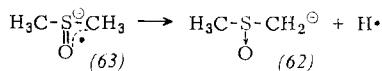


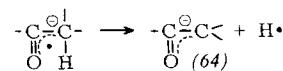
und aromatischen Kernen aufweisen; das Radikalion (61) ist indessen wenig stabil.

Diphenylsulfon gibt in 1,2-Dimethoxyäthan mit Kalium blaue, selbst bei -70°C instabile Lösungen, liefert aber ein EPR-Spektrum^[177]. Es ist somit zu folgern, daß Alkalimetalle mit DMSO das „Dimsyl“-Anion (62)^[178] bilden, das Radikalion (63) aber außerordentlich instabil ist.



- [177] E.T. Kaiser et al., J. Amer. chem. Soc. 88, 1037 (1966).
 - [178] A. Lewith u. N. McFarlane, Proc. chem. Soc. (London) 1964, 108.
 - [179] J.P. Pascault u. J. Golé, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci., Sér. C 264, 115 (1967).
 - [180] H.W. Sternberg, R.E. Markby, I. Wender u. D.M. Mohilner, J. Amer. chem. Soc. 89, 186 (1967).
 - [181] R. Goutarel et al., Bull. Soc. chim. France 1962, 646.

In gleicher Weise müssten Carbonsäureamide mit α -ständigen Wasserstoffatomen (z.B. Dimethylacetamid und *N*-Methylpyrrolidon) sowie enolisierbare Ketone mit Alkalimetallen Enolationen (64) liefern.



Für die Stabilität der Radikalionen ergibt sich die Folge $\text{HMPT}^\ominus > \text{TMU}^\ominus > \text{DMSO}^\ominus$; dies erklärt, weshalb unter allen bisher bekannten polaren aprototischen Lösungsmitteln lediglich HMPT für Synthesen mit gelösten reaktiven Metallen zu gebrauchen ist.

Eingegangen am 9. März 1967, ergänzt am 8. September 1967 [A 599]

- [182] R. Goutarel et al., Bull. Soc. chim. France 1967, 2100.
 [183] H. Normant, unveröffentlicht.
 [184] J. F. Brault u. H. Normant, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 264, 707 (1967).

Struktur und Wirkungsweise des aktiven Zentrums der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase

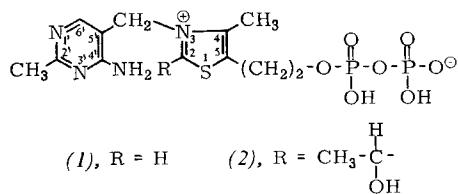
VON A. SCHELLENBERGER [**]

Dem Andenken an Professor W. Langenbeck gewidmet

Kinetische Untersuchungen haben ergeben, daß die beiden niedermolekularen Komponenten der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase (Thiaminpyrophosphat und Mg^{2+} -Ionen) sich zunächst schnell und reversibel in vorgelagerten Binärgleichgewichten an das Apoenzym anlagern. Anschließend „cyclisiert“ dieses Addukt in geschwindigkeitsbestimmender und praktisch irreversibler Reaktion zum thermodynamisch stabilen Holoenzym. – Aus diesen Ergebnissen – ergänzt und erweitert durch Prüfung zahlreicher Analoger des Thiaminpyrophosphats im Enzymversuch – werden Vorstellungen über den Ablauf der Enzymreaktion entwickelt.

Einleitung

1961 gelang Holzer und Mitarbeitern^[1,2] der Nachweis, daß der enzymatische Abbau des Pyruvats durch die Hefe-Pyruvat-Decarboxylase über ein Kondensationsprodukt zwischen dem als Coenzym fungierenden Thiaminpyrophosphat (TPP) (1) und Acetaldehyd verläuft. Diese relativ stabile Zwischenverbindung wurde als „aktiver Acetaldehyd“ (2) bezeichnet.



Damit schien es gerechtfertigt, die von *Ugai*^[3], *Mizuhara*^[4], *Breslow*^[5] und *Sykes*^[6] an Thiazolium-Modellen eingehend studierte katalytische Decarboxylierung der α -Ketosäuren (Schema 1) in ihren wesentlichen Teilen auf die Wirkungsweise des Enzyms zu übertragen.

Das Kernproblem der Wirkungsweise der Pyruvat-Decarboxylase (PDC) schien damit zwar gelöst, doch blieben noch einige Fragen offen:

1. Warum wird „aktiver Acetaldehyd“, wenn man ihn dem Enzym anstelle von Pyruvat anbietet, um vier Zehnerpotenzen langsamer umgesetzt als das Pyruvat selbst [2]?
2. Warum bildet sich nach den in Schema 1 dargestellten Modellreaktionen kein Acetaldehyd [4]?
3. Hat der Pyrimidinanteil des Thiaminpyrophosphat-Moleküls eine Funktion und gegebenenfalls welche?

[*] Prof. Dr. A. Schellenberger
Institut für Biochemie (Chemische Abteilung) der Universität
DDR 402 Halle/S., Weinbergweg

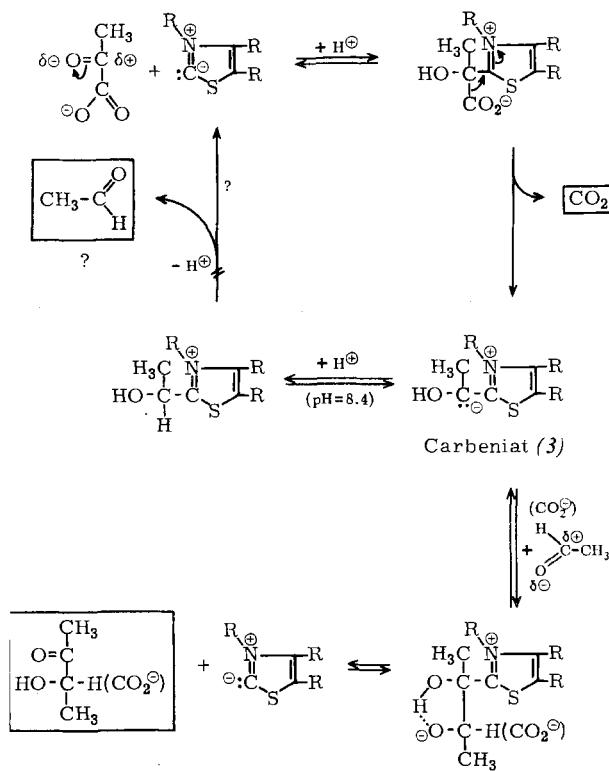
[1] H. Holzer u. K. Beaumamp, Angew. Chem. 71, 776 (1959).
 [2] H. Holzer u. K. Beaumamp, Biochim. biophysica Acta 46, 225 (1961); siehe auch H. Holzer, Angew. Chem. 73, 721 (1961); H.-W. Goedde, B. Ulrich, C. Stahlmann u. H. Holzer, Biochem. Z. 343, 204 (1965).

[3] T. Ugai, S. Tanaka u. S. Dokawa, J. pharm. Soc. Japan 63, 296 (1943).

[4] S. Mizuhara, R. Tamura u. H. Arata, Proc. Japan Akad. 27, 302 (1951); S. Mizuhara u. P. Handler, J. Amer. chem. Soc. 76, 571 (1954).

[5] R. Breslow, Chem. and Ind. 1957, 893; J. Amer. chem. Soc. 80, 3719 (1958).

[6] E. Downes u. P. Sykes, Chem. and Ind. 1957, 1095.

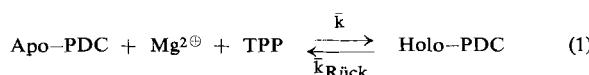


Schema 1. Decarboxylierung von α -Ketosäuren an Thiazolium-Modellen bei pH = 8,4.

4. Wie kann die Hemmung der PDC durch das Reaktionsprodukt – obwohl die Decarboxylierung der α -Ketosäuren thermodynamisch praktisch irreversibel ist – erklärt werden?

Ein sorgfältiges Studium dieser Fragen war nur mit neuen Arbeitsmethoden möglich.

Dabei war es vor allem erforderlich, anhand der kinetischen Parameter der Rekombination (d.h. der Resynthese des Holoenzymes aus seinen Bestandteilen Apo-PDC, Metallion und Thiaminpyrophosphat (TPP) entsprechend Gl. (1))



mathematisch formulierbare Aussagen über den Bildungsmechanismus des Holoenzym-Komplexes zu gewinnen.

Weiterhin galt es, die Funktion des Coenzyms nunmehr an Modellen zu studieren, deren Struktur mit der des TPP weitgehend übereinstimmt. Die Versuche ergaben, daß der Reaktionsablauf am Enzym wesentlich komplizierter ist als bisher angenommen wurde.

I. Kinetik der Enzym-Rekombination

Bereits 1944 wiesen Steyn-Parvé und Westenbrink [7] in einer ausführlichen Studie zur Spaltung und Resynthese von PDC auf einige Besonderheiten hin, deren Gültigkeit wir erneut bestätigen konnten und die für das Verständnis der Coenzym-Apoenzym-Bindungen von allgemeiner Bedeutung sind.

[7] E. Steyn-Parvé u. H. G. K. Westenbrink, Z. Naturforsch. 15, 1 (1944).

Steyn-Parvé und Westenbrink bewiesen die Identität von synthetisierter und nativer PDC und fanden, daß das Enzym gemäß Gl. (1) bei pH = 8 innerhalb weniger Minuten und ohne erhebliche Schädigung der Proteinkomponente in seine Bestandteile gespalten wird. Die Resynthese hat bei pH = 6,8 ein scharfes Optimum (Stabilitäts optimum), während das Optimum der pH-Aktivitätskurve bei pH = 5,6 liegt.

