

Eigenschaften der [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate als Strukturanaloge des Coenzym NAD

The Properties of [ω -(3-Acetylpyridinio)-*n*-alkyl]Adenosine Pyrophosphates,
Structural Analogs of the Coenzyme NAD

Reinhard Jeck

Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Enzymologie, im Klinikum
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **32 c**, 550–556 [1977]; eingegangen am 14. März 1977)

NAD Analogs, Substitution of Ribose, Dehydrogenases, Complex Formation

[ω -(3-Acetylpyridinio)-*n*-alkyl]adenosine pyrophosphates are coenzyme analogs of NAD⁺. The adenosine pyrophosphate moiety and the 3-acetylpyridine ring of the analogs are connected by *n*-alkyl chains of different lengths (ethyl–hexyl). The analogs form strong dissociating complexes with lactate dehydrogenase. The complex formation is predominantly achieved by interaction of the ADP moiety with its respective binding domain at the active site.

The redox potentials of the analogs and NAD are of similar magnitude. The coenzyme function of the analogs depends upon the length of the hydrocarbon chain. Lactate dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from yeast and horse liver do not catalize hydrogen transfer from their substrates to any other alkyl analog but [4-(3-acetylpyridinio)-*n*-butyl]adenosine pyrophosphate, aldehyde dehydrogenase from horse liver catalyzes hydrogen transfer from acetaldehyde to the pentyl derivative and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase catalyzes hydrogen transfer to both analogs. In no case, hydrogen transfer from or to one of the 3-acetylpyridine-*n*-alkyl analogs proceeded with a velocity comparable to NAD or its 3-acetylpyridine analog. The results show that the nicotinamide bound ribose in NAD is involved in the binding and the activation of the coenzyme.

Einleitung

Zur Affinitätsmarkierung NAD-abhängiger Dehydrogenasen wurde in jüngerer Zeit ein Coenzym-analoges verwandt, in dem der Nicotinamid-ribose-teil durch den 3-Bromacetylpyridinium-*n*-propylrest ersetzt ist¹. Diese Verbindung ist als Wasserstoffakzeptor nicht wirksam, reagiert aber sehr spezifisch mit Aminosäureseitenresten des aktiven Zentrums verschiedener Dehydrogenasen unter Ausbildung kovalenter Enzym-Coenzymmodellverbindungen². Neuere Affinitätsmarkierungsstudien zeigten, daß die homologe 3-Bromacetylpyridinium-*n*-butyl-

verbindung ebenfalls ein wirksamer Inaktivator ist, aber darüber hinaus im enzymatischen Test auch als Wasserstoffakzeptor reagiert³. Dieses Ergebnis lenkte unsere Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit, durch weitere Variation der Alkylkettenlänge in einer Reihe homologer [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate den Abstand zwischen ADP-Bindungsstelle und der Bindungsregion des funktionellen Pyridiniumringes bei verschiedenen Dehydrogenasen zu untersuchen.

Diese Reihe homologer [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate sollte darüber hinaus Hinweise auf die Bedeutung der Nicotinamid-gebundenen Ribose bezüglich der Bindung und Aktivierung des NAD im binären Enzymkomplex geben.

Material und Methoden

Alkohol-Dehydrogenasen aus Hefe und Pferdeleber, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherzen, NAD⁺, NADH und AP-NAD⁺ waren Produkte der Firma Boehringer, Mannheim.

Die Darstellung der [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate mit Propyl-¹ bzw.

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Jeck, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Enzymologie, Theodor Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt am Main 70.

Abkürzungen: AP-NAD⁺, 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid; AP-NADH, 1,4-Dihydro-3-acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid; Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe bzw. Pferdeleber = Alkohol : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.1); Lactat-Dehydrogenase = Lactat : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.27); Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase = Glycerinaldehyd-3-phosphat : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.2.1.12); Aldehyd-Dehydrogenase = Aldehyd : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.2.1.3); Pyrophosphatase aus Naja Nivea = Dinucleotid-nucleotid-Hydrolase (EC 3.6.1.9).



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Butylrest³ als Kohlenwasserstoffkette wurde früher beschrieben. Die Synthese der Verbindungen mit Aethyl-, Pentyl- und Hexylrest erfolgte in Analogie zu diesen Vorschriften:

[2-(3-Acetylpyridinium)-aethyl]-adenosin-pyrophosphat, Schmelzpunkt (unter Zersetzung) ab 145 °C;

$C_{19}H_{24}N_6O_{11}P_2 \times 0,66 \text{ mol } (CH_3)_2CO$ (613,1)				
	C	H	N	P
Ber.	41,14	4,60	13,71	10,10,
Gef.	41,16	4,68	13,62	10,05.

