

Verschiedene Formen der Enzym-Heterogenität *, **

H. Aebi ***

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern

Summary

The main forms of enzyme heterogeneity are of genetic nature: Iso(en)zymes and enzyme polymorphisms (allelic forms). Epigenetic (secondary) enzyme modifications («Metazymes») form a group of growing chemical and biological importance. They include substitutions and conformational alterations, which are involved in activity regulation, enzyme ageing and in preparatory artefacts. For each type typical examples are given.

Die analytische Methodik zur Erfassung feinsten Unterschiede hinsichtlich Struktur und Funktion von Enzymen hat in den letzten Jahren eine zunehmende Ver-

besserung erfahren. Dabei ist immer deutlicher geworden, dass bei dieser Stoffklasse ein Ausmass an Variation anzutreffen ist, das man früher nicht für möglich gehalten hätte. Das Leitbild von der Einheitlichkeit des artspezifischen Bauplanes wurde schrittweise durch das-

* Eingegangen am 9. Januar 1976

** Meinem verehrten Kollegen und lieben Freund, Professor Hans Nitschmann, anlässlich seiner Emeritierung als Dank für 30jährige Zusammenarbeit zugeeignet.

*** Prof. H. Aebi, Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern, Bülhstrasse 28, CH-3012 Bern

jenige der extremen Wandelbarkeit und Variabilität – selbst innerhalb ein und derselben Spezies – ersetzt. Das Studium dieser Heterogenitäten ist im Bereich der Enzymforschung zu einem besonderen Spezialgebiet geworden [1,2].

Multiple molekulare Formen sind nach heutiger Auffassung entweder Ausdruck einer extremen Spezialisierung, d.h. sie sind das in ein und demselben Organismus biochemisch fassbare Korrelat der Organdifferenzierung und der Organspezifität; oder sie sind die Folge von Mutationseignissen. Die Vielfalt der Enzym-Modifikationen, wie sie beim Vergleich verschiedener Organismen beobachtet werden kann, hat zum Konzept der biochemischen Individualität geführt.

Zu wenig Beachtung haben andererseits bisher diejenigen Vorgänge gefunden, die gleichfalls zur Heterogenität beitragen, aber nicht genetisch determiniert sind. Bei diesen sekundären Veränderungen der Enzymstruktur (epigenetische Modifikationen) handelt es sich entweder um physiologische Prozesse, die man als Alterung betrachten darf, oder um eigentliche präparative Artefakte, wie sie im Verlauf der Aufarbeitung und Isolierung selbst bei noch so schonendem Vorgehen auftreten können. Diese drei Arten der Enzym-Heterogenität seien anhand typischer Beispiele näher erläutert.

1. Isoenzyme

Als Isoenzyme («Isozyme») wurden ursprünglich nur diejenigen genetisch festgelegten multiplen Formen eines Enzyms bezeichnet, die in verschiedenen Organen, Zellen oder Organellen desselben Individuums vorkommen¹. Die bereits 1950 von A. Meister beobachtete Uneinheitlichkeit gereinigter Enzympräparate (LDH) stiess zunächst auf Unglauben und Skepsis, weil dieser Befund nicht mit dem damals gültigen Axiom von der Uniformität des Bauplanes und der Homogenität «reiner» Enzyme vereinbar schien. Ein Meinungsumschwung erfolgte erst, als es Markert 1959 gelang, diese Heterogenität mittels einfacher Trenn- und Färbemethoden auf dem Objektträger (Stärkegel-Elektrophorese kombiniert mit der in der Histochemie üblichen Formazanfärbung) im Falle der Esterase und der

Lactatdehydrogenase zu demonstrieren. Isoenzyme dieser Art sind heute in grosser Zahl (über 100) bekannt. Entweder handelt es sich um genetisch unabhängig voneinander kodifizierte und verschieden lokalisierte Enzyme mit ähnlicher Substratspezifität (Untergruppe 1), wie z.B. die mitochondriale und die im Cytosol vorkommenden Formen der Malat-Dehydrogenase oder der Aldehyd-Reduktase [3]; oder es sind Oligomer-Enzyme, deren heteropolymere Formen aus zwei (oder mehr) Arten von Monomer-Untereinheiten (= subunits) aufgebaut sind. Klassisches Beispiel hierfür ist nach wie vor die Lactat-Dehydrogenase, ein Tetramer-Enzym, an dessen Aufbau zwei Untereinheitentypen H (H = Herz) und M (M = Muskel), die durch zwei nicht-allele Gene kodifiziert werden, in wechselnder Proportion beteiligt sind (Tabelle 1). Die in vivo erfolgende Kombination von inaktiven Monomer-Untereinheiten zum aktiven Enzym-Tetramer lässt sich auch in vitro realisieren. Dies gelingt relativ leicht nach vorgängiger Zerlegung des Enzyms (z.B. in 8 M Urea) in die verschiedenen Untereinheitentypen. Durch geeignetes Kombinieren lassen sich auf diese Weise nicht nur die bekannten Heteropolymere, sondern auch Hybride im Sinne von «molekularen Kreuzungen» herstellen, z.B. LDH-Moleküle, die teils aus Untereinheiten vom Pferd, teils aus jenen vom Rind bestehen.

