

## Oxydation von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid in *Rhodospirillum rubrum*

### I. Charakterisierung einer löslichen NADH-Dehydrogenase

M. BOLL

Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Freiburg i. Br.

Eingegangen am 4. März 1968

#### *Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Rhodospirillum rubrum*

##### *I. Characterization of a Soluble NADH Dehydrogenase*

**Summary.** A soluble NADH\* Dehydrogenase [NADH: (acceptor) oxidoreductase, EC 1.6.99.3.] has been purified 25—30fold from *R. rubrum* by gel filtration with Sephadex G 200 and ionexchange chromatography on DEAE-Cellulose. During the second purification step the enzyme is stable only in the presence of either FMN or NADH. Electronacceptors which were found to be effective include menadione, ferricyanide, DCPIP, p-benzoquinone and cytochrome c, the latter substance being a poor acceptor. The optimum pH of the reaction is at about 8.4.  $K_M$  for NADH is  $3.0 \times 10^{-5}$  M. NADPH is oxidized at only about 3—5% the rate of NADH. The active prosthetic group of the enzyme is FMN with an apparent  $K_M$  of  $0.3 \times 10^{-7}$  M. When diluted in 0.05 M buffer the enzyme becomes rapidly inactivated. FMN, FAD and also NADH and NADPH exhibit a stabilizing protective effect. Higher concentrations of buffer cause increasing inactivation. The mechanism of the inactivation is thought to be a labilization or detachment of the prosthetic group from the enzyme molecule. Several metals also inactivate the enzyme.

**Zusammenfassung.** Es wird die 25—30fache Anreicherung einer löslichen NADH-Dehydrogenase [NADH: (acceptor) oxidoreductase, EC 1.6.99.3.] aus *R. rubrum* durch Gelfiltration an Sephadex G 200 und Chromatographie an DEAE-Cellulose beschrieben. Das Enzym ist bei DEAE-Cellulosechromatographie nur in Gegenwart von FMN oder NADH stabil. Menadion, Ferricyanid, DCPIP, p-Benzochinon und Cytochrom c sind als Elektronenacceptoren wirksam. Cytochrom c ist ein schlechter Acceptor. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei 8,4.  $K_M$  für NADH ist  $3,0 \cdot 10^{-5}$  M. NADPH wird nur mit etwa 3—5% des Wertes von NADH umgesetzt. Die prosthetische Gruppe des Enzyms ist FMN,  $K_M$  für FMN ist  $0,3 \cdot 10^{-7}$  M. Das Enzymprotein wird bei Verdünnung in 0,05 M Puffer inaktiviert; FMN und FAD sowie NADH und NADPH haben einen stabilisierenden Effekt. Durch höhere Pufferkonzentrationen wird das Enzym zunehmend inaktiviert. Die

\* Verwendete Abkürzungen: NAD(P)H = reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (Phosphat); FMN = Flavinmononucleotid; FAD = Flavin-adenin-dinucleotid; DCPIP = 2,6-Dichlorphenol-indophenol.

Inaktivierung besteht in einer Labilisierung oder Abspaltung der prosthetischen Gruppe vom Enzymmolekül. Verschiedene Metalle inaktivieren das Enzym ebenfalls.

Unter den enzymatischen Systemen, welche die Oxydation von NADH und NADPH katalysieren, sind von besonderem Interesse die in einigen Mikroorganismen und in höheren Organismen nachgewiesenen Aktivitäten vom Typ der NADH-Dehydrogenase (REPASKE u. LIZOTTE, 1965; BERNOFSKY u. MILLS, 1966; DUNCAN u. MACKLER, 1966; AVIGARD u. LEVIN, 1967; BRAGG u. HOU, 1967b; WORCEL u. GOLDMAN, 1967; DI PRISCO et al., 1967; RAO et al., 1963). NADH-Dehydrogenase [NADH: (acceptor) oxidoreductase, EC 1.6.99.3.] ist ein Flavoprotein. Als prosthetische Gruppe sind sowohl FMN als auch FAD nachgewiesen worden. Das Enzym gilt als verantwortlich für die Koppelung der NADH-Oxydation an das elektronentransportierende System, unter Umständen stellt es den Flavinanteil der NADH-Oxydasepartikel dar. Das Vorliegen des Enzyms in der Zelle als ein an Strukturen gebundenes Protein macht für eingehendere Untersuchungen in vielen Fällen eine Loslösung von den Strukturen durch Behandlung mit verschiedenen Agentien notwendig (HEINEN et al., 1964; BRAGG u. HOU, 1967a; KING et al., 1966; KANIUGA u. GARDAS, 1967). Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß im Zuge der Isolierung Veränderungen im Proteinmolekül eintreten. Daneben sind auch durch einfachen Aufschluß der Zellen lösliche NADH-Dehydrogenasen erhalten worden (DUNCAN u. MACKLER, 1966).

Nach MACKLER (1966) stellt die kleinste Untereinheit des elektronentransportierenden Systems, die eine Oxydation von NADH, gleich mit welchem Elektronenacceptor katalysieren kann, die Grundeinheit der NADH-Dehydrogenase dar. Im zellfreien Extrakt reagiert das Enzym mit einer Reihe von Elektronenacceptoren. Hierbei kommt der Übertragung der Elektronen auf Chinone, wie Ubichinon oder Substanzen vom Vitamin K-Typ als Bestandteilen des elektronentransportierenden Systems eine gewisse physiologische Bedeutung zu. In *E. coli*, das beide Arten Chinone enthält, haben KASHKET u. BRODIE (1963) Hinweise auf zwei verschiedene Systeme der Elektronenübertragung erhalten. Coenzym  $Q_8$  (Ubichinon) ist Bestandteil der Succinatoxydation, während ein Naphthochinon an der Oxydation von NADH beteiligt ist.

Bei Experimenten mit *Rhodospirillum rubrum* über die enzymatischen Veränderungen bei der Umsteuerung des Stoffwechsels zu Beginn der Bakterienchlorophyllsynthese wurde in zellfreien Extrakten lösliche NADH-Dehydrogenaseaktivität festgestellt. In der folgenden Arbeit wird über die partielle Anreicherung und über einige Eigenschaften des Enzyms berichtet.

