

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Enzymen

Von Priv.-Doz. Dr. GERHARD PFLEIDERER

Biochemische Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

Versuche, den Mechanismus enzym-katalysierter Reaktionen aufzuklären, stoßen auf große experimentelle Schwierigkeiten: Enzyme sind hochmolekulare Proteine, deren Aminosäure-Sequenz noch weitgehend unbekannt ist. Sie sind empfindlich gegen chemische Reagentien und lassen sich nur selten selektiv an den aktiven Zentren chemisch verändern.— Etwas einfacher wird das Problem, wenn niedermolekulare Coenzyme an der Katalyse beteiligt sind, die sich z. B. durch Einführung neuer Substituenten so abwandeln lassen, daß aus der noch verbleibenden enzymatischen Aktivität oder durch die Aufnahme von Spektren Schlüsse auf den Reaktionsmechanismus möglich werden. Gelegentlich geben Modellreaktionen Hinweise, doch sind solche Fälle selten.

Einleitung

Wohl kaum ein Zweig der Naturwissenschaften hat in den letzten Jahrzehnten eine derartig stürmische Entwicklung durchlaufen, wie die Biochemie. Zahllose Stoffwechselvorgänge wurden entdeckt, Reaktionsfolgen aufgeklärt und die sie katalysierenden Enzyme untersucht. Mit zunehmender Zahl der zur Verfügung stehenden reinen Enzymproteine wuchs die Möglichkeit, den Mechanismus der enzymatischen Reaktion zu studieren. Wie gering unsere Kenntnisse hierüber heute noch sind, sollen die folgenden Ausführungen zeigen. Sie beschränken sich auf Untersuchungen an Enzymen und solchen niedermolekularen Substanzen, die mit prosthetischen Gruppen oder Coenzymen entweder identisch oder chemisch nahe verwandt sind. Nicht erwähnt werden rein spekulative Betrachtungen oder Modellreaktionen, wie sie z. B. Langenbeck¹⁾ mit großem Erfolg seit vielen Jahren angestellt hat. Langenbecks Enzymmodelle bewirken zwar analoge Substrat-Umsetzungen, ihre chemische Konstitution hat aber meist keine direkte Beziehung zu den Wirkgruppen der Enzyme.

Zum allgemeinen Verständnis sei kurz in Erinnerung gerufen, daß Enzyme Proteine sind, durch die alle chemischen Prozesse in der lebenden Zelle katalysiert werden. Schon geringste Störungen im harmonischen Zusammenwirken der vielfältigen Enzymsysteme können zu Krankheit oder gar zum Erlöschen des Lebens führen. Die katalytische Wirkung eines Enzyms beginnt mit der Anlagerung der Reaktionspartner an bestimmte Bezirke der Enzymoberfläche, wodurch die reagierenden Gruppen in Nachbarschaft zueinander gebracht werden²⁾ und eine Aktivierung, z. B. eine Polarisierung von Bindungen im Substrat oder Coenzym, bewirkt wird. Der außerordentlich große Einfluß eines „Nachbarschaftseffektes“ auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde vor Jahren u. a. von Th. Wieland und Mitarb. z. B. bei kinetischen Untersuchungen zur aminolytischen Spaltung von S-Acylcystein-Verbindungen erkannt.

Eine wichtige Eigenschaft der Enzyme ist ihre Spezifität hinsichtlich

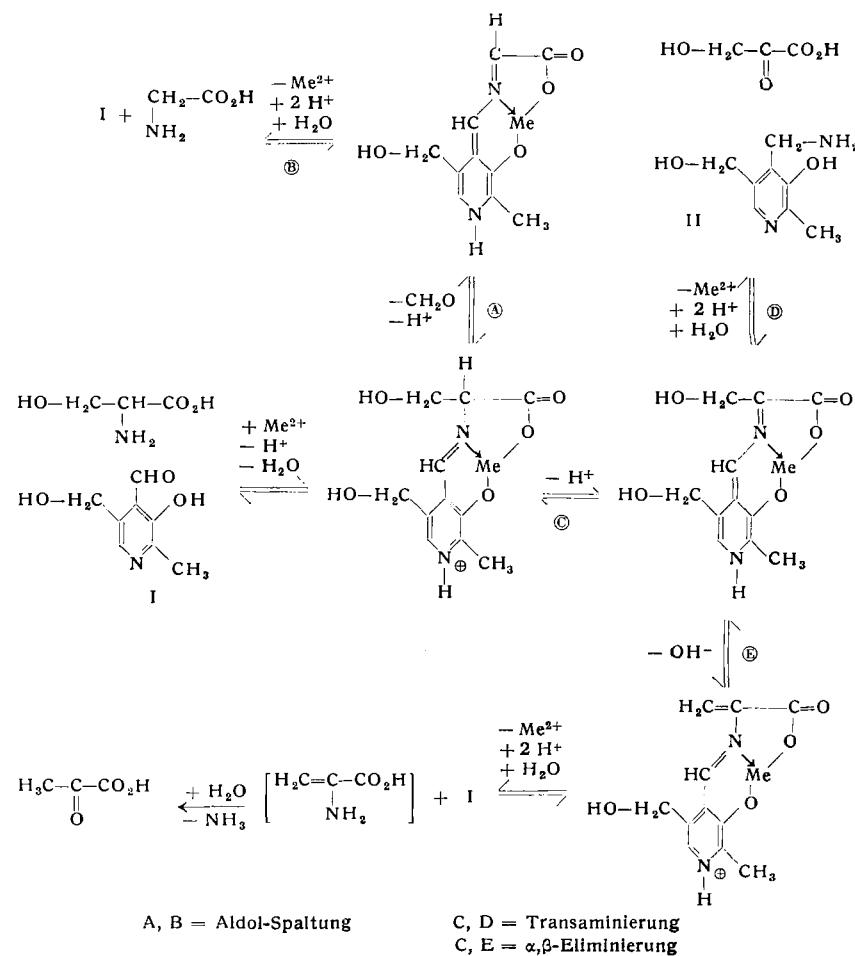
der zu katalysierenden Reaktion und der Reaktionspartner. Sie ist jedoch meistens nicht absolut, d. h. vielfach werden mehrere chemisch ähnliche Substanzen umgesetzt.

Natürlich mußte den Chemiker die Frage reizen, wie die Natur imstande ist, chemische Reaktionen, die im Laboratorium die Anwendung von Druck und erhöhter Temperatur erfordern, bei Körpertemperatur zum Ablauf zu bringen. Es war naheliegend, zu versuchen, durch Modellsubstanzen Hinweise auf den Reaktionsmechanismus zu gewinnen. In einigen Fällen ist dies auch gelungen.

Modellreaktionen

Pyridoxal

So konnten Snell und Mitarb. auf Grund von Modellversuchen zur enzymatischen Transaminierung den Reaktionsmechanismus deuten, bevor neuerdings erste Anhaltspunkte für die Bildung einer Schiffsschen Base am Coenzym der Glutamat-Aspartat-Transaminase entdeckt wur-



¹⁾ W. Langenbeck, Advances in Enzymol. 14, 163 [1953].

²⁾ Vgl. Th. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang u. H. Lau, Liebigs Ann. Chem. 583, 141 [1953].

A, B = Aldol-Spaltung

C, D = Transaminierung

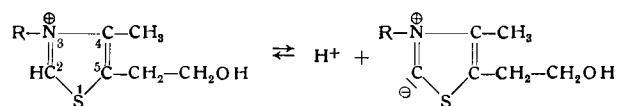
C, E = α,β -Eliminierung

den³⁻⁵). Snell konnte zeigen, daß in Gegenwart von Al^{3+} , Fe^{2+} oder Cu^{2+} Glutamat beim Erhitzen seiner wäßrigen Lösung mit Pyridoxal (I), dem wesentlichen Bestandteil der prosthetischen Gruppe von Transaminasen, in α -Ketoglutarat überführt wird, wobei sich Pyridoxamin (II) bildet. Snells Mechanismus, der auch andere durch Pyridoxal-5-phosphat katalysierte Reaktionen, wie Aldolspaltung, Racemisierung oder α,β -Eliminierung, erklärt, sieht die Bildung eines Chelats zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure und der Hydroxylgruppe des Pyridoxals vor⁶) (s. Schema S. 160).

Bisher war fraglich, ob auch bei der enzymatischen Katalyse ein Metall beteiligt ist. Wir haben neuerdings an hochgereinigter Glutaminsäure-Alanin-Transaminase aus Schweineherz eine starke Hemmung der Aktivität durch α -Phenanthrolin beobachten können, was für eine Beteiligung von Metall-Ionen spricht⁷⁾.

