

## Fermentchemische Charakterisierung von Carbonat-Hydrolasen (Carboanhydrasen) aus menschlichen Erythrocyten\*

Von EGON E. RICKLI

Theodor-Kocher-Institut und Organisch-Chemisches Institut der Universität Bern

### Summary

Carbonic anhydrase, a Zn-containing enzyme, catalyzes the hydration of  $\text{CO}_2$  and the dehydration of  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . These properties make it the powerful promotor of the  $\text{CO}_2$  uptake in the tissue and the discharge in the lungs. Besides this function, carbonic anhydrase is also of importance in other biological processes. The enzyme is widely distributed in the animal kingdom, in plants, and it has also been found in certain bacteria.

The most abundant source of human carbonic anhydrase is the red cell. The enzyme is isolated and purified by chromatography of erythrocyte hemolyzate on DEAE-Sephadex columns. Other methods employ zone electrophoresis or column chromatography on Amberlite IRC-50 of chloroform-ethanol treated hemolyzate. By these methods, the enzyme is obtained in three different, distinct, active fractions, designated A, B and C. The most plentiful component is enzyme B, whereas the A- and C-forms are present only in low concentrations. The three components differ considerably in some of their properties. Physico-chemical parameters are compiled in Table 1 in the text. The carbonic anhydrase molecule has a highly compact structure and the molecular shape is close to spherical.

The Zn atom can be dissociated reversibly by dialysis against *o*-phenanthroline. The dissociation rate at pH 5.0 in the presence of the chelating agent is twice as fast as at pH 7.0. The metal-free apoenzyme is enzymatically inactive; activity is restored by adding Zn ions. Enzymatic activity is directly proportional to the amount of protein-bound Zn.

The Zn atom can be replaced by other bivalent heavy-metal ions, such as  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  and  $\text{Hg}^{++}$ . The Co derivative is about half as active as compared to the native Zn enzyme. The other metalloproteins possess but a low degree of residual activity or are entirely inactive, as for the Cu and Hg derivatives. The Co enzyme shows four absorption maxima between 510 and 650  $m\mu$ . Spectral shifts of these maxima induced by various carbonic anhydrase inhibitors, and the direct

relation between enzyme activity and Zn content have led to the conclusion that the Zn atom is the essential constituent of the active center.

The sulfhydryl group of the sole cysteine residue in carbonic anhydrase is not free to titrate in the native enzyme. It is accessible only in the apoenzyme or after the Zn has been split off by denaturation, either by acid or urea treatment. Yet, the SH group apparently does not serve as a ligand group of the Zn atom, since crystallographic studies showed that the distance between the Zn and S atom is close to 15 Å.

Carbonic anhydrase shows catalytic versatility: it also catalyzes the reversible hydration of aldehydes (acetaldehyde) and accelerates the cleavage of esters (*p*-nitrophenyl acetate). These processes proceed at a considerably slower rate as compared to the reactions with  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{CO}_3$  substrates. The active center appears to be identical for all these reactions. Acetazolamide, a recognized sulfonamide inhibitor of carbonic anhydrase, efficiently inhibits aldehyde and esterase activities as well. However, esterase activity is not affected by diisopropylfluorophosphate.

Carbonic anhydrase is an inherent constituent of the red cell. So far, only two cases are known with a markedly reduced level of this enzyme; complete absence of erythrocyte carbonic anhydrase in man has not been observed. The enzyme forms —above all enzyme B—show considerable genetic variability. Of the human B form, four different variants were found, differing in electrophoretic mobility and esterase activity. Enzyme C seems to be evolutionally older than enzyme B; the latter may have evolved by duplication and further changes of the carbonic anhydrase C locus.

### Vorkommen

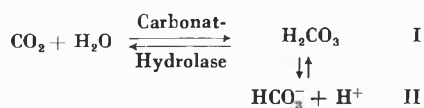
Die Carbonat-Hydrolase (E.C. 4.2.1.1) kommt vorwiegend in Erythrocyten vor. Daneben findet man sie, allerdings in kleineren Mengen, ebenfalls in verschiedenen Organen und Sekretionsflüssigkeiten, z. B. im Pankreas, in Niere, Leber und Darmschleimhaut, dann

\* Vortrag, gehalten am 24. Februar 1967 vor der Berner Chemischen Gesellschaft.

auch in der Augenlinse, im Speichel usw. In menschlichen Thrombocyten hat man Carbonat-Hydrolase nur in geringen Mengen festgestellt<sup>1</sup>; in Leukocyten und Lymphocyten dagegen fehlt sie vollständig. Im Tierreich ist das Enzym weit verbreitet. Es wurde nicht nur bei den höheren Gattungen gefunden, sondern z.B. auch bei den Wirbellosen, in Insekten, Mollusken und andern mehr<sup>2</sup>, dort aber weniger in der Blutflüssigkeit, sondern angereichert in gewissen Organen, wie beispielsweise in den Kiemen der Crustaceen. Sogar in gewissen Bakterien konnte Carbonat-Hydrolase-Aktivität nachgewiesen werden, wie am Beispiel von *Neisseria sicca*<sup>3</sup> gezeigt wurde, wo es einen Stamm gibt, der sich durch eine hohe spezifische Aktivität auszeichnet, die derjenigen in Pferdeerythrocyten kaum nachsteht. Schließlich sei noch erwähnt, daß ebenfalls Pflanzen Carbonat-Hydrolase enthalten, und zwar im Cytoplasma von Blattgewebe, nicht aber von Wurzelgewebe. Spinat weist einen recht hohen Carbonat-Hydrolase-Gehalt auf<sup>4,5</sup> und wird deshalb häufig als Ausgangsmaterial zur Isolierung des pflanzlichen Enzyms verwendet. Man darf annehmen, daß es, mit Ausnahme von einigen niederen Lebensformen, kaum einen Organismus gibt, der nicht Carbonat-Hydrolase enthält.

#### Funktion und geschichtlicher Hintergrund

Die Carbonat-Hydrolase katalysiert die Hydratation von  $\text{CO}_2$  bzw. die Dehydratation von  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .



Es ist somit die Katalyse einer Reaktion, die an sich auch ohne das Mittun eines Enzyms abläuft, bloß eben wesentlich langsamer. Mit einer Halbwertszeit von einigen wenigen Sekunden wäre sie den physiologischen Anforderungen nicht gewachsen und muß deshalb enzymkatalytisch beschleunigt werden. Mit dem Eingreifen des Enzyms wird der geschwindigkeitsbeschränkende Schritt eliminiert; damit ist die Pflicht der Carbonat-Hydrolase getan, da ja die Reaktion II bekanntlich ein sehr rasch ablaufender Vorgang ist.

