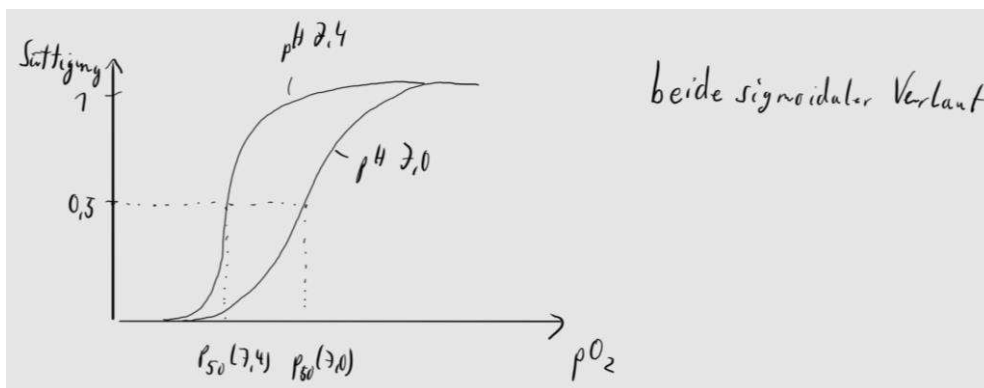


Lösungsvorschlag BC WiSe 25/26

- 1) Die Absorption einer Proteinlösung bei 280nm beträgt 1,2. Wie hoch ist die Konzentration des Proteins bei einer Schichtdicke (d) der Küvette von 2 cm und einem Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) von 24000 1/M*cm? (2 P)

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \rightarrow c = A / (\epsilon \cdot d) = 1,2 \text{ mol} \cdot \text{cm} / (24000 \text{ l} \cdot 2 \text{ cm}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l} = 0,025 \text{ mmol/l}$$

- 2) Zeichnen Sie schematische O₂-Sättigungskurven für Hämoglobin bei pH 7,0 und pH 7,4. Beschriften Sie dabei die Ordinate und die Abszisse. (2 P)



- 3) (4 P)1

- a) Nennen Sie drei Coenzyme, die in biologischen Redoxreaktionen Elektronen übertragen (Trivialname genügt).

