

Biochemie der Spurenelemente des Menschen

(772.309, 2 Std.)

Zink 1

Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Bioanorganische Chemie des Zinks

Carboanhydrase

Peptidasen, Proteinasen, Lipasen und Phosphatasen

Aldolasen, Dehydratasen und Polymerasen

Alkohol-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase

Genregulierende Zinkproteine

Insulinspeicherung

Spurenelement Zink

Einleitung

Seit der Antike kennt man die Wirkung zinkhaltiger Salben auf die **Wundheilung**. Heute weiß man, dass damit im Zusammenhang die Aktivität der Zn^{2+} -enthaltenden **Kollagenasen** steht. In den letzten Jahrzehnten hat man die bedeutende Rolle von Zink bei der Behebung von **Wachstums- und Entwicklungsstörungen** erkannt.

Zink-enthaltende Proteine kennt man seit etwa 1930. Derzeit (2009) sind mehr als **310 verschiedene Zink-Proteine** bekannt. Nach dem Eisen ist Zink mit ca. 2 g pro 70 kg Körpergewicht das zweithäufigste *3d*-Metall im menschlichen Organismus.

Der **tägliche Zinkbedarf** wird zwischen 6 mg (Kleinkinder) und 20 mg (Schwangere) eingeschätzt. Es besteht eine relativ große Toleranz für höhere Dosen, bevor Vergiftungserscheinungen auftreten. Durch heutige Ernährungsgewohnheiten wird dieser Zinkbedarf nicht immer gedeckt. Übermäßiger Alkoholkonsum verursacht erhöhten täglichen Zinkbedarf (\rightarrow **Alkoholdehydrogenase**).

Zinkmangel führt zu gravierenden pathologischen Erscheinungen:

Appetitlosigkeit, Abstumpfen des Geschmacksinns

Neigung zu Entzündungen

Beeinträchtigung des Immunsystems

Wachstumsstörungen

Entwicklungsstörungen

Vergiftung durch die homologen Elemente Cd^{2+} und Hg^{2+} führt zur Verdrängung des Zn^{2+} aus seinen Enzymen mit der Konsequenz der Ausbildung der typischen Symptome des Zinkmangels.

Im Menschen findet man hohe Zinkgehalte bei Feten und Säuglingen sowie in den Fortpflanzungsorganen, insbesondere im Sperma (wichtiger Hinweis auf die katalysierende Wirkung des Zinks bei Aufbaureaktionen und auf Funktion bei Genregulation).

Unter den mehr als 300 humanen Zink-Proteinen befinden sich **zahlreiche essentielle Enzyme des anabolen und katabolen Stoffwechsels.**

Beispiele für Zink-Proteine im anabolen Stoffwechsel sind **Synthetasen, Polymerasen, Lyasen** und **Transferasen.**

Beispiele für Zink-Proteine im katabolen Stoffwechsel sind **Hydrolasen** (für Proteine, Nukleinsäuren, Lipid-Moleküle), **Dehydratasen** (Porphyrin-Biosynthese) oder **Dehydrogenasen.**

In aktiven Zentren von Enzymen fungiert Zink als **Lewis-Säure** und/oder **polarisiert** und **fixiert** Substrate in bestimmten Konformationen während der Umsetzung (Gewährleistung der **Stereoselektivität**).

Und schließlich ist Zink wichtig in der **strukturellen Stabilisierung** von Peptiden oder Proteinen, wie. z.B. **Insulin, Hormon-Rezeptor-Komplexen** oder **Transkriptions-regulierenden Faktoren.**

Einige allgemeine Bemerkungen zur Rolle von Zink in Zellen:

- **Zink ist das häufigste Spurenelement im Cytoplasma.**
Eisen ist in Membranen häufiger anzutreffen, Mangan vor allem in Vesikeln oder Organellen und Kupfer hauptsächlich im periplasmatischen Raum bzw. außerhalb der Zellen.
Zink-Proteine sind (fast) nie mit Membranen assoziiert.
Nur Zink-hältige Verdauungsenzyme sind entweder in Vesikeln oder außerhalb der Zellen lokalisiert.
- Cytoplasmatische **Zink-Enzyme** zeichnen sich durch eine **große Variabilität** hinsichtlich der von ihnen katalysierten Reaktionen aus.
- Zink zeigt neben katalytischen auch **Strukturfunktionen** (z.B. Domänenstabilisierung in Proteinen, Keratin-Struktur, Organisation der Chromosomen) meist innerhalb der Zelle.
- Rolle in der **Transkriptions-Regulation** beschränkt sich auf **Eukaryonten**.

Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Zink gehört zu jenen Spurenelementen, die relativ gut verfügbar sind (Meerwasser etwa 10^{-8} mol/L).

Die Konzentration an freiem Zink innerhalb von Zellen variiert von 10^{-9} mol/L im Cytoplasma bis etwa 10^{-3} mol/L in einigen Vesikeln. Calcium zeigt ähnliche Konzentrationsverteilungen.

Membranen sind für Zn^{2+} nicht permeabel. Es muss jedoch vom Intestinalbereich ins Blut und von dort in intrazelluläre Bereiche transportiert werden. Momentan werden zwei Gruppen von **Zink-Transporter-Proteinen** unterschieden, die neben Zink auch Eisen-, Mangan- und Cobaltionen transportieren:

ZIP-Transporter Familie (ZIP, zinc regulated transporter and iron-regulated transporter) und

CDF-Transporter Familie (CDF, cation diffusion family).

ZIP-Transporter (4 Unterfamilien) transportieren Zink vom extrazellulären Raum in das Cytoplasma und mobilisieren intrazellulär in Kompartimenten gespeichertes Zink. In Säugern ZnT1-ZnT10 (ZnT, zinc transporter).

CDF-Transporter [3 Unterfamilien: CDF1 (Säuger), CDF2, CDF3] transportieren Zink vom Cytoplasma in intrazelluläre Organellen oder vom Cytoplasma in den extrazellulären Raum (Ausscheidung, Entgiftung).

Review: Taylor and Nicholson (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1611**, 16-30

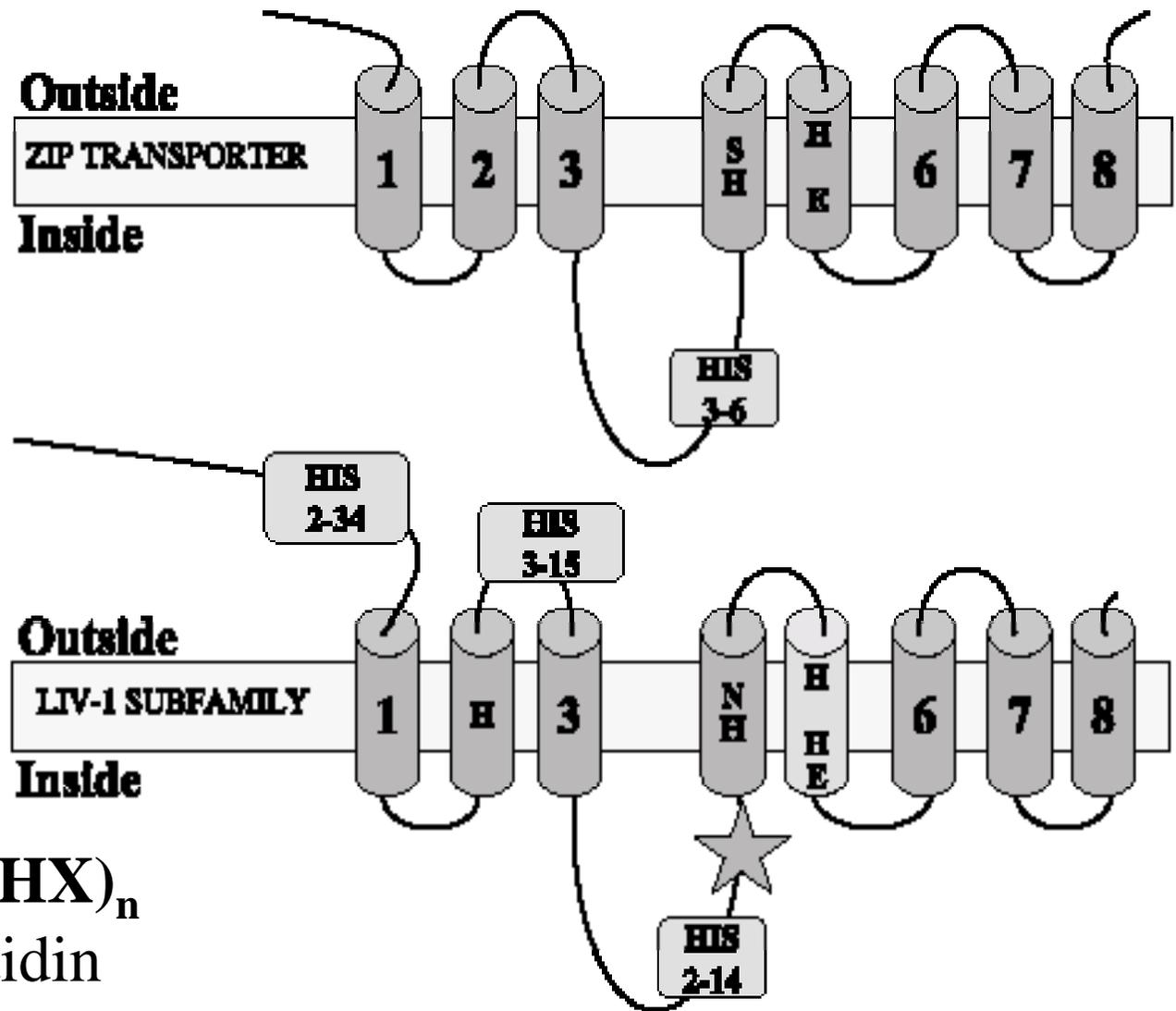
Die Sekundärstruktur und Funktion dieser Moleküle ist sehr ähnlich:

- **Integrale Membranproteine** mit 6 bis 8 transmembranalen Bereichen.
- **Histidin-reiche Bereiche** für die Zink-Bindung.
- **Porenstruktur** aus zumindest 2 transmembranalen Helices (weniger hydrophob als die anderen transmembranalen Helices).

Zwei Beispiele für die allgemeine Struktur von Zink-Transporter-Molekülen.

Zwischen TM 3 und 4 (transmembranal) liegt ein Histidinreicher Bereich (= Bindungsstelle) mit der allgemeinen Formel $(HX)_n$ mit $n = 3-6$ und H = Histidin und X = beliebige Aminosäure.

Porenregion möglicherweise zwischen TM 4 und 5 (Vorkommen von Glutamat und Histidin).



Taylor and Nicholson (2003)
Biochim. Biophys. Acta **1611**, 16-30

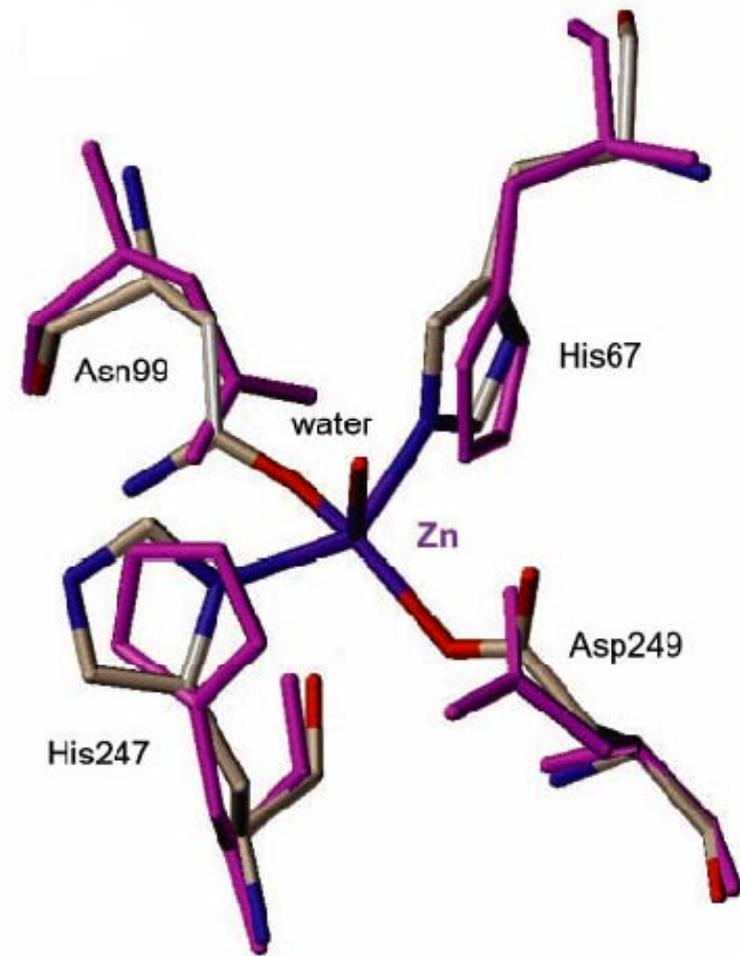
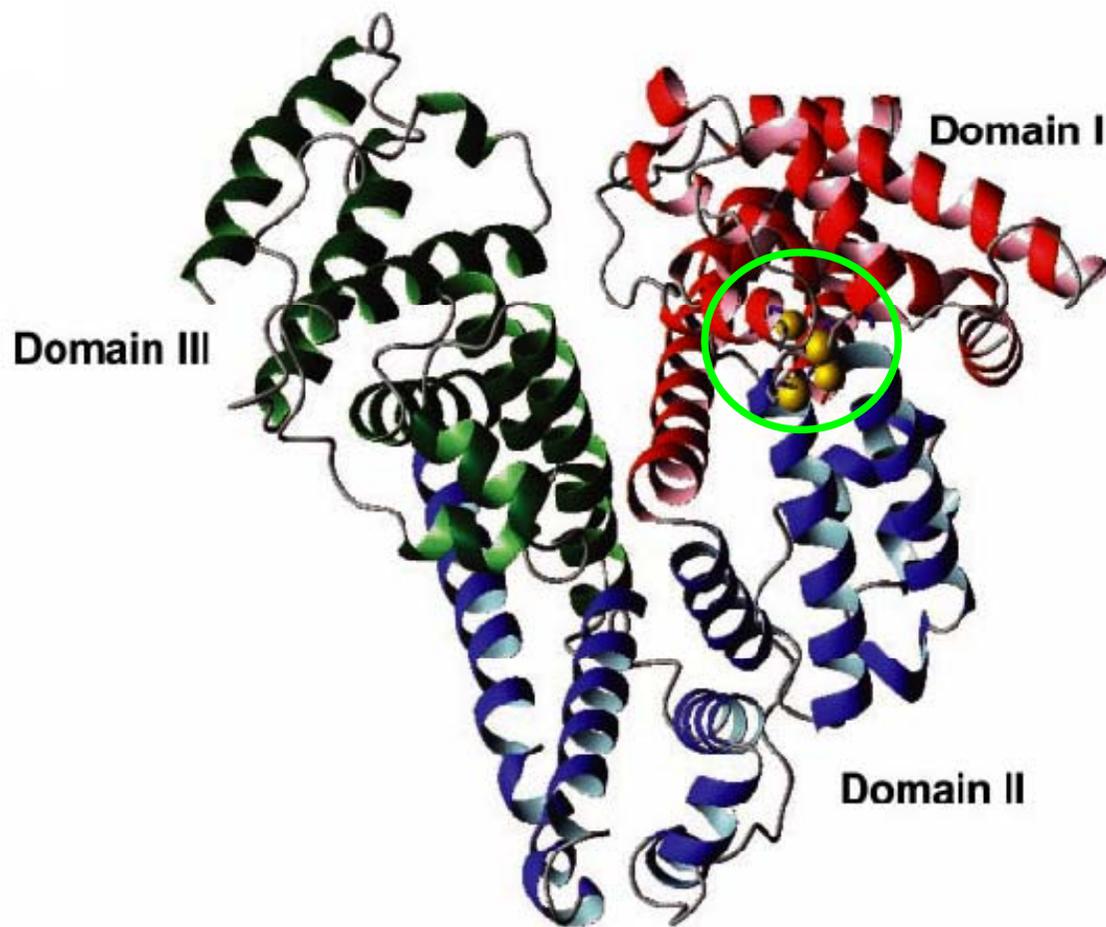
Im Blutplasma wird Zn^{2+} mittels **Albumin** bzw. **Metallothioneinen** transportiert. Die Konzentration des Zn^{2+} im Blutplasma ist etwa $19 \mu\text{M}$.

Humanes **Albumin** ist ein aus einer Polypeptidkette (585 As; 66,5 kDa) bestehendes Protein. Es ist das häufigste Protein des Blutplasmas (etwa 0,6 mmol/L). Der α -Helix-Anteil dominiert (67%). Albumin hat 3 Domänen: I, II und III. Funktion: Bindung & Transport von Fettsäuren, Porphyrinen und Spurenelementen im Plasma.

Serumalbumin hat mehrere Bindungsstellen für Spurenelemente.

Am besten sind die Bindungsstellen für Cu^{2+} und Ni^{2+} beschrieben (quadratisch planare Umgebung aus 4 N-Atomen von Asp1, Ala2, His3 und dem N-Terminus).

Die Zn^{2+} bzw. Cd^{2+} -Bindungsstelle liegt zwischen der Domäne I und II.



Humanes Serumalbumin mit seiner 3-Domänenstruktur

Stewart et al. (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **100**, 3701-3706

Zn²⁺-Bindungsstelle im humanen Albumin: N-Liganden vom His67 und His247 und O-Liganden von Asn99 und Asp249 [wie in Endonucleotidasen oder Phosphatasen (overlay)] und H₂O.

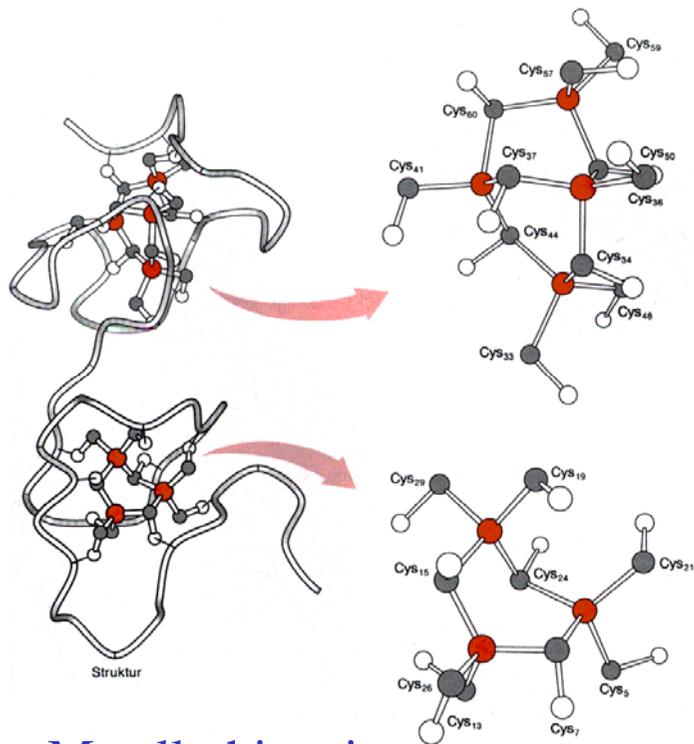
Ein weiteres **Transport- und Speichersystem** für Zink (wie auch für Kupfer) sind die sog. **Metallothionein-Proteine** (kleine, extrem Cystein-reiche Proteine). Sie haben eine Präferenz für zweiwertige Kationen mit der bevorzugten Koordinationszahl 4.

Metallothioneine sind multifunktionell. Folgende Funktionen werden ihnen zugeschrieben:

- 1. Speicher-Funktion** für die essentiellen Thiolat-affinen Metalle Zink und Kupfer. Die ubiquitären **Metallothioneine** dienen der Homöostase und dem **Transport** Thiolat-affiner Metallionen.
- 2. Entgiftungsfunktion:** Besonders effizient wird das Zink-Homologe Cd^{2+} gebunden. Auch andere Thiolat-liebende Schwermetall-Ionen wie Cu(I) , Ag(I) , Hg(II) werden gebunden (Entgiftungsrolle nicht unumstritten).
- 3. Radikalfänger:** Aufgrund ihres hohen Cystein-Gehalts dienen Metallothioneine als Radikalfänger (z.B. für Hydroxyl-Radikale, $\text{OH}\cdot$).

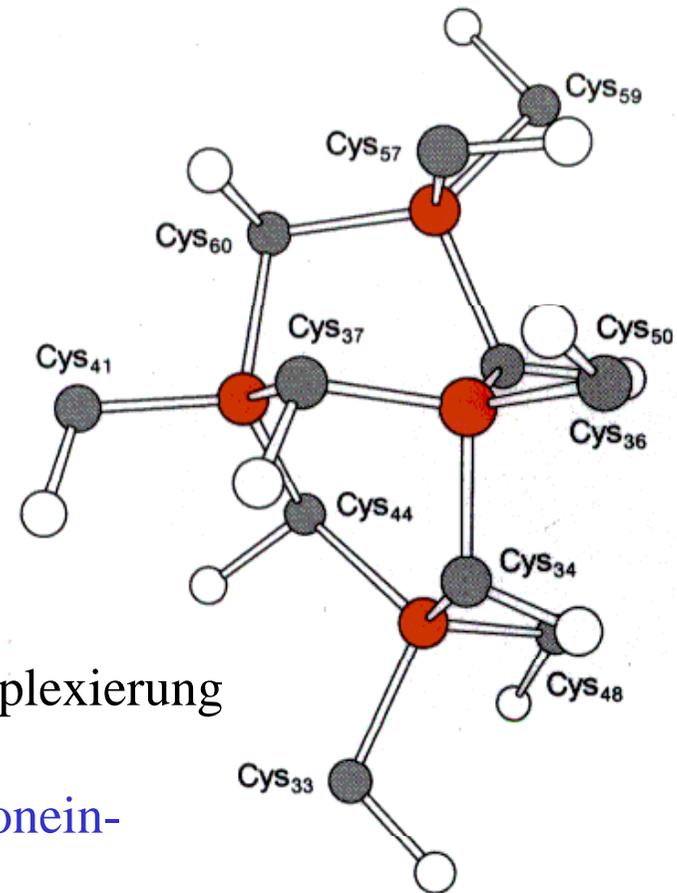
Aminosäuresequenz eines Metallothionein-Proteins:

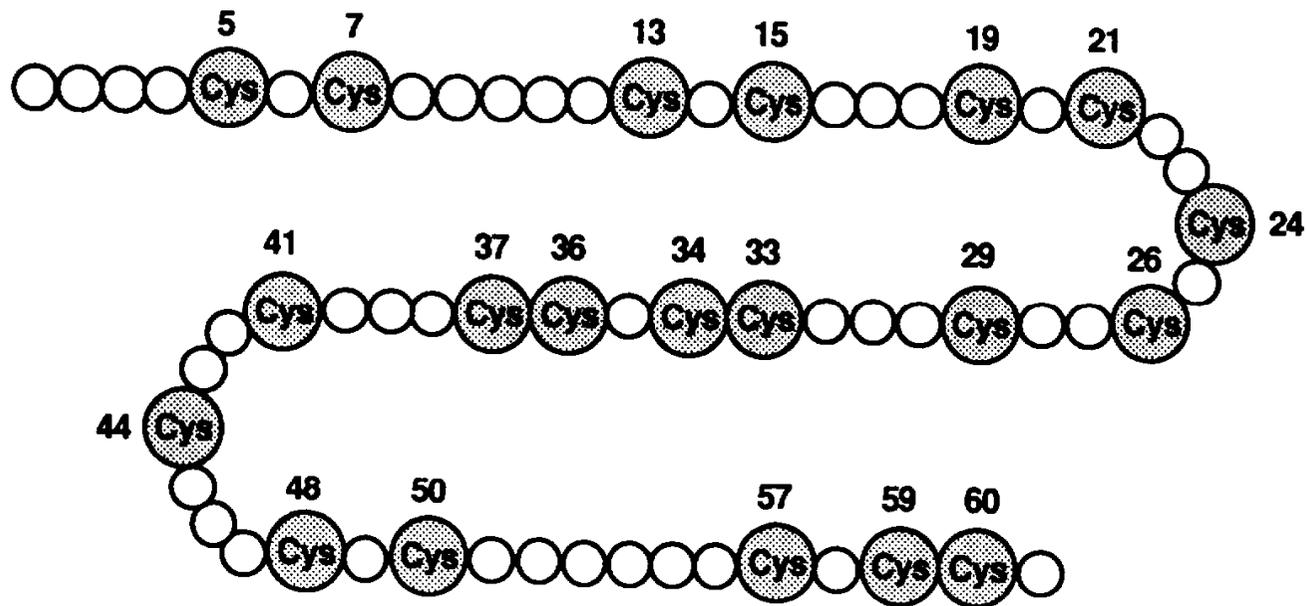
CH₃CONH-Met Asp Pro Asn **Cys** Ser **Cys** Ala Thr Asp Gly Ser
Cys Ala Gly Ser **Cys** Lys **Cys** Lys Gln **Cys** Lys **Cys** Thr Ser **Cys**
Lys Lys Ser **Cys** **Cys** Ser **Cys** **Cys** Pro Val Gly **Cys** Ala Lys Ser
Gln Gly **Cys** Ile **Cys** Lys Glu Ala Ser Asp Lys **Cys** Ser **Cys** **Cys**
Ala-COO-



Metallothionein
mit 2 Domänen

Metallkomplexierung
in einem
Metallothionein-
Protein





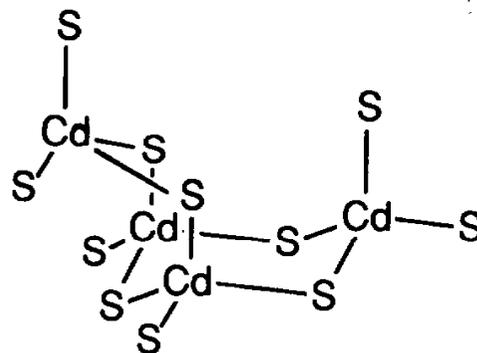
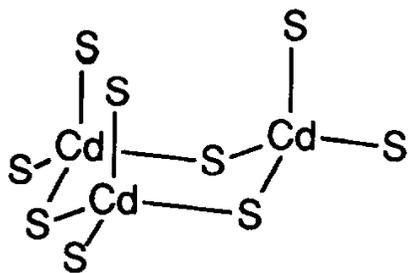
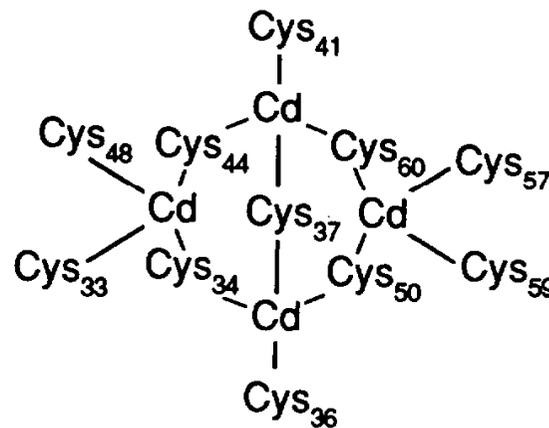
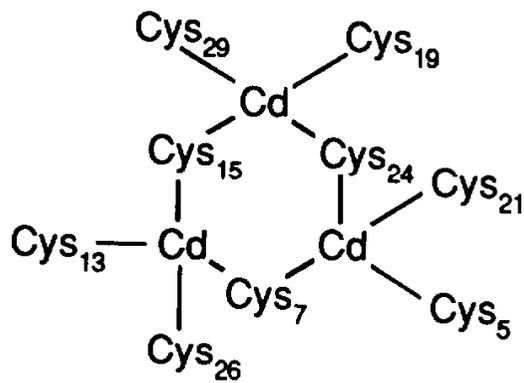
Bindung des Zn^{2+} -
Homologen Cd^{2+} in
einem humanen
Metallothionein.
Mehrere Cluster sind
beschrieben:

Beispiele:

[3Cd-3S]-Sessel

[4Cd-5S]-Cluster

Reich an
Metallothioneinen
sind Leber und Niere,
Dünndarm,
Bauspeicheldrüse und
Hoden



Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Bioanorganische Chemie des Zinks

Periodic Table

Electron Configuration

Plot Data

Element Data

Zink

	1 1A																		18 8A
1	1 H	2 2A												13 3A	14 4A	15 5A	16 6A	17 7A	2 He
2	3 Li	4 Be												5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg	3 3B	4 4B	5 5B	6 6B	7 7B	8 -----	9 8B	10 -----	11 1B	12 2B	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
6	55 Cs	56 Ba	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn	
7	87 Fr	88 Ra	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub		114 Uuq		116 Uuh		118 Uuo	
			6	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb		
			7	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No		

Element Data

Zinc, Zn

Atomic number (Z)

30

Electronegativity (Pauling)

1.65

Ionic radius

83 (2+) pm

Molar Mass

65.37 g/mol

Electron configuration

[Ar]3d¹⁰4s²

Ionization energy

(1) 906 kJ/mol

Atomic Radius

137 pm

Stable isotopes

⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁶⁷Zn, ⁶⁸Zn, ⁷⁰Zn

(2) 1733 kJ/mol

(3) 3833 kJ/mol

Normal state

solid / metal

Melting point

420 °C

Density

7.14 g/cm³

Enthalpy of fusion

6.67 kJ/mol

Boiling point

907 °C

Molar heat capacity

25.4 J K⁻¹ mol⁻¹

Enthalpy of vaporization

115.3 kJ/mol

Standard molar entropy

41.6 J K⁻¹ mol⁻¹

				18
				8A
	14	15	16	17
	4A	5A	6A	7A
	2			2
	C	N	O	F
	10			10
	Ne			Ne
	14	15	16	17
	Si	P	S	Cl
	18			18
	Ar			Ar
	32	33	34	35
	Ge	As	Se	Br
	36			36
	Kr			Kr
	50	51	52	53
	Sn	Sb	Te	I
	54			54
	Xe			Xe
	82	83	84	85
	Pb	Bi	Po	At
	86			86
	Rn			Rn
	114		116	
	Uuq		Uuh	
	118			118
	Uuo			Uuo
66	67	68	69	70
Dy	Ho	Er	Tm	Yb
98	99	100	101	102
Cf	Es	Fm	Md	No

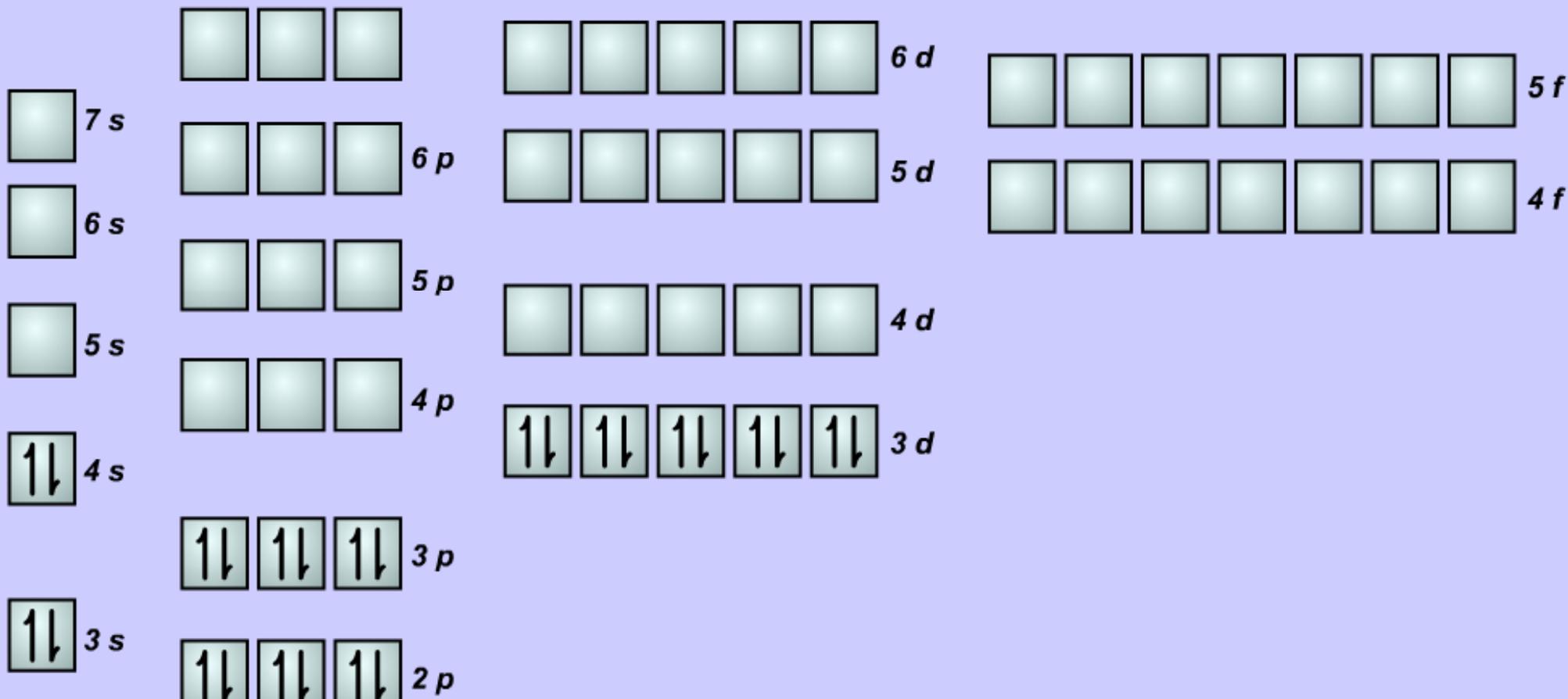
Kleines Ion mit hoher effektiver Ladung!

