

Christoph Woenckhaus und Manfred H. Volz<sup>\*)</sup>

## Synthese und biochemische Eigenschaften des Nicotinamid-phenyl-dinucleotids

Aus dem Institut für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Eingegangen am 16. November 1965)



Nicotinamid-phenyl-dinucleotid (NPhD) ist als Coenzym in Dehydrogenasesystemen wirksam. Die Bindung an das Enzym wird durch lipophile Kräfte bewirkt. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten lassen den Schluß zu, daß die Aktivierung des Coenzym-Enzym-Komplex durch das Enzym Lactatdehydrogenase ausschließlich am Nicotinamidring erfolgt. Dagegen erfolgt die Aktivierung des Komplexes bei den zinkhaltigen Alkoholdehydrogenasen vorwiegend über den Adeninring.

NPhD wurde durch Kondensation der beiden Mononucleotide in wäßrigem Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt. 1-*O*-Phenyl-β-D-ribofuranosyl-5-phosphat wie auch das Coenzymanalogue sind sehr säureempfindlich. Durch milde saure Hydrolyse erhielten wir aus NPhD die Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat(*P*<sup>2</sup>)-5''-ribose<sup>1)</sup>.

Optische Untersuchungen am hydrierten und oxydierten Coenzym weisen auf eine sehr geringe Wechselwirkung zwischen dem Phenyl- und dem Nicotinamidring hin. Im Fluoreszenzanregungsspektrum des hydrierten Coenzymanalogen tritt eine Energieübertragung vom Phenyl- auf den Dihyronicotinamidring ein.



Das natürliche Coenzym Nicotinamid-adenin-dinucleotid ist nach Verlust des Adeninteils als Coenzym in Dehydrogenasesystemen nur noch schwach aktiv<sup>1)</sup>. Dieses äußert sich in der großen Michaelis-Konstanten, als Maß für die Bildung des Coenzym-Enzym-Komplexes, wie auch in der geringen Aktivierung des Komplexes, die durch die maximale Umsatz- oder Zerfallsgeschwindigkeit ausgedrückt wird. Um die Bedeutung des Adeninteils im Coenzym zu klären, haben wir zunächst die Substituenten im Purinteil verändert<sup>2)</sup>. Die synthetisierten purinhaltigen Coenzymmodelle wiesen aber nahezu gleiche enzymatische Eigenschaften auf wie das natürliche Coenzym NAD<sup>\*\*)</sup> . Erst der Ersatz des Purinringes durch 1-Desaza-purin<sup>\*\*\*)</sup>  oder

<sup>\*)</sup> Teil der Dissertat. *M. Volz*, Univ. Frankfurt am Main 1966.

<sup>\*\*)</sup>  Abkürzungen: Nicotinamid-adenin-dinucleotid = NAD, Nicotinamid-phenyl-dinucleotid = NPhD, Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat(*P*<sup>2</sup>)-5''-ribose = NMNPR, Dihyronicotinamid-adenin-dinucleotid = NADH, Dihyronicotinamid-phenyl-dinucleotid = NPhDH, Leber- bzw. Hefe-Alkoholdehydrogenase = ADH<sub>L</sub> bzw. ADH<sub>H</sub>, Lactatdehydrogenase = LDH.

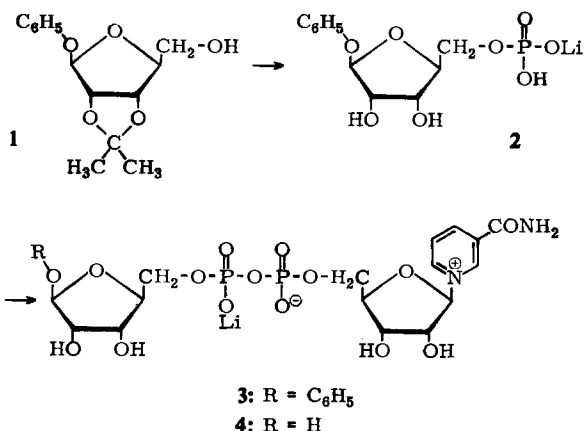
<sup>\*\*\*)</sup>  1-Desaza-purin = 3*H*-Imidazolo[4.5-*b*]pyridin.

