, Acta chem. scand. 9, 1148 (1955).

⁹ B. L. VALLEE und F. L. HOCH, J. biol. Chem. 225, 185 (1957).

¹⁰ A. ÅKESON, Biochem. biophys. Res. Comm. 17, 211 (1964).

¹¹ O. WARBURG, W. CHRISTIAN und A. GRIESE, Biochem. Z. 282, 157 (1955).

¹² A. D. WINTER und H. THEORELL, Acta chem. scand. 13, 1038 (1959); 14, 1729 (1960).

¹³ H. THEORELL und R. K. BONNICHSEN, Acta chem. scand. 5, 1105 (1951).

¹⁴ K.-J. BÄCKLIN, Acta chem. scand. 12, 1279 (1958).

¹⁵ H. THEORELL und B. CHANCE, Acta chem. scand. 5, 1127 (1951).

Unser Hauptbeweis lag in der Übereinstimmung der aus den erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten (1) und (3) berechneten Dissoziationskonstanten $K_{E,0}$ ($= k_2'/k_1'$) und $K_{E,R}$ ($= k_2/k_1$) mit den unabhängig ermittelten Werten von $K_{E,0}$ und $K_{E,R}$. Es besteht aber auch kein Zweifel, dass (2) eine Vereinfachung eines komplizierteren Verlaufs darstellt:



Dass in der Tat ternäre Komplexe mit Substrat gebildet werden, konnte man auf verschiedene Weisen feststellen. Der vielleicht überzeugendste Beweis haben die Zürcher Forscher HADORN, LEUTHARDT et al.¹⁶ geliefert. Glyzerin wird vom LADH-System stereospezifisch zu L-Glyzeraldehyd oxydiert. Ohne Bindung des Substrats im Ternärkomplex wäre dies nicht möglich.

Wie man leicht einsieht, erfordert die kinetische Gültigkeit des Theorell-Chance-Mechanismus, dass k' und k im Verhältnis zu den anderen Konstanten gross sind, und dass die Abspaltung des Substratproduktes vom Ternärkomplex im Verhältnis zur Spaltung des binären Coenzym-Enzymkomplexes schnell geht. SILVERSTEIN und BOYER haben mit Isotopexperimenten gezeigt, dass dies der Fall ist¹⁷.

Inhibitoren. Eine grosse Anzahl von LADH-Inhibitoren sind im Laufe der Jahre gefunden worden. Wir werden uns hier nur für diejenigen interessieren, die uns etwas über die Wirkungsweise des ADH-Systems aussagen. Im wesentlichen sind das solche Hemmer, die entweder mit dem Substrat oder Coenzym um ihre Haftstellen an der Oberfläche des Enzyms konkurrieren.

Zusammen mit WINER¹² fanden wir, dass aliphatische Carbonsäuren hemmend wirken, weil sie mit ADH und NAD⁺ Ternärkomplexe bilden, in denen die Säuren den Platz des Alkohols einnehmen. Eine Verlängerung der Kohlenstoffkette von C₂ bis C₁₀ verstärkte die Bindung der Fettsäure ($K_{EO,1}$) wenigstens tausendfach. Wir schlossen daraus, dass eine lipophile Haftstelle an der Oberfläche des Enzymmoleküls für die Bindung der Fettsäure und auch der Alkohole, die als Substrat dienen, wesentlich ist. Interessanterweise sind Fettsäuren ab C₁₆ (Palmitinsäure) aufwärts wirkungslos, was für die Funktion des ADH in der lebenden Zelle wahrscheinlich von Bedeutung ist. Auch die Bindung der NAD⁺ wird bei pH 7 durch den Eintritt der Fettsäure etwa 30fach stabilisiert; dieser Effekt ist unabhängig von der Länge der Kohlenstoffkette und röhrt, wie wir anderswie bestätigen konnten, von der Einfügung der negativen Carboxylgruppe zwischen Zn⁺⁺ und NAD⁺ her.

Fettsäuren bilden keine Komplexe mit NADH und ADH. Dagegen werden solche Komplexe mit den Fett säureamiden gebildet. Kinetisch konkurrieren die Amide mit den Aldehyden. Ein lipophiler Effekt der

Kohlenstoffkette ist, wie bei den Fettsäuren, vorhanden, und die Bindung des NADH zum ADH wird durch den Eintritt der Amide etwa hundertfach stabilisiert. Da schon der binäre ADH-NADH-Komplex sehr stabil ist, $K_{E,NADH} = 0,3 \mu M$ bei pH 7, folgt daraus, dass NADH in den Ternärkomplexen außerordentlich stark gebunden ist, z.B. $K_{EI,R} = 0,003 \mu M$ für den Komplex mit Isobutyramid. Diese Verbindung ist interessant, weil sie sehr stark fluoresziert. Wir dachten daran, diesen Effekt für einen spezifischen intrazellulären Nachweis von ADH in vivo auszunutzen, sind aber noch nicht dazu gekommen. Dagegen benutzen wir diesen Effekt regelmässig für die fluorimetrische Titration sehr verdünnter ADH-Lösungen.

Mit MCKINLEY-MCKEE¹⁸ fanden wir, dass Imidazol mit NAD⁺ oder NADH als Partner Ternärkomplexe gibt. Da Imidazol bekanntlich mit Zink Komplexe bildet, nehmen wir an, dass es sich mit dem Zink im Enzym verbindet.

