

Entropie, Bindungsenergie und enzymatische Katalyse^[**]

Von M. I. Page^[*]

Warum verlaufen enzymkatalysierte Reaktionen so viel schneller als unkatalysierte Reaktionen, und warum wirken Enzyme so spezifisch? Welchen Einfluß hat die bloße Annäherung von Enzym und Substrat, und wie wirkt sich die Spannungsenergie aus? Um diese Fragen zu beantworten, wurden u. a. Entropieänderungen bei intermolekularen und intramolekularen Reaktionen miteinander verglichen und die Innere Energie der Bindung bestimmt, die durch nichtkovalente Wechselwirkung von Enzym und Substrat zustandekommt.

1. Einleitung

Alle biologischen und chemischen Strukturen und Prozesse sind das Resultat von intramolekularen und intermolekularen Kräften. Die intermolekularen nichtkovalenten Kräfte, die zwei Moleküle zusammenhalten, sind für so unterschiedliche Phänomene wie die Existenz von Dimeren eines inerten Gases oder die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen verantwortlich. Auf diesen Kräften beruht auch die Bildung von Enzym-Substrat-Komplexen; die Innere Energie der Bindung, die aus der nichtkovalenten Wechselwirkung eines Substrates mit einem Enzym resultiert, scheint für einen großen Teil des enormen Geschwindigkeitsunterschieds der enzymkatalysierten und der nicht enzymkatalysierten Reaktionen verantwortlich zu sein^[1].

Die Wege, auf denen kovalente Bindungen in enzymkatalysierten Reaktionen gebildet oder gespalten werden, sind offensichtlich nicht von ungewöhnlicher Art; die Mechanismen, die man einfachen chemischen Reaktionen üblicherweise zugrunde legt, sind auch auf biochemische Reaktionen anwendbar. Die Vergrößerung der Geschwindigkeit läßt sich bei *einigen* enzymkatalysierten Reaktionen bereits durch die simple Anwendung gebräuchlicher chemischer Mechanismen erklären, z.B. die kovalente Katalyse, bei der sich eine kovalente Bindung zwischen Enzym und Substrat bildet^[2]. Dennoch kann man aus dem tatsächlichen Reaktionsmechanismus nicht immer die enorme Steigerung der Geschwindigkeit ableiten, die durch die Enzymkatalyse hervorgerufen wird. Dies gilt besonders bei Beteiligung der allgemeinen Säure- oder Basekatalyse. Diese Reaktionswege sind nämlich nicht besonders effizient, was man aus der vergleichsweise geringen Geschwindigkeitssteigerung schließen kann, die beim Übergang von einer derartig katalysierten intermolekularen Reaktion zu einer entsprechenden intramolekularen Reaktion auftritt^[3, 4].

In der anschließenden Diskussion wollen wir uns auf folgende Fragen beschränken:

1. Warum sind die Geschwindigkeiten enzymkatalysierter Reaktionen so hoch?
2. Warum reagieren einige kleine unspezifische Substrate, die im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden werden, so langsam?
3. Warum ist die Energie der Bindung, die aus der nichtkovalenten Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat resultiert, so groß?

[*] Dr. M. I. Page
Department of Chemical Sciences
The Polytechnic
Huddersfield HD1 3DH (England)

[**] Nach einem Vortrag beim Symposium "Drug-Receptor and Drug-Enzyme Interactions", Namur (Belgien), Mai 1976.

Wir glauben, daß die Beschleunigung der Reaktion durch Enzyme zum überwiegenden Teil der großen Inneren Energie der Bindung zwischen dem Substrat und den dichtgepackten, kovalent miteinander verbundenen Atomen im Protein zuzuschreiben ist. Diese Wechselwirkung von Substraten mit Enzymen ist größer als etwa mit dem Lösungsmittel oder mit Festkörpern, da die Anzahl und möglicherweise die Stärke der wirksamen Dispersionskräfte in Enzym-Substrat-Komplexen größer als in Enzym-Lösungsmittel- oder Enzym-Festkörper-Komplexen ist. Wir glauben jedoch auch, daß die enzymatische Katalyse nicht vollständig verstanden werden kann, wenn man den Substratbindungsprozeß von den chemischen Mechanismen der Katalyse trennt, d.h. wenn man versucht, die Spezifität bzw. die Beschleunigung der Reaktion gesondert zu erklären.

Eine obere Grenze für die Geschwindigkeitssteigerung, die durch Bindung der Reaktanden an das aktive Zentrum eines Enzyms oder durch kovalente Verknüpfung der Reaktanden wie in einer intramolekularen Reaktion zu erreichen ist, kann man aus den unterschiedlichen Entropieänderungen von bimolekularen und monomolekularen Reaktionen abschätzen. Dies gilt allerdings nur, falls dabei keinerlei Spannungseffekte eine Rolle spielen. Im folgenden wird gezeigt werden, daß theoretische und experimentelle Studien intramolekularer Reaktionen zu einem maximalen Wert von etwa 10^8 mol l^{-1} führen.

Ebenfalls werden wir sehen, daß es nicht zulässig ist, anhand der relativen Geschwindigkeiten einer Serie von intramolekularen Reaktionen völlig neue Theorien über die Enzymwirkung zu beweisen. Unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten können ebenso gut durch unterschiedliche Änderungen der Entropie und der Konformationsenergie der untersuchten Systeme erklärt werden.

2. Einige ausgewählte Probleme

2.1. Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit

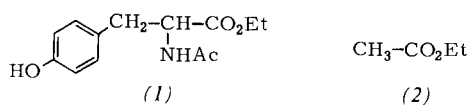
Die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion ist um vieles höher als die einer unkatalysierten Reaktion. Zum Beispiel verläuft die durch Leber-Esterase katalysierte Esterhydrolyse sehr viel schneller als die nicht enzymkatalysierte Reaktion^[5]. Es entstehen jedoch bereits Probleme, wenn man diese einfache Feststellung quantitativ betrachten möchte. Soll man die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Hydrolyse mit der Geschwindigkeit der wasser-, der säure- oder der basekatalysierten Hydrolyse desselben Substrates vergleichen? Welche Reaktion man auch immer zum Vergleich heranzieht – die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion ist oft um etwa zehn Größenordnungen höher als die der nichten-

zymatischen Reaktion. Zum Beispiel ist die Wechselzahl der durch Leber-Esterase katalysierten Hydrolyse von Essigsäureethylester etwa 10^{13} mal größer als die Geschwindigkeit der pH-unabhängigen wasserkatalysierten Hydrolyse und immer noch etwa 10^{10} mal größer als die Geschwindigkeit der durch Hydroxid-Ionen katalysierten Hydrolyse bei $\text{pH} \approx 7$ ^[5]. Ein anderes Beispiel ist die Geschwindigkeitssteigerung der Enolisierung von Dihydroxyacetonphosphat bei der Katalyse durch Triosephosphat-Isomerase um einen Faktor größer als 10^9 ^[6]. Dies ist allerdings eine untere Grenze, da bei dieser Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht in der Bildung oder Spaltung von Bindungen, sondern im Abdiffundieren des Produkts D-Glycerinaldehyd-3-phosphat vom Enzym besteht^[6]. Es sei hier kurz daran erinnert, daß z. B. eine Geschwindigkeitssteigerung um den Faktor 10^{10} die Halbwertszeit einer Reaktion von 300 Jahren auf 1 Sekunde verkürzen würde.

Eine andere Schwierigkeit liegt darin, daß man manchmal Geschwindigkeiten von Reaktionen unterschiedlicher kinetischer Reaktionsordnung miteinander vergleichen muß. Dabei ergeben sich Verhältniszahlen mit der Dimension einer Konzentration (siehe Abschnitt 3).

2.2. Spezifität

Wird ein großes Substratmolekül vom Enzym nur schwach gebunden, so kann dies z. B. durch ungünstige sterische Effekte erklärt werden. Das Substrat ist einfach zu groß, um in das aktive Zentrum hineinzupassen. Schwieriger ist es zu verstehen, warum einige kleine unspezifische Substratmoleküle, die an das aktive Zentrum von Enzymen gebunden werden können, sehr langsam reagieren. So wird z. B. Chymotrypsin durch das spezifische Substrat *N*-Acetyl-L-tyrosin-ethylester (1) um mehr als 4×10^7 mal schneller acyliert als durch das kleine, unspezifische Substratmolekül Essigsäureethylester (2)^[7, 8]. Die Reaktivität der Estergruppe ist in diesen beiden Molekülen wahrscheinlich sehr ähnlich, und das Essigsäureethylestermolekül sollte in das aktive Zentrum des Enzyms passen. Dennoch ist seine Freie Aktivierungsenergie um wenigstens 43 kJ mol^{-1} höher als die des größeren Substratmoleküls.



Mit diesen beiden Problemen, nämlich der enormen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Spezifität enzymkatalysierter Reaktionen, wollen wir uns im folgenden befassen.

3. Annäherungseffekt und intramolekulare Reaktionen

Im allgemeinen wird angenommen, daß zur Wirksamkeit der Enzymkatalyse folgende Effekte beitragen:

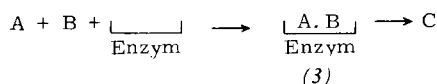
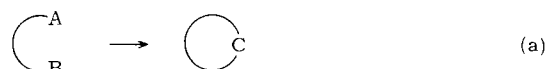
1. Die kovalente Katalyse,
2. die allgemeine Säure- oder Basekatalyse,
3. die räumliche Annäherung der Partner,
4. Spannungen oder Deformationen.

Von kovalenter Katalyse spricht man, wenn eine elektrophile oder nucleophile Gruppe in der Peptidkette des Enzyms eine kovalente Bindung mit dem Substratmolekül bildet. Saure und basische Gruppen können dabei als allgemeine Säuren

oder allgemeine Basen fungieren, indem sie das Substratmolekül protonieren oder diesem Protonen entziehen. Solche Katalysemechanismen sind bereits anderswo^[2] gut beschrieben und sollen deshalb hier nicht weiter behandelt werden. Außerdem dürften die Enzyme auch dadurch so wirksam sein, daß sie die Reaktanden in einen engen Kontakt zueinander bringen. Dieses Zusammenführen der Reaktanden wird als Annäherungs- oder Nachbarschaftseffekt bezeichnet. Enzyme könnten eine Reaktion auch dadurch erleichtern, daß sie Spannungs- oder Deformationseffekte im Substrat induzieren. Dessen Destabilisierung kann sowohl geometrischer als auch elektrostatischer Natur sein oder etwa durch Desolvatation hervorgerufen werden. Dieses Phänomen hängt aber grundsätzlich von der Energie der Bindung zwischen Enzym und Substrat ab. Eine derartige, im Substrat induzierte Destabilisierung kann nämlich nur dann zu einer Beschleunigung der Reaktion führen, wenn sie durch Bindungsenergie „bezahlt“ wird^[7, 9].

