Hydrolytisch aktive Enzyme und Gruppentransfer-Reaktionen

(Die Koenzyme Acyl-CoA, ATP, SAM und die Folate)

In der Natur gibt es prinzipiell drei Sorten von hydrolytisch aktiven Enyzmen. Diese bauen die unterschiedlichen Biopolymeren, die es in der Natur gibt effizient ab.

A. Peptidasen. Sie hydrolysieren Peptide

B. Nukleasen. Sie spalten Nukleinsäuren

C. Glycosylasen. Sie spalten Oligosaccharide

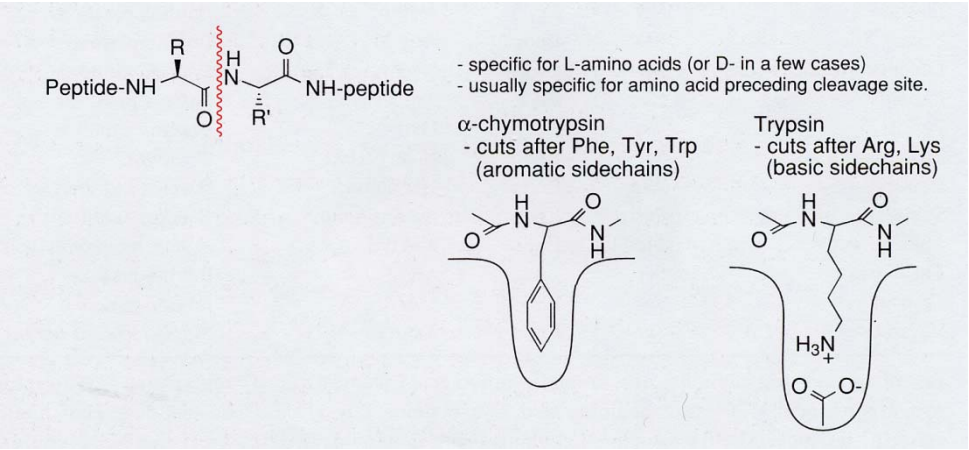
A. Die Peptidasen

Es gibt vier Klassen von Peptidasen.

1. Serin-Peptidasen
2. Cystein-Peptidasen
3. Metallo-Peptidasen
4. Aspartyl-Peptidasen

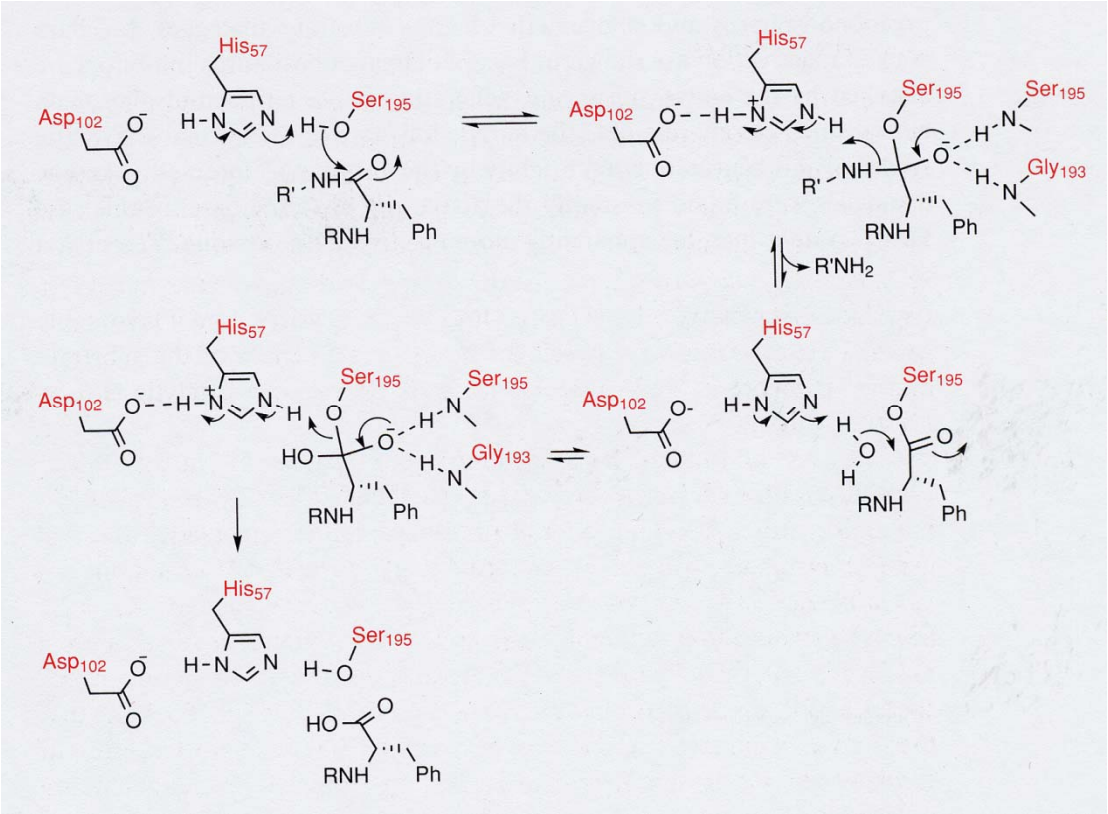
A1. Die Serin Peptidasen

Diese Peptidasen besitzen ein aktives Zentrum, das manchmal durch eine vorgelagerte tiefe Furche (Cleft) gekennzeichnet ist. Diese Furche bestimmt die Selektivität der Peptidasen. Chymotrypsin spaltet z. B. immer nach einer aromatischen Aminosäure, während Typsin nach positiv geladenen Aminosäureseitenketten spaltet.



