

Die Funktion der 4'-Aminopyrimidin-Komponente im Katalysemechanismus von Thiaminpyrophosphat-Enzymen aus heutiger Sicht

Alfred Schellenberger

Wissenschaftsbereich Enzymologie/Enzymtechnologie am Biotechnikum der Universität Halle-Wittenberg,
Domplatz 1, DDR-4020 Halle/Saale

Eingegangen am 4. Januar 1990

Key Words: Thiamine pyrophosphate enzymes / Thiamine pyrophosphate mechanism / Substitutions, site-directed

The Function of the 4'-Aminopyrimidine Component in the Mechanism of the Catalysis of Thiamine Pyrophosphate Enzymes from Today's View

Binding mechanism and coenzyme function of thiamine pyrophosphate (TPP) are described with the help of site-directed substitutions at different positions of the coenzyme. In accordance to the earlier suggestions of Langenbeck (see this issue²⁾) it is shown, that besides the thiazolium moiety (C² atom) also the aminopyrimidine part plays an essential role in

the catalytic mechanism of TPP enzymes such as pyruvate decarboxylase, pyruvate dehydrogenase, and transketolase, respectively. A two-center mechanism of TPP is proposed explaining the function of the amino group as an internal proton relay in the catalytic mechanisms of TPP enzymes.

Im Jahre 1930 konnten Langenbeck und Hutschenreuther nachweisen¹⁾, daß primäre Amine die Decarboxylierung von α -Ketosäuren zu den entsprechenden Aldehyden katalysieren. Der in seinem Verlauf eindeutig beschriebene Mechanismus (s. voranstehende Arbeit²⁾) diente lange Zeit als Beispiel einer über Modellstudien aufgeklärten Enzymreaktion (Pyruvat-Decarboxylase, PDC). Er gewann weitere Bedeutung, als es 1937 Lohmann und Schuster³⁾ gelang, mit der Strukturaufklärung der Cocarboxylase als Thiaminpyrophosphat (I, TPP) die Existenz einer Aminogruppe im aktiven Zentrum des Enzyms zu bestätigen.

Erst 1956 konnte Breslow⁴⁾ nach Vorarbeiten von Ugai⁵⁾, Mizuhara⁶⁾ u. a. nachweisen, daß die im Thiazoliumring des TPP enthaltene Cyanid-Struktur in ihrer Ylidform sowohl für die Pyruvat-Decarboxylierung (Schema 1) als auch für die im Enzym- und Modellversuch⁵⁾ in Gegenwart von Acetaldehyd beobachtete Acetoinbildung verantwortlich ist. Der von Breslow vorgeschlagene Mechanismus konnte schließlich von Holzer⁷⁾ am Enzym bestätigt werden. Durch Verwendung von 1- bzw. 2-¹⁴C-markiertem Pyruvat wurde 2-([1-¹⁴C]-1-Hydroxyethyl)-TPP (Schema 1, 2, Y = H, R = CH₃) als Intermediat der Enzymreaktion nachgewiesen und der Thiazoliumring von TPP (nach Sultitspaltung) als Träger der radioaktiven Markierung bestätigt. Mit diesen überzeugenden Experimenten schien nicht nur die Frage des Funktionsmechanismus der Coenzymkomponente von PDC, sondern auch der zahlreichen anderen TPP-abhängigen Enzyme⁸⁾ im Prinzip gelöst (Schema 1).

Noch vor der Publikation der Breslowschen Arbeiten waren aber in unserem Labor, angeregt durch die Langenbeckschen Modellversuche mit Amin-Katalysatoren, umfangreiche Synthesearbeiten angelaufen, die eine Modifizierung der 4'-ständigen Aminogruppe von TPP zum Ziel hatten. Mit diesen TPP-Analoga beabsichtigten wir, die Bedeutung der Aminogruppe für den Enzymmechanismus

nach Einbau in die Proteinkomponente (Apo-PDC) zu überprüfen. In der vorliegenden Arbeit werden einige wichtige Ergebnisse dieser Experimente, die 1967 erstmalig umfassend dargestellt⁹⁾ und inzwischen durch ergänzende Experimente in ihrer Aussage bestätigt und erweitert werden konnten, als Fortsetzung der von Langenbeck begonnenen Untersuchungen zusammengefaßt.