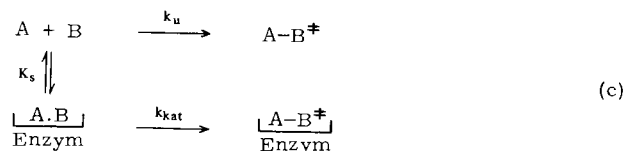
Im folgenden wollen wir uns nun besonders mit den Annäherungseffekten und mit intramolekularen Reaktionen als Modellen für enzymkatalysierte Reaktionen befassen.

Es ist lange bekannt, daß intramolekulare Reaktionen (a), bei denen die Reaktanden kovalent miteinander verknüpft sind, oft sehr viel schneller ablaufen als die analogen intermolekularen Reaktionen (b). Solche intramolekularen Reaktionen



werden häufig als Modelle für enzymkatalysierte Reaktionen herangezogen, bei denen die Reaktanden im Enzym-Substrat-Komplex (3) in enger Nachbarschaft zueinander festgehalten werden. Es ist deshalb vorgeschlagen worden, daß ein Enzym eine Reaktion auch durch diese Annäherung der Reaktionspartner erleichtern kann.

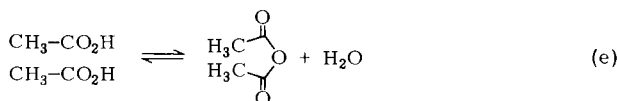
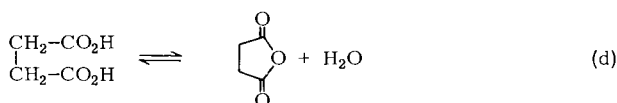
Das Problem besteht dann darin, die maximale Geschwindigkeitsdifferenz zwischen k_{kat} (für die enzymkatalysierte Reaktion) und k_{u} (für die nichtkatalysierte Reaktion) [Gl. (c)] allein auf der Grundlage der Annäherungseffekte abzuschätzen, d. h. in Abwesenheit von Spannungs- oder Solvationseffekten so-



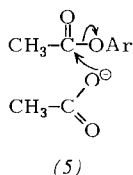
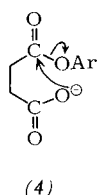
wie einer besonderen chemischen Katalyse durch das Enzym. Das Verständnis intramolekularer Reaktionen ist für die Lösung dieses Problems der enzymatischen Katalyse sehr wichtig. Wir wollen nun versuchen, die Geschwindigkeitssteigerungen in diesen Systemen zu erklären.

Typisch für intramolekulare Reaktionen ist eine enorme Beschleunigung der Reaktion und die Bildung besonderer Gleichgewichtszustände. Dies soll anhand einiger Reaktionen

der Bernsteinsäure und ihrer Derivate demonstriert werden. Die Gleichgewichtskonstante für die Bildung von Bernstein-



säureanhydrid aus Bernsteinsäure [Gl. (d)] ist $3 \times 10^5 \text{ mol l}^{-1}$ größer als diejenige für die Bildung von Essigsäureanhydrid aus Essigsäure [Gl. (e)], eine analoge intermolekulare Reaktion^[10]. Ähnlich verhalten sich die Geschwindigkeiten derartiger Reaktionen. So verläuft z. B. die Bildung von Bernsteinsäure-

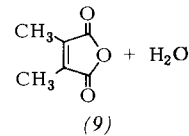
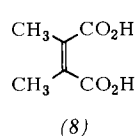
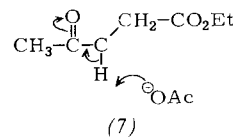
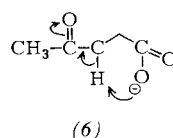


reanhydrid aus dem Bernsteinsäuremonoester, die über einen intramolekularen nucleophilen Angriff der Carboxylatgruppe auf die Estergruppierung (4) erfolgt, ebenfalls um etwa 10^5 mol l^{-1} schneller als die analoge intermolekulare Bildung von Essigsäureanhydrid (5)^[11]. Die Begünstigung intramolekularer Reaktionen gegenüber ihren intermolekularen Analoga äußert sich also sowohl in den Geschwindigkeiten als auch in der Lage der Gleichgewichte. Deshalb bedürfen die Unterschiede in der Geschwindigkeit auch keiner speziellen Erklärung durch besonders geartete Aktivierungskomplexe^[4].

Da man hierbei jeweils eine monomolekulare mit einer bimolekularen Reaktion vergleicht, wird die Erhöhung der Geschwindigkeit oder die Verschiebung des Gleichgewichts durch eine Größe mit der Dimension einer Konzentration beschrieben. Aus diesem Grund bezeichnet man die Geschwindigkeitserhöhung auch als „effektive Konzentration“ oder als „effektive Molarität“. Dies ist die hypothetische Konzentration, mit der einer der beiden Reaktanden bei der intermolekularen Reaktion vorliegen müßte, um diese mit derselben Geschwindigkeit wie die intramolekulare Reaktion ablaufen zu lassen.

Die effektiven Konzentrationen oder Geschwindigkeitserhöhungen sind nun aber keineswegs für alle intramolekularen Reaktionen gleich groß, sondern variieren in einem weiten Bereich etwa zwischen 1 und $10^{15} \text{ mol l}^{-1}$ ^[4]. So ergibt sich z. B. beim Vergleich der intramolekularen basekatalysierten Enolisierung von 4-Oxopentanoat (6), bei der die Carboxylatgruppe im fünfgliedrigen cyclischen Übergangszustand ein Proton entfernt, mit der analogen intermolekularen Reaktion von (7) nur eine effektive Konzentration von 0.5 mol l^{-1} ^[12]. Demgegenüber liegt das Gleichgewicht bei der Dehydratation von Dimethylmaleinsäure (8) zum fünfgliedrigen cyclischen Säureanhydrid (9) um etwa $10^{12} \text{ mol l}^{-1}$ weiter auf der Seite des Anhydrids als beim analogen Essigsäure-Essigsäureanhydrid-System^[10, 13].

Vermutlich hat diese große Variationsbreite bei der Reaktionsbeschleunigung zu der enormen Verwirrung in der Litera-



tur beigetragen und eine rationale Erklärung der intramolekularen Katalyse erschwert.

Bei dieser stark variierenden Geschwindigkeitserhöhung stellt sich wieder die Frage nach der maximalen Geschwindigkeitszunahme, die man allein aufgrund der Annäherung, d. h. durch das räumliche Zusammenführen der Reaktanden, aber ohne Mitwirkung von Spannungs- oder Solvationseffekten erwarten darf. Bis vor einiger Zeit^[14] galten geringe Reaktionsbeschleunigungen als Normalfall; sie wurden üblicherweise zu 55 mol l^{-1} angenommen. Daher schienen größere beobachtete Werte einer besonderen Erklärung zu bedürfen wie etwa Rotamerenverteilung^[15], Orbitalausrichtung^[16], Stereopopulationskontrolle^[17], Schwingungsaktivierung^[18], Einfrieren an reaktiven Enzymzentren^[19].

Wir glauben hingegen, daß solche großen effektiven Konzentrationen oder Geschwindigkeitserhöhungen nach den bekannten chemischen Prinzipien zu erwarten sind^[4, 14]. Falls überhaupt etwas eine besondere Erklärung erfordert, ist es die Beobachtung einer niedrigen effektiven Konzentration.

Tatsächlich läßt sich leicht eine obere Grenze für die Geschwindigkeitserhöhung ermitteln, die durch die kovalente Verbindung der Reaktanden, also wie bei einer intramolekularen Reaktion, oder durch ihre Bindung an das aktive Zentrum eines Enzyms erreicht werden kann. Diese läßt sich aus den unterschiedlichen Entropieänderungen abschätzen, die bei bimolekularen und monomolekularen Reaktionen zu beobachten sind^[4, 14].

Bei intermolekularen Reaktionen ändert sich die Art der Freiheitsgrade, bei analogen intramolekularen Reaktionen nicht. Dies führt zu den großen Unterschieden der Entropieänderungen bei den beiden Reaktionstypen. Ein nichtlineares Molekül mit n Atomen besitzt drei Freiheitsgrade der Translation entsprechend seiner Verschiebungsmöglichkeit entlang den drei Raumkoordinaten. Daneben besitzt es noch drei Freiheitsgrade der Rotation entsprechend den Rotationsmöglichkeiten des gesamten Moleküls um drei durch seinen Schwerpunkt führende Achsen. Damit verbleiben $3n - 6$ Freiheitsgrade für interne Bewegungen des Moleküls, d. h. für Schwingungen und interne Rotationen.

Bei einer bimolekularen Assoziationsreaktion [Gl. (f)] gehen bei der Produktbildung drei Translations- und drei Rotationsfreiheitsgrade verloren. Zugleich entstehen im Produkt sechs neue Schwingungszustände. Bei einer mono- und intramolekularen Reaktion [Gl. (g)] ändert sich hingegen durch die Pro-

	A	+	B	\rightleftharpoons	A-B	
Translation	3		3		3	(f)
Rotation	3		3		3	
Schwingung	$3n - 6$		$3n' - 6$		$3n + 3n' - 6$	

duktbildung die Zahl der Translations-, Rotations- und Schwingungsfreiheitsgrade nicht. Die mit diesen Bewegungen

	$A \quad B \rightleftharpoons A-B$	
Translation	3	3
Rotation	3	3
Schwingung	$3n - 6$	$3n - 6$

(g)

verknüpfte Entropie kann leicht aus der Verteilungsfunktion berechnet werden^[4], die einfach die Zahl der Quantenzustände angibt, die das Molekül bei allen Bewegungszuständen besetzen kann.

Die Translationsentropie eines Moleküls ist proportional zu seiner Masse, zur Temperatur und zu dem ihm zugänglichen Raum. Bei einem Standardzustand von 1 mol l^{-1} und 298 K tragen im wesentlichen physikalische Konstanten zur Translationsentropie bei; diese ist deshalb bei den meisten Molekülen nur wenig von der Masse abhängig. Die Rotationsentropie eines Moleküls, das um seinen Schwerpunkt rotiert, ist proportional zu seinem Trägheitsmoment und zur Temperatur und hängt von der Molekülsymmetrie ab. Wiederum liefern jedoch physikalische Konstanten den Hauptbeitrag zur Rotationsentropie, die deshalb nur wenig von der jeweiligen Molekülgröße und -struktur abhängt. Bei internen Rotationen rotieren Gruppen des Moleküls um Einfachbindungen. Die diesen internen Rotationen entsprechende Entropie hängt vom Trägheitsmoment und von den Symmetrieeigenschaften der rotierenden Gruppen ab sowie von den Energiebarrieren dieser Rotationen und von der Temperatur. Schließlich hängt die Schwingungsentropie eines Moleküls von den Schwingungsfrequenzen und ebenfalls von der Temperatur ab.

