

# Biochemie Zusammenfassung

## 1. Vorlesung:

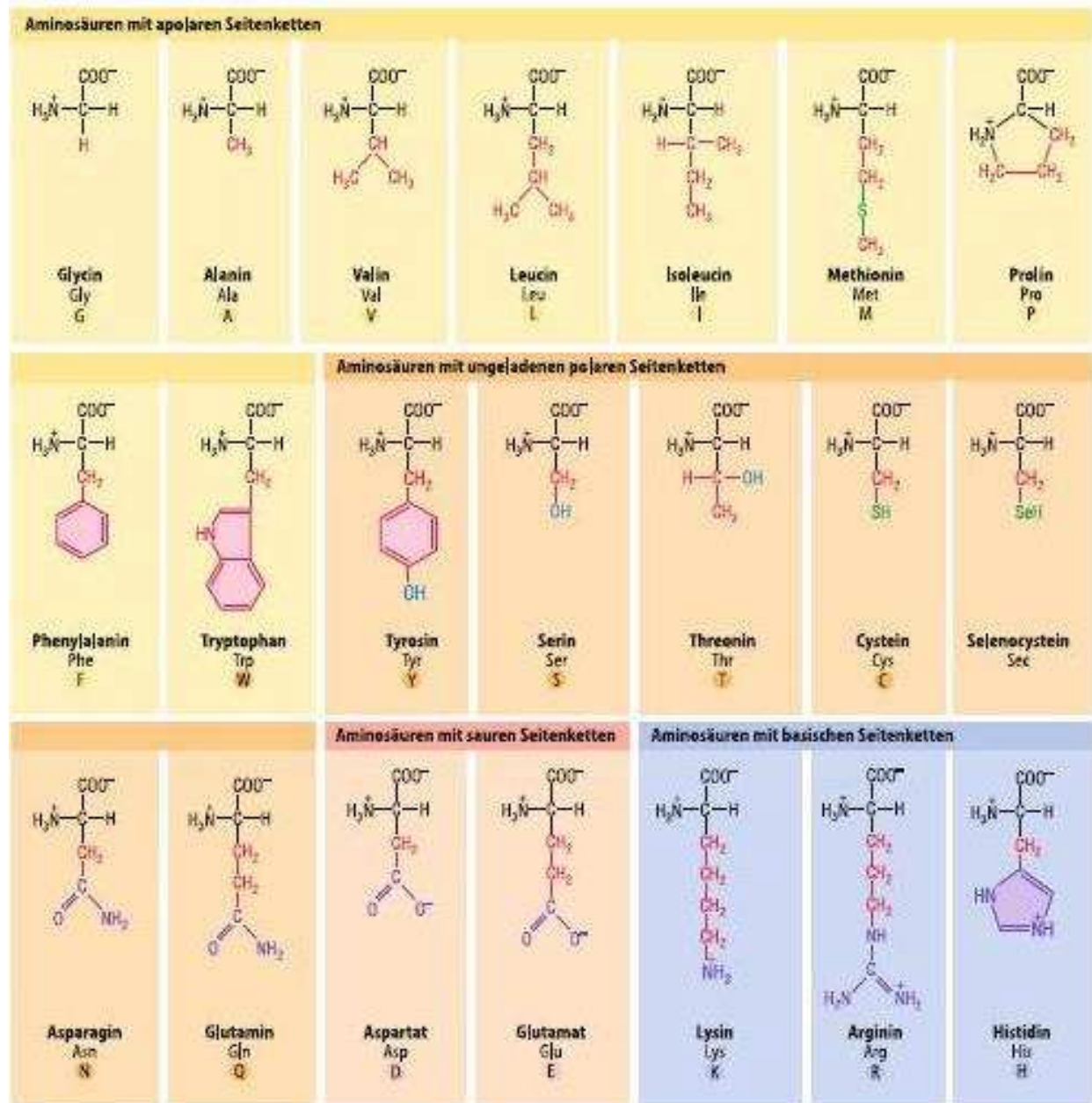


Abb. 2.2 Die proteinogenen Aminosäuren. Die Aminosäuren sind nach den chemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten geordnet. Unter den Formeln stehen jeweils die Trivialnamen sowie die 3- und 1-Buchstaben-Abkürzungen

Tabelle: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

- **20 proteinogene Aminosäuren:** Pflanzen und Bakterien können diese selber herstellen,
- **essentielle Aminosäuren:** Tiere und Menschen können nur 11 AS selbst herstellen, die restlichen Aminosäuren müssen über die Nahrung aufgenommen werden und heißen essentielle Aminosäuren  
**Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Valin**
- **amphotere Substanzen:** Freie Aminosäuren sind amphotere Substanzen: Ihre Ladung ist pH-abhängig  
→ im Sauren bildet sich das Kation (Aminogruppe positiv, Carboxylgruppe gar nicht geladen), im neutralen das Zwitterion, im Basischen das Anion
- **α-L-Aminosäuren:** Proteine sind Polymere aus α-L-Aminosäuren

- **Isoelektrischer Punkt (pI):** Der pH-Wert, bei dem die AS keine Nettoladung trägt  
 $pI = (pK_1 + pK_2) / 2$   
 In der Titrationskurve ist der pI genau in der Mitte
- **optisch aktiv:** Aminosäuren sind optisch aktiv, drehen das polarisierte Licht
- chirale Verbindungen: durch Louis Pasteur entdeckt
- **Stereoisomerie:** gleiche Strukturformel, gleiche Verkettung der Atome aber unterschiedliche räumliche Anordnung
- D-/L-Nomenklatur: alle proteinogenen Aminosäuren L-Konfiguration,
- R-/S-Nomenklatur: nach Cahn-Ingold-Prelog: alle proteinogenen Aminosäuren S-Konfiguration außer Cys (R-Konfiguration)

Hydrophobe/apolare Aminosäuren:

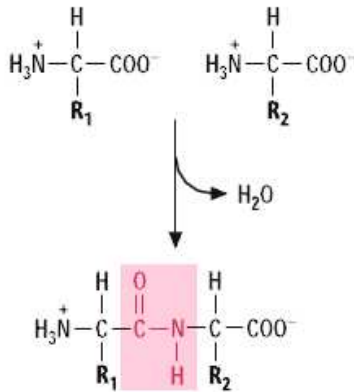
### FAMILY-VW

- **pK<sub>a</sub>-Werte** der Seitenkette:
  - spielen wichtige Rolle bei der Säure-Base-Katalyse
  - pK<sub>a</sub> jedoch stark umgebungsabhängig
  - Asp Katalyse bei der HIV-Protease
  - Ser, Nukleophil bei Serin-Proteasen (pK<sub>a</sub> von Methanol ungefähr 16)
  - Insulin-Hexamerkristalle lösen sich bei pH>6 auf
  - Asp:3,9; Glu:4,3 (induktiver Effekt der zusätzlichen CH<sub>2</sub>-Gruppe)
  - His: 6,0; Cys:8,3, Tyr: 10,1; Lys:10,5; Arg:12,5
  - pK<sub>a</sub> Carboxylatgruppe = 2,5
  - pK<sub>a</sub> Aminogruppe = 4,6
- Aminosäuren können **Wasserstoffbrücken** ausbilden: dabei ist NH-Gruppe Wasserstoffdonator und Carbonylgruppe Wasserstoffakzeptor (besonders in der Polypeptidkette)
- **Disulfidbrücken:** Querverbindungen, die durch Oxidation von zwei Cysteinresten entstehen (Voraussetzung ist eine oxidative Umgebung), kommen besonders in extrazellulären Proteinen vor
- **Spezielle Eigenschaften:**
  - Thr, Ile besitzen 2. asymmetrisches Zentrum (2S,3R)-Threonin
  - Gly, Pro Extrakonfigurationen, sekundäres Amin
  - Cys Möglichkeit zur Quervernetzung -> Bildung von Disulfidbrücken
- Wichtigkeit der unterschiedlichen Eigenschaften: Katalyse, Faltung, Stabilität
- **Warum genau 20 Aminosäuren?:**
  - Vielfältige Eigenschaften -> verschiedenste Funktionen
  - Aminosäuren standen aus präbiotischen Reaktionen zur Verfügung
  - Mögliche andere Aminosäuren waren zu reaktiv
- **Warum L-Aminosäuren:** nicht genügend geklärt, aber wahrscheinlich zufällig, einmal geschehen war es sehr schnell in der Evolution festgelegt

## 2. Vorlesung: (Peptidbindung, Struktur(-elemente))

- **modifizierte Aminosäuren** z.B. Hydroxyprolin,  $\gamma$ -Carboxyglutamat, Phosphotyrosin haben spezielle Rollen wie Signalkaskaden, Blutgerinnung, (Kollagen, Epigenetics)
- **abgewandelte Aminosäuren:** spielen Rolle bei der Nervenleitung (z.B. GABA, Histamin)

### Peptidbindung:



- Proteine=Polymere von Aminosäuren
- Chemische Verknüpfung der Bausteine=Peptidbindung
- **Energetik der Peptidbindung:**
  - chemisches Gleichgewicht liegt auf der Seite der freien Aminosäuren
    - Energie muss aufgebracht werden
    - Die Aminosäuren müssen aktiviert werden
- **Aktivierung** der Aminosäuren:
  - am Ribosom: Aminoacyl-tRNA (am 3'OH-Ende)
  - vorher: Adenylierung: Aminoacyladenylat

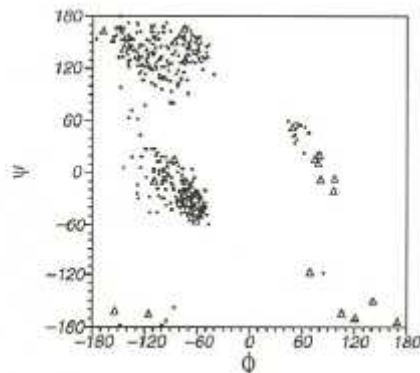
### Eigenschaften der Peptidbindung:

- Peptidbindung hat **Doppelbindungscharakter**, was sich durch die Messung der Bindungslängen zeigt: C-N Bindung kürzer als erwartet und C=O Bindung länger als erwartet (40% Doppelbindungscharakter)
- Bindung ist **Resonanzstabilisiert** -> wird am besten durch Grenzformeln beschrieben (Resonanzstabilisierung etwa 20kcal/mol)
- Bindung ist **planar**
  - zwei mögliche **Konformationen**: cis- und trans-Konformation
    - nahezu immer **trans-Konfiguration** ( $\alpha$ -C-Atome auf unterschiedlichen Seiten der Peptidbindung) -> weniger sterische Kollision
    - **cis-peptidische** Bindungen kommen vor, wenn Pro C-terminal, da N-Atom im **Prolin** an zwei tetraedische C-Atome gebunden ist -> geringere Präferenz für trans-Konformation, Gleichgewichtskonstante ist identisch jedoch ist die Aktivierungsenergie nicht so hoch (cis-trans Isomerisierung durch Prolylisomerasen)
  - Rotation um die Peptidbindung verhindert
- Einzige Rotationsfreiheit entlang der Proteinkette sind die Diederwinkel, Dihedralwinkel Phi  $\Phi$  und Psi  $\Psi$  (Torsionswinkel)

