

ENZYME I

Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles: analytische und präparative Trennverfahren, chemische Bindung, Koordinationsbindungen, Begriff der Katalyse, Massenwirkungsgesetz und Gleichgewichtsverteilung, Redoxreaktionen, funktionelle Gruppen und deren Reaktivität (z. B. hydrolytische Spaltungen)

Schlüsselwörter:

Struktur von Proteinen: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur (Definitionen, Meßmethoden zur Bestimmung von Strukturelementen, Bedeutung der Quartärstruktur für Kooperativität); Bedeutung von Disulfidbrücken und hydrophober Wechselwirkung (z. B. Leucin-Reißverschluß) für Stabilität/Strukturbildung von Proteinen; Bedeutung von Koordinationsbindungen für Strukturwirkung (z. B. Zinkfinger).

Proteinanalytik: Ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese („proteomics“); isoelektrische Fokussierung; SDS-PAGE und Massenspektrometrie („fingerprinting“ nach Proteasebehandlung; hier Mechanismus und Spaltungsspezifität der Proteasen und Analogieschluß zu Restriktionsendonucleasen); Chromatographiemethoden (Affinitäts-, Gelfiltrations- und Ionenaustauschchromatographie sowie HPLC); Sequenzaufklärung von Proteinen (Edman-Abbau an Spaltpeptiden, Sequenzierung von Genen und cDNA, hier Prinzipien der Maxam-Gilbert Methode aus der Vorlesung); Nachweismethoden mit Antikörpern (Definition der Immunglobuline, ELISA, Western Blotting).

Wirkungsweise von Enzymen: Enzyme als Biokatalysatoren; freie Enthalpie (Gibbs' freie Energie) und Standardenthalpie sowie Gleichgewichtskonstante; Gibbs-Helmholtz-Gleichung; Reaktionsgeschwindigkeit und -gleichgewicht; freie Aktivierungsenthalpie; Bildung von Übergangszuständen; Enzym-Substrat-Komplex; aktives Zentrum; Prinzipien der Bildung von Enzym-Substrat-Komplexen (ionische Interaktion, H-Brücken, CH/ π -Interaktion, *van-der-Waals* Kräfte, hydrophobe Wechselwirkung); Schlüssel-Schloß Modell; „induced fit“; Enzymspezifität (Substrat-, Gruppen- und Wirkungsspezifitäten, optische Spezifität); Temperaturabhängigkeit (RGT-Regel) und pH-Abhängigkeit enzymatischer Reaktionen; Klassifizierung von Enzymen in sechs Hauptgruppen und Beispiele für jede Gruppe; Strategieführung von gekoppelten Enzymreaktionen in Stoffwechselwegen am Beispiel der beiden

Substratkettenphosphorylierungen im zweiten Teil der Glykolyse; Kopplung auf der Ebene des Organismus (Cori-Zyklus).

Struktur und Funktion von Coenzymen: Biotin; Coenzym A; Cytochrome; Desoxyadenosyl- und Methylcobalamin; FMN/FAD; Liponsäure; NAD(P)⁺/NAD(P)H als enzymatisch-optisches Nachweisreagenz bei Oxidoreduktasen (auch Betrachtung der Funktion bei Synthesen wie Cholesterolsynthese und Zusammenspiel mit Ribonukleotid-Reduktase); Tetrahydrobiopterin (Beteiligung an Monoxygenase-Reaktionen); Pyridoxalphosphat; Tetrahydrofolat (C₁-Übertragung in unterschiedlichen Oxidationsstufen); Thiaminpyrophosphat (hier insbesondere im Pyruvatdehydrogenasekomplex und Transketolase im Pentosephosphatweg).

Enzymdiagnostik: Isoenzyme (z. B. L-Lactatdehydrogenase); Enzymlokalisierung (intrazelluläre Kompartimentierung, z. B. für die beiden Carbamoylphosphat-synthetasen sowie für die Trennung von Synthese/Abbau von Fetten in Zytoplasma/Mitochondrien, Organspezifität); Leitenzyme in der Labordiagnostik (z. B. alkalische Phosphatase, Transaminasen, γ -Glutamyltransferase, Kreatinkinase*).

*in Lehrbüchern auch als Creatinkinase aufgeführt.

Literatur:

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“.

Für die Auswertung des Versuchs wird Millimeterpapier benötigt. Bitte bringen Sie dieses am Kurstag mit!

Ein Enzym stellt sich vor

von J. G. Meyer-Bertenrath

Enzym zu sein ist heut' modern,
so daß ich selbstverständlich gern
erlaube Ihnen hier zu lesen,
was wichtig scheint an meinem Wesen.
Um die Strukturen darzulegen,
bin ich am Anfang so verwegen
das Rad der Zeit zurückzudrehen
und mich als Urahn zu verstehen.

