

KFK-582:2

# KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Gesellschaft für Kernforschung m.B.H.  
Zentralbücherei

März 1967

11 33 57

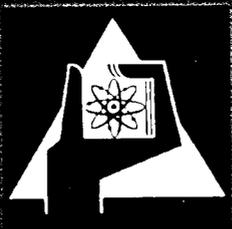
KFK 582

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über den Einfluß von Chelatbildnern auf die  
biologische Aktivität der Rindererythrocyten-Carboanhydratase

S. Carpy

Wicht collection





Kernforschungszentrum Karlsruhe

März 1967

KFK 582

Institut für Strahlenbiologie



Untersuchungen über den Einfluß von Chelatbildnern  
auf die biologische Aktivität der Rindererythrocyten-Carboanhydratase

Serge Carpy

	<p>Strahlenbiologie Institut für Strahlenbiologie Kernforschungszentrum Karlsruhe</p>	Nr. 2
--	---	----------

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



# Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Bestimmung der Enzymaktivität</u>	5
I. Wahl der Bestimmungsmethode	5
II. Aufbau der Meßapparatur	7
III. Durchführung der Aktivitätsbestimmung	8
IV. Physikochemische Parameter der Aktivitätsbestimmung	10
V. Prüfung der Effektivität der Bestimmungsmethode	14
C. <u>Reinigung des Enzympräparats</u>	14
I. Bestimmung des Reinheitsgrades	14
II. Reinigungsverfahren	17
III. Reinheitskriterien und Identifizierung des Enzyms	18
D. <u>Einfluß der Chelatbildner auf die Enzymaktivität</u>	21
I. Auswahl der untersuchten Chelatbildner	21
II. Allgemeine Überlegungen	25
III. Methodik der Untersuchungen	29
IV. Ergebnisse	
1. Sofortige Hemmung	31
2. Hemmung nach Inkubation	36
E. <u>Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Chelatbildner</u>	45
I. Reaktivierung des Enzyms	46
II. Prinzip der Untersuchungen	50
III. Herstellung des $^{65}\text{Zn}$ -markierten Enzyms	51
IV. Methodik der Untersuchungen	52
V. Ergebnisse	54
F. <u>Diskussion und Schlußbemerkungen</u>	55
G. <u>Methodische Einzelheiten</u>	66
H. <u>Literatur</u>	70
I. <u>Tabellen und Abbildungen</u>	

## A. Einleitung

Bestimmte Chelatbildner stellen das Mittel der Wahl für die Behandlung von Vergiftungen mit radioaktiven und nicht radioaktiven Schwermetallen dar. In besonderem Maße sind es synthetische Polyaminopolycarbonsäuren (z.B. Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) oder Diätylensäure (DTPA), die wegen ihrer hohen Affinität zu zahlreichen Metallionen beim Menschen in zunehmendem Maße Verwendung finden. Bei einer über längere Zeit fortgesetzten Applikation ist unter Umständen mit unerwünschten toxischen Nebenerscheinungen zu rechnen, die sich im wesentlichen in einer Schädigung der Nieren, und zwar in einer nephrotischen Degeneration der proximalen Tubuli manifestieren (Schrifttum bei Catsch 1964a). Die Frage nach der Pathogenese der Nephrose ist nicht nur von theoretischem, sondern auch praktischem Interesse, da ihre Klärung Aussichten auf eine Verbesserung der therapeutischen Anwendung und Effektivität der Chelatbildner eröffnet.

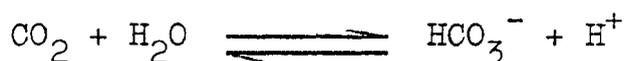
Da die Chelatbildner keine Spezifität (in der strengen Definition des Begriffs) für bestimmte Metallionen besitzen, liegt es nahe, ihre Toxizität auf die Bindung essentieller Spurenmetalle mit anschließender Inaktivierung von Metalloenzymen bzw. von metall-aktivierten Enzymen zurückzuführen (Catsch 1964b, 1966, Foreman et al. 1956, Seven 1960). Im Falle der Nierenschädigung wird man in erster Linie an die Inaktivierung von Zink-Enzymen, wie z.B. der alkalischen Phosphatase oder der Carboanhydratase denken, die in der Nierenrinde in relativ hoher Konzentration vertreten sind. Der Grund für diese Annahme liegt in der Tatsache, daß unter dem Einfluß von Ca-ÄDTA und -DTPA eine deutlich erhöhte Ausscheidung von Zink, nicht aber oder in nur geringem Maße von anderen Spurenmetallen nachgewiesen werden konnte (Havlíček 1967, hier auch weiteres Schrifttum). Weiterhin weist Zn-DTPA eine geringere Toxizität als Ca-DTPA auf (Catsch 1963, 1964b). Nigrović (1964) erbrachte den Nachweis einer primären Inaktivierung der alkalischen Phosphatase der Nierenrinde in vivo durch die Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA, während die Verabfolgung der Zn-Chelate sich als ineffektiv erwies.

Die in vitro-Inaktivierung zahlreicher metall-aktivierter Enzyme sowie einiger Metallo-Enzyme durch Chelatbildner ist bekannt (Vallee 1959, Vallee et al. 1960). Analoge in vitro Versuche mit der Carboanhydratase dagegen zeigten zunächst, daß das Enzym gegenüber verschiedenen Chelatbildnern eine erhebliche Widerstandsfähigkeit aufweist (Davis 1959, Keller und Peters 1959) Die Assoziationskonstante des Zn mit dem Protein bei pH 7 ist rund  $10^{12,5}$  (Lindskog und Malmström 1964). Erst kürzlich gelang es Lindskog und Malmström (1960), durch Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin bei pH 5 das Zink reversibel zu entfernen. Keller und Gottwald (1960) konnten ebenfalls zeigen, daß bei niedrigem pH Komplexbildner wie ÄDTA, Dithizon, 8-Hydroxychinolin und Cystein die volle Reaktivierung der Carboanhydratase verhindern. Daß aber grundsätzlich eine Reaktivierung des Enzyms mit Zinkacetat nach Hemmung mit ÄDTA möglich ist, wiesen Ho und Sturtevant (1960) nach. Es wird jetzt als gesichert betrachtet, daß die Entfernung des Zinks aus der Enzym-Molekel bei physiologischen Bedingungen nicht möglich ist, wohl aber in sauerem Milieu, z.B. durch einige Chelatbildner (Lindskog und Malmström 1962, Lindskog 1963). Bei der Deutung dieser Befunde wird implizit eine Mobilisierung von Zink angenommen; grundsätzlich sind jedoch auch andere Wirkungsmechanismen, z.B. Bildung ternärer Komplexe, denkbar.

Allerdings sind die bisherigen Untersuchungen nicht systematisch, und die Wirksamkeit von Liganden, die sich sowohl durch ihre Affinität zu Zink als auch durch ihre Konfiguration und die Art der Ligandatome wesentlich voneinander unterscheiden, ist noch nicht untersucht worden. Es sind insbesondere die DTPA, die eine größere Zink-Affinität als ÄDTA aufweist, sowie Polyamine und S-haltige Verbindungen.

Die vorliegende Untersuchung stellt sich die Aufgabe, den Einfluß einer größeren Zahl von Chelatbildnern auf die enzymatische Aktivität der Carboanhydratase zu prüfen. Im Hinblick auf die eingangs erwähnte Arbeitshypothese (die Nephrotoxicität therapeutischer Chelatbildner betreffend) wurden die Untersuchungen bei physiologischem pH durchgeführt.

Die Wahl der Carboanhydratase (CA) als Untersuchungsobjekt ist sowohl durch ihre biologische Bedeutung als auch durch ihre biochemischen Eigenschaften bedingt. Die CA, die bei Säugetieren hauptsächlich in Erythrocyten, der Nierenrinde und in der Darmmukosa in hohen Konzentrationen vertreten ist, spielt als Katalysator der Reaktion



eine wichtige Rolle für den Austausch von Elektrolyten zwischen verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten (d.h. für den Transport von Protonen, Alkalimetall- und Bicarbonat-Ionen, die den pH im Organismus bedingen) sowie für die Diffusion von Kohlendioxid und die Bildung des Harns (Polya und Wirtz 1965). Ferner eignet sich die CA besonders gut für die Prüfung der Frage, ob und gegebenenfalls in welchem Umfang eine Wechselwirkung mit Chelatbildnern stattfindet, da die Zahl der an das Enzym gebundenen Metallionen bekannt ist, und zwar ein Zn pro Enzymmolekül (Lindskog und Malmström 1962). Die Tatsache, daß der Zink-Gehalt des Enzyms seine biologische Aktivität spezifisch bedingt (bei Abwesenheit von anderen bivalenten Übergangsmetallionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), ist ein weiterer und entscheidender Punkt (Lindskog und Malmström 1962, Lindskog und Nyman 1964). An der Bestimmung der Natur der Bindungen, die für die Stabilität des Protein-Zn-Komplexes verantwortlich sind, sowie an der Aufklärung der Proteinstruktur wird zur Zeit noch in mehreren Forschungsgruppen gearbeitet, ohne daß bis jetzt aber eine endgültige Klärung dieser Fragen erzielt werden konnte (Edsall et al. 1965, Coleman 1965, Tilander et al. 1965, Laurent et al. 1965, Lindskog 1966, Nyman et al. 1966, Dobry-Duclaux 1966).

Als Untersuchungsobjekt wählten wir die CA aus Rindererythrocyten, da das aus Menschenerythrocyten isolierte Enzym im Handel nicht erhältlich ist. Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß in den Eigenschaften von Enzymen verschiedener Herkunft sowie von Isoenzymen aus gleichem Isolierungsmaterial erhebliche Unterschiede nachgewiesen wurden (Liefländer 1964,

Laurent et al. 1963, Rickli et al. 1964, Nyman und Lindskog 1964, Reynaud et al. 1965); alle sind jedoch Zink-Enzyme, und ihre maximale biologische Aktivität wird bei einem molaren Verhältnis [Zink]:[Enzym] = 1 erreicht.

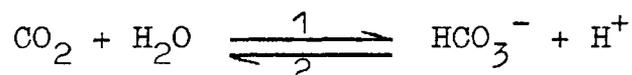
Der erste Schritt der Untersuchung bestand darin, bei der von uns gewählten Bestimmung der CA-Aktivität den Einfluß verschiedener Parameter zu erfassen, die bei unserer speziellen Fragestellung von Bedeutung sein könnten.

Eine wesentliche Voraussetzung für quantitative Untersuchungen ist natürlich, sie mit gereinigter und wohldefinierter CA durchzuführen. Tatsächlich sind jedoch die im Handel erhältlichen CA-Chargen äusserst variabel, und die Literaturangaben über ihre Eigenschaften dementsprechend verschieden (Tab. 1 und 2). Da die Darstellung der CA aus Rindererythrocyten in reiner Form grundsätzlich möglich ist (Lindskog 1960, Liefländer 1964), hielten wir es deshalb für notwendig, das kommerziell erhältliche Enzym auf seine Reinheit zu prüfen und gegebenenfalls zu reinigen. Nach Darstellung des Enzyms in reiner Form diente die Bestimmung des Molekulargewichts und der Aminosäurezusammensetzung als Reinheits- und Identifizierungskriterium.

Der Einfluß der zu prüfenden Chelatbildner auf die CA wurde zunächst mit einer Schnelltest-Methode bestimmt; den zeitlichen Verlauf der CA-Inaktivierung untersuchten wir für ausgewählte Verbindungen, die sich bei den orientierenden Untersuchungen als wirksam erwiesen oder uns aus einem anderen Grunde interessant erschienen. Zur Klärung des Inaktivierungsmechanismus boten sich Versuche mit  $^{65}\text{Zn}$ -markiertem Enzym an. Grundsätzlich ist auch an eine Markierung des Chelatbildners (z.B. mit  $^{14}\text{C}$  oder  $^{35}\text{S}$ ) zu denken; es wird jedoch später begründet, daß in diesem Fall quantitative Aussagen äußerst schwierig werden.

## B. Bestimmung der Enzymaktivität

Die Haupteigenschaft der Carboanhydratase (CA) ist es, die Hydratisierung des in Wasser gelösten Kohlendioxids zu katalysieren:



Das Substrat kann Kohlendioxid (Richtung 1) oder Bicarbonat (Richtung 2) sein. Dadurch bestimmt die CA den Austausch von Elektrolyten zwischen den verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten. Vor kurzem wurde außerdem von Tashian et al. (1964) eine Esterolase-Aktivität nachgewiesen: die CA katalysiert die Freisetzung von Nitrophenol aus verschiedenen p- oder o-Nitrophenylestern, wobei das p-Nitrophenylacetat das bestgeeignete Substrat für den Nachweis dieser CA-Aktivität zu sein scheint.

## I. Wahl der Bestimmungsmethode

Für die Bestimmung der Enzymaktivität können die Konzentrationsänderungen entweder von  $\text{CO}_2$  oder der Protonen gemessen werden. Es ist somit zwischen zwei methodischen Prinzipien zu unterscheiden:

- 1.) Die manometrischen Methoden (Roughton and Booth 1946), bei denen entweder die Abnahme (Richtung 1 der Reaktion) oder die Zunahme (Richtung 2) des  $\text{CO}_2$ -Volumens (je nachdem ob Kohlendioxid oder Bicarbonat als Substrat verwendet wird) in einer Meßzelle bestimmt wird.
- 2.) Methoden, die auf Änderungen des pH basieren.
  - a) Bei der kolorimetrischen Methode von Philpot und Philpot (1936), von Wilbur und Anderson (1948) modifiziert, wird ein Farbindikator dem Ansatz zugesetzt; die bis zum Farbumschlag benötigte Zeit wird als Maß der Enzymaktivität betrachtet. Der pH-Bereich bis zum Farbumschlag umfasst mehrere pH-Einheiten, und die Reaktionsgeschwindigkeit wird dadurch vermindert.

- b) Die elektrometrische Methode von Davis (1958) misst mit Hilfe entsprechender Elektroden die Änderung der Protonen-Aktivität infolge der  $\text{CO}_2$ -Hydratisierung. Eine starke Säure dient als Eichsubstanz.
- c) Die spektrophotometrische Methode von Nyman (1963) basiert auf dem Absorptionsunterschied zwischen der sauren und basischen Form des Veronal-Puffers.
- d) Die sog. pH-Stat-Methode nach Leibman, Alfort und Boudet (1961) verwendet einen automatischen Titrator, d.h. der pH des Reaktionsgemisches wird durch Zusatz von NaOH konstant gehalten und die verbrauchte NaOH-Menge als Maß der Enzymaktivität genommen.

Da eine der wesentlichen Voraussetzungen für unsere Untersuchungen die Konstanz des pH ist, sind Methoden mit kontinuierlichem pH-Abfall von vorn herein ungeeignet, d.h. die kolorimetrischen, elektrometrischen und spektrophotometrischen Verfahren. Außerdem wird dadurch die Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Reaktion kontinuierlich vermindert, so daß die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit der ursprünglich linearen, maximalen Anfangsgeschwindigkeit nicht mehr entspricht. Was die manometrische Methode betrifft, so ist sie für Routineuntersuchungen zu aufwendig und erfordert ausserdem verschiedene Korrekturen.

Für unsere Fragestellung eignet sich am besten die pH-Stat-Methode, obwohl auch hier (wie übrigens bei allen anderen Methoden) die Hemmung durch entstehende Produkte nicht zu vermeiden ist. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß sie die Bestimmung der Michaelis-Konstante - ein wichtiger Test für die Reinheit des Enzyms - nicht gestattet (s. auch S. 12). Um eine ausreichende Meßgenauigkeit zu erreichen ist es notwendig, die Bestimmung bei niedrigen Temperaturen, d.h. unter  $10^\circ\text{C}$  durchzuführen, da bei Zimmertemperatur die Geschwindigkeitskonstante der nicht katalysierten Hydratisierungsreaktion zu groß wird, die Glaselektrode (s. S. 7) jedoch zu langsam reagiert. Diese Schwierigkeit kann mit Hilfe einer für Messungen

bei tiefen Temperaturen geeigneten Glaselektrode weitgehend überwunden werden. Eine Proteinadsorption an der Wand der Glaselektrode und eine Wirkung des Puffers auf die Enzymaktivität spielen wegen der kurzen Kontaktzeit mit der Elektrode und der niedrigen Pufferkonzentration keine Rolle. Die entscheidenden Vorteile der Methode sind die Bestimmung der Enzymaktivität bei konstantem pH und die Ermittlung der maximalen Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. Die Zeitabhängigkeit der Reaktion verläuft über eine verhältnismäßig lange Zeit (ca. 15 bis 30 Sekunden) linear und kann deshalb leicht bestimmt werden. Schließlich weist die pH-Stat-Methode eine 10mal größere Empfindlichkeit als die photometrischen Methoden auf, so daß Enzymkonzentrationen bis zu  $10^{-10}$  molar nachgewiesen werden können.

## II. Aufbau der Meßapparatur

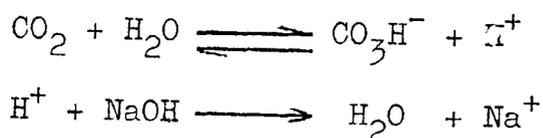
Für die Bestimmung der CA-Aktivität wurde die in Details von uns modifizierte pH-Stat-Meßanordnung nach Leibman, Alfort und Boudet (1961) verwendet, deren wesentliche Merkmale in Abb. 1 schematisch dargestellt sind. Die aus durchsichtigem Glas hergestellte Meßzelle (Titriergefäß) enthält den gepufferten Reaktionsansatz, durch den ein  $\text{CO}_2\text{-N}_2$ -Gemisch durchgeleitet wird. Eine Bezugslektrode (B), eine spezielle Tieftemperatur-Glasmeßlektrode (M) und ein Thermometer (T) (in  $0,1^\circ\text{C}$  graduiert; Genauigkeit  $\pm 0,05^\circ\text{C}$ ) tauchen in das Titriergefäß ein. Zwischen den beiden Elektroden befindet sich die Öffnung der Leitung (L), die NaOH zuführt. Die beiden Elektroden, das Thermometer und die NaOH-Leitung sind an einer Plexiglasstütze montiert, die nach oben zu bewegen ist, so daß Leeren und Spülen des Gefäßes erleichtert werden. Die Stütze ist so konstruiert, daß sie die Zugabe der Enzymprobe mit einer Mikropipette von oben gestattet. Das Gasgemisch tritt von unten durch eine feine Glasfritte ein und perlt in das wäßrige Medium. Die Gaswirbel in der Flüssigkeit sichern ihre gleichmäßige Durchmischung. Das Gefäß wird von außen mit Methanol gekühlt. Das eingeleitete Gas wird in einem Schlangenkühler auf die gleiche Temperatur wie das Reaktionsmedium gebracht. Die Länge des gekühlten Rohres beträgt 1,5 m.

Die Menge des gasförmigen Substrats wird mit Hilfe eines Ganzglas-Strömungsmessers (Fa. Lauda) bestimmt. Die Temperatur wird mittels eines Kältethermostats (Fa. Haake) reguliert. Die Isolierung der aus PVC bestehenden Kühlmittelschläuche erfolgt mittels Schaumgummi. Zwei Gasflaschen mit Druckminderer und Feineinstellung liefern das benötigte Gas: eine den reinen Stickstoff, die andere das Substratgemisch (4,6% CO<sub>2</sub>, 95,4% N<sub>2</sub>). Sie werden mit Hilfe des Hahns H mit dem Strömungsmesser und dadurch mit der Apparatur verbunden.

Die automatische Titration der im Laufe der Reaktion erzeugten Protonen wird mit Hilfe eines Kombititrators (Fa. Metrohm) durchgeführt. Das Gerät besteht aus einem pH-Meter (Typ E 300) mit einem empfindlichen Bereich zwischen pH 6 und 8,4, aus einem Impulsomat I (Typ E 373) und einem Dosigraph D (Typ E 364). Der Dosigraph ist an einen Schreiber S angeschlossen, der das Volumen des mit Hilfe der Mikroburette Mb zugegebenen Titriermittels (0,5 n NaOH) als lineare Funktion der Zeit registriert.

### III. Durchführung der Aktivitätsbestimmung

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die NaOH-Menge, die bei der Reaktion



zur Wahrung der pH-Konstanz verbraucht wird, als Funktion der Zeit registriert wird.

Für die Durchführung einer Bestimmung wird zunächst der reine N<sub>2</sub> durch den Puffer (ohne Enzym) im Titriergefäß so lange durchgeleitet, bis die gewünschte Temperatur von 6 °C erreicht ist. Dann wird N<sub>2</sub> durch die Substratmischung CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> ersetzt, und die spontane, d.h. nicht katalysierte Hydratisierungsreaktion des CO<sub>2</sub> registriert. Nach Zusatz von CA verläuft diese Reaktion (und damit der NaOH-Verbrauch pro Zeiteinheit) schneller (Abb. 2).

Die Zeitkonstante des Titrigraphs wurde so gewählt, daß eine optimale Titration erreicht wird. Diese Einstellung bestimmt einen maximalen NaOH-Zusatz pro Zeiteinheit, unterhalb dessen die Bestimmungsgenauigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich des Standardfehlers bleibt. Oberhalb dieses Wertes entspricht das Titrogramm nicht mehr dem tatsächlichen Reaktionsverlauf.

Die Steigung der Kurve (1) in Abb. 2 gibt die Geschwindigkeit  $V_0$  der spontanen Hydratisierungsreaktion wieder, während die der nach Zugabe des Enzyms registrierten Kurve (2) der Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion  $V_K$  entspricht. Die Differenz zwischen katalysierter und spontaner Reaktionsgeschwindigkeit ist die maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion  $V_E$ :

$$V_E = V_K - V_0$$

Als Zeiteinheit wählten wir die Minute. Die Enzymaktivität drückten wir je nach Fragestellung als mval  $H^+$  oder in Internationalen Einheiten (I.E.) aus.

Bei der praktischen Auswertung wird die Gerade (1) verlängert und  $x$  für  $PQ = 30$  mm in mm gemessen (Abb. 2). Da die Laufgeschwindigkeit des Papiers  $86 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  beträgt und 15 mm der Abszisse 0,1 ml 0,5 n NaOH entsprechen, wird die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in Routineversuchen für 1  $\mu\text{g}$  Enzym

$$V_E = x \cdot \frac{86 \cdot 1 \cdot 1}{30 \cdot 150 \cdot 2} = 0,96 \cdot 10^{-2} x \text{ [mval } H^+ \cdot \text{min}^{-1}]$$

angegeben. Soll die spezifische Aktivität (SEA) des Enzyms in Internationalen Einheiten (I.E.) pro mg Protein angegeben werden, gilt die Auswertungsformel:

$$SEA = 9,6 \cdot 10^3 \cdot x \text{ [I.E.} \cdot \text{mg}^{-1}]$$

#### IV. Physikochemische Parameter der Aktivitätsbestimmung

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Untersuchungen, die mit kommerziell erhältlichem Enzym durchgeführt wurden.

##### Puffer

Na-Veronal und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan weisen bei pH 7,4 eine gute Pufferwirkung auf. Die so gepufferten Lösungen sind jedoch insofern ungeeignet als sie während der Aktivitätsbestimmung schäumen. Eine verdünnte Lösung von Dinatrium- und Mononatrium-Phosphat eignet sich am besten.

##### pH

Abb. 3 gibt die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit wieder. Die Geschwindigkeit  $V_0$  der spontanen Reaktion nimmt mit wachsendem pH stetig zu, während die maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion  $V_E$  ein Maximum bei pH 7,9 aufweist. Da unsere Meßapparatur für pH > 8 die Grenze ihres feinen pH-Bereichs erreicht, werden die Messungen ungenau; dies erklärt auch die Streuung der Meßpunkte in diesem Bereich. Die Festlegung des pH ist nicht nur für die Chelatwirkung, sondern auch für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wichtig. Bei physiologischem pH 7,4 erreicht die Enzymaktivität 80% ihres bei pH 7,9 beobachteten Maximums, und der Kombitritrator weist eine befriedigende Empfindlichkeit und Meßgenauigkeit (Maximum bei pH 7,0) auf.

##### Temperatur

Aus Abb. 4 ist zu ersehen, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_0$  und  $V_E$  mit steigender Temperatur zunehmen. Der Temperaturkoeffizient  $Q_{10}$  beträgt zwischen 0 und 10 °C für  $V_0$  2,6 und für  $V_E$  1,2 im Falle des ungereinigten Enzympräparats bzw. 1,1 bei dem hochgereinigten Enzym CA-II (s. hierzu § C). Bei Temperaturen > 15 °C ist die nicht-katalysierte Reaktion an der Gesamthydratisierung des Kohlendioxids wesentlich beteiligt, so daß die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden kann.

Abb. 5 zeigt, daß der Temperatureffekt der Arrhenius-Gleichung entspricht:

$$\log V_E = \frac{A}{2,3 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} + K$$

Für die Aktivierungsenergie A ergibt sich 12,7 kcal, für die nichtkatalysierte Reaktion 3,8 und 1,7 kcal für die enzymatische Reaktion des ungereinigten bzw. hochgereinigten Enzyms. Der einzige in der Literatur erwähnte Wert von 8,9 kcal bezieht sich auf die Reaktion: Enzym-Substrat-Komplex — Enzym im Temperaturbereich von 0 bis 12,5 °C; außerdem handelte es sich um ein ungereinigtes Präparat (Kiese 1941).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig die höhere Genauigkeit der Bestimmung bei niedrigen Temperaturen. Praktisch die günstigste Meßtemperatur liegt bei 5 bis 6 °C. Größere Temperaturunterschiede als  $\pm 0,2$  °C während der Durchführung verschiedener Versuche wurden nicht beobachtet, so daß keine Korrekturen notwendig waren.

### Reaktionsvolumen

Ein Mindestvolumen von 20 ml ist notwendig, um das vollständige Eintauchen der Meßelektrode zu ermöglichen. Da man die gesamte Menge der erzeugten Protonen mit der Meßmethode erfaßt, war bei Vergrößerung des Puffervolumens eine Zunahme von  $V_0$  zu erwarten, während die enzymatische Reaktion  $V_E$  mit konstanter Geschwindigkeit verlaufen sollte. Die in Abb. 6 wiedergegebenen Ergebnisse bestätigen diese Erwartung. Für die Durchführung der Aktivitätsbestimmung wurde das Reaktionsvolumen mit 25 ml festgelegt.

### Geschwindigkeit der Substratzugabe

Wie aus der Abb. 7 zu ersehen ist, wird eine Sättigung des Enzyms durch das Substrat  $\text{CO}_2$  erst bei einer Strömungsgeschwindigkeit des Gasgemisches  $\text{CO}_2 + \text{N}_2$  von  $> 10 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$  er-

reicht. Da während der Messung kein Substratmangel auftreten darf, wählten wir eine Geschwindigkeit von  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ . Bei diesem Strömungswert beträgt das  $\text{CO}_2$ -Angebot  $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$ , während die vom Enzym während einer Messung umgesetzte Menge maximal  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$  erreicht. Da die  $\text{CO}_2$ -Löslichkeit in verdünnter Pufferlösung bei  $6^\circ\text{C}$  und  $1 \text{ atm}$   $6,14 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  beträgt, reicht die Substratzugabe vollkommen aus, um das verbrauchte  $\text{CO}_2$  während der Reaktion zu ersetzen.

Aus Abb. 7 geht auch hervor, daß eine Proportionalität  $V_E = k [S]$  ( $[S]$  = Substrat-Konzentration) nur bei Durchflußgeschwindigkeiten 2 bis  $5 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$  besteht. Dies hat zur Folge, daß die Variation der Substratkonzentration zu begrenzt ist, um die Michaelis-Konstante bestimmen zu können.

#### Konzentration des Puffers und des Enzyms

Abb. 8 zeigt die Proportionalität zwischen  $V_E$  und dem Enzymgehalt der Lösung für unterschiedliche Pufferkonzentrationen. Die Feststellung dieser Proportionalität ist für die Auswertung der Versuche von großer Wichtigkeit. Abb. 9 faßt für eine konstante Enzymmenge den Einfluß der Pufferkonzentration auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion zusammen. Die Hemmung der gemessenen Enzymaktivität, die bei Erhöhung der Pufferkonzentration auftritt, ist wahrscheinlich nicht auf die erhöhte Pufferkapazität, sondern auf die Erhöhung der Ionenstärke in der Lösung zurückzuführen, da keine lineare Beziehung zwischen  $V_E$  und Pufferkonzentration besteht.

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, ist die nach der Debye-Hückel-Theorie korrigierte Beziehung zwischen der Geschwindigkeitskonstante einer enzymatischen Reaktion und der Ionenstärke  $\mu$ :

$$\log k = \log k_0 + A \frac{\mu^{1/2}}{1 + 1,31 \mu^{1/2}} + K$$

(wobei  $A = a \cdot z_A \cdot z_B$  die Neigung der Gerade ist) verifi-

ziert, und zwar ist  $A = 4$  Ladungseinheiten. Davis (1958) fand einen Beitrag von 6 Einheiten; die von ihm untersuchten Ionenstärken umfassten allerdings einen kleineren Bereich, und bei dem Enzym handelte es sich um ein Rohpräparat.

Aus Abb. 10 ist auch der Einfluß der Verunreinigung des Rohenzym auf den Verlauf der Kurve zu ersehen. Die Abweichung der Linearität, die im Falle des gereinigten Enzyms bei hohen Ionenstärken auftritt, zeigt, daß der Effekt von  $\mu$  mit der korrigierten Gleichung nicht mehr vollständig erfasst wird.

Bei der Festlegung der optimalen Pufferkonzentration für unsere Aktivitätsbestimmungen muß neben dem Einfluß der Ionenstärke auch die Pufferkapazität berücksichtigt werden, da bei zu niedrigen Konzentrationen die Lösung schlecht gepuffert und der pH zu großen Schwankungen während der Titration unterworfen sein würden, was einerseits zu ungenauen Bestimmungen und andererseits zur Verwendung von zu begrenzten Enzymmengen führen würde. Aufgrund des Ionenstärke-Effekts kann die Konzentration jedoch auch nicht zu hoch gewählt werden, ohne an Bestimmungsempfindlichkeit zu verlieren. Mit einer Pufferkonzentration von  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  wurde ein praktisch vernünftiger Kompromiß geschlossen.

### Zusammenfassung

Die Bestimmung der CA-Aktivität in den weiteren Versuchen erfolgte somit unter folgenden Bedingungen:

Puffer:	Natriumphosphat, $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 25 ml.
pH:	7,4
Temperatur:	+ 6 °C
Gasgemisch:	15 l $\cdot \text{h}^{-1}$

Die Enzymmenge wurde so gewählt, daß die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion unterhalb  $14 \cdot 10^{-2} \text{ mval H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$  bleibt. Unter diesen Bedingungen wird eine für solche Bestimmungen recht gute Meßreproduzierbarkeit beobachtet. Der Standardfehler betrug  $\pm 7\%$ .

## V. Prüfung der Effektivität der Bestimmungsmethode

Es erschien uns zweckmässig, die Effektivität unserer Methode mit Hilfe eines bereits bekannten CA-Inhibitors wie z.B.  $\text{Na}_2\text{S}$  zu prüfen und die Ergebnisse mit Literaturdaten zu vergleichen. Da bei pH 7,4  $\text{Na}_2\text{S}$  jedoch hydrolysiert und der entstandene  $\text{H}_2\text{S}$  durch den durchströmenden  $\text{N}_2$  aus dem Bestimmungsansatz schnell entfernt wird, wählten wir 2-Acetylamino-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid (Acetazolamid, Diamox<sup>R</sup>) als Hemmstoff. Tabelle 3 vergleicht unsere Ergebnisse mit denen anderer Autoren. Unsere Daten stimmen mit denen von Woodford et al. (1961), die die Versuche mit einem ähnlichen Enzympräparat und die Aktivitätsbestimmung kolorimetrisch durchführten, recht gut überein. Wenn man die Konzentration des aktiven Materials im Präparat berücksichtigt (s. § C), erhalten wir für das Verhältnis  $E/I_{50}$  einen Wert von 1,4; die Übereinstimmung mit Lindskog (1963)<sup>50</sup> ist befriedigend, und wir können somit unsere Bestimmungsmethode der Enzymaktivität für die Durchführung der Untersuchungen als geeignet betrachten.

## C. Reinigung des Enzympräparats

Die Carboanhydratase erhielten wir in gefriergetrocknetem Zustand von der Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland. Es wurde aus Rindererythrocyten nach der Ammoniumsulfat-Methode von Keilin und Mann (1940) isoliert. Da Verunreinigungen des Präparats die Interpretation der Versuchsergebnisse erschweren würden, war es angezeigt, den Einfluß von Chelatbildnern an einem hochgereinigten Enzym zu prüfen, und es wurde deshalb folgende Untersuchung des kommerziellen Präparats (Rohenzym genannt) durchgeführt.

### I. Bestimmung des Reinheitsgrades

Wir prüften zuerst das Verhalten des Rohenzym bei er Chromatographie über eine Diäthylaminoäthyl(DEAE)-Cellulose-Säule. Es handelt sich hierbei um ein analytisches Verfahren. Die Eluierung erfolgte mit optimaler Trennung bei pH 6,80 mit

Hilfe eines stufenlos ansteigenden Konzentrationsgradienten von Natriumphosphat-Puffer. Durch Färbung des Eluats mit Ninhydrin wurde der Proteingehalt bestimmt und mittels eines Technicon Autoanalyzers registriert. Abb. 11 gibt das so erhaltene Chromatogramm wieder. Abb. 12 zeigt die Verteilung der CA-Aktivität nach Trennung über DEAE-Cellulose und Fraktionierung in je 3 ml Eluat. Als Maß für die Proteinkonzentration diente die Extinktion bei 280 m $\mu$ ; bei dieser Wellenlänge weist die CA eine maximale Absorption auf (Abb. 13). Bei den weiteren Routinemessungen wurde die Extinktion allerdings bei 253,7 m $\mu$  automatisch (LKB-Uvicord) registriert. Abb. 14 gibt die Extinktion der Maxima II und III (vgl. Abb. 12) bei verschiedenen Wellenlängen wieder. Die Verschiebung des "Uvicord"-Maximums hat rein technische Gründe (Volumen der Küvette und der Zuleitung zum Siphon).

Aus Abb. 12 ist zu ersehen, daß die CA in den Proteinfractionen II und III enthalten ist. Der Vergleich der Chromatogramme von Abb. 11 und 12 zeigt, daß bei präparativer Fraktionierung die Substanz I von Substanz II schlecht getrennt wird. Diese Diskrepanz ist darin begründet, daß die aufzutrennende Proteinmenge beim präparativen Verfahren mindestens 10mal größer als bei der analytischen Trennung ist. Die Rechromatographie nach der Ninhydrin-Methode bestätigt dies. Mit Ausnahme von Komponente I stimmen jedoch die nach den zwei Trennmethode erhaltenen Chromatogramme überein. Das Rohenzym weist somit stärkere Verunreinigungen auf, und seine Reinigung war deshalb notwendig.

Um die Trennung der Komponente I und II zu verbessern, wurde das Rohenzym mit Hilfe der Molekularsieb-Methode (Dextran-Gel Sephadex G-75) analysiert. Abb. 15. 1 zeigt die Extinktion nach Färbung des Eluats mit Ninhydrin und Abb. 16 die Lokalisierung der Enzymaktivität. Bei der niedermolekularen Fraktion C, die keine UV-Absorption sondern nur eine Ninhydrinfärbung aufweist, handelt es sich wahrscheinlich um das Ammoniumsalz, das für die Extraktion verwendet wurde. Da diese Fraktionen enzymatisch inaktiv sind, wurden sie verworfen.

Abb. 16 erbringt den wichtigen Befund, daß die gesamte Enzymaktivität im Maximum B konzentriert ist. Nach Entsalzung wurden die Fraktionen A und B gefrieretrocknet und über DEAE-Cellulose rechromatographiert. Die danach gewonnene Färbung des Eluats mit Ninhydrin zeigen die Chromatogramme in Abb. 15. 2. Die hochmolekulare Komponente A der Gel-Trennung setzt sich aus den Substanzen I und VI zusammen, während die Fraktion B nicht nur die enzymatisch aktiven Komponenten II und III, sondern auch eine enzymatisch inaktive Fraktion IV von gleichem Molekulargewicht enthält.

Die kleinen Peaks I und V bei der Rechromatographie der aus Gel-Filtration erhaltenen Fraktion B bzw. A (Abb. 15.2) können auf die ungenügende Trennung von A und B bei der Gel-Chromatographie zurückgeführt werden.

Die Chromatographie des Rohenzym über eine längere Gel G-75-Säule (130 cm statt 90 cm) zeigte, daß die Fraktion A aus zwei bezüglich des Molekulargewichts verschiedenen Komponenten  $A_1$  und  $A_2$  besteht (Abb. 17). Die Substanzen  $A_2$  und  $A_1$  konnten mit der Komponente I bzw. VI der Cellulose-Trennung identifiziert werden.

Aus diesen Ergebnissen und nach Berücksichtigung der Korngröße des Gels G-75, das ein gutes Trennvermögen für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 50000 besitzt, kann auf die Natur der verschiedenen Komponenten geschlossen werden. Die enzymatisch aktiven Substanzen II und III sind zwei Isoenzyme der CA, während V Ammoniumsulfat und VI Hämoglobin sein könnten. Die Natur der Proteine I und IV bleibt unbekannt.

Die Tab. 4 und 5 fassen die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Fraktionen und Präparate zusammen, wie sie sich bei den obigen Trennmethode ergibt. Der Anteil der enzymatisch aktiven Fraktionen II und III im Rohmaterial beträgt 45%, während er bei der durch Gelfiltration gewonnenen

B-Fraktion ca 86% erreicht, was eine wesentliche Verbesserung des Reinheitsgrads und damit auch der spezifischen Enzymaktivität bedeutet.

## II. Reinigungsverfahren

Aufgrund der vorstehend erwähnten Ergebnisse wählten wir folgende Reinigungsprozedur des kommerziell erhältlichen Enzympräparats.

Die Vorreinigung verläuft wie in dem Versuch von Abb. 16. Der Peak B, der die CA enthält, besteht aus drei Komponenten und muß weiter gereinigt werden. Dies erfolgt durch Chromatographie über DEAE-Cellulose. Da die dem Peak B entsprechenden Fraktionen ein zu großes Volumen aufweisen, um direkt auf DEAE-Cellulose aufgetragen zu werden, ist es notwendig, die Proteinlösung zu konzentrieren, ohne jedoch die Pufferkonzentration zu erhöhen. Dies erreicht man durch Gefrier-trocknung der Proteinlösung, setzt aber eine vorherige Entsalzung voraus. Diese erfolgt durch Austauschchromatographie über eine Säule von einem speziellen Ionenverzögerungsharz AG 11 A 8 (Bio Rad Laboratories, Richmond, USA). Das Harz bietet gegenüber der Dialyse die Vorteile der größeren Schnelligkeit und der vollständigen Ionenentfernung.

Zur Hauptreinigung der durch Gel-Filtration isolierten Fraktion B. wurde sie in wenigen ml verdünnten Puffer wieder gelöst (ca.  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und aufgetragen. Die Eluierung erfolgt durch Verwendung eines Konzentrationsgradienten von Natriumphosphat-Puffer (vgl. Abb. 15. 2). Die Trennung der Isoenzyme II und III ist meistens vollständig, und die Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen führt zu den voll gereinigten Proteinen. Während das Ausgangsmaterial dunkelbraun ist und kristalline Form zeigt, ist das gereinigte Enzym ein weißes flockiges Material. Im Endeffekt erhält man aus 100 mg Ausgangsmaterial 20 bis 25 mg des hoch gereinigten Isoenzym II und nur 3 bis 5 mg Isoenzym III.

### III. Reinheitskriterien und Identifizierung des Enzyms

Die so gewonnenen CA-Isoenzyme II und III wurden in einem weiteren chromatographischen Trennverfahren über DEAE-Cellulose mit Ninhydrin-Färbung des Eluats auf ihre Einheitlichkeit geprüft. Nur solche Präparate, die sich als homogen erwiesen, wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Abb. 18. 1 gibt für das Enzym II das so erhaltene Chromatogramm wieder.

Im Gegensatz zu Isoenzym II war es nicht möglich, das Isoenzym III einheitlich zu isolieren, was möglicherweise durch die Entsalzungsmethode bedingt sein könnte. Es wurden deshalb die Chromatogramme der Fraktionen III, die durch Bio Rad-Harz oder Dialyse entsalzt wurden, miteinander verglichen. Abb. 19 zeigt jedoch, daß auch bei Dialyse eine einheitliche Fraktion nicht zu gewinnen war.

Da das Isoenzym III im kommerziell erhältlichen Präparat in nur kleinen Mengen enthalten ist, wurden die im Laufe der Zeit gewonnenen Fraktionen für eine spätere endgültige Reinigung gesammelt und mehrere Monate in trockenem Zustand bei + 3 °C aufbewahrt. Dabei zeigt sich aber immer, daß die Fraktion III sich zu ca. 80 - 85% aus dem Isoenzym II und zu 15 - 20% aus dem Isoenzym III zusammensetzt. Das Verhältnis der beiden Isoenzyme II : III bleibt wie im Rohenzym ca. 5 : 1. Das Protein III ist also unbeständig und seine Anwesenheit immer mit der vom Isoenzym II verbunden. Im Gegensatz hierzu bleibt das Isoenzym II in trockenem Zustand und in keimfreier wäßriger Lösung mindestens 2 Tage bei 37 °C einheitlich. Es erschienen uns deshalb weitere Versuche (d.h. Reinigungs- sowie Inaktivierungsversuche) mit der enzymatisch aktiven Proteinfraction III zwecklos zu sein.

In diesem Zusammenhang ist auf einen methodisch wichtigen Punkt, die Keimfreiheit der verwendeten Lösungen, hinzuweisen. Abb. 20 zeigt, daß die Anwesenheit von Mikroorganismen in der Enzymlösung zu einer Änderung des Chromatogramms führen kann. Der Peak "1" entspricht nicht dem üblichen Peak "I",

da er durch Sephadex-Chromatographie vom Isoenzym II nicht abgetrennt werden kann. Keimfreie Lösungen erhielten wir durch Zugabe einiger Tropfen von Chloroform. Die Aktivität der CA wurde dadurch nicht geändert.

Als weitere Reinheitskontrolle verwendeten wir die Cellogel-Schnellelektrophorese. Abb. 18. 2 vergleicht das DEAE-Chromatogramm mit dem Elektropherogramm des Enzyms II. Die Elektrophorese weist ein besseres Trennungsvermögen auf.

Die in den weiteren Versuchen verwendete Fraktion II kann nach den vorstehend angeführten Ergebnissen als befriedigend rein angesehen werden, falls die Reinheit mindestens 95% beträgt.

Das Absorptionsspektrum (Abb. 13) des so gewonnenen Enzyms II im UV-Bereich ist typisch für Proteine, genau wie beim Rohenzym liegt das Maximum bei 280  $m\mu$  und das Minimum bei 250  $m\mu$ . Die Extinktion einer 0,1%igen Enzymlösung (1 cm-Zelle; pH 7,4) ist bei 280  $m\mu$  1,68 für das Enzym II, während sie nur 1,08 für das Rohenzym beträgt. Außerdem weist das Rohmaterial einen zusätzlichen Peak bei 410  $m\mu$  auf, der auf Hämoglobin zurückzuführen ist. Das Verhältnis  $E_{280}/E_{260}$  ist 1,8. Nimmt man ein Molekulargewicht von etwa 31000 an, so ergibt sich für das gereinigte Präparat eine molare Extinktion von etwa  $\epsilon = 52000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Lindskog (1960) und Liefländer (1964) erhielten für das aus Rindererythrocyten isolierte, hochgereinigte Enzym B, folgende Werte:  $E_{280} = 1,80$ ;  $E_{280}/E_{260} = 1,6 - 1,7$  und  $\epsilon = 56000$ .

Die Relevanz dieser Befunde ist mit Vorbehalt zu bewerten, da alle Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280  $m\mu$  besitzen und die molare Extinktion pH-abhängig ist.

Tabelle 6 gibt die enzymatische Aktivität der verschiedenen Präparate wieder und zeigt, daß eine gute Übereinstimmung zwischen dem Enzymgehalt und der spezifischen Enzymaktivität besteht.

Der Abb. 21 ist zu entnehmen, daß  $V_E = K[E]$  für alle Präparate verifiziert ist.

Für die durch Vorreinigung getrennten Substanzen  $A_I$ ,  $A_{II}$  sowie das Isoenzym II führten wir eine Molekulargewichtsbestimmung nach Whitaker (1963) über Sephadex Gel G-200 durch; es ergaben sich folgende Werte (Tabelle 7). Durch Bestimmung der Sedimentationskonstante gibt Lindskog (1960) für das von ihm untersuchte bCA-B einen Wert von  $31000 \pm 1000$  an, während die Aminosäureanalyse 30000 ergab. (Nyman und Lindskog 1964).

Da unsere Eichkurve mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist, (s. § 6) können die Werte für CA-II im extremen Fall 30000 bzw. 35000, 42000 - 49000 ( $A_{II}$ ) und 77000 - 90000 ( $A_I$ ) betragen.

Tabelle 2 faßt die in der Literatur angegebene Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen CA-Isoenzyme aus Menschen- und Rindererythrocyten und unsere eigenen Ergebnisse zusammen. Die von uns angegebenen Mittelwerte betreffen drei Proteinhydrolysate, wobei für jedes drei Analysen durchgeführt wurden. Da unser Enzympräparat aus Rindererythrocyten stammt, kann es unmittelbar nur mit der bCA-B verglichen werden. Die Tatsache, daß die von uns ermittelten Asp-, Thr- und Ser-Werte mit den von Nyman und Lindskog (1964) gefundenen Werten nicht übereinstimmen, hängt aller Wahrscheinlichkeit nach damit zusammen, daß die von uns gewählte Hydrolysedauer von 22 Std. zu kurz war, um zu einem kompletten Abbau des Proteins zu führen. Bezüglich der anderen Aminosäuren ist die Übereinstimmung sehr befriedigend. Der Vollständigkeit halber ist zu der Tabelle die Zusammensetzung eines Präparats der Komponente III angeführt. Aus dem Fehlen von Methionin könnte auf eine Oxidation während der Hydrolyse geschlossen werden. Sonst weist die Analyse der CA-III wohl größere Fehlerbereiche, aber keinen wesentlichen Unterschied zu dem gereinigten Enzym II auf.

Der Vergleich der Zusammensetzung des Isoenzym B mit der des gereinigten Präparats II (unter Berücksichtigung der Hydrolysezeit) führt zu der Schlußfolgerung, daß es sich um die gleichen Isoenzyme handelt. Die Bestimmung des Molekulargewichtes stützt ebenfalls diese Annahme.

Von Bedeutung für die Art der Komplexverbindung Zn-Protein in der CA ist die Abwesenheit von Cystein oder Cystin im Rinderenzym. Obgleich die CA des Menschen ein Cystein enthält, berechtigt die bei allen Isoenzymen identische Verhaltensweise des Zn zu der Annahme, daß auch bei der menschlichen CA das Zn nicht am Schwefel gebunden ist, wie dies bei vielen anderen Zn-haltigen Proteinen (z.B. der Carboxypeptidase) (Vallee et al. 1963, Wintersberger et al. 1965) der Fall ist.

Die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Isoenzyme aus Menschen- und Rindererythrocyten sollte sich auch in unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften manifestieren. Dies entspricht den tatsächlichen Verhältnissen (s. Tabelle 1).

Obwohl die bCA-B von Lindskog (1960) mit unserem Isoenzym II aus Rindererythrocyten identisch ist, behalten wir im weiteren die Bezeichnung bCA-II bei. Die aus Gel G-75-Chromatographie gewonnene Fraktion B wird als bCA.G-75-Präparat bezeichnet und enthält ca. 85% biologisch aktives Material, während das kommerziell erhältliche Enzym mit bCA-Roh oder Rohenzym bezeichnet wird.

