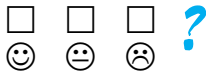


4 Enzyme

4.1 Grundlagen der Enzymchemie



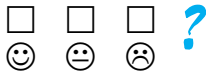
Frage: Was sind **Enzyme** und wieso brauchen wir sie?

Antwort: Enzyme sind Proteine mit einem Molekulargewicht von >10.000 Dalton. Ihre Funktion als **biologische Katalysatoren** besteht darin, chemische Reaktionen im Organismus zu beschleunigen ohne Einfluss auf das chemische Gleichgewicht zu nehmen. Dies geschieht durch Erniedrigung der für die Reaktion benötigten **Aktivierungsenergie**.

Der Mechanismus läuft folgendermaßen ab: Stoffe, die ein Enzym umsetzt, werden als **Substrate** bezeichnet. Das Enzym reagiert mit einem entsprechenden Substrat zum Enzym-Substrat-Komplex ($E+S \rightarrow ES$). Anschließend wird die katalysierte Reaktion ausgelöst ($ES \rightarrow EP$). Das Produkt wird abgestoßen ($EP \rightarrow E+P$) und das unveränderte Enzym kann erneut Substrat binden.

Alternativ könnte man die Herabsetzung der Aktivierungsenergie nur durch eine massive Temperaturerhöhung erreichen. Dies wäre jedoch nicht lange mit dem Leben vereinbar.

In unserem Organismus kommen verschiedenste Enzyme zum Einsatz: Die Bandbreite reicht von relativ unspezifischen (z.B. Peptidasen) bis hin zu hochspezifischen Enzymen (z.B. Aspartase).



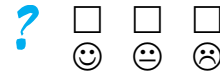
Frage: In welche Klassen lassen sich Enzyme am sinnvollsten einteilen?

Antwort: Enzyme werden entsprechend ihrer Funktion in **6 Hauptklassen** eingeteilt:

Enzymklasse	Funktion	Beispiele
Hydrolasen	Hydrolytische Abspaltungen	Peptidasen, Proteasen
Isomerasen	Umwandlung von Isomeren	UDP-Galaktose-4-Epimerase
Ligasen	Verknüpfung von Bindungen	Pyruvatcarboxylase
Lyasen	Nicht-hydrolytische Abspaltung	Aldolase
Oxidoreduktasen	Reduzierte Form $\leftrightarrow$ oxidierte Form	Lactatdehydrogenase (LDH)
Transferasen	Übertragung von funktionellen Gruppen	Phosphorylase, Hexokinase

Tab. 4.1: Enzymklassen

Frage: Erläutern Sie bitte den Begriff **Enzymkinetik**!



Antwort: Enzymkinetik beschreibt die **Substrat-** und **Produktkonzentration** während einer enzymatisch katalysierten Reaktion in Abhängigkeit von der **Zeit**. Dadurch lassen sich verschiedene Enzymaktivitäten miteinander vergleichen.

Frage: Zu welchen entscheidenden Erkenntnissen gelangten die Forscher **Michaelis** und **Menten** in dieser Richtung? Was können Sie mir zu **Lineweaver** und **Burk** berichten? Verdeutlichen Sie Ihre Ausführungen anhand einer Skizze!

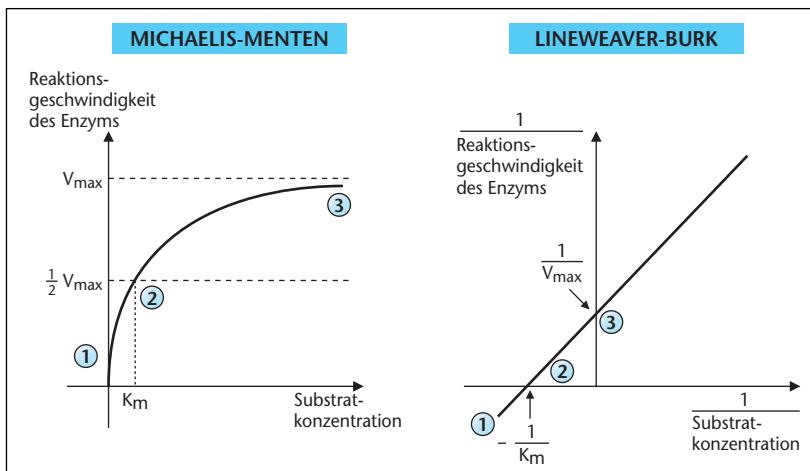
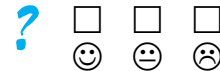


Abb. 4.1: Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk

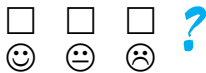
Antwort: Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms mit zunehmender Substratkonzentration.

