

---

## **Proteinseminar**

# **Praktikum der Biochemie für Studenten der Medizin und Zahnmedizin**

---

Dieses Skript soll als Information dienen, welche Teilbereiche der Proteinbiochemie im Rahmen des Seminars zum Biochemie-Praktikum für Studenten der Medizin und Zahnmedizin behandelt werden. Die meisten Passagen sind eher kurz gehalten.

**Keinesfalls soll und kann das Skript das Studium eines vernünftigen Lehrbuchs ersetzen.**

# Inhalt

---

<b>A</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>1</b>
A 1	Die Aminosäuren der Proteine	1
A 1.1	Allgemeine Eigenschaften	1
A 1.2	Peptidbindungen	2
A 1.3	Klassifizierung und Charakteristika	2
A 1.4	Säure-Base-Eigenschaften	9
A 2	Optische Aktivität	10
A 3	Seltene Aminosäuren	10
A 3.1	Aminosäure-Derivate in Proteinen	10
A 3.2	Besondere Funktionen von Aminosäuren	11
<b>B</b>	<b>Strukturen von Proteinen</b>	<b>12</b>
B 1	Die Primärstruktur	13
B 1.1	Analyse der Primärstruktur	15
B 1.2	Endgruppenbestimmung	17
B 1.2.1	Identifikation des N-Terminus	17
B 1.2.2	Identifizierung des C-Terminus	19
B 1.3	Spaltung der Disulfid-Bindungen	19
B 2	Die Sekundärstruktur	19
B 2.1	$\alpha$ -Helix	20
B 2.2	$\beta$ -Faltblatt	20
B 2.3	Nichtrepetitive Strukturen	21
B 2.4	Kollagen-Tripelhelix	21
B 3	Die Tertiärstruktur	24
B 4	Die Quartärstruktur	26
<b>C</b>	<b>Denaturierung und Renaturierung von Proteinen</b>	<b>33</b>
C 1	Denaturierung von Proteinen	33
C 2	Renaturierung von Proteinen	34
C 3	Chaperone	37
C 4	Prionerkrankungen	38

<b>D</b>	<b>Methoden der Proteintrennung</b>	<b>39</b>
D 1	Trennung nach Ladung - Ionenaustausch-Chromatographie	39
D 2	Trennung nach Größe	41
D 2.1	Gelfiltrations-Chromatographie	41
D 2.2	Dialyse	42
D 2.3	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	42
D 2.4	Trennung nach Ligandenspezifität - Affinitätschromatographie	44

---

Hinweis des Autors:

Die farbigen Abbildungen entstammen der Bild-CD

*Löffler • Petrides optimax Biochemie und Pathobiochemie, Springer electronic media*

---

## A Aminosäuren

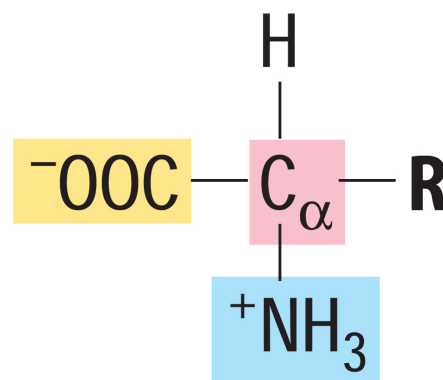
### A 1 Die Aminosäuren der Proteine

Alle Proteine sind aus den 20 sog. *proteinogenen* Aminosäuren zusammengesetzt. Diese tragen am C<sub>α</sub>-Kohlenstoffatom eine primäre Aminogruppe und eine Carboxygruppe. Prolin, die einzige Ausnahme dieser generellen Struktur, hat eine sekundäre Aminogruppe und ist deshalb eigentlich eine α-Iminosäure.

#### A 1.1 Allgemeine Eigenschaften

Die pK-Werte für die α-Carboxygruppen der α-Aminosäuren liegen im Bereich um 2,2, d. h. bei einem pH > 3,5 liegen sie als Carboxylate vor. Alle α-Aminogruppen haben pK-Werte um 9,4, weshalb sie bei pH-Werten < 8 als Ammonium-Ionen vorliegen. Hieraus folgt eine strukturelle Besonderheit: Im physiologischen pH-Bereich (ca. pH 7,0) sind sowohl die Carboxygruppen als auch die Aminogruppen der α-Aminosäuren vollständig ionisiert. Eine AS kann deshalb entweder als Säure oder Base wirken. Sie werden deshalb als **amphoterisch** bezeichnet; man nennt sie **Ampholyte** (*amphoterische Elektrolyte*).

Moleküle, die Gruppen entgegengesetzter Ladung tragen, bezeichnet man außerdem als **Zwitter-** oder **dipolare Ionen**.



## A 1.2 Peptidbindungen

$\alpha$ -Aminosäuren polymerisieren unter Abspaltung von Wassermolekülen. Die entstandene **CO-NH**-Verknüpfung wird als **Peptidbindung** bezeichnet. Sie ist durch ihre **planare Struktur** charakterisiert. Polymere aus zwei, drei, wenigen (3 bis 10) oder vielen AS-Resten heißen entsprechend **Di-, Tri- Oligo- bzw. Polypeptide**. Proteine sind Moleküle aus einer oder mehreren Polypeptid-Ketten (ca. 40 – 4000 AS).

Polypeptide sind **lineare Polymere**, d. h. jede AS ist in Kopf(N)-Schwanz(C)-Anordnung mit der benachbarten AS verbunden, es werden also keine verzweigten Ketten gebildet ( $\Rightarrow$  Colinearität zwischen Gensequenz und Proteinsequenz).

## A 1.3 Klassifizierung und Charakteristika

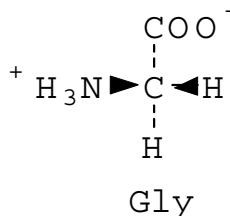
Die am weitesten verbreitete Klassifizierung der 20 Standard-AS erfolgt gemäß der Polaritäten ihrer Seitenketten. Demnach gibt es drei Haupttypen:

Aminosäuren mit

1. unpolaren Seitenketten,
2. ungeladenen polaren Seitenketten und
3. geladenen Seitenketten.

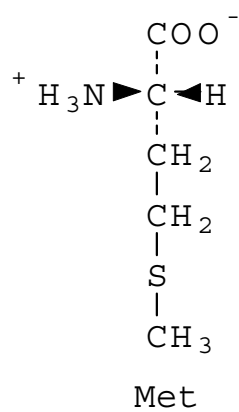
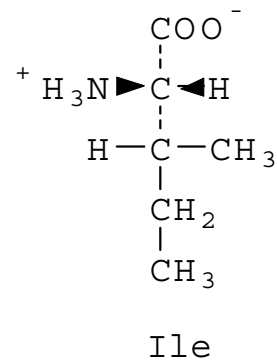
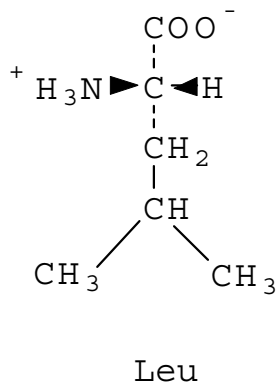
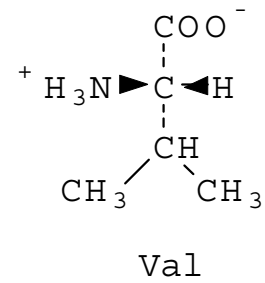
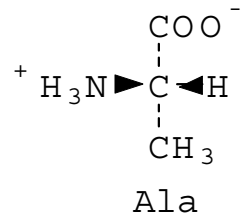
Unpolare AS-Reste unterscheiden sich in Form und Größe:

**Glycin** (H-Atom)

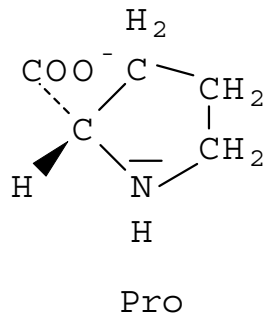


**Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin** (aliphatische Kohlenwasserstoff-Seitenketten)

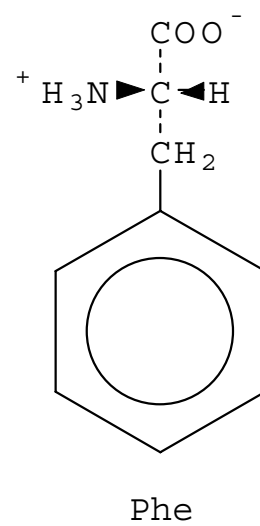
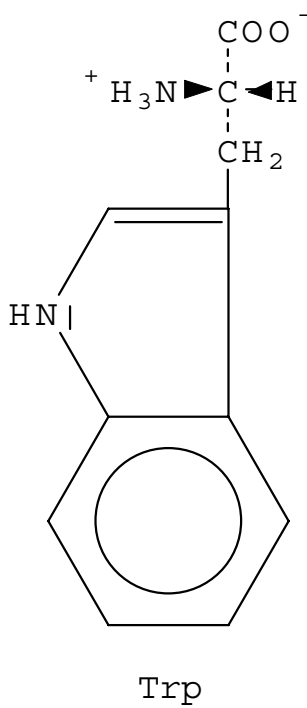
**Methionin** (Thioether-Seitenkette)



**Prolin** (cyclischer Pyrrolidin-Rest,  $\Rightarrow$  relativ starre Konformation)

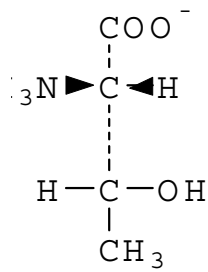


**Phenylalanin** (Phenyl-Rest) und **Tryptophan** (Indolgruppe) mit aromatischen Seitenketten  
(groß, unpolar)

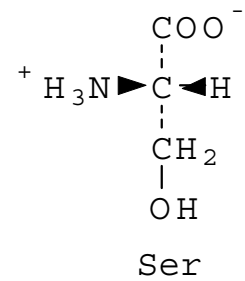


Ungeladene polare Seitenketten besitzen Hydroxy-, Amid- oder Thiolgruppen:

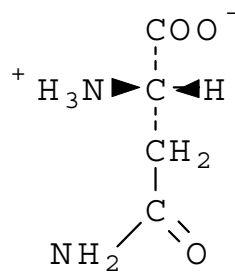
**Serin, Threonin** (hydroxylierte Seitenketten)



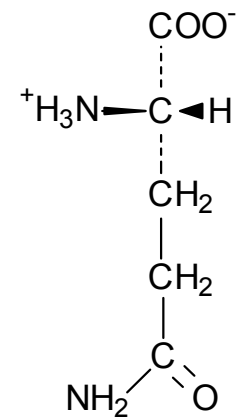
Thr



**Asparagin, Glutamin** (amidtragende Seitenketten)



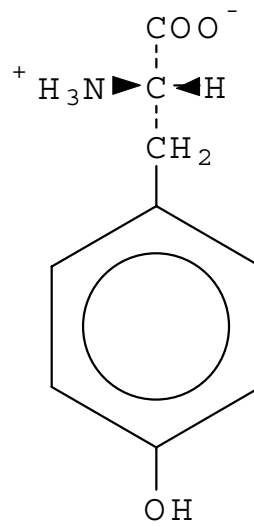
Asn



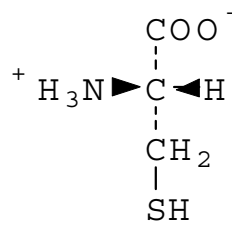
Gln





**Tyrosin** (Hydroxyphenylgruppe)

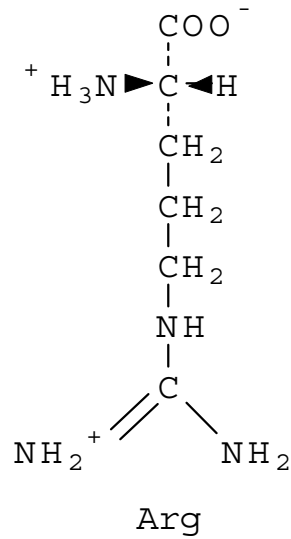
Tyr

**Cystein** (freie Thiolgruppe, ermöglicht Disulfidbindung)

Cys

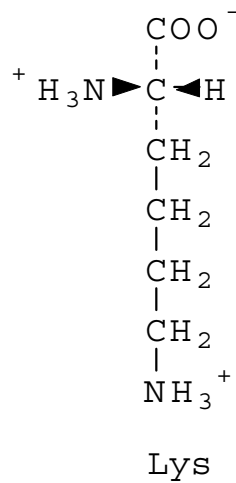
Geladene polare Seitenketten besitzen basische oder saure Gruppen:

**Arginin** (Guanidinogruppe)

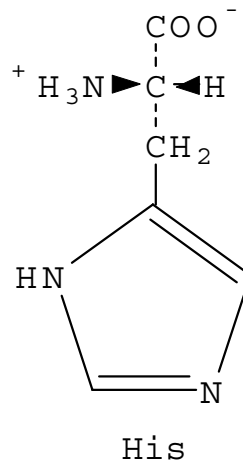


Basische AS sind bei physiologischem pH-Wert positiv geladen:

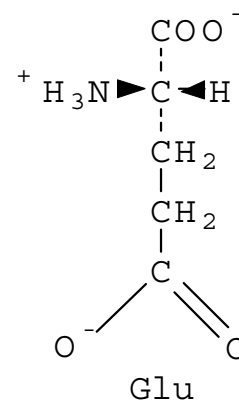
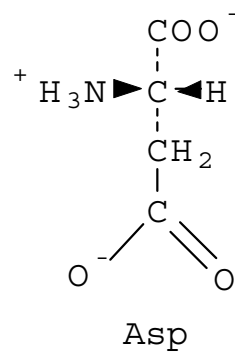
**Lysin** (Aminobutyl-Seitenkette)



