
2 Proteine als Katalysatoren: Die Enzyme

ZUSAMMENFASSUNG

Einteilung der Enzyme: Enzyme werden nach den Reaktionen eingeteilt, die sie katalysieren. Einige Enzyme benötigen für ihre Funktion Coenzyme.

Die Enzymkinetik: Die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat bestimmen die Enzymkinetik. Die Enzymkatalyse zeigt Spezifität. Die Enzymmenge wird durch Messen der biologischen Aktivität bestimmt. Die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen hängt von der Substratkonzentration ab. Die Aktivität von Enzymen hängt von physikalischen Faktoren ab und kann durch Inhibitoren beeinflusst werden. Temperatur und Ionenkonzentration beeinflussen die Enzymaktivität. Die Enzymaktivität kann durch körperfremde und körpereigene Verbindungen gehemmt werden. Für die Wechselwirkung mit dem Substrat ist das aktive Zentrum von Enzymen verantwortlich.

2.1 Einteilung der Enzyme

Enzyme werden nach den Reaktionen eingeteilt, die sie katalysieren

In jedem lebenden Organismus läuft *gleichzeitig* eine Vielzahl komplizierter chemischer Reaktionen ab, die einmal dem Abbau komplexer organischer Verbindungen für die Energiegewinnung dienen, zum anderen der Biosynthese zelleigenen Materials. Die dabei herr-

schenden Bedingungen – neutraler pH-Wert, konstanter Druck und Temperatur, Überschuß an Wasser als Lösungsmittel – machen es von vornherein unwahrscheinlich, daß die geschilderten Reaktionen ohne weiteres mit der benötigten Geschwindigkeit ablaufen. Die Natur bedarf vielmehr zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels eines großen Satzes außerordentlich effektiver Katalysatoren, die als *Enzyme* bezeichnet werden.

Enzyme sind immer **Proteine** und wirken als Katalysatoren in biologischen Systemen. Ihre Molekulargewichte schwanken zwischen etwa 10 000 und mehreren Millionen.

Während in den Anfangsjahren der Enzymologie neu entdeckte Enzyme von ihren Entdeckern mit mehr oder weniger phantasievollen Namen ausgestattet wurden, hat es sich später durchgesetzt, Enzyme nach dem jeweiligen Substrat mit der Endung *-ase* zu bezeichnen (z.B. *Lipase* für *fettspaltende* Enzyme, Proteasen für *proteolytisch* wirkende Enzyme).

Eine verbesserte Nomenklatur ergab sich in der Folgezeit aus der Benennung von Enzymen nach ihrer *Funktion* (*Oxidasen*, *Reduktasen*, *Synthetasen* usw.). Dieses System ist in vielen Trivialnamen der heute bekannten Enzyme enthalten und wird zudem durch ein in den letzten Jahren von der „International Union of Biochemistry“ vorgeschlagenes Nomenklatorsystem ergänzt, das Enzyme nach den *katalysierten Reaktionen* benennt.

Tabelle 2.1 zeigt die heute gültige Systematik, die insgesamt 6 Hauptklassen unterscheidet:

Die erste und besonders wichtige Hauptklasse bilden die sogenannten **Oxidoreduktasen**. Sie katalysieren Redoxreaktionen, die beim Substratabbau zur Energiegewinnung eine außerordentlich große Rolle spielen. Bei vielen Oxidoreduktasen ist ein Partner der Redoxreaktion als sogenanntes Wasserstoff-übertragendes Coenzym mehr oder weniger fest an das Enzym gebunden. Wie aus den in Tabelle 2.1 angegebenen Beispielen hervorgeht, katalysieren Oxidoreduktasen u.a. die Oxidation von CHOH- , CHNH_2- sowie $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -Gruppierungen.

Zur zweiten Hauptgruppe der Enzyme, den **Transferasen**, gehören diejenigen Enzyme, die den Transfer einer Gruppe X zwischen zwei Substraten S und S' katalysieren. Beispiele für diese wichtige Gruppe von Enzymen sind die Kinasen, die den Phosphattransfer von ATP auf entsprechende Substrate vermitteln. Andere Transferasen übertragen Glykosyl-, Acyl- oder Alkyl-Gruppen.

Tabelle 2.1. Einteilung der Enzyme in Hauptklassen

Hauptklasse	Katalysierte Reaktion	Beispiele
1. Oxido-reduktasen	$S_{\text{red}} + S'_{\text{ox}} \rightleftharpoons S_{\text{ox}} + S'_{\text{red}}$	Lactatdehydrogenase (S. 121) Glutamatdehydrogenase (S. 186) Succinatdehydrogenase (S. 159) Pyruvatdehydrogenase (S. 155)
2. Transferasen	$S-X + S' \rightleftharpoons S + S'-X$	Hexokinase (S. 116) Phosphorylase (S. 122)
3. Hydrolasen	$S-S' + H_2O \rightarrow S-OH + S'-H$ Hydrolytische Abspaltung von Gruppen	Proteasen, Peptidasen Esterasen Glykosidasen
4. Lyasen	Nichthydrolytische Abspaltung von Gruppen	Aldolase (S. 117) Transketolase (S. 130) Fumarase (S. 159)
5. Isomerasen	Umwandlungen isomerer Verbindungen	Retinalisomerase (S. 319) Triosephosphatisomerase (S. 117) UDP-Galaktose-4-Epimerase (S. 125)
6. Ligasen	Energieabhängige Verknüpfung von Bindungen	Pyruvatcarboxylase (S. 222) Thiokinase (S. 141) Glutaminsynthetase (S. 193)

Eine große Bedeutung beim Abbau der verschiedenen Makromoleküle haben die **Hydrolasen**. Sie katalysieren ganz allgemein die hydrolytische Spaltung von Estern, Ethern, Peptiden, Glykosiden, Säureanhydriden oder C-C-Bindungen. Hauptvertreter dieser dritten Hauptklasse sind die vielen Hydrolasen des Verdauungstraktes.

Lyasen katalysieren im Gegensatz zu den Hydrolasen die nichthydrolytische Abspaltung von verschiedenen Gruppen. Gespalten werden können C-C-, C-O-, C-N-, C-S-Bindungen.

Isomerasen sind Enzyme, die die Umwandlung der verschiedenen in der Natur vorkommenden Isomere ineinander ermöglichen.

