

- [104] I. Agrell u. O. Heby, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 39 (1971).
- [105] E. O. Akiurimisi, J. Bonner u. P. O. P. Tso, J. Mol. Biol. 11, 1281 (1965).
- [106] Y. V. Koslov u. G. P. Georgiev, Nature 228, 245 (1970).
- [107] T. C. Spelsberg, L. S. Hnilica u. A. T. Ansevin, Biochim. Biophys. Acta 228, 550 (1971).
- [108] J. Bonner, M. E. Dahmus, D. Fambrough, R. C. Huang, K. Marushige u. D. Y. H. Tuan, Science 159, 147 (1968).
- [109] T. Hoare u. E. W. Johns, Biochem. J. 119, 931 (1970).
- [110] C. H. Tan u. M. Miyagi, J. Mol. Biol. 50, 641 (1970).
- [111] J. Paul u. R. S. Gilmour, J. Mol. Biol. 16, 242 (1966).
- [112] R. F. Itzhaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 25 (1970).
- [113] R. J. Clark u. G. Felsenfeld, Nature, New Biology 229, 101 (1971).
- [114] T. C. Spelsberg u. L. S. Hnilica, Biochim. Biophys. Acta 228, 202 (1971).
- [115] T. C. Spelsberg u. L. S. Hnilica, Biochim. Biophys. Acta 228, 212 (1971).
- [116] P. R. Gross, K. Kraemer u. L. I. Malkin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 569 (1965).
- [117] J. Hindley, Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 175 (1963).
- [118] G. C. Barr u. J. A. V. Butler, Nature 199, 1170 (1963).
- [119] E. Johns u. T. A. Hoare, Nature 226, 650 (1970).
- [120] H. J. Frenster, Nature 206, 680 (1965).
- [121] Y. Kurashina u. Y. Oba, Protein (Tokyo) 15, 2 (1970).
- [122] G. Rovera u. R. Barega, J. Cell. Physiol. 77, 201 (1971).
- [123] J. Paul u. R. S. Gilmour, J. Mol. Biol. 34, 305 (1968).
- [124] T. C. Spelsberg, L. S. Hnilica u. T. Ansevin, Biochim. Biophys. Acta 228, 550 (1971).
- [125] M. Kamiyama u. T. Y. Wang, Biochim. Biophys. Acta 228, 563 (1971).
- [126] I. Bekhor, G. Kung u. J. Bonner, J. Mol. Biol. 39, 351 (1969).
- [127] S. Schwimmer u. J. Bonner, Biochim. Biophys. Acta 108, 67 (1965).
- [128] F. Crick, Nature 234, 25 (1971).
- [129] A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2945 (1971).
- [130] K. Marushige u. J. Bonner, J. Mol. Biol. 15, 160 (1966).

Die Funktion des Metall-Ions in der Carboanhydrase

Von R. H. Prince und P. R. Woolley^[*]

Im vorliegenden Fortschrittsbericht soll eine Zusammenfassung über die Chemie des Metall-Ions im Enzym Carboanhydrase gegeben werden. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Ableitung der Wirkungsweise des Enzyms aus dem Studium des Metalls. Die Ergebnisse aus der Chemie der Metallenzyme scheinen eine Neubewertung einiger Aspekte der herkömmlichen Metallkomplex-Chemie zu verlangen.

1. Einleitende Betrachtung: Die Eigenschaften von Metallkomplexen

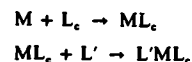
1.1. Das freie Metall-Ion

Die Hauptcharakteristika der Komplexchemie lassen sich durch das quantenmechanische Bild vom Metall-Ion verstehen, in welchem Elektronen in wasserstoffähnlichen Orbitalen untergebracht werden. Die Elektronen eines freien Ions im Grundzustand besitzen eine charakteristische Energie- und Ladungsverteilung. Diese Eigenschaften führen zur Konzeption von Ionenradius und Nettoladung und, im Zusammenhang mit angeregten Zuständen, der Polarisierbarkeit. Diese drei Attribute manifestieren sich in der Komplexchemie des Metall-Ions als maximale Koordinationszahl, Polarisierungskraft, Lewissäurestärke, stereochemisches Verhalten, Reaktionsfähigkeit etc. (vgl. z. B.^[1a]).

[*] Dr. R. H. Prince und Dr. P. R. Woolley
University Chemical Laboratory
Lensfield Road
Cambridge CB2 1EW (England)

1.2. Das komplex gebundene Metall

Betrachten wir ein Metall-Ion M, das von einem Liganden L_c mit gegebener Geometrie komplex gebunden wird und wenigstens eine freie Koordinationsstelle behält. Diese freie Koordinationsstelle kann von einem (einzähnigen) Liganden L' besetzt werden:



Die Bildung des Komplexes aus M und L_c wird die Eigenschaften von M gegenüber denen des freien, aber auch des solvatisierten Ions verändern. Darüber hinaus werden sich die Eigenschaften von L_c (und L') durch die Komplexbildung ändern. Der erste offenkundige Effekt am Metall-Ion wird eine Verringerung der Zahl freier oder von Lösungsmittelmolekülen besetzter Koordinationsstellen der inneren Sphäre sein, wenn L_c gebunden wird. Außerdem wird, falls L_c eine Nettoladung trägt, die Komplexbildung von einer Änderung der Gesamtladung begleitet sein. In jedem Fall wird die Ladung am Metall-Ion bei der Komplexbildung beträchtlich abnehmen; auch die Elektronenenergien

werden anders verteilt. Falls die Komplexbildung in Lösung stattfindet, muß auch die Solvation berücksichtigt werden.

Eine Veränderung der lokalen Ladung und der Elektronenenergie im Metall-Ion zieht weitere Veränderungen nach sich: in der Polarisierungskraft, die mit abnehmender Ladung sinkt, in der Polarisierbarkeit und im Redoxpotential^[*], schließlich in der Lewisäurestärke und der Härte oder Weichheit des Metall-Ions gegenüber L_c sowie der Reaktionsträgheit und der Stabilität der $M-L_c$ -Bindung.

1.3. Die komplex gebundenen Liganden

Hier muß man drei wichtige Vergleiche ziehen: 1. zwischen komplex gebundenem L_c und freiem oder solvatisiertem L_c ; 2. zwischen komplex gebundenem L' und freiem oder solvatisiertem L' , und 3. zwischen dem Komplex $L'ML_c$ und dem Komplex $L'M$ ·Lösungsmittel (d. h. Effekt von L_c auf die Wechselwirkung von M mit L').

Zu 1. Durch die Komplexbildung wird häufig die Reaktivität von L_c verändert; L_c wird wahrscheinlich in seiner stereochemischen Beweglichkeit eingeschränkt. Falls L_c eine negative Ladung trägt, wird sie neutralisiert, und zwar am wirksamsten, wenn die Donoratome selbst die Ladung tragen, wie etwa bei Carboxygruppen.

Zu 2. Auf L' wirkt sich die Komplexbildung gewöhnlich ähnlich aus wie auf L_c . Da L' jedoch einzähnig ist, wird es schwächer als L_c gebunden, vorausgesetzt, daß alle sonstigen Bedingungen übereinstimmen. Die Art der Veränderungen in der Reaktivität, die das Metall-Ion verursacht, sind wohl bekannt. Fast alle Prozesse, die negative Ladung auf das Metall-Ion übertragen würden, werden beschleunigt, so z. B. die Abspaltung von Protonen aus den Liganden und die Aufnahme nucleophiler oder reduzierender Agentien.

Zu 3. In welcher Weise könnte sich nun $L'ML_c$ von $L'M$ ·Lösungsmittel unterscheiden? Eine Möglichkeit wäre die Art der Mikroumgebung bei der Wechselwirkung von M mit L' ; so könnte z. B. der chelatbildende Ligand polare Moleküle aus der Umgebung der $M-L'$ -Bindung fernhalten und dadurch elektrostatische Wechselwirkungen verstärken. In einem unpolaren Lösungsmittel könnte das Gegenteil eintreten. Eine andere Möglichkeit, wie L_c die Eigenschaften der $M-L'$ -Bindung beeinflussen könnte, wäre die Veränderung der oben erwähnten Eigenschaften von M (Härte, Säurestärke etc.). Gegen solche Änderungen wäre nicht nur die $M-L'$ -Bindung empfindlich, sondern auch die Art, in der die Donoratome von L_c sich um das Ion M gruppieren.

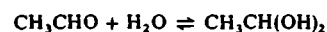
2. Carboanhydrase: Struktur und katalytische Aktivität

Carboanhydrase (CA) ist ein zinkhaltiges Enzym, das die Hydratisierung und Hydrolyse vieler Carbonylverbindun-

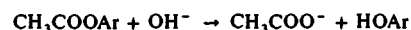
gen und ähnlicher Systeme katalysiert; mehrere etwas verschiedene Formen kommen in verschiedenen Organismen vor. Die einfachste katalysierte Reaktion ist die Hydratisierung von Kohlendioxid^[1]



Andere Reaktionen werden weniger wirksam katalysiert, z. B. die Wasseranlagerung an viele Aldehyde^[2]



die Hydrolyse von Estern^[3]



von einigen Sulfonen^[4] und von 2,4-Dinitrofluorbenzol^[5]. Bei allen diesen Reaktionen wird eine Bindung gespalten. Die entsprechenden nichtenzymatischen Reaktionen verlaufen meistens über einen Übergangskomplex, in welchem sich ein Hydroxid-Ion an das elektrophile Zentrum anlagert.