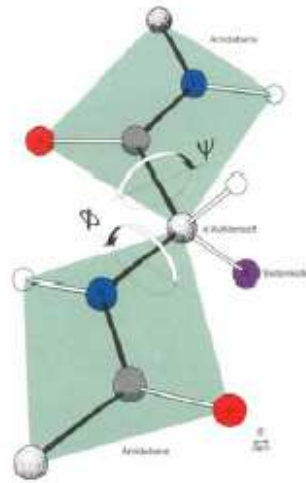
### Diederwinkel/Torsionswinkel:

- **phi  $\Phi$** : Rotationswinkel um die Bindung zwischen dem Stickstoffatom und dem  $\alpha$ -Kohlenstoff-Atom
- **psi  $\Psi$** : Rotationswinkel um die Bindung zwischen dem  $\alpha$ -Kohlenstoff-Atom und dem Carbonylkohlenstoffatom
- Faltung der Hauptkette ist allein von phi und psi abhängig
- Struktur der Hauptkette kann im **Ramachandran-Diagramm** festgehalten werden
- Nicht alle phi, psi-Kombinationen sind möglich
  - ➔ erlaubte und nicht erlaubte Bereiche im Ramachandranplot (durch sterischen Ausschluss, also die Tatsache dass zwei Atome nicht gleichzeitig den gleichen Raum einnehmen können)
  - ➔ Zahl der möglichen Strukturen für die Peptidfaltung eingeschränkt

### *Ramachandranplot:*



### *Torsionswinkel:*



### **Primärstruktur:**

- Sequenz eines Proteins
- Vereinbarungsgemäß vom N-Terminus (links) zum C-Terminus (rechts) (man kann Reihenfolge nicht einfach umdrehen)

### **Sekundärstruktur:**

- lokale Faltung der Hauptkette ohne Einfluss der Seitenketten
- Stabilisierung über Wasserstoffbrücken entlang der Hauptkette
- $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblattstränge,  $\beta$ -Turns

### **$\alpha$ -Helix:**

- rechtsgängig (energetisch günstiger, stabilisiert über H-Brücken) (Drehsinn: wie dreht sie sich, wenn man entlang der Achse guckt, vom Betrachter weg)
- 3,6 Aminosäurereste pro Windung  $\rightarrow$  Aminosäuren die 3-4 Reste voneinander entfernt liegen sind in unmittelbarer räumlicher Nähe
- die C=O-Gruppe einer Aminosäure  $i$  bildet eine Wasserstoffbrücke mit der N-H-Gruppe der Aminosäure  $i+4$
- Reste R zeigen nach außen
- $\alpha$ -Helices besitzen ein Dipolmoment  $\rightarrow$  Stabilisierung negativer Ladung am N-Terminus

### **β-Faltblatt:**

- Polypeptidketten innerhalb eines β-Faltblatts, die β-Stränge liegen fast völlig ausgestreckt vor
- Die Seitenketten benachbarter Aminosäuren weisen in unterschiedliche Richtungen
- **Paralleles β-Faltblatt:** benachbarte Stränge weisen die gleiche Richtung auf
  - jede AS auf einem Strang mit zwei AS auf dem anderen Strang verbunden
  - Trapezförmig
- **antiparalleles β-Faltblatt:** entgegengesetzte Laufrichtung benachbarter Stränge
  - Wasserstoffbrückenbindungen zwischen NH- und CO-Gruppen
  - Jede AS ist mit einer anderen Aminosäure verbunden
  - Paralleles Muster
- Länge: im Mittelwert 6 Reste entspricht  $6 \times 3,3 \text{Å} = 20 \text{Å}$  Länge
- Anzahl an Strängen: 4-6 Stränge, Separierung =  $4,5 \text{Å}$  →  $25 \text{Å}$  breit
- Dimension entspricht ungefähr der Struktur eines 100-200 Reste langen Proteins
  
- Twist von β-Faltblättern: rechtsgängig

### **Supersekundärstruktur:**

Verknüpfung von Sekundärstrukturen

- alpha-alpha: coiled-coils, zwei um sich schlängelnde Helices, eigene Gesetzmäßigkeiten, dann linksgängig, sehr stabil (z.B. α-Keratin der Haare)
- beta-beta: hairpin β motif: Kehre eines β-Stranges → Stabilität durch Wasserstoffbrückenbindungen

### **Domänen:**

- Polypeptidkette zu kompakten Bereichen gefaltet (30-400 AS)
- z.B. extrazellulärer Teil eines Zelloberflächenproteins enthält 4 Domänen, an die das HIV-Virus binden kann

### **Tertiärstruktur:**

- räumliche Faltung einer vollständigen Polypeptidkette
- Seitenketten spielen wichtige Rolle
- Seitenketten sind im Inneren so orientiert, dass eine fast optimale Raumerfüllung entsteht
- Allgemein: hydrophobe Seitenketten nach innen, hydrophile nach außen
- Hauptkette im unpolaren Teil bildet Wasserstoffbrückenbindungen
- Ausnahme: Proteine in hydrophober Umgebung wie Membranproteine. Sie müssen hydrophobe Gruppe außen, damit WW mit Umgebung möglich
- CATH: Klassifizierung von Tertiärstrukturen (Class, Architecture, Topologie, Homologie) Klassen: alpha, beta, alpha und beta
- Ungefähr 1000 Faltungen zu erwarten, 30000 unterschiedliche humane Gene

### **Quartiärstruktur:**

- Proteine, die aus mehreren Polypeptidketten bestehen
- Die Polypeptidketten bezeichnet man als Untereinheiten#
- Quartiärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung und die Art der WW untereinander
- Oft: symmetrische Anordnung, z.B. Dimer, Trimer, Tetramer...

### **Oligomere Proteine bilden oft symmetrische Anordnung:**

- verhindern dass Polymere gebildet werden
- Kontakte zwischen den Ketten sind gleich → günstige Kontakte treten wiederholt auf

- Fehlerhafte Ketten können einfach ausgetauscht werden
- Oligomerisierung erniedrigt den osmotischen Druck
- Komplizierte Regulation möglich: Kontrolle durch Allosterie

### 3. Vorlesung (Wechselwirkungen, Faltung, Polymere, Krankheiten)

#### **Wasserstoffbrücken:**

- D-H A ... Ein Wasserstoffdonator und ein Wasserstoffakzeptor
- Distanz von D zu H 2,7 und 3,5 Å

#### **Van der Waals WW:**

- anziehend Dispersionskräfte: Anziehung zwischen Atomen
- abstoßend: Kugelmodell, abhängig von den Radien der Atome

#### **Elektrostatische Wechselwirkung, ionische Wechselwirkung:**

- Coulomb-Gesetz: Gleiche Ladungen stoßen sich ab, entgegengesetzte Ladungen ziehen sich an z.B. Salzbrücken in Kristallen

#### **Hydrophober Effekt: -> Fetttropfenbildung**

- entropiegetriebener Effekt, bevorzugt hydrophobe Seitenketten im Inneren
- Tröpfchenbildung setzt Wasser frei, welches sonst zur Solvatisierung notwendig ist
- Faltung an sich ist auch Entropieänderung

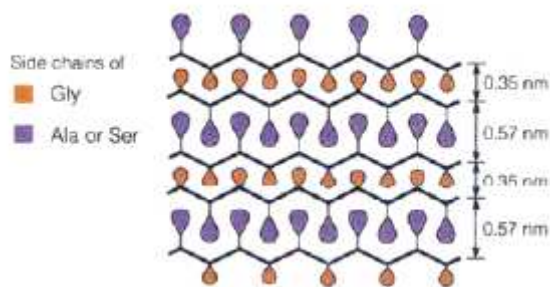
#### **Disulfidbrücken:**

- einzige kovalente Bindungen, die bei der Proteinfaltung verknüpft werden können

#### **Sekundärstrukturen in Reinform:**

##### **Seidenfibroin ( $\beta$ -Faltblatt) (Spinnen und Insekten)**

- repetitive Sequenz: Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala
- packing in  $\beta$ -Faltblättern -> eine Seite Ala (oder Ser) andere Seite Gly
- Packung der Faltblätter Gly zu Gly, Ala zu Ala
- Muster mit Abständen 5,7 Å, 3,5 Å
- Keine starre Packung, da nur über VdW WW gehalten
- Keine Wasserstoffbrücken zwischen Faltblättern
- Wasserstoffbrücken zwischen Faltblattsträngen



##### **$\alpha$ -Keratin ( $\alpha$ -Helix) in Haar, Horn, Nägeln, Federn**

- Hauptprotein von Haaren, Fingernägeln, etc. (Intermediate Filament Proteine)
- Moleküle 300 Reste lang
- 2 rechtsgängige  $\alpha$ -Helices sind zu einer linksgängigen Superhelix verdrillt (coiled-coils)
- Assoziation mehrerer dieser coiled-coils
  - ➔ Bildung von Proto-Fibrillen, Proto-Filamenten
- Reich an Cysteinen -> Disulfidbrücken, Quervernetzung durch Cysteine



## **Kollagen**

- eines der Hauptproteine des menschlichen Körpers
- Kollagen gebildet aus Tropokollagen=Trippelhelix
- Trippelhelix besteht aus drei Monomeren mit repetitiven Sequenzen
- Repetitive Sequenzen: Gly-Pro-Pro(Hydroxy-Pro)
- Die einzelnen Ketten bilden linksgängige Helix (keine  $\alpha$ -Helix, keine H-Brücken innerhalb eines Stranges, Stabilität durch Abstoßung der Pyrrolidonringe)
- Gesamtkette ist rechtsgängig
- Nur möglich weil Glycin im Zentrum (hat keine Seitenkette und hat dadurch als einzige AS im Zentrum Platz)
- Hydroxylgruppen der Hydroxyprolinreste sind an der Bindung von Wasserstoffbrücken beteiligt -> Stabilitätsfunktion

## **Vitamin C und Skorbut**

- Prolylhydroxylase katalysiert die Bildung von Hydroxyprolin aus Prolin
- Vitamin C reduziert das Eisenion des inaktivierten Enzyms
  - bei Vitamin C Mangel wird kein Hydroxyprolin gebildet
  - keine Stabilisierung der Tripelhelix
  - fehlerhaft ausgebildete Fasern
  - Kollagen kann Funktion als Strukturprotein nicht nachkommen

## **Wie entsteht 3D-Struktur eines Proteins?**

### **Afinsen-Experiment:**

- Denaturierung von Proteinen durch chaotrope Reagenzien: Harnstoff, Guanidiniumchlorid oder durch Hitze, Kälte, Säure, SDS kann auch irreversibel sein
  - Proteine nehmen zufällige Knäuelformation an (random-coil) ohne jegliche enzymatische Aktivität
- spontane Faltung des Proteins nach Entfernung der Reagenzien
  - die Information zur Faltung ist in der Sequenz enthalten

### **Levinthal Paradoxon:**

- ausprobieren aller möglicher Faltungen dauert zu lange
  - es müssen detaillierte Faltungswege existieren (Zwischenstufen)
  - Trichtermodell der Proteinfaltung: lokale Faltungen können entstehen, anfangs breites Spektrum an möglichen Strukturen, freie Enthalpie nimmt ab, immer weniger Konformationen möglich
- Beschreibung nach Ken Dill: Faltungsweg kann vielfältig sein, Einheitliche Darstellung der Faltung
- Bekannte langsame Schritte der Faltung: Prolin-Isomerisation, Disulfidbrückenbildung

### **Krankheiten, die durch Proteinfehlfaltungen entstehen:**

- BSE: durch Prionen übertragen, Aggregate bilden sich (amyloid-Erkrankungen)
- Grund für die Fehlfaltung kann auch Gendefekt sein: z.B. Sichelzellenanämie, Mukoviszidose

### **Bedeutung von Chaperons/Chaperonins:**

- 20% der Proteine falten nicht spontan, sondern benötigen Hilfe: Chaperone
- wirken durch Anlagerung (auch bekannt als Hitzeschockproteine)
- bilden hydrophobe Schutzkapsel
- Vermeidung von hydrophoben Interaktionen (Verknäulung zu Aggregaten)

## Unterscheidung von Proteinen und Polymeren (aus der organischen Chemie)

	<u>Proteine</u>	<u>Polymere – Organische Chemie</u>
<u>Größe:</u>	Definierte Länge	Statistische Verteilung um Mittelwert
<u>Zusammensetzung/Sequenz</u>	Fest vorgegebene Sequenz	Statistischer Einbau von Bausteinen
<u>Vernetzung</u>	Lineares Polymer (Vernetzung nur über S-S)	Kann linear oder vernetzt sein
<u>3D-Struktur</u>	Definierte Struktur Überwiegend kooperative Auffaltung	Knäuelstrukturen == Feststoffe, vermutlich keine kooperative Auffaltung
<u>Bausteine</u>	20 verschiedene Bausteine	Beliebige Möglichkeiten
<u>Vielfalt</u>	?	„Anzahl der Chemiker“

### zur Vielfalt der Proteine:

wie viele Möglichkeiten aus 20 Aminosäuren unterschiedliche Proteine herzustellen?

