

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

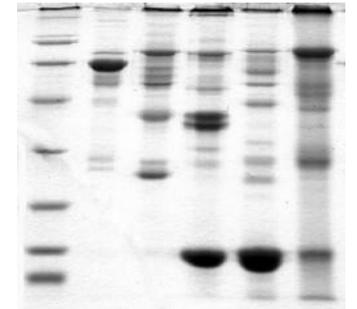
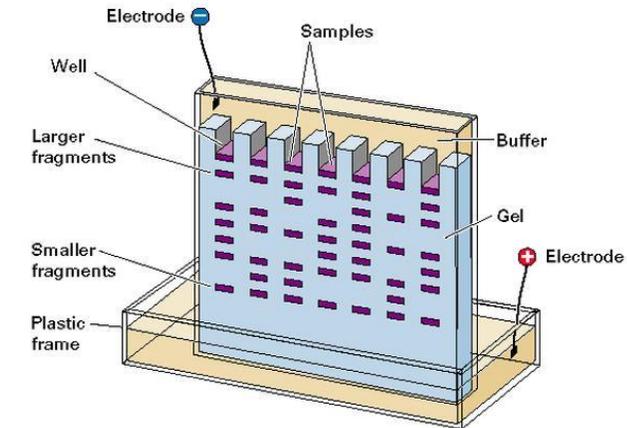
- Auf Cellulose (modifiziert mit Aminoethylgruppen) DEAE-Cellulose (Ionentauscher)
- Auf Gelen (Dextrane) Sepharose (sortieren nach Größe)

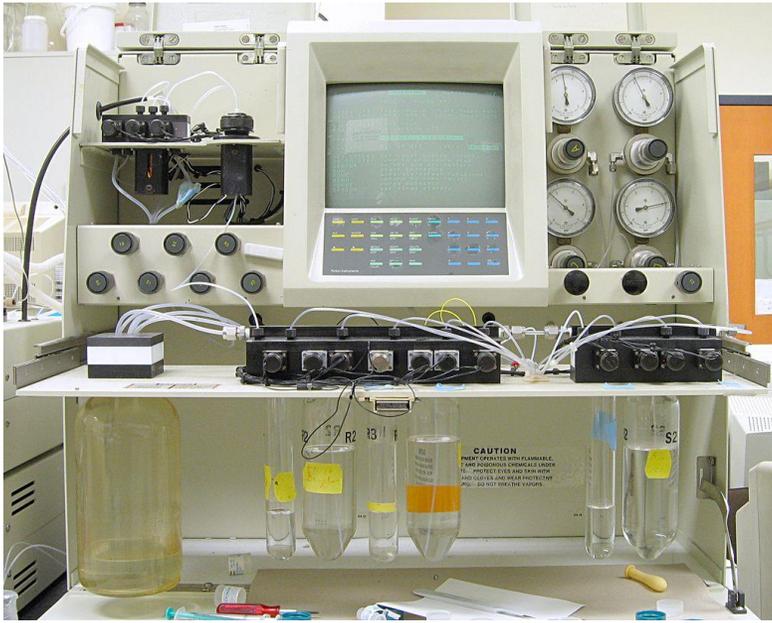
c) Elektrophorese: Wanderung im Gel im elektr. Feld

