

Biochemie

Hinweise zu den Kärtchen

Die Kärtchen wurden für die Prüfung nach dem WS 2004/2005 geschrieben.

Erstellt von: Thomas Kuster (3. Semester, D-UWIS)

Verfügbar via: <http://fam-kuster.ch>

Welche Kräfte und welche Teile der peptid-artig gebundenen Aminosäuren sind für das Zustandekommen einer Protein-Sekundärstruktur verantwortlich?

Die Ausbildung von Sekundärstrukturen geht von den Atomen aus, die an der Peptidbindung direkt beteiligt sind und kommt einzig durch H-Brücken zwischen Carbonyl-O und H-N der Peptidbindungen zustande.

Ein Gemisch von Proteinen wird über eine Sepharose-Säule gelchromatographiert (Fraktionierbereich 10000 bis 500000 MW). In welcher Reihenfolge erscheinen die Proteine im Eluat, wenn das Gemisch aus Myoglobin [17000], Myosin [200000], Serumalbumin [68000] und Bacitracin [8000] besteht?

Myosin, Serumalbumin, Myoglobin, Bacitracin, wobei die beiden letzten vermutlich nicht mehr getrennt erscheinen sondern im Totalvolumen laufen.

Wie gross ist das Molekulargewicht (die Molekülmasse) eines unbekanntes Proteins, wenn es in einem SDS-PAGE einen Rf Wert von 0.5 hat, während die Rf Werte der folgenden Eichproteine Werte annehmen von: Spektrin (240000 MW, Rf 0.15), Bande 3 (MW 95000, Rf 0.36), Aktin (41000 MW, Rf 0.82).

8

Antwort

77 kDa

Ein Laborant beschickt eine DEAE Säule bei 400 mM NaCl in einem Puffer bei pH 8,0 mit einem Proteingemisch und wundert sich, dass die aufgetragenen Proteine nicht gebunden wurden sondern zusammen mit dem Auftragspuffer eluierten. Was hat er falsch gemacht?

Er hat einen Puffer mit zu hoher Ionenstärke verwendet.

Wodurch ist die Tertiärstruktur eines Proteins bedingt und wie kommt diese zustande (welche Kräfte spielen dabei eine Rolle)?

Die Tertiärstruktur kommt durch die räumliche Anordnung der bereits ausgebildeten Sekundärstrukturen zustande und wird für globuläre wasserlösliche Proteine zusammengehalten durch:
hydrophobe Kräfte, SS Brücken, Salzbrücken, und allenfalls H-Brücken zwischen Seitenketten.

Was versteht man unter einer Proteindomäne?

Ein aus 50 bis 200 Aminosäurereste aufgebauter Teilbereich eines Proteins mit einer charakteristischen Tertiärstruktur. Die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen und somit die Tertiärstruktur bleibt in zwei Domänen gleicherr Zuordnung aber mit diversen Mutationen erhalten, weil strukturelevante Aminosäurereste erhalten bleiben.

Was versteht man unter einer posttranslationalen Protein-Modifikation?

Die Einführung einer protein-fremden Verbindung an polare Aminosäurereste, wie z. B. Phosphatgruppen, Zucker, etc. Die Modifikation erfolgt posttranslationell entweder im ER (N-Glykosylierung) oder im Golgi Apparat (O-Glykosylierung) oder erst im Zytosol (Phosphorylierung).

Welche Sätze sind falsch:

1. Ein Enzym nimmt an der Reaktion teil.
2. Ein Enzym setzt die Änderung der freien Energie herab.
3. Ein Enzym verändert die Lage des chemischen Gleichgewichts nicht.
4. Ein Enzym beschleunigt die Hinreaktion, nicht aber die Rückreaktion.
5. Ein Enzym setzt die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion herab.

