

Examenvragen Biochemie

Hoofdstuk 3: Aminozuren, peptiden en eiwitten

- **2D gelelektroforese? PAGE? Western Blot? Wat is het + beknopt de stappen**

- 2D gelelektroforese = zuiveringstechniek

- o = scheiding van eiwitten in elektrisch veld
- o = gebaseerd op de migratie van geladen(door SDS) proteïnen in elektrisch veld
- o = Combinatie van PAGE en isoelectric focusing.

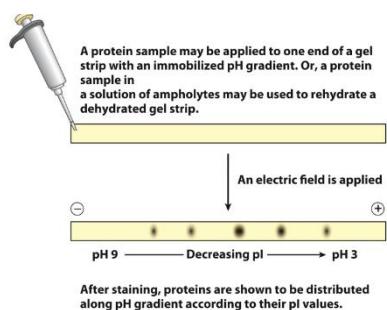
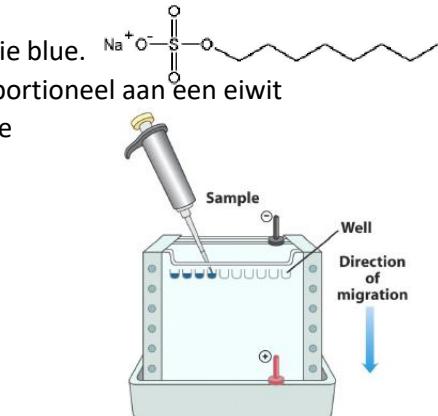
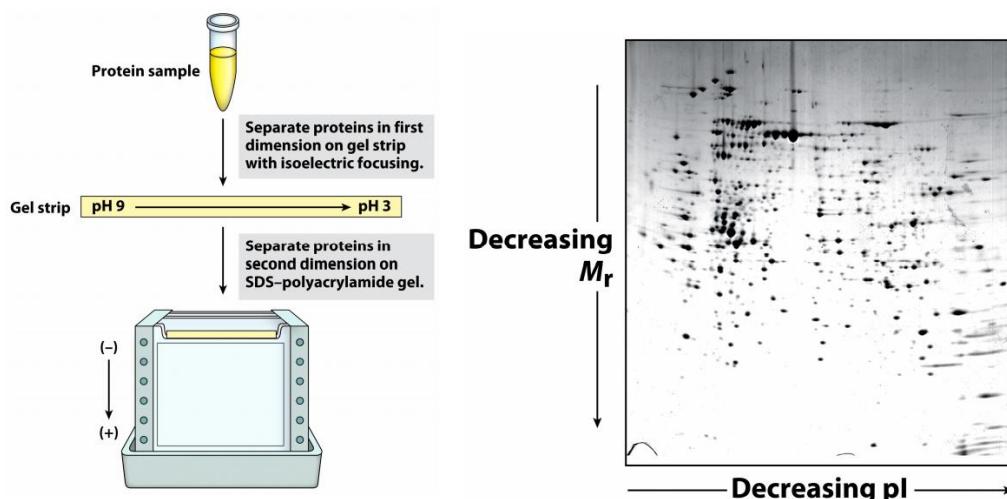
- o **Elektroforese:**

- Scheiding van eiwitten in een elektrisch veld.
- Dit is een analytische (niet-preparatieve) methode.
- De matrix is een 'cross-linked' polymeer (meestal polyacrylamide) die functioneert als een moleculaire zeef. Er is dus scheiding naar grootte en vorm.
- De kleuring van de eiwitten gebeurt met een eiwitspecifieke kleurstof, coomassie blue.
- Men voegt een detergent van sodium dodecyl sulfate (SDS) toe, deze bindt proportioneel aan een eiwit ($1\text{ SDS}/2\text{ AZn}$), dit geeft een grote negatieve lading maar heeft maar een beperkte invloed op de 3D structuur.
- **PAGE** = polyacrylamide gel electrophoresis
- Matrix \approx moleculaire zeef \rightarrow **scheiding naar massa (gelelektroforese) en vorm**
- Kleuring met eiwitspecifieke kleurstof, e.g. **Coomassie blue**
- Toevoegen sodium dodecyl sulfate (SDS) (detergent)
- SDS bindt proportioneel, $1\text{ SDS} / 2\text{ AZ} \rightarrow$ grote netto negatieve lading
- Conformatieverandering \rightarrow beperkte invloed van 3D structuur
- Denaturatie (niet meer de natuurlijke configuratie, werkt niet meer)

- o **Isoelectric focusing**

- Scheiding in elektrisch veld, en pH gradiënt
- Migratie op basis van eigen (netto) lading
- Bepaling pl
- pH gradiënt door amfolyten die bewegen in E-veld (amfoteer)
- eiwitten hebben netto lading die afh is vd opl
 - vb neg. eiwit migreert naar pos kant, gaat dan zelf naar nettolading nul, bij $\text{pH}=...$

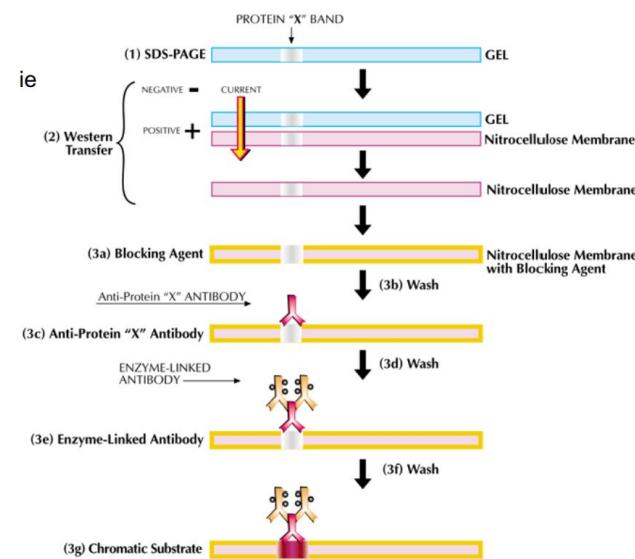
\Rightarrow 2D elektroforese:



After staining, proteins are shown to be distributed along pH gradient according to their pl values.

- Western Blot

- = detectie van 1 **specifiek** eiwit in gel
- = gebaseerd op antilichamen bij primaire binding
- Werkwijze 3 stappen
 - 1) Alle eiwitten in polyacrylamide matrix, overbrengen op nitrocellulose membraan (=blotting)
 - 2) Nitrocellulosemembraan blokkeren
 - Het membraan volzetten met een ander eiwit op de plaatsen waar geen interessant eiwit (stap 1) voorkomt
 - Reden: membraan bindt eiwitten en antilichaam is een eiwit
 - 3) Antilichamen toevoegen + kleuring doen
 - Kleuring gebeurt dus op het nitrocellulosemembraan en niet op de gel → stabiever!
- Figuur uitleg
 - 1) Alle eiwitten in polyacrylamide gel
 - 2) Transfer eiwitten naar nitrocellulose membraan (=blotting)
 - 1) Gel op nitrocellulosemembraan
 - 2) E-veld aanleggen over gel + membraan
 - 3) Eiwit is neg. geladen door SDS → migreert naar pos. pool = membraan → eiwit transfer naar membraan = BLOTTEN
 - 3) Blocking agent: blokkeren onspecifieke eiwitbinding
 - nitrocelulose in vloeistof met veel eiwit gebracht vb melk
 - eiwit zal binden, hierdoor kunnen de prim antilichamen alleen aan gezochte eiwit binden.
 - Koppel enzym aan antilichaam
 - Bij toevoegen van juiste substraat wordt het antilichaam+enzym zichtbaar

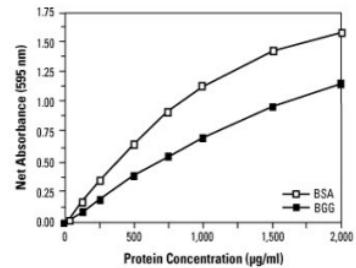


- 2 polypeptide, bereken de lading en hoe scheiden?
-
- 2 methoden om eiwit concentratie te bepalen (= ijklijn en Beer-lambert). Waarom twee verschillende waarde? Hoe zuiverheid eiwit bepalen?
 - Lambert-Beer wet
 - Meting van lichtabsorptie door moleculen door een **spectrofotometer**
 - Zo concentraties vd moleculen in oplossing bepalen
 - Formule

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon \cdot C \cdot L$$
 - I_0 = intensiteit vh invallende licht ; I = intensiteit vh uitgezonden licht;
 - C = concentratie vh absorberend species; L = weglengte vd cuvette; A = absorbantie
 - ϵ = extinctiecoeff (afhankelijk vd ch aard en golflengte)
 - Werkwijze
 - Lichtbron → zend licht uit → door monochromator → selecteert en zend licht uit van 1 specifieke golflengte → door sample in cuvette → sample absorbeert een deel vh licht → uitgezonden licht gemeten door detector
 - Lichtabsortie vh sample ~ concentratie opgeloste stof & weglengte

- Ijklijn (~amylase prac)

- Kwantificatie noodzakelijk bij zuivering en activiteitbepaling
- Colorimetrie (e.g. met Coomassie) + standaardcurve
- Absorptie 280 nm (met ϵ_{280} in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
 - Via ijklijn conc afleiden (met rico en snijpunt)
 - Ijkeiwit waarvan je de conc kent + kleurstof (BSA)
 - Onbekende eiwit reageert met Coomassie, je meet absorptie
 - **Conc = (absorbantie – snijpunt) / rico**
 - Als ijklijn niet lineair, geen ideale methode
 - Ijklijn hangt af van referentiemolecule (calibratie machine)
- Enzymen karakteriseren: omstandigheden (pH), cofactoren, kinetiek, ...
- Activiteiten en eenheden:
 - enzymeenheid (unit) = hoeveelheid enzym die 1 μmol S omzet, per minuut (25 °C)
 - activiteit = hoeveelheid substraat omgezet, per tijdseenheid, per vol-eenheid
 - specifieke activiteit = totale activiteit per totale massa eiwit (milligram)



- Gegeven tabel met zuiveringsprocessen. Bereken SA, zuivering, winst en geef de eenheden. Welke stap is meest efficiënt? Hoe weter of het zuiver is?

- ??????????????

- Oefening: specifieke activiteit berekenen (slide 32)

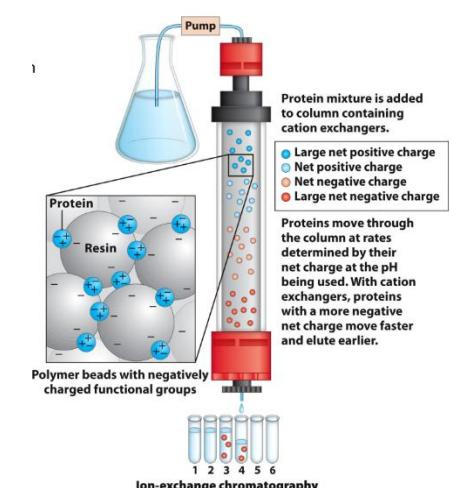
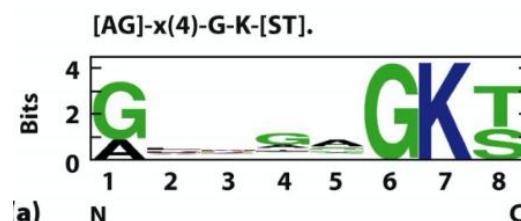
- ~ oefeningen GIP F-B

- Hoe kan men aan de hand van eiwitsequenties de geschiedenis van de aarde onderzoeken?

- gensequenties en eiwitsequenties in verwante organismen gelijkend
- sequenties vertellen iets over EVOLUTIE
- 2 organismen verwant → gen & eiwitsequenties gelijkend
- Sequenties verschillen ~ Toenemende evolutionaire afstand tss 2 org.
- Beschikbare sequentie data stijgt enorm → geschiedenis/ evolutie traceren
 - Laterale gentransfer, (e.g. antibiotica resistentie)
 - Eiwitfamilies: = homologe eiwitten. Paraloog, binnen soort; ortholoog, tussen soorten
 - Aligneren(vgl'en) eiwitsequenties (e.g. Hsp70) (= multiple alignment); 'gaps'; conservering eigenschappen
 - Signatuursequenties: karakteristieke sequentie voor taxonomische groep
- Consensussequentie: beschrijving van conservering van primaire sequentie
 - [XY], (n), {XY}, voorkomen van AZ X, Y
- Sequentielogo: stacking volgens niveau van conservering en bijdrage AZ
 - (a) = P loop; (b) = Ca^{2+} binding EF hand

- Scheidingstechnieken eiwitten algemeen

1. Extractie = breken weefsels/cellen
- Differentiële centrifugatie = scheiding naar densiteit
2. Zuiveren → chromatografie (kleuren)
- Kolomchromatografie (practicum plantenpigmenten)
 - Vaste (stationaire) fase: poreuze matrix
 - Mobiele fase: vloeistof, beweegt door matrix
 - Bewegingssnelheid afhankelijk van eigenschappen
 - Scheiden eiwitmengsel in fracties = fractioneren
- Ionenuitwisselingschromatografie
 - Interactie geladen eiwitten met matrix (scheiding afh van pH opl)
 - Matrix synthetisch polymeer met geladen groepen
 - Kationen uitwisseling: matrix met anionen
 - Anionen uitwisseling: matrix met kationen

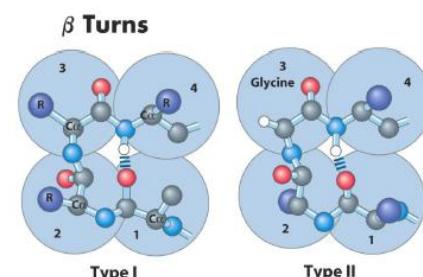
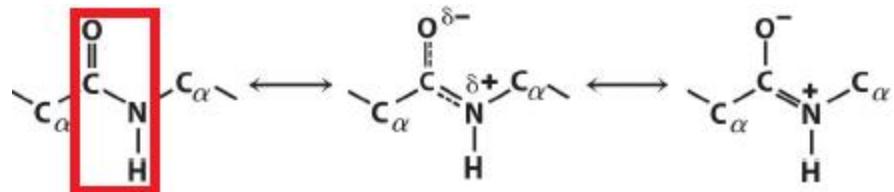


- Size-exclusion chromatography (moleculaire-zeef chromatografie)
 - o Scheiding op basis van grootte, interactie met matrix
 - o Grottere eiwitten elueren sneller want zij gaan rond porien en niet erdoor
- Affinitetschromatografie
 - o Binding groepen covalent gebonden aan matrix = ligand
 - o Elutie door hoge zoutconcentratie of competitie
 - o Toepassing: immuno-affinitetschromatografie
 - Ligand kan binden met sommige vd eiwitten in de extractieve (specifiek)
 - Antilichaam = eiwit dat specifiek op epitope (=plek op eiwit) v/e eiwit bindt → specifiek!!!
 - Vaste fase bevat antilichamen aan beads
 - 1) Eiwit mengsel toevoegen
 - antilichamen binden specifiek & sterk met de epitope's vd eiwitten
 - zo 1 eiwit uitvissen/scheiden
 - 2) interactie verbreken met hoge zoutconcentratie
 - Probleem: Er zijn maar voor heel weinig eiwitten de juiste antilichamen gekend, niet veel antilichamen

Hoofdstuk 4: 3D structuur van eiwitten

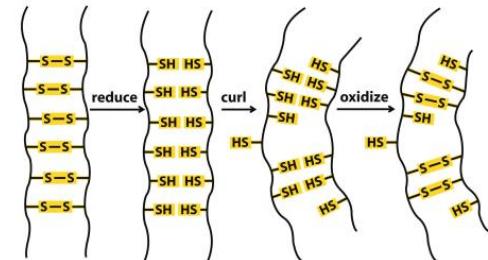
• **Ruimtelijke structuur eiwitten + interacties. Fibrillaire en globulaire eiwitten? Sub-eenheden?**

- De peptide binding
 - o De peptide binding is rigide (stijf) en vlak.
 - o Carbonyl (O) en amide (N) delen elektronen (resonantie) → Elektrische dipool.
 - o Er is geen vrije rotatie mogelijk rond C_{α} -C-NH-C $_{\alpha}$ bindingen.
 - De peptide binding (6 atomen) vormt een vlak.
 - Beperking van vrije conformaties.
 - Vrije rotaties rond N-C $_{\alpha}$ en C $_{\alpha}$ -C zijn wel mogelijk.
- Secundaire eiwitstructuur
 - o α -helix
 - Imaginaire as: rechtsdraaiend, 5.4 Å/winding, 3.6 AZ/winding
 - R groepen aan buitenkant
 - Optimaal gebruik H-bruggen (-NH...OC-), 3-4 H-bruggen/winding
 - Niet alle AZ even geschikt voor α -helix (e.g. proline)
 - α -Helix heeft netto $\delta^+(N)$ en $\delta^- (O)$ → helix dipool
 - o β -sheets
 - De C-ruggengraat van de polypeptideketens vormt een zigzag-structuur i.p.v. een helix.
 - De ketens liggen zij-aan-zij in een vlak, dit kan parallel of antiparallel.
 - Er worden waterstofbruggen gevormd tussen de aanpalende segmenten.
 - De restgroepen liggen alternerend 'boven' en 'onder' het vlak.
 - De parallelle en antiparallele β -plaats hebben verschillende waterstofbruggen.
 - β Bochten zijn veelvoorkomend in eiwitten (compact, stabile door H-bruggen)
 - Globulaire proteïnen hebben zeer compacte structuur → ca 1/3 AZ in scherpe ' β bochten'
 - β -bocht: tussen α -helices en segmenten van β -platen,
 - 180° draaiing over 4 AZ met H-brug tussen AZ1 en AZ4
 - Vaak met Pro (Type I), Gly (Type II)



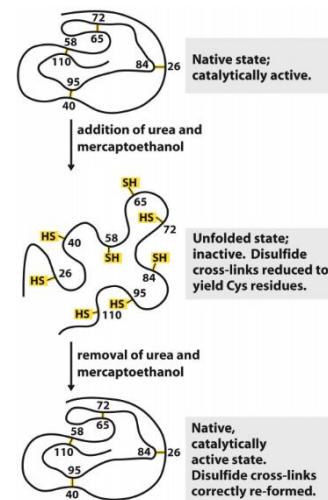
- Tertiaire en quaternaire structuren

- Tertiaire structuur = 3D organisatie van alle atomen in een enkel eiwit (subeenheid)
- Quaternaire structuur = 3D organisatie van subeenheden
- Multimeer, oligomeer (enkele subeenheden),
- Protomeer, kleinste eenheid herhaald in hetero-oligomeer eiwit (minstens 2 eiwitten)
- Organisatie door zwakke bindingen en covalente bindingen (S-S)
- Globulair (sferisch) en fibrillaire (vezelvormig, langwerpig)
- Fibrillaire eiwitten, meestal 1 type secundaire structuur, structuurfuncties
 - **α Keratine**
 - Hoofdbestanddeel haar, wol, nagels, hoorn, buitenste huidlaag
 - Linksdraaiende 'coiled coil', twee parallelle strengen
 - Hydrofobe R aan α - α interactie → dichte stapeling
 - Supramoleculaire complexen, stabilisatie door S-S
 - Haarbehandeling (krullen), oxidatie / reductie S-S bruggen
 - **Collageen** ('Hy' = hydroxy)
 - pezen, kraakbeen, hoornvlies, extracellulaire matrix
 - Unieke secundaire structuur, verschillend van α helix, linksdraaiend, 3 AZ /winding
 - Coiled-coil: 3 α ketens, 'super twisted', in rechtsdraaiende helix, superhelix
 - Typisch: 35% Gly, 11% Ala, 21% Pro + 4-Hyp, sequentie: "Gly-X-Y", X = vaak Pro, Y = vaak 4-Hyp
 - Gly is essentieel (oorzaak verschillende genetische afwijkingen)
 - Cross-linking tussen Lys, HyLys of His in X en Y posities
 - **Zijde**
 - Voornamelijk β platen
 - Rijk aan Ala, Gly → packing, interlocking
 - H-bruggen peptidebindingen, van der Waals → flexibele weefsel lagen
- Globulaire eiwitten, gemengde secundaire structuren, enzymen en regulatorische eiwitten
 - **Myoglobine**
 - Structuur: John Kendrew, 1950s, x-straal diffractie → structuur x functie relatie
 - O-binding, transport, opslag in spieren (e.g. zeezoogdieren)
 - Globulair, Mwt 16,7 kDa, 153 AZ, met protoporfyrine (heem)
 - 70% in 8 α -helices (27 AZ - 7 AZ)
 - Maximaal aantal H-bruggen
 - Hydrofobe residu's in eiwit (binnenkant weg van water)
 - In hoge mate compact (4 H₂O)
 - Protoporfyrine (heem), verhinderen Fe²⁺ → Fe³⁺ oxidatie
 - Motief / plooiling (fold) / super-secundaire structuur
 - Vaak voorkomende organisatie secundaire structuurelementen, e.g. β - α - β loop; β -barrel
 - Domein
 - E.g. 1 polypeptide georganiseerd in meerdere globulaire eenheden
 - Dikwijls verschillende functies
 - Scheiden vaak met behoud van functie
 - Eiwitplooiling bepaald door fysicochemische beperkingen ('rules')



- Welke factoren zorgen voor denaturatie? Leg de- en renaturatie uit bij ribonuclease. Wat zijn moleculaire chaperones?

- Denaturatie = voldoende verlies van structuur leidt tot verlies van functie.
 - Gebeurt niet noodzakelijk door een volledige ontplooiing.
 - Meestal zijn er geen verbrekingen van covalente bindingen (buiten S-S).
 - Verwarming leidt tot abrupt verlies van structuur door het verbreken van zwakke bindingen en hydrofobe interacties.
 - pH veranderingen leidt tot wijzigingen van de netto lading, elektrische afstoting en het verbreken van waterstofbruggen.
 - Organische solventen, detergenten, urea en guanidine hydrochloride verbreken hydrofobe interacties.
- De aminozuursequentie bepaalt de tertiaire structuur want ze bevat alle informatie voor het correct plooien van het eiwit.
- Ribonuclease.
 - Urea(verbreken H-bruggen) en mercaptoethanol (verbreken S-S binding) zorgen voor denaturatie.
 - Door het verwijderen van urea en mercaptoethanol is er een spontane renaturatie met behoud van activiteit.
 - De S-S binding faalt in aanwezigheid van urea, zwakke interacties zijn nodig voor het positioneren van de -SH groepen voor S-S vorming
- Geassisteerde plooing
 - Moleculaire chaperones assisteren bij het plooien van eiwitten.
 - Hsp70 is een Heat Shock Proteïne.
 - → Wanneer er een te grote hoeveelheid slecht gevouwen eiwitten in het cytosol aanwezig is, dan zal de cel een heat shock response opwekken.
 - → Bij deze response worden grote hoeveelheden heat shock proteins (HSP) geproduceerd om de misvormde eiwitten in het cytosol te hervouwen.
 - 70 kDa (sterke conservatie; bacteriën → mensen)
 - Binden hydrofobe restgroepen om onjuiste aggregatie te vermijden.
 - Verhinderen plooien van eiwitten die eerst door membranen getransporteerd moeten worden.
 - Extra assistentie bij de plooing gebeurt door volgende eiwitten, nl. chaperonins.
 - Proteïn disulfide isomerase (PDI), herorganiseren van S-S bindingen.
 - Peptide prolyl cis-trans isomerase (PPI), interconversie van cis/trans Proline (Pro / P).
 - Defecten in eiwitplooing kunnen de moleculaire basis zijn voor genetische ziekten.
 - Type 2 diabetes, Alzheimer, Huntington en Parkinson.
 - Secretie van verkeerde (onvolledig) geplooide β -sheets en aggregatie tot fibrillen geeft aanleiding tot amyloïde fibrillen en amyloidosen.