Thiamin

Ein anderer Modellversuch brachte Hinweise auf den Mechanismus der enzymatischen Decarboxylierung. Thiamin, das entphosphorylierte Coenzym der Carboxylase, kann bei Zimmertemperatur und nahezu neutralem p_H ähnlich wie das Enzym katalytisch Brenztraubensäure decarboxylieren, Acetaldehyd und Brenztraubensäure zu Acetoin kondensieren, sowie Diacetyl und Acetaldehyd zu Acetat und Acetoin umsetzen⁸⁻¹⁰). Breslow hat verschiedene Stellen des Thiamins chemisch verändert und gezeigt, daß das Substrat an das C-Atom 2 des Thiazol-Ringes angelagert wird¹¹), denn sobald dieses C-Atom substituiert wird, verschwindet die katalytische Fähigkeit des Thiamins. Der „aktive Acetaldehyd“ ist demnach 2-(α -Hydroxyäthyl)-thiamin^{12, 13}). Nach Breslow ist die Reaktionsfähigkeit dieses C-Atoms auf die Ausbildung einer Zwitterionen-Struktur im Thiazol-Ring zurückzuführen.

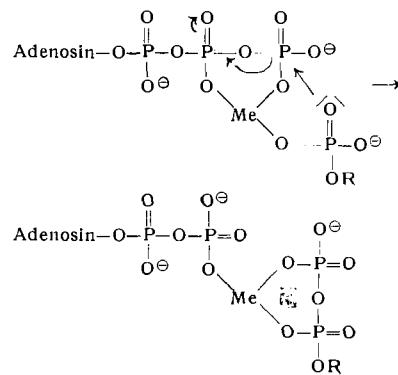


Franzen hat den Mechanismus der Glyoxalase-I-Reaktion¹⁴) ebenfalls durch Einschaltung von Modellen aufklären können. Die enzymatische Reaktion besteht in einer intramolekularen Disproportionierung des Methylglyoxals zu α -Milchsäure mit Glutathion als Coenzym. Franzen konnte zeigen, daß die Reaktion nicht enzymatisch durch N-Dialkyl-cysteamin katalysiert wird und vermutet, daß in analoger Weise auch in der Wirkgruppe des Enzyms eine basische Aminosäure die katalytische Funktion ausübt¹⁵). Auch ein Beispiel einer nicht-enzymatischen Wasserstoff-Übertragung unter Beteiligung eines Coenzymes ist bekannt geworden. Needham und Mitarb. entdeckten die Oxydation von Glycerinaldehyd durch Diphospho-pyridin-nucleotid (DPN) bei p_H 8,5¹⁶). O. Warburg gelang dieselbe Reaktion sogar bei p_H 7,5 in Phosphatpuffer¹⁷).

- ³⁾ D. E. Metzler, M. Ikawa u. E. E. Snell, J. Amer. chem. Soc. 76, 648 [1954].
- ⁴⁾ J. B. Longenecker u. E. E. Snell, ebenda 79, 142 [1957].
- ⁵⁾ W. T. Jenkins u. I. W. Sizer, ebenda 79, 2655 [1957].
- ⁶⁾ D. S. Hoare u. E. E. Snell, Proc. Internat. Symp. Enz. Chem. Tokio u. Kyoto, Pergamon Press, London 1957, S. 142.
- ⁷⁾ L. Grein u. G. Pfleiderer, Biochem. Z. 330, 433 [1958].
- ⁸⁾ S. Mizuhara u. P. Handler, J. Amer. chem. Soc. 76, 571 [1954].
- ⁹⁾ E. Yatko-Manzo, F. Roddy, R. G. Yount u. D. E. Metzler, J. biol. Chemistry 234, 733 [1959].
- ¹⁰⁾ R. G. Yount u. D. E. Metzler, ebenda 234, 738 [1959].
- ¹¹⁾ R. Breslow, J. Amer. chem. Soc. 79, 1762 [1957]; 80, 3719 [1958].
- ¹²⁾ L. O. Krampitz, G. Greull u. I. Suzuki, Fed. Proc. 18, 1050 [1959]; R. Breslow u. E. McNelis, J. Amer. chem. Soc. 81, 3080 [1959].
- ¹³⁾ H. Holzer u. K. Beaucamp, Angew. Chem. 71, 776 [1959].
- ¹⁴⁾ E. Racker, J. biol. Chemistry 190, 685 [1951].
- ¹⁵⁾ V. Franzen, Chem. Ber. 88, 1361 [1955]; 89, 1020 [1956].
- ¹⁶⁾ D. M. Needham, L. Siminovitch u. S. M. Rapkin, Biochem. J. 49, 113 [1951].
- ¹⁷⁾ O. Warburg, H. Klotz u. K. Gaweihn, Z. Naturforsch. 9b, 391 [1954].

Phosphat-Übertragung

Schließlich ist neuerdings auch das Modell für eine Phosphatübertragung beschrieben worden. Lowenstein konnte in Gegenwart von Mn^{2+} bei Zimmertemperatur und p_H 9 aus Adenosin-triphosphat (ATP) und anorganischem Phosphat Pyrophosphat und Adenosin-diphosphat gewinnen¹⁸⁾. Hierbei wird der elektrophile Charakter des endständigen Phosphoratoms durch Chelatbildung erhöht und dadurch die nucleophile Anlagerung des Phosphat-Sauerstoffs ermöglicht. Als Phosphat-Aczeptoren können auch Carbonsäuren dienen¹⁹⁾.



Diese wenigen Modellreaktionen, die analog den Enzymprozessen verlaufen, sind Ausnahmefälle. Die meisten Enzymreaktionen lassen sich nicht mit Modellen imitieren, besonders wenn sie ohne Beteiligung niedermolekularer Coenzyme ablaufen. Welche Möglichkeiten bestehen nun, um trotzdem Hinweise auf den Wirkungsmechanismus zu erhalten? Im Rahmen dieser Arbeit steht die chemische Betrachtungsweise im Vordergrund. Es sei aber betont, daß auch aus kinetischen Daten oder aus der p_H -Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit auf die Reaktionsfolge und auf die Art der funktionell wichtigen Gruppen im Eiweißmolekül geschlossen werden kann.

Untersuchungen mit Coenzymen und Substraten

DPN-Analoga

Bei den Dehydrogenasen handelt es sich bis auf die 3-Phospho-glycerinaldehyd-Dehydrogenase um Enzyme, die ihre Coenzyme (Diphospho-pyridin-nucleotid, DPN, bzw. Triphospho-pyridin-nucleotid, TPN) leicht abdissoziieren. Sie katalysieren den ersten Schritt der biologischen Oxydation, wobei der Wasserstoff vom Substrat auf das Coenzym übertragen wird. Dieser Prozeß kann mittels der optischen Methode von O. Warburg bequem verfolgt werden. Sie beruht darauf, daß während der Hydrierung des Coenzymes bei $340 \mu\text{m}$ ein neues Absorptionsmaximum entsteht (Abb. 1). Verfolgt man also bei dieser Wellenlänge die Zu- oder Abnahme der Lichtabsorption, so hat man wegen der streng stöchiometrischen Reaktion zwischen Substrat und Coenzym ein exaktes Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Arbeitsgruppe von Westheimer und Vennesland konnte mit deuterierten Substraten zeigen²⁰⁾, daß das Wasserstoff-Atom direkt vom Substrat auf das C-Atom 4 im Nicotinamid-Teil des Coenzymes übertragen²¹⁾ und dabei je nach Spezifität der Dehydrogenase oberhalb oder unterhalb der Pyridin-Ring-Ebene angelagert wird

- ¹⁸⁾ J. M. Lowenstein, Biochem. J. 70, 222 [1958].
- ¹⁹⁾ J. M. Lowenstein, Biochem. biophysica Acta 28, 206 [1958].
- ²⁰⁾ F. H. Westheimer, H. F. Fisher, E. E. Conn u. B. Vennesland, J. Amer. chem. Soc. 73, 2403 [1951]; H. F. Fisher, E. E. Conn, B. Vennesland u. F. H. Westheimer, J. biol. Chemistry 202, 687 [1953].
- ²¹⁾ M. E. Pullmann, A. San Pietro u. S. P. Colowick, ebenda 206, 129 [1954].

