

1. Theoretischer Hintergrund .....	2
1.1 Proteine .....	2
1.2 Aminosäuren .....	3
1.3 Organisationsebenen der Proteine .....	5
1.4 Proteinbiosynthese – Genexpression .....	10
1.4.1 Transkription.....	11
1.4.2 RNA-Processing.....	12
1.4.3 Translation.....	12
2. Material und Methoden .....	18
2.1 Die Gelelektrophorese .....	18
2.2 SDS-PAGE .....	18
3. Versuchsdurchführung .....	20
3.1 SDS-PAGE .....	20
3.2 PAL-Enzymaktivität .....	20
3.3 Anthocyanbestimmung.....	21
3.4 Leucocyanbestimmung .....	21
4. Ergebnisse.....	22
4.1 SDS-PAGE .....	22
4.2 PAL-Enzymaktivität .....	22
TCA-Versuch.....	23
4.3 Anthocyanbestimmung.....	24
4.4 Leucocyanbestimmung .....	24
5. Diskussion .....	25
5.1 SDS-PAGE .....	25
5.2 PAL-Enzymaktivität .....	25
5.3 Anthocyanbestimmung.....	25
5.4 Leucocyanbestimmung .....	26
6. Zusammenfassung.....	26
7. Weiterführende Fragen.....	27

# 1. Theoretischer Hintergrund

## 1.1 Proteine

Proteine erfüllen in biologischen Systemen vielfältigste Aufgaben, so werden sie beispielsweise als Zellmaterial verwendet oder als Botenstoffe eingesetzt. Sie bilden eine Gruppe von außerordentlich komplizierten und vielgestaltigen Makromolekülen, die aus langen, unverzweigten Aminosäureketten bestehen. Die 20 proteinogenen Aminosäuren werden bei der Proteinbiosynthese über Peptidbindungen miteinander verknüpft.

Die Sequenz dieser Aminosäurekette ist für jedes Protein spezifisch und genetisch festgelegt, man kann also sagen, dass die Proteine die funktionelle Verwirklichung der in den Nukleinsäuren gespeicherten Informationen sind.

Innerhalb eines Organismus kann man die Proteine in verschiedene Großgruppen einteilen, hierbei unterscheidet man sie nach ihren Funktionen:

Die **Enzyme** bilden die größte Gruppe, sie sind von der Zelle gebildete Biokatalysatoren, die den Ablauf wichtiger Stoffwechselreaktionen beschleunigen. Sie sind essentiell, da sie den Bedarf an Aktivierungsenergie herabsetzen (der Organismus muss mit möglichst geringem Energieaufwand möglichst viel erreichen).

Enzyme sind Moleküle, die sich aus einem Proteinanteil und häufig aus einem Nicht-Proteinanteil, dem Coenzym, zusammensetzen. Den Proteinanteil nennt man Apoenzym; Apo- und Coenzym zusammen bilden das Holoenzym. Enzyme sind wirkungs- und substratspezifisch, sie können in sechs Hauptklassen unterteilt werden, die Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen.

Eine weitere Gruppe der Proteine sind die **Hormone**, hier werden die Proteine als Botenstoffe im Organismus eingesetzt, außerdem dienen sie auch als **Hormon-Rezeptoren**. Beispiele sind hier Insulin und Adrenalin.

Eine andere Gruppe bilden die **Strukturproteine**, sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von dreidimensionalen Strukturen, die der Stabilisierung und Festigkeit von Zellen und Geweben dienen. Als Beispiele sind hier die Histone (dienen der Stabilisierung der DNA) und Kollagen zu nennen.

Außerdem sind Proteine bei der Immunabwehr beteiligt, sie bilden die **Antikörper** und **Immunglobuline**, die dem Körper das Eindringen von Fremdstoffen mitteilen und diese bekämpfen.

Auch zum Transport von Substanzen innerhalb des Organismus werden Proteine verwendet, die so genannten **Transportproteine**. Ein bekanntes Beispiel für ein Transportprotein ist das Hämoglobin der Vertebraten, das O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> im Blut transportiert. Bei Pflanzen gibt es

integrale Membran-Proteine, die dem Transport von Substanzen durch die Zellmembran dienen.

Viele Einzeller besitzen Geißeln, die sie zur selbständigen, aktiven Fortbewegung befähigen. Bewegt werden diese Geißeln mit **kontraktilen Proteinen** wie Actin und Tubulin.

Des Weiteren sind, vor allem bei pflanzlichen Zellen, **Speicherproteine** bekannt. Sie sind nicht so weit verbreitet wie die sonst zur Energiespeicherung verwendeten Kohlenhydrate oder Fette und werden nach ihrer Löslichkeit unterteilt. Albumine (z.B.: Ovalbumin) lösen sich in Wasser, Gluteline in schwachen Säuren und Basen, Prolamine in Alkohol und Globuline in Salzlösungen.

Eine traurige Berühmtheit hat eine weitere Gruppe der Proteine erlangt, die Prionen, eine Proteinform, die natürlicherweise im Hirngewebe von Vertebraten vorkommen. Von den Prionen gibt es zwei Arten, die normalen Prionen, PrP<sup>c</sup>, und die pathogene Art, die PrP<sup>Sc</sup>, wobei Sc für Scrapie steht. Über die Funktion der Prionen im Hirngewebe ist noch nichts bekannt, es gibt jedoch die Theorien, dass sie bei der Regulierung der inneren Uhr oder der Nervenreizleitung in den Synapsen eine Rolle spielen.

Bei den Vertebraten kommt eine Krankheit vor, deren Erscheinungsformen unter dem Begriff Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) zusammengefasst werden. Bei Rindern ist die Krankheit als BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie), bei Schafen und Ziegen als Scrapie und bei Menschen als Creutzfeldt-Jacob bekannt, dies sind aber nur die bekanntesten Formen. Im Hirngewebe infizierter Individuen wurde eine Anhäufung der pathogenen PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle gefunden. Ob jedoch diese Proteine allein für die Krankheit verantwortlich sind, ist noch umstritten. Bekannt ist jedenfalls, dass diese infektiösen Proteine katalytische Eigenschaften besitzen, das heißt, sie falten die „guten“ Prionen in die infektiöse Form um. Man hat zwischen den beiden Protein-Formen keine chemischen Unterschiede feststellen können, fest steht nur, dass die PrP<sup>Sc</sup> mehr aus  $\beta$ -Faltblatt-, die PrP<sup>c</sup> mehr aus  $\alpha$ -Helix-Strukturen bestehen.

## 1.2 Aminosäuren

Alle Proteine sind wie anfangs beschrieben aus einer langen, unverzweigten Aminosäurekette aufgebaut. Es handelt sich hier um  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren, die durch eine endständige Carboxyl-Gruppe und durch eine Aminogruppe am  $\alpha$ -C-Atom charakterisiert sind. Sie haben die allgemeine Formel R-HC-NH<sub>2</sub>-COOH, wobei das R für einen variablen spezifischen Seitenkettenrest steht.

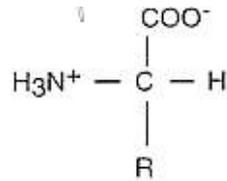


Abb.1: Allgemeine Struktur einer proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäure als Zwitterion (Praktikumsskript Pflanzenphysiologie SS 03, S.50)

Mit Ausnahme der einfachsten Aminosäure Glycin sind alle Aminosäuren optisch aktive Isomere, sie können aufgrund des chiralen C-Atoms in L- und in D-Form vorkommen. In der Fischer-Projektion liegt bei der L-Konfiguration die Aminogruppe auf der linken Seite des Moleküls, bei der D-Aminosäure auf der rechten Seite (von dexter, lat. rechts und laevus, lat. links). Die natürlich vorkommenden Aminosäuren haben fast alle L-Konfiguration.

Bakterien zum Beispiel können D-Aminosäuren in ihre Zellwand integrieren (z.B. im Murein), dies ist aber nur von ganz wenigen Lebewesen überhaupt bekannt.