d) serologisch: Bindung an spez. Antikörper

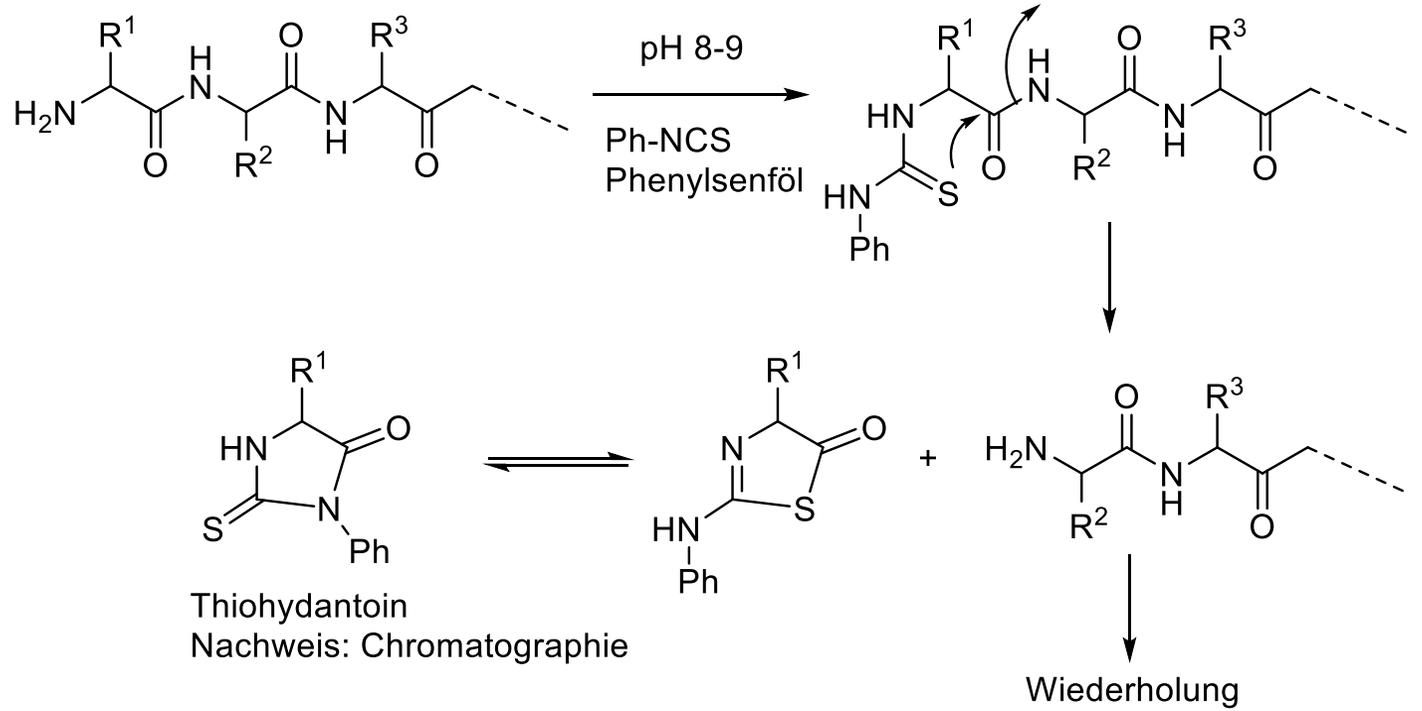
e) Affinitätschromatographie

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

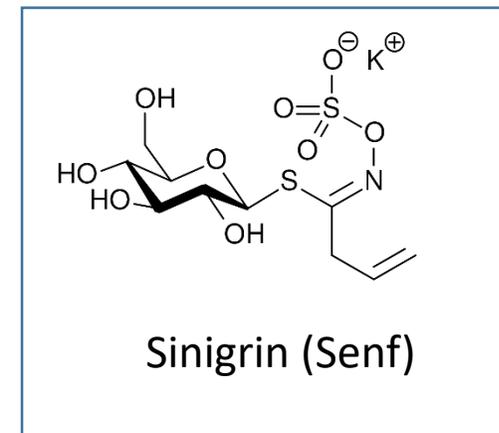
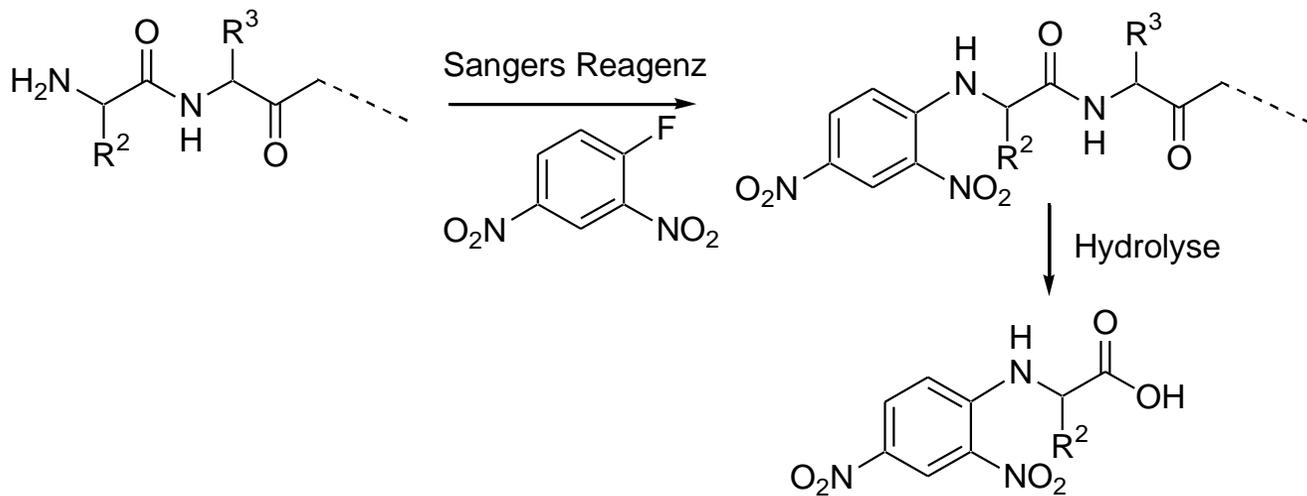




Edman-Abbau:



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

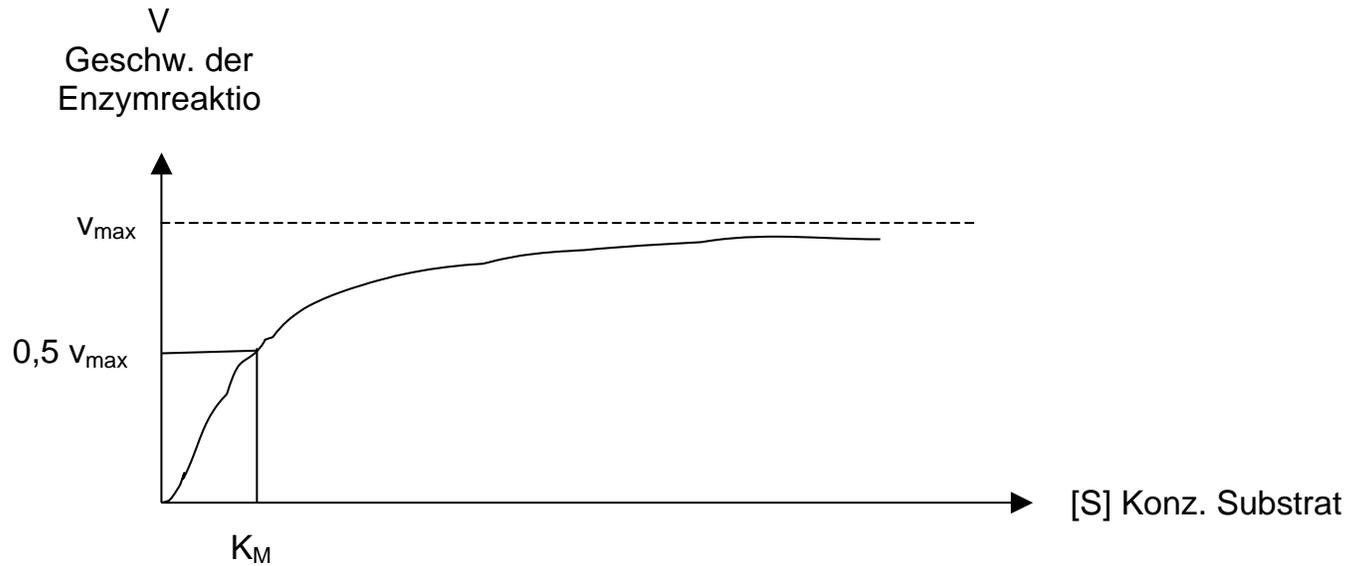
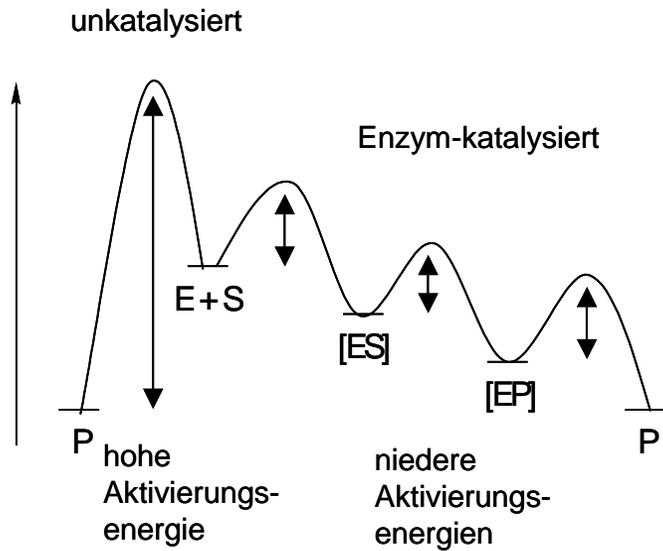
Prothetische Gruppe = Coenzym

