

DISPUTANDUM

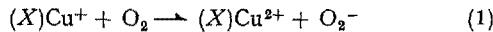
Zum Reaktionsmechanismus von Oxydasen

Umsetzungen mit molekularem Sauerstoff sind in der Natur meist durch Metallenzyme katalysiert. Dass das an eine prosthetische Gruppe oder direkt an einen Proteinteil gebundene Metall im Oxydationsmechanismus eine wesentliche Funktion hat, ist durch ein grosses Beweismaterial belegt¹. Verschiedene Eisen oder Kupfer als essentielle Strukturelemente enthaltende Sauerstoff-Transferasen oxydieren aromatische *o*-Dihydroxyverbindungen unter Ringspaltung und Einbau beider Sauerstoffatome des O₂-Moleküls in das Substrat. Als primäre Reaktionsstufe wird hierbei die Bildung eines Perferryl-Komplexions (Z)Fe²⁺ · O₂²⁻ oder eines binuklearen Komplexes (Z)Fe²⁺ · O₂ · Fe²⁺(Z) angesehen². Von den kupferhaltigen Enzymen sei hier erwähnt: Monophenoloxydase, eine Hydroxylase, die nur ein Sauerstoffatom des O₂-Moleküls in das Substrat einbaut und z. B. 3,4-Dimethylphenol zu 4,5-Dimethylbrenzcatechin oxydiert³. Gestützt auf die Resultate kinetischer Untersuchungen wird in diesem Fall als reaktive Zwischenstufe ein Percupryl-Komplexion (Z)Cu⁺ · O₂ bzw. dessen binukleares Analogon (Z)Cu⁺ · O₂ · Cu⁺(Z) postuliert⁵. Ähnliche Strukturen liegen vermutlich im O₂-übertragenden Hämocyanin vor, das in Mollusken und Arthropoden gefunden wird⁶.

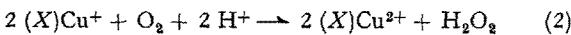
Während aber im Falle der Eisenenzyme die Existenz von O₂-Addukten an einfachen Modellen bewiesen worden ist⁷, muss die Vorstellung über die Bildung von (Z)Cu⁺ · O₂ bzw. (Z)Cu⁺ · O₂ · Cu⁺(Z) als primärer Reaktionsschritt im Enzymmechanismus als recht zweifelhaft angesehen werden, solange es nicht gelungen ist, solche Verbindungen im einfachen Modell mit überblickbarer Struktur nachzubilden. In der vorliegenden Mitteilung wird über den Nachweis einer solchen Partikel in wässriger Lösung berichtet.

Wie immer die exakte Reaktionsfolge im Mechanismus einer Kupferenzym-katalysierten Oxydation aussehen mag, in irgendeiner Phase muss vermutlich das O₂-Molekül in direkten Kontakt mit der reduzierten Stufe (Z)Cu⁺ treten und diese mehr oder weniger rasch zu (Z)Cu²⁺ aufoxydieren⁸. Aus dieser Überlegung heraus haben wir es unternommen, die Reaktivität verschiedener Komplexe (X)Cu⁺ gegenüber O₂ systematisch zu untersuchen⁹.

Die Oxydation zu (X)Cu²⁺ kann z. B. nach (1) erfolgen, wobei vermutlich nach Protonierung das Radikal HO₂ eine weitere Partikel (X)Cu⁺ oxydiert und so sukzessive



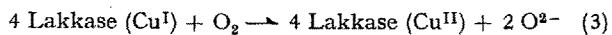
in 1-Elektronenschritten zu H₂O₂, OH und schliesslich zu H₂O reduziert wird. Der erste Reaktionsschritt kann aber unter Auslassung der energetisch ungünstigen Radikalstufe HO₂ auch in einer 2-Elektronenoxydation (2) bestehen¹⁰. Unter Annahme des Mechanismus (1) ermittelten



wir in Lösungen, in denen hauptsächlich Cu(NH₃)₂⁺ vorliegt¹¹, für die Geschwindigkeitskonstante der bimolekularen Umsetzung die Grössenordnung 10⁸–10⁴ Mol⁻¹L⁻¹ Min⁻¹. Die direkt spektrophotometrisch zu messende Geschwindigkeit $d[(X)Cu^{2+}]/dt$ ist unabhängig von der [Cu²⁺]. Es folgt daraus, dass die Rückreaktion von (1) offenbar vernachlässigbar klein ist gegenüber den Geschwindigkeiten der Folgereaktionen von O₂²⁻ bzw. HO₂.