Die katalytische Wirksamkeit der Carboanhydrase ist sehr hoch; ihre Wechselzahl (unter Sättigungsbedingungen) für die CO_2 -Hydratisierung liegt bei $10^6 s^{-1}$ ^[6]; die Geschwindigkeit der spontanen Hydratation beträgt $7.0 \cdot 10^{-4} s^{-1}$. Demnach vergrößert die Carboanhydrase die Umsetzungsgeschwindigkeit um den Faktor 10^9 . Die Geschwindigkeitskonstante der hydroxid-katalysierten Reaktion beträgt $8 \cdot 10^3 l mol^{-1} s^{-1}$ ^[6, 7]. Für andere Substrate ist die Beschleunigung weniger dramatisch, aber doch noch beträchtlich. Da bereits eine detaillierte Zusammenstellung der umfangreichen biochemischen und chemischen Literatur über die Carboanhydrase existiert^[8], werden hier nur diejenigen Arbeiten zusammengefaßt, die im Zusammenhang mit der Funktion des Metall-Ions interessieren, wobei wiederum nur die neuesten Arbeiten zitiert werden.

2.1. Katalytische Effekte und Hemmung der Carboanhydrase

Die Kinetik der Carboanhydrase folgt in den meisten Fällen dem Michaelis-Menten-Konzept. Einige typische K_m - und k_2 -Werte zeigt Tabelle 1.

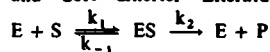
Aus den Michaelis- und den Hemmungskonstanten (Tabelle 2) kann man ableiten, daß große, konjugierte Moleküle am aktiven Zentrum am festesten gebunden werden – wenn man vom CO_2 absieht. Das deutet sehr wahrscheinlich auf einen besonders hydrophoben Charakter in der Umgebung des aktiven Zentrums hin. Allerdings ist dies nicht absolut sicher, weil auch Anzeichen dafür vorhanden sind, daß aromatische Moleküle bevorzugt auf der polaren Oberfläche gewisser Micellen angelagert werden, statt ins Innere einzudringen^[9]. Die extrem starke Bindung von Sulfonamiden wurde noch nicht zufriedenstellend geklärt; daß nur Aryl- (und nicht Benzyl-)sulfonamide mit nicht substituiertem Stickstoff gebunden werden, ist wohl darauf zurückzuführen, daß die stereoelektronische Topographie von Enzym und Hemmstoff sehr genau zusammenpassen müssen. Dies ist im Einklang mit der Vorstellung^[10], daß

[*] Die Polarisierbarkeit wird gewöhnlich erhöht, während das Redoxpotential um so negativer wird, je mehr die Donorkraft des Liganden ansteigt.

ein Enzym gewisse Substrat-Analoga stärker binden kann als Substrate. Es gibt starke Hinweise dafür, daß Sulfonamide und andere ionisierbare Hemmstoffe als Anionen gebunden werden^[22]. Die Hammett-Beziehung wurde benutzt, um zu zeigen, daß die Bindung von Sulfonamiden

der Carboanhydrase in diesem Bereich anzeigt. Aus der Kenntnis des Ionisationsverhaltens von Proteinen kann man diesen pK_a -Wert der NH_2 -Endgruppe einer Polypeptidkette oder einem Imidazol-Stickstoff eines Histidinrestes zuordnen; eine weitere Möglichkeit wäre die Ionisie-

Tabelle 1. Kinetische Parameter einiger carboanhydrase-(CA)-katalysierter Reaktionen (Daten aus [2, 3, 6, 8] und dort zitierter Literatur). Die kinetische Gesetzmäßigkeit ist das Michaelis-Menten-Schema:



(E = Enzym, S = Substrat, P = Produkt). Die experimentellen Konstanten sind k_2 sowie $K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$ (K_m in $\text{mol/l} \cdot 10^{-3}$, k_2 in s^{-1}).

CA-Form	CO ₂ -Hydratation			HCO ₃ ⁻ -Dehydratation			CH ₃ CHO-Hydratation			pNPA-Hydrolyse [b]		
[a]	pH	K _m	k ₂	pH	K _m	k ₂	pH	K _m	k ₂	pH	K _m	k ₂
HCAB	6.30	6.3	5.2 · 10 ³							7.0	5.2	0.8
	7.55	1.0	2.2 · 10 ⁴	7.05	32	2.3 · 10 ⁴				9.0	5.8	2.1
HCAC	6.30	18.0	2.8 · 10 ³							7.0	22.0	37
	7.55	9.3	6.3 · 10 ³	7.05	68	3.7 · 10 ³				9.0	24.0	55
BCA	6.30	12.5	1.8 · 10 ³				7.08	650	700	7.44	1.4	0.13
	7.55	12.5	7.1 · 10 ³	7.05	[c]		7.64	610	880	8.22	8.6	1.1

[a] HCAB bzw. HCAC = Human-Carboanhydrase Form B bzw. C.

[b] pNPA = p-Nitrophenylacetat.

[c] $k_{\text{anz}} = k_2/K_m = 8.9 \cdot 10^6 \text{ (l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$.

Tabelle 2. Hemmungskonstanten einiger Sulfonamid-Inhibitoren vom Typ R-SO₂NH₂ [55]. $K = ([E][I])/[EI]$; E = Enzym, I = Inhibitor.

R	K (mol/l)
C ₆ H ₅	4.6 · 10 ⁻⁷
p-CH ₃ -C ₆ H ₄	1.0 · 10 ⁻⁷
p-H ₂ N-C ₆ H ₄	9.0 · 10 ⁻⁷
α-Naphthyl	1.6 · 10 ⁻⁷
β-Naphthyl	1.0 · 10 ⁻⁷
o-HOOC-C ₆ H ₄	5.3 · 10 ⁻⁷
NC-CH ₂ -CH ₂	380 · 10 ⁻⁷
C ₆ H ₅ -CH ₂	150 · 10 ⁻⁷
hochkonjugiert, aromatisch	typischer Wert 0.08 · 10 ⁻⁷
R-SO ₂ -NHR'	typischer Wert 6000 · 10 ⁻⁷

eine Zunahme der negativen Ladung auf dem Donor-Stickstoff bewirkt^[11]. Anionische Hemmstoffe könnten zwar am Zink-Ion der Carboanhydrase gebunden werden, doch entspricht die Reihe der Bindungsstärke solcher Inhibitoren am Enzym tatsächlich nicht derjenigen an freien Zink-Ionen in wäßriger Lösung, sondern folgt recht gut der lyotropen Reihe (siehe Tabelle 2a)^[43].

Tabelle 2a. Hemmung der Carboanhydrase [43] und Komplexierung von Zn²⁺ (aq.) [54] durch kleine Anionen.

Anion	K = [E][I]/[EI] (mol/l)	Anion	K = [Zn ²⁺][I]/[ZnI ⁺] (mol/l)
F ⁻	0.4	ClO ₄ ⁻	sehr groß
Cl ⁻	0.05	NO ₃ ⁻	10 ⁷
CH ₃ COO ⁻	0.03	J ⁻	10
Br ⁻	0.02	Br ⁻	1
NO ₂ ⁻	0.01	Cl ⁻	1
J ⁻	0.002	SCN ⁻	0.07
ClO ₃ ⁻	0.001	F ⁻	0.05
SCN ⁻	0.0007	CH ₃ COO ⁻	0.03

Die Wechselzahl der Carboanhydrase, aufgetragen gegen den pH-Wert, ergibt eine sigmoide Kurve, entsprechend einem Aktivitätsanstieg in zunehmend alkalischeren Lösungen (Abb. 1). Die Kurven haben alle einen Wendepunkt zwischen pH = 6.9 und 8.0, der eine ionisierbare Gruppe

ung eines zink-gebundenen Wassermoleküls. Die ionisierende Gruppe ist fest mit dem aktiven Zentrum verbunden.

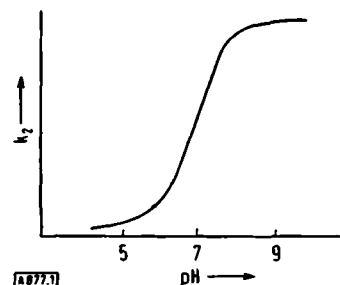


Abb. 1. Sigmoide pH-Abhängigkeit der Carboanhydrase. (Die Skalengröße der Ordinate hängt vom Substrat ab.)

2.2. Konstitution und Struktur der Carboanhydrase

Eine chemische Analyse^[12] hat eindeutig gezeigt, daß die Carboanhydrase nur aus Protein und einem Zink-Ion besteht. Eine Röntgen-Strukturanalyse ist in Arbeit, geht aber aus praktischen Gründen nur langsam voran^[13]. Untersuchungen mit einer Auflösung von 5.5 Å haben folgendes ergeben:

1. Das Molekül ist etwa ellipsoid mit den Maßen 40 · 45 · 55 Å.
2. Das Zink befindet sich in der Nähe der Molekülmitte; seine freie Koordinationsstelle steht über eine „Spalte“ im Molekül mit der Umgebung in Verbindung.
3. Die einzige SH-Gruppe ist 14 Å vom Zink entfernt, woraus sich ergibt, daß das Zink über N und O mit dem Protein verbunden sein muß.
4. Sulfonamid-Inhibitoren ragen in die Spalte hinein und werden am oder nahe beim Zink gebunden.