**Histidin** (Imidazol-Rest;  $pK_R=6,0$ ; bei pH 6,0 zu 50 % geladen, bei pH 8,0 neutral;  
⇒ His oft an katalytischen Enzymreaktionen beteiligt)

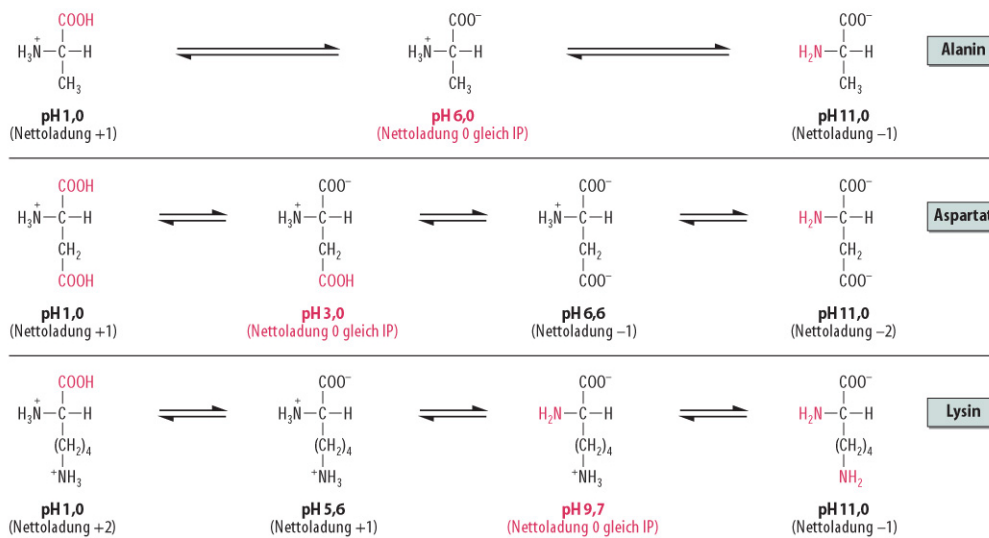


Acide AS sind bei pH > 3 negativ geladen: **Asparaginsäure** (=Aspartat) und **Glutaminsäure** (=Glutamat)



Die AS unterscheiden sich erheblich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Polarität, Acidität, Basizität, Aromatizität, Größe, konformationelle Flexibilität, Fähigkeit zur Vernetzung bzw. Wasserstoffbrückenbildung und chemische Reaktivität. Diese Merkmale sind bestimmend für Protein-Eigenschaften.

## A 1.4 Säure-Base-Eigenschaften



AS haben zwei, solche mit ionisierbaren Seitenketten sogar drei Säure-Base-Gruppen. Diese sind bei niedrigen pH-Werten vollständig protoniert, sodass die kationische Form  $^+\text{NH}_3\text{CHR}\text{COOH}$  dominiert. Durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung lässt sich jeder Teilbereich der Titrationskurve gut annähern:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$$

Der pH-Wert, an welchem die AS keine elektrische Nettoladung trägt, entspricht ihrem **isoelektrischen Punkt pI**.

$$\text{pI} = 1/2 (\text{pK}_i + \text{pK}_j)$$

$K_i$  und  $K_j$  entspricht  $K_1$  und  $K_2$  außer:

Asp und Glu:  $K_1$  und  $K_R$

Arg, Lys und His:  $K_R$  und  $K_2$

Titrationskurven von Proteinen sind weitaus komplexer. Unter anderem sind sie von den umgebenden Salzkonzentrationen abhängig.



## A 2 Optische Aktivität

Mit der Ausnahme von Glycin sind alle proteinogenen Aminosäuren optisch aktiv. Optisch aktive Moleküle zeigen eine Asymmetrie, d. h. sie sind mit ihrem Spiegelbild nicht deckungsgleich, so wie die linke Hand und rechte Hand nicht deckungsgleich sind. Sie enthalten im allgemeinen ein Kohlenstoffatom mit vier verschiedenen Substituenten. Die Zentralatome in solchen Konstellationen bezeichnet man als **asymmetrische** oder **chirale Zentren**. Die  $C_{\alpha}$ -Atome aller Aminosäuren (außer Glycin) sind solche chirale Zentren.

Zwei Verbindungen, die als Bild und Spiegelbild auftreten, bezeichnet man als **Enantiomere**. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, linear polarisiertes Licht zu drehen (d=+=rechtsdrehend; l=- = linksdrehend).

Eine einfache Formeldarstellung für Enantiomere ist die **Fischer-Projektion**. Hierbei liegen horizontale Bindungen oberhalb der Papierebene, vertikale Bindungen unterhalb, das Chiralitätszentrum in der Papierebene.

Eine genauere, aber auch etwas kompliziertere Nomenklatur bietet das Cahn-Ingold-Prelog-System.

Bei der normalen chemischen Synthese chiraler Verbindungen entsteht im allgemeinen stets ein **Racemat** (1:1-Mischverhältnis der Enantiomere). Eine der bemerkenswertesten Fähigkeiten lebender Systeme ist die Synthese optisch aktiver Verbindungen. Die Biosynthese einer Substanz mit asymmetrischen Zentren führt fast ausnahmslos zu einem reinen Stereoisomer. So haben z. B. alle proteinogenen AS L-Konfiguration.

## A 3 Seltene Aminosäuren

### A 3.1 Aminosäure-Derivate in Proteinen

Die selten vorkommende AS **Selenocystein** (Schwefel-Atom im Cystein ist durch Selen-Atom ersetzt; bei Pro- und Eukaryonten) besitzt offenbar eine **eigene spezifische Transfer-Ribonukleinsäure** mit entsprechendem Codon.



Außerdem kommen noch viele weitere Aminosäuren auch in Proteinen vor. Allerdings sind diese ungewöhnlichen AS in allen bekannten Fällen Produkte spezifischer **posttranslationaler Modifikationen** der proteinogenen AS:

- **4-Hydroxyprolin** und **5-Hydroxylysin**: wichtige strukturelle Bestandteile von Kollagen.
- Viele Proteine sind spezifisch methyliert, acetyliert oder phosphoryliert.
- **N-Formylmethionin** ist der N-terminale Rest aller prokaryontischer Proteine, wird jedoch meist wieder entfernt.
- **$\gamma$ -Carboxyglutaminsäure** ist Bestandteil mehrerer Blutgerinnungsfaktoren.

### A 3.2 Besondere Funktionen von Aminosäuren

AS und ihre Derivate fungieren oft als **Botensubstanzen** in der Kommunikation zwischen Zellen: **Glycin**,  **$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)**; ein Glutamat-Decarboxylierungsprodukt) und **Dopamin** (ein Tyrosin-Abkömmling) sind Neurotransmitter; **Histamin** (das Decarboxylierungsprodukt des Histidins) ist ein lokal wirkender Mediator bei allergischen Reaktionen; **Thyroxin** (Tyrosin-Derivat) ist ein iodhaltiges Schilddrüsenhormon, das den Vertebraten-Metabolismus stimuliert.

AS sind wichtige Zwischenprodukte metabolischer Abläufe:

- **Citrullin und Ornithin (bei Harnstoff-Biosynthese)**
- **Homocystein (AS-Metabolismus)**
- **S-Adenosylmethionin (biologisches Methylierungsreagens)**

**Azaserin** (Antibiotikum)

Viele Organismen besitzen auch **D-Aminosäuren**, z. B. als Bestandteil bakterieller Zellwände. Außerdem sind sie Bestandteile vieler **Antibiotika** einschließlich **Valinomycin**, **Actinomycin D** und **Gramicidin S**.



## B Strukturen von Proteinen

Proteine stehen im Mittelpunkt jedes biologischen Prozesses. Sie katalysieren als Enzyme einen komplexen Ablauf biochemischer Reaktionen, die in ihrer Gesamtheit „das Leben“ ausmachen. Proteine sind also Regulatoren dieser Reaktionen, sie sind an Transport- und Bewegungsprozessen beteiligt, spielen in der Sinnesphysiologie oft zentrale Rollen, bilden das Kernstück des Immunsystems, lenken Replikation, Transkription und Translation oder gewährleisten einfach Form und Gestalt eines Gewebes, Organs oder Organismus:

- Enzyme
- Hormone
- Rezeptoren
- Transport und Speicherung von O<sub>2</sub>,  
Glucose, Lipide u. v. m.
- Aktin, Myosin
- Rhodopsin
- Immunglobuline
- Kollagen ...

All diese Proteinfunktionen können nur an Hand der jeweiligen Proteinstruktur verstanden werden. Hierbei unterscheidet man traditionell vier Organisationsebenen:

### Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur.

Klassifizierung der Proteine nach ihrem strukturellen Aufbau:

- einfache Proteine:  
nur aus Aminosäuren bzw. -derivaten zusammengesetzt
- zusammengesetzte Proteine:  
Hydrolyse setzt außer AS einen Nicht-Proteinanteil (**prothetische Gruppe**) frei. Je nach der Natur dieses Anteils unterscheidet man z. B. Nucleoproteine, Glycoproteine, Chromoproteine, Lipoproteine, Metalloproteine u. a.; die prothetische Gruppe kann kovalent oder nicht-kovalent gebunden sein.
- globuläre Proteine:  
kugelförmig, stark gefaltet, gut wasserlöslich (hydrophober Kern, hydrophile Peripherie), z. B. die meisten Enzyme, Plasmaproteine, Hämoglobin, Proteohormone



- fibrilläre oder Skleroproteine:

bilden wasserunlösliche, fadenförmige Polymerisate; funktionell stellen sie Strukturproteine dar, z. B.  $\alpha$ -Keratin, Kollagen, Elastin, Fibrinogen, Myosin

## B 1 Die Primärstruktur

Als **Primärstruktur** eines Proteins werden die Aminosäuresequenz und Stellung der Disulfidbrücken einer Polypeptidkette bezeichnet. Diese Sequenz muss in eine **definierte Richtung** gelesen werden: vom **N-Terminus** (links) zum **C-Terminus** (rechts). Die Abfolge der AS-Reste bestimmt die daraus resultierende Sekundärstruktur. Durch Vergleiche der AS-Sequenzen verschiedener Proteine können Homologien aufgeklärt werden, die dann Rückschlüsse über mögliche Funktionen oder die Lokalisation *in vivo* erlauben können.

Beispiel: Kallidin (Peptidhormon, Dekapeptid)

K - R - P - P - G - F - S - P - F - R

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

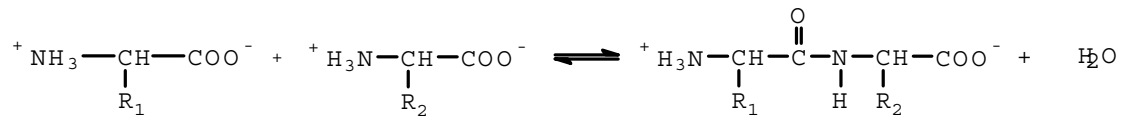
Charakteristika der Aminosäuresequenz:

- genetische Determination und Colinearität zur DNA-Saquenz
- Festlegung der Proteinkonformation (dennoch bis heute sichere Ableitung der Konformation eines Proteins aus der AS-Sequenz noch immer nicht möglich)
- hohe Variabilität: bei 100 AS-Resten und 20 proteinogenen AS sind  $20^{100} \cong 10^{130}$  verschiedene Proteinsequenzen denkbar. Von der Natur wird dieses Repertoire bei weitem nicht ausgeschöpft. Nur ein kleiner Teil der möglichen Sequenzen ergibt funktionell brauchbare Proteine.

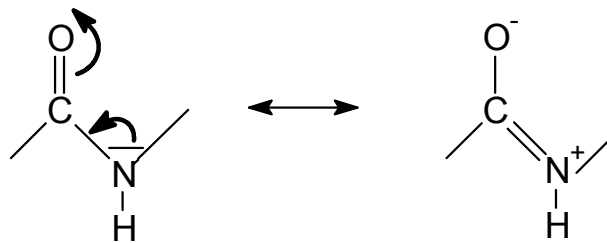




Die Aminosäuren sind dabei durch die sog. **Peptidbindung** miteinander verbunden:

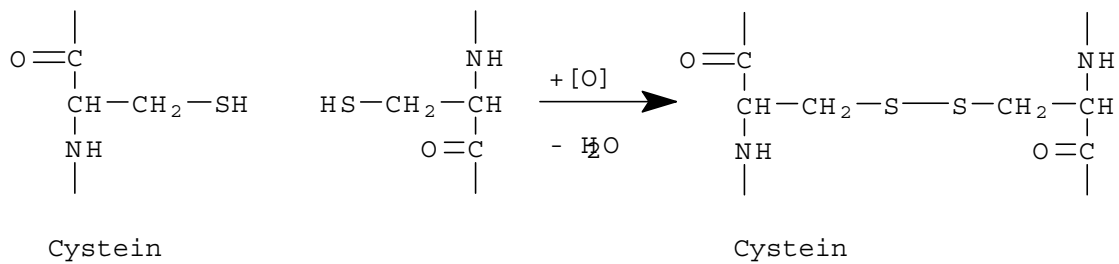


*In vivo* findet diese Reaktion unter Einschaltung der komplexen Proteinbiosynthese-Maschinerie an den Ribosomen statt. Die Rückreaktion wird durch Peptidasen / Proteasen katalysiert. Die Peptidbindung hat *trans*-Konfiguration und aufgrund der Mesomeriestabilisierung partiellen Doppelbindungscharakter. Sie ist durch ihre starre, planare Struktur gekennzeichnet.

