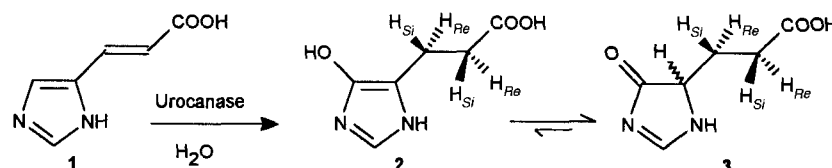


Die Selektivität der Ionendurchlässigkeit durch Membrankanäle wird in erster Linie durch die engste Stelle der Kanalpore, den Selektivitätsfilter, bestimmt. Das Verhältnis von elektronischer Feldstärke am Filter und der Dehydratisierungsenergie der hindurchtretenden Ionen bestimmt das Ausmaß der Dehydratisierung^[4]. Insbesondere der für die Selektivität bei spannungskontrollierten K⁺-Ionenkanälen verantwortliche Mechanismus ist ausführlich diskutiert worden. Dabei wird im allgemeinen angenommen, daß der für K⁺-Ionen selektive Filter aus einem von vier Tyrosinresten gebildeten „aromatischen Käfig“ besteht. Dieser bewirkt ein schwaches elektrisches Feld, das die vollständige Dehydratisierung von K⁺-, nicht aber von Na⁺-Ionen ermöglicht. Folglich können die K⁺-Ionen den Filter passieren, nicht jedoch die Na⁺-Ionen. Die π -Elektronen der Arylreste tragen wahrscheinlich durch anziehende π -Kationen-Wechselwirkungen zu einer Verringerung der Potentialbarriere für den Durchtritt der K⁺-Ionen bei^[11]. Dieser Mechanismus kann auch die von uns beobachtete Selektivität von **1a**-Kanälen erklären. Die engste Stelle der ionenleitenden Pore in **1a** wird von den vier Resorcinringen mit einem schwachen elektrischen Feld) gebildet. Diese Öffnung wird als gerade groß genug angesehen nackte K⁺-Ionen ($r = 1.33 \text{ \AA}$) passieren zu lassen, nicht aber die etwas größeren Rb⁺-Ionen ($r = 1.47 \text{ \AA}$). Nach Moleküldynamiksimulationen ähnelt die Größe der Öffnung von **1a** etwa der Pore von *p*-tert-Butylcalix[4]arentetraamid, das den Durchtritt von K⁺-Ionen nicht aber von Cs⁺-Ionen ($r = 1.69 \text{ \AA}$) zuläßt^[12].

Erstmals gelang also ein selektiver Ionentransport durch eine Membran-Doppelschicht über einen Kanalmechanismus mit einem einfachen und stabilen synthetischen Molekül, dessen Dimer die essentiellen biologischen Eigenschaften eines Einzelionenkanals aufweist. Es ist das einfachste Modell eines Einzelionenkanals und dürfte unser Verständnis der Ursachen der Ionenselektivitäten von Ionenkanälen bereichern.

Eingegangen am 30. August,
veränderte Fassung am 1. Dezember 1994 [Z 7277]



Schema 1. Sterischer Verlauf der Urocanase-Reaktion. Die Protonen aus dem Lösungsmittel werden an die Re-Positionen der Seitenkette addiert.

- [9] a) M. T. Tosteson, D. S. Auld, D. C. Tosteson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 707; b) A. Grove, M. Mutter, J. E. Rivier, M. Montal, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5919, zit. Lit.; c) K. S. Åkerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 191; sowie für Peptidkanäle, die einen Typ von Leitfähigkeit zeigen: d) M. Montal, M. S. Montal, J. M. Tomich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 6929; e) A. Grove, J. M. Tomich, M. Montal, *ibid.* **1991**, *88*, 6418; f) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301.
- [10] W. Veatch, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* **1977**, *113*, 89.
- [11] a) L. Heginbotham, R. MacKinnon, *Neuron* **1992**, *8*, 483; b) S. R. Durell, H. R. Guy, *Biophys. J.* **1992**, *62*, 238; c) S. Bogusz, A. Boxer, D. D. Busath, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 285; d) R. A. Kumpf, D. A. Dougherty, *Science* **1993**, *261*, 1708.
- [12] P. Guilbaud, A. Varnek, G. Wipff, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8298.