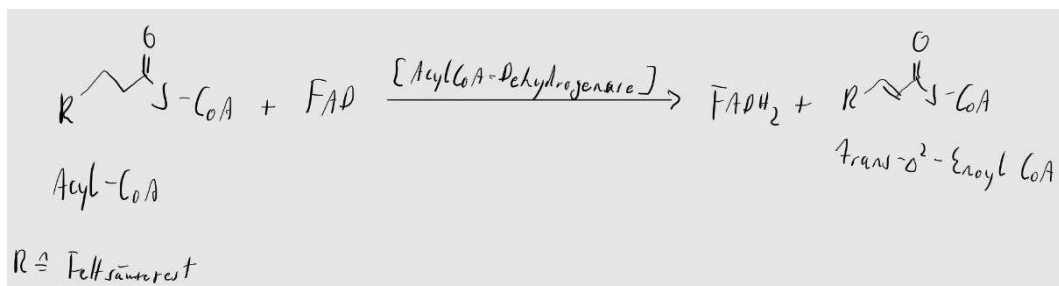
NAD⁺/NADH: Nicotinamadenindinucleotid

NADP⁺/NADPH: Nicotinamadenindinucleotidphosphat

FAD/FADH₂: Flavinadenindinucleotid

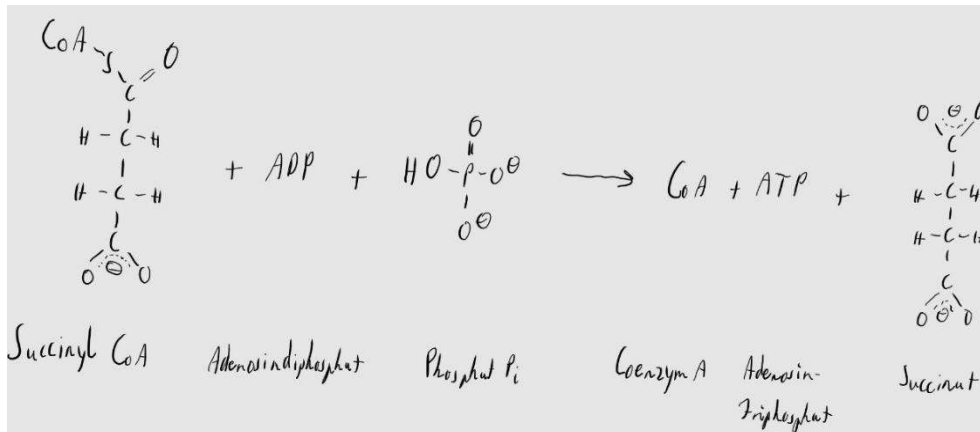
- b) Nennen Sie ein Beispiel für eine derartige Reaktion aus der β -Oxidation und zeichnen Sie die Strukturformeln von Substrat und Produkt.

1. Reaktion aus der β -Oxidation:



- 4) Durch welches Enzym wird im Citratcyclus ATP erzeugt? Formulieren Sie die Gesamt-Reaktionsgleichung (Strukturformeln mit Ausnahme der Coenzyme). (3 P)

Durch die Succinyl-CoA-Synthetase



- 5) Bei der Oxidation von NADH bzw. FADH_2 in der Atmungskette entstehen 2,5 bzw. 1,5 Äquivalente ATP. Wodurch erklärt sich dieser Unterschied?

NADH wird an Komplex I (NADH-Q-Oxidoreductase) der Atmungskette eingespeist (sein Elektronenübertragungspotential ist hoch genug). Der Komplex „pumpt“, zusätzlich zur Abgabe des Protons bzw. der beiden Protonen von NADH in den Intermembranraum und Aufnahme zweier Protonen für Ubiquinon (Q) aus der Matrix, das zur Ubiquinol (QH_2) wird, über pK_A -Perturbation durch Konformationsänderung weitere Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum.

Bei FADH_2 (niedrigeres Elektronenübertragungspotential), das an Komplex II (Succinate-Q-Reductase) eingeht, entfällt dieser zusätzliche Protonentransfer (-> 4 Protonen weniger).

Da der am Ende entstandene Protonengradient ($pH_{\text{Matrix}} > pH_{\text{Intermembranraum}}$) durch die ATP-Synthase in ATP-Produktion umgewandelt wird, entspricht NADH mehr Äquivalenten ATP als FADH_2 .

- 6) (3P)

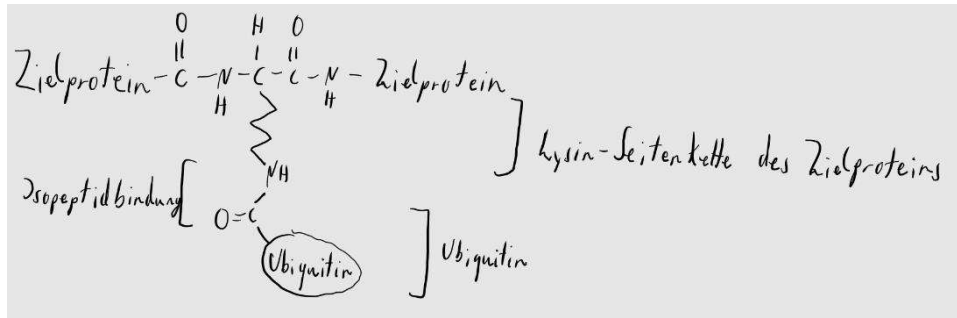
- a. Welche drei Enzyme sind erforderlich, um Ubiquitin mit einem Zielprotein zu verknüpfen?

Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1)

Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2)

Ubiquitin-Ligase (E3)

- b. Benennen und zeichnen Sie die chemische Bindung, über die die Verknüpfung erfolgt.