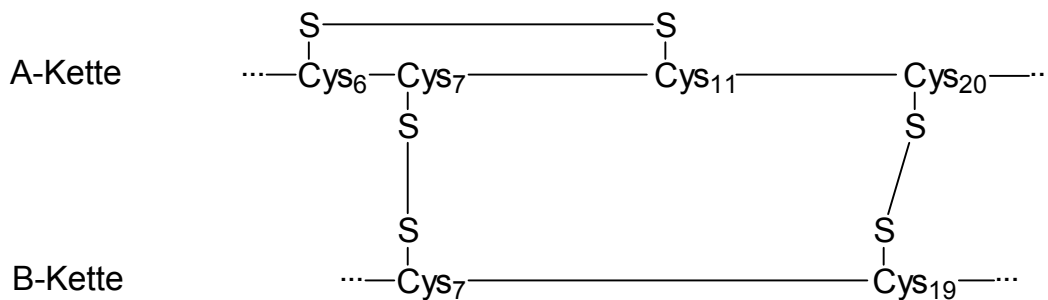


Folgen der Ausbildung von Peptidbindungen:

- **Polarisierung** der Kette (N-Terminus, C-Terminus)
- $\alpha$ -ständige funktionelle Gruppen nicht-endständiger Aminosäuren sind nicht mehr ionisierbar  $\Rightarrow$  individuelle Eigenschaften eines Proteins / Peptids werden von AS-Seitenketten bestimmt
- Ausbildung eines unverzweigten, polaren Rückgrats  
(Beteiligung an H-Brücken)
- Drehbarkeit einzelner Einfachbindungen des Rückgrats (eingeschränkt durch Starrheit der Peptidbindung und sterische Hinderungen) ermöglicht drei-dimensionale Faltung der Polypeptidkette (Proteinkonformation)

**Disulfidbrücken:** kovalente Vernetzungen von Cysteinresten

Man unterscheidet **intra-** und **interkatenäre Disulfid-Brücken**.

**Schematische Darstellung von Insulin.**

Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten (A-Kette, 21 AS; B-Kette, 30 AS), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

**B 1.1 Analyse der Primärstruktur**

Das erste Protein, dessen Aminosäuresequenz vollständig bestimmt wurde, war die von Insulin aus Rind. Frederick Sanger entwickelte 1953 eine Methode, die im Prinzip auch heute noch zur Proteinsequenzierung verwendet wird. Das Verfahren kann wie folgt aufgeteilt werden:



### 1. Vorbereitung des Proteins für die Sequenzierung

- a) Bestimmung der Anzahl der chemisch verschiedenen Polypeptidketten (Untereinheiten) im Protein.
- b) Spaltung der Disulfidbrücken des Proteins
- c) Trennung und Reinigung der verschiedenen Untereinheiten
- d) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Untereinheiten

### 2. Sequenzierung der Polypeptidketten

- a) Fragmentierung der individuellen Untereinheiten an bestimmten Positionen zur Herstellung kleinerer, direkt sequenzierbarer Peptide.
- b) Trennung und Reinigung der Fragmente.
- c) Bestimmung der AS-Sequenz jedes Peptidfragments.
- d) Wiederholung von Schritt 2 a) nach einem Fragmentierungsschema, bei dem Peptidbindungen der Untereinheit an anderen Positionen als zuvor gespalten werden. Trennung dieser Peptidfragmente wie in Schritt 2 b) und Bestimmung ihrer AS-Sequenz wie in Schritt 2 c).

### 3. Aufklärung der vollständigen Struktur

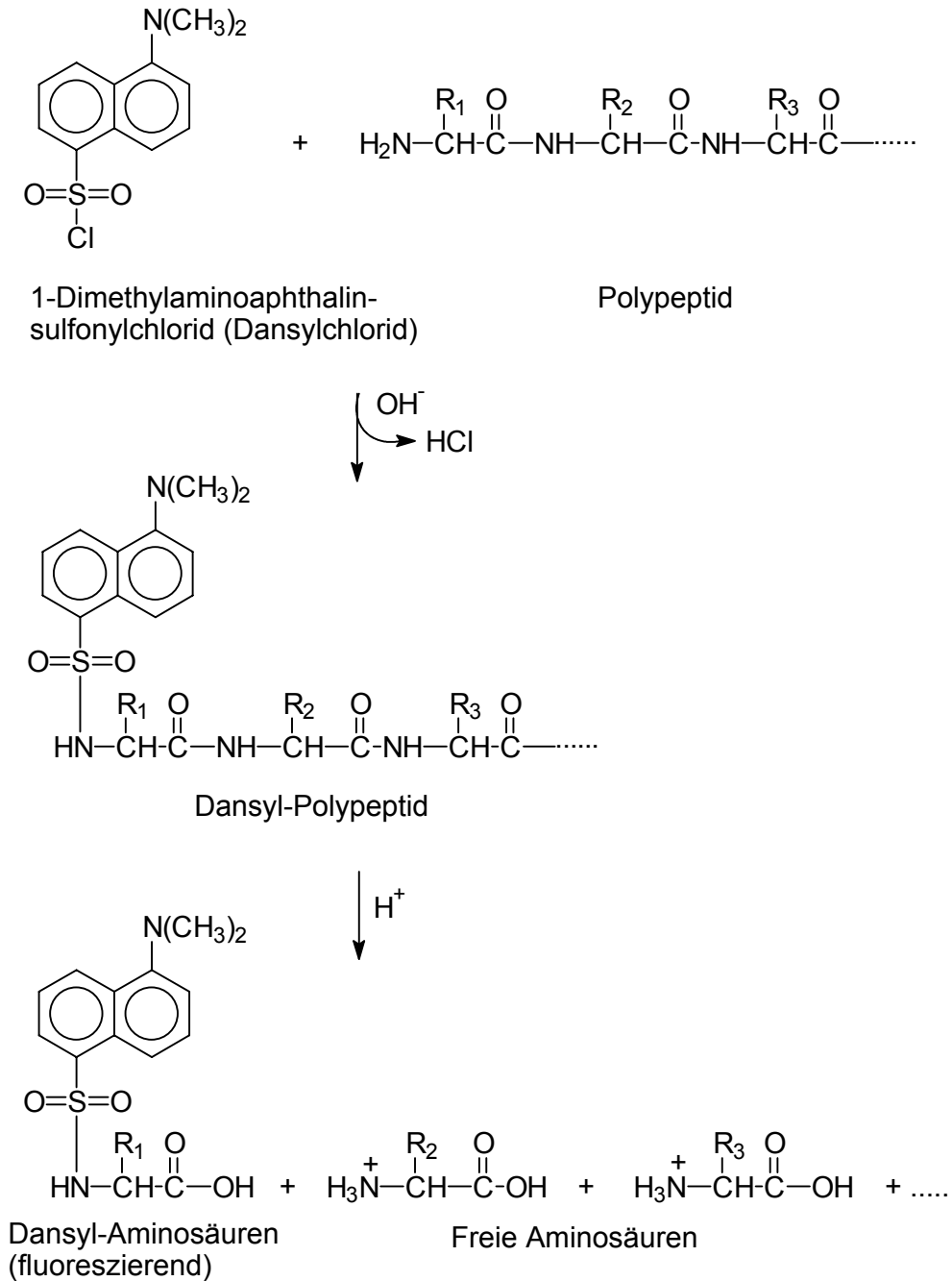
- a) Überbrückung der Spaltstellen des einen Satzes von Peptidfragmenten mit dem zweiten Satz.  

Durch Vergleich lassen sich die Sequenzen der Polypeptidfragmente der unterschiedlichen Spaltungen in der Folge ordnen, in der sie in der Untereinheit auftreten; hierdurch wird die AS-Sequenz etabliert.
- b) Zuordnung der vorhandenen Disulfidbrücken innerhalb und zwischen den Untereinheiten.



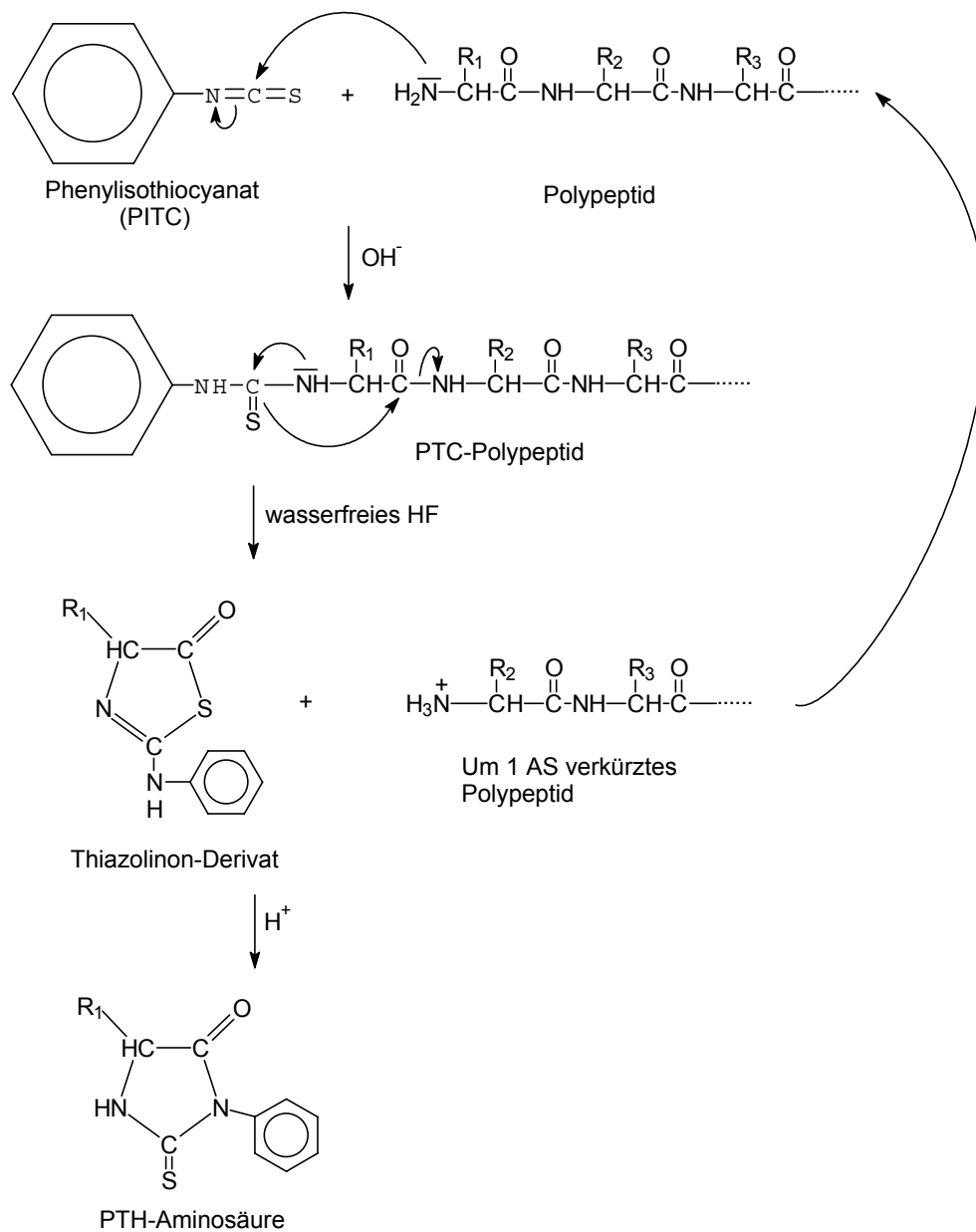
## B 1.2 Endgruppenbestimmung

### B 1.2.1 Identifikation des N-Terminus



**Dansylchlorid** reagiert mit primären Aminen unter Bildung von dansylierten Polypeptiden. Saure Hydrolyse entfernt den N-terminalen Rest als **Dansyl-Aminosäure**, die eine sehr intensive gelbe Fluoreszenz zeigt.

Beim **Edman-Abbau** (nach Pehr Edman) reagiert **Phenylisothiocyanat (PITC, Edman-Reagens)** bei milden alkalischen Bedingungen mit der N-terminalen Aminogruppe des Proteins unter Bildung eines Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Addukts. Dies wird mit wasserfreier Fluorwasserstoffsäure behandelt, wodurch der N-terminale Rest selektiv als Thiazolinon-Derivat abgespalten wird, ohne dass andere Peptidbindungen hydrolysiert werden. Es erfolgt die selektive Extraktion der **Thiazolinon-AS** mit einem organischen Lösungsmittel und die Überführung in das stabilere **Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivat** mittels wässriger Säure.



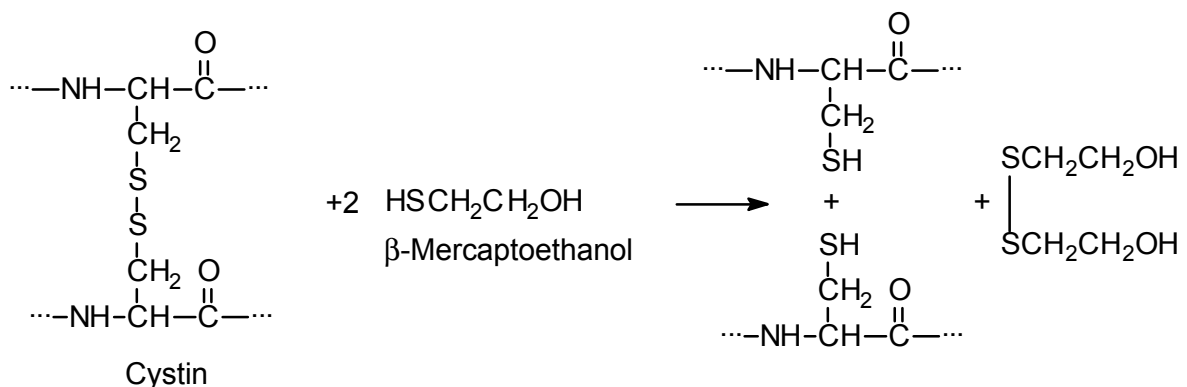
### B 1.2.2 Identifizierung des C-Terminus

**Exopeptidasen** sind Enzyme, die einen terminalen Rest von einem Polypeptid abtrennen, z. B. **Carboxypeptidasen**, die die Hydrolyse eines spezifischen C-terminalen Restes des Polypeptids katalysieren. (Anmerkung: **Aminopeptidasen** spalten AS ausgehend vom N-Terminus sequentiell ab.)