Als einst zu Lande und im Meer
die Welt war noch von Leben leer,
entstand in Wolken voller Blitze
- also aus feuchter Luft und Hitze –
die erste Säurekolkktion
mit einer NH₂-Funktion:
Es hatte jedes Molekül
Aminorest und Carboxyl.

Dies traf sich deshalb so vorzüglich,
weil beide Gruppen höchstvergnülich
begannen bald das Reagieren
um zum Peptid zu kondensieren.
Die Kette wuchs zum Protein
mit einer Alpha-Helix hin,
die sich im Raum noch mehrmals knickte,
bis ich das Licht der Welt erblickte.

Hier muß ich nun zur Klärung sagen,
daß es kein Protein kann wagen,
sich arrogant Enzym zu nennen
wenn nicht Substrate landen können.
Als Teil der Tertiärstruktur
wird zum aktiven Zentrum nur
die schmale, eingebrenzte Bucht,
die das Spezialsubstrat sich sucht.

Dadurch vermag ich ohne Müh'
die Aktivierungsenergie
vom hohen Roß herabzuheben –
den Reaktionsstart freizugeben:
Nur im Enzym-Substrat-Komplex
die Reaktion läuft wie verhext!
Was sonst in Wochen nicht will gehen
ist jetzt sekundenschnell geschehen.

Hierüber sagt die Wechselzahl,
wieviel Substrat von Fall zu Fall
pro Molekül, Enzym und Zeit
vom Umsatzschicksal wird ereilt.
Danach wird das Produkt sofort
entfernt von seinem Bildungsort.
Es tritt mit allergrößter Schnelle
ein frisches Teil an seine Stelle.

So wird in jeweils zarter Bindung
- dies ist ein Kernpunkt der Erfindung –
sehr viel Substrat rasch umgesetzt
und keinesfalls Enzym verletzt,
von dem deshalb schon Mini-Mengen
die Reaktion zum Ablauf drängen.
Die Wirkung also, das ist typisch,
vollzieht sich einfach katalytisch!

In diesem Umstand liegt begründet,
weshalb man mich so einfach findet.
Hat man erst einmal herausgestellt,
was mir besonders gut gefällt
- zum Beispiel Wärme und pH –
und ist Substrat genügend da,
entfalte ich Aktivität,
die man zu messen gut versteht.

Ein sehr präzises Meßverfahren
entdeckte Warburg schon vor Jahren:
Die Extinktionen im UV
entsprachen immer ganz genau
den Mengen an NADH,
durch die das Licht gekommen war,
so daß man Extinktion verliert,
wenn ein Enzym Substrat hydriert.

Natürlich war es nicht ganz leicht
(und manchem Forscher hat's gereicht
zu Doktorgrad und andren Ehren)
das Wissen ständig zu vermehren.
Heut' ist die Enzymologie
heraus aus grauer Theorie,
verehrt doch jede Diagnose
der Forschung eine rote Rose!

Bestimmung der Enzymaktivität

Vorbemerkung:

Ein Enzym ist an seiner katalytischen Wirkung zu erkennen. Die katalytische Aktivität eines Enzyms wird ermittelt, indem man den von einer bestimmten Enzymmenge katalysierten Substratumsatz pro Zeiteinheit bestimmt. Als Enzymeinheit wird die Menge Enzym definiert, die pro Minute ein Mikromol (μmol) Substrat unter Standardbedingungen umsetzt. Man bezeichnet sie als Internationale Einheit (International Unit, U). Im SI-System, das als Basiseinheit der Stoffmenge das Mol und als Basiseinheit der Zeit die Sekunde hat, wurde 1972 als neue Basiseinheit das Katal (kat) eingeführt. Die Aktivität 1 Katal entspricht der Enzymmenge, die ein Mol Substrat pro Sekunde in einem Standardtestsystem umsetzt ($1\text{U} = 16,67 \times 10^{-9} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}$).

Wenn man die gemessene katalytische Aktivität eines Enzyms durch das Volumen des Messsystems dividiert, so erhält man die katalytische Aktivitätskonzentration (b) (Einheiten: kat/l; U/ml). Wenn die gemessene katalytische Aktivität eines Enzyms durch das Gewicht dividiert wird, so erhält man die spezifische katalytische Aktivität (Einheiten: kat/kg; U/mg). Eine in der Enzymologie wichtige abgeleitete Größe ist die molare katalytische Aktivität, bei der die gemessene katalytische Aktivität durch die in den Messansatz eingebrachte Enzymmenge dividiert wird (Einheiten: kat/mol; U/mol).

