

Reaktionsselektivität von Enzymen durch negative Katalyse oder wie gehen Enzyme mit hochreaktiven Intermediaten um?

Von János Rétey*

Unser heutiges Verständnis der Enzymkatalyse ist durch die von *Linus Pauling* erstmals im Jahre 1946 diskutierte Hypothese der Bindung des Übergangszustands geprägt. Diese Bindung des Übergangszustands sowie das Zusammenspiel geeigneter katalytisch aktiver Gruppen kann sowohl die Beschleunigung als auch die Spezifität vieler enzymatischer Reaktionen weitgehend erklären, sofern für diese analoge chemische Reaktionen bekannt sind. Es wird angenommen, daß Enzyme bei chemisch „schwierigen“ oder „unwahrscheinlichen“ Umsetzungen auf einen zusätzlichen Trick zurückgreifen. Durch die Verwendung von Cofaktoren hoher potentieller Energie, wie etwa Coenzym B_{12} , stabilisierter Radikale oder Licht, können sie das gebundene Substrat in ein äußerst reaktives, instabiles Intermediat überführen. Die Selektivität wird in diesem Fall durch *negative Katalyse* gewährleistet, die verhindert, daß das „heiße“ Intermediat so reagiert wie in Lösung oder in der Gasphase. Durch die Verlängerung seiner Lebensdauer kann das hochreaktive Intermediat Reaktionen eingehen, deren Aktivierungsenergien relativ groß sind und die deshalb ohne negative Katalyse unterdrückt würden. Die Selektivität solcher Reaktionen wird daher eher durch das Verhindern unerwünschter Reaktionen als durch die Förderung der eigentlichen Zielreaktion bedingt. Die Überführung in hochreaktive Zwischenstufen kann umkehrbar sein, wie es etwa bei Coenzym B_{12} der Fall ist, oder irreversibel, wenn sie durch Licht oder ATP verursacht wird. Hochreaktive Zwischenstufen sind oft Radikale, können aber auch andere instabile Intermediate sein. In diesem Aufsatz werden eine Reihe enzymatischer Reaktionen diskutiert, die durch negative Katalyse erklärt werden können.

1. Einleitung

Obwohl die wahre Natur der Enzymkatalyse bisher nicht vollständig erkannt ist, konnten in den letzten Jahrzehnten doch viele wichtige Einzelheiten bezüglich der Enzymstrukturen und der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen entschlüsselt werden. Als Ergebnis können einige allgemein gültige Schlußfolgerungen gezogen werden, und es ist möglich, die Prinzipien, die eine enzymatische Reaktion ermöglichen, zu benennen. Der erste und absolut notwendige Schritt aller enzymatischen Reaktionen ist die Bindung des Substrats. Obwohl dieser Schritt essentiell ist, ist er natürlich nicht ausreichend für eine Katalyse. Das aktive Zentrum von Enzymen ist, wie erstmals 1946 von *Linus Pauling* ausgeführt^[1], eher zum Übergangszustand als zum Substrat komplementär. Mit anderen Worten, daß enzymkatalysierte Reaktionen eine geringere Energiebarriere haben als unkatalysierte, wird durch die Destabilisierung des Grundzustands des Substrats und die damit verbundene Stabilisierung des Übergangszustands vom Enzymkomplex verursacht. Genaugenommen ist diese Unterteilung nicht völlig korrekt, da nach der Bindung des Substrats der gesamte Komplex als eine Einheit angesehen werden sollte. Wenn man über diese Nachlässigkeit hinwegsieht, kann man anführen, daß die meßbare Bindungsenergie wesentlich geringer ist als die theoretisch zu erwartende, da ein Teil der Bindungsenergie dazu verwendet wird, das Substrat in Richtung des Übergangszustands zu verändern. Dabei kann das Substrat in einer zwar ungünstigen, aber reaktiven Konformation fixiert werden, es kann von der Solvathülle getrennt werden, es kann eine Polarisationsänderung stattfinden, oder es kann eine kovalente Bin-

dung zwischen Substrat und Enzym geknüpft werden. An dieser Stelle erscheint es angebracht, die Rolle des nicht an der Reaktion beteiligten Teils des Substrats oder des Coenzym zu betonen. Die von diesem Teil erbrachte Bindungsenergie kann dazu verwendet werden, den reagierenden Teil des Substrats in ein „ihn nicht willkommen heißendes Loch“ zu zwingen^[2]. In vielen Fällen, z. B. bei Acyl-CoA, SAM, NAD⁺ und FAD^[*], ist solch ein nichtreaktiver Teil am Substrat bzw. am Coenzym vorhanden. Solch ein Kunstgriff mag dabei einer doppelten Rolle dienen, zum einen der chemischen Aktivierung als Thioester oder Sulfonium-Ion, zum anderen der starken Bindung durch die Wechselwirkung mit der komplementären Bindungstasche des Enzyms, z. B. der Adenosin-Bindungstasche. Ähnliche Effekte können beim Pyridoxalphosphat oder Thiaminpyrophosphat durch Phosphorylierung oder Pyrophosphorylierung erzielt werden, da diese durch zum Teil ionische Wechselwirkungen gebunden werden. Ein Teil der Bindungsenergie kann auch für Konformations- und andere Strukturänderungen des Enzyms verwendet werden.

Eine weitere Folge des Paulingschen Postulats ist die sehr starke Bindung sogenannter Übergangszustandsanaloge an Enzyme. Diese sind stabile Verbindungen, deren Strukturen den vermeintlichen Übergangszuständen von Substraten bei Enzymreaktionen ähneln. Solche Übergangszustandsanaloge werden im Hinblick auf ihre Eignung als wirkungsvolle Inhibitoren und als Arzneimittel untersucht, und in neuerer Zeit werden sie bei der Herstellung katalytischer Antikörper verwendet^[3,4]. Es ist begreiflich, daß die meisten Wissenschaftler ihre Bemühungen auf solche enzymatischen Reaktionen konzentrieren, die relativ einfach und chemisch

[*] Prof. Dr. J. Rétey
Lehrstuhl für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee, D-7500 Karlsruhe 1

[*] CoA = Coenzym A, SAM = S-Adenosylmethionin, NAD = Nicotinamid-adenin dinucleotid, FAD = Flavinadenin dinucleotid.

plausibel erscheinen. Dabei handelt es sich z. B. um Protonenübertragungen, etwa die Tautomerisierung, Epimerisierung oder Racemisierung sowie die hydrolytische Spaltung von Estern und Amiden^[5-7]. Trotz allem bleiben noch einige Probleme ungelöst. Da sich die meisten Enzymreaktionen aus einer Reihe elementarer Schritte zusammensetzen, ergeben sich folgende Fragen: Welches ist der Reaktions-schritt, dessen Übergangszustand komplementär zur Bindungsstelle am Enzym ist, und handelt es sich dabei um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt? Oder ist das Enzym in der Lage, komplementäre Bindungszentren für mehrere aufeinanderfolgende Übergangszustände einer Reaktions-folge durch feine und schnelle Konformationsänderungen zu bilden?