1. Richtig: Ein Enzym nimmt an der Reaktion teil.
2. Falsch: Ein Enzym setzt die Änderung der freien Energie herab.
3. Richtig: Ein Enzym verändert die Lage des chemischen Gleichgewichts nicht.
4. Falsch: Ein Enzym beschleunigt die Hinreaktion, nicht aber die Rückreaktion.
5. Richtig: Ein Enzym setzt die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion herab.

Welche kinetischen Eigenschaften weisen auf das Vorhandensein einer enzymatischen Katalyse hin?

die Sättigungskinetik

Wann spricht man von einer Säure/Base Katalyse?

Wenn an einer enzymatischen Katalyse sowohl saure als auch basische Gruppen gleichzeitig an der Katalyse beteiligt sind.

Weshalb sollte das NADH/NAD⁺ Paar als Kosubstrat und nicht als Koenzym bezeichnet werden?

Weil NAD^+/NADH in stöchiometrischen Mengen teilnehmen und verändert aus der Reaktion hervorgehen.

Berechnen Sie die Anfangsgeschwindigkeit der Laktatbildung für folgende Bedingungen:



Pyruvat und NADH liegen im Überschuss vor. Eine bestimmte Menge Enzym wurde beigegeben. Innerhalb einer Minute änderte sich die Absorption (OD=optische Dichte= Extinktion) bei 340nm um 1.5 (Extinktionskoeffizient für NADH = $62300 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

$$24.1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

Bestimmen Sie aus den gegebenen Daten zu einer enzymatischen Reaktion den K_M Wert für die nicht gehemmte und die gehemmte Reaktion und ermitteln Sie die Art der Hemmung in Gegenwart des Inhibitors:

Substratkonzentration (mM)	2	3	4	10	15
Produktbildung μg Produkt/h,					
ohne Inhibitor	139	179	213	313	370
mit mit Inhibitor	88	121	149	257	313

$K_M =$ ungefähr 5.2mM, Hemmung kompetitiv

Folgende Gleichung beschreibt Bildung und Zerfall eines Enzymsubstratkomplexes für den Fall, dass sich die Konzentration von ES über die Zeit nicht ändert. Welcher Term wird zu Null, wenn man eine Anfangsgeschwindigkeit misst?

$$[E] \cdot [S] \cdot k_1 + [E] \cdot [P] \cdot k_{-2} = [ES] \cdot (k_{-1} + k_2)$$

$$[E] \cdot [P] \cdot k_{-2}$$

Weshalb ist der Ordinaten Schnittpunkt in der Lineweaver-Burk Darstellung für eine ungehemmte und kompetitiv gehemmte Reaktion derselbe?

Weil V_{\max} unverändert bleibt.

Welche strukturellen Eigenschaften von Proteinen stellen eine Voraussetzung für das Auftreten von Allosterie dar?

Das Protein muss eine Quartärstruktur haben, d. h. aus mehr als einer Untereinheit bestehen.

Wie kann aus einem Proenzym ein Enzym entstehen?

Durch limitierte Proteolyse. Die damit verbundenen konformellen Änderung bringen die an der aktiven Stelle beteiligten Aminosäurereste erst eigentlich in eine katalytisch aktive Anordnung (Abstand).

Substrate binden oft nicht in thermodynamisch stabilstem Zustand an ein Enzym. Welche Komponente bindet thermodynamisch stabiler als das Substrat?

Das Substrat im Übergangszustand

Geben Sie ein Beispiel für einen Enzymmechanismus während welchem sich ein kovalenter Enzym-Substrat Komplex ausbildet. Welcher Aminosäurerest des Enzyms geht eine kovalente Bindung mit dem Substrat ein?

Serinproteasen, Serin.

Bei der kovalenten Modifikation (z. B. Phosphorylierung eines Enzyms) werden mehrere, hintereinander geschaltete Kinasen aktiviert? Worin liegt die Bedeutung dieser stufenweisen Form der Aktivierung?

Auf jeder Stufe wird ein Enzym aktiviert, das nicht nur ein sondern vielleicht 100 bis 1000 Produkte entstehen lässt = Verstärkung.