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

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

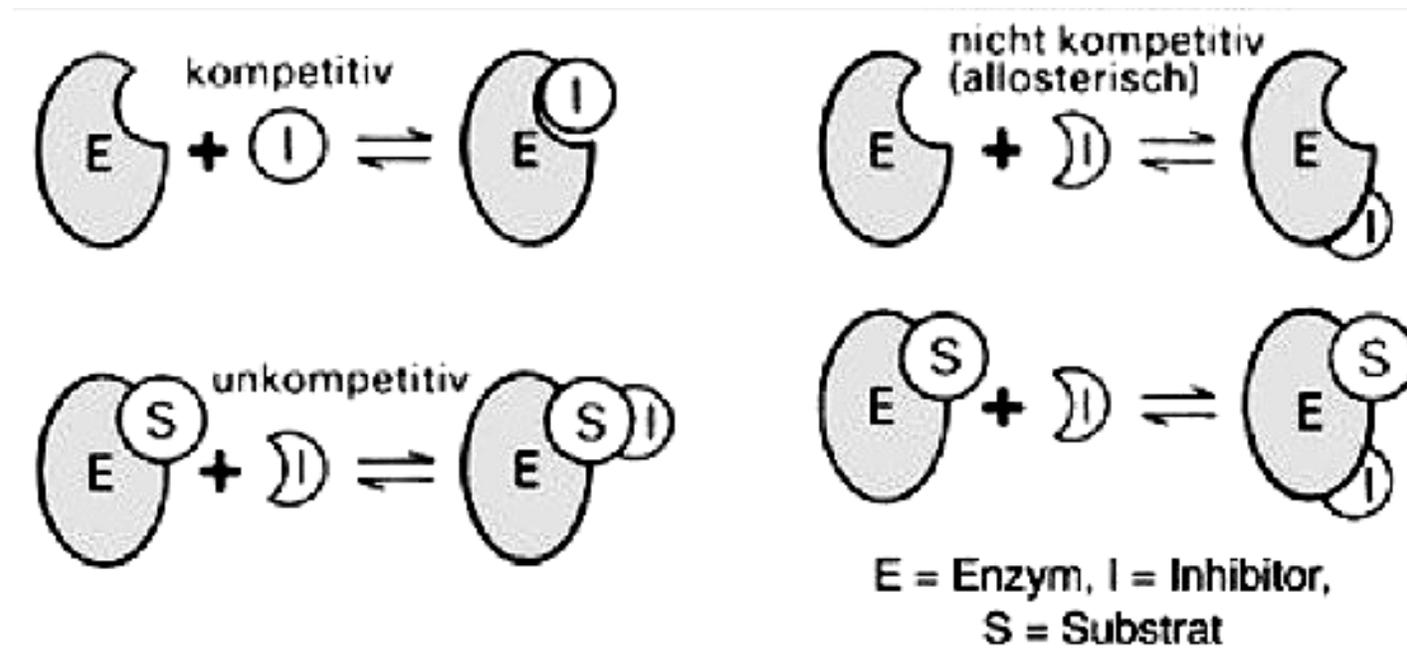
Enzymaktivierung: meist durch Ionen, die zur katalytischen Wirkung notwendig sind (z.B. Enzyme, die ATP umsetzen brauchen Mg^{2+} Ionen)

