Kofaktoren Teil I

Die blau gefärbten Text- und Abb-Bereiche wurden in der Vorlesung nicht behandelt und sind nicht Gegenstand der Prüfung

1 Redoxpotentiale und Redoxreaktionen

In der Natur müssen eine Vielzahl von Redoxreaktionen katalysiert werden. Hierzu gehören alle Reaktionen die der Energiegewinnung dienen. Die Seitenketten der Aminosäuren sind nicht geeignet Elektronenaustauschreaktionen zu katalysieren. Proteine, die an diesen Reaktionen beteiligt sind, benötigen daher „Faktoren“ sogenannte Koenzyme, die diese Aufgabe übernehmen.

Die verschiedenen Kofaktoren lassen sich bezüglich des Redoxpotentials auflisten. Ein stark oxidierend wirkender Kofaktor wird selber sehr leicht reduziert. Er besitzt ein positives Redoxpotential. Substanzen, die sehr wenig oxidierend wirken, d. h. weniger gern Elektronen aufnehmen, haben weniger positive oder sogar negative Redoxpotentiale.

Abb. 1 zeigt eine Skalierung

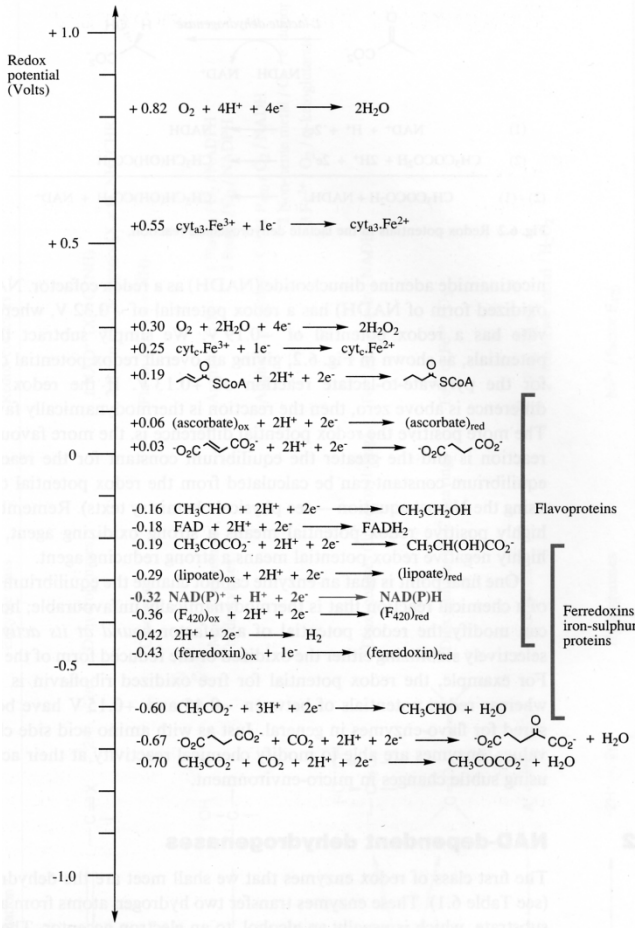
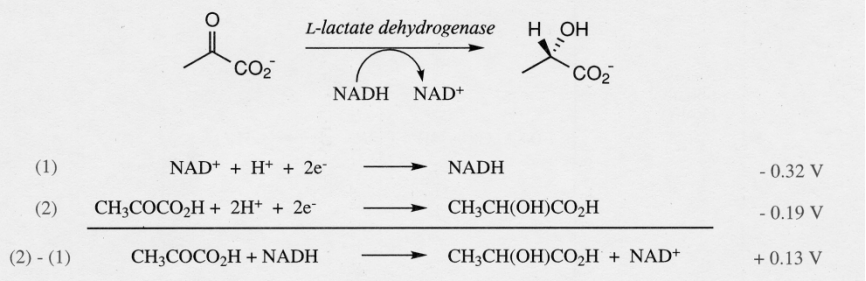


Abb1. Skala der Redoxpotentiale verschiedener Kofaktoren.

Die Skala wird an der Normal-Wasserstoffelektrode normiert, die ein Potential von –0,42 V bei pH 7 aufweist. Anhand der Tabelle lässt sich ermitteln, ob eine Enzymreaktion thermodynamisch möglich ist oder nicht. Bsp. L-Laktat Dehydrogenase

Ist die Differenz der Potentiale positiv, so ist die Reaktion thermodynamisch günstig $\Delta G = - nF\Delta E$.



Schema 1. Redoxpotentiale der Laktat Dehydrogenase katalysierten Reaktion (6.2).

Bei den Gruppentransferreaktionen haben wir gelernt, dass Enzyme Übergangszustände stabilisieren, aber nicht die Thermodynamik von chemischen Prozessen modifizieren können. Das ist im Fall der Redoxenzyme anders. Enzyme können die Kofaktoren stabilisieren oder destabilisieren und in den jeweiligen Redoxzuständen das Redoxpotential modulieren. Bsp. Flavin. Dieser Kofaktor hat in Lösung ein Potential von -0,20 V. An Enzyme gebunden kann dieses Potential zwischen -0,45 V und + 0,15 liegen.

2) NAD-abhängige Dehydrogenasen

Diese Enzyme entfernen zwei H-Atome aus dem Substrat und transferieren die H-Atome auf NAD^+ welches zum NADH reduziert wird.

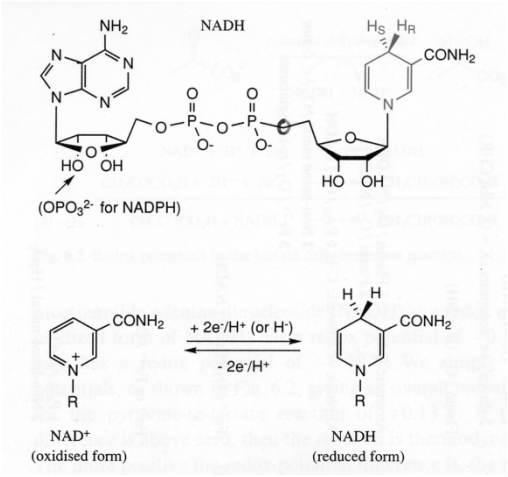


Abb. 2. Darstellung der Kofaktoren NAD^+ und $NADP^+$

Einige Enzyme verwenden NAD^+ andere $NADP^+$. Der Unterschied ist nur eine Phosphatgruppe am C2' der Adenosin-Einheit. NAD^+ wird oft für katabolische Abbauprozesse verwendet, $NADP^+$ wird in der Biosynthese eingesetzt.

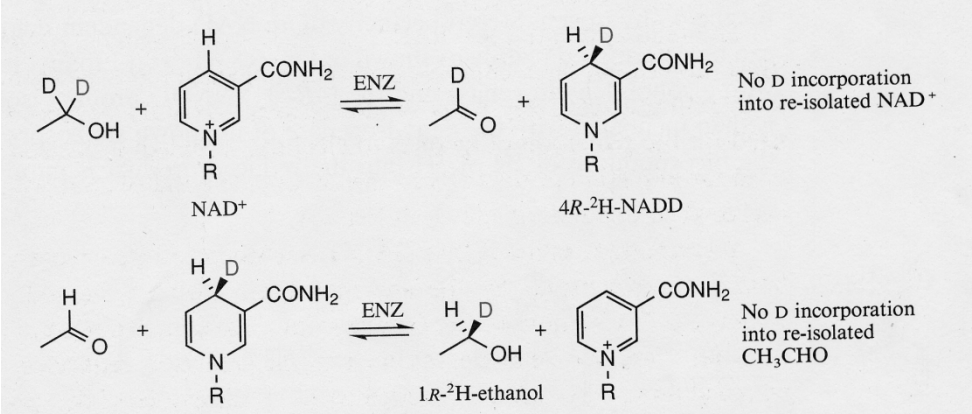


Abb. 3. Stereospezifität bei NAD^+ abhängigen Reaktionen.(6.5)

Die Enzyme sind stereospezifisch. D. h. sie entfernen spezifisch eines der prochiralen H-Atome des Alkohols (pro-*R*) und transferieren das (H^-) stereospezifisch auf den Pyridiniumring welcher zum 1,4-Dihydropyridin reagiert. Auch die „umgekehrte" Reaktion, also die Reduktion von Acetaldehyd läuft stereospezifisch ab. Diese Stereospezifität wird durch die chirale Enzymtasche ermöglicht, welche Substrat und Koenzym exakt anordnet.