In früheren Arbeiten aus diesem Institut ist gezeigt worden, dass der Verteilung der LDH-Isoenzyme diagnostische Bedeutung zukommt [4]. Dabei lässt sich die Beobachtung ausnützen, dass zahlreiche Organe ein typisches Isoenzym-Muster aufweisen, welches beim Entweichen von Enzym in das Blutserum im wesentlichen erhalten bleibt. Beispielsweise sind Ergüsse, die in Zusammenhang mit malignen Tumoren entstehen, besonders reich an der kaum wandernden LDH-5. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass im Verlauf der Ontogenese bei Hühnchen und Maus drastische Verschiebungen des Isoenzymmusters auftreten können, z.B. bei der Kreatinphosphokinase [5,6].

2. Enzymvarianten

Enzymvarianten («Allozyme») sind Formen, die sich vom normalerweise vorkommenden Enzym bezüglich Struktur und Funktion (z.B. spezifischer Aktivität, Stabilität oder Substratspezifität) unterscheiden. Diese Varianten bilden die Untergruppe 3 des IUB-Nomenklaturvorschlages. Das Vorkommen von verschiedenen

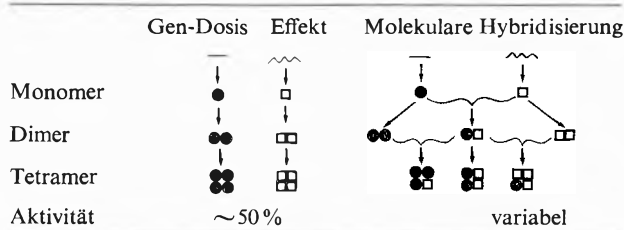
¹ Die in der Empfehlung der zuständigen Nomenklaturkommission der IUB gegebene Definition ist weiter gefasst; es werden hierbei 7 Untergruppen unterschieden. Der engen Auslegung dieses Begriffs entsprechen indessen nur die Untergruppen 1 und 2 des IUB-Vorschlages von 1972.

Tabelle 1: Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Bezeichnung	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
Zusammensetzung	HHHH (H ₄)	HHHM (H ₃ M)	HHMM (H ₂ M ₂)	HMMM (HM ₃)	MMMM (M ₄)
Isoelektrischer Punkt	4,5	5,8	6,8	8,0	9,4
Elektrophoretische Mobilität (pH 8,5)	- 4,9	- 4,0	- 2,1	- 1,3	+ 0,6
Vorkommen	besonders Herz (= H)			besonders Muskel (= M)	

Weitere Einblicke in die Variabilität der Enzymstruktur konnten durch das Studium von Enzymen heterozygoter Träger eines Enzymdefektes erhalten werden. Während Zellen heterozygoter Träger von Monomer-Enzymdefekten das normale Enzym infolge eines Gen-Dosis-Effektes in halber Konzentration enthalten (z. B. Uridyl-Gal-1-Ph-Transferase bei der Galactosämie), kann es bei heterozygoten Trägern eines Oligomer-Enzym-Defektes zur Bildung molekularer Hybride kommen (vgl. Abb. 3). Solche Zwischenformen können jedenfalls dann entstehen, wenn normale und mutierte Untereinheiten gleichzeitig synthetisiert und erst in einer zweiten Phase, nach den Gesetzen des Zufalles, zum Oligomer zusammengefügt werden. Anhaltspunkte, dass dies auch für die heterozygoten Träger der Schweizer Akatalasämiefälle zutrifft, konnten kürzlich erhalten werden [11]. Auch dieser Hybridisierungsvorgang lässt sich im Reagensglas imitieren.