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

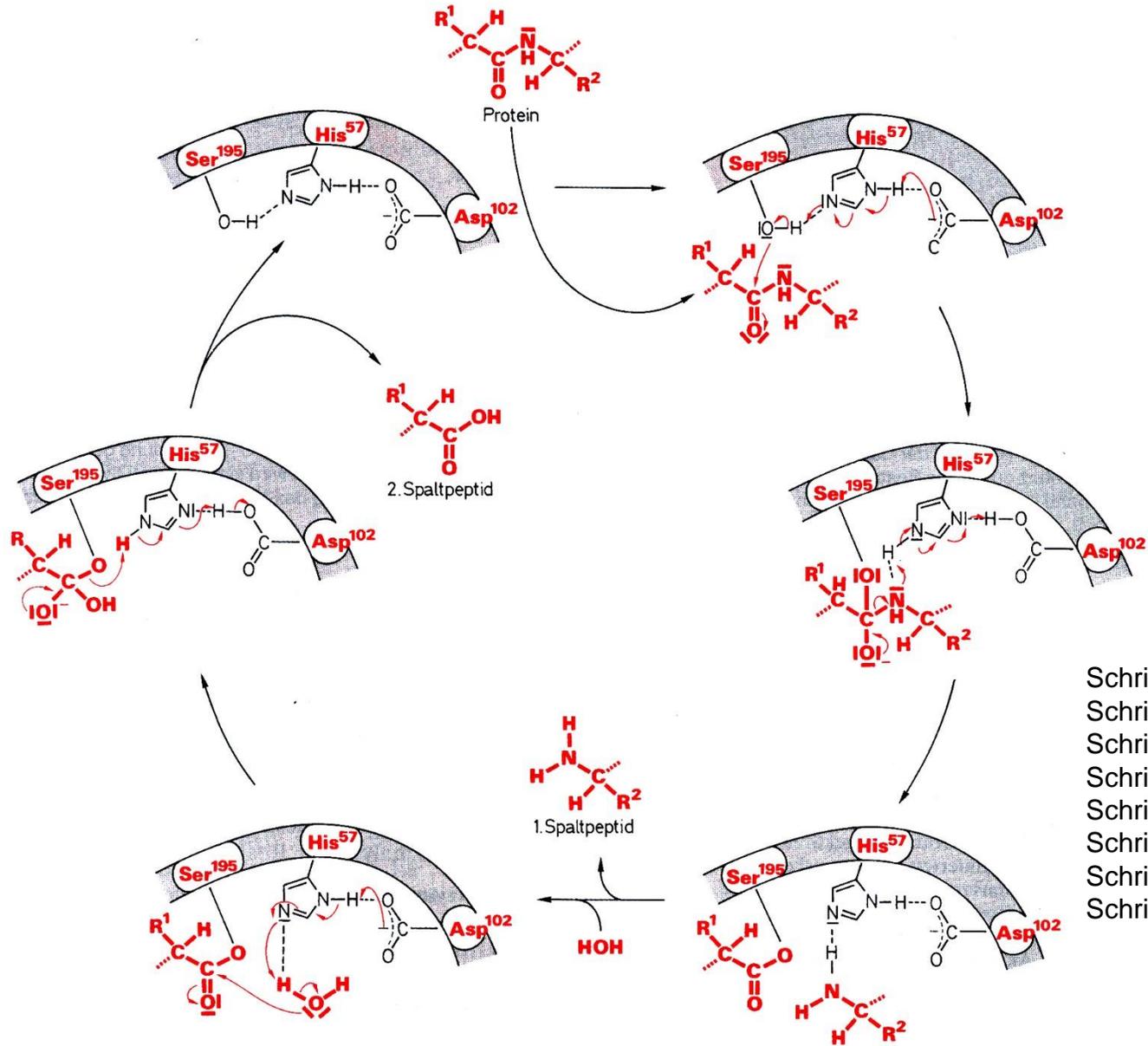
Laufende
Nummer



Subclass	Name	Enzyme file type	
EC 1	Oxidoreductases		
EC 1.1	Acting on the CH-OH group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.2	Acting on the aldehyde or oxo group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.3	Acting on the CH-CH group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.4	Acting on the CH-NH ₂ group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.5	Acting on the CH-NH group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.6	Acting on NADH or NADPH	sub-subclasses	up to 50
EC 1.7	Acting on other nitrogenous compounds as donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.8	Acting on a sulfur group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.9	Acting on a heme group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.10	Acting on diphenols and related substances as donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.11	Acting on a peroxide as acceptor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.12	Acting on hydrogen as donor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.13	Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxygenases)	sub-subclasses	up to 50
EC 1.14	Acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	sub-subclasses	up to 50
EC 1.15	Acting on superoxide radicals as acceptor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.16	Oxidising metal ions	sub-subclasses	up to 50
EC 1.17	Acting on CH or CH ₂ groups	sub-subclasses	up to 50
EC 1.18	Acting on iron-sulfur proteins as donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.19	Acting on reduced flavodoxin as donor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.20	Acting on phosphorus or arsenic in donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.21	Acting on X-H and Y-H to form an X-Y bond	sub-subclasses	up to 50
EC 1.97	Other oxidoreductases	sub-subclasses	up to 50
EC 2	Transferases		
EC 2.1	Transferring one-carbon groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.2	Transferring aldehyde or ketonic groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.3	Acyltransferases	sub-subclasses	up to 50
EC 2.4	Glycosyltransferases	sub-subclasses	up to 50
EC 2.5	Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.6	Transferring nitrogenous groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.7	Transferring phosphorus-containing groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.8	Transferring sulfur-containing groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.9	Transferring selenium-containing groups	sub-subclasses	up to 50

EC 3	Hydrolases		
EC 3.1	Acting on ester bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.2	Glycosylases	sub-subclasses	up to 50
EC 3.3	Acting on ether bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.4	Acting on peptide bonds (peptidases)	sub-subclasses	up to 50
EC 3.5	Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.6	Acting on acid anhydrides	sub-subclasses	up to 50
EC 3.7	Acting on carbon-carbon bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.8	Acting on halide bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.9	Acting on phosphorus-nitrogen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.10	Acting on sulfur-nitrogen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.11	Acting on carbon-phosphorus bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.12	Acting on sulfur-sulfur bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.13	Acting on carbon-sulfur bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 4	Lyases		
EC 4.1	Carbon-carbon lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.2	Carbon-oxygen lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.3	Carbon-nitrogen lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.4	Carbon-sulfur lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.5	Carbon-halide lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.6	Phosphorus-oxygen lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.99	Other lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 5	Isomerases		
EC 5.1	Racemases and epimerases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.2	<i>cis-trans</i> -Isomerases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.3	Intramolecular isomerases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.4	Intramolecular transferases (mutases)	sub-subclasses	up to 50
EC 5.5	Intramolecular lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.99	Other isomerases	sub-subclasses	up to 50
EC 6	Ligases		
EC 6.1	Forming carbon—oxygen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.2	Forming carbon—sulfur bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.3	Forming carbon—nitrogen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.4	Forming carbon—carbon bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.5	Forming phosphoric ester bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.6	Forming nitrogen—metal bonds	sub-subclasses	up to 50