#### D. Einfluß der Chelatbildner auf die Enzym-Aktivität

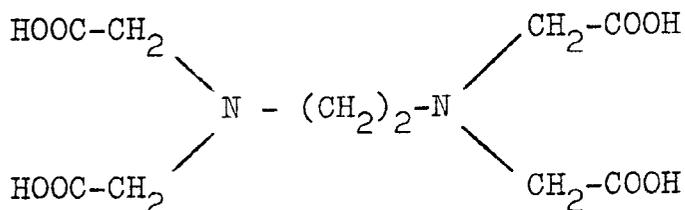
##### I. Auswahl der untersuchten Chelatbildner

Da die CA im Gegensatz zu anderen bekannten Zink-Enzymen eine sehr hohe Affinität zu Zn aufweist (Davis 1959, Lindskog und Nyman 1964), war als erste Bedingung für die zu untersuchenden Chelatbildner eine hohe Stabilitätskonstante des Zn-Chelats vorauszusetzen. Ein weiterer Gesichtspunkt war die Wasserlöslichkeit der Verbindungen bei pH 7,4. Unabhängig von der Höhe der Stabilitätskonstante erschien es uns wünschenswert, auch den Einfluß der molekularen Konfiguration

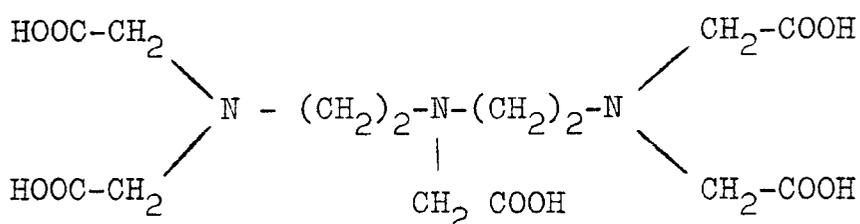
sowie der Art der Ligandatome zu prüfen. Es wurden deshalb auch einige Verbindungen untersucht, deren Affinität zu Zn noch nicht bestimmt ist.

Im einzelnen handelt es sich um:

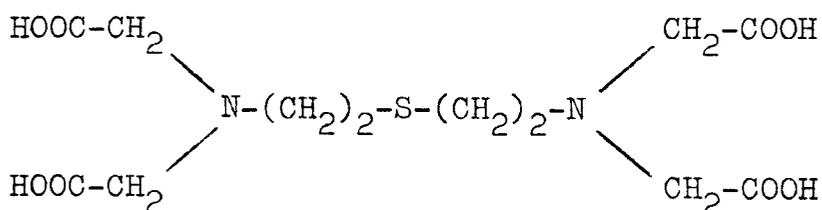
1. Äthylendiamin - N, N, N', N'-tetraessigsäure (ÄDTA)



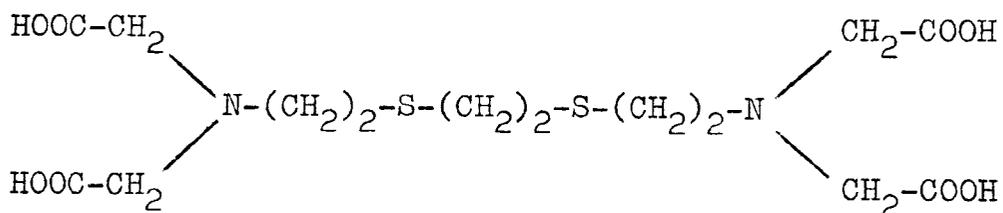
2. Diäthylentriamin - N, N, N', N'', N''-pentaessigsäure (DTPA)



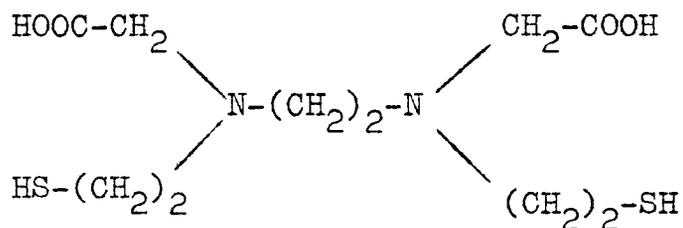
3. 2,2'-Bis[di(carboxymethyl)amino]diäthylsulfid (BADS)



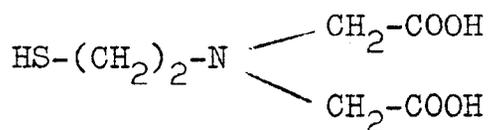
4. 1,2-Bis[2-di(carboxymethyl)aminoäthylthio]äthan (BATÄ)



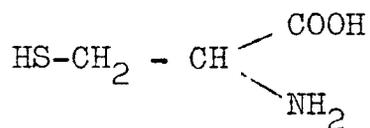
5. N,N'-Bis (2-Merkaptoäthyl)äthylendiamin-N,N'-diessigsäure (BMÄDA)



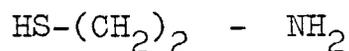
6. N-2-Merkaptoäthyliminodiessigsäure (MÄIDA)



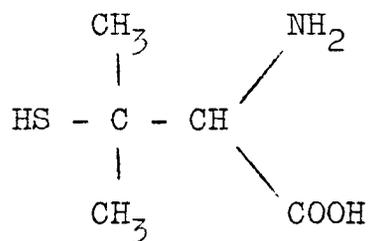
7. L-Cystein (Cys)



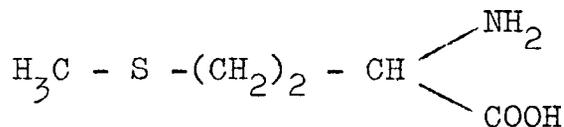
8. Cysteamin (CysA)



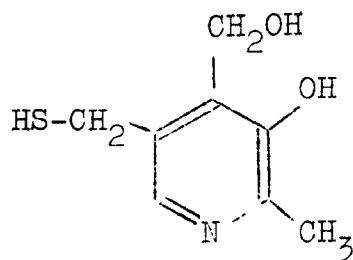
9. D-Penicillamin, Hydrochlorid (PA)



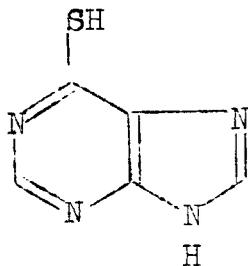
10. Methionin (Met)



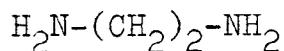
11. 5-Merkaptopyridoxin, Hydrochlorid (MP)



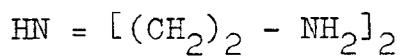
12. 6-Merkaptopurin (MPur)



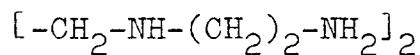
13. Äthylendiamin (EN)



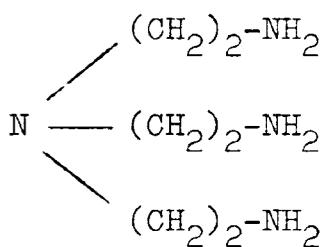
14. Diäthylentriamin (DIEN)



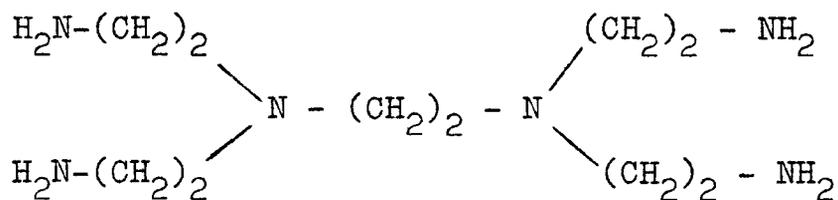
15. Triäthylentetramin (TRIEN)



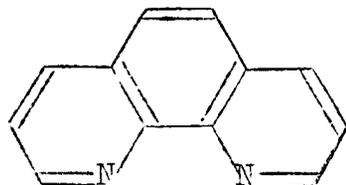
16. 2,2',2''-Tri-(aminotriäthyl)amin (TREN)



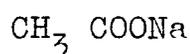
17. N,N,N',N'-Tetra-(2-aminoäthyl)äthylendiamin (PENTEN)



18. 1,10-Phenanthrolin (PHEN)



19. Natriumacetat (Ac)



Verbindungen 1. - 6. wurden als Natriumsalze untersucht, Verbindung 2. auch als Ca- oder Zn-Chelat.

Tabelle 8 informiert, soweit bekannt, über die Konstanten dieser Liganden.

## II. Allgemeine Überlegungen

Für das Verständnis der Ergebnisse dürfte es zweckmäßig sein, ihrer Darstellung und Diskussion einige allgemeine Bemerkungen über die biologische Wirksamkeit von Chelatbildnern voranzustellen.

Unsere Untersuchungen gingen von der Überlegung aus, daß die Zn-Entfernung aus der CA-Molekel durch Chelatbildner zu einer Abnahme der Enzymaktivität führt. Da die Enzymaktivität dem Zn-Gehalt proportional ist (Lindskog und Malmström 1962), sollte das Ausmaß der Inaktivierung eine einfache Funktion der mobilisierten Zn-Menge sein.

Komplex-chemisch definiert, ist die Effektivität (E) eines Chelatbildners durch das Verhältnis von chelierten zu freien Metallionen bestimmt und hängt in erster Linie von der sog. Bruttobildungskonstante  $\beta_i$  ab (Schwarzenbach 1965):

$$\beta_i = \prod_{i=1}^n \cdot \frac{[ML_n]}{[ML_{n-1}][L]} = K_{1LM} \cdot K_{2LM} \cdot K_{3LM} \dots \dots K_{iLM} \quad (1)$$

M ist ein Metallion, L der Komplexbildner,  $ML_n$  ein n Ligand : 1 Metall-Komplex und  $K_{iLM}$  sind die individuellen Bildungskonstanten der i Liganden : 1 Metall-Chelate. Da im speziellen Fall der höherzähligen Liganden in der Regel  $K_{1LM} \gg K_{2LM} > K_{3LM} \dots \dots$  ist, wird ihre Effektivität in erster Näherung der Konstante  $K_{1LM}$  proportional:

$$E = \frac{[ZnL]}{[Zn]} = K_{1LZn} \cdot [L]_t \quad (2)$$

Mit  $[L]_t$  ist die Gesamtkonzentration des Chelatbildners bezeichnet; die Beziehung gilt nur, wenn  $[L]_t > [M]_t$  ist.

Unberücksichtigt blieb in (2) der Einfluß konkurrierender Kationen, konkurrierender Liganden und Anionen (im vorliegenden Fall z.B. von Phosphat-, OH-Ionen und des Apoenzyms der CA). Bei den Kationen sind in erster Linie die  $H^+$ -Ionen zu berücksichtigen, da die Protonierung des Liganden die Stabilität der Chelate wesentlich erniedrigt. Durch Verwendung eines Verteilungskoeffizienten  $\alpha_{(H)}$  kann nach Schwarzenbach (1965) die Konstante  $K_{1LZn}$  entsprechend korrigiert werden; man erhält so die scheinbare oder "effektive" Konstante  $K'_{1LZn} \cdot \alpha_{(H)}$  berechnet sich aus den Basizitätskonstanten ( $K_y^H$ ) der Chelatbildner für einen gegebenen pH. Abb. 22 zeigt die Änderung von  $K'_{1LZn}$  als Funktion des pH. In Tab. 8 sind die Basizitätskonstanten sowie die für pH 7,4 berechneten  $K'_{1LZn}$ -Werte zusammengestellt. Der Einfluß der Na-Ionen des Puffers kann ohne weiteres vernachlässigt werden, da die Stabilität der Na-Chelate sehr gering ist. Die Hydroxokomplexe des

freien Zn dürfen ebenfalls vernachlässigt werden, da die verwendeten Komplexbildner bei pH 7,4 mit allen Metallionen hydrolysebeständige Komplexe bilden. Was die Konkurrenz des Phosphations betrifft, so weisen die Phosphatkomplexe des Zn eine im Vergleich zu den Chelaten wesentlich geringere Beständigkeit auf.

Für die Chelierung der echt gelösten Zn-Ionen durch Bildung eines 1 : 1-Chelats ist somit bei pH 7,4 die Effektivität eines Liganden:

$$E = \frac{K'_{1LZn} \cdot [L]_t}{\alpha(H)} = K'_{1LZn} \cdot [L]_t \quad (3)$$

In unserem Fall liegt jedoch Zn nicht als echt gelöstes Zn-Ion vor, sondern als Enzymkomplex, so daß die CA als konkurrierender Komplexbildner zu betrachten ist, dessen Bildungskonstante bei pH 7,4  $K'_{1EzN}$  wäre (E = Enzym). Demnach wäre eine zunehmende Effektivität des Chelatbildners mit zunehmendem Überschuß  $[L]_t/[E]_t$  zu erwarten; gleichermaßen sollte E mit zunehmender  $K'_{1LZn}$  ansteigen. E kann bei Berücksichtigung der Konkurrenz des Enzyms formuliert werden:

$$E = \frac{K'_{1LZn}}{K'_{1EzN}} \cdot \frac{[L]_t}{[E]_t} \quad (4)$$

$[E]_t$  ist die Gesamtkonzentration des Enzyms.

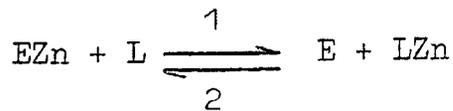
Wenn - in Analogie zu pH - pZn als

$$pZn = - \log [Zn^{++}]$$

definiert ist, müssen die pZn-Werte bei Anwesenheit des Liganden ( $pZn_{(L)}$ ), wie sie sich aus (3) ergeben, mit dem des Enzyms ( $pZn_{(E)}$ ) verglichen werden:

$$pZn_{(L)} - pZn_{(E)} = pZn_{(L-E)}$$

Diese Differenz sagt aus, in welcher Richtung die Reaktion



verläuft, d.h. ob unter dem Einfluß von Chelatbildnern überhaupt eine Zn-Mobilisierung stattfinden kann: Ist  $p\text{Zn}_{(\text{L-E})} < 0$ , ist keine Zn-Mobilisierung durch den Chelatbildner möglich. Wenn  $p\text{Zn}_{(\text{L-E})} > 0$  ist, wird das Enzym inaktiviert und das Ausmaß der Inaktivierung durch die Gleichung (4) bestimmt (Abb. 23).

Die experimentell faßbare Effektivität von Chelatbildnern wird im folgenden als der Quotient

$$\frac{\text{Aktivität der CA in Anwesenheit von L}}{\text{Aktivität der CA in Abwesenheit von L}} = \frac{a}{a_0} = Q$$

definiert. Dies ist insofern gerechtfertigt, als die CA-Aktivität dem Zn-Gehalt proportional ist. Da  $\log Q = -\log E$  (Heller und Catsch 1959) ist, wird die experimentell faßbare Effektivität:

$$\log \frac{a}{a_0} = -\log \frac{K'_{1\text{LZn}} \cdot [\text{L}]_t}{K'_{1\text{EZn}} \cdot [\text{E}]_t} \quad (5)$$

Danach ist eine zunehmende Enzyminaktivierung mit ansteigendem Ligandüberschuß zu erwarten, und die Inaktivierungskurve

$$\log \frac{a}{a_0} = f\left(\log \frac{[\text{L}]_t}{[\text{E}]_t}\right)$$

sollte eine Neigung 1 aufweisen. Eine Inaktivierung tritt nur dann auf, wenn  $p\text{Zn}_{(\text{L})} \simeq p\text{Zn}_{(\text{E})}$  ist. In diesem Bereich sollte die Inaktivierungskurve noch nicht linear verlaufen, sondern eine Schulter zeigen. Die Ligandkonzentration, bei der eine Hemmung gerade nachweisbar wird, erhält man durch Extrapolation der Inaktivierungsgerade für  $\log a/a_0 = 0$ .

### III. Methodik der Untersuchungen

Der Einfluß der Chelatbildner auf die Aktivität der CA wurde in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen untersucht: in der ersten, gewissermaßen orientierenden Anordnung ("sofortige Hemmung") bestimmten wir, welche der untersuchten Verbindungen eine ausreichend hohe Inaktivierung hervorruft, um dann in der zweiten Anordnung die Effektivität einiger ausgesuchter Chelatbildner detaillierter zu prüfen.

#### 1. Sofortige Hemmung

Unter diesem Begriff ist die Hemmung der CA zu verstehen, die bei kurzzeitiger Wechselwirkung zwischen Enzym und Ligand auftritt. Die Bestimmung der sog. Sofort-Hemmung erfolgt, indem der Chelatbildner während der Aktivitätsbestimmung in den Reaktionsansatz zugegeben wird. Da die Methode wenig Aufwand erfordert, eignet sie sich besonders für die Durchführung von sog. "screening tests". Sie weist jedoch unter Umständen den Nachteil einer Wechselwirkung Ligand-Substrat, von Meßartefakten und einer evtl. unvollständigen Enzym-Ligand-Reaktion auf. Tatsächlich ließ sich eine Wechselwirkung zwischen Ligand und  $\text{CO}_2$  bei den Polyaminen (s. § IV 1.) nicht vermeiden. Wenn von Meßartefakten gesprochen wurde, so dachten wir zunächst an eine Hemmung der CA-Aktivität infolge der erhöhten Ionenstärke im Titriergefäß, die somit nicht auf eine Metallmobilisierung zurückzuführen wäre, falls die benötigte Chelatkonzentration die des Puffers übersteigt. Schließlich braucht die Enzym-Ligand-Reaktion nicht momentan zu verlaufen, so daß die Messung der Sofort-Hemmung nur einen Hinweis auf die Größenordnung der Effektivität, nicht jedoch auf das tatsächliche Inaktivierungsmaß liefert. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse müssen deshalb mit Vorbehalt betrachtet werden.

Praktisch verläuft die Bestimmung der sofortigen Hemmung folgendermaßen: Nach Messung der Kontroll-Aktivität erfolgt eine zweite Messung, wobei der Chelatbildner (dessen wäßrige Stammlösung bei pH 7,4 mit Natriumphosphat gepuffert ist) direkt in das Titriergefäß zugesetzt wird. Dadurch wird auch gegebenenfalls die Beeinflussung der nichtkatalysierten Reaktion berücksichtigt. Die bei der zweiten Messung bestimmte Enzymaktivität ( $a$ ) wird in % der Kontroll-Aktivität ( $a_0$ ) ausgedrückt und ergibt die Aktivität durch "sofortige" Hemmung. Der Fehler für den Quotient  $\frac{a}{a_0}$  beträgt im extremen Fall 10%, was dem Standardfehler der Aktivitätsbestimmung entspricht und für biologische Messungen annehmbar ist.

## 2. Zeitlicher Verlauf der Hemmung

In dieser Versuchsanordnung wurde die CA-Aktivität nach Inkubation mit einem Chelatbildner zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, die Effektivität der Chelatbildner genauer und vollständiger zu erfassen. Weiterhin entfallen die oben erwähnten Vorwürfe gegen die erste Methode. Wegen der außergewöhnlichen Widerstandsfähigkeit der CA gegenüber Chelatbildnern kann die Inkubationsdauer bis zu 48 Stunden betragen, bevor es zu einer stärkeren Hemmung kommt. Die Beständigkeit des Enzyms im Kontrollversuch unter den jeweiligen Bedingungen muß deshalb gewährleistet sein, um Aussagen über den Liganden-Einfluß zu erlauben.

Während die sofortige Hemmung bei 6 °C bestimmt wurde, führten wir die Inkubierungsversuche bei physiologischen Temperaturen (37 °C) oder Zimmertemperatur (~ 25 °C) durch. Die Inkubierung bei 25 bzw. 37 °C zeigte keinen signifikanten Einfluß der Temperatur. Die gepufferte Enzym-Ligand-Lösung inkubierten wir unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem thermostatisierten Inkubierungsgefäß (Abb. 24), um die Fixierung des Luft-CO<sub>2</sub> durch die CA und dadurch die Erniedrigung des pH sowie eine eventuelle Oxidation des Liganden durch O<sub>2</sub> zu

vermeiden. Das Gefäß besteht aus einem Glasgefäß (G), das die Reagentien (R) enthält und mit Hilfe eines Kunststoff-Deckels (D) verschlossen wird; das Glasgefäß befindet sich in einem zugeschraubten thermostatisierten Plexiglasbehälter (A). Für die Einregulierung der Temperatur auf  $37^{\circ}\text{C}$  diene Wasser. Der Deckel ist mit 4 Öffnungen für Normal-Schliffe ( $\varnothing 14,5 \text{ mm}$ ) versehen und trägt ein Kontrollthermometer (T), eine kombinierte Meßglaselektrode (E) und die Stickstoffzu-leitung (L). Die vierte Öffnung bleibt offen, um einerseits den  $\text{N}_2$ -Druck bei 1 atm zu halten und andererseits die Ent-nahme der Probe zu ermöglichen.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden Aliquote aus dem Inkubierungsgefäß entnommen, mit Puffer zur gewünschten Konzentration verdünnt, so daß der Enzym-Gehalt des Aliquots in den Effektivitätsbereich der Meßapparatur fällt, und in das Titriergefäß zugefügt. Durch die Verdünnung könnte eine eventuelle Reaktivierung des Enzyms durch Spuren von  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  u.a. stattfinden; dies wurde durch Zusatz von  $1 \cdot 10^{-4} \text{ m Na}_2$ -ÄDTA in Puffer verhindert. Bei dieser ÄDTA-Kon-zentration tritt keine CA-Inaktivierung auf. Die so ge-messene Aktivität wird auf die Ausgangsaktivität (Inkubierungs-zeit  $t = 0$ ) bezogen, welche der Kontroll-Aktivität entsprechen sollte, und in Prozent ausgedrückt.

#### IV. Ergebnisse

##### 1. Sofortige Hemmung

Bei der Inaktivierung von CA-Präparaten G 75 und Isoenzym II mit verschiedenen Chelatbildnern unter den in § III. 1 be-schriebenen Bedingungen und für konstante Enzym-Konzentration ( $1,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) ergaben sich Inaktivierungskurven, die im doppelt-logarithmischen Maßstab eine lineare Abhängig-keit der verbleibenden Enzymaktivität  $\frac{a}{a_0}$  vom Verhältnis [Ligand]/[Enzym] zeigen (Abb. 25 - 27). Die Neigung der Geraden berechneten wir mit Hilfe der Regressionsanalyse.

Der Fehler der Regressionskoeffizienten beträgt ca. 7 - 10 %. Aus den Abbildungen geht hervor, daß eine Inaktivierung nur bei höherem Ligandüberschuß ( $L/E > 10^5$ ) auftritt, was auf die hohe Stabilität des Zn-Protein-Chelats hinweist (vgl. hierzu die Überlegungen in § II). Die Neigung der Kurve (k) hängt, wie aus Tab. 9, Abb. 25, 26 und 27 zu entnehmen ist, von der Art der Chelatbildner ab; mit Ausnahme von MP, für das die Neigung 0,9 beträgt, sind die Regressionskoeffizienten  $\ll 1$ . In Tab. 9 ist weiterhin die Ligand-Konzentration angeführt, für welche die Inaktivierung 0% ( $I_0$ ) bzw. 50% ( $I_{50}$ ) beträgt, wie sie durch Extrapolation bzw. Interpolation des linearen Abschnitts der in Abb. 25, 26 und 27 wiedergegebenen Kurven erhalten wurde.

Die Bestimmung der Effektivität von PHEN war deshalb nicht möglich, da eine Wechselwirkung dieses Amins mit der Elektrodenmembran stattfindet und die Bestimmung des pH unmöglich macht.

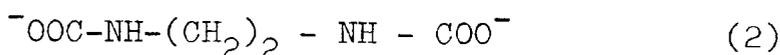
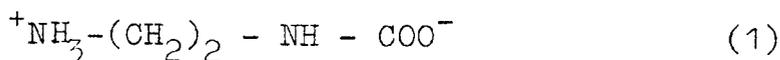
Da Na-Acetat trotz niedriger  $K'_{1LZn}$  eine Wirkung ausübt, die mit der von ÄDTA, DTPA und des Phosphat-Puffers vergleichbar ist (Abb. 25 und 26), könnte die Enzyminaktivierung nicht auf die Chelierung des Zn, sondern auf eine unspezifische Hemmung, z.B. durch Erhöhung der Ionenstärke (vgl. § B.IV.6), zurückgeführt werden. Weiterhin ist bekannt, daß Chlorid-Ionen die CA zu hemmen vermögen (Kernohan 1965), so daß die Inaktivierung im Falle des (als Hydrochlorid vorliegenden) MP ihre Ursache in den Cl-Ionen finden könnte. Wie Kurve A in Abb. 28 zeigt, hemmen höhere Cl-Konzentrationen tatsächlich die CA. Da Pyridoxin-Hydrochlorid die CA zwar hemmt (Kurve B in Abb. 28), jedoch in wesentlich geringerem Maße als MP-Hydrochlorid (vgl. Abb. 26), darf angenommen werden, daß die Inaktivierung auf die Mercaptogruppe des MP zurückzuführen ist. Die Neigung der für MP erhaltenen Inaktivierungskurve beträgt nach Korrektur noch 0,8.

Die Interpretation der mit den Polyaminen erhaltenen Inaktivierungskurven wird insofern erschwert, als die Amino-  
gruppen dieser Liganden mit dem Enzym-Substrat unter Bil-  
dung von Carbamaten reagieren, was zur Freisetzung zusätz-  
licher Protonen führt (Jensen und Christensen 1955). Die  
Titration dieser Protonen erfolgt während der Bestimmung  
der unkatalysierten  $\text{CO}_2$ -Hydratisierungsreaktion, und die  
dabei erzeugten  $\text{Na}^+$ -Ionen erhöhen die Ionenstärke des Mediums  
vor dem Start der Enzymreaktion, was eine unerwünschte Ver-  
minderung von  $V_E$  und eine Verstärkung der Hemmung zur Folge  
hat (s. § B.IV.6). Um diesen Effekt zu berücksichtigen,  
wurde ein Korrekturfaktor eingeführt (s. Abb. 29), mit dessen  
Hilfe die Inaktivierung durch Erhöhung der Ionenstärke aus-  
geschlossen werden sollte. Der Korrekturfaktor wurde bestimmt,  
indem wir die unkatalysierte Reaktion  $V_0$  so lange ablaufen  
ließen, bis die zur Titration benötigte 0,5 n NaOH Volumina  
erreichte, wie sie denen in den Versuchen mit Polyaminen  
entsprechen. Die Einführung dieser Korrektur setzt eine Addi-  
tivität der Inaktivierung durch Erhöhung der Ionenstärke und  
durch die eigentliche Wirkung der Polyamine voraus; ob dies  
tatsächlich der Fall ist, kann noch nicht entschieden werden.

Die Anwendung der Korrektur vermindert zwar die Streuung der  
Meßpunkte, vereinfacht jedoch nicht die Interpretation der  
Kurven (vgl. auch Tab. 9), da z.B. beim TRIEN eine konstante  
Hemmung trotz zunehmenden Ligandüberschusses auftritt. Dies  
ließ Zweifel an der Richtigkeit der Korrektur aufkommen, und  
wir beabsichtigten deshalb, den Einfluß der Polyamine auf  
die Esterase-Aktivität der CA zu bestimmen, da in diesem Fall  
nicht  $\text{CO}_2$ , sondern p-Nitrophenylacetat (pNPA) als Substrat  
dient. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der spektro-  
photometrischen Methode von Tashian et al. (1964), wobei  
durch Hydrolyse von pNPA p-Nitrophenol freigesetzt und bei  
400  $\mu$  gemessen wird. Blindversuche zeigten aber, daß sowohl  
Aminogruppen als auch sulfhydryl-haltige Liganden die Este-  
rolyse des pNPA katalysieren (Obara und Ogasawara 1959),  
so daß im Laufe weniger Sekunden kein Substrat mehr vorhan-  
den ist.

Wie in § D. II begründet wurde, sollte aufgrund der Hypothese, daß der Inaktivierung der CA durch Chelatbildner primär die Mobilisierung von Zn ursächlich zugrunde liegt, 1) für die Inaktivierungskurven eine Neigung  $k = 1$  und 2) eine positive Korrelation zwischen der effektiven Konstante  $K'_{1LZn}$  und dem Ausmaß der Enzymhemmung erwartet werden. Daß die Inaktivierungskurven wesentlich flacher verlaufen, wurde bereits erwähnt. Auch Punkt 2) konnte nicht bestätigt werden. Abb. 30 zeigt, daß die  $I_0$ -Werte der meisten Liganden in die gleiche Größenordnung fallen, obwohl die  $K'_{1LZn}$  sich um 12 Größenordnungen voneinander unterscheiden. Aus Abb. 31 ist zu entnehmen, daß auch die  $I_{50}$ -Werte unsystematisch streuen und daß Liganden mit sehr hohen  $K'_{1LZn}$ -Werten wie ÄDTA, DTPA, BATÄ die geringste Wirksamkeit aufweisen. Da offenbar kein wesentlicher Unterschied zwischen der Hemmung der CA-Präparate G 75 und II besteht (Abb. 25 und 26, Tab. 9), wurden in den Abbildungen 30 und 31 die entsprechenden Mittelwerte der  $I_0$ - und  $I_{50}$ -Werte angeführt.

Die Ergebnisse mit den Polyaminen sind übrigens nicht nur wegen des fraglichen Korrekturfaktors mit Vorbehalt zu betrachten, sondern auch aus folgenden Gründen: Jensen und Christensen (1955) stellten fest, daß EN leicht Mono- und Dicarbamate bilden kann:



Für unsere experimentellen Bedingungen (pH 7,4) und nach Berücksichtigung der verschiedenen Gleichgewichte, Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der zur Carbamatbildung führenden Reaktionen kann angenommen werden, daß EN praktisch nur als Monocarbat (1) vorliegt. Bei dieser Reaktion sollten 1,4 Protonen-Äquivalente pro EN-Molekel freigesetzt werden. Tatsächlich entspricht die vor dem Start der enzymatischen Reaktion verbrauchte NaOH-Menge dieser Annahme, da die Verbrauchskurve als Funktion der EN-Konzentration

eine Steigung  $\sim 1,3$  aufweist (Abb. 32, Kurve 1). Das Monocarbamat des EN besitzt nun zwei Ligandatome, ein Stickstoffatom und eine Carboxyl-Gruppe in  $\alpha$ -Stellung, während die Ligandatome des EN selbst zwei Stickstoffatome in  $\beta$ -Stellung sind. Es handelt sich also um zwei unterschiedliche Liganden mit (wahrscheinlich) unterschiedlichen  $K'_{1LZn}$ -Werten. Die gleichen Überlegungen gelten auch für die übrigen Polyamine.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Analyse der Inaktivierung ist somit die genaue Kenntnis der Zusammensetzung des Meßmilieus. Wenn für den verhältnismäßig einfachen Fall des EN die CA-Hemmung auf die Wirkung der Monocarbamat-Verbindung zurückgeführt werden konnte, ist es jedoch äußerst schwierig, den Anteil der möglichen Reaktionsprodukte im Testmedium für die anderen Polyamine mit einer größeren Zahl von Aminogruppen exakt zu erfassen. Obwohl die Kurve des NaOH-Verbrauchs im Falle des TRIEN eine Steigung 1,1 aufweist (Abb. 32), ist es im Hinblick auf die hier besonders komplizierten Verhältnisse wenig sinnvoll, Überlegungen bezüglich der im einzelnen ablaufenden Reaktionen anzustellen.

TREN stand uns nur als Hydrochlorid (TREN  $\cdot$  3 HCl) zur Verfügung, so daß die Molzahl der Ligandatome nur 1 anstatt 4 im eigentlichen TREN beträgt. Die Carbamatbildung erreicht deshalb auch, wie aus Abb. 27 (Kurve 4) zu ersehen ist, ein nur geringes Ausmass.

Aufgrund der Carbamatbildung einerseits und der Hydrolyse des Substrats durch die Polyamine während der Bestimmung der Hydratase- bzw. Esterase-Aktivität andererseits sind somit quantitative Auslegungen nicht möglich, indem die Korrelation zwischen Effektivität und Struktur dieser (eine interessante strukturelle Homologie aufweisenden) Liganden nicht untersucht werden konnte.

## 2. Hemmung nach Inkubation

Die Tatsache, daß die Inaktivierungskurven eine Neigung wesentlich  $< 1$  zeigen, könnte unter Umständen auf die Unvollständigkeit der Reaktion zwischen Enzym und Ligand zurückgeführt werden, da nur die sofortige Wechselwirkung erfaßt wurde. Es wurde deshalb der zeitliche Verlauf der Inaktivierung der CA durch einige ausgewählte Chelatbildner, die uns nach den Ergebnissen von § IV. 1 besonders interessant erschienen, untersucht. Es handelt sich um: ÄDTA, DTPA, MÄIDA, Cys, CysA, BADS, BATÄ, Met und PHEN.

### a) Beständigkeit der CA

Es war zunächst erforderlich zu prüfen, ob die CA-Aktivität während der Inkubierung abnimmt. Wir inkubierten die verschiedenen CA-Präparate (Rohenzym, CA-G 75 und CA-II) in  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Natriumphosphat-Puffer bei  $37^\circ \text{C}$  und pH 7,4. Der Tab. 10 ist zu entnehmen, daß eine Enzymkonzentration von mindestens  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) nötig ist, um eine ausreichende Beständigkeit der CA während einer Inkubierung von 24 Stunden zu gewährleisten. Allerdings ist auch diese Konzentration im Falle des Rohenzym noch zu klein, wenn nicht nur orientierende Kurzversuche sondern 24-stündige Inkubationsversuche vorgenommen werden.

Die Aktivität des Rohenzym und der CA-G 75 nimmt während der ersten Stunden der Inkubierung bis um 25% zu. Dieser Effekt könnte auf den Einfluß der Inkubierungstemperatur zurückgeführt werden, da bei  $20^\circ \text{C}$  die Aktivierung nur ca. 15% für CA-G 75 erreicht.

Daß eine  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  CA-Lösung (G 75 oder II) eine ausreichende Beständigkeit aufweist, ist für die Durchführung von Routineversuchen insofern günstig, als die Aktivitätsbestimmung keine Verdünnung der inkubierten Lösung erfordert.

Die Bestimmung der sog. Soforthemmung hatte gezeigt, daß die Inaktivierung einen hohen Ligandüberschuss zur Voraussetzung hat. Bei Inkubierung des Enzyms mit ÄDTA oder DTPA könnte somit unter Umständen eine Inaktivierung auftreten, die auf den Einfluß der Ionenstärke zurückzuführen wäre. Diese Hypothese können wir jedoch verwerfen, wie ein entsprechender Kontrollversuch mit 0,5 n Na-Acetat zeigt (Tab. 11): Die Beständigkeit der CA wird durch Na-Acetat nicht beeinflusst. Im Falle des hochgereinigten Enzyms tritt während der ersten 10 Minuten eine kurzdauernde Aktivierung auf, deren Ausmass der Acetat-Konzentration proportional ist. Im Gegensatz zu der Inkubierung bei Abwesenheit von Na-Acetat (Tab. 10) tritt die Aktivierung sofort und nur bei den gereinigten Enzym-Präparaten ein.

Da mit PHEN die Inkubierung auch bei pH 5 durchgeführt wurde, prüften wir die CA-Beständigkeit bei diesem pH in  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Na-Acetat-Puffer. Die Enzymkonzentration war  $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und die Inaktivierungstemperatur  $37^\circ \text{C}$ . Eine signifikante Änderung der Enzymaktivität konnte nicht nachgewiesen werden, wenn die Inkubierungsdauer  $\leq 5$  Stunden betrug.

Wenn bei den nachstehenden Versuchsergebnissen nicht anders angegeben, wurde die Inkubierung bei  $37^\circ \text{C}$  und pH 7,4 in  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Phosphat-Puffer für  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  durchgeführt, während die Aktivitätsbestimmung bei  $6^\circ \text{C}$  erfolgte. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt.

## b) ÄDTA und DTPA

Wir untersuchten den Einfluß von  $\text{Na}_2$ -ÄDTA,  $\text{Na}_3$ -DTPA und in einigen Fällen auch den der Chelate  $\text{Na}_3[\text{Ca-DTPA}]$  und  $\text{Na}_3[\text{Zn-DTPA}]$  bei verschiedenen Konzentrationen. Da der zeitliche Verlauf der Inaktivierung sich graphisch schlecht darstellen läßt, sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengestellt (Tab. 12 - 15). Tabelle 12 gibt das zeitliche Verhalten der Aktivität von CA-II bei verschiedenen Ligand-Konzentrationen wieder. Versuche mit dem ungereinigten Enzym zeigten einen

der CA-II-Inaktivierung ähnlichen Verlauf, insbesondere die deutliche Aktivierung zu Beginn der Inkubierung mit  $\text{Na}_2$ -ÄDTA. Im Falle von  $\text{Na}_3$ -DTPA ist die Aktivierung geringer als mit  $\text{Na}_2$ -ÄDTA. Dies könnte entweder bedeuten, daß nur ein bestimmter Anteil der Aktivierung erfaßt wird (falls die unmittelbare Inaktivierung schneller als mit  $\text{Na}_2$ -ÄDTA erfolgt) oder daß die Inaktivierung tatsächlich geringer als bei  $\text{Na}_2$ -ÄDTA ist.

Aus den Tabellen 12 und 13 ist zu entnehmen, daß die Inaktivierung durch ÄDTA oder DTPA von der Reinheit des Enzym-Präparates, jedoch nicht von der Inkubierungstemperatur abhängt. Außerdem konnten wir feststellen, daß eine Erhöhung des Konzentrationsproduktes  $[\text{L}] \cdot [\text{E}]$  um einen Faktor 25 den Ablauf der Inaktivierung nicht beeinflusst.

Zur Prüfung der Frage, ob die Art des Puffers einen Einfluß auf die Wirksamkeit der Chelatbildner ausübt, führten wir Versuche in Na-Veronal-Puffer ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) durch. Tabellen 14 und 15 zeigen, daß dies nicht der Fall ist.

Wird CA mit  $\text{Na}_3$ [Zn-DTPA] inkubiert (Tab. 14), tritt wie auch bei den Na-Chelaten während der ersten Minuten eine Aktivierung ein; die Aktivität bleibt jedoch bei weiterer Inkubierung mit 110% - 120% der Kontroll-Aktivität bei einem  $10^5$  - bzw.  $10^6$  -fachen Überschuß erhöht. Tabelle 15 faßt das Ausmaß der Wirkung von ÄDTA- und DTPA-Chelaten auf die CA-Aktivität zusammen.

### c) MÄIDA und andere S-haltige Verbindungen

Ein MÄIDA-Überschuß von  $\geq 3 \cdot 10^3$  ist notwendig, um die CA zu inaktivieren (Tab. 16, 17). Im Hinblick auf den großen Überschuß kann die Inaktivierung als Reaktion erster Ordnung betrachtet werden:

$$\log \frac{a}{a_0} = - \frac{k}{2,3} \cdot t$$

k ist die Geschwindigkeitskonstante und t die Inkubierungszeit. Abb. 33 zeigt, daß die Inaktivierung während der ersten 5 Stunden der Inkubierung tatsächlich exponentiell verläuft. Die nach Abb. 33 bestimmten Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  der Inaktivierung betragen

<u>MÄIDA-Überschuß</u>	<u><math>t_{1/2}</math> (h)</u>
$1,5 \cdot 10^4$	6,4
$6,0 \cdot 10^4$	3,0
$1,5 \cdot 10^5$	2,0
$3,0 \cdot 10^5$	1,5

Die Abweichung der Kurven von der Linearität in späteren Zeitpunkten konnte teilweise auf eine Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen durch den in den wässrigen Reagentien-Lösungen gelösten  $O_2$  (ca.  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) zurückgeführt werden. Außerdem konnte eine Undichtigkeit des Inkubierungsgefäßes nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Daß das Alter der MÄIDA-Lösung, d.h. ihr Oxidationsgrad, eine wesentliche Rolle für das Ausmaß der Inaktivierung spielt, zeigen die in Tab. 16 angeführten Ergebnisse: Die Lösung war eine Woche alt und war im Kühlschrank aufbewahrt worden; trotz eines Überschusses von  $3 \cdot 10^4$  weist sie eine eindeutig geringere Effektivität ( $t_{1/2} = 9 \text{ h}$ ) als frisch hergestellte Lösungen auf, deren Reaktionshalbwertszeit etwa 4 h beträgt. Das Oxidationsprodukt der MÄIDA, das 2,2'-Dithiobis[äthyliminodi(acetat)], ist zwar auch ein Chelatbildner, dürfte jedoch wegen fehlender SH-Gruppen weniger wirksam als MÄIDA sein (vgl. z.B. die Wirksamkeit von BATÄ in Abb. 34).

Eine andere Erklärung für den nichtlinearen Kurvenverlauf wäre, daß sich ein Reaktionsgleichgewicht bei noch längerer Inkubation einstellt. Nach unseren Messungen scheint diese Annahme wenig wahrscheinlich zu sein, da die nach 24 h Inkubierung und bei höheren MÄIDA-Konzentrationen gemessene Enzymaktivität extrem niedrig ist. Eine direkte Prüfung war praktisch nicht möglich, da bei einer Inkubierungsdauer

von > 24 h das Enzym thermisch oder durch Mikroorganismen inaktiviert wird.

Die Ergebnisse der Tabellen 16 und 17 zeigen, daß die Natur des Puffers kein bestimmender Faktor der CA-Inaktivierung durch MÄIDA ist: Die Halbwertszeit der Inkubierung im Phosphatpuffer für einen Überschuß  $[MÄIDA]/[CA-II] = 1,5 \cdot 10^4$  beträgt 6,0 h bzw. 6,4 h im Na-Veronalpuffer.

Abb. 34 vergleicht die Wirksamkeit verschiedener HS-haltiger Liganden mit solchen ohne Merkaptid-S. Es handelt sich um Met, BADS, BATÄ, Cys, CysA und MÄIDA; der Überschuß zum Enzym betrug  $3 \cdot 10^5$ . Die thio-ätherischen Substanzen sind wesentlich unwirksamer als die Merkaptane, obwohl ihre effektive Konstante  $K'_{1LZn}$  (soweit bekannt und Met ausgenommen) größer ist. Die nach Abb. 34 bestimmten Halbwertszeiten der Inaktivierung weisen (für die ersten Stunden der Inkubierung) folgende Werte auf:

Met	kein Einfluß
BADS	18 Stunden
BATÄ	5 "
Cys	4 "
CysA	1 "
MÄIDA	1,5 "

Met zeigte keinen Effekt auf die CA-Aktivität: Im Falle von BADS und BATÄ scheint sich ein Gleichgewicht bei 80% bzw. 50% der Ausgangsaktivität einzustellen; ob es sich dabei um ein echtes Gleichgewicht handelt, ist allerdings fraglich und könnte erst durch (aus methodischen Gründen nicht mögliche) Untersuchungen bei noch längeren Inkubierungszeiten entschieden werden. Die sulfhydryl-haltigen Verbindungen scheinen eine vollständige Inaktivierung der CA zu verursachen. Da z. B. BATÄ einen mit ÄDTA oder DTPA vergleichbaren Inaktivierungsverlauf zeigte, untersuchten wir den Einfluß dieses Liganden auf die CA-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen (Tab. 18). Im untersuchten Konzen-

trationsbereich zeigte BATÄ eine nur unwesentliche Erhöhung der Hemmung von 38 auf 51 % der Ausgangsaktivität, wenn der Überschuß um einen Faktor 10 vergrößert wird. Diese Hemmung ist aber wesentlich höher als im Falle der DTPA (ca. 15%); die Halbwertszeiten zu Beginn der Inkubierung sind:

<u>Überschuß</u>	<u><math>t_{1/2}</math> (h)</u>
$3,0 \cdot 10^4$	ca. 32
$6,0 \cdot 10^4$	16
$1,5 \cdot 10^5$	14
$3,0 \cdot 10^5$	5

d) PHEN

Tab. 19 gibt die Werte der CA-Aktivität wieder, wie sie sich durch Inkubierung mit PHEN bei pH 7,4 und 37 °C sowie verschiedenen Konzentrationen ergeben. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit des PHEN konnte ein Überschuß von  $3 \cdot 10^4$  nicht überschritten werden. Die Abnahme der Aktivität läßt sich halblogarithmisch als Gerade darstellen (Abb. 35). Die Inaktivierung verläuft also nach einem Prozess erster Ordnung und die somit bestimmten Halbwertszeiten der Inaktivierung sind:

<u>Überschuß</u>	<u><math>t_{1/2}</math> (h)</u>
$3,0 \cdot 10^3$	43
$6,0 \cdot 10^3$	43
$1,5 \cdot 10^4$	25
$3,0 \cdot 10^4$	9

Im Gegensatz zu den anderen Liganden ist nach 28 Stunden Inkubierungszeit noch keine Abweichung vom linearen Verlauf zu beobachten.

Die Inaktivierung der CA durch PHEN verläuft bei pH 7,4 langsamer als im Falle der SH-haltigen Substanzen. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Davis (1959), Maren (in Davis 1959 zitiert), Keller und Peters (1959), die keine Hemmung der CA durch PHEN ( $10^{-3}$  mol  $\cdot$  l $^{-1}$ ) nachweisen konnten. Die Autoren verwendeten allerdings ein ungereinigtes Enzympräparat, und die Inkubierungsdauer war < 1 h. Lindskog (1960) fand keine Inaktivierung der b CA bei Dialyse gegen PHEN in neutralem pH; wahrscheinlich war der Überschuß (L/E = 3,6) zu gering. Wird der Überschuß um eine Größenordnung erhöht, konnte nach 24 Stunden eine 10%ige Inaktivierung des Human-Enzyms B beobachtet werden (Lindskog und Nyman 1964). Vallee et al. (1956) zeigten, daß die Inaktivierung einiger Metallodehydrogenasen durch PHEN nur dann auftritt, wenn die Inkubierung über mehrere Stunden und bei einem hohen Überschuß durchgeführt wird. Wenn die Dialyse der bCA-B gegen PHEN bei pH 5,0 durchgeführt wird, wiesen Lindskog und Malmström (1960) einen wesentlichen Aktivitätsverlust nach. Aufgrund dieser Beobachtung inkubierten wir die CA-II mit PHEN bei pH 5,0 in  $1 \cdot 10^{-2}$  n Na-Acetat-Puffer. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte wie früher bei pH 7,4; Temperatur und Enzymkonzentration waren die gleichen, wie früher angegeben.

Die mit verschiedenem PHEN-Überschuß durchgeführten Versuche zeigten eine rasche Inaktivierung der CA, die wiederum nach einem Prozess erster Ordnung verläuft (Abb. 36). Die Halbwertszeiten betragen einige Minuten:

<u>Überschuß</u>	<u>t<sub>1/2</sub> (min)</u>
$3,0 \cdot 10^3$	21,0
$6,0 \cdot 10^3$	15,0
$1,5 \cdot 10^4$	6,1
$3,0 \cdot 10^4$	3,5

Bei pH 5,0 erfolgt die Inaktivierung ca. 160 mal schneller als bei pH 7,4, wobei der Verlauf der Inaktivierungskurven auch hier auf eine Aktivierung der CA zu Beginn der Inkubierung schließen ließ. Beim höchsten PHEN-Überschuß von  $3 \cdot 10^4$  erreicht die Inaktivierung bei pH 5,0 99% in weniger als 30 Minuten. Wird die Enzymkonzentration (im Hinblick auf die später zu beschreibende Herstellung radioaktiv-markierter CA-II (s. § E)) auf  $3,2 \cdot 10^{-5}$  oder sogar  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\cdot$  l $^{-1}$  erhöht, erhält man mit einem PHEN-Überschuß von  $10^3$  bis  $3 \cdot 10^3$  das gleiche Inaktivierungsausmaß in ca. 45 bis 60 Min.

