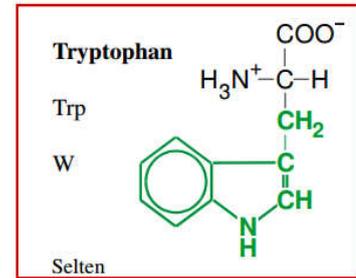


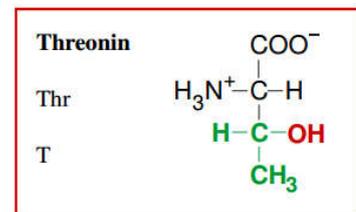
• Welche Aminosäure wurde erst durch den Trypsin-Verdau von Eiweiß entdeckt?

Tryptophan wurde erstmals durch den Trypsin-Verdau in Casein nachgewiesen. Es wird durch saure Hydrolyse als einzige Aminosäure komplett zerstört. Tryptophan ist eine aromatische, essentielle und lipophile Aminosäure. Wird im menschlichen Körper unter anderem zu Serotonin umgewandelt.



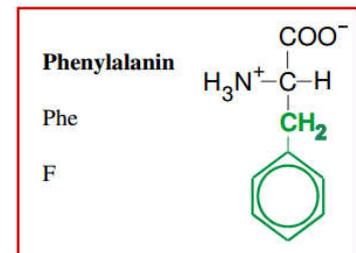
• Zeichnen Sie die Struktur von Threonin! Welche Bedeutung hat diese Aminosäure?

Threonin ist eine essentielle und polare Aminosäure. Sie wurde als letzte proteinogene Aminosäure entdeckt. Threonin gehört zur Gruppe der Hydroxy-Aminosäuren und kann phosphoryliert werden, wodurch es eine Rolle bei der Enzymregulation spielen kann. Über die OH-Gruppe können desweiteren Kohlenhydrate gebunden sein (O-glykosidische Bindung).



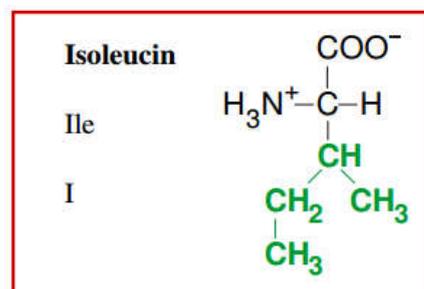
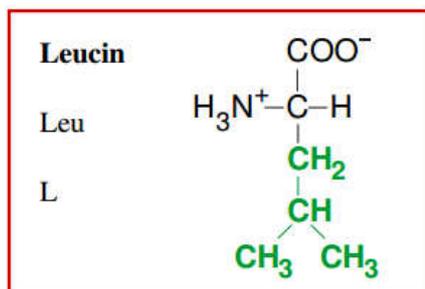
• Welche Aminosäure ist aromatisch und unpolar? Zeichnen Sie die Struktur!

Phenylalanin ist essentiell, trägt eine hydrophobe Seitenkette und ist unter anderem Bestandteil von Aspartam. Phenylalanin ist beteiligt an der Synthese von Adrenalin, Noradrenalin und L-Dopa. Die Aminosäure Phenylalanin dient als Ausgangsstoff für viele weitere Stoffe, z. B. für den Botenstoff Dopamin. Bei Phenylketonurie kann der Körper Phenylalanin nicht mehr zu Tyrosin synthetisieren.



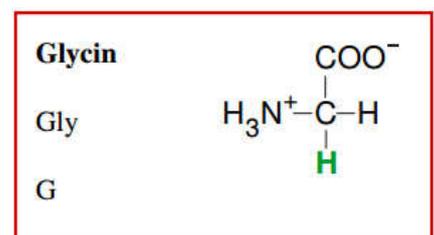
• Welche 2 Aminosäuren sind isobar?

Leucin und Isoleucin sind isobar. Beide Aminosäuren sind essentiell und ausgesprochen hydrophob. Zusammen mit den ebenfalls hydrophoben Aminosäuren Valin und Phenylalanin findet man sie häufig in Proteinen, die in biologischen Membranen eingebettet sind.



• Welche Aminosäuren sind nicht chiral?

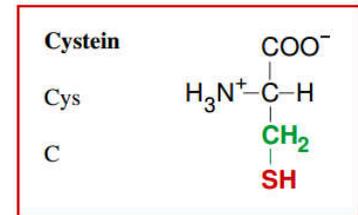
Glycin ist als einzige proteinogene Aminosäure nicht chiral. Glycin ist nicht essentiell. Große Mengen an Glycin und Prolin kommen in Kollagen vor. Aufgrund seiner geringen Größe wird Glycin bevorzugt in Polypeptide an räumlich beengten Positionen eingebaut.



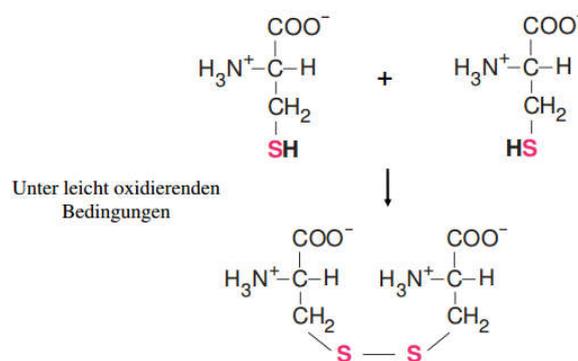
• Welche Aminosäure ist für die Bildung von Disulfidbrücken verantwortlich?

Wie können Sie die Disulfidbrücken eines Proteins vorübergehend und wie dauerhaft auflösen?

Cystein ist eine nicht essentielle, hydrophile und schwefelhaltige Aminosäure. Sie kann aus Methionin synthetisiert werden. Bei der Proteinfaltung kann zwischen Cysteinresten, die sich in verschiedenen Polypeptidketten oder an verschiedenen Stellen ein und derselben Polypeptidkette befinden und durch die Faltung in räumliche Nähe geraten, eine Disulfidbrücke ausbilden. Die kovalente Bindung erhöht die Stabilität der Proteinstruktur und kommt bei vielen extrazellulären Proteinen vor, beispielsweise bei Keratin und Insulin.



**Oxidation von Cystein zu Cystin**



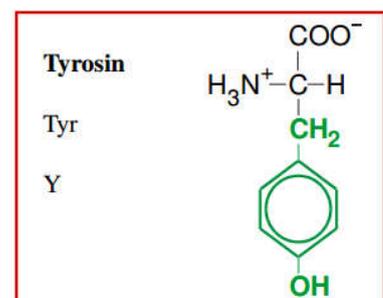
Die Disulfidbrücken können mit 2-Mercaptoethanol, Dithioerythrit (DTE) oder Dithiothreitol (DTT) aufgelöst werden. Diese können aber wieder reoxidieren z.B. durch Verdünnen der oben genannten Reduktionsmittel. Um die Disulfidbrücken dauerhaft zu lösen, werden die Thiolgruppen mittels Iod-Acetamid oder Iodessigsäure alkyliert. Die Thiolgruppen werden dadurch dauerhaft deaktiviert.

Wieso sind Harnstoff und Guanidinium-HCl zum Auflösen der Disulfidbrücken ungeeignet?

Diese beiden Stoffe sind chaotrope Agentien. Sie stören Wasserstoffbrückenbindungen. Disulfidbrücken werden daher nicht gelöst.

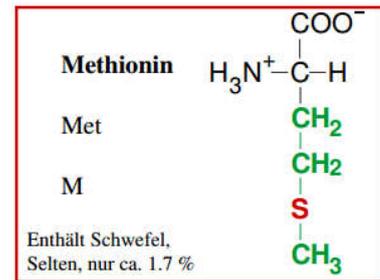
• Welche aromatische Aminosäure kann phosphoryliert werden?

Tyrosin kann an der OH-Gruppe phosphoryliert werden. Tyrosin ist nicht essentiell und kann aus Phenylalanin synthetisiert werden. Als Empfänger von Phosphatgruppen spielt es eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion (Tyrosinkinasen).



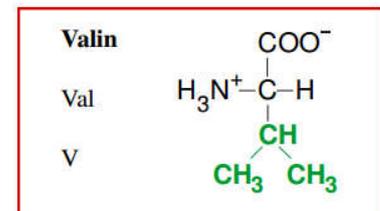
• Für welche Aminosäure stehen zwei tRNAs zu Verfügung?

Methionin ist eine hydrophobe, essentielle und unpolare Aminosäure. Aus Methionin kann Cystein synthetisiert werden. Die Proteinsynthese wird immer mit Methionin gestartet (AUG). Methionin verfügt über eine Thio- und eine Methylgruppe. Aufgrund des Thioethers ist Methionin weniger reaktiv als Cystein und daher weniger für die Ausbildung von Disulfidbrücken geeignet. Methionin hat eine tRNA für die Initiation und eine tRNA für die Verlängerung.



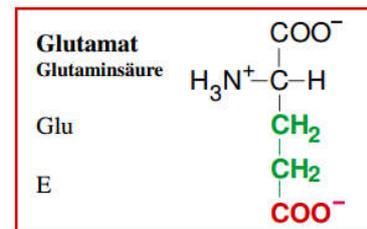
• Zeichnen Sie Valin und beschreiben Sie die Aminosäure!

Valin ist eine essentielle, lipophile, aliphatische und unpolare Aminosäure mit verzweigter Kohlenstoffkette. Valin ist im Falle der Mobilisierung körpereigener Proteinreserven auch zur Energiegewinnung nutzbar. Beispielsweise dient Valin, wie die beiden anderen Aminosäuren mit verzweigter Kohlenstoffkette Leucin und Isoleucin, der Ernährung des Muskels.



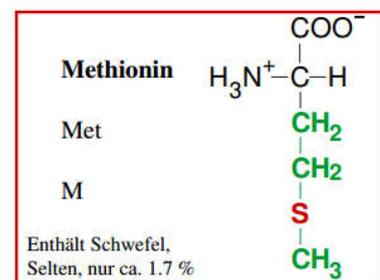
• Welche Aminosäure wird gerne in der chinesischen Küche zum Würzen verwendet?

Glutamat ist eine nicht-essentielle Aminosäure deren Salze in der Küche als Geschmacksverstärker verwendet werden (Mononatriumglutamat). Glutamat ist ein wichtiger Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Glutamat wird durch das Enzym L-Glutaminsäuredecarboxylase zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) decarboxyliert, welches als Neurotransmitter an inhibitorischen Synapsen eingesetzt wird.



• Welche schwefelhaltige Aminosäure kann keine Disulfidbrücken bilden? Zeichnen Sie die Formel. Welche Rolle spielt sie bei der Proteinbiosynthese?

Methionin ist eine hydrophobe, essentielle und unpolare Aminosäure. Aus Methionin kann Cystein synthetisiert werden. Die Proteinsynthese wird immer mit Methionin gestartet (AUG). Methionin verfügt über eine Thio- und eine Methylgruppe. Aufgrund des Thioethers ist Methionin weniger reaktiv als Cystein und daher weniger für die Ausbildung von Disulfidbrücken geeignet. Methionin hat eine tRNA für die Initiation und eine tRNA für die Verlängerung.

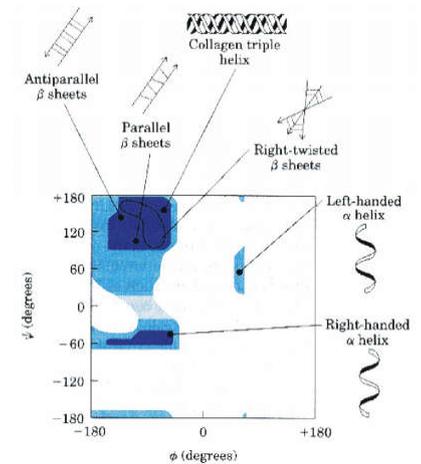


• Wie können Serin, Threonin und Asparagin posttranslational modifiziert werden?

Die oben genannten Aminosäuren können glycosyliert werden. Asparagin kann eine N-glycosidische Bindung eingehen. Serin und Threonin können eine O-glycosidische Bindung eingehen.

● Was sind die Besonderheiten des Ramachandran-Plots bei der Peptidbindung, was haben  $\phi$  und  $\psi$  damit zu tun?

Ein Ramachandran-Plot ist ein Diagramm, das die statistische Verteilung von Kombinationen von jeweils zwei Torsionswinkeln ( $\phi$  und  $\psi$ ) eines bestimmten Protein-Backbones darstellt. Ramachandran-Plots sind für jeweilige bestimmte Typen von Protein-Molekülen charakteristisch. Man kann anhand eines Ramachandran-Plots auch die Häufigkeit von  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und anderer Protein-Sekundärstrukturen im Molekül abschätzen.



$\phi = \psi = 0$  ... diese Kombination ist nicht möglich

● Welche Gruppen sind dafür verantwortlich, dass die Seitenkette einer Aminosäure polar ist?

- OH: - Tyrosin
- Serin
- Threonin
- SH: - Cystein
- CO(NH<sub>2</sub>): - Asparagin
- Glutamin
- R<sub>2</sub>NH: - Tryptophan

● Welche Gruppen sind für den sauren Charakter von Aminosäuren verantwortlich?

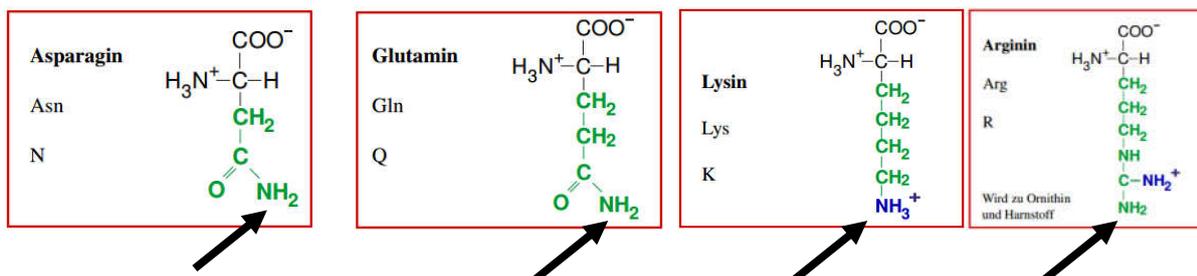
- eine zweite Carboxygruppe (-COOH): - Glutamat
- Aspartat

● Welche Gruppen sind für den basischen Charakter von Aminosäuren verantwortlich?

- eine zweite primäre Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>): - Lysin
- Arginin
- oder eine tertiäre Aminogruppe (R<sub>3</sub>N): - Histidin

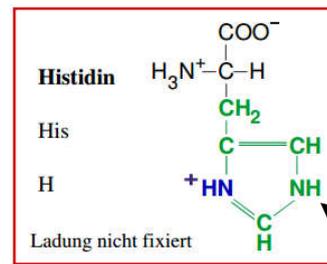
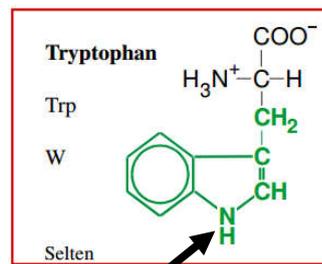
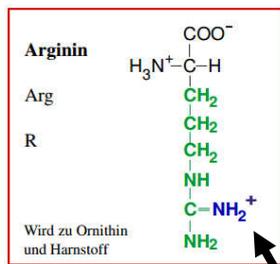
● Welche Aminosäure hat in ihrer Seitenkette eine primäre Aminogruppe?

Asparagin, Glutamin, Arginin, Lysin



• Welche Aminosäure hat in ihrer Seitenkette eine sekundäre Aminogruppe?

Tryptophan, Histidin, Arginin



• Was ist eine Sichelzellenanämie und welche Ursachen hat sie?

Die Sichelzellenanämie beruht auf einer Strukturveränderung des Hämoglobins, die im tropischen Afrika weit verbreitet ist. Ursache ist eine Punktmutation im Gen der  $\beta$ -Kette. Sie hat zur Folge, dass in Position 6 Glutaminsäure gegen Valin ausgetauscht wird.