Da ein Aminosäure-Molekül sowohl eine Säure- (Carboxylgruppe) als auch Basenfunktion hat (Aminogruppe), liegt es am isoelektrischen Punkt, an dem die Zahl der positiven und negativen Ladungen gleich ist, als Zwitterion vor. Und da die meisten Zellen ungefähr einen pH-Wert von 7 haben, liegen die Aminosäuren in den Zellen meistens als Zwitterionen vor.

Man kann die proteinogenen Aminosäuren nach der chemischen Struktur ihrer Seitenkette und ihrer Polarität einteilen. So gibt es neutrale, aliphatische, schwefelhaltige, aromatische, saure und basische AS (siehe Abb.2).

## Proteine

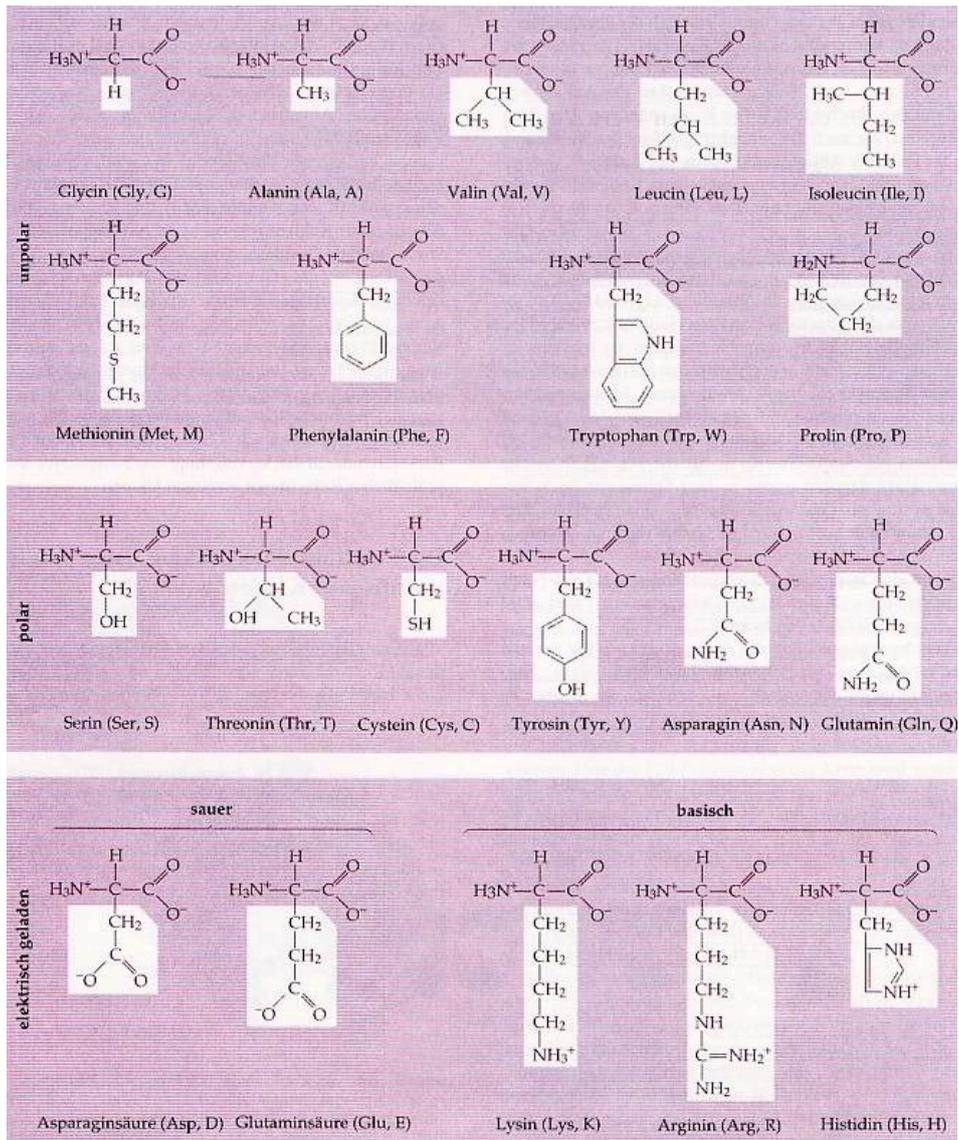


Abb.2: Die proteinogenen Aminosäuren (Campbell, Biologie, S.81, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Hier fällt besonders Prolin auf, deren Seitenketten-Rest einen Pyrolidin-Ring enthält, der sich durch einen Ringschluß in der Seitenkette gebildet hat.

Die Aminosäuren, die vom Organismus nicht selbst gebildet werden können, werden als essentiell bezeichnet und müssen dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden.

### 1.3 Organisationsebenen der Proteine

Ein Proteinmolekül kann in mehrere Strukturen unterteilt werden:

Die Aminosäuresequenz des Proteins bezeichnet man als **Primärstruktur**. Sie ist durch die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren so stabil, dass sie nur durch Peptidasen

hydrolytisch gespalten werden kann. Die Peptidbindung entsteht bei der Proteinbiosynthese, die Aminogruppe der einen Aminosäure kondensiert hierbei mit der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure zu einem Säureamid (Dipeptid).

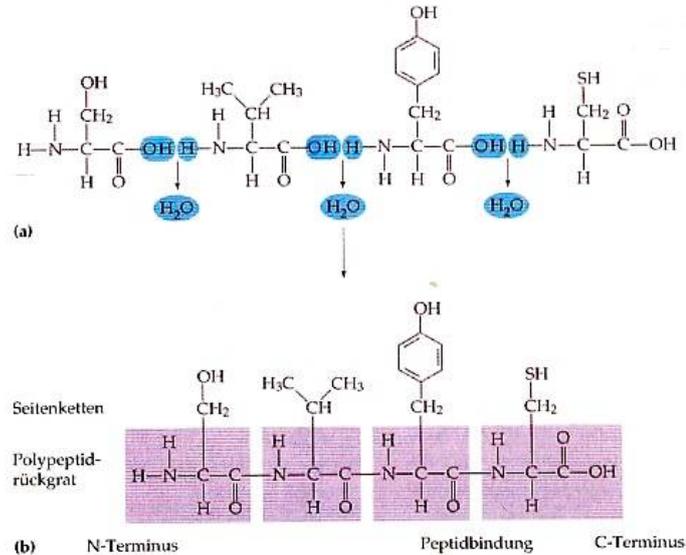


Abb.3: Peptidbindung (Campbell, Biologie, S.82, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Das Carboxylende eines Polypeptids wird als C-Terminus, das Aminoende als N-Terminus bezeichnet. Manche Aminosäuren werden während und nach der Translation noch modifiziert, so wird zum Beispiel Selenocystein, das auch als 21.Aminosäure bezeichnet wird, cotranslational durch eine eigene tRNA in die mRNA eingebaut. Andere Aminosäurereste werden posttranslational sekundär modifiziert, zum Beispiel werden sie phosphoryliert oder glycosiliert.

Durch die Primärstruktur werden alle weiteren Konformationen des Proteinmoleküls bestimmt:

Die **Sekundärstruktur** des Proteins entsteht durch Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen benachbart liegenden CO- und NH- Gruppen ausbilden. Da die Peptidebene sehr starr ist und nur an den Bindungen zwischen chiralem C-Atom und Carbonyl- bzw. Stickstoffatom eine Rotation möglich ist, kommt es zu sich regelmäßig wiederholenden Strukturen. Diese nennt man  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -Schleife.

Die am häufigsten auftretende Form ist die  $\alpha$ -**Helix**, hier windet sich das Proteinerückgrat in einer rechtshändigen Schraube auf, wobei die Polypeptide innen liegen und die Seitenketten nach außen aus dem Molekül herausragen.

Diese Form der Sekundärstruktur wird bevorzugt von den Aminosäuren Glutamat, Leucin, Glutamin, Lysin, Methionin, Histidin, Alanin, und Cystein gefördert.

Solche  $\alpha$ -Helix-Strukturen treten vor allem bei Transmembranproteinen (Ionenkanäle) oder DNA-bindenden Proteinen auf. Auch Hämoglobin, Myosin und Myoglobin sind  $\alpha$ -Helices.