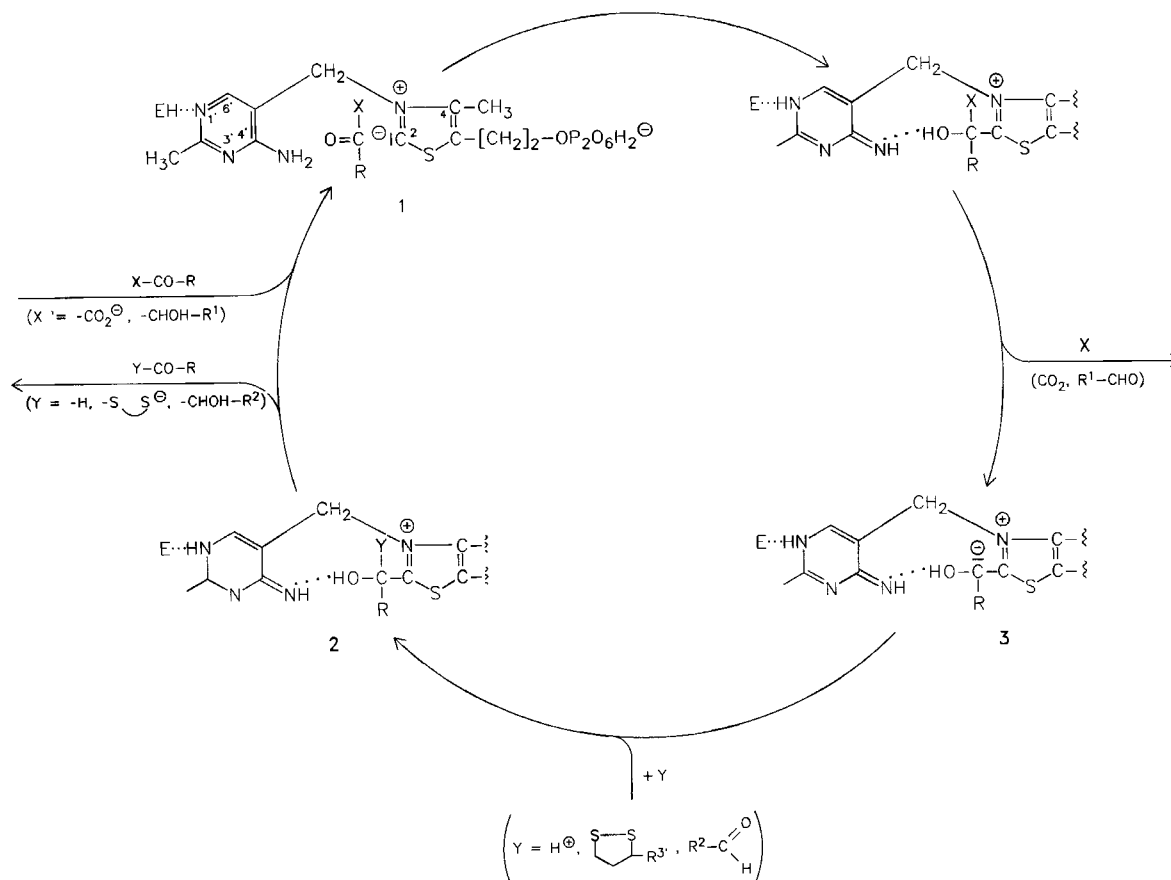
Bei Studien zur Enzymfunktion ist es heute üblich, durch gezielte Veränderungen der Proteinstruktur mittels „ortsspezifischer Mutagenese“ (site-directed mutagenesis, d. h. Seitenkettenaustausch im Reaktionsbereich mittels gentechnischer Verfahren) das Verständnis für die katalytische Bedeutung spezieller Teilbereiche der Proteinkomponente zu fördern. Im Falle der TPP-Enzyme, insbesondere von PDC, haben – infolge der relativ einfach zu bewerkstellenden Möglichkeit des Cofaktor-Austausches am Enzym – chemische Veränderungen von funktionspezifischen Strukturbereichen bereits Ende der 60er Jahre sehr konkrete Hinweise zum Funktionsmechanismus geliefert. Dabei haben die auf diese Weise erzeugten „ortsspezifischen Substitutionen“ im Coenzymbereich den wesentlichen Vorteil, daß die chemischen Veränderungen separat (außerhalb des Proteins) und unabhängig von den durch die natürlichen Protein-Synthesemechanismen eingegengten Variationsmöglichkeiten erfolgen können.

Inzwischen sind Untersuchungen mit modifizierten Coenzymen, Cosubstraten und Substraten längst zu einem vielgenutzten Verfahren der Enzymchemie geworden. Die hier beschriebenen, durch Langenbecks Arbeiten angeregten Modellstudien haben dazu nicht unerheblich beigetragen.