Alkalische Phosphatasen treten bei Störungen des Knochen- oder des Leberstoffwechsels vermehrt in das Blutserum über. Für ihre Aktivitätsbestimmung wird 4-Nitrophenylphosphat als Substrat verwendet. Durch enzymatische Hydrolyse der Phosphatgruppe entsteht 4-Nitrophenol, das bei alkalischem pH (pH 10,5) gelb gefärbt ist und bei 400 - 420 nm photometrisch gemessen werden kann. Die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge 4-Nitrophenol ist ein Maß für die Phosphatase-Aktivität.

Aufgabe:

Es soll die katalytische Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Blutserum bestimmt werden.

Prinzip:

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität eines Enzyms im Serum wird in der Regel zur Ermittlung der vorhandenen Enzymkonzentration verwendet. Die Aktivitätsmessung setzt optimierte Reaktionsbedingungen, insbesondere die Sättigung des Enzyms mit seinem Substrat, voraus. Außerdem muss die Inkubationszeit des Enzyms mit seinem Substrat so kurz wie möglich gehalten werden, um eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit infolge sinkender Substratkonzentration während der Messzeit zu verhindern.

Reagenzien:

1. Substrat-Pufferlösung: 1,25 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat in Diethanolamin (0,1 mol/l), pH 9,8
2. Natronlauge: 0,05 mol/l

Reaktionsansätze:

In Reagenzgläser werden pipettiert (ml):

	Leerwert	Probe A	Probe B
Substrat-Pufferlösung	2,0	2,0	2,0
Serum	-	0,05	0,05
nach Mischung und genau 30 min Inkubation bei 25 °C (Wasserbad) setzt man zu			
Natronlauge	10,0	10,0	10,0
Serum	0,05	-	-
mit Stopfen verschließen und gut durchmischen			

Messung:

2 ml der obigen Ansätze werden in Küvetten (d = 1 cm) überführt und die Extinktion der Proben wird gegen den Leerwert im Photometer gemessen (Wellenlänge 405 nm). Die gemessenen Extinktionen werden zur Berechnung der Enzymaktivität verwendet.

Auswertung: Bestimmung der katalytischen Aktivitätskonzentration (b):

1) Berechnung der Substratkonzentration c von 4-Nitrophenol nach dem LAMBERT - BEER'schen Gesetz: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$

bzw.

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{cm}^2 \cdot \text{cm}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{cm}^3} \right]$$

c = Konzentration [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3$]

E = Extinktion [dimensionslos]

d = Schichtdicke Küvette [cm]

ε = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2/\mu\text{mol}$]

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d} \left[\frac{\text{cm}^3}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} = \frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}} \right]$$

$$\varepsilon_{4\text{-Nitrophenol}} \text{ bei } 405 \text{ nm} = 18,5 \text{ [cm}^2/\mu\text{mol]}$$

2) Die katalytische Aktivitätskonzentration b $\left[\text{Einheit} : \frac{\text{kat}}{\text{l}} \right]$ ergibt sich aus der Änderung der Substratkonzentration pro Zeit:

$$b = \frac{c}{t} \cdot F \left[\frac{\text{kat}}{\text{l}} \right] ; F = \frac{\text{Volumen gesamt}}{\text{Volumen Probe}} \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3} \right]$$

Zu beachten ist, dass bei spektrophotometrischen Messungen meist eine Verdünnung der Probe vorgenommen wird. Diese geht als Verdünnungsfaktor F in die Berechnung ein.

Enzymatische Bestimmung von Metaboliten

Vorbemerkung:

Aufgrund ihrer Spezifität gestatten Enzyme in einem eine Vielzahl chemisch ähnlicher Komponenten enthaltenden Stoffgemisch (Serum, Gewebeextrakt u. a.), Substanzen spezifisch und quantitativ zu bestimmen. Im Unterschied zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen ist es dabei notwendig, dass die Reaktion in einer relativ kurzen Zeit vollständig abläuft. Dazu müssen hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt und gebildete Produkte zur Unterbindung von Rückreaktionen oder Produkthemmungen unter Umständen abgefangen werden.

Aufgabe:

Es soll die von dem Enzym L-Lactatdehydrogenase (LDH) in einer bestimmten Zeit umgesetzte Menge des Substrates Pyruvat bestimmt werden.

