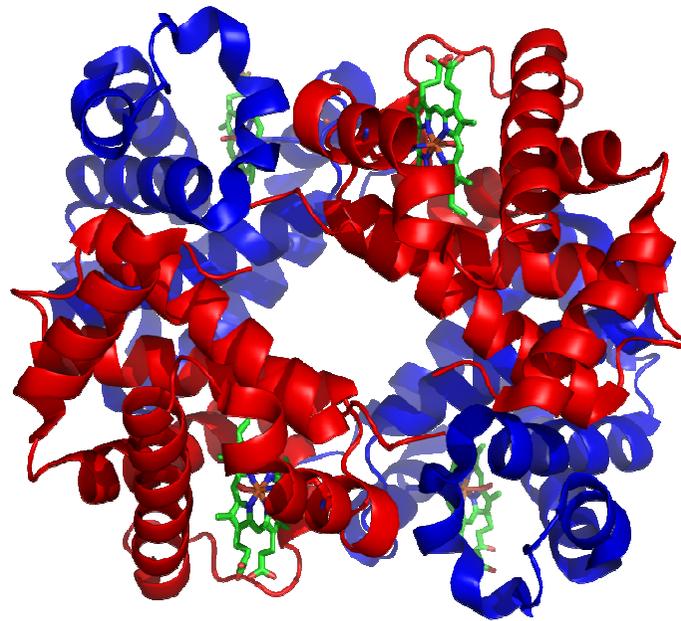


Strukturaufklärung von Fe²⁺- Proteinen



Eine Präsentation von Felix
Kockmann

Inhalt

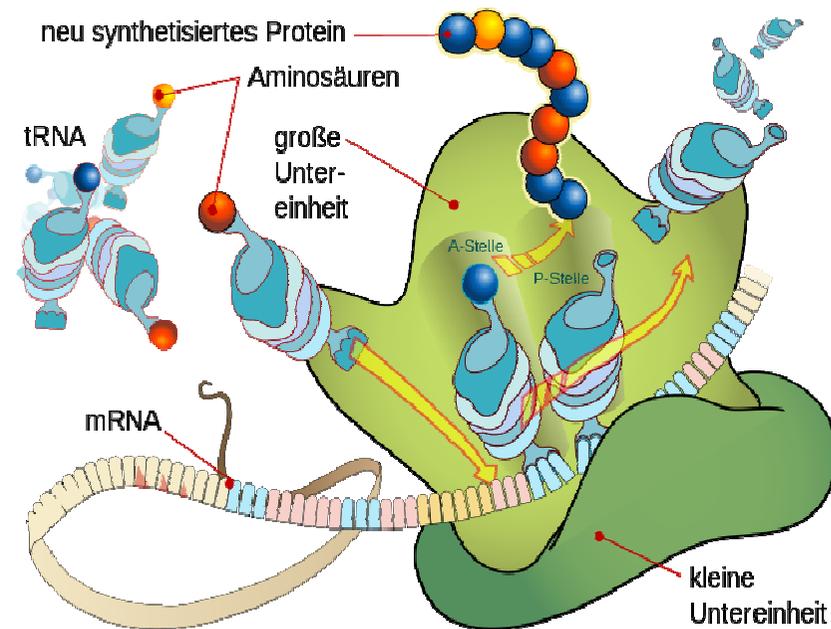
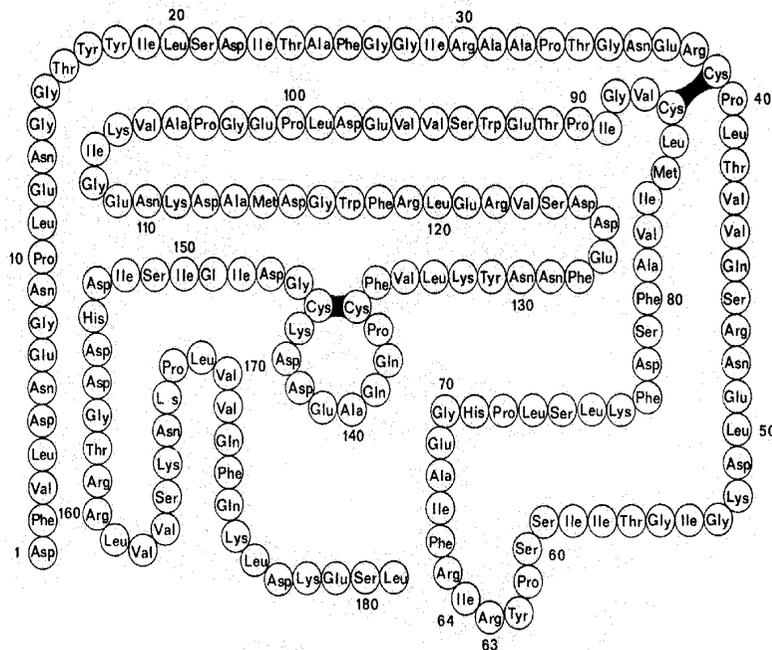
- Strukturmerkmale von Proteinen
- Vielfalt der Eisenproteine
- Vorgehensweise in der Strukturaufklärung
- Messmethoden in der Strukturaufklärung
 - NMR-Spektroskopie
 - Röntgenbeugung
 - Mößbauer-Spektroskopie

Strukturmerkmale von Proteinen: Einleitung

- Proteine bilden...
 - Primärstruktur (Aminosäuresequenz)
 - Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt)
 - Tertiärstruktur (Faltung der Sekundärstruktur)
 - Quartärstruktur (Zusammenlagerung von Untereinheiten zu Proteinkomplexen)
- Dreidimensionale Struktur charakteristisch und oft unbedingt notwendig um die biologische Wirksamkeit zu gewähren.

