

beiten bei weitem nicht erschöpft sein. Prinzipiell sollten sie bei jeder durch irgend ein Ion katalysierten Reaktion verwendet werden können. Die Synthese neuer Austauschertypen, die Phosphon- und Arsonsäuren, tert. Sulfonium-Gruppen, optisch aktive Zentren, oder auch Fermente als „Festionen“ enthalten, wird neue, bisher kaum erforschte Möglichkeiten erschließen.

Diese kurze Übersicht über das in stürmischer Entwicklung begriffene Gebiet möge vor allem dazu dienen, dem präparativ Arbeitenden beim Auffinden der Original-Literatur dienlich zu sein und ihm Hinweise zu geben, wie Katalyse durch Ionenaustauscher vielleicht bei der Lösung seiner Aufgaben helfen kann.

Eingeg. am 20. Februar 1954 [A 553]

## Chemie und Biologie der Kohlensäureanhydratase

Von Dr. H. GIBIAN

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.-G., Berlin

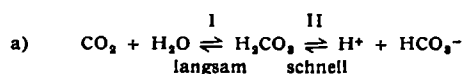
Es wird ein Überblick über die wichtigsten chemischen, biochemischen und physiologischen Daten der Kohlensäureanhydratase (carbonic anhydrase) gegeben. Ohne selbst direkt an hydrolytischen oder oxydoreduktiven Stoffwechselvorgängen beteiligt zu sein, gibt dieses Zink-haltige Ferment doch an der Grenze des anorganischen und organischen Stoffbereichs entscheidende Hilfestellung für den normalen Ablauf physiologischer Vorgänge. Die „Kohlensäureanhydratase“<sup>1)</sup> könnte als Ferment der Reaktion  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$  auch Kohlendioxydhydratase heißen; der angelsächsische Ausdruck carbonic anhydrase erscheint wegen der sprachlichen Ähnlichkeit mit den Wasserstoff abspaltenden Dehydrasen unglücklich gewählt. Wegen der älteren Literatur sei auf frühere Zusammenfassungen verwiesen<sup>1)</sup>.

Allgemeine (physikalische) Eigenschaften des Substrates  
Vorkommen und Bedeutung des Fermentes  
Warm- und kaltblütige Wirbeltiere  
Niedere Tiere  
Pflanzen  
Darstellung  
Aus tierischem Material  
Aus pflanzlichem Material

Auswertung  
Einheit der Fermentwirksamkeit  
Eigenschaften  
Tierisches Ferment  
Pflanzliches Ferment  
Inhibitoren und Aktivatoren  
Anwendungen  
Zur geschichtlichen Entwicklung

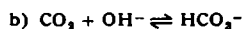
### Allgemeine (physikalische) Eigenschaften des Substrates

Ein Volumen Wasser löst bei 0 °C und 760 mm 2 Volumen  $\text{CO}_2$ . Davon ist größenordnungsmäßig nur  $\frac{1}{1000}$  zu Kohlensäure hydratisiert, der Rest physikalisch gelöst:



Das Gleichgewicht I liegt weit auf der linken Seite; trotz schneller und weitgehender elektrolytischer Dissoziation nach II ist die Kohlensäure daher scheinbar eine schwache Säure („scheinbares“  $\text{pK}_1 = 6,58$ , wahres  $\text{pK}_1 = 3,59$  bei 0 °C). Experimentell läßt sich leicht zeigen, daß I im Gegensatz zu II eine Zeitreaktion ist.

$\text{pH}$ -Erhöhung  $\gg 7$ , besonders  $> 11$ , verschiebt das Gleichgewicht naturgemäß nach rechts. Ob die dabei auftretende Beschleunigung der Reaktion a) auf einer katalytischen Wirkung der  $\text{OH}^-$ -Ionen beruht, oder ob noch eine 2. Reaktion



in Betracht zu ziehen ist, kann bisher nicht entschieden werden<sup>3)</sup>.

Abgesehen davon katalysieren verschiedene Anionen die Reaktion a) erheblich, z. B.  $\text{HPO}_4^{3-}$ ,  $\text{H}_2\text{BO}_3^-$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{TeO}_3^{2-}$ ,  $\text{AsO}_3^{3-}$  bzw.  $\text{AsO}_3^{2-}$ ,  $\text{OBr}^-$ ,  $\text{OCl}^-$ , ferner  $\text{Cl}_2$  und  $\text{Br}_2$ , dann cyclische N-Basen wie Imidazol, Dimethylimidazol und Nicotin. Bei reaktionskinetischen Messungen in Pufferlösungen müssen diese

Einflüsse durch geeignete Korrekturfaktoren oder Extrapolation auf die Konzentration Null eliminiert werden<sup>4)</sup>.

Der katalytische Effekt der Kohlensäureanhydratase übersteigt diese Wirkungen, auf gleiches Gewicht umgerechnet, um das mehr als 1000fache. Reaktion b) wird dabei wiederum nicht beeinflusst. Ebenso wenig wird durch die Reaktion von  $\text{CO}_2$  mit aliphatischen N-Basen katalysiert (Reaktion c); diese führt zu Carbamaten und verläuft schon an sich schnell:



### Vorkommen und Bedeutung des Fermentes

Warm- und kaltblütige Wirbeltiere

Allgemeines

Im Tierreich ist  $\text{CO}_2$  Endprodukt des C-Stoffwechsels, also der inneren oder Zellatmung. Ein genügend schneller Austritt des  $\text{CO}_2$  vom Ort seiner Bildung durch die Membran der Zellen ins Blut ist nur in molekularer Form möglich, nicht etwa als Ion  $\text{HCO}_3^-$ . Da Kohlensäureanhydratase durchaus nicht ubiquitär in allen Zellen vorkommt, darf vermutet werden, daß  $\text{CO}_2$  tatsächlich molekular und nicht ionisiert gebildet wird.

Blutkörperchen

Stark vereinfacht kann der Transport des  $\text{CO}_2$  vom Bildungsort zum Ausscheidungsort entsprechend Bild 1 (s. S. 250) schematisiert werden.

Die Verweilzeit des Blutes in den Kapillaren ist durchschnittlich kleiner als eine Sekunde. Der  $\text{CO}_2$ -Austausch muß also sehr rasch verlaufen und ohne daß eine wesentliche  $\text{pH}$ -Änderung im Blut eintreten darf<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> F. J. W. Roughton in Bamann-Myrbäck: Methoden d. Fermentforsch. 3, 2552–63, Leipzig 1941. H. W. Davenport, Physiol. Rev. 26, 560–73 [1946]. B. L. Vallee u. M. D. Atschule, Physiol. Rev. 29, 370–88 [1949]; vgl. Blood 4, 398 [1949]. H. van Goor, Enzymologia 13, 73–164 [1948]. F. J. W. Roughton u. A. M. Clark, in Sumner-Myrbäck: Enzymes 1, 1250–65, New York 1951.

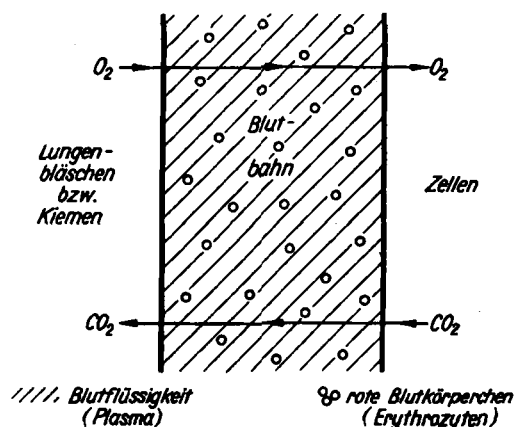
<sup>2)</sup> M. Leiner u. G. Leiner, Biolog. Zbl. 60, 449 [1940].

<sup>3)</sup> M. Kiese, Biochem. Z. 307, 207–14 [1940/41].

<sup>4)</sup> F. J. W. Roughton u. V. H. Booth, Biochem. J. 32, 2049 [1938].

<sup>5)</sup> F. J. W. Roughton, Harvey Lectures 39, 96–142 [1943].

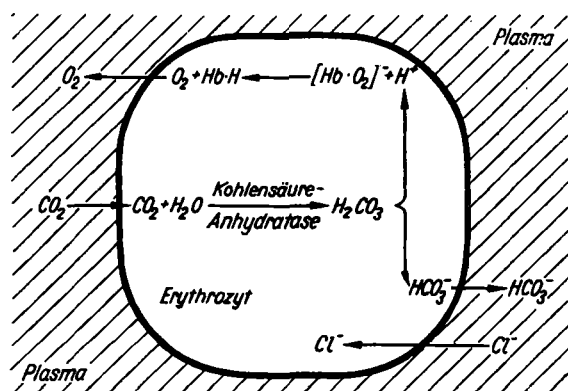
Nur ein geringer Teil des  $\text{CO}_2$  kann primär vom Blutplasma aufgenommen werden. Die Hauptmenge des von



[A 556.1]

Bild 1. Weg des  $\text{CO}_2$  im Tierkörper

den Zellen gelieferten und zu transportierenden  $\text{CO}_2$  muß über die in den roten Blutkörperchen steckende Pufferreserve des Hämoglobins aufgefangen werden (Bild 2).



[A 556.2]

Bild 2

Austausch von  $\text{O}_2$  gegen  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  gegen  $\text{Cl}^-$  im Erythrocyten des Kapillarblutes der Gewebe. Im Lungen-(Kiemen-)Kapillarblut kehren sich sämtliche Vorgänge um (Hb = Hämoglobin-Radikal)

Das molekulare  $\text{CO}_2$  kann wiederum schnell durch die Erythrocytenmembran eindringen. In den roten Blutkörperchen wird nun Kohlensäure gebildet. Die dabei entstehenden  $\text{H}^+$ -Ionen werden durch das  $\text{O}_2$ -beladene, als K-Salz vorliegende Hämoglobin abgefangen: es entsteht undissoziiertes  $\text{O}_2$ -freies Hämoglobin. Der Sauerstoff wandert zu den Körperzellen.

Die  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen werden schließlich bis zum Ausgleich der osmotischen Drucke gegen  $\text{Cl}^-$ -Ionen des Plasmas ausgetauscht („chlorid-shift“), so daß letzten Endes ein großer Teil des  $\text{CO}_2$  doch im Plasma als Carbonat transportiert wird.

Die Hydratation des  $\text{CO}_2$  in den Erythrocyten (bzw. rückwärts seine Freisetzung) wird durch Kohlenensäureanhydratase um das Vielhundertfache beschleunigt und erst dadurch mit der kurzen Verweilzeit des Blutes in den Kapillaren in Einklang gebracht<sup>6, 9</sup>). Tatsächlich kommt in den roten Blutkörperchen die Kohlenensäureanhydratase in der höchsten bekannten Konzentration vor: Rindererythrocyten enthalten z. B. etwa 0,2% (neben 25% Hämoglobin).

Durch Gabe von Kohlenensäureanhydratase-Hemmern kann die  $\text{CO}_2$ -Elimination kaum oder erst bei gleichzeitig

<sup>6</sup>) F. J. W. Roughton, J. Physiol. 107, 12 P [1948].

sehr großen körperlichen Anstrengungen gestört werden. Nach neueren Berechnungen liegt ein etwa 10facher Überschuß an Kohlenensäureanhydratase vor<sup>6</sup>). Anscheinend soll eine Beeinträchtigung dieser absolut lebenswichtigen Funktion auch in abnormen Fällen weitgehend vermieden werden: Die  $\text{CO}_2$ -Elimination ist bei pathologisch stark erniedrigten Kohlenensäureanhydratase-Werten nicht gestört<sup>7</sup>).