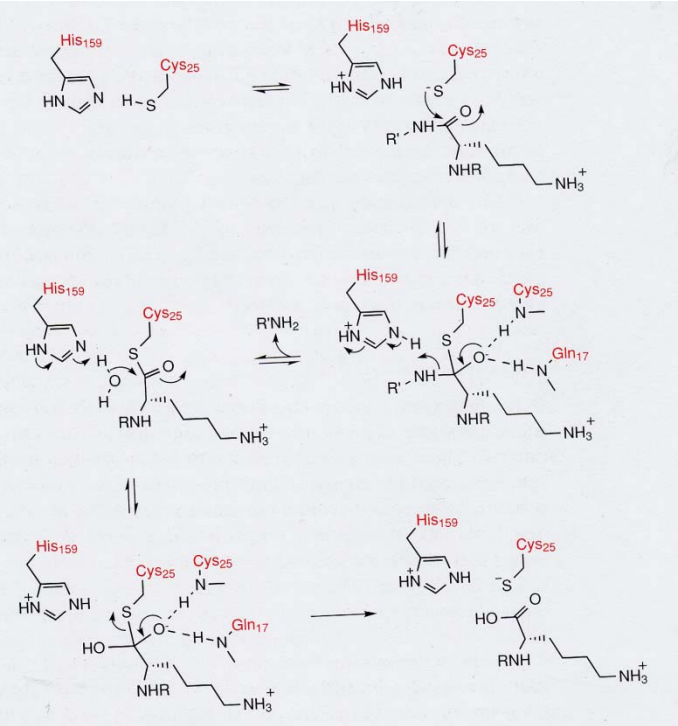
Während der Katalyse greift ein nukleophiles OH eines Serin-Restes das fragliche Amid an. Das sich bildende Oxyanion-Intermediat wird durch H-Brücken stark stabilisiert. Dieses ist

die gewohnte Übergangszustandsstabilisierung. Das Ser (pKa = 16) wird mit Hilfe eines Imidazols (pKa = 7) zunächst deprotoniert. Diese Reaktion ist thermodynamisch ungünstig. Die Reaktion wird ermöglicht, weil das sich bildende Imidazolium-Ion durch eine protonierte Asparaginsäure wiederum durch Protonierung stabilisiert wird. Die Anordnung Ser-His-Asp nennt man auch **katalytische Triade**. Entfernt man z. B. das Asp durch gerichtete Mutagenese, so verliert das Enzym an Aktivität um den Faktor 10^4.



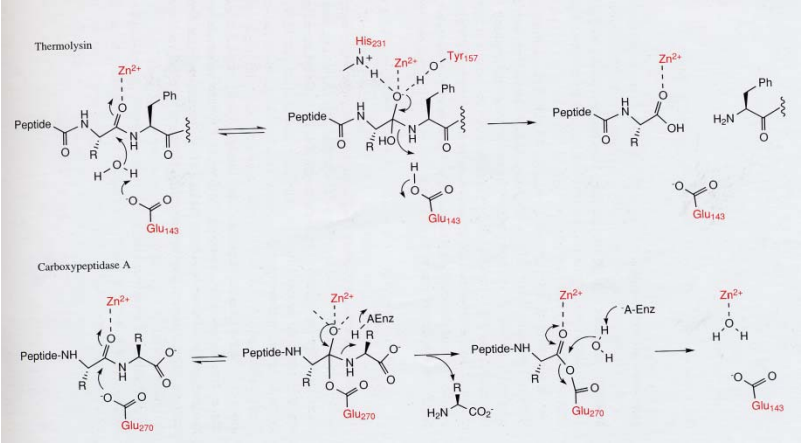
A2. Cystein Proteasen

Hier wird das aktive Nukleophil, die OH Gruppe des Serins durch die viel nukleophilere SH-Gruppe des Cysteins ersetzt. Erneut wichtig ist die Stabilisierung des Oxyanion-Intermediates.



A3. Metallo Proteasen

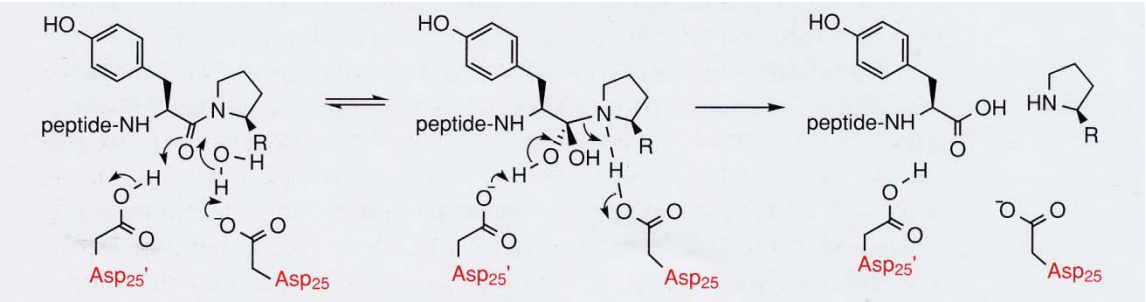
Diese Enzyme sind wichtige Targets in der Pharmaindustrie. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Carboxypeptidase A.



Hier wirkt die Carboxylgruppe einer Glu-Aminosäure als Nukleophil. Das Metallion, meist ein Zn^{2+}, fungiert als Lewissäure. Es aktiviert das Amid. Thermolysin unterscheidet sich mechanistisch ein wenig von der Carboxypeptidase A, weil hier ein Wassermolekül direkt als Nukleophil fungiert. Das Wasser wird wohl durch das Carboxylat zunächst deprotoniert und dadurch für den Angriff aktiviert.