1. Cofaktor-Austausch als Möglichkeit für ortsspezifische Substitutionen

An den Cofaktoren (Coenzymen und funktionsbeteiligten Metall-Ionen) vollziehen sich in der Regel die entscheidenden

Schema 1. Katalysemechanismus von Thiaminpyrophosphat-Enzymen. 1: Thiaminpyrophosphat (Ylid-Form); 2: Coenzym-Produkt-Komplex. [Das intermediär gebildete, enzymgebundene α -Carbanion (3) bzw. die entsprechende Enamin-Form wird auch als „Aktiver Acetaldehyd“ bezeichnet] R, R¹ und R² begrenzt variabel. R³ = $-\text{[CH}_2\text{]}_4-\text{CO}_2\text{H}$ (Liponsäure).]



Tab. 1. Relative Aktivitäten und Dissoziationskonstanten (K_D) von im 4'-Aminopyrimidin-Teil modifizierten TPP-Analoga unter optimalen Reaktionsbedingungen (n. b. = nicht bestimmt)

TPP-Analogon	Pyruvat-Decarboxylase		Pyruvat-Dehydrogenase		Transketolase	
	V_{rel} (%)	$V_{sim}^{a)}$	V_{rel} (%)	$K_D [K_i]^{b)}$ [M]	V_{rel} (%)	$K_D [K_i]^{b)}$ [M]
TPP	100	100	100	1.5×10^{-7}	100	9.7×10^{-7}
4'-OH-TPP	0	52	0	$[2.9 \times 10^{-6}]$	0	n. b.
4'-SH-TPP	0	33	0	n. b.	0	n. b.
4'-NH(CH ₃)-TPP	0	25	0	$[4.1 \times 10^{-5}]$	0	$[1.4 \times 10^{-5}]$
4'-N(CH ₃) ₂ -TPP	0	22	0	$[8.5 \times 10^{-5}]$	n. b.	$[3.0 \times 10^{-6}]^{c)}$
4'-H-TPP	0	30	0	$[4.0 \times 10^{-5}]$	0	$[2.6 \times 10^{-5}]$
6'-CH ₃ -TPP	0	10	0	n. b.	50 ^{d)}	1.4×10^{-5}
6'-CH ₃ -4-H-TPP	22	n. b.	n. b.	6.0×10^{-6}	0	$[1.6 \times 10^{-5}]$
N ¹ -Pyridyl-TPP	65	n. b.	90	n. b.	100	8.0×10^{-7} ^{e)}
N ³ -Pyridyl-TPP	0	n. b.	0	n. b.	0	$[0.1 \times 10^{-7}]^{e)}$

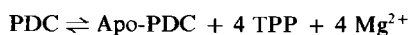
^{a)} V_{sim} entspricht der Aktivität, die bei simultaner Inkubation von Apo-PDC mit überschüssigem TPP und TPP-Analogon im Verhältnis 1:1 erhalten wird. — ^{b)} Die in dieser Spalte aufgeführten, mit unterschiedlichen Verfahren der Enzymkinetik ermittelten (und daher nicht streng vergleichbaren) Werte entsprechen den Dissoziations- (K_D) bzw. Inhibierungskonstanten (K_i). — ^{c)} Persönliche Mitteilung von G. A. Kochetov, Moskau. — ^{d)} Substrate: Xylulose-5-phosphat + Ribose-5-phosphat.

den Katalyseschritte von Enzymen. Ihre Modifizierung kann aber nur dann zu verbindlichen mechanistischen Aussagen führen, wenn es gelingt, die natürlichen Cofaktoren ohne Beeinträchtigung des Apoenzyms gegen die entsprechend modifizierten Moleküle auszutauschen, und wenn der

einwandfreie Nachweis ihrer korrekten Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms erbracht werden kann.

Im Falle der von uns vorwiegend als Studienobjekt verwendeten PDC sind die Cofaktoren (TPP und Mg²⁺-Ionen) bei den funktionsspezifischen pH-Werten um 6.0 zwar nicht

kovalent, aber trotzdem sehr stabil an das Apoenzym gebunden. Eine Dissoziation, die z. B. bei der Passage über längere Sephadex-Säulen zur Inaktivierung des Enzyms führen müßte, wird unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Bei pH-Werten über 7.0 jedoch dissoziiert die PDC reversibel gemäß:



Das so gebildete, inaktive Apoenzym läßt sich – wiederum durch Behandlung mit Sephadex-Ionenaustauschern – leicht von den Cofaktoren befreien. Es kann bei pH 6.0 entweder mit den natürlichen Cofaktoren unter praktisch vollständiger Rückgewinnung seiner Aktivität zum Holoenzym rekombiniert, oder durch Umsetzung mit modifizierten Cofaktoren (TPP-Analoga oder anderer 2-wertiger Metall-Ionen) in entsprechende PDC-Derivate übergeführt werden⁹. Durch chemische Veränderungen am Coenzym wird die Bindungsstabilität zum Apoenzym in der Regel geschwächt. Trotzdem lassen sich eindeutig solche Strukturbereiche, deren Veränderung vom Apoenzym (meist unter Aktivitätsminderung) toleriert wird, von Bereichen unterscheiden, die trotz nachweisbarer Protein-Bindung zur totalen Inaktivierung des Enzyms führen (Tab. 1).

Die Mg^{2+} -Ionen sind ausschließlich für die Bindung des TPP-Moleküls an die Proteinkomponente verantwortlich. Ihr Ersatz durch andere 2-wertige Metall-Ionen (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} u. a.) bewirkt keine Veränderung der Enzymaktivität. Lediglich die Stabilität der Coenzymbindung, die im Falle von Mg^{2+} bei pH 6.0 das „quasi-irreversible“ Bindungsverhalten hervorruft, ist geschwächt. Weiterhin konnte mittels ^{31}P -Kernresonanzuntersuchungen am Enzym¹⁰ nachgewiesen werden, daß im aktiven Zentrum der PDC der Pyrophosphatrest von TPP über das Mg^{2+} -Ion mit dem Apoenzym eine stabile, vom umgebenden Medium abgeschirmte Bindung eingeht, die z. B. keinem Austausch mit zugesetzten Mn^{2+} -Ionen unterliegt.

Ohne 4'-Aminogruppe keine Enzym-Katalyse

Die Frage nach der Funktion der 4'-Aminopyrimidin-Komponente in TPP muß nach drei Richtungen untersucht werden. Zum einen wäre es denkbar, daß dem gesamten Pyrimidinbereich die Funktion einer zweiten Ankergruppe zum Protein zukommt. Daß solche spezifischen Wechselwirkungen zwischen den N-Atomen und der Proteinkomponente bei der TPP-Bindung eine Rolle spielen, zeigt nicht nur die reduzierte Bindungsstabilität der in 4'-Stellung oder am Ring-Stickstoff modifizierten TPP-Analoga (Tab. 1), sondern auch die fehlende Affinität des Thiazoliumpyrophosphat-Fragments zum aktiven Zentrum¹¹.

Dadurch erklärt sich, daß Modifizierungen am Coenzym schon durch die reduzierte Anzahl funktionsfähiger Katalysezentren eine unter Umständen beträchtlich verminderte katalytische Aktivität zur Folge haben können. Als eine zweite Möglichkeit muß geprüft werden, ob die Aminopyrimidinkomponente über einen induktiven Effekt die Katalysefunktion der Thiazoliumkomponente ermöglicht oder steigert. Zu diesem Aspekt liegen bereits sorgfältige Studien

vor, aus denen hervorgeht, daß Substitutionen im Pyrimidinteil die H/D-Austauschgeschwindigkeit der C²-H-Bindung (als Parameter für die elektronische Situation des Katalysezenters) nicht beeinflussen¹². Ein solcher Mechanismus kommt demzufolge zur Erklärung des fehlenden Katalyseverhaltens, wie es z. B. nach Modifizierung der 4'-Aminogruppe beobachtet wird, nicht in Frage.

Als dritte Möglichkeit wäre eine unmittelbare Beteiligung der Aminogruppe am Funktionsmechanismus von TPP-Enzymen zu diskutieren. In diesem Falle sollten durch chemische Veränderungen der Aminogruppe Analoga von TPP resultieren, die sich trotz nachweislicher und korrekter Bindung im aktiven Zentrum als völlig inaktiv erweisen. Der auf solche Weise entstehende „Zweizentren-Mechanismus“ (Schema 1) würde nicht nur ebenfalls die Existenz der Aminopyrimidin-Komponente rechtfertigen, sondern darüber hinaus der Natur Möglichkeiten eröffnen, die Effizienz der Katalysereaktion durch Drehung der beiden Katalysezentren um die Methylenbrücke den jeweiligen physiologischen Erfordernissen im Organismus anzupassen. Die bei der PDC nachgewiesene Abhängigkeit der Katalysegeschwindigkeit von der Pyruvatkonzentration im Reaktionsbereich (Substrataktivierung¹³) könnte auf einem solchen Regelmechanismus beruhen.