Andererseits kann vielleicht der nicht unwidersprochene Befund<sup>8</sup>) eines pro Erythrocyt erhöhten Kohlenensäureanhydratase-Wertes bei perniziöser Anämie als Ausgleich für das ungünstigere Verhältnis Oberfläche/Volumen der hier auftretenden größeren Makrocyten gewertet werden. Kohlenensäureanhydratase-Vermehrung bei sekundären Anämien, auch vorübergehend nach Blutverlusten, bei niedrigen Drucken<sup>9</sup>), bei Hyperthyreoidismus<sup>10</sup>) (Schilddrüsenüberfunktion mit erhöhtem Stoffwechsel!) und bei Kükenembryonen<sup>11</sup>) kann als Adaption angesehen werden. Eine neurohumorale Steuerung des Blut-Kohlenensäureanhydratase-Spiegels wird diskutiert<sup>12</sup>).

Der Kohlenensäureanhydratase-Gehalt des Blutes ist bei Frauen geringer als bei Männern, bei Jugendlichen geringer als bei Erwachsenen; bei Neugeborenen ist er nur ca.  $\frac{1}{3}$ , bei Frühgeburten  $\frac{1}{4}$  der Norm<sup>13, 14</sup>).

Über die Art-Abhängigkeit gibt Tabelle 1 Auskunft.

Mensch	1,0	Rind	2,3
Pferd	1,3	Ziege	2,6
Schwein	1,8	Wal	2,8
Kaninchen	2,1	Ratte	3,4

Tabelle 1

Relative Kohlenensäureanhydratase-Aktivität des Blutes von Menschen und verschiedenen Tierarten<sup>15</sup>)

Man vermutet, daß die Blut-Kohlenensäureanhydratase wie die Erythrocyten selbst im Knochenmark gebildet wird<sup>16</sup>).

Im Plasma der höheren Tierarten kommt niemals Kohlenensäureanhydratase vor, wenn sie nicht durch Zerfall der roten Blutkörperchen freigesetzt wurde.

## Kiemen

Im Zuge der „äußeren Atmung“ wird das  $\text{CO}_2$  aus dem Blut der Lungentiere einfach mittels Diffusion durch die Membranen der Lungenbläschen ausgeschieden. Voran geht die rückläufige Mobilisierung des  $\text{HCO}_3^-$  (s. oben) durch die Kohlenensäureanhydratase der Blutkörperchen (s. o.).

Im Gegensatz zu den Lungen enthalten Kiemen, besonders von Knochenfischen, zusätzlich große Mengen Kohlenensäureanhydratase<sup>17</sup>), deren Funktion durch Inhibitoren gehemmt werden kann<sup>17a</sup>).

## Verdauungstrakt

$\text{CO}_2$  kann auch als Anhydrosäure, d.h. als Wasserstoffionen- und (Bi)Carbonat-Ionenbildner fungieren. Seine Bildung bzw. Fixierung dient also an gewissen Stellen physiologischen Zwecken der Regulierung

<sup>7</sup>) C. G. Lambie, Edinburgh. med. J. 45, 373 [1938].

<sup>8</sup>) R. G. Schneider, Wm. C. Levin u. M. E. Haggard, J. Lab. clin. Med. 34, 1249–53 [1949]. B. L. Vallee u. M. D. Altschule<sup>1</sup>).

<sup>9</sup>) N. A. Wershbinskaja u. Mitarb., Nachr. Akad. Wiss. UdSSR., biol. Ser. 1948, 448.

<sup>10</sup>) A. Galeone u. G. Dal Santo, Acta Med. Scand. 143, 266–72 [1952].

<sup>11</sup>) Z. D. Pigareva, Ber. Akad. Wiss. UdSSR. 77, 805–07 [1950].

<sup>12</sup>) E. M. Kreps, Amer. Rev. Soviet. Med. 4, 426–35 [1947], Biol. Abstr. 22, 1050 [1948].

<sup>13</sup>) M. D. Altschule u. C. A. Smith, Pediatrics. 6, 717–20 [1950].

<sup>14</sup>) R. Berfenstam, Acta paediatrica [Uppsala], Suppl. 77, 124–25 [1949], 41, Suppl. 87, 1–105 [1952]. P. E. H. Jones u. R. A. McCance, Biochem. J. 45, 464–67 [1949]. W. J. Lawrence, Med. J. Australia 34, 587–89 [1947]. E. Z. Rabinowitsch, Voprosy Pediat. i Okhrany Materinstva i Detstva 17, Nr. 4, 24–27 [1949]. M. Sibily u. J. G. Wood, Acta paediatrica [Stockholm] 41, 32 [1952].

<sup>15</sup>) A. M. Clark, J. exp. Biology 28, 332–43 [1951].

<sup>16</sup>) H. van Goor<sup>1</sup>).

<sup>17</sup>) C. Lutwak-Mann, Nature [London] 164, 607–08 [1949]. H. van Goor, Enzymologia 8, 113 [1940]. A. M. Clark<sup>14</sup>).

<sup>17a</sup>) M. Leiner, zit. nach van Goor<sup>1</sup>).

<sup>17b</sup>) J. Maetz, C. R. Séances Soc. biol. Filiales Assoc. 147, 207, 291 [1953].

von  $p_H$  und Ionenzusammensetzung zur Aufrechterhaltung des Säure-Basengleichgewichtes. Die Kohlensäureanhydratase spielt auch dabei eine wesentliche Rolle.

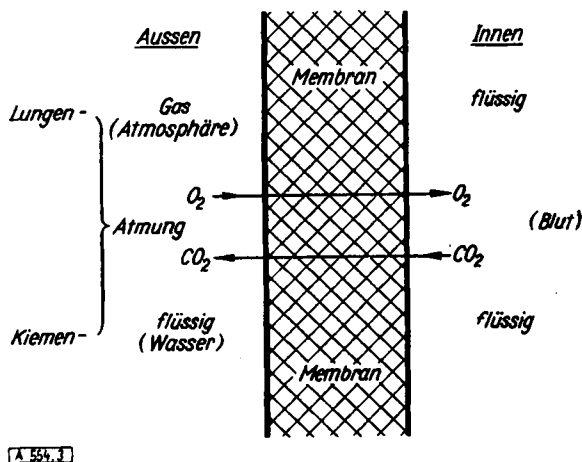


Bild 3  
Vergleich von Lungen- und Kiemenatmung

Die Ohrspeicheldrüse weist einen sehr großen Gehalt an Kohlensäureanhydratase auf<sup>18)</sup>. Sie sorgt offenbar für die Hydratisierung des im Stoffwechsel der Drüsenzellen gebildeten  $CO_2$ ; die entstandenen  $HCO_3^-$ -Ionen können nur langsam diffundieren, werden dafür aber durch die Speichelsekretion der Drüsen eliminiert. Als Beweis für die Fermenttätigkeit kann die Hemmung der  $HCO_3^-$ -Sekretion durch Kohlensäureanhydratase-Inhibitoren angesehen werden<sup>19)</sup>. Im Speichel selbst kommen geringe Mengen Kohlensäureanhydratase vor, die wohl aus der Drüse stammen. Der Speichel ist die einzige Körperflüssigkeit mit Kohlensäureanhydratase-Gehalt.

Im Magen werden für die Aktivierung des Pepsins große Mengen Salzsäure sezerniert. Der Gesamtvorgang ist sehr komplex; Bild 4 soll nur als ein biochemischer Ausschnitt gewertet werden.

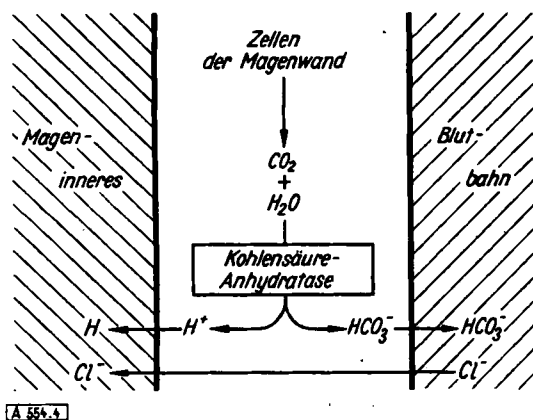


Bild 4  
Schema der Säurebildung im Magen

Während der Verdauung verstärkt sich naturgemäß der Stoffwechsel der Magenwandzellen. Dadurch, daß diese Zellen tatsächlich sehr große Mengen Kohlensäureanhydratase enthalten<sup>20)</sup>, wird eine schnelle Bildung von  $H^+$  und  $HCO_3^-$ -Ionen gewährleistet. Die  $HCO_3^-$ -Ionen können

gegen  $Cl^-$ -Ionen des Blutes ausgetauscht werden. Der Sekretionsmechanismus der  $H^+$ -Ionen ist noch unbekannt<sup>21)</sup>.

Erst nach Auffinden starker Kohlensäureanhydratase-Inhibitoren konnte neuerdings eine Hemmung der Salzsäure-Produktion nachgewiesen werden. Dies kann als wesentliche Stütze obiger Theorie gewertet werden<sup>22)</sup>.

Der aus dem Magen austretende saure Speisebrei muß für die Einwirkung des Trypsins neutralisiert bzw. schwach alkalisiert werden. Dies besorgt der Saft der Pankreasdrüse, als wichtiger Carbonat-Lieferant. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß ein gewisser Teil davon aus der Blutbahn übernommen wird<sup>23a)</sup>. Der hohe Gehalt an Kohlensäureanhydratase im Pankreas<sup>23)</sup> (nicht bei Fischen!) sowie wieder die Minderung der Carbonat-Bildung nach Anwendung von Kohlensäureanhydratase-Hemmern<sup>24)</sup> sprechen jedoch dafür, daß ein erheblicher Teil dem Stoffwechsel der Drüse selbst entstammt und dort fixiert wird.

## Niere

Die Nieren scheiden Stoffwechselendprodukte, Schlacken, Giftstoffe und dgl. aus. Auch aus diesem komplexen Vorgang gibt Bild 5 wieder nur einen Ausschnitt.

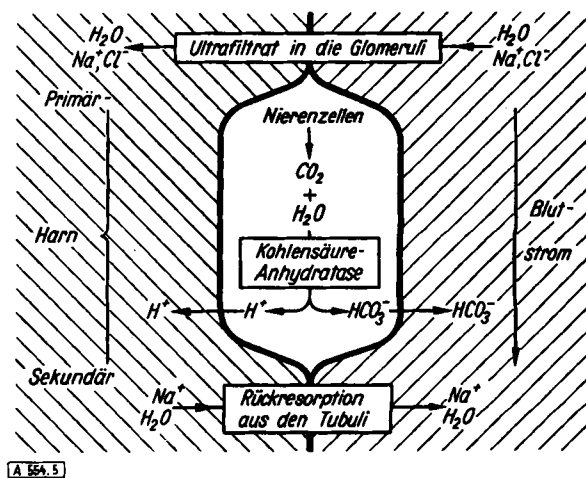


Bild 5  
Schema der Nierenfunktion

Durch Ultrafiltration wird Blutwasser mit allen echt gelösten niedermolekularen Bestandteilen (hier symbolisiert durch  $H_2O$  und  $NaCl$ ) aus der Nierenarterie in die Nierenbläschen (Glomeruli) gepreßt (Primärharn). Hier setzt der Mechanismus der Kohlensäureanhydratase-gesteuerten  $H^+$  und  $HCO_3^-$ -Bildung ein. Die  $H^+$ -Ionen werden gegen die  $Na^+$ -Ionen ausgetauscht. Der „Sekundärharn“ wird tatsächlich saurer als das Blut und der Primärharn ( $p_H$  ca. 6–6,5 gegen 7,4); aber infolge der Anwesenheit von puffernden Substanzen (Phosphaten und dgl.) wird viel mehr  $Na^+$  rückresorbiert als der resultierenden  $H^+$ -Ionenkonzentration (dem  $p_H$ ) entspricht. Also sinkt der osmotische Druck und somit kann auch Wasser in den Blutkreislauf mit zurückgelangen! Die gleichzeitig entstandenen  $HCO_3^-$ -Ionen werden ins Blut ausgeschieden, wodurch für den elektrischen Ladungsausgleich gesorgt ist.

<sup>21)</sup> E. E. Martinson, *Biochimica (russ.)* 15, 121–27 [1950].