Hoofdstuk 6: Enzymen

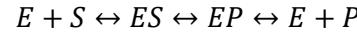
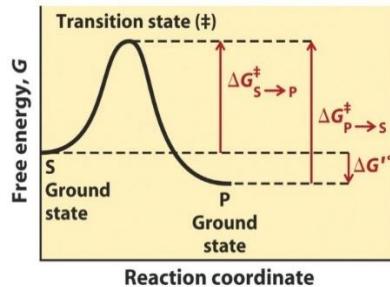
(Regulatorische enzymen: samenvatting Robin p.23-24)

- Algemene werking enzymen. Evenwicht/snelheid

- Een enzym voorziet in een omgeving waarin een bepaalde reactie sneller kan doorgaan.
- Het substraat (S) wordt gebonden op de actieve site van het enzym (E) (induces fit hypothese), met de vorming van een enzym-substraatcomplex (ES).

- Reactiesnelheid

- Enzymen beïnvloeden de reactiesnelheid en niet het evenwicht



E = Enzym ; S = Substraat ; P = Product

$\Delta G_{S \rightarrow P}^{\ddagger}$ en $\Delta G_{P \rightarrow S}^{\ddagger}$ = Activatie energie

ΔG° = Verandering van vrije energie in standaard omstandigheden

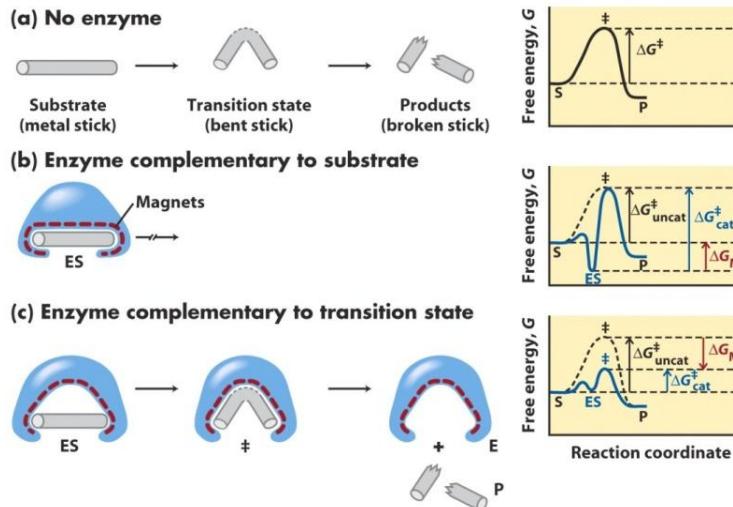
- De activatie energie is bepalend voor de reactiesnelheid. Terwijl ΔG° bepalend is voor het evenwicht.
- Transition state is een tijdelijk ‘moleculair moment’, het is geen intermediair.
- Katalyse bevordert de reactie door het verlagen van de activatie energie.
 - ΔG° blijft ongewijzigd en het evenwicht wordt sneller bereikt.
- Een enzym katalyseert een reactie in beide richtingen.
 - Intermediaren zijn moleculen met een discrete levensduur; ES en EP.
 - Rate limiting step is een stap in een cascade van reacties met de hoogste activatie energie.
- Het verbreken van een peptidebinding is exergonic (spontaan) maar gebeurt toch niet spontaan. Dit omdat er eerst activatie energie toegevoegd moet worden om het reactie-evenwicht in te stellen.

- Thermodynamische definitie

- Reactie evenwicht is gekoppeld aan de verandering van standaard vrije energie (ΔG°).
- Reactie snelheid is gekoppeld aan de activatie energie (ΔG^{\ddagger}).
- Evenwichtsconstante K'_{eq} (standaard condities).
 - $K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$; $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$
 - $\Delta G^{\circ} < 0 \rightarrow$ Gunstig evenwicht van S naar P.
- De reactiesnelheid wordt bepaald door [S] en snelheidsconstante k.
- De snelheidsvergelijking voor een unimoleculaire reactie is $V=k \cdot [S]$ (s^{-1}).
 - k is een maat voor de probabiliteit van de reactie bij gegeven condities.
- Relatie tussen k en ΔG^{\ddagger} ; $k = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}}$
- De snelheidsvergelijking voor twee substraten is $V = k \cdot [S_1] \cdot [S_2]$ ($M^{-1}s^{-1}$).

- Katalytische kracht en specificiteit

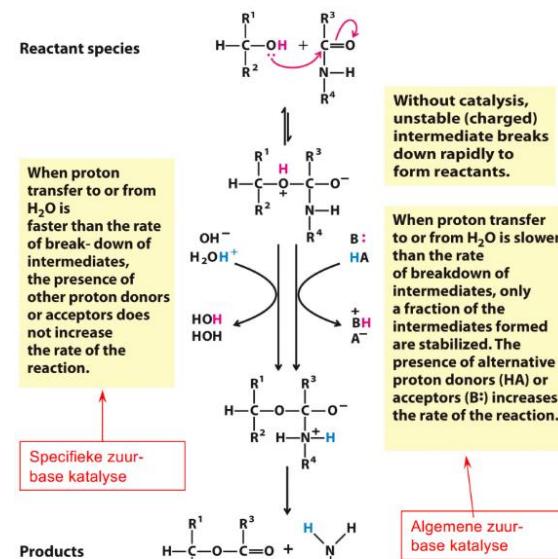
- Reorganisatie van covalente bindingen in het substraat.
 - Talrijke reacties tussen het substraat en enzym, waaronder tijdelijke covalente bindingen. Als nettoresultaat is er een verlaging van de activatie energie.
→ De katalytische kracht en specificiteit wordt grotendeels uit vrije energie vrijgesteld door zwakke interacties tussen het enzym en substraat.
- Vorming van niet-covalente bindingen tussen het enzym en substraat.
 - Zwakke interacties tussen het substraat en enzym. Vorming van ES-complex.
→ Zwakke interacties zijn optimaal in de transitietoestand, het enzym is ruimtelijk complementair met de transitietoestand van het substraat.
 - Vrijstellen van kleine hoeveelheden vrije energie = **Bindingsenergie ΔG_B** .
 - Verlagen van de activatie energie.
- Zwakke bindingen tussen enzym en substraat zijn geoptimaliseerd in de transitietoestand.
 - Enzym en substraat binden op basis van zwakke interacties.
 - Omvorming substraat (vorming transitietoestand).
 - Meer zwakke interacties.
 - Extra bindingsenergie compenseert gedeeltelijk voor activatie energie.



- Bindingsenergie is slechts 1 factor in het katalytische mechanisme.
- Specifieke katalytische groepen dragen bij aan de katalyse

▪ Zuur-Base katalyse.

- Talrijke biochemische reacties leveren onstabiele geladen intermediairen op, deze worden gestabiliseerd door protonering.
- H^+ transfer
- stabilisatie geladen intermediairen
- H^+ van H_2O of van AZ zijgroep



▪ Covalente katalyse.

- Tijdelijke covalente binding tussen enzym en substraat als alternatieve weg voor de reactie. Functionele groepen en/of cofactoren dienen als nucleofiel.
- $A-B + X: \rightarrow A-X + B \rightarrow A + X: + B$
- Tijdelijke covalente binding E-S \rightarrow alternatieve reactieweg
- Functionele groepen en/of cofactoren als nucleofie
- Bv.: Chymotrypsine \rightarrow Covalente en Zuur-Base katalyse.

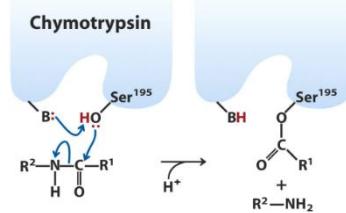
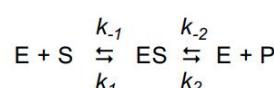
▪ Metaalion katalyse.

- Ionische interactie tussen metaal en substraat.
 - Oriëntatie van substraat.
 - Oxidatie-Reductie reacties.

• Steady state kinetics + voorwaarden. Michaelis Menten en wat valt hieruit af te leiden? (Specifieke) activiteit en hoe beïnvloeden inhibitoren deze?

- Steady state kinetics

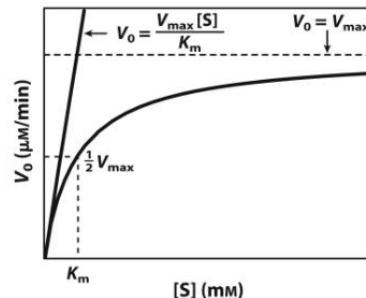
- = verwijst naar de initiële snelheid V_0
- = $d[ES]/dt \approx 0$
- Als ES concentratie constant blijft over de tijd
 - \rightarrow Dan is de gevormde P gelijk aan de weggereageerde S
 - \rightarrow Gemeten V_0 dus meestal gelijk aan steady state



- Michaelis-Mentenvergelijking (1-substraat reacties, relatie tussen substraatconcentratie en reactiesnelheid)

- = de snelheidsvergelijking voor een 1-substraat enzym gekatalyseerde reactie
- = de kwantitatieve uitdrukking vd relatie van V_0 , V_{max} en initiële [S] concentratie
 - → allemaal verbonden door de Michaelis constante K_m
- = geeft hyperbolisch verband weer

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$



○ **Michaelis constante K_m**

- $K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1$
- $K_m = [S]$ als $V_0 = 1/2 V_{max}$

○ **V_{max}**

- = snelheidswaarde waar de relatie naar evolueert als S blijft stijgen
- Bij zeer hoge [S]: $V_0 = V_{max}$

○ Plaats K_m zegt iets over de affiniteit: meer/minder S nodig voor $\frac{1}{2} V_{max}$

○ Michael Menten kinetiek enkel in steady state conditie (initiële snelheden)

○ Niet alle enzymen volgen Michaelis-Menten kinetiek

- → enkel enzymen die hyperbolisch verband hebben tss V_0 en [S] volgen Michael Menten

- Interpretatie V_{max} en K_m (betekenis kan verschillen van enzym tot enzyme)

- K_m
 - \sim substraatsaffiniteit
 - \sim indicator voor de affiniteit vh enzyme voor een substraat
- V_{max}
 - = bepaald door snelheidsbepalende stap (n) $\rightarrow V_{max} = kn[E_t]$
 - Vb: als enzyme reageert volgens 2 staps Michael Menten mechanisme \rightarrow stap 2 rate limiting dan $V_{max} = k_2[E_t]$
- K_{cat}
 - = nuttiger om snelheidsbepalende stap te beschrijven tot V_{max}
 - = algemene snelheidsconstante $\rightarrow K_{cat} = V_{max}/[E_t]$
 - Indien er 1 duidelijke snelheidsbepalende stap is
 - $\rightarrow K_{cat}$ gelijk aan k van die reactiestap
 - = 'turnover number' = $S \rightarrow P$ / tijd (bij verzadiging)
 - K_{cat} = het aantal S moleculen die omgezet zijn naar P in een gegeven tijd, wnr het enzym verzadigd is met het substraat (Hoe hoger K_{cat} → Hoe sneller de reactive)

- Wat doen om V_{max} en K_m te bepalen?

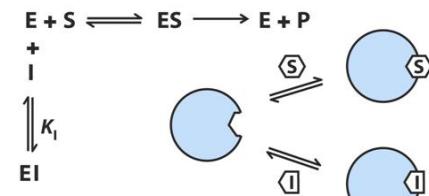
- \rightarrow lineaire regressie: rechte lijn proberen fitten door punten
 - = vgl fitten en K_m & V_{max} variëren
- Vergelijking van mechanismen en efficiëntie
 - K_{cat} en K_m reflecteren in vivo (cellulaire) condities
 - Efficiëntie: specificiteitsconstante, K_{cat}/K_m
 - Methode: transformatie van de Michaelis-Menten vergelijking, de dubbel-reciproke plot
 - Algebraïsche transformatie, $1/x$
 - $\rightarrow 1/V_0 = (K_m + [S])/V_{max}[S]$
 - $\rightarrow 1/V_0 = K_m/V_{max}[S] + 1/V_{max}$ (Lineweaver-Burk vergelijking)
 - Resultaat is de Lineweaver-Burk plot
 - \rightarrow $rico = K_m/V_{max}$
 - \rightarrow intercept $1/V_{max}$ op y-as $\rightarrow 1/V_{max}$ aflezen $\rightarrow V_{max}$
 - \rightarrow intercept $-1/K_m$ op x-as $\rightarrow -1/K_m$ aflezen $\rightarrow K_m$ OF $rico \cdot V_{max} = K_m$

- Reversibele en irreversibele inhibitie

- Inhibitoren zijn moleculen die enzymkatalyse reversibel of irreversibel vertragen of volledig remmen. Bij irreversibele wordt de inhibitor covalent gebonden of stabiel-niet-covalent gebonden, of het vernietigt een functionele groep.
- Reversibele inhibitie.

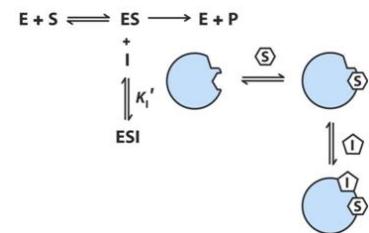
▪ Competitieve inhibitor.

- Inhibitor (I) in competitie met substraat (S) voor bindingsplaats op eiwit.
- Vorming van een EI-complex.
- Bij $[S] \gg [I] \rightarrow$ Normale V_{max} en gewijzigde K_m .
- Michaelis-Menten: $V_0 = V_{max} [S] / (\alpha K_m + [S])$



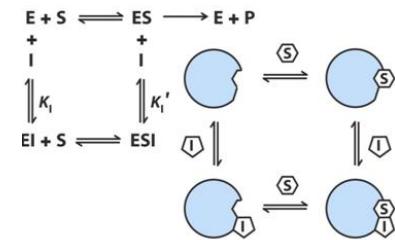
▪ Oncompetitieve inhibitor.

- Inhibitor bindt aan site verschillend van het substraat-bindingsplaats. Dit gebeurt enkel als het ES-complex al gevormd is.
- Michaelis-Menten: $V_0 = V_{max} [S] / (K_m + \alpha'[S])$
- Dus geen competitie



▪ Gemengde inhibitor.

- Inhibitor bindt aan site verschillend van het substraat-bindingsplaats. Dit gebeurt zowel op E zo of als het ES-complex al gevormd is.
- Michaelis-Menten: $V_0 = V_{max} [S] / (\alpha K_m + \alpha' [S])$
- Combo van eerste en tweede



- Irreversibele inhibitie.

▪ Suicide inactivators.

- Binden als substraat en worden omgezet tot een reactieproduct dat het enzym irreversibel inactiveert.

• Chymotrypsine uitleggen aan de hand van gegeven schema

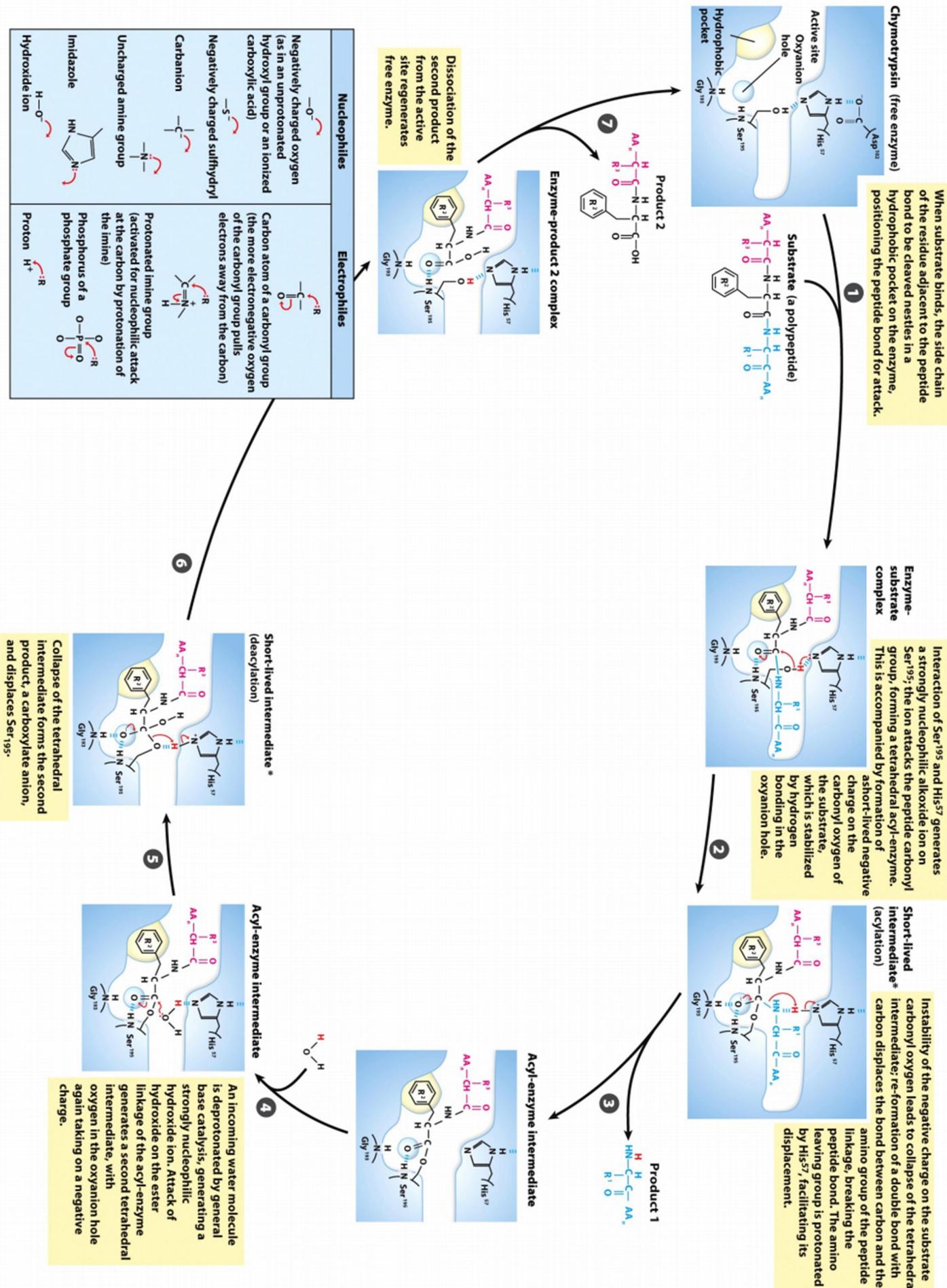
- Reactiemechanisme van chymotrypsine \rightarrow omvat acylering en deacylering v/e Ser residu
- Het reactiemechanisme van chymotrypsine omvat acylering en deacylering van een Serine (Ser / S) residu.
- Chymotrypsine (mr 25,191 Da)
 - = een eiwit
 - = serine protease
 - = proteasen met Ser residu's die nucleofiele rol spelen
 - = protease
 - = enzyme dat de hydrolytische cleavage van peptidebindingen katalyseert
 - \rightarrow Dit protease is specifiek voor peptide bindingen aangrenzend aan aromatische AZ residu's (Trp, Phe, Tyr)
- Chymotrypsine protease breekt peptidenbindingen, specifiek tussen Phenylalanine (Phe / F), Tyrosine (Tyr / Y) en Tryptophan (Trp / W).
- De katalyse gebeurt via een tijdelijk covalent acyl-enzym intermediair.
 - Acylering: splitsing van peptide binding met ester binding van peptide acyl aan Serine (Ser / S) van enzym.
 - Deacylering: hydrolyse van de esterbinding en regeneratie van het enzym.
- Electron pushing.
 - Ser¹⁹⁵ is de nucleofiel \rightarrow Serine protease.
 - Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ en Asp¹⁰² zijn de katalytische triade.
 - Interactie tussen His⁵⁷-Asp¹⁰².
 - ΔpK_a His⁵⁷ (> 12).
 - Opname van H⁺ van Ser¹⁹⁵.