(α - und β -Form)²²). 1938 hat Meyerhof die Anlagerung von Sulfit- und Cyanid-Ionen an DPN entdeckt²³). Auch hierbei entsteht eine Dihydropyridin-Konfiguration mit der

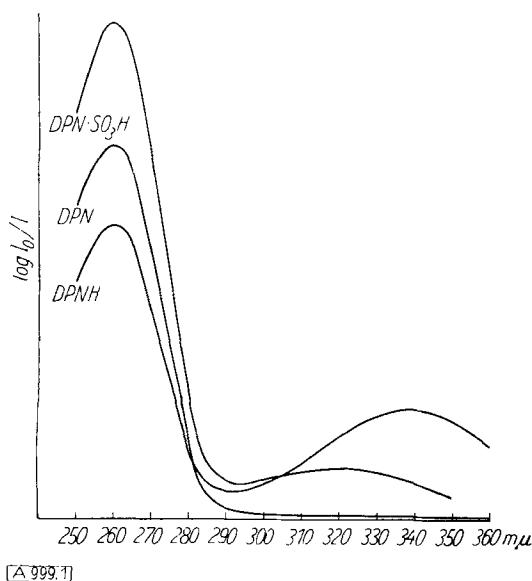


Abb. 1. Absorptionsspektren von Diphospho-pyridin-nucleotid (DPN), hydriertem Diphospho-pyridin-nucleotid (DPNH) und der Diphospho-pyridin-nucleotid-Sulfit-Additionsverbindung (DPN·SO₃H)

charakteristischen Lichtabsorption im Gebiet von 320 bis 360 m μ (Abb. 1). Die Reaktion entwickelt sich aus einer mesomeren Grenzstruktur des Nicotinamids heraus, die in 4-Stellung eine Elektronenlücke aufweist. Den ausführlichen Untersuchungen Kaplans ist es zu verdanken, daß wir über den Einfluß verschiedener Substituenten in 3-Stellung des Pyridin-Rings sowohl auf die chemische

Auch der Arbeitskreis von Wallenfels²⁶) hat in den letzten Jahren durch die Synthese zahlreicher Modellsubstanzen (vor allem N(1)-2,6-Dichlorbenzyl-Derivate substituierter Pyridine) wesentliche theoretische Grundlagen für das Verständnis der enzymatischen Wasserstoff-Übertragung geschaffen. Allerdings ist nur das komplette Dinucleotid als Coenzym wirksam²⁷). In einigen Fällen kann aber die 6-Aminogruppe des Adenins mit salpetriger Säure durch Hydroxyl ersetzt werden, ohne daß eine wesentliche Aktivitätsabnahme zu beobachten ist.

Hemmstoffe

Kaplan konnte erstmals einen dem Enzym-Coenzym-Substrat-Komplex analogen Hemmstoffkomplex aus Leber-Alkohol-Dehydrogenase, DPN und Hydroxylamin beobachten²⁸). Es war naheliegend, die Hemmwirkung des Hydroxylamins auf eine nucleophile Anlagerung an die 4-Stellung des Pyridin-Rings im DPN zurückzuführen. Zwei Jahre später gelang es Pfeiderer, Jeckel und Wieland, einen analogen Komplex aus Milchsäure-Dehydrogenase (LDH), DPN und Sulfit zu entdecken. Sie beobachteten eine außerordentlich starke Hemmung verschiedener Dehydrogenasen, vor allem der LDH, durch Sulfit-Ionen und konnten deren nahezu stöchiometrische Anlagerung an DPN unter dem Einfluß des Enzyms durch das hierbei neu auftretende Absorptionsmaximum bei 320 m μ demonstrieren²⁹). Das Spektrum ist identisch mit dem des von Meyerhof nicht-enzymatisch dargestellten DPN-Sulfit-Adduktes, das infolge seiner großen Dissoziationskonstanten aber erst bei höheren Sulfit-Konzentrationen auftritt. Bei Zugeben steigender Sulfit-Mengen zu DPN enthaltender LDH beobachteten wir zuerst einen proportionalen Extinktions-Anstieg und schließlich einen Sättigungswert, der uns ein Maß gab für die Zahl der maximal vom Enzym gebundenen DPN-Moleküle. Der Wert von 3 bis 4 DPN-Molekülen^{29,30}) pro Mol Enzym ist bei der LDH mit völlig anderen Bestimmungsmethoden bestätigt worden^{31,32}).

Wir fanden außerdem, daß die Milchsäure mit den Sulfit-Ionen konkurriert: Durch Erhöhung der Lactat-Konzentration konnte die durch Sulfit bewirkte Hemmung schließlich völlig aufgehoben werden³³). Gleichtes gilt für die Äpfelsäure-Dehydrogenase³⁴). Ein direkter Hinweis für eine der Sulfit-Reaktion analoge Anlagerung des Substrates an das DPN unter Einfluß des Enzyms konnte bisher nicht erbracht werden, da sich natürlich sofort DPNH und

das oxydierte Substrat bilden. Auch Substrat-Analoga, wie die α -Hydroxy-isobuttersäure oder die α -Methyl- α -hydroxybernsteinsäure (Citramalsäure), die nicht mehr enzymatisch dehydriert werden, bildeten keine optisch erkennbaren Additionsverbindungen bzw. wirkten, vermutlich wegen sterischer Behinderung durch die Methylgruppe, nicht einmal als kompetitive Hemmstoffe.

<chem>N+([R])c1ccccc1X</chem>	relative Hydrierungs-Geschwindigkeiten mit				
	Alkohol-Deh. aus		Lactat-Deh. aus		3-Phosphoglyceraldehyd-Deh.
	Pferdeleber	Hefe	Kaninchenskelettmuskel	Rinderherz	
X = $-\text{CO}(\text{NH}_2)$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$-\text{CO}(\text{NOHO})$	0,44	0,03	0,20	0,10	0,19
$-\text{CO}(\text{NNH}_2)$	0,68	0,08	0,33	0,09	0,38
$-\text{CH}=\text{NOH}$	0,50	0,06	0,07	0,01	0,01
$-\text{CO}(\text{C}_6\text{H}_5)$	0,31	0	0	0	0
$-\text{NH}_2$	0	0	0	0	0
$-\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_3)$	0	0	0	0	0
$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}(\text{NH}_2)$	0	0	0	0	0
$-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$...	7,92	0,52	1,25	0,37	0,01
$-\text{CS}(\text{NH}_2)$	3,48	0,16	0,03	0,41	0,16

Tabelle 1. Vergleich von DPN-Analogen in Dehydrogenase-Systemen²⁵)

Anlagerungsreaktion als auch auf die enzymatische Hydrierung gut orientiert sind. Mit einem Enzym, das die N-glycosidische Bindung zwischen Nicotinamid und Ribose spaltet, ist es möglich, in einer Austauschreaktion Pyridin-Abkömmlinge, die in 3-Stellung anders als durch die Carbonamid-Gruppe substituiert sind, in das DPN-Molekül einzubauen. Früher schon hatte Kaplan zeigen können²⁴), daß die 3-Acetylpyridin- und Pyridin-3-aldehyd-Analogen von DPN als Coenzyme wirksam sind. Weitere Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt²⁵). Man sieht, daß die natürliche Carbonamid-Gruppe nicht unbedingt für die katalytische Funktion notwendig ist.

²²) H. R. Levy u. B. Vennesland, J. biol. Chemistry 228, 85 [1957].
²³) O. Meyerhof, P. Ohlmeyer u. W. Möhle, Biochem. Z. 297, 113 [1938].

²⁴) N. O. Kaplan u. M. M. Ciotti, J. biol. Chemistry 221, 823 [1956].
²⁵) B. M. Anderson u. N. O. Kaplan, ebenda 234, 1226 [1959].

- ²⁶) K. Wallenfels u. Mitarb., Liebigs Ann. Chem. 621, 86 [1959] u. folgende.
²⁷) J. v. Eys, M. M. Ciotti u. N. O. Kaplan, J. biol. Chemistry 231, 571 [1958].
²⁸) R. M. Burton u. N. O. Kaplan, ebenda 211, 447 [1954].
²⁹) G. Pfeiderer, D. Jeckel u. Th. Wieland, Biochem. Z. 328, 187 [1956].
³⁰) G. Pfeiderer u. D. Jeckel, ebenda 329, 370 [1957].
³¹) Y. Takenaka u. G. W. Schwert, J. biol. Chemistry 223, 157 [1956].
³²) S. F. Velick, ebenda 233, 1455 [1958].
³³) G. Pfeiderer, D. Jeckel u. Th. Wieland, Biochem. Z. 329, 104 [1957].
³⁴) G. Pfeiderer u. E. Hohnholz, ebenda 331, 245 [1959].

Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Für die Untersuchung binärer Enzym-Coenzym- und ternärer Enzym-Coenzym-Substrat-Komplexe eröffnen sich auf andere Weise neue Möglichkeiten. *Theorell* und *Bonichsen*³⁵⁾ beobachteten erstmals eine Verschiebung des DPNH-Absorptions-Maximums von 340 m μ nach 325 m μ bei Zugabe von Leber-Alkohol-Dehydrogenase. Eine ähnliche Verschiebung nach kürzeren Wellenlängen, die durch eine Komplexbildung zwischen hydriertem Coenzym und Apo-Enzym verursacht wird, stellten *Neilands* und *Chance* an der LDH fest³⁶⁾. *Pfleiderer* und *Hohnholz*³⁴⁾ fanden eine Verschiebung des DPNH-Absorptions-Maximums nach 351 m μ in Gegenwart von Äpfelsäure-Dehydrogenase (MDH) aus Schweineherz. Besser zu beobachten ist diese Komplexbildung im Fluoreszenzspektrum des DPNH. DPNH sendet bei Anregung im UV (340 oder 366 m μ) eine sehr intensive weiße Fluoreszenz aus, deren Emissionsmaximum bei 462 bis 468 m μ liegt. *Schwert* beobachtete eine Verdoppelung der Fluoreszenz-Intensität, wenn der DPNH-Lösung LDH zugefügt wurde³⁷⁾. *Velick*³⁸⁾ konnte daraus das Bindungsvermögen von DPNH an LDH und an 3-Phospho-glycerinaldehyd-Dehydrogenase bestimmen und prinzipielle Unterschiede in der Art der Bindung des Coenzymes durch das Apo-Enzym feststellen: LDH steigert die Fluoreszenz von DPNH, während 3-Phospho-glycerinaldehyd-Dehydrogenase sie vermindert. *Pfleiderer* und *Hohnholz* fanden eine Verdreifachung der DPNH-Fluoreszenz-Intensität bei Bindung an MDH (Abb. 2) und errechneten aus der Titrationskurve eine Wirkgruppe pro Mol

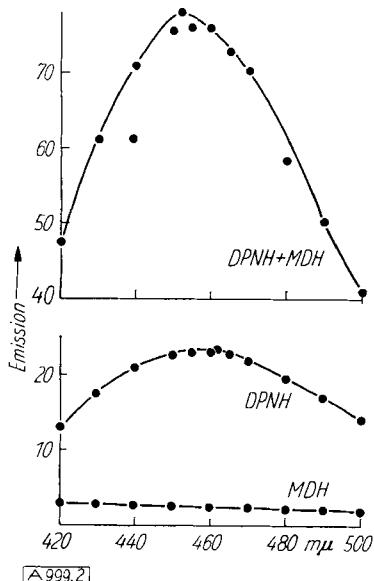


Abb. 2. Fluoreszenzspektren des freien und an Äpfelsäure-Dehydrogenase (MDH) gebundenen hydrierten Diphospho-pyridin-nucleotids (DPNH). DPNH: 10⁻⁸ Mol/cm³, MDH: 2-10⁻⁸ Mol/cm³, m/5 Trisbuffer pH 6,5; Anregung mit Hg-Linie 366 m μ , Zeiß Fluoreszenzzusatz ZF 4, Temp. = 25 °C

Enzym (Abb. 3). Neuerdings bewies *Schwert* die Bildung eines ternären Komplexes aus DPNH, Lactat und LDH³⁷⁾, später auch aus Glutamat, DPNH und Glutaminsäure-Dehydrogenase oder aus Alkohol, DPNH und Alkohol-Dehydrogenase³⁸⁾. Auf Zugabe des hydrierten Substrates erhöht sich die DPNH-Fluoreszenz nochmals beträchtlich unter Verschiebung des Maximums nach kürzeren Wellen-

längen. *Schwert* hat durch Fluoreszenz-Messungen sogar Komplexe aus DPNH, LDH und enzymatisch nicht dehydrierbaren Säuren nachweisen können³⁹⁾. Außerdem fand er, daß in Gegenwart des Oxalsäure-halbamids, eines

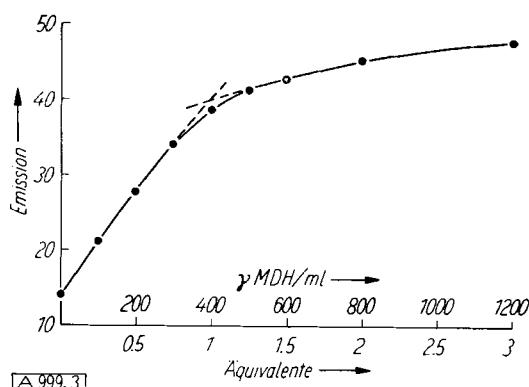


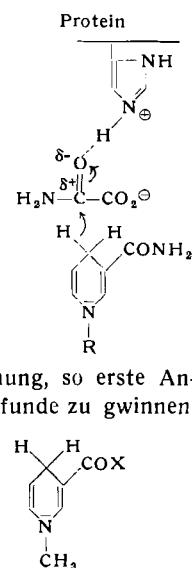
Abb. 3. Fluoreszenz-Intensität von 10⁻⁸ Mol/cm³ reduziertem Diphospho-pyridin-nucleotid in Abhängigkeit von der zugesetzten Äpfelsäure-Dehydrogenase-Menge (MDH). Versuchsbedingungen wie bei Abb. 2. Der Enzym-Blindwert ist berücksichtigt

kompetitiven Hemmstoffs der Brenztraubensäure-Hydrierung, die Fluoreszenz des DPNH-LDH-Komplexes stark vermindert ist, obwohl diese Substanz enzymatisch nicht reduziert wird. *Schwert* deutet diesen Befund, indem er annimmt, daß die Carbonamidgruppe des Oxalsäureamids durch eine positiv geladene Imidazolgruppe des Proteins polarisiert wird. Ein Hydrid-Ion soll dann vom DPNH zum positiv geladenen Carbonyl-C-Atom gezogen werden, so daß sich der aromatische Pyridin-Ring bildet.

Wir haben in ähnlichen Untersuchungen an der MDH beträchtliche Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität von DPNH bei Zugabe von MDH und D- oder L-Malat festgestellt⁴⁰⁾.

Wir untersuchten die optischen Eigenschaften von in 3-Stellung verschieden substituierten N(1)-Methyl-dihydro-pyridin-Derivaten in der Hoffnung, so erste Anhaltspunkte für die Deutung obiger Befunde zu gewinnen.

In Tabelle 2 sind die Absorptionsmaxima einer Anzahl derartiger Modellkörper aufgeführt, die *E. Sann*⁴¹⁾ ohne Kenntnis der gleichlaufenden Arbeiten von *Wallenfels* und Mitarbeitern²⁶⁾ bestimmt hat. *Kröhne* hatte erstmals den Einfluß der Substituenten auf das Absorptionsspektrum und Reaktionsvermögen bei Pyridin-Derivaten studiert⁴²⁾. Aus den Daten der Tabelle 2 geht hervor, daß die Polarisierung des Dihydropyridin-Moleküls durch Substituenten wie Methyl oder Äthyl, die einen Elektronendruck ausüben, zurückgedrängt wird, während Sub-



X =	m μ
NH ₂	360
NHCH ₃	355,5
NHC ₂ H ₅	357
NHC ₂ H ₅	373,5
N(CH ₃) ₂	346,5
N(C ₂ H ₅) ₂	347
NCH ₃ C ₆ H ₅	372
OH	355
OCH ₃	364
OC ₂ H ₅	363,5
OC ₆ H ₅	367
H	372

Tabelle 2. Absorptionsmaxima verschiedener N(1)-Methyl-dihydro-pyridin-Derivate

³⁵⁾ H. Theorell u. R. Bonnichsen, Acta chem. scand. 5, 1105 [1951].

³⁶⁾ A. D. Chance u. J. B. Neilands, J. biol. Chemistry 199, 383 [1952].

³⁷⁾ A. D. Winer, W. B. Novoa u. G. W. Schwert, J. Amer. chem. Soc. 79, 6571 [1957].

³⁸⁾ A. D. Winer u. G. W. Schwert, Biochim. biophysica Acta 29, 424 [1958].

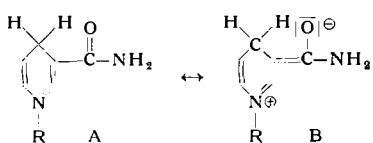
³⁹⁾ A. D. Winer u. G. W. Schwert, J. biol. Chemistry 234, 1155 [1959].

⁴⁰⁾ E. Hohnholz, unveröffentlicht.

⁴¹⁾ E. Sann, Diplomarbeit, Universität Frankfurt 1959.

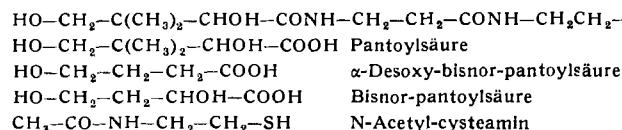
⁴²⁾ F. Kröhne, K. Ellegast u. E. Bertram, Liebigs Ann. Chem. 600, 176 [1956].

stituenten, die Elektronen saugen (z. B. der Phenyl-Rest), sie vergrößern. Man darf also im 1. Fall eine Annäherung an die mesomere Grenzstruktur A mit kurzwelligerem Maximum annehmen, im 2. Fall an die polarisierte Form B mit einem langwelligeren Maximum.