Wichtig war hierbei die Feststellung, daß bei Vereinigung der ursprünglich in der Hefe vorhandenen TPP-Menge unter optimalen Bedingungen mit der alkalisch ausgewaschenen (vom Coenzym befreiten) Hefe nur ein sehr geringer Teil wieder an das Apoenzym gebunden wird, „...obgleich die Carboxylase (PDC) ein undissoziiertes Enzym ist...“ und daß die Resynthese selbst bei Zugabe eines größeren Überschusses an TPP nicht wieder vollständig verläuft. Die Autoren folgerten: „Durch Dissoziation bzw. Synthese werden also verschiedene Endzustände erreicht“ (wobei eine irreversible Schädigung des Apoenzyms ausgeschlossen werden konnte) und stellten schließlich fest: „Aber warum vereinigt sich potentiell aktive Apo-PDC nicht mit dem in genügender Menge vorhandenen TPP? Das ist das große Rätsel der Resynthese, das noch nicht gelöst werden konnte.“

Dieses „Rätsel“, das wir mit „Quasi-Irreversibilität“ [8] der Bindungen zwischen Co- und Apoenzym bezeichnet haben, läßt sich durch folgendes Experiment sehr einfach demonstrieren (vgl. auch [9]):

Nach Ullrich, Wittorf und Gubler [10] beträgt das Molekulargewicht von hochgereinigten PDC-Präparaten etwa 175000. In dieses Proteinmolekül sind 3–4 TPP-Moleküle und die gleiche Anzahl Metallionen eingebaut. Ein aus stöchiometrischen Mengen Apo-PDC, TPP und Mg²⁺ zusammengesetztes Gemisch rekombiniert auch unter optimalen pH-Bedingungen in 3–4 Std. nicht. Läßt man dagegen TPP und Mg²⁺ in erheblichem Überschuß auf gereinigte Apo-PDC einwirken, so erfolgt innerhalb von 3–4 min vollständige Rekombination, wobei man unter günstigen Bedingungen ein Enzym mit praktisch der ursprünglichen Aktivität erhalten kann.

Nach diesem Ergebnis sollte man erwarten, daß das Holoenzym nach Abtrennung der überschüssigen niedermolekularen Bestandteile (TPP und Mg²⁺) wieder in seine Komponenten zerfällt. Das reine Holoenzym läßt sich aus den Rekombinationsansätzen durch Filtration über ein Molekulsieb (Sephadex G 25) leicht von den niedermolekularen Komponenten (TPP und Mg²⁺-Ionen) abtrennen. Es zeigt keine durch Dissoziation bedingte Aktivitätsabnahme [8] (Sephadex-Test).

1. Rekombinations- und Stationärphase

Die Menge des bei der Rekombination aus den Komponenten entstehenden Holoenzymes kann im optischen Test [11] schnell und quantitativ durch ihre katalytische Aktivität erfaßt werden. Der bei der Reaktion gebildete Acetaldehyd wird hierbei in Gegenwart von Alkohol-Dehydrogenase (ADH) als Hilfsenzym mit

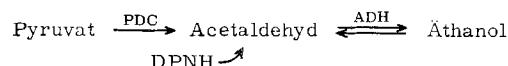
[8] A. Schellenberger, K. Winter, G. Hübner, R. Schwaiberger, D. Helbig, S. Schumacher, R. Thiemer, G. Bouillon u. K.-P. Rädler, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 346, 123 (1966).

[9] A. V. Morey u. E. Juni, Bacteriolog. Proc. 1965, 86 (P 78).

[10] J. Ullrich, J. H. Wittorf u. C. J. Gubler, Biochim. biophysica Acta 113, 595 (1966).

[11] E. Holzer, H.-D. Söling, H.-W. Goedde u. H. Holzer in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962, S. 602 ff.

reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (DPNH) zu Äthanol reduziert und der DPNH-Verbrauch bei 366 nm gemessen.



Durch Anwendung eines großen Überschusses an Hilfsenzym und Reduktionsmittel (DPNH) werden der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in den PDC-Teil der Enzymkette verlagert und Rückwirkungen des Reaktionsproduktes auf die PDC verhindert.

Die in Abhängigkeit von der Zeit gemessenen Extinktionswerte (Abb. 1) lassen zwei charakteristische Phasen erkennen^[8]. In der ersten Phase nimmt die katalytische Aktivität kontinuierlich zu (gekrümpter Teil der Kurven, Rekombinationsphase). In der zweiten Phase (geradliniger Teil, Stationärphase) ist die konstante Endgeschwindigkeit des Rekombinationsansatzes erreicht; die Rekombination zum Holoenzym ist praktisch abgeschlossen.

Die Dauer der Rekombinationsphase ist von der Art des in den Enzymkomplex eingebauten Metallions abhängig. Die Zunahme der Rekombinationsgeschwindigkeiten $\text{Mg} < \text{Co} < \text{Mn} < \text{Ca}$ entspricht der von *Eigen* und *Hammes*^[12] aufgestellten Reihenfolge zunehmender Komplexbildungsgeschwindigkeiten.

Tabelle 1. Einfluß des Metallions und struktureller Veränderungen am Coenzym auf die Stabilität des PDC-Komplexes. Die Rekombinationsansätze wurden nach 5 min Inkubationszeit auf einer Sephadex-G 25-Säule getrennt (experimentelle Einzelheiten siehe [13]).

| Coenzym oder Analoges (Pyrophosphat) | Metallion M^{2+} | proz. Beladung des Apoenzyms mit Coenzym oder Analogen nach Sephadex-Filtration bezogen auf TPP = 100 % | Lit. |
|--|------------------------------|---|------|
| Thiamin | Mg | 100 | [13] |
| Thiamin | Ca | 0 | [8] |
| Thiamin | — | 0 | |
| 4'-Hydroxy-4'-desamino-T [a] (Hydroxy-T) | Mg | 100 | [13] |
| Hydroxy-T-N-Methyl-T | — | 6 | [13] |
| N-Methyl-T | Mg | 1 | [13] |
| 2-Methyl-T | Mg | 1 | [8] |
| 2-(1-Hydroxyäthyl)-T | Mg | 16 [b] | [8] |
| 4-Nor-T | Mg | 4 | [14] |
| 6'-Methyl-4-nor-T | Mg | 100 | [14] |
| 6'-Methyl-T | Mg | 44 | [13] |
| 6'-Methyl-4'-hydroxy-4'-desamino-T | Mg | 26 | [13] |
| N-1-Pyridin-Analoges | Mg | 6 | [15] |
| Pyrithiamin [c] | Mg | 3 | [13] |
| 2'-Äthyl-2'-nor-T | Mg | > 90 | [8] |
| 4-Äthyl-4-nor-T | Mg | > 90 | [8] |

[a] T = Thiamin.

[b] Die noch vorhandene Aktivität ist auf Verunreinigungen mit TPP zurückzuführen.

[c] 2-Methyl-1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl-methyl)-3-(2-hydroxy-äthyl)pyridiniumchlorid.

[12] *M. Eigen u. G. Hammes*, Advances in Enzymol. 25, 1 (1963).

[13] *A. Schellenberger, V. Müller, K. Winter u. G. Hübner*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 344, 244 (1966).

[14] *A. Schellenberger, I. Heinroth u. G. Hübner*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 506 (1967).

[15] *A. Schellenberger, K. Wendler, P. Creutzburg u. G. Hübner*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 501 (1967).

Dagegen ist die stationäre Aktivität des Enzyms vom Metallion unabhängig, wie die Parallelität der geradlinigen Kurvenabschnitte $(\text{dE}/\text{dt})_{\max}$ beweist. Das im Holoenzym fixierte Metallion hat demnach keinen Einfluß auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Enzymreaktion.

Andererseits bestimmt das Metallion die Stabilität des Holoenzym-Komplexes. Der Ca-PDC-Komplex zerfällt trotz gleicher katalytischer Aktivität bei der Filtration über Sephadex G 25 vollständig in seine Komponenten^[8], während der Mg-PDC-Komplex nicht gespalten wird (Tabelle 1). Bildungsgeschwindigkeit und Stabilität des Holoenzym-Komplexes sind demnach voneinander unabhängige Größen. Sie gehorchen den Gesetzmäßigkeiten der Komplexchemie, sind aber ohne Einfluß auf die katalytische Aktivität der PDC.

2. Rekombinationskinetik und geschwindigkeitsbestimmender Schritt

Für die folgenden Untersuchungen verwendeten wir wegen der meßtechnisch günstigen Rekombinationsgeschwindigkeit Mg^{2+} -Ionen.

Aus dem Anstieg der Extinktions-Zeit-Kurven (Abb. 1) läßt sich der Anteil an freiem Apoenzym (Apo-PDC_f) zur Zeit t berechnen. Am Beispiel der Mg^{2+} -Kurve kann man sehen, daß für $(\text{dE}/\text{dt}) = 0$ die Konzentration an Apo-PDC_f gleich der Ausgangskonzentration ist, während bei $(\text{dE}/\text{dt})_{\max}$ (Stationärgeschwindigkeit) praktisch kein freies Apoenzym vorliegt. Die Differenz des Anstieges zur Zeit t zum maximalen Anstieg

$$(\text{dE}/\text{dt})_{\max} - (\text{dE}/\text{dt})_t = C [\text{Apo-PDC}_f]_t$$

ist der Konzentration an freiem Apoenzym zur Zeit t proportional.

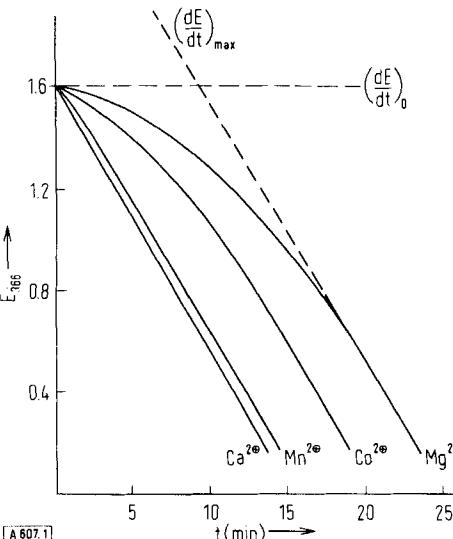


Abb. 1. Einfluß von Metallionen auf Rekombinations- und Stationärgeschwindigkeit von PDC bei $\text{pH} = 6.6$ (Einzelheiten siehe [8]).

Bei konstanter TPP-, Mg^{2+} - und Pyruvat-Konzentration, was durch den erheblichen Überschuß aller drei Komponenten gegenüber dem Apoenzym im allgemeinen stets erfüllt ist, verläuft die Rekombination des

Enzyme in Bezug auf das Apo-PDC_f nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung^[7, 16]. Für diesen Fall lautet die Geschwindigkeitsgleichung der Rekombination

$$v = - \frac{d[Apo-PDC_f]}{dt} = - \frac{d((dE/dt)_{max} - (dE/dt)_0)}{dt} = \bar{k} [Apo-PDC_f] \quad (2)$$

wobei k bei konstantem pH und konstanter Temperatur eine Funktion der TPP-, Mg^{2+} - und Pyruvat-Konzentration ist:

$$\bar{k} = f([TPP], [Mg^{2+}], [Pyruvate])$$

Ändert man unter Konstanthaltung der Mg^{2+} - und Pyruvatkonzentration die TPP-Konzentration, so ergibt sich aus den entsprechenden $\lg((dE/dt)_{\max} - (dE/dt_t))$ /Zeit-Kurven k' als Funktion der TPP-Konzentration:

$$\bar{k}_{[\text{Mg}^{2+}], [\text{Pyruvat}]} = f([\text{TPP}]) = k'$$

Beim Auftragen von k' gegen die TPP-Konzentration erhält man Kurven, wie sie in Abbildung 2a für zwei Mg-Konzentrationen dargestellt sind.