Bereits 1967 (also noch zu Lebzeiten Langenbecks) legten wir in einem Übersichtsartikel⁹ dar, daß in der Tat jede Modifizierung der 4'-Aminogruppe (Substitution oder Eliminierung) zu völlig inaktiven TPP-Analoga führt, obwohl auch bei diesen eine deutliche Affinität zum aktiven Zentrum der PDC nachgewiesen werden konnte. Allerdings ließen sich im Falle von PDC infolge der bereits erwähnten, beim optimalen Funktions-pH 6.0 „quasi-irreversiblen“ Bindung von TPP zum aktiven Zentrum keine quantitativen Daten, z. B. über die Dissoziationskonstanten (K_D oder K_i) der TPP-Analoga, ermitteln. Aber die deutliche Aktivierungsminde- rung, die eintritt, wenn man Apo-PDC mit einem 1:1-Gemisch von TPP und TPP-Analoga (beide im Überschuß) inkubiert, zeigt, daß auch diese TPP-Derivate beträchtliche Affinität zum aktiven Zentrum der PDC aufweisen müssen (Tab. 1).

Inzwischen liegen in zwei Fällen von reversibel TPP-bindenden Enzymen (Pyruvat-Dehydrogenase¹⁴ und Transketolase¹⁵) Bindungskonstanten vor, welche die hohe Affinität der Analoga zum aktiven Zentrum dieser Enzyme eindeutig bestätigen (Tab. 1).

Diese Befunde müssen als deutlicher Hinweis für eine direkte Beteiligung der 4'-Aminogruppe am Funktionsmechanismus gelten. Sie rücken zugleich die von Langenbeck durchgeführten Modellversuche in ein neues Licht. Da aber die nachbarständig zum Ring-N gebundene Aminogruppe eher ein für Amide typisches Reaktionsverhalten zeigt, macht sich ein Überdenken des an primären Aminen gewonnenen Funktionsablaufes erforderlich. Tatsächlich ist es mit Aminopyrimidinen nie gelungen, die bei der Umsetzung mit α -Ketosäuren zur Decarboxylierung befähigten Schiffchen Basen zu isolieren¹⁶. Es wäre daher einleuchtender, einen aus dem Protonendonator-Verhalten der Amide ableitbaren Beitrag – in Analogie zu ähnlichen, von Histidin

bekanntesten Enzymmechanismen (Proteasen) – zur Unterstützung der Katalysereaktion zu diskutieren (Schema 1).

Es sei auf ein weiteres Experiment hingewiesen, das ebenfalls für eine unmittelbare Beteiligung der Aminogruppe am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PDC-Reaktion spricht. Trotz sorgfältigster Durchführung und eindeutiger statistischer Absicherung der Befunde liegt seine Aussage gegenwärtig noch an der Grenze der kinetischen „Glaubhaftigkeit“, so daß die erhaltenen Befunde mit Vorbehalt bewertet werden müssen. Eine Reproduzierung unter verbesserten experimentellen Voraussetzungen steht bevor. In der Versuchsordnung wurde die Eigenschaft der Enzyme als Mikro-Heterogenkatalysatoren genutzt, bei erheblichem Coenzymüberschuß eine der Menge an aktiven Zentren entsprechende, d. h. von der zugesetzten Coenzymmenge unabhängige Maximalgeschwindigkeit zu erreichen. Wenn man daher die zwei Küvetten eines empfindlichen Doppelstrahl-Photometers mit der gleichen Menge an Apoenzym versieht und mit einem großen Überschuß an TPP bzw. TPP-Analogen inkubiert, so sollten die bei gleichzeitiger Substratzugabe resultierenden, durch das Spektrometer registrierten Geschwindigkeitsdifferenzen ein extrem empfindliches Maß für Aktivitätsunterschiede der beiden Enzymproben in den Küvetten darstellen. Voraussetzung ist allerdings, daß ein entsprechend empfindliches optisches Testverfahren zur Verfügung steht. Im Falle der PDC-Reaktion läßt sich dieses im sog. optischen Test durch Reduktion des gebildeten Acetaldehyds mit Alkohol-Dehydrogenase [Übergang des chinoiden Nicotinamid-Cosubstrates (DPNH) in die aromatische Form (DPN⁺)] leicht realisieren.