In Tabelle 1 sind einige typische Werte für diese Entropieanteile aufgeführt. Bezogen auf den Standardzustand von 1 mol l^{-1} beträgt die Translationsentropie im allgemeinen etwa 120 bis $150 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Diese Größe ist, wie bereits erwähnt, nicht sehr stark vom jeweiligen Molekulargewicht abhängig. Für die Mehrzahl der mittelgroßen Moleküle liegt die Rota-

Tabelle 1. Typische Entropiebeiträge aufgrund von Translations-, Rotations- und Schwingungsbewegungen bei 298 K [14].

Bewegung	S^0 [$\text{JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$]
Drei Translationsfreiheitsgrade Molekulargewichte 20 bis 200 Standardzustand 1 mol l^{-1}	120–148
Drei Rotationsfreiheitsgrade	
Wasser	44
n-Propan	90
endo-Dicyclopentadien $\text{C}_{10}\text{H}_{12}$	114
Interne Rotation	13–21
Schwingungen $\omega = 1000 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$	0.4
800	0.8
400	4.2
200	9.2
100	14.2

tionsentropie bei etwa 85 bis $115 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$; meistens hängt sie nicht sehr stark von der Größe und der Struktur der Moleküle ab. Auffallend klein ist dabei mit $44 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ der Wert für das Wassermolekül: Fast seine gesamte Masse ist im Schwerpunkt konzentriert; das bedingt ein kleines Trägheitsmoment und infolgedessen eine geringe Entropie. Der

auf interne Rotationen entfallende Entropieanteil ist gegenüber der Gesamtentropie verhältnismäßig gering. Noch kleiner sind, außer bei sehr niedrigen Schwingungsfrequenzen, die Schwingungsanteile.

Diese Angaben gelten nur für die Gasphase. Zur Zeit ist es noch nicht möglich, ähnliche Entropieberechnungen auch für den flüssigen Zustand durchzuführen. Jedoch kann man die Entropie eines Moleküls in Lösung näherungsweise unter Berücksichtigung von beobachteten oder empirisch abgeschätzten Verdampfungsentropien bestimmen, die der Entropieänderung bei der Überführung eines Moleküls aus der flüssigen Phase in die Gasphase entsprechen^[4, 14]. Auf diese Weise kann man die ungefähre Entropieänderung für eine bimolekulare Reaktion in der Gasphase und in Lösung abschätzen (Tabelle 2). Bei einer bimolekularen Assoziationsreaktion in der Gasphase bei einem Standardzustand von 1 mol l^{-1} und 298 K beläuft sich der gesamte Verlust an Translations- und Rotationsentropie auf etwa $-220 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, ein Wert, der nur wenig von Masse, Größe und Struktur

Tabelle 2. Änderungen der Entropieanteile in $\text{JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ bei einer bimolekularen Reaktion für einen Standardzustand von 1 mol l^{-1} und 298 K [4, 14].

Gas	A	+	B	\rightleftharpoons	Produkt oder Übergangszustand	ΔS
$S_{\text{Translation}}$	135		135		140	-130
S_{Rotation}	100		100		110	-90
S_{intern}	12		12		74	+50
S_{Gesamt}	247		247		324	-170
$-\Delta S_{\text{Verdampf.}}$	$\downarrow -40$		$\downarrow -40$		$\downarrow -60$	
Lösung	A	+	B	\rightleftharpoons	Produkt oder Übergangszustand	-150

der beteiligten Moleküle beeinflusst wird. Dieser Verlust wird allerdings oft in unterschiedlichem Maße durch Schwingungen niedriger Frequenz im Produkt oder im Übergangszustand kompensiert. Bei vielen Reaktionen mit besonders „festem“ Übergangszustand oder mit kovalent gebundenen Produkten beträgt die Änderung der Inneren Entropie etwa $+50 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ^[4, 14]. Daraus kann man die Gesamtentropieänderung zu etwa $-170 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ abschätzen. In dieser Größenordnung liegen nun tatsächlich viele experimentell bestimmte Werte für bimolekulare Reaktionen in der Gasphase^[4, 14]. In Lösung ist die Entropieänderung bei einer bimolekularen Reaktion schätzungsweise nur um etwa $20 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ geringer als in der Gasphase (auf den gleichen Standardzustand von 1 mol l^{-1} bezogen). Dies kommt daher, daß das Produkt oder der Übergangszustand gewöhnlich einen höheren Siedepunkt besitzt als die Reaktanden und damit eine etwas negativere Entropie für die Überführung aus der Gasphase in die Lösung aufweist (Tabelle 2)^[14].

Diese Vorstellungen sind mit dem experimentellen Befund im Einklang, daß die Gleichgewichtslage und die Aktivierungsentropien von Diels-Alder-Reaktionen (-125 bis $-170 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) in der flüssigen Phase und in der Gasphase sehr ähnlich sind. Viele andere bimolekulare Assoziationsreaktionen weisen, sofern sie frei von Solvationseffekten sind, ähnlich stark negative Entropieänderungen in Lösung auf^[4, 7, 14].

Da diesem großen, für eine bimolekulare Reaktion typischen Entropieverlust entgegengewirkt werden kann, indem die Reaktanden entweder an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden werden [Gl. (c)] oder die Reaktion intramolekular

durchgeführt wird [Gl. (a)], kann man nun den durch Annäherung maximal erreichbaren Vorteil hinsichtlich der Entropie abschätzen [Gl. (h)].

$A + B \rightleftharpoons A \cdots B \rightleftharpoons A - B$			(h)
	„lockerer“ Übergangs- zustand oder Produkt	„fester“ Übergangs- zustand oder Produkt	Maximum
ΔS [$\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$]	-40	-150	-210
Effektive Konzentration [mol l^{-1}]	10^2	10^8	10^{11}

Die theoretisch zu erwartende, am stärksten negative Entropieänderung für eine bimolekulare Reaktion beträgt ungefähr $-210 \text{ JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$, was bei 298 K etwa 63 kJ mol^{-1} entspricht und eine solche Reaktion um den Faktor $10^{11} \text{ mol l}^{-1}$ ungünstiger macht. Dieser Fall ist jedoch äußerst selten zu beobachten. Im allgemeinen wird dieser große Verlust an Translations- und Rotationsentropie durch eine Entropieänderung von etwa $+60 \text{ JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$ kompensiert, die von Änderungen interner Bewegungszustände beim Übergang von den Reaktanden zum Produkt oder zum Übergangszustand und von unterschiedlichen Verdampfungsentropien von Reaktanden und Produkten herrührt. Dies führt bei bimolekularen Reaktionen zu einer Gesamtentropieänderung von etwa $-150 \text{ JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$. Da dieser Entropieverlust aber weder bei einer Reaktion auftritt, bei der die Reaktanden an das aktive Zentrum eines Enzyms gebunden sind [Gl. (c)], noch bei einer intramolekularen Reaktion [Gl. (a)], beträgt die ungefähre *maximale* effektive Konzentration oder Geschwindigkeitserhöhung bei solchen Reaktionen allein aufgrund der Entropieverhältnisse etwa 10^8 mol l^{-1} . Bei der vergleichsweise selteneren bimolekularen Reaktion, bei der ein besonders „lockerer“ Übergangszustand oder ein entsprechendes Produkt auftritt, wird die Assoziation sogar noch weniger durch die Entropieterme benachteiligt sein, da die Entropie der niederfrequenten Schwingungen im „lockeren“ Komplex den starken Verlust an Translations- und Rotationsentropie ausgleicht^[4, 14]. Die Geschwindigkeitserhöhung bei der analogen intramolekularen Reaktion wird dementsprechend kleiner ausfallen und im Bereich von 100 mol l^{-1} oder darunter liegen.

Es muß hier ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß sich diese Entropieunterschiede nicht notwendigerweise auch in den gemessenen Entropieänderungen einer Reaktion widerspiegeln müssen. Letztere werden nämlich stark durch Lösungsmittelleffekte beeinflusst und sind daher schwierig zu interpretieren^[7].

Wir fassen zusammen: Geschwindigkeitserhöhungen von etwa 10^8 mol l^{-1} bei intramolekularen enzymatischen Reaktionen sind allein schon aufgrund der unterschiedlichen Entropieänderungen bei bimolekularen und bei monomolekularen Reaktionen zu erwarten. Reaktionen, deren Geschwindigkeit noch weiter erhöht ist, verdanken dies vermutlich zusätzlichen Beiträgen aufgrund von Unterschieden der potentiellen Energie. Geringere Geschwindigkeitserhöhungen können entweder die Folge eines „lockeren“ Übergangszustands oder Produktes sein oder von ungünstigen Entropieänderungen herrühren. Als solche kämen der Verlust an internen Rotationen und/oder Änderungen der potentiellen Energie bei der intramolekularen Reaktion in Frage^[4].

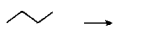
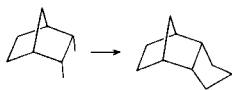


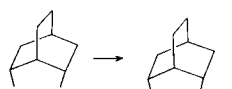
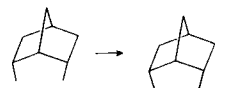
Es ist lehrreich zu untersuchen, wie diese Faktoren zu der beobachteten großen Variationsbreite der Geschwin-

digkeitserhöhungen bei intramolekularen Reaktionen führen können. Solche Unterschiede haben nämlich oft zur Begründung neuer Konzepte oder Theorien über die enzymatische Katalyse herhalten müssen. Unserer Meinung nach läßt sich die Vielfalt der Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Systemen, die von den Befürwortern dieser Theorien angeführt werden, durch die vorhandenen Vorstellungen von Entropie- und Spannungsenergieeffekten zufriedenstellend erklären^[4].

4. Spannungsenergieeffekte

Im Verlauf der intramolekularen Reaktion, die in jedem Fall einen Cyclisierungsschritt einschließt, werden oft Spannungen in das Molekül eingeführt, manchmal wird es aber auch entspannt. Solche Änderungen können folglich die effektive Konzentration verringern oder erhöhen. Als Modelle für Änderungen der Spannungsenergie, die bei cyclisierenden Molekülen auftreten, mögen uns die analogen Kohlenwasserstoffsysteme dienen^[4]. Die Spannungsenergie eines Kohlenwasserstoffs kann man entweder mit einem molekülmechanischen Verfahren („molecular mechanics procedure“)^[20] oder nach einem Gruppenadditivitätsschema („group additivity scheme“)^[21] bestimmen. Tabelle 3 zeigt Beispiele für Änderungen der Spannungsenergie, die bei der Cyclisierung einiger Kohlenwasserstoffe auftreten^[20–22]. Außerdem sind die geschätzten Entropieänderungen aufgeführt, die sich aus der verringerten Möglichkeit zu internen Rotationen aufgrund der Cyclisierung ergeben^[4].