In den Ternärkomplexen mit Imidazol sind NAD⁺, bzw. NADH weniger fest gebunden als in den binären Verbindungen. Infolgedessen wirkt Imidazol in kinetischen Versuchen entweder hemmend (mit kleinen Konzentrationen von NAD⁺ oder Alkohol) oder umgekehrt beschleunigend (bei hohen Konzentrationen). Dazwischen gibt es also Konzentrationen, bei welchen Imidazol scheinbar wirkungslos ist; aus einem Versuch darf man also nie auf Unwirksamkeit einer Substanz schliessen. Warum Imidazol so wirken kann, wurde kinetisch aufgeklärt. Wir werden diese etwas verwickelten Zusammenhänge hier nicht weiter verfolgen. Als wir eine Reihe von anderen heterocyclischen Stickstoffbasen prüften, fanden wir, dass Pyrazol ein äusserst starker Inhibitor ist, der mit Alkohol um die Haftstelle konkurriert¹⁹. ADH und NAD⁺ bilden mit Pyrazol einen festen Ternärkomplex, wobei eine neue Absorptionsbande bei 290 nm erscheint. Pyrazol bildet mit Zinkionen Zink-di-Pyrazol, wobei ein Proton pro Pyrazol freigesetzt wird und titriert werden kann. Wurde nun ADH + NAD⁺ mit Pyrazol titriert, unter Konstanthalten des pH im pH-Stat, so fanden wir, dass Lauge verbraucht wurde und dass ein Proton pro gebundenes Pyrazol frei wurde. Wir schlossen daraus, dass auch im ADH Pyrazol unter Ausstossen des Imino-Wasserstoffs als Proton an Zink gebunden wird (Figur 2). Die im Pyrazol nun vorhandene negative Ladung wandert zum positiven Pyridinring, wodurch die beiden Ringe covalent verbunden werden. Eine Doppelbindung im Pyridinring verschwindet, und

¹⁶ B. HADORN, F. LEUTHARDT, E. MENARD und D. VISCHER, Helv. chim. Acta 46, 2003 (1963).

¹⁷ E. SILVERSTEIN und P. D. BOYER, J. biol. Chem. 239, 3908 (1964).

¹⁸ H. THEORELL und J. S. MCKINLEY-MCKEE, Acta chem. scand. 15, 1811 (1961).

¹⁹ H. THEORELL und T. YONETANI, Biochem. Z. 338, 537 (1963).

die Umlagerung der Doppelbindungen lässt die Bande bei 290 nm erscheinen.

VALLEE et al.^{20,21} und WALLENFELS et al.²² haben nachgewiesen, dass o-Phenanthrolin hemmend wirkt, und sich mit dem Zink in ADH verbindet, wobei Absorptionsbanden im UV auftreten. Phenanthrolin verhält sich gegenüber dem Coenzym «competitive»²³. YONETANI²⁴ fand bei uns, dass Adenin-Diphosphat-Ribose (ADPR), d.h. NAD⁺ minus Nikotinsäureamid, mit ADH eine ziemlich feste Verbindung («E-A») mit der Dissoziationskonstante 16 μM bei pH 7 liefert. Merkwürdigerweise verbindet sich EA mit Phenanthrolin zu einem «Mosaik»-Komplex E_A^{Phe}, in welchem A und Phe gar nicht aufeinander einwirken, die Dissoziationskonstante des Phenanthrolins bleibt = 8 μM , die des ADPR = 16 μM , unabhängig von anderen Liganden (Figur 3).

Das Phenanthrolinmolekül scheint im Gegensatz zu Pyrazol so gross zu sein, dass sterische Hinderung am Nikotinsäureamidteil des NAD⁺ vorliegt.

WALLENFELS et al.²⁵ haben die Theorie aufgestellt – woran wir²⁶ einige Zeit glaubten – dass der Adeninteil des Coferments sich mit dem Zink des ADH verbinden würde. Nach unseren Ergebnissen über den ADH-Phenanthrolin-ADPR-Komplex lässt sich diese Annahme nicht mehr aufrecht erhalten.

Über den Wirkungsmechanismus der ADH-Systems machen wir uns in gewisser Übereinstimmung mit WALLENFELS²⁵ ein Bild (Figur 4), das durch unsere Befunde über den Ternärkomplex mit Pyrazol wesentlich gestützt wird.

Nachdem der Alkohol in seine Haftstelle eingefügt ist, wird unter dem Einfluss des positiv geladenen Zinks der Wasserstoff der -OH-Gruppe als Proton ausgestossen unter Bildung eines negativ geladenen Alkoholats. Die negative Ladung wird vom benachbarten Wasserstoff übernommen, der dann als Hydridion zum C(4) des Nikotinsäureamids wandert. Dabei entstehen NADH und Aldehyd.

Substrate der Leber-Alkoholdehydrogenase. LADH wirkt nicht nur auf Äthanol, sondern auch auf eine bunte Reihe von primären und sekundären Alkoholen – jedoch nicht auf Methanol, das keine lipophile Seitenkette hat – und reversibel auf ihre entsprechenden Aldehyde und Ketone. Die weite Verbreitung des Ferments in lebenden Organismen die normalerweise niemals mit Äthanol in Berührung kommen, macht es schon unwahrscheinlich, dass Oxydation von Äthanol die physiologische Funktion der ADH, z.B. in der Leber der Wirbeltiere, wäre. In der Hefe und z.B. in keimenden Erbsen sind die Verhältnisse anders; da ist die normale Funktion in der Reduktion von Acetaldehyd zu Äthanol zu sehen. Die Hefe-ADH ist dementsprechend viel spezifischer für Äthanol-Acetaldehyd als die Leber-ADH. Trotzdem LADH eines von den am meisten studierten Fermenten ist, hat man heute

noch keine Ahnung von seinen physiologischen Aufgaben. Dies zu wissen wäre jedoch von grosser praktischer Bedeutung, denn so viel steht fest, dass, solange Äthanol im Körper anwesend ist – z.B. nach Einnahme von alkoholischen Getränken – LADH nichts anderes