$20^n$  Varianten, bei einer Länge von 400AS  $\rightarrow 20^{400} = 10^{520}$  Möglichkeiten

### wichtige Zahlen:

- Länge: 300-600 AS Länge, Festlegung auf DNA-Ebene
- Mittleres Molekulargewicht: 110Da pro AS  $\rightarrow$  33-66kDa

#### 4. Vorlesung: (Methoden in der Biochemie, Enzymkinetik)

photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen/Proteingemischen

- nach Lambert Beerschem Gesetz:  $A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon_{280} * c * d$
- Absorption bei 280nm=hauptsächlich verursacht durch Tyr, Trp, Cys, (Phe)

Native Trennung von Proteinen/Proteingemischen:

- Zentrifugation
- Chromatographie

Analytische/ nicht native Trennung von Proteinen/Proteingemischen

- SDS-PAGE
- IEF
- Massenspektroskopie

**Zentrifugation:**

$$v = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)g}{18\eta}$$

g: relative Zentrifugalbeschleunigung  $g = \omega^2 * r / 981$

- **Sedimentationszentrifugation:** Trennung nach Sedimentationsgeschwindigkeit
- **Sukrosegradient-Zentrifugation:** Dichtegradient (eignet sich zur Trennung von Organellen), CsCl-Gradient
- **Gleichgewichtszentrifugation:** Untersuchung von Oligomerisierung, unterschiedliche Wahrscheinlichkeit Partikel in unterschiedlicher Höhe zu finden

**Chromatographische Methoden:**

Unterschiedliche Proteine wechselwirken unterschiedlich mit dem Trägermaterial

- es kommt zur Retardierung
- unterschiedlicher Zeitpunkt der Elution
- Unterschiedliche *Eigenschaften*, die ausgenutzt werden:
- **Größe** -> **Gelfiltrationschromatographie** (große Moleküle passieren die Säule schneller, weil ihnen nur ein kleineres Volumen zugänglich ist)
- **Ladung** -> **Ionenaustauschchromatographie**
- **Affinität zu anderen Molekülen** -> **Affinitätschromatographie** (z.B. Glucosereste an Säule -> Glucosebindende heften sich an. Können durch Zugabe von hochkonzentrierter Glucoselösung eluiert werden)

**Analytische Trennung von Proteingemischen (nicht native Trennung)**

**SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

- Gel: Polyacrylamid-Gel, quervernetzt mit Methylen-Bisacrylamid; Radikalreaktion: Polymerisation mit Ammoniumperoxodisulfat; Radikalstarter: TEMED
- 1.) Zugabe von SDS -> Denaturierung -> Anlagerung
  - gleichmäßige negative Ladung, da je ein SDS-Molekül pro 2 Aminosäuren
  - Wanderungsgeschwindigkeit jetzt nur noch von Masse abhängig (da Ladung auch von Masse abhängig)
- Zugabe von Mercaptoethanol
  - Reduktion der Disulfidbrücken

- 2.) Anlegen einer Spannung, Proteine (im Komplex mit SDS) wandern zur Anode
- 3.) Detektion: Anfärben mit Coomassie-Blau - 2µg Protein können nachgewiesen werden  
Sonst Autoradiographie oder Blotten (Anfärben mit Antikörpern)
- 4.) Auswertung: Logarithmus der Masse ist linear zur relativen Mobilität

### **Diskontinuierliche Elektrophorese:**

- Trenngel mit Sammelgel überschichtet
- Sammelgel: Fokussierung der Banden (geringe Quervernetzung, weitporig)
- Aufbau von Feldern zwischen Leitonen und Folgeionen  
→ Stapelung der Proteine

### **IEF: Isoelektrische Fokussierung**

- Trennung nach der nativen Ladung der Proteine
- pH-Gradient im Gel  
→ Proteine wandern bis pH-Wert des Gels ihrem pI entspricht  
(Isoelektrischer Punkt = pH-Wert, an dem die Nettoladung des Proteins=0 ist)
- Acrylamid-Gel oder Agarose-Gel verwendet

### **2D-Gelelektrophorese:**

- Kombination von IEF und SDS-PAGE
- Erst horizontal Auftrennung nach pI und dann vertikale Auftrennung nach der Größe
- Untersuchung von unterschiedlichen Proteomen bei gesunden und kranken Zellen
- Spots können ausgeschnitten und über Massenspektroskopie sequenziert und identifiziert werden

### **Massenspektroskopie:**

- MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation)-(Time of flight)
- Durch Laser werden Moleküle aus der Oberfläche herausgeschleudert und dann wird die Flugzeit bestimmt. Durch die Messung der Beschleunigung lässt sich die Masse bei bekannter Kraft ermitteln

### **ENZYME**

- Beschleunigung um Faktor  $10^5$ - $10^7$
- 1000x besser als chemische Katalyse
- Grenze=Diffusionskontrolle
- Bemerkenswerte: milde Reaktionsbedingungen, wässrige Lösungen, ohne giftige Zwischenstufen

### **Prinzip der Katalyse:**

- Herabsetzung der Aktivierungsenergie
- Geschwindigkeitskonstante ist eine Funktion der Aktivierungsenergie
- Gleichgewicht der chemischen Umsetzung ist eine Funktion von  $\Delta G$
- Katalyse -> Geschwindigkeit wird erhöht

### **Wie kann man die Aktivierungsenergie herabsetzen?**

- Stabilisieren des Übergangszustands
- Komplementarität der Struktur des Aktiven Zentrums zum ÜZ

### **Warum sind Enzyme so effiziente Katalysatoren:**

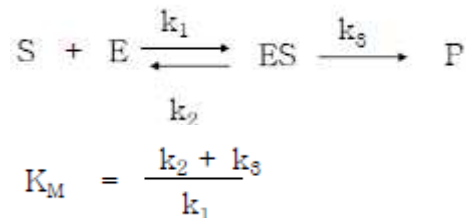
- 1.) hochspezifische Bindung der Substrate
- 2.) Bindung der Substrate in unmittelbarer Nachbarschaft (hohe effektive Konzentration)

- 3.) Bindung der Substrate in korrekter Orientierung
- 4.) Bereitstellung der funktionellen Gruppe (z.B. Säure-Base-Katalyse)
- 5.) Ausbildung von kovalenten Enzym-Substrat-Zwischenprodukten (Energie der chemischen Bindung kann gespeichert werden)
- 6.) Bevorzugte Bindung des ÜZ – Schlüssel-Schloss-Prinzip
- 7.) Zum Teil auch induced-Fit-Mechanismus

### Typen von Enzymen:

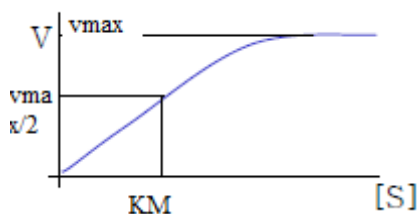
- 1.) Oxidoreduktasen
- 2.) Transferasen
- 3.) Hydrolasen
- 4.) Lyasen
- 5.) Isomerasen
- 6.) Ligasen

### Michaelis-Menten-Formalismus



### Michaelis-Menten-Kinetik:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$



Maximum ist  $v_{\max}$

$K_M$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht.

$$[S] \ll K_M \rightarrow v = k_3 \cdot [S] / K_M$$

linearer Anstieg der Geschwindigkeit mit der Substratkonzentration

$$[S] \gg K_M \rightarrow v = k_3 \rightarrow P = k_3 \cdot [E_0]$$

Geschwindigkeit ist nahezu unabhängig von  $[S]$  und hat ihren maximalen Wert erreicht.

$k_3$  wird auch Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  eines Enzyms genannt.

- Wechselzahl: Anzahl an Substratmolekülen, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden
- $k_{\text{cat}}/K_M$  ist ein Maß für die Effizienz des Enzyms. Der Wert wird durch  $k_1$  begrenzt. Die Geschwindigkeit kann nicht größer werden, als die Geschwindigkeit der diffusionskontrollierten Begegnung von Enzym und Substrat

## 5. Vorlesung: (Enzymkinetik, Serinproteasen)

### Umsatzraten einer Enzymreaktion steigern durch:

- Erhöhung der Enzymkonzentration (immer)
- Erhöhung der Substratkonzentration (nur unterhalb der Sättigung)

### Bedeutung von $K_M$ :

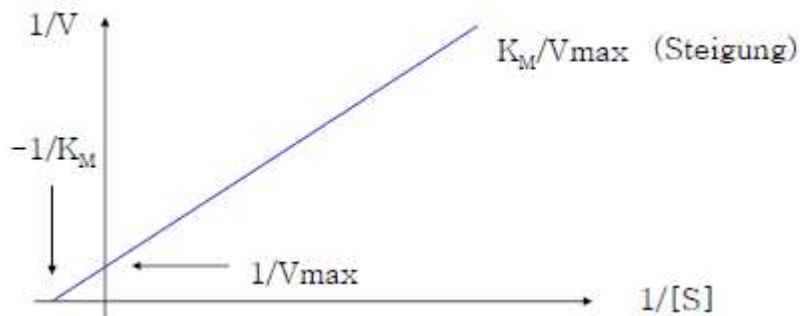
- $K_M$  ist ein Maß für die Affinität von Substrat und Enzym
- Je kleiner  $K_M$ , desto affiner ist das Substrat zum Enzym
- Bei  $v = v_{max}/2$  gilt:  $K_M = [S]$

