

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 (→ **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

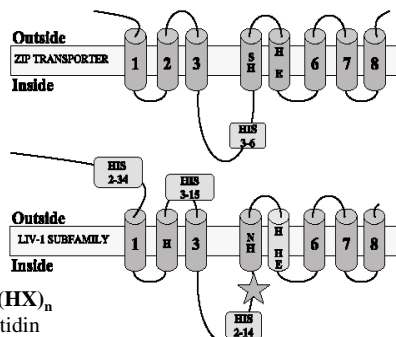
Die Sekundärstruktur und Funktion dieser Moleküle ist sehr ähnlich:

- **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 Histidin-reicher 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

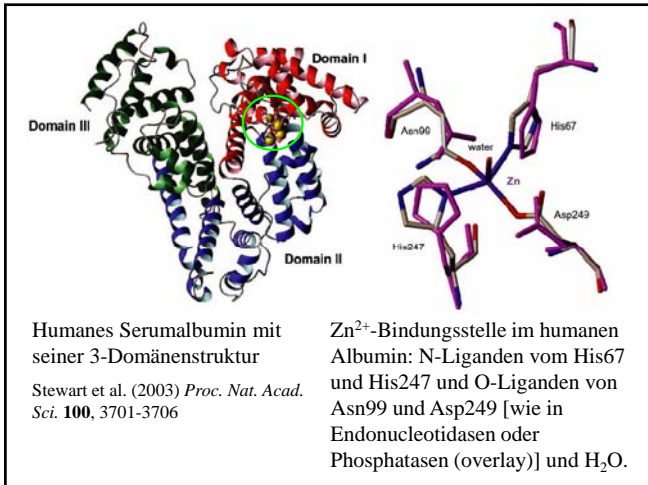
Im Blutplasma wird Zn^{2+} mittels **Albumin** bzw. **Metallothioneinen** transportiert. Die Konzentration des Zn^{2+} im Blutplasma ist etwa $19 \mu\text{M}$.

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).

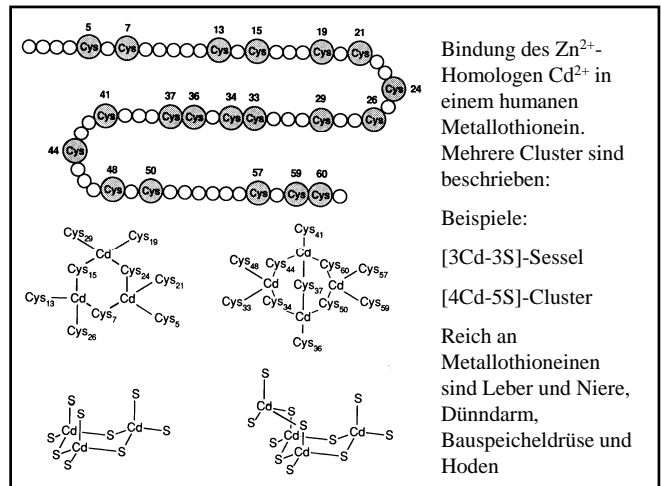
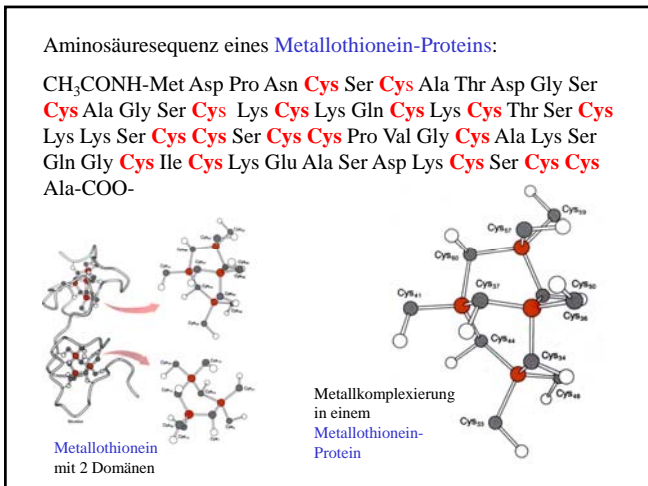
Die Zn^{2+} bzw. Cd^{2+} -Bindungsstelle liegt zwischen der Domäne I und II.



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:

- Speicher-Funktion** für die essentiellen Thiolat-affinen Metalle Zink und Kupfer. Die ubiquitären **Metallothioneine** dienen der Homöostase und dem **Transport** Thiolat-affiner Metallionen.
- Entgiftungsfunktion:** Besonders effizient wird das Zink-Homologe Cd²⁺ gebunden. Auch andere Thiolat-liebende Schwermetall-Ionen wie Cu(I), Ag(I), Hg(II) werden gebunden (Entgiftungsrolle nicht unumstritten).
- Radikalfänger:** Aufgrund ihres hohen Cystein-Gehalts dienen Metallothioneine als Radikalfänger (z.B. für Hydroxyl-Radikale, OH⁻).



Spurenelement Zink

Einleitung

Transport und Speicherung

Bioanorganische Chemie des Zinks

Periodic Table - Netscape

Periodic Table Electron Configuration Plot Data Element Data

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

Element Data
Zinc, Zn

Atomic number (Z)	Electronegativity (Pauling)	Ionic radius
30	1.65	83 (2+) pm
Molar Mass	Electron configuration	Ionization energy
65.37 g/mol	[Ar]3d ¹⁰ 4s ²	(1) 906 kJ/mol
Atomic Radius	Stable isotopes	(2) 1733 kJ/mol
137 pm	⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁶⁷ Zn, ⁶⁸ Zn, ⁷⁰ Zn	(3) 3833 kJ/mol
Normal state	Melting point	Density
solid / metal	420 °C	7.14 g/cm ³
Enthalpy of fusion	Boiling point	Molar heat capacity
6.67 kJ/mol	907 °C	25.4 J K ⁻¹ mol ⁻¹
Enthalpy of vaporization	Standard molar entropy	
115.3 kJ/mol	41.6 J K ⁻¹ mol ⁻¹	

Kleines Ion mit hoher effektiver Ladung!

Zinc, Zn

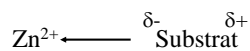
Vom reaktionschemischen Standpunkt aus besteht die wesentliche biologisch wirksame Funktion des Zinks in seiner **Lewis-Acidität**.

Es kommt unter physiologischen Verhältnissen nur zweifach ionisiert vor (Zn²⁺).

Elektronenkonfiguration von Zn²⁺: [Ar]3d¹⁰

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

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

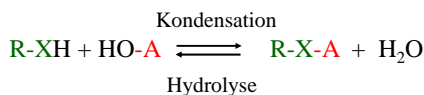
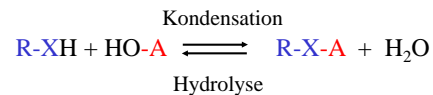


Hydrolyseprozesse und Kondensationsprozesse werden chemisch-synthetisch oft durch starke Säuren oder Basen katalysiert.