<sup>1)</sup> *G. Pfeleiderer, E. Sann und F. Ortanderl*, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **73**, 39 (1963).

<sup>2)</sup> *C. Woenckhaus*, Chem. Ber. **97**, 2439 (1964).

Benzimidazol<sup>3)</sup> führte zum Abfall der Coenzymfunktion. Da bei diesen Ringsystemen noch die Möglichkeit einer Wasserstoffbrücken- oder Nebervalenzbindung zwischen dem Ringstickstoff und entsprechenden Gruppen im „aktiven Zentrum“ des Enzymeiweißes besteht, interessierte ein Coenzymmodell, in dem der nichtfunktionelle Molekülteil einen lipophilen Phenylring enthält, um die Möglichkeit jeder anderen Bindungsart außer der lipophilen Bindung auszuschließen.

Nicotinamid-phenyl-dinucleotid erhielten wir durch Kondensation der beiden Mononucleotide Nicotinamid- und Phenylribotid-5-phosphat mit Dicyclohexylcarbodiimid in wäßrigem Pyridin<sup>4)</sup>. Die Synthese des Phenylribotid-5-phosphats gelang durch Veresterung des in 2- und 3-Stellung durch eine Isopropylidengruppe geschützten Phenylribosids mit  $\beta$ -Cyan-äthylphosphat in wasserfreiem Pyridin<sup>5)</sup>. Bei allen Reaktionsschritten durften die Verbindungen nur kurzzeitig schwach saurem Medium ausgesetzt werden, da sonst der Phenylring abgespalten wird. Die Isolierung der Verbindungen gelang als Lithiumsalze. Wir vermieden die Acetonfällung bei NPhD, da der Nicotinamidteil Aceton in neutraler oder schwach alkalischer Lösung irreversibel addiert<sup>6)</sup>.



Die Michaelis-Konstante und maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) von NMNPR (4) wurden schon früher in unserem Institut bestimmt<sup>1)</sup>. Bei der Elution der durch Hochspannungselektrophorese auf Papierstreifen abgetrennten Substanz werden aus dem Papier Stoffe miteluiert, die die enzymatische Reaktion stark beeinflussen könnten. Wir haben deshalb die damalige Untersuchung überprüft und mußten feststellen, daß die  $K_M$ -Werte und die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten etwas von denen der reinen Substanz abweichen.

Das Coenzym NPhD ist beinahe so aktiv wie die vorher erwähnten Modelle Nicotinamid-1-desazapurin-dinucleotid und Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid. Die Bindung an das Enzym kann nur durch lipophile Kräfte bewirkt werden. In der Tabelle sind die enzymatischen Daten aufgeführt. Der Unterschied, den NPhD als

<sup>3)</sup> C. Woenckhaus und G. Pfeleiderer, *Biochem. Z.* **341**, 495 (1965).

<sup>4)</sup> N. A. Hughes, C. W. Kenner und A. R. Todd, *J. chem. Soc. [London]* **1957**, 3733.

<sup>5)</sup> G. M. Tener, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).

<sup>6)</sup> R. M. Burton, A. San Pietro und N. O. Kaplan, *Arch. Biochem. Biophysics* **70**, 87 (1957).

Biochemische Eigenschaften von Nicotinamid-phenyl-dinucleotid (NPhD) verglichen mit NAD und Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat(P<sub>2</sub>)-5''-ribose (NMNPR)

	ADH <sub>H</sub>		ADH <sub>L</sub>		LDH	
	K <sub>M</sub>	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>	V <sub>max</sub>
NAD	2.5 × 10 <sup>-4</sup>	55000	0.3 × 10 <sup>-4</sup>	410	0.75 × 10 <sup>-4</sup>	17000
NPhD	50 × 10 <sup>-4</sup>	7000	6 × 10 <sup>-4</sup>	240	8.7 × 10 <sup>-4</sup>	15000
NMNPR	100 × 10 <sup>-4</sup>	1000	40 × 10 <sup>-4</sup>	100	60 × 10 <sup>-4</sup>	500