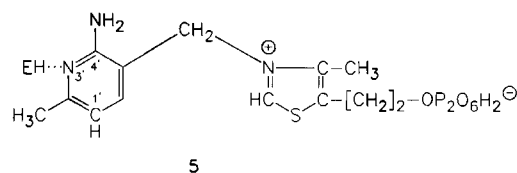
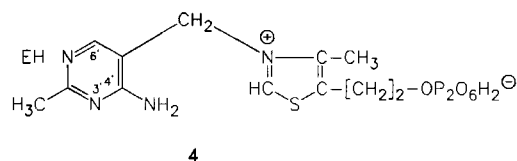
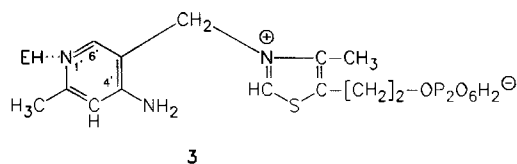
Unter diesem Aspekt haben wir in parallel geführten Syntheseansätzen neben normalem TPP ein in der Aminogruppe ¹⁵N-markiertes TPP synthetisiert und in seiner katalytischen Effizienz nach obigem Differenztest geprüft. Es zeigte sich, daß nach insgesamt 28 Versuchen bei sorgfältiger statistischer Absicherung im Signifikanztest (*t*-Test) die gemessenen Geschwindigkeitsdifferenzen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,95% > 0 sind. Dabei erwies sich die aus ¹⁵N-TPP gewonnene PDC um 0,6% aktiver als normale PDC¹⁷. Sollten sich diese Experimente als richtig erweisen, so würden sie die unmittelbare Beteiligung der Aminogruppe am Katalysemechanismus der PDC bestätigen.

Zur Funktion der Pyrimidin-N-Atome

Die verminderte Stabilität der Coenzymbindung nach Substitutionen im Aminopyrimidinteil wirft die Frage auf, in welchem Maße die drei vorhandenen basischen Zentren an der Stabilität der Coenzymbindung beteiligt sind. Auch in diesem Falle haben „ortsspezifische Substitutionen“ unerwartet eindeutige Antworten geliefert.

Wie bereits erwähnt, führt die Eliminierung der 4'-Aminogruppe (4'-H-TPP, Tab. 1) zu inaktiven Derivaten, die aber noch deutliche Affinität zum Apoenzym aufweisen. Von den beiden möglichen Pyridin-Analoga von TPP [*N*¹-Pyridyl-TPP (3) und *N*³-Pyridyl-TPP (4 bzw. 5)] führt nur der Einbau des *N*¹-Analogons (N-Atom *p*-ständig zur Amino-

gruppe) in das Apoenzym zu Enzymderivaten, die zwischen 65% (PDC) und 100% (Transketolase) Aktivität aufweisen (Tab. 1). Dagegen zeigt das *N*³-Analogon zwar (wie im Falle der PDC und Transketolase nachgewiesen werden konnte) noch etwa die gleiche Affinität zum Apoenzym wie das *N*¹-Pyridylderivat, ist aber völlig inaktiv. Aus diesen Befunden ist abzuleiten, daß das *N*¹-Atom, offenbar über eine spezifische Wechselwirkung mit dem Protein, zur katalytischen Funktion der Aminogruppe beiträgt. Bekanntlich wird die Reaktivität bzw. Acidität der 4'-Aminogruppe durch *N*¹-Protonierung stark beeinflusst. Aus Untersuchungen zum Protonierungsverhalten von Thiamin-Derivaten ist bekannt, daß das *N*¹-Atom (vor der Aminogruppe und *N*³) als Protonenakzeptor fungiert¹⁸. Ferner konnte durch Untersuchung der pH-Abhängigkeit der ¹⁵N-Bande im NMR-Spektrum von ¹⁵NH₂-Thiamin¹⁹ sowie durch Ab-initio-Berechnungen des Einflusses von *N*¹-Substitutionen auf die Elektronenstruktur im Aminopyrimidinteil²⁰ gezeigt werden, daß die Bindungsstruktur der Aminogruppe durch *N*¹-Protonierung starken Veränderungen unterliegt.



Im Falle von *N*³-Pyridyl-TPP könnte das *N*³-Atom nach 180°-Drehung des Pyrimidinringes um die Methylenebrücke ebenfalls die vom Apoprotein bereitgestellte Bindungsposition zum Apoenzym einnehmen. Dafür spricht die etwa gleiche Affinität des *N*³-Pyridyl-Analogons zum Apoenzym. In diesem Falle wäre aber die für die katalytische Funktion der Aminogruppe erforderliche Nachbarschaft zum C²-Atom (Abb. 1) im aktiven Zentrum nicht mehr gegeben (5), was die funktionelle Inaktivität dieses Analogons erklären würde.