Zu ihnen gehören die Aldose-Ketose-Isomerasen der Glykolyse, die verschiedenen Epimerasen sowie die Cis-Trans-Isomerasen.

Die letzte Hauptgruppe von Enzymen stellen schließlich die **Ligasen** dar, die im wesentlichen für biosynthetische Prozesse benutzt werden. Sie katalysieren die energieabhängige Knüpfung von Bindungen. Der Energiedonator ist im allgemeinen das ATP, jedoch kann es durch analoge Verbindungen mit hohem Gruppenübertragungspotential ersetzt werden.

Einige Enzyme benötigen für ihre Funktion Coenzyme

Alle bisher bekannten *Enzyme* gehören zu der Gruppe der *Proteine*. Ein großer Teil der Enzyme ist gut wasserlöslich und befindet sich im cytosolischen Raum der Zelle. Wie man aus Röntgenstrukturanalysen weiß, handelt es sich in diesem Fall um *globuläre* Proteine. Andere Enzyme, die sogenannten **Membranenzyme**, sind fest an die verschiedenen zellulären Membranen der tierischen Zelle gebunden. Beispiele hierfür sind die Enzyme des Elektronentransports der biologischen Oxidation (s.S. 164), die Enzyme der Glykoproteinbiosynthese (s.S. 78, 400), die Enzyme des *Ionentransportes*, sowie die Enzyme der Lipidbiosynthese (s.S. 241). Häufig gelingt es nicht, Membranenzyme ähnlich wie die wasserlöslichen cytosolischen Enzyme durch konventionelle Anreicherungsverfahren (s.u.) zu reinigen. Beim Versuch, sie aus der Lipidmatrix der Membran zu lösen, werden sie oft inaktiviert, so daß es erheblichen experimentellen Geschickes bedarf, sie zur Reaktivierung in entsprechende künstliche Membransysteme einzubauen. Membranenzyme besitzen in vielen Fällen **hydrophobe Aminosäuren**, was sicherlich ihren Einbau in die Lipidmatrix von Membranen erleichtert.

Viele Enzyme, besonders diejenigen der Hauptklassen 1, 2, 5 und 6, katalysieren die Reaktionen mit ihrem Substrat nur in Gegenwart eines speziellen Nichtprotein-Moleküls, das im allgemeinen als **Coenzym** bezeichnet wird (Tabelle 2.2). Coenzyme sollten *dann* besser als Cosubstrate bezeichnet werden, wenn sie wie ein *zweites Substrat* an der Reaktion teilnehmen. Dies wird besonders deutlich am Beispiel der Oxidoreduktasen, die alle über wasserstoffübertragende Coenzyme verfügen. Im Gegensatz zum eigentlichen Substrat ist das Coenzym oder Cosubstrat häufig relativ fest, gelegentlich auch durch covalente Bindungen, an das Enzymprotein gebunden. Der Komplex

aus Enzym und Coenzym wird auch als *Holoenzym* bezeichnet, der Proteinanteil alleine als *Apoenzym*.

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten *Coenzyme*. Die überwiegende Zahl von Coenzymen leitet sich interessanterweise von *Vitaminen* ab, kann also vom Organismus selbst nicht synthetisiert werden (s.S. 305). Dabei sind die Funktionen der von Vitaminen abgeleiteten Coenzyme außerordentlich vielfältig. Sie reichen von Wasserstoffübertragung in Redoxsystemen zu Decarboxylierungen, Carboxylierungen, Transaminierungen, C-1-Gruppenübertragungen und Acylgruppenverschiebungen. Aus dieser Tatsache wird

Tabelle 2.2. Herkunft und Funktion wichtiger Coenzyme

Coenzym	Funktion	Vitamin	Beispiel
Ascorbat	Hydroxylierungen Redoxsystem	Ascorbat Vitamin C	Prolin Hydroxylase (s. S. 464)
Thiamin- pyrophosphat	Decarboxylierung Aldehydgruppen- transfer	Thiamin Vitamin B ₁	Pyruvatdehydro- genase (s. S. 155)
Flavinmono- nucleotid (FMN); Flavin- adenin dinucleotid (FAD)	Wasserstoff- übertragung	Riboflavin Vitamin B ₂	Succinatdehydro- genase (s. S. 159) NADH-Coenzym Ubichinonreduk- tase (s. S. 164)
Nicotinamid- adenin dinucleotid (-phosphat) NAD ⁺ ; NADP ⁺	Wasserstoff- übertragung	Nicotinsäure	Glucose-6-Phosphat- dehydrogenase (s. S. 130) HMG-CoA- Reduktase (s. S. 255)
Pyridoxal- phosphat	Transaminierung, Decarboxylierung, α -, β -Elimination	Pyridoxin Vitamin B ₆	Aspartat Aminotransferase
Coenzym A	Acylübertragung	Pantothensäure	Citratsynthase (s. S. 157) Ketothiolase (s. S. 145)

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Coenzym	Funktion	Vitamin	Beispiel
Biotinyl-Lysyl-Enzym	Carboxylierung	Biotin	Pyruvatcarboxylase (s. S. 222) Acetyl-CoA-Carboxylase (s. S. 244)
Lipoyl-Lysyl-Enzym	Wasserstoff- und Acylgruppenübertragung	Liponsäure	Pyruvatdehydrogenase (s. S. 155)
Tetrahydrofolat	C1-Gruppenübertragung	Folsäure	Purinbiosynthese (s. S. 260)
5'-Adenosylcobalamin	1,2-Verschiebung von Alkylgruppen	Cobalamin (= Vitamin B ₁₂)	Methyl-Malonyl-CoA-Mutase (s. S. 145)
Difarnesyl-naphthochinon	Carboxylierung von Glutamylresten in Proteinen	Naphthochinon (= Vitamin K)	γ -Carboxylierung von Glutamylresten des Prothrombin (s. S. 408)
Ubichinon	Wasserstoffübertragung	–	NADH-Ubichinonreduktase (s. S. 164)
Cytochrome	Elektronenübertragung	–	Cytochrom a/a ₃ (s. S. 166)
Adenosin-triphosphat (ATP)	Phosphatübertragung Adenylübertragung	–	Hexokinase (s. S. 116)
Cytidin-diphosphat (CDP)	Phospholipidbiosynthese	–	Übertragung von Phosphorylcholin (s. S. 250)
Uridin-diphosphat (UDP)	Saccharidübertragung	–	Glykogensynthese (s. S. 233)
Adenosyl-methionin	Methylgruppenübertragung	–	Cholinbiosynthese (s. S. 206)
Phospho-adenosyl-Phosphosulfat (PAPS)	Sulfatübertragung	–	Saccharid-sulfatierung (s. S. 238)

verständlich, daß ernährungsbedingte Vitaminmangel-Zustände, die ja häufig mehrere Vitamine betreffen, ein eher unspezifisches, jedoch schweres Krankheitsbild hervorrufen, da die grundlegenden Reaktionen des Stoffwechsels beeinträchtigt sind.

