

Proteinanalytik

1. Reinigung:

a) Fällung:

aa) denaturierend (mit CF_3COOH)

ab) reversibel

- Aussalzen mit Ammonsulfat bei verschiedenen pH Werten
- Zugabe von EtOH, Aceton in der Kälte

b) Chromatographie

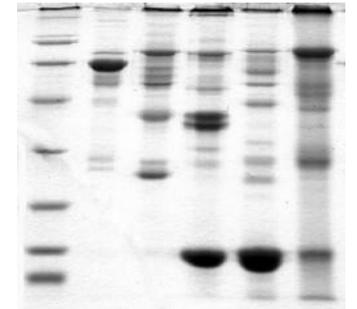
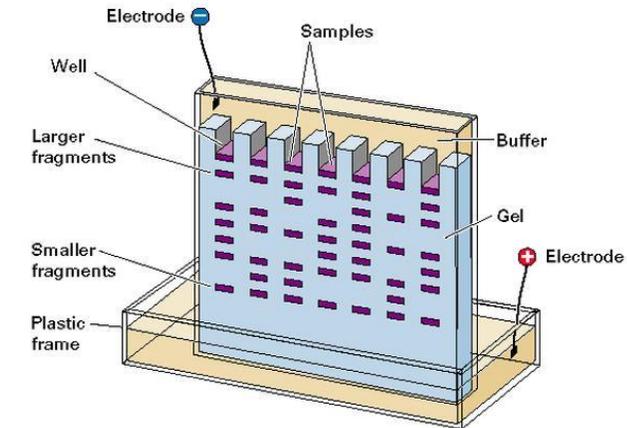
- Auf Cellulose (modifiziert mit Aminoethylgruppen)
DEAE-Cellulose (Ionentauscher)
- Auf Gelen (Dextrane) Sepharose (sortieren nach Größe)

c) Elektrophorese: Wanderung im Gel im elektr. Feld

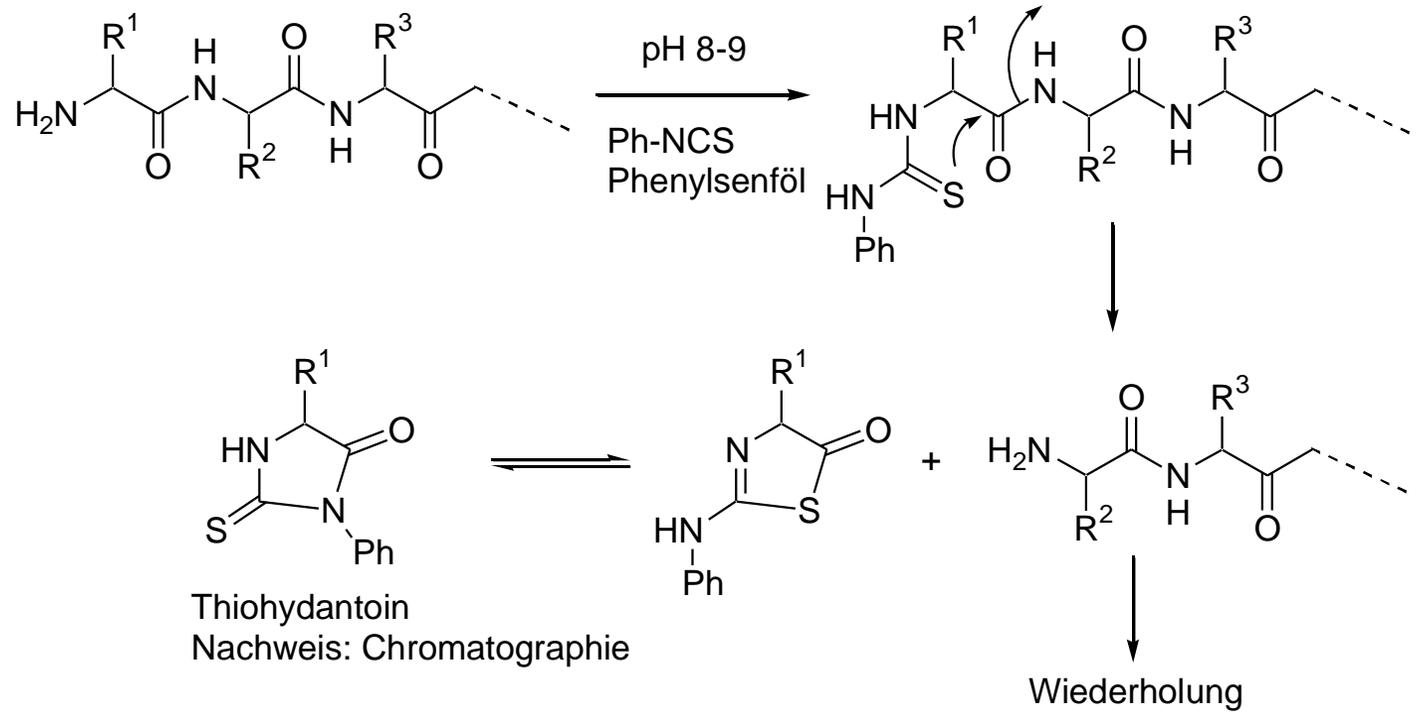
d) serologisch: Bindung an spez. Antikörper