Zum Mechanismus der Urocanase-Reaktion: ¹³C-NMR-spektroskopische Beobachtung des enzymgebundenen NAD⁺-Inhibitor-Adduktes**

Carsten Schubert, Herbert Röttele, Manfred Spraul
und János Rétey*

In den meisten Zellen katalysiert Urocanase (E.C. 4.2.1.49) den zweiten Schritt im Histidinabbau (Schema 1). Sie enthält ein fest gebundenes NAD⁺, das für die katalytische Aktivität essentiell ist^[1, 2]. Es wird angenommen, daß NAD⁺ als elektrophiler Kata-

lysatoren wirkt und intermediär ein kovalentes Addukt mit dem Imidazolring des Substrates, Urocaninsäure **1**, bildet^[3]. Nach einem von uns postulierten Mechanismus^[3–5] erfolgt die ungewöhnliche Wasseranlagerung zu 5'-Hydroxyimidazolpropionsäure **2** in einer chemisch plausiblen Weise. **2** steht seinerseits mit Imidazolpropionsäure **3** in einem spontanen Gleichgewicht^[6].

Kürzlich haben wir die Struktur eines NAD⁺-Inhibitor-Adduktes, das an der Urocanase entsteht und höchstwahrscheinlich dem intermediären NAD⁺-Substrat-Addukt analog ist, durch Bestimmung der direkten ¹³C-¹³C-Kopplungskonstanten bewiesen^[5]. Wegen seiner Instabilität mußte das doppelt ¹³C-markierte Addukt im enzymgebundenen Zustand durch Oxidation stabilisiert und erst dann vom Enzym abgetrennt werden^[4, 7].

[*] Prof. Dr. J. Rétey, Dr. C. Schubert, Dr. H. Röttele
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee, D-76128 Karlsruhe
Telefax: Int. + 721/608-4823

Dr. M. Spraul
Bruker Analytische Meßtechnik GmbH
D-76287 Rheinstetten

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Frau J. Herman für zahlreiche Enzymisolationen.

Stichworte: Ionenkanal · Membranmodell · Resorcin

- [1] Siehe z.B.: M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. A. Raftery, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata, S. Numa, *Nature* **1984**, *312*, 121.
- [2] Über spannungskontrollierte K⁺-Ionenkanäle siehe: a) C. Miller, *Science* **1991**, *252*, 1092, zit. Lit.; b) G. A. Lopez, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Nature* **1994**, *367*, 179, zit. Lit.
- [3] a) I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4601; b) U. F. Kragten, M. F. M. Roks, R. J. M. Nolte, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 1275; c) J.-H. Fuhrhop, U. Kiman, V. Koesling, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6840; d) A. Nakano, Q. Xie, J. V. Mallen, L. Echegoyen, G. W. Gokel, *ibid.* **1990**, *112*, 1287; e) F. M. Menger, D. S. Davis, R. A. Persichetti, J.-J. Lee, *ibid.* **1990**, *112*, 2451; f) M. J. Pregel, L. Jullien, J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1695; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1637; g) T. M. Fyles, T. D. James, K. C. Kaye, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12315; h) E. Stadler, P. Dedek, K. Yamashita, S. L. Regen, *ibid.* **1994**, *116*, 6677.
- [4] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2. Aufl., Sinauer, Sunderland, MA, **1992**.
- [5] Y. Kobuke, K. Ueda, M. Sokabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7618.
- [6] **1a**: Ausbeute 50%; Schmp. > 300 °C; ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 7.22, 6.12 (jeweils s, jeweils 4H; Aryl-H), 4.30 (t, 4H; CHR), 2.15, 1.26 (128H; CH₂), 0.88 (t, 12H; CH₃), 7.5–10.5 (br, 8H; Aryl-OH), 3.8 (br, 2H; H₂O); MS (FAB): m/z 1441 ($M^+ + H$), korrekte C₁₂H₁₈O-Analyse.
- [7] a) Y. Aoyama, Y. Tanaka, S. Sugahara, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5397; b) Y. Tanaka, Y. Aoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 3343.
- [8] Experimentell wurde wie früher beschrieben vorgegangen [5]. Die Durchlaßkinetik wird hier nicht diskutiert, jedoch liegen die Lebensdauern der offenen und geschlossenen Zustände im Bereich von Sekunden bis Millisekunden.