Bei der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ist das Molekül nahezu ausgestreckt und regelmäßig wie eine flache Zieharmonika gefaltet. Hier kann man zwischen einem parallelem und einem antiparallelem Faltblatt unterscheiden, wobei bei dem parallelen Faltblatt alle Polypeptide in die gleiche Richtung zeigen. Das antiparallele Faltblatt ist energetisch begünstigt, da sich die Polypeptide hier nicht wie beim parallelen Faltblatt sterisch behindern. Faltblatt-fördernde Aminosäuren sind Phenylalanin, Threonin, Valin, Thryptophan, Isoleucin und Tyrosin, ein Beispiel für ein  $\beta$ -Faltblatt-Protein sind die TATA-Box-Bindungsproteine.

Die  $\beta$ -Schleifen-Struktur findet sich oft innerhalb oder an den Enden einer  $\alpha$ -Helix oder eines  $\beta$ -Faltblatts, sie bilden eine  $180^\circ$ -Kehrtwende im Peptidrückgrat und werden besonders durch die Aminosäure Prolin, aber auch durch Serin, Aspartat, Glycin und Asparagin gebildet. Am häufigsten kommen  $\beta$ -Schleifen an den Enden zweier benachbarter Abschnitte eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts vor, die durch sie verbunden werden.

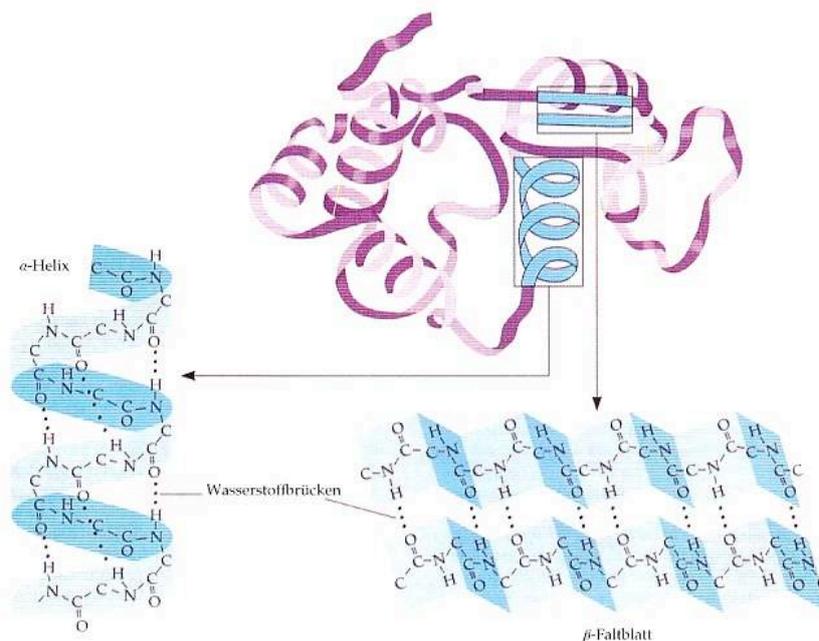


Abb.4: Sekundärstruktur (Campbell, Biologie, S.85, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Als **Tertiärstruktur** bezeichnet man weitere dreidimensionale Konfigurationen, die das Proteinmolekül aufgrund der Eigenschaften seiner Seitenkette annimmt. Hier treten Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte, Disulfidbrücken und kovalente Bindungen auf, außerdem kann es zur Komplexbildung mit Metallionen kommen.

Als Faltungsmotive werden besonders stabile Anordnungen mehrerer Sekundärstrukturen bezeichnet (räumliche und funktionelle Strukturen durch Faltung des Proteins), die ATP-Bindungsstelle zum Beispiel ist solch ein Faltungsmotiv, sie ist bei fast allen Proteinen sehr ähnlich aufgebaut.

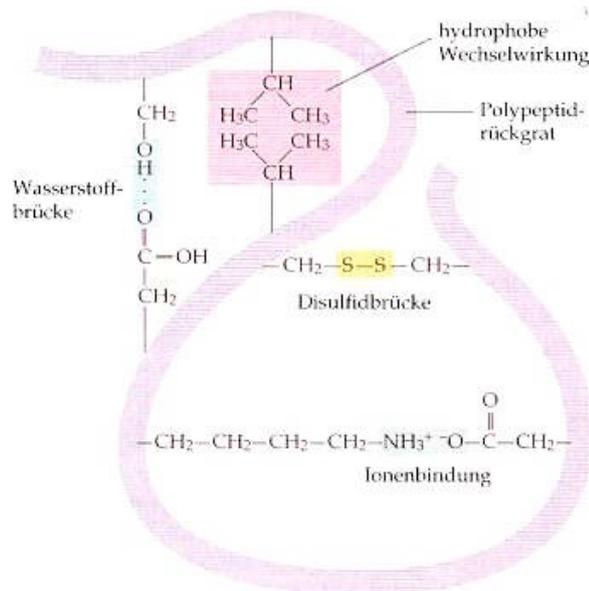


Abb.5: Tertiärstruktur (Campbell, Biologie, S.87, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Es kommt auch vor, dass sich mehrere Proteine als Untereinheiten zu einem strukturellen Komplex zusammenlagern; diese **Quartärstruktur** hat den Vorteil einer schnellen und effektiven Substratübertragung zwischen den Untereinheiten und bei deren Kooperation untereinander. Außerdem sind für den Organismus kleine Untereinheiten, die in mehreren Proteinen verwendet werden können, leichter herzustellen als große, komplex aufgebaute Moleküle.

Ein bekanntes Beispiel für ein Molekül mit Quartärstruktur ist das Hämoglobin der Vertebraten, das aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten besteht.

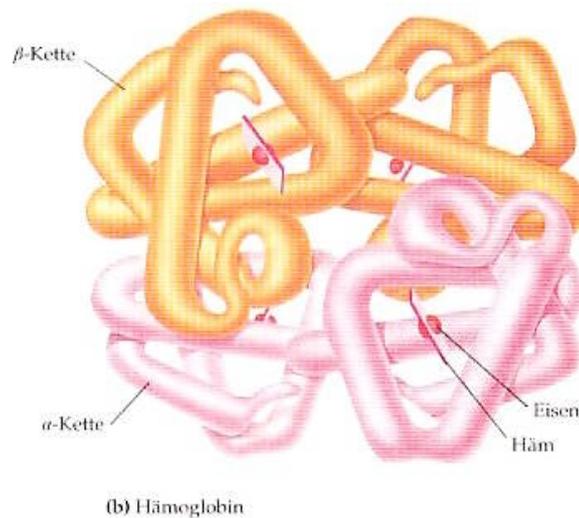


Abb.6: Quartärstruktur von Hämoglobin (Campbell, Biologie, S.87, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Ein Protein kann durch Einwirkung bestimmter Agenzien denaturiert (entfaltet) werden, hierbei werden die nichtkovalenten Wechselwirkungen, die die gefaltete Kette zusammenhalten, zerstört. Dadurch wird aus dem Protein eine flexible Polypeptidkette, die die natürliche Gestalt verloren hat. Wird aber das Denaturierungsmittel wieder entfernt, faltet sich das Protein oft spontan wieder in seine ursprüngliche Konformation zurück, es renaturiert. Diese Fähigkeit der Proteine ist auch ein Hinweis darauf, dass die ganze Information, die die dreidimensionale Struktur des Proteins festlegt, durch die Aminosäuresequenz bestimmt ist.

Je nachdem, wie hoch der Stressfaktor (zum Beispiel Hitze) ist, kann es auch passieren, dass ein Protein irreparabel geschädigt wird, ein Beispiel hierfür wäre die Denaturierung der Proteine beim Kochen eines Eis. Ist ein Ei einmal hart gekocht, kann es nicht wieder verflüssigt werden.

Aber auch hier bestehen Unterschiede zwischen den Proteinen. Die taq-Polymerase zum Beispiel, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, hat ihr Temperatur-Optimum zwischen 70°C und 80°C.