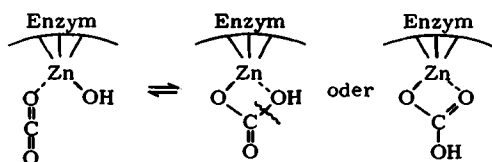
Eine weitere Untersuchung mit höherer Auflösung, welche die Bestimmung der Bindungsabstände in der Human-

Carboanhydrase von Typ C zum Ziel hat, ergab folgende vorläufige Daten^[14]:

5. Im Gebiet des aktiven Zentrums sind alle Peptid-NH- und -CO-Gruppen gepaart angeordnet, so daß das Protein in dieser Gegend relativ hydrophob sein muß.
6. Das Zink-Ion scheint durch drei Proteingruppen gebunden zu sein, und zwar an Imidazol-Stickstoffatome in etwa tetraedrischer Anordnung. Die vierte Koordinationsstelle bleibt frei und hat Kontakt zum umgebenden Medium.
7. Innerhalb der Spalte in der Nähe des Zink-Ions scheinen die umgebenden Wassermoleküle geordnet vorzuliegen.

3. Untersuchungen über das Metallzentrum

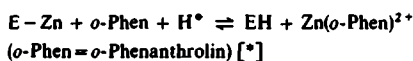
1949 formulierte *Smith* eine allgemeine Theorie über die Wirkungsweise hydrolytischer Enzyme^[15], nachdem erkannt worden war, daß viele dieser Enzyme ein Metall-Ion enthielten, das für die katalytische Funktion unentbehrlich schien. Nach seiner Hypothese ist „... der Metall-Substrat-Komplex so an das Protein gebunden, daß eine Elektronenverschiebung an der sensitiven Bindung hervorgerufen wird. Die eigentliche Katalyse findet dann sauer oder basisch nach dem Brønsted-Mechanismus statt.“ *Smith* führt die Carboanhydrase als einfachstes Beispiel für seine Theorie an; die „sensitive Bindung“ ist eine C—OH-Bindung im Hydrogencarbonat.



Daraus folgt, daß *Smith* den Proteinanteil des Enzyms höchstens als eine Art Matrice ansieht, die sicherstellt, daß nur das richtige Substrat angegriffen wird. Dies ist aber gerade eine Schwäche seiner Theorie, weil schon die Größe des Enzyms nahelegt, daß es mehr ist als nur ein Molekül, das Zn, CO₂ und OH⁻ zusammenbringen kann. Allerdings betonte die Theorie die Bedeutung des Metalls und seines Koordinationsraums, und dies wenigstens kann experimentell nachgeprüft werden. Im folgenden wird diskutiert, ob die enzymatische Aktivität von der Existenz einer zink-gebundenen Hydroxygruppe abhängt.

3.1. Apocarboanhydrase

Lindskog^[16] fand zuerst eine Möglichkeit, die Rolle des Zinks in der Carboanhydrase zu untersuchen, als es ihm gelang, das sehr fest gebundene Zink-Ion reversibel unter milden Bedingungen zu entfernen, ohne daß Denaturierung eintrat. Hierzu wurde das Gleichgewicht



[*] Dies ist keine Reaktionsgleichung im strengen chemischen Sinn, sondern nur eine Zusammenstellung der Reaktanden.

benutzt, das zur Entfernung des Zn(*o*-Phen)²⁺ durch Dialyse auf die rechte Seite verschoben wurde. Durch Zusatz von Zink-Ionen im Molverhältnis 1:1 konnte der größte Teil der enzymatischen Aktivität zurückerhalten werden. Die geringe Restaktivität der Apocarboanhydrase ist nicht signifikant, denn die gewöhnliche Säure-Base-Katalyse könnte von den polaren Gruppen auf der Enzymoberfläche etwas gefördert werden. Die Apocarboanhydrase hat praktisch die gleiche Struktur des Proteins wie die Carboanhydrase (durch Sedimentation^[16] und ORD^[17] nachgewiesen), denaturiert jedoch leichter. Damit wird die Annahme gestützt, daß die Funktion des Zinks wahrscheinlich nicht in der Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins liegt, sondern daß es direkt am aktiven Zentrum beteiligt sein muß.

3.2. Ersatz des Zinks durch andere Metalle

Durch Zusatz äquimolarer oder auch Überschußmengen von Co²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Be²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ und Fe³⁺ wurden neue Derivate der Carboanhydrase hergestellt^[16,17]. Der Austausch eines Metall-Ions durch ein anderes in Verbindungen unbekannter Struktur gestattet wertvolle Schlüsse auf die Art der Metallkoordination, wenn man voraussetzt, daß alle Metall-Ionen an der gleichen Stelle gebunden werden. Bei der Carboanhydrase wird diese Annahme durch *Colemans* Beobachtung^[17] gestützt, daß die so gewonnenen Metall-Carboanhydrasen kein radioaktives Zink einbauen.

Ein Metallenzym läßt sich dadurch untersuchen, daß nur das Metall variiert wird. Wenn man die thermodynamischen, magnetischen, kinetischen und spektralanalytischen Eigenschaften der so erhaltenen Metallenzyme mit den Eigenschaften einfacher Komplexverbindungen der betreffenden Ionen vergleicht, ist es häufig möglich, Informationen über die Koordination im Enzym herzuleiten^[19].

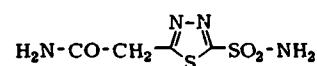
3.2.1. Aktivität der Metall-Carboanhydrasen

Typische Ergebnisse^[20] sind die folgenden Aktivitäten, die für etwa zurückgebliebenes Zink und die Restaktivität der Apocarboanhydrase korrigiert sind:

Native Carboanhydrase (CA) 100%; Zn²⁺ + apoCA, 94%; Co²⁺ + apoCA, 50%; andere Metall-Ionen + apoCA, 0%. Nur Zink- und Kobalt-Carboanhydrase sind signifikant aktiv.

3.2.2. Bindung von Inhibitoren

Inhibitoren werden je nach Aktivität verschieden stark gebunden (Abb. 2). Das Apoenzym und die inaktiven Metall-Carboanhydrasen binden Acetazolamid^[1] nur schwach,



im Gegensatz zu den aktiven Enzymen ZnCA und CoCA, die den Hemmstoff 10²- bis 10³-mal stärker binden und gehemmt werden. Das deutet sehr stark darauf hin, daß die

[*] 5-Sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-acetamid. Der Trivialname ist abgeleitet von 5-Acetamido-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid.

Sulfonamidgruppe und das Metall-Ion miteinander reagieren. Röntgen-Strukturanalyse, die Tatsache, daß Sulfonamide als Anionen gebunden werden, die Feststellung, daß andere hemmende Anionen nur gebunden werden, wenn ihre Konzentration groß genug ist, um das fester gebundene Sulfonamid zu verdrängen, sowie die UV-Spektren (siehe Abschnitt 3.2.3) stützen die Vorstellung einer Metall-Inhibitor-Bindung. Wenn demnach ein Hemmstoff an die Carboanhydrase gebunden wird, verändert er die Koordination des Zinks oder Kobalts wahrscheinlich dadurch, daß er eine schon vorher gebundene Gruppe ersetzt, wodurch die enzymatische Reaktion nicht mehr stattfinden kann. Auch die sigmoiden (im Gegensatz zu hyperboloiden) Bindungskurven für Acetazolamid zeigen, daß der Inhibitor irgendetwas ersetzt und nicht einfach zusätzlich ans Enzym angelagert wird.

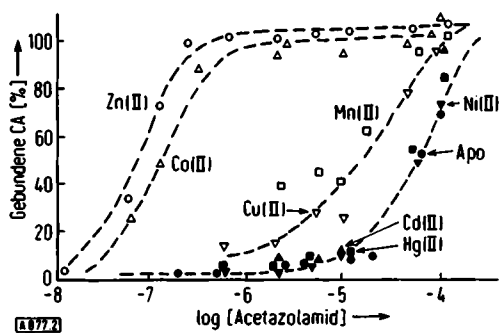


Abb. 2. Bindung von Acetazolamid an Metall-Carboanhydrase und Apocarboanhydrase (nach [18]).

3.2.3. Stöchiometrie, Kinetik und Thermodynamik der Bindung von Metall-Ionen

Ein allgemeines Charakteristikum der Koordinationschemie ist die Neutralisation von basischen Liganden-gruppen bei der Komplexbildung unter gleichzeitiger Freisetzung von Protonen, falls die Komplexbildung bei pH-Werten unterhalb des pK_s -Werts dieser Gruppen erfolgt. *Lindskog*^[21] zeigte allerdings, daß bei der Carboanhydrase das umgekehrte stattfindet, d. h. bei $pH = 6$:



und bei $pH = 9$:



Das Zink induziert demnach bei der Bindung eine weitere Ionisierung, woraus man auf eine Störung des Ligandenfeldes am Zink schließen darf, wenn der pH-Wert von 6 nach 9 übergeht. An der ZnCA kann das nicht nachgeprüft werden; es sollte sich aber am d-d-Elektronenspektrum der CoCA erkennen lassen. Tatsächlich ist das sichtbare Spektrum der CoCA in saurer und alkalischer Lösung verschieden^[21]; wohldefinierte isobestische Punkte zeigen, daß ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen nur zwei Formen existiert. Diese sind durch einen pK_s -Wert um 7.1 verbunden. Aus den Spektren geht hervor, daß die Koordination in beiden Formen irregulär ist (Abb. 3).