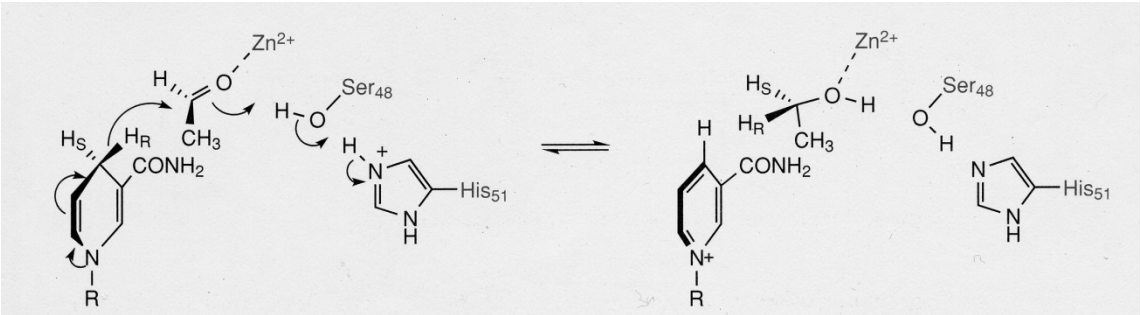


Abb. 4. Mechanismus der Alkohol Dehydrogenase. (6.6)

Die beiden H's (H_S und H_R) sind auch auf Grund der Nichtplanarität des Dihydropyridinringes stereo-elektronisch nicht gleich. Das σ*-Orbital eines der beiden H's ist besser konjugiert zum π-System, was dieses H als H^- aktiviert.

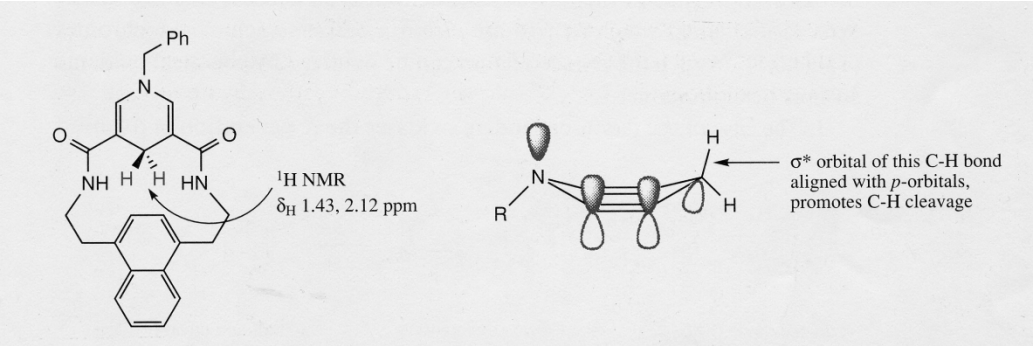


Abb. 5. Pucker des Dihydropyrimidin Rings und stereoelektronische Effekte

2) Flavinabhängige Dehydrogenasen und Oxidasen

Flavine sind sehr vielseitige Redox-Kofaktoren. Flavine bauen sich aus einem Isoalloxalinringsystem auf, welches an N(10) eine offenkettige Ribityleinheit trägt. An diese ist ein Adenosindiphosphat angeknüpft.

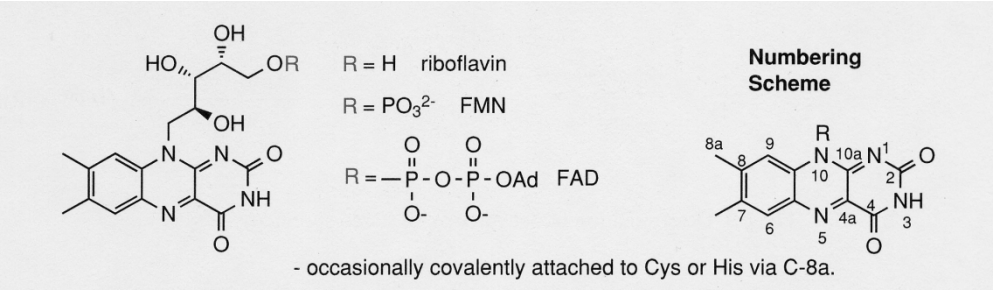


Abb. 6. Darstellung des Flavin Kofaktors.

Flavine können $2e^-$ und $1e^-$ Redoxreaktionen katalysieren. Im Gegensatz zu NAD^+ sind sie daher in der Lage mit O_2 zu reagieren. Während das NAD^+ nur lose gebunden ist und so nach der Abreaktion aus der Enzymtasche hinaus diffundieren kann, sind die Flavine fest nicht-kovalent oder sogar kovalent an das Protein gebunden. Die Kofaktorregenerierung muss daher in der aktiven Tasche, von außen, z. B. mit molekularem Sauerstoff, welcher zu H_2O_2 reagiert, durchgeführt werden. Hier liegt genau das Problem bei der technischen Anwendung dieser Enyzme: Die Kofaktorregenerierung ist ein teures Problem.

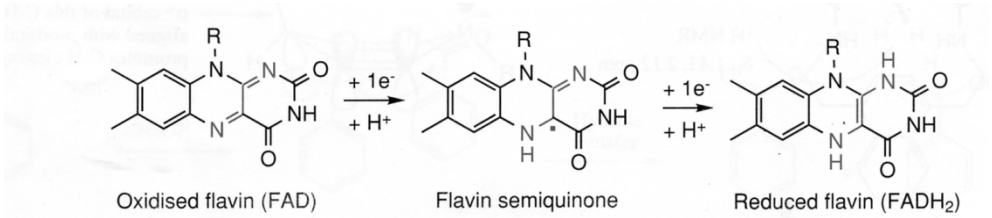


Abb. 7. Redoxzustände des Flavin Kofaktors (ohne Protonierungsgleichgewichte).

Das reduzierte Koenzym wird oft durch Sauerstoff regeneriert, d.h. aufoxidiert. Der Mechanismus der Reaktion von $FADH_2$ mit O_2 beinhaltet zunächst einen Elektronentransfer. Das ergibt Superoxid und ein Flavin-Semichinon. Diese reagieren miteinander.

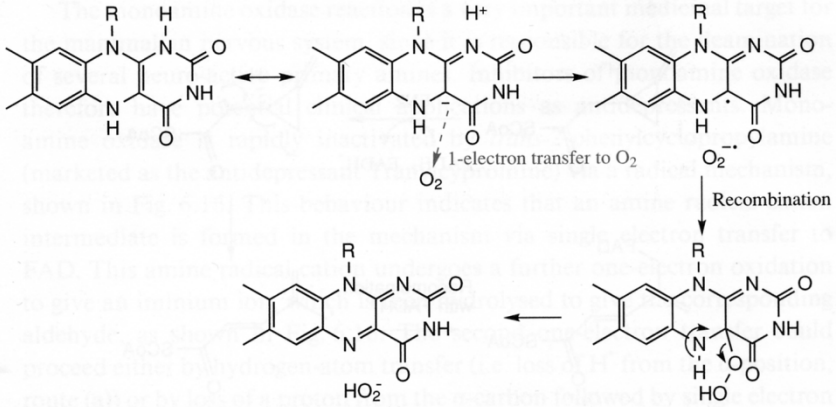


Abb. 8. Regenerierung des Flavin Koenzyms mit molekularem Sauerstoff.

Enzyme, die mit Flavinen als Koenzyme arbeiten, nutzen oft die Möglichkeit der Ein-Elektronenübertragung. Die Acyl-CoA-Dehydrogenase scheint zunächst ein „α-Carbonyl"-Radikal zu bilden, welches anschließend zur α,β-ungesättigten Verbindung abreagiert. Diese Mechanismen sind nicht gesichert, sondern geben nur Vorstellungen wieder. Alternativ können auch andere Mechanismen postuliert werden.

Besonders interessant ist derzeit die Monoamin Desoxygenase. Dieses Enzym desaminiert viele neuroaktive Amine. Inhibitoren des Enzyms wirken daher als Antidepressiva. Zurzeit wird angenommen, dass zunächst erneut ein Elektronentransfer erfolgt. Insgesamt erfolgen 2 aufeinanderfolgende Einelektronenoxidationen.

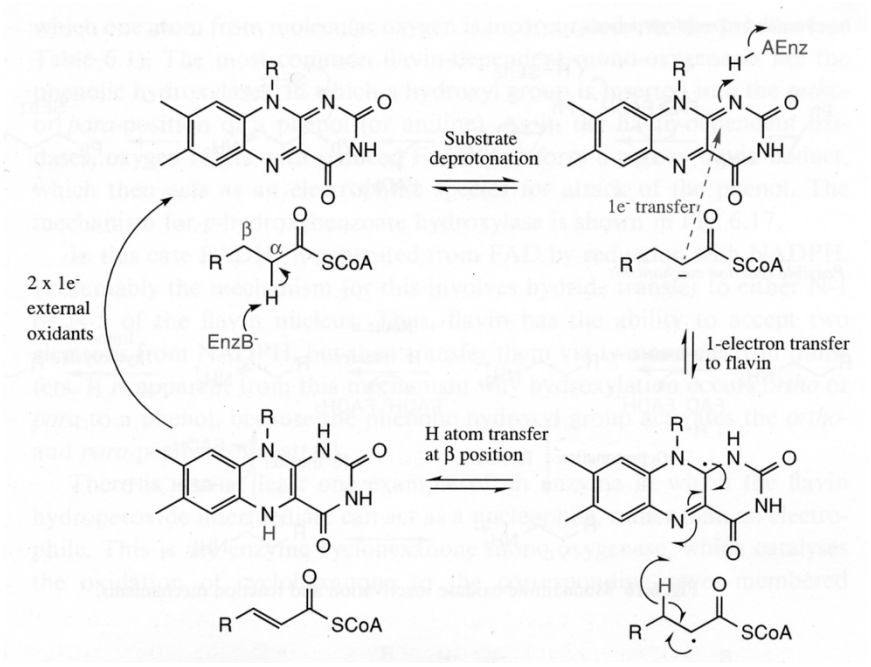


Abb. 9. Mechanismus der Acyl-CoA Dehydrogenase.

