

Einführung in die Biochemie

Robert Adam

Stand: 19. September 2018

Vorwort

Dieses Skript wurde nach bestem Wissen und Gewissen von mir geschrieben, wobei ich versucht habe, alles korrekt darzustellen. Nichtsdestotrotz kann ich nicht für die Fehlerfreiheit des Skript-Inhalts garantieren.

Sollten dir Fehler egal welcher Natur (inhaltlich, Rechtschreibung, etc.) auffallen, dann sende bitte eine E-Mail an robby@alexanderadam.de damit ich den Fehler verbessern kann.

Die Fertigstellung dieses Skriptes erfolgte unter zeitlichem Druck, was leider dazu geführt hat, dass die Ausdrucksweise und Grammatik gegen Ende des Skripts etwas gelitten haben. Ich bitte das zu entschuldigen. Wenn ich die Zeit und Lust finde, werde ich das nochmals korrigieren, aber bis dahin musst du wohl oder übel damit leben. Solltest du Interesse haben das für mich zu korrigieren, so kannst du mir ebenfalls eine Mail schreiben.

Inhaltsverzeichnis

1	Aminosäuren und Proteine	1
1.1	Allgemeines	1
1.1.1	Struktur	2
1.2	Säure-Base-Eigenschaften	3
1.3	Modifikationen	4
1.4	Peptidsynthese	5
1.4.1	Eigenschaften der Peptidbindung	5
1.5	Proteinstruktur	7
1.5.1	Strukturtypen	9
1.5.2	Supersekundäre Strukturen	14
1.5.3	Einflussfaktoren auf die Proteinfaltung	16
1.5.4	Domänen	18
1.6	Proteinfunktionen	18
1.6.1	Faserproteine	18
1.6.2	Ligandenbindung	21
1.6.3	Beispiel: Hämoglobin	27
1.6.4	Immunsystem	31
1.6.5	Motorproteine	36
1.7	Die Hill-Gleichung	40
1.7.1	Der Hill-Graph	40
1.8	Proteinfaltung und Denaturierung	41
1.8.1	Proteinfaltung als hierarchischer Prozess	43
1.8.2	Mechanismus der Proteinfaltung	44
1.8.3	Denaturierung	51
1.8.4	Krankheiten durch Proteinfaltungsfehler	54
2	Enzym-Mechanismen	57
2.1	Grundlagen	57
2.1.1	Nomenklatur	57
2.1.2	Funktionsweise	58
2.2	Beispiel: Chymotrypsin	61
2.2.1	Vergleich und Analoga	64

2.3	Beispiel: Carboanhydrasen	66
2.4	Beispiel: Nukleotid-Monophosphat-Kinasen	68
3	Enzymkinetik	69
3.1	Steady-State-Kinetik	71
3.2	Michaelis-Menten-Kinetik	73
3.2.1	Impuls-Kinetik	75
3.2.2	Lineweaver-Burk-Graph	75
3.3	Enzymhemmung	76
3.3.1	Mathematische Beschreibung der Enzymhemmung	78
3.3.2	Irreversible Hemmung	80
3.3.3	Reversible Hemmung	81
3.4	Enzymregulation	86
3.4.1	Allosterische Regulierung	86
3.4.2	Kovalente Modifikation	88
3.4.3	Proteinspaltung	89
4	Nukleotide und Nukleinsäuren	97
4.1	Nukleotidstruktur	97
4.2	DNA und RNA	101
4.2.1	Was hält die DNA zusammen?	103
4.2.2	De- und Renaturierung der DNA	106
4.2.3	Nukleinsäurestruktur	108
4.2.4	Deamination von Basen	109
4.2.5	Struktur der RNA	110
4.3	Andere Funktionen von Nukleotiden und Nukleinsäuren	111
4.3.1	DNA als Bauteil in der Nanotechnologie	111
4.3.2	Weitere Funktionen von Nukleotiden in Zellen	112
4.4	DNA-Methyl-Transferasen	113

1 Aminosäuren und Proteine

1.1 Allgemeines

Aminosäuren sind die Bausteine von sogenannten **Proteinen** (> 100 Aminosäuren) oder auch **Peptide** (≤ 100 Aminosäuren) (lineare Verknüpfungen von Aminosäuren), welche dann letztendlich für folgende Dinge in einem Organismus zuständig sind:

- **Katalysator** - In diesem Fall wird von sogenannten **Enzymen** gesprochen. Sie setzen die Aktivierungsenergie von spezifischen Reaktionen herab, sodass sie die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen.
- **Transport und Lagerung** - In (größeren) Organismen ist es unabdingbar, dass bestimmte Stoffe im ganzen Organismus verteilt werden. Auch die sichere Lagerung ist wichtig, wenn Stoffe gelagert werden sollen, ohne weiter zu reagieren. Für beide diese Anwendungen sind Proteine zuständig.
- **Struktur** - Proteine verleihen unseren Zellen ihre Struktur und Oberflächeneigenschaften (z.B. Zellmembran)
- **Bewegung** - Ohne Proteine wäre keine gezielte Bewegung möglich. Das wohl prominenteste Beispiel sind Muskelbewegungen, die uns unser Fortbewegen erlauben, aber auch beim Ausrichten von Zellorganellen in der Zelle (z.B. bei der Zellteilung) sind sie wichtig.

Insgesamt gibt es 22 verschiedene proteinogene Aminosäuren (dh. sie werden in der natürlichen Proteinsynthese verwendet). Die Abfolge der Aminosäuren in einem Protein bestimmen sein Struktur und Eigenschaften und somit auch die Funktionalität des Proteins. Für die Struktur und die Eigenschaften ist es auch essentiell in welchem Milieu sich das Protein befindet. In der Natur kommen Proteine im Allgemeinen nur in wässriger Umgebung (in Zellen) vor, sodass sich alle folgenden Aussagen über Struktur und Funktion primär auf eine wässrige Umgebung

1 Aminosäuren und Proteine

beziehen.

Diese Reihenfolge ist in der DNA kodiert und wird bei der Proteinsynthese in eine Aminosäure-Sequenz übersetzt.

1.1.1 Struktur

Eine Aminosäure hat stets den folgenden, allgemeinen Aufbau:

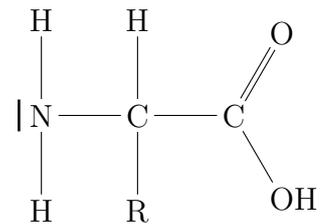


Abbildung 1.1: Allgemeine Darstellung einer Aminosäure

Die NH_2 -Gruppe wird dabei als **Aminogruppe** und die COOH -Gruppe als **Säuregruppe** bezeichnet. R stellt einen beliebigen, organischen Rest dar (oder im Falle von Glycin nur ein Wasserstoffatom).

Die einzelnen Aminosäuren unterscheiden sich einzig und allein in ihrem organischen Rest R voneinander, der unter anderem auch weiter funktionelle Gruppen tragen kann, die dementsprechend die Eigenschaften dieser speziellen Aminosäure charakterisiert.

Gemäß des organischen Rests R werden Aminosäuren auch grob unterteilt in aliphatische, saure, basische, aromatische, etc. Aminosäuren.

Für die Nomenklatur ist noch wichtig zu wissen, dass die Nummerierung der Kohlenstoffatome stets an dem der Säuregruppe mit 1 beginnt und die weiteren Kohlenstoffatome der Reihe nach durchnummeriert werden. Alternativ werden die Kohlenstoffatome, welche auf das der Säuregruppe folgen auch mit griechischen Buchstaben benannt (α , β , γ , usw.).

Dementsprechend handelt es sich bei Aminosäure wie in Abbildung 1.1 um sogenannte α -Aminosäuren, da die Aminogruppe stets am α -Kohlenstoffatom sitzt.

Des Weiteren ist aus Abbildung 1.1 bereits zu erkennen, dass das α -C-Atom vier unterschiedliche Substituenten besitzt (mit Ausnahme von Glycin) und somit offensichtlich chiral ist. Dementsprechend gibt es verschiedene Stereoisomere (R/S) von Aminosäuren, wobei alle natürlichen Aminosäuren (außer Cystein) die S-Konfiguration einnehmen. Für Aminosäuren ist es analog zu Zuckern üblich die D/L-Nomenklatur zu verwenden. In dieser Nomenklatur treten alle Aminosäuren natürlicherweise in der L-Konfiguration auf.

Es ist selbstverständlich ohne Weiteres möglich, dass Aminosäuren in ihren Resten noch weitere chirale Zentren aufweisen.

1.2 Säure-Base-Eigenschaften

Wie sich aus dem Namen heraus schon vermuten lässt, handelt es sich bei Aminosäuren um Moleküle, die Säure-Base-Reaktionen eingehen können. Das Besondere an Aminosäuren ist nun, dass sie sowohl eine saure Gruppe (COOH), als auch eine basische Gruppe (Aminogruppe) besitzen und somit sowohl als Säure, als auch als Base reagieren können. Es handelt sich bei Aminosäuren also um Ampholyte.

Aber Aminosäuren können nicht nur mit anderen Molekülen in einer Säure-Base-Reaktion reagieren, sondern können auch intramolekular mit sich selbst eine Säure-Base-Reaktion eingehen. Dabei entstehen die sogenannten Zwitterionen:

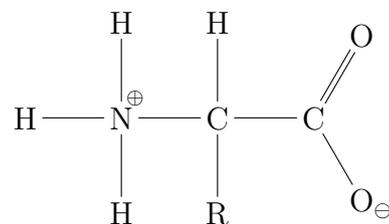


Abbildung 1.2: Allgemeine Darstellung eines Zwitterions einer Aminosäure

Je nach pH-Wert der Umgebung liegen Aminosäuren in unterschiedlich protonierten Zuständen vor. Rund um den neutralen Bereich liegen Aminosäuren als Zwitterionen vor.

Wird eine Titration durchgeführt, so ergibt sich ein sogenannter **isoelektrischer Punkt** (bei einem pH-Wert pI), an dem alle Aminosäuren als Zwitterion vorliegen

1 Aminosäuren und Proteine

und somit eine Gesamtladung von Null besitzen. Dieser isoelektrische Punkt ist in der Mitte zwischen den beiden Halbäquivalenzpunkten der Aminosäure (bzw. in der Mitte der ersten Beiden im Falle von sauren Resten).

Aufgrund dieser intramolekularen Säure-Base-Reaktionen stellen Lösungen von Aminosäuren Pufferlösungen mit einem Pufferbereich im Sauren und einem im Basischen dar.

1.3 Modifikationen

In Proteinen werden aber nicht nur die 22 “normalen” Aminosäuren gefunden, sondern auch Modifikationen (funktionalisierte Aminosäuren) derselben. Dies ist der Fall, da Aminosäuren nach Einbau in Proteine noch modifiziert/funktionalisiert werden können.

Dies kann beispielsweise erfolgen, indem an eine Aminosäure noch eine Hydroxygruppe als weitere funktionelle Gruppe eingebaut wird (wie es bei der Modifikation von Prolin zu 4-Hydroxyprolin der Fall ist). Eine solche Funktionalisierung erlaubt es die Eigenschaften von Proteinen gezielt zu manipulieren, sodass sie danach eine bestimmte Aufgabe erfüllen können, die andernfalls nicht (oder nur schlecht) möglich wäre.

Im konkreten Fall von 4-Hydroxyprolin dient die modifizierte Aminosäure der Stabilisierung der Bindungen zwischen Kollagen-Helices, was unter Anderem der Haut ihre Stabilität und Widerstandskraft verleiht.

Eine weitere Anwendung einer solchen nachträglichen Modifikation ist das Verknüpfen von Aminosäure-Resten miteinander, um die Proteinstruktur zu stabilisieren. Es kommt also zur Ausbildung sogenannter **Crosslinks**.

Diese Modifikation kann aber auch durch äußere Einflüsse (ungewollt) erfolgen, was dann natürlich die Funktionalität des Proteins in aller Regel einschränkt oder sogar komplett zerstört. Ein Beispiel für einen solchen “äußeren Einfluss” ist das Rauchen von Zigaretten, bei dem aus Methionin ein Methioninsulfoxid entstehen kann.

1.4 Peptidsynthese

Peptide entstehen durch Verknüpfung von Aminosäuren in einer linearen Kette. Diese Verknüpfung erfolgt in einer Kondensationsreaktion zwischen der Säuregruppe der einen und der Aminogruppe der anderen Aminosäure unter Ausbildung einer sogenannten **Peptidbindung** und Wasserabspaltung.

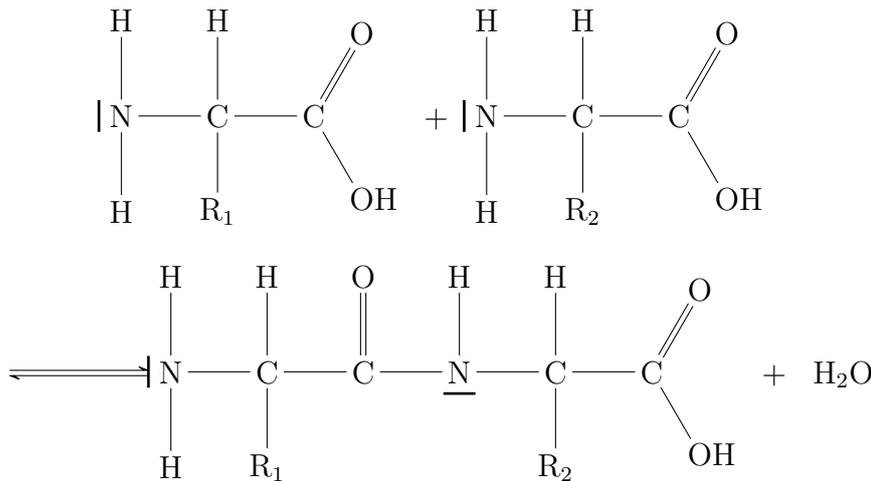


Abbildung 1.3: Verknüpfung zweier Aminosäuren unter Wasserabspaltung

Wie aus Abbildung 1.3 zu entnehmen ist, besitzt ein Peptid stets ein **N-terminales** (“Amino-Terminus”) und ein **C-terminales** Ende (“Carboxyl-Terminus”). Die “Richtung” in die eine Kette gelesen wird ist nach Konvention stets vom N-terminalen zum C-terminalen, da dies auch der Richtung der Proteinsynthese entspricht.

1.4.1 Eigenschaften der Peptidbindung

Die neu entstandene Peptidbindung (Die O=C-NH-Bindung) hat eine ganz wichtige Eigenschaft, die sich aus der Resonanzstruktur der Bindung ergibt:

1 Aminosäuren und Proteine

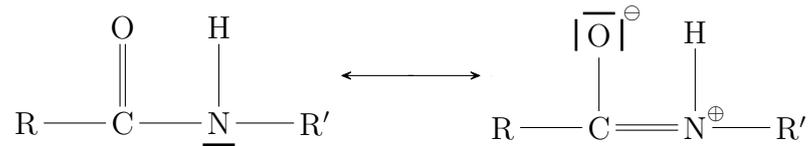


Abbildung 1.4: Mesomerieformeln der Peptidbindung

Die Peptidbindung hat **Doppelbindungscharakter**, was bedeutet, dass sie keine freie Drehbarkeit um sich zulässt und dass die Bindung in einer planaren Ebene liegt. Dies führt zu einer cis/trans-Isomerie an den Peptidbindungen. Außerdem verhindert der Doppelbindungscharakter eine direkte Hydrolyse der Peptidbindung, sodass sie auch in wässriger Umgebung erhalten bleibt.

Aus sterischen Gründen liegt die Peptidbindung in den allermeisten Fällen in der trans-Konfiguration vor.

Ungehindert ist die Rotation um die $N - C_{\alpha}$ - und um die $C_{\alpha} - C$ -Bindung (dies entspricht der $N - R'$ -Bindung und der Bindung von C' zu seinem rechten Nachbar-C-Atom (nicht mehr abgebildet) in Abbildung 1.4), da diese Bindungen nicht von der Mesomerie der Peptidbindung beeinflusst werden.

Zur Charakterisierung einer Aminosäure-Verknüpfung werden diese Rotationswinkel um die entsprechende Bindung mit Φ ($N - C_{\alpha}$) und Ψ ($C_{\alpha} - C$) angegeben.

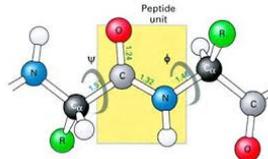


Abbildung 1.5: Peptidbindung mit den charakteristischen Winkeln Φ und Ψ [1].

Mit Hilfe einer Variation in Φ und/oder Ψ ist im Wesentlichen jeder mögliche Faltung von Proteinen möglich, allerdings sind auch viele Kombinationen der beiden Winkel aus sterischen Gründen unmöglich (bzw. stark benachteiligt). Dies ist stark abhängig davon, welche Aminosäure betrachtet wird, da diese sterischen Effekte von den entsprechenden Resten der Aminosäuren abhängig sind. Dementsprechend hat Glycin eine größere Kombinationsvielfalt, als alle anderen Aminosäuren.

Im Fall $\Phi = \Psi = 180^\circ$ nehmen die über die Peptidbindung verbundenen Aminosäuren die maximale, lineare Ausdehnung an.

Die Kombinationen an möglichen Winkeln können in einem sogenannten **Ramachandran Diagramm** dargestellt werden. Da bestimmte Kombinationen charakteristisch für bestimmte Proteinstrukturen sind, kann den einzelnen Bereich in einem solchen Diagramm jeweils eine bestimmte Struktur zugeordnet werden.

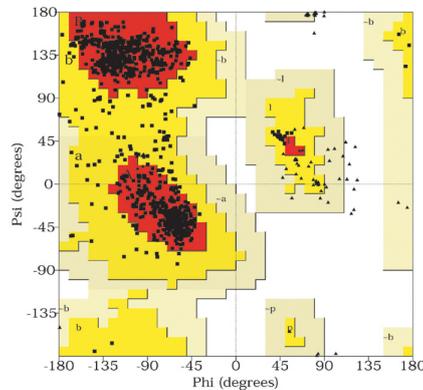


Abbildung 1.6: Beispiel für ein Ramachandran-Diagramm[2].

Die Verknüpfung von Aminosäuren ist endergon, sodass für die Reaktion zunächst die funktionellen Gruppen aktiviert werden müssen. Ohne Einsatz eines Katalysators wird also keine Peptidbindung ausgebildet werden. In der Natur dienen spezielle Enzyme als Katalysator für diesen Prozess.

1.5 Proteinstruktur

Jedes Protein/Peptid hat eine (oder einige wenige) ganz bestimmte und einzigartige Struktur(en), durch die es überhaupt erst seine Funktionalität erhält. Diese Struktur ist durch die Aminosäure-Sequenz bestimmt, aus der das Peptid aufgebaut ist.

Bemerkenswert ist jedoch, dass diese Strukturen nicht so stabil sind, wie vielleicht angenommen werden könnte. Tatsächlich ergibt sich für die **Denaturierung** (Zerstören der nativen Struktur) $\Delta G_{Den.} = 20 - 65 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ (Das ist etwa die ein- bis vierfache Energie zum Aufbrechen einer H-Brücke und nicht mal die Hälfte der Energie zum Aufbrechen einer Einfachbindung).

1 Aminosäuren und Proteine

Verantwortlich für die Strukturausbildung (Abweichung von der linearen Kette in der ein Peptid stets synthetisiert wird) sind zwischenmolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen. Letztere können dabei sowohl attraktiv, als auch repulsiv sein.

Ein weiterer, großer Faktor ist die polare (wässrige) Umgebung in der sich das Peptid befindet. Sie bewirkt, dass hydrophile Gruppen nach außen gerichtet werden, wohingegen hydrophobe (organische) Gruppen zum Zentrum des Peptids ausgerichtet werden, sodass es grob gesagt aus einem hydrophoben Kern mit einer hydrophilen Oberfläche besteht.

Dies ist auch der Grund, warum Proteine in organischen Lösungsmittel **denaturieren** (ihre native Struktur verlieren).

Eine Tatsache die noch zu beachten ist, ist dass Wasserstoffbrücken stets gerichtete Wechselwirkungen sind (da sie aus einem elektrischen Dipol resultieren). Deshalb sind sie umso stabiler, je linearer sie sind.

Eine Eigenschaft, die allen Proteinstrukturen gemein ist, ist dass sie keine Knoten aufweisen kann. Das bedeutet, dass jede Struktur durch bloßes "Ziehen" an beiden Enden entfaltet sein muss. Dies liegt daran, dass die Strukturbildung unmittelbar nach Beginn der Proteinsynthese beginnt, sodass das andere Ende der Kette noch gar nicht existiert. Dementsprechend können auch keine Knoten gebildet werden.

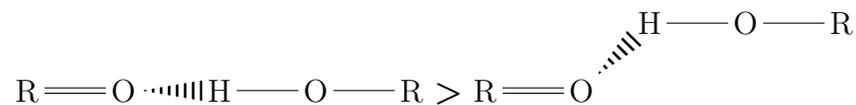


Abbildung 1.7: Vergleich der Stärke einer Wasserstoffbrücke mit unterschiedlicher Geometrie

Als Faustregel für die Proteinfaltung kann angenommen werden, dass in einem nativ gefalteten Protein folgende Aussagen zutreffen werden:

- Hydrophobe Reste "sammeln sich" im Protein-Inneren
- Ungesättigte H-Brücken-Donatoren oder -Akzeptoren werden nicht auftreten (Mit Ausnahme von der Proteinoberfläche)
- Es ist sehr dicht gepackt, ohne große Lücken, um die Van-der-Waals-Wechselwirkung zu maximieren

Von der ersten Regel sind selbstverständlich nur Proteine in wässriger Umgebung betroffen. Auch wenn dies die Meisten sein dürften, gibt es eine wichtige Ausnahme, die hier erwähnt werden soll. Integrierte Membranproteine machen genau das Gegenteil: Sie besitzen einen hydrophilen Kern und eine hydrophobe Hülle. Dies liegt daran, dass sie im Innern einer Biomembran liegen, das selbst aus hydrophoben Resten besteht.

Bei Proteinen, die nur teilweise in einer Biomembran verankert sind, erlaubt diese Tatsache von der reinen Struktur des Proteins (bzw. teilweise auch schon aus der reinen Aminosäure-Sequenz) Rückschlüsse darüber zu ziehen, welche Teile in der Membran verankert sein werden (alle Bereiche, die diese “umgedrehte” Struktur der integrierten Membranproteine besitzen).

1.5.1 Strukturtypen

Allgemein werden vier unterschiedliche Strukturtypen bei Proteinen unterschieden:

- **Primärstruktur:** Die reine Aminosäure-Sequenz eines Proteins
- **Sekundärstruktur:** Lokale Strukturausbildung der linearen Kette zu kleineren Komplexen (z.B. Helix oder Faltblatt)
- **Tertiärstruktur:** Räumliche Faltung der einzelnen (Super-)Sekundär-Elemente zu einer verdichteten Struktur (bildlich: Verklumpung)
- **Quartärstruktur:** Zusammenlagerung **mehrerer** Proteine zu einem größeren Komplex (z.B. Hämoglobin)

Die verschiedenen Aminosäuren kommen dabei unterschiedlich oft in den unterschiedlichen Sekundärstrukturtypen vor, da sie durch ihre speziellen Eigenschaften (durch ihre Reste) unterschiedlich gut für die einzelnen Strukturen geeignet sind. Trotz allem gibt es keinen ultimativen Zusammenhang zwischen einer Aminosäure-Gruppe und einer speziellen Struktur. Es kommt stets auf die gesamte Sequenz an.

Helix

Bei einer Helix handelt es sich um einen Sekundärstrukturtyp, in dem die lineare Kette wie eine Spirale aufgewickelt ist.

Im speziellen Fall der α -Helix bildet dabei immer die Carbonylgruppe (C=O) der n -ten mit der NH-Gruppe der $(n+4)$ -ten Aminosäure eine Wasserstoffbrücke.

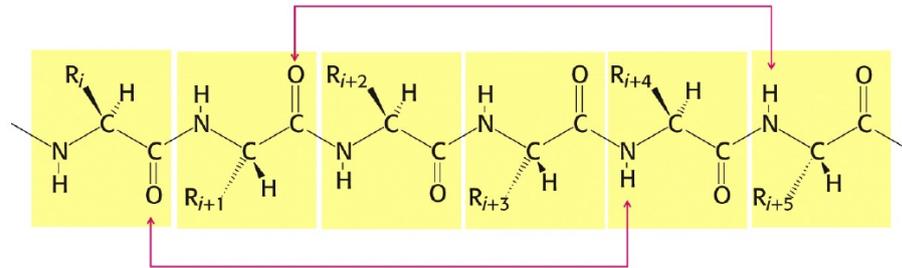


Abbildung 1.8: Entstehung der H-Brücken in einer α -Helix [17]

Allgemein werden Helizes danach klassifiziert, ob sie rechts- oder linkshändig sind. Dazu wird die Faust mit ausgestrecktem Daumen vom C- zum N-Terminus der Helix gezeigt (in die Richtung, in der die Spiralen nach Oben laufen). Je nachdem welche Hand benutzt werden muss, damit sich die Helix in Richtung der gekrümmten Finger "dreht" entscheidet sich die Händigkeit.

Lange α -Helizes sind stets rechtshändig. Lange linkshändige α -Helizes wurden noch nicht gefunden.

Weitere Charakteristika einer Helix sind der Anstieg (Höhengewinn) und die Rotation von einer Restgruppe zur Nächsten, was im Endeffekt in der sogenannten **Ganghöhe** der Helix resultiert, die angibt, wie viel Höhe mit einer Drehung gewonnen wird (Indirekt wird dadurch auch die Anzahl an Aminosäure-Restgruppen angegeben, die an einer Umdrehung beteiligt sind).

Eine α -Helix weist eine Ganghöhe von 100 \AA , einen Anstieg von $1,5 \text{ \AA}$, sowie eine Rotation von 100° auf. Dementsprechend enthält eine volle Drehung der Helix 3,6 Restgruppen.

Wichtig ist, dass die Aminosäure-Restgruppen niemals ins Innere der Helix zeigen, da dort kein Platz wäre, sie unterzubringen. Die Helix ist also so dicht gepackt,

wie es nur geht, um die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu maximieren, die die Helix zusätzlich stabilisieren.

Außerdem sind die H-Brücken stets annähernd parallel zur Helixachse, sodass sie eine möglichst lineare Geometrie einnehmen können, was zu maximaler Stabilität führt. Ein weiteres Merkmal der H-Brücken ist, dass sie alle in die selbe Richtung zeigen (bzw. die zugrundeliegenden Dipole sind alle gleich ausgerichtet), sodass eine Helix stets ein Gesamtdipolmoment entwickelt.

Bei einer α -Helix ist das Dipolmoment in etwa so groß, als wäre eine positive Ladung am N und eine Negative am C-Terminus der Helix.

Neben der α -Helix gibt es noch weitere Helix-Typen, die jeweils durch die Anzahl an Aminosäuren pro Umdrehung charakterisiert werden.

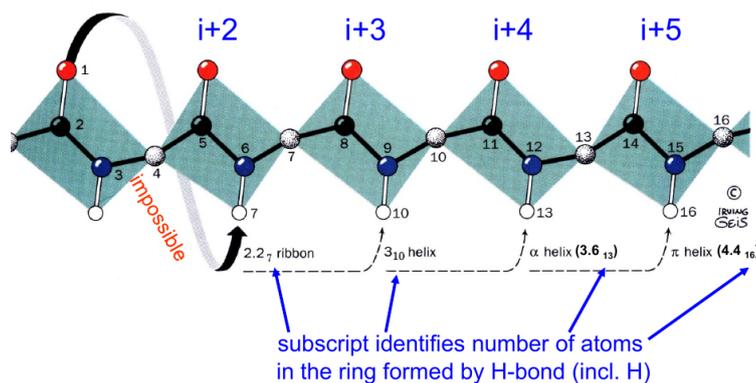


Abbildung 1.9: Unterscheidung der Helix-Arten anhand der Aminosäuren pro Umdrehung [17]

Bei Betrachtung der entsprechenden Daten fällt auf, dass die α -Helix die mit sehr viel Abstand am Häufigsten auftretende Helixart ist, wohingegen die 3_{10} -Helix selten und wenn überhaupt sehr kurz ist und die π -Helix sehr, sehr selten ist. Die Frage die sich nun stellt ist, warum dies der Fall ist. Dies wird in Kapitel 1.5.3 weiter erörtert.

Faltblatt

Bei einem Falblatt handelt es sich wie bei einer Helix um eine Sekundärstruktur. Allerdings wird bei einem Falblatt die Aminosäure-Kette nicht zu einer Spirale gewickelt, sondern in Reihen oder Schlingen nebeneinander gelegt, sodass eine Art planare Fläche entsteht. Der klassische Vertreter der Falblätter ist das β -Falblatt.

Es existieren das parallele und das antiparallele Falblatt, wobei beim Ersten die nebeneinanderliegenden Stränge stets in die selbe Richtung zeigen, wohingegen sie beim Zweiten stets in entgegengesetzte Richtungen zeigen.

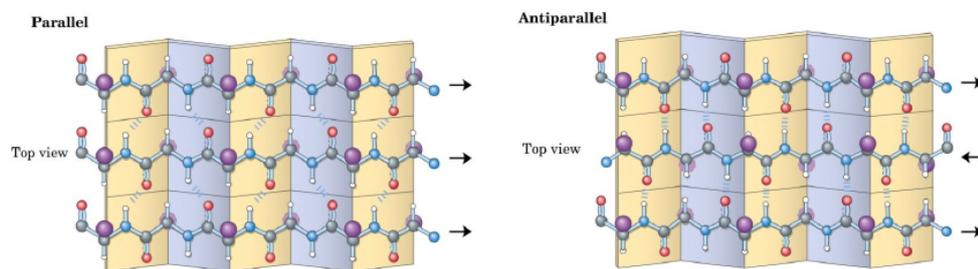


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der beiden Falblattstrukturen [17]

Gemischte Falblätter (parallel und antiparallel) sind sehr ungünstig und kommen daher so gut wie nie vor.

Die eingängliche Behauptung ein Falblatt wäre flach ist so nicht ganz korrekt. Die Ebene, die durch ein Falblatt erzeugt wird erfährt mit zunehmender Länge (senkrecht zur Aminosäure-Kette) eine Krümmung nach links, sodass ebenfalls ein Ansatz einer spiralförmigen Struktur entsteht.

β -Turn

Ein β -Turn ist gewissermaßen eine Sekundärstruktur, die nur 4 Aminosäuren umfasst. Er wird beispielsweise benötigt, um die Stränge in einem antiparallelen β -Falblatt zu verbinden.

Ein solcher Turn ist im Wesentlichen nichts Anderes, als der Beginn einer 3_{10} -

Helix: 4 Aminosäuren ordnen sich so an, dass eine Wasserstoffbrücke zwischen der i-ten und der (i+3)-ten Aminosäure ausgebildet wird.

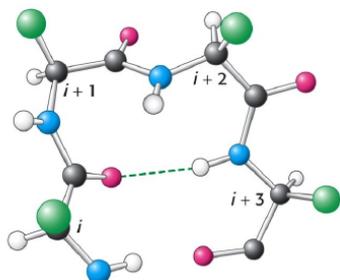


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung eines β -Turns [17]

γ -Turn

Ein alternativer Turn, der sogenannte γ -Turn, verwendet den Anfang einer α -Helix, ist aber weniger günstig (siehe Kapitel 1.5.3) und kommt dementsprechend kaum vor.

Es gibt nun zwei Möglichkeiten einen solchen β -Turn zu bilden (Typ I und Typ II):

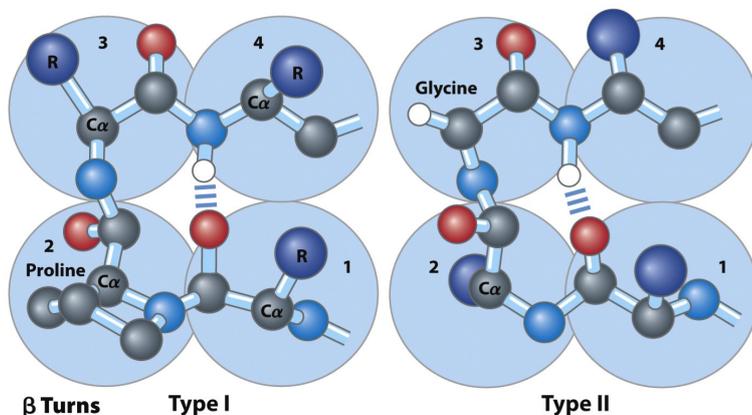


Figure 4-7a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Abbildung 1.12: Darstellung der beiden β -Turn-Typen (Typ I links und Typ II rechts) [3]. Der Übergang zwischen den Typen entsteht durch Umorientierung der Aminosäuren in Bereich 2 und 3 (und Ersetzen von Nummer 3 mit Glycine).

1 Aminosäuren und Proteine

Für Typ I ist Prolin sehr beliebt, da es ohne nennenswerte sterische Probleme die notwendige cis-Peptidbindung ausbilden kann (Zwischen Position 1 und 2 in Abbildung 1.12). Dagegen ist für die Bildung eines Typ II Glycin an Position 3 unerlässlich, da sonst die sterische Hinderung mit dem Sauerstoffatom in Bereich 2 zu groß wäre.

Loops

Loops sind wie Turns ein Verbindungsstück zwischen Sekundärstrukturelementen. Der große Unterschied ist, dass Loops **keine definierte Struktur** einnehmen, sondern einfach als "lose Kette" als Verbindungsstück dienen. Allerdings haben sie in den allermeisten Fällen eine **wohldefinierte Konformation**.

Da Loops keine definierte Struktur besitzen, ist auch die Aminosäure-Sequenz sehr variabel, was sie z.B. für Antikörper sehr wichtig macht, da hier die Aminosäure-Sequenzen verändert werden können, um bestimmte Antigene zu binden. Generell sind Loops sehr oft als Ligandenbinder oder Katalysator (aus dem selben Grund, wie bei den Antikörpern) im Einsatz und sind deshalb oft auf der Oberfläche von Proteinen zu finden.

Sie stellen außerdem eine Möglichkeit der Verbindung der Stränge in einem parallelen β -Faltblatt dar.

1.5.2 Supersekundäre Strukturen

Bei **supersekundären Strukturen** handelt es sich um direkte Kombinationen der bisher vorgestellten Sekundärstrukturen.

Ein Beispiel für eine solche Struktur wäre das sogenannte $\beta\alpha\beta$ -Motiv. Dies besteht aus einem zwei Stränge breiten parallelen β -Faltblatt, bei welchem die beiden Stränge nicht über einen Loop, sondern über eine α -Helix verbunden sind.

Der nächste Vertreter ist der "Coiled-Coil", bei dem es sich um zwei Helizes handeln, die miteinander in einer Art "Superhelix" verdrillt sind. Eine solche Struktur wird von Helizes gebildet, die auf der einen Seite hydrophil und auf der anderen Seite hydrophob sind. In Wässriger Umgebung lagern sich dann die hydrophoben Seiten beider Helizes zusammen. Sie verdrillen sich also so, dass immer die hydro-

phobe Seite der Einen auf der der Anderen liegt, sodass die Außenseite des Coiled Coils hydrophob ist (was in wässriger Umgebung ja sehr von Vorteil ist).

Diese Coiled Coils kommen sehr häufig bei Proteinen vor, die eine Art “Arm” benötigen. Dies ist zum Beispiel bei sehr vielen Motorproteinen der Fall. Außerdem bieten sie eine Möglichkeit für zwei Proteine eine Quartärstruktur zu bilden, indem sie jeweils eine Helix zu einem Coiled Coil beisteuern und somit dann verknüpft sind.



Abbildung 1.13: Schematische Darstellung eines Coiled Coils [17]

Ein weiterer Typ ist der sogenannte “Helix-Verbund”. Dabei lagern sich mehrere Helizes (typischerweise drei oder vier) so zusammen, dass sie die Mantelfläche eines Zylinders bilden. Dabei sammeln sich alle hydrophoben Reste der Helizes in der Zylindermitte, sodass sie von der wässrigen Umgebung abgeschirmt sind während die Außenseite des Verbundes wieder hydrophil ist.

Als Nächstes gibt es noch den “Helix-Turn-Helix”, bzw. “Helix-Loop-Helix” bei dem zwei Helizes über einen Turn, bzw. eine Loop verbunden sind, sodass sie gewinkelt zueinander stehen können. An dem Turn, bzw. Loop finden dann auch häufig Ligandenbindungen statt.

Das β -Fass ist ebenfalls eine mögliche supersekundäre Struktur, bei der sich ein (oder mehrere) antiparallele β -Faltblatt auf der Mantelfläche eines Zylinders zusammenlagern und somit die Mantelfläche des Zylinders (Fasses) bilden. Die Faltblattstränge können dabei entweder durch Turns oder Loops verbunden sein.

Ein Beispiel für diesen Strukturtyp sind Immunglobuline, die aus zwei Faltblättern bestehen.

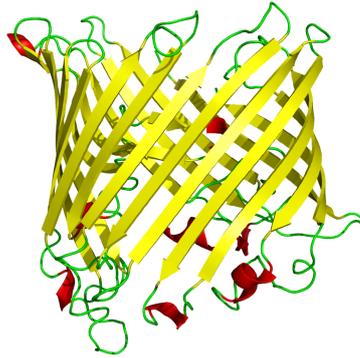


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung eines β -Fasses [4]

Der letzte Vertreter der hier noch genannt werden soll ist das sogenannte “Greek-key-motif”:

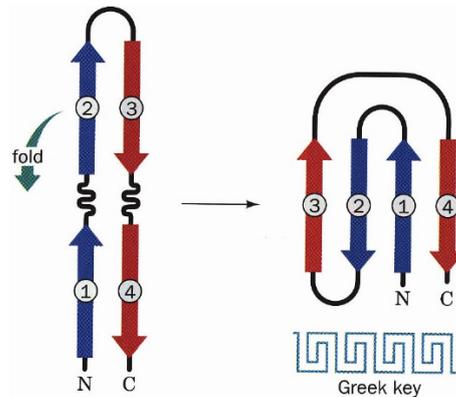


Abbildung 1.15: Schematische Darstellung eines Greek-key-motifs [17]

Supersekundäre Strukturen können aus bis zu 5 Sekundärstrukturelementen bestehen und sind vielfältig in Gebrauch. Größere Strukturen werden dabei häufig als “Motiv” (Motif) oder “Faltung” (Fold) bezeichnet.

1.5.3 Einflussfaktoren auf die Proteinfaltung

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Einflussfaktoren auf die Proteinfaltung am Beispiel der verschiedenen Helixarten aus Abbildung 1.9 besprochen.

Im Wesentlichen gibt es zwei gegensätzliche “Kräfte” die bei diesem Vorgang wichtig sind

- Verringerung der Entropie durch Erzwingen einer bestimmten Konformation der Peptidkette (Ohne eine feste Struktur kann die Kette im Prinzip unendliche viele Konformationen annehmen) $\Delta G > 0$
- Gewinn neuer, attraktiver zwischenmolekularer Wechselwirkungen $\Delta G > 0$

Um eine neue Helix zu bilden, müssen sich zunächst in der sogenannten **Nukleationsphase** eine entsprechende Anzahl an Aminosäure-Resten zu einer Spiralstruktur anordnen, bevor die ersten H-Brücken entstehen. Dementsprechend ist dies ein Vorgang, der die Entropie verringert, ohne irgendwelche Vorteile zu bringen. Somit gilt also auf jeden Fall $\Delta G_{nukl.} < 0$.

Sobald die Nukleationsphase einmal überschritten ist, beginnt die **Elongationsphase**, bei der jede weitere Ordnung eines Aminosäure-Restes eine weitere H-Brücke ausbildet und somit einen Energiegewinn darstellt. Die Entropie wird bei diesem Vorgang zwar nach wie vor verringert, aber im Gegenzug wird Energie durch Ausbildung neuer attraktiver Wechselwirkungen freigesetzt. Nicht zu hohe Temperaturen vorausgesetzt (bei denen der entropische Effekt überwiegen würde) gilt $\Delta G_{el.} < 0$.

Allein mit dieser Erkenntnis kann erklärt werden, warum die π -Helix so selten ist: Bei ihr ist die Nukleationsphase am längsten, sodass diese erste Phase im Vergleich zu den anderen beiden Helizes stärker benachteiligt ist, was im Endeffekt dazu führt, dass es so gut wie nie zur Elongationsphase kommt.

Ohne weitere Betrachtung müsste aber die 3_{10} -Helix die Häufigste sein. Dass dem nicht so ist induziert, dass es noch mindestens einen weiteren Effekt geben muss, der bei der Proteinstrukturbildung (bzw. bei der Helixbildung) eine Rolle spielt.

Tatsächlich ist genau dies der Fall: In einer 3_{10} -Helix können nur gebogene Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, die (wie bereits zuvor festgestellt worden ist) nicht so stabil sind, wie (annähernd) Lineare.

Darum ist der Energiegewinn in der Elongationsphase bei einer α -Helix größer, als bei einer 3_{10} -Helix. Offenbar reicht also der Energiegewinn bei Letzterer nicht aus, um den entropischen Effekt zu kompensieren (bzw. eben nur selten).

Im Gesamtbild erklärt sich nun aber auch, dass eine 3_{10} -Helix nur kurz ist (soweit

1 Aminosäuren und Proteine

sie überhaupt gebildet wird), denn für kurze Helizes ist die α -Helix benachteiligt, da sie eine längere Nukleationsphase braucht, die bei einer kurzen Elongationsphase einfach nicht wieder wett gemacht werden kann.

Denaturierung

Mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung kann die Denaturierung von Proteinen bei hohen Temperaturen leicht erklärt werden, da mit höherer Temperatur der entropische Term überwiegt und somit die Entfaltung des Proteins auf einmal exergonisch wird.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1.1)$$

1.5.4 Domänen

Proteine weisen in aller Regel sogenannte **Domänen** auf. Domänen sind Bereiche im Protein, die den selben Strukturtyp einnehmen.

Per Definition kann die Aminosäure-Kette eine Domäne nur einmal “betreten” und einmal “Verlassen”. Somit handelt es sich bei Domänen um unabhängige Faltungsbereiche, die häufig auch eine funktionelle Gruppe eines Proteins darstellen.

1.6 Proteinfunktionen

1.6.1 Faserproteine

Faserproteine haben eine sehr längliche (fadenartige) Struktur und spielen bei der Ausbildung von organischen Strukturen eine große Rolle (z.B. Aufbau eines Cytoskeletts).

α -Keratin

α -Keratin ist ein wichtiger Baustoff im menschlichen Körper. So besteht beispielsweise fast die gesamte Trockenmasse an Haaren aus α -Keratin.

Auch Nägel, Horn und Haut bestehen zu großen Anteilen aus diesem Faserprotein.

Es besteht aus übereinander geschichteten Strängen von coiled coils aus α -Helizes, deren Zusammenhalt zusätzlich durch Disulfidbrücken verstärkt werden kann. Das Nashorn eines Rhinoceros besteht beispielsweise aus α -Keratin, welches aus etwa 18% Cystein besteht das Disulfidbrücken ausbildet.

α -Keratin lässt sich durch Zug reversibel Strecken/Verlängern.

Fibroin

Fibroin ist ein Faserprotein, welches beispielsweise in Seide vorkommt. Es handelt sich dabei um ein glycin- und alaninreiches Protein, welches in einer dichten Packung von β -Faltblättern vorkommt, wobei die Aminosäure-Reste gegeneinander verkeilt sind, um die Stabilität zu erhöhen.

Es ist im Gegensatz zum α -Keratin nicht streckbar, da die β -Faltblattstruktur die Aminosäure-Ketten annähernd in ihrer ausgestreckten Form enthält. Außerdem hindern die vielen Wasserstoffbrücken innerhalb der Struktur ebenfalls eine Streckung des Proteins.

Da es keine 3D-Vernetzung in Form von Bindungen (z.B. Disulfidbrücken) aufweist, handelt es sich um ein sehr flexibles Protein.

Kollagen

Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil in Knochen, Sehnen, Bändern, Knorpeln, Augenlinsen, sowie vielen weiteren Elementen in unserem Körper. Insgesamt macht es etwa 30% des kompletten menschlichen Körpers aus.

Das bemerkenswerte an diesem Stoff ist seine enorme Zugfestigkeit, die größer als die von Stahl ist (bei gleichem Querschnitt).

Kollagen ist aus mehreren einzelnen Tropokollagen-Molekülen, welche versetzt aneinandergelagert sind.

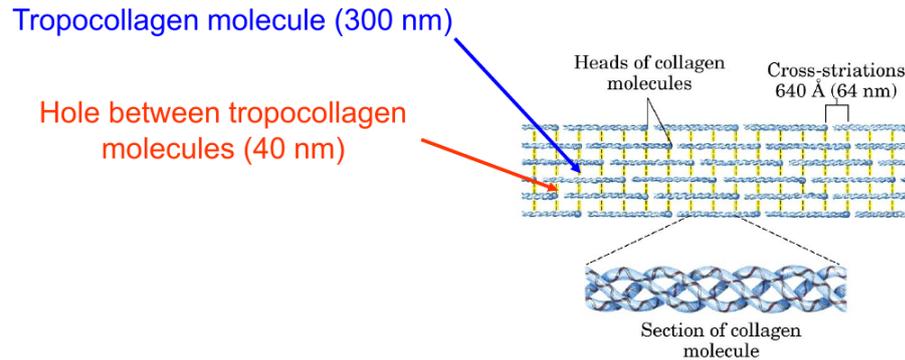


Abbildung 1.16: Schematische Darstellung der Kollagen-Struktur [17]. Zu beachten sind die zueinander versetzten Lücken zwischen den Tropokollagen-Molekülen.

Tropokollagen besteht seinerseits aus drei zu einem coiled coil verwundenen (rechtsgewunden) Polyprolin-II-Helizes (linksgewunden). Diese Prolin-Helizes bestehen zu großen Teilen aus Prolin (daher auch der Name) und Glycin, Helizes sterisch überhaupt erst möglich zu machen.

Des Weiteren kommt in Kollagen auch das sogenannte 4-Hydroxyprolin vor, bei welchem es sich um ein funktionalisiertes Prolin-Molekül handelt. Dabei wurde an Position 4 ein Wasserstoffatom durch ein Hydroxgruppe substituiert. Diese Modifikation der Aminosäure findet allerdings erst nach der Proteinsynthese statt.

Diese zusätzlich eingeführten Hydroxygruppen erlauben es dann zwischen den drei Polyprolin-II-Helizes Wasserstoffbrücken auszubilden, die dann diese Zusammenlagerung zum Coiled Coil stabilisieren.

Kollagen und Vitamin-C-Mangel

An der Modifikation von Prolin zum 4-Hydroxyprolin ist Vitamin-C (Ascorbinsäure) beteiligt, sodass dieses bei Vitamin-C-Mangel nicht mehr gebildet werden kann. Somit verliert das produzierte Kollagen seine Stabilität, was zu poröser Haut, instabilen Blutadern und Ähnlichem führt.

Zur weiteren Stabilitätsverbesserung im Kollagen werden die einzelnen Tropokollagen-Moleküle chemisch miteinander verbunden (sogenannte "Crosslinks"). Da diese Reaktion enzym-katalysiert ist, muss das Enzym auch irgendwie an die entsprechenden Bereiche kommen. Die Verknüpfung erfolgt aber nach dem Zusam-

menlagern der Tropokollagen-Moleküle zum Kollagen, sodass die inneren Molekülstränge für das Enzym nicht erreichbar wären, wenn nicht zwischen den einzelnen Tropokollagen-Molekülen Löcher wären (siehe Abbildung 1.16). Das Enzym kann durch die Löcher in das Kollagen hinein diffundieren und somit auch die inneren Stränge miteinander verknüpfen.

Das hat dann auch zur Folge, dass diese Verlinkungen hauptsächlich in der Nähe dieser Löcher und somit am Ende der Tropokollagen-Molekülen erfolgen.

Die Synthese von Tropokollagen in einer Zelle wäre sehr problematisch, da dieses logischerweise dazu neigt sich zu Kollagen zusammen zu lagern. Würde dies jedoch innerhalb der Zelle geschehen, wäre das ungeschickt (Schließlich ist Kollagen Hauptbestandteil von Fasergewebe, welches innerhalb einer Zelle aber denkbar im Weg wäre).

Darum wird nicht direkt Tropokollagen, sondern zunächst Prokollagen synthetisiert, welches an beiden Enden noch weitere Aminosäuren besitzt. Diese verhindern ein Zusammenschließen der Prokollagen-Moleküle und verhindern somit effektiv eine "Verklumpung der Zelle".

Um dann das Tropokollagen aus dem Prokollagen zu gewinnen, müssen nur die entsprechenden Peptidbindungen katalytisch hydrolysiert (die Randketten abgespalten) werden und schon steht der Bildung von Kollagen nichts mehr im Wege.

1.6.2 Ligandenbindung

Die wohl bei Weitem bekannteste Ligandenbindung eines Proteins ist die Sauerstoffbindung im roten Blutfarbstoff Hämoglobin.

Allgemein kann ein Ligand dann an ein Protein gebunden werden, wenn er sterisch an, bzw. in das Protein passt und dort durch entsprechende Wechselwirkungen gehalten wird. Somit ist die Ligandenbindung eine relativ spezifische Reaktion, da der Ligand in Form, Größe und Wechselwirkung mit dem Protein im Einklang stehen muss.

Bindet ein Protein einen Liganden, so ist es möglich, dass das Protein durch die neuen Wechselwirkungen eine Konformationsänderung erfährt, was ggf. seine Eigenschaften beeinflusst. Befindet sich das von der Konformationsänderung betroffene Protein in einer Quartärstruktur mit anderen Proteinen pflanzt sich diese

1 Aminosäuren und Proteine

Änderung in den meisten Fällen weiter fort, sodass im Endeffekt alle Proteine eine Konformationsänderung erfahren haben.

Die Stärke dieser Bindung lässt sich über eine Gleichgewichtskonstante beschreiben. Wird die Bindung eines Liganden L an ein Protein P zum Komplex LP betrachtet, so ergibt sich für die Bindungskonstante

$$K_{ass} = \frac{[LP]}{[L] \cdot [P]} = \frac{1}{K_{dis}} \quad (1.2)$$

Wie in Gleichung (1.2) zu sehen ist, kann auch der Zerfall des entsprechenden Komplexes betrachtet werden, was dann durch die Dissoziationskonstante K_{dis} charakterisiert ist. Diese Dissoziationskonstante ist genau der Kehrwert der Bindungskonstante K_{ass} .

Unter Beachtung der Massenerhaltung kann Gleichung (1.2) zur Bestimmung unbekannter Größen verwendet werden, wobei dies jedoch genaue Messungen der Konzentrationen voraussetzen, die häufig nicht ohne Weiteres möglich sind.

Bestimmung der Bindungskonstanten

Um die Bindungskonstante K_{ass} messen zu können, wird häufig der Bindungsanteil Θ betrachtet. Dieser gibt an, welcher Anteil der verfügbaren Bindungsmöglichkeiten auch in einer Bindung beteiligt sind.

Bei der Messung wird dabei die Konzentration eines Bindungspartners konstant gehalten, während der Zweite hinzutitriert wird. Während dieses Vorgangs kann dann der Bindungsanteil Θ bei unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen gemessen werden.

Wird dieser Anteil bei konstanter Proteinkonzentration bestimmt, so ergibt er sich zu

$$\Theta = \frac{\text{Proteine, die Ligand gebunden haben}}{\text{Gesamte Menge an Protein}} = \frac{c_{PL}}{c_{PL} + c_L} \quad (1.3)$$

Für den Fall, dass die Ligandenkonzentration konstant gehalten wird und das Protein hinzutitriert wird, gilt

$$\Theta = \frac{\text{Gebundener Ligand}}{\text{Gesamte Menge an Ligand}} = \frac{c_{PL}}{c_{PL} + c_L} \quad (1.4)$$

Im Folgenden soll nun der Fall der konstanten Proteinkonzentration (siehe Gleichung (1.3)) betrachtet werden. Dabei soll gelten $c_L \gg c_P$, sodass also selbst bei einem Bindungsanteil von 1 noch sehr viel Ligand ungebunden vorliegt. Somit kann die Näherung $c_L \approx c_{L,gesamt}$ getroffen werden.

Somit gilt

$$\begin{aligned}\Theta &= \frac{c_{PL}}{c_{PL} + c_L} = \frac{K_{ass} \cdot c_L \cdot c_P}{K_{ass} \cdot c_L \cdot c_P + c_P} = \frac{K_{ass} \cdot c_L}{K_{ass} \cdot c_L + 1} \\ &= \frac{c_L}{c_L + \frac{1}{K_{ass}}}\end{aligned}$$

Das bedeutet, dass der Bindungsanteil Θ direkt mit dem Kehrwert der Bindungskonstante K_{ass} zusammen hängt, was ja aber nichts anderes, als die Dissoziationskonstante ist. Somit gilt

$$\Theta = \frac{c_L}{c_L + K_{diss}} \quad (1.5)$$

Gleichung (1.5) beschreibt eine hyperbolische Kurve, die mit steigendem c_L asymptotisch gegen Eins strebt.

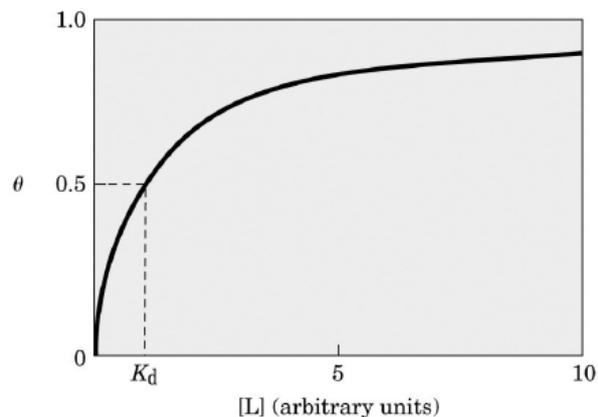


Abbildung 1.17: Allgemeiner Verlauf einer Kurve gemäß Gleichung (1.5). [17]

Wie schon in Abbildung 1.17 schon eingezeichnet bietet es sich bei dieser Art Messung an, den Punkt abzulesen, an dem der Bindungsanteil genau 50% beträgt. Diese Stelle wird mit K_d bezeichnet und beschreibt im Allgemeinen die bis zu diesem Zeitpunkt zugegebene Ligandenmenge (gemessen als Konzentration in der Lösung)

1 Aminosäuren und Proteine

Mit Hilfe von oben genannter Näherung kann nun die Bindungskonstante des Protein-Ligand-Komplexes berechnet werden:

$$\begin{aligned}\Theta = 0,5 &= \frac{c_L}{c_L + K_{diss}} \\ 0,5c_L + 0,5K_{diss} &= c_L \\ K_{diss} &= c_L \approx c_{L,gesamt}\end{aligned}$$

Am Punkt $\Theta = 0,5$ gilt also ein direkter Zusammenhang zwischen der bis dato zugegebenen Ligandenmenge und der Dissoziationskonstante. Somit ist die Bindungskonstante gleich der inversen Ligandenkonzentration.

$$K_{ass} = \frac{1}{c_L} \approx \frac{1}{c_{L,gesamt}} \quad \text{für } \Theta = 0,5 \quad (1.6)$$

Bindung von Sauerstoff

Die meisten uns bekannten Lebensformen leben aerob, was bedeutet, dass sie Sauerstoff für ihren Stoffwechsel benötigen.

Bei kleinen Lebewesen ist es gegebenenfalls ausreichend die Sauerstoffmoleküle durch die Haut in den Körper zu den entsprechenden Stoffwechselprozessen hin diffundieren zu lassen. Dies ist allerdings nur über wenige Millimeter effektiv, sodass alle größeren Lebewesen einen aktiven Sauerstofftransport in ihren Körper praktizieren müssen.

Da es keine Aminosäure-Reste gibt die Sauerstoff reversibel als Ligand binden können, werden für diesen Zweck Fe^{2+} -Ionen verwendet. Allerdings wird Fe^{2+} von Sauerstoff unter normalen Verhältnissen zu Fe^{3+} oxidiert, wobei sehr reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen (z.B. Peroxide). Fe^{3+} kann aber seinerseits keinen Sauerstoff mehr binden, sodass das Verwenden von Fe^{3+} zu diesem Zweck nicht infrage kommt.

Die Lösung für dieses Problem ist die Abschirmung des Fe^{2+} in einem Protein, so dass es noch Sauerstoff reversibel binden kann, aber nicht mehr von diesem oxidiert werden kann. Dieses Schutzprotein ist das sogenannte Häm, bei dem es sich um ein vom Porphyrin abgeleitetes Molekül handelt.

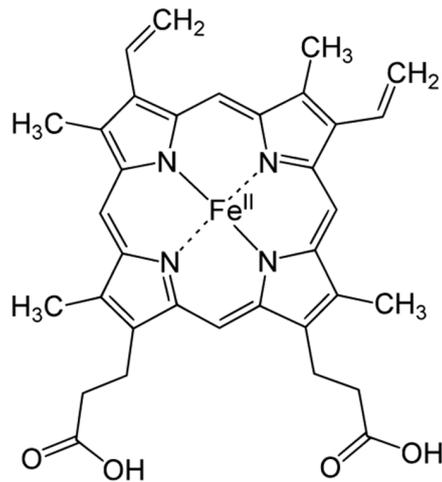


Abbildung 1.18: Aufbau des Häm-Moleküles, welches ein Fe^{2+} in seiner Mitte gebunden hat. [5]

Wie in Abbildung 1.18 zu sehen ist, besitzt das Fe^{2+} eine sechsfache Koordination in einer Ebene durch das Häm-Molekül, sodass es noch zwei freie Koordinationsstellen (oben und unten) besitzt. An einem dieser freien Koordinationsstellen wird zur reversiblen Bindung eines Sauerstoffmoleküls verwendet, während die Andere zur Bindung des Häms an das Myoglobin gebraucht wird.

Das Myoglobin ist nötig, da das Häm-Molekül wie aus Abbildung 1.18 zu erkennen ist, sehr hydrophob ist und somit innerhalb einer Zelle oder im Blut nicht vernünftig transportiert werden kann. Das Myoglobin kann sich als eine hydrophile Tasche vorgestellt werden, in die das Häm eingebettet ist. Das "Taschen-Innere" ist dabei ebenfalls hydrophob, um das Häm darin einlagern zu können.

Strukturell handelt es sich bei dem Myoglobin um ein Protein mit sehr hohem α -Strukturanteil.

Die Bindung des Häm-Moleküls in das Myoglobin erfolgt dabei dadurch, dass ein Histidin-Rest des Myoglobins die zweite freie Koordinationsstelle am Fe^{2+} im Häm besetzt.

Durch diesen Protein-Schutz ist nun gewährleistet, dass Sauerstoff nur an die ver-

1 Aminosäuren und Proteine

bleibende Koordinationsstelle binden kann und in dieser einfachen Koordination das Fe^{2+} nicht oxidieren kann.

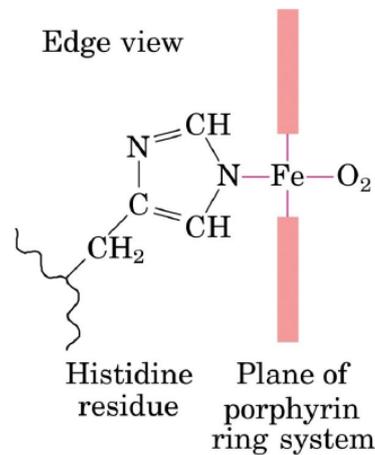


Abbildung 1.19: Seitenansicht eines Häm-Moleküls, das in einem Myoglobin gebunden ist [17]

Durch die Bindung des Sauerstoffs an das Häm-Molekül wird die Elektronenverteilung im Hämoglobin verändert, was seine Farbe von einem dunklen Lila zu einem hellen Rot ändert.

Das Problem ist nun, dass das Häm nicht nur Sauerstoff binden kann, sondern beispielsweise auch Kohlenstoffmonooxid. Letzteres wird vom freien Häm-Molekül sogar 2000 mal so stark gebunden wie Sauerstoff. Somit wird Sauerstoff als Ligand von Kohlenstoffmonooxid verdrängt.

Im Hämoglobin wird jedoch die Bindung des Kohlenstoffmonooxids durch einen Histidin-Rest des Myoglobins sterisch behindert, sodass die Bindung des Monoxids "nur noch" 200 mal stärker, als die von Sauerstoff ist. Diese sterische Hinderung ist auf die Geometrie des Sauerstoff-, bzw. Kohlenstoffmonooxid-Moleküls zurückzuführen. Sauerstoff ist dank seiner freien Elektronenpaare sp^2 hybridisiert und weist bei einer Koordination zum Fe^{2+} deshalb einen Winkel auf. Das sp hybridisierte Kohlenstoffmonooxid weist bei einer Koordination eine lineare Bindung auf. Durch diese unterschiedlichen "Bindungswinkel" kommt die unterschiedliche sterische Hinderung zustande.

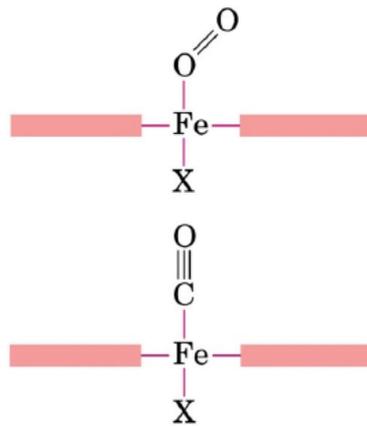


Abbildung 1.20: Schematische Darstellung der Bindung von Sauerstoff bzw. Kohlenstoffmonooxid zum Häm-Molekül.

1.6.3 Beispiel: Hämoglobin

Hämoglobin dient zum Sauerstofftransport in Organismen. Es handelt sich dabei um ein Molekül mit einer Quartärstruktur aus vier Untereinheiten die strukturell sehr ähnlich zum im vorigen Kapitel vorgestellten Myoglobin sind.

Bei den vier Untereinheiten handelt es sich um zwei β und zwei α Komponenten. Deswegen wird auch auf geschrieben, Hämoglobin habe die prinzipielle Struktur $\alpha_2\beta_2$.

Ein wesentlicher Unterschied des Hämoglobins zum Myoglobin besteht darin, dass das Hämoglobin gleich vier Häm-Moleküle binden kann (eines in jeder Teileinheit).

Bei genauerer Betrachtung des Moleküls stellt sich heraus, dass es immer eine sehr starke Wechselwirkung zwischen einer α - und einer β -Untereinheit existieren, sodass das Hämoglobin effektiv aus zwei Untereinheiten besteht, die ihrerseits aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen.

Aufgrund der starken Wechselwirkung untereinander werden die vergebenen Indizes für die entsprechenden Untereinheiten gewählt, sodass diese starke Wechselwirkung jeweils zwischen α_1 und β_1 statt findet (und entsprechend für die zweite Teileinheit). Die Wechselwirkung zwischen α_1 und β_2 sind entsprechend schwächer,

1 Aminosäuren und Proteine

sodass sich bei der Bindung von Sauerstoff eine Konformationsänderung an dieser “Bindung” stattfindet, während die 1-1-“Bindungen” davon nicht betroffen sind.

Durch diese Konformationsänderung besitzt das Hämoglobin zwei stabile Zustände: “Relaxed” (R) und “Tensed” (T). Dabei ist die T-Konformation entgegen der namentlichen Intuition die energetisch günstigere Konformation (somit handelt es sich um den Grundzustand des Hämoglobins), die durch viele Salzbrücken und sonstige positive Wechselwirkungen stabilisiert wird.

Bindet nun ein Sauerstoff-Ligand an das Hämoglobin, so wechselt es vom T- zur R-Konformation. Durch diese Konformationsänderung sind natürlich auch die eingebauten Häm-Moleküle betroffen, die damit ihre räumliche Position und Anordnung ändern.

Tatsächlich ist es so, dass das Hämoglobin in T-Konformation keine sehr hohe Affinität zu Sauerstoff aufweist. Erst durch Veränderung der Konformation zu R wird die erwartete Affinität zum Sauerstoff hergestellt. Diese unterschiedlichen Affinitäten sind damit zu erklären, dass das Molekül in T-Konformation relativ starr ist, sodass es sich nicht wirklich an die Konformationsänderung anpassen kann, die eine Sauerstoffbindung mit sich bringt. In R-Konformation ist das Molekül relativ flexibel, sodass sich die Molekülstruktur leicht an die Konformationsänderung einer Sauerstoffbindung anpassen kann.

In der Praxis bedeutet dies, dass das Hämoglobin durch die Bindung zu einem ersten Sauerstoffmolekül (bzw. durch die damit einhergehende Konformationsänderung von T zu R) “aktiviert”, sodass die Bindung von Sauerstoff an Bindungspositionen 2-4 deutlich leichter vonstatten gehen kann.

Dieser Effekt wird auch als ein **allosterischer Effekt** bezeichnet: Die Bindung von Sauerstoff auf einer Seite beeinflusst die Bindung von Sauerstoff auf der anderen Seite (allos = griech. für Anders).

Konformationsänderung bei Sauerstoffbindung

Die Konformationsänderung des Proteins bei Sauerstoffbindung ist recht einfach mit Hilfe des VSEPR-Konzepts zu erklären. Ohne eine Sauerstoffbindung besitzt das Fe^{2+} -Zentralteilchen 5 Liganden (4 Stickstoffatome aus dem Häm-Molekül und der 5. Stickstoff aus dem Histsidin-Rest), sodass sich eine quadratische Pyramide als Komplexgeometrie ergibt. Bei dieser Geometrie ist das Zentralteilchen im

Mittelpunkt der Pyramide und somit nicht in der quadratischen Grundfläche der Pyramide.

Bindet nun das Sauerstoffmolekül als sechster Ligand, so wechselt die Koordinationsgeometrie zu einer quadratischen Bipyramide, bei welcher das Fe^{2+} nun in der quadratischen Grundfläche zu Liegen kommt. Somit hat sich also das Zentralteilchen durch die Anlagerung des Sauerstoffliganden etwas in Richtung des neuen Liganden bewegt. Da der Histidin-Rest an dieses Zentralteilchen gebunden ist, wird dieser ebenfalls mit bewegt.

Diese kleine Bewegung (etwa $0,4 \text{ \AA}$) wird nun durch einen molekularen Hebel, der am entsprechenden Histidin beginnt in eine größere Bewegung umgewandelt, die somit für die Konformationsänderung verantwortlich ist.

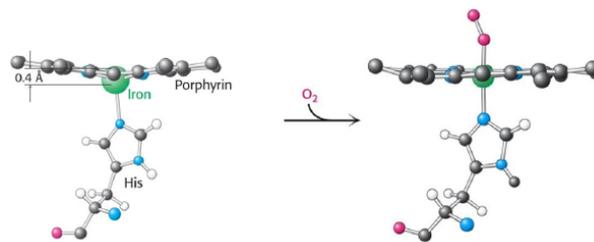


Abbildung 1.21: Schematische Darstellung der Vorgänge beim Binden eines Sauerstoffmoleküls [17].

Diese Konformationsänderung betrifft zu diesem Zeitpunkt nur eine Untereinheit des Hämoglobins, aber durch die Kopplung der Untereinheiten wird diese Änderung auch auf die anderen Segmente übertragen. Dies ist der Grund warum das Binden eines Sauerstoffes an einer Bindungsstelle die restlichen Drei aktiviert.

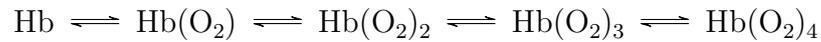
Da eine Mischung der Konformation (aktiviert und nicht-aktiviert) sehr instabil ist, kann das Hämoglobin nach dem “Alles-oder-Nichts-Prinzip” entweder komplett im R- oder komplett im T-Zustand gefunden werden.

Charakteristika einer (positiven) Kooperation

Eine **positive Kooperation** wie sie beispielsweise bei der Sauerstoffbindung im Hämoglobin zu finden ist, ist im Wesentlichen dadurch charakterisiert, dass ein

1 Aminosäuren und Proteine

“Alles-oder-Nichts-Prinzip” vorliegt. Das bedeutet, dass sämtliche Zwischenstufen im chemischen Gleichgewicht praktisch nicht vorkommen.



Im Falle des Hämoglobins bedeutet dies, dass entweder freies Hämoglobin oder aber voll besetztes Hämoglobin im chemischen Gleichgewicht vorliegt. Alle teilweise besetzten Zwischenstufen sind praktisch nicht präsent.

Ein weiteres Charakteristikum ist die Tatsache, dass der zweite Ligand signifikant stärker an das Zentralteilchen gebunden ist, als der Erste, da bei der Bindung des Zweiten eine höhere Affinität zum Ligand vorliegt.

Das letzte Charakteristikum ist eine sigmoidale Bindungs-, bzw. Sättigungskurve.

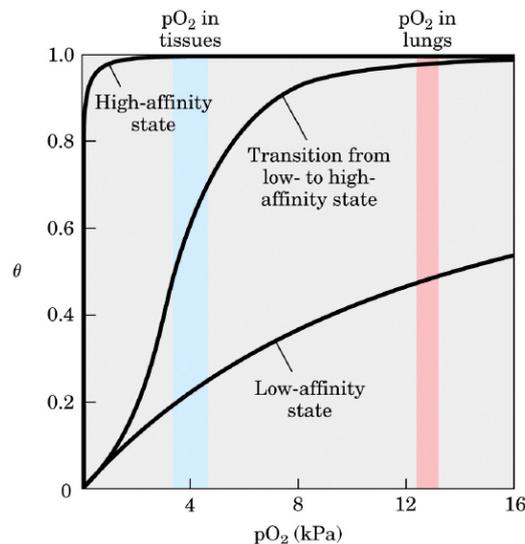


Abbildung 1.22: Sättigungskurve von Hämoglobin im aktivierten, bzw. inaktivierten Zustand und in der Mitte die sigmoidale Kurve der positiven Kooperation [17].

Wie in Abbildung 1.22 zu erkennen, weist die sigmoidale Kurve in der Mitte eine sehr hohe Steigung auf, dh. bei einer kleinen Änderung im Sauerstoffpartialdruck findet eine große Änderung in der Hämoglobinsättigung statt.

Dies ist sehr wichtig, da der Sauerstofftransport im Körper auf Partialdruckunterschiede von Sauerstoff im Gewebe und in der Lunge beruht. Durch den hohen

Partialdruck in der Lunge wird das Hämoglobin mit Sauerstoff “aufgeladen” und aufgrund des geringeren Partialdrucks im Gewebe “entlädt” sich das Hämoglobin gemäß der Kurve in Abbildung 1.22.

Wie zu erkennen ist würde für den Fall eines immer aktivierten Hämoglobins überhaupt kein Sauerstoff und im Falle des dauerhaft deaktivierten Hämoglobins vergleichsweise wenig Sauerstoff anhand dieses Mechanismus transportiert werden.

Die sigmoidale Kurve erlaubt aufgrund ihrer “schalterartigen” Eigenschaft einen sehr hohen Sauerstofftransport bei der selben Partialdruckdifferenz (es wird etwa doppelt so viel transportiert).

1.6.4 Immunsystem

Unser Immunsystem besteht aus zwei Komponenten: Der zellulären und der humoralen Immunreaktion. Letztere soll uns dabei an dieser Stelle etwas genauer beschäftigen, da sie durch sogenannte **Antikörper** durchgeführt wird, die ihrerseits nichts Anderes, als Proteine sind, die in den B-Lymphozyten (B-Zellen) produziert werden.

Ein Antikörper besteht stets aus zwei “schweren” und zwei “leichten” Ketten.

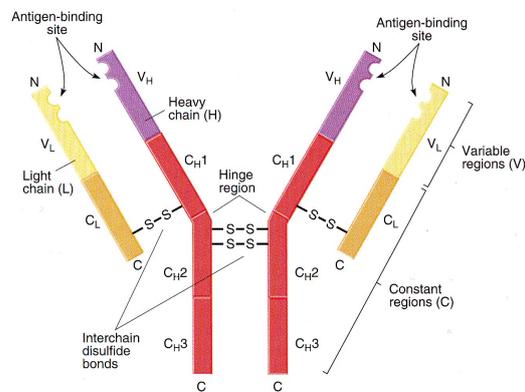


Abbildung 1.23: Schematische, allgemeine Darstellung eines “klassischen” Antikörpers [6].

Wie in Abbildung 1.23 zu sehen ordnen sich die vier Ketten eines Antikörpers in drei Domänen an. Sie nehmen dabei die sogenannten Ig (Immunglobolin)-Faltung

1 Aminosäuren und Proteine

an, was aus zwei Schichten antiparalleler β -Faltblätter besteht (“ β -Sandwich”), welches die Topologie eines Greek-Key-Motives (siehe Abbildung 1.15 aufweist.

Die Antikörper selbst können nun in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, die sich alle in ihrer “schweren” Kette voneinander unterscheiden. Sie werden dann in die Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE eingeteilt.

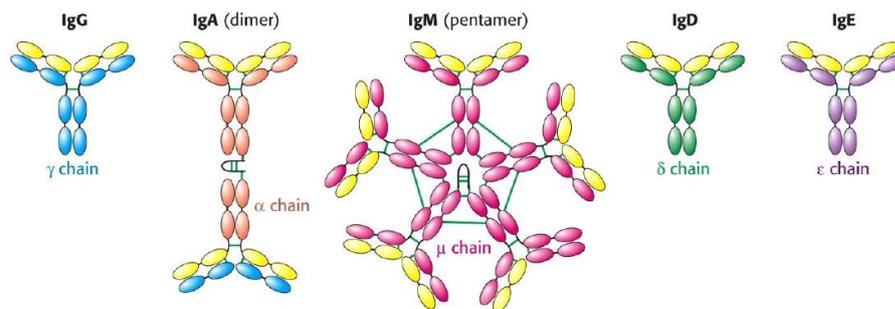


Abbildung 1.24: Verschiedene Antikörper-Klassen [17]

Jeder dieser Antikörperklassen erfüllt eine besondere Aufgabe im menschlichen Immunsystem, bzw. ist an verschiedenen Stellen im menschlichen Körper vertreten.

Die eigentliche “Arbeit” erledigen die sogenannten “Hypervariablen Schleifen” innerhalb der Antikörper-Ketten. Dabei handelt es sich um Abschnitte in der Aminosäure-Kette, die von Antikörper zu Antikörper eine sehr hohe Varianz bezüglich der in ihr verbauten Aminosäuren aufweist. Dies ist auch nötig, denn diese Schleifen sind für die Bindung des entsprechenden Antigens zuständig und da es enorm viele verschiedene Antigene gibt, muss es auch die Möglichkeit geben die Antikörper entsprechend anpassen zu können, sodass sie an das aktuell vorhandene Antigen binden können.

Diese Schleifen werden auch (gemäß ihrer Funktionsweise beim Binden von Antigenen) CDR (Complementary-Defining-Region) genannt und da Antikörper aus einer doppelten Ig-Faltung besteht die ihrerseits jeweils 3 CDRs haben, besitzt ein Antikörper im Normalfall 6 CDRs.

Je nach Größe des entsprechenden Antigens kann es mit unterschiedlich vielen CDRs des Antikörpers reagieren (binden), sodass Große Antigene meist mehrere Wechselwirkungen (mit mehreren CDRs), als Kleine aufweisen. Es ist verständlich,

dass die Bindung des Antigens an den Antikörper umso stärker ist, je mehr CDRs des Antikörpers an das Antigen binden.

Nun gibt es aber nicht nur einen Antikörper-Typ pro Zielmolekül (z.B. Bakterium), sondern meist gleich mehrere. Dabei dienen unterschiedliche Bereiche des Zielmoleküls als Antigen für die entsprechenden Antikörper, sodass an ein und das selbe Zielmolekül mehrere Antikörper binden können. In Kombination mit Bi- oder Multivalenten Antikörpern (mehr als eine Bindungsstelle - z.B. IgA-Dimer in Abb. 1.24) führt dies dann zu einer Verklumpung der Zielmoleküle untereinander (verbrückt über die Antikörper), was im Endeffekt ihrer Deaktivierung entspricht.

Eine andere Möglichkeit der Bekämpfung von Zielmolekülen (z.B. Viren) mit Hilfe von Antikörpern sind Makrophagen (Riesenfresszellen) die IgG-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen. Findet die Makrophage nun ein Molekül, an das ein IgG-Antikörper gebunden hat, so ist es ihr Job das entsprechende Molekül aufzufressen und abzubauen (Phagozytose).

MHC

MHC-Proteine sind eine spezielle Klasse von Proteinen, die auf Zelloberflächen zum Einsatz kommen. Sie dienen dabei zur Identifizierung der Zellen gegenüber den T-Lymphozyten, indem sie Peptide, die innerhalb einer Zelle synthetisiert werden, auf ihrer Oberfläche präsentieren.

MHC-Proteine kommen in einer sehr großen Vielfalt vor, sodass die meisten Menschen jeweils andere MHC-Proteine in ihrem Körper haben. Tatsächlich ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei nicht-verwandte Personen den selben MHC-Typ aufweisen geringer als 10^{-4} .

Kommt nun eine Zelle mit anderen MHC-Proteinen auf ihrer Oberfläche in einen Organismus, so werden diese vom Immunsystem als fremde Zellen erkannt und bekämpft. Das ist der Grund, warum die Kompatibilität von Organspenden von eben diesen MHC-Proteinen abhängt. Des Weiteren dienen sie auch zur Identifizierung von viral befallenen Zellen: Die Proteine werden kontinuierlich in der Zelle synthetisiert und an die Zelloberfläche gebracht, wo sie vom Immunsystem "überprüft" werden. Ist nun eine Zelle von einem Virus befallen, so ändert dieser ihre Proteinbiosynthese was zur Synthese anderer Proteine führt, die dann wiederum von den MHC-Proteinen an der Zelloberfläche "präsentiert" werden. Somit kann eine viral befallene Zelle vom Immunsystem bekämpft werden.

1 Aminosäuren und Proteine

Innerhalb der MHC-Proteine gibt es nochmals zwei große Unterklassen:

1. MHC I: Diese Proteine sind auf der Oberfläche einer jeden körpereigenen Zelle und dienen der Zellidentifizierung (wie oben beschrieben).
2. MHC II: Diese Proteine kommen nur auf Makrophagen und B-Zellen vor. Sie werden dazu benutzt gefundene Antigene zu präsentieren, sodass T-Helferzellen das Immunsystem darauf einstellen können.

MHC-I-Proteine sind $\alpha\beta$ -Dimere, die die zu präsentierenden Peptide in einer Lücke in ihrer Struktur binden können. Diese Bindung ist dabei nicht sequenzspezifisch, sodass theoretisch jedes beliebige Peptid gebunden werden kann. Praktisch gibt es dabei jedoch trotzdem einige Ausnahmen, die sterisch bedingt nicht gebunden werden können.

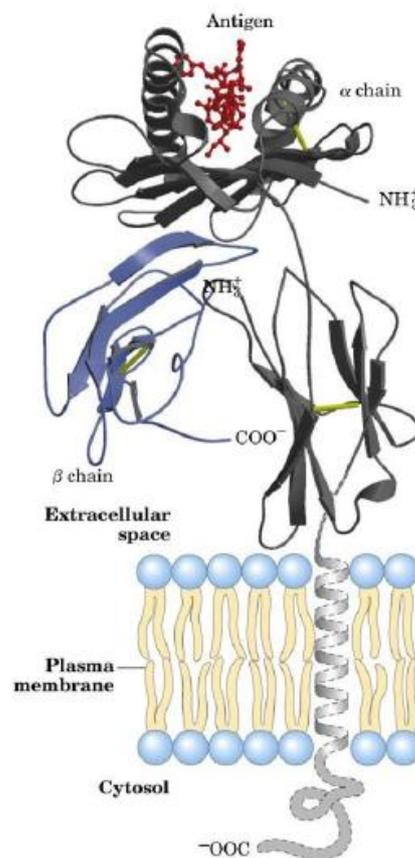


Abbildung 1.25: Schematische Darstellung eines MHC-I-Proteins. Zu erkennen ist der Dimere Aufbau aus Teilen einer β -Struktur und Teilen einer α -Struktur [17].

Aufgrund dieser Unfähigkeit einzelner MHC-Proteine Peptide zu binden (und somit zu präsentieren) wäre es denkbar, dass ein Virus sich so anpasst, dass er genau solche Peptide synthetisiert bzw. aus solchen besteht. Somit wäre dieser Virus nicht bekämpfbar.

Um eine Auslöschung einer der kompletten Menschheit mit Hilfe eines solchen Virus zu vermeiden hat sich das MHC-Protein im Laufe der Evolution als extrem polymorph entwickelt. Das bedeutet, dass verschiedenste Mutationen dazu geführt haben, dass innerhalb der Menschheit sehr viele verschiedene MHC-Varianten zum Einsatz kommen, sodass der Befall der gesamten Menschheit mit einem einzigen Virus sehr unwahrscheinlich ist, da quasi jeder Mensch andere MHC-Proteine besitzt und somit andere Peptide nicht präsentieren kann.

Die grundlegende Funktion des gesamten "MHC-Mechanismus" ist die Interaktion der körpereigenen T-Killerzellen mit den MHC-Proteinen auf einer Zelloberfläche. Diese binden an das MHC und wechselwirken somit mit dem MHC und dem darauf präsentierten Peptid. Wird die T-Zelle durch diese Interaktion aktiviert, so induziert sie den programmierten Zelltod der entsprechenden Zelle. Somit werden also Zellen abgetötet, die nicht-körpereigene Peptide (weil sie z.B. von einem Virus befallen sind oder aber eine Mutation aufweisen) präsentiert oder aber einen nicht-körpereigenen MHC-Typ aufweist.

Um zu verhindern, dass die T-Killerzellen körpereigene Zellen abtöten werden diejenigen T-Zell-Variationen, die auf körpereigene Peptide und MHC-Typen reagieren, während der Entwicklung des Immunsystems entfernt.

Die Bindung einer T-Zelle an das MHC-Protein ist allerdings nicht immer stabil (schließlich muss die Zelle ja auch an körperfremde MHC-Proteine binden, um diese als solche zu identifizieren. Da das Immunsystem aber vorher nicht weiß, was für körperfremde Proteine in den Körper kommen werden, kann die Bindung nicht auf diese Proteine optimiert werden.). Da aber eine stabile Bindung essentiell für den gesamten Vorgang ist, existieren an der T-Zelle noch die sogenannten CD8-Korezeptoren, die für eine Stabilisierung der Bindung zu einem MHC-I-Protein dienen. Das funktioniert, da MHC-I-Proteine stets eine konstante Region aufweisen, an die der genannte Korezeptor bindet. Da diese Region bei allen MHC-I-Proteinen gleich ist, spielt es keine Rolle, ob es sich um ein körpereigenes oder -fremdes MHC-I handelt.

Bei der Interaktion von T-Helferzellen mit den MHC-II-Proteinen existiert eine analoge Lösung des Stabilitätsproblems. Allerdings weisen MHC-II-Proteine eine andere konstante Region, als MHC-I-Proteine auf, sodass ein anderer Korezeptor

benötigt wird. In diesem Fall handelt es sich um einen CD4-Korezeptor.

1.6.5 Motorproteine

Motorproteine kommen überall da zum Einsatz, wo gezielte Bewegung erforderlich ist. Das offensichtlichste Beispiel dafür wären wohl Muskeln, die es uns erlauben unsere Gliedmaßen kontrolliert zu bewegen. Aber auch in viel kleineren Dimensionen werden Motorproteine benötigt: Beispielsweise für die Zellteilung oder Proteinbiosynthese müssen Zellbestandteile (z.B. DNA oder Peptidketten) gezielt bewegt werden.

Das Konzept, das allen Motorproteinen gemeinsam zugrunde liegt ist die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) oder GTP (Guanintriphosphat) zur Gewinnung von mechanischer Energie, die sich in Form einer Konformationsänderung des entsprechenden Proteins bemerkbar macht, die dann zur gezielten Bewegung genutzt werden.

Lineare Motoren

Lineare Motoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich stets entlang eines Filaments (beispielsweise einer Muskelfaser) entlang bewegen. Damit das funktioniert muss ein lineares Motorprotein über mindestens zwei "Arbeitsköpfe" also im Endeffekt über zwei Beine verfügen. So kann stets einer der beiden Füße am Filament haften, während der Andere einen "Schritt vorwärts" macht. Somit wird ein Zurückrutschen oder gar Loslösen am bzw. vom Filament verhindert.

Die Fortbewegung erfolgt dann über sogenannte "Kraftschläge", bei dem die Affinität des "laufenden Fußes" zum Filament verringert wird, sodass sich dieser leichter davon lösen kann, um einen "Schritt" zu machen. Dieser Schritt ist eine durch die Hydrolyse von ATP hervorgerufene Konformationsänderung des Motorproteins.

Beispiel: Muskelbewegung

Bei unseren Muskeln handelt es sich um lineare Motoren, die aus Actin (dem Filament) und Myosin (dem linearen Motor) bestehen.

Myosin besteht dabei aus zwei Strängen, die in einer ausgedehnten Coiled Coil-Struktur aneinander gekoppelt sind. Jeder der beiden Stränge besitzt einen Arbeitskopf, sodass Myosin also zwei Arbeitsköpfe und somit zwei "Füße" besitzt.

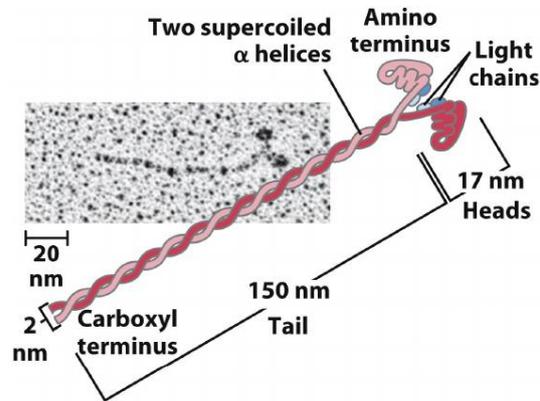


Abbildung 1.26: Schematische Darstellung von Myosin, sowie eine reale Aufnahme im Hintergrund [17].

Myosin lagert sich in unseren Muskeln zu größeren, bipolaren Aggregaten mit weiteren Myosin-Molekülen zusammen, die dann auch **dickes Filament** genannt werden.

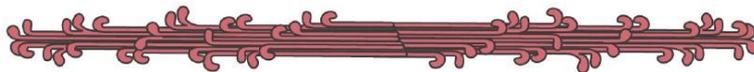


Abbildung 1.27: Schematische Darstellung eines dicken Filaments [17].

F-Actin (das dazugehörige Filament) ist ein Polymer aus G-Actin-Monomeren. Die Polymerisation erfolgt dabei paarweise, sodass das resultierende Polymer aussieht, als würde es aus zwei umeinander gewickelte Stränge bestehen. Dieses F-Actin wird auch oft als **dünnes Filament** bezeichnet.

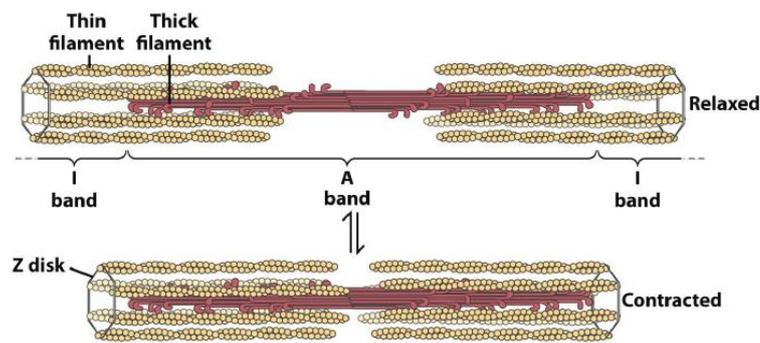


Abbildung 1.28: Schematische Darstellung einer Muskelkontraktion [17].

Der Aufbau einer Muskelfaser ist in Abbildung 1.28 zu sehen. Bei einer Muskelkontraktion bewegen sich nun die dicken Filamente (Myosin) auf den Dünnen (F-Actin). Somit werden die einzelnen F-Actin-Komponenten näher zusammen gerückt, sodass sich die gesamte Faserlänge verkürzt.

Die eigentliche Bewegung des Myosins auf dem Actin erfolgt dabei in vier Schritten:

1. ATP bindet an einen Myosinkopf, was dessen Bindung zum Actin schwächt und letztendlich die Bindung gänzlich aufbricht.
2. Das am Myosin gebundene ATP wird schnell hydrolysiert und es bildet sich ein stabiler Myosin-ADP (Adenosindiphosphat)-Phosphat-Komplex. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Myosins ("Entspannung").
3. Das Actin bindet wieder an diesen Komplex (durch die Konformationsänderung des Myosins findet dies aber an einer anderen Stelle statt, als die ursprüngliche Bindung war)
4. Aus dem Komplex wird zunächst Phosphat und anschließend das ADP freigesetzt. Die Freisetzung von Phosphat führt nun erneut zu einer Konformationsänderung des Myosins (Spannung). Da Actin und Myosin miteinander verbunden sind, wird durch diese Änderung ein Zug auf das Actin ausgeübt.

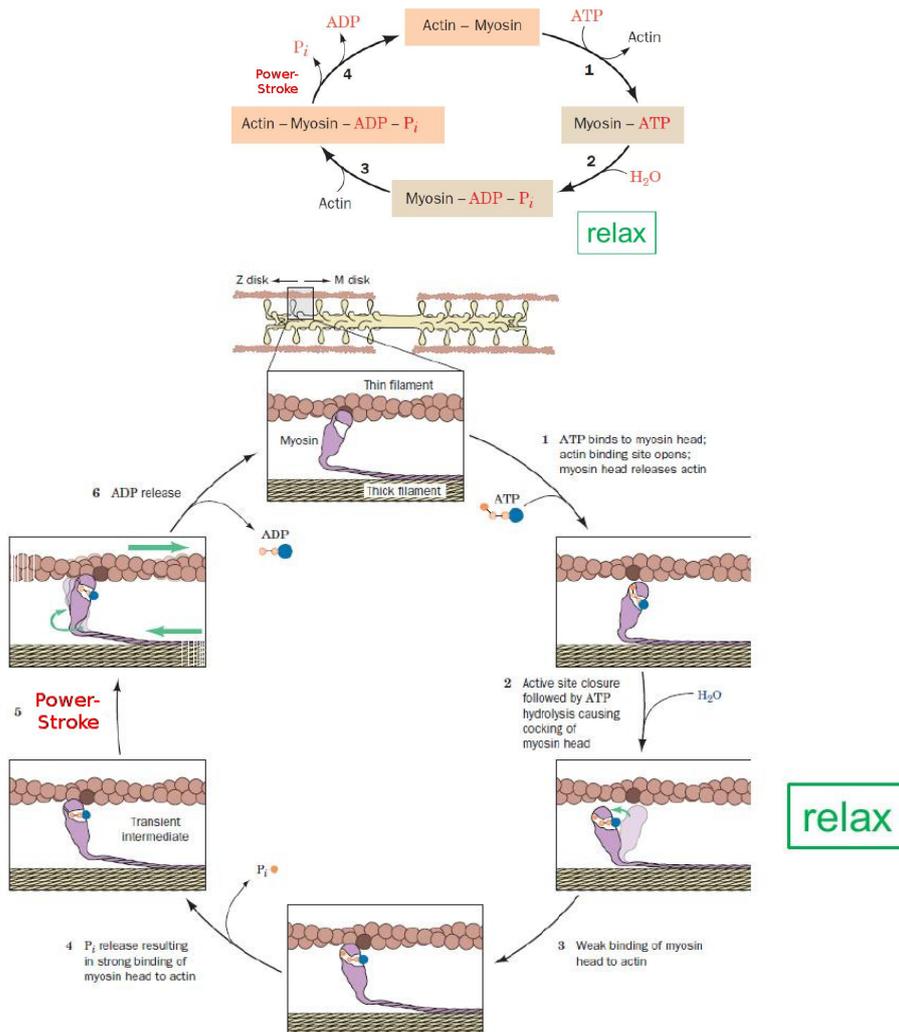


Abbildung 1.29: Schematische Darstellung der Abläufe einer Muskelkontraktion [17].

Die Tatsache, dass Myosin solch große Konformationsänderungen aufgrund des simplen Vorhandenseins von Phosphat als Bindungspartner, lässt sich auf den raffinierten Einsatz von intramolekularen Hebeln zurückführen, sodass die kleine Änderung in der Konformation die direkt durch das Phosphat hervorgerufen wird durch den Hebel in eine vergleichsweise sehr große Bewegung umgesetzt wird.

1.7 Die Hill-Gleichung

Die Hill-Gleichung ist im Wesentlichen nichts Anderes als Gleichung (1.5), die bereits eingeführt wurde, um den Bindungsanteil des vorhandenen Liganden zu quantifizieren. Der einzige Unterschied ist die Einführung des sogenannten Hill-Koeffizienten n , der die "Kooperativität" einer solchen Ligandenbindung beschreibt.

$$\Theta = \frac{c_L^n}{K_{diss} + c_L^n} \quad (1.7)$$

Dabei ist c_L wieder die Konzentration an freiem (ungebundenem) Ligand und K_{diss} die Dissoziationskonstante des entsprechenden Komplexes.

Für den Hill-Koeffizienten n werden nun drei Fälle unterschieden:

1. $n > 1$: Positiv kooperative Bindung - Sobald ein Ligand gebunden hat, steigt die Affinität des Zentralteilchens weitere Liganden zu binden.
2. $n = 1$: Nichtkooperative Bindung - Die Affinität des Zentralteilchens ist unabhängig von den gebundenen Liganden
3. $n < 0$: Negative kooperative Bindung - Die Affinität des Zentralteilchens gegenüber den entsprechenden Liganden sinkt durch Bindung eines Liganden.

1.7.1 Der Hill-Graph

Die Hill-Gleichung (siehe Gleichung (1.7)) kann folgendermaßen umgeformt werden:

$$\begin{aligned} \Theta &= \frac{c_L^n}{K_{diss} + c_L^n} \\ \frac{1}{\Theta} &= \frac{K_{diss} + c_L^n}{c_L^n} \\ c_L^n &= K_{diss} \cdot \Theta + c_L^n \cdot \Theta \\ c_L^n \cdot (1 - \Theta) &= K_{diss} \cdot \Theta \\ \frac{c_L^n}{K_{diss}} &= \frac{\Theta}{1 - \Theta} \end{aligned}$$

1.8 Proteinfaltung und Denaturierung

Wird diese Gleichung nun logarithmiert, so ergibt sich

$$\begin{aligned}\log\left(\frac{\Theta}{1-\Theta}\right) &= \log\left(\frac{c_L^n}{K_{diss}}\right) \\ &= n \cdot \log(c_L) - \log(K_{diss})\end{aligned}$$

Dies entspricht der allgemeinen Geradenform $y = mx + b$, sodass also eine Auftragung von $\log\left(\frac{\Theta}{1-\Theta}\right)$ gegen die logarithmierte Ligandenkonzentration eine lineare Auftragung ergibt (solange sich der Hill-Koeffizient in dem entsprechenden Bereich nicht ändert).

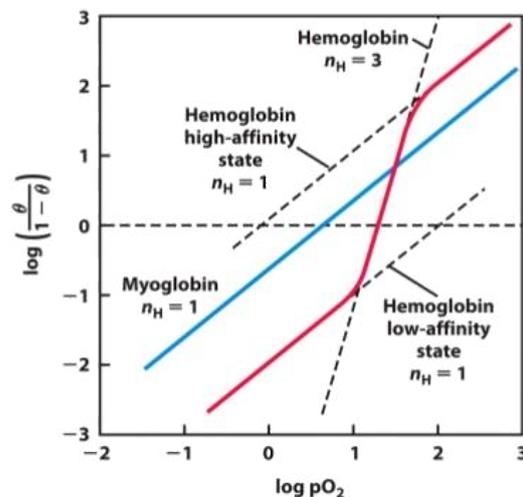


Abbildung 1.30: Hill-Graph von Hämoglobin im Vergleich zu Myoglobin [7].

In Abbildung 1.30 ist sehr schön zu erkennen, dass sich der Hill-Koeffizient des Hämoglobins ändert und somit anzeigt, dass in diesem Bereich die positive Kooperation “angesprungen” ist. Das Myoglobin hingegen zeigt durchweg nichtkooperatives Bindungsverhalten.

1.8 Proteinfaltung und Denaturierung

Um die Proteinfaltung und -entfaltung (**Denaturierung**) verstehen zu können, muss sich zunächst gefragt werden, was überhaupt die Triebkraft hinter einer solchen Faltung ist.

1 Aminosäuren und Proteine

Ausgangspunkt ist eine lange Kette von Aminosäuren, die eine Vielzahl verschiedener Konformationen annehmen kann. Die Kette besitzt also eine sehr hohe Entropie. Auf der anderen Seite steht ein gefaltetes Protein, das mehr oder weniger nur noch eine Konformation einnimmt (bzw. einige Wenige), was entropisch logischerweise deutlich niedriger liegt, als die freie Kette. Das bedeutet dass durch die Faltung die Entropie verringert wird. Gemäß der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (siehe Gleichung (1.1)) ist das aber ein Kriterium das die Spontanität einer Reaktion verhindert.

Das bedeutet, dass es einen weiteren Einflussfaktor auf die Faltung geben muss, der die Spontanität begünstigt und groß genug ist, um den entropischen Effekt zu überwinden. Dieser Effekt ist die Ausbildung neuer, attraktiver Wechselwirkungen durch die Faltung.

Ein einfaches Beispiel könnte so aussehen: Auf der einen Seite der Aminosäurekette sitzt eine Keto-Gruppe und auf der Anderen ein positives polarisiertes Wasserstoffatom. In Kettenform können diese beiden Komponenten nicht miteinander wechselwirken. Faltet sich die Kette nun aber so dass die beiden miteinander in Kontakt kommen, kann eine neue Wasserstoffbrücke ausgebildet werden. Dadurch wird Energie frei und das System fällt in ein energetisch niedrigeres (stabileres) Niveau ab.

Neben Wasserstoffbrückenbindungen gibt es noch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Disulfidbrücken sowie ionische Wechselwirkungen.

Experimente mit Ribonuklease A im Jahr 1950 zeigte, dass Proteine eine wohl definierte Konformation besitzen. Dazu wurde das Enzym genommen und mittels Harnstoff und Mercaptoethanol reduziert (Aufbrechen der Disulfidbrücken) was zu einer Denaturierung des Enzyms führte. In diesem denaturierten Zustand war das Enzym auch nicht mehr funktionsfähig. Durch Entfernen der vorher zugegebenen Substanzen konnten sich die Disulfidbrücken wieder ausbilden, sodass sich das Protein erneut falten konnte. Es nahm allerdings nicht eine zufällige neue Faltung an (wie ggf. erwartet werden könnte) sondern wieder genau die Anfängliche, sodass das Enzym wieder funktionsfähig wurde.

Statistisch gesehen ist dieses Ergebnis äußerst unwahrscheinlich, sodass daraus geschlossen werden konnte, dass die Faltung von Proteinen kein zufälliger, sondern ein gerichteter Prozess ist. Da aber kein äußerer, direkter Einfluss auf die Faltung vorliegt (z.B. jemand der die Kette mit seiner Hand in die richtige Position bringt) muss diese trotz allem auf zufällig hervorgerufenen, kleinen Konformationsände-

rungen hervorgerufen werden. Wäre dies der Weisheit letzter Schluss, so wäre die Wahrscheinlichkeit genau die eine Zielkonformation zu erhalten bei vorsichtigen Schätzungen etwa $1 : 5 \cdot 10^{47}$. Würde das "Ausprobieren" einer einzigen Konformation etwa 0,1 ps dauern, müsste die Faltung der Ribonuklease A etwa $1,6 \cdot 10^{26}$ Jahre dauern (was deutlich mehr, als die Existenz des Universums ist).

Aus diesem Vergleich wird offensichtlich, dass dies nicht korrekt sein kann. Wie aber läuft die Faltung eines Proteins dann ab?

1.8.1 Proteinfaltung als hierarchischer Prozess

Die Vorstellung des Faltungsprozesses als ein hierarchischer Vorgang baut darauf aus, dass die Faltung eines Proteins schrittweise abläuft. Zunächst faltet sich die Aminosäure-Kette lokal (Sekundärstruktur) und anschließend falten sich diese Lokalelemente zu größeren Strukturen (Tertiärstruktur). Dabei bleiben Faltungen, die einmal günstig ausgebildet werden weitestgehend erhalten und lösen sich nicht wieder auf, sodass im zweiten Schritt wirklich die "Klumpen" von Lokalelementen als komplettes "verfaltet" werden können (und während des Faltens erhalten bleiben).

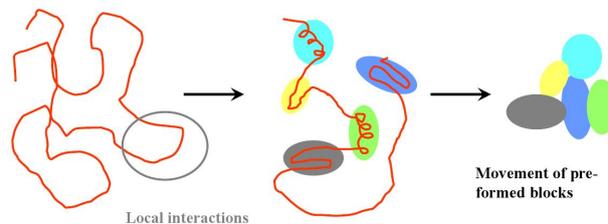


Abbildung 1.31: Schematische Darstellung der Hierarchie einer Proteinfaltung [17].

Das Erhalten der gefalteten Elemente beruht einfach auf den durch die Faltung ausgebildeten Wechselwirkungen, die beim Entfalten ja wieder gebrochen werden müssten (was Energie kostet).

1.8.2 Mechanismus der Proteinfaltung

Eines der ersten Ereignisse in der Kette zur Proteinfaltung ist der sogenannte "hydrophobe Kollaps". Dies ist bedingt durch die wässrige Umgebung innerhalb einer Zelle und sorgt im Endeffekt dazu, dass das Protein einen hydrophoben Kern und eine weniger hydrophobe Oberfläche bildet ("Molten globule state"). Diese Struktur ist allerdings in den meisten Fällen deutlich weniger dicht gepackt, als die spätere native Form des Proteins.

Durch dieses "Zusammenknäueln" wird die Ausbildung eines sehr hohen Anteils Sekundärstruktur induziert (teilweise wird in diesem Schritt mehr Sekundärstruktur ausgebildet, als in der nativen Form gefunden wird), wobei ein großer Anteil der hier ausgebildeten Struktur noch nicht in seiner nativen Form vorliegt.

Der "schwierigste" Schritt in der Ausbildung der Sekundärstruktur ist dabei die Nukleationsphase (Ordnung von Aminosäuren ohne dass neue Wechselwirkungen ausgebildet werden).

Nachdem sich die ersten Sekundärstrukturelemente gebildet haben, beginnen diese sich zueinander anzuordnen, sodass sich native Strukturelemente des Proteins ausbilden können, die im Laufe der Faltung immer weiter wachsen.

Der letzte Schritt in der Ausbildung der Sekundärstruktur ist das "Fine-tuning" in Form von kleinen Konformationsänderungen in die tatsächlich native Form. Die so entstandene Sekundärstruktur kann sich dann weiter zu Supersekundärstrukturen zusammenschließen.

Die Geschwindigkeit dieses Faltungsprozesses ist dabei direkt proportional zum durchschnittlichen Kontakt der Proteinelemente zueinander (Proteine mit vielen kleinen "Kurzstreckeninteraktionen" falten sich schneller, als solche mit wenigen "Langstreckeninteraktionen"). Das bedeutet, dass sich beispielsweise rein helicale Proteine schneller falten, als reine Faltblattproteine, wobei diese sich immer noch schneller falten, als $\alpha\beta$ -Proteine ("Mischproteine").

Diese schrittweise Faltung sorgt für eine stetige Abnahme der Gesamtenergie (stabilisierend) und der Entropie (destabilisierend) des Proteins, wobei Ersteres Letzteres natürlich überwiegen muss. Grafisch dargestellt führt dies zu einem sogenannten "Faltungstrichter" für ein Protein.

Ein solcher Trichter - wie er in Abbildung 1.32 dargestellt ist - ist selbstverständlich

1.8 Proteinfaltung und Denaturierung

von Protein zu Protein unterschiedlich. Er zeigt aber auch, dass ein und das selbe Protein mehrere Wege der Faltung hin zu seiner nativen Struktur besitzt. Dies ist schlicht und einfach auch darauf zurückzuführen, dass das Protein im ungefalteten (denaturierten) Zustand so viele verschiedene Konformationsmöglichkeiten besitzt, aus denen heraus es sich beginnen kann zu falten (dementsprechend kann nicht für jede Faltung der exakt selbe Weg genommen werden).

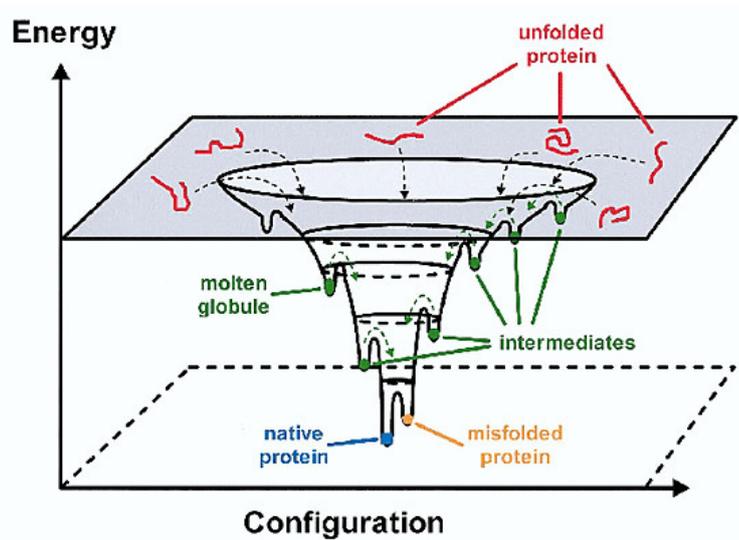


Abbildung 1.32: Darstellung eines "Faltungstrichters" [8]

Während der Faltung folgt das Protein natürlich nicht kontinuierlich einer dauerhaften Abnahme seiner Energie, da sich durch die Teilfaltungen lokale Energieminima ausbilden können, aus denen das Protein erst wieder durch Energieaufwand "entkommen" muss, bevor es sich hin zum globalen Minimum (native Struktur) weiter bewegen (falten) kann.

Ist die Energiebarriere aus einem solchen lokalen Energieminimum kleiner als $k_B \cdot T$ (gleichbedeutend mit der Aussage, dass das Protein bei der gegebenen Temperatur diese Energiebarriere ohne nennenswerten Widerstand überwinden kann), so wird von einer "glatten Oberfläche" des Faltungstrichters gesprochen. Handelt es sich um größere Barrieren wird von einer "rauen Oberfläche" gesprochen.

Proteine, die sich komplett entlang einer glatten Oberfläche falten, haben eine sehr hohe Faltungsgeschwindigkeit, sodass während der Faltung keine Intermediate auftreten. Raue Oberflächen können dagegen zur Ausbildung eines oder mehrerer Intermediate führen, die erst "warten" müssen, bevor sie genügend Energie

1 Aminosäuren und Proteine

bekommen, um die Energiebarriere zu überwinden. Fällt das Protein in ein lokales Energieminimum mit Energiebarrieren, die es nicht wieder überwinden kann, so kommt es zur Ausbildung eines fehlgefalteten Proteins.

Bindet nun ein Ligand ein Protein, so kann es durch die neuen Wechselwirkungen dazu kommen, dass es ein neues Energieminimum (eine neue native Struktur des Proteins) gibt, was dann zu einer Konformationsänderung des Proteins führt.

Es ist außerdem auch möglich ein Protein durch Energiezufuhr aus seiner nativen Form “heraus zu heben”. Ein gutes Beispiel dafür ist der Vorgang beim Sehen: Das Protein Retinal weist eine cis-Bindung an Stelle 11 in seiner nativen Form auf. Strahlt nun elektromagnetische Strahlung (Licht) ein, so ist dies eine Form der Energiezufuhr. Das Retinal kann damit dann aus seiner 11-cis- in seine all-trans-Form übergehen. Dies geht mit einer Bewegung einer Lysin-Seitenkette um etwa 5 Å. Diese kleine Konformationsänderung induziert dann eine Konformationsänderung des Rhodopsins (in welches das Retinal eingebettet ist) in seine Meta-II-Form, die wiederum Wechselwirkungen mit bestimmten Molekülen erlaubt, sodass das Lichtsignal nun in ein chemisches Signal (in Form eine Kaskade) umgewandelt wurde.

Proteindynamik

Auch wenn Proteine in aller Regel nur eine native Konformation (2008 wurde herausgefunden, dass es wahrscheinlich doch nicht so selten für Proteine ist, mehrere native Strukturen zu besitzen (Metamorphismus)) besitzen, bedeutet dies nicht dass es sich bei Proteinen um perfekt starre und bewegungslose Moleküle handelt. Aufgrund thermischer Energie existieren stets Rotationen um Einfachbindungen, sowie diverse Schwingungen in einem Protein.

Sogar im Rückgrat des Proteins gibt es gewisse Fluktuationen um bis zu 2 Å. Dies wird auch als “Proteinatmung” bezeichnet.

Für gewisse Proteinfunktionen ist diese “Atmung” sogar essentiell. Die bereits besprochene Bindung von Sauerstoff an die Häm-Gruppe, die in Myoglobin eingebettet ist, kann nur stattfinden, indem eine Seitenkette des Myoglobins aus dem Weg rotiert, damit der Sauerstoff an die Häm-Gruppe heran diffundieren kann.

Proteinfaltungshelfer

Nicht selten kommt es vor, dass sich ein Protein von allein nicht korrekt faltet. Um seine gewünschte native Struktur zu erreichen benötigt es Helfer, die dafür sorgen, dass es nicht in einer falschen Konformation stecken (tiefes, lokales Energieminimum im Faltungstrichter) bleibt.

Dies ist insbesondere wichtig, wenn die Proteinkonzentration in der Lösung (so wie in einer Zelle) sehr hoch ist. Un- oder teilgefaltete Proteine besitzen noch einige hydrophobe Gruppen, die nach außen zeigen. Sind nun viele solcher Proteine in direkter Nähe zueinander, so kann es zu einer Aggregation dieser Proteine kommen. Dieser Vorgang steht somit in direkter Konkurrenz zum hydrophoben Kollaps, der aber in aller Regel der erste wichtige Schritt in Richtung nativer Konformation ist.

Auch das ausbilden "falscher" Disulfidbrücken (also an Stellen, an denen sie in der nativen Konformation nicht vorkommen) kann verhindern, dass sich das Protein korrekt faltet. In diesem Falle müssen diese Brücken wieder aufgespalten werden, bevor sich das Protein weiter falten kann. Ein Beispiel für dieses Phänomen ist die RNAaseA, die Spuren β -Mercaptoethanol benötigt, das vorzeitig ausgebildete Disulfidbrücken wieder reduziert (spaltet).

In aller Regel handelt es sich bei diesen "Faltungshelfern" um Enzyme. Die großen Klassen dieser Helfer sind

1. **Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPI)** - Wie bereits in Kapitel 1.4.1 erwähnt, hat die Peptidbindung Doppelbindungscharakter, was zu einer cis/trans-Isomerie führt. Während fast alle Bindungen aufgrund sterischer Effekte in trans-Konfiguration vorkommen, gibt es doch einige wenige, die auch als cis-Bindung vorkommen (müssen). Dies sind in aller Regel Prolin-Bindungen, welches aufgrund seiner zyklischen Natur nur eine sehr kleine Hinderung in cis-Konfiguration aufweist (Deswegen sind etwa 6% aller Prolin-Bindungen in cis-Konfiguration).

Eine cis/trans-Isomerisierung einer Peptidbindung ist ein sehr langsamer Vorgang, der eine sehr hohe Aktivierungsbarriere hat. PPI katalysiert diese Isomerisierung durch Absenkung der dafür notwendigen Aktivierungsbarriere, was dementsprechend die Einstellung des entsprechenden Gleichgewichts beschleunigt. Dies ist für die Proteinfaltung wichtig, da diese Isomerisierung oft der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Proteinfaltung ist.

1 Aminosäuren und Proteine

2. **Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI)** - Diese Enzymgruppe ist dafür zuständig die Reaktion zweier Thiol-Gruppen zu einer Disulfidbrücke zu katalysieren. Diese Reaktionen werden dabei mit einer sehr breiten Palette an Spezifitäten katalysiert.

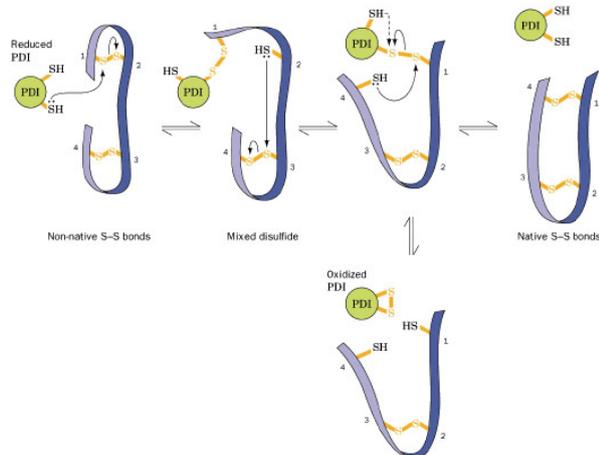


Abbildung 1.33: Schematische, beispielhafte Katalyse der Disulfidbrückenbildung mittels einer PDI [9]

3. **Chaperone (GroEL/ES)** - Diese Gruppe an Enzymen stellt im Wesentlichen eine "Faltungskammer" bereit, in der sich ein Protein ungehindert falten kann, ohne dass es mit anderen Proteinen in Kontakt zu kommen, mit denen es aggregieren könnte.

Es handelt sich um zylinderförmige Moleküle aus zwei Untereinheiten, die im Innern hydrophobe Reste besitzen, sodass un-, teil- oder fehlgefaltete Proteine gebunden und somit in die Faltungskammer gebracht werden können.

Diese Chaperone können durch Umsatz von ATP zu ADP auch aktiv fehlgefaltete Proteine mechanisch wieder entfalten und sich öffnen bzw. schließen, um Proteine in die Faltungskammer herein bzw. aus der Faltungskammer heraus zu lassen.

Eine wichtige Aufgabe der Chaperone ist die Verhinderung der Polymerisierung mehrerer teilgefalteter Proteine.

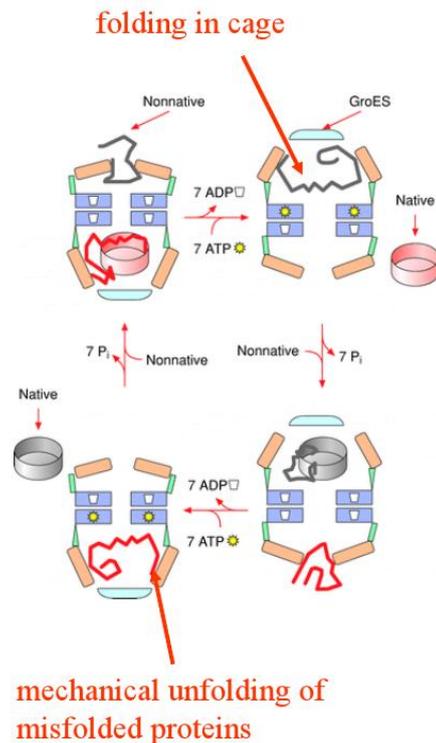


Abbildung 1.34: Schematische Darstellung der Funktionsweise von Chaperoninen [17].

4. **Trigger-Faktoren (TF)** - Die Aufgabe von Trigger-Faktoren ist es eine Fehlbildung neuer Proteine direkt an den Ribosomen zu verhindern. Dazu binden Trigger-Faktoren in einem 1:1 Verhältnis an die große Untereinheit der Ribosome, aus denen die gerade synthetisierte Polypeptidkette heraus kommt.

Nach Verlassen des Ribosoms wird die Kette in den durch den TF bereitgestellten Hohlraum geleitet, der als Faltungskammer dient, in dem die Kette einen "lokalen, hydrophoben Kollaps" durchführen und nicht mit anderen Proteinen aggregieren kann. Anschließend wird das so entstandene Knäuel aus der Kammer entlassen, sodass sich der nächste Teil des Proteins darin einlagern kann.

1 Aminosäuren und Proteine

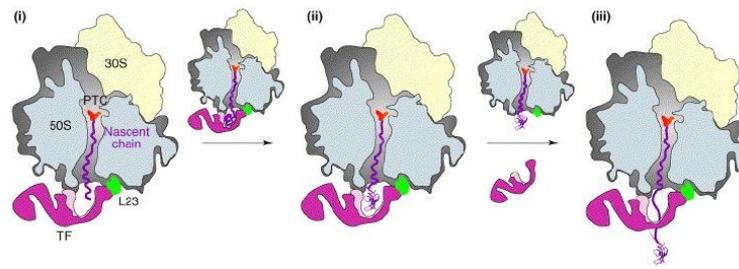


Abbildung 1.35: Schematische Darstellung der Arbeitsweise eines Trigger-Faktors [17]

5. **Hsp70 Chaperone** - Diese speziellen Chaperone verhindern ebenfalls eine Aggregation von Proteinen, indem es an hydrophobe Regionen ungefalteter Proteine bindet. Diese Bindung ist reversibel und kann unter ATP-Hydrolyse gespalten werden.

Durch Interaktion mit ATP (bzw. durch dessen Hydrolyse) kann das Hsp70 auch zwischen einem “high-affinity” und einem “low-affinity” gegenüber ungefalteten Protein umgeschaltet werden.

Hsp70 kooperiert meist noch mit anderen Hsp-Proteinen.

Proteine, die trotz Hilfe nicht korrekt gefaltet sind, werden in der Zelle von sogenannte Proteasen zersetzt und somit unschädlich gemacht.

Vorhersage von Proteinfaltungen

Die Vorhersage der nativen Struktur eines Proteins ausgehend von seiner Aminosäure-Sequenz ist eine sehr aktuelle Herausforderung der numerischen Molekularbiologie.

Die Problematik besteht in der Präzision mit der die Kraftfelder (z.B. elektrische Felder) simuliert werden und die Abdeckung aller möglicher Konformationen innerhalb der Simulation.

Nichtsdestotrotz ist es möglich diese Vorhersage durch Kombination verschiedener Methoden und Parameter für kleine Peptide (weniger als 85 Aminosäuren) die native Struktur mittels Simulationen vorauszusagen, die recht genau der experimentell

gefundenen Struktur entspricht.

1.8.3 Denaturierung

Bei der Denaturierung handelt es sich um nichts Anderes, als ein Entfaltung und somit der Aufhebung der nativen Struktur eines Proteins. Um dies zu Erreichen gibt es viele unterschiedliche Möglichkeiten, da die Proteinfaltung an sich ein sehr sensibler Prozess ist, der aus vielen schwachen Interaktionen besteht, die alle aufeinander angewiesen sind (Proteinfaltung als sehr kooperativer Prozess).

Wichtig bei der Denaturierung ist, dass dabei niemals teilweise denaturierte Proteine auftreten. Ein Protein ist entweder komplett in seiner nativen Struktur oder komplett denaturiert. Der Grund dafür ist, dass der Beginn der Denaturierung eine Kettenreaktion in Gange setzt, denn sobald ein kleiner Teil der in der nativen Struktur vorliegenden Wechselwirkung aufgehoben wird führt das dazu dass sich das Protein teilweise entfalten kann, was dann immer weitere Wechselwirkungen aufhebt. Somit handelt es sich um eine Kettenreaktion, die sich sehr schnell durch das gesamt Protein fortpflanzt, sodass keine Zwischenstufen gefunden werden können. Auch hier gilt mal wieder das Alles-oder-Nichts-Prinzip.

Denaturierung durch Hitze

Die wohl bekannteste Art der Denaturierung ist das Erhitzen eines Proteins (z.B. beim Braten eines Spiegeleis). Dabei wird dem Protein Energie zugeführt, sodass es - bildlich gesprochen - den Faltungstrichter wieder hinauf klettern kann (was einem Entfalten entspricht) und es ggf. in einem anderen, lokalen Energieminimum landet und nicht mehr heraus kommt (irreversible Denaturierung).

Etwas mathematischer kann die Denaturierung des Proteins durch Temperaturerhöhung anhand der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (siehe Gleichung (1.1)) erläutert werden. Bei der Entfaltung erhöht sich die Entropie des Systems, sodass $\Delta S > 0$ ist. Gleichzeitig nimmt die Energie des Systems aufgrund der aufzubrechenden Wechselwirkungen zu, sodass auch $\Delta H > 0$ gilt.

Bei normaler Temperatur gilt $\Delta H > T \cdot \Delta S$, sodass die Entfaltung des Proteins nicht statt findet. Wird nun aber die Temperatur erhöht, so kommt irgendwann

1 Aminosäuren und Proteine

der Punkt an dem der Entropie-Term größer als der Enthalpie-Term wird und somit die Entfaltung auf einmal eine spontane Reaktion wird.

Denaturierung durch pH-Änderung

Wird der pH-Wert um das Protein im Vergleich zu seinen Faltungsbedingungen geändert, so ändert dies in aller Regel die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche und somit die elektrostatischen Wechselwirkungen im Protein.

Denaturierung durch Veränderung des Solvens

Wird das Solvens in dem sich ein Protein befindet (Wasser) verändert, so ändert dies die hydrophoben Effekte, die wichtig für die Ausbildung der Proteinstruktur sind (z.B. hydrophober Kollaps).

Eine solche Änderung kann im einfachsten Fall durch den kompletten "Austausch" des Solvens geschehen, indem man beispielsweise ein Protein aus seiner wässrigen Umgebung heraus nimmt und in ein organisches Lösungsmittel gibt. Dann wird sich der hydrophobe Kern nicht mehr im Innern verstecken, sondern sich schleunigst nach aus drehen, sodass sich nun ein hydrophiler Proteinkern ausbilden wird.

Weniger radikal kann eine solche Änderung auch durch Zugabe verschiedener Chemikalien ins Wasser vorgenommen werden. So können Emulgatoren (z.B. Waschmittel oder Seife), Guanidiniumchlorid oder Harnstoff den hydrophoben Kern "angreifen", bzw. die Wasserstruktur und somit die hydrophilen Wechselwirkungen verändern.

Disulfidbrücken

Disulfidbrücken sind für die Faltung eines Proteins nicht erforderlich, erhöhen aber seine Resistenz gegen Denaturierung erheblich. Die Grundlage dafür ist, dass es sich bei Disulfidbrücken um kovalente Bindungen handelt, die gebrochen werden müssen, um das Protein nachhaltig zu denaturieren.

Um ein Protein mit Disulfidbrücken zu denaturieren bedarf es reduzierender Stoffe (z.B. Mercaptoethanol), die die Disulfidbrücken spalten können.

Die erhöhte Widerstandskraft gegen Hitze durch Disulfidbrücken ist auf einen zentralen Aspekt zurückzuführen: Durch diese Brücken wird die Konformationsvielfalt im denaturierten Zustand deutlich eingeschränkt, sodass eine Entfaltung des Proteins keinen so hohen Entropiegewinn mehr erzielt. Somit ist die Entfaltung als solches energetisch, bzw. entropisch weniger vorteilhaft.

Einfluss von Salzen auf Proteinlöslichkeit

Gelöste Salze haben in den meisten Fällen eine Auswirkung auf die Löslichkeit eines Proteins.

Die meisten Proteine benötigen einen gewissen Anteil an Salzen, um Gegenionen zu geladenen Aminosäure-Resten darzustellen und um geladene Bereiche des Proteins abzuschirmen.

Allerdings gibt es auch sogenannte "Chaotropische" Salze, die die Wasserstruktur verändern und somit Proteine aus der Lösung ausfällen (in den meisten Fällen reversibel). Beispiel eines solchen Salzes ist das bereits erwähnte Guanidiniumchlorid.

Termophile Proteine

Viele Bakterien leben in vergleichsweise extremen Temperaturen von bis zu 140°C. Da auch Bakterien auf funktionierende Proteine angewiesen sind, müssen sie einen Weg gefunden haben ihre Proteine so zu modifizieren, dass sie bei diesen Temperaturen nicht denaturiert werden. Diese speziellen Proteine werden auch als "termophile" Proteine bezeichnet.

Der Temperaturbereich in dem sie stabil sind (nicht denaturiert werden) ist im Gegensatz zu "normalen" Proteinen in Richtung höherer Temperaturen verschoben (Sie sind dafür anfälliger für Kälte). Zusätzlich weisen sie generell eine höhere Stabilität auf.

Um diese Effekte zu erwirken bedienen sich diese Proteine einiger Mechanismen:

- **Oberflächenschleifen-Eliminierung** - Zur Verringerung der Entropie im denaturierten Zustand werden alle "unnötigen" Schleifen des Proteins an seiner Oberfläche reduziert, bzw. gänzlich entfernt.

1 Aminosäuren und Proteine

- **Hydrophobe Ketten** - Die Anzahl hydrophober Ketten (mit Verzweigungen) wird erhöht, um den hydrophoben Kern des Proteins zu stabilisieren.
- **Salzbrücken** - Die Anzahl geladener Seitenketten wird auf Kosten von polaren Seitenketten erhöht, um ein stabilisierendes Salzbrücken-Netzwerk auszubilden

Alles in Allem nutzen thermophile also keine anderen Tricks als “normale” (mesophile) Proteine, doch die erhöhte Temperaturresistenz kommt mit einem Preis: Thermophile Proteine sind in aller Regel bei “normalen” Temperaturen weniger aktiv, als Mesophile, da ihre “verhärtete” Struktur Konformationsänderungen erschwert, sodass dafür mehr Energie (in Form von Wärme) benötigt wird. Das ist somit auch die Erklärung dafür, warum sich nicht alle Proteine zu Thermophilen entwickelt haben.

1.8.4 Krankheiten durch Proteinfaltungsfehler

Werden Protein nicht korrekt gefaltet und trotzdem nicht von Proteasen zersetzt, so können ernsthafte Krankheiten entstehen. Einige bekannte Vertreter, die durch die Fehlfaltung bzw. Aggregation und Polymerisation von Proteinen entstehen, sind

- Creutzfeld-Jakob
- Alzheimer
- Parkinson
- Huntington

Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei solchen Krankheiten um eine Kettenreaktion handelt, bei der ein fehlgefaltetes Protein weitere Proteine mit sich reißt, die sich normalerweise korrekt gefaltet hätten. Somit benötigen diese Krankheiten also nur ein “Keimprotein” (also ein einziges falsch gefaltetes Protein) das nicht (rechtzeitig) abgebaut wird und dann dafür sorgt, dass sich andere Proteine anschließen, sodass es letztendlich zu ernsthaften Schäden kommt.

Dass Krankheiten wie Alzheimer meist mit hohem Alter auftreten ist nun auch verständlich: Letztendlich ist es nur eine Frage der Zeit, bis sich mal ein Pro-

1.8 Proteinfaltung und Denaturierung

tein nicht richtig faltet und nicht abgebaut wird. Je älter eine Person ist, desto unwahrscheinlicher ist es, dass es noch keine solche Fehlfaltung gab. Liegt ein genetischer Defekt vor, der die Bildung solcher Keimproteine begünstigt, so können diese Krankheiten natürlich auch schon in frühen Jahren auftreten (was andernfalls einfach unwahrscheinlich - wenn auch nicht unmöglich - ist).

2 Enzym-Mechanismen

Enzyme werden für so ziemlich alles in einem Organismus benötigt. Es handelt sich meistens (aber nicht immer) um Proteine, die eine spezifische, chemische Reaktion katalysieren. Meist sind jedoch die Aminosäure-Reste nicht dazu in der Lage diese Katalyse durchzuführen, sodass die meisten Enzyme sogenannte **Coenzyme** (Eingelagerte, bzw. gebundene Metall(-ionen)) und/oder **Coenzyme** (gebundene, organische Komplexe) benötigen, die für die Katalyse verantwortlich sind.

Ist der Cofaktor, bzw. das Coenzym sehr eng an das Enzym gebunden, so wird von einer **prosthetischen Gruppe** gesprochen. Der gesamte Komplex aus Enzym, Cofaktor und Coenzym wird als **Holoenzym** bezeichnet. Dabei heißt der Protein-Teil des Holoenzym **Apoenzym**.

2.1 Grundlagen

2.1.1 Nomenklatur

Je nach der Art der katalysierten Reaktion werden Enzyme in verschiedene Klassen eingeteilt (bestehend aus einer Nummer, sowie einem Klassennamen). Die internationale Norm zur Einteilung und Nomenklatur dieser Enzymklassen ist in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Einteilung der Enzyme nach internationaler Norm.

Nummer	Name	katalysierter Reaktionstyp
1	Oxidoreduktasen	RedOx-Reaktionen, sowie Protonen- und Hydridionen-Transfers
2	Transferasen	Transfer von (funktionellen) Gruppen
3	Hydrolasen	Hydrolysen
4	Lyasen	Addition an Doppelbindungen oder Eliminierung zur Ausbildung neuer Doppelbindungen
5	Isomerasen	Umwandlung eines Isomers in ein Anderes
6	Ligasen	Ausbildung von C-C, C-S, C-O oder C-N Bindungen durch Kondensationsreaktionen gekoppelt an ATP-Spaltung

2.1.2 Funktionsweise

Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen durch Absenken der benötigten Aktivierungsenergie. dabei bindet das Enzym zunächst an das Edukt (das Substrat) und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex. Anschließend wandelt sich das Substrat in das Produkt um, welches sich wieder vom Enzym löst.

Die Absenkung der Aktivierungsenergie gelingt dabei stets durch eine Stabilisierung des Übergangszustand. Durch diese Stabilisierung wird die Energie dieses Übergangszustandes abgesenkt, sodass die insgesamt benötigte Aktivierungsenergie ebenfalls sinkt. Um diesen Übergangszustand stabilisieren zu können, müssen Enzyme eine hohe Affinität zum entsprechenden Übergangszustand aufweisen, welche durch sehr viele nicht-kovalente Wechselwirkungen hervorgerufen wird (analog zur Proteinfaltung und Ligandenbindung). Würde das Enzym hingegen eine hohe Affinität zum Substrat selbst aufweisen, so hätte dies genau den gegenteiligen Effekt (Erhöhung der Aktivierungsenergie) wie in Abbildung 2.1b zu sehen ist.

Interessant bei Enzymen ist dabei, dass die aktiven Zentren der Enzyme oftmals aus Aminosäure-Resten bestehen, die in der Primärstruktur sehr weit auseinander liegen. Dies macht die Bedeutung der korrekten Konformation eines Enzyms für

seine Funktionsweise deutlich. Dazu kommt noch dass diese aktiven Zentren in aller Regel in Spalten, bzw. Taschen im Enzym sitzen. Somit muss das Substrat also in diese Spalten, bzw. Taschen gelangen, um vom aktiven Zentrum katalysiert werden zu können.

Das Bindungsprinzip zwischen Enzym und Substrat wird häufig auch als “Schlüssel-Schloss-Prinzip” bezeichnet, da das aktive Zentrum eines Enzyms die genau komplementäre Form zum entsprechenden Substrat hat, sodass das Substrat wie ein Schlüssel in da Enzym passt. Somit wird auch die Spezifität der Enzym-Katalyse deutlich: Jedes anders aussehende Substrat kann nicht an das aktive Zentrum des Enzyms binden und kann somit auch nicht katalysiert werden.

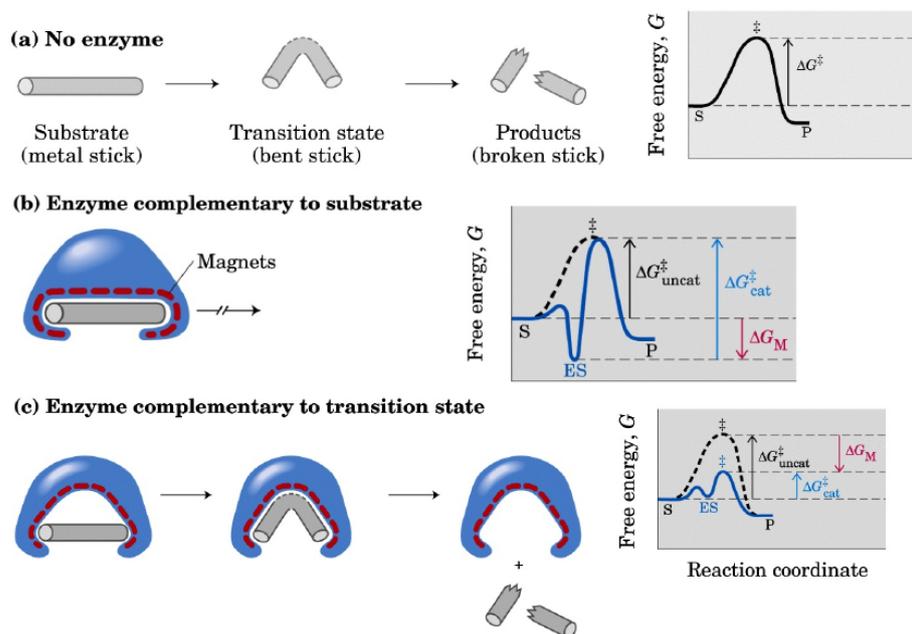


Abbildung 2.1: Demonstration der Funktionsweise eines Enzyms am Beispiel des fiktiven Enzyms “Stickase”, welches das Brechen eines Metallstabes katalysieren soll [17].

Typischerweise durchlaufen Enzym und Substrat bei der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes Änderungen ihrer Konformation, was dann zu einer “induzierten Passform” der beiden zueinander führt. Dies ist ein weiterer Mechanismus der die Selektivität der Enzymkatalyse bedingt.

Neben der Absenkung der Aktivierungsenergie bieten Enzyme aber auch noch weitere Möglichkeiten eine Reaktion zu katalysieren. Eine davon betrifft die Anord-

2 Enzym-Mechanismen

nung zweier Reaktanden zueinander. Um reagieren zu können, müssen die Reaktanden in bestimmter Orientierung aufeinander treffen. Befinden sich diese Reaktanden "frei" in Lösung, so ist es vergleichsweise unwahrscheinlich, dass dies bei einer Kollision der Fall ist. Ein Enzym kann also die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen, indem es die Reaktanden bindet und diese dann in automatisch richtiger Anordnung zusammen zu führen.

Insgesamt gibt es folgende Arten der Katalyse, die von Enzymen durchgeführt werden:

- Bindung (Stabilisierung) des Übergangszustandes
- Anordnung der Substrate zueinander
- Generelle Säure-Base-Katalyse
- Kovalente Katalyse
- Metallionen-Katalyse

Die Säure-Base-Katalyse bedeutet schlicht, dass das Enzym Säure-Base-aktiv ist und somit z.B. Reaktionen katalysieren kann, die säure-, bzw. basenkatalysiert ablaufen. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass die pK_S -Werte der Aminosäuren im Protein deutlich von denen der freien Aminosäure abweichen können.

Bei der kovalenten Katalyse bildet das Enzym im Laufe der Reaktion eine kovalente Bindung mit dem Substrat aus, die die Weiterreaktion des Selben ermöglicht, bzw. begünstigt. Ein Beispiel hierfür wäre die Bindungsspaltung eines Substrates $A - B$. Die direkte Spaltung zu $A + B$ könnte energetisch problematisch sein, wohingegen B ggf. eine gute Abgangsgruppe in einer nukleophilen Substitution ist. Diese Reaktion kann nun kovalent von einem Nukleophil katalysiert werden, indem dieses zunächst B substituiert. Die anschließende Trennung des Nukleophils und A muss natürlich ohne allzu großen Energieaufwand möglich sein, um eine katalytische Wirkung zu gewährleisten.

Bei der Metallionen-Katalyse sind (wie schon im Namen impliziert) ionisierte Metalle beteiligt. Diese können entweder über ihre Lewis-Säure-Eigenschaften eine Lewis-Säure-Base-Katalyse durchführen, als Ligand ein Substrat koordinieren (was z.B. eine Änderung der Konformation zur Folge haben kann), reversible RedOx-Reaktionen mit dem Substrat eingehen, um dessen Oxidationsstufe (temporär) zu

ändern oder aber einfach über elektrostatische Effekte die Reaktion voran treiben.

Wie sich hier schon zeigt ist die Metallionen-Katalyse sehr vielseitig, was auch als Grund gesehen werden kann, warum knapp 30% aller bekannten Enzyme ein oder mehrere Metallionen für ihre katalytische Aktivität benötigen.

Wenn in diesem Zusammenhang von einer "Beschleunigung der Reaktion" gesprochen wird, so ist damit eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um Faktoren in der Größenordnung 10^8 gemeint. Somit würden also bestimmte Reaktionen niemals auch nur ansatzweise in vernünftiger Zeit ablaufen, wenn sie nicht durch Enzyme katalysiert würden.

2.2 Beispiel: Chymotrypsin

Die Aufgabe von Proteasen ist der Abbau von Proteinen. Um Proteine abzubauen müssen die darin vorhandenen Peptidbindungen gespalten (hydrolysiert) werden. Obwohl dies thermodynamisch begünstigt ist, beträgt die Halbwertszeit einer Peptidbindung in neutraler, wässriger Lösung zehn bis eintausend Jahre. So lange kann aber selbstverständlich nicht gewartet werden, wenn entschieden wurde, dass ein Protein abgebaut werden muss.

Deswegen wird diese Hydrolyse durch Proteasen katalysiert und somit um ein Vielfaches beschleunigt.

Chymotrypsin ist ein Vertreter der Proteasen und ist dazu in der Lage Peptidbindungen an der Carboxyl-Seite von Aminosäuren mit aromatischen oder hydrophoben Resten zu hydrolysieren.

2 Enzym-Mechanismen

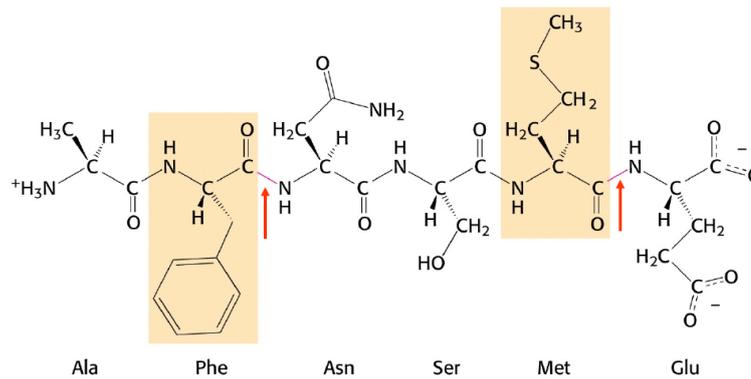


Abbildung 2.2: Mögliche "Schnittstellen" von Chymotrypsin in einer Peptid-Kette [17].

Die Katalyseeigenschaft von Chymotrypsin ist auf einen Serin-Rest zurückzuführen, der sehr reaktiv ist (Das Serin an Stelle 195 um genau zu sein). Das Ser¹⁹⁵ wird dabei durch eine katalytische Triade (Ein Komplex aus drei Aminosäuren (-Resten)) aktiviert wodurch es seine besonderen Eigenschaften erhält.

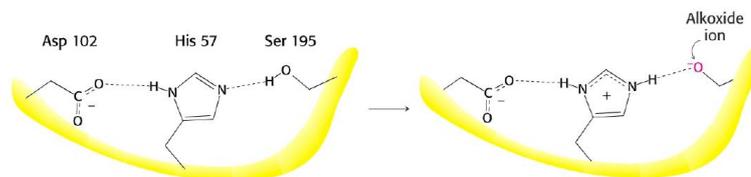


Abbildung 2.3: Darstellung der katalytischen Triade im Chymotrypsin [17].

Das durch diese Triade entstehende Oxyanion (genauer gesagt handelt es sich nur um eine mesomere Grenzformel, die aber dabei hilft zu verstehen, was tatsächlich passiert) ist nun ein sehr starkes Nukleophil, das sogar in der Lage ist das C_1 (Das mit der Doppelbindung zum Sauerstoff) der Peptidbindung anzugreifen. Somit handelt es sich also bei dieser Katalyse sowohl um eine Säure-Base-, als auch um eine kovalente Katalyse.

Durch Bindung des Oxyanions entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand, der durch das sogenannte "Oxyanion-Loch" stabilisiert wird. Dabei handelt es sich um eine weitere Region im Enzym, die diese Stabilisierung (energetische Absenkung) übernimmt, indem zwei Wasserstoffatome mit dem am C_1 neu entstandenen Oxyanion koordinieren (etwas in die Richtung einer Wasserstoffbrücke ausbilden).

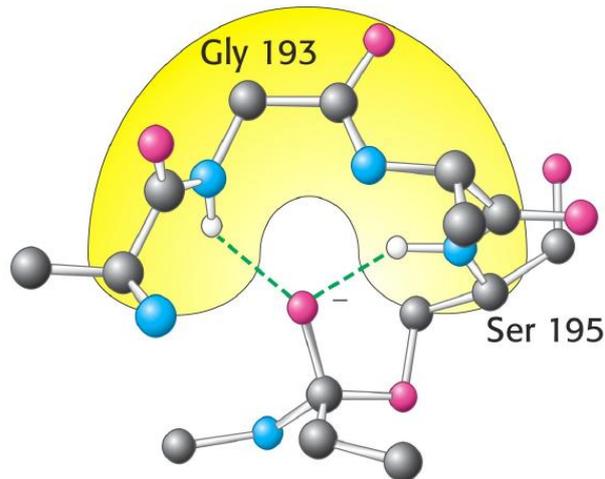


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Oxyanionloches [17].

Durch Rückbildung der C=O Bindung wird die Peptidbindung gespalten, wobei noch beide Proteinfragmente am Chymotrypsin gebunden sind. Das "N-Fragment" nimmt nun das vorher in der katalytischen Triade vom Serin abstrahierte Wasserstoffatom und stellt somit das Neue N-terminale Ende des Fragmentes dar.

In einer darauf folgenden Reaktion mit Wasser wird zum Einen das soeben "geklaute" Wasserstoffatom wieder zurück gebracht, als auch die Carboxylat-Gruppe am C_1 wiederhergestellt, sodass sich dieses endgültig vom Serin lösen kann und nun das neue C-terminale Ende des Fragmentes darstellt. Das bei diesem Schritt zwischenzeitlich entstehende Oxyanion am c_1 wird wieder durch das selbe Oxyanionloch von vorher stabilisiert.

Das Chymotrypsin ist nun wieder in seinem ursprünglichen Zustand und keine eine weitere Hydrolyse katalysieren.

2 Enzym-Mechanismen

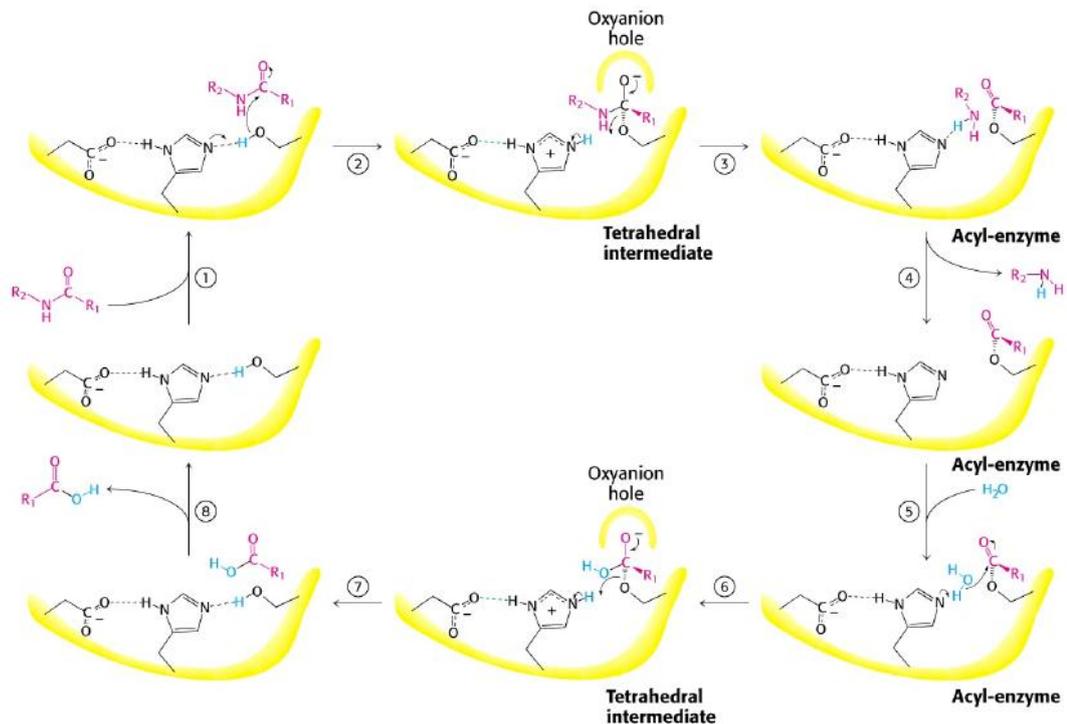


Abbildung 2.5: Mechanismus der Hydrolyse mittels Chymotrypsin [17].

Aus dem geschilderten Mechanismus geht die Selektivität auf aromatische, bzw. hydrophobe Aminosäure-Reste an der zu spaltenden Bindung noch nicht hervor, da der entsprechende Rest am Mechanismus direkt gar nicht beteiligt ist. Der Grund dafür ist eine hydrophobe Tasche, in die der entsprechende Aminosäure-Rest gehen muss, damit das Enzym wirken kann. Hydrophile Reste gehen da schlicht und einfach (so gut wie) nicht hinein, sodass die dazugehörigen Bindungen sicher vor Chymotrypsin sind. Diese hydrophobe Tasche im Chymotrypsin wird auch als S_1 -Position oder S_1 -Tasche bezeichnet.

2.2.1 Vergleich und Analoga

Auch andere Enzyme weisen eine solche S_1 -Tasche auf. Unter Anderem auch Trypsin und Elastase. Im Vergleich zum Chymotrypsin unterscheidet sich diese Tasche allerdings ein klein wenig, sodass die darin einzulagernden Reste unterschiedlich sind. Dies führt zu einer anderen Regioselectivität der Katalyse.

2.2 Beispiel: Chymotrypsin

Trypsin hat beispielsweise ein Asparagin in der Tasche verbaut, welches aufgrund seiner Carboxylat-Gruppe nur Lysin- oder Argininreste in der Tasche bevorzugt. Elastase hat zwei Valinreste in der Tasche verbaut, die aufgrund ihrer verzweigten Struktur dafür sorgen, dass nur kleine Seitenketten in der Tasche eingelagert werden.

Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sind Homologe, aber auch bei nicht-homologen Enzymen wurde das Ausbilden einer katalytischen Triade gefunden.

Außerdem gibt es auch Proteasen, die nicht auf einem aktivierten Serin aufbauen, sondern auf einem Cystein. Die Funktionsweise ist dabei analog, nur dass statt eines Oxyanions ein Schwefelanion als Nukleophil wirkt.

Ein anderer Hydrolyse-Mechanismus (z.B. bei der Aspartyl-Protease) baut auf zwei Asparagin-Resten (einer davon deprotoniert), wovon das Deprotonierte das angreifende Wasser polarisiert (und somit als Nukleophil aktiviert), während das Andere das anzugreifende Kohlenstoffatom polarisiert, indem es mit dem daran gebundenen Sauerstoff wechselwirkt, was den nukleophilen Angriff am Kohlenstoffatom erleichtert.

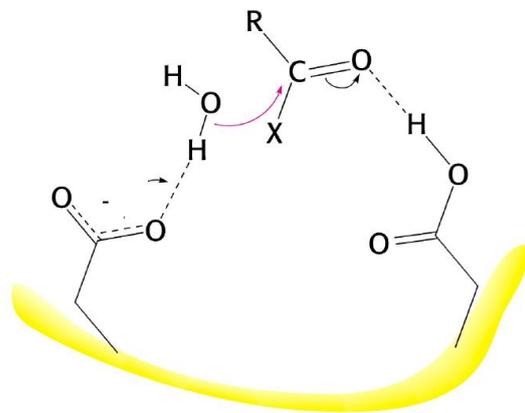


Abbildung 2.6: Hydrolyse katalysiert durch Aspartyl-Protease [17].

Ein weiterer, analoger Mechanismus findet in sogenannten Metalloproteasen Anwendung. Dabei dient ein Metallkation (meist Zn^{2+}) als Zentralteilchen im Komplex, der die Aktivierung mit einem Oxyanion eines Glutamat-Restes übernimmt. Das Kation übernimmt gleichzeitig auch die Stabilisierung des Oxyanions, sodass es keines extra Oxyanionenloches bedarf.

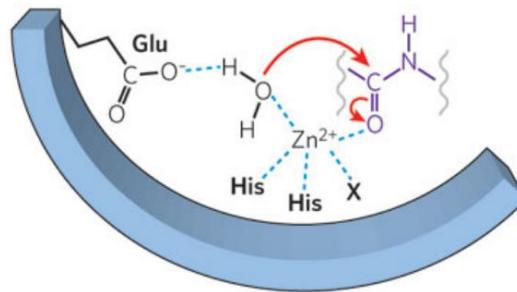


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Hydrolyse durch eine Metalloprotease [17].

2.3 Beispiel: Carboanhydrasen

Carboanhydrasen sind essentiell für das Lösen von CO_2 in Wasser. Normalerweise löst sich CO_2 nach folgender Reaktion in Wasser:



Wie schon in der Reaktionsgleichung angedeutet, liegt das Gleichgewicht eher auf Seiten des gasförmigen CO_2 statt auf Seiten der Kohlensäure. Wird diese jedoch deprotoniert, so ist das entstehende Hydrogencarbonat-Ion stabil in Wasser. Soll nun also gezielt CO_2 in Wasser gelöst werden, so muss am Ende dieses Lösungsvorganges das Hydrogencarbonat stehen.

Carboanhydrasen haben ein Zn^{2+} in ihrem aktiven Zentrum, an das ein Wassermolekül gebunden ist. Durch die Bindung zum Zink, ist das Wasser als Säure aktiviert (sein pK_S -Wert wird von 14 auf 7 abgesenkt). Dies liegt in der Stabilisierung des durch Deprotonierung entstehenden Hydroxids.

Das so gebildete Hydroxid ist nach wie vor an das Zn^{2+} gebunden und kann nun ein CO_2 -Molekül binden. Auch hier ist das Oxyanion des entstehenden Hydrogencarbonats durch das Zink stabilisiert. In einem letzten Schritt wird nun das Hydrogencarbonat durch ein "frisches" Wassermolekül substituiert, sodass der Vorgang wieder von vorne beginnen kann.

Durch diesen Prozess wurde also die instabile Zwischenstufe der Kohlensäure komplett vermieden, was ein effizienteres Lösen von CO_2 in Wasser ermöglicht.

2.3 Beispiel: Carboanhydrasen

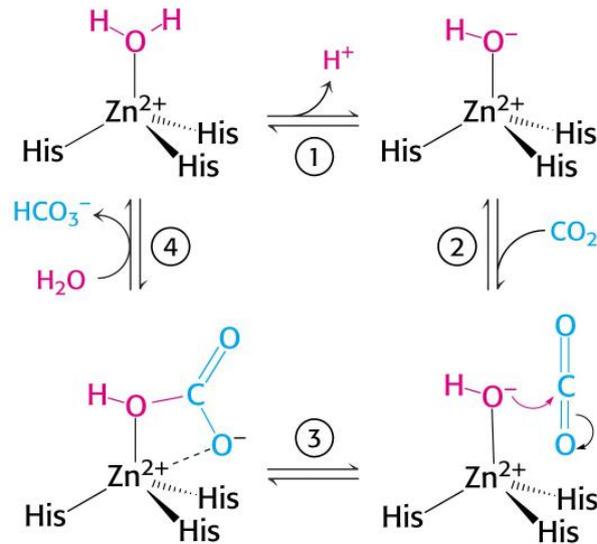


Abbildung 2.8: Mechanismus der durch eine Carboanhydrase katalysierten Lösung von CO₂ in Wasser [17].

Damit die Lösung durch das Lösen von CO₂ nicht sauer wird (es wird jedes Mal ein Proton abgespalten), muss es sich um eine Pufferlösung handeln, wobei die abgespaltenen Protonen an die Puffersubstanz übertragen werden. Würde die Lösung sauer werden, so würde das Hydrogencarbonat wieder protoniert werden und die dadurch entstehende Kohlensäure würde sich wieder in CO₂ und Wasser zersetzen.

Allerdings kann das Proton nicht direkt auf den Puffer übertragen werden, da sich das aktive Zentrum der Carboanhydrase (wie bei Enzymen üblich) in einer Tasche des Enzyms befindet. Somit muss das Proton irgendwie aus dem Enzym heraus transportiert werden. Diesen Job hat ein im Enzym verbauter Histidin (das Histidin an Position 64 um genau zu sein), welches das beim Lösungsvorgang abgespaltene Proton an seinem Stickstoff bindet. Von dort kann es dann weiter auf den Puffer übertragen werden.

Die Carboanhydrase ist nebenbei bemerkt ist eines der am schnellsten arbeitenden, bekannten Enzyme.

2.4 Beispiel: Nukleotid-Monophosphat-Kinasen

Diese Enzyme katalysieren die Übertragung eines Phosphats von ATP auf ein Nukleotid-Monophosphat (NMP), um ein Nukleotid-Diphosphat (NDP) zu bilden. Dabei wird das ATP **nicht** hydrolysiert.

Der Mechanismus beruht darauf, dass das ATP an das Enzym bindet (an der sogenannten “P-Schleife”) und dadurch eine enorme Änderung in der Konformation hervorruft, die dazu führt dass das ATP an das aktive Zentrum des Enzyms gelangt.

Interessant ist dabei, dass das Prinzip der Änderung der Konformation durch Binden von ATP an eine P-Schleife bei sehr vielen Enzymen und Protein zu finden ist, die chemische in mechanische Energie umsetzen. Diese Moleküle nutzen die Änderung in der Konformation nicht dafür das ATP in die richtig Position zu bringen, sondern direkt die mechanische Energie, die in dieser Änderung steckt (z.B. Motorproteine, die dadurch einen “Schritt” machen).

3 Enzymkinetik

Enzyme beschleunigen den Ablauf von chemischen Reaktionen. Anders ausgedrückt erhöhen sie ihre Reaktionsgeschwindigkeit. Welches Feld ist nun besser geeignet diesen Prozess zu beschreiben, also die Kinetik die sich ja genau mit Reaktionsgeschwindigkeiten und deren Abhängigkeiten beschäftigt.

Es kann zwar auch die Bindungsqualität zwischen Enzym und Substrat quantifiziert werden, aber das spiegelt in den meisten Fällen nicht die enzymatischen Eigenschaften des zu untersuchenden Enzyms wieder. Tatsächlich wurde ja bereits festgestellt, dass eine starke Bindung des Enzyms zum Substrat kontraproduktiv ist und die Reaktion verlangsamt, da dies die benötigte Aktivierungsenergie der Reaktion erhöht.

Wichtig bei der Enzymkinetik zu verstehen ist, dass die sowohl die Reaktion, als auch ihre Rückreaktion gleichermaßen beschleunigt werden. Dies ist eine allgemeine Eigenschaft eines Katalysators, der nur die Einstellung des Gleichgewichtszustands, nicht aber die Lage des Gleichgewichts verändert.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v mit der Aktivierungsenergie E_A kann für viele Reaktionen über die Arrhenius-Gleichung ausgedrückt werden. Gleichzeitig gilt auch das empirische Geschwindigkeitsgesetz, welches die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zu den potenzierten Eduktkonzentrationen setzt. Letzteres hat jedoch nichts mit der Aktivierungsenergie zu tun.

$$v = k \cdot \prod_i c_i^{p_i} = A \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (3.1)$$

Dabei sind c_i die Eduktkonzentrationen, p_i die Reaktionsordnung bezogen auf das Edukt i , R die universelle Gaskonstante, T die absolute Temperatur in Kelvin und A die Stoßzahl, die über Temperatur, die Boltzmann-Konstante k_B und das Planck'sche Wirkungsquantum h ausgedrückt werden kann. Die Reaktionsordnung

3 Enzymkinetik

der gesamten Reaktion ergibt sich dabei als Summe aller Reaktionsordnungen bezogen auf die einzelnen Edukte.

Soll nun qualitativ beschrieben werden, wie stark sich die Änderung der Aktivierungsenergie auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirkt, so kann dies durch eine beispielhafte Verringerung der Aktivierungsenergie um $10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ berechnet werden:

$$\begin{aligned}\frac{v_2}{v_1} &= \frac{\mathcal{A} \cdot \exp\left(-\frac{E_A - 10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{RT}\right)}{\mathcal{A} \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right)} = \exp\left(\frac{-E_A + 10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + E_A}{RT}\right) \\ &= \exp\left(\frac{10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{RT}\right)\end{aligned}$$

Bei Raumtemperatur ($T = 298 \text{ K}$) ergibt dies

$$\frac{v_2}{v_1} = \exp\left(\frac{10\,000 \frac{\text{J}}{\text{mol}}}{R \cdot 298 \text{ K}}\right) \approx 57$$

Wie sich also in dieser Rechnung zeigt, beschleunigt eine Erniedrigung der Aktivierungsenergie um nur $10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ die Reaktion bei Raumtemperatur um etwa den Faktor 57!

