

Kurze Mitteilungen

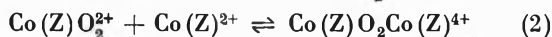
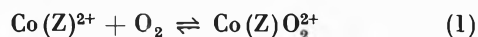
Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen

Reaktivität von Koordinationsverbindungen XIX¹ Kinetik der Dissoziation des μ -Disauerstoff- μ -hydroxo- bis(triäthylentetramin)-dikobalt(II)-Ions*²

Summary

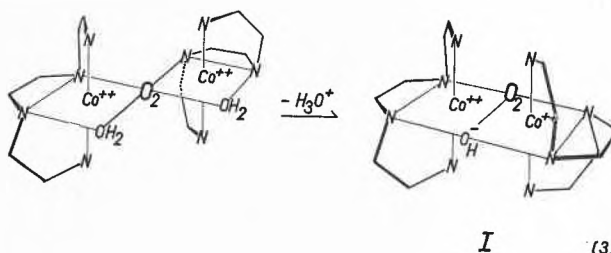
The kinetics of the dissociation of a binuclear chelate of triethylenetetramine-cobalt(II)-ion with O_2 and OH^- as bridging ligands have been studied. In contrast to similar systems the rate of dissociation in weakly acidic solution was found to be proportional to $[H^+]$. This suggests a mechanism in which protonation of the OH^- bridge precedes the first dissociation step.

In einer vorangegangenen Mitteilung¹ berichteten wir über die Zusammensetzung verschiedener reversibler Sauerstoffaddukte von Kobalt(II)-Chelaten mit Polyaminen. Die Resultate belegen die starke Tendenz zur Ausbildung zweikerniger Komplexe mit O_2 als Brückenligand. WILKINS und Mitarbeiter haben die Kinetik der Bildung in wäßrigen luftgesättigten Lösungen mit Hilfe einer «stopped flow»-Methode untersucht³. Sie postulieren zwei reversible Schritte (1,2)⁴ und geben für die Hinreaktion von (1) bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten an⁵.

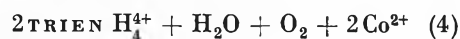
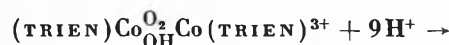


Im Falle des uns speziell interessierenden Systems $Co(TRIEN)^{2+}$ ($TRIEN = \text{Triäthylentetramin}$) fanden wir in spektrophotometrischen Versuchen, daß der relativ raschen Bildung von $(TRIEN)CoO_2Co(TRIEN)^{2+}$ eine sehr viel langsamere Reaktion folgt, wobei sich die Absorptionsbande von 370 auf 360 nm verschiebt. Aufgrund von pH-Titrationsen, die den zusätzlichen Verbrauch von einem OH^- auf zwei Co^{2+} anzeigen, schließen

wir, daß es sich dabei um eine Kondensation (3) handelt und daß das Endprodukt eine doppelt verbrückte Struktur (I) aufweisen muß.



$(TRIEN)Co_{OH}^{O_2}Co(TRIEN)^{3+}$ (I) ist in wäßriger Lösung längere Zeit ohne irreversible Veränderungen des Oxydationszustandes der gebundenen O_2 -Molekel haltbar und zerfällt in saurer Lösung ($2 < pH < 6$) in die Ausgangsprodukte (4). Im folgenden beschreiben wir einige kinetische Versuche zur Untersuchung des Mechanismus von (4), der uns im Zusammenhang mit der Redoxreaktivität von (I)⁶ interessierte.