Es ist üblich, die durch ein Enzym erzielte Beschleunigung einer Reaktion durch Vergleich mit der nicht-katalysierten Reaktion abzuschätzen. Solch eine Beschleunigung wird in erster Näherung dem Quotienten der Dissoziationskonstanten von Enzym-Substrat und Enzym-Übergangszustands-Komplex K_S bzw. K_T , gleichgesetzt [Gl. (a)]^[8].

$$\frac{k_e}{k_n} = \frac{K_S}{K_T} \quad (a)$$

Beschleunigungen zwischen 10^{10} und 10^{20} wurden abgeschätzt. Eine weitere hervorragende Eigenschaft von Enzymen ist ihre hohe Spezifität. Ihre Substrat- und Stereospezifität wurde in vielerlei Zusammenhängen gezeigt und diskutiert^[9-12]. Wir wollen uns hier auf die Betrachtung der Reaktionsspezifität beschränken, d. h. auf die Tatsache, daß mehrere Enzyme das gleiche Substrat umsetzen können, aber jedes Enzym dabei nur eine spezifische Reaktion katalysiert, die zu nur einem spezifischen Produkt führt. Auch dies folgt selbstverständlich aus der Paulingschen Theorie der Bindung von Übergangszuständen. Mit anderen Worten, viele Enzyme arbeiten nach folgender Strategie: Sie wählen eine Reaktion und vermindern ihre Aktivierungsenergie durch Stabilisierung des zugehörigen Übergangszustands. Andere mögliche Reaktionen haben dann zu hohe Aktivierungsenergien, d. h. das betreffende Substrat wird spezifisch umgewandelt.

Es gibt jedoch eine steigende Anzahl von Enzymreaktionen, die weder einfach noch chemisch plausibel sind. Ihre enzymatische Beschleunigung ist quasi unendlich, da die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion praktisch Null ist. Wie können Enzyme solche „chemisch unmöglichen“ Reaktionen durchführen? Bietet die Theorie der Bindung des Übergangszustands auch für solche Reaktionen eine zu-

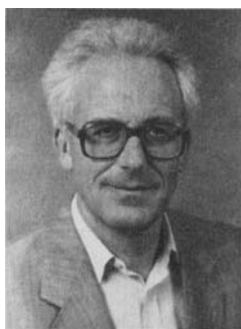
friedenstellende Erklärung? Um ein gebundenes Substrat genügend reaktiv zu machen, können Enzyme auf „energie-reiche“ Verbindungen, wie etwa ATP oder Radikale erzeugende Agentien zurückgreifen, etwa die Kombination von Eisenkomplexen mit radikalbildenden Gruppen wie Tyrosin, Coenzym B_{12} oder sogar Licht. Im Fall des Coenzym B_{12} kann durch die homolytische Spaltung der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung ein hochreaktives Radikal gebildet werden, das in der Lage ist, von einer nicht-aktivierten Position des Substrats ein Wasserstoffatom zu abstrahieren. Das entstehende, destabilisierte Radikal neigt zu spontanen Folgereaktionen. Die Hauptaufgabe des Enzyms besteht nun darin, Stabilisierungsreaktionen, die für freie Radikale in Lösung typisch wären, zu verhindern. Solch eine „negative Katalyse“ kann durch die Abschirmung des hochreaktiven Intermediats gegenüber reaktiven Gruppen erreicht werden und durch die Verhinderung von Konformationen, aus denen heraus unerwünschte Reaktionen stattfinden können. Dies ermöglicht der radikalischen Zwischenstufe, untypische Reaktionen einzugehen, z. B. Umlagerungen unter 1,2-Wanderungen.

Die Reaktionsselektivität kann also durch die spezifische Beschleunigung einer Reaktion erreicht werden oder aber, unter Energieeinsatz, durch die Bildung hochreaktiver Intermediate, die dann daran gehindert werden, unerwünschte Reaktionen einzugehen. Wenn dadurch die Lebensdauer des hochreaktiven Intermediats verlängert wird, können unübliche Umwandlungen folgen. Im Gegensatz zur Energie von ATP, Licht oder anderen Energiequellen muß die von Coenzym B_{12} übertragene Energie am Ende eines Katalysezyklus zurückgegeben werden.

Was sind die experimentellen Stützen für solch eine Alternative oder besser gesagt, für solch ein zusätzliches Prinzip der Reaktionsselektivität, und worin liegt seine Bedeutung auf dem Gebiet der enzymatischen Reaktionen?

2. Coenzym- B_{12} -abhängige enzymkatalysierte Umlagerungen

Man kennt heute etwa ein Dutzend Coenzym- B_{12} -abhängige Umlagerungen, die unter mehreren Gesichtspunkten bemerkenswert sind. Coenzym B_{12} und einige seiner Derivate sind die einzigen bekannten Naturstoffe, die eine kovalente Metall-Kohlenstoff-Bindung haben. Die thermische Stabilität dieser Bindung, insbesondere in wäßriger Lösung, ist bemerkenswert. Die Dissoziationsenergie der homolytischen Spaltung wurde mit etwa 30 kcal mol^{-1} angegeben^[13, 14],