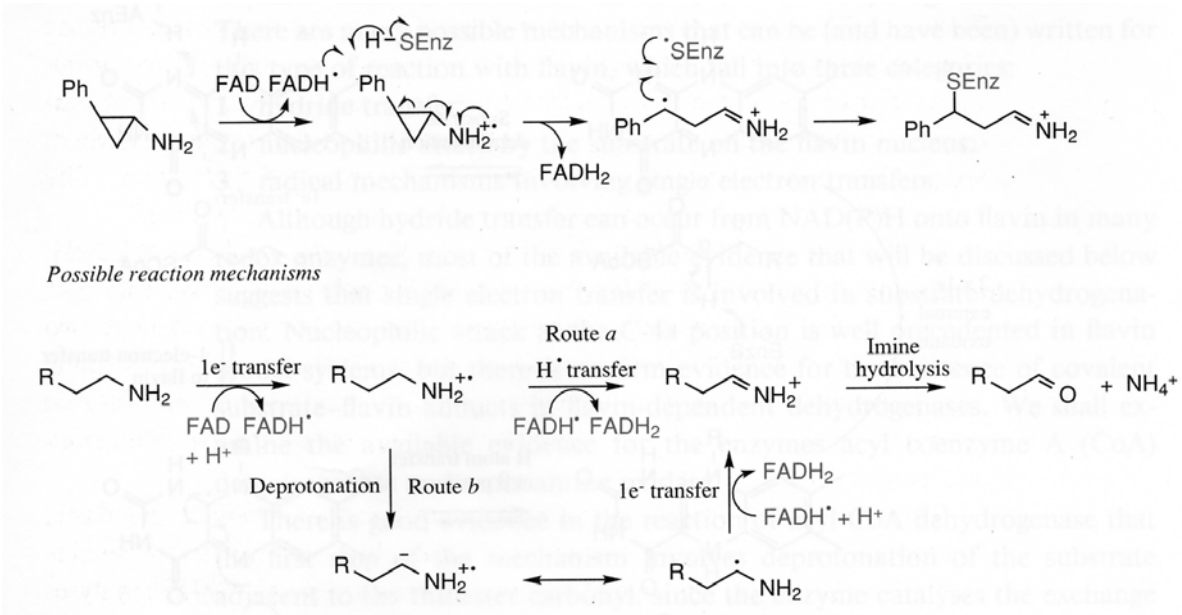


Abb. 10. Mechanismus der Monoamin Oxidase.

Enzyme, die in der Lage sind mit molekularem Sauerstoff selektiv zu oxidieren, sind prinzipiell von großem biotechnologischem Interesse. Hierzu gehören die flavinabhängigen Monooxygenasen. Die flavinabhängigen Enzyme oxidieren vor allem aromatische Substrate

wie z. B. Phenol (aktivierte Aromaten). Der Mechanismus beinhaltet die Regeneration des Flavins durch das lösliche $NADH_2$. Das Flavin ist erneut fest in der aktiven Tasche eingebunden. Übertragen wird ganz formal ein $[OH]^+$.

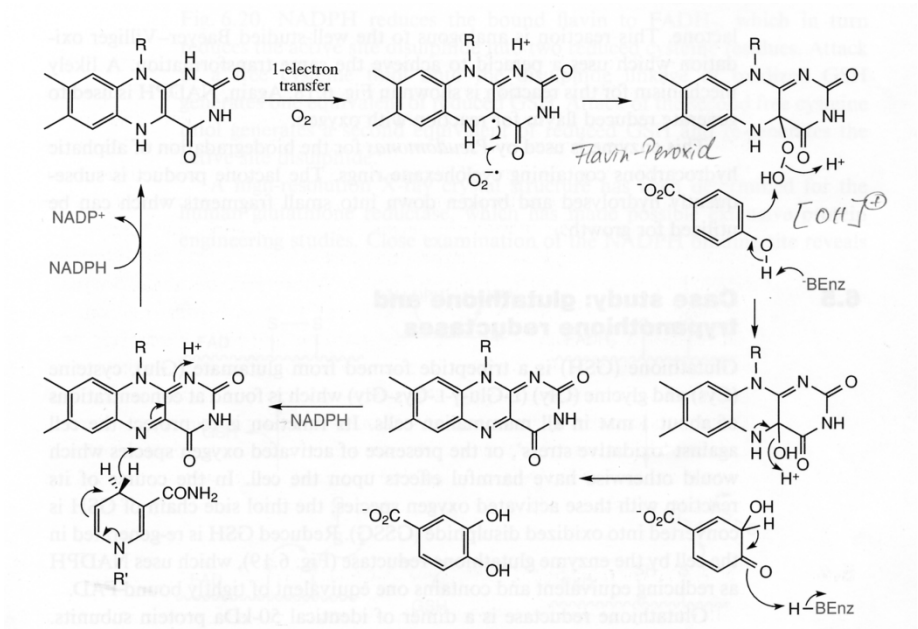


Abb. 11. Mechanismus der *p*-Hydroxybenzoat Hydroxylase.

Eine Oxidationsreaktion bei der formal ein $[O]^-$ übertragen wird, findet sich im sogenannten Bayer-Villiger-Enzym, der Cyclohexanon-Monooxygenase. Dieses Enzym dient zur Detoxifizierung von Cyclohexan enthaltenden Kohlenwasserstoffen in der Natur.

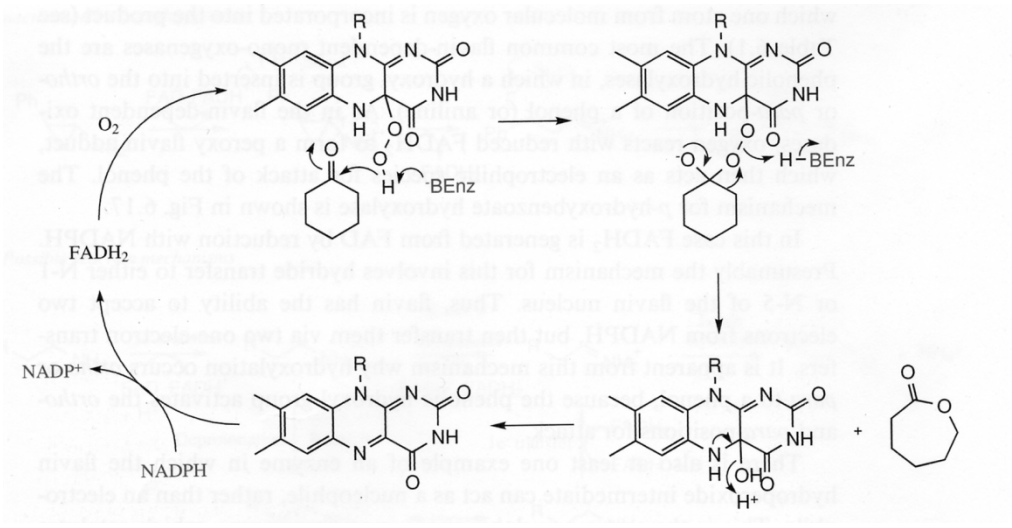


Abb. 12. Mechanismus des Bayer Villiger Enzyms.

Wir sehen, Flavine sind fest in die aktive Tasche integrierte Koenzyme, die ein und zwei Elektronenreduktionen und Oxidationen katalysieren. Entscheidend ist, dass Flavine eben auch Ein-Elektronentransferschritte durchführen und damit radikalische Intermediate bilden können.

2) Desazaflavine und Pterine

Desazaflavine sind Redoxkofaktoren, die man bei methanogenen Bakterien findet. Diese leben strikt unter Sauerstoffausschluß und fermentieren Acetat zu Methan und CO_2.

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

Es handelt sich um eine neue Substanz ähnlich dem Flavin, nur dass ein N im Ringsystem durch eine CH-Einheit ersetzt ist.