e) Affinitätschromatographie

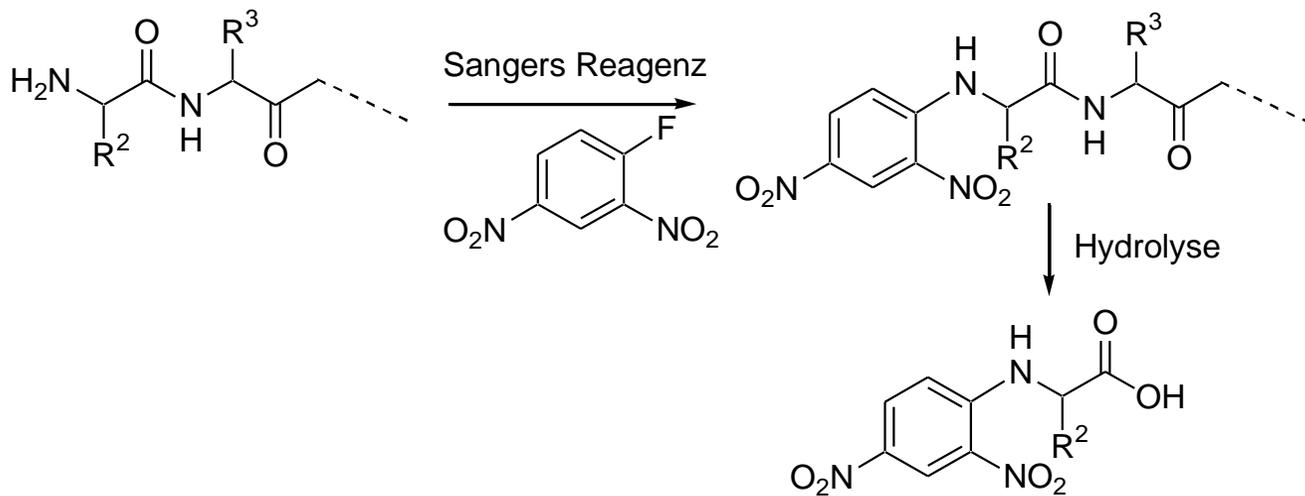
2. Analyse: Heute meist mit MS Techniken (z.B. MALDI-TOF)



Edmann-Abbau:



Endgruppenbestimmung nach Sanger:



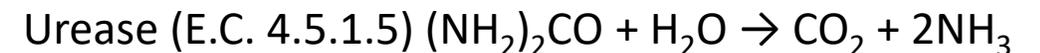
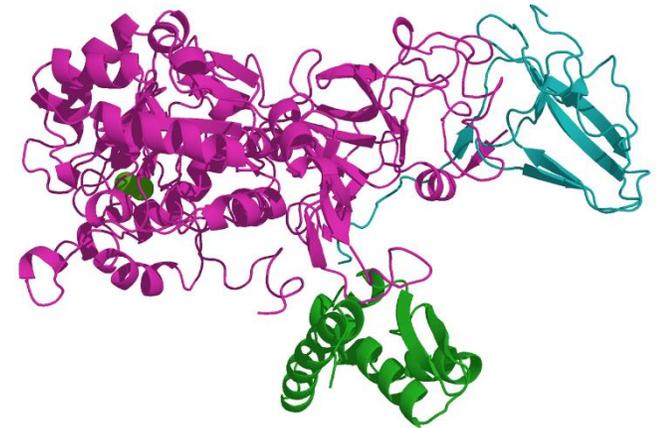
Enzyme

- Enzyme (Fermente) sind “Biokatalysatoren” zur Umsetzung von Stoffen. Stoffe, die von Enzymen umgesetzt werden heißen Substrate. Enzyme sind meist Proteine, können aber auch aus RNA bestehen (Ribozyme).
- Erstes Enzym, das in reiner kristalliner Form isoliert wurde: Urease (1926): katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak.
- Enzyme benötigen oft Cofaktoren (Coenzyme), wie z.B. Metallionen oder organische Moleküle, um ihre katalytische Wirkung zu entfalten.

Begriffe: Proteid = Protein + prothetische Gruppe

Prothetische Gruppe = Coenzym

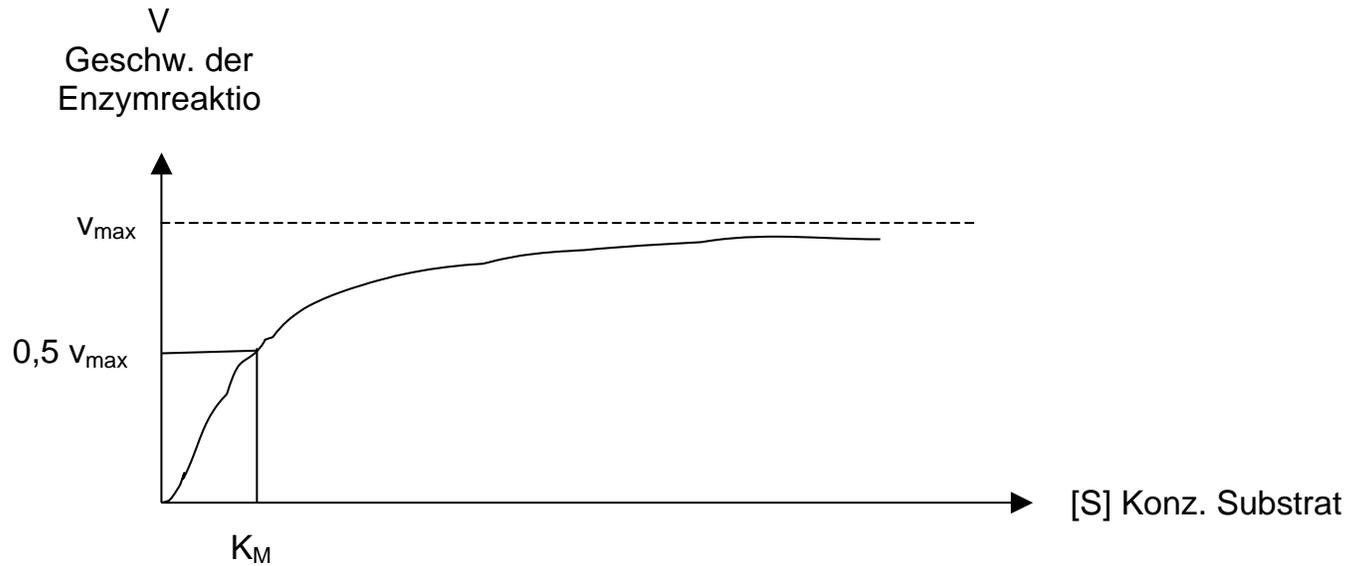
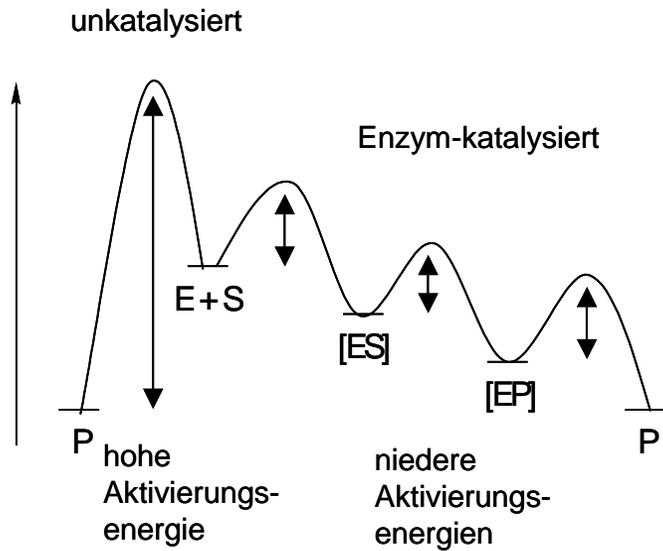
Holoenzym = Apoenzym + Coenzym



Kinetik:

Michaelis-Menten-Kinetik (siehe Vorlesung Physikalische Chemie)