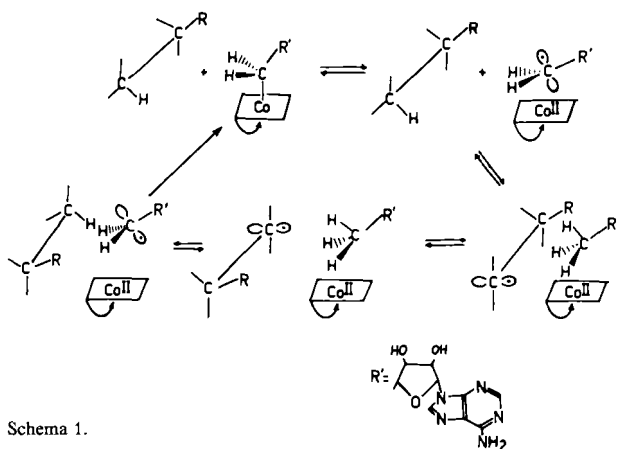
János Rétey, geboren 1934 in Szeged (Ungarn), studierte von 1957 bis 1960 Chemie an der ETH-Zürich und promovierte dort 1963 bei V. Prelog über die Stereospezifität von Oxido-Reduktasen. Nach Postdoc-Jahren bei F. Lynen (München, 1963–1965) und D. Arigoni (ETH-Zürich, 1965–1968) wurde er Oberassistent und Lehrbeauftragter an der ETH-Zürich. Seit 1972 ist er Professor für Biochemie an der Universität Karlsruhe. 1971 erhielt er den Alfred-Werner-Preis der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft. Seine Arbeitsgebiete sind: Wirkungsweise und Stereospezifität von Enzymen, synthetische Enzymmodelle, Bioorganische und Bioanorganische Chemie sowie Untersuchung der Enzymstruktur mit molekularbiologischen Methoden.

ihre Photolyse verläuft schnell, ist aber wahrscheinlich ohne Bedeutung für die enzymatischen Reaktionen. Noch erstaunlicher sind die von Coenzym B₁₂ katalysierten Umlagerungen. Es handelt sich dabei um den Austausch eines Wasserstoffatoms und einer variablen Gruppe R zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen [Gl. (b)].



Handelt es sich bei R um einen C-gebundenen Rest, z. B. -COSCoA, -C(H)(NH₂)COOH oder -C(=CH₂)COOH, so spricht man von einer Kohlenstoffgerüstumlagerung, z. B. im Fall der durch Methylmalonyl-CoA-, Glutamat- oder Methylenglutarat-Mutase katalysierten Reaktionen. In all diesen Fällen wird im Verlauf der Reaktion eine nicht-aktivierte Methylgruppe angegriffen. Handelt es sich bei R um eine Heteroatom-gebundene Gruppe, z. B. OH oder NH₂, so werden die entsprechenden Enzyme als Diol-Dehydratasen, Ammoniak-Lyasen oder Amino-Mutasen bezeichnet. Ein Beispiel für Amino-Mutasen ist die β-Lysin-Mutase.

Während die Wanderung von R streng intramolekular verläuft^[15, 16], ist die Wanderung des H-Atoms teilweise intermolekular^[17–20]. 1966 entdeckten Frey und Abeles^[18], daß Umlagerungen, die durch Coenzym-B₁₂-abhängige Enzyme katalysiert werden, das wandernde H-Atom mit jenen der cobaltgebundenen Methylengruppe austauscht. Sie folgerten daraus eine vorübergehende Spaltung der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung unter intermediärer Bildung von 5'-Desoxyadenosin. Als Folge davon muß man annehmen, daß ein weiterer, chemisch schwieriger Schritt, nämlich der Angriff des 5'-Desoxyadenosins an einer nicht-aktivierten Methylgruppe notwendig ist, um den Katalysator zu regenerieren. In Schema 1 ist ein solcher Minimalmechanismus dargestellt.



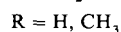
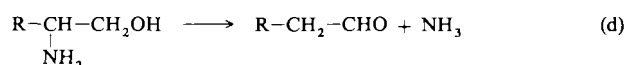
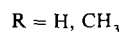
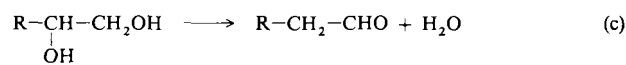
Schema 1.

Die angenommene Spaltung der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung erfolgt wahrscheinlich homolytisch. Dies ist die am wenigsten Energie erfordernde Art des Bindungsbruchs; in einigen Fällen gibt es auch experimentelle Hinweise (ESR, UV) für die intermediäre Bildung paramagnetischer Co^{II}-Spezies und eines organischen Radikals^[21–29]. Ein hochreaktives organisches Radikal kann eine nicht-aktivierte Methylgruppe angreifen, wie dies im Falle der Reaktionen mit Methylmalonyl-CoA^[30], Isobutyryl-CoA^[31] oder Methyl-

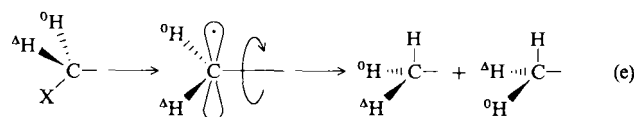
aspartat geschieht^[32]. Obwohl der direkte Beweis für die Existenz radikalischer Zwischenstufen bei diesen Kohlenstoffgerüstumlagerungen noch aussteht, wurden bereits ESR-Spektren von Enzym-Substrat-Komplexen mit Ethanolamin-Ammoniak-Lyase^[21, 23, 24], Diol-Dehydratase^[25–27] und Ribonucleotid-Reduktase^[28] veröffentlicht. Aufgrund dieser Spektren hat man angenommen, daß während der Katalyse das paramagnetische Co^{II}-Zentrum und das 5'-Methylen-Radikal der Adenosineinheit 10–12 Å voneinander entfernt sind. Es ist verlockend anzunehmen, daß die Bindung des Substrats eine Konformationsänderung des Enzyms auslöst, wodurch die beiden Teile des Coenzym auseinandergezogen werden. Das Substrat kann dann in den durch diese Bewegung geschaffenen Raum eindringen. Eine genaue Positionierung von Methylen-Radikal und Substrat sind die Voraussetzung für die spezifische Abstraktion des wandernden H-Atoms.

2.1. Diol-Dehydratase- und Ethanolamin-Ammoniak-Lyase-Reaktionen

Viele interessante und stereochemisch überraschende Einzelheiten wurden bei den Reaktionen der Diol-Dehydratase und der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase gefunden, wobei in beiden Fällen ein Paar homologer Substrate in einer ähnlichen, aber stereochemisch deutlich unterscheidbaren Art umgesetzt werden [Gl. (c) und (d)].