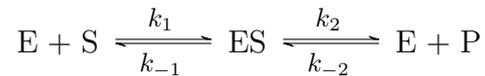
Eine Eigenschaft enzymatisch katalysierter Reaktionen ist, dass die Reaktionsordnung abhängig vom Verhältnis von Substratkonzentration zur Enzymkonzentration. Ist dieses Verhältnis niedrig, so ist die Reaktionsordnung bezogen auf die beiden Edukte jeweils 1 und somit ist die Gesamtreaktion zweiter Ordnung (Hier wird die einfachste Enzymreaktion betrachtet: $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES} \rightleftharpoons \text{E} + \text{P}$).

Ist das Verhältnis jedoch sehr groß, so ist die Reaktionsordnung bezogen auf die Substratkonzentration gleich Null und die bezogen auf das Enzym nach wie vor 1. Somit handelt es sich dann also um eine Reaktion erster Ordnung.

Diese Beobachtung macht auch Sinn, denn um eine Reaktion katalysieren zu können, muss das Enzym ein Substrat binden. Wenn es ein Substrat gebunden hat, so kann es bis zur Vollendung der Reaktion kein weiteres Substrat binden. Ist nun eine Substratkonzentration erreicht, bei der alle vorhandenen Enzym-Moleküle besetzt sind, so spielt es keine Rolle, wie viel Substrat sonst noch in der Lösung vorhanden ist. Somit hängt die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch von der Enzymkonzentration ab.

3.1 Steady-State-Kinetik

Ausgangspunkt für die folgende Betrachtung ist folgende Reaktionsgleichung



Auf den Reaktionspfeilen stehen dabei die dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten wie sie in Gleichung (3.1) zu sehen sind.

Zu Beginn der Reaktion kann, unter der Annahme dass noch kein Produkt vorliegt, $k_{-2} = 0$ gesetzt werden, da die Rückreaktion nur stattfinden kann, wenn auch Produkt vorhanden ist. Wenn dies der Fall ist, kann die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion folgendermaßen berechnet werden

$$v_0 = k_2 \cdot [\text{ES}] \quad (3.2)$$

Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes findet dabei Beachtung in der Konzentration des selbigen Komplexes, welche ja abhängig von k_1 und k_{-1} ist.

Das Interessante ist nun der Fall $[\text{E}] \ll [\text{S}]$, da dann nach kurzer Einstellungsphase das Quasistationaritätsprinzip gilt, das $\frac{d[\text{ES}]}{dt} \approx 0$ aussagt. Wenn die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes konstant ist, so kann Gleichung (3.2) verwendet werden, um die von nun an herrschende Reaktionsgeschwindigkeit zu berechnen. Somit steigt die Produktkonzentration also linear mit der Zeit an (solange genügend Substrat vorhanden ist). Dieser Zustand wird dann auch als **steady state** bezeichnet.

3 Enzymkinetik

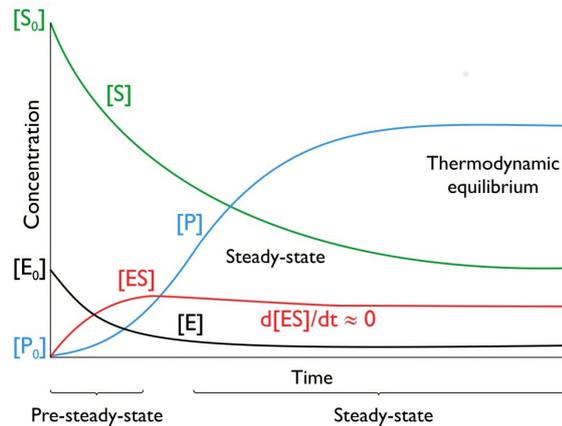


Abbildung 3.1: Konzentrationsverlauf während einer Reaktion mit steady state [10]. Entscheidend ist der lineare Bereich der Produktkurve im steady state.

Damit die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes konstant bleiben kann, muss seine Bildung genauso schnell verlaufen, wie sein Abbau (egal ob dies wieder zurück zu den Edukten oder zum Produkt führt). Mathematisch ausgedrückt bedeutet dies also

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_{-1}) \cdot [ES]$$

Wird nun beachtet, dass die Gesamtkonzentration an Enzym stets die Summe aus freiem Enzym und Enzym im Komplex ist, gilt $[E]_0 = [E] + [ES]$. Eingesetzt für $[E]$ ergibt sich

$$k_1 \cdot ([E]_0 - [ES]) \cdot [S] = (k_2 + k_{-1}) \cdot [ES]$$

Unter Verwendung der **Michaelis-Menten-Konstante** K_M

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3.3)$$

ergibt sich durch Umformung

$$\begin{aligned} ([E]_0 - [ES]) \cdot [S] &= K_M \cdot [ES] \\ [E]_0 \cdot [S] &= [ES] \cdot (K_M + [S]) \end{aligned}$$

Daraus ergibt sich nun ein allgemeiner Ausdruck für die (konstante) Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes:

$$[ES] = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3.4)$$

3.2 Michaelis-Menten-Kinetik

Aus Gleichung (3.4) und (3.2) kann nun die sogenannte **Michaelis-Menten-Gleichung** hergeleitet werden (Einsetzen von (3.4) für die Enzym-Substrat-Komplex-Konzentration in (3.2)):

$$v_0 = k_2 \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (3.5)$$

In Gleichung (3.2) war das Produkt aus der Geschwindigkeitskonstanten k_2 und der Enzym-Substrat-Komplex-Konzentration eine Reaktionsgeschwindigkeit (empirisches Geschwindigkeitsgesetz). Somit ist es logisch, dass das Produkt aus k_2 und der Enzym-Gesamtkonzentration $[E]_0$ die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion ist, denn k_2 ist konstant und die maximale Konzentration des Komplexes ist erreicht, wenn gerade jedes einzelne Enzym mit einem Substrat in einem Komplex ist.

Somit kann über Gleichung (3.5) auch die Michaelis-Menten-Konstante aus der Messung der Anfangsgeschwindigkeit bestimmt werden.

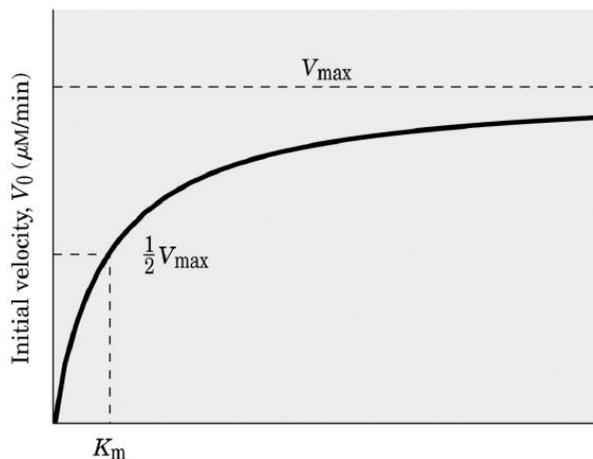


Abbildung 3.2: Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration gemäß Gleichung (3.5) [17].

Wie bereits in Abbildung 3.2 angedeutet, befindet sich die halbe Start-Maximalgeschwindigkeit genau bei einer Substratkonzentration von $[S] = K_M$. Anders ausgedrückt beschreibt K_M die Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist.

3 Enzymkinetik

Das Teilen der Maximalgeschwindigkeit durch die Enzym-Gesamtkonzentration ergibt die sogenannte **Wechselzahl** k_{cat} einer katalysierten Reaktion. Diese beschreibt die Anzahl an Formelumsätzen pro Zeitspanne, die ein Katalysator katalysieren kann.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]_0} \quad (3.6)$$

In dem bisher besprochenen Beispiel ergibt sich also $k_{cat} = k_2$.

An dieser Stelle sei nochmals betont, dass die gesamte Michaelis-Menten-Kinetik nur für den Fall $[E]_0 \ll [S]$ gilt, da nur dann ein steady state erreicht wird, in welchem diese Kinetik Anwendung findet.

Wird die Michaelis-Menten-Konstante - definiert in Gleichung (3.3) - nochmals genauer betrachtet, so kann festgestellt werden, dass sie ein Maß für die Affinität des Enzyms gegenüber des Substrates ist. Diese Aussage ist zutreffend, da im Zähler die Geschwindigkeitskonstanten auftauchen, die für eine Dissoziation des Komplexes verantwortlich sind, und im Nenner diejenige(n) die zu seiner Bildung führen. Ein geringer Wert für K_M bedeutet folglich, dass die Affinität des Enzyms zum Substrat recht hoch ist, während ein hoher Wert genau das Umgekehrte besagt.

Dieser Sachverhalt wird noch deutlicher, wenn der Fall $k_2 \ll k_{-1}$ betrachtet wird. Dann gilt

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = K_{diss}$$

In diesem Fall ist K_M also in erster Näherung identisch mit der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes.

Interessant ist noch, dass die Substratkonzentration in einer natürlichen Zelle häufig K_M entspricht.

Wird der Fall einer sehr geringen Substratkonzentration betrachtet so kann Gleichung (3.5) unter Zuhilfenahme der Wechselzahl aus Gleichung (3.6) folgendermaßen angenähert werden:

$$\begin{aligned} v_0 &= \frac{k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \\ &\approx \frac{k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M} = \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [E]_0 \cdot [S] \end{aligned}$$

Dieser Quotient aus Wechselzahl und Michaelis-Menten-Konstante kann auch aus-

geschrieben werden:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{cat}}{\frac{k_2+k_{-1}}{k_1}} = \frac{k_{cat}}{\frac{k_{cat}+k_{-1}}{k_1}} = \frac{k_{cat}}{k_{cat} + k_{-1}} \cdot k_1 < k_1$$

Dass die oben formulierte Ungleichung gültig ist, ergibt sich durch die Tatsache, dass stets gilt $k_{-1} > 0$.

k_1 ist seinerseits durch die Diffusionsgeschwindigkeit auf etwa $k_1 = 10^9 \frac{1}{\text{mol}\cdot\text{s}}$ limitiert.

3.2.1 Impuls-Kinetik

Die bisherigen Formeln suggerieren alle eine lineare Abnahme der Substratkonzentration über die Zeit. Allerdings treten in der Natur solche "perfekten Enzyme" eher selten auf. Viel öfter wird eine "Impuls-Kinetik" beobachtet, bei der im ersten Zeitintervall eine schnellere Produktzunahme beobachtet wird, als es im darauf folgenden Zeitintervall der Fall ist.

das lässt sich durch die Tatsache erklären, dass in diesen Fällen das Freisetzen des Produktes aus dem Enzym der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Zu Beginn der Reaktion ist der bestimmende Schritt das Binden des Substrates an das Enzym, da zu diesem Zeitpunkt noch sehr viel freies Enzym zur Verfügung steht. Dieses wird im Laufe der Reaktion aber immer weniger, sodass schlussendlich die Freisetzung des Produktes zum bestimmenden Schritt wird (diese Aussage setzt natürlich voraus, dass die Freisetzung tatsächlich langsamer als die Bindung und Umsetzung ist).

3.2.2 Lineweaver-Burk-Graph

Der Lineweaver-Burk-Graph ist eine bewährte Methode, um die Michaelis-Menten-Konstante K_M sowie die Wechselzahl k_{cat} zu bestimmen. Sie geht dabei von der Michaelis-Menten-Gleichung (3.5) aus und bildet ihr Inverses.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{v_{max} \cdot [S]} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (3.7)$$

3 Enzymkinetik

Wird nun die reziproke Anfangsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen, so ergibt sich eine Gerade mit der Steigung $m = \frac{K_M}{v_{max}}$ und dem y-Achsenabschnitt $y = \frac{1}{v_{max}}$. Ein weiterer interessanter Punkt ist die Nullstelle der Geraden, die gerade bei $x_0 = -\frac{1}{K_M}$ liegt.

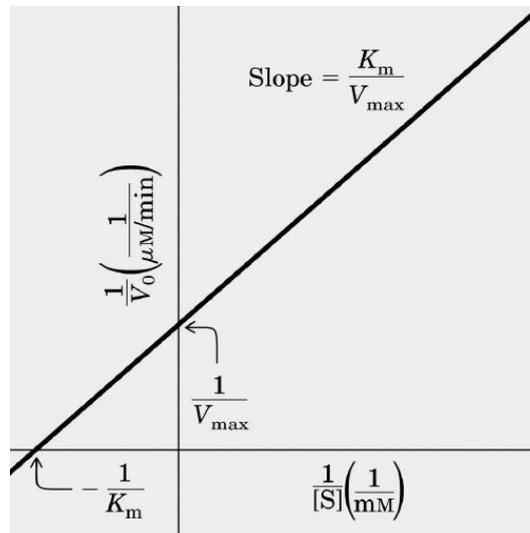


Abbildung 3.3: Beispiel eines Lineweaver-Burk-Graphen [17].

3.3 Enzymhemmung

Es wurde bereits besprochen, dass enzymatisch katalysierte Reaktionen sehr sensibel bezüglich des Enzyms und des Substrats sind, sodass es kaum verwundert, dass diese Reaktion durch Fremdstoffe (Inhibitoren) gestört (gehemmt) werden kann. Es werden grundsätzlich die folgenden Hemmungstypen unterschieden:

- Irreversible Hemmung
- Reversible Hemmung
 - **Kompetitive Hemmung** - Der Inhibitor kann ebenfalls reversibel an das aktive Zentrum des Enzyms binden und kann somit Enzyme “belegen”, die dementsprechend nicht mehr für das Substrat zur Verfügung stehen. Somit konkurrieren Substrat und Inhibitor um das Enzym.

3.3 Enzymhemmung

- **Unkompetitive Hemmung** - Der Inhibitor bindet reversibel an den Enzym-Substrat-Komplex, sodass dieser nicht weiter reagieren kann. Die Umsetzung zum Produkt bzw. dessen Freisetzung kann also erst geschehen, wenn sich der Inhibitor wieder vom Komplex abgespalten hat.
- **Gemischte Hemmung** - Der Inhibitor kann sowohl an das Enzym, als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden. Die Bindung an das Enzym und an den Komplex sind dabei unterschiedlich stark.
- **Nicht-kompetitive Hemmung** - Wie bei der gemischten Hemmung, jedoch sind in diesem Fall die Bindungen zu Enzym und Komplex gleich stark.

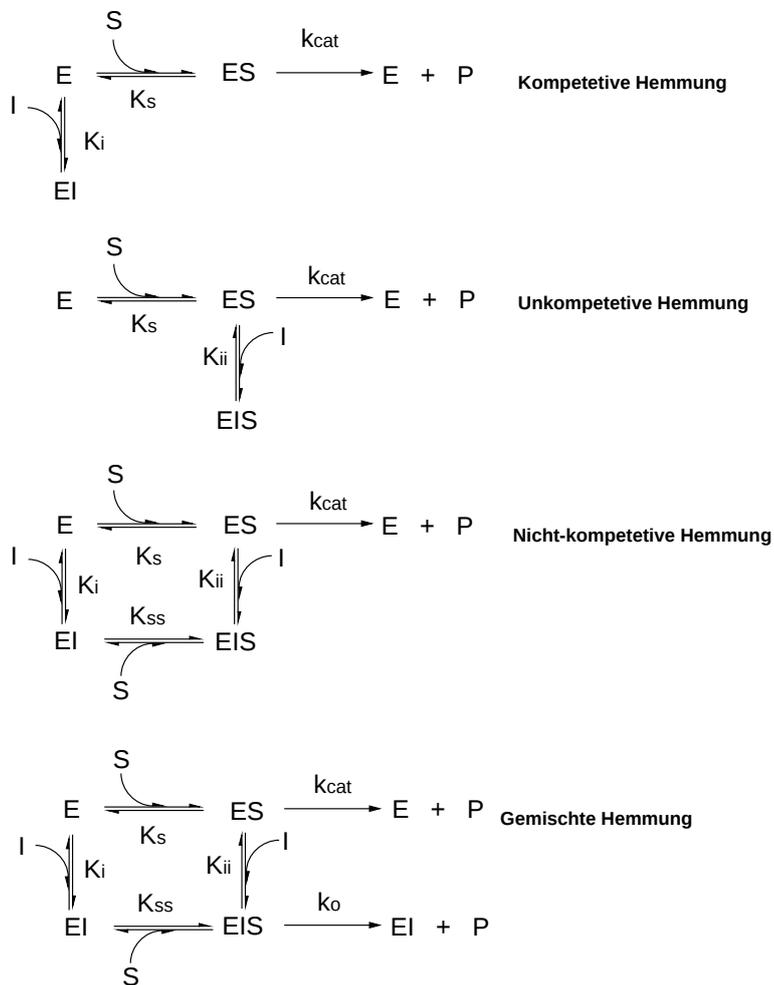


Abbildung 3.4: Übersicht der Hemmungstypen [11]

3.3.1 Mathematische Beschreibung der Enzymhemmung

Bei Inhibitionen, die die Maximalgeschwindigkeit, bzw. die Michaelis-Menten-Konstante verändern, werden diese Größen in allen Gleichungen durch die "augenscheinlichen Größen" v_{max}^{app} und K_M^{app} ersetzt. Dies bringt zum Ausdruck, dass die ursprünglichen Größen Charakteristika der entsprechenden Reaktion sind, die auf dem Papier durch die Zugabe eines Inhibitors nicht verändert werden. Allerdings ergeben Messungen der Reaktion mit Inhibitor eben andere Werte, sodass diese Änderung dadurch veranschaulicht wird, indem diese "augenscheinlichen" Größen eingeführt werden.

Für bestimmte Inhibitoren(-arten) lassen sich nun Beziehungen zwischen v_{max} , K_M und v_{max}^{app} und K_M^{app} finden (siehe folgende Kapitel).

Ausgangspunkt für die folgende, mathematische Beschreibung der Enzymhemmung ist eine enzymatisch katalysierte Reaktion, bei der die Rückreaktion vernachlässigt wird ($k_{-2} = 0$), die unter Michaelis-Menten-Bedingungen abläuft (Quasistationalität + großer Substratüberschuss).

Prinzipiell kann ein Inhibitor an das Enzym oder an den Enzym-Substrat-Komplex binden. Für beide Reaktionen kann das Massenwirkungsgesetz für die Dissoziation der entsprechenden Verbindung aufgestellt werden.

$$K_{diss} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \qquad K'_{diss} = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]} \qquad (3.8)$$

Im allgemeinen Fall (der Inhibitor bindet sowohl an das Enzym, als auch an den Enzym-Substrat-Komplex) muss in Gleichung (3.3) die freie Enzymkonzentration durch die Summe aus freiem Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex ersetzt und die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplex noch mit der des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes addiert werden. Für K_M^{app} gilt also

$$K_M^{app} = \frac{([E] + [EI]) \cdot [S]}{[ES] + [ESI]} \qquad (3.9)$$

Es gilt weiterhin nach Gleichung (3.8)

$$[EI] = \frac{[E] \cdot [I]}{K_{diss}} \qquad \text{und} \qquad [ESI] = \frac{[ES] \cdot [I]}{K'_{diss}}$$

Eingesetzt in Gleichung (3.9) ergibt sich somit

$$K_M^{app} = \frac{\left([E] + \frac{[E] \cdot [I]}{K_{diss}}\right) \cdot [S]}{[ES] + \frac{[ES] \cdot [I]}{K'_{diss}}} = \frac{[E] \left(1 + \frac{[I]}{K_{diss}}\right) \cdot [S]}{[ES] \left(1 + \frac{[I]}{K'_{diss}}\right)}$$

Wird nun folgende Substitution durchgeführt

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_{diss}} \quad \text{und} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_{diss}}$$

vereinfacht sich obige Gleichung zu

$$K_M^{app} = \frac{[E] \cdot [S] \cdot \alpha}{[ES] \cdot \alpha'} \quad (3.10)$$

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit gemäß Gleichung (3.1) ist abhängig von der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes. Dabei wird bei der Berechnung der Maximalgeschwindigkeit davon ausgegangen, dass kein freies Enzym mehr vorliegt. Kommt nun ein Inhibitor ins Spiel, so ist ein Teil des Enzym-Substrat-Komplexes durch einen Inhibitor gebunden. Um aber dennoch die Gesamt-Enzym-Konzentration für die Berechnung der Maximalgeschwindigkeit zu verwenden, muss also die Summe beider Komplexe verwendet werden. Somit gilt

$$v_{max} = k_2 \cdot ([ES] + [ESI]) \quad (3.11)$$

Für den Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex kann wieder der Ausdruck aus Gleichung (3.8) eingesetzt werden. Somit ergibt sich

$$v_{max} = k_2 \cdot \left([ES] + \frac{[ES] \cdot [I]}{K'_{diss}}\right) = k_2 \cdot [ES] \left(1 + \frac{[I]}{K'_{diss}}\right)$$

Mit der bereits eingeführten Substitution, sowie $v_{max}^{app} = [ES] \cdot \alpha'$ ergibt sich somit

$$v_{max}^{app} = k_2 \cdot v_{max}^{app} \quad \text{bzw.} \quad v_{max}^{app} = \frac{v_{max}}{\alpha'} \quad (3.12)$$

Werden die bis hierher gefunden Ausdrücke in die Lineweaver-Burk-Gleichung (anstelle von K_M und v_{max}) (3.7) eingesetzt, so ergibt sich

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M \cdot \alpha}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{v_{max}} \quad (3.13)$$

3 Enzymkinetik

Sollen nun speziellere Formen der Hemmung betrachtet werden, so müssen lediglich die Werte für α und α' angepasst werden. Wenn z.B. der Inhibitor nicht an den Enzym-Substrat-Komplex bindet ergibt sich $\alpha' = 1$, was dann entsprechend in Gleichung (3.13) berücksichtigt werden muss. Nach diesem Prinzip lassen sich die im Folgenden "empirisch" hergeleiteten Ausdrücke auch (mehr oder weniger) streng mathematisch beweisen.

Außerdem bietet Gleichung (3.13) die Möglichkeit charakteristische Punkte (Nullstellen, Steigung, y-Achsenabschnitt) des Lineweaver-Burk-Graphen allgemein zu berechnen.

3.3.2 Irreversible Hemmung

Bei einer irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor irreversibel (in aller Regel kovalent) an das Enzym und deaktiviert es damit. Da die Bindung zum Inhibitor permanent ist, ist das Enzym damit funktionsunfähig und muss ersetzt werden.

Dies führt im Endeffekt also dazu, dass die Enzymkonzentration in der Lösung verringert wird. Dementsprechend bleibt K_M von dieser Hemmung unbetroffen, da es ja nur die nötige Enzymkonzentration bis zur halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit angibt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird durch diesen Inhibitor natürlich reduziert (die $v_{max}^{app} < v_{max}$ kleiner wird bleibt $K_M^{app} = K_M$ konstant).

Ein Beispiel einer irreversiblen Enzymhemmung ist Penicillin, welches das Enzym Transpeptidase in Bakterien hemmt. Dieses Enzym ist an der Zellwandbildung der Bakterien beteiligt, wobei es dort eine kovalente Katalyse durchführt. Penicillin bindet nun irreversibel an das aktive Zentrum dieses Enzyms, sodass es inaktiviert wird.

Bakterien können aber auch Resistenzen gegen Penicillin ausbilden, indem sie neue Enzyme bilden, die die Zersetzung von Penicillin katalysieren. Diese Resistenzbildung ist der Grund warum immer wieder neue Antibiotika auf den Markt kommen.

3.3.3 Reversible Hemmung

Kompetitive Hemmung

Wie bereits erwähnt konkurrieren bei dieser Art der Hemmung Inhibitor und Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms. Ein Maß für die Hemmung ist in diesem Fall die Bindungskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes.

$$K_i = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (3.14)$$

Die kompetitive Hemmung kann durch einen Überschuss an Substrat überwunden, bzw. nivelliert werden.

Bei der kompetitiven Hemmung bleibt die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion gleich, aber die Michaelis-Menten-Konstante ändert sich. Es kann also folgender Ansatz gewählt werden

$$v_{max}^{app} = v_{max} \quad K_M^{app} = \alpha \cdot K_M \quad (3.15)$$

Eingesetzt in Gleichung (3.7) ergibt sich also

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{\alpha \cdot K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

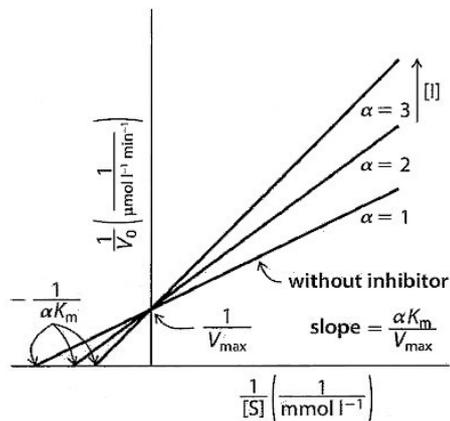


Abbildung 3.5: Lineweaver-Burk-Graph für verschiedene kompetitive Hemmungen [17]. Da die Maximalgeschwindigkeit unverändert bleibt, bleibt auch der y-Achsenabschnitt stets konstant.

3 Enzymkinetik

Da sich die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion nicht ändert, bleibt auch die Wechselzahl k_{cat} unverändert. Da sich jedoch K_M ändert, ändert sich zwangsläufig auch das Verhältnis der Wechselzahl zur Michaelis-Menten-Konstante.

Eine klassisches Beispiel für eine kompetitive Hemmung ist die Behandlung einer Methanol-Vergiftung. Um zu verhindern, dass das Methanol im Körper abgebaut wird, wird dem Patienten Ethanol verabreicht, welches an das gleiche Enzym bindet. Wird nun genügend Ethanol verabreicht, so verhindert dies effektiv den Abbau des Methanols.

Unkompetitive Hemmung

Durch die Bindung des Inhibitoren an den Enzym-Substrat-Komplex, wird die Aktivität des Enzyms gesenkt. Dadurch sinkt sowohl die Maximalgeschwindigkeit, als auch die Michaelis-Menten-Konstante. Was aber konstant bleibt ist das Verhältnis der beiden Größen. Es gilt also

$$\frac{v_{max}}{K_M} = \frac{v_{max}^{app}}{K_M^{app}}$$

Dies legt folgenden Ansatz nahe

$$v_{max}^{app} = \frac{v_{max}}{\alpha'} \quad K_M^{app} = \frac{K_M}{\alpha'} \quad (3.16)$$

Eingesetzt in Gleichung (3.7) ergibt sich also

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha'}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

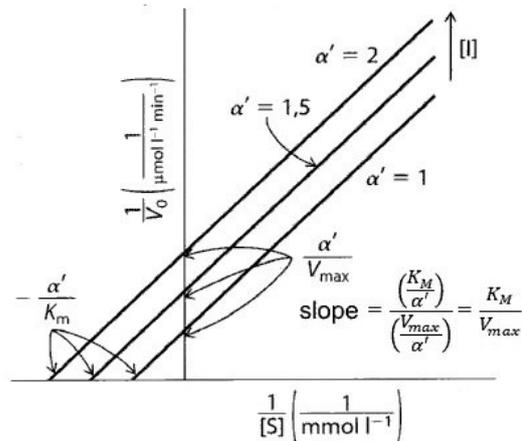


Abbildung 3.6: Lineweaver-Burk-Graph für verschiedene, unkompetitive Hemmungen [17]. Auffällig ist, dass die Gerade nur als Ganzes in y-Richtung verschoben wird, nicht aber ihre Steigung ändert.

Durch das Verändern der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, verändert sich auch die Wechselzahl k_{cat} . da sich die Michaelis-Menten-Konstante aber um den selben Faktor ändert, wie die Maximalgeschwindigkeit (und somit auch die Wechselzahl), bleibt das Verhältnis $\frac{k_{cat}}{K_M}$ konstant.

Gemischte Hemmung

Da der Inhibitor bei diesem Typ der Hemmung sowohl an das Enzym, als auch an das Substrat bindet, müssen die Effekte beider Bindungsarten auf die charakteristischen Größen der Reaktion betrachtet werden.

Hierzu muss der Ansatz für die kompetitive (Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms) aus Gleichung (3.15) und der für die Unkompetitive Hemmung (Bindung an den Enzym-Substrat-Komplex) aus Gleichung (3.16) betrachtet werden.

Daraus ergibt sich, dass die Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum des Enzyms lediglich die Michaelis-Menten-Konstante um den Faktor α ändert. Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion ist davon nicht betroffen.

Bei der unkompetitiven Hemmung hingegen, werden beide Größen um den Faktor $\frac{1}{\alpha'}$ verändert.

3 Enzymkinetik

Werden diese beiden Ansätze zusammengefügt, so ergibt sich ein brauchbarer Ansatz für eine gemischte Hemmung (die ja nichts anderes als eine gleichzeitige kompetitive und unkompetitive Hemmung ist)

$$v_{max}^{app} = \frac{v_{max}}{\alpha'} \quad K_M^{app} = \frac{\alpha}{\alpha'} \cdot K_M \quad (3.17)$$

Da es sich um eine gemischte (und keine nicht-kompetitive) Hemmung handelt, muss $\alpha \neq \alpha'$ gelten.

Wird dieser Ansatz nun in Gleichung (3.7) eingesetzt, so ergibt sich folgender Zusammenhang für die gemischte Hemmung

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha'}{v_{max}} + \frac{\alpha \cdot K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

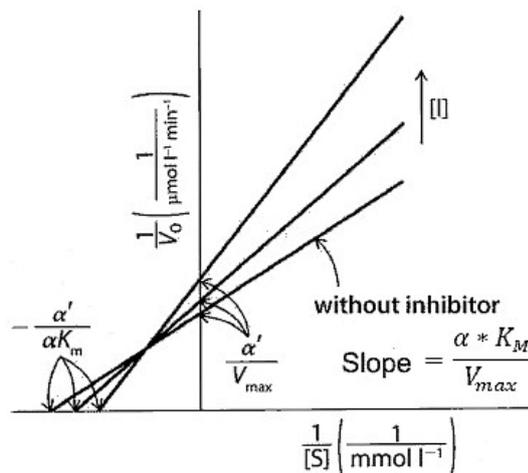


Abbildung 3.7: Lineweaver-Burk-Graph für verschiedene, gemischte Hemmungen [17].

Bei der gemischten Hemmung bleibt also keine der charakteristischen Größen konstant. Der Schnittpunkt der einzelnen Geraden wie sie in Abbildung 3.7 zu sehen sind, ist abhängig von dem Verhältnis von $\frac{\alpha}{\alpha'}$. Für den Fall $\alpha > \alpha'$ liegt der Schnittpunkt wie in Abbildung 3.7 im 4. Quadranten eines kartesischen Koordinatensystems.

Nicht-kompetitive Hemmung

Bei diesem Hemmungstyp kann der selbe Ansatz wie bei der gemischten Hemmung aus Gleichung (3.17) gewählt werden, wobei jedoch $\alpha = \alpha'$ zu setzen ist.

Somit ergibt sich für die nicht-kompetitive Hemmung folgender, angepasster Ansatz

$$v_{max}^{app} = \frac{v_{max}}{\alpha} \quad K_M^{app} = K_M \quad (3.18)$$

Durch die Bedingung $\alpha = \alpha'$ ergibt sich somit, dass die Michaelis-Menten-Konstante durch diese Hemmung nicht beeinflusst wird und sich somit nur die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion ändert. Eingesetzt in Gleichung (3.7) ergibt sich somit

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha}{v_{max}} + \frac{\alpha \cdot K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

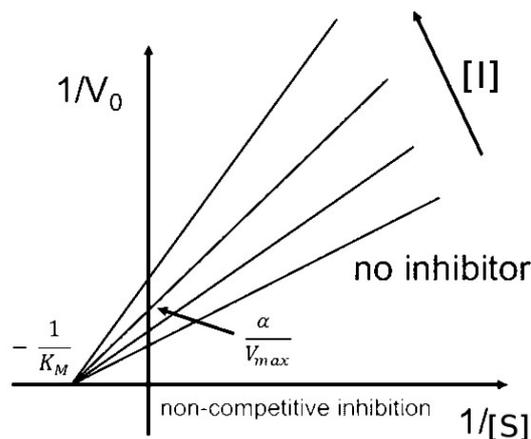


Abbildung 3.8: Lineweaver-Burk-Graph für verschiedene, nicht-kompetitive Hemmungen [17].

Da sich die Maximalgeschwindigkeit ändert, ändert sich auch die Wechselzahl k_{cat} . Dazu kommt noch, dass K_M konstant bleibt, sodass sich das Verhältnis $\frac{k_{cat}}{K_M}$ verändern muss.

3.4 Enzymregulation

Bei der Enzymhemmung wurden bereits einige Mechanismen vorgestellt, wie die von Enzymen katalysierten Reaktionen verlangsamt oder sogar unterdrückt werden können. Dies kann aber auch durchaus gewollt sein. In dem Fall einer solchen “beabsichtigten Hemmung” wird in aller Regel von einer **Enzymregulation** gesprochen. Da die Enzyme bei einer Regulation aber nicht zerstört werden sollen, kommen dafür nur reversible Prozesse in Frage.

Wie auch bei der Hemmung gibt es verschiedene Typen der Enzymregulation, die alle nach einem eigenen Mechanismus ablaufen und unterschiedliche Anwendungen finden.

3.4.1 Allosterische Regulierung

Eine allosterische Regulierung zeichnet sich dadurch aus, dass diese durch die Bindung eines Aktivators, bzw. eines Inhibitors an das Enzym (**nicht** an das aktive Zentrum) die Enzymaktivität reguliert wird.

In aller Regel werden enzymatische Reaktionen am Enzym, das als erstes in der Reaktionskaskade steht reguliert (sonst würde sich ggf. Zwischenprodukt in der Zelle anreichern). Diese Regulierung übernimmt in vielen Fällen das am Ende der Reaktionskaskade stehende Produkt, welches als Inhibitor an besagtes “erstes Enzym” binden kann. Somit unterdrückt also das Produkt seine eigene Produktion, was dazu führt, dass die Konzentration des Produktes in der Zelle relativ konstant bleibt (hohe Konzentration führt zu geringerer Bildung und niedrige Konzentration zu Hoher).

Diese Art der “Selbstregulierung” wird auch **Feedback-Regulierung** genannt.

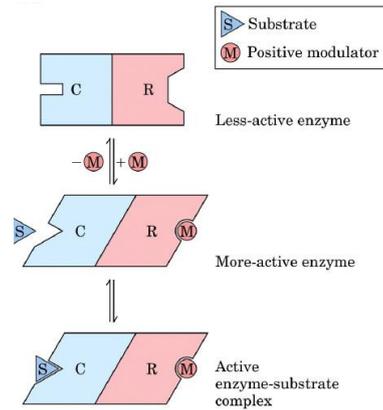


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung einer (positiven) allosterischen Regulation [17].

Wie bereits in Abbildung 3.9 angedeutet, bestehen allosterisch regulierte Enzyme meist aus mehreren Untereinheiten. Die Bindung des Modulator-Moleküls erfolgt dann an einer Untereinheit und die dadurch induzierte Änderung der Konformation pflanzt sich durch das Enzym fort, sodass schlussendlich auch die Untereinheit mit dem aktiven Zentrum eine Konformationsänderung erfährt. Diese kann entweder zu einer erhöhten (positive Regulierung) oder einer verringerten (negative Regulierung) Enzymaktivität führen.

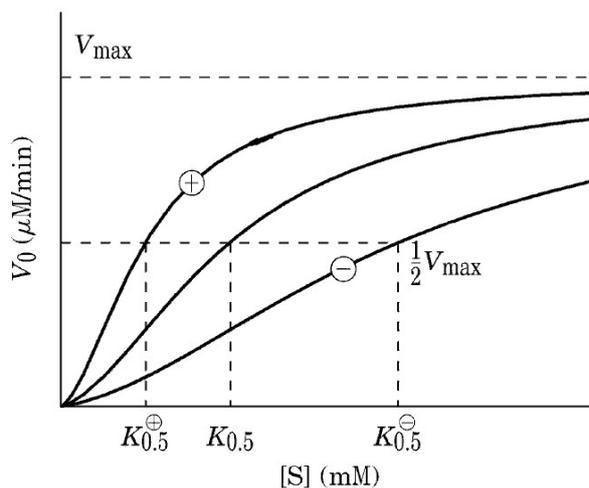


Abbildung 3.10: Darstellung der Anfangsgeschwindigkeitsänderung durch positive, bzw. negative allosterische Regulierung [17].

3 Enzymkinetik

Wenn Abbildung 3.10 mit Abbildung 1.22 (positive Kooperation beim Sauerstofftransport) verglichen wird, so wird deutlich, dass es sich bei der positiven/negativen allosterischen Regulierungen im Endeffekt um das selbe Phänomen wie der positiven/negativen Kooperation handelt.

3.4.2 Kovalente Modifikation

Etwa ein Drittel aller Enzyme wird im Körper phosphoryliert, indem eine Phosphat-Gruppe (abgespalten von ATP) an das Enzym geknüpft wird. Dort beeinflusst es das Enzym (und dessen Konformation) durch seine doppelte, negative Ladung, sowie durch das Ausbilden von Wasserstoffbrücken. Wird das Phosphat nicht mehr benötigt, so wird es durch Hydrolyse wieder abgespalten. Es kann aber auch (und das ist der häufigere Fall) zur Energiegewinnung abgespalten werden. Die so entstehende Energie kann zur schnelleren Umsetzung eines Substrates zum Produkt verwendet werden.

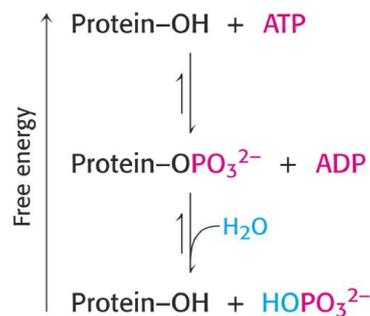


Abbildung 3.11: Energetische Lage der einzelnen Stufen der Phosphorylierung [17].

Da beide in Abbildung 3.11 dargestellten Reaktionen irreversibel sind, muss das Phosphat unter Energieaufwand wieder zurück an ein ADP gekoppelt werden, um frisches ATP zur Verfügung zu haben, das wieder in solch einer Reaktion eingesetzt werden kann. Dies zeigt einmal mehr, dass ATP im Körper der universelle Energiespeicher ist, der unter anderem durch solche Phosphorylierungen und anschließender Hydrolyse abrufbar ist.

Ein Beispiel für ein Enzym, das über eine Phosphorylierung reguliert wird, ist die Glycogen-Synthase und die Proteinkinase A.

Letztere besteht ist ein Tetramer, dh. es besteht aus insgesamt 4 Untereinheiten. In seinem “natürlichen Zustand” ist das Enzym deaktiviert und kann kein Substrat binden. Dies ist der Fall, da die eigentlich wirksamen Enzyme die zwei äußeren Enzymuntereinheiten sind. Diese sind jedoch an das mittlere Dimer an ihrem aktiven Zentrum gebunden, da das mittlere Dimer substratähnliche Strukturen aufweist, sodass die Bindung am aktiven Zentrum möglich ist.

Aktiviert werden kann das Enzym nun, indem cAMP an das mittlere Dimer bindet. Dies hat eine Konformationsänderung zur Folge, sodass es nicht mehr an die aktiven Zentren der äußeren Enzymuntereinheiten binden kann. Diese werden somit freigesetzt und können beginnen Substrat umzusetzen.

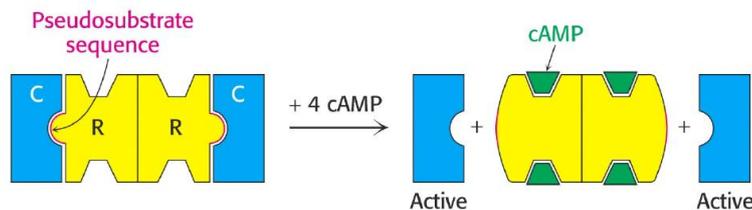


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP [17].

3.4.3 Proteinspaltung

Zunächst mag sich diese Art der Regulierung erst einmal wie die “Hau-drauf-und-Schluss-Methode” anhören, denn die Regulierung die hier statt findet ist der simple Abbau des Enzyms in seine Bestandteile und somit die permanente (De)Aktivierung des Enzyms.

Tatsächlich bietet diese Methode aber auch einige Vorteile mit sich. Einer ist der, dass es dank dieser Methode möglich ist inaktive Enzymvorstufen (sogenannte **Zy-mogene**) zu synthetisieren, die erst an ihrem Zielort gespalten werden und durch diese Spaltung das eigentlich aktive Enzym entsteht. Somit wirkt dieses Enzym auch wirklich nur dort, wo es benötigt wird. Dieser Vorgang spielt insbesondere in der menschlichen Verdauung eine große Rolle.

Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich um eine irreversible Regulierung handelt. Das bedeutet, dass ein Enzym nicht wieder seinen “Aktivierungszustand” ändern kann, weil sich die Umweltfaktoren ein klein wenig geändert haben. Einmal (De)Aktiviert bleibt das auch so.

Beispiel: Verdauung von Proteinen

Um Proteine verwerten zu können, müssen diese zunächst verdaut (in die einzelnen Aminosäuren zerlegt) werden. Dies beginnt im Magen, der einen pH-Wert zwischen 1 und 2 aufweist und somit ein ziemlich saures Milieu darstellt. Die Säure dient zum Einen dazu die gegessenen Proteine zu denaturieren (und somit auch mögliche Bakterien, Viren, etc. unschädlich zu machen) und zum Anderen dazu das Enzym Pepsinogen zu aktivieren.

Der niedrige pH-Wert im Dünndarm induziert die Freisetzung von Sekretin ins Blut, welches wiederum den Pankreas dazu stimuliert Bicarbonat auszuschütten.

Im Pankreastrakt herrscht dann wieder ein neutraler pH-Wert und das Enzym Trypsinogen wird von der Enteropeptidase aktiviert, die vorher von den Darmzellen freigesetzt wurde. Der Pankreas synthetisiert noch weitere Vorstufen von Verdauungsenzymen: Chymotrypsinogen (Vorstufe des Chymotrypsins), Procarboxypeptidase (Carboxypeptidase) und Proelastase (Elastase).

Die Synthese der Verdauungsenzyme als Zymogene ist essenziell, denn andernfalls würden die Verdauungsenzyme anfangen den Verdauungstrakt (bzw. den Ort an dem sie synthetisiert werden) zu verdauen. Durch die Vorstufen können die Zellen ohne sich selbst verdauen zu lassen diese Enzyme (genauer: Ihre Vorstufen) herstellen und diese werden erst aktiviert, wenn sie auch wirklich an dem Ort sind, an dem sie anfangen sollen Proteine zu verdauen.

Ein zweiter Schutzmechanismus der Zellen gegen eine Selbstverdauung sind Protease-Inhibitoren, die in den Zellen vorhanden sind und sehr stark an die entsprechende Protease binden, sodass diese keine Proteine (insbesondere nicht die Zelle oder ihre Bestandteile) spalten können. Ein Beispiel dafür ist das α 1-Antitrypsin, welches das Gewebe vor Elastase schützt.

Die Aktivierung der Enzyme erfolgt in einer autokatalytischen Spaltung. Das bedeutet, dass die Reaktionen nach einer Startreaktion in einer Art Kettenreaktion von alleine weiter laufen.

Im konkreten Fall der Verdauung ist diese Startreaktion die Aktivierung des Trypsinogen zu Trypsin, welches seinerseits weitere Verdauungsenzyme aktiviert. Die Aktivierung von Trypsinogen beruht darauf, dass das Protein gespalten wird und dadurch eine Konformationsänderung erfährt.

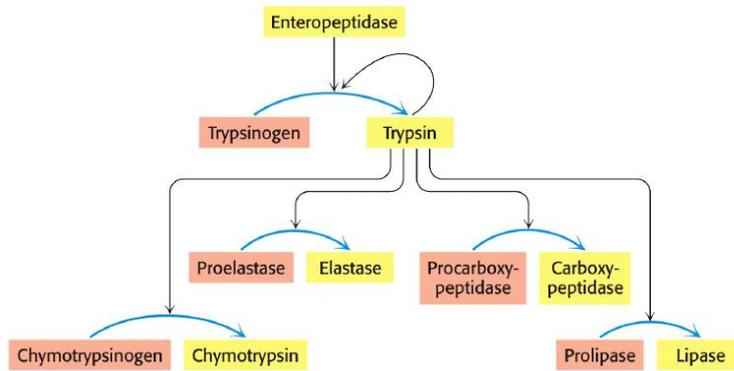


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der autokatalytischen Kaskade zur Aktivierung der Verdauungsenzyme.

Beispiel: Blutverklumpung

Die Blutverklumpung (**Koagulation**) ist ein Mechanismus, der verhindert dass aus einer Wunde Blut verloren geht, indem es selbiges mit Fibrin-Fasern verklumpt und somit eine schließende Schicht über der Wunde ausbildet, die verhindert dass weiteres Blut aus der Wunde strömt.

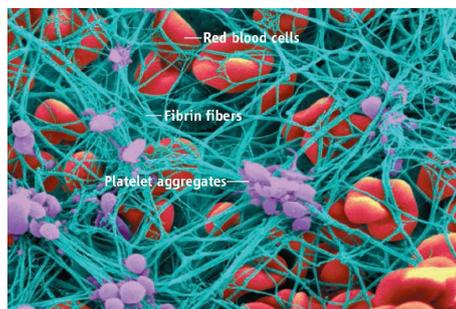


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung von verklumptem Blut [17].

Diese Verklumpung ist ein recht heikler Prozess, denn er muss verlässlich bei allen (offenen) Wunden einsetzen, darf aber auf keinen Fall an anderer Stelle statt finden. Somit bedarf es einer sehr genauen Regulierung wann und wie diese Verklumpung statt findet.

Diese Regulierung findet in Form einer Kaskade statt, in der letztendlich aus dem Zymogen Prothrombin das Thrombin gebildet wird. Dieses aktiviert nun seiner-

3 Enzymkinetik

seits das Fibrinogen, um das Fibrin zu bilden, welches dann verbrückt wird um die Verklumpung zu bilden. Dabei gibt es zwei verschiedene Anfänge für diese Kaskade

1. **Extrinsischer Weg** - Dies ist der Kaskadenstart mit der höchsten Wichtigkeit im (menschlichen) Körper. Er tritt in Kraft, sobald ein Blutgefäß beschädigt ist. Der inaktivierte Koagulationsfaktor VII gelangt somit aus der Blutbahn heraus und an Gewebezellen heran. Diese besitzen teilweise den sogenannten Gewebefaktor ("tissue factor") auf ihrer Oberfläche, welcher bei Kontakt aus dem VII die aktivierte Form VII_a macht. VII_a aktiviert nun den Koagulationsfaktor X, der dann den weiteren, gemeinsamen Verlauf von ex- und intrinsischer startet.
2. **Intrinsischer Weg** - Dieser Kaskadenstart beruht auf dem Kontakt von Kollagen (z.B. in der Haut) auf dem ein Komplex verschiedener Koagulationsfaktoren gebildet werden kann, der zur Aktivierung von XII zu XII_a führt. Nach einer Kettenreaktion wird schlussendlich ebenfalls X zu X_a umgesetzt, welches dann den weiteren, gemeinsamen Verlauf von ex- und intrinsischer startet.

Nach dem Kaskadenstart (und die damit ultimativ verbundene Aktivierung von X zu X_a) tritt auch schon die eingangs erwähnte Aktivierung des Prothrombins durch X_a (und andere Faktoren) in Kraft, was letztendlich zur Bildung und Verknüpfung ("cross linking") von Fibrinsträngen führt, die zu einem Verklumpen des Blutes führen.

Wie zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich schon festgestellt wurde, ist es üblich die Koagulationsfaktoren mit römischen Ziffern durchnummerieren und die aktive Form durch ein a im Index zu kennzeichnen.

Das Verklumpen des Fibrins ist auf seine Aktivierung aus dem Fibrinogen zurück zu führen. Dabei wird durch das Thrombin einige Fibrinopeptide vom Fibrinogen abgeschnitten, sodass die "funktionellen Gruppen" des Fibrins freigelegt werden, die dann miteinander Polymerisieren können.

3.4 Enzymregulation

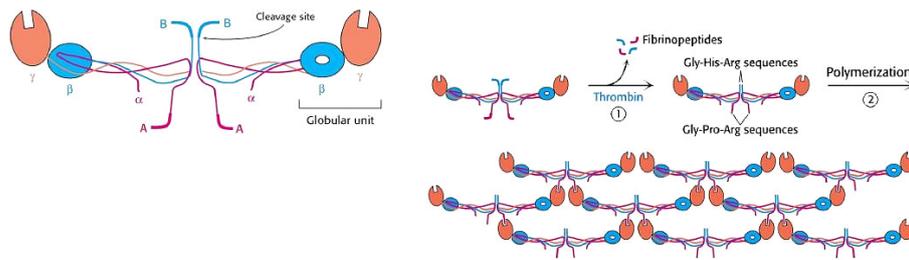


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Aktivierung des Fibrinogens zu Fibrin und anschließender Polymerisation [17].

Das Verbrücken der Fibrinstränge erfolgt dabei über die katalytische Reaktion eines Glutamin- und eines Lysinrestes. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, heißt Transglutaminase.

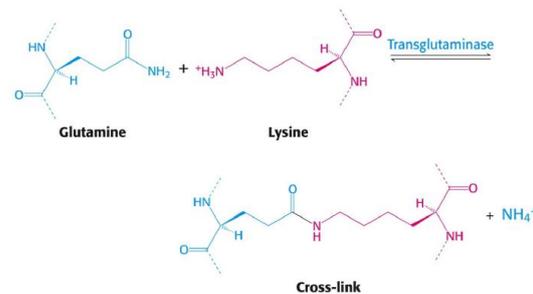


Abbildung 3.16: Verknüpfungsreaktion, die zur Verbrückung der Fibrinstränge benötigt wird [17].

Kontrolliert wird dieser Prozess dabei durch folgende Faktoren

- Alle aktivierten Koagulationsfaktoren haben nur eine kurze Lebensdauer, so dass immer wieder neue Faktoren aktiviert werden müssen, um die Blutverklumpung im Gang zu halten
- Antithrombin III blockiert viele Serinproteasen in der Kaskade, was somit zum Stopp der Reaktionskaskade (und somit der Blutverklumpung) führen kann
- Heparin verstärkt die Effektivität des Antithrombin III

3 Enzymkinetik

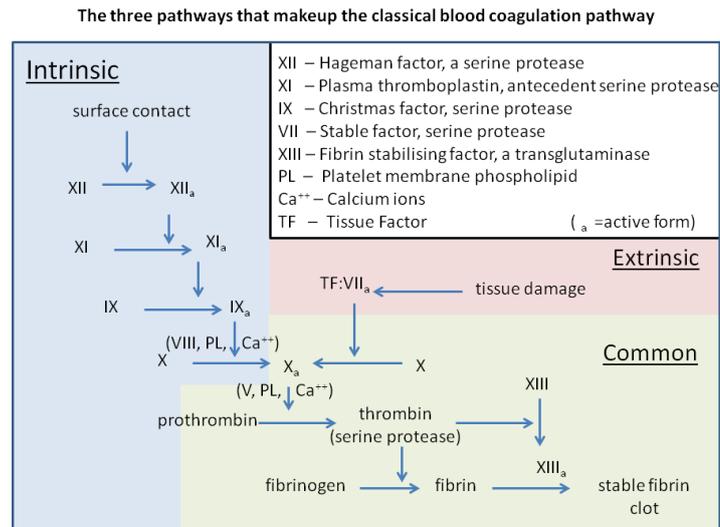


Abbildung 3.17: Prinzipieller Ablauf der Blutverklumpungskaskade [12].

Um Blutverklumpungen wieder aufzulösen wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert, welches eine hohe Affinität für verklumptes Blut besitzt und dieses abbaut. Diese Aktivierung erfolgt dabei durch TPA (“tissue-type plasminogen activator”)

Es gibt aber auch natürliche Mechanismen, die die Blutverklumpung aktiv unterbinden. Ein Beispiel hierfür ist das Hirudin, welches von Blutegeln in ihre Opfer “eingespritzt” wird. Hirudin ist das effektivste, natürlich vorkommende Antikoagulationsmittel, das aktuell bekannt ist.

Es bindet sehr stark an das Thrombin und verstopft dadurch sein aktives Zentrum, sodass es kein Fibrinogen aktivieren kann. Somit wird eine Blutverklumpung verhindert und der Blutegel kann nach Belieben Blut aus seinem Opfer saugen.

Beispiel: Apoptose

Auch bei der Apoptose (der programmierte Zelltod) spielt die Regulierung von Enzymen durch Proteinspaltung eine wichtige Rolle. Sie wird auf viral infizierte oder mutierte Zellen (Krebs) angewendet, um weiteren Schaden am Organismus zu unterbinden.

Während der Apoptose schrumpft die Zelle durch den Stopp zellulärer Prozesse,

3.4 Enzymregulation

das Chromatin wird verdichtet, um eine weitere Transkription zu unterbinden, die Zellmembran löst sich auf und der Zellkern samt DNA wird "zerschreddert", um die möglicherweise fehlerhafte DNA nachhaltig zu zerstören und aus dem Organismus zu entfernen.

Initiiert wird die Apoptose durch eine Caspase-Proteasen-Kaskade. Caspase sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die Proteine an der C-terminalen Seite eines Asparagin-Restes zerschneiden. Durch die Kaskade wird das anfänglich schwache Signal verstärkt und somit irreversibel gemacht.

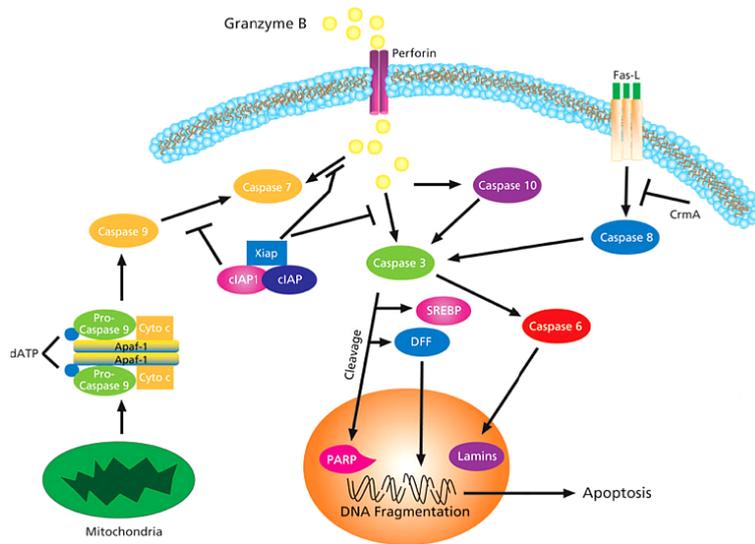


Abbildung 3.18: Schematischer Ablauf einer Apoptose [17].

4 Nukleotide und Nukleinsäuren

1868 wurde zum ersten Mal DNA aus einem Zellkern isoliert. 1944 wurde aber erstmals gezeigt, dass die DNA die Erbinformation enthalten muss. Dies gelang durch ein Experiment mit einer Bakterienform, die zwei verschiedene Stämme hatte: Einen Viralen, der Mäuse nach der Injektion tötete und einen Nicht-Viralen, der den Mäusen nichts tat.

Wurde nun aber der Nicht-Virale zusammen mit DNA des viralen Stammes vermischt und nach einiger Zeit in die Mäuse injiziert, so starben diese. Dies zeigte, dass zumindest ein Teil des nicht-viralen Stammes die Erbinformation des Viralen aufgenommen haben musste. Da aber der einzige Bestandteil des viralen Stammes in der Lösung die DNA war, musste diese Information auf der DNA sitzen.

4.1 Nukleotidstruktur

Ein **Nukelotid** besteht aus drei charakteristischen Komponenten: Einer heterozyklischen Base, einer Pentose (Ribose oder Desoxyribose), sowie einem Phosphat. Ist das Phosphat nicht vorhanden, so wird von einem **Nukleosid** gesprochen. Ein Beispiel für ein Nukelosid wäre das Adenosin, welches aus der Base Adenin und einer Ribose besteht.

4 Nukleotide und Nucleinsäuren

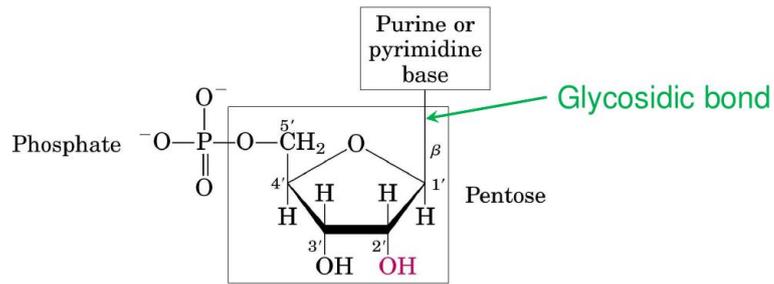


Abbildung 4.1: Allgemeiner Aufbau eines Nucleotids [17].

Insgesamt gibt es fünf verschiedene Basen

- Adenin (A)
- Thymin (T)
- Guanin (G)
- Uracil (U)
- Cytosin (C)

A, G, C und T werden dabei in der DNA verwendet. Uracil kommt lediglich in der RNA anstelle von Thymin vor. Die Basen Adenin und Guanin leiten sich dabei aus einem Purin-Gerüst ab und Cytosin, Thymin und Uracil aus einem Pyrimidin-Gerüst.

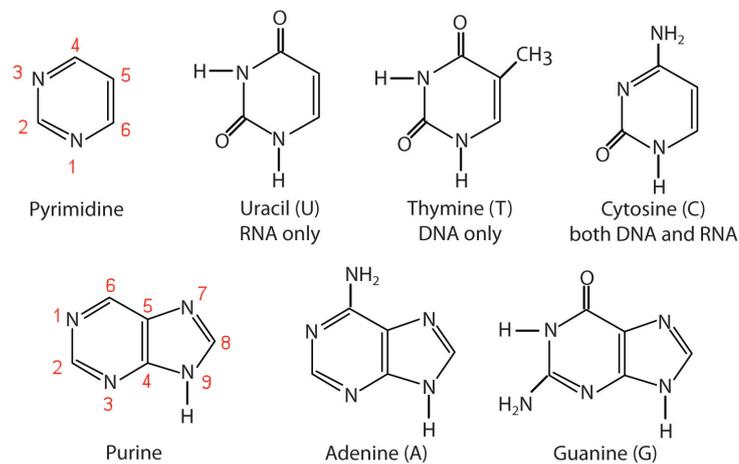


Abbildung 4.2: Darstellung der einzelnen Basen, sowie dem dazugehörigen Grundgerüst [13]. Die Bindung an den entsprechenden Zucker erfolgt am Stickstoff an Position 1 (Pyrimidine), bzw. 9 (Purine).

Als Zucker kommen wie oben bereits erwähnt Ribose und Desoxyribose in Frage. Ersteres wird in der RNA und Letzteres in der DNA verwendet. Es handelt sich um einen Furanosering, der in Envelop-Struktur vorliegt. In der DNA ist dabei das C_2 in endo-Stellung (“S”), wohingegen das bei der RNA das C_3 ist (“N”).

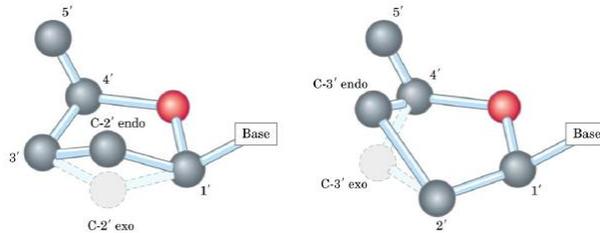


Abbildung 4.3: Furanosering in der DNA, bzw. RNA [17].

Tabelle 4.1: Nomenklatur der Basen in verschiedenen Kontext. Die Benennung erfolgt entsprechend dem verbauten Zucker, welcher mit der Nukleinsäure korrespondiert.

Base	Nukleosid	Nukelotid	Nukleinsäure
Adenin	Adenosin	Adenylat	RNA
	Desoxyadenosin	Desoxyadenylat	DNA
Guanin	Guanosin	Guanylat	RNA
	Desoxyguanosin	Desoxyguanylat	DNA
Cytosin	Cytidin	Cytidylat	RNA
	Desoxycytidin	Desoxycytidylat	DNA
Thymin	(Desoxy-)Thymidin	(Desoxy-)Thymidylat	DNA
Uracil	Uridin	Uridylat	RNA

Für die Nukleotide werden auch gerne die Abkürzungen XMP, XDP und XTP verwendet - je nachdem ob es ein **M**ono-, **D**i- oder **T**riphosphat ist (X ist dabei eine der 5 Basen). Die entsprechende “Desoxy-Form” wird durch ein vorgestelltes “d” gekennzeichnet (Beispiel: Desoxyguanyltriphosphat: dGTP).

4 Nukleotide und Nucleinsäuren

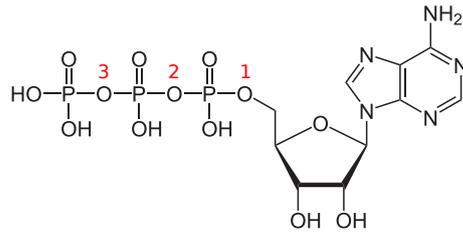


Abbildung 4.4: Skelettformel von Adenosintriphosphat (ATP) in seiner protonierten Form [14]. Bindung 1 ist dabei eine Esterbindung und Bindung 2 und 3 eine Anhydridbindung.

Wie in Abbildung 4.4 angemerkt, enthalten Di- und Triphosphate der Basen eine bzw. zwei Anhydridbindungen. Dies ist der auch ein Grund dafür, dass z.B. ATP (bzw. dessen Derivate) zum Monophosphat hydrolysiert werden können.

Wichtig wäre noch anzumerken, dass die Phosphatgruppe nicht zwangsläufig am C₅ sitzen muss. Sie kann auch an anderen Stellen binden und sogar einen eigenen Zyklus kreieren (siehe cAMP).