In den Jahren 1917–1921 beschäftigten sich hauptsächlich englische Forscher mit der Frage des Mechanismus des  $\text{CO}_2$ -Transportes im Blut. Zwei Theorien standen sich damals gegenüber, einerseits die sogenannte Bi-

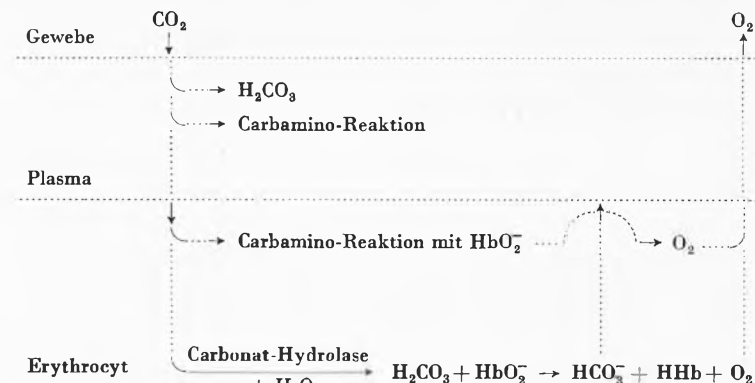


Abb. 1

carbonattheorie, verfochten u.a. durch HALDANE und HENDERSON, und andererseits die sogenannte direkte Kombinationstheorie, unterstützt durch Forscher wie BUCKMASTER und BAYLISS. 1925 schlug ROUGHTON vor, anstatt der bis anhin untersuchten Gleichgewichtszustände die Kinetik dieser Prozesse zu ermitteln, und wenig später wartete HENRIQUES<sup>6</sup> mit überraschenden Resultaten auf. Man wußte bereits, daß die Dissoziation von  $\text{H}_2\text{CO}_3$  zu Bicarbonat sehr rasch, die Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dagegen langsam verläuft und geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Berechnungen von HENRIQUES ergaben, daß die Aufnahme von  $\text{CO}_2$  in der Hydratationsreaktion unter physiologischen Bedingungen wesentlich langsamer erfolgen müßte, als dies anhand der experimentellen Werte tatsächlich der Fall war. Man schloß deshalb daraus, daß Hydratation und Dehydratation im Blut katalytisch verlaufen müssen. Die Suche nach diesem Katalysator wurde 1934 von MELDRUM und ROUGHTON<sup>7</sup> mit der Isolierung der Carbonat-Hydrolase erfolgreich abgeschlossen.

Die Vorgänge, die sich bei der Aufnahme von  $\text{CO}_2$  vom Gewebe ins Blut abspielen, sind schematisch und vereinfacht in Abb. 1 wiedergegeben.

Infolge hohen  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes im Gewebe diffundiert das  $\text{CO}_2$  vom Gewebe ins Plasma. Hier spielen sich einstweilen zwei Nebenreaktionen ab, indem ein Teil des eindiffundierenden  $\text{CO}_2$  in der langsamen, spontanen Reaktion zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$  hydratisiert wird und ein anderer Teil direkt mit den Aminogruppen der Plasmaproteine zu Carbaminoverbindungen reagiert. Der weitaus größere Anteil des  $\text{CO}_2$  – mehr als zwei Drittel – diffundiert in die Erythrocyten und wird dort von der Carbonat-Hydrolase hydratisiert. Das  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dissoziiert zu Bicarbonat, wobei gleichzeitig das anwesende Oxyhämoglobin unter Sauerstoffabgabe reduziert wird. Das Bicarbonat diffundiert zu einem guten Teil zurück ins Plasma und der Sauerstoff via Plasma in die Zellen des

<sup>1</sup> F. BELLONI und R. TURPINI, *Haematologica* 42 (1957) 217.

<sup>2</sup> J. B. POLYA und A. J. WIRTZ, *Enzymologica* 29 (1965) 27.

<sup>3</sup> F. P. VEITCH und L. C. BLANKENSHIP, *Nature* 197 (1963) 76.

<sup>4</sup> R. DAY und J. FRANKLIN, *Science* 104 (1946) 363.

<sup>5</sup> E. WAYGOOD und K. A. GLENDEENING, *Science* 113 (1951) 177.

<sup>6</sup> O. HENRIQUES, *Biochem. Z.* 200 (1928) 1.

<sup>7</sup> N. U. MELDRUM und F. J. W. ROUGHTON, *J. Physiol.* 80 (1934) 113.

Gewebes. Auch in den Erythrocyten findet in einer Nebenreaktion die Bildung von Carbaminverbindungen, vorwiegend mit den Aminogruppen des Oxyhämoglobins, statt, eine Reaktion, die ihrerseits ebenfalls Sauerstoff liefert.

Bei der Abgabe von  $\text{CO}_2$  und Aufnahme von Sauerstoff in der Lunge laufen die Reaktionen in umgekehrter Richtung. Auf weitere wichtige Funktionen der Carbonat-Hydrolase – erwähnt sei bloß die Resorption von Bicarbonat-gebundenen Kationen in der Niere – kann hier nicht eingegangen werden.

Einen Markstein in der Erforschung der Carbonat-Hydrolase stellte 1940 die Entdeckung von KEILIN und MANN<sup>8</sup> dar, wonach das Enzym Zink enthält, welches für die enzymatische Aktivität eine essentielle Rolle spielt. In den folgenden Jahren beschränkten sich die Untersuchungen fast ausschließlich auf physiologische und pharmakologische Aspekte, so daß eine Aufklärung der Natur des Enzyms mit physikalisch-chemischen Parametern einstweilen ausblieb. Gegen Ende der fünfziger Jahre befaßten sich dann drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander mit diesen Problemen. Es waren dies:

- B.G. MALMSTRÖM und Mitarbeiter (Universität Göteborg)
- Y. DERRIEN und Mitarbeiter (Laboratoire de Chimie biologique, Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie, Marseille)
- die Gruppe von J.T. EDSALL (Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge/Mass., USA)

### Isolierung und Reinigung

Neben Hämoglobin ist die Carbonat-Hydrolase im Erythrocyt mengenmäßig das am stärksten vertretene Protein, macht aber, verglichen mit Hämoglobin, bloß etwa 0,1 Gew.-% aus. Der große Hämoglobinüberschuß bereitet bei der Enzympräparation gewisse Schwierigkeiten, die sich aber mit der Methode von TSUCHIHASHI<sup>9</sup> umgehen lassen. Verrührt man Erythrocytenhämolyt mit etwas Chloroform und Äthanol, so werden dabei das Hämoglobin und teilweise auch andere Erythrocytenproteine denaturiert und fallen aus, während die Carbonat-Hydrolase-Aktivität beinahe gänzlich in Lösung bleibt. Nach Ausdialysieren der organischen Lösungsmittel kann das Enzym z. B. durch Gefriertrocknung als sogenannte Rohfraktion erhalten werden, die ihrerseits das Ausgangsmaterial für weitere, meistens säulenchromatographische Reinigungsverfahren darstellt.