Der Zusatz mehrzähniger Komplexbildner wie Diäthylentriamin und Triäthylentetramin hat eine Beschleunigung des Elektronenabtausches (1) um ca. einen

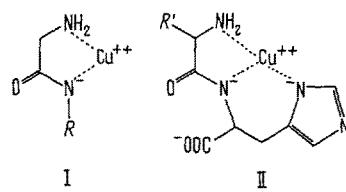
Faktor 10 zur Folge. In der gleichen Grössenordnung liegt die Geschwindigkeit der Umsetzung von Kupfer(I)-äthylendiamintetraacetat mit O₂. Es ist interessant, die in diesen Modellversuchen ermittelte Geschwindigkeit der Autoxydation von Cu^I-Komplexen mit der Geschwindigkeit einer entsprechenden Enzymreaktion zu vergleichen. NAKAMURA gibt für Reaktion (3) den Wert von $2,8 \cdot 10^6$ Mol⁻¹L⁻¹ Sek⁻¹ an¹². Dass spezielle Bindungseffekte die



Autoxydation (1) so stark zu beschleunigen vermögen, halten wir auf Grund unserer Modellversuche für unwahrscheinlich. Es muss daher für die Enzymreaktion ein total anderer Mechanismus angenommen werden. Theoretisch denkbar und energetisch günstig wäre eine Reaktion, in der in einem 4-Elektronenschritt gleichzeitig 4 durch den Proteinteil räumlich günstig fixierte (Z)Cu⁺-Gruppen oxydiert werden.

Mit einigen Liganden X fanden wir einen völlig unerwarteten, aber im Hinblick auf den Chemismus von Sauerstoff-Transferasen interessanten Reaktionsverlauf:

(a) Amide vom Typus H₂N-CH₂-CO-NHR verlangsamten den Elektronenabtausch (1) erheblich. Sie bilden mit Cu²⁺ Chelate von der Struktur I, in denen aus der Amidgruppe ein H⁺ freigesetzt wird. Der retardierende Effekt muss der Ligandengruppe -N(R)⁻ zugeschrieben werden.



(b) In Gegenwart von Histidylhistidin als Komplexbildner X findet überhaupt keine Autoxydation zum entsprechenden Cu^{II}-Komplex statt, sondern der Komplexbildner wird unter Aufspaltung des Imidazolrings oxydiert. Das O₂-Molekül wird somit nicht durch Elektronentransferreaktionen zu H₂O reduziert, sondern vermutlich unter Einbau von Sauerstoffatomen zur Oxydation des Liganden verwendet. Histidylhistidin bildet mit Cu²⁺

¹ Vgl. z. B. H. S. MASON, Adv. Enzymol. 19, 79 (1957).

² (Z) bedeutet hier die metallbindende Ligandengruppe des Proteins.

³ Vgl. L. L. INGRAHAM, Biochemical Mechanisms (New York 1962), p. 68.

⁴ H. S. MASON, W. L. FOWLKS und E. PETERSON, J. Amer. chem. Soc. 77, 2914 (1955).

⁵ L. L. INGRAHAM, J. Amer. chem. Soc. 79, 666 (1957). – L. MELANDER, Acta chem. scand. 3, 95 (1949).

⁶ J. B. CONANT, J. biol. Chem. 101, 463 (1933). – I. M. KLOTZ, Science 121, 477 (1955).

⁷ Vgl. L. H. VOCHT, H. M. FAIGENBAUM und S. E. WIBERLEY, Chem. Rev. 63, 269 (1963). – Diss. VONDERSCHMITT, Basel (1964).

⁸ S. FALLAB, Z. naturwiss.-med. Grundlagenforschung, im Druck.

⁹ (X) bedeutet hier irgendeinen niedermolekularen Komplexliganden mit bekannter Struktur.

¹⁰ Ein solcher Mechanismus ist bei der Autoxydation von Coll-Chelaten beobachtet worden.

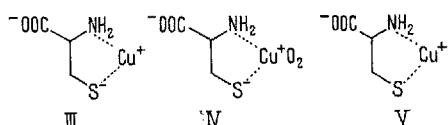
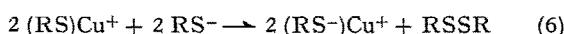
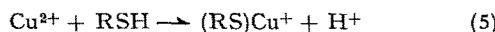
¹¹ J. BJERRUM, Kgl. danske Videnskab Selskab, mat.-fys. Medd. 12, No. 15 (1934). – M. VON STACKELBERG und H. VON FREYHOLD, Z. Elektrochemie 46, 120 (1940).

¹² T. NAKAMURA, Biochim. biophys. Acta 42, 499 (1960).

¹³ R. B. MARTIN und J. T. EDSALL, J. Amer. chem. Soc. 82, 1107 (1960).

Chelate von der Struktur II¹³, in der wiederum Ligandengruppen $-N(R)^-$ vorliegen, die für den völlig andersartigen Reaktionsverlauf verantwortlich sein dürften.

(c) Cystein (RS^-) wird durch Cu^{2+} über eine Radikalzwischenstufe zu Cystin oxydiert. Bei der Reaktion äquivalenter Mengen entsteht eine violettbraune Partikel, der wir die Struktur eines Radikalkomplexes V zuschreiben (5). Im Überschuss an Cystein findet eine Verdrängung des Radikalliganden RS^- durch die stärkere Base RS^- statt, wobei unter Dimerisierung des Radikals RS^- Cystin gebildet wird (6). Die Stabilität des farblosen Cu^I -Komplexes III ist von KOLTHOFF zu ca. 10^{19} bestimmt worden¹⁴.