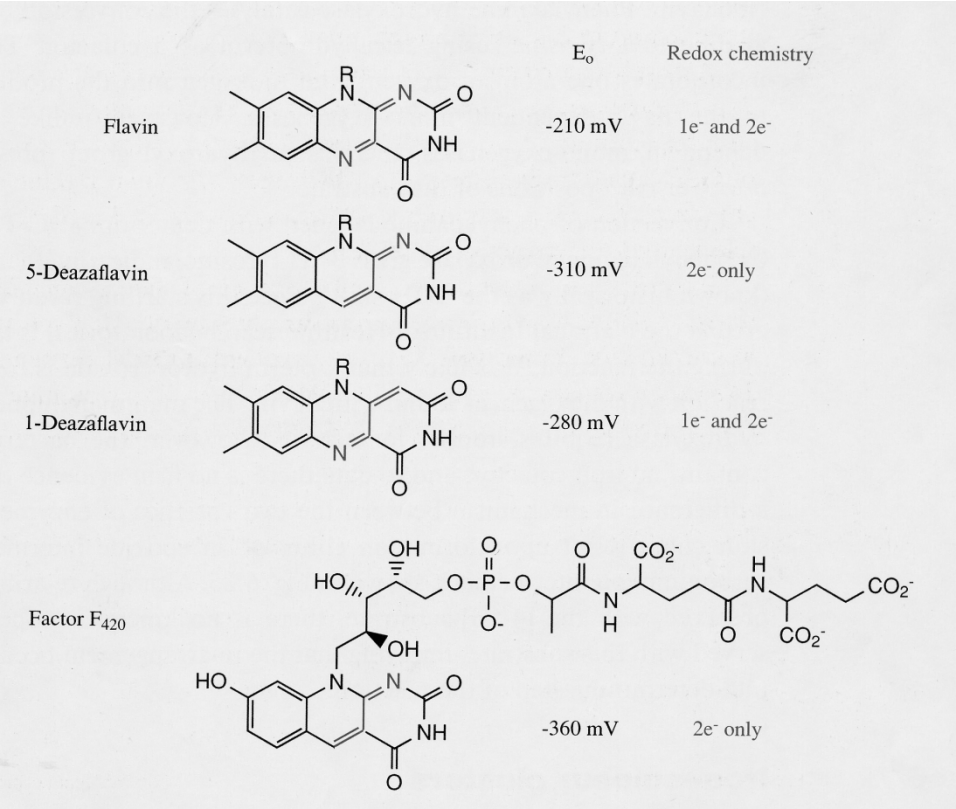


Abb. 13. Darstellung von Flavin und dem in der Natur gefundenen 5-Desazaflavin (F_0), welches in der Regel an Glutamat gebunden in Form des Koenzyms F_{420} vorkommt. Das 1. Desazaflavin ist ein synthetisches Derivat.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zum Flavin reagiert das Desazaflavin aber eher wie ein Nikotinamid. Es ist nicht zur Einelektronenübertragung befähigt, sondern übertragt immer zwei Elektronen und ein Proton, also ein Hydrid. Das Desazaflavin hat ein sehr niedriges Redoxpotential.

Das Desazaflavin fungiert aber nicht nur als H^--Donor, sondern kann auch als Lichtsammelchromophor fungieren. Flavine sind gelb und fluoreszieren gelb-rot. Desazaflavine sind zitronengelb und fluoreszieren blau. Deprotoniert man die 8-OH Gruppe ($pK_a \sim 5{,}3$) so entsteht ein ausgedehnteres π-System. Jetzt fluoresziert der Kofaktor intensiv grün mit einer Quantenausbeute von ca. 80%.

Dieser grün fluoreszierende Kofaktor kann Lichtenergie absorbieren und an einen Akzeptorchromophor weitergeben. Man nennt diesen Prozess Förster Dipol-Dipol Energietransfer. Einen solchen Energietransfer findet man in dem Enzym DNA Photolyase.

Pterine sind ebenfalls essentielle Kofaktoren, die in einer sehr kleinen Familie von Monooxygenasen essentiell sind. Auch diese hydroxylieren Aromaten, z. B. Phenylalanin-Hydroxylase. Diese Enzyme synthetisieren z. B. Tyrosin aus Phenylalanin.

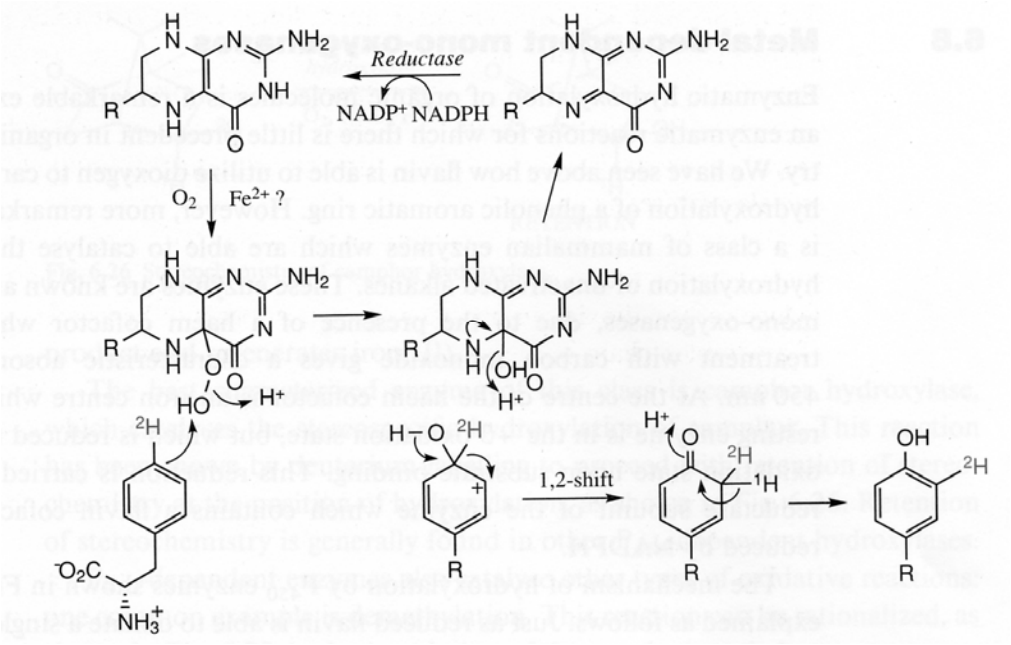


Abb. 14. Mechanismus der Pterin-abhängigen Phenylalanin Hydroxylase.

Dieses Enzym hydroxyliert demnach einen nicht oder nur sehr schwach aktivierten Aromaten. Der Mechanismus ist hochinteressant und er beinhaltet einen NIH-(1,2)-Shift.

Auf Pterin-Kofaktoren kommen wir bei der Diskussion von Radikalenzymen noch einmal zurück.

3) Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster sind Kofaktoren die ausschließlich an 1-Elektronenprozessen beteiligt sind. Die Cluster haben eine unterschiedliche Gestalt. Die Redoxpotentiale der Cluster liegen zwischen -0,2 bis -0,6V.

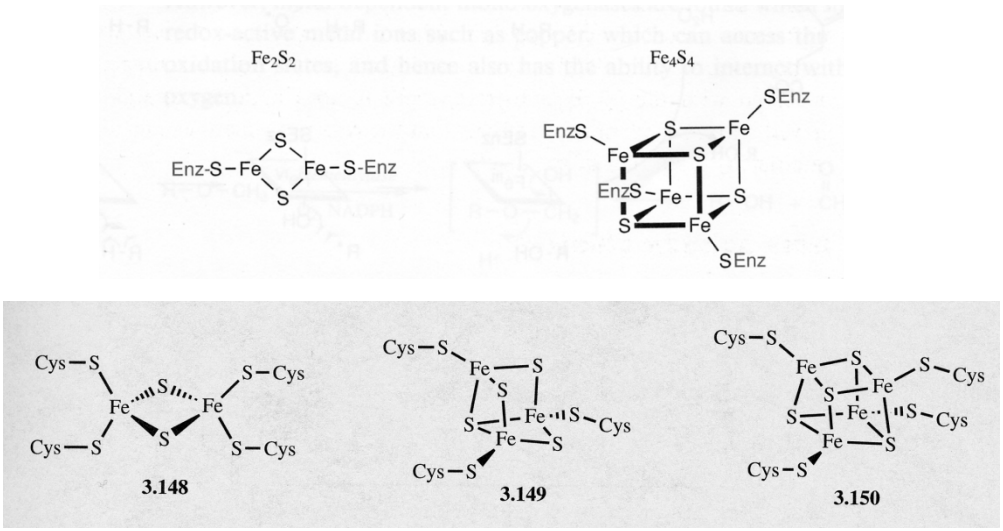


Abb. 15. Darstellung verschiedener Fe/S Cluster.

Diese Cluster sind stark reduzierend. Ihre Chemie ist sehr komplex.
Man unterscheidet heute drei Typen von Clustern: [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S]. Viele dieser Cluster erhalten die Elektronen von FAD, welches wiederum durch $NADH_2$ reduziert wird. Neben dem Elektronenaustausch kann der Cluster auch Reaktionsintermediate koordinieren. Trotzdem, Fe/S Cluster sind häufig wichtige Relaisstationen, über die Elektronen innerhalb von Proteinen laufen. Fe/S Cluster werden uns bei den Radikalenzymen noch einmal begegnen.

Während Flavine und Pterine O_2 zur Hydroxylierung verwenden, schafft es eine Familie von Molybdän und Wolfram Enzymen die Hydroxylieung von Substraten mit „OH“ aus dem Wasser durchzuführen. Die Enzyme besitzen einen Pterin-Kofaktor welcher zusätzlich ein Mo oder W bindet.

