

Abb. 1. y,z-Projektion eines Perchlorat-Anions und eines Phosphacyanin-Kations (2) mit gemittelten Abständen (Å) und Winkeln. In den Kreisen sind die x-Koordinaten in a/100 angegeben.

Abbildung die über die beiden Molekülhälften gemittelten Abstände und Winkel angegeben. Besonders sei auf die nahezu isolierten Doppelbindungen [(C-3)-(C-4) = 1,34 Å] hingewiesen.

Die kristallographischen Daten von (2) sind:

$a = 7,997 \pm 13 \text{ Å}$	Raumgruppe $P 2_1/c$
$b = 19,546 \pm 21 \text{ Å}$	$D_m$ (pykn.) = $1,36 \pm 1 \text{ g cm}^{-3}$
$c = 14,157 \pm 28 \text{ Å}$	$D_x = 1,34 \text{ g cm}^{-3}$
$\beta = 93,67 \pm 0,16^\circ$	$Z = 4$

Die Strukturbestimmung von (2) stützte sich auf 2560 unabhängige Reflexe (davon 374 unbeobachtete) und wurde auf die gleiche Art wie die Strukturbestimmung von (1) vorgenommen. Mit isotropen individuellen Temperaturfaktoren konnte (unter Ausschluß der H-Atome) ein Zuverlässigkeitswert von  $R = 16,3\%$  zwischen beobachteten und berechneten Strukturfaktoren erreicht werden.

Eingegangen am 20. Oktober 1967 [Z 654]

[\*] Dr. I. Kawada und Dr. R. Allmann  
Mineralogisches Institut der Universität  
355 Marburg, Deutschhausstraße 10

[1] R. Allmann, Angew. Chem. 77, 134 (1965); Angew. Chem. internat. Edit. 4, 150 (1965); R. Allmann, Chem. Ber. 99, 1332 (1966).

[2] Die Substanz wurden von K. Dinroth u. P. Hoffmann [3] synthetisiert.

[3] K. Dinroth u. P. Hoffmann, Chem. Ber. 99, 1325 (1966).

## Substratbindung bei der Hefe-Pyruvatdecarboxylase [1]

Von A. Schellenberger und G. Hübner [1]

Um die Funktion der SH-Gruppen in der Hefe-Pyruvatdecarboxylase (PDC; 2-Oxosäure-Carboxylase, 4.1.1.1) zu studieren, haben wir N-(N-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)maleinimid (ASPM) [2] unter den in der Tabelle angegebenen Bedingungen auf PDC oder Apo-PDC einwirken lassen. Die Inaktivierung des Enzyms in Gegenwart eines großen Überschusses von SH-Reagens ist in beiden Fällen eine Reaktion erster Ordnung.

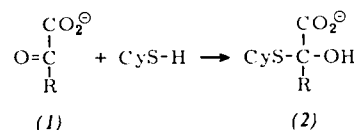
Daß das Enzym durch sein Substrat vor dem Angriff von SH-Reagentien geschützt wird, war bekannt [3]. Die in der

Tabelle aufgeführten Resultate lassen erkennen, daß das Substrat vor der Umsetzung mit dem Coenzym (TPP) an eine SH-Gruppe des Enzyms gebunden wird.

Tab. 1. Halbwertszeiten der Inaktivierung von Apo-PDC und PDC durch ASPM. Puffer: 0,1 M Maleinat, pH = 6,6. Konzentrationen: ASPM =  $1,43 \times 10^{-2} \text{ M}$ ; Pyruvat =  $3,43 \times 10^{-2} \text{ M}$ ; Thiaminpyrophosphat (TPP) =  $3,57 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $\text{Mg}^{2+} = 10^{-2} \text{ M}$ .

Ansatz	Halbwertszeit (min)
Apo-PDC	2,5
Apo-PDC + TPP	2,5
Apo-PDC + $\text{Mg}^{2+}$	3,0
Apo-PDC + Pyruvat	3,0
PDC	15
PDC + Pyruvat	> 120

Es wäre auch möglich, daß durch die Bindung des Substrates an eine andere Gruppe im aktiven Zentrum die an der Wirkung des Enzyms beteiligten SH-Gruppen vor der Umsetzung mit dem relativ großen ASPM-Molekül geschützt werden. Wir untersuchten daher als Modellreaktion die Umsetzung von Pyruvat (1),  $\text{R} = \text{CH}_3$ , oder Trimethylpyruvat (1),  $\text{R} = \text{C}(\text{CH}_3)_3$ , mit Cystein spektroskopisch im Bereiche des  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei pH = 7,4 und fanden, daß die Extinktion einer Pyruvat-Lösung bei 314 nm nur durch Cystein, nicht aber durch andere Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin), vermindert wird. Dieses Ergebnis spricht für die Bildung eines Semimercaptals (2) zwischen Pyruvat und Cystein.



Das Kalottenmodell zeigt, daß Trimethylpyruvat aus sterischen Gründen kein Halbmercaptal bilden kann. Damit wird verständlich, daß Trimethylpyruvat durch PDC nicht decarboxyliert wird und auch nicht als kompetitiver Inhibitor der PDC-Reaktion wirkt [4].

Apo-PDC reagiert wesentlich schneller mit ASPM als Holo-PDC, wobei weder das Coenzym noch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen das Apoenzym vor der Umsetzung mit dem SH-Reagens schützen. Wir schließen daraus in Übereinstimmung mit früheren, aus kinetischen Messungen hervorgegangenen Vorstellungen [5], daß die Bindungsorte für TPP und  $\text{Mg}^{2+}$  im Apoenzym zunächst freiliegen und relativ weit vom Substratbindungsort entfernt sind. Erst bei der Rekombination zum Holoenzym findet eine Umstrukturierung der Proteinkomponente unter Einbeziehung des Cysteins in das aktive Zentrum statt.

Eingegangen am 23. Oktober 1967 [Z 653]

[\*] Prof. Dr. A. Schellenberger und Dipl.-Chem. G. Hübner  
Institut für Biochemie (Chemische Abteilung)  
der Universität  
DDR 401 Halle/Saale, Weinbergweg

[1] VII. Mitteilung zur Theorie der Thiaminpyrophosphat-Wirkung. – VI. Mitteilung: A. Schellenberger, I. Heinroth u. G. Hübner, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 506 (1967).

[2] H. Merz, G. Pfeleiderer u. Th. Wieland, Biochem. Z. 342, 66 (1965).

[3] A. O. M. Stoppani, A. S. Actis, J. O. Deferrari u. E. L. Gonzales, Nature (London) 170, 842 (1952); Ss. I. Kanopkaite, Biokhimiya (Moskau) 21, 834 (1956).

[4] E. Juni, J. biol. Chemistry 236, 2302 (1961).

[5] A. Schellenberger u. G. Hübner, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 491 (1967).