Periodic Table

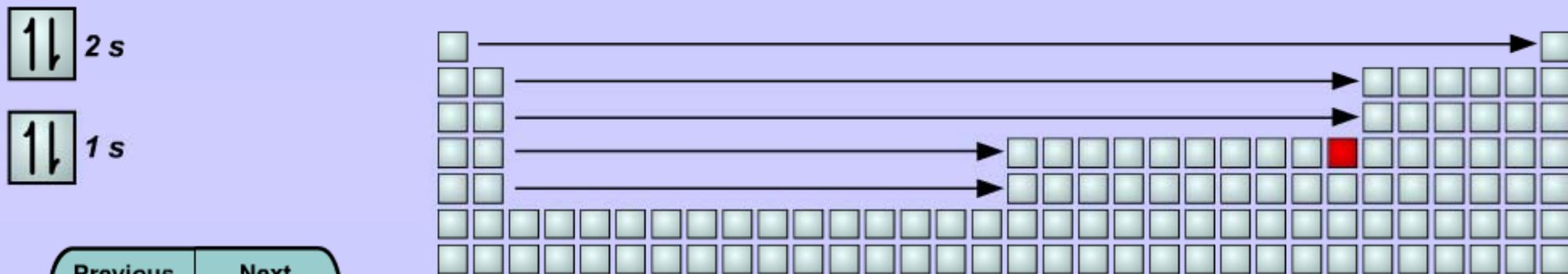
Electron Configuration

Plot Data

Element Data



Zinc, Zn



Previous Next

Vom reaktionschemischen Standpunkt aus besteht die wesentliche biologisch wirksame Funktion des Zinks in seiner **Lewis-Acidität**.

Es kommt unter physiologischen Verhältnissen nur zweifach ionisiert vor (Zn^{2+}).

Elektronenkonfiguration von Zn^{2+} : $[\text{Ar}]3d^{10}$

Abgeschlossene *d*-Schale: Komplexe immer diamagnetisch und farblos.

Durch seine hohe Lewis-Acidität (Lewis-Säure ist Elektronenmangelverbindung!) hat Zink die Fähigkeit Substrate zu polarisieren:



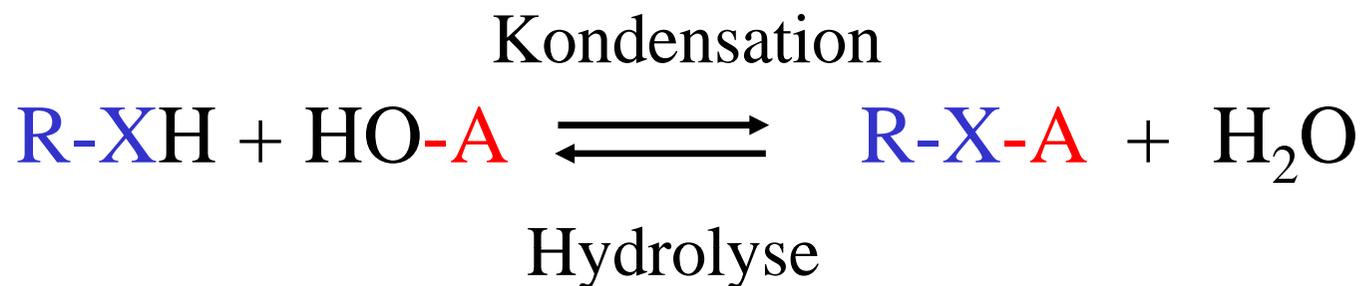
Hydrolyseprozesse und Kondensationsprozesse werden chemisch-synthetisch oft durch starke Säuren oder Basen katalysiert.

Entsprechende Verhältnisse sind in biologischen Systemen allerdings nur sehr selten verwirklicht (Ausnahme z.B. Magenflüssigkeit). Die

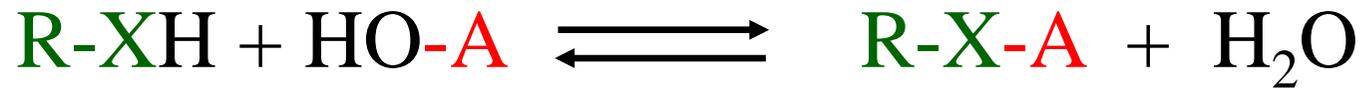
Natur bedient sich des **Zink-Ions** als **elektrophilen Polarisator**.

Zink fungiert als Lewis-saures Metallion mit hoher effektiver Ladung (kleiner Radius).

Zinkproteine erlauben die Polarisation von Substraten (inkl. Wasser, H₂O) bei physiologischen Kondensationsreaktionen (z.B. RNA-Polymerisation) oder Hydrolyseprozessen (Spaltung von Estern oder Peptiden):



Kondensation



Hydrolyse



Peptidasen, Lactamasen,
Kollagenasen, Dehydratasen



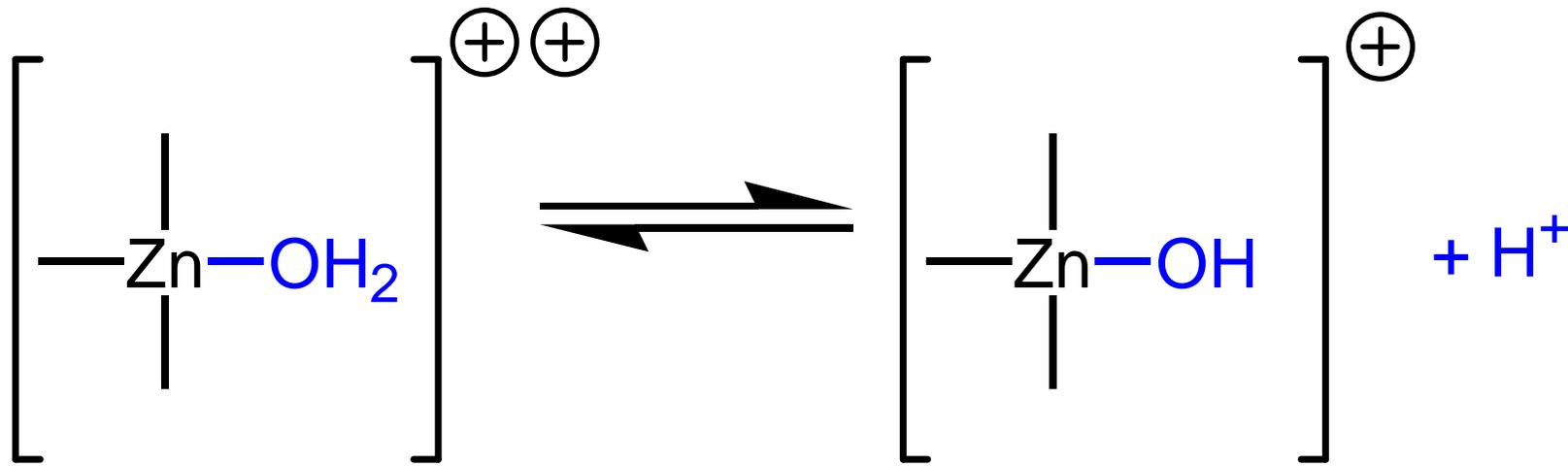
Esterasen



Phosphatasen, Nucleasen

Daneben kann Zink auch mit Hilfe des Wassers zu einer Lewis-Base werden: $[\text{Zn-OH}]^+$

Die Grundlage hierfür ist die bei jeder Metallhydroxid-Fällung vorausgehende Deprotonierung des Aquokomplexes.



Deprotonierung des Aquokomplexes (Aktivierung von Wasser!) macht aus Zink eine Lewis-Base. Der pK_s -Wert für $[\text{Zn}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ beträgt in wässrigen Medien etwa 10, kann sich für enzymatische Systeme aber bis auf etwa 7 verringern!

Während Zn^{2+} als Lewis-Säure nucleophile Zentren angreifen kann, greift $[-\text{Zn}-\text{OH}]^+$ als Lewis-Base elektrophile Zentren an!

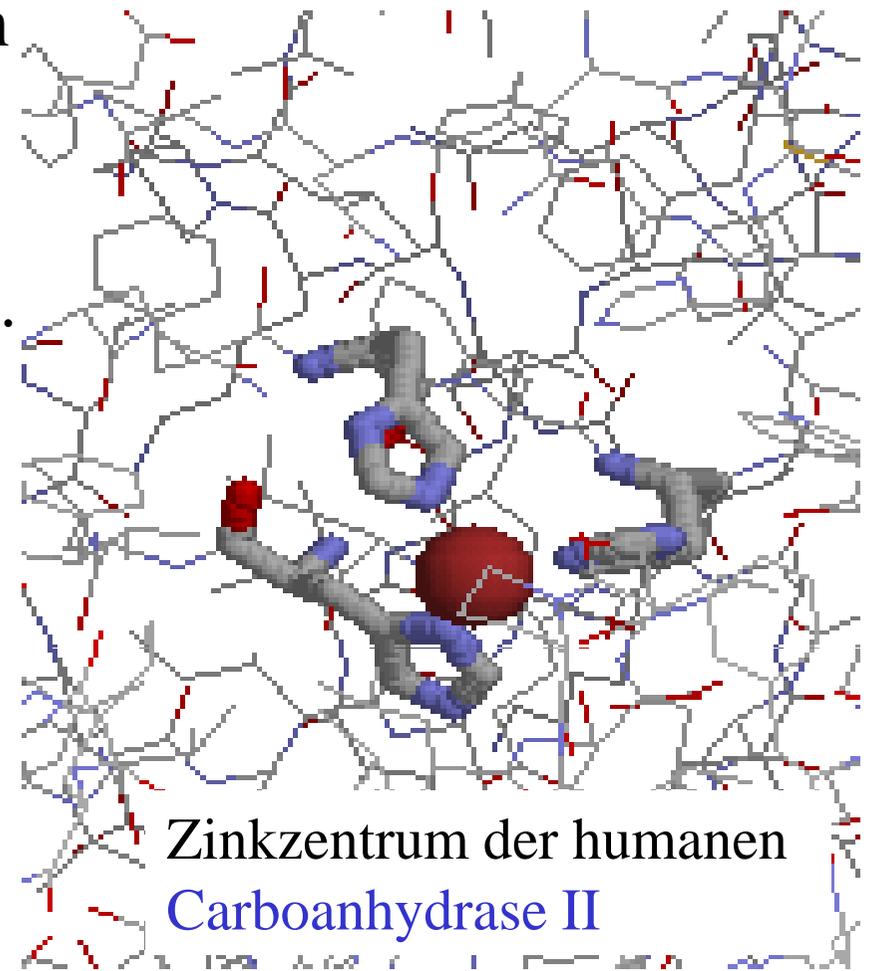
In den Zink-Proteinen ist Zn^{2+} oft durch **Histidine** kinetisch fest gebunden (kein rascher Austausch). Daneben **Cysteinat** oder **Glutamat** als Liganden.

Zn^{2+} ist **nicht redoxaktiv**, ist daher nicht an Elektronentransferprozessen beteiligt.

Es bevorzugt aufgrund der d^{10} -Konfiguration (keine Ligandeneffekte) und seiner Stellung im

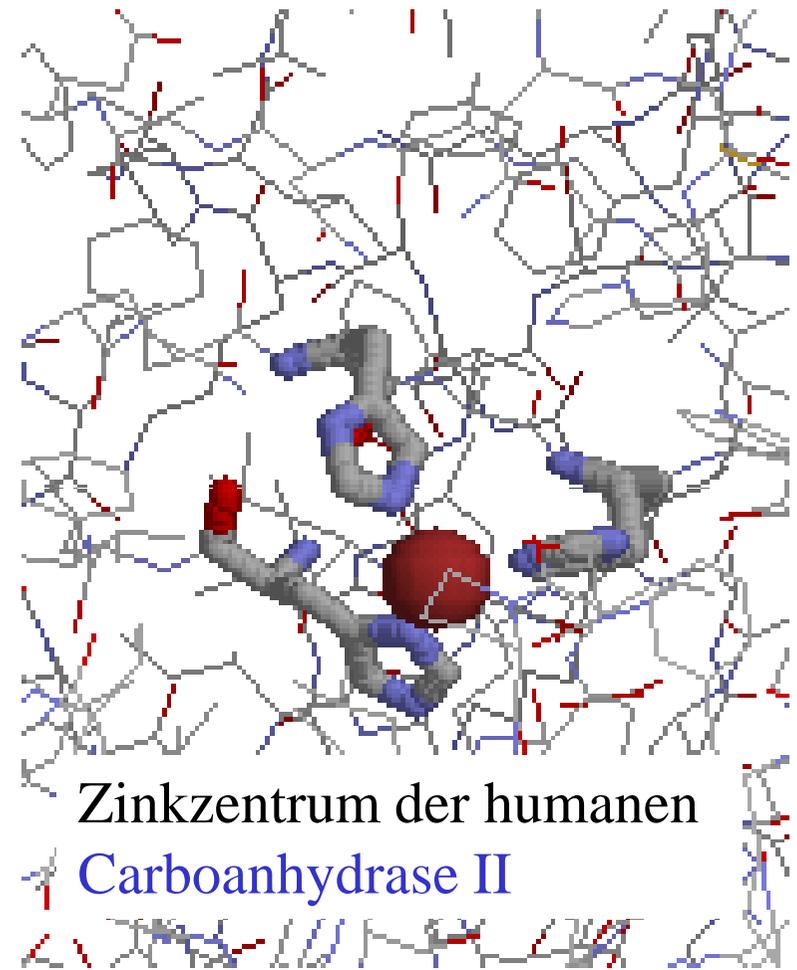
Periodensystem eher **niedrige Koordinationszahlen**.

Das Apoenzym beeinflusst die Koordinationsgeometrie oft stark und es können auch größere Substrate an das Metall koordinieren, sodass eine **verzerrte**, dem Übergangszustand der Reaktion ähnelnde **Geometrie** typisch ist (entatischer Zustand).



Das **Tetraeder** (Koordinationszahl 4) ist die häufigste Geometrie, daneben noch **trigonale Bipyramide** (5) und **Oktaeder** (6). Die eine oktaedrische Konfiguration begünstigende Ligandenfeldstabilisierung spielt aber bei gefüllter *d*-Schale keine Rolle (ebenso nicht bei leerer *d*-Schale, z.B. Mg^{2+} , oder bei halbgefüllter *d*-Schale, z.B. Mn^{2+}).

Das Zentral-Ion in **Zink-Enzymen** ist bezüglich der Koordinationszahl typischerweise **ungesättigt**. Im Gegensatz zur kinetisch festen Bindung des Metalls an das Proteingerüst erfordert die Wasser-Aktivierung (\rightarrow Hydrolysefunktion) eine labile Bindung dieses Teilchens im Verlauf der Katalyse. Zn^{2+} gehört zu den Metall-Ionen mit sehr **raschem H_2O -Ligandenaustausch**.



Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Bioanorganische Chemie des Zinks

Carboanhydrase

Carboanhydrase (Lyase: EC 4.2.1.1)

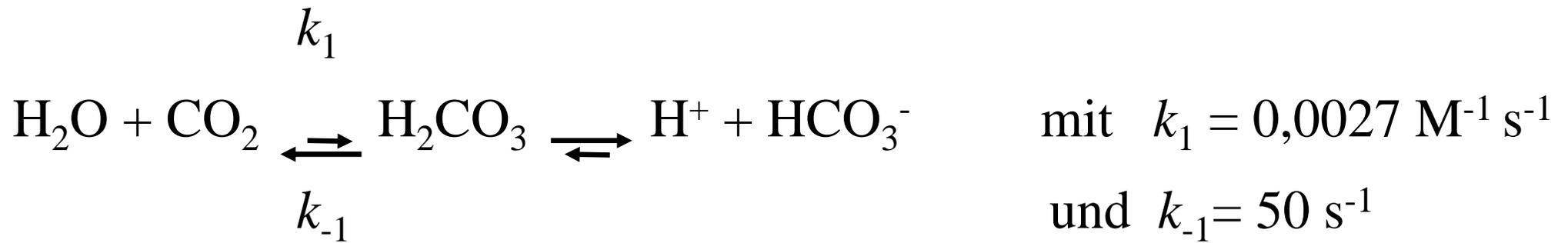
CO₂ ist eines der hauptsächlichen Endprodukte im aeroben Metabolismus. Bei komplexen Organismen wird CO₂ ins Blut freigesetzt und zum Ausatmen zu den Lungen transportiert.

Im Blut ist Kohlendioxid teilweise physikalisch gelöst.

Reagiert es mit Wasser ist das Produkt dieser Reaktion Kohlensäure, eine mittelstarke Säure ($pK_s = 3,5$), die durch Dissoziation eines Protons zu einem Hydrogencarbonat-Ion wird.

Die Hydrolyse von CO₂ ist ein pH-abhängiger Prozess, der selbst ohne Katalysator abläuft. Bei 37°C und pH 7,0 ist die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung jedoch nur

$$k_1 = 0,0027 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$



Mit $[\text{H}_2\text{O}] = 55,5 \text{ M}$ entspricht dies einer effektiven Geschwindigkeitskonstante von $0,15 \text{ s}^{-1}$ [aus $(0,0027 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}) \times 55,5 \text{ M}$]

Die Rückreaktion (Dehydratisierung von Hydrogencarbonat) läuft relativ schnell ab ($k_{-1} = 50 \text{ s}^{-1}$).

$$K_1 = k_1/k_{-1} = 0,0027 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}/50 \text{ s}^{-1} = \mathbf{5,4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}}$$

Dies entspricht einem Verhältnis von $[\text{CO}_2]$ zu $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ von 340:1!

Die Reaktion zwischen H_2O und CO_2 erfolgt also selbst ohne Katalysator, jedoch nur mit effektiven Geschwindigkeitskonstante von $0,15 \text{ s}^{-1}$.

Allerdings ist die Hydratisierung von CO_2 oder die Dehydratisierung von Hydrogencarbonat oft mit schnellen Prozessen gekoppelt und muss daher signifikant erhöht werden:

Carboanhydrasen (EC 4.2.1.1; engl. *carbonic anhydrase*; Lyase). Sie sind perfekt evolvierte Enzyme ($k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$). 1932 als erstes Zn-protein entdeckt! Neben **Hämoglobin** häufigstes Protein der Erythrocyten. Man findet Carboanhydrasen im Zusammenhang mit

Enzymreaktionen: HCO_3^- als Substrate!

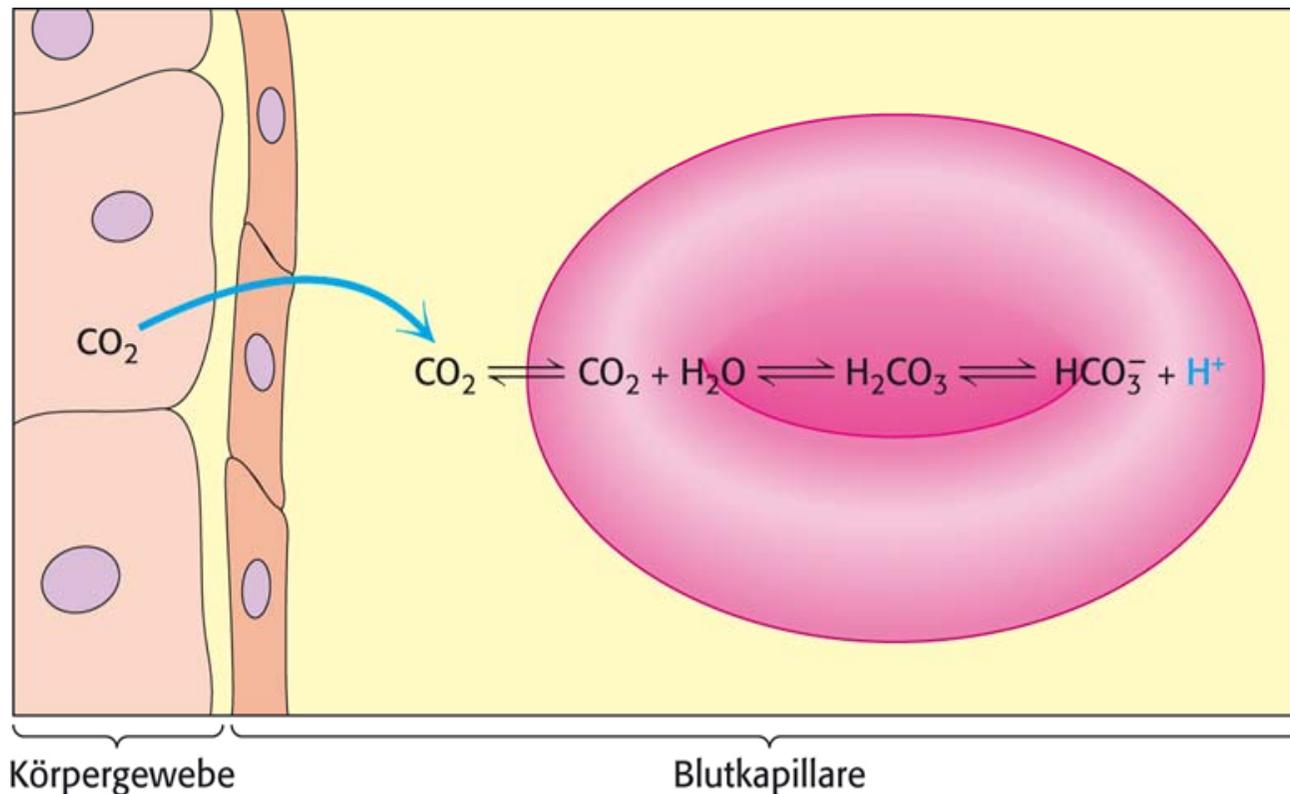
Photosynthese: Calvin-Cyclus (Dunkelreaktion)

Citratzyklus, oxidativer Pentosephosphatweg: oxidative Decarboxylierung

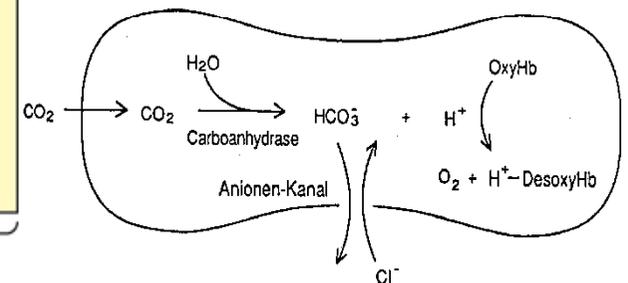
Calcifizierung bzw. Decalcifizierung: Auf- und Abbau von carbonathaltigen Skeletten

pH-Pufferung

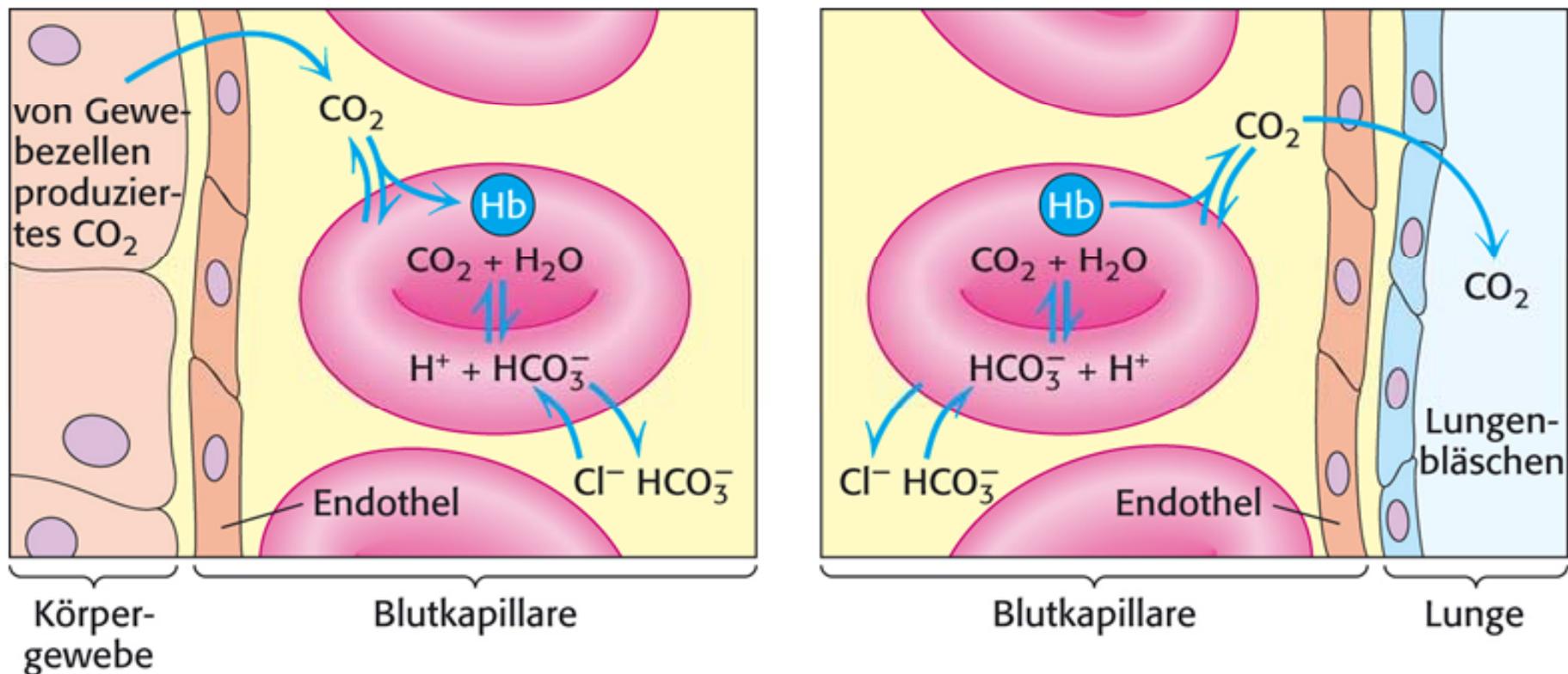
Im aeroben Stoffwechsel entstehen pro verbrauchtem Sauerstoffmolekül etwa 0,8 Moleküle CO_2 . In den Geweben enthaltenes (neutrales) Kohlendioxid diffundiert durch die Membranen in die Erythrocyten. Dabei sind Membrantransporter beteiligt. In den roten Blutkörperchen wird CO_2 durch die **Carboanhydrase** mit Wasser in Kohlensäure umgewandelt, die in Hydrogencarbonat HCO_3^- und H^+ dissoziiert.



Siehe auch
Einheit über
Spurenelement
Eisen und
Hämoglobin
(Bohreffekt)



Erythrocyten transportieren nun Kohlendioxid in Form von Hydrogencarbonat zur Lunge. Ein Teil des HCO_3^- verlässt die Zelle mittels eines spezifischen Membrantransportproteins (Anionenkanal). Hierbei erfolgt der Austausch von HCO_3^- aus dem Zellinneren mit Cl^- von der anderen Seite der Membran. Dadurch erhöht sich die Konzentration von HCO_3^- im Serum. In der Lunge erfolgt die Umkehr des Prozesses. Hydrogencarbonat wird wieder in CO_2 umgewandelt, das ausgeatmet wird.



Die biologische Bedeutung der Carboanhydrase ist der Hauptgrund, warum Zn^{2+} ein limitierendes Element für das Wachstum von Phytoplankton darstellt. Eine bedeutende Rolle spielt die Carboanhydrase auch im Recycling von anthropogen bedingtem CO_2 -Eintrag in die Atmosphäre!

Im menschlichen Organismus existieren mindestens sieben strukturell sehr ähnliche, aber funktional unterschiedliche Varianten (Isoenzyme) der **Carboanhydrase** (sieben Gene).

Strukturell gut charakterisiert ist die menschliche Form **Carboanhydrase II** (PDB-Code 1CA2). Es handelt sich um ein mittelgroßes Metalloprotein ($40 \times 40 \times 55 \text{ \AA}$) aus 249 Aminosäuren (etwa 30 kDa).

Home Hide

News & Publications
Policies
FAQ
Contact
Feedback
About Us

Deposition Hide

All Deposit Services
Electron Microscopy
NMR
Validation Server
BioSync Beamline
Related Tools

Search Hide

Advanced Search
Latest Release
Latest Publications
Sequence Search
Ligand Search
Unreleased Entries
Browse Database
Histograms

Tools Hide

File Downloads
FTP Services
File Formats
Services: RESTful | SOAP
Widgets
Compare Structures

Education Hide

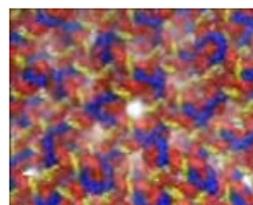
Looking at Structures
Molecule of the Month
Educational Resources

A Resource for Studying Biological Macromolecules

The PDB archive contains information about experimentally-determined structures of proteins, nucleic acids, and complex assemblies. As a member of the **wwPDB**, the RCSB PDB curates and annotates PDB data according to agreed upon standards.

The RCSB PDB also provides a variety of tools and resources. Users can perform simple and advanced searches based on annotations relating to sequence, structure and function. These molecules are visualized, downloaded, and analyzed by users who range from students to specialized scientists.

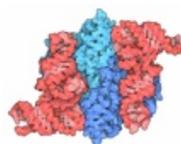
Molecule of the Month: Designed DNA Crystal



DNA is a perfect raw material for constructing nanoscale structures. Since base-pairing has been selected by evolution to be highly specific, it is easy to design sequences that will link up with their proper mates. In this way, we can treat small pieces of DNA like Tinkertoys, designing individual components and then allowing them to assemble when we put them together. In addition, the chemistry of DNA synthesis has been completely automated, so custom pieces of DNA can be easily constructed, or even ordered from commercial biotech companies. This puts DNA nanotechnology in the hands of any modest laboratory, and many laboratories have taken advantage of this, creating nanoscale scaffolds, tweezers, polyhedra, computers, and even tiny illustrations composed entirely of DNA.

■ [Read more ...](#) ■ [Previous Features](#)

PSI Featured Molecule: Pseudouridine Synthase TruA



Pseudouridine synthase TruA has a taste for flexible tRNA molecules, flipping their uracil bases and making them more rigid. In a series of three structures, researchers at the PSI CSMP have revealed several steps in the process.

■ [Read more from the Structural Genomics Knowledgebase](#) ■ [Previous Features](#)

New user? Try the browser [compatibility check](#) and information on [Getting Started](#).

<http://www.rcsb.org/pdb/>

News

- [Complete News](#)
- [Newsletter](#)
- [Discussion Forum](#)
- [Job Listings](#)

17-November-2009

New Website Features

The latest website release includes enhancements to browsing query results, generating tabular reports, viewing large structures, and more. See the [WHAT'S NEW](#) page for detailed descriptions. [More >>](#)

17-November-2009

Newsletter Published

The fall 2009 issue ([HTML](#) | [PDF](#)) includes recent news, a report on how the CSD is used to teach chemistry, and an interview with Roland Dunbrack, Jr. about his research in computational structural biology and the related software offered by his laboratory. [More >>](#)

FTP Archive

The up-to-date PDB archive is available at: <ftp://wwpdb.org>

Time-stamped yearly snapshots are available at: <ftp://snapshots.wwpdb.org>

3KBB



Crystal structure of putative beta-phosphoglucomutase from *Thermotoga maritima*

Characteristics Release Date: 17-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION
 Resolution: 1.74 Å
Classification **Hydrolase**
Compound **Molecule:** Phosphorylated carbohydrates phosphatase TM_1254
Polymer: 1 **Type:** polypeptide(L) **Length:** 216
Chains: A
EC#: 3.1.3.-^{EC}
Authors Strange, R.W., Antonyuk, S.V., Ellis, M.J., Bessho, Y., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Hasnain, S.S., RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI)



2WCV



CRYSTAL STRUCTURE OF BACTERIAL FUCU

Characteristics Release Date: 10-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION
 Resolution: 1.90 Å
Classification **Isomerase**
Compound **Molecule:** L-FUCOSE MUTAROTASE
Polymer: 1 **Type:** polypeptide(L) **Length:** 140
Chains: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J
Authors Lee, K.-H., Kim, M.-S., Suh, H.-Y., Ku, B., Song, Y.-L., Oh, B.-H.