### Bedeutung von $k_{cat}$ :

- Wechselzahl eines Enzyms oder spezifische Aktivität Unit/mg

### Experimentelle Bestimmung:

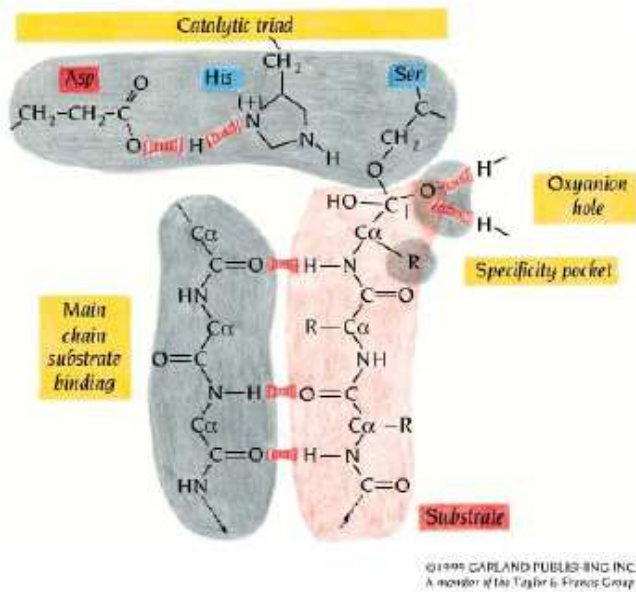
- doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk
- Problem: große Fehler, da Messwerte bei messbaren  $[S]$ -Konzentrationen zusammenschrumpfen



## Serinproteasen

### Bedeutung der Proteasen

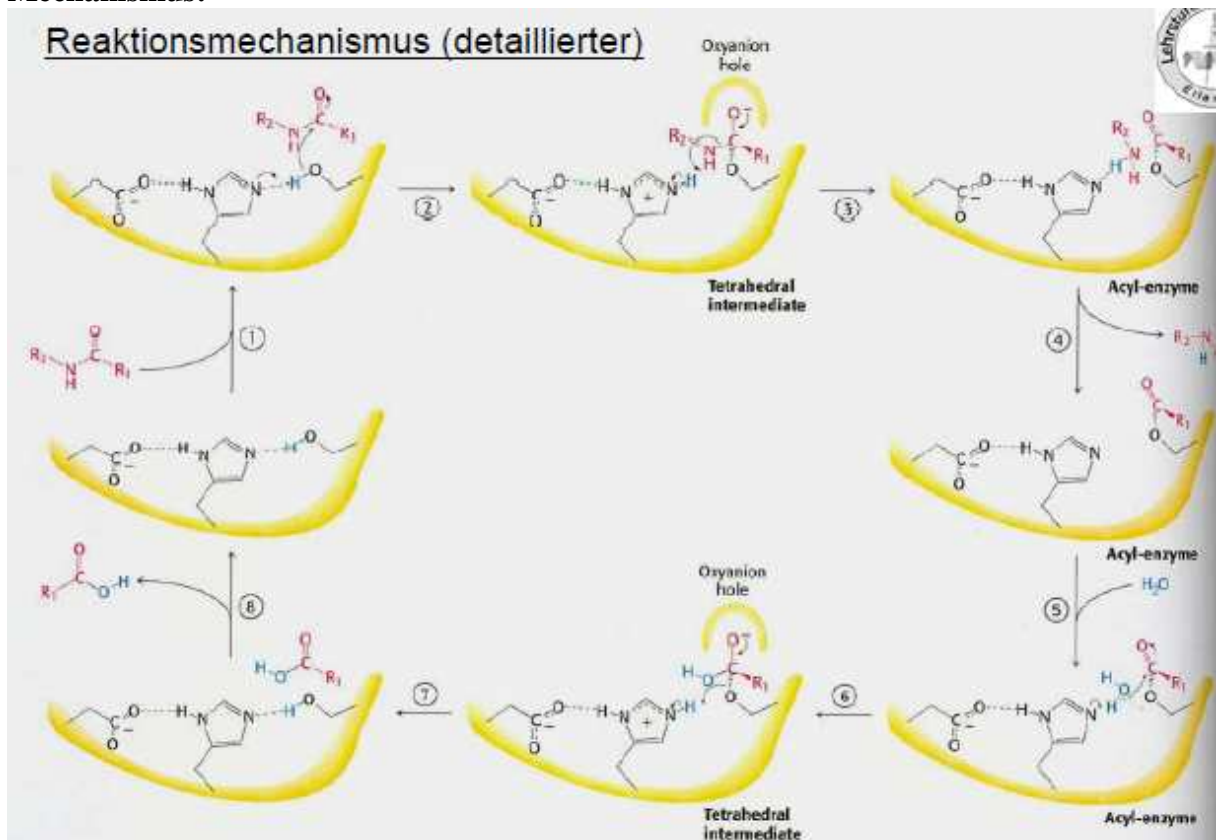
- wichtige Zielmoleküle der pharmazeutischen Forschung
- Gebiete: virale Infektionen (HIV-Protease), Blutgerinnung (Thrombin, Faktor VII), Krebs (Metalloproteasen), Zelltod (Caspasen)
- Bedeutende Familie : Serinproteasen  
Trypsin-Chymotrypsin-Familie der Proteasen



### Hauptfeatures:

- katalytische Triade (Ser, His, Asp)
- Oxy-Anion-Hole
- Spezifitätstasche
- Unspezifische Hauptketten-Wechselwirkungen mit dem Substrat

### Mechanismus:



- 1.) Substratbindung
- 2.) Nucleophiler Angriff des Sauerstoffatoms in der Seitenkette von Ser195 auf das Carbonylkohlenstoffatom
- 3.) Entstehung des tetraedischen Zwischenproduktes (vorher planar)  
Oxyaniontasche stabilisiert negative Ladung am Sauerstoff
- 4.) Zerfall des Zwischenproduktes, Entstehung des Acyl-Enzyms  
Aminogruppe kann sich vom Enzym lösen
- 5.) Einbau von Wasser, wo vorher Aminogruppe war
- 6.) Bildung von tetraedischem Zwischenprodukt, da Histidin ein Proton entzieht
- 7.) Zerfall der Struktur, Bildung eines Carbonsäureprodukts
- 8.) Freisetzung des Carbonsäureprodukts

### Wichtigste Punkte:

- tetraedischer Übergangszustand, Stabilisierung über Oxyanion-hole
- Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates
- Rolle der katalytischen Triade: Umwandlung von Ser195 in ein starkes Nucleophil

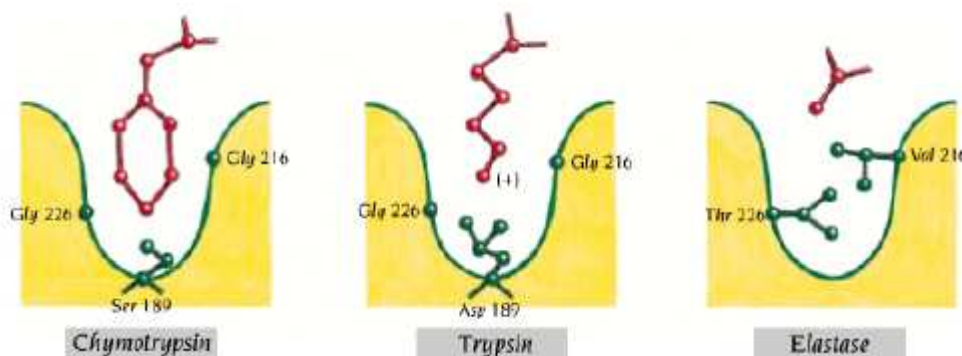
### Oxyanion-Hole:

- Funktion: bindet den tetraedischen Übergangszustand
- Entspricht allgemeinem Prinzip der Katalyse
- Absenkung der Aktivierungsenergie durch günstige Wechselwirkungen mit dem Übergangszustand

### Spezifitätstasche:

- Bindung der zu spaltenden Peptide über sequenzspezifische Wechselwirkungen
- Substratbindungs-Pockets für die Reste
- N-terminale Seite des Substrats P3 P2 P1 und P1' P2' – C-terminale Seite
- Wichtigste Taschen vor allem P1, dann P2, P3

### Substratspezifität von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase erklärbar über die P1-Tasche:



### Chymotrypsin:

- spaltet Peptidbindung hinter Resten mit aromatischen oder langen, unpolaren Seitenketten

### Trypsin:

- spaltet hinter langen, positiv geladenen Seitenketten (Arginin und Lysin)
- Aspartatrest zieht positiv geladenes Substrat an und stabilisiert es

### Elastase:

- spaltet hinter kleinen Seitenketten
- die zwei Valinreste am oberen Ende der Tasche verschließen die Tasche, sodass nur kleine Reste hineinkönnen



### **Divergente Evolution:**

- Proteine, die von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen
- Ähnliche Faltung und Struktur, aber unterschiedliche Funktion
- z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase

### **konvergente Evolution:**

- Proteine mit unterschiedlicher Faltung konvergieren in der Evolution zur gleichen Lösung eines Problems (katalytischer Mechanismus)
- z.B. Subtilisin und Trypsin haben eine unterschiedliche Faltung/Tertiärstruktur, aber die gleiche katalytische Triade und eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums

### **Begrifflichkeiten bei der Beschreibung der divergenten Evolution:**

- **Homologe:** Abgeleitet von einem gemeinsamen Ursprungsprotein; ähnliche Sequenz/ähnliche Struktur
- **Paralogue:** Homologe Proteine aus einem Organismus mit unterschiedlichen Funktionen; parallele Evolution
- **Orthologe:** Proteine mit gleicher Funktion in unterschiedlichen Organismen
- Strukturhomologie kann auch bei sehr geringer Sequenzhomologie erhalten bleiben (15-20% Sequenzidentität)

### **Aktivierungsmechanismus von Serinproteasen:**

- komplizierter Aktivierungsmechanismus durch eine irreversible proteolytische Spaltung
- Zymogen wird in aktives Enzym umgewandelt
- z.B. Chymotrypsinogen in Chymotrypsin, Trypsinogen in Trypsin, FVII in FVIIa...
- Aktivierung verbunden mit kaskadenhafter Aktivierung
- Durch proteolytische Spaltung entsteht am neuen N-Terminus eine Ionenbindung mit Resten im aktiven Zentrum (mit Asp194)
- Vollständige Ausbildung der Substratspezifitätstasche
- Oxyanion-hole wird vollständig ausgebildet
- Das Anschalen der Enzymaktivität kommt durch diskrete streng ortsgebundene Konformationsänderungen zustande, die durch Spaltung einer Peptidbindung ausgelöst werden

### **Mechanismus allgemein:**

- stark konserviert
- Aktivierung über Kaskade
- Biologischer Sinn: Aktivierung erst an Ort und Stelle
- Spezifische Protease steht an erster Stelle der Kaskade
- Andere wichtige Kaskaden: Bluterinnung, Aktivierung von Thrombin
- Problem: Mechanismus irreversibel -> schlecht für weitere Regulierung -> Abschaltung schwierig

### **Schummelmechanismus bei Staphylococcus aureus:**

- bakterielle Pathogen, sekretiert Staphylocoagulase
- diese aktiviert Prothrombin auch ohne Spaltung (sonst wird Prothrombin zu Thrombin über Kaskade und aktiviert Fibrinogen)
  - ➔ Blutvergiftung, Sepsis

## 6. Vorlesung (HIV-Protease, Methoden zur Untersuchung der Primärstruktur von Proteinen)

### **HIV-Protease:**

- wichtig für die Vervielfältigung des Virus
- relativ breite Substratspezifität
- Spaltung zwischen Phe und Pro
- Gehört zu den sauren Proteasen (Aspartat-Protease), Dimer
- Ein Asparaginsäurerest nimmt Proton von Wasser auf, der andere polarisiert die Bindung der Peptidcarbonylgruppe des Substrats
- Pepstatin hemmt HIV-Protease

### **Kriterien für mögliche Medikamente-Kandidaten:**

- Inhibitionseigenschaften (Bindungsaffinitäten)
- Löslichkeit
- Biologische Verfügbarkeit
- Stabilität