Um das native Addukt im enzymgebundenen Zustand direkt beobachten zu können, verwendeten wir die Differenz- ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Zur Verstärkung der relevanten ^{13}C -Signale wurden die 4-Position des prosthetischen NAD^+ und die 5'-Position des Inhibitors mit ^{13}C angereichert. Im ersten Experiment wurden Urocanase mit $(4\text{-}^{13}\text{C})\text{NAD}^+$ (99% ^{13}C) eingesetzt. Im 150 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt das enzymgebundene $(4\text{-}^{13}\text{C})\text{NAD}^+$ ein breites Signal bei $\delta = 146$ (Abb. 1).

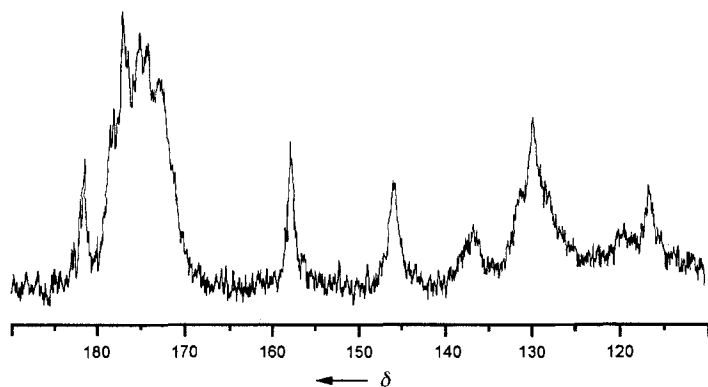


Abb. 1. Tieffeldausschnitt des 150 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrums der $(4\text{-}^{13}\text{C})\text{NAD}^+$ enthaltenden Urocanase. Das breite Signal bei $\delta = 146$ wird von dem C-4-Atom des Nicotinamid-Teils (99% ^{13}C) erzeugt. Ca. 120 mg (0.99 μmol) Urocanase in 2 mL 50 mM K_2HPO_4 -Puffer, pH 7.5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 8:1, 10 mm-Probenrohr, ^1H -breitbandentkoppelt, Linienverbreiterung: 10 Hz, $T = 300$ K, jeweils 30 000 Scans.

Nach Zugabe von Imidazolpropionsäure (zehnfacher molarer Überschuß, fünffacher Überschuß bezogen auf die aktiven Zentren) verschwindet das Signal bei $\delta = 146$ weitgehend, gleichzeitig entsteht ein neues, ähnlich breites Signal bei $\delta = 37.7$. Dies deutet darauf hin, daß die aktiven Zentren praktisch vollständig mit

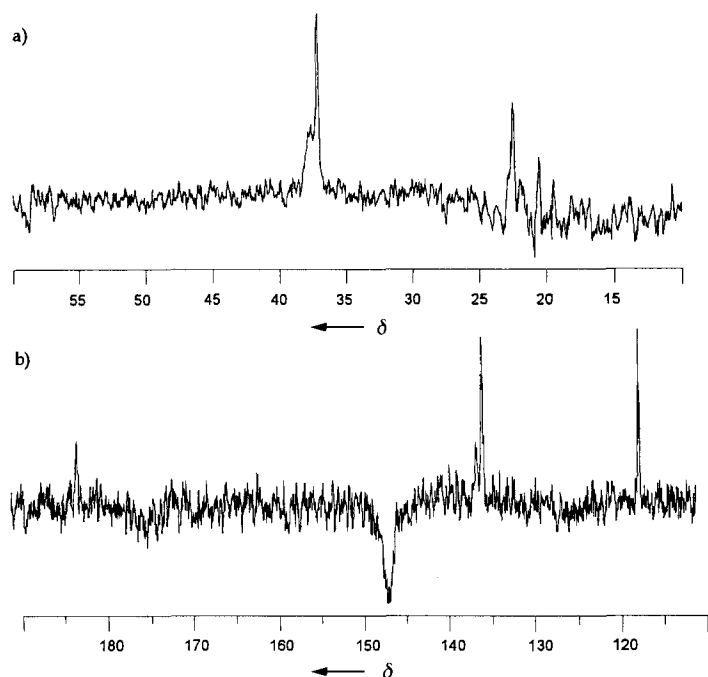
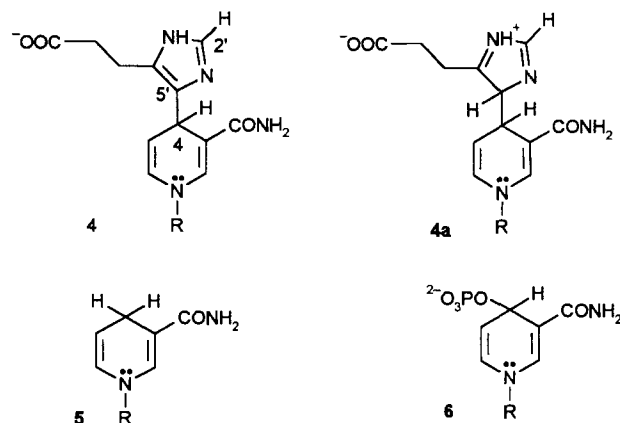