Obwohl sich ein Protein ohne Hilfe in seine korrekte Struktur falten kann, wird in den Zellen die Faltung durch spezielle Proteine, die **Chaperone**, gefördert. Sie lagern sich kurzfristig nicht-kovalent an ein ungefaltetes Protein an und kontrollieren dessen Faltung. Sie transportieren auch noch ungefaltete Proteine durch die Membran, durch die sie im gefalteten Zustand nicht gelangen würden (die Chaperone hindern es für die Zeit des Transports an der Faltung), und verhindern Wechselwirkungen mit anderen Proteinen.

Eine andere Aufgabe der Chaperone ist es, denaturierte Proteine in ihren nativen Zustand zurückzusetzen.

## 1.4 Proteinbiosynthese – Genexpression

Die genetische Information ist durch die Sequenz der Nucleotide in der DNA gespeichert.

Ein Nukleotidtriplett (**Codon**) codiert eine ganz bestimmte Aminosäure, aus vier verschiedenen Basen, können  $4^3 = 64$  mögliche Dreierkombinationen gebildet werden. Das heißt, manche Aminosäuren werden durch mehrere verschiedene Triplets codiert. Aus diesem Grund wird der genetische Code als **degeneriert** bezeichnet: man kann zwar eindeutig von einem Codon auf eine ganz bestimmte Aminosäure schließen, umgekehrt ist dies aber nicht möglich, da eine Aminosäure durch mehrere Triplets codiert werden kann.

Außerdem findet man im genetischen Code auch ein Startcodon (AUG), das gleichzeitig die Aminosäure Methionin codiert und drei Stoppcodons (UAA, UAG, UGA), die keine Aminosäure codieren.

Da die genetische Information durch die Nukleotidsequenz in der DNA gespeichert ist, definiert man ein **Gen** als einen DNA-Abschnitt, der ein Polypeptid (meist ein Protein) codiert. Als **Genom** bezeichnet man die Gesamtheit aller codierenden und nicht codierenden Genabschnitte.

Unter Genexpression versteht man die Verwirklichung der genetischen Information: die entscheidenden Schritte auf dem Weg vom Gen zum Protein sind Transkription, Processing und Translation.

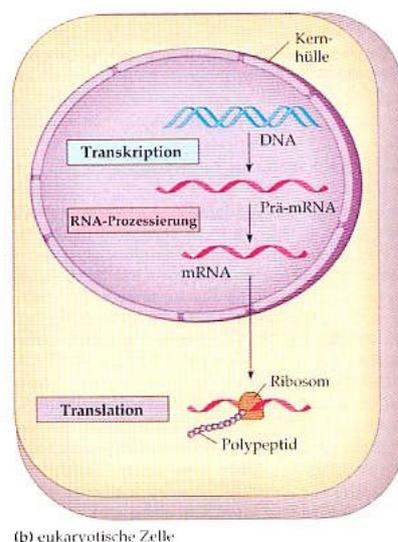


Abb. 7: Proteinbiosynthese bei Eukaryoten (Campbell, Biologie, S.328, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Das Bindeglied im Informationsfluss vom Gen zum Protein stellt die mRNA dar, dabei bezeichnet man die Übertragung von der DNA-Nucleotidsequenz in die RNA-Nucleotidsequenz als **Transkription**. Beim Processing wird die prä-mRNA in die mRNA umgewandelt. Unter **Translation** versteht man die Übersetzung der RNA-Nucleotidsequenz in die Aminosäuresequenz des Proteins.

### 1. 4.1 Transkription

Bei der **mRNA** (messenger RNA) handelt es sich um ein Transkript eines Gens, welches ein bestimmtes Protein kodiert. Um eine Kopie des Stranges, der die genetische Information trägt (sense-Strang, anticodogener Strang) zu erhalten, muss der dazu komplementäre Strang (non-sense-Strang, codogener Strang) transkribiert werden. Dieses Transkript kann dann aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert werden. Der Vorgang der m-RNA-Synthese wird als **Transkription** bezeichnet.

Die Transkription unterscheidet sich bei Eu- und Prokaryoten ein wenig:

Bei Prokaryoten binden sich RNA-Polymerasemoleküle schwach an die DNA, wenn sie zufällig darauf treffen. Dann gleitet die Polymerase schnell über die DNA, bis sie auf eine Promotor-Sequenz trifft, hier beginnt dann die Transkription, die im Cytoplasma gleichzeitig mit der Translation stattfindet..

Bei Eukaryoten katalysieren DNA-abhängige RNA-Polymerasen (RNA-Polymerase I, RNA-Polymerase II und RNA-Polymerase III) den im Kern stattfindenden Prozess.

Die Transkription beginnt an spezifischen Bereichen der DNA, die als **Promotor** bezeichnet werden. Die RNA-Polymerase II bindet für die Transkription am 3`-Ende eines Promotorbereichs. Diese Promotorbereiche befinden sich am 5`-Ende eines Gens, bestehen aus ca. 200 Basenpaaren und sind bei verschiedenen Organismen relativ ähnlich; sie werden deshalb auch als **Consensussequenzen** bezeichnet. Der wichtigste Teil des Promotors ist die sog. TATA-Box mit der charakteristischen Basenfolge „TATAAA“, sie befindet sich typischerweise 25 Nucleotide stromaufwärts der Initiationsstelle.

Der Transkriptionsprozess beginnt mit der Bindung des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID an die TATA-Box. Da die Basen Adenin und Thymin nur zwei Bindungen haben und nicht drei wie die Basen Guanin und Cytosin, ist die Doppelhelix an der TATA-Box leichter manipulierbar. Die Bindung von TFIID verursacht eine lokale und drastische Verbiegung der DNA, die für die Versammlung anderer Proteine (TFIIB, TFIIE, TFIIIF und andere Faktoren) am Promotor wie ein Startsignal wirkt. Nach der Bindung des ersten allgemeinen

Transkriptionsfaktors an die TATA-Box assemblieren sich die anderen Faktoren mit der RNA-Polymerase und bilden den Transkriptions-Initiationskomplex.

Die Verlängerung des RNA-Stranges wird als **Elongation** bezeichnet. Dabei trennt das Enzym (die RNA-Polymerase II) einen kurzen Abschnitt der DNA-Doppelhelix in Einzelstränge auf und entwindet die DNA. Im Anschluss daran wird der codogene Strang in 3' → 5'- Richtung abgelesen und die mRNA synthetisiert. Die Verknüpfung der RNA-Nucleotide erfolgt, ebenso wie bei der Replikation, nach dem Prinzip der Basenpaarung. Der einzige Unterschied zur Replikation liegt darin, dass in der mRNA an Stelle von Thymin Uracil eingebaut wird.

Beendet wird die Transkription durch eine **Terminationssequenz**, der sog. Polyadenylierungssequenz, z.B. „AATAAA“.

Bei der entstandenen m-RNA handelt es sich um eine sogenannte **prä-mRNA**. Diese muss erst noch prozessiert werden, bevor sie den Zellkern verlassen kann.

### 1.4.2 RNA-Processing

Beim **Processing** wird an das 5'-Ende der m-RNA ein 7-Methyl-GTP-Rest angehängt; dieser wird als **5'-Cap** bezeichnet und soll die m-RNA vor Abbau durch Exonukleasen schützen und dient außerdem als Erkennungsmerkmal für die Ribosomen. An das 3'-Ende wird ein **Polyadenylat-Schwanz** angeheftet. Der Poly-A- Schwanz dient der Erhöhung der Stabilität und hilft der m-RNA beim Verlassen des Zellkerns.

Ein weiterer Vorgang während des Processing ist das **splicing**. Beim splicing werden die nichtcodierenden Bereiche, die sog. **Introns** aus der mRNA herausgeschnitten und die verbliebenen codierenden Bereiche, die sog. **Exons** anschließend miteinander verbunden (verspleißt). Dieser Vorgang wird durch **small nuclear ribonucleoprotein particles** (snRNP), Verbindungen aus **snRNA** (kleine nukleäre RNA) und Proteinen, katalysiert.

Bei Prokaryoten findet die Transkription im Cytoplasma statt, da diese keinen Zellkern besitzen. Die mRNA wird meist nicht mehr prozessiert, da die meisten Prokaryoten keine Introns besitzen. Außerdem finden bei Prokaryoten auf Grund der nicht vorhandenen räumlichen Trennung Transkription und Translation gleichzeitig statt.