### **Cocktail-Therapie:**

- Inhibierung durch mehrere Proteaseinhibitoren gleichzeitig
- Inhibierung der reversen Transkriptase mittel z.B. AZT

### **Problem: Resistenzbildung:**

- Mutationen in den Bindungstaschen = Verringerung der Bindungsaffinität der Inhibitoren
- Lösung: Cocktail/Kombinationstherapie

## Methoden zur Untersuchung der Primärstruktur von Proteinen:

### **Bestimmung der Zusammensetzung mittels Totalhydrolyse:**

- 1.) Totalhydrolyse im Sauren (6 M HCl bei 110°C, 24h) -> Zerlegung in AS-Bausteine
- 2.) Chromatographische Trennung der Aminosäuren über Ionentauscher, Identifizierung der Aminosäure über Elutionsvolumen (nötiges Puffervolumen um AS freizusetzen)
- 3.) Detektion durch Derivatisierung mit Ninhydrin: Entstehung von Ruhemans Violet  
Konzentration über optische Absorption messbar (Pro andere Wellenlänge)

### **Bestimmung der Aminosäuresequenz (klassischer Weg, Edman-Abbau)**

- 1.) Spaltung der Proteine in Peptide (da zu lang)
  - Enzymatische oder chemische Spaltung
  - CNBr spaltet nach Methionin
  - Trypsin nach Arginin und Lysinresten
  - Chymotrypsin spaltet nach großen hydrophoben Resten (Tyr, Phe, Trp)
- 2.) Auftrennung der Peptide mittel Reversephase-HPLC
- 3.) Automatische Sequenzierung nach Edman, schrittweise Sequenzierung
  - Umsetzung mit Phenylisothiocyanat (PITC)
  - Entstehung eines Phenylthiocarbamolyptids (PTC-Peptids), PITC reagiert mit der endständigen Aminogruppe des Peptids
  - Abspaltung -> Entstehung einer ATZ-Aminosäure
  - Umlagerung, Konvertierung bei erhöhter Temperatur zur Phenylthiohydantoin (PTH-Aminosäure)

- PTH-Aminosäuren mittels HPLC getrennt und anhand von Standards identifiziert
- 4.) Proteinsequenz durch Einreihung der Peptide über überlappende Fragemente ableitbar (Spaltung der Polypeptidkette mittels eines anderen Enzyms)

**Alternativ: Sanger-Methode**

- DNA-Sequenzierung über Dideoxymethode

**Bestimmung der 3D-Struktur von Proteinen:**

- NMR- Spektroskopie
- Röntgenstrukturanalyse (Kristallographie)
- Elektronenmikroskopie

## 7. Vorlesung (Enzym-Regulierung/Hemmung, Allosterie, Hämoglobin)

### Regulierung der Enzymaktivität:

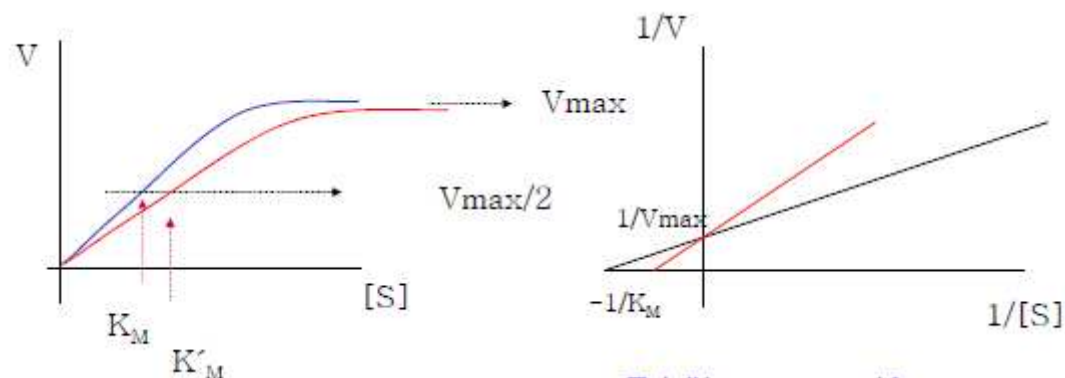
- Regulierung der Enzymmenge: Genexpression (Transkription, Translation)
- Enzymmodifizierung: Aktivierung durch proteolytische Spaltung; Phosphorylierung, Methylierung usw.
- Spezifische Inhibition von Enzymen durch Blockierung des aktiven Zentrums
- Allosterische Regulation, Wirkung von Aktivatoren (positiven Effektoren)

### Irreversible Hemmung

- irreversible Bindung des Inhibitors an das Enzym (kovalente Modifikation des aktiven Zentrums)
- z.B. Nervengifte, Nervengase: Sarin oder Tabun
- Sarin: Methyl-fluorphosphonsäure-isopropylester -> Inhibition der Acetylcholinesterase: dauernde Übererregung, da Signal nicht abgeschaltet wird
- Jodacetamid: Inhibition von Cysteinproteasen, auch allgemeine Alkylierung von Cysteinen

### Kompetitive Hemmung:

- Konkurrenzkampf um das aktive Zentrum
- Inhibitoren ahmen das Substrat in seiner Struktur nach und binden nicht kovalent an das aktive Zentrum, können aber nicht umgesetzt werden
- Die Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die freie Bindungsstelle bewirkt eine apparente (scheinbare) Minderung der Affinität des Enzyms zum Substrat
  - $K_M$  wird erhöht
- es müssen größere Substratkonzentrationen aufgewendet werden um  $v_{max}/2$  zu erzielen
  - Abflachung der Kurve im Geschwindigkeitsdiagramm,  $K_M$  wird nach rechts zu  $K_{Mapp}$  verschoben
  - $V_{max}$  kann bei großem Substratüberschuss immer noch erreicht werden

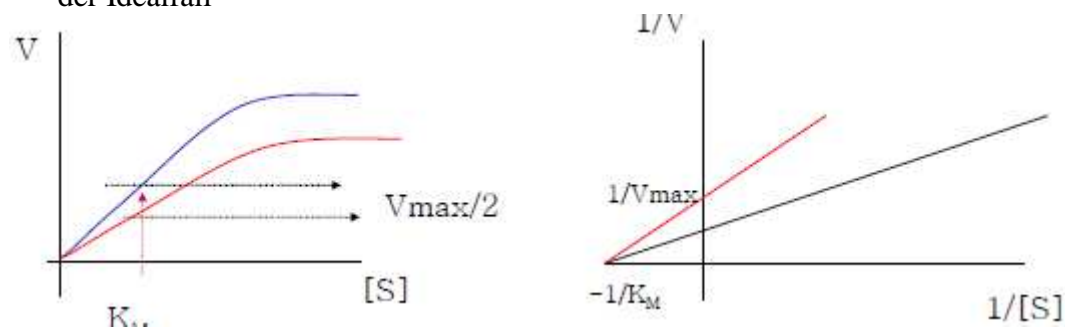


- kompetitive Hemmung kann also durch Erhöhung der Substratkonzentration überwunden werden
- $K_{Mapp}$  kann über Auftragung von  $1/V$  gegen  $1/[S]$  in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen bestimmt werden

### Nichtkompetitive Inhibition:

- Hemmung der katalytischen Aktivität
- Kann nicht durch weitere Substratzugabe ausgeglichen werden
- Oft bei Enzymen mit zwei Substraten
- Substrat und Inhibitor können gleichzeitig binden

- Primär wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  verringert, aber das ist nur der Idealfall



### **Bedeutung der Allosterie bei Hämoglobin**

- Myoglobin und Hämoglobin sind Proteine für den Sauerstofftransport in höheren Organismen
- Problem ist der Sauerstofftransport von der Lunge in das Gewebe
- Hämoglobin soll möglichst viel Sauerstoff auf Myoglobin übertragen

### **Verschiedene Möglichkeiten:**

- strong binding transport molecule: hohe Sauerstoffaufnahme, nur wenig Abgabe an Myoglobin
- weak binding transport molecule: geringe Sauerstoffaufnahme aber hohe Übertragung auf Myoglobin

### **Lösung:**

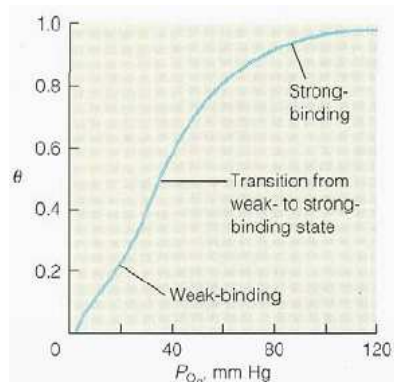
- kooperative Bindung
- allosterische Regulation: viel Aufnahme: hohe Sättigung in der Lunge
- Transfer an Myoglobin in Muskeln sehr effizient

### **Molekulare Grundlagen: Hämoglobin:**

- einzelne Ketten bestehen aus 8 Helices
- hochkonservierte Strukturen
- im Blut kommt Hämoglobin als Tetramer vor
- Dimer aus Dimeren, Dimer  $\alpha 1-\beta 1$ ,  $\alpha 2-\beta 2$
- Extensive Wechselwirkungen zwischen den Monomeren in diesen Dimeren
- Sauerstoff bindet an  $Fe^{2+}$  im Porphyrinring (prosthetische Gruppe),  $Fe^{2+}$  wird dabei nicht oxidiert
- Struktur von Hämoglobin ändert sich bei der Bindung von Sauerstoff:
  - o Verschiebung des proximalen Histidins führt zur Hebelwirkung über Helix F
    - ➔ Verschiebung von Helix F
    - ➔ Auswirkungen auf Quartärstruktur
    - ➔ Konformationsänderungen im Interface (die Dimere drehen sich um  $15^\circ$  gegeneinander, Dimere bleiben relativ unverändert)
    - ➔ Übergang von der T- zur R-Form

### **Formen von Hämoglobin:**

- Erklärung für sigmoidales Bindungsverhalten von Hämoglobin
- T-Form: niedrige Affinität für Sauerstoff (tense)
- R-Form: hohe Affinität für Sauerstoff



### Symmetrie-Modell für Allosterie: Monod-Wyman-Changeux (MWC)

- es gibt zwei mögliche Konformationen des Hämoglobins (T und R-Konformation)
- konzertierter Mechanismus: alles oder nichts (entweder das eine oder das andere)
- das Protein ist ein Oligomer und existiert in zwei Zuständen
- T und R-Zustand sind im Gleichgewicht: Unterschiede in der Energie der Zustände
- Bei einer bestimmten Sauerstoffkonzentration kommt es zum Umschalten von T- zu R-Zustand
- Durch die Bindung der Liganden verschiebt sich also das Gleichgewicht zwischen den zwei Zuständen

### Wirkung von allosterischen Effektoren (Regulatormoleküle):

- homotrope Effektoren: positive Kooperativität (Substrat ist Effektor)
- heterotrope Effektoren: können aktivieren (positive Effektoren) oder inhibieren (negative Effektoren) (anderes Molekül ist Effektor)

### Allosterische Effektoren beim Hämoglobin:

- homotroper Effektor: Sauerstoff
- heterotroper Effektor:
  - o 2,3-Diphosphoglycerat (stabilisiert T-Form durch Bindung in Tasche) -> negativer Effektor
  - o Bohr Effekt, CO<sub>2</sub>-Effekt, H<sup>+</sup> Addition an His146->Ionenbindung mit Aspartat94 -> Stabilisierung der T-Form (Sauerstoff kann leichter abgegeben werden) bei CO<sub>2</sub> entsteht im Blut HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und der pH-Wert sinkt. Alternativ CO<sub>2</sub> Addition an terminale NH<sub>2</sub>-Gruppe

### Fötales Hämoglobin:

- α<sub>2</sub>,γ<sub>2</sub> im Gegensatz zum adulten Hämoglobin α<sub>2</sub>-β<sub>2</sub>
- dieselben O<sub>2</sub>-Bindungseigenschaften
- niedrigere Affinität für 2,3-Diphosphoglycerat
- T-Zustand-Konzentration bei gleicher DPG-Konzentration geringer
  - ➔ Sauerstoffbindungsaffinität beim Fötus höher als bei der Mutter
  - ➔ Bei gleichem Sauerstoffpartialdruck: pO<sub>2</sub> geht Sauerstoff von der Mutter auf das fötale Hämoglobin über

### Sichelzellanämie:

- Substitution von Glutamat an Position 6 der β-Kette durch Valin
- Bei homozygoten Menschen wird die Löslichkeit von Desoxyhämoglobin verringert (hohes Schlaganfall und Infektionsrisiko)
- Heterozygote Träger zeigen eine Malaria-Resistenz -> in Afrika weit verbreitet

### Genetische Defekte:

- der Austausch einzelner Nukleotide kann unterschiedliche Wirkungen auf der Ebene des Proteins erzielen
  - o **Missensmutationen:** Austausch einer Aminosäure durch eine andere z.B. Sichelzellanämie
  - o **Nonsens-Mutation:** Auftauchen eines Stop-Signals, Protein wird verkürzt
  - o **Frameshift-Mutation:** Verschiebung des Leserasters – völlig neue Sequenz (Frameshift bei Deletion und Insertion)

### Aspartat-Transcarbamoylase

- Reaktion: **Aspartat+Carbamoylphosphat -> N-Carbamoylaspartat**
- N-Carbamoylaspartat ist Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Pyrimidinen (kommen in Nukleotiden vor)
- Weichenstellung: Verbrauch von Aspartat und Glutamat entweder für Proteinsynthese oder für Nukleotidsynthese (Pyrimidine)
- Oligomeres Enzym (300kDa, 12 Untereinheiten, 6 katalytische, 6 regulatorische)
- 2 katalytische Trimere und 3 regulatorische Dimere
- aktives Zentrum auf Grenzfläche zwischen den Untereinheiten
- katalytische Untereinheit kann man in Aspartatbindende und Carbamoyl-bindende Domäne unterteilen
- 2 Konformationen T-Form: ziemlich inaktiv ; R-Form: Verschiebung der katalytischen Untereinheiten zueinander, sodass das aktive Zentrum so ausgerichtet ist, dass die Katalyse stattfinden kann

### Regulation der Enzymaktivität von ATCase:

- **Homoallosterie:** Kooperative Aktivierung durch Aspartat und Carbamoylphosphat (Zunahme der Substratkonzentration begünstigt Übergang der T-Form in die R-Form; Umschalten)
- **Heteroallosterie:**
  - o Negativer heterotroper Effektor: Inhibition CTP (Cytidintriphosphat): Wenn viel CTP da ist, werden keine Pyrimidine mehr in der Zelle benötigt
  - o Positiver heterotroper Effektor: Aktivierung durch ATP: Viel ATP bedeutet dass viele Pyrimidine (T,C) für DNA-Basenpaarung gebraucht werden, da viele Purine (A,G) vorhanden sind.  
→ Zelle in einem energiereichen Zustand: Zellteilung, Zellwachstum

→ **Vorteil: Feedback-Mechanismus**

## 8. Vorlesung (Phosphofruktokinase Regulation, Cofaktoren)

### **Allosterische Regulation: Beispiel Phosphofruktokinase**

- wichtigstes Enzym bei der Regulierung der Glykolyse
- katalysiert irreversible Reaktion: Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat (Schrittmacher-Reaktion; Glucose-6-Phosphat könnte auch noch im Muskel genutzt werden)
- Aktivitätsregulierung durch: ATP, AMP, Citrat, Fruktose-2,6-bisphosphat
- Negativer Effektor: Deaktivierung durch hohe ATP-Konzentrationen und Citrat (wenn genug Energie vorhanden ist, sinkt Aktivität; Citrat: Zwischenprodukt des Citratzyklus. In der Leber bedeutet das, dass genug Synthesebausteine vorhanden)
- Positiver Effektor: AMP, Fruktose-2,6-bisphosphat
  
- Citrathemmung: stellt sicher, dass nicht zu viele Metabolite „downstream“ gebildet werden
- pH-Regulation: verhindert zu starkes Ansäuern durch Lactat
- ATP-Hemmung: wenn genug ATP vorhanden
- AMP-Hemmung: wenn zu wenig Energie vorhanden

### **Struktur der Phosphofruktokinase:**

- Tetramer aus vier identischen Untereinheiten
- Bindestelle für Substrate: ATP, Fruktose-6-phosphat
- Effektorbindestelle (auch ATP kann hier gebunden werden)

### **Zustände:**

- konzertierte Umänderung: alle 4 Einheiten T oder R Konformation (alles oder nichts)
- Bevorzugung des R-Zustandes → Verschiebung der sigmoiden Aktivitätskurve nach links: Fruktose-2,6-bisphosphat
- Bevorzugung des T-Zustandes → Verschiebung nach rechts → ATP

### **Phosphofruktokinase in *Bacillus stearothermophilus***

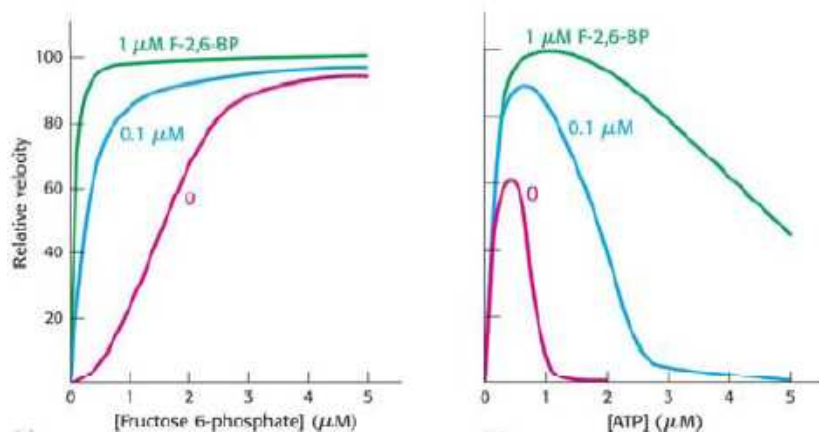
- aktive Site: bindet ATP und Fruktose-6-phosphat, Kooperativität der Bindung nur bezüglich Fruktose-6-phosphat
- Effektorbindestelle: Regulation über ATP, Phosphoenolpyruvat (PEP) (negativer Effektor favorisiert T-Zustand), und ADP (positiver Effektor, favorisiert den R-Zustand)
- Allosterische Verknüpfung der beiden Sites über den 6-F Loop  
→ Umlagerung des 6-F Loops
- im R-Zustand: Arg zeigt in Richtung Fruktose-6-Phosphat  
→ positiv geladene AS fördert die Bindung von Fruktose-6-phosphat (negativ geladen)
- im T-Zustand: Glu zeigt zur Bindungsstelle von Fruktose-6-phosphat  
→ Abstoßung von Fruktose-6-phosphat durch negative Ladung

### **Regulation von Phosphofruktokinase durch Fruktose-2,6-bisphosphat:**

- Fruktose-2,6-Bisphosphat ist eine Art „third“ Messenger
- Regulation durch Phosphofruktokinase II (PFK II)
- PFK II ist ein bifunktionelles Enzym:
  - o Kinase-Aktivität: wandelt Fruktose-6-Phosphat in Fruktose-2,6-bisphosphat um
  - o Phosphatase-Aktivität: dephosphoryliert Fruktose-2,6-bisphosphat zu Fruktose-6-Phosphat



- Aktivität der PFK II wird in der Leber über Hormone reguliert
- **Glukagon:** Hungersignal (zu niedriger Blutzucker)
  - Leber soll Glukose ausschütten und nicht selber metabolisieren
  - Glukagon aktiviert die Proteinkinase A, diese phosphoryliert die PFK II
  - Phosphatase aktiv: Fruktose-2,6-bisphosphat wird abgebaut
  - Phosphofruktokinase nicht aktiviert/weniger aktiv, Glukose-6-Phosphat wird zu Glukose umgewandelt und ins Blut ausgeschieden
- **Insulin:** zeigt, dass viel Glukose vorhanden ist, Leber soll Glukose umsetzen
  - Dephosphorylierung der PFK-II, Bewirkt erhöhte Kineaseaktivität
  - erhöhte Bildung von Fruktose-2,6-bisphosphat
  - Aktivierung der Phosphofruktokinase Umsetzung von Glucose in der Glykolyse



Fruktose-2,6-Bisphosphat erhöht Affinität der PFK und vermindert den Hemmeffekt des ATP

### Cofaktoren, Vitamine etc.

#### **Cofaktoren:**

- Allgemeiner Begriff für kleine Moleküle, welche zur Funktion eines Proteins beitragen, aber kein Bestandteil der Peptidkette sind. z.B. Ionen und organische Verbindungen
- Dienen dazu chemische Reaktionen durchzuführen, die nicht allein mit den 20AS möglich sind

**Coenzyme:** Organische Verbindungen wie NADH und FAD

- Cosubstrat: vorübergehende Bindung der Coenzyme
- Prosthetische Gruppen: dauerhafte oder sogar kovalent verknüpfte Gruppen z.B. Hämgruppe=prosthetische Gruppe des Hämoglobins
- Leiten sich oft von Vitaminen ab z.B. Vitamin A → Retinol

#### **Apoenzym:**

- Protein ohne prosthetische Gruppen (ohne seinen Cofaktor)

#### **Holoenzym:**

- Enzym mit all seinen prosthetischen Gruppen (aktiv)

**Apoenzym + Cofaktor = Holoenzym**

- Coenzyme müssen regeneriert werden um katalytische Zyklen zu vollenden

### ATP-Verwendung:

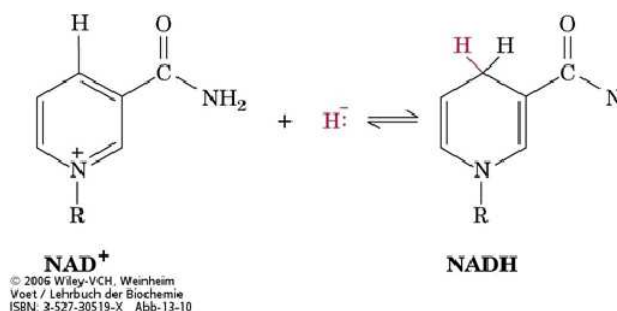
- Energiespeicherung-Energiewährung „Brennstoff der Zelle“
  - o Endprodukt der Zuckerverwertung
  - o Verschiebung der Gleichgewichte in chemischen Reaktionen
- Bestandteil von Nukleinsäuren, DNA, RNA, Genen
- Umwandlung von chemischer Energie in Bewegung -> Muskel
- Signalübertragungswege -> Kinasen, cAMP als second messenger
- nur exergonische Prozesse laufen spontan ab → gekoppelte Prozesse an Hydrolyse von ATP