- Algemeenheden reactiemechanisme

- Chemotrypsine katalyseert geen rechtstreekse attack van water op de peptide binding (voor hydrolytische splitsing/ cleavage vd peptidebinding)
 - → Het vormt in de plaats hiervan een tijdelijk covalent acyl-enzyme intermediair
 - → reactie bestaat dus uit 2 aparte fasen/stappen
- Katalyse in 2 stappen:
 - 1) Acylering fase: splitsing peptidebinding & vormen ve covalente acyl esterbinding aan Ser195 (**stap 1-7**)
 - = esterbinding tussen de peptide carbonyl C & het enzyme
 - → Het O atoom van Ser195 is het nucleofiel in de acylering fase
 - 2) Deacylering fase: hydrolyse esterbinding & regeneratie vh niet geacyleerde enzyme (**Stap 5-7**)
- De katalytische triade (**zie stap 1**)
 - = het waterstofbruggen netwerk waarin Ser 195 is gelinked aan His57 en Asp102
 - 1) Wanneer peptide substraat bindt aan chemotrypsine → kleine verandering in conformatie zorgt voor samendrukken vd waterstofbrug tussen H57 en Asp102
 - Resultaat: sterkere interactie
 - 2) Sterkere interactie → zorgt voor stijging pKa van His57 van 7 naar >12
 - Gevolg: His residu kan als base dienen → proton weghalen vd Ser195 OH → maakt van Ser195 een sterker nucleofiel (O atoom)

- Reactiemechanisme: Hydrolytische cleavage vd peptide binding door chemotrypsin

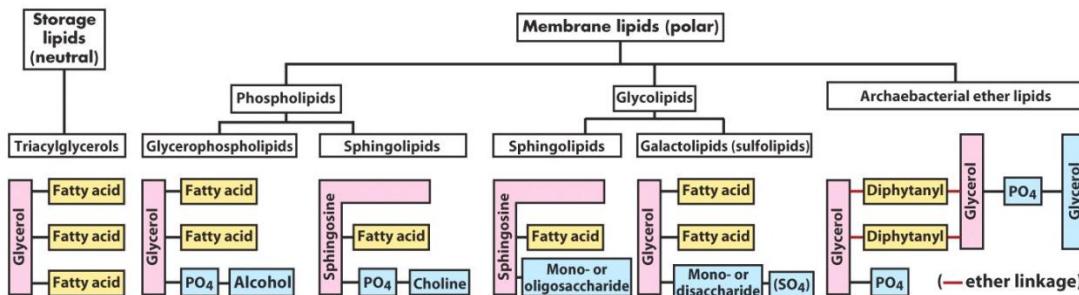
- 1) Door substraatbinding aan Chemotrypsin
 - → R keten in het S, aangrenzend aan de peptidebinding die gecleaved zal w, nestelt zich in de hydrofobe pocket van Chemotryp. → vorming ES
 - Zorgt voor positionering vd peptidebinding voor attack
- 2) Door interactie Ser195 & His157
 - → w een sterk nucleofiel alkoxide ion op Ser195 gegenereerd → ion valt de peptide carbonyl groep aan
 - → vorming tetrahedraal acyl enzyme intermediair
 - Gaat gepaard met een neg. lading op carbonyl O vh S → lading gestabiliseerd door H brug binding in de oxyanion holte.
- 3) Door instabiliteit vd neg. lading op het S carbonyl O atoom
 - → Leidt tot collaps vh tetrahedraal intermediair
 - → Verbreking vd peptidebinding door hervorming vd dubbele binding
 - → Amino leaving groep is geprotoneerd door His57 → dit zorgt dat de verplaatsing makkelijker verloopt
 - Resultaat: acyl enzym ester op Ser195 (acylering)
- 4) Door deprotonering v/e inkomend H₂O molecule
 - → wordt een sterk nucleofiel OH ion gegenereerd
 - → OH valt de ester binding vh acyl enzym aan → verbreken acyl-enzym ester
 - → genereert een 2^{de} tetrahedraal intermediair
 - Gaat weer gepaard met een neg. lading op carbonyl O vh S → lading gestabiliseerd door H brug binding in oxyanion holte
- 5 &6) Door collaps vh tetrahedrale intermediair
 - → vorming vh 2^{de} product (carboxylate anion) & verplaatsing van Ser195
- 7) Door dissociatie vh 2^{de} product vd actieve site
 - → regeneriert het enzyme Chemotrypsin



Hoofdstuk 10: Lipiden (voor de rest enkel termen)

- **Algemene typen lipiden**

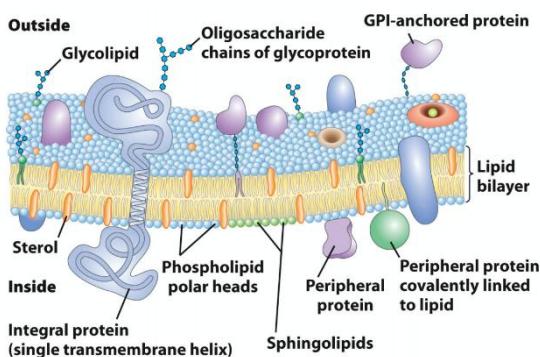
- **glycerofosfolipiden, sulfolipiden, galactolipiden, sfingolipiden, sterolen**



Hoofdstuk 11: Biologische membranen en transport

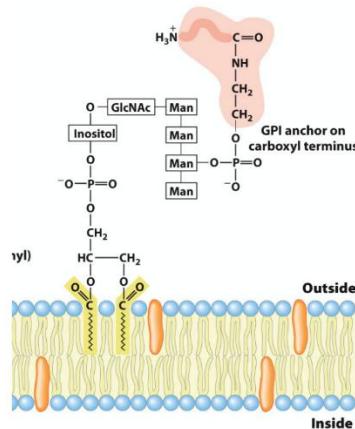
- **Lipidensamenstelling van een membraan? Hoe bepaalt het de membraan eigenschappen? Annulaire lipiden en lipid rafts uitleggen**

- **Lipidensamenstelling van een membraan**



- Ongeveer 5 – 8 nm dik, trilamellair.
- Vloeibaar (niet-covalente interacties) mozaïek model, eiwitten in een zee van fosfolipiden.
- De oriëntatie van eiwitten in de membraan is asymmetrisch → Sidedness.

- Fosfolipiden in water → vorming (hydrofobe interacties) aggregaten
 - **micellen**: sferische met hydrofobe delen in centrum (bol)
 - **dubbellagen**: twee lipiden lagen vormen dubbellaag → liposomen
- Drie typen membraaneiwitten verschillen in hun associatie met de membraan
 - **Integrale eiwitten**: 'stevig verbonden' aan membraan → oplosbaar met detergenten, organische solventen
 - **Perifere eiwitten**: elektrostatische interactie, H-bruggen → oplosbaar met detergenten, zouten, hoge pH
 - **Amfitrope eiwitten**: eiwitten 'soms' membraangebonden, niet-covalent, interactie met membraaneiwit of -lipide, of covalent gebonden lipide
- Covalent gebonden lipiden verankeren sommige membraaneiwitten
 - **GPI anker**: glycosyl phosphatidylinositol, aan C-terminaal einde met ethanolamine



- Trans-dubbellaag bewegingen van lipiden vereist katalyse.
 - 'Flip-flop' diffusie van een lipide in een membraan gebeurt zeer traag.
 - Flippase, translocatie van fosfatidylethanolamine, fosfatidylserine. Verwant aan P-type ATP-assen.
 - Floppase, fosfolipiden van cytosolzijde naar extracellulaire zijde van plasmamembraan. ABC transporters.
 - Scramblase, translocatie volgens concentratiegradiënt.

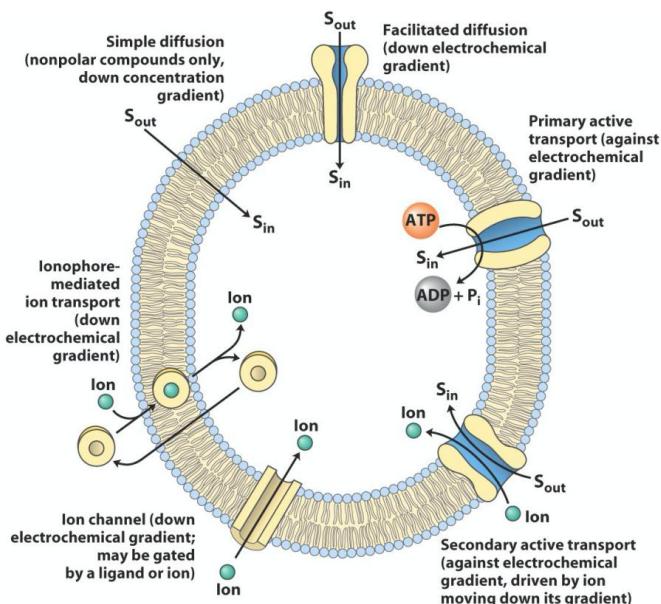
- Annulaire lipiden

- fosfolipiden in associatie met oppervlakte eiwit (e.g. aquaporine)
- bevorderen oplosbaarheid van eiwit in membraan

- lipid rafts

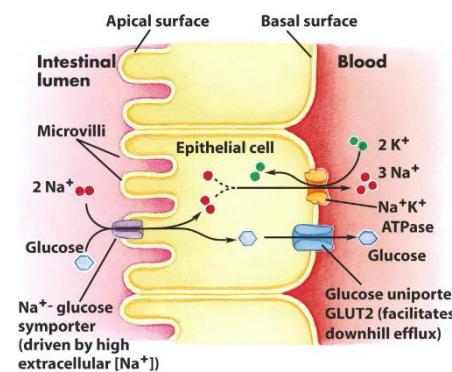
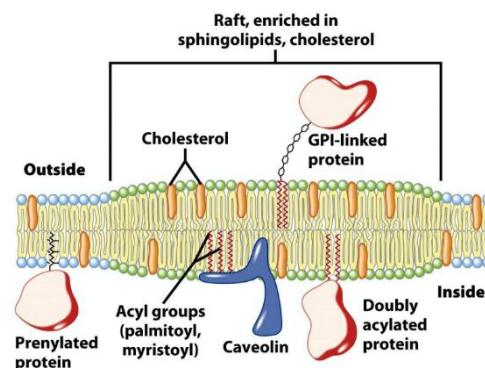
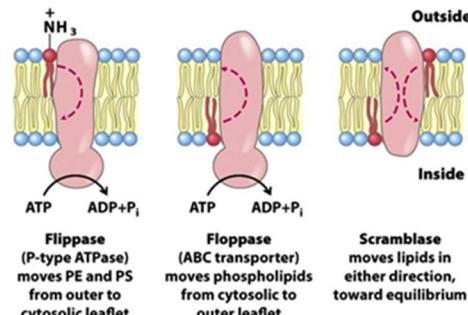
- sfingolipiden (lang-keten, verzadigde vetzuren) vormen tijdelijke clusters, zonder glycerofosfolipiden
- grotere oplosbaarheid van cholesterol → sfingolipide-cholesterol 'rafts'
- relatief aangereikt in integrale membraaneiwitten met 2 lang-keten vetzuren of GPI anker
- concentratie van specifieke eiwitten verhoogt kans op interactie !

- **eiwittransport door membranen**



- Vb glucose transport in darmepitheel cellen

- opname van glucose met Na^+ gradiënt en membraanpotentiaal
- excretie van glucose in bloed door gefaciliteerde diffusie
- opbouw Na^{2+} gradiënt door actief transport (Na^+/K^+ -ATPase) (Na^+ in cel moet laag genoeg zijn)
- cellen zijn gepolariseerd (andere eiwitten aan beide kanten)
- Ionoforen: moleculen (soms eiwitten) die ionengradiënt selectief vernietigen
 - toxicisch
 - antibiotisch (valinomycine (K^+), monensine (Na^+))
- Valinomycine, K^+ ionofoor
 - klein cyclisch peptide (12 AZn)
 - schermt K^+ lading af
 - beweging volgens concentratiegradiënt

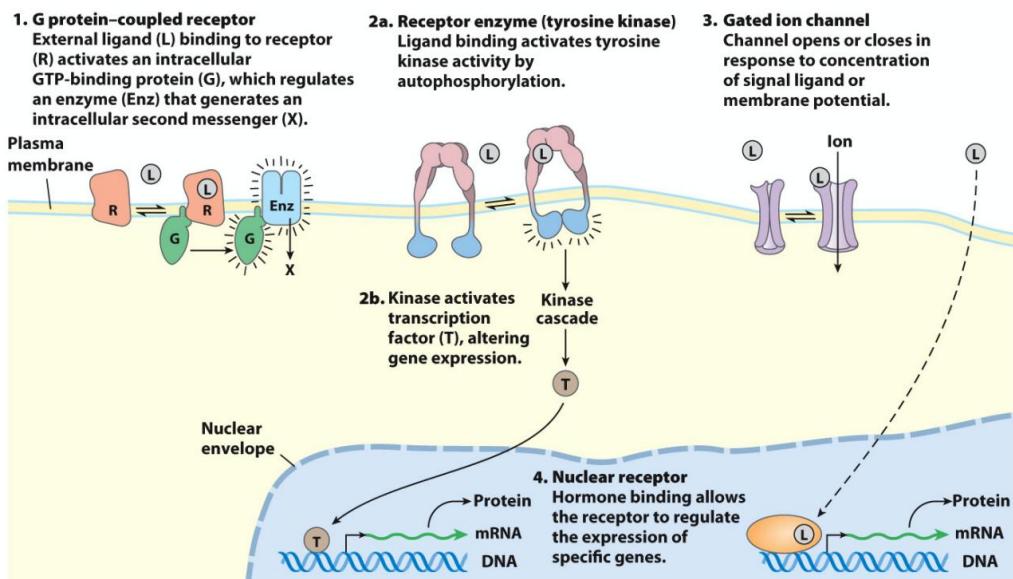


- Aquaporines

- transmembraan eiwitten gevonden in alle organismen (e.g. 38 AQP genen in Arabidopsis)
- uiteenlopende fysiologische functies: volume RBC, productie van zweet, tranen, speeksel, urine, ...
- zeer lage activatie energie → water in continue stroom
- selectief: geen transport van H_3O^+ !
- tetrameer (4 poriën): elke subeenheid: 6 TM helices + 2 korte α -helices met Asn-Pro-Ala (NPA)
- specificiteit: positieve ladingen (Arg, His) verhinderen H_3O^+ doorgang
- regulatie van opening door fosforylering

Hoofdstuk 12: Signaaltransductie

- **Signaaltransductie.** Geef 5 mogelijkheden + specificatie, amplificatie, integratie en desensitisaie + basale transductiereceptoren
- Receptortypen: G-proteïne gekoppelde receptoren, receptor enzymen, 'gated'-ionenkanalen, nucleaire receptoren

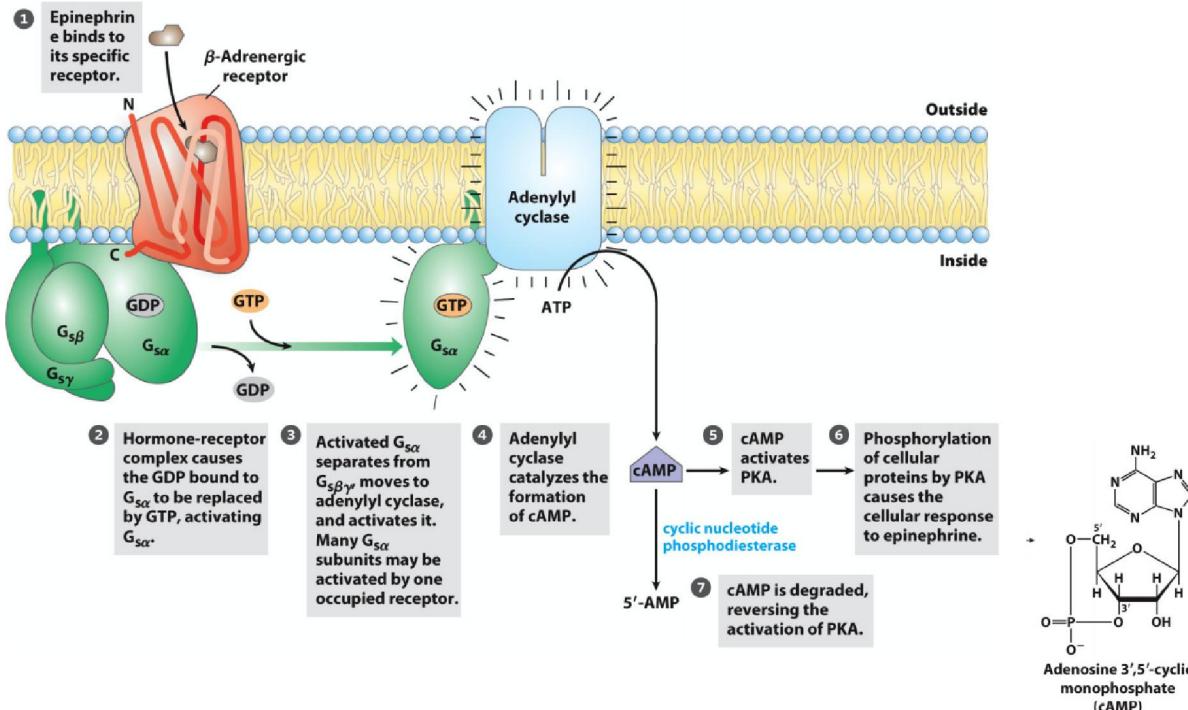


- Specificiteit, moleculaire complementariteit (cfr. enzymen, zwakke interacties, sleutel-slot)
- Coöperativiteit, lage concentratie ligand → groot effect op receptor activiteit
- Amplificatie, e.g. cascades van enzymatische reacties, versterking
- Modulair, associatie meerdere eiwitten tot 1 complex dat bindt aan receptor
- Desensitisaie, inactivatie van signaaltransductie door negatieve feedback
- Integratie, respons is resultaat van meerdere inkomende signalen
- Lokalisatie, reactie soms lokaal en kort

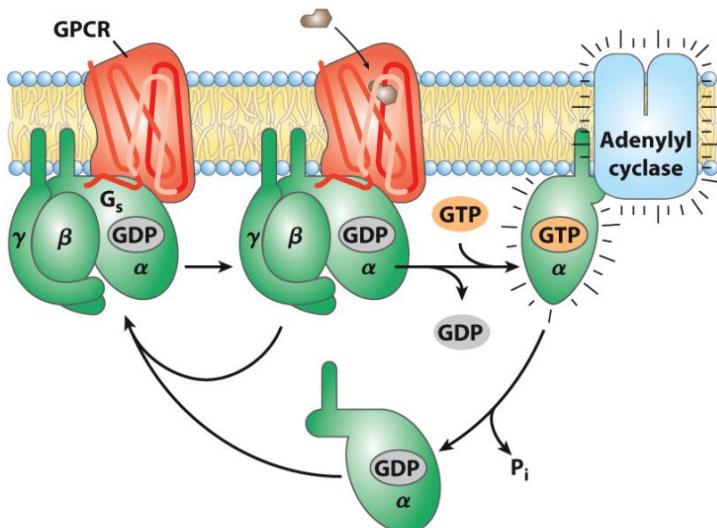
- **B-Adrenerge receptor. Werking uitleggen + hoe beëindigd?**

- Het β -adrenerge receptor systeem gebruikt cAMP als second messenger
- Epinefrine (adrenaline) 'fight or flee' → vrijstellen energie.
- Bindt aan β -adrenerge receptor.
- Is een 'serpentine receptor' met 7 transmembraan helices.
- Komt voor in de spieren, lever en vetweefsel → Δ energiemetabolisme.

- Binding epinefrine $\rightarrow \Delta$ conformatie $\rightarrow \dots \rightarrow$ G-proteïne $\rightarrow \dots \rightarrow$ adenylyl cyclase \rightarrow cAMP synthese

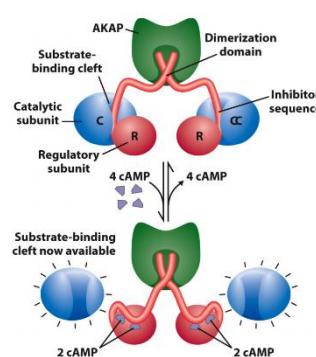


- G_s, stimulatorisch G proteïne, functioneert als 'moleculaire switch', GTP als substraat (extra uitleg bovenste)

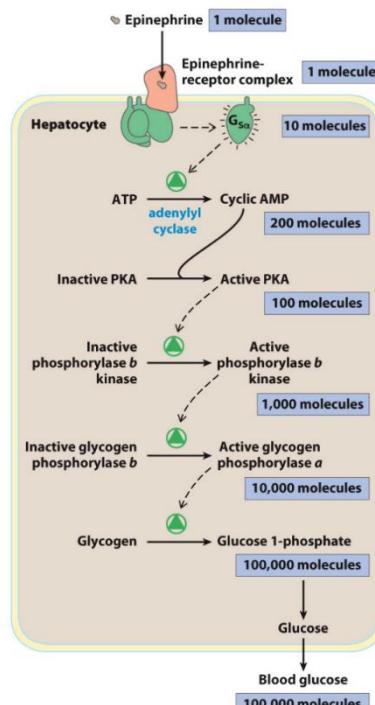
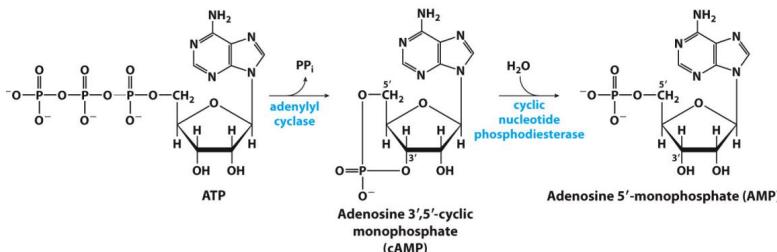


- 1** G_s with GDP bound is turned off; it cannot activate adenylyl cyclase.
- 2** Contact of G_s with hormone-receptor complex causes displacement of bound GDP by GTP..
- 3** G_s with GTP bound dissociates into α and βγ subunits. G_{sα}-GTP is turned on; it can activate adenylyl cyclase.
- 4** GTP bound to G_{sα} is hydrolyzed by the protein's intrinsic GTPase; G_{sα} thereby turns itself off. The inactive α subunit reassociates with the βγ subunit.