<sup>22)</sup> R. E. Davies, *Biochemic. J.* 42, 609–21 [1948]; – u. J. Edelman, ebenda 50, 190 [1951]. H. D. Janowitz, H. Colcher u. F. Hollander, *Amer. J. Physiol.* 171, 325–30 [1952], *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 15, 54–55 [1952].

<sup>23a)</sup> E. G. Ball, H. F. Tucker, A. K. Solomon u. B. Vennesland, *J. biol. Chemistry* 140, 119 [1941].

<sup>23)</sup> H. van Goor, *Enzymology* 8, 113 [1940] zit. n. 1).

<sup>24)</sup> D. Birnbaum u. F. Hollander, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 87, 23–24 [1952], *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 15, 56–58 [1952].

Kürzlich<sup>25)</sup> konnte beim Menschen mit Kohlensäureanhydratase-Hemmern das Auftreten von Polyurie (Erhöhung des Harnvolumens) und Alkalose (Verschiebung des Harn-p<sub>H</sub> in den alkalischen Bereich) demonstriert werden.

Die Lokalisation des Kohlensäureanhydratase-Vorkommens in der Niere scheint bisher noch nicht eindeutig geklärt zu sein<sup>26)</sup>. Die vorkommende Konzentration ist abhängig von der Tierart, aber nicht vom Alter<sup>27)</sup>.

Das Auftreten von Kohlensäureanhydratase in einigen Abschnitten des Darmtraktes<sup>28)</sup> von verschiedenen Fischen mag Ersatz für das Fehlen im Pankreas bei diesen Tieren und damit von ähnlicher Bedeutung wie dort sein. Kohlensäureanhydratase-Vorkommen in Leber, Milz und Muskeln erscheinen noch nicht gesichert<sup>29)</sup>.

## Augen

Größere Kohlensäureanhydratase-Aktivitäten werden in den Augen verschiedener Tierarten gefunden<sup>30)</sup>, vor allem in Netzhaut, Hornhaut und Linsen. Besonders bei Augentieren, wie Vögeln, aber auch bestimmten Knochenfischen, wird die Netzhaut besonders beansprucht, ist umgekehrt aber relativ schlecht durchblutet. Der Kohlensäureanhydratase-Gehalt könnte eine Bedeutung zur CO<sub>2</sub>-Elimination haben im Hinblick auf den hier stark erhöhten Stoffwechsel (Parallelität zur ontogenetischen Entwicklung; Fehlen bei Tieren, die blind geboren werden<sup>30)</sup>).

Über den Bildungsort der Augen-Kohlensäureanhydratase herrscht noch Unsicherheit<sup>31)</sup>. Bei bestimmten Knochenfischen könnten es die stark Kohlensäureanhydratasehaltigen Pseudobranchien (zurückgebildeter Kiementeil) sein, da sie die Augen mit Blut versorgen<sup>32)</sup>.

## Schwimmbläse

Weiterhin enthalten die Schwimmbläsen<sup>33)</sup> der Physoklisten (Knochenfische mit geschlossener Schwimmbläse) reichlich Kohlensäureanhydratase.

Es kann angenommen werden, daß dies mit dem Füllmechanismus der Blasen zusammenhängt. Bekannt ist, daß nach künstlicher Leerung die Schwimmbläse sich zunächst schnell mit CO<sub>2</sub> füllt, das dann allmählich durch O<sub>2</sub> ersetzt wird. Bei entspr. Reizung werde durch Aktivierung der Kohlensäureanhydratase CO<sub>2</sub> aus dem venösen Blut freigesetzt, das teils zur Primärfüllung der Schwimmbläse benutzt wird. Teilweise diffundiere es in einem sog. doppelten „Wundernetz“ (verschränktes venöses und arterielles Kapillarnetz) aus den Venolen in die Arteriolen: dort würde durch die Erhöhung des CO<sub>2</sub> dann der O<sub>2</sub> freigesetzt, der dann die endgültige Blasenfüllung übernimmt<sup>34)</sup>. Auch konnte kürzlich durch Kohlensäureanhydratase-Inhibitoren die Gassekretion gehemmt werden<sup>35)</sup>.

## Zentralnervensystem

Kohlensäureanhydratase wurde im Zentralnervensystem gefunden<sup>36)</sup>. Bemerkenswert ist die Parallelität des Vorkommens mit der relativen Bedeutung der betreffenden Regionen, sowohl im Hinblick auf die phylogenetische wie die onthogenetische Entwicklungsstufe<sup>34)</sup>.

- <sup>25)</sup> R. W. Berliner, T. J. Kennedy u. J. Orloff, *Amer. J. Med.* 17, 274 [1951]. J. Gasch u. F. Krück, *Klin. Wschr.* 31, 285 [1953]. Th. M. Maren, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 15, 53 [1952].  
<sup>26)</sup> W. Ashby, *J. biol. Chemistry* 151, 521 [1943]. H. W. Davenport<sup>3)</sup>, H. W. Davenport u. A. E. Wilhelmi, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 48, 53 [1941]. H. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>27)</sup> R. Day u. J. Franklin, *Pediatrics* 7, 182–5 [1951].  
<sup>28)</sup> H. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>29)</sup> A. Bakker u. M. Leiner, zit. bel van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>30)</sup> A. Tschetwerikoff, *Nachr. Akad. Wiss. UdSSR., Biol. Ser.* 1948, 461.  
<sup>31)</sup> A. Bakker, zit. bel van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>32)</sup> M. Leiner, zit. bel van Goor<sup>1)</sup>; s. a. *Naturwiss.* 28, 165–71 [1940].  
<sup>33)</sup> L. Skinazi, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Assoc. 147, 295 [1953].  
<sup>34)</sup> H. van Goor<sup>23)</sup>.  
<sup>35)</sup> W. Ashby u. E. M. Schuster, *J. biol. Chemistry* 184, 109–16 [1950]. W. Ashby, R. F. Garzoli u. E. M. Schuster, *Amer. J. Physiol.* 170, 116–20 [1952]. E. M. Kreps, *J. Physiol. UdSSR.* 36, 97–110 [1950]. N. A. Wershbinskaja, *Nachr. Akad. Wiss. UdSSR. biol. Ser.* 1949, 598–607.

Bei flinken und physisch geschickten Tieren wie der Katze ist die Kohlensäureanhydratase vornehmlich im Rückenmark lokalisiert, beim trägen aber relativ intelligenten Hausschwein, bei Hund und Pferd, vor allem im Großhirn. Beim Rind ist die Kohlensäureanhydratase im Kleinhirn lokalisiert, während beim Rheussaffen wie bei allen Primaten in Richtung zur Gehirnrinde eine Kohlensäureanhydratase-Zunahme zu sehen ist bei gleichzeitig hohem Gehalt des Kleinhirns<sup>35)</sup>.

Bei gewissen Geisteskrankheiten ist der Kohlensäureanhydratase-Gehalt des Zentralnervensystems erniedrigt<sup>35)</sup>. Beim Foetus bzw. der Frühgeburt ist er wesentlich geringer als beim Neugeborenen, d. h. er fehlt überhaupt vor der Reifung der Seh- und Hörorgane und dem Einsetzen der Gehirnfunktionen<sup>36)</sup>. Die Kohlensäureanhydratase tritt in Kern und Plasma der Zellen der menschlichen Hirnrinde auf<sup>37)</sup>.

Es ist bekannt, daß molekulares(!) CO<sub>2</sub> die Reizschwelle der Nerven erhöht, d. h. die Reizempfindlichkeit und -geschwindigkeit herabsetzt<sup>38)</sup>. Es kann vermutet werden, daß das Kohlensäureanhydratase-Vorkommen in den wichtigsten zentralen Steuerungsorganen die Bedeutung hat, durch beschleunigte Auflösung mit anschließender Ionisierung das CO<sub>2</sub> unschädlich zu machen und damit für schnellstmögliche Wiederherstellung des Normalzustandes zu sorgen.

Wie weit Kohlensäureanhydratase an der Carbonat-Bildung von Knochen und Eischalen beteiligt<sup>40, 41)</sup> ist, ist noch offen<sup>40, 41)</sup>. Jedenfalls konnte im Eileiter der Henne etwas Kohlensäureanhydratase nachgewiesen werden<sup>39)</sup>.

## Niedere Tiere

Soweit niedere Tiere Blut besitzen, besteht kein Zusammenhang zwischen Kohlensäureanhydratase-Vorkommen und Anwesenheit oder Fehlen eines Blutfarbstoffs (Hämoglobin bzw. dem Fe-Porphyrin-haltigen Chlorocruorin)<sup>42)</sup>. Der Borstenwurm (Polychaet) *Arenicola* stellt den einzigartigen Fall dar, daß Farbstoff und Kohlensäureanhydratase extrazellulär im Blutplasma vorkommen<sup>43)</sup>.

Die Bedeutung des Kohlensäureanhydratase-Vorkommens im Blut niederer Tiere dürfte die gleiche wie bei den höheren sein, ähnlich wie für das häufige Auftreten in den Kiemen und anderen Atmungsorganen wie Tentakeln (Fühlern), vielleicht auch gewissen Regionen des Verdauungstraktes. Dies betrifft z. B. die Auffindung von Kohlensäureanhydratase bei Anthozoen (Nessel-, Blumentieren wie Seeanemonen) und Crustaceen (Krebstieren). Bei Mollusken (Weichtieren, Schnecken) fehlt Kohlensäureanhydratase im Blut, findet sich jedoch oft reichlich in den Kiemen, was auf die Möglichkeit hindeuten mag, daß bei diesen Tieren das CO<sub>2</sub> direkt als HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ins Blut gelangt und so transportiert wird. Die Menge der Kohlensäureanhydratase hängt wesentlich von der Agilität der Tiere ab, ist z. B. bei den äußerst beweglichen Tintenfischen relativ groß<sup>44)</sup>.

Soweit die Tiere Carbonat-haltige Schalen tragen (Muscheln, Korallen, Krebse), hätte man eine Kohlensäureanhydratase-Beteiligung an der CO<sub>2</sub>-Fixierung vermuten können. Gerade hier scheint sie aber oft völlig zu fehlen. Vielleicht ist die Carbonat-Bildung als der „physiologische“ Ausscheidungsmodus für das im Stoffwechsel dieser Tiere gebildete CO<sub>2</sub> anzusehen<sup>45)</sup>. Austern scheinen allerdings, abhängig vom Entwicklungsstadium, Kohlensäureanhydratase zu besitzen<sup>46)</sup>.

- <sup>36)</sup> W. Ashby, *J. Nervous Mental Disease* 114, 391–95 [1951].  
<sup>37)</sup> W. Ashby<sup>35)</sup> u. *Amer. J. Psychiatry* 106, 491–96 [1950].  
<sup>38)</sup> D. Richter u. R. P. Hullin, *Biochemic. J.* 48, 406–10 [1951].  
<sup>39)</sup> E. Coraboeuf u. R. Thienlin, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. Soc. Biol. Filiales Associées 146, 190–94 [1952].  
<sup>40)</sup> R. H. Common, *J. Agric. Sci.* 37, 412 [1941].  
<sup>41)</sup> R. Benesch u. Mitarb., *Nature [London]* 153, 138 [1944]; 155, 203 [1945].  
<sup>42)</sup> Z. B. Miller, J. Waldmann u. F. C. McClean, *Nature [London]* 161, 273–74 [1948].  
<sup>43)</sup> H. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>44)</sup> M. Florkin, *Arch. int. Physiol.* 40, 283 [1935]. A. M. Clark, *Nature [London]* 162, 191 [1948].  
<sup>45)</sup> H. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>46)</sup> J. A. Freeman u. K. M. Wilbur, *Biol. Bull.* 94, 55–59 [1948]. K. M. Wilbur u. N. G. Anderson, ebenda 98, 19–24 [1950].

Kohlensäureanhydratase wurde schließlich bisher auch nicht gefunden bei Quallen (Hydrozoen), Schnurwürmern (Nemertina) und nur in geringsten Mengen bei Insekten<sup>46)</sup>.

