

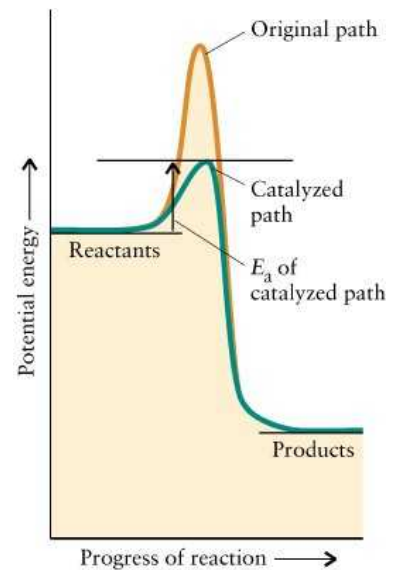
Biomoleküle II Enzymkinetik, Hämoglobin, Signalkaskaden (MAPK & G-Protein)

1. Was sind Enzyme?

- Biokatalysatoren
- Beschleunigen chem. Reaktionen in der Zelle
- Spezifität/ Affinität zum Substrat
- katalytische Aktivität regulierbar (feedback – Hemmung)
- $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$

Substrate werden bevorzugt gebildet, verschiedene Annahmen:

- **1. Theorie: Schlüssel-Schloss-Prinzip**
- **2. Theorie: Induced Fit (Enzyme-Substrate-Complex)**
 - erst wenn erste Wechselwirkungen durch **räumliche Nähe** auftreten
 - Bindung wird in der katalytischen Spalte (**active Site**) gebunden (H-2 Brücken, Kovalenzbindungen durch komplementäre Strukturen)
 - Konformationsänderung des Enzym-Substrate-Komplex verstärkt Bindung



Regulatorproteine: Calmodulinsensor 4 Ca^{2+} bindet \rightarrow Veränderung der Enzymaktivität
kovalente Modifikation: Phosphorylierung von z.B. Ser, Thr, Tyr

prolyt. Aktivierung: Enzyme in inaktiver Vorstufe \rightarrow am physilog. geeigneten Ort + Zeitpkt. aktiviert (das Enzym passt sich dem Substrat an, das es ideal in die katalytische Spalte passt)

kovalente Reaktionen sind länger anhaltend, dauern ca. 1000 ms

nichtkovalente Verbindungen/Mechanismen (auch Feedback-Mechanismen):
(Diffusionskontrolliert, sehr schnelle Reaktionen)

Schrittmachereenzyme: (sind die regulierten Enzyme) bestimmen die Reaktionsgeschwindigkeit.

Fließgleichgewicht: Theorie der Thermodynamik beschreibt die Gleichgewichtreaktion

Feedback-Mechanismus:

Mechanismus der am Ende der Enzymkettenreaktion die Enzyme am Anfang der Kette reguliert.

Feedforward-Mechanismus:

Mechanismus der am Anfang der Enzymkettenreaktion die Enzyme am Anfang der Kette reguliert.

Allosterie: sind Wechselwirkungen an räumlich getrennten Regionen am Enzym. (siehe Oligomere)
Bsp. für allosterische E. ACTASE; Ribonucleotid-Reduktase; Glykogen-Phosphorylase

Interkonvertierung:

enzymatisch katalysierte Aktivierung von Enzymen – Beispiel ist die Phosphorregulierung von Aminosäuren durch Kinasen (Proteinkinasen).

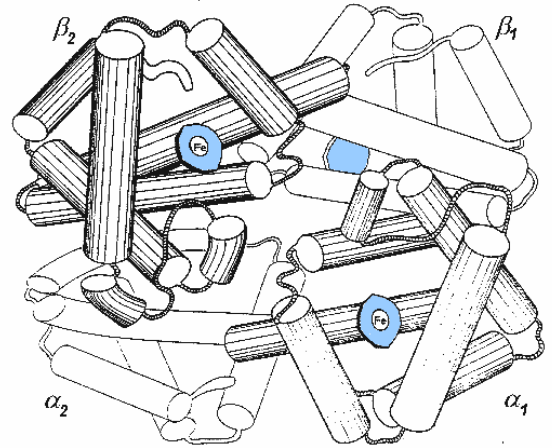
2. Bsp. Hämoglobin Hämoglobin (Blut) und Myoglobin (Muskel)

Aufgabe: Transport von Sauerstoff aus der Lunge zu den Geweben und CO₂ von den Geweben zurück zur Lunge.