[5-(3-Acetylpyridinium)-*n*-pentyl]-adenosin-pyrophosphat, Schmelzpunkt (unter Zersetzung) ab 80 °C;

$C_{22}H_{30}N_6O_{11}P_2 \times (CH_3)_2CO \times 2 H_2O$ (710,6)				
	C	H	N	P
Ber.	42,25	5,67	11,83	8,72,
Gef.	41,85	5,66	11,56	9,07.

[6-(3-Acetylpyridinium)-*n*-hexyl]-adenosin-pyrophosphat, Schmelzpunkt (unter Zersetzung) ab 100 °C;

$C_{23}H_{32}N_6O_{11}P_2 \times 0,66 (CH_3)_2CO$ (669,2)				
	C	H	N	P
Ber.	44,87	5,42	12,56	9,26,
Gef.	44,88	4,96	12,32	9,52.

Die Darstellung des AP-NADH erfolgte durch enzymatische Reduktion wie früher beschrieben⁴, die Reduktion der [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate mit Natriumdithionit⁵.

UV-Spektren und Differenzspektren wurden im Cary 14 Spectrophotometer gemessen⁶; die Aufnahme der Fluoreszenzspektren und die Durchführung der Fluoreszenztitrationen erfolgte im Beckman Gitterfluorometer 1076 unter Messung der in senkrechter Inzidenz zur Küvette emittierten Fluoreszenzstrahlung. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten binärer Komplexe der Lactat-Dehydrogenase mit den Dihydrocoenzymanalogen erfolgte durch Fluoreszenztitration. Gemessen wurde der Anstieg der Coenzymfluoreszenz im Emissionsmaximum des Komplexes (445–490 nm) (Anregungswellenlänge 380 nm).

Die Enzymkonzentrationen waren 20, 50 und 100 μM , die Coenzymkonzentrationen wurden zwischen 1,3 und 300 μM variiert. AP-NADH: Die Enzymkonzentrationen waren 1 und 10 μM , die Coenzymkonzentration variierte von 48–4100 nM bzw. 0,48–20 μM ; die Messung der Fluoreszenzemission erfolgte bei 440 nm bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm. Zur Ermittlung der Fluoreszenzsteigerung werden in parallelen Titrationen Enzym- und Pufferlösungen mit dem Dihydrocoenzym titriert. Die Auswertung der Fluoreszenztitrationen erfolgte in Analogie zur Differenzmethode von Yakovlev und Mitarbeitern⁷: Die im folgenden benutzten Symbole sind, [E] = Konzentration des freien Enzyms, [E_t] = Gesamtenzymkonzentration, [S] = Konzentration des nichtgebundenen Dihydrocoenzym, [ES] = Konzentration des Enzym-Dihydrocoenzymkomplexes, K_D = Dissoziationskonstante des Komplexes, ΔF = die mit der Komplexbildung verbundene Fluoreszenzsteigerung, ΔF_{\max} = die maximale Fluoreszenzsteigerung für [ES] = [E_t].

Ist die Beziehung zwischen Fluoreszenzsteigerung und der Sättigung der Coenzymbindungsstellen des Enzyms linear, so gilt:

$$[ES] = [E_t] \cdot \Delta F \cdot (\Delta F_{\max})^{-1}. \quad (1)$$

Diese Gleichung liefert zusammen mit der Massenwirkungsgesetzgleichung der Komplexdissoziation eine Formel, welche als unbekannte Größen nur ΔF_{\max} und K_D enthält:

$$K_D = \frac{(\Delta F_{\max} - \Delta F) \cdot ([S_t] \cdot \Delta F_{\max} - \Delta F \cdot [E_t])}{\Delta F \cdot \Delta F_{\max}} \quad (2)$$

Diese Gleichung stimmt inhaltlich mit der Scatchard-Gleichung (8) überein und gestattet die Ermittlung der K_D im Falle schwach dissoziierter Komplexe, bei denen ΔF_{\max} experimentell bestimmbar ist. Die Dissoziationskonstante des Lactat-Dehydrogenase-Komplexes mit AP-NADH wurde auf diesem Wege erhalten.