Abb. 3: Molekulare Hybridisierung von Oligomer-Enzymen bei heterozygoten Trägern von Enzymdefekten



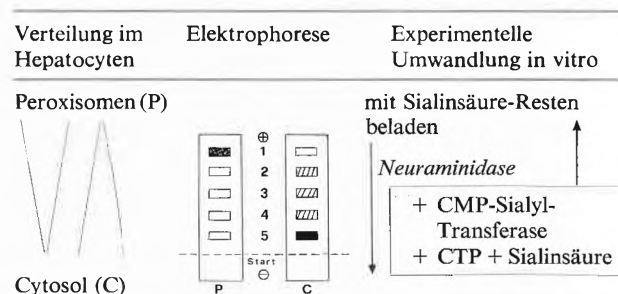
3. Sekundäre Enzym-Modifikationen

Diese Sammelgruppe, die eine Vielzahl von Veränderungsmöglichkeiten umfasst, ist heterogen und schlecht definierbar. Zu ihrer Umschreibung werden vage Begriffe gebraucht, wie z. B. «Metazyme» (als Gegenstück zu Proenzymen), Pseudo-Isoenzyme, post-translationale multiple (oder alternative) Enzymformen. Schränkt man diese Betrachtung auf epigenetisch entstandene Enzym-Modifikationen mit erhaltener katalytischer Aktivität ein, stehen Konformationsänderungen bzw. Substitutionen im Vordergrund. Diese Veränderungen beschränken sich – soweit bekannt – auf gezielt erfolgende Umsetzungen an einzelnen reaktiven Resten. Sie haben indessen oft eine mehr oder weniger starke Änderung der kinetischen Eigenschaften zur Folge. Stehen Konformationsänderungen im Vordergrund, werden diese multiplen Formen der Untergruppe 7 des IUB-Vorschlags (allosterische Modifikationen; Konformere) zugeordnet. Sind diese auf reversible oder irreversible Umsetzungen mit niedermolekularen Partnern zurückzuführen, passen diese eher in die Untergruppe 4 des IUB-Vorschlags (mit anderen Gruppen konjugierte Proteine). Damit wird auch deutlich, dass zwischen Enzymen, die durch reversible Konjugierungsvorgänge reguliert werden (z. B. Phosphorylierung und b: Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung) und den im folgenden beschriebenen Sekundärveränderungen kein prinzipieller Unterschied besteht.

Sekundärveränderungen von Enzymen können auch durch folgende Reaktionen zustande kommen: (a) Selektive Desaminierung, z. B. von Säureamidresten, (b) Abspaltung von Sialinsäure von der Kohlenhydratkomponente des Enzyms; (c) Oxidation von SH-Gruppen (eventuell unter Bildung gemischter Disulfide), (d) limitierte, selektive Proteolyse. Wie am Beispiel der Aldolase A von Kaninchenmuskel gezeigt werden konnte, genügt bei diesem vorerst einheitlichen Tetramer-Enzym der Übergang von Asn 258 in Asp, um im Pherogramm fünf Banden auftreten zu lassen. Die Geschwindigkeit dieses in vitro und in vivo zu beobachtenden «molekularen Alterungsvorganges» ($t_{1/2} \sim 8$ Tage) hängt – wie Modellversuche an Peptiden ergeben haben – vor allem von der Sequenz der benachbarten Aminosäurereste ab. Demgegenüber ist die Heterogenität der Fructose-bisphosphatase aus Kaninchenmuskel auf die Abspaltung eines Peptids am NH_2 -Ende zurückzuführen, wobei diese Kürzung der Hauptpeptidkette zwar keine Aktivitätsabnahme, jedoch eine Änderung des pH-Profiles mit sich bringt (Modifikation A $\rightarrow$ B). Das Mengenverhältnis zwischen den beiden Enzym-Modifikationen A und B verschiebt sich bei längerem Hungern von A nach B; dasselbe lässt sich in vitro durch Inkubieren der Enzymform A mit Papain erreichen.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten der Katalase verschiedener Herkunft. Die Heterogenität der Leberkatalase, wie sie bei Ratte und Maus, nicht aber bei anderen Spezies auftritt, kommt durch den unterschiedlichen Sialinsäuregehalt zustande [12]. Während das in den Peroxisomen vorhandene Enzym mit sauren Resten voll beladen ist und daher in der Elektrophorese einheitlich und rasch wandert, lässt sich die im Cytosol vorhandene Katalase elektrophoretisch in vier bis fünf Banden auftrennen (vgl. Abb. 4). Tracer-Versuche haben gezeigt, dass die peroxisomale Katalase vorwiegend aus frisch synthetisierten Enzymmolekülen besteht, wogegen im Cytosol vor allem die «älteren Jahrgänge» zu finden sind. Diese Sialinsäureabspaltung, in der man so etwas wie den Beginn eines Abbaues erblicken könnte, lässt sich in vitro durch Inkubieren mit Neuraminidase imitieren; in Gegenwart von CMP-Sialyl-Transferase und CTP verläuft der Vorgang im umgekehrten Sinne. Formal analoge Verhältnisse liegen bei der Serum-Cholinesterase vor.