Abb. 2. ^{13}C -NMR-Differenzspektrum der $(4\text{-}^{13}\text{C})\text{NAD}^+$ enthaltenden Urocanase nach – vor Zugabe von 9.9 μmol Imidazolpropionsäure. a) Hochfeldausschnitt, b) Tieffeldausschnitt. Das breite Signal bei $\delta = 37.7$ entspricht dem enzymgebundenen $(4\text{-}^{13}\text{C})\text{NAD}^+$ -Imidazolpropionat-Addukt.

dem Inhibitor besetzt wurden. Am deutlichsten ist es im Differenzspektrum (Abb. 2) zu beobachten. Neben den scharfen ^{13}C -Signalen der überschüssigen, ungebundenen Imidazolpropionsäure erscheint bei $\delta = 37.7$ das Signal vom ^{13}C -4-Atom des enzymgebundenen $(4\text{-}^{13}\text{C})\text{NAD}$ -Imidazolpropionat-Adduktes (**4** oder **4a**; Schema 2). Zum Vergleich: Das C-4-Atom von NADH ergibt ein Signal bei $\delta = 21.9$, während es beim C-4-phosphorylierten Dihydropyridinderivat **6** bei $\delta = 78.7$ erscheint^[8].



Schema 2. Mögliche Strukturen des enzymgebundenen NAD^+ -Imidazolpropionat-Adduktes **4** und **4a** sowie die Struktur von NADH **5** und des NAD^+ -4-Phosphat-Adduktes **6**. R = Adenosindiphosphat-ribosyl.

In einem zweiten Experiment, in dem nicht NAD^+ , sondern der Inhibitor, Imidazolpropionsäure, in 5'-Stellung ^{13}C -markiert wurde, konnte die Beobachtbarkeit des enzymgebundenen Adduktes bestätigt und die chemische Verschiebung des C-5'-Atoms ermittelt werden. Im Differenzspektrum (Abb. 3) sieht

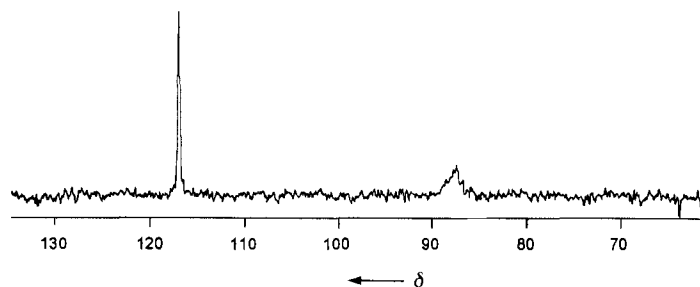


Abb. 3. 100 MHz- ^{13}C -NMR-Differenzspektrum der unmarkierten Urocanase nach – vor Zugabe von 2 μmol $(5\text{-}^{13}\text{C})$ Imidazolpropionsäure. Das breite Signal bei $\delta = 87.5$ entspricht dem $\text{NAD}^+(5\text{-}^{13}\text{C})$ Imidazolpropionat-Addukt, das scharfe Signal bei $\delta = 117$ der freien $(5\text{-}^{13}\text{C})$ Imidazolpropionsäure. Ca. 150 mg (1.22 μmol) Urocanase in 2 mL 50 mM K_2HPO_4 -Puffer, pH 7.5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 8:1, 10 mm-Probenrohr, ^1H -breitbandentkoppelt, NOE nicht unterdrückt, Linienverbreiterung: 10 Hz, $T = 297$ K, jeweils 52 000 Scans.

man im Bereich zwischen $\delta = 80$ und $\delta = 120$ nur zwei ^{13}C -Signale, bei $\delta = 117$ für die freie und bei $\delta = 87.5$ für die gebundene $(5\text{-}^{13}\text{C})$ Imidazolpropionsäure. Die starke Hochfeldverschiebung des C-5'-Signals spricht dafür, daß im enzymgebundenen Addukt die Aromatizität des Imidazolringes aufgehoben wird, d. h. das Addukt hat nicht Struktur **4**, sondern **4a**. Die Favourisierung von **4a** gegenüber **4** an der Aktivstelle kann durch eine ionische Wechselwirkung zwischen einer negativ geladenen Gruppe des Enzyms und dem positivierten Stickstoffatom des Imidazolringes erklärt werden. Der schon früher beobachtete

enzymkatalysierte Austausch des H-5'-Atoms der Imidazolpropionsäure mit Lösungsmittelprotonen beweist, daß **4a** mit **4** in einem schnellen Gleichgewicht steht^[6, 9, 10].