Was sind Isozyme?

Isozyme sind Enzyme gleicher Spezifität aber unterschiedlicher katalytischer Eigenschaften (K_M , V_{\max}).

Glykophorin ist ein integrales Membranprotein der Erythrozyten, das stark glykosyliert ist (Name: Glyco-phor). Werden Membranen von Erythrozyten mit Chloroform und Methanol extrahiert (Lipidextraktion), verbleiben die Glykophorine praktisch als einzige Proteine in der Wasserphase. Die meisten anderen integralen und ebenso die peripheren Proteine fallen aus und verbleiben in der Interphase. Wie könnte man dies erklären?

Da Glykophorin 15 einfach verzweigte Kohlehydratreste mit je einer endständigen, negativ geladenen Sialinsäure trägt, die dem Protein eine hohe Wasserlöslichkeit verleihen, bleibt es in der Wasserphase. Die anderen, mehrheitlich hydrophoben oder globulären Proteine kehren ihre hydrophoben Reste nach aussen im Kontakt mit organischen Lösungsmitteln und bilden beim Schütteln mit Wasser makroskopische Aggregate.

Welche Lipide sind anteilmässig am häufigsten in biologischen Membranen zu finden?

Zeichne ihre chemische Strukturformel!

Phospholipide, insbesondere Glycerophospholipide bestehend aus Glycerin, das an 2 OH mit Fettsäuren verestert ist und an einem mit einem Phosphorsäurerest, der seinerseits in den meisten Fällen mit einer weiteren, OH tragenden Gruppe (Cholin, Serin etc.), verestert ist.

Welche Eigenschaften sind charakteristisch für ein peripheres Membranprotein?

Seine Wasserlöslichkeit

Periphere Membranproteine bilden in vielen Zellen ein Zytoskelett aus.
Worin liegt seine Bedeutung?

Verantwortlich für die Form einer Zelle, mitbeteiligt an deren Beweglichkeit (sofern die Zelle beweglich ist). Verankern Integrale Membranproteine, verhindern so das beliebige Umherwandern bestimmter integraler Membranproteine.

Von welchen Faktoren ist die laterale Beweglichkeit eines integralen Membranproteins abhängig?

- von der Grösse desjenigen Teils des integralen Membranproteins, der in der Membran selber lokalisiert ist
- von der Viskosität der Lipiddoppelschicht (und somit von der Temperatur abhängig)
- die laterale Beweglichkeit ist nur dann gegeben, wenn das integrale Membranprotein nicht mit dem Zytoskelett verankert ist.

Welche Bedeutung kommt der Kompartimentierung der Zelle zu?

Kompartimentierung erlaubt die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten (Speicher) was sowohl chemisch wie energetisch von Bedeutung ist. Sie erlaubt, dass in einer Zelle sowohl ana- wie katabolische Prozesse ablaufen und diese getrennt reguliert werden können.

Die Phospholipide sind asymmetrisch in der Lipiddoppelschicht angeordnet. Wie?

Welche Kräfte und welches Enzym sind für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie verantwortlich?

Die negativ geladenen sind auf der zytoplasmatischen Seite (Serin, teils Phosphatidylethanolamin). Mit einer Halbwertszeit von 1-2 Wochen können selbst Phospholipide mit einer polaren Kopfgruppe flippen und auf die exoplasmatische Seite wechseln. Plasmamembranen besitzen ATP-abhängige Enzyme, welche die negativ geladenen Phospholipide von der exo- zur zytoplasmatischen Seite zurückbefördern (Aminophospholipid Translokase). Zellen die Apoptose eingehen haben infolge Energieverarmung vermehrt PS auf der Oberfläche. Für Zellen in Kontakt mit Blut ist exoplasmatisches PS gefährlich, es löst Blutgerinnung aus.