Tabelle 3. Geschätzte relative Energieänderungen in kJ mol^{-1} für die Ringschlußreaktion von Kohlenwasserstoffen bei 298 K (siehe auch Abb. 1).

System		$\Delta H[20, 22]$ Spannung	$-T\Delta S$ Int. Rotation	$\log K_{\text{rel}}$ $\log k_{\text{rel}}$
	(10)	33.5	16.3	0.0
	(11)	26.8	10.9	2.1
	(12)	23.8	10.9	2.6
(13) 	(14)	14.0	10.9	4.3
	(15)	18.8	5.4	4.5
	(16)	4.2	5.4	8.5

Aus der Kombination dieser Daten kann man die relativen Geschwindigkeiten oder Gleichgewichtskonstanten für eine Reihe von intramolekularen Reaktionen voraussagen, an denen ähnliche Strukturen wie diese Kohlenwasserstoffe beteiligt sind. So sind z. B. in Abbildung 1 für eine Reihe von Dicarbonsäuren^[13] die beobachteten relativen Gleichgewichtskonstan-

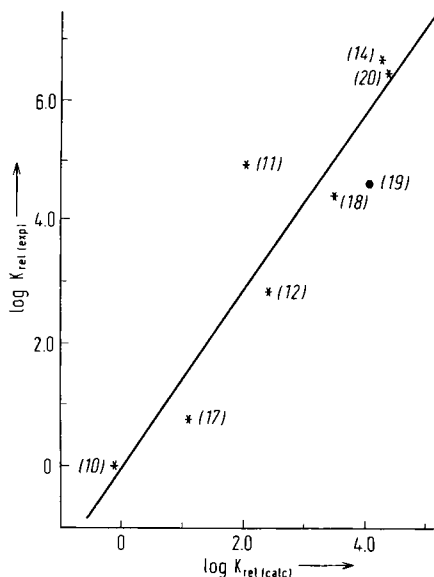


Abb. 1. Relative Gleichgewichtskonstanten $K_{rel}(exp)$ für die Anhydridbildung aus Dicarbonsäuren aufgetragen gegen $K_{rel}(calc)$ für die Cyclisierung der entsprechenden Kohlenwasserstoffe [Produkte (10), (11), (12), (14) siehe Tabelle 3; (17) bis (20) siehe unten].

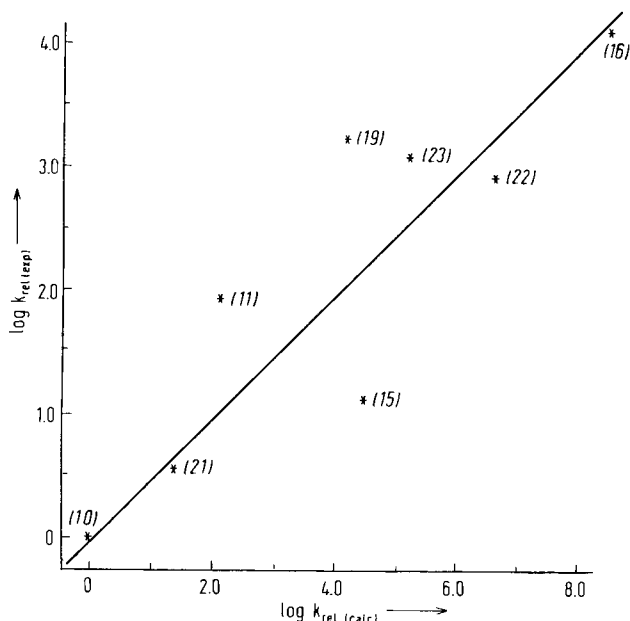
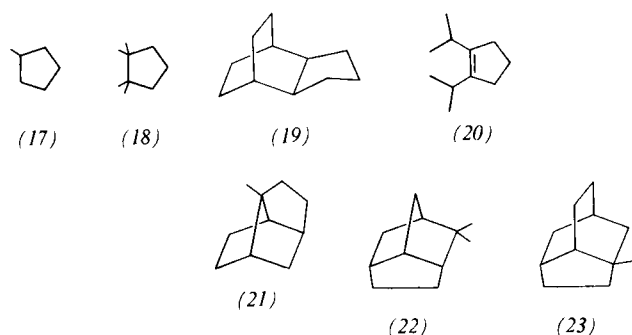


Abb. 2. Relative Geschwindigkeitskonstanten $k_{rel}(exp)$ für die säurekatalysierte Lactonisierung von Hydroxysäuren, aufgetragen gegen $k_{rel}(calc)$ für die Cyclisierung der entsprechenden Kohlenwasserstoffe [Produkte (10), (11), (15), (16) siehe Tabelle 3; (19), (21) bis (23) siehe unten].

ten gegen die entsprechenden vorausgesagten Werte aufgetragen, die nach der oben beschriebenen Methode berechnet

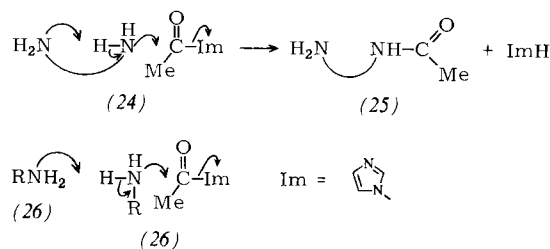


worden waren. Dieser Vergleich zeigt z. B., daß die Änderung der Spannungsenergie bei der Cyclisierung von 2,3-Dimethyl-2-buten (13) zu 1,2-Dimethylcyclopenten (14) als Modell für die Cyclisierung von Dimethylmaleinsäure (8) zu Dimethylmaleinsäureanhydrid (9) dienen kann. Dies Verfahren ist dadurch gerechtfertigt, daß die Spannungsenergie in erster Näherung eine Funktion der Ringgröße eines Moleküls und nicht so sehr der beteiligten Atome ist^[4]. In Abbildung 2 sind Daten für die Hydroxysäuren und Lactone aufgeführt, die zur Rechtfertigung des Konzepts der „Orbitalausrichtung“ herangezogen wurden^[16], sowie für die entsprechenden Kohlenwasserstoffe. Die Brauchbarkeit solcher Modelle ist selbstverständlich begrenzt. Dennoch darf man aufgrund der Ergebnisse sagen, daß bei einer Reihe von intramolekularen Reaktionen die Vielfalt der Gleichgewichtslagen und Reaktionsgeschwindigkeiten allein auf die unterschiedlichen Spannungsenergien von Reaktanden und Produkten oder Übergangszuständen und auf die unterschiedlichen Entropieänderungen aufgrund des Verlustes an internen Rotationsmöglichkeiten zurückzuführen ist^[4]. Viele andere homologe Reihen von intramolekularen Reaktionen sind in entsprechender Weise ausgewertet worden und zeigen ähnlich enge Korrelationen^[23].

5. Reaktionen mit „lockeren“ Übergangszuständen

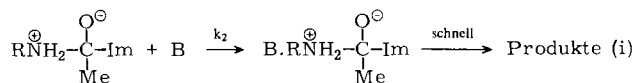
Bimolekulare Reaktionen, die „lockere“ Übergangszustände durchlaufen, sind entropisch weniger ungünstig als solche mit „festen“ Übergangszuständen^[4, 14]. Dies rührt daher, daß die den niederfrequenten Bewegungszuständen entsprechende Entropie des Übergangszustands den großen Verlust an Translations- und Rotationsentropie aufwiegt. Folglich sollte bei der analogen intramolekularen Reaktion die Geschwindigkeitserhöhung oder die effektive Konzentration geringer ausfallen. Dies ist bei Protonenübertragungsreaktionen der Fall: Alle bisher untersuchten Reaktionen, die eine intramolekulare allgemeine Säure- oder Basekatalyse einschließen, sind durch niedrige effektive Konzentrationen charakterisiert. Das scheint gleichermaßen für die Übertragung von Protonen auf elektronegative Atome und Kohlenstoffatome wie auch von diesen auf andere Gruppen zu gelten^[4]. Der Grund besteht vermutlich darin, daß bei solchen Reaktionen entweder ein sehr lockerer wasserstoffverbundener Komplex als Übergangszustand vorkommt oder ein diffusionskontrollierter geschwindigkeitsbestimmender Schritt auftritt^[24]. Deshalb bringt offenbar bei einer allgemein säure- oder basekatalysierten Reaktion ein Wechsel von der intermolekularen zur intramolekularen Reaktion keinen besonderen Vorteil.

Dies läßt sich besonders schön anhand der intramolekularen basekatalysierten Aminolyse von Acetylimidazol durch Diamin



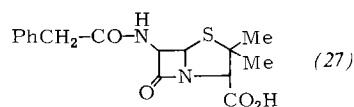
ne (24) belegen, bei der Amide (25) und Imidazol entstehen. Die effektive Konzentration beträgt im Vergleich zur analogen

intermolekularen Reaktion der Amine (26) nur etwa 1 mol l^{-1} ^[3]. Wegen der geringen Abhängigkeit von der Diaminstruktur kann der Einfluß der potentiellen Energie bei dieser Reaktion nicht wichtig sein^[3]. An der allgemeinen Basekatalyse bei der intermolekularen Reaktion der Amine (26) ist wahrscheinlich die geschwindigkeitsbestimmende, diffusionskontrollierte Begegnung zwischen dem tetraedrischen Zwischenzustand und der Base^[25], entsprechend k_2 in Gl. (i), beteiligt. Der Übergangszustand ist deshalb sehr locker, und der bimolekulare



Schritt (k₂) wird mit einer geringen Entropieänderung einhergehen, die wiederum zu der niedrigen effektiven Konzentration der intramolekularen Reaktion beiträgt.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Aminolyse von Benzylpenicillin (27). Die Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion von Benzylpenicillin mit Ethylendiamin ist mindestens 25mal größer als bei der Reaktion mit einem Monoamin gleicher Basizität. Das deutet auf eine intramolekulare allgemeine Basekatalyse. Jedoch ist der Effekt, der dem intramolekularen Charakter selbst zuzuschreiben ist, gering.



Die effektive Konzentration beträgt im Vergleich mit der intermolekularen allgemein basekatalysierten Reaktion nur etwa 1 mol l^{-1} , was wiederum auf einen „lockeren“ Übergangszustand hinweist^[26].

Zusammenfassend können wir feststellen, daß es im Falle eines besonders „lockeren“ Übergangszustandes kaum oder gar nicht vorteilhaft ist, wenn der Katalysator und einer der Reaktanden kovalent verbunden sind.