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):



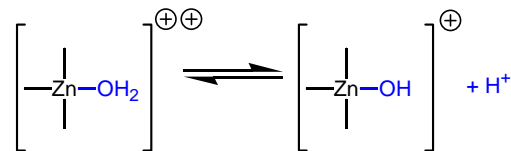
X = NH, A = -CO-R' Peptidasen, Lactamasen, Kollagenasen, Dehydratasen

X = O, A = -CO-R' Esterasen

X = O, A = PO₃²⁻ Phosphatasen, Nucleasen

Daneben kann Zink auch mit Hilfe des Wassers zu einer Lewis-Base werden: [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 [Zn(OH)₂]²⁺ beträgt in wässrigen Medien etwa 10, kann sich für enzymatische Systeme aber bis auf etwa 7 verringern!

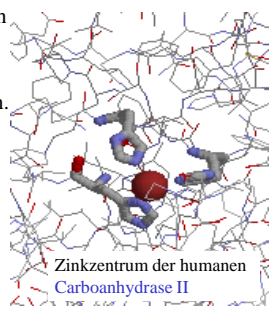
Während Zn²⁺ als Lewis-Säure nucleophile Zentren angreifen kann, greift [-Zn-OH]⁺ als Lewis-Base elektrophile Zentren an!

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.

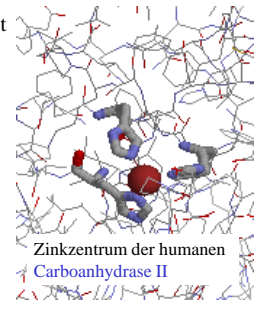
Es bevorzugt aufgrund der d^{10} -Konfiguration (keine Ligandeneffekte) und seiner Stellung im Periodensystem eher **niedrige Koordinationszahlen**.

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 (entartischer 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

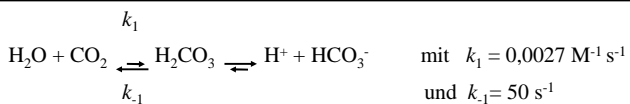
Carboanhydrase

Carboanhydrase (Lyase: EC 4.2.1.1)

CO_2 ist eines der hauptsächlichen Endprodukte im aeroben Metabolismus. Bei komplexen Organismen wird CO_2 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 CO_2 ist ein pH-abhängiger Prozess, der selbst ohne Katalysator abläuft. Bei $37^\circ C$ und pH 7,0 ist die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung jedoch nur $k_1 = 0,0027 M^{-1} s^{-1}$.



Mit $[H_2O] = 55,5 M$ entspricht dies einer effektiven Geschwindigkeitskonstante von $0,15 s^{-1}$ [aus $(0,0027 M^{-1} s^{-1}) \times 55,5 M$]

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

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

Dies entspricht einem Verhältnis von $[CO_2]$ zu $[H_2CO_3]$ von 340:1!

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

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 ($k_{cat} = 10^6 s^{-1}$). 1932 als erstes Zn-protein entdeckt! Neben **Hämoglobin** häufigstes Protein der Erythrocyten. Man findet Carboanhydrasen im Zusammenhang mit

Enzymreaktionen: HCO_3^- als Substrate!

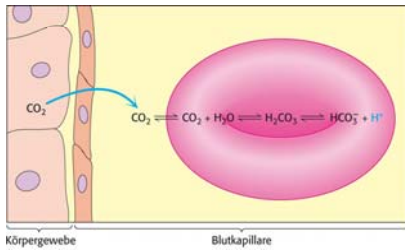
Photosynthese: Calvin-Cyclus (Dunkelreaktion)

Citratzyklus, oxidativer Pentosephosphatweg: oxidative Decarboxylierung

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

pH-Pufferung

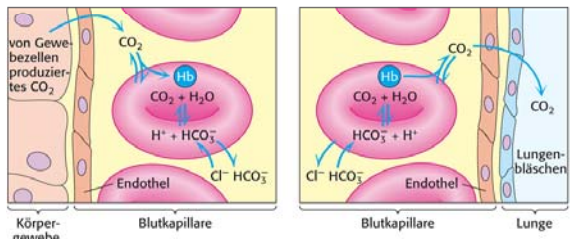
Im aeroben Stoffwechsel entstehen pro verbrauchtem Sauerstoffmolekül etwa 0,8 Moleküle CO₂. In den Geweben enthaltenes (neutrales) Kohlendioxid diffundiert durch die Membranen in die Erythrocyten. Dabei sind Membrantransporter beteiligt. In den roten Blutkörperchen wird CO₂ durch die **Carboanhydrase** mit Wasser in Kohlensäure umgewandelt, die in Hydrogencarbonat HCO₃⁻ 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 HCO₃⁻ verlässt die Zelle mittels eines spezifischen Membrantransportproteins (Anionenkanal). Hierbei erfolgt der Austausch von HCO₃⁻ aus dem Zellinneren mit Cl⁻ von der anderen Seite der Membran. Dadurch erhöht sich die Konzentration von HCO₃⁻ im Serum. In der Lunge erfolgt die Umkehr des Prozesses. Hydrogencarbonat wird wieder in CO₂ umgewandelt, das ausgeatmet wird.



Die biologische Bedeutung der Carboanhydrase ist der Hauptgrund, warum Zn²⁺ ein limitierendes Element für das Wachstum von Phytoplankton darstellt. Eine bedeutende Rolle spielt die Carboanhydrase auch im Recycling von anthropogen bedingtem CO₂-Eintrag in die Atmosphäre!

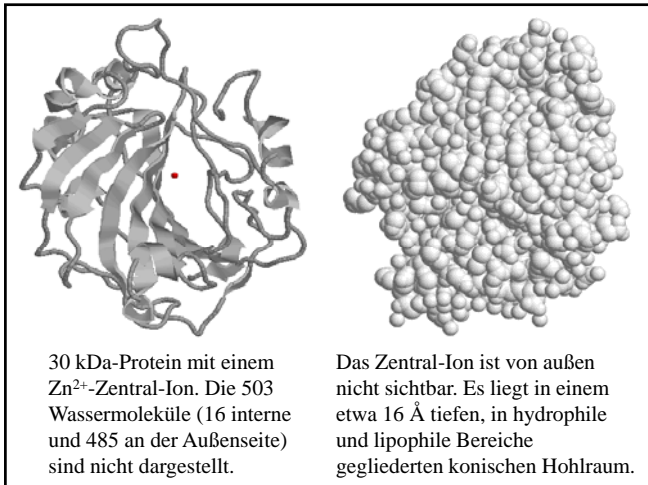
Im menschlichen Organismus existieren mindestens sieben strukturell sehr ähnliche, aber funktional unterschiedliche Varianten (Isoenzyme) der **Carboanhydrase** (sieben Gene).

Strukturell gut charakterisiert ist die menschliche Form **Carboanhydrase II** (PDB-Code 1CA2). Es handelt sich um ein mittelgroßes Metalloprotein (40 × 40 × 55 Å) aus 249 Aminosäuren (etwa 30 kDa).