AA	Aa	aa
Rote Blutkörperchen normal Träger gesund	Heterozygoter Träger	Rote Blutkörperchen sichelförmig
	Rote Blutkörperchen in Normalform	Typische Krankheitssymptome
	nur bei schwerem O <sub>2</sub> -Mangel Sichelform	Tod vor Erreichen des Erwachsenenalters
	Malaria-Resistenz	

- **Woran denkt eine Biochemikerin, wenn vom Hydrophoben Kollaps gesprochen wird?**

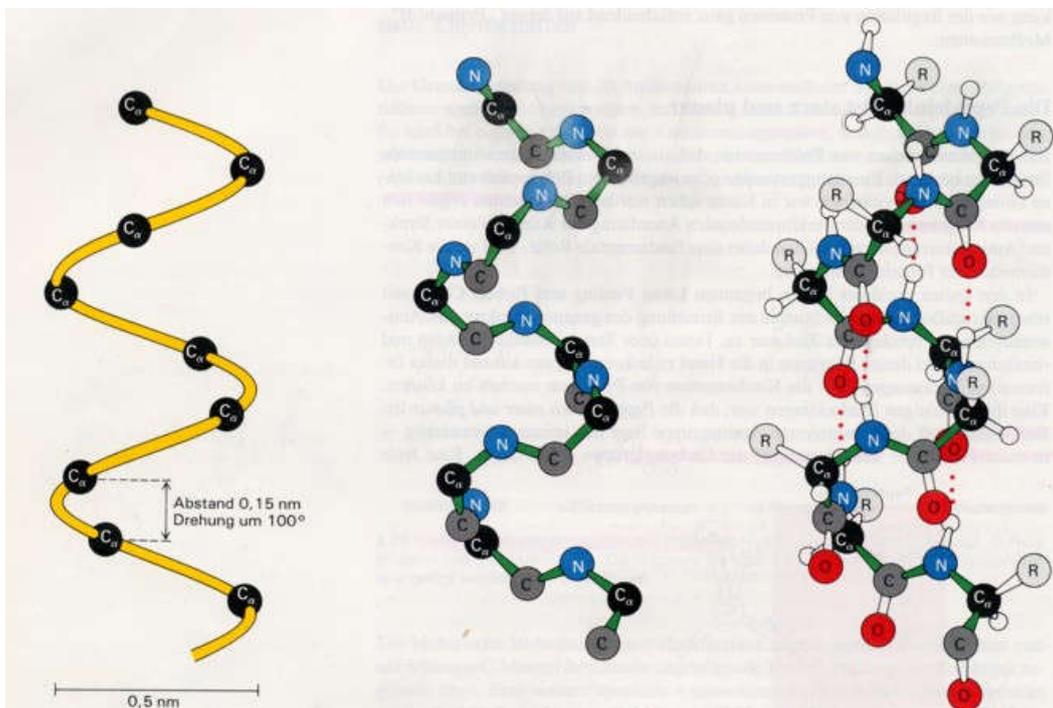
Der hydrophobe Kollaps wird durch hydrophobe Kräfte angetrieben. Die hydrophoben Aminosäuren sammeln sich im Inneren des Proteins, wobei die Wasser-Moleküle heraus gedrängt werden. Danach bilden sich Sekundärstruktur-Bereiche aus, bevor die Faltung beendet wird.

- **Mit welchen Reagenzien löst man Inclusion-bodies auf. Warum gerade mit diesen ?**

Inclusion bodies sind große Aggregate aus falsch- bzw. ungefalteten Proteinen. Durch Zugabe von Harnstoff oder Guanidinium-HCl in hohen Konzentrationen werden die Proteine denaturiert und gehen in Lösung. Durch sukzessive Verringerung der Harnstoff- oder Guanidinium-HCl-Konzentration kann das Protein wieder seine native Form einnehmen. Harnstoff und Guanidinium-HCl erlauben eine Renaturierung bzw. reversible Denaturierung.

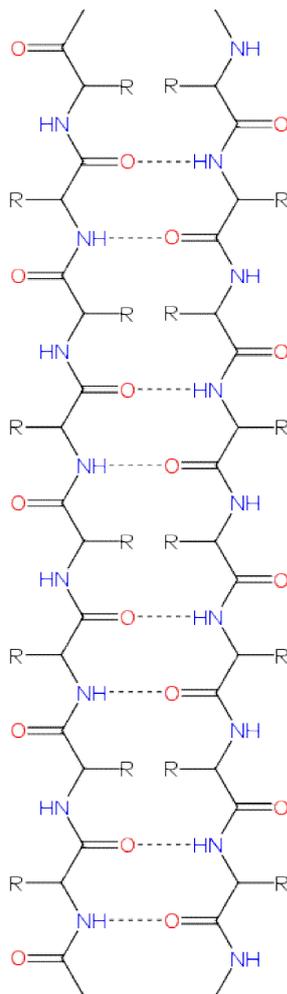
- **Beschreiben Sie die Struktur und Eigenschaften von  $\alpha$ -Helices näher!**

Die  $\alpha$ -Helix ist eine rechtsgängige, ausschließlich durch Wasserstoffbrücken stabilisierte Sekundärstruktur. Pro Windung befinden sich im Durchschnitt 3,6 Aminosäuren. Eine Windung ist ca. 0,54 nm hoch. Die Aminosäure Prolin ist ein Helixbrecher. Dadurch, dass das Stickstoffatom des Prolins in der Peptidgruppe nicht mit einem H-Atom verbunden ist, kann keine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden.  $\alpha$ -Helices findet man in Myoglobin und Hämoglobin. Weiters kommen  $\alpha$ -Helices auch in Transmembranregionen vor.

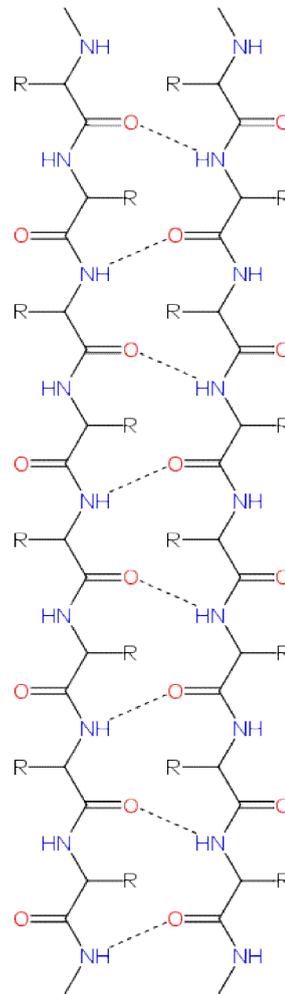


• **Zeichnen und erklären Sie die Struktur des  $\beta$ -Faltblatts!**

Lagern sich Aminosäureketten in weitgehend gestreckter Konformation nebeneinander, kann sich ein  $\beta$ -Faltblatt ausbilden. Die daran beteiligten Kettenabschnitte werden als  $\beta$ -Faltblattstränge bezeichnet.  $\beta$ -Faltblattstrukturen werden durch Wasserstoffbrücken stabilisiert, die sich zwischen zwei parallel oder auch antiparallel liegenden Aminosäureketten ausbilden. Man findet  $\beta$ -Faltblätter z.B. in Antikörpern.



antiparallel



parallel

• **Stärke - Amylase / Glykogen - Phosphorylase: Ähnlichkeiten und Unterschiede!**

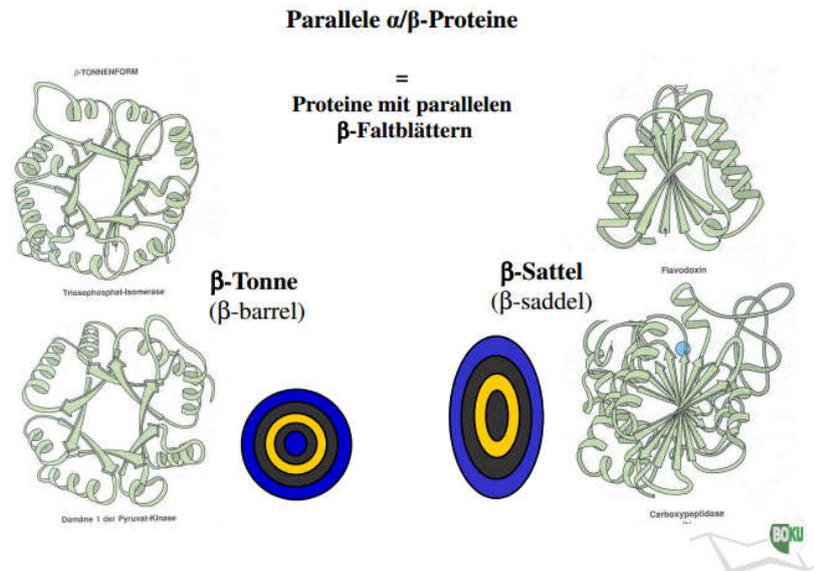
Amylasen spalten Polysaccharide wie z.B. Stärke. Beim Maischen entstehen dadurch vergärbare Mono- und Disaccharide. Amylasen sind Hydrosylasen.

Glykogen wird durch Phosphorylase abgebaut und phosphoryliert. Es entsteht dann Glucose-1-Phosphat. Die Phosphorylase ist erst aktiv, wenn sie phosphoryliert wurde (indirekt durch Proteinkinase A). Phosphorylasen sind Glycosyltransferasen. Phosphorylase baut Glykogen ab und hängt eine Phosphatgruppe an.

- Sind  $\beta$ -Faltblätter wirklich so flach wie ein Blatt Papier und was hat das mit Sätteln und Tonnen zu tun?

$\beta$ -Faltblätter sind "gefächert". Sie sind daher nicht so flach wie ein Stück Papier.

- $\beta$ -Tonne: Die  $\beta$ -Tonne ist ein achtsträngiges paralleles  $\beta$ -Faltblatt mit  $\alpha$ -Helices außen. Das Loch in der Mitte ist nur scheinbar. Dort befinden sich Seitenketten der Aminosäuren. Vorkommen: bakterielle Toxine (z.B. Staphylococcus aureus)
- $\beta$ -Sattel: Acht-strängiges gemischtes  $\beta$ -Faltblatt mit rechtsgängiger Verdrehung. z.B. Bovine Carboxypeptidase A



- Beschreiben Sie den  $\beta$ -Loop und dessen Besonderheiten!

$\beta$ -loops sind U-förmige Abschnitte der Aminosäurekette, die die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen eines Proteins miteinander verbinden. Ein  $\beta$ -Loop besteht aus 4 Aminosäuren, wobei die erste und die vierte Aminosäure durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind.

- Was sind chaotrope Agentien? Wozu werden Sie in der Biotechnologie eingesetzt?

Als chaotrop werden chemische Substanzen bezeichnet die geordnete Wasserstoffbrückenbindungen in Wasser auflösen. Indem die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden, stören die chaotropen Substanzen die Wasserstruktur und sorgen für Unordnung (Zunahme der Entropie). Bei Aminosäuren vermindern sie damit hydrophobe Effekte und wirken denaturierend auf Proteine, da die treibende Kraft der Proteinfaltung die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren im Wasser ist. Chaotrope Agentien werden zur Renaturierung (Refolding) von Proteinen verwendet. Durch langsames Entfernen oder Verdünnen des chaotropen Agens in Gegenwart katalytischer Mengen an 2-ME wird das Protein renaturiert.

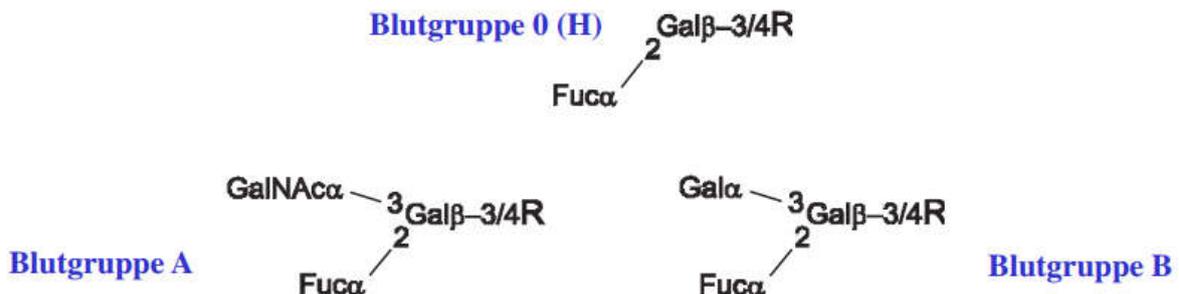
- Chaotrope Agentien: - Harnstoff  
- Guanidium-Hydrochlorid

- **Welche Strukturelemente verleihen den Erythrozyten ihre Blutgruppeneigenschaften?**

Im ABO-System bezieht sich die jeweilige Bezeichnung der Blutgruppe auf die aus Oligosacchariden bestehenden Antigene, die von den körpereigenen Zellen exponiert werden, nicht auf die Antikörper, die der Betroffene bildet.

Bei den Blutgruppen A, B und AB bestehen die beiden Antigene A und B aus Tetrasacchariden. Diese sind teilweise an Protein, teilweise auch an Lipide der Zellmembran gebunden.

Bei der Blutgruppe 0 besteht das Antigen aus einem Trisaccharid, das als H-Antigen bezeichnet wird. Das H-Antigen ist auch der Grundkörper der Tetrasaccharide vom Typ A und B.



- **Was ist ein Signal Recognition Particle (SRP)? In welchem Zellkompartiment kommt es vor?**

Die Translation von Membran- und Lumenproteinen und sekretierten Proteinen beginnt an freien Ribosomen im Zytoplasma. Wenn die wachsende Peptidkette eine Länge von 70-80 Aminosäuren erreicht hat und die Signalsequenz das Ribosom verlassen hat, wird diese vom SRP gebunden.

Wird die Signalsequenz vom SRP gebunden, verzögert oder stoppt dies die Translation, bis der gesamte Komplex an einen SRP-Rezeptor in der ER-Membran bindet. Das SRP verlässt nun den Komplex, während die Signalsequenz des unfertigen Peptids in einen Transportkanal in der Membran eindringt. Das zuvor zytoplasmatische Ribosom ist nun also über das Peptid an das ER gebunden. Die Peptidsynthese wird nun fortgesetzt und das quasi eingefädelt Protein durch den Transportkanal gebracht; es handelt sich also um einen co-translationalen Transport.

Das SRP hat zwei Funktionen: zum einen dirigiert es die wachsende Peptidkette zum ER, zum anderen verhindert es eine verfrühte Faltung des Proteins. Innerhalb des ER sorgt dann die Proteindisulfid-Isomerase dafür, dass die korrekten Disulfid-Brücken gebildet werden. ist. Warum können Politiker nicht vom degenerierten genetischen Code zurücktreten?

- **Was bedeutet es, wenn ein Protein "geranylgeranyliert" ist? Um welche Struktur handelt es sich dabei und welche Funktion hat sie?**

Die Geranylgeranylierung ist eine Form der Prenylierung von Proteinen. Die Geranylgeranylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, durch die unter anderem zytoplasmatische Proteine über die angehängte Geranylgeranylgruppe im Sinne eines Membranankers an der Zellmembran oder an anderen Biomembranen in einer Zelle befestigt werden. Die Substrate bei der Geranylgeranylierung sind Geranylpyrophosphat und ein oder zwei C-terminale Cysteine am zu modifizierenden Protein. Die Abgangsgruppe bei der Geranylgeranylierung ist Pyrophosphat. Beispiele für geranylgeranylierte Proteine sind z. B. die Rho-GTPase und die γ-Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen.

● **Welche Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen kennen Sie?**

- Röntgenkristallographie
- Kernresonanzspektroskopie
- CD-Spektroskopie
- Empirische Vorhersage der Sekundärstruktur
- Rechnerische Modellierung (3D-Modeling)

● **Wie kann die Proteinstruktur vorhergesagt werden?**

- ab initio Modellierung
- Modellierung nach bekanntem Homolog
- Vorhersage von Sekundärstrukturelementen (z.B. nach Chou-Fasman Schema)

● **Welche Kräfte stabilisieren Protein?**

- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Polare Wechselwirkungen
- Van-der-Waal Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrücken
- Hydrophobe Wechselwirkungen

● **Welche Beobachtung machte Christian Anfinsen mit dem Enzym Ribonuklease?**

Ribonuklease aus Rinderpankreas kann mithilfe von Harnstoff und 2-Mercaptoethanol denaturiert werden.

● **Wie können Disulfidbrücken in Proteinen umgelagert werden?**

Disulfidbrücken können durch Spuren von 2-Mercaptoethanol oder "in vivo" durch Disulfidisomerasen umgelagert werden.

● **Was beeinflusst die Proteinstabilität? Wie kann die Proteinstabilität gemessen werden?**

- Temperatur ( $T_m$  eines Proteins)
- pH-Wert
- Detergentien
- organische Lösungsmittel
- Polare organische Substanzen
- Salze
- Chaotrope Agentien
- Druck
- Einfrieren/Auftauen

Messung:       - UV-Absorption  
                  - Fluoreszenz  
                  - Differenzkalorimetrie

### ● Was sind Chaperones und was ist ihre Aufgabe?

Chaperones sind Hilfsproteine und unterstützen die Proteine bei der korrekten Faltung. Sie verhindern Aggregation und helfen aus energetischen Fallen. Sie wirken unter Energieverbrauch. Chaperones erkennen exponierte hydrophobe Bereiche. Chaperones werden bei Stress wie z.B. Hitze vermehrt exprimiert. Deshalb werden sie auch als Hitze-Schutz-Proteine (HSP) bezeichnet.

Kleinen:	HSP70:	in E. coli; Eukaryonten
	HSP90:	
Große:	HSP60:	in E. coli

### ● Prionen-Krankheiten

- BSE (bovine spongiforme Enzephalitis)
- nvCJD (neue Version der Creutzfeld-Jacob Krankheit)

### ● Welche Probleme können bei der Proteinexpression von eukaryotischen Genen in E. coli auftreten und wie können diese gelöst werden?