(S=Substrat, E=Enzym, ES=Enzym-Substrat-Komplex, P=Produkt)



v_{Max} = Geschw. Wenn alles E als ES vorliegt

K_M (Michaelis-Konstante)= Konzentration, bei der E zur Hälfte als ES vorliegt

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

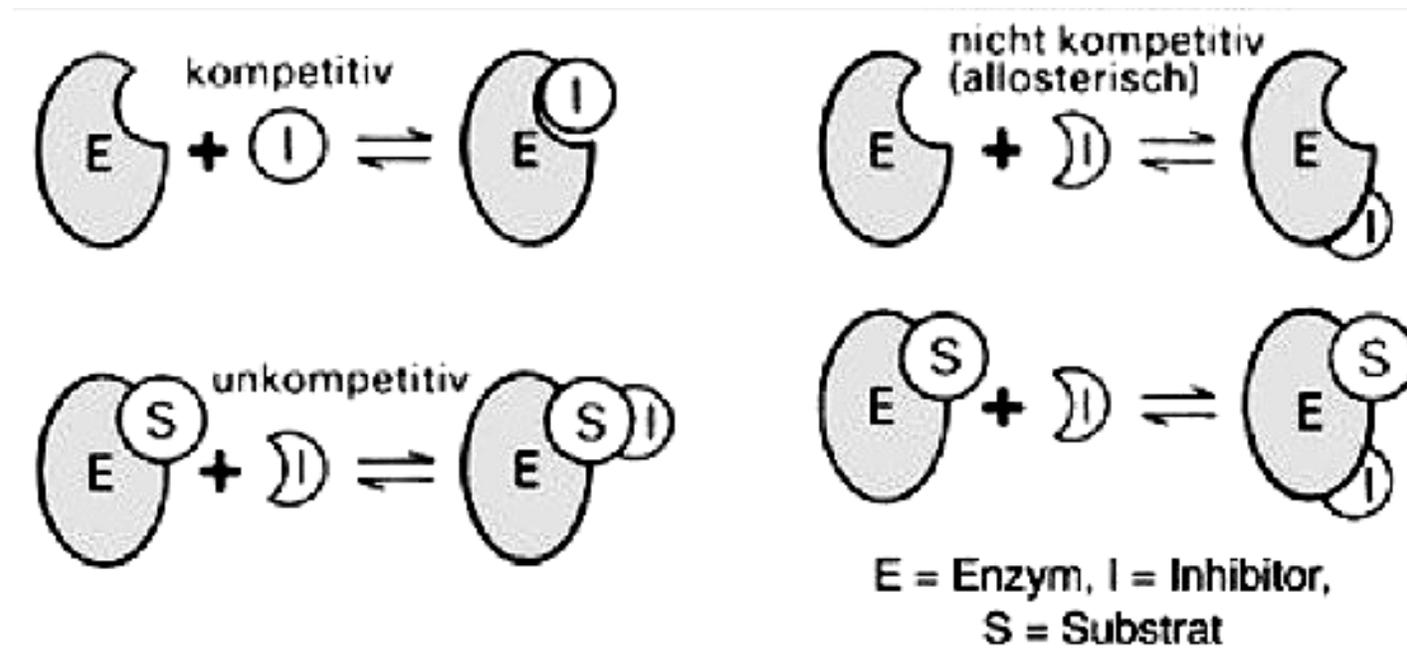
Enzymaktivierung: meist durch Ionen, die zur katalytischen Wirkung notwendig sind (z.B. Enzyme, die ATP umsetzen brauchen Mg^{2+} Ionen)

Vergiftung: spezifische Blockierung von Enzymen (z.B. durch Cyanidionen)

Interkonversion: An- und Abschalten von Enzymen (z.B. durch Phosphorylierung)

Enzymhemmung: es werden 4 Arten der Enzymhemmung unterschieden:

- Kompetitive Hemmung: ein Hemmstoff konkurriert mit dem Substrat um die Bindungsstelle am Enzym
- Nicht-kompetitive Hemmung: Substrat und Hemmstoff binden gleichzeitig an Enzym und verändern die Reaktionsgeschwindigkeit
- Substrat-Produkt-Hemmung: Hohe Konzentrationen von Substrat oder Produkt hemmen die Reaktion
- Allosterische Hemmung: Hemmstoff wird irgendwo anders am Enzym gebunden



Einteilung der Enzyme

Enzyme werden nach E.C. Nummern (Enzyme Commission Number) unterteilt. Die erste Ziffer gibt den Reaktionstyp, der vom Enzym katalysiert wird an. Die zweite Ziffer bezeichnet das Substrat, auf das das Enzym wirkt. Die dritte Ziffer bezieht sich auf das Coenzym für diese Reaktion. Die vierte Ziffer ist eine fortlaufende Numerierung

Beispiel:

E.C. 1.1.1.x

Oxidation oder
Reduktion

Substrate mit CH-O
Bindung

NAD⁺ oder NADP⁺
als Coenzym

Laufende
Nummer