Wie *Coleman*^[22] nachgewiesen hat, wird die Ionisierung beim pK_s -Wert nicht nur durch Entfernung des Zinks, son-

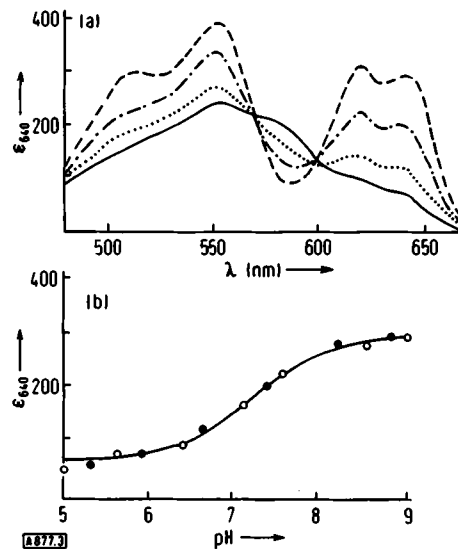
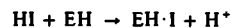
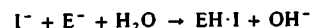


Abb. 3. Sichtbare Spektren von Kobalt-Carboanhydrase a) in saurer (—) und zunehmend alkalischer Lösung (·····, ---, - - -); b) Extinktion bei verschiedenen pH-Werten (aus [21]).

dern auch durch Einwirkung von Hemmstoffen aufgehoben. Die Bindung anionischer Inhibitoren ist bei niedrigen pH-Werten von der Abgabe von Protonen, bei hohen pH-Werten von der Abgabe von Hydroxid-Ionen begleitet; wenn E^- und EH die beiden Formen des Holoenzym und I^- das hemmende Anion sind, dann gilt in saurer Lösung



und in alkalischer Lösung



Die Mengen der freigesetzten H^+ - und OH^- -Ionen als Funktion des pH-Wertes konnten zu den pK_s -Werten des Inhibitors und des Enzyms in Beziehung gesetzt werden. Es sollte ausdrücklich festgehalten werden, daß die pK_s -Werte für die Aktivität, die Hemmung und die metall-abhängige Ionisierung etwa gleich groß sind. Man darf daher annehmen, daß die gleiche Gruppe an allen diesen Vorgängen beteiligt ist.

Über Kinetik und Thermodynamik der Zink-Bindung durch Carboanhydrase unterrichtet Tabelle 3^[23, 24]. Sie enthält die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung, die Aktivierungsparameter und die thermodynamischen Konstanten für die Bindung. Zum Vergleich sind die Daten für kleinere Liganden unterschiedlicher Koordinationszahl angegeben. Umsatzzahlen und Gleichgewichte sind trotz einer kleineren gegenläufigen Enthalpie entropie-bestimmt. Die Entropie-Terme sind bedeutend. Der einzige in dieser Hinsicht vergleichbare Ligand ist das formal sechszählige CDTA (Cyclohexendiamintetraacetat). Wenn es auch höchst unwahrscheinlich ist, daß die Carboanhydrase sechszählig ist (das Beispiel veranschaulicht die Gefahr der Überinterpretation eines ähnlichen Verhaltens von Enzym und vorgegebenem Modell!), hat die Ähnlichkeit der Carboanhydrase mit CDTA doch sehr wahrscheinlich denselben Grund: den Austritt einer großen Anzahl von Wassermolekülen. Bei CDTA wird der Effekt durch den Ladungsausgleich hervorgerufen, bei der Carboanhydrase kann durch

die Bindung des Metalls ebenfalls ein Ladungsausgleich im Bereich des aktiven Zentrums eintreten.

Noch ein weiterer Beweis hierfür mag angeführt werden (siehe dazu Zitate in [24]): Das UV-Differenzspektrum der ZnCA minus apoCA ähnelt dem Differenzspektrum, das man erhält, wenn man Tyrosin- oder Tryptophan-Derivate aus Wasser in ein weniger polares Lösungsmittel überführt. Die Analogie deutet an, daß eine oder mehrere Tyrosin- und/oder Tryptophangruppen im Apoenzym in einer stärker polaren Umgebung vorliegen als im Holoenzym. Andere Forscher schlossen aus dem Verhalten fluoreszierender Sulfonamide, daß das aktive Zentrum des nativen Enzyms unpolar ist. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß neuere Strukturuntersuchungen an einer Reihe von Enzymsystemen ergeben haben, daß das aktive Zentrum sich in unpolarer Umgebung befindet [24a].

Tabelle 3. Reaktionsgeschwindigkeits- und Gleichgewichtsparameter für die Reaktion $M + \text{apoCA} \rightarrow \text{MCA}$ (Daten aus [23, 24, 53, 54]).

M	Ligand	k (l mol ⁻¹ s ⁻¹)	ΔH^* (kcal/mol)	ΔS^* (cal grad ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal grad ⁻¹ mol ⁻¹)
Zn	typischer kleiner einzähniger	10 ⁷ –10 ⁸				
Zn	typischer kleiner zweizähniger (Bipyridyl)					
Zn	typischer kleiner dreizähniger (Terpyridyl)	10 ⁶	+ 6	- 9	- 10	+ 8
Zn	apoCA, pH = 5.5	10 ⁶	+ 8	- 4		
Zn	apoCA, pH = 7.0	< 10 ⁴	+ 21	+ 28	+ 3.9	+ 61
Co	apoCA, pH = 7.0	10 ⁴	+ 21	+ 30	+ 9.8	+ 88
Ni	apoCA, pH = 7.0				+ 9.4	
Cu	apoCA, pH = 7.0				+ 3.2	
Cd	apoCA, pH = 7.0				+ 3.4	
Zn	CDTA (Cyclohexendiamintetraacetat)				+ 4.4	
					+ 4.7	+ 82

Die positive Bindungsenthalpie begünstigt eine niedrige Koordinationszahl, so daß während der Reaktion mehr M—L-Bindungen geöffnet als geschlossen werden, wie man es erwarten sollte, wenn das Zink drei oder vier Koordinationsstellen hätte. (Hydratisiertes Zink besitzt die Koordinationszahl 6.) Diejenigen Metalle, deren Bindung ein aktives Enzym ergibt, werden zugleich am stärksten endotherm gebunden. Das ist auch im Einklang mit der Irving-Williams-Reihe für die Komplexstabilitäten ($\text{Co} < \text{Ni} < \text{Cu} > \text{Zn}$); falls die fünf Metalle Zn, Co, Cd, Cu und Ni alle an derselben Stelle gebunden werden, könnte diese Reihe für das Aktivitätsmuster verantwortlich sein. Dennard und Williams [19] haben darauf hingewiesen, daß ein katalytisch aktives Metall nicht zu fest an sein Apoenzym gebunden werden darf, weil es sonst seine Fähigkeit verliert, die Koordination zu ändern.

3.3. Spektroskopische und magnetische Untersuchungen

Der d-d-Übergang in Kobalt-Carboanhydrase ist ausführlich studiert worden. Grundsätzlich werden drei Arten von Spektren der CoCA erhalten: je ein Spektrum in saurer und alkalischer Lösung sowie eins für das gehemmte En-

zym (Abb. 4). Die Interpretation ist schwierig; jedenfalls läßt sich die Koordination nicht in einfacher Weise beschreiben. Das Spektrum von $\text{CoCA} \cdot \text{CN}^-$ ähnelt dem von $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ und deutet somit auf tetraedrische Koordination. Dieser Schluß ist aber nicht zwingend, weil irreguläre hexakoordinierte Co^{2+} -Komplexe bekannt sind, die sehr ähnliche Spektren aufweisen [23].

Coleman [17] hat an der Human-Carboanhydrase vom Typ B (HCAB) die optische Rotationsdispersion (ORD) gemessen. Zn-, Co- und apoCA besitzen im UV ähnliche ORD-Spektren, was jedoch nur besagt, daß sie praktisch dieselbe Proteinkonformation haben. Der sichtbare Bereich im ORD-Spektrum von CoCA ist trotz des d-d-Übergangs unausgeprägt. Das bedeutet, daß die Bindungsstelle des Kobalts optisch inert ist. Coleman postulierte, daß das Kobalt einen quadratisch-planaren Komplex bil-

det, an den zusätzlich H_2O oder OH^- gebunden sind, die als Liganden nicht stark genug sind, um die annähernde

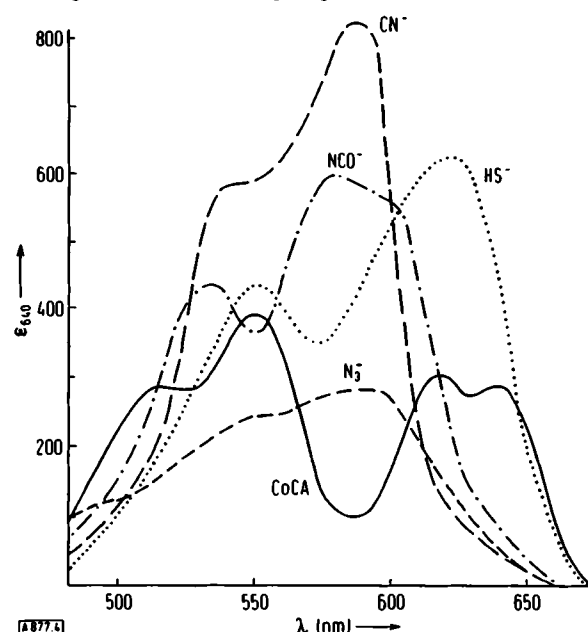


Abb. 4. Sichtbare Spektren von Kobalt-Carboanhydrase in alkalischer Lösung in Gegenwart hemmender Anionen (aus [21]).

Symmetrie zu stören. Tatsächlich wäre aber eine tetraedrische Koordination des Kobalts mit zwei äquivalenten Donormolekülen eine ebenso gute Erklärung; unter Berücksichtigung der Röntgen-Strukturuntersuchungen muß man sie wohl vorziehen. Inhibitoren erzeugen ein ORD-Spektrum der CoCA im sichtbaren Bereich, das sich als Folge des Austausches von H_2O oder OH^- durch einen in der spektrochemischen Reihe höherstehenden Liganden erklären läßt. Außerdem bindet CuCA Cyanid weniger stark als CoCA, was einer größeren Destabilisierung von trigonalem oder tetragonalem Cu^{2+} durch Zusatz eines axialen Liganden entspricht.