Eine chemische Möglichkeit zur Identifizierung C-terminaler Reste bildet die **Hydrazinolyse**. Dabei wird ein Polypeptid mit **Hydrazin** ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ;  $90^\circ\text{C}$ , 20 bis 100 h; saure Katalyse an einem Ionenaustauscher-Harz) behandelt. Dabei werden alle Peptidbindungen gespalten. Es entstehen die **Aminoacylhydrazide** aller AS-Reste mit Ausnahme des C-terminalen Restes, der als freie AS übrigbleibt und damit chromatographisch identifiziert werden kann.

### B 1.3 Spaltung der Disulfid-Bindungen

Disulfid-Bindungen können oxidativ mittels Perameisensäure oder reduktiv durch Mercaptane gespalten werden:



## B 2 Die Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur eines Polymers ist seine lokale Gerüstkonformation. Bei den Proteinen werden damit reguläre Faltmuster des Polypeptidgerüsts, wie Helices, Faltblattstrukturen und Windungen bezeichnet.



## B 2.1 $\alpha$ -Helix

Die  $\alpha$ -Helix wurde 1951 als erste hoch geordnete räumliche Struktur nah benachbarter AS-Reste an  $\alpha$ -Keratinen (= Strukturproteine von Haut, Haar, Horn, Federn und Wolle) entdeckt (Pauling und Corey). Folgende Eigenschaften sind charakteristisch:

- räumliche Struktur: Rechtswendelung des Polypeptid-Rückgrats (Längenverkürzung), Seitenketten der AS ragen nach außen
- Abmessungen:  $n = 3,6$  AS / Windung; Ganghöhe  $p = 0,54$  nm; AS-Abstand: 0,15 nm; innerer Durchmesser: 0,5 nm
- stabilisierende Kräfte: H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe des  $n$ ten Restes und der Aminogruppe des  $(n + 4)$ ten Restes.
- Eigenschaften: energieärmste Konformation der Polypeptidkette
- spontane Faltung, Stabilität, Starrheit

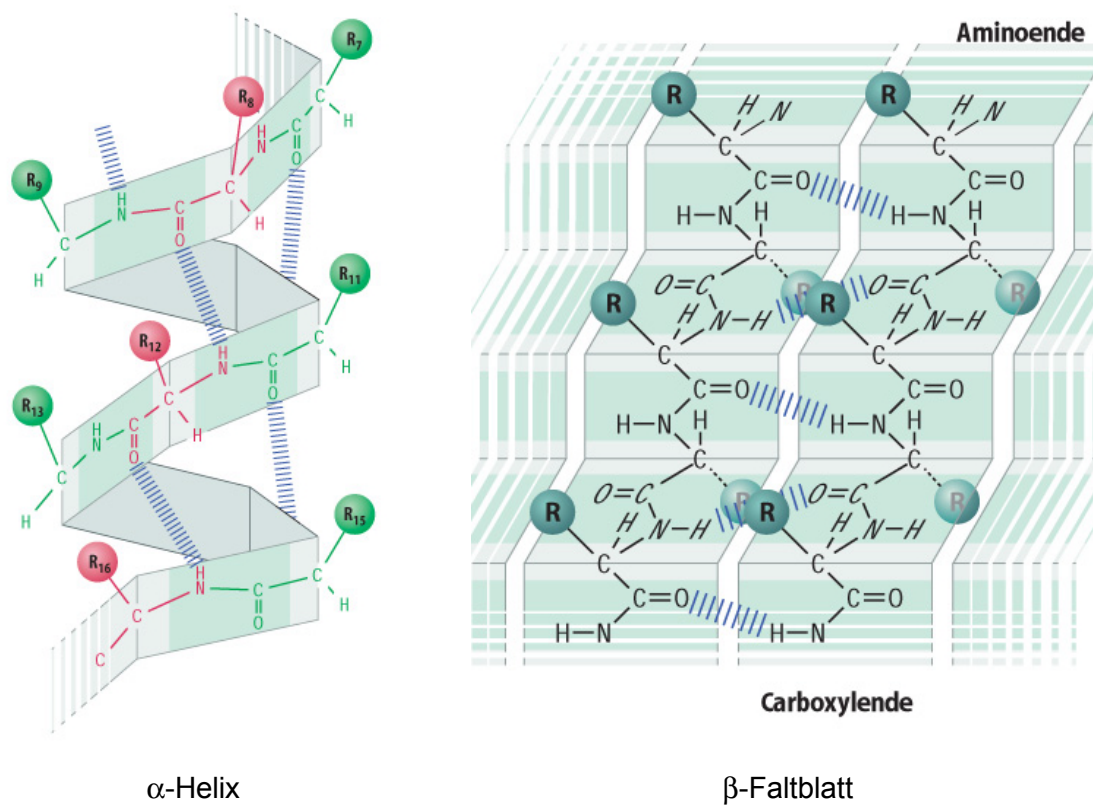
## B 2.2 $\beta$ -Faltblatt

Das  $\beta$ -Faltblatt (auch Pauling und Corey, 1951) ist das Hauptstrukturprinzip der  $\beta$ -Keratine (z. B. im Seidenfibroin). Seine Charakteristika sind:

- räumliche Struktur: Zickzack-Konformation des Polypeptid-Rückgrats, i. d. R. aus zwei bis fünf Strängen paralleler oder antiparalleler Kettenabschnitte, häufig etwas rechtgänglich verdrillt, Seitenketten ragen nach oben und unten aus der Faltblatt-Ebene heraus
- Stabilisierung durch H-Brücken zwischen Amino- und Carbonylfunktionen verschiedener Kettenabschnitte

Prinzipiell sind zwei aufeinanderfolgende AS meist in **trans** angeordnet, nur selten in **cis** (wegen sterischer Hinderung). Für den Fall des  $\beta$ -Faltblatts bedeutet dies, dass die Peptidbindung die Fläche des Blattes bildet, während am  $C\alpha$  der Knick im Faltblatt erfolgt.





### B 2.3 Nichtrepetitive Strukturen

**β- oder Haarnadelschleife:** abrupte Richtungsänderung der Polypeptidkette unter Ausbildung einer H-Brücke zwischen Carbonylfunktion von Rest  $n$  und Aminofunktion von Rest  $(n + 3)$ ; i. d. R. an Oberfläche globulärer Proteine; häufige Beteiligung an β-Faltblättern.

### B 2.4 Kollagen-Tripelhelix

Kollagen ist Strukturprotein unlöslicher, zugfester Fasern aller Formen des Bindegewebes (Knochen, Zähne, Sehnen, Bänder, Blutgefäße, Haut); in Säugern häufigstes Protein (ca.  $\frac{1}{4}$  des Gesamtproteingewichts).

Funktionen des Kollagens:

- Aufrechterhaltung des Zellverbandes in Geweben und Organen

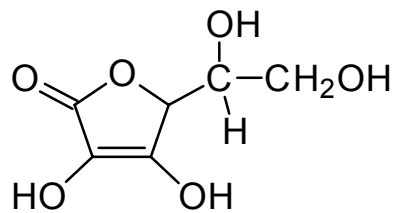


- Steuerung von Zellen während der Gewebeentwicklung

Es gibt ca. 10 Kollagen-Varianten; die Varianz beruht auf der Existenz mindestens 17 verschiedener Ketten; charakteristische AS-Zusammensetzung (30 % Gly, 15 – 30 % Prolin und 4-Hydroxyprolin [Hyp]) mit der Sequenz **Gly-X-Y** (X = häufig Pro, Y = häufig Hyp).

Aufbau des Tropokollagens (Grundstruktureinheit des Kollagens; im Typ I-Kollagen ein Stab der Länge 300 nm und der Breite 1,4 nm):

- 3 Typ II-trans-Helices (linksgängige Helices, durch sterische Behinderung der Pyrrolidinringe gestreckter als  $\alpha$ -Helices, 3 AS-Reste / Windung  $\Rightarrow$  alle Gly auf einer Seite) lagern sich aufgrund der geringen Raumerfüllung der Glycinreste eng und parallel aneinander und bilden leicht rechtsgewendelte Tripelhelix
- Stabilisierende Kräfte: intra- und interchenäre H-Brücken (auch Hyp beteiligt), Starrheit der Pyrrolidinringe trägt zur Versteifung bei



Ascorbinsäure (Vitamin C)

Umwandlung von Pro zu Hyp wird durch die **Prolyl-Hydroxylase** katalysiert. Diese benötigt Ascorbinsäure (Vitamin C), um enzymatisch aktiv zu sein. Bei der Vitamin C-Mangelerkrankung **Skorbut** kann das neu synthetisierte Kollagen keine normalen Fasern bilden. Daraus folgen die Skorbut-Symptome wie leicht lädierbare Haut, fragile Blutgefäße und schlecht heilende Wunden.

nächste Organisationsebene: Kollagenfibrille ( $\varnothing = 10 - 200$  nm):

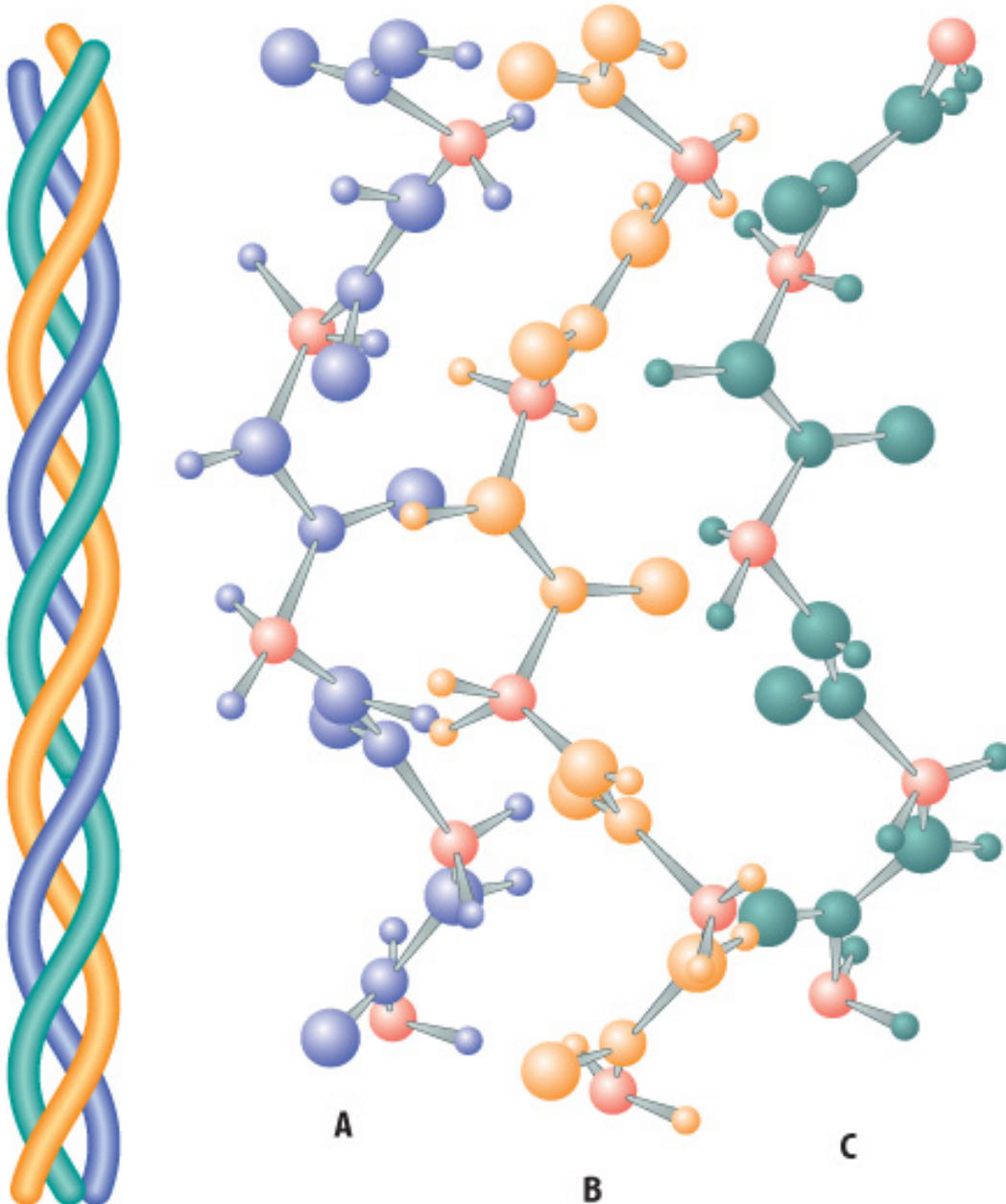
Bündel gestaffelt angeordneter Tropokollagen-Stäbe.

Die 40 nm-Lücke ist Kristallisationsursprung der Mineralisierung (Bildung von Hydroxylapatit,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ).