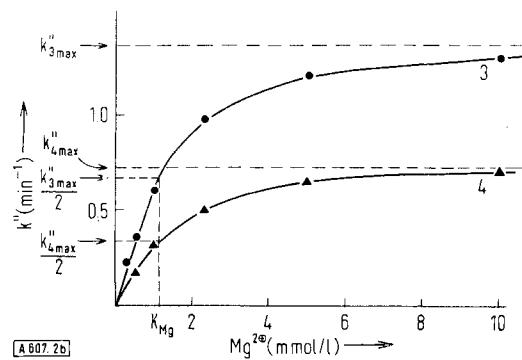
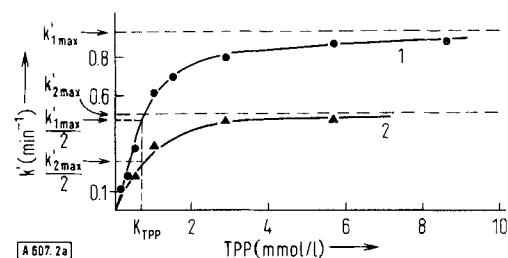


Abb. 2. Abhängigkeit der Rekombinationsgeschwindigkeitskonstanten von der TPP-(k' , Abb. 2a) und Mg-Konzentration (k'' , Abb. 2b) bei pH = 6,15.

Konzentrationen: $Mg^{2+} = 1 \text{ mM}$ (Kurve 1), $0,5 \text{ mM}$ (Kurve 2); TPP = 1 mM (Kurve 3), $0,5 \text{ mM}$ (Kurve 4); Pyruvat = $34,3 \text{ mM}$.

Das Charakteristische ist, daß die Rekombinationsgeschwindigkeit mit steigender TPP-Konzentration bis zu einem Wert ansteigt, bei dem alle TPP-Bindungsorte am Apoenzym abgesättigt sind. Diejenige TPP-Konzentration, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht wird, ist unter der Voraussetzung, daß die Bildungsgeschwindigkeitskonstante

[16] A. Schellenberger u. G. Hübner, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 491 (1967).

des Apo-PDC-TPP-Binärkomplexes wesentlich größer als k' ist, nach der Michaelis-Menten-Beziehung gleich K_{TPP} , der Zerfallskonstante des Apo-PDC-TPP-Binärkomplexes. Der Wert von K_{TPP} ($0,65 \cdot 10^{-3}$) ist unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration (Abb. 2a).

Durch Änderung der Mg^{2+} -Konzentration bei konstanter TPP- und Pyruvat-Konzentration

$$\bar{k}_{[\text{TPP}], [\text{Pyruvat}]} = f([\text{Mg}^{2+}]) = k''$$

erhält man nach dem gleichen Verfahren die Zerfallskonstante des Apo-PDC-Mg²⁺-Binärkomplexes ($K_{Mg} = 1,13 \cdot 10^{-3}$) als von der TPP-Konzentration unabhängige Größe (Abb. 2b).

Die beiden primären Schritte bei der Rekombination, die Anlagerung von TPP und von Mg^{2+} an das aktive Zentrum des Apoenzyms, beeinflussen sich somit gegenseitig nicht.

Die Abhangigkeit der Rekombinationsgeschwindigkeitskonstanten \bar{k} von der Pyruvatkonzentration

$$\bar{k}_{[\text{TPP}], [\text{Mg}^{2+}]} = f([\text{Pyruvate}]) = k'''$$

zeigt Abbildung 3.

Einem in Abwesenheit von Substrat gestarteten Rekombinationsansatz wurde das Substrat erst nach den in Abbildung 3 eingetragenen Zeiten zugesetzt. Aus den nach der Pyruvat-Zugabe erhaltenen, parallelen Kurven wurden durch Extrapolation auf den Zeitpunkt der Pyruvatzugabe die mit x gekennzeichneten $\lg((dE/dt)_{\max} - (dE/dt)_0)$ -Werte errechnet. Die resultierende Gerade entspricht der Rekombinationsgeschwindigkeit des Enzyms in Abwesenheit von Substrat. Aus ihrer Steigung kann man die Rekombinationsgeschwindigkeitskonstante bei der Pyruvat-Konzentration = 0 zu $4,36 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ berechnen.

Die aus den ausgezogenen Linien (Konzentration an Pyruvat = $3,43 \cdot 10^{-2}$ M) erhaltene Geschwindigkeitskonstante $k''' = 5,25 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ ist um eine Zehnerpotenz größer.

Durch Änderung der Pyruvatkonzentration bei konstanter TPP- und Mg^{2+} -Konzentration und Vergleich der erhaltenen Kurven mit der Pyruvatabhängigkeit der Enzymaktivität (Stationärgeschwindigkeit) ließ sich folgendes feststellen^[16]:

1. Es existiert kein vorgelagertes Substratbeladungsgleichgewicht, das die Rekombination und den Stationärprozeß gleichzeitig kontrolliert.
 2. Die beiden Primärgleichgewichte zwischen TPP bzw. Mg^{2+} und Apo-PDC sind unabhängig von der Substrat-Konzentration.

Nach den unabhängig voneinander und relativ schnell ablaufenden Anlagerungen von TPP bzw. Mg^{2+} an das Apoenzym bildet sich in geschwindigkeitsbestim-

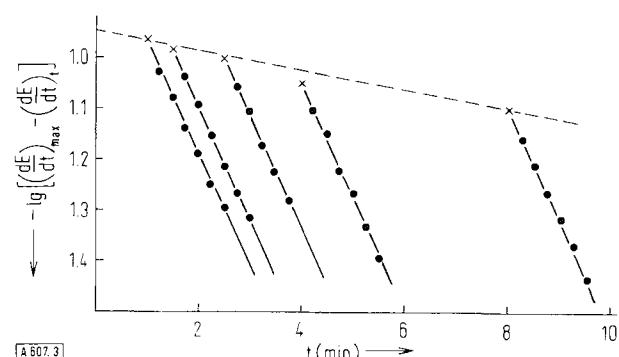


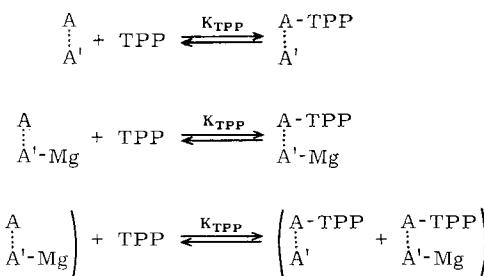
Abb. 3. $\lg((dE/dt)_{\text{max}} - (dE/dt)_t)/\text{Zeit-Kurven der Rekombination von PDC nach zeitlich verzögter Pyruvatzugabe. Temperatur } 25^\circ\text{C, pH} = 6,15$ [16].

mender Reaktion (\bar{k}) der thermodynamisch stabile („Quasi-Irreversibilität“) Holoenzym-Komplex.

Mit der bereits beschriebenen Sephadex-Methode ließ sich nicht nur zeigen, daß für die stabile Verknüpfung von Apo-PDC mit TPP Mg^{2+} -Ionen erforderlich sind (Tabelle 1), sondern daß auch eine feste Verbindung von Mg^{2+} -Ionen mit dem Apoenzym nur in Gegenwart von TPP erfolgt^[16]. Da auch zwischen TPP und Mg^{2+} keine stabilen Komplexbindungen nachgewiesen werden konnten, ist die Bildung des thermodynamisch stabilen Holoenzym-Komplexes [*] nur unter gleichzeitiger Beteiligung aller drei Komponenten möglich.

Damit läßt sich die „Quasi-Irreversibilität“ der Holoenzym-Bildung als ein kinetisch kontrolliertes Gleichgewicht zwischen dem „cyclisierungsfähigen“ Ternärkomplex und dem cyclisierten („eingerasteten“) Holo-

Die aus Abbildung 2 abgeleitete Bedingung, daß K_{Mg} und K_{TPP} sich gegenseitig nicht beeinflussen, läßt sich über die folgenden Gleichgewichte in die Ableitung einführen:



Analoge Ansätze ergeben sich für K_{Mg} . Aus den resultierenden Massenwirkungs-Gleichungen kann man unter der Voraussetzung, daß $[TPP] \gg [Mg] \gg$

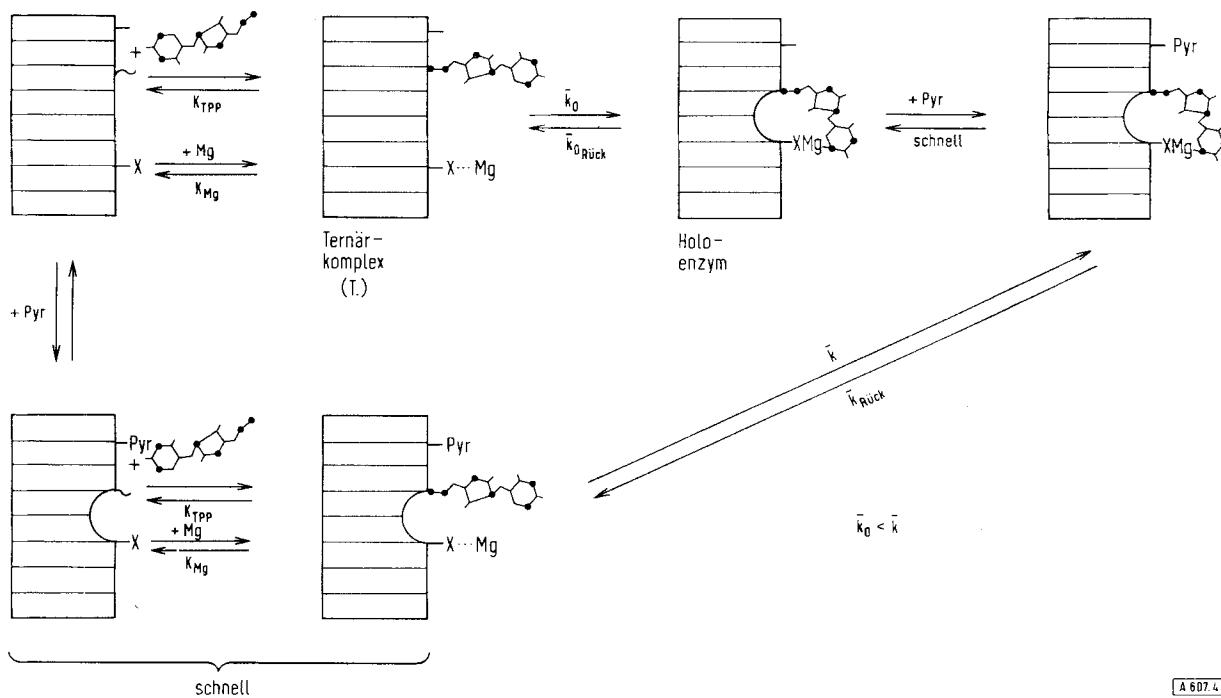


Abb. 4. Rekombinationsschema der PDC (aktives Zentrum) in Ab- und Anwesenheit von Substrat. —X: Bindungsort des Metallions; ~: Bindungszentrum (basisch) zur Fixierung des Pyrophosphatrestes von TPP; —: Ort der Substratbindung (SH); $k_0/k_0\text{Rück}$: Rekombination in Abwesenheit von Pyruvat (Pyr).