Eingegangen am 4. November 1994 [Z 7452]

Stichworte: Enzymmechanismen · ¹³C-NMR-Spektroskopie · Urocanase

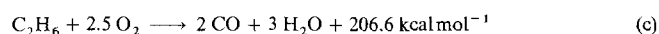
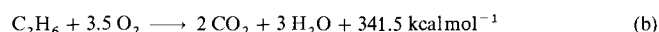
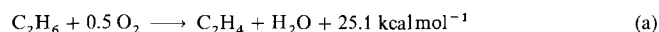
- [1] R. M. Egan, A. T. Phillips, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5701–5707.
 [2] V. Keul, F. Kaeppli, C. Ghosh, T. Krebs, J. A. Robinson, J. Rétey, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 843–851.
 [3] J. Rétey, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *314*, 1–16.
 [4] J. Klepp, A. Fallert-Müller, K. Grimm, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 669–676.
 [5] C. Schubert, Y. Zhao, J.-H. Shin, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1331–1332; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1279–1280.
 [6] E. Gerlinger, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *117*, 629–634.
 [7] L. H. Matherly, C. W. De Brosse, A. T. Phillips, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2789–2794.
 [8] J.-F. Biellmann, C. Lapinte, E. Haid, G. Weimann, *Biochemistry* **1979**, *18*, 1212–1217.
 [9] R. M. Egan, L. H. Matherly, A. T. Phillips, *Biochemistry* **1981**, *20*, 132–137.
 [10] S. Sawada, K. Endo, M. Ushida, N. Esaki, K. Soda, *Bull. Kyoto Univ. Education Ser. B* **1981**, *51*, 11–17.

Kopplung des endothermen thermischen Crackens mit der exothermen oxidativen Dehydrierung von Ethan zu Ethylen unter Verwendung eines verdünnten SrO/La₂O₃-Katalysators

Vasant R. Choudhary*, Balu S. Uphade und Shafeek A. R. Mulla

Derzeit wird Ethylen durch thermisches Cracken von Ethan, Ethan/Propan-Gemischen oder Naphtha^[1] hergestellt. Dieser Prozeß ist endotherm und somit energieintensiv, außerdem entstehen dabei größere Mengen an Koks. Neuere Anstrengungen gelten der katalytischen oxidativen Dehydrierung von Ethan zu Ethylen^[2–8]. Obwohl die oxidative Dehydrierung [Gl. (a)] nur mäßig exotherm ist, kann sie sehr gefährlich und schwer kontrollierbar werden, da die Verbrennung von Ethan [Gl. (b) und (c)] stark exotherm verläuft. Deshalb hat bereits eine kleine Umsatzsteigerung der Reaktionen von Ethan zu CO und CO₂ einen starken Anstieg der freiwerdenden Reaktionswärme zur Folge. Darüber hinaus bewirkt ein hoher Ethanumsatz bei hoher Raumgeschwindigkeit die Freisetzung einer großen Wärmemenge innerhalb eines eng begrenzten Katalysatorbereichs. Diese Probleme führen dazu, daß es sehr schwierig ist, die Wärme aus dem Reaktor abzuführen, und der Prozeß kann wegen der Bildung heißer Zonen im Reaktor außer Kontrolle geraten. Es wäre von großer Bedeutung, die Umwandlung von Ethan zu Ethylen energieeffizient (ohne externe Energiezufuhr) und sicher durchführen zu können. In dieser Mitteilung zeigen wir, daß man das thermische Cracken von Ethan mit seiner oxidativen Dehydrierung verknüpfen kann. Dazu werden die beiden Reaktionen gleichzeitig in Gegenwart von Wasserdampf und begrenzter O₂-Zufuhr durchgeführt und ein Trägerkatalysator mit hoher thermischer und hydrothormaler Stabilität, SrO/La₂O₃/SA 5205, benutzt, der durch einen inerten Feststoff ver-