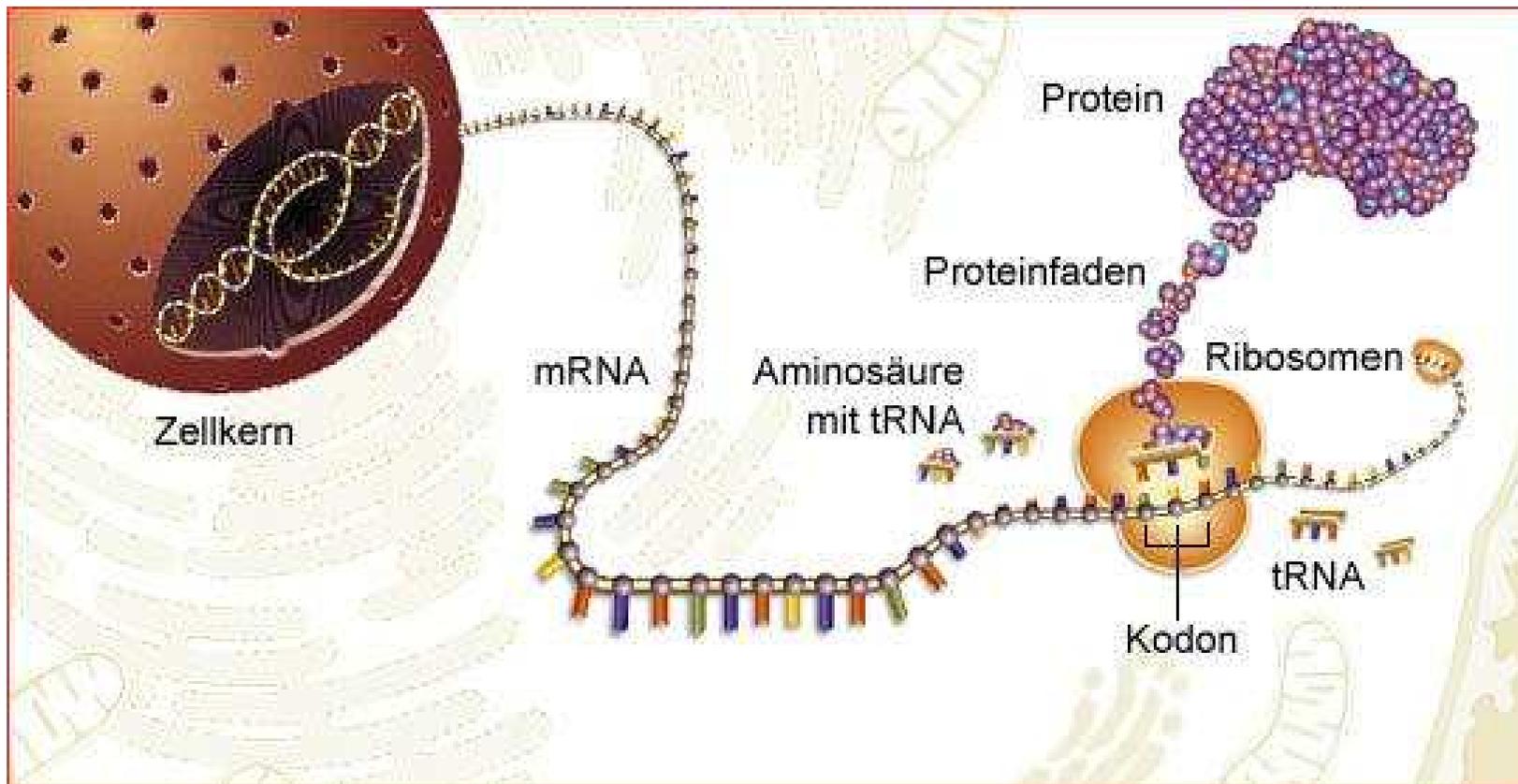
Strukturmerkmale von Proteinen: Primärstruktur

- Aminosäuresequenz wird durch DNA bzw. mRNA codiert



Durch die Aminosäuresequenz und damit charakteristischer Abfolge der Aminosäure-Restgruppen wird gleichzeitig später die Gestalt der höheren Proteinstrukturen bestimmt!

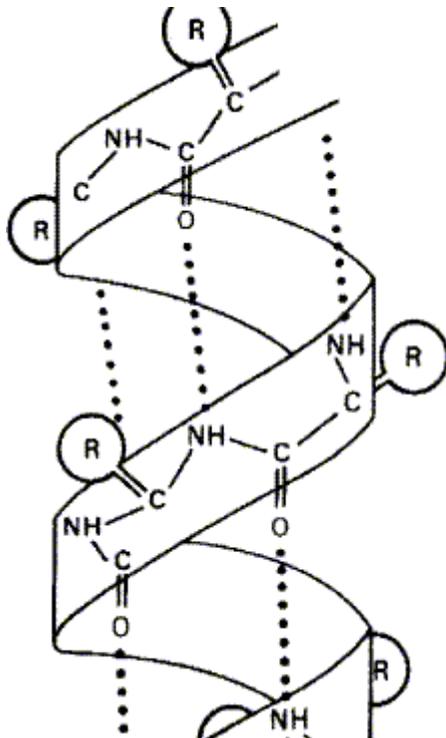
Strukturmerkmale von Proteinen: Proteinbiosynthese



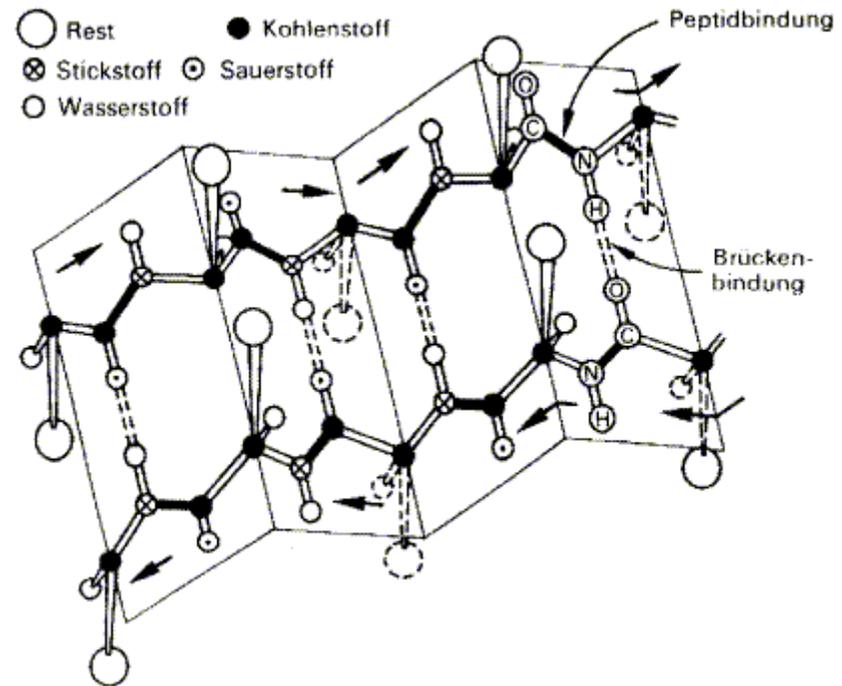
Strukturmerkmale von Proteinen: Sekundärstruktur

- In Abhängigkeit der Primärstruktur bilden sich verschiedene Sekundärstrukturen heraus.

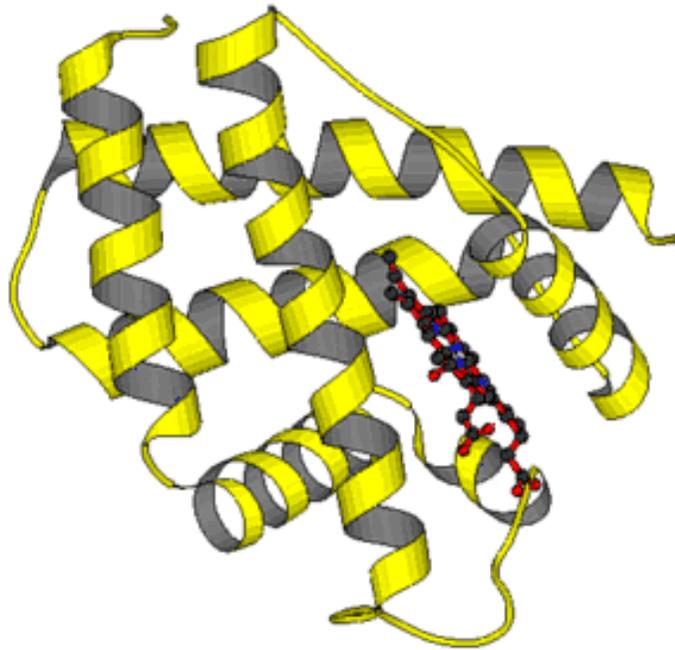
α -Helix



β -Faltblatt



Strukturmerkmale von Proteinen: Tertiärstruktur

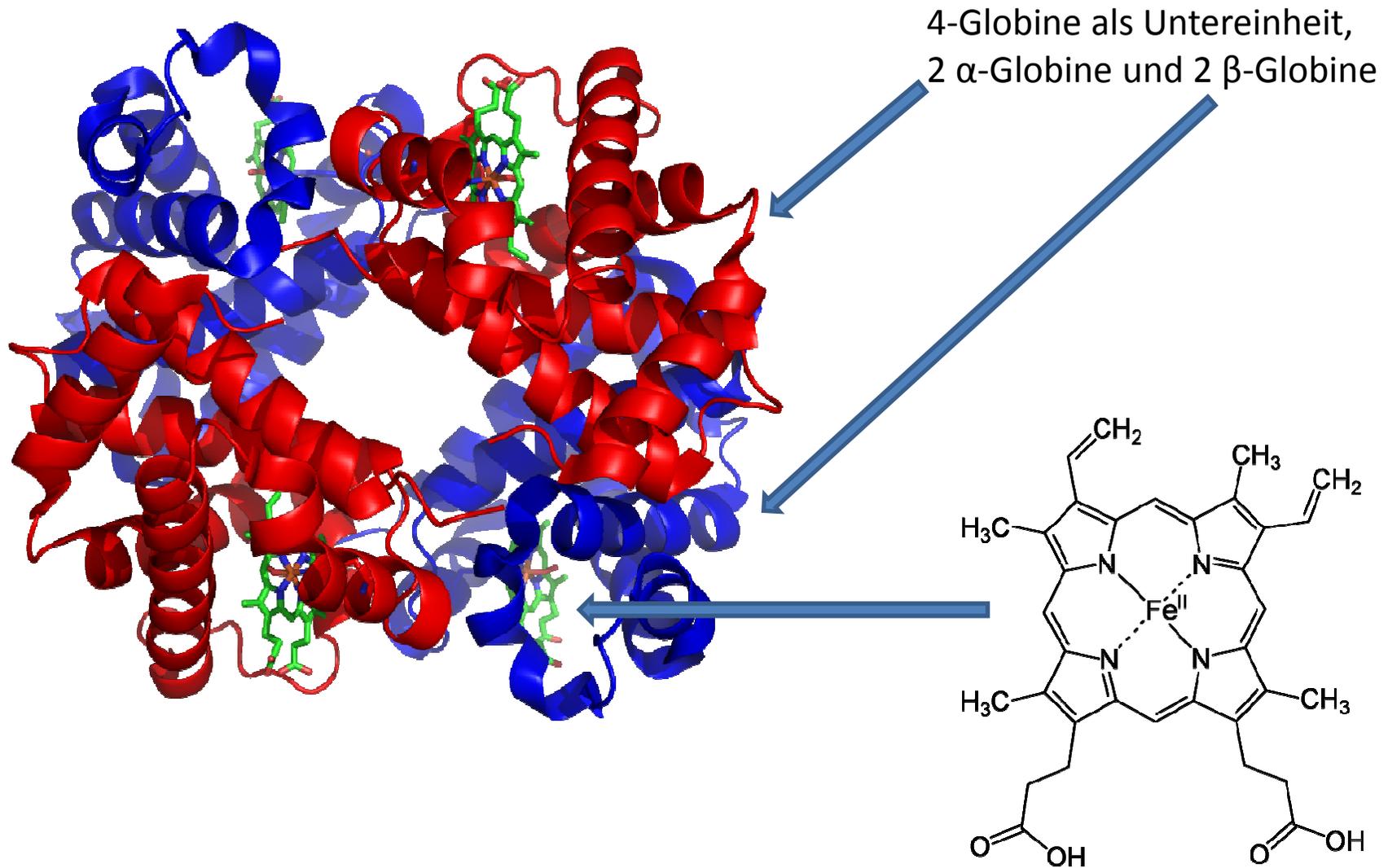


Überwiegend
gefaltete α -Helices



Überwiegend gefaltete
 β -Faltblatt-Strukturelemente

Strukturmerkmale von Proteinen: Quartärstruktur



Vielfalt der Eisenproteine

- Es werden 3 Gruppen von wichtigen Eisenproteinen in der Biosphäre unterschieden.

Hämoproteine

- Hämoglobin (tierischer O₂-Transport)
- Myoglobin (tierische O₂-Speicherung)
- Cytochrome (Elektronentransfer)
- Oxygenasen (Oxygenierung durch O₂)
- Oxidasen (O₂-Red. Zu O₂⁻, O₂²⁻, O²⁻)
- Peroxidasen (Oxidation mit H₂O₂)
- Catalasen (H₂O₂ Disprop. Zu H₂O/O₂)