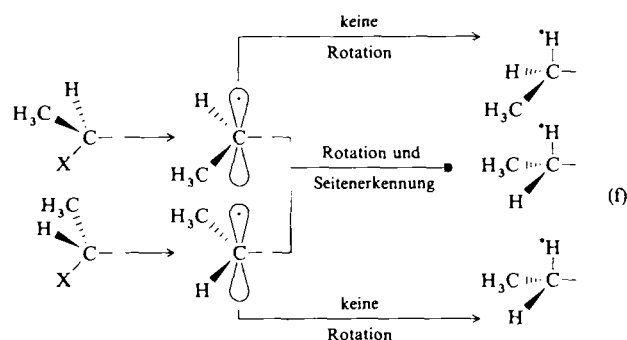


Die Ergebnisse wurden schon früher zusammenfassend dargestellt^[11, 12]. Insgesamt bestätigen sie das Vorkommen radikalischer Zwischenstufen, für das ESR-Spektren erste Hinweise geliefert hatten. Insbesondere die Beobachtung, daß immer dann, wenn die Reaktion über ein Methylenradikal verläuft, Racemisierung beobachtet wird, erklärt sich durch eine schnelle Rotation um eine C-C-Bindung, wodurch die homotopen Seiten ununterscheidbar werden [Gl. (e)].



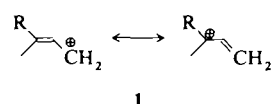
Wird eines der Wasserstoffatome durch eine Methylgruppe ersetzt, so verhindert dies, wie im Falle der Diol-Dehydratase-Reaktion^[33], die Rotation an der Enzymbindungsstelle, oder es führt bei einer niedrigen Rotationsbarriere zu zwei für das Enzym unterscheidbaren Seiten des trigonalen Zentrums, was im Fall der Reaktion der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase^[34] zutrifft [Gl. (f)]. Experimentell beobachtet man einen einheitlichen sterischen Verlauf (z. B. Inversion)

im ersten Fall und eine uneinheitliche, von der Konfiguration des Substrats unabhängige Stereospezifität im zweiten Fall.



Man sieht, daß sich stereochemische Untersuchungen ausgezeichnet dafür eignen, das Auftreten von Methylenradikal-Zwischenstufen nachzuweisen. Enzymatische Umwandlungen über anionische Methylengruppen, wie sie etwa bei Kondensationsreaktionen von Acetyl-CoA beteiligt sind, sind aufgrund der hohen Rotationsbarriere durchweg stereospezifisch^[35–38].

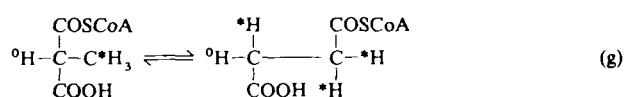
Enzymatische Prozesse, bei denen die Beteiligung von Methylen-Kationen vermutet wird, sind selten. In der Terpen-Biosynthese bei der Kondensation der Isopreneinheiten Isopentenyl- und Dimethylallyldiphosphat ist das vermeintliche Intermediat ein Allyl-Kation mit einer Methylengruppe an einem Ende (siehe 1).



Die Verwendung stereospezifisch markierter Substrate ergab eine vollständige Selektivität bezüglich der enantiotopen Methylenseiten, was für eine hohe Rotationsbarriere in 1 spricht^[39].

2.2. Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktionen

Unter den Coenzym-B₁₂-abhängigen Kohlenstoffgerüstumlagerungen wurde die Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion [Gl. (g)] am gründlichsten untersucht. Der ste-



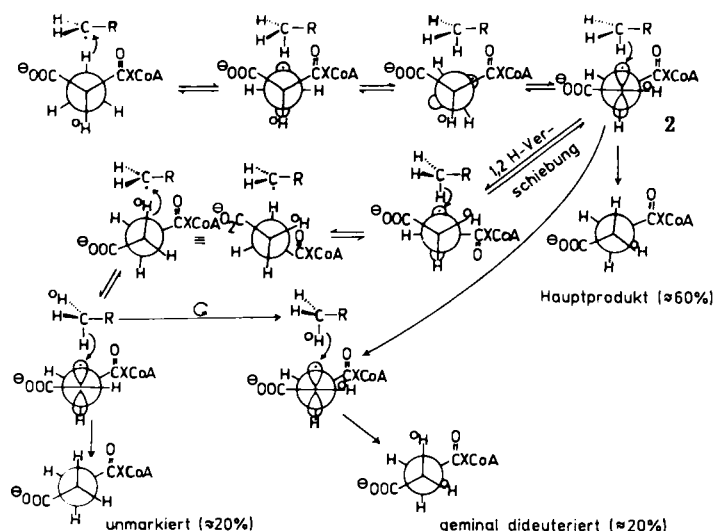
rische Verlauf der Substitutionen an den wandernden Zentren wurde durch Deuteriummarkierung^[40, 41] und durch Verwendung des homologen Substrats Ethylmalonyl-CoA^[42] aufgeklärt. Die Substitutionen erfolgen an beiden Zentren hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, unter Retention. Geht man von monodeutertem, [2-²H₁]Methylmalonyl-CoA aus, so ist das entstehende Succinyl-CoA zu je 15–20% unmarkiert und dideutert^[40, 41]. Da man an eine strenge Stereospezifität der Enzyme glaubte, wurden diese Ergebnisse zunächst unreinen Enzympräparaten oder experimentellen Fehlern zugeschrieben. Erst zwanzig Jahre später, als HPLC-gereinigte Enzympräparate verfügbar wa-

ren und hochauflösende NMR-Spektrometer eine genaue Beobachtung der Enzymreaktionen ermöglichten, konnte gezeigt werden, daß die überraschende Deuteriumverteilung keine Folge experimenteller Fehler, sondern vielmehr die Konsequenz des Reaktionsmechanismus war^[43, 44]. Besonders aussagekräftige Ergebnisse wurden durch die Verwendung des Carba(dethia)-Coenzym-A(CH₂CoA)-Analogons des Methylmalonyl-CoA erhalten^[45]. Diese Verbindung ist ein genau so gutes Substrat wie der natürliche Thioester, hat jedoch den Vorteil, daß sie hydrolysestabil ist. Deshalb konnte die Bildung und Deuterierung von Succinyl-CH₂-CoA ca. einen Tag NMR-spektroskopisch beobachtet werden; die Bildung von Succinyl-CoA, das unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert, läßt sich nicht NMR-spektroskopisch verfolgen.