Im Fall stärker dissoziierter Komplexe ermöglicht es Gleichung (2) ΔF_{\max} zu bestimmen. Die Eliminierung der unbekannten Größe K_D erfolgt in üblicher Weise durch Betrachtung von Wertepaaren [S_t], ΔF und [S_t]' = $k \cdot [S_t]$, $\Delta F'$ (dabei ist k eine willkürlich gewählte Konstante: $0 < k < \infty$) und nach verschiedenen mathematischen Umformungen erhält man die Gleichung (3):

$$\frac{k \cdot (\Delta F - \Delta F')}{[S_t] \cdot (k - 1)} = \frac{\Delta F_{\max}}{[E_t]} - \frac{\Delta F_{\max}^2}{[E_t]} \times \frac{k \cdot \Delta F' - \Delta F}{\Delta F \cdot \Delta F' \cdot (k - 1)}. \quad (3)$$

Die graphische Darstellung von

$$(y) = \frac{k \cdot (\Delta F - \Delta F')}{[S_t] \cdot (k - 1)} \quad \text{gegen} \quad \frac{k \cdot \Delta F' - \Delta F}{\Delta F \cdot \Delta F' \cdot (k - 1)} (=x)$$

liefert eine Gerade deren Abschnitt auf der x -Achse dem Reziprokwert von ΔF_{\max} entspricht. Die Er-

mittlung der K_D kann anschließend entweder rechnerisch unter Verwendung von Gleichung (2) oder graphisch nach Scatchard erfolgen.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten binärer Lactat-Dehydrogenase-Komplexe mit AP-NAD⁺ bzw. den oxidierten Acetylpyridin-alkyl-analogen des NAD erfolgte analog zu Theorell und Winer⁹ durch kompetitive Verdrängung eines Dihydrocoenzymanalogen aus seinem stark fluoreszierenden binären Lactat-Dehydrogenase-Komplex. Da NADH und AP-NADH im Vergleich zu den oxidierten Coenzymanalogen zu fest an das Enzym gebunden werden, um eine genauere Messung der Verdrängung zu ermöglichen, wurde der wesentlich stärker dissoziierte Komplex des Enzyms mit dem Coenzymanalogen [4-(3-Acetyl-1,4-dihydro-1-pyridyl)- n -butyl]-adenosin-pyrophosphat verwendet.

Die Konzentrationen waren: Dihydrocoenzymmodell: 25,81 μM ($= [S_t]$), Lactat-Dehydrogenase: 14,74 μM ($= [E_t]$); die spezifische Aktivität des Enzyms betrug 430–490 U/mg, die Zahl der Coenzymbindungsstellen, nach Scatchard mit AP-NADH ermittelt, 3,5–3,9 pro Mol tetrameres Enzym. Die Konzentrationen der oxidierten Coenzymanalogen ($[O_t]$) wurden zwischen 90 und 1900 μM variiert, im Falle des Acetylpyridin-äthyl- und -propylanalogen bis 3200 μM . Zur Kontrolle und Korrektur von inneren Filtereffekten, Reflexions- und Streulichtverlusten wurden unter Verwendung gleicher Konzentrationen freie Lactat-Dehydrogenase bzw. Dihydrocoenzym mit den oxidierten Coenzymmodellen titriert. Gleichzeitig wird dabei die jeweilige Partialfluoreszenz des Dihydrocoenzym-Enzym-Komplexes ΔF erhalten. Die relative Fluoreszenzintensität des reduzierten Butylanalogen war 2,46 Einheiten/ μM , im binären Lactat-Dehydrogenase-Komplex betrug sie 34,23. Die Konzentration dieses Komplexes ist demnach unter den Meßbedingungen $[ES] = \Delta F/31,77$ und die Berechnung der Dissoziationskonstanten der oxidierten Analogen ($K_{D(\text{ox})}$) erfolgt für die einzelnen Konzentrationen von $[O_t]$ nach der Formel:

$$K_{D(\text{ox})} = \frac{K_{D(\text{red})} \cdot [ES]}{[S_t] - [ES]} \cdot \left(\frac{[O_t]}{[E_t] - [ES] - \frac{K_{D(\text{red})} \cdot [ES]}{[S_t] - [ES]}} \right) - 1.$$

$K_{D(\text{red})}$ ist die Dissoziationskonstante des Dihydrocoenzym-Enzym-Komplexes ES. Die im Ergebnis angegebene Werte für $K_{D(\text{ox})}$ sind die Mittelwerte von durchschnittlich 9 Bestimmungen.