2WEG



THERMODYNAMIC OPTIMISATION OF CARBONIC ANHYDRASE FRAGMENT INHIBITORS

Characteristics Release Date: 10-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION
 Resolution: 1.10 Å
Classification **Lyase**
Compound **Molecule:** CARBONIC ANHYDRASE 2
Polymer: 1 **Type:** polypeptide(L)
Chains: A
EC#: 4.2.1.1^{EC}
Fragment: RESIDUES 2-260
Authors Scott, A.D., Phillips, C., Alex, A., Bent, A., O'Brien, R., Damia



2WEH



THERMODYNAMIC OPTIMISATION OF CARBONIC ANHYDRASE FRAGMENT INHIBITORS

Characteristics Release Date: 10-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION
 Resolution: 2.09 Å
Classification **Lyase**
Compound **Molecule:** CARBONIC ANHYDRASE 2
Polymer: 1 **Type:** polypeptide(L) **Length:** 259
Chains: A
EC#: 4.2.1.1^{EC}
Fragment: RESIDUES 2-260
Authors Scott, A.D., Phillips, C., Alex, A., Bent, A., O'Brien, R., Damian, L., Jones, L.H.

Humane
 Carboanhydrase
 Code: 1CA2

REFINED STRUCTURE OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE II AT 2.0 ANGSTROMS RESOLUTION

DOI:10.2210/pdb1ca2/pdb

1CA2

- Display Files ▾
- Download Files ▾
- Print this Page
- Share this Page

Primary Citation

Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 A resolution.

Eriksson, A.E., Jones, T.A., Liljas, A.
(1988) *Proteins* **4**: 274-282

PubMed: 3151019

DOI: 10.1002/prot.340040406

[Search Related Articles in PubMed](#)

PubMed Abstract:

The structure of human erythrocytic carbonic anhydrase II has been refined by constrained and restrained structure-factor least-squares refinement at 2.0 A resolution. The conventional crystallographic R value is 17.3%. Of 167 solvent molecules associated with the protein, four are buried ...

[\[Read More & Search PubMed Abstracts \]](#)

Related Citations in PDB Entry (REMARK 1)

Hide

Crystallographic Studies of Inhibitor Binding Sites in Human Carbonic Anhydrase II. A Pentacoordinated Binding of the Scn-Ion to the Zinc at High Ph
Eriksson, A.E., Kylsten, P.M., Jones, T.A., Liljas, A.
(1988) *Proteins* **4**: 283

Structural Relationship of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isozymes B and C
Notstrand, B., Vaara, I., Kannan, K.K.
(1975) *Isozymes-Molecular Structure* **1**: 575

Crystal Structure of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase C. Vi. The Three-Dimensional Structure at High Resolution in Relation to Other Mammalian Carbonic Anhydrases
Kannan, K.K., Liljas, A., Waara, I., Bergsten, P.-C., Lovgren, S., Strandberg, B., Bengtsson, U., Carlbom, U., Fridborg, K., Jarup, L., Petef, M.
(1972) *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* **36**: 221

Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase C
Liljas, A., Kannan, K.K., Bergsten, P.-C., Waara, I., Fridborg, K., Strandberg, B., Carlbom, U., Jarup, L., Lovgren, S., Petef, M.
(1972) *Nature New Biol.* **235**: 131

Molecular Description

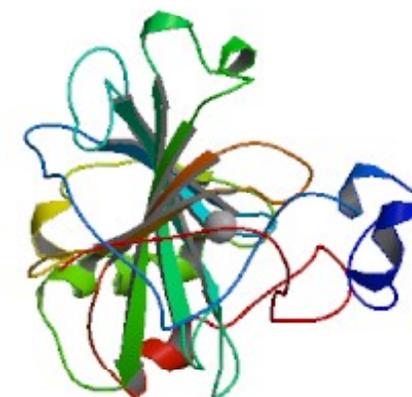
Classification: Lyase(oxo Acid)
Structure Weight: 29223.48

Molecule: CARBONIC ANHYDRASE II
Polypeptide: 1 Type: polypeptide(1)

Rasmol

Swiss-Pdb-Viewer

Biological Assembly



[More Images...](#)

[View in Jmol](#) SimpleViewer
[Other Viewers ▾](#) Protein Workshop

Biological assembly assigned by authors

Deposition Summary

Hide

Authors: Eriksson, A.E., Jones, T.A., Liljas, A.

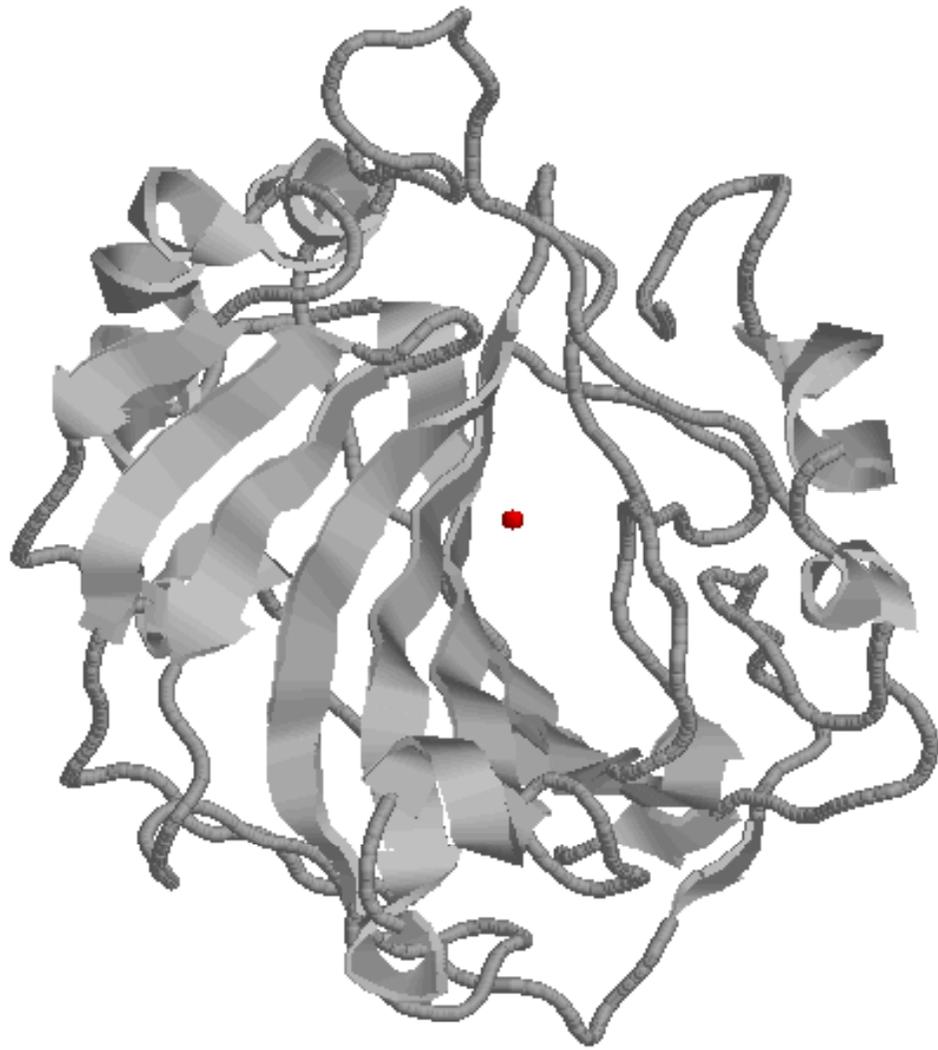
Deposition: 1989-02-06
Release: 1990-01-15
Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

Previous versions: 1CAC

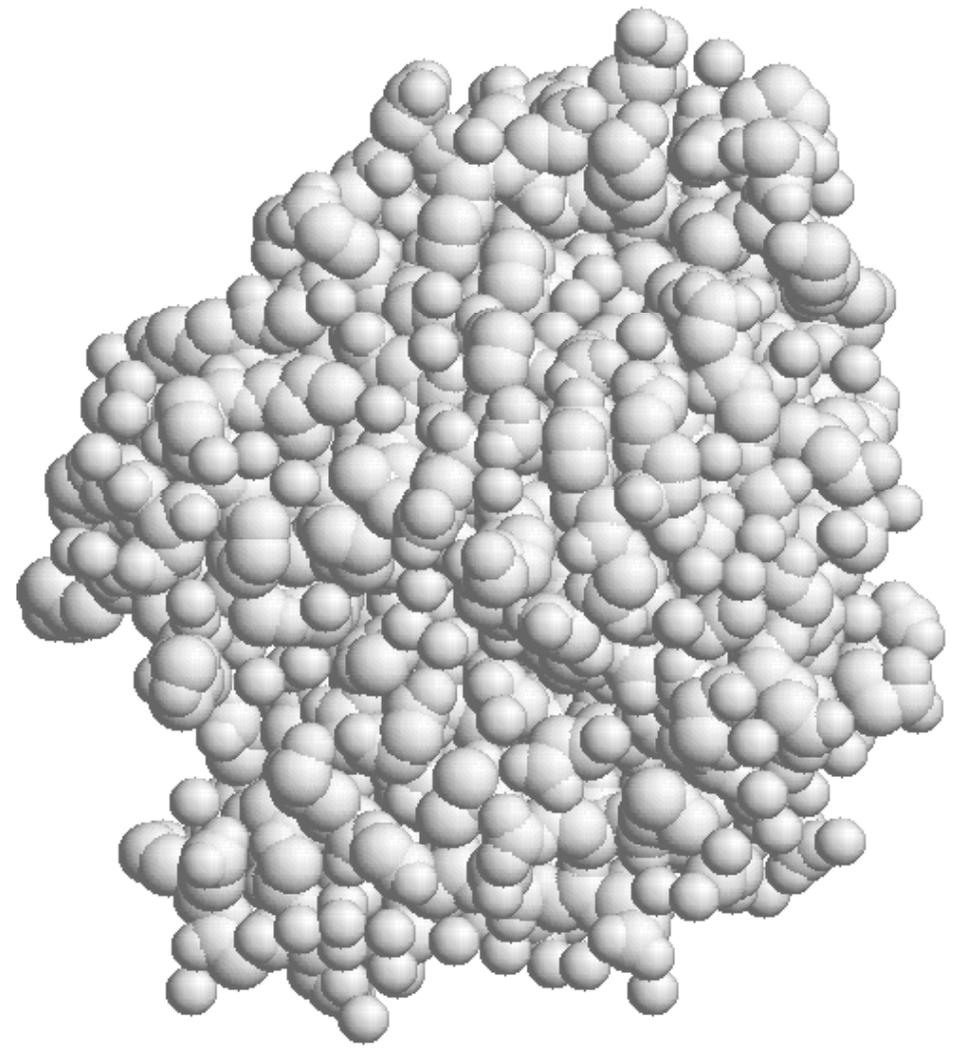
Experimental Details

Hide

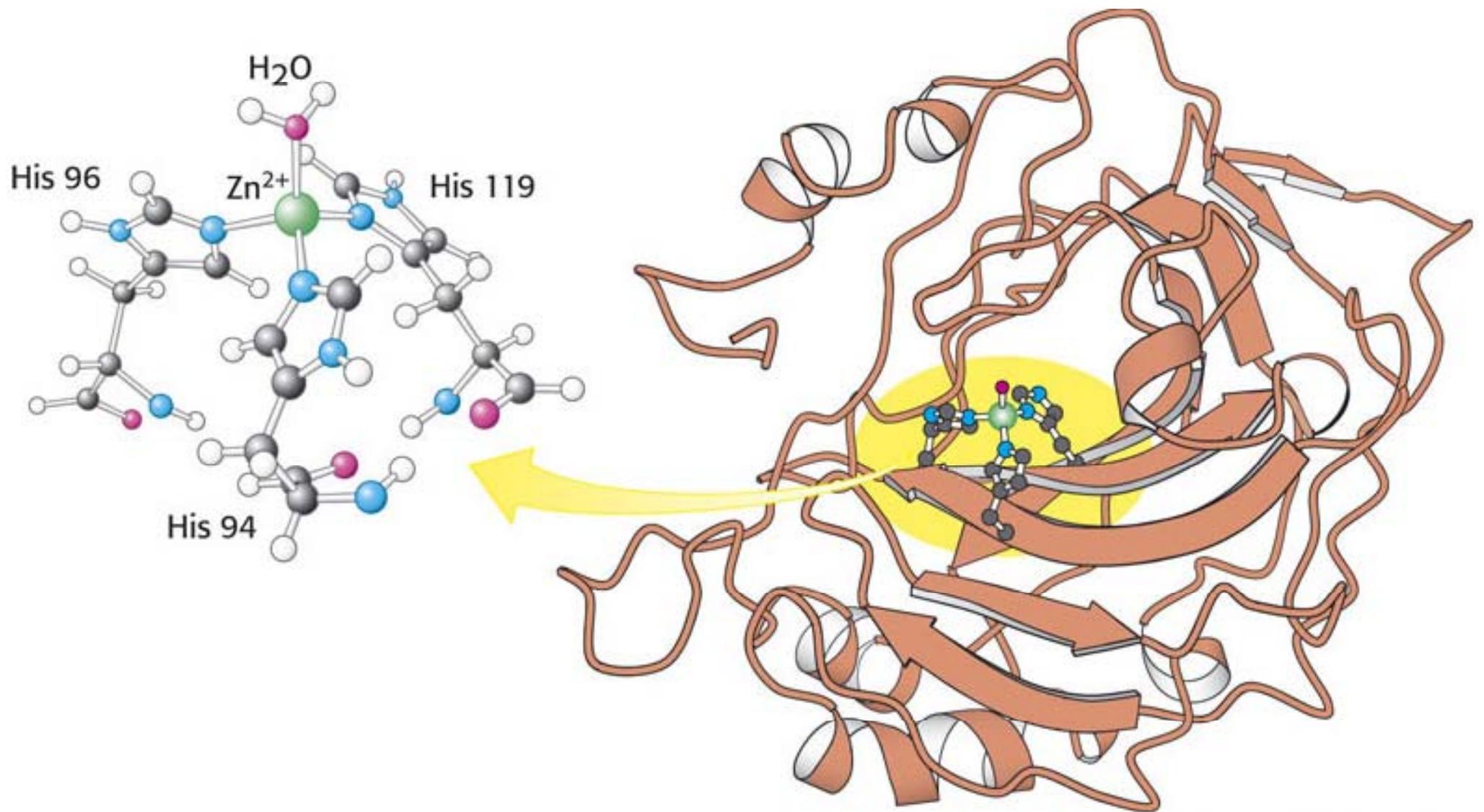
Method: X-RAY DIFFRACTION



30 kDa-Protein mit einem Zn^{2+} -Zentral-Ion. Die 503 Wassermoleküle (16 interne und 485 an der Außenseite) sind nicht dargestellt.



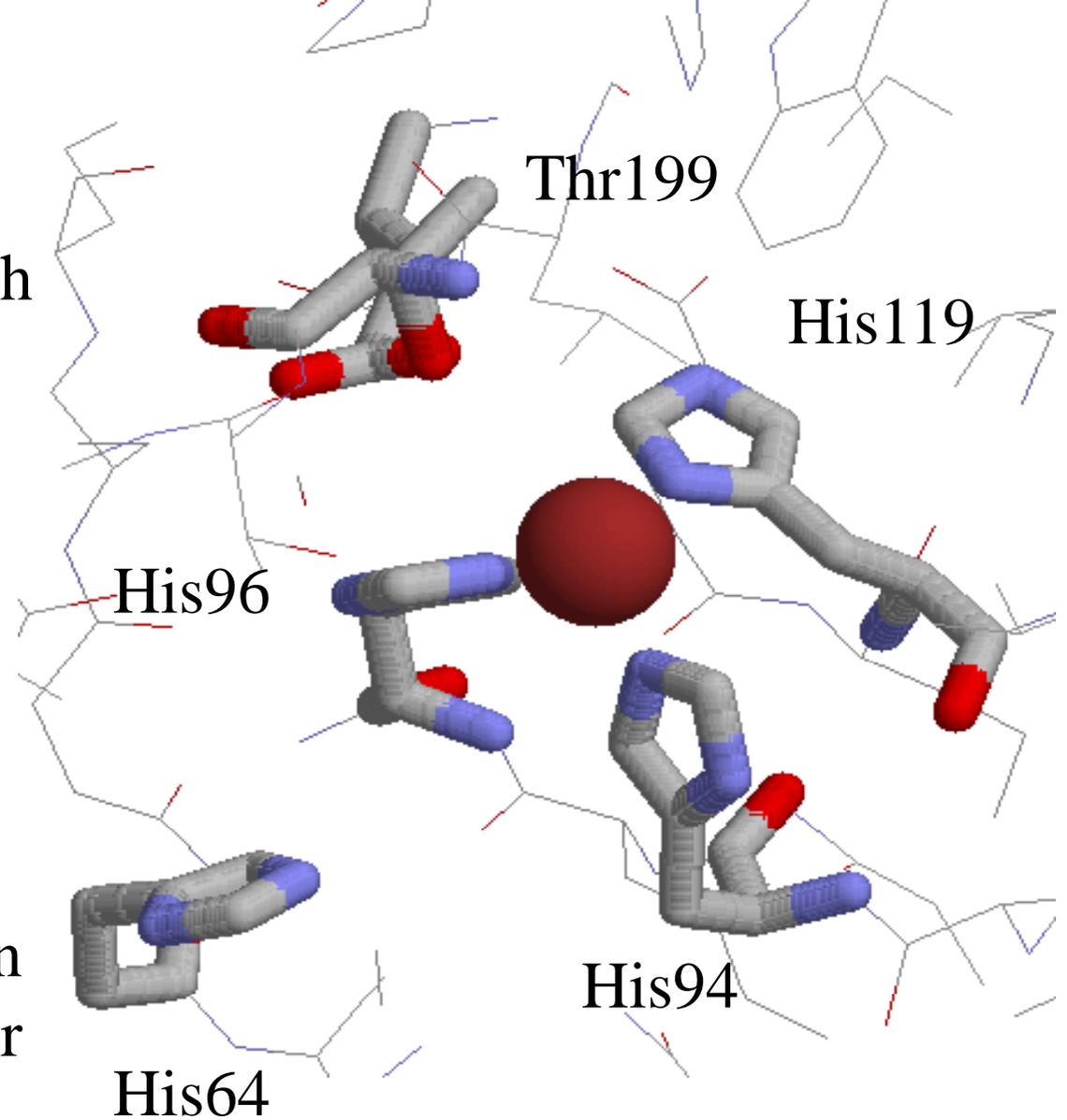
Das Zentral-Ion ist von außen nicht sichtbar. Es liegt in einem etwa 16 Å tiefen, in hydrophile und lipophile Bereiche gegliederten konischen Hohlraum.



Humane Carboanhydrase II

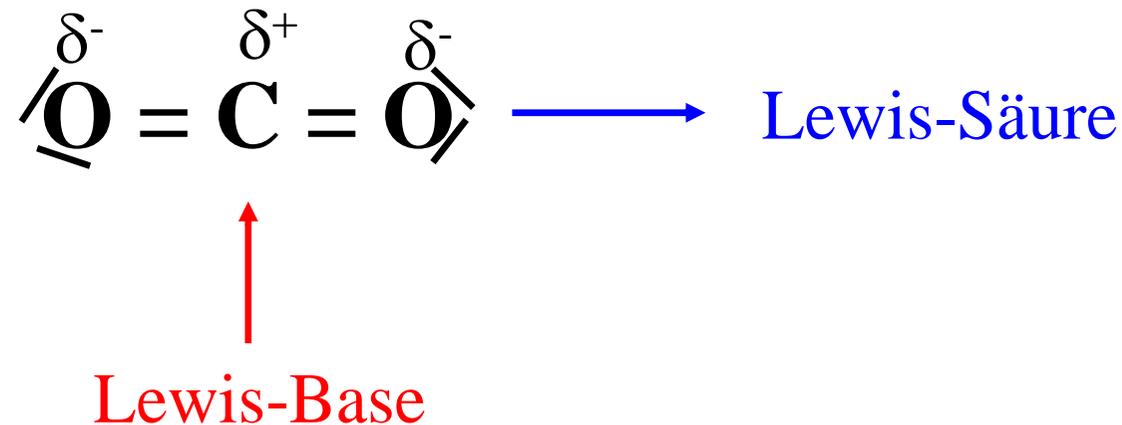
Koordination des Zinks in der **Anhydrase** ist verzerrt tetraedrisch. Das Metall läßt sich durch 2,2'-Bipyridin entfernen, wodurch ein inaktives Apoprotein resultiert.

Das dipositive Zink ist durch drei neutrale Histidin-Reste (His94, His96, His119) koordiniert, die vierte Koordinationsstelle ist durch ein Wassermolekül besetzt, das über Wasserstoffbrücken-Bindungen mit weiteren Aminosäureresten (Thr199) und Wassermolekülen verbunden ist.

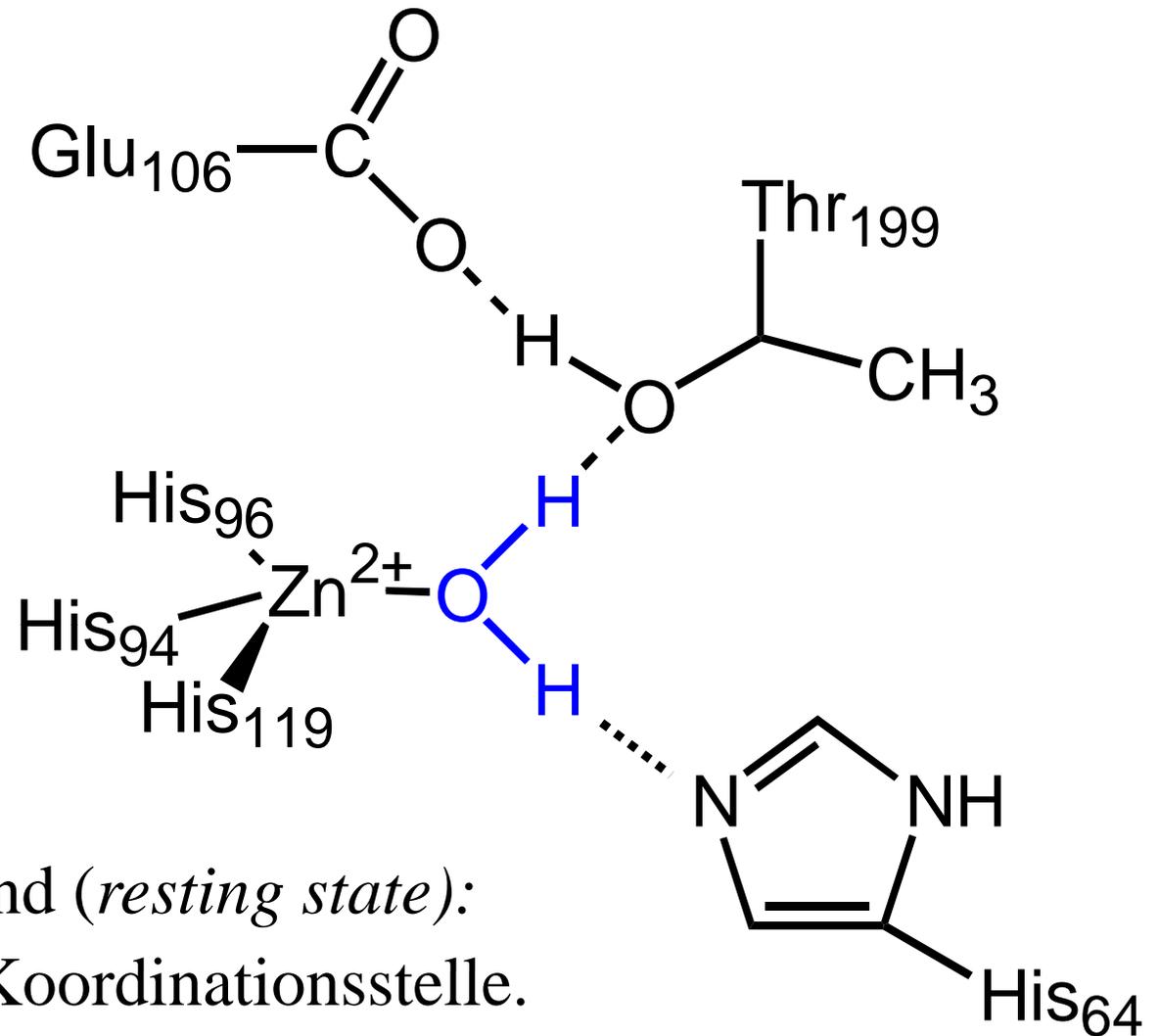
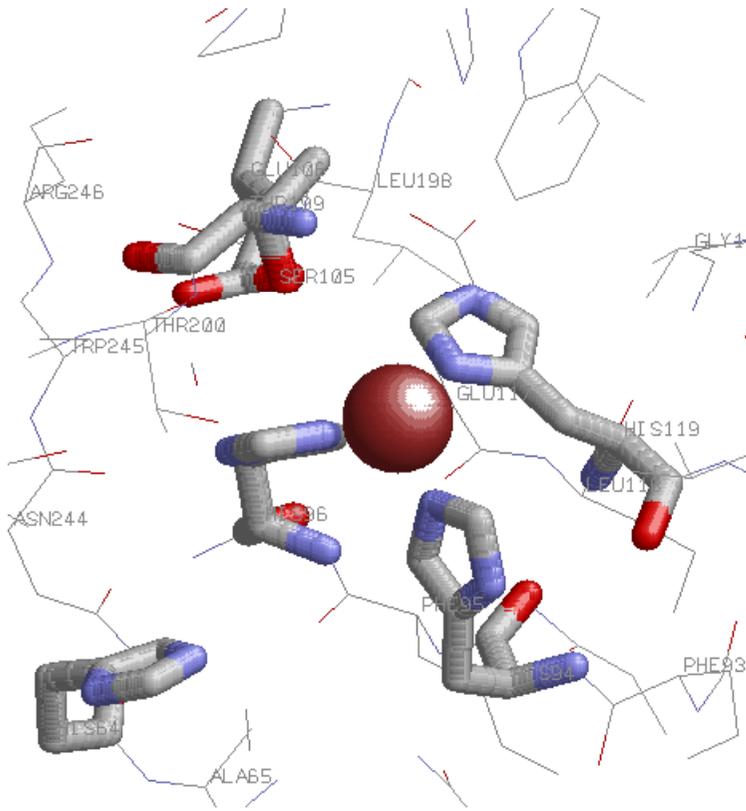


Aktives Zentrum der humanen **Carboanhydrase II**

CO₂ ist ein lineares Molekül ohne permanentes Dipolmoment (O=C=O). Um es zu aktivieren ist eine Kombination von Lewis-Säure-Einwirkung (Angriff am Sauerstoff) und Baseneffekt (Angriff am Kohlenstoffatom) notwendig: **Push-pull-Effekt (bifunktionelle Katalyse)**:



Nicht-enzymatische Katalyse kann mit Hilfe von ambivalenten Lewis-Säure/Base-amphoter Systemen, wie z.B. Arseniger Säure, Schwefeliger Säure, Unterbromiger Säure oder Monohydroxo-Metallkomplexen erfolgen. Es handelt sich dabei um Verbindungen mit freien Elektronenpaaren (Base) und Akzeptor (Säure) Funktion.



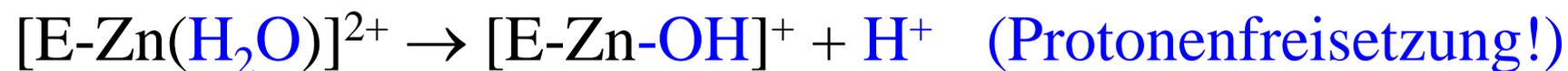
Enzym im Ausgangszustand (*resting state*):

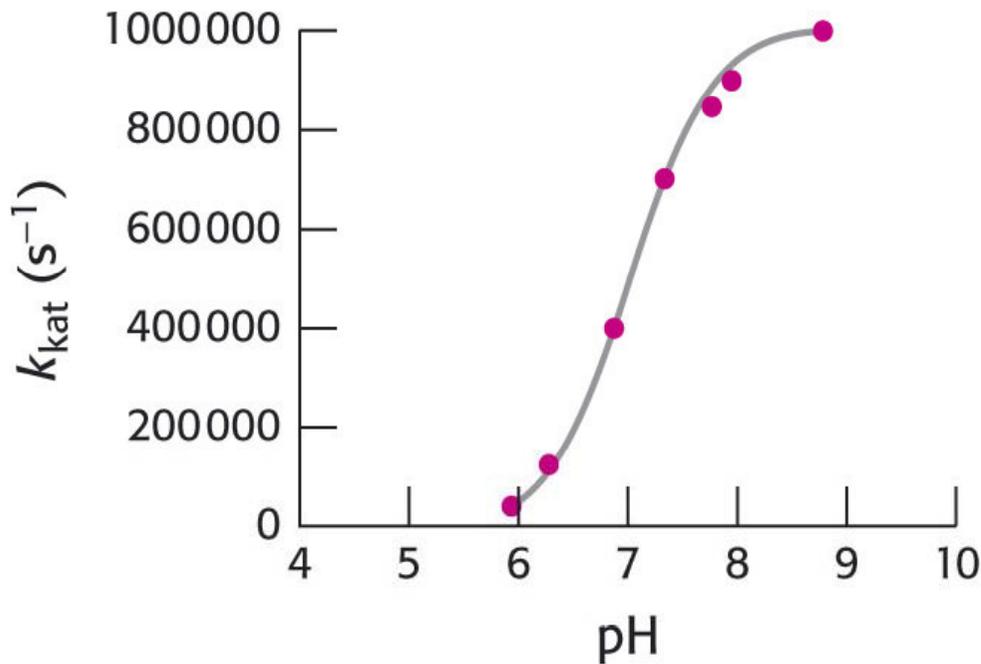
Wasser besetzt die vierte Koordinationstelle.

