

2 Biologisch wichtige Makromoleküle und ihre Bausteine II: Aminosäuren, Peptide, Proteine

A Theoretische Grundlagen

2.1 Einleitung

Der Name Protein leitet sich vom griechischen „*proteios*“ ab, was soviel wie „an erster Stelle“ bedeutet. Bereits 1836 erkannte Jöns Jakob BERZELIUS (1779–1848, schwedischer Chemiker), der den Namen einführte, die besondere Bedeutung dieser Stoffklasse für das Leben. Die Proteine tragen ihren Namen zu Recht, und es ist bemerkenswert, mit welcher klugen Voraussicht BERZELIUS diesen Namen gewählt hat.

Proteine spielen in jeder Zelle eine zentrale und herausragende Rolle. Eine einzige Zelle enthält Tausende verschiedener Proteine, wobei deren biologische Funktionen außerordentlich vielfältig sind. In gewissem Sinn sind Proteine die molekularen Instrumente, durch die genetische Information ausgedrückt wird. Alle Proteine sind aus demselben, ubiquitären Satz von 20 Aminosäuren (den sog. proteinogenen Aminosäuren) aufgebaut. Proteine sind Ketten von Aminosäuren, wobei jede an ihren Nachbarn durch spezifische kovalente Bindungen gekoppelt ist. Zellen können aus den 20 Standard-Aminosäuren durch variable Kombination dieser Untereinheiten Proteine mit den unterschiedlichsten Eigenschaften und Funktionen aufbauen, wie Enzyme, Hormone, Transportproteine, Nährstoff- und Speicherproteine, kontraktile oder motile Proteine, Strukturproteine, Abwehrproteine, regulatorische Proteine und eine Vielzahl anderer Proteine, deren Funktionen nicht einfach zu klassifizieren sind.

Nach der Gestalt der Proteine, die als Konformation bezeichnet wird, kann man fibrilläre (Faser-) und globuläre (Sphäro-) Proteine unterscheiden. Fibrilläre Proteine sind unlöslich in Wasser, von langgestreckter Gestalt und finden meist als Gerüstsubstanzen bei Tieren Verwendung, weshalb sie auch den Na-

men Skleroproteine führen. Die globulären Sphäropoteine sind aufgeknäult und haben eine mehr oder weniger kugelige Gestalt. Enzyme und Membranproteine sind typischerweise globuläre Proteine. Als dritte Gruppe kann man die Proteinkomplexe (Proteide) abgrenzen, die außer einem Proteinanteil auch nicht-proteinartige prosthetische Gruppen enthalten. So liegen z. B. viele pflanzliche Pigmente als Chromoproteine vor. Entsprechendes gilt für die Verbindungen von Proteinen mit Lipiden (Lipoproteine), mit Zuckern (Glykoproteine), mit Phosphorsäure (Phosphoproteine) und mit Metallen (Metalloproteine). Die Art der Bindung zwischen dem Proteinanteil und der prosthetischen Gruppe kann sehr unterschiedlich sein.

2.2 Aminosäuren – die Bauelemente der Proteine

Bausteine (Monomere) der Proteine sind die Aminosäuren, die sich formal von Mono- oder Dicarbonsäuren ableiten lassen. Neben der Carboxy-Gruppe -COOH , die leicht ein Proton (H^+) durch Dissoziation abgibt und somit als Säure wirkt, enthalten Aminosäuren mindestens eine weitere funktionelle Gruppe, die namensgebende Aminogruppe (-NH_2). Die einfachste biologisch relevante Aminosäure lässt sich von der Essigsäure ableiten. Die Einführung einer Aminogruppe am C-2 (bei Monocarbonsäuren bezeichnet man das der Carboxy-Gruppe unmittelbar benachbarte C-Atom auch als α -C) führt zur α -Amino-Essigsäure, für die auch der Trivialname Glycin üblich ist (Abbildung 2.1).