Coenzym A

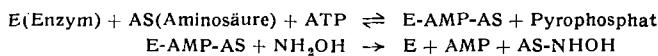
Der Arbeitskreis von *Lynen* hat in den letzten Jahren an Coenzym A bedürftigen Enzymen systematische Untersuchungen mit Bruchstücken des Coenzymes A, wie Pantethein, Pantethein-phosphat, Dephospho-CoA und deren im Pantothen-Rest chemisch veränderten Derivaten Bisnor- α -desoxy-pantoyl-, Bisnor-pantoyl-, sowie mit N-Acyl-cysteamin durchgeführt. Teilweise kamen hierbei überraschende Ergebnisse zutage. So ist die Transacetylase aus *Clostridium kluyveri* nur mit intaktem CoA voll wirksam. Bei der Thiolase dagegen spielt der Pantoyl-Rest als Baustein des Cofaktors offenbar keine große Rolle: Die Michaelis-Konstante ist für N-Acetyl-cysteamin $12 \cdot 10^{-5}$ M, für Pantethein oder sein Phosphat, wie für die entsprechenden Bisnor-Verbindungen je $5 \cdot 10^{-5}$ M. Bei der β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase ist der Pantoyl-Rest für die Funktion des Coenzymes wesentlich, nicht dagegen der Adenylsäure-Rest. Bei der Crotonase schließlich führt die Abspaltung des AMP-Restes ebenfalls zu einem starken Affinitätsverlust. Allerdings sinkt in den meisten Fällen die Wechselzahl mit den CoA-Bruchstücken stark ab.



Austausch-Reaktionen

Natürlich ist die Isotopentechnik ein wichtiges Hilfsmittel bei der Aufklärung des Mechanismus von Enzym-Reaktionen.

Setzt man einem Enzym ein Reaktionsprodukt in radioaktiv-markierter Form zu, so kann infolge des dynamischen Gleichgewichtes, aus der Art und dem Ausmaß des Einbaues in die anderen Reaktionspartner u. U. auf den Reaktionsmechanismus geschlossen werden. Als Beispiel sei die 1955 von *Hoagland*⁴³⁾ entdeckte Austauschreaktion von radioaktivem Pyrophosphat mit dem Pyrophosphat-Rest von ATP in Gegenwart von Aminosäuren und cytoplasmatischen Enzymen erwähnt, wodurch die Aufklärung der Biosynthese von Proteinen rasch vorangetrieben worden ist. *Hoagland* folgerte aus diesem Austausch, daß in Gegenwart von Aminosäuren diese Enzyme ATP in AMP und Pyrophosphat spalten und formulierte die Reaktion, da in Gegenwart von Hydroxylamin α -Amino-Hydroxamsäuren entstehen, als:



Inzwischen sind mehrere aminosäure-aktivierende Enzyme rein dargestellt oder angereichert worden. Sie katalysieren den ersten Schritt der Biosynthese von Proteinen, indem sie die Aminosäuren in eine für die Peptidverknüpfung notwendige, aktivierte Form bringen. *Hoaglands* Formulierung konnte durch die Synthese von Aminosäure-AMP-

Anhydriden^{44–47)} und deren Umsetzung mit Pyrophosphat durch dieselben Enzyme zu ATP gesichert werden^{44, 48).} Neuerdings konnten auch natürliche Aminosäure-AMP-Anhydride nach Trichloressigsäure-Fällung vom Enzym abgespalten und elektrophoretisch identifiziert werden^{49–52).}

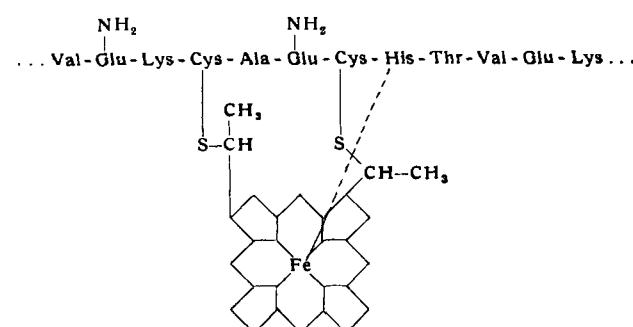
Bei enzymatischen Reaktionen der Phosphorsäure und ihrer Ester gab die Verwendung des stabilen ^{18}O -Isotops nützliche Hinweise auf den Mechanismus. *Hoagland* inkubierte das tryptophan-aktivierende Enzym mit ATP, Mg^{2+} und Tryptophan, das in der Carboxylgruppe mit ^{18}O ⁵³⁾ markiert war, und fand, daß ein Sauerstoff-Atom im AMP durch ^{18}O ersetzt wird. Dies ist nur möglich, wenn intermediär zwischen Aminosäure und AMP eine Anhydridbindung vorlag. In gleicher Weise konnten *Boyer* und *Koshland*^{54, 55)} eine Anhydrid-Bindung zwischen Glutaminsäure und Phosphorsäure bei der biologischen Glutamin-Synthese aus Glutaminsäure, ATP und Ammoniak demonstriert.

Die katalytischen Zentren am Enzym

Cytochrom C

Die bisher angestellten Betrachtungen haben den für die Aktivierung von Substrat und Coenzym entscheidenden Einfluß des Apo-Enzyms weitgehend vernachlässigt. Hier beginnen nun auch die außerordentlichen experimentellen Schwierigkeiten vor allem in den Fällen, in denen das Enzym seine katalytische Funktion unmittelbar, d. h. also ohne Beteiligung eines Coenzymes, ausübt. Es genügt ja nicht zu wissen, ob ein Enzym bei der Behandlung z. B. mit einem Acylierungsmittel unwirksam wird, sondern es gilt festzustellen, welche der vielen Aminosäure-Reste, die acyliert wurden, nun funktionelle Bedeutung für den

Pantethein katalytischen Prozeß haben. Günstige Verhältnisse liegen vor, wenn eine prosthetische Gruppe homöopolär an das Protein gebunden ist. So hat *Tuppy* durch proteolytische Spaltung des Cytochrom c, eines an der biologischen Oxydation beteiligten Häminenzymes, Peptide isolieren können, die noch die Häminkomponente, über Thioätherbrücken ge-



- ⁴⁴⁾ J. A. DeMoss, S. M. Genuth u. G. D. Novelli, Proc. natl. Acad. Sci. USA 42, 325 [1956].
- ⁴⁵⁾ P. Berg, J. biol. Chemistry 233, 608 [1958].
- ⁴⁶⁾ Th. Wieland u. F. Jaenicke, Liebigs Ann. Chem. 613, 95 [1958].
- ⁴⁷⁾ C. Z. Zioudrou, S. Fuji u. J. S. Fruton, Proc. natl. Acad. Sci. USA 44, 439 [1958].
- ⁴⁸⁾ P. Berg, Fed. Proc. 16, 152 [1957]; J. biol. Chemistry 233, 601 [1958].
- ⁴⁹⁾ M. Karasek, P. Castelfranco, P. R. Krishnaswamy u. A. Meister, J. Amer. chem. Soc. 80, 2335 [1958].
- ⁵⁰⁾ S. B. Weiss, G. Acs u. F. Lipmann, Fed. Proc. 17, 333 [1958].
- ⁵¹⁾ P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson u. L. I. Hecht, Proc. natl. Acad. Sci. USA 44, 73 [1958].
- ⁵²⁾ H. S. Kingdon, L. T. Webster, jr. u. E. W. Davie, ebenda 44, 757 [1958].
- ⁵³⁾ M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik, N. Sharon, F. Lipmann, M. P. Stuhlberg u. P. D. Boyer, Biochim. biophysica Acta 26, 215 [1957].
- ⁵⁴⁾ P. D. Boyer, O. J. Koeppe u. W. W. Luchsinger, J. Amer. chem. Soc. 78, 356 [1956].
- ⁵⁵⁾ A. Kowalsky, C. Wyttnerbach, L. Langer u. D. E. Koshland jr., J. biol. Chemistry 219, 719 [1956].

⁴³⁾ M. B. Hoagland, Blochim. biophysica Acta 16, 288 [1955].

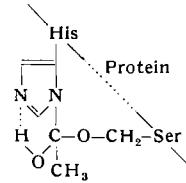
bunden^{56, 57}), enthalten⁵⁸). Er konnte die Aminosäuresequenz an den Haftstellen aufklären und damit exakte Vorstellungen über die Konstitution des aktiven Bezirks geben. Unter Berücksichtigung der Helixtheorie von *Pauling* haben *Ehrenberg* und *Theorell*⁵⁹) dann ein räumliches Modell des Cytochrom c entwickelt.