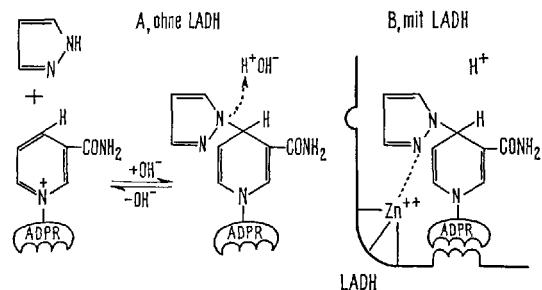


Fig. 2. Mechanismus für Pyrazol gekuppelt mit: A, DPN bei alkalischer Reaktion; B, als Brücke zwischen Zn⁺⁺ und Nicotinamid in LADH¹⁹.

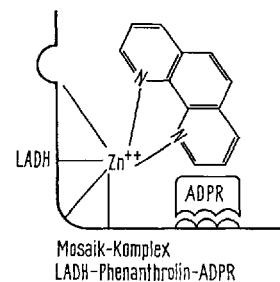


Fig. 3. Mosaik-Komplex LADH-Phenanthrolin-ADPR.

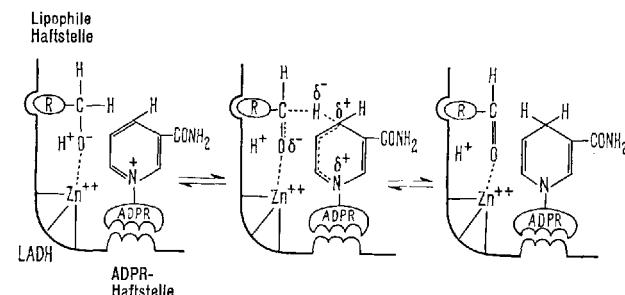


Fig. 4. Wirkungsmechanismus der Leber-ADH¹⁹.

²⁰ B. L. VALLEE und F. L. HOCH, J. biol. Chem. 225, 185 (1957).

²¹ B. L. VALLEE, R. J. P. WILLIAMS und F. L. HOCH, J. biol. Chem. 234, 2621 (1959).

²² K. WALLENFELS, H. SUND und H. DIEKMANN, Biochem. Z. 329, 48 (1957).

²³ R. A. PLANE und H. THEORELL, Acta chem. scand. 15, 1866 (1961).

²⁴ T. YONETANI, Acta chem. scand. 17, Suppl. 1, 96 (1963); Biochem. Z. 338, 300 (1963). – T. YONETANI und H. THEORELL, Arch. Biochem Biophys. 106, 243 (1964).

²⁵ K. WALLENFELS und H. SUND, Biochem. Z. 329, 59 (1957).

²⁶ H. THEORELL und J. S. MCKINLEY-MCKEE, Acta chem. scand. 15, 1834 (1961).

machen kann als Äthanol oxydieren. Dabei werden die anderen, unbekannten aber vielleicht wichtigen Funktionen ausser Spiel gesetzt, und dies könnte die Ursache gewisser Alkoholschäden sein. Ob dies zutrifft, könnte man in Tierexperimenten mit Pyrazol prüfen. Mit REYNIER²⁷ haben wir eine Reihe von zinkhaltigen Fermenten auf Hemmung durch Pyrazol geprüft. Das Ergebnis war negativ, sogar für Hefe-ADH. Pyrazol ist also ein sehr spezifischer Hemmer für Leber-ADH. Auf unsere Anregung hin haben WRETLIND²⁸ und GOLDBERG²⁹ an Hunden, bzw. Ratten festgestellt, dass Pyrazol auch *in vivo* die Verbrennung von Äthanol verlangsamt. Ich möchte einige der Goldbergschen Rattenversuche kurz erwähnen.

Ohne Pyrazol verläuft die Abnahme des Alkohols im Blut wie beim Menschen geradlinig.

Wird nach dem Alkohol Pyrazol injiziert, so flacht die Kurve gleich ab; der Grad der Abflachung hängt von der gegebenen Dosis ab. Der Verlauf der Alkoholverbrennung bleibt mit Pyrazol nicht mehr streng geradlinig, sondern die Hemmung wird desto grösser, je weniger Alkohol zurückgeblieben ist. Dies war zu erwarten, da die Pyrazolhemmung «competitive» ist.

Wurde Ratten in geschlossener Kammer mit konstanter Durchlüftung ¹⁴C-Äthanol injiziert, so stieg der ¹⁴C-Gehalt des ausgeatmeten CO₂ zu einem konstanten Wert.

Sobald der Alkohol verbrannt war, fiel der ¹⁴C-Gehalt rasch zu niedrigen Werten ab. Wurde Pyrazol injiziert, währenddem Alkohol noch im Körper vorhanden war, fiel ¹⁴C gleich zu einem niedrigeren Niveau ab.

Bei hinreichend grosser einmaliger Dosierung konnte GOLDBERG die LADH in Ratten so effektiv hemmen, dass Alkohol noch eine Woche nach der Einspritzung im Blut vorhanden war. Noch etwas stärker als Pyrazol wirkt 3-Iodopyrazol.