Bei den in Proteinen vorkommenden Aminosäuren befindet sich die Aminogruppe an dem der Carboxy-Gruppe benachbarten C-Atom (α -Stellung). Der Rest R ist im Fall des Glycins ein H-Atom, bei allen anderen Aminosäuren dagegen eine unverzweigte oder verzweigte Kohlenstoffkette, die die Individualität der einzelnen Aminosäure ausmacht. Beginnend mit der α -Amino-Propionsäure (Alanin) trägt das α -Atom vier verschiedene Reste (Carboxy-Gruppe, Aminogruppe, H-Atom und Rest R) und ist daher asymmetrisch substituiert; folglich müssen händige (chirale) Moleküle als D- und L-Formen auftreten. Konventionsgemäß steht bei den L-Aminosäuren die Aminogruppe in der Projektionsformel (Carboxy-Gruppe oben, Rest R unten) links, bei den D-Formen rechts. In den Proteinen kommen nur L-Aminosäuren vor.

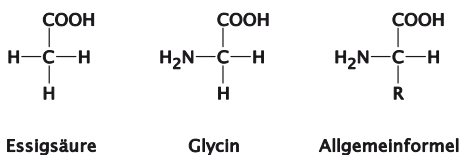


Abbildung 2.1 Ableitung von Glycin und Allgemeinformel von Aminosäuren

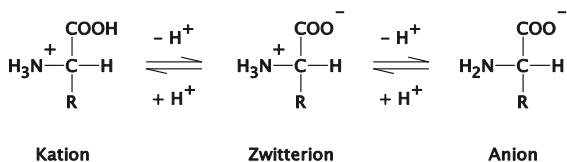


Abbildung 2.2 Zwitterionenstruktur von Aminosäuren

In wässriger Lösung kann die saure Carboxy-Gruppe Protonen abgeben, während die basische Aminogruppe Protonen aufnehmen kann. So entsteht die typische Zwitterionen-Struktur. Wenn beide funktionellen Gruppen einer Aminosäure je eine elektrische Ladung tragen, reagiert das betreffende Molekül nach außen elektrisch neutral – man bezeichnet den pH-Wert, bei dem dieser Zustand vorliegt, als isoelektrischen Punkt (IEP oder pI). Verändert sich der pH-Wert ($\text{pH} = \text{potentia hydrogenii} = \text{Konzentration der Wasserstoffionen einer Lösung} = -\log[\text{H}^+]$) in Richtung höherer oder niedrigerer Wasserstoffionen-Konzentrationen (Zugabe von Säuren bzw. Basen), verschiebt sich entsprechend auch der Zwitterionen-Anteil in Richtung positiv bzw. negativ geladener Teilchen (Abbildung 2.2).

In der Natur bestehen die Proteine regulär aus 20 verschiedenen L-Aminosäuren, die sich durch ihre Seitenkette in Größe, Gestalt, Reaktivität sowie der Fähigkeit, intermolekulare Bindungen eingehen zu können, unterscheiden. Sie lassen sich in vier bzw. fünf Gruppen einteilen (Abbildung 2.3):

(1) Aminosäuren mit unpolarer (hydrophober) Seitenkette (Rest R unpolar). Die Seitenkette besteht bei den Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Prolin aus einer unsubstituierten Kohlenwasserstoffkette oder einem Ring. Wegen seiner besonderen Eigenschaften zählt man auch noch das Methionin dazu, welches sich durch eine Thioether-Gruppe ($-\text{S}-\text{CH}_3$) auszeichnet. Die Aminosäuren dieser Gruppe bilden den hydrophoben Kern der Proteinmoleküle. Man findet sie auch bei Transmembranproteinen in den Abschnitten, die mit den Membranlipiden in Wechselwirkung treten.

Grundsätzlich würde auch Glycin hierher gehören. Da es jedoch im Unterschied zu den übrigen Angehörigen dieser Gruppe nicht an hydrophoben Wechselwirkungen teilnimmt, bildet es eine eigene Gruppe (Abbildung 2.3, Gruppe 5).

(2) Aminosäuren mit polaren Gruppen in der Seitenkette. Dies sind Aminosäuren, die Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können und deshalb für die Ausbildung der Tertiärstruktur von Bedeutung sind. Hierzu gehören die Hydroxygruppen von Serin und Threonin, die Iminogruppe des Tryptophans und die Amidgruppen von Asparagin und Glutamin. Bei physiologischen pH-Werten sind die polar wirkenden Gruppen dieser Aminosäuren ungeladen.