## Pflanzen

Falls die Reaktionskette der Photosynthese grüner Pflanzen nicht von molekularem  $\text{CO}_2$  ausgehen sollte, sondern von Kohlensäure bzw. ihrem Anion  $\text{HCO}_3^-$ , ist aus reaktionskinetischen Gründen die Beteiligung eines  $\text{CO}_2$ -hydratisierenden Fermentes erforderlich<sup>47)</sup>. Neuerdings stellte sich heraus, daß das pflanzliche Ferment häufig nur unter besonderen Kautelen angereichert und nachgewiesen werden kann. Dies läßt an einer Identität beider Fermentgruppen zweifeln (s. a. später<sup>48)</sup>).

Kohlensäureanhydratase-Aktivität wurde in zahlreichen grünen Pflanzenteilen nachgewiesen, besonders jungen Blättern von Spinat, Grape-Frucht u. a. m. Nicht vorzukommen scheint Kohlensäureanhydratase in den Chloroplasten, den Assimilationszentren. In nicht assimilierenden, farblosen bzw. im Dunkeln wachsenden Pflanzenteilen scheint Kohlensäureanhydratase gleichfalls nicht vorzukommen oder vermindert zu sein<sup>49)</sup>.

Einen Hinweis auf die Richtigkeit der hypothetischen Bedeutung der Pflanzen-Kohlensäureanhydratase soll in der Beobachtung gesehen werden, daß gewisse Hemmstoffe der Assimilation von Monokotyledonen (Einkeimblättrigen) auch die aus diesen Pflanzen gewonnene Kohlensäureanhydratase hemmen können. Zweikeimblättrige (Dikotyledonen) werden nicht beeinflusst<sup>49)</sup>.

In grünen Wasserpflanzen kommt Kohlensäureanhydratase nur zu 1% der Größenordnung wie bei Landpflanzen vor, vielleicht weil hier schon hydratisierte Kohlensäure aus der wäßrigen Umgebung bezogen werden kann<sup>49)</sup>.

Nicht untersucht worden zu sein scheinen bisher niedere Pflanzen wie Hefen und Bakterien. Doch kann hier wohl auch kaum ein Vorkommen erwartet werden.

## Darstellung

### Aus tierischem Material

Fermentpräparate wurden aus verschiedenen Kohlensäureanhydratase-haltigen Organen (z. B. Magen, Pankreas usw.; ferner aus niederen Tieren z. B. Actinien) erhalten. Es wurde von Preßsäften oder wäßrigen, Puffer- oder besonders Glycerin-Extrakten ausgegangen, evtl. nach Aufschluß der Gewebe durch Gefrieren. Leichteste und ergiebigste Quelle zur Darstellung sind jedoch rote Blutkörperchen, z. B. des Rindes<sup>50)</sup>.

Nach sorgfältigem Waschen mit Kochsalzlösung werden die Erythrocyten durch Wasserzusatz hämolytisch. Durch Fällung mit einem geeigneten Gemisch von Alkohol und Chloroform trennt man das Hämoglobin ab. Die fast klare, schwach gelbe Lösung liefert durch Vakuumtrocknung ein stabiles Rohferment, mit dem der größte Teil der Untersuchungen gemacht worden ist<sup>50)</sup>.

Zur weiteren Reinigung werden gemeinsam oder einzeln und in wechselnder Reihenfolge Dialyse oder Ultrafiltration zur Beseitigung niedermolekularer, Adsorption an Ca-Phosphat zur Entfernung höhermolekularer Begleitstoffe benutzt. Fraktionierung mit Ammonsulfat, Ausfällung zusammen mit Bleiacetat, Adsorption an Aluminiumhydroxyd  $\text{Oy}$  und fraktionierte Fällung durch Aceton liefern mehr oder minder angereicherte Präparate, von denen die reinsten etwa 85proz. sein sollen<sup>50)</sup>. Berichte über

- <sup>46)</sup> H. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>47)</sup> G. O. Burr, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B, 120, 42 [1936].  
<sup>48)</sup> R. Day u. J. Franklin, Science [New York] 104, 363–65 [1946]. J. R. G. Bradfield, Nature [London] 159, 467 [1947]. J. J. Gunar u. E. E. Krastina, Ber. Akad. Wiss. UdSSR, 83, 161–64 [1952].  
<sup>49)</sup> E. R. Waygood u. K. A. Clendenning, Science [Washington] 113, 177–79 [1951]; Can. J. Research 28C, 673–89 [1950]. R. Day u. J. Franklin, Science [New York] 104, 363 [1946]. J. R. G. Bradfield, Nature [London] 159, 467 [1947].  
<sup>50)</sup> H. van Goor, Enzymologia 8, 113 [1940]. D. Keilin u. T. Mann, Biochemic. J. 34, 1163 [1940]. M. Kiese, Blochem. Z. 307, 400 [1941]. M. Kiese u. A. B. Hastings, J. biol. Chemistry 132, 281 [1940]. M. Leiner u. G. Leiner, Biol. Zbl. 60, 449 [1940]. N. U. Meldrum u. F. J. W. Roughton, J. Physiology 80, 143 [1933]; s. a. H. van Goor<sup>1)</sup> u. F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1)</sup>.

die Gewinnung kristallisierter Derivate der Kohlensäureanhydratase<sup>51)</sup> durch Endfällung mit Ammoniak-haltigem Aceton oder mit anderen N-Basen sind angezweifelt worden<sup>52)</sup>.

Die höchste bisher erzielte Anreicherung scheint etwa 150fach, bezogen auf Trockensubstanz, zu sein. Ein Vergleich der aus verschiedenen Laboratorien stammenden Angaben über den Reinheitsgrad der Endprodukte ist wegen der verschiedenen Auswertungsmethoden kaum möglich.

Wegen der evtl. Auftrennung in Co- und Apoferment s. weiter unten.

### Aus pflanzlichem Material

Eine weitergehende Anreicherung pflanzlicher Kohlensäureanhydratase scheint bisher noch nicht unternommen worden zu sein. Rohextrakte aus Blattbrei werden zweckmäßig unter Zusatz von 0,01 m Cystein als Stabilisator gemacht. Nach anderen Angaben ist dies ohne besonderen Einfluß. Die Abtrennung der Chloroplasten durch Zentrifugieren muß bei schwach alkalischem  $\text{pH}$  geschehen; sonst wird durch eine flokkulierende Substanz des Zellsaftes (Tannin?) plasmatisches Eiweiß zusammen mit der Kohlensäureanhydratase ausgeflockt, die sich dann scheinbar mit den Chloroplasten vergesellschaftet findet, obgleich sie tatsächlich im Cytoplasma vorkommt<sup>53)</sup>.

## Auswertung

Die Wirksamkeit von Kohlensäureanhydratase-Präparaten kann nach zweierlei Methoden bestimmt werden:

- Benutzung des Reaktionsteils I der Gleichung a), d. h. Verfolgung des  $\text{CO}_2$ -Verbrauchs oder der  $\text{CO}_2$ -Bildung.
- Benutzung des Reaktionsteils II der Gleichung a) als Indikator für den eigentlich katalysierten Teil I, d. h. Verfolgung der  $\text{pH}$ -Änderung.

Direkte Messung des  $\text{CO}_2$ -Umsatzes.

Es wird manometrisch<sup>54)</sup> oder volumetrisch<sup>54)</sup> gearbeitet. Benutzt wird ein Warburg-Apparat mit üblichen Gefäßen<sup>55)</sup> oder auch mit einem sog. Schiffchen („Boat-Methode“)<sup>56)</sup>, s. Bild 6.

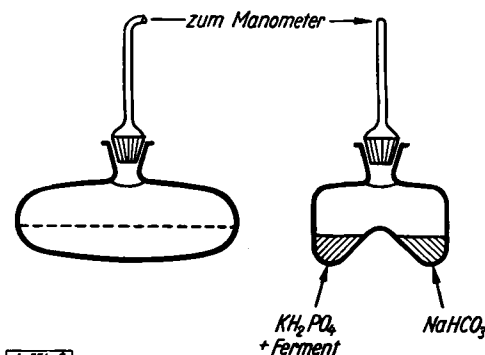


Bild 6. Reaktionsgefäß der „Boat-Methode“

Als Reagenzien werden verwandt eine Pufferlösung von geeignetem  $\text{pH}$  (z. B. Phosphat oder Veronal) und Bicarbonat, wobei  $\text{CO}_2$  entwickelt wird, oder selten gasförmiges  $\text{CO}_2$ , das verbraucht wird.

- <sup>51)</sup> D. A. Scott u. A. M. Fisher, J. biol. Chemistry 142, 959 [1942], 144, 371 [1942].  
<sup>52)</sup> D. Keilin u. T. Mann, Nature [London] 153, 107–8 [1944]. K. Kondō, T. Genezawa u. H. Chiba, Bull. Res. Inst. Food. Sci. Kyoto Univ. 8, 1–35 [1952]. R. Day u. J. Franklin, Science [New York] 104, 363–65 [1946]. J. R. G. Bradfield, Nature [London] 159, 467 [1947]. E. R. Waygood u. K. A. Clendenning<sup>49)</sup>.  
<sup>53)</sup> M. D. Allschule u. H. D. Lewis, J. biol. Chemistry 180, 557–63 [1949]. H. A. Krebs u. F. J. W. Roughton, Biochemic. J. 43, 550–555 [1948].  
<sup>54)</sup> H. van Goor<sup>1)</sup>, J. Maetz, Bull. Soc. Chim. biol. 32, 830–34 [1950].  
<sup>55)</sup> Vgl.<sup>50)</sup> u. M. Leiner, Blochem. Z. 15, 31 [1943].  
<sup>56)</sup> N. U. Meldrum u. F. J. W. Roughton, J. Physiology 80, 143 [1933] u. F. J. W. Roughton<sup>1)</sup>.

Anders als sonst bei Fermentmessungen besitzt hier auch die unkatalysierte Reaktion bereits eine merkliche Geschwindigkeit. Es muß also die Geschwindigkeits- bzw. Umsatzzunahme durch die Beigabe des Fermentes zu seiner Konzentration in Beziehung gesetzt werden.

Für vergleichende Auswertung von Fermentpräparaten, ausgedrückt in willkürlichen Einheiten, genügen relativ einfache Formeln. Bei Benutzung der Warburg-Apparatur kann unter geeigneten Bedingungen der Reaktionsablauf in den ersten Minuten konstant sein, so daß die Umsatzzunahme, d. h. die zusätzliche  $\text{CO}_2$ -Bildung, direkt als Aktivitätsmaß genommen werden kann<sup>67)</sup>. Bei der „Boat-Methode“ wird üblicherweise die relative Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit während des 2. Viertels der Gesamtreaktion benutzt<sup>68)</sup>:

$$\text{Wirksamkeit } x = \frac{R_x - R_0}{R_0} = \frac{t_0 - t_x}{t_x} \quad \text{Gl. 1}$$

Hierbei bedeutet  $R$  die Reaktionsgeschwindigkeit  $= 1/t$ ,  $t$  die Reaktionszeit des 2. Viertels der Gesamtreaktion, der Index 0 die unkatalysierte, der Index  $x$  die durch die Fermentmenge  $x$  katalysierte Reaktion. Vergleiche auch Bild 7.