Die kinetischen NMR-Studien^[45] bestätigen die überraschende Verteilung des „nicht-wandernden“ Deuteriumatoms unter den gebildeten Succinyl-Spezies. So wurde anstatt des erwarteten 100% monodeuterten Produkts nur etwa 60% gebildet. Der Rest war unmarkiert oder geminal dideutert. In Anwesenheit von Methylmalonyl-CoA-Epimerase incorporiert sämtliches, durch Rückreaktion gebildetes unmarkiertes Methylmalonyl-CH₂CoA sofort Deuterium aus dem Lösungsmittel in die α-Position. Wiederholte Umlagerungen, die wieder unter der gleichen Deuteriumverteilung stattfinden, führen ein weiteres Mal zu etwas unmarkiertem Produkt, das durchweg auf der Methylmalonyl-Stufe deuteriert worden ist. Dieser Vorgang kommt einem Leck im System gleich, das einen kontinuierlichen Deuteriumeinbau aus dem Lösungsmittel in das Produkt erlaubt, was durch NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte^[45]. In strenger Abwesenheit der Methylmalonyl-CoA-Epimerase erreicht die Deuteriumverteilung eine stationäre Phase mit statistischer Verteilung von unmarkierten, monodeuterten und geminal dideuterten Spezies im Verhältnis 1:1:1^[46].

Da die Deuteriumverteilung bereits vor Erreichen des Gleichgewichts stattfindet, kann sie nicht durch einen Mangel an Stereospezifität der Rückreaktion, d.h. durch eine unvollständige Unterscheidung zwischen den beiden diastereotopen 3-Methylen-Wasserstoffatomen der Succinyl-Einheit erklärt werden. Des weiteren hat das in Experimenten mit dem natürlichen Thioester-Substrat in Deuteriumoxid gebildete monodeuterte Succinyl-CoA eine optische Reinheit von >90%^[40, 47]. Einen Mechanismus, der all diesen Tatsachen Rechnung trägt, zeigt Schema 2.

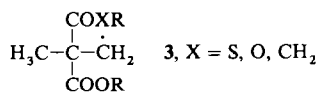
In Schema 2 wird angenommen, daß das paramagnetische Co^{II}-Zentrum nach der homolytischen Spaltung der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung lediglich die Rolle eines „Beobachters“ einnimmt. Das Adenosin-5'-Radikal ist so angeordnet, daß es ein Wasserstoffatom von der Methylgruppe des Substrats abstrahieren kann, wobei es dadurch in eine nicht-aktivierte Methylgruppe übergeht. Nach der Wanderung der Carbonyl-XCoA-Gruppe (X = S oder CH₂) kann das Produkt-Radikal 2 wieder ein Wasserstoffatom von der 5'-Methylgruppe des Adenosins abstrahieren, was zum erwarteten stereospezifisch deuterierten Produkt führt. Um die Anwesenheit von unmarkierten und doppelt markierten Spezies zu erklären, kann man eine stereoelektronisch begünstigte und in Konkurrenz zur „intermolekularen“ H-Abstraktion stattfindende 1,2-H-Verschiebung annehmen. Dabei kommt es zu einer Inversion des vorderen Zentrums, wodurch ein Deuteriumatom in die „Reichweite“ des 5'-Methylen-Radikals kommt.



Schema 2.

Letzteres wird nach der Wasserstoffverschiebung zum „hinteren“ Zentrum regeneriert und steht nun zur Abstraktion von Deuterium vom „vorderen“ Zentrum des gebundenen Produkts zur Verfügung. Da Methylgruppen selbst im aktiven Zentrum von Enzymen eine geringe Rotationsbarriere haben, kann die Rückübertragung eines H-Atoms zu unmarkiertem Succinyl-CH₂CoA unter gleichzeitiger Incorporation von Deuterium in die 5'-Methylengruppe des Coenzym führen. Im nächsten Katalysezyklus kann solch ein deuteriertes Coenzym Deuterium auf die monodeuterierte radikalische Zwischenstufe 2 übertragen und somit zum beobachteten geminal dideutierten Succinyl-Produkt führen.

Wenn das postulierte Methylmalonyl-Thioester-Radikal 3 in nicht-enzymatischen Modellsystemen erzeugt wird, werden relativ geringe Ausbeuten an Produkten einer 1,2-Wanderung beobachtet^[48–53]. Normalerweise überwiegt die direkte Wasserstoffabstraktion. Die Wanderungstendenz der Gruppen nimmt in der folgenden Reihe ab: –COR > –COSR > –CN > –COOR^[48, 51, 52, 54]. Über eine eindeutig belegte 1,2-Wanderung von Wasserstoffatomen in organischen Radikalen wurde bisher nicht berichtet.



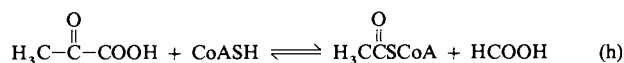
Man erkannte^[51], daß die Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion relativ langsam verläuft im Vergleich zur Lebensdauer freier Radikale, die durch Modellstudien erzeugt wurden. Dies verdeutlicht, daß das Enzym die Lebensdauer der „freien Radikale“ erhöht, indem es die Radikale vor Reaktionen mit dem Lösungsmittel schützt.

3. Coenzym-B₁₂-unabhängige enzymkatalysierte Radikalreaktionen

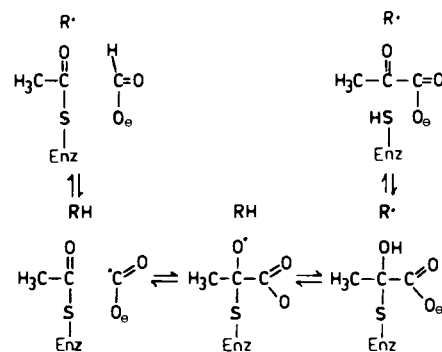
Im Laufe der letzten Jahre wurden immer mehr enzymatische Reaktionen bekannt, bei denen radikalische Zwischenstufen postuliert werden. Die meist unüblichen chemischen Umwandlungen können nicht durch herkömmliche, insbesondere ionische Mechanismen erklärt werden. Ob-

wohl die vorgeschlagenen Mechanismen bisher nicht streng bewiesen wurden, sollte eine Übersicht die in diesem Aufsatz entwickelten Ideen veranschaulichen und untermauern.