Eine ^{35}Cl -NMR-Untersuchung von ZnCA in Chloridlösung ergab, daß das Zink in Rinder-Carboanhydrase (BCA) wenigstens eine, und wahrscheinlich nur eine freie Koordinationsstelle besitzt. Ward^[26] zeigte anhand der Linienverbreiterung, daß die Chlorid-Ionen im $\text{CA}-\text{Cl}^-$ -Komplex direkt ans Zink gebunden sind. Der sich daraus ergebende Gradient der elektrischen Feldstärke hat schnelle Quadrupol-Relaxation zur Folge. Durch Titration mit Cyanid, das das Chlorid verdrängt, wurde die Zahl der gebundenen Chlorid-Ionen ermittelt. Die Bindung des Chlorids erwies sich als pH-abhängig. Der so bestimmte pK_a -Wert der Carboanhydrase hing seinerseits von der Chlorid-Ionen-Konzentration ab; er betrug 6.2 bei $[\text{Cl}^-]=0$ und 9.3 bei $[\text{Cl}^-]=0.5 \text{ mol/l}$. Die Erweiterung dieser Untersuchung auf Human- und Pferde-Carboanhydrase zeigte, daß die aktiveren Formen einen kleineren pK_a -Wert bei der Chlorid-Ionen-Konzentration $=0$ und eine höhere molare Relaxation als die weniger aktiven Formen haben. Wenn der pK_a -Wert vom ionisierenden zink-gebundenen Wasser herrührt, dann überrascht es nicht mehr, daß die stärkere Polarisierung des Liganden Wasser (höhere Feldstärke) von einer größeren molaren Relaxation (größerer Gradient der Feldstärke) begleitet ist. Beide könnten von der vergrößerten positiven Ladung am Zink-Ion herrühren. – Es wäre weitaus überraschender, wenn das stärker polarisierte Hydroxid-Ion nucleophiler wäre. Dies könnte andeuten, daß – falls der Hydroxid-Mechanismus richtig ist – die Aktivität der Carboanhydrase auch noch von anderen Faktoren abhängt.

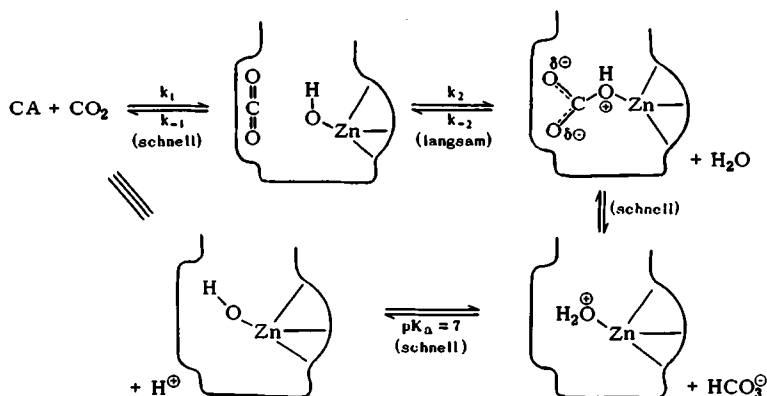
Eine Untersuchung^[27] der Lösungsmittel-Protonen-Relaxation durch das paramagnetische Co^{2+} -Ion in der CoCA ergab eine starke, pH-abhängige, hemmbare Relaxation, die mit dem aktiven Zentrum gekoppelt ist. Die Relaxation war bei niedrigem pH-Wert geringer; die saure Form des Enzyms besaß dieselbe molare Relaxation wie die gehemmte Form. Daraus wurde geschlossen, daß ein schnell austauschbares, Co-gebundenes Hydroxid-Ion durch Inhibitoren ersetzt oder durch Protonierung ($\text{pK}_a \approx 7$) am Austausch gehindert werden könnte. Für die schnell austauschende Form wurden aus der Relaxation mehrere Parameter berechnet: $r_{\text{Co}-\text{H}}$ (falls OH^- vorliegt) $= 2.5 \text{ \AA}$; $r_{\text{Co}-\text{H}}$ (falls OH_2 vorliegt) $= 2.8 \text{ \AA}$; Verweilzeit des Protons $\approx 10^{-5} \text{ s}$. Diese Werte sind zu gering für etwas anderes als $\text{Co}-\text{O}-\text{H}$. – Für den Abstand $r_{\text{Co}-\text{H}}$ in der alkalischen Form sind für $\text{Co}-\text{OH}_2$ 2.85 \AA zu erwarten. Dieser Wert stimmt zwar besser als der Wert für $\text{Co}-\text{OH}^-$ mit dem experimentell ermittelten überein, doch ist der Unterschied wahrscheinlich nicht signifikant, da die verwendete Technik $1/r^6$ ergibt.

Einen weiteren Beweis für die Zinkhydroxid/Zink-Wasser-Spezies finden wir in der Kinetik der Sulfonamid-Substitution^[28], die der Kinetik der Ligandensubstitution in der inneren Koordinationssphäre von 3d-Metall-Komplexen ähnelt. Nach einer Vorsättigung der äußeren Sphäre wird die Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung in der inneren Sphäre von der Natur des Substituenten unabhängig und hängt nur noch von der Geschwindigkeit ab, mit der Reaktionsstellen der inneren Sphäre von Wassermolekülen verlassen werden.

Obwohl sie nicht direkt mit dem Zink-Ion zusammenhängt, sollte noch die Arbeit von Riepe und Wang^[29] erwähnt werden, weil sie ein Hauptargument zum Problem der Substratbindung beisteuert. Durch sorgfältige IR-Differenz-Spektroskopie wurde gezeigt, daß CO_2 nicht direkt an Zink gebunden wird, während dies bei seinem isoelektronischen Analogon N_3^- der Fall ist. Allerdings schließen sich die Bindung von N_3^- und CO_2 gegenseitig aus. Das bedeutet, daß CO_2 sehr nahe am Zink-Ion gebunden wird, wo es gebundenen Liganden zugänglich ist. Außerdem zeigten Riepe und Wang, daß die Bindungskonstante des Azid-Ions mit steigendem pH-Wert abnimmt und keinem konstanten Wert zustrebt. Das bedeutet, daß das Azid-Ion gegen OH^- spezifisch ausgetauscht und nicht durch eine andere entprotonierte Gruppe ersetzt wird.

4. Die mechanistische Rolle des Zinks

Die oben dargestellten Ergebnisse liefern außerordentlich gute Hinweise dafür, daß das Zink-Ion in allen Formen der Carboanhydrase mit Protein und Wasser komplex gebunden vorliegt. Zwar kann nicht mit letzter Sicherheit bewiesen werden, daß der in der Chemie der Carboanhydrase stets wiederkehrende pK_a -Wert um 7 von der Ionisation eines zink-gebundenen Wassermoleküls stammt, doch ist es schwer möglich, die UV-Spektren und Relaxationsdaten anders zu deuten. Die Existenz des Zink-Aquo-Komplexes scheint eine notwendige Voraussetzung für die Aktivität



der Carboanhydrase zu sein. Unter Berücksichtigung des Hinweises, daß CO_2 nahe, aber nicht direkt am Zink gebunden ist, erscheint das abgebildete Schema recht einleuchtend^[30].

Kann nun diese Vorstellung der quantitativen Nachprüfung standhalten? Aus den CO_2 -Hydratationsdaten für

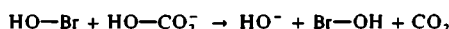
die alkalische Form der Rinder-Carboanhydrase ergibt sich $k_2 = 8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$, während $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1 = 0.0124 \text{ l mol}^{-1}$ ist^[6]. Da k_2 pH-abhängig ist, K_m aber nicht, ist wahrscheinlich $k_{-1} \gg k_2$. Nimmt man als unteren Grenzwert für k_{-1} $10k_2$ an, dann ergibt sich als unterer Grenzwert für $k_1 = 6 \cdot 10^8 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert liegt dicht bei der durch Diffusion gegebenen Grenze. Man muß daher ein ziemlich weit geöffnetes aktives Zentrum annehmen, was mit der beobachteten Bindung größerer aromatischer Substrate und Hemmstoffe im Einklang steht.

Tabelle 4. Vergleich von k_2 der Carboanhydrase (Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes) mit k_{OH^-} (Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall des Substrats in alkalischer Lösung).

Substrat	$k_2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$50 k_{OH^-} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
CO ₂	10 ⁶	0.4 · 10 ⁶
CH ₃ CHO	10 ³	200 · 10 ³
Pyridin-carbaldehyde	10 ²	2500 · 10 ²
p-Nitrophenylacetat	10	50 · 10

Falls der Reaktionsschritt mit der Geschwindigkeitskonstanten k_2 dem Angriff durch ein enzym-gebundenes Hydroxid-Ion entspricht, dann kann er mit der Geschwindigkeit des Angriffs durch ein freies Hydroxid-Ion verglichen werden (siehe Tabelle 4). Nur bei CO₂ ist k_2 unvernünftig groß, womit gezeigt ist, daß die katalytische Wirkung der Carboanhydrase nicht allein von der Bereitstellung „freien“ Hydroxids bei relativ niedrigen pH-Werten am aktiven Zentrum abhängt.

Die Dehydratisierung von Hydrogencarbonat ergibt ein ähnliches kinetisches Bild, obwohl die Rinder-Carboanhydrase^[6] nicht gesättigt sein kann, so daß der E—HCO₃⁻-Komplex sehr instabil sein muß. Caplow^[31] untersuchte als Modell die Katalyse der Dehydratation durch hypobromige Säure und schloß daraus, daß ein konzertierter elektrophiler Platzwechsel stattfinden muß:



Das Brom wirkt als Lewisäure. Diese Folgerung steht mit dem vorgeschlagenen Schema für die Dehydratisierung im Einklang. Eine Substitution des zink-gebundenen Wassers durch Hydrogencarbonat hätte die Bildung und den sofortigen Zerfall des Zink-Hydrogencarbonat-Komplexes zur Folge.