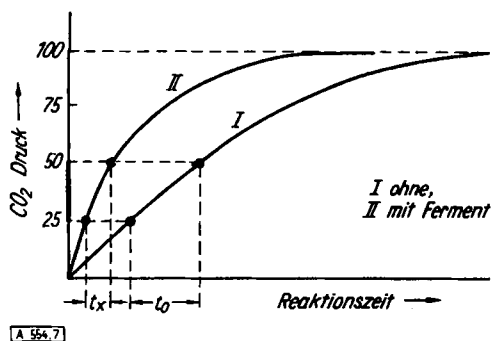


Bild 7  
Auswertung der „Boat-Methode“

Für exakte reaktionskinetische Untersuchungen und absolute Aktivitätsbestimmungen müssen jedoch eine Reihe von Umständen beachtet bzw. Bedingungen erfüllt sein<sup>69)</sup>:

Es muß die Diffusion des  $\text{CO}_2$  als limitierender Effekt apparativ (durch hohe, sehr konstante Schüttelgeschwindigkeit) und rechnerisch berücksichtigt werden. Besonders bei höher gereinigten Präparaten ist während des Versuchs der zunehmenden Inaktivierung des Ferments Rechnung zu tragen durch Extrapolation auf die Zeit 0. Der hemmende Einfluß der Puffer-Ionen (z. B. des Phosphats) ist zu beachten (Benutzung der zur  $p_{\text{H}}$ -Konstanthaltung minimal möglichen Konzentration, evtl. auch Extrapolation auf die Pufferkonzentration 0). Es muß eine lineare Relation zwischen katalytischem Effekt und zugesetzter Enzymmenge im Versuchsbereich sicher gestellt werden. Unkatalysierte und vom Ferment katalysierte Reaktionen besitzen verschiedene Temperaturkoeffizienten (s. unten). Für die Abwesenheit störender Verunreinigungen (Metallspuren und dgl.) muß peinlichste Sorge getragen werden. Zur Berechnung darf ferner nicht die relative, sondern muß die absolute (additive) Umsatzzunahme als Grundlage benutzt werden (um unabhängig von der daneben laufenden unkatalysierten Reaktion zu werden; hierin ist auch die vom Ferment nicht katalysierte Reaktion b) ( $\text{CO}_2 + \text{OH}^-$ ) einbezogen).

Für bestimmte Fälle lassen sich die recht komplizierten Formeln abkürzen<sup>69, 60)</sup>.

## Indirekte Verfolgung des $\text{CO}_2$ -Umsatzes durch $p_{\text{H}}$ -Messungen

Im allgemeinen wird die zur Erzielung einer bestimmten  $p_{\text{H}}$ -Änderung benötigte Zeit bestimmt, sei es mit Indika-

toren<sup>61)</sup> oder durch direkte  $p_{\text{H}}$ -Messung<sup>62)</sup>. Prinzipiell können hiermit keine reaktionskinetischen Untersuchungen gemacht werden.

Für vergleichende Aktivitätsbestimmung der Praxis ist jedoch die Indikatormethode bestens geeignet<sup>63)</sup>. Neben komplizierteren Apparaturen sind einfachere Geräte im Gebrauch, vgl. z. B. Bild 8.

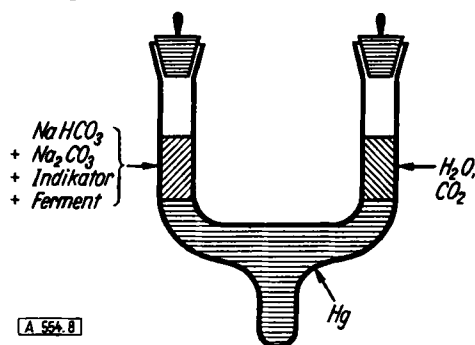


Bild 8. Reaktionsgefäß für Indikatormethode<sup>64)</sup>

Am einfachsten und für praktische Zwecke bei geeigneter Ausführung durchaus genau genug ( $\pm 10\%$ ) ist es, mit Gummistopfen versehene Reagenzgläser zu benutzen<sup>65, 66)</sup>.

Die für a) beschriebenen Einwände bzw. Beschränkungen gelten hier ebenso. Die Inkonzanz des  $p_{\text{H}}$  und die relativ große Eigenhemmung des benutzten Systems (Puffer,  $\text{CO}_3^{2-}$ , Indikator) machen besonders die Auswertung von Versuchen mit Aktivatoren und Inhibitoren schwierig. Hieraus dürften sich Diskrepanzen zwischen a) und b) erklären<sup>67)</sup>.

## Einheit der Fermentwirksamkeit

Eine Einigung über eine Standardauswertungstechnik und damit zusammen über eine Fermenteinheit ist noch nicht erzielt worden. Häufig wird die *Meldrum-Roughton*-Einheit benutzt, die unter bestimmten Bedingungen der Methode a) derjenigen Fermentsubstanzmenge zukommt, für die der Ausdruck der Gleichung (1) gleich 1 wird, die also eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt<sup>68)</sup>.

Um die Ergebnisse verschiedener Autoren miteinander vergleichen zu können, ist es zweckmäßig, die Angaben über die in der hämolysierten Blutkörperchenlösung gefundenen Wirksamkeiten zueinander in Beziehung zu setzen; deren objektive Größe darf wohl in Grenzen als relativ konstant angesehen werden.

## Eigenschaften

### Tierisches Ferment

Die Kohlensäureanhydratase ist ein relativ niedrig molekulares elektrophoretisch einheitliches Protein (Mol.-Gew. ca. 30000; isoelektrischer Punkt bei etwa  $p_{\text{H}}$  5,3), dessen genaue analytische Zusammensetzung noch unbekannt ist. Cystin soll zu etwa 1,3%, Tyrosin zu 4,1% vorhanden sein bei einem Gesamt-N-Gehalt von 15,9%. P und SH-Gruppen sollen fehlen, ebenso keine Polysaccharide vorhanden sein<sup>69)</sup>.

<sup>61)</sup> R. Brinkman, F. J. Philpot u. J. St. L. Philpot, J. Physiology 80, 170 [1934]; Biochemic. J. 30, 2191 [1936]. H. van Goor<sup>1)</sup>.

<sup>62)</sup> A. M. Clark u. D. D. Perrin, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 337–46 [1951]; vgl. a. A. M. Clark, Nature [London] 163, 562–63 [1949]. K. M. Wilbur u. N. G. Anderson, J. biol. chemistry 176, 147 [1948].

<sup>63)</sup> H. van Goor, Enzymol. 8, 113 [1940] u.<sup>1)</sup>.

<sup>64)</sup> R. Brinkman<sup>61)</sup>.

<sup>65)</sup> F. J. W. Roughton<sup>1)</sup>.

<sup>66)</sup> Eigene Beobachtungen.

<sup>67)</sup> F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1)</sup>.

<sup>68)</sup> N. U. Meldrum u. F. J. W. Roughton, J. Physiology 80, 113 [1933]; s. a. F. J. W. Roughton<sup>1)</sup>.

<sup>69)</sup> D. A. Scott u. J. R. Mendive, J. biol. Chemistry 139, 661 [1941]. F. J. W. Roughton, Harvey Lectures 39, 96 [1943]. M. L. Petermann u. N. V. Hakala, J. biol. Chemistry 145, 701 [1942].

<sup>67)</sup> H. A. Krebs u. F. J. W. Roughton<sup>68)</sup>.

<sup>68)</sup> N. U. Meldrum u. F. J. W. Roughton, J. Physiology 80, 113 [1933]. F. J. W. Roughton u. H. V. Booth, Biochemic. J. 32, 2049 [1938].

<sup>69)</sup> F. J. W. Roughton u. H. V. Booth, Biochemic. J. 40, 309–330 [1946].

<sup>60)</sup> C. A. Mitchell, C. Pozzani u. R. W. Fessenden, J. biol. Chemistry 160, 283–85 [1945].

Am bemerkenswertesten ist ein Zink-Gehalt<sup>70)</sup> von etwa 0,33%, was 2 Zn-Atomen/Mol entspricht (z. Vgl. Hämoglobin mit 0,3% Fe). Die Kohlensäureanhydratase ist damit das erste und bisher einzige Zn-Protein, dessen Funktion und Bedeutung man kennt. Als Beweis dient die Konstanz der Relation Zn/Aktivität unabhängig von Ausgangsmaterial, Herstellungsart und Reinheitsgrad des Fermentes; die Vergiftung durch  $\text{CN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{S}^{2-}$  und die Inaktivierung bei Abspaltung des Zn durch Trichloressigsäure lassen das Zn als wesentlichen Teil des aktiven Zentrums des Fermentes erscheinen. Es scheint sehr fest gebunden zu sein, da ein Austausch gegen radioaktives  $^{65}\text{Zn}$  nicht zu erzielen ist<sup>71)</sup>. Ein Maß für die Ferment-Aktivität ist der Zn-Gehalt jedoch nicht: es muß noch andere Inaktivierungsmöglichkeiten geben, da auch Produkte mit höherem Zink-Gehalt, aber niedriger Aktivität auftreten können.

Die Stabilität von Trockenpräparaten scheint unbegrenzt zu sein. Lösungen sind je nach Konzentration, Reinheitsgrad und Temperatur weniger stabil: über 65 °C sowie bei  $p_{\text{H}}$  unter 3 und über 13, evtl. auch unter 4 und über 11 tritt schnelle Zerstörung ein<sup>72)</sup>.

Eine Trennung in Apo- und Coferment soll geglückt sein<sup>73)</sup>, was aber noch der Bestätigung bedarf (s. o.). Durch Adsorption an Ca-Phosphat oder durch Dialyse soll ein thermostabiler Anteil reversibel entfernt werden können; der zurückbleibende Teil ist thermolabil. Wo das Zn bleibt, ist nicht bekannt. Zn-Salze aktivieren jedenfalls nicht, sondern hemmen sogar. Der labile Anteil kommt an den gleichen Stellen wie das Holoferment vor, die Verbreitung des stabilen Cofermentes ist größer, z. B. im Blutplasma, Galle, Urin und verschiedenen Geweben.

Kinetik: Ein  $p_{\text{H}}$ -Optimum besitzt die Kohlensäureanhydratase bemerkenswerterweise nicht, soweit eine Untersuchung der Reaktion bisher möglich war (bei höherem  $p_{\text{H}}$  tritt ja die Nebenreaktion b) ganz in den Vordergrund!); die Aktivität steigt vielmehr praktisch linear von  $p_{\text{H}}$  6–10 an. Ob der Anstieg auf der sauren Seite reell ist, ist fraglich<sup>74)</sup>.

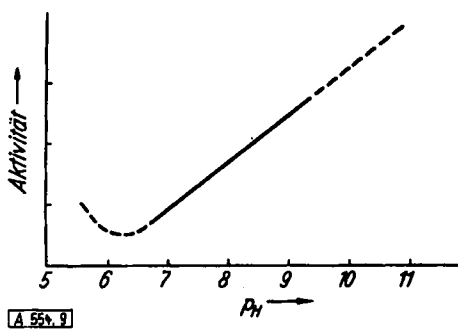


Bild 9. Aktivitäts- $p_{\text{H}}$ -Kurve der Kohlensäureanhydratase

Der Temperaturkoeffizient  $Q_{10}$  zwischen 0 °C und 35 °C ist für die durch Kohlensäureanhydratase katalysierte Reaktion 1,4, für die unkatalysierte Reaktion dagegen 2,9<sup>75)</sup>. Bei Temperaturerhöhung wird also die unkatalysierte Reaktion relativ schneller, man erhält somit scheinbar geringere Fermentaktivitäten als bei niedriger Temperatur.

- <sup>70)</sup> D. Keilin u. T. Mann, *Biochemic. J.* 34, 1163–76 [1940].  
<sup>71)</sup> R. Tupper, R. W. E. Watts u. A. Wormald, *Biochemic. J.* 50, 429–32 [1952].  
<sup>72)</sup> H. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>73)</sup> H. van Goor, *Onderz. Physiol. Lab. Utrecht* 8, III 80 [1943] u. *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 64, 5 [1944]; vgl. a. M. Leiner, *Naturwiss.* 28, 316 [1940]; M. Leiner u. G. Leiner, *Biolog. Zbl.* 60, 449 [1940], zit. n. van Goor<sup>1)</sup>.  
<sup>74)</sup> F. J. W. Roughton u. V. H. Booth, *Biochemic. J.* 40, 309, 319 [1946].  
<sup>75)</sup> F. J. W. Roughton, *J. Physiology* 107, 12 P [1948].