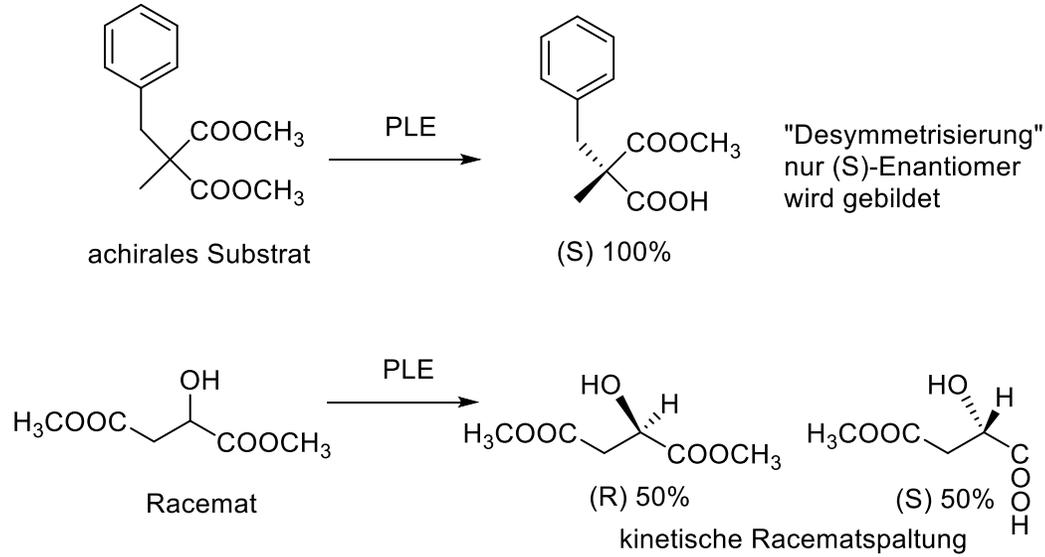
Katalytische Triade in vielen Peptidasen und Lipasen (Ser / His / Asp)



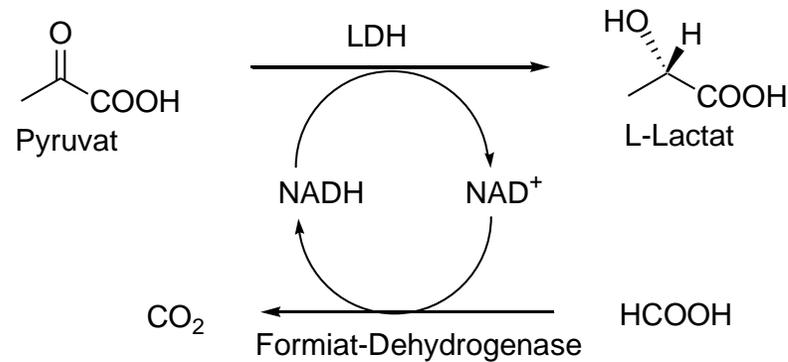
- Schritt 1: Protein (Amidbindung eines Peptides) bindet an Enzym
- Schritt 2: Serin (Ser) wird über Histidin (His) und Asparaginsäure (Asp) deprotoniert
- Schritt 3: O des Serins addiert an Carbonyl-C des Amids (Tetrahedralmechanismus)
- Schritt 4: N des Peptides wird durch His und Asp protoniert
- Schritt 5: Bruch der Peptidbindung; Säureteil als Ester an Ser gebunden
- Schritt 6: Amin wird durch Wasser verdrängt
- Schritt 7: Acylgruppe wird durch His/Asp analog protoniert (Tetrahedralmech.)
- Schritt 8: Carbonsäure wird abgespalten

Enantioselektivität von Enzymreaktionen

Desymmetrisierung und Racematspaltung von Estern mit Esterasen / Schweineleber-Esterase (PLE) EC 3.1.1.1



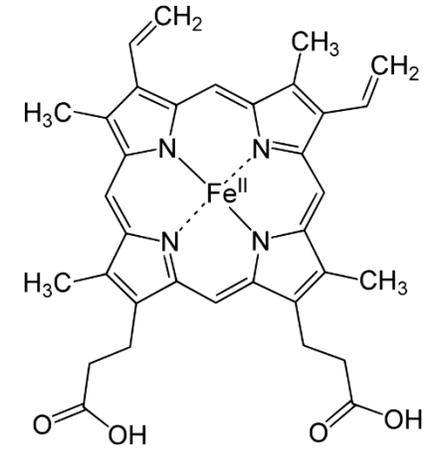
Enantioselektive Reduktion mit Oxidoreduktasen / Lactatdehydrogenase (LDH) EC 1.1.1.27 und NADH



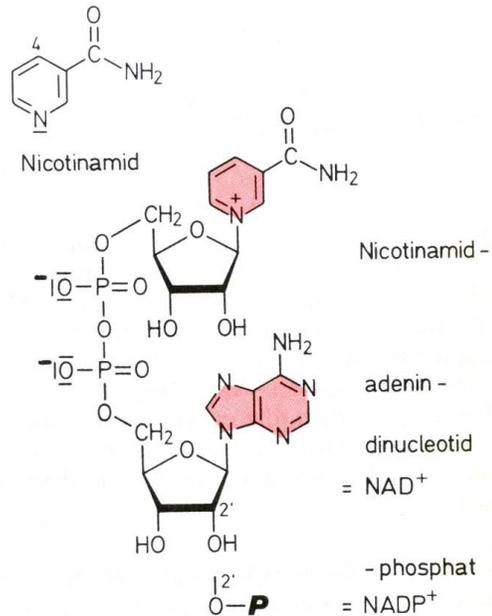
Coenzyme

Wasserstoffübertragende Coenzyme (z.B. für Oxidoreduktasen)