### Redoxprozesse:

- wichtige Coenzyme hier: FAD, FMN, NADH, NADPH

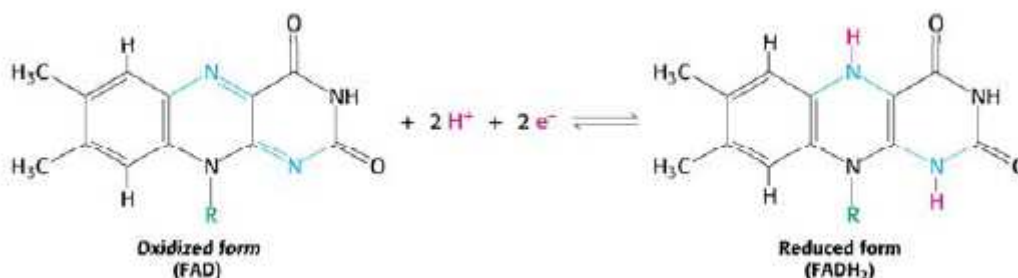
### NADH/NAD<sup>+</sup> (Nicotinamidadenindinukleotid)

- herausragendes Merkmal: Nicotinamidring
- NADH: entsteht vor allem beim katabolischen Abbau (Energiegewinnung)
- NADPH wird in anabolen Prozessen verbraucht: Aufbau, Synthese von Metaboliten (Biosynthesewege)
- Enzyme können zwischen NADPH und NADH unterscheiden
- NAD<sup>+</sup> nimmt ein Wasserstoffion und zwei Elektronen auf, was einem Hydridion entspricht (H<sup>-</sup>) → es wird also reduziert zu NADH



### FAD/FADH<sub>2</sub>

- Flavinadenindinucleotid oxidierte Form FAD und reduzierte Form FADH<sub>2</sub>
- Reaktiver Teil: Isoalloxazinring
- FAD besteht aus Flavinmononucleotid (FMN) und einer AMP-Einheit
- Anders als NAD<sup>+</sup> nimmt FAD zwei H-Atome auf
- FAD ist gelb, FADH<sub>2</sub> farblos → eignet sich gut für kinetische Messungen



### Redoxgleichgewichte

- elektrochemische Spannungsreihe (Redoxpotential) zeigt an, ob Verbindung eher oxidierend oder reduzierend wirkt (je positiver, desto stärker oxidierend, je negativer desto stärker reduzierend; Bezugshalbzelle: Standardwasserstoffhalbzelle bei pH=0)
- Standardreduktionspotential im Skript bei pH=7 als Referenz

- **Nernstsche Gleichung**

$$\Delta G^{\circ'} = -nF\Delta E^{\circ'}$$

G: Gibbs-Energie (freie Enthalpie) (wenn  $\Delta G < 0$  verläuft die Reaktion freiwillig)

n : Anzahl der übertragenen Elektronen

F : Faraday-Konstante 23,06 kcal/(mol\*V)=96,485 kJ/(mol\*V)

**Konzentrationsabhängigkeit:**

$$\Delta G = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{c_2}{c_1}$$

**Rechenaufgaben:**

- Teilreaktionen aufstellen
- $\Delta E$  bestimmen
- Formel einsetzen

**Beispiel: Oxidative Phosphorylierung**

- Energie aus Wasserbildung und NADH Oxidation ist höher als für ATP-Synthese nötig (liefert 52,6kcal/mol, obwohl für ATP-Synthese nur **7,5 kcal/mol** nötig)
- Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran verwendet  
→ Es ergibt sich die Nernstsche-Gleichung für Transmembrangradienten

$$\Delta G = -ZF\Delta V + RT \ln \left( \frac{c_2}{c_1} \right)$$

$\Delta V$  ist Potential an der Membran

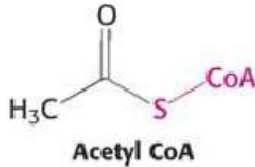
Z ist gleich der transportierten Ladung

$c_2/c_1$  = Konzentrationsdifferenz = pH-Differenz

## 9. Vorlesung (Coenzyme, Nährstoffe, Antibiotika)

### Coenzym A (CoA):

- zentrale Rolle im Stoffwechsel, da es Acylgruppe überträgt ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ )
- endständige Sulfohydrylgruppe im CoA ist die reaktivste Stelle



### Pyridoxalphosphat (PLP) (Ableger von Pyridoxin, Vitamin B6)

- Cofaktor, der wichtig bei den Transaminasen ist
- Übertragung von  $\text{NH}_2$ -Gruppen von Aminosäuren auf andere  $\alpha$ -Ketosäuren
- Bildet über Aldehydgruppe Schiff'sche-Base-Verbindung

### Thiamindiphosphat

- Coenzym, welches in Decarboxylierungsreaktionen involviert ist
- Strukturmerkmal: Thiazolring
- Pyruvat bindet an TPP und wird zu Hydroxyethyl-TPP decarboxyliert
- In der Pyruvat-Oxidase entsteht Acetylphosphat
- In der Pyruvat Decarboxylase entsteht Acetaldehyd
- In der Pyruvat-Dehydrogenase entsteht Acetyllyponamid
- Übertragung der Acetylgruppe auf CoA  $\rightarrow$  es entsteht Acetyl-CoA

### Folat, Tetrahydrofolat

- spielt Rolle bei Übertragung von C1-Gruppen

...

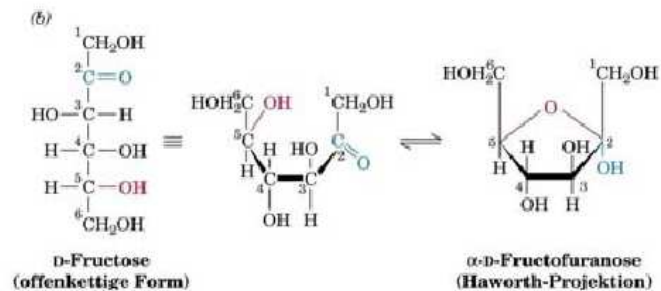
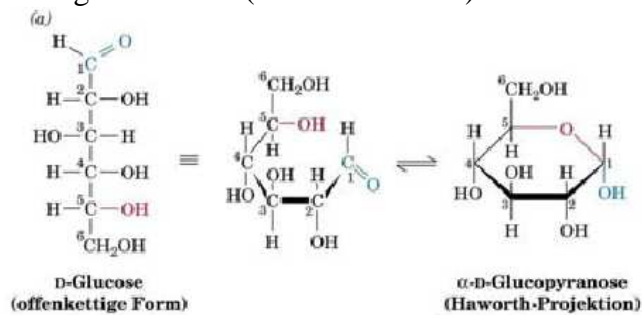
### Zucker:

- Zucker sind Kohlenhydrate: chemische Formel  $[\text{C}(\text{H}_2\text{O})]_x$ 
  - Zucker unterscheiden sich in:
    - o Der Zahl der Kohlenstoffatome
    - o Der Stereochemie der asymmetrischen Kohlenstoffatome (D/L)
    - o Dem Vorhandensein einer Aldehydgruppe an C1  $\rightarrow$  **Aldosen** (reduzierende Zucker) oder einer Ketogruppe an C2  $\rightarrow$  **Ketosen** (nicht reduzierende Zucker)

### Zyklisierung von Zuckern:

- in Lösung liegen viele Kohlenhydrate nicht in Form von offenen Ketten sondern in Form von Ringen vor (energetisch günstiger)
  - intramolekulare Halbacetal/Halbketal-Reaktion liegt zu Grunde z.B. C1 Aldehydgruppe reagiert mit C5-Hydroxylgruppe zu intramolekularem Halbacetal
  - es entsteht ein zusätzliches Asymmetriezentrum
  - $\alpha$ -: Hydroxylgruppe am C1 auf der gegenüberliegenden Seite des Ringes als die  $\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe am Chiralitätszentrum
  - $\beta$ -: Hydroxylgruppe liegt auf der gleichen Seite wie  $\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe des Chiralitätszentrums
- $\rightarrow$   $\alpha$ - und  $\beta$ - Formen werden **Anomere** genannt (es handelt sich um Konfigurationsisomere) (C1 Atom heißt auch anomeres C-Atom)
- Zyklisierung erzeugt Furanoside (4C) oder Pyranoside (5C)

- C1-Kohlenstoffatom ist immer das, was an das O und an eine weitere Hydroxylgruppe gebunden ist (höchste Priorität)



## Ring Konformation

Konformationen des Sechsrings: Sessel-, Boot- und Halbsessel

Konformationen des Fünfrings: 4 Atome in einer Ebene, eines ragt heraus: bei Ribose 2'endo und 3'endo

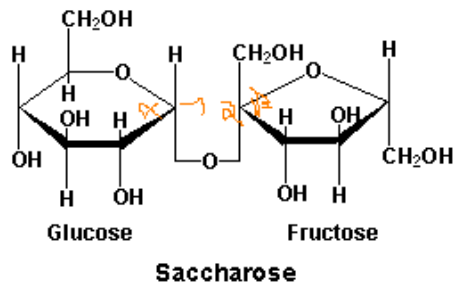
Bei der  $\beta$ -D-Glukose gibt es eine Konformation, wo alle OH-Gruppen lateral angeordnet sind: besonders begünstigte sterische Form, besonders stabile Form. Bildet Rückgrat von Cellulose

## Verknüpfung von Zuckerresten

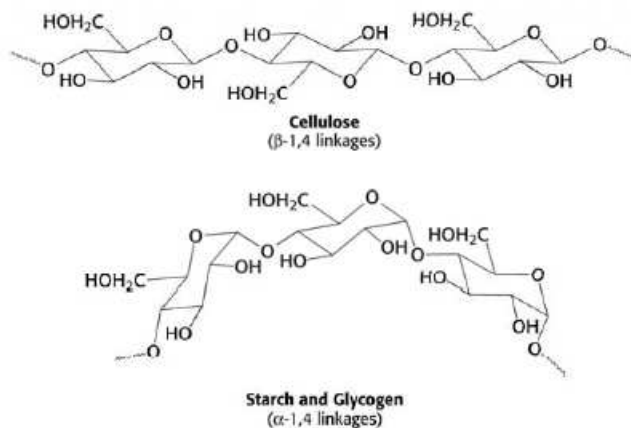
- entweder  $\alpha$  oder  $\beta$  verknüpft
- Glykosidische Bindung: Verknüpfung mit einer OH-Gruppe,  $\alpha(1-4)$ Verknüpfung
- $\alpha$ -Verknüpfungen kommen meistens bei Substanzen zur Energiespeicherung/Energiestoffwechsel vor
- $\beta$ -Verknüpfungen bei Substanzen welche Gerüste aufbauen: Cellulose etc.
- es können O- und N-Glykosidische Bindungen verknüpft werden

## Disaccharide:

- besteht aus zwei Kohlenhydraten, die durch O-glykosidische Bindungen verknüpft sind
- Atome, die verknüpft werden: Saccharose, Sucrose =Haushaltszucker
  - o 1-2 Verknüpfung von  $\alpha$ -Glucose und  $\beta$ -Fructose  $\rightarrow$ kein reduzierendes Ende mehr
- Maltose: Glc  $\alpha$  (1-4)Glc
- Sucrose: Glc  $\alpha$  (1-2) Fru  $\beta$
- Laktose: Gal  $\beta$  (1-4) Glc