Zur Abbildung: Am Punkt ① ist die Konzentration des Substrates geringer als die des Enzyms. Hier existieren noch relativ wenig Enzym-Substrat-Komplexe, die Reaktionsgeschwindigkeit ist entsprechend gering. Bei Punkt ② liegt die Hälfte der Enzymmoleküle in gebundener Form vor. Ein Zustand, bei dem das **Enzym mit halber Maximalgeschwindigkeit** arbeitet. Die Substratkonzentration an dieser Stelle wird als **Michaeliskonstante K_m** bezeichnet. Sie ist ein **Maß für die Affinität** des Enzyms zum Substrat. Ist der Wert klein, so ist die Affinität groß und umgekehrt. Am Punkt ③ sind alle Enzymmoleküle mit Substrat gesättigt, die Maximalgeschwindigkeit ist erreicht. V_{max} ist demnach ein **Maß für die Arbeitskapazität** des Enzyms. Lineweaver und Burk verarbeiteten diese Erkenntnisse in ihrer Darstellung. Durch doppelt reziproke Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung, erreichten sie eine genauere Ablesemöglichkeit von V_{max} und K_m (Schnittpunkte statt Annäherungen!).

Merke:

1. Die Reaktion darf nur von einem Reaktionspartner abhängig sein.
2. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist $ES \rightarrow E+P$.
3. V_{max} ist nur dann möglich, wenn alle Enzymmoleküle vom Substrat besetzt sind.
4. In vivo gibt es keine Enzyme, die im Sättigungsbereich arbeiten. Ausnahme: Die Glukokinase nach Nahrungsaufnahme!

4.2 Regulationsmechanismen



Frage: Besitzt unser Organismus Möglichkeiten zur **kontrollierten Enzymregulation**?

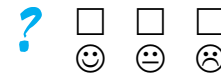
Antwort: Unser Organismus besitzt eine Vielzahl an Möglichkeiten, die Enzymaktivität zu beeinflussen. Neben der **Enzyminduktion**, d.h. der gezielten Synthese von Enzymen, findet man dabei hauptsächlich folgende Mechanismen:

- **Regulation durch Rückkopplung** (enzymatische Selbstregulation): Hier hat ein Stoffwechselendprodukt direkten Einfluss auf ein Enzym seines eigenen Syntheseweges. Kommt es zu einer Hemmung liegt eine **negative Rückkopplung** vor. Stimuliert es seine Produktion spricht man von **positiver Rückkopplung**.

- **Allosterische Regulation:** Allosterische Effektoren binden an die regulatorische Untereinheit eines oligomeren Enzyms. Dies führt zu einer **Konformationsänderung der katalytischen Untereinheit** und somit zu einer Verbesserung (Aktivator) oder Verschlechterung (Inhibitor) der Substratbindung.
- **Interkonversion:** Hierbei findet eine ein- oder ausschaltende **chemische Veränderung** des Enzyms statt. Die häufigste Interkonversion erfolgt durch **Phosphorylierung** der OH-Gruppen einzelner Serin- und Threoninreste. Je nachdem um welches Enzym es sich handelt, führt dies zu einer Aktivierung oder Inaktivierung.
- **Limitierte Proteolyse:** Enzyme werden häufig in Form von inaktiven Vorstufen (**Zymogenen**) synthetisiert. Diese werden erst durch die **proteolytische Abspaltung bestimmter Kettenreste** in ihre aktive Form überführt. Ein wichtiges Beispiel hierfür bilden die Verdauungsenzyme Trypsin und Elastin. Sie werden im Pankreas produziert (Trypsinogen, Proelastase), aber erst im Duodenum aktiviert. Das verhindert eine Verdauung der Pankreasgänge.