Eine $2,5 \cdot 10^{-2}$ mMol $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $5 \cdot 10^{-2}$ mMol $TRIEN \cdot 4HCl$ und 0,5 mMol Tetramethyläthylendiamin (zur schwachen Pufferung im pH-Gebiet 7 bis 10) enthaltende Lösung vom Gesamtvolumen 20 ml wurde auf pH 8 bis 9 gebracht und während 2 Minuten mit Luft gut durchgespült. Unter diesen Bedingungen reagiert $Co(TRIEN)^{2+}$ praktisch vollständig zu I, dessen Bildung spektrophotometrisch kontrolliert werden kann. Die molare Extinktion beim Maximum von 360 nm beträgt $6,6 \cdot 10^3$. Die Geschwindigkeit der Dissoziation von I (4) wurde nun durch Verfolgung der Abnahme der Absorptionsbande bei 360 nm in Lösungen vom pH 1,7 bis 5, also unter Bedingungen, unter welchen die Bildungsreaktion vernachlässigbar ist, ermittelt. Die Meßlösung wird hierbei durch rasche Mischung von 1 ml Stammlösung der oben angegebenen Zusammensetzung mit 20 ml 0,1-M KCl-Lösung⁷ von gewünschter Acidität (Zusatz von HCl) hergestellt, in eine 4-cm-Küvette

* Eingegangen am 8. April 1969.

¹ XVIII: Primärprodukte bei Reaktionen von Kobalt(II)-Chelaten mit molekularem Sauerstoff, S. FALLAB, *Chimia* 21 (1967) 538.

² In der Literatur sind bisher aus Kobalt(II)-Salzen gebildete binukleare O_2 -Addukte als μ -Peroxo-dikobalt(III)-Komplexe bezeichnet worden. Der Verlauf ihrer Bildung und ihres Zerfalls in saurer Lösung spricht für die Annahme, daß es sich bloß um eine Koordinationsreaktion von elementarem Sauerstoff und nicht um einen Redoxvorgang handelt.

³ (a) J. SIMPLICIO und R. G. WILKINS, *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 6092; (b) J. SIMPLICIO und R. G. WILKINS, *J. Amer. Chem. Soc.* 1969, im Druck; (c) F. MÜLLER, J. SIMPLICIO und R. G. WILKINS, *J. Amer. Chem. Soc.* 1969, im Druck.

⁴ Z kann ein mehrzähliger Ligand oder auch eine Kombination verschiedener Liganden bedeuten.

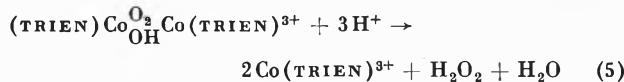
⁵ z. B. für die Reaktion von $Co(EN)_2^{2+}$ mit O_2 $k = 4,7 \cdot 10^5$ Liter $Mol^{-1} sec^{-1}$ (25°), ($EN = \text{Äthylendiamin}$).

⁶ Über die Redoxreaktivität von I wird in einer nächsten Mitteilung berichtet.

⁷ Verdoppelung der KCl-Konzentration hatte eine etwa 20prozentige Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit zur Folge.

transferiert und $E_{360} = f(t)$ mit Hilfe eines «Bausch & Lomb Spectronic 505» während etwa 10 Minuten verfolgt und aufgezeichnet. Die nach etwa 20 Sekunden nach dem Mischzeitpunkt einsetzenden Kurven gestatten eine einfache graphische Auswertung und Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit dE_{360}/dt . Im pH-Bereich von 1,7 bis 2,5 blieb der pH-Wert auch ohne Pufferzusatz hinreichend konstant. Bei höheren pH-Werten setzten wir *m*-Phenylendiamin als Puffersubstanz zu.

Bei Verwendung von koordinationsfähigen Pufferbasen, wie Chloracetat, Acetat, Phosphat, Tartrat oder Oxalat, beobachteten wir störende Beeinflussung der Absorptionsänderungen. In den meisten Fällen wird $-dE/dt$ stark erhöht. Es tritt jedoch nicht Dissoziation, sondern irreversible Oxydation nach (5) ein.

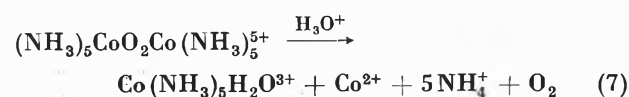


m-Phenylendiamin liegt zwischen pH 2,7 und 4,9 vorwiegend als kationische monoprotierte Pufferbase vor⁸ und kann daher kaum in störender Weise mit I reagieren. Daß in Gegenwart von *m*-Phenylendiaminpuffer und in ungepufferten salzsauren Lösungen ausschließlich Reaktion (4) stattfindet, ist leicht dadurch erkennbar, daß nach Verschwinden der dem binuklearen O₂-Addukt I zugeordneten Absorptionsbande die Reaktionslösung, wieder auf pH 8 bis 9 gebracht und luftgesättigt, das ursprüngliche Spektrum zeigt. Um Temperaturkonstanz zu gewährleisten, wurden die Komponenten der Meßlösung vorher auf die gewünschte Temperatur gebracht und die spektrophotometrischen Messungen in einem thermostatisierten Küvettenblock vorgenommen. Zur Ermittlung der Reaktionskinetik wurde die oben beschriebene Konzentration der Meßlösung und die Menge der zugesetzten HCl variiert.

$$-dE/dt = kE_0[\text{H}^+] \quad (6)$$

Im ganzen untersuchten pH-Bereich (1,7 bis 5) fanden wir, daß die mit dE_{360}/dt gemessene Anfangsgeschwindigkeit von (4) proportional dem Extinktionswert bei 360 nm zum Mischzeitpunkt (E_0) und proportional $[\text{H}^+]$ ist (6). Für die Geschwindigkeitskonstante errechneten wir bei 25°, 30° und 35° die Werte: $\log k = 1,4 \pm 0,05$, $1,6 \pm 0,05$ bzw. $1,8 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$. Aus den drei Werten läßt sich eine Aktivierungsenergie von etwa 15 kcal/Mol abschätzen.

Der Diskussion des Mechanismus von Reaktion (4) sei ein Vergleich mit Resultaten kinetischer Untersuchungen anderer Autoren an ähnlichen Systemen vorausgeschickt. SYKES und Mitarbeiter⁹ fanden pH-Unabhängigkeit beim Studium des Zerfalls von μ -Superoxodikobalt(III)-Komplexen in saurer Lösung (7). In



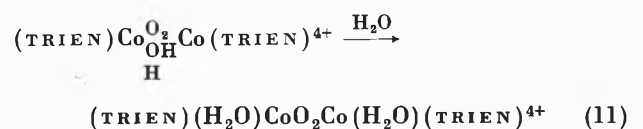
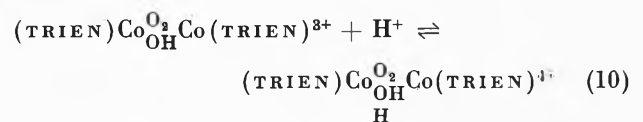
einer Studie über die Reduktion des μ -Superoxo-dikobaltions $(\text{NH}_3)_5\text{CoO}_2\text{Co}(\text{NH}_3)_5^{5+}$ durch Cr^{2+} , V^{2+} und Eu^{2+} konnten HOFFMANN und TAUBE¹⁰ ein protoniertes Zwischenprodukt $(\text{NH}_3)_5\text{CoO}_2\text{HCo}(\text{NH}_3)_5^{5+}$ sicherstellen, dessen Dissoziationsgeschwindigkeit sich in saurer Lö-

sung als umgekehrt proportional zu $[\text{H}^+]$ erwies. Die Resultate von SIMPLICIO und WILKINS^{3b} über die Dissoziation des deprotonierten $(\text{NH}_3)_5\text{CoO}_2\text{Co}(\text{NH}_3)_5^{4+}$ (8) stimmen insofern überein, als sich die Geschwindigkeit von (8) in neutraler und schwach alkalischer Lösung als pH-unabhängig erwies.



Bei 25° beträgt die monomolekulare Geschwindigkeitskonstante 56 sec^{-1} . Der Grund für die langsamere Dissoziation des protonierten $(\text{NH}_3)_5\text{CoO}_2\text{HCo}(\text{NH}_3)_5^{5+}$ kann in einer Stabilisierung der Peroxostruktur des O₂-Brückenliganden gesehen werden. WILKINS und Mitarbeiter untersuchten auch die Kinetik der Dissoziation verschiedener μ -Peroxdikobalt-Chelate^{3c}, deren Zerfall im allgemeinen sehr viel langsamer ist als derjenige von $(\text{NH}_3)_5\text{CoO}_2\text{Co}(\text{NH}_3)_5^{4+}$ ¹¹. Aber auch hier finden sie stets pH-Unabhängigkeit.

Die obigen Ergebnisse mit $(\text{TRIE N})\text{Co}\overset{\text{O}_2}{\text{OH}}\text{Co}(\text{TRIE N})^{3+}$ stehen also in gewissem Gegensatz zu den bisherigen Resultaten und verlangen eine Erklärung, die auf die Besonderheiten der doppelt verbrückten Struktur (I) Rücksicht nimmt. Der kinetische Ausdruck (6) zwingt zur Annahme, daß der eigentlichen Zerfallsreaktion eine Protonierung vorausgeht und daß das protonierte Zwischenprodukt leichter dissoziiert als I. Die Tatsache, daß (6) im ganzen untersuchten pH-Bereich von etwa 1,7 bis 5 gilt, besagt, daß die Protonierung an einer schwach basischen Stelle mit $pK_s < 1,7$ erfolgen muß. Protonierung an der O₂-Brücke ist unwahrscheinlich, da dies, wie HOFFMANN und TAUBE¹⁰ richtig kommentieren, zu einer Stabilisierung führen müßte. Es muß daher angenommen werden, daß die Protonierung an der Hydroxobrücke erfolgt (10) und daß der erste Schritt der Dissoziation von I in einer Aufhebung der OH-Brücke besteht (11).



Der weitere Zerfall dürfte auf dem von WILKINS^{3c} vorgeschlagenen Wege entsprechend den Gleichgewichten (1) und (2) erfolgen.

Wie einleitend erwähnt wurde, tritt in Gegenwart von Pufferbasen B⁻, wie Acetat oder Phosphat, nicht

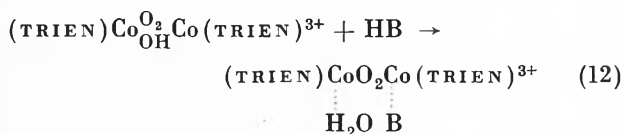
⁸ Ionization constants of acids and bases, A. ALBERT und E. P. SERJEANT, Methuen & Co., 1962, S. 147.

⁹ R. D. MAST und A. G. SYKES, *J. Chem. Soc. (A)* 1968, 1031.

¹⁰ A. B. HOFFMANN und H. TAUBE, *Inorg. Chem.* 7 (1968) 1971.

¹¹ z. B. dissoziiert das O₂-Addukt von $\text{Co}(\text{EN})_2^{2+}$ mit einer Geschwindigkeitskonstanten $k = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ (25°) (vgl. ^{3c}).

Dissoziation (4), sondern die Redoxreaktion (5) ein. Dieser einen völlig anderen Reaktionsverlauf erzwingende Einfluß von B^- ist erstaunlich, wird aber durch den vorgeschlagenen Mechanismus verständlich, denn in Reaktionsschritt (11) entsteht zunächst am einen Co^{II} eine Koordinationslücke, die je nachdem durch H_2O oder von in Lösung befindlichen koordinationsfähigen Basen B^- besetzt werden kann (12). Das koordinativ gebundene B^- beschleunigt jetzt offenbar den irreversiblen Schritt $Co^{II}O_2Co^{II} \rightarrow Co^{III}O-OCo^{III}$.



Fräulein KARIN RAMPP und ESTHER THOMMEN sei hier für die sorgfältige Durchführung der spektrophotometrischen Versuche gedankt. Dem Schweizerischen Nationalfonds (Projekt Nr. 4689.2) danken wir für die finanzielle Unterstützung.

S. FALLAB

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel

Substratspezifität und aktives Zentrum der Chlorophyllase*

Summary

The enzymic specificity of the chlorophyllase, the chlorophyll hydrolyzing enzyme, was investigated and found to be the same as described in the literature, i. e. the substrate specificity is determined by the two «Extra»-H-atoms at C-7 and C-8 of the phorbine skeleton. The enzyme is inhibited by SH-reagents and reducing agents. On the other hand enzymic activity is increased by treatment with oxidizing agents. Consequently the active site of this enzyme might involve a disulphide group.

In unserer ersten Mitteilung¹ hatten wir die Reinigung und teilweise Charakterisierung der Chlorophyllase beschrieben. Unsere weiteren Untersuchungen befaßten sich nun mit der Substratspezifität sowie der Hemmbarkeit der enzymatischen Aktivität und damit der Struktur des aktiven Zentrums.

Die bereits bekannte hohe Spezifität der Chlorophyllase² ließ sich bestätigen. Nur Phorbine werden durch dieses Enzym hydrolytisch gespalten, während Porphyrine und Chlorine sowie niedermolekulare Säureester nicht angegriffen werden. Bestimmend für die Spezifität scheinen somit die beiden «Extra»-H-Atome an C-7 und C-8 sowie der Cyclopentanonring mit der Carboxymethylgruppe an C-10 zu sein. Substanzen, denen das eine oder andere Strukturmerkmal fehlt, werden nicht umgesetzt. Von den sechs verwendeten Testsubstanzen – Phäophytin a; Methylphäophorbid a; Protophäophytin a; Phäoporphyrin-a₅-dimethylester; 2,4-Divinylphäoporphyrin-a₅-dimethylester; *iso*-Amylbenzoat (s. Abb. 1) – wurden somit nur die beiden erstgenannten hydrolytisch gespalten. Diese absolute Spezifität – vor allem gegenüber den beiden erwähnten H-Atomen – ist erstaunlich, denn meistens sind Hydrolasen relativ unspezifische Enzyme, und ihre Spezifität wird kaum durch eine solche – vergleichsweise weit von der angegriffenen Gruppierung entfernte – Struktur beeinflusst, wie dies bei der Chlorophyllase der Fall ist. Eine Erklärung dieses Verhaltens könnte nur aufgrund genauerer Kenntnis des aktiven Zentrums dieses Enzyms gegeben werden.

Bei der Untersuchung der Hemmbarkeit des Enzyms beschränkten wir uns zunächst auf den Nachweis essentieller SH-Gruppen, deren Teilnahme am aktiven Zentrum durch KLEIN und VISHNIAC³ beschrieben wurde.

Orientierende Vorversuche ergaben eine Enzymhemmung durch SH-Hemmer wie Jodacetamid, *p*-Chloromercuribenzoat (CMB) und $HgCl_2$. Um genaueren Aufschluß über die Hemmbarkeit des Enzyms zu erhalten, untersuchten wir die Wirkung einer Konzentrationsreihe von CMB auf die enzymatische Aktivität der Chlorophyllase. Gleichzeitig prüften wir die Umkehrbarkeit der Hemmung durch Regeneration der SH-Gruppen mit

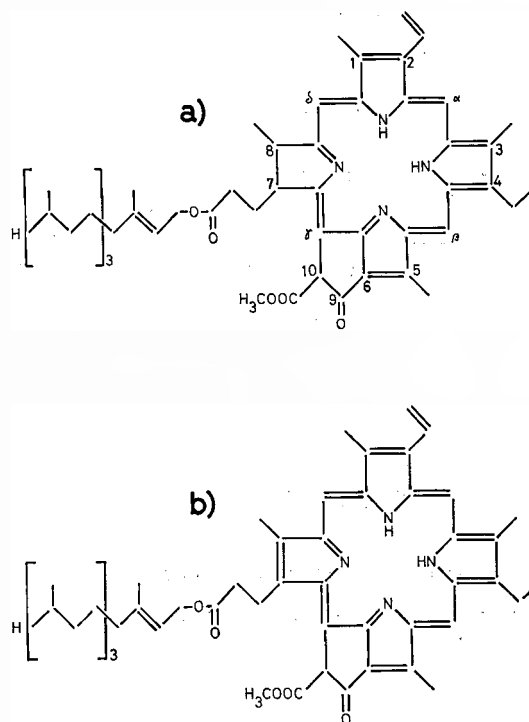


Abb. 1. Substrate zur Untersuchung der Chlorophyllasespezifität. a) Phäophytin a, b) Protophäophytin a

* Zweite vorläufige Mitteilung. Eingegangen am 12. April 1969.

¹ E. C. GROB und J. SEILER, *Chimia* 21 (1967) 466.

² M. HOLDEN, *Biochem. J.* 78 (1960) 359.

³ A. O. KLEIN und W. VISHNIAC, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2544.

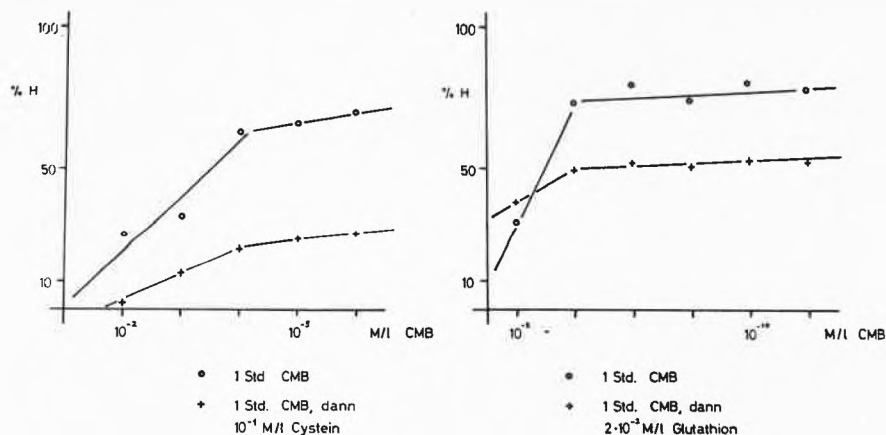


Abb.2. Enzymhemmung durch CMB und Cystein/Glutathion

Cystein und Glutathion. Die Resultate sind in Abb.2 dargestellt.

Schienen die ersten Ergebnisse die Beteiligung von SH-Gruppen an der Enzymwirkung zu beweisen, so zeigte sich jetzt, daß eine chemische Reduktion und Bildung von SH-Gruppen die Enzymaktivität ebenfalls verringerte. Dieses abnorm erscheinende Verhalten kann nicht anders erklärt werden als durch die Annahme, daß für die Enzymaktivität nicht oder nicht nur SH-Gruppen, sondern in erster Linie Disulfidbrücken verantwortlich sind.

Die Rolle einer oxidierten Struktur (Disulfidgruppe) im aktiven Zentrum der Chlorophyllase konnte durch ein weiteres Experiment noch verdeutlicht werden. Nach verschiedener Vorbehandlung (Reduktion mit Cystein oder Oxidation mit Thiosulfat) zeigen Rohenzympräparate sehr abweichende hydrolytische Aktivitäten, wobei einerseits der massive Abfall der enzymatischen Aktivität bei der Reduktion und andererseits der beachtliche Anstieg der Hydrolysenrate bei der Oxidation gegenüber dem unbehandelten Präparat auffällt. Ferner ließen sich höhere Ausbeuten an enzymatischer Aktivität gewinnen, wenn die Extraktion nach BÖGER⁴ in

einem schwach oxidativ wirkenden Medium durchgeführt wurde⁵.

Diese Resultate weisen eindeutig auf eine Beteiligung von S-S-Gruppen an der Enzymaktivität hin. *A priori* ist zwar nicht zu entscheiden, ob diesen Disulfidbrücken eine analoge Rolle wie im Pepsin zufällt, nämlich durch Aufrechterhaltung einer bestimmten Tertiärstruktur des Enzymproteins dem Substrat den Zutritt zum aktiven Zentrum zu ermöglichen, oder ob die Disulfidgruppen als Haftpunkte für das Substrat wirken und damit direkt am aktiven Zentrum teilhaben. Wenn man jedoch zusätzlich die Substratspezifität des Enzyms in Betracht zieht, dürfte man wohl den zweiten Fall als wahrscheinlicher erachten.

Eine möglichst vollständige Aufklärung der Struktur des aktiven Zentrums der Chlorophyllase ist das Ziel unserer weiteren Arbeiten.

Diese Arbeiten wurden mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds durchgeführt.

J. P. SEILER und E. C. GROB

Institut für Organische Chemie, Universität Bern

⁴ P. BÖGER, *Phytochem.* 4 (1964) 435.

⁵ J. P. SEILER, *Die Chlorophyllase*, Diss. Bern 1969.