### 1.4.3 Translation

Die Translation stellt (nach Transkription und Processing) den dritten und letzten Schritt der Proteinbiosynthese dar.

Bei der Translation wird die Nucleotidsequenz der mRNA an den Ribosomen mit Hilfe der **tRNA** (transfer- RNA) in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Polypeptidsynthese).

Die tRNAs bestehen aus ca. 80–95 Nucleotiden und besitzen eine charakteristische Kleeblattsstruktur, an ihren 3'-Enden werden durch spezielle Enzyme, die **Aminoacyl-tRNA-Synthetasen**, die passenden Aminosäuren angehängt. Um welche AS es sich dabei handelt, wird durch das **Anticodon** der mittleren Schleife bestimmt. Das Anticodon erkennt durch Basenpaarung bestimmte Codons der mRNA und ordnet so die richtigen Aminosäuren, die am 3'-Ende der tRNA gebunden sind, den entsprechenden Codons zu.

Da die tRNAs als Bindeglied zwischen mRNA und Aminosäuren dienen, werden sie auch als **Adapter** bezeichnet.

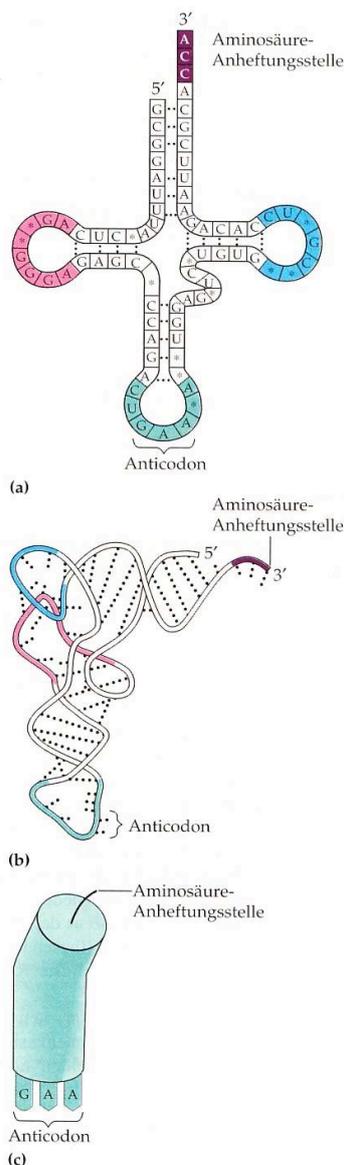


Abb.8: Struktur der tRNA (Campbell, Biologie, S.335, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)  
a, zweidimensionale Struktur; b, dreidimensionale, L-förmige Gestalt; c, vereinfachte Darstellung

Wie oben bereits erwähnt, müssen die tRNAs durch sog. **Aminosäure-Aktivierung** mit den entsprechenden Aminosäuren beladen werden. Der Vorgang der Aminosäuren-Aktivierung setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen:

- das aktive Zentrum der Aminoacyl-tRNA-Synthetase bindet die Aminosäure und ein ATP-Molekül
- das ATP bindet sich unter Abspaltung von zwei Phosphatgruppen an die Aminosäure
- die AMP- Aminosäure- Bindung erleichtert die kovalente Bindung der passenden tRNA an ihre Aminosäure; bei dieser kovalenten Bindung wird das AMP freigesetzt
- im letzten Teilschritt entlässt die Aminoacyl-tRNA-Synthetase die „aktivierte“ Aminosäure

Besonders gut untersucht ist der Vorgang der Translation, der im Cytoplasma abläuft, bei *E. coli*. Das Prinzip des Ablaufs ist jedoch bei Pro- und Eukaryoten ähnlich.

Die Synthese eines Polypeptids kann in drei Schritte unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Bei allen drei Teilschritten sind Proteinfaktoren zur Unterstützung von mRNA, tRNA und Ribosomen nötig.

Bei der **Initiation** bindet die kleine Untereinheit des Ribosoms unter dem Einfluss spezieller Proteine, den sog. Initiationsfaktoren, am 5'-Ende einer mRNA und bildet mit dieser einen sog. **Initiationskomplex**. Durch diesen Komplex wird schließlich die Bindung der ersten „aktivierten“ tRNA ermöglicht. Diese Initiator-tRNA trägt bei Eukaryoten die Aminosäure Methionin (bei Prokaryoten N-Formyl-Methionin), die passende Aminosäure für das Initiationscodon der mRNA (AUG).

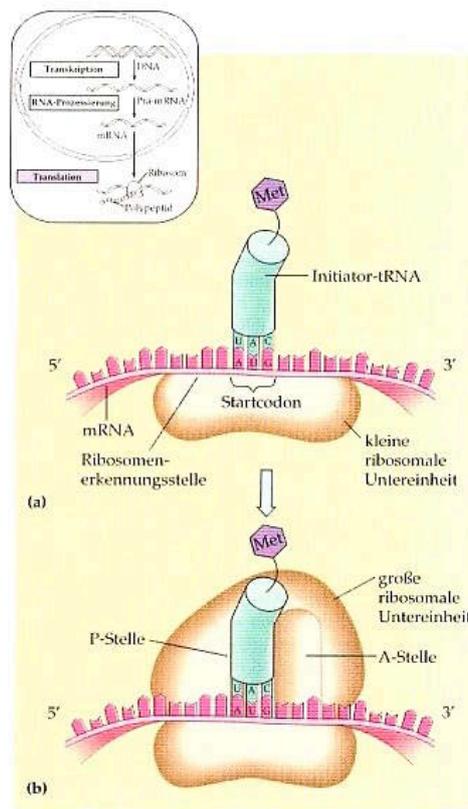


Abb.9: Initiation der Translation (Campbell, Biologie, S.337, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Erst jetzt bindet die große Untereinheit des **Ribosoms** an den Initiationskomplex, im Anschluss daran werden die Initiationsfaktoren abgespalten. Nach Beendigung des Initiationsvorgangs befindet sich die Initiator- tRNA an der **P-Stelle** (Peptidyl-Stelle) des Ribosoms, die freie **A-Stelle** (Akzeptor-Stelle) ist bereit, eine neue tRNA aufzunehmen.

Im zweiten Teilschritt, der **Elongationsphase**, wird die Peptidkette mit weiteren Aminosäuren verlängert. Auch bei der Anheftung weiterer Aminosäuren sind mehrere Proteine, die sog. Elongationsfaktoren, beteiligt.

Die Elongation erfolgt in drei Schritten:

- **Codonerkennung:** Bindung des Anticodons der tRNA an das passende Codon (an der A-Stelle des Ribosoms), hierzu wird ein Elongationsfaktor (GTP-haltiges Protein) benötigt. Damit eine feste Bindung entsteht, wird GTP zu GDP hydrolysiert; der Elongationsfaktor wird nach der Hydrolyse wieder abgespalten.
- **Bildung einer Peptidbindung:** das Polypeptid trennt sich von der an die P-Stelle gebundenen tRNA und hängt dann, über eine Peptidbindung verknüpft, an der neuen Aminosäure an der A-Stelle.

- **Translokation:** Die tRNA auf der P-Stelle ist wieder frei, kann abdissoziieren und im Cytoplasma mit Hilfe der Aminoacyl-tRNA-Synthetase neu beladen werden. Nach der Abdissoziation der freien tRNA wird die die Polypeptidkette tragende tRNA von der A- auf die P-Stelle verschoben; katalysiert wird diese Reaktion von der Peptidyltransferase. Beim Stellungswechsel der tRNA bleibt ihr Anticodon mit dem entsprechenden Codon der mRNA über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden, so wandern mRNA und tRNA als Einheit weiter. Die mRNA wandert immer mit dem 5'-Ende voran durch das Ribosom, dabei bewegt sich das Ribosom um ein Codon in 5' → 3'-Richtung vorwärts, das heißt, mRNA und Ribosom verschieben sich in festgelegter Richtung gegeneinander.

Die letzte Phase der Translation wird als **Termination** bezeichnet. Die Termination beginnt, wenn das Ribosom ein **Terminationscodon** (UAA, UGA, UAG) erreicht.