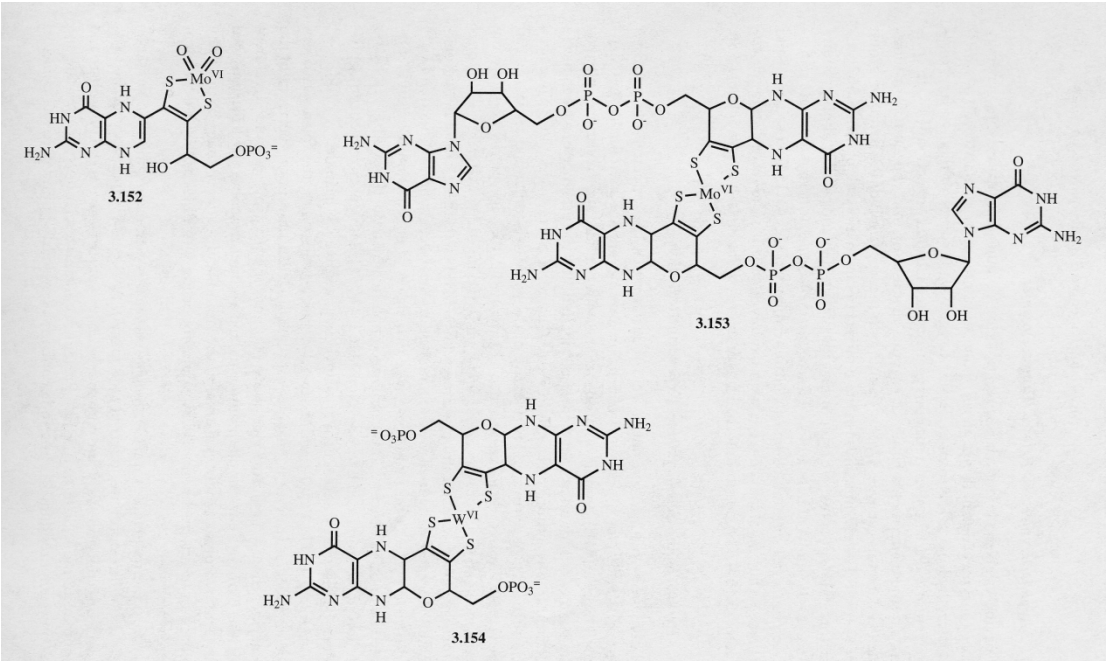


Abb. 16. Mo und W enthaltende Koenzyme.

Der Mechanismus der Sulfit zu Sulfat Oxidation zeigt wie das Wasser als Reagenz von diesen Enzymen aktiviert wird.

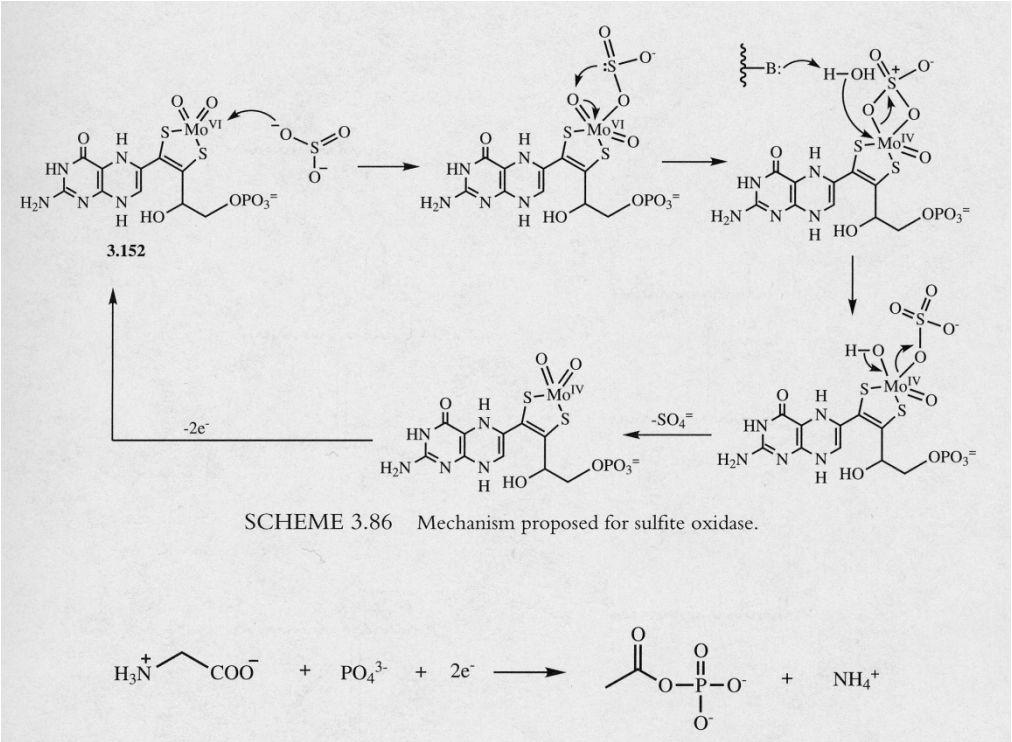


Abb. 17. Mechanismus der Wasseraktivierung durch Molybdopterin

4) Metallabhängige Monooxygenasen

Die bekanntesten Monooxygenasen sind die in der Leber vorkommenden Cytochrom P_{450}-Enzyme. Sie enthalten einen Häm Kofaktor. Dieser reagiert mit CO zu einem Komplex mit einer charakteristischen Absorption bei 450 nm, daher der Name P450. Häm Enzyme werden seit vielen Jahren intensiv untersucht. Sie gehören zu den wenigen Enzymen, die CH Bindungen aktivieren können.

Zentrum des Enzyms ist ein Fe, welches in der Oxidationsstufe +3 vorliegt. Nach der Substratbindung erfolgt die Reduktion des Fe auf +2. Das e^- wird von einem Flavin geliefert. Der Mechanismus sieht dann die Reaktion mit O_2 vor, gefolgt von einer weiteren Reduktion. Postuliert wird die Bildung einer hoch reaktiven Fe(V)=O Spezies, welche die H-Atome aus dem Substrat abstrahiert. Das C-Radikal wird dann hydroxyliert. Man beobachtet Retention der Konfiguration. Heute geht man davon aus, dass das Fe nicht in der Oxidationsstufe +5 vorliegt, sondern +4. Dafür scheint aber der Porphyrin Ring ein Elektron abzugeben und als $Porph^+$ vorzuliegen. Also ein Fe(IV) mit einem kationischen Liganden.

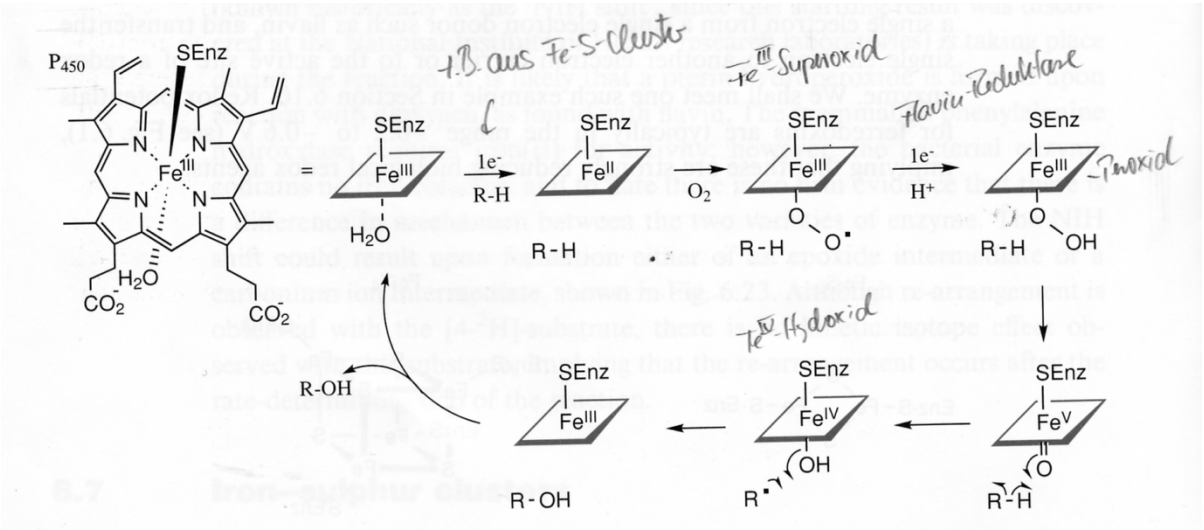


Abb. 18. Mechanismus eines P450 Enzyms. Hydroxylierung von Campher.

Besonders interessant ist, dass P_{450} Enzyme auch Aliphaten hydroxylieren können. Sie aktivieren so nicht-aktivierte CH-Bindungen.

Besonders interessant ist auch, dass diese Enzyme demethylieren können. Auch hierbei wird die Methylgruppe hydroxyliert. Es entsteht Formaldehyd.