Nachdem WALLER³⁰ gefunden hatte, dass Farnesol vom ADH-System zu Farnesal oxydiert wird, hielten wir es für angebracht, nach einer möglichen Rolle der ADH im Steroidumsatz zu suchen. Mit WALLER und SJÖWALL³¹ untersuchten wir zunächst eine Reihe von hydroxylierten Gallensäuren (Tabelle I).

Aus der Tabelle I ersieht man, dass LADH stereospezifisch 3 β -Hydroxy-5 β -cholansäuren oxydert. Eine 12 α -ständige Hydroxylgruppe verbessert die Reaktionsfähigkeit etwas, vielleicht durch Einfügen des Substrats in die richtige Lage an der Haftstelle. 3 α -5 β -Cholansäuren reagieren überhaupt nicht.

Die reversible Reaktion, Reduktion von 3-Keto-5 β -cholansäuren durch ADH + NADH, gab übereinstimmende Resultate. Dies wurde sichergestellt, indem nach der Oxydation von 3 β -OH, 5 β -Cholansäure als Reaktionsprodukt 3-Keto-5 β -cholansäure in 90prozentiger Ausbeute isoliert werden konnte. Auch die umgekehrte Reaktion führte zum entsprechenden Ergebnis (Tabelle II).

Es ist ausserordentlich interessant, dass die 3 β -OH-Gruppe in dieser Verbindung axial, der zum Pyridinring abgegebene Wasserstoff also äquatorial ist (Figur 5). Dies stimmt mit den Arbeiten von PRELOG³² und RÉTEY³³ vollkommen überein, die LADH als ein e-Enzym, das also äquatorialen Wasserstoff transferiert, klassifiziert haben. In 3 α -OH, 5 α -Cholansäuren ist der 3-ständige Wasserstoff auch äquatorial gelagert. Solche Verbindungen wurden noch nicht als LADH-Substrate untersucht. Es bleibt also noch ungewiss, ob die β -Stellung zwischen A- und B-Ring und die Äquatoriallage des 3-ständigen Wasserstoffs für die Reaktionsfähigkeit beide notwendig sind, oder ob die Äquatoriallage allein ausreicht.

Tabelle I. Substratspezifität der LADH; Aktivität mit Hydroxycholansäuren^a

Verbindung	Geschwindigkeit ^b	K _m (M)
3 β -Hydroxy-5 β -cholansäure	100	2,1 · 10 ⁻⁶
3 α -Hydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3 β , 7 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure	110	–
3 β , 12 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure	180	–
3 β -Hydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	82	–
3 α , 7 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3 α , 7 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure, gebunden an Glycin	0	–
3 α , 7 β -Dihydroxy-5 β -cholansäure ^c	0	–
3 α , 12 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3 α -Hydroxy-7-keto-5 β -cholansäure	0	–
3 α -Hydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	0	–
3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxy-5 β -cholansäure, gebunden an Glycin	0	–
3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxy-5 β -cholansäure, gebunden an Taurin	0	–
3 α , 7 β , 12 α -Trihydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3 α , 7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	0	–
11 α -Hydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	0	–
3-Keto-7 α -hydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3-Keto-12 α -hydroxy-5 β -cholansäure	0	–
3-Keto-7 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholansäure	0	–

^a Diese Substanzen wurden in 0,01 M NaOH gelöst und mit 25 bzw. 100 μ M (\pm 10%) Lösungen getestet. Die Küvette enthielt 4,0 ml Lösung. Die NAD⁺-Konzentration betrug 50 bzw. 100 μ M. Die Enzymkonzentration war 0,72 μ N. Die Temperatur war 23,5°C, und die Reaktion wurde in 0,1 μ Glycin-NaOH-Puffer, pH 9,5, ausgeführt.

^b Eine Geschwindigkeit von 0,61 μ M NAD⁺ pro min wurde mit 3 β -Hydroxy-5 β -cholansäure erhalten. Die Anfangsgeschwindigkeitsmessungen wurden während 90 sec gemacht. ^c Eine gewisse Aktivität wurde bei einer Konzentration von 320 μ M beobachtet, aber es blieb ungewiss, ob dies von einer Verunreinigung in der Verbindung herrührte. Dies schien jedoch der Fall zu sein, da keine Zunahme der NADH-Bildung nach 15 min zu beobachten war³¹.

²⁷ H. THEORELL und M. REYNIER, noch unveröffentlicht.

²⁸ A. WRETLIND, noch unveröffentlicht.

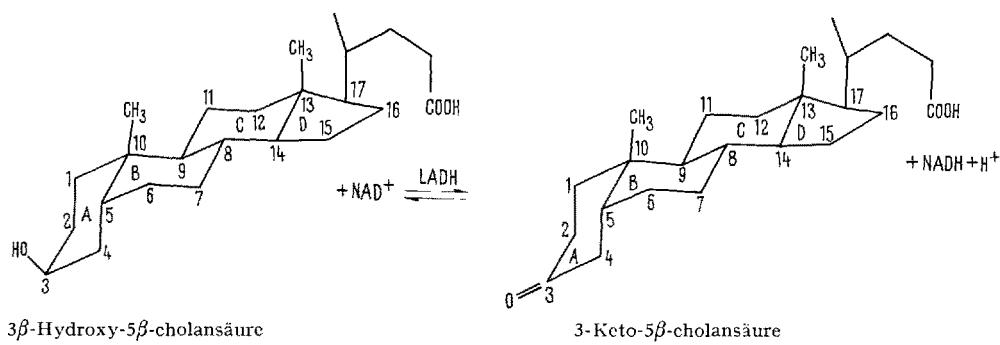
²⁹ L. GOLDBERG, noch unveröffentlicht.