Coenzym im Test mit Alkoholdehydrogenasen einerseits und Lactatdehydrogenasen andererseits aufweist, können wir nur durch die unterschiedliche Aktivierung des Nicotinamidteils an den verschiedenen Dehydrogenasen erklären. Die Enzym-Substrat-Affinität ist bei den drei Enzymen LDH, ADH<sub>H</sub> und ADH<sub>L</sub> etwa in der gleichen Größenordnung herabgesetzt. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten unterscheiden sich bei den drei Enzymen erheblich. NPhD erreicht im Test mit Lactatdehydrogenase die gleiche maximale Umsatzgeschwindigkeit wie natürliches Coenzym. Die hydrophobe Bindung durch den Phenylring reicht aus, das Coenzym im „aktiven Zentrum“ des Enzyms zu halten<sup>7)</sup>. Die Aktivierung des Enzym-Coenzym-Komplexes erfolgt also ausschließlich am Nicotinamidring. Dagegen finden wir im Test mit Alkoholdehydrogenasen erheblich kleinere maximale Umsatzgeschwindigkeiten. Wir schließen daraus, daß bei den zinkhaltigen Alkoholdehydrogenasen die Aktivierung des Coenzym-Enzym-Komplexes nur zum Teil am Nicotinamidring erfolgt, daneben tritt in diesem Komplex noch eine Aktivierung über den Adeninring ein. Beim Ersatz des Purinringes durch einen Benzimidazol-, 1-Desaza-purin- oder Phenylring fällt dieser Aktivierungsanteil aus.

NPhD zeigt eine sehr geringe Wechselwirkung zwischen dem Phenyl- und dem Nicotinamid- bzw. Dihyronicotinamidring. Die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten zwischen oxydierter und hydrierter Form gemessen bei 265 m $\mu$  beträgt 4.0 × 10<sup>3</sup> und ist fast so groß wie bei Coenzymmodellen, die nur den funktionellen Nicotinamidring besitzen. Purinhaltige Coenzymanaloge wiesen molare Extinktionsdifferenzen zwischen 3–3.4 × 10<sup>3</sup> auf<sup>2)</sup>. Bei den Coenzymmodellen ohne einen zweiten Ring liegt sie bei 4.5 × 10<sup>3</sup>.

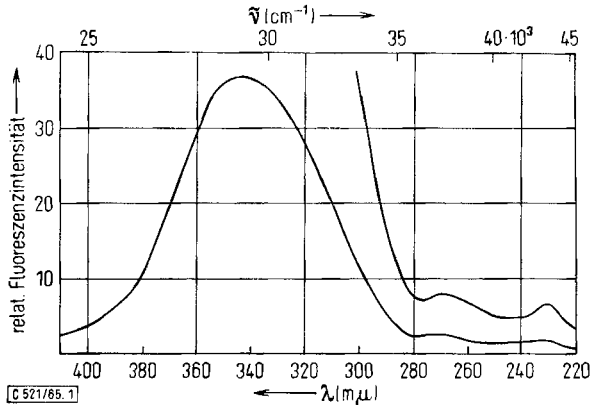
Das Fluoreszenzanregungsspektrum von NPhDH (Abbild. 1) zeigt, daß Licht vom Phenylring bei 270 m $\mu$  absorbiert und auf den Dihyronicotinamidring übertragen wird. Dieser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 465 m $\mu$ .

Die Fluoreszenzanregung des Dihyronicotinamids durch den Adeninring im NADH ist nach Leonard und Laursen<sup>8)</sup> keine strahlungslose Anregung. Sowohl unsere Untersuchungen am  $\alpha$ -NAD<sup>9)</sup> als auch die von Leonard am Nicotinamid-3-isoadenindinucleotid zeigten, daß diese Erscheinung nicht im Zusammenhang mit der Coenzymfunktion steht.