4. TPP-Konformation und Zweizentren-Mechanismus

Die durch Drehung der beiden Ringebenen um die Methylenebrücke möglichen TPP-Konformationen (Abb. 1) werden sowohl durch intramolekulare als auch durch die bei der Proteinbindung neu entstehenden Wechselwirkungen beeinflusst. So nimmt bei der im TPP-Kristall eingenommenen, sog. F-Konformation die 4'-Aminogruppe eine Po-

sition ein, die dem in Schema 1 dargelegten Zweizentrenmechanismus widerspricht. Gibt es Hinweise, daß sich diese Konformation beim Einbau in das aktive Zentrum ändert?

Die für den Zweizentrenmechanismus erforderliche, heute als V-Konformation bezeichnete TPP-Struktur ist durch eine unmittelbare Nachbarschaft der 4-Methylgruppe und des 6'-H-Atoms gekennzeichnet (Abb. 1). Diesen Sachverhalt haben wir genutzt, um Hinweise für die TPP-Konformation im aktiven Zentrum zu erhalten⁹. Wir gingen dabei von der Vermutung aus, daß ein in 6'-Stellung methyliertes TPP-Derivat (6'-Methyl-TPP) durch die von der 4-Methylgruppe ausgehende sterische Hinderung nicht mehr in der Lage sein sollte, den für die Enzymkatalyse erforderlichen Beitrag der Aminogruppe zum Katalysemechanismus zu leisten. In der Tat ruft der Einbau von 6'-Methyl-TPP nicht nur im Falle von PDC, sondern auch bei der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) völlige Inaktivität hervor, während bei der Transketolase (TK), einem weiteren TPP-Enzym, das für die Spaltung und Resynthese von Kohlenhydrat-Strukturen verantwortlich ist, das gleiche Derivat noch Coenzymaktivität aufweist¹⁵. Daraus abzuleitende strukturelle Unterschiede der TPP-Konformation bei den verschiedenen Enzymvarianten könnten mit den Besonderheiten der

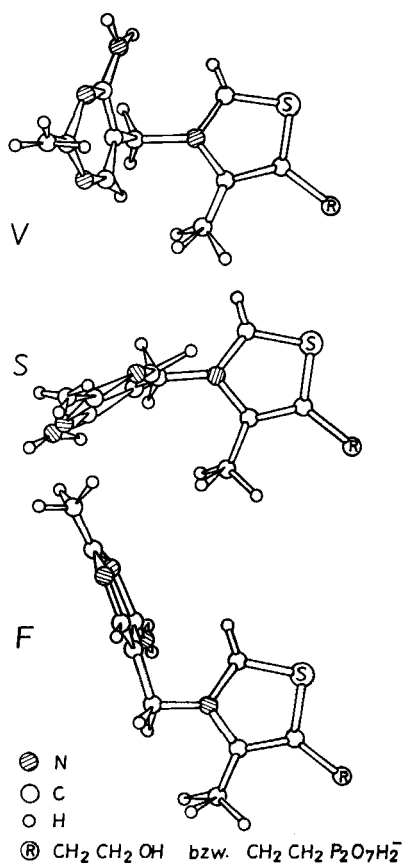


Abb. 1. Basiskonformationen des Thiaminsystems (nach Friedemann et al.²¹). Die von der Methylenebrücke zum Pyrimidinteil (φ_P) bzw. Thiazoliumteil (φ_T) gebildeten Diederwinkel betragen für die F-Konformation: $\varphi_T = 0^\circ$, $\varphi_P = 90^\circ$; S-Konformation: $\varphi_T = 100^\circ$, $\varphi_P = 150^\circ$; V-Konformation: $\varphi_T = -90^\circ$; $\varphi_P = +90^\circ$

entsprechenden Substratstrukturen in Einklang gebracht werden. Unsere Vermutung, daß die Inaktivität des 6'-Methyl-TPP vorwiegend auf den veränderten sterischen Verhältnissen im Coenzym beruht, fand durch die Eliminierung der 4-Methylgruppe aus 6'-Methyl-TPP (6'-Methyl-4-H-TPP) eine weitere Stütze. Dieses TPP-Derivat ruft bei PDC⁹ und PDH¹⁴ deutliche Katalyseaktivität hervor, während es sich bei TK¹⁵ als inaktiv erwies (Tab. 1).