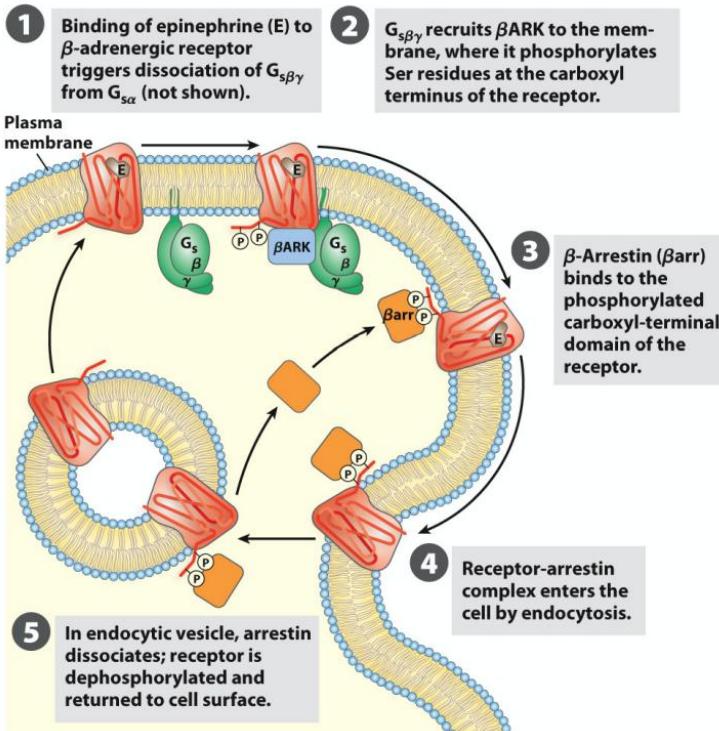
- Proteïne kinase A (PKA), cAMP activeert, door vijstellen van auto-inhiberende subeenheden
- PKA fosforeert eiwitten
- Consensussequentie: xR[RK]x[ST]B



- Amplificatie
 - o PKA activeert fosforylase b kinase → fosforylase b kinase activeert glycogeen fosforylase → ... → 10,000x
- Samenvatting:
 - o $[epinefrine] < K_d \rightarrow$ inactieve conformatie
 - o GTP hydrolyse op G-proteïne → inactivatie GS α
 - o Afbraak cAMP tot 5'-AMP door cyclisch nucleotide fosfodiesterase → inactivatie PKA
 - o Eiwit fosfatasen → defosforylering



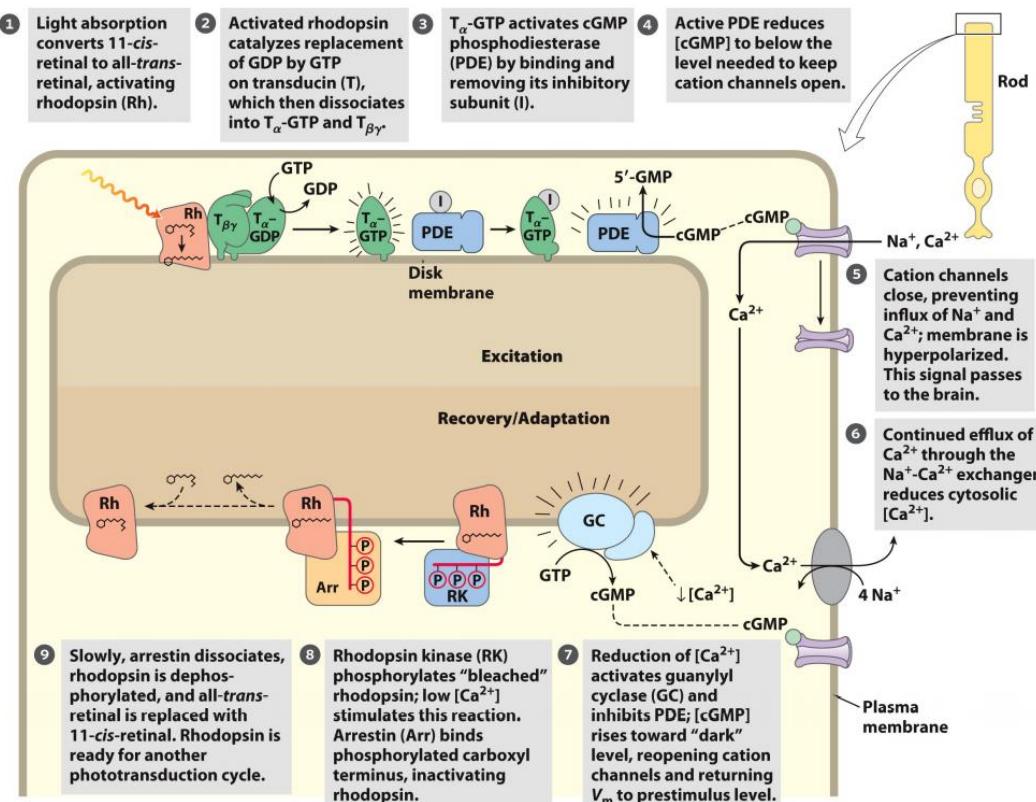
- Densensitisaie: onderbreken signaal, in aanwezigheid van stimulus
- β -adrenerge receptor kinase (β ARK), fosforeert Ser (C-terminus) → β -arrestine (β arr)
 - endocytose



- Bespreek geurperceptie en vergelijk geur-, adrenaline- en lichtreceptor

- Lichtreceptor
 - o Het visuele systeem gebruikt klassieke GPCR mechanismen.
 - o Staafjes (intensiteit) en kegeltjes (kleur) zijn gespecialiseerde neuronen.
 - Binnen segment → nucleus en mitochondria.
 - Buiten segment → membranen met rhodopsine.
 - V_m door Na^+K^+ -ATPase en cGMP-gevoelige Na^+/Ca^{2+} kanaal.

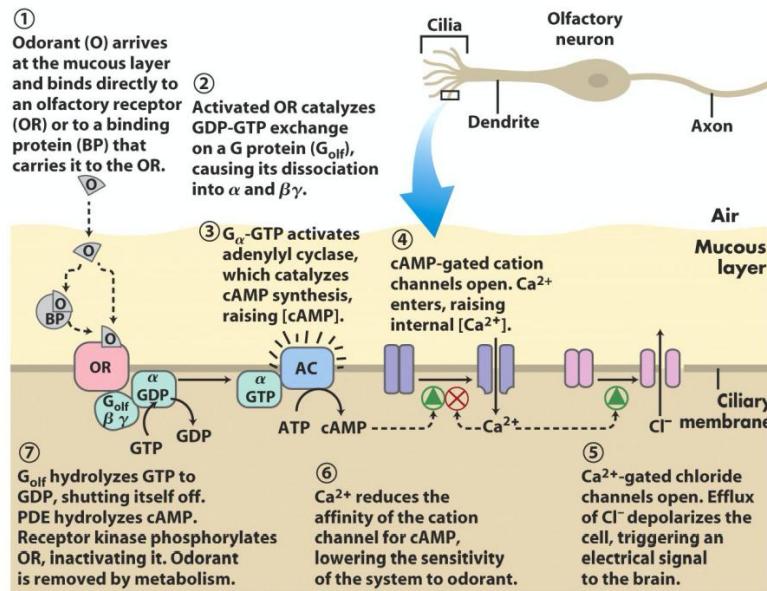
- Licht $\rightarrow \Delta$ cGMP \rightarrow sluiten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanaal \rightarrow hyperpolarisatie.
- Rhodopsine, 7 transmembranaire helices.
 - Chromofoor \rightarrow 11-cis-retinal covalent aan opsine.
 - Foton \rightarrow 11-cis-retinal \rightarrow all-trans-retinal \rightarrow Δ conformatie rhodopsine.
- Geëxciteerde rhodopsine gebruikt het G-proteïne transducin om de cGMP concentratie te verlagen. (1-5)
 - Associatie met transducine (T) \rightarrow uitwisseling GDP voor GTP $\rightarrow T_\alpha\text{-GTP}$ activeert cGMP PDE (vrijstellen van inhibitor) \rightarrow cGMP \rightarrow 5'-GMP \rightarrow sluiten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanaal $\rightarrow \Delta V_m$ (hyperpolarisatie).
 - Versterking \rightarrow 500 moleculen transducine geactiveerd per rhodopsine, PDE turn-over 4200 mol/sec, cGMP binding is coöperatief, gevoeligheid voor licht (1 foton \rightarrow > 1000 kanalen $\rightarrow \Delta V_m \sim 1$ mV).
- Uitschakelen van het lichtsignaal.(6-7)
 - GTP hydrolyse \rightarrow reassociatie van $T_\alpha\text{-GTP}$ met $\beta\gamma$ \rightarrow inhibitor activeert PDE.
 - Ca^{2+} efflux $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ daalt \rightarrow cGMP synthese door guanylyl cyclase.
- Recuperatie rhodopsine.(8-9)
 - Threonine (Thr / T) en Serine (Ser / S) fosforylering door rhodopsine kinase \rightarrow binding van arrestine ($\sim \beta$ arr) \rightarrow associatie met 11-cis-retinal.



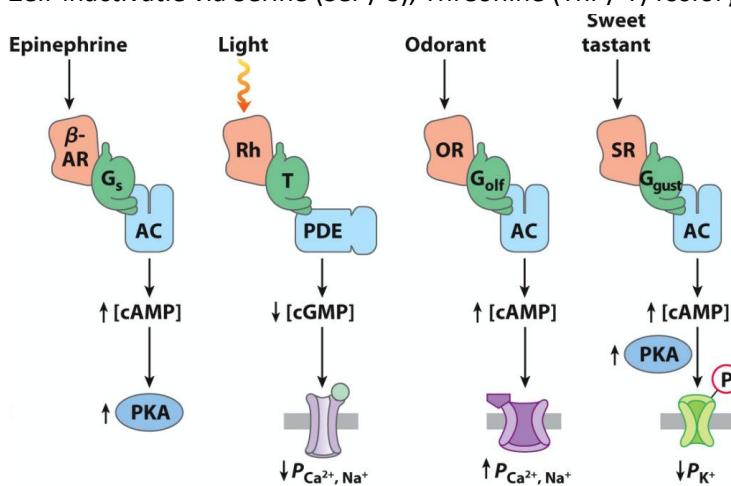
- Kegeltjes zijn gespecialiseerd in kleurwaarneming.
 - Signaaltransductie in staafjes en kegeltjes gebeurt gelijkaardig.
 - Kegeltjes bevatten 3 versies van opsine.
 - Verschillende omgeving voor 11-cis-retinal.
 - Excitatie door verschillende golflengten.
 - Kleurenblindheid wordt veroorzaakt door mutaties in het opsine.
 - Verlies van pigment gevoeligheid.
 - Gewijzigde kleurwaarneming.

- Geurreceptor (en smaak)

- Geur en smaak perceptie gebruikt mechanismen vergelijkbaar met die van het zicht.
- Olfactorische neuronen.
 - Met cilia in extracellulaire mucuslagen.
 - Cilia membraan met olfactorische receptoren (GPCR).
 - Verschillende receptoren → geurbereik.
 - Integratie van geurpatronen → verhoogd geurbereik.
- G-proteïne gekoppelde reactie, associatie met geurmolecule met receptor.
 - Activatie $G_{olf}\alpha$ → activatie adenylyl cyclase → synthese cAMP → opening Ca^{2+} kanaal → opening Cl^- kanaal → ΔV_m

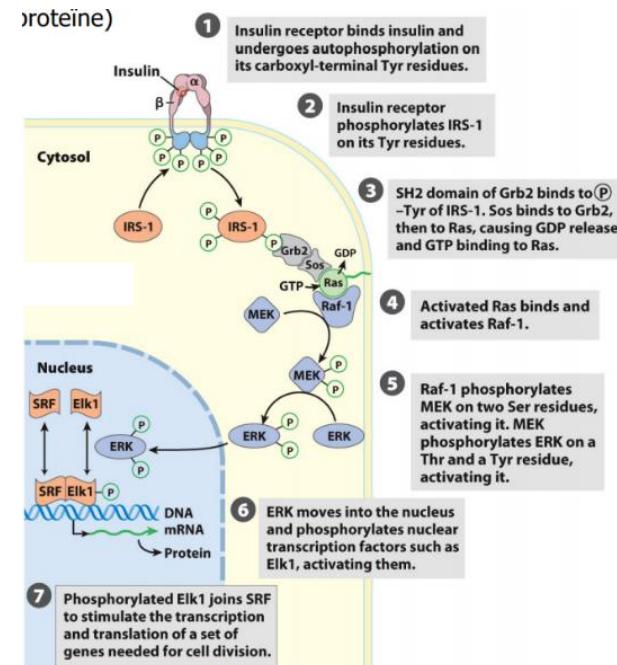


- GPCRs van de zintuigen en hormoon signaaltransductie(adrenaline~epinefrine) hebben vergelijkbare eigenschappen.
 - 7 transmembranaire segmenten.
 - Δ conformatie na ligand binding.
 - Interactie met trimeer G-proteïne.
 - G-proteïne activeert effector enzymen.
 - Δ tweede boodschapper.
 - Δ fosforylering of Δ ionentransport.
 - Zelf-inactivatie via Serine (Ser / S), Threonine (Thr / T) fosforylering.



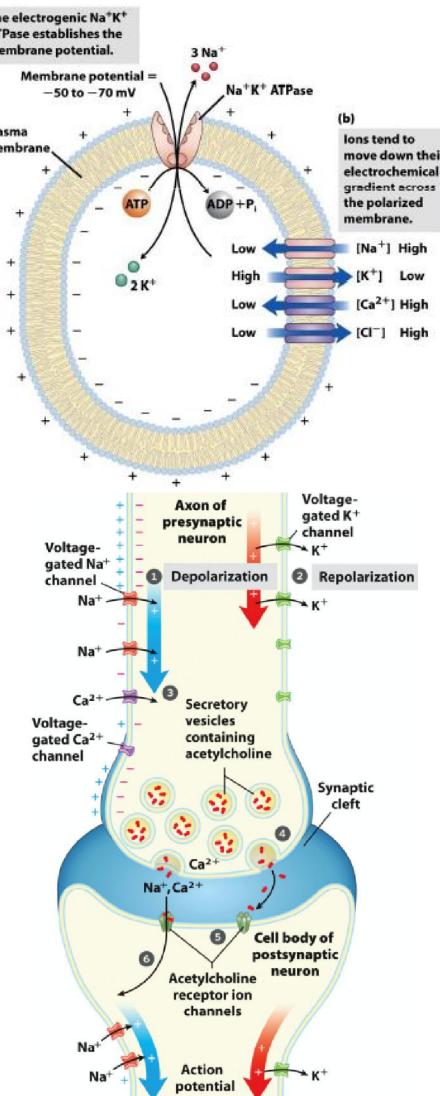
• Tyrosine kinase receptor bv. Insuline

- Receptor tyrosine kinases (RTK) zijn plasmamembraan eiwitten met een extracellulair receptor domein en intracellulair Tyrosine (Tyr / Y) kinase domein.
- Stimulatie van de insuline receptor initieert een cascade van proteïne fosforylatie reacties.
 - o Insuline reguleert metabolisme en genexpressie.
 - o Structuur actieve receptor.
 - 2 α -eenheden met insulinebinding domein.
 - 2 β -transmembraan eenheden met Tyr-specifieke kinase domein.
 - o Activiteit.
 - Binding van insuline op α -ketens \rightarrow activatie kinase \rightarrow autofosforylering van 3 Tyrosine (Tyr / Y) \rightarrow opening actieve site.
 - o Geactiveerde insuline receptor bindt en fosforyleert 'Insuline Receptor Substraat' eiwit (IRS-1) \rightarrow P-Tyr op IRS-1 bindt SH2 domein van Grb2 \rightarrow SH3 domein van Grb2 bindt Pro-rijke zone van Sos \rightarrow Sos katalyseert GTP binding op Ras (een monomeer G-proteïne) \rightarrow Ras fosforyleert proteïne kinase Raf-1 \rightarrow Raf-1 fosforyleert proteïne kinase MEK \rightarrow MEK fosforyleert proteïne kinase ERK \rightarrow ERK verhoogt transcriptiefactoren \rightarrow verhoogde genexpressie.
 - ERK, MEK, Raf-1 zijn Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK).
 - ERK = MAPK (Ser of Thr).
 - MEK = MAPK kinase (Ser en Thr).
 - Raf-1 = MAPK kinase kinase (Ser of Thr).



• Wat is een gated ionenkanaal en leg de werking hiervan uit?

- Ionenkanalen liggen aan de basis van elektrische signalen in exciteerbare cellen.
- Sommige celtypen zijn exciteerbaar.
 - o Spelen een rol in zenuwgeleiding, spiercontractie, hormoonsecretie, ...
 - o Vaak afhankelijk van 'gated' ionenkanalen.
 - o Controle door ligand of Δ membraanpotentiaal (V_m).
 - o Elektrogeen transport beïnvloedt V_m (Na^+K^+ -ATPase).
- Gated ionenkanalen.
 - o Passief transport door ionenkanalen $\rightarrow \Delta V_m$ (elektrochemische gradiënt)
 - o Aantal ionen nodig voor V_m is klein \rightarrow weinig verandering in concentratie.
 - $\Delta G_t = R \cdot T \cdot \ln \frac{C_{in}}{C_{out}} + Z \cdot F \cdot \Delta \psi$
 - o 'Voltage-gated' ionenkanalen produceren neuronale actiepotentialen
 - Na^+ kanaal, gehele axon, gesloten bij rustpotentiaal
 - kort open bij depolarisatie door acetylcholine \rightarrow instroom Na^+
 - K^+ kanaal, gehele axon, gesloten bij rustpotentiaal
 - open bij depolarisatie door Na^+ instroom \rightarrow efflux K^+ \rightarrow repolarisatie (!)
 - Ca^{2+} kanaal, axontip, open bij depolarisatie
 - influx Ca^{2+} (tweede boodschapper)
 - exocytose acetylcholine



Hoofdstuk 13: Bio-energetica en metabolisme

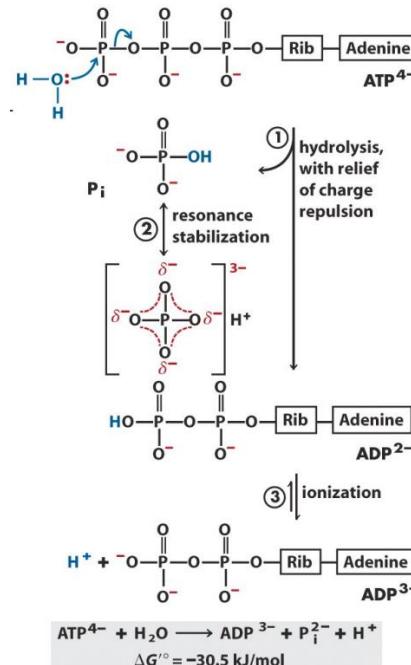
- **Mass-action rate uitleggen, ATP tekenen en waarom is het thermodynamisch een goede energiebron?**

- Mass-action rate

- Veranderingen in vrije energie zijn afhankelijk van de substraat- en productconcentraties.
- Voor elke chemische reactie geldt het volgende.
 - Verandering in standaard (Gibbs) vrije energie (ΔG°) is constant.
 - Verandering in vrije energie (ΔG) is veranderlijk, in functie van het substraat, product, actuele temperatuur en druk.
- $\Delta G = \Delta G^\circ + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} = \Delta G^\circ + R \cdot T \cdot \ln Q$ (Q = mass-action ratio $= [C]^c [D]^d / [A]^a [B]^b$).
 - Exotherm \rightarrow vrijstellen van vrije energie ($\Delta G < 0$).
 - Endotherm \rightarrow opnemen van vrije energie ($\Delta G > 0$).

- ATP

- ATP afbraak is energetisch voordelig
 - 1 - hydrolyse \rightarrow opheffen van elektrostatische afstoting
 - 2 - resonantie stabilisatie van Pi
 - 3 - ionisatie van ADP^{2-} \rightarrow ADP^{3-}
 - 4 - ADP^{3-} en Pi $^{2-}$ grotere solvatatie (watermantel) dan ATP^{4-}
- Eigenlijke substraat voor meeste enzymatische reacties = MgATP^{2-}
- ATP-afhankelijke reacties (meestal) in twee stappen
 - 1 - fosforyl (Pi), of pyrofosforyl (PPi)-groep, of AMP overdracht (covalent)
 - \rightarrow verhoogd vrije energie gehalte
 - 2 - verwijderen van groep
- Fosfaathoudende verbindingen arbitrair ingedeeld in 'hoge energie' & 'lagere energie'
 - ATP niet enige fosfaatdonor, ook andere hoge EN fosfaathoudende groepen
 - ATP behoort tot de hoge energie: $\Delta G^\circ = -30 \text{ kJ/mol}$
 - Energiewinst (!)afkomstig van verschil in vrije energie van substraten en producten
 - Niet door verbreken binding (breken binding kost altijd energie)



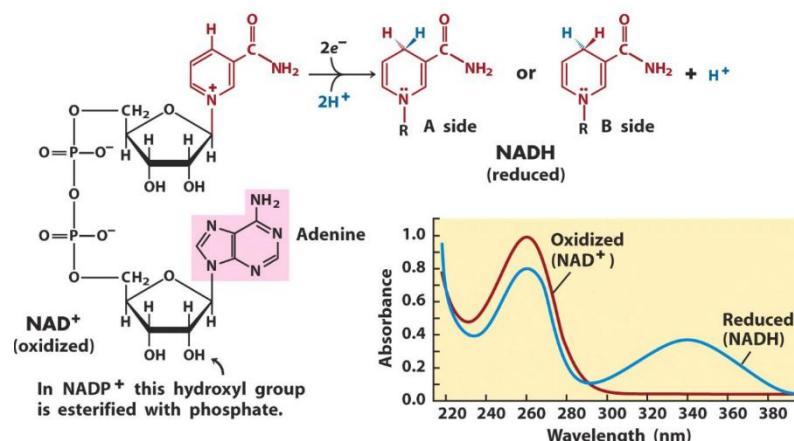
- **NADH en NADPH als oplosbare elektronencarriers**

- NAD(P)H (nicotinamide adenine dinucleotide)

- geoxideerde vorm (NAD(P)^+) accepteert hydride ion ($: \text{H}^-$) (2e^- , 1H^+) $\rightarrow \text{NAD(P)H}$
- \rightarrow halfreactie: $\text{NAD(P)}^+ + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

- NAD^+ & NADP^+

- Concentratieverhouding in cel
 - $[\text{NAD}^+] + [\text{NADH}] \sim 10^{-5} \text{ M}$
 - $[\text{NADP}^+] + [\text{NADPH}] \sim 10^{-6} \text{ M}$
- Voorkomen
 - $[\text{NAD}^+] > [\text{NADH}] \rightarrow$ treedt vaker op als elektronacceptor (katabolisme)
 - $[\text{NADP}^+] < [\text{NADPH}] \rightarrow$ treedt vaker op als elektrondonor (anabolisme)
- Enzymen: **oxidoreductasen = dehydrogenasen**
 - Katalyseren reacties waarbij $\text{NAD(P)}^+ + \text{e}^-$ accepteert of NAD(P)H dat e^- afgeeft

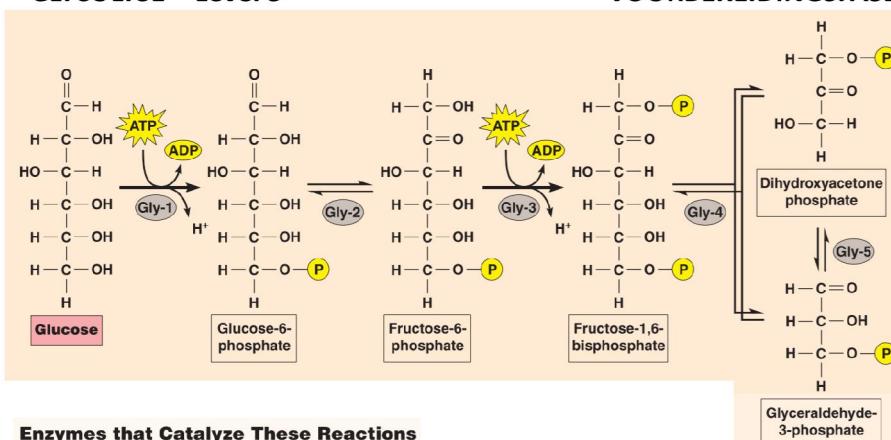


- NADH en NADPH
 - o Functie: werken als oplosbare carriers met dehydrogenasen
 - o Associatie relatief zwak → migreert vaak van enzym tot enzym als wateroplosbare protoncarrieér
- Reductie door :H⁻
 - o twee configuraties (A en B) (verwijst naar H,H voor achter vlak)
 - o specificiteit door enzymen
- Rossmann fold
 - o = Cofactor bindingsdomein
 - o = domeinstructuur die zorgt dat NADH & NADPH kunnen binden met eiwit
 - o Structuur: 3parallele β sheets + 2α helices (x2)

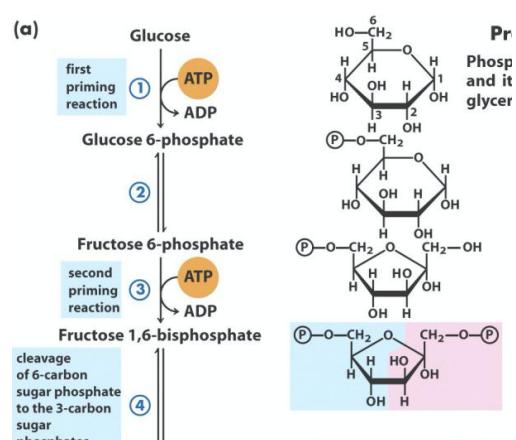
Hoofdstuk 14: Glycolyse, gluconeogenese en pentose fosfaat route

- **Glycolyse uitleggen**
 - Glycolyse verloopt in 2 stappen
 - o 1 molecule glucose wordt omgezet in 2 moleculen pyruvaat
 - Dit gebeurt in 10 enzymatische reacties verdeeld in 2 fasen
 - Voorbereidingsfase (energieinvesteringsfase)
 - Pay-off fase
 - o Voorbereidingsfase = eerste 5 reacties
 - 1) Glucose 6C gefosforyleerd op de hydroxylgroep van C6
 - 2) Product hiervan is D-glucose 6-fosfaat → wordt omgezet tot D-fructose 6-fosfaat
 - 3) Nogmaals gefosforyleerd op C1 → D-fructose 1,6-bifosfaat
 - Voor elke fosforylatie wordt 1 ATP verbruikt als donor vd fosfaatgroep
 - 4) Fructose 1,6-bifosfaat → splitst in 2 3C-moleculen: dihydroxyaceton fosfaat en glyceraldehyde 3-fosfaat
 - De lytische stap = waaraan glycolyse haar naam dankt
 - 5) Dihydroxyaceton isomeriseert tot een 2^{de} molecule glyceraldehyde 3-fosfaat
 - Laatste stap van de voorbereidingsfase
 - In totaal verlies van 2ATP's → geen energiewinst in deze fase
 - o Pay-off fase = uitbetalingsfase = eigenlijke energiewinst
 - 6) Elke molecule glyceraldehyde 3-fosfaat geoxideerd en gefosforyleerd zonder verbruik van ATP → 2 moleculen 1,3-bifosfoglyceraat
 - 7-10) Energie wordt vrijgesteld bij omzetting 1,3-bifosfoglyceraat naar pyruvaat
 - Meeste van vrijgestelde energie wordt geconserveerd door vorming van 4 moleculen ATP uit ADP
 - Netto balans: 4ATP (pay-off fase) – 2ATP (voorbereiding) = 2ATP
 - Oxidatie van 1 molecule 1,3-bifosfoglyceraat gaat gepaard met reductie van 1 molecule NAD⁺ tot NADH + H⁺
 - o Samengevat glycolyse resultaat:
 - Afbraak 6C suiker tot 3C moleculen
 - Productie van 2 ATP
 - Productie van 2 moleculen NADH

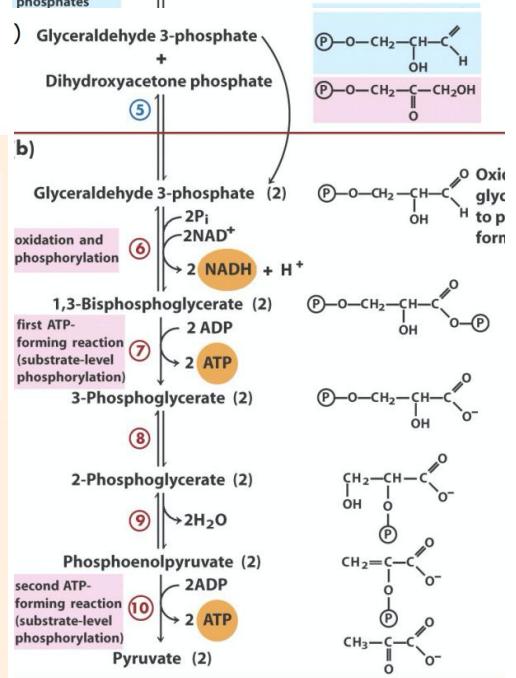
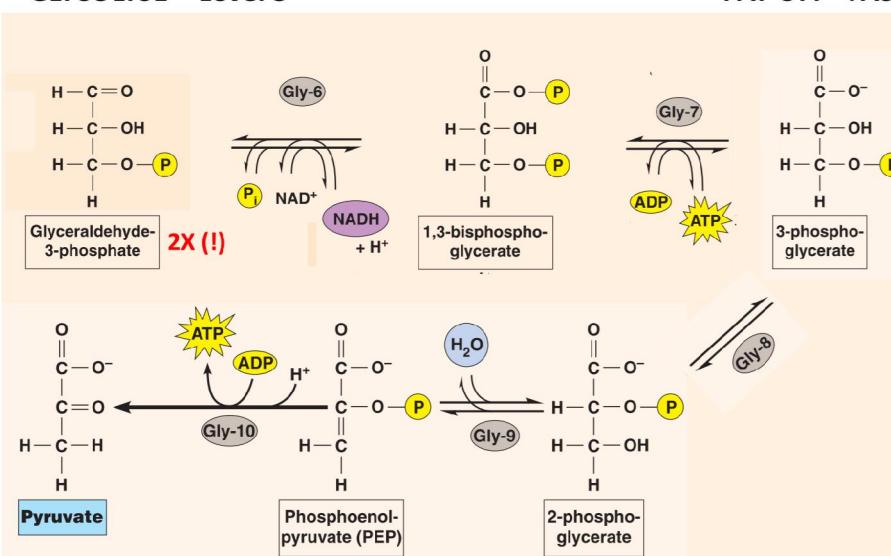
GLYCOLYSE – Level 3



VOORBEREIDINGSFASE

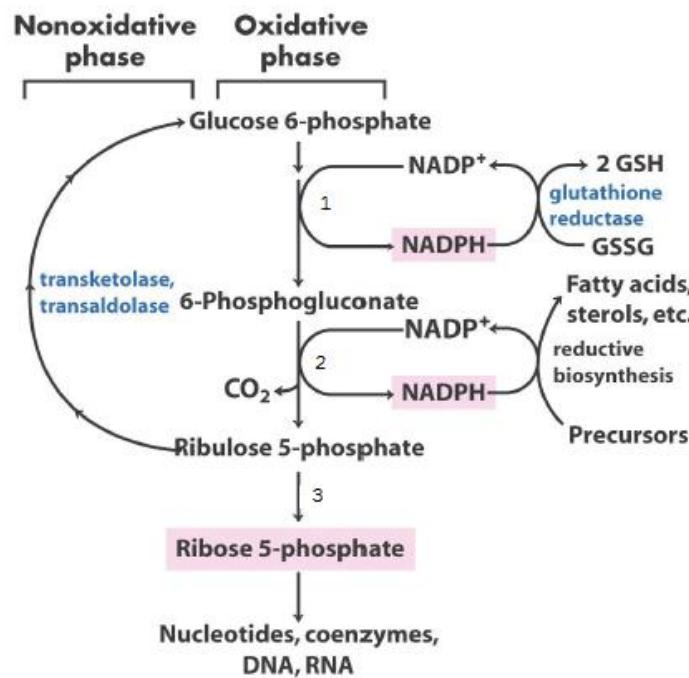


GLYCOLYSE – Level 3



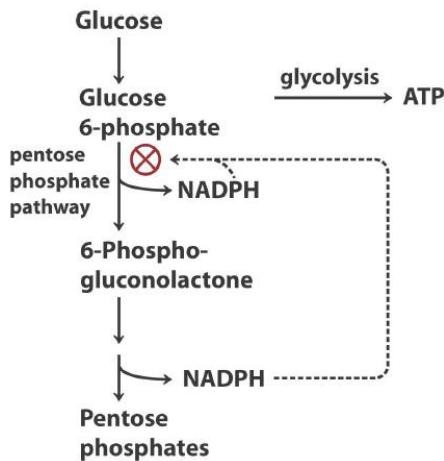
- Pentose fosfaat biosyntheseweg voor glucose oxidatie uitleggen + schema en belang voor de cel

- Oxidatieve route voor glucose-6-fosfaat → pentose fosfaat.
- Synthese van gespecialiseerde producten (RNA, DNA, NADH, FADH₂, CoA).
- NADP⁺ is een elektronen acceptor → NADH.
- De oxidatieve fase produceert pentose fosfaat en NADPH.
 - Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD).
 - Oxidatie van glucose-6-fosfaat.
 - NADP⁺ als elektronen acceptor.
 - 6-fosfogluconate dehydrogenase.
 - Oxidatie en decarboxylatie.
 - NADP⁺ als elektronen acceptor.
 - Fosfopentose isomerase.
 - Ribulose-5-fosfaat → ribose-5-fosfaat.
- De pentose fosfaat weg genereert NADPH → antioxidatieve verdediging.



- Bestemming glucose-6-fosfaat

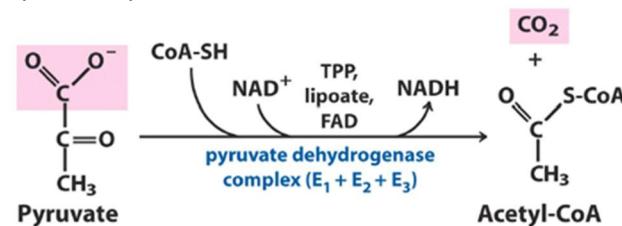
- Glucose-6-fosfaat wordt verdeeld tussen glycolyse en de pentose fosfaat weg.
- Regulatie op niveau van G6PD ($[NADP^+]$ stijgt \rightarrow G6PD stijgt).
- Cel beslist met NADPH of pentose of ATP gevormd wordt



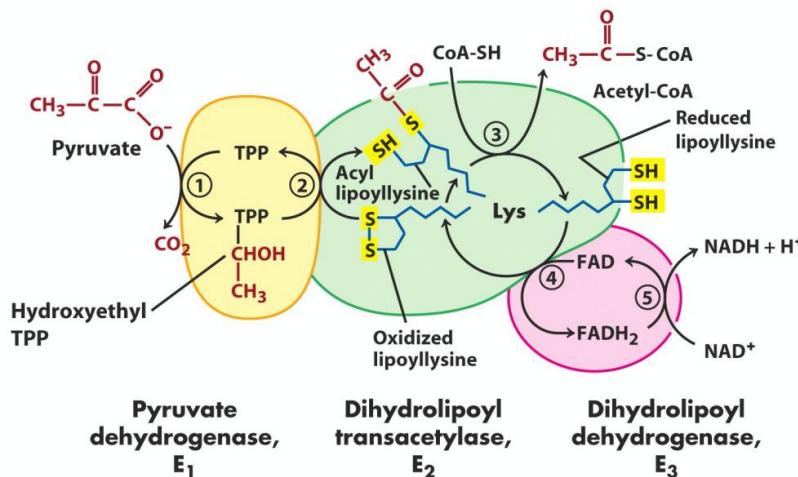
Hoofdstuk 16: Citroenzuurcyclus

• **Pyruvaat dehydrogenase complex uitleggen, domeinen en stappen**

- In aerobe organismen worden suikers, vetzuren, A_{Zn} afgebroken tot acetyl in acetyl-CoA.
- Pyruvaat wordt geoxideerd tot acetyl-CoA en CO₂.
 - Pyruvaat dehydrogenase (PDH) \rightarrow irreversibele oxidatieve decarboxylering.
- Pyruvaat dehydrogenase (PDH).
 - Oxidatieve carboxylering.
 - In mitochondriale matrix
 - 3 enzymen.
 - Pyruvaat dehydrogenase (E_1) \rightarrow met TPP.
 - Dihydrolipoyl transacetylase (E_2) \rightarrow met lipoate.
 - Covalente aanhechting \rightarrow lange, flexibele arm.
 - 3 functionele domeinen.
 - Flexibele linkers.
 - Dihydrolipoyl dehydrogenase (E_3) \rightarrow met FAD.
 - Elk enzym in meerdere kopieën.
 - Regulatorische eiwitten (kinase, fosfoproteïne, fosfatase).
 - 5 co-enzymen.
 - Thiamine pyrofosfaat (TPP) \rightarrow decarboxyleringen.
 - FAD \rightarrow oxidatie-reductie reacties.
 - CoA-SH \rightarrow activering acyl groep.
 - NAD⁺ \rightarrow elektronen acceptor.
 - Lipoate \rightarrow electron/acetyl carrier.
 - Vitaminen.
 - Thiamine (vit B₁) \rightarrow TPP.
 - Riboflavine (vit B₂) \rightarrow FAD.
 - Niacine \rightarrow NAD⁺.
 - Pantothenate (vit B₅) \rightarrow CoA.
 - Door substrate channeling verlaten de intermediaren nooit het enzymoppervlak.

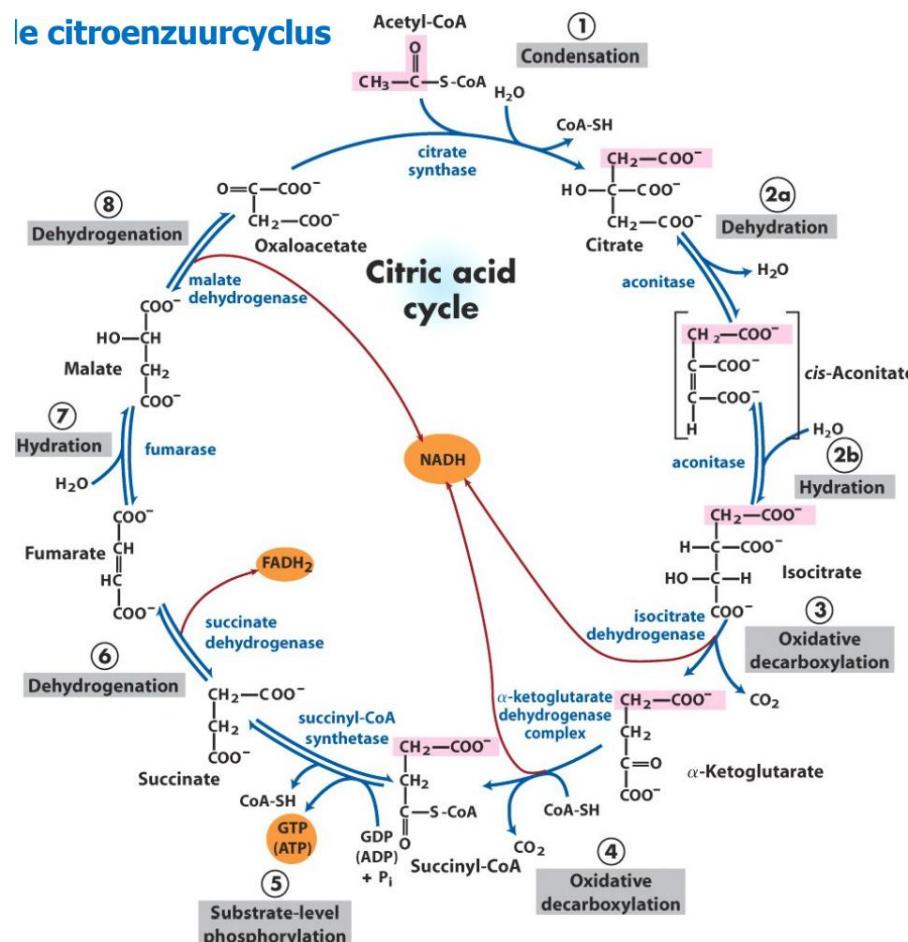


- Pyruvaat dehydrogenase heeft 5 opeenvolgende reacties van substrate channeling.
 - 1. Decarboxylatie, hydroxyethyl koppeling aan TPP, snelheidsbeperkend, substratspecifiek.
 - 2. Oxidatie hydroxyethyl groep, reductie van lipoate (-S-S- → -SH-S-), acetyl thioester op lipoyllysine.
 - 3. Overdracht van acetyl naar CoA → acetyl-CoA.
 - 4. Reductie van FADH₂, oxidatie lipoate.(FAD krijgt elektronen en protonen)
 - 5. Reductie van NAD⁺.



• Citroenzuurcyclus met structuren en enzymen + hoe worden de enzymen gereguleerd?

- Acetyl-CoA, 8 reacties, in mitochondriale matrix
 - 1 - koppeling acetyl (2C) aan oxaalazijnzuur (4C) → citroenzuur (6C)
 - 2 - omzetting naar isocitraat
 - 3 - oxidatieve decarboxylering → CO₂, NADH, α-ketoglutaarzuur (5C)
 - 4 - oxidatieve decarboxylering → CO₂, NADH, succinyl-CoA (4C)
 - 5, 6, 7, 8 - regeneratie → oxaalazijnzuur, GTP, FADH₂, NADH
- oxaalazijnzuur aanwezig in lage concentraties
 - → 2 CO₂
 - → 3 NADH, FADH₂, GTP
 - → precursor moleculen
- Energiebalans,
 - oxidatieve fosforylering,
 - ~2.5 ATP/NADH, ~1.5 ATP/FADH₂
 - 32 ATP ≈ 976 kJ/mol
 - volledige oxidatie glucose: ~2840 kJ/mol → 34%
 - 'actuele' omstandigheden: ≈65%



- Componenten van de citroenzuurcyclus zijn belangrijke biosynthese intermediairen

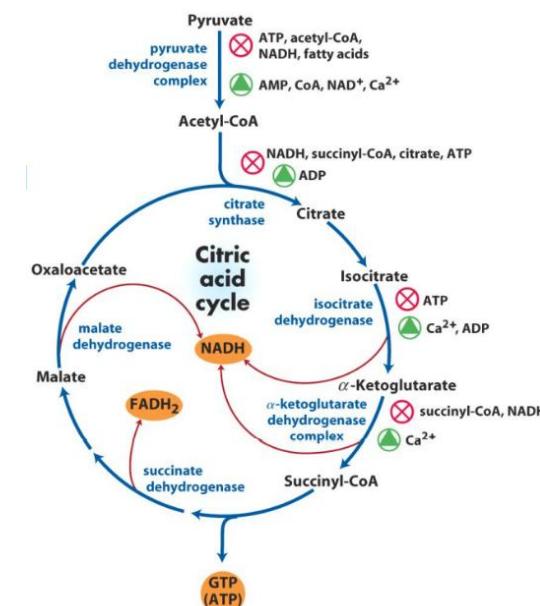
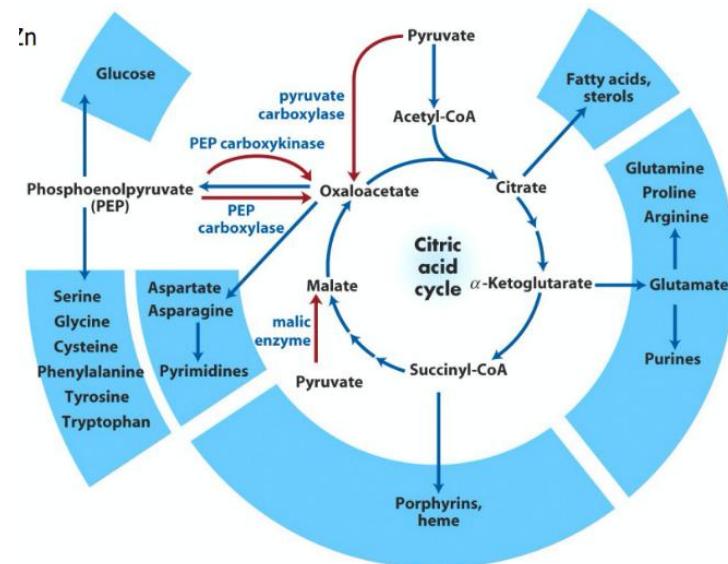
- o Amfibolische route,
 - rol in anabolisme en katabolisme
 - α -ketoglutaat en oxaalazijnzuur " A_{Zn}
 - oxalaat \rightarrow glucose (gluconeogenese)
 - succinyl-CoA \rightarrow porfyrinen, heem

- Anaplerotische reacties leveren citroenzuurcyclus intermediairen (rode pijlen)

- o Anaplerotische reacties,
 - niveau van intermediairen nagenoeg constant
 - carboxylering van pyruvaat " oxaalazijnzuur (pyruvaat carboxylase)

Regulatie van de citroenzuurcyclus

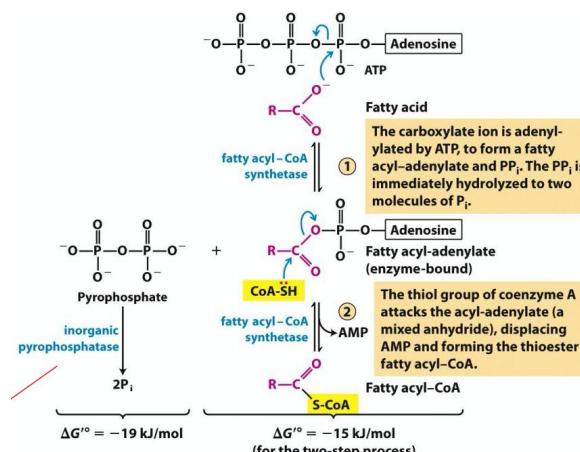
- o Regulatie TCA cyclus op twee niveaus,
 - pyruvaat \rightarrow acetyl-CoA
 - acetyl-CoA + oxaloacetaat \rightarrow citraat
- o Productie van acetyl-CoA door het pyruvaat dehydrogenase complex wordt gereguleerd door allosterische en covalente mechanismen
 - Allosterische inhibitie van PDH,
 - bij voldoende 'energie' (ATP, NADH)
 - 'brandstoffen' (acetyl-CoA, vetzuren)
 - Covalente regulatie van PDH (zoogdieren),
 - fosforylering (kinase, Ser in E1) / defosforylering
 - allosterisch activatie kinase door ATP



Hoofdstuk 17: Vetzuur katabolisme

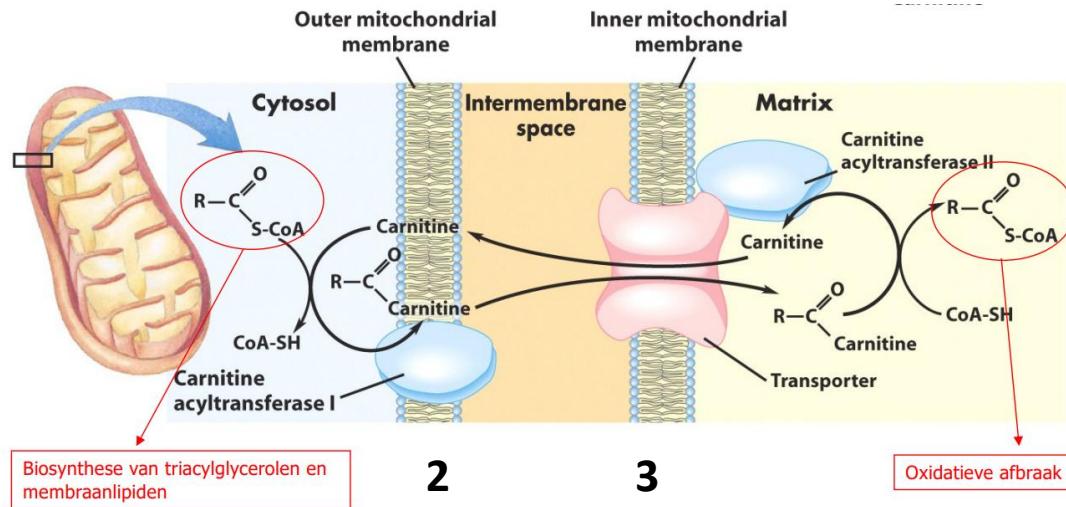
Activatie vetzuren uitleggen + carnithine shuttle

- **Vetzuuroxidatie in mitochondriale matrix,**
 - o vetzuren $\leq 12C$ \rightarrow rechtstreeks door membraan
 - o vetzuren $\geq 14C$ \rightarrow activatie in carnitine shuttle(door membraan begeleiding) (3 reacties)
 - o 1. esterificatie met CoA \rightarrow fatty acyl-CoA synthetase in mitochondriale membraan (2 stappen reactie)



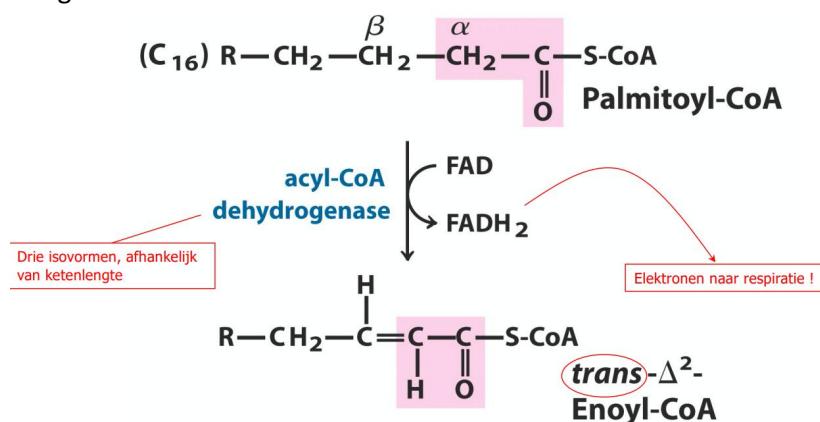
Energiewinst door PP_i hydrolyse

- 2. transesterificatie naar carnitine door carnitine acyltransferase in mitochondriale buitenmembraan
 - transport naar intermembranaire ruimte via 'porines'
- 3. transport door binnenmembraan door gefaciliteerde diffusie en transesterificatie naar CoA
 - antiporter stelt ook carnitine beschikbaar
- Twee gescheiden 'pools' van FA-CoA met verschillend metabolisch 'lot'

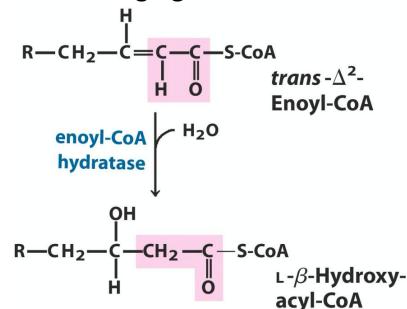


• **Bèta-oxidatie + carnitine shuttle van vetzuren en vergelijken met peroxisomen en glycosomen + belang voor de cel**

- Vetzuuroxidatie in 3 fasen
 - 1 - β oxidatieve verwijdering van 2C-eenheden \rightarrow synthese van acetyl-CoA
 - 2 - TCA cyclus \rightarrow e- en CO_2
 - 3 - respiratie \rightarrow vorming van ATP
- De β oxidatie van verzadigde vetzuren bestaat uit vier stappen
 - 1 - Dehydrogenatie met vorming van trans dubbele binding
 - door acyl-CoA dehydrogenase, flavoproteïne met FAD
 - gebonden aan mitochondriale binnenmembraan

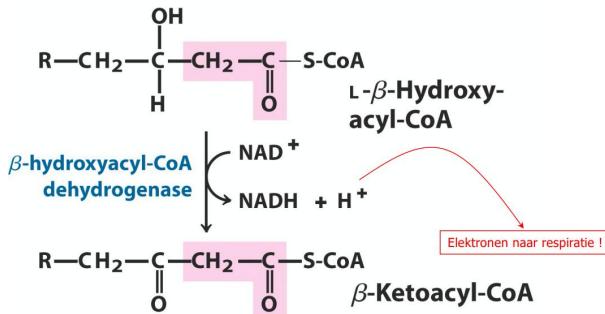


- 2 - Toevoeging van water aan de dubbele binding door enoyl-CoA hydratase

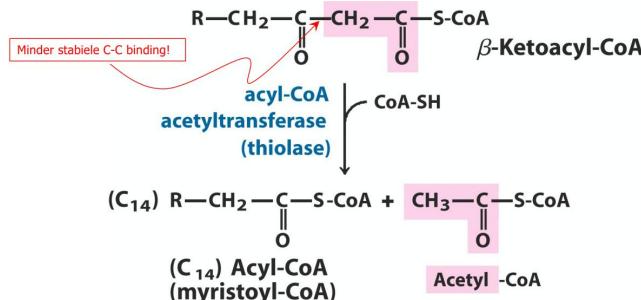


- 3 - Dehydrogenatie door β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

- NAD⁺ als cofactor



- 4 - Thioester vorming met CoA-SH door acyl-CoA acetyltransferase (= thiolase) = 'thiolyse'



- De vier β oxidatie reacties worden herhaald voor vorming van acetyl-CoA en ATP

- Omzetting van palmitaat (16:0) tot 8 acetyl-CoA:

- Palmitoyl-CoA + 7CoA + 7O₂ + 28P_i + 28ADP 8 acetyl-CoA + 28 ATP + 7H₂O

- Acetyl-CoA kan verder worden geoxideerd in de citroenzuurcyclus

- 8 acetyl-CoA + 16O₂ + 80P_i + 80ADP 8CoA + 80ATP + 16CO₂ + 16H₂O

- De carnitine shuttle is de rate limiting en regulatorische stap.

- Malonyl-CoA (vetzuursynthese) remt de carnitine shuttle (hoog suikergehalte \rightarrow geen afbraak vetzuren).

- β Oxidatie in peroxisomen,

- gelijkaardig aan mitochondriën

- belangrijkste locatie voor β oxidatie in planten

- acyl-CoA oxidase \rightarrow H₂O₂ (gedoofd door catalase)

- β -oxidatie in glyoxysomen.

- Identiek aan peroxisomen.

- Uitsluitend in kiemende zaden.

- Afbraak van lipiden tot glucose en macromoleculen.

- Acetyl-CoA in de lever kan instaan voor het vormen van ketolichaampjes voor transport naar andere weefsels. Ze worden als brandstof geëxporteerd.

- Acetoacetaat.

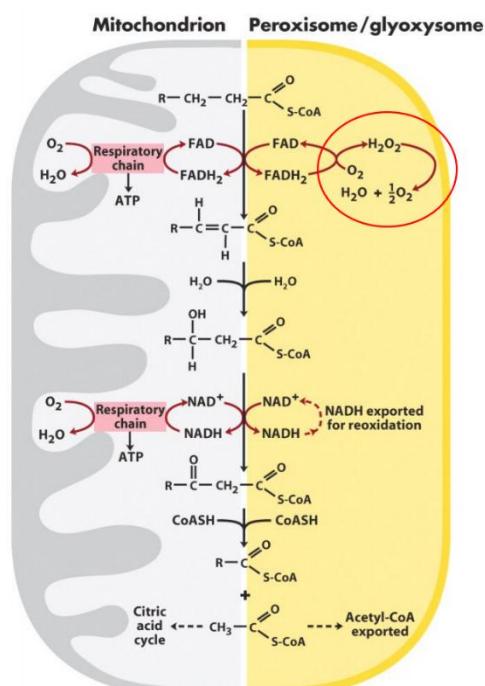
- Aceton.

- D- β -hydroxybutyraat.

- Ketolichaampjes worden overgeproduceerd in diabetes en tijdens uithongering.

- Bij lage insuline of voedselgebrek \rightarrow geen glucose opname \rightarrow stimulatie van gluconeogenese \rightarrow verwijderen van citroenzuurcyclus intermediairen \rightarrow onderbreking citroenzuurcyclus.

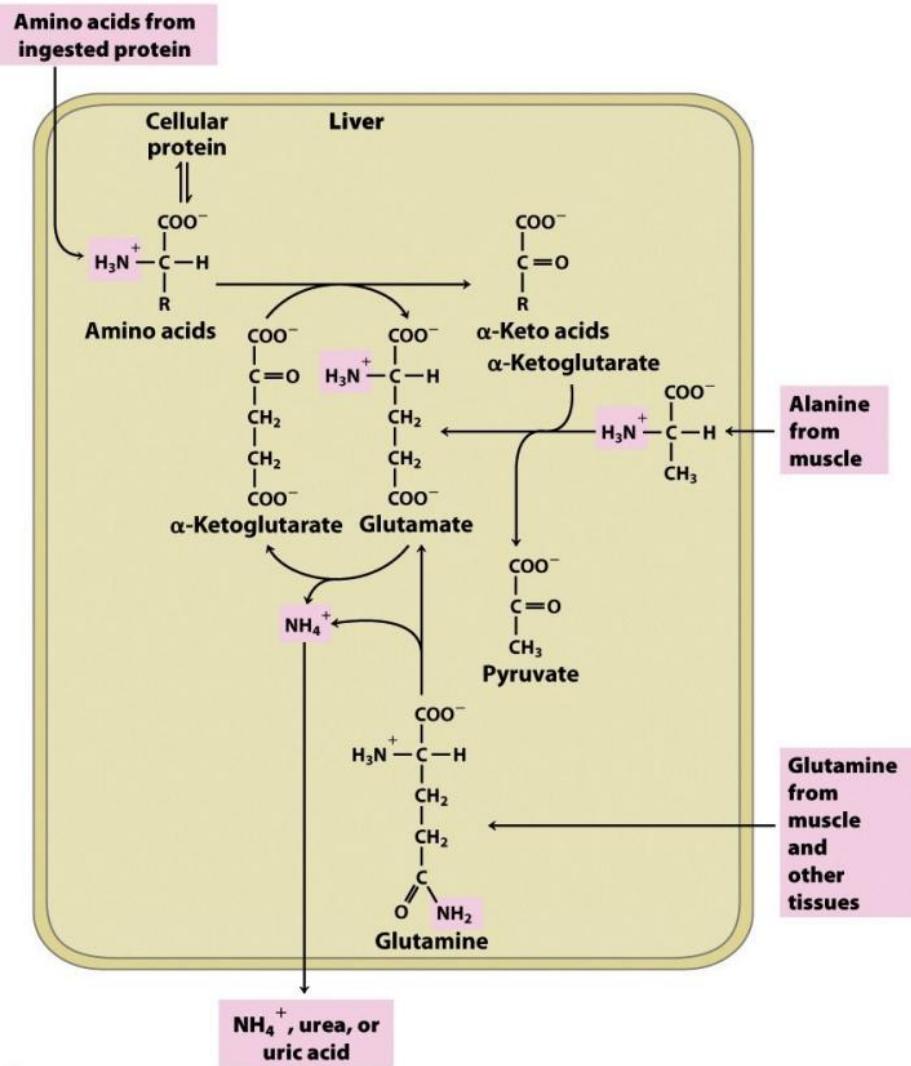
- Bij lage insuline of voedselgebrek \rightarrow verlaging malonyl-CoA \rightarrow activatie carnitine shuttle \rightarrow fatty acids omgezet naar acetyl-CoA \rightarrow verhoogde synthese van ketolichaampjes \rightarrow verlaging bloed pH (acidose).



Hoofdstuk 18: Aminozuur oxidatie en productie van ureum

- AZ'en in de levercyclus + ureumcyclus

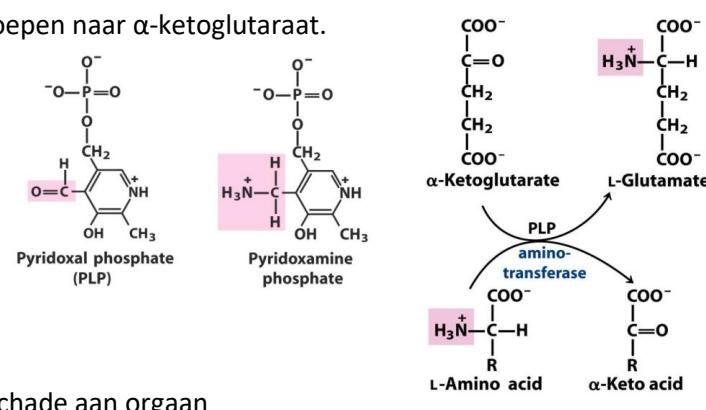
- Metabole bestemming van aminogroepen
 - Glutamaat en glutamine.
 - Essentiële rol als collecting points voor NH_3^+ .
 - Meeste aminozuren worden gemetaboliseerd in de lever.
 - Glutamine \rightarrow transport van aminogroepen naar de lever.
 - Glutamaat \rightarrow collecting point van NH_4^+ in de lever.



- Eiwitten uit de voeding worden enzymatisch afgebroken tot aminozuren.
 - Vertering van eiwitten.
 - Vrijstelling van gastrine (hormoon) in de maag \rightarrow vrijstelling HCl en pepsinogeen \rightarrow antiseptisch + denaturatie.
 - Pepsinogeen \rightarrow pepsine (breekt grote eiwitten \rightarrow kleine peptiden).
 - Secretine secretie (hormoon) door lage pH \rightarrow pancreas secretie (HCO_3^- , trypsinogeen, chymotrypsinogeen en procarboxypeptidase A & B ~ voorlopers van enzymen).
 - De meeste eiwitten worden afgebroken tot aminozuren.
 - Transport naar de lever.

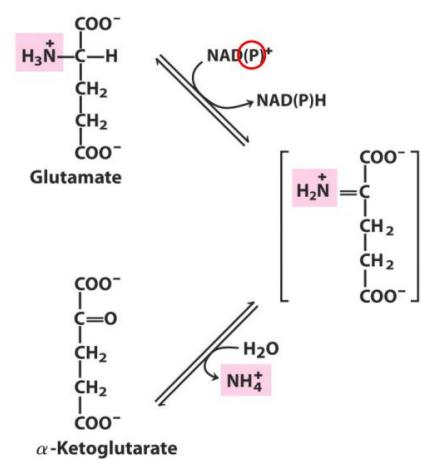
- Pyridoxaal fosfaat neemt deel in de transfer van α -amino groepen naar α -ketoglutaat.

- Aminotransferase (transaminase).
 - Verwijderen aminogroep.
 - Overdracht naar α -ketoglutaat \rightarrow verzamelen amino groepen op L-glutamaat.
 - Isoformen door verschillende aminozuren.
 - Cofactor is pyridoxaal fosfaat (PLP) \rightarrow intermediaire aminogroep drager.
 - Aminotransferases: gebruik in medische diagnoses
 - voorkomen in bloed geeft weefsel (hart, lever) schade aan orgaan



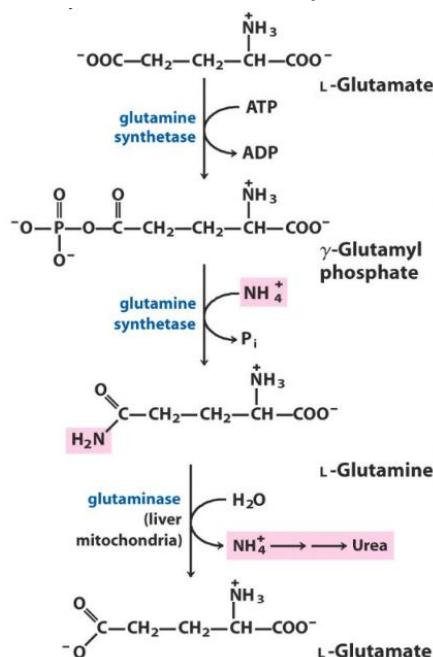
- L-Glutamaat stelt zijn aminogroep in de lever vrij als ammonium.

- Van cytoplasma naar mitochondriën \rightarrow oxidatieve deaminatie door glutamaat dehydrogenase.
 - Aminotransferase + deaminatie = trans-deaminatie (=2 reacties samen)
 - NAD⁺ of NADP⁺ als cofactor.



- Glutamine transporteert ammonium door het bloed.

- Ammonium is toxicisch.
 - Transport van niet-lever weefsel via glutamine.
 - Glutamine synthetase koppelt NH_4^+ aan glutamaat.
 - Glutaminase stelt NH_4^+ vrij in lever, nieren en darmen $\rightarrow \text{NH}_4^+$ wordt in de lever omgezet tot ureum.

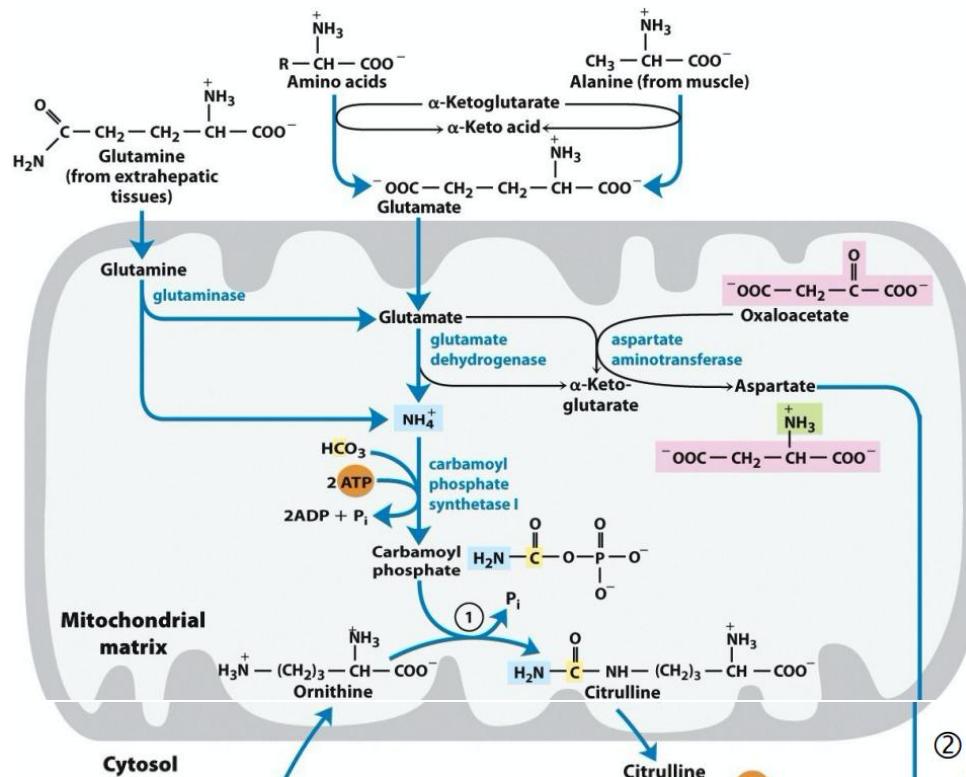


- Alanine transporteert ammonium van de skeletspieren naar de lever.

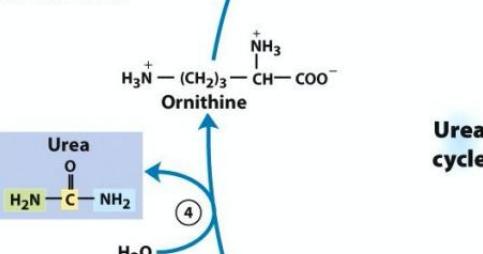
- Glucose-alanine cyclus.
 - Afbraak van aminozuren voor energie in spieren \rightarrow aminogroep van glutamaat naar pyruvaat (alanine aminotransferase) \rightarrow alanine \rightarrow via het bloed naar de lever \rightarrow gluconeogenese (pyruvaat \rightarrow glucose) \rightarrow energievoorziening van spieren.

- Ureumcyclus

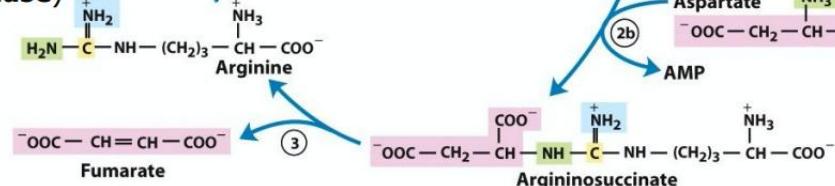
- Ureotele organismen secreteren ureum, ureum wordt geproduceert uit ammonium in vier enzymatische stappen.
 - 1. Vorming van carbamoyl fosfaat uit NH_4^+ en HCO_3^- , citrulline synthese (ornithine transcarbamoylase).
 - 2. Toevoer $-\text{NH}_2$ groep van aspartaat (argininosuccinaat synthetase).
 - 3. Splitsing van argininosuccinaat (argininosuccinase).
 - 4. Arginase splits arginine tot ornithine en ureum.



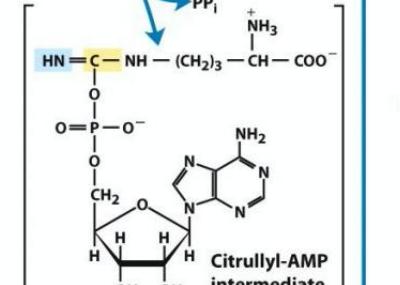
④ Arginase splitst arginine tot ornithine en ureum



③ Splitsing argininosuccinaat (argininosuccinase)



② Toevoer $-\text{NH}_2$ groep van aspartaat (argininosuccinaat synthetase)



- De citroenzuurcyclus en de ureumcyclus zijn gekoppeld

- Ze hebben gemeenschappelijke intermediaren.
- Transport van intermediaren tussen mitochondriën en cytosol.
- Link tussen pathways waarin aminogroepen en C-skeletten van aminozuren worden verwerkt → Krebs fiets.