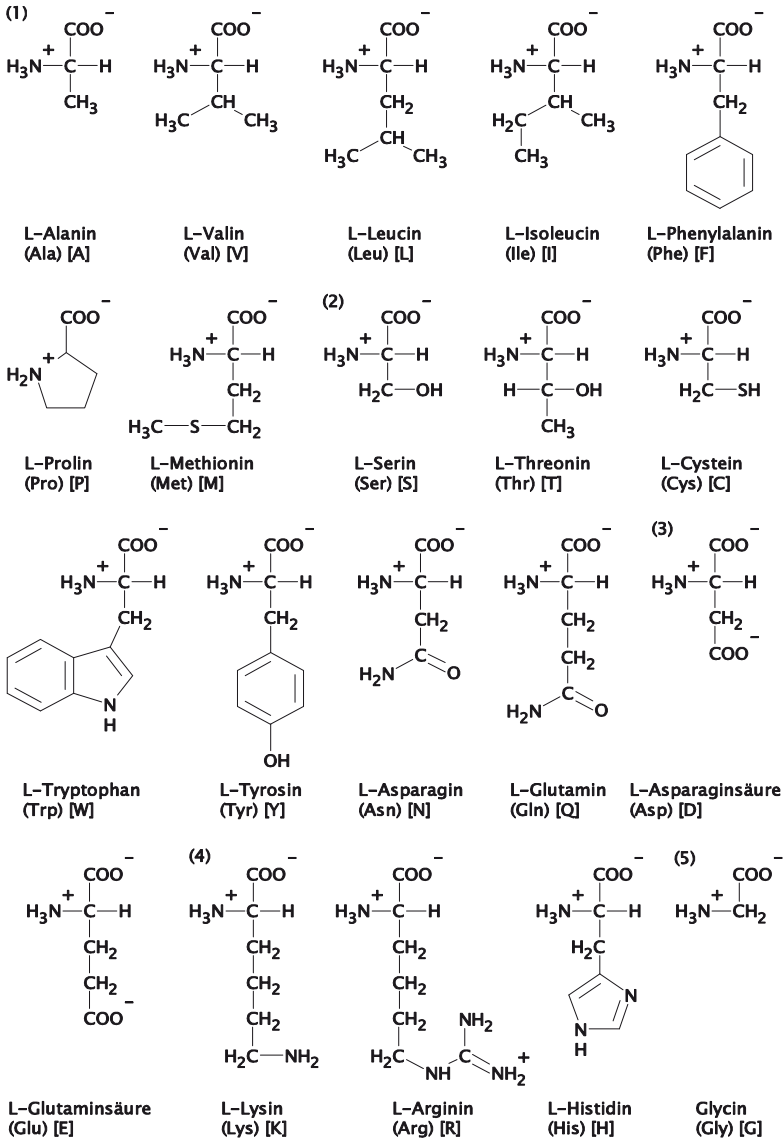


Abbildung 2.3 Die proteinogenen Standardamino­säuren. In Klammern sind die Abkürzungen im Drei- bzw. Einbuchstabencode angegeben

(3) Saure Aminosäuren. Die beiden Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure sind Monoamino-Dicarbonsäuren. In Abhängigkeit vom pH-Wert in der Zelle tragen die zusätzlichen Carboxylgruppen nach Dissoziation eines

Protons eine negative Ladung. Sie können in deprotonierter Form Ionenbindungen eingehen. Die ionisierten Formen heißen Aspartat und Glutamat.

(4) Basische Aminosäuren. Sie tragen eine weitere basische Gruppe in der Seitenkette und können in protonierter Form wie die sauren Aminosäuren zu Ionenbeziehungen beitragen. Arginin und Lysin tragen bei neutralem pH-Wert positive Ladungen und reagieren basisch. Die Seitenkette von Histidin ist ebenfalls positiv geladen, was sich im Neutralbereich jedoch kaum bemerkbar macht.

Pflanzliche Organismen sind die Lieferanten der für den Menschen und viele Tiere essenziellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Methionin, Threonin, Lysin. Sie können von diesen Organismen nicht selbst synthetisiert werden.

2.3 Primärstruktur der Proteine

Die Makromoleküle der Proteine sind aus Aminosäuremolekülen aufgebaut, die miteinander verknüpft sind. Einzelne Aminosäuren lassen sich durch eine Kondensationsreaktion untereinander verbinden. Formal erfolgt die Verknüpfung durch Reaktion einer Carboxylgruppe der einen und der Aminogruppe der nächsten Aminosäure, dabei wird Wasser eliminiert. Die entstehende Säureamidbindung wird auch als Peptidbindung bezeichnet, und die so verknüpften Monomere bilden ein Peptid (Dipeptid, Abbildung 2.4).

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt jedoch auf der Seite der Aminosäuren. Deshalb ist die Verknüpfung der Aminosäuren zu Peptiden und Proteinen nur unter Energieaufwand und Mitwirkung von Enzymen möglich. Mithilfe der Peptidbindungen sind die Aminosäuren zu Ketten verbunden, an denen als Seitenketten die Reste R der Aminosäuren stehen. Entsprechend der Zahl der Aminosäureglieder spricht man von Dipeptiden (2), Tripeptiden (3) usw., bis zu etwa 10 von Oligopeptiden und bei vielen von Polypeptiden. Diese leiten zu den Proteinen über, doch ist die Grenze nicht scharf zu ziehen. Die Molekülmassen der Proteine liegen zwischen 10.000 und einigen Millionen Dalton (1 Dalton = 1/12 der Masse des Kohlenstoffisotops ^{12}C ; benannt nach John DALTON, 1766–1844, englischer Naturforscher). Die Reihenfolge verschiedener Aminosäuren bezeichnet man als Aminosäuresequenz oder Primärstruktur eines Peptids (Proteins). Grundsätzlich beträgt die Anzahl unterschiedlicher Primärstrukturen einer Kette mit 20 verschiedenen Aminosäuren, die n Monomere lang ist, 20^n . Für ein Protein aus 1000 Aminosäuren ergibt sich somit die

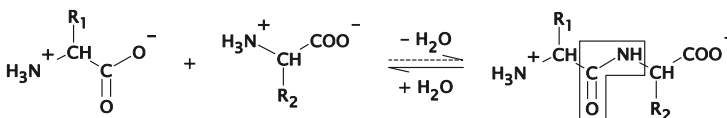


Abbildung 2.4 Kondensation von Aminosäuren

erstaunliche Anzahl von 20^{1000} (oder rund 10^{1300}) alternativen Primärstrukturen – eine unerschöpfliche Vielfalt, die praktisch unbegrenzte Kettenvarianz zulässt. Im Hinblick darauf ist es nicht überraschend, dass jede Tier- und Pflanzenart ihre spezifischen Proteine besitzt.

2.4 Sekundärstruktur

In bestimmten Bereichen nehmen die Proteine unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten CO- und NH-Gruppen der Peptidbindungen die Gestalt eines Faltblattes oder einer Schraube, einer α -Helix, an. Man bezeichnet dies als Sekundärstruktur der Proteine. Zwischen dem Wasserstoff der in die Peptidbindung eingegangenen Aminogruppe und einer beliebigen C=O-Gruppe einer anderen besteht wegen der beachtlichen Elektronegativität des Sauerstoffs ein kleiner Ladungsunterschied. Daher bilden sich entweder zwischen verschiedenen Abschnitten der gleichen oder zwischen zwei verschiedenen Proteinketten Wasserstoffbrücken aus, die fallweise zwei bevorzugte Raumgebilde (Sekundärstrukturen) stabilisieren:

(1) Relativ gleichförmig aus ähnlichen Aminosäuren zusammengesetzte Polypeptidketten (Abschnitte) lagern sich in größerer Anzahl nebeneinander und bilden durch Wasserstoffbrücken die sogenannte β -Faltblattstruktur aus, wobei

die Seitenketten nahezu senkrecht nach oben oder nach unten von der Faltblattebene weg stehen. Durch die Abfaltung der einzelnen Ebenen wird es möglich, dass sich Wasserstoffbindungen nicht nur zwischen gegenläufigen, antiparallelen Ketten ausbilden, sondern auch zwischen gleichläufigen, parallelen Ketten.

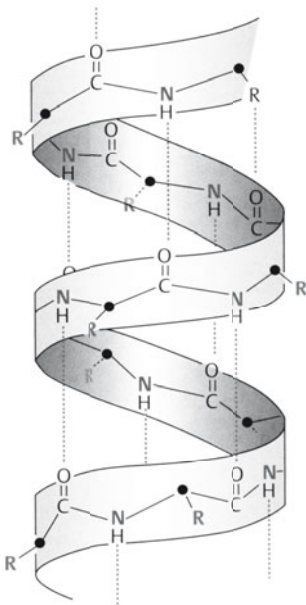


Abbildung 2.5 Modell der α -Helix einer Peptidkette (DOENECKE et al., 2005)

Kommt es innerhalb der gleichen Kette zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken, ist eine Struktur begünstigt, bei der sich die reaktiven Gruppen bereits innerhalb der eigenen Sequenz absättigen. Dabei nimmt das Polypeptid eine schraubige Grundgestalt an, bei der sich die C=O- und NH-Gruppen zwischen aufeinanderfolgenden Windungen gegenüberstehen. Das Ergebnis ist eine Schraube oder α -Helix mit durchschnittlich etwa 3,6 Aminosäureresten je Umgang (Abbildung 2.5). Die Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich

zwischen den Windungen in Richtung der Schraubenachse aus; das gibt der α -Helix eine besondere Stabilität. Die Seitenketten stehen nach außen von der Schraubenachse weg. Sie können mit ihrer Umgebung – z. B. in Membranen mit Membranlipiden oder mit anderen Abschnitten der Polypeptidkette – in Wechselwirkung treten. Die Aminosäure Prolin lässt sich wegen ihrer Ringstruktur nicht in eine Helix einfügen, sie ist ein „Helixbrecher“.

2.5 Tertiär- und Quartärstruktur, supramolekulare Strukturen

Die Wechselwirkungen der Seitenketten untereinander ermöglichen eine charakteristische Knäuelung oder Faltung der Peptidkette. Diese endgültige räumliche Anordnung bezeichnet man als Tertiärstruktur. Sie wird durch folgende intermolekulare Bindungen hervorgerufen und stabilisiert (Abbildung 2.6).

(1) Wasserstoffbrückenbindungen. Sie kommen dadurch zustande, dass ein H-Atom zwischen zwei gleich starken elektronegativen Atomen, z. B. N und O, gewissermaßen pendelt, obwohl es an eines der beiden kovalent gebunden ist. Eine Wasserstoffbrückenbindung kann dargestellt werden als $D-H \cdots A$, wobei D-H eine schwach saure Donorgruppe wie N-H oder O-H ist und A ein schwach basisches Akzeptoratom mit einem einsamen Elektronenpaar wie N oder O.

(2) Dipol-Dipol-Wechselwirkungen bzw. VAN-DER-WAALS-Kräfte im weiteren Sinne (Johannes Diderik VAN-DER-WAALS, 1837–1923, niederländischer Physiker). Durch Wechselwirkungen von Dipolen mit Dipolen, induzierten Dipolen sowie ionischen Ladungen entstehen Bindungskräfte. Für Proteine sind die Wechselwirkungen zwischen permanenten Dipolen bedeutende Struktur determinanten, da viele dieser Gruppen – wie die Carbonyl- und Amidgruppen des Peptidgerüsts – permanente Dipolmomente besitzen.

(3) Disulfidbrücken. Diese kommen durch Dehydrierung, d. h. Abspaltung von Wasserstoff zwischen den SH-Gruppen zweier benachbarter Cysteinmoleküle, zustande.

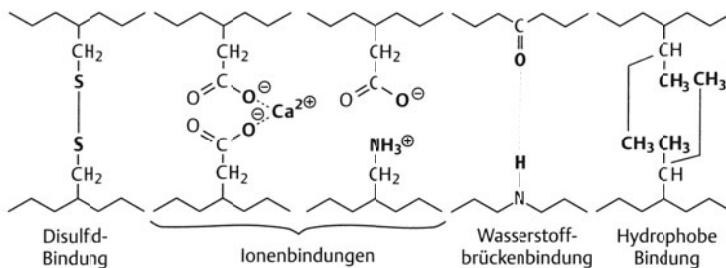


Abbildung 2.6 Mögliche intermolekulare Bindungen bei Proteinmolekülen (Nultsch, 2001. Mit freundlicher Genehmigung von Thieme)

(4) Ionische Bindungen. Eine für die Proteinstruktur bedeutsame Ionenbindung ist die zwischen der NH_3^+ - und der COO^- -Gruppe. Eine weitere Ionenbindung ist die Brückenbildung zwischen zwei negativ geladenen Carboxylgruppen durch zweiwertige Kationen, etwa Calcium- oder Magnesiumionen.