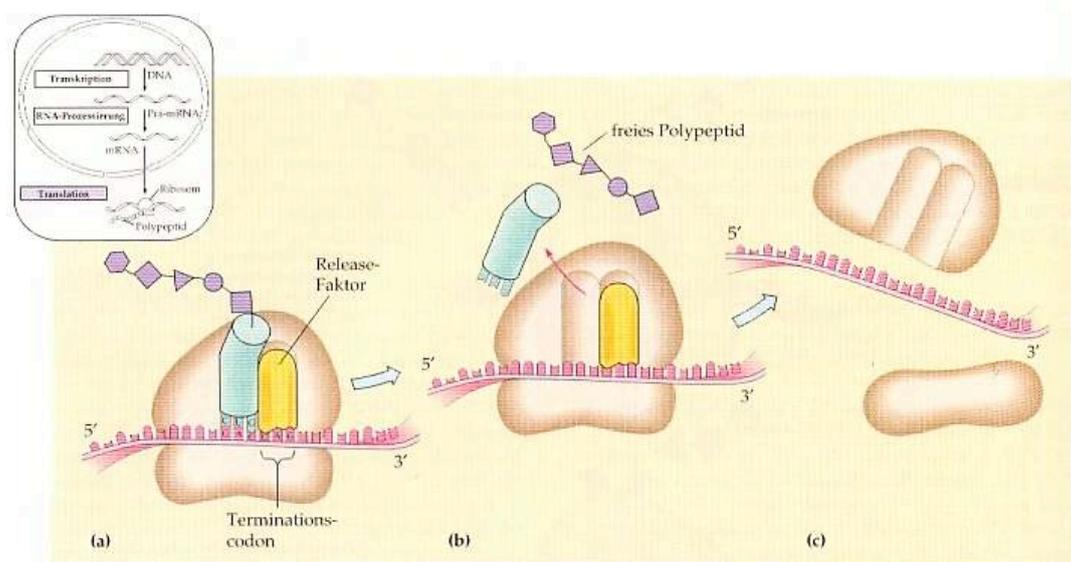


Abb. 10: Termination der Translation (Campbell, Biologie, S.340, 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Bei Erreichen dieses Codons bindet keine neue „aktivierte“ tRNA an die A-Stelle des Ribosoms, sondern ein Protein, der sog. **Release-Faktor** (Freisetzungsfaktor). Mit Hilfe des Release-Faktors wird das fertige Polypeptid von der letzten tRNA abgespalten.

Nach Abspaltung der Polypeptidkette wird die mRNA freigesetzt und das Ribosom dissoziiert wieder in seine kleine und große Untereinheit.

Unter **Polysomen** versteht man eine Anhäufung von Ribosomen, die gleichzeitig nacheinander eine einzelne mRNA translatieren. Die mRNA wird nicht ein einziges Mal,

sondern viele Male von den Ribosomen abgelesen, da die Zelle eine sehr große Anzahl an Proteinen benötigt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Die Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese erfolgt die Auftrennung der DNA durch die Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld, die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Form und Größe der jeweiligen DNA-Moleküle.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in der Regel in Gelen aus elektrisch neutralen Substanzen, die eine dreidimensional vernetzte Gitterstruktur bilden.

Während der Gelelektrophorese befindet sich das Gel zwischen einer Anode und einer Kathode in gepufferter Salzlösung, die den Stromfluss vermittelt. Die DNA-Proben werden in die Geltaschen auf der Seite der Kathode gegeben.

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt ab von der Länge der DNA-Moleküle: kleine Fragmente bewegen sich schneller durch die Gelmatrix als große. Gleich große Fragmente wandern gleich schnell, sodass sie sich nach Beenden der Elektrophorese auf derselben Höhe befinden und eine Bande bilden. Das Bandenmuster gibt Aufschluss über die Anzahl und die Länge der DNA-Fragmente.

Wenn die Größe der unbekannter DNA-Fragmente ermittelt werden soll, muss außerdem noch ein Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Größen als Standard aufgetragen werden.

Als einfaches Trennmedium in der Gelelektrophorese sind Agarosegele zu nennen. Bei diesen Gelen liegt die Grenze der Auflösungsfähigkeit bei DNA-Molekülen mit einer Größe von ca. 100 Basenpaaren.

### 2.2 SDS-PAGE

Wird eine hohe Auflösung benötigt (z.B. bei der Trennung von kleinen Nukleinsäuren und Proteinen, wo Unterschiede von nur einem Nucleotid bei der DNA-Sequenzierung auftreten können), ist eine **PAGE (Polyacrylamid- Gelelektrophorese)** erforderlich.

In der PAGE werden die Proteine, die getrennt werden sollen, mit dem Detergenz **SDS** (Natriumdodecylsulfat) und reduzierenden Reagenzien wie Mercaptoethanol oder DTT (Dithiothreitol) denaturiert. Die diskontinuierliche Page besteht aus zwei Gelphasen, dem niedrig konzentrierten Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel, durch das die Probe zuerst läuft, hält möglicherweise noch in der Probe enthaltene Zellfragmente und nicht

denaturierte Proteine zurück und bringt alle Proteine auf eine Startlinie. Das Sammelgel besteht aus 4% Acrylamid/Bis-Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 und 0,05% SDS, das Trenngel besteht aus 10% Acrylamid/Bis-Acrylamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 und 0,05% SDS. Das Acrylamid ist im flüssigen Zustand ein Neurotoxin, wenn es auspolymerisiert ist, ist es nicht mehr toxisch. Zur Herstellung der Polyacrylamidgele werden Lösungen der Monomere Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 29:1 in Gegenwart des Katalysators TEMED und mit Ammoniumpersulfat (APS) als Starter polymerisiert. In der Regel läuft die Elektrophorese bei der SDS-PAGE vertikal.

Bei unserem Versuch wurden etiolierte und 14h belichtete Buchweizenkeimlinge (*Fagopyrum esculentum*) verwendet.

### 3. Versuchsdurchführung

#### 3.1 SDS-PAGE

Das Trenngel war vom Versuchsbetreuer schon vorbereitet. Wir haben 4ml Sammelgellösung mit 50 $\mu$ l APS und 5 $\mu$ l TEMED gemischt und nach Entfernen des Wassers auf das Trenngel gegossen, zum Formen der Taschen wurde ein Kamm eingesetzt und das Gel zum Polymerisieren ca. 30min stehengelassen. Hierbei sind aufgrund der Toxizität des Acrylamids Handschuhe zu tragen, außerdem ist zu beachten, dass das Gel recht schnell polymerisiert.

Je 2g der etiolierten und belichteten Hypokotyle werden mit Seesand und 5ml kaltem Boratpuffer homogenisiert, diese Mischungen werden bei 12000 g für 10min abzentrifugiert, der Überstand wird auf Eis aufbewahrt.

Zu je 20 $\mu$ l des Extrakts werden 20 $\mu$ l Laemmli-Puffer gegeben und für 5min bei 80°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Aus 10x SDS-Laufpuffer wird 1x Laufpuffer hergestellt, mit dem dann die Pufferkammern befüllt werden.

In zwei Taschen wird Marker als Größenreferenz in das Gel geladen, in zwei andere Taschen die Proben aus belichteten und unbelichteten Buchweizenkeimlingen. Die Elektrophorese wird bei 100V gestartet, später wird auf 200V hochgestellt, um die Elektrophorese zu beschleunigen, die ca. 1h läuft.

Der Versuchsbetreuer färbt das Gel nach Beendigung der Elektrophorese 1h mit Coomassie Brilliant Blue ein und lässt es über Nacht vom Labor entfärben.

#### 3.2 PAL-Enzymaktivität

Die Messung der PAL-katalysierten Reaktion basiert auf der photometrischen Bestimmung des Produktes Zimtsäure, die ihr Absorptionsmaximum bei 290nm hat.

Je 1,5ml Boratpuffer werden mit 1,0ml Phenylalaninlösung und 0,5ml Probenlösung (etiolierte und belichtete Buchweizenkeimlinge) gemischt. Zur Bestimmung des Leerwerts misst man mit einer Mischung aus 2ml Boratpuffer und 1ml Phenylalaninlösung bei einer Wellenlänge von 290nm. Da mit Licht im UV.-Bereich photometriert wird, verwendet man Quarzküvetten, die das kurzwellige Licht nicht brechen und so das Ergebnis nicht verfälschen.