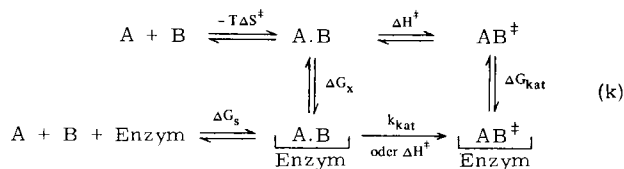
6. Bindungsenergie und enzymatische Katalyse

Das Zusammenbringen zweier Moleküle ist entropisch ungünstig. Obwohl die Situation für ein enzymgebundenes Substrat [Gl. (c)] ähnlich ist wie bei einer intramolekularen Reaktion [Gl. (a)], bei der dieser große Entropieterm fehlt, führt natürlich die primäre Bindung des Substrats an das Enzym zu einer für die Katalyse ungünstigen Entropieänderung. Falls die Katalyse wirksam sein soll, muß dieser große Entropieverlust durch die Bindungsenergie ausgeglichen werden, die von der günstigen nichtkovalenten Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym herrührt.

Die Bedeutung der Enzym-Substrat-Bindung wird klar, wenn die Substratkonzentration niedriger als die Michaelis-Konstante K_M ist und die Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max}/K_M beträgt. In diesem Fall führt eine zunehmende Bindungsstärke, entsprechend einem kleineren K_s -Wert [siehe Gl. (c)], zu einer größeren Reaktionsgeschwindigkeit. Wir wollen zwei Beispiele betrachten, bei denen die Bindungsenergie den Entropieverlust ausgleicht, der bei der unkatalysierten Reaktion auftritt. Im ersten Fall soll es gar keine chemische Katalyse durch das Enzym geben, im zweiten Fall soll das Substrat mit einer katalytisch wirksamen Gruppe des Enzyms reagieren^[1, 7].

6.1. Reaktion ohne chemische Katalyse durch das Enzym

Nehmen wir an, daß zwei Verbindungen A und B ohne Katalyse miteinander reagieren und einen Übergangszustand AB^* durchlaufen. Die Freie Aktivierungsenergie möge willkürlich in Anteile der Aktivierungsenthalpie und der Aktivierungsentropie zerlegt werden [Gl. (k)]. Derselbe Übergangszu-



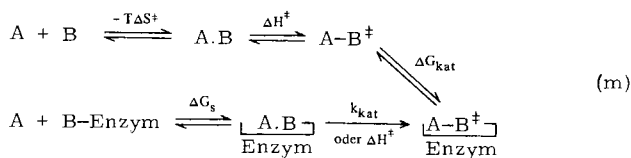
stand möge auch erreicht werden, wenn die Reaktanden an das aktive Zentrum eines Enzyms gebunden sind. Wir betrachten demnach einen Prozeß, bei dem keinerlei chemische Katalyse durch das Enzym erfolgt; das Enzym hat also nur die Funktion, die Reaktanden zusammenzubringen. Jede Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit ist daher dem Unterschied zwischen der Enthalpie der Bindung von Enzym und Substraten und der Entropie der Assoziation von Enzym und Übergangszustand zuzuschreiben [Gl. (I)]⁽¹⁾. Der Term $T\Delta S_x$ stellt in Gleichung (I)

$$\Delta G_{\text{kat}} = \Delta H_s - T\Delta S_s \quad (1)$$

den ungünstigen Entropieverlust aufgrund der Wirkung des Enzyms als Katalysator dar. Jeder Überschuß an Innerer Bindungsenergie gegenüber diesem Entropieverlust wird als Katalyse der Reaktion in Erscheinung treten. Bildlich betrachtet kann man den Entropieeffekt auch als „Entropiespannung“ ansehen, die durch die Bindungsenergie überwunden werden muß^[1].

6.2. Reaktionen mit einer Gruppe des Enzyms^[7]

Auch hier nehmen wir an, daß zwei Moleküle A und B zu einem Übergangszustand AB^* zusammentreten. Diese Reaktion wollen wir diesmal aber mit der analogen Reaktion vergleichen, bei der B kovalent an das Enzym gebunden ist [Gl. (m)]. Ein etwaiger Gewinn an Freier Energie bei der



enzymatischen Reaktion wird dann durch Gleichung (n) beschrieben. Diese geht in die einfachere Gleichung (o) über, wenn man annehmen darf, daß die Aktivierungsentropie $T\Delta S^{\ddagger}$ gleich der Entropieänderung $T\Delta S_s$ ist, die der Bindung des Substrats A an das Enzym entspricht. Diese Annahme trifft, wie wir bereits gesehen haben, annähernd zu.

$$\Delta G_{\text{kat}} = \Delta H_s + T\Delta S^\ddagger - T\Delta S_s \quad (\text{n})$$

$$\Delta G_{\text{kat}} = \Delta H_s \quad (o)$$

In diesem Fall ist der Katalysebeitrag direkt durch die Energie der Bindung zwischen Enzym und Substrat gegeben. Daraus

wird der Vorteil einer kovalenten Katalyse bei enzymatischen Reaktionen deutlich.

Es muß an dieser Stelle nochmals betont werden, daß sich die Größen, auf die hier Bezug genommen wird, nicht in den meßbaren Werten der Reaktionsenthalpie und Reaktionsentropie widerspiegeln, die zum großen Teil durch Solvationsseffekte bestimmt werden.

Bevor wir fortfahren, die Größe der Energie der Enzym-Substrat-Bindung zu betrachten, soll kurz darauf hingewiesen werden, daß die klassische Trennung von Spezifität und Katalyse möglicherweise nicht gerechtfertigt ist^[1]. Oft wird nämlich der Substratbindungsprozeß, den man etwa mit dem „Schlüssel-Schloß“-Modell beschreiben kann, als ein Vorgang behandelt, der mit der katalytischen Beschleunigung nichts zu tun hat, die man mit den Mechanismen der klassischen Chemie zu erklären versucht. In Wirklichkeit äußern viele Enzyme ihre Spezifität aber eher durch die Katalysegeschwindigkeit als durch die Substratbindung.

Bei der Herleitung von Gleichung (o) haben wir einfach $\Delta S^* = \Delta S_s$ gesetzt. Dies wird näherungsweise für gute, fest gebundene Substrate gelten. Schlechte Substrate hingegen werden weniger fest gebunden, da ihre Bindung oft mit einer geringeren Enthalpieänderung verbunden ist. Zugleich ist bei ihnen der Entropieverlust geringer, so daß ΔS_s kleiner als ΔS^* werden kann. Da bei einer solch schwachen Bindung aber der Entropieverlust u. U. nicht genügt, um den Übergangszustand ganz zu erreichen, muß k_{kat} kleiner werden. Zugleich sollte sich die scheinbare Freie Bindungsenergie beim schlechteren Substrat kaum ändern, falls die Änderung von ΔS_s gerade durch die Änderung der Bindungsenthalpie ΔH_s ausgeglichen wird. Im wesentlichen wird sich die größere Innere Energie der Bindung guter Substrate also eher in einer Reaktionsbeschleunigung als etwa in einer zunehmenden Bindungskonstante äußern. Nur für den Fall $\Delta S_s = \Delta S^*$ wird sich eine größere Wechselwirkungsenergie bei guten Substraten in einer stärkeren Bindung niederschlagen.

7. Die Größe der Bindungsenergie

Die gemessenen Werte der Freien Energie für die Bindung von Substraten an Enzyme sind häufig kleiner als die eigentliche Bindungsenthalpie, da ein Großteil der Bindungsenergie zum Ausgleich des Entropieverlustes und möglicherweise für eine Destabilisierung der Reaktanden „aufgebraucht“ wird^[1]. Es gibt nun einige Beispiele für Bindungen zwischen Proteinen und anderen Molekülen, bei denen die hohen Werte für die Freie Bindungsenergie auf eine sehr viel größere Wechselwirkungsenergie hindeuten als üblicherweise angenommen wird.

Tabelle 4. Einige Beispiele für große Bindungsenergien [7].

System	Bindungskonstante [mol l ⁻¹]	–ΔG [kJ mol ⁻¹]	Lit.
1. Campher/Fe ^{II} -Cytochrom P 450	2.2×10^8	46	[30]
2. Amethopterin/Dihydrofolatreduktase	10^{10}	57	[31]
3. Amethopterin/Reduktase-NADPH-Komplex	10^{11}	63	[32]
4. Biotin/Avidin	10^{15}	85	[33]
5. Glucose-1-phosphat/Phosphoglucomutase	10^{15}	85	[34, 7]

In Tabelle 4 sind die Bindungskonstanten für einige Assoziationsreaktionen mit sehr großen Freien Bindungsenergien wiedergegeben^[7]. Daneben gibt es viele Beispiele für eine sehr starke Assoziation von großen Molekülen. Hier seien nur drei Beispiele erwähnt: die Bildung von Komplexen zwischen Proteininhibitoren und proteolytischen Enzymen^[27] – die Dissoziationskonstanten haben so enorm niedrige Werte wie 10^{-13} mol l⁻¹; die große Affinität des *lac*-Repressors zu seinem spezifischen Bindungsbereich in der *E. coli*-DNA – der Halbsättigungswert für die Bindung des Repressors an den Operator liegt bei einer Repressorkonzentration von 10^{-13} mol l⁻¹^[28]; und schließlich Antikörper-Antigen-Komplexe – so beträgt die Dissoziationskonstante für den Komplex zwischen einem IgM-Antikörper vom Hai und dem dinitrophenylierten Virus ΦX-174 nur 6×10^{-12} mol l⁻¹^[29a]. Die Komplexe zwischen Serinproteinasen und Proteininhibitoren verdanken ihre große Stabilität nicht etwa einer kovalenten Verbindung zwischen beiden Proteinen, sondern einer Vielzahl von nichtkovalenten Wechselwirkungen^[29b]. Natürlich findet man in diesen Komplexen sehr viele Kontakte, so daß die Größenbestimmung der einzelnen Kräfte schwierig ist. Besser abschätzen kann man die Innere Energie für die Bindung eines Moleküls an ein Protein aus der Zunahme der Bindungsenergie, die man beobachtet, wenn dieses „Molekül“ Strukturbestandteil eines größeren Moleküls ist. Diese Art von Bindungsvermittlung bezeichnen wir als „Ankerprinzip“^[1].

8. Das Ankerprinzip^[1]

Die Innere Bindungsenergie einer kleinen Gruppe (eines kleinen „Moleküls“) A kann durch Vergleich der Freien Bindungsenergien des größeren Moleküls B und des Moleküls A–B, mit A als kovalent gebundenem Substituenten, ermittelt werden. Die starke Bindung des kleinen Moleküls A an ein Enzym geht notgedrungen mit dem Verlust an Translations- und Rotationsentropie einher, was wiederum einen ungünstigen Beitrag zur gesamten Änderung der Freien Energie liefert. Ist A jedoch Teil des Moleküls A–B, so geht der größte Teil der Entropie bereits bei der Bindung von B an das Enzym verloren; der Entropieverlust bei der Bindung von A–B wird etwa ebenso groß wie bei der Bindung von B allein sein, entsprechend $\Delta S_{AB} \approx \Delta S_B$. Die Differenz in den Freien Bindungsenergien von A–B und von B entspricht daher ungefähr der wirklichen Bindungsenergie von A [Gl. (p)].

$$\Delta G_{AB} - \Delta G_B = \Delta H_{AB} - \Delta S_{AB} - \Delta H_B + \Delta S_B \approx \Delta H_{AB} - \Delta H_B$$

$$\Delta G_{AB} - \Delta G_B \approx \Delta H_A \quad (p)$$

Folglich ist die Differenz $\Delta G_{AB} - \Delta G_B$ sehr viel größer als die beobachtete Freie Energie für die Bindung von A, ΔG_A , da ΔG_A noch den ungünstigen Entropieterm enthält.

