

Hans Bisswanger

Enzyme

Struktur, Kinetik und Anwendungen



Hans Bisswanger

Enzyme

**Beachten Sie bitte auch weitere interessante Titel
zu diesem Thema**

Yeh, W., Yang, H., McCarthy, J.R.

Enzyme Technologies

Metagenomics, Evolution, Biocatalysis
and Biosynthesis

2010

Print ISBN: 978-0-470-28624-1; auch in
elektronischen Formaten verfügbar

Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T.

**Biocatalysts and Enzyme
Technology**

2. Auflage

2012

Print ISBN: 978-3-527-32989-2; auch in
elektronischen Formaten verfügbar

Copeland, R.A.

Enzymes

A Practical Introduction to Structure,
Mechanism, and Data Analysis

2. Auflage

2000

Print ISBN: 978-0-471-35929-6; auch in
elektronischen Formaten verfügbar
eMobi-lite ISBN: 978-0-470-23916-2

Cornish-Bowden, A.

**Fundamentals of Enzyme
Kinetics**

4. Auflage

2012

Print ISBN: 978-3-527-33074-4; auch in
elektronischen Formaten verfügbar

Bugg, T.D.

**Introduction to Enzyme and
Coenzyme Chemistry 3e**

3. Auflage

2012

Print ISBN: 978-1-119-99594-4; auch in
elektronischen Formaten verfügbar

Bisswanger, H.

**Enzyme Kinetics. Principles and
Methods**

2. Auflage

2008

ISBN: 978-3-527-31957-2

Garcia-Junceda, E. (Hrsg.)

Multi-Step Enzyme Catalysis

Biotransformations and
Chemoenzymatic Synthesis

2008

Print ISBN: 978-3-527-31921-3; auch in
elektronischen Formaten verfügbar

Bisswanger, H.

Practical Enzymology

2. Auflage

2011

ISBN: 978-3-527-32076-9

Hans Bisswanger

Enzyme

Struktur, Kinetik und Anwendungen

WILEY-VCH
Verlag GmbH & Co. KGaA

Autor

Hans Bisswanger

Interfakultäres Institut für Biochemie
Hoppe-Seyler-Str. 4
72076 Tübingen
Germany

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Satz le-tex publishing services GmbH, Leipzig, Deutschland

Druck und Bindung Markono Print Media Pte Ltd, Singapore

Print ISBN 978-3-527-33675-3

ePDF ISBN 978-3-527-69585-0

ePub ISBN 978-3-527-69586-7

Mobi ISBN 978-3-527-69587-4

Gedruckt auf säurefreiem Papier

Inhaltsverzeichnis

Vorwort *XI*

Zusatzmaterial: Power-Point Animationen *XIII*

Abkürzungen *XV*

1 Einleitung *1*

- 1.1 Historische Entwicklung und Bedeutung der Enzyme, ein Überblick *1*
- 1.2 Wie sind Enzyme entstanden? *4*
- 1.3 Ribozyme *5*
- 1.4 Weiterführende Literatur über Enzyme *7*
- 1.5 Literatur *8*

2 Struktur der Enzyme *13*

- 2.1 Primärstruktur *13*
- 2.2 Sekundärstruktur *15*
- 2.3 Tertiärstruktur *18*
- 2.4 Quartärstruktur *21*
- 2.5 Verlauf der Proteinfaltung *25*
- 2.6 Katalytisches Zentrum und Coenzyme *27*
 - 2.6.1 Biotin *29*
 - 2.6.2 Liponsäure *30*
 - 2.6.3 Thiamindiphosphat *32*
 - 2.6.4 Coenzym A *33*
 - 2.6.5 Pyridoxalphosphat *33*
 - 2.6.6 Tetrahydrofolat *34*
 - 2.6.7 Cobalamin *35*
 - 2.6.8 Nicotinamid-Coenzyme *37*
 - 2.6.9 Flavin-Coenzyme *38*
 - 2.6.10 Coenzym Q *39*
 - 2.6.11 Porphyrin-Coenzyme *39*
 - 2.6.12 Metallionen als Cofaktoren *42*
- 2.7 Literatur *45*

3	Enzymklassen, Enzymnomenklatur	47
3.1	Klasse 1: Oxidoreduktasen	48
3.2	Klasse 2: Transferasen	55
3.3	Klasse 3: Hydrolasen	66
3.4	Klasse 4: Lyasen	72
3.5	Klasse 5: Isomerasen	75
3.6	Klasse 6: Ligasen	77
3.7	Literatur	79
4	Allgemeine Eigenschaften von Enzymen, Enzymtests	81
4.1	Woran erkennt man ein Enzym?	81
4.2	Wie werden Enzyme getestet und was ist dabei zu berücksichtigen?	81
4.3	pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität	83
4.4	Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität	84
4.5	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Ionenstärke	88
4.6	Allgemeine Regeln für Enzymtests	89
4.7	Aufbewahrung von Enzymen	91
4.8	Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit Enzymen	92
4.9	Vorgehensweise beim Enzymtest	92
4.10	Auswertung von Enzymtests, Enzymeinheiten	95
4.11	Wie bestimmt man die Umsatzgeschwindigkeit von Enzymen?	97
4.12	Vom Einzelnachweis zum Massentest	98
4.12.1	Aspekte für Einfach- und Mehrfachtests	98
4.12.2	Tests auf Mikrotiterplatten	99
4.12.3	Microarray-Verfahren	100
4.13	Statistische Behandlung von Daten aus Enzymuntersuchungen	101
4.14	Literatur	105
5	Methoden für Enzymuntersuchungen	107
5.1	Optische Methoden	107
5.1.1	Absorptionsfotometrie	107
5.1.2	Fluoreszenzspektroskopie	117
5.1.3	Polarisationspektroskopie, optische Rotationsdispersion, Circular dichroismus	123
5.2	Elektrochemische Methoden	124
5.2.1	pH-Bestimmung, Glaselektrode	124
5.2.2	pH-Stat	126
5.3	Methoden zur Messung schneller Reaktionen	126
5.3.1	Flussmethoden	126
5.3.2	Relaxationsmethoden	129
5.4	Literatur	132

- 6 Enzymisolierung 135**
 - 6.1 Wie gewinnt man Enzyme? 135
 - 6.2 Wie reinigt man Enzyme? 137
 - 6.3 Fällungsmethoden 140
 - 6.4 Ultrafiltration und Dialyse 141
 - 6.5 Zentrifugation 142
 - 6.6 Säulenchromatografische Methoden 144
 - 6.6.1 Ionenaustauschchromatografie 145
 - 6.6.2 Gelfiltration 147
 - 6.6.3 Adsorptionschromatografie 148
 - 6.6.4 Hydrophobe Chromatografie 149
 - 6.6.5 Affinitätschromatografie 149
 - 6.7 Elektrophoretische Methoden 150
 - 6.8 Literatur 152

- 7 Ligandenbindung 155**
 - 7.1 Wie findet das Substrat sein Enzym? 155
 - 7.2 Worauf beruht die Stärke einer Bindung und wie kann man sie quantifizieren? 160
 - 7.3 Formulierung der Bindungsgleichung 162
 - 7.4 Wie misst man die Ligandenbindung? 168
 - 7.4.1 Gleichgewichtsdialyse 168
 - 7.4.2 Ultrafiltration und Ultrazentrifugation 170
 - 7.4.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz 171
 - 7.5 Literatur 172

- 8 Kinetische Behandlung von Enzymreaktionen 173**
 - 8.1 Reaktionsordnung 173
 - 8.1.1 Reaktionen erster Ordnung 173
 - 8.1.2 Reaktionen zweiter Ordnung 175
 - 8.1.3 Reaktionen nullter Ordnung 176
 - 8.2 Michaelis-Menten-Gleichung 177
 - 8.2.1 Theorie der Michaelis-Menten-Gleichung 177
 - 8.2.2 Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung 182
 - 8.2.3 Auswertung enzymkinetischer Daten 186
 - 8.2.4 Ein Schritt zurück – wie bestimmt man die Reaktionsgeschwindigkeit? 189
 - 8.3 Rückreaktion 193
 - 8.4 Literatur 196

- 9 Enzymhemmung 199**
 - 9.1 Kategorien der Enzymhemmung 199
 - 9.2 Reversible Enzymhemmung 201
 - 9.2.1 Kompetitive Hemmung 201
 - 9.2.2 Nicht-kompetitive Hemmung 207

- 9.2.3 Unkompetitive Hemmung, Substrathemmung 213
- 9.2.4 Andere Hemmarten 218
- 9.3 Literatur 221

- 10 Mehrsubstratreaktionen 223**
- 10.1 Darstellungsweise von Mehrsubstratreaktionen 223
- 10.2 Die verschiedenen Mechanismen der Mehrsubstratreaktionen 225
- 10.3 Analyse von Mehrsubstratreaktionen 227
- 10.4 Literatur 231

- 11 Allosterische Enzyme 233**
- 11.1 Grundlagen der Kooperativität 233
- 11.2 Symmetrie-Modell und allgemeine Betrachtungen zu allosterischen Enzymen 235
- 11.3 Sequenz-Modell und negative Kooperativität 243
- 11.4 Kinetische Kooperativität, das Slow-Transition-Modell 246
- 11.5 Literatur 248

- 12 Passgerechte Enzyme: Immobilisierung, Enzymreaktoren und künstliche Enzyme 251**
- 12.1 Immobilisierung von Enzymen 251
- 12.1.1 Allgemeine Aspekte der Immobilisierung 251
- 12.1.2 Nicht-kovalente Fixierung 253
- 12.1.3 Kovalente Fixierung 253
- 12.1.4 Quervernetzung 254
- 12.1.5 Mikroverkapselung 255
- 12.1.6 Entrapment 255
- 12.2 Enzymreaktoren 256
- 12.2.1 Rührkesselreaktoren 257
- 12.2.2 Festbettreaktoren 258
- 12.3 Künstliche Enzyme 258
- 12.3.1 Katalytische Antikörper 260
- 12.3.2 Synzyme 261
- 12.4 Literatur 262

- 13 Enzyme im praktischen Gebrauch 265**
- 13.1 Enzyme in der Industrie 265
- 13.1.1 Allgemeine Aspekte 265
- 13.1.2 Proteinspaltende Enzyme 267
- 13.1.3 Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels 269
- 13.1.4 Oxidierende Enzyme 271
- 13.1.5 Lipasen 272
- 13.1.6 Aminosäuresynthesen 273
- 13.1.7 Weitere Enzyme in industrieller Anwendung 273

13.2	Enzyme in Medizin und Therapie	274
13.3	Literatur	278
14	Ausblick	281
14.1	Literatur	282
	Sachverzeichnis	283

Vorwort

Das Wissen über Enzyme hat seit der Entdeckung der ersten Vertreter sprunghaft zugenommen. Zum einen stieg die Zahl der erforschten Enzyme beachtlich, nicht nur hinsichtlich der Vielfalt der katalysierten Reaktionen, sondern mehr noch durch ihre divergenten Erscheinungsformen in der Organismenvielfalt der Mikro-, Pflanzen- und Tierwelt. Zum anderen verfeinern die immer exakteren Methoden insbesondere der Strukturanalyse unsere Kenntnis von Struktur- und Funktionszusammenhängen bei Enzymen. Ein kurzes Lehrbuch kann daher kaum mehr als einen Überblick über die verschiedenen Aspekte, die für das Verständnis und das Arbeiten mit Enzymen wichtig sind, vermitteln. Für weitergehende und detailliertere Studien sind Literaturhinweise angegeben. Bei der Stofffülle ist auch die Auswahl der Schwerpunkte bis zu einem gewissen Maße willkürlich. Als vorrangig wird das Erfassen der Wirkungsweise von Enzymen gesehen und es wird eine komprimierte Einführung in Struktur und Katalysemechanismen gegeben. Im Weiteren werden die besonderen Aspekte herausgestellt, die beim Arbeiten mit Enzymen von Bedeutung sind: wie lassen sich Enzyme in reiner Form bekommen, wie behandelt man sie, was ist beim Enzymtest zu beachten, und welche hauptsächlich Methoden eignen sich dafür. Schließlich wird darauf eingegangen, wie mit den Messergebnissen umzugehen ist und wie diese auszuwerten sind. Die Bedeutung von Bindungsvorgängen von Substraten, Cofaktoren und Regulatoren an Enzymen für Katalyse und Regulation der Enzyme wird diskutiert und geeignete Messmethoden besprochen. In einem weiteren Schritt wird die enzymatische Reaktion mit einbezogen und die Grundzüge der klassischen Enzymkinetik vorgestellt. Anhand der Enzymklassen werden die wesentlichen Reaktionstypen behandelt und an repräsentativen Enzymbeispielen charakteristische Eigenschaften von Enzymen diskutiert. Schließlich werden praktische Aspekte beleuchtet: Auf welche Weise können Enzyme technisch nutzbar gemacht werden und in welchen Bereichen der Industrie, der Medizin und der Therapie spielen Enzyme eine wichtige Rolle?

Soweit wie möglich wurde hinsichtlich Text und Abbildungen besonderer Wert auf leichte Verständlichkeit gelegt, was aber bei schwierigeren Themen wie der Enzymkinetik nicht immer konsequent durchzuhalten ist. Komplexere Abhandlungen wie Ableitung von Formeln, soweit sie nicht, wie die Michaelis-Menten-Gleichung, von zentraler Bedeutung sind, sind in Boxen ausgelagert, sodass

der Leser, der nicht ins Detail gehen will, darüber hinweggehen kann, ohne den Zusammenhang zu verlieren. Andererseits soll das dem Buch beigegebene Zusatzmaterial dazu beitragen, vor allem komplexere Sachverhalte anschaulicher darzustellen. In den Abbildungen wie auch im Zusatzmaterial wurde das Schwergewicht auf das unmittelbare Erfassen des jeweiligen Sachverhalts gelegt, gegebenenfalls unter Verzicht auf Detailtreue, wo diese für das Verständnis des eigentlichen Gegenstands entbehrlich ist. Dem trägt auch die Wahl der Sprache Rechnung. Zwar ist Englisch die inzwischen unangefochtene Wissenschaftssprache und viele Begriffe sind nur noch in dieser Sprache gebräuchlich, trotzdem ist es gerade für Einsteiger wichtig, sich einem neuen Gebiet voll widmen zu können, ohne durch sprachliche Barrieren behindert zu sein. Dort wo der englische Ausdruck üblich ist, wird dieser in Klammern ausgewiesen.

Bezüglich der Nomenklatur orientiert sich dieses Buch im Wesentlichen an den von der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) herausgegebenen Richtlinien, doch finden sich in der einschlägigen Literatur oft andere Schreibweisen, die aber zumeist soweit einsichtig sind, dass es dem Leser beim Vergleich keine wesentlichen Probleme bereiten sollte.

Tübingen, Mai 2015


Hans Bisswanger

Zusatzmaterial: Power-Point Animationen

www.wiley-vch.de/home/EnzymeStrukturKinetik/



Praktische Hinweise zur Benutzung des Zusatzmaterials

Das Buch besteht aus zwei Teilen, dem gedruckten Text und dem Zusatzmaterial. Letzteres soll einzelne Themen des Buches anschaulich machen und vertiefen, es berührt nicht alle Themen des Textes. Der Buchtext mit seinen Abbildungen einerseits und das Zusatzmaterial andererseits können unabhängig voneinander studiert werden. Trotzdem sind im Text entsprechende Verweise auf die jeweiligen Folien des Zusatzmaterials, während dort für weitergehende Studien mit dem Symbol →  auf das Buch verwiesen wird.

Für die Nutzung des Zusatzmaterials wird eine Grundkenntnis im Umgang mit dem Power-Point-Programm vorausgesetzt. Die Bilder sind im Vorführungsmodus zu betrachten. Ein grüner Pfeil am linken unteren Bildrand zeigt an, dass mit der Maus- bzw. Cursortaste eine Animation auszulösen ist. Solange die Animation läuft, verschwindet der Pfeil und erscheint wieder zur Ausführung des nächsten Schrittes. Erscheint anstelle des Pfeils ein „X“, so ist das betreffende Thema abgeschlossen. Mit der Maus- bzw. Cursortaste wird dann das nächste Thema aufgerufen. Das Thema kann mit einer Folie enden oder aber über mehrere Folien gehen. Die Geschwindigkeit der Animationen ist derart eingestellt, dass diese gut verfolgt werden können. Beim ersten Betrachten mag das Tempo etwas rasch erscheinen, um alles genau aufzunehmen. Es besteht dann die Möglichkeit, in der Pause beim Erscheinen des grünen Pfeils durch Betätigung der Rückwärtstaste den Vorgang nochmals ablaufen zu lassen, sodass genügend Zeit bleibt, sich mit der Materie gründlich zu befassen. Grundsätzlich soll immer das Ende der Animation, also das Erscheinen des grünen Pfeils, abgewartet werden. Zu frühe Betätigung der Cursortaste überschlägt die laufende Animation und lässt unter Umständen das Folgende unverständlich erscheinen.

Abkürzungen

Gängige Abkürzungen wie ATP, NAD, DNA, wie auch Abkürzungen, die nur an der Stelle ihrer Definition gebraucht werden, sind nicht aufgeführt.

A, B, C...	Enzymsubstrate bzw. Enzymliganden
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ACTase	Aspartatcarbamoyl-Transferase
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
CM	Carboxymethyl
CoA	Coenzym A
DEAE	Diethylaminoethyl
GOD	Glucose-Oxidase
I	Hemmstoff (Inhibitor) eines Enzyms
k	Geschwindigkeitskonstante
k_{cat}	katalytische Konstante
K_A	Dissoziationskonstante des Substrats oder Liganden
K_d	Dissoziationskonstante
K_g	Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion
K_i	Hemmkonstante
K_{iA}	Hemmkonstante des Substrats
K_{ic}	kompetitive Hemmkonstante
K_{iu}	unkompetitive Hemmkonstante
K_m	Michaelis-Konstante
K_p	Dissoziations- bzw. Hemmkonstante des Produkts
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
P, Q, R...	Enzymprodukte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PALA	<i>N</i> -Phosphonacetyl- <i>L</i> -Aspartat
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFK	6-Phosphofruktokinase
P_i	anorganisches Phosphat
PLP	Pyridoxalphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PP _i	anorganisches Diphosphat
RN	<i>recommended name</i> , empfohlener Enzymname
SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	<i>systematic name</i> , systematischer Enzymname
SOD	Superoxid-Dismutase
ThDP	Thiamindiphosphat
THF	Tetrahydrofolat
TIM	Triosephosphat-Isomerase
v	Umsatzgeschwindigkeit
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
V bzw. V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit

1

Einleitung

1.1

Historische Entwicklung und Bedeutung der Enzyme, ein Überblick

Enzyme zählen zweifellos zu den wirkungsvollsten Substanzen dieser Erde. Zellen als Grundbausteine lebender Organismen enthalten eine Vielfalt wichtiger Verbindungen: zur Aufrechterhaltung der Strukturen, zur Abschirmung nach außen, zur Regulation, genetisches Material zur Weitergabe der Erbinformation. Alle diese Komponenten sind für das Funktionieren der Zelle und damit des Lebens unentbehrlich. Die Arbeit aber erledigen Enzyme. Sie halten den Stoffwechsel im Gang, bewirken Auf- und Abbau wichtiger Zellbestandteile wie Membranen und Organellen, bewerkstelligen die Weitergabe der Erbinformation sowie deren Umsetzung zu Genprodukten und damit auch ihre eigene Synthese. Somit sind sämtliche Lebensvorgänge direkt von Enzymen abhängig. Sie sind in der Lage, Reaktionen in einem teilweise unvorstellbaren Maße zu beschleunigen, die Umsatzgeschwindigkeit wird um Faktoren zwischen 10^5 – 10^{12} erhöht. Reaktionen, deren Dauer die Lebenszeit von Organismen um ein Vielfaches übersteigt, benötigen in Gegenwart des Enzyms derart kurze Zeit, dass sie in einen normalen Stoffwechsel einzuordnen sind. Die spontane Decarboxylierung von Orotidin-5'-phosphat hat eine Halbwertszeit von 78 Millionen Jahren, die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, ein besonders effektives Enzym, steigert die Umsatzgeschwindigkeit um den Faktor $1,4 \times 10^{17}$. Die Hydratisierung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat hat mit fünf Sekunden zwar eine wesentlich kürzere Halbwertszeit, doch wäre diese Reaktion immer noch so langsam, dass sich Kohlendioxid im Blut als Gas freisetzt, würde nicht die Carboanhydrase diesen Prozess neunmillionenfach beschleunigen.

Schon im Altertum bediente man sich der Wirkungsweise von Enzymen. Die Sumerer in Mesopotamien stellten bereits 6000 v. Chr. Bier durch Vergären von Getreide her, wie später auch die Germanen Met aus gärendem Bienenhonig gewannen. Die Konsumierung und damit die Kenntnis der Vergärung von Wein ist in der Genesis, dem ersten Buch der Bibel, beschrieben. Die Ägypter verwendeten Hefe zum Brotbacken. Die Herstellung von Essig als frühestes Beispiel mikrobieller Oxidation ist seit 2000 v. Chr. bekannt. Alle diese Fermentationsprozesse bedienten sich der Enzymausstattung lebender Mikroorganismen, doch von der

Kenntnis einzelner Enzyme war man noch weit entfernt. Der Beginn der modernen Enzymologie geht zurück ins späte 18. Jahrhundert, als Lazzaro Spallanzani feststellte, dass Magensaft in der Lage ist, Fleisch zu verdauen. Die aktive Substanz bezeichnete Theodor Schwann 1836 als Pepsin. Anselme Payen konnte 1833 zeigen, dass eine in Gerstenextrakt enthaltene hitzelabile Komponente Stärke in Zucker verwandelt. Die wirksame Substanz, nach unserem heutigen Wissen ein Gemisch verschiedener Amylasen, nannte er Diastase. Friedrich Wöhler gelang 1828 die chemische Synthese von Harnstoff und widerlegte damit die bis dahin vorherrschende Auffassung, Substanzen lebender Organismen könnten nur sich mithilfe einer Lebenskraft (*vis vitalis*) bilden. Ein weiterer entscheidender Schritt in diese Richtung war die Darstellung der alkoholischen Gärung in einem zellfreien Hefeextrakt durch Eduard Buchner 1897. Die wirksame Komponente bezeichnete er als Zymase. Jacob Berzelius (1836) schrieb den Fermentationsprozessen eine katalytische Kraft zu. Eingehende Untersuchungen um 1894 über das Phänomen der Katalyse, bei der der Katalysator selbst an der Reaktion nicht teilnimmt, brachten Wilhelm Ostwald 1909 den Nobelpreis. Oscar Loew beschrieb 1899 die katalytische Funktion der Zymase.

Die in den Fermentationsprozessen wirkenden Komponenten wurden zunächst als „Fermente“ bezeichnet, bis 1876 Wilhelm Friedrich Kühne den Begriff Enzym (von griech. *ενζυμη*, im Sauerteig) einführte. Trotzdem war man sich über die Natur der Enzyme lange nicht einig. Selbst noch bis 1920 war ihre Proteinnatur umstritten, auch wenn bereits Buchner feststellte, dass Enzyme ohne Zweifel als Proteine zu betrachten sind. Besonders Richard Willstätter bezweifelte die Proteinnatur von Enzymen und betrachtete sie vielmehr als kolloidale Teilchen mit prosthetischen Gruppen. Diese Ansicht vertrat er selbst noch 1927, ein Jahr nach der Reindarstellung der Urease durch J.B. Sumner. Emil Fischer, der dagegen schon frühzeitig die Proteinnatur der Enzyme erkannte, postulierte 1894 mit der Schlüssel-Schloss-Hypothese die Vorstellung einer spezifischen Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat. Er fand, dass Invertase zwar α -Methylglucosid, nicht aber β -Methylglucosid spalten kann, während Emulsin genau die umgekehrte Spezifität besitzt. Die allgemeine Akzeptanz der Proteinnatur der Enzyme erbrachte die Reindarstellung und Kristallisierung der Urease durch J.B. Sumner im Jahre 1926 und kurz darauf einiger proteolytischer Enzyme durch J.H. Northrop und seine Mitarbeiter.

In den folgenden Jahren wurden die wesentlichen Stoffwechselwege und deren Enzyme aufgeklärt, woran eine Vielzahl von Forscher beteiligt war, hier seien nur die bekanntesten Namen erwähnt. Die Glykolyse wurde durch Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl und Gerti Cori und Carl Neuberg (der auch den Begriff „Biochemie“ prägte) bis 1940 entschlüsselt. Auch Otto Warburg hatte daran einen wesentlichen Verdienst, daneben hatte er entscheidenden Anteil an der Erforschung der Atmungskette und deren Enzyme. Sein Schüler Hans Krebs entdeckte 1932 den Harnstoff-Zyklus und 1937 den auch als Krebs-Zyklus bekannten Citrat-Zyklus. In den fünfziger Jahren klärten schließlich Bernard Horecker, Fritz Lipman und Efraim Racker den Pentosephosphat-Zyklus auf.

Die ersten Enzyme, deren Aminosäuresequenz entschlüsselt wurde, waren Ribonuklease und Lysozym 1963. Lysozym war auch das erste Enzym, dessen dreidimensionale Struktur durch Röntgenstrukturanalyse von D.C. Phillips (1967) aufgeklärt wurde, der seinerseits auf den Pionierarbeiten der Strukturaufklärung des Myoglobins und des Hämoglobins durch John Kendrew und Max Perutz (1962) aufbauen konnte.

Die Geburtsstunde der Enzymkinetik liegt um die Wende zum 20. Jahrhundert, als Victor Henri in Paris und Adrian Brown in Birmingham (1902) eine Formel für das Sättigungsverhalten von Enzym und Substrat unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes veröffentlichten. Diese in etwas modifizierter Form als Michaelis-Menten-Gleichung bekannte Beziehung ist nach wie vor die zentrale Gleichung der Enzymkinetik. Sie beschrieb zunächst Bindung des Substrats an das Enzym, mit der Einbeziehung der Steady-State-Theorie unter Berücksichtigung der Umsatzgeschwindigkeit durch G.E. Briggs und J.B.S. Haldane 1925 erhielt sie ihre heute noch gültige Form. Leonor Michaelis und Maud Menten erkannten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes proportional ist. In ihrer wegweisenden Arbeit von 1913 stellten sie die Abhängigkeit von Enzymreaktionen von äußeren Bedingungen, wie Temperatur und pH-Wert, heraus und zeigten damit Wichtigkeit der Standardisierung bei Messungen von Enzymreaktionen. Ein Meilenstein in der Erforschung regulatorischer Effekte war 1965 die Postulierung des Symmetrie-Modells allosterischer Enzyme durch J. Monod, J. Wyman und F. Changeux. Es erklärt, wie mittels Hemmung und Aktivierung von Enzymen durch Metaboliten, die selbst nicht an der Reaktion beteiligt sind, verschiedene Stoffwechselwege miteinander verknüpft werden und somit Quervernetzungen des gesamten Stoffwechsels entstehen.

Die fortschreitende Erforschung der Enzyme ergab, dass es sich dabei um hochkomplexe Gebilde handelt. In ihrer Grundstruktur sind sie aus einer Vielzahl von Aminosäuren zusammengesetzte Proteine. Trypsin als noch vergleichsweise kleines Protein besteht aus 224 Aminosäuren, zur Katalyse sind aber nur drei davon, die sog. katalytische Triade, notwendig, also kaum mehr als 1%. Dies mag zunächst als ein unnötiger Aufwand erscheinen, führt man sich aber vor Augen, dass in der Natur durchgehend das Prinzip höchster Sparsamkeit gilt, ahnt man, dass keine einzige Aminosäure überflüssig ist, eine solche wäre längst wegmuriert. Die hohe Effizienz der Enzymkatalyse wird nur durch ein äußerst exaktes Zusammenwirken aller erforderlichen Komponenten erreicht. Jede am katalytischen Prozess mitwirkende Komponente muss eine genaue Position einnehmen. Um dies zu gewährleisten, sind die umgebenden, für die Katalyse nicht unmittelbar essenziellen Aminosäuren verantwortlich. Sie formen ein stabiles Gerüst, in dem die essenziellen Komponenten passgenau eingebettet sind. Weiterhin muss die Umgebung des aktiven Zentrums derart aufbereitet werden, dass die katalytisch wirksamen Gruppen in reaktiver Form vorliegen, so muss der Ionisierungsgrad genauestens eingestellt sein. Die 20 proteinogenen Aminosäuren bieten nicht gerade ein breites Spektrum reaktionsfähiger Gruppen, wenn man noch bedenkt, dass einige davon, vor allem die aliphatischen Aminosäuren, als unreaktiv gelten und überhaupt nicht zur Katalyse beitragen. Die Reaktivität anderer Amino-

säuren hängt dagegen stark von Einflüssen durch ihre unmittelbare Umgebung ab. So kann der pK_a -Wert der funktionellen Gruppen bestimmter Aminosäure, wie Histidin, durch den Einfluss benachbarter Aminosäuren bis zu zwei pH-Einheiten verschoben werden. Derartige Feinanpassungen ermöglichen es Enzymen, mit einer begrenzten Zahl an Aminosäuren vielfältige Katalysemechanismen abzudecken. Wo dies trotzdem nicht ausreicht, bedient sich das Enzym nicht proteinogener Komponenten, wie Metallionen oder Cofaktoren, die beim Menschen häufig Vitamincharakter haben. Cofaktoren binden teilweise in nicht kovalenter Weise an das Enzym und können unter Verlust der enzymatischen Aktivität dissoziieren. Sie werden als Coenzyme bezeichnet. Andere Faktoren, wie Biotin und Liponsäure, sind kovalent mit dem Enzym verknüpft und gehen nicht durch Dissoziation verloren. Sie werden als prosthetische Gruppen bezeichnet. Allerdings sind auch manche nicht kovalente Coenzyme derart fest mit dem Enzym verbunden, dass sie sich nicht entfernen lassen, ohne das Enzym zu denaturieren.

Neben der katalytischen Reaktion müssen sich Enzyme auch anderen Aufgaben stellen. Das Substrat muss erkannt und eingefangen und für den katalytischen Prozess vorbereitet werden. Darüber hinaus sind wichtige regulatorische Funktionen innerhalb des Zellstoffwechsels zu erfüllen. Diese laufen ebenfalls über hochspezifische Erkennungsmechanismen. Die Signalübertragung vom regulatorischen auf das katalytische Zentrum erfordert genau abgestimmte Beweglichkeiten. Das Enzymmolekül muss eine exakte Raumstruktur aufrecht erhalten, darf aber trotzdem kein starres Gebilde sein. Schließlich muss es auf seine Umgebung reagieren entweder in Form hydrophiler Wechselwirkungen als lösliches Enzym oder über hydrophobe Kräfte in einer Membran integriert.