Stabilisierung durch schwefelfrei kovalente Quervernetzungen:

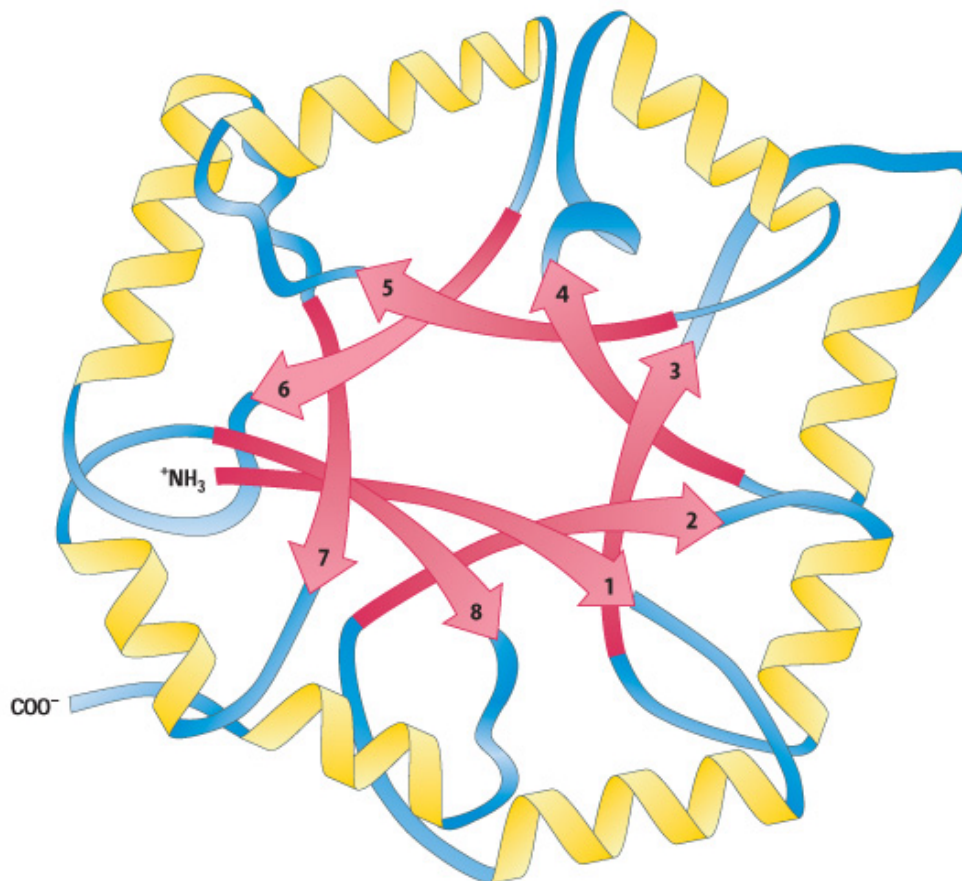
- intramolekular: oxidative Verknüpfung zweier Lys-Reste
- intermolekular: oxidative Verknüpfung eines Lys-Restes mit zwei Hyl-Resten



### B 3 Die Tertiärstruktur

Als **Tertiärstruktur** bezeichnet man die räumliche Anordnung aller Aminosäuren *einer* Kette unter Einbeziehung der Sekundärstrukturen. Die Tertiärstruktur entsteht **cotranslational**. Die Faltung der Polypeptidkette erfolgt spontan unter Einnahme des energieärmsten Zustandes oder mit Hilfe von Faltungshilfsproteinen (**chaperons**). Die Proteinfaltung ist ein von hydrophoben Kräften getriebener Prozess.

Tertiärstruktur der TIM



Folgende Kräfte sind an der Faltung beteiligt:

- Hydrophobe Wechselwirkungen:

Thermodynamische Grundlagen des Entropie-Effekts: Wasser bildet hochgeordnetes dreidimensionales Netzwerk, stabilisiert durch H-Brücken. Hydrophobe Moleküle können mit Wasser nicht wechselwirken  $\Rightarrow$  Aufbrechen von H-Brücken (Zunahme der Unordnung). Wasser hat die Tendenz, die Unordnung so gering wie möglich zu halten (Energie dazu stammt aus Bindungsenergien der H-Brücken)

$\Rightarrow$  Zusammenlagerung hydrophober Moleküle (weniger H-Brücken gesprengt als bei separierten Molekülen).

- Bei globulären Proteinen lagern sich hydrophobe Seitenketten zusammen und bilden einen hydrophoben Kern. Hydrophile Seitenketten wechselwirken mit Wasser unter Ausbildung von H-Brücken und bilden die hydrophile Peripherie  $\Rightarrow$  Wasserlöslichkeit globulärer Proteine.
- Jede Änderung der Lösungsmitelegenschaften hat Auswirkungen auf die Proteinkonformation, z. B. EtOH  $\Rightarrow$  Wechselwirkung mit hydrophoben Resten  
 $\Rightarrow$  Zerstörung der nativen Struktur.

- H-Brücken

- elektrostatische Kräfte:

ionische Wechselwirkungen (Salzbrücken): Wechselwirkung zwischen ionisierten Gruppen, z. B. Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> OOC-Glu; Beitrag zur Protein-Stabilisierung jedoch weniger stark

- Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (*van-der-Waals*-Kräfte): leisten einen signifikanten Beitrag
- kovalente Bindungen (Disulfidbrücken)

Globuläre Proteine mit über 150 AS-Resten bilden oft Domänen aus. Domänen sind kompakte, globuläre Bereiche mit häufig unterscheidbaren Funktionen, die sich autonom falten. In vielen Fällen geht eine Domäne auf ein Exon zurück.



## B 4 Die Quartärstruktur

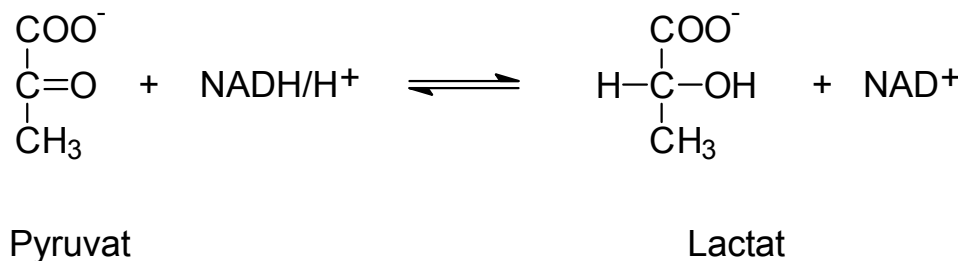
Unter Quartärstruktur versteht man die räumliche Beziehung von Untereinheiten eines globulären Proteins zueinander und die Art ihres Zusammenhalts.

Bei Proteinen mit Quartärstruktur (MW > 100 kDa) treten zwei oder mehrere identische und / oder nicht-identische Ketten mit eigener Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur zu einer Funktionseinheit zusammen. Voraussetzung für die Zusammenlagerung sind komplementäre Bereiche auf der Oberfläche der Untereinheiten (Ausbildung nicht-kovalenter, selten kovalenter Bindungen).

Die Quartärstruktur verleiht besondere funktionelle Eigenschaften (Biologische Aktivität, Flexibilität der Konformation, Regulierbarkeit).

Beispiele für Proteine mit Quartärstruktur:

- **Lactat-Dehydrogenase:** ubiquitäres Enzym der Glycolyse



Tetramer aus zwei verschiedenen 35 kDa-Untereinheiten (H-Kette, M-Kette); 5 verschiedene Tetramer-Typen (Isoenzyme) nachweisbar: H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>M, H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>, HM<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>.

Herzmuskel-Isoenzym (= Typ1-LDH): H<sub>4</sub>

- Eigenschaften:
- relativ hohe Affinität zu Substrat
  - allosterisch hemmbar durch Pyruvat
  - Katalyse begünstigt Pyruvat-Bildung (aerober Stoffwechsel des Herzmuskels erlaubt Pyruvat-Endoxidation)



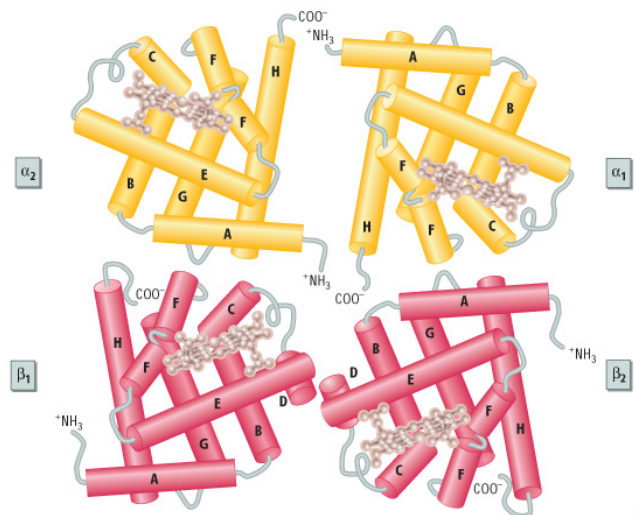
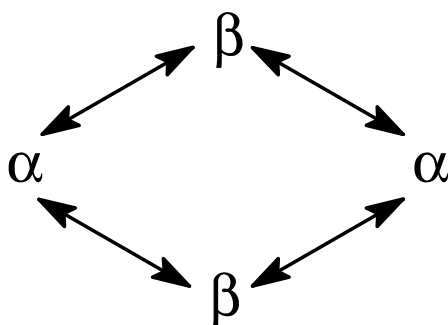
Skelettmuskel- und Leber-Isoenzym (= Typ5-LDH):  $M_4$

- Eigenschaften:
- relativ niedrige Affinität zu Substrat
  - **nicht** allosterisch hemmbar durch Pyruvat
  - Katalyse begünstigt Lactat-Bildung (anaerober Muskelstoffwechsel  $\Rightarrow$  NADH-Reoxidation an Pyruvat)

Die Eigenschaften der übrigen Isoformen werden durch die Anteile der einzelnen Ketten am Tetramer bestimmt ( $\Rightarrow$  LDH ist Beispiel dafür, wie die Quartärstruktur die Enzymaktivität beeinflusst).

- **Hämoglobin:**

Hämoglobin ist ein zusammengesetztes Transportprotein für  $O_2$  (aber auch  $CO_2$  und  $H^+$ ) und das intrazelluläre Hauptprotein der Erythrocyten (MW = 64,5 kDa). Es bildet ein Tetramer aus zwei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ -Kette,  $\beta$ -Kette) mit der Quartärstruktur  $\alpha_2\beta_2$  (= HbA; daneben gibt es noch zu 2 % Anteil am adulten Gesamthämoglobin HbA2 =  $\alpha_2\delta_2$ ; embryonale und fetale Hämoglobine). Die Untereinheiten werden nicht-kovalent zusammengehalten, jede  $\alpha$ -Kette wechselwirkt dabei mit zwei  $\beta$ -Ketten:

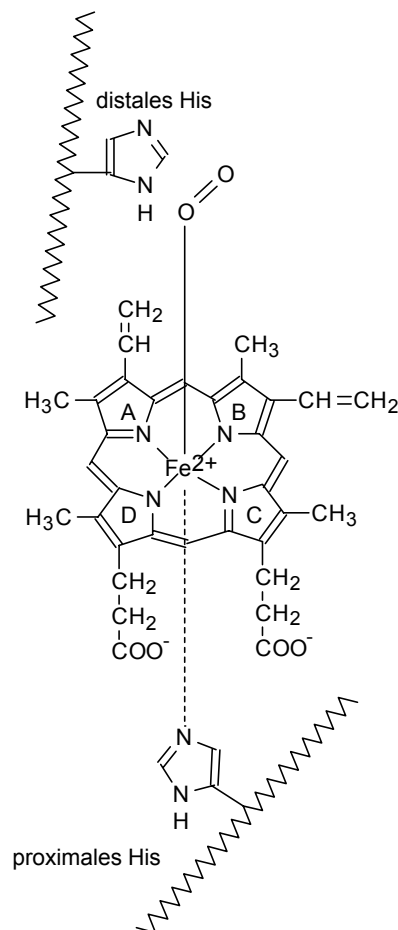


Hauptfunktion: Erhöhung der  $O_2$ -Konzentration ( $10^{-4} M \rightarrow 10^{-2} M$ ) und Beschleunigung des  $O_2$ -Transports im Blut (Diffusion nicht ausreichend zur Versorgung der Gewebe).

Jede Kette ist aus einem Proteinanteil (= Apoprotein) und einem Nicht-Proteinanteil (= prosthetische Gruppe), dem Häm, zusammengesetzt.

### Apoprotein + prosthetische Gruppe = Holoprotein

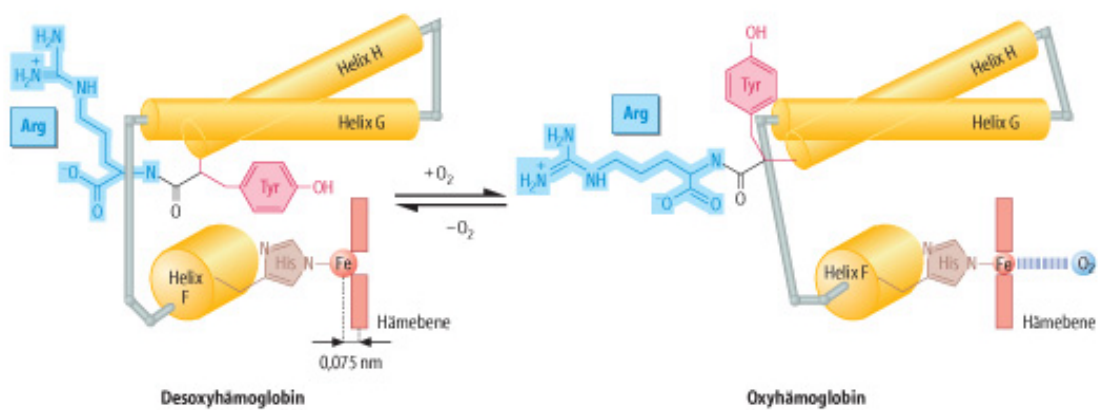
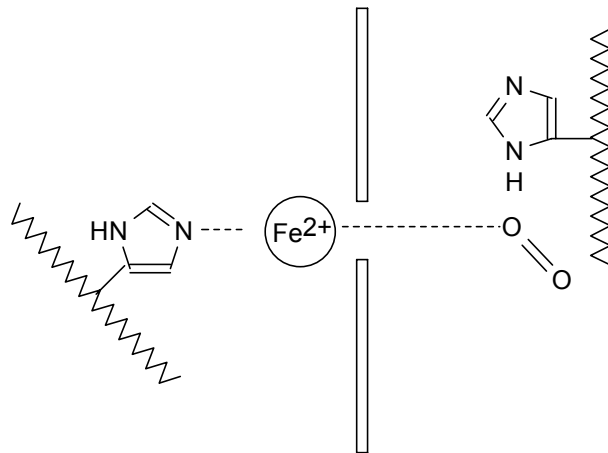
Das Häm ist die  $O_2$ -bindende chromophore Gruppe. Es besteht aus einem organischen Protoporphyrin (= cyclische Tetrapyrrolstruktur) mit 4 Methyl-, 2 Vinyl- und 2 Propionat-Seitenketten in nur einer natürlich vorkommenden Konstellation (= Protoporphyrin IX) und einem zentralen Eisenion mit 6 Koordinationsstellen (Ferri- und Ferro-Form):



Über die Koordinationsstellen 5 und 6 erfolgt die Bindung ans Apoprotein. Das Häm liegt in einer Spalte des Apoproteins, die Propionatreste ragen zur Moleküloberfläche.