Um das Enzym für einen nukleophilen Angriff

“fit” zumachen, wird Wasser durch Deprotonierung unter

Beteiligung von His64 in Hydroxid umgewandelt (\rightarrow Lewis-Base):



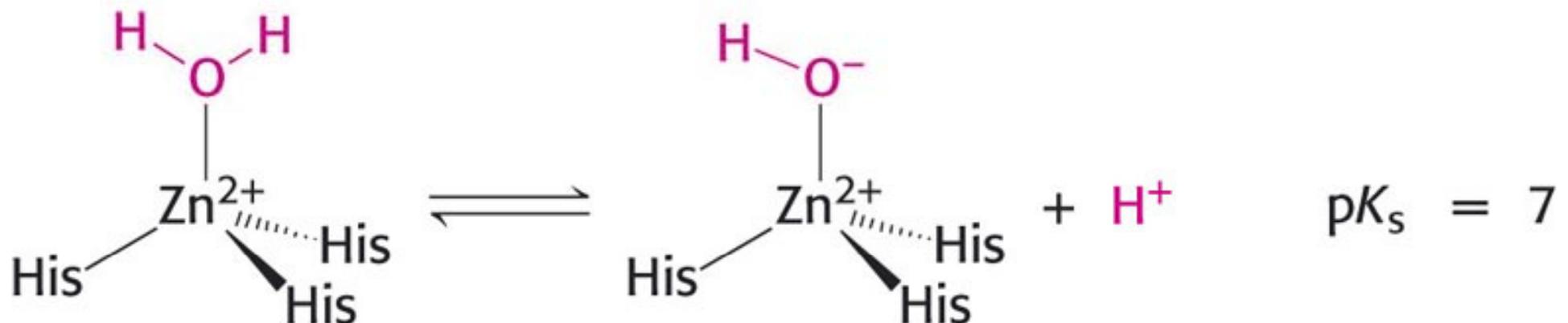


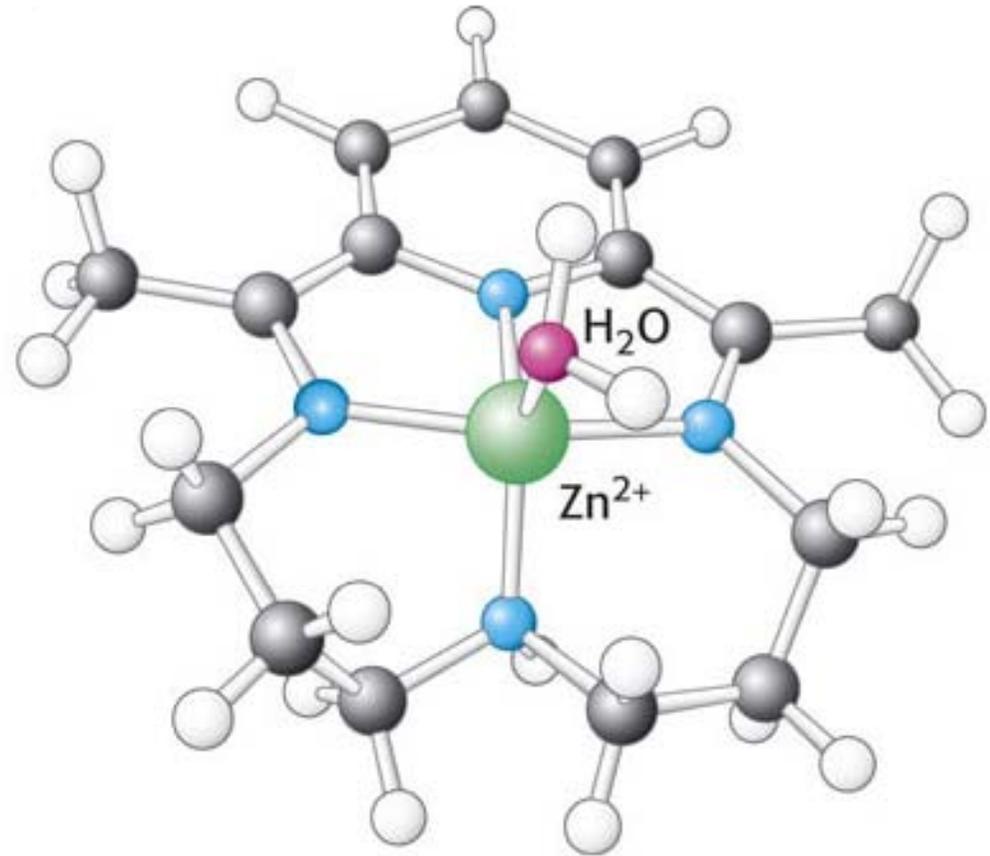
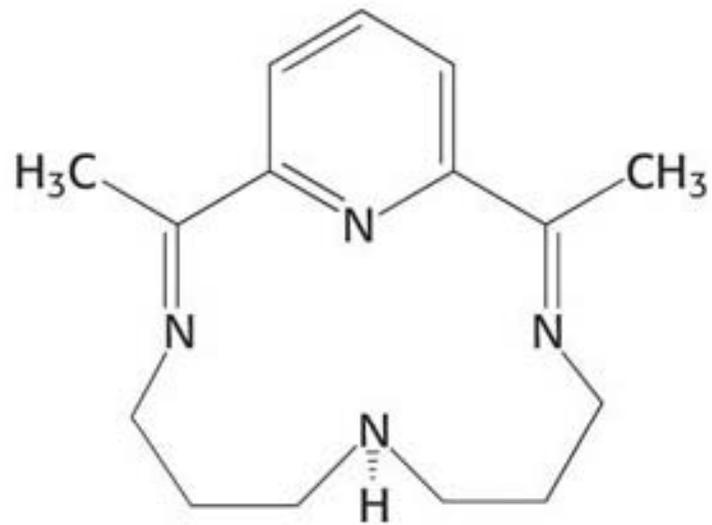
Die Kinetik der **Carboanhydrase**-Reaktion ist pH-abhängig.

Bei höheren pH-Werten läuft sie rascher ab (ab pH 8 mit fast maximaler Geschwindigkeit).

Die Reaktion wird von einer Gruppe im aktiven Zentrum mit

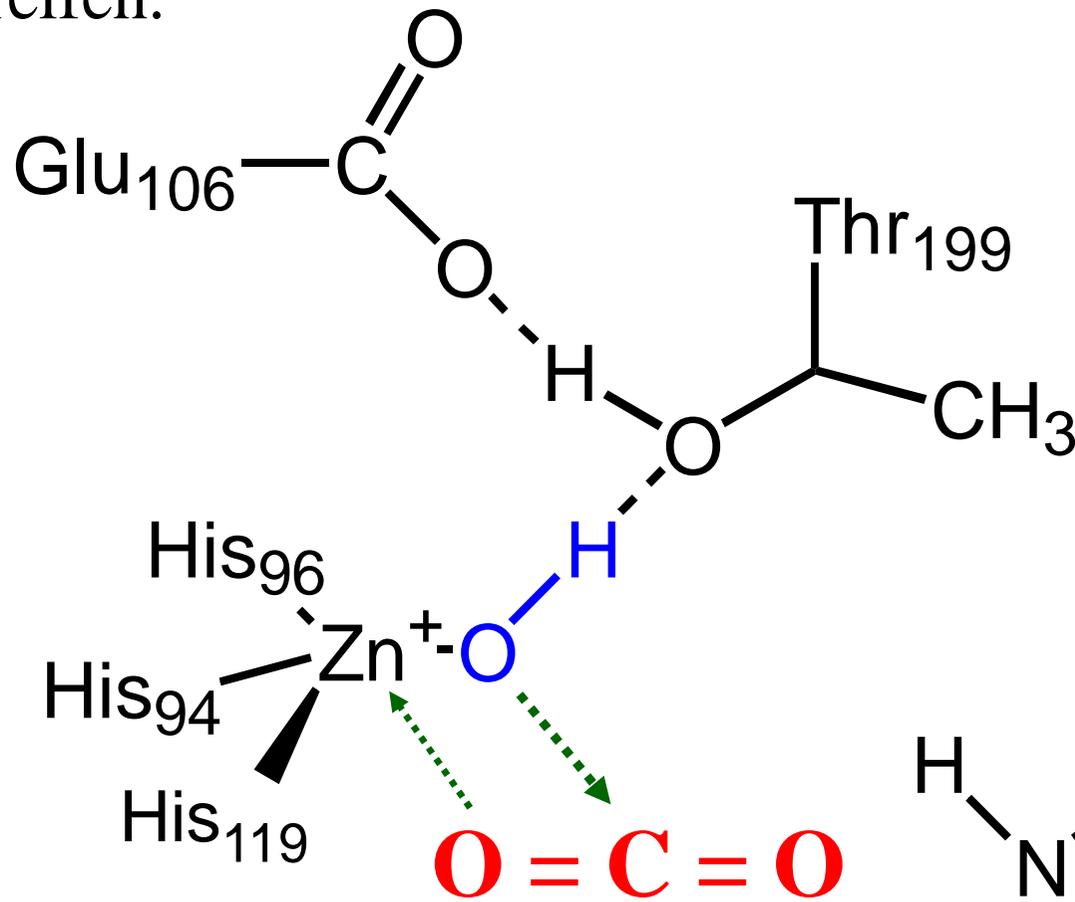
einem apparenten $pK_s = 7$ kontrolliert (= zinkgebundenes Wasser!). Die Bindung des Wassermoleküls an das positiv geladene Zink-Ion verringert also den pK_s -Wert des Wassermoleküls von 7!



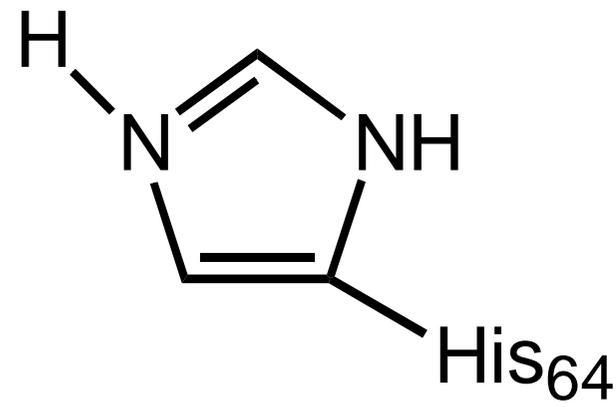


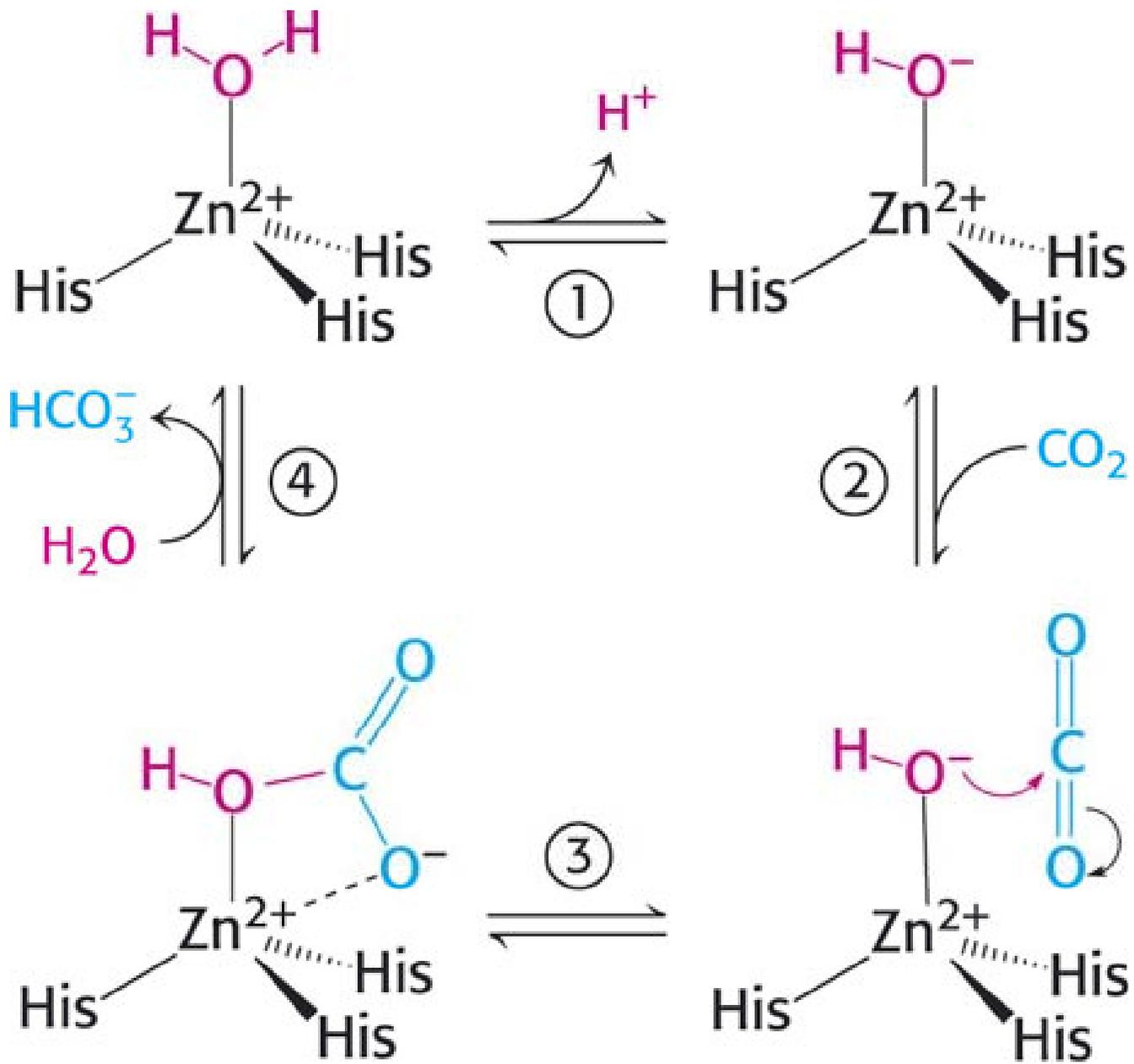
Modellsystem mit synthetischem Analogon für die Carboanhydrase. Dieser Zinkkomplex beschleunigt die Hydratisierung von Kohlendioxid um mehr als das 100fache im Vergleich zur nicht-katalysierten Reaktion!

Die Nucleophilie der $[E-Zn-OH]^+$ - Spezies reicht aus um CO_2 anzugreifen.

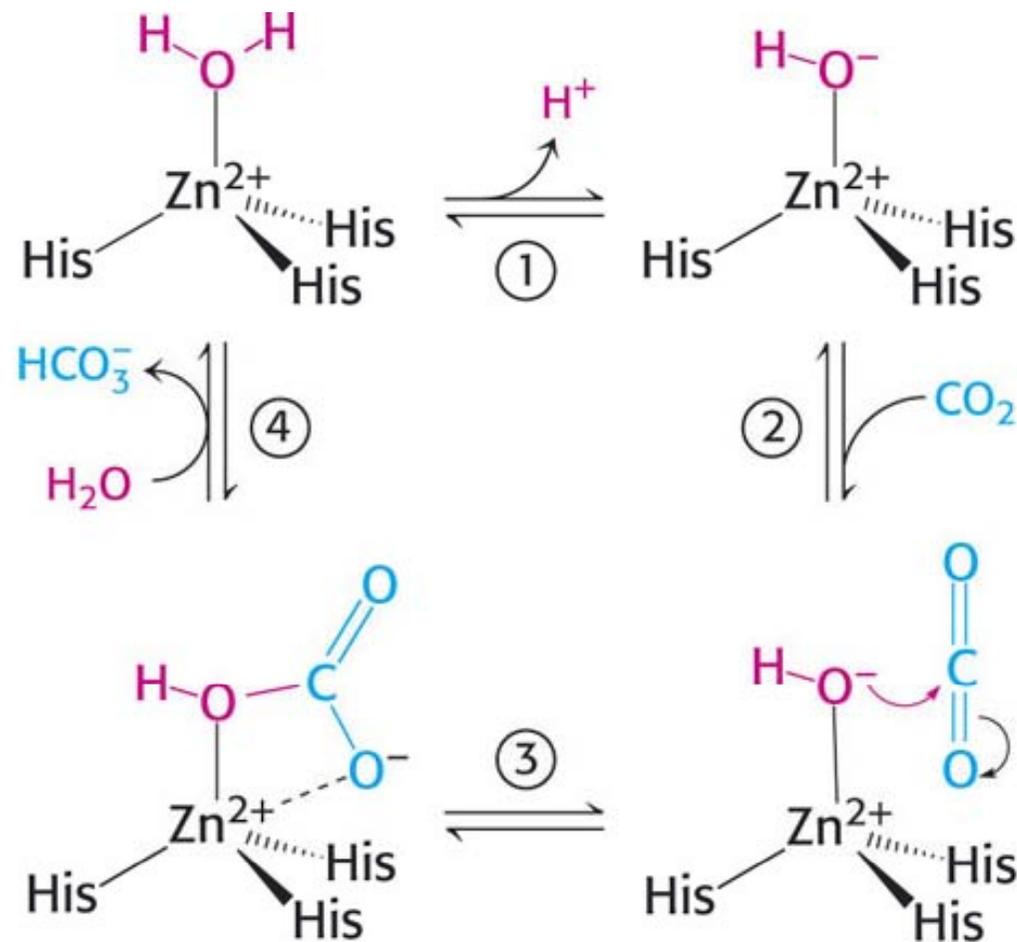


Die $[E-Zn-OH]^+$ - Spezies orientiert und polarisiert das CO_2 -Molekül in weitgehend linearer Anordnung.





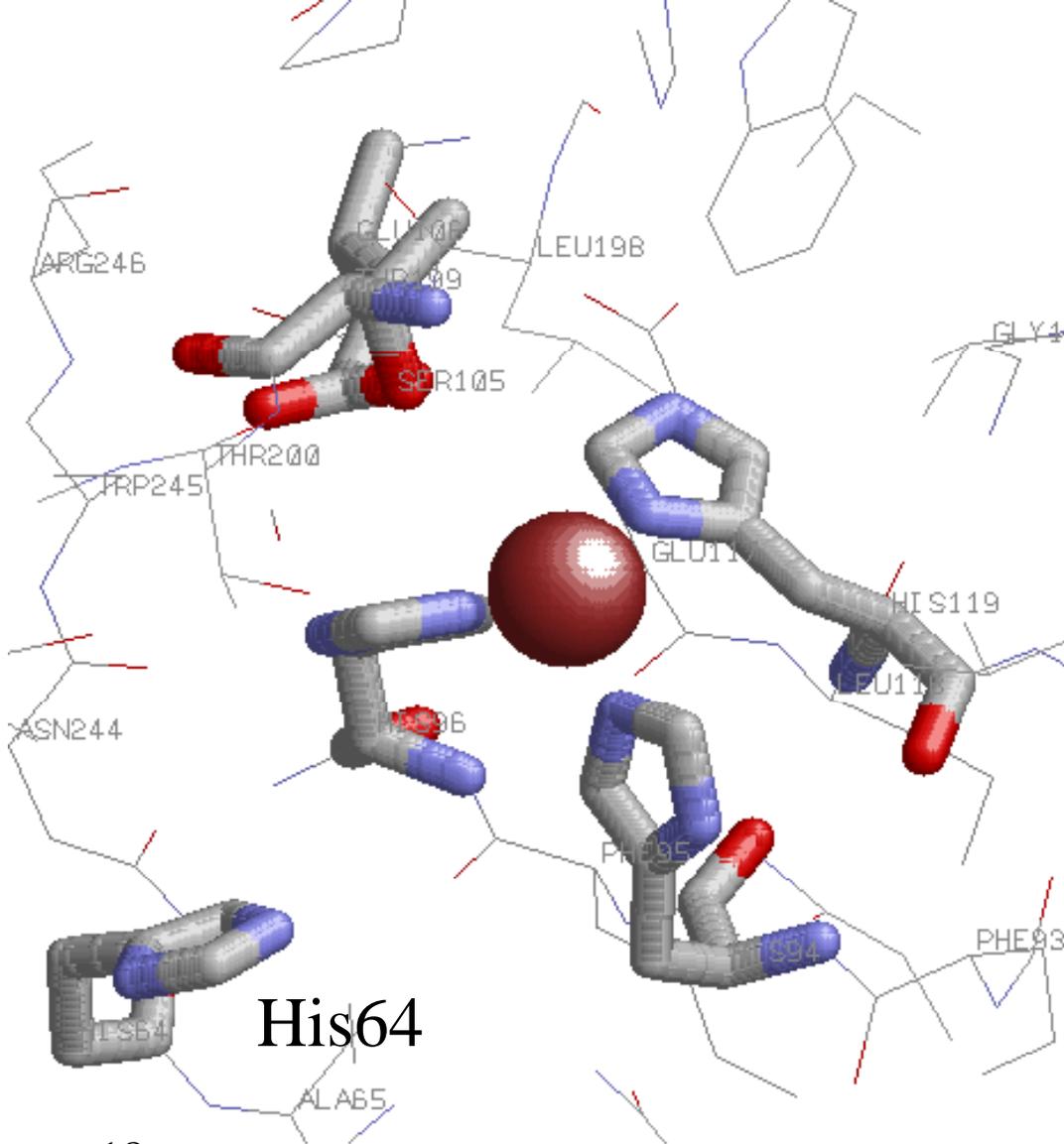
Reaktionsmechanismus der Carboanhydrase



Übergangszustand: $[\text{E-Zn}(\text{HCO}_3)]^+$

Dem Hydrogencarbonat verwandte, aber stärker bindende und damit den Übergangszustand stabilisierende (anionische)

Substrate wie Formiat, Hydrogensulfit oder Sulfonamide hemmen die **Carboanhydrase!**

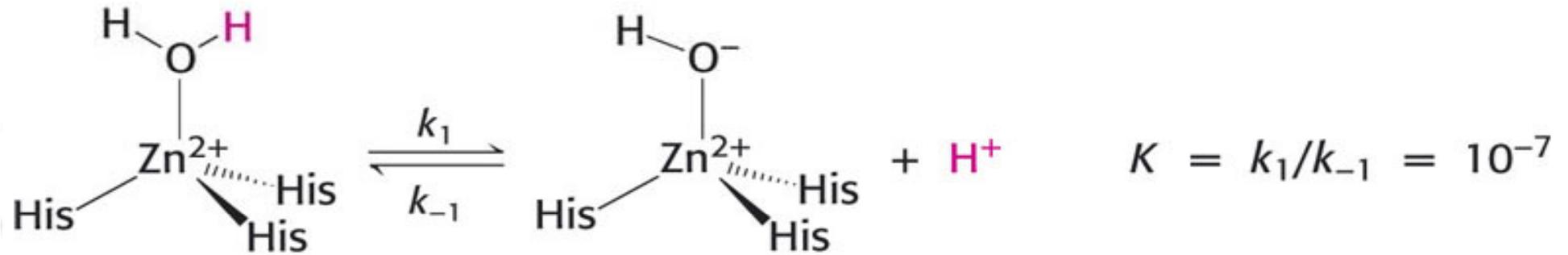


Wasser und Protonen sind Substrat bzw. Reaktionsprodukt! Durch H-Brücken gebundene und geordnete Wassermoleküle im Substratkanal sind integraler Bestandteil der Struktur und Funktion der **Carboanhydrase**.

$$k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$$

Experimentelle Untersuchungen

(^{18}O -Markierung; H/D-Austausch) haben gezeigt, dass die Protonenübertragung (**proton shuttling**) unter Beteiligung von Aminosäureresten und des H_2O -Netzwerkes den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der CO_2 -Hydratisierung durch **Carboanhydrase** dargestellt!



Erster Schritt: Deprotonierung von Wasser.

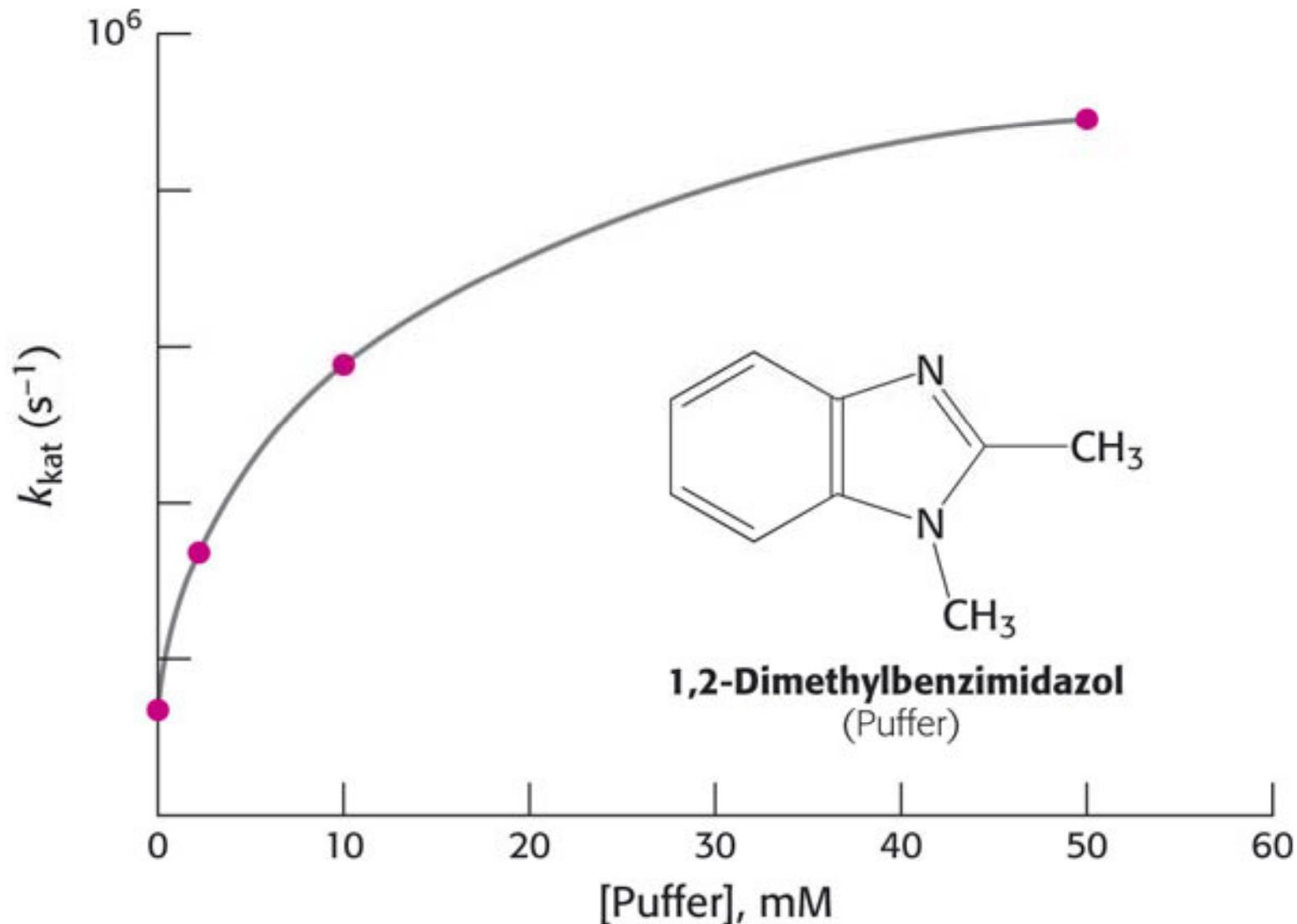
Die Geschwindigkeit der Rückreaktion, d.h. die Protonierung des zinkgebundenen Hydroxid-Ions, ist durch die Protonendiffusion begrenzt ($\sim 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die Geschwindigkeit der Rückreaktion k_{-1} muss also geringer als die Protonendiffusion sein ($k_{-1} \leq 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

$$K = k_1/k_{-1} = 10^{-7} \text{ (da } pK_s = 7)$$

$$k_1 = K \times k_{-1} = 10^{-7} \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \leq 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

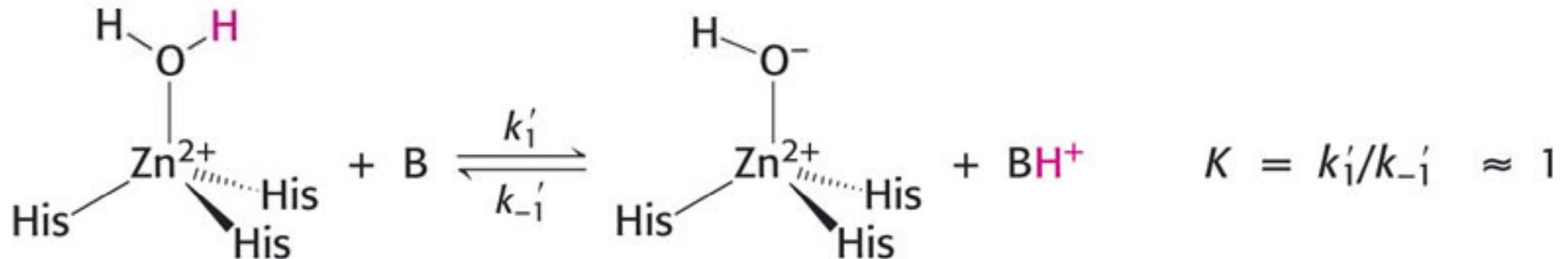
d.h. für protischen Ligand (z.B. Wasser) mit $pK_a = 7$ ist die Geschwindigkeit der Protonenfreisetzung mit $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ begrenzt.

Jedoch ist $k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$! Widerspruch?

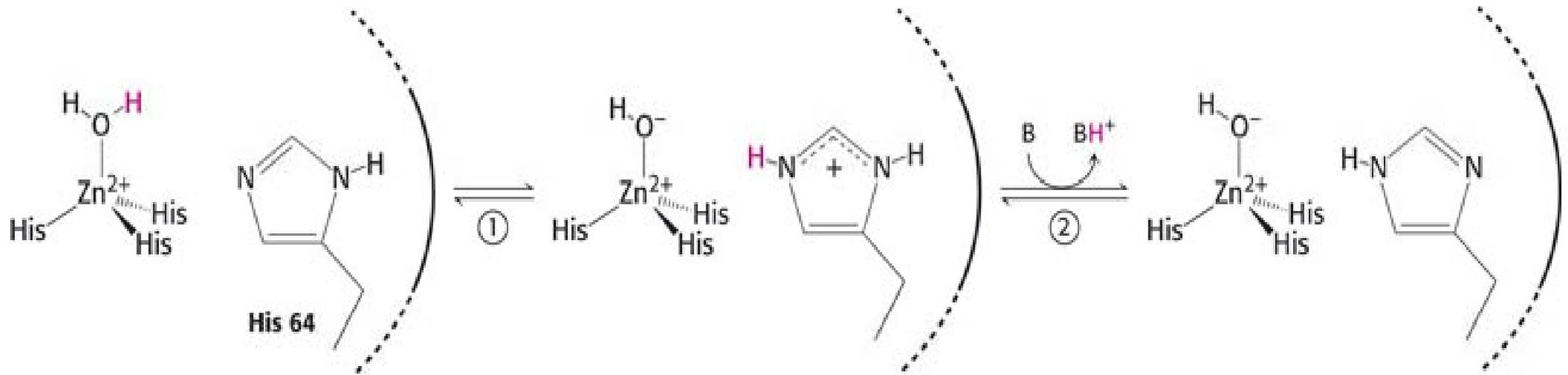


Experimenteller Befund: Damit ein k_{cat} von 10^6 s^{-1} erreicht wird, ist ein Puffer notwendig. Das bedeutet, dass Komponenten des Puffers an der Reaktion beteiligt sind. Puffer kann Protonen binden und freisetzen.

Bei $\text{pH} = 7$ ist die Konzentration an Protonen und Hydroxid-Ionen auf 10^{-7} beschränkt. Dagegen kann die Konzentration an Pufferkomponenten viel höher sein (mM). Wenn also eine Pufferkomponente BH^+ auch den Wert $\text{p}K_s = 7$ hat, wird $K \sim 1!$



Warum? Die Geschwindigkeit der Protonenabgabe ist festgelegt durch $k_1' \times [\text{B}]$. Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_1' und k_{-1}' werden durch die Pufferdiffusion auf $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ begrenzt. Pufferkonzentration von 1 mM (10^{-3} M) sind daher hoch genug, um eine Hydratisierung von CO_2 mit 10^6 s^{-1} zu ermöglichen, da $k_1' \times [\text{B}] = (10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}) (10^{-3} \text{ M}) = 10^6 \text{ s}^{-1}$.



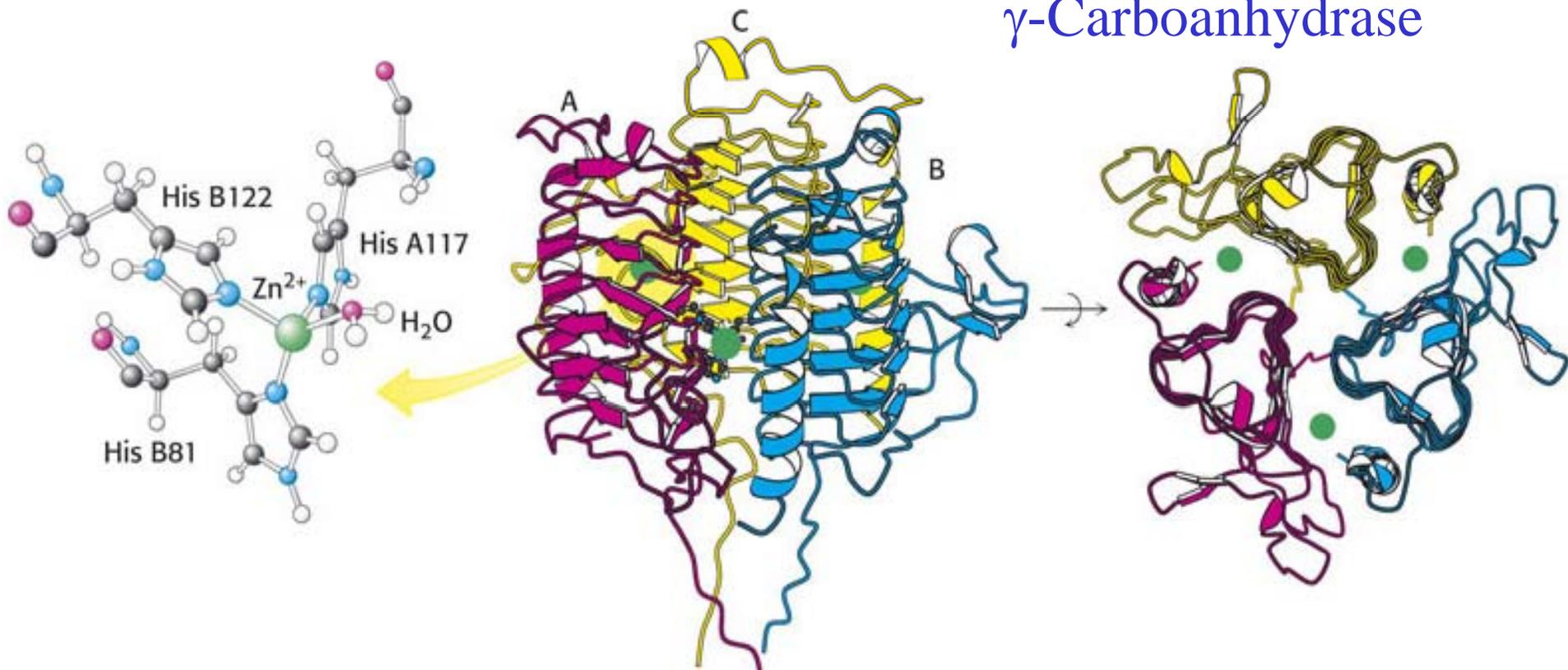
Histidin-Protonen-Shuttle:

- His64 zieht vom zinkgebundenen Wassermolekül ein Proton ab. Dadurch entsteht ein nucleophiles Hydroxid-Ion und ein protoniertes His64
- Puffer B (oder eine andere Komponente des Netzwerkes im Substratkanal) entfernt aus dem protonierten His-64 ein Proton, sodass wieder die deprotonierte Form entsteht, usw., bis die Protonen außen an der Proteinoberfläche an den Puffer abgegeben werden.

