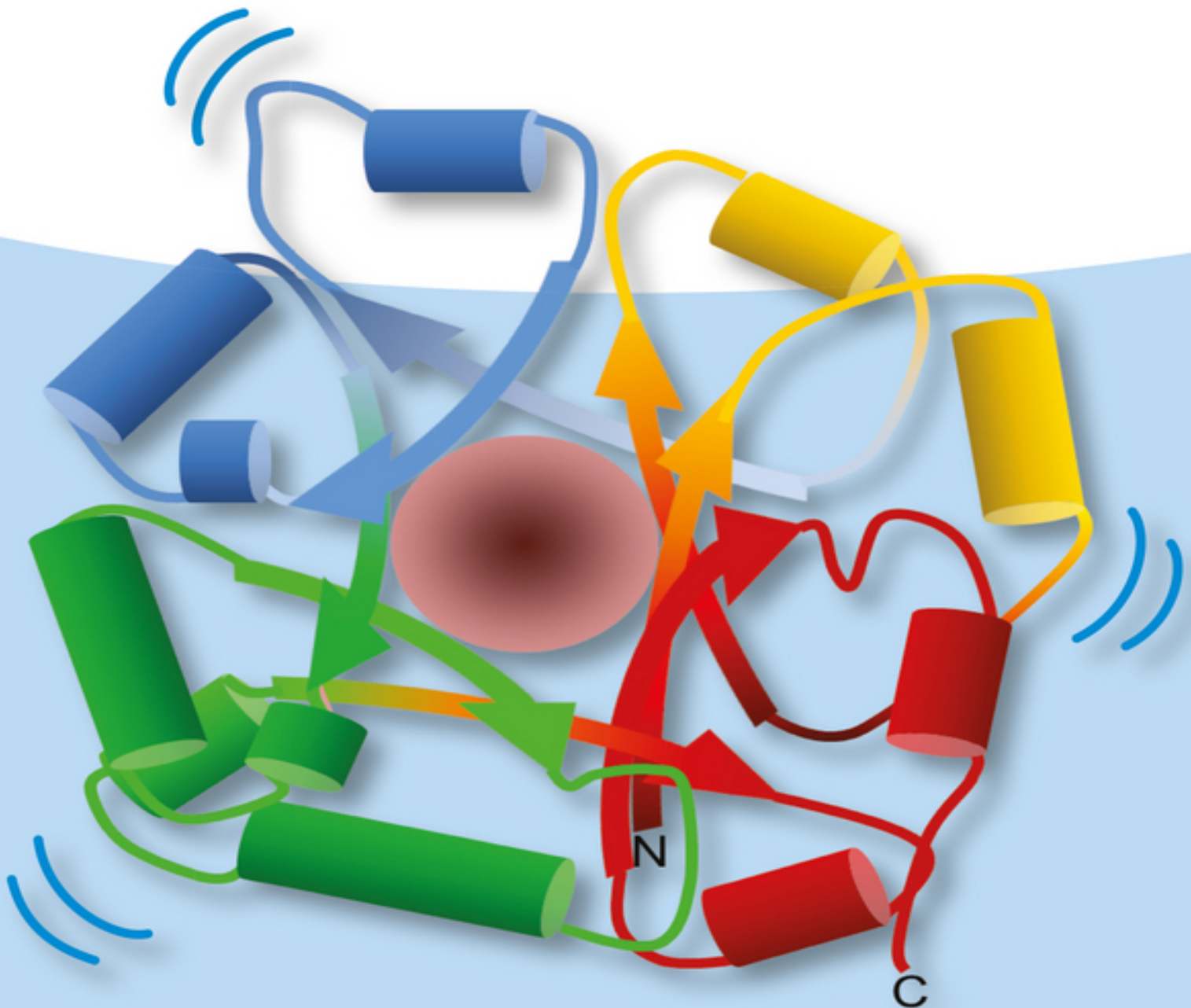


Hans Bisswanger

# Enzyme

Struktur, Kinetik und Anwendungen



# 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/](http://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 Cursorstaste 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
$k_{\text{cat}}$	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-L-Aspartat



PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFK	6-Phosphofructokinase
$P_i$	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 Enzyme.

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  $\alpha$ -Methylglucosid, nicht aber  $\beta$ -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 wegmutierte. 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 Aminosäuren 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 abdissoziieren. 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  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -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.