³⁰ G. WALLER, Nature, im Druck.

³¹ G. WALLER, H. THEORELL und J. SJÖVALL, Arch. Biochem. Biophys., im Druck.

³² V. PRELOG, Pure appl. Chem. 9, 119 (1964).

³³ J. RÉTEY, Dissert. ETH, Zürich (1963).

Fig. 5³¹.

Untersucht wurden aber bereits einige Sterole mit primären Alkoholen in der Seitenkette (Tabelle III).

26-OH Cholesterol reagiert nicht, was möglicherweise auf mangelnde Löslichkeit zurückzuführen ist. 3 α , 7 α , 26-Trihydroxykoprostan reagierte, indem die 26-OH-Gruppe oxydiert wurde, ebenso verhielt sich 3 α , 7 α , 12 α , 26-Tetrahydroxykoprostan. Benachbarte Hydroxylgruppen in 24- und 25-Stellung verhinderten die Wirkung.

Man kann aus den erwähnten Versuchen ersehen, dass die Gallensäuren und die Sterole, sofern sie als LADH-Substrate dienen können, in ganz verschiedenen Lagen an die Haftstelle eingefügt werden.

Tabelle II. Substratspezifität der LADH; Aktivität mit Hydroxycholansäure*

Verbindung	Geschwindigkeit ^b	K_m (M)
3-Keto-5β-cholansäure	100	$5,05 \cdot 10^{-6}$
3, 7-Diketo-5β-cholansäure	46	11,9
3, 12-Diketo-5β-cholansäure	145	50,1
3, 7, 12-Triketo-5β-cholansäure	18	–
3, 7, 12-Triketo-5β-cholansäure, gebunden an Taurin	18	–
3-Keto-7 α -hydroxy-5β-cholansäure	71	–
3-Keto-12 α -hydroxy-5β-cholansäure	100	–
3-Keto-7 α , 12 α -dihydroxy-5β-cholansäure ^c	0	–
3 α -Hydroxy-7-keto-5β-cholansäure	0	–
3 α , 12 α -Dihydroxy-7-keto-5β-cholansäure	0	–
3 α -Hydroxy-7, 12-diketo-5β-cholansäure	0	–
11, 12-Diketo-5β-cholansäure	0	–
11 α -Hydroxy-12-keto-5β-cholansäure	0	–
4-Cholesten-3-one ^e	0	–

* Diese Substanzen wurden in 0,01 M NaOH gelöst und mit 25 bzw. 100 μ M ($\pm 10\%$) Lösungen getestet. Die Küvetten enthielten 4,0 ml Lösung. Die NADH-Konzentration betrug 5 bzw. 10 μ M. Die Enzymkonzentration war 0,72 μ N. Die Temperatur war 23,5°C und die Reaktion wurde in 0,1 μ Phosphatpuffer, pH 7,0, ausgeführt.
b Eine Geschwindigkeit von 1,35 μ N NADH pro min wurde mit 3-Ketocholansäure erhalten. Die Anfangsgeschwindigkeitsmessungen wurden während 90 sec gemacht. c Die anfängliche Geschwindigkeitsverminderung beträgt 25% vom 3-Keto-Wert, aber nach 5 min glich sich dies aus; folglich ist diese Erscheinung auf eine Verunreinigung in der 3-Keto, 7 α , 12 α -dihydroxycholansäure zurückzuführen. Die Lösung war opaleszent, da es unmöglich war, die Verbindung vollständig aufzulösen³¹.

Für die Gallensäuren und Sterole ergab die Analyse der kinetischen Data, dass der «Theorell-Chance»-Mechanismus nicht gültig ist. Die Abweichungen sind sehr offenbar. Alle Voraussetzungen für den «Theorell-Chance»-Mechanismus sind also nicht vorhanden. Wir stellen uns vor, dass entweder die intramolekulare Wasserstoffübertragung im, oder die Dissoziation des Substratproduktes vom Ternärkomplex langsam genug sind, um teilweise geschwindigkeitsbestimmend zu sein.

Die Tatsache, dass ein Ferment auf ein Substrat im Reagenzglas wirkt, beweist ja gar nicht, dass diese Reaktion von physiologischer Bedeutung ist. Katalase und Wasserstoffsperoxyd z. B. oxydieren im Reagenzglas Alkohole. Physiologisch scheint aber diese Reak-

Tabelle III. Substratspezifität der LADH; Aktivität mit Sterolen, die eine primäre Alkoholgruppe enthalten

Gelöst in Glycodeoxycholsäure mM	Verbindung ^a	Geschwindigkeit ^b	K_m (M)
13,3	26-Hydroxy-cholesterol	0	–
13,3	3 α , 7 α , 26-Trihydroxykoprostan	12,3	$18,7 \cdot 10^{-6}$
7,1	3 α , 7 α , 12 α , 24-Tetrahydroxy-koprostan	0	–
7,1	3 α , 7 α , 12 α , 24-Tetrahydroxy-koprostan	13,7	$10,8 \cdot 10^{-6}$
5	3 α , 7 α , 12 α , 25, 26-Penta-hydroxy-koprostan	0	–
5	3 α , 7 α , 12 α , 24, 26-Penta-hydroxy-koprostan	0,73	–

a Alle Verbindungen, mit Ausnahme von Pentahydroxy-koprostan, wurden während des Lösungsprozesses auf pH 9,8 eingestellt. Sie wurden in Glycodeoxycholsäure in den angegebenen Konzentrationen gelöst. Die Konzentrationen der Sterole betrugen 75–200 μ M. 26-Hydroxy-cholesterol löste sich nicht vollständig, jedoch wurde eine stabile kolloide Suspension erreicht. Folgende Konzentrationen wurden angewandt: für NAD⁺ 125 bzw. 500 μ M; für Sterol 10 bzw. 25 μ M. Die Küvetten enthielten 4,0 Lösung. Die Enzymkonzentration war 0,9 μ N. Die Temperatur war 23,5°C, und die Reaktion wurde in 0,1 μ Glycin-NaOH-Puffer, pH 9,5 ausgeführt.