Das Hämoglobin (220 ml O₂ pro l) ist notwendig, um die schlechte Wasserlöslichkeit von Sauerstoff im Blutplasma (3.2 ml O₂) zu überwinden.

Struktur:

- Tetramer besteht aus (2-alpha und 2-beta- Ketten mit Massen von jeweils 16kDa). 80% Prozent des Globins sind alpha Helices.
- Jede Untereinheit (4) trägt eine Häm-Gruppe mit einem 2-wertigen Eisen-Ion
- Die Tetramere zusammengehalten von nichtkovalenten Bindungen zusammengehalten.
- Zustände: Oxygenierung, Desoxygenierung
- Von den sechs Koordinationsstellen des Eisens sind vier mit dem Stickstoff der Pyrrolringe besetzt. Eine Bindungsstelle mit dem proximalen Histidin. An der letzten Stelle koordiniert im Oxy-Hämoglobin der O₂.
- HbF : Hämoglobin im Fötus (Zeta-Ketten werden zu den Alpha-Ketten, die Epsilon-Ketten zu den Beta-Ketten)



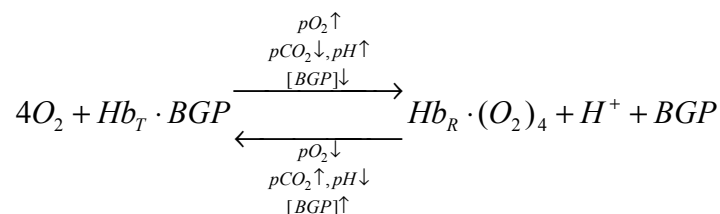
Allosterische Effekte im Hämoglobin:

T-Form (tense-form): starr, gespannt (über Salzbrücken stabilisiert): desoxygen besitzt eine viel geringere O₂-Affinität als die **R-Form (relaxed-form)**.

Bindet O₂ aneine der Untereinheiten der T-Form, kommt es zu einer konformationsänderung, die den Zusammenhalt der Untereinheiten schwächt. Mit zunehmendem O₂ Partialdruck gehen immer mehr Moleküle in die affinere R-Form über.

Daher: mit zunehmender O₂ (**positiv homotroper Effektor**) Konzentration steigt auch die Aufnahmefähigkeit des Sauerstoffs – man spricht hier von kooperativen Wechselwirkungen. Die Sättigungskurve des Bindungsverhaltens ist **sigmoidal**

allosterische Effektoren, die das O₂ Bindungsverhalten ändern: die Anwesenheit von 2,3 **Biphosphoglycerat, CO₂ und H⁺** (homotrophe Effektoren; additive Wirkung) sinkt die O₂-Affinität des Hämoglobins. CO₂, H⁺ lagern sich an anderen Stellen an. (nicht Häm-Gruppe). Wenn der pH-Wert im Blut zunimmt, verschiebt sich die Sättigungskurve nach unten.



Myoglobin:

Myoglobin ist ein Monomer, die Struktur ähnelt den Untereinheiten des Hämoglobins. Es zeigt kein allosterisches Verhalten.