Die Untersuchung der Coenzymfunktion der Analogen erfolgte wie früher beschrieben^{3,4}. Die

zur Berechnung der maximalen Umsatzzahlen verwandten molaren Extinktionskoeffizienten der 3-Acetylpyridin-alkyl-analogen des NADH sind bei 366 nm gemessen: Propylverbindung = 8800, Butylverbindung = 8400 und Pentylderivat = 8400. Die Michaelis-Konstanten und maximalen Umsatzzahlen wurden durch doppelt reziproke¹⁰ oder direkt lineare¹¹ Darstellung bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die [ω -(3-Acetylpyridinium)- n -alkyl]-adenosin-pyrophosphate enthalten anstelle von Nicotinamid als funktionellen Heterocyclus einen 3-Acetylpyridinring. Dieser ist mit dem Adenosindiphosphatteil über Kohlenwasserstoffbrücken verknüpft. Die Zahl der Methylengruppen in den Alkylresten beträgt 2–6 (Abb. 1). Der Abstand zwischen dem funk-

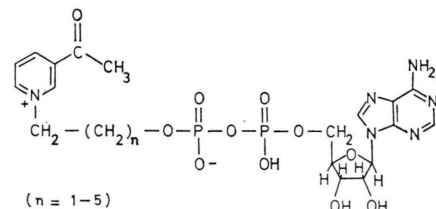


Abb. 1.

tionellen Ringsystem und dem ADP-Teil ist außer von der Kettenlänge von der jeweiligen Faltungskonformation der Moleküle abhängig. Der maximale Abstand zwischen Pyridiniumringstickstoff und dem der Alkylkette benachbarten Adenosindiphosphat-Sauerstoff läßt sich näherungsweise berechnen. Er beträgt bei der Äthylverbindung 3,5 Å und steigt bei zunehmender Kettenlänge über 4,9–6,1–7,4 auf 8,6 Å bei dem n -Hexyl-analogen.

Die optischen Eigenschaften der Coenzymanalogen sind denen des NAD und AP-NAD ähnlich (Tab. I). In den UV-Spektren der reduzierten 3-Acetylpyridin-alkyl-analogen liegt die Extinktion des Dihydropyridinsystems in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Wallenfels langwelliger als im NADH und AP-NADH^{13,14}.

Intramolekulare Wechselwirkung

Die Acetylpyridin-alkyl-analogen besitzen in der oxidierten wie auch der reduzierten Form einen Hypochromieeffekt, der von der Länge der Kohlenwasserstoffkette abhängig ist (Tab. II). Durch Ver-

Tab. I. Spektralphotometrische Konstanten der [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate im Vergleich mit NAD und AP-NAD.

<i>n</i> -alkyl-Kette	oxidierte Form			Dihydroform				
	pH	λ_{\max}	$\varepsilon \times 10^{-3}$	pH	λ_{\max}	$\varepsilon \times 10^{-3}$	λ_{\max}	$\varepsilon \times 10^{-3}$
aethyl	9,5	260	17,5	9,5	260	14,0	380	9,9
propyl	9,5	259	18,1	9,5	258	14,5	382	10,3
butyl	9,5	259	17,2	9,5	258	14,6	382	10,6
pentyl	9,5	259	18,4	9,5	259	14,5	382	10,3
hexyl	9,5	260	17,9	9,5	259	14,6	382	10,8
NAD ^a	7,5	259	17,8	9,5	259	14,4	338	6,22
AP-NAD ^a	7,5	260	16,4	9,5	260	13,6	363	9,1

^a vgl. l. c. 12; λ_{\max} [nm]; ε [cm⁻¹ × M⁻¹].

gleich mit NAD und dessen 3-Acetylpyridin-analogen lassen sich aus der Größe des Hypochromieeffektes in den Coenzymanalogen Rückschlüsse auf die Lage des Gleichgewichtes zwischen offenen und gefalteten Konformationen ziehen¹⁶. In den oxidierten Formen der Acetylpyridin-alkyl-analogen zeigen die Verbindungen mit „ungeradzahlig“ Propyl- bzw. Pentylkette einen sehr kleinen Hypochromieeffekt. Das Faltungsgleichgewicht dieser Verbindungen liegt demnach fast vollständig auf der Seite der aufgefalteten Form. In den Verbindungen mit geradzahlig Kohlenwasserstoffkette ist der Hypochromieeffekt etwa halb so groß wie im AP-NAD[®].

Auch in den reduzierten Acetylpyridin-alkyl-analogen, ausgenommen die Aethylverbindung, sind die gefalteten Konformen etwa um die Hälfte weniger begünstigt als im AP-NADH. Der Hypochromieeffekt nimmt mit wachsender Länge der Alkylreste ab.