#### e) Diskussion

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der CA-Inaktivierung durch verschiedene Chelatbildner in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte eindeutig, daß die Inaktivierung ein zeitabhängiges Ereignis ist, das nach einem Prozeß erster Ordnung verläuft. Die "Sofortmethode" (s. § IV. 1) konnte demnach nur relativ grobe Hinweise auf die Effektivität der Chelatbildner geben, die sich jedoch nach den Ergebnissen der Inkubierungsversuche im wesentlichen als richtig erwiesen haben. Im Falle der Inkubierung kann die Geschwindigkeit der Chelateinwirkung auf die CA-Aktivität als Maß für ihre Effektivität genommen werden. Es handelt sich hierbei um die sog. "Bruttogeschwindigkeit" der Inaktivierungsreaktion, wie sie sich auf dem Diagramm  $\log a/a_0 = f(t)$  durch den linearen Abschnitt der Inaktivierungskurve direkt bestimmen läßt. Diese Geschwindigkeit hängt vom Ligandüberschuß ab und wird als sog. "Bruttohalbwertszeit" ( $t_{1/2}$ ) der Inaktivierungsreaktion ausgedrückt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Je kleiner  $t_{1/2}$  ist, umso höher ist die Effektivität des für die Inaktivierung verantwortlichen Liganden. Für jeden Liganden läßt sich die Abhängigkeit der  $t_{1/2}$ -Werte vom Ligandüberschuß als Gerade in doppelt-logarithmischem Maßstab wiedergeben (Abb. 37). Der Abb. 37 ist zu entnehmen, daß die

Effektivität der betreffenden Liganden bei pH 7,4 in der Reihenfolge BATÄ < PHEN < MÄIDA zunimmt. Für die S-haltigen Verbindungen fanden wir folgende Effektivitäten (s. § 2. c): BADS < BATÄ < Cys < MÄIDA  $\approx$  CysA.

Was die Bestimmung der Effektivität von ÄDTA, DTPA, BADS und BATÄ betrifft, wurde die nach 24 h Inkubierung noch vorhandene Enzymaktivität als Kriterium der Wirksamkeit betrachtet; hier erhebt sich allerdings die Frage, ob diese Aktivität in % der Aktivität bei der Inkubierungszeit  $t = 0$  oder in % des während der Inkubierung gemessenen Aktivitätsmaximums ausgedrückt werden soll. Im zweiten Fall würde sich eine höhere Effektivität ergeben (s. z.B. Tab. 15), jedoch würde sich an den Effektivitätsverhältnissen nichts ändern. Da außerdem die Ursache der Enzymaktivierung zu Beginn der Inkubierung nicht bekannt ist und die Aktivierung unterschiedlich hoch ist, haben wir die verbleibende Aktivität als prozentualen Anteil der Kontroll-Aktivität angegeben. Die so gewonnene Effektivität der ÄDTA, DTPA, BADS und BATÄ ist als Funktion der Ligandkonzentration in Abb. 38 dargestellt. Die Effektivität der verschiedenen Liganden nimmt mit der Reihenfolge ÄDTA  $\approx$  DTPA  $\approx$  BADS < BATÄ zu. Somit ergänzt sich die Zusammenstellung unserer Ergebnisse, so daß die Chelatbildner in unseren Untersuchungen folgende Effektivität aufweisen:

Met  $\ll$  ÄDTA  $\approx$  DTPA  $\approx$  BADS < BATÄ < PHEN < Cys < CysA  $\approx$  MÄIDA

Damit finden auch die bei der Soforthemmung gefundenen Verhältnisse, d.h. die fehlende Korrelation zwischen Effektivität und der Konstante  $K'_{1LZn}$ , eine volle Bestätigung.

Die bei unseren Versuchen häufig beobachtete Enzymaktivierung zu Beginn der Inkubierung kann nicht auf die Chelierung hemmender Metallionen zurückgeführt werden, da die Aktivierung nur bei höheren Ligandkonzentrationen auftritt, während die Konzentration von Spurenmetallen in den Lösungen höchstens  $10^{-6}$  Atome  $\cdot$   $l^{-1}$  beträgt. Daß Chelatbildner die bCA aktivieren können, fanden auch Ho und Sturtevant (1960) mit ÄDTA. Nach Dialyse des Enzyms ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\cdot$   $l^{-1}$ )

gegen PHEN ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bei pH 5,0 wurde es durch Zusatz von  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Zn-Acetat reaktiviert. Wenn die Reaktivierung in Anwesenheit von ÄDTA erfolgt, wurde die CA-Aktivität um einen Faktor von 6 erhöht. Die Autoren nehmen an, daß die Aktivierung auf "feineren Änderungen" im Enzym unter Einfluß von ÄDTA beruht. In unserem Falle erreicht die Aktivierung nur 30 bis 45% der Ausgangsaktivität und kann deshalb wahrscheinlich nicht mit den Befunden von Ho und Sturtevant verglichen werden.

Um weitere Informationen über den Mechanismus der CA-Inaktivierung durch Chelatbildner zu gewinnen, wurden Versuche mit  $^{65}\text{Zn}$ -markiertem Enzym vorgenommen.

#### E. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Chelatbildner

Die fehlende Korrelation zwischen Effektivität und der Konstante  $K'_{1\text{LZn}}$  legt den Gedanken nahe, daß die Inaktivierung der CA nicht durch die Mobilisierung des Cofaktors bedingt ist, sondern durch Anlagerung des Chelatbildners an das Metall in situ, d. h. durch Bildung eines ternären Komplexes, erfolgen könnte. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Enzym bzw. Liganden sollten die Klärung dieser Frage ermöglichen.

Im Abschnitt D erwähnten wir die Notwendigkeit eines hohen Ligandüberschusses von  $10^3$  bis  $10^4$  (in Bezug auf die Enzymkonzentration), um bei pH 7,4 eine stärkere Inaktivierung der CA (> 50%) bei einer 24-stündigen Inkubierung zu erhalten. Im Hinblick auf den hohen Überschuß erscheint eine Markierung des Enzyms (und nicht des Liganden) als zweckmäßig, da beim Liganden nur minimale Änderungen der Konzentration und damit auch der Radioaktivität zu erwarten sind, die praktisch nicht erfaßt werden könnten. Außerdem beobachteten wir, daß die CA während der Abtrennung des Ligandüberschusses reaktiviert wird (s. § E. I), was darauf hinweist, daß der vermutete ternäre Komplex unbeständig ist und als solcher nicht isoliert wer-

den kann. Auch dies schließt die Ligand-Markierung aus, da die Auftrennung der reagierenden Species zur Messung ihrer Radioaktivität notwendig ist.

Für die speziellen Untersuchungen mit  $^{65}\text{Zn}$ -markierter CA wählten wir MÄIDA und PHEN, da sie bei pH 7,4 und Inkubation die CA stark inaktivieren (s. § D. IV. 2) und unterschiedliche Eigenschaften ( $K'_{\text{LZn}}$ , Ligandatome und Struktur) besitzen. Bevor wir auf das Prinzip der Methodik eingehen, soll zunächst die Reaktivierung der CA durch  $\text{Zn}^{++}$  besprochen werden, da diese den Ausgangspunkt für die Herstellung des  $^{65}\text{Zn}$ -markierten Enzyms darstellt.

### I. Reaktivierung des Enzyms

Lindskog und Malmström (1960) zeigten erstmalig, daß die durch PHEN bei pH 5,0 inaktivierte CA durch Zusatz von Zn-Ionen vollständig reaktiviert werden kann. Von diesem Befund ausgehend beabsichtigten wir, die durch MÄIDA bzw. PHEN bei pH 7,4 inaktivierte CA durch Zusatz von Zn-Ionen zu reaktivieren. Es wurde ein zweifacher Überschuß von Zn-Acetat (in Bezug auf die Ligandkonzentration) zugesetzt. Bei diesem Zn-Überschuß trat jedoch keine Reaktivierung des durch MÄIDA inaktivierten Enzyms auf, während in der Kontrolle die Aktivität schnell gehemmt wurde: Nach einer 24-stündigen Inkubierung der CA ( $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) mit MÄIDA ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) betrug die Enzymaktivität 96% und 21% der Ausgangsaktivität in der Kontrolle bzw. bei dem mit MÄIDA inkubierten Enzym. Eine Stunde nach Zn-Zusatz wies die Aktivität nur noch 5% in der Kontrolle auf, während im MÄIDA-Versuch die Aktivität mit 20% praktisch unverändert blieb. Wird jedoch der Zn-Überschuß auf  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  erhöht, tritt eine Hemmung der nach MÄIDA-Inkubation noch aktiven Enzymfraktion auf ca. 2% ein. Analoge Ergebnisse erhielten wir auch für die Inaktivierung der CA durch PHEN; in diesem Falle allerdings konnte eine auf den  $\text{Zn}^{++}$ -Zusatz zurückzuführende Enzyminaktivierung schon beim zweifachen Zn-Über-

schuß auch bei pH 5 beobachtet werden.

Für die Inaktivierung ist nicht das Acetat (da die CA-II in 0,5 n Na-Acetat beständig ist (Tab. 11)), sondern wahrscheinlich die Zn-Ionen verantwortlich. Tatsächlich ist bekannt, daß  $Zn^{++}$  in Konzentrationen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  molar die CA inaktiviert (Davis 1961). Im Hinblick auf die Herstellung radioaktiv-markierter CA schien es uns wichtig, die Einwirkung von Zn-Ionen auf die Aktivität nativer CA zu prüfen.

Abb. 39 zeigt, daß ein Überschuß von Zn-Ionen zur Inaktivierung der CA führt <sup>(1)</sup>. Nach Abzug der im Gleichgewicht verbleibenden Enzymaktivität zeigt die Reaktion eine Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Minuten; aus diesem Wert berechnet sich die Geschwindigkeitskonstante zu  $0,35 \text{ min}^{-1}$ . Die im Gleichgewicht vorliegende CA-Aktivität ist in Abb. 40 als Funktion des Zn-Überschusses aufgetragen. Bis zu einem  $10^3$ -fachen Überschuß ( $[Zn] = 3,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) weist die Inaktivierungskurve eine Neigung 0,07 auf; danach beträgt sie 0,87. Der Umschlagspunkt entspricht genau der Konzentration, bei der die Löslichkeit von  $Zn(OH)_2$  überschritten wird. Die Hemmung kann vermutlich auf eine unspezifische Bindung des Zn an das Protein und/oder eine Präzipitation zurückgeführt werden (Davis 1961).

Das Fehlen der an sich durch Zn-Ionen zu erwartenden Reaktivierung der CA ist aller Wahrscheinlichkeit nach methodisch begründet: Wegen des großen Konzentrationsunterschiedes zwischen Ligand und Enzym wird die Lösung ausreichend freie Zn-Ionen enthalten, um die Reaktivierung der CA durch den sekundären hemmenden Effekt zu maskieren. Vorausgesetzt wird, daß die Zn-Menge ausreichend ist, um das PHEN zu sättigen; ist dies nicht der Fall, so wird das Enzym weder inaktiviert noch reaktiviert.

---

(1) Wegen der Unlöslichkeit des Zn-Phosphats führten wir die Versuche in Barbitol-Puffer durch.

Da einerseits die Untersuchung der Einwirkung von Zn-Ionen auf die CA-Aktivität den Rahmen unseres Themas überschreiten würde und andererseits die Reaktivierung des Enzyms durch Entfernung des Ligand- und/oder Zn-Überschusses mit Hilfe der Molekularsiebfiltration über Sephadex Dextran-Gel möglich ist (s. hier unten), wurden die Versuche über den Einfluß von  $Zn^{++}$  auf die CA-Aktivität nicht fortgeführt.

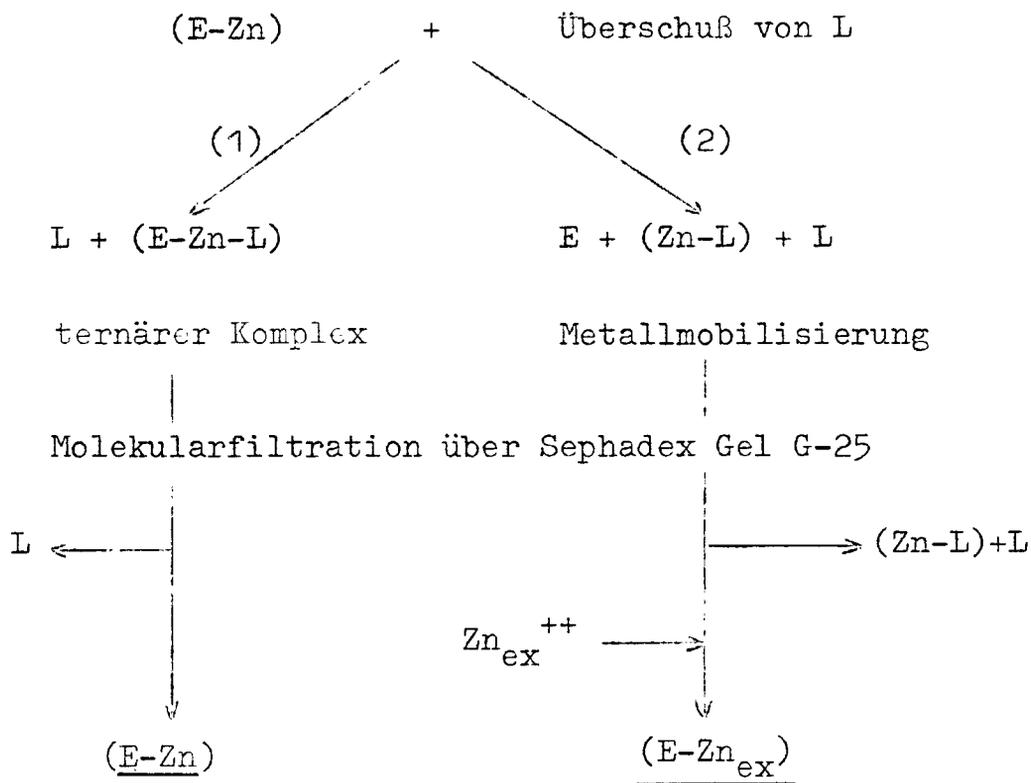
Durch Sephadex Gel-Filtration kann die CA nach Einwirkung der Chelatbildner von diesen abgetrennt werden. Da das Fraktionierungsprinzip der Gel-Filtration auf den Größenunterschieden der Molekeln der zu trennenden Species beruht, wird das Enzym vor den Liganden und anderen Salzionen eluiert<sup>(1)</sup> (s. Abb. 41). Das so erhaltene Enzym weist eine fast vollständige biologische Aktivität auf (s. Tab. 20). Der Tab. 20 ist zu entnehmen, daß die inaktivierte CA - unabhängig davon, ob die Inaktivierung durch MÄIDA oder PHEN bei pH 7,4 bzw. 5,0 erfolgt und ob Zn im Überschuß zum Liganden vor der Gel-Fraktionierung zugesetzt wird - durch Entfernung des Hemmstoffes reaktiviert wird.

Die hierbei stattfindende Reaktivierung der CA ist aller Wahrscheinlichkeit nach methodisch begründet: Wenn der Hemmung die Bildung eines bei der Inkubierung beständigen ternären Komplexes: Enzym-Zn-Ligand zugrunde liegt, sollte dieser Komplex während der Fraktionierung infolge der Beseitigung des Ligandüberschusses zerfallen und das aktive Enzym wieder freigesetzt werden (Schema, 1). Ist jedoch die Enzyminaktivierung auf eine echte Mobilisierung des Zn zurückzuführen, so kann die Reaktivierung während der Chromatographie durch die Zn-Spuren im Säulenmaterial und im Eluierungsmittel erfolgen, da die Enzymmenge nur  $\leq 5 \cdot 10^{-7}$  Mol beträgt (Schema, 2).

---

(1) Als Eluierungsmittel diente Na-Phosphat-Puffer ( $4 \cdot 10^{-3}$  mol  $\cdot$  l<sup>-1</sup>) pH 7,4.

Schema



In diesem Reaktionsschema wird mit (E-Zn) das ursprüngliche, aktive Enzym, mit L der Ligand bezeichnet; (E-Zn-L) ist der ternäre Komplex, (Zn-L) der Zn-Komplex des Liganden, E das inaktive, da Zn-freie Enzym und  $\text{Zn}_{\text{ex}}$  Spuren von Zn in den verwendeten Reagentien. Nach Fraktionierung durch Gel-Chromatographie erhält man also im Falle

- (1) das Ausgangsenzym (E-Zn)
- (2) ein aktives Enzym, dessen Cofaktor (Zn) während der Behandlung durch  $\text{Zn}_{\text{ex}}$  ersetzt wurde.

Daß ein  $\text{Zn}^{++}$ -Überschuß bei pH 7,4 die native CA stark hemmt, erwähnten wir im vorherigen Paragraph (s. auch Abb. 39). Durch Anwendung der Filtrationschromatographie

über Sephadex G-25 gelingt es, das Enzym vom Zn-Überschuß abzutrennen, wobei eine deutliche, wenn auch nicht vollständige Reaktivierung auftritt (s. Tab. 20).

Die durch Chelatbildner oder Zn-Ionen inaktivierte CA kann also nach Entfernung des Ligandüberschusses und/oder der hemmenden Ionen durch Verwendung der Sephadex-Gel-Chromatographie praktisch vollständig reaktiviert werden.

## II. Prinzip der Untersuchungen

Bei pH 5 erfolgt die Inaktivierung durch PHEN durch Mobilisierung des Cofaktors, und Zusatz von Zn oder anderer bivalenten Metallionen reaktiviert das Enzym (Lindskog und Malmström 1960; Lindskog und Nyman 1964; Coleman 1966). Die Klärung des Hemmungsmechanismus der CA durch die Chelatbildner bei pH 7,4 ist die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen.

In der CA ist Zn im Gegensatz zu vielen anderen Zn-Enzymen sehr fest an das Protein gebunden (Hoch et al. 1958), und bei neutralem pH findet ein isotopischer Austausch mit  $^{65}\text{Zn}^{++}$  in der Lösung nicht statt (Tupper et al. 1952). Dieser Punkt ist für die Interpretation unserer Ergebnisse naturgemäß ausschlaggebend und wurde deshalb nachgeprüft (s. Ergebnisse).

Aufgrund der Reaktivierbarkeit der CA (s. § I) wählten wir zur Klärung des Hemmungsmechanismus von MÄIDA und PHEN folgende Untersuchungsmethoden:

1.  $^{65}\text{Zn}$ -markierte CA wird durch MÄIDA bzw. PHEN bei 24-stündiger Inkubierung inaktiviert und danach von den Chelatbildnern über Sephadex G-25 getrennt. Der Nachweis von Radioaktivität nach dieser Behandlung in der Ligandfraktion würde bedeuten, daß das Zn aus der Enzymmolekel mobilisiert wurde. Die prozentuale Radioaktivität der Proteinfraction entspräche dem Anteil der En-

zymaktivität nach Einwirkung des Chelatbildners. Würde dagegen das nach Gel-Filtration gewonnene aktive Enzym die ursprüngliche Radioaktivität zu 100% enthalten, läge der Hemmung der Enzymaktivität die reversible Bildung eines ternären Komplexes Enzym-Zn-Ligand als einzige Ursache zugrunde. Methode I.

2. Die andere Versuchsvariante besteht darin, daß das nicht radioaktiv markierte Enzym durch den Chelatbildner inaktiviert wird. Vor der Abtrennung des Liganden wird ein Überschuß von  $^{65}\text{Zn}$ -markiertem Zn-Acetat zugegeben. Falls die Inaktivierung durch Zn-Mobilisierung erfolgt, würde die durch Gel-Filtration abgetrennte CA Radioaktivität aufweisen, und zwar entsprechend der prozentualen Hemmung. Eine Enzymmarkierung fände nicht statt, wenn ein ternärer Komplex Ursache der Inaktivierung wäre. Da der große Zn-Überschuß in diesem Falle eine unspezifische Markierung des Enzyms (durch Adsorption an der Oberfläche des Enzyms) verursachen könnte, behandelten wir vor den Radioaktivitätsmessungen die Enzym-Fraktion mit ÄDTA ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), um störende  $^{65}\text{Zn}$ -Ionen zu entfernen. Methode II.

### III. Herstellung des $^{65}\text{Zn}$ -markierten Enzyms

Die Tatsache, daß Zn-freie und inaktive CA durch  $\text{Zn}^{++}$  reaktiviert werden kann, stellte den Ausgangspunkt für die Darstellung markierter CA dar, indem wir für die Reaktivierung  $^{65}\text{Zn}$ -markiertes  $\text{Zn}^{++}$  verwendeten. Wir gingen dabei so vor, daß wir gereinigte CA-II ( $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) ca. 60 Minuten mit PHEN ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) in Na-Acetat-Puffer ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bei pH 5 und  $37^\circ \text{C}$  inkubierten. Die Inaktivierung des Enzyms betrug hierbei  $> 99\%$ . Es wurde dann mit trägerfreiem  $^{65}\text{Zn} \text{Cl}_2$  markiertes Zn-Acetat ( $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) zugegeben; die spezifische Aktivität betrug  $0,5 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Die "Übersättigung" des PHEN mit Zn erfolgte ohne weitere Inkubierung. Das molare Verhältnis Zn/PHEN beträgt hierbei 2 (Lindskog 1960), da im Falle von

PHEN bekanntlich auch 1Zn : 2L- und 1Zn : 3L-Chelate gebildet werden können. Nach Neutralisierung mit 0,1 n NaOH auf pH 7,4 wurde zur Isolierung des Enzyms eine Molekularsiebfiltration über eine Säule von Sephadex G-25 vorgenommen. Die dabei erhaltene Enzymfraktion wies volle Aktivität auf (s. Tab. 21). Um die an der Proteinoberfläche eventuell adsorbierten Zn-Ionen zu entfernen, inkubierten wir das Enzym bei Zimmertemperatur 60 Minuten mit  $\text{Na}_2\text{-ÄDTA}$  ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Bei dieser Konzentration findet keine Hemmung der CA statt (vgl. hierzu § D. IV. 2.b), während alle eventuell adsorbierten Metallionen mobilisiert werden (Lindskog 1960). Die CA wurde von ÄDTA über eine neue Sephadex G-25-Säule getrennt. Nach Gefriertrocknung des Eluats hatten wir einen Verlust von 80 - 85% des Proteins. Die Ursache hierfür ist, daß ein Teil des Proteins während der Neutralisierung ausfällt und von der Sephadex-Säule nicht eluiert wird. Eine analoge Denaturierung des Proteins wurde auch von Lindskog (1966) und Lindskog und Nyman (1964) erwähnt. Das gefriergetrocknete Enzym weist außerdem eine um ca. 70 - 75% geringere spezifische Aktivität auf. Diese Inaktivierung ist wahrscheinlich auf eine Denaturierung des Enzyms zurückzuführen, die während der Gefriertrocknung auftritt (s. Tabelle 21). Die gefriergetrocknete CA verwendeten wir nach Wiederauflösung für die weiteren Inaktivierungsversuche.

#### IV. Methodik der Untersuchungen

Bei der Durchführung der Versuche (s. § E. II) wählten wir folgende Inkubierungsbedingungen:

Die CA ( $3,2$  bis  $10 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) inkubierten wir mit MÄIDA ( $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) oder PHEN ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bei pH 7,4 und  $37^\circ \text{C}$ ; die Inkubationsdauer erreichte 17 - 18 und 24 Stunden mit MÄIDA bzw. PHEN. Als Puffer diente Naphosphat ( $8 \cdot 10^{-3}$  molar) für die Versuche mit markierter CA (Methode I) und Na-Veronal ( $1 \cdot 10^{-2}$  molar), wenn ein Überschuß von Zn-Acetat vor der Gel-Fraktionierung zugegeben

wurde (Methode II). In diesem Fall wurde Zn-Acetat mit trägerfreiem  $^{65}\text{Zn Cl}_2$  markiert; die spezifische Radioaktivität betrug 0,1 bzw. 0,5 Ci  $\cdot \text{mol}^{-1}$  in den Versuchen mit MÄIDA bzw. PHEN. Für die Elution der Substanzen aus der Sephadex Gel G-25-Säule verwendeten wir Na-Phosphat-Puffer ( $4 \cdot 10^{-3}$  molar). Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen fraktioniert.

Zur Identifizierung der Substanzen in Eluat bestimmten wir die Extinktion bei 280 und 250  $\text{m}\mu$  im Falle der Versuche mit MÄIDA, da die Extinktion des Enzyms ein Minimum bei 250 und ein Maximum bei 280  $\text{m}\mu$  aufweist (Abb. 13), während MÄIDA bei 250  $\text{m}\mu$  eine ca. 20mal höhere Extinktion als bei 280  $\text{m}\mu$  besitzt (Abb. 42). Bei Inkubierung mit PHEN wurde die Extinktion des Eluats bei 280, 270 und 264,5  $\text{m}\mu$  gemessen: Phenanthrolin in wässriger Lösung besitzt ein Absorptions-Maximum bei 264,5  $\text{m}\mu$ , während das Zn-Chelat ein Maximum bei 270  $\text{m}\mu$  erreicht und einen zusätzlichen Peak bei 292  $\text{m}\mu$  aufweist (Abb. 43).

Die Bestimmung der Radioaktivität, und zwar der von  $^{65}\text{Zn}$  emittierten  $\gamma$ -Strahlung, erfolgte mittels eines NaJ(Tl)-Bohrlochszintillators. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wird als Zählrate (Impulse  $\cdot \text{sec}^{-1}$ ) und als % der sog. Bilanz ausgedrückt.

Im Hinblick auf die Interpretation der mit der Methode II gewonnenen Ergebnisse prüften wir die Frage des isotopischen Austausches, indem wir die CA-II ( $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 24 Stunden bei 37 °C und pH 7,4 in Veronal-Puffer mit  $1 \cdot 10^{-4}$  molar Zn  $\cdot$  Acetat<sup>(1)</sup> bei Abwesenheit von Chelatbildnern inkubierten, das mit trägerfreiem  $^{65}\text{ZnCl}_2$  markiert war; die spezifische Aktivität betrug in diesem Fall 2,5 mCi  $\cdot \text{mol}^{-1}$ . Nach Beseitigung des Zn durch Gel-Chromatographie und durch ÄDTA-Behandlung ( $1 \cdot 10^{-4}$  molar) wurden die biologische Aktivität und die Radioaktivität des Enzyms gemessen.

---

(1) Diese Konzentration wählten wir wegen der Löslichkeit des Zn, da bei höheren Konzentrationen ( $> 3 \cdot 10^{-4}$ ) Zn (OH)<sub>2</sub> sich bildet, das zur Aggregation der CA-Molekeln führt (s. § E. I).

## V. Ergebnisse

### Methode I.

Nach Einwirkung der Chelatbildner auf das  $^{65}\text{Zn}$ -markierte Enzym und Trennung der Fraktionen bestimmten wir die in jeder Fraktion gefundene Radioaktivität sowie die Enzymaktivität. Die Ergebnisse sind in Abb. 44, 45 und Tab. 22 zusammengestellt. Die  $^{65}\text{Zn}$ -Bilanz im Eluat ist 100%. Sowohl die CA- als auch die Chelatbildnerfraktionen sind mit  $^{65}\text{Zn}$  markiert, wobei der Anteil der durch das Enzym gebundenen Radioaktivität dem Anteil der nach Einwirkung des Chelatbildners verbleibenden Enzymaktivität genau entspricht.

### Methode II.

Die Inkubierung der nicht radioaktiven CA mit  $^{65}\text{Zn}$ -markiertem  $\text{Zn}^{++}$  bei pH 7,4 bestätigte die Beobachtung von Tupper et al. (1952), daß kein isotopischer Austausch des "enzymatischen" Zn stattfindet: nach Gelfiltration wies zwar die Enzymfraktion geringfügige Radioaktivität auf (ca. 10% des gesamten Zn-Gehalts des Enzyms), die jedoch durch ÄDTA ohne Verlust der biologischen Aktivität vollkommen entfernt werden konnte. Wir können deshalb die nach Methode II gewonnenen Ergebnisse folgendermaßen interpretieren.

Die nach ÄDTA-Behandlung gemessenen Impulsraten der Enzymfraktion werden mit den im Falle eines 100%igen Zn-Austausches zu erwartenden Impulsraten verglichen. Aus Tab. 23 geht hervor, daß die reaktivierte CA  $^{65}\text{Zn}$  enthält, wobei die prozentuale Radioaktivität wiederum der durch den Liganden verursachten Inaktivierung entspricht.

Beide Methoden zeigen somit konsistente Ergebnisse und erbrachten den Nachweis, daß der Hemmung der CA nach Inkubierung mit MÄIDA oder PHEN die Entfernung des Cofaktors Zn ursächlich zugrunde liegt.

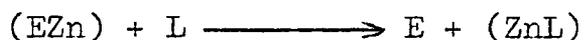
## F. Diskussion und Schlußbemerkungen

Die wesentlicheren Ergebnisse unserer Untersuchung seien hier noch einmal kurz zusammengefasst:

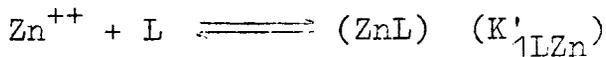
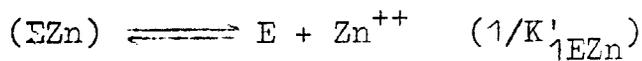
- 1) Der Einfluß verschiedener Chelatbildner auf die Aktivität der CA manifestiert sich in einer sofortigen Inaktivierung des Enzyms, die mit fortschreitender Zeit langsam zunimmt.
- 2) Unter dem Einfluß der Chelatbildner ist außerdem eine Aktivierung der CA-Aktivität zu beobachten; die Aktivierung verläuft sehr schnell, jedoch mit einer noch meßbaren Geschwindigkeit. Das Ausmaß der Aktivierung scheint weniger von der Art des Chelatbildners als von der Konzentration abzuhängen.

Was zunächst die unter 2) erwähnte Aktivierung des Enzyms betrifft, so hatten wir bereits in einem früheren Zusammenhang (vgl. Abschnitt E.I.) darauf hingewiesen, daß es im Moment noch nicht möglich ist, eine plausible und vor allem auch experimentell begründete Hypothese über die der Aktivierung ursächlich zugrunde liegenden Faktoren zu machen. Wir sind dieser Frage auch nicht näher nachgegangen, da sie ausserhalb der eigentlichen Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung liegt.

Was den der Inaktivierung der CA zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus betrifft, so ist es zweckmässig, die speziellen, mit  $^{65}\text{Zn}$  durchgeführten Untersuchungen zum Ausgangspunkt der Überlegungen zu machen. Wir konnten hierbei in zwei voneinander unabhängigen Versuchsvarianten den Nachweis führen, daß bei Inkubation des Enzyms mit verschiedenen Chelatbildnern eine echte Mobilisierung des Apoenzyms, d.h. Zn, aus der CA auftritt. Das Ausmaß der Mobilisierung erwies sich dabei als direkt proportional dem Hemmungsgrad der Aktivität. Dies steht übrigens auch in guter Übereinstimmung mit den bereits zitierten Untersuchungen von Lindskog und Malmström (1962). Die Inaktivierung des Enzyms könnte man somit durch folgende Bruttoreaktion wiedergeben:



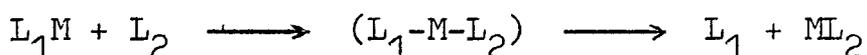
Anders ausgedrückt, bedeutet dies, daß ein Ligand, und zwar das Apoenzym E gegen einen anderen Liganden, d.h. in unserem Fall den dem System zugegebenen Chelatbildner L, ausgetauscht wird. Wenn man der Terminologie von Hughes und Ingold folgt, handelt es sich um eine sog. nukleophile Substitution ( $S_N$ -Reaktion). Bei nukleophilen Substitutionen wird grundsätzlich zwischen den sog.  $S_N1$ - und  $S_N2$ -Mechanismen unterschieden. Der  $S_N1$ -Mechanismus verläuft zweistufig, d.h. der Bindung des Metallions durch den zweiten Liganden geht der Zerfall des ursprünglichen Metallkomplexes voraus:



Für die Frage, ob es sich bei der von uns beobachteten Inaktivierung des Enzyms um eine  $S_N1$ -Reaktion handelt, ergeben sich zwei Prüfungsmöglichkeiten: Zunächst müsste erwartet werden, daß die Konzentration von (ZnL) und damit das Ausmaß der Inaktivierung dem Verhältnis der effektiven Stabilitätskonstanten  $K'_{1\text{LZn}}/K'_{1\text{EZn}}$  direkt proportional sind. Ausserdem wird bei der obigen Formulierung des  $S_N1$ -Mechanismus implizit angenommen, daß die erste Reaktion, d.h. der Zerfall des ersten Komplexes, langsam verläuft und damit auch die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmt. Beides ist in unseren Versuchen jedoch nicht realisiert. Es wird zunächst eine sofortige Hemmung der CA beobachtet, und - wie bereits mehrfach unterstrichen wurde - wird die zu erwartende Korrelation zwischen Ausmaß der Inaktivierung und effektiver Stabilitätskonstante vermisst.

Nachdem der  $S_N1$ -Mechanismus in unserem Falle wenig wahrscheinlich sein dürfte, wäre die Frage des sog.  $S_N2$ -Mechanismus zu diskutieren. Der  $S_N2$ -Mechanismus besteht darin, daß ein intermediärer Komplex gebildet wird ( $L_1\text{-M-L}_2$ ), welcher die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt und der in der teilweisen Bildung einer neuen Metall-Ligand-Bindung und der gleichzeitigen Abschwächung der ursprünglichen Bindung besteht (Basolo und

Pearson 1961):



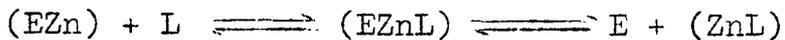
Für den von uns betrachteten konkreten Fall würde dies bedeuten, daß der Mobilisierung des Zn (die durch Versuche mit  $^{65}\text{Zn}$  eindeutig bewiesen ist) die Bildung eines intermediären, d.h. ternären Komplexes: Apoenzym - Zn - Chelatbildner zeitlich vorausgeht.  $\text{Zn}^{++}$  betätigt eine maximale Koordinationszahl 4; die Zahl sowie die Art der Bindung des Zn im aktiven Zentrum der CA sind zwar nicht bekannt (Coleman 1965; Kernohan 1965; Riddiford et al. 1965; Dobry-Duclaux 1965, 1966; Lindskog 1966), die Annahme ist jedoch nicht unplausibel, daß die maximale Koordinationszahl in der CA nicht voll abgesättigt ist. Dafür spricht u. a., daß das Zn für die Aktivität des Enzyms essentiell ist und bei der Bildung des  $\text{HCO}_3^-$  Hydroxylionen und eventuell  $\text{CO}_2$  als Substrat zu binden vermag (Davis 1959; De Voe und Kistiakowsky 1961; Kernohan 1965; Lindskog 1963, 1966). Selbst wenn eine volle Absättigung aller Koordinationsstellen des Zn im Enzym vorläge, wäre dies mit der Hypothese der Bildung eines ternären Komplexes durchaus vereinbar; es wäre hierbei nur die durchaus plausible Annahme zu machen, daß bei Anwesenheit eines im hohen Überschuß vorliegenden Liganden eine der koordinativen Bindungen des Zn im Enzym gelockert und durch eine Bindung mit einem Ligand-Atom des Chelatbildners ersetzt würde.

Im Hinblick auf die jetzt allgemein gültigen Vorstellungen über die Rolle des Zn bei der enzymatischen Aktivität der CA ist man berechtigt anzunehmen, daß der von uns postulierte ternäre Komplex enzymatisch inaktiv ist. Desgleichen wäre zu folgern, daß der sog. Soforthemmung der CA durch die Chelatbildner im wesentlichen die Bildung des ternären Komplexes ursächlich zugrunde liegt. Damit würde auch die fehlende Korrelation zwischen Ausmaß der sofortigen Inaktivierung und der Größe der effektiven Stabilitätskonstante  $K'_{1LZn}$  ohne weiteres verständlich. Wir werden in einem späteren Zusammen-

hang zu dieser Frage noch einmal zurückkehren.

Falls die Inaktivierung des Enzyms ausschließlich auf der Bildung des ternären Komplexes beruhen würde, müßte der inaktivierte Bruchteil des Enzyms unabhängig von der Zeit konstant bleiben. Da dies jedoch, wie die Versuche mit der Inkubation des Enzyms eindeutig zeigen, nicht der Fall ist und da weiterhin eine echte Mobilisierung des Cofaktors aus der CA wahrscheinlich gemacht werden konnte, ist man berechtigt anzunehmen, daß der ternäre Komplex zu dem Zn-freien Enzym und dem Zn-Chelat des Liganden L zerfällt, wobei es sich offensichtlich um eine relativ langsam verlaufende Reaktion handelt. Dies bedeutet, daß die Schwächung der Bindung zwischen Zn und dem Enzym und die schließlich dabei resultierende vollkommene Auflösung der Bindung langsam verläuft; anders ausgedrückt, daß es sich bei der CA um einen sog. robusten Komplex nach der Terminologie von Schwarzenbach (1958) handelt.

Wir können somit die Inaktivierung der CA durch einen gegebenen Komplexbildner L folgendermaßen formulieren:



wobei (EZn) der enzymatisch aktive Zn-Komplex der CA und E das Apoenzym sind. Die Konzentration des ternären Komplexes (EZnL) wird durch die Gleichgewichtskonstanten

$$K^L_{EZnL} = \frac{[EZnL]}{[EZn][L]}$$

und

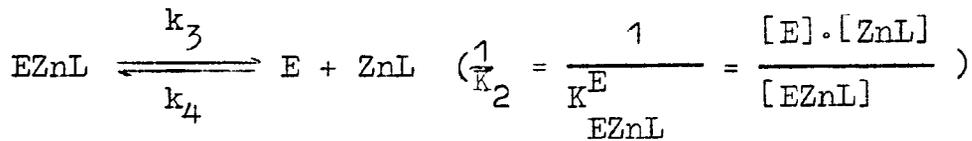
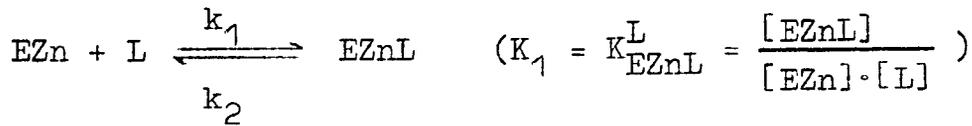
$$K^E_{EZnL} = \frac{[EZnL]}{[E][ZnL]}$$

bestimmt. Eine quantitative Analyse der Kinetik ist aus folgendem Grund nicht durchführbar. Wir müssen uns nämlich darüber im klaren sein, daß der experimentell erfaßte Grad der

Sofort-Inaktivierung insofern nicht der tatsächlich vorliegenden Inaktivierung entspricht, als die aktivierende Wirkung des Chelatbildners in gegensinniger Richtung wirkt, d.h. daß die gemessene Inaktivierung die Resultate aus zwei in verschiedenen Richtungen wirkenden Mechanismen, der Inaktivierung einerseits und der Aktivierung andererseits, ist. Der gleiche Umstand erklärt auch, warum im Falle der sofort zu registrierenden Hemmung der Enzymaktivität die Abhängigkeit der Aktivierung von der Konzentration des Liganden Neigungen  $< 1$  aufweist. An sich wäre eine Abnahme der Effektivität mit steigender Konzentration des Liganden mit einer Neigung  $> 1$  zu erwarten gewesen. Da nun aber das Ausmaß der Aktivierung von der Konzentration des Liganden abhängt, indem, zumindest in einem bestimmten Konzentrationsbereich, das Ausmaß der Aktivierung direkt proportional zur Ligandkonzentration ist (s. z.B. Tab. 12, 14, 16, 17), wird ohne weiteres ersichtlich, daß bei solchen Ligandkonzentrationen, bei denen die Aktivierung des Enzyms stärker ausgeprägt ist, eine scheinbar geringere Inaktivierung des Enzyms und Konzentrationseffekt-Kurven mit Neigungen  $< 1$  resultieren. Daß die Kurven bei den sog. Sofortversuchen für verschiedene Chelatbildner unterschiedliche Neigungen aufweisen, wird ebenfalls verständlich, da der aktivierende Einfluß auf das Enzym bei den verschiedenen, von uns untersuchten Chelatbildnern unterschiedlich stark ist.

Bei den Inkubierungsversuchen wurde bei bestimmten Konzentrationen bestimmter Chelatbildner kurzfristig, d.h. während der ersten 5 - 10 Min., eine relativ rasche Abnahme der Aktivität beobachtet und erst nach Ablauf dieser ersten Phase stellte sich die charakteristische langsame Abnahme der Aktivität ein. Auch dies dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach auf die "Maskierung" des eigentlichen Inaktivierungseffekts durch die davon unabhängigen Aktivierungsprozesse bedingt sein.

Aufgrund des Reaktionsschemas



sollte erwartet werden, daß die bei den Inkubierungsversuchen resultierende Halbwertszeit der Aktivitätsabnahme sich invers proportional zum Ausmaß der Hemmung verhält.  $k_1$  und  $k_2$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Bildungsreaktion bzw. Rückreaktion und  $k_3$  die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des ternären Komplexes. Die mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_4$  verlaufende Rückreaktion kann bei Chelatbildnern mit großer  $K'_{\text{ZnL}}$  und großer  $[\text{L}]_t \gg [\text{EZn}]_0$ , Ausgangskonzentration des Enzyms, und dadurch  $[\text{L}] \gg [\text{EZn}] + [\text{EZnL}] + [\text{ZnL}]$  ist, gilt

$$\frac{d[\text{EZn}]}{dt} = -k_1 \cdot [\text{EZn}] + k_2 \cdot [\text{EZnL}]$$

$$\frac{d[\text{EZnL}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{EZn}] - (k_2 + k_3) \cdot [\text{EZnL}]$$

Daraus folgt:

$$\frac{d[\text{EZn}]}{dt} + \frac{d[\text{EZnL}]}{dt} = -k_3 \cdot [\text{EZnL}]$$

Im Hinblick auf die Soforthemmung der CA muß die erste Reaktion sehr schnell ablaufen, d.h.  $k_3 \ll k_1$  od.  $k_2$ , und praktisch ist stets:

$$[\text{EZnL}] = K_1' \cdot [\text{EZn}],$$

wobei  $K_1' = K_1 \cdot [\text{L}]_t$ , und  $K_1$  die Gleichgewichtskonstante der ersten Reaktion darstellen. Demnach folgt

$$\frac{d[\text{EZn}]}{dt} + \frac{d(K_1' \cdot [\text{EZn}])}{dt} = -k_3 \cdot K_1' \cdot [\text{EZn}]$$

und

$$[\text{EZn}] = [\text{EZn}]_{\text{eq}} \cdot e^{-K \cdot k_3 \cdot t}$$

Dabei sind

$$K = \frac{K_1'}{1+K_1} = \frac{[\text{EZnL}]}{[\text{EZn}] + [\text{EZnL}]}$$

und  $[\text{EZn}]_{\text{eq}}$  die Konzentration des noch aktiven Enzyms nach Einstellung des Gleichgewichts

$$[\text{EZn}]_{\text{eq}} = \frac{[\text{EZnL}]}{K_1' \cdot [\text{L}]_t} = (1-K) \cdot [\text{EZn}]_0$$

Da das relative Ausmaß der biologischen Aktivität der CA dem Verhältnis  $[EZn]/[EZn]_0$  direkt entspricht, wird

$$\ln \frac{a}{a_0} = -Kk_3 \cdot t + \ln (1-K)$$

Die Halbwertszeit der Inaktivierungsreaktion ist:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K \cdot k_3. \text{ Somit wird:}$$

$$\log \frac{a}{a_0} = -\frac{0,3}{t_{1/2}} \cdot t - \log (1+K_1')$$

Aus den obigen Formulierungen geht hervor, daß  $[EZn]_{eq}$  und  $t_{1/2}$  sich umgekehrt proportional zu  $[L]_t$ , d.h. dem Ligandüberschuß, verhalten. Dies steht mit unseren Ergebnissen in Übereinstimmung.

Die Bildung eines ternären Komplexes liefert - wie bereits kurz erwähnt - auch für die fehlende Korrelation zwischen Effektivität und  $K'_{1LZn}$  der Chelatbildner eine befriedigende Erklärung, da es sich bei der Inaktivierung der CA nicht um die Chelierung freier Zn-Ionen - und nur die wird durch die Bildungskonstante  $K'_{1LZn}$  beschrieben - sondern um eine Chelierung des Zn in situ handelt. Hierbei sind naturgemäß im Falle der von uns untersuchten höherzähligen Chelatbildner nur wenige der Ligandatome beteiligt. Weiterhin dürften auch die sterische Anordnung der Ligandatome, die molekulare Konfiguration und die Zahl der Ladungen bei der Bildung des ternären Komplexes entscheidend sein. Dementsprechend sollte z.B. im Falle der ÄDTA, DTPA und strukturell verwandter Substanzen wie BADS oder BATÄ die Effektivität nicht den entsprechenden  $K'_{1LZn}$ -Werten proportional sein, sondern der Konstante  $K'_{1LZn}$  von Dicarbonsäuren wie Malonsäure ( $10^{3,3}$ ), Bernsteinsäure ( $10^{2,5}$ ), Glutarsäure ( $10^{1,6}$ ), oder Iminodiessigsäure ( $10^{4,5}$ ). Die niedrigen Zn-Stabilitätskonstanten dieser

Säuren wurden auch die geringe Wirksamkeit der ÄDTA und DTPA erklären. Obwohl der molare Ligandüberschuß sehr groß ist, können  $nL:1Zn$ -Chelate ( $n > 1$ ) für die Bildung des ternären Komplexes aus sterischen Gründen gegenüber dem  $1L:1Zn$ -Chelat vernachlässigt werden, und die Berücksichtigung der Konstanten  $K'_{nLZn}$  ist überflüssig.

Die Versuche mit den verschiedenen Polyaminen, die eine unterschiedliche Konfiguration, aber die gleichen Ligandatome besitzen, wurden in der Absicht durchgeführt, Information über die Bedeutung des sterischen Faktors zu gewinnen. Aus methodischen Gründen war es jedoch nicht möglich, die mit den Polyaminen erzielten Ergebnisse zu verwerten (vgl. § D.IV.1).

Neben der Konfiguration des Liganden spielt auch die Art der Ligandatome eine wesentliche Rolle für die Inaktivierung der CA. In diesem Zusammenhang ist auf die Überlegenheit der SH-haltigen (MÄIDA, Cys, CysA) und N-haltigen (PHEN) Verbindungen hinzuweisen. Tatsächlich ist es allgemein bekannt, daß  $Zn^{++}$  S und N gegenüber O als Elektronendonator bevorzugt (Williams et al. 1959; Coleman und Vallee 1961).

Zugunsten der Hypothese, daß die CA-Inaktivierung durch Chelatbildner über die Bildung eines ternären Komplexes verläuft, können auch folgende Befunde von Vallee et al. (1958) angeführt werden. Diese Autoren fanden bei mehreren Zn-Metalloenzymen (Carboxypeptidase A, Alkoholdehydrogenasen) das gleiche Absorptionsspektrum für das von PHEN gehemmte Zn-Enzym und für das Zn-Chelat des PHEN, was mit der Bildung eines ternären Komplexes erklärt wurde. Der Komplex konnte durch Dialyse zersetzen.