2CKB	Crystal structure of putative beta-phosphoglucomutase from <i>Thermotoga maritima</i>	Release Date: 17-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION Resolution: 1.74 Å	Molecule: Phosphorylated carbohydrates phosphatase TH_1254	Length: 216
2WCV	CRYSTAL STRUCTURE OF BACTERIAL FICU	Release Date: 10-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION Resolution: 1.90 Å	Molecule: L-FUCOSE MUTAROTASE	Length: 140
2WEG	THERMODYNAMIC OPTIMISATION OF CARBONIC ANHYDRASE FRAGMENT INHIBITORS	Release Date: 10-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION Resolution: 1.10 Å	Molecule: CARBONIC ANHYDRASE 2	Length: 239
2WEH	THERMODYNAMIC OPTIMISATION OF CARBONIC ANHYDRASE FRAGMENT INHIBITORS	Release Date: 10-Nov-2009 Exp. Method: X-RAY DIFFRACTION Resolution: 2.09 Å	Molecule: CARBONIC ANHYDRASE 2	Length: 239

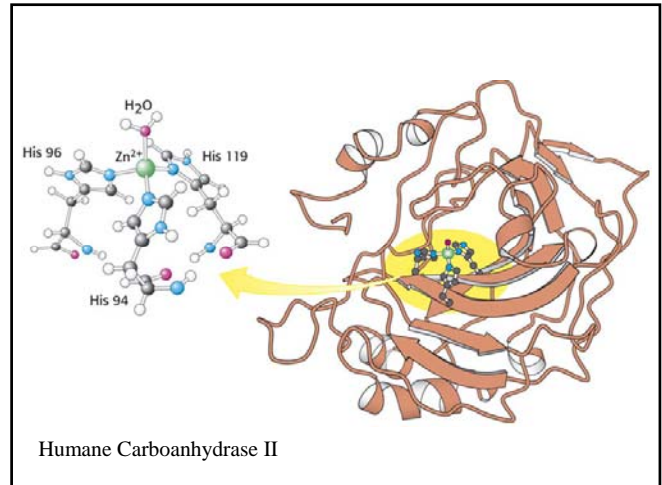
Humane Carboanhydrase Code: 1CA2

Rasmol Swiss-Pdb-Viewer

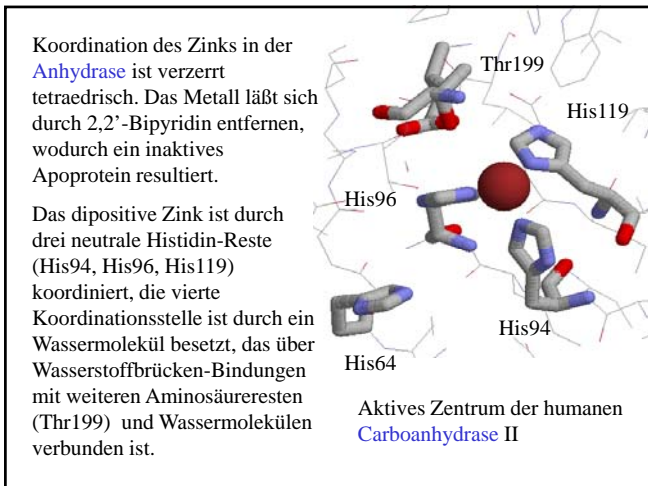


30 kDa-Protein mit einem Zn^{2+} -Zentral-Ion. Die 503 Wassermoleküle (16 interne und 485 an der Außenseite) sind nicht dargestellt.

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



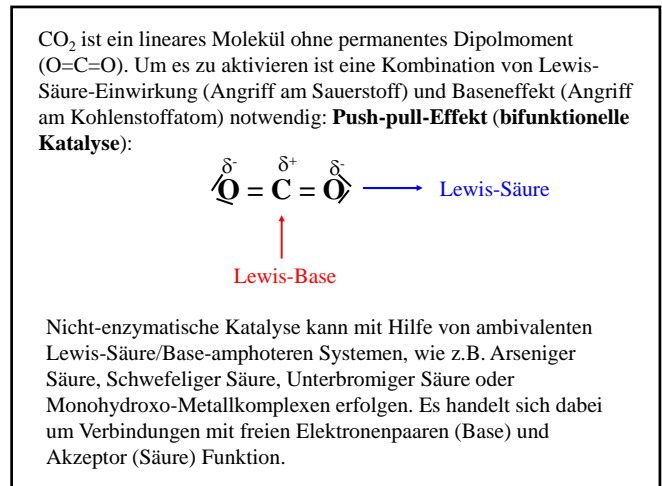
Humane Carboanhydrase II



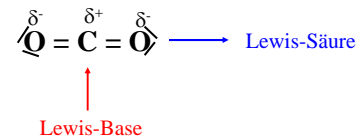
Koordination des Zinks in der **Anhydrase** ist verzerrt tetraedrisch. Das Metall lässt sich durch 2,2'-Bipyridin entfernen, wodurch ein inaktives Apoprotein resultiert.

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.

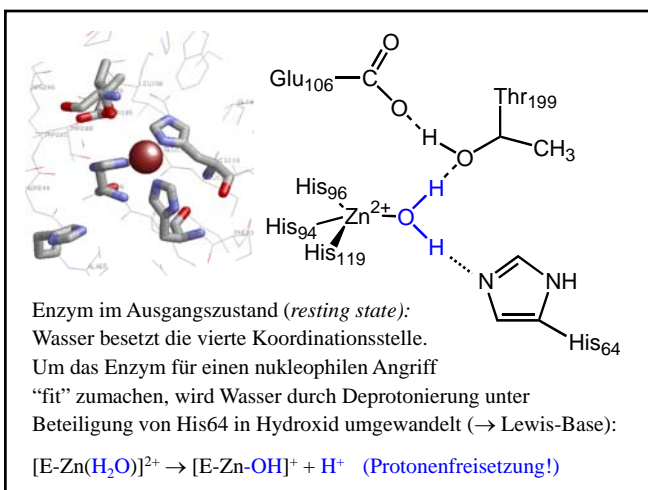
Aktives Zentrum der humanen Carboanhydrase II



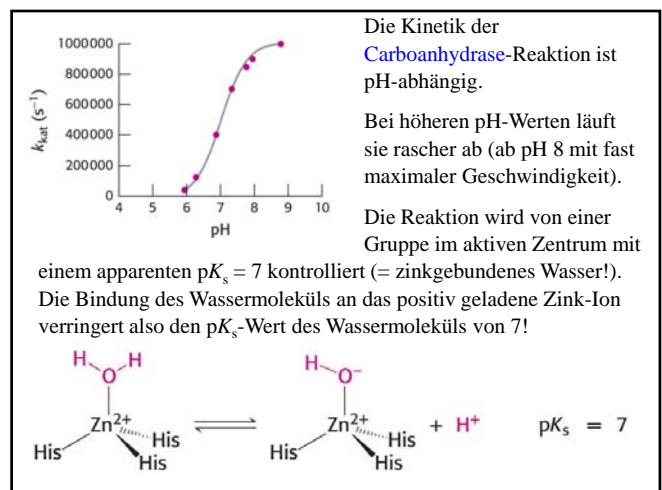
CO_2 ist ein lineares Molekül ohne permanentes Dipolmoment ($O=C=O$). Um es zu aktivieren ist eine Kombination von Lewis-Säure-Einwirkung (Angriff am Sauerstoff) und Baseneffekt (Angriff am Kohlenstoffatom) notwendig: **Push-pull-Effekt (bifunktionelle Katalyse)**:



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.