Wird eine farblose Lösung von III mit Luft gespült, so entsteht nach kurzer Zeit ein gelbbraunes Addukt IV¹⁵. Die Bildungsreaktion (7) muss reversibel sein, denn Einleiten von N_2 oder Zugabe von CN^- bewirkt partielle Entfärbung der Lösung, somit Verschiebung des Gleichgewichts (7) nach links. Addukt IV ist aber sehr unbeständig und wird nach wenigen Minuten in irreversibler Weise



zum violettbraunen Radikalkomplex V oxydiert. Aber auch V ist unstabil. Beim längeren Einwirken von O_2

findet unter Entfärbung Oxydation zur Cu^{II} -Stufe statt, und unter Dimerisierung von RS entsteht schliesslich Cystin.

In der Reaktionsfolge III \rightarrow IV \rightarrow V ist bemerkenswert, dass spezifische Bindungseffekte in III, durch die Ligandengruppe RS^- hervorgerufen, das Metallion Cu^+ zur reversiblen Addition von O_2 befähigen. Die Vermutung, wonach im Hämocyanin das Metall über eine SH-Gruppe an das Protein gebunden ist¹⁶, wird somit durch die vorliegenden Resultate bestätigt¹⁷.

Summary. The reactivity of copper(I)-complexes towards molecular oxygen in relation to some copper containing enzymes has been studied. The oxydation of simple amine-complexes proceeds at a rate of about 10^3 - 10^4 Mol⁻¹L⁻¹ Min⁻¹. Replacing the amine by amides and peptides has a strong retarding effect. A copper(I)-cysteine complex exhibits the interesting property of adding O_2 reversibly.

L. GRAF und S. FALLAB

Institut für anorganische Chemie, Universität Basel (Schweiz), 26. September 1963.

¹⁴ I. M. KOLTHOFF und W. STRICKS, J. Amer. chem. Soc. 73, 1723 (1951).

¹⁵ Möglicherweise binuklear: $(RS^-)Cu^+ \cdot O_2 \cdot Cu^+(RS^-)$.

¹⁶ L. C. G. THOMSON, M. HINES und H. S. MASON, Arch. Biochem. Biophys. 83, 88 (1959).

¹⁷ Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für einen Forschungskredit.

PRO EXPERIMENTIS

The Direct Conversion of Wood Charcoal to Lithium Carbide in the Production of Acetylene for Radiocarbon Dating

Most laboratories engaged in radiocarbon dating use gas proportional counters filled with pure carbon dioxide, acetylene, or methane. The advantage of acetylene lies in the fact that it contains two carbon atoms per gas molecule and thus introduces twice as much radiocarbon into the counter for a given filling pressure. In addition, acetylene has good counting characteristics and is less sensitive to impurities than carbon dioxide. Moreover, the preparation procedure can be arranged so as automatically to eliminate any radon present in the sample. The disadvantage of acetylene arises from the fact that the sample preparation takes somewhat longer than it does in the case of, for instance, carbon dioxide.

Two completely different methods have so far been used for preparing acetylene for radiocarbon dating. The one method, of BARKER¹, involves the combustion of the sample to carbon dioxide, the reaction of the carbon dioxide with lithium, the conversion of the lithium carbide to acetylene by addition of water, and the purification of the sample by passing it in turn over potassium hydroxide solution and phosphoric acid.

The other method, of SUÈSS², involves the combustion of the sample to carbon dioxide, the conversion of the car-

bon dioxide to strontium carbonate, the reduction of the strontium carbonate to strontium carbide with excess magnesium, the conversion of the strontium carbide to acetylene, and the purification of the sample by passing it over cooled charcoal.

It is obvious that any method of shortening the sample preparation would make acetylene a much more attractive proposition as a counting gas for radiocarbon dating. With this end in view we have successfully developed a new method of preparing acetylene from wood charcoal.

Laboratories engaged largely on archaeological work, such as our own, deal predominantly with charcoal samples and there appears to be no reason why such samples should not be reacted directly with lithium to form lithium carbide, thus avoiding the necessity for the initial combustion.

It has long been known that graphite will react directly with lithium, to form lithium carbide, at red heat³. We have accordingly reacted samples of dry wood charcoal, as supplied to us by archaeologists and pretreated in the usual manner, containing 6 g of carbon with excess lithium ($14\frac{1}{2}$ g) by heating under vacuum at about $800^\circ C$ in a steel furnace. Some gas is evolved during the reaction

¹ H. BARKER, Nature 172, 631 (1953).

² H. E. SUÈSS, Science 120, 5 (1954).

³ J. W. MELLOR, *A Comprehensive Treatise of Inorganic Chemistry and Theoretical Chemistry* (1956), vol. V, p. 847.