Den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen bildete die Frage, ob die nach therapeutischer Applikation von Chelatbildnern gelegentlich zu beobachtende Nierenschädigung mit einer Inaktivierung der CA zusammenhängen könnte, so wie es von verschiedenen, in der Einleitung erwähnten Autoren zur Diskussion gestellt wurde. Obwohl die von uns untersuchte CA aus Erythro-

cyten und nicht aus der Niere stammt, halten wir es für berechtigt, unsere Ergebnisse zu verallgemeinern, da alle CA-Isoenzyme im aktiven Zentrum ein Zn pro Molekel binden, das spezifisch die biologische Aktivität bedingt und auch bei verschiedenen in vitro-Untersuchungen sich identisch verhält (Lindskog und Nyman 1964; Tilander et al. 1965; Coleman 1965; Duff und Coleman 1966 und hier weiteres Schrifttum). Aufgrund unserer Untersuchungen können wir die Frage nach der Bedeutung der CA-Inaktivierung für die Pathogenese der Toxizität der Chelatbildner negativ beantworten. Unsere Befunde zeigen zwar die grundsätzliche Möglichkeit, die CA durch Chelatbildner zu inaktivieren, jedoch nur bei sehr hohem Überschuß und bei mehrstündiger Einwirkung des Chelatbildners. Gerade diejenigen Chelatbildner, die wegen ihres hohen therapeutischen Index für eine praktisch-therapeutische Anwendung in Frage kommen (wie z.B. ÄDTA, DTPA, BADS und BATÄ), sind sogar bei extrem hohen Konzentrationen, wie sie selbst nach Verabfolgung nephrotoxischer Dosen im Organismus mit Sicherheit nicht erreicht werden, kaum wirksam.

Obwohl somit eine Inaktivierung der CA bei den toxischen Nebenwirkungen der Chelatbildner mit aller größter Wahrscheinlichkeit keine Rolle spielen dürfte, glauben wir, daß den Ergebnissen unserer Untersuchung für die Frage nach der Pathogenese der toxischen Nebenwirkungen eine gewisse Bedeutung zukommt. Für die Hypothese, daß die Toxizität der Chelatbildner in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Mobilisierung essentieller Spurenmetalle und damit auch einer Beeinträchtigung der Funktion bestimmter Enzyme stehen könnte, ergibt sich nämlich eine grundsätzliche Komplikation. Bei vergleichenden Untersuchungen über die Toxizität verschiedener Chelate fanden von Wedelstaedt und Catsch (1965), daß Ca-DTPA eine rund zweimal höhere Toxizität als Ca-ÄDTA aufweist. Das gleiche Effektivitätsverhältnis konnte auch von Nigrović (1964) für die in vivo-Inaktivierung der renalen alkalischen Phosphatase durch beide Ca-Chelate festgestellt werden. Geht man nun davon aus, daß die Bindung bzw. Mobilisierung von endogenem Zn

bei der Toxizität der Ca-Chelate eine entscheidende Rolle spielt, müßte unter physiologischen Bedingungen eine im Vergleich zu Ca-ÄDTA 100mal höhere Toxizität der Ca-DTPA erwartet werden, da im Falle der Ca-Chelate das Verhältnis der effektiven Zn-Stabilitätskonstanten  $\sim 100$  ist. Um Missverständnissen vorzubeugen sei hier darauf hingewiesen, daß in dem von uns untersuchten Fall der Ca-freien Chelatbildner dies Verhältnis nur ca. 6 beträgt. In Übereinstimmung damit findet nun Havlíček (1967) unter dem Einfluß von Ca-DTPA und Ca-ÄDTA eine erhöhte Ausscheidung von Zn mit dem Urin, wobei DTPA tatsächlich entsprechend dem Verhältnis der effektiven Stabilitätskonstanten eine 100 mal höhere Wirksamkeit zeigt. Da jedoch - wie bereits erwähnt - die Ca-DTPA eine nur zweimal höhere Toxizität als Ca-ÄDTA aufweist, erscheint die pathogenetische Relevanz dieses Befundes fraglich. Es könnte eingewendet werden, daß die erwähnte Diskrepanz nur die Annahme ausschaltet, daß die Bindung von Zn eine wesentliche Rolle spielt, und an die Beteiligung anderer Spurenmetalle gedacht werden. Es ist hier jedoch nachdrücklich darauf hinzuweisen, daß die gleiche Komplikation wie für Zn sich auch ausnahmslos für andere Spurenmetalle ergibt, da keines von ihnen im physiologischen Milieu ein Verhältnis der effektiven Stabilitätskonstanten DTPA/ÄDTA  $\sim 2$  aufweist (vgl. hierzu Martell 1964). Nachdem jedoch unsere Untersuchungen eine Wechselwirkung zwischen Chelatbildnern und einem repräsentativen Metalloenzym nachweisen konnten, bei der die effektive Stabilitätskonstante keine entscheidende Rolle spielt - im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus, d.h. der intermediären Bildung eines ternären Komplexes - liegt es natürlich nahe, einen gleichen Wirkungsmechanismus auch für andere und durch Chelatbildner leichter zu inaktivierende Enzyme anzunehmen. Es sei hier auf die noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen von Schüßler (1967) hingewiesen, denen zufolge ÄDTA und DTPA bei der in vitro-Inaktivierung einer hoch gereinigten alkalischen Phosphatase praktisch gleich wirksam sind.

## G. Methodische Einzelheiten

### Reagentien

Alle Reagentien (mit Ausnahme der meisten Chelatbildner) wurden von der E. Merck AG (Darmstadt) bezogen und wiesen den p.A.-Reinheitsgrad auf; Na<sub>2</sub>-ÄDTA, Na<sub>2</sub>[Ca-ÄDTA], MP sowie PHEN erhielten wir ebenfalls von Merck AG. Pyridoxin und p-Nitrophenylacetat wurden von Serva-Entwicklungslabor (Heidelberg) geliefert. Von Fluka AG-Buchs SG (Schweiz) bekamen wir CysA, L-Cys, L-Met, MPur, EN und DIEN. Heyl und Co.(Berlin) lieferte das D-Penicillamin · HCl, und Bracco Industria Chimica S.p.A. (Milano) das BMÄDA. Für die Überlassung von MÄIDA, BADS, BATÄ, TRIEN, PENTEN, DTPA und Na<sub>3</sub>[Zn-DTPA] sind wir J.R. Geigy AG (Basel) zu Dank verbunden. Herrn Prof. Dr. G. Schwarzenbach danken wir für die freundliche Überlassung von TREN. Die Sephadex-Gele G 25 und G 75 erhielten wir von der Deutschen Pharmacia (Frankfurt) und die DEAE-Cellulose (Austauschkapazität ca. 0,63 mÄq · g<sup>-1</sup>) von C. Roth (Karlsruhe).

DIEN und PENTEN, die bräunlich verfärbt waren, wurden deshalb mit Hilfe einer Widmer-Kolonne im Vakuum destilliert (Schwarzenbach 1950). Die so gewonnenen Polyamine waren farblos und wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Für alle Lösungen verwendeten wir aqua tridest. Das Enzym (1 mg · ml<sup>-1</sup>) wurde in Na Phosphat- bzw. Na Veronal-Puffer (1 · 10<sup>-2</sup> molar, pH 7,4) gelöst und bei +3 °C aufbewahrt; diese Lösung diente als Stammlösung, wurde jedoch jede Woche frisch zubereitet. Unter solchen Bedingungen wies das Isoenzym II eine gute Beständigkeit auf (mittlere spezifische Aktivität: 12,1):

---

Alter der Lösung (d)	0	1	3	5	10	17
Enzymaktivität (10 <sup>4</sup> I.E.)	11,5	11,9	11,7	12,6	12,8	12,0

---

### Chromatographie

Die DEAE-Cellulose wurde nach der Methode von Pesce et al. (1964) gereinigt und mit  $5 \cdot 10^{-3}$  bzw.  $4 \cdot 10^{-3}$  molarem Phosphat-Puffer pH 6,8 (Anfangspuffer der Chromatographie) aufgenommen. Die Eluierung der Proteine aus der Säule erfolgte mittels eines stufenlos ansteigenden Konzentrationsgradienten von Phosphat-Puffer bei konstantem pH 6,8 :  $4$  od.  $5 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  bzw.  $5 \cdot 10^{-1}$  molar. Zur Bildung dieses Gradienten wurde ein Autograd (Technicon Chromatography Corp., New York) verwendet. Einen linearen Gradienten erhält man mit zwei hintereinander geschalteten Kammern, wobei die erste Kammer den Ausgangs- und die zweite den Endpuffer enthält; zur Bildung eines konkav ansteigenden Gradienten wird der Ausgangspuffer in die Kammern 1 und 2 gegeben, während der Endpuffer sich in einer dritten Kammer befindet. Mit dem konkaven Gradienten wird bei der DEAE-Chromatographie eine bessere Auftrennung der Peak I, II und III gewonnen (s. hierzu Abb. 11 und 12). Beim sog. analytischen Verfahren (s. § C.I.), bei dem eine 1 bis 5 mg Enzym-Lösung aufgetrennt wurde, erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts im Gesamteluat durch automatische Anfärbung mit Ninhydrin (und automatischer Messung der Extinktion bei 570 m $\mu$ ) mit Hilfe eines Autoanalyzers (Fa. Technicon). Als Eichsubstanz für die Ninhydrin-Färbung diente eine in 0,1 n HCl L-Leucin-Lösung ( $5 \cdot 10^{-2}$  molar).

### Entsalzung

Die Entsalzung der CA-Lösungen erfolgte chromatographisch durch Verwendung einer Säule ( $\varnothing$  2 x 30 cm) mit dem Verzögerungsharz AG 11 A 8 (Bio Rad Laboratories, Richmond); aqua tridest diente als Eluierungsmittel (Durchflußgeschwindigkeit ca. 120 ml  $\cdot$  h $^{-1}$ ). Abb. 46 zeigt die Verzögerung des Phosphats durch das Harz, wenn ca. 20 ml einer Rohenzym-Lösung in  $5 \cdot 10^{-2}$  molarem Phosphat-Puffer aufgetragen wurden. Die Phosphat-Bestimmung erfolgte mit Aminonaphtol-Sulfonsäure als Reduktionsmittel nach Bodansky und Schwartz (1961).

### Cellogel-Elektrophorese

Für die Elektrophorese verwendeten wir die von Serva (Heidelberg) entwickelte Methode. 0,1 mg Enzym (10  $\mu$ l) wurde im  $5 \cdot 10^{-2}$  molaren Laurell-Puffer (Na Veronal) bei pH 9,0 6 Stunden bei  $0,9 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-1}$  aufgetrennt. Die Pherogramme wurden mit Amidoschwarz gefärbt. Die Messung der Farbintensität der transparenten Streifen erfolgte mit Hilfe eines Mikrodensitometers (Fa. Zeiss).

### Molekulargewichtsbestimmung

Sie erfolgte nach der Methode von Whitaker (1963) durch Gel-Chromatographie über Sephadex G-200. Der Logarithmus des Molekulargewichts nimmt mit dem  $R_f$  des Proteins linear ab:

$$\log \text{MG} = k \frac{V}{V_0} \quad (V = \text{Elutionsvolumen})$$

Das "freie" Volumen  $V_0$  bestimmten wir mit Blue-Dextran (eingefärbtes hochmolekulares Dextrose-Polymer), dessen Elution wegen des hohen mittleren Molekulargewichts von  $2 \cdot 10^6$  vom Gel nicht beeinflußt wird. Für die zu bestimmenden Molekulargewichte (von 30 000 bis höchstens 90 000) eignet sich der Sephadex-Gel G-200. Die Länge des Gel-Bettes in der Säule betrug 140 cm und der Durchmesser 1,5 cm. Rinderserumalbumin (MG = 70 000), Eialbumin (45 000), Pepsin (35 500) und Chymotrypsin (22 500) dienten als Eichsubstanzen. Tabelle 24 gibt die Ergebnisse und Abbildung 47 die Eichkurve wieder.

### Aminosäureanalyse

Das Isoenzym II bzw. III (2,5 mg) wurde in 6 n HCl (2 ml) gelöst und in abgeschmolzenen Glasampullen unter Ausschluß von Luft 22 Stunden bei  $110^\circ \text{C}$  hydrolysiert (Methode von Grundlach et al. 1959). Die Aminosäureanalyse der Hydrolysate erfolgte nach Spackman et al. (1958) mit Hilfe eines Technicon Autoanalyzers. Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte mittels einer Rechenmaschine IBM 7070 mit Fortran-Programm (Langner 1966).

Als theoretisch erwartete Werte für jede Aminosäure dienten die abgerundeten Werte von Nyman und Lindskog (1964) für das bCA-Isoenzym B (s. Tab. 2), und die experimentell beobachteten Werte berechneten wir nach der Methode von Schüßler und Jung (1967).

#### CA-II-Reaktivierung

Zur Bestimmung des Anteils der wiedergefundenen CA-Aktivität (in % der Kontrolle) nach Auftrennung über Sephadex Gel G-25 (s. hierzu § E.I.) diente eine Eichkurve (Abb. 48), wobei die Enzymaktivität einer Kontroll-Lösung (CA-II) als Funktion der Proteinabsorption bei 280 m $\mu$  bestimmt wurde.

#### Zn-Bestimmung

Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von Vallee und Gibson (1948).

#### Elektroden

Die für die Aktivitätsbestimmung verwendeten Elektroden (Schott und Gen, Mainz) waren eine Kalomel-Bezugselektrode Nr. 9825 mit Keramik-Diaphragma und eine für tiefe Temperaturen geeignete Kalomel-Glaselektrode Nr. U 9202 (Nullpunkt bei pH 7).

## H. Literatur

BASOLO, F. and R.G. Pearson

Mechanisms of Substitution Reactions of Metal Complexes.

Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry, Vol, 3, p.2  
Academic Press Inc., New York (1961)

BODANSKY, O. and M.K. Schwartz

VI. Alkaline and Acid Phosphatases.

Meth. in Med. Res., 9, 79 (1961)

CANDURA, F., M. Candura, T. Villa e S. Eszechieli

L'eliminazione urinaria e fecale dello zinco durante trattamento  
con etilendiamino-tetracetato calcioidisodico [EDTA Ca Na<sub>2</sub>].

Lav. umano, 12, 402 (1960)

CATSCH, A.

Dekorporierung radioaktiver Stoffe.

In Strahlenschutz in Forschung und Praxis, 3, S. 181

Freiburg i. Br., Rombach & Co. (1963)

CATSCH, A.

Radioactive Metal Mobilization in Medicine.

Springfield, Ch. C. Thomas (1964a)

CATSCH, A.

Zur Toxikologie der Diäthylentriaminpentaessigsäure.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak., 246, 316 (1964b)

CATSCH, A.

Medikamente gegen Vergiftungen mit radioaktiven Substanzen.

Nukleonik, 8, 56 (1966)

COLEMAN, J.E.

Human Carbonic Anhydrase. Protein Conformation and Metal Ion  
Binding.

Biochem., 4, 2644 (1965)

COLEMAN, J.E. and B.L. Vallee

Metallo carboxypeptidases: Stability Constants and Enzymatic  
Characteristics.

J. Biol. Chem., 236, 2244 (1961)

DAVIS, R.P.

The Kinetics of the Reaction of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase. I. Basic Mechanism and the Effect of Electrolytes on Enzyme Activity.

J. Am. Chem. Soc., 80, 5209 (1958)

DAVIS, R.P.

The Kinetics of the Reaction of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase. II. The Effect of Sulfanilamide, Sodium Sulfide and Various Chelating Agents.

J. Amer. Chem. Soc., 81, 5674 (1959)

DAVIS, R.P.

The Enzymes, Vol. 5, Ed. 2, p. 559  
Acad. Press Inc., New York (1961)

DOBRY-DUCLAUX, A.

Structure du centre actif de l'anhydrase carbonique.  
Compt. Rend. Acad. Sc. Paris, 261, 2131 (1965)

DOBRY-DUCLAUX, A.

Sur la détermination des sites actifs de certains enzymes.  
VIII. Sur les chélates-modèles du centre actif de l'Anhydrase Carbonique.

Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 895 (1966)

DUFF, T.A. and J.E. Coleman

Macaca mulata Carbonic Anhydrase. Crystallization and Physico-chemical and Enzymatic Properties of Two Isozymes.

Biochem., 5, 2009 (1966)

EDSALL, J.T. and D.V. Myers

Optical Rotatory Dispersion of Human Carbonic Anhydrases: Cotton Effects and Aromatic Absorption Bands.

Proc. of the Nation. Acad. of Sc., 53, 169 (1965)

FOREMAN, H., C. Finnegan and C.C. Lushbauch

Nephrotoxic Hazard from uncontrolled eduthamil calcium-disodium Therapy.

J. Amer. Med. Ass., 160, 1042 (1956)

GIBBONS, B.H. and J.T. Edsall

Kinetic Studies of Human Carbonic Anhydrase B and C.

J. Biol. Chem., 239, 2539 (1964)

GRUNDLACH, G., W.H. Stein and S. Moore

The Nature of the Amino Acid Residues Involved in the Inactivation of Ribonuclease by Iodoacetate.

J. Biol. Chem., 234, 1754 (1959)

HAVLÍČEK, F.

Metabolisches Verhalten und Toxizität therapeutischer Chelatbildner. 3. Mitteilung. Einfluß von ÄDTA und DTPA auf die Ausscheidung von endogenem Zink.

Strahlentherapie. Im Druck (1967)

HELLER, H. J. und A. Catsch

Einige physikalisch-chemische Überlegungen zur Dekorporation radioaktiver Metalle durch Komplexbildner.

Strahlentherapie, 109, 464 (1959)

HO, Chien und J.H. Sturtevant

Activation of bovine Carbonic Anhydrase by Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA).

Biochem. Biophys. Res. Comm., 3, 20 (1960)

HOCH, F.L., R.J.P. Williams, B.L. Vallee

The Role of Zinc in Alcohol Dehydrogenases. II. The Kinetics of the Instantaneous reversible Inhibition of Yeast Alcohol Dehydrogenase by 1,10-Phenanthroline.

J. Biol. Chem., 232, 453 (1958)

JENSEN, A. and R. Christensen

Studies on Carbamates. XI. The Carbamate of Ethylenediamine.

Acta Chem. Scand., 9, 486 (1955)

KEILIN, D. and T. Mann

Carbonic Anhydrase. Purification and Nature of the Enzyme.

Biochem. J., 34, 1163 (1940)

KELLER, H. und U.H. Peters

Untersuchungen zur Frage der Bedeutung des Zinks für die Carboanhydratase.

Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., 317, 228 (1959)

KELLER, H. und P. Gottwald

Über die reversible und irreversible Inaktivierung der Carboanhydratase durch Wasserstoffionen.

Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., 318, 201 (1960)

KELLER, H. P. Gottwald and N. Wendling

The Role of Zinc in carbonic Anhydrase.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 3, 24 (1960)

KERNOHAN, J.C.

The pH-Activity Curve of Bovine Carbonic Anhydrase and its Relationship to the Inhibition of the Enzyme by Anions.

Biochim. Biophys. Acta, 96, 304 (1965)

KIESE, M.

Zitiert in: The Enzymes, Vol. 5, Ed. 2, p. 557

Acad. Press Inc., New York, 1961

Biochem. Z., 307, 400 (1941)

LANGNER, I.

Bericht INR-247/66

Kernforschungszentrum-Karlsruhe (1966)

LAURENT, G., M. Castay, C. Marriq, D. Garçon, M. Charrel et Y. Derrien

Composition en amino-acides et hydrolyse tryptique des anhydrases carboniques humaines X<sub>1</sub> et Y.

Biochim. Biophys. Acta, 77, 518 (1963)

LAURENT, G., C. Marriq et F. Luccioni

Présence de radicaux acétyle dans les anhydrases carboniques érythrocytaires humaines et caractérisation d'un peptide N-terminal acétylé dans l'enzyme B.

Biochim. Biophys. Acta, 105, 603 (1965)

LEIBMAN, K.C., D. Alfort and R.A. Boudet  
Nature of the Inhibition of Carbonic Anhydrase by Acetazolamide  
and Benzthiazide.

J. Pharmacol. Exptl. Therap., 131, 271 (1961)

LENZ, G.R. und A.E. Martell  
Metal chelates of some Sulfur-containing Amino Acids.  
Biochem., 3, 745 (1964)

LIEFLÄNDER, M.  
Über Carbonat-Hydro-Lyase (Kohlensäure-Dehydratase) aus Rinder-  
erythrocyten.  
Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., 335, 125 (1964)

LINDSKOG, S.  
Purification and Properties of Bovine Erythrocyte Carbonic  
Anhydrase. Biochim. Biophys. Acta, 39, 218 (1960)

LINDSKOG, S.  
Effect of pH and Inhibitors on some Properties Related to  
Metal Binding in Bovine Carbonic Anhydrase.  
J. Biol. Chem., 238, 945 (1963)

LINDSKOG, S.  
Interaction of Cobalt (II)-Carbonic Anhydrase with Anions.  
Biochem., 5, 2641 (1966)

LINDSKOG, S. and B.G. Malmström  
Reversible Dissociation of Zn in Bovine Carbonic Anhydrase.  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 2, 213 (1960)

LINDSKOG, S. and B.G. Malmström  
Metal Binding and Catalytic Activity in Bovine Carbonic An-  
hydrase.  
J. Biol. Chem., 237, 1129 (1962)

LINDSKOG, S. and P.O. Nyman

Metal Binding Properties of Human Carbonic Anhydrases.  
Biochim. Biophys. Acta, 85, 462 (1964)

MAREN, T.H., A.L. Parcell and M.N. Malik

A Kinetic analysis of Carbonic Anhydrase Inhibition.  
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 130, 389 (1960)

MARTELL, A.E.

Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Section II: Organic Ligands.

The Chemical Society, London (1964)

MILLAR, J.M., M.I. Fisher, C.A. Mawson and P.V. Elcoate

Influence of Ethylenediamine-tetra-acetic Acid on the excretion of Zinc by the Rat.

Nature (Lond.), 174, 881 (1954)

NIGROVIĆ, V.

In vivo-Inaktivierung der alkalischen Phosphatase durch DTPA und ÄDTA.

Nauny-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak., 249, 206 (1964)

NYMAN, P.O.

A Spectrophotometric Method for the Assay of Carbonic Anhydrase Activity.

Acta Chem. Scand. 17, 429 (1963)

NYMAN, P.O. and S. Lindskog

Amino Acid Composition of various forms of Bovine and Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase.

Biochim. Biophys. Acta, 85, 141 (1964)

NYMAN, P.O. L. Strid and G. Westermark

Carboxyl-terminal amino acid sequences of human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase.

Biochim. Biophys. Acta, 122, 554 (1966)

OBARA, T. and Y. Ogasawara

Esterases from seeds. V. Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetic Acid by Sulfhydryl Amino Acids.

Nippon Nogeikagaku Kaishi, 33, 1150 (1959)

Chem. Abstracts, 59, 1892 g

PERRY, H.M. and E.F. Perry

Normal concentrations of some trace metals in human urine: changes produced by ethylene diamine-tetraacetate.

J. Clin. Invest., 38, 1452 (1959)

PESCE, A., R.H. Mc Kay, F. Stolzenbach, R.D. Cahn and N.O. Kaplan

The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenases. I. Properties of the Crystalline Beef and Chicken Enzymes.

J. Biol. Chem., 239, 1754 (1964)

PHILPOT, F.J. and J. St. L. Philpot

A modified colorimetric Estimation of Carbonic Anhydrase.

Biochem. J., 30, 2191 (1936)

POLYA, J.B. and A.J. Wirtz

Studies on carbonic anhydrase. Part I. A review of recent investigations.

Enzymologia, 28, 355 (1965)

RAYNAUD, J., J. Savary et Y. Derrien

Sur les Anhydrases Carboniques erythrocytaires humaines.

II. Etudes hydrodynamiques des enzymes B et C.

Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 1125 (1965)

RACKLI, E.E., S.A.S. Ghazanfar, B.H. Gibbons and J.T. Edsall

Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes. Preparation and Properties of two enzymes.

J. Biol. Chem., 239, 1065 (1964)

RIDDIFORD, L.M., R.H. Stellwagen, S. Mehta und J.T. Edsall

Hydrogen Ion Equilibria of Human Carbonic Anhydrases B and C.

J. Biol. Chem., 240, 3305 (1965)

ROWGHTON, F.J.W. and V.H. Booth

The Manometric Determination of the Activity of Carbonic Anhydrase under Varied Conditions.

Biochem. J., 40, 309 (1946)

SCHÜBLER, H.

Persönliche Mitteilung (1967)

SCHÜBLER, H. und H. Jung

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease. II. Aminosäure-Zusammensetzung der Bestrahlungsprodukte.

Z. f. Naturforschung, im Druck (1967)

SCHWARZENBACH, G.

Metallkomplexe mit Polyaminen I-V.

Helv. Chim. Acta, 33, 947 (1950)

SCHWARZENBACH, G.

Die Chemie wässriger Metallsalzlösungen.

Angew. Chem., 70, 451 (1958)

SCHWARZENBACH, G. und H. Flaschka

Die komplexometrische Titration, S. 12

F. Enke Verlag, Stuttgart (1965)

SEVEN, M.J.

Observations on the toxicity of intravenous chelating agents. Metal-Binding in Medicine, p. 95

Philadelphia and Montreal: J.B. Lippincott (1960)

SPACKMAN, D.H., W.H. Stein and S. Moore

Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids.

Analyt. Chem., 30, 1190 (1958)

TARUI, S.

Studies on zinc metabolism. I. The influence of chelating agents on urinary excretion of metals.

Med. J. Osaka Univ., 10, 499 (1960)

- TASHIAN, R.E., D.P. Douglas and Ya-Shiou L. Yu  
Esterase and Hydrase Activity of Carbonic Anhydrase-I from  
Primate Erythrocytes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 256 (1964)
- TEISINGER, J. und V. Fišerová-Bergerová  
Über den Einfluß des zur Therapie der Bleivergiftung angewende-  
ten Calciumdinatriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure auf  
den Eisen- und Kupferspiegel im Blut und Urin.  
Arch. Gewebepath. Gewebehyg., 16, 478 (1958)
- TILANDER, B., B. Strandberg and K. Fridborg  
Crystal Structure Studies on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase  
C. (II).  
J. Mol. Biol., 12, 740 (1965)
- TUPPER, R., R.W.E. Watts and A. Wormald  
Some Experiments on the Zinc in Carbonic Anhydrase.  
Biochem. J., 50, 429 (1952)
- VALLEE, B.L.  
Biochemistry, physiology and pathology of Zinc.  
Physiol. Rev., 39, 443 (1959)
- VALLEE, B.L. and J.G. Gibson  
An Improved Dithizone Method for the Determination of small  
Quantities of Zinc in Blood and Tissues samples.  
J. Biol. Chem., 176, 435 (1948)
- VALLEE, B.L., F.L. Hoch, S.J. Adelstein and W.E.C. Wacker  
Pyridine Nucleotide Dependent Metallodehydrogenases.  
J. Amer. Chem. Soc., 78, 5879 (1956)
- VALLEE, B.L., T.L. Coombs und R.J.P. Williams  
Spectrophotometric Evidence for Enzyme Inhibitor Complexation.  
J. Amer. Chem. Soc., 80, 397 (1958)

VALLEE, B.L., J.A. Rupley, T.L. Coombs and H. Neurath  
The Role of Zinc in Carboxypeptidase.  
J. Biol. Chem., 235, 64 (1960)

VALLEE, B.L., J.F. Riordan and J.E. Coleman  
Carboxypeptidase A: Approaches to the chemical Nature of the  
Active Center and the Mechanisms of Action.  
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 49, 109 (1963)

de VOE, H. and G.B. Kistiakowsky  
The Enzymic Kinetics of Carbonic Anhydrase from Bovine and Human  
Erythrocytes.  
J. Amer. Chem. Soc., 83, 274 (1961)

von WEDELSTAEDT, E. und A. Catsch  
Dekorporation von Radionukliden (Untersuchungen über den thera-  
peutischen Index der Triäthylentretraaminhexaessigsäure).  
Strahlentherapie, 128, 385 (1965)

WHITAKER, J.R.  
Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration  
on Sephadex.  
Analyt. Chem., 35, 1950 (1963)

WILBUR, K.M. and N.G. Anderson  
Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase.  
J. Biol. Chem., 176, 147 (1948)

WILLIAMS, R.J.P.  
The Enzymes, Vol. 1, Ed. 2, p. 391  
Academic Press Inc., New York (1959)

WINTERSBERGER, E., H. Neurath, T.L. Coombs and B.L. Vallee  
A Zinc-binding Thiol Group in the Active Center of Bovine Car-  
boxypeptidase B.  
Biochem., 4, 1526 (1965)

WOODFORD, V.R., N. Leegwater and S.M. Drance  
A Comporative Study of some Carbonic Anhydrase Inhibitors.  
Can. J. Biochem. Physiol., 39, 287 (1961)

---

## Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Physikalische und biologische Eigenschaften verschiedener CA-Isoenzyme.

bCA = Carboanhydratase aus Rindererythrocyten; hCA = Carboanhydratase aus Menschenerythrocysten; SEA = spezifische Enzymaktivität; MG = Molekulargewicht;  $A_{280}$  = Absorption einer 0,1%igen Lösung bei 280 m $\mu$ ;  $A_{\frac{280}{260}}$  = Verhältnis der Absorption bei 280 und 260 m $\mu$ ;  $\epsilon_{280}$  = molare Absorption [mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]; pH<sub>i</sub> = isoelektrischer Punkt; S = Zahl der S-Atome pro Enzym-Molekül; Zn = Zahl der Zn-Atome pro Enzymmolekül.

	Isoenzym	Menge im Hämolyolat	SEA	MG	$A_{280}$	$A_{\frac{280}{260}}$	$E_{280}$	pH <sub>i</sub>	S	Zn
bCA	B	++	++	30-31000	1,80-1,87	1,6-1,7	56000	5,3	3	1
	C	+	++	-	-	-	-	-	-	-
hCA	A	+	+	28-29000	-	-	-	-	-	1
	B	++	++	30000	1,63-1,78	1,9	49000	5,8	4	1
	C	+	+++	30-34000	1,54-1,87	1,9	55000	6,5-7,3	4	1

Tabelle 2: Aminosäure-Zusammensetzung verschiedener Carboanhydratase-Isoenzyme

Aminosäure	hCA			bCA			
	A <sup>1)</sup>	B <sup>1,2,3)</sup>	C <sup>3)</sup>	B <sup>3)</sup>	B <sup>4)</sup>	II <sup>5)</sup>	III <sup>5)</sup>
Asparaginsäure	31	31	29	32,1 ± 0,3	32	32,2 ± 0,4	31,9 ± 0,7
Threonin	14	14	12	14,5 ± 0,3	14	11,6 ± 0,3	12,0 ± 0,5
Serin	29	30	<u>20</u>	16,1 ± 0,7	<u>16</u>	10,4 ± 0,6	11,6 ± 0,6
Glutaminsäure	23	22-24	<u>27</u>	23,7 ± 0,7	24	23,8 ± 0,8	24,6 ± 0,5
Prolin	18	18	17	19,5 ± 0,4	<u>20</u>	--	--
Glycin	17	15-16	<u>22</u>	20,2 ± 0,5	<u>20</u>	19,8 ± 0,4	20,1 ± 0,7
Alanin	20	19	<u>13</u>	16,9 ± 0,3	<u>17</u>	16,9 ± 0,3	17,4 ± 0,6
Valin	17	17	17	19,9 ± 0,1	20	19,7 ± 0,4	20,1 ± 0,5
1/2 Cystin	-	1	1	< 0,2	<u>0</u>	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1
Methionin	2	2	<u>1</u>	3,1 ± 0,1	<u>3</u>	3,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2
Isoleucin	9	10	9	5,0 ± 0,2	<u>5</u>	5,0 ± 0,3	5,2 ± 0,1
Leucin	20	20	<u>25</u>	26,2 ± 0,4	26	25,9 ± 0,1	26,9 ± 0,7
Tyrosin	8	8	8	7,9 ± 0,1	8	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,5
Phenylalanin	11	11	12	11,3 ± 0,2	11	11,2 ± 0,2	11,5 ± 0,9
Lysin	18	18	<u>24</u>	18,7 ± 0,3	<u>19</u>	19,1 ± 0,3	18,3 ± 0,5
Histidin	11	11	12	11,3 ± 0,2	11	10,8 ± 0,2	10,9 ± 0,4
Arginin	7	7	7	9,0 ± 0,2	<u>9</u>	9,1 ± 0,1	8,3 ± 0,2
Tryptophan	-	6	7	--	-	--	--

1) Laurent et al. (1963); 2) Rickli et al. (1964); 3) Nyman und Lindskog (1964); 4) Abgerundete Werte nach 3) 5) Eigene Werte.

Tabelle 3: Hemmung der CA durch Acetazolamid

[E] = Enzymkonzentration [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \times 10^8$ ];

$I_{50}$  = Acetazolamid-Konzentration, bei der die Hemmung 50% beträgt [ $\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \times 10^8$ ].

Enzym-Präparat	[E]	$I_{50}$	$[E]/I_{50}$	Autor
nicht greinigt(Rind)	7,8	2,2	3,54	1
Hämolysat (Hund)	4,0	1,1	2,85	2
rein (Rind)	1,2	0,9	1,33	3
nicht gereinigt(Rind)	32	8	4,0	4

1) Woodford et al. (1961); 2) Maren et al. (1960);

3) Lindskog (1963); 4) Eigene Werte.

Tabelle 4: Prozentuale Zusammensetzung des kommerziell erhältlichen Präparats. Trennung nach dem analytischen Verfahren. Mittelwert von drei Bestimmungen.

Komponente	Ninhydrin-Färbung	Entsprechende G-75-Fraktion
II	37,7	} B = 50,3%
III	7,3	
IV	5,3	
V	10,4	C = 10,4%
VI	26,3	} A = 39,6%
I	13,3	

Tabelle 5: Prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Fraktionen (nach Gelfiltration) bei analytischer Trennung bzw. Fraktionierung über DEAE-Cellulose.

Komponente	Ninhydrin-Färbung	Gewichtsanteil <sup>1)</sup>
Fraktion A = A <sub>I</sub> + A <sub>II</sub> = 100 %		
I	16,2	Keine quantitative Bestimmung
V	3,5	
VI	80,0	
Fraktion B = 100%		
I	1,6	45 - 50% 8 - 10% nicht bestimmt
II	69,4	
III	16,4	
IV	11,7	

<sup>1)</sup> Nach Fraktionierung, Entsalzung und Gefriertrocknung (Präparatives Verfahren).

Tabelle 6: Aktivität verschiedener Enzympräparate

Präparat	Enzym-Gehalt <sup>1)</sup> (%)	SEA	
		$\cdot 10^3$ I.E.	%
Rohenzym	45	52,5	44
CA-G 75	85	103	86
CA-II!	~ 100	120	100

<sup>1)</sup>Nach dem analytischen Verfahren bestimmt.

Tabelle 7: Molekulargewichtsbestimmung

Komponente	Molekulargewicht	
	bestimmt	Literatur
A <sub>I</sub>	83 000	ca. 70 000
A <sub>II</sub>	45 000	-
CA-II	32 000	31 000

Tabelle 8: Basizitäts- und Zn-Stabilitätskonstanten der untersuchten Verbindungen (Martell; Lenz und Martell 1964).  
Erläuterungen s. Text.

Ligand	Basizitätskonstante					log K <sub>1LZn</sub>	log K' <sub>1LZn</sub>
	K <sub>1</sub> <sup>H</sup>	K <sub>2</sub> <sup>H</sup>	K <sub>3</sub> <sup>H</sup>	K <sub>4</sub> <sup>H</sup>	K <sub>5</sub> <sup>H</sup>		
ÄDTA	10,3	6,2	2,7	2,0		16,26	13,35
DTPA	10,6	8,6	4,3	2,6	1,5	18,55	14,15
BADS	9,5	8,8	2,8	1,8		15,25	11,75
BATÄ	9,2	8,5	2,6	1,9		-	-
BMÄDA	-	-	-	-		-	-
MÄIDA	10,8	8,2	2,1			15,92	11,65
Cys	10,3	8,4	2,0			9,86	5,93
CysA	11,9	9,15				9,04	3,72
PA	10,4	7,9				9,51	6,0
Met	9,7	2,13				4,37	2,1
MP	-					-	-
MPur	-					-	-
EN	10,4	7,3				5,92	2,7
DIEN	9,9	9,1	4,3			8,9	4,7
TRIEN	9,9	9,2	6,7	3,3		12,1	7,7
TREN	10,3	9,7	8,6			14,6	8,3
PENTEN	10,2	9,7	9,1	8,6		16,24	8,2
PHEN	5,0					6,5	6,4
Ac	4,8					1,6	1,6

$$\text{Basizitätskonstante } (K_y^H) = K_{H_y L}^H = \frac{[H_y L]}{[H][H_{y-1} L]}$$

K<sub>1LZn</sub> Stabilitätskonstante des 1 : 1-Chelats

K'<sub>1LZn</sub> = "effektive" Stabilitätskonstante des 1 : 1-Chelats bei  
pH 7,4

Tabelle 9: Sofortige Hemmung.  $I_0$  in  $10^{-4}$  mol · l<sup>-1</sup>,  $I_{50}$  in  $10^{-3}$  mol · l<sup>-1</sup>  
 $k$  = Regressionskoeffizient. In Klammern sind die auf Ionenstärke korrigierten Werte angeführt (vgl. hierzu Text).

Ligand	G 75			II		
	$I_0$	$I_{50}$	-k	$I_0$	$I_{50}$	-k
ÄDTA	70	75	0,29	54	170	0,20
DTPA	50	30	0,48	30	16	0,40
BADS	-	-	-	2,8	270	0,10
BATÄ	-	-	-		kein Einfluß	
BMÄDA	1,8	1,2	0,37	-	-	-
MÄIDA	3,6	1,7	0,45	1,1	0,68	0,38
Cys	4,7	4,7	0,30	9,6	5,2	0,41
CysA	4,4	6,6	0,74	10,0	7,0	0,35
PA	13,0	ca 110	0,16	-	-	-
MP	3,5	0,76	0,87	2,9	0,66	0,83
M-Pur	-	-	-	14	9,0	0,37
Met	-	-	-		kein Einfluß	
EN	-	-	-	2,8	4,0 (16)	0,27 (0,19)
DIEN	-	-	-	3,3	7,0 (16)	0,22 (0,19)
TRIEN	-	-	-	< 0,5	3,7 (-)	0,13 (0,0)
TREN	-	-	-	8,0	6,2 (11)	0,34 (0,26)
PENTEN	2,5	1,4	0,40	2,4	1,3 (2)	0,40 (0,35)
PHEN	-	-	-		nicht meßbar	
Ac	50	52	0,64	100	53	0,43
Puffer				70,0	24,0	0,56
NaCl				60,0	330,0	0,17
NH <sub>4</sub> Cl						
Pyridoxin				3,0	>10 <sup>3</sup>	0,02

Tabelle 10: Beständigkeit der CA-Präparate bei 37 °C pH 7,4.  
 Die Enzymaktivität ist in % der Ausgangsaktivität  
 (t = 0) angegeben. Mittelwerte von 2 Bestimmungen.  
 t = Inkubationsdauer.

t	Rohenzym			G-75	II
	$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$				
	6,7	10	100	10	10
5 min	100	115	115	124	101
0,5 h	115	124	124	124	104
1 "	89	127	123	123	111
2 "	65	114	127	127	106
4 "	52	106	121	121	102
6 "	-	99	118	112	105
20 "		74	105	104	102
24 "		70	101	-	103
27 "		-	-	101	95,2
48 "		-	92	85	82

Tabelle 11: Beständigkeit der CA-Präparate bei Inkubierung in 0,5 n  $\text{CH}_3\text{COONa}$ -Lösung ( $37^\circ\text{C}$  und pH 7,4). Die Aktivität ist in % der Kontrolle bei  $t = 0$  angegeben. Als Kontrolle diente eine CA-Lösung in  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Phosphat-Puffer.  
 $[\text{E}] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

t	Rohenzym	G-75	II	II <sup>1)</sup>
3 min			121	109
8 "	102	107	112	112
0,5 h	98	105	106	105
1 "	106	105	106	101
2 "	103	100	96	98
4 "	97	102	100	89
6 "	101	100	103	100
20 "	102	101	101	91
24 "	98	-	97	-
27 "	-	105	91	-
48 "	95	98	87	-

<sup>1)</sup> 0,05 n  $\text{CH}_3\text{COONa}$

Labelle 12: CA-II-Aktivität bei Inkubierung mit  $\text{Na}_2$ -ÄDTA bzw.  $\text{Na}_3$ -DTPA. Inkubierungszeit : t. Enzym-Aktivität in % der Kontrolle bei t = 0.  $\bar{U} = [L]/[E]$ .

t \ $\bar{U}$	$\text{Na}_2$ -ÄDTA				$\text{Na}_3$ -DTPA			
	$10^4$	$10^5$	$3 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	$10^4$	$10^5$	$3 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$
2 min	117	130	130	126	100	117	102	101
7 min	110	120	115	108	99	97	100	97
1 Std.	122	121	117	105	97	108	91	79
2 "	105	91	94	77	106	99	87	86
6 "	103	96	90	75	116	108	99	82
24 "	100	104	92	78	96	93	86	76

Tabelle 13: Enzym-Aktivität nach 24 h Inkubierung a) bezogen auf Kontrolle bei  $t = 0$ ; b) bezogen auf maximale Aktivität während der Inkubierung. Die Konzentrationen sind in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  angegeben.

°C	L	[L]	[E]	Ü	Aktivität	
					a)	b)
Rohenzym						
37	Na <sub>2</sub> -ÄDTA	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	$10^5$	103	108
37	Na <sub>3</sub> -DTPA	"	"	"	95	72
37	Na <sub>3</sub> Ca-DTPA	"	"	"	104	83
CA-G 75						
20	Na <sub>2</sub> -ÄDTA	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	$10^5$	99	79
20	"	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$10^5$	97	79
20	"	$3,2 \cdot 10^{-1}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	$10^6$	95	82
20	Na <sub>3</sub> -DTPA	$3,2 \cdot 10^{-1}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	$10^6$	97	73
37	Na <sub>2</sub> -ÄDTA	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	$10^5$	104	80

Tabelle 14: CA-II-Aktivität bei Inkubierung mit  $\text{Na}_3\text{-DTPA}$  bzw.  $\text{Na}_3[\text{Zn-DTPA}]$  in Na-Barbital-Puffer ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  pH 7,40. Aktivität in % der Kontroll-Aktivität bei  $t = 0$  (Tab. 11).  
 $[\text{E}] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

t \ Ü	$\text{Na}_3\text{-DTPA}$				$\text{Na}_3[\text{Zn-DTPA}]$	
	$10^4$	$10^5$	$3 \cdot 10^5$	$10^6$	$10^5$	$10^6$
2 min	110	97	113	85	124	184
7 "	97	100	107	86	106	148
12 "	-	102	97	101	104	122
0,5 Std.	100	94	96	92	112	113
1 "	103	93	96	91	115	120
2 "	100	93	97	90	110	122
4 "	95	89	96	82	110	110
7 "	88	90	85	83	117	-
24 "	84	91	81	67	111	120

Tabelle 15: CA-II-Aktivität nach 24-stündiger Einwirkung von ÄDTA oder DTPA in % der Kontrolle (t = 0).  
 A; im  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Natriumphosphat-Puffer; B: im  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Natriumbarbital-Puffer. In Klammern ist die gleiche Aktivität in % der maximalen Aktivität angegeben.

L \ Ü		$10^4$	$10^5$	$3 \cdot 10^5$	$10^6$	$1,6 \cdot 10^6$
A	Na <sub>2</sub> -ÄDTA	100(84)	104(80)	92(71)	-	78(60)
	Na <sub>3</sub> -DTPA	96(93)	93(92)	86(86)	-	76(71)
B	Na <sub>3</sub> -DTPA	95	89(88)	80(83)	66	-
	Na <sub>3</sub> [Zn·DTPA]	-	111	-	120	-

Tabelle 16: CA-II-Aktivität bei Inkubierung mit MÄIDA in Phosphat-Puffer pH 7,4 bei 37 °C.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Enzymaktivität in % der Kontrolle für  $t = 0$ .

t	Kontrolle	[MÄIDA]/[E]				
		$3 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$
3 min	97	90	103	109	92	100
8 "	102	95	100	102	100	96
14 "	101	104	109	102	-	-
0,5 h	-	94	113	109	88	76
1 "	100	109	101	100	89	80
2 "	107	114	99	101	80	74
3 "	-	-	-	-	63	69
4 "	103	103	95	88	-	-
6 "	-	-	-	-	54	57
7 "	101	98	86	88	-	-
24 "	92	98	90	92	20	13
$t_{1/2}$ (h)	-	-	-	-	6,0	9*

\* Alte MÄIDA-Lösung.

Tabelle 17: CA-II-Aktivität bei Inkubierung mit MÄIDA in Na-Barbital-Puffer pH 7,4 bei 37 °C. [E] =  $3,2 \cdot 10^{-7}$  mol  $\cdot$  l<sup>-1</sup>. Enzymaktivität in % der Kontrolle für t = 0.

t (h)	[MÄIDA]/[E]			
	$1,5 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
0,1	101	117	100	94
0,75	93	98	86	68
3	69	57	36	20
5	59	37	18	9,4
7	49	27	11	5,1
24	21	5,1	0	0
$t_{1/2}$	6,4	3,0	2,0	1,5

Tabelle 18: CA-II-Aktivität bei Inkubierung mit BATÄ bei pH 7,4, 37 °C in Phosphat-Puffer.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Enzymaktivität in % der Kontrolle für  $t = 0$ .

T	[BATÄ]/[E]			
	$3 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
7 min	96	116	136	146
13 "	87	103	124	130
1,5 h	80	91	120	141
4 "	78	81	108	86
7 "	70	73	94	68
24 "	56	65	64	54
27 "	59	57	49	44
$t_{1/2}$ (h)	~ 32	16,2	13,7	5,2

Tabelle 19: CA-II-Aktivität bei Inkubierung mit PHEN bei pH 7,4, 37 °C in  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Natriumbarbital-Puffer.  $[\text{E}] = 32 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Enzymaktivität in % der Kontrolle für  $t = 0$ .

t	[PHEN]/[E]			
	$3 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$
10 min	112	98	111	110
15 "	88	98	93	85
1,5 h	95	83	84	80
4 "	93	102	77	59
19 "	82	77	55	22
26 "	69	65	40	12
28 "	68	68	39	9,6

Tabelle 20: CA-Aktivität vor und nach Fraktionierung über Sephadex Gel G-25 in % der Ausgangsaktivität.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $[\text{MÄIDA}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $[\text{PHEN}] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Inkubationsdauer bei pH 7,4: 17 - 24 h und bei pH 5 1 h; 37 °C.

L	pH	Zn-Zusatz <sup>1)</sup>	Aktivität	
			vorher	nachher
MÄIDA	7,4	-	1 - 5	88 - 95
"	5,0	-	53	93
"	7,4	+	5	95
PHEN	7,4	-	24	90
"	5,0	+	0,1	90
-	7,4	+ <sup>2)</sup>	39	85

<sup>1)</sup>Vor Fraktionierung; 3-facher und 2-facher Überschuß im Falle von MÄIDA bzw. PHEN.

<sup>2)</sup> $[\text{Zn}^{++}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Tabelle 21: Enzymaktivität (% der Ausgangsaktivität) bei der Herstellung der <sup>65</sup>Zn-markierten CA.

Präparationsschritt	Aktivität
nach PHEN-Inkubation	0,1
nach Filtration über G 25	92
nach Entsalzung	114
nach Gefriertrocknung	27

Tabelle 22: Inaktivierung von  $^{65}\text{Zn-CA}$  bei 24-stündiger Inkubation ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pH 7,4) in Phosphat-Puffer. Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Fraktionen nach Fraktionierung über Gel Sephadex G-25.  $[\text{E}] = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $[\text{MÄIDA}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $[\text{PHEN}] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . In Klammern ist die Radioaktivität in % der eluierten Radioaktivität ausgedrückt.

L	Hemmung (%)	Radioaktivität ( $\text{Imp} \cdot \text{sec}^{-1}$ )			
		Aufgetragen	eluiert	E	L
MÄIDA	98	48	49	1 (2%)	48 (98%)
PHEN	66	96	93	35 (38%)	58 (62%)
PHEN	76	159	162	40 (25%)	122 (75%)

Tabelle 23: Inaktivierung von nicht markierter CA und nach Zusatz von  $^{65}\text{Zn}$ -markiertem Zn-Acetat.  
Erklärung s. Text.

L	Hemmung (%)	Radioaktivität (Imp·sec <sup>-1</sup> )	
		berechnet	gefunden
MÄIDA	95	29	26 (90%)
PHEN	83	141	113 (80%)

Tabelle 24: Molekulargewichtsbestimmung nach Whitaker (1963):  
 Abhängigkeit des Elutionsvolumens V vom Molekulargewicht (MG) für verschiedene Eichproteine und für die zu bestimmenden Substanzen. Säule: Ø 1,5 x 140 cm aus Sephadex Gel G-200; Eluierung mit  $5 \cdot 10^{-2}$  molarem  $\text{NH}_4$ -Acetat-Puffer pH 7,0; T = 25 °C.

Substanz	V (ml)	V/V <sub>0</sub>	MG	log MG
Blue Dextran	91 (V <sub>0</sub> )	1,000	$2 \cdot 10^6$	-
Chymotrypsin	195	2,147	22500	4,352
Pepsin	174	1,916	35500	4,550
Ei Albumin	170	1,839	45000	4,653
Serum Albumin	134	1,478	70000	4,845
A <sub>I</sub>	126	1,388	89000	4,950
A <sub>II</sub>	164	1,806	43000	4,632
CA-II	190	2,093	32000	4,480

Abb. 1 : Schematische Darstellung der Meßapparatur für die Bestimmung der Enzymaktivität. pH = pH-Meter; I = Impulsomat; D = Dosigraph; S = Schreiber; Mb = Mikroburette; KT = Kältethermostat; K = Schlangenkühler; R = Gas-Meßrohr; H = Verteilungshahn; G = Titriergefäß mit eingebauter Glasfritte F; L = NaOH-Leitung; M = MeBelektrode; B = Bezugelektrode; T = Thermometer.

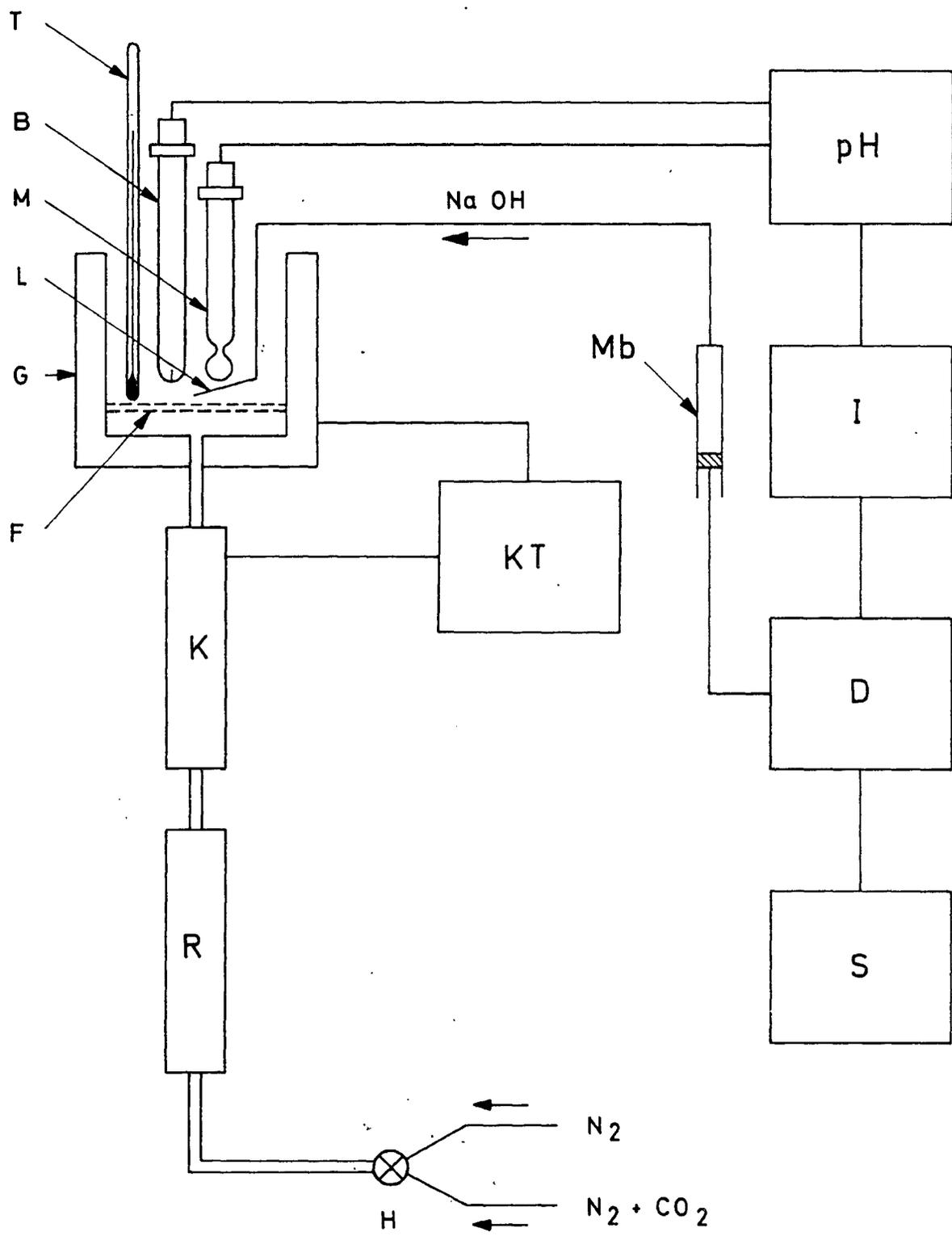


Abb. 2: Beispiel einer enzymatischen Bestimmung. Geschwindigkeit der nicht katalysierten Reaktion ( $V_0$ ), der katalysierten Reaktion ( $V_k$ ) und der enzymatischen Reaktion ( $V_E$ ). (1) und (2) sind die der nicht katalysierten bzw. katalysierten Reaktion entsprechenden Kurven.  
Versuchsbedingungen: 1  $\mu\text{g}$  Rohenzym;  $T = 6^\circ\text{C}$ ; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen: 25 ml  $8 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4.

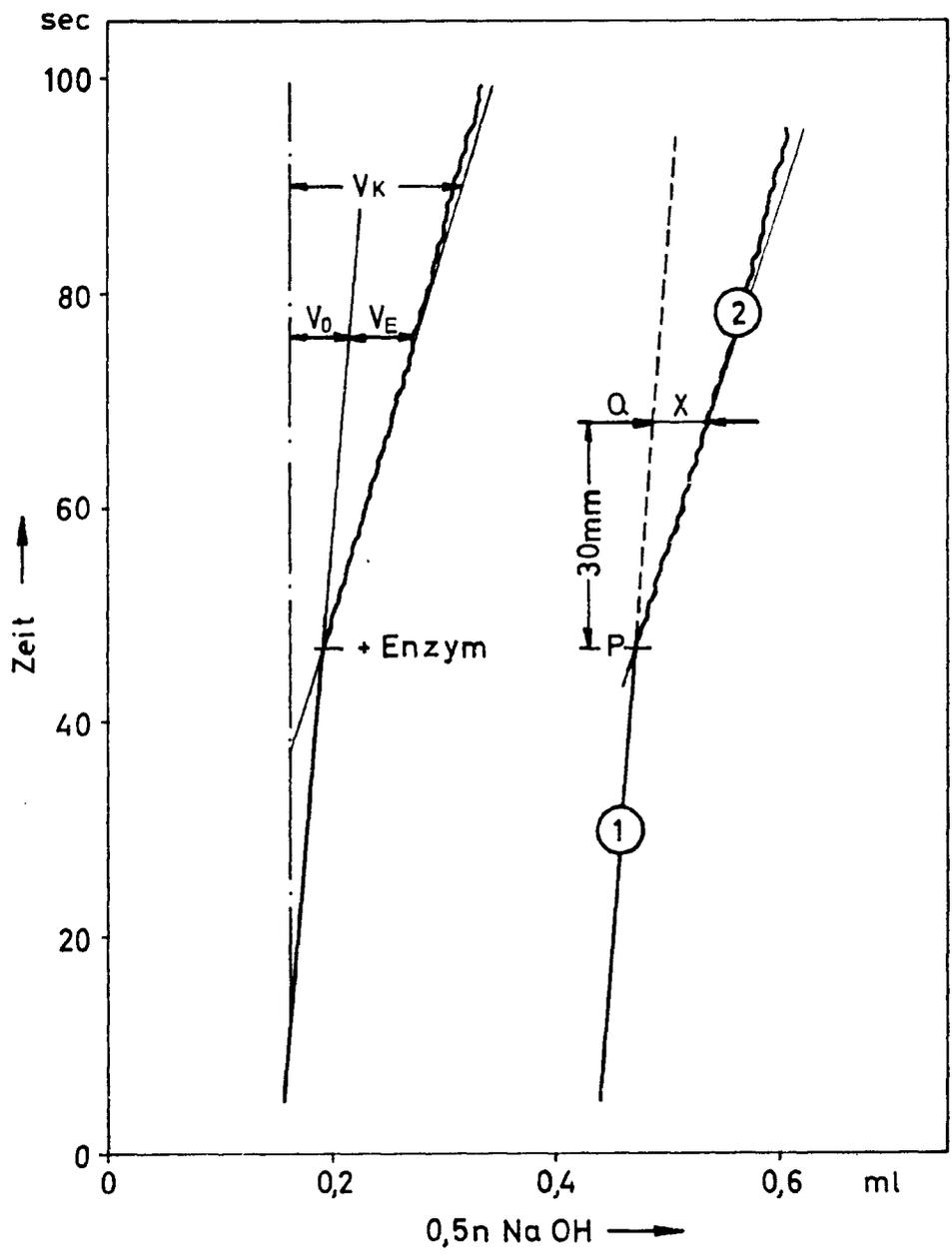


Abb. 3: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_E$  bzw.  $V_O$  vom pH. 2  $\mu\text{g}$  Rohenzym;  $T = 0,5^\circ\text{C}$ ; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen:  $25 \text{ ml } 8 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4.

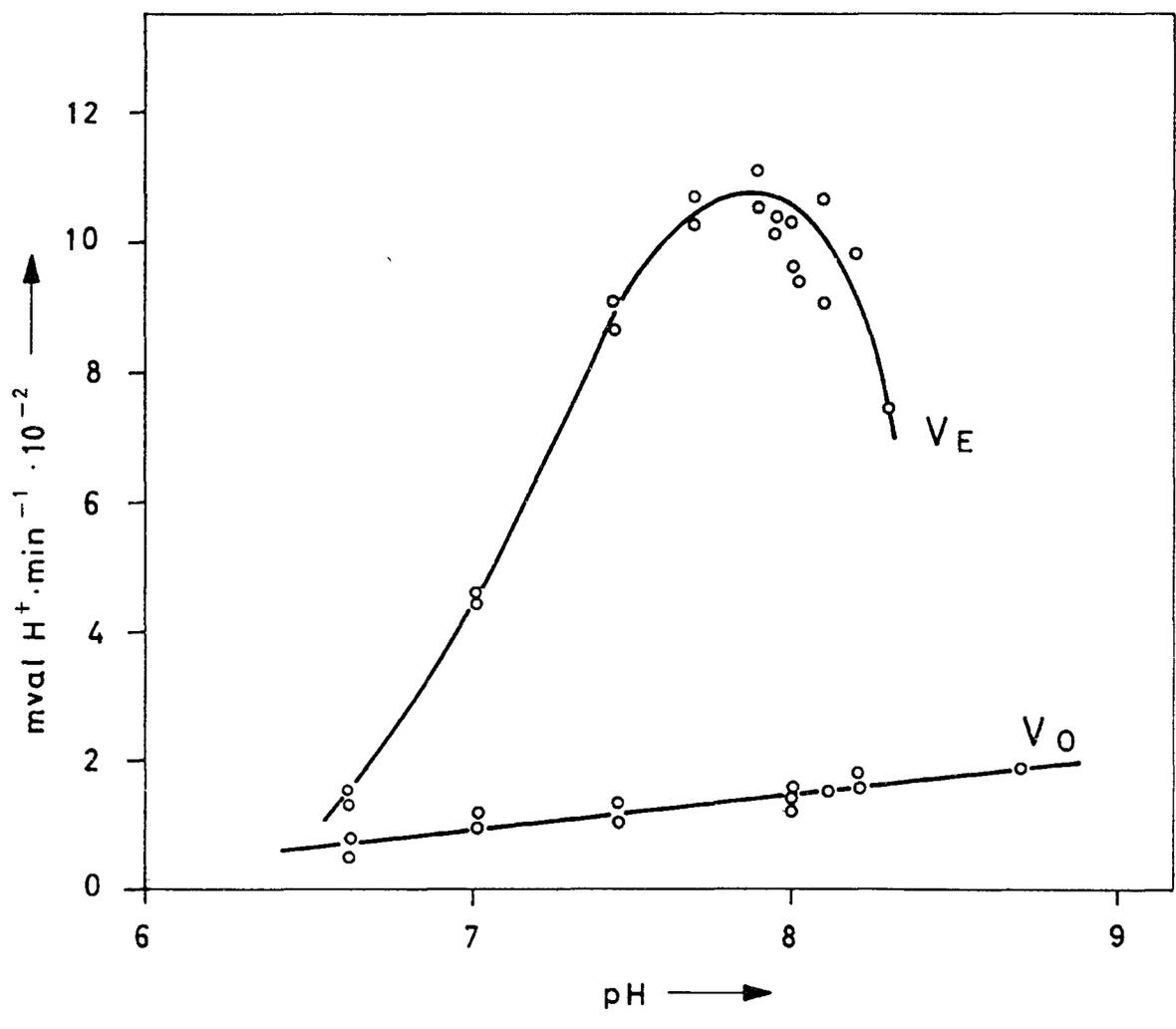


Abb. 4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Temperatur. Kurve (1):  $V_0$ , Kurven (2) und (3):  $V_E$  für das Rohenzym bzw. Isoenzym-II.  $1 \mu\text{g}$  Enzym;  $T = 6^\circ\text{C}$ ; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen:  $25 \text{ ml } 8 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4.

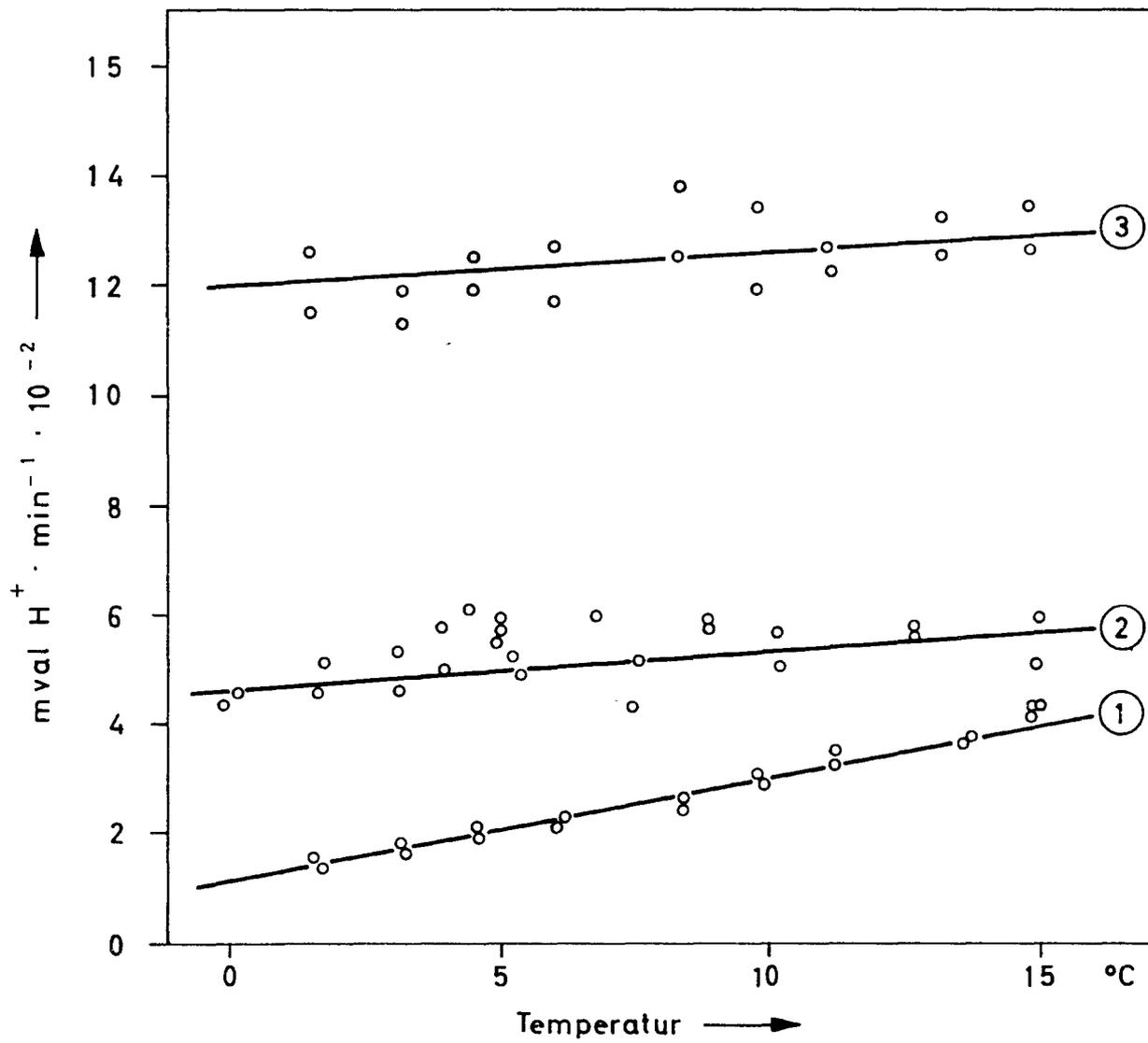
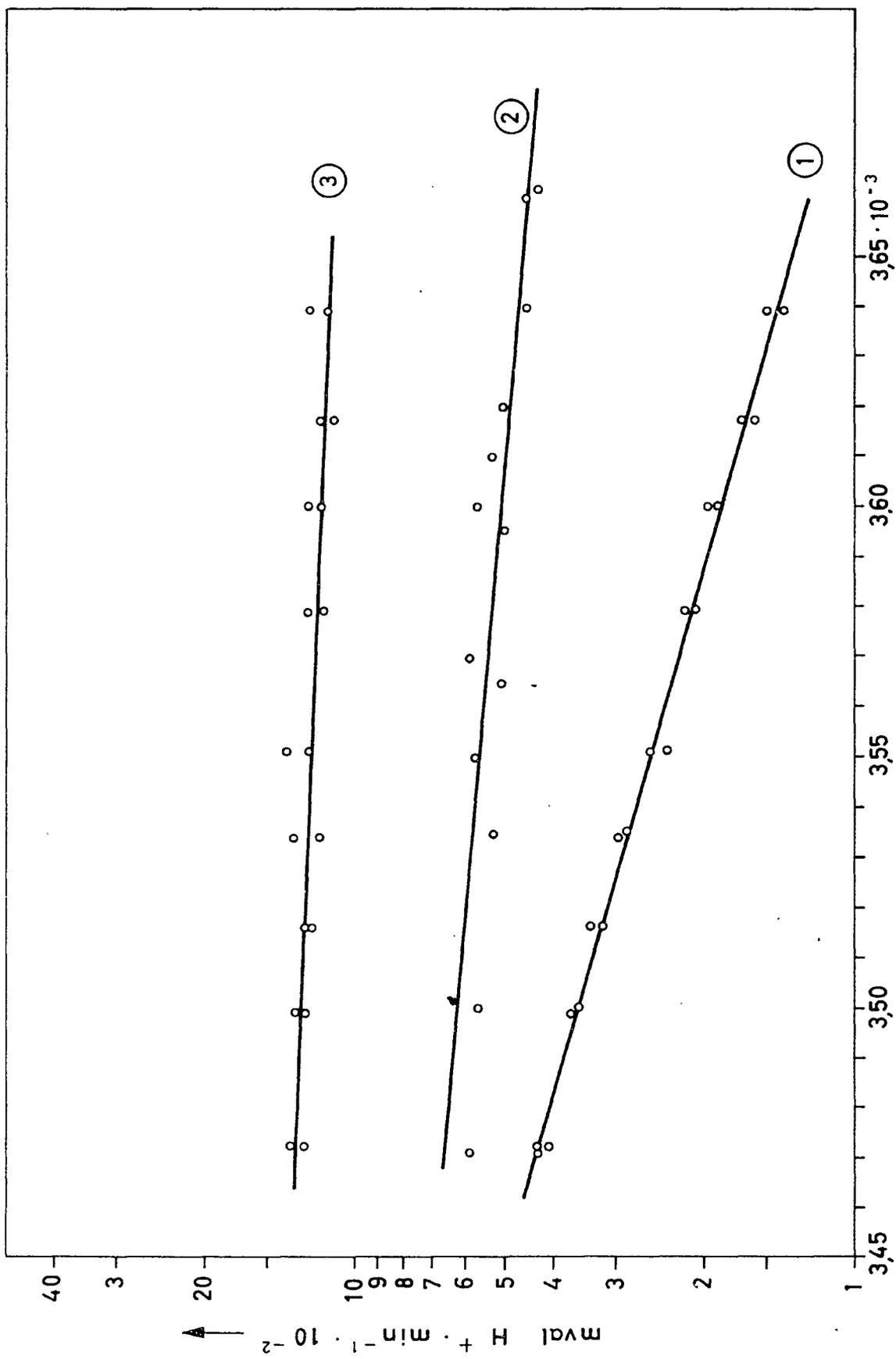


Abb. 5: Darstellung des Temperatureffekts nach Arrhenius (vgl. Abb. 4). Kurve (1):  $V_0$ ; Kurve (2) und (3):  $V_E$  für das Rohenzym bzw. Isoenzym II.



$1/T \rightarrow$

Abb. 6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_E$  bzw.  $V_O$  vom Reaktionsvolumen.  $1 \mu\text{g}$  Rohenzym;  $T = 6^\circ\text{C}$ ; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $8 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4.

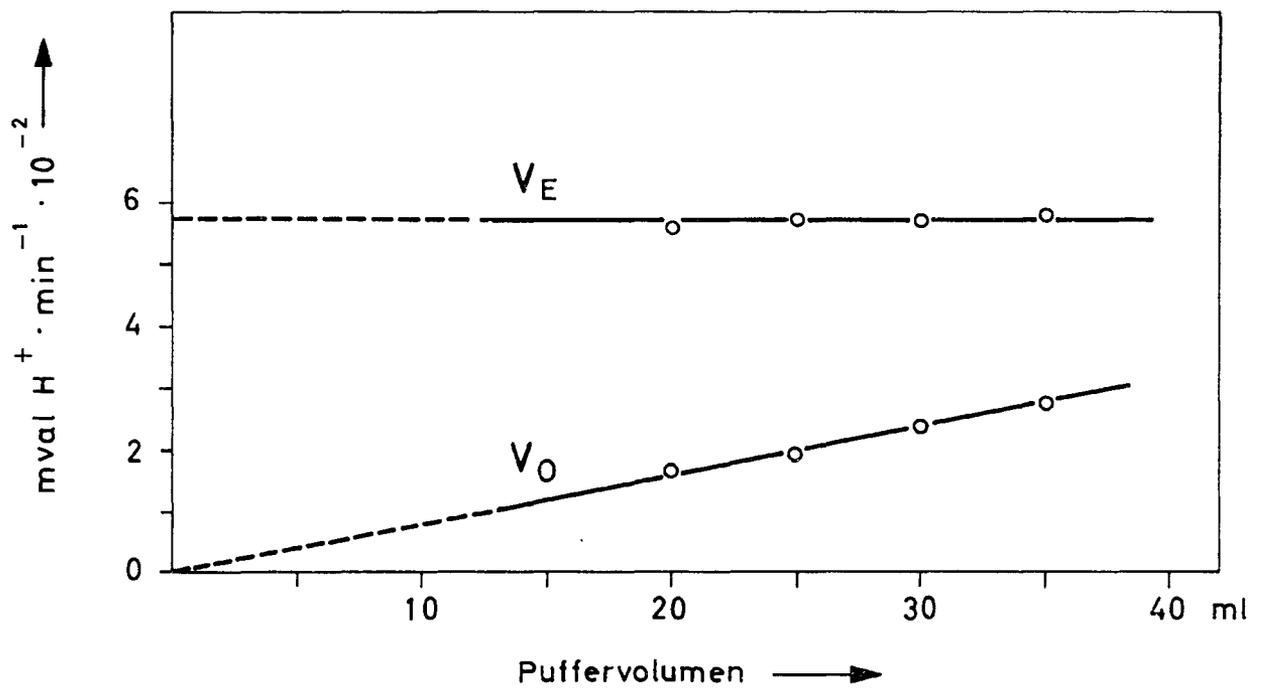


Abb. 7: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_E$  bzw.  $V_O$  von der Durchflußgeschwindigkeit des Substratgemisches  $\text{CO}_2 + \text{N}_2$ . 2  $\mu\text{g}$  Rohenzym;  $T = 0,5^\circ\text{C}$ , Reaktionsvolumen: 25 ml  $8 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4.

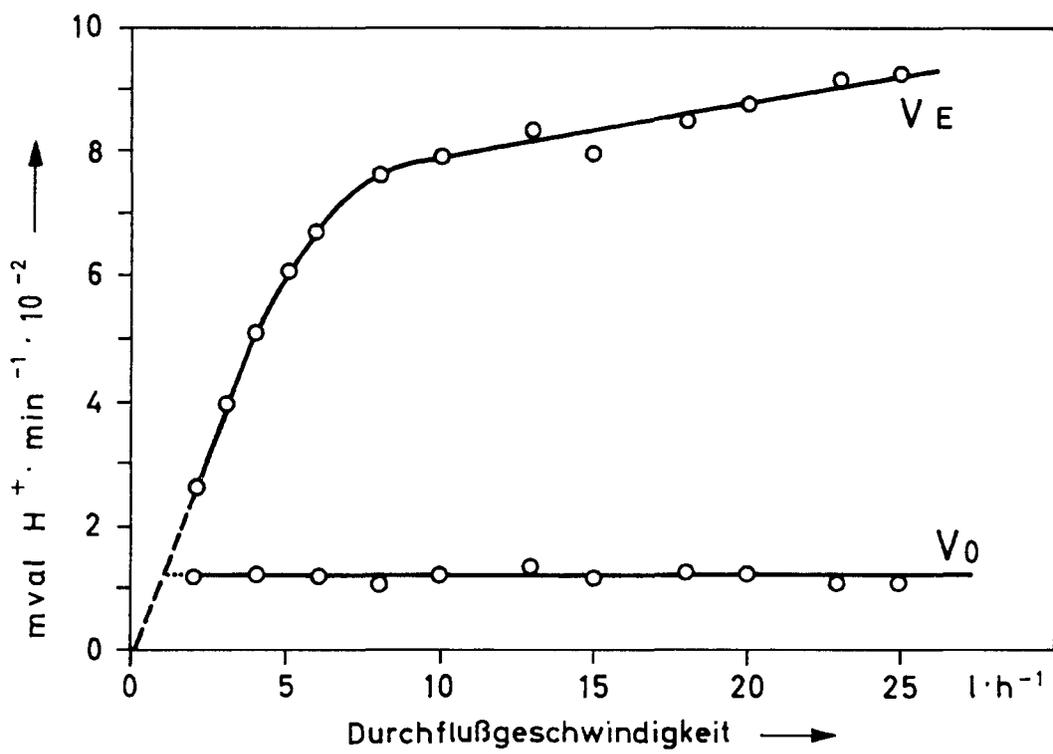


Abb. 8: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit  $V_E$  von der Konzentration des Rohenzym bei verschiedenen Puffer-Konzentrationen. pH 7,4;  $T = 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Substratzugabe  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen 25 ml. [Phosphat-Puffer] in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ : (1) 2; (2) 3,5; (3) 5; (4) 8; (5) 15; (6) 30.

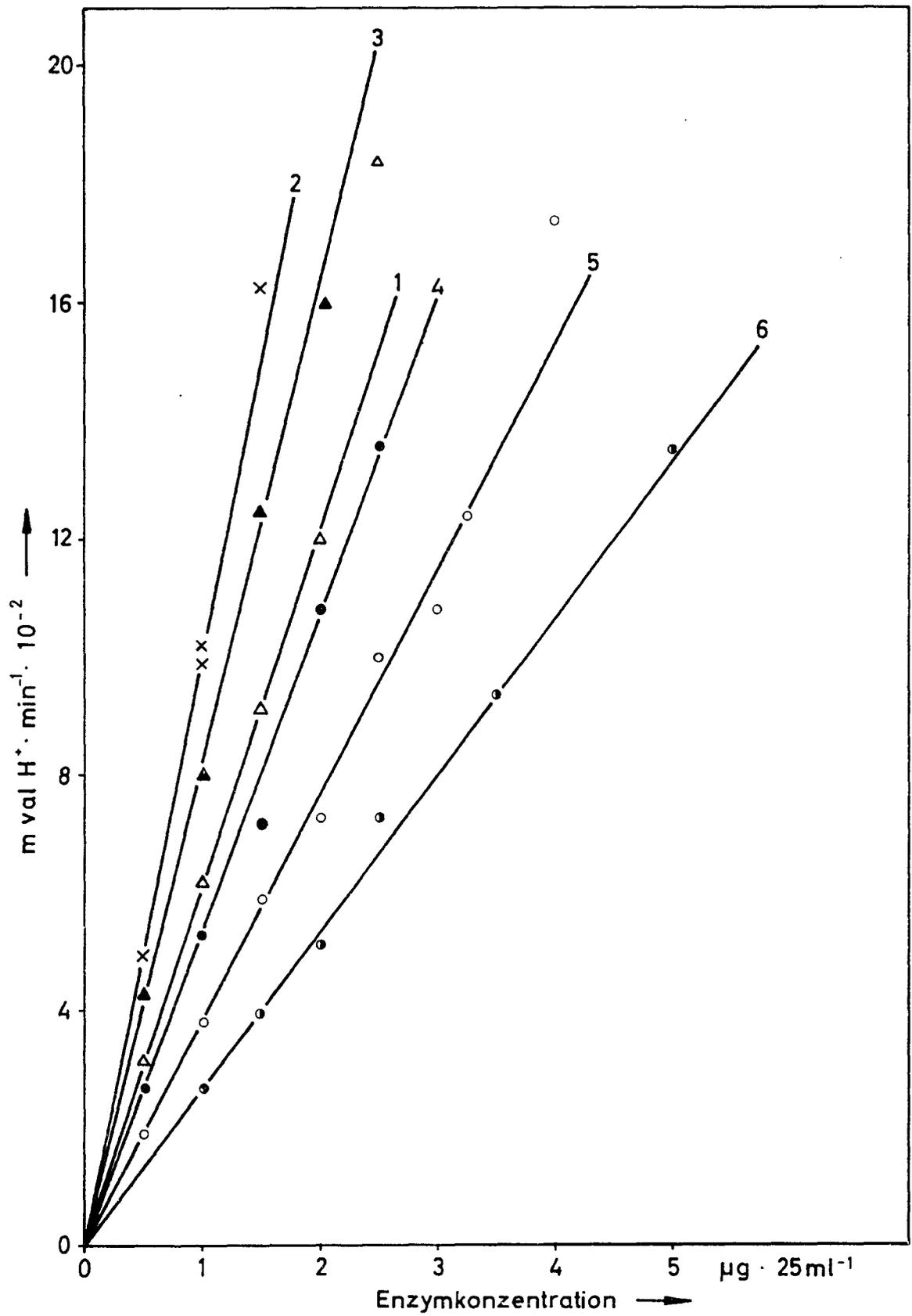


Abb. 9: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit  $V_E$  von der Konzentration des Puffers.  $[E] = 1 \mu\text{g}$ ;  
 $T = 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen: 25 ml;  
pH 7,4.

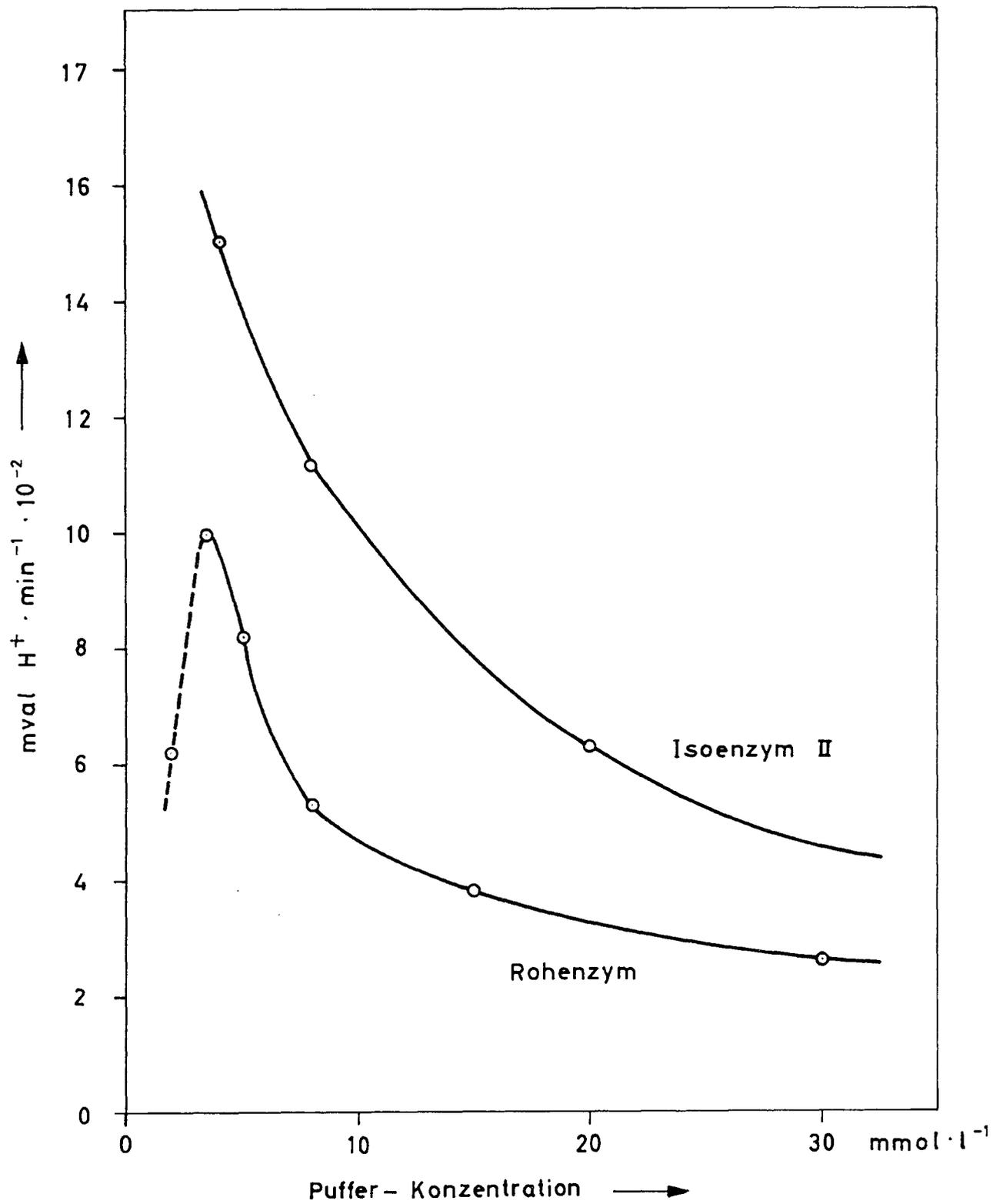


Abb. 10: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit  $V_E$  von der Ionenstärke nach Debye-Hückel.  $[E] = 1 \mu\text{g}$ ;  $T = 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen: 25 ml; pH 7,4.

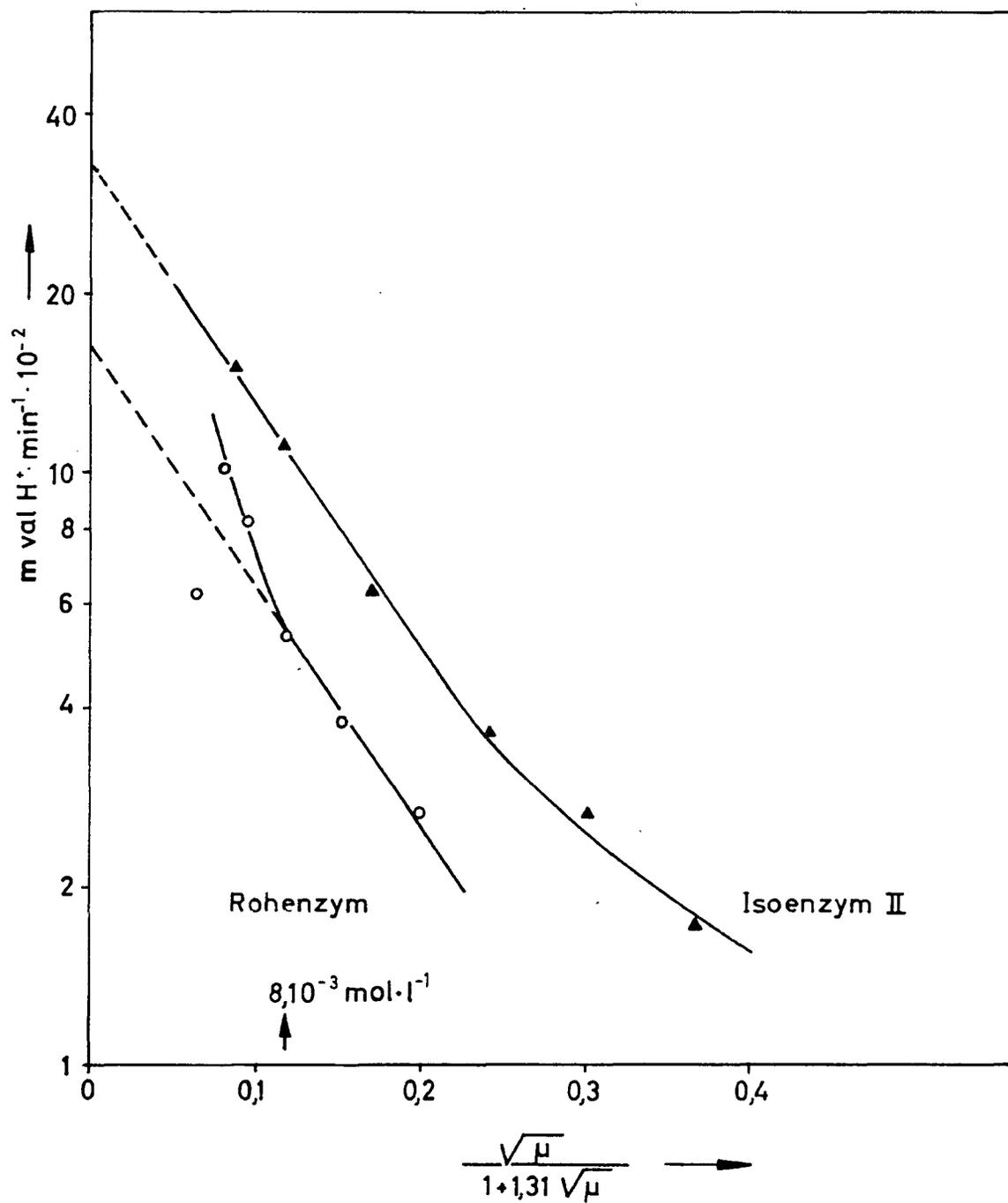


Abb. 11: Chromatographische Auftrennung von 5 mg Rohenzym über DEAE-Cellulose. Aufgetragen ist die Ninhydrin-Färbung des Eluats. Säule  $\emptyset$  1,5 x 20 cm. Linearer Elutionsgradient des Phosphat-Puffers:(1):  $5 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  molar; (2)  $5 \cdot 10^{-2}$  -  $5 \cdot 10^{-1}$  molar; pH 6,8.

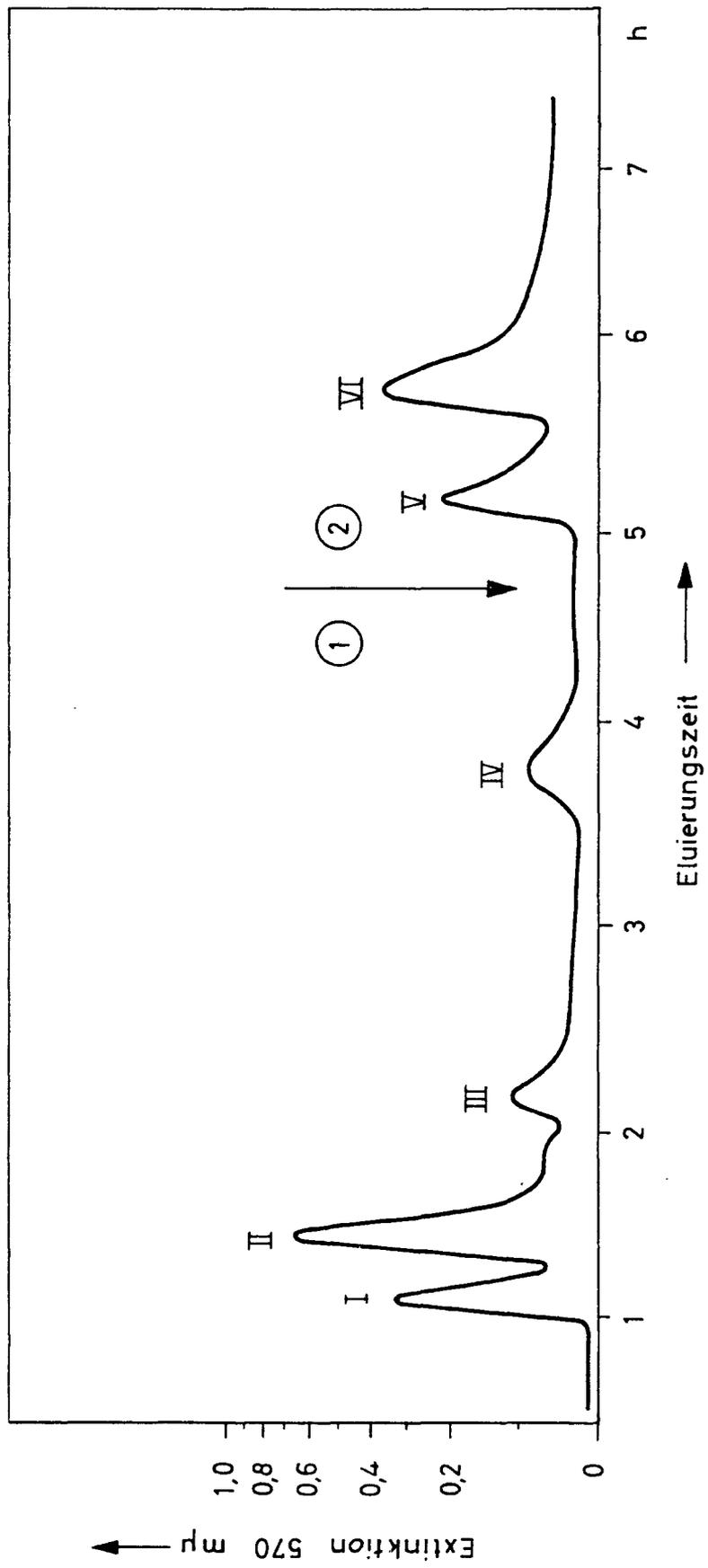


Abb. 12: Chromatographische Auftrennung von 50 mg Rohenzym über DEAE-Cellulose. Aufgetragen sind die Extinktion ("LBK-Uvicord") und die Enzymaktivität von je 3 ml Eluat. Säule:  $\varnothing$  1,5 x 20 cm. Linearer Elutionsgradient des Phosphat-Puffers: (1)  $5 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  molar; (2)  $5 \cdot 10^{-2}$  -  $5 \cdot 10^{-1}$  molar; pH 6,8.

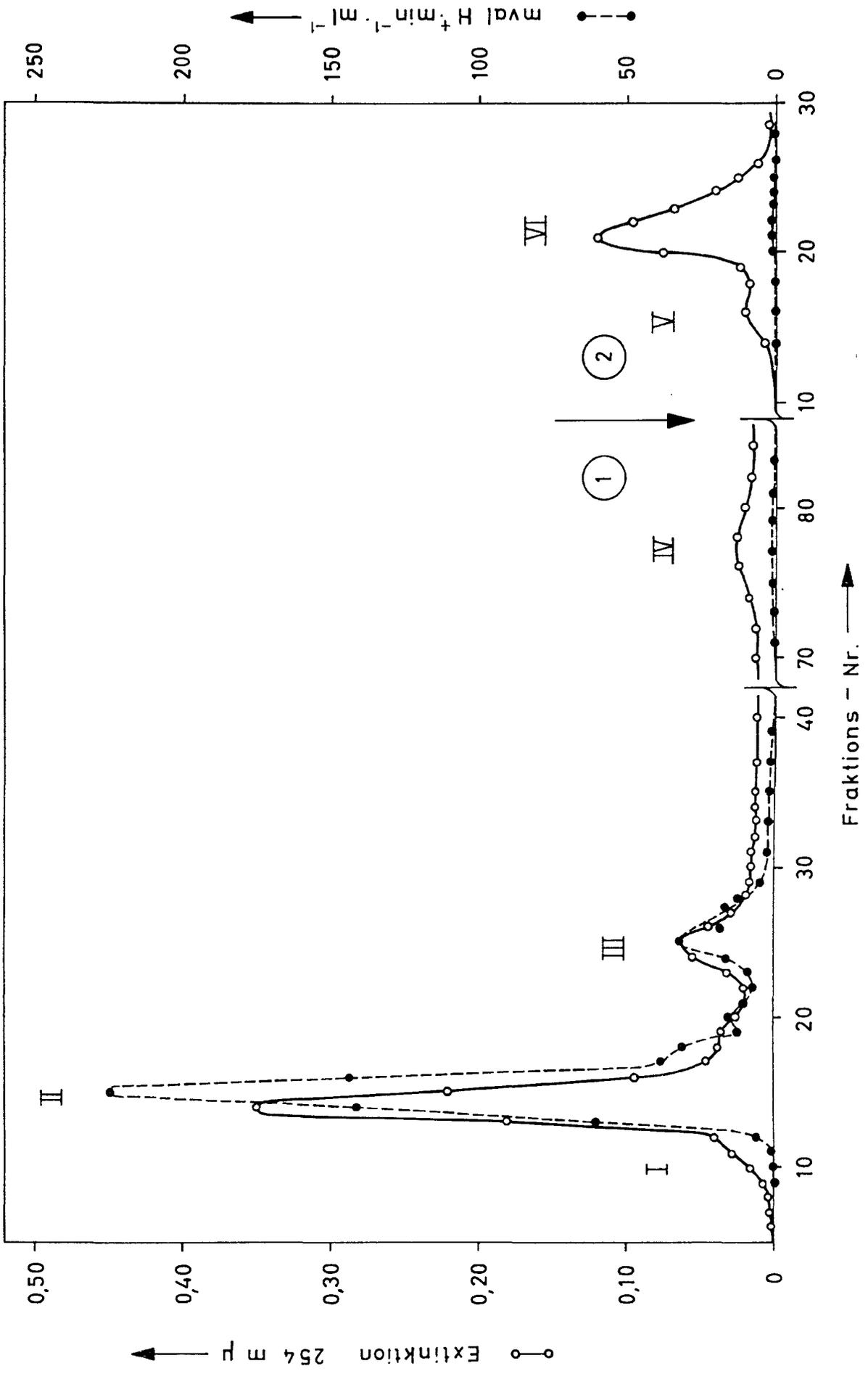


Abb. 13: Absorptionsspektrum einer 0,1%igen Enzymlösung in  
 $5 \cdot 10^{-3}$  molarem Phosphat-Puffer pH 6,8.

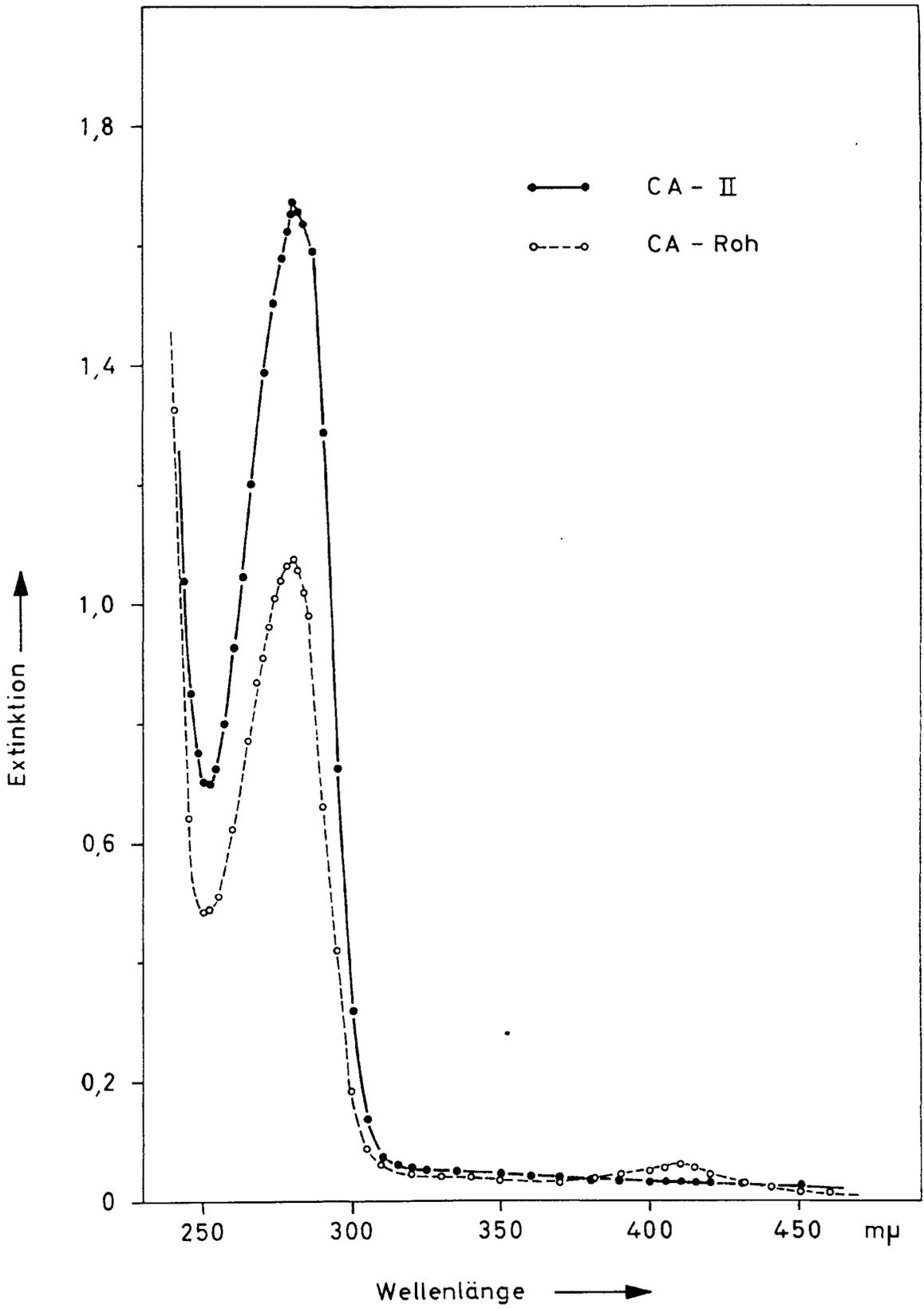


Abb. 14: Extinktion der Peaks II und III von Abb. 12 bei verschiedenen Wellenlängen.  $\Delta$ : 280 m $\mu$ ;  $\circ$  : 253,7 m $\mu$ ;  
C : im "LKB-Uvicord" registrierte Extinktion;  $\ast$  : 410 m $\mu$ .

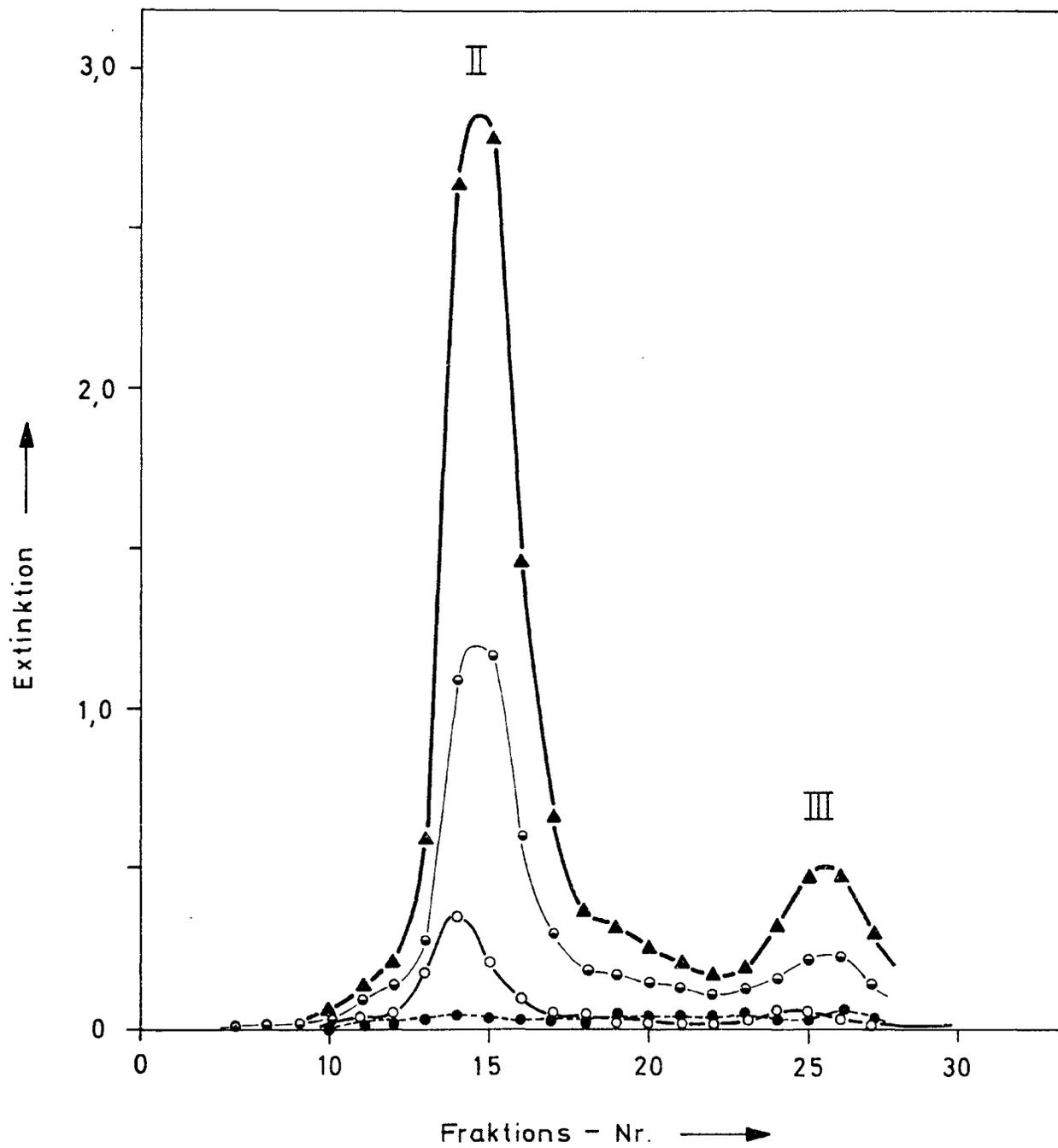
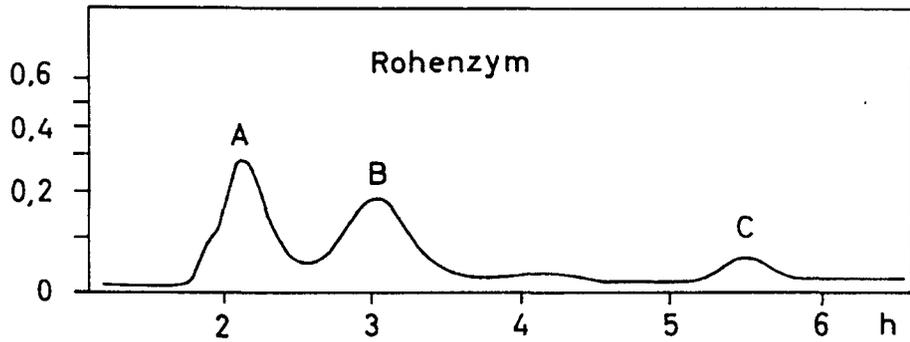


Abb. 15: Chromatographische Auftrennung von:

- 1) 5 mg Rohenzym über Sephadex G-75. Säule  $\emptyset$  1,5 x 90 cm.  
Eluierung mit  $5 \cdot 10^{-3}$  molarem Phosphat-Puffer pH 6,8.
- 2) von je 5 mg der Gel-Fractionen A und B und des Rohenzym über DEAE-Cellulose. Säule  $\emptyset$  1,5 x 20 cm.  
Linearer Elutionsgradient des Phosphat-Puffers: (1)  $5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2}$  molar; (2)  $5 \cdot 10^{-2} - 5 \cdot 10^{-1}$  molar; pH 6,8.  
Aufgetragen ist die Ninhydrinfärbung des Eluats.

1. SEPHADEX - GEL G 75



2. DEAE - CELLULOSE

Extinktion 570 m $\mu$  ↑

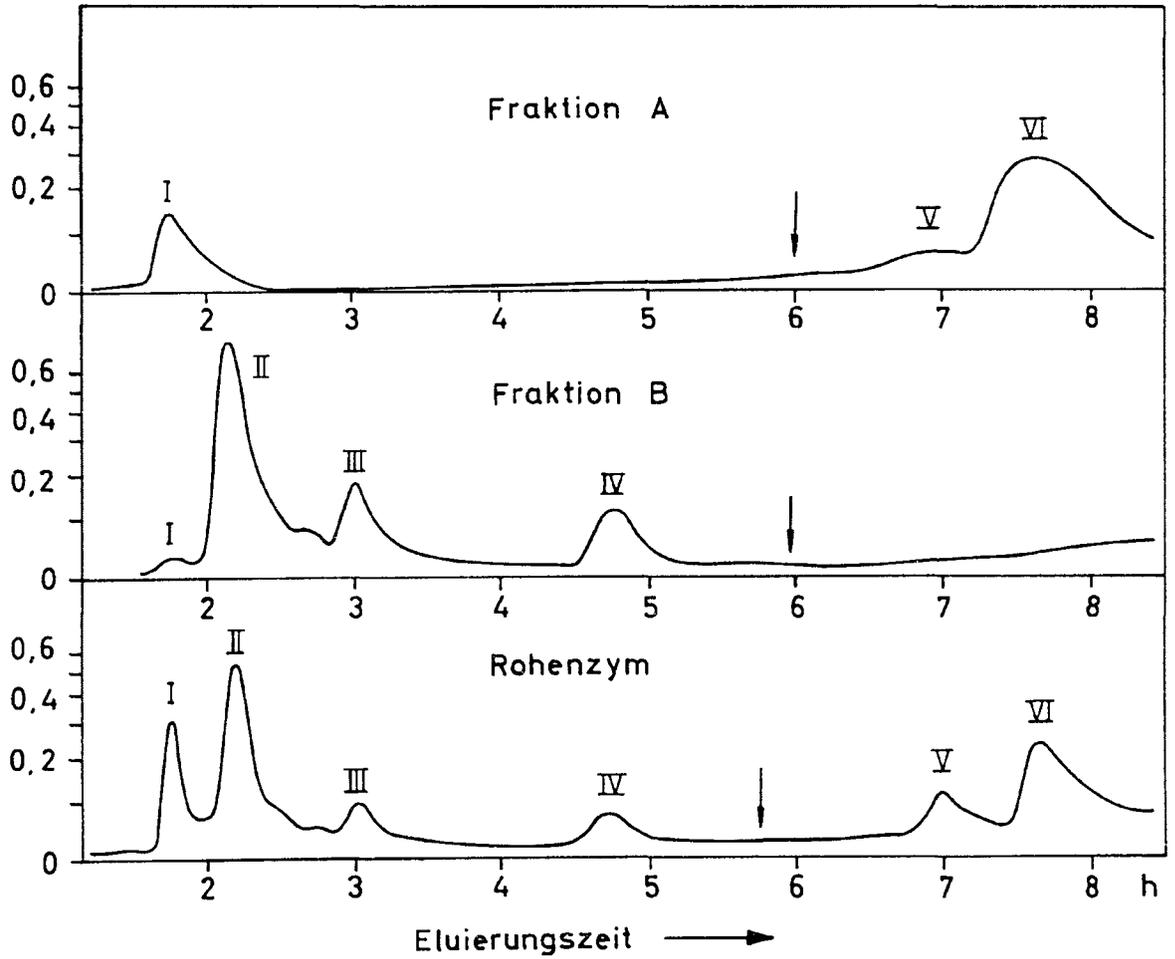


Abb. 16: Chromatographische Auftrennung von 50 mg Rohenzym über Sephadex G-75. Aufgetragen sind die Extinktion bei 280 m $\mu$  und die Enzymaktivität von je 3 ml Eluat. Säule  $\emptyset$  1,5 x 90 cm; Eluierung mit  $5 \cdot 10^{-3}$  molarem Phosphat-Puffer pH 6,8.

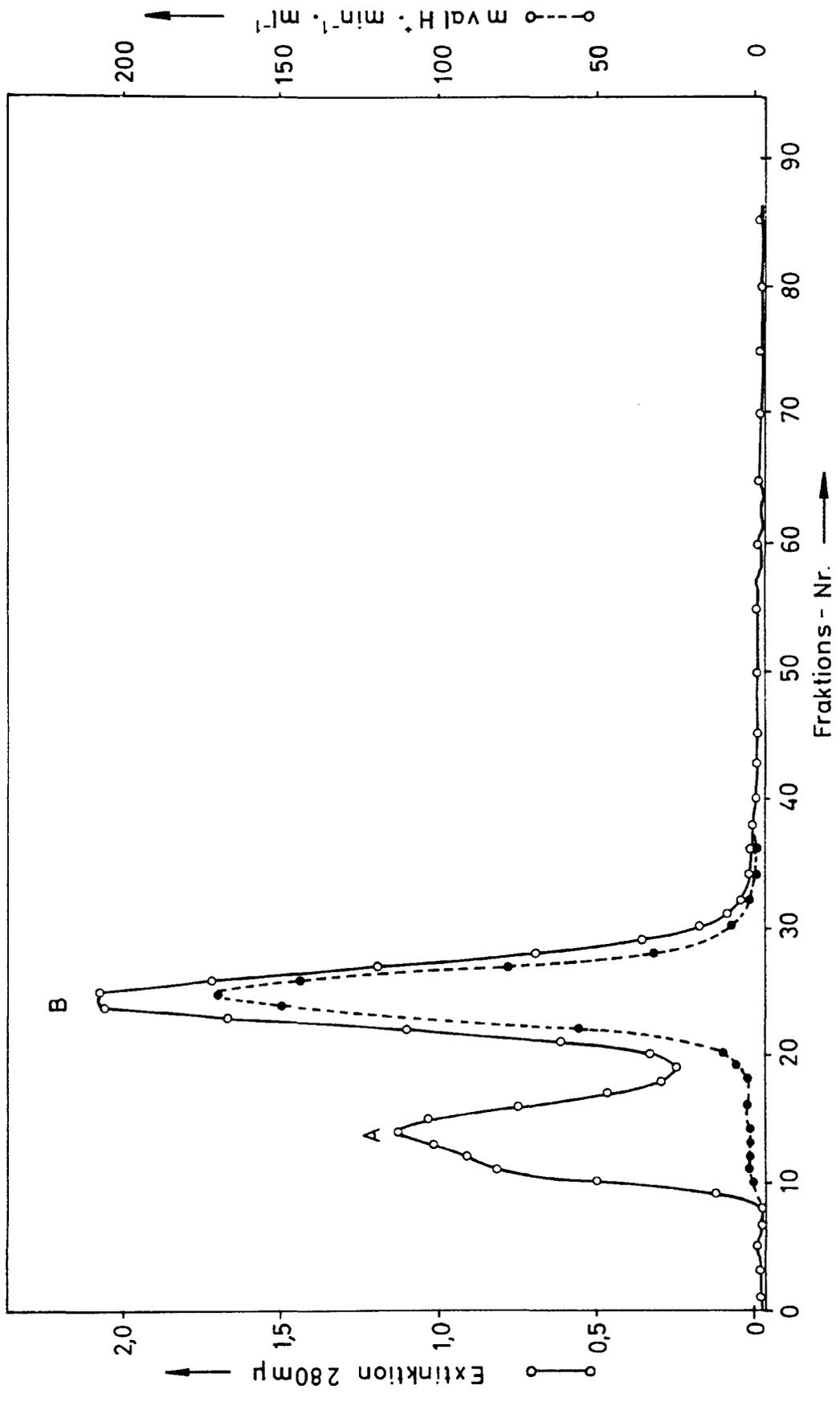


Abb. 17: Chromatographische Auftrennung von 500 mg Rohenzym über Sephadex G-75. Aufgetragen sind die Extinktion bei 280 m $\mu$  und die Enzymaktivität von je 3 ml Eluat. Säule  $\emptyset$  1,5 x 130 cm. Eluierung mit  $5 \cdot 10^{-3}$  molarem Phosphat-Puffer pH 6,8.

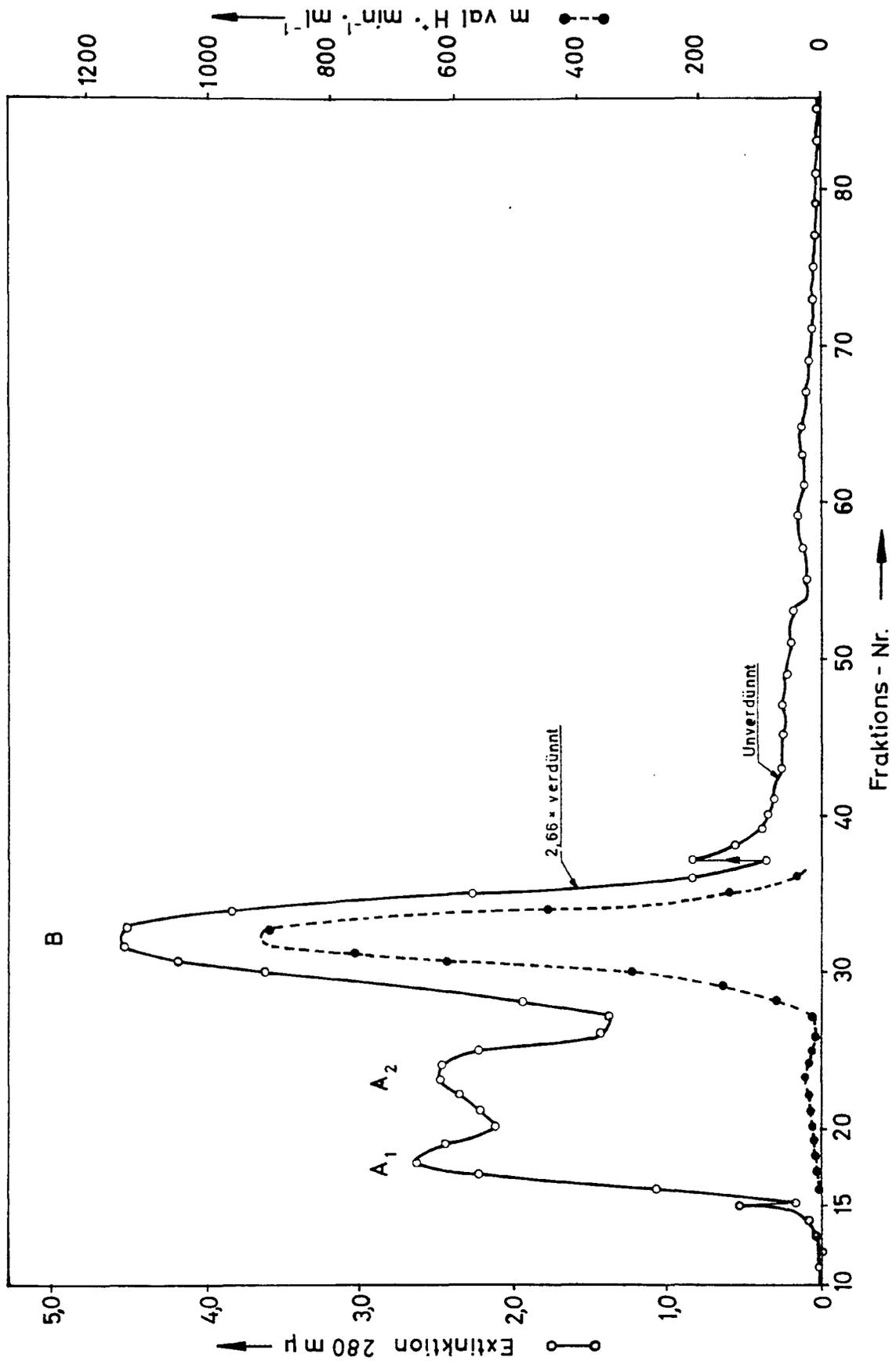


Abb. 18: Vergleich des DEAE-Cellulose-Chromatogramms (1) mit dem Cellogelelektropherogramm (2).

- (1) Chromatographie von 2,5 mg Isoenzym II über DEAE-Cellulose. Aufgetragen ist die Ninhydrin-Färbung des Eluats. Säule:  $\varnothing$  1,5 x 20 cm. Linearer Eluierungsgradient des Phosphat-Puffers:  
 $5 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  molar; pH 6,8.
- (2) Cellogelelektrophorese von 0,1 mg Isoenzym II. Aufgetragen ist die Amidoschwarz-Färbung der Streife. Na-Veronal-Puffer  $5 \cdot 10^{-2}$  molar, pH 9,0;  $0,9 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; Laufzeit 6 h.



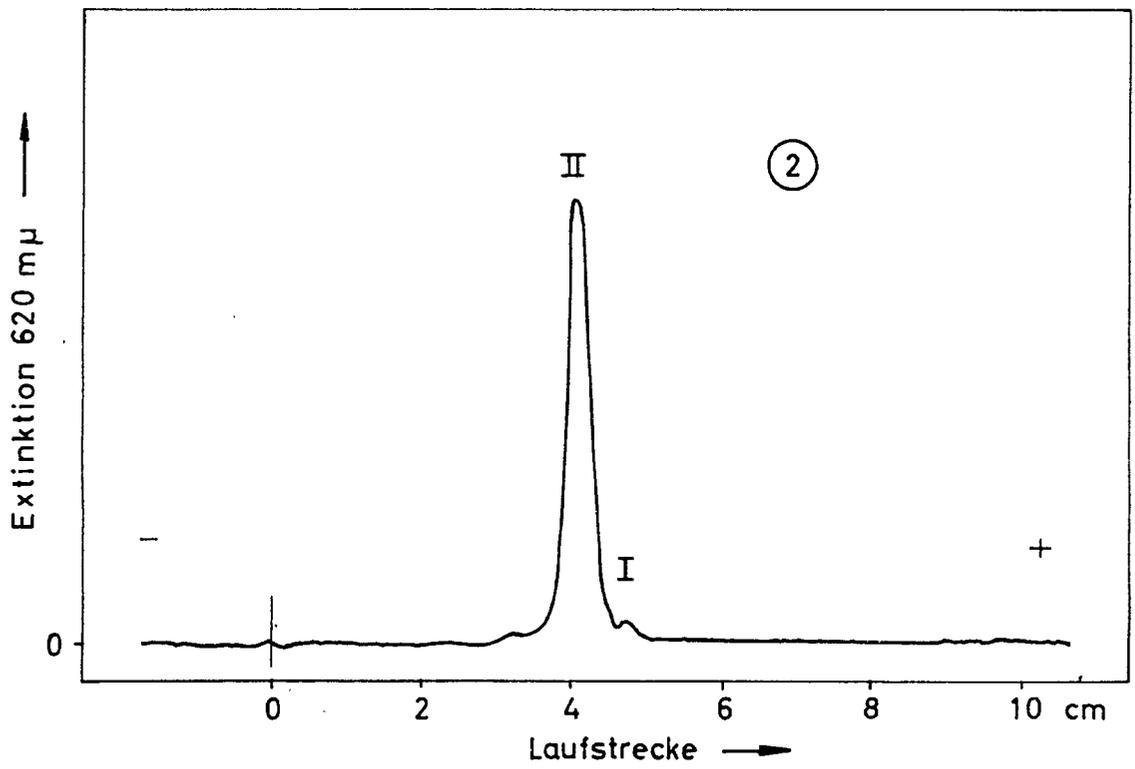
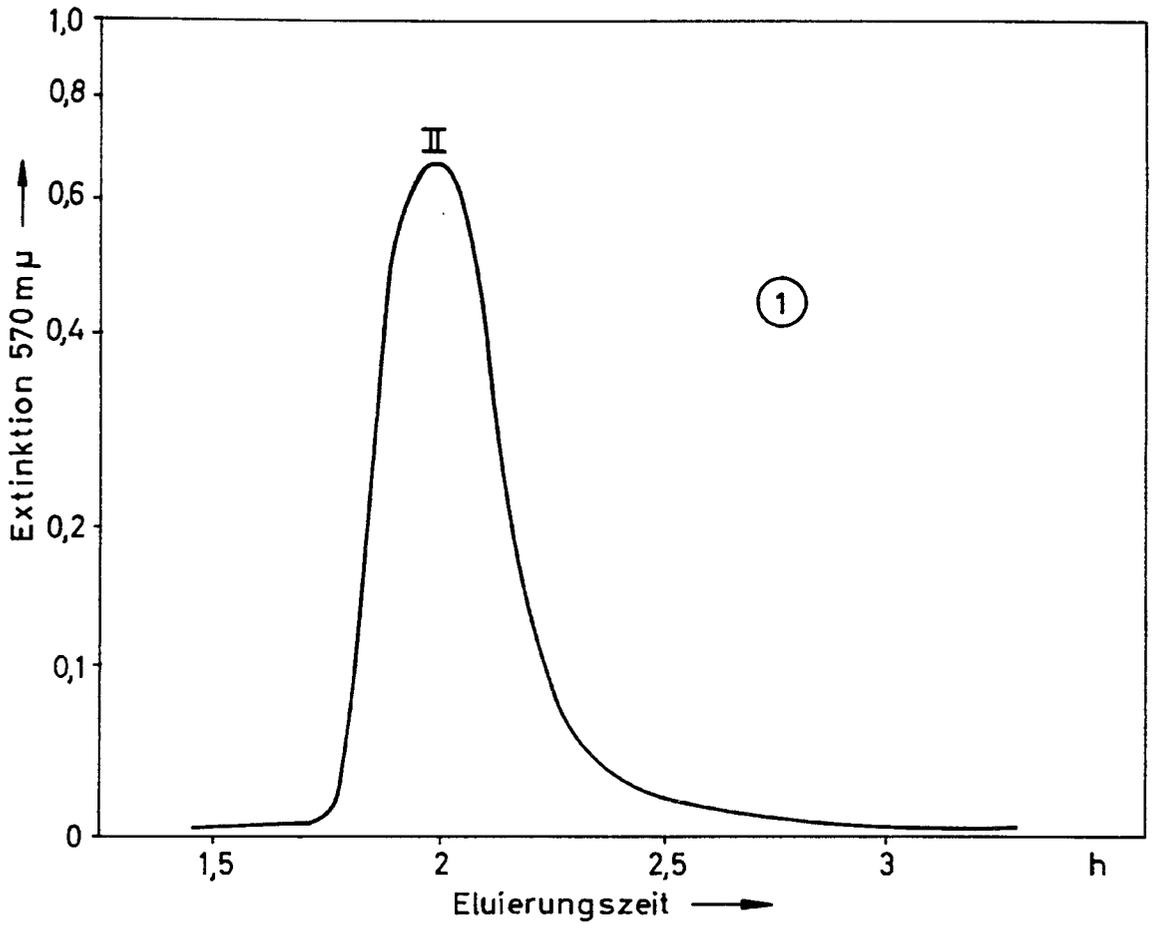


Abb. 19: Chromatographische Auftrennung des Isoenzym III über DEAE-Cellulose. Aufgetragen ist die Ninhydrin-Färbung des Eluats. Entsalzung: (1) Bio Rad-Verzögerungsharz AG 11 A8 (1,1 mg Enzym) und (2) Dialyse (1,6 mg Enzym). Säule  $\emptyset$  1,5 x 20 cm. Linearer Eluierungsgradient des Phosphat-Puffers:  $5 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  molar, pH 6,8.

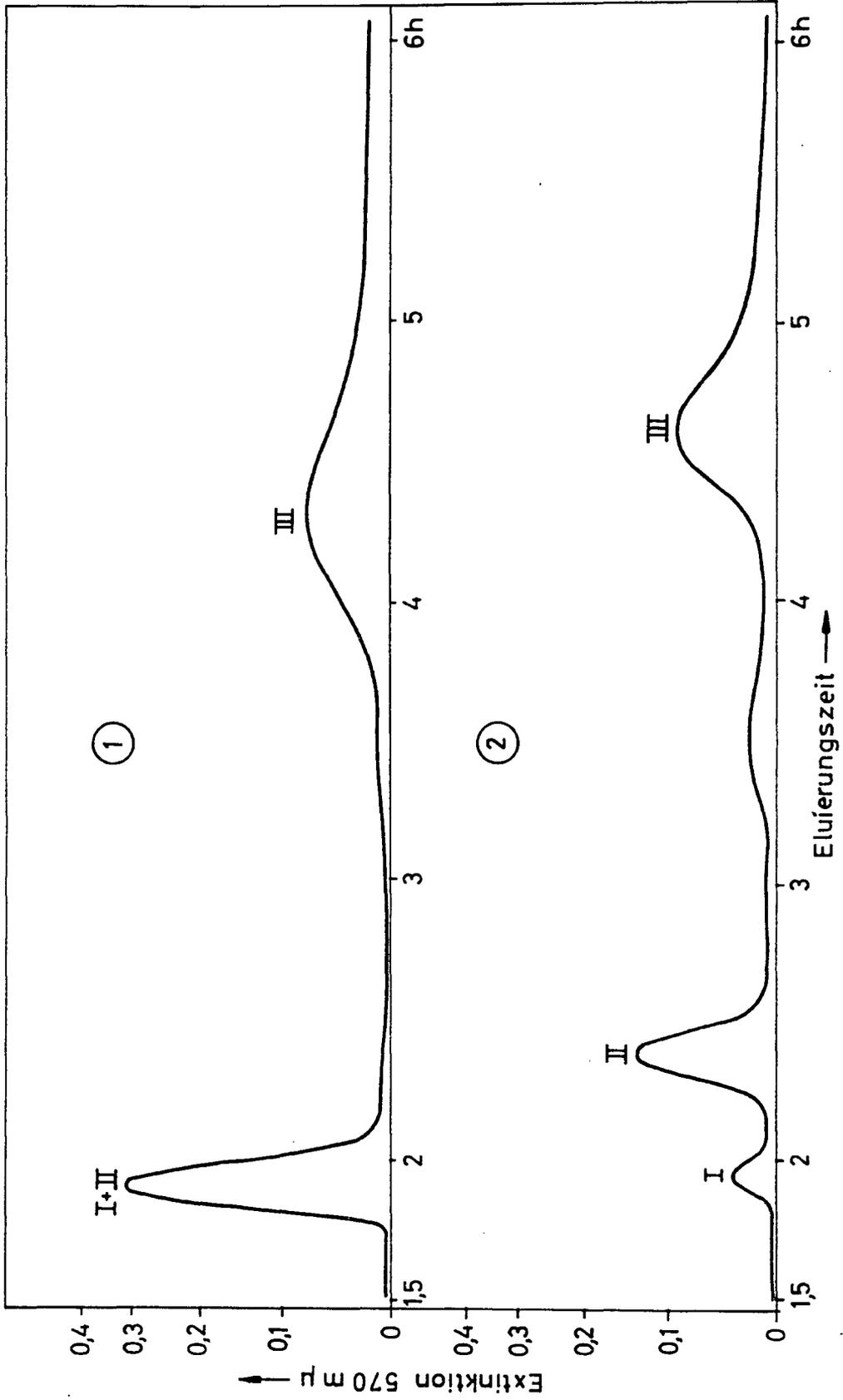


Abb. 20: Chromatographische Auftrennung einer keimfreien (1) bzw. keimhaltigen (2) Isoenzym-II-Lösung über DEAE-Cellulose. Aufgetragen ist die Ninhydrin-Färbung des Eluats. 1 mg Isoenzym II. Säule  $\emptyset$  1,5 x 20 cm. Linearer Eluierungsgradient des Phosphat-Puffers:  $4 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  molar, pH 6,8. Das Enzym wurde 18 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  in verdünntem Phosphat-Puffer ( $1 \cdot 10^{-2}$  molar, pH 6,8) mit bzw. ohne Zusatz von  $\text{HCCl}_3$  inkubiert.

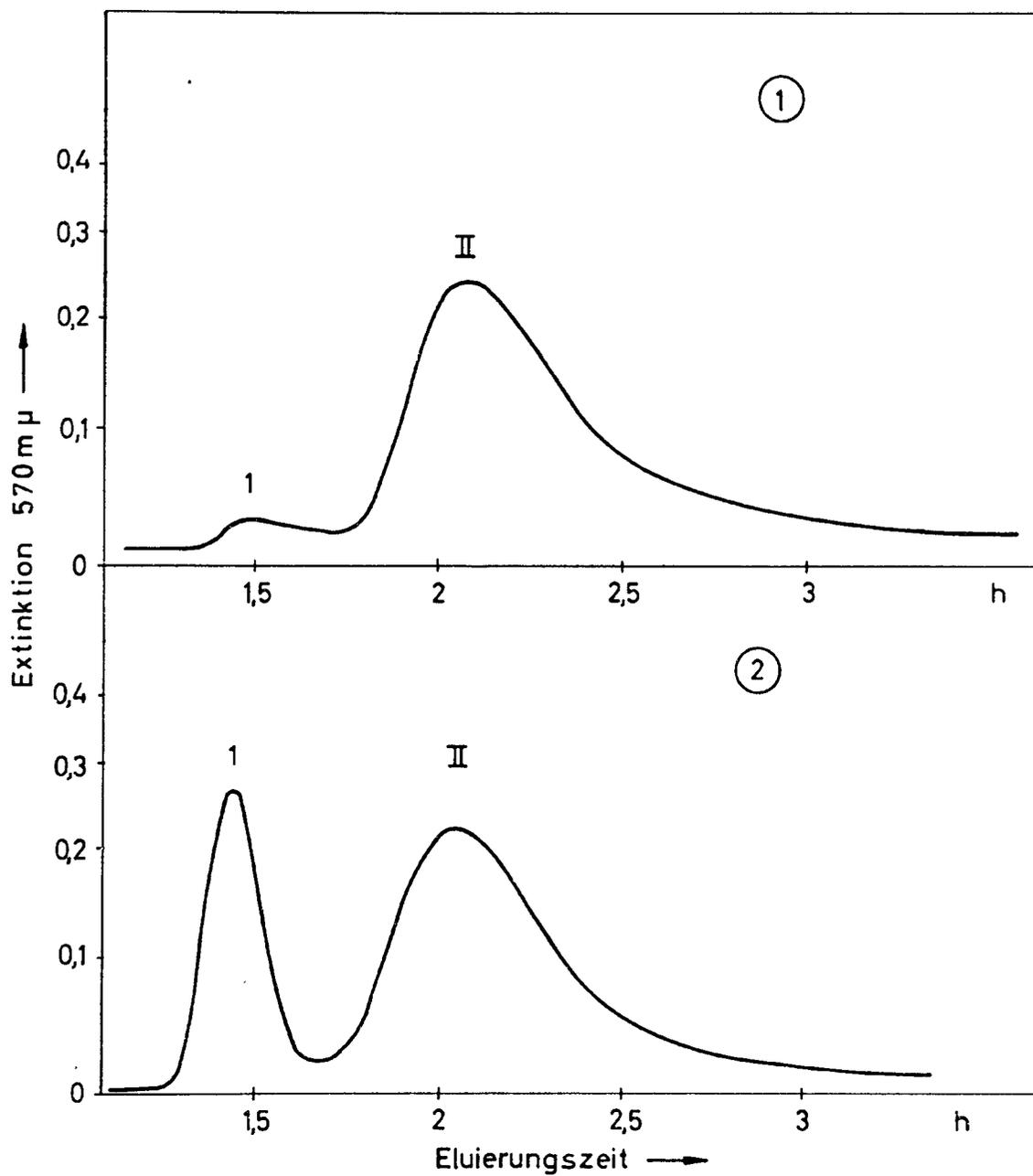


Abb. 21: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion von der Enzym-Konzentration für verschiedene CA-Präparate (vgl. hierzu Abb. 8 für das Rohenzym).  
T = 6 °C; Substrat  $15 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Reaktionsvolumen: 25 ml  
 $8 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4.

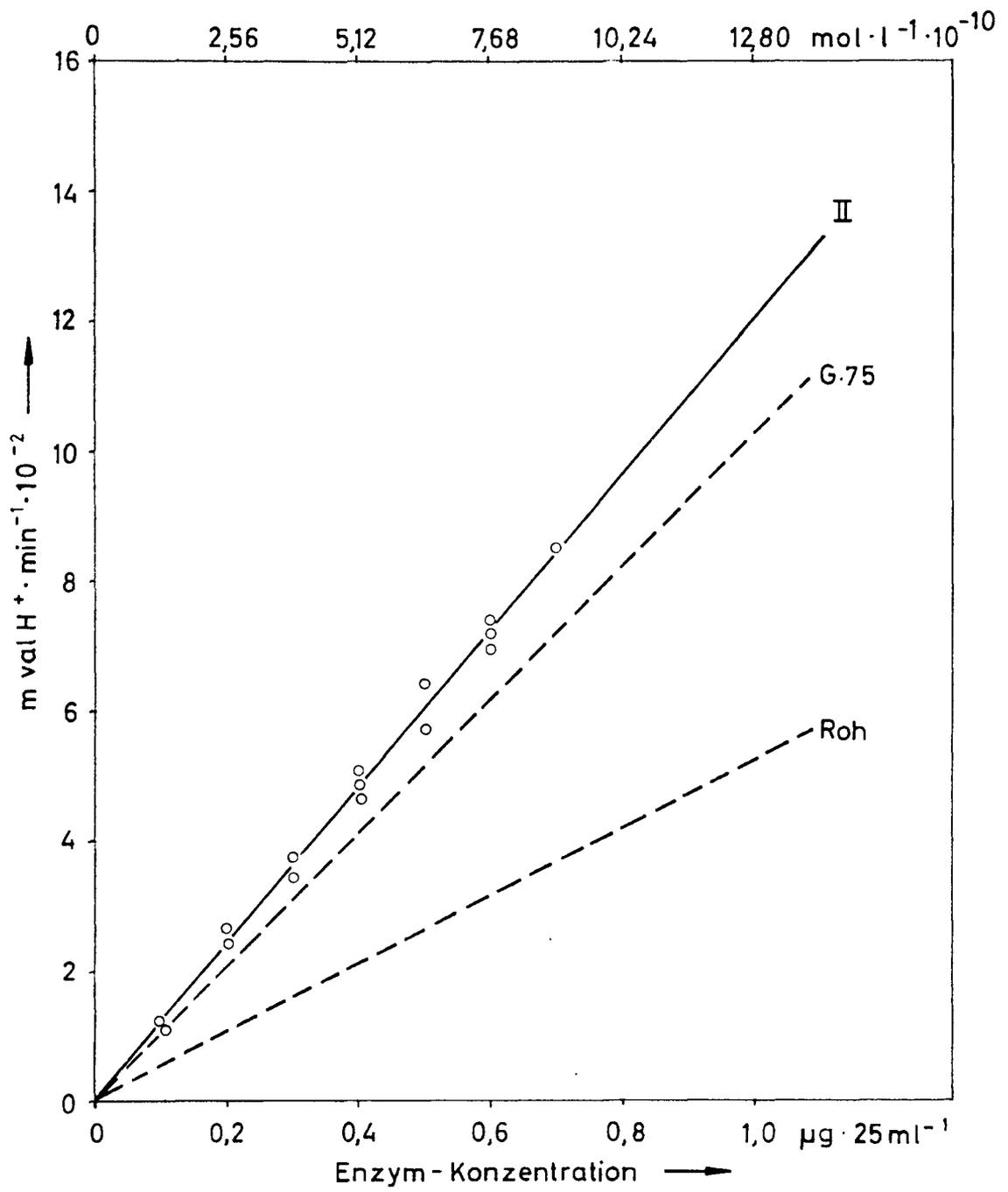


Abb. 22: Effektive Stabilitätskonstante  $K'_{11Zn}$  verschiedener Chelatbildner als Funktion des pH.

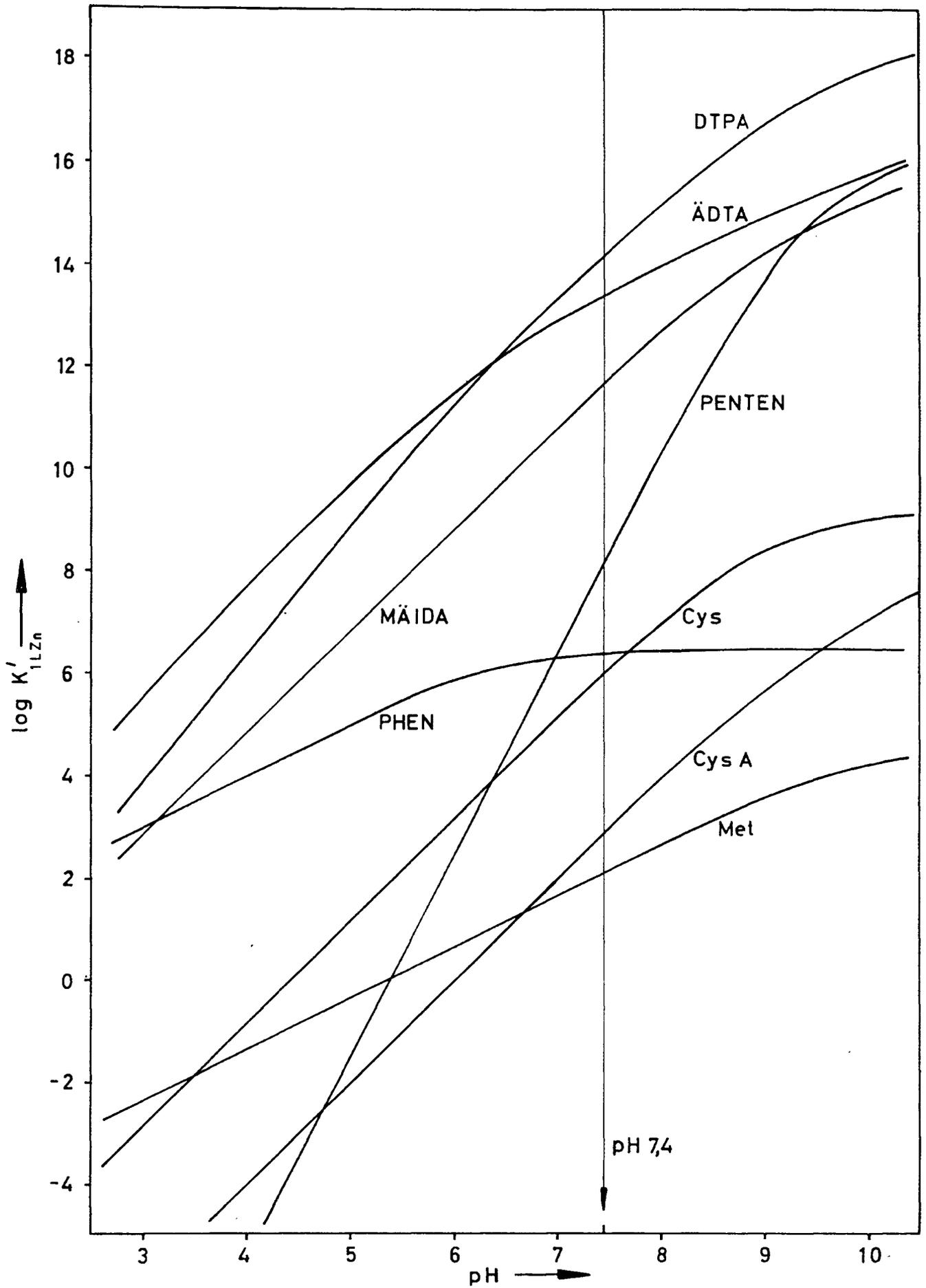


Abb. 23: Abhängigkeit der Enzymaktivierung und des  $pZ_n$  von der Ligandkonzentration  $[L]_t$  bei konstanter Enzymkonzentration. Weitere Erklärungen s. Text.

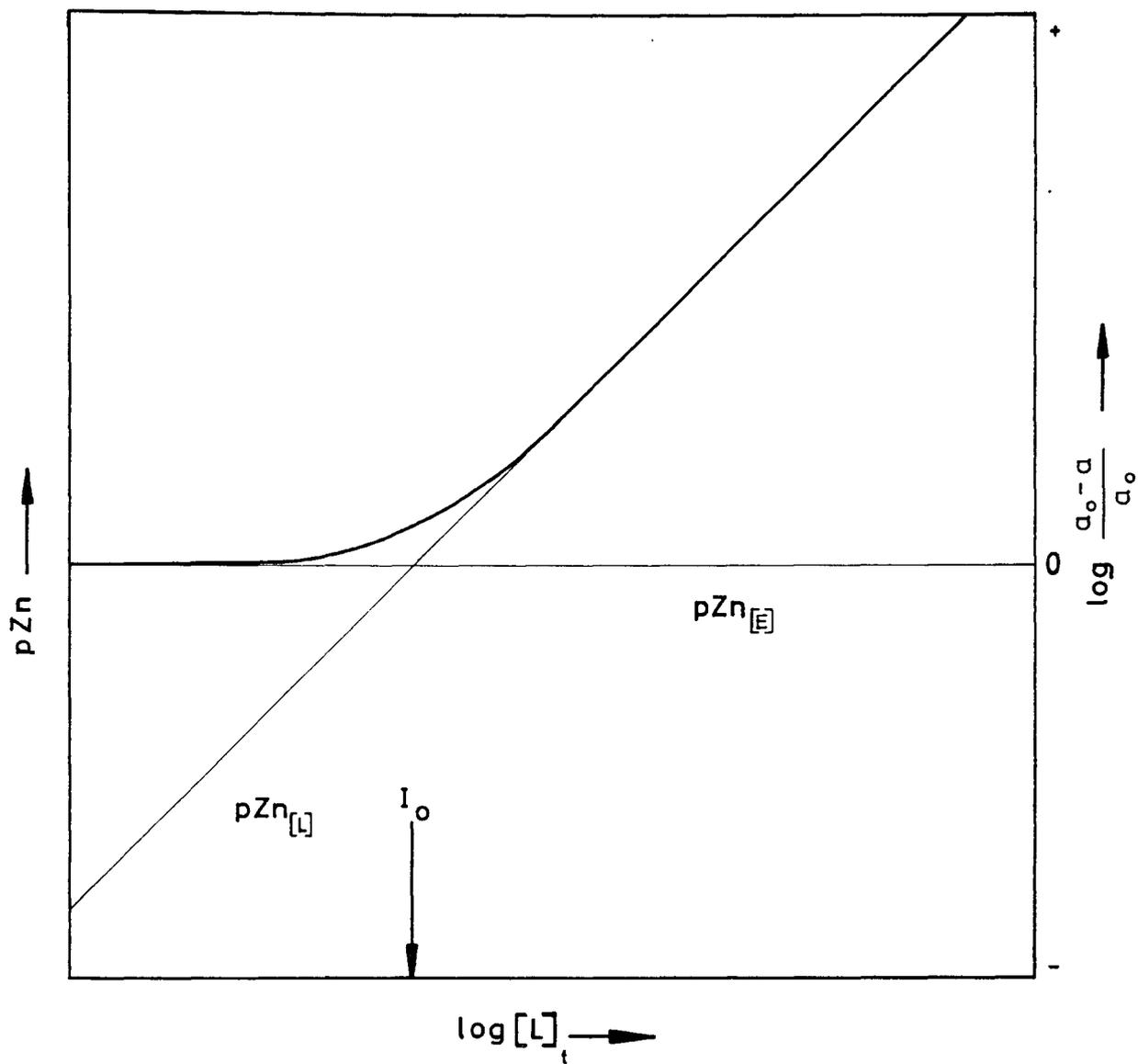


Abb. 24: Schematische Darstellung des Inkubierungsgefäßes.  
Erklärung im Text.

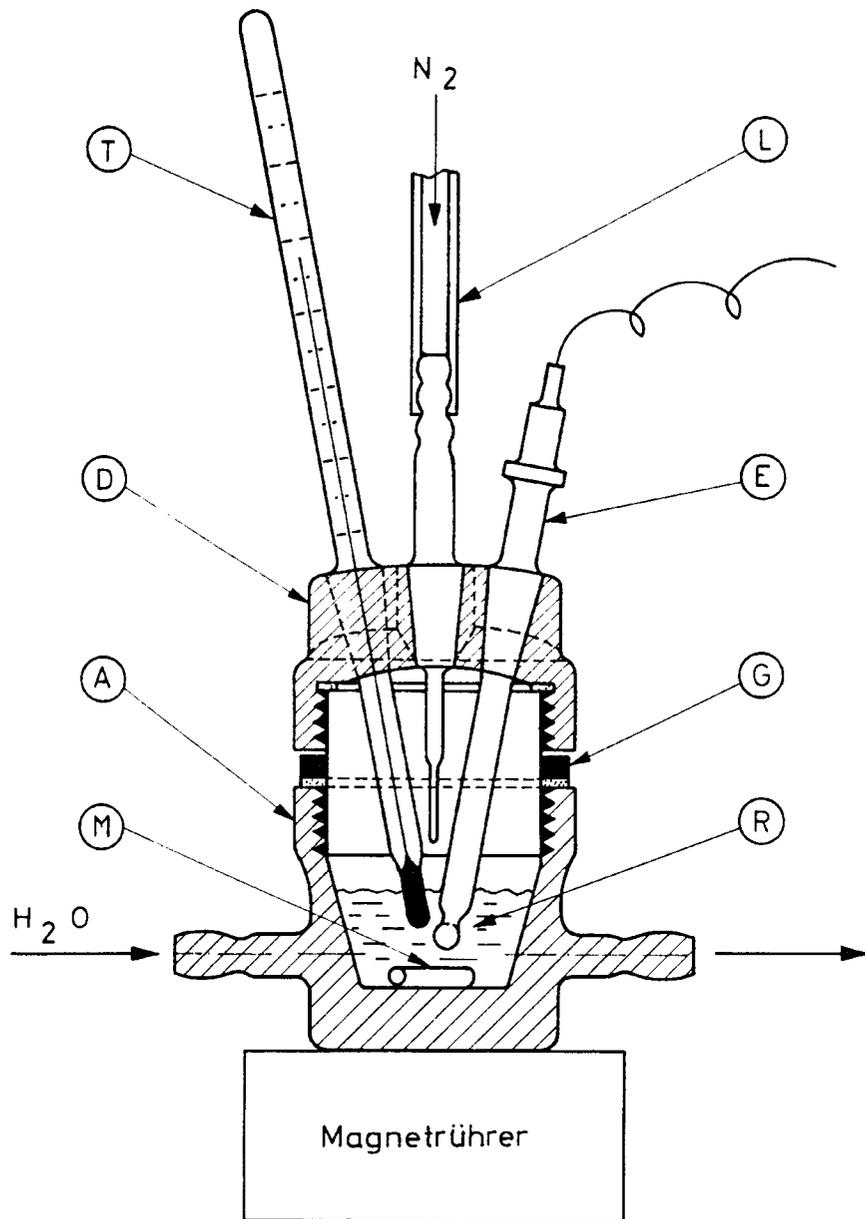


Abb. 25: Soforthemmung der CA-G75 durch verschiedene Chelatbildner.  $[E] = \sim 5,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (0,5  $\mu\text{g}$  in 25 ml).

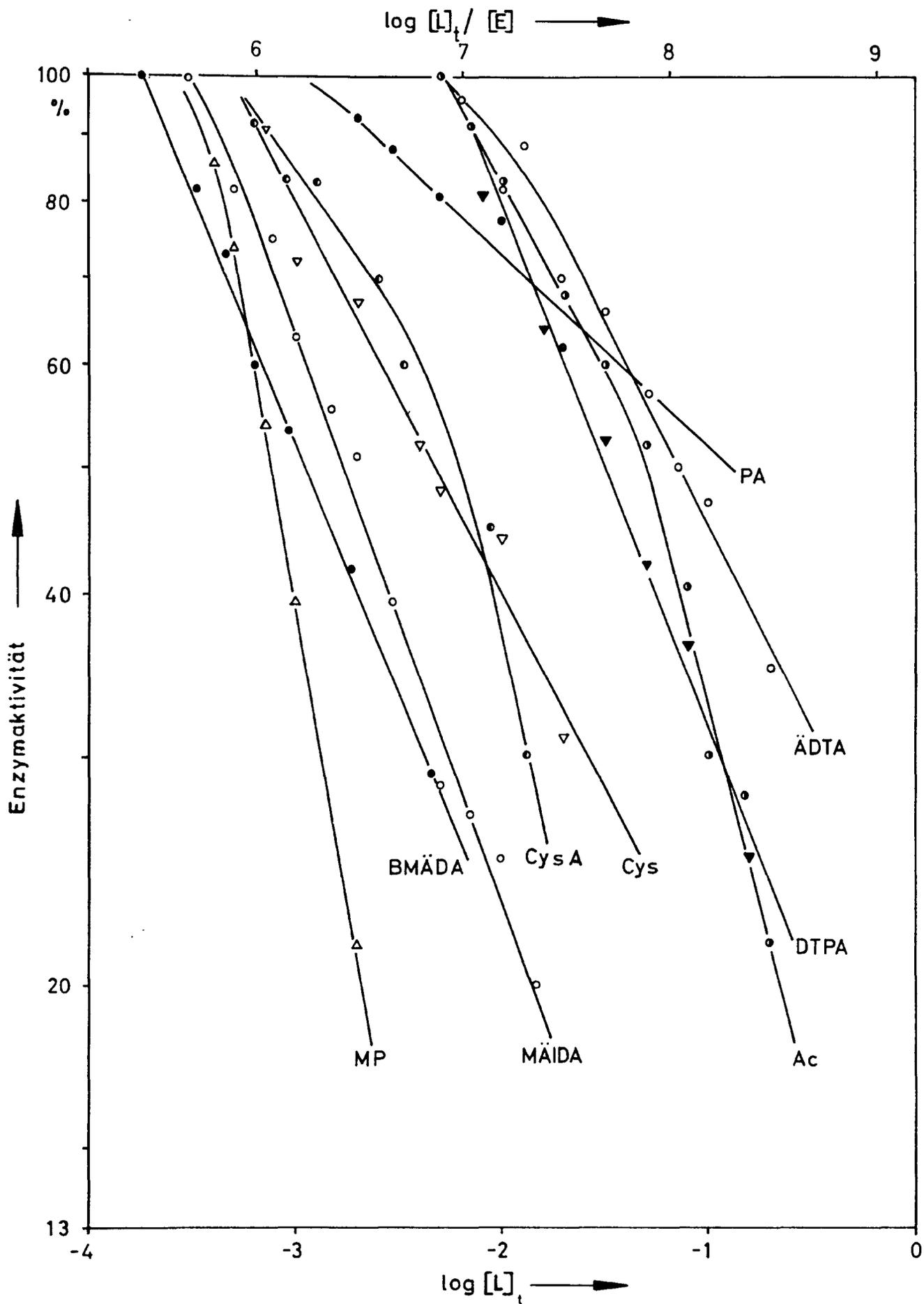


Abb. 26: Soforthemmung der CA-II durch verschiedene Chelatbildner.  $[E] = 6,4 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (0,5  $\mu\text{g}$  in 25 ml).

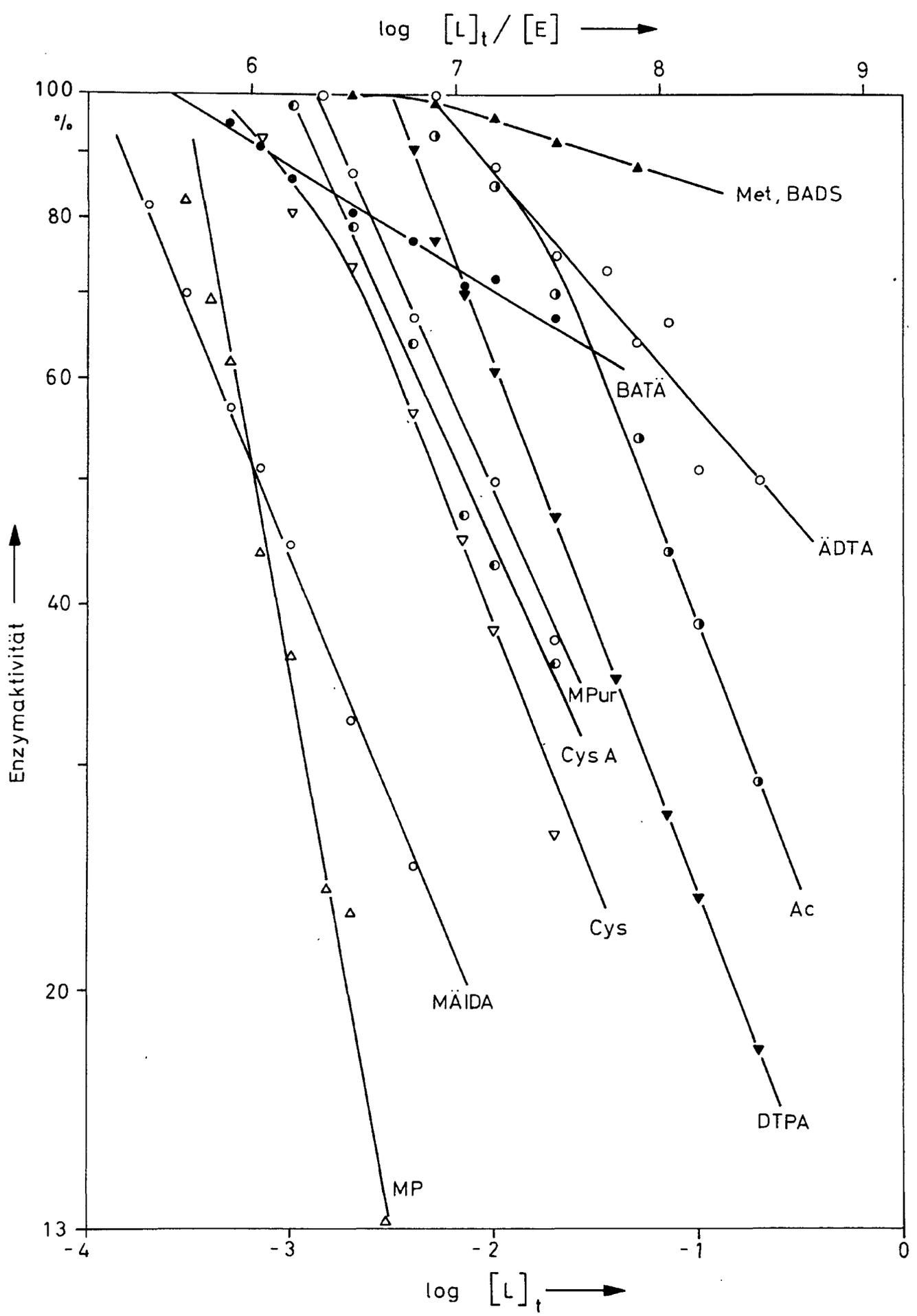


Abb. 27: Soforthemmung der CA-II durch Polyamine. Die gestrichelten Kurven (und offenen Symbole) geben die Inaktivierung nach Korrektur der Ionenstärke wieder (vgl. Text).  $[E] = 6,4 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

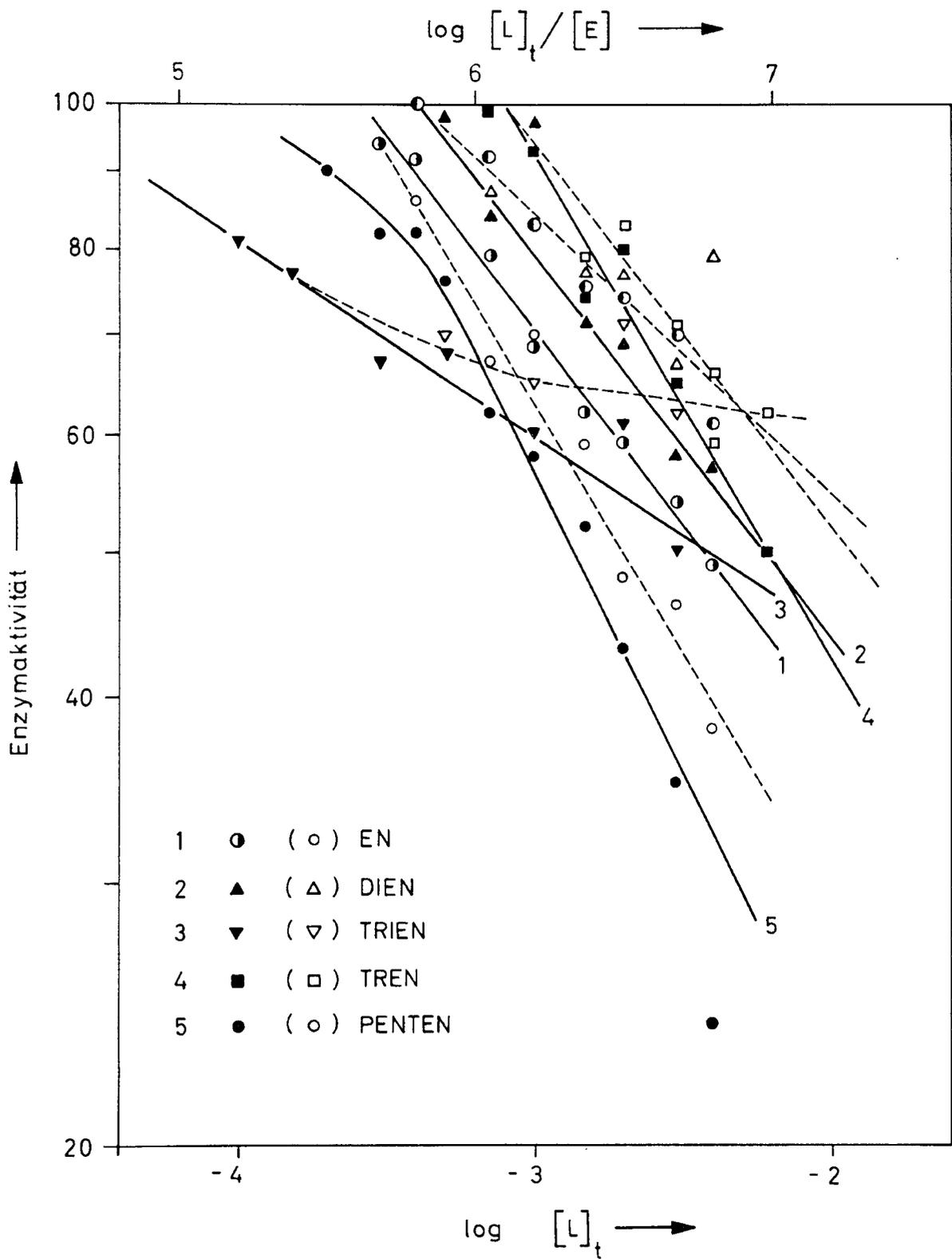


Abb. 28: Soforthemmung der CA-II als Funktion der Konzentration von Phosphat-Puffer, Ac, NaCl bzw.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Kurve A) und Pyridoxin  $\cdot$  HCl (Kurve B).  $[\text{E}] = 6,4 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

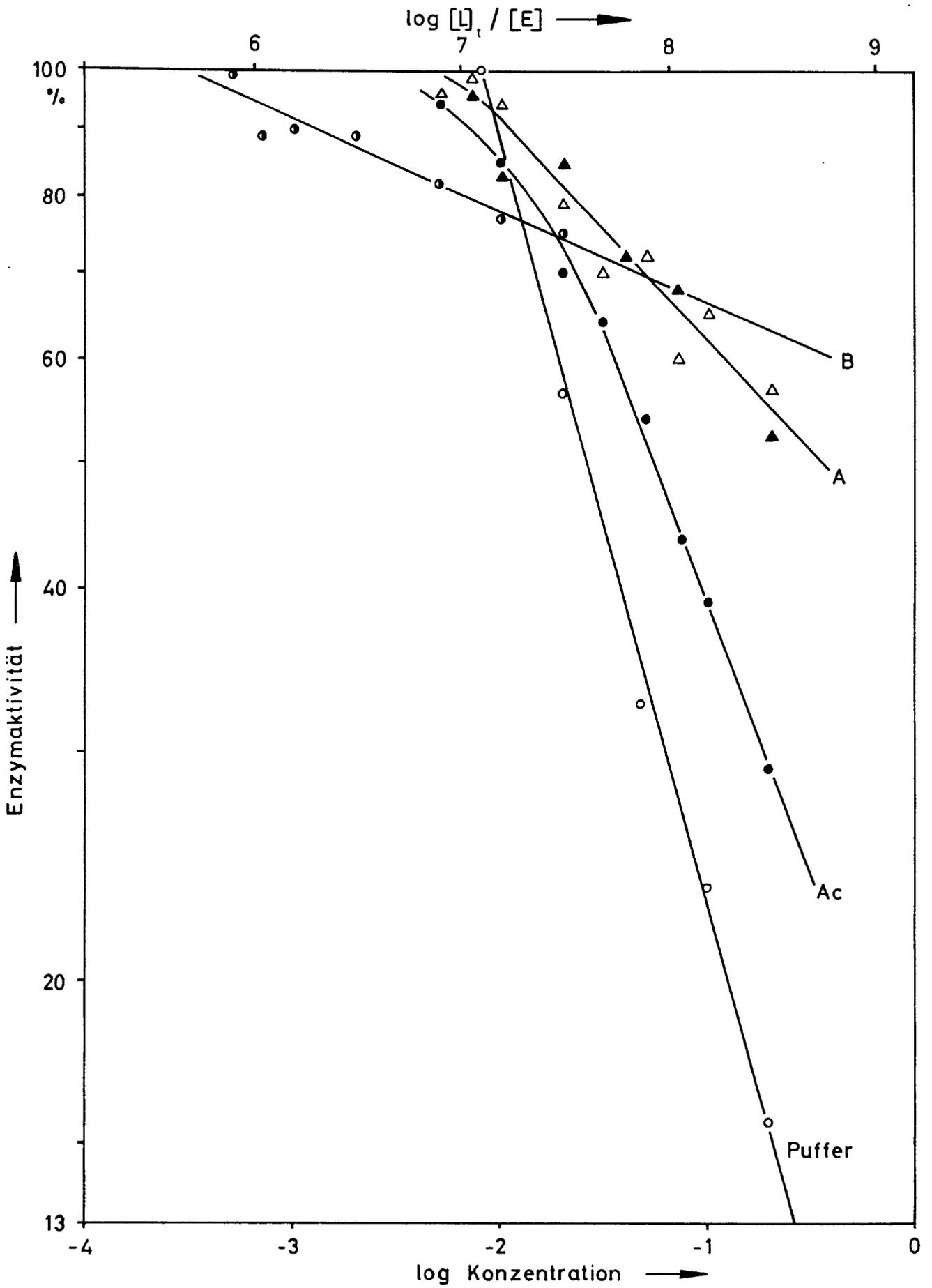


Abb. 29: Soforthemmung und  $V_E$  der CA-II in Abhängigkeit von der verbrauchten NaOH-Menge (bedingt durch die Carbatbildung der Polyamine). Weitere Erklärungen im Text.  $[E] = 6,4 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

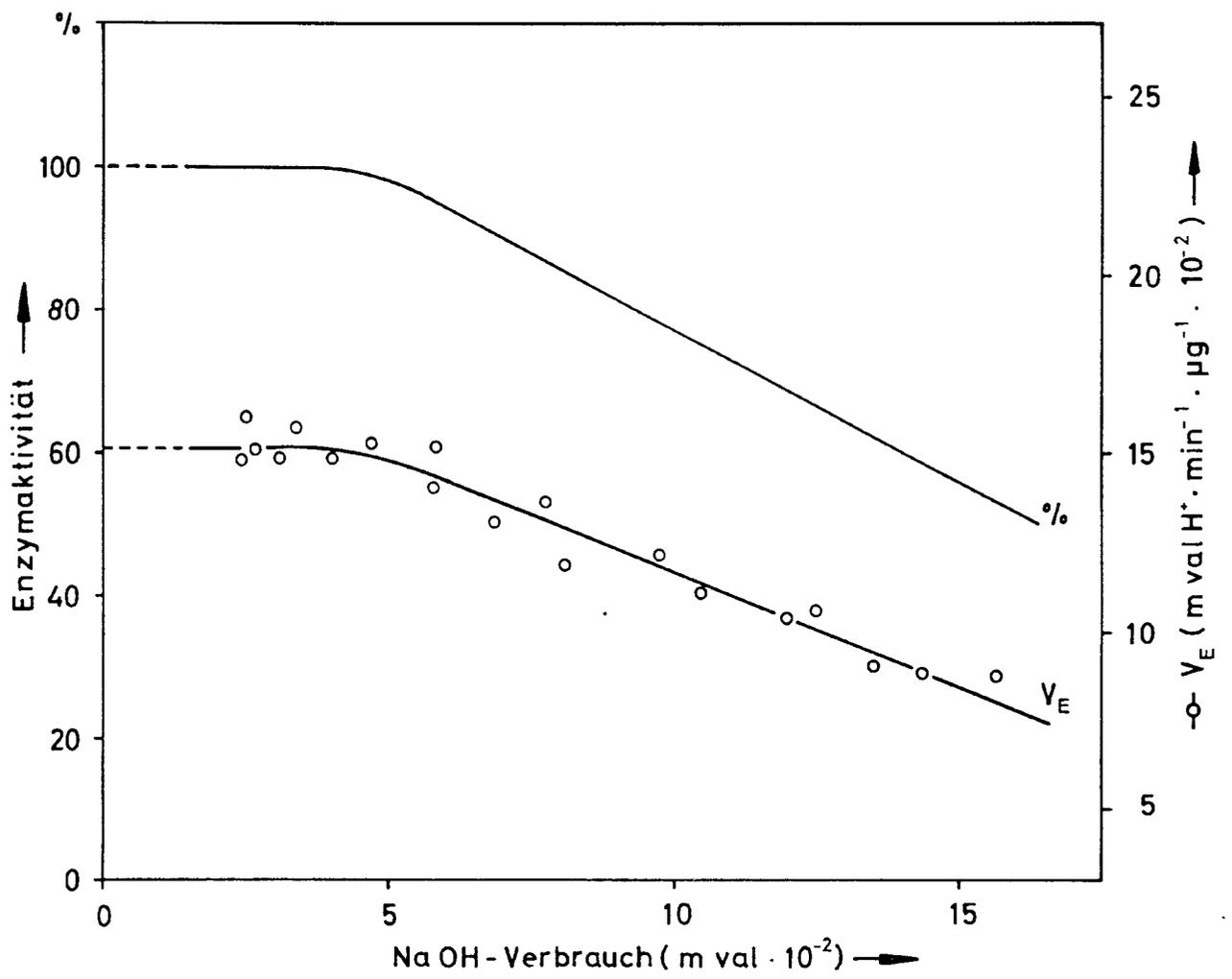


Abb. 30: Soforthemmung ( $I_0$ ) der CA-II und CA-G75 als Funktion von  $K_{1LZn}$ .

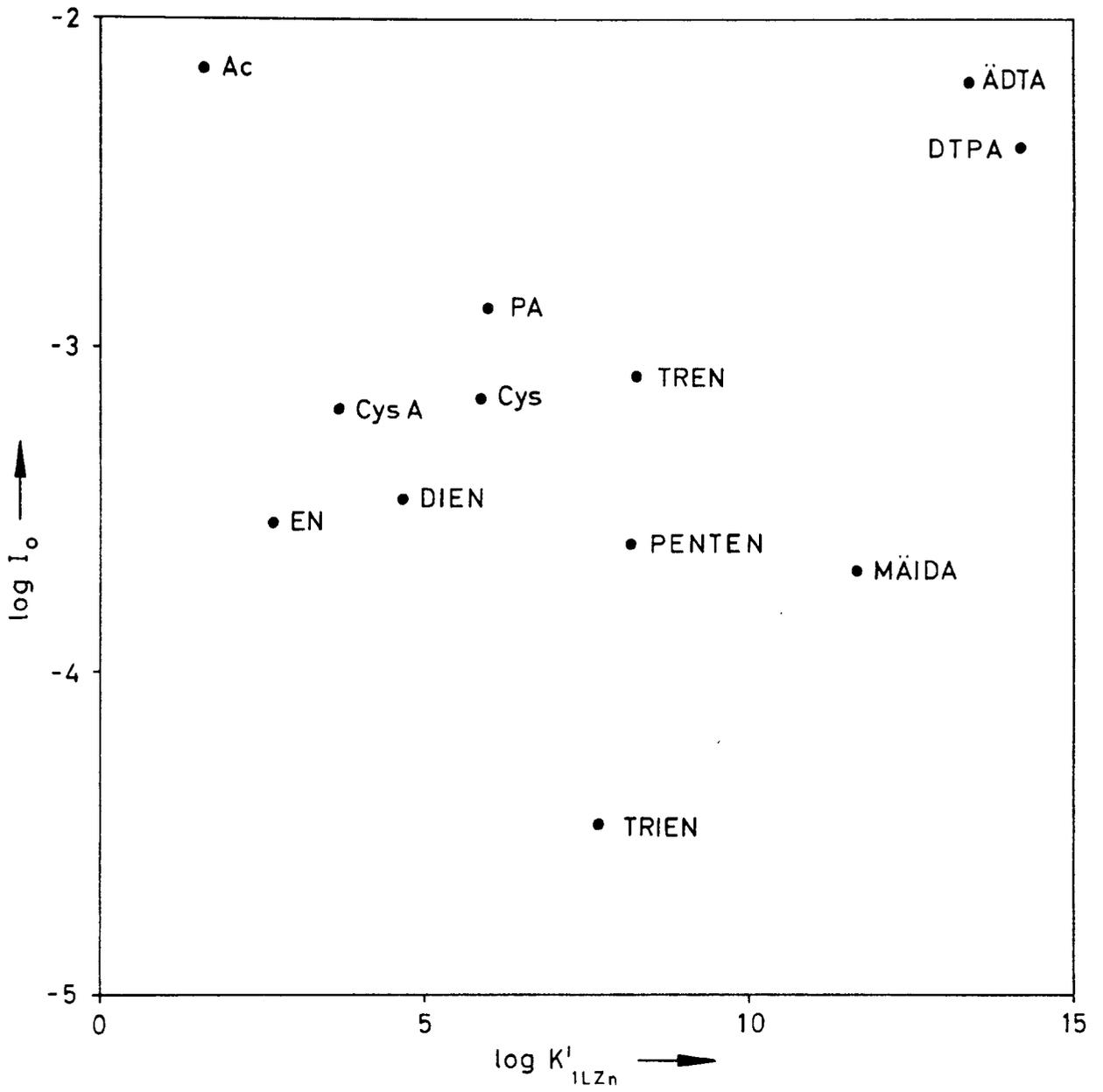


Abb. 31: Soforthemmung ( $I_{50}$ ) der CA-II und CA-G75 als Funktion von  $K'_{1LZn}$ . Die offenen Kreise entsprechen den der korrigierten Werte für Polyamine (Erklärung im Text).

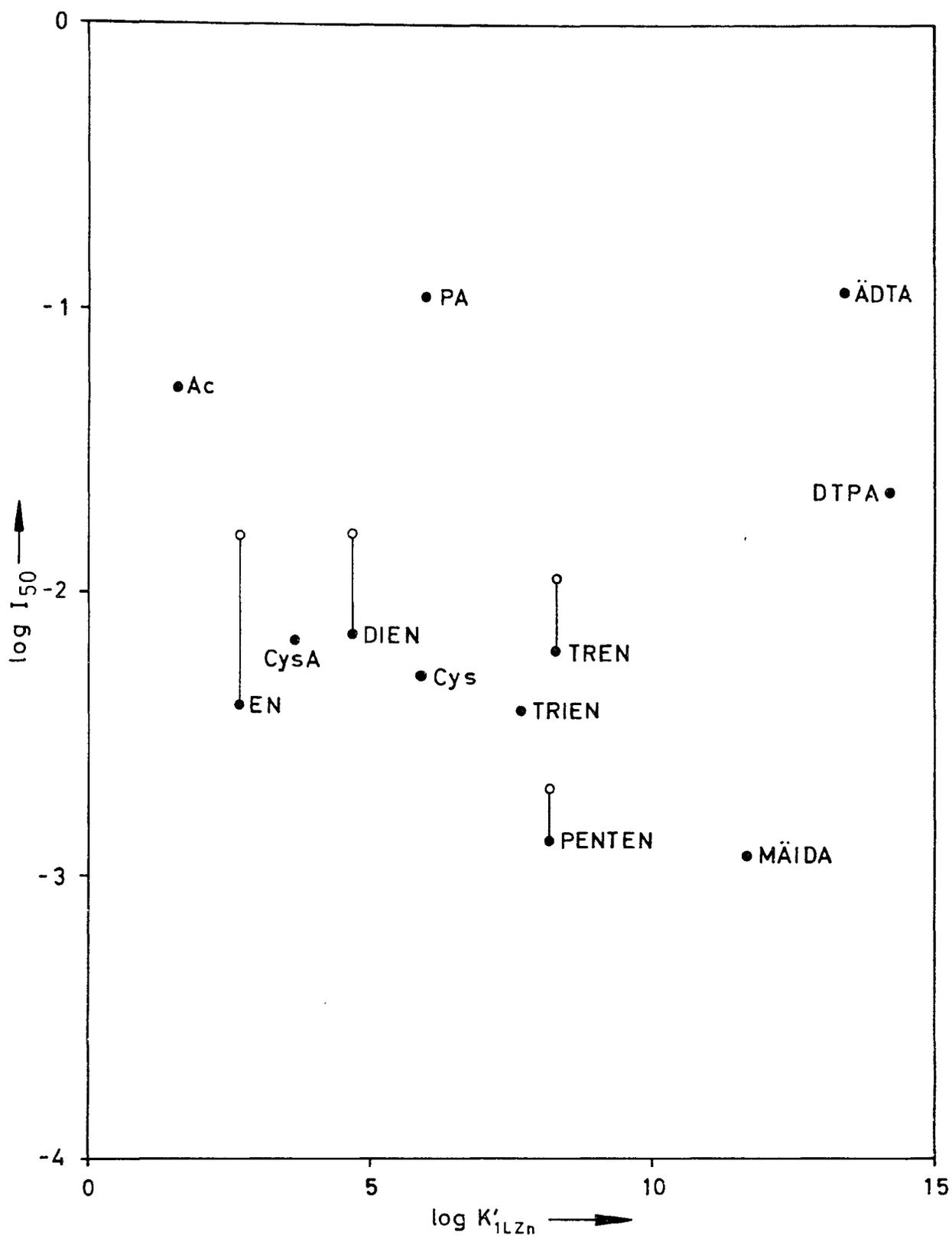


Abb. 32: NaOH-Verbrauch durch Polyamine als Funktion ihrer Konzentration im Titriergefäß. Die gestrichelte Kurve weist eine Steigung 1 auf.

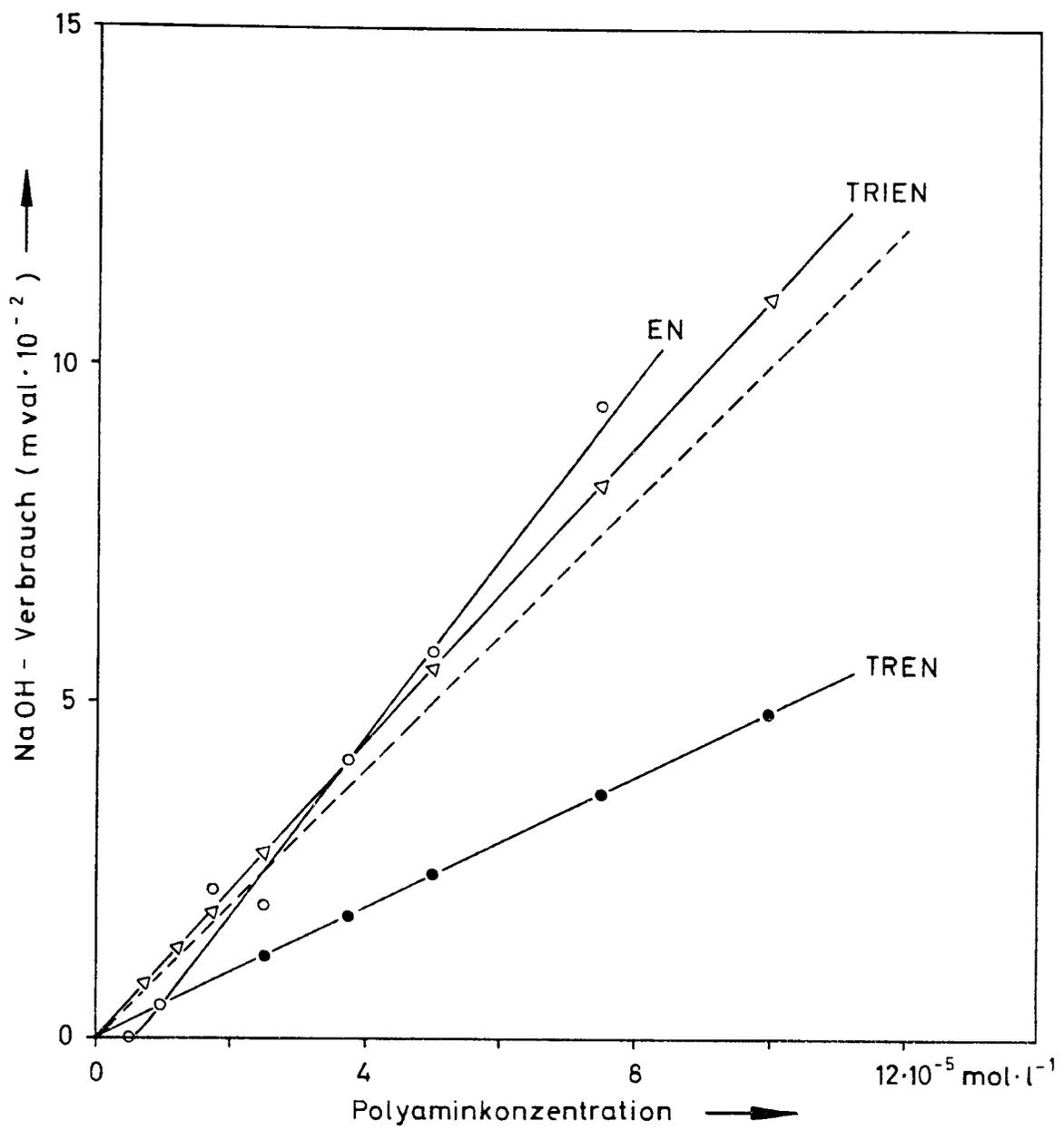


Abb. 33: Abnahme der Enzymaktivität (in % der Kontrolle für  $t = 0$ ) bei Inkubierung mit MÄIDA. Bei  $[L]/[E] = 1,5 \cdot 10^4$  wurde in Phosphat- und Veronalpuffer, sonst in Veronalpuffer inkubiert.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Puffer:  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; pH 7,4, 37 °C.

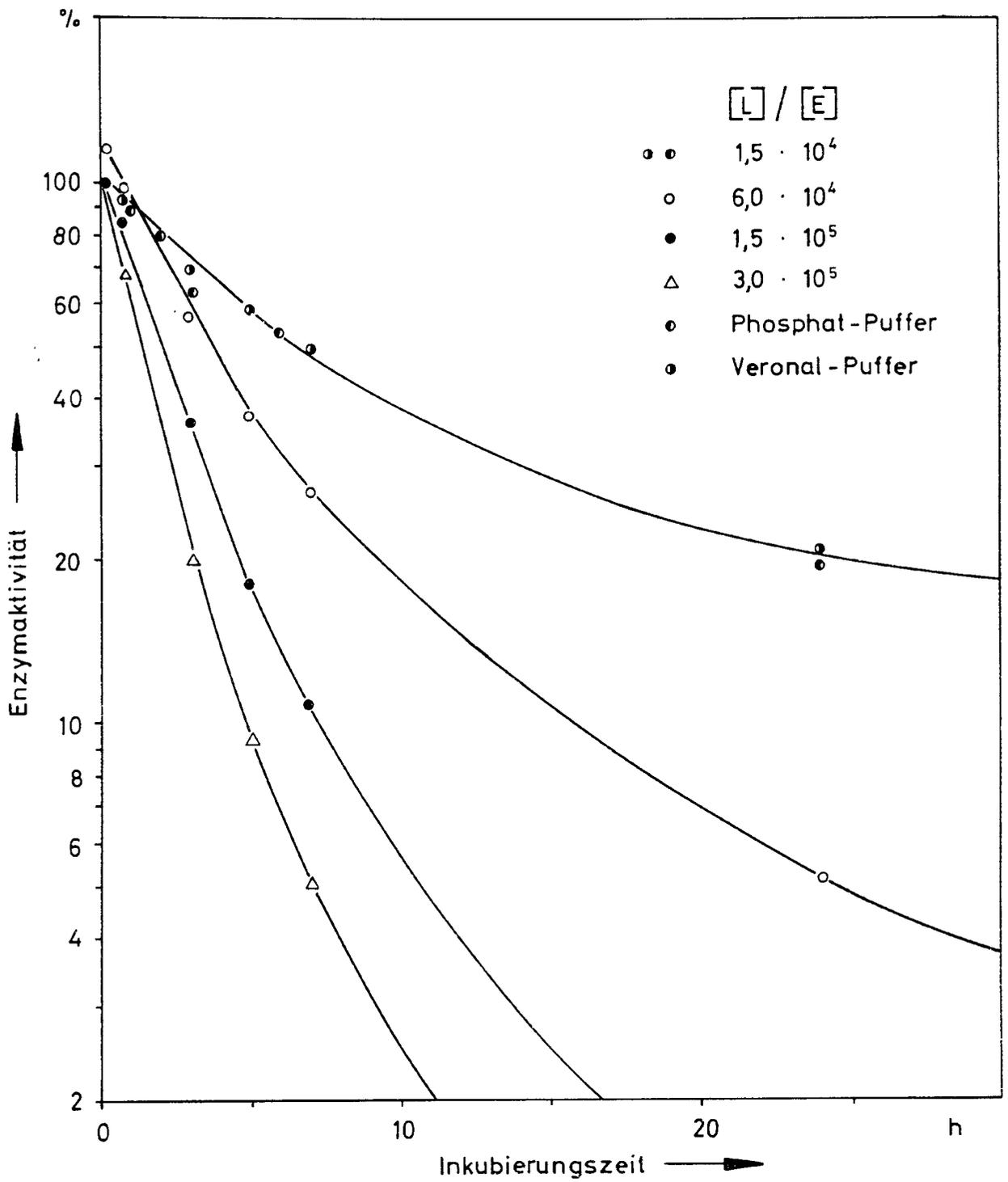


Abb. 34: Abnahme der Enzymaktivität (in % der Kontrolle für  $t = 0$ ) bei Inkubierung mit verschiedenen S-haltigen Liganden.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $[L]/[E] = 3 \cdot 10^5$  (außer für CysA<sup>1</sup>):  $6 \cdot 10^5$ ); Phosphat-Puffer:  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4; 37 °C.

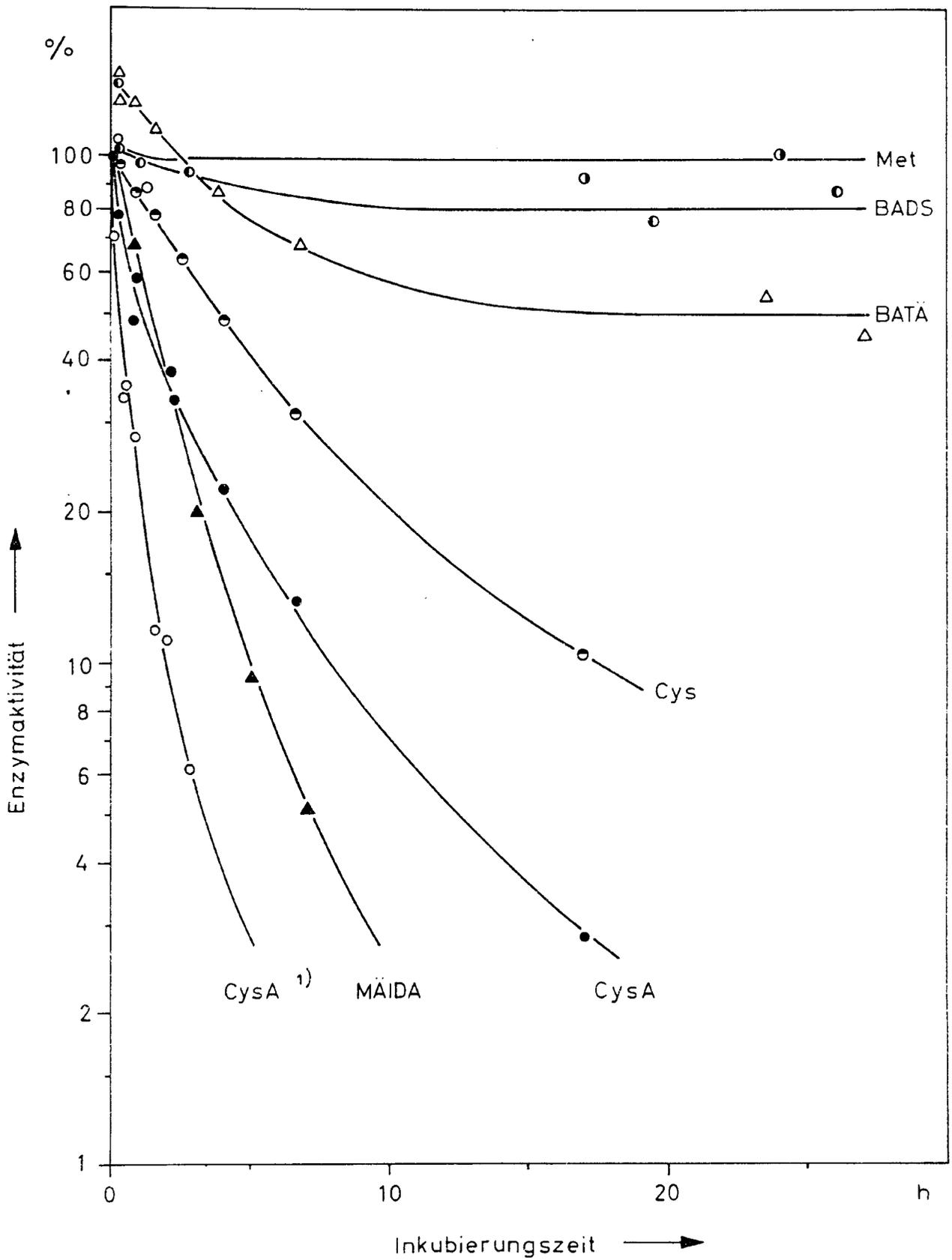


Abb. 35: Abnahme der Enzymaktivität (in % der Kontrolle für  $t = 0$ ) bei Inkubierung mit PHEN bei pH 7,4.  
[E] =  $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Veronal-Puffer:  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4, 37 °C.

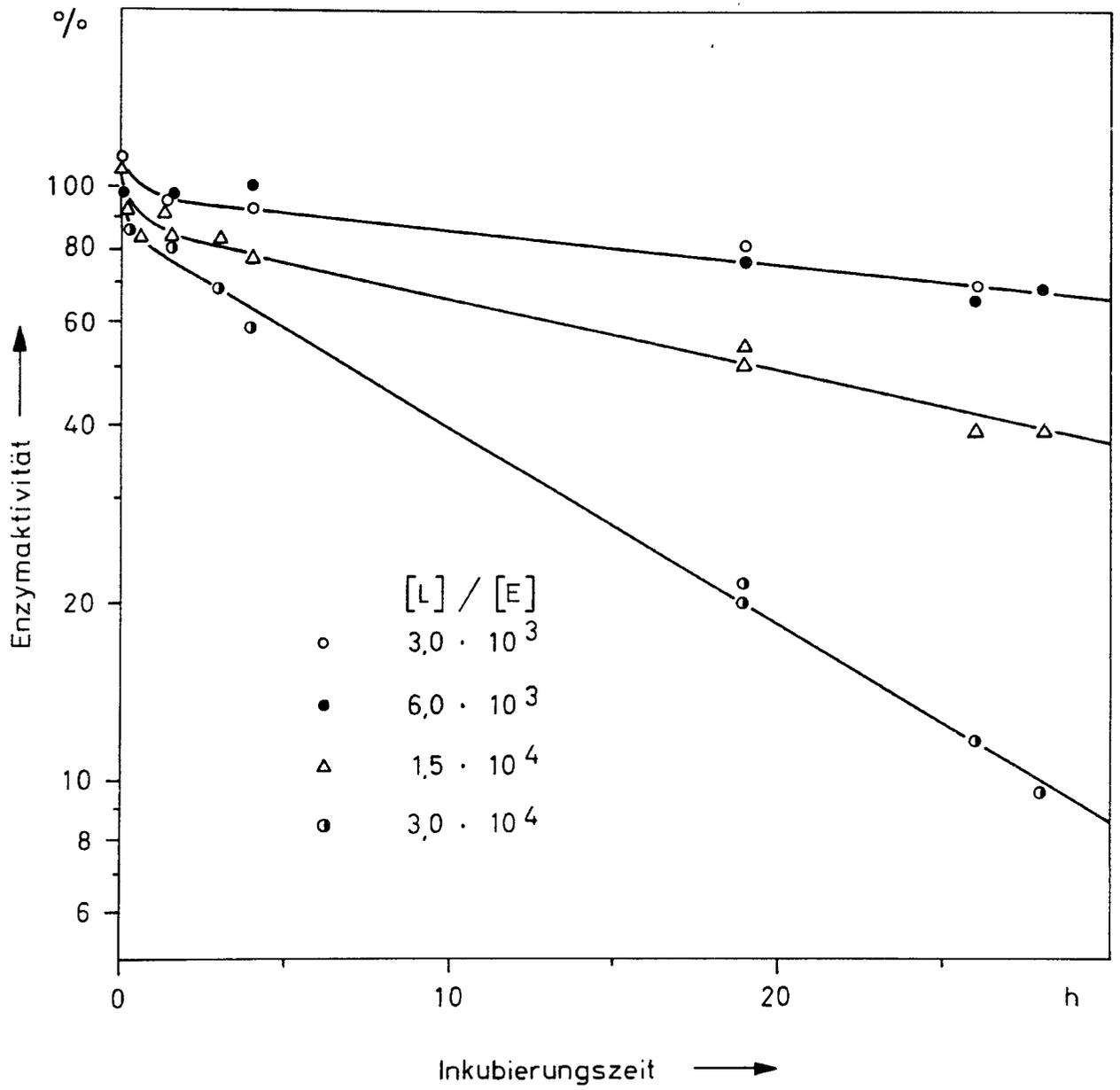


Abb. 36: Abnahme der Enzymaktivität (in % der Kontrolle für  $t = 0$ ) bei Inkubierung mit PHEN bei pH 5,0.  
[E] =  $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Na-Acetat-Puffer:  
 $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 37 °C.

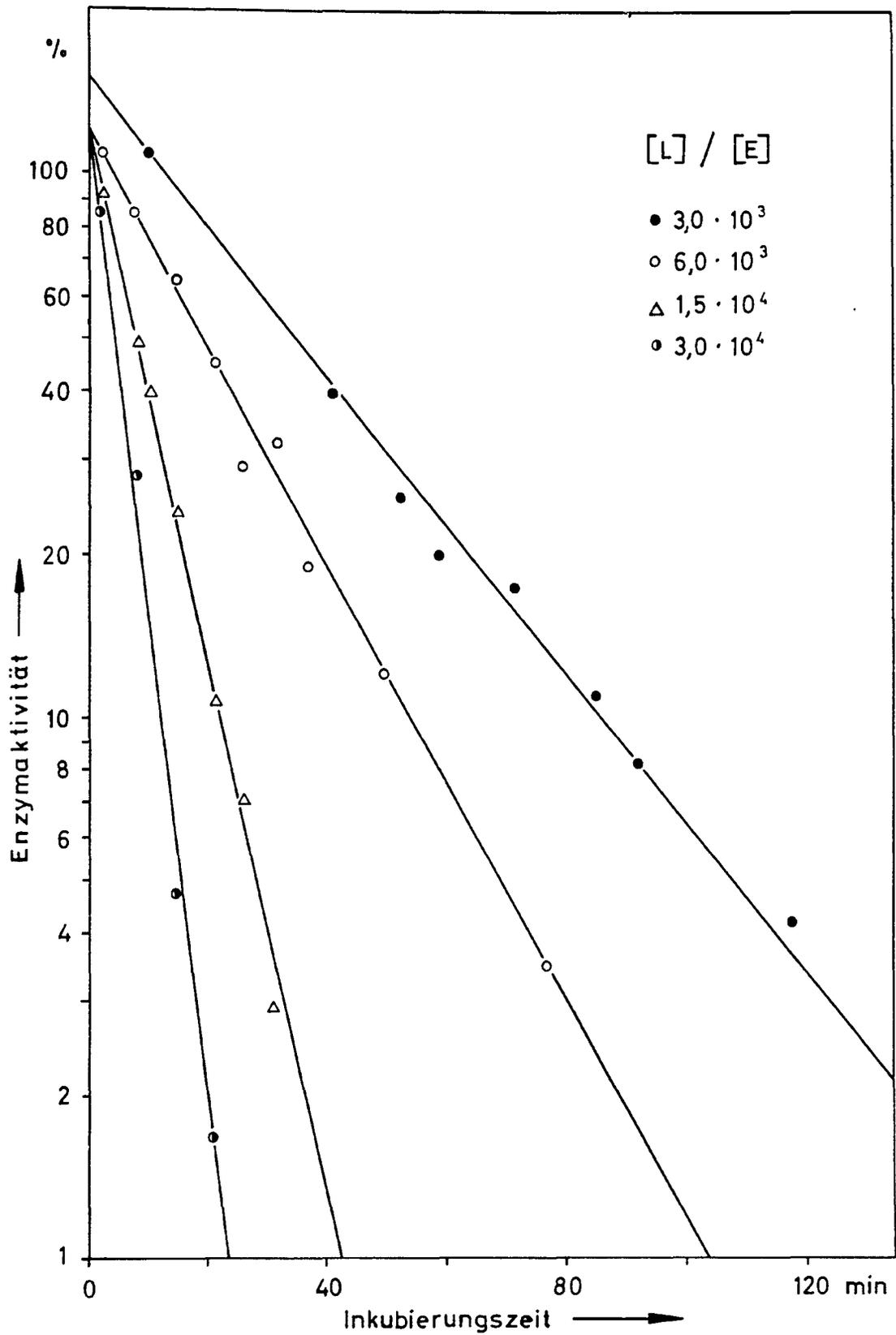


Abb. 37: Abhängigkeit der sog. Bruttohalbwertszeit der Enzym-  
inaktivierung ( $t_{1/2}$ ) vom Ligandüberschuß. pH = 7,4,  
wenn nicht anders angegeben.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

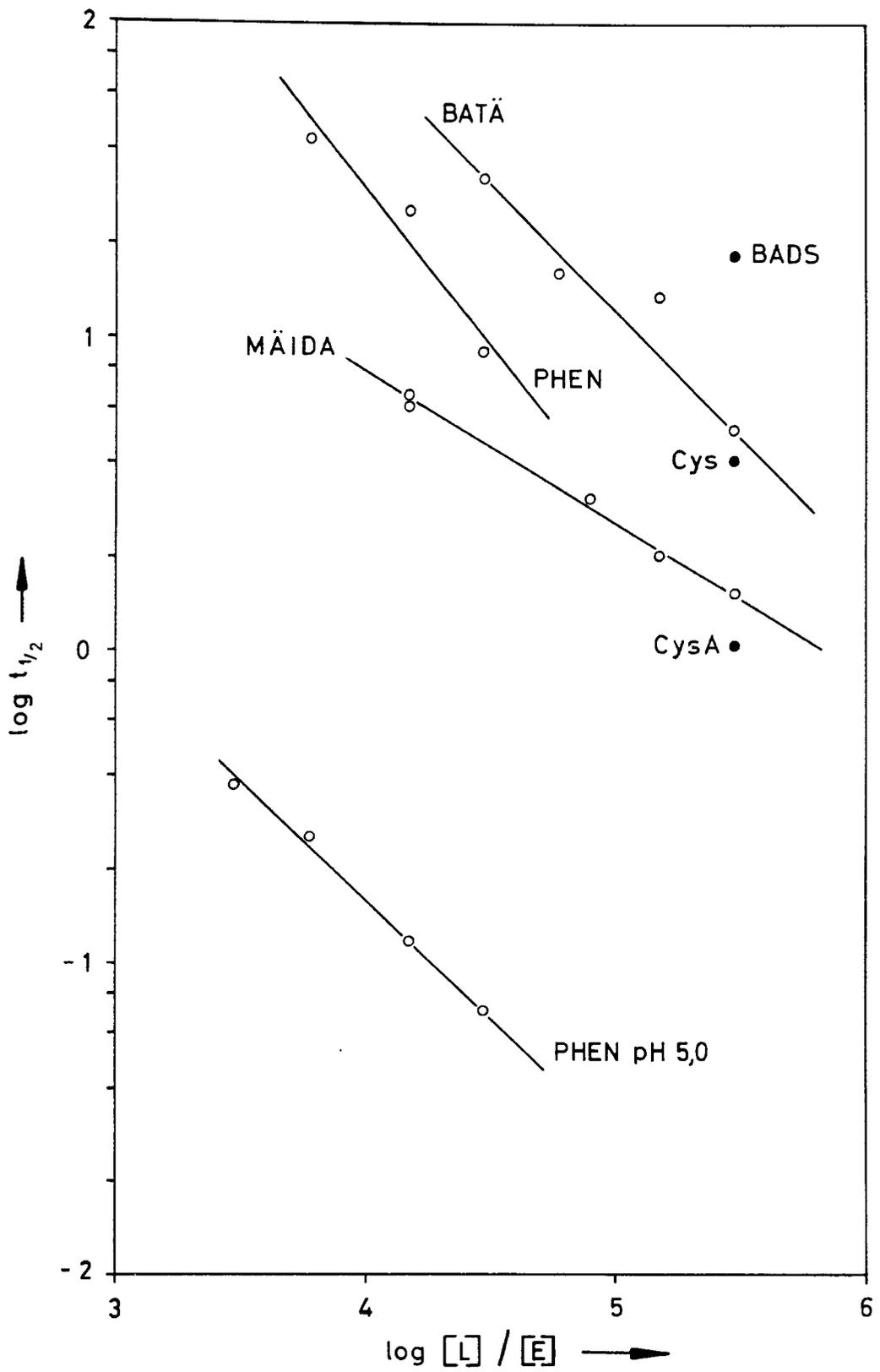


Abb. 38: Enzymaktivität (in % der Kontrolle für  $t = 0$ ) als Funktion des Ligandüberschusses. Die gestrichelte Kurve gibt für ÄDTA die Enzymaktivität in % der während der Inkubation erreichten maximalen Aktivität (s. Text) wieder.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Phosphat-Puffer:  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4; 37 °C.

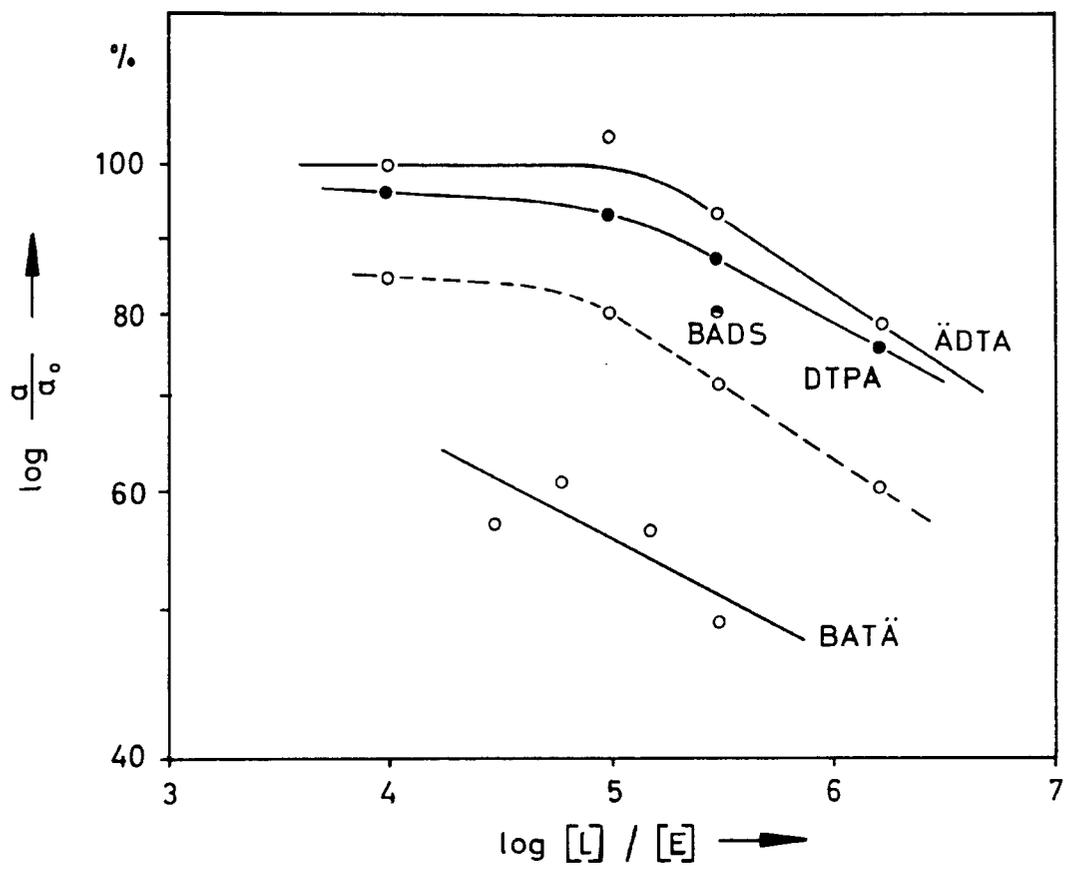


Abb. 39: Abnahme der Enzymaktivität (in % der Kontrolle für  $t = 0$ ) bei Inkubierung mit Zn-Acetat. Die gestrichelten Kurven geben die Aktivität nach Abzug der Gleichgewichtsaktivität für  $[Zn]/[E] = 3$  bzw.  $6 \cdot 10^3$  wieder.  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Veronal-Puffer:  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4; 37 °C.

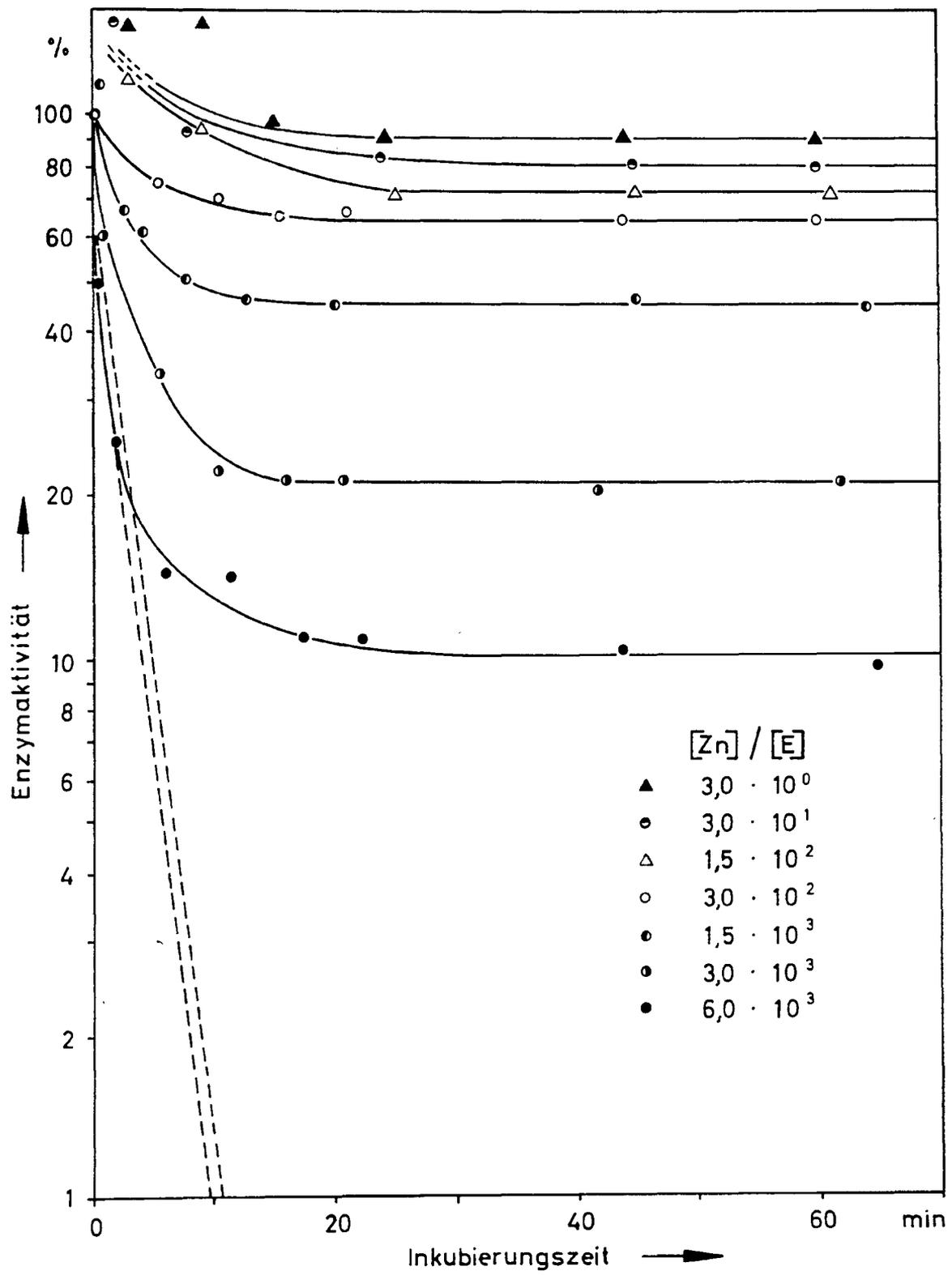


Abb. 40: Enzymaktivität als Funktion des Zn-Überschusses.  
Die gestrichelte Gerade gibt die Enzymaktivität der Zn-freien CA nach Zusatz von  $\text{Zn}^{++}$  wieder (nach Lindskog und Malmström (1962)).  $[\text{E}] = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Veronal-Puffer:  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4; 37 °C.

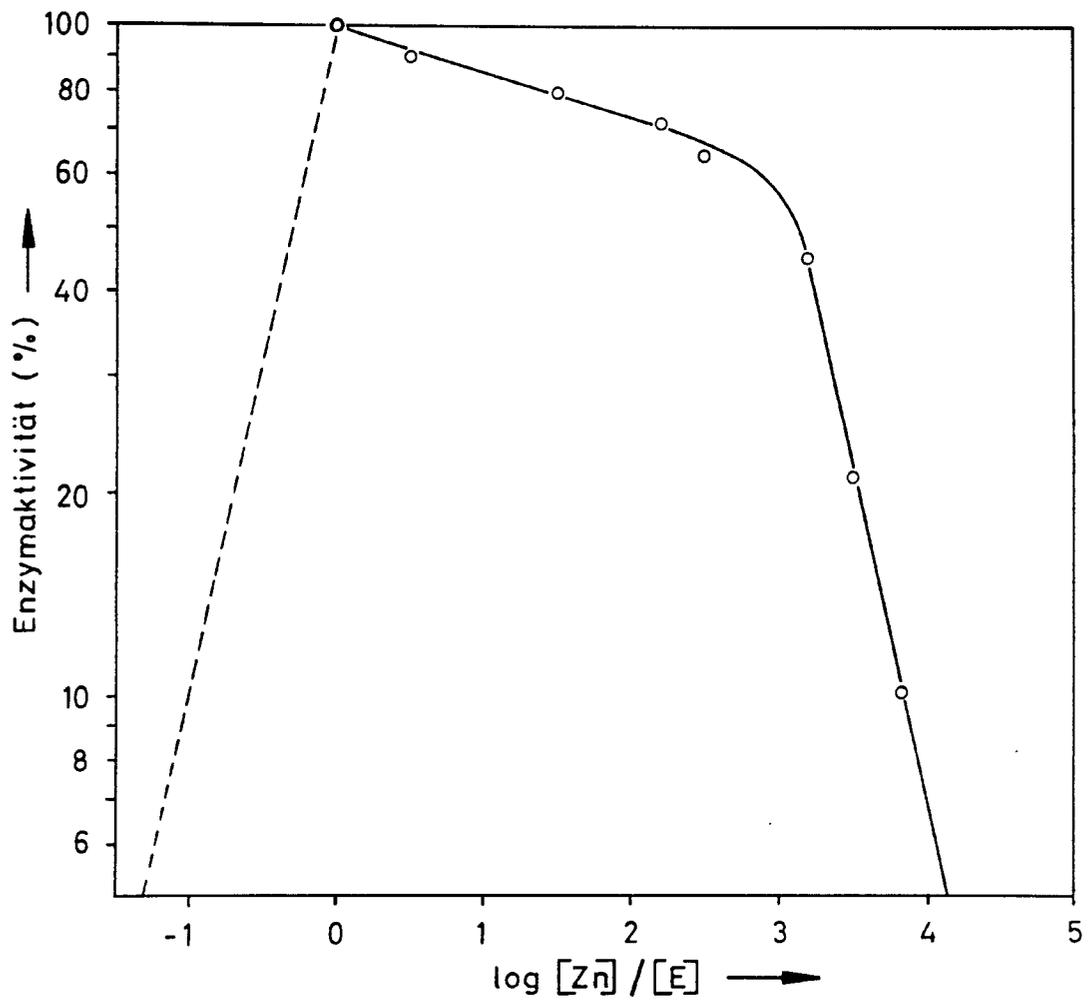


Abb. 41: Chromatographische Auftrennung der CA-II (nach Einwirkung von MÄIDA) über Sephadex Gel G-25. Säule: Ø 2,0 x 40 cm; Eluierungsmittel:  $4 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4. Inkubierungsbedingungen:  $[E] = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $[\text{MÄIDA}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Na-Veronal-Puffer:  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4; 37 °C, 24 h. Bei Inkubation im Phosphat-Puffer entfällt der Puffer-Peak.

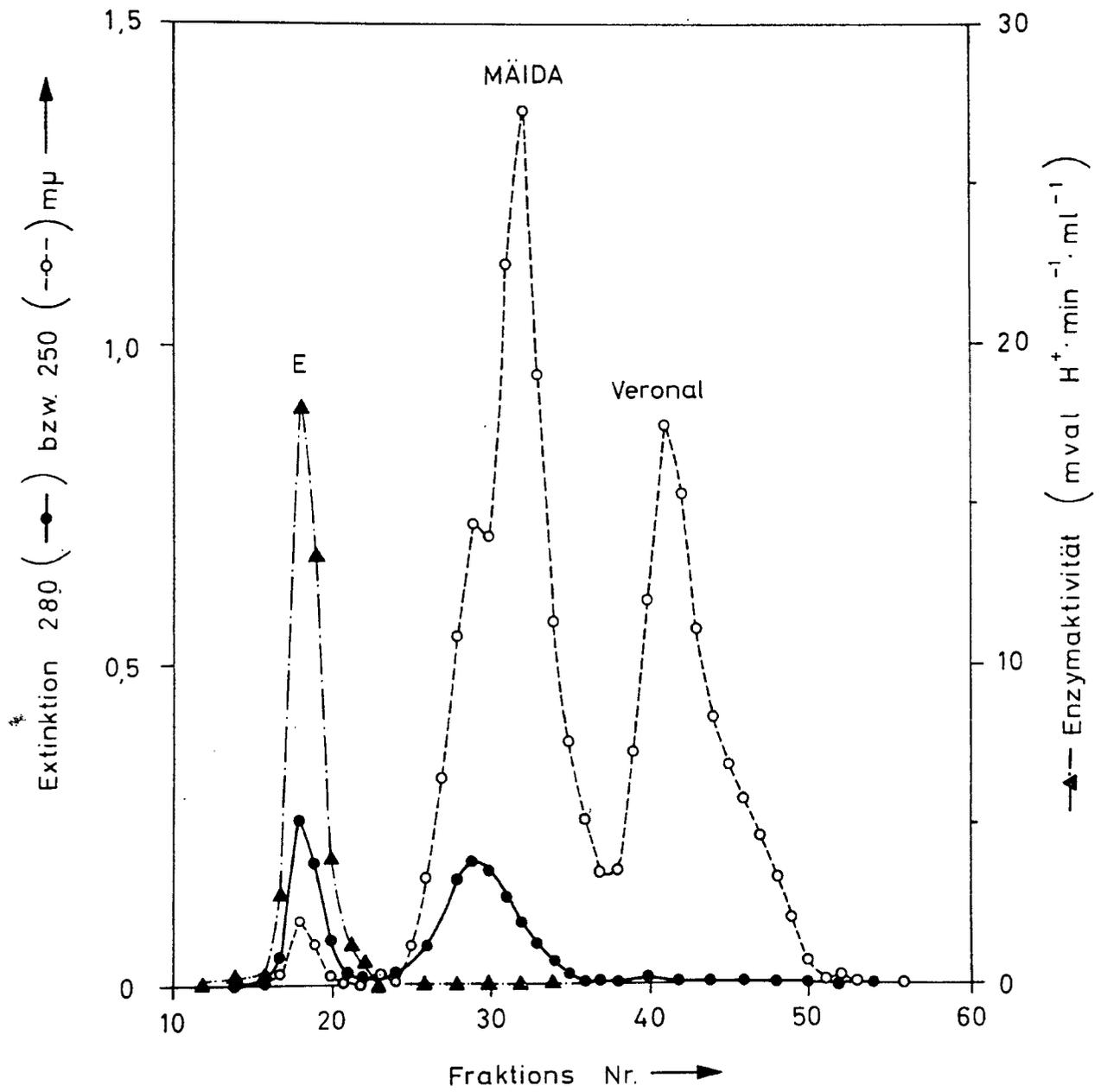


Abb. 42: Absorptionsspektrum einer  $5 \cdot 10^{-3}$  molarem MÄIDA- bzw. Zn-MÄIDA-Lösung in  $4 \cdot 10^{-3}$  molarem Na-Phosphat-Puffer pH 7,4.  $[\text{Zn}]/[\text{MÄIDA}] = 1$ .

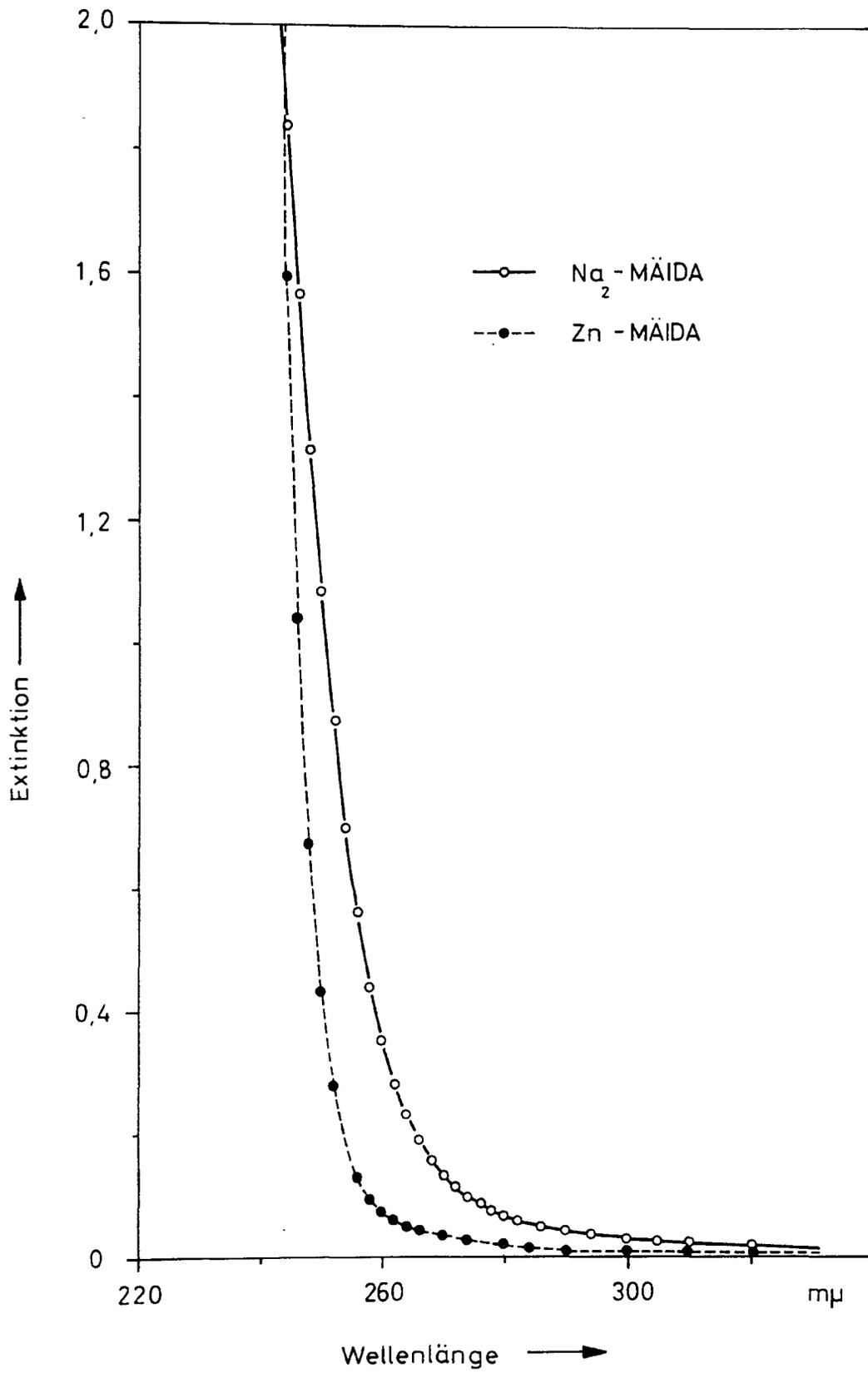


Abb. 43: Absorptionsspektrum und Differenz-Spektrum einer  
 $5 \cdot 10^{-5}$  molaren PHEN- bzw. Zn-PHEN-Lösung in  
 $4 \cdot 10^{-3}$  molarem Na-Phosphat-Puffer pH 7,4.  
[Zn]/[PHEN] = 2.

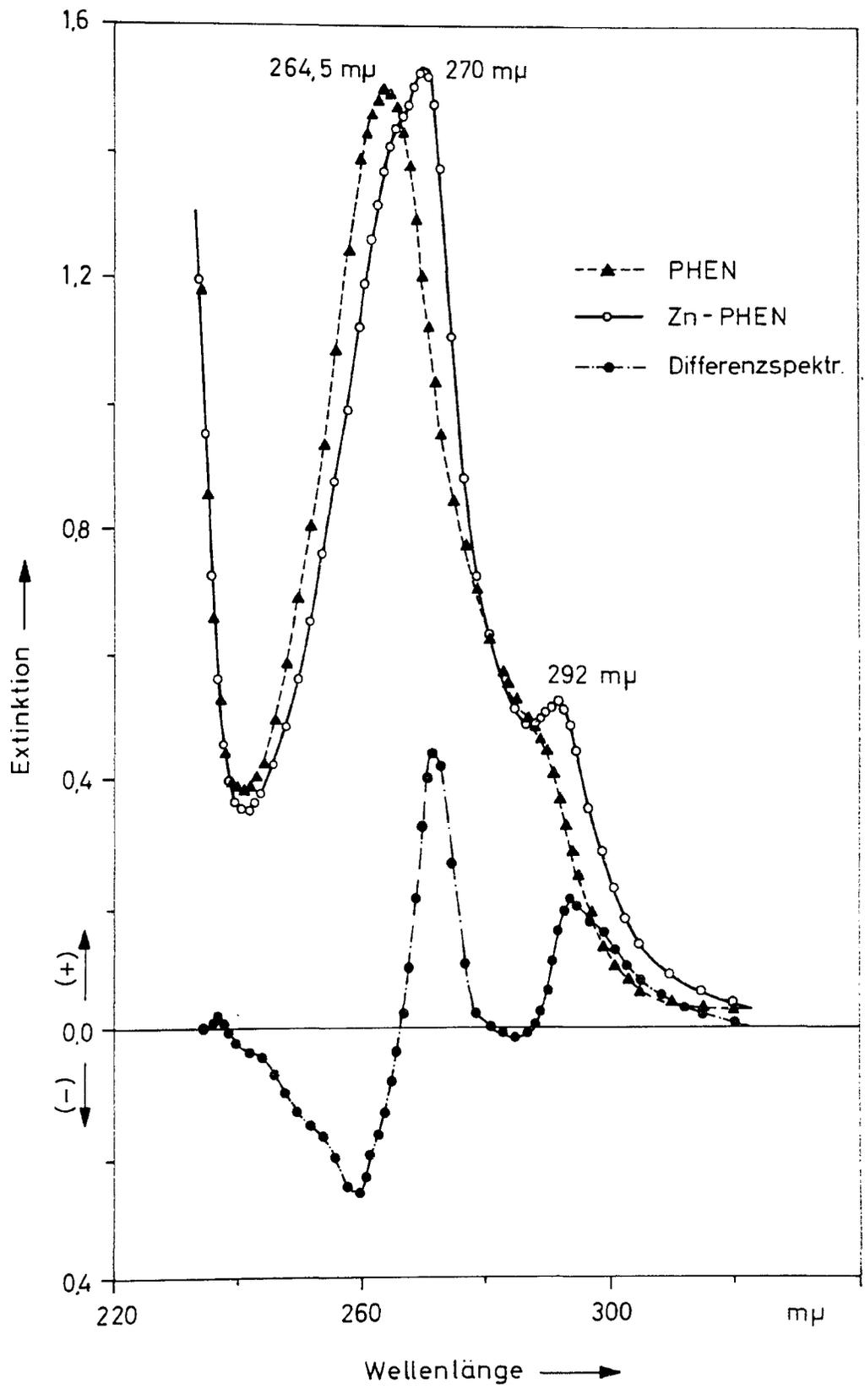


Abb. 44: Chromatographische Auftrennung von  $^{65}\text{Zn}$ -markierter CA-II (nach Einwirkung von MÄIDA) über Sephadex Gel G-25. Säule:  $\emptyset$  2,0 x 40 cm. Eluierungsmittel:  $4 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer, pH 7,4. Inkubierungsbedingungen:  $[\text{E}] = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $[\text{MÄIDA}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Phosphat-Puffer:  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4; 37 °C, 18 h.

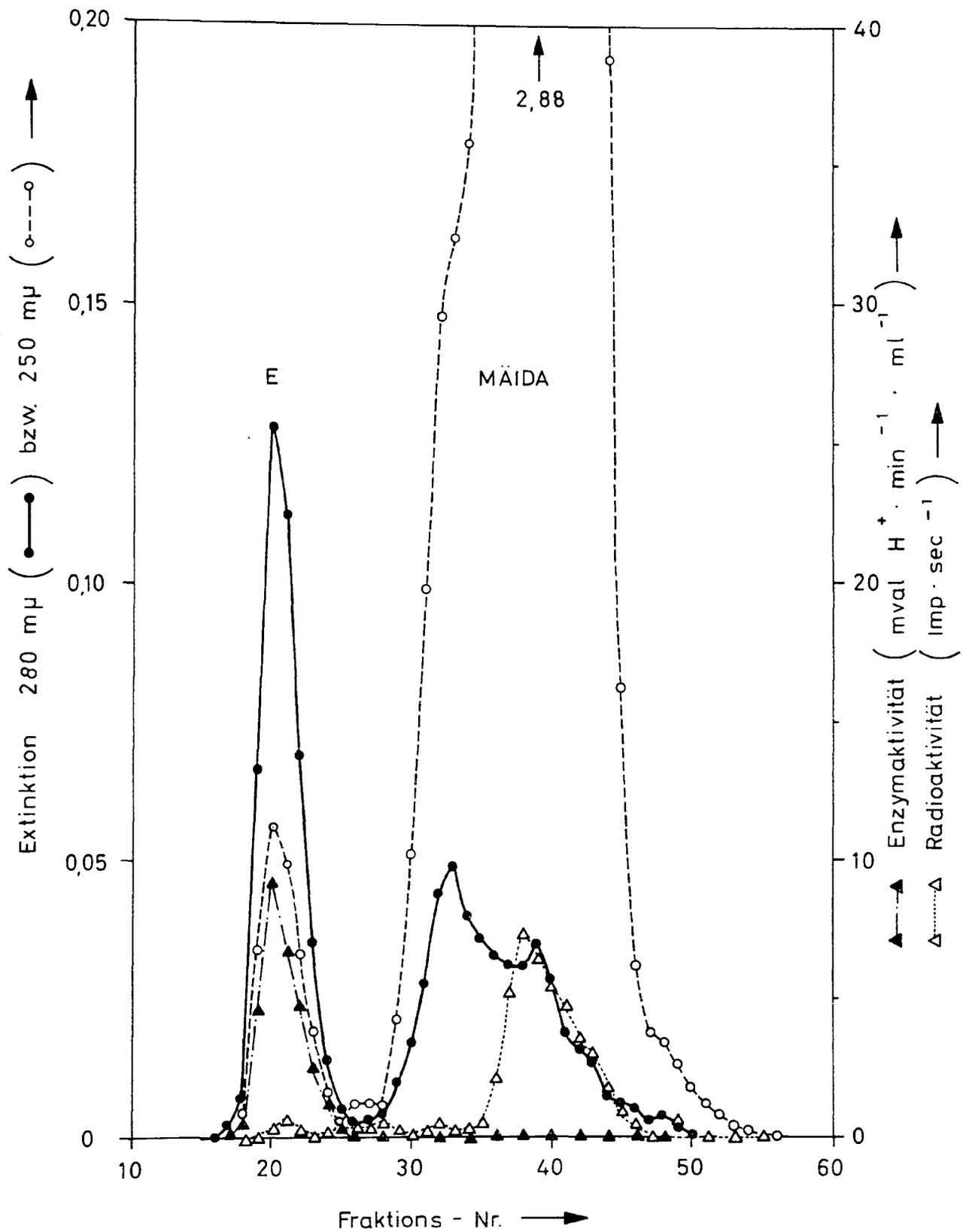


Abb. 45: Chromatographische Auftrennung von  $^{65}\text{Zn}$ -markierter CA-II (nach Einwirkung von PHEN) über Sephadex Gel G-25. Säule:  $\emptyset$  2,0 x 40 cm. Eluierungsmittel:  $4 \cdot 10^{-3}$  molarer Phosphat-Puffer pH 7,4. Inkubierungsbedingungen:  $[\text{E}] = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $[\text{PHEN}] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Phosphat-Puffer:  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,4;  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h.

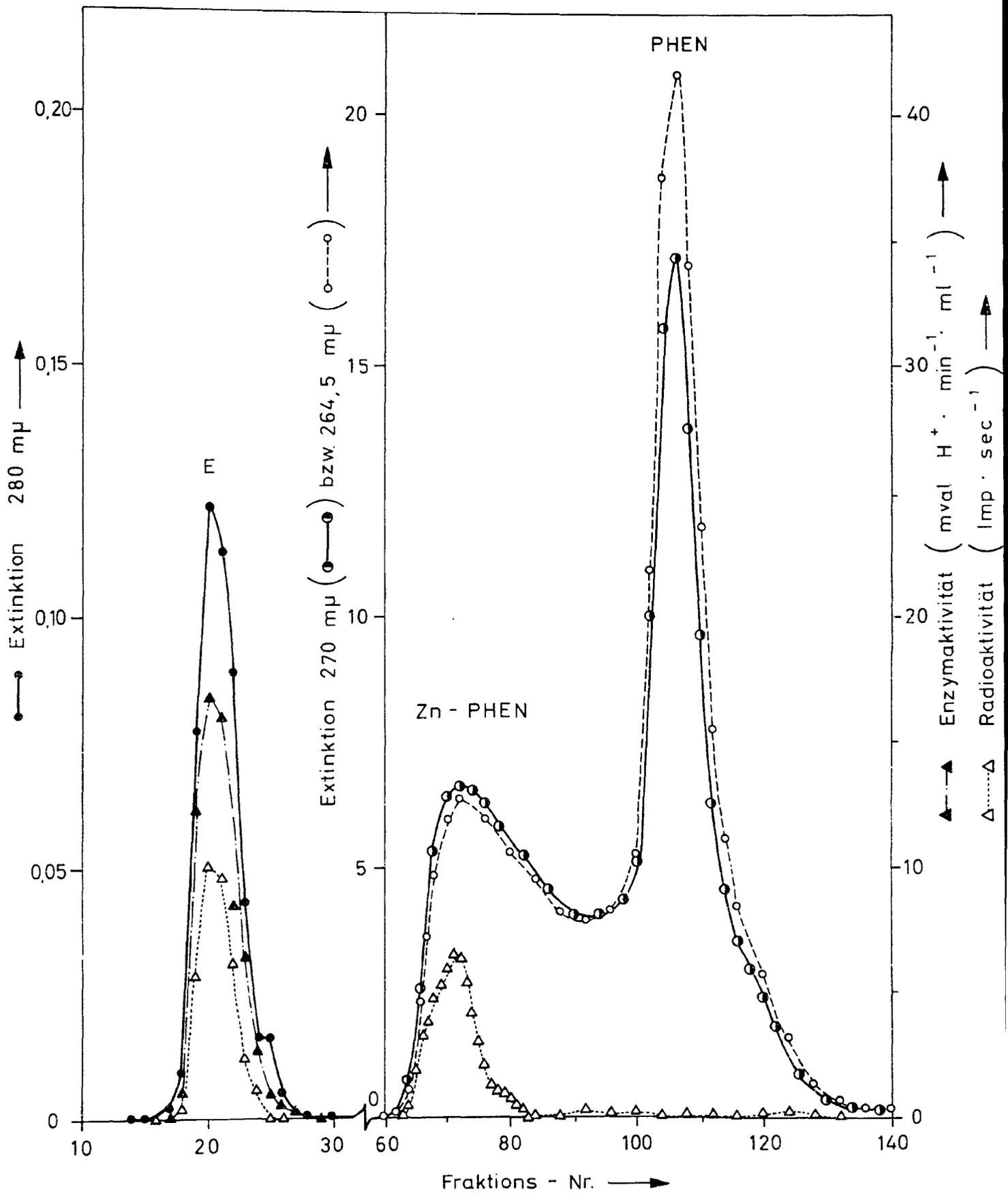


Abb. 46: Chromatographische Entsalzung der CA durch das Ionenverzögerungsharz Bio Rad AG 11 A 8: Beseitigung des Phosphat-Puffers.

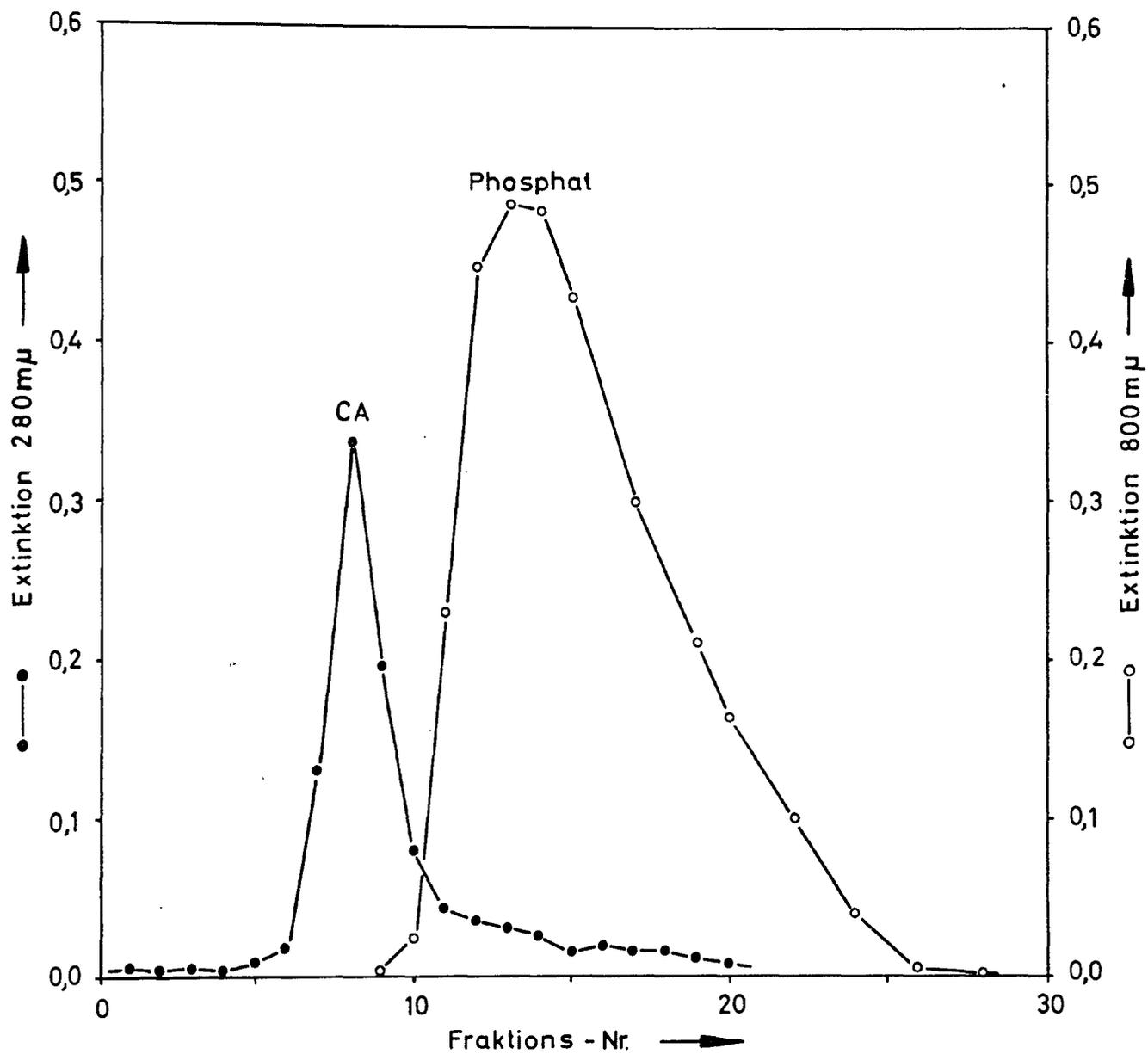


Abb. 47: Eichkurve der Molekulargewichtsbestimmung mittels  
Gel-Filtration nach Whitaker (1963). (Vgl. Text).

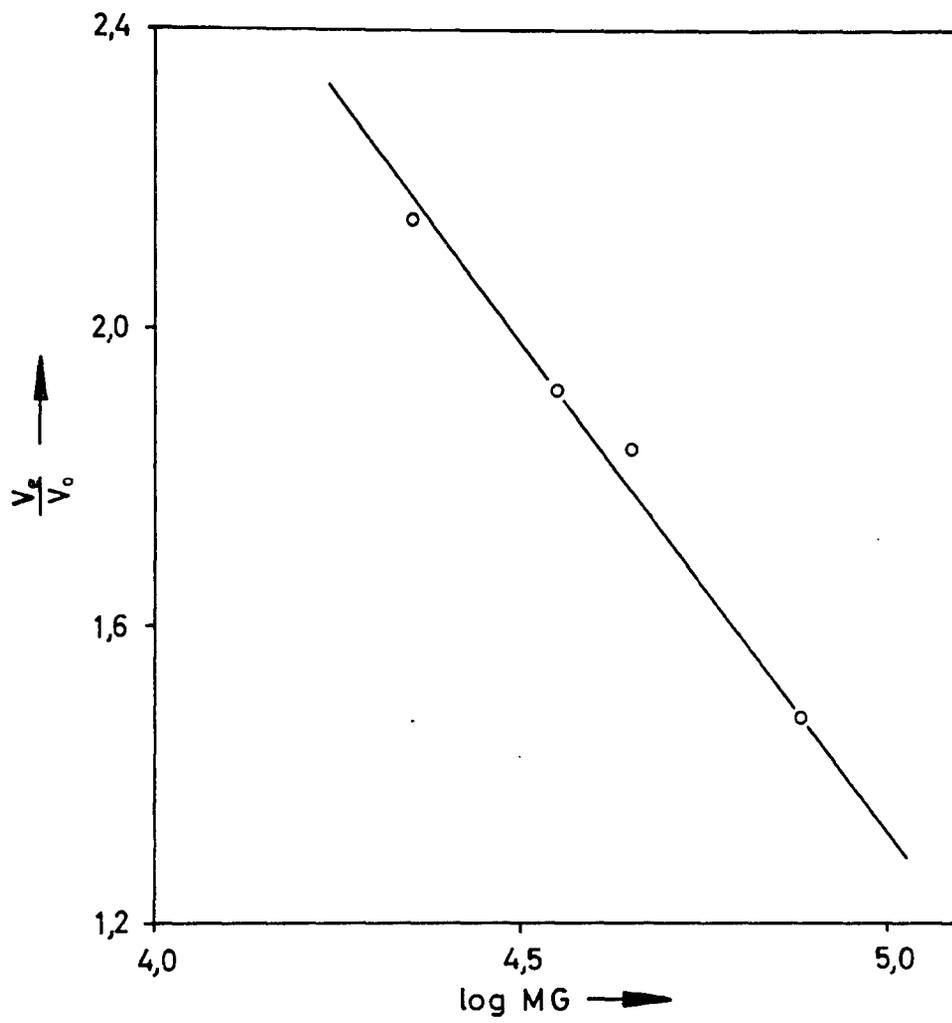


Abb. 48: Beziehung zwischen Enzymaktivität und Absorption  
in  $4 \cdot 10^{-3}$  molarem Phosphat-Puffer pH 7,4. Eichkurve.