A4. Aspartyl Proteasen

Diese Proteasen haben eine traurige Berühmtheit erlangt, weil die HIV Protease eine solche Aspartyl Protease ist. Mechanistisch entscheidend ist das Vorhandensein von zwei Asp Resten. Ein Rest spielt das Nukleophil, der zweite Rest fungiert als generelle Säure und protoniert das tetraedrische Zwischenprodukt um es zu stabilisieren.



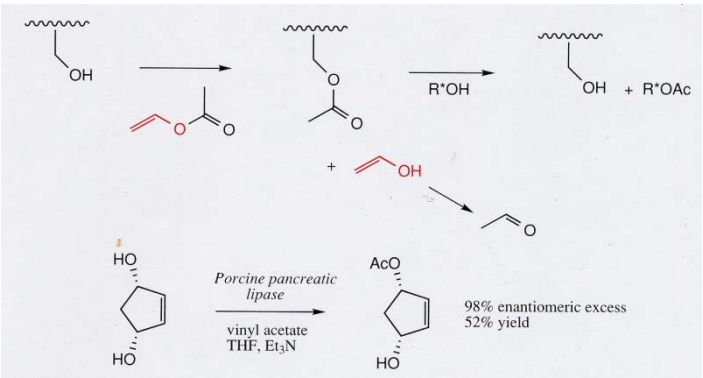
Alle diese Proteasen lassen sich mit Inhibitoren blockieren, die die tetraedrische Zwischenstufe als eine Art *transition-state* Inhibitor nachahmen. Beispiele sind Peptide, welche die HIV Protease subnanomolar inhibieren. Auch Organophosphor-Verbindungen und Chlormethylketone werden von den Serin-Proteasen als Substrate akzeptiert. Nach dem Angriff des Nukleophils, kann das Zwischenprodukt jedoch nicht mehr zerfallen. Das Enzym wird so kovalent modifiziert und dadurch chemisch irreversibel inaktiviert.

B. Esterasen, Lipasen, Acylasen und Phosphatasen

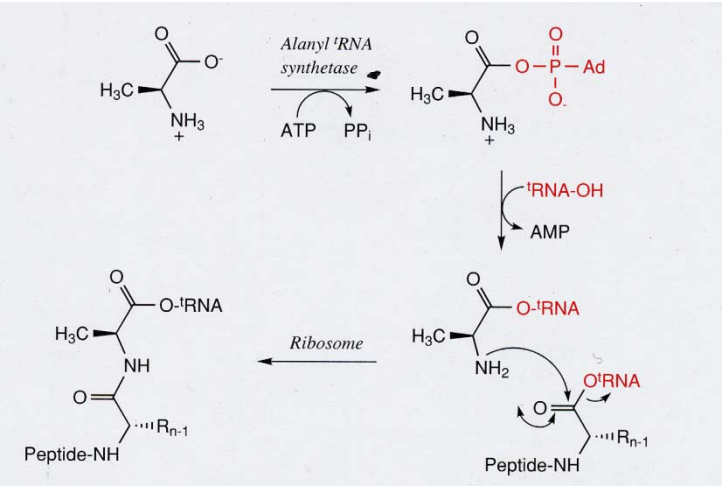
Esterasen spalten die Ester von Triglyceriden. Sie bauen also Fette ab und arbeiten dabei an der Fett/Öl-Wasser Grenzschicht. Mechanistisch ähneln diese Enzyme stark den Serin-Proteasen, d. h. sie funktionieren nach dem Chymotrypsin Mechanismus. Wichtige Vertreter dieser Enzyme haben Einzug in die chemische Synthese gefunden. So werden heute zur kinetischen Razematspaltung die Enzyme Schweineleber-Esterase (PLE) und Schweinepankreas Lipase (PPL) eingesetzt. Diese Enzyme ermöglichen die streng stereoselektive Hydrolyse von Estern.

Mechanistisch wird zunächst wieder ein tetraedrisches Zwischenprodukt gebildet, das dann durch Wasser hydrolysiert wird. Man kann die Enzyme statt in Wasser auch in Vinylacetat einsetzen. Die Enzyme erkennen dann das Vinylacetat als Substrat und bilden die tetraedrische Zwischenstufe. Diese kann anschließend durch einen in Lösung befindlichen Alkohol hydrolysiert werden. Die Acetylgruppe wird so nicht auf Wasser, sondern auf das

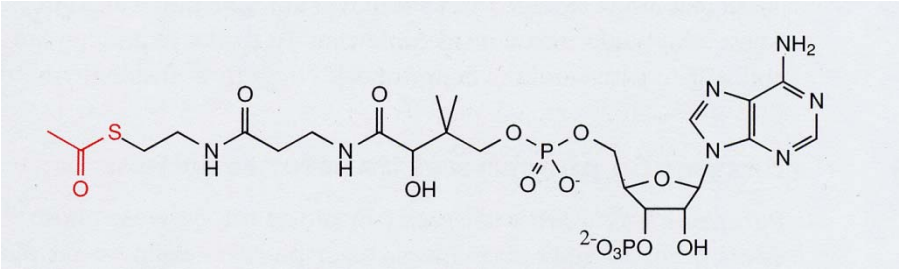
Substrat übertragen. Das geschieht enantioselektiv und wird zur Razematspaltung von chiralen Alkoholen eingesetzt.