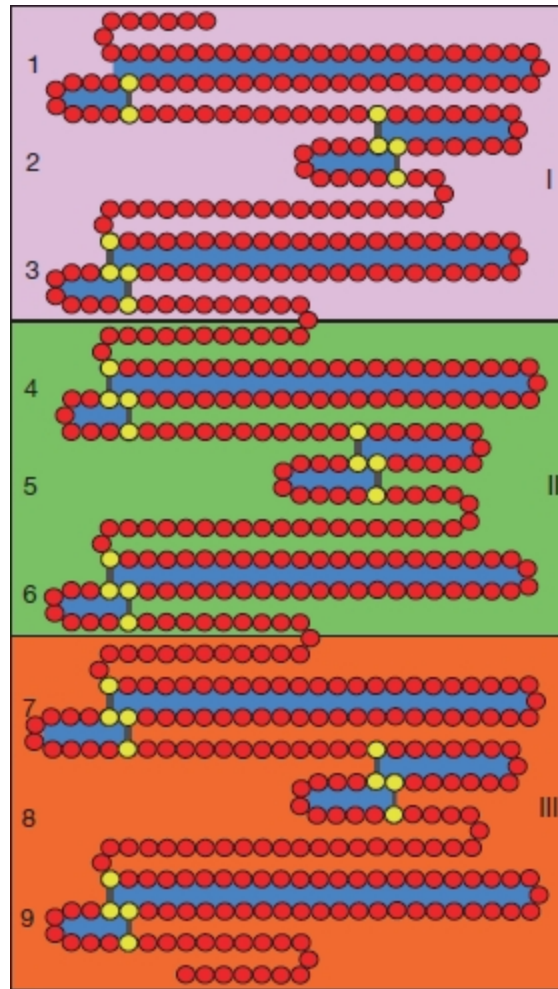
Ein noch detailliertes Evolutionsprinzip zeigt sich beim Serumalbumin, das Transportprotein des Bluts für zahlreiche Substanzen, wie langkettige Fettsäuren, Billirubin, Tryptophan, Thyroxin, Cystein, Glutathion,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ . Die Proteinkette des Serumalbumins besteht aus 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

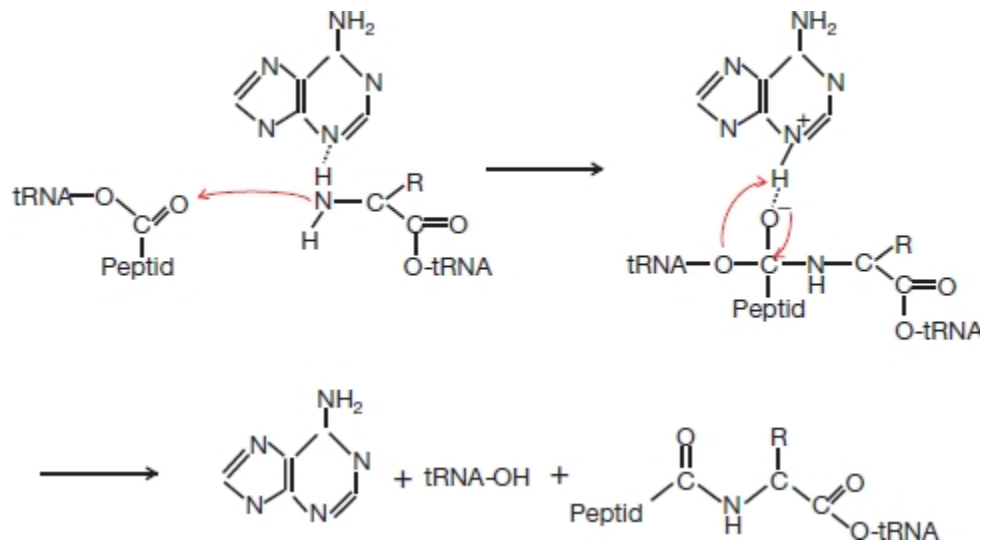
Wie erwähnt dauerte es bis über 1920 hinaus, bis die Proteinnatur der Enzyme allgemein anerkannt wurde. In der Folgezeit erwies es sich, dass alle dahingehend untersuchten Enzyme ausnahmslos Proteine waren. Eine unabhängige Bestätigung lieferte die Aufklärung der Biosynthese der Enzyme nach dem universellen 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 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.



**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).

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

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 Riboserests 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](#)).



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

## 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. Übersichtsartikel 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 Gesamtaufstellung 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 Peptidinhhibitoren dokumentiert.

Zur Auftragung von Daten in Diagrammen und deren Auswertung sind Grafik-programme, 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](http://www.brenda-enzymes.info)
- EMBL-EBI's Protein Data Bank in Europe (PDBe), [www.ebi.ac.uk/pdbe](http://www.ebi.ac.uk/pdbe)
- ExPASy (**E**xpert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem), [www.expasy.org](http://www.expasy.org)
- MEROPS Data Bank, <http://merops.sanger.ac.uk>
- Prosite, [www.prosite.expasy.org](http://www.prosite.expasy.org)
- Protein Data Bank (PDB), [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)
- String, [www.string-db.org](http://www.string-db.org)
- SWISS-MODEL, [www.swiss-model.expasy.org](http://www.swiss-model.expasy.org)
- UniProt, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)
- Worldwide Protein Data Bank, [www.wwpdb.org](http://www.wwpdb.org)

## **Auswertprogramme**

- Origin 2015, OriginLab Corporation
- SigmaPlot 13; Systat Software GmbH
- ENZKIN, Cardillo, G. (2010) [www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/26653-enzkin](http://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  $\beta$ -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.

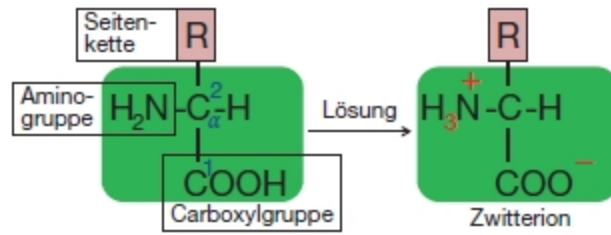
## 2

# Struktur der Enzyme

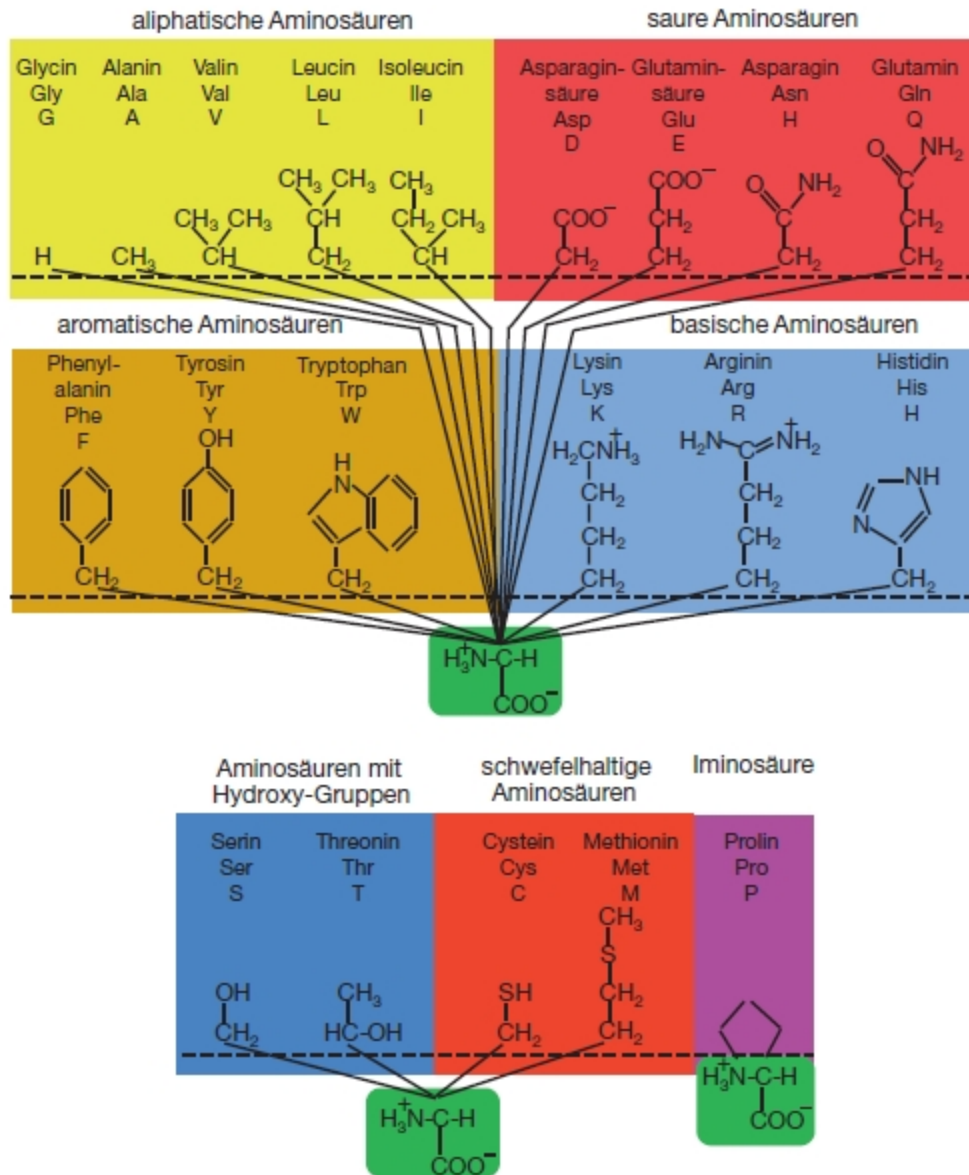
Enzyme zeigen die typischen Strukturmerkmale der Proteine, ausgerüstet mit den speziellen Erfordernissen zur Ausbildung eines katalytischen Zentrums und vielfach auch versehen mit regulatorischen Zentren. Zunächst werden die Elemente der Proteinstruktur behandelt, um dann genauer auf die Ausbildung der katalytischen Funktionen einzugehen.

## 2.1 Primärstruktur

Wie alle Proteine bestehen Enzyme in ihrer Grundstruktur aus einer Polypeptidkette, in der die 20 proteinogenen Aminosäuren in einer zunächst scheinbar willkürlichen Abfolge, gleich bunten Perlen einer Perlenkette, der *Primärsequenz*, aufgereiht sind. Mit Ausnahme von Prolin stimmen alle Aminosäuren in den ersten beiden Positionen überein. Position 1 besteht aus der Carboxylgruppe, Position 2 trägt die Aminogruppe, somit handelt es sich um  $\alpha$ -Aminosäuren. Mit dem  $\alpha$ -C-Atom sind die Seitenketten verbunden, durch die sich die Aminosäuren unterscheiden. Die Seitenkette von Prolin verbindet sich in ringförmiger Anordnung mit dem Stickstoffatom der Aminogruppe und stellt somit eine Iminosäure dar. In Lösung gibt die Carboxylgruppe ihr Proton an die Aminogruppe ab und ist negativ, die Aminogruppe entsprechend positiv geladen. Die Aminosäure bildet damit ein nach außen hin neutrales *Zwitterion* ([Abb. 2.1](#); Folie 2.1). Nach der Art der Seitenketten unterscheidet man zwischen aliphatischen, sauren, basischen, aromatischen, hydroxy- und schwefelhaltigen Aminosäuren ([Abb. 2.2](#); Folie 2.2).



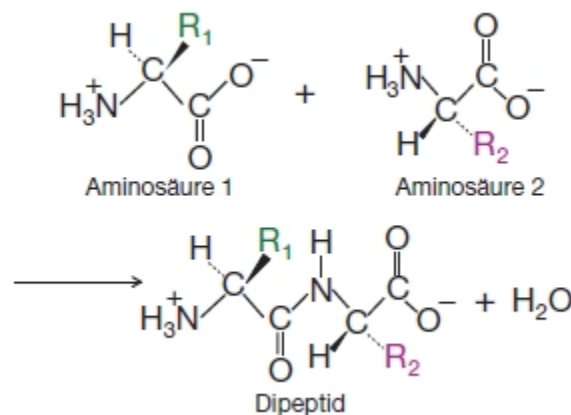
**Abb. 2.1** Grundstruktur der  $\alpha$ -Aminosäuren. In Lösung liegt das Molekül als Zwitterion vor.



**Abb. 2.2** Struktur und Einteilung proteinogener Aminosäuren. Gezeigt ist für jede Aminosäure nur die Seitenkette, darunter grün unterlegt die allen gemeinsame Grundstruktur, wobei Prolin als Iminosäure abweicht. Angegeben für jede Aminosäure ist der Drei- und Einbuchstabencode.

Carboxy- und  $\alpha$ -Aminogruppe verbinden sich in der Proteinbiosynthese säureamidartig zu einer Peptidbindung ([Abb. 2.3](#); Folie 2.3). Die Aminosäuren ordnen sich kettenförmig zur Primärstruktur des Proteins an. Die

Kettenlänge von Enzymen reicht von 122 Aminosäureresten bei der Ribonuklease bis zu 2500 Resten einer Untereinheit der Fettsäuresynthase. Vergleiche von Primärsequenzen lassen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Enzymen erkennen. Eng verwandte Enzyme besitzen große Sequenzhomologien, weniger verwandte entsprechend schwächere, wobei sich die Homologiebereiche durchaus nicht gleichmäßig über das ganze Proteinmolekül verteilen. Innerhalb der gleichen Proteinkette finden sich oft Bereiche hoher neben solchen geringer Homologie. Aus solchen Sequenzhomologien lassen sich evolutionäre Stammbäume entwickeln.



**Abb. 2.3** Knüpfen der Peptidbindung unter Bildung eines Dipeptids.

Zur Entschlüsselung der Primärsequenz gibt es verschiedene Methoden, wobei sich als chemisches Verfahren der Edmann-Abbau des schrittweisen Abbaus der Polypeptidkette vom Aminoende her mit Phenylisothiocyanat bewährt hat. Diese Methode wurde im Laufe der Zeit verfeinert und durch Aminosäuresequenz-Automaten wesentlich vereinfacht und beschleunigt. Daneben kann die Sequenzierung auch durch enzymatischen Abbau mittels Amino- und Carboxypeptidasen erfolgen. Die schnellste und einfachste Methode ist jedoch die Sequenzierung des betreffenden