In der Gruppe EDSALL bediente man sich zuerst der Säulenchromatographie auf Hydroxylapatit<sup>10</sup>. Dabei überraschte die Tatsache, daß das Enzym in mehreren Komponenten auftrat. Zwei konnten säulenchromato-

graphisch voneinander getrennt werden, und die dritte wurde gelelektrophoretisch nachgewiesen. Man hat sich gefragt, ob das Auftreten mehrerer aktiver Enzymkomponenten auf eine teilweise Veränderung der Molekülform, bedingt durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, zurückzuführen sei. Bis heute wurden jedoch keinerlei Anzeichen einer nachteiligen Wirkung gefunden. Immerhin war diese Frage Grund genug, daß man nach besseren und vor allem schonenden Aufarbeitungsmethoden suchte. Hier kam die Entwicklung der Sephadex-Präparate zu Hilfe. Auf Säulen von Sephadex G-75 gelang vorerst mittels Gelfiltration eine recht gute Trennung der Carbonat-Hydrolase vom Hämoglobin<sup>11</sup>.

Am saubersten läßt sich das Hämoglobin mit DEAE-Sephadex abtrennen<sup>12</sup>. Gibt man bei pH 8,7 und kleiner Ionenstärke Erythrocytenhämolyt auf eine DEAE-Sephadexsäule, so wird das Hämoglobin adsorbiert, während sich die Carbonat-Hydrolase mit 0,1 M Tris-puffer als Rohprodukt eluieren läßt. Diese Methode hat sich gut bewährt, und heute läßt sich routinemäßig Hämolyt von 6 Litern gepackter Erythrocyten aufarbeiten.

Die Rohfraktion wird dann auf DEAE-Sephadex säulenchromatographisch aufgearbeitet. Dabei erhält man die drei aktiven Enzymkomponenten A, B und C (siehe Abb. 2).

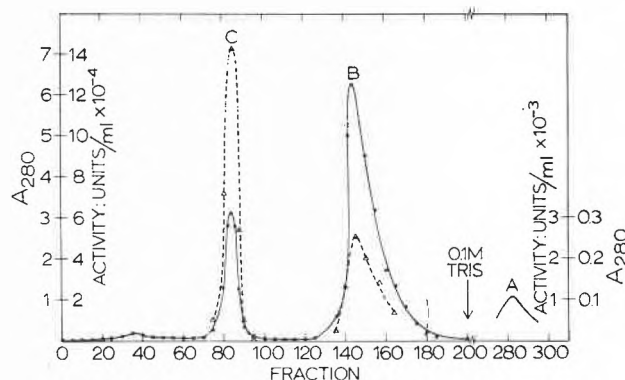


Abb. 2. Chromatographie von Carbonat-Hydrolase auf DEAE-Sephadex. Beladung der Säule mit etwa 15 g Enzym-Rohfraktion. Volumen der einzelnen Fraktionen: 20 ml. Die Enzymkomponenten C und B wurden mit 0,05 M Tris, 0,012 M HCl, pH 8,7 eluiert und die Komponente A nach Erhöhen der Pufferkonzentration auf 0,1 M Tris, pH 8,7. Die linke Ordinate gilt für die Peaks C und B, die rechte Ordinate für Peak A. Ausgezogene Linie: Absorption bei 280  $\mu$  ( $A_{280}$ ); gestrichelte Linie: Enzymaktivität, ermittelt nach der Methode von WILBUR-ANDERSON<sup>13</sup>. Für Peak A fallen Absorptions- und Aktivitätskurve praktisch zusammen, deshalb ist nur ein Kurvenverlauf eingezeichnet (nach J. MCD. ARMSTRONG, D. V. MYERS, J. A. VERPOORTE und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 241 [1966] 5137)

<sup>11</sup> E. E. RICKLI, S. A. S. GHAZANFAR, B. H. GIBBONS und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1065.

<sup>12</sup> J. MCD. ARMSTRONG, D. V. MYERS, J. A. VERPOORTE und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5137\*.

\* Ich verdanke Professor EDSALL die Überlassung einer Kopie des Manuskriptes vor der Veröffentlichung der Arbeit.

<sup>13</sup> K. M. WILBUR und N. G. ANDERSON, *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 147.

<sup>8</sup> D. KEILIN und T. MANN, *Biochem. J.* 34 (1940) 1163.

<sup>9</sup> M. TSUCHIHASHI, *Biochem. Z.* 140 (1923) 63.

<sup>10</sup> E. E. RICKLI und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) PC 258.

In MALMSTRÖMS Gruppe wurden die drei Enzymkomponenten durch Säulenelektrophorese von Chloroform-Äthanol-behandelter Rohfraktion dargestellt<sup>14</sup>. Dabei wird das Ausgangsmaterial auf eine mit inertem Trägermaterial gefüllte Säule gegeben, dann der Elektrophorese unterworfen, worauf die separierten Eiweißzonen durch Puffer aus der Säule verdrängt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden dann noch weiter mit DEAE-Sephadex gereinigt.

DERRIEN und Mitarbeiter<sup>15</sup> haben ein Verfahren entwickelt, das es gestattet, die Rohfraktion in mehrfachen Passagen über Amberlite-CG-50-Ionenaustauscher säulenchromatographisch ebenfalls in drei Komponenten zu zerlegen.