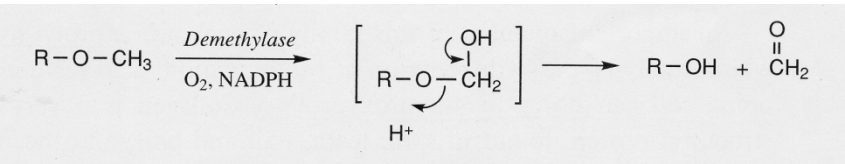


Abb. 19. Mechanismus der Demethylierung.

Noch einige Stichworte zu P_{450}

- Man kennt heute über 500 unterschiedliche P_{450} Isozyme, die in der P_{450} Superfamilie zusammengefasst sind. Es handelt sich in der Regel um schwer zu reinigende, membranständige Enzyme. Gut untersucht ist deshalb nur das lösliche Campher-induzierbare bakterielle P_{450}.
- Die Enzyme können Alkane hydroxylieren, Alkene epoxidieren und auch Arene hydroxylieren und epoxidieren. Auch die Dealkylierung von Aminen, Sulfiden und Ethern ist bekannt.

Der Mechanismus (etwas genauer) scheint ganz wesentlich eine Regulation des Spinzustandes zu beinhalten.

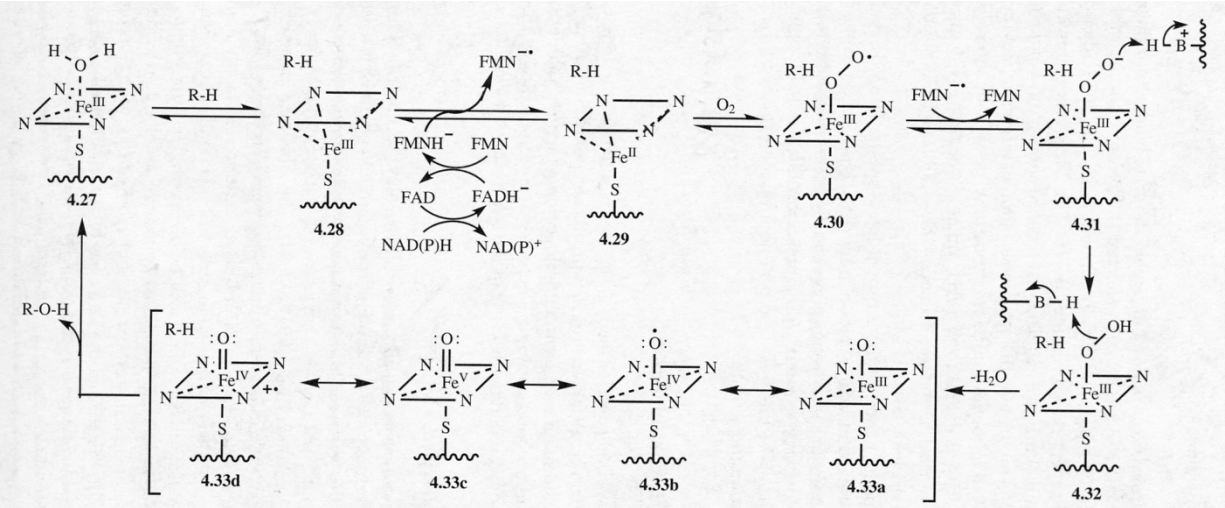


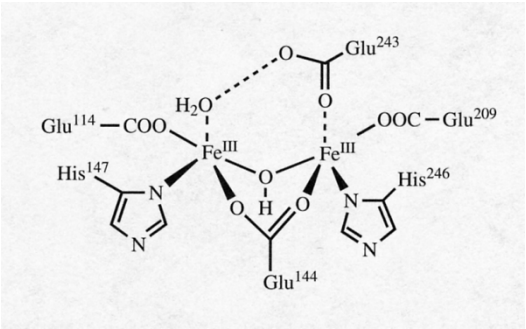
Abb. 20. Mechanismus unter Berücksichtigung der Spinzustände.

Zunächst ist das Fe^{III} in einem low-spin Zustand. Substratbindung führt zu einem Verlust des axialen Liganden. Das Fe wechselt in den high-spin Zustand und bewegt sich aus der Porphyrin Ebene heraus. Das Potential erhöht sich von -330 mV auf -173 mV (gegen NHE). Es folgt der Elektronentransfer. Dann erfolgt der Elektronentransfer vom Flavin Koenzym.

Neben den P_{450} Enzymen gibt es eine Reihe von Monooxygenasen, die keine Häm-Gruppe beinhalten.

5. Methan Monooxygenase

Dieses Enzym enthält einen Di-Eisenkomplex. Dieser ist in der Lage aus Methan und anderen Kohlenwasserstoffen Methanol zu produzieren. Man benötigt zusätzlich O_2 und NADH. Man vermutet, dass die katalytisch aktive Spezies zwei antiferromagnetisch gekoppelte Fe^{IV}-Zentren enthält. Den Mechanismus stellt man sich so vor, dass anschließend O_2 bindet, und sich ein di-Fe^{III}-2O-Komplex bildet, welcher dann zu einer binuklearen Fe^{IV}-Oxo-Spezies weiterreagiert. Diese Spezies nennt man auch Verbindung Q.



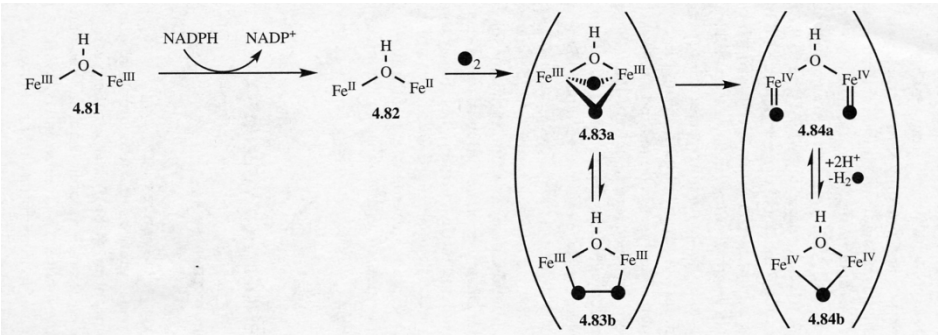


Abb. 21. Aktives Zentrum der Methan Monooxygenase und Reaktionsmechanismus.

Neben der Fe-enthaltenden Methanmonooxygenase ist noch eine Cu-haltige Monooxygenase bekannt welche Dopamin hydroxyliert zu Norepinephrin.

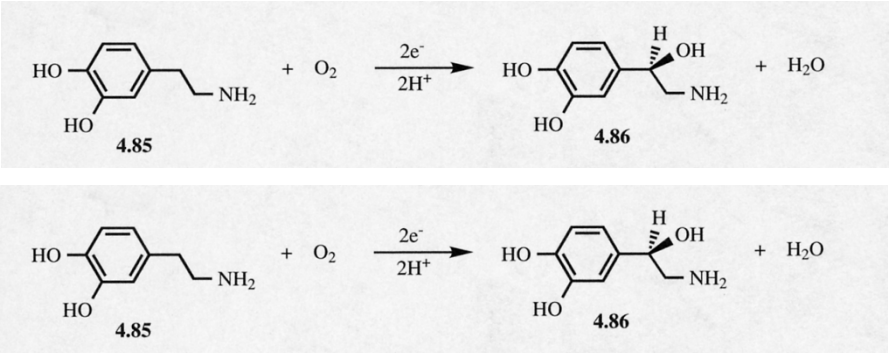


Abb. 22 Dopamin Hydroxylase

Die Reaktion benötigt Ascorbinsäure als Elektronenspender und zwei Cu^{II}-Metallatome. Der Mechanismus beinhaltet erneut die Bildung eines metallzentrierten Cu-Hydroperoxids.

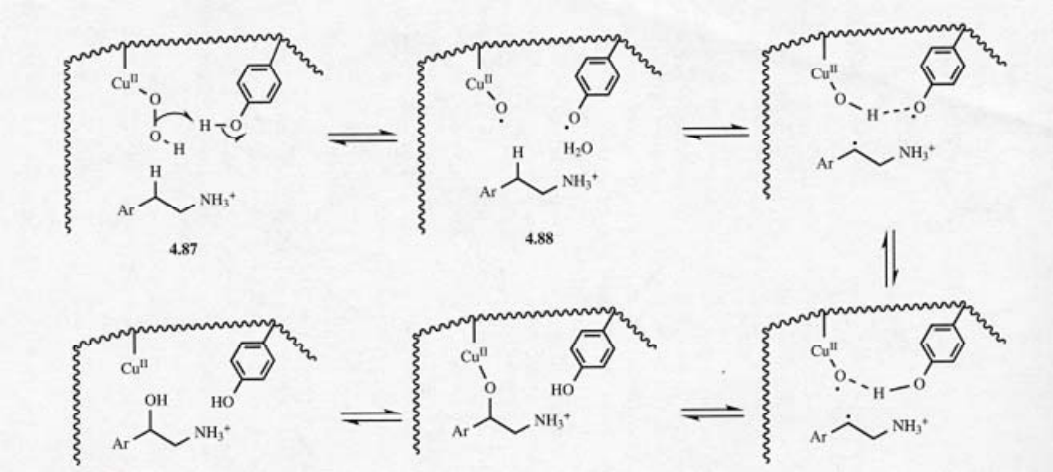


Abb. 23 Mechanismus der Dopamin Hydroxylase

6. Dioxygenasen

Dioxygenasen bauen beide O-Atome des Sauerstoffs in das Substrat ein.