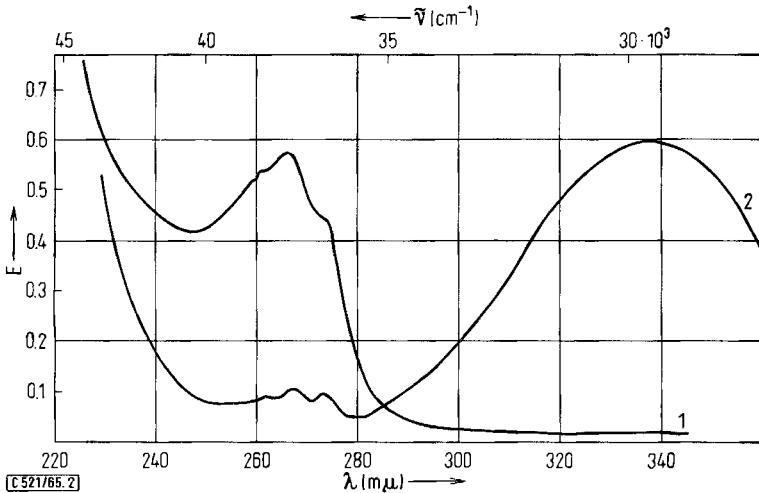
<sup>7)</sup> B. M. Anderson, M. I. Reynolds und C. D. Anderson, Arch. Biochem. Biophysics **111**, 202 (1965).

<sup>8)</sup> N. J. Leonard und A. R. Laursen, Biochemistry **4**, 365 (1965).

<sup>9)</sup> G. Pfeiderer, C. Woenckhaus und M. Nelböck-Hochstetter, Liebigs Ann. Chem. **690**, 170 (1965).



Abbild. 1. Fluoreszenzanregungsspektrum von NPhDH,  $c = 10^{-5} m$  in 0.1 m Natriumchlorid-Lösung pH 9.5. Ordinate: relative Fluoreszenzintensität, bezogen auf die Photozelle des Aminco-Bowman Spektralfluorimeter, Spaltprogramm 0.03



Abbild. 2. Absorptionsspektrum von 0.1  $\mu$ Mol/ccm NPhD in 0.2 m Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9.5 (1), NPhOH in 0.1 m Natriumchlorid-Lösung pH 9.5 (2)

### Beschreibung der Versuche

*Hefe-Alkoholdehydrogenase*, *Leber-Alkoholdehydrogenase* und *Schweineherz-Lactatdehydrogenase* wurden von C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim-Waldhof, bezogen.

Absorptionsmessungen wurden im Zeiss-Spektrophotometer PQM II vorgenommen. Das Fluoreszenzanregungsspektrum wurde im Spektralfluorimeter Aminco-Bowman aufgenommen. Zur Messung der Michaelis-Konstanten wurde ein Photometer Eppendorf mit registrierendem Schreiber verwandt und in einer Thermoküvette bei 25° der Absorptionsanstieg bei 366  $m\mu$  gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist in  $\Delta E/Min.$  angegeben. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit ist definiert als Mol gebildetes Dihydrocoenzym/Mol Enzym/Min.

**ADH-Heffe-Test:** In einer 1-cm-Küvette befanden sich in einem Gesamtvolumen von 2 ccm 0.2 M Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9.5, 1.0 mMol *Äthanol* und 0.5–4  $\mu$ Mol *Coenzym*. Die Reaktion wurde mit 60  $\mu$ g  $ADH_H$  (0.02 ccm einer 1:30 verd. Enzymsuspension 10 mg/ccm) gestartet. Den gleichen Testansatz verwandten wir zur Bestimmung der *ADH-Leber-Reaktion* (200  $\mu$ g  $ADH_L$ ) (0.02 ccm einer Enzymsuspension 10 mg/ccm). Der *LDH-Test* wurde in 0.2 M Glycin/Natronlauge-Puffer pH 10 durchgeführt, 0.4 mMol *Lithiumlactat* wurden als Substrat zugesetzt; die Coenzymmenge betrug 0.5–4  $\mu$ Mol. Ausgelöst wurde die Reaktion mit 4  $\mu$ g *LDH* (0.02 ccm einer 1:50 verd. Enzymsuspension 10 mg/ccm). Die Michaelis-Konstanten und  $V_{max}$ -Werte wurden nach *Lineweaver* und *Burk*<sup>10)</sup> bestimmt.

*1-O-Phenyl-2,3-isopropyliden- $\beta$ -D-ribofuranose* (**1**): 2.6 g *1-O-Phenyl- $\beta$ -D-ribofuranose*<sup>11)</sup> wurden in 300 ccm trockenem *Aceton* suspendiert, mit 18.9 g *p-Toluolsulfonsäuremonohydrat* versetzt und die Mischung unter gelegentlichem Schütteln 30 Min. stehengelassen. Dann wurde sie unter Rühren in 45 ccm 0.5 N  $NaHCO_3$  gegeben und anschließend i. Vak. bei 30° zur Trockne eingengt. Nach Trocknen des Rückstands über  $P_4O_{10}$  extrahierte man dreimal mit heißem Benzol und dampfte die Extrakte erneut ein: 2.6 g blaßgelber Sirup.