Prinzip:

Pyruvat wird durch die L-Lactatdehydrogenase mit NADH als Wasserstoffdonator zu Lactat reduziert. Das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite von Lactat, sodass bei Überschuss von NADH die Umsetzung vollständig ist. Die dem umgesetzten Pyruvat äquivalente Menge NADH wird dabei oxidiert und die resultierende Extinktionsabnahme (ΔE) bei 366 nm photometrisch bestimmt. Nach dem gleichen Prinzip (optischer Test nach WARBURG) können auch andere Reaktionen gemessen werden, bei denen NADH verbraucht oder gebildet wird.

Reagenzien:

1. Pufferlösung: 300 mM Triethanolamin pH 7,6 + 3 mM Ethylendiamintetraacetat (TRA-EDTA)
2. NADH-Lösung: 12 mM β -NADH in Aqua dest.
3. LDH-Suspension: 0,5 mg Protein/ml

Reaktionsansätze:

In Küvette (d = 1 cm) pipettieren (ml):

Pufferlösung	2,0
Probe	0,10
NADH-Lösung	0,05
mit Plastikspatel mischen, Extinktionen nach 5, 10 und 15 min ablesen und die Reaktion mit Enzym starten	
LDH-Suspension	0,05
mischen, Extinktionen nach weiteren 5, 10 und 15 min ablesen	

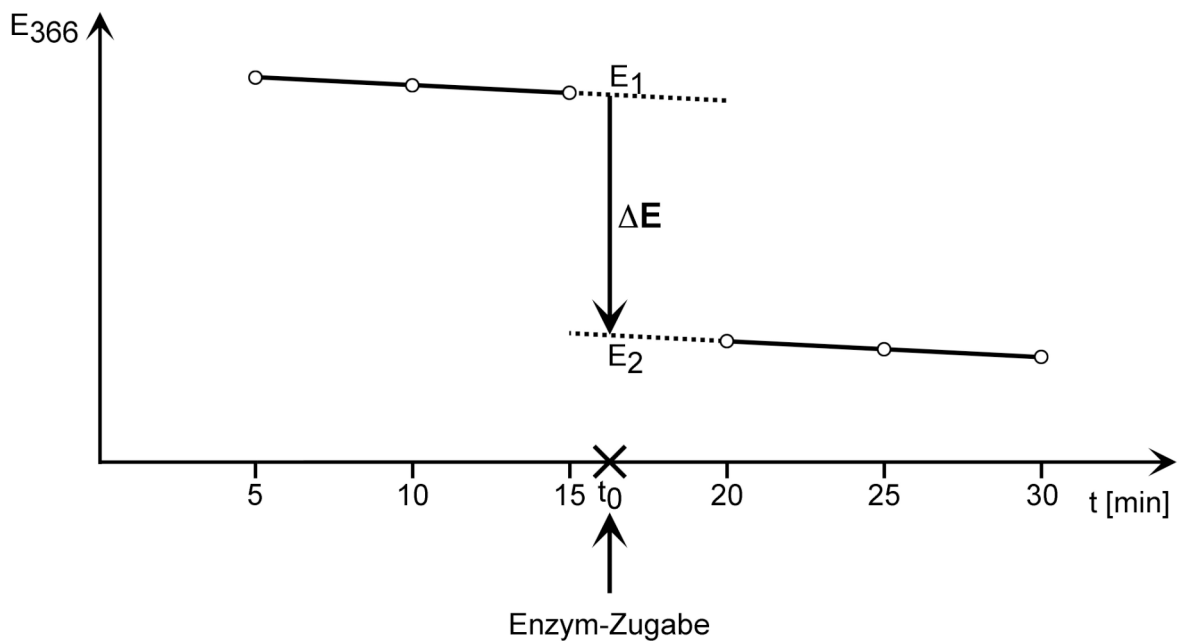
Messung:

Die Messung erfolgt bei Raumtemperatur spektrophotometrisch ($\lambda=366$ nm).

Auswertung:

Die Messwerte werden gegen die Zeit (Abszisse) auf Millimeterpapier aufgetragen und die vor (E_1) und nach (E_2) LDH-Zugabe gemessenen Extinktionen auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe (t_0) extrapoliert.

Die dabei erhaltenen Extinktionen ergeben $E_1 - E_2 = \Delta E$



Die Veränderung der Konzentration an Pyruvat ($\mu\text{mol/ml}$) ergibt sich aus dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (s. o.) bzw. aus dem Quotienten $\Delta E/\epsilon \cdot d$ unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors F .

Der Extinktionskoeffizient für NADH beträgt bei 366 nm

$$\epsilon = 3,30 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$$

Wie hoch ist die Pyruvat-Konzentration (mol/l) in der Lösung?