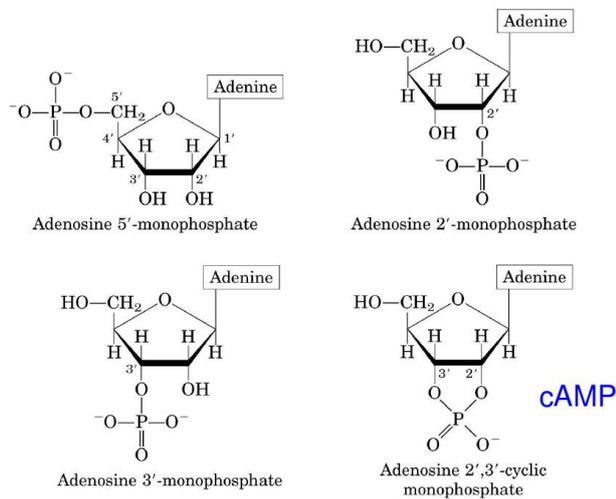


Abbildung 4.5: Variationen von ATP durch unterschiedliche Bindungsstelle der Phosphatgruppe [17].

4.2 DNA und RNA

DNA und RNA haben einen fast identischen Aufbau und unterscheiden sich nur darin, dass in DNA Deoxyribose und in RNA Ribose verbaut ist, sowie in der Ersetzung des Thymins durch Uracil in RNA. Beide besitzen aber ein Rückgrat aus einer alternierenden Abfolge Zucker und Phosphat. An dem Zucker ist dabei stets noch eine der Basen gebunden.

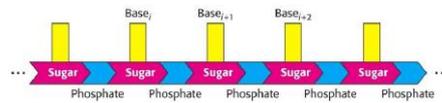


Abbildung 4.6: Schematischer Aufbau der DNA und RNA [17].

Da das Phosphat zwischen zwei Zuckern ist und diese miteinander verbrückt, bildet es einen Phosphordiester. Das Phosphat bindet an einem Zucker am C₃ und am Anderen am C₅. Analog zum C- und N-terminalen Ende bei den Peptiden gibt es somit bei der DNA und RNA ein 3'- und ein 5'-Ende.

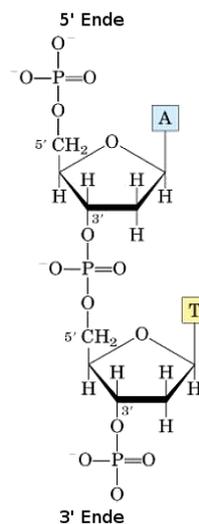


Abbildung 4.7: Darstellung des 3'- und 5'-Endes [17].

Gegen Ende der 1940er Jahre wurde herausgefunden, dass die DNA unterschiedlicher Spezies leicht andere Zusammensetzungen bezüglich der Basen aufweisen, aber stets das Verhältnis von Adenin zu Thymin und von Guanin zu Cytosin stets

4 Nukleotide und Nukleinsäuren

1:1 ist. Das ist das erste Indiz dafür dass die jeweiligen Basen immer paarweise auftauchen.

1953 wurde dann von Watson und Crick die DNA-Struktur als eine Doppelhelix mit komplementärer Basenpaarung (G-C und A-T) postuliert. Die zwei Stränge der DNA sind dabei antiparallel (dh. die 3'-5'-Richtung ist bei den beiden Strängen gerade umgekehrt) und eine Umdrehung erfasst etwa 10 Basenpaare (in Lösung sind es 10,5). Wichtig ist noch, dass die Geometrie der Basenpaare (G-C oder A-T) annähernd identisch ist, sodass die DNA eine beliebige Abfolge dieser Basen(paare) erlaubt und nicht durch sterische Effekte eingeschränkt ist.

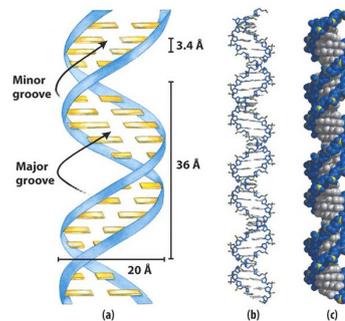


Abbildung 4.8: Aufbauschema der DNA-Doppelhelix in verschiedenen Darstellungsweisen [15].

Der Aufbau der DNA als komplementärer Doppelstrang bedeutet, dass die Erbgutinformation, welche in Form der Basenabfolge auf jedem der Stränge kodiert ist in zweifacher Ausführung vorliegt. Dies ist essenziell für das Vervielfältigen der DNA (z.B. während der Zellteilung).

Wie bereits in Abbildung 4.8 angedeutet, gibt es entlang der Doppelhelix zwei unterschiedlich große Rillen (“major + minor groove”). Dies ist dem Aufbau der DNA zuzuschreiben, der sterisch zur Ausbildung unterschiedlich großer Rillen führt. Die große Rille ist dabei etwa 22 Å und die Kleine etwa 12 Å breit.

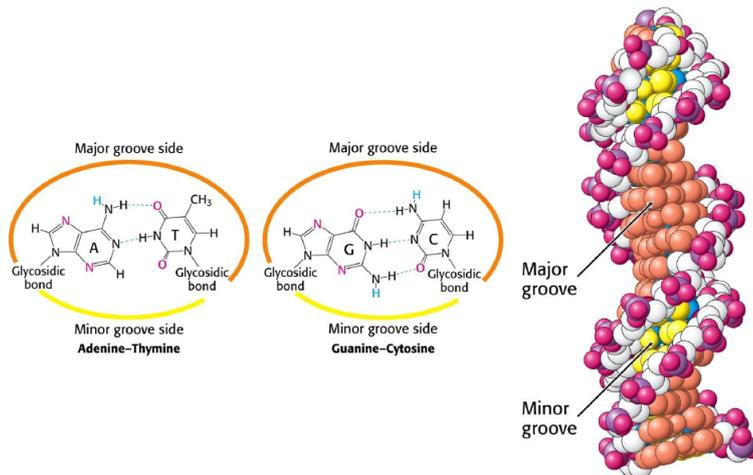


Abbildung 4.9: Genauere Darstellung des Zustandekommens der unterschiedlich großen Rillen in der DNA [17].

4.2.1 Was hält die DNA zusammen?

Im Folgenden soll sich nun der Frage gewidmet werden, welche Kräfte und Wechselwirkungen dafür verantwortlich sind, dass die DNA als Doppelhelix und nicht als zwei einzelne Stränge vorliegt.

Im Wesentlichen sind das die folgenden drei:

- Wasserstoffbrücken
- Basenstapelung
- Elektrostatische Wechselwirkungen

Wasserstoffbrücken

Wasserstoffbrücken wurden bereits ausgiebig diskutiert. Hier sei lediglich angemerkt, dass sie etwa die Hälfte der Stabilisierungsenergie des DNA-Doppelstrangs beitragen.

Darüber hinaus sind die Wasserstoffbrücken aber auch das Einzige, was die Spezi-

4 Nukleotide und Nukleinsäuren

fität der Basenpaare bedingen. A-T bilden zwei Wasserstoffbrücken aus, während es bei G-C Drei sind. Letzteres ist somit um etwa $3 - 4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ stabiler.

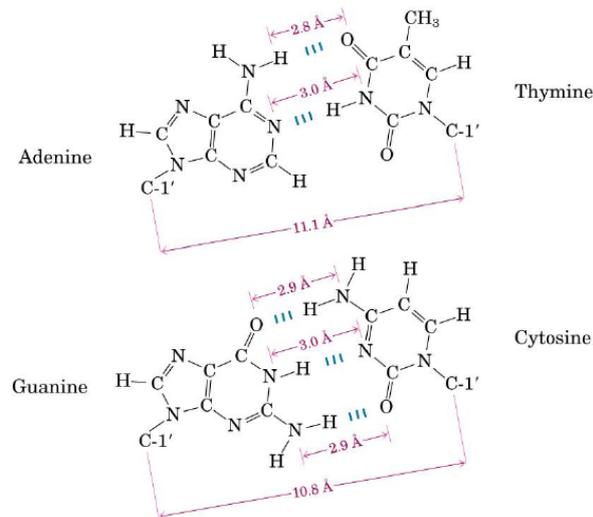


Abbildung 4.10: Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basenpaaren [17].

Basenstapelung

Die Basenstapelung bezeichnet die Wechselwirkungen der Basen, welche in der Doppelhelix übereinander gestapelt sind. Durch diese spezielle Anordnung können die aromatischen Ringsysteme der Basen miteinander wechselwirken, was ebenfalls zur Stabilisierung dieser Struktur beiträgt. Diese Wechselwirkung ist analog zu den hydrophoben Wechselwirkungen bei der Proteinfaltung.

Der Stabilisierungseffekt der Basenstapelung ist zwischen Purinen (A, G) stärker als zwischen Pyrimidinen (C, T, U). Dies liegt (unter Anderem) an dem zweiten Heteroatom im Purin-Gerüst (das zweite Stickstoffatom), welches bei der Stapelung eine direkte Vergrößerung des aromatischen Systems bewirkt.

Die Vergrößerung des π -Systems kann auch über ein einfaches Absorptionsexperiment demonstriert werden. Hierbei wird ein DNA-Einzelstrang (entstanden durch die Hitzedenaturierung eines Doppelstrangs) mit dem eines Doppelstrangs. Die Differenz in der Absorption ist mit der Wechselwirkung der π -Systeme zu erklären. Dieser Effekt wird auch **hypochromer Effekt** genannt.

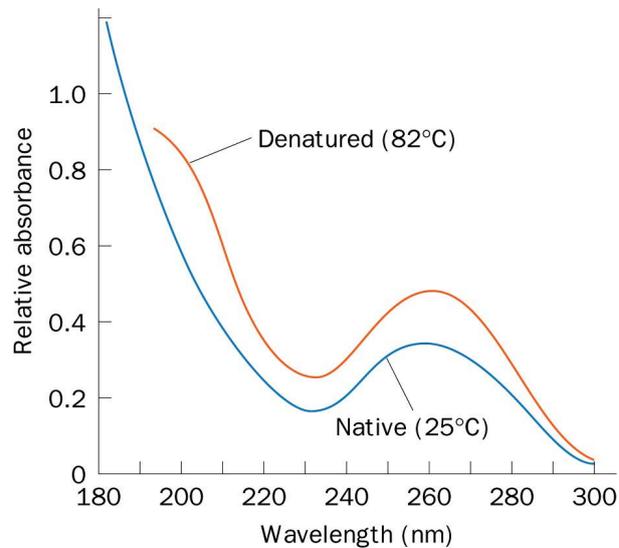


Abbildung 4.11: Lichtabsorption eines Einzelstrangs (rot) gegenüber der eines Doppelstrangs (blau) [16].

Die Basenstapelung als Ganzes trägt ebenfalls etwa die Hälfte der Stabilisierung der Doppelhelix-Struktur bei.

Elektrostatische Wechselwirkungen

Auch wenn die elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der DNA nicht allzu viel zur Stabilisierung der Doppelhelix beitragen, so sind sie doch essentiell für das Verhalten und die Konformation der DNA. Insbesondere für Protein-DNA-Wechselwirkungen.

Aufgrund der vielen Phosphate (nicht protoniert!) in der DNA handelt es sich um ein Polyanion. Da sich die vielen negativen Ladungen gegenseitig abstoßen, ist die Stabilität der DNA auf Gegenionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Na^+ oder K^+) angewiesen. Divalente Kationen sind dabei deutlich effektiver, als die Monovalenten. So ist Mg^{2+} beispielsweise etwa 10-100 mal so effektiv wie Na^+ .

4.2.2 De- und Renaturierung der DNA

Denaturierung

Die Denaturierung der DNA ist ein sehr kooperativer Prozess, bei dem analog zur Denaturierung von Proteinen keine Intermediate auftreten. Der Grund hierfür ist die Tatsache, dass die anfängliche Denaturierung der DNA die positiven Wechselwirkungen (insbesondere die konjugierten Basenpaare) innerhalb der DNA aufbricht und somit der Rest der DNA durch eine Art Kettenreaktion ebenfalls denaturiert wird. Der letzte Schritt in der Denaturierung ist die Separation der zwei DNA-Stränge.

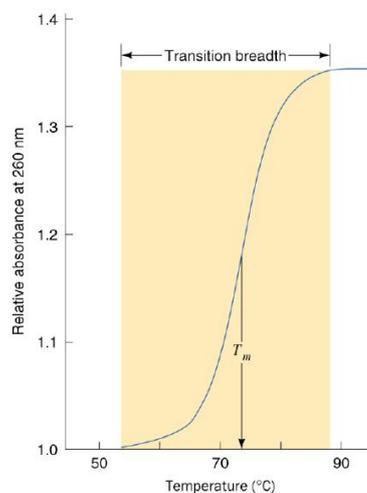


Abbildung 4.12: Spektrogramm während der Denaturierung der DNA bei konstanter Wellenlänge (die denaturierte Form weist eine höhere Absorption auf) [17]. Zu beachten ist der sigmoidale Kurvenverlauf, der charakteristisch für kooperative Reaktionen ist.

Der Schmelzpunkt der DNA ist abhängig von dem Salzgehalt der umgebenden Lösung (seiner "ionischen Stärke"), sowie von dem Gehalt an G-C-Basenpaaren, welche - wie oben bereits erwähnt - stabiler sind, als A-T-Paare. Für diesen Schmelzpunkt kann folgender Zusammenhang gefunden werden

$$T_M = 16,6 \log(c_{\text{Salz}}) + 41 \cdot \Theta_{GC} + 81,5 \quad (4.1)$$

Mit der Konzentration an monovalentem Salz c_{Salz} und dem G-C-Anteil Θ_{GC} .

Da die A-T-Bindung schwächer, als die G-C-Bindung ist, beginnt die Denaturierung der DNA stets in den Regionen mit hohem A-T-Gehalt und beginnt sich dann von dort aus weiter aufzudröseln.

Renaturierung

Die Renaturierung einer DNA ist ein sehr komplizierter und heikler Prozess, da es genau einen Endzustand gibt, der der nativen DNA entspricht und somit erreicht werden muss. Rein statistisch ist jedoch klar, dass die ohne Hilfe nicht verlässlich passieren wird.

Ein auftretendes Problem ist die Bildung sogenannter intrasträngulärer Schleifen, dh. ein einzelner Strang beginnt seine Basen zu Basenpaaren zusammen zu lagern, wodurch fixierte Schleifen im Strang entstehen, die zunächst wieder aufgebrochen werden müssen, bevor sich der komplementäre Strang vernünftig anlagern kann. Das nächste Problem ist, dass auch bei der Anlagerung der Stränge aneinander Schleifen entstehen können, indem sich die falschen Basen der komplementären Stränge zusammenfügen. Auch hier müssen die entsprechenden Basenpaare erst wieder voneinander getrennt werden, um eine korrekte Renaturierung der DNA zu ermöglichen.

Alles in allem muss die Anlagerung der Stränge aneinander sehr langsam erfolgen, damit die DNA nicht in einer falschen Form stecken bleibt.

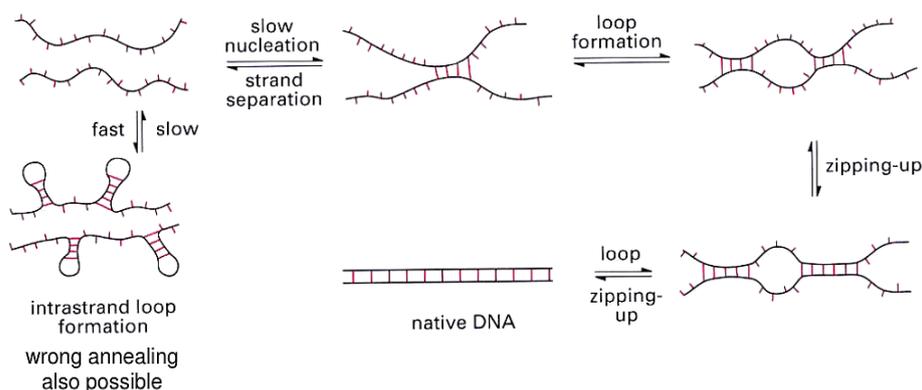


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung des Renaturierungsprozesses einer DNA [17].

4.2.3 Nukleinsäurestruktur

Die Struktur von Nukleinsäuren lässt sich analog zu der Proteinstruktur beschreiben. Die Primärstruktur beschreibt ebenfalls die reine Sequenz der Bausteine (Nukleotide) im Strang. Die Sekundärstruktur ist im Falle der Nukleinsäuren eine helikal und stabilisiert durch "lokale Wechselwirkungen" (z.B. Wasserstoffbrücken zwischen den Basen).

Die Tertiärstruktur von Nukleinsäuren ist analog zu den Proteinen die Konformation der gesamten Helix im dreidimensionalen Raum, die durch "long range"-Wechselwirkungen stabilisiert wird.

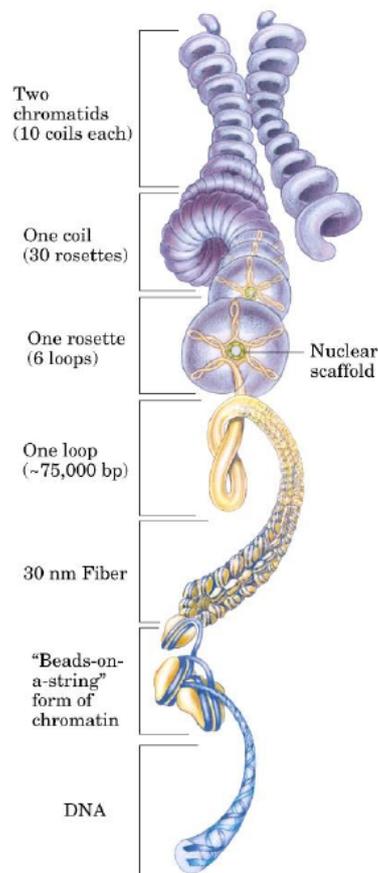


Abbildung 4.14: Übersicht der Tertiärstrukturen der DNA [17].

Die Struktur solcher Nukleinsäuren (insbesondere der DNA) ist sehr flexibel. Sie

kann gebogen und geknickt werden und außerdem ein Phänomen namens **Base flipping** aufweisen. dabei dreht sich ein Nukleotid eines Stranges so heraus, dass seine Base nun aus dem Strang hinaus zeigt (und somit nicht mehr in der Mitte mit ihrer konjugierten Base ein Basenpaar bildet).

Des Weiteren gibt es drei verschiedene Formen der Helixstruktur von Nukleinsäuren. Sie werden als A-, B- und Z-Form bezeichnet.

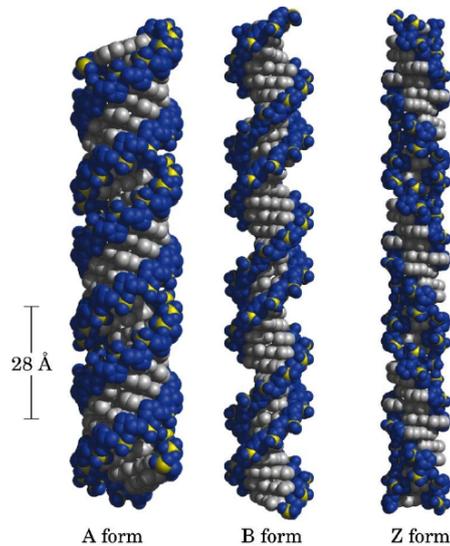


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der Helixtypen [17].

Die Z-Form ist dabei die Einzige, die eine linkshändige Helixstruktur aufweist. DNA liegt hauptsächlich in der B- und RNA in der A-Form vor.

4.2.4 Deamination von Basen

Die Basen (in Nukleotiden) unterliegen einer sogenannte Deamination, bei der die Aminogruppe der Base in eine Ketogruppe überführt wird. Cytosin ist dabei um Faktor 100 am anfälligsten und wird durch Deamination in Uracil umgewandelt. Dies ist übrigens der Grund, warum in DNA kein Uracil aktiv verbaut sein darf. Sonst wäre es uneindeutig ob es sich um ein gewolltes Uracil oder ein deaminifiziertes Cytosin handelt. Diese Deamination findet bei Cytosin etwa mit einer Rate von $100 \frac{\text{Zerfälle}}{\text{Zelle} \cdot \text{Tag}}$ statt.

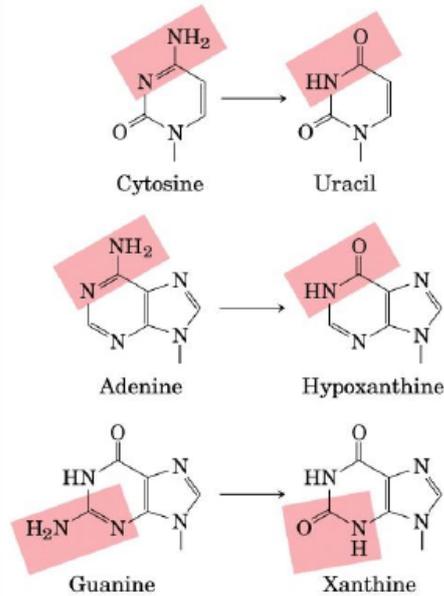


Abbildung 4.16: Deamination bei den Nukleotidbasen [17].

4.2.5 Struktur der RNA

Bisher wurde hauptsächlich über die DNA gesprochen. Nun ist es an der Zeit die Strukturunterschiede der RNA aufzuzeigen. Neben der bereits erwähnten Tatsache, dass anstatt Thymin die Base Uracil verwendet wird sei zunächst einmal angemerkt, dass die RNA sehr anfällig für eine basenkatalysierte Hydrolyse ist. Dies ist auch der Grund warum die Erbgutinformation in Form einer DNA und nicht einer RNA gespeichert wird.

Diese Spaltung beginnt durch eine Deprotonierung der Hydroxygruppe am C₂ der Ribose. Da die Desoxyribose am C₂ keine Hydroxygruppe (sondern nur ein Wasserstoffatom) besitzt, ist eine entsprechende Deprotonierung nicht möglich und die gesamte Hydrolyse somit im Keim unterbunden.

Ein weiterer, wichtiger Unterschied ist, dass RNA nicht als Doppelhelix, sondern nur als Einzelstränge auftreten.

4.3 Andere Funktionen von Nukleotiden und Nukleinsäuren

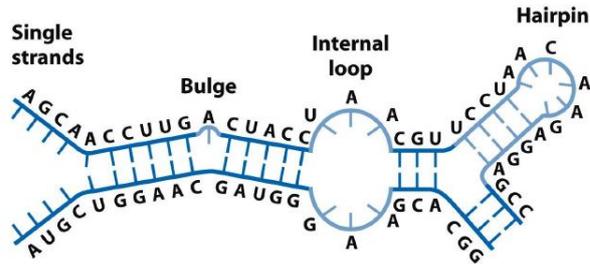


Abbildung 4.17: Mögliche Strukturen innerhalb einer RNA [17].

Die RNA liegt somit teilweise als Doppelstrang (mit sich selbst) vor und teilweise als ungepaarter Strang. Diese Kombination ermöglicht die sehr komplexen Tertiärstrukturen der RNA. Außerdem faltet sich die RNA wie ein Protein in kompakten Strukturen zusammen.

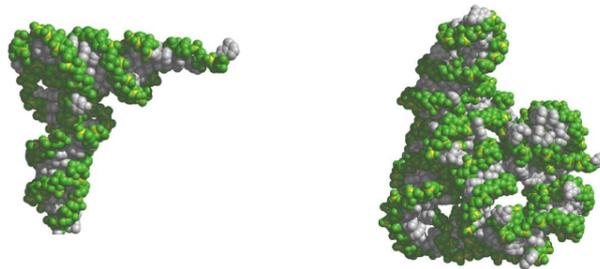


Abbildung 4.18: Strukturen von tRNA (links) und eines Tetrahymena-Ribosoms, also einem Protein (rechts) [17].

4.3 Andere Funktionen von Nukleotiden und Nukleinsäuren

4.3.1 DNA als Bauteil in der Nanotechnologie

Aufgrund seiner wohl definierten und stabilen Struktur lässt sich DNA dazu "missbrauchen" durch Hybridisierung mehrere Einzelstränge komplizierte Strukturen (z.B. 2D-Kristalle oder würfealartige Strukturen) zu formen.

Diese Strukturen können dann dazu verwendet werden, um andere Moleküle oder

Nanobauteile einzulagern und somit an Ort und Stelle fest zu halten. Beispielsweise können in einem DNA-Gitter Makromoleküle in bestimmter Anordnung zueinander festgehalten werden oder elektronische Schaltelemente in Nanogröße einzulagern und somit zu stabilisieren, was das Aufbauen eines Nanoschaltkreises ermöglicht.

4.3.2 Weitere Funktionen von Nukleotiden in Zellen

Die wohl prominenteste Funktion von Nukleotiden ist die Speicherung von Energie in den Anhydrid- und Esterbindungen eines Triphosphat-Restes. Die Hydrolyse einer Anhydridbindung resultiert in einer Energiefreisetzung von etwa $30 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ unter Standardbedingungen und bis zu $60 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ in einer Zelle. Die Hydrolyse der Esterbindung liefert deutlich weniger Energie aber immerhin noch etwa $14 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$.

Das bei Weitem bekannteste und häufigste Nukleotid, das als Energiespeicher genutzt wird ist Adenosintriphosphat (ATP), aber auch andere Nukleotide können diese Funktion erfüllen.

Eine weitere Anwendung von Nukleotiden (wie ATP) ist das Übertragen von Phosphatgruppen auf andere Moleküle. Dies wurde bereits im Zusammenhang mit Motorproteinen besprochen, hat aber auch wieder sehr viele Anwendungsbereiche. Durch das Übertragen einer Phosphatgruppe "verliert" das XTP Energie, da die Hydrolyse vom XTP zum XDP Energie freisetzt. Es handelt sich somit um einen irreversiblen Prozess. Um ein XDP wieder zu einem XTP "aufzuladen" bedarf es entweder der Oxidation von "Brennstoffmolekülen" (Verbrennen von Zucker) oder Photosynthese.

Des Weiteren können Nukleotide auch als Elektronentransporter fungieren. Ein Beispiel dafür ist das NAD(P). Dies kann durch Bindung weiterer Gruppen an Nukleotide geschehen. Diese Gruppe kann dann als "Elektronenspeicher" fungieren.

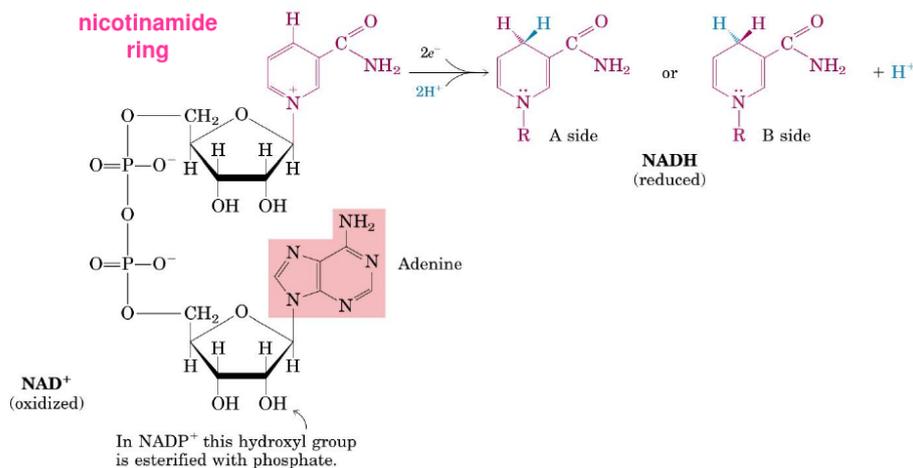


Abbildung 4.19: Möglichkeit der “Elektronenspeicherung” in NAD⁺ [17]. Die dargestellte RedOx-Reaktion hat ein Standardpotential von $E^0 = -0,32 \text{ V}$.

In Abbildung 4.19 ist die angelagerte Gruppe eine NAD-Gruppe. Durch Interaktion mit anderen Molekülen (z.B. Proteinen) kann das RedOx-Potential des entsprechenden Moleküls signifikant verändert werden.

Zu guter Letzt können Nukleotide auch noch als Regulierungsmoleküle in beispielsweise Rezeptorprozessen dienen (oft als sogenannte “2nd messenger”).

4.4 DNA-Methyl-Transferasen

Bei genauerer Untersuchung der DNA kann festgestellt werden, dass sie nicht nur die bis hier besprochenen Basen enthält, sondern auch methylierte Formen derselben. Die “eingeschleuste” Methylgruppe sitzt dabei stets in der großen Rille der DNA, um dort DNA-Protein-Wechselwirkungen zu beeinflussen.

Die Methylierung der DNA-Basen erfolgt über DNA-Transferasen. Diese katalysieren die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet), das für diesen Vorgang als Coenzym dient, auf eine Nukleobase.

4 Nucleotide und Nucleinsäuren

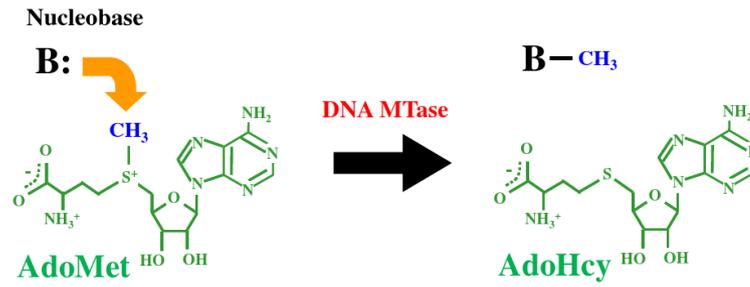


Abbildung 4.20: Ablauf einer Methylierung einer Nucleobase [17].

Eine der Aufgaben der Methyl-Transferase ist dabei das Herausdrehen (“base flipping”) der Base aus dem DNA-Strang, damit die Methylierung stattfinden kann.

Literatur

- [1] 29. Dez. 2017. URL: <http://www.iitg.ac.in/sunanda.c/images/torsion%20angles.jpeg>.
- [2] 29. Dez. 2017. URL: https://jkweb.berkeley.edu/external/pdb/2003/cam_kinase/RamachandranPlot.jpg.
- [3] 29. Dez. 2017. URL: http://classconnection.s3.amazonaws.com/421/flashcards/714421/png/beta_turns1329688878567.png.
- [4] 30. Dez. 2017. URL: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Sucrose_porin_1a0s.png.
- [5] 26. Jan. 2018. URL: <https://amit1b.files.wordpress.com/2008/03/heme.png>.
- [6] 24. Feb. 2018. URL: <http://homepage.usask.ca/~kmj127/antibody.jpg>.
- [7] 21. Feb. 2018. URL: <https://image.slidesharecdn.com/chapter5-globularproteins-151122062726-lva1-app6891/95/chapter-5-globularproteins-biochemistry-27-638.jpg?cb=1448174274>.
- [8] 28. Feb. 2018. URL: <http://swift.cmbi.ru.nl/teach/folding/IMAGE/funnel.gif>.
- [9] 2. März 2018. URL: <https://www3.nd.edu/~aseriann/CHAP9B.html/img024.gif>.
- [10] 4. März 2018. URL: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/images/m534d7452.jpg>.
- [11] 6. März 2018. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_inhibitor#/media/File:Types_of_inhibition_en.svg.
- [12] 10. März 2018. URL: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/42/Classical_blood_coagulation_pathway.png.
- [13] 10. März 2018. URL: http://saylordotorg.github.io/text_the-basics-of-general-organic-and-biological-chemistry/section_22/dc9df397a1d1801eb3c21a8630c64325.jpg.
- [14] 10. März 2018. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Adenosintriphosphat#/media/File:Adenosintriphosphat_protoniert.svg.
- [15] 10. Feb. 2018. URL: <http://slideplayer.com/slide/4047443/13/images/14/The+double+helix+has+minor+and+major+grooves.jpg>.

Literatur

- [16] 10. März 2018. URL: <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter5/F05-15.jpg>.
- [17] Herr Prof. Dr. Albert Jeltsch. *Vorlesungsfolien zur Einführung in die Biochemie*. 2017.