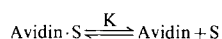
Zusätzlich ergibt sich aus dem Vergleich von ΔG_A mit $\Delta G_{AB} - \Delta G_B$ eine untere Grenze für den Entropieverlust bei der Bindung von A [Gl. (q)].




$$\Delta G_{AB} - \Delta G_B - \Delta G_A = \Delta H_{AB} - \Delta H_B - \Delta H_A + \Delta S_A$$

$$\Delta G_{AB} - \Delta G_B - \Delta G_A \approx \Delta S_A \quad (q)$$

In Tabelle 5 sind Werte für die Bindung einiger Moleküle an das Protein Avidin aufgeführt^[33]. Harnstoff (28) wird

Tabelle 5. Dissoziationskonstanten K einiger Avidinkomplexe bei $T = 298\text{ K}$ [33]. (28): Beispiel für A; (29), (30): Beispiele für B; (31): Beispiel für A—B.



S	K	$-\Delta G$ [kJ mol ⁻¹]
$\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$ (28)	3.6×10^{-2}	8
 (29)	7×10^{-7}	≈ 35
 (30)	3×10^{-7}	≈ 37
 (31)	10^{-15}	≈ 85

nur schwach an Avidin gebunden, doch ist die Differenz zwischen den Freien Energien für die Bindung von Biotin (31) einerseits und den ähnlich gebauten Molekülen ohne die Harnstoffgruppierung [(29) und (30)] andererseits sehr viel größer als die Freie Bindungsenergie von Harnstoff. Natürlich ist die Harnstoffgruppierung im Biotin kein ideales Modell für das Harnstoffmolekül; anhand dieses Beispiels läßt sich das Prinzip aber sehr schön erklären. Falls nämlich der zu erwartende Verlust an Translations- und Rotationsentropie im wesentlichen bei der Bindung des Ankermoleküls B auftritt, das in diesem Fall das Biotinanalogen (29) oder (30) ist, dann kann das Ankoppeln einer Harnstoffgruppe u. U. zu einer beträchtlichen Abnahme der (negativen) Freien Energie, d. h. zu einer stärkeren Bindung führen. Die Änderung von etwa 50 kJ mol^{-1} (Tabelle 5) entspricht demnach etwa der Inneren Energie der Bindung von Harnstoff an Avidin.

Diese Methode zur Bestimmung der Inneren Bindungsenergien setzt voraus, daß der Entropieverlust bei der Bindung von A—B dem bei der Bindung von B ähnlich ist [Gl. (p)]. Falls das Ankermolekül B nur locker gebunden ist, kann u. U. die der Bindung von A zuzuordnende Innere Bindungsenergie von A—B zu einer gewissen Einschränkung der Beweglichkeit im Molekül A—B führen. Entsprechend $T\Delta S_{AB} > T\Delta S_B$ folgte daraus, daß keine Änderung oder sogar eine Abnahme der meßbaren Bindungskonstante zu beobachten wäre. Die auf diesem Weg abgeschätzten Werte für die Innere Bindungsenergie setzen daher vermutlich eine untere Grenze.

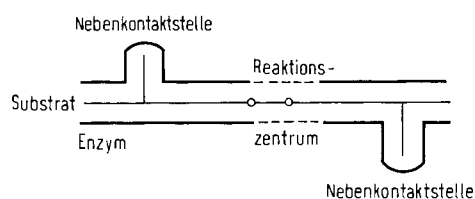
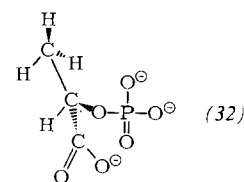


Abb. 3. Reaktionszentrum und Nebenkontaktstellen eines Enzyms, schematisch. ○—○: zu spaltende Bindung des Substrats.

Die Bedeutung von Nebenkontaktstellen für Teile des Substrats in einiger Entfernung von der zu spaltenden Bindung läßt sich auf das Ankerprinzip zurückführen (Abb. 3). So ist z. B. die katalytische Wirksamkeit des Pepsins bei der Spaltung von Polypeptiden sehr stark von Änderungen der Substratstruktur abhängig, die ein Stück von der zu spaltenden

Peptidbindung entfernt vorgenommen werden^[35a]. Die Bindung der Peptidkette über die Nebenkante stellt die benötigte Bindungsenergie zur Verfügung, um den Verlust an Translations- und Rotationsentropie sowie gegebenenfalls eine Destabilisierung des Substrats, die zum Erreichen des Übergangszustandes notwendig sind, zu kompensieren. Ist die Verankerung unvollständig, so wird der für die Bildung des Übergangszustandes erforderliche Entropieverlust nicht durch die Bindung aufgewogen werden, so daß eine geringere Katalysegeschwindigkeit zu beobachten sein wird [siehe Gl. (p)]. Dies erklärt möglicherweise die bis zum Faktor 7×10^3 variierenden k_{kat} -Werte bei zugleich etwa konstanten K_M -Werten für Pepsinsubstrate mit unterschiedlichen Aminosäuren an den Peptidpositionen außerhalb der eigentlichen Spaltstelle^[35a].

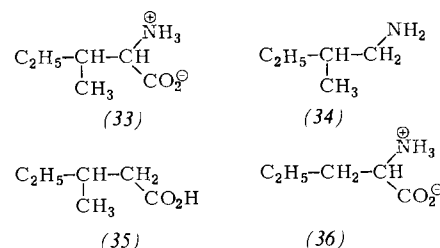
Diese Einschränkung der Beweglichkeit von Molekülen bei der Bindung an Proteine läßt sich NMR- und ESR-spektroskopisch zeigen. So deuten ESR-Spektren darauf hin, daß die Nitroxidgruppen in einigen Acylchymotrypsinderivaten nicht frei rotieren können^[35b], und aus NMR-Studien geht hervor, daß sogar die interne Rotation der Methylgruppe des L-Phospholactats (32), eines Inhibitors der Pyruvat-Kinase, bei dessen Bindung an das Enzym eingeschränkt wird^[19].



Eines der interessantesten Probleme bei der Enzym-Substrat-Wechselwirkung betrifft die Größe der Energie bei der Bindung kleiner Substituenten an Proteine. Wir glauben, daß die übliche Methode, nach der diese Wechselwirkungen aus der Energie für die Überführung des Substituenten aus einer Flüssigkeit in eine andere bestimmt wird, zu niedrige Werte der Bindungsenergie liefert.

In Tabelle 6 sind die Freien Energien für die Bindung von Isoleucin (33) und den verwandten Verbindungen (34) bis (36) an die Isoleucyl-tRNA-Synthetase als Beispiele aufgeführt^[36]. Isoleucin kommt eine Freie Bindungsenergie von

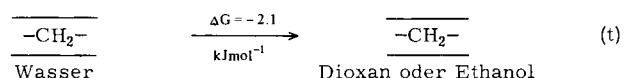
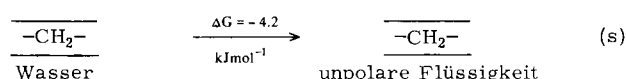
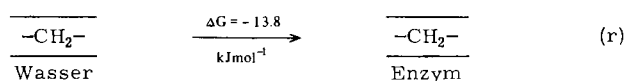
Tabelle 6. Beitrag kleiner Gruppen zur Bindungsenergie am Beispiel von Isoleucin (33) und den verwandten Verbindungen (34) bis (36) im System (33) bis (36)/Ile-tRNA-Synthetase.



Verb.	fehlende Gruppe	$-\Delta G$ [kJ mol ⁻¹]	$-\Delta\Delta G$ [kJ mol ⁻¹]
(33)	—	29.7	—
(34)	CO_2^-	11.7	18.0
(35)	NH_3^+	< 1.7	> 28.0
(36)	$\beta\text{-CH}_3$	15.9	13.8

–29.7 kJ mol^{–1} zu. Nach dem Austausch seiner Carboxylgruppe gegen ein Wasserstoffatom [zu (34)] beträgt die Bindungsenergie nur noch –11.7 kJ mol^{–1}. Daraus ergibt sich für die Innere Energie der Bindung der Carboxylatgruppe an das Enzym ein Wert von –18 kJ mol^{–1}. Nach der gleichen Methode läßt sich die Bindungsenergie der protonierten Aminogruppe zu mindestens –28 kJ mol^{–1} abschätzen. Diese Werte der Inneren Bindungsenergie sind vermutlich deswegen so groß, weil der mit der Bindung notwendigerweise einhergehende Entropieverlust bereits durch die Bindungsenergie des übrigen Teils der Aminosäure, des „Ankers“, aufgewogen wird.

Die auf diese Weise abgeschätzte Innere Bindungsenergie einer Methylengruppe beträgt –13.8 kJ mol^{–1} (Tabelle 6). Einen ähnlichen Wert erhält man aus den Daten für die Valyl-tRNA-Synthetase^[37a]. Die Addition einer Methylengruppe zu substituierten Phenyl-*N*-methylcarbamaten erhöht die Freie Energie für die Bindung dieser Stoffe an Acetylcholin-Esterase um 12.1 kJ mol^{–1}^[37b]. Womit läßt sich dieser große Wert erklären? Es wird oft angenommen, daß das Innere eines Proteins analog einer organischen Flüssigkeit ist^[38] und daß die Überführung einer Gruppe aus Wasser in ein unpolares Lösungsmittel dem Übergang derselben Gruppe aus Wasser in oder an das Enzym entspricht [Gl. (r) bis (t)]. Die auf diese Weise abgeschätzte Änderung der Wechselwirkungsenergie, die für eine Methylengruppe ungefähr –4.2 kJ mol^{–1} bei Überführung in eine unpolare Flüssigkeit^[39] und etwa –2.1 kJ mol^{–1}



bei Überführung in Dioxan oder Ethanol^[40] beträgt, ist jedoch mindestens dreimal *weniger* günstig als die Änderung bei der Bindung an ein Enzym. Auch an vielen anderen Beispielen läßt sich zeigen, daß man mit den so bestimmten Wechselwirkungen zwischen einem Substituenten und einem unpolaren Lösungsmittel die Kräfte zwischen dem gleichen Substituenten und einem Enzym zu niedrig schätzt^[7].