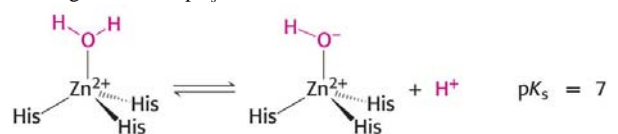
Enzym im Ausgangszustand (*resting state*): Wasser besetzt die vierte Koordinationsstelle. Um das Enzym für einen nukleophilen Angriff "fit" zumachen, wird Wasser durch Deprotonierung unter Beteiligung von His64 in Hydroxid umgewandelt (\rightarrow Lewis-Base):
 $[E-Zn(H_2O)]^{2+} \rightarrow [E-Zn-OH] + H^+$ (Protonenfreisetzung!)

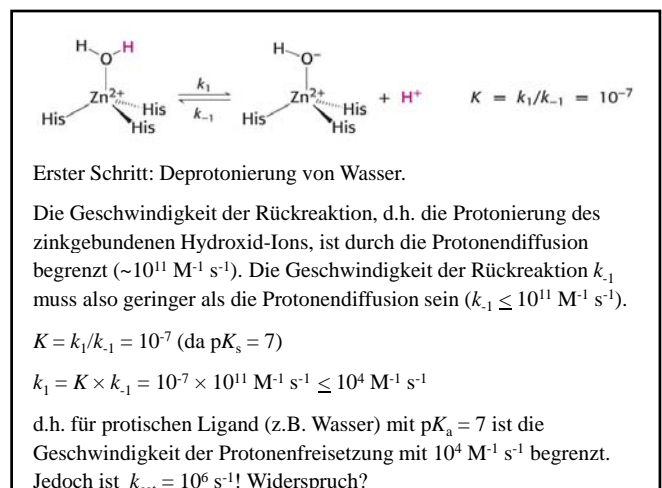
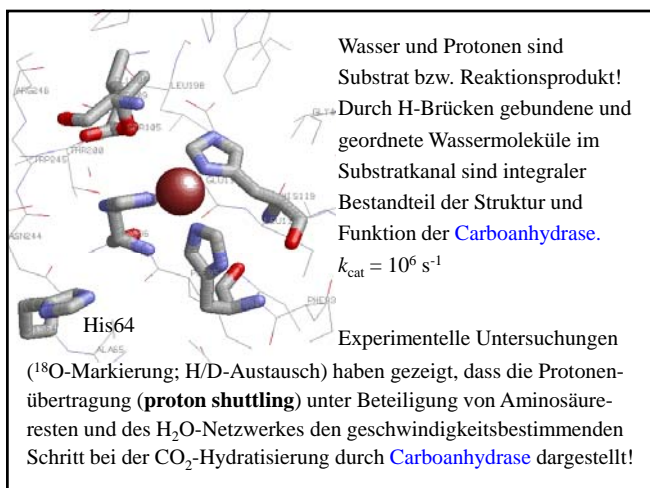
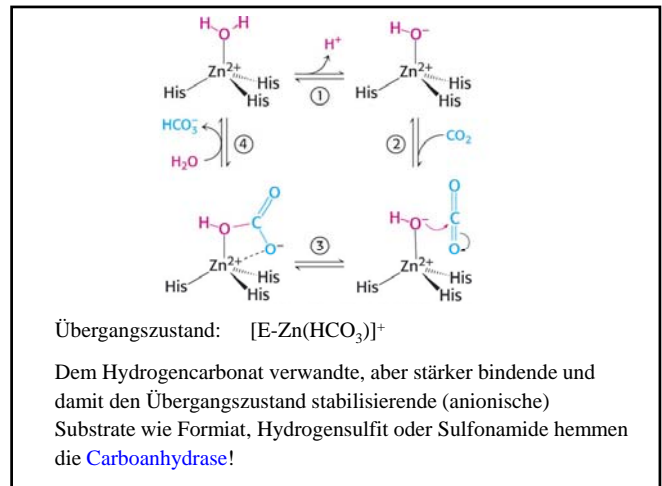
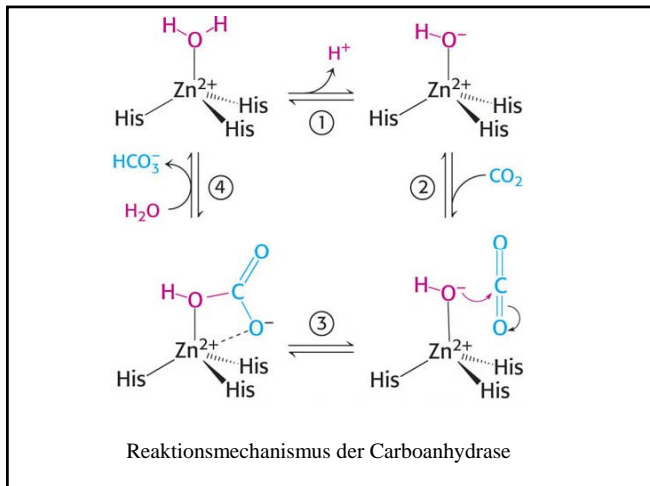
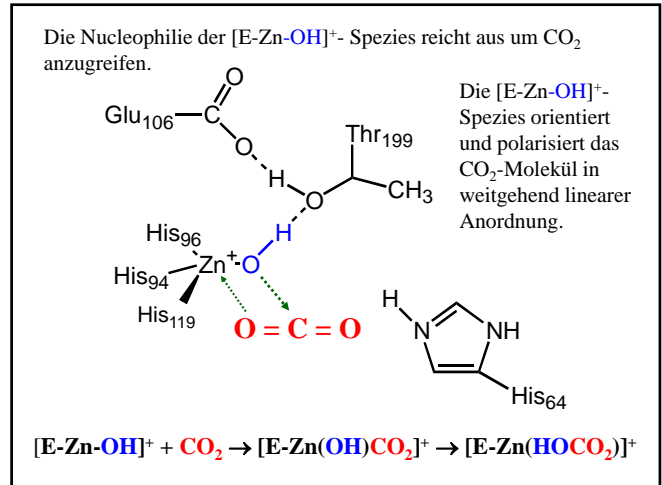
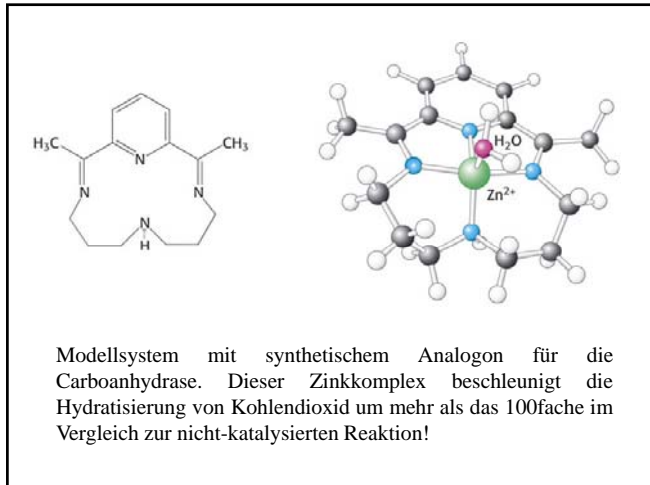


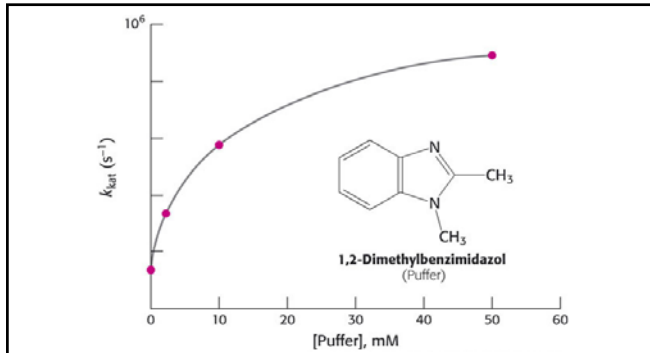
Die Kinetik der **Carboanhydrase**-Reaktion ist pH-abhängig.