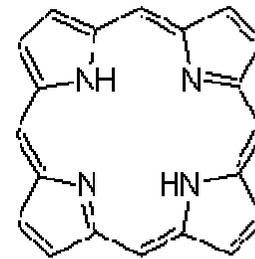
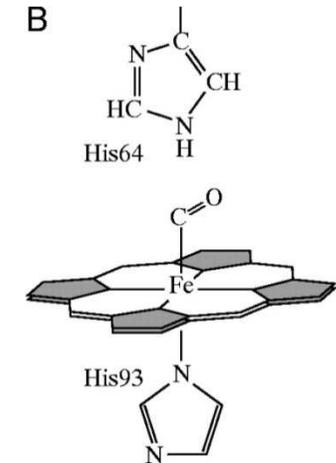
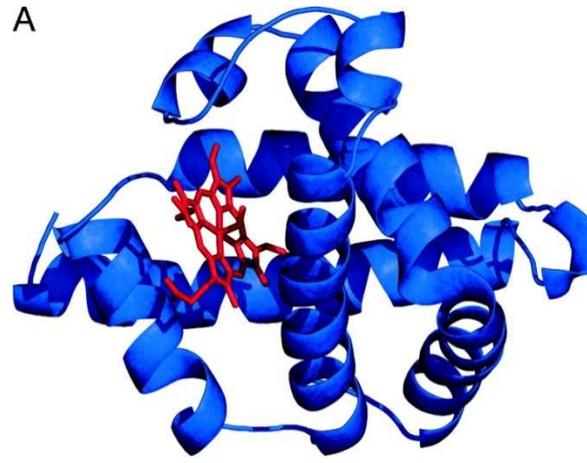
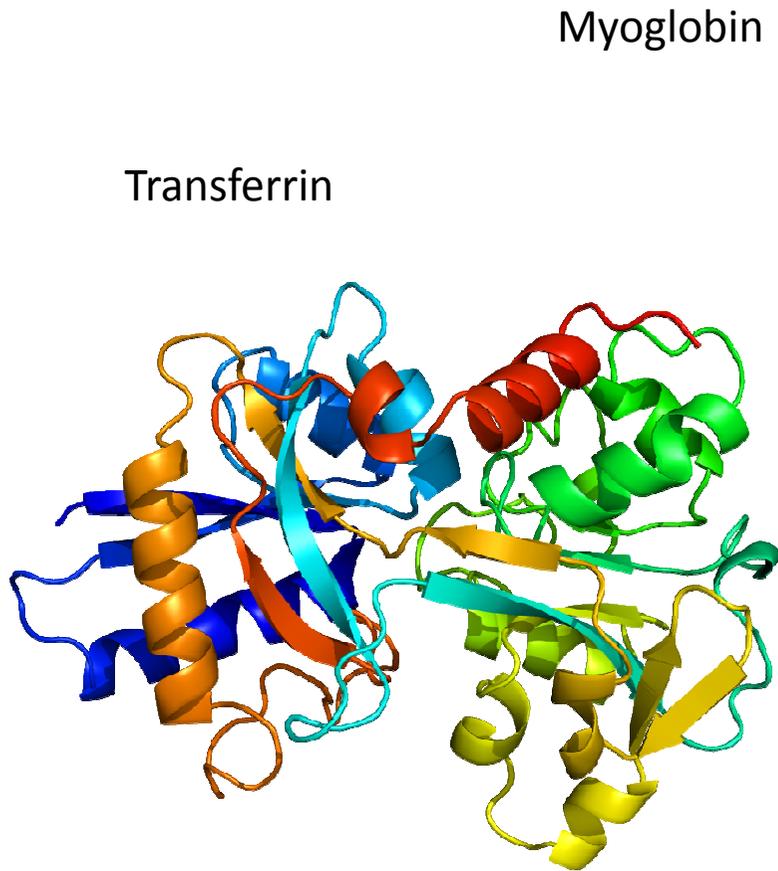
Eisen-Schwefel Proteine

- Rubridoxine (Elektronentransfer)
- Ferredoxine (Elektronentransfer)
- Nitrogenasen (N₂-Red. zu NH₃)

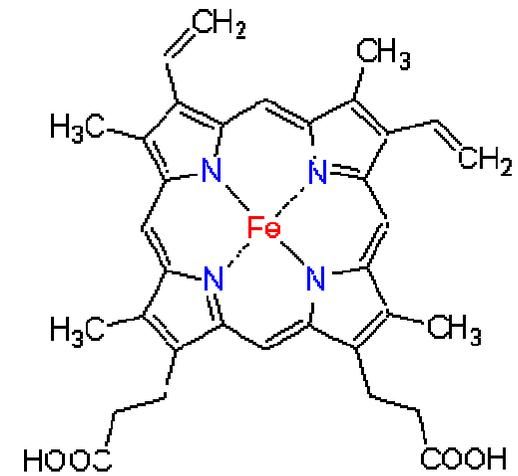
Eisenproteine

- Transferrine (tierischer Eisentransport)
- Ferritine (Eisenspeicherung)

Vielfalt der Eisenproteine



Porphyrin

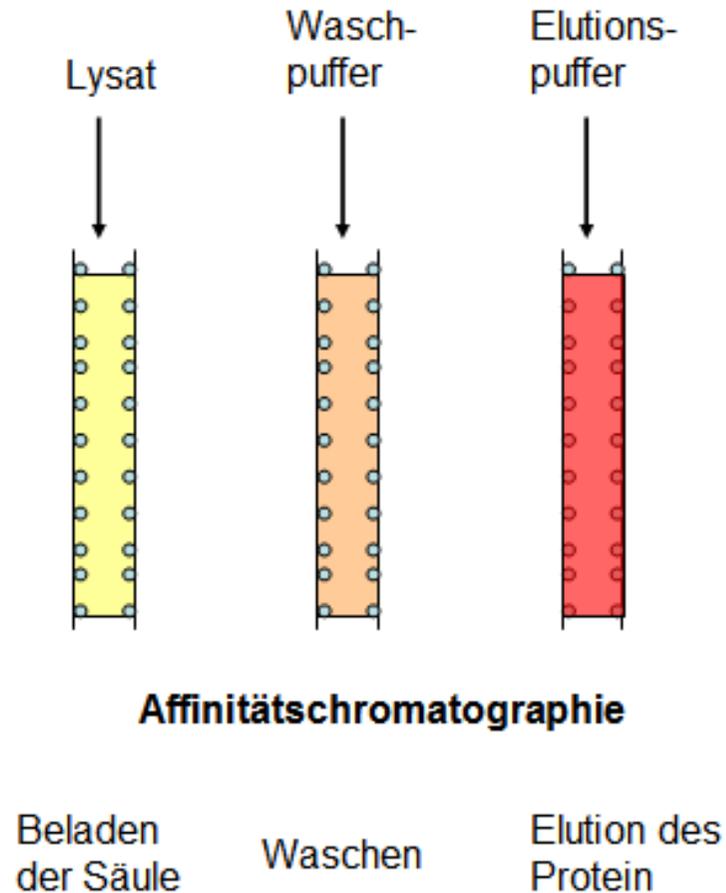


Häm-Gruppe des Hämoglobins

Vorgehensweise in der Strukturaufklärung

- Isolierung/Aufreinigung der Proteine
 - Oft Zellaufschluss um cytoplasmatische Proteine in Lösung zu bringen. (osmotische Lyse, chemische bzw. enzymatische Lyse und mechanische Lyse)
 - Anschließende Isolierung der Proteine durch z.B. Dialyse, Ultrafiltration, Gelelektrophorese und eine Reihe von chromatographischen Methoden (muss sehr rein sein!!!)
- Überführung in analysierbare Proben
 - Züchtung von einem einzelnen großen, stabilen Proteinkristall für Röntgenbeugung
 - Erhalt von eindeutigen Röntgenbeugungsmustern
 - I.d.R. stellt sich die Züchtung von Proteinkristallen als schwer und langwierig dar.

Vorgehensweise in der Strukturaufklärung



Affinitätschromatographie
als Beispiel für eine sehr
selektive Aufreinigung

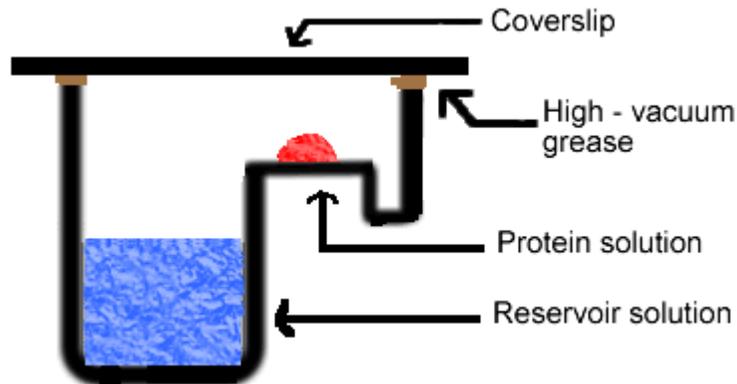
→ Beliebtes Verfahren zur
Aufreinigung



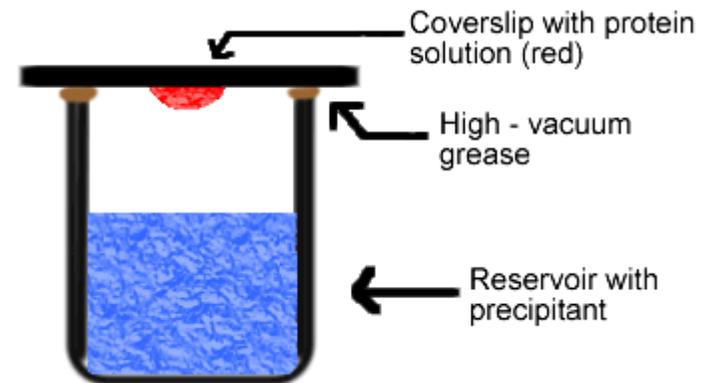
Vorgehensweise in der Strukturaufklärung

- Es werden zwei gängige Methoden zur Protein-Kristallisation in der „Routine“ unterschieden

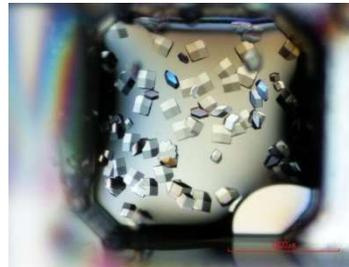
Sitting-Drop-Methode



Hanging-Drop-Methode



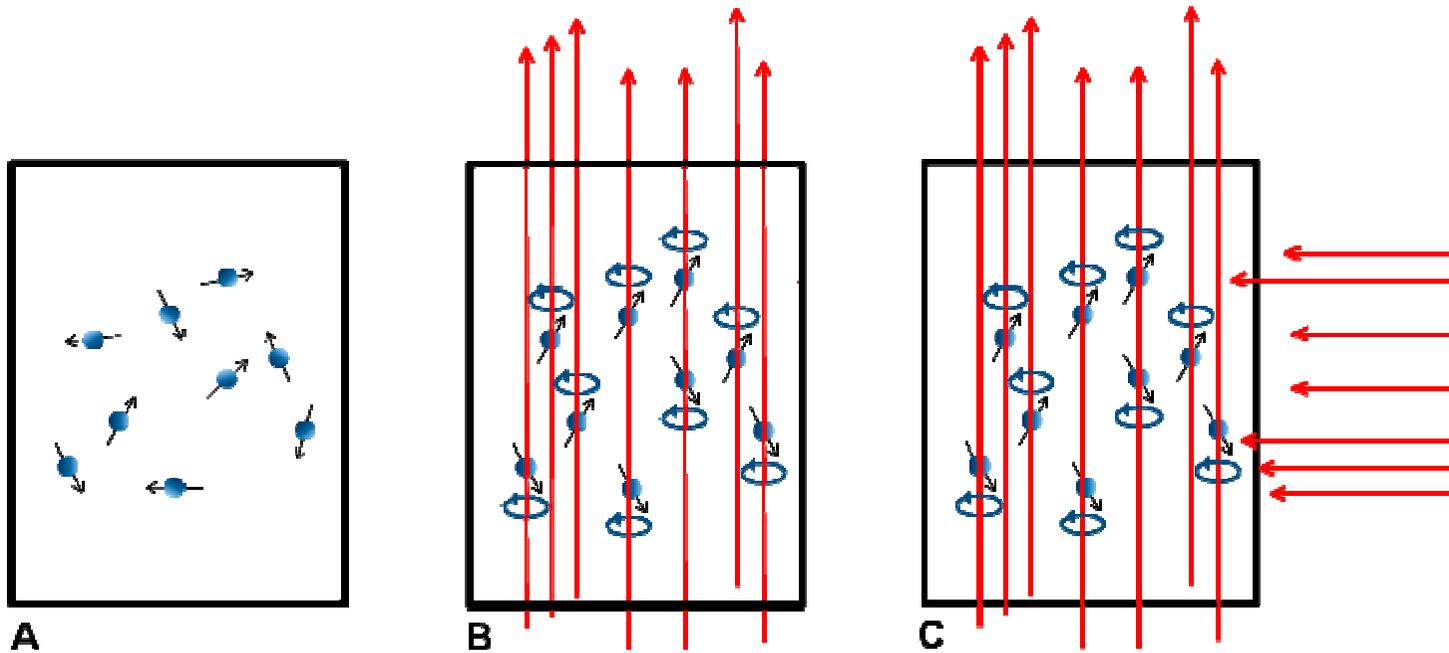
Lysozymeinkristalle unter
polarisiertem Licht



Messmethoden in der Strukturaufklärung

- **NMR-Spektroskopie**
 - Analyse des Proteins in Lösung
 - Beruht auf Larmorpräzession der Kernspins um die Achse des konstanten Magnetfelds
- **Röntgenbeugung**
 - Analyse des Proteins in Form von Kristallen
 - Beugung von Röntgenstrahlen am Proteinkristall
- **Mößbauer-Spektroskopie**
 - Hauptanwendung zur Untersuchung von zwei- und dreiwertigem Eisen
 - Ausnutzung von Mößbauer- und Doppler-Effekt

NMR-Spektroskopie



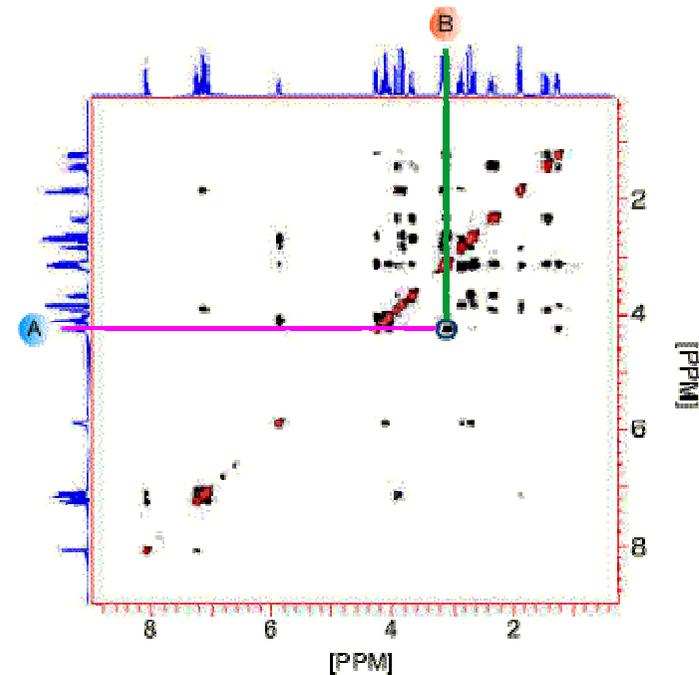
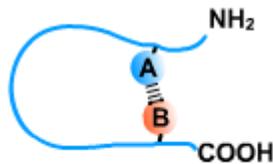
A: Ohne Magnetfeld

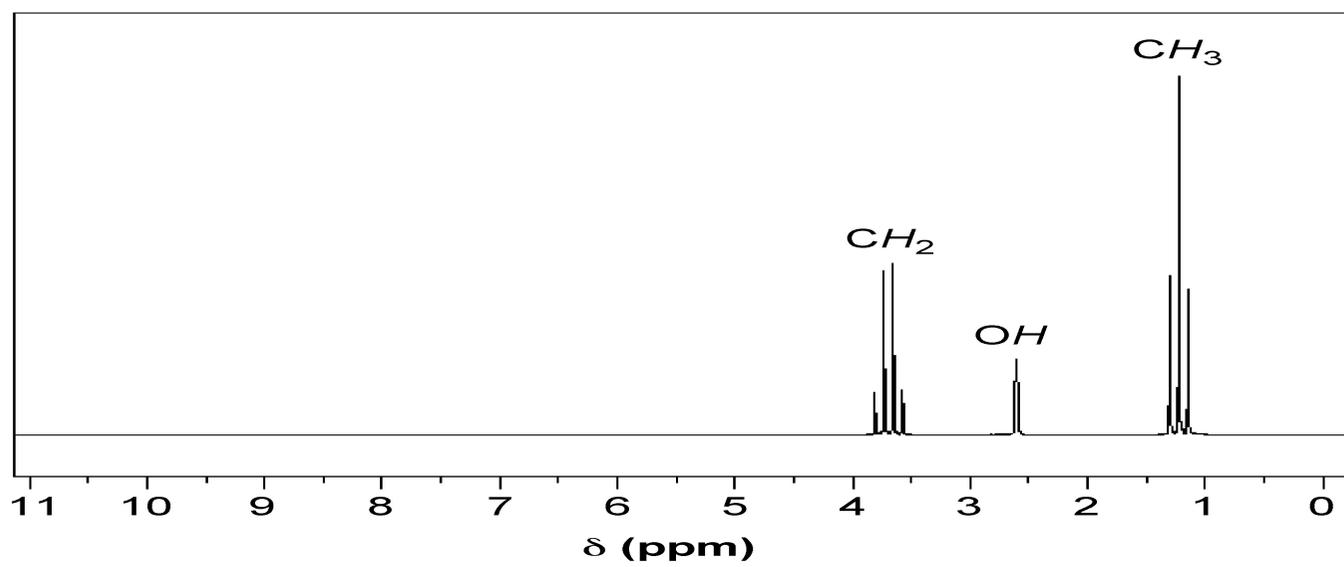
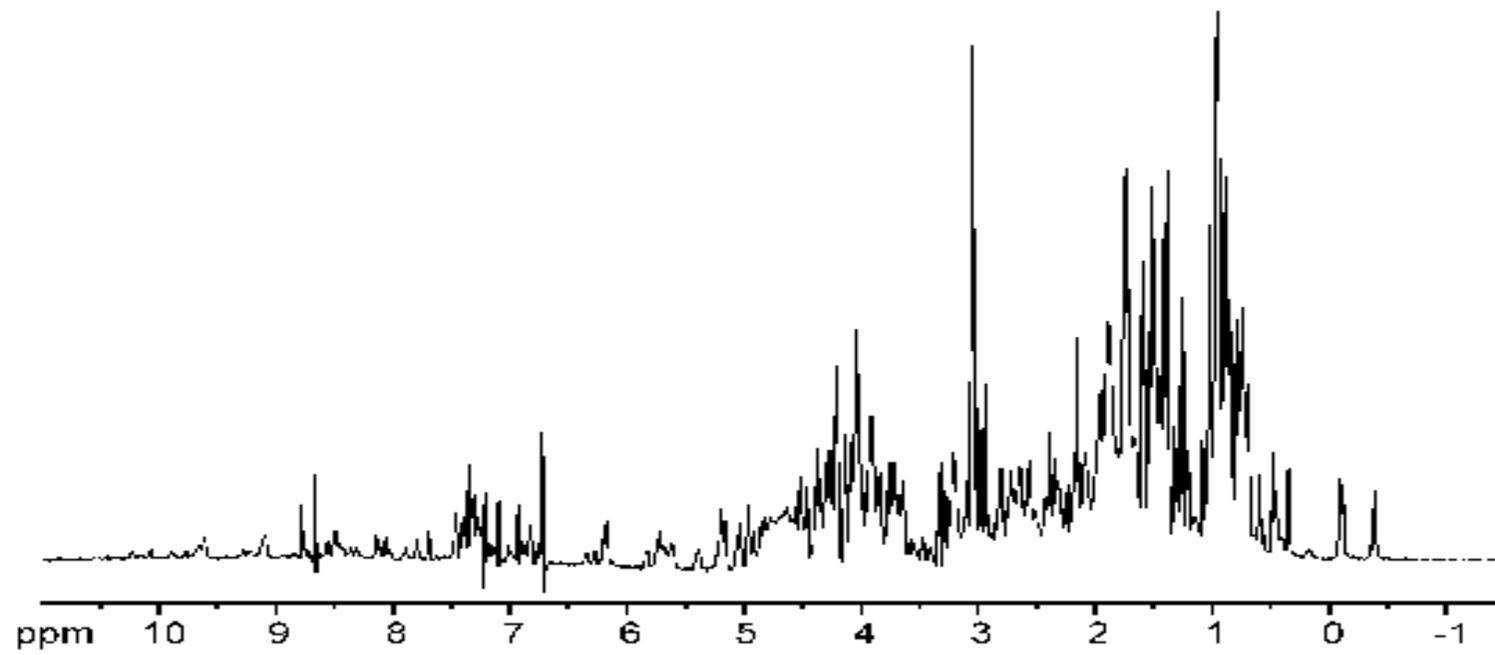
B: Einwirkung von starkem Magnetfeld

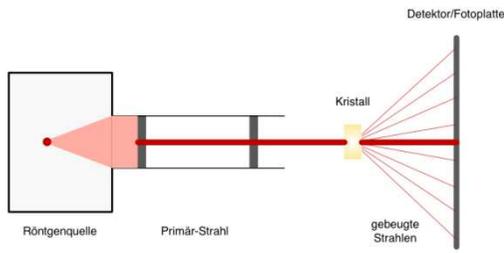
C: Anlegung von zweitem oszillierendem Feld

NMR-Spektroskopie

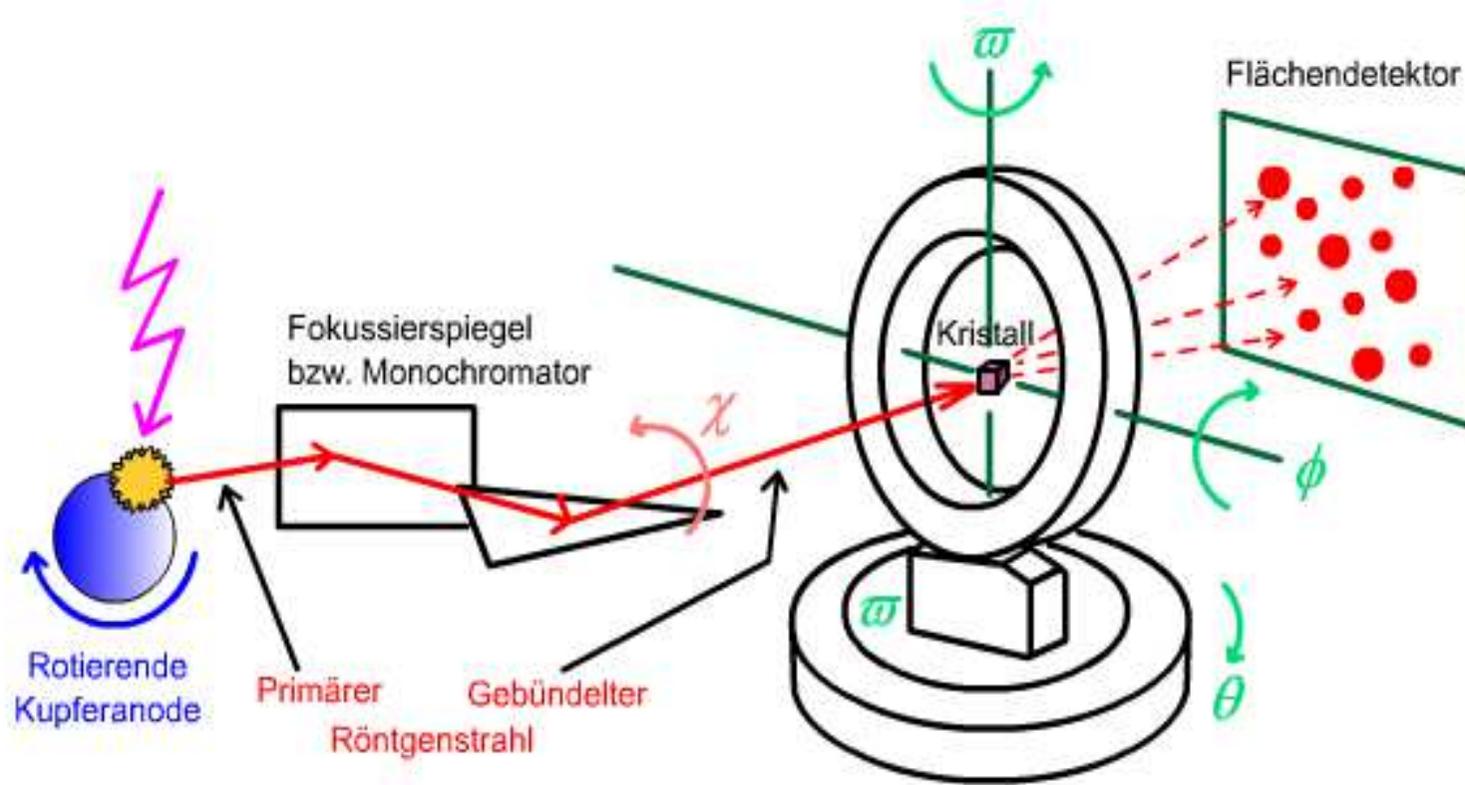
- Resonanzabsorption ist abhängig von Atomtyp und chemischen Umgebung (→ chemische Verschiebung)
 - Liefert Information über die Struktur einer Substanz!!!
- Zur Analyse von komplexen Strukturen werden mehrdimensionale NMR-Messung verwendet.







Röntgenbeugung



Röntgenbeugung

- Röntgenstrahlung wird an der Elektronenhülle der Atome gebeugt.
- Beugung tritt auf, wenn Abstand der Gitternetzlinien in der Größenordnung der auftreffenden Wellenlängen liegt.

Bragg-Gleichung

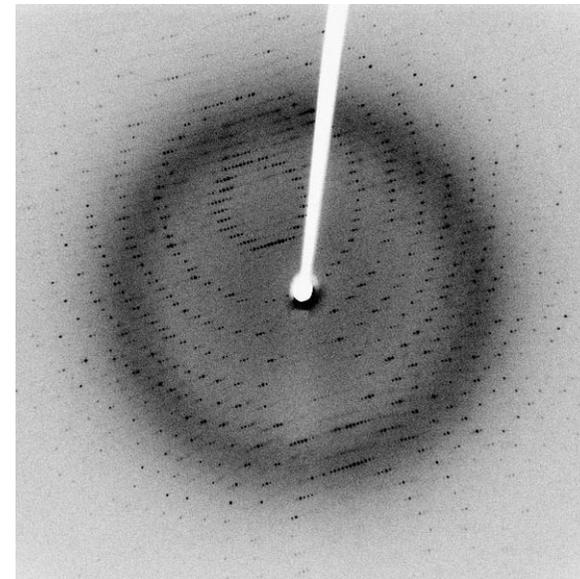
$$n * \lambda = 2d * \sin \theta$$

λ = Wellenlänge des monochromatischen Röntgenstrahls

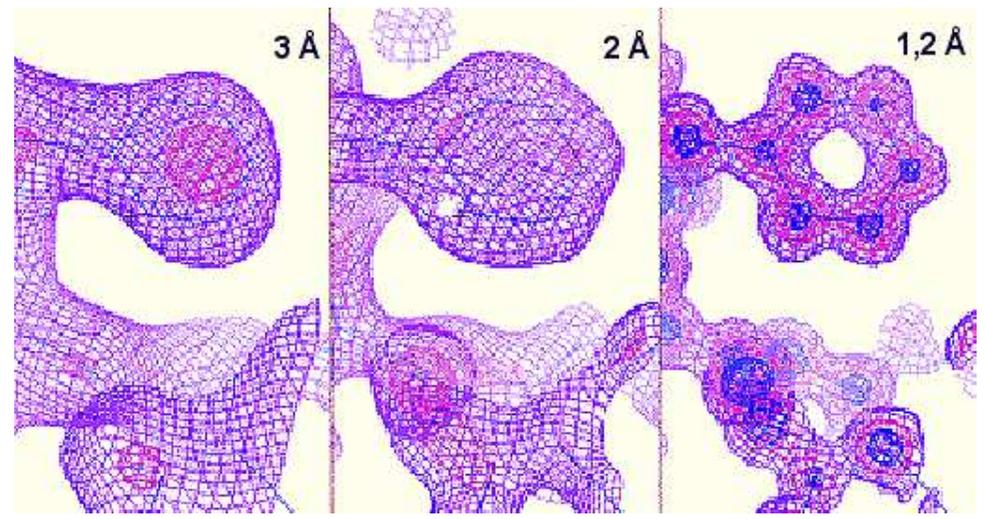
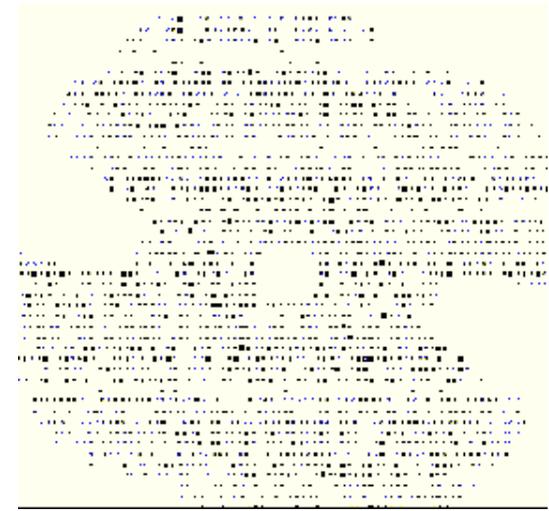
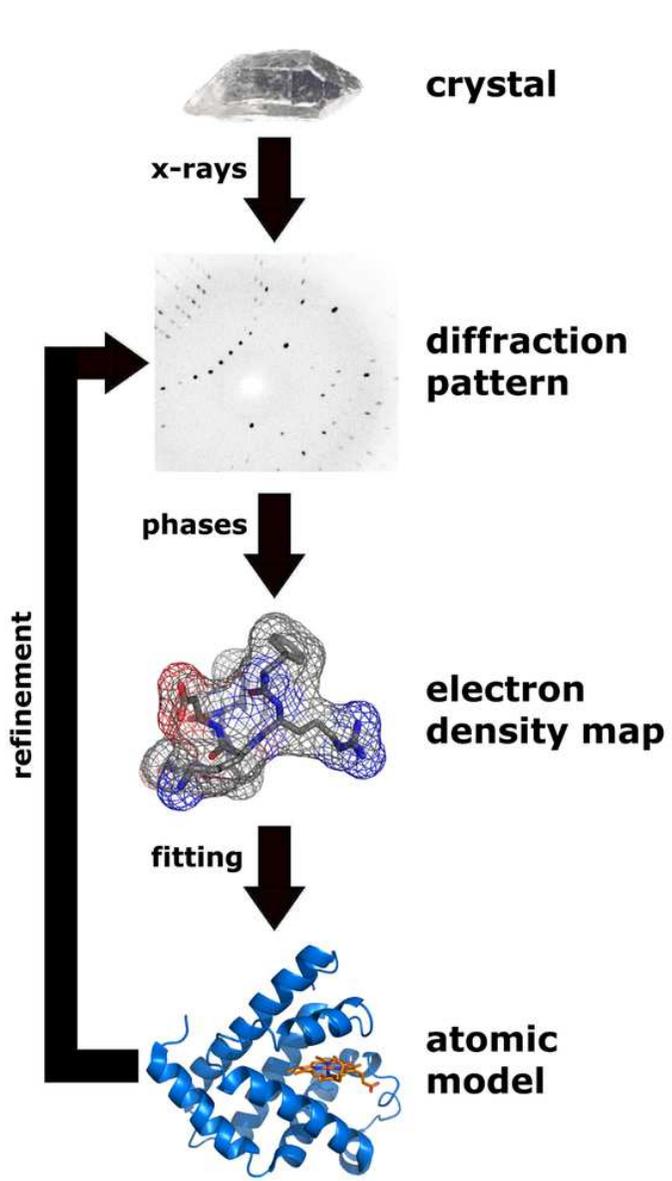
n = Beugungsordnung

θ = Winkel zwischen Röntgenstrahl und Ebene

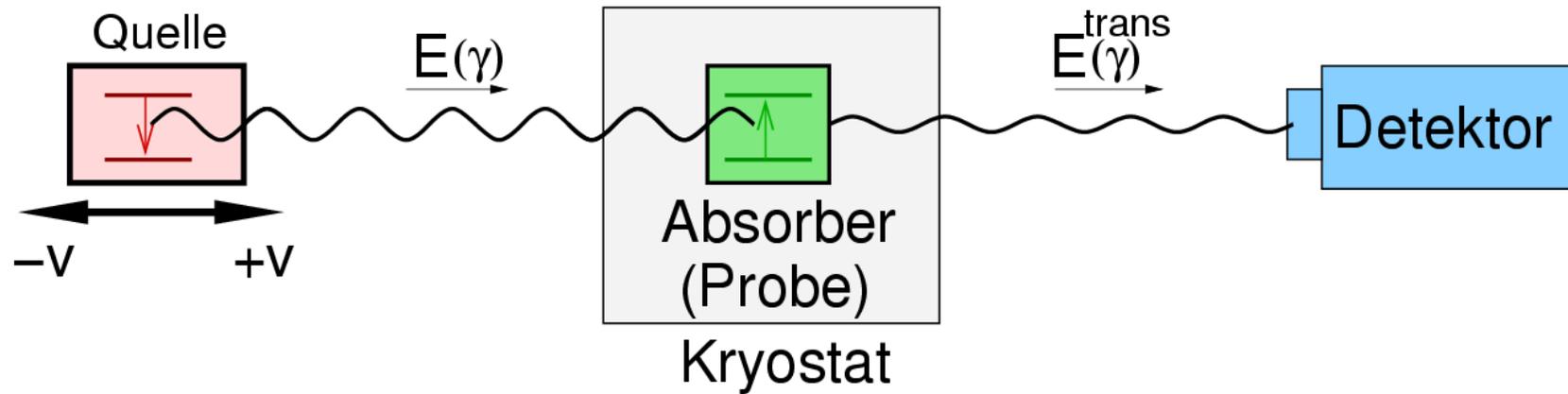
d = Abstand zwischen parallelen Gitterebenen



Diffractionsmuster eines Protein-Kristalls einer SARS Protease



Mößbauer-Spektroskopie



Element, bei dem der Mößbauer-effekt beobachtet wurde

H																			He
Li	Be											B	C	N	O	F		Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn		
Fr	Ra	Ac																	
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu			
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw			

Quellen

- M. Holtzhauer, Methoden in der Proteinanalytik, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/drug_design/struct_analy_prot.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug_design/xray_aspect.vscml.html
- http://plantbreeding.boku.ac.at/957308/qu_kti2.gif
- <http://www.vcell.de/proteinstation/proteinstation-proteinbiosynthese-die-fabrik/>
- http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/88/Ribosom_mRNA_translation_de.svg
- <http://www.bioinformatik.uni-leipzig.de/Leere/PRAKTIKUM/Protokolle/SS04/1/einfuehrung.html>
- <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d17/17d.htm>
- <http://de.wikipedia.org/wiki/H%C3%A4moglobin>
- http://www.bayertechnology.com/fileadmin/user_upload/Redakteure/NewsBilder/Paper_Proteinkristallisation.pdf
- <http://www.bio.davidson.edu/molecular/MolStudents/spring2003/Kogoy/protein.html>
- http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/proteinkristall.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug_design/nmr_spectr.vscml.html
- <http://sichten.blogspot.de/2012/10/roentgendiffraktometrie.html>
- http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/Vorlesung/methoden_I_5.xhtml