Zunächst gibt es die Fe-abhängigen Enzyme, die aber kein Häm enthalten. Die Enzyme verwenden α-Ketoglutarat als Kosubstrat, welches in Succinat und CO_2 umgewandelt wird.

So scheint sich aus Fe^{2+} und O_2 zunächst eine Fe^{III}-Peroxiverbindung zu bilden, die dann zusammen mit α-Ketoglutarat zu einer reaktiven Fe-Oxo Spezies reagiert. Diese oxidiert dann das Substrat.

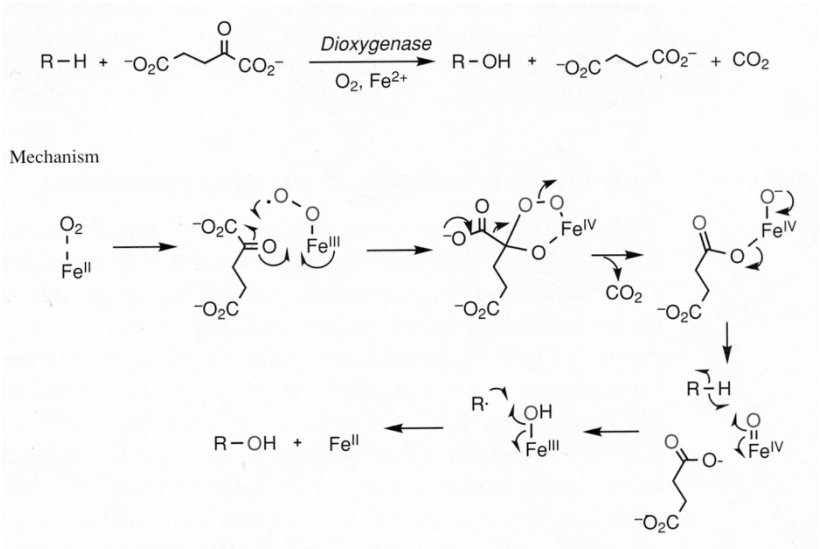


Abb. 24 Dioxygenase Reaktion.

Ein derartiges Enzym, welches Prolin zu Hydroxyprolin umsetzt, verwendet Ascorbinsäure als Kosubstrat.

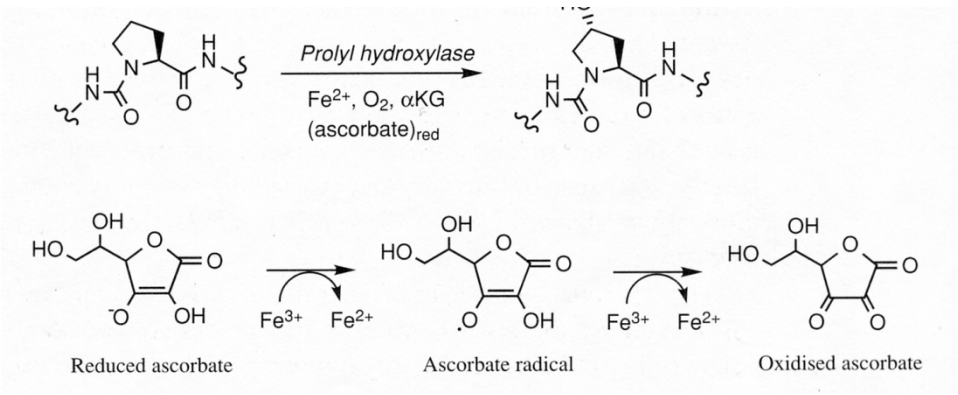


Abb. 25 Mechanismus der Prolyl Hydroxylase (Fig. 6.30).

Die Aufgabe der Ascorbinsäure ist es, Fe^{III} zu Fe^{II} zu reduzieren, welches für die Katalyse benötigt wird. Hydroxyprolin ist ein Hauptbestandteil des Kollagen. Es ist entscheidend

verantwortlich für die Faltung. Ohne Ascorbinsäure kein Kollagen. Ascorbinsäuremangel führt zur Krankheit Skorbut. Ganz ähnlich arbeiten die Catechol-Dioxigenasen welche Aromaten in Catechole umwandeln.

Abb. 26. Catechol-Dioxigenase

In der Regel werden die Catechole dann noch weiter unter C-C Spaltung oxidiert. Die Catechol Dioxigenasen sind Multikomponentenenzyme deren Mechanismus noch sehr schlecht verstanden ist. Die Enzyme enthalten NADH und $FADH_2$ sowie Fe/S Cluster und dann das Fe-enthaltende Katalysezentrum.

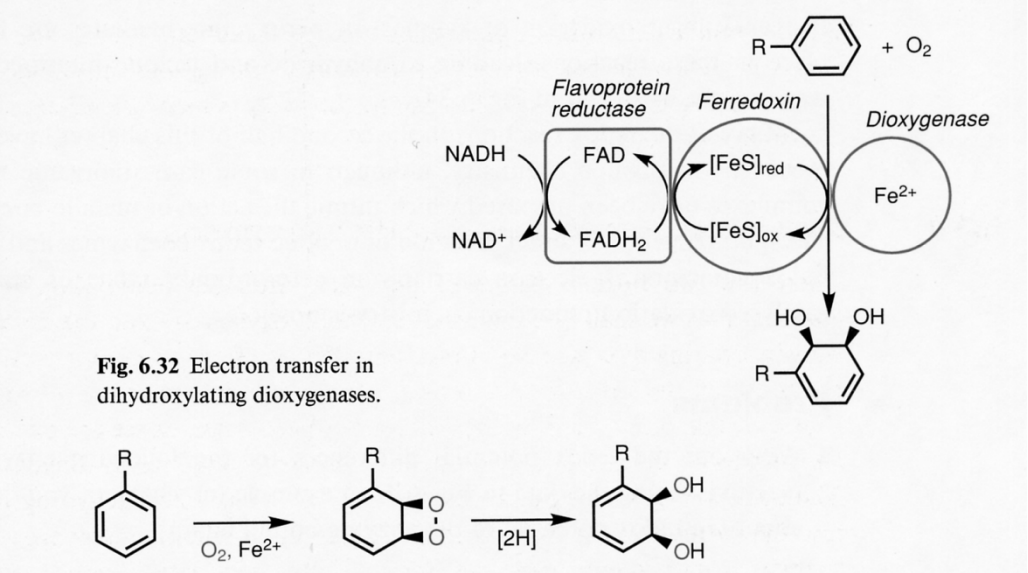


Abb 27

Auch die weiteren Oxidationen sollen über Fe-Oxo Spezies erfolgen. Entscheidend hier ist die jeweilige Peroxidumlagerung. Die Peroxidumlagerung ist auch als Criegee-Umlagerung bekannt.

Catechol Dioxygenasen sind wichtige Enzyme weil es mit ihnen der Natur gelingt, Aromaten und aromatische Abfallstoffe zu beseitigen (Insektizide, Pestizide u. a. Carcinogene). Die

bekannten Enzyme unterscheiden sich nur darin, ob das Diol intra- oder extra- diol gespalten wird.

Die Prostaglandin-H-Synthese

Prostaglandine sind Hormone, die u. a. im Entzündungsprozess eine wichtige Rolle spielen. Inhibition der Prostaglandin-H-Synthase auch Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2) führt zur Entzündungshemmung. COX-1 ist wichtig zur Aufrechterhaltung von Gewebe u. a. der Magenschleimhaut. COX-2 wird durch Cytokine im Entzündungsprozess aktiviert. COX-2 ist im Entzündungsprozess wichtig und involviert in der Fieberentwicklung und im Schmerzprozess. Aspirin und Ibuprofen inhibieren COX-1 und COX-2 und sind daher nicht sehr magenverträglich. Es wurden und werden daher selektive COX-2 Inhibitoren entwickelt. Die ersten sind jetzt seit wenigen Jahren auf dem Markt.

COX-1 hat in der aktiven Tasche einen Isoleucin Rest (Ile 523)

COX-2 hat in dieser Position ein Valin (Val-523)

Da Valin kleiner ist als Isoleucin, führen große Substituenten in dem Schmerzmittel zu einer erhöhten COX-2 Selektivität. Die modernen Medikamente erreichen eine Selektivität von 10^3 – 10^4.

Die COX-Enzyme besitzen erneut zwei Aktivitäten. Zunächst eine Cyclooxygenase-Aktivität; dann eine Peroxidase-Aktivität.