Pyruvat-Formiat-Lyase katalysiert die reversible Spaltung von Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA [Gl. (h)].

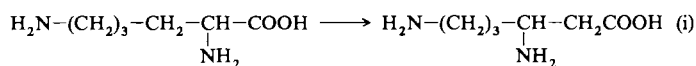


Im Gegensatz zur oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat ist die Pyruvat-Formiat-Lyase-Reaktion unabhängig von Thiaminpyrophosphat^[55]. Knappe et al.^[56] fanden, daß das gereinigte Enzym ein Radikal unbekannter Natur enthält, und schlugen, unabhängig von anderen^[58], den in Schema 3 dargestellten Mechanismus vor^[57]. Der zentrale Schritt ist dabei die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Thioalketal-Zwischenstufe in der Hinreaktion und vom Formiat in der Rückreaktion. Die Spaltung/Knüpfung der C-C-Bindung ist eine Radikalreaktion, wodurch die Schwierigkeit der Bindungsbildung zwischen zwei gleich polarisierten Kohlenstoffatomen umgangen wird. Wie in den Coenzym-B₁₂-katalysierten Reaktionen ist die hohe Reaktivität des Substrats nur „geliehen“ und muß am Ende eines Katalysezyklus an den Katalysator zurückgegeben werden.



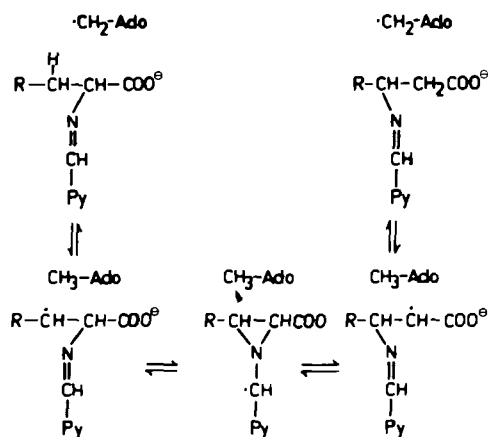
Schema 3.

Lysin-2,3-Amino-Mutase aus *Clostridium* katalysiert die Wanderung einer Aminogruppe von Position 2 nach 3 in Lysin [Gl. i)]^[59]. Das Enzym benötigt Pyridoxalphosphat



und S-Adenosylmethionin (SAM) als Coenzyme. Frey et al. fanden einen Tritiumaustausch zwischen der 5'-Position der Adenosineinheit von SAM und der 2-Position von β-Lysin^[60, 61]. Dies erinnert an die Coenzym-B₁₂-abhängige Mutasereaktion, und die Autoren schlugen einen Mechanismus vor, in dem einige einfache Schritte sehr ähnlich sind (Schema 4).

In Analogie zu Coenzym-B₁₂-abhängigen Reaktionen postulieren sie eine homolytische Spaltung der Schwefel-Kohlenstoff-Bindung unter Bildung eines 5'-Adenosyl-Radikals, welches seinerseits ein Wasserstoffatom von der unreaktiven 3-Position des Lysins abstrahieren kann. Das dabei



Schema 4.

entstehende Radikal greift das benachbarte Stickstoffatom der Schiffischen Base zwischen Lysin und Pyridoxalphosphat an, wobei ein Radikal resultiert, das sowohl durch den aromatischen Ring als auch durch den Aziridinring stabilisiert wird. Eine Umlagerung führt schließlich zu einem zur CO_2^- -Gruppe α -ständigen Radikal, das dann durch eine Wasserstoffübertragung von $5'$ -Desoxyadenosin, das an das aktive Zentrum gebunden ist, stabilisiert wird. Aberhart et al. führten unabhängige Untersuchungen unter Verwendung von Deuteriummarkierung durch^[62, 63]. Es gelang ihnen nicht, eine Deuteriumübertragung von der $5'$ -Position des SAMs auf α - oder β -Lysin nachzuweisen, so daß sie zu einem anderen Schluß als Frey et al. kamen. Der Grund für diese Widersprüche mag in der Verwendung unterschiedlicher Enzympräparate und Reaktionsbedingungen liegen^[61].

Eines der am besten charakterisierten Enzyme, das ein „stabilisiertes“ Radikal enthält, ist die Ribonucleotid-Diphosphat-Reduktase aus *E. coli*^[64]. Bei ihr wurde erstmals ein Tyrosyl-Radikal gefunden, das durch ein benachbartes zweikerniges Eisen(III)-Zentrum stabilisiert wird^[65]. Interessanterweise ist das entsprechende Enzym aus *Lactobacillus leichmannii* Coenzym- B_{12} -abhängig. In der Tat nimmt man an^[66], daß in beiden Fällen die Reaktionszentren, die Radikale bilden, ähnliche Aufgaben haben, indem sie Wasserstoffatome von SH-Gruppen und/oder von der $3'$ -Position des Nucleotids abstrahieren (Schema 5)^[67]. Die überras-

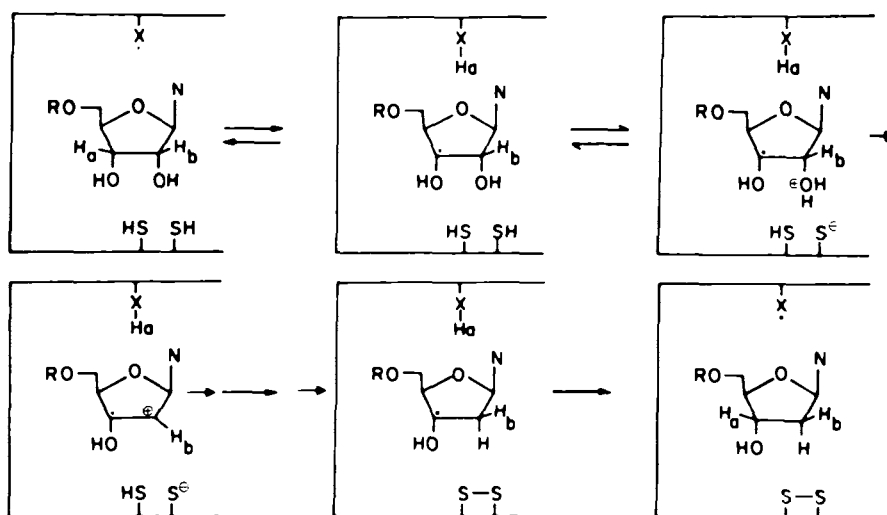
schende Beteiligung von $3'$ -H an der Reaktion wird durch einen deutlichen kinetischen Deuteriumisotopeneffekt belegt. Darin liegt eine interessante Analogie zur Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion, bei der ebenfalls ein scheinbar unbeteiligtes Wasserstoffatom am Umlagerungsmechanismus beteiligt ist^[45, 46].