## Methoden

### 1. Präparate

Die Nucleotide, Cytochrom c und Alkoholdehydrogenase waren Präparate von C. F. Boehringer und Soehne, Mannheim. FMN, FAD wurden von Sigma, St. Louis, USA, Menadion von Fluka, Buchs, SG, Schweiz, bezogen.

### 2. Bakterienstamm und Vermehrung

*Rhodospirillum rubrum* FRI (DREWS, 1965a) wurde in einem Medium R 8 ÄH (DREWS, 1965b) bei 30°C unter Schütteln vermehrt. Der Wachstumsverlauf wurde bei 644 m $\mu$  ( $d = 1$  cm) verfolgt. Für die Versuche wurden 24 Std-Kulturen verwendet; zu dieser Zeit befinden sich die Bakterien am Ende der log. Wachstumsphase. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und dreimal mit 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 7,6 gewaschen. Die so erhaltene Paste kann bei -20°C über mindestens 4 Monate aufgehoben werden.

### 3. Aufschlußmethoden

a) *Ultraschall*. Die feucht abgewogene Bakterienpaste wurde im dreifachen Volumen 0,05 M Tris-HCl Puffer (7,6) homogen suspendiert und, im Eisbad gekühlt, in einem MSE Ultraschallgerät in Portionen von 2,5 ml 90 sec bei maximaler Leistung beschallt. Anschließend wurde 30 min bei 30000  $\times$  g abzentrifugiert.

b) *French Pressure Cell*. Die Bakteriensuspension (siehe a) wurde in einer Aminco French Press aufgeschlossen und wie unter a) abzentrifugiert.

c) *Aluminiumpulver*. Die Bakterienpaste wurde in einem Mörtel bei 0-4°C mit dem dreifachen Gewicht Alcoa A 305 5 min trocken zerrieben, anschließend mit dem dreifachen Volumen Tris-HCl Puffer (7,6) 5 min durch weiteres Reiben extrahiert und wie unter a) abzentrifugiert.

Der Überstand der Zentrifugation wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet.

### 4. Testsysteme

Alle enzymatischen Bestimmungen wurden im Photometer Eppendorf mit temperierbarem Cuvettenhalter durchgeführt.  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $d = 1$  cm.

In einem Gesamtvolumen von 3,0 ml waren enthalten: 150  $\mu\text{Mol}$  Tris-HCl Puffer pH 8,1, 0,75  $\mu\text{Mol}$  NADH, sowie einer der folgenden Elektronenacceptoren: 2,5  $\mu\text{Mol}$  Menadion, 3  $\mu\text{Mol}$  Ferricyanid oder 0,21  $\mu\text{Mol}$  DCPIP. Beim Test mit Cytochrom c als Acceptor enthielt das Gesamtvolumen von 1,0 ml die entsprechenden Konzentrationen an Puffer und NADH, 0,05  $\mu\text{Mol}$  KCN sowie 0,12 ml Pferdeherz-Cytochrom c (10 mg/ml). Start jeweils mit Enzym. Das Enzym zeigt mit keinem der Acceptoren eine direkte Reaktion. Einzelheiten des Testes mit Menadion siehe Abb. 1. Ferricyanid und DCPIP ergeben mit NADH eine geringfügige Blindreaktion, die von der eigentlichen Reaktion abgezogen wurde. Mit beiden Acceptoren nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit langsam ab. Die Wellenlängen zur Bestimmung der Aktivität und die verwendeten millimolaren Extinktionskoeffizienten sind folgende: 3,3 für Menadion bei 366 m $\mu$ ; 1,04 für Ferricyanid bei 405 m $\mu$ ; 20,6 für DCPIP bei 578 m $\mu$  und 21,0 für Cytochrom c bei 546 m $\mu$ . Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde als Elektronenacceptor ausschließlich Menadion verwendet. Durch vergleichende Aktivitätsbestimmung wurde übereinstimmendes Verhalten der anderen Elektronenacceptoren bei jedem Experiment sichergestellt.

### 5. Apoenzym

Die Herstellung des Apoenzyms erfolgte in Anlehnung an die Methode von WARBURG u. CHRISTIAN (1938). Die Enzymlösung (aktive Fraktionen der Gelfiltration mit Sephadex, etwa 1,3 mg/ml Protein enthaltend) wurde bei 4°C mit dem

gleichen Volumen saurer Ammoniumsulfatlösung versetzt. Das präzipitierte Protein wurde sofort 8 min bei  $8000 \times g$  in der Kälte abzentrifugiert und unmittelbar danach im anfänglich vorhandenen Volumen kalten Tris-HCl Puffer (7,6) aufgenommen. Das saure Ammoniumsulfat war ein Gemisch von 3,88 ml kalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung und 0,12 ml 1 N  $H_2SO_4$ . Der pH-Wert betrug 2,9.

### 6. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) oder nach der Methode von WARBURG u. CHRISTIAN (1941) bestimmt.

### 7. Aktivitätseinheiten

Eine Einheit ist die Menge Enzymprotein, welche unter den Testbedingungen in Gegenwart des betreffenden Elektronenacceptors 1  $\mu$ Mol Substrat je min umsetzt. Aktivität sind Einheiten je ml.

### 8. Partielle Anreicherung des Enzyms

Der durch Ultraschallbehandlung hergestellte Rohextrakt wurde auf eine Säule Sephadex G 200 (Pharmacia, Uppsala)  $2 \times 35$  cm gegeben, die mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (7,6) äquilibriert war. Nach Einsickern der Enzymlösung wurde mit dem gleichen Puffer eluiert. Auf der Säule erfolgt Auftrennung in zwei schwach rosa gefärbte Banden, von denen die erste schneller laufende die Hauptmenge des aufgesetzten Proteins enthält. Die enzymatische Aktivität erscheint im zweiten Proteingipfel. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und zur Chromatographie an DEAE-Cellulose entweder mit  $4 \cdot 10^{-3}$  M FMN oder mit  $2 \cdot 10^{-4}$  M NADH versetzt. Dann wurden sie auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Serva, Heidelberg, Kapazität 0,64 mÄq/g) gegeben. Säulendurchmesser 1 cm, Höhe des Austauschers 17 cm. Das Austauschermaterial (vorbereitet durch NaOH-Behandlung) war mit 0,05 M Tris-HCl Puffer (7,6) äquilibriert worden, dem entweder FMN oder NADH in den oben angegebenen Konzentrationen zugesetzt waren. Nach Adsorption des Proteins am Austauscher wurde mit zwei Säulenvolumina des gleichen Puffers gewaschen und dann mit steigender Pufferkonzentration stufenweise eluiert (Intervalle 0,025 M). Alle Elutionspuffer enthielten einen der beiden Zusätze in der angegebenen Konzentration. Die gesamte enzymatische Aktivität wird nach Zugabe von 0,225 M Puffer als scharfer Gipfel eluiert.