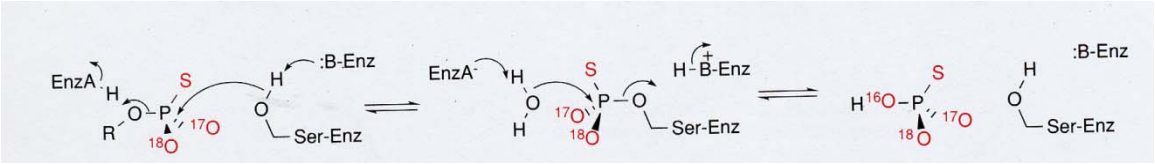
Weitere Acyltransferreaktionen werden in der Natur auf zwei unterschiedliche Arten bewerkstelligt. Am Ribosom wird eine Peptidkette geknüpft. Hierzu muss die Carbonsäure aktiviert werden. Das geschieht meistens durch zuvor erfolgende Adenylierung der Carboxylfunktion mit Hilfe von ATP. Es entsteht ein gemischtes Anhydrid, ein Acyl-Adenylat, welches als aktivierte Säure mit einem Amin eine Amidbindungsbildung durchführt.



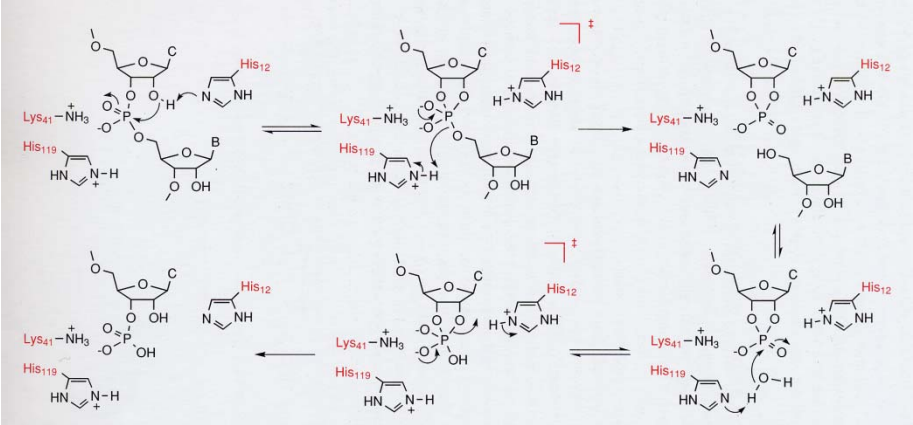
Eine weitere Möglichkeit Acylgruppen zu übertragen hat die Natur unter Verwendung des **Acetyl-KoenzymsA** (unten gezeigt). Dieses Koenzym reagiert mit Alkoholen, da es über eine Thioester Funktion verfügt, die einen aktivierten Ester darstellt. Dieser Thioester ermöglicht es dem Koenzym seine Acyl-Gruppe auf alle möglichen Substrate (Alkohole, Amine) zu übertragen.



Phosphatasen hydrolysieren Phosphormonester und Phosphordiester. Phosphatasen verwenden dabei ebenfalls einen Mechanismus, der dem der Serin Proteasen stark ähnelt. Ein Serin greift nach der Aktivierung durch eine generelle Base den Phosphormonoester an. Die Abgangsgruppe wird durch sofortige Protonierung (zunächst der Zwischenstufe) stabilisiert.

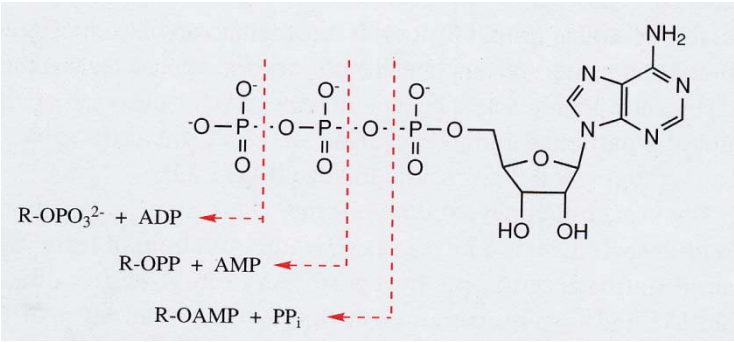


Nukleasen sind Enzyme, die die Phosphordiesterbindung z. B. in DNA oder RNA Molekülen spalten. Z. B. die snake venom 3'→5' Exonuklease. Diese Enzyme sind in der Regel sehr unspezifisch. Viel spezifischer sind die Endonukleasen. Sie sind als Restriktionsenzyme (*EcoR*1) heute vielgenutzte Werkzeuge in der Molekularbiologie sind.

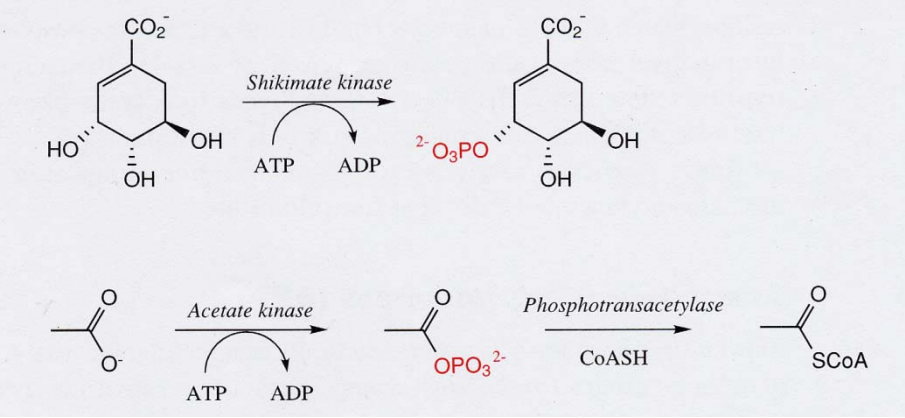


Die Nukleasen, die RNA abbauen, verwenden das 2'OH als Nukleophil, welches unter Bildung eine 2'-3'-Cyclophosphates, die Phosphordiester Gruppe angreift.