enzym-Komplex erklären (Abb. 4). Die Konzentration des Ternärkomplexes wird über die beiden Primärgleichgewichte (K_{TPP} und K_{Mg}) geregelt.

3. Formeln zur Rekombinationskinetik^[16]

Die Rekombinationsgeschwindigkeit, also die zeitliche Abnahme an Apo-PDC_f ($\frac{d}{dt} \left[\begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A' \end{array} \right]$) ist der Konzentration an „cyclisierungsfähigem“ Ternärprodukt $\begin{array}{c} A-TPP \\ \vdots \\ A'-Mg \end{array}$ (T.) proportional (Gl. (3)).

$$v = - \frac{d}{dt} \left[\begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A' \end{array} \right] = \bar{k} \left[\begin{array}{c} A-TPP \\ \vdots \\ A'-Mg \end{array} \right] \equiv \bar{k} [T.] ; \begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A' \end{array} \equiv \text{Apo-PDC}_f \quad (3)$$

[*] Die von Juni [9] beschriebene Stabilität des Holoenzymes gegenüber Äthylendiamin-tetraessigsäure konnten wir bestätigen [16].

[Apo-PDC_f] ist, [T.] berechnen und mit der bekannten Menge an eingesetztem Apoenzym

$$\left[\begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A' \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A'_0 \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} A-TPP \\ \vdots \\ A' \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A'-Mg \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} A-TPP \\ \vdots \\ A'-Mg \end{array} \right]$$

in Beziehung bringen. Man erhält

$$[T.] = \left[\begin{array}{c} A \\ \vdots \\ A'_0 \end{array} \right] \cdot \frac{[TPP]}{K_{TPP} + [TPP]} \cdot \frac{[Mg]}{K_{Mg} + [Mg]}$$

[T.] in Gl. (3) eingesetzt liefert die gesuchte Geschwindigkeitsgleichung für die Enzym-Rekombination [*].

[*] Im Prinzip gilt diese Gleichung für alle Umsetzungen, bei denen ein Makro-Molekül an zwei Stellen, die sich gegenseitig (induktiv und sterisch) nicht beeinflussen, mit zwei verschiedenen Substraten reagiert, wobei sich die angelagerten Reste anschließend in geschwindigkeitsbestimmender Reaktion miteinander umsetzen.

$$v = \bar{k} \begin{bmatrix} A \\ A_0 \end{bmatrix} \cdot \frac{[TPP]}{K_{TPP} + [TPP]} \cdot \frac{[Mg]}{K_{Mg} + [Mg]} \quad (4)$$

Da die beiden letzten Glieder dieser Gleichung nur die Werte ≤ 1 annehmen können, erhält man die Maximalgeschwindigkeit der Rekombination,

$$v_{\max} = \bar{k} [Apo-PDC_f] \cdot f$$

$f = 1$, wenn die Konzentrationen an TPP und Mg^{2+} die Größenordnung der beiden Konstanten K_{TPP} und K_{Mg} ($\approx 10^{-3}$) wesentlich übersteigen.

Unter physiologischen Bedingungen liegt zwar die Mg^{2+} -Konzentration etwa in der Größenordnung von K_{Mg} , die TPP-Konzentration aber, falls es nicht Bereiche mit stark angereichertem TPP-Gehalt gibt, wesentlich niedriger ($\approx 10^{-5}$ M). Damit vermindert sich v_{\max} mindestens um den Faktor $f \approx 10^{-3}$. Man sollte daher annehmen, daß TPP und Mg^{2+} in das Enzym bereits während des Aufbaus der Eiweiß-Komponente an den Ribosomen eingebaut werden. Der Versuch, das Holoenzym aus einem Ansatz zu isolieren, der sich nach Gl. (1) aus äquivalenten Mengen von Apo-PDC, Metallion und TPP zusammensetzt, muß trotz der hohen thermodynamischen Stabilität des Holoenzymes an der Größenordnung von f ($\approx 10^{-8}$) scheitern. Damit liefert Gl. (4) die mathematische Erklärung für das „Quasi-Irreversibilitäts-Rätsel“.

II. Wirkungsweise des Enzyms

1. Modellversuche

Bei der Untersuchung der Wirkungsweise von Enzymen liefern Modellstudien wegen der meist unbekannten Natur der Proteinkomponente auch heute noch wichtige Beiträge zur Bestimmung kinetischer und

Andererseits ist es oft schwer zu entscheiden, ob Modellversuche auf den Vorgang am Enzym übertragen werden dürfen. Primäre Amine können z.B. eine katalytische Decarboxylierung der α -Ketosäuren bewirken, so daß Langenbeck diese lange Zeit für Decarboxylase-Modelle („Decarboxylatoren“) hielt^[18]. Nicht zuletzt durch die eigenen Arbeiten von Langenbeck und seinen Schülern mußte schließlich aber festgestellt werden, daß weder die elektronische Situation der Aminogruppe des Thiamins^[19] noch das chemische Verhalten der als Intermediär-Produkte nachgewiesenen α -Iminosäuren Parallelvorstellungen zum Enzymvorgang zuließen^[20].

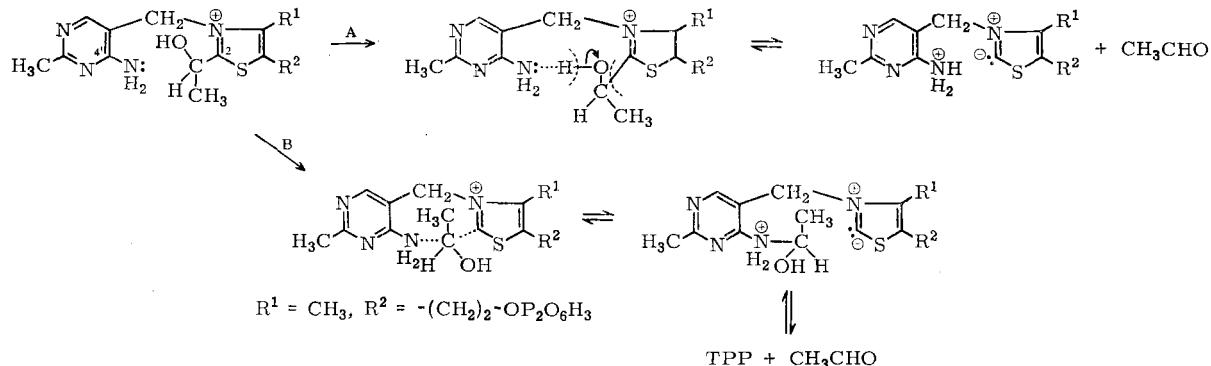
1951 erkannte Ugai^[3], daß auch Thiazoliumsalze α -Ketosäuren decarboxylieren können. Der von Breslow^[5] aufgestellte Mechanismus (Schema 1) enthält bereits wesentliche Elemente des Vorgangs am Enzym, jedoch unterscheiden sich die im Modell- und im Enzymtest erhaltenen Ergebnisse nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ (Tabelle 2).

Tabelle 2. Vergleich der katalytischen Aktivität von Thiamin und Thiaminanalogen im Modeltest nach Mizuhara (s. Schema 1) [4] mit der coenzymatischen Aktivität der entsprechenden Pyrophosphorsäureester [13, 21].

| Verbindung | Katalytische Aktivität im Modeltest. Acetoinbildung in % aus Acetaldehyd | Coenzymatische Aktivität der Pyrophosphorsäureester in % |
|------------------------------|--|--|
| Thiamin (T) | 100 | 100 |
| N-Methyl-T | 165 | 0 |
| N,N-Dimethyl-T | 281 | 0 |
| 4'-Hydroxy- 4'-desamino-T | 65 | 0 |
| 6'-Methyl-T | — | 18 [22] |
| 2-Methyl-T | 0 | 0 |

Nur das am gemeinsamen Reaktionszentrum blockierte 2-Methyl-thiamin liefert eine einheitliche Aussage.

Eine weitere Annäherung der Reaktionen der Modell-Katalysatoren an den Enzymvorgang wurde erreicht,



Schema 2. Erweiterte Modellvorstellungen über die Decarboxylierung von α -Ketosäuren. Weg A: allgemeine Basenkatalyse, Weg B: S_N2 -Reaktion.

thermodynamischer Parameter. Dabei kann man sich einerseits auf sehr einfache, chemisch leicht charakterisierbare Modelle beschränken, wie es im wesentlichen Langenbeck und seine Schüler getan haben. An derartigen Modellen gelang 1933 die grundlegende Entdeckung, daß sich Substrat und Katalysator auch über Covalenzbindungen umsetzen können^[17].

[17] W. Langenbeck, Ergebni. Enzymforsch. 2, 314 (1933).

[18] W. Langenbeck u. R. Hutschenreuter, Z. anorg. Chem. 188, 1 (1930).

[19] A. Schellenberger, Diplomarbeit, Universität Halle/Saale 1952; K. G. Stern u. J. L. Melnick, J. biol. Chemistry 131, 615 (1939).