E. coli kann viele eukaryotische Proteine nicht korrekt falten. E. coli hat andere Chaperones, keine Signal Recognition Particle → keine PTMs in rER. Zu wenig oxidierend.

1. Inclusion Bodies (Präzipitat-Klumpen aus rekombinanten Proteinen)
2. Mechanische Isolierung der Inclusion Bodies
3. Auflösen der Inclusion Bodies mithilfe von Harnstoff, Thioharnstoff oder Gu-HCl
4. Renaturierung der Proteine durch langsames Entfernen/Verdünnen des chaotropen Agens in Gegenwart katalytischer Mengen an 2-ME.
5. Refolding

### ● Was können Sie über PrP<sup>Sc</sup> erzählen?

PrP steht für Prionen-Protein. PrP<sup>C</sup> steht für zelluläres Prionen-Protein und ist die ungefährliche Variante. PrP<sup>Sc</sup> ist die gefährliche Scrapie-Form.

### ● Welche Kräfte sind für das Zusammenhalten der Proteine verantwortlich? Beschreiben Sie den zeitlichen Ablauf der Proteinfaltung!

Kräfte:

- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Polare Wechselwirkungen
- Van-der-Waal Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrücken
- Hydrophobe Wechselwirkungen

Ablauf:

1. Rasche und reversible Ausbildung von Sekundärstrukturen
2. Kooperative Aggregation der Faltungsnuklei führt zur Ausbildung stabilerer Strukturen
3. Langsamer Übergang vom "Molten Globule" zum fertigen Protein

● **Was versteht man unter einem degenerierten Primer?**

Degenerierte Primer werden dann eingesetzt, wenn man die zu amplifizierende DNA nicht kennt und ihre Sequenz z.B. aus einer Aminosäure abgeleitet wurde. Die Aminosäure Valin wird z.B. von vier verschiedenen Basentriplets codiert.

G U N =      G U U  
                   G U C  
                   G U A  
                   G U G

● **Wie läuft die Translation bei Prokaryonten ab?**

Initiation: Die Initiation umfasst alle Prozesse, die zur Assemblierung des Ribosoms (80S oder 70S) führen.

Elongation: Die Elongation ist die eigentliche Proteinsynthese.

Termination: Sobald das Ribosom ein Stoppcodon auf der mRNA erreicht hat, wird die Termination eingeleitet. Das neue Protein und die mRNA werden freigesetzt, das Ribosom dissoziiert.

● **Welche Gemeinsamkeiten und welche Unterschiede gibt es bei der Proteinbiosynthese zwischen Eukaryonten und Prokaryonten?**

	Prokaryonten	Eukaryonten
<b>Initiation</b>	fMET	Met
	AUG	AUG
		CAP
		Poly-A-Tail
<b>Elongation</b>	EF-Tu	EF-1
	EF-G	EF-2
<b>Termination</b>	3 RFs	1 RF

fMET...Formylmethionin

MET...Methionin

AUG...Startcodon, codiert für Methionin

CAP...5'-Cap; posttranslationelle Modifikation

Poly-A-Tail...bei der eukaryontischen mRNA werden Adenin-Nukleotide am 3'-Ende angehängt

EF-Tu...Elongationsfaktor; gehört zur Gruppe der G-Proteine; GTP-Form aktiv; transportiert

Aminoacyl-tRNA zur A-Stelle

EF-G...Elongationsfaktor G; erhöht die Translationsgeschwindigkeit

EF-1...Elongationsfaktor; entspricht dem EF-Tu

EF-2...ist während der eukaryotischen Proteinbiosynthese an der Translokation beteiligt

RF...Release Factor; erkennt ein Stoppcodon und bewirkt die Freisetzung des vollständigen Proteins

● **Wie kann ein Protein posttranslational modifiziert werden?**

1. Proteolytische Prozessierung und limitierte Proteolyse

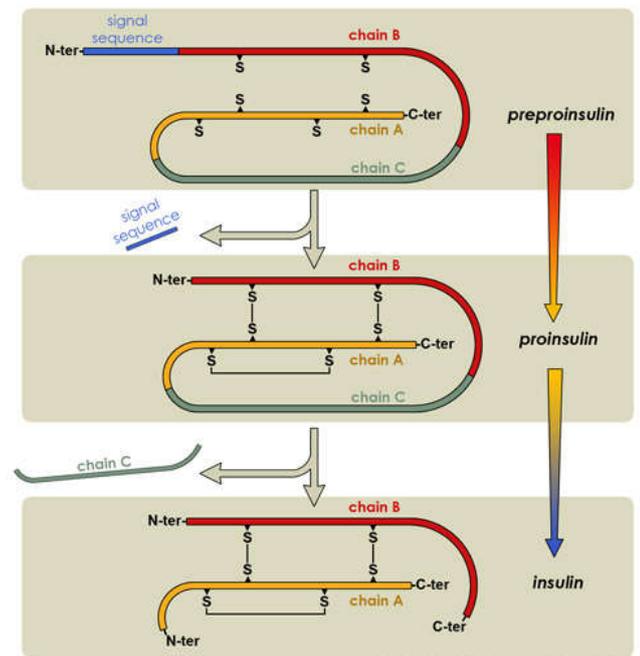
Alle Proteine enthalten unmittelbar nach der Translation ein aminoterminal Methionin. Diese Aminosäure wird bei den meisten Proteinen durch eine spezifische Aminopeptidase entfernt. Peptidhormone wie z.B. Insulin werden aus Vorläufermolekülen durch proteolytische Schnitte hergestellt.

- 2. Hydroxylierung: Lysin- und Prolinreste des Kollagens werden hydroxyliert und so stabilisiert.
- 3. Carboxylierung: Die Carboxylierung von Glutamatresten ist für die Funktion einiger Calcium-bindender Proteine (z.B. Blutgerinnungsfaktoren) essentiell.
- 4. Phosphorylierung: Viele Enzyme werden durch reversible Phosphorylierung reguliert.
- 5. Glykosylierung: Membranständige und sezernierte Proteine werden mit Oligosacchariden verknüpft.
- 6. Acetylierung: Acetylierung am N-Terminus schützt ein Protein vermutlich vor Abbau. Acetylierung von Histonen dient der Regulation der Chromatinstruktur.
- 7. Acylierung: Kopplung mit Myristin- oder Palmitinsäure ermöglicht dem Protein die Bindung an die Zellmembran.
- 8. Isoprenylierung: Ermöglicht die Bindung des Proteins an jegliche Art von Membran.

● **Was geschieht mit dem Präproinsulin?**

Insulin besteht aus einer A- und einer B-Kette, die über Disulfidbrücken zusammenhängen. Am rauhen ER entsteht Präproinsulin, aus dem durch Abspaltung des Signalpeptids Proinsulin wird. Aus Proinsulin entsteht durch Abspaltung des C-Peptids das reife Hormon Insulin.

- 1. Abspaltung des Signalpeptids
- 2. Faltung im ER
- 3. Prozessierung im Golgi-Apparat = Abspaltung des C-Peptids



● **Was sind sogenannte "tight junctions"?**

Tight Junctions dienen Epithel- und Endothelzellen als Diffusionsbarriere zwischen Körperinneren und -äußerem. Tight Junctions halten durch die Diffusionbarriere auch Membranmoleküle in ihrem Bereich der Membran.

• **Welche Marker für die Sortierung der Proteine im Endomembranweg kennen Sie?**

Signal Patches: Besteht aus Aminosäuren, diese müssen in der Primärsequenz nicht unmittelbar nebeneinander liegen, jedoch sind diese nah beieinander, wenn das Protein gefaltet ist. Werden aus dem fertigen Protein nicht mehr entfernt.

Lysosomale Enzyme: - Unbekannte Patches bewirken Bildung von Mannose-6-Phosphat  
 - M-6-P bindet an M-6-P-Rezeptor  
 - Der M-6-P-Rezeptor ist verantwortlich für den Transport zu den Lysosomen.  
 - Ein Defekt der Phosphorylierung führt zu lysosomalen Speicherkrankheiten.  
 - M6P ist Teil eines N-Glykans

Polarisierte Zellen: Dazu gehören z.B. die Endothelzellen. Diese können zwischen "apikal" und "basolateral" unterscheiden. Befindet sich zwischen den extrazellulären Räumen (tight junctions).

• **Was ist das besondere daran, wenn Proteine zu Mitochondrien transportiert werden?**

Die Proteine müssen, bevor sie in die Mitochondrien transportiert werden können, wieder entfaltet werden.

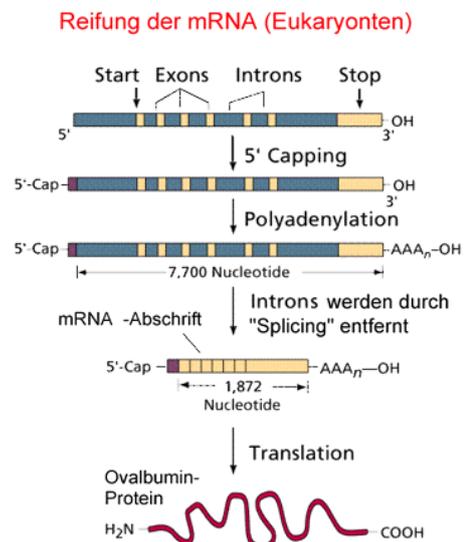
• **Was geschieht nach dem Ende mit einem Protein?**

- Abbau in Lysosomen durch Proteasen wie z.B. Asialo.Glykoprotein-Rezeptor
- Abbau im Cytosol durch Proteasomen nach Markierung mit Ubiquitin
- Die Halbwertszeit eines Proteins ist abhängig von der N-terminalen Aminosäure. Bei Methionin, Alanin, Glycin, Serin und Threonin beträgt die Halbwertszeit über 20 Stunden. Bei Arginin und Lysin weniger als 2 Minuten.
- Die Halbwertszeit ist außerdem abhängig von dem Vorhandensein von PEST-Sequenzen (Prolin, Glutamat, Serin und Threonin).

• **Wie ist die eukaryotische mRNA aufgebaut? Wie schaut sie vor dem Reifen aus und wie danach?**

Die mRNA von Eukaryonten ist monocistronisch (1 Gen pro Promoter). Vor der Reifung besteht die eukaryotische mRNA aus einem Start-Codon, einem Stop-Codon und Introns und Exons. Introns sind nicht-kodierende Sequenzen innerhalb der mRNA die durch Splicen entfernt werden. Die mRNA wird mit einem 5'-Cap und einem 3'-Poly-A-Tail versehen.

mRNA	reife mRNA
Start-Codon	5'-Cap
Introns	Exons
Exons	3'-Poly-A-Tail
Stop-Codon	



- Was hat ein therapeutisches Protein mit der PEST-Sequenz zu tun? Warum sollten PEST-Sequenzen vermieden werden?

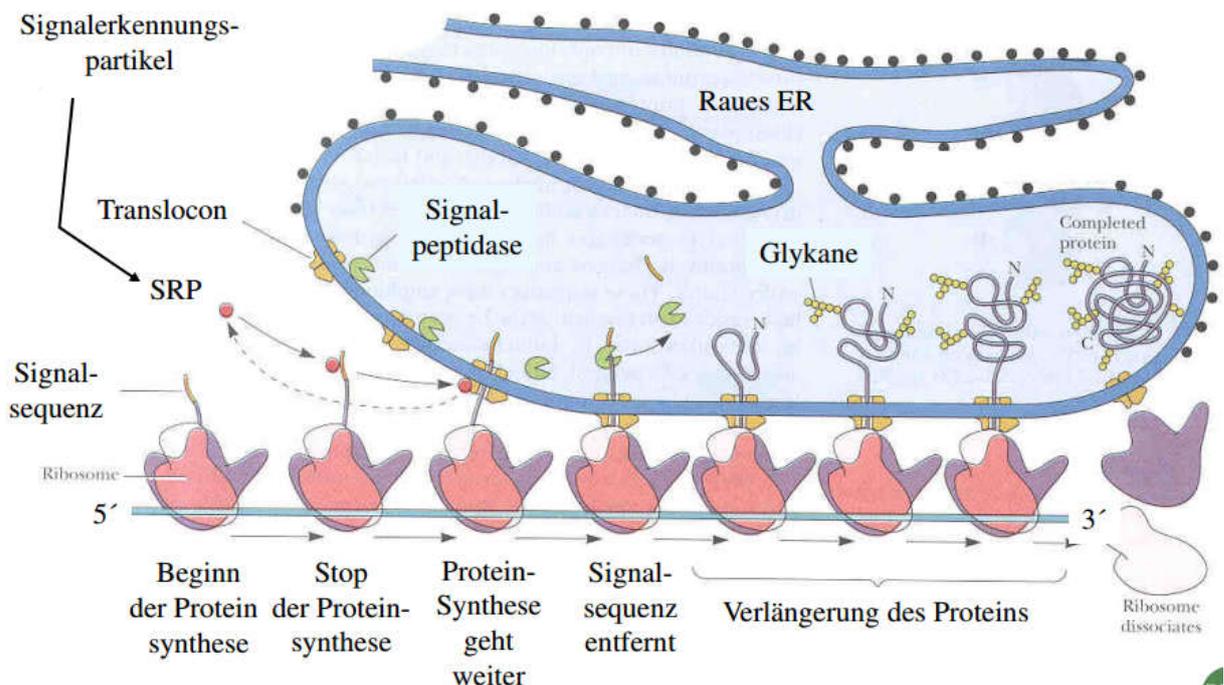
PEST-Sequenzen sind Teile von Proteinen, die besonders reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind, welches zu einer geringeren Halbwertszeit des gesamten Proteins führt und damit zu einem schnelleren Abbau im Proteasom. PEST-Sequenzen sollten bei therapeutischen Proteinen vermieden werden um die Wirkungsdauer nicht zu verringern.

- Was ist die Funktion eines Signalpeptids bei einem eukaryotischen Protein? Was erwarten Sie, wenn Sie das gesamte Protein in Bakterien (z.B. E. coli) exprimieren?

Die kleine ribosomale Untereinheit bindet an das 5'-terminale Ende der mRNA, wann immer sie mit ihr in Berührung kommt und egal welches Protein diese mRNA kodiert. Anschließend lagert sich die große ribosomale Untereinheit an. Die Ribosomen beginnen nun mit der Proteinsynthese (Translation) vom Amino-Ende her. Allerdings bedarf es, bevor ein Ribosom seine Arbeit aufnimmt, neben Aminosäuren noch bestimmte Kofaktoren.

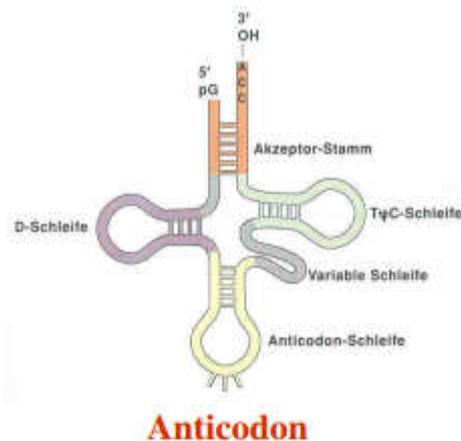
Prinzipiell kann jedes Ribosom jede mRNA translatieren. Membrangebundene Ribosomen können diese Position aufgeben und als freie Ribosomen weiterarbeiten und umgekehrt. Der Unterschied hängt lediglich von einer Signalsequenz der jeweiligen mRNA ab. Ist eine solche Sequenz vorhanden, dann wird ein Ribosom zur Arbeit an einer Membranoberfläche des rauen engagiert, fehlt sie, so arbeitet das Ribosom frei im Zytosol.

Posttranslationelle Modifikationen, wie wir sie von Sekret- und Membranproteinen kennen, treten an den freien Ribosomen gebildeten Proteinen fast nicht auf. Wenn also eine mRNA mit einer Signalsequenz von einem Bakterium translatiert wird, kann diese nicht ins raue ER transportiert werden. Posttranslationelle Modifikationen, die im rauen ER stattfinden und für die Funktion des Proteins wichtig sein könnten, fehlen dann.



● **Beschreiben Sie die Struktur, Entstehung und Aufgabe einer Acyl-tRNA!**

tRNAs übersetzen den genetischen Code der mRNA in eine Peptidsequenz. Sie enthalten zahlreiche Nicht-Standard-Basen und werden durch spezielle tRNAsen aus pre-tRNA gebildet. Methionin ist die einzige Aminosäure mit zwei tRNAs. Eine tRNA für die Verlängerung und eine für die Initiation. Die Aminoacyl-tRNA-Synthase erkennt bestimmte Stellen der jeweiligen tRNA.