(5) Hydrophobe Wechselwirkungen. Sie entstehen, wenn apolare Gruppen der Aminosäureseitenketten miteinander in Kontakt treten und sich auf diese Weise der wässrigen Phase gewissermaßen entziehen. Als hydrophoben Effekt bezeichnet man Phänomene, die den Kontakt unpolarer Substanzen mit Wasser minimieren.

Polypeptidketten, die aus mehr als 200 Resten bestehen, falten sich gewöhnlich in zwei oder mehr globuläre Gruppen, auch Domänen genannt, die diesen Proteinen eine zwei- oder mehrlappige Struktur verleihen. Die meisten Domänen umfassen 100 bis 200 Aminosäurereste. Oft haben Domänen eine spezifische Funktion, z. B. die Bindung kleiner Moleküle.

Zahlreiche funktionelle Proteine bestehen aus Aggregaten mehrerer Polypeptidketten. Dabei kann es sich um gleichartige, aber auch um verschiedene Ketten (Untereinheiten) handeln. Diese Organisationsform wird als Quartärstruktur bezeichnet.

Obwohl die Konformation, d. h. die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, bereits durch deren Primärstruktur festgelegt ist, erfolgt die Faltung der Peptidketten und somit die Ausbildung der räumlichen Gestalt bei den meisten Proteinen nicht spontan, sondern unter Mitwirkung von Hilfsproteinen. Diese werden auch als Chaperone (engl.: chaperon = Anstandsdame) bezeichnet.

Erhitzt man Proteine oder behandelt sie mit unpolaren Lösungsmitteln, so kommt es zu einer Änderung der Konformation, da bestehende Bindungen gelöst und zufällig neu geknüpft werden. Das Protein verliert dadurch seine ursprüngliche Funktion, man sagt, es wird denaturiert. Bei Denaturierung eines Proteins wird seine hochgeordnete Raumstruktur in einen ungeordneten Zustand überführt, weil sich die stabilisierenden Bindungen lösen. Werden dabei Gruppen reaktiv, die zuvor in der Faltungsstruktur neutralisiert oder „maskiert“ waren, so verliert das Protein aufgrund neuer Bindungsverhältnisse meistens seine biologische Aktivität. Bei einigen Proteinen lassen sich die eingetretenen Veränderungen teilweise rückgängig machen: Renaturierung.

Gruppen von Enzymen, die zwei oder mehr Schritte einer metabolischen Kaskade katalysieren, bilden oft nichtkovalente Assoziate, sogenannte Multienzymkomplexe. Diese hochgradig organisierten Assoziate erlauben einen effizienten Durchsatz der Substrate von einem Enzym des Stoffwechselweges zum nächsten.

Oligomere Proteine und Multienzymkomplexe repräsentieren das unterste Niveau der strukturellen Organisation von Makromolekülen. Supramolekulare Strukturen wie Ribosomen oder Membrankomponenten der Elektronentransportketten der Photosynthese und der Atmung sind Beispiele für eine höher-rangige makromolekulare Organisation. Tatsächlich bildet die enorm komplexe,

hierarchische Organisation von individuellen Molekülen die strukturelle Grundlage des Lebens.

B Versuche

V 2.1 Aminosäuren

V 2.1.1 Nachweis von Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff und Wasserstoff in Aminosäuren

Kurz und knapp. Mit diesem Experiment kann man die elementare Zusammensetzung von Aminosäuren veranschaulichen.