Der vorgeschlagene Reaktionsverlauf wirft eine Reihe von Fragen auf:

1. Läßt sich dadurch der sehr niedrige pK_a -Wert von Zn—OH₂ in der Carboanhydrase erklären?
2. Kann man den schnellen Protonenübergang in das Schema einbauen?
3. Kann man damit die außergewöhnliche Reihenfolge für die Bindung von Inhibitoren erklären?
4. Warum erfordert die Carboanhydrase sehr spezifisch Zn²⁺ oder Co²⁺?

Vor der Diskussion dieser Fragen sei auf einige der Konzepte eingegangen, die sich bisher in der Enzymchemie bewährt haben. Die Grundannahme ist natürlich, daß die Gruppen im Enzymmolekül denselben chemischen Prin-

zipien gehorchen, die das Verhalten kleiner Moleküle in wäßriger Lösung bestimmen. Die Katalyse durch Enzyme ist aus zwei Gründen besonders bemerkenswert: wegen der sehr beträchtlichen Beschleunigung von Reaktionen und wegen der großen, manchmal absoluten Substratspezifität. Meistens liegt eines der folgenden Konzepte den Erklärungsversuchen für diese Tatsachen zugrunde^[32]:

1. Das Schloß/Schlüssel-Bild, nach welchem Substrate als stereoelektronische und topographische Gegenstücke der substratbindenden Stelle am Enzym spezifisch gebunden werden. Die spezifische Bindung durch Metallion-Zentren in Enzymen erfaßt erwartungsgemäß hauptsächlich elektronenliefernde Substrate wie etwa Anionen, O₂ und CO. Es gibt dafür viele Beispiele^[33]. In solchen Fällen kann der Einfluß des Proteins auf das Metall nicht sehr bedeutend sein, solange das Metall genügend Koordinationsstellen besitzt, um das Substrat zu binden, sowie eine genügend große Ligandenaustauschgeschwindigkeit an den freien Stellen. Letztere ist eine Funktion der Donorkraft und der Geometrie des Proteins^[34].

2. Die Annäherung der reagierenden Gruppen in der Weise, daß die Stoßhäufigkeit und/oder der sterische Wahrscheinlichkeitsfaktor erhöht wird. Die Annäherung reagierender Gruppen bewirkt im einfachsten Fall einen Konzentrationsanstieg am aktiven Zentrum und erhöht somit die Stoßzahl. In zahlreichen Fällen^[35] läßt sich jedoch die große Reaktivität von normalerweise recht inerten Substraten nicht ausreichend durch Annäherung reaktiver Gruppen erklären. Auch für die Carboanhydrase – wie oben diskutiert – dürfte sie kaum ausreichen, weil eine unvernünftig große effektive OH⁻-Ionenkonzentration am aktiven Zentrum erforderlich wäre. Auch die erheblich herabgesetzte Aktivierungsenergie der katalysierten Reaktion ist so nicht zu erklären^[36]. Darüber hinaus wäre es auch nicht einleuchtend, wollte man dem zink-gebundenen OH⁻ die nucleophilen Eigenschaften des freien OH⁻ zuschreiben.

Für viele Reaktionen ist die Elektronenaktivierungsenergie eine empfindliche Funktion des Angriffswinkels; die Arrhenius-Gleichung gibt nur „Mittelwerte“ an. Erst kürzlich wurde versucht, die Enzymwirkung damit zu erklären, daß das Enzym die Substrate zum Zusammentreffen in einer festgelegten Orientierung zwingt, die einer viel niedrigeren Aktivierungsenergie entspricht als in freier Lösung beobachtet wird. Dieses Verhalten wird als Orbitalorientierung („orbital steering“) bezeichnet^[37]. Für die Funktion der Carboanhydrase kann eine solche Erklärung nicht ausgeschlossen werden.

3. Die Hypothese vom spannungsreichen Molekül. Im wesentlichen wird das Substratmolekül durch die Enzym-Substrat-Bindung in der Reaktionsrichtung verdrillt, wodurch die Aktivierungsenergie niedriger als beim Enzym-Substrat-Komplex im Grundzustand wird. Die Beteiligung von Metall-Ionen bei der Bildung des ES-Komplexes, in dem das Substratmolekül verdrillt wird, leuchtet vor allem deshalb ein, weil das Metall-Ion labile Bindungen zu Donoren ausbilden kann, bei denen die Donoratome oder -gruppen elektronisch und/oder geometrisch „verdrillt“ sind.

Das postulierte ionisierende Wassermolekül in der Carboanhydrase ist ein solcher Donor. Die Polarisationsenergie

von $[(\text{H}_2\text{O})_5\text{Zn}]^{2+}$ wird durch Vergleich der pK_a -Werte von H_2O , $(\text{H}_2\text{O})_5\text{ZnOH}^{2+}$ und H_3O^+ illustriert; die Werte betragen 15.7, $10.5^{[1]}$ bzw. -1.7 . So wird die Polarisationsenergie des pentakoordinierten Zink-Ions geringer als die eines Protons, wie man auch erwarten könnte. In der Carboanhydrase sinkt derselbe pK_a -Wert auf etwa 7.1, was eine ganz wesentliche Änderung ist.

4. Die Theorie des „außergewöhnlichen Mediums“. Danach sollen die Enzyme ein außergewöhnliches Milieu sein, das sich von der wäßrigen Lösung unterscheidet, in welcher die katalysierte Reaktion stattfindet. Es gibt Beweise, daß das Innere eines Enzyms viel weniger polar ist als sein Äußeres. Diese Ladungsverteilung soll die Konformation des Enzymmoleküls stabilisieren^[39], durch Röntgen-Strukturanalyse konnte diese Voraussage untermauert werden. Das inzwischen klassische Beispiel Lysozym^[40] enthält eine Furche oder Spalte. Das Substrat wird in dieser Furche gebunden, und die katalysierte Reaktion läuft dann im Innern des Enzyms ab. – Eine solche Theorie ist auch geeignet, um die Riesengröße vieler Enzymmoleküle im Vergleich zu ihren Substraten zu deuten.

Der Idee einer außergewöhnlichen Umgebung um das aktive Zentrum haben sich *Vallee* und *Williams*^[41] gewidmet. Sie heben besonders hervor, daß viele metallionenhaltige Enzyme ungewöhnliche Eigenschaften besitzen, insbesondere was ihre UV-Spektren, ESR-Spektren und Redoxpotentiale betrifft. Solche Anomalien fehlen bei biologischen Molekülen, in denen das Metall inaktiv ist. Bei der Hemmung oder Denaturierung gehen diese Eigenschaften häufig verloren. Die außergewöhnlichen Fähigkeiten von Metallenzymen werden der unüblichen Koordinationsgeometrie des Metall-Ions zugeschrieben, die mit einfachen Liganden nicht vorkommt. Diese Geometrie wird dem Metall vom Protein aufgezwungen, dessen Konformation festliegt. Dadurch werden die Eigenschaften des Metall-Ions hinsichtlich der Komplexbildung mit weiteren Liganden verändert (siehe Abschnitt 1). In der Carboanhydrase mag die Umgebung des Zinks oder Kobalts in dreifacher Hinsicht „außergewöhnlich“ sein: in der Konformation, die dem Metall-Ion durch das Protein aufgeprägt wird, in ihrer Unpolarität und in der Anordnung der Wassermoleküle um das Metall-Ion. (Daß Wassermoleküle an einer unpolaren Oberfläche in wäßriger Lösung relativ geordnet vorliegen, ist zu erwarten^[42].)

In welcher Weise ist nun die Koordination des Zinks anomal? Wenn die Koordinationszahl vier beträgt (drei Bindungen zum Protein, eine zum Wasser), dann kann die Restladung auf dem Zink größer sein als wenn das Zink hexakoordiniert wäre. Zwingend ist dieser Schluß allerdings nicht, weil als Donoren eher Stickstoffatome vom Imidazol als Sauerstoffatome vom Wasser fungieren. Eine größere Restladung auf dem Zink würde den pK_a -Wert des gebundenen Wassers herabsetzen. Die beobachtete Verschiebung um 3.5 Einheiten ist allerdings beträchtlich. Die unpolare Natur der Umgebung des Zinks könnte die Restladung weiter erhöhen; die Ionisierung wäre begünstigt, wenn sie den Ladungsausgleich innerhalb des Moleküls erleichterte.

[*] Diese Zahl ist aus dem tabellierten pK -Wert (9.7) [38, 43, 54] durch Anwendung einer statistischen Korrektur abgeleitet, welche die Zahl der ionisierbaren Protonen von 12 auf 2 herabsetzt.

Eine Schwierigkeit in allen mechanistischen Schemata, die für die Carboanhydrase entwickelt wurden, besteht darin, daß der Zink-Hydroxo-Komplex Hydroxid-Ionen an das Substrat abgibt und Wasser aufnimmt, das anschließend ionisiert wird. Bei der CO_2 -Hydratation (Umsatzzahl 10^6 s^{-1}) muß demnach das zink-gebundene Wasser mindestens mit dieser Geschwindigkeit ionisiert werden. Wenn nun aber der pK_a -Wert des Wassers 7.0 und die maximale diffusionskontrollierte Protonierungsgeschwindigkeit $10^{10} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ist, ergibt sich eine maximale Deprotonierungsgeschwindigkeit von nur $10^{10}/10^7 = 10^3 \text{ s}^{-1}$.