Das beim Äquilibrieren der Säule und Adsorbieren des Enzyms auf die Säule gebrachte FMN bzw. NADH wird dort teilweise festgehalten und konzentriert. Bei Pufferkonzentrationen zwischen 0,10 M und 0,15 M werden die Substanzen jedoch wieder ausgewaschen, so daß bei der Elution des Enzyms annähernd die FMN- bzw. NADH-Konzentration des Elutionspuffers vorhanden ist (Bestimmung bei 450 m $\mu$  für FMN und bei 366 m $\mu$  für NADH).

Zur Proteinbestimmung wurden die aktiven Fraktionen der Chromatographie an DEAE-Cellulose 24 Std in der Kälte gegen das 500fache Volumen Tris-HCl Puffer (7,6) dialysiert, um FMN bzw. NADH zu entfernen, da die Substanzen die beiden Methoden der Proteinbestimmung stören.

Alle hier beschriebenen Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, mit den aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration mit Sephadex (spez. Aktivität 2,2–2,6) gemacht, da das Enzym nach der Chromatographie an DEAE-Cellulose nur in Gegenwart von FMN oder NADH stabil ist.

### Ergebnisse und Diskussion

1. *Aufschlußmethoden.* Ein Vergleich der drei verschiedenen Methoden ergibt übereinstimmende spezifische Aktivitäten mit sämtlichen Elektronenacceptoren. Die Abweichungen sind nicht größer als 10%. Das Enzym wird also in allen Fällen als lösliches Protein erhalten. Von Bedeutung ist, daß bei längerer Behandlung mit Ultraschall die enzymatische Aktivität zerstört wird. So findet man nach 8 min Ultraschallaufschluß nur noch 20% der Aktivität des Wertes von 90 sec.

Tabelle 1. *Anreicherung von NADH-Dehydrogenase aus Rhodospirillum rubrum*

	$\Sigma V$ (ml)	Ein- heiten/ ml	$\Sigma$ Ein- heiten	mg Protein/ ml	$\Sigma$ Protein (mg)	Spez. Aktivität
Rohextrakt	4,5	16,4	73,8	21,0	94,5	0,78
Sephadex						
a) Spitzenfraktion	2,6	4,55	11,83	1,50	3,90	3,03
b) aktive Fraktionen	22,0	2,54	55,90	1,15	25,30	2,21
DEAE						
a) Spitzenfraktion	2,6	3,64	9,46	0,17	0,44	21,40
b) aktive Fraktionen	12,0	2,58	30,08	0,14	1,68	18,40

2. *Anreicherung des Enzyms.* Tab.1 enthält die Daten über die partielle Anreicherung des Enzyms. Es wurde eine 25—30fache Anreicherung bei etwa 40%iger Aktivitätsausbeute erzielt. Chromatographie des Enzyms an DEAE-Cellulose ohne Zusatz von FMN oder NADH bewirkt weitgehende Inaktivierung. Von der aufgesetzten Aktivität werden nur noch etwa 5% wiedergefunden, während das Protein zu über 90% wiederzufinden ist. Aus verschiedenen Ergebnissen (siehe 8. „Prosthetische Gruppe“ und 9. „Stabilität und Inaktivierung des Enzyms“) kann angenommen werden, daß FAD und NADPH ebenfalls in der Lage sind, eine Inaktivierung der enzymatischen Aktivität während der Chromatographie an DEAE-Cellulose zu verhindern.

3. *Testkinetik.* In Abb.1 ist die Kinetik der Aktivitätsbestimmung mit Menadion als Elektronenacceptor dargestellt. Nach Beendigung der kurzzeitigen Zunahme der Extinktion, hervorgerufen durch Menadion, erfolgt der Start mit Enzym. Wie aus Vergleich der Kurven 2 und 3 zu sehen ist, erhöht FMN (oder FAD) die Reaktionsgeschwindigkeit um 10—15%. Ohne Elektronenacceptor ist bei der gleichen Enzymmenge ohne oder mit Flavin keine meßbare Aktivität vorhanden (Kurven 4 und 5).

Die Geschwindigkeit der Oxydation von NADH ist der eingesetzten Menge Enzymprotein proportional. Bei sehr großer Enzymmenge

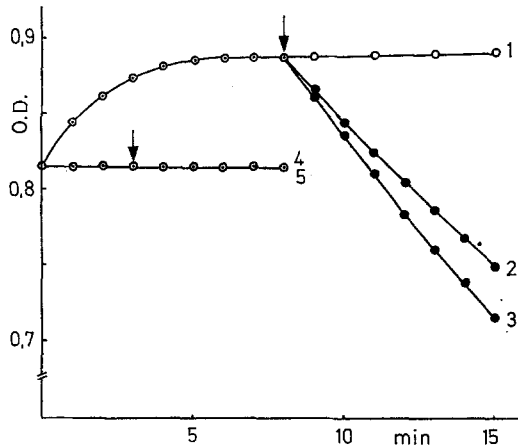


Abb. 1. *NADH-Dehydrogenase im optischen Test (Menadion als Elektronenacceptor)*. Standardtestbedingungen siehe „Methoden“. Zu den mit Pfeil markierten Zeitpunkten wurde die Reaktion mit 0,01 ml Enzym (13  $\mu$ g Protein) gestartet. Es bedeuten: 1 ohne Substrat; 2 ohne FMN (FAD); 3 mit FMN (FAD); 4 ohne Menadion, ohne FMN (FAD); 5 ohne Menadion, mit FMN (FAD). FMN (FAD):  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M

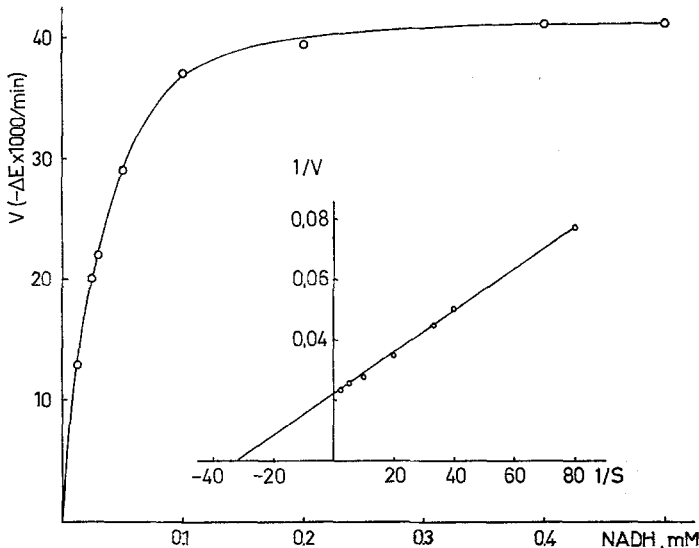


Abb. 2. *Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der NADH-Dehydrogenase*. Testbedingungen siehe „Methoden“. Es wurden 23  $\mu$ g Enzymprotein zum Test eingesetzt

bewirkt das Absinken der Substratkonzentration nach kurzer Reaktionszeit eine Abnahme der Geschwindigkeit.

Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Aus den gefundenen Werten errechnet sich eine  $K_M$  von  $3,0 \cdot 10^{-5}$  M. Großer Überschuß an Substrat hat keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

4. *Substratspezifität.* Das Enzym zeigt ausgeprägte Substratspezifität. NADPH wird nur mit etwa 3–5% der Geschwindigkeit des Umsatzes von NADH oxydiert. Die gleiche strikte Spezifität findet man bei den entsprechenden enzymatischen Aktivitäten in *Hydrogenomonas* (REPASKE u. LIZOTTE, 1965) und in *Aerobacter* (BERNOFSKY u. MILLS, 1966). Dagegen oxydiert das Enzym aus *E. coli* (BRAGG, 1965) beide Nucleotide, wobei es allerdings zu NADH höhere Affinität besitzt.

Tabelle 2. *Spezifische Aktivitäten von NADH-Dehydrogenase mit verschiedenen Elektronenacceptoren*

Acceptor	Menadion	Ferricyanid	DCPIP	Cyt c
Spez. Aktivität	2,15	3,9	0,52	0,001

Testbedingungen siehe „Methoden“.

5. *Acceptorspezifität.* Tab. 2 enthält eine Zusammenstellung der spezifischen Aktivitäten des Enzyms mit den verschiedenen Elektronenacceptoren. Cytochrom c ist in diesem System ein schlechter Acceptor. p-Benzochinon ist als Elektronenacceptor ebenfalls wirksam.

6. *pH-Optimum.* Die Abb. 3 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH. Bei den verwendeten Puffern liegt das Optimum der Reaktion bei etwa 8,4.

7. *Nachweis des gebildeten Reaktionsproduktes.* Das bei der Reaktion entstehende NAD ist stabil und kann mit Alkoholdehydrogenase und Äthanol nachgewiesen werden. Dies ist in Abb. 4 dargestellt. Man sieht, daß das gebildete NAD zum großen Teil gefunden werden kann. Vollständige Reduktion von NAD ist unter den gegebenen Testbedingungen (ohne Entfernung des gebildeten Acetaldehyds durch Semicarbazid) nicht möglich.

8. *Prosthetische Gruppe.* FMN und FAD aktivieren das Enzym. Die Aktivierung der enzymenthaltenden Fraktionen aus der Gelfiltration mit Sephadex in Gegenwart von  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M Flavin in der Testcuvette beträgt 10–15%. Dagegen ist die Aktivierung im Rohextrakt < 3%. In beiden Fällen ist durch Inkubation des Enzyms mit  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M Flavin bei 20°C keine größere Aktivierung als angegeben möglich. Dialyse der aktiven Fraktionen aus der mit NADH behandelten DEAE-Cellulose-Säule (2 ml Enzym gegen  $2 \cdot 210,05$  M Tris-HCl Puffer (7,6), 6 Std in der Kälte) führt zu einer Zunahme der Aktivierung durch die beiden Flavine auf 30–40%.

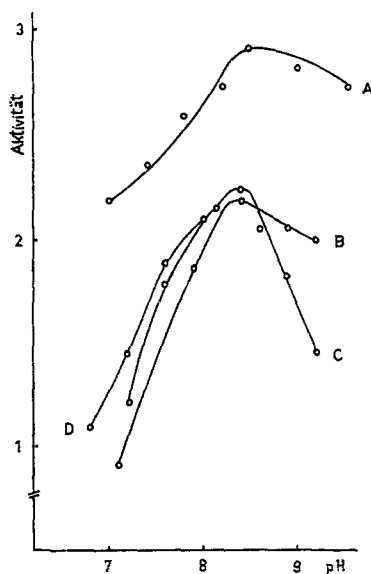


Abb. 3. Abhängigkeit der NADH-Oxydation vom pH-Wert des Testgemisches. Testbedingungen siehe „Methoden“. Sämtliche Puffer 0,05 M. Es bedeuten: A Glycylglycin; B Triäthanolamin-HCl; C Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl; D Sörensen-Phosphat

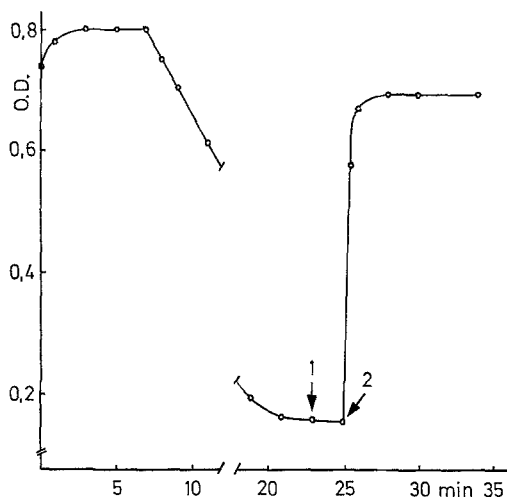


Abb. 4. Nachweis des durch NADH-Dehydrogenase gebildeten NAD mit Äthanol und Alkoholdehydrogenase. Testbedingungen siehe „Methoden“. Zu den markierten Zeitpunkten erfolgte Zusatz von 1 50  $\mu$ Mol Äthanol und 2 0,02 ml Alkoholdehydrogenase (30 mg/ml)



Dabei wird das Enzym jedoch teilweise inaktiviert. Gleichartige Dialyse des Enzyms nach der Gelfiltration mit Sephadex ergibt keine Zunahme der Aktivierung.

Die bei Chromatographie an DEAE-Cellulose ohne Zusatz von FMN oder NADH beobachtete Inaktivierung des Enzyms besteht wahrscheinlich in einer Abspaltung der prosthetischen Gruppe auf der Säule. Die verbliebene minimale Aktivität (siehe 2. „Anreicherung des Enzyms“) kann jetzt bereits durch Zusatz von  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M Flavin in die Cuvette um etwa 100% vergrößert werden. Ferner resultiert zweistündige Inkubation des Enzyms mit  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M Flavin bei 20°C in einer dreifachen Erhöhung der enzymatischen Aktivität. Inkubation ohne Flavin erhöht die Aktivität nur unwesentlich ( $< 20\%$ ). NADH verhindert auf der Säule, wahrscheinlich durch seine Bindung an der aktiven Stelle des Enzyms, die Abspaltung der prosthetischen Gruppe, so daß genau wie in Gegenwart von FMN die enzymatische Aktivität zum großen Teil wiedergefunden werden kann.

Tabelle 3  
*Spezifische Aktivität von Holo-Apo- und aktivierter ApoNADH-Dehydrogenase*

	spez. Aktivität
Holoenzym	2,15
Apoenzym	0,045
Apoenzym nach Inkubation mit $1 \cdot 10^{-5}$ M FMN (FAD) 20°C 120 min	1,27

Einzelheiten siehe „Methoden“.

Mit den bisher dargestellten Versuchen ist jedoch noch kein Unterschied in der Aktivierung durch die beiden Flavine FMN und FAD feststellbar. Die Präzipitation des Enzyms mit Ammoniumsulfat bei niedrigem pH-Wert [WARBURG u. CHRISTIAN, 1938 (siehe Methoden)] liefert ein verändertes Protein, das in seinen Eigenschaften einem Apoenzym entspricht. Die enzymatische Aktivität ohne Zusatz von Flavin ist kleiner als 3%, verglichen mit dem Holoenzym. Durch Inkubation mit FMN oder FAD werden etwa 60% der ursprünglichen Gesamtaktivität zurückerhalten. Einzelheiten enthält Tab.3. In Abb.5 ist die Aktivität des unbehandelten Apoenzym in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem Flavin dargestellt. Aus den Meßdaten ergibt sich, daß das Apoprotein etwa 25mal größere Affinität zu FMN besitzt als zu FAD.  $K_M$  für FMN  $0,33 \cdot 10^{-7}$  M, für FAD  $8,5 \cdot 10^{-7}$  M. Daraus kann geschlossen werden, daß FMN die prosthetische Gruppe des Enzyms ist. Die NAD(P)-

H-oxydierenden Flavoproteine aus *Hydrogenomonas* (REFASKE u. LIZOTTE, 1965), *Aerobacter* (BERNOFSKY u. MILLS, 1966), *Bacillus subtilis* (AVIGARD u. LEVIN, 1967) und ebenso die aus *Octopus vulgaris* (DI PRISCO et al., 1967) und Rinderherz (RAO et al., 1963) enthalten ebenfalls FMN als prosthetische Gruppe. In *Mycobacterium phlei* (ASANO u. BRODIE, 1965) und *E. coli* (BRAGG u. HOU, 1967b) sind beide Flavine gefunden worden, wobei FMN die etwas wirksamere Substanz ist. Das Enzym aus Hefe (DUNCAN u. MACKLER, 1966) ist ein FAD-Protein.

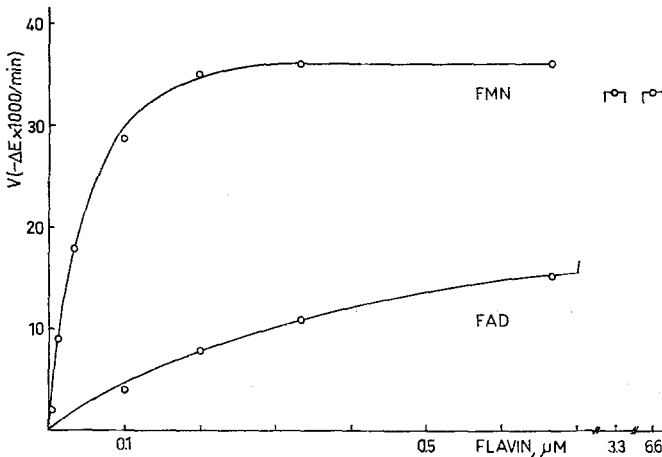


Abb. 5. Die Aktivität von NADH-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Konzentration an FMN und FAD. Testbedingungen siehe „Methoden“. Es wurden 32 μg Enzymprotein zum Test eingesetzt

**9. Stabilität und Inaktivierung des Enzyms.** Die enzymatische Aktivität ist bei Proteinkonzentrationen von 1,1–1,3 mg/ml, wie sie bei der Gelfiltration mit Sephadex erhalten werden, weitgehend stabil. Bei 0°C bleibt die Aktivität mindestens 2 Tage unverändert, bei 20°C nimmt sie in 12 Std um etwa 10% ab. Präparationen mit weniger als 1 mg/ml Protein sind nicht stabil. Bei 0,80 mg/ml Protein z. B. nimmt die enzymatische Aktivität bei 0°C je 24 Std um 20% ab. Wird die Enzymlösung eingefroren, so ist sie nach dem Wiederauftauen nicht mehr stabil, sondern verliert in 24 Std bei 0°C mehr als die Hälfte der Aktivität. 10<sup>-3</sup> M β-Mercaptoäthanol hat in keinem Fall stabilisierenden Einfluß.

Das Enzym wird durch Verdünnung inaktiviert. Abb. 6 zeigt die Kinetik der bei Verdünnung in 0,05 M Puffer eintretenden Inaktivierung. Man sieht, daß die Stärke der Inaktivierung vom Verdünnungsgrad (Kurven 1, 2 und 4) und von der Temperatur (Kurven 1 und 3) abhängen. Sörensenphosphatpuffer in gleicher Konzentration wie Tris-HCl Puffer wirkt stärker inaktivierend (Kurven 1 und 5).

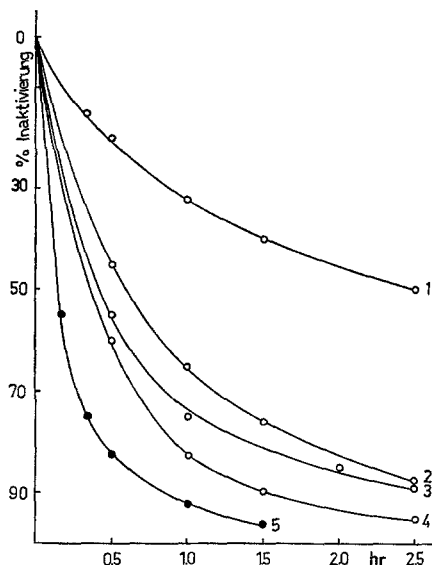


Abb. 6. *Kinetik der Inaktivierung von verdünnter NADH-Dehydrogenase.* Testbedingungen siehe „Methoden“. Abszisse: Inkubationsdauer des Enzyms in verschieden verdünntem Zustand. Kurven 1—4 Verdünnung in 0,05 M Tris-HCl Puffer (7,6); Kurve 5 Verdünnung in 0,05 M Sörensen Phosphatpuffer (7,6). Es bedeuten: 1 1:10, 0°C; 2 1:50, 0°C; 3 1:10, 20°C; 4 1:100, 0°C; 5 1:10, 0°C

Das Enzym kann gegen diese Inaktivierung geschützt werden. In Tab. 4 sind die verschiedenen Substanzen und die wirksamen Konzentrationen zusammengestellt. FMN und FAD schützen noch in Endkonzentrationen von  $10^{-7}$  M vollständig. NADH und NADPH zeigen erst in etwa 100fach höherer Konzentration eine Wirkung. NAD, NADP und Riboflavin sind auch in noch höheren Konzentrationen nur teilweise wirksam, Nicotinsäure schützt nicht. Interessanterweise ist NADPH, obwohl es vom Enzym praktisch nicht umgesetzt wird, trotzdem in der gleichen Konzentration wie NADH wirksam. Man muß daher annehmen, daß NADPH an der aktiven Stelle des Enzyms gebunden, aber nicht umgesetzt werden kann.

Die Verdünnungsinaktivierung besteht in einer Veränderung der aktiven Stelle durch Labilisierung oder Abspaltung des Flavins. Daher ist es verständlich, daß FMN und FAD bereits in sehr geringer Konzentration die Inaktivierung verhindern können. Die Bindung von NADH oder NADPH an der aktiven Stelle bewirkt dort eine Stabilisierung und verhindert so die Veränderung des Flavins. Dieser Vorgang erfordert jedoch höhere Konzentrationen an NADH oder NADPH als sie an FMN oder FAD für eine Stabilisierung notwendig sind (siehe Tab. 4).

Tabelle 4. *Schutzwirkung verschiedener Substanzen gegen die Inaktivierung von NADH-Dehydrogenase bei Verdünnung*

Zusatz		Zeit (min)			
		60	120	180	1080
—		70	80	> 90	—
Nicotinsäure	$10^{-3}$ M	70	85	> 90	—
NAD, NADP	$10^{-3}$ M	5	30	70	—
	$10^{-5}$ M	30	60	85	—
	$10^{-6}$ M	55	75	90	—
NADH, NADPH	$10^{-4}$ M	< 2	—	< 2	< 2
	$10^{-5}$ M	< 2	< 2	< 2	> 90
	$10^{-6}$ M	30	80	—	—
Riboflavin	$10^{-4}$ M	50	75	85	—
FMN, FAD	$10^{-6}$ M	—	< 2	—	< 2
	$10^{-7}$ M	< 2	—	< 2	> 90
	$10^{-8}$ M	35	55	75	—

0,04 ml Enzym (52  $\mu$ g Protein) wurden mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6, der die angegebenen Zusätze enthielt, 1:50 verdünnt und bei 0°C gehalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Bestimmung der Aktivität. Einzelheiten siehe „Methoden“. Die Zahlen bedeuten Prozent Inaktivierung.

Während der Inaktivierung wird das Enzym nach Zusatz von FMN oder FAD aktivierbar. Die Kinetik dieses Vorgangs ist in Abb. 7 dargestellt. Die vorher nur geringe Aktivierbarkeit nimmt nach der Verdünnung des Enzyms in der Cuvette innerhalb kurzer Zeit beträchtlich zu. Im weiteren Verlauf bleibt sie, der Inaktivierung des Enzyms entsprechend, von konstanter Größe. Die Stärke der beschriebenen Aktivierbarkeit des Enzyms ist abhängig von der Menge an zugesetztem Flavin. Wird die niedrigste Konzentration bestimmt, bei der gerade noch maximale Aktivierbarkeit möglich ist, so ergibt sich, daß FMN schon in sehr viel geringerer Konzentration wirksam ist als FAD. Folgende Endkonzentrationen werden in einem Experiment, bei dem das Enzym 1:200 verdünnt, 5 min bei 25°C der Verdünnungsinaktivierung ausgesetzt war, gefunden: FMN  $0,2-0,6 \cdot 10^{-7}$  M, FAD  $6-12 \cdot 10^{-7}$  M. Das bedeutet, daß die jetzt veränderte Stelle im Proteinmolekül eine etwa 20–30fach höhere Affinität zu FMN hat und ist ein weiterer Hinweis auf FMN als prosthetische Gruppe des Enzyms.