3. Enzymkinetik:

Michaelis-Menten-Modell: einfaches Modell zur Erklärung der charakteristischen Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration. (Grafik in den Kopien)

Annahmen:

1. Substrat A wird vom Enzym E gebunden, die Reaktion geht weitaus schneller zum Produkt P als in Abwesenheit von E
2. k_{cat} (Wechselzahl) entspricht einem Enzym-Molekül pro Sekunde umgesetzten Zahl von Substrat-Molekülen. Dabei überwiegt der ES Anteil > E Anteil in Lsg.
3. Annahme das E, A und EA im chemischen Gleichgewicht

Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{k_{cat} [E]_g * [S]}{K_m + [S]}$$

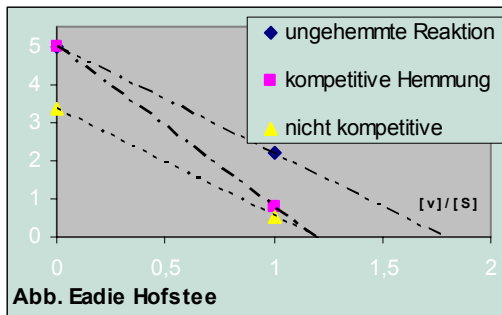
Kritik:

1. Es wird angenommen, dass die Umwandlung vom Enzym-Substrat-Komplex in das Enzym und das Produkt irreversibel ist.
2. Das ein Gleichgewicht zwischen dem Enzym, dem Substrat und auf der anderen Seite dem Enzym-Substrat-Komplex existiert.
3. Das nur das Enzym X und der Enzym-Substrat-Komplex an der Reaktion beteiligt sind.

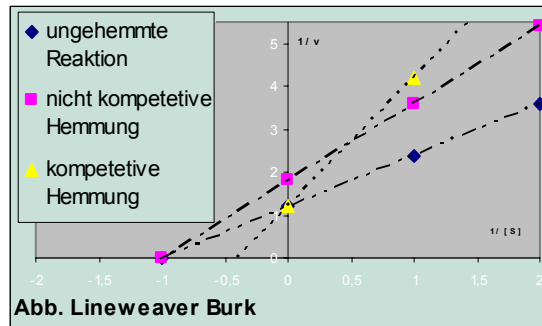
V_{max} = die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion $V = k_{cat} * [E]_g$,
 K_M = gibt die Affinität des Substrats an. $[E]*[A]/[EA] = K_m$

Unter diesen Annahmen entspricht K_M der Dissoziationskonstante des E-S-Komplexes, k_{cat} der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des E-S-Komplexes $\rightarrow E + \text{Produkt}$.

Eadie Hofstee



Lineweaver Burk



V-S Diag.: V_{max} ist Annäherung 0,029 mM/s und das Abtragen von $V_{max} / 2$ an der X-Achse ist K_M -Wert

Burk Dia.: V_{max} ist der Schnittpunkt mit der Y-Achse, wobei $V_{max} = 1/v$ für $1/[S]=0$ ist.
 K_M ist der Schnittpunkt mit der X-Achse, wobei $K_M = -1/s$ für $1/v=0$.

Eadie Dia. : V_{max} ist der Schnittpunkt mit der Y-Achse. K_M ist der Betrag des neg. Anstiegs der Geraden.

PH-Wert:



$K = [H^+][A^-]/[HA]$ $[HA]=[A]$

pH-Wert: $pI=pH=1/2 (p_{K1}+p_{K2})$ der negative dekadische Logarithmus vom Wasserstoffionenkonzentration

pk-Wert: ist der neg. dekadische log. der Dissoziation von $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$

kompetitiver, nicht kompetitiv und allosterischer Inhibitor

kompetitive Hemmung:

Bei der kompetitiven Hemmung wird die Substratbindungsstelle am Enzym besetzt. Die Affinität des Enzyms wird kleiner und der K_M -Wert dadurch grösser. Wenn die Substratkonzentration erhöht wird, wird der Inhibitor aus der Bindungsstelle verdrängt, die Hemmung ist somit reversibel, durch eine hohe Konzentration von Substrat lässt sich das V_{max} der ungehemmten Reaktion erreichen, V_{max} bleibt daher unverändert.
Bsp. Multienzymkomplex (Pyruvat-Dehydrogenase)

nicht kompetitive Hemmung:

Bei der nicht kompetitiven Hemmung verringert sich die Geschwindigkeit der Reaktion und somit auch V_{max} . Der Inhibitor reagiert mit dem Enzym so, dass die Funktion des Enzyms gehemmt wird. Die Bindungsstelle für das Substrat bleibt dabei unbeeinträchtigt. Die Affinität des Enzyms zum Substrat bleibt dadurch erhalten, sowie der K_M -Wert des Enzyms.

allosterische Hemmung:

Die allosterischen Inhibitoren binden an separate Bindungsstellen außerhalb des aktiven Zentrums. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzymproteins, die indirekt die Aktivität vermindert. Allosterische Effekte treten nur bei oligomeren Enzymen auf. (Bsp. Hämoglobin :)

Kopplung von Proteinmodifikation und Protein-Protein-WW: SH2 Domänen & P-Tyr

Kopplung von Proteinmodifikation und zellulärer Lokalisation: STATs, MAPK

3. Signalkaskaden:

Metabolischer Mechanismus: (Kontrolle der Zelle des ATP Haushalts)

Hormoneller Mechanismus: (Adrenalin) steuert den metabolischen Mechanismus

Kaskaden:

Reversibilität

(Phosphorylierung-Dephosphorylierung, GDP-GTP-GDP)

Signalverstärkung

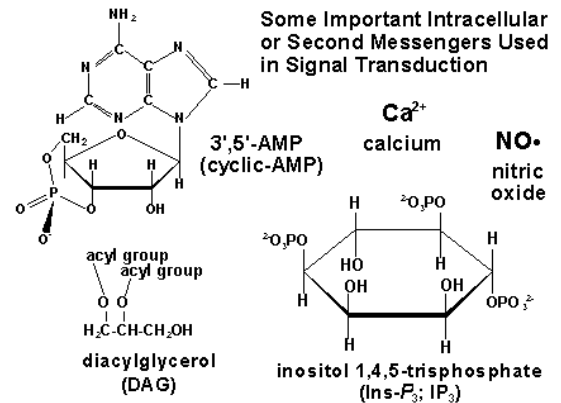
(intrazelluläre "second messenger", Enzymkaskaden)

MAP Kinase Kaskade:

- **Katalytische Rezeptoren**

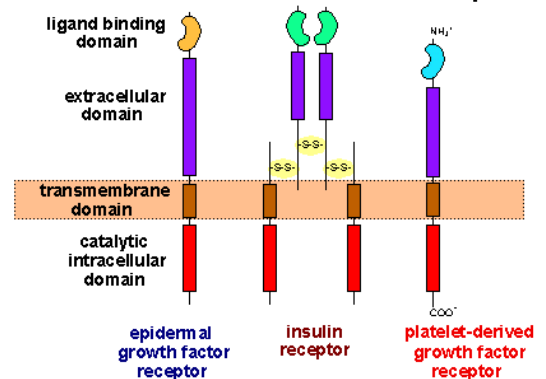
- Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (MAPK-Weg, Jak-STAT-Weg)

- Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen



Durch Bindung der Liganden (Wachstumsfaktoren) dimerisieren die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bzw. ändern ihre intrazelluläre Konformation derartig, dass eine gegenseitige Phosphorylierung der intrazellulären Kinase-domänen (Autophosphorylierung) oder eine Phosphorylierung bestimmter Effektorproteine möglich wird

General Structure of Growth Factor Receptors



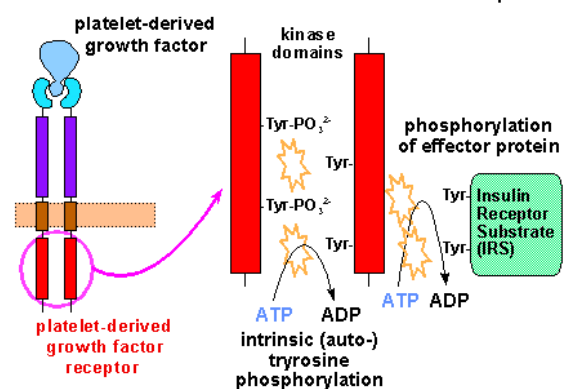
Signaltransduktion bei G-Protein gekoppelte