Viele biologischen Membranen bestehen zur Hälfte aus Proteinen und zur Hälfte aus Lipiden. Wie gross ist das molare Verhältnis und damit das zahlenmässige Verhältnis an Proteinen zu Lipiden (Annahme: durchschnittliche Molekülmasse von Lipiden = 800, von Proteinen = 50,000).

$$\frac{50000}{800} = 62.5$$

Man stellt Liposomen aus einem Gemisch von normalen Phospholipiden und von farbig fluoreszierenden Phospholipiden her. Dabei werden einerseits Liposomen mit grün und andererseits solche mit rot fluoreszierenden Phospholipiden hergestellt. Die beiden verschieden farbigen Liposomen werden künstlich zur Fusion gebracht. Wie verhalten sich die fluoreszierenden Moleküle nach der Fusion?

Sie unterliegen der lateralen Beweglichkeit in der Lipiddoppelschicht und verteilen sich schliesslich gleichmässig über die gesamte Membran des Fusionsprodukts.

Weshalb sind biologische Membranen instabil in organischen Lösungsmitteln?

weil die Proteinstruktur abhängig ist von umgebendem Wasser. Fehlt dieses, klappen hydrophobe Reste nach aussen.

Membranproteine werden aufgrund ihrer Extrahierbarkeit operationell eingeteilt. Ordnen Sie die folgenden Proteine einer der operationell definierten Gruppen von Membranproteinen zu:

1. Protein A lässt sich aus offenen Membranen durch Lösungen tiefer Ionenstärke zu 90% extrahieren.
2. Protein B ist nach Behandlung der Zelle mit einer Phospholipase C oder D (spalten Phospholipide vor, bzw. nach der Phosphatgruppe) durch Waschen mit einer isotonen Salzlösung von intakten Zellen ablösbar.
3. Die Kohlenhydratseitenketten des Proteins C lassen sich an intakten Zellen chemisch modifizieren. Trotzdem lässt sich Protein C nicht durch Triton X-100 extrahieren. Zu welcher Gruppe gehört das Protein? Welche zusätzlichen Eigenschaften hat Protein C?

1. Zytoskelettäres Protein
2. GPI-verankertes Protein
3. Es handelt sich um ein integrals Glykoprotein. Es muss zusätzlich mit dem Zytoskelett verankert sein.

Was versteht man unter einem sekundär aktiven Membrantransportsystem?

Eines, das den von einem direkt aktiven Transportsystem aufgebauten Gradienten nutzt. Z. B. Natrium-abhängige Glucose Aufnahme in die Darmepithelzelle.

Welche Eigenschaften hat der Glucosetransporter menschlicher Erythrozyten?

Es handelt sich um eine erleichterte Permeation (diffusions-kontrolliert bis zum Konzentrationsausgleich). Genügend, weil intrazelluläre Glucose unmittelbar chemisch verändert wird.

Was versteht man unter einer isopyknischen Zentrifugation?

eine Zentrifugation in einem Dichtegradienten, in welchem das Partikel solange wandert bis es den Ort der gleichen Dichte erreicht hat.

Welche Formveränderungen erfahren Erythrozyten, wenn die Wechselwirkung zwischen Ankyrin und Bande 3 infolge einer Mutation gestört ist?

Sie schnüren Vesikel ab (Lipidmembran ohne Zytoskelett) und werden, da sie so Oberfläche verlieren, zu Sphärozyten (Kugelnzellen).

In welcher Konformation liegen die Fettsäurereste eines Phospholipids vor, wenn Phospholipidmembranen bei Temperaturen weit unter dem Transitionspunkt des Lipids gehalten werden?

(in all trans?) Alle in trans

Ein transmembranäres Protein mit dem N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran hat folgende Eigenschaften:

	21	42	73	91	111	130	
N	_____						C
	Hydrophobe Reste		jede 3.-4. Asre.		jede 3.-4. Asre.		
			polar		polar		
			Rest hydrophob		Rest hydrophob		

Wie ist das Protein in der Membran angeordnet?

Wenn alle erwähnten Bereiche alpha Helices ausbilden wäre es möglich, dass die zweite und dritte Helices, dort wo sie polar sind, einander berühren und die hydrophoben Teile gegen die Lipide gekehrt oder mit der ersten Helix vergesellschaftet sind.

Die Analyse des Elektronentransports in einem Gram-negativen Bakterium zeigte, dass fünf Elektronentransportkomponenten an der Elektronentransportkette beteiligt sind. Die Standard-Reduktions-Potentiale dieser Komponenten sind wie folgt:

oxidierte Form (Oxidationsmittel)	reduzierte Form (Reduktionsmittel)	n	$E^{0'}$ (V)
Flavoprotein b (ox)	Flavoprotein b (red)	2	-0.22
NAD^+	$\text{NADH} + \text{H}^+$	2	-0.32
Cytochrom c (+3)	Cytochrom c (+2)	1	+0.22
Ferroprotein (ox)	Ferroprotein (red)	2	+0.62
Cytochrom a (ox)	Cytochrom a (red)	1	+0.35

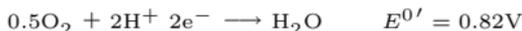
$E^{0'}$ ist das Standard-Reduktionspotential bei pH 7.0 und n die Anzahl der übertragenen Elektronen.

- Bestimmen Sie die Sequenz der Elektronentransportkomponenten in dieser Elektronentransportkette.
- Wieviele Moleküle ATP können unter Standardbedingungen höchstens gebildet werden, wenn ein Elektronenpaar die Elektronentransportkette durchläuft?
- Wäre Nitrat oder Sauerstoff der bessere terminale Elektronenakzeptor für diese Elektronentransportkette? Erklären Sie Ihre Antwort?
- Nehmen Sie an, dass das Bakterium mit Glucose als Substrat in einem aeroben Sediment gut wachsen kann. Mit der Zeit geht der Sauerstoff zu Neige, jedoch ist im Sediment Nitrat im Überschuss vorhanden. Kann das Bakterium mit der oben beschriebenen Elektronentransportkette unter denitrifizierenden Bedingungen weiter wachsen? Erklären Sie Ihre Antwort?

Hilfsgrößen:

$$F = 96.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$$

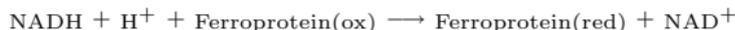
$\Delta G^{0'}$ für die Bildung von ATP: 30.5 kJ mol^{-1}



1. Sequenz der Elektronentransportkomponenten:

NAD ⁺	NADH + H ⁺	-0.32 V
Flavoprotein b (ox)	Flavoprotein b (red)	-0.22 V
Cytochrom c (+3)	Cytochrom c (+2)	+0.22 V
Cytochrom a (ox)	Cytochrom a (red)	+0.35 V
Ferroprotein (ox)	Ferroprotein (red)	+0.62 V

2. $\Delta G^{0'} = -Fn\Delta E^{0'}$ In dieser Elektronentransportkette werden die Elektronen von NADH auf Ferroprotein, dem terminalen Akzeptor der Kette übertragen. Die Redoxreaktion lautet deshalb:



$$\Delta E^{0'} = E^{0'}(\text{Ferroprotein ox/red}) - E^{0'}(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = 0.94\text{V}$$

$$\Delta G^{0'} = -183.4\text{kJ mol}^{-1} \text{ mit } n = 2 \text{ als können 6 ATP gebildet werden.}$$

3. Sauerstoff wäre der bessere terminale Elektronenakzeptor, da bei dieser Reaktion mehr Energie frei wird als mit Nitrat als terminaler Akzeptor (siehe auch 4).
4. Nein, das Bakterium kann unter denitrifizierenden Bedingungen unter den beschriebenen Umständen nicht weiter wachsen, da der Übergang von +0.62 V zu +0.42 V unter Standardbedingungen nicht möglich ist, d. h. es müsste Energie hineingesteckt werden um Elektronen auf Nitrat zu übertragen.