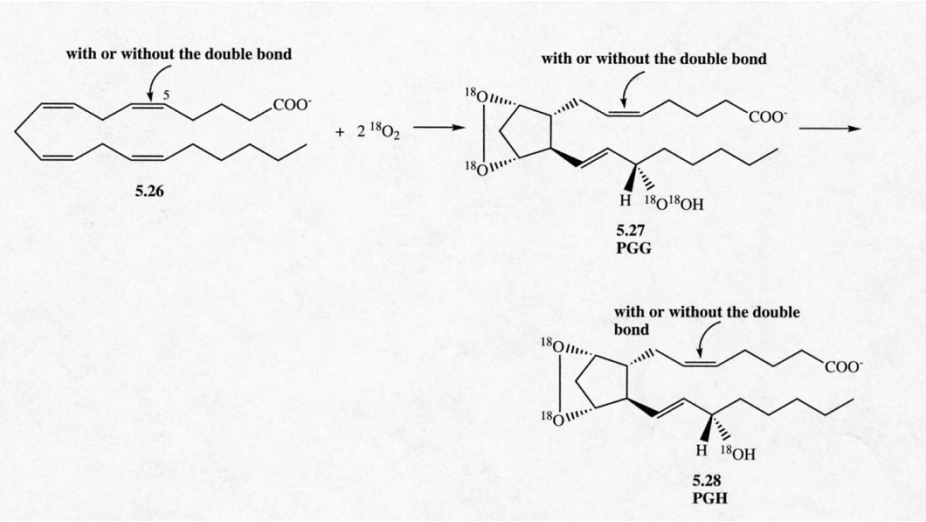


Abb. 28 COX Enyzme

Erneut ist der Mechanismus nicht ganz klar. Es scheint aber zunächst eine H-Atom-Abstraktion stattzufinden, gefolgt von der Bildung eines Peroxids, welches dann eine intramolekulare Kaskadenreaktion auslöst, die zu einer Peroxidierung einer weiteren Doppelbindung führt. COX-Enzyme besitzen als Koenzyme Häm-Gruppen.

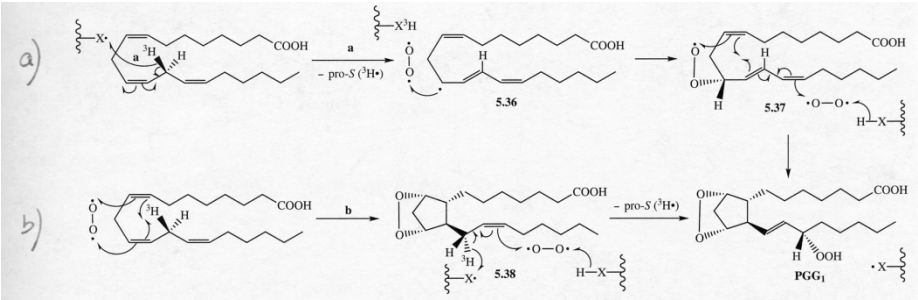


Abb. 29 Mechanismus der COX Enzyme

Die weiteren Reaktionen sind dann Säure/Base-Reaktionen, die zur Ringöffnung des Endoperoxids führen.

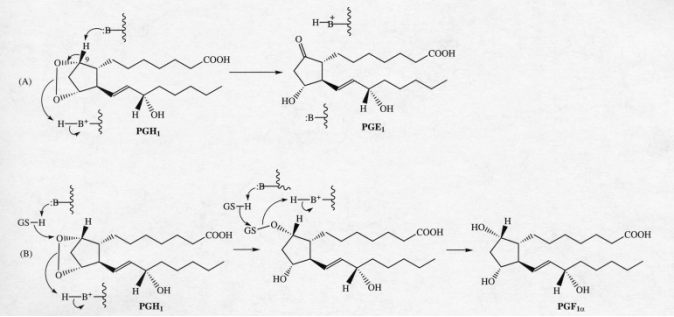


Abb. 30 S.238 Silverman

7 C-C-Bindungsbildung durch Enzyme

Die Katalyse von C-C-Verknüpfungsreaktionen ist enorm bedeutend für die Biosynthese von Zuckern, Aminosäuren, etc. Eine Gruppe von Enzymen, die Aldolasen, katalysieren Aldolreaktionen. Man unterscheidet zwei Klassen.

Klasse 1 Aldolasen besitzen in der aktiven Tasche ein Lysin. Klasse 2 Aldolasen haben stattdessen ein zweiwertiges Metallion wie Mg^{2+}, Zn^{2+} oder Mn^{2+}. Fructose-1,6-biphosphat Aldolase gibt es in beiden Klassen. Dieses Enzym katalysiert die folgende Reaktion.

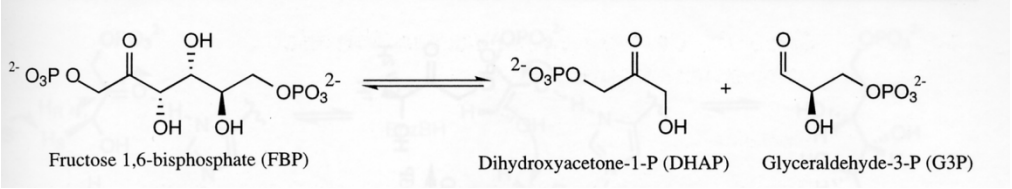


Abb. 31 Fructose-1,6-biphosphat Aldolase

Klasse 1 Aldolasen bilden zunächst ein Imin und daraus ein Enamin, welches als Enolatäquivalent fungiert.

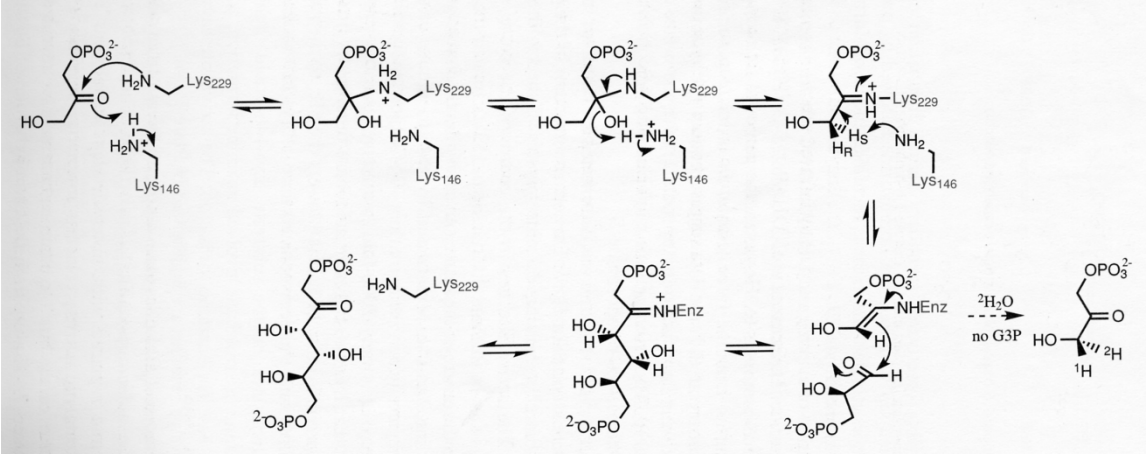


Abb. 32 Mechanismus der Fructose-1,6-biphosphat Aldolase.

Im Fall des Klasse 2 Enzyms aktiviert das Metall als Lewissäure den Aldehyd. Das Enolat wird in der Enzymtasche gebildet. In der organischen Chemie sind hierzu harsche Bedingungen nötig. Das Enzym schafft diesen Schritt nur deshalb in Wasser, weil das Enolat Anion sehr gut stabilisiert wird.

Aldolasen werden auch in der organischen Chemie eingesetzt, z. B. zur Synthese von „Aminozuckern“.

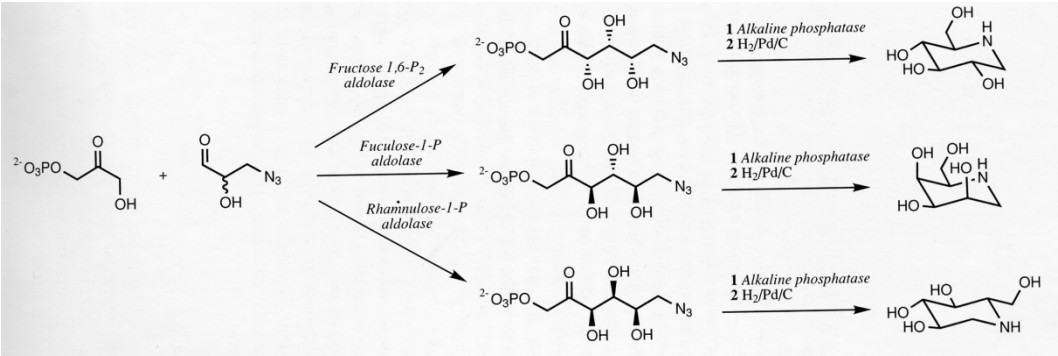


Abb. 33