● **Woher kommt die Energie für die Proteinbiosynthese? Mittels welcher Substanzen und bei welchen Schritten wird die benötigte Energie eingebracht?**

- Initiation: ● An IF-2 ist GTP gebunden. Durch Hydrolyse von GTP wird IF-2 freigesetzt, welches zur Bildung des 70S-Initiationskomplex führt.
- Elongation: ● Bei der Beladung der tRNA mit Aminosäuren wird ATP verbraucht. Aus ATP und einer Aminosäure entsteht eine AMP-Aminosäure.  
 ● Der Elongationsfaktor G (EF-G) verschiebt tRNAs und mRNA, wodurch die deacylierte tRNA zur E-Stelle wandert. Dort angelangt, kann sie frei ab dissoziieren und damit den Zyklus abschließen. Während der Translokation wird GTP verbraucht.  
 ● Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) benötigt für seine Aktivität GTP. EF-Tu bindet die Aminoacyl-tRNA nur in seiner GTP-Form und gibt sie in seiner GDP-Form an das Ribosom ab. Die Bindung von EF-Tu an die Aminoacyl-tRNA erfüllt zwei Funktionen. Erstens schützt EF-Tu die empfindliche Esterbindung in der Aminoacyl-tRNA vor einer Hydrolyse und zweitens wird das GTP im EF-Tu zu GDP hydrolysiert, wenn sich der richtige Komplex zwischen EF-Tu, Aminoacyl-tRNA und Ribosom gebildet hat. Ist das Anticodon nicht richtig mit dem Codon gepaart, findet keine Hydrolyse statt und die Aminoacyl-tRNA wird nicht auf das Ribosom übertragen. Über diesen Mechanismus kann die freie Enthalpie der GTP-Hydrolyse zur Genauigkeit der Proteinsynthese beitragen.
- Termination: Der Release Factor 3 (RF-3) benötigt GTP um den Komplex aufzulösen.

● **Was ist eine Wobble-Paarung?**

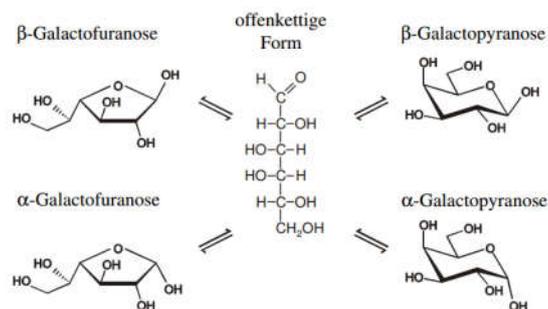
Zwischen dem letzten Nukleotid im Codon und dem erstem Nukleotid im Anticodon kann es auch zu einer "Nicht-Watson-Crick" Paarung kommen. Die Wobble-Hypothese erlaubt eine reduzierte Anzahl an tRNAs.

• Sie haben ein für die Anti-Aging-Ernährung höchst interessantes pflanzliches Glykosid entdeckt. Was müssen Sie alles herausfinden, um den Zuckerteil vollständig zu charakterisieren?

- Ketose oder Aldose
- Triose, Tetrose, Pentose oder Hexose
- Anordnung der Hydroxyl-Gruppen (Glukose, Mannose, Galaktose, ...)
- D- oder L-Form
- $\alpha$ - oder  $\beta$ -Monomer

• Was verstehen Sie unter den süßen Fünf?

Die möglichen Formen eines Monosaccharides.



• Welche Möglichkeiten findet eine Hexose sich an die gleiche Hexose anzuhängen?

Der Zucker kann mit jeder der 4 OH-Gruppen eine glykosidische Bindung eingehen mit der Option zu  $\alpha$  oder  $\beta \Rightarrow 8$  Möglichkeiten.

• Was ist der Unterschied zwischen Homopolymer und Heteropolymer?

Glykane können aus einer Art von Monosaccharid aufgebaut sein z.B. Zellulose, Amylose, Amylopektin und Inulin. Man spricht dann von Homopolymeren.

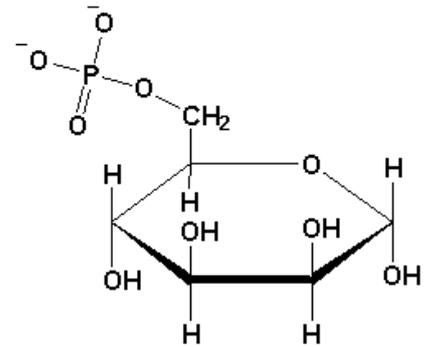
Glykane können aber auch aus verschiedenen Monosaccharid aufgebaut sein z.B. Hyaluronsäure, Alginat. Diese werden als Heteropolymere bezeichnet.

• Was ist GlcNAc? Wo kommt es häufig vor und wo weniger häufig?

N-Acetylglucosamin ist ein Monosaccharid und ein Derivat der D-Glucose, das an der Position 2 des Ringes einen acetylierten Aminrest besitzt. Polymerisiert mit Glucuronsäure bildet es Hyaluronsäure, welche zu den Glykosaminoglykanen bzw. Heteroglykanen gehört. N-Acetylglucosamin ist zusammen mit N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Diese wird auch Peptidoglycan genannt. N-Acetylglucosamin ist weiterhin die Monomereinheit des Polymers Chitin, aus welchem die äußeren Hüllen von Insekten und Krebsen aufgebaut sind. Natürlich im Körper vorkommendes D-Glucosamin ist Bestandteil des Knorpels. Genauer ist das N-Acetyl-D-Glucosamin Teil in der Polysaccharidkette der Hyaluronsäure. Als gemeinsames Merkmal aller Blutgruppen kommt es als N-Acetylglucosamin in der Glycocalix der Erythrocyten vor.

• **Zeichnen Sie die Strukturformel von Mannose-6-Phosphat! Welche Aufgabe hat es in der Zelle?**

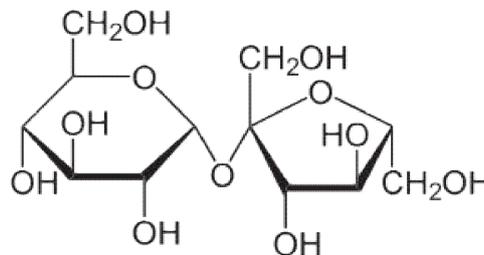
Proteine mit einem Mannose-6-Phosphat-Rest werden in die Lysosomen transportiert. Die im rER produzierten Hydrolasen tragen Oligosaccharide mit mehreren an Stickstoff gebundenen Mannose-Resten. Diese Mannose-Reste werden im cis-Golgi-Netzwerk phosphoryliert. Membranständige M6P-Rezeptoren des trans-Golgi-Netzwerkes binden an die M6P-Einheiten der Enzyme und sorgen für die Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln, die den aus Enzym-M6P und M6P-Rezeptor gebildeten Komplex beinhalten. Die Vesikel verschmelzen danach mit Endolysosomen und verlieren dabei ihre Clathrinhülle. Durch den niedrigen pH-Wert im Lysosom wird der Komplex wieder zerstört und der Phosphatrest von der Mannose abgespalten. Die freigesetzten M6P-Rezeptoren werden über Vesikel wieder zurück in das trans-Golgi-Netzwerk transportiert, wo sie wieder für den Enzymtransport zu Verfügung stehen.



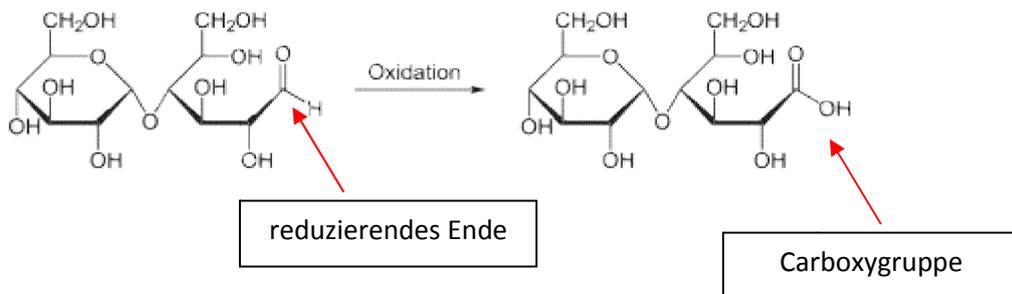
**Mannose-6-Phosphate**

• **Haben die an Glykoproteine gebundenen Oligosaccharide eine reduzierende Wirkung?**

Als reduzierende Zucker bezeichnet man Mono-, Di- oder Oligosaccharide, deren Moleküle in Lösung eine freie Aldehydgruppe besitzen. Im Fall von Einfachzuckern nennt man diese Aldosen. Auch Ketosen können reduzierend wirken, wenn sie in  $\alpha$ -Stellung eine Hydroxygruppe aufweisen. Bei Oligosacchariden liegt am reduzierenden Ende die zyklische und die offenkettige Form in Lösung im Gleichgewicht vor. Die offenkettige Form kann reduzierend wirken sofern sie eine freie Aldehyd- oder Ketogruppe hat. Saccharose z.B. besteht aus Glucose und Fruktose, welche über eine  $\alpha, \beta$ -1,2-glycosidische Bindung verbunden sind. Weil seine Moleküle in Lösung durch die 1,2-Verbindung beider anomeren C-Atome keine freie Aldehydfunktion besitzen ist Saccharose ein nicht-reduzierender Zucker.



Bei Maltose bildet sich am nicht reduzierenden Ende ein Acetal, während das anomere Zentrum des zweiten Bausteins frei bleibt und damit als reduzierendes Ende dient.



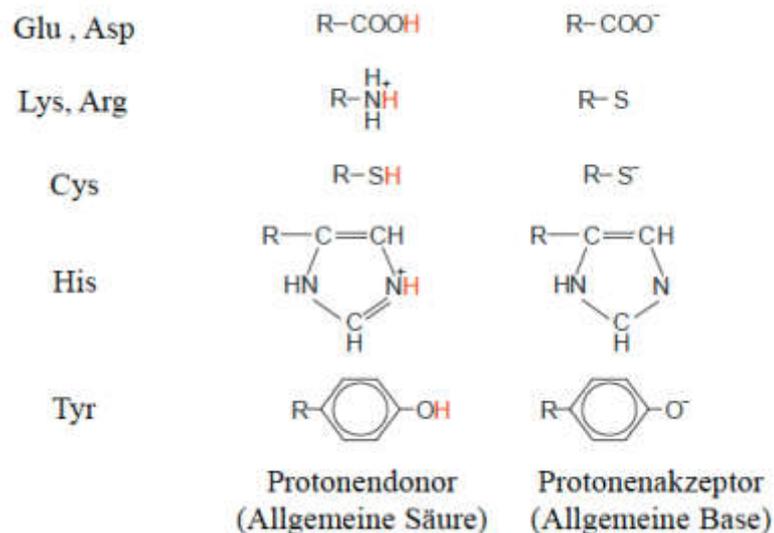
Oligosaccharide, die an Glykoproteine gebunden sind, haben nur eine reduzierende Wirkung, wenn sich am reduzierenden Ende eine freie Aldehydgruppe befindet bzw. eine Ketose mit einer Hydroxygruppe in  $\alpha$ -Stellung.

• Was versteht man unter einer "allgemeinen Säure"? Um welche Stoffe handelt bzw. Gruppen kann es sich dabei in der Biochemie handeln?

Eine allgemeine Säure ist eine Substanz, die ein Proton abgeben kann.

Eine allgemeine Base ist eine Substanz, die ein Proton aufnehmen kann.

Die allgemeine Säure-Base-Katalyse führt oft zu Verstärkung der Azidität oder Basizität von H<sub>2</sub>O.



• Biotin spielt bei CO<sub>2</sub>-Transfers eine wichtige Rolle. Es ist dabei kovalent an ein Enzym gebunden. Daher bildet es eine sogenannte Prostethische-Gruppe. Welcher spezielle Mechanismus der enzymatischen Katalyse wird durch Biotin ermöglicht?

Es handelt sich um eine kovalente Katalyse mithilfe eines Coenzym. Vor der Addition an den Stickstoff des Biotins wird das CO<sub>2</sub>, welches als Hydrogencarbonat vorliegt, mit ATP in eine aktive Form, das Carboxyphosphat, ein gemischtes Anhydrid der Phosphor- und Kohlensäure, überführt. Als prosthetische Gruppe ist Biotin fest an einen Lysinrest des Enzyms gebunden. Die Einheit (auch Biocytin genannt) fungiert als eine Art Drehscheibe, über welche die Pyruvatbindungsstelle bedient werden kann. Das Pyruvat ist dort in seiner Enolform gebunden, was direkt die unmittelbare Übernahme des CO<sub>2</sub>-Restes ermöglicht. Die Reaktion zeigt beispielhaft den Einsatz und die Regenerierung einer prosthetischen Gruppe an ein und demselben Enzym.

• Was wäre zur Metallionenkatalyse anzumerken?

Metallionen können auf verschiedene Weise katalytisch wirken. Beispielsweise erleichtert ein Metallion durch direkte Koordination die Bildung von Nucleophilen wie Hydroxidionen. Bei der von der Carboanhydrase katalysierten Reaktion dient beispielsweise ein Zn<sup>2+</sup>-Ion diesem Zweck. Ein Metallion kann auch eine Brücke zwischen Enzym und Substrat bilden und so die Bindungsenergie erhöhen. Diesen Mechanismus findet man bei Myosinen sowie bei fast allen Enzymen, denen ATP als Substrat dienen.

### ● Beschreiben Sie die Säure-Base-Katalyse!

Bei der allgemeine Säure-Base-Katalyse besitzt ein anderes Molekül als Wasser die Funktion eines Protonendonators oder -akzeptors. Bei Chymotrypsin ist der basische Katalysator ein Histidinrest, der den nucleophilen Charakter eines Serinrestes verstärkt. Bei Myosinen fördert eine Phosphatgruppe des Substrats ATP die eigene Hydrolyse.

### ● Was gibt es zur Substratbindungsstelle zu sagen? Welche Aufgaben erfüllt diese und welche Mechanismen sind beteiligt?

Das aktive Zentrum ist der Teil eines Enzyms, welcher das spezifische Substrat bindet und in das Produkt überführt. Das aktive Zentrum besteht aus dem eigentlichen katalytischen Zentrum, das relativ unspezifisch ist und der Substratbindungsstelle, welche für die Spezifität des Enzyms verantwortlich ist. Normalerweise treten nur einige wenige Aminosäurereste im aktiven Zentrum direkt mit dem Substrat in Wechselwirkung. Der Rest des Proteinmoleküls dient dazu, diese wenigen Reste in die geeignete Anordnung zu bringen. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren können bei Abwesenheit des Substrats in beträchtlichem Abstand voneinander liegen. Sie werden durch Konformationsänderungen ins Spiel gebracht, die durch die Bindung des Substrats induziert werden.

Mechanismen:

- Entropieverkleinerung durch Reduzierung der Möglichkeiten zur Bewegung und Drehung des Substrats.
- Desolvatisierung: Bei Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes wird das Hydratwasser "heraus gedrängt". Dies erhöht die Reaktionsfähigkeit.
- Destabilisierung durch elektrostatische Abstoßung. In der hydrophoben Bindungstasche wirken elektrostatische Kräfte. Entgegengesetzte Ladungen erhöhen die Bindungsenergie. Gleiche Ladungen führen zur Verformung des Substrats.
- Bevorzugte Bindung des Übergangszustands. Ein Teil der Bindungsenergie wird dazu verwendet, um das Substrat in den Übergangszustand zu bringen. Dies senkt die Aktivierungsenergie.
- Allgemeine Säure-Base-Katalyse: Dabei besitzt ein anderes Molekül als Wasser die Funktion eines Protonendonators oder -akzeptors. Bei Chymotrypsin ist der basische Katalysator ein Histidinrest, der den nucleophilen Charakter eines Serinrestes verstärkt. Bei Myosinen fördert eine Phosphatgruppe des Substrats ATP die eigene Hydrolyse.
- Kovalente Katalyse: Das aktive Zentrum enthält eine reaktive Gruppe die im Verlauf der Katalyse temporär kovalent an ein Teil des Substrats gebunden wird. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist das proteolytische Enzym Chymotrypsin
- Metallionen-Katalyse: Metallionen können auf verschiedene Weise katalytisch wirken. Beispielsweise erleichtert ein Metallion durch direkte Koordination die Bildung von Nucleophilen wie Hydroxidionen. Bei der von der Carboanhydrase katalysierten Reaktion dient beispielsweise ein  $Zn^{2+}$ -Ion diesem Zweck. Ein Metallion kann auch eine Brücke zwischen Enzym und Substrat bilden und so die Bindungsenergie erhöhen. Diesen Mechanismus findet man bei Myosinen sowie bei fast allen Enzymen, denen ATP als Substrat dienen.

• **Was versteht man unter einer exergonischen oder einer endergonischen Reaktion?**

Eine chemische Reaktion ist endergonisch, wenn sie nicht freiwillig, sondern nur unter Energiezufuhr abläuft. Die Gibbs-Energie  $\Delta G$  dieser Reaktion ist größer null.

Eine chemische Reaktion ist exergonisch, wenn sie freiwillig abläuft. Die Gibbs-Energie  $\Delta G$  dieser Reaktion ist kleiner null.

Wenn die Gibbs-Energie gleich 0 ist, dann ist die Reaktion im Gleichgewicht.

• **Wie können endergonische Reaktionen trotzdem ablaufen?**

Durch energetische Kopplung mit einer exergonischen Reaktion z.B. Hydrolyse von ATP oder GTP.

• **Wie wirkt sich die freie Enthalpie auf Enzyme aus?**

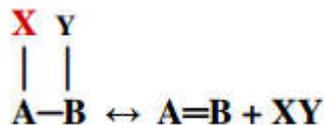
Die freie Energie wird auch als Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) bezeichnet. Die meisten biochemischen Reaktionen würden ohne Enzyme nur mit vernachlässigbarer Geschwindigkeit ablaufen. Wie bei jeder spontan ablaufenden Reaktion muss die freie Reaktionsenthalpie ( $\Delta G$ ) negativ sein. Das Enzym beschleunigt die Einstellung des chemischen Gleichgewichts ohne das Gleichgewicht zu verändern. Die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms beruht einzig auf seiner Fähigkeit, in einer chemischen Reaktion die Aktivierungsenergie zu senken.

Die Änderung der freien Enthalpie liefert Informationen über die Spontanität einer Reaktion, aber nicht über ihre Geschwindigkeit.

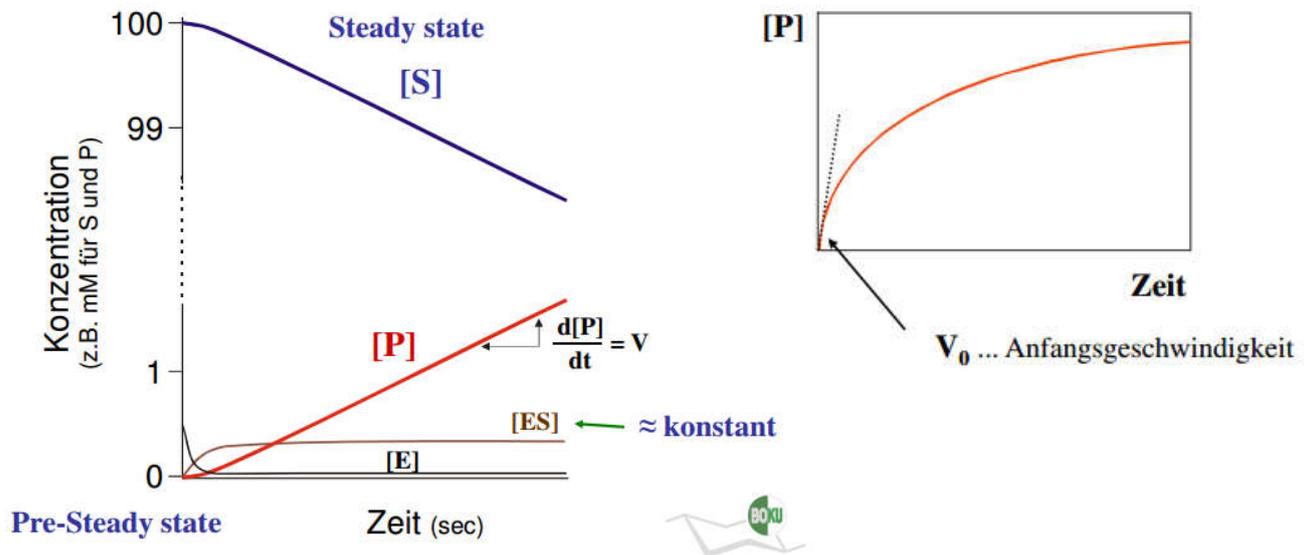
- $\Delta G < 0$ : exergone Reaktion, die unter den gegebenen Bedingungen freiwillig abläuft
- $\Delta G = 0$ : Gleichgewichtssituation, Hin- und Rückreaktion laufen in gleichem Maße ab.
- $\Delta G > 0$ : endergone Reaktion, deren Ablauf in der angegebenen Richtung Energiezufuhr erfordern würde.

• **Was sind Lyasen?**

Lyasen sind Enzyme der vierten Enzymklasse. Sie fügen Gruppen zu Doppelbindungen hinzu bzw. eliminieren Gruppen unter Bildung einer Doppelbindung. Beispiele: Aldolase (Glykolyse), Fumarase (Citratzyklus).



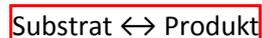
- Beschreiben Sie den zeitlichen Ablauf einer Enzymreaktion. Wann kommt eine Enzymreaktion zum Stillstand?



Am Anfang sind wenig Substrate an Enzyme gebunden. Durch den niedrigen Anteil an Enzym-Substrat-Komplexen ist auch die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  niedrig. Je mehr Substrat schließlich an Enzyme binden, desto schneller wird dann auch die Reaktionsgeschwindigkeit, bis die maximale Reaktionsgeschwindigkeit schließlich erreicht worden ist.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes.

Die Enzymreaktion kommt zum Stillstand, wenn der Gleichgewichtszustand erreicht worden ist. Die Hin- und Rückreaktion verläuft dann gleich schnell. Die Lage des Gleichgewichts ist abhängig von  $\Delta G^0$ .



- Wie hängen  $v_{max}$  und  $k_{cat}$  zusammen?

$$v_{max} = k_{cat} \times [E_t] \rightarrow k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_t]}$$

$E_t$  ... Enzymgesamtkonzentration

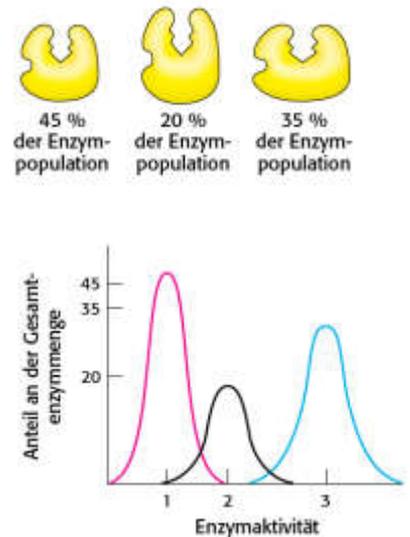
$v_{max}$  ... Maximalgeschwindigkeit

$k_{cat}$  ... katalytische Konstante

● Was ist der Unterschied zwischen Enzymaktivität und spezifischer Enzymaktivität?

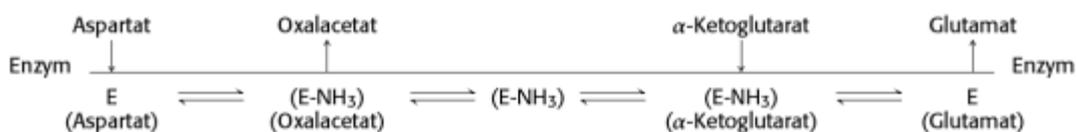
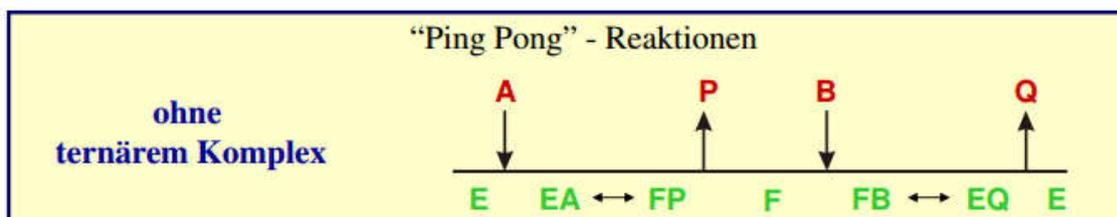
Vieles von dem, was wir bislang über Enzyme in Erfahrung gebracht haben, ergab sich aus Gesamtanalysen, die man im Englischen als "ensemble studies" bezeichnet. Gesamtanalysen gehen von der grundlegenden Annahme aus, dass alle Enzyme gleich oder zumindest sehr ähnlich sind. Wird in solchen Untersuchungen eine Enzymeigenschaft wie der  $K_M$ -Wert bestimmt, so handelt es sich bei dem erhaltenen Wert zwangsläufig um einen Durchschnittswert aller in der Lösung vorhandenen Enzyme. Molekulare Heterogenität - also die Fähigkeit eines Moleküls, im Laufe der Zeit mehrere verschiedene, unterschiedlich stabile Strukturen einzunehmen - gehört jedoch nachweislich zu den inhärenten Eigenschaften sämtlicher großen Biomoleküle.

Die Abbildung zeigt ein Enzym, das eine molekulare Heterogenität zeigt: Es gibt drei aktive Formen, welche dieselbe Reaktion katalysieren, allerdings in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Jede Form stellt von der gesamten Enzymmenge den angegebenen Anteil. Würden wir experimentell anhand einer Gesamtanalyse die Enzymaktivität bei bestimmten Bedingungen ermitteln, so erhielten wir einen einzelnen Wert, der dem Durchschnittswert der heterogenen Zusammensetzung entspräche. Würden wir hingegen eine ausreichende Zahl von Einzelmolekülexperimenten durchführen, so würde dabei ans Licht kommen, dass es von diesem Enzym drei verschiedene Molekülformen mit sehr unterschiedlichen Aktivitäten gibt. Überdies würde sich mit ziemlicher Sicherheit herausstellen, dass diese verschiedenen Formen mit bedeutenden biochemischen Abweichungen einhergehen.



● Was bezeichnet man als Ping-Pong-Effekt in der Biochemie?

Ping-Pong-Reaktionen kommen bei Bisubstratreaktionen ohne ternärem Komplex vor. Durch die Bindung des Substrats A kommt es zur kurzweiligen Modifikation des Enzyms. Das kurzweilig modifizierte Enzym kann nun die Reaktion des Substrats B katalysieren. Das Enzym liegt am Ende wieder in normaler Form vor. Als Beispiel dient das Enzym Aspartat-Aminotransferase. Dieses Enzym katalysiert die Übertragung einer Aminogruppe von Aspartat auf  $\alpha$ -Ketoglutarat. Nachdem Aspartat an das Enzym gebunden hat, übernimmt das Enzym die Aminogruppe des Aspartats und bildet das substituierte Enzym-Zwischenprodukt. Daraufhin wird Oxalacetat als erstes Produkt freigesetzt. Das zweite Substrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, bindet an das Enzym, übernimmt die Aminogruppe von dem modifizierten Enzym und wird dann als das Endprodukt Glutamat freigesetzt.

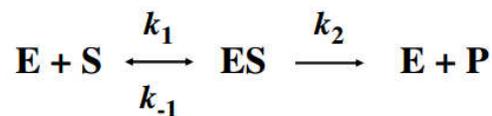


- Mit welchen Substraten würden Sie die enzymatische Aktivität eines Proteins testen, das Sequenzhomologie zu Phosphodiesterasen hat?

Phosphodiesterasen bauen die second messenger cAMP und cGMP zu AMP und GMP ab. Die Aktivität würde ich daher zuerst mit cAMP und cGMP testen.

- Aus welcher elementaren biochemischen Gleichung ist die folgende Gleichung abgeleitet und welchen Zustand beschreibt sie?

$$k_1 \times [E] \times [S] = k_2 \times [ES] + k_{-1} \times [ES]$$



Die Gleichung wurde aus der oberen biochemischen Gleichung abgeleitet und beschreibt den "Steady-State", bei dem die Bildung und der Zerfall von [ES] konstant ist. Durch entsprechendes Umformen der Gleichung erhält man die Michaelis-Menten-Konstante.

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

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

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

$$[E] \cdot [S] = K_M \cdot [ES]$$

Michaelis-Konstante:

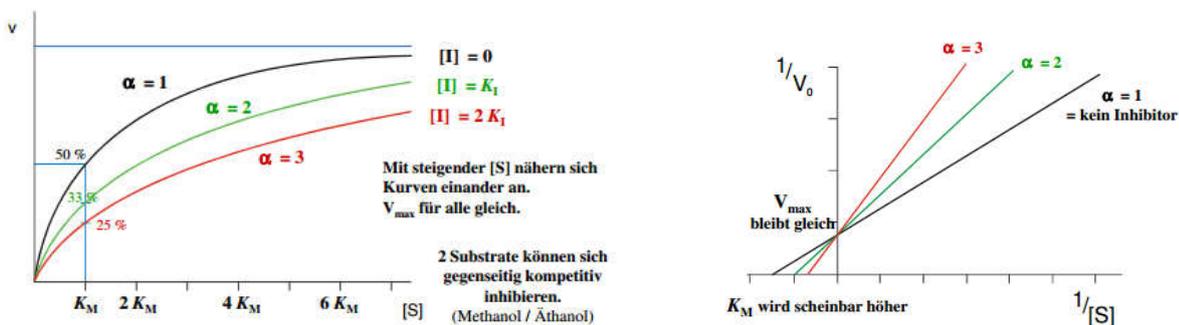
$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_M$$

- Was beschreibt folgende Gleichung und wofür steht  $\alpha$ ?

$$v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{[S] + K_M \times \alpha}$$

Diese Gleichung beschreibt die kompetitive Inhibition eines Enzyms. Wenn  $\alpha = 1$  findet keine Inhibition statt. Je höher  $\alpha$  ist, desto stärker wird die Enzymreaktion gehemmt. Ein kompetitiver Inhibitor erhöht den  $K_M$ -Wert, lässt aber  $v_{max}$  unverändert. Eine kompetitive Enzymhemmung kann also durch Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden.



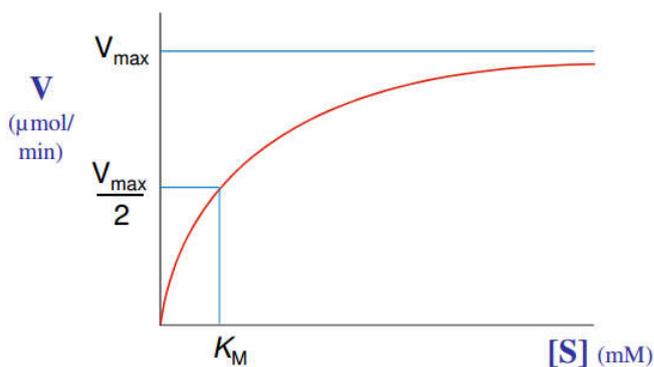
- Was steckt hinter dieser Formel und was ist das besondere an der Gleichsetzung?

$$\Delta G^{0'} = -R \times T \times \ln (K_{eq})$$

Die Lage des Gleichgewichts ist abhängig von  $\Delta G^{0'}$

- Beschreiben Sie den Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion und der Substratkonzentration. Mit Worten, Diagramm und Formeln!

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion hängt unter den Bedingungen einer Michaelis-Menten-Kinetik von der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich durch Erhöhung der Substratkonzentration steigern, allerdings nur bis zu der Konzentration, bei der alle Enzymmoleküle als Enzym-Substrat-Komplexe vorliegen. Bei dieser Substratkonzentration läuft die Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit  $v_{\max}$  ab. Die Kurve ergibt eine Hyperbel. Die maximale Geschwindigkeit  $v_{\max}$  einer enzymkatalysierten Reaktion hängt von der Enzymkonzentration ab.

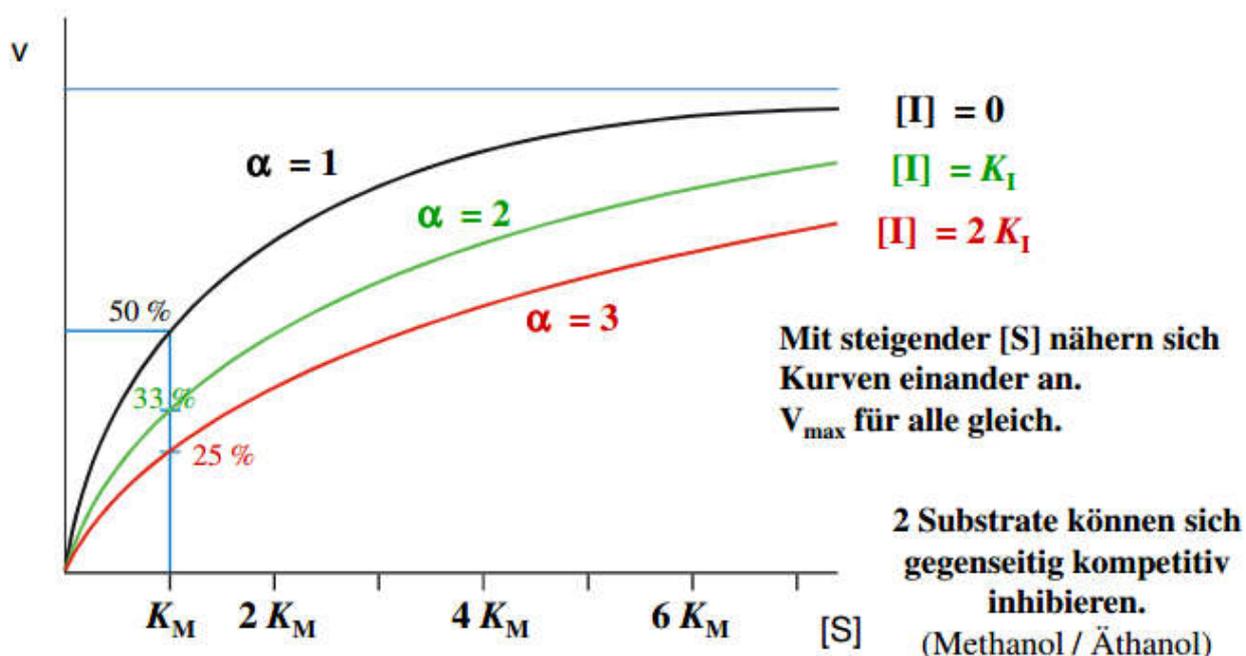


$$v_0 = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E_t]$$

- Bei einer Methanol-Vergiftung Ethanol als Gegengift nehmen, wieso könnte das funktionieren? An welchem biochemischen Parameter könnte man ablesen ob das wirkt?

Stichwort kompetitive Inhibition eines Enzyms. Die zwei Substrate Methanol und Ethanol können sich gegenseitig kompetitiv inhibieren. Giftig sind die Abbauprodukte von Methanol, die durch den Abbau mit der Alkoholdehydrogenase entstehen (Formaldehyd und die daraus entstehende Ameisensäure). Durch die kompetitive Inhibition wird die katalytische Aktivität des Enzyms herabgesetzt. Bei gleicher Konzentration des Substrates nimmt die Geschwindigkeit ab.



• Wann findet die Reaktion [S] und [P] ein Ende? Wieso ist die Michaelis-Menten-Kinetik vereinfacht und welche Einflussfaktoren gibt es noch?

Die Enzymreaktion kommt zum Stillstand, wenn der Gleichgewichtszustand erreicht worden ist. Die Hin- und Rückreaktion verläuft dann gleich schnell. Die Lage des Gleichgewichts ist abhängig von  $\Delta G^0$ .



An enzymkatalysierten Reaktionen sind oft mehrere Substrate und mehrere aktive Zentren beteiligt. In derartigen Fällen kann die Wechselzahl  $k_{cat}$  nicht mehr ohne weiteres mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  gleichgesetzt werden.

Der Michaelis-Menten-Gleichung liegt eine irreversibel verlaufende Enzymreaktion zugrunde. Dies trifft z.B. für Phosphatasen und Peptidasen zu. Die meisten anderen Enzyme wie z.B. die Isomerasen und Dehydrogenasen streben allerdings einem Gleichgewicht zu und können durch Zugabe von Substrat oder Produkt gestartet werden. Bei der dabei ablaufenden Reaktion muss besonders die Rückreaktion  $k_{-2}$  beachtet werden.

Die Messung darf nur im linearen Bereich ausgewertet werden.

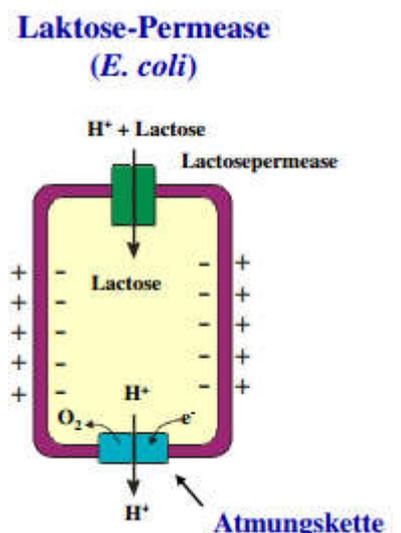
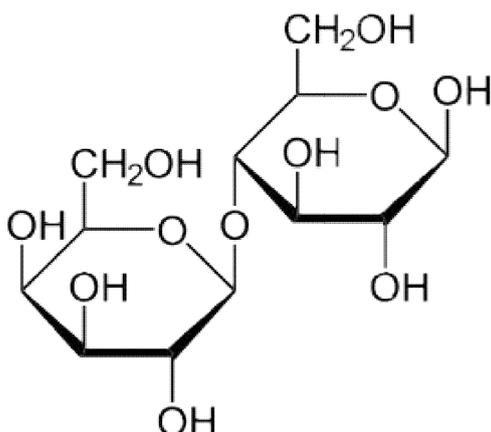
Die Substratmenge sollte möglichst hoch sein. Dies erhöht aber die Kosten und kann zu Störungen führen.

Parameter wie z.B. Temperatur und pH-Wert können die Messung beeinflussen. Erhöhung der Temperatur erhöht auch die Geschwindigkeit  $v$  und beschleunigt auch die Denaturierung. Die maximale Aktivität eines Enzyms ist unter anderem auch vom pH-Wert abhängig.

• Was ist Laktose und welches Enzym wird mit der Spaltung in Zusammenhang gebracht? Was sind die Besonderheiten?

Bei der Laktose handelt es sich um Glucose und Galaktose die über eine  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung verbunden sind. Laktose wird von der  $\beta$ -Galaktosidase (Lactase) in Glucose und Galaktose gespalten. Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase wird bei den meisten Völkern der Erde nur in den ersten Lebensjahren exprimiert, bei den Europäern und einigen afrikanischen Völkern ist sie jedoch noch im Erwachsenenalter aktiv.

Laktose wird über einen sekundär-aktiven Transporter in die E. coli Zelle gebracht. Bei diesem Transporter handelt es sich um die Laktose-Permease, welche bei Vorhandensein von Laktose gebildet wird. Ein Gradient (in diesem Fall  $H^+$ ) wird benutzt um einen zweiten Stoff (Laktose) entgegen einem Konzentrationsgradienten zu transportieren.



• **Wie ermittelt man den  $k_{cat}$ -Wert eines Enzyms? Welche Einheit und welche Bedeutung hat der Zahlenwert?**

Die Wechselzahl (katalytische Konstante)  $k_{cat}$  eines Enzyms gibt an, wie viel Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit in das Reaktionsprodukt umgesetzt werden und wird in  $s^{-1}$  ausgedrückt. Sie entspricht daher der kinetischen Konstanten  $k_2$  und wird über die Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  und die Gesamtkonzentration des Enzyms  $[E_t]$  berechnet.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_t]}$$

• **Wie ermittelt man den  $K_M$ -Wert eines Enzyms? Welche Einheit und welche Bedeutung hat der Zahlenwert?**

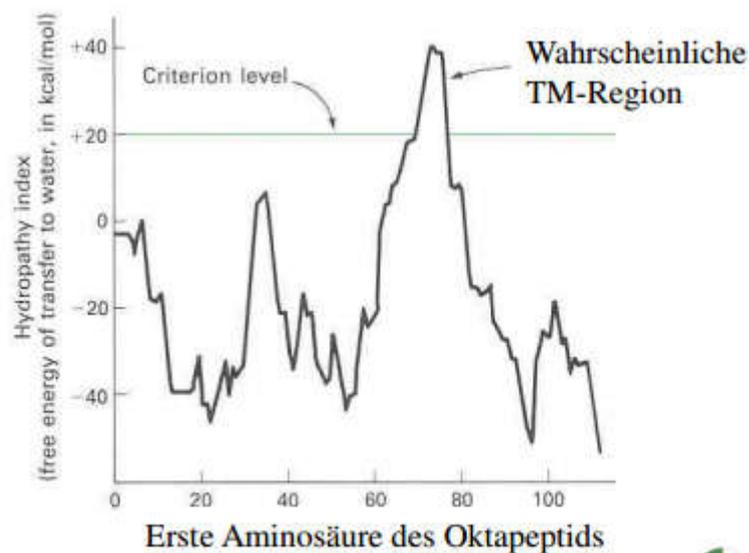
Man führt eine Aktivitätsbestimmung in 6 - 10 Ansätzen mit unterschiedlicher Substratkonzentration durch. Die Auswahl der Enzymkonzentration ist vor allem bei sehr niedriger Substratkonzentration kritisch. Man bestimmt bei allen Messungen  $v_0$ . Die Messwerte werden dann in ein Michaelis-Menten-Diagramm übertragen. Die Auswertung des Ergebnisse erfolgt mit einem linearen Plot.

• **Organophosphate wie z.B. Diisopropylflourphosphat oder das hochgiftige Insektizid E605 Sarin oder Tabun inhibieren die Acetylcholinesterase. Um welche Art von Inhibition handelt es sich? Auf welche Organe wirken daher diese Gifte?**

Es handelt sich hier um eine irreversible Inhibition, da das Enzym kovalent modifiziert wird. Acetylcholin ist ein Neurotransmitter, der nach Ausschüttung in die Synapse durch die Acetylcholinesterase abgebaut wird. Ist diese Entfernung des Botenstoffes nicht möglich, funktioniert die Signalübertragung im Nervensystem und auch Gehirn nicht mehr.

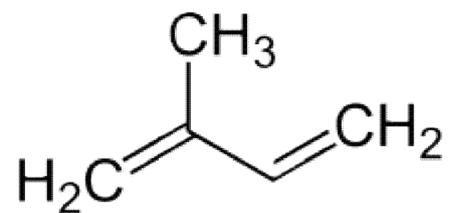
- Was ist die typische Struktur einer Transmembranregion eines Proteins? Was kann man allgemein darüber sagen und welche Eigenschaften werden die darin enthaltenen Aminosäuren haben?

Die Transmembranregion eines Proteins enthält hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren wie z.B. Valin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin. Mittels Hydropathieplot können hydrophobe Bereiche eines Proteins bestimmt werden. Alle bekannten Transmembran-Segmente bestehen entweder aus  $\alpha$ -Helices (sehr häufig) oder  $\beta$ -Fässern (selten).



- Warum fühlen sich Latex-Handschuhe und Menthol-Zuckerl irgendwie verwandt an?

Beide sind aus Isopren-Einheiten aufgebaut. Menthol ist aus Monoterpenen (2 Isopreneinheiten) und Latex (Naturkautschuk) aus Polyterpenen (>8 Isopreneinheiten) aufgebaut.



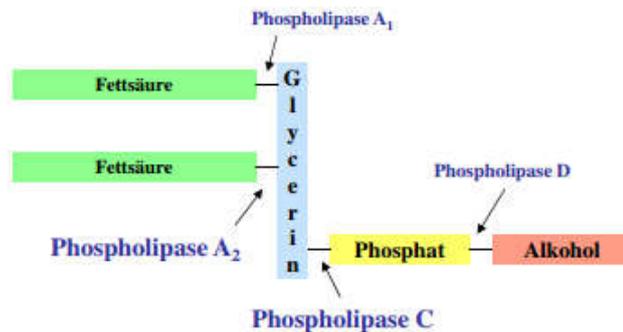
- Wie sind Sphingolipide aufgebaut?

	Ceramid	Sphingomyelin	Cerebrosid	Glykosphingolipid
Sphingosin	x	x	x	x
Fettsäure	x	x	x	x
Phosphocolin		x		
Hexose			x	
Oligosaccharid				x

• **Wie sind Glycerophospholipide aufgebaut?**

Glycerophospholipide sind aus Glycerin, 2 Fettsäuren und einer Phosphatgruppe, an der ein Alkoholrest hängt, aufgebaut.

	Glycerin	Glycerin-3-Phosphat	Phosphatidat	Glycerophospholipid
Glycerin	x	x	x	x
Phosphat		x	x	x
Fettsäuren			x	x
Alkohol				x



• **Was ist der Unterschied zwischen Micellen und Doppelschichten?**

Micellen werden aus ionisierten Fettsäuren gebildet. Finden Anwendung in der Reinigung z.B. Seifen (Fettsäuren) oder Detergentien (Tenside). Doppelschichten hingegen werden z.B. aus Phospholipiden gebildet.

• **Beschreiben Sie Membranproteine näher (Verankerung, Gewinnung, Aufgaben)!**

Membranproteine können die Membran durchspannen oder selten auch teilweise eindringen. Diese Membranproteine werden auch als Transmembranproteine bezeichnet. Alternativ können Membranproteine auch mit einer unpolaren Gruppe in der Membran verankert sein.

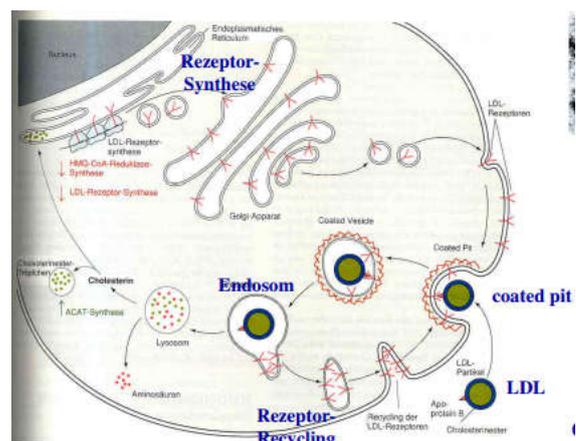
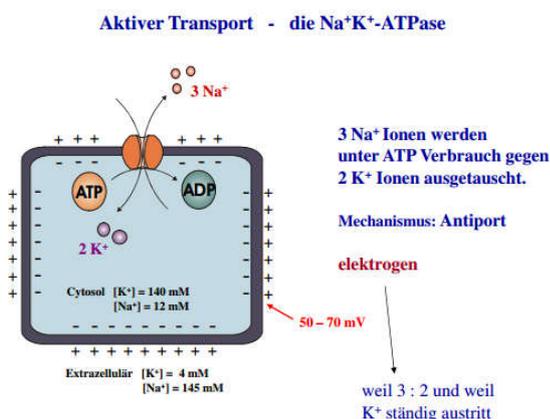
Periphere Membranproteine können mit Salz gelöst werden.

Integrale Membranproteine werden mit Detergentien isoliert (Triton X-100, Desoxycholat, n-Octylglucosid)

Transportproteine können diverse Stoffe durch die Membran transportieren (Glukose, Salze, ...)

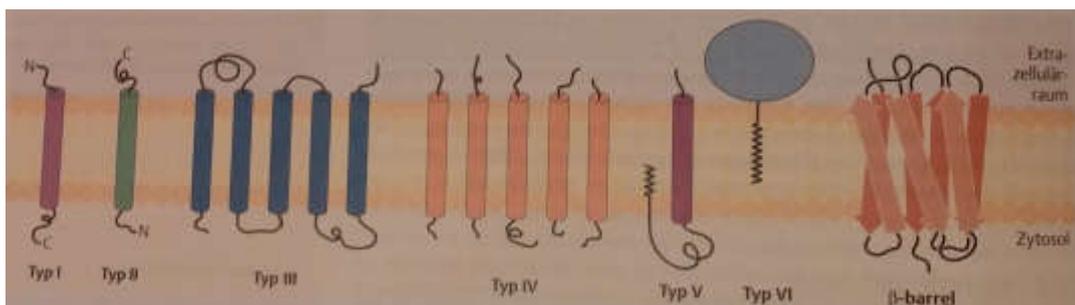
Membranproteine können der Zelle auch als Rezeptor dienen für Substanzen (LDL, Transferrin), für Signalmoleküle (Hormone, Wachstumsfaktoren, Antigene) oder auch für Bakterien und Viren.

Desweiteren können Membranproteine als Erkennungszeichen (HLA- bzw. MHC-Proteine) dienen.



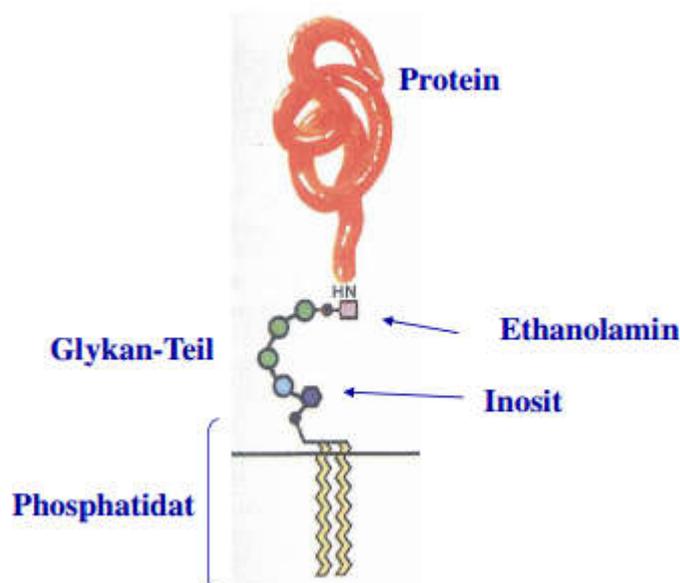
• **In welche Gruppen werden Membranproteine eingeteilt?**

- Typ I: Enthalten eine einzige Transmembranhelix. Das C-terminale Ende zeigt ins Zellinnere.
- Typ II: Enthalten eine einzige Transmembranhelix. Das N-terminale Ende zeigt ins Zellinnere.
- Typ III: Enthalten mehrere Membranhelices (z.B. G-Proteine gekoppelter Rezeptor).
- Typ IV: Bestehen aus mehreren Proteinen vom Typ I und II.
- Typ V: Enthalten einen Lipidanker, der kovalent mit der Aminosäurekette des Proteins verbunden ist. Das Membranprotein wird dadurch in der Membran verankert. Der Lipidanker besteht aus meist aus einer langkettigen Fettsäure. Membranproteine vom Typ V enthalten desweiteren eine Transmembranhelix.
- Typ VI: Wie Typ V, nur ohne Transmembranhelix.



• **Welche Arten von Membranankern kennen Sie?**

- Fettsäuren: Das Protein wird über N-Myristylierung oder S-Palmitoylierung verankert.
- Prenylketten: Das Protein ist am C-terminalen Cystein mit verschiedenen Formen der Prenylierung versehen. Das C-terminale Ende kann durch Geranylgeranylierung oder durch Farnesylierung modifiziert sein.
- GPI-Anker: Glycosylphosphatidylinosit-Anker. Aufgabe des GPI-Ankers ist es, Glycoproteine der Zelloberfläche an der Außenseite der Plasmamembran fest zu verankern. Der GPI-Anker wird im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums an die terminale Carboxygruppe des Glycoproteins angehängt, wobei die Signalsequenz (siehe SRP), welche für den Import ins endoplasmatische Retikulum codierte, abgeschnitten wird. Der GPI-Anker kann durch GPI-Phospholipasen rasch entfernt werden.



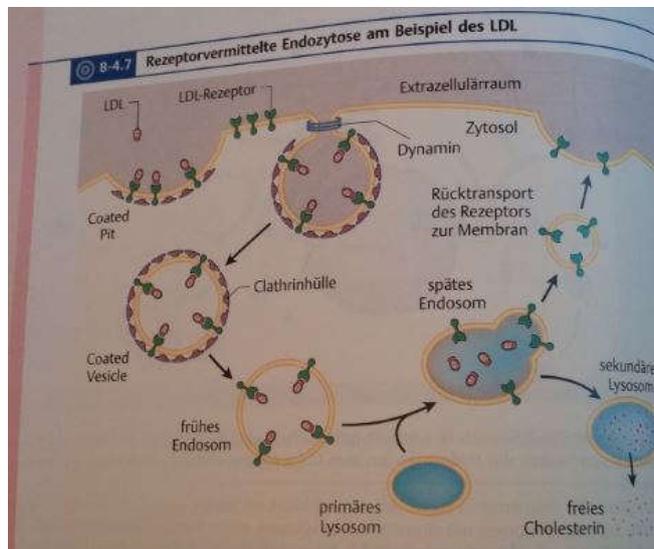
● **Wie werden Proteine durch Membranen transportiert?**

Die Proteine können durch die Membran mittels Pore oder in Vesikel transportiert werden.

**Pore:** Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum translatiert werden sollen tragen an ihrem N-Terminus eine Signalsequenz. Diese Signalsequenz wird von dem Signal Recognition Particle erkannt und gebunden. Das SRP kann nun mitsamt dem Komplex an den SRP-Rezeptor andocken und überträgt diesen Komplex auf einen Protein-Translokator. Dieser Protein-Translokator fädelt das entstehende Polypeptid durch die ER-Membran.

**Vesikel:** Proteine können durch rezeptorvermittelte Endozytose von außen ins innere der Zelle transportiert werden. Proteine können durch vesikulären Transport im sekretorischen Weg bis hin zur Exocytose transportiert werden.

● **Wie funktioniert die rezeptorvermittelte Endozytose von LDL?**



Die aufzunehmende gelöste Substanz (z.B. LDL) bindet an einen spezifischen Rezeptor in der Zellmembran. Mithilfe des Proteins Clathrin schnüren sich sogenannte "Coated Vesicles" ab. Durch das Protein Dynamin wird das Vesikel von der Membran getrennt. Das Vesikel ist voll mit Rezeptoren und Liganden beladen. Die Vesikelhülle aus Clathrinproteinen dissoziiert nun ab und es entsteht das frühe Endosom. Dieses wiederum fusioniert mit einem primären Lysosom und es entsteht ein spätes Endosom. Die Rezeptoren im späten Endosom schnüren sich ab und wandern wieder zur Zellmembran. Aus dem späten Endosom ist nun ein sekundäres Lysosom geworden, in dem die Liganden abgebaut werden.

● **Welche Schicksale können endozytierte Rezeptor-Ligand-Komplexe ereilen?**

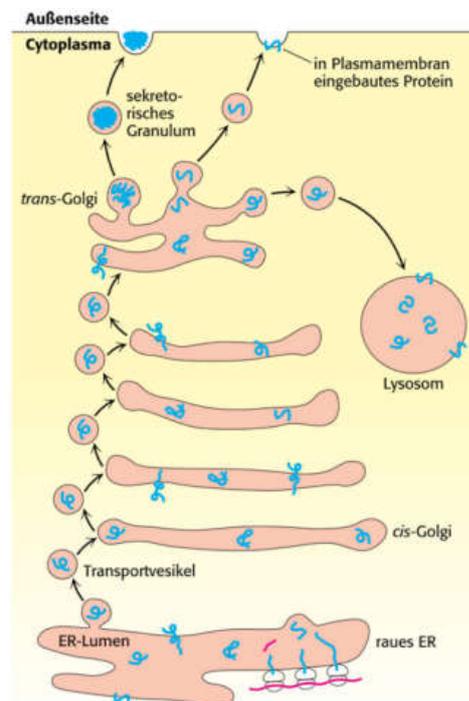
Rezeptor	Protein	Beispiel
recycliert	recycliert	Transferrin, MHC-Proteine
recycliert	abgebaut	LDL, Transcobalamin II
abgebaut	abgebaut	EGF, Immunkomplexe
transportiert	transportiert	maternales IgG und IgA

● **Beschreiben Sie den sekretorischen Weg (Exozytose) und seine Elemente!**

Bei der Exozytose verschmelzen Vesikel, die in der Zelle mit Substraten beladen wurden, mit der Plasmamembran und geben ihren Inhalt in den extrazellulären Raum ab. Dies kann kontinuierlich geschehen wie z.B. in Drüsenzellen (konstitutive Exozytose) oder aber auf ein Signal hin, wie z.B. bei der Freisetzung von Neurotransmittern (getriggerte Exozytose). Die sekretorischen Proteine werden im Golgi-Apparat verpackt und in Vesikeln über das Trans-Golgi-Netzwerk zur Zellmembran transportiert. Dort fusionieren die Vesikel mit der Zellmembran und geben ihren Inhalt frei.

Während die Proteine synthetisiert werden, falten sie sich im Lumen des ER und bilden ihre dreidimensionalen Strukturen aus. Einige Proteine werden durch Anhängen von N-gekoppelten Kohlenhydraten modifiziert. Schließlich müssen die Proteine sortiert und zu ihren Bestimmungsorten transportiert werden. Transportvesikel schnüren sich dabei vom endoplasmatischen Retikulum ab und bringen die Proteine zum Golgi-Komplex, mit dem die Vesikel fusionieren und ihren Inhalt in den Komplex hinein abgeben. Dort werden die Proteine weiter modifiziert, beispielsweise durch Anhängen von Kohlenhydraten. Vom Golgi-Komplex aus bringen Transportvesikel die Proteine an ihre endgültigen Bestimmungsorte. Wie gelangt ein Protein an den richtigen Bestimmungsort? Ein neu synthetisiertes Protein diffundiert in das ER-Lumen, bis es an ein integrales Membranprotein bindet, das man als Cargo-Rezeptor bezeichnet. Diese Bindung zieht das Protein in einen kleinen Bereich der Membran hinein, der anschließend eine Membranausstülpung bilden kann. Diese Ausstülpung transportiert dann das Protein an seinen spezifischen Bestimmungsort. Die Bildung solcher Ausstülpungen wird durch die Bindung von Hüllproteinen (coat proteins, COP) ermöglicht.

- Elemente:
- Kernmembran
  - Kernporen
  - raues ER
  - glattes ER
  - Ribosomen am rER
  - Transportvesikel
  - Golgiapparat

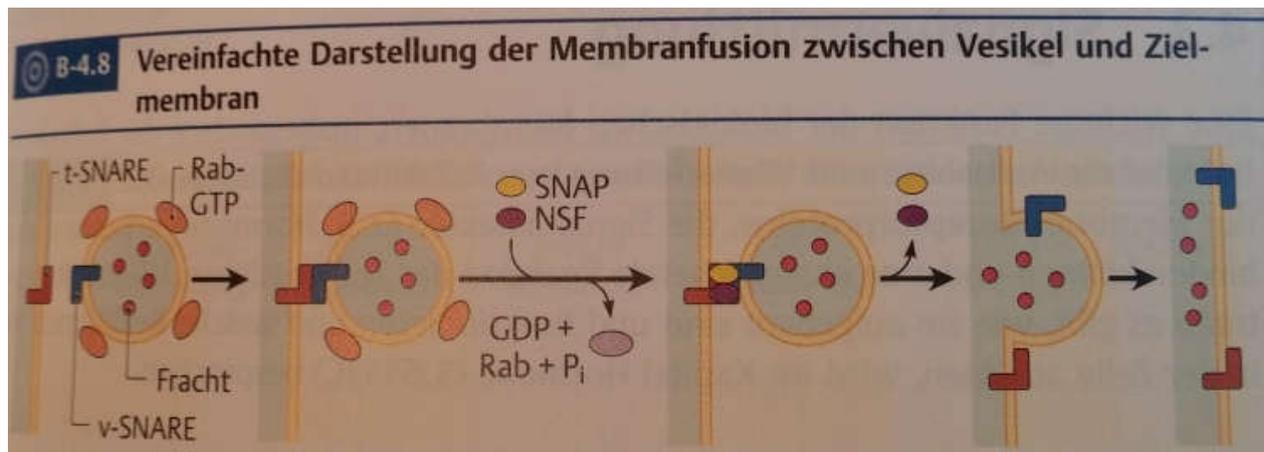


● **Welche Proteine sind für den vesikulären Transport wichtig?**

Die Vesikel werden mit Clathrin abgeschnürt und mithilfe von Dynamamin von der Membran getrennt. Die Sortierung erfolgt durch V-SNARES und T-SNARES. Die Fusion erfolgt durch das G-Protein Rab unter ATP-Verbrauch.

- **Was sind V-Snares und T-Snares? Welche Bedeutung und Aufgabe haben sie?**

In der Vesikelmembran befindet sich das v-SNARE, das mit dem t-SNARE in der Zielmembran einen Komplex bildet. Das kleine G-Protein Rab hilft unter Spaltung von GTP, das Vesikel an die Membran zu docken. Das SNAP-Protein hilft nun bei der Fusion von Vesikelmembran und Zielmembran. Das Protein NSF mit seiner ATPase-Aktivität trennt den Komplex aus den SNARE-Proteinen, damit die Vesikelmembran in die Zielmembran integriert werden kann. Das v-SNARE-Protein, das sich nun ebenfalls in der Zielmembran befindet, wird durch retrograden Transport zurück in die Vesikel gebracht.



- **Durch was wird die Fluidität und der Schmelzpunkt von Membranen bestimmt?**

Die Fluidität und der Schmelzpunkt einer Membran wird von deren Zusammensetzung bestimmt. Je kürzer eine Fettsäure ist und je mehr Doppelbindungen einer Fettsäure hat, desto tiefer ist der Schmelzpunkt und desto höher ist die Fluidität. Kokosfett und Butterschmalz bestehen zum größten Teil aus gesättigten Fettsäuren und sind deswegen auch bei Raumtemperatur noch flüssig. Cholesterin in der Membran verhindert die Kristallisation und senkt die Fluidität.

- **Was sind Endosomen und was ist ihre Aufgabe?**

Endosomen entstehen bei der Endozytose. Man unterscheidet zwischen frühen und späten Endosomen. Frühe Endosomen befinden sich an der Zellperipherie, späte Endosomen eher im Bereich des Nucleus. Eine Ansäuerung durch spezielle Protonenpumpen bewirkt eine Loslösung der in den Endosomen gebundenen Moleküle von den jeweiligen Membranrezeptoren. Diese Rezeptoren können ausgeschleust und zurück zur Zellmembran transportiert werden, um einem weiteren endozytotischen Vorgang zur Verfügung zu stehen (Recycling). Die Zelle kann so einen Teil des sie umgebenden Mediums in ihr Inneres aufnehmen wie z.B. LDL oder Eisen.

- **Was sind Lysosomen und welche Aufgaben erfüllen sie?**

Lysosomen dienen der intrazellulären Verdauung. Die für Lysosomen typischen sauren Hydrolasen enthalten Mannose-6-Phosphat als Erkennungssignal zur selektiven Abtrennung vom Trans-Golgi-Netzwerk, als primäre Lysosomen, die dann mit Vesikeln völlig verschiedenen Ursprungs fusionieren. Lysosomale Enzyme vermögen alle natürlichen Stoffgruppen abzubauen. Lysosomale Enzyme werden im rauen ER synthetisiert und glykosyliert. Eine weitere Modifikation erfolgt bei Eintritt in den Golgi-Apparat. Hier wird auf das C6-Atom eines Mannose-Restes ein Phosphat-Rest übertragen. Dieser Mannose-6-Phosphat-Rest kennzeichnet ein noch im Golgi-Apparat befindliches Protein als lysosomales Protein. Im Trans-Golgi-Netzwerk sitzen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren.

- **Was ist der Unterschied zwischen Endosom und Lysosom?**

Ein Endosom entsteht z.B. bei der rezeptorvermittelten Endozytose. Dabei werden Substanzen von außen in die Zelle befördert. An der Membran wird ein Vesikel abgeschnürt. Sobald die Clathrinproteine abdissoziieren entsteht ein frühes Endosom. Durch Fusion mit einem primären Lysosom entsteht ein spätes Endosom. Durch Abschnürung der Rezeptoren entsteht wiederum ein sekundäres Lysosom indem die Substanzen abgebaut werden.

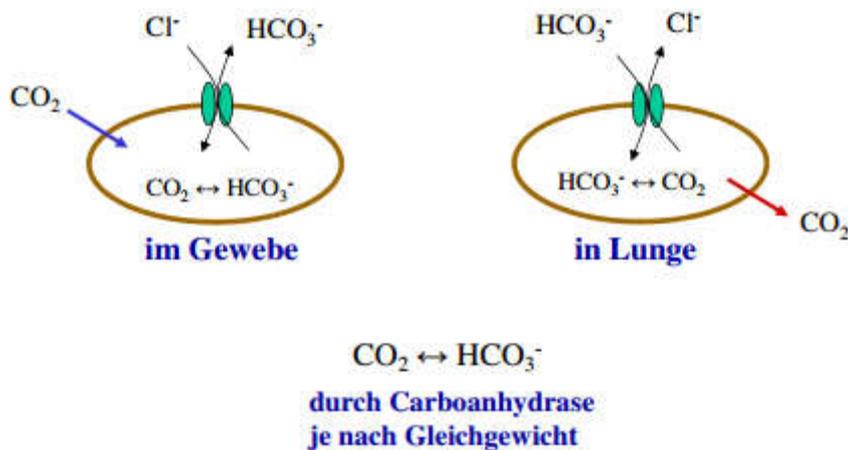
Endosom = Aufnahme von extrazellulären Stoffen; werden von der Membran abgeschnürt

Lysosom = Abbau von intrazellulären Stoffen durch saure Hydrolasen (markiert durch M6P); werden teilweise im Golgi-Apparat gebildet

• Beschreiben Sie den passiven Transport bzw. Antiport der Anionenkanäle!

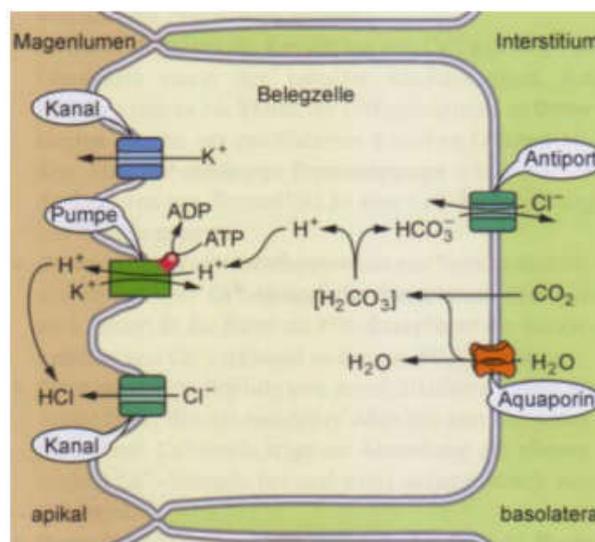
Passiver Transport wird auch als erleichterte Diffusion bezeichnet. Es wird dabei kein ATP verbraucht und entspricht einer Diffusion. Der Transport findet über ein Protein statt, welches die Diffusion erleichtert z.B. durch eine zentrale Pore oder Flip-Flop-Modell. Der passive Transport kann nur entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgen. Ist der Gradient ausgeglichen, kommt der Transport zum Stillstand.

Als Beispiel für den passiven Transport steht der Anionenkanal der Erythrozytenmembran. Dieser Anionenkanal erlaubt den Durchtritt von  $\text{HCO}_3^-$  im Antiport gegen  $\text{Cl}^-$ . Hydrogencarbonat wird aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  mittels Carboanhydrase gebildet und umgekehrt.



• Warum ist es im Magen sauer und welcher pH-Wert herrscht dort?

Im Magen beträgt der pH-Wert 1.  $\text{CO}_2$  diffundiert in die Zelle und  $\text{H}_2\text{O}$  gelangt durch Aquaporine ins Zellinnere. Aus den beiden Komponenten bildet sich mithilfe der Carboanhydrase  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , welches zu  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  dissoziiert. Durch passiven Transport gelangt  $\text{Cl}^-$  in die Belegzelle, im Austausch gegen  $\text{HCO}_3^-$ . Es handelt sich dabei um einen Antiport.  $\text{K}^+$ -Ionen und  $\text{Cl}^-$ -Ionen gelangen jeweils über einen spezifischen Kanal aus der Belegzelle in das Magenlumen. Nun kann die  $\text{K}^+-\text{H}^+$ -ATPase ihre Arbeit verrichten.  $\text{H}^+$ -Ionen werden ins Magenlumen gepumpt, während die  $\text{K}^+$ -Ionen wieder in die Belegzelle transportiert werden. Dabei wird ATP verbraucht.



● **Wie kommt  $\text{Ca}^{2+}$  ins sarkoplasmatische Retikulum?**

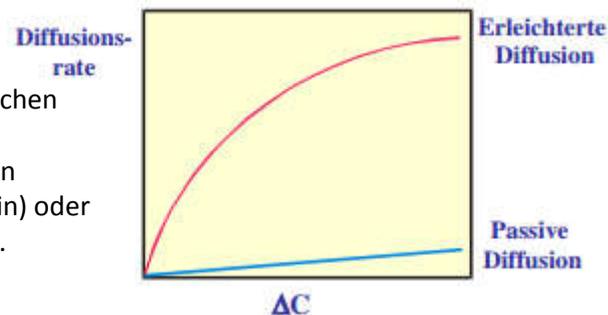
$\text{Ca}^{2+}$  kommt über die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ins sarkoplasmatische Retikulum. Der Transporter nimmt  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf und bindet dann ATP. Der Transporter wird darauf phosphoryliert und es kommt zu einer Konformationsänderung. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gelangen nun ins sER. Es handelt sich dabei um einen Uniport und aktiven Transport.

● **Was ist Zystische Fibrose und was ist die Ursache?**

Zystische Fibrose wird auch als Mukoviszidose bezeichnet und ist ein Defekt im Gen des CFTR-Proteins (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). In den meisten Fällen entsteht die Krankheit durch eine Mutation, die zum Fehlen des Phenylalanins der Position 508 führt. Die primäre Folge des Defekts des CFTR-Proteins ist eine Störung der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion an der apikalen Seite der Zellen. Das CFTR-Protein gehört zur Gruppe der ABC-Proteine (ATP-Binding-Casette). Diese Klasse von Transport-Proteinen transportiert spezifisch Ionen, Zucker und Peptide unter ATP-Verbrauch.

● **Passiver Transport und passive Diffusion klingen ähnlich. Sind sie es auch?**

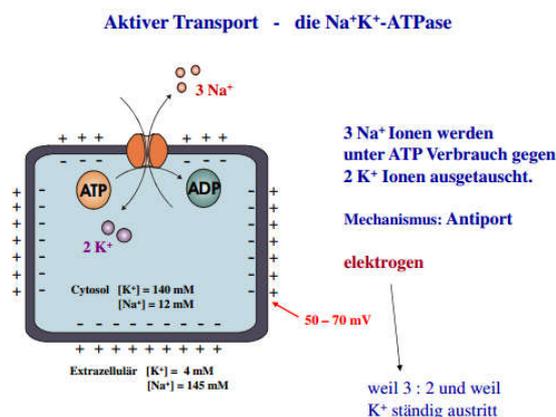
Beide Transportformen verbrauchen keine Energie in Form von ATP und verlaufen nur entlang eines Konzentrationsgradienten. Der Transport kommt zum Stillstand, wenn der Gradient ausgeglichen ist. Die passive Diffusion erfolgt direkt durch die Membran ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$ , Steroide). Der passive Transport findet über ein Membranprotein statt wie z.B. über eine zentrale Pore (Aquaporin) oder durch ein Flip-Flop-Modell. Die Diffusion wird dabei beschleunigt.



● **Was wäre ein elektrogener Transport in tierischen Zellen?**

$\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase ist ein Antiport. 3  $\text{Na}^+$ -Ionen werden hinaus und 2  $\text{K}^+$ -Ionen hineingepumpt. Dabei wird ATP verbraucht. Desweiteren tritt Kalium ständig aus der Zelle aus. Es handelt sich also um einen elektrogenen Transport.

1. 3  $\text{Na}^+$ -Ionen binden vom Zellinneren an den Transporter.
2. ATP bindet an die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und phosphoryliert den Transporter.
3. Es kommt zur Konformationsänderung.
4. Die 3  $\text{Na}^+$ -Ionen werden nun zur Außenseite transportiert
5. 2  $\text{K}^+$ -Ionen binden von der Außenseite an den Transporter
6. Es kommt zur Dephosphorylierung und zur Konformationsänderung
7. Die 2  $\text{K}^+$ -Ionen werden nun an die Innenseite abgegeben.

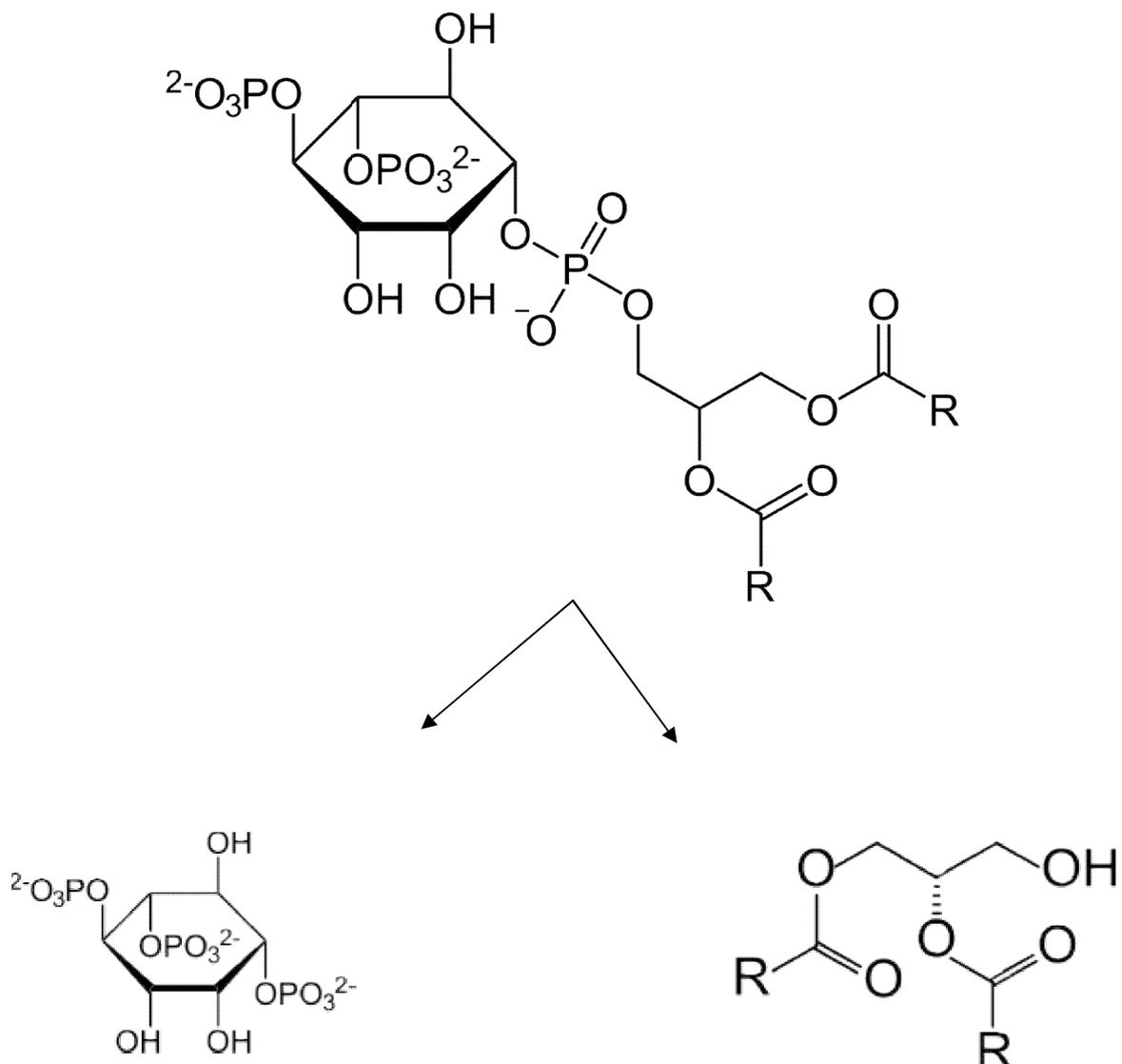


- **Extremisten neigen zu einem Aktionspotential. Wo kommt es in liebenswerten Zeitgenossen vor und was hat es mit ATP zu tun?**

Das Aktionspotential findet man bei der Nervenreizleitung im ZNS. Es wird von Neurone erzeugt. Die aktivierte presynaptische Zelle schüttet Acetylcholin aus. Das Acetylcholin bindet jenseits der Synapse an einen Rezeptor und bewirkt dadurch eine Öffnung der Ionenkanäle. Dadurch kann nun  $\text{Na}^+$  in die Zelle und  $\text{K}^+$  aus der Zelle strömen. Das Membranpotential bricht nun zusammen und ein elektrisches Signal breitet sich bis zur nächsten Synapse aus. ATP wird benötigt um mit Hilfe der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase das Membranpotential wieder herzustellen.

- **Welche Funktion hat Phospholipase C? Welche Produkte entstehen und welcher Mechanismus wird dadurch gesteuert? Zeichnen Sie die Formel des Substrats!**

Das G-Protein  $G_q$  aktiviert die Phospholipase C. Phospholipase C spaltet  $\text{PIP}_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat) in DAG (Diacylglycerin) und  $\text{IP}_3$  (Inositoltriphosphat).  $\text{IP}_3$  wirkt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und führt dadurch zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration in der Zelle. Durch die erhöhte Calcium-Konzentration und DAG wird nun die Proteinkinase C aktiviert. Die Proteinkinase C kann nun andere Proteine phosphorylieren und dadurch aktivieren oder deaktivieren.



### • Wo kommen Phosphorylase und Phosphatase vor und wie wirken Sie zusammen?

Bei Bedarf wird Glukose in Form von Glukose-1-Phosphat aus Glykogen gebildet (v.a in Muskel- und Leberzellen). Die dafür verantwortliche Phosphorylase ist aktiv, wenn sie phosphoryliert ist. Aufgebaut wird Glykogen durch Glykogensynthase, die aktiv, wenn sie nicht phosphoryliert ist.

Bei hohem cAMP-Spiegel soll Glykogen abgebaut werden, d.h. beide Enzyme sollen phosphoryliert sein. Dafür sorgt die Proteinkinase A. Im Falle der Phosphorylase aber indirekt, indem sie zunächst die Phosphorylase-Kinase phosphoryliert. Im Falle der Synthetase inaktiviert die PKA direkt. Zusätzlich inaktiviert sie eine Protein-Phosphatase um ein zu rasches Reaktivieren der Synthetase zu verhindern. Bei niedrigem cAMP Spiegel hingegen wirkt diese Phosphatase und sorgt dafür, dass alle Enzyme nicht phosphoryliert sind. In diesem Zustand ist nur die Glykogensynthase (nebst Phosphatase) aktiv.

Anmerkung: Die Glykogensynthetase ist allerdings trotzdem meist phosphoryliert aufgrund der Wirkung von Glykogensynthase-Kinase 3. Diese Blockade wird bei hohem Blutzuckerspiegel aufgehoben.

### • Nach welchem Prinzip funktioniert der Insulin-Rezeptor?

Der Insulin-Rezeptor funktioniert nach dem Prinzip der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Im Gegensatz zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen liegt der Rezeptor des Insulin-Rezeptors bereits dimerisiert vor und arbeitet Ras-unabhängig.

1. Der Ligand bindet an den Insulin-Rezeptor.
2. Dadurch wird das IRS 1 (Insulin Rezeptor Substrat 1) phosphoryliert und aktiviert.
3. IRS 1 bindet und aktiviert die PI-3-Kinase.
4. PIP2 wird durch die PI-3-Kinase zu PIP3.
5. PIP3 wiederum bindet an die Proteinkinase B und aktiviert diese dadurch.
6. Die Proteinkinase phosphoryliert die Glykogensynthetase-Kinase und inhibiert diese.
7. Durch die Inhibition der Glykogensynthetase-Kinase wird auch die Glykogensynthase nicht mehr phosphoryliert. Dies führt dazu, dass diese nicht mehr inhibiert ist.
8. Es kann nun Glykogen aufgebaut werden.

### • GTP-G<sub>sα</sub>: Was fällt uns dazu ein?

GTP-G<sub>sα</sub> ist die Untereinheit eines G-Proteins, welche die Adenylatcyclase aktiviert. Dadurch steigt der cAMP-Spiegel an und Glykogen kann mobilisiert werden.

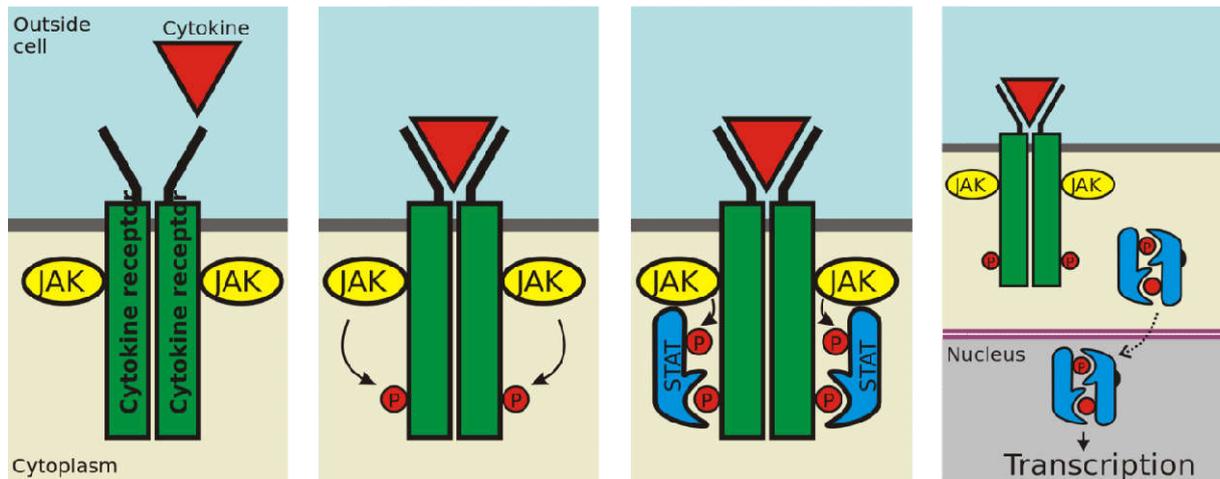
### • Was ist Glykogen und wie wird es im menschlichen Organismus mobilisiert?

Glykogen ist ein Homopolymer, welches aus Glucosemonomeren aufgebaut ist, welche wiederum über eine  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Glykogen ist stark verzweigt (über  $\beta$ -1,6-glykosidische Bindungen).

Glykogen wird über ein G<sub>s</sub>-Protein mobilisiert. Das G<sub>s</sub>-Protein aktiviert die Adenylatcyclase, welches aus ATP cyclischesAMP (cAMP) herstellt. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A. Ein steigender cAMP-Spiegel stimuliert den Abbau von Glykogen und verhindert den Aufbau dessen.

• **Beschreiben Sie den Jak-STAT-Weg!**

Bei dem Jak-STAT-Weg ist nicht der Rezeptor die Tyrosinkinase, sondern ein daran gebundenes Protein. Die Ligandenbindung führt zur Rezeptordimerisierung. Die Jak-Kinasen werden durch Autophosphorylierung aktiviert und phosphorylieren Tyrosinreste des Rezeptors. STAT-Proteine binden über ihre SH2-Domänen an die Phosphotyrosinreste, dimerisieren nach der Phosphorylierung, diffundieren in den Kern und stimulieren die Transkription. Der Jak-STAT-Weg wird von vielen Zytokinen, aber auch von Hormonen benutzt.



- **CD8+ T-Zellen werden zu zytotoxischen, CD4+ T-Zellen werden zu T-Helferzellen. Was bedeutet CD? Wie kann man die beiden Zelltypen unterscheiden und trennen?**

CD steht für "Cluster of Differentiation" und bezeichnet bestimmte Oberflächenmerkmale von Zellen. Meistens handelt es sich um Glykoproteine. Die Zellen werden mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekennzeichnet und durch die Durchflußzytometrie nachgewiesen. Getrennt könnten die verschiedenen Zelltypen durch die Affinitätschromatografie werden, indem man auch die Antikörper, die bei der Durchflußzytometrie verwendet worden sind, als Ligand verwendet.

- **Welches kaskadenartige System von Proteasen führt zur Bildung eines Membran-Attack-Complex (MAC)? Wie kann es aktiviert werden?**

Das Komplementsystem kann über den klassischen Weg über gebundene Antikörper aktiviert werden oder alternativ durch bestimmte Oberflächