

**BIOCHEMIE des Stoffwechsels
(772.114)**

11. Einheit

**Protein und Aminosäure
Stoffwechsel**

Abbau von Proteinen aus der Nahrung
Abbau von zellulären Proteinen
Transaminasen und Glutamat-Dehydrogenase
Harnstoff-Cyclus
Abbau von Aminosäuren

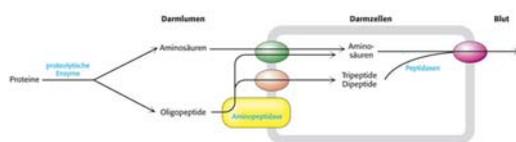
Abbau von Proteinen aus der Nahrung

Proteine aus der Nahrung sind eine lebenswichtige Aminosäurequelle. Einige Aminosäuren aus der Nahrung sind für den Menschen essentiell, d.h. der Mensch kann sie nicht selbst synthetisieren.

Für den Menschen **essentielle Aminosäuren** sind:

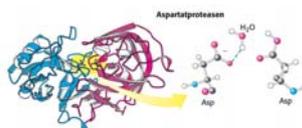
- Histidin** und **Lysin**
- Phenylalanin** und **Tryptophan**
- Threonin**
- Methionin**
- Leucin, Isoleucin** und **Valin**

Eine weitere Quelle für Aminosäuren ist der Abbau von zellulären Proteinen, die defekt sind oder nicht benötigt werden.

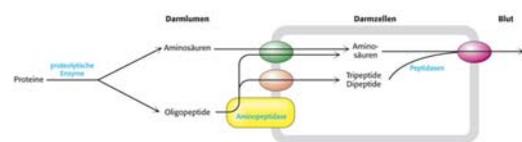


Die Proteinverdauung beginnt im **Magen**. **pH-Wert ~ 2**. Die meisten Proteine **denaturieren** in diesem Milieu. Dadurch werden sie für die Proteolyse zugänglich.

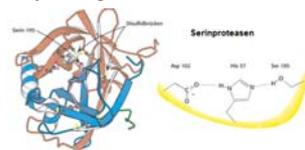
Sezernierung von **Pepsin**:



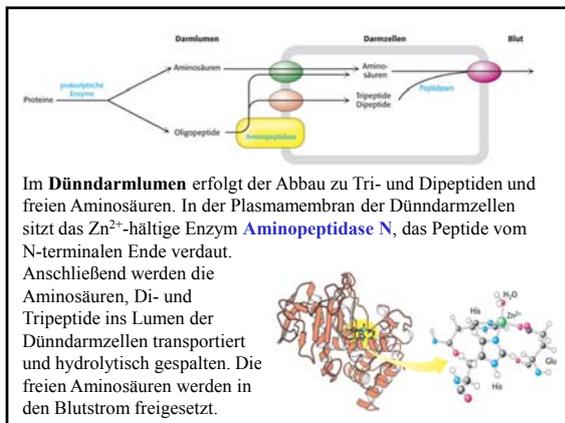
unspezifisch,
Aktivitätsmaximum
bei pH 2.0!
Pepsin ist eine
saure Endopeptidase
mit zwei Asp im
aktiven Zentrum



Im **Dünndarm lumen** wird dann der Proteinabbau fortgesetzt. Das **Pankreas** sezerniert eine Reihe proteolytischer Enzyme als inaktive **Zymogene** in das Darm lumen, wo sie anschließend in aktive Enzyme umgewandelt werden.



Beispiele:
Chymotrypsinogen zu
Chymotrypsin oder
Trypsinogen zu
Trypsin. Beides sind
Serinproteasen (siehe
Einheit 1)



Abbau von Proteinen aus der Nahrung
Abbau von zellulären Proteinen

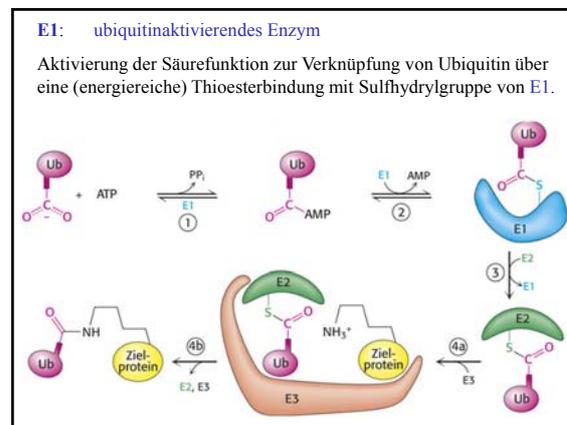
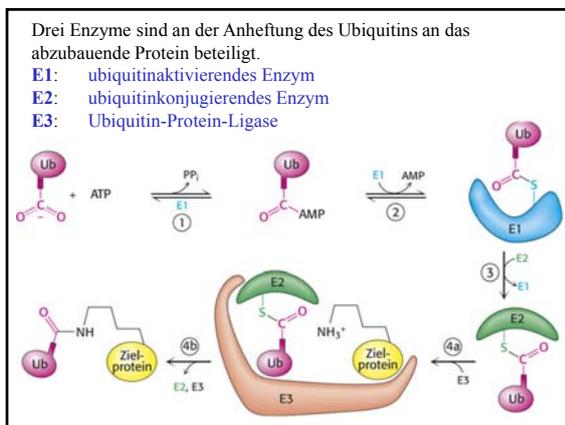
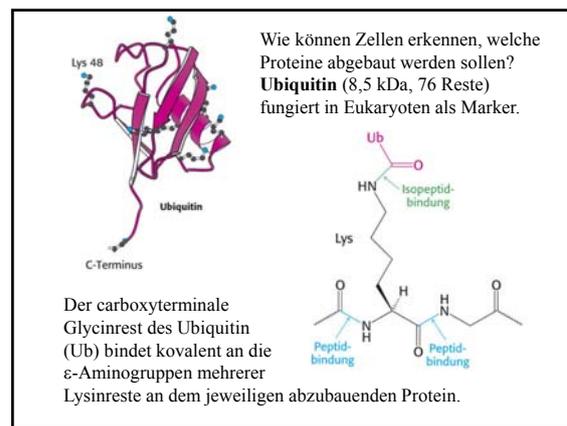
Zelluläre Proteine werden ständig abgebaut und synthetisiert. Manche Proteine haben eine sehr lange Halbwertszeit (z.B. Augenlinsenprotein Crystallin), manche eine kurze Lebenszeit (z.B. die Peptidhormone Insulin oder Glucagon). Auch fehlerhaft synthetisierte (Translationsfehler) oder oxidative geschädigte Proteine müssen entfernt werden.

Die **Halbwertszeit** cytoplasmatischer Proteine hängt von der Natur ihrer **aminoterminalen Reste** ab (**N-Terminus Regel**):

Beispiel Hefe:

Hochgradig stabilisierend: $t_{1/2} > 20$ Stunden: Ala, Cys, Gly, Met, Pro, Ser, Thr, Val
 Destabilisierende Reste: $t_{1/2} \sim 2-30$ Minuten: Arg, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Trp, Tyr

Manche Reste destabilisieren nach chemischer Veränderung (Asn, Asp, Gln, Glu)



E2: ubiquitinkonjugierendes Enzym: Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf Sulfhydrylgruppe von E2.

E3: Ubiquitin-Protein-Ligase: Transfer des Ubiquitins von E2 auf eine ε-Aminogruppe des Zielproteins

An einem Zielprotein kann eine **Kette von Ubiquitinmolekülen** hängen. Dies kann das Signal zum Proteinabbau verstärken. Kette entsteht durch Verküpfung der ε-Aminogruppe des Lys48 eines Ubiquitins an das C-terminale Ende eines weiteren Ubiquitins usw.

Halbwertszeit folgt der N-Terminus-Regel. Destabilisierende N-terminale Reste (z.B. Arg oder Leu) begünstigen die rasche Anlagerung von Ubiquitin, Gruppen wie Met oder Pro jedoch nicht.

Die N-terminalen Reste werden von **E3** gelesen. Im Gegensatz zu **E1** und **E2** sind **E3-Enzyme sehr heterogen**, gehören zu unterschiedlichen Proteinfamilien. Die **E3-Familie** bildet eine der größten Genfamilien des Menschen. Offenbar erfordert die große Vielfalt an Zielproteinen eine große Zahl von **E3-Enzymen**.

Es gibt auch noch andere Signale, die Proteine für den Abbau identifizieren, z.B. Cyclinabbaukasten (**cyclin destruction boxes**). Das sind Aminosäuresequenzen, die Zellzyklusproteine für den Abbau markieren. Oder **PEST**-Sequenzen (P-E-S-T: Pro-Glu-Ser-Thr).

Letztendlich werden die durch Ubiquitin markierten Proteine an einem riesigen Proteasekomplex, dem **Proteasom** oder **26S-Proteasom** (ATP-abhängige Protease) verdaut.

Das **Proteasom** ist ein Komplex aus einer katalytischen 20S Untereinheit und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten (Caps). Die 20S-Einheit ist aus zwei Homologen Untereinheiten aufgebaut (700 kDa). Anordnung: vier Ringe zu je sieben Untereinheiten.

Die 20S-Untereinheit ist ein geschlossenes Fass. Der Zugang wird durch die beiden regulatorischen 19S-Untereinheiten gesteuert. Diese binden spezifisch an Polyubiquitinketten. Sie enthalten verschiedene **ATPasen**. Die Hydrolyse von ATP unterstützt die Entfaltung der Zielproteine und deren Transport in das 20S Proteasom.

Im 20S Proteasom werden die Zielproteine, aber nicht die Ubiquitinmoleküle proteolytisch abgebaut. Letztere werden wiederverwendet.

Die proteolytisch aktiven Zentren im Inneren der Fassstruktur des 20S-Proteasoms sind abgeschirmt. Die β -Untereinheiten haben drei Typen von aktiven Zentren mit unterschiedlicher Spezifität. Prominenter Rest: Nucleophile Hydroxylgruppe eines konservierten **Threonins** (Mechanismus ähnlich den Serinproteasen, siehe Einheit 1)

N-terminales Threoninnucleophil

Die Substrate werden sukzessive abgebaut, ohne dass Zwischenstufen freigesetzt werden. Restlänge: 7-9 Aminosäuren

Schließlich spaltet eine Isopeptidase in der 19S-Untereinheit intakte Ubiquitin-Moleküle von diesen Peptiden ab. Das Ubiquitin wird wiederverwertet und die Peptidprodukte werden durch andere zelluläre Prozesse zu Aminosäuren abgebaut. Diese werden entweder für Biosynthesen gebraucht oder abgebaut (siehe unten).

Mit dem gezielten Proteinabbau über den **Ubiquitin-Proteasom-Weg** werden auch viele physiologische Prozesse gesteuert. Die abgebauten Proteine sind dann meist **regulatorische Proteine**.

Beispiel:
Transkriptionsfaktor NF-κB, der Entzündungsreaktionen kontrolliert (NF, nuclear factor). Dieser Faktor wird wiederum durch das (inhibitorische) Protein **I-κB** inaktiviert. Bei Entzündungssignalen, die an membrangebundenen Rezeptoren binden, wird **I-κB** an zwei Serinresten phosphoryliert. Dadurch entsteht eine **E3-Bindungsstelle** und I-κB wird nach Ubiquitylierung abgebaut. So wird NF-κB freigesetzt, wandert zum Zellkern und stimuliert die Transkription von Zielgenen.

Andere **durch gezielten Proteinabbau regulierte Prozesse** umfassen Gentranskription, Zellzyklus, Organbildung, circadiane Rhythmen, Entzündungsreaktionen, Tumorsuppression, Cholesterinstoffwechsel, Antigenprozessierung usw.)

Ubiquitinweg und Proteasom kommen bei allen **Eukaryonten** vor. Bei **Prokaryonten** gibt es Homologe zum Proteasom, deren physiologische Rolle ist aber noch in Diskussion. Dagegen ist das Proteasom einiger **Archaea** sehr ähnlich dem der Eukaryonten (Gesamtstruktur ähnlich, aber unterschiedliche Untereinheitenstruktur und Substratspezifität).

Proteasom von Eukaryonten Proteasom von Archaea

Ubiquitin kommt bei Prokaryonten nicht vor. Man fand aber homologe Proteine, die an der Biosynthese des Cofaktors Thiamin beteiligt sind: **ThiS, ThiF**

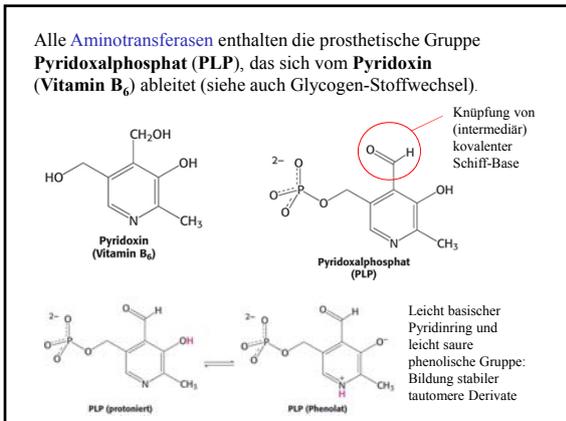
Die Funktionalität ist sehr ähnlich. **ThiS** (ähnliche Struktur wie Ubiquitin) wird durch das Enzym **ThiF** aktiviert. **ThiF** hat hohe Homologie zu eukaryotischem **E1**. Hat sich aus einem prokaryotischen Biosyntheseweg für Thiamin der eukaryotische Ubiquitin-Proteasom Weg entwickelt?

Abbau von Proteinen aus der Nahrung
 Abbau von zellulären Proteinen
Transaminasen und Glutamat-Dehydrogenase

Erster Schritt im Aminosäureabbau ist die **Abspaltung der α-Aminogruppe** mittels **Aminotransferasen**. In Säugern findet diese Reaktion hauptsächlich in der **Leber**, zu einem geringeren Teil auch im Muskelgewebe statt. Kompartiment: **Cytosol und Matrix der Mitochondrien**.

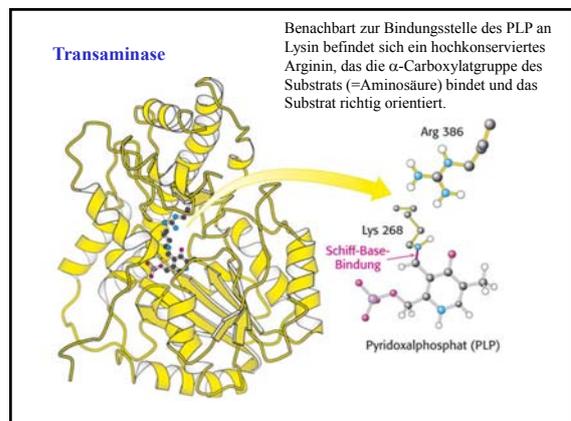
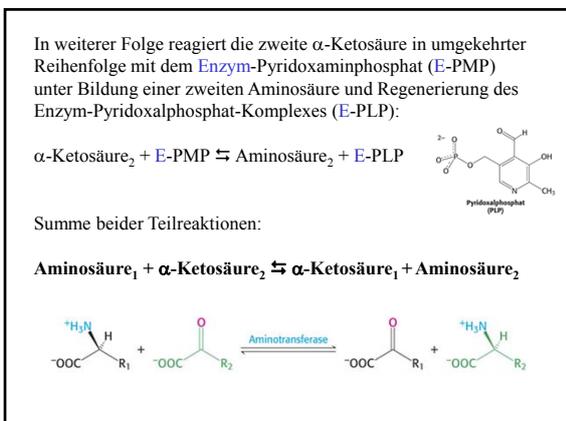
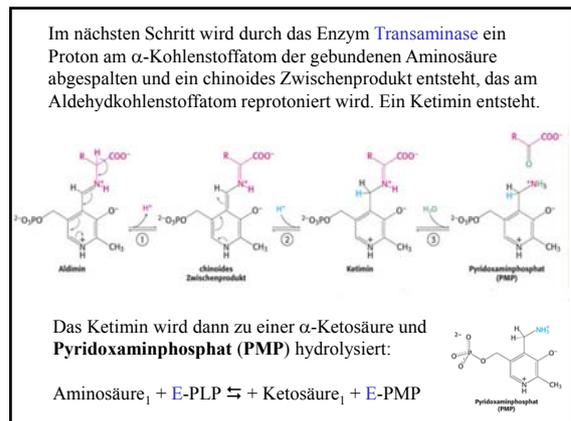
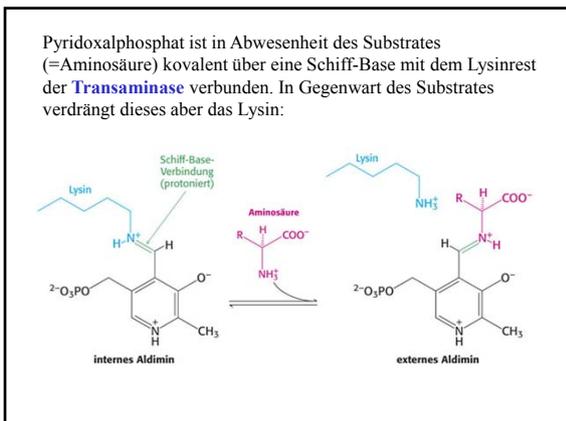
Es erfolgt der Transfer einer α-Aminogruppe von einer α-Aminosäure auf eine α-Ketosäure (**α-Ketoglutarat**) unter Bildung von **Glutamat**. Die Reaktionen sind vollkommen reversibel (siehe auch Einheiten 7 & 8). Zwei Beispiele:

Aspartat + α-Ketoglutarat ⇌ Oxalacetat + **Glutamat**
 Alanin + α-Ketoglutarat ⇌ Pyruvat + **Glutamat**



Die Vitamine werden aus der Nahrung aufgenommen. Vitamine B sind wasserlöslich! Bereits besprochene Vitamine sind in **rot** dargestellt:

Vitamin	Cofaktor
Thiamin (Vitamin B₁)	Thiaminpyrophosphat
Riboflavin (Vitamin B₂)	FAD
Niacin (Vitamin B₃)	NAD ⁺
Pantothenat (Vitamin B₅)	Coenzym A
Pyridoxin (Vitamin B₆)	Pyridoxalphosphat: Glykogen- und Aminosäurestoffwechsel
Vitamin B₁₂	Cobalamin (Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsel)



Von **PLP-Enzymen** werden auch andere Umwandlungen von Aminosäuren katalysiert, nicht nur Transaminierungen.

PLP-Enzyme katalysieren am α -Kohlenstoffatom von Aminosäuren auch Decarboxylierungsreaktionen, Desaminierungen, Racemisierungen und Aldolsplaltungen.

Aminotransferasen labilisieren die Bindung a , **Decarboxylasen** b und **Aldolasen** c .

Daneben können PLP-Enzyme auch Eliminierungs- und Austauschreaktionen am β -Kohlenstoffatom und am γ -Kohlenstoffatom der Aminosäuresubstrate durchführen.

PLP-Enzyme sind also im Aminosäurestoffwechsel (neben dem Glycogen-Stoffwechsel) weit verbreitet. Folgendes haben sie gemeinsam:

1. Bildung einer **Schiff-Base** aus dem Aminosäuresubstrat und dem PLP
2. Die protonierte Form des PLP wirkt als Elektronenfalle (Stabilisierung von negativ geladenen Katalyse-Intermediaten, da Elektronen im Pyridinring delokalisiert werden können): **elektrophiler Katalysator**
3. Die **Schiff-Base** wird zum Abschluss der Reaktion **gespalten**.

Wie schaffen es aber nun die PLP-Enzyme eine bestimmte der Bindungen am α -Kohlenstoffatom zu spalten?

Stereoelektronische Kontrolle: Die Bindung, die gespalten werden soll, muss senkrecht zu den delokalisierten π -Orbitalen des PLP stehen (dafür sorgt die Enzymarchitektur).

In einer **Aminosäuretransferase** bindet das Aminosäurederivat so, dass die C_{α} -H-Bindung senkrecht zu den π -Orbitalen steht. Dies begünstigt die Spaltung.

Aspartat-Aminotransferase **Serin-Hydroxymethyltransferase**

Für die notwendige Konformation des Substrates sorgt natürlich die Architektur des aktiven Zentrums des jeweiligen Enzyms.

Letztendlich landen die Aminogruppen der Transaminierungsreaktionen am α -Ketoglutarat und Glutamat entsteht. Glutamat wird dann durch **oxidative Desaminierung (Glutamat-Dehydrogenase)** zu einem freien Ammonium-Ion umgewandelt.

Das Enzym **Glutamat-Dehydrogenase** ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert. Dadurch kann das entstehende freie toxische **Ammonium** abgetrennt werden (der Harnstoff-Cyclus startet in den Mitochondrien).

Glutamat-Dehydrogenase: Oxidative Desaminierung mit NAD^+ oder $NADP^+$ als Elektronenakzeptor. Vollkommen reversibel. Normalerweise durch Entfernen von NH_4^+ (Harnstoff-Cyclus) angetrieben.

Heterolytische Bindungsspaltung

Bilanz der durch **Aminotransferasen** und **Glutamat-Dehydrogenase** katalysierten Reaktionen:

α -Aminosäure + NAD^+ ($NADP^+$) \rightleftharpoons α -Ketosäure + NH_4^+ + $NADH$ ($NADPH$) + H^+

Zwei Aminosäuren, nämlich **Serin** und **Threonin** können durch **Dehydratasen** auch direkt desaminiert werden (ohne **Transaminasen**):

Serin-Dehydratase:
 $\text{Serin} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{Pyruvat}$

Threonin-Dehydratase:
 $\text{Threonin} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \alpha\text{-Ketobutyrat}$

Mechanismus: Abspaltung eines Protons vom α -Kohlenstoffatom und Eliminierung der Hydroxylgruppe vom β -Kohlenstoffatom. Ausbildung eines instabilen Intermediats mit einer Doppelbindung.

Glucose-Alanin-Cyclus

Der Aminosäureabbau findet großteils in der Leber statt. Teilweise können auch andere Gewebe Aminosäuren abbauen. Muskel nutzen z.B. bei längerer Anstrengung und in Fastenperioden (verzweigtkettige) Aminosäuren als Brennstoffquelle. Die Kohlenstoffgerüste werden im Citrat-Cyclus oxidiert, der abgespaltene Stickstoff muss aber zur Leber transportiert werden, da den Muskeln der Harnstoff-Cyclus fehlt. Er wird in Form von **Alanin** und **Glutamin** transportiert.

Glucose-Alanin-Cyclus

Stickstoff wird in Form von **Alanin** von der Muskulatur zur Leber transportiert. **Alanin** entsteht durch Transaminierung von Pyruvat:
 $\text{Glutamat} + \text{Pyruvat} \rightleftharpoons \alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{Alanin}$

Alanin wird ins Blut ausgeschwemmt und von der Leber aufgenommen. Es entsteht wieder Pyruvat, das zur Gluconeogenese verwendet werden kann.

Daneben kann Stickstoff auch als **Glutamin** transportiert werden.

Enzym: **Glutamin-Synthetase**

Abbau von Proteinen aus der Nahrung
 Abbau von zellulären Proteinen
 Transaminasen und Glutamat-Dehydrogenase
Harnstoff-Cyclus

Bei den meisten landlebenden Wirbeltieren (und daher auch beim Menschen) wird das Ammonium-Ion in **Harnstoff** umgewandelt und in dieser Form ausgeschieden. Diese Organismen heißen **ureotelisch**. Reaktionsweg: **Harnstoff-Cyclus**. Ort: Leber. Ein Teil wird auch zur Biosynthese stickstoffhaltiger Verbindungen verbraucht.

Ureotelische Organismen scheiden überschüssiges Ammonium in Form von Harnstoff aus. Der **Harnstoff-Cyclus** wurde bereits 1932 von Hans Krebs und Kurt Henseleit vorgeschlagen. Erster aufgeklärter cyclischer Stoffwechselweg.

Es ist zu beachten, dass nur ein Stickstoffatom des Harnstoffs aus freiem **Ammonium** entsteht, das andere stammt aus **Aspartat**. Der Kohlenstoff stammt aus dem **Hydrogencarbonat**.

Der Harnstoff-Cyclus startet in der Matrix der Mitochondrien und verläuft dann im Cytoplasma.

Ammoniak, NH_3 , ist eine Base, daher liegt sie in wässriger Form als NH_4^+ vor. Die Transportform des CO_2 ist HCO_3^- (Bildung durch **Carboanhydrase**).

Enzym: **Carbamoylphosphat-Synthetase**. Lokalisation: Matrix von Lebermitochondrien.

Carbamoylphosphat: gemischtes Anhydrid. Hohes Gruppenübertragungspotenzial der Carbamoylgruppe.

Die nächste Reaktion des Harnstoff-Cyclus findet ebenfalls noch in der Matrix der Mitochondrien statt. Enzym: **Ornithin-Transcarbamoylase**

Ornithin und Citrullin sind Aminosäuren.

Die nachfolgenden Reaktionen des Harnstoff-Cyclus finden im Cytoplasma statt. **Citrullin** wird ins Cytosol transportiert und kondensiert dort mit **Aspartat**. Aspartat ist der zweite Stickstoff-Donor des Harnstoffs.

Enzym: **Argininosuccinat-Synthetase**

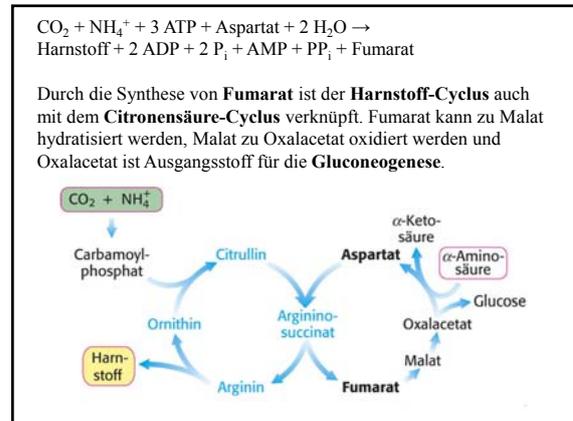
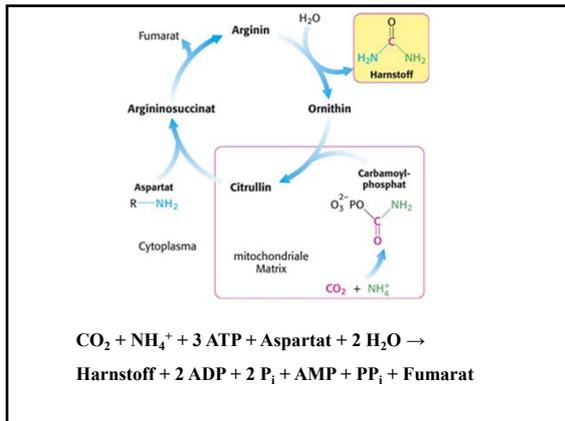
Reaktion durch Spaltung von ATP in AMP und PP_i und PP_i -Spaltung angetrieben.

Die **Argininosuccinase** spaltet dann das **Argininosuccinat** in **Arginin** und **Fumarat**. Das Kohlenstoffskelett des Aspartats bleibt also in Form von **Fumarat** erhalten. Fumarat ist Intermediat des Citronensäure-Cyclus.

Im letzten Schritt wird Ornithin wieder regeneriert und Harnstoff gebildet. Enzym: **Arginase**

Das **Ornithin** wird zurück in die Matrix der Mitochondrien transportiert. Harnstoff wird ausgeschieden.

Ein Mensch produziert pro Jahr etwa 10 kg Harnstoff (täglich etwa 30 g).



Warum ist Ammonium eigentlich giftig? Sämtliche Defekte des Harnstoff-Cyclus führen zu erhöhten NH_4^+ -Spiegel im Blut (**Hyperammonämie**), die extrem schädlich sind (z.B. irreversible Hirnschädigungen bei Säuglingen).

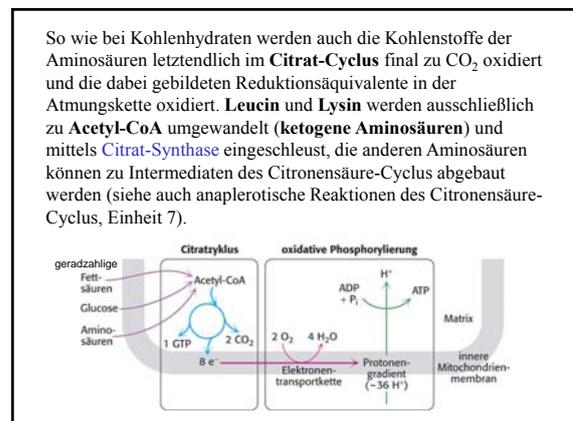
Mögliche Ursache: erhöhter Glutaminspiegel, der osmotische Effekte hervorruft und das Gehirn anschwellen lässt.

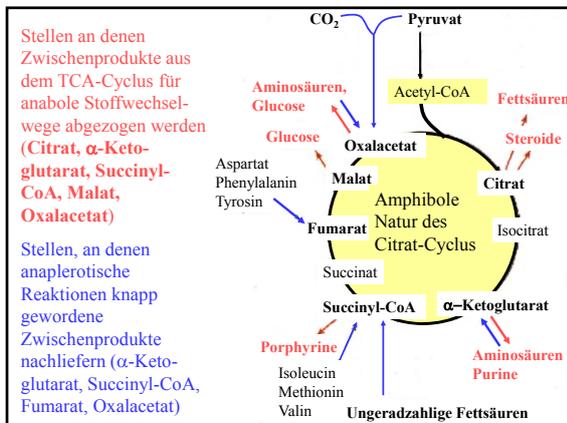
Terrestrische Vertebraten sind **ureotelisch**. Sie scheiden überschüssigen Stickstoff als **Harnstoff** aus.

Ammoniotelische Organismen, wie z.B. aquatische Vertebraten und Invertebraten, setzen Stickstoff direkt als NH_4^+ frei. Die wässrige Umgebung verdünnt die toxische Substanz.

Uricotelische Organismen (Vögel und Reptilien) geben reine **Harnsäure** ab. Diese wird als ziemlich feste Masse ausgeschieden, enthält nur wenig Wasser. Harnsäure ist auch das Endprodukt des Nukleinsäureabbaus (Salze: Urate).

Abbau von Proteinen aus der Nahrung
 Abbau von zellulären Proteinen
 Transaminasen und Glutamat-Dehydrogenase
 Harnstoff-Cyclus
Abbau von Aminosäuren

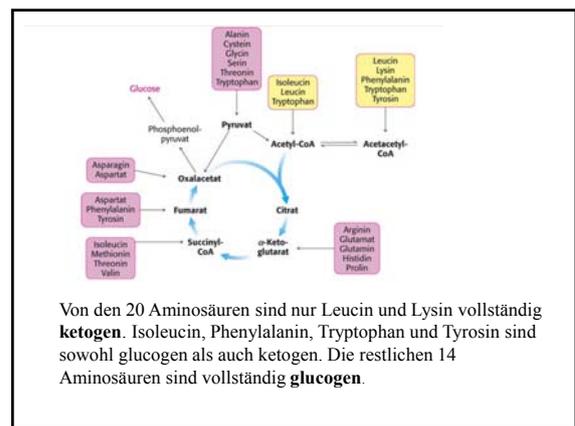
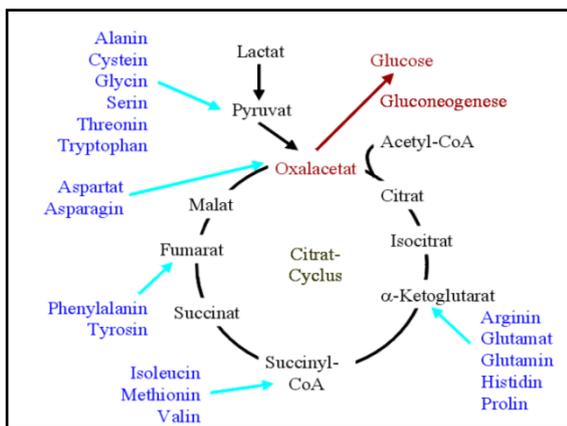




Daher können (außer Leucin und Lysin) alle Aminosäuren (und daher Proteine generell) zur Glucose-Synthese verwendet werden.

Gluconeogenese: Biosynthese von Glucose aus Vorstufen, die definitionsgemäß keine Kohlenhydrate sind (siehe Einheit 9). Die wichtigsten Vorstufen sind **Lactat, Alanin, Pyruvat** und **Oxalacetat**. Prinzipiell aber alle **Zwischenprodukte des Citrat-Cyclus**, die meisten **Aminosäuren** (mit Ausnahme Leucin und Lysin) und **Glycerin**. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von **glucogenen Aminosäuren**.

In Säugetieren können **geradzahlige Fettsäuren** und die Aminosäuren **Leucin** und **Lysin** (ketogene Aminosäuren) nicht als Glucose-Vorstufen fungieren. Geradzahlige Fettsäuren und die beiden genannten Aminosäuren werden zu **Acetyl-CoA** abgebaut und aus Acetyl-CoA kann in Tieren keine Nettosynthese von Zuckern durchgeführt werden (es gibt keinen Glyoxylat-Cyclus, Einheit 7).



Die auf den folgenden Seiten angeführten detaillierten Abbauege der individuellen Aminosäuren sind nicht Prüfungsstoff.

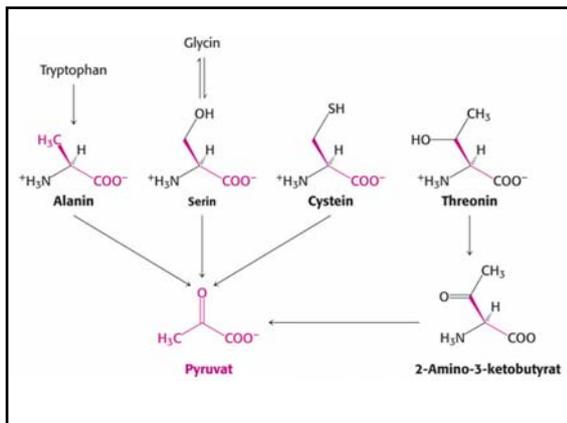
C3-Familie - Umwandlung in Pyruvat

Alanin wird direkt durch Transaminierung in Pyruvat umgewandelt:
 Alanin + α-Ketoglutarat ⇌ Pyruvat + Glutamat

Serin wird durch die **Serin-Dehydratase** desaminiert (siehe vorne): Serin → Pyruvat + NH₄⁺

Cystein kann auf verschiedene Weise in Pyruvat übergeführt werden. Das Schwefelatom kann in verschiedensten chemischen Formen im Stoffwechsel auftreten: H₂S, SO₃²⁻, SCN⁻ etc.

Auch **Threonin, Glycin** und **Tryptophan** liefern letztendlich Pyruvat.



C4-Familie - Umwandlung in Oxalacetat

Aspartat wird direkt zu Oxalacetat transaminiert:
 $\text{Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{Glutamat}$

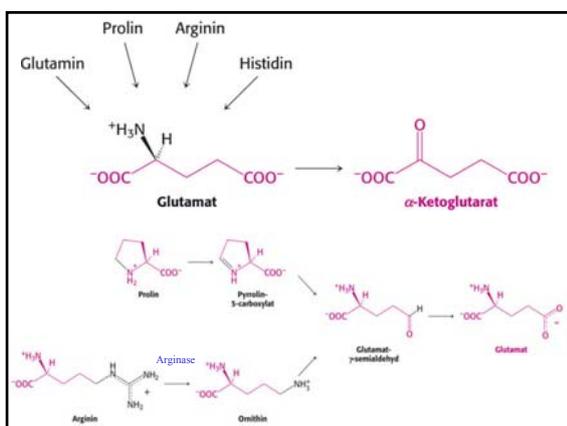
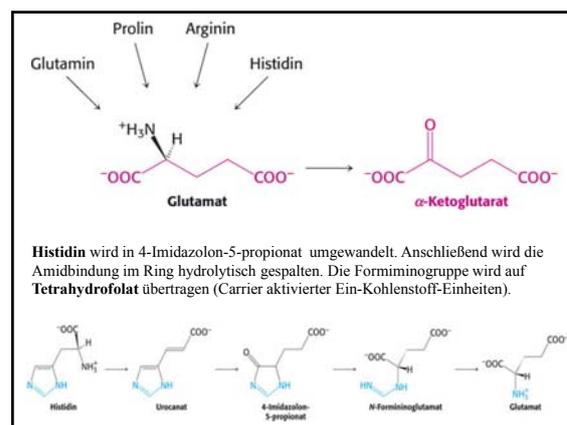
Aspartat kann aber auch über den Harnstoff-Cyclus in Fumarat übergehen (siehe vorne).

Asparagin wird von der Asparaginase zu NH_4^+ und Aspartat hydrolysiert.

C5-Familie - Umwandlung in α -Ketoglutarat

Diese Aminosäuren werden zuerst in **Glutamat** überführt, das dann durch die **Glutamat-Dehydrogenase** oxidativ zu α -Ketoglutarat desaminiert wird.

Glutamin wird durch die **Glutaminase** direkt zu Glutamat und NH_4^+ hydrolysiert.



Succinyl-CoA – Eintrittsstelle für unpolare Aminosäuren

Einige Kohlenstoffe der Aminosäuren Methionin, Isoleucin und Valin werden über Succinyl-CoA eingeschleust. Als Zwischenprodukte treten Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA auf (wie beim Abbau ungeradzahligter Fettsäuren, siehe Einheit 12).

Methionin, Isoleucin, Valin → Propionyl-CoA → Methylmalonyl-CoA → Succinyl-CoA

Enzyme: Propionyl-CoA-Carboxylase, Methylmalonyl-CoA-Mutase (Vitamin B12-abhängig)

Die Vitamine werden aus der Nahrung aufgenommen. Vitamine B sind wasserlöslich! Die Cofaktoren sind in enzymatischen Reaktionen essentiell.

Vitamin	Cofaktor
Thiamin (Vitamin B₁)	Thiaminpyrophosphat
Riboflavin (Vitamin B₂)	FAD
Niacin (Vitamin B₃)	NAD ⁺
Pantothenat (Vitamin B₅)	Coenzym A
Pyridoxin (Vitamin B₆)	Pyridoxalphosphat: Glykogen- und Aminosäurestoffwechsel
Cobalamin (Vitamin B₁₂)	Methylcobalamin und 5'-Desoxyadenosylcobalamin (Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsel)