Lage des Eisens relativ zur Häm-Ebene:



Besetzung der 6. Koordinationsebene:

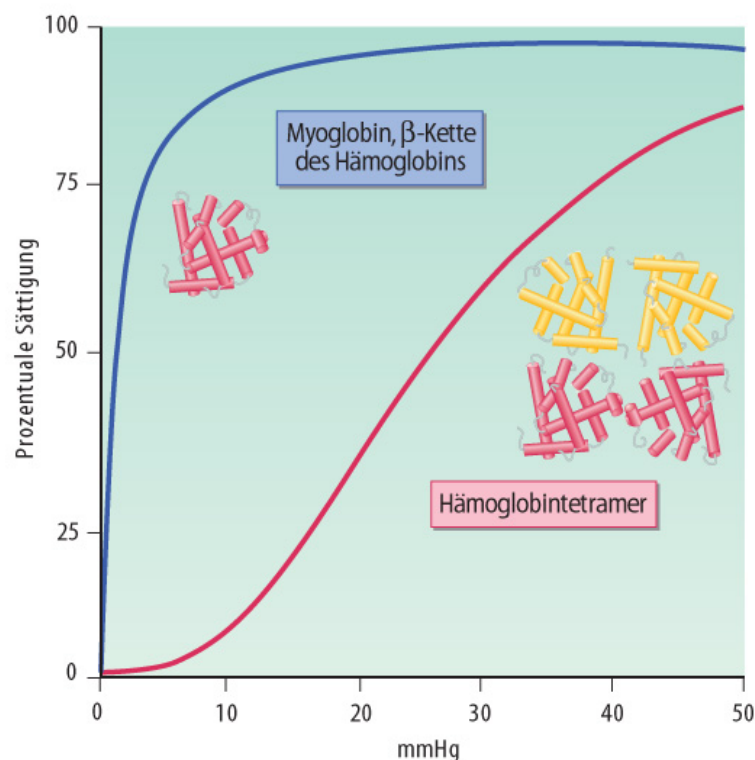
- Desoxy-Hb: leer
- Oxy-Hb: O<sub>2</sub>
- Met-Hb: H<sub>2</sub>O



Folge der Oxygenierung (keine Oxidation) des Häms: Änderung der  $e^-$ -Konfiguration des Häm-Eisens

- ⇒ sichtbarer Farbwechsel des Blutes von dunkelpurpur (venös) zu leuchtend scharlachrot (arteriell)
- ⇒ Schrumpfung des Eisenions und Bewegung in Häm-Ebene hinein ⇒ Übertragung der Bewegung auf Globin-Kette über proximales His ⇒ Aufbrechen von Salzbrücken zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten ⇒ konformative Entspannung des Moleküls und Erleichterung der Anlagerung weiterer  $O_2$ -Moleküle (**Kooperativität**)

Die Kooperativität der Sauerstoffanlagerung drückt sich im sigmoiden Verlauf der Sauerstoffdissoziationskurve aus:



$p_{50}$  ist Ausdruck für Sauerstoffaffinität:

$p_{50_{\text{Myoglobin}}} = 1 \text{ Torr}$ ;  $p_{50_{\text{Hämoglobin}}} = 26,6 \text{ Torr}$

$p_{O_2}$  in den Kapillaren = 20 Torr ⇒ Hämoglobin wird desoxygeniert

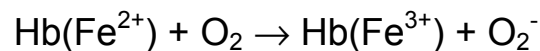
$p_{O_2}$  in den Lungenalveolen = 100 Torr ⇒ Hämoglobin wird oxygeniert



Vorteil der Kooperativität: schnelle und flexible Änderung der Sauerstoff-Sättigung in Abhängigkeit von der Änderung des  $pO_2$  (im Gegensatz zum Myoglobin, welches über einen weiten Bereich des  $pO_2$  in oxygenierter Form vorliegt und einen hyperbolischen Kurvenverlauf aufweist).

Kleine Moleküle (CO, NO,  $H_2S$ ) binden stärker an Häm als  $O_2 \Rightarrow$  Toxizität

Methämoglobin-Bildung: durch hohe  $O_2$ -Partialdrücke im Erythrocyten wird Fe(II) oxidiert :

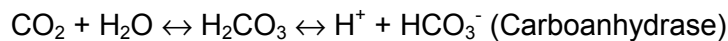


(Superoxid-Ion wird durch Superoxid-Dismutase und Katalase zu Wasser reduziert)

Methämoglobin ist schwarzbraun und nicht mehr imstande, Sauerstoff zu binden. Im Erythrocyten wird Methämoglobin durch die Methämoglobin-Reduktase NADH-abhängig wieder reduziert.

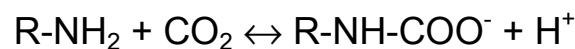
### Allosterische Regulation des $O_2$ -Transports:

- $H^+$  und  $CO_2$ : beide Regulatoren stehen miteinander im Gleichgewicht:



$H^+$  und  $CO_2$  binden an Aminosäuren der Globinkette:

Carbamat-Bildung des  $CO_2$  (10-15 % des  $CO_2$ ; 90 % werden als  $HCO_3^-$  und 10 % physikalisch gelöst im Blut transportiert) mit nicht-ionisierten N-Termini:

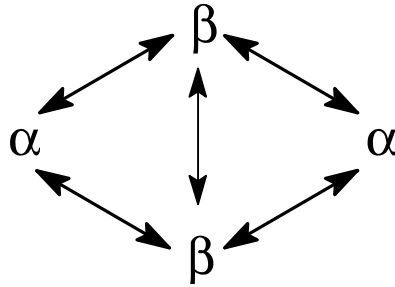


Neben der Carbamat-Bildung führt auch die Protonierung von Histidin-Resten und N-Termini zur Bildung von Salzbrücken  $\Rightarrow$  Zunahme der konformativen Spannung im Hb-Molekül  $\Rightarrow$  Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve nach rechts (**Bohr-Effekt**).  
Bedeutung für  $O_2$ -Versorgung im Gewebe: im Gewebe herrscht ein hoher  $CO_2$ -Partialdruck und damit eine hohe Protonenkonzentration, was die Desoxygenierung des Hämoglobins begünstigt.



- **2,3-Bisphosphoglycerat:**

2,3-BPG entsteht im Erythrocyten-Stoffwechsel mit Hilfe der Bisphosphoglycerat-Mutase aus 1,3-Bisphosphoglycerat und stellt damit einen Nebenweg der Glycolyse dar (Abbau zu 3-Phosphoglycerat mittels 2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase unter Umgehung des energieliefernden Schrittes). Es lagert sich zentral in Desoxy-Hb-Tetramer ein  $\Rightarrow$  Quervernetzung der  $\beta$ -Ketten:



Die Quervernetzung führt zur Zunahme der konformativen Spannung  $\Rightarrow$  Ausbildung der Hb-typischen sigmoiden Sauerstoffdissoziationskurve (ohne 2,3-BPG hätte Hb eine hyperbolische Sauerstoffdissoziationskurve wie Myoglobin)

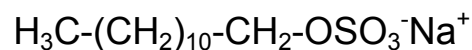
## C Denaturierung und Renaturierung von Proteinen

### C 1 Denaturierung von Proteinen

Als Denaturierung bezeichnet man den Verlust der nativen Konformation eines Proteins, wobei i. d. R. auch die biologische Aktivität verloren geht. Die Ursache dafür liegt in der Störung der stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen den AS eines Proteins (nicht-kovalente Bindungen, Disulfidbrücken). Dies führt zur Entfaltung der Ketten  $\Rightarrow$  Änderung der Viskosität (Coagulation = Ausflockung) und der UV-Absorptionseigenschaften. Jede partielle Entfaltung destabilisiert die Reststruktur  $\Rightarrow$  **Denaturierung ist kooperativ**.

Arten denaturierender Bedingungen:

- Temperaturerhöhung: sprengt sämtliche nicht-kovalenten Bindungen (Zunahme der Molekularbewegung)
- Schmelztemperatur (=  $T_m$ ) der meisten Proteine liegt zwischen 40 und 100°C
- Säuren / Basen: Protonierungen / Deprotonierungen unterbinden Salz- und H-Brücken zwischen den AS-Seitenketten
- Detergentien (Seifen):  
lagern sich an hydrophobe Reste an und unterbinden hydrophobe Wechselwirkungen; dabei sind schon geringste Konzentrationen (bis  $10^{-6}$  M) meist irreversibel wirksam, z. B. SDS



- hohe Konzentrationen wasserlöslicher organischer Substanzen (z. B. aliphatische Alkohole): senken die Hydrophilie des Lösungsmittels und wechselwirken mit hydrophoben Resten  $\Rightarrow$  hydrophober Kern globulärer Proteine gelangt an Oberfläche
- Salze: sehr unterschiedliche Wirkungen
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  stabilisieren die native Proteinstruktur
- KCl und NaCl verhalten sich beinahe neutral
- KSCN, LiBr und  $\text{CaCl}_2$  wirken denaturierend (sog. chaotrope Ionen)
- 8M Harnstoff und 6M Guanidin-HCl:  
Wirkung bis heute wenig verstanden, spalten nicht-kovalente Bindungen
- Perameisensäure und Mercaptane:  
oxidative (irreversible) und reduktive (reversible) Spaltung von Disulfidbrücken

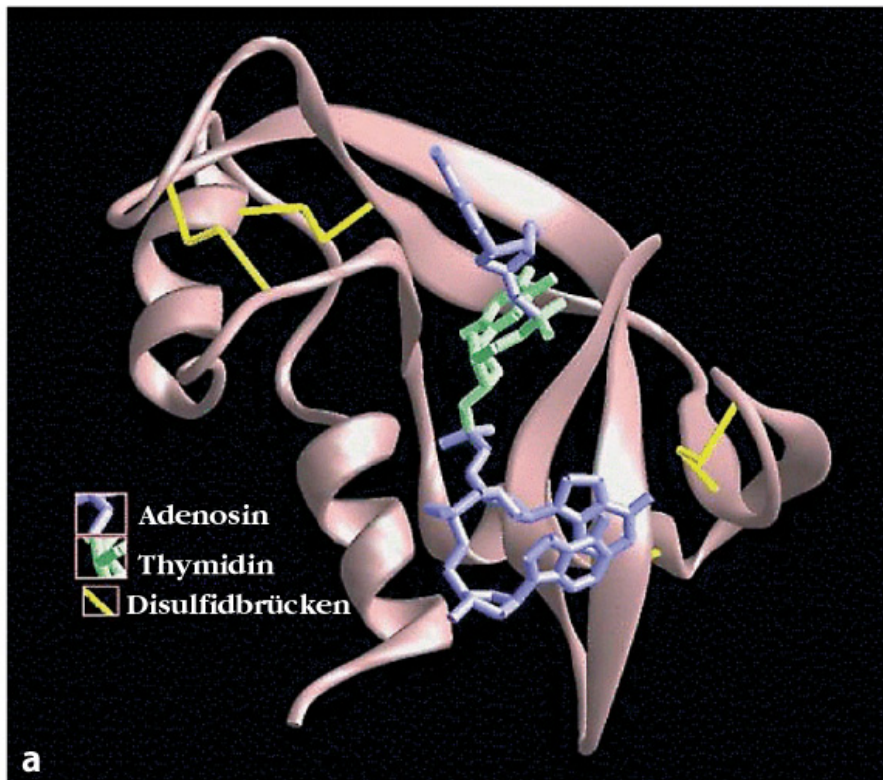


## C 2 Renaturierung von Proteinen

Unter Renaturierung versteht man die Wiederherstellung der nativen Proteinkonformation und der biologischen Aktivität.