Die Existenz gefalteter Konformen bei den reduzierten Analogen ermöglicht eine Energieübertragung vom Adenin- auf den Dihydropyridinring

Tab. II. Hypochromie der 3-Acetylpyridin-*n*-alkyl-analogen des NAD, angegeben als Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ (%), bei hydrolytischer Spaltung der Pyrophosphatbindung durch Pyrophosphatase aus Naja Nivea ^a, gemessen bei pH 8,2.

<i>n</i> -alkyl-Kette	oxidierte Form		reduzierte Form			
	λ (nm)	$\Delta\varepsilon$ (%)	λ (nm)	$\Delta\varepsilon$ (%)	λ (nm)	$\Delta\varepsilon$ (%)
aethyl	262	6,5	260	9	380	10
proyl	260	2	260	6	380	7
butyl	259	6	258	5	380	6
pentyl	260	1	260	5	380	6
hexyl	260	3	260	5	380	4
NAD ^b	262	10,9	258	6,1	338	6,6
AP-NAD ^b	261	9,5	260	10,5	363	9,5

^a vgl. l. c. 15; ^b vgl. l. c. 12.

ähnlich der in NADH. Die Fluoreszenzanregungsspektren der Verbindungen zeigen 2 Maxima bei 260 und 380 nm. Deren Lage entspricht den Maxima in den UV-Spektren. Das Maximum der Fluoreszenzemission liegt bei 480 nm. Die Fluoreszenzspektren der verschiedenen Alkylanalogen unterscheiden sich geringfügig in der relativen Fluoreszenzintensität.

Intermolekulare Wechselwirkungen bei der Bindung der Analogen an Dehydrogenasen

Bei Anlagerung der oxidierten [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate an Dehydrogenasen treten keine deutlichen UV-spektroskopischen Änderungen auf. Dagegen bildet die reduzierte Verbindung [4-(3-Acetyl-1,4-dihydro-1-pyridyl)-*n*-butyl]-adenosin-pyrophosphat mit Dehydrogenasen binäre Komplexe, deren Differenzspektren gegen die nichtgemischten Komponenten charakteristische Banden aufweisen (Abb. 2). Sie zeigen das bei NADH-Bindung charakteristische Minimum bei 260 nm und ein Maximum bei 285 nm^{6, 17}. Das Minimum bei 400 nm wird durch Bindung des Dihydroacetylpyridinringes bewirkt. Bei Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe tritt nur im kurzwelligen UV die für die AMP-Bindung charakteristische spektrale Änderung auf; der funktionelle Ring wird nicht ausreichend fixiert.

Bei Anlagerung der reduzierten Analogen an Lactat-Dehydrogenase treten je nach Länge der Alkylkette unterschiedliche Änderungen der Coenzymfluoreszenz auf (Tab. III).

Berücksichtigt man die unterschiedliche Komplexdissoziation bei den einzelnen Analogen, so wird deutlich, daß sich nur das Butylanaloge ähnlich wie AP-NADH verhält. Das Dihydroacetylpyridin-butylanaloge zeigt eine Steigerung der Coenzymfluoreszenz um mehr als das 10-fache, bei

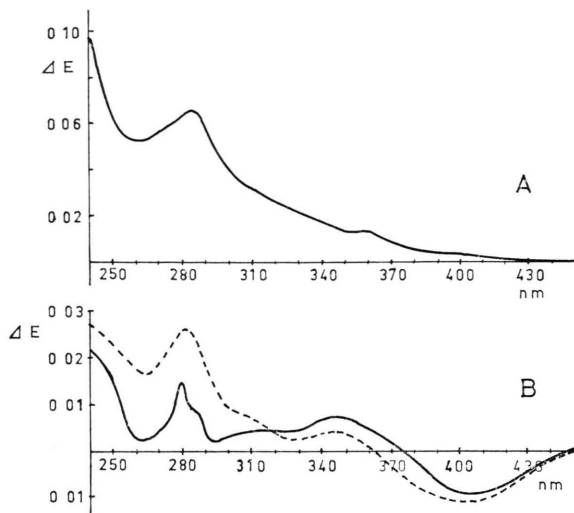


Abb. 2. Spektrale Änderungen bei der Ausbildung binärer Komplexe des [4-(3-Acetyl-1.4-dihydro-1-pyridyl)-*n*-butyl]-adenosin-pyrophosphat mit Dehydrogenasen, gemessen als Differenzspektren in 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2; die Konzentrationen der Komponenten waren 50 μ M; $D=0,87$ cm. A, Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe; B, Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (—) und Lactat-Dehydrogenase (---).