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!

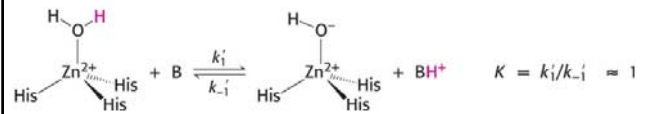




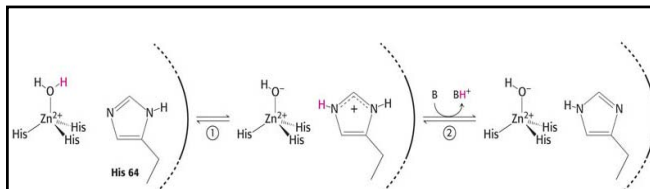


Experimenteller Befund: Damit ein k_{cat} von 10^6 s^{-1} erreicht wird, ist ein Puffer notwendig. Das bedeutet, dass Komponenten des Puffers an der Reaktion beteiligt sind. Puffer kann Protonen binden und freisetzen.

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 $k_1' \times [\text{B}] = (10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}) (10^{-3} \text{ M}) = 10^6 \text{ s}^{-1}$.

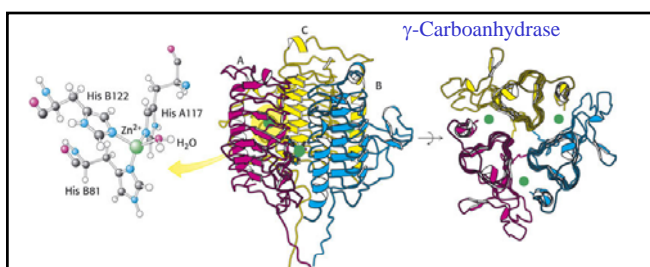


Histidin-Protonen-Shuttle:

- 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).



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

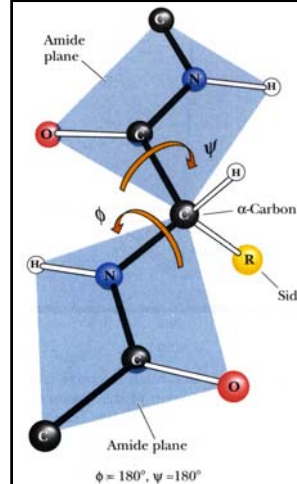
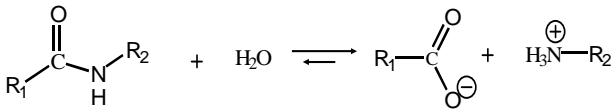
Carboanhydrase

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 Hydrolyse, 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.

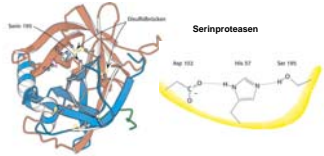


Für die kinetische Stabilität von Peptidbindungen ist deren Resonanzstruktur verantwortlich, welche die planare Form einer Peptidbindung verursacht.

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.

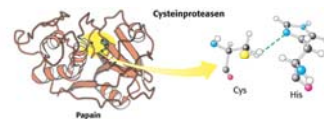
Serinproteinasen:

Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Subtilisin (nicht human), Blutgerinnungsfaktoren...



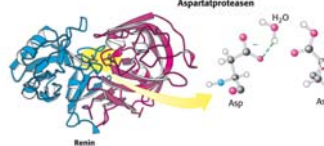
Cysteinproteinasen:

Cathepsine, Caspase, Papain (nicht human)...



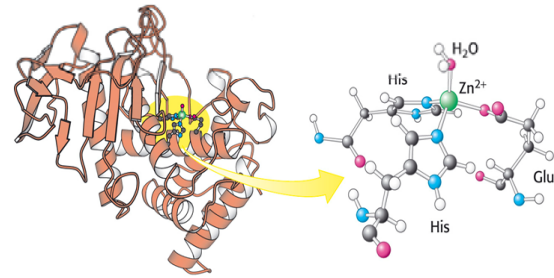
Aspartatproteinasen:

Renin, Pepsin...



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

Enthalten Zn²⁺ 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.

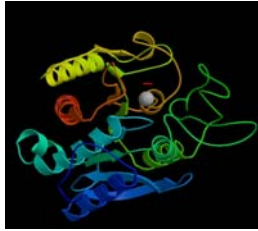
Ebenso wird aus Prokollagenase durch Aktivierung bei bestimmten Entwicklungsprozessen oder auch bei Verletzung (Rolle des Zink in der Wundheilung!) **Kollagenase**.

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

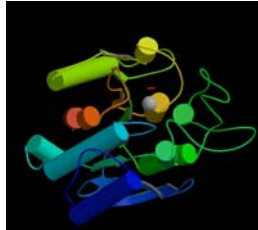
Familie der Zink-Proteasen

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

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.

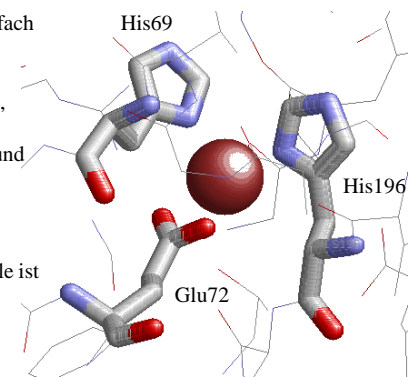


Mit etwa 300 Aminosäuren (Molekulargewicht 34 kDa) ähnliche Größe wie Carboanhydrase. Weitgehend globulär gefaltet.



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

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

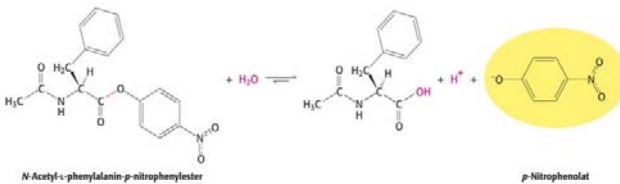


Geometrie: Trigonal-bipyramidal. Substratbindungsstelle ist frei.

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).

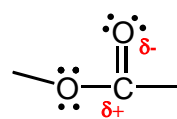


Peptidase- und Esterase-Reaktivität unterscheiden sich in einigen kinetischen Merkmalen, z.B. im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und im Effekt der Metallsubstitution (Kohlenstoff der Carbonylgruppe ist in Peptiden und Estern unterschiedlich elektrophil).