Rezeptoren

Hier sollten wir uns zunächst folgende sekundäre Botenmoleküle (second messengers) ansehen:

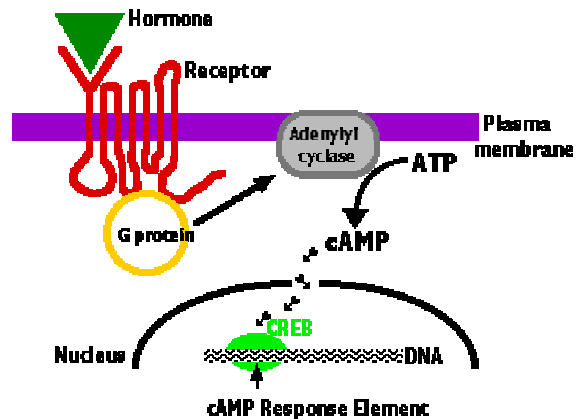
- **cAMP (cyclic AMP, 3',5'AMP):** cAMP wird aus ATP durch das Enzym **Adenylatzyklase** gebildet und kann durch **Phosphodiesterase** zu AMP abgebaut werden
- **Diacylglycerol (DAG)** und **Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3)** entstehen durch Spaltung des Zellmembranlipides Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)
- weitere Botenmoleküle sind **Kalzium-Ionen (Ca²⁺)** und **Stickoxid-Radikale (NO)**

Dimerization & Activation of Growth Factor Receptors



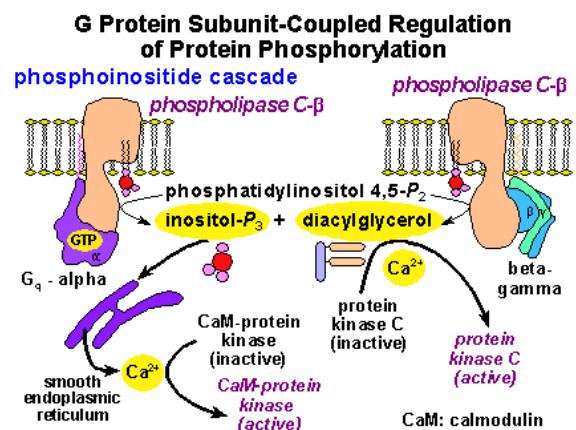
Adenylat-Zyklase-Kaskade

- Nach Ligandenbindung (z.B. Adrenalin) an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor wird ein $G\alpha$ -Protein freigesetzt und aktiviert die Adenylatzyklase, welche die Bildung von cAMP katalysiert.
- cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)
- PKA phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB, CREB aktiviert Transkription CRE-kontrollierter Gene
- PKA phosphoryliert und aktiviert Phosphorylasekinase und phosphoryliert und deaktiviert Glykogensynthetase, damit Erhöhung der Glykogenolyse und Hemmung der Glykogensynthese in der Leber - Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut



Phosphoinositid-Kaskade

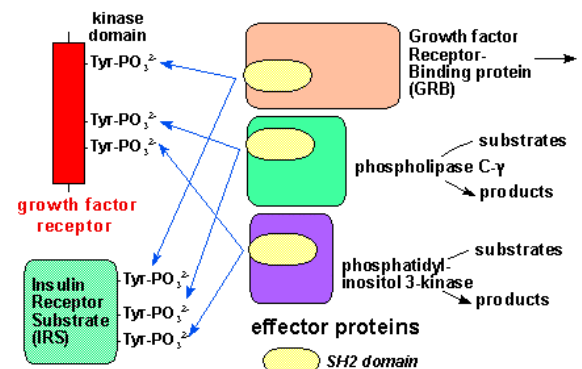
- Nach Ligandenbindung (z.B. Azetylcholine) an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor wird ein $G\alpha$ -Protein freigesetzt und aktiviert die Phospholipase $C\beta$, welche PIP₂ zu IP₃ und DAG spaltet.
- DAG stimuliert die membranlokalisierte Proteinkinase C (PKC)
- IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor des ER, Ca²⁺ strömt in das Cytoplasma ein, bindet an das Protein Calmodulin (CaM) und aktiviert dann CaM-abhängige Enzyme, z.B. Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen



Signaltransduktion bei Katalytischen Rezeptoren

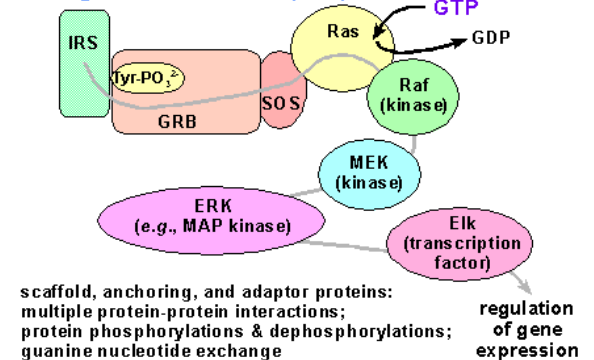
- Der erste Schritt bei der weiteren Signalübertragung durch viele Wachstumsfaktorrezeptoren ist die spezifische Bindung von sogenannten Adaptorproteinen an die Phosphotyrosinreste der intrazellulären Domäne des Rezeptors bzw. an ein rezeptorassoziiertes Protein wie z.B. Insulin-Rezeptor-Substrat IRS-1. Die Bindung an Phosphotyrosin wird durch sogenannte Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen in den Adaptorproteinen realisiert.
- Über verschiedenen Phosphotyrosinreste und verschiedene Adaptorproteine können dann verschiedene Signalwege stimuliert werden:
 - Über das Wachstumsfaktorrezeptor-bindende Protein (GRB) wird die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade aktiviert
 - Über andere Effektorproteine kann z.B. die Phospholipase $C\gamma$ stimuliert werden, die dann ähnlich wie Phospholipase $C\beta$ agiert.
- GRB-Bindung an den Rezeptor führt zur Aktivierung des kleinen monomeren GTP-bindenden Proteins Ras (Austausch GDP zu GTP), welches dann die erste Kinase der MAP-Kinase-Kaskade, Raf, aktivieren kann
- Raf phosphoryliert und aktiviert die Kinase MEK und MEK wiederum die MAP-Kinase ERK
- ERK transloziert dann in den Zellkern und phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor Elk, der die Transkription Mitogen-abhängiger Gene stimuliert

Signal Transduction by Growth Factor Receptors



Signal Transduction by Growth Factor Receptors

mitogen-activated kinase (MAP) cascade



4. Proteomics-Vorlesung

Beispiel für eine Protein Analyse:

Reaktion: $\text{NAD}^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{ADP}$

Ziel: gesuchtes Protein ist für die obige Reaktion zuständig

folgende Schritte zur Reinigung:

1. **Zellaufschluss** // Zerstörung der Zellmembran
2. **Homogenisierung**: // Zerkleinern
 - a. langsame **Zentrifugation** zur Auftrennung der Zellorganellen und des plasmatischen Reticulums
 - i. Kerne
 - ii. Membranen
 - iii. Cytosol
 - b. alle Prozesse bei 4° Celsius
 - c. Ionenaustauscher
3. **Chromatographie** // Überprüfen aller Fraktionen auf Aktivität
4. **Photometer**: messen der Absorption der Produkte der Reaktion Zu überprüfen anhand der U/mg (Units: Anteil der Enzyme)
5. **Elektrophorese** // SDS Nachteil: nach Auftrennen gibt es keine Enzymaktivität mehr
 - a. nach dem Auftrennen wird das gesuchte Enzym geblottet
 - b. **Edman-Sequenzierung**: vom N-terminus des Proteins Aminosäuren abgespalten funktioniert nur mit NH₂ Terminus (keine Modifikation)
 - c. Proteasen, die gezielt schneiden (z.B. Trypsin; schneidet Arginin, Lysin) es entstehen Peptide + Massen mit Aminosäureketten
6. **Massenspektroskopie (MALDI-TOF)**