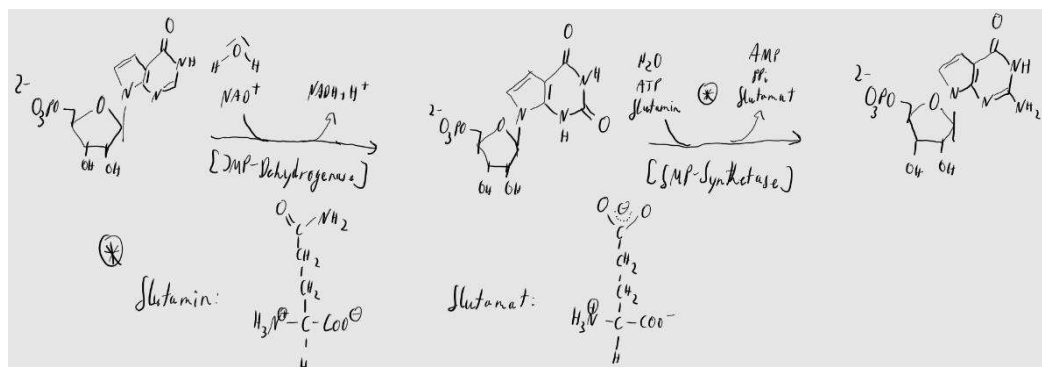
- 7) Beschreiben Sie die grundlegende chemische Struktur eines Nucleotids. Wie unterscheidet sich diese Struktur von der eines Nucleosids? (1 P)

Ein Nucleosid besteht aus einem Zucker (Ribose), der am C1 über eine N-glycosidische Bindung, mit einer Base (A,G,C,U,I,X) verknüpft ist.

Bei einem Nucleotid kommt zusätzlich zum Nucleosid, in der Regel am C5 der Ribose, eine oder mehrere Phosphatgruppe(n) hinzu.

- 8) (2,5 + 0,5 P)

- a. Skizzieren Sie mit chemischen Strukturformeln und Nennung der Enzyme die Synthese von GMP aus IMP.



- b. Markieren Sie die richtige Aussage (eine Antwort richtig)

- PRPP (Phosphoribosyl-Pyrophosphat) inhibiert die Purin-Biosynthese
- PRPP aktiviert die Purin-Biosynthese.
- PRPP aktiviert den Purin-Abbau.
- AMP/ADP/ATP aktiviert die Purin-Biosynthese.

Richtig: b)

- 9) (4 x 0,5 P)

- a. Nennen Sie **je ein** Lipid, das bevorzugt im äußeren bzw. inneren Monolayer vorkommt.

Außen: Phosphatidylcholin (PC)

Innen: Phosphatidylserin (PS)

- b. Erklären Sie, welche physikalischen Kräfte in der Kopfreion im Vergleich zur Kettenregion der Lipide wirken (Anziehung vs. Abstoßung) und wie sich dies im lateralen Druckprofil $\pi(z)$ widerspiegelt.

In der Kopfreion wirken vor allem Hydratationskräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen und Coulombwechselwirkungen (v.A. abstoßend), während zwischen den Ketten eher unpolare Kräfte wirken: van-der-Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Effekte und sterische Wechselwirkungen (abstoßend).

In der Summe führt dies zu eher abstoßenden Kräften in Kopf- und Kettenbereich, aber zu attraktiven im Übergangsbereich. Hier ist das laterale Druckprofil negativ ($\pi < 0$), „außen“ (in Ketten und Köpfen) positiv ($\pi > 0$).

- c. Erklären Sie den Einfluss von Cholesterin auf die Fluidität von biologischen Membranen bei hohen vs. niedrigen Temperaturen.

Bei hohen Temperaturen erhöht Cholesterin die Packungsdichte und damit die zwischenmolekularen Wechselwirkungen, die Fluidität sinkt.

Bei niedrigen Temperaturen erhöht es durch Einlagerung zwischen die dicht-gepackten (v.a. gesättigten Ketten) die Fluidität.

→ Puffer für Membranfluidität

- d. Warum senkt eine cis-Doppelbindung (z.B. Ölsäure 18:1) die Schmelztemperatur (T_m) im Vergleich zur Stearinsäure (18:0)?

Eine Doppelbindung verhindert die dichteste Packung von Fettsäuren und verringert damit Wechselwirkungen (v.A. van-der-Waals-Kräfte). Weniger attraktive Wechselwirkungen heißt vor allem eine geringere Schmelztemperatur. Dieser Effekt entfällt bei z.B. Stearinsäure.

10)(4 x 0,5 P)

- a. Erklären Sie den molekularen Mechanismus der Selektivität im Selektivitätsfilter des KcsA K^+ Kanals (TVGYG)-Sequenz unter Berücksichtigung der Hydrathülle.

Zur Passierung des Kanals muss das K^+ -Ion seine Hydrathülle abstreifen. Dies wäre an und für sich energetisch ungünstig, wird allerdings durch polare Aminosäuren (Peptidbindungen und polare Reste) in der Pore

(Segment S5 + S6) energetisch kompensiert. Dies geht allerdings nur, wenn das Ion die richtige Größe hat. Daraus resultiert die Selektivität. (Na⁺ z.B. zu klein für diese Koordinierung.)

- b. Welches Segment fungiert als Spannungssensor in spannungsgesteuerten Kanälen und wie führt eine Depolarisation zur Öffnung?

Der Spannungssensor ist ein (de)protonierter Aminosäurerest (z.B. von Arginin) in Segment S4. Eine Änderung in der Protonierung (Protonierung bei Depolarisation) hat eine transmembrane Verschiebung von S4 zur Folge. Dies wiederum löst durch eine Konformationsänderung von S5 & S6 eine Öffnung aus.

- c. Berechnen Sie den Fluss J_A eines Medikaments ($P = 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$) bei $[A]_{\text{out}} = 50 \text{ mM}$ und $[A]_{\text{in}} = 10 \text{ mM}$. (Einheit: $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

$$J_A = P_A \cdot ([A]_{\text{out}} - [A]_{\text{in}}) = 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s} \cdot (50 \cdot 10^{-3} \text{ M} - 10 \cdot 10^{-3} \text{ M}) = 1 \cdot 40 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{M/s} = 4 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{mol}/(\text{s} \cdot \text{l}) = 4 \cdot 10^{-11} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2)$$

- d. Reicht die Energie von 1 Na⁺ (-12,5 kJ/mol) aus, um Glucose 100-fach durch den SGLT Sekundärtransporter anzureichern ($[\text{Glc}]_{\text{in}} / [\text{Glc}]_{\text{out}} = 100$)?

$$\Delta G_{\text{Glucose}} = 2,3 \cdot R \cdot T \cdot \log ([\text{Glc}]_{\text{in}} / [\text{Glc}]_{\text{out}}) = 5,7 \text{ kJ/mol} \cdot \log (100) = 11,4 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G_{\text{Gesamt}} = 11,4 \text{ kJ/mol} + (-12,5 \text{ kJ/mol}) = -1,1 \text{ kJ/mol}$$

→ Exogoner Prozess → Energetisierung durch Natrium ist ausreichend, eine Kopplung mit einem zweiten Na⁺ findet physiologisch allerdings statt.

Fragen zum Grundpraktikum Biochemie

11)(2 +1 P)

- a. Welche Aminosäure wird bei einem Kationenaustauscher zuerst und welche zuletzt eluieren, wenn der Startpuffer pH 4 und eine niedrige NaCl-Konzentration hat und der Endpuffer pH 10 mit hoher NaCl-Konzentration ist? Die Aminosäuren sind: Aspartat, Alanin, Histidin, Lysin und Tyrosin.

Zuerst wird Aspartat als die sauerste der genannten Aminosäuren eluieren (als erste nicht mehr positiv geladen), als letzte Lysin als basischste der genannten.

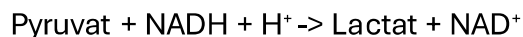
- b. Erklären Sie, wozu Protein G- und A-Sepharose gekoppelte Säulen in der Proteinreinigung verwendet werden.