Carbonat-Hydrolase ist kristallisierbar. 1962 haben STRANDBERG *et al.*<sup>16</sup> erstmals die Komponente C in kristalliner Form präpariert [in Gegenwart von 2,5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]. MYERS und EDSALL<sup>17</sup> und RIDDIFORD<sup>18</sup>

Tabelle 1. Einige Eigenschaften von humanen Carbonat-Hydrolasen B und C

	Enzymform B	C
Menge im Erythrocyt	groß	klein
Spezifische Aktivität	niedrig	hoch
Zn-Gehalt (Grammatom pro Mol)	1	1
Isoelektrisches pH	5,7	7,3
$S_{20,w}$ sec. (Phosphat-Puffer pH 7)	$2,75 \cdot 10^{-13}$	$2,65 \cdot 10^{-13}$
$f/f_{\min}$	1,19	1,21
$[\eta]$ ml · g <sup>-1</sup>	2,76	
$\bar{V}$ ml · g <sup>-1</sup>	0,731	
$D_{20,w} \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> · sec <sup>-1</sup>	$8,89 \pm 0,03$	$8,62 \pm 0,01$
MG (aus Sedimentation und Diffusion)	28 000	27 900
MG (aus Sedimentationsgleichgewicht)	$27 200 \pm 1100$	$27 840 \pm 270$
MG (aus Analyse)	28 733	30 058
$V_{\max} \cdot 10^{-3}$ (Hydratation)*	21,5	640,0
(Dehydratation)*	23,0	365,0
$K_M$ mM (Hydratation)*	1,0	9,3
(Dehydratation)*	32	68
Gehalt einiger Aminosäuren in Aminosäureresten pro Molekül		
Lysin	18	25
Histidin	11	12
Prolin	18	18
Serin	30	19
Glycin	16	22
Cystein	1	1
Methionin	2	1
Phenylalanin	11	12
Tyrosin	8	8-9
Tryptophan	6	7

Die Zahlenwerte wurden Ref.<sup>12</sup> entnommen. Die mit \* bezeichneten Angaben stammen aus Ref.<sup>23</sup>.

<sup>14</sup> P. O. NYMAN, *Biochim. Biophys. Acta* 52 (1961) 1.

<sup>15</sup> G. LAURENT, M. CHARREL, F. LUCCIONI, M. F. AUTRAN und Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1101.

<sup>16</sup> B. STRANDBERG, B. TILANDER, K. FRIDBORG, S. LINDSKOG und P. O. NYMAN, *J. Mol. Biol.* 5 (1962) 583.

<sup>17</sup> D. V. MYERS und J. T. EDSALL, *Proc. Nat. Acad. Sci. (US)* 53 (1965) 169.

<sup>18</sup> L. M. RIDDIFORD, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1079.

haben die Enzymformen B und C kristallisiert. Die Komponente C gibt größere und besser ausgebildete Kristalle als Komponente B. Interessant ist die Feststellung<sup>16</sup>, daß das Enzym nach Lyophilisieren die Kristallisierbarkeit einbüßt.

Neben der mengenmäßigen Verteilung zeigen die Komponenten B und C vor allem in bezug auf das isoelektrische pH, die enzymatische Umsatzrate, die Michaelis-Konstante und im Gehalt einiger Aminosäuren ausgeprägte Unterschiede. Die Molekulargewichtsdifferenz von etwas mehr als 1000 ist dagegen eher gering. Darüber hinaus zeichnet sich die Carbonat-Hydrolase durch einige bemerkenswerte Charakteristika aus.

Die Reibungskoeffizienten stellen für Proteine außerordentlich kleine Werte dar. TANFORD<sup>19</sup> gibt als kleinsten Wert für ein globuläres Protein 1,14 für Ribonuklease an. Die Carbonat-Hydrolase dürfte demnach eine praktisch kugelförmige Partikel darstellen. Auch die intrinsische Viskosität ist für Proteine sehr niedrig und deutet ebenfalls auf eine annähernd kugelige Molekülform hin. Am meisten überrascht die enzymatische Umsatzrate der Komponente C, die nicht nur 30mal größer ist als für die Komponente B, sondern mit einem Umsatz von rund 600 000 CO<sub>2</sub> Molekülen pro Enzymmolekül in der Sekunde zugleich eine der größten je gemessenen Umsatzzahlen darstellt. Derartig hohe Reaktionsgeschwindigkeiten erheischen eine spezielle Meßtechnik. Am besten eignet sich dazu die sogenannte «stopped flow»-Methode, wobei Substrat und Enzym mit großer Geschwindigkeit in eine Reaktionskammer eingespritzt und durchmischt werden. Mit einem automatisch registrierenden Photo- oder Colorimeter läßt sich so auch die wichtige Anfangsphase der Reaktion verfolgen. Die gewöhnlichen colorimetrischen und titrimetrischen Methoden sind dazu zu wenig empfindlich und ungeeignet, und man mag sich in diesem Zusammenhang fragen, ob in einem ruhenden oder wenig bewegten System bei so hohen Umsatzzahlen die Zu- und Wegdiffusion von Substrat bzw. Reaktionsprodukten nicht bereits geschwindigkeitslimitierend wirken.

In beiden Enzymformen ist die  $\alpha$ -Aminogruppe der terminalen Aminosäuren durch einen Acetylrest blockiert<sup>20</sup>.

### Rolle des Zinks

Die Wichtigkeit, die dem Zn zukommt, wurde schon 1940 von KEILIN und MANN<sup>8</sup> erkannt. Unter geeigneten Bedingungen läßt sich das Zn aus dem Proteinmolekül wegdissoziieren, und wenn dies auf schonende Art, z. B. mit Chelatbildnern, geschieht, so erhält man ein metallfreies Apoenzym, das durch Zugabe von Zn-Ionen wieder

<sup>19</sup> C. TANFORD, *Physical Chemistry of Macromolecules*, John Wiley & Sons, New York 1961, S. 356-61.

<sup>20</sup> C. MARRIQ, F. LUCCIONI und G. LAURENT, *Biochim. Biophys. Acta* 105 (1965) 606.

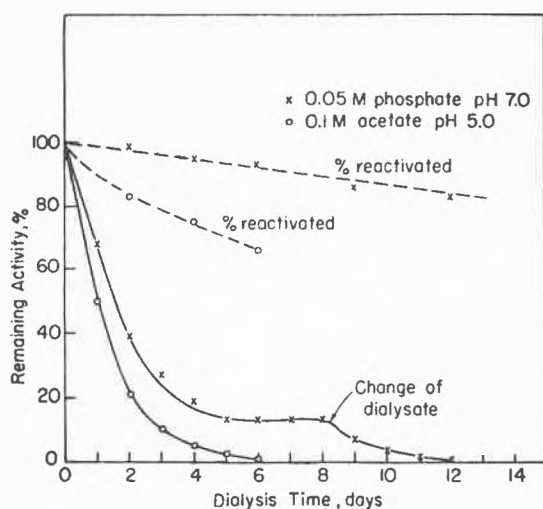


Abb. 3

zum nativen, enzymatisch aktiven Molekül rekonstituierbar ist.

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Zn-Entfernung durch Dialyse in Gegenwart von *o*-Phenanthrolin als Chelatbildner bei pH 7 und bei 5<sup>10</sup>. Als Maß für die Zn-Entfernung bzw. für das verbleibende am Protein gebundene Zn dient die enzymatische Aktivität, ausgedrückt in Prozent der ursprünglichen Aktivität des nativen Enzyms. Die Geschwindigkeit der Zn-Dissoziation ist eine Funktion des pH. Bei pH 7 benötigt man rund zwei Tage, um eine 50prozentige Reduktion der Enzymaktivität zu erreichen oder um die Hälfte des Zn zu entfernen, während die Halbwertszeit dieser Reaktion bei pH 5 bloß 1 Tag beträgt. Der Grund, weshalb das Zn bei pH 5 rascher abgegeben wird, ist offenbar auf eine Schwächung der Zn-Proteinbindung unter dem Einfluß der Protonen zurückzuführen, da das *o*-Phenanthrolin, mit einem *pK* von 4,96 bei höherem pH ein besserer Chelatbildner sein sollte als bei pH 5. Gibt man in irgendeinem Punkt zum mehr oder weniger metallfreien Protein einen Überschuss an Zn-Ionen, so läßt sich die enzymatische Aktivität zum großen Teil wieder rekonstituieren. Die gestrichelten Linien geben den Reaktivierungsverlauf wieder. Beim Protein, das bei pH 7 metallfrei gemacht wurde, beträgt die Reaktivierbarkeit 80 bis 85%, während beim pH 5 behandelten Apoenzym 65 bis 70% der Ursprungsaktivität erhalten werden. Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit ist offenbar auf den Einfluß des pH auf das Apoenzym zurückzuführen.

Diese Versuche lassen sich durch eine Zn-Bestimmung unter Verwendung von radioaktivem Zn ergänzen. Die Messungen sind der Übersicht halber hier nicht eingezeichnet, aber man findet, daß der prozentuale Gehalt an Aktivität zahlenmäßig genau mit dem Prozentgehalt an proteingebundenem Zn übereinstimmt. Dies zeigt, daß das Zn für die enzymatische Aktivität tatsächlich eine essentielle Rolle spielt und daß zwischen Enzym-

aktivität und Zn-Gehalt eine proportionale Beziehung besteht. Damit ist aber nicht bewiesen, daß das Zn selber das aktive Zentrum darstellt und direkt am katalytischen Prozeß beteiligt ist. Man kann sich nämlich immer noch vorstellen, daß das Metall bloß die Funktion eines Strukturelementes ausübt, indem es beispielsweise ein Segment der Polypeptidkette in einer bestimmten Position fixiert, die ihrerseits für die Ausbildung und Erhaltung des Wirkungszentrums verantwortlich ist.

Das Zn kann durch andere zweiwertige Metallionen, wie Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> und Hg<sup>2+</sup>, ersetzt werden<sup>21, 22</sup>. Je nach der Art des eingebauten Metallions findet man im rekonstituierten Enzym unterschiedliche spezifische Aktivitäten. Nimmt man die Aktivität des Zn-Enzyms als 100% an, so erhält man für das Co-Derivat ungefähr 40 bis 50% Aktivität<sup>21, 22, 23</sup>. Die Ni-, Fe-, Mn- und Cd-Enzyme sind nur schwach aktiv, während die Cu- und Hg-Derivate enzymatisch inaktiv sind. Am besten untersucht ist bis jetzt das Co-Enzym. Es zeigt neben dem für die meisten Eiweiße charakteristischen UV-Spektrum zusätzliche spektrale Eigenschaften<sup>21, 22</sup>, die durch die Absorption des hydratisierten Co-Ions bedingt sind, nämlich vier Absorptionsmaxima zwischen ungefähr 510 und 650 m $\mu$ . Das Co wird vom bovinen Apoenzym weniger stark gebunden als das Zn<sup>24</sup>. Es wird, wenn das Co-Enzym gegen Zn-Lösungen dialysiert wird, vom Zn allmählich verdrängt und ersetzt. Während dieser Austauschreaktion bleibt die Summe des proteingebundenen Co und Zn konstant = 1 g Atom pro Mol Protein, und die spezifische Aktivität nimmt in dem Maß, wie Zn eingebaut wird, zu. Diese und weitere Untersuchungen haben zum Schluß geführt, daß die metallbindenden Stellen in boviner Carbonat-Hydrolase für Zn und Co identisch sind.

Der Beweis über die Rolle des Zn als aktives Zentrum wurde durch schwedische Arbeiten ein gutes Stück weitergetragen, und zwar in Hemmversuchen an nativem und metallfreiem bovinem Enzym<sup>25</sup>. Schon von KEILIN und MANN<sup>8</sup> her war bekannt, daß Metallenzymgifte, wie Cyanid, Sulfid und Azid, sehr wirksame Inhibitoren der Carbonat-Hydrolase sind. Auch Cyanat und Sulfonamide sind starke Hemmer. Unter den Sulfonamiden ist besonders das Acetazolamid, das die Kliniker unter dem Namen Diamox kennen, bekannt; es ist 5-Acetamido-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid. Läßt man diese Inhibitoren auf das metallfreie Protein einwirken, so werden sie von diesem überhaupt nicht gebunden. Arbeitet man hingegen mit dem nativen, metallhaltigen Enzym, so wird pro Mol Enzym 1 Mol Inhibitor aufgenommen, und dies vom Zn- wie auch vom Co-Enzym. Betrachtet man zugleich das sichtbare Absorptionsspektrum des Co-Enzyms, so findet man in Gegenwart

<sup>21</sup> J. E. COLEMAN, *Biochemistry* 4 (1965) 2644.

<sup>22</sup> S. LINDSKOG und P. O. NYMAN, *Biochim. Biophys. Acta* 85 (1964) 462.

<sup>23</sup> B. H. GIBBONS und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2539.

<sup>24</sup> S. LINDSKOG und B. G. MALMSTRÖM, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1129.

der Inhibitoren ausgeprägte spektrale Veränderungen. Diese Änderungen sind recht komplex und nicht für alle Inhibitoren gleichartig, so daß eine quantitative Interpretation einstweilen schwierig fällt. Wichtig ist aber vor allem die Feststellung, daß sich, parallel zur inhibitorbedingten Inaktivierung, markante Verschiebungen im Absorptionsspektrum der Metallkomponente selber abzeichnen. Obschon diese Resultate mit bovinem Protein ermittelt wurden, darf man annehmen, daß die Verhältnisse beim humanen Enzym sehr ähnlich sein werden. Jedenfalls nimmt man auf Grund der Stabilitätskonstanten und der optischen Eigenschaften der Co- und Cu-Derivate sowie deren Inhibitor Komplexe für das humane und bovine Enzym identische Metallbindungsverhältnisse an<sup>22, 25</sup>.

Für das Acetazolamid hat man eine Hypothese über seine Wirkungsweise entwickelt<sup>25</sup>. Anhand von Titrationsversuchen nimmt man an, daß in Gegenwart des Inhibitors eine der Ligandengruppen des Metalls gelöst wird, daß sich der Inhibitor und diese Ligandengruppe um eine Koordinationsstelle des Metallions bewerben und sich dann der Inhibitor zwischen die Ligandengruppe und das Metall einschleibt. Es wäre also möglich, daß der Inhibitor Komplex ein Ringgebilde – Polypeptidkette–Inhibitor–Zn–Polypeptidkette – bildet.

Eines der brennendsten Probleme stellt die Frage nach der Natur der Ligandengruppen des Zn dar, das jedoch trotz großer Anstrengungen noch nicht gelöst werden konnte. Die Verhältnisse scheinen komplexer zu sein als beispielsweise bei der Carboxypeptidase, die ja mit der Carbonat-Hydrolase einiges gemeinsam hat. Diese Exopeptidase ist ebenfalls ein Metallenzym mit Zn als prosthetischer Gruppe. Allerdings ist dort das Zn lockerer gebunden als in der Carbonat-Hydrolase<sup>26</sup>. Es wird bereits bei leicht saurem pH, selbst in Abwesenheit von Chelatbildnern, abgegeben und in Gegenwart von *o*-Phenanthrolin oder auch EDTA ist die Zn-Abgabe entsprechend beschleunigt. Die Dissoziationskonstante des Zn in der Carboxypeptidase ist mit  $3 \cdot 10^{-11}$  (bei pH 8)<sup>27</sup> um eine Zehnerpotenz größer als bei Carbonat-Hydrolase<sup>24</sup>. In Titrationsversuchen an metallfreier Carboxypeptidase konnten die metallbindenden Liganden erfaßt werden<sup>28</sup>, und anhand deren pK-Werte kam man zum Schluß, daß in der Carboxypeptidase das Zn einerseits an die SH-Gruppe eines Cysteinrestes und andererseits an die  $\alpha$ -Aminogruppe des N-terminalen Asparaginrestes gebunden ist. Bei der Carbonat-Hydrolase führten derartige Titrationsversuche nicht zum Ziel<sup>25</sup>. Wohl kann man bei der Reaktivierung des metallfreien Proteins mit Zn pro gebundenes Zn-Ion gesamthaft zwei Protonen titrimetrisch erfassen, die offensichtlich von

den Ligandengruppen herkommen. Die Titrationskurve verläuft aber ausgesprochen flach, so daß eine Bestimmung von pK-Werten unmöglich ist. Es läßt sich bloß vermuten, daß eine der Ligandengruppen ein pK besitzt, das größer als 9 ist, doch kommt eine eindeutige Zuordnung nicht in Frage. Nun hat die Aminosäureanalyse gezeigt, daß das Carbonat-Hydrolase-Molekül einen Cysteinrest enthält, der mit der SH-Gruppe einen potentiellen Zn-Liganden beisteuern könnte. Diese Frage wurde denn auch eingehend untersucht, vor allem mit Hilfe der amperometrischen Titration mit Silber- und Quecksilberionen sowie der spektrophotometrischen Titration mit *p*-Chloromercuribenzoat<sup>10</sup>. Im nativen Enzym war kein freies SH nachweisbar. Entfernte man jedoch das Zn mit *o*-Phenanthrolin, so war pro Mol Enzym ein Mol freies SH erfaßbar. Wurde nun diese freie SH-Gruppe blockiert und fügte man nachher Zn bei, so wurden keine Metallionen gebunden, und als Folge davon fand auch keine Reaktivierung statt. Diese Tatsachen stehen im Einklang mit den Forderungen, die man an das Verhalten einer Zn-bindenden Sulfhydrylgruppe stellt. Es zeigte sich aber anhand röntgenographischer Strukturanalysen<sup>16, 29</sup>, daß der Abstand zwischen dem Zn- und S-Atom ungefähr 15 Å beträgt (im kristallisierten Zustand). Damit fällt natürlich eine Zn–S-Bindung außer Betracht.

Das Verhalten der SH-Gruppe ließ sich erklären, sobald man über das Gehaben des metallfreien Proteins vermehrt Aufschluß hatte<sup>10</sup>. Bei pH 7 unterscheiden sich die physikalisch-chemischen Parameter des nativen und des Apoenzyms in keiner Weise. Dagegen sind schon bei pH 5 Unterschiede feststellbar; das Apoenzym ist unter diesen Bedingungen nur zu  $\frac{2}{3}$  reaktivierbar. In der Ultrazentrifuge zeigt diese Präparation ein Sedimentationsdiagramm, das zwei Komponenten aufweist. Die eine, die ungefähr  $\frac{2}{3}$  des Materials umfaßt, besitzt eine Sedimentationskonstante, die mit dem nativen Enzym identisch ist, während die zweite Komponente sehr viel rascher sedimentiert. Sie stellt offenbar Aggregate von denaturiertem und nicht mehr reaktivierbarem Protein dar. Diese Instabilität ist ausschließlich dem Apoenzym eigen, während das native Enzym bei demselben pH über längere Zeit praktisch keine Veränderung erfährt. In ähnlicher Richtung gehen Beobachtungen, die man an boviner Carbonat-Hydrolase gemacht hat<sup>30</sup>. Während das metallhaltige Enzym nach Inaktivierung in 4 M Harnstoff seine Aktivität unmittelbar mit dem Verdünnen des Harnstoffes wiedererlangt, so erstreckt sich der Reaktivierungsprozeß beim Apoenzym nach gleicher Harnstoffbehandlung und Zugabe von  $Zn^{2+}$  über mehrere Stunden. Man wird deshalb annehmen, daß dem

<sup>25</sup> S. LINDSKOG, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 945.

<sup>26</sup> B. L. VALLEE, J. A. RUPLEY, T. L. COOMBS und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 64.

<sup>27</sup> B. L. VALLEE, R. J. P. WILLIAMS und J. E. COLEMAN, *Nature* 190 (1961) 633.

<sup>28</sup> J. E. COLEMAN und B. L. VALLEE, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2244.

<sup>29</sup> B. G. MALMSTRÖM, P. O. NYMAN, B. STRANDBERG und B. TILANDER, *Structure and Activity of Enzymes*, Federation of European Biochemical Societies; Symposium No. 1, London 1964, Academic Press, London/New York 1964, S. 121–9.

<sup>30</sup> S. LINDSKOG, unveröffentlichte Resultate.

Zn neben seiner primären Funktion als Konstituente des Wirkungszentrums ebenfalls eine strukturelle Rolle zukommt, nicht im Sinne eines unbedingten Erfordernisses zur Aufrechterhaltung einer spezifischen Konformation, sondern in der Form eines stabilisierenden Faktors.

### Stabilität und Denaturierung

Bei pH-Werten unterhalb 4 erleidet auch das native Molekül drastische Veränderungen<sup>31, 32</sup>. Die Enzymaktivität geht dabei verloren, das Zn wird abgespalten und der Proteinanteil seinerseits zeigt eine starke Aggregationstendenz, die bei pH 3 am ausgeprägtesten ist. Bekannte Denaturierungsmittel, wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, haben bereits bei neutralem pH einen ähnlichen Effekt<sup>10, 33</sup>. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Feststellung, daß zwischen den Enzymformen B und C bedeutende Stabilitätsunterschiede bestehen. Die Form B ist gegenüber alkalischer Denaturierung (pH 12 bis 13) wesentlich beständiger als die Form C<sup>34, 18, 35</sup>. Auch von Guanidinhydrochlorid und Harnstoff wird das Enzym C sehr viel rascher und leichter denaturiert als Enzym B<sup>33</sup>. Während es bis jetzt noch nicht gelungen ist, Bedingungen zur Renaturierung von säuredenaturiertem Protein zu finden, so können nach Guanidin- und Harnstoffbehandlung beträchtliche Anteile an löslichem und enzymatisch aktivem Material zurückgewonnen werden<sup>33</sup>.

### Katalytische Vielfalt:

#### reversible Hydratation von Aldehyden und Esterspaltung

Bis vor kurzem herrschte die Auffassung, daß die Carbonat-Hydrolase eine strenge Substratspezifität zeigt und daß sich ihre Wirkung auf die Substrate CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> beschränkt. Neuerdings hat man jedoch gefunden, daß sie ebenfalls in der Lage ist, Aldehyd reversibel zu hydratisieren<sup>36</sup> und Ester zu spalten<sup>37, 38</sup>.

Die reversible Hydratation von Aldehyden, untersucht am Beispiel des Acetaldehyds, verläuft wesentlich langsamer als beim CO<sub>2</sub><sup>36</sup>. Das pH-Profil der Aldehydreaktion hat gezeigt, daß eine dissoziierende Gruppe mit einem pK-Wert von 7,4 beteiligt ist, wahrscheinlich das Imidazol eines Histidinrestes, das aber nicht als substratbindende Gruppe funktionieren soll. Da auch in diesem Fall das Zn essentiell ist, nimmt man an, daß metallgebundenes Wasser oder eventuell auch OH direkt vom Zn auf das Substrat übertragen wird, wobei das Imidazol

in der Funktion einer Base als Initiant dieser Transferreaktion dient. Wie beim CO<sub>2</sub> ist Acetazolamid ebenfalls für die Hydratation von Aldehyd ein sehr wirksamer, nicht kompetitiv wirkender Inhibitor. Aus dieser Parallele hat man den Schluß gezogen, daß das aktive Wirkungszentrum für beide Reaktionen identisch ist.

Die Esterspaltung, demonstriert an *p*-Nitrophenylacetat, verläuft ebenfalls beträchtlich langsamer als die Reaktion mit CO<sub>2</sub> und langsamer als die Hydratation von Aldehyd. Die Überföhrungszahl für die humane Komponente B liegt um etwas mehr als vier Zehnerpotenzen tiefer als für die Hydratation von CO<sub>2</sub><sup>12</sup>. Acetazolamid wirkt auch in dieser Reaktion als nicht kompetitiver Inhibitor<sup>12, 29, 38</sup>. Die spezifische Hemmbarkeit durch diese Substanz wird als Beweisstück interpretiert, daß die Esteraseaktivität tatsächlich der Carbonat-Hydrolase zuzuschreiben ist, da die übrigen Erythrocytenesterasen, wenigstens soweit bekannt, von Sulfonamiden nicht betroffen werden. Aufschlußreich ist ebenfalls der Befund, daß der bekannte Esterase- und Protasehemmer Diisopropylfluorophosphat auf Carbonat-Hydrolase keinerlei hemmende Wirkung ausübt<sup>12, 29</sup>. Daraus läßt sich in der Carbonat-Hydrolase die vom Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Thrombin her bekannte Serinsequenz im Wirkungszentrum mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Die Fähigkeit der Carbonat-Hydrolase, gegenüber Substraten aus so verschiedenen Stoffklassen wirksam zu sein, war überraschend, steht sie doch scheinbar im Widerspruch zum Grundsatz der absoluten Substratspezifität. Obwohl die Substrate unterschiedlich sind, läßt sich dennoch ein gemeinsamer Faktor feststellen: die Reaktionen, welche die Carbonat-Hydrolase beschleunigt, verlaufen säure-basen-katalysiert. Man müßte somit den Ausdruck Substratspezifität von einem strukturellen auf einen mechanistischen Gesichtspunkt erweitern und ihn z. B. mit Reaktionsspezifität ersetzen.

### Genetische Betrachtung

Die Entdeckung der Esteraseaktivität ist ein Verdienst der Genetiker, und zwar der Gruppe von TASHIAN<sup>37, 39</sup> in Ann Arbor, und erfolgte eigentlich zufälligerweise. TASHIAN untersuchte die Möglichkeit der Verwendung von Erythrocytenesterasen für taxonomische Studien an Primaten und fertigte zu diesem Zweck sogenannte Zymogramme an, d. h. Hämolyt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit histochemischen Methoden in Gegenwart von Estersubstrat gefärbt. Die Bande, welche der Carbonat-Hydrolase entspricht, wurde vorerst als Erythrocytenesterase D bezeichnet, bevor man nachträglich merkte, daß sie mit Carbonat-Hydrolase identisch ist.

<sup>31</sup> S. A. S. GHAZANFAR, E. E. RICKLI und J. T. EDSALL, *Fed. Proc.* 21 (1962) 254.