Von der angewandten Fermentkonzentration ist die Aktivität (pro Gewichtseinheit) bei Benutzung verdünnter nicht zu hochgereinigter Präparate normalerweise nicht abhängig. Für sehr hochgereinigte Produkte kann gelegentlich eine scheinbar geringere Aktivität bei höheren Verdünnungen gefunden werden. Vielleicht wird zunächst ein gewisser Fermentteil durch anwesende Inhibitor- oder Giftspuren oder Oberflächenwirkung oder dgl. inaktiviert. Zusatz von Stabilisatoren (die in roheren Präparaten schon anwesend sein dürften) mindert bzw. unterdrückt diesen Effekt tatsächlich<sup>76)</sup>.

Der Einfluß der Substratkonzentration wird durch die Michaelis-Gleichung erfaßt:

$$R = \frac{K_E \cdot c \cdot E}{c + K_M} \quad \text{Gl. (2)}$$

wobei E die Enzymkonzentration, c die Substratkonzentration,  $K_E$  die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substratkomplexes und  $K_M$  die Michaelis-Konstante bedeutet; letztere gibt ein Maß für die Größe von c, bei der R praktisch unabhängig von c wird.

$K_M$  ergab sich zu  $0,009 \pm 0,001$  mol.  $\text{CO}_2$  bei 0 °C, d. h. erst bei einer (praktisch nicht erreichbaren!) Konzentration von über 0,1 m würde die Reaktion annähernd substratunabhängig werden. Für  $K_E$  wurde ein Wert von etwa  $1,6 \cdot 10^6$  bestimmt. Kohlensäureanhydratase gehört damit zu den wirksamsten bekannten Fermenten überhaupt. Experimentell wurde z. B. gefunden, daß unter den betreffenden Bedingungen pro Zn-Atom und pro Sekunde etwa 45000 Molekeln  $\text{CO}_2$  umgesetzt werden (Katalase setzt 100000, Peroxydase 54000 mol/sec/Fe um)<sup>77)</sup>.

Salzeffekte vgl. unter Inhibitoren.

Pharmakologische Eigenschaften: Intravenös applizierte Kohlensäureanhydratase wird, sofern sie nicht durch Plasmainhibitoren inaktiviert wird (Hund), bald im Harn wieder ausgeschieden (Kaninchen)<sup>78)</sup>. Auch intravaskuläre Hämolyse (Zerfall der roten Blutkörperchen in den Gefäßen) führt zum Auftreten von Kohlensäureanhydratase im Harn<sup>79)</sup>. Über antigene Eigenschaften oder spezifische Antikörper ist bisher nichts bekannt geworden.

Nach intramuskulärer (!) Injektion von Kohlensäureanhydratase soll bei Hunden sowie Nieren-, Kreislauf- und Lungenkranken das  $\text{CO}_2$ -Bindungsvermögen des Blutes (d. h. die bei bestimmtem Partialdruck aufgenommene  $\text{CO}_2$ -Menge) vorübergehend ansteigen<sup>80)</sup>. Diese Vergrößerung der Alkalireserve und die weiter beobachteten ionalen Verschiebungen zwischen Erythrocyten und Plasma bleiben noch zu deuten bzw. zu bestätigen.

#### Pflanzliches Ferment

Außer den bereits oben mitgeteilten Eigenschaften ist nur relativ wenig bekannt. Es besteht keine Einmütigkeit darüber, ob es sich ebenfalls um ein Zn-haltiges Protein handelt. Nach einigen Autoren soll es ein SH-Ferment sein, das nicht durch Cyanid und andere Schwermetallgifte gehemmt wird, also nicht Zn-haltig wäre<sup>81)</sup>. Vielleicht gibt

- <sup>76)</sup> D. D. Perrin u. A. M. Clark, *Int. Congr. Biochem. Abstr. Cambridge* 1949, 374–75. F. J. W. Roughton u. V. H. Booth, *Biochemic. J.* 40, 309, 319 [1946].  
<sup>77)</sup> F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1)</sup> sowie <sup>74)</sup>.  
<sup>78)</sup> H. W. Davenport, *Fed. Proc.* 4, 16 [1945]. H. van Goor, *Act. brev. neerl. Physiol. Pharmacol., Microbiol.* 10, 218 [1941]. F. J. W. Roughton u. F. R. Winton, unveröff., *zit. Physiol. Rev.* 15, 265 [1935].  
<sup>79)</sup> J. R. Robinson, *J. clin. Pathol.* 3, 142–45 [1950].  
<sup>80)</sup> F. Schmitt, *Dtsch. Arch. klin. Med.* 184, 300–09 [1939]. F. Schmitt u. H. Prigge, *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 185, 245 [1940].  
<sup>81)</sup> M. Sibly u. J. G. Wood, *Austral. J. sci. Res.* 134, 500–10 [1951]. R. Day u. J. Franklin, *Science [New York]* 104, 363 [1946]. J. R. G. Bradfield, *Nature [London]* 159, 467 [1947]. K. Kondō, T. Gonezawa u. H. Chiba, *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto, Univ.* 8, 1–35 [1952].



es tatsächlich verschiedene wirksame Prinzipien innerhalb des Pflanzenreichs; manche Pflanzen, die Kohlensäureanhydratase-Wirksamkeit besitzen, sind gegen gewisse Krankheiten (*little-leaf*, *mottle-leaf*) besonders anfällig, die auf Zn-Mangel beruhen sollen. Ein diesbezüglicher Zusammenhang mit der Kohlensäureanhydratase ist natürlich offen<sup>82)</sup>.

## Inhibitoren und Aktivatoren (Stabilisatoren)

### Tierische Kohlensäureanhydratase

Ältere Ergebnisse über aktivierende Wirkungen von thermostabilen Plasmabestandteilen, Gewebsextrakten, niederen Proteinen wie Protamin, Edestin, Gelatine, Pepton, aber auch von verschiedenen Aminosäuren und Stickstoff-Verbindungen sind meist mit der Indikatormethode erzielt worden. Sie werden neuerdings für fragwürdig gehalten<sup>83)</sup>. Wahrscheinlich handelt es sich meist um stabilisierende Wirkungen, die sich vor allem an höher gereinigten und stärker verdünnten Präparaten zeigen. Dies ist z. B. für Pepton und Gelatine ja auch bei anderen Fermenten bekannt<sup>84)</sup>. Wie weit ein echter Co-Faktorgehalt der betreffenden Gewebsextrakte noch eine Rolle spielt, ist ebenfalls noch offen (s. oben).

Als Inhibitoren wirken verschiedene Gruppen von Reagenzien: Zahlreiche Anionen besitzen schwach hemmende Wirkungen, z. B. die Halogenide, Nitrat, Carbonat, Chlorat, Bromat, sek. Phosphat, Borat; 50proz. Hemmung wird bei  $1/10-1/100$  Molarität erreicht, was bei Fermentaustausungen berücksichtigt werden muß. Bei  $\text{Cl}^-$  ist eine  $\text{pH}$ -Abhängigkeit gefunden worden derart, daß über  $\text{pH}$  8,2 kein Hemmeffekt mehr feststellbar ist.  $\text{PtCl}_4^{2-}$  ist unwirksam, ebenso Pyrophosphat. Schwermetallgifte wie Cyanide, Sulfide und Azide wirken in Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  stark hemmend<sup>84)</sup>.

Kationen der Alkalien und Erdalkalien scheinen nicht zu hemmen, auch Cd, Ce, Al, Ti, Pb, Cr, Mn, Fe, Co, Ni nicht bei  $1/1000$  Molarität. Dagegen sind Cu, Ag, Au, Hg, V und Zn (!) in  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  Molarität stark hemmend. Ihre eiweißfällenden Wirkungen sind bekannt und dürften wohl die Reaktionsfähigkeit gegen Kohlensäureanhydratase erklären<sup>84)</sup>.

Oxydierende Agentien wie  $\text{J}_2$  und  $\text{KMnO}_4$  hemmen reversibel durch Ascorbinsäure, bei  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  Molarität, Perjodat, Perchlorat u. a. erst bei wesentlich höheren Konzentrationen<sup>84)</sup>.

Unklar ist die Wirkungsweise von Thiocyanat (durch Zn-Salz nicht aufhebbar, also wohl nicht gegen das Metall des aktiven Zentrums gerichtet)<sup>85)</sup>, von DDT<sup>86)</sup> und anderen krampferzeugenden Pharmacia (krampfhemmende Stoffe sollen aktivieren!)<sup>87)</sup>. Die Ergebnisse mit CO sind widersprechend, durch Belichtung soll seine Hemmwirksamkeit aufgehoben werden<sup>88)</sup>.

Natürliche Inhibitoren wurden im Plasma bzw. Serum mancher Tierarten gefunden. Die Bedeutung dieser thermolabilen, pseudoglobulin-ähnlichen Proteine ist unklar. Um eine fermentative (zerstörende) Wirkung scheint es sich nicht zu handeln<sup>89)</sup>.

Von großer praktischer Bedeutung ist die Hemmwirksamkeit von Benzol-sulfonamid und seinen Deriva-

ten<sup>90)</sup>. Sie ist sehr spezifisch, eine Wirkung ist sonst nur noch gegen Phosphatasen bekannt. Voraussetzung ist, daß die Sulfonamid-Gruppierung  $\text{SO}_2\text{-NH}_2$  nicht substituiert ist; die therapeutisch meist gebrauchten Angehörigen dieser Körperklasse gehören also nicht hierher, andererseits ist die für deren klinische Wirksamkeit notwendige Kern- $\text{NH}_2$ -Gruppe hier nicht wesentlich<sup>91)</sup>.

Wirksam sind auch heterocyclische Homologe, z. B. Pyridin(3)- und Thiophen(2)-sulfonamid<sup>92)</sup>. In dieser Kategorie wurden neuerdings die stärkst aktiven Inhibitoren entdeckt, z. B. substituierte Thiodiazol- und Benzothiazol-sulfonamide. Letztere erwiesen sich als 2500mal wirksamer als das einfache Benzolsulfonamid<sup>93)</sup>.

Die Wirksamkeit dieser Substanzen liegt *in vitro* in der Größenordnung von  $10^{-6}$  mol und ist abhängig von der Temperatur, Enzymkonzentration, Inkubationszeit und Anwesenheit anderer Proteine, z. B. von Gewebsextrakten. Die Reaktion zwischen Enzym (E) und Inhibitor (I) scheint durch  $\text{E} + \text{I} \rightleftharpoons \text{EI}$  dargestellt werden zu können<sup>94)</sup>. Die Gleichgewichtskonstanten (Dissoziationskonstanten) sind für verschiedene Sulfonamide berechnet worden. Deren Affinität zum Enzym ist in der Größenordnung von 3 Zehnerpotenzen und mehr größer als die des  $\text{CO}_2$ <sup>95)</sup>.

Besonders für Untersuchungen *in vivo* sind die hochwirksamen Sulfonamide von Bedeutung; wegen des oft sehr großen natürlichen Kohlensäureanhydratase-Überschusses konnten erst hiermit Hemmwirkungen und damit die Beteiligung der Kohlensäureanhydratase an den betreffenden Vorgängen sicher nachgewiesen werden<sup>96)</sup>.

### Pflanzliche Kohlensäureanhydratase

Spezifische Aktivatoren sind nicht bekannt, wenn man nicht die (umstrittene) stabilisierende Wirkung von Cystein oder Glutathion hierzu rechnen will.

Die Inhibitorwirkung von Arsenit und p-Chlorquecksilber(II)-benzoat, die rückgängig gemacht werden kann, ist als Beweis für das Vorliegen eines SH-Fermentes angesehen worden. Wegen des Fehlens von Wirkungen der Schwermetallgifte und der Sulfonamide wurde die Anwesenheit geringer Zn-Mengen Begleitstoffen zugeschrieben. Neuerdings wurde dem widersprochen und ein normales Verhalten gegen  $\text{CN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$  und Sulfonamide nachgewiesen<sup>97)</sup>.

Die Kohlensäureanhydratase-Wirksamkeit von ein- (nicht zwei-)keimblättrigen Pflanzen soll durch Carbamate, Thioharnstoff und Derivate gehemmt werden, die auch die Photosynthese und das Wachstum dieser Pflanzen hemmen<sup>98)</sup>.