Zeitaufwand. Vorbereitung: 10 min, Durchführung: 5 min

Geräte:	Demonstrationsreagenzglas, Spatel, Feuerzeug, Bunsenbrenner, Filterpapier, Haartrockner, Trichter, 2 Bechergläser, Stativ mit Muffe und Stativklammer, Pinzette
Chemikalien:	Cystein (alternativ: getrocknetes Eiklar), Bleiacetatlösung (500 mg $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in 20 ml entmin. Wasser), 5 %ige Cobaltchlorid-Lösung ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), rotes Lackmuspapier

Sicherheit. Bleiacetat (Festsubstanz): T, N. Cobaltchlorid (Festsubstanz): T, N. Cystein (Festsubstanz): Xn. Bei der Herstellung von Bleiacetatpapier und Cobaltchloridpapier sind die Sicherheitshinweise für Bleiacetat bzw. Cobaltchlorid zu beachten! Alternativ zur eigenen Herstellung von Bleiacetatpapier kann dies auch schon fertig im Fachhandel bezogen werden. Da bei dem Versuch unangenehm riechende Verbrennungsgase entstehen, sollte dieser im Abzug durchgeführt werden.

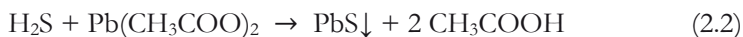
Durchführung. Die Herstellung von Bleiacetat- und Cobaltchloridpapier darf nur durch den Lehrer erfolgen. Hierzu tränkt man ein Filterpapier in der Bleiacetatlösung und ein anderes in der Cobaltchloridlösung. Anschließend werden beide Filterpapiere mit einem Haartrockner getrocknet. Man befestigt das Reagenzglas am Stativ. Hierauf gibt man eine große Spatelspitze Cystein (alternativ: zwei bis drei Spatelspitzen getrocknetes Eiklar) in das Reagenzglas und stülpt einen passenden Trichter über die Reagenzglasöffnung. Nun erhitzt man das Reagenzglas mit dem Bunsenbrenner und hält über den Trichter zunächst ein feuchtes Lackmuspapier und anschließend Bleiacetatpapier. Mit der im Trichter niedergeschlagenen Flüssigkeit benetzt man das Cobaltchloridpapier.

Beobachtung. Die Aminosäure ist durch das Erhitzen zu einer schwarzen Masse verkohlt. Das rote Lackmuspapier färbt sich blau, das Bleiacetatpapier schwarz. Im Trichter kondensiert Wasserdampf, der das blaue Cobaltchloridpapier rot färbt.

Erklärung. Die nach dem Erhitzen zurückbleibende schwarze Masse lässt auf die Anwesenheit von Kohlenstoff schließen. Die Blaufärbung des Lackmuspapiers spricht für das Vorhandensein von Stickstoff. Durch das Erhitzen der Aminosäure entsteht Ammoniak. Der Farbumschlag des Lackmuspapiers geht auf die entstehenden Hydroxylionen zurück:



Die Schwarzfärbung des Bleiacetatpapiers zeigt an, dass in der Aminosäure Schwefel enthalten ist. Beim Erhitzen von Cystein entsteht Schwefelwasserstoff, der mit Bleiacetat zu schwarzem Bleisulfid reagiert:



Der im Trichter kondensierte Wasserdampf lässt auf die Anwesenheit von Sauerstoff und Wasserstoff in der Aminosäure schließen. Der Wasserdampf bewirkt eine Hydratisierung des Cobaltchlorids, und so färbt sich das Cobaltchloridpapier von blau nach rot.

Entsorgung. Reste der zur Herstellung des Bleiacetat- bzw. Cobaltchloridpapiers verwendeten Lösungen werden in einen Behälter für anorganische Abfälle (mit Schwermetallen) gegeben. Cobaltchloridpapier kann durch Trocknen regeneriert werden. Verbrauchtes Bleiacetat- und Cobaltchloridpapier werden in den Abfallbehälter für mit Gefahrstoffen verunreinigte Festsubstanzen gegeben. Lackmuspapier und die verkohlten Aminosäuren bzw. Proteine können im Hausmüll entsorgt werden.

V 2.1.2 Farbreaktionen mit Ninhydrin

Kurz und knapp. Aminosäuren können mit Ninhydrin sehr empfindlich nachgewiesen werden. Mit diesem Experiment lässt sich demonstrieren, in welchen Lebensmitteln Aminosäuren enthalten sind.

Zeitaufwand. Vorbereitung: 10 min, Durchführung: 10 min

Biochemische und physiologische Versuche mit
Pflanzen

für Studium und Unterricht im Fach Biologie

Wild, A.; Schmitt, V.

2012, XVIII, 446 S. 130 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-8274-2818-9