Hoofdstuk 19: Oxidatieve fosforylering en fotofosforylering

- Geef de e- transfer moleculen/ elektronencarriers. Bespreek structuur en oxidatie/reductie

- De mitochondriale respiratieketen

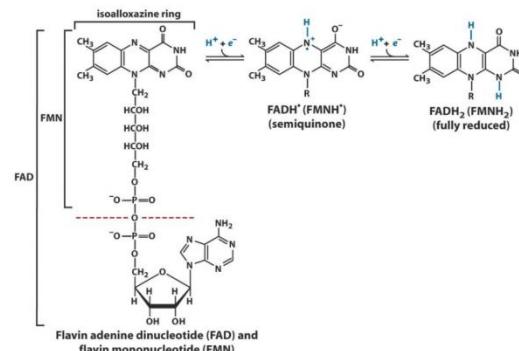
- Oxidatieve fosforylering in mitochondria
- H⁺-ondoorlaatbaar
- e⁻ naar universele elektronenacceptoren gesluisd

- **Nicotinamide nucleotide, NAD⁺/NADH**

- Meeste dehydrogenasen specifiek voor NAD⁺ als e⁻-acceptor
- Transfer van 2 H⁺-atomen (hydride ion + H⁺)
- Reversibele associatie met enzym
- Wateroplosbaar
- NAD⁺ en NADP⁺ gescheiden in de cel

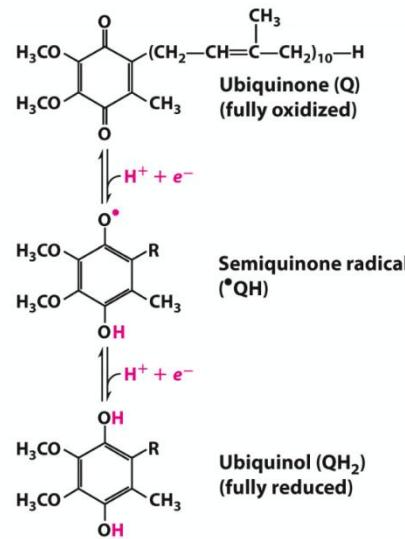
- **Flavoproteïnen,**

- hecht / covalent gebonden flavine nucleotide
- 1 of 2 e- transfer (semiquinon tussenvorm)
→ intermediair in reacties met 2 en 1 e-
- redoxpotentiaal varieert door eiwit



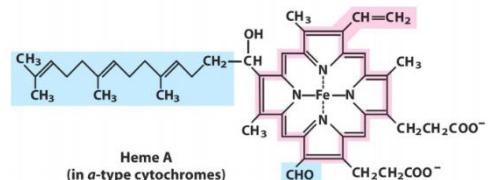
- **Ubiquinon (coenzyme Q, Q₁₀),**

- lipideoplosbaar benzoquinon
≈ plastoquinon in planten
≈ menaquinon in bacteriën
- overdracht van 1 of 2 e-
- lipofiel → e- 'shuttle'
- transfer van e- en H⁺
→ koppeling e- en H⁺ flow



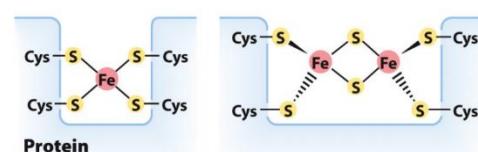
- **Cytochromen,**

- eiwitten met gebonden heem groep, met Fe
- absorptie in visueel spectrum, redox-status afhankelijk
- verschillende types (a, b, c, ...)
- redoxpotentiaal afhankelijk van associatie met eiwit



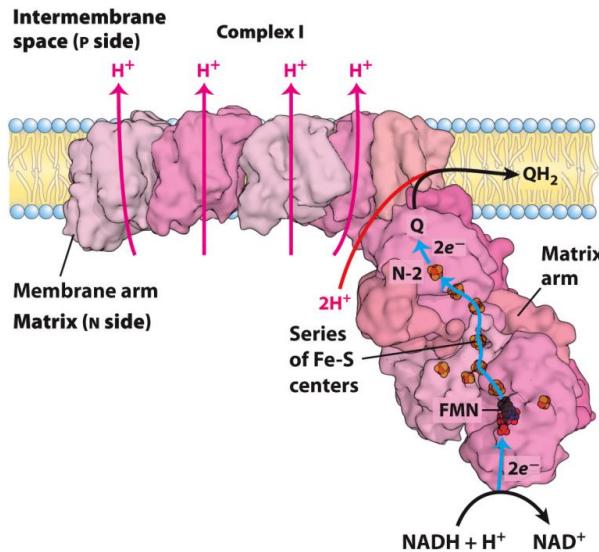
- **Fe-S proteïnen,**

- Fe in associatie met anorganische S, of S van Cys
- Rieske Fe-S eiwit: Fe gecoördineerd door His
- redoxpotentiaal afhankelijk van eiwitassociatie



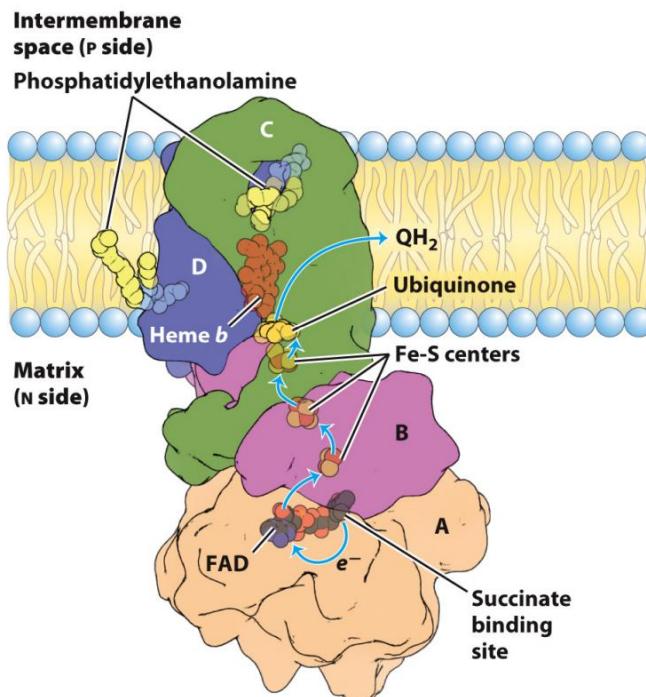
- Elektronen dragers functioneren in multi-enzym complexen

- Elektronen carriers in mitochondriën (en chloroplasten),
- Oriëntatie eiwitten in membraan = vast
- **Complex I = NADH:ubiquinon oxidoreductase,**
 - NADH dehydrogenase: $\text{NADH} \rightarrow \text{ubiquinon}$ (2 e^- naar Q)
 - L-vormig eiwitcomplex met: 42 polypeptiden, FMN, 6 Fe-S eiwitten
 - katalyseert 2 gekoppelde reacties:
 - exergone transfer van $:H^- + H^+$ naar Q $\rightarrow QH_2$
 - exergone transfer van $4H^+$

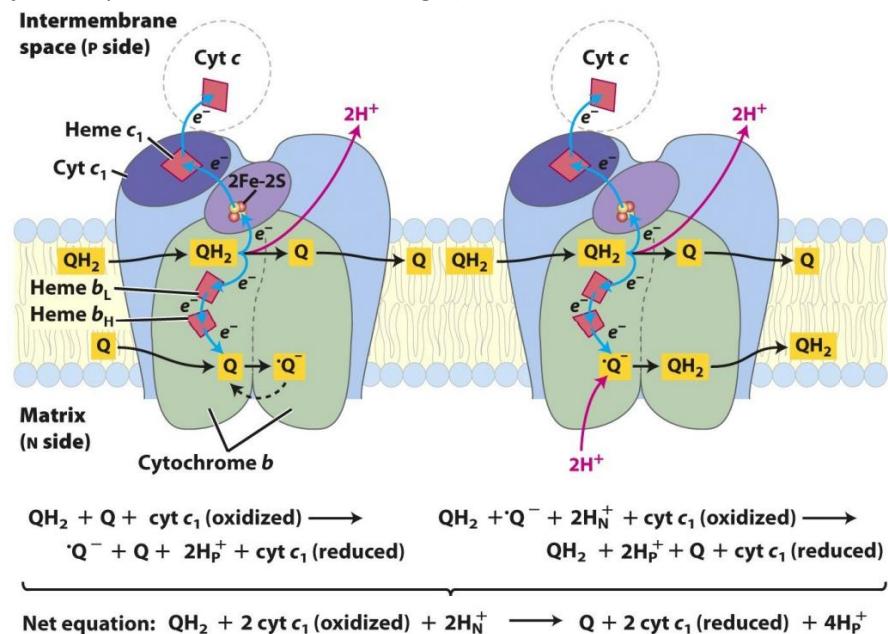
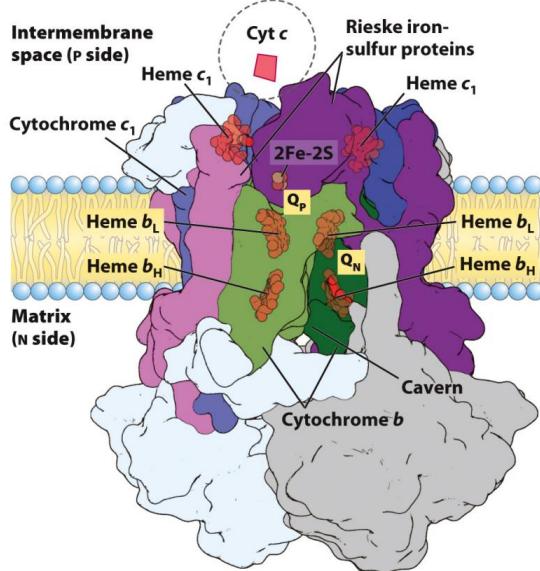


○ **Complex II = succinaat dehydrogenase: succinaat \rightarrow ubiquinon,**

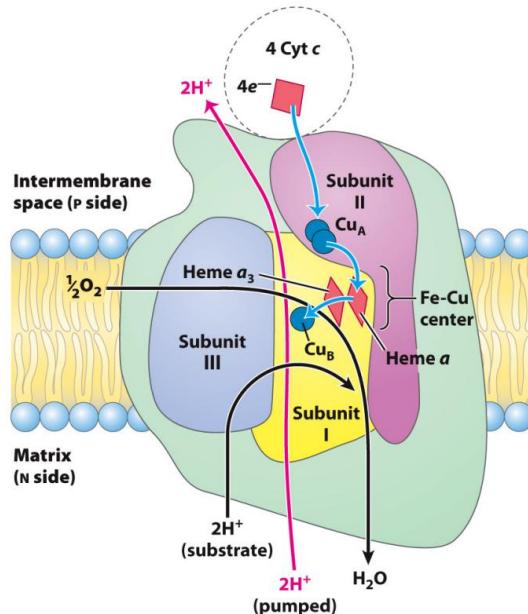
- 4 eiwitten, 5 prosthetische groepen, bindingsplaats voor Q
- e- van andere routes komen in de respiratieketen via Q
- cytochrome kan e^- opnemen al er niet genoeg ubiquinon is (redox buffer)
- $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}^2$



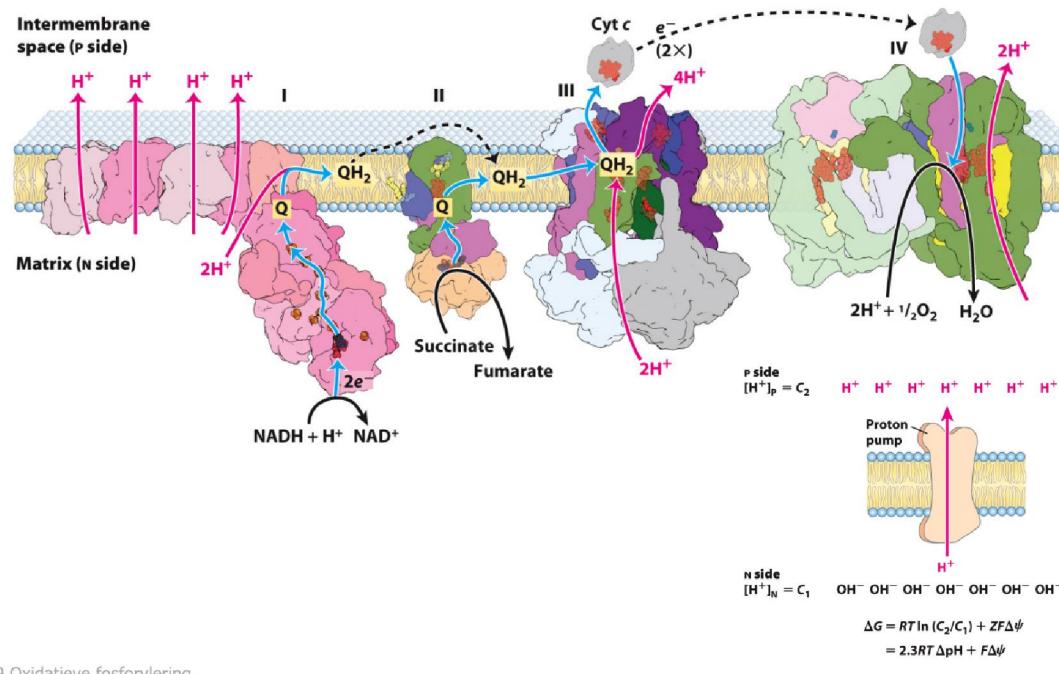
- Complex III = cytochrome bc₁ complex: ubiqinon → cytochrome c
 - transport van e- van QH₂ naar cyt c = **Q cyclus**
 - koppeling van 2e- carrier (QH₂) aan 1e- carriers (cytochromen)
 - cytochrome c = oplosbaar eiwit, maar wel ontvanger
 - Histidine als AZ dat 2Fe-S bindt
 - QH₂ geoxideerd → Q + 2H⁺ + 2e⁻
 - 1 e⁻ aan Fe-S (reduceerd) → 1 e⁻ aan cytochrome c₁ → cytochrome c
 - Andere e- reduceert Heme b → naar Q → semiquinon Q. op eiwit
 - Bij 2de keer de reactie heb je semiquinon Q. + 1e- → QH₂ (begin)



- Complex IV = cytochrome oxidase: cytochrome c → O₂
 - 13 subeenheden, Cu-Fe complex, Cyt a, Cyt a₃
 - Elektronen van Cyt c → CuA → Cyt a → Cyt a₃ → CuB → O₂
 - vorming van actieve O₂ moleculen (radicalen~ partieel gereduceerd) !
 - O₂ gereduceerd tot H₂O
 - O₂ belangrijk, ook H⁺ verplaatst, gebonden aan H₂O
 - protonengradiënt

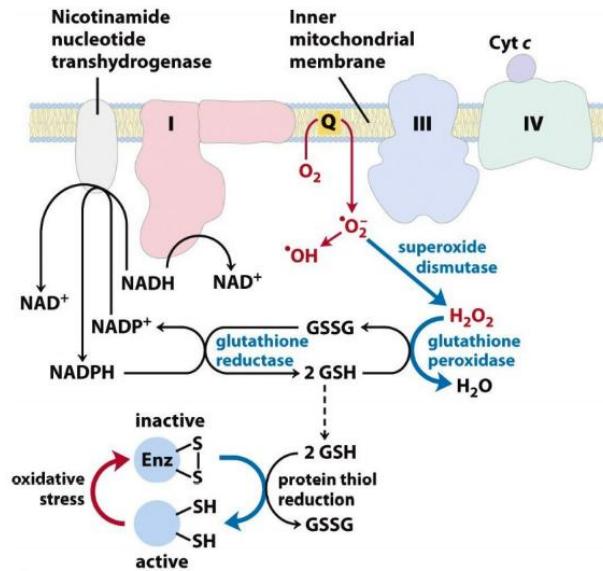


- De energie van de elektronentransfer wordt efficiënt in een proton gradiënt geconserveerd
 - Proton-motive force: chemische potentiaal ($[H^+]$) en elektrische potentiaal (ladingsscheiding)
 - $\sim 200 \text{ kJ/mol} e^-$



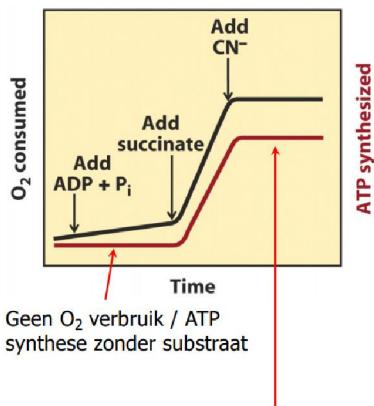
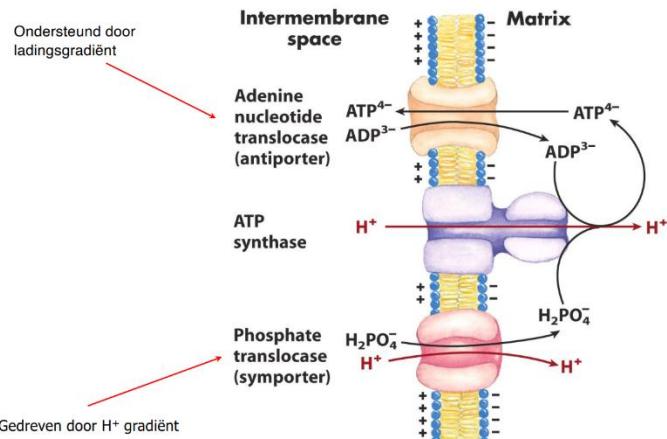
} Oxidatieve fosforivering

- Tijdens de oxidatieve fosforylering worden reactieve zuurstofmoleculen gevormd
 - Reactieve zuurstofmoleculen,
 - reductie van O₂ door Q.- → O₂^{·-}
 - superoxide dismutase, reductie van O₂^{·-} → H₂O₂
 - glutathion peroxidase, reductie van H₂O₂ → H₂O + ½ O₂
 - regeneratie van GSH door NADPH

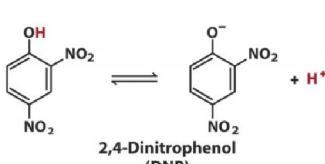
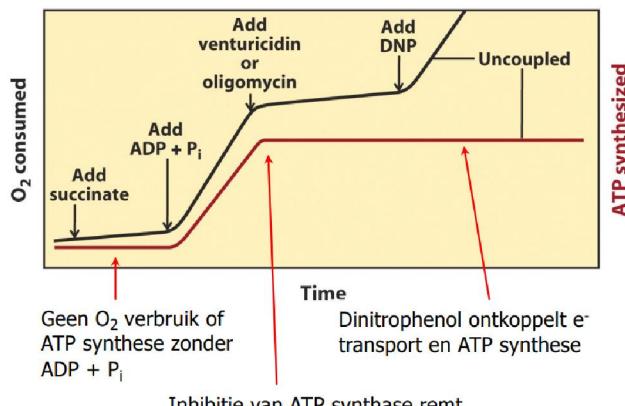


• Verklaar ATP-synthese + koppeling met e- transport in 2 richtingen en hoe ontkoppelen?

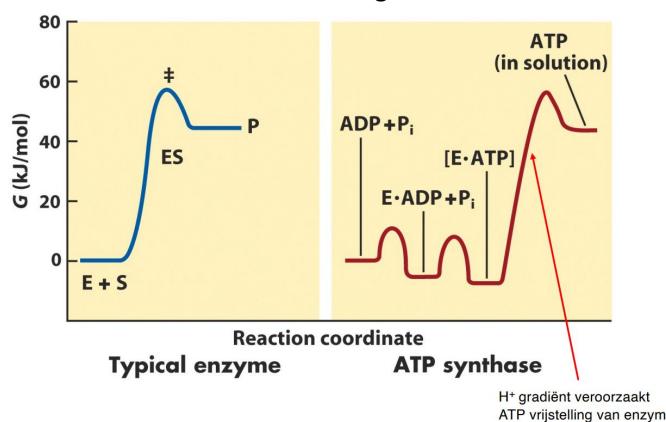
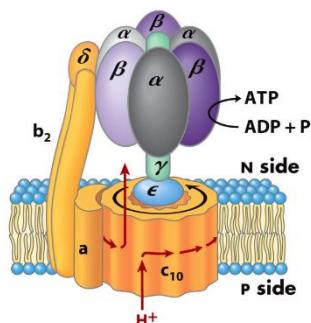
- Proton motive force(energie voor ladingstransport):
Chemische([H+]) + elektrische potentiaal(ladingsverschil)
 - o H⁺ gradiënt → toevoer van ADP³⁻ en P
 - o ATP → cel, ADP → matrix om ATP te vormen
- Chemiosmotische theorie (Peter Mitchell),
 - o biochemisch mechanisme van ATP synthese
 - o ATP synthese 'gekoppeld' aan 'passief' terugvloeien van H⁺
 - o Protonen gradiënt te sterk, systeem val stil, dus ATP synthese moet werken om H⁺ terug naar binnen te brengen



Remming van e⁻ transport blokkeert O₂ verbruik **EN** ATP synthese !



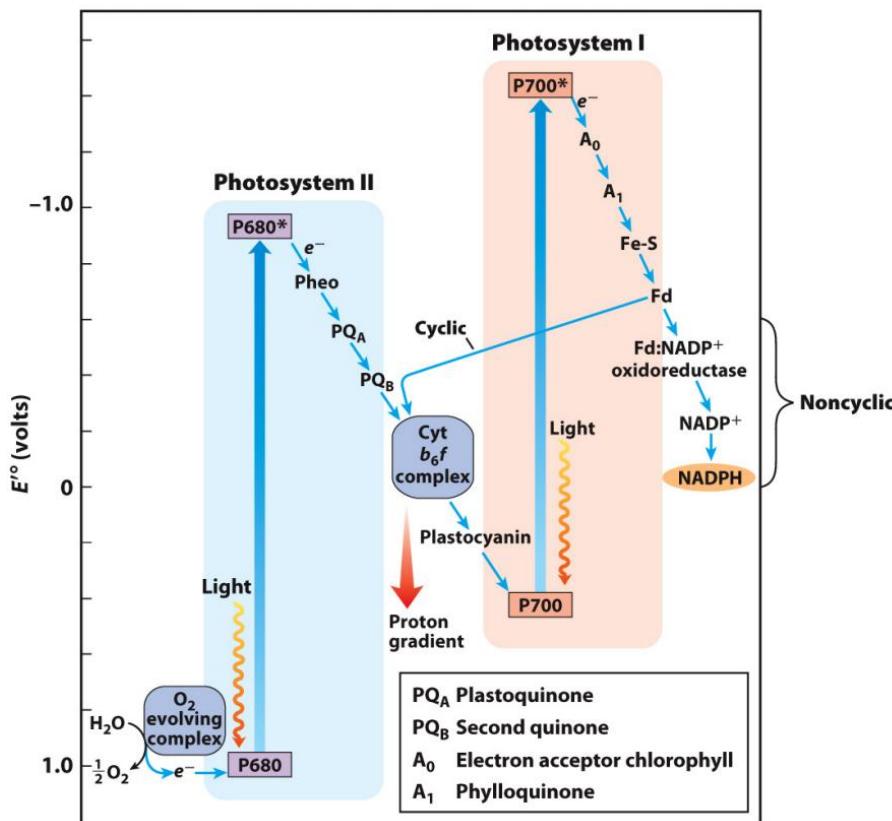
- ATP synthase heeft twee functionele domeinen, F₀ en F₁
 - o ATP synthase,
 - mitochondriaal ATP synthase (complex V) is een F-type ATPase
 - F₁ essentieel voor ATP synthese / ATP-ase activiteit(alleen zou dit ATP gwn afbreken, niet vormen)
 - F₀ ("o" voor oligomycine gevoeligheid), H⁺ porie
 - ADP + P_i + n H⁺_p → ATP + H₂O + n H⁺_n
- De protongradiënt bewerkstelligt het vrijstellen van ATP van het enzymoppervlak
 - o Reactiemechanisme: hechte binding van ATP



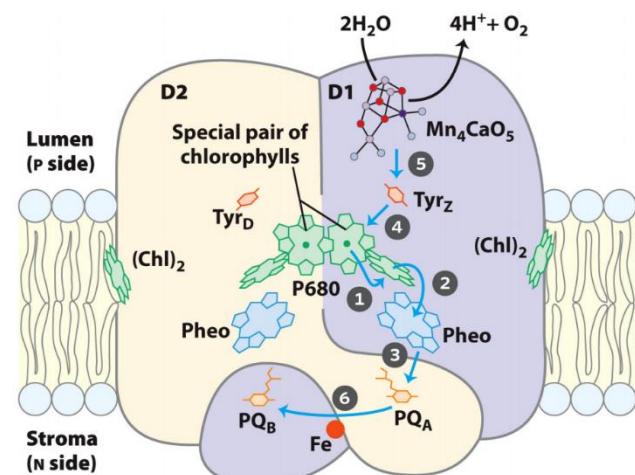
Hoofdstuk 20: Koolhydraat Biosynthese in planten en bacteriën

- Bespreek en teken het Z-schema fotofosforylering+ cyclische fosforylering uitleggen. Welke reactie specifiek in reactiecentrum?