b Eine Geschwindigkeit von 0,78 μ N NAD⁺ pro min, erhalten mit 3 β -Hydroxy-cholansäure, wurde als 1,0 Basis-Wert verwandt³¹.

tion keine Rolle zu spielen. SJÖVALLS Versuche, in Leberbrei eine Störung des Steroid- oder Gallensäureumsatzes durch Pyrazolzusatz hervorzurufen, sind bisher erfolglos verlaufen. Die Versuche werden aber fortgesetzt.

Komplexkristalle, Röntgenkristallographie und Optische Rotationsdispersion. Wir haben mit YONETANI seit 1962 einige vergleichende Untersuchungen über das freie Ferment sowie seine binären und ternären Komplexverbindungen ausgeführt. Es stellte sich heraus, dass binäre, und in noch höherem Grade ternäre Komplexbildung das Protein stabilisiert. Mit *p*-Chloro-mercuri-benzolsulfonat reagiert ADH momentan unter Inaktivierung³⁴. Der binäre Komplex mit NADH reagiert schon soviel langsamer, dass man den Reaktionsverlauf fluorimetrisch mit einem gewöhnlichen Schreiber verfolgen kann; der ternäre Komplex mit NADH und Isobutyramid reagierte etwa zehnmal langsamer als der Binärkomplex. Bei pH 4,2 wird ADH in wenigen Minuten zerstört. NADH stabilisiert etwas, wird ausserdem Isobutyramid zugegeben, so hält sich der Ternärkomplex unbegrenzt. Dasselbe wurde bei stark alkalischer Reaktion (pH 11,9) und bei hoher Temperatur (75°C) beobachtet. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass Strukturveränderungen im Protein bei Komplexbildung eintreten. In der Literatur diskutiert man vielfach solche Möglichkeiten, wobei die Nomenklatur – «configurational adaptability» (KARUSH 1950); «rack mechanism» (LUMRY und EYRING); «induced fit» (KOSHLAND); «allosteric effects» (MONOD) – reichlicher erscheint als die experimentellen Belege. Wir haben uns deshalb zusammen mit YONETANI vorgenommen, eine Reihe von binären, ternären und Mosaikkomplexen zu kristallisieren um näher zu untersuchen, ob Komplexbildung zu Umlagerungen führt. Es ist uns auch gelungen, viele Komplexe als makroskopisch sichtbare Kristalle darzustellen (Figur 6–8).

Seit zwei Jahren werden diese von BRÄNDÉN und LINDQVIST in Uppsala röntgenkristallographisch studiert. Von der Technik des Kristallisierens möchte ich nur erwähnen, dass Zusatz von Ammoniumsulfat sich als ungeeignet erwies, da auf diese Weise nur kleine Kristalle erhalten wurden. Bessere Resultate ergab Einengen in Dialyseschläuchen von Lösungen in verdünntem Phosphatpuffer. Überraschenderweise zeigte sich, dass die Ternärkomplexe fünf- bis zehnmal löslicher sind als freie ADH – schon eine Andeutung, dass eine Strukturveränderung bei Komplexbildung eintritt. Um die Löslichkeit herabzumindern, setzten wir manchmal mit guten Erfolg entweder etwas Methanol – das entgegen wiederholten Angaben in der Literatur mit ADH-NAD nicht reagiert – oder den ebenfalls nicht reagierenden tert-Butanol zu. Mit Hilfe solcher Methoden sind nunmehr von allen Gesichtspunkten aus – Grösse, Regelmässigkeit und Haltbarkeit – befriedigende Kristalle erhalten worden, die allenfalls

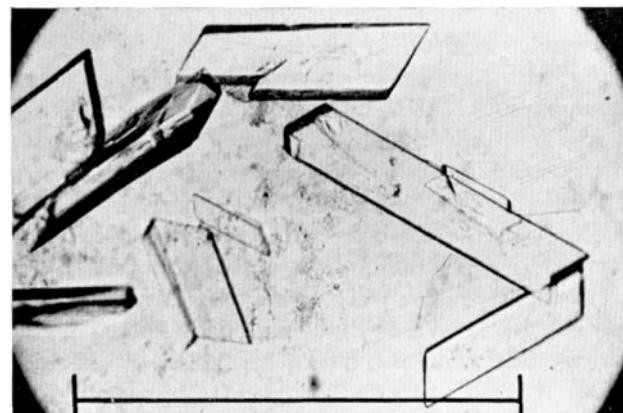


Fig. 6. LADH-NADH Binärkomplex (Skala 1,0 mm). T. YONETANI und H. THEORELL, Arch. Biochem. Biophys. 100, 554 (1963).