Tab. III. Spektralfluorometrische Konstanten der [ω -(3-Acetyl-1.4-dihydro-1-pyridyl)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate und ihrer Komplexe mit Lactat-Dehydrogenase.

<i>n</i> -alkyl-Kette	Coenzymmodell		Coenzymmodell + Lactat-Dehydrogenase			binärer Komplex ^a	
	λ_{\max}	$I_{\text{rel.}}$	λ_{\max}	$I_{\text{rel.}}$	α	λ_{\max}	$I_{\text{rel.}}$
aethyl	485	90	470	130	19	470	300
propyl	490	75	485	80	9	485	130
butyl	480	60	460	290	34	460	740
pentyl	480	60	485	120	43	485	200
hexyl	485	55	485	110	48	485	170

λ_{\max} = Wellenlänge des Fluoreszenzemissionsmaximums, $I_{\text{rel.}}$ = relative Fluoreszenzintensität, α = Sättigungsgrad der Coenzymbindungsstellen der Lactat-Dehydrogenase (%); die Anregungswellenlänge war 380 nm, die Konzentrationen von Enzym und Dihydrocoenzymmodell waren jeweils 20 μ M in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5.

^a Die Fluoreszenzintensität der binären Komplexe wurde aus der Fluoreszenz der Enzym-Coenzym-Mischungen für $\alpha=100\%$ extrapoliert.

gleichzeitiger Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums nach kürzeren Wellenlängen¹⁸. Die Lage des funktionellen Ringes in den Komplexen der Coenzymmodelle mit kürzeren oder längeren Alkylresten ist offensichtlich gegenüber der im AP-NADH-Komplex verändert.

Die Komplexe der Lactat-Dehydrogenase mit den oxidierten Acetylpyridin-alkyl-analogen des NAD⁺ sind teilweise sehr stark dissoziiert. Die Dissoziationskonstanten des Aethyl- und Propylanalogen entsprechen in ihrer Größenordnung den Inhibitorkonstanten von AMP und ADP^{19, 20}. Die Bindung dieser Analogen erfolgt demnach fast ausschließlich durch Wechselwirkung des nichtfunktionellen ADP-Teils mit dem aktiven Zentrum. Die Dissoziationskonstanten der Lactat-Dehydrogenase-Komplexe mit der Butyl- bzw. Pentylverbindung sind etwa halb so groß wie die Inhibitorkonstante des ADP. Da bei diesen beiden Coenzymmodellen die Länge der Kohlenwasserstoffketten der räumlichen Ausdehnung der Ribose am nächsten kommt, ist eine Beteiligung des 3-Acetylpyridinringes an der Coenzymbindung möglich. Unerwarteterweise wird das 3-Acetylpyridin-hexyl-analoge des NAD⁺ von Lactat-Dehydrogenase ähnlich fest gebunden wie AP-NAD⁺.

Die reduzierten Coenzymanalogen bilden mit Lactat-Dehydrogenase sehr stark dissoziierte Komplexe (Tab. IV). Deren Dissoziationskonstanten

Tab. IV. Dissoziationskonstanten der binären Komplexe der 3-Acetylpyridin-*n*-alkyl-analogen des NAD mit Lactat-Dehydrogenase, gemessen bei pH 9,5.

(Alkylkette) Coenzymmodell	oxidierte Form K_D [μ M]	Dihydroform K_D [μ M]
aethyl	3000	70
propyl	1900	180
butyl	700	25
pentyl	500	15
hexyl	130	11
AP-NAD	100	0,1
AMP ^a	4600	—
ADP ^a	1500	—

^a vgl. l. c. 19.

werden ebenfalls von der Länge der Alkylreste beeinflusst.

Die Unterschiede zwischen oxidierten und reduzierten Coenzymanalogen bei der Komplexbildung zeigen, daß der Dihydropyridinring wesentlich zur Bindung des Coenzyms beiträgt. Vergleicht man die Dissoziationskonstanten der Coenzymmodell-Komplexe mit denen des AP-NAD⁺ bzw. AP-NADH, so fällt auf, daß der Ersatz der Ribose auf der funktionellen Seite des Coenzyms durch Alkylketten im Dihydrocoenzym zu einer erheblich stärkeren Vergrößerung der Dissoziationskonstanten führt, als

bei den oxidierten Analogen. Dies läßt die Interpretation zu, daß der Zucker im AP-NADH-Komplex stärker zur Bindung beiträgt als im Komplex des AP-NAD⁺.