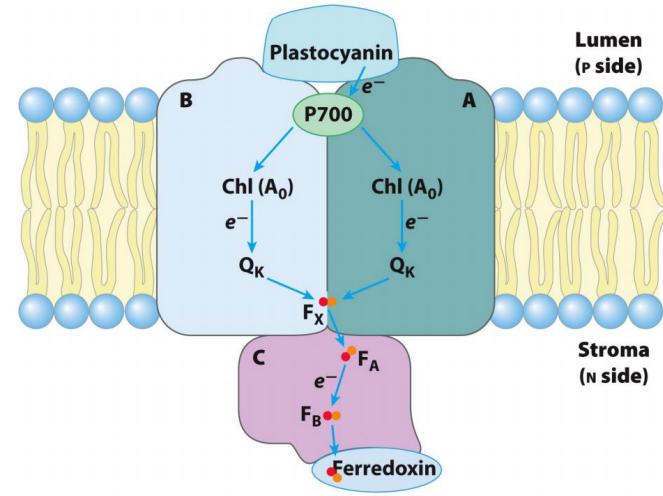
- Bij planten: 2 reactiecentra: PSII en PSI werken in **tandem** in fotosynthese
 - 2 reactiecentra: P680 van PSII en P700 van PSI
 - P700 hogere redoxpotentiaal dan P680
 - Z-schema:** het lijkt op een Z



- PSII:** Foton valt in \rightarrow P680 w geexciteerd naar P680* \rightarrow e- naar feofytine (e-acceptor)
 \rightarrow naar plastoquinone ($A \rightarrow B$) \rightarrow cyt b₆f complex \rightarrow naar plastocyanine (e-donor voor P700 ~ systeem I)
 - Cyt b₆f complex bouwt H⁺ gradient op
 - Concentratie Chla ~ Chlb \Leftrightarrow PSI
 - Tyr = rol van e- acceptor & e- donor = speciaal!
 - Naam P680: verwijst naar absorptiemaximum bij 680nm
 - Maar absorptiemax van chla \neq bij 680nm op p7?
 - Reden: p7 spectra is van chla dat is geïsoleerd/ opgelost en dus ongebonden
 - Hier is special pair gebonden aan eiwit \rightarrow max verschuift



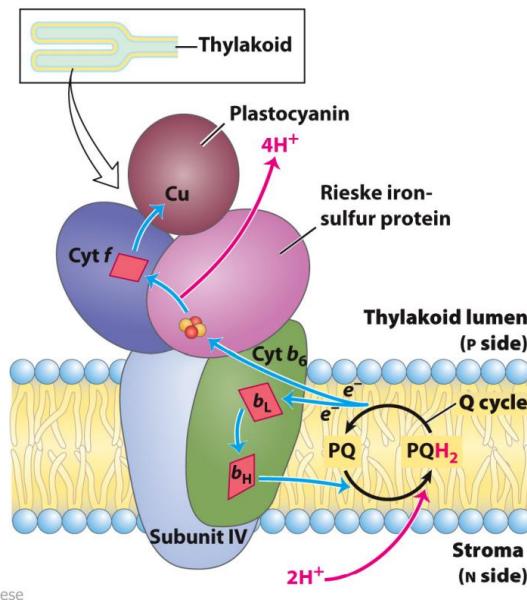
- **PSI:** foton valt in → P700 w geexciteerd naar P700*
 - e- naar A₀ en A₁ → e- naar Fe-S centrum (e⁻-acceptor)
 - naar Ferredoxine (e⁻-acceptor) → e- doorgeven aan Fd: NADP⁺ oxidoreductase die NADP⁺ reduceert naar NADPH
 - A₀ = 1ste e⁻-acceptor = afgeleide van chlorofyl
 - Ferredoxine = finale e⁻-acceptor
 - Plastocyanine = e⁻-donor voor e⁻-hole P700
 - Concentratie Chla >> Chlb



- Wat zijn de e⁻-donors voor recuperatie special pair?
 - PSI: plastocyanine = koperhoudend eiwit = **mobiel** oplosbaar eiwit
 - Recupereert P700 na excitatie door e⁻ te geven
 - PSII: water → wordt gesplitst in O₂, H⁺ en e⁻
 - Recupereert P680 na excitatie door e⁻ te geven
 - Oxygene fotosynthese naam want het genereert O₂

Cyt b6f complex (bc complex) (het 3de eiwitcomplex)

- Verbindt het PSII en PSI
- Verloop: PQH₂ → cyt b6 → Rieske FeS → cyt f → plastocyanine
 - Essentie: gereduceerd quinon/ plastoquinol → w geoxideerd → e⁻ gaan naar plastocyanine
 - H⁺ transport bij oxidatie plastoquinol
 - H⁺ transport van stroma naar lumen → opbouw H⁺ gradient
- Mechanistische werking: **Q cyclus**
 - de e⁻-transfer verloopt via de **Q cyclus** (~ ox fosforylering)
 - gereduceerd PQH₂ (2e⁻, 2H⁺) w geoxideerd
 - → 1e⁻ via Rieske FeS eiwit naar ct f → plastocyanine
 - Hierbij 4H⁺ van - naar + side
 - → 1e⁻ naar heme bL → heme bH → terug naar PQ → PQ w een semiquinon vorm (~ ox fosfo) → reduceert dan met 2e⁻ en 2H⁺ volledig naar PQH₂
 - Plastoquinon PQ = mobiel in membraan = kan migreren in Q cyclus = lipofiel ~ ubiquinon



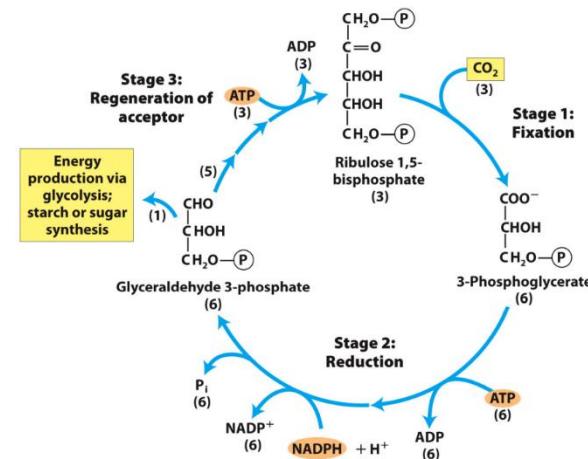
Cyclische fotofosforylering

- Cyclisch elektronentransport tussen PSI en Cyt b6f
- Functie: het verhoogt ATP productie tov NADPH
- Verloop: e⁻ van ferredoxine → Cyt b6f → Plastocyanine PC
 - Fd = oplosbaar eiwit
 - Kan associeren met PSI en met cytochrome b6f via plastocyanine
 - → cytochrome b6f reduceert dan
- Gevolg: geen e⁻ die naar Fd: NADP⁺ oxidoreductase gaan → geen vorming NADPH
 - Wel extra activiteit op het b6f complex
 - → O₂ verbruikt & meer EN (e⁻) naar H⁺ gradient dus verhoogt de ATP productie
- Conclusie:
 - Geen NADPH, geen O₂, wel H⁺ gradient
 - cyclische fotofosforylering controleert/ reguleert de ratio ATP tv NADPH

• Calvin cyclus + rubisco + Fotorespiratie + glycolaat pathway

- Calvin cyclus

- Koolstofdioxidefixatie gebeurt in 3 fasen (cyclische pathway)
 - 1) Condensatie: $(3) \text{CO}_2 + (3) \text{ribulose } 1,5\text{-bifosfaat (5C)} \rightarrow 2x (6) \text{3-fosfoglyceraat (3C)}$
 - Condensatie = CO_2 captatie
 - Ribulose 1,5-bifosfaat (5C) = initiele substraat S met 2 fosfaten P

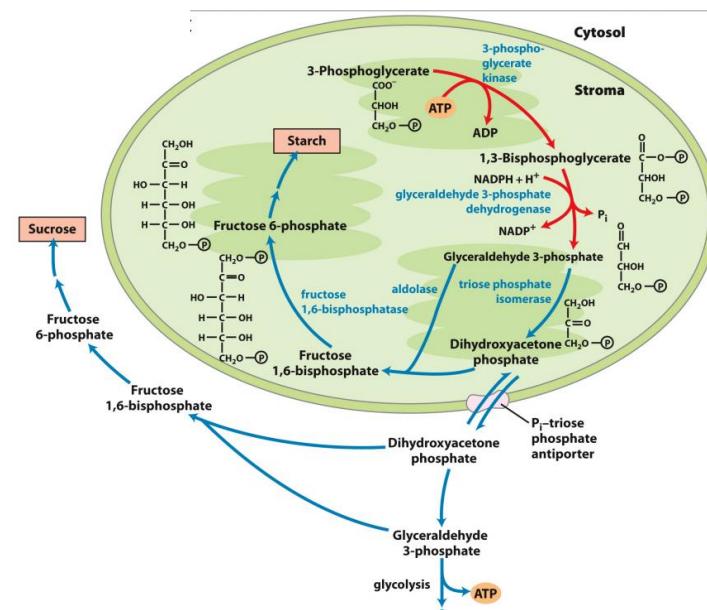


○ Fase 1: fixatie CO_2 in 3-fosfoglyceraat

- Enzyme: **ribulose 1,5-bifosfaat carboxylase/oxygenase (=rubisco)**
 - = eiwit dat in grote hoeveelheden voorkomt in natuur
 - Reden: (1) rubisco is niet efficient, (2) CO_2 captatie heeft geen hoger turnover, (3) veel fotosynthese
 - Structuur: 8 grote subeenheden / 8 kleine subeenheden
 - Activiteit rubisco
 - Rubisco structuur in actieve site: Asp, Glu, Lys
 - Actief centrum met carbamoyl-Lys (Lys hangt aan een CO_2) en Mg^{2+}
 - Mg^{2+} → stabiliseert de neg. O in CO_2 & ribulose 1,5-bifosfaat
 - 1) Inactief: gebonden met ribulose 1,5 bifosfaat en geassocieerd met Lys
 - Ribulose 1,5 bifosfaat verhindert de activiteit
 - 2) Enzym **Rubisco activase** verwijdert het S & zorgt dat er CO_2 en Mg gebonden wordt → CO_2 w gebonden op Lys → ontstaat carbamoyl-Lys
 - Resultaat: actieve rubisco
 - Gepaard met ATP verbruik
 - $\text{CO}_2 + \text{ribulose } 1,5\text{-bifosfaat (5C)} \rightarrow 2x \text{3-fosfoglycerate}$
 - Enzym: **het geactiveerde rubisco**
 - Naam C3 metabolisme komt van 3-fosfoglycerate

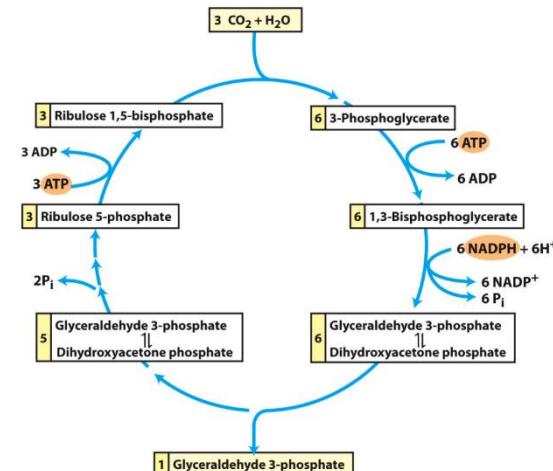
○ Fase 2: 3-fosfoglyceraat → Glyceraldehyde 3-fosfaat

- Analoog aan inverse reactie glycolyse
- 1) Fosforlyering 3-fosfoglyceraat in chloroplast → 1,3-bisfosfoglyceraat
 - Enzym: 3-fosfoglycerate kinase & ATP verbruik
- 2) 1,3-bisfosfoglyceraat gereduceerd → glyceraldehyde 3-fosfaat
 - Enzym: glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase reduceert het met NADPH & 1P van 1,3 bisfosfoglyceraat wordt afgesplitst
- 3) glyceraldehyde 3-fosfaat is in evenwicht met dihydroxyacetone fosfaat
 - 3.1) samen vormen ze fructose 1,6-bisfosfaat
 - Zie schema
 - Essentie: omgekeerde glycolyse



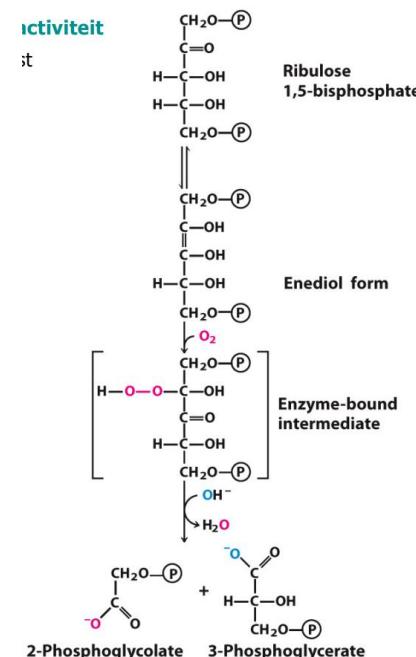
- Fase 3: regeneratie ribulose 1,5-bisfosfaat (principe KE)
 - Principe: $5x\ 3C \rightarrow 3x\ 5C$
 - 1) Glyceradehyde 3-P (3C) / dihydroxyaceton P (3C) → condensatie tot Fructose (6C)
 - Enzym: aldolase
 - 2) een fructose (6C) → reageert opnieuw met glyceraldehyde 3-P → tot een 4C en 5C molecule
 - 3) 5C molecule → wordt omgezet naar ribulose 1,5-bisfosfaat = al 1x5C molecule!!!
 - 4) 4C molecule → reageert opnieuw met dihydroxyacetone-P (3C) → tot 7C molecule
 - 5) 7C suiker reageert opnieuw met dihydroxyacetone-P (3C) → vormt 10C
 - 6) 10C → $2x5C$ maken → $1x5C$ w gerecupereerd & gefosforyleerd tot ribulose 1,5-bisfosfaat
 - $1x5C$ ondergaat isomeratiedeactie naar ribulose 5-P → gefosforyleerd door tot ribulose 1,5-bisfosfaat
 - Opm: in deze fase komen speciale suikers voor die enkel in de Calvin Cyclus voorkomen
- Synthese van elke triose-fosfaat uit CO₂ vergt 6 NADPH en 9ATP moleculen

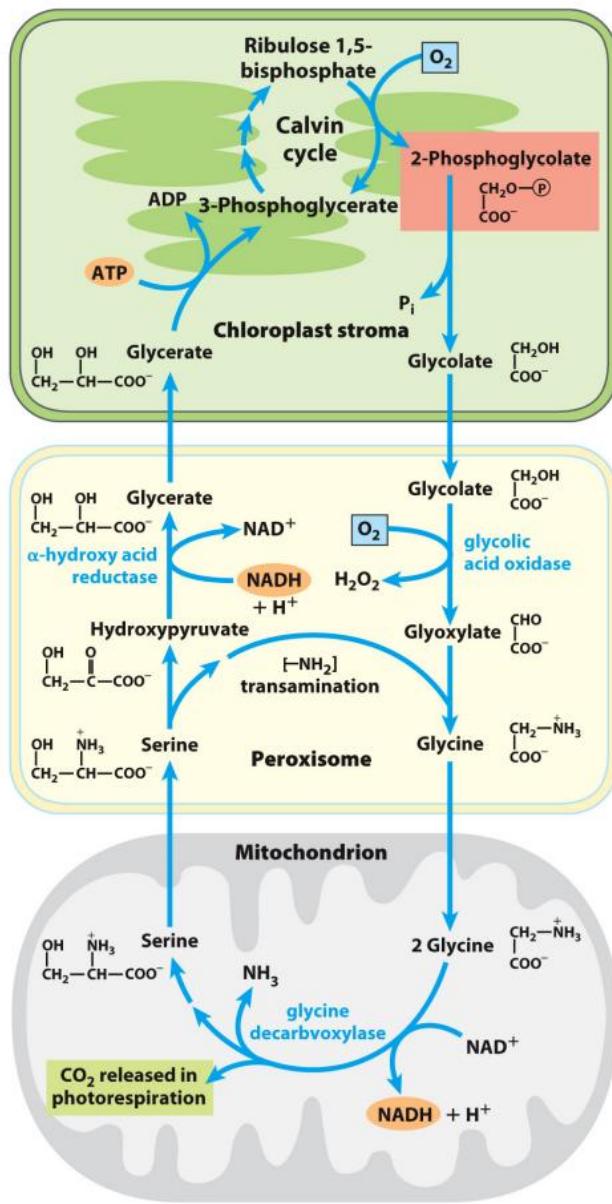
- Stoichiometrie
 - 3x fixatie van CO₂ nodig op ribulose 1,5-bisfosfaat → levert 6x 3-fosfoglycerate → 1 molecule w gebruikt voor synthese van zetmeel of suiker, 5 moleculen gebruikt voor de regeneratie van 3 moleculen ribulose 1,5-bisfosfaat
 - 9 ATP en 6NADPH w verbruikt



Fotorespiratie is het resultaat van rubisco's oxygenase activiteit

- Rubisco = lui & slordig (niet specifiek)
- Foto-'respiratie'
 - = gevolg vh gebrek aan specificiteit van rubisco!!!
 - = verbruik van O₂ en productie van CO₂ in chloroplast
 - Respiratie: wijst op O₂ verbruik & CO₂ vrijstelling
 - Foto: wijst erop dat het proces gekoppeld is aan fotosynthese
 - Essentie: fixatie van O₂ → 2-fosfoglycolaat & 3-fosfoglyceraat
 - O₂ fixatie bevoordeeld bij hoge T
- Foto-respiratie werking
 - Ribulose 1,5-bisfosfaat → enediol vorm → bindt O₂ ipv CO₂ → ontstaat een 5C molecule op rubisco → splitst in 2 moleculen: 2-fosfoglycolaat & 3-fosfoglyceraat
 - Dit zijn geen 2x 3C moleculen → maar 1x3C suiker
 - Conclusie: 2-fosfoglycolaat is verlies/waist
- ⇒ Glycolaat pathway: 2-fosfoglycolaat → serine + CO₂
- Glycolaat pathway
 - recuperatie van tot Gly en CO₂
 - Glycolaat oxidatie levert H₂O₂
 - Pathway in 3 compartimenten: chloroplast, peroxisoom, mitochondrion

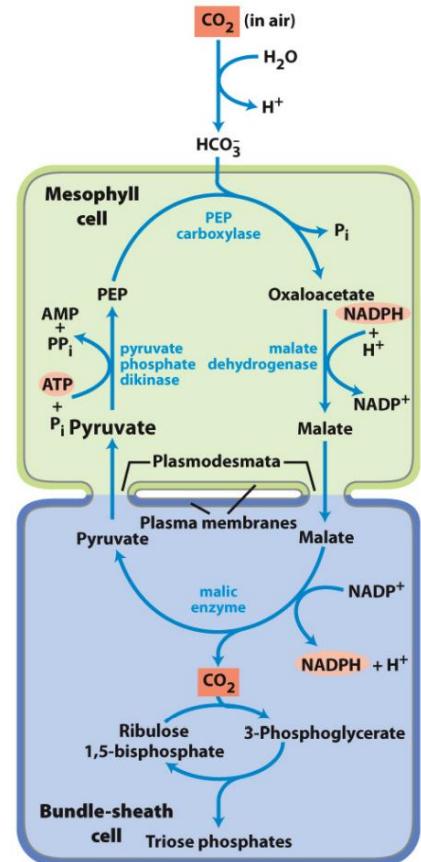




- **Fotosynthese in C4 en CAM + reactiemechanisme**

- CO₂ fixatie en rubisco activiteit zijn ruimtelijk gescheiden in C4 planten
 - 2 groepen planten hebben adaptaties om fotorespiratie impact te minimaliseren
 - = C4 en CAM planten
 - → hebben alternatieve C fixatieroutes om fotorespiratie te omzeilen
 - **C4 planten** vb mais
 - Planten bij hoge T en hoge lichtintensiteit
 - Bij hoge licht = andere balans van gasontwikkeling (stomata open) & sterke opname van CO₂
 - CO₂ fixatie & rubisco activiteit zijn ruimtelijk gescheiden
 - Adaptatie: aparte anatomie ontwikkelt = Kranz-anatomie
 - Dwz in de planten voor fotosynthese in bladeren komen 2 typen cellen voor 1) normale mesofylcellen 2) bundelschedecellen
 - Mesofylcellen = dicht gepakte grana met goed ontw chloroplasten
 - Bundelschedecellen = gedifferentieerd mesofyl met minder goed ontw chloroplasten
 - Plasmodesmata = verbindingen tssn mesofyl & bundelschedecellen

- Werking: zie schema
- PEP(phosphoenolpyruvaat) carboxylase is zeer specifiek
 - PEP carboxylase reageert niet met O_2 / bindt geen O_2 aan PEP
 - Gevolg: geen competitie met O_2 , geen fotorespiratie
- Netto:
 - 1NADH samen met malaat van mesofyl naar bundelschede (zie ppt)
 - Reacties kosten extra ATP maar efficiënter want geen competitie



- CAM planten Vb: cactus, ananas

- CO_2 fixatie en rubisco activiteit zijn gescheiden in de tijd!
- Overdag onvoordelig om stomata te openen \rightarrow weinig competitie met O_2
 \rightarrow geen fotorespiratie
 - Reden: teveel waterverlies door te hoge T, hoge I
- Essentie: Nacht: CO_2 fixatie door PEP carboxylase \rightarrow oxaalazijnzuur \rightarrow malaat \rightarrow vacuole
 - Overdag vrijstelling CO_2 \rightarrow fixatie door rubisco
- 1) Snachts: stomata open \rightarrow CO_2 opgenomen \rightarrow HCO_3^- evenwicht \rightarrow PEP carboxylase ontvanger van HCO_3^- \rightarrow oxaalazijnzuur \rightarrow malaat \rightarrow malaat w in vacuole opgeslagen
 - NADH verbruik \Leftrightarrow NADPH in C4 planten
- 2) Overdag: malaat vrijgesteld, goxideerd & e- naar $NADP^+$ tot NADPH \rightarrow vrijstelling CO_2 & pyruvaat
 \rightarrow CO_2 fixatie in Calvencyclus
- Geen competitie met O_2

