

Diss. ETH 5559

**Presteady-state-kinetische Untersuchung der
Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber:
Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten
einzelner Reaktionsschritte**

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
FELIX K. MEIER
dipl. Chem. ETH
geboren am 2. Dezember 1948
von Mettendorf und Frauenfeld (Kt. Thurgau)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. V. Prelog, Referent
PD Dr. H. Dutler, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich
1975

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die von Neumann [3] beschriebene Methode zur Stopped-Flow-Analyse der durch die Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber katalysierten Oxydation von Alkoholen mit NAD und Reduktion von Ketonen bzw. Aldehyden mit NADH wurde erweitert, modifiziert und in ihrer Aussagekraft wesentlich verbessert. Durch geeignete Wahl der Substratkonzentrationen sowie durch entsprechendes Vormischen von Enzym und Coenzym liess sich der Reaktionsablauf anhand von Teilmodellen untersuchen.
2. Es wurde ein Computerprogramm entwickelt, welches die Simulation des Reaktionsablaufs anhand von Reaktionsmodellen mit bis zu neun enzymhaltigen Zentren auf einem digitalen Kleincomputer (PDP-8E) im "on-line"-Verfahren gestattet. Die Experimente wurden ausgewertet, indem die simulierten Kurven mit den experimentellen Reaktionskurven durch Variation der Geschwindigkeitskonstanten zur Deckung gebracht wurden. Als Ausgangspunkt dienten dabei die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation von Enzym und Coenzym und die Dissoziation der binären Enzym-Coenzym-Komplexe, sowie die Extinktionskoeffizienten der einzelnen enzymhaltigen Spezies, welche von Hadorn [4] im Rahmen seiner Dissertation bestimmt worden sind.
3. Das BZAL-BZOL-System wurde anhand des von Dalziel und Dickinson [12] vorgeschlagenen Siebenzentrenmodells untersucht, welches eine befriedigende Erklärung sämtlicher Stopped-Flow-Experimente zuließ. Mit Hilfe der Isotopeneffekte auf die Geschwindigkeit der Wasserstoffübertragung gelang es, bis auf die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von Enzym und BZOL und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante für $E \cdot BZOL$, sämtliche Geschwindigkeitskonstanten für die im Modell vorkommenden Reaktionsschritte zu bestimmen.
4. Zur Untersuchung des CHON-CHOL-Systems wurde ein vollständig erweitertes Neunzentrenmodell mit beliebiger Assoziationsfolge

von Coenzym und Substrat verwendet. Mit diesem Modell konnte eine gute Uebereinstimmung sämtlicher simulierter und experimenteller Reaktionskurven erzielt werden. Insbesondere konnten auch die in der Arbeit von Neumann [3] zu Widersprüchen führenden Experimente mit Produktsubstratzusatz befriedigend erklärt werden. Es gelang, die wichtigsten Geschwindigkeitskonstanten - einschliesslich derjenigen für die Wasserstoffübertragung - sowie die Dissoziationskonstanten sämtlicher enzymhaltiger Spezies eindeutig zu bestimmen.

5. Es wurden keine Hinweise auf ein nichtäquivalentes Verhalten der beiden Untereinheiten des Enzyms gefunden, wie dies von verschiedenen Arbeitsgruppen [20-25] postuliert worden ist.
6. Das Verfahren zur Isolierung der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber wurde modifiziert und verbessert. Die von Neumann [3] eingeführte Chromatographie an Hydroxylapatit wurde durch eine Kristallisation des Enzyms durch Dialyse gegen Aethanol [8] und Chromatographie an Whatman-CM-Cellulose [43] ersetzt. Dadurch erhielt man elektrophoretisch reines und stabiles EE-Isoenzym in guter Ausbeute, welches in kristallinem Zustand über längere Zeit lagerfähig war.

5. ABSTRACT

An improved method is described for the investigation of the liver-alcohol-dehydrogenase-catalysed oxydation of alcohol by NAD and reduction of keton or aldehyde by NADH. Stopped-flow reaction curves were evaluated by numerical adaptive simulation on a small computer system (PDP-8E).

The substrate pair benzaldehyde-benzyl alcohol was studied on the basis of a seven-center reaction mechanism with random sequence of addition of NAD and alcohol and ordered sequence of addition of NADH and aldehyde. It was possible to determine the rate constants for the individual reaction steps and the deuterium isotope effects on the hydrogen transfer.

To evaluate the experiments with cyclohexanone-cyclohexanol the above reaction mechanism was extended to allow randomness in the sequence of association of NADH and ketone also. The rate constants of some reaction steps and the dissociation constants for all enzyme containing species were determined and good agreement between the simulated and the experimental reaction curves was obtained.

No evidence was found indicating a non-equivalent behaviour of the active sites, as has been postulated by various authors [20-25].