Die Vorstellung, daß ein benachbarter Histidinrest die Deprotonierung unterstützen könnte, leuchtet besonders deshalb nicht ein, weil eine solche Gruppe mit chemischen Methoden nur in einem einzigen Fall bei einer weniger aktiven Form der Carboanhydrase nachgewiesen werden konnte. Wenn allerdings das unpolare aktive Zentrum von einer Region geordneter Wassermoleküle umgeben ist, dann bestehen zwei Möglichkeiten:

1. Der wahre pK_a -Wert von ZnOH_2 ist noch kleiner als 7; die maximale Deprotonierungsgeschwindigkeit würde dadurch vergrößert. (Die Differenz zwischen dem wahren und dem beobachteten pK_a -Wert müßte dann durch ein Gleichgewicht zwischen solvatisierten Protonen in der geordneten Region und in der Gesamphase erklärt werden.)
2. Der diffusions-bedingte Grenzwert für den Protonenübergang ist wie in Eis stark erhöht^[42a], was einen gleichzeitigen Anstieg der maximalen Deprotonierungsgeschwindigkeit zur Folge hat.

Die Vorstellung von geordneten Wassermolekülen am aktiven Zentrum vermag auch die beobachtete Reihenfolge der Inhibitorbindung^[43] zu erklären, die der lyotropen Reihe entspricht^[44] (siehe Tabelle 2a). Die Bindung von Anionen und damit verbundene Veränderungen des Spektrums in der Kobalt(II)-Carboanhydrase zeigen, daß die Inhibitoren an das Metall gebunden werden; die Reihenfolge der Bindungskonstanten läßt sich aber leichter erklären, wenn man als thermodynamischen Antrieb für die Bindung die leichte Aufnahme von Anionen in eine geordnete Wasserstruktur annimmt. Eine Stabilisierung von Anionen, die ans aktive Zentrum gebunden werden, kann auch zur Erniedrigung der pK_a -Werte des zink-gebundenen Wassers beitragen.

Vom anorganischen Standpunkt aus ist die absolute Spezifität für Zn^{2+} oder Co^{2+} das bemerkenswerteste Kennzeichen der katalytischen Aktivität der Carboanhydrase. Kein anderes Metall-Ion verleiht der Apocarboanhydrase signifikante Aktivität, so daß Zn^{2+} und Co^{2+} wahrscheinlich mehr als nur eine entscheidend wichtige Eigenschaft für die Hydrolyse beisteuern.

Man kann die Eigenschaften von Zn^{2+} und Co^{2+} mit denen anderer Ionen vergleichen. Ionenradius, Austauschgeschwindigkeit des Wassers in der inneren Koordinationsphäre und Stärke der Bindung an Imidazol sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Keine dieser Eigenschaften deutet auf ein spezielles Verhalten von Zink- und Kobalt-Ionen.

Die beste Erklärung scheint in der Fähigkeit der beiden Metall-Ionen zur Bildung verzerrter Koordinationspolyeder zu liegen („Koordinationsflexibilität“)^[45]. Dies wird

aus Tabelle 6 ersichtlich, in der als Beispiele die Stabilitätskonstanten für die Komplexe zweier Chelatbildner mit mehreren Metall-Ionen verglichen werden. Der Ligand L^1 ergibt mit zwei Wassermolekülen und einem Metall-Ion einen oktaedrischen Komplex, während dies bei L^2 nur mit einiger Verzerrung erreicht werden kann.

Tabelle 5. Ausgewählte Eigenschaften von Metall-Ionen (siehe Text).

Metall-Ion	Ionenradius (Å) [a]	Wasseraustauschgeschwindigkeit $\log_{10}K$ (s^{-1}) [53]	Stabilitätskonstante des Imidazol-Komplexes $\log_{10}K$ (l/mol) [54]
Mn^{2+}	0.80	7.6	1.65
Fe^{2+}	0.76	6.5	—
Co^{2+}	0.71	6.4	2.23
Ni^{2+}	0.69	4.4	3.27
Cu^{2+}	0.92	9.9	4.26
Zn^{2+}	0.72	7.5	2.57
Cd^{2+}	0.95	—	2.80

[a] Vgl. [45], dort S. 45.

Es wäre nach diesen Ergebnissen möglich, daß allein Zn^{2+} und Co^{2+} Imidazol auch in nicht-oktaedrischer Anordnung binden könnten. Andere Metalle, die stärker an Imidazol gebunden werden, würden den Donoratomen oktaedrische Geometrie aufzwingen und das aktive Zentrum erheblich verzerren. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, daß Imidazol unter ähnlichen Bedingungen sowohl oktaedrische (Hexakis-) als auch tetraedrische (Tetrakis-)Komplexe mit Co^{2+} bilden kann^[46].

Tabelle 6. Stabilitätskonstanten von Chelaten (siehe Text). $L^1 = H_2N(CH_2CH_2NH)_3H$, $L^2 = N(CH_2CH_2NH_2)_3$, $K_1 = \frac{[ML_i]}{[M][L_i]}$ (Daten aus [54]).

M	$\log_{10}K_1$	$\log_{10}K_2$	$\log_{10} \frac{K_2}{K_1}$
Mn^{2+}	5.0	5.7	0.7
Fe^{2+}	8.0	8.7	0.7
Co^{2+}	11.0	12.7	1.7
Ni^{2+}	14.1	14.8	0.7
Cu^{2+}	20.5	18.7	-1.8
Zn^{2+}	11.9	14.5	2.6
Cd^{2+}	10.8	12.3	1.5
Hg^{2+}	25.3	26	0.7

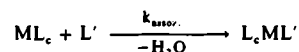
Auf der einfachen Grundlage der Koordinationsflexibilität könnte man erwarten, daß auch Cd^{2+} und Mn^{2+} die Apocarboanhydrase aktivieren. Keines der beiden sollte koordinations-selektive Ligandenfeldstabilisierungsenergien (LFSE) zeigen, und außerdem ist Cd^{2+} bekanntlich in vieler Hinsicht ein Analogon des Zn^{2+} ^[45]. Tatsächlich ist aber weder Cd^{2+} noch Mn^{2+} in der Carboanhydrase aktiv, was lediglich darauf hindeutet, daß ein bisher unbekannter Faktor in der Carboanhydrase mitwirkt – besonders wenn man bedenkt, daß Co/Zn-Enzyme, wie etwa Carboxypeptidase^[47] und alkalische Phosphatase^[48], durch Cd^{2+} und Mn^{2+} partiell aktiviert werden können.

Das Studium der Carboanhydrase gestattet demnach Aussagen über die Eigenschaften von Metallen in Systemen, in denen die Koordination eher durch die Liganden als durch das Metall festgelegt ist. Die postulierte Wirkungsweise des Enzyms basiert auf der Annahme eines aktivierten, komplex gebundenen Wassermoleküls und erfordert 1., daß die

Säuredissoziation dieses Moleküls thermodynamisch und kinetisch sehr viel leichter verläuft als die entsprechende Dissoziation des freien hydratisierten Zink-Ions, und 2., daß der Hydroxo-Komplex sehr stark nucleophil ist. Um diese Vorstellungen zu überprüfen, ist gewiß eine quantitative Untersuchung vonnöten. Die beiden Forderungen

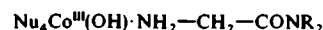
können nur von einem Metall-Ion erfüllt werden, dessen Polarisierungskraft groß, aber nicht zu groß ist.

Die Komplexbildungsgeschwindigkeiten $k_{\text{assoz.}}$ bei der Reaktion

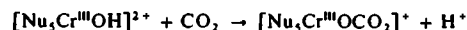


hängt je nach Metall-Ion überhaupt nicht ($M = Mg^{2+}$) oder mehr oder weniger stark ($M = Mn^{2+}$, Cu^{2+} , Zn^{2+}) von L_c ab^[49]. Die drei letztgenannten Ionen sind stärker polarisierbar als z. B. Mg^{2+} . Interessant ist ein Beispiel^[50], in dem sich Zn^{2+} und Co^{2+} gleichartig verhielten, Ni^{2+} aber anders, als L_c variiert wurde.

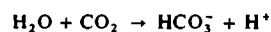
Sehr wenig ist über die Nucleophilie von metall-gebundenem Wasser oder metall-gebundenen Hydroxid-Ionen bekannt, wenn es auch Hinweise gibt, daß $Cr^{III}-OH$ und $Co^{III}-OH$ gute Nucleophile sind; Buckingham et al.^[51] konnten zeigen, daß der Komplex



sehr schneller intramolekularer Hydrolyse der Amidgruppe unterliegt, während Earley et al.^[52] feststellten, daß die Reaktion



mindestens 10^4 -mal schneller als die Reaktion



verläuft^[1].

[*] Anmerkung bei der Korrektur (24. April 1972): Khalifah [56] fand inzwischen, daß die Michaelis-Konstanten für die durch Human-Carboanhydrase, Form C, katalysierte CO_2 -Hydratation im Gegensatz zu früheren Ergebnissen pH-unabhängig sind. Demnach ist die Humanmit der Rinder-Carboanhydrase zu vergleichen (s. Tabelle 1).

Mit einem durch die Nitroxid-Gruppe spinmarkierten Sulfonamid wurde das aktive Zentrum der Rinder-Carboanhydrase untersucht [57]. Die Analyse des ESR-Signals des Nitroxid-Radikals legte nahe, daß der 11 Å vom Zink-Ion entfernte Teil der Höhlung nicht unpolar, sondern stark polar ist. Alle Folgerungen, die auf der Annahme ausschließlich unpolarer Aminosäurereste in dieser Region basieren, müssen demnach infrage gestellt werden, bis die Röntgen-Strukturanalyse des Moleküls abgeschlossen ist.

An zinkhaltigen Modellsystemen haben wir zwei Probleme untersucht, welche die Chemie der Carboanhydrase aufwirft: das Ausmaß, in welchem einfachere organische Systeme bei der Katalyse von Reaktionen der Carbonylverbindungen mit Zink-Ionen kooperieren können [58], und die Frage des pK_a -Wertes von zink-gebundenem Wasser.

Wir sind Herrn Dr. K. K. Kannan und Herrn Dr. A. Liljas sehr dankbar, daß sie uns die Ergebnisse der Röntgen-Strukturanalyse der Carboanhydrase vor der Veröffentlichung zugänglich gemacht haben. – P. R. W. dankt dem Science Research Council of the U. K. für ein Forschungsstipendium.

Eingegangen am 24. Mai 1971 [A 877]
Übersetzt von Priv.-Doz. Dr. Klaus Wegmann, Tübingen

- [1] N. U. Meldrum u. F. J. W. Roughton, J. Physiol. 75, 15 P (1932).
- [1a] D. P. Craig u. R. S. Nyholm in F. P. Dwyer u. D. P. Mellor: Chelating Agents and Metal Chelates. Academic Press, New York 1964.
- [2] Y. Pocker u. J. E. Meany, J. Amer. Chem. Soc. 87, 1809 (1967); Biochemistry 6, 239 (1967).
- [3] Y. Pocker u. J. T. Stone, Biochemistry 7, 4139 (1968), und ältere Arbeiten.
- [4] K. Lo u. E. T. Kaiser, J. Amer. Chem. Soc. 91, 4912 (1969).
- [5] P. Henkart, G. Guidotti u. J. T. Edsall, J. Biol. Chem. 243, 2447 (1968).
- [6] J. C. Kernohan, Biochim. Biophys. Acta 96, 304 (1965).
- [7] D. M. Kern, J. Chem. Educ. 37, 14 (1960).
- [8] J. T. Edsall, Ann. New York Acad. Sci. 151, 41 (1968).
- [9] J. C. Erikson u. G. Gillberg, Acta Chem. Scand. 20, 2019 (1966).
- [10] R. Wolfenden, Nature 223, 704 (1969).
- [11] N. Kakeya, M. Aoki, A. Kamada u. N. Yata, Chem. Pharm. Bull. 17, 1010 (1969).
- [12] Siehe z. B. P. O. Nyman u. S. Lindskog, Biochim. Biophys. Acta 85, 141 (1964).
- [13] K. Fridborg, K. K. Kannan, A. Liljas, J. Lundin, B. Strandberg, R. Strandberg, B. Tilander u. G. Wiren, J. Mol. Biol. 25, 505 (1967).
- [14] A. Liljas, Vortrag in Cambridge, Juni 1970; A. Kannan, persönliche Mitteilung.
- [15] E. Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 35, 80 (1949).
- [16] S. Lindskog u. B. G. Malmström, J. Biol. Chem. 237, 1129 (1962).
- [17] J. E. Coleman, Biochemistry 4, 2644 (1965).
- [18] J. E. Coleman, Nature 214, 193 (1967).
- [19] Siehe z. B. A. E. Dennard u. R. J. P. Williams in R. L. Carlin: Transition Metal Chemistry. Bd. 2, S. 116.
- [20] Berechnet nach Coleman [18] und für Rest-Zink sowie Aktivität der Apocarboanhydrase korrigiert.
- [21] S. Lindskog, J. Biol. Chem. 238, 945 (1963).
- [22] J. E. Coleman, J. Biol. Chem. 242, 5212 (1967).
- [23] R. W. Henkens u. J. M. Sturtevant, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2669 (1968).
- [24] R. W. Henkens, G. D. Watt u. J. M. Sturtevant, Biochemistry 8, 1874 (1969).
- [24a] M. F. Perutz, Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B 257, 265 (1970); D. M. Blow u. T. A. Steitz, Annu. Rev. Biochem. 39, 64 (1970).
- [25] F. A. Cotton u. R. H. Soderberg, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2402 (1963).
- [26] R. L. Ward, Biochemistry 8, 1879 (1969); 9, 2447 (1970).
- [27] M. E. Fabry (Riepe), S. H. Koenig u. W. E. Schillinger, J. Biol. Chem. 245, 4256 (1970).
- [28] J. Olander u. E. T. Kaiser, J. Amer. Chem. Soc. 92, 5758 (1970).
- [29] M. E. Riepe u. J. H. Wang, J. Biol. Chem. 243, 2779 (1968).
- [30] Zuerst vorgeschlagen von R. P. Davis. Siehe Boyer et al.: The Enzymes. Bd. 5, S. 545.
- [31] M. Caplow, J. Amer. Chem. Soc. 93, 230 (1971).
- [32] Eingehende Diskussion siehe W. P. Jencks: Catalysis in Chemistry and Enzymology. McGraw-Hill, New York 1969.
- [33] Siehe z. B. J. O. Alben, L. Yen u. N. J. Farrier, J. Amer. Chem. Soc. 92, 4475 (1970); K. Garbett, D. W. Darnall, I. M. Klotz u. R. J. P. Williams, Arch. Biochem. Biophys. 135, 419 (1969); J. Naylor u. R. J. P. Williams: The Chemistry of Alkaline Phosphatase Catalysis. Tagung der Chem. Soc., Canterbury, Juli 1970.
- [34] J. P. Jones, E. J. Billo u. D. W. Margerum, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1875 (1970).
- [35] Diskussion in [32], dort Kapitel 1.
- [36] Siehe [30], dort S. 556.
- [37] D. R. Storm u. D. E. Koshland, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66, 445 (1970).
- [38] T. M. Hunt: Metal Ions in Aqueous Solution. Benjamin, London 1963, S. 50.
- [39] H. F. Fischer, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 1285 (1960); siehe [24a].
- [40] D. C. Phillips, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 484 (1967).
- [41] B. L. Vallee u. R. J. P. Williams, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 498 (1968); Chem. Brit. 1968, 399.
- [42] Siehe [32], dort Kapitel 8.
- [42a] M. Eigen in S. Claesson: Proceedings of 5th Nobel Symposium. Interscience, New York 1967, S. 246.
- [43] J. A. Verpoorte, S. Mehta u. J. T. Edsall, J. Biol. Chem. 242, 4221 (1967).
- [44] M. J. Blandamer, Quart. Rev. Chem. Soc. 24, 169 (1970); I. Fridovitch, J. Biol. Chem. 238, 592 (1963).
- [45] Siehe z. B. F. A. Cotton u. G. Wilkinson: Advanced Inorganic Chemistry. Wiley, New York 1966, 2. Aufl., S. 610, 865; vgl. F. A. Cotton u. G. Wilkinson: Anorganische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim 1968.
- [46] W. J. Davis u. J. Smith, J. Chem. Soc. A 1971, 317.
- [47] D. S. Auld u. B. L. Vallee, Biochemistry 9, 4353 (1970).
- [48] M. L. Applebury, B. P. Johnson u. J. E. Coleman, J. Biol. Chem. 245, 4968 (1970).
- [49] M. A. Cobb u. D. N. Hague, Chem. Commun. 1971, 20; T. J. Cayler, M. A. Cobb, D. N. Hague, A. M. John u. D. J. Zetter: The Role of Metals in Enzymic Reactions. Tagung der Chem. Soc., Canterbury 1970.
- [50] M. A. Cobb u. D. N. Hague, Chem. Commun. 1971, 20.
- [51] D. A. Buckingham, D. M. Foster u. A. M. Sargeson, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6151 (1970).
- [52] J. E. Earley u. W. Alexander, J. Amer. Chem. Soc. 92, 2294 (1970).
- [53] D. J. Hewkin u. R. H. Prince, Coord. Chem. Rev. 5, 61 (1970).
- [54] L. G. Sillen u. A. E. Martell: Stability Constants. Spec. Publ. Nr. 17, Chem. Soc., London 1964.
- [55] H. A. Krebs, Biochem. J. 43, 525 (1948).
- [56] R. G. Khalifah, J. Biol. Chem. 246, 2561 (1971).
- [57] J. F. Hower, R. W. Henkens u. D. B. Chesnut, J. Amer. Chem. Soc. 93, 6665 (1971).
- [58] R. H. Prince u. P. R. Wolley, J. Chem. Soc. (Dalton), im Druck.

ZUSCHRIFTEN

Einfache Synthese von [2.2]Paracyclophanen

Von Henning Hopf^[*]

Herrn Professor R. Criegee zum 70. Geburtstag gewidmet.

Additionsreaktionen an 1,2,4,5-Hexatetraen (Biallenyl) (1)^[1] sind von Interesse, da dieser acyclische C₆H₆-

Kohlenwasserstoff ein konjugiertes und zwei kumulierte Diensysteme enthält. Um zu prüfen, ob die [2+2]-Cycloaddition an die Allengruppen oder die [2+4]-Cycloaddition an die „inneren“ Doppelbindungen bevorzugt ist^[2], haben wir (1) mit Dienophilen umgesetzt; wir berichten hier über die Reaktion von Biallenyl (1) und Acetylendicarbonsäure-dimethylester (2).

Neunstündiges Erwärmen (65°C) einer Lösung äquimolarer Mengen von (1) und (2) in Benzol liefert, nach Entfernen des Lösungsmittels und Umkristallisation (Ben-

[*] Dr. H. Hopf
Institut für Organische Chemie der Universität
75 Karlsruhe, Richard-Willstätter-Allee 2