dünnt ist. Auf diese Weise läßt sich Ethan energieeffizient und sicher mit hohem Umsatz und hoher Selektivität zu Ethylen umwandeln, ohne daß es zur Koksbildung kommt. Unsere Ergebnisse demonstrieren, daß dieser Prozeß durch Variation der Reaktionsbedingungen, insbesondere der Temperatur und des C₂H₆/O₂-Verhältnisses im Zustrom schwach exotherm, thermisch neutral oder schwach endotherm gehalten werden kann und wenig oder gar keine äußere Energiezufuhr benötigt.



In den Abbildungen 1 und 2 sind unsere Resultate zusammengefaßt. Man erkennt den Einfluß sowohl der Reaktionstemperatur als auch des C₂H₆/O₂-Molverhältnisses im Zustrom auf

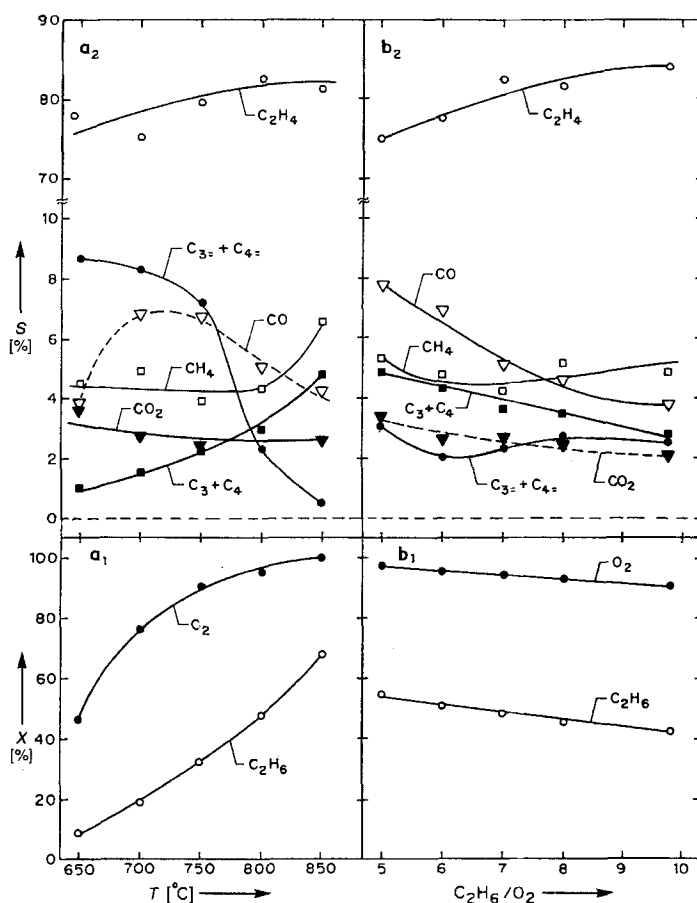


Abb. 1. Einfluß a) der Reaktionstemperatur und b) des C₂H₆/O₂-Molverhältnisses im Zustrom auf Umsatz und Selektivität des gekoppelten Prozesses (T = Reaktionstemperatur, x = Umsatz, S = Produktselektivität). a) C₂H₆/O₂-Molverhältnis im Zustrom = 7.0, T = 800 °C; C₂H₆/Wasserdampf-Molverhältnis = 1.0; Raumgeschwindigkeit = 35 100 cm³ pro g (verdünnter Katalysator) pro h; Verhältnis Träger/Katalysator (Gew./Gew.) = 2.0

Umsatz, Selektivität, Umsatzverhältnis von Ethancracken zu Ethanoxidation, Netto-Reaktionswärme (ΔH_r) sowie Energiezufuhr zum Reaktorofen. Bei diesen Reaktionen findet ein Trägerkatalysator der Zusammensetzung SrO (17.3 Gew.-%)/La₂O₃ (17.9 Gew.-%)/SA 5205 Verwendung, der gleichmäßig mit weiterem Trägermaterial SA 5205 verdünnt wird. Dieser Träger ist inert, porös (Porosität: 50 %), hat eine geringe Ober-

[*] Dr. V. R. Choudhary, B. S. Uphade, S. A. R. Mulla
 Chemical Engineering Division, National Chemical Laboratory
 Pune 411 008 (Indien)
 Telefax: Int. + 212/330233