Protein G & A binden mit hoher Affinität an Immunglobulinen (und dessen Komplexe). Diese Eigenschaft kann für die Affinitätschromatographie verwendet werden, bei der andere Moleküle/Proteine ohne Bindung an die Säule schnell eluiert werden können, während Immunglobuline eben an die Affinitätsmatrix in der Säule binden und so nach Elution aufkonzentriert vorliegen.

- 12) Die Aktivität einer Lactatdehydrogenase (LDH)-Präparation wird in einer Küvette (d = 0,5 cm) mit Pyruvat, NADH und Puffer ermittelt (V = 1,49 ml). Sofort nach dem Start der Reaktion mit 10 µl LDH (20 mg/ml) werden folgende Messwerte bestimmt:

Zeit [sec]	E
0	0,975
15	0,930
30	0,885
45	0,840

- a. Formulieren Sie die Wortgleichung, der in der Küvette ablaufenden Reaktion. (0,5 P)



- b. Berechnen Sie die Aktivität der eingesetzten LDH in U/ml. ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ ml}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$). (2 P)

Beer-Lambertsches Gesetz: $\Delta E/\Delta t = \Delta c/\Delta t * \epsilon * d \rightarrow \text{Volumenaktivität} = \Delta c/\Delta t = f * \Delta E / (\Delta t * \epsilon * d) = (1500 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l}) * ((0,975 - 0,840) \mu\text{mol}\cdot\text{cm}) / (0,75 \text{ min} * 6,2 \text{ ml} * 0,5 \text{ cm}) = 150 * 0,058 \mu\text{mol} / (\text{min} * \text{ml}) = 8,71 \text{ U/ml}$

- c. Geben Sie die spezifische Aktivität der LDH in U/mg an. (0,5 P)

Spezifische Aktivität: $(8,71 \text{ U/ml}) / (20 \text{ mg/ml}) = 0,435 \text{ U/mg}$

- 13) Die Aspartat-Aminotransferase (Asp-AT) ist eine archetypische pyridoxalabhängige Transaminase.

- a. Beschreiben Sie die Bindung zwischen PLP und der Asp-AT in Abwesenheit von Aspartat und geben Sie die chemische Strukturformel an. (1 P)

Es handelt sich um eine Aldimin-Bindung (interne Schiff-Base) zu einem Lysin-Seitenrest der Asp-AT seitens des (ehemaligen) Aldehyd-Kohlenstoffatoms.

- b. In einem gekoppelten enzymatischen Test soll die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase photometrisch bestimmt werden. Geben Sie die Wortgleichung dieser Indikatorreaktion an. (1 P)



- c. Bleibt die Aktivität der Asp-AT erhalten, wenn das Enzym vor Reduktion mit NaBH_4 mit folgenden Molekülen inkubiert wird (Begründung angeben)? (1 P)