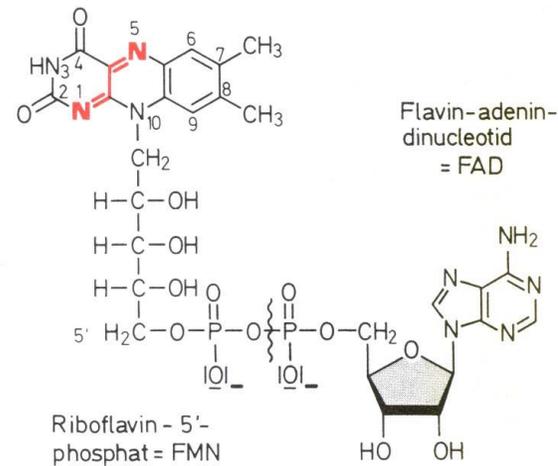
Coenzym	Name	übertragene Gruppe
NADH / NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid	H ²
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid	H ²
Q	Ubichinon	H ²
-	Häm	Elektron
Lip	Liponsäure	H ² / Acyl



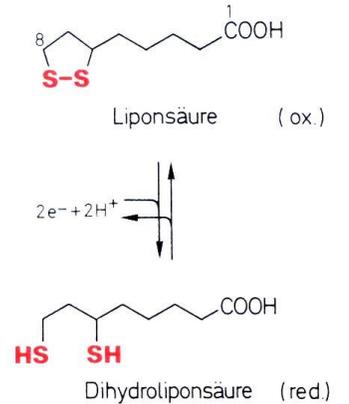
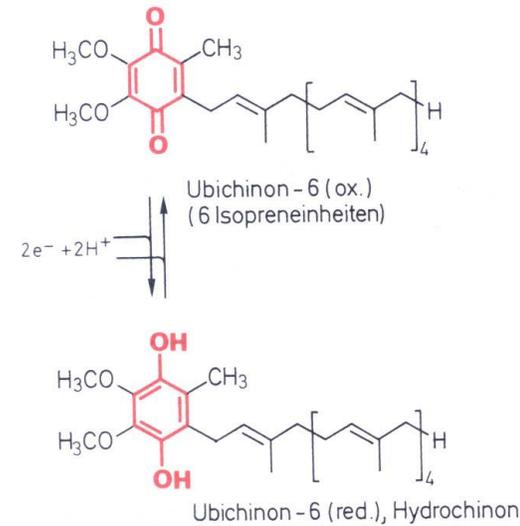
HÄM (Hämoglobin)



NAD⁺ / NADH



FAD / FADH₂

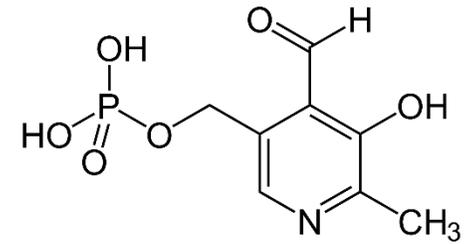
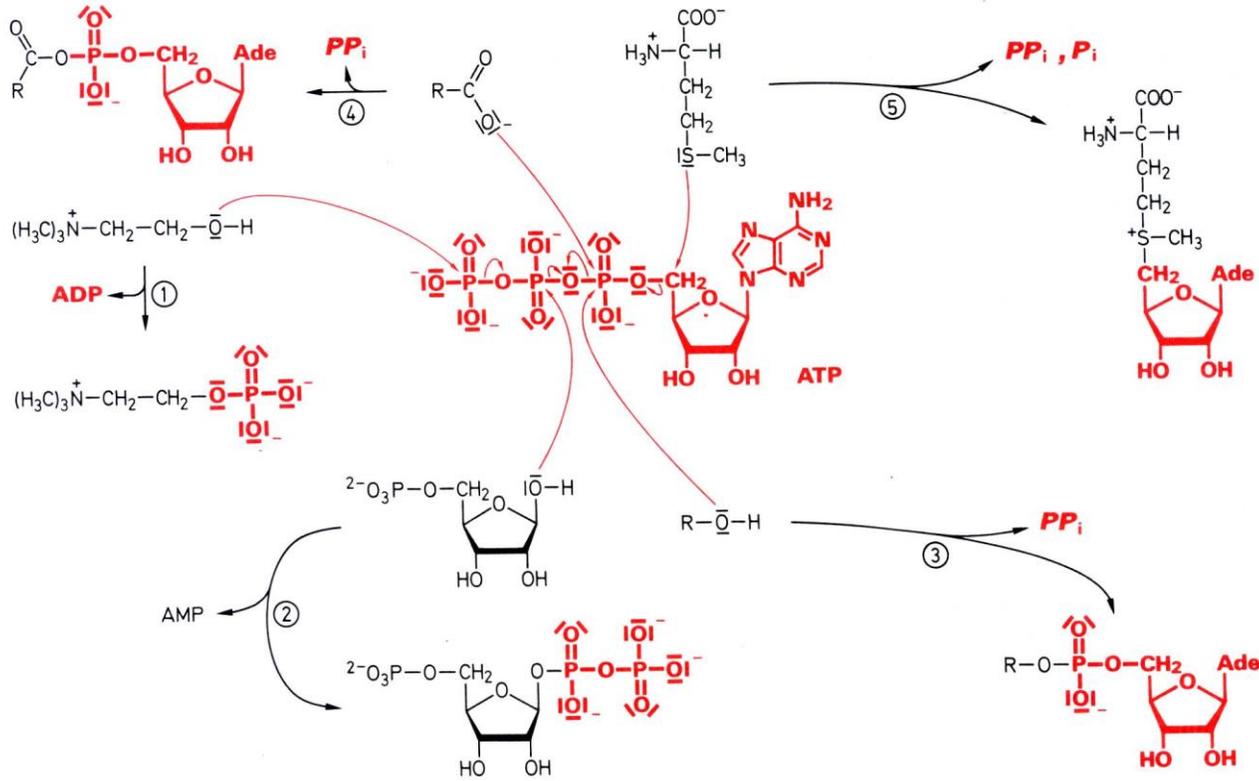