✚ Phosphoryliert wird durch eine Proteinkinase (ATP-Verbrauch), dephosphoryliert durch eine Proteinphosphatase.

Frage: Was verstehen Sie unter **kompetitiver Hemmung**? Erläutern Sie den Reaktionsverlauf und gehen Sie auf die wichtigsten Unterschiede zur nicht-kompetitiven Hemmung ein!



Antwort: Die kompetitive Hemmung findet man hauptsächlich bei monomeren Enzymen. Hier konkurriert das Substrat mit einem strukturell ähnlichen, aber nicht umsetzbaren Inhibitor um das **aktive Zentrum** des Enzyms. Daher ist die Umsatzmenge einer kompetitiv gehemmten enzymatischen Reaktion abhängig von der Konzentration beider Substanzen: Ist die Konzentration oder Enzymaffinität des Inhibitors im Vergleich zum Substrat sehr hoch, so wird entsprechend weniger Produkt gebildet als bei umgekehrten Voraussetzungen.

✚ Das sog. **Induced-fit-Modell** beschreibt die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum des Enzyms und die daran gekoppelte Veränderung der räumlichen Struktur beider Moleküle!

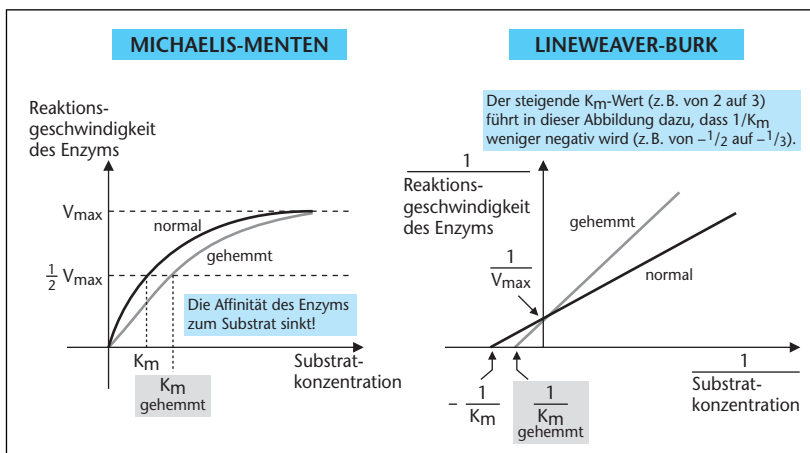


Abb. 4.2: Kompetitive Hemmung

Die **nicht-kompetitive Hemmung** betrifft Enzyme, welche neben dem aktiven Zentrum noch ein weiteres, **allosterisches** Zentrum besitzen. An dieses können nun, unabhängig davon, ob bereits Substrat am aktiven Zentrum gebunden ist, reversible Bindungen von Inhibitoren erfolgen. Die Affinität vom Enzym zum Substrat bleibt dabei unverändert. Durch die Hemmung der Reaktion $ES \rightarrow EP$ wird jedoch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit negativ beeinflusst.

Merke: Kompetitive Hemmung: Maximalgeschwindigkeit bleibt gleich, K_m -Wert steigt! Nicht-kompetitive Hemmung: Maximalgeschwindigkeit sinkt, K_m -Wert bleibt gleich!