Abb. 4: Pseudo-Isoenzyme der Leber-Katalase (Maus)



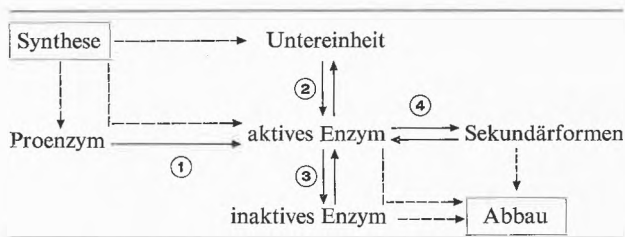
Im Gegensatz zur Leberkatalase ist die Heterogenität der Erythrocytenkatalase im wesentlichen auf eine schrittweise Oxidation von SH-Gruppen zurückzuführen. Jedenfalls können bei durchgehender Anwendung nicht-oxidativer Versuchsbedingungen (N_2 , EDTA, Thiole) Präparate erhalten werden, die bei Titration mit PCMB den theoretischen Wert von 16 freien SH-Gruppen pro Molekül ergeben. Demgegenüber weisen unter oxidativen Bedingungen hergestellte Proben von Katalase nur noch etwa 6 SH-Gruppen pro Molekül auf. Gleichzeitig verschiebt sich der IEP (z. B. bei Erythrocytenkatalase vom Menschen von 6,5 nach 5,2); Elutionsbedingungen und elektrophoretische Mobilität ändern sinngemäss; die spezifische Aktivität bleibt dagegen unverändert. Ein ähnliches Verhalten ist bei der Phosphoglucose-Isomerase aus Kaninchenmuskel zu beobachten. Auch hier besteht eine Interkonvertierbarkeit zweier Enzym-Formen von gleicher Aminosäurezusammensetzung, aber verschiedenem Oxidationszustand der SH-Gruppen. Nichtgenetisch bedingte multiple molekulare Formen können aber auch noch auf andere Weise zustande kommen; so z. B. durch Polymerbildung eines Monomer-Enzyms im Falle der Glutamat-Dehydrogenase (entsprechend der für die Untergruppe 6 des IUB-Vorschlages gegebenen Definition).

Diese wenigen willkürlich herausgegriffenen Beispiele zeigen, dass zwischen den im Organismus normalerweise ablaufenden Umwandlungen und den Enzym-Modifikationen, wie sie bei der Präparation als Artefakt auftreten können, ein offenbar fließender Übergang besteht und somit eine scharfe Trennung beider Erscheinungen in der Praxis oft kaum möglich ist. Dies dürfte vor allem für Enzyme zutreffen, welche auf Grund ihres relativ hohen Gehaltes an freien SH-Gruppen leicht oxidabel sind und die sich im Organismus in einem reduzierenden Milieu befinden (z. B. im Erythrocyten).

Die Existenz von Isoenzymen wurde vor bald zwanzig Jahren nach anfänglichem Zögern zur Kenntnis genommen. Erforderte diese Form der Heterogenität vorerst ein gewisses Umdenken, hat sie in der Folge ein neues, lohnendes Arbeitsfeld eröffnet. Dieses hat sich für die biochemische Genetik (Studium der Enzymvarianten und Polymorphismen), für die Enzym-Biochemie (Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen) und für das Verständnis von Regulationsmechanismen (Variation von Synthese und Abbau bzw. reversible Aktivierung und Inaktivierung von Enzymen) als überaus nützlich und ergiebig erwiesen. Die erhaltenen Befunde haben zur Einsicht geführt, dass Enzyme nicht nur höchst aktive, sondern auch überaus wandelbare Gebilde sind, und dass es auch bei den Enzymen so etwas wie einen molekularen «Lebenszyklus» gibt (Abb. 5). Wesen und Leistungsfähigkeit biologischer Anpassungsvorgänge beruhen nicht zuletzt darauf, dass Synthese- und Abbaugeschwindigkeit von Enzymen völlig unabhängig voneinander und in einem relativ