Coenzyme

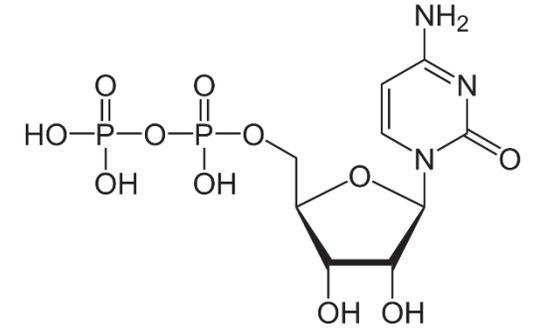
Gruppenübertragende Coenzyme (z.B. für Transferasen)

Coenzym	Name	übertragene Gruppe
ATP	Adenositriphosphat	PO ₄ -
PLP	Pyridoxalphosphat	NH ₂
CDC	Cytidindiphosphat	Cholin
UDP	Uridindiphosphat	Zucker
H ₄ -Folat	Tetrahydrofolsäure	CH ₃ / CHO
-	Biotin	CO ₂
CoA	Coenzym A	Acyl
TPP	Thiaminpyrophosphat	C ₂ -Aldehyde
B ₁₂	Vitamin B ₁₂	Carboxyl

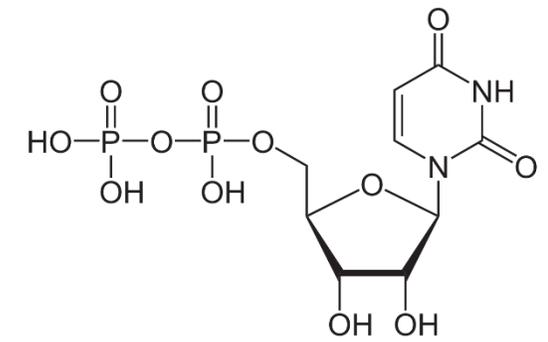
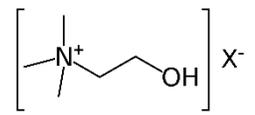
ATP (Energie)



Pyridoxalphosphat
(Transaminierung)

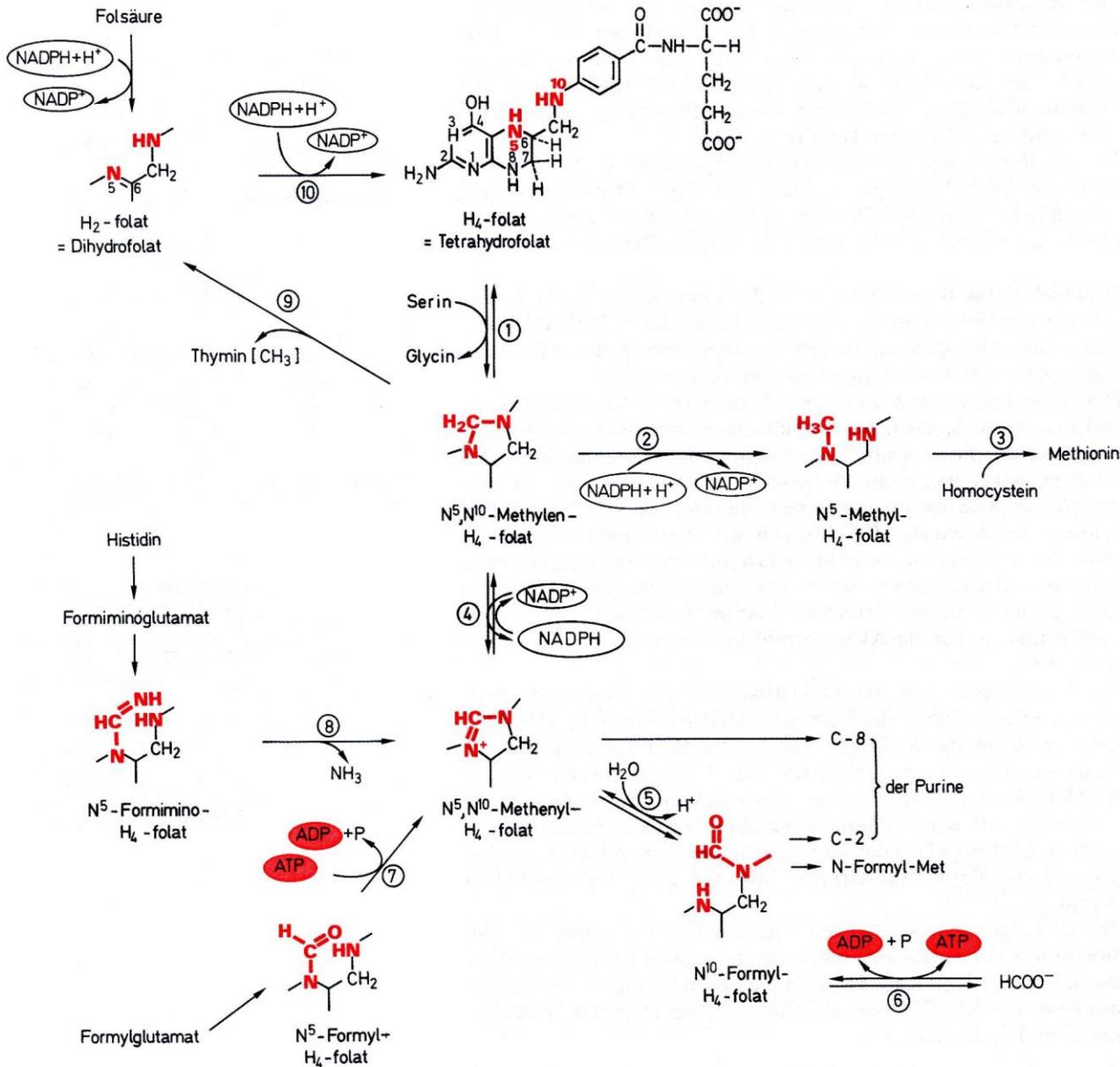


Cytidindiphosphat
(Cholin)