Als Coenzym dienende Verbindungen, die vom Organismus selbst synthetisiert werden können, leiten sich zum großen Teil von Purin- oder Pyrimidin-Nucleotiden ab. Sie dienen der Übertragung von Phosphat- oder Adenylresten, der Phospholipidbiosynthese, der Saccharidübertragung, der Übertragung von Methylgruppen sowie der Sulfatübertragung. Als Coenzyme in den Elektronentransport der Atmungskette eingeschaltet sind schließlich noch das Ubichinon sowie die verschiedenen Cytochrome.

2.2 Die Enzymkinetik

Die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat bestimmen die Enzymkinetik

► Die Enzymkatalyse zeigt Spezifität

Die in der Chemie üblichen Katalysatoren, die keine Proteine darstellen, beschleunigen in aller Regel relativ unspezifisch eine Reihe von Reaktionen. Im Gegensatz dazu katalysieren Enzyme den Umsatz von nur wenigen strukturell verwandten Verbindungen, häufig sogar nur eine einzige Reaktion.

Die Spezifität von Enzymen geht gelegentlich so weit, daß nicht ganze Moleküle, sondern nur bestimmte Gruppen innerhalb eines Moleküls als Erkennungsmerkmal für das Substrat dienen. So zeigen die meisten Enzyme eine absolute **Stereospezifität** für einen Teil des Substratmoleküls. Das heißt, daß von zwei oder mehreren Stereoisomeren eines Substrates selektiv nur ein einziges umgesetzt wird.

So wird beispielsweise von den beiden Stereoisomeren des Lactates nur das L-Lactat, nicht jedoch das D-Lactat, durch die Lactatdehydrogenase als Substrat erkannt und zum optisch inaktiven Pyruvat oxidiert. Umgekehrt ist es so, daß bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat nicht das Razemat D,L-Lactat, sondern wiederum *ausschließ-*

lich L-Lactat entsteht. Dieses erstaunliche Phänomen läßt sich nur durch die hohe Spezifität der Bindung von Lactat an entsprechende Bindungsstellen im aktiven Zentrum der Lactatdehydrogenase verstehen (s.u.).

Neben der Stereospezifität findet sich bei einer Reihe von Enzymen auch eine sogenannte **Gruppenspezifität**. Bei Enzymen mit Gruppenspezifität handelt es sich um solche, die bestimmte chemische Gruppierungen wie Ester-, Anhydrid-, Peptid- oder glykosidische Bindungen als Substrate erkennen, wobei sonst eine eher breite Substratspezifität vorliegt. Die im Verdauungstrakt vorkommende Protease *Trypsin* z.B. spaltet Peptidbindungen in einer Vielzahl von Proteinen, jedoch nur nach den geladenen, hydrophilen Aminosäuren Arginin bzw. Lysin. Eine Reihe von Glykosidasen zeigt hohe Spezifität bezüglich des die glykosidische Bindung eingehenden Zuckers und der sterischen Anordnung der glykosidischen Bindung (α - bzw. β -glykosidische Bindung), jedoch nur eine sehr geringe Spezifität bezüglich des Aglykons.

- ▶ Die Bestimmung der Enzymmenge erfolgt durch Messung der biologischen Aktivität

Enzyme als Proteine unterscheiden sich im *allgemeinen in nichts* von anderen Proteinen im Intra- bzw. Extrazellulärraum. Diese Tatsache macht es äußerst schwierig, *direkt* die Menge eines Enzymproteins zu messen. Dagegen erlaubt die Tatsache, daß Enzyme als Biokatalysatoren eine sehr genau bestimmbare **biologische Aktivität** haben, den quantitativen Nachweis ihres Vorhandenseins. Das heißt mit anderen Worten, daß in einer Gewebeprobe oder Körperflüssigkeit nicht die Enzymmenge, sondern die **Enzymaktivität** bestimmt wird.

Unter Enzymaktivität wird ganz allgemein die Reaktionsgeschwindigkeit verstanden, mit der eine enzymkatalysierte Reaktion abläuft. Bei optimalen Bedingungen, d.h. einem Überschuß aller Reaktionspartner, Messung im Temperatur- und pH-Optimum, Vorhandensein der notwendigen Cofaktoren in ausreichender Menge, ist die **Geschwindigkeit** des Substratumsatzes **proportional** der **Menge** des in einem Testansatz vorhandenen Enzyms.

Damit derartige Enzymaktivitäts-Bestimmungen erfolgreich durchgeführt werden können, ist es notwendig, mit Hilfe physikalisch-

chemischer Methoden entweder den Verbrauch des (Co-)Substrates bzw. die Bildung des entsprechenden Produktes messen zu können.

Sehr elegant gestaltet sich das Verfahren dann, wenn es sich um Reaktionen handelt, bei denen NAD^+ bzw. NADP^+ als Reaktionspartner eingeschaltet sind. Wie die Abb. 2.1 zeigt, verfügen beide wasserstoffübertragenden Coenzyme in der reduzierten Form, d.h.