<sup>80)</sup> D. Keilin u. T. Mann, Nature [London] 146, 164 [1940]. H. van Goor, Enzymologia 11, 174 [1944]; Acta brevia neerl. Physiol., Pharmacol., Microbiol. 14, 61 [1946].

<sup>81)</sup> A. Locke, E. R. Main u. R. R. Mellon, Science [New York] 93, 66 [1941].

<sup>82)</sup> H. W. Davenport, J. biol. Chemistry 158, 567 [1945]. H. A. Krebs, Biochemic. J. 43, 525 [1948].

<sup>83)</sup> R. O. Roblin u. J. W. Clapp, J. Amer. Chem. Soc. 72, 4890-92 [1950]. W. H. Miller, A. M. Dessert u. R. O. Roblin, J. Amer. Chem. Soc. 72, 4893-96 [1950].

<sup>84)</sup> H. W. Davenport<sup>83)</sup>.

<sup>85)</sup> F. J. W. Roughton u. V. H. Booth, Biochemic. J. 40, 309, 319 [1946].

<sup>86)</sup> R. W. Davies u. J. Edelman, Biochemic. J. 50, 190 [1951]. H. D. Janowitz, H. Colcher u. F. Hollander, J. Physiology 171, 325-330 [1952]; Trans. [New York] Acad. Sci. 15, 54-55 [1952]. D. Birnbaum u. F. Hollander, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 23-24 [1952]; Trans. [New York] Acad. Sci. 15, 56-58 [1952]. R. W. Berliner, T. J. Kennedy u. J. Orloff, Amer. J. Med. 11, 274 [1951]. J. Gasch u. F. Krück, Klin. Wschr. 31, 285 [1953]. Th. M. Maren, Trans. [New York] Acad. Sci. 15, 53 [1952].

<sup>87)</sup> J. J. Gunar u. E. E. Krastina, Ber. Akad. Wiss. UdSSR. 83, 161-64 [1952]. R. Day u. J. Franklin, Science [New York] 104, 363-65 [1946]. I. R. G. Bradford, Nature [London] 159, 467 [1947]. E. R. Waygood u. K. A. Clendenning, Science [Washington] 113, 177-79 [1951]; Can. J. Research 28C, 673-89 [1950]. M. Sibily u. J. G. Wood, Australian J. Sci. Res. 134, 500-10 [1951]. K. Kondō, T. Genezawa u. H. Chiba, Bull. Res. Inst. Food. Sci. Kyoto. Univ. 8, 1-35 [1952].

<sup>88)</sup> J. J. Gunar u. E. E. Krastina<sup>87)</sup>.

<sup>82)</sup> J. R. G. Bradfield<sup>81)</sup>.

<sup>83)</sup> F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1)</sup>. F. J. W. Roughton<sup>80)</sup>. M. Kiese, Naturwiss. 29, 116-17 [1941].

<sup>84a)</sup> D. R. McCullagh, J. W. Cassidy, F. Valentine u. S. Tolksdorf, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 295-298 [1949]. A. M. Clark u. D. D. Perrin, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 337-46 [1951]. D. D. Perrin u. A. M. Clark, Intern. Congr. Biochem. Abstr. Cambridge 1949, 374-75.

<sup>84b)</sup> H. van Goor, F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1)</sup>.

<sup>85)</sup> E. Hove, C. A. Elvehjem u. E. B. Bart, J. biol. Chemistry 136, 425 [1940].

<sup>86)</sup> H. Keller, Naturwiss. 39, 109 [1952].

<sup>87)</sup> C. Torda u. H. G. Wolff, J. Pharmacol. exp. Therap. 95, 444-47 [1949].

<sup>88)</sup> H. van Goor, F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1)</sup>.

<sup>89)</sup> V. H. Booth, J. Physiology 91, 474 [1938]; H. van Goor, Arch. neerland. Physiol. 27, 393 [1943].



## Anwendungen

Es ergeben sich einige Anwendungsmöglichkeiten.

a) Chemische Prozesse, bei denen die Hydratation des  $\text{CO}_2$  bzw. die Spaltung der  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (Reaktion a) geschwindigkeitsbegrenzend sind, können durch Kohlensäureanhydratase-Zusatz beschleunigt werden. Dies trifft besonders für Titrationen im schwach alkalischen Gebiet in Gegenwart von Carbonat zu; durch Kohlensäureanhydratase-Zusatz können sie so schnell wie gewöhnliche Säure-Basen-Titrationen gemacht werden. Auch andere anorganische zusammengesetzte Prozesse können beschleunigt werden: Die Auflösung von  $\text{CaCO}_3$  durch schwache Säuren, die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme durch schwache Basen oder die Bildung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aus  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  und  $\text{CaSO}_4$  in Suspension<sup>99</sup>.

b) Die Hemmbarkeit der Kohlensäureanhydratase durch DDT ist für eine Bestimmung von geringen Mengen DDT mittels der Warburg-Technik vorgeschlagen worden<sup>100</sup>.

c) Die biochemisch wichtige Frage, ob  $\text{CO}_2$  als solches oder in Form von  $\text{H}_2\text{CO}_3$  das Endprodukt verschiedener Reaktionen ist, kann durch Zusatz von Kohlensäureanhydratase bzw. deren Hemmern (Sulfonamide) geklärt werden: Die Dissoziation von Carbamaten, die Zersetzung von Harnstoff durch Urease und die Decarboxylierung von Brenztraubensäure durch Hefe-Carboxylase kann in der

zustand in der Lösung wird durch das Ferment schneller erreicht, ein in manchen Fällen primär überschüssiger  $\text{CO}_2$ -Ausstoß verhindert (Bild 10).

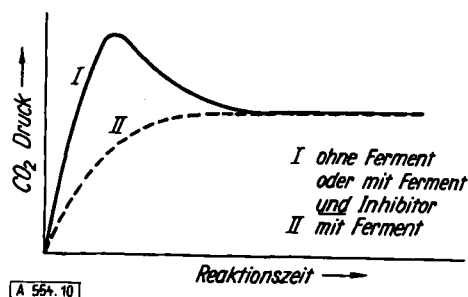


Bild 10. Beeinflussung der Urease-Wirkung durch Zusatz von Kohlensäure-anhydratase

Wenn  $\text{H}_2\text{CO}_3$  Primärprodukt wäre, wäre umgekehrt eine Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Entwicklung zu erwarten gewesen.

d) Die Benutzung der spezifisch hemmenden Sulfonamide in vivo zum Nachweis der Beteiligung von Kohlensäureanhydratase wurde schon erwähnt.

Eine Methode, die Kohlensäureanhydratase-Wirksamkeit in Erythrocyten in situ zu demonstrieren, sei beschrieben: Durch Oxydation des Hämoglobins entsteht Methämoglobin. Dies ist im Reagenzglas mit Nitrit ohne Beeinträchtigung der roten Blutkörperchen möglich. Das Methämoglobin besitzt ein  $\text{pH}$ -abhängiges Spektrum, so daß man nun einen „natürlichen Indikator“ in den roten Blutkörperchen selbst hat<sup>102</sup>. Die Zeit, die z. B. nach Kohlen-säure-Zugabe zu den vorher schwach alkalisierten Erythrocyten bis zum Farbumschlag verstreicht, wird nach Sulfonamid-Zugabe infolge der Kohlensäureanhydratase-Hemmung wesentlich verlängert. Mit der Zellschrumpfung als Indikator werden entsprechende Ergebnisse erzielt<sup>103</sup>.

e) Die klinische Verwertung von Kohlensäureanhydratase-hemmenden Sulfonamiden als Diuretica ist empfohlen worden: Es wird wesentlich vermehrt Flüssigkeit und Alkali im Harn ausgeschieden. Durch Kopplung mit Hg-haltigen Diureticis (z. B. Salyrgan) kann zusätzlich eine vermehrte  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung erzielt werden<sup>104</sup>.

f) Die oben angeführte Hemmwirksamkeit krampferzeugender und Aktivierung durch krampfhemmende Mittel läßt eine Anwendung

dieser oder auch des Fermentes selbst bei bestimmten Kramp fzuständen als möglich erscheinen<sup>105</sup>.

Metall	Gehalt %	Name	Mol.-Gew. $\times 1000$	Vorkommen	Funktion
Fe	> 20 0,12	Ferritin	470	Leber, Milz	Speicher
		Siderophilin (Fe-bindendes Globulin)	90	Plasma	Transport
		Haemosiderin		Leber	Abbauprodukt des Ferritins?
	0,34	Haemoglobin	68	Erythrocyten	Atmung
	0,34	Myoglobin		Muskeln	Atmung
		Leghaemoglobin		Wurzelknöllchen der Leguminosen	$\text{N}_2$ -Assimilation
	0,1	Katalase	250	Gewebe	} $\text{O}_2$ -Abspaltung aus $\text{H}_2\text{O}_2$ Peroxyden
	0,4	Peroxydase	40–100		
		Cytochrom a, b, c	(c) 13		} Oxydoreduktion in der Atmungskette
		Cytochromoxydase	75		
Cu		Erythrocyruorin	20–3000	Blut verschiedener Wirbelloser	Atmung
	1,2	Chlorocyruorin		Blut des Spirographis-Wurms	Atmung
	1,0	Haemoerythrin	66	Meereswürmer	Atmung
	0,34	Haemocuprein		Erythrocyten	?
	0,34 0,17–0,26	Cu-bindende Globuline		Plasma	Transport?
		Hepatocuprein		Leber	?
		Haemocyanin	500–10000	Blut verschiedener Wassertierarten	Atmung
	0,2	Laccase		Milchsaft des Sumach	?
	0,2	Polyphenol-oxydase	} ~ 100	Kartoffeln, Pilze	?
	0,15	Ascorbinsäure-oxydase		Kürbissamen	?
Zn	0,33	Kohlensäureanhydratase	30	Erythrocyten, verschiedene Gewebe, Pflanzen?	siehe vorliegende Arbeit

Tabelle 2. Biologisch wichtige Schwermetallproteide<sup>106</sup>

Warburg-Apparatur manometrisch verfolgt werden<sup>101</sup>. Durch Kohlensäureanhydratase-Zusatz wird im Anfangsstadium der  $\text{CO}_2$ -Ausstoß verringert; es wird also tatsächlich  $\text{CO}_2$  als Primärprodukt gebildet, der Gleichgewichts-

<sup>99</sup> F. J. W. Roughton u. A. M. Clark<sup>1</sup>.

<sup>100</sup> H. Keller, Naturwiss. 39, 109 [1952].

<sup>101</sup> H. A. Krebs u. F. J. W. Roughton, Biochemic. J. 43, 550–55 [1948]. E. J. Conway u. E. O'Malley, Biochemic. J. 54, 154–63 [1953].

<sup>102</sup> D. Keilin u. T. Mann, Nature [London] 148, 493–96 [1941].

<sup>103</sup> F. A. Holton, Biochemic. J. 52, 506–11 [1952].

<sup>104</sup> W. B. Schwartz, New. England J. Med. 240, 173–77 [1949]. J. Gasch u. F. Krück, Klin. Wschr. 37, 285 [1953]. Th. M. Maren, Trans. [New York] Acad. Sci. 15, 53 [1952].

<sup>105</sup> H. Keller, Klin. Wschr. 37, 617 [1953].

<sup>106</sup> S. u. a. F. Haurowitz: Chemistry and Biology of Proteins, New York 1950.

## Zur geschichtlichen Entwicklung

Die Kohlendensäureanhydratase ist das erste Zn-haltige Protein, das bekannt geworden ist (vgl. Tab. 2, S. 8. 257).