Die Übertragung von Phosphaten erfolgt in der Regel ausgehend von **ATP**. ATP ist die Phosphatquelle in der Natur schlechthin.

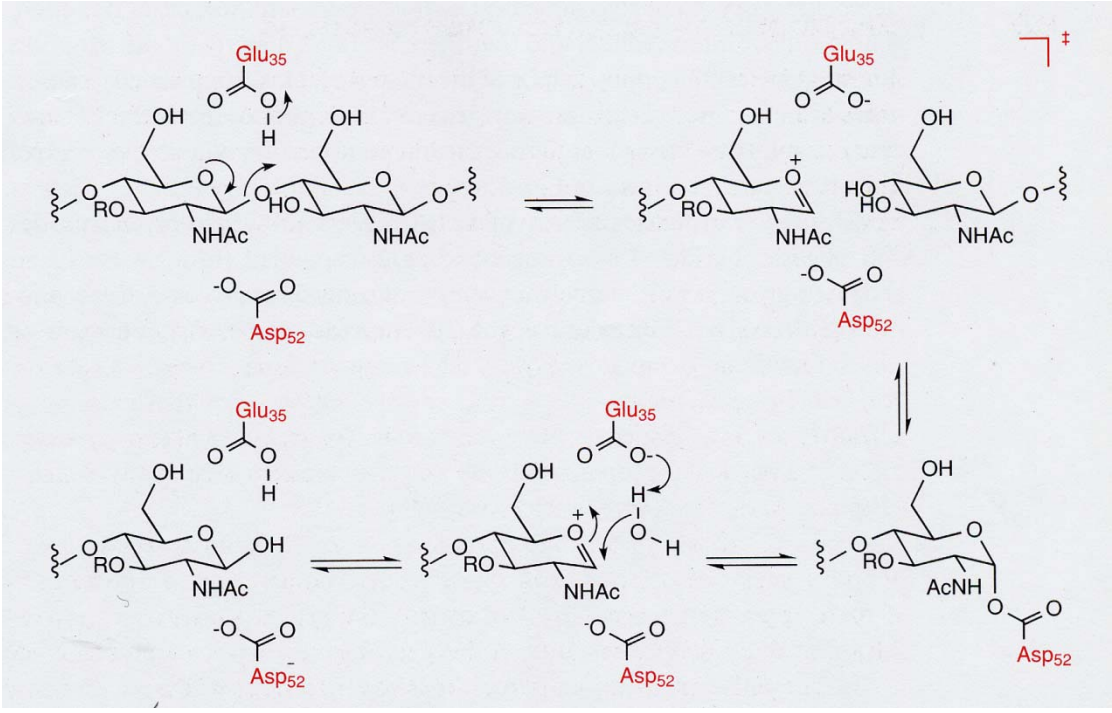


Enzyme, die die Phosphatgruppe z. B. auf Serin-, Threonin-, oder Aspartyl-Reste übertragen heißen Kinasen. Sie sind ebenfalls beliebte Targets in der modernen Pharmaforschung. Ein Beispiel ist die unten gezeigte Reaktion, die durch das Enzym Shikimat-Kinase katalysiert wird.

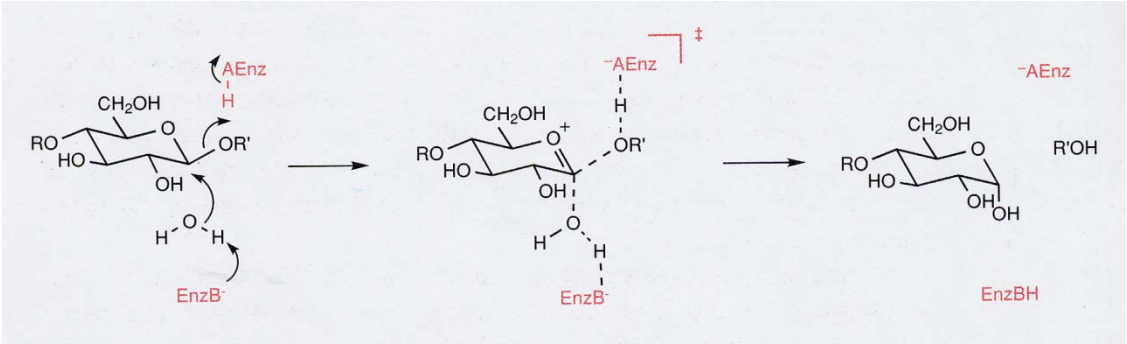


C. Glycosylasen

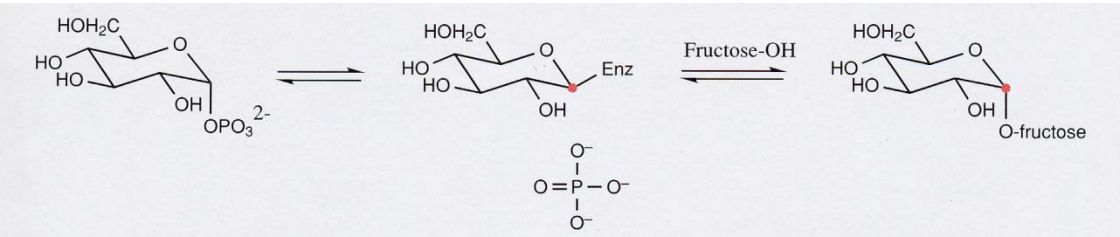
Diese Enzyme hydrolysieren die glycosidischen Bindungen von Oligosacchariden, wie man sie z. B. auf der Oberfläche von Bakterienzellen findet. Das Lysozym ist z. B ein solches Enzym. Man findet es in Eiweiß und auch in unserer Tränenflüssigkeit. Das Enzym ist schwach antimikrobiell. Die Hydrolyse der glycosischen Bindung erfolgt entweder unter Retention oder Inversion der Konfiguration. Bei der Retention wird vermutlich zunächst ein kovalentes Enzym-Zucker Intermediat gebildet, welches anschließend durch Wasser hydrolysiert wird.