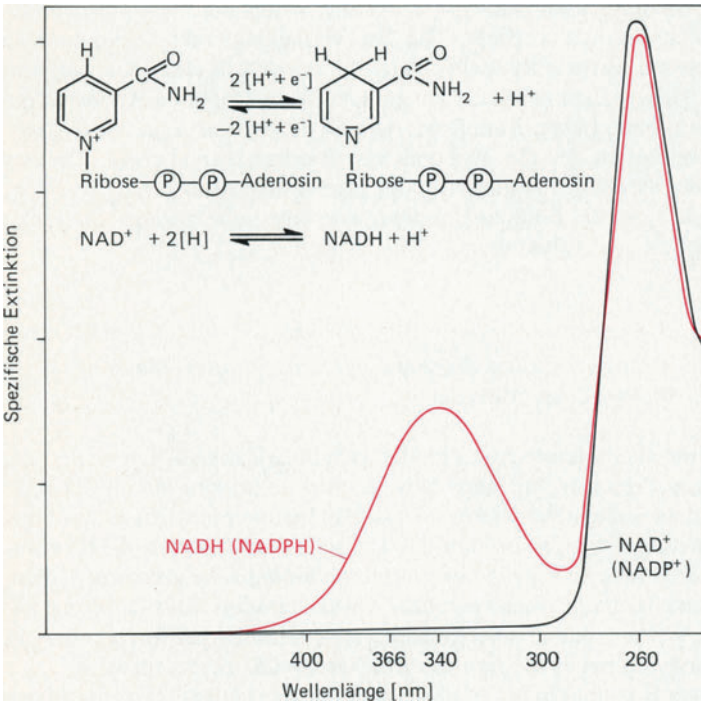


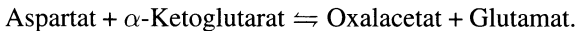
Bild 2.1. Absorptionsspektren von NAD^+ (—) und NADH (—)

also als NADH bzw. NADPH , über ein deutliches Absorptionsmaximum bei 340 nm. Der molare Extinktionskoeffizient von NADH bzw. NADPH ist identisch und sehr leicht zu vermessen. Er gibt die Extinktion einer einmolaren Lösung dieser Verbindungen bei einer

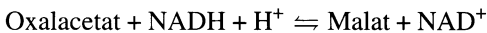
Schichtdicke von 1 cm an. Zur Enzymaktivitäts-Bestimmung muß also lediglich *während* des Ablaufs der enzymkatalysierten Reaktion die Änderung der Absorption bei 340 nm gemessen werden.

Unter optimalen Bedingungen ist der Abfall der Extinktion bei Oxidation von reduziertem Coenzym bzw. der Anstieg der Extinktion bei Reduktion des oxidierten Coenzym *proportional* der eingesetzten Enzymmenge. Da die Extinktionskoeffizienten genau bekannt sind, läßt sich darüber hinaus leicht die Menge des umgesetzten Substrates errechnen.

Auch dann, wenn an der untersuchten Enzymreaktion kein NAD^+ (bzw. NADP^+) beteiligt ist, versucht man im allgemeinen, durch Nachschaltung einer zweiten Reaktion als Hilfsreaktion das oben geschilderte Meßprinzip mittels wasserstoffübertragender Coenzyme zu verwenden. Ein Beispiel ist die Bestimmung der Transaminaseaktivitäten in Zellen und Körperflüssigkeiten. Die Aspartat-Aminotransferase (ASAT; synonym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GOT) katalysiert folgende Reaktion:



Diese Reaktion allein liefert keinen Meßparameter, der leicht durch direkte Photometrie die Bestimmung der Enzymaktivität erlaubt. Durch Nachschalten der von der Malatdehydrogenase katalysierten Reaktion:

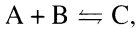


gelingt im sogenannten *zusammengesetzten optisch-enzymatischen Test* auch hier die direkte photometrische Bestimmung der Enzymaktivität. Die einzige Voraussetzung hierfür ist, daß das Gleichgewicht der Hilfsreaktion ganz auf der rechten Seite liegt.

Nach internationaler Übereinkunft bezeichnet man als *Internationale Einheit* (IU, International Unit) diejenige Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen bezüglich Temperatur, pH-Wert und Substratsättigung den Umsatz von *1 μmol Substrat pro Minute* katalysiert. In neuerer Zeit wird alternativ als Meßgröße für den Umsatz das *Katal* (kat) verwendet. Ein Katal entspricht dabei derjenigen Enzymmenge, die den Umsatz von *1 mol Substrat pro Sekunde* katalysiert.

- Die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen hängt von der Substratkonzentration ab

Grundlagen der Reaktionskinetik. Betrachtet man die Reaktion



so kann man nach der kinetischen oder Kollisionstheorie davon ausgehen, daß A und B zusammenstoßen müssen, um zu C zu reagieren. Dabei muß die Häufigkeit der Zusammenstöße der Reaktionsgeschwindigkeit proportional sein. Durch den Zusammenstoß von A und B werden beide Moleküle in einen reaktionsfähigeren Zustand, d.h. in dem Zustand eines *höheren Energieniveaus* überführt, von dem aus dann die Reaktion zu C spontan erfolgt. Diejenige Energiemenge, die benötigt wird, um den angeregten Zustand von A und B zu erzielen, wird auch als **Aktivierungsenergie** bezeichnet. Eine Erhöhung der Temperatur, d.h. eine Zufuhr von Energie, erhöht die kinetische Energie der Moleküle A und B, so daß Zusammenstöße häufiger erfolgen und dementsprechend die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt. Für enzymkatalysierte Reaktionen gilt wie für katalysierte Reaktionen allgemein, daß durch den Katalysator die Aktivierungsenergie *herabgesetzt* wird.

In chemischen Systemen beruht die Wirkung eines Katalysators meist darauf, daß er mit einem der Reaktionspartner vorübergehend eine Verbindung eingeht, so daß die Aktivierungsenergie herabgesetzt wird. Für enzymkatalysierte Reaktionen trifft im Prinzip das gleiche zu. An sehr spezifischen Stellen im **aktiven Zentrum** eines Enzyms (s.u.) werden die Substrate so gebunden, daß sie in eine entsprechende räumliche Zuordnung zueinander geraten, die ihre spezifische Reaktionsmöglichkeit verbessert.

Die Effektivität von Enzymen als Katalysatoren ist beachtlich. Im allgemeinen kann man davon ausgehen, daß im Vergleich zu nicht-katalysierten Reaktionen Enzyme die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 10^8 - 10^{20} erhöhen. Man beachte dabei jedoch immer, daß grundsätzlich wie bei allen katalysierten Reaktionen auch Enzyme nicht das *Gleichgewicht* einer Reaktion, sondern lediglich die *Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung* verändern können (weiteres s. Lehrbücher der Chemie).

Abhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen von der Enzym- und Substratkonzentration. Bei *Substratüberschuß* liegt unter

Berücksichtigung des meist hohen Molekulargewichts von Enzymen die Konzentration des Substrates meist um viele Größenordnungen über derjenigen des Enzyms. Dies bedeutet nach der Kollisionstheorie, daß zwar alle Enzymmoleküle eine reelle Chance haben, mit ihrem Substrat in Wechselwirkung zu treten, auf der anderen Seite jedoch nur ein kleiner Teil der Substratmoleküle je Zeiteinheit auf ein Enzym als Reaktionspartner trifft. Daraus wird verständlich, daß dann die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion *direkt proportional* der Enzymkonzentration ist (streng genommen trifft das nur zu, wenn optimale Bedingungen bezüglich der Konzentration des Cosubstrates, des pH-Wertes sowie der Temperatur eingehalten werden). Anders stellen sich die Verhältnisse dar, wenn bei konstanter Enzymkonzentration die Substratkonzentration variiert wird. Abbildung 2.2 zeigt die Beziehung zwischen Substratkonzentration und Geschwindigkeit der *enzymkatalysierten* Reaktion. Auffallend dabei ist, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur **Substratkonzentration** zunimmt.

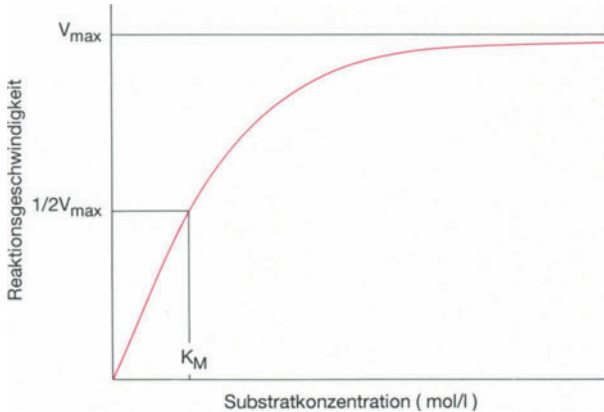


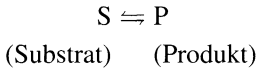
Bild 2.2. Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration. V_{\max} , Maximalgeschwindigkeit; K_M , Michaeliskonstante

Bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration flacht diese Beziehung asymptotisch ab bis die weitere Erhöhung der Substratkonzentration

zentration nicht mehr zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Aus dieser Beobachtung zogen Michaelis und Menten einige grundlegende Schlüsse über den prinzipiellen Mechanismus enzymkatalysierter Reaktionen, die im folgenden kurz dargestellt werden sollen. Eckige Klammern geben Konzentrationen wieder:

Im einfachsten Fall verläuft die Reaktion



in Anwesenheit eines Enzyms (E) als Katalysator nach folgendem Mechanismus:



Er beinhaltet, daß sich zunächst aus E und S der *Enzym-Substratkomplex* (ES) bildet, aus dessen Zerfall das Produkt (P) entsteht, wobei das Enzym wieder regeneriert wird. Unter der Annahme, daß die Geschwindigkeit der Rückreaktion von P + E zu ES verschwindend klein ist, läßt sich Gleichung (1) folgendermaßen schreiben:



Dabei sind k_1 , k_{-1} und k_2 die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Reaktionen. Michaelis und Menten gingen davon aus, daß für die Gesamtreaktion der Zerfall des Enzym-Substratkomplexes zu P + E geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit V wird dann¹

$$V = k_2[ES]. \quad (3)$$

Das Problem besteht nun darin, für die nicht oder nur schwer zu ermittelnde Konzentration von ES einen Ausdruck aus bekannten oder leicht zu ermittelnden Größen zu finden.

Die Geschwindigkeit der Bildung von ES entspricht

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] [S]. \quad (4)$$

¹ Im folgenden geben eckige Klammern Konzentrationen wieder.

Die Geschwindigkeit des Verbrauchs von ES ist dann

$$\frac{-d[\text{ES}]}{dt} = k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}], \quad (5)$$

oder

$$\frac{-d[\text{ES}]}{dt} = (k_{-1} + k_2) [\text{ES}]. \quad (6)$$

Im **Gleichgewichtszustand** sind Bildung und Verbrauch von ES gleich, so daß sich ergibt:

$$k_1[\text{E}][\text{S}] = k_{-1} + k_2[\text{ES}], \quad (7)$$

oder

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{(k_{-1} + k_2)/k_1}. \quad (8)$$

Der Nenner der Gleichung (8) kann zu einer einzigen Konstante, der Michaeliskonstante K_M zusammengefaßt werden:

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1. \quad (9)$$

Eingesetzt in Gleichung (8) ergibt sich

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_M}. \quad (10)$$

Unter normalen Bedingungen wird $[\text{S}]$ sehr viel größer als $[\text{E}]$ sein. $[\text{E}]$ gibt die Konzentration des freien Enzyms wieder, entspricht also

$$[\text{E}] = ([\text{E}_t] - [\text{ES}]) \quad (11)$$

wobei $[\text{E}_t]$ der Gesamtzymkonzentration entspricht. Durch Einsetzen in Gleichung (10) ergibt sich

$$[\text{ES}] = \frac{([\text{E}_t] - [\text{ES}]) [\text{S}]}{K_M}. \quad (12)$$

Durch Umformung ergibt sich

$$[\text{ES}] = [\text{E}_t] \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}. \quad (13)$$

Diese Ableitung von ES kann nun in Gleichung (3) eingesetzt werden:

$$V = k_2[E_t] \frac{[S]}{K_M + [S]}. \quad (14)$$

Da die **Maximalgeschwindigkeit** einer enzymkatalysierten Reaktion dann erreicht wird, wenn das Enzym vollständig als Enzym-Substratkomplex vorliegt ($ES = E_t$), ergibt sich

$$V_{\max} = k_2[E_t]. \quad (15)$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung (14) ein, so wird

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}. \quad (16)$$

Diese Gleichung von Michaelis und Menten beschreibt für viele Enzyme die *Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration*, was sich an verschiedenen Grenzfällen leicht demonstrieren läßt:

1. $[S]$ ist viel kleiner als K_M :

Da in diesem Fall im Nenner der Michaelis-Menten-Gleichung der Ausdruck $K_M + [S]$ gleich K_M gesetzt werden kann, reduziert sich die Gleichung auf

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M}.$$

V_{\max} und K_M sind Konstanten, also kann es weiter heißen

$$V = K \cdot [S]$$

Dies bedeutet, daß unter *diesen Bedingungen* die Reaktionsgeschwindigkeit V **proportional** der Substratkonzentration ist.