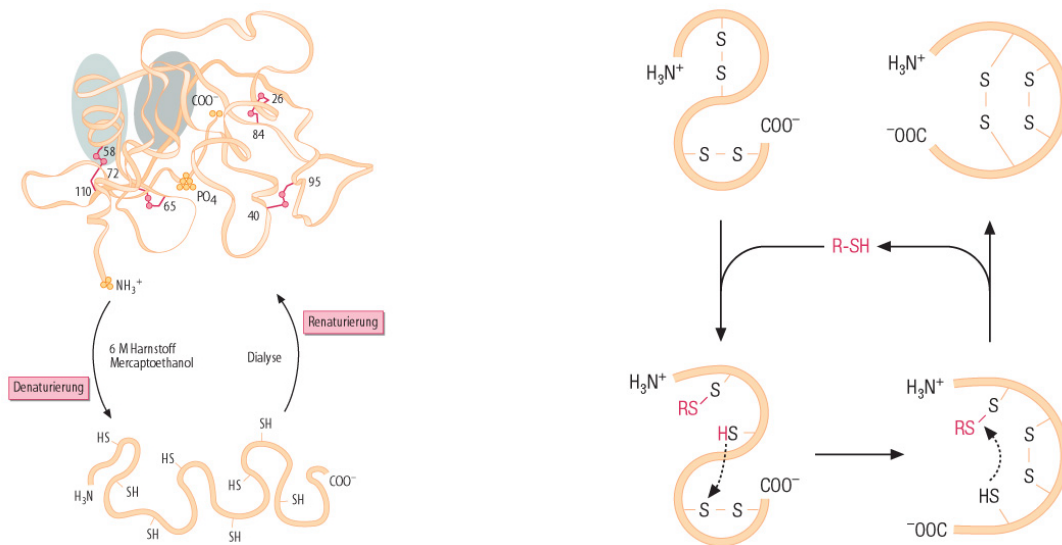
- **Rnase A: Anfinsen 1957**

Rnase A ist ein RNA-hydrolysierendes Enzym, das ubiquitär intrazellulär vorkommt und außerdem als Verdauungsenzym eine Rolle spielt; Monomer aus 124 AS mit vier Disulfidbrücken



Denaturierung mit Harnstoff und 2-Mercaptoethanol führt unter Lösung der Disulfidbindungen zur vollständigen Entfaltung des Enzyms (Verlust der Aktivität).

- Reoxidation der Disulfidbrücken mit Luft-O<sub>2</sub> (Inkubation an Luft bei pH 8):  
in Gegenwart von Harnstoff: falsche Disulfidbindungen führen zur Bildung von *scrambled* RNase; Renaturierung durch Zusatz katalytischer Mengen 2-Mercaptoethanol (führt zu intermediärer Bildung gemischter Disulfide), Dauer: ca. 10h
- in Abwesenheit von Harnstoff: vollständige Renaturierung



theoretische Wahrscheinlichkeit der spontanen Renaturierung:

$$P_1. \text{ Cystinbrücke} = 1/7$$

$$P_2. \text{ Cystinbrücke} = 1/5$$

$$P_3. \text{ Cystinbrücke} = 1/3$$

$$P_4. \text{ Cystinbrücke} = 1/1$$

$$\Rightarrow P_{\text{vollst. Renaturierung}} = 1/7 \times 1/5 \times 1/3 \times 1! = 1/105$$

Interpretation: native Konformation ist die energieärmste und damit stabilste; die Information für die Ausbildung dieser Konformation liegt allein in der AS-Sequenz.

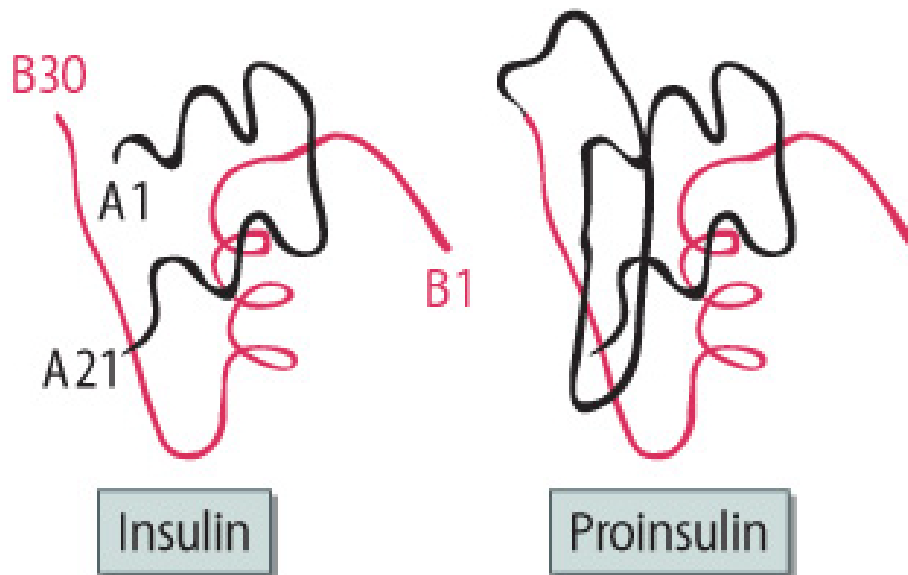
Proteindisulfid-Isomerase: ubiquitäres intrazelluläres Enzym, das *in vivo* die Bildung korrekter Disulfidbrücken innerhalb weniger Minuten katalysiert.



- **Insulin**

Proteohormon der  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas; Heterodimer aus einer A-Kette (21 AS) und einer B-Kette (30 AS).

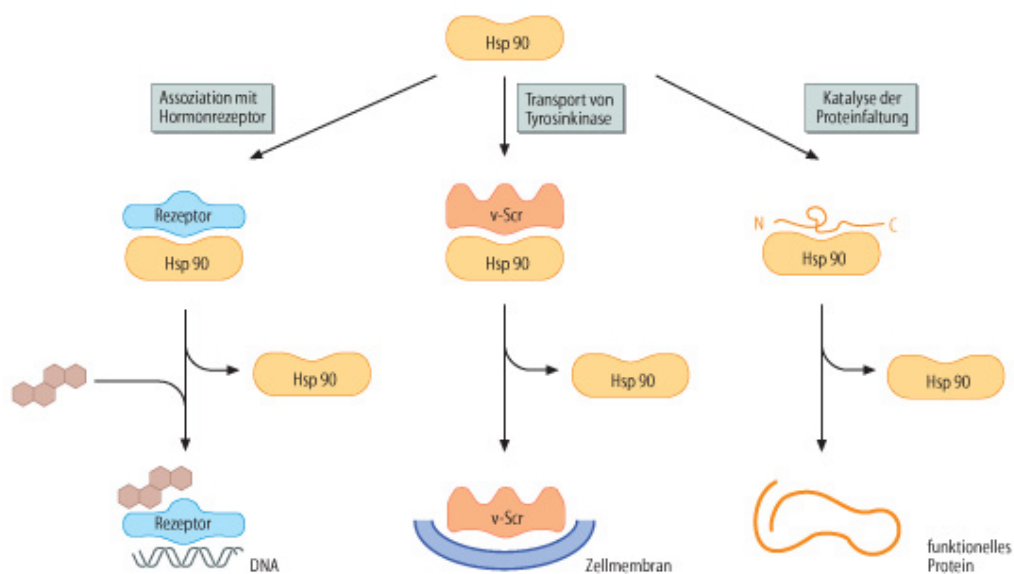
Nach Lösen der Disulfidbrücken ist Insulin selbst in Gegenwart der Proteindisulfid-Isomerase nicht mehr renaturierbar; Isomerase *in vivo* aber an der Bildung der nativen Disulfidbrücken beteiligt  $\Rightarrow$  Insulin muss intrazellulär in anderer Form vorliegen  $\Rightarrow$  Proinsulin: Monomer, bei dem A- und B-Kette über C-Peptid (=connecting; 33 AS) verknüpft sind; vor der Sekretion wird dieses Peptid durch limitierte Proteolyse entfernt.



### C 3 Chaperone

Molekulare Chaperone (engl.: „Anstandsdamen“) sind die wichtigsten Katalysatoren der Proteinfaltung *in vivo*. Sie wurden bereits in den 1960er Jahren in Larven der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als sog. *Hitzeschock*-Proteine entdeckt. Sie

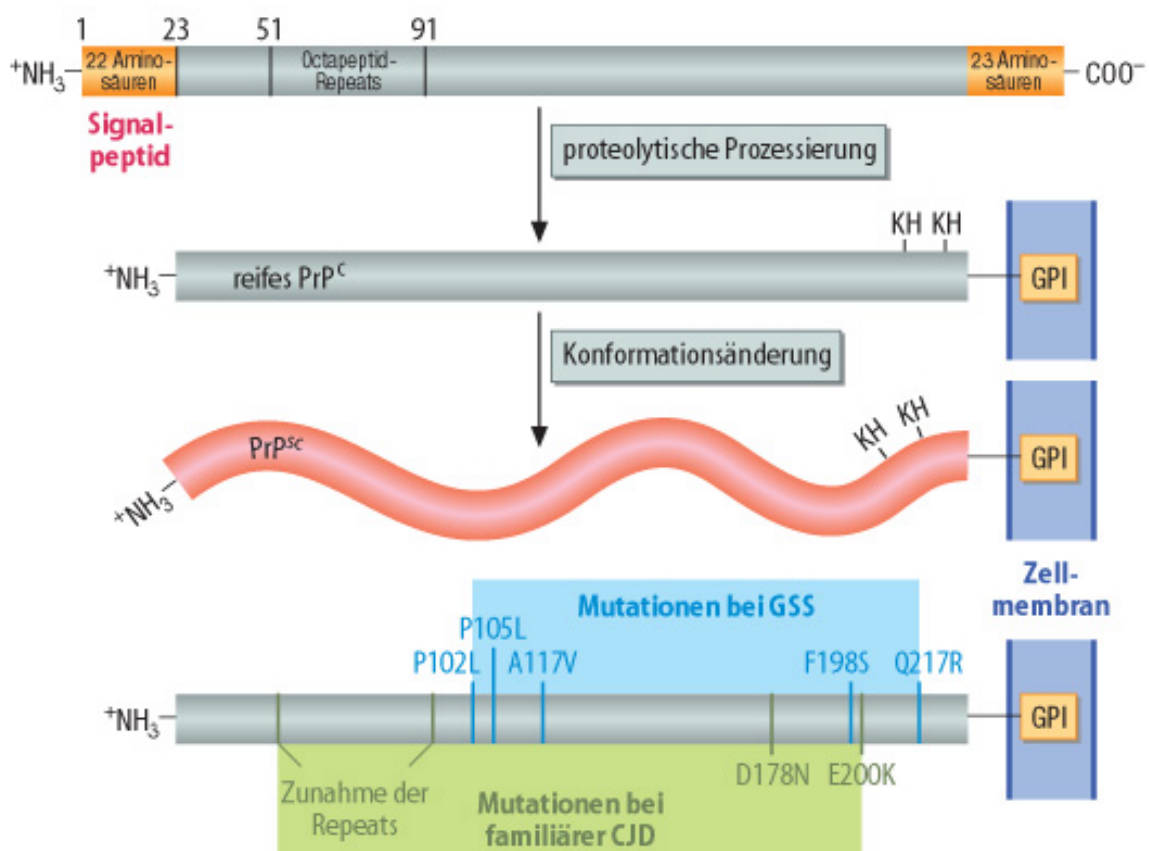
- hemmen die Proteinaggregation während der Proteinfaltung.
- hemmen die Aggregation während der Entfaltung eines Proteins,
- beeinflussen die Ausbeute und Kinetik während der Proteinfaltung und
- wirken in nahezu stöchiometrischem Verhältnis zu den Proteinen.





## C 4 Prionerkrankungen

Die als bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bekannt gewordene Prionerkrankung von Rindern wird vermutlich durch ein falsch gefaltetes Protein, PrP<sup>sc</sup>, verursacht. Es bewirkt die Umwandlung der gesunden Form, PrP<sup>c</sup>, das aus einer identischen Aminosäuresequenz besteht, in die krankmachende Form. Möglicherweise spielen bei der dabei stattfindenden Konformationsänderung von  $\alpha$ -Helix- in  $\beta$ -Faltblattstrukturen Chaperone eine Rolle.



Umwandlung von PrP<sup>c</sup> zu PrP<sup>sc</sup>, dem Auslöser von BSE

## D Methoden der Proteintrennung

Die verschiedensten Methoden zur Proteintrennung stellen einen wichtigen Teil der Arbeit in einem biochemischen Labor dar. Um ein Protein näher charakterisieren zu können, muss es in möglichst sauberer Form vorliegen, d. h. es muss von Verunreinigungen (z. B. andere Proteine, Zucker, Nukleinsäuren) befreit werden. Viele dieser Techniken finden routinemäßig auch in der klinischen Analyse Verwendung. Die Charakteristika der Proteine oder anderer Biomoleküle, auf denen die verschiedenen Trennverfahren basieren, sind Löslichkeit, Ionenladung, Molekülgröße, Adsorptionseigenschaften und Bindungsaffinität für andere Biomoleküle.

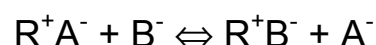
### Chromatographische Trennverfahren

1903 beschrieb der russische Botaniker Mikhail Tswett die Trennung von gelösten Pigmenten aus Pflanzenblättern unter Verwendung fester Adsorbentien. Er gab diesem Prozess den Namen **Chromatographie** (griech.: *chroma*, die Farbe; *graphein*, schreiben), wahrscheinlich aufgrund der farbigen Banden, die sich bei der Pigmenttrennung am Adsorbens gebildet hatten (möglicherweise auch, weil Tswett im Russischen „Farbe“ bedeutet).

In der Chromatographie wird prinzipiell das zu trennende Substanzgemisch in einer Flüssigkeit (= **mobile Phase**) gelöst. Die resultierende Lösung lässt man durch eine Säule (= **stationäre Phase**) sickern. Die Trennung kommt durch unterschiedlich starke **Wechselwirkungen** der verschiedenen gelösten Stoffe mit den beiden Phasen zustande.