*Lithium-1-O-phenyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl-5-phosphat* (**2**): 2.6 g **1** wurden mit einer  $\beta$ -Cyan-äthylphosphat-Lösung<sup>5)</sup> (aus 16.1 g Barium- $\beta$ -cyan-äthylphosphat nach Behandeln mit Dowex-50 X8, 100–200 mesh,  $H^+$ -Form und Lösen in 50 ccm Pyridin) und 30 ccm *Pyridin* versetzt. Die Lösung wurde bei 30° zur Trockne eingengt, der Rückstand mit je 30 ccm absol. Pyridin dreimal i. Vak. bei 30° azeotrop getrocknet, anschließend in 100 ccm absol. Pyridin aufgenommen und mit 10.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Nach 40 Stdn. setzte man bei Raumtemperatur 100 ccm Wasser zu, dampfte nach einer Stde. Pyridin und Wasser bei 30° i. Vak. ab, versetzte den Rückstand mit 80 ccm 0.5 N NaOH und kochte 1 Stde. unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen wurde mit verd. Salzsäure neutralisiert, der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. auf 30 ccm eingengt und mit Salzsäure auf pH 2 eingestellt, um die Isopropylidengruppe zu entfernen. Nach 20 Min. wurde mit verd. Natronlauge neutralisiert und die Lösung auf eine Dowex-I X8-Säule ( $Cl^-$ -Form, 100–200 mesh,  $2 \times 50$  cm) gegeben. Nach Aufgabe von 0.5 M LiCl-Lösung erscheint **2** im Eluat. Nach Lyophilisieren löste man den Rückstand in wenig Methanol, fällte **2** mit dem dreifachen Volumen Aceton, zentrifugierte ab, löste das Sediment in möglichst wenig Wasser und fällte nach Filtrieren mit dem 20fachen Volumen kaltem Isopropylalkohol. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und getrocknet. 650 mg (20%) farbloses, amorphes Produkt. Gef. Phosphat: Ribose<sup>12)</sup> = 1:1.

UV (0.1 M Tris/Acetat-Puffer pH 7.0):  $\lambda_{max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon = 1.1 \times 10^3$ ).

$LiC_{11}H_{14}O_8P$  (312.1) Ber. C 42.33 H 4.52 P 9.92 Gef. C 41.91 H 4.88 P 8.38

*Nicotinamid-phenyl-dinucleotid, Lithiumsalz* (**3**): 320 mg **2** wurden in wenig Wasser an einer Dowex-50 X8-Säule (Ammonium-Form, 200–400 mesh,  $2 \times 20$  cm) in das Ammoniumsalz übergeführt. Das wäbr. Eluat wurde mit 10 ccm *Pyridin* versetzt und i. Vak. bei 30° zur Trockne eingengt; Pyridinzugabe und Eindampfen wurden zehnmal wiederholt. Nach Lösen des Phenylribotids in 25 ccm Wasser und Zugabe von 500 mg *Nicotinamidmononucleotid* setzte man solange Pyridin zu, bis eine leichte Trübung bestehen blieb, ließ nach Zufügen von 20.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, filtrierte anschließend vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff, und wusch den Rückstand mit 4.5 ccm heißem Wasser. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und mit 10 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Filtrieren, Waschen und Zugabe von *Dicyclohexylcarbodiimid* wurden fünfmal nach je 24 Stdn.

<sup>10)</sup> H. *Lineweaver* und D. *Burk*, J. Amer. chem. Soc. **56**, 658 (1934).

<sup>11)</sup> E. *Vis* und H. G. *Fletcher*, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1182 (1957).