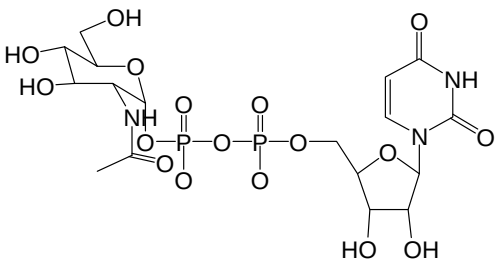


Enzyme, die unter Inversion spalten, aktivieren wohl gleich das Wasser, welches dann in einer Art S_N2-Reaktion angreift.



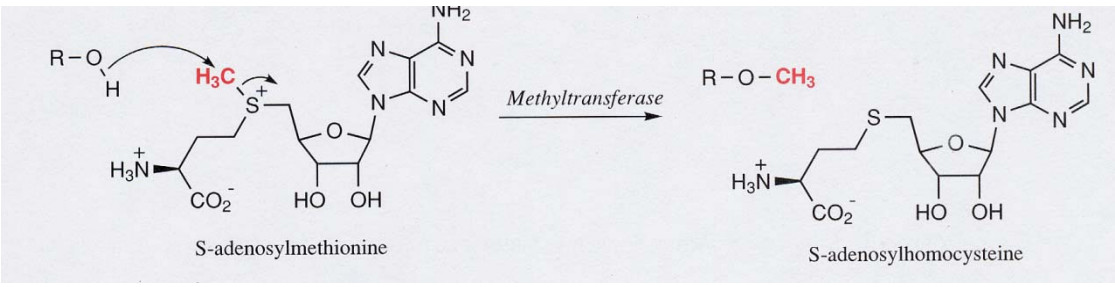
Die Biosynthese von Zuckern und damit deren Verknüpfung muss umgekehrt über eine Aktivierung der Zucker erfolgen. Hierzu wird erneut entweder die glycosidische OH-Gruppe in ein Glycosylphosphat oder in ein Diphosphouridin umgewandelt und dadurch in eine gute Abgangsgruppe überführt.





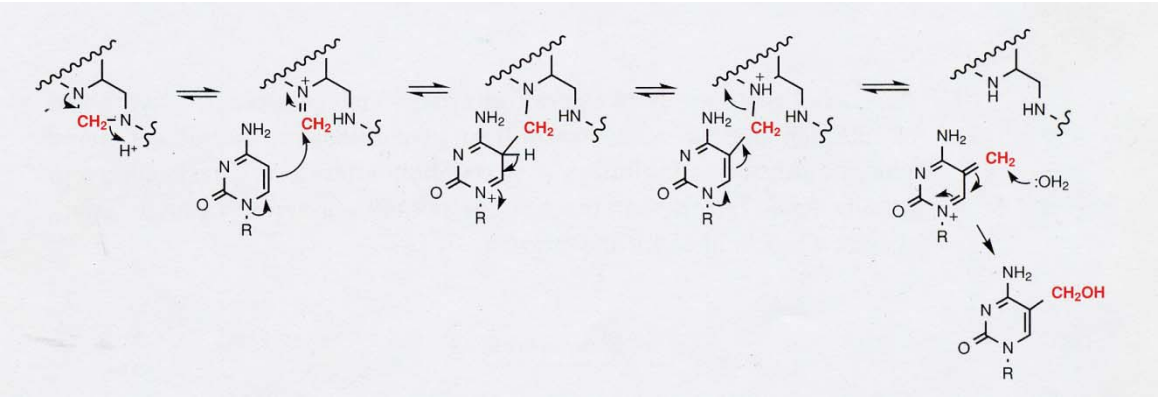
Der Methylgruppentransfer in der Natur

Das Methyliodid der Natur ist das Koenzym SAM. ***S*-Adenosylmethionin** alkyliert eine große Zahl biologischer Substrate. Der Mechanismus entspricht dabei im wesentlichen dem S_N2-Mechanismus. Die Methylgruppe wird unter Inversion der Konfiguration übertragen, wie man aus dem Studium der chiralen Methylgruppen weiß.