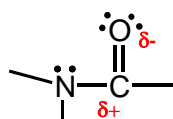
Peptidase-Funktion: Zn^{2+} und Co^{2+}

Esterase-Funktion: $Mn^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Hg^{2+} > Pb^{2+} > Ni^{2+}$ (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).



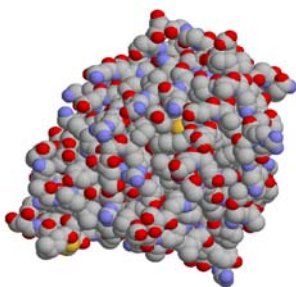
Carbonsäureester



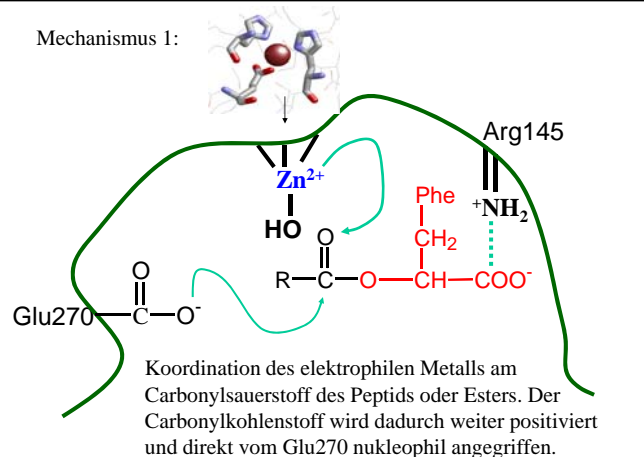
Peptid (Carboxamid)

Carboxypeptidase A

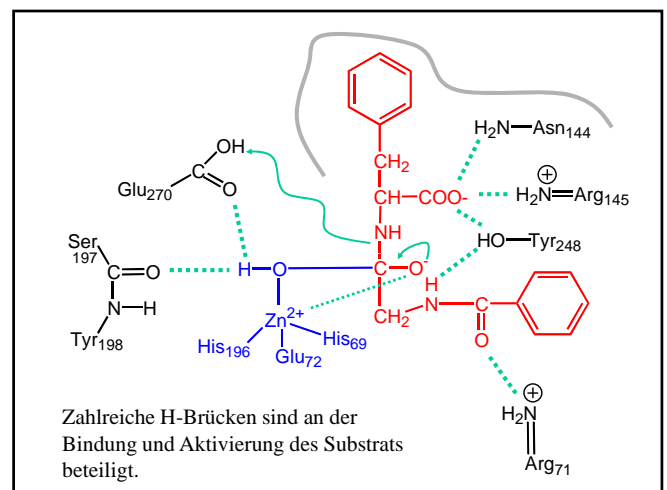
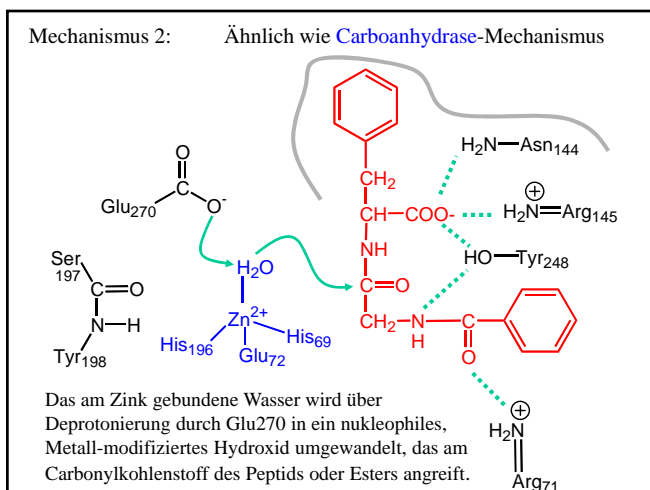
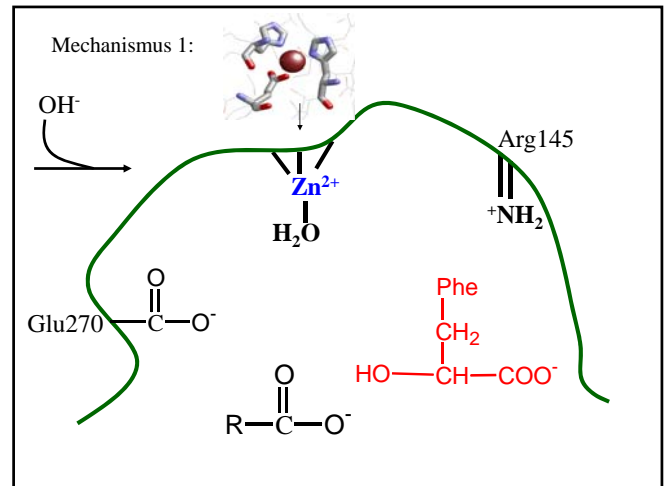
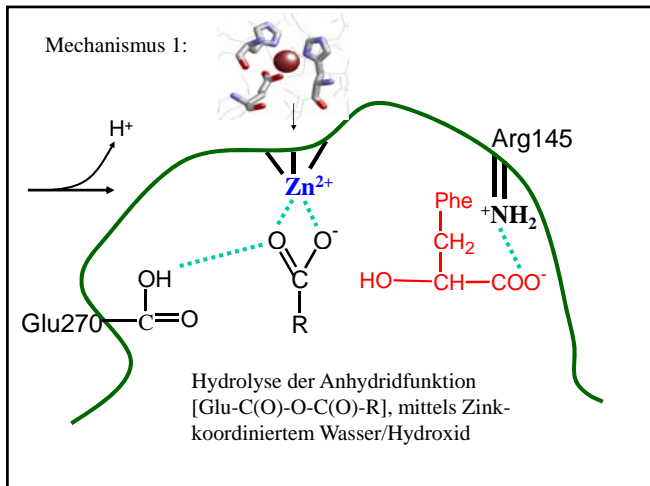
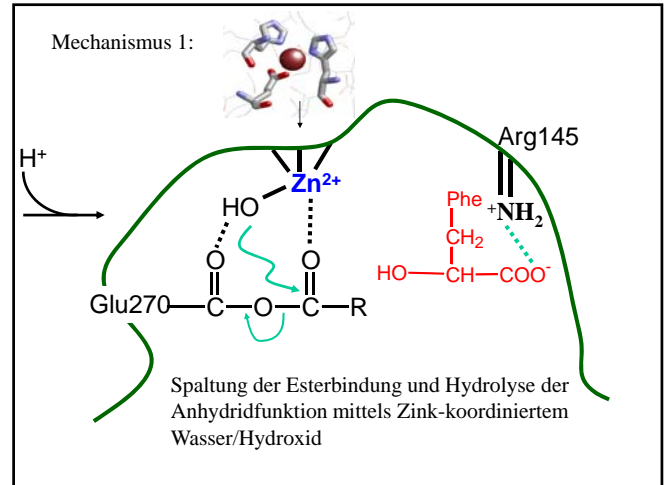
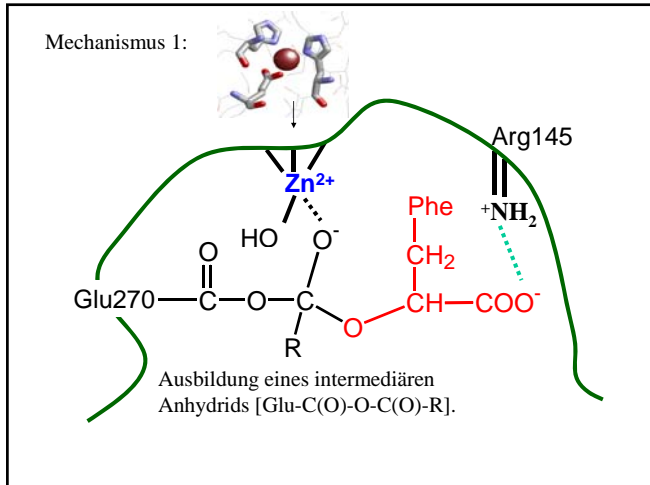
Momentan gibt es 2 Hypothesen zum Reaktionsmechanismus