Tab. V. Cyanid-Additionsverbindungen der [ω -(3-Acetylpyridinium)-*n*-alkyl]-adenosin-pyrophosphate im Vergleich mit NAD⁺ und AP-NAD⁺.

<i>n</i> -alkyl-Kette	λ_{\max} [nm]	log K_A	ΔG_0 [kcal/mol]	E_0' [V]
aethyl	358	+2,16	-2,90	-0,322
propyl	360	+2,43	-3,26	-0,314
butyl	361	+2,29	-3,07	-0,318
pentyl	361	+2,36	-3,26	-0,316
hexyl	361	+2,33	-3,30	-0,317
NAD ⁺ -CN ^{-a}	327	+2,396	-3,21	-0,315
AP-NAD ⁺ -CN ^{-a}	342	+4,462	-5,97	-0,255

K_A , Gleichgewichtskonstante der Cyanidadditionsreaktion: Pyridiniumsalz + CN⁻ \rightleftharpoons Cyanidaddukt; ΔG_0 , freie Reaktionsenthalpie; E_0' , Normalpotential der Verbindungen bei 20 °C und pH 7, berechnet nach Wallenfels und Diekmann²¹; ^a vgl. l. c. 21.

Coenzymfunktion

Die Länge der Kohlenwasserstoffketten in den Coenzymanalogen hat nur geringfügigen Einfluß auf das Redoxpotential des funktionellen Ringes. Die aus der Cyanidadditionsreaktion bestimmten Redoxpotentiale entsprechen dem des NAD⁺ (Tab. V). Da die Bindung der oxidierten Coenzymmodelle überwiegend durch den ADP-Teil erfolgt, kann die Wasserstoffakzeptorfunktion Hinweise darauf geben, wie weit im aktiven Zentrum verschiedener Dehydrogenasen die Pyrophosphatbindungsstelle von der Bindungsregion des funktionellen Pyridinringes entfernt ist. Dieser Abstand entspricht bei vielen Dehydrogenasen 4 Methylengruppen (Tab. VI). Etwas abweichend verhalten sich die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, die auch mit dem Pentylderivat reagiert, und Aldehyd-Dehydrogenase²², die nur mit dem Pentylanalogen als Wasserstoffakzeptor im Test wirksam ist.

Tab. VI. Coenzymfunktion der 3-Acetylpyridin-*n*-alkyl-analogen des NAD.

<i>n</i> -alkyl-Kette	oxidierte Form					Dihydroform				
	LDH	ADH _L	ADH _H	GAPDH	AlDH	LDH	ADH _L	ADH _H	GAPDH	
aethyl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
propyl	—	—	—	—	—	+	(+)	(+)	—	—
butyl	+	+	(+)	+	— ^a	+	+	(+)	+	+
pentyl	—	—	—	+	+	+	(+)	(+)	+	+
hexyl	—	—	—	—	— ^a	—	—	—	—	—

LDH, Lactat-Dehydrogenase; ADH_L, Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber; ADH_H, Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe; GAPDH, Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; AlDH, Aldehyd-Dehydrogenase aus Pferdeleber; +: als Wasserstoffakzeptor bzw. -donator wirksam, (+): als Wasserstoffakzeptor bzw. -donator sehr langsam wirksam, —: als Wasserstoffakzeptor bzw. -donator unwirksam. ^a vgl. l. c. 22.

Tab. VII. Michaelis-Konstanten (K_M) und maximale Umsatzzahlen (UZ) einiger 3-Acetylpyridin-alkyl-modelle des NAD⁺ und NADH.

Coenzymmodell (alkyl-Kette)	Lactat-Dehydrogenase			Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber		
	pH	K_M ^a	UZ ^b	pH	K_M ^a	UZ ^b
oxidierte Form						
propyl	9,5	—	0	9,5	—	0
butyl	9,5	2	5	9,5	7	5
pentyl	9,5	—	0	9,5	—	0
NAD ⁺	9,5	0,08	17000	9,5	0,03	300
AP-NAD ⁺	9,5	0,025	140	10,0	0,14 ^c	1100 ^c
Dihydroform						
propyl	7	0,2	15		—	—
butyl	7	0,1	500	7	0,7	50
pentyl	7	0,2	60		—	—
NADH	7	0,01	140000	7	0,008	4000
AP-NADH	7	0,005	25000		—	—

^a Angegeben in mM; ^b angegeben in $\mu\text{M} \times \text{min}^{-1}$; ^c vgl. l. c. 23.