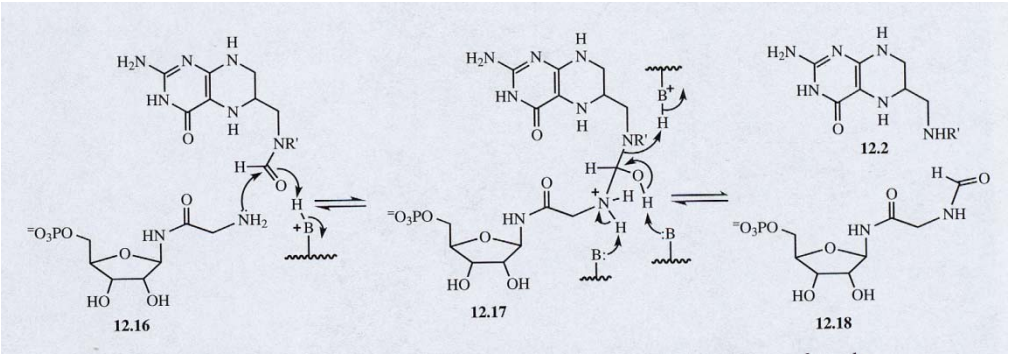


Ein weiteres Koenzym, das Methylgruppen übertragen kann, ist das **Folat**, genauer das N5-Methyl-FH4. Zunächst wird vermutlich das N5-Atom protoniert, um das Pteringerüst in eine gute Abgangsgruppe zu überführen. Dann greift das Nukleophil die Methylgruppe an.

Dieses Folatkoenzym kann neben dem Methyltransfer auch Methylen- und sogar Methingruppen (also Formaldehyd) übertragen. Für die Übertragung von Methylengruppen verwendet die Natur das Koenzym N5,N10-Methylen-FH4.



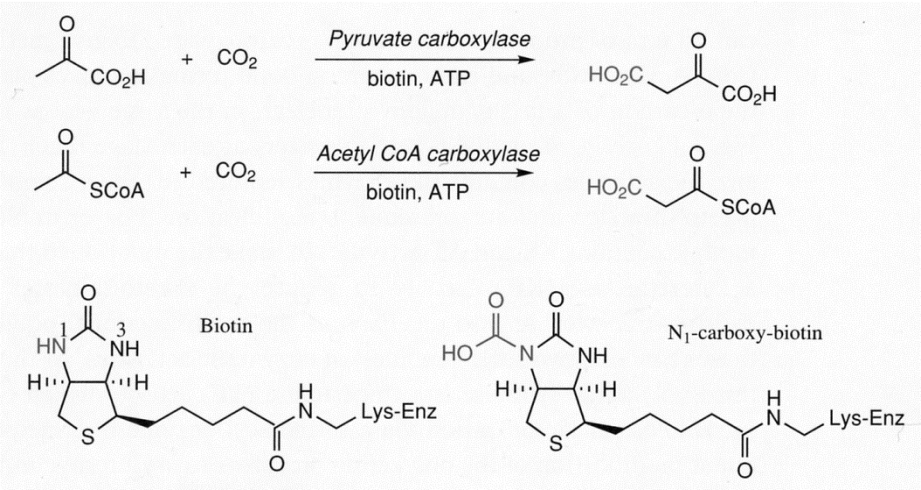
Für den Transfer von Formaldehyd wird das Koenzym N5,N10-Methenyl-FH4 gebraucht.



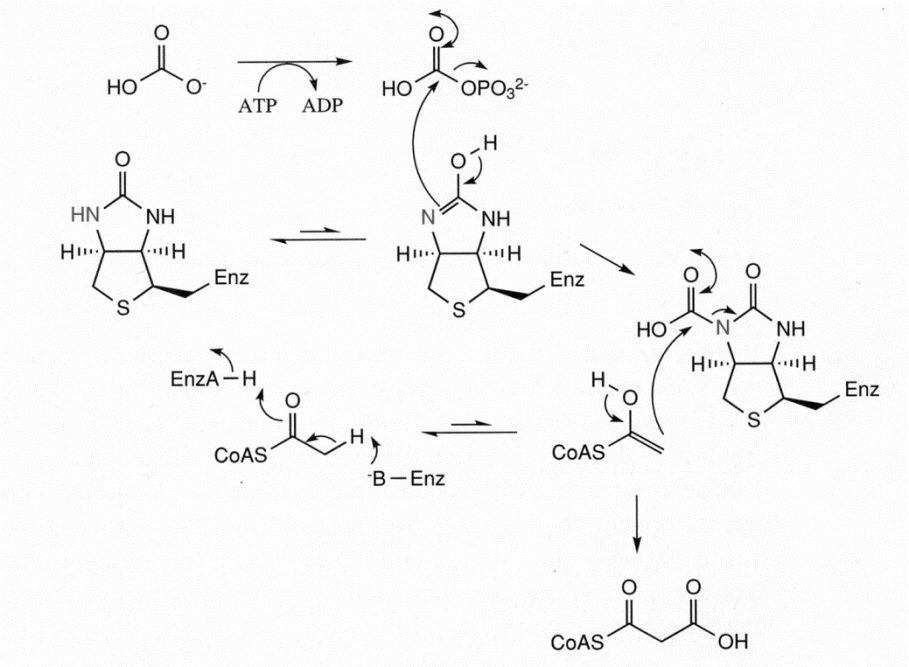
Die vom Folat abgeleiteten Koenzyme sind also in der Natur als C1-Gruppenüberträger von großer Bedeutung. Die Folat-abhängige Methylierung von Uridin zu Thymidin ist ein Schlüsselschritt in der Biosynthese von DNA. Werden Enzyme, die an diesen Prozessen beteiligt sind, gehemmt, kann man das Zellwachstum stoppen. Tatsächlich sind viele der an der DNA-Biosynthese beteiligten Enzyme wichtige Targets in der Pharmaforschung auf der Suche nach neuen antiproliferativ wirkenden Substanzen in der Krebsforschung.