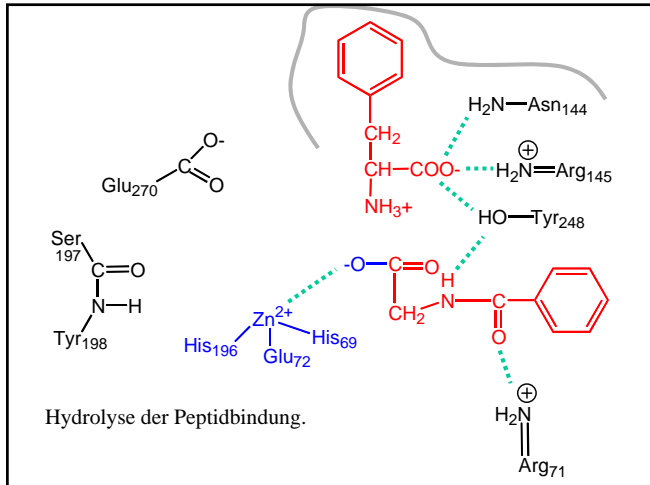


Mechanismus 1:



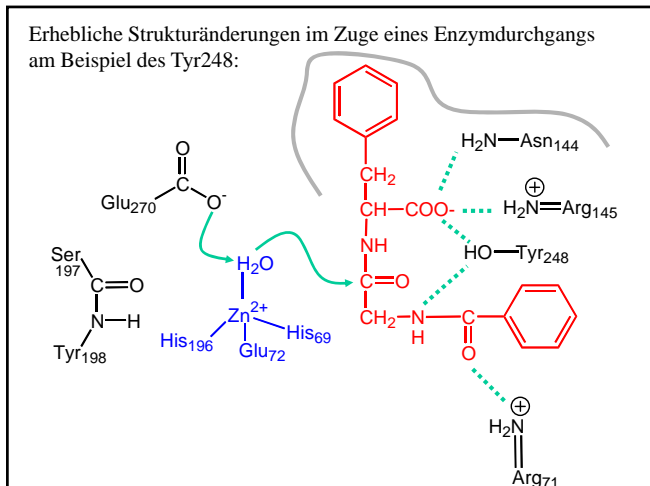
Koordination des elektrophilen Metalls am Carbonylsauerstoff des Peptids oder Esters. Der Carbonylkohlenstoff wird dadurch weiter positiviert und direkt vom Glu270 nukleophil angegriffen.





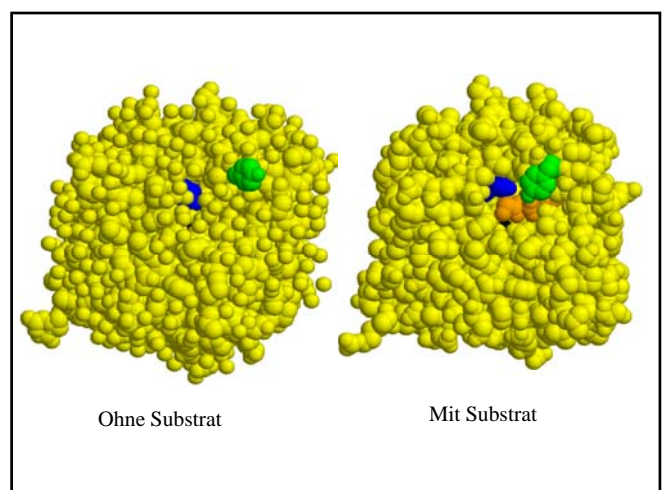
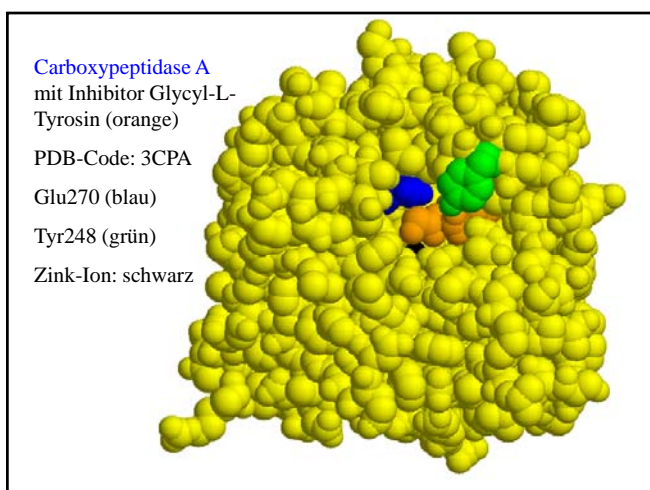
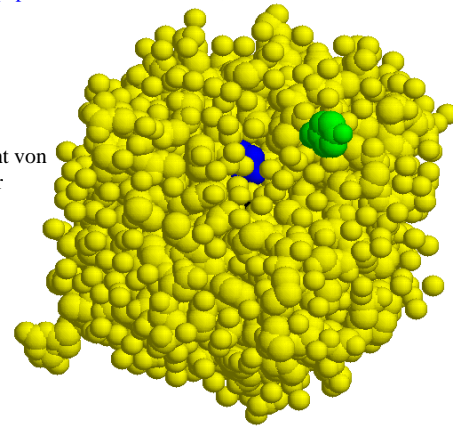
Wie bei der **Carboanhydrase** bewirkt also direkte Zink-Polarisation der Carbonylfunktion in Kombination mit einem Angriff Metall- und Glutamat-aktivierten Wassers bzw. Hydroxids am Carbonylkohlenstoff letztendlich die Hydrolyse.