### D 1 Trennung nach Ladung - Ionenaustausch-Chromatographie

Im Ionenaustausch-Prozess werden Ionen, die elektrostatisch an **eine unlösliche und chemisch inerte Matrix** gebunden sind, reversibel durch Ionen des Lösungsmittels verdrängt:



R<sup>+</sup>: **Anionenaustauscher**, der A<sup>-</sup> bindet; B<sup>-</sup>: Anionen in der Lösung

**Kationenaustauscher**: *vice versa*



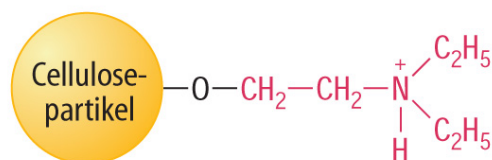
Die Bindung eines Proteins (**Polyelektrolyt**) an einen Ionenaustauscher ist vom pH-Wert und der Salzkonzentration des Lösungsmittels abhängig. Will man ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch reinigen, so werden auch unerwünschte Proteine an die Säule gebunden. Bei der **Elution** der Säule bewegen sich Proteine mit geringer Affinität zum Ionenaustauscher schneller durch die Säule als Proteine mit höherer Affinität. Durch einen **Fraktionssammler** kann eine weitere Reinigung des Proteins erzielt werden. Der Reinigungsprozess kann durch **Gradienten-Elution** der proteinbeladenen Säule noch verbessert werden: kontinuierliche Variation des pH-Werts oder der Salzkonzentration des Elutionspuffers.

Drei Materialien sind gebräuchliche Matritzen für Ionenaustauscher:

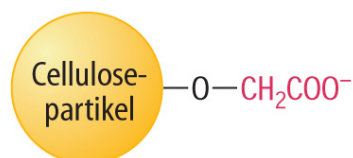
- **Harze wie Polystyrol, das mit Divinylbenzol vernetzt ist**
- **Cellulose**
- **vernetzte Polyacrylamid- oder Polydextran-Gele**

häufigster Anionenaustauscher: **Diethylaminoethyl-(DEAE)-Cellulose**

häufigster Kationenaustauscher: **Carboxymethyl-(CM)-Cellulose**



**Diethylaminoethyl (DEAE)**



**Carboxymethyl (CM)**

## D 2 Trennung nach Größe

### D 2.1 Gelfiltrations-Chromatographie

Bei der **Gelfiltrations-Chromatographie**, auch **Ausschluß-Chromatographie** oder **Molekularsieb-Chromatographie** genannt, werden Moleküle nach ihrer Größe und Form getrennt. Die stationäre Phase besteht hier aus Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten Materials mit relativ konstanter molekularer Porenweite.

**Ausschlussgrenze** des Gels: molare Masse des kleinsten Moleküls, das nicht mehr die Poren eines gegebenen Moleküls durchdringen kann.

Elution: Moleküle, deren molare Massen unterhalb der Ausschlussgrenze des Gels liegen, werden mit abnehmender Molekülgröße vom Gel eluiert, d. h. die größten Moleküle erscheinen zuerst.

Die Gelfiltrations-Chromatographie erlaubt die ungefähre **Abschätzung molarer Massen**, da über einen relativ großen Molekulargewichtsbereich eine lineare Beziehung zwischen dem relativen Elutionsvolumen  $V_e$  einer Substanz und dem Logarithmus seiner molaren Masse besteht.

Materialien zur Herstellung chromatographischer Gele:

- **Dextran (hochmolekulares Glucose-Polymer aus *Leuconostoc mesenteroides*)**
- **Agarose (lineares Polymer aus roten Algen)**
- **Polyacrylamid**

Dextran- und Polyacrylamidgele können mit ionisierbaren Gruppen wie DEAE und CM derivatisiert werden und damit als Ionenaustauschgele eingesetzt werden. Die Trennung erfolgt dann nach ionischen Ladungen *und* Größe bzw. Form einer Substanz.



## D 2.2 Dialyse

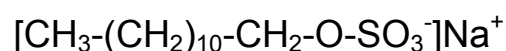
Die **Dialyse** ist ein Trennverfahren, das mittels **semipermeabler Membranen** Moleküle gemäß ihrer Größe trennt; die Größe der Membranporen liegt dabei unterhalb makromolekularer Abmessungen. So können kleine Moleküle wie z. B. Lösungsmittel, Salze und Metaboliten durch die Membran **diffundieren**, während Größere zurückgehalten werden. Meist wird **Cellophan** (Cellulose-Acetat) als Dialyse-Membran benutzt, aber auch **Nitrocellulose** oder **Kollodium**.

Dialyse (die nicht zu den Chromatographien zählt) wird routinemäßig angewendet, um das Lösungsmittel von Makromolekülen zu wechseln.

## D 2.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die **Gelelektrophorese** zählt zu den effektivsten und einfachsten Trennmethoden für Makromoleküle. Gele zur Proteinauftrennung bestehen aus **Polyacrylamid**, das zu einem bestimmten Grad **vernetzt** wurde. Dadurch wird die Beweglichkeit großer Moleküle relativ zu kleineren Molekülen herabgesetzt (also genau umgekehrt wie bei der Gelfiltrations-Chromatographie), d. h. kleine Moleküle durchlaufen in einer definierten Zeitspanne weitere Strecken als große Moleküle.

### Natriumdodecylsulfat (SDS)



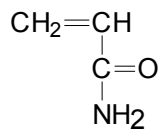
ist ein **Detergens**, das sehr fest an Proteine bindet, diese denaturiert und in eine stabähnliche Form zwingt. Dabei binden 1,4 g SDS / g Protein, also etwa 1 SDS-Molekül / 2 AS-Resten. Die große negative Ladung, die SDS auf das Protein überträgt, maskiert dessen eigentliche Ladung, sodass SDS-beladene Proteine nahezu identische **Ladung-Masse-Verhältnisse und ähnliche Form** aufweisen. Die Elektrophorese in einem SDS-haltigen Gel trennt Proteine daher aufgrund der **Siebeffekte** in der Reihenfolge ihrer molarer Massen. Durch Vergleich mit Standard-Proteinen bekannter molarer Masse lässt sich die Größe eines Proteins recht genau abschätzen.



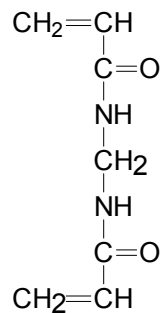
Viele Proteine bestehen aus mehreren Polypeptidketten. SDS zerstört nur die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen diesen Untereinheiten. **Mercaptoethanol** reduziert **Disulfidbrücken** zwischen Untereinheiten. Durch SDS-PAGE in Gegenwart des Reduktionsmittels erhält man auch die molaren Massen der ursprünglich kovalent verknüpften Untereinheiten.

Proteinbanden sind auf dem Gel primär nicht sichtbar. Sie müssen erst durch spezielle Methoden gefärbt werden. Dies erfolgt meist mit **Coomassie Brilliant Blue** oder der etwa 100-fach sensibleren **Silberfärbung**.

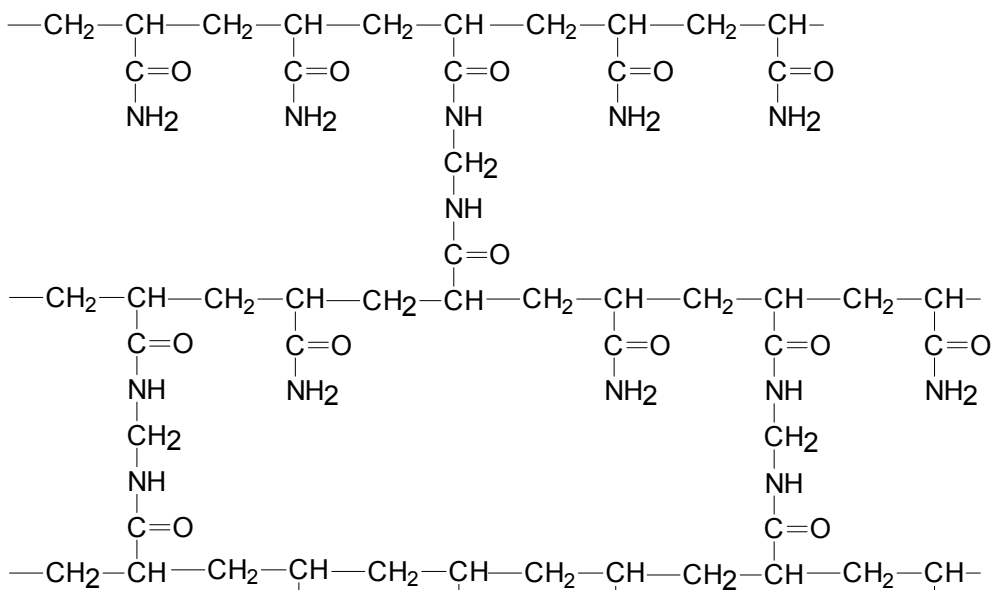
Acrylamid

*N,N'*-Methylenbisacrylamid

+



+ freier Radikal-Katalysator



## D 2.4 Trennung nach Ligandenspezifität - Affinitätschromatographie

Wird eine ungereinigte Proteinlösung über ein **Affinitätsgel** geschickt, bindet das gewünschte Protein an den fixierten **Ligand**, wogegen andere Substanzen mit dem Puffer von der Säule gewaschen werden. Das gesuchte Protein kann nun in angereicherter, oft hochgereinigter Form isoliert werden, indem es unter geeigneten Elutionsbedingungen von der Affinitätsmatrix abgelöst wird. Der große Vorteil der Affinitätschromatographie besteht in der Möglichkeit, spezifische biochemische Eigenschaften des jeweiligen Proteins auszunutzen, anstatt wie bei den anderen chromatographischen Methoden relativ geringfügige physikalisch-chemische Unterschiede zu verwenden.

Als Matrix wird meist **Agarose** verwendet, an die der Ligand gekoppelt wurde:

1. **Aktivierung** der Agarose mit **Bromcyan**
2. Ligand bildet eine **kovalente Bindung** an die aktivierte Agarose aus

**Spacer**: wirkt sterischer Hinderung entgegen:

**Diamin** wird mittels Bromcyan durch  $\omega$ -Aminoalkylierung an die Agarose gekoppelt; daran wird schließlich der Ligand gekoppelt.

Verschiedene Elutionsmöglichkeiten:

- **Kompetitive Elution:**

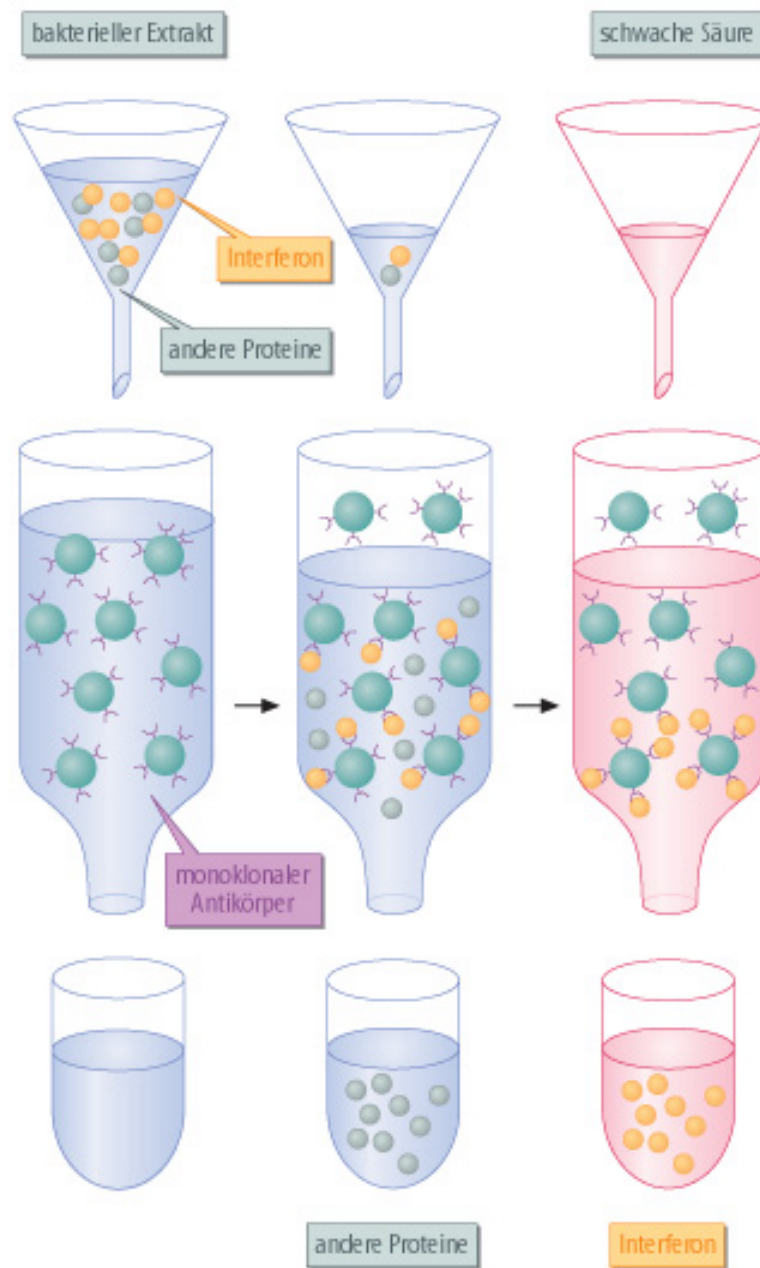
Elutionspuffer enthält freien Liganden oder Substanzen, die eine höhere Affinität für die Proteinbindungsstelle besitzen als der immobilisierte Ligand

- **Elution durch Veränderung der Eigenschaften der mobilen Phase**, z. B. pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur

- **Strip-Elution:**

Manchmal besteht die Möglichkeit, den immobilisierten Liganden zusammen mit dem gebundenen Protein von der Matrix abzuspalten. Das Protein liegt dann im Eluat an den Liganden gekoppelt vor.



**Immunaффinitäts-Chromatographie:** basiert auf der Antikörperspezifität

Aффinitätsreinigung eines rekombinant exprimierten Proteins mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers.