

Diss ETH 6311

ANWENDUNG VON ZIRKULARDICHROISMUS UND FLUORESZENZ-
SPEKTROSKOPIE FUER DIE UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG
ZWISCHEN PFERDELEBER ALKOHOLDEHYDROGENASE UND LIGANDEN

A B H A N D L U N G

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

REGULA JOPPICH-KUHN

dipl. Chem. ETH

geboren am 20. Juli 1951

von Degersheim SG

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. D. Arigoni, Referent

Prof. Dr. P.L. Luisi, Korreferent

1979

7. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die CD-Eigenschaften des Apoenzyms LADH wurden in wässriger Lösung untersucht. Aus dem CD-Spektrum des Bereiches im tiefen UV wurden die Sekundärstrukturanteile des Enzyms berechnet und im Vergleich zu den Daten der Röntgenstrukturanalyse diskutiert.
- 2) Die CD-Feinstrukturbanden des Apoenzyms konnten den einzelnen Typen der aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) zugeordnet werden. Der Vergleich der Änderungen in diesem Bereich, einerseits bei Variation des pH, andererseits bei der Bindung von NAD in Anwesenheit des Inhibitors Trifluoräthanol, ergab Hinweise auf eine coenzyminduzierte Konformationsänderung des Enzyms und ermöglichte es, die in der Literatur vorgeschlagene Hypothese, dass bei der Bindung von Coenzym ein Tyrosin deprotoniert wird zu widerlegen.
- 3) Dass die Bindung von NAD oder NADH an LADH eine Konformationsänderung des Enzyms induziert, konnte auch aus der Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften des LADH·NAD- und LADH·NADH-Komplexes abgeleitet werden. Sowohl Fluoreszenz- als auch CD-Untersuchungen ergaben übereinstimmend, dass Tryptophanreste von LADH von dieser Konformationsänderung betroffen werden.
- 4) Die Analyse der Fluoreszenzeigenschaften des Apoenzyms ermöglichte die Separierung der Fluoreszenzbeiträge der beiden Tryptophanreste in LADH. Danach zu schliessen befindet sich ein Tryptophanrest im hydrophoben Inneren, der andere nahe der Enzymoberfläche, aber nicht vollständig solvatisiert durch die umgebende Lösung. Diese

Interpretation wurde als konsistent mit den Resultaten der Röntgenstrukturanalyse erachtet.

- 5) Bindungsstudien zeigten, dass weder mit Benzamid und Isobutyramid in Anwesenheit von NADH, noch mit Vitamin-A-Säure ein kooperatives Bindungsverhalten an LADH vorliegt, und dass gegenteilig lautende Berichte in der Literatur auf Artefakte zurückzuführen waren.
- 6) Die spektroskopischen Eigenschaften der Coenzymanaloge sNAD und sNADH und deren Mononukleotide in Wasser und Aethanol/Wasser-Lösung wurden untersucht. Dadurch konnte eine qualitative Unterscheidung gemacht werden zwischen Coenzymbanden, welche auf Konformationsänderungen empfindlich sind und solchen, die auf Lösungsmitteländerungen reagieren.
- 7) Aufgrund der detaillierten Untersuchungen der freien thio-Coenzyme war eine Interpretation der spektroskopischen Veränderungen, die durch die Bindung der Coenzymanaloge an LADH oder durch die zusätzliche Bindung eines Inhibitors verursacht werden, möglich.

Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von Isobutyramid zum LADH·sNADH-Komplex eine Änderung der Wechselwirkung des gebundenen Coenzym oder/und eine Konformationsänderung desselben mit sich bringt. Basierend auf Resultaten aus Röntgenstrukturanalysen mit anderen Coenzymanalogen konnten die abnormalen spektroskopischen Eigenschaften des gebundenen sNAD in Anwesenheit von Trifluoräthanol interpretiert werden. Die aus CD- und Fluoreszenzstudien abgeleiteten Bindungseigenschaften ergaben zusammen mit den kinetischen Untersuchungen ein einheitliches Bild des Verhaltens der thio-Coenzyme mit LADH.

- 8) Das systematische Vorgehen bei der Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften ermöglichte eine kritische Beurteilung der Aussagekraft der angewandten Methoden bezüglich Informationen über Struktur und strukturelle Aenderungen eines Proteins und seiner Komplexe in Lösung.

Abstract

UV absorption, circular dichroism and fluorescence properties of horse liver alcohol dehydrogenase and its complexes with different ligands have been investigated, in order to obtain information about the structure of the enzyme in solution and about structural changes following the binding of ligands. The results have been discussed based on recent x-ray data for the enzyme.

Based on the far UV region of the CD spectrum, the secondary structure of the apoenzyme has been estimated. The highly resolved near UV region has been discussed in terms of the contribution of the aromatic amino acid residues. Based on the comparison of the CD fine structure of the apoenzyme at alkaline pH and in the presence of NAD and trifluoroethanol, it was possible to exclude the hypotheses from the literature that coenzyme binding induces the deprotonation of a tyrosin residue. But the spectrum of the same complex indicated a coenzyme-induced conformational change of the enzyme which involves tryptophan residues of the enzyme. In agreement with these results, the same conclusion was obtained from fluorescence studies of binary enzyme-coenzyme complexes. In addition, the analysis of the corrected fluorescence properties of the apoenzyme permitted an identification of the contribution of each of the two tryptophans to the total enzyme fluorescence. In agreement with x-ray data, one tryptophan could be located in the hydrophobic interior, the second one near the protein surface.

Binding studies demonstrated that neither benzamide or isotyramide in presence of NADH nor vitamin A acid show cooperative binding to horse liver alcohol dehydrogenase, contradicting earlier reports in the literature.

Special attention has been devoted to the spectroscopic properties of the coenzyme analogs sNAD and sNADH free in

solution and bound to the enzyme. Dissociation constants of the thio-coenzymes from different complexes have been determined from the quenching of the enzyme's fluorescence following coenzyme binding. Based on extensive investigations of the spectroscopic properties of sNAD, sNADH and the mononucleotide mixtures resulting from enzymatic cleaving of the dinucleotides in different solvent systems, a detailed analysis of the spectroscopic properties of the thio-coenzymes bound to the enzyme has been presented.

In particular, a change of the specific interaction of the bound sNADH with functional groups of the active site and/or a conformational change of the bound sNADH following isobutyramide binding has been detected. Based on recent x-ray data for enzyme-coenzyme complexes, also the anomalous spectroscopic properties of the bound sNAD in the presence of trifluoroethanol have been interpreted. The binding properties deduced from CD and fluorescence studies are consistent with kinetic results observed for horse liver alcohol dehydrogenase with thio-coenzymes.

This systematic investigation of the spectroscopic properties was used to examine critically the inherent limits of the methods employed in getting information about structure and structural changes of a protein and its complexes in solution.