<sup>32</sup> L. M. RIDDIFORD, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 168.

<sup>33</sup> J. T. EDSALL, S. MEHTA, D. V. MYERS und J. MCD. ARMSTRONG, *Biochem. Z.* 345 (1966) 9.

<sup>34</sup> G. LAURENT, M. CHARREL, D. GARCON, M. CASTAY, C. MARRIQ und Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46 (1964) 603.

<sup>35</sup> L. M. RIDDIFORD, R. STELLWAGEN, S. MEHTA und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 3305.

<sup>36</sup> Y. POCKER und J. E. MEANY, *Biochemistry* 4 (1965) 2535.

<sup>37</sup> R. E. TASHIAN, D. P. DOUGLAS und Y. L. YU, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14 (1964) 256.

<sup>38</sup> Y. POCKER und J. T. STONE, *J. Amer. Chem. Soc.* 87 (1965) 5497.

<sup>39</sup> R. E. TASHIAN, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 108 (1961) 364.



TASHIANS Arbeiten sind für Fragen, die sich auch der Biochemiker stellt, nicht unbedeutend, nämlich:

- woher rühren die verschiedenen Enzymkomponenten,
- besitzen wir alle die Formen A, B und C,
- treten vielleicht genetisch bedingte Unterschiede auf, gibt es Varianten?

Die Betrachtung beschränkt sich auf die Enzyme B und C, da der Gehalt an Komponente A wahrscheinlich zu gering ist, als daß sie mit dieser Methode eindeutig erfaßt werden könnte.

Aus TASHIANS Untersuchungsmaterial, das mehr als 4000 Fälle umfaßt, geht hervor, daß beide Komponenten, B und C, zum normalen Enzymbild gehören. Bis jetzt kennt man bloß zwei Fälle mit stark vermindertem Carbonat-Hydrolase-Pegel. Im ersten Fall betrifft es einen 47jährigen Amerikaner griechischer Abstammung, bei dem beide Komponenten sehr stark reduziert sind und der zudem ein abnormes Hämoglobinbild zeigt, indem er praktisch nur das fötale Hämoglobin F besitzt<sup>40</sup>. Der zweite Fall betrifft eine Negerin, bei der die Komponente B fast vollständig fehlt, während C in normaler Konzentration vorhanden ist<sup>41</sup>. Ein gänzlich Fehlen der Carbonat-Hydrolase hat man bisher noch nicht beobachtet, und es läßt sich mit einiger Sicherheit annehmen, daß wenigstens der Warmblüterorganismus ohne dieses Enzym nicht lebensfähig ist. Man kennt auch kein anderes System, das die Funktionen der Carbonat-Hydrolase übernehmen oder ersetzen könnte.

Es sind auch einige Fälle bekanntgeworden, in denen vorwiegend die Komponente B in Varianten auftritt, die sich sowohl in bezug auf elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wie auch in spezifischer Aktivität gegenüber Estersubstrat unterscheiden. Die Variante B<sub>b</sub><sup>42</sup> wurde bei einem 4jährigen mongoloiden Kind, dessen Vater und Großmutter väterlicherseits gefunden,

die Variante B<sub>c</sub><sup>43</sup> bei 4 Chamarros, Bewohner einer Inselgruppe der Marianen, und die dritte Variante B<sub>d</sub><sup>44</sup> fand man bei einer Negerin und ihrer Tochter in den USA. Die Esteraseaktivität nimmt von normal B<sub>a</sub> über B<sub>b</sub> und B<sub>c</sub> nach B<sub>d</sub> zu, ebenfalls die kathodische Wanderungsgeschwindigkeit, die sich derjenigen der Komponente C nähert. TASHIAN hat seine Untersuchungen auch auf Alt- und Neuweltaffen ausgedehnt<sup>44</sup> und dabei eine recht ausgeprägte Intra- und Interspeciesvariation, hauptsächlich in der Komponente B, gefunden. Die Komponente C zeigt weniger Variabilität und stellt evolutionsmäßig wahrscheinlich das ältere und konservativere Molekül dar. Es wird deshalb angenommen, daß die Komponente B durch Duplikation und weiteren Veränderungen aus dem C-Lokus hervorging<sup>44</sup>, ähnlich der Evolution von Haptoglobinen<sup>45</sup> und der Hämoglobinketten<sup>46</sup>.

*Addendum:* Nach neusten röntgenographischen Ermittlungen<sup>47</sup> stellt das Carbonat-Hydrolase Molekül (Komponente C) ein Ellipsoid dar, mit den Dimensionen 40 × 45 × 55 Å. Das Wirkungszentrum liegt in einer Einbuchtung, an deren tiefster Stelle sich das Zn befindet. Ein Teil der Einbuchtung ist zu einer engen, schlitzförmigen Vertiefung ausgebildet. Untersuchungen an einem Enzym-Sulfonamidinhibitor Komplex haben ergeben, daß der Hemmstoff von dieser Vertiefung aufgenommen wird. Die sterischen Verhältnisse sind so beschaffen, daß der Inhibitor befähigt ist, die Bindung zum Zn zu bewerkstelligen.

<sup>43</sup> R. E. TASHIAN, C. C. PLATO und T. B. SHOWS, *Science* 140 (1963) 53.

<sup>44</sup> R. E. TASHIAN, *Amer. J. Hum. Genet.* 17 (1965) 257.

<sup>45</sup> O. SMITHIES, G. E. CONNELL und G. H. DIXON, *Nature* 196 (1962) 232.

<sup>46</sup> V. M. INGRAM, *Nature* 189 (1961) 704.

<sup>47</sup> K. FRIDBERG, K. K. KANNAN, A. LILJAS, J. LUNDIN, B. STRANDBERG, R. STRANDBERG, B. TILANDER und G. WIREN, *J. Mol. Biol.* 25 (1967) 505.

Ergebnisse von Untersuchungen mit optischer Drehungsdispersion finden sich in Ref. <sup>12</sup> und <sup>17</sup> sowie bei A. ROSENBERG, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5126, und S. BEYCHOK, J. McD. ARMSTRONG, C. LINDBLOW und J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5150.

<sup>40</sup> LIE-INJO LUAN ENG und R. TARAIL, *Nature* 211 (1966) 47.

<sup>41</sup> R. F. RIEDER und D. J. WEATHERALL, *Nature* 203 (1964) 1364.

<sup>42</sup> C. R. SHAW, F. N. SYNER und R. E. TASHIAN, *Science* 138 (1962) 31.