2. $[S]$ ist viel größer als K_M :

In diesem Fall kann im Nenner der Michaelis-Menten-Gleichung der Wert der K_M vernachlässigt werden:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S]} \quad \text{oder} \quad V = V_{\max}$$

Die **Reaktionsgeschwindigkeit** entspricht also der **Maximalgeschwindigkeit** V_{\max} .

3. $K_M = [S]$:

In diesem Fall kann die Michaelis-Menten-Beziehung aufgelöst werden zu:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{2[S]} \quad \text{oder} \quad V = \frac{1}{2} V_{\max}.$$

Dies bedeutet, daß eine enzymkatalysierte Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft, wenn die eingesetzte Substratkonzentration der Michaeliskonstanten entspricht. Mit anderen Worten gibt die **Michaeliskonstante** K_M für ein gegebenes Enzym diejenige *Substratkonzentration* an, die zu *halbmaximaler Geschwindigkeit* führt. Die Michaeliskonstante hat die Dimension mol/l, wie sich übrigens auch aus Gleichung (9) errechnen läßt. Im allgemeinen liegt sie in einer Größenordnung von 10^{-3} - 10^{-5} mol/l.

Methoden zur Bestimmung der Michaeliskonstanten. Im einfachsten Fall läßt sich der Wert für K_M direkt der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration entnehmen, wie in Abb. 2.2 dargestellt ist. Man ermittelt daraus den Wert für V_{\max} , halbiert ihn und bestimmt die zugehörige Substratkonzentration, die dann K_M entspricht. Leider läßt sich V_{\max} häufig nicht mit ausreichender Genauigkeit ermitteln, so daß dann die Michaelis-Menten-Gleichung zur Bestimmung von K_M umgeformt werden muß. Die gebräuchlichste Methode ist die Umformung nach Lineweaver und Burk. Hierzu wird die Michaelis-Menten-Gleichung in die *reziproke* Form gebracht:

$$\begin{aligned} \frac{1}{V} &= \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \cdot [S]} \quad \text{oder} \\ \frac{1}{V} &= \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]} \quad \text{oder} \\ \frac{1}{V} &= \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}. \end{aligned}$$

Diese Umformung entspricht der Geradengleichung:

$$y = ax + b$$

Trägt man graphisch statt y $1/V$ und statt x $1/S$ auf, so wird die in Abb. 2.2 dargestellte Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

enzymkatalysierter Reaktionen zu einer Geraden (Abb. 2.3). Diese schneidet die y-Achse im Punkt b bzw. $1/V_{\max}$. Setzt man $y = 0$, so ergibt sich für den Schnittpunkt mit der x-Achse:

$$ax = -b \quad x = -\frac{b}{a} = -\frac{1}{K_M}$$

d.h., der Schnittpunkt mit der x-Achse gibt den negativen, reziproken Wert der Michaeliskonstanten K_M wieder.

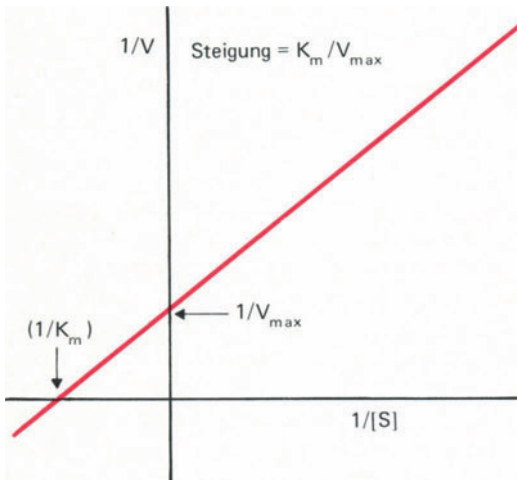


Bild 2.3. Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration in der Auftragung nach Lineweaver-Burk

Die Aktivität von Enzymen hängt von physikalischen Faktoren ab und kann durch Inhibitoren beeinflusst werden

- Temperatur und Ionenkonzentration beeinflussen die Enzymaktivität

Temperatur. Innerhalb des Temperaturbereiches der belebten Natur zeigt sich mit steigender Temperatur eine deutliche Zunahme der Ge-

schwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen. Der Beschleunigungsfaktor bei einer Erhöhung der Temperatur um 10°C wird auch als **Temperaturkoeffizient** oder Q_{10} bezeichnet. Er beträgt bei den meisten enzymkatalysierten Reaktionen 2, d.h. bei einer Erhöhung der Temperatur um 10°C verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit. Allerdings gilt diese Beziehung bei den meisten Enzymen nur bis zu einer Temperatur von $40 - 50^{\circ}\text{C}$. Wird diese überschritten, so fällt die Reaktionsgeschwindigkeit meist sehr steil ab. Der Grund hierfür liegt darin, daß die meisten Enzyme als Proteine *nicht hitzestabil* sind und infolgedessen bei höheren Temperaturen meist *irreversibel* denaturiert werden. Ausnahme von dieser Regel machen z.B. die **thermophilen Mikroorganismen**, die in heißen Quellen leben und deren Enzymproteine so ausgestattet sind, daß sie auch bei Temperaturen weit über 40°C hohe Aktivität zeigen.

Wasserstoffionenkonzentration. Die meisten Enzyme zeigen biologische Aktivität bei pH-Werten zwischen 4 und 9, wobei der pH-Wert, bei dem sie die höchste Aktivität entwickeln, auch das *pH-Optimum* genannt wird. Diese Abhängigkeit der Enzymkatalyse von der Wasserstoffionenkonzentration wird verständlich, wenn man bedenkt, daß sehr häufig an der Katalyse saure oder basische Gruppen der Aminosäureseitenketten beteiligt sind, von deren Dissoziationszustand jeweils die enzymatische Aktivität abhängt. Bei sehr hohen bzw. sehr niedrigen pH-Werten kommt es dagegen zur *irreversiblen Denaturierung* des Enzymproteins. Außer einer optimalen Wasserstoffionenkonzentration benötigen viele Enzyme Spurenelemente wie Mangan-, Zink-, Calcium-, oder Selenionen (s. Kap. 15).

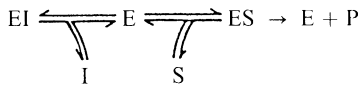
- ▶ Die Enzymaktivität kann durch körperfremde oder körpereigene Verbindungen gehemmt werden

Die **Hemmung** enzymatischer Aktivitäten ist ein in der Natur vielfach vorkommendes Verfahren zur *Regulation* komplexer Prozesse wie der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, des Komplementsystems und anderer. Im Blut sowie in anderen Körperflüssigkeiten wie Harn, Liquor, Samenflüssigkeit, Speichel usw. finden sich beispielsweise eine Reihe von **Proteinaseinhibitoren** (α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin usw., s.S. 408), deren Fehlen aufgrund genetischer Defekte zu charakteristischen Krankheitsbildern führt.

Neben diesen sehr spezifisch wirkenden *physiologischen* Hemmstoffen gibt es auch eine Reihe *unphysiologischer* Verbindungen, die in vivo und in vitro die Aktivität bestimmter Enzyme hemmen und die aus diesem Grunde gelegentlich auch als Arzneimittel verwendet werden. Nach dem Hemmtyp unterscheidet man prinzipiell zwei Klassen von Inhibitoren, *kompetitive* und *nichtkompetitive* Hemmstoffe.

Die kompetitive Hemmung. Damit eine Verbindung als kompetitiver Hemmstoff eines Enzyms wirken kann, muß sie im aktiven Zentrum des Enzyms *anstatt* des natürlichen Substrates von der **Substratbindungsstelle** fixiert werden. Hierfür ist in aller Regel eine beträchtliche **Strukturanalogie** notwendig. Ein klassisches Beispiel für kompetitive Hemmung ist die Hemmung der Succinatdehydrogenase durch das um 1 C-Atom verkürzte Succinat analoge Malonat (Abb. 2.4).

Die Succinatdehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat (s.S. 159), wobei eine Doppelbindung zwischen den beiden C-Atomen 2 und 3 entsteht. Genau wie mit Succinat bildet die Succinatdehydrogenase auch mit dem Malonat einen Enzymsubstratkomplex. Da das Malonat jedoch nur über drei C-Atome verfügt, kann keine zu einer C=C-Doppelbindung führende Oxidation stattfinden. Dem **Enzym-Inhibitor-Komplex** bleibt damit als einzige Reaktionsmöglichkeit die Rückreaktion zu freiem Enzym und Inhibitor. Konkurrieren Enzyminhibitor und natürliches Substrat um die Bindungsplätze im aktiven Zentrum, so ergibt sich folgende Beziehung:



Die Geschwindigkeit der Bildung von P hängt einzig und allein von der Konzentration von ES ab. Bei Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors konkurrieren Inhibitor und Substrat um die gleiche Bindungsstelle am Enzym, nämlich um das aktive Zentrum. Die Konzentration von ES wird infolgedessen vom Verhältnis Substrat zu Inhibitor sowie von deren jeweiligen Affinitäten zum Enzym abhängen. Jede Erhöhung der Inhibitorkonzentration muß zu einer Abnahme von ES, jede Zunahme der Substratkonzentration zu einer Zunahme von ES führen. Ist die Substratkonzentration *wesentlich* größer als

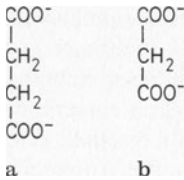


Bild 2.4. Vergleich von Succinat (a) und Malonat (b)

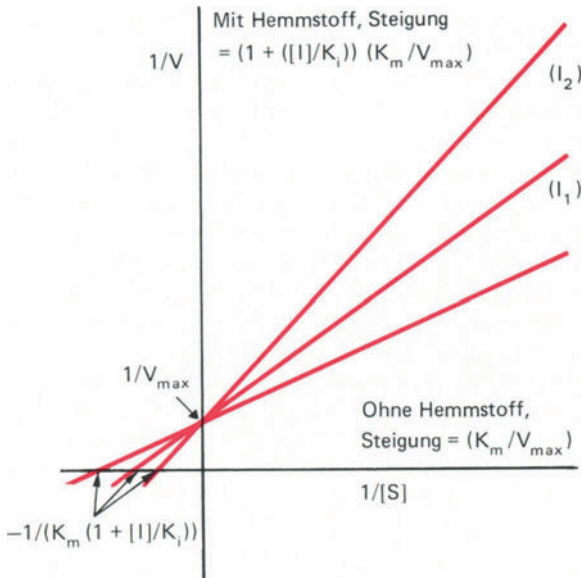


Bild 2.5. Lineweaver-Burk Diagramm in Abwesenheit (–) und in Anwesenheit (+) eines kompetitiven Inhibitors

die Inhibitorkonzentration, so spielt die Bildung von EI keine Rolle mehr.

Trägt man bei konstanter Hemmstoffkonzentration die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in doppelt reziproker Weise auf, so ergibt sich das in Abb. 2.5 dar-

gestellte Diagramm. Bei Vorliegen einer kompetitiven Hemmung ist der Schnittpunkt der in Ab- bzw. Anwesenheit des Inhibitors gemessenen Geraden mit der y-Achse identisch. Da dieser Schnittpunkt dem reziproken Wert der Maximalgeschwindigkeit entspricht, bedeutet dies mit anderen Worten, daß bei Substratüberschuß, d.h. unter den Bedingungen der Maximalgeschwindigkeit, die Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors nicht zu einer Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Der Schnittpunkt mit der x-Achse, der dem negativen reziproken Wert der Michaeliskonstanten entspricht, ist jedoch in *Anwesenheit* eines kompetitiven Inhibitors kleiner als in dessen *Abwesenheit*. Dies bedeutet, daß *kompetitive* Inhibitoren die Michaeliskonstante *erhöhen*: In *Anwesenheit* des Inhibitors wird eine *höhere Substratkonzentration* zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit des Enzyms gebraucht.

Eine Reihe von erfolgreichen Arzneimitteln gehören in die Gruppe der kompetitiven Enzyminhibitoren. Als Beispiel hierfür sei das Allopurinol genannt, das zur Therapie der Gicht eingesetzt wird. Wie aus Abb. 2.6 hervorgeht, ist das Allopurinol ein Strukturanaloges des Hypoxanthins. Als solches hemmt es kompetitiv die Xanthinoxidase (s.S. 261), welche die Umwandlung Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure katalysiert. Hierdurch werden Xanthin und Hypoxanthin zu Endprodukten des Purinabbaues. Beide Verbindungen sind wesentlich besser wasserlöslich als Harnsäure und können leichter durch die Nieren ausgeschieden werden.

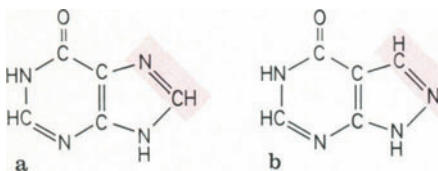


Bild 2.6. Strukturformel von Hypoxanthin (a) und Allopurinol (b)

Die nichtkompetitive Hemmung. Das Phänomen der nichtkompetitiven Hemmung von Enzymen ist von relativ geringer Bedeutung. Ein nichtkompetitiver Hemmstoff hat im allgemeinen wenig oder

gar keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat und wird häufig auch an einer anderen Bindungsstelle des Enzymproteins gebunden. Durch diese Bindung wird allerdings eine Hemmung der Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms bewirkt. Im Gegensatz zum *kompetitiven* Hemmstoff ändert sich in Anwesenheit eines *nichtkompetitiven* Hemmstoffes die **Michaeliskonstante** für das Substrat *nicht*, jedoch nimmt die Maximalgeschwindigkeit ab.

Die *reversible, nichtkompetitive Hemmung* ist ein außerordentlich seltenes Phänomen. Dagegen führen eine Vielzahl von Enzymgiften zur *irreversiblen nichtkompetitiven* Hemmung. Häufig sind derartige Gifte Schwermetallionen (z.B. Hg^{2+}) oder Oxidationsmittel, die für die katalytische Aktivität des Enzyms wichtige Gruppen verändern. *Irreversible, nichtkompetitive* Hemmstoffe haben jedoch auch eine *physiologische* Bedeutung. So finden sich im Blut eine Reihe von Proteinaseinhibitoren (z.B. α_2 -Makroglobulin), deren Fehlen zu typischen Krankheitserscheinungen führt. Auch im Pankreas finden sich derartige Proteinaseinhibitoren.

Für die Wechselwirkungen mit dem Substrat ist das aktive Zentrum von Enzymen verantwortlich

Die Tatsache, daß Enzyme zu den effektivsten bekannten Katalysatoren gehören (Beschleunigung im Vergleich zur nichtkatalysierten Reaktion um den Faktor $10^8 - 10^{20}$), wirft natürlich die Frage auf, welche molekularen Mechanismen ihnen diese Effektivität verleihen. Die dabei beteiligten Vorgänge müssen sich im *aktiven Zentrum*, also einem relativ kleinen Areal des Enzyms, in Form einer entsprechenden Wechselwirkung zwischen Substratmolekülen und Enzym abspielen. Wie aufgrund der Verschiedenheit der katalysierten enzymatischen Reaktion nicht anders zu erwarten ist, läßt sich auch die Enzymkatalyse nicht nur auf einen Mechanismus zurückführen. Man kennt heute im wesentlichen vier Mechanismen, über die Enzyme ihre katalytische Effektivität erhalten:

Stereospezifische Bindung und Fixierung des Substrates. Sie erfolgt am aktiven Zentrum in der Weise, daß die anzugreifende Gruppe in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer katalytischen Gruppierung des aktiven Zentrums gelangt.

Säure-Basen-Katalyse. Säuren bzw. Basen dienen als Katalysatoren bei einer Vielzahl organischer Reaktionen. Da auch Enzyme in Form ihrer Aminosäureseitenketten über *protonierbare* bzw. *deprotonierbare* Gruppierungen verfügen, können sie für viele Reaktionen als Protonendonatoren bzw. Protonenakzeptoren dienen. Derartige Gruppierungen sind Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl-, phenolische Hydroxyl- und Imidazol-Gruppen. Ein Beispiel für die **Säure-Basen-Katalyse** durch Enzyme sind die meisten Proteasen des Gastrointestinaltraktes. Während unkatalysiert für die Hydrolyse von Peptidbindungen sehr hohe Protonenkonzentrationen neben hohen Temperaturen benötigt würden, können Peptidbindungen aufgrund der enzymatischen Säure-Basen-Katalyse bei neutralem pH-Wert in kurzer Zeit gespalten werden.

Bildung von kovalenten Bindungen zwischen Enzym und Substrat. Im Verlauf des Katalysezyklus einer ganzen Reihe von Enzymen entsteht ein *kovalent* verbundener Enzymsubstratkomplex. Abbildung 6.9 stellt als Beispiel hierfür den Mechanismus des Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase dar. Hier entsteht der kovalente Enzymsubstratkomplex durch Ausbildung eines Thiohalbacetals zwischen der SH-Gruppe eines Cysteinrestes und der Carbonylgruppe des Glycerinaldehyd-3-Phosphates. Andere Aminosäuren, die zur Bildung von kovalenten Enzymsubstratkomplexen beitragen können, sind Serin (Proteasen des Gastrointestinaltraktes, Gerinnungsenzyme), Lysin (Fructose-1,6-Bisphosphataldolase) und Histidin (z.B. Glucose-6-Phosphatase). Der biologische Vorteil der kovalenten Katalyse besteht darin, daß das Substrat am aktiven Zentrum durch die kovalente Bindung besonders genau positioniert wird, um z.B. von entsprechenden Aminosäureseitenketten des Enzyms nucleophil angegriffen werden zu können.

Die induzierte Paßform (induced fit). Mit dieser Bezeichnung wird die durch experimentelle Daten wahrscheinlich gemachte Annahme beschrieben, daß bei einigen Enzymen durch die Bindung des Substrates eine **Konformationsänderung** ausgelöst wird, die dazu dient, die anzugreifende Bindung des Substrates bloßzulegen und damit dem Angriff reaktiver Gruppen des Enzyms auszusetzen.