### Polysaccharide:



### **Energiespeicher (Stärke, Glykogen)**

- Stärke-Polymere  $\alpha$  (1-4) verknüpft
- In Pflanzen: Stärke besteht aus Amylose (linear) und Amylopektin (verzweigt)
- In Tieren und Bakterien: Glykogen, ähnlicher Aufbau wie Amylopektin, jedoch ist Glykogen stärker verzweigt wie Amylopektin (jede 8.-12. Glucoseeinheit)
- Abbau von Glykogen in der Leber: Glykogenphosphorylase
- Zusätzlich werden noch Glykogen debranching enzyme benötigt um Verzweigungen aufzuheben

### **Struktur-Polysaccharide:**

- Cellulose ( $\beta$ (1-4) glykosidisch verknüpfte D-Glukoseeinheiten) und Chitin (Chitinpanzer, Aussenskelett von wirbellosen Tieren, Krebse, Käfer etc)
- $\beta$ (1-4) glykosidisch verknüpfte N-acetylamin-D-Glucosamin-Einheiten

### **Bakterielle Zellwände bestehen aus Zuckerketten und Peptidketten**

- Unterscheidung gram+ und gram –
- Penicillin blockiert Transpeptidase
- Enzym welches Vernetzung der Zucker über Peptide bewirkt
- Vernetzung des Pentaglycin-Peptids mit dem D-Ala haltigen Peptid  
     ➔ Zellwandaufbau behindert -> Bakterien platzen

### **Antibiotika-Resistenz:**

- Sekretion von Penicillinase, welches Penicillin deaktiviert
- Die Penicillinase ist eine  $\beta$ -Lactamase, welche den  $\beta$ -Lactam-Ring des Penicillins spaltet, sodass es nicht mehr durch die Transpeptidase erkannt wird

## 10. Vorlesung (Glykoproteine, Lipide, Membranen)

### **Glykoproteine:**

- Glykosierungen kommen nur in eukaryotischen Zellen und in exportierten (aus den Zellen ausgeschleusten) Proteinen vor
- Glykosierung stellt posttranslationale Modifikation dar
- N-Glykosylierung: Bindung an das Stickstoffatom der Amidgruppe in der Seitenkette des Asparagins
  - o N-Glykosylierungsstellen können vorhergesagt werden
  - o Sequenzen: Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr
- O-Glykosylierungsstellen schwer vorherzusagen
- Funktion: Beteiligt an Protein-Protein-Erkennungen z.B. Spermien-Eizelle-Erkennung, Stabilisierung der Proteine im Blutplasma
- Findet im Golgi und im ER statt
- Blutgruppen: Unterschiede in den Glykosylierungen von Proteinen an Zelloberflächen (nicht nur roten Blutkörperchen)

### **AB0-Blutgruppen**

- Biotechnik: Enzyme entwickeln, welche spezifisch diese Antigene entfernen
  - ➔ Blutkonserven werden zur Blutgruppe 0 unmoduliert

### **EPO-Doping**

- EPO enthält 3-N-Glykosylierungsstellen, eine O-Glykosylierungsstelle und 150 AS
- Zuckerkennung an EPO -> EPO-Dopingtest
- Unterschiede in der Glykosylierung vor allem der Anzahl der N-Acetylneuraminsäurereste -> pI-Unterschiede, Molekulargewichtsunterschiede usw.
- Unterschiede könne im EPO was im Urin ausgeschieden wird festgestellt werden

### **Lipide und Membranen**

- Triacylglyceride: Energiespeicher; Glycerinester von Fettsäuren (Glycerin und 3 Fettsäuren)
- Gesättigte Fettsäuren: keine Doppelbindungen
- Ungesättigte Fettsäuren: Doppelbindungen (cis-Konfiguration)
- Verseifung setzt Fettsäuren aus Triacylglyceriden frei
- Ungesättigte Fette haben niedrigere Schmelztemperatur als gesättigte
- Ungesättigte Fettsäuren haben eine niedrigere Schmelztemperatur als gesättigte
- Langkettige Fettsäuren haben eine höhere Schmelztemperatur als kürzere

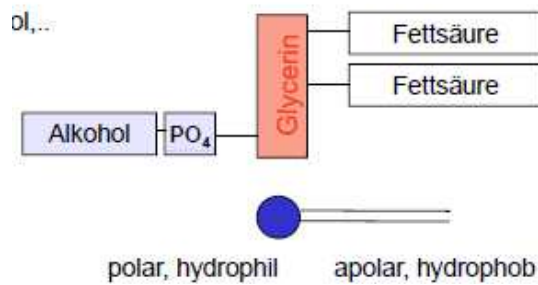
### **Lipidzusammensetzung der Membran**

- Glycerophospholipide (Phosphoglyceride), Sphingolipide, Sterole
- Zusammensetzung bestimmt physikalische Eigenschaften
  - o Ungesättigte Fettsäuren erhöhen Fluidität
  - o In Eukaryoten können Membranen bis zu 25% aus Cholesterin bestehen
    - ➔ Cholesterin erniedrigt die Fluidität der Membran
  - o Sterole können sich zusammenlagern
  - o Lipid rafts: Komplexe aus Phospholipiden und Cholesterin (Regulation der Membranfluidität)

### **Glycerophospholipide (Phosphoglyceride)**

- bestehen aus Glycerin, Fettsäuren, Phosphatgruppe und Alkohol
- Alkohole sind: Serin, Ethanolamin, Cholin, Inositol usw.

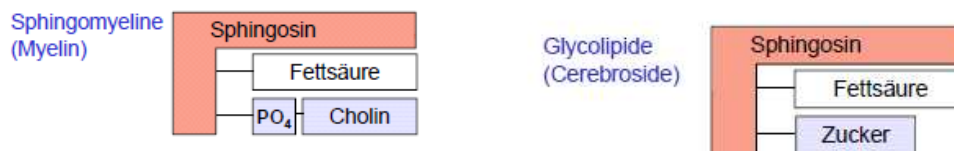
- Phospholipide sind durch die polare Kopfgruppe amphiphil (hydrophiler Kopf und hydrophober Schwanz)
- Verbindung der Bausteine über Esterbindungen



- mit dem Alkoholbaustein Serin entsteht Phosphatidylcholin
- Phosphoglyceride >40% der Membranlipide

### Spingolipide

- enthalten statt Glycerin den langkettigen Aminoalkohol Sphingosin
- **Sphingosin**: Aminoalkohl mit langer, ungesättigter Kohlenwasserstoffkette
- Im Sphingomyelin ist Aminogruppe durch Amidbindung mit Fettsäure verknüpft und Hydroxylgruppe mit Phosphorylcholin verestert
- Vorkommen: Sphingomyeline: enthalten Phosphocholin- oder Phosphoethanolamin Kopfgruppe
- **Sphingomyeline**: Membranscheide welche Nervenzellen umgibt ist besonders reich an Sphingomyelinen
- **Cerebroside**: tragen Kopfgruppe einzelnen Zuckerrest. Besitzen keine Phosphatgruppe



### Sterole:

- Cholesterin (10%) (anders aufgebaut als Phospholipide)
- An einem Ende Schwanz aus Kohlenwasserstoffen am anderen Ende Hydroxylgruppe
- Cholesterin reduziert Fluidität von Membranen
- Kommt in Eukaryoten vor

### Selbstassemblierung von Glycerophospholipiden, Spingolipiden...

- können Doppelschicht ausbilden
- auch Mizellen und Vesikel (Liposomen)
- entropisch getriebener Prozess

### Eigenschaften von Membranen:

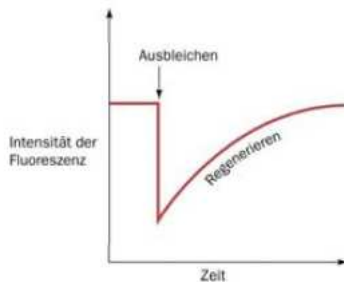
- semipermeabel (undurchlässig für Ionen und polare Moleküle; apolare Substanzen und Gase können Lipid-Doppelschicht überwinden → Kanäle und Carrier benötigt)
- Membranen sind dynamische Strukturen und asymmetrisch
  - o Laterale Diffusion erfolgt leicht (horizontal), transversale erschwert (von einer auf andere Seite)
  - o Lipidmoleküle diffundieren nicht spontan von der einen auf die andere Membranseite (Flip flop) (Flippase benötigt)



- Flüssig-Mosaic-Modell: zweidimensionale Lösungen gerichteter Lipide und globulärer Proteine, Membransymmetrie, Diffusion (lateral, transversal)
- Membranen erlauben Kompartimentierung

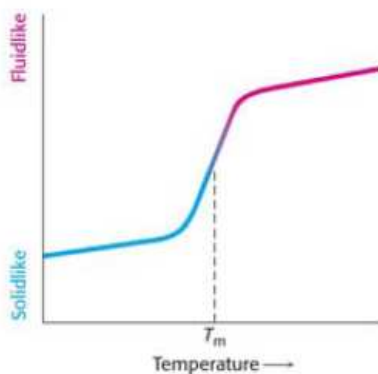
### Diffusionsgeschwindigkeit von Proteinen in Membranen messen:

- Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung:
- Kleiner Teil der Membran wird mit Laser gebleicht und beobachtet
- Betrachtung der Fluoreszenz des Bereiches in Abhängigkeit von der Zeit
- Ungebleichte treten ein, gebleichte verlassen den Bereich durch laterale Diffusion



### Lipidzusammensetzung und Eigenschaften der Membran

- je mehr gesättigte Fette, desto starrer
- je Länger die Ketten, desto starrer
- cis-Doppelbindungen stören Aufbau → Membran beweglicher
- Cholesterin versteift Membran, es entstehen lipid rafts in Cholesterin-reichen Domänen



### Membranproteine:

- **Integrale Membranproteine:** intensive WW mit den Kohlenwasserstoffmolekülen der Membranlipide, verlaufen meist durch Lipiddoppelschicht, können über **Hydrophobizitätsplots** erkannt werden
- **Periphere Membranproteine:** binden an der Oberfläche von integralen Membranproteinen, können aber auch über Lipidanker verankert sein

### Wichtige biologische Funktionen von Membranproteinen:

- Metabolittransport in und aus Kompartimenten (aktiver und passiver)
- Signaltransduktion durch Bindung von Hormonen an Rezeptoren der Zelloberfläche  
Lösen Signal in der Zelle aus
- Nervenleitung durch Spannungsgesteuerte Ionenkanäle

### **Transportmöglichkeiten durch die Membran:**

- Osmose
- Passiv-vermittelter Transport: Diffusion durch Porine, mobile Carrier (Antibiotika Valinomycin), spezifische Transportproteine
- Aktiver Transport: entgegen Konzentrationsgradienten
  - o Sekundär aktiver Transport: Kopplung des gewünschten Transports an Transmembrangradient
  - o Primär aktiver Transport: Transport unter ATP-Verbrauch

Formeln für Transporte???

### **Kompartimentierung:**

- Aufteilung in Kompartimente unterscheidet sich drastisch zwischen Organismen
- Biochemische Prozesse laufen in unterschiedlichen Räumen ab (Reaktionsräume/-bedingungen)
- Umkehrung vieler Stoffwechselwege gelingt oft durch Wechsel der Kompartimente
- Konzentrationsunterschiede an Kompartimentengrenzen für Energiegewährung, Nervenimpulsweiterleitung, Transportmöglichkeiten

### **Entstehung des Lebens**

- Urknall
- Entstehung der RNA-Welt (Stanley-Miller-Experiment)
- Kompartimentierung schafft Möglichkeiten (Maschinen und Codierfunktion)