[20] A. Schellenberger, G. Osske u. W. Rödel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 149 (1962).

[21] V. Müller, Dissertation, Universität Halle/S. 1966.

[22] J. Biggs u. P. Sykes, J. chem. Soc. (London) 1961, 2595.

als es gelang, durch Zugabe organischer Basen wie Alkoholat, Imidazol, 2-Aminopyridin und 4-Amino-2-methyl-5-hydroxymethyl-pyrimidin zu den Thiazolium-katalysatoren den Pyrimidinteil des TPP-Moleküls zu imitieren^[13]. Diese Systeme bildeten als erste Enzymmodelle Acetaldehyd in nachweisbaren Mengen. Die Versuche führten uns zu der Annahme, daß der am Modell als allgemeine Basenkatalyse oder als S_N-Mechanismus^[13] zu formulierende Vorgang der Aldehydabspaltung (Schema 2) bei der Pyruvat-Decarboxylase unter bestimmten sterischen Voraussetzungen, auf die wir in Abschnitt II.4. eingehen werden, intramolekular erfolgt.

Zur Stützung dieser Vorstellungen mußten die Modellkatalysatoren dem TPP-Molekül noch weiter angenähert werden. Die verwendeten Verbindungen unterschieden sich schließlich nur noch in einzelnen Bereichen vom natürlichen Vorbild. Wenn die Anordnung der bindenden Gruppen der Modelle dann noch den spezifischen Gegebenheiten der Apo-PDC-Komponente entspricht, kann man die Modelle enzymatisch, d. h. unter „physiologischen Bedingungen“ (pH, Medium, Konzentration, Temperatur u.a.) prüfen.

2. TPP-Analoge als „Coenzym-Modelle“

Die Untersuchungen an TPP-Analogen ergaben, daß einige Bereiche des Coenzymes verändert werden können, ohne daß die coenzymatische Aktivität verloren geht. Andere Stellen sind dagegen in hohem Maße konstitutionsspezifisch. Durch systematisches Variieren des TPP-Moleküls lassen sich mit dieser Methode Bindungsverhältnisse und Wirkungsweise studieren, vorausgesetzt, daß zuverlässige und aussagekräftige Methoden zur Charakterisierung der Analogen zur Verfügung stehen.

Als solche haben sich bei der PDC bewährt:

1. Der Aktivitätstest: Das Analogon wird bei der Rekombination anstelle von TPP angeboten. Falls es in das Apoenzym eingebaut wird, erhält man Aussagen über die coenzymatische Aktivität des Analogen. Inaktivität in diesem Test kann zwei Ursachen haben: Das Analogon wird vom Apoenzym nicht funktionsfähig gebunden, oder der Reaktionsablauf am Analogon ist gestört.

2. Der Simultantest^[23]: Überschüssiges TPP und Analogon konkurrieren im Molverhältnis 1:1 um die Bindungszentren am Apoenzym. Dabei würden coenzymatisch inaktive Analogen, deren Bindung zum Apoenzym in Gegenwart von Metallionen irreversibel ist und deren Rekombination ebenso schnell wie die Rekombination mit TPP verläuft, die Aktivität des Rekombinationsansatzes um die Hälfte herabsetzen. Bei fehlender „Affinität“ des Analogen zum aktiven Zentrum würde sich das Apoenzym vollständig mit TPP beladen und volle Enzymaktivität bewirken.

3. Der Sephadex-Siebtest^[13]: Wie der Simultantest liefert diese Methode (Tabelle 1) Hinweise auf die Stabilität der Bindungen im Holoenzym. Hier wird jedoch – im Gegensatz zum Simultantest – der Zerfall des thermodynamisch mehr oder weniger stabilen Holoenzymanalogen-Komplexes registriert. Die mit diesem Verfahren erhaltenen Werte sind eindeutiger (sie gehorchen im Prinzip nur einem Gleichgewicht ($k'/k''_{\text{rück}}$ ^[*])) als die im Simultantest durch Konkurrenz mehrerer Gleichgewichte ($K_{\text{TPP}}, K_{\text{TPP}'}; k/k_{\text{rück}}$ und $k'/k''_{\text{rück}}$) erhaltenen.

[23] A. Schellenberger u. K. Winter, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 344, 16 (1966); 322, 164 (1960).

[*] Die apostrophierten Konstanten gehören zu den Coenzym-Analogen.

renz mehrerer Gleichgewichte ($K_{\text{TPP}}, K_{\text{TPP}'}; k/k_{\text{rück}}$ und $k'/k''_{\text{rück}}$) erhaltenen.

4. Untersuchungen mit [1-¹⁴C]- und [2-¹⁴C]-markiertem Pyruvat^[13]: Durch vergleichende Kurzzeitexperimente mit unterschiedlich markiertem Substrat kann man in Anlehnung an die von Holzer^[1] beschriebene Methode die Fähigkeit der Analogen zur Decarboxylierung und Aldehydablösung getrennt bestimmen (z.B. Abb. 5).

Tabelle 3. Coenzymatische Aktivität und Inhibitorwirkung (Simultantest) von TPP-Analogen (experimentelle Einzelheiten siehe [23]).

| Coenzym oder Analogon (Pyrophosphate) | Coenzym- aktivität (Sättigungs- werte) (%) | Verminderung der Enzymak- tivität im Si- multantest (%) | Lit. |
|--|---|--|---------|
| Thiamin | 100 | — | |
| 4'-Hydroxy-4'- desamino-T [a] | 0 | 52 ± 7 | [13] |
| N-Methyl-T | 0 | 25 ± 3 | [13,23] |
| N,N-Dimethyl-T | 0 | 22 ± 3 | [23] |
| Desamino-T | 0 | 30 ± 5 | [24,13] |
| 2-Methyl-T | 0 | 0 | [8] |
| 2-(1-Hydroxy-äthyl)-T | 0 | 0 | [8] |
| 6'-Methyl-T | 0 | 10 ± 3 | [14] |
| 6'-Methyl-4'-hydroxy- 4'-desamino-T | 0 | 2 ± 1 | [13,14] |
| 6'-Methyl-4-nor-T | 22 | — | [14] |
| 4-Nor-T | 24 | 25 ± 4 | [14] |
| 4-Äthyl-4-nor-T | 32 | 4 ± 1 | [8] |
| 2-Methyl-4-äthyl-4-nor-T | 0 | 18 ± 5 | [8] |
| N-1-Pyridin-Analoge | 13 | 11 ± 2 | [15] |
| N-3-Pyridin-Analoge | 0 | 0 | [15] |
| Pyrithiamin [b] | 0 | 0 | [8] |
| 2'-Äthyl-2'-nor-T | 48 | 11 ± 2 | [13] |
| 5-(3-Hydroxypropyl)-5- nor-T | 0 | 22 ± 3 | [8] |

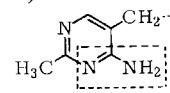
[a] T = Thiamin.

[b] Siehe Fußnote [c] zu Tabelle 1.

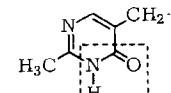
In Tabelle 3 sind die im Aktivitäts- und Simultantest an den TPP-Analogen erzielten Ergebnisse zusammengefaßt.

3. Blockierung der Aktivitätszentren

Im günstigsten Fall sollten TPP-Analogen, bei denen nur die Gruppen mit katalytischer Funktion blockiert sind, trotzdem die volle Bindungskapazität zur Apo-PDC aufweisen. Sie sollten coenzymatisch inaktiv sein, im Simultantest 50 % Hemmwirkung haben und sich bei der Filtration über Sephadex-Molekularsieben nicht aus dem Holoenzymkomplex abtrennen lassen. Das gilt bisher nur für 4'-Hydroxy-4'-desamino-TPP (Hydroxy-TPP) (4) (vgl. Tabellen 1 und 3).



TPP (1)



Hydroxy-TPP (4)

Da Hydroxy-TPP wie TPP nur in Gegenwart von Metallionen stabile Bindungen zur Apo-PDC bildet (Tabelle 1), darf man für dieses Analogon eine im wesentlichen gleiche Bindung zur Apo-PDC annehmen

[24] A. Schellenberger, W. Rödel u. H. Rödel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 339, 122 (1964).

wie für das natürliche Coenzym. Der umrandete Amidin- bzw. Amidbereich ist demnach ohne Bedeutung für die Coenzym-Apoenzym-Bindung.

Nach den im Schema 1 skizzierten Vorstellungen ist für die Decarboxylierung des Substrates nur das C-Atom 2 des Thiazoliumringes erforderlich. Das aus Hydroxy-TPP dargestellte Holoenzym-Analoge produziert aber keinen Acetaldehyd (Tabelle 3). Das führte zur Annahme einer Beteiligung der 4'-Aminogruppe bei der Ablösung des Aldehyd-Moleküls (Schema 2). Versuche mit radioaktiv markiertem Pyruvat haben die Funktion der 4'-ständigen Aminogruppe als zweites Reaktionszentrum bewiesen (Abb. 5)^[13]: Nach Anlagerung an C-2, die offenbar auch ohne Mitwirkung des Apoenzyms vor sich geht (Abb. 5c), wird das Pyruvat-Molekül auch durch das Hydroxy-TPP-Holoenzym decarboxyliert (Abb. 5b und 5d) (aber – wie der optische Test eindeutig beweist – kein Acetaldehyd abgelöst!).