<sup>12)</sup> E. *Volkin* und W. E. *Cohn*, Methods of Biochemical Analysis, Bd. 1, S. 298, Interscience Publishers, New York 1957.

wiederholt. Anschließend fügte man 200 ccm Wasser zu, destillierte das Lösungsmittel i. Vak. bei 30° bis auf 100 ccm ab, entfernte den Dicyclohexylharnstoff mit dem restlichen Pyridin durch Extraktion mit 3 × 200 ccm Chloroform, engte die wäßr. Phase i. Vak. bei 30° auf 30 ccm ein und gab auf eine Dowex-I X8-Säule (Cl<sup>⊖</sup>-Form, 100–200 mesh, 2 × 50 cm). Zunächst wurde mit Wasser eluiert, dann mit Lithiumchloridlösungen steigender Konzentration (Mischgefäß 500 ccm). Mit 0.05 *m* LiCl-Lösung erschien das Coenzymanaloge. Nach Gefriertrocknen wurde der Rückstand in absol. Äthanol gelöst, das Lithiumsalz **3** mit Äther gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, in möglichst wenig Wasser gelöst, filtriert und das Coenzymanaloge mit kaltem Isopropylalkohol gefällt. Ausb. 102 mg (16%) farblose, amorphe Substanz.

UV (6.1 *m* Tris/Acetat-Puffer pH 7.0):  $\lambda_{\max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon = 5.7 \times 10^3 \pm 5\%$ ).

LiC<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub> · 1/2 H<sub>2</sub>O (637.4) Ber. C 41.46 H 4.43 N 4.34 P 9.72

Gef. C 41.52 H 4.98 N 4.07 P 9.71

$\epsilon$ -Werte des reduzierten Coenzymalogens in 0.2 *m* Glycin/Natronlauge, pH 9.5:  $\epsilon = 1.05 \times 10^3 \pm 5\%$  bei 267 m $\mu$ ,  $\epsilon = 5.9 \times 10^3 \pm 5\%$  bei 338 m $\mu$ .

*Dihydronicotinamid-phenyl-dinucleotid (NPhDH)*: Zur Messung des Fluoreszenzanregungsspektrums wurden 10 mg *NPhD* in 10 ccm 0.2 *m* Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9.5 gelöst und mit 0.1 ccm Äthanol versetzt. Die Reduktion wurde mit 1.5 mg *ADH<sub>H</sub>* (0.15 ccm einer Enzymsuspension 10 mg/ccm) ausgelöst. Man ließ 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, dampfte dann i. Vak. bei 30° zur Trockne ein, extrahierte aus dem Rückstand *Dihydronicotinamid-phenyl-dinucleotid* mit 5 ccm Methanol, dampfte das Lösungsmittel i. Vak. ab und nahm den Rückstand in 1 ccm Wasser auf. Zur Reinigung wurde auf eine Sephadex-Säule (Cl<sup>⊖</sup>-Form, A 50 coarse, 3 × 15 cm) gegeben, die mit einer 0.01 *m* NaCl-Lösung (mit verd. Natronlauge auf pH 9.5 eingestellt) äquilibriert worden war. Nach Aufgabe einer 0.1 *m* NaCl-Lösung als Gradient (Mischgefäß 500 ccm) erschien *NPhDH* im Eluat. Der Coenzymgehalt wurde durch Absorptionsmessungen bei 340 und 267 m $\mu$  und durch Phosphatanalyse<sup>13)</sup> bestimmt.

*Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat (P<sub>2</sub>)-5''-ribose (NMNPR), Lithiumsalz, (4)*: Zu 150 mg *NPhD* (Lithiumsalz) in 10 ccm Wasser gab man 0.5 ccm konz. Salzsäure, ließ 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehen und fällte dann mit dem 15fachen Volumen Isopropylalkohol. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und noch einmal umgefällt. Man erhielt 77 mg eines farblosen, amorphen Produkts, das pherographisch einheitlich war und keine Phenolreaktion mit Millons-Reagenz zeigte. Die Substanz war sehr gut wasserlöslich und reagierte in der Kälte mit alkalischer Triphenyltetrazoliumlösung unter Rotfärbung. Mit stark verdünnten Enzymlösungen konnten wir auf Grund der verschiedenen Umsatzzahlen von *NPhD* und *NMNPR* Spuren von *NPhD* im *NMNPR* nachweisen.

LiC<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub> (552.3) Ber. C 34.80 H 4.20 N 5.07 P 11.22

Gef. C 34.62 H 4.41 N 4.92 P 11.00

<sup>13)</sup> M. Martland und R. Robinson, *Biochem. J.* **20**, 848 (1926).