Bild fehlt noch

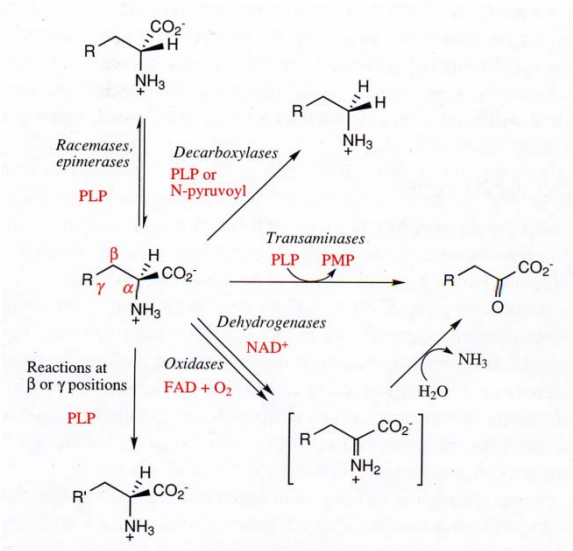
Ein weiteres Koenzym, welches am Gruppentransfer beteiligt ist, ist das Biotin. Es überträgt eine Ameisensäuregruppe, kann also carboxylieren. Ausgangspunkt der Reaktion ist die monophosphorylierte Kohlensäure, die dann auf das Biotin übertragen wird.



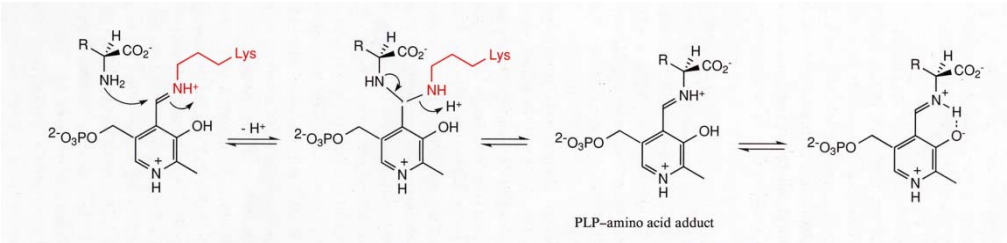
Das CO_2 ist quasi anhydridartig am Biotin aktiviert



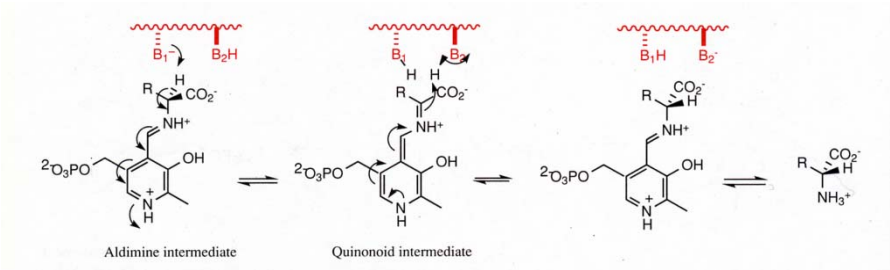
Besonders große Bedeutung hat das Koenzym Pyridoxalphosphat. Dieses Koenzym ist vor allem in der Biosynthese und im Abbau von Aminosäuren von zentraler Bedeutung. PLP katalysiert eine große Vielzahl von Reaktionen.



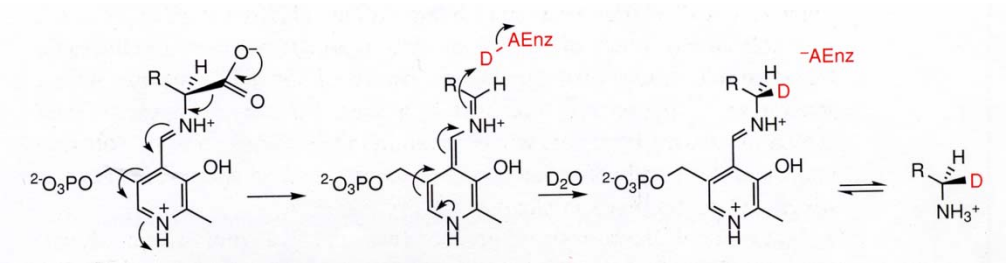
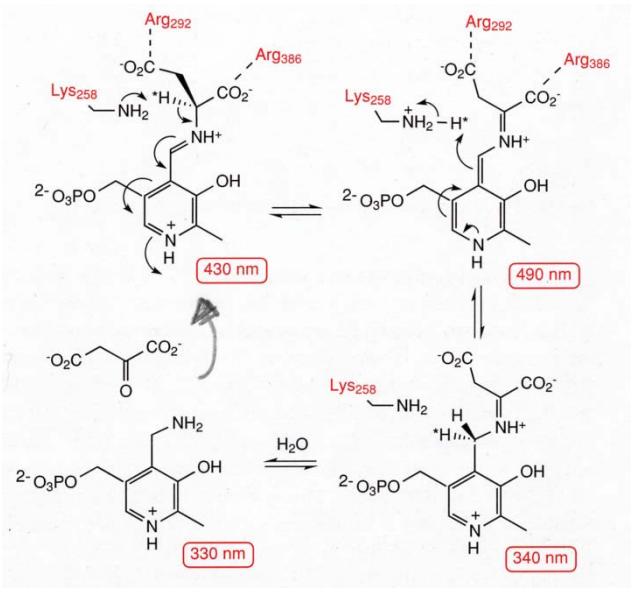
Es bildet sich zunächst immer das Iminaddukt aus dem Koenzym und der umzusetzenden Aminosäure:



Danach kann z. B. razemisiert werden:



Oder es findet eine Decarboxylierung statt:



Wichtig sind auch die Transaminasen bei denen die Aminogruppe der Aminosäure auf den PLP Kofaktor übertragen wird, wobei die oxo-Funktion auf dem Produkt „landet“.