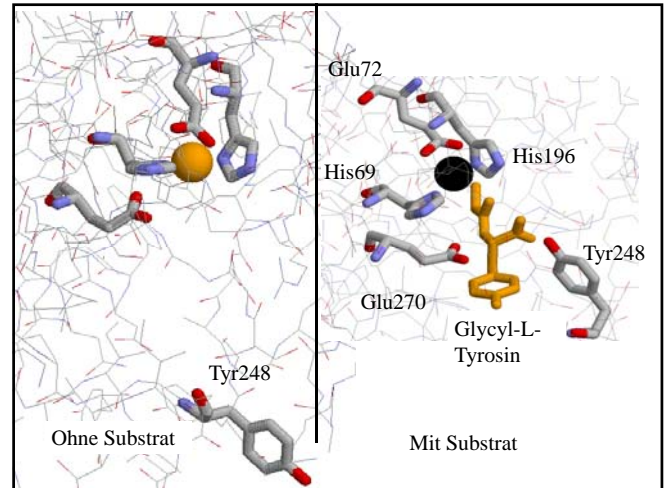
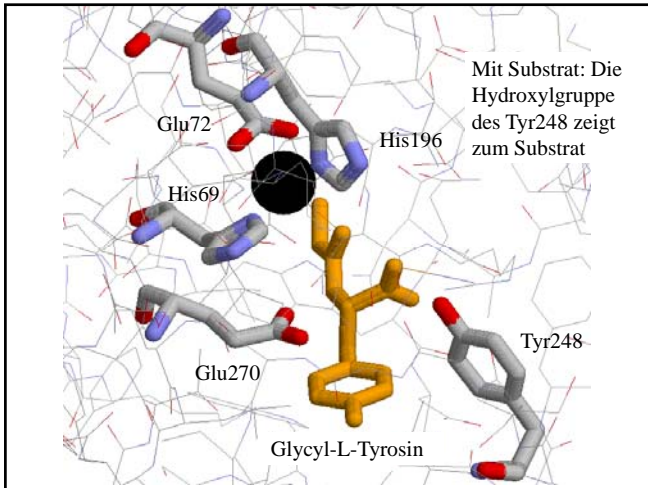
Bemerkenswert für Zink-Proteasen sind **erhebliche Strukturänderungen bei Bindung von Substraten bzw. Substratanaloga**, wie z.B. Glycyl-L-Tyrosin (=Inhibitor): Arg145 und Glu270 bewegen sich um etwa 2 Å und und Tyr248 ändert seine Position um 12 Å (!), damit seine phenolische OH-Gruppe in die Nähe der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



Carboxypeptidase A ohne Substrat; PDB Code: 1M4L

Glu270 (blau)
Tyr248 (grün)
Zink-Ion: nicht von außen sichtbar





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**.

Endopeptidase (=Proteinase)

H₃N⁺ COO⁻

Aminopeptidase N Carboxypeptidase A oder B

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 Zn²⁺-Zentrum (macht Substrat-Bindungsstelle frei) erfolgt Aktivierung. Auch Kollagenasen besitzen die typische Koordinationsumgebung am Zink-Ion (3 Histidine als Liganden).

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

1CGE

Primary Citation: Crystal structures of recombinant 19-kDa human fibroblast collagenase complexed to itself. Lovley, B., Howell, A.M., Lather, M.A., Weigl, D., Jordan, S.K., 1994) Biochemistry 33: 8207-8217. PMID: 8031754

Molecular Description: 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 ...

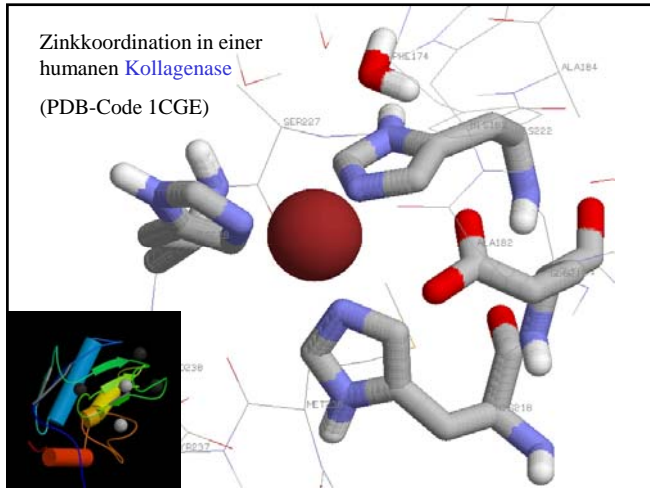
Source: Polymer: 1 Type: polypeptide(s) Length: 190

Depositor Summary: Authors: Lovley, B., Howell, A.M., Lather, M.A., Weigl, D., Jordan, S.K. Deposited: 1994-02-02 Release: 1995-02-21 Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

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 Ca²⁺-Ionen haben strukturelle Funktion.

Ca²⁺ Zn²⁺

Kollagenase aus humanen Fibroblasten (PDB-Code 1CGE)

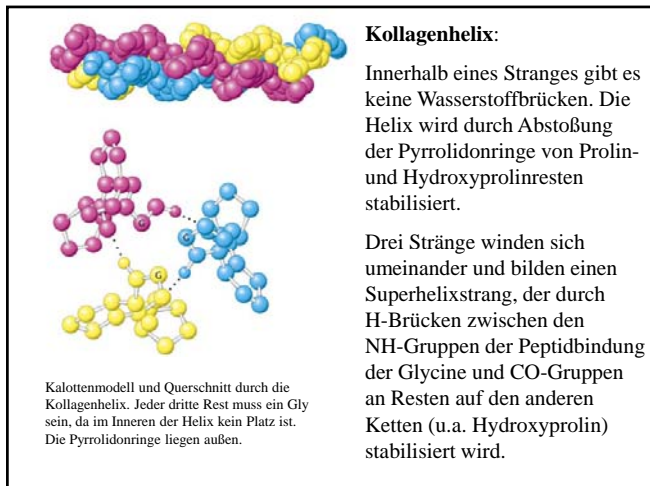
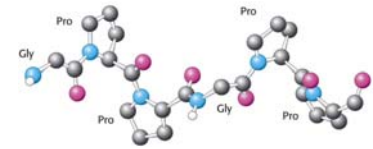


Kollagen ist bei Säugern das häufigste Protein. Es ist ein faserförmiger Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel und Zähnen.

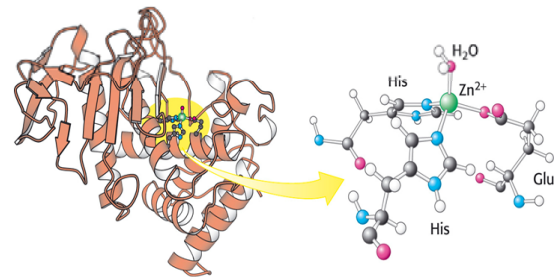
Stabförmiges, extrazelluläres Protein mit einer Länge von 3000 Å und einem Durchmesser von 15 Å. Kollagen enthält drei helicale Polypeptidketten, die jeweils etwa 100 Reste umfassen. Jeder dritte Rest ist ein Glycin und die Sequenz Gly-Pro-Hydroxyprolin kommt häufig vor.



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



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 **Schlangengifte** 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 Proteinasen sind! Inaktivierung des Giftes durch EDTA!

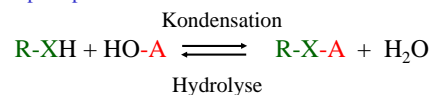
Effiziente **Toxine** vom Tetanus- und Botulinus-Typ sind zinkabhängige Proteinasen. Neurotoxisch, da sie spezifische synaptische Membranproteine entfernen.

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:



Kondensation:

Phosphatasen, Phospholipasen

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