breiten Bereich variiert werden können. Für die praktische Arbeit ergibt sich die Forderung, dass Sekundärveränderungen mit Sicherheit ausgeschlossen werden müssen, bevor eine beobachtete Heterogenität als genetisch determiniert angesehen werden darf. Dabei muss man sich im klaren sein, dass zahlreiche Mutationseignisse sich dem Nachweis mit üblichen Methoden entziehen, weil die betreffenden Aminosäuresubstitutionen auf die elektrophoretische Beweglichkeit keinen Einfluss haben. Je nach Geschwindigkeit und Reversibilität der sich in vivo (oder in vitro) abspielenden Sekundärveränderungen imponieren diese als Regulationsmechanismus, Alterungsvorgang, erste Stufe der Enzyminaktivierung oder als eigentlicher Artefakt.

Abb. 5: Modifikationsmöglichkeiten bei Enzymen



- ① Bildung des aktiven Enzyms durch Proteolyse (z. B. Pepsinogen → Pepsin)
- ② Bildung durch Monomer-Kombination (z. B. Katalase, LDH, ADH)
- ③ Regulation durch reversible Inaktivierung (z. B. Phosphorylase, Glykogensynthetase)
- ④ Gleichgewicht zwischen mehreren aktiven Formen (z. B. Glucosephosphat-Isomerase)

Auch die heutige Enzymforschung ist – gleich wie die Biologie als Ganzes – geprägt durch einen Dualismus in der Zielsetzung: Einerseits ist sie auf der Suche nach dem Gemeinsamen und Allgemeingültigen bestrebt, die Gesetzmässigkeiten und Prinzipien der Enzym-Wirkung noch besser zu erkennen und zu verstehen. Andererseits hat gerade die Suche nach Ausnahmen und das Studium von Abweichungen neue wesentliche Einblicke in die Wandelbarkeit der Enzymproteine gegeben. Die Entdeckung von Enzymvarianten in zunehmender Zahl hat zum besseren Verständnis der biochemischen Individualität und der Evolutionsvorgänge auf molekularer Ebene geführt. Das Konzept der Isoenzyme – einst Ausnahme, heute nahezu die Regel – hat ein Höchstmass an Spezialisierung und ein fortlaufendes Anpassen an veränderte Bedingungen eigentlich erst möglich gemacht.

Die in diesem Beitrag erwähnten Arbeiten über die Erythrocyten-Katalase wurden mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ausgeführt (Projekte Nr. 3.846-72 bzw. 3.384-74). Für wertvolle Mithilfe bei der Abfassung des Manuskriptes sei Fräulein Sonja R. Wyss herzlich gedankt.

Literaturverzeichnis

- 1 Isozymes, Band I: Molecular Structure, herausgegeben von C.I. Markert, Academic Press, New York 1975.
- 2 C.J. Masters und R.S. Holmes: Adv. in Comp. Physiol. & Biochem. 5 (1974) 109.
- 3 M.M. Ris, R.A. Deitrich und J.-P. von Wartburg: Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 1865.
- 4 H. Aebi und R. Richterich: Helv. Med. Acta 30 (1963) 353.
- 5 A. Burger, R. Richterich und H. Aebi: Biochem. Z. 339 (1964) 305.
- 6 H. M. Eppenberger, M. Eberhardt, R. Richterich und H. Aebi: Developmental Biol. 10 (1964) 1.
- 7 J.-P. von Wartburg, J. Papenberg und H. Aebi: Can. J. Biochem. 43 (1965) 889.
- 8 D. Berger, M. Berger und J.-P. von Wartburg: Eur. J. Biochem. 50 (1974) 215.
- 9 H. Aebi und H. Suter: Acatalasemia, in Adv. in Human Genetics 2 (1971) 143.
- 10 H. Aebi, S. R. Wyss, B. Scherz und F. Skvaril: Eur. J. Biochem. 48 (1974) 109.
- 11 S. R. Wyss und H. Aebi: Enzyme 20 (1975) 257.
- 12 G. L. Jones und C. J. Masters: Arch. Biochem. & Biophys. 169 (1975) 7.