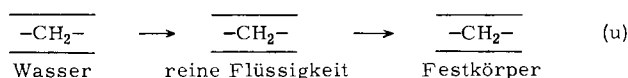
Im folgenden soll kurz diskutiert werden, welche speziellen Wechselwirkungen zu der großen Energiedifferenz zwischen dem „enzymatischen“ Prozeß [Gl. (r)] und dem analogen „unpolaren“ Prozeß [Gl. (s)] beitragen^[41]. Da der Anfangszustand in beiden Fällen gleich ist, wird auch die Energieänderung bei der Entfernung des Gelösten aus dem Wasser beide Male gleich groß sein. Bei der Überführung des Gelösten in ein unpolares Lösungsmittel [Gl. (s)] nehmen die Wechselwirkungen zwischen Lösung und Gelöstem zu, während sie zwischen den Lösungsmittelmolekülen abnehmen. Diese Abnahme entspricht der Freien Energie für die Bildung eines Hohlraums, in den ein Molekül des Gelösten paßt^[42].

Wird das Gelöste auf ein Enzym übertragen [Gl. (r)], so nehmen die Wechselwirkungen zwischen dem Gelösten und dem Enzym zu, falls ursprünglich an der Bindungsstelle des Enzyms kein Wasser anwesend war. Wenn jedoch Wasser

gebunden war, das durch den Substituenten (das Gelöste) verdrängt wird, so resultiert eine Zunahme der Wasser-Wasser- und eine Abnahme der Wasser-Enzym-Wechselwirkungen. Die Summe der Änderungen der Freien Energie bei diesen beiden Wechselwirkungen muß thermodynamisch für eine Bindung ungünstig sein, denn sonst wäre ja ursprünglich kein Wasser an das Enzym gebunden. Daher entspricht die beobachtete Freie Energie für die Überführung eines Substituenten von Wasser an ein Enzym der *unteren* Grenze für die Größe der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen.

Im Innern des Chymotrypsinmoleküls sind etwa 16 Wassermoleküle lokalisiert worden^[43]. Sehr viel mehr Wassermoleküle dürfte man vermutlich in Proteinen nicht finden^[44]. Falls ursprünglich *kein* Wasser an das Enzym gebunden ist, könnte die Überführung nach Gleichung (r) günstiger sein als nach Gleichung (s), da beim letzteren Prozeß Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmittelmolekülen entsprechend der Freien Energie für die Erzeugung eines Hohlraums verlorengehen. Daher wird man bei Zugrundelegung der Änderung der Freien Energie, wie sie sich nach Gleichung (s) ergibt, die Wechselwirkungen zwischen dem Gelösten und dem Lösungsmittel zu gering einschätzen. Nach der „scaled-particle“-Theorie^[45] und aufgrund anderer Berechnungen^[46] haben die Freie Energie für die Erzeugung eines Hohlraums in unpolaren Lösungsmitteln und die Freie Energie für die Wechselwirkung zwischen dem Gelösten und dem Lösungsmittel die gleiche Größenordnung, jedoch verschiedene Vorzeichen. Dies könnte in einigen Fällen einen Teil der Diskrepanz zwischen den ΔG -Werten in den Gleichungen (r) und (s) erklären. Das Enzym könnte nämlich eine Art vorgefertigter Höhle besitzen, so daß die Bindung eines Substituenten an diese Stelle nicht zu den ungünstigen Änderungen führen würde, welche die Erzeugung eines Hohlraumes in Flüssigkeiten üblicherweise mit sich bringt. Es fällt jedoch schwer einzusehen, wie Wasser an der Bindung an eine Stelle gehindert werden könnte, die auch von einer Methylengruppe besetzt werden kann. Ein anderer entscheidender Faktor ist, daß die *Zahl* der günstigen Dispersions- und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem Substituenten (dem Gelösten) und dem Enzym größer ist als zwischen dem Substituenten und einer Flüssigkeit.

In einem Enzym sind die Atome dicht gepackt, da sie durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind; in einigen Fällen sind die Polypeptidketten außerdem noch durch kovalente Disulfidbrücken vernetzt. Der Anteil des Raums, der in einem Proteinmolekül durch Atome ausgefüllt ist, beträgt 75 %^[47]. Demgegenüber ist der Wert für die günstigste Anordnung gleich großer Kugeln (kubisch oder hexagonal dichteste Kugelpackung) 74 %. In einer Flüssigkeit ist ein sehr viel kleinerer Raumanteil besetzt: Die oberen Grenzen für Wasser, Cyclohexan und Tetrachlorkohlenstoff liegen bei 36, 44 bzw. 44 %^[47]. Das Proteininnere enthält also wenig freien Raum und ist daher einem Festkörper ähnlicher als einer Flüssigkeit. Es wäre deshalb angebrachter, Gleichung (r) mit der Freien Energie für die Überführung eines Substituenten aus Wasser an einen Festkörper zu vergleichen [Gl. (u)]. Die damit einhergehende Energieänderung läßt sich aus entsprechenden Werten für die Zusammenlagerung von Kohlenwasserstoffen ableiten^[41].



Die Schmelzenthalpie pro Methylengruppe beträgt in geradzähligen *n*-Alkanen bis etwa $C_{20}H_{42}$ $4.1 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ^[48]. Die Wärmekapazitätsänderung pro zusätzliche Methylengruppe ist ebenfalls etwa konstant. Sie beträgt für die Flüssigkeit bzw. für den festen Körper etwa 26 bzw. $14 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ^[48]. Daher wird die hypothetische Schmelzenthalpie pro zusätzliche Methylengruppe bei z. B. 25°C nicht stark von den obigen Werten abweichen. Natürlich wird beim Übergang aus der Lösung in den festen Zustand eine ungünstige Entropieänderung auftreten. Aus den Gleichungen (s) und (u) kann man aber abschätzen, daß die maximal mögliche, günstige Freie Energie für die Überführung einer Methylengruppe aus Wasser an einen unpolaren Festkörper ungefähr -8.3 kJ mol^{-1} beträgt^[41].

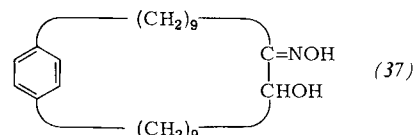
In einem Enzym sind die Atome, die das Substrat umgeben, äußerst dicht gepackt und zumeist nur entsprechend ihren kovalenten Radien voneinander getrennt. In einer Flüssigkeit ist das Gelöste von Lösungsmittelmolekülen umgeben, die voneinander einen Abstand entsprechend ihren van-der-Waals-Radien haben. Deshalb ist im Enzym die effektive Koordinationszahl sehr viel größer als in einer Flüssigkeit. So sind z. B. die van-der-Waals-Radien von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff etwa 2.2mal so groß wie ihre jeweiligen kovalenten Radien. Ein einfacher Packungsversuch zeigt, daß die Koordinationszahl einer Kugel ungefähr 2.5mal größer ist, wenn sie von anderen, jeweils durch kovalente Radien voneinander getrennte Kugeln umgeben ist, als wenn die Abstände dieser Nachbarkugeln ihren van-der-Waals-Radien entsprechen.

In einer Flüssigkeit ist ein großer Teil der Oberfläche eines gelösten Moleküls vom leeren Raum zwischen den Lösungsmittelmolekülen umgeben^[49]. Selbst in einem unpolaren Festkörper wird der engste Kontakt zwischen benachbarten Molekülen durch ihre van-der-Waals-Radien bestimmt. Daher führt möglicherweise die Energie, die man für die Überführung einer Gruppe aus Wasser an einen Festkörper messen kann, zu einer Unterschätzung der Energie für die Wechselwirkung zwischen derselben Gruppe und einem Enzym. Hinsichtlich der Wechselwirkungsenergie erweisen sich gewissermaßen Enzyme als bessere Festkörper als viele feste Körper selbst!

Bei einem Protein wird nicht nur die Kontaktfläche zum gebundenen Molekül größer sein als in einer Flüssigkeit, so daß die Wechselwirkungsenergie zunimmt, sondern die Dispersionskräfte werden auch stärker sein. Vermutlich sind nämlich die Dispersionswechselwirkungen zwischen einem Molekül und umgebenden Atomen größer, wenn diese Atome kovalent miteinander verknüpft sind^[49].

Die physikalische Adsorption von Molekülen an feste Oberflächen besitzt gewisse Ähnlichkeit mit der Enzym-Substrat-Bindung. Die Atome in einem festen Körper bilden nämlich ebenfalls eine dichtgepackte Oberfläche. In einigen Fällen, z. B. beim Graphit, ist der interatomare Abstand ähnlich dem in kovalent verknüpften Molekülen. Man beobachtet anstelle der üblichen Abhängigkeit der London-Kräfte von r^{-6} für ein Molekülpaar eine r^{-3} -Abhängigkeit für die Wechselwirkung zwischen einem Molekül und einem Festkörper^[50]. Diese weiterreichende Wechselwirkung ist der Hauptgrund dafür, daß Gase bereits bei Drücken adsorbiert werden, die niedriger als die Drücke für die Kondensation zu Flüssigkeiten oder festen Stoffen liegen. Die differentielle Adsorptionswärme ist oft etwa doppelt so groß wie die Kondensationswärme des adsorbierten Gases^[51].

Die Bildung von Chlathraten und Einschlußverbindungen zeigt ebenfalls Ähnlichkeiten mit dem Prozeß der Enzym-Substrat-Bindung. Die Acylierung des Oxims (37) mit 4-Nitrophenylalkancarboxylaten verläuft entsprechend einer Sättigungskinetik, was in Einklang mit der Bildung eines Vergleichsgewichts zwischen dem Oxim und dem Substrat einerseits und einem Einschlußkomplex andererseits steht^[52]. Die Bindungskonstanten liegen zwischen 10^5 und 10^6 mol l^{-1} und sind somit größer als die normalerweise für Cycloamylasen gemessenen Werte von 10^2 bis 10^3 mol l^{-1} ^[53]. Interessanterweise wird das Oxim (37) nicht durch kürzerkettige Ester wie 4-Nitrophenylacetat acyliert^[52]. Dies liegt im Falle des kleineren Moleküls vermutlich an der ungenügenden Bindungsenergie, die den bei der Bindung auftretenden Entropieverlust nicht zu kompensieren vermag.



Kürzlich hat man aus Experimenten schließen können, daß der Beitrag nichtkovalenter Wechselwirkungen zur Stabilität des Cofaktor-Protein-Komplexes aus D-Serin-Dehydratase und Pyridoxaminphosphat wenigstens 20- bis 30mal größer ist als der Beitrag der kovalenten $>C=N$ -Bindung^[54].

Ein Großteil der Beschleunigung von chemischen Reaktionen durch Enzyme ist danach offenbar der großen Inneren Energie für die Bindung zwischen dem Substrat und den dichtgepackten, kovalent verknüpften Atomen in den Enzymen zuzuschreiben.