Esterasen, Proteasen

Bei einer anderen Enzymklasse konnten in neuerer Zeit Hinweise auf den Bau der aktiven Bezirke erhalten werden. Schon lange war bekannt, daß Esterasen und Proteasen durch Di-isopropyl-fluorophosphat (DIFP) gehemmt werden. In manchen Fällen, z. B. beim Chymotrypsin, bringt bereits der Umsatz mit einem Äquivalent DIFP die enzymatische Aktivität völlig zum Erliegen⁶⁰). Nach der Hydrolyse der mit ^{32}P -DIFP behandelten Enzyme fanden sich die Phosphat-Reste mit Serin verestert, was einen ersten Hinweis auf die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäure gab. Nach proteolytischer Spaltung konnten isotop-markierte Serin-Peptide isoliert werden⁶¹). Hier wurde bei einer großen Zahl von Proteasen und Esterasen – neuerdings auch beim gruppenübertragenden Enzym Phospho-glucomutase – in der Umgebung des funktionellen Serins immer dieselbe Sequenz Gly-Asp-Ser-Gly beobachtet⁶²), was auf einen gleichartigen Wirkungsmechanismus der hydrolytischen Enzyme deutet. Neuerdings gelang die Isolierung eines am Ser* mit ^{32}P markierten Pentadekapeptids der Zusammensetzung Asp-Ser-Cys-Glu-Gly-Gly-Asp-Ser*-Gly-Pro-Val-Cys-Ser-Gly-Lys⁶³) aus Trypsin. Überraschenderweise war aber in der Nähe des essentiellen Serins kein Histidin zu entdecken, obwohl dessen funktionelle Bedeutung für die enzymatische Aktivität einwandfrei gesichert ist: Man hatte an Modellversuchen zeigen können, daß die direkte Phosphorylierung von Serin mit DIFP nur in Gegenwart eines Katalysators, und zwar des Imidazols möglich ist und daß die hydrolytische Spaltung einiger Ester, z. B. des Nitrophenyl-acetates, durch Imidazol beschleunigt wird. Dabei tritt als Zwischenprodukt Acylimidazol auf, dessen Absorption bei 245 μm ein Maximum aufweist. Die Beteiligung des Histidins an enzymatischen Reaktionen ließ sich z. B. durch oxydative Abbau des Histidin-Imidazolrings zeigen, der mit sichtbarem Licht in Gegenwart von Methylenblau rasch eintritt⁶⁴). Nach der Photooxydation eines Histidin-Restes⁶⁵), wie auch nach der Entfaltung des Proteinmoleküls in Harnstofflösung werden manche Proteasen inaktiv und der essentielle Serinrest kann nicht mehr chemisch phosphoryliert werden. Aus diesen Beobachtungen muß man eine durch die Faltung der Proteinkette bedingte Annäherung eines Histidin-Rests an das funktionelle Serin annehmen.

Es würde zu weit führen, die zahlreichen Untersuchungen über die Einwirkung von Proteasen auf synthetische Substrate zu besprechen, deren Ergebnisse verschieden gedeut-

tet wurden⁶⁶). *Gutfreund* und *Sturtevant*⁶⁷) hatten aus kinetischen Daten 3 Reaktionsschritte bei der Spaltung von Nitrophenyl-acetat durch Chymotrypsin abgeleitet. Zuerst soll ein Enzym-Substrat-Komplex entstehen. Dann wird Nitrophenol abgespalten unter gleichzeitiger Bildung eines acylierten Enzyms, das in der 3. Phase hydrolytisch in freies Enzym und freie Säure zerfällt. Die genannten Autoren postulierten eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen einem Histidin-(Imidazol-) und einem Serin-Rest des Proteins⁶⁸), die bei der Acylierung des Enzyms am Serin-Rest aufgespalten wird. Andererseits glaubten *Neurath* und *Mitarb.*⁶⁹) aus Absorptionsmessungen bei 245 μm zu entnehmen, daß in dem nach *Balls* und *Wood*⁷⁰) isolierten Acyl-Enzym beim Inkubieren in Puffer vom p_{H} 9 eine O-N-Acylwanderung stattfindet und sich schließlich die hydrolytische Spaltung des acylierten Imidazols optisch verfolgen läßt⁷¹). Eine soeben publizierte Arbeit von *Marini* und *Hess*⁷²) scheint diese unterschiedlichen Ergebnisse in Einklang bringen zu können, indem sie für das intermediär auftretende acyierte Enzym folgende Struktur annehmen:



SH-Enzyme

In den meisten Fällen ist eine chemische Markierung der aktiven Bezirke in Enzymen sehr viel schwieriger, da die an der Bindung des Coenzyms oder Substrats wie die an der Umsetzung direkt beteiligten Aminosäuren nicht so spezifisch durch bestimmte Agentien fixiert werden können, wie die Serin-Reste von Proteasen oder Esterasen. Dies gilt insbesondere für freie SH-Gruppen, die in der Enzymchemie eine große Rolle spielen⁷³). Als Beispiel sollen die in unserem Institut unternommenen Untersuchungen über die chemische Fixierung essentieller SH-Gruppen in der LDH aufgeführt werden.

Schon lange ist bekannt, daß Jodessigsäure oder ihr Amid mit SH-Gruppen von Enzymen unter Thioäther-Bildung reagieren können und daß dabei in den meisten Fällen die Enzymaktivität abnimmt. Heute wissen wir, daß nur ein begrenzter Teil der SH-Gruppen in Proteinen mit diesem Reagenz erfaßt wird. Später wurden günstigere und spezifischere SH-Reagentien wie Maleimid und Quecksilber-organische Verbindungen mit Erfolg angewandt⁷⁵). Vor allem die Quecksilber-Verbindungen sind äußerst wirksame Hemmstoffe, die in vielen Fällen unter völliger Reaktivierung des Enzyms mit überschüssigem Mercaptan oder KCN wieder entfernt werden können. Die Dissoziationsfähigkeit der S-Hg-Bindung hat aber auch den Nachteil, daß sie im Verlauf der chemischen Untersuchungen gespalten werden kann. Durch das von *Boyer*⁷⁶) entdeckte spektrophotometrische Verfahren kann aus der Zunahme der Absorption bei 250 oder 255 μm (S-Hg-Bande) die Zahl der reagierenden Thiol-Gruppen in Proteinen quantitativ ermittelt werden.

⁶⁶) G. H. Dixon, H. Neurath u. J. F. Pechere, Ann. Rev. Biochem. 27, 518 [1958].

⁶⁷) H. Gutfreund u. J. M. Sturtevant, Biochem. J. 63, 656 [1956]; Proc. natl. Acad. Sci. USA 42, 719 [1956].

⁶⁸) B. R. Hammond u. H. Gutfreund, Biochem. J. 72, 349 [1959]; T. Spencer u. J. M. Sturtevant, J. Amer. chem. Soc. 81, 1874 [1959].

⁶⁹) G. H. Dixon u. H. Neurath, J. Amer. chem. Soc. 79, 4558 [1957].

⁷⁰) A. K. Balls u. H. N. Wood, J. biol. Chemistry 219, 245 [1956].

⁷¹) Th. Wieland u. G. Scheider, Liebigs Ann. Chem. 580, 159 [1953]; H. A. Staab, Chem. Ber. 89, 1927 [1956].

⁷²) M. A. Marini u. G. P. Hess, Nature [London] 184, 113 [1959].

⁷³) Häufig sind im Innern des Moleküls gelegene SH-Gruppen chemischen Agentien nicht zugänglich. Hier haben wir im p-Benzochinon ein Reagens gefunden, das anscheinend mit allen SH-Gruppen nativer Proteine durch Anlagerung zum Thioäther des Hydrochinons reagiert⁷⁴).

⁷⁴) G. Pfleiderer, D. Jeckel u. Th. Wieland, Arch. Biochem. Biophysics 83, 275 [1959].

⁷⁵) A. Schöberl, Angew. Chem. 70, 646 [1958].

⁷⁶) P. D. Boyer, J. Amer. chem. Soc. 76, 4331 [1954].

- ⁵⁶) K. Zeile u. H. Meyer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 262, 178 [1939].
- ⁵⁷) H. Theorell, Enzymologia 6, 88 [1939].
- ⁵⁸) H. Tuppy u. G. Bodo, Mh. Chem. 85, 1024 [1954]; 85, 1182 [1954]; H. Tuppy u. S. Paleus, Acta chem. scand. 9, 353 [1955].
- ⁵⁹) A. Ehrenberg u. H. Theorell, ebenda 9, 1193 [1955].
- ⁶⁰) E. F. Jansen, M. D. Fellows Luiting, R. Jang u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 179, 189 [1949].
- ⁶¹) N. K. Schaffer, R. R. Engle, L. Sincef, R. W. Drisko u. S. Harshman, Fed. Proc. 15, 347 [1956]; N. K. Schaffer, R. P. Lay, L. Siemet u. R. W. Drisko, J. biol. Chemistry 230, 185 [1958].
- ⁶²) G. H. Dixon, D. L. Kauffmann u. H. Neurath, ebenda 233, 1373 [1958].
- ⁶³) F. Turba u. G. Gundlach, Biochem. Z. 327, 186 [1955].
- ⁶⁴) L. Weil, W. G. Gordon u. A. R. Buchert, Arch. Biochemistry 33, 90 [1951].
- ⁶⁵) L. Weil, S. James u. A. R. Buchert, ebenda 46, 266 [1953].