Wahrscheinlich ist die Labilisierung oder Abspaltung des Flavins vom Enzymmolekül eine Folge der Wirkung des Puffersystems. Da als eine der möglichen Bindungsarten der Flavine an das Protein ionische Wechsel-

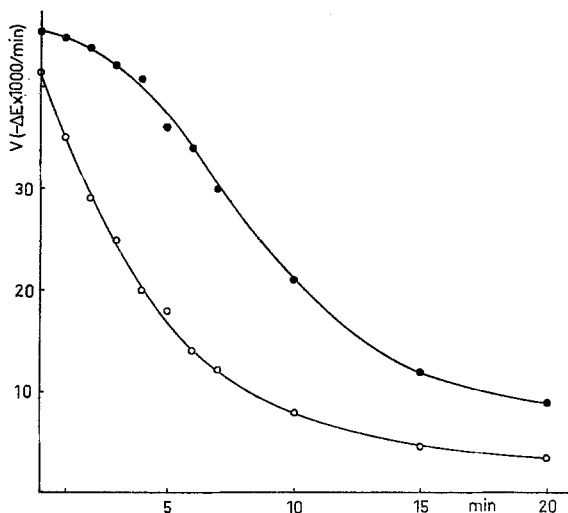


Abb. 7. Die Aktivierbarkeit der NADH-Dehydrogenase durch FMN während der Inaktivierung bei Verdünnung. Testbedingungen siehe „Methoden“. 0,015 ml Enzym (20  $\mu$ g Protein) wurden mit 0,05 M Tris-HCl Puffer (7,6) 1:200 verdünnt und wie auf der Abszisse angegeben bei 25°C inkubiert. Start der Reaktion mit NADH bzw. NADH und FMN in einer Parallelcuvette. Der Zusatz von Menadion erfolgte in allen Fällen 5 min vor dem jeweiligen Start. ○—○ ohne FMN; ●—● mit  $3,3 \cdot 10^{-5}$  M FMN

wirkungen zwischen kationischen Gruppen im Protein und den Phosphatresten der prostethischen Gruppe angenommen werden, ist eine Beeinflussung des Enzyms durch Puffersysteme verständlich. Eine Wirkung dieser Art wird dann zunehmend deutlich, wenn das Enzym in verdünntem Zustand vorliegt. In konzentrierterem Zustand bewirken, da es sich hier nur um eine partiell angereicherte Präparation handelt, wahrscheinlich die übrigen vorhandenen geladenen Proteinmoleküle eine Stabilisierung des Enzymmoleküls. Die Grenzkonzentration ist bei dem untersuchten Enzymprotein ungefähr 1 mg/ml Protein. Unterhalb dieser Konzentration beginnt die Inaktivierung (siehe Beginn dieses Abschnitts).

Mit der Wirkung des Puffersystems ist auch die Inaktivierung des Enzyms bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose ohne Zusatz von FMN oder NADH zu erklären. Durch die bei der Anreicherung stattfindende Abtrennung von Fremdprotein sinkt die Proteinkonzentration auf einen Wert, bei dem das Enzym inaktiviert wird (siehe Tab. 1).

Die Tatsache, daß bei Flavoproteinen die Erhöhung der Ionenstärke zunehmende Abspaltung der prosthetischen Gruppe bewirkt (BEINERT, 1960; SINGER, 1963), läßt mit steigender Pufferkonzentration vermehrte Inaktivierung erwarten. Tab. 5 zeigt die Werte eines solchen Experiments.

Bei einer 20fachen Verdünnung des Enzyms und Inkubation bei 20°C verläuft in vierfach stärkerem Puffer die Inaktivierung mehr als doppelt so schnell.

Tabelle 5. *Inaktivierung von NADH-Dehydrogenase bei Verdünnung in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration*

Dauer der Inkubation (min)	Aktivität	
	0,05 M Tris-HCl	0,2 M Tris-HCl
0	2,63	2,65
5	2,08	1,36
10	1,68	0,54
20	1,19	0,01

0,1 ml Enzym (130 µg Protein) wurden mit 0,05 M bzw. 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 1:20 verdünnt und bei 20°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten erfolgte die Aktivitätsbestimmung. Einzelheiten siehe „Methoden“.

Tabelle 6  
*Inaktivierung von NADH-Dehydrogenase durch Testpuffer verschiedener Stärke*

Puffer pH 7,6	0,05 M		0,3 M	
	— FMN	+ FMN	— FMN	+ FMN
Sörensenphosphat	60	30	90	45
Tris-HCl	15	< 2	75	30
Tra-HCl	15	< 2	60	25
Glycylglycin	10	< 2	30	—

Einzelheiten siehe „Methoden“. Die Zahlen bedeuten Prozent Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit im optischen Test zwischen der 1. und der 10. min. FMN:  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M.

In Gegenwart höher konzentrierter Puffer sind weder das Substrat noch FMN in der Lage, die enzymatische Aktivität vor Inaktivierung zu schützen. Tab. 6 zeigt die Abnahme der Aktivität in verschieden starken Testpuffern im Standardtest, bei dem das Enzym jeweils 150–200fach verdünnt wird. Es ist also bereits bei der für alle Experimente verwendeten Konzentration von 0,05 M eine Inaktivierung vorhanden. Diese tritt während der zehnminütigen Meßdauer jedoch nur bei Verwendung von Phosphatpuffer stark in Erscheinung. In 0,3 M Puffer verhindert die Gegenwart von  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M FMN in der Cuvette teilweise eine Inaktivierung. Durch höhere FMN-Konzentrationen (bis  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M getestet) ist dort das Enzym zunehmend stabilisierbar. NADH, das bei 0,05 M Puffer in der Konzentration des Routinetests von  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M das Enzym

fast vollständig schützen kann, zeigt bei Puffern höherer Stärke erst in größerer Menge eine schützende Wirkung. Beispielsweise ergeben beim Test in 0,3 M Tris-HCl Puffer (7,6)  $5 \cdot 10^{-4}$  M bzw.  $7,5 \cdot 10^{-4}$  M NADH nur 47% bzw. 30% Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten 10 min, verglichen mit 75% Rückgang bei  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M NADH.

Die Aktivität geht jedoch in allen Fällen auf Null zurück. Diese Tatsache macht eine Hemmung des Enzyms, wie sie z.B. bei *E. coli* durch Phosphationen beobachtet wurde (BRAGG, 1965), unwahrscheinlich. Die Berechnung der jeweiligen Gesamtextinktionsänderung ergibt, daß bei der eingesetzten Enzymmenge in keiner der Proben Substratmangel die Ursache für die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ist.