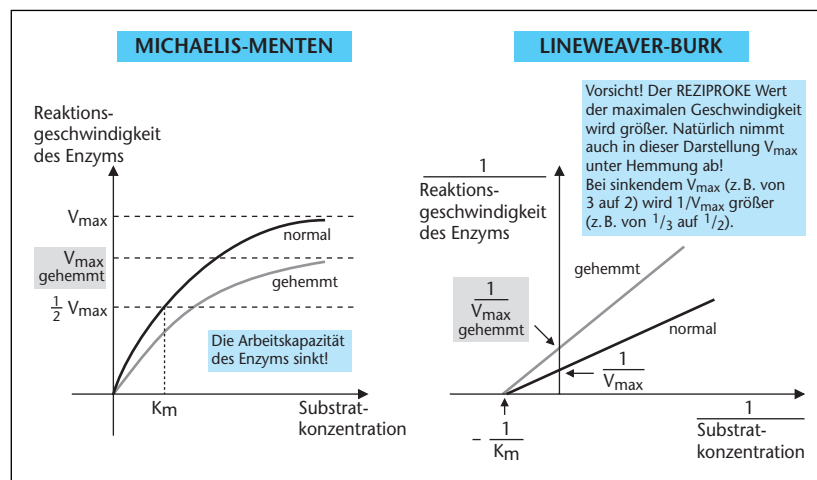
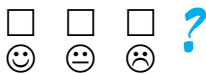


Abb. 4.3: Nicht-kompetitive Hemmung



Frage: Sie sprachen soeben von **Allosterie**. Erläutern Sie anhand einer Skizze die Reaktionsverschiebungen durch Effektoren, die an das allosterische Zentrum eines Enzyms anlagern!

tip Der V-Typ wird manchmal auch als M-Typ bezeichnet.

Antwort: Die sinnvollste Einteilung der Effekte, die Aktivatoren oder Inhibitoren am allosterischen Zentrum von Enzymen auslösen können, erhält man bei der Betrachtung von sog. **K-Typ-** und **V-Typ-Effektoren**. Dabei bezieht sich die Wirkung des K-Typs auf die Affinität des Enzyms zum Substrat (K_m). Der V-Typ hingegen beeinflusst die maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

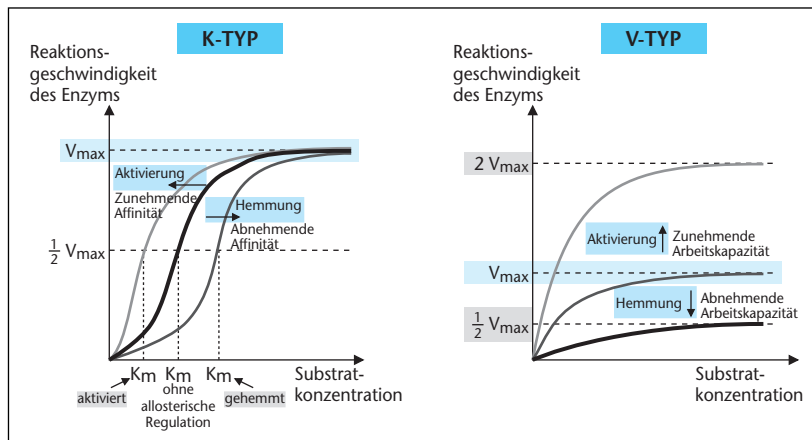


Abb. 4.4: Allosterische Regulation vom K- und V-Typ

Zur Verdeutlichung dient das Beispiel der allosterischen Regulation einer **Endprodukthemmung**: Hierbei entsteht mit dem Endprodukt (P) ein spezifischer Hemmstoff, der an das allosterische Zentrum des Enzyms ankoppelt. Sinnbildlich ragt er mit seiner „Spitze“ in das aktive Zentrum hinein und verhindert so über den **Stopp einer weiteren Substratanlagerung** die Umsetzung zu noch mehr Produkt. Die Endprodukthemmung sorgt also für eine gewisse Konstanz der Endproduktkonzentration. Wird nun aufgrund einer außergewöhnlichen Situation doch mehr Produkt benötigt, kann die Hemmung durch Ausschüttung einer nicht-hemmenden Konkurrenzsubstanz aufgehoben werden. Diese koppelt ebenfalls an das allosterische Zentrum des Enzyms und behindert damit die Anlagerung des Endproduktes. Sie blockiert allerdings, aufgrund der „fehlenden Spitze“, nicht das aktive Zentrum, wodurch nun wieder eine Katalyse der zuvor inhibierten Reaktion möglich ist.

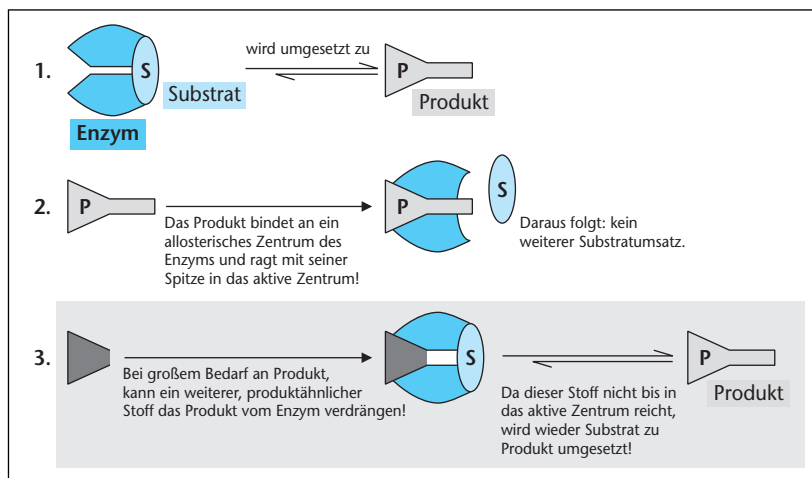
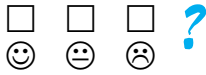


Abb. 4.5: Endprodukthemmung



Frage: Nun kommt es aber auch in Abwesenheit von Aktivatoren und Inhibitoren zu einem sigmoiden Kurvenverlauf allosterischer Enzymreaktionen. Wie erklären Sie sich das?

Antwort: Der sigmoide Kurvenverlauf findet seinen Ursprung in der **positiven Kooperativität**. Hier führt die Bindung von Substrat an eine Enzymuntereinheit zur Veränderung der Konformation einer benachbarten Untereinheit. Dadurch kommt es zur Freigabe einer vorher versteckten Substratbindungsstelle. Man sagt, die Untereinheiten gehen von der **t(tense)-Form** in die **r(relaxed)-Form** über. Die Affinität des Enzyms zum Substrat wird also mit zunehmender Substratbindung größer.

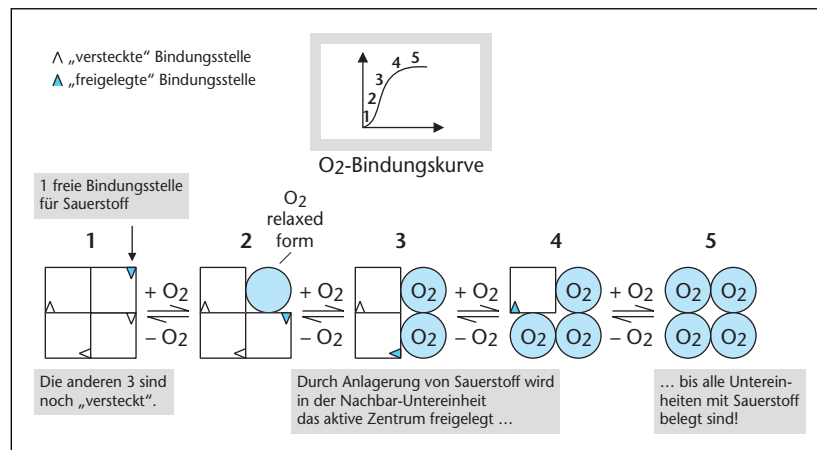
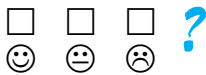


Abb. 4.6: Positive Kooperativität am Beispiel des Hämoglobins

4.3 Enzymdiagnostik



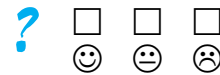
Frage: Erklären Sie den Begriff **Isoenzyme**! Gehen Sie auch auf ihre Bedeutung in der Enzymdiagnostik ein!

Antwort: Isoenzyme katalysieren trotz **unterschiedlicher Aminosäuresequenz** die **gleichen Reaktionen**. Ihr Aufbau und die diagnostische Bedeutung wird am ehesten am Beispiel der Lactatdehydrogenase (**LDH**) deutlich: Die LDH ist ein Enzym aus **4 Untereinheiten**. Jede dieser Untereinheiten ist entweder eine A- oder B-Polypeptidkette. Kombiniert man diese miteinander, ergeben sich 5 verschiedene Isoenzyme der LDH. Sie sind organspezifisch und geben somit beim Auftreten im Serum einen Hinweis auf entsprechende Zellschäden im für sie typischen Gewebe.

Isoenzym	Kombination der Untereinheiten	Vorkommen
LDH-1	BBBB	v.a. Herz (gering: Erythrozyten, Niere)
LDH-2	BBBA	Herz, Erythrozyten, Niere
LDH-3	BBAA	Granulozyten, Lunge, Gehirn
LDH-4	BAAA	Leber, Skelettmuskel, Lunge, Milz
LDH-5	AAAA	Leber, Skelettmuskel

Tab. 4.2: Isoenzyme der LDH

Frage: Worauf beruht das Auftreten der Enzyme im Serum und welche weiteren „Organschaden-Marker“ kennen Sie? Wie sieht die Serum-Enzymaktivität eines Herzinfarkt-Patienten aus?



Antwort: Zellenzyme kommen normalerweise gar nicht oder in nur sehr geringen Mengen im Serum vor. **Organschäden** gehen allerdings häufig mit **Permeabilitätsstörungen der Zellmembran** einher. Infolgedessen können entsprechend ansässige Enzyme in das Serum übertreten und dort vergleichsweise hohe Konzentrationen erreichen. Je nach Spezifität des Enzyms für ein Organ kann man dann Rückschlüsse auf den pathologischen Herd ziehen.

Enzym	Lokalisation	erhöhte Konzentration im Plasma
Alkalische Phosphatase (AP)	Osteoblasten, Leber- u. Gallenwegsepithel (Zellmembran)	Knochenerkrankungen, Rachitis
Amylase	Pankreas, Mundspeicheldrüsen	Akute Pankreatitis, Mumps, Niereninsuffizienz, Parotitiden
Creatinkinase (CK)	Skelettmuskel (CK-MM) Herzmuskel (CK-MB) Gehirn (CK-BB)	Erkrankungen von Herz- und Skelettmuskulatur
Glutamatdehydrogenase (GLDH)	Leber (Mitochondrium)	Leberschädigungen

Enzym	Lokalisation	erhöhte Konzentration im Plasma
γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT)	Leber- u. Gallenwegsepithel (Zellmembran)	Alkoholabusus, Hepatiden, Cholestaten
Lactatdehydrogenase (LDH)	Herz, Erythrozyten	Herzinfarkt (Spätdiagnose), hämolytische Anämien
Saure Phosphatase	Prostata (Lysosomen)	Prostatakarzinom

Tab.4.3: Klinisch wichtige Enzyme

Die Serum-Enzymaktivität eines Herzinfarktpatienten hängt stark davon ab, wie weit das schädigende Ereignis bereits zurückliegt. Handelt es sich um einen **frischen Infarkt**, so ergibt sich ein starker Anstieg von **CK-MB** und **HBDH** (= LDH-1 + LDH-2). Zur **Spätdiagnose** hingegen eignet sich **nur** die **HBDH**, da die CK-MB schon nach 4 Tagen wieder Normalwerte erreicht, die HBDH aber noch bis zu 2 Wochen erhöht bleibt.

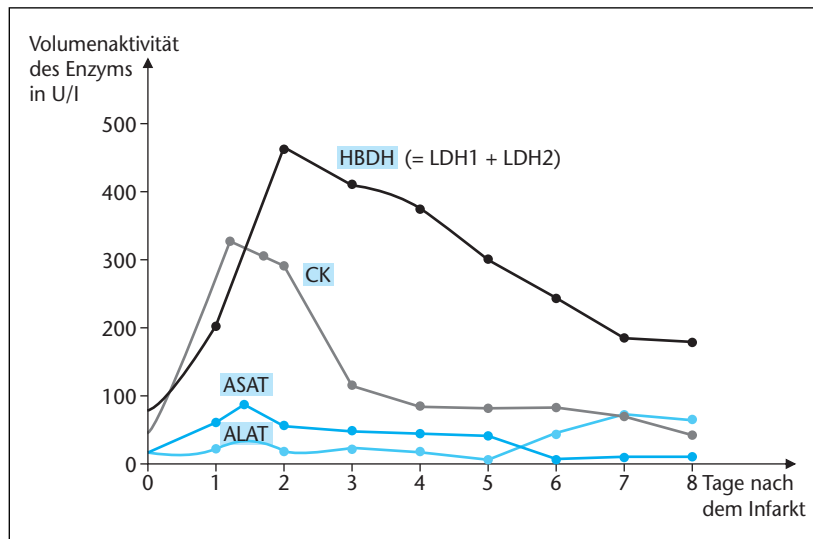
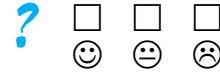


Abb. 4.7: Enzymaktivität nach Herzinfarkt

4.4 Biotransformation

Frage: Was verstehen Sie unter dem Begriff **Biotransformation**?



Antwort: Der Begriff Biotransformation beschreibt eine Vielzahl von Reaktionen, die vorwiegend in der **Leber** ablaufen. Diese dienen dazu, **exogene** Giftstoffe (z.B. Pharmaka) oder auch **endogene** Abfallprodukte (z.B. Steroidhormone) weitgehend unschädlich zu machen bzw. deren Ausscheidung zu beschleunigen.

Man unterteilt grob in 2 Phasen:

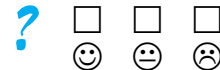
- In **Phase I** werden die Stoffe so genannten **Funktionalisierungsreaktionen** unterworfen. Dadurch werden sie in eine – für die zweite Phase wichtige – reaktivere Form überführt. Es finden **oxidierende** (Cytochromoxidase, Katalasen, Peroxidasen, Mono- und Dioxygenasen), **hydrolytische** (Hydrolasen, Esterasen) und **reduzierende** Enzyme Verwendung.
- Die Produkte der ersten Phase werden schließlich in **Phase II** an **Glucuronsäure, Glutathion, Glycin, Taurin** oder **Sulfatgruppen** gekoppelt. Somit werden sie nochmals in ihrer Wirkung verändert und vor allem **wasserlöslicher** gemacht. In diesem Zustand können sie relativ problemlos über die Nieren bzw. zu geringen Teilen auch mit der Galle **ausgeschieden** werden.

✚ In der Biotransformation findet leider **nicht nur Entgiftung**, sondern manchmal auch Gif-tung statt, d.h. eine eigentlich harmlose Substanz (Prodrug) wird in einen schädlichen Stoff überführt!

Beispiel: Methanol → Formaldehyd → Ameisensäure.

4.5 Cofaktoren

Frage: Welche Rolle spielen **Cofaktoren** bei enzymatisch katalysierten Reaktionen und woher beziehen wir diese?



Antwort: Viele Enzyme erlangen ihre katalytische Funktion erst durch die Anlagerung eines Cofaktors. Cofaktoren leiten sich von verschiedenen Stoffen ab: So bilden neben den **Purin- und Pyrimidinderivaten** (z.B. ATP, UTP) auch **Metalle** (z.B. Fe^{2+} , Cr^{2+}) oder **Vitamine** entsprechende Vorläufer. Entsprechend ihrer Assoziation zum Enzym teilt man Cofaktoren in 2 große Klassen ein: **Prosthetische Gruppen** (z.B. FAD, Häm) sind kovalent mit dem Apoenzym verbunden und liegen am Ende der Reaktion vollständig regeneriert vor. **Coenzyme** (z.B. NAD^+) hingegen binden nur für den Verlauf der Reaktion an das Apoenzym. Sie müssen in einer Folgereaktion wieder aufbereitet werden. Wichtige Funktionen von Cofaktoren sind (De-)Carboxylierungen, Gruppen- und Restübertragungen (z.B. C, NH, H) und die Aktivierung von Sacchariden.

✚ Apoenzym + Cofaktor = **Holoenzym**.