Bei den Dihydrocoenzymanalogen ist die Abhängigkeit der Coenzymfunktion von der Länge der Alkylkette weniger ausgeprägt und spricht für die stärkere Beteiligung des Dihydropyridinsystems an der Coenzymbindung.

Auch mit den als wirksam bezeichneten Coenzymanalogen erfolgt die Wasserstoffübertragung nur in langsamer Reaktion, verglichen mit NAD⁺, AP-NAD⁺ und deren Dihydroderivaten. Die Michaelis-Konstanten sind stark vergrößert, die maximalen Umsatzzahlen dagegen sehr stark verringert (Tab. VII). In vielen Fällen war eine Bestimmung der Konstanten nicht möglich, da Zersetzungsreaktionen des Coenzyms die Redoxreaktion überlagerten.

Die Nicotinamid-gebundene Ribose im NAD scheint nicht nur zur Bindung des Coenzyms notwendig zu sein. Sie richtet wahrscheinlich den funktionellen Pyridinring im Komplex aus und kann durch Wechselwirkung ihrer Hydroxylgruppen mit dem Enzym auch das Redoxpotential des komplex-gebundenen funktionellen Ringes beeinflussen.

Für die Unterstützung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. C. Woenckhaus; die Durchführung der Arbeit erfolgte unter Verwendung von Geräten der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

- ¹ C. Woenckhaus, M. Zoltobrocki u. J. Berghäuser, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **351**, 1441–1448 [1970].
- ² C. Woenckhaus, Topics in Current Chemistry (F. L. Boschke, ed.), Vol. **52**, pp. 209–233, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974.
- ³ R. Jeck, P. Zumpe u. C. Woenckhaus, Liebigs Ann. Chem. **1973**, 961–968.
- ⁴ R. Jeck u. G. Wilhelm, Liebigs Ann. Chem. **1973**, 531–543.
- ⁵ C. Woenckhaus u. R. Jeck, Meth. Enzymol., Academic Press, New York, in press.
- ⁶ D. Scherr, R. Jeck, J. Berghäuser u. C. Woenckhaus, Z. Naturforsch. **28c**, 247–254 [1973].
- ⁷ B. I. Kurganov, N. P. Sugrobova u. V. A. Yakovlev, FEBS Letters **19**, 308–310 [1972].
- ⁸ G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 660–672 [1949].
- ⁹ H. Theorell u. A. D. Winer, Arch. Biochem. Biophys. **83**, 291–308 [1959].
- ¹⁰ H. Lineweaver u. D. Burk, J. Am. Chem. Soc. **56**, 658–666 [1934].
- ¹¹ R. Eisenthal u. A. Cornish-Bowden, Biochem. J. **139**, 715–720 [1974].
- ¹² J. M. Siegel, G. A. Montgomery u. R. M. Bock, Arch. Biochem. Biophys. **82**, 288–299 [1959].
- ¹³ K. Wallenfels, M. Gellrich u. F. Kubowitz, Liebigs Ann. Chem. **621**, 137–148 [1959].
- ¹⁴ K. Wallenfels, H. Schüly u. D. Hofmann, Liebigs Ann. Chem. **621**, 106–136 [1959].
- ¹⁵ T. P. Wang, L. Shuster u. N. O. Kaplan, J. Biol. Chem. **206**, 299–309 [1954].
- ¹⁶ D. G. Cross u. H. F. Fisher, Biochemistry **8**, 1147–1155 [1969].
- ¹⁷ H. F. Fisher, D. L. Adija u. D. G. Cross, Biochemistry **8**, 4424–4430 [1969].
- ¹⁸ R. H. McKay u. N. O. Kaplan, Biochim. Biophys. Acta **79**, 273–283 [1964].
- ¹⁹ A. J. Forlano, J. Pharm. Sci. **56**, 763–765 [1967].
- ²⁰ A. McPherson, Jr., J. Mol. Biol. **51**, 39–46 [1970].
- ²¹ K. Wallenfels u. H. Diekmann, Liebigs Ann. Chem. **621**, 166–177 [1959].
- ²² C. Woenckhaus u. S. Sohn, persönliche Mitteilung.
- ²³ N. O. Kaplan, M. M. Ciotti u. F. E. Stolzenbach, J. Biol. Chem. **221**, 833–844 [1956].