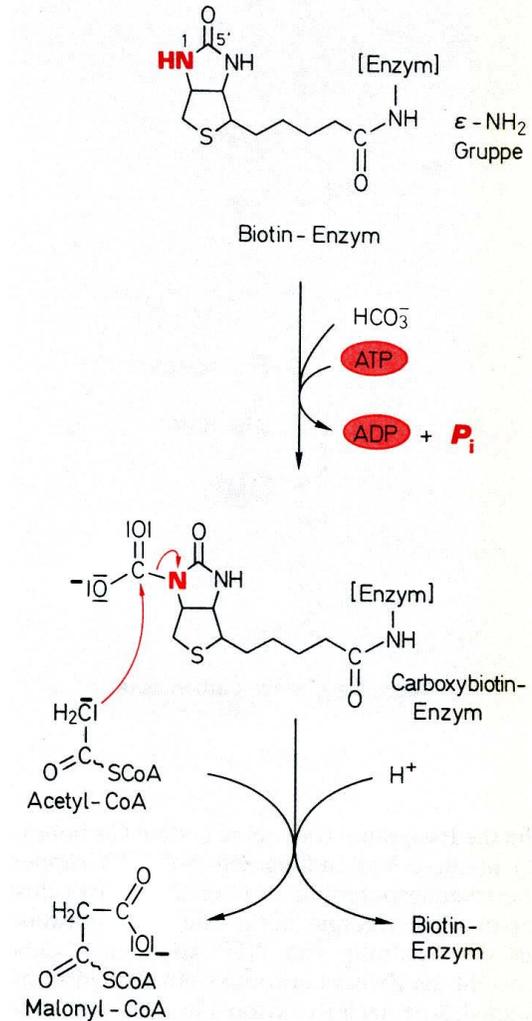


Uridindiphosphat
(Zucker)

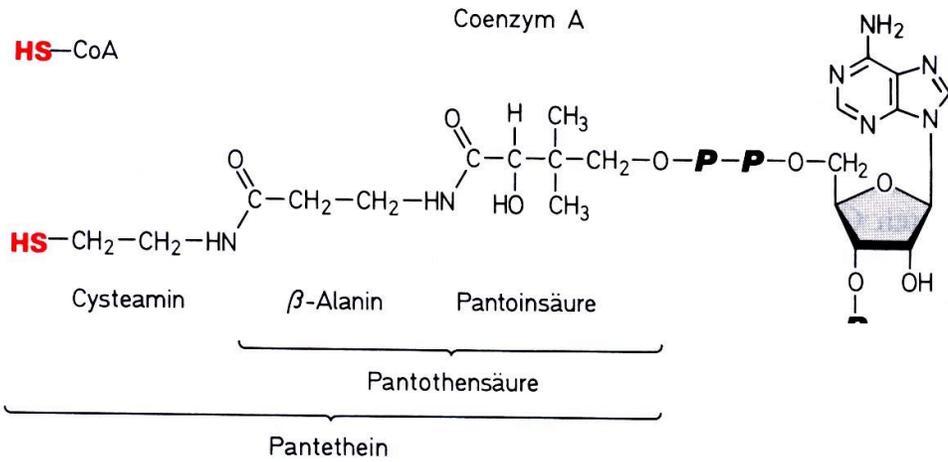
Tetrahydrofolsäure (Methyl, Formyl)



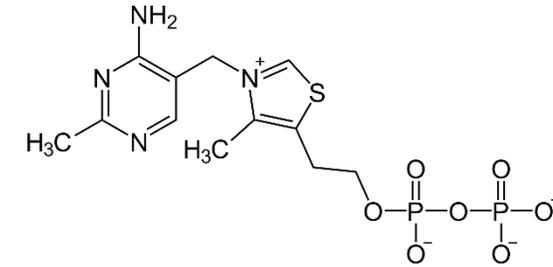
Biotin (CO₂)



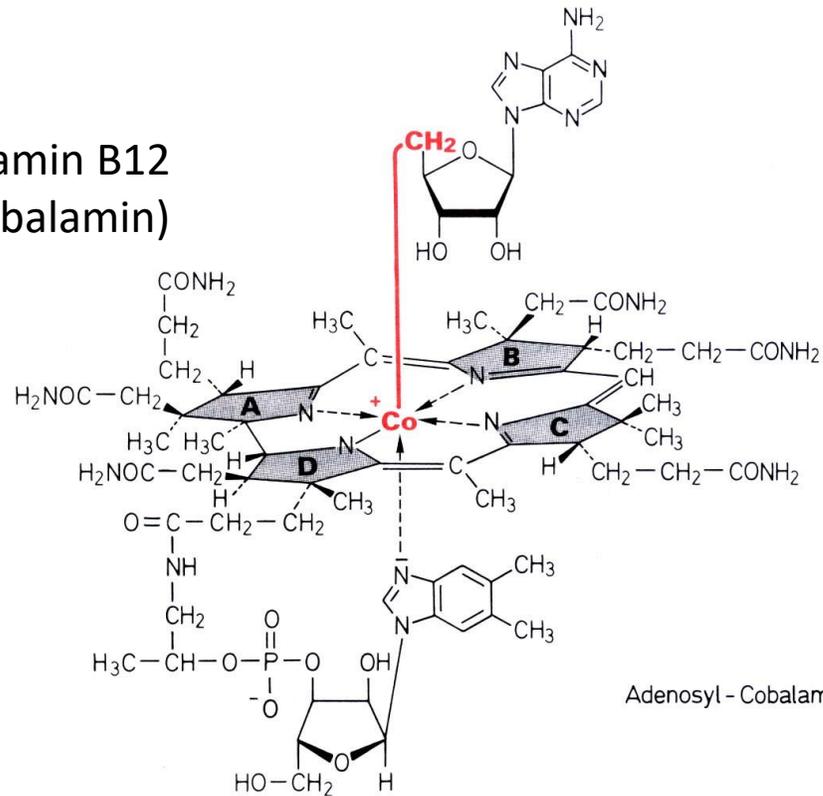
Coenzym A (CoA)



Thiaminpyrophosphat (Pyruvat-Dcarboxylase)



Vitamin B12 (Cobalamin)



Synthese 1972



Robert Burns Woodward



Albert Eschenmoser