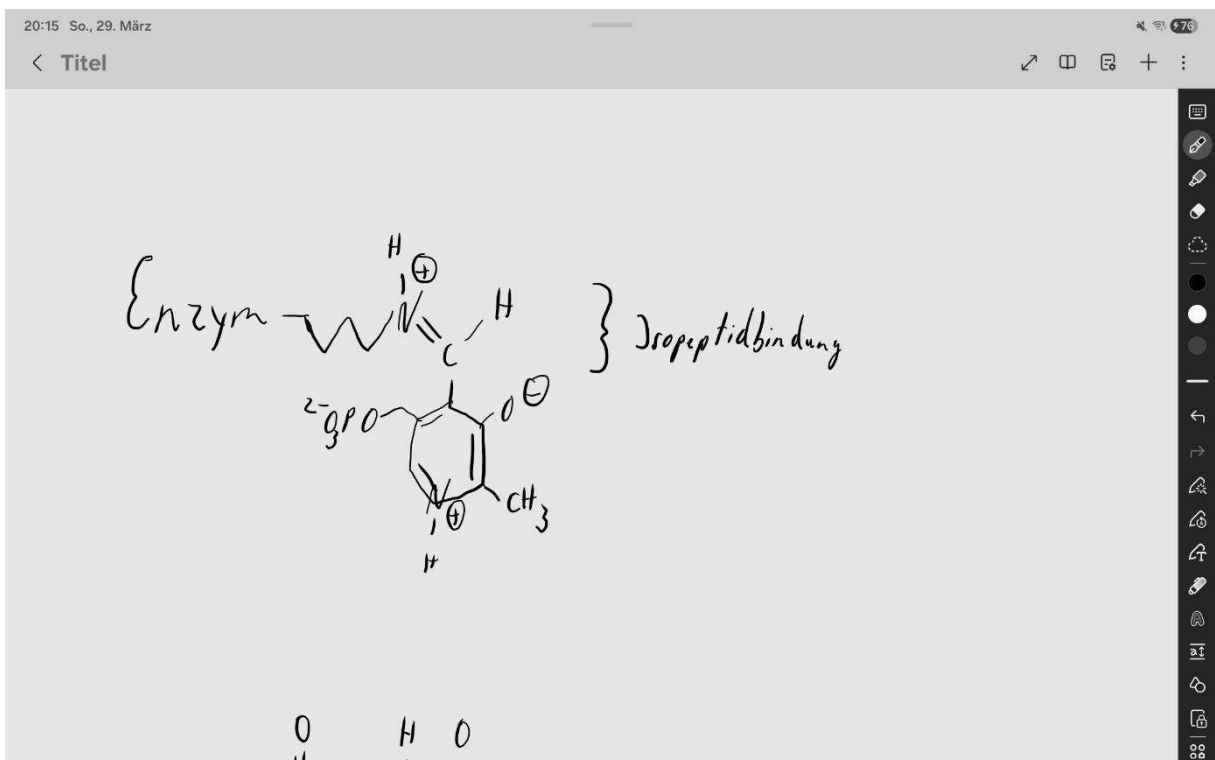
- i) Aspartat

Aspartat verdrängt die Enzym-PLP-Bindung und bindet mittels externer Schiff-Base an PLP, ehe die Transaminierung einsetzt. Oxalacetat wird abgespalten, die Aminogruppe, mit einer Einfachbindung an PLP gebunden. Es findet damit keine Reduktion statt, die Enzymaktivität bleibt erhalten.

- ii) Alanin

Alanin kann aufgrund der Substratspezifität nicht binden, die unter i) erläuterte Reaktion bleibt aus. Somit bleibt die Enzym-PLP-Schiff-Base bestehen, die irreversibel durch NaBH_4 reduziert wird, die Enzymaktivität wird zerstört.

- 14) Eine Sauerstoffmesszelle enthält Mitochondrien und Succinat in phosphatgepuffertem KCl-Medium. Begründen Sie, wie sich die oxidative Phosphorylierung, insbesondere hinsichtlich „Sauerstoffverbrauch“ und „ATP-



Synthese“, durch die aufeinanderfolgenden Zugaben (A), (B) und (C) verändert. (3 x 1P)

- (A) Zugabe von einem Überschuss an ADP
- (B) Zugabe von Oligomycin (Inhibitor der ATP-Synthese)
- (C) Zugabe von 1,4-Dinitrophenol (Entkoppler)

(A) Durch die Zugabe von ADP im Überschuss geht die Atmung von einer kontrollierten zu einer aktiven Atmung über. Bei dieser wirkt nicht mehr ADP als Substrat limitierend, sondern lediglich die Enzymgeschwindigkeiten.

Folglich nehmen ATP-Synthese (-> vermehrter Protonentransfer) und Sauerstoffverbrauch zu.

(B) Durch Inhibition der ATP-Synthese wird der entstehende Protonengradient nicht mehr abgebaut, der Protonentransfer wird energetisch aufwendiger, ehe die Atmungskette (-> Sauerstoffverbrauch & ATP-Synthese) nahezu zum Erliegen kommen.

(C) 2,4-Dinitrophenol als membranlöslicher Protonenshuttle baut den Protonengradienten wieder ab. Die Atmungskette kann, entkoppelt von der noch immer inhibierten ATP-Synthese (wenig bis keine ATP-Synthese), wieder ablaufen, der Sauerstoffverbrauch nimmt wieder zu, erreicht allerdings nicht den Wert aus (A).