Vor 25 Jahren bemerkte O. M. Henriques<sup>107</sup>, daß CO<sub>2</sub> sich aus Hämoglobin-haltigen Lösungen schneller als aus Serum abpumpen läßt und vermutete eine reversible Reaktion zwischen Hämoglobin und CO<sub>2</sub> (1928). Hawkins und van Slyke<sup>108</sup> glaubten 1930 irrtümlich, einen Katalysator der Ionisation der Kohlensäure (Gl. aI) verantwortlich machen zu sollen. Dirken und Mook<sup>109</sup> wiesen 1930–31 diese Annahme im Hinblick auf Berechnungen Faurholt's<sup>110</sup> (1924–25) zurück. Sie vermuteten erstmalig, wie kurz nach ihnen auch Stadie und O'Brien<sup>111</sup> (1931), daß die Hydratisierung des CO<sub>2</sub> (Gl. aI) der katalysierte Vorgang sei; allerdings sollte Hämoglobin die Fermentwirkung besitzen. Brinkman und Margaria<sup>112</sup> zeigten 1931 endgültig, daß die Reaktion  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$  (aI) fermentativ beschleunigt wurde. Kurz darauf konnten sie mit Meldrum und Roughton<sup>113</sup> und unabhängig von ihnen auch Stadie und O'Brien<sup>114</sup> 1932/33 das wirksame Prinzip vom Hämoglobin trennen. Sie benannten das neue Ferment „carbonic anhydrase“, ein Name, der seit Leiner<sup>115</sup> 1941 im deutschen Schrifttum durch „Kohlensäureanhydratase“ ersetzt wurde.

Das Vorkommen der Kohlensäureanhydratase in der Magewand wurde von Berend<sup>116</sup> 1937 entdeckt, von Davenport und Mitarbeitern<sup>117</sup> 1938 bestätigt und in Zusammenhang mit der Säureproduktion des Magens gebracht. Eine Beteiligung der Kohlensäureanhydratase an der Nierenfunktion vermuteten ebenfalls Davenport und Mitarbeiter<sup>118</sup> 1941. Das Vorkommen dort wurde von Ashby<sup>119</sup> bestätigt (1943), der auch Angaben von van Goor<sup>120</sup> (1934–1940) über das Vorkommen im Zentralnervensystem verifizieren konnte.

Mit dem Kohlensäureanhydratase-Gehalt der Augen hatten sich vor allem Leiner<sup>121</sup> seit 1937, später auch Bakker<sup>122</sup> (1939) und van Goor<sup>123</sup> (1940) befaßt.

Das Auftreten der Kohlensäureanhydratase bei niederen Tieren hatten schon 1933 Brinkman und van Goor<sup>124</sup> entdeckt.

<sup>107</sup> O. M. Henriques, Biochem. Z. 200, 1 [1928].

<sup>108</sup> J. A. Hawkins u. D. D. van Slyke, J. biol. Chemistry 87, 265 [1930].

<sup>109</sup> M. N. J. Dirken u. H. W. Mook, J. Physiology 70, 373 [1930]; 73, 349 [1931].

<sup>110</sup> C. Faurholt, J. Chlm. physique 21, 400 [1924]; 22, 1 [1925].

<sup>111</sup> W. C. Stadie u. H. O'Brien, Biochem. Z. 237, 290 [1931].

<sup>112</sup> R. Brinkman u. R. Margaria, J. Physiology 72, 6 P [1931].

<sup>113</sup> R. Brinkman, R. Margaria, N. U. Meldrum u. F. J. W. Roughton, J. Physiology 75, 3 P [1932].

<sup>114</sup> W. C. Stadie u. H. O'Brien, J. biol. Chemistry 103, 521 [1933].

<sup>115</sup> M. Leiner u. G. Leiner, Biol. Zbl. 60, 449 [1940].

<sup>116</sup> M. Berend, Ber. ges. Physiol. 105, 488 [1938]. Magyar Orvos Arch. 38, 232 [1937].

<sup>117</sup> H. W. Davenport u. R. B. Fisher, J. Physiology 94, 16 P [1938].

<sup>118</sup> H. W. Davenport u. A. E. Wilhelmi, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 48, 53 [1941].

<sup>119</sup> W. Ashby, J. biol. Chemistry 151, 521 [1943].

<sup>120</sup> H. van Goor, Enzymologia 8, 113 [1940].

<sup>121</sup> M. Leiner, Z. vergleich. Physiol. 26, 416 [1939].

<sup>122</sup> A. Bakker, Graefes Arch. Ophthalmol. 140, 543 [1939].

<sup>123</sup> H. van Goor, Acta brevia neerl. Physiol., Pharmacol., Microbiol. 10, 37 [1940].

<sup>124</sup> R. Brinkman u. H. van Goor<sup>120</sup>.

Der Zn-Gehalt tierischer Kohlensäureanhydratase wurde von Keilin und Mann<sup>125</sup> 1939–40 gefunden, die auch erstmalig weitestgehend gereinigtes Ferment in der Hand hatten.

1936 hatte Burr<sup>126</sup> ein Kohlensäureanhydratase-wirksames Ferment in Pflanzen als Voraussetzung für die Assimilation gefordert. Der Nachweis gelang Neish<sup>127</sup> 1939, wenn dieser es auch noch fälschlich in den Chloroplasten lokalisierte. Erst 1946 konnten Day und Franklin<sup>128</sup> pflanzliche Kohlensäureanhydratase darstellen. Bradfield<sup>129</sup> konnte 1947 mit der Cystein-Technik eine weite Verbreitung bei Pflanzen nachweisen. Dies wurde 1950 durch Waygood und Mitarbeiter<sup>130</sup> ergänzt.

Die spezifische Hemmwirkung der Sulfonamide fanden 1940 Mann und Keilin<sup>131</sup>. Die neuesten hochwirksamen Inhibitoren dieser Gruppe stammen von Roblin, Miller und Mitarbeitern<sup>132</sup> (1950). Erst damit konnten 1952 Janowitz und Mitarbeiter<sup>133</sup> endgültig die Hemmung der Säureproduktion des Magens, Birnbaum und Mitarbeiter<sup>134</sup> 1952 die Hemmung der Carbonat-Bildung im Pankreas, 1953 Gasch und Krück<sup>135</sup> die Diuresishemmung in der Niere und Skinazi<sup>136</sup> die Hemmung der Gasproduktion der Schwimmblasen nachweisen.

Die antikonvulsive Wirkung (Hemmung von Krämpfen) intraperitoneal gegebener Kohlensäureanhydratase wurde 1953 von Keller gefunden<sup>137</sup>.

Nachtrag bei der Korrektur: Im Durchströmungsversuch an der lebenden Niere hatte schon 1942 R. Höber eine Alkalisierung nach Sulfonamid-Gabe gefunden<sup>138</sup>. — Neuerdings konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Kohlensäureanhydratase in der Uterusschleimhaut des Kaninchens und frühen Stadien der Embryonalentwicklung wahrscheinlich gemacht werden<sup>139</sup>.

Meinem Mitarbeiter Dr. G. Bratfisch habe ich für experimentelle Unterstützung und Hilfe bei der Literatursammlung zu danken.

Eingeg. am 14. September 1953 [A 554]

<sup>125</sup> D. Keilin u. T. Mann, Nature [London] 144, 442 [1939]; Biochem. J. 34, 1163 [1940].

<sup>126</sup> G. O. Burr, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B. 120, 42 [1936].

<sup>127</sup> A. C. Neish, Biochem. J. 33, 300 [1939].

<sup>128</sup> R. Day u. J. Franklin, Science [New York] 104, 363 [1946].

<sup>129</sup> I. R. G. Bradfield, Nature [London] 159, 467 [1947].

<sup>130</sup> E. R. Waygood u. K. A. Clendenning, Clin. J. Research 28C, 673–89 [1950].

<sup>131</sup> T. Mann u. D. Keilin, Nature [London] 146, 164 [1940].

<sup>132</sup> R. O. Roblin u. J. W. Clapp, J. Amer. Chem. Soc. 72, 4890–92 [1950]. W. H. Miller, A. M. Dessert, J. Amer. Chem. Soc. 72, 4890–92 [1950].

<sup>133</sup> H. D. Janowitz, H. Colcher u. F. Hollander, Amer. J. Physiol. 171, 325–330 [1952].

<sup>134</sup> D. Birnbaum u. F. Hollander, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 23–24 [1952].

<sup>135</sup> J. Gasch u. F. Krück, Klin. Wschr. 31, 285 [1953].

<sup>136</sup> H. Keller, Klin. Wschr. 31, 617 [1953].

<sup>137</sup> R. Höber, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 49, 87 [1942].

<sup>138</sup> C. Lutwak-Mann u. U. H. Laser, Nature [London] 173, 268–69 [1954].

## Zuschriften

### Ölspaltung durch kurzzeitige Lichtbögen<sup>1)</sup>

Von Prof. Dr. H. KROEPELIN und Dr. P. KLENCZ

Aus dem Institut für Chemische Technologie der T. H. Braunschweig

Über die Zersetzung von flüssigen Kohlenwasserstoffen durch den elektrischen Lichtbogen findet man in der wissenschaftlichen Literatur nur wenig Angaben<sup>2)</sup>. Die Patentliteratur befaßt sich überwiegend mit der Gewinnung von Ruß auf diesem Wege; die Entstehung von Acetylen wird an mehreren Stellen erwähnt, jedoch ohne nähere Angaben. Daher wurde ein solches Verfahren näher untersucht<sup>3)</sup>. Die Schwierigkeiten, die das Aufrechterhalten bzw. ständige Wiederzünden eines Lichtbogens in einer Flüssigkeit macht, wurden durch eine besondere Anordnung umgangen.

Apparatur. Auf einen Rost aus harten Homogenkohlen wurden ründliche Körner aus Kohle oder Graphit gelegt. Der Rost bildete den Boden eines Kastens aus isolierendem Material, dessen Wände das Herunterfallen der Körner verhindern. Dann werden

Rost und Körner einige Zentimeter hoch mit Flüssigkeit (z. B. Kogasin, Benzol u. a.) bedeckt und an die Roststäbe eine Gleich- oder Wechselspannung gelegt, derart, daß je zwei benachbarte Stäbe auf verschiedenem Potential liegen.

Da die Kohlekörner die Stäbe nur in einer sehr kleinen Fläche berühren und diese Stelle gleichzeitig einen gewissen Übergangswiderstand bildet, wird hier eine große Joulesche Wärme in einem kleinen Volumen entwickelt. Dadurch verdampft anscheinend etwas Flüssigkeit, das Kohlekörnchen wird unter Bildung eines sehr kleinen Lichtbogens (bzw. zweier Lichtbögen) etwas vom Rost abgehoben, der Bogen verdampft eine etwas größere Menge Öl unter gleichzeitiger Zersetzung, die Gasblase schleudert das Kohlekörnchen heftig fort, und der Lichtbogen reißt ab. Liegen die Roststäbe z. B. an einer Phase des 220 V-Wechselstrom-Netzes bzw. am Nulleiter, so brennt der Lichtbogen ca. 6 Millisekunden, wobei die Stromstärke über 30 Amp erreicht. Wir haben zur Stabilisierung einen geringen Vorwiderstand von ein bis einigen Ohm vorgeschaltet, jedoch ist das nicht notwendig<sup>4)</sup>.

Die Zusammensetzung des Spaltgases ist bei Gleich- und Wechselstrombetrieb praktisch die gleiche. Sie hängt auch nur wenig von der Art der gespaltenen Kohlenwasserstoffe ab. Ein typisches Spaltgas enthält rd. 50 Vol% Wasserstoff, 5 % Methan

<sup>1)</sup> Inhaltlich vorgetragen in der Sitzung der Braunschw. Wissensch. Gesellsch. am 16. Dezember 1953.

<sup>2)</sup> Z. B. F. Fischer, K. Peters u. K. Winzer, Brennstoff-Chem. 16, 421 [1935]. A. Maillard u. Cibaef, 119, Congr. mondial petrole 2. Sect. 2, 713/16 [1937] Chem. Abstr. 1939, 355.

<sup>3)</sup> Dissertat. P. Klencz, Braunschweig 1953.

<sup>4)</sup> Tatarinow, Russ. Pat. 40352; Chem. Zbl. 1935, 11, 35801.