1.2

Wie sind Enzyme entstanden?

Wie konnten so große Enzymmoleküle entstehen? Wenn eine derartige Größe zur Erfüllung der Aufgaben eines Enzyms erforderlich ist, wären kleinere, einfachere Enzymmoleküle als Vorgänger heutiger Enzyme prinzipiell nicht in der Lage, diese Funktionen zu übernehmen. Trotzdem musste sich der komplexe Stoffwechsel, wie wir ihn heute wahrnehmen, aus einfachen Prozessen entwickeln, die an die katalytische Effizienz der Urenzyme weit geringere Ansprüche stellten. Tatsächlich lässt der strukturelle Aufbau von Enzymen vielfach entwicklungsgeschichtliche Aspekte erkennen. Die Triosephosphat-Isomerase hat eine charakteristische fassähnliche Struktur (*TIM barrel*), bestehend aus acht ringförmig angeordneten Elementen aus je einer α -Helix und einem β -Strang, das katalytische Zentrum im Inneren einschließend (s. Abschn. 2.3). Vergleichbare Strukturen finden sich in Enzymen, die völlig anderer Reaktionen katalysieren, wie die Aldolase und Pyruvatkinase. Offensichtlich entwickelten sich aus einer stabilen Urstruktur durch Modifikationen der Aminosäuren im aktiven Zentrum unterschiedliche enzymatische Aktivitäten.

Ein anderes Entwicklungsprinzip zeigt sich bei der Klasse der von NAD(P) abhängigen Dehydrogenasen. Diese bestehen meist aus vier identischen Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten wird gebildet aus zwei Domänen ähnlicher Größe, wobei eine für die Bindung des Cofaktors NAD(P), die andere für die Substratbindung verantwortlich ist. Die Cofaktor-Domänen der verschiedenen Dehydrogenasen zeigen auffallende Strukturhomologien, während die Substratdomänen einander wenig ähnlich sind. Auch hier geht man von einem Urenzym aus, dessen Cofaktor-Domäne weitgehend erhalten blieb, wogegen sich die Substratdomänen den verschiedenen Substraten anpasste und sich somit unterschiedliche Dehydrogenasen heraus bildeten.

Ein noch detailliertes Evolutionsprinzip zeigt sich beim Serumalbumin, das Transportprotein des Bluts für zahlreiche Substanzen, wie langkettige Fettsäuren, Billirubin, Tryptophan, Thyroxin, Cystein, Glutathion, Cu^{2+} und Ni^{2+} . Die Proteinkette des Serumalbumins besteht aus drei Domänen, die beträchtliche strukturelle Übereinstimmungen aufweisen (Abb. 1.1). Jede Domäne wird wiederum aus drei einander sehr ähnlichen Schleifen gebildet. Die gesamte Proteinkette besteht somit aus insgesamt neun sich weitgehend wiederholenden Einheiten und es ist anzunehmen, dass sich ein aus einer Schleife bestehendes Uralbumin durch Genduplikationen zunächst zu einer Urdomäne entwickelte. Durch weitere Duplikationen entstand schließlich das derzeitige Serumalbuminmolekül mit seinen verschiedenerelei Funktionen. Genduplikationen dürften auch die Entwicklung des Kollagens bestimmt haben, bei dem jede dritte Aminosäure Glycin ist und die Dreiersequenz Glycin-Prolin-4-Hydroxyprolin eine häufig sich wiederholende Grundeinheit darstellt.

Aus diesen und einer Vielzahl nicht erwähnter Beispiele ist zu folgern, dass sich große Proteine durch Verdoppelung und Vervielfältigung kleiner Einheiten mit zunächst einfachen Funktionen entwickelten. Durch die Genduplikation bleibt die ursprüngliche Funktion zunächst in beiden Kopien erhalten. Während eine Kopie diese Funktion konserviert, dient die zweite Kopie als Spielwiese zur Erprobung neuer und somit immer komplexerer Funktionen.

1.3

Ribozyme

Wie erwähnt dauerte es bis über 1920 hinaus, bis die Proteinnatur der Enzyme allgemein anerkannt wurde. In der Folgezeit erwies es sich, dass alle dahingehend untersuchten Enzyme ausnahmslos Proteine waren. Eine unabhängige Bestätigung lieferte die Aufklärung der Biosynthese der Enzyme nach dem universellen Prinzip der Genexpression durch Transkription und Translation, das zum allgemeingültigen Dogma erhoben wurde. Umso überraschender war daher die Entdeckung von Thomas R. Cech und Sidney Altman 1982, dass auch bestimmte RNA-Moleküle, als *Ribozyme* bezeichnet, enzymatische Aktivität besitzen können. Allerdings zeigten die weiteren Forschungen auf diesem Gebiet, dass für ein grundlegendes Umdenken kein Grund besteht. Ribozyme katalysieren durchwegs

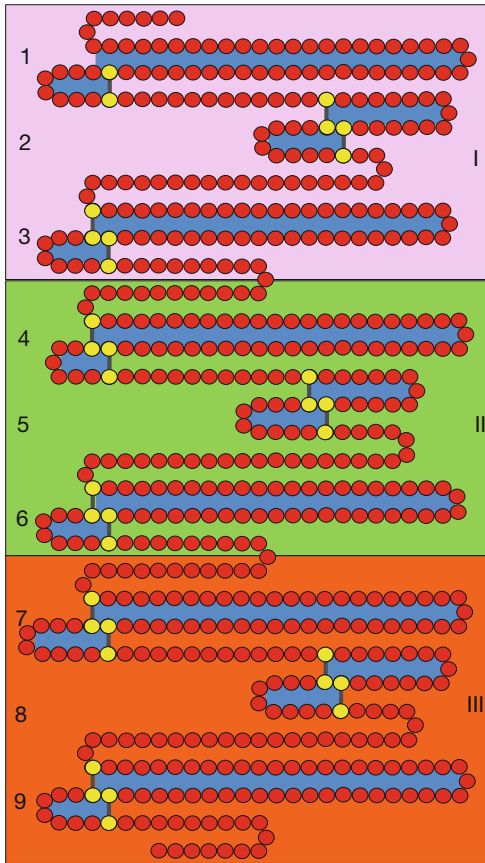


Abb. 1.1 Struktur von Serumalbumin. Aminosäuren sind als rote Kreise dargestellt, Cysteine, die Disulfidbrücken bilden, sind gelb. Den drei repetitiven Domänen I–III sind verschiedenfarbigen Rechtecke unterlegt. Die einander entsprechenden Schleifen 1–9 sind links durchnummeriert. Von Disulfidbrücken

eingeschlossene Bereiche sind blau markiert, wobei die erste Schleife ihre Disulfidbrücke offenbar im Laufe der Evolution verloren hat (Nach Brown, J.R. und Shockely, P. (1982) *Lipid-Protein-Interactions* (Hrsg. P. Jost und O.H. Griffith), Bd. 1, John Wiley & Sons, S. 25–68).

einfache Reaktionen und haben nicht die wichtige Bedeutung wie die Proteinenzyme, die alle chemischen Reaktionen des Gesamtstoffwechsels der Organismen kontrollieren. Entsprechend besitzen Ribozyme auch nicht die überaus komplexe Struktur der Proteinenzyme. Andererseits stützen die RNA-Enzyme die Theorie, wonach sich das Leben zunächst aus einer RNA-Welt entwickelte, die im weiteren Evolutionsprozess durch die flexibler Proteinwelt abgelöst wurde. Die Ribozyme stellen wohl rezente Vertreter fossiler RNA-Enzyme dar. Nach einer kurzen Vorstellung der Ribozyme werden wir uns daher im Weiteren ausschließlich mit Proteinenzymen beschäftigen.

Grundsätzlich verhalten sich Ribozyme wie Proteinenzyme, sie bilden einen Enzym-Substrat-Komplex und gehorchen der Michaelis-Menten-Kinetik. Ihre

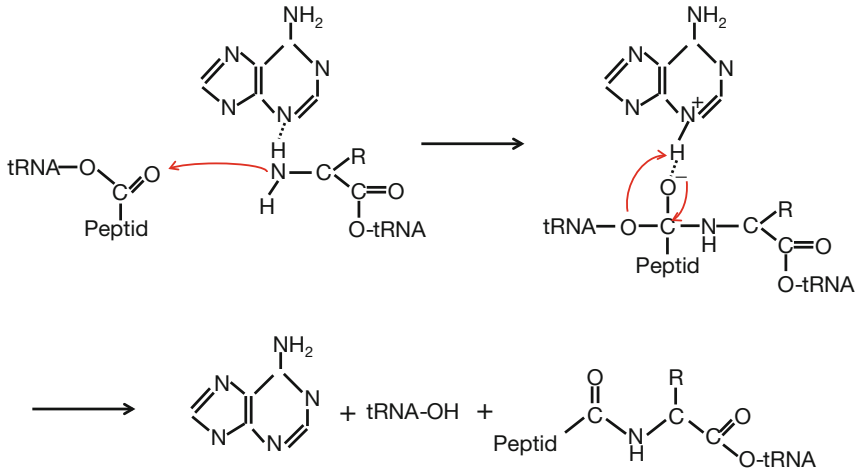


Abb. 1.2 Mechanismus einer von der rRNA des Ribosoms katalysierten Peptidsynthese (nach Nissen *et al.* (2000) *Science*, **289**, 920–930).

Umsatzgeschwindigkeiten sind vergleichsweise geringer als die der Proteinenzyme, erreichen aber doch bis zu 10^9 -fache Beschleunigung gegenüber den unkatalysierten Reaktionen. Ribozyme spalten Phosphodiesterbindungen der RNA, was auf zwei verschiedene Weisen erfolgen kann. So wurde zunächst bei *Tetrahymena thermophila* beobachtet, wie die prä-rRNA in autokatalytischer Weise ein Intron abschnürt und die beiden flankierenden Exons wieder verbindet. Die Reaktion verläuft ohne Beteiligung von Proteinen, das katalytisch aktive Molekül wird aber verändert, sodass es nicht völlig einem Enzym adäquat ist. Freie RNA-Moleküle, wie das in Pflanzenviroiden gefundene Hammerkopf-Ribozym, agieren dagegen als echte Katalysatoren. Sie binden an eine Substrat-RNA durch Paarung komplementärer Basen und spalten die Phosphodiesterbindung mithilfe eines internen Nukleophils. Als solches kann die 2'-OH-Gruppe des terminalen Riboseresests des Ribozyms wirken. Diese greift die Phosphodiesterbindung über das Phosphat an und spaltet sie dadurch. Andere Ribozyme bedienen sich eines externen Nukleophils, z. B. eines Wassermoleküls. Bei der Sichelzellenanämie kann ein Ribozym die mutierte Gensequenz gegen eine nicht mutierte austauschen. Die rRNA des Ribosoms zeigt katalytische Aktivität in der Peptidsynthese in Umkehrung zum Acylierungsschritt der Serinproteasen (Abb. 1.2).

1.4

Weiterführende Literatur über Enzyme

Die weiterführende Literatur über Enzyme ist naturgemäß äußerst umfangreich. Es sei zunächst auf die ausführlichen Lehrbücher der Biochemie verwiesen, die Enzyme in den Zusammenhang des Gesamtstoffwechsels stellen. Übersichts-

artikel zu bestimmten Enzymen und Themenbereichen finden sich in Serienwerken, wie *Advances in Enzymology*, *Annual Reviews of Biochemistry*, *Annual Reviews of Biophysics* und vor allem in der sich längst nicht mehr auf Enzymthemen beschränkenden Reihe *Methods in Enzymology*. Ein Standardwerk der Enzymanalyse ist das zehnbändige Werk von H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*. Eine Gesamtaufzählung aller bisher beschriebenen Enzyme mit allen wichtigen Daten findet sich im *Springer Handbook of Enzymes*. Aus diesem ist die BRENDA-Datenbank des Departments für Bioinformatik und Biochemie der TU Braunschweig hervorgegangen. Neben der Enzym-Nomenklatur mit EC-Nummern, den systematischen, empfohlenen und trivialen Enzymnamen und der katalysierten Reaktion enthält es Angaben über Substrate, Cofaktoren, Metallionen, Inhibitoren, molare Massen und Struktur von Enzymen, sowie funktionale Parameter, kinetische Konstanten, pH-Optima und umfangreiche Literaturhinweise. Die Datenbank ist bestrebt, alle relevanten Informationen über sämtliche bekannten Enzyme zu dokumentieren. Jedes Enzym ist nach seiner Herkunft aufgelistet. Da die Eigenschaften von Enzymen aus unterschiedlichen Organismen teilweise stark variieren, ist es nicht immer einfach, ein einheitliches Bild eines bestimmten Enzyms herauszukristallisieren. 3-D-Proteinstrukturen finden sich in der Protein Data Bank und der *EMBL-EBI's Protein Data Bank in Europe* des Heidelberger European Molecular Biology Laboratory. Die ExpASy-Datenbank des Schweizer Instituts für Bioinformatik gibt Informationen über verschiedene Themenbereiche, wie Proteomics, Systembiologie und Genomics und bietet Zugang zu weiteren Datenbanken: UniProt für Proteinsequenzen und Sequenzvergleiche (BLAST), String für Protein-Protein-Wechselwirkungen, Prosite für Proteindomänen, Proteinfamilien und funktionelle Zentren und SWISS-MODEL für Proteinstrukturvergleiche und Protein-Modelling. In der MEROPS-Datenbank sind über 3000 Peptidasen und Peptidinhibitoren dokumentiert.

Zur Auftragung von Daten in Diagrammen und deren Auswertung sind Grafikprogramme, wie Origin und SigmaPlot erhältlich, die auch Regressionsanalysen enthalten. Für enzymkinetische Auswertungen existieren spezielle Programme, wie ENZKIN, ein Programm von Mathworks, das nicht lineare und lineare Regressionsanalysen enthält.

1.5

Literatur

Lehrbücher der Biochemie (Auswahl)

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. und Stryer, L. (2012) *Biochemie*, 7. Aufl., Springer.
- Copeland, R.A. (2000) *Enzymes. A Practical Approach to Structure, Mechanism and Data Analysis*, 2. Aufl., John Wiley & Sons.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Scimgeour, K.G., Perry, M.D. und Rawn, J.D. (2006) *Principles of Biochemistry*, Pearson.

- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G. und Gerok, W. (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Aufl., Thieme.
- Löffler, G. und Petrides, P.E. (2014) *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl., Springer.
- Lottspeich, F. und Engels, J.W. (2012) *Bioanalytik*, 3. Aufl., Springer.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. und Clark, D.P. (2013) *Brock Mikrobiologie*, 13. Aufl., Pearson.
- Voet, D., Voet, J.G. und Pratt, C.W. (2010) *Lehrbuch der Biochemie*, 2. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH.

Standardwerke und Serien

- *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
- *Annual Reviews of Biochemistry*
- *Annual Reviews of Biophysics*
- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Aufl., Verlag Chemie.
- *Methods in Enzymology*, Elsevier
- Schomburg, D. Schomburg, I. und Chang, A. (2006) *Springer Handbook of Enzymes*, Springer.

Datenbanken

- BRENDA-Datenbank (**B**raunschweig **E**nzyme **D**atabase), www.brenda-enzymes.info
- EMBL-EBI's Protein Data Bank in Europe (PDBe), www.ebi.ac.uk/pdbe
- ExPASy (**E**xpert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem), www.expasy.org
- MEROPS Data Bank, <http://merops.sanger.ac.uk>
- Prosite, www.prosite.expasy.org
- Protein Data Bank (PDB), www.rcsb.org
- String, www.string-db.org
- SWISS-MODEL, www.swiss-model.expasy.org
- UniProt, www.uniprot.org
- Worldwide Protein Data Bank, www.wwpdb.org

Auswertprogramme

- Origin 2015, OriginLab Corporation
- SigmaPlot 13; Systat Software GmbH
- ENZKIN, Cardillo, G. (2010) www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/26653-enzkin

Historische Entwicklung und Evolution der Enzyme

- Berzelius, J.J. (1836) Einige Ideen über eine bei der Bildung organischer Verbindungen in der lebenden Natur wirksame aber bisher nicht bemerkte Kraft. *Jahresber. Fortschr. Phys. Wiss.*, **237**, 237–248.
- Blake, C.C., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C. und Sarma, V.R. (1965) Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis of 2 Angstrom resolution. *Nature*, **206**, 757–761.
- Brown, A. (1902) Enzyme action. *J. Chem. Soc.*, **81**, 377–388.
- Buchner, E. und Rapp, R. (1898) Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **31**, 212–213.
- Buchner, E. und Meisenheimer, J. (1904) Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **37**, 417–428.
- Cornish-Bowden, A. (1986) Why are enzymes so small? Or why do biochemists ask ,why are enzymes so big? *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 286.
- Fischer, E. (1894) Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Chem. Ges.*, **27**, 2985–2993.
- Fischer, E. (1898) Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Z. Physiol. Chem.*, **26**, 60–87
- Freeman, S. und Herron, J.C. (2007) *Evolutionary Analysis*, 4. Aufl., Pearson.
- Fruton, J.S. (1972) *Molecules and Life*, John Wiley & Sons.
- Gutfreund, H. (1976) Enzymes: 100 years. *FEBS Lett.*, **62**, Suppl.
- Loew, O. (1899) On the chemical nature of enzymes. *Science*, **10**, 955–961.
- Ostwald, W. F. (1894) Abstract on catalysis. *Z. Phys. Chem.*, **15**, 705–706
- Peters, T. (1985) Serum albumin. *Adv. Prot. Chem.* **37**, 161–245.
- Radzicka, A. und Wolfenden, R. (1995) A proficient enzyme. *Science*, **267**, 90–93.
- Sumner J.B. (1926) The isolation and crystalization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.*, **69**, 435–441.
- Willstätter, R. (1927) *Problems and Methods in Enzyme Research*, Cornell University Press.

Ribozyme

- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849–857.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. und Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclisation of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, **31**, 147–157.
- Lan, N., Howrey, R.P., Lee, S.W., Smith, C.A. und Sullenger, B.A. (1998) Ribozyme-mediated repairs of sickle β -globin mRNA in erythrocytes precursors. *Science*, **280**, 1593–1596.

- Nissen, P., Hansen, J. Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide synthesis. *Science*, **289**, 920–930.
- Tanner, N.K. (1999), Ribozyme: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 257–275.