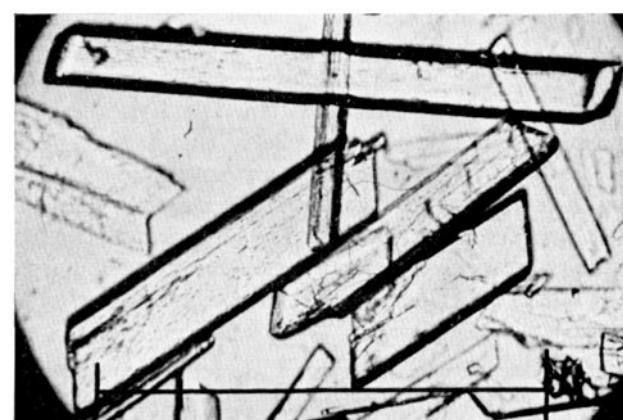


Fig. 7. LADH-NADH-Isobutyramid Ternärkomplex (Skala 1,0 mm). T. YONETANI und H. THEORELL, Arch. Biochem. Biophys. 100, 554 (1963).



Fig. 8. LADH-NAD⁺-Pyrazol Ternärkomplex (Skala 1,0 mm)¹⁹.

³⁴ T. YONETANI und H. THEORELL, Arch. Biochem. Biophys. 99, 433 (1962).

wochenlang haltbar sind und auch für 2 Å Auflösung verwendet werden können.

Es stellte sich heraus, dass freie ADH und der Binärkomplex mit NADH bis zu 6 Å Auflösung identisch waren und *ortho*-rhombische Einheitszellen bilden, die drei zueinander senkrechte Symmetrieeachsen enthalten³⁵. Da eine Einheitszelle acht nichtäquivalente Positionen besitzt, konnte das Gewicht jeder asymmetrischen Einheit zu 68,700 (atomische Massenskala) berechnet werden. Da dieser Wert kleiner als das Molekulargewicht ist, muss jede Einheit ein halbes Molekül enthalten. Man kann also mit Sicherheit sagen, dass das ADH-Molekül aus zwei identischen oder sehr nahe identischen Peptidketten besteht. Das passt sehr schön zu der schon früher bekannten Tatsache, dass LADH zwei aktive Gruppen enthält, die kinetisch identisch reagieren. Die beiden Peptidketten sind aber miteinander so stark verknüpft, dass es nicht gelungen ist, sie reversibel zu trennen.

Die Ternärkomplexe zeigten überraschenderweise von ADH und Binärkomplexen stark abweichende kristallographische Eigenschaften. Die Kristalle sind monoklin, und die Einheitszelle ist nur halb so gross wie die von ADH und Binärkomplexen. Figur 9 zeigt, wie sich BRÄNDÉN³⁵ das Verhältnis zwischen den beiden Kristallformen vorstellt. Die hohe Symmetrie der *ortho*-rhombischen Kristalle ist durch eine Formveränderung bei der Ternärkomplexbildung verloren gegangen.

Die Zelldimensionen sind aus der Tabelle IV ersichtlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Eintreten eines sehr kleinen Liganden in ein Protein eine erhebliche Konformationsänderung hervorrufen kann.

Von besonderem Interesse sind die halogenierten Pyrazole, 3-Br, 3,4-Br und 3,4,5-Br, 3-I-, 3,4-I- und 3,4,5-I-Pyrazol, die Doz. B. SJÖBERG (AB Astra,

Schweden) für uns synthetisierte und freundlicherweise zur Verfügung stellte. Sie bilden Ternärkomplexe, von welchen 3-I und 3-Br am stabilsten sind. Der 3-I-Komplex wurde schon kristallisiert. Wir hoffen, auch die anderen bald in Kristallen fassen zu können, obwohl z.B. 3,4,5-I-Pyrazol wegen geringer Wasserlöslichkeit gewisse Schwierigkeiten bereiten wird. Schon zwei Iodatome ($2 \cdot 127 = 254$) wirken röntgenkristallographisch stärker als ein Atom Quecksilber, und da wir wissen, dass die Pyrazole an der aktiven Haftstelle des Alkohols eintreten, wird man sie im Fermentmolekül lokalisieren können.

Optische Rotationsdispersion. Es erschien durchaus möglich, dass die röntgenkristallographisch gefundene Konformationsänderung bei der Ternärkomplexbildung von einer Veränderung der α -Spiralisierung herührt. Auf Grund von Messungen der optischen Rotationsdispersion in synthetischen Polypeptiden kann man sich auch in natürlichen Proteinen einen Begriff von dem Ausmass der Spiralisierung machen. Dabei verwendet man die Moffitt-Yangsche Gleichung

$$m' = \frac{3}{n_\lambda^2 + 2} \times \frac{MRW}{100} \times [\alpha]_\lambda = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2},$$

wo n_λ den Refraktionsindex bei der Wellenlänge λ , MRW das Durchschnittsgewicht der Aminosäurereste, $[\alpha]_\lambda$ die spezifische Drehung bei λ nm und λ_0 eine konstante Wellenlänge bedeutet, die so gewählt wird, dass eine gerade Linie resultiert, wenn man $m(\lambda^2 - \lambda_0^2)/\lambda_0^2$ gegen $\lambda_0^2/(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ in einem Koordinatensystem aufträgt. Die Neigung der Linie wird dann

Tabelle IV. Daten über Kristalle aus Pferdeleber-ADH und einige Komplexe

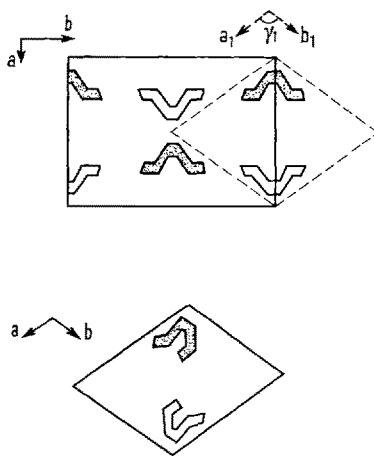


Fig. 9. Oben: *Ortho*-rhombische Einheitszelle (LADH oder Binärkomplex). Unten: Monokline Einheitszelle (Ternärkomplex). Weisse und beschattete Figuren sind entlang der C-Achse um eine halbe Einheitszelle verschoben³⁵.

$E = ER_2$	$E(RI)_2 = E(OP)_2 = E(OPJ)_2$
<i>Ortho</i> -rhombische Symmetrie	Monokline Symmetrie
Raumgruppe C222 ₁	Raumgruppe P2 ₁
a = 56 Å	a = 51 Å
b = 75 Å	b = 44 Å
c = 181 Å	c = 182 Å
V = 760 000 Å ³	V = 388 000 Å ³
Z = 8	Z = 2
d = 1,2 g/cm ³	d = 1,2 g/cm ³
	$\gamma = 108^\circ$
E = Pferdeleber-ADH	
O = NAD ⁺ = Nikotinamid-adenin-dinucleotid	
R = NADH	
I = Isobutyramid	
P = Pyrazol	
PJ = 3-Iodopyrazol	

(Ref. ³⁵)

³⁵ C.-I. BRÄNDÉN, Arch. Biochem. Biophys., im Druck.

$= b_0$. b_0 gibt ein Mass der Spiralisierung: zu 100% nach rechts spiralierte Polypeptide geben $b_0 \approx -630^\circ$.

ROSENBERG³⁶ in Uppsala liess sich freundlicherweise von uns anregen eine Reihe von O.R.D.-Messungen an freier LADH, binären und ternären Komplexen zu unternehmen. Mit $\lambda_0 = 212$ nm, ein Wert der auch von anderen Autoren an anderem Material gefunden worden ist, ergab sich $a_0 = -30^\circ \pm 10$, $b_0 = -100^\circ \pm 10$ für LADH, und innerhalb der Fehlergrenzen dasselbe für LADH-NADH ($a_0 = -49^\circ \pm 15$, $b_0 = -119^\circ \pm 10$). Für die Ternärkomplexe ergaben sich andere Werte: LADH-NADH-Isobutyramid $b_0 = -185^\circ \pm 10$, $a_0 = -65^\circ \pm 10$; LADH-NAD⁺-Pyrazol $b_0 = -185^\circ \pm 10$; $a_0 = -60^\circ \pm 10$ (Figur 10).

Das ADH-Molekül enthält etwa 780 Aminosäurereste. Berechnet man die Anzahl der spiralierten Aminosäurereste aus den b_0 -Werten (was allerdings nicht einwandfrei sicher ist) so findet man, dass LADH und Binärkomplexe 125, Ternärkomplexe 234 α -spirali-

sierte Reste pro Mol enthalten. Die Ternärkomplexbildung durch kleine Liganden hat also eine erstaunliche Fernwirkung auf die Sekundärstruktur des Proteins.

Abschliessend möchte ich sagen, dass die Wege für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des gesamten LADH-Systems jetzt als offen erscheinen. Die Tatsache, dass zwei gleiche Peptidketten vorhanden sind, erleichtert die Aminosäuresequenzbestimmung, woran wir jetzt arbeiten. Andererseits wird die Arbeit dadurch verdoppelt, dass die Struktur von LADH und ihren Ternärkomplexen so verschieden zu sein scheint, dass die röntgenkristallographische Arbeit für beide durchgeführt werden muss.

Summary. Liver alcohol dehydrogenase (LADH) is one of the most intensely studied of all enzymes because it is easily available in crystalline form and has many properties which are favourable for experimentation. Its mode of action has been elucidated to some extent mainly by kinetic experiments with and without inhibitors.

Its substrate specificity is very low, since the enzyme attacks a great variety of primary and secondary alcohols, or reversibly aldehydes and ketones. Its main physiological function is still unknown, but may be found by the aid of pyrazole which acts as a specific inhibitor *in vivo*.

Complexes of the enzyme with coenzyme, or coenzyme + inhibitors have been crystallized and are presently being studied by X-ray crystallography in the hope of determining the three-dimensional structure of the molecule. The formation of the ternary complexes leads to a profound change of conformation (monoclinic instead of *ortho*-rhombic crystals). Simultaneously the optical rotatory dispersion is drastically changed.

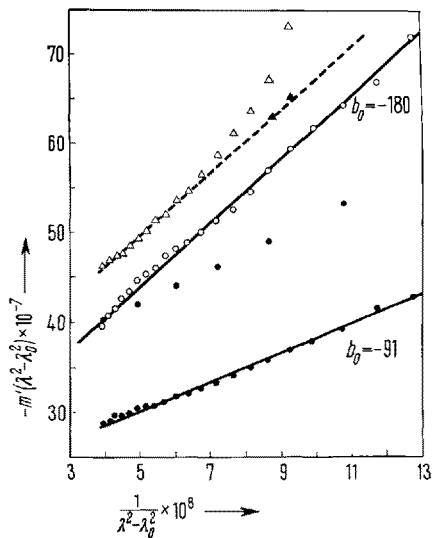


Fig. 10. --- LADH; o—o ADH-NAD⁺-Py; Δ ADH-NADH-IB (▲ korrig. für Cotton Effekt 340 nm). ··· ADH-NAD⁺-Py korrigiert unter einer Voraussetzung, die zu verwerfen ist^{36b}.

³⁶ A. ROSENBERG, H. THEORELL und T. YONETANI, (a) Nature 203, 755 (1964); (b) Arch. Biochem. Biophys., im Druck.