Neuerdings hat man auch die durch SH-Reagentien bewirkte Verdrängung des Coenzysms vom Apo-Enzym optisch verfolgen können. So wird z. B. das an 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase gebundene DPN durch Zugabe von Quecksilber-organischen Verbindungen in Freiheit gesetzt, was sich in einer Abnahme der Absorption bei 360 m μ äußert. Wie schon erwähnt, verläuft die Dehydrierung mit 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase anders als bei den übrigen Dehydrogenasen, indem hier intermediär eine S-Acylverbindung des Proteins entsteht, die phosphoratisch zu der energiereichen 1,3-Diphospho-glycerinsäure gespalten wird.⁷⁷⁾

Pfleiderer und Wieland⁷⁸⁾ konnten an der LDH zeigen, daß der oben erwähnte DPN-Sulfat-Enzym-Komplex stöchiometrisch in dem Maße zerlegt wird wie Quecksilber gebunden wird. Der Extinktionsanstieg bei 255 m μ , der für die Reaktion von SH-Gruppen des Enzyms mit Quecksilber charakteristisch ist, entspricht der Abnahme der Lichtabsorption bei 320 m μ , die ein Ausdruck für die Spaltung des DPN-Sulfat-Enzym-Komplexes ist. Damit dürfte wohl die Beteiligung von Thiol-Gruppen des Enzyms an der Bindung des Coenzysms, wahrscheinlich des Pyridin-Teiles, bewiesen sein, umso mehr als LDH drei bis vier sehr reaktionsfähige SH-Gruppen enthält, die gleichzeitig für die enzymatische Aktivität verantwortlich sind^{30, 31, 79)}. Diese Zahl stimmt sehr gut mit der Zahl von DPN-Molekülen überein, die von der LDH maximal gebunden werden. Verfolgt man die Reaktion des Quecksilber-Reagens spektrophotometrisch bei 255 m μ und die Enzymaktivität über längere Zeit, so zeigt sich, daß die LDH noch weitere Thiolgruppen enthält, die jedoch nichts mit der enzymatischen Wirksamkeit

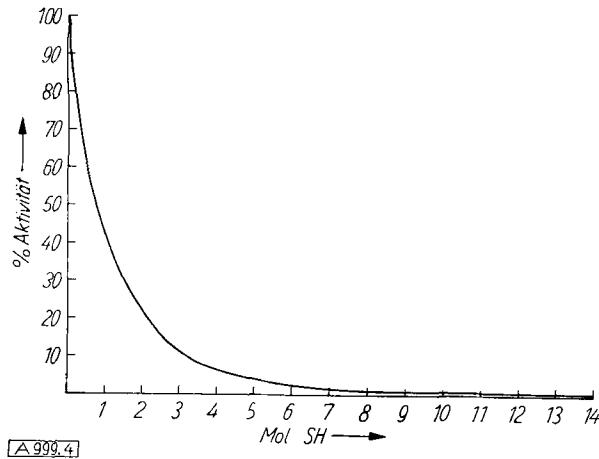
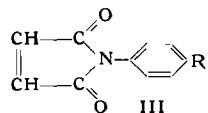


Abb. 4. Abhängigkeit der Milchsäure-Dehydrogenase-Aktivität (LDH aus Schweineherz) von der Zahl der mit p-Chloro-mercuribenzoat (PCMB) reagierenden SH-Gruppen. LDH: 4 · 10⁻⁸ Mol, PCMB: 1,1 · 10⁻⁶ Mol in 2,7 cm³ m/15 Phosphatpuffer, pH 7,0

zu tun haben (Abb. 4). Pfleiderer, Jeckel und Wieland⁷⁴⁾ fanden insgesamt 14 freie SH-Gruppen in Lactat-Dehydrogenasen verschiedenen Ursprungs. Es bestand also das



Problem, durch selektive chemische Reaktion aus 14 Thiolen 3 funktionell besonders wichtige auszuwählen, was uns neuerdings durch Verwendung substituierter N-Phenyl-maleinimide (III) gelungen ist. Durch Verwendung iso-

⁷⁷⁾ Neueste zusammenf. Übersicht: E. Racker u. I. Krimsky, Fed. Proc. 17, 1135 [1958].

⁷⁸⁾ G. Pfleiderer u. Th. Wieland, Vortrag Jahrestag. Deutsch. Ges. Physiol. Chem. Hamburg 27. 9. 1957.

⁷⁹⁾ A. P. Nygaard, Acta chem. scand. 10, 397 [1956].

topen-markierter Phenyl-maleinimide haben wir nun die Möglichkeit, die Aminosäuresequenz in der Wirkgruppe des Enzyms aufzuklären.

Es sei vermerkt, daß nicht in allen Enzymen die chemisch reaktionsfähigsten SH-Gruppen auch für die katalytische Funktion wichtig sind. Zum Beispiel enthalten Urease⁸⁰⁾ und Glutaminsäure-Dehydrogenase⁸¹⁾ zwei Typen von SH-Gruppen. Zuerst reagieren die als a-Gruppen bezeichneten mit Jod oder Quecksilber-Verbindungen ohne Abnahme der enzymatischen Aktivität, dann erst nimmt diese linear mit der Blockierung der b-Gruppen ab.

Im Verlauf seiner Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der β -Galactosidase hat Wallenfels^{81a)} die interessante Beobachtung gemacht, daß die Zahl der enzymatisch wirksamen SH-Gruppen mit der Temperatur zunimmt (bei 5 °C 2, bei 40 °C 10 pro 100000 g Protein). Wie er aus der Abhängigkeit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit vom pH und aus der Größe der Dissoziationsenergie entnahm, sind neben SH-Gruppen ($p_K = 8,9$) auch Histidin-Reste ($p_K = 6,67$) an der katalytischen Wirkung der β -Galactosidase beteiligt. Diese soll auf einem nucleophilen Angriff des Imidazol-N-Elektronenpaars auf das anomere C-Atom des Galactosids und einem gleichzeitigen elektrophilen Angriff des SH-Protons auf das glykosidische O-Atom beruhen. Dabei entsteht eine intermediäre Galactose-Enzym-Verbindung, die den Charakter einer energiereichen Oniumverbindung hat.

Enzyme, die Schwermetalle enthalten

Auch die Bedeutung von Schwermetallen als Bestandteile der Wirkgruppen von Enzymen ist bei den Dehydrogenasen besonders eingehend studiert worden. Als Ergebnis ausführlicher Untersuchungen der Arbeitskreise von Vallee und Wallenfels wissen wir heute, daß Zink ein funktionell wichtiger Bestandteil einiger Dehydrogenasen ist. Die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe bindet pro Molekül Enzym 4 Mole Coenzym und enthält 4–5 Atome Zink^{82, 83)}. Bei der Alkohol-Dehydrogenase aus Leber sind es zwei Zink-Atome⁸⁴⁾ pro Mol Protein in Übereinstimmung mit 2 DPN-Molekülen, die maximal angelagert werden können. Außer auf analytischem Wege konnte die Bedeutung des Zinks, das nicht austauschbar ist und nur bei der Biosynthese ins Enzym eingebaut wird, auch aus dem hemmenden Einfluß von Metallkomplexbildern auf die Enzymaktivität bewiesen werden. Vallee hat dem Zink eine allgemeine Bedeutung für die Wirkgruppen der Dehydrogenasen zugeschrieben⁸⁵⁾. Pfleiderer, Jeckel und Wieland haben jedoch das Vorkommen von Zink in der LDH ausschließen und Pfleiderer und Hohnholz das Fehlen von Zink auch für die MDH sehr wahrscheinlich machen können^{34, 86)}. Wir sind der Ansicht, daß dem Zink nur dann eine Bedeutung kommt, wenn das Substrat keine polare Gruppe enthält, die für die Bindung und Aktivierung durch das Protein Voraussetzung ist.

⁸⁰⁾ L. Hellermann, F. P. Chinard u. V. R. Deitz, J. biol. Chemistry 147, 443 [1943].

⁸¹⁾ L. Hellermann, K. A. Schellenberg u. O. K. Reiss, ebenda 233, 1468 [1958].

^{81a)} K. Wallenfels, Angew. Chemie 71, 526 [1959].

⁸²⁾ B. L. Vallee u. F. L. Hoch, J. Amer. chem. Soc. 77, 821 [1955]; Proc. natl. Acad. Sci. USA 41, 327 [1955]; B. L. Vallee, H. R. Kaegi u. F. L. Hoch, Fed. Proc. 17, 326 [1958].

⁸³⁾ K. Wallenfels, H. Sund, A. Fäßler u. W. Burchard, Biochem. Z. 329, 31 [1957]; K. Wallenfels u. H. Sund, Biochem. Z. 329, 59 [1957].

⁸⁴⁾ B. L. Vallee u. F. L. Hoch, J. biol. Chemistry 225, 185 [1957].

⁸⁵⁾ B. L. Vallee, S. J. Adelstein u. J. A. Olson, J. Amer. chem. Soc. 77, 5196 [1955]; B. L. Vallee, F. L. Hoch, S. J. Adelstein u. W. E. C. Wacker, J. Amer. chem. Soc. 78, 5879 [1956].

⁸⁶⁾ G. Pfleiderer, D. Jeckel u. Th. Wieland, Biochem. Z. 330, 296 [1958].

Struktur und enzymatische Aktivität

Mit Amino-⁸⁷⁾ oder Carboxypeptidasen^{88, 89)} lassen sich Aminosäuren aus Proteinen vom Amino- oder Carboxylende her abspalten. In einigen Fällen, z. B. bei Pepsin⁹⁰⁾, Ribonuclease⁹¹⁻⁹³⁾ und Papain⁹⁴⁾ konnte gezeigt werden, daß nicht das gesamte Protein-Molekül für die volle katalytische Aktivität notwendig ist. *Malmström* gelang es, an der Enolase aus Hefe sowohl vom Amino- wie vom Carboxyl-Ende her je 150 Aminosäure-Reste abzuspalten, ohne daß das Enzym dabei an Aktivität verlor⁹⁵⁾. Auf diese Weise sollte es in Zukunft gelingen, niedermolekulare Polypeptide zu gewinnen, die noch katalytisch wirksam sind und deren Konstitution sehr viel leichter aufzuklären ist als die der hochmolekularen Proteine.

Über die Raumstruktur, die in der Proteinchemie vielfach als sekundäre und tertiäre Struktur bezeichnet wird, wissen wir noch sehr wenig, obwohl sie offenbar entscheidenden Einfluß auf die Wirksamkeit eines Enzyms hat. Im vergangenen Jahr konnte erstmals die Raumstruktur des Myoglobins durch *Kendrew*⁹⁶⁾ aufgeklärt werden. Der Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität eines Enzyms wird am besten durch den Einfluß der Hitze- und Harnstoff-Behandlung deutlich. Es dürfte bekannt sein, daß die meisten Proteine zwischen 50 und 70 °C koagulieren und dabei ihre enzymatische Aktivität verlieren. Auch bei der Inkubation von Enzymen in 6- bis 8-molarer Harn-

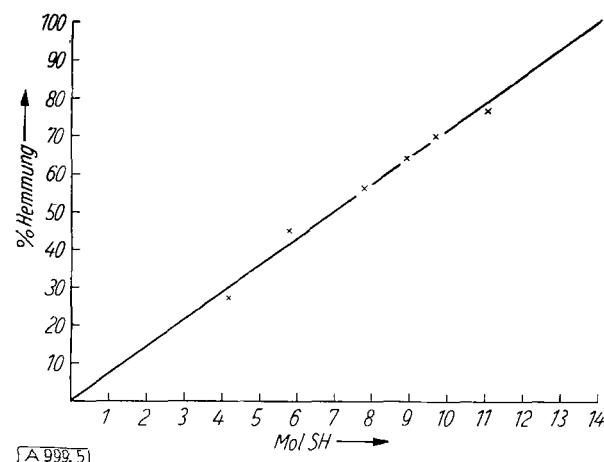


Abb. 5. Abhängigkeit der Milchsäure-Dehydrogenase-Aktivität (LDH aus Schweineherz) von der durch Harnstoff bewirkten Freilegung von SH-Gruppen. LDH: $1,2 \cdot 10^{-8}$ Mol in 2 cm^3 3 m Harnstoff-Lösung, gepuffert durch m/15 Phosphat pH 7,0. Nach verschiedenen Zeiten wurde die mit $4,2 \cdot 10^{-7}$ Mol p-Chloro-mercuri-benzoat erzielte momentane Extinktions-Erhöhung bei $255 \text{ m}\mu$ gemessen

- ⁸⁷⁾ D. H. Spackman, E. L. Smith u. D. M. Brown, J. biol. Chemistry 212, 255 [1955].
- ⁸⁸⁾ I. S. Harris: Chem. Soc. Special Publication Nr. 2, London 1955, S. 71.
- ⁸⁹⁾ J. E. Folk u. J. A. Gladner, J. biol. Chemistry 231, 379 [1958]; 231, 393 [1958].
- ⁹⁰⁾ G. E. Perlmann, Nature [London] 173, 406 [1954].
- ⁹¹⁾ C. B. Anfinsen, W. F. Harrington, A. Hvist, K. Lindstrom-Lang, M. Ottesen u. J. Schellman, Biochim. biophysica Acta 17, 141 [1955].
- ⁹²⁾ S. M. Kalman, K. Lindstrom-Lang, M. Ottesen u. F. M. Richards, ebenda 16, 297 [1955].
- ⁹³⁾ G. Kalnitsky u. W. I. Rogers, ebenda 20, 378 [1956].
- ⁹⁴⁾ R. L. Hill u. E. L. Smith, Biochim. biophysica Acta 19, 376 [1956].
- ⁹⁵⁾ O. Nylander, B. G. Malmström, ebenda 34, 196 [1959].
- ⁹⁶⁾ J. C. Kendrew, G. Bao, H. M. Dintzis, R. G. Parrish u. H. Wykoff, Nature [London] 181, 662 [1958].

stoff-Lösung tritt meist eine mehr oder weniger rasche Aktivitäts-Abnahme ein. Beide Denaturierungs-Prozesse haben ihre Ursache in der Entfaltung der Peptidketten, was sich bei der Harnstoff-Denaturierung (die übrigens reversibel sein kann) sehr schön durch die Freilegung von SH-Gruppen, die im nativen Protein nicht mit chemischen Agentien reagieren, beweisen läßt (Abb. 5).

Wir konnten feststellen, wie wichtig die Wirkgruppe der Enzyme für den Denaturierungs-Vorgang ist: In dem oben bereits erwähnten ternären Komplex aus DPNH, Lactat und LDH oder aus DPN, Sulfit und LDH bleibt die enzymatische Aktivität sogar in 6 M Harnstoff-Lösung lange Zeit erhalten. Nicht nur die Wirkgruppe bleibt intakt, sondern wir konnten mit der Boyerschen Methode auch nicht die geringste Entfaltung im Protein beobachten. Dieses Phänomen scheint allgemeinere Bedeutung zu haben. So berichteten Elödi und Szabolcsi⁹⁷⁾ über den stabilisierenden Einfluß des gebundenen DPN auf die Struktur der 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase. Sobald das Coenzym durch Adsorption an Holzkohle oder durch quecksilber-organische Verbindungen verdrängt war, veränderte sich die optische Drehung, stieg die Viscosität und die proteolytische Angreifbarkeit des Apo-Enzyms. Cytochrome c ist in 10 m Harnstoff-Lösung stabil, solange es seine Hämin-Komponente enthält. Wird diese durch Silbersalze abgespalten, so setzt sofort die Entfaltung der Peptidketten ein⁹⁸⁾. α -Amylase wird durch proteolytische Enzyme erst dann angegriffen, wenn das gebundene Calcium (1 Mol pro 1 Mol Enzym) durch Komplexbildner entfernt wurde⁹⁹⁾. Auch „gelbe Fermente“, welche die prosthetische Gruppe fest gebunden enthalten, z. B. Diaphorase aus Schweineherz, sind weitgehend gegen Harnstoff resistent und können durch aggressive Proteasen wie das für die Eiweiß-Strukturaufklärung neuerdings viel benutzte Subtilisin¹⁰⁰⁾ nicht angegriffen werden.

Im Rahmen dieses Aufsatzes war es natürlich unmöglich, den komplizierten Fragenkomplex über den Wirkungsmechanismus von Enzymen erschöpfend zu behandeln. So wären z. B. die zahlreichen Arbeiten von B. Chance über den Nachweis von Enzym-Substratverbindungen mit eigens hierfür konstruierten Spektralphotometern, die solche Komplexe in Bruchteilen von Sekunden erfassen und automatisch aufzeichnen, zu erwähnen. Es wurde versucht, die wesentlichen und heute aktuellen Gesichtspunkte herauszustellen und an gut untersuchten Beispielen aus der Enzymchemie zu erläutern. Es sollte klar geworden sein, daß dieses verhältnismäßig neue Arbeitsgebiet sowohl dem Chemiker und Physiker, als auch dem Physikochemiker und Biochemiker interessante Aufgaben stellt, wobei die hier aufgefundenen Erkenntnisse in der Zukunft weiten Gebieten der Biologie und Medizin von Nutzen werden können.

Prof. Dr. Th. Wieland danke ich für anregende Diskussionen bei der Abfassung dieses Referates.

Eingegangen am 25. September 1959 [A 999]

- ⁹⁷⁾ P. Elödi u. G. Szabolcsi, ebenda 184, 56 [1959].
- ⁹⁸⁾ W. Kauzmann, Diskussionsbem. Symp. „Sulfur in Proteins“, Falmouth, Mai 1958.
- ⁹⁹⁾ E. A. Stein u. E. H. Fischer, J. biol. Chemistry 232, 867 [1958].
- ¹⁰⁰⁾ A. V. Güntelberg u. M. Ottesen, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 29, Nr. 3, 4, S. 27 [1954].