Tabelle 7. *Inaktivierung von NADH-Dehydrogenase durch Metalle*

zugesetzte Substanz		% Inaktivierung	
—		20° C	5
MgCl <sub>2</sub>	$2 \cdot 10^{-3}$ M	0° C	10
	$4 \cdot 10^{-3}$ M		45
MgCl <sub>2</sub>	$2 \cdot 10^{-3}$ M	20° C	65
	$4 \cdot 10^{-3}$ M		90
CoCl <sub>2</sub>	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M	20° C	40
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	$1 \cdot 10^{-3}$ M	20° C	65

1 ml Enzym (1,3 mg Protein) wurden mit den verschiedenen Metallen in der angegebenen Konzentration 6 Std bei 0° C bzw. 20° C gehalten. Hierauf erfolgte Messung der Aktivität. Einzelheiten siehe „Methoden“.

Verschiedene Metalle inaktivieren das Enzym. Eine Zusammenstellung zeigt Tab. 7. Ohne Wirkung sind: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Mn<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup> und Cu<sup>++</sup>. Der Zusatz von  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M FMN zur Inkubation schützt das Enzymprotein vor der Inaktivierung. Dialyse einer mit  $2 \cdot 10^{-3}$  M MgCl<sub>2</sub> bei 20° C etwa 50% inaktivierten Probe zur Entfernung der Metallionen und anschließende Inkubation des Dialysates mit  $6,7 \cdot 10^{-5}$  M FMN (90 min 20° C) ergibt praktisch keine Steigerung der Aktivität, verglichen mit der nichtinkubierten Kontrolle. Daher kann man für die Wirkung der Metalle einen anderen zur Inaktivierung des Enzyms führenden Mechanismus als den der Labilisierung oder Abspaltung der prosthetischen Gruppe annehmen.

Herrn Professor Dr. G. DREWS danke ich für sein Interesse an der Arbeit. Besonders gedankt sei Frl. U. BEHRENS für interessierte und zuverlässige Mitarbeit. Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

## Literatur

- ASANO, A., and A. F. BRODIE: The properties of the non-phosphorylative electron-transport bypass enzymes in *Mycobacterium phlei*. Biochem. biophys. Res. Commun. **19**, 121—126 (1965).
- AVIGARD, G., and N. LEVIN: Reduced nicotinamide dinucleotide phosphate diaphorase from *Bacillus subtilis*. European J. Biochem. **1**, 102—109 (1967).
- BEINERT, H.: Flavin Coenzymes. In: BOYER, P. D., H. LARDY, and K. MYRBÄCK: The Enzymes, 2nd Ed., Vol. 2, pp. 339—414. New York-London: Acad. Press 1960.
- BERNOFSKY, C., and R. C. MILLS: Diaphorases from *Aerobacter aerogenes*. J. Bact. **92**, 1404—1414 (1966).
- BRAGG, P. D.: Purification and properties of menadione reductase of *Escherichia coli*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **96**, 263—271 (1965).
- , and C. HOU: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidation in *Escherichia coli* particles. I. Properties and cleavage of the electron transport chain. Arch. Biochem. **119**, 194—201 (1967 a).
- — Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidation in *Escherichia coli* particles. II. NADH Dehydrogenases. Arch. Biochem. **119**, 202—208 (1967 b).
- DI PRISCO, G., L. CASOLA, and A. GIUDITTA: Purification and properties of a soluble reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) dehydrogenase from the hepatopancreas of *Octopus vulgaris*. Biochem. J. **105**, 455—460 (1967).
- DREWS, G.: Untersuchungen zur Regulation der Bakterienchlorophyll-Synthese bei *R. rubrum*. Arch. Mikrobiol. **51**, 186—198 (1965 a).
- Die Isolierung schwefelfreier Purpurbakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. Suppl. Heft 1, 170—178 (1965 b).
- DUNCAN, H. M., and B. MACKLER: Electron transport system of yeast. II. Purification and properties of a soluble DPNH dehydrogenase. Biochemistry **5**, 45—50 (1966).
- HEINEN, W., M. KUSUNOSE, E. KUSUNOSE, D. S. GOLDMAN, and M. J. WAGNER: Properties and origin of DPNH diaphorase from *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Biochem. **104**, 448—457 (1964).
- KASHKET, E. R., and A. F. BRODIE: Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. X. Different roles for the natural quinones of *Escherichia coli* W in oxidative metabolism. J. biol. Chem. **238**, 2564—2570 (1963).
- KANIUGA, Z., and A. GARDAS: Isolation of high-molecular-weight NADH dehydrogenase of the respiratory chain by diethyl-Triton-X-100 treatment. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **143**, 647—650 (1967).
- KING, T. E., R. L. HOWARD, J. KETTMAN, B. M. HEGDEKAR, M. KUBOYAMA, K. S. NICKEL, and E. A. POSSEHL: Comparison of soluble NADH dehydrogenases from the respiratory chain of cardiac mitochondria. In: Flavins and Flavoproteins, edit. by E. C. SLATER, pp. 441—480, s. Tab. 1, p. 443, BBA Library, Vol. 8. Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Comp. 1966.
- LOWRY, O. H., M. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. **193**, 265—275 (1951).
- MACKLER, B.: The DPNH dehydrogenase of the electron transport particle systems of heart muscle and yeast. In: Flavins and Flavoproteins, edit. by E. C. SLATER, pp. 427—440, BBA Library, Vol. 8. Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Comp. 1966.
- REPASKE, R., and C. L. LIZOTTE: The electron transport system of *Hydrogenomonas eutropha*. II. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-menadione reductase. J. biol. Chem. **240**, 4774—4779 (1965).



- RAO, N. A., S. P. FELTON, F. M. HUENNEKENS, and B. MACKLER: Flavinmononucleotide: the coenzyme of DPNH dehydrogenase. *J. biol. Chem.* **238**, 449—455 (1963).
- SINGER, T. P.: Flavoprotein dehydrogenase of the electron transport chain (survey). In: BOYER, P. D., H. LARDY and K. MYRBÄCK: *The Enzymes*, 2nd Ed., Vol. 7, pp. 345—381. New York-London: Acad. Press 1963.
- WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: Isolierung der prosthetischen Gruppe der D-Aminosäureoxydase. *Biochem. Z.* **298**, 150—168 (1938).
- — Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* **310**, 384—421 (1941).
- WORCEL, A., and D. S. GOLDMAN: Stereospecificity of the allosteric NADH dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem.* **118**, 420—423 (1967).

Dr. M. BOLL  
Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität  
Labor II  
78 Freiburg i. Br., Stübeweg 51