Ich danke Professor W. P. Jencks für viele stimulierende Diskussionen und seine ständige Ermutigung. Professor P. von R. Schleyer danke ich für einige der molekülmechanischen Berechnungen.

Eingegangen am 30. September 1976 [A 171]
Übersetzt von Dr. Wolfram Bode, Martinsried

- [1] W. P. Jencks, M. I. Page, Proc. Eighth FEBS Meeting, Amsterdam, 29, 45 (1972).
- [2] W. P. Jencks: Catalysis in Chemistry and Enzymology. McGraw-Hill, New York 1969; M. L. Bender: Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins. Wiley, New York 1970; T. C. Bruice, S. J. Benkovic: Bioorganic Mechanisms. Vol. 1. Benjamin, New York 1966.
- [3] M. I. Page, W. P. Jencks, J. Am. Chem. Soc. 94, 8818 (1972).
- [4] M. I. Page, Chem. Soc. Rev. 2, 295 (1973).
- [5] P. Greenzaid, W. P. Jencks, Biochemistry 10, 1210 (1971).
- [6] A. Hall, J. R. Knowles, Biochemistry 14, 4348 (1975).
- [7] W. P. Jencks, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 43, 219 (1975).
- [8] J. McConn, E. Ku, A. Himoe, K. G. Brandt, G. P. Hess, J. Biol. Chem. 246, 2918 (1971).
- [9] W. P. Jencks in N. O. Kaplan, E. P. Kennedy: Current Aspects of Biochemical Energetics. Academic Press, New York 1966, S. 273.
- [10] W. P. Jencks, F. Barley, R. Barnett, M. Gilchrist, J. Am. Chem. Soc. 88, 4464 (1966); T. Higuchi, L. Ebersson, J. D. McRae, ibid. 89, 3001 (1967).
- [11] T. C. Bruice, U. K. Pandit, J. Am. Chem. Soc. 82, 5858 (1960); V. Gold, D. G. Oakenfall, T. Riley, J. Chem. Soc. B 1968, 515.
- [12] R. P. Bell, M. A. D. Fluendy, Trans. Faraday Soc. 59, 1623 (1963).
- [13] L. Ebersson, H. Welinder, J. Am. Chem. Soc. 93, 5821 (1971).
- [14] M. I. Page, W. P. Jencks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1678 (1971).
- [15] T. C. Bruice in P. D. Boyer: The Enzymes. 3. Aufl., Vol. 2. Academic Press, New York 1970, S. 217.
- [16] D. R. Storm, D. E. Koshland Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 445 (1970); A. Dafforn, D. E. Koshland Jr., ibid. 68, 2463 (1971); D. R. Storm, D. E. Koshland Jr., J. Am. Chem. Soc. 94, 5805, 5815 (1972).
- [17] S. Milstein, L. A. Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1143 (1970).

- [18] R. A. Firestone, B. G. Christensen, *Tetrahedron Lett.* 1973, 389.
- [19] T. Nowak, A. S. Mildvan, *Biochemistry* 11, 2813 (1972).
- [20] E. M. Engler, J. D. Andose, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 8005 (1973); N. L. Allinger, J. T. Sprague, *ibid.* 94, 5734 (1972); N. L. Allinger, J. A. Hirsch, M. A. Miller, I. J. Tyminski, *ibid.* 90, 5773 (1968).
- [21] S. W. Benson, F. R. Cruickshank, D. M. Golden, G. R. Haugen, H. E. O'Neal, A. S. Rodgers, R. Shaw, R. Walsh, *Chem. Rev.* 69, 279 (1969).
- [22] P. von R. Schleyer, persönliche Mitteilung; die Spannungsenergie der Alkene wurde unter Benutzung von Allingers Kraftfeld-Methode [20] berechnet.
- [23] M. I. Page, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [24] W. P. Jencks, *Chem. Rev.* 72, 705 (1972).
- [25] M. I. Page, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8828 (1972).
- [26] A. R. Martin, J. J. Morris, M. I. Page, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 495, und unveröffentlichte Beobachtungen.
- [27] J.-P. Vincent, M. Lazdunski, *Biochemistry* 11, 2967 (1972); R. J. Baugh, C. G. Trowbridge, *J. Biol. Chem.* 247, 7498 (1972).
- [28] A. D. Riggs, R. F. Newby, S. Bourgeois, *J. Mol. Biol.* 51, 303 (1971).
- [29a] C. L. Hornick, F. Karush, *Immunochemistry* 9, 325 (1972).
- [29b] D. S. Ryan, R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* 250, 843 (1975); H. Ako, R. J. Foster, C. A. Ryan, *Biochemistry* 13, 132 (1974); R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, W. Steigemann, *J. Mol. Biol.* 89, 73 (1974).
- [30] B. W. Griffin, J. A. Peterson, *Biochemistry* 11, 4740 (1972).
- [31] W. C. Werkheiser, *J. Biol. Chem.* 236, 888 (1961).
- [32] M. N. Williams, M. Poe, N. J. Greenfield, J. M. Hirshfield, K. Hodgsteen, *J. Biol. Chem.* 248, 6375 (1973).
- [33] N. M. Green, *Biochem. J.* 89, 599 (1963); *Adv. Protein Chem.* 29, 85 (1975).
- [34] J. W. Long, W. J. Ray, Jr., *Fed. Proc.* 31, 419 (1972).
- [35a] G. P. Sachdev, J. S. Fruton, *Biochemistry* 9, 4465 (1970).
- [35b] K. Flohr, R. M. Paton, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1209 (1975).
- [36] E. Holler, P. Rainey, A. Orme, E. L. Bennett, M. Calvin, *Biochemistry* 12, 1150 (1973).
- [37a] R. B. Lofffield, E. A. Eigner, *Biochim. Biophys. Acta* 130, 426 (1966); S. L. Owen, F. E. Bell, *J. Biol. Chem.* 245, 5515 (1970).
- [37b] B. Hetnarski, R. D. O'Brien, *J. Agric. Food Chem.* 23, 709 (1975); R. L. Metcalf, T. R. Fukoto, *ibid.* 13, 220 (1965).
- [38] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14, 1 (1959).
- [39] H. D. Nelson, C. L. DeLigny, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 87, 623 (1968).
- [40] Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.* 246, 2211 (1971).
- [41] M. I. Page, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 456 (1976).
- [42] D. D. Eley, *Trans. Faraday Soc.* 35, 1281, 1421 (1939).
- [43] J. Birkoft, D. W. Blow, *J. Mol. Biol.* 68, 187 (1971).
- [44] W. Kauzmann, K. Moore, D. Schultz, *Nature* 248, 447 (1974); M. Pincus, L. L. Thi, R. P. Carty, *Biochemistry* 14, 3653 (1975).
- [45] R. A. Pierroti, *J. Phys. Chem.* 67, 1840 (1963); 69, 281 (1965); H. Reiss, *Adv. Chem. Phys.* 9, 1 (1965).
- [46] H. H. Uhlig, *J. Phys. Chem.* 41, 1215 (1937); siehe auch O. Sinanoğlu in B. Pullman: *Proc. Internat. Conf. Mol. Assoc. Biol.* Academic Press, New York 1968.
- [47] M. H. Klapper, *Biochim. Biophys. Acta* 229, 557 (1971); F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* 82, 1 (1974).
- [48] J. Timmermans: *Physico-Chemical Constants of Pure Organic Compounds*. Vol. 2. Elsevier, New York 1965.
- [49] E. Grunwald, E. Price, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4517 (1964).
- [50] J. M. Honig, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 58, 741 (1954); M. Polanyi, F. London, *Naturwissenschaften* 18, 1099 (1930); J. H. de Boer, *Trans. Faraday Soc.* 32, 10 (1936).
- [51] S. J. Gregg: *The Surface Chemistry of Solids*. Chapman and Hall, London 1965.
- [52] Y. Murakami, J. Sunamoto, H. Okamoto, K. Kawanami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 1537 (1975).
- [53] D. L. Vander Jagt, F. L. Killian, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1016 (1970).
- [54] N. D. Schonbeck, M. Skalski, J. A. Sahfer, *J. Biol. Chem.* 250, 5359 (1975).

Photodielektrische Polymere für die Holographie

Von Shimon Reich^[*]

In diesem Aufsatz wird die Verwendung von Polymeren als „dickes“ Aufzeichnungsmedium für die Holographie diskutiert. Diese Materialien bieten aufgrund ihres hohen Beugungswirkungsgrades, ihrer hohen Speicherdichte und ihrer ausgezeichneten Winkel- und Wellenlängenselektivität interessante Anwendungsmöglichkeiten. Außerdem erlauben Polymere die Echtzeit-Aufzeichnung in situ. Neben dem gegenwärtigen Stand der Technik werden auch Zukunftsaussichten besprochen.

1. Einführung

Wie es oft in der Geschichte der Wissenschaft geschieht, hatte Gabor^{1, 2} die Holographie vor der Entwicklung der nötigen Technologie für die Aufzeichnung von Hologrammen erfunden. Zur Einschätzung dieses Sachverhaltes sollte man sich kurz erinnern, was Holographie ist: eine Interferenzmethode zur Aufzeichnung von Wellen, die von einem mit kohärentem Licht beleuchteten Gegenstand gestreut werden. Die gestreute Welle interferiert mit einer Referenzwelle, deren Phasenbeziehung zur Phase der gestreuten Welle definiert ist. Auf diese Weise wird ein Interferenzmuster erzeugt. Eine Aufzeichnung dieses Musters enthält alle Informationen, die not-

wendig sind, um die ursprünglich vom Objekt gestreute Welle zu rekonstruieren. In der Aufzeichnung ist demnach die gesamte Information gespeichert, d.h. Phase und Amplitude der gestreuten Welle. Daher spricht man von einem „Hologramm“, abgeleitet vom griechischen „ $\delta\lambda\omicron\varsigma$ “ oder ganz. Das Prinzip der Aufzeichnung und Wiedergabe (Rekonstruktion) eines Hologramms geht aus Abbildung 1 hervor.

Vom Standpunkt der Technologie aus gesehen benötigen wir eine kohärente Lichtquelle und ein Medium, in welchem das Interferenzmuster, das die holographische Information bildet, sich wirkungsvoll aufzeichnen läßt.

Eine leistungsfähige kohärente Lichtquelle wurde erst 1960 durch die Erfindung des Lasers realisiert. Diese Erfindung hat das Schicksal der Idee einer holographischen Aufzeichnung verändert: Aus einem interessanten Aspekt der Optik ist ein neuer und blühender Zweig der Wissenschaft und Technik geworden. Als Aufzeichnungsmedium diente zunächst die pho-

[*] Dr. S. Reich
Polymer Department, Weizmann Institute of Science
Rehovot (Israel)