Dann werden die Proben über einen Zeitraum von 30min in 5min-Intervallen gegen den Leerwert photometriert.

Parallel wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration ein Test zur Proteinfällung mit TCA (Trichloressigsäure) durchgeführt.

Hier werden 1ml Probenlösung mit 4ml TCA gemischt und 10min stehen gelassen. Der Leerwert wird mit Wasser bestimmt (das TCA hat keinen Einfluß auf die Extinktion), dann werden die Proben bei 600nm gegen den Leerwert photometriert.

### **3.3 Anthocyanbestimmung**

Je 2g der Hypokotylen werden mit Seesand und 10ml HCl homogenisiert und 10min bei 12000 g zentrifugiert. Die Proben werden bei 515nm gegen den mit reiner HCl bestimmten Leerwert gemessen.

### **3.4 Leucocyanbestimmung**

In saurem Milieu werden die farblosen Leucocyane mit dreiwertigem Eisen durch Dehydratisierung zu gefärbten Anthocyanen umgewandelt, deren Gehalt dann im Photometer bestimmt werden kann.

In einem hohen Reagenzglas werden 8ml Lösung A (200ml konz. HCl (32%) und 300ml n-Butanol), 2ml Lösung B (77mg  $\text{FeSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  in 100ml Lösung A) und je 2g Hypokotyle gegeben und für 15min im siedenden Wasserbad erhitzt (Murmeln auf die Reagenzgläser legen, damit nichts verdampft!). Der Leerwert wird mit Lösung A und Lösung B ohne Hypokotyle bei 515nm bestimmt.

Nach dem Abkühlen der Proben werden je 0,15ml Probe mit 2,85ml Lösung A verdünnt und die Extinktion bei 515nm gemessen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 SDS-PAGE

Leider wurden bei diesem Versuch keine Ergebnisse erzielt, da aus einem uns nicht bekannten Grund das Gel trotz angemessener Polymerisationszeit nicht vollständig polymerisiert ist. Das Gel ist zwischen den beiden Glasplatten verrutscht, so dass die Taschen teilweise verschoben waren, außerdem waren sehr viele Luftblasen im Gel.

Leider wurde zusätzlich dazu unser Gel vom Labor, in dem es entwickelt werden sollte, vergessen, so dass keine Ergebnisse mehr zu erkennen waren.

Theoretisch hätten wir in diesem Versuch ein Bandenmuster erhalten, das die Laufwerte des Markers neben den Laufwerten der Proben anzeigt. Mit Hilfe der Laufweiten des Markers, dessen Größe bekannt ist, kann man eine Eichgerade aufstellen, indem man die Laufweiten des Markers auf die x-Achse und den Logarithmus des Molekulargewichts der Banden auf die y-Achse aufgetragen wird. Mit Hilfe dieser Kalibriergerade können dann die Molekulargewichte der Banden der beiden Proben abgelesen werden.

### 4.2 PAL-Enzymaktivität

Zeit [min]	Messung [nm]	Extinktion belichtet	Extinktion unbelichtet
0	290	2,164	1,242
5	290	2,16	1,238
10	290	2,161	1,232
15	290	2,173	1,248
20	290	2,168	1,253
25	290	2,17	1,257
30	290	2,194	1,261

Die gebildete Zimtsäure lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\Delta E = E_{30\text{min}} - E_{0\text{min}}$$

wobei  $\epsilon = 10^7 \text{cm}^2/\text{mol}$  und  $d = 1\text{cm}$  (Schichtdicke der Küvetten)

Extinktion 0,22 entspricht 1mg Protein

Enzymaktivität der PAL berechnet sich aus:

$$A_{PAL} = \frac{\text{Zimtsäure}[\text{nmol}]}{\text{Zeit}[\text{min}] \cdot \text{Proteinmenge}[\text{mg}]}$$

**TCA-Versuch**

Die Probe mit den belichteten Keimlingen hatte eine Extinktion von 0,110, die Probe der unbelichteten Keimlinge von 0,064.

**PAL-Enzymaktivität bei belichteten Pflanzen:**

$$\Delta E = 2,194 - 2,164 = 0,03$$

$$\text{Lambert-Beersches-Gesetz: } c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d}$$

Verdünnungsfaktor: 0,5ml Extrakt + 1,5ml Boratpuffer + 1ml Phenylalaninlösung  $\ddot{E}$  6

$$c = 6 \cdot \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} = 6 \cdot \frac{0,03}{10^7 \frac{\text{cm}^2}{\text{mol}} \cdot 1\text{cm}} = 18 \cdot 10^{-9} \text{ mol/cm}^3 = 18 \cdot 10^{-9} \text{ mol/ml} = 18 \text{ nmol/ml}$$

**Proteinmenge:**

Extinktion von 0,22 = 1mg Protein

$\ddot{E}$  1mg/0,22 = x/0,11  $\ddot{E}$  x = 0,11 mg/0,22  $\ddot{E}$  x = 0,5mg Protein in unserer Probelösung

**PAL-Aktivität:**

$$A_{PAL} = \frac{18 \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}}{30 \text{ min} \cdot 0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} = 1,2 \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$$

**PAL-Enzymaktivität bei unbelichteten Pflanzen:**

$$\Delta E = 1,261 - 1,242 = 0,019$$

Verdünnungsfaktor: 6

$$c = 6 \cdot \frac{0,019}{10^7 \frac{\text{cm}^2}{\text{mol}} \cdot 1\text{cm}} = 1,14 \cdot 10^{-8} \text{ mol/cm}^3 = 1,14 \cdot 10^{-8} \text{ mol/ml} = 1,14 \text{ nmo/ml}$$

**Proteinmenge:**

Extinktion von 0,22 = 1mg Protein

$\ddot{E}$  1mg/0,22 = x/0,064  $\ddot{E}$  x = 0,064 mg/0,22  $\ddot{E}$  x = 0,29mg Protein in unserer Probelösung

**PAL-Aktivität:**

$$A_{PAL} = \frac{1,14 \frac{nmol}{ml}}{30 \text{ min} \cdot 0,5 \frac{mg}{ml}} = 0,076 \frac{nmol}{\text{min} \cdot mg}$$

**4.3 Anthocyanbestimmung**

Die Probe mit den belichteten Hypokotylen hatte eine Extinktion von 1,6, die Probe mit den etiolierten Hypokotylen eine Extinktion von 0,031.

Extinktion 1 entspricht 0,37  $\mu$ mol Cyanidin:

Die belichteten Pflanzen hatten einen Cyanidingehalt von 0,592  $\mu$ mol Cyanidin.

Die unbelichteten Pflanzen hatten einen Cyanidingehalt von 0,01147  $\mu$ mol Cyanidin.

**4.4 Leucocyanbestimmung**

Die Probe mit den belichteten Hypokotylen hatte eine Extinktion von 0,112, die Probe mit den etiolierten Hypokotylen eine Extinktion von 0,031.

Extinktion 1 entspricht 0,37  $\mu$ mol Cyanidin:

Da die Proben mit dem Faktor 20 verdünnt wurden, muss mit einer Extinktion von 2,24 bei der belichteten Probe und einer Extinktion von 0,62 bei der unbelichteten Probe gerechnet werden, außerdem muss der im vorherigen Versuch bestimmte Anthocyangehalt abgezogen werden. Die farblosen Leucocyane werden mit dem dreiwertigen Eisen durch Dehydratisierung zu den farbigen Anthocyanen umgewandelt, man misst bei diesem Versuch also die absolute Anthocyan-Menge. Da man aber den Leucocyan-Gehalt bestimmen will, muss man die im vorausgegangenen Versuch bestimmte Anthocyan-Menge, die in der Probe enthalten ist, abziehen. So kann man einfach die enthaltenen Äquivalente Anthocyan als Äquivalente Leucocyan ansprechen.