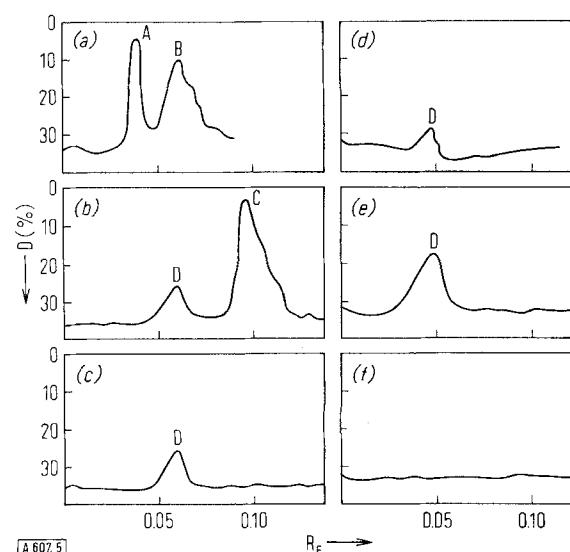


Abb. 5. Nachweis der enzymatischen Bildung des „aktiven Acetaldehyd“-Analogen von Hydroxy-TPP (Autoradiogramme der dünnenschicht-chromatographisch getrennten Ansätze) [13].

| Ansatz | Apoenzym | Coenzym | Pyruvat |
|--------|----------|--------------|----------------------|
| (a) | + | TPP | [2- ¹⁴ C] |
| (b) | + | Hydroxy-TPP | [2- ¹⁴ C] |
| (c) | - | Hydroxy-TPP | [2- ¹⁴ C] |
| (d) | + | Hydroxy-TPP | [1- ¹⁴ C] |
| (e) | + | N-Methyl-TPP | [2- ¹⁴ C] |
| (f) | + | 2-Methyl-TPP | [2- ¹⁴ C] |

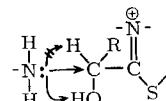
In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde bisher kein an der Aminogruppe variiertes TPP-Analoges mit coenzymatischer Aktivität gefunden [23]. Allerdings verfügt keine der in den Tabellen 1 und 3 aufgeführten Verbindungen wie das Hydroxy-TPP über die volle Bindungskapazität zum Apoenzym. Die Ursache sind sterische Faktoren, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

Erwartungsgemäß führt die Substitution des Decarboxylierungszentrums (2-Methyl-TPP) ebenfalls zu einem coenzymatisch inaktiven Analogen. Die Ergeb-

nisse im Simultan- und Sephadex-Test zeigen jedoch, daß die 2-Methylgruppe den Rekombinationsvorgang blockiert, so daß hier der Aktivitätstest nicht die gestörte Katalyse-Wirkung, sondern die gehinderte Rekombination demonstriert^[8]. Das gleiche gilt für das Zwischenprodukt 2-Hydroxyäthyl-TPP^[8]. An Stelle von TPP eingesetzt, zählt es zu den rekombinationsgehinderten TPP-Analogen.

4. Stereochemie der Reaktionszentren

Die 4'-Aminogruppe kann ihre katalytische Funktion, die Spaltung der Bindung im „aktiven“ Aldehyd, nur erfüllen, wenn sie in unmittelbarem Kontakt mit dem abzulösenden Aldehydteil steht. Von den drei in



Schema 3. Drei Möglichkeiten der Spaltung des „aktiven“ Aldehyds

Schema 3 dargestellten Möglichkeiten ist die Wechselwirkung des freien Elektronenpaares der Aminogruppe mit der sehr stabilen (fast kein H-D-Austausch unterhalb pH = 8^[25]) α -C-H-Bindung unwahrscheinlich, so daß nur der unmittelbare Kontakt mit dem durch Hydroxygruppe und Thiazoliumring positivierten α -C-Atom (S_N-Mechanismus) oder mit dem Hydroxyproton (Basenkatalyse) in Betracht kommen (Schema 3). In beiden Fällen zeigt das Kalottenmodell, daß die 4-ständige Methylgruppe das 6'-ständige H-Atom nahezu berührt (Abb. 6). Die Einführung einer Methylgruppe in 6'-Stellung (6'-Methyl-TPP) führt zu einer Verdrillung des Moleküls um die CH₂-Brücke, die in erster Linie eine Trennung der beiden Reak-

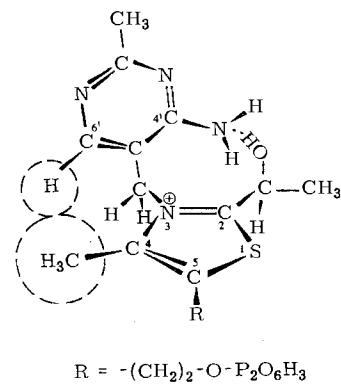


Abb. 6. Aktiver Acetaldehyd (umgezeichnetes Kalottenmodell) in der Stellung maximaler Annäherung der beiden Reaktionszentren (Basenkatalyse-Mechanismus A).

tionszentren, daneben auch eine Verschiebung der bindenden Gruppierungen des Coenzyms zur Folge hat [8, 14].

Daher unterbinden derartige Deformationen die intramolekulare Katalyse, gestatten aber noch die

[25] J. Ullrich u. A. Mannschreck, European J. Biochem. 1, 110 (1967); J. J. Miyayal, R. G. Votaw, L.-O. Krampitz u. H. Z. Sable, Biochim. biophysica Acta 141, 205 (1967).

Bindung zum Apoenzym. Das 6'-methylierte TPP-Analoge ist coenzymatisch völlig inaktiv, hat aber noch geringe Affinität zum Apoenzym (Tabelle 3, Simultantest). Hydroxy-TPP verliert dagegen seine Inhibitorwirkung im Simultantest völlig, wenn man es in 6'-Stellung methyliert.

Die durch die 6'-Methylgruppe hervorgerufene Verdrillung wird aufgehoben, wenn man die 4-Methylgruppe entfernt. 6'-Methyl-4-nor-TPP ist coenzymatisch aktiv und wird auch bei der Sephadex-Filtration nicht gespalten^[14]. Auch 4-Desmethyl-TPP (4-Nor-TPP) ist coenzymatisch aktiv, wird aber im Gegensatz zu den in 4- oder 6'-Stellung methylierten Analogen vom Apoenzym nur noch locker gebunden^[14]. Daraus folgt, daß die Methylgruppe in 4- oder 6'-Stellung an der Bindung zwischen Co- und Apoenzym beteiligt ist.

Die Vermutung, das Apoenzym sei aus sterischen Gründen nur zu einer hydrophoben Wechselwirkung mit einer Methylgruppe fähig, während sich zwei Methylreste beim Bindungsvorgang gegenseitig behindern, ist unzutreffend, denn 4-Äthyl-4-nor-TPP ist coenzymatisch aktiv und wird vom Apoenzym fest gebunden (Tabelle 1 und 3^[8]). Durch eine 4-Äthylgruppe läßt sich sogar die Affinität des rekombinationsgehinderten 2-Methyl-TPP zum Apoenzym soweit erhöhen, daß es im Simultantest mit TPP konkurriert.

Die Äquivalenz von 4- und 6'-Stellung ist eine der wesentlichsten Stützen für den auf intramolekularer Wechselwirkung basierenden Zweizentrenmechanismus. Die sich daraus ergebende Konformation des im aktiven Zentrum der PDC gebundenen TPP-Moleküls ist nicht mit der von *Pletcher* und *Sax*^[26] an TPP-Kristallen röntgenographisch ermittelten Struktur identisch.

5. Die Funktion der Pyrimidin-N-Atome und des S-Atoms

Die hohe Affinität des in der Lactam-Form vorliegenden Hydroxy-TPP zum Apoenzym läßt bereits vermuten, daß der Molekülbereich um N-3 nicht unmittelbar an der Bindung beteiligt ist. Bestätigt wurde dies durch die Untersuchung der beiden Pyridin-Analogen (5) (N-1-Pyridin-Analoges) und (6) (N-3-Pyridin-Analoges).



Das N-1-Pyridin-Analoge zeigt als Pyrophosphorsäureester deutliche Coenzymwirkung^[15], der Pyrophosphorsäureester des N-3-Pyridin-Analogen ist dagegen weder coenzymatisch aktiv noch wird er, wie der Simultantest zeigt, vom Apoenzym gebunden. Daraus folgt, daß das N-3-Atom weder katalysewirksam noch apoenzym-bindend ist. Auch ein gegenseitiger Einfluß oder eine tautomere Wechselwirkung der

[26] *J. Pletcher u. M. Sax*, Science (Washington) 154, 1331 (1966).

4'-Aminogruppe mit dem benachbarten Stickstoffatom im Kern ist für den Katalyseprozeß offenbar ohne Bedeutung. Allerdings wird die Stabilität der Bindungen zwischen Co- und Apoenzym durch das fehlende N-3-Atom herabgesetzt, was sich besonders bei der Sephadex-Filtration zeigt.

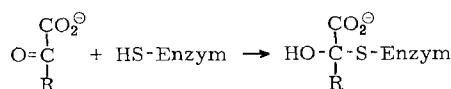
4-Aminopyrimidine werden bevorzugt in 1-Stellung protoniert^[27]. Das läßt vermuten, daß die Bindung zwischen N-1' des TPP-Moleküls und Apoenzym durch Vermittlung des Metallions zustandekommt, während der Pyrophosphatrest, wie es der Unabhängigkeit von K_{Mg} und K_{TPP} entspricht, im Primärgleichgewicht ohne Mitwirkung des Metallions an das Apoenzym fixiert wird (Säure-Base-Wechselwirkung). Der fehlende Einfluß unphosphorylierten Thiamins auf das Primärgleichgewicht TPP-Apo-PDC und die Größenordnung von K_{TPP} (der Wert von 10^{-3} spricht für Salzbindung) stützen ebenfalls diese Annahme.

Ersetzt man den Thiazolring des Thiamins durch einen Pyridinring, so erhält man das Pyritthiamin (2-Methyl-1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl-methyl)-3-(2-hydroxyäthyl)pyridinium-halogenid^[28]), das als Pyrophosphorsäureester weder coenzymwirksam noch bindungsfähig zum Apoenzym ist^[8]. Es verhält sich damit ähnlich wie das N-3-Pyridin-Analoge (6). Die Schlußfolgerung, daß auch der Schwefel zu den bindenden Gruppen im TPP-Molekül gehört, ist aber aufgrund der großen Strukturänderungen vorsichtig zu bewerten.

6. Der Reaktionsablauf

Die α -Ketosäuren werden am Enzym nach dem bisher vorliegenden Versuchsmaterial über drei Stufen umgesetzt: Substratbindung, irreversible Decarboxylierung und Spaltung der aktiven C-C-Bindung.

Substratbindung: Versuche mit Sephadex haben ergeben, daß das Pyruvat-Moleköl auch in Abwesenheit von Metallionen vom Apoenzym relativ fest gebunden wird. Durch Hemmversuche mit SH-Reagenzien und Untersuchung des $n-\pi^*$ -Übergangs von α -Ketosäuren in Gegenwart von Cystein konnten wir zeigen^[29], daß diese primäre Bindung des Substrats an das Enzym sehr wahrscheinlich über Halbmercaptalbindungen erfolgt:



Anschließend wird das Pyruvat-Moleköl an C-2 des Thiazoliumringes fixiert. Dieses liegt nach NMR-Untersuchungen von *Ullrich* und *Mannschreck*^[30] und nach MO-Berechnungen von *Pullman*^[31] beim optimalen pH-Wert sehr wahrscheinlich in der Carbeniat-

[27] Siehe z.B. *S. Mizukami u. E. Hirai*, J. org. Chemistry 31, 1199 (1966).

[28] *A. H. Tracy u. R. D. Elderfield*, J. org. Chemistry 26, 54 (1961).

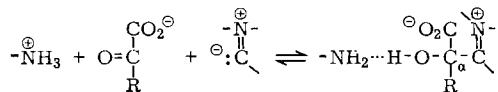
[29] *A. Schellenberger u. G. Hübner*, Angew. Chem., im Druck.

[30] *J. Ullrich u. A. Mannschreck*, Biochim. biophysica Acta 115, 46 (1966).

[31] *R. L. Collin u. B. Pullman*, Arch. Biochem. Biophysics 108, 535 (1964).

form vor, wobei eine basische Gruppe des aktiven Zentrums oder die Carboxylatgruppe des Substrates durch Übernahme des Protons die Spaltung der (C-2)-H-Bindung begünstigen könnte. Die in Abbildung 5c dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß sich die α -Ketosäure spontan, also ohne Mitwirkung des Apoenzyms, zur aktiven Form anlagert.

Die Kondensation wird – in Analogie zur Hydratisierung von Carbonylverbindungen – durch Protonierung des Carbonylsauerstoffs begünstigt. Es ist möglich, daß die benachbarte 4'-NH₂-Gruppe in der protonierten Form als Donator dient. Auf diese Weise würde bereits beim Bindungsvorgang die für die folgenden Schritte erforderliche Wasserstoffbrücke gebildet und das neu entstehende asymmetrische α -C-Atom sterisch orientiert.



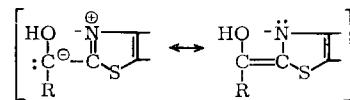
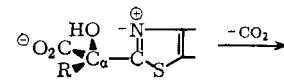
Die Substratspezifität der Hefe-PDC ist nicht besonders ausgeprägt. Außer Pyruvat werden zahlreiche β -mono- und dialkylierte α -Ketosäuren (einschließlich Cyclohexylglyoxylsäure) sowie Phenylglyoxylsäure und ihre *m*- und *p*-substituierten Derivate umgesetzt^[32]. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen werden Affinität und Umsetzungsgeschwindigkeit vom induktiven Effekt des β -ständigen Restes entgegengesetzt beeinflußt.

Zu den wenigen α -Ketosäuren, die vom Enzym nicht umgesetzt werden, gehört die Glyoxylsäure. Neuere Untersuchungen von *Hübner* in unserem Laboratorium mit [¹⁴C]-Glyoxylsäure haben ergeben, daß die Säure am Enzym zwar decarboxyliert wird, aber keine Spaltung der „aktiven“ C–C-Bindung erfährt, so daß das Coenzym für die Aufnahme weiterer Substratmoleküle blockiert wird. Die Ursache der blockierten Aldehydablösung wird in Zusammenhang mit den Modellen zur C–C-Spaltung dargelegt.

Irreversible Decarboxylierung und Stabilisierung des α -Carbanions: Da es bisher nicht gelungen ist, aktives Pyruvat zu synthetisieren^[33], kann nicht entschieden werden, ob das Apoenzym durch Wechselwirkung mit dem Thiazolium-Stickstoff oder -Schwefel an der Decarboxylierung beteiligt ist, oder ob das aktive Pyruvat spontan zu aktivem Acetaldehyd decarboxyliert. Das nach der CO₂-Abspaltung zurückbleibende Elektronenpaar müßte (in Analogie zu den leicht decarboxylierenden β -Ketosäuren) eine Zunahme der Bindungsordnung der aktiven Bindung bewirken und damit der anschließenden Aldehydablösung entgegenwirken. Diese Resonanzstabilisierung, die bei den Thiazolium-Modellkatalysatoren als wesentliche Ursache für die niedrige Aldehydausbeute anzusehen ist, setzt voraus, daß die beiden am α -C-Atom verbleibenden Reste (R, OH) mit dem Thiazoliumring in einer Ebene liegen.

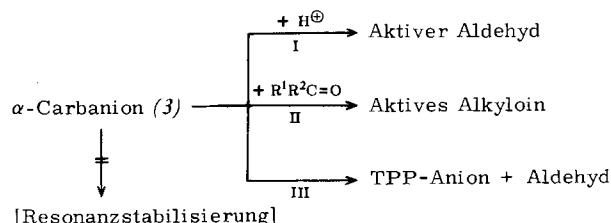
[32] R. Henkel, Diplomarbeit, Universität Halle/S. 1967.

[33] T. Eyles, P. Sykes u. J. E. Downes, J. chem. Soc. (London) 1965, 4265.



Am Kalottenmodell zeigt sich, daß durch die Knüpfung einer Wasserstoff-Brücke zwischen Amino- und Hydroxygruppe die beiden Reste am α -C-Atom nahezu senkrecht zur Ebene des Thiazoliumrings ausgerichtet werden. Dadurch wird die Wechselwirkung des freien Elektronenpaares mit den π -Elektronen des Ringes und die damit verbundene Zunahme der Bindungsordnung der aktiven Bindung stark eingeschränkt. Ferner bleibt die Stereospezifität und hohe Basizität des α -C-Atoms erhalten.

Reaktionschema 4 zeigt die Möglichkeiten, über die sich das Carbanion (3) stabilisieren kann.



Schema 4. Möglichkeiten der Stabilisierung des Carbanions (3).

Nach Untersuchungen von *Ullrich* und *Mannschreck* sowie von *Meyal*, *Votaw*, *Krampitz* und *Sable* zeigt die α -C–H-Bindung von aktivem Acetaldehyd bei pH-Werten unter 8 keinen H–D-Austausch^[25]. Die daraus zu schließende hohe Basizität des Carbanions (3) sollte als Hauptreaktion die sofortige Protonierung^[*] unter Bildung von 2-(1-Hydroxyethyl)-TPP (2) (Weg I) und als unbedeutende Nebenreaktion die Kondensation mit (aus dem Medium angebotenen) Carbonylverbindungen zu den aktiven Alkyloin-Derivaten (Weg II) erwarten lassen. Der in D₂O beobachtete Isotopeneffekt bei der Acetoinbildung^[34] würde sich damit als Verschiebung des Anteils beider Reaktionen am Endprodukt erklären.

Die direkte Spaltung des α -Carbanions (3) unter Bildung von TPP-Anion und Aldehyd (Weg III) wäre nur denkbar, wenn eine protonenfreie Zone im aktiven Zentrum (die bei der hohen Basizität von (3) auch die Nachbarschaft von NH-, OH- und verwandten Bindungen ausschließen würde) die Protonierungsreaktion I verzögerte. Selbst wenn das der Fall wäre, würde sich die Aldehyd-Hemmung, die ein beeinflussbares Gleichgewicht nach der irreversiblen Decarboxylierung erfordert, sowie die blockierte Aldehydablösung bei Verwendung von Hydroxy-TPP als

[*] Aus Gleichgewichtslage und Isotopenaustauschgeschwindigkeit kann man die Protonierungsgeschwindigkeit von Carbenat-Ionen abschätzen. Sie liegt z.B. bei dem noch meßbar austauschenden Malonsäure-diäthylester in der Größenordnung 10⁸ mol·l⁻¹·min⁻¹ [35].

[34] J. Ullrich, Freiburg/Brsg., persönliche Mitteilung.

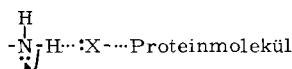
[35] R. G. Pearson u. R. L. Dillon, J. Amer. chem. Soc. 75, 2439 (1953).

Coenzym oder von Glyoxylsäure als Substrat über Weg III vorerst nicht erklären lassen.

Spaltung der aktiven Bindung: In einer früheren Arbeit^[13] haben wir aufgrund von Modellversuchen die Spaltung der „aktiven“ Aldehydbindung als intramolekulare nucleophile Substitution am α -C-Atom formuliert (Schema 2, Weg B). Am Kalottenmodell zeigte sich jedoch, daß eine colineare Anordnung des freien Orbitals der Aminogruppe mit der aktiven Bindung, wie sie bei S_N2 -Reaktionen gefordert wird, nicht möglich ist. Der Winkel zur Achse der aktiven Bindung beträgt etwa 80°.

Dagegen würden für eine intramolekulare Basenkatalyse (Schema 2, Weg A) räumlich günstige Voraussetzungen bestehen. Wenn man am Atommodell das 6'-H-Atom mit der 4-Methylgruppe (vgl. dazu Abschnitt II.4) in Kontakt bringt, kommen sich die 4'-Aminogruppe und das α -Hydroxyproton so nahe, daß sich eine Wasserstoff-Brücke zwangsläufig bilden kann. Gegen den intramolekularen Basenkatalyse-Mechanismus gab es zwei Einwände. Erstens ist die Basizität der 4'-Aminogruppe durch den Pyrimidinring stark herabgesetzt. Zweitens sollte *N*-Methyl-TPP, falls nicht sterische Faktoren entscheidend mitwirken, mindestens die gleiche Wirkung haben wie TPP, was aber nicht der Fall ist (Tabelle 3). Im Sephadex-Test zeigt sich allerdings, daß *N*-Methyl-TPP vom Apoenzym nur schwach gebunden wird. Wir sehen darin einen Hinweis für den engen Kontakt der Aminogruppe mit der Apoenzym-Oberfläche, der zur Erfüllung der basenkatalytischen Funktion offenbar erforderlich ist.

Damit bietet sich ein neuer Gesichtspunkt an: Ein sterisch und chemisch geeigneter Bereich im aktiven Zentrum des Apoenzyms bildet mit einem der relativ aciden H-Atome der Aminogruppe eine Wasserstoff-Brücke, dreht diese dadurch aus ihrer ursprünglichen Resonanzlage heraus und ermöglicht den Kontakt mit dem Hydroxyproton.



Durch die Wechselwirkung mit dem Apoenzym wird die Basizität des 4'-Amino-N-Atoms und damit dessen katalytische Wirksamkeit gesteigert. Gleichzeitig wird verständlich, daß das bifunktionell operierende N-Atom durch Methylierung unwirksam wird.

Die nach Juni^[36] nicht-kompetitive Produkthemmung der PDC wird bei Substratsättigung bereits bei minimalen Aldehydkonzentrationen wirksam. Daher muß angenommen werden, daß die der irreversiblen Decarboxylierung folgende Aldehydablösung im Stationärzustand die katalytische Aktivität des Enzyms bestimmt. Bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen ist dagegen die Beladung des Enzyms mit Substrat oder die Decarboxylierung geschwindigkeitsbestimmend, da in diesem Falle die Hemmwirkung erst bei höheren Aldehydkonzentrationen eintritt.

Die mit der Spaltung der aktiven Bindung verbundene Problematik kann man an zwei Modellen studieren,

[36] E. Juni, J. biol. Chemistry 236, 2302 (1961).

die weitgehende Analogien zum Vorgang am Enzym aufweisen.

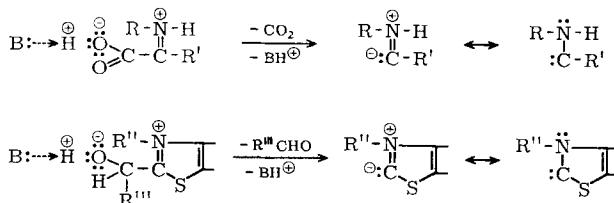
Im ersten Modell wird die Spaltung der aktiven C-C-Bindung mit der Decarboxylierung von α -Iminosäuren verglichen (Schema 5). Es ist bekannt, daß diese Verbindungen (im Gegensatz zu den α -Ketosäuren) leicht decarboxylieren, wobei die Immoniumcarboxylatform als reaktive Species anzusehen ist^[37].

Eigene Arbeiten über das Verhalten *N*-substituierter α -Iminosäuren^[38] haben gezeigt, daß die mit der Decarboxylierung verbundene (C-1)-(C-2)-Spaltung hauptsächlich durch folgende Effekte begünstigt wird:

1. Durch Elitnierung des Säure-Protons wird der abzuspaltende Rest (CO_2) prästabilisiert, so daß die unter Resonanzstabilisierung des CO_2 -Moleküls erfolgende Ablösung vom Bindungselektronenpaar gefördert wird.

2. Die decarboxylierende Wirkung der α -ständigen Immoniumgruppe wird durch elektronenanziehende Substituenten am N-Atom erhöht. So decarboxyliert unter gleichen Bedingungen die *N*-benzylierte Iminosäure etwa doppelt so schnell wie die *N*-äthylierte.

Ganz ähnliche Bedingungen ergeben sich für die Spaltung der C-C-Bindung im aktiven Aldehyd. Durch Protonenabzug wird das abzuspaltende Aldehyd-Molekül prästabilisiert, was im zweiten Modell ausführlicher dargelegt wird. Ferner wird die Spaltungs geschwindigkeit durch den stark elektronenziehenden *N*-ständigen 4-Aminopyrimidinring erheblich gesteigert.



Schema 5. Analogien zwischen der Decarboxylierung von α -Iminosäuren und der Spaltung des aktiven Aldehyds.

Das zweite Modell geht von der inzwischen mehrfach experimentell^[30] und theoretisch^[31] bestätigten hohen Acidität der 2-ständigen C-H-Bindung im Thiazoliumring aus. Dabei ergeben sich für die intramolekulare Basenkatalyse Analogien zur basenkatalysierten Dehydratisierung von geminalen Diolen^[39] sowie zur ebenfalls basenkatalysierten Spaltung von Halbacetalen. Diese am Beispiel der Mutarotation von Glucose eingehend studierte Reaktion^[40] ist gleichzeitig säure- und basekatalysiert, wobei sich 2-Hydroxypyridin, in dem die saure und die basische Gruppe in einer für die Umsetzung günstigen Lage fixiert sind, als besonders wirksamer bifunktioneller Katalysator

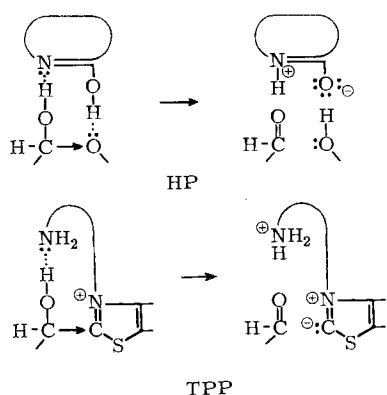
[37] H. Schenkel u. M. Schenkel-Rudin, Helv. chim. Acta 31, 514 (1948).

[38] A. Schellenberger, G. Osske u. W. Rödel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 149 (1962).

[39] R. P. Bell, Advances physic. org. Chemistry 4, 1 (1966).

[40] C. G. Swain u. J. F. Brown, J. Amer. chem. Soc. 74, 2534 (1952).

erwiesen hat. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird (wiederum in Analogie zum TPP-Mechanismus) die Spaltung der C–O-Bindung formuliert (Schema 6).



Schema 6. Vergleich der 2-Hydroxypyridin(HP)-Katalyse der Mutation nach Swain mit der TPP-Katalyse bei der Spaltung des aktiven Aldehyds. Beide Reaktionen sind geschwindigkeitsbestimmend.

Zur quantitativen Abschätzung der Analogien zwischen TPP-Katalyse und Hydratisierungs-Dehydratisierungs-Gleichgewichten seien die von Greenzaid et al.^[41] zusammengestellten Gleichgewichtskonstanten ($K_d = RR'C=O/RR'C(OH)_2$) aufgeführt. (Tabelle 4).

Tabelle 4. Gleichgewichtskonstanten für die Dehydratisierung von Carbonylverbindungen (Untersuchungsmethodik und Fehlerbreite s.[41]).

| Carbonylverbindung | K_d |
|--|------------------------|
| CH ₂ O | 5,0 · 10 ⁻⁴ |
| CH ₃ CHO | 0,7 |
| CH ₃ CH ₂ CHO | 1,4 |
| CH ₃ COCO ₂ H | 0,42 |
| CH ₃ COCO ₂ ⁺ | 18,5 |

Geht man davon aus, daß die Anlagerung der Carbonylverbindung an die acide 2-C–H-Bindung der Hydratisierung, die Abspaltung der Dehydratisierung entspricht, so kann man den K_d -Werten folgende Hinweise entnehmen:

[41] P. Greenzaid, Z. Luz u. D. Samuel, J. Amer. chem. Soc. 89, 749 (1967).

1. Die Reaktionsfähigkeit der undissoziierten α -Ketosäure gegenüber anionoiden Komponenten ist höher als die des entsprechenden Anions, was die Säurekatalyse^[42] beim Anlagerungsvorgang (4'-NH₃-Katalyse bei der Substratanlagerung bzw. Aldehydhemmung) unterstreicht.

2. Vergleicht man das nur schwach hydratisierte Pyruvat^[43] mit dem zu über 50 % in der Hydratform vorliegenden Acetaldehyd, so ergibt die Analogie-Vorstellung, daß die zu spaltende Bindung im aktiven Acetaldehyd wesentlich stabiler ist als die zu bildende C–C-Bindung im aktiven Pyruvat. Daher wird ohne die basisenkatalysierte Beschleunigung der Aldehydablösung (Hydroxy-TPP!) kein Umsatz am Enzym beobachtet.

Dieser Befund sollte von allgemeiner Bedeutung für Katalyseprozesse sein, die über covalent gebundene Zwischenstoffe führen. Wird im Verlaufe einer beliebigen Umsetzung am Katalysator oder Enzym die ursprüngliche Substrat-Katalysator-Bindung gefestigt, so wird ein die Abspaltung des Reaktionsproduktes fördernder Cokatalysator die Stationärgeschwindigkeit erhöhen.

3. Eine Extremstellung unter den Aldehyden nimmt der praktisch vollständig hydratisierte Formaldehyd mit einem um 3–4 Potenzen kleineren K_d -Wert ein. Auf Grund unserer Analogiebetrachtungen müßte damit die Stabilität der Bindung des aktiven Formaldehyds im Enzym um ca. drei Potenzen größer sein als beim aktiven Acetaldehyd. Das ist der Grund für die fehlende Aldehyd-Spaltung bei Verwendung von Glyoxylsäure als Substrat.

Meinen fleißigen und mit großer Hingabe tätigen Diplomanden, ganz besonders aber Herrn Dr. K. Winter und Herrn Dipl.-Chem. G. Hübner, schulde ich herzlichen Dank. Auch Herrn Prof. Dr. H.-R. Schütte bin ich für die bereitwillige Überlassung eines Arbeitsplatzes im Isotopenlaboratorium des Instituts für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften in Halle/S. zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 27. April 1967, ergänzt am 10. Oktober 1967 [A 607]

[42] Zur Existenz des Protonenchelates in wäßriger Lösung siehe z.B. A. Schellenberger, G. Oehme u. G. Hübner, Chem. Ber. 98, 3578 (1965); G. Oehme, Dissertation, Universität Halle/S., 1966.

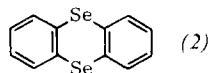
[43] M. Becker, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 68, 669 (1964).

ZUSCHRIFTEN

Bildung von Selenanthren aus Diphenylselenid und Bildung von Dikalium-triimidotellurit aus Diphenyltellurid

Von O. Schmitz-Dumont und B. Ross^[*]

Während Diphenylsulfid $S(C_6H_5)_2$ in flüssigem NH₃ bei Gegenwart von KNH₂ unter Bildung von C_6H_5SK und Anilin^[1] eine partielle Ammonolyse erleidet, reagiert Diphenylselenid $Se(C_6H_5)_2$ (1) unter gleichen Bedingungen zu Selenanthren



(2). Die Ausbeute hängt von der KNH₂-Menge ab. Nebenprodukte sind Anilin, K_2Se_x ($x \geq 2$) und C_6H_5SeK .

Diphenylselenid wird in einer Druckapparatur^[2] mit etwa einem Äquivalent KNH₂ in flüssigem NH₃ bei -70 °C versetzt. Beim Erwärmen auf 0 °C geht alles Diphenylselenid in Lösung. Aus der gelben Lösung scheiden sich nach einigen Stunden farblose Nadeln aus, die abfiltriert und mehrmals bei 0 °C mit flüssigem NH₃ gewaschen werden. Die Verbindung ist danach rein ($F_p = 181\text{--}182$ °C) und stimmt in allen Eigenschaften mit früher beschriebenem^[3] Selenanthren überein. Besonders charakteristisch ist die Reaktion mit HNO₃, die nach^[3] zu einer Additionsverbindung $C_6H_4Se_2C_6H_4 \cdot 2HNO_3$ (3) führen soll. Wir fanden, daß diese Verbindung mit Kalilauge Selenanthrendioxid (4) liefert, das beim Erhitzen über den Schmelzpunkt unter Abspaltung von O₂ in Selenanthren