Der endgültige Nachweis der TPP-Konformation im aktiven Zentrum von TPP-Enzymen wird sicher erst durch Röntgenstrukturanalyse zu erbringen sein. Die hier dargelegten Befunde bestätigen jedoch die Leistungsfähigkeit der ortsspezifischen Substitutionstechnik und sind durchweg mit dem in Schema 1 formulierten Mechanismus in Einklang. Dabei sprechen alle gegenwärtig verfügbaren Daten dafür, daß die 4'-Aminogruppe unmittelbar am Katalysemechanismus von TPP-Enzymen beteiligt ist.

Das Katalyseverhalten von TPP-Enzymen ist in den folgenden Schritten von Protonentransfermechanismen abhängig:

- Deprotonierung der C²-H-Bindung zur katalytisch aktiven Ylid-Struktur (1)
- Protonierung der Substrat-Carbonylgruppe bei der Bildung des ersten tetraedrischen Intermediates (Substrat-TPP-Komplex)
- Deprotonierung des zweiten tetraedrischen Intermediates (Produkt-TPP-Komplex) bei der Produktablösung (2)
- Speziell bei PDC: α -C-Protonierung des nach der Decarboxylierung entstehenden α -Carbanions bzw. Enamins (3).

Es wäre verfrüht, sich gegenwärtig bereits auf den speziellen Schritt festzulegen, der durch die Aminogruppe unmittelbar beeinflusst wird. Der in Schema 1 formulierte Mechanismus sollte daher als Vorschlag gewertet werden, die Funktion der Aminogruppe im Sinne einer erweiterten Langenbeck'schen Vorstellung zu begreifen.

¹⁾ W. Langenbeck, R. Hutschenreuter, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **188** (1930) 1.

²⁾ A. Schellenberger, *Chem. Ber.* **123** (1990) I, voranstehend.

³⁾ K. Lohmann, G. Schuster, *Naturwissenschaften* **25** (1937) 26.

⁴⁾ R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 1762; **80** (1958) 3719.

⁵⁾ T. Ugai, S. Tanaka, S. Dokawa, *Yakugaku Zasshi* **63** (1943) 269.

⁶⁾ S. M. Mizuhara, P. Handler, *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 571.

⁷⁾ H. Holzer, K. Beaucamp, *Angew. Chem.* **71** (1959) 776; s. auch **73** (1961) 721.

⁸⁾ Wichtige Enzyme mit TPP als Coenzym sind neben PDC die α -Ketosäure-Dehydrogenasen (mit Liponsäure als Elektrophil Y), Transketolasen und Acetolactat-Synthase (mit Zuckeraldehyden bzw. α -Ketosäuren als Elektrophil Y).

⁹⁾ A. Schellenberger, *Angew. Chem.* **79** (1967) 1050; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **6** (1967) 1024.

¹⁰⁾ S. Flatau, G. Fischer, E. Kleinpeter, A. Schellenberger, *FEBS Lett.* **233** (1988) 379.

¹¹⁾ G. Hübner, *Dissertation*, Universität Halle, 1968.

¹²⁾ C. A. Fierke, W. P. Jencks, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 7603; M. W. Washabaugh, W. P. Jencks, *Biochemistry* **27** (1988) 5044.

- ¹³⁾ G. Hübner, R. Weidhase, A. Schellenberger, *Eur. J. Biochem.* **92** (1978) 175; G. Nafe, G. Hübner, G. Fischer, H. Neef, A. Schellenberger, *Acta Biol. Med. Germ.* **29** (1972) 581.
- ¹⁴⁾ R. Bernhardt, *Dissertation*, Universität Moskau, 1976.
- ¹⁵⁾ M. G. Pustinnikov, H. Neef, R. A. Usmanov, A. Schellenberger, G. A. Kochetov, *Biokhimiya* **51** (1986) 1003.
- ¹⁶⁾ A. Schellenberger, *Dissertation*, Universität Halle, 1955.
- ¹⁷⁾ G. Hübner, H. Neef, G. Fischer, A. Schellenberger, *Z. Chem.* **15** (1975) 221.
- ¹⁸⁾ F. Jordan, Y. M. Mariam, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 2532.
- ¹⁹⁾ A. H. Cain, G. R. Sullivan, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 6423.
- ²⁰⁾ A. Marzotto, M. B. Cingi, D. A. Clemente, *Inorg. Chim. Acta* **135** (1987) 37.
- ²¹⁾ R. Friedemann, D. Richter, W. Gründler in *Thiamin Pyrophosphate Biochemistry* (A. Schellenberger, R. Schowen, Eds.) Bd. 1, S. 11, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida 1988.

[8/90]