Belichtete Pflanzen: 0,8288  $\mu$ mol - 0,592  $\mu$ mol = 0,2368  $\mu$ mol Leucocyan

Unbelichtete Pflanzen: 0,2294  $\mu$ mol - 0,01147  $\mu$ mol = 0,2179  $\mu$ mol Leucocyan

## **5. Diskussion**

### **5.1 SDS-PAGE**

Bei diesem Versuch wäre zu erwarten gewesen, dass die Bandendensität der Probe der unbelichteten Pflanzen deutlich größer ist als die der Probe der belichteten Pflanzen, da in den unbelichteten Pflanzen noch alle Speicherproteine vorhanden sind. Hier sind sie, da das PAL noch nicht induziert wurde, noch nicht in Farbstoffe umgewandelt. In den belichteten Pflanzen sind viel weniger Speicherproteine vorhanden, deswegen wäre hier eine geringere Bandendichte zu erwarten gewesen.

### **5.2 PAL-Enzymaktivität**

Bei diesem Versuch haben wir ein Ergebnis erhalten, das in etwa unseren Erwartungen entsprach: die Enzymaktivität in den belichteten Pflanzen ist höher als in den unbelichteten Pflanzen.

Theoretisch müsste die Enzymaktivität der unbelichteten Pflanzen gleich null sein, da in ihnen das PAL durch den Lichtmangel noch nicht induziert war.

### **5.3 Anthocyanbestimmung**

Bei diesem Versuch kann man erkennen, dass die belichteten Pflanzen einen wesentlich höheren Anteil an Anthocyan hatten als die unbelichteten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die belichteten Pflanzen gezwungen sind, ihre Zellen vor der schädlichen UV-Strahlung zu schützen und diesen Schutz durch eingebaute Farbstoffe erreichen. Die unbelichteten Pflanzen haben keinen Anlass sich zu schützen und sparen sich also die Energie, die aufgewandt werden müsste, um die Farbstoffe zu produzieren. Dass die unbelichteten Pflanzen überhaupt Anthocyane enthielten kommt daher, dass sie nicht komplett lichtfrei ausgezogen werden konnten (beim Gießen etc. waren sie wohl dem Licht ausgesetzt). Grundsätzlich produzieren Pflanzen keine unbenötigten Proteine, da sie mit einem begrenzten Energiehaushalt wirtschaften müssen, alle vorhandenen Ressourcen werden optimal genutzt.

## 5.4 Leucocyanbestimmung

Man kann erkennen, dass beide Pflanzen, unbelichtete und belichtete, nahezu den gleichen Leucocyangehalt haben. Die unbelichteten Pflanzen produzieren Leucocyane, damit sie, wenn sie Licht bekommen, sofort mit der Farbstoffsynthese beginnen können und nur möglichst kurz dem schädlichen UV-Licht ausgesetzt sind. Die belichteten Pflanzen produzieren die Leucocyane als Vorstufe und Reservoir für die Farbstoffsynthese.

Es ist möglich, dass unser Ergebnis verfälscht wurde, da die gekochte Probe der unbelichteten Pflanzen aus einem uns nicht bekannten Grund auch Farbstoff enthielt.

Möglicherweise kommt dies daher, dass die Pflanzen während der Aufzucht nicht wirklich komplett lichtfrei gehalten wurden und so schon ein wenig Anthocyan produziert haben.

Außerdem haben wir die Murneln zu spät auf die Reagenzgläser gegeben, es ist also möglich, dass manche Proteine schon verdampft waren und nicht in unserem Ergebnis enthalten sind.

## 6. Zusammenfassung

In unseren Versuchen haben wir den Gehalt von Anthocyanen und Leucoanthocyanen in belichteten und unbelichteten Buchweizenkeimlinge bestimmt. Wir haben die Enzymaktivität von Phenylalaninammoniumlyase in den Keimlingen bestimmt und eine SDS-PAGE durchgeführt.

## 7. Weiterführende Fragen

**Was bedeutet L-Aminosäure? Welche Aminosäure in Abb.1 des Praktikumsskripts Proteine besitzt unter diesem Aspekt eine Besonderheit?**

L-Aminosäure bedeutet, dass die Amino- und die Carboxylgruppe an einem chiralen (assymmetrischen) „C“ C-Atom gebunden sind, dies verleiht dem Molekül eine optische Aktivität. Das L bedeutet, dass, wird das Molekül in der Fischer-Projektion abgebildet, die Aminogruppe auf der linken Seite des chiralen C-Atoms steht.

Die Aminosäure Threonin hat, im Gegensatz zu den anderen abgebildeten Aminosäuren, ein zweites chirales Zentrum.

**PAL wird in der Pflanzenentwicklung neu synthetisiert. Können sie andere Mechanismen der Regulierung der Enzymaktivität nennen?**

Andere Mechanismen zur Regulierung der Enzymaktivität sind zum Beispiel die Endprodukt-Repression, die allosterische Hemmung oder Feedforward-Stimulierung.

Bei der Endprodukt-Repression wird durch die Anhäufung des Endproduktes die Enzymsynthese gehemmt (Feedback-Hemmung).

Die allosterische Hemmung ist recht häufig, hierbei werden die Enzyme durch sogenannte Regulator-Moleküle (Effektoren oder Modulatoren) beeinflusst. Diese Moleküle hemmen das Enzym durch Binden an ein allosterisches Zentrum am Enzym, dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms und es hat seine Funktion verloren. Bei den Regulatoren kann es sich um das Substrat der vom Enzym katalysierten Reaktion oder andere Stoffe handeln.

Viele Enzyme sind auch nur in Kombination mit einem Cofaktor aktiv, fehlt dieser, hat das Enzym keine Wirkung.

Eine andere Form der Enzymregulierung ist die Interkonversion, hier wird das Enzym durch eine Modifikation, zum Beispiel eine Phosphorylierung, verändert. Dies kann, je nach Enzym und Modifikation zu einer Aktivierung oder einer Deaktivierung des Enzyms führen.

Wird die Enzymsynthese durch ein Produkt eines vorgeschalteten Stoffwechsels gesteuert, spricht man von einer Feedforward-Stimulierung

### **Warum wandern bei der SDS-PAGE alle Proteine zur Anode?**

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine der Probe mit SDS (Natriumdodecylsulfat), einer Seife, denaturiert. SDS-Moleküle haben einen hydrophoben Schwanz und einen polaren, negativ geladenen Kopf. Diese Moleküle lagern sich mit den negativen Ladungen nach außen an die Proteine an, die somit Kationen gleichen. Kationen wandern immer in Richtung der Kathode.

### **Sehen Sie bei der Gelelektrophorese im Vergleich des Materials Unterschiede?**

Im Gegensatz zur „normalen“ Gelelektrophorese wird hier ein Gel verwendet, das aus zwei Phasen besteht, bei der Gelelektrophorese läuft die Probe durch ein einphasiges Gel.

Der Vorteil des zweiphasigen Gels ist, dass die Proben auf ein Level gebracht werden und so alle einen gleichen Startpunkt haben.

Außerdem laufen bei der SDS-PAGE die Proben durch ein aufgestelltes Gel und nicht waagrecht durch das Gel.

Ein weiterer Vorteil gegenüber der Gelelektrophorese ist die Verwendung eines ungiftigen Farbstoffes (Coomassie Brilliant Blue G), bei der Gelelektrophorese wird toxisches Ethidiumbromid verwendet. Doch auch bei der SDS-PAGE werden giftige Substanzen verwendet (Acrylamid und Bisacrylamid, Bestandteile des Trenngels), die aber nach dem Polymerisieren nicht mehr toxisch sind.

Ein auf den unterschiedlichen Farbstoffen beruhender Unterschied ist, dass das Gel aus der Gelelektrophorese nur auf der UV-Box betrachtet werden kann, bei dem PAGE-Gel kann man ohne Hilfsmittel das Ergebnis ablesen.

## Literaturangabe

- Campbell, Biologie; 2.korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum Akademischer Verlag
- alte Protokolle
- Schopfer, Peter und Brennicke, Axel: Pflanzenphysiologie, 5. völlig neubearbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1999
- Alberts et al.: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 2., korrigierte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2001
- [www.verbraucherministerium.de/forschungsreport/rep1-97/prionen.html](http://www.verbraucherministerium.de/forschungsreport/rep1-97/prionen.html)