Carboanhydrasen, die zu menschlichen Enzymen homolog sind (sog. α -Carboanhydrasen) kommen bei Tieren, einigen Bakterien und Algen häufig vor.

Daneben gibt es sog. β -Carboanhydrasen bei höheren Pflanzen und Bakterien (z.B. *E. coli*). Diese Proteine enthalten im aktiven Zentrum ebenfalls Zn^{2+} , zeigen aber keine erkennbare Sequenzübereinstimmung mit α -Carboanhydrasen. Selbst die Liganden für das Metallion unterscheiden sich: 1 His, 2 Cys. Wichtig in Pflanzen beim Calvin-Zyklus (Akkumulation von Kohlendioxid).

γ -Carboanhydrase



Zusätzlich gibt es eine dritte Familie (γ -Carboanhydrasen) in Archaea), die drei zinkhaltige Zentren haben, die ähnlich koordiniert wie in α -Carboanhydrasen sind. Aber andere 3D-Struktur.

Durch **konvergente Evolution** sind also mindestens dreimal unabhängig voneinander **Carboanhydrasen** entstanden. Immer Zn-Proteine! Jedesmal scheint die Reaktivität mit zinkgebundenem Wasser in Zusammenhang zu stehen.

Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Bioanorganische Chemie des Zinks

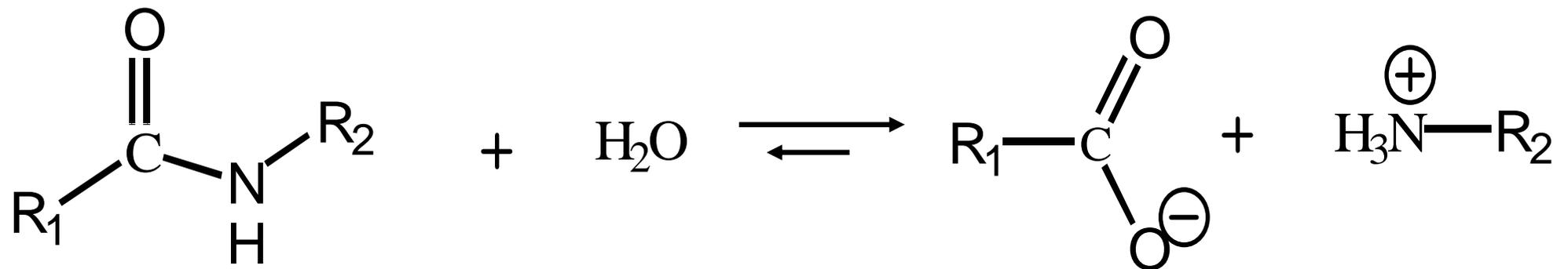
Carboanhydrase

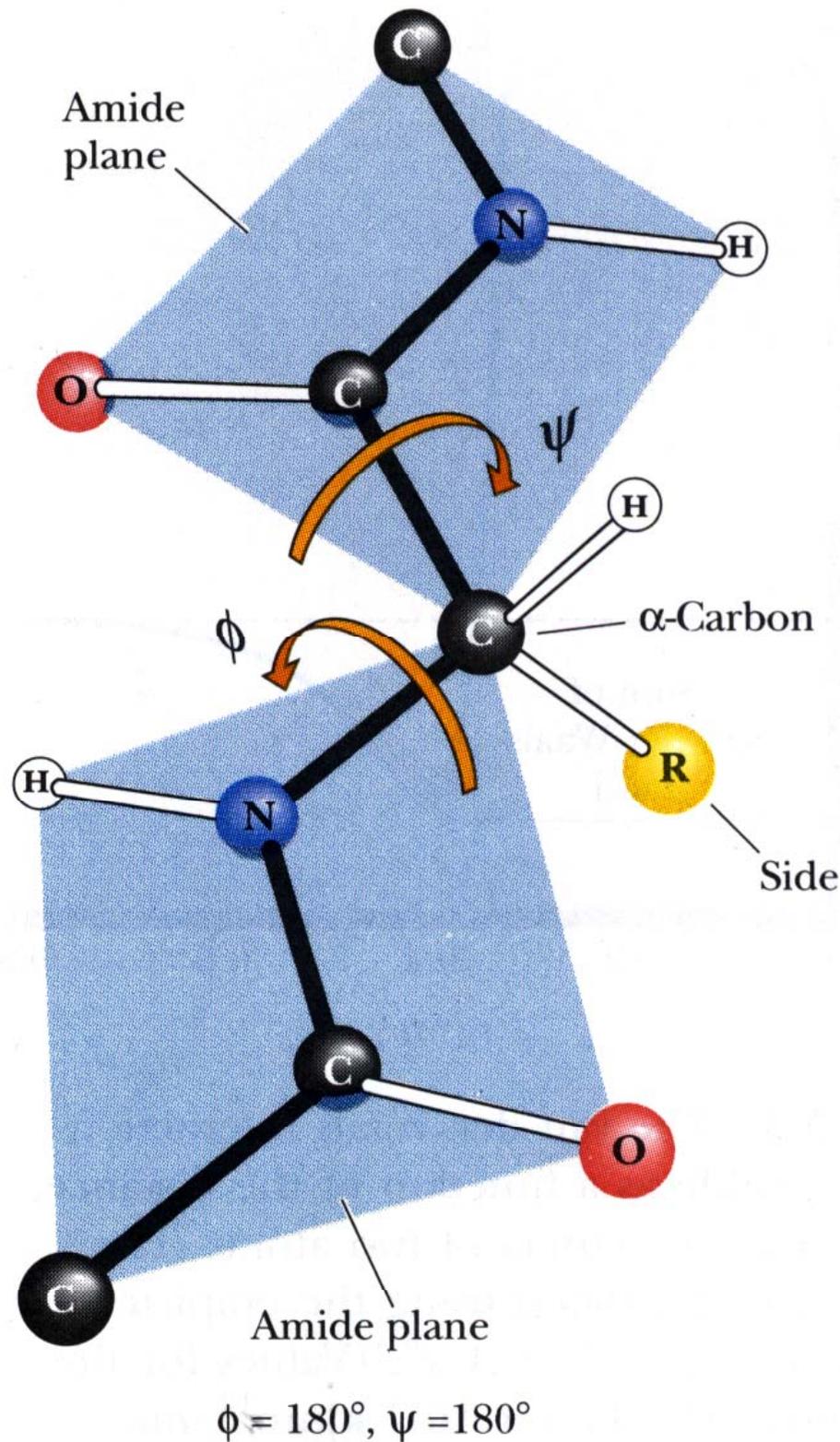
Peptidasen, Proteinasen, Lipasen und Phosphatasen

Peptidasen, Proteinasen, Lipasen und Phosphatasen

Peptidasen, Proteinasen, Lipasen und Phosphatasen sind Hydrolasen, also Enzyme der 3. Enzymklasse (EC 3.X.X.X).

Proteasen spalten Proteine durch Hydrolysereaktion, nämlich durch Addition von Wasser an eine Peptidbindung. Obwohl die Hydrolyse thermodynamisch begünstigt ist, erfolgt sie extrem langsam. Peptide haben Halbwertszeiten von 10 – 1000 Jahren.

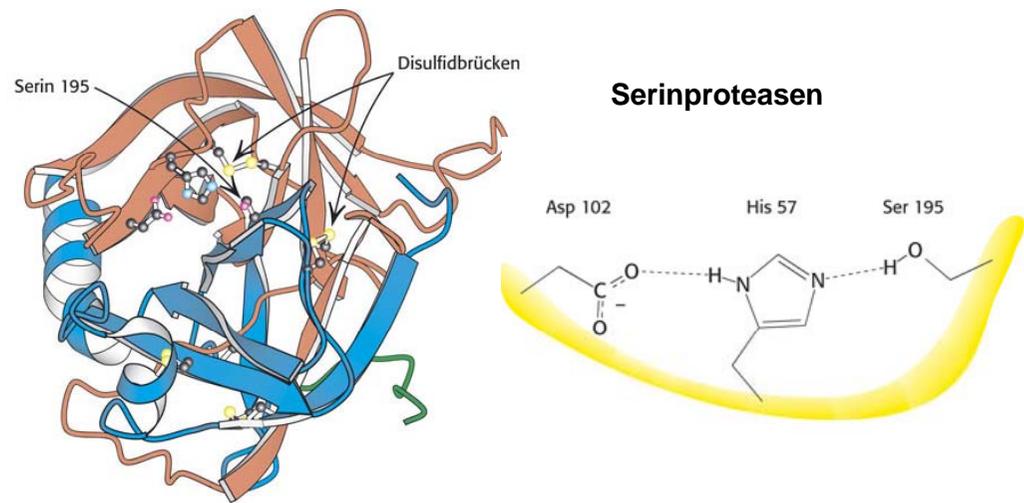




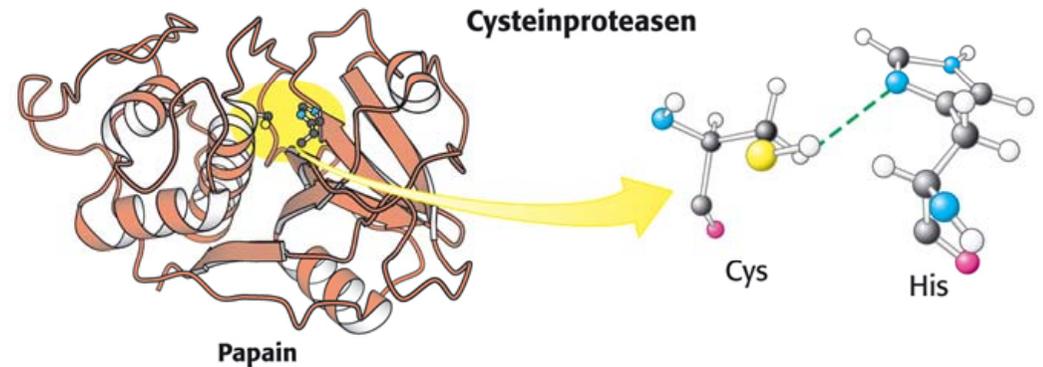
Für die kinetische Stabilität von Peptidbindungen ist deren Resonanzstruktur verantwortlich, welche die planare Form einer Peptidbindung verursacht.

Die Resonanzstruktur verleiht der Peptidbindung den Charakter einer partiellen Doppelbindung. Der Doppelbindungscharakter der Bindung zwischen dem C-Atom und dem N-Atom führt dazu, dass der Kohlenstoff der Carbonylgruppe weniger elektrophil ist (als z.B. in Estern) und daher für einen nucleophilen Angriff weniger zugänglich ist.

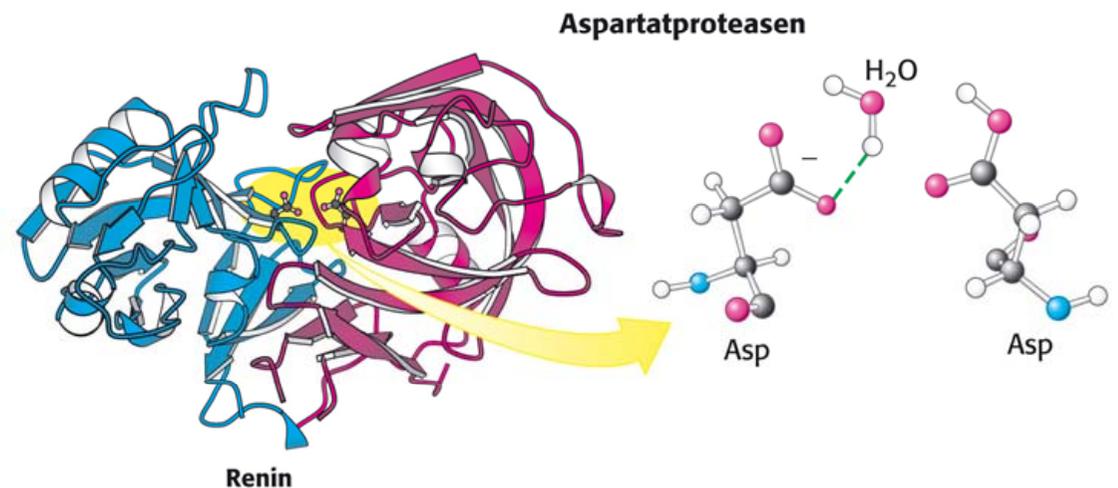
Serinproteinasen:
Chymotrypsin, Trypsin,
Elastase, Subtilisin (nicht
human), Blutgerinnungs-
faktoren...



Cysteinproteinasen:
Cathepsine, Caspasen,
Papain (nicht human)...

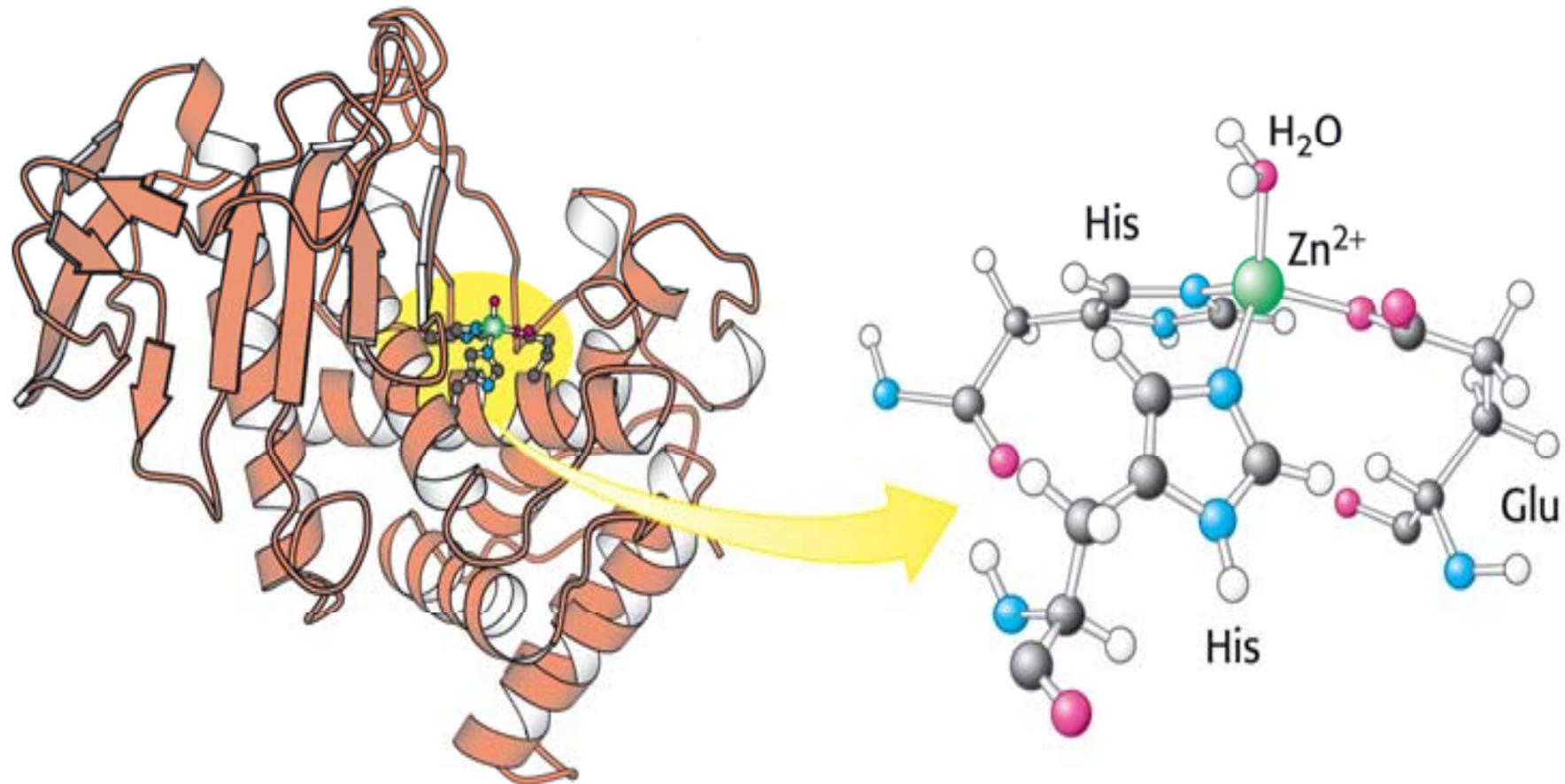


Aspartatproteinasen:
Renin, Pepsin...



Metalloproteinasen: Carboxypeptidase A und B, Matrix-Metalloproteasen (Kollagenasen), Thermolysin (nicht human)....

Enthalten Zn^{2+} im aktiven Zentrum.



Am besten untersucht sind Carboxypeptidase A und B. Neben den Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sezerniert der **Pankreas** zwei zinkhaltige Proteasen, die Oligopeptide vom C-terminalen Ende her Rest für Rest hydrolysieren:

Carboxypeptidase A und **Carboxypeptidase B**. Wie andere Proteasen werden die beiden Zink-Proteasen auch als **Zymogene** sezerniert.

Ebenso wird aus Prokollagenase durch Aktivierung bei bestimmten Entwicklungsprozessen oder auch bei Verletzung (Rolle des Zink in der Wundheilung!) **Kollagenase**.

Die Zink-Proteasen sind kinetisch viel effektivere Katalysatoren als die Serinproteasen, ihre k_{cat} -Werte sind etwa 100mal größer.

Familie der Zink-Proteasen

Carboxypeptidase A (E.C. 3.4.17.1) ist am intensivsten untersucht.

News & Publications
Policies
FAQ
Contact
Feedback
About Us

↕ Deposition Hide

All Deposit Services
Electron Microscopy
NMR
Validation Server
BioSync Beamline
Related Tools

↕ Search Hide

Advanced Search
Latest Release
Latest Publications
Sequence Search
Ligand Search
Unreleased Entries
Browse Database
Histograms

Explorer:

Last Structure: 3CPA

↕ Tools Hide

File Downloads
FTP Services
File Formats
Services: RESTful | SOAP
Widgets
Compare Structures

↕ Education Hide

Looking at Structures
Molecule of the Month
Educational Resources

X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC INVESTIGATION OF SUBSTRATE BINDING TO CARBOXYPEPTIDASE A AT SUBZERO TEMPERATURE

DOI:10.2210/pdb3cpa/pdb

Primary Citation

X-ray crystallographic investigation of substrate binding to carboxypeptidase A at subzero temperature.
Christianson, D.W.¹, Lipscomb, W.N.²
(1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**: 7568-7572

PubMed: 3463986

PubMedCentral: PMC386762

[Search Related Articles in PubMed](#)

PubMed Abstract:

A high-resolution x-ray crystallographic investigation of the complex between carboxypeptidase A (CPA; peptidyl-L-amino-acid hydrolase, EC 3.4.17.1) and the slowly hydrolyzed substrate glycyl-L-tyrosine was done at -9 degrees C. Although this enzyme-substrate complex has been the subject of earlier crystallographic investigation, ... [\[Read More & Search PubMed Abstracts \]](#)

↕ Related Citations in PDB Entry (REMARK 1)

Hide

Crystallographic Studies on Apocarboxypeptidase a and the Complex with Glycyl-L-Tyrosine
Rees, D.C., Lipscomb, W.N.
(1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**: 7151

Refined Crystal Structure of Carboxypeptidase a at 1.54 Angstroms Resolution.
Rees, D.C., Lewis, M., Lipscomb, W.N.
(1983) *J.Mol.Biol.* **168**: 367

Binding of Ligands to the Active Site of Carboxypeptidase A
Rees, D.C., Lipscomb, W.N.
(1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**: 5455

Zinc Environment and Cis Peptide Bonds in Carboxypeptidase a at 1.75-Angstroms Resolution
Rees, D.C., Lewis, M., Honzatko, R.B., Lipscomb, W.N., Hardman, K.D.
(1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**: 3408

Carboxypeptidase a Mechanisms
Lipscomb, W.N.
(1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **77**: 3875

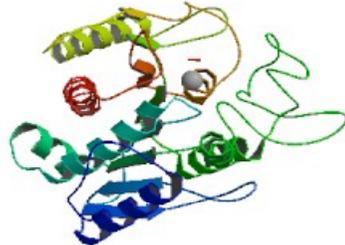
Carboxypeptidase A, A Protein and an Enzyme
Quioco, F.A., Lipscomb, W.N.
(1971) *Adv.Protein Chem.* **25**: 1

Structure and Mechanism in the Enzymatic Activity of Carboxypeptidase a and Relations to Chemical Sequence
Lipscomb, W.N.

3CPA

- Display Files ▼
- Download Files ▼
- Print this Page
- Share this Page

Biological Assembly ?



More Images...

View in Jmol SimpleViewer ?
Other Viewers ▼ Protein Workshop

Biological assembly assigned by authors

↕ Deposition Summary Hide

Authors: Lipscomb, W.N.

Deposition: 1982-03-24
Release: 1982-07-29
Last Modified (REVDAT): 2009-08-25

Previous versions: 1CPA

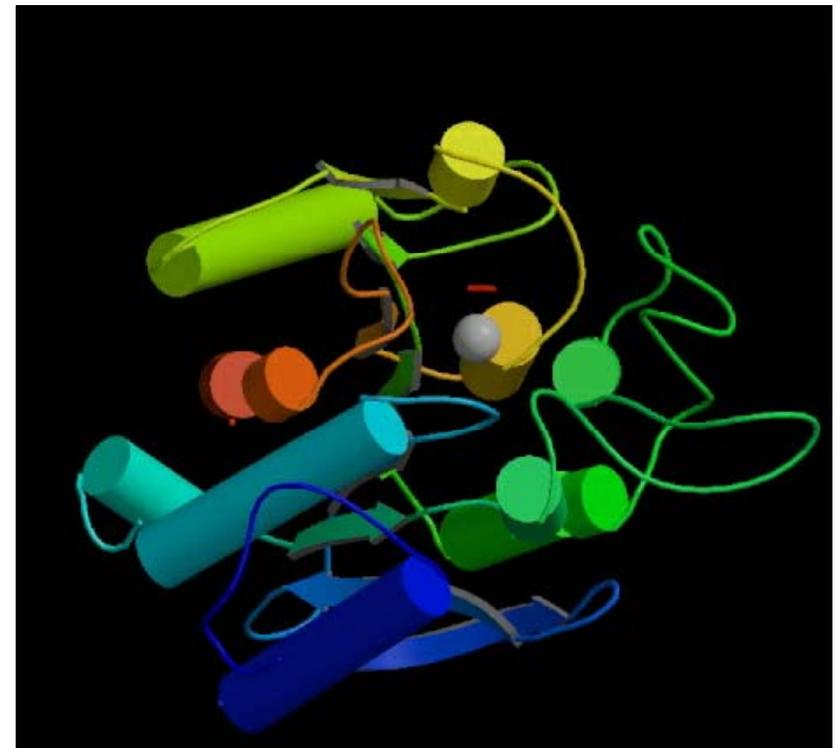
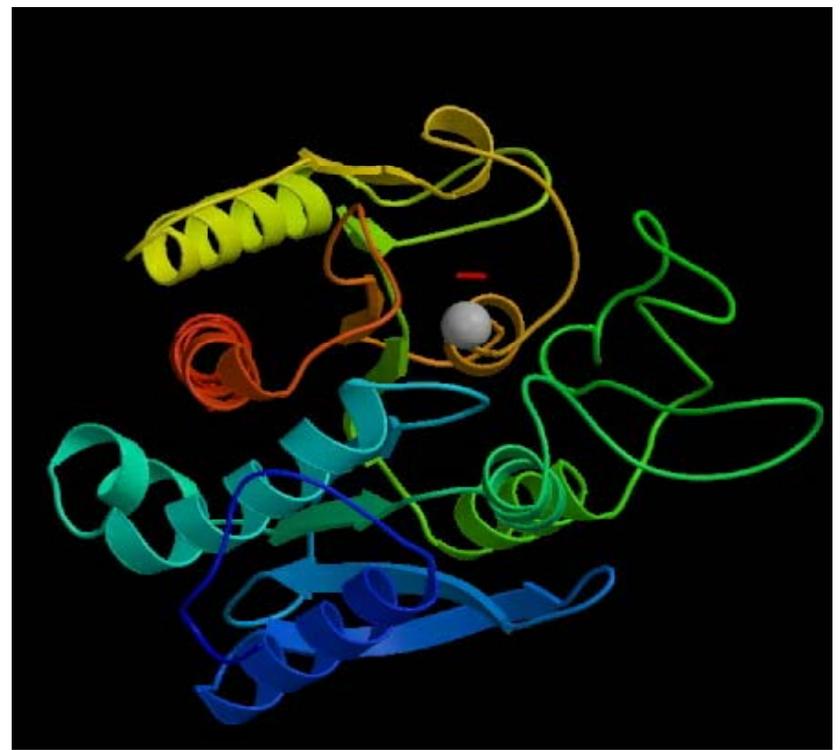
↕ Experimental Details Hide

Method: X-RAY DIFFRACTION
Experimental Data: N/A
Resolution Å: 2.00

Es existieren zahlreiche Röntgenstrukturen für verschiedene Enzym/Substrat bzw. Enzym/Inhibitor-Komplexe, die das Enzym z.T. in einzelnen Phasen des enzymatischen Umsatzes (quasi eingefroren) zeigen. **Carboxypeptidase A (CPA)** war daher ein erstes wichtiges Modellenzym für Computer-unterstütztes “molecular modeling” von Enzym-Substrat und Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen.

Mit etwa 300 Aminosäuren (Molekulargewicht 34 kDa) ähnliche Größe wie Carboanhydrase. Weitgehend globulär gefaltet.

Das katalytisch essentielle Zn^{2+} -Ion sitzt im Inneren eines Hohlrums.

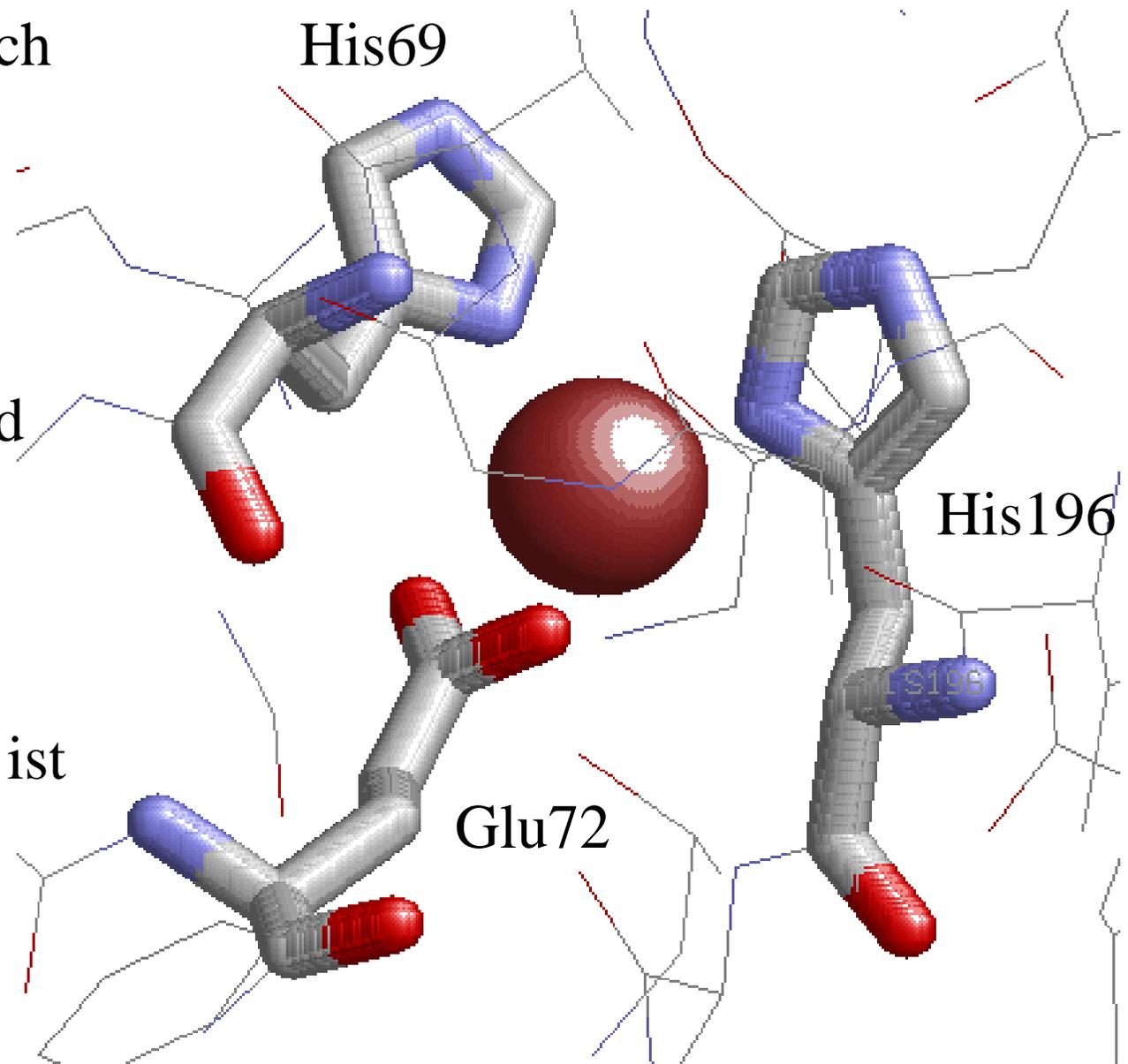


Das Zn^{2+} -Ion ist vierfach koordiniert: Zwei Histidin-Liganden (δ -N-Koordinierung), ein Glutamat (η^2 -Koordinierung) und ein Wasser, H_2O .

Geometrie: Trigonalbipyramidal.
Substratbindungsstelle ist frei.

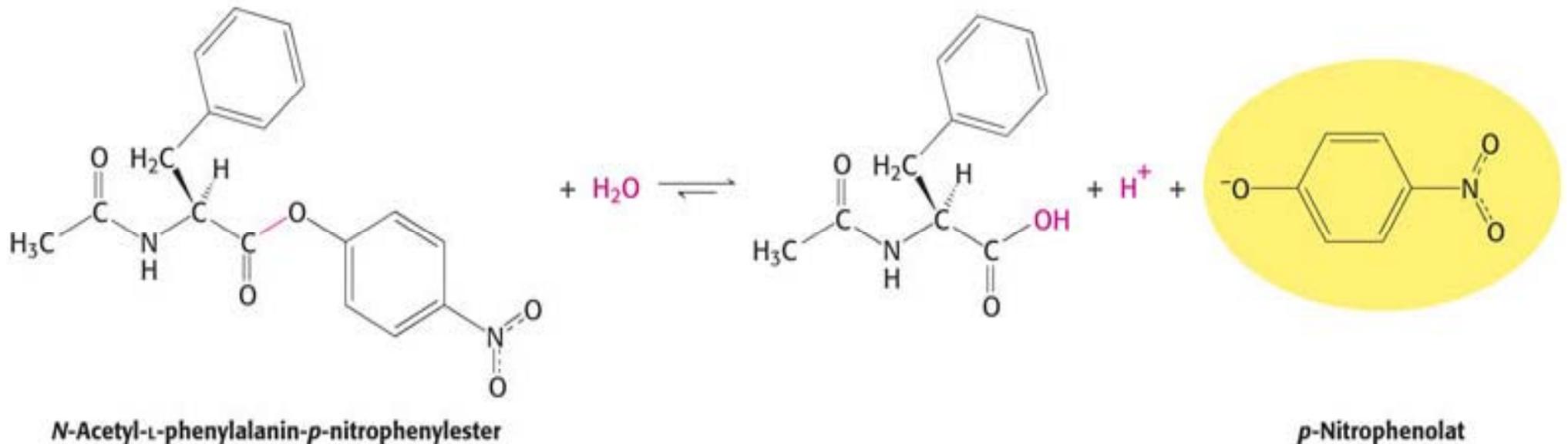
Wichtig für die Funktion sind (wie bei der

[Carboanhydrase](#)) saure und basische Aminosäurereste in der Nähe des Metall-Ions, also in der “äußeren” Koordinationssphäre des Metalls (siehe unten).



Enzymatische Spezifität: Peptidyl-L-aminosäurehydrolase

Aufgrund der enzymatischen Bindungsstellen für das Substrat werden besonders rasch L-Aminosäuren mit großen hydrophoben, vorzugsweise aromatischen Resten (z.B. Phenylalanin) am C-Terminus gespalten. Die CPA ist jedoch auch in der Lage, die Hydrolyse bestimmter Ester oder Amide zu katalysieren (Bestimmung der enzymatischen Aktivität mittels chromogenen Reaktionsprodukten).

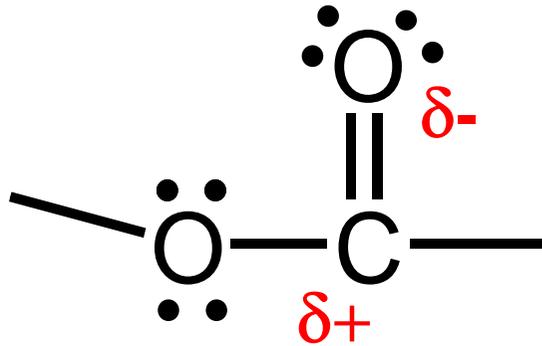


Peptidase- und Esterase-Reaktivität unterscheiden sich in einigen kinetischen Merkmalen, z.B. im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und im Effekt der Metallsubstitution (Kohlenstoff der Carbonylgruppe ist in Peptiden und Estern unterschiedlich elektrophil).

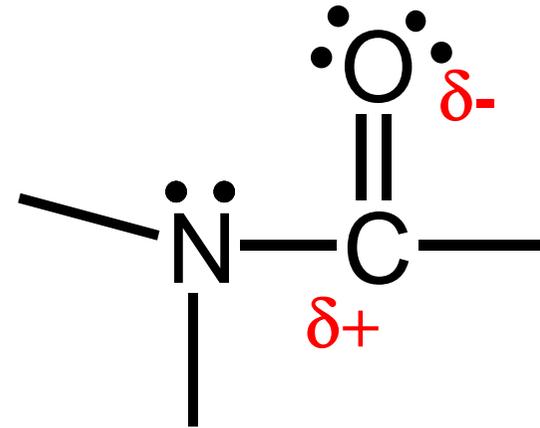
Peptidase-Funktion: Zn^{2+} und Co^{2+}

Esterase-Funktion: $\text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ (signifikante strukturelle Unterschiede nach Metallsubstitution)

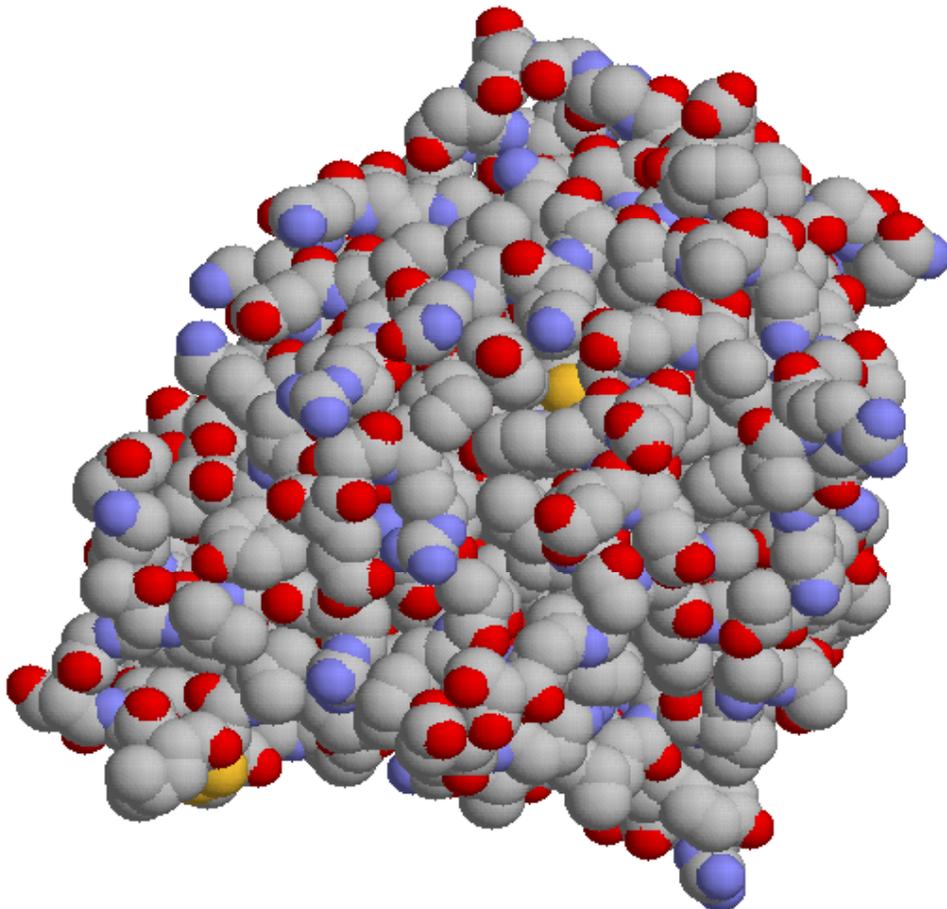
Sowohl bei den Estern als auch bei den Peptiden handelt es sich um leicht polarisierbare Systeme aus **Carbonylakzeptor-, und Alkoxy- oder Aminodonorkomponenten**. Ein mehrfacher Angriff durch eine Kombination Nukleophil & Elektrophil ist notwendig. Zusätzlich zu diesem multiplen Angriff ist eine Substrat-Spezifität (Erkennungsstellen; induced fit) wichtig, damit sich das Enzym nicht selbst hydrolysiert (Autoproteolyse).



Carbonsäureester



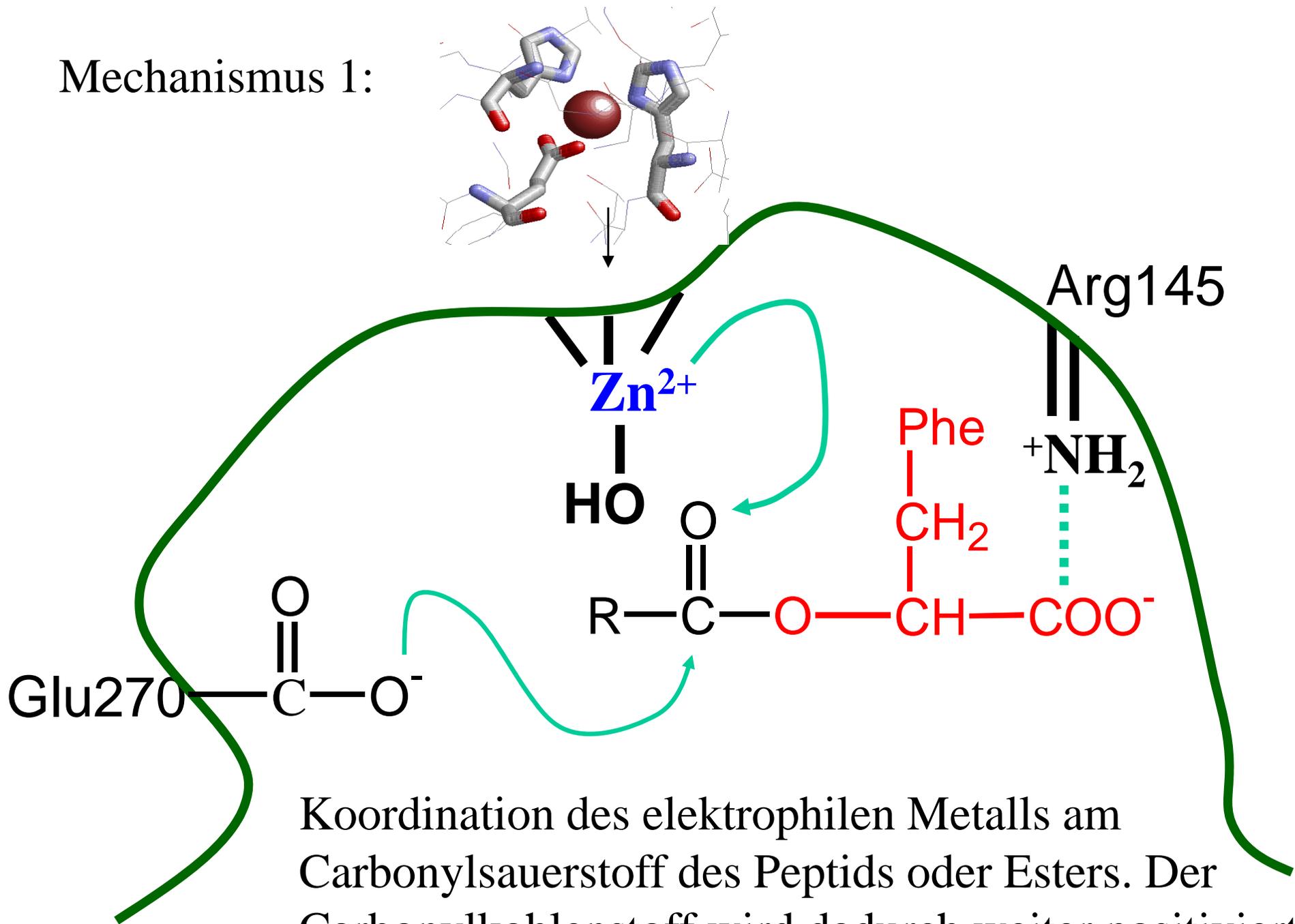
Peptid (Carboxamid)



Carboxypeptidase A

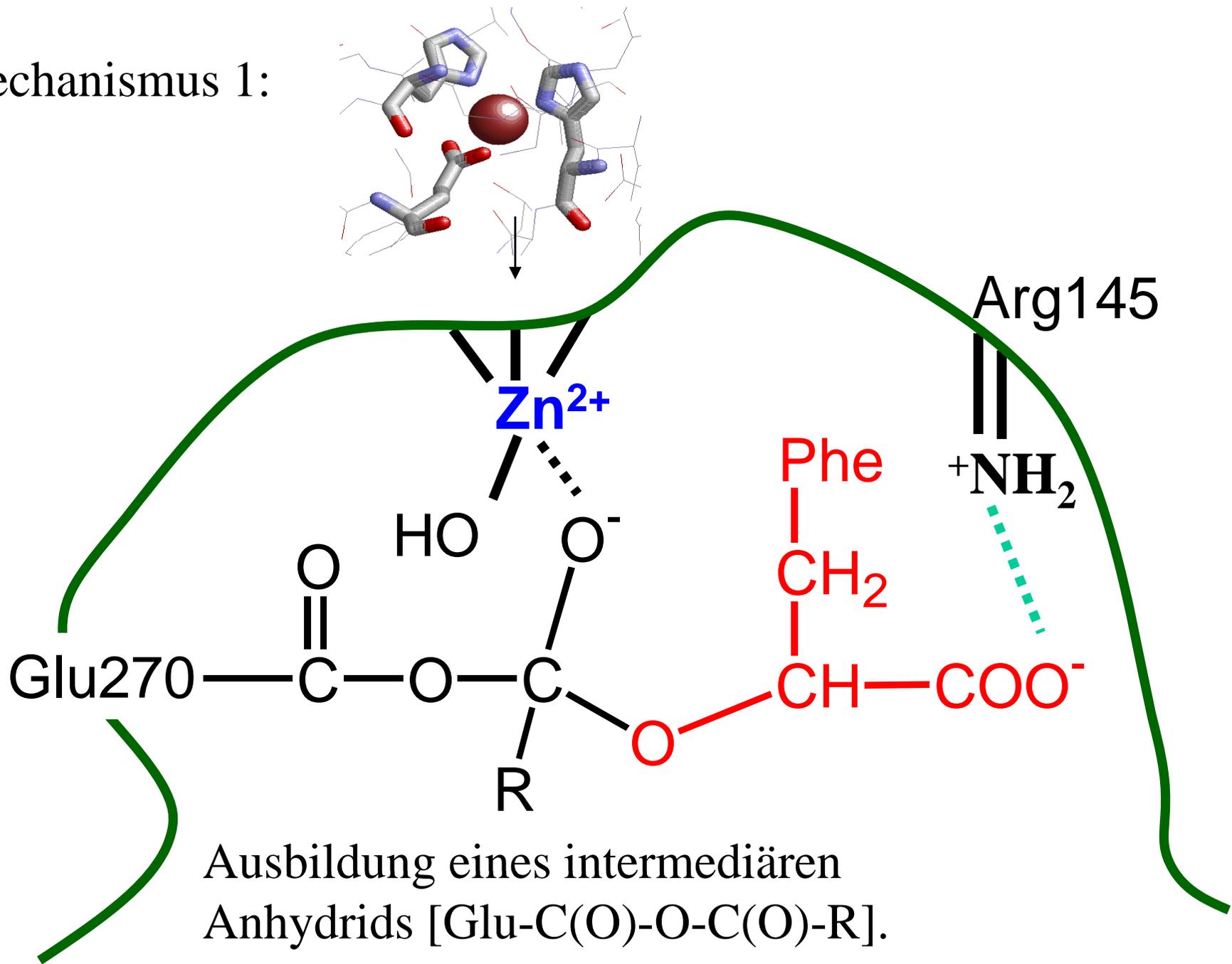
Momentan gibt es 2
Hypothesen zum
Reaktionsmechanismus

Mechanismus 1:

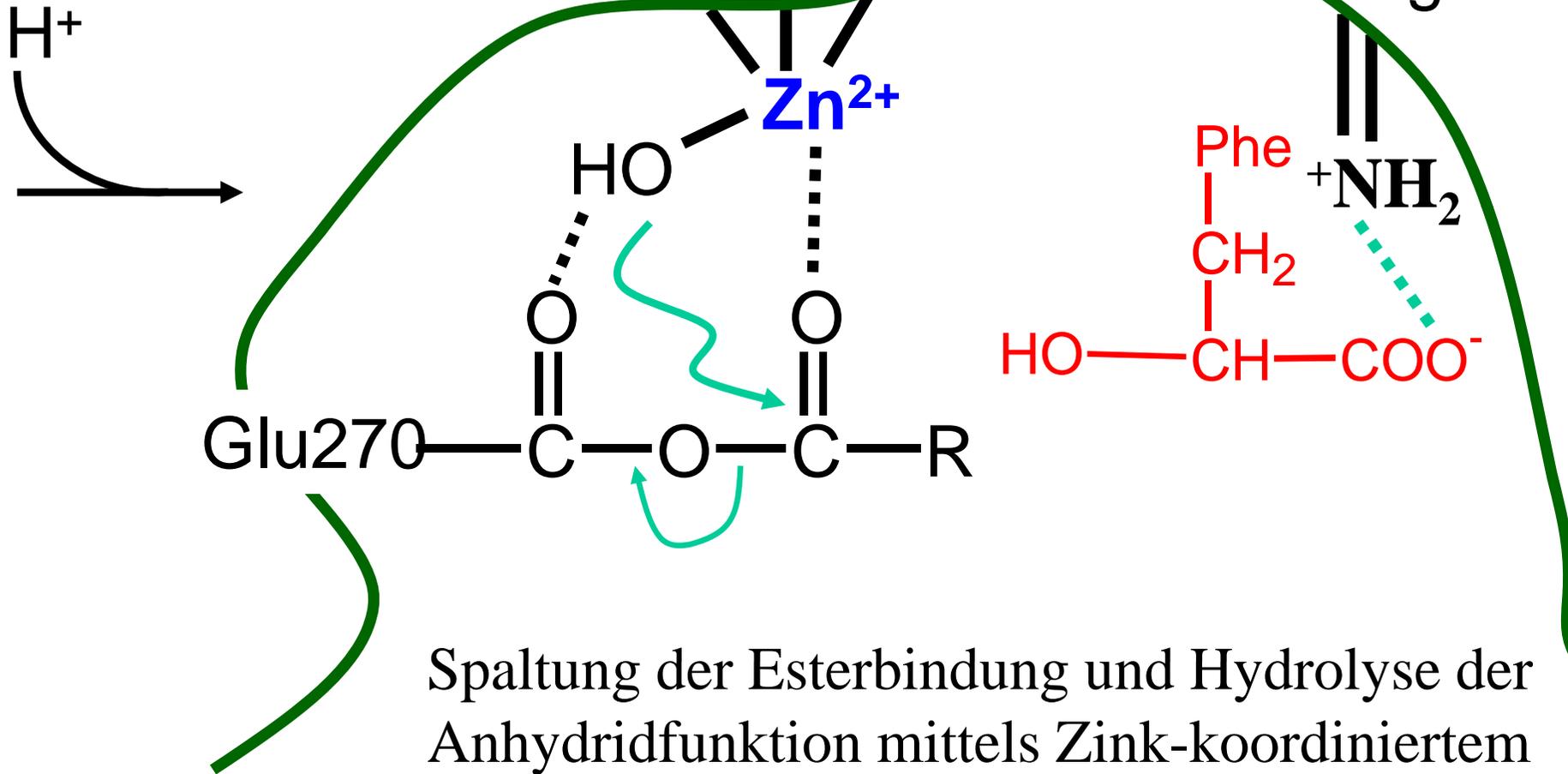
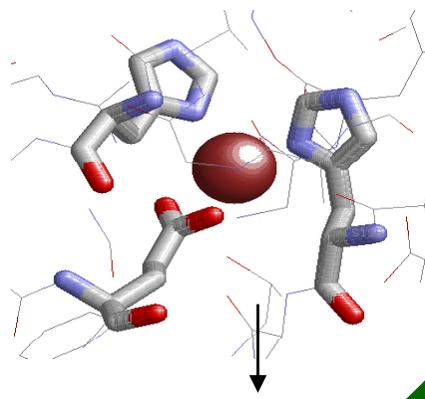


Koordination des elektrophilen Metalls am Carbonylsauerstoff des Peptids oder Esters. Der Carbonylkohlenstoff wird dadurch weiter positiviert und direkt vom Glu270 nukleophil angegriffen.

Mechanismus 1:

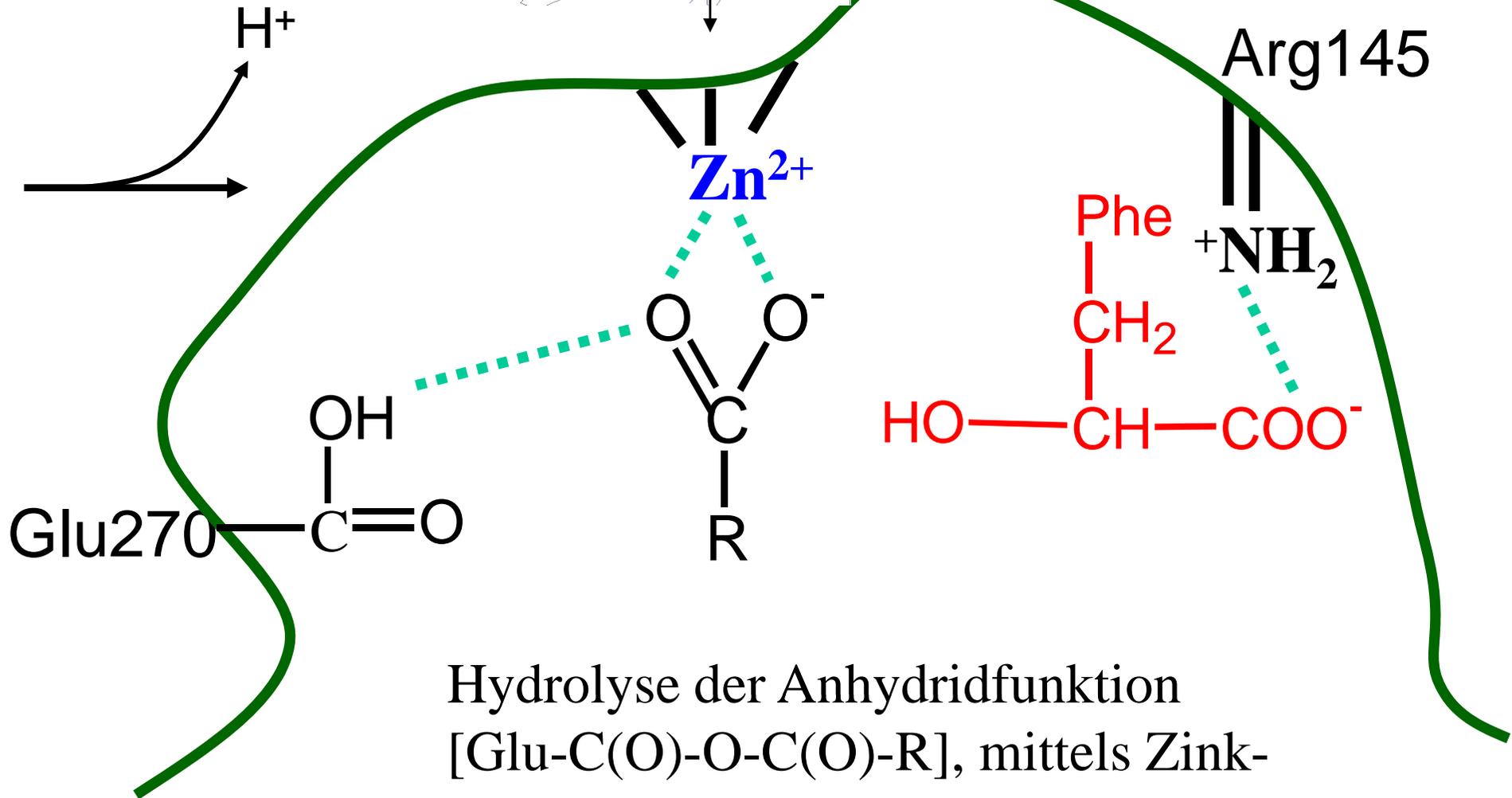
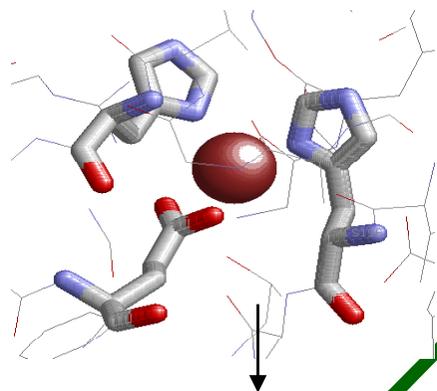


Mechanismus 1:



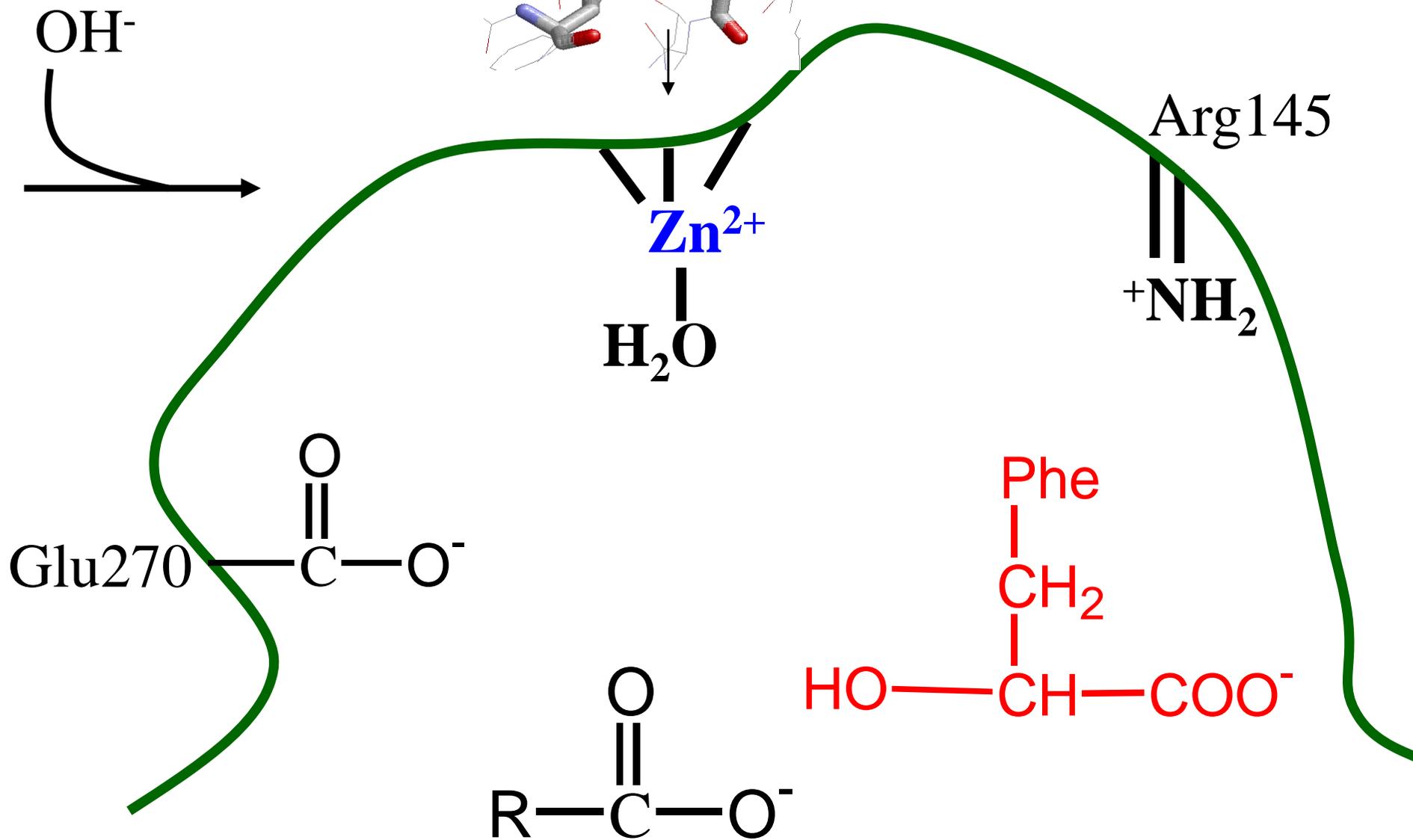
Spaltung der Esterbindung und Hydrolyse der Anhydridfunktion mittels Zink-koordiniertem Wasser/Hydroxid

Mechanismus 1:



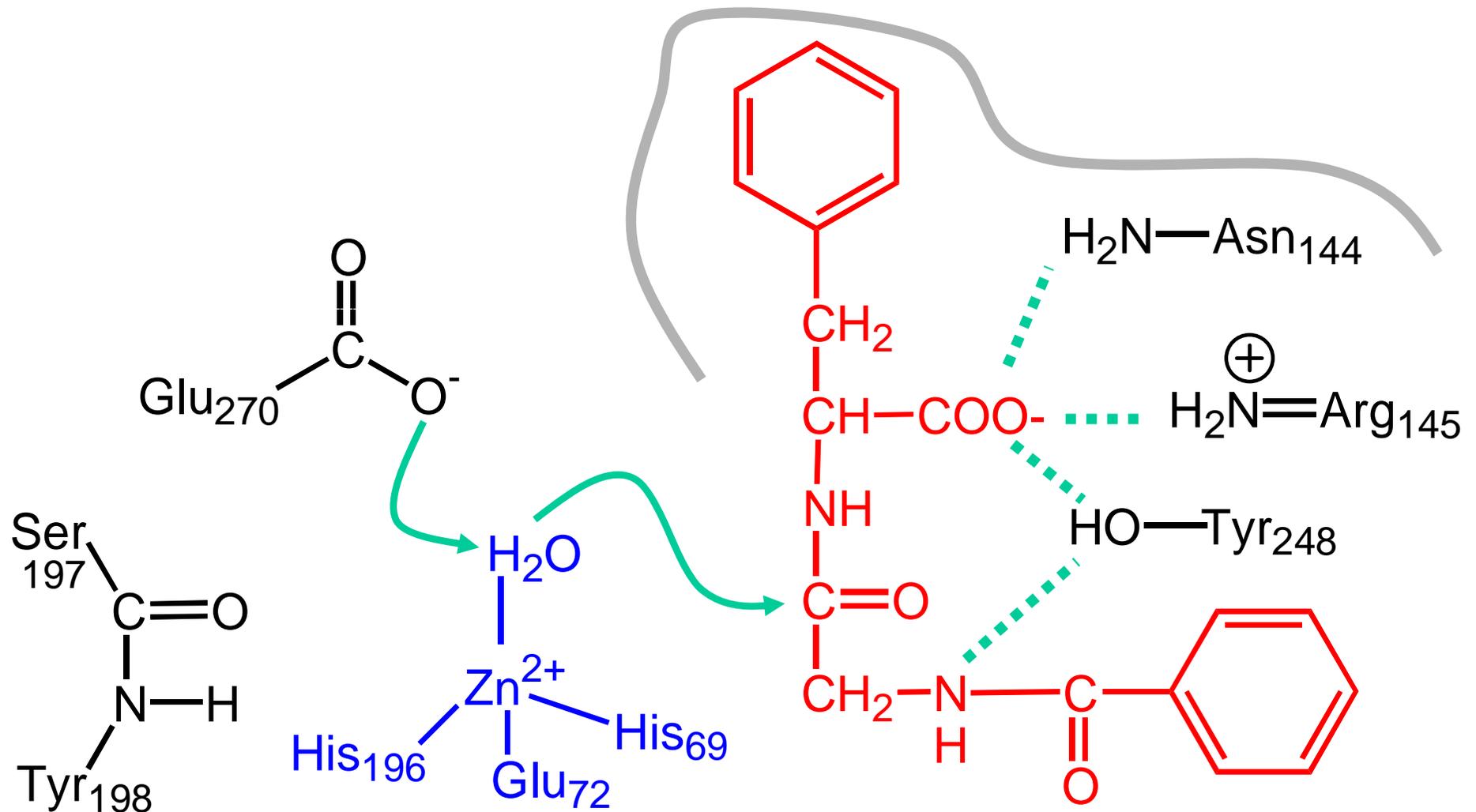
Hydrolyse der Anhydridfunktion
[Glu-C(O)-O-C(O)-R], mittels Zink-
koordiniertem Wasser/Hydroxid

Mechanismus 1:

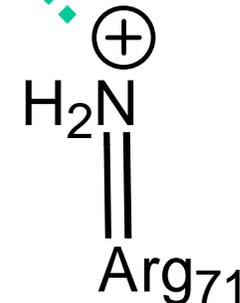


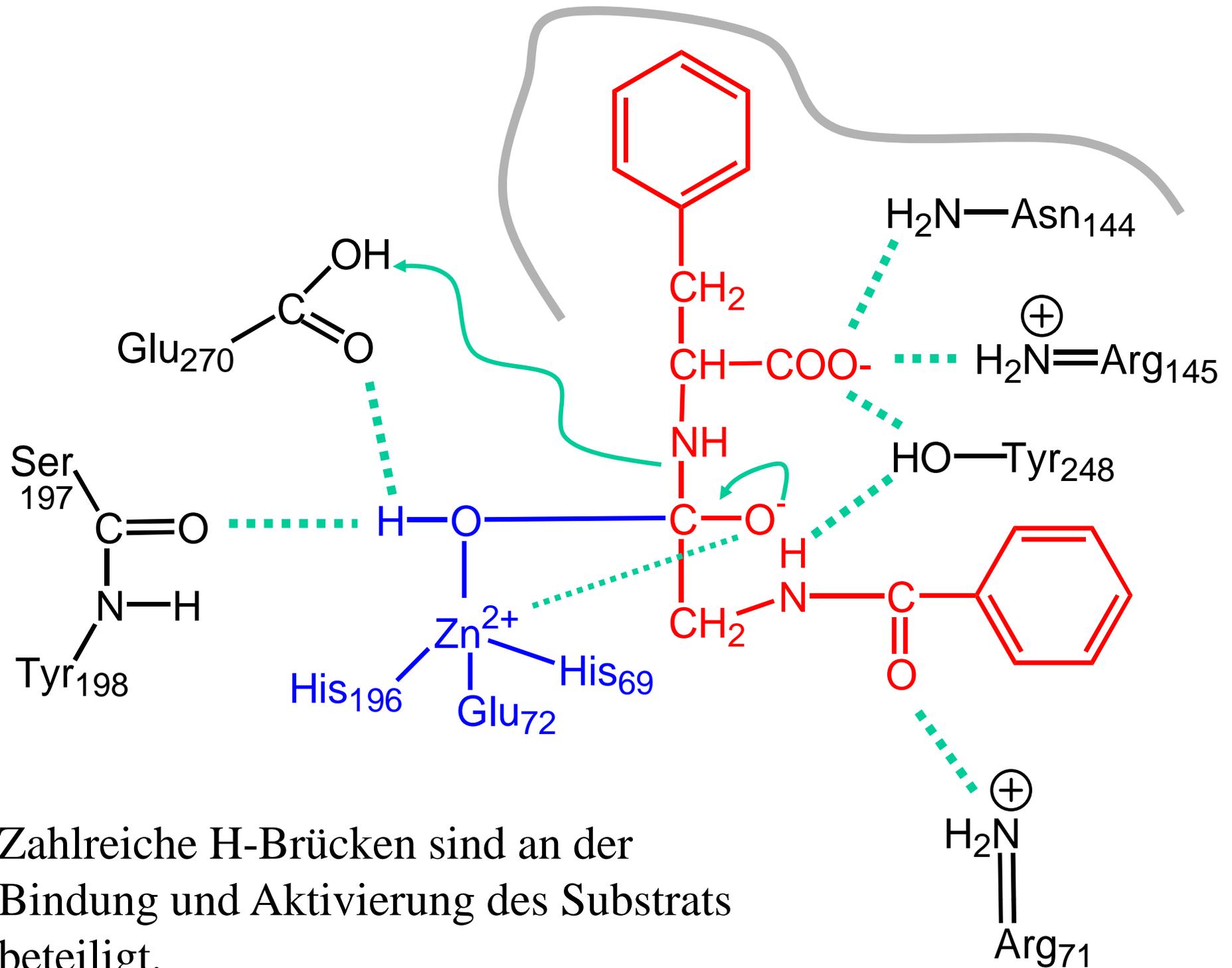
Mechanismus 2:

Ähnlich wie **Carboanhydrase**-Mechanismus

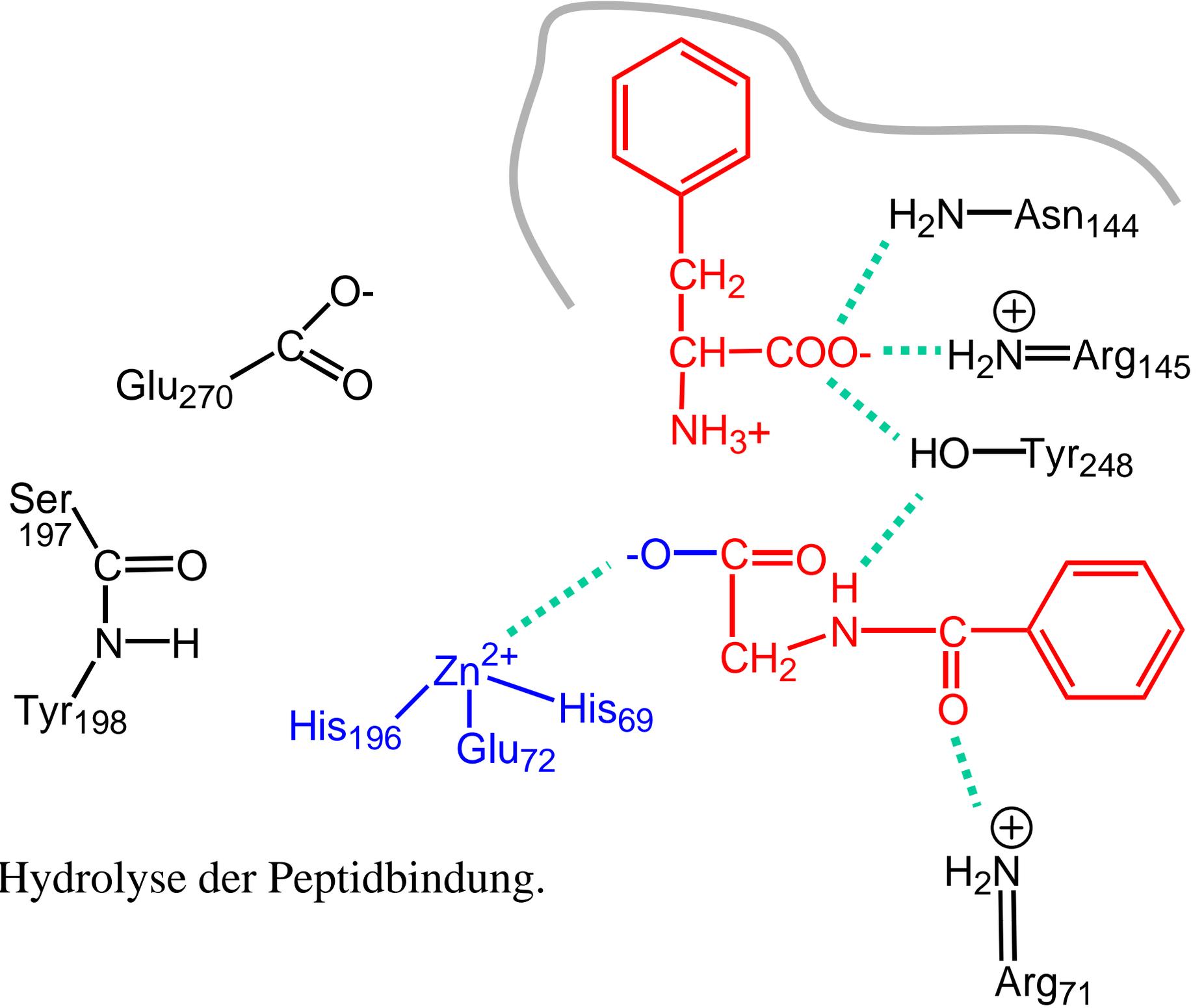


Das am Zink gebundene Wasser wird über Deprotonierung durch Glu270 in ein nukleophiles, Metall-modifiziertes Hydroxid umgewandelt, das am Carbonylkohlenstoff des Peptids oder Esters angreift.





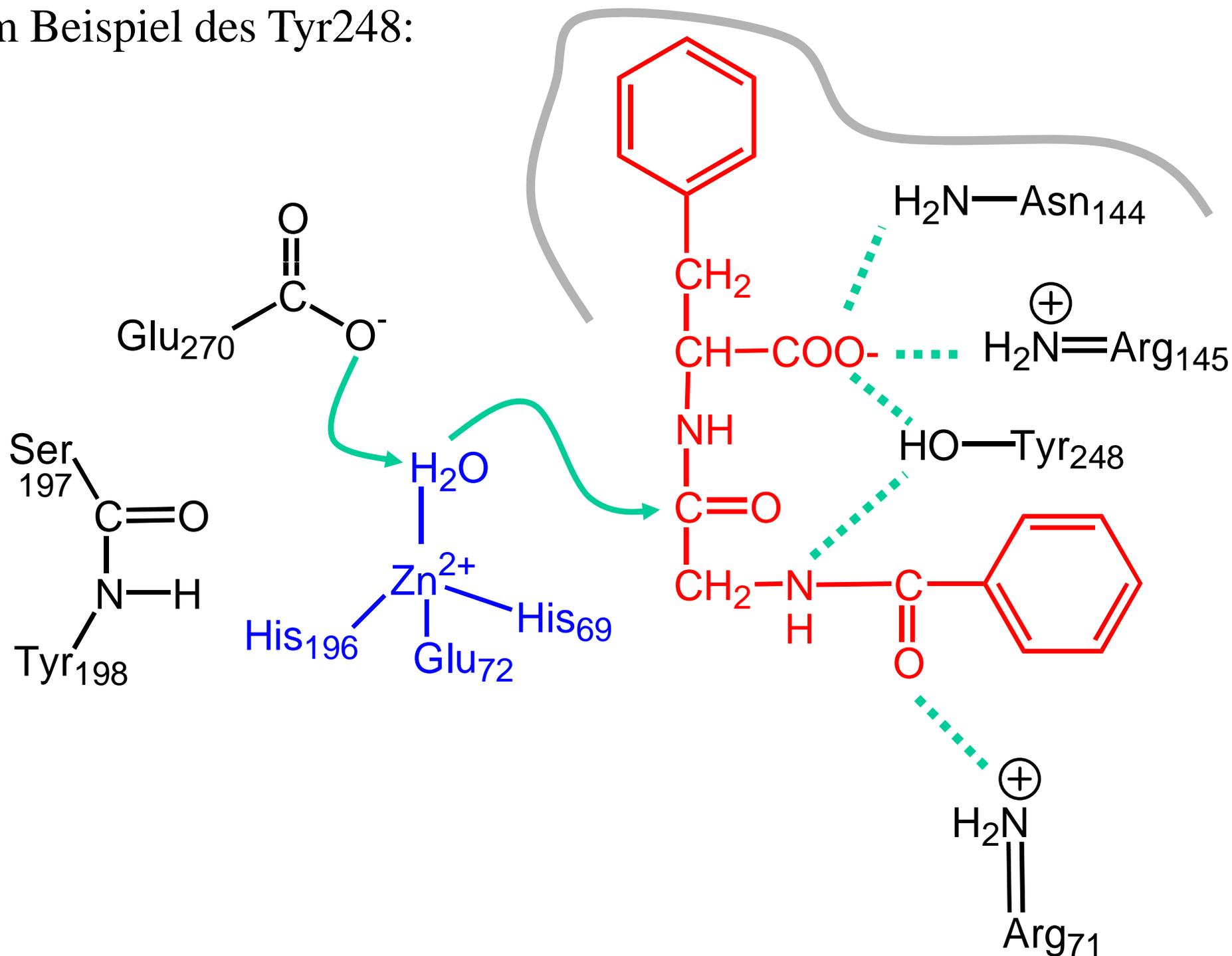
Zahlreiche H-Brücken sind an der Bindung und Aktivierung des Substrats beteiligt.



Wie bei der **Carboanhydrase** bewirkt also direkte Zink-Polarisation der Carbonylfunktion in Kombination mit einem Angriff Metall- und Glutamat-aktivierten Wassers bzw. Hydroxids am Carbonylkohlenstoff letztendlich die Hydrolyse.

Bemerkenswert für Zink-Proteasen sind **erhebliche Strukturänderungen bei Bindung von Substraten bzw. Substratanaloga**, wie z.B. Glycyl-L-Tyrosin (=Inhibitor): Arg145 und Glu270 bewegen sich um etwa 2 Å und Tyr248 ändert seine Position um 12 Å (!!), damit seine phenolische OH-Gruppe in die Nähe der NH-Gruppe der zu spaltenden Bindung kommt (siehe Abbildung). Zumindest 4 Wassermoleküle werden bei diesem Vorgang verdrängt, sodass das Substrat hauptsächlich von hydrophoben Gruppen anstelle von Wasser umgeben ist (günstige Entropiezunahme!). Wichtig, damit sich Enzym nicht selbst verdaut!

Erhebliche Strukturänderungen im Zuge eines Enzymdurchgangs
am Beispiel des Tyr248:

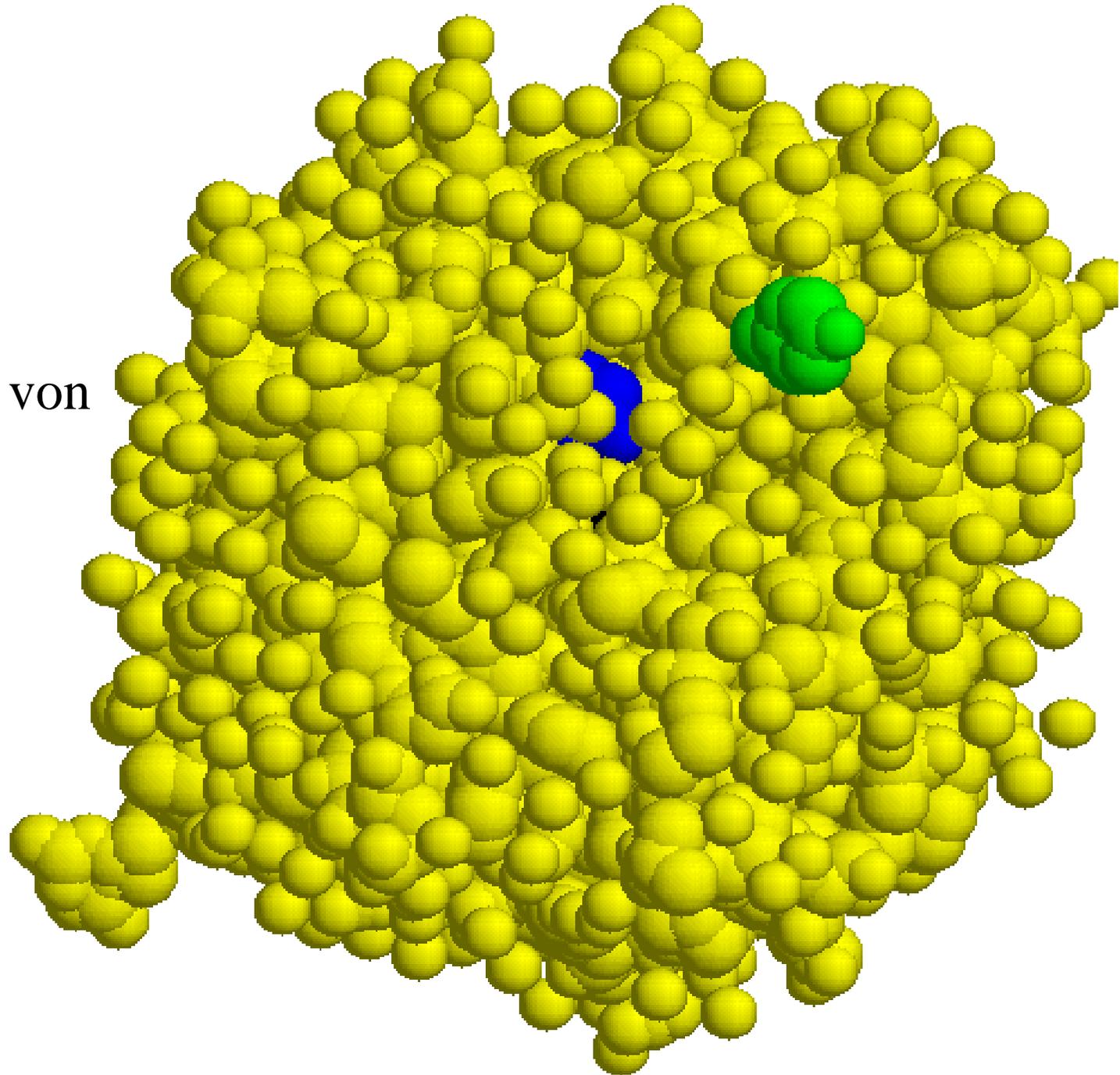


Carboxypeptidase A ohne Substrat; PDB Code: 1M4L

Glu270 (blau)

Tyr248 (grün)

Zink-Ion: nicht von
außen sichtbar



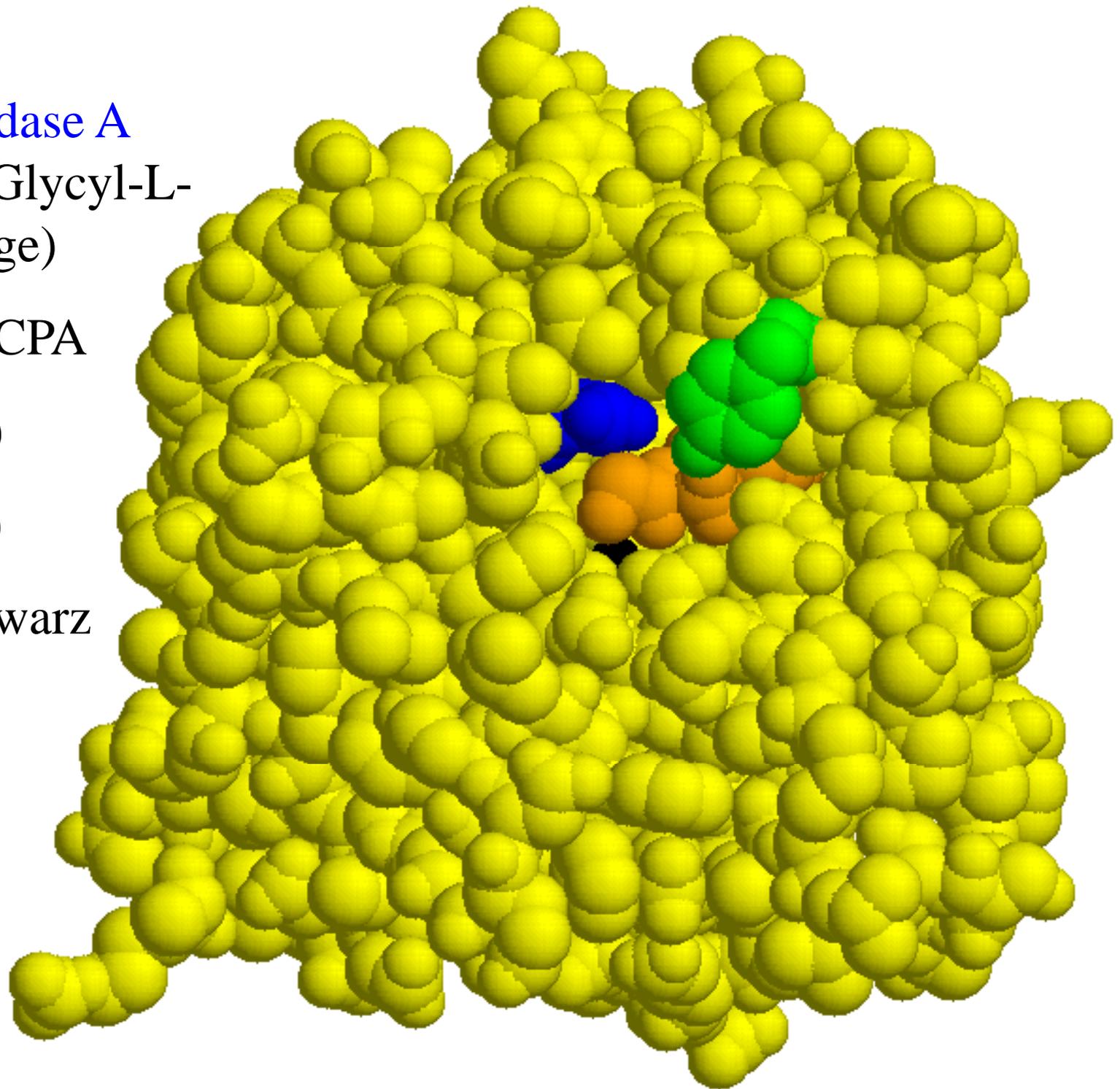
Carboxypeptidase A
mit Inhibitor Glycyl-L-
Tyrosin (orange)

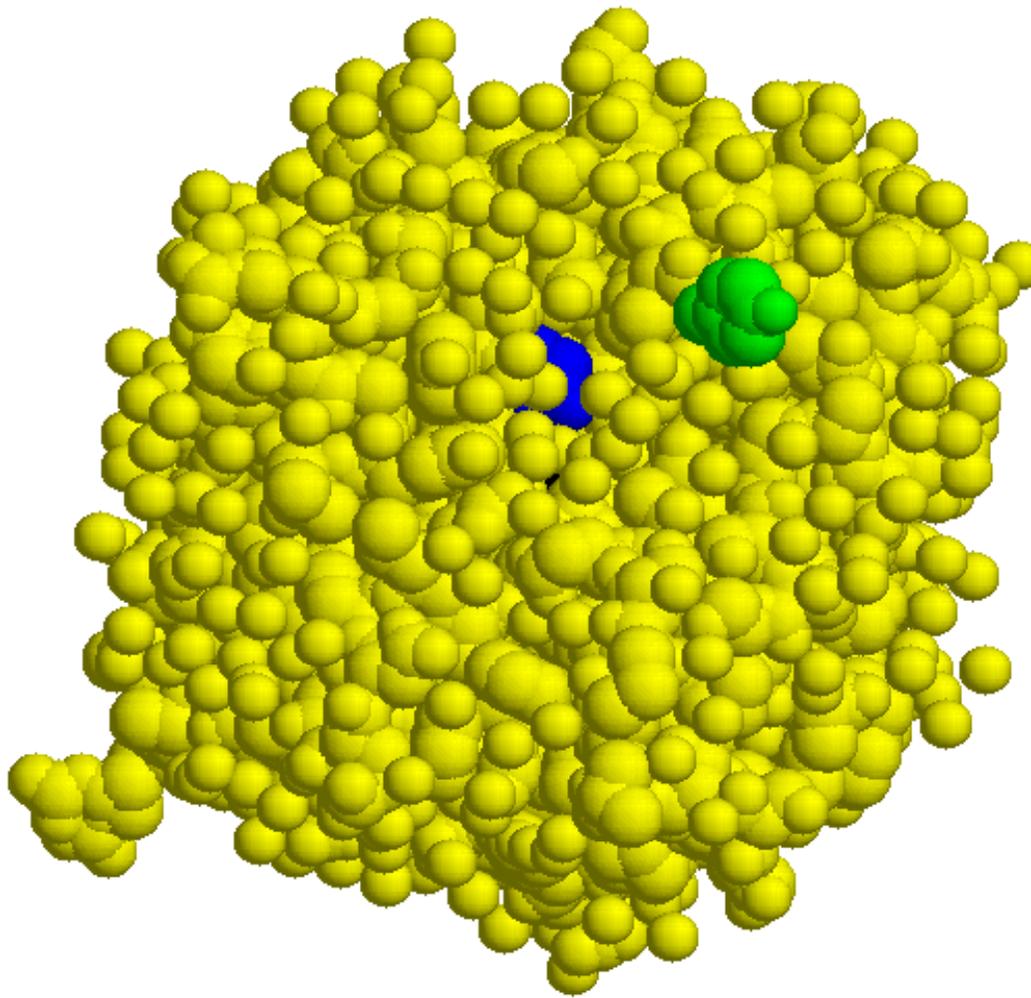
PDB-Code: 3CPA

Glu270 (blau)

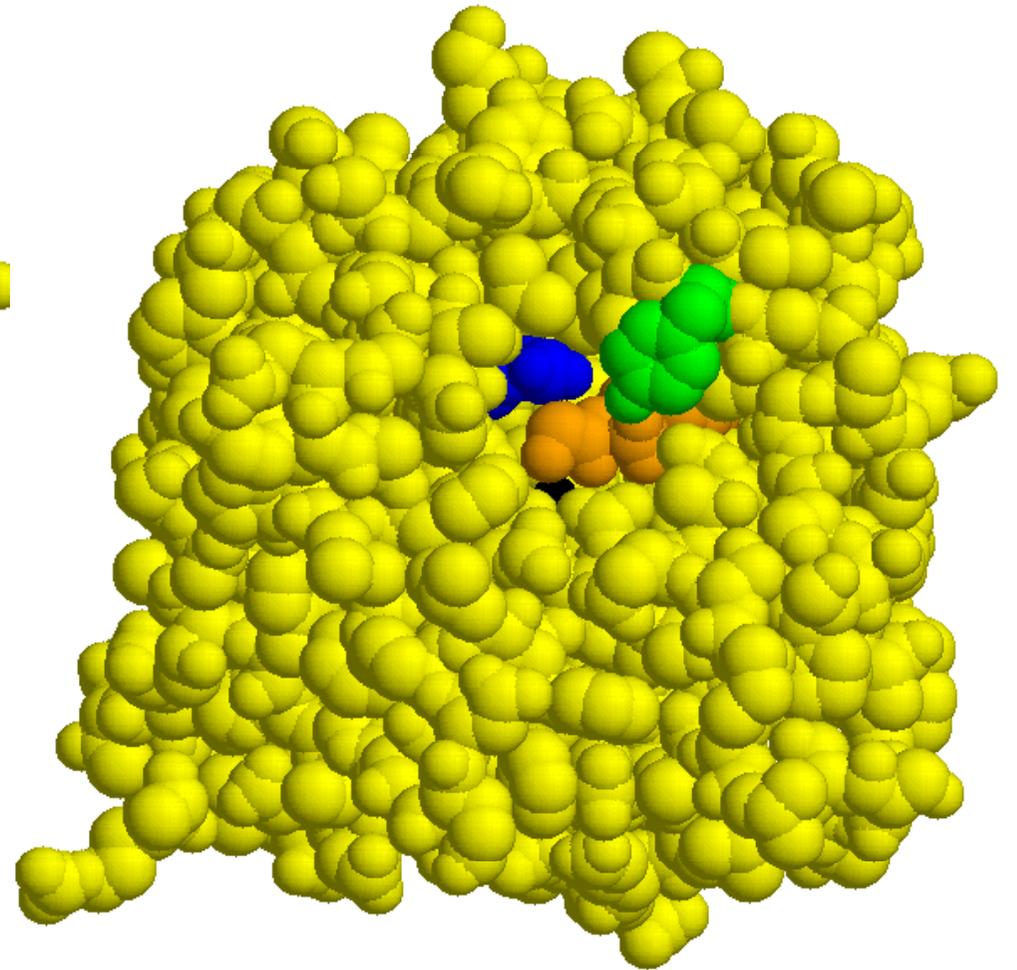
Tyr248 (grün)

Zink-Ion: schwarz

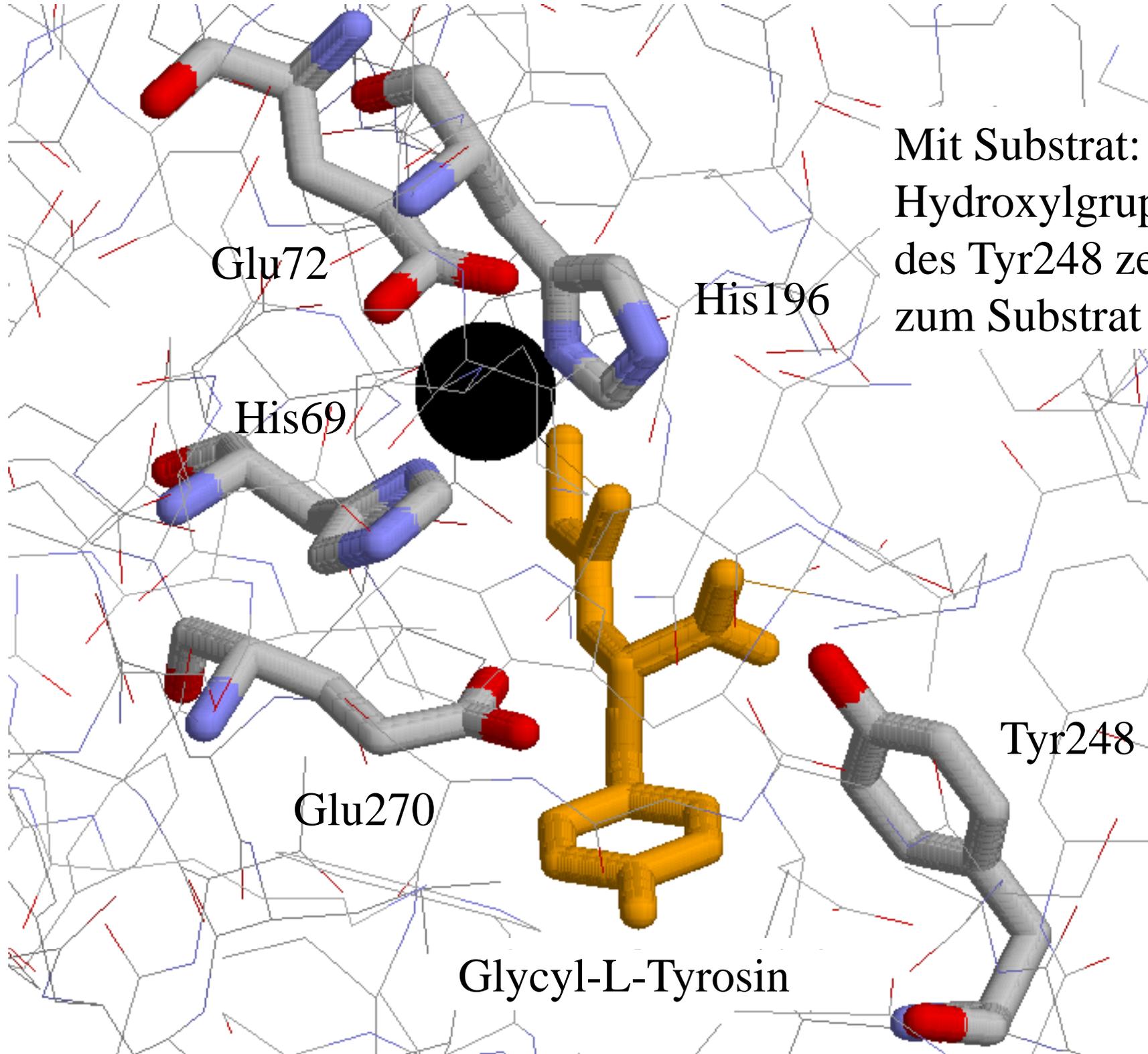




Ohne Substrat



Mit Substrat



Mit Substrat: Die Hydroxylgruppe des Tyr248 zeigt zum Substrat

Glu72

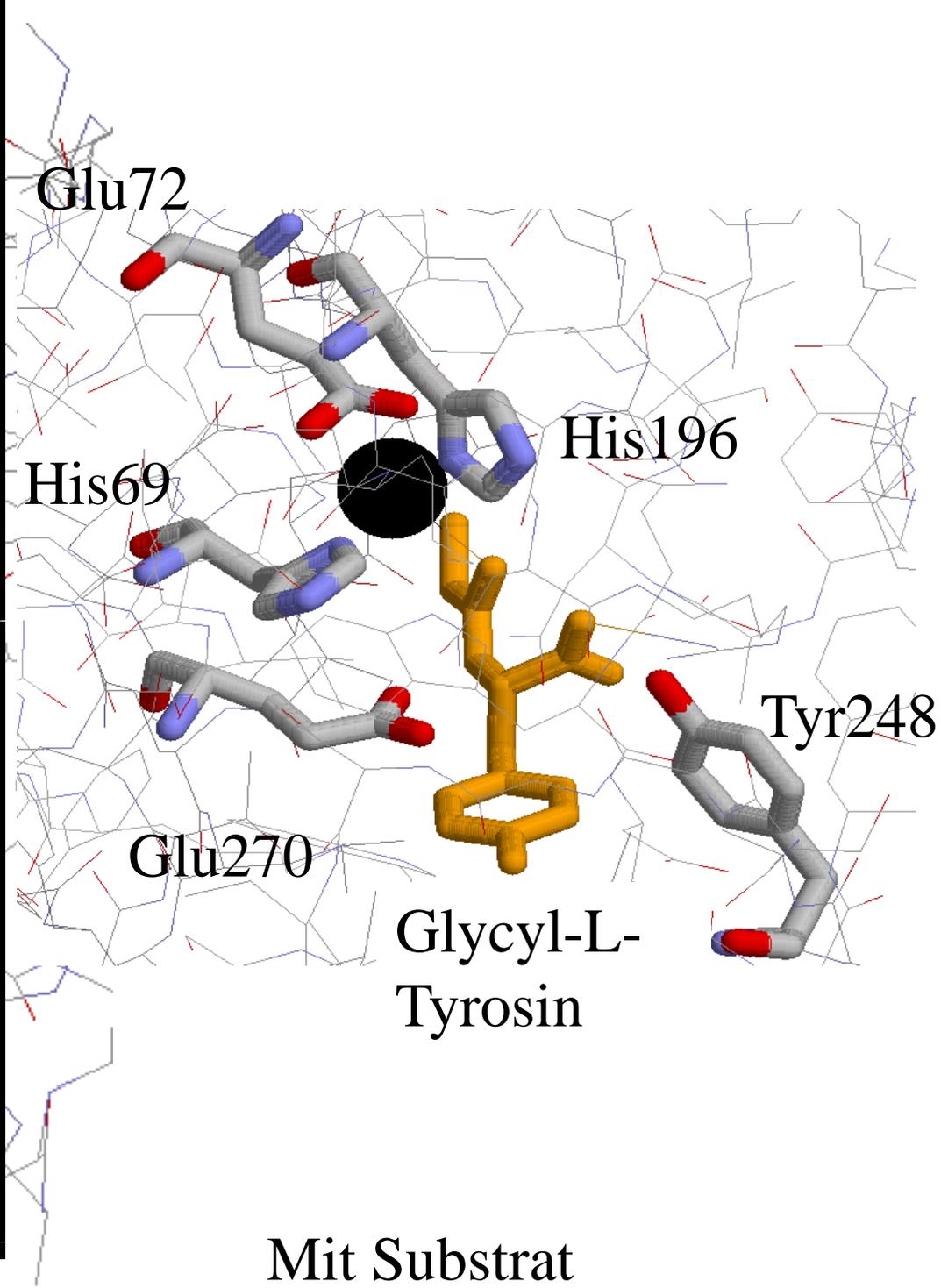
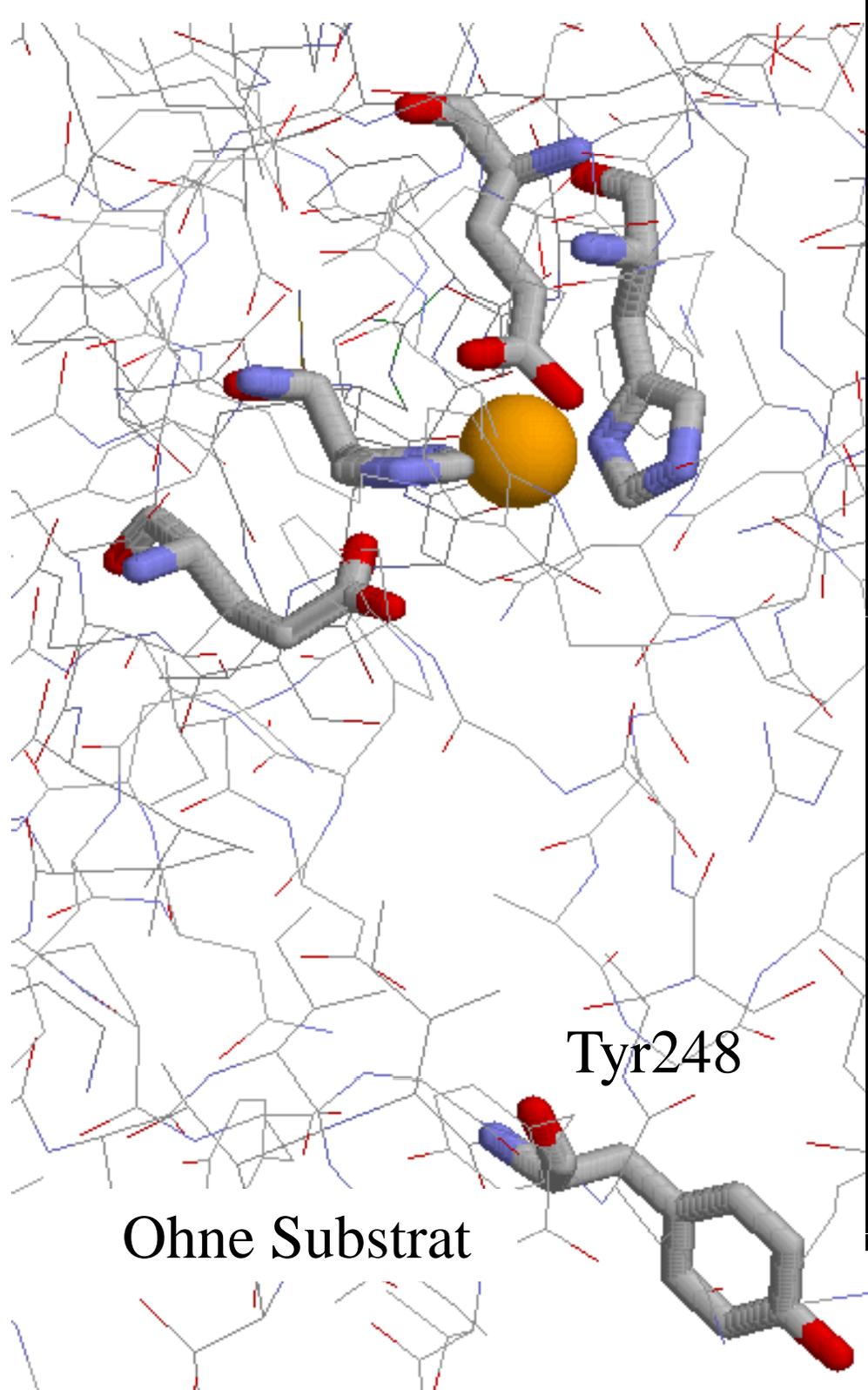
His196

His69

Tyr248

Glu270

Glycyl-L-Tyrosin



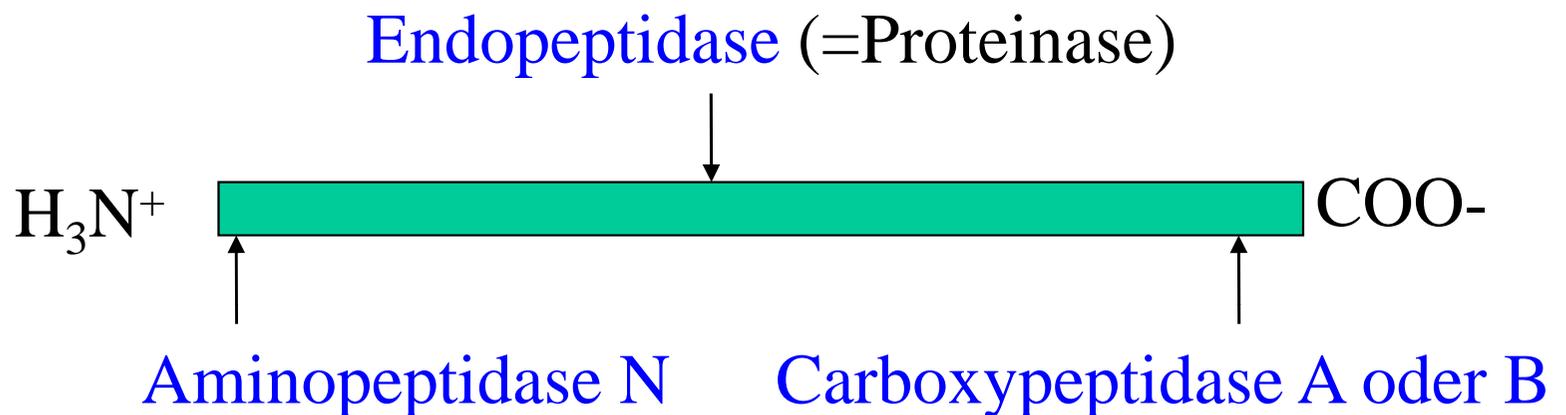
Dargestellte Mechanismen gelten für alle Zink-hältigen hydrolytischen Enzyme. Unterschiede liegen in der Substratspezifität.

Carboxypeptidase A: C-terminale Abspaltung von L-Aminosäuren mit großen hydrophoben, vorzugsweise aromatischen Resten (z.B. Phenylalanin).

Carboxypeptidase B: C-terminale Abspaltung von L-Aminosäuren mit basischen Resten.

Weitere humane Zink-Peptidasen/proteinasen:

Aminopeptidase N und mehrere **Endopeptidasen**.



Bedeutende **Endopeptidasen** (=Proteinasen) des Menschen sind die **Kollagenasen** (sog. MMPs: Matrix-Metalloproteinasen).

Kollagenasen sind gewebsauflösende **Matrix-Metalloproteinasen**, die sehr große physiologische Bedeutung haben:

- Embryonalentwicklung
- Wundheilung
- Tumormetabolismus
- arthritische Prozesse
- Amyloidprotein-Abbau (→ Alzheimer-Syndrom).

Typischerweise werden **Kollagenasen** wieder als Zymogene produziert. Durch Entfernen eines Cysteinat-Liganden am katalytischen Zn^{2+} -Zentrum (macht Substrat-Bindungsstelle frei) erfolgt Aktivierung. Auch Kollagenasen besitzen die typische Koordinationsumgebung am Zink-Ion (3 Histidine als Liganden).

↓ Deposition Hide

All Deposit Services
Electron Microscopy
NMR
Validation Server
BioSync Beamline
Related Tools

↓ Search Hide

Advanced Search
Latest Release
Latest Publications
Sequence Search
Ligand Search
Unreleased Entries
Browse Database
Histograms

Explorer:

Last Structure: 1CGE

↓ Tools Hide

File Downloads
FTP Services
File Formats
Services: RESTful | SOAP
Widgets
Compare Structures

CRYSTAL STRUCTURES OF RECOMBINANT 19-KDA HUMAN FIBROBLAST COLLAGENASE COMPLEXED TO ITSELF

DOI:10.2210/pdb1cge/pdb

Primary Citation

Crystal structures of recombinant 19-kDa human fibroblast collagenase complexed to itself.

Lovejoy, B., Hassell, A.M., Luther, M.A., Weigl, D., Jordan, S.R.

(1994) *Biochemistry* 33: 8207-8217

PubMed: 8031754

[Search Related Articles in PubMed](#)

PubMed Abstract:

Collagenase is a member of the matrix metalloproteinase (MMP) family of enzymes. Aberrant regulation of this family has been implicated in pathologies such as arthritis and metastasis. Two crystal forms of the catalytic (19-kDa) domain of human fibroblast collagenase have ...

[\[Read More & Search PubMed Abstracts \]](#)

↓ Molecular Description Hide

Classification: **Hydrolase (metalloprotease)**

Structure Weight: 19073.70

Molecule: FIBROBLAST COLLAGENASE

Polymer: 1 Type: polypeptide(L)

Length: 168

Chains: A

EC#: 3.4.24.7

↓ Source Hide

Polymer: 1

Scientific Name: **Homo sapiens**



Common Name: Human

↓ Related PDB Entries Hide

Id	Details
1CGF	
1CGL	

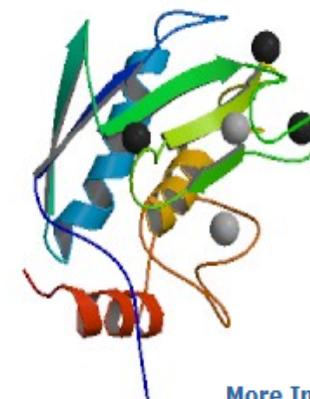
↓ Ligand Chemical Component Hide

Identifier	Name	Formula	Interaction View	Links
CA	CALCIUM ION	Ca	Ligand Explorer	L D H

1CGE

- [Display Files](#)
- [Download Files](#)
- [Print this Page](#)
- [Share this Page](#)

← Biological Assembly ?



[More Images...](#)

[View in Jmol](#) [SimpleViewer](#)
[Other Viewers](#) [Protein Workshop](#)

Biological assembly assigned by authors

↓ Deposition Summary Hide

Authors: Lovejoy, B., Hassell, A.M., Luther, M.A., Weigl, D., Jordan, S.R.

Deposition: 1994-02-03

Release: 1995-03-31

Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

↓ Experimental Details Hide

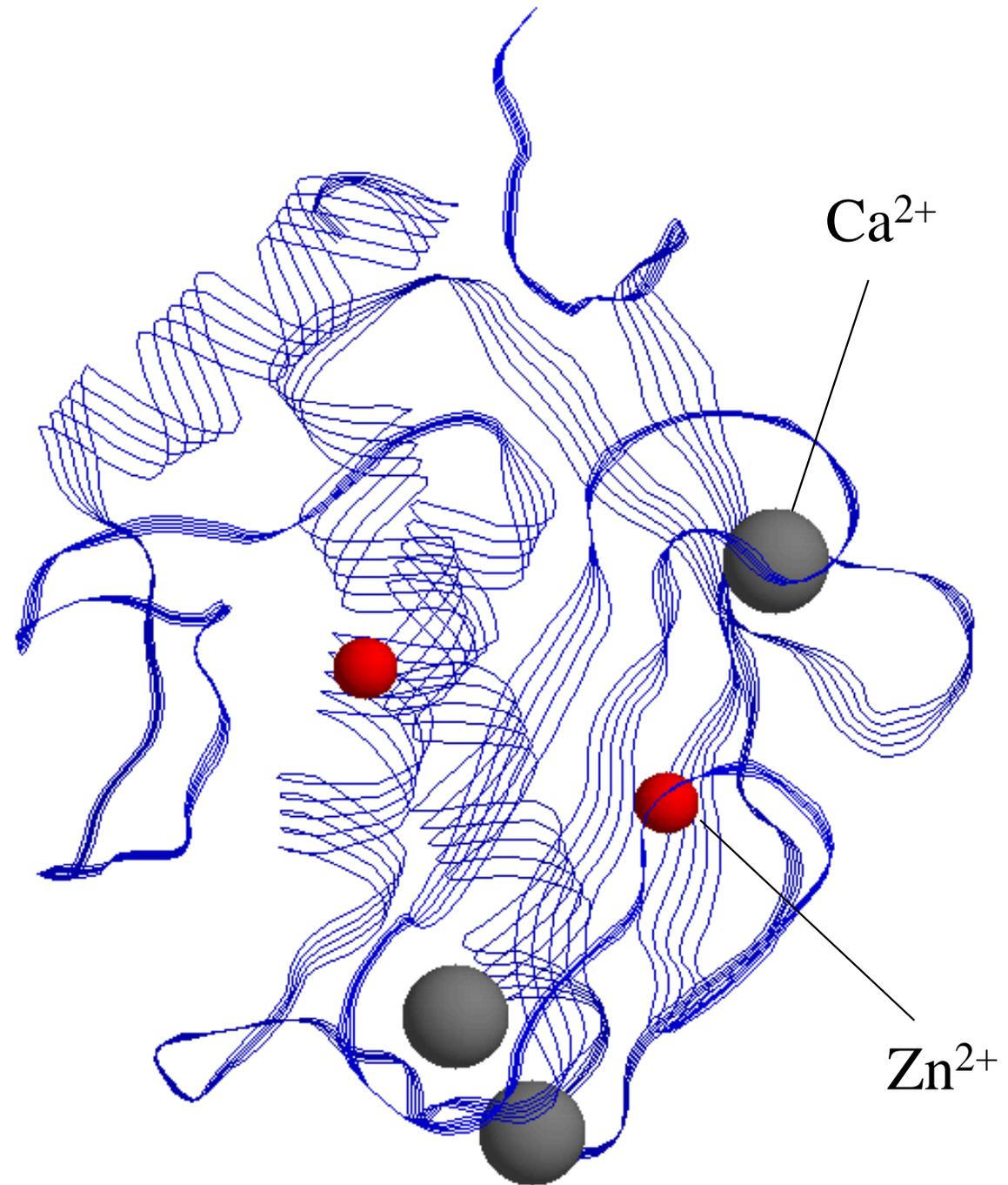
Method: X-RAY DIFFRACTION

Experimental Data: N/A

Resolution[Å]: 1.90

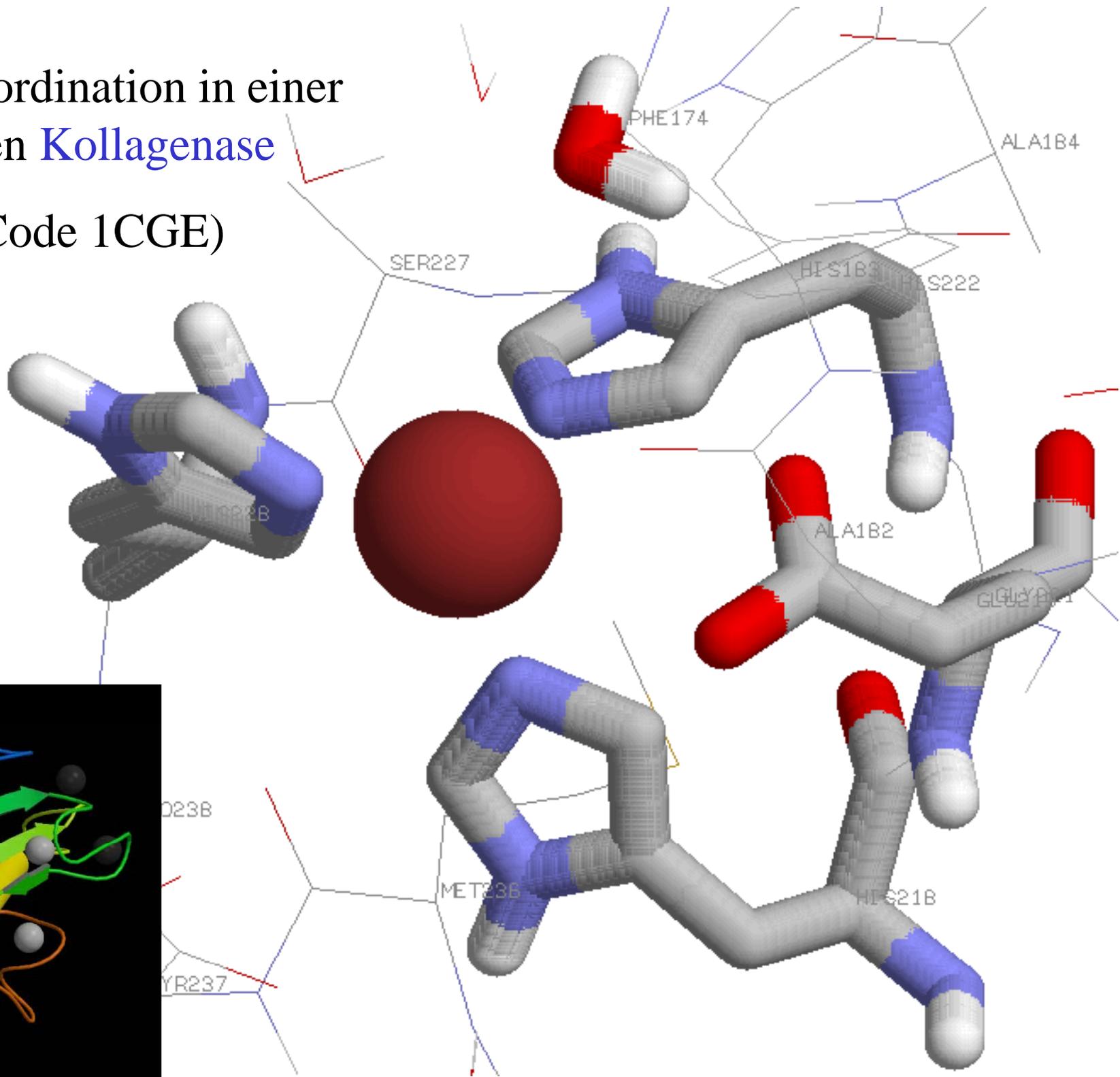


In **Kollagenasen** findet man im aktiven Zentrum ein Zink-Ion, das – ähnlich dem gut untersuchten bakteriellen **Thermolysin** - durch jeweils drei Histidine koordiniert ist. Die rechts dargestellte Struktur stammt aus einem (artifiziellem) Dimer. Drei Ca^{2+} -Ionen haben strukturelle Funktion.



Kollagenase aus humanen Fibroblasten (PDB-Code 1CGE)

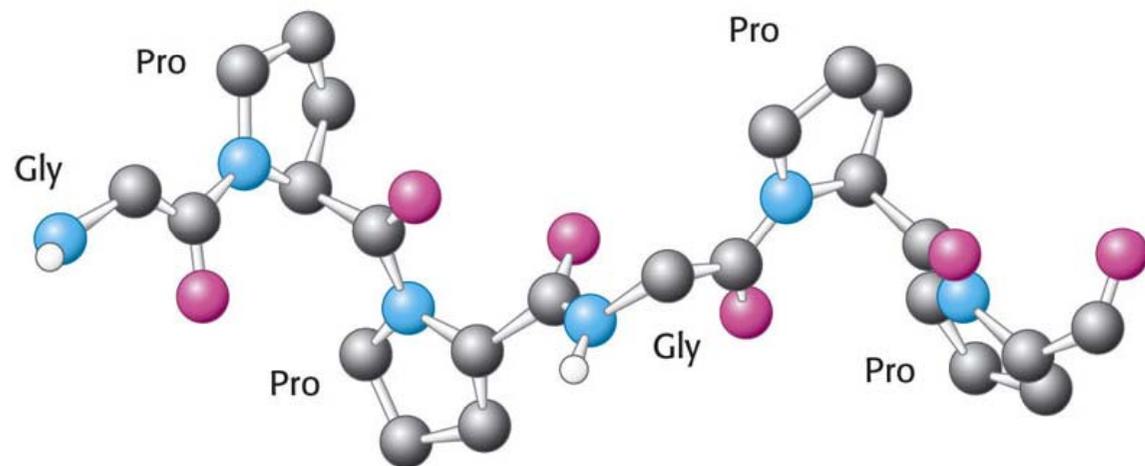
Zinkkoordination in einer
humanen **Kollagenase**
(PDB-Code 1CGE)



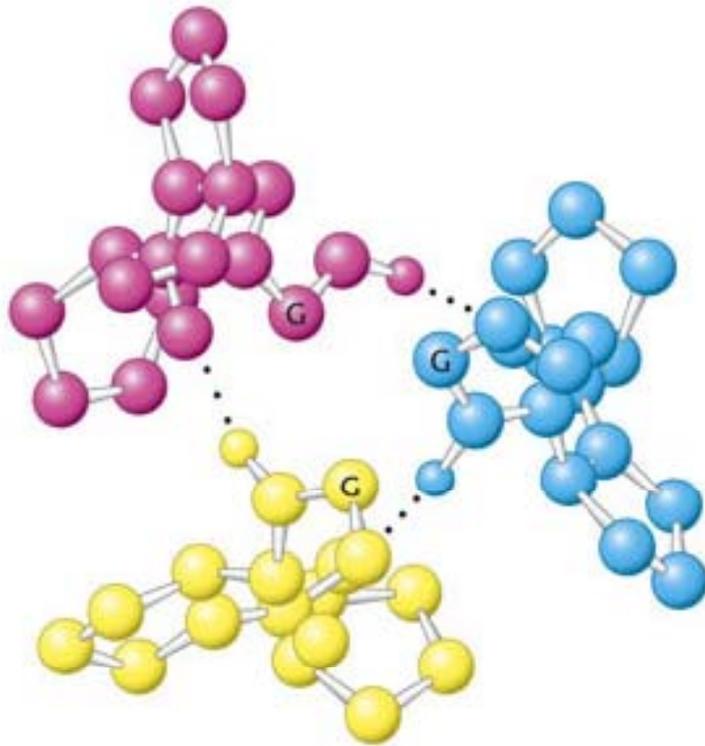
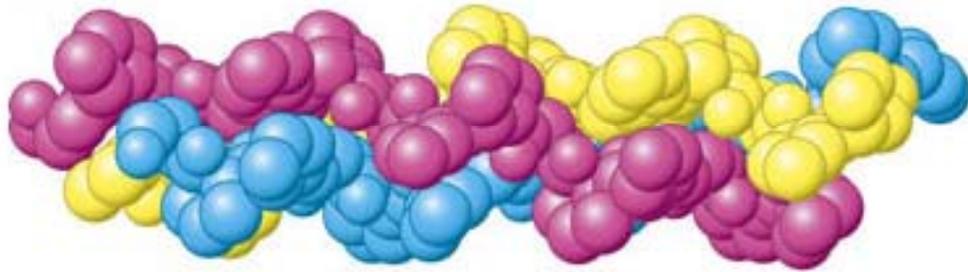
Kollagen ist bei Säugern das häufigste Protein. Es ist ein faserförmiger Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel und Zähnen.

Stabförmiges, extrazelluläres Protein mit einer Länge von 3000 Å und einem Durchmesser von 15 Å. Kollagen enthält drei helicale Polypeptidketten, die jeweils etwa 100 Reste umfassen. Jeder dritte Rest ist ein Glycin und die Sequenz Gly-Pro-Hydroxyprolin kommt häufig vor.

-Gly-Pro-Met- Gly-Pro-Ser- Gly-Pro-Arg-
22
-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-
31
-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Hyp-
40
-Gly-Glu-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Ser-
49
-Gly-Pro-Met- Gly-Pro-Arg- Gly-Pro-Hyp-
58
-Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Asn- Gly-Asp-Asp-



Hydroxyprolin ist ein Derivat vom Prolin, das anstelle von einem der Wasserstoffatome im Pyrrolidonring eine Hydroxylgruppe enthält. Bildung ist Vitamin C abhängig. Mangel: Skorbut.



Kalottenmodell und Querschnitt durch die Kollagenhelix. Jeder dritte Rest muss ein Gly sein, da im Inneren der Helix kein Platz ist. Die Pyrrolidonringe liegen außen.

Kollagenhelix:

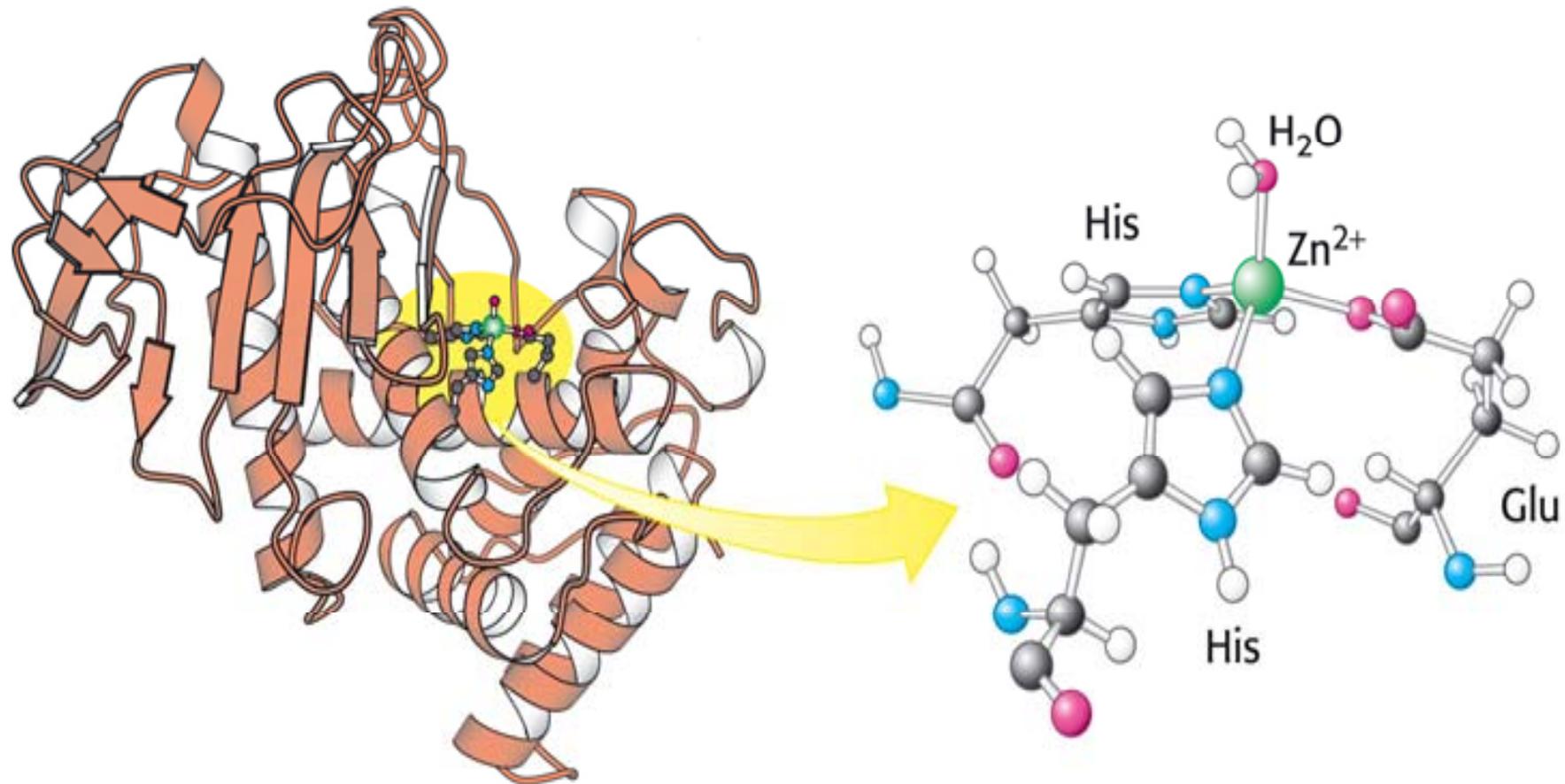
Innerhalb eines Stranges gibt es keine Wasserstoffbrücken. Die Helix wird durch Abstoßung der Pyrrolidonringe von Prolin- und Hydroxyprolinresten stabilisiert.

Drei Stränge winden sich umeinander und bilden einen Superhelixstrang, der durch H-Brücken zwischen den NH-Gruppen der Peptidbindung der Glycine und CO-Gruppen an Resten auf den anderen Ketten (u.a. Hydroxyprolin) stabilisiert wird.

Nicht humane (interessante) Zink-hältige Hydrolasen sind

Thermolysin (Endopeptidase aus *Bacillus thermoproteolyticus*).

Biotechnologisch interessant, da sehr temperaturstabil
(Stabilisierung durch vier Ca^{2+} -Ionen). Hydrolysiert interne
Bindungen, die neben hydrophoben Resten liegen.



Nicht humane (interessante) Zink-hältige Hydrolasen sind **Schlängengifte** sind in der Regel Bindegewebsauflösend und gerinnungshemmend. Das Gift der texanischen Klapperschlange (western diamond rattlesnake, *Crotalus atrox*) enthält z.B. fünf Toxine, die allesamt Zn-hältige Proteinase sind! Inaktivierung des Giftes durch EDTA!

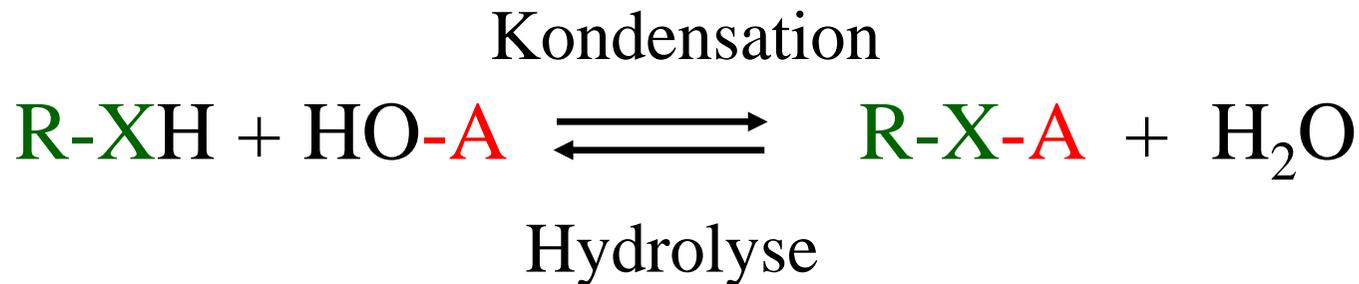
Effiziente **Toxine** vom Tetanus- und Botulinus-Typ sind zinkabhängige Proteinase. Neurotoxisch, da sie spezifische synaptische Membranproteine entfernen.

β -Lactamasen (Resistenz gegen Penicillin-Antibiotika) können Zn-Proteine sein.

usw. usw.

Weitere hydrolytische Zink-Enzyme

Weitere wichtige humane Zn-abhängige Hydrolasen (E.C. 3.x.x.x) sind Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Nucleasen und Phospholipasen.



Hydrolyse:



Phosphatasen, Phospholipasen

Kondensation:

DNA-Polymerasen und RNA-Polymerasen; Bildung von Polymeren aus Mononucleosidtriphosphat-Bausteinen [siehe Zink (2)].

Phosphatasen entfernen Phosphatreste u.a. aus phosphorylierten Proteinen und Zuckern und sind daher sehr wichtig in der Regulation der Stoffwechselwege und in der Signalübermittlung.

Oftmals enthalten diese Enzyme Spurenelemente im aktiven Zentrum. Neben Zink findet man Mangan und/oder Eisen.

Bei den **Proteinphosphatasen** unterscheidet man aufgrund der Substratspezifität (komplett unterschiedliche Strukturen und katalytische Mechanismen):

- **Serin-Threonin-Phosphatasen** (entweder 2 Mn, 2 Fe oder Fe/Zn-Kombination im aktiven Zentrum)
- **Tyrosin-Phosphatasen** (keine Übergangsmetalle im aktiven Zentrum)

Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Bioanorganische Chemie des Zinks

Carboanhydrase

Peptidasen, Proteinasen, Lipasen und Phosphatasen

Aldolasen, Dehydratasen und Polymerasen

Alkohol-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase

Genregulierende Zinkproteine

Insulin