Es gibt eine große Anzahl weiterer enzymatischer Reaktionen, an denen hochreaktive Zwischenstufen, meist Radikale, teilnehmen. Unter ihnen befinden sich Oxidationsprozesse, die durch Flavoenzyme, Cytochrom P-450 oder andere eisenhaltige Enzyme katalysiert werden. In all diesen Fällen ist es eine wesentliche Aufgabe des Enzyms, das hochreaktive Intermediat daran zu hindern, unerwünschte Reaktionen einzugehen. Diese *negative Katalyse* mag ebenso wichtig sein wie die *positive Katalyse* bei solchen Enzymen, die mit unreaktiven Substraten oder Intermediaten umgehen.

In der Photosynthese, bei deren Untersuchung in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht wurden, könnte die negative Katalyse ebenfalls von Bedeutung sein. In der Thylakoidmembran werden Elektronen durch Absorption von Lichtquanten auf ein energetisch hohes Niveau angehoben. In den meisten Modellsystemen fallen sie unter Energiedissipation in den Grundzustand zurück. In den Chloroplasten werden sie von anwesenden Enzymen und dem Membransystem daran gehindert und über Ferredoxin, NADP etc. einem Elektronentransportsystem zugeleitet, das mit der Bildung von ATP verknüpft ist. Im Gegensatz zu Coenzym B_{12} , das die Energie für die enzymatische Reaktion nur „ausleiht“, ist das Licht in diesem Fall ein Energielieferant.

4. Schlußfolgerung

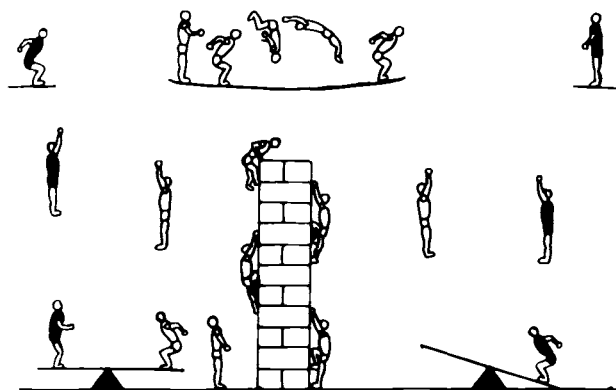
An vielen Reaktionen der Organischen Chemie sind hochreaktive Intermediate beteiligt. Auch einige ungewöhnliche enzymatische Reaktionen lassen sich verstehen, wenn man annimmt, daß sie über hochreaktive enzymgebundene Intermediate verlaufen. Durch die Unterdrückung typischer Stabilisierungsreaktionen können solche Zwischenstufen unerwartete Umlagerungen oder Gruppenwanderungen eingehen. Anhand Coenzym- B_{12} -abhängiger und -unabhängiger



Schema 5.

enzymatischer Radikalreaktionen wurde gezeigt, wie solche chemisch unwahrscheinlichen Umwandlungen möglich werden.

Der Cartoon zeigt eine antropomorphe Sicht Coenzym-B₁₂-abhängiger Reaktionen. Die potentielle Energie des Co-



faktors wird zur Bildung eines energiereichen Intermediats verwendet, das nach erfolgter Umlagerung ohne nennenswerten Energieverlust die geliehene Energie an das Coenzym zurückgibt. Eine der bedeutendsten Aufgaben des Proteins besteht dabei darin, das energiereiche Intermediat daran zu hindern, auf ein niedrigeres Energieniveau abzufallen. Die unkatalysierte Reaktion ist durch das Überklettern der Mauer dargestellt.

Ich danke meinen Mitarbeitern, deren Beiträge, die die Basis für die hier beschriebenen Ideen bilden, zitiert wurden. Dieser Aufsatz wurde während einer von der Swiss Technion Society finanzierten Gastprofessur am Technion – Israel Institute of Technology geschrieben. Ich danke den Kollegen in Haifa für ihre Gastfreundschaft und für anregende Diskussionen, insbesondere Professor A. Halevi. Die experimentelle Arbeit in meinem Laboratorium wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, den Fonds der Chemischen Industrie und das Land Baden-Württemberg unterstützt.

Eingegangen am 28. August 1989 [A 755]
Übersetzt von Dr. Jürgen Klepp, Karlsruhe

- [1] L. Pauling, *Chem. Eng. News* 24 (1946) 1375.
- [2] a) M. I. Page, A. Williams (Hrsg.): *Enzyme Mechanisms*, Royal Society of Chemistry, London 1987; b) M. I. Page in [2a], S. 9.
- [3] A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* 234 (1986) 1566–1570; S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *ibid.* 234 (1986) 1570–1573.
- [4] Übersicht: P. G. Schultz, *Angew. Chem.* 101 (1989) 1336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 1283.
- [5] W. P. Jencks, *Adv. Enzymol.* 43 (1975) 219–402.
- [6] R. J. Leatherbarrow, A. R. Fersht in [2a] S. 79–96.
- [7] R. Wolfenden, L. Frick in [2a] S. 97–122.
- [8] J. Kraut, *Science* 242 (1988) 533–540.
- [9] R. Bentley: *Molecular Asymmetry in Biology*, Vol. I, II, Academic Press, New York 1969.
- [10] W. L. Alworth: *Stereochemistry and its Application in Biochemistry*, Wiley-Interscience, New York 1972.
- [11] J. Rétey, J. A. Robinson: *Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [12] J. Rétey in C. Tamm (Hrsg.): *Stereochemistry (New Comprehensive Biochemistry, Vol. 3)*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam 1982, S. 249–282.
- [13] B. P. Hay, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4820–4829.
- [14] J. Halpern, S. H. Kim, T. W. Leung, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 8317–8319.
- [15] R. W. Kellenmeyer, H. G. Wood, *Biochemistry* 1 (1962) 1124–1131.

- [16] E. F. Phares, M. V. Long, S. F. Carson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8 (1962) 142–146.
- [17] R. H. Abeles, B. Zagalak, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 1245–1246.
- [18] P. A. Frey, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 2732–2733.
- [19] J. Rétey, D. Arigoni, *Experientia* 22 (1966) 783–784.
- [20] G. J. Cardinale, R. H. Abeles, *Biochim. Biophys. Acta* 132 (1967) 517–518.
- [21] B. M. Babior, T. H. Moss, D. C. Gould, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4389–4392.
- [22] M. R. Hollaway, H. A. White, K. N. Joblin, A. W. Johnson, M. F. Lappert, O. C. Wallis, *Eur. J. Biochem.* 82 (1978) 143–154.
- [23] B. M. Babior, T. H. Moss, W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 4537–4544.
- [24] O. C. Wallis, R. C. Bray, S. Gutteridge, M. R. Hollaway, *Eur. J. Biochem.* 125 (1982) 299–303.
- [25] S. A. Cockle, H. A. O. Hill, R. J. P. Williams, S. P. Davies, M. A. Foster, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 275–277.
- [26] T. H. Finlay, J. Valinsky, A. S. Mildvan, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 1285–1290.
- [27] K. L. Schepler, W. R. Dunham, R. H. Sands, J. A. Fee, R. H. Abeles, *Biochim. Biophys. Acta* 397 (1975) 510–518.
- [28] G. R. Buettner, R. F. Coffman, *Biochim. Biophys. Acta* 480 (1977) 495–505.
- [29] J. R. Boas, P. R. Hicks, J. R. Pilbrow, T. D. Smith, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 74 (1978) 417–431.
- [30] J. Rétey in D. Dolphin (Hrsg.): *Vitamin B₁₂*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York 1982 S. 357–379.
- [31] G. Brendelberger, J. Rétey, D. M. Ashworth, K. Reynolds, F. Willenbrock, J. A. Robinson, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1122–1124; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1089–1090.
- [32] H. A. Barker, F. Susuku, A. A. Iodice, V. Rooze, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 112 (1964) 644.
- [33] J. Rétey, A. Umani-Ronchi, D. Arigoni, *Experientia* 22 (1966) 72–73.
- [34] P. Diziol, H. Haas, J. Rétey, S. W. Graves, B. M. Babior, *Eur. J. Biochem.* 106 (1980) 211–224.
- [35] J. W. Cornforth, J. W. Redmond, H. Eggerer, W. Buckel, C. Gutschow, *Nature* 221 (1969) 1212.
- [36] J. Lüthy, J. Rétey, D. Arigoni, *Nature* 221 (1969) 1213.
- [37] H. Eggerer, W. Buckel, H. Lenz, P. Wunderwald, G. Gottschalk, J. W. Cornforth, C. Donninger, R. Mallaby, J. W. Redmond, *Nature* 226 (1970) 517–519.
- [38] J. Rétey, J. Lüthy, D. Arigoni, *Nature* 226 (1970) 519–521.
- [39] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popjak, *Proc. Roy. Soc. B.* 163 (1966) 492.
- [40] M. Sprecher, M. S. Clark, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 872–877.
- [41] J. Rétey, zitiert nach D. Arigoni, E. L. Eliel, *Top. Stereochem.* 4 (1969) 147–243.
- [42] J. Rétey, E. H. Smith, B. Zagalak, *Eur. J. Biochem.* 83 (1978) 437–451.
- [43] K. Wölfe, M. Michenfelder, A. König, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* 156 (1986) 545–554.
- [44] M. Michenfelder, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* 168 (1987) 659–667.
- [45] W. E. Hull, M. Michenfelder, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 191–201.
- [46] M. Kunz, W. E. Hull, J. Rétey, unveröffentlicht.
- [47] J. Rétey, unveröffentlicht.
- [48] J. Rétey, in B. Zagalak, W. Friedrich (Hrsg.): *Vitamin B₁₂*, de Gruyter, Berlin 1979, S. 439–460.
- [49] P. Dowd, M. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 3724–3725.
- [50] A. I. Scott, K. Kang, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 1997–1999.
- [51] S. Wollowitz, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 3112–3120.
- [52] W. M. Best, D. A. Widdowson, *Tetrahedron* 45 (1989) 5943–5954.
- [53] U. Aeberhard, R. Keese, E. Stamm, V. R. Vögeli, W. Lau, J. K. Kochi, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 2740–2759.
- [54] M. Tada, T. Nakamura, M. Matsumoto, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4647–4652.
- [55] J. Knappe, H. P. Blaschkowski, P. Gröbner, T. Schmitt, *Eur. J. Biochem.* 50 (1974) 253–263.
- [56] J. Knappe, F. A. Neugebauer, H. P. Blaschkowski, M. Gänzler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1332–1335.
- [57] W. Plaga, R. Frank, J. Knappe, *Eur. J. Biochem.* 178 (1988) 445–450.
- [58] E. J. Brush, K. A. Lipsett, J. W. Kozarich, *Biochemistry* 27 (1988) 2217–2222.
- [59] T. P. Chirpich, V. Zappia, R. N. Costilow, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1778–1789.
- [60] M. Moss, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 14859–14862.
- [61] J. Baraniak, M. L. Moss, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 1357–1360.
- [62] D. J. Aberhart, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1988, 343–350.
- [63] D. J. Aberhart, J. A. Dotting, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1988, 2119–2122.
- [64] P. Reichard, A. Ehrenberg, *Science* 221 (1983) 514–519.
- [65] A. Larsson, B.-M. Sjöberg, *EMBO J.* 5 (1986) 2037–2040.
- [66] G. W. Ashley, G. Harris, J. Stubbe, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 3958–3964.
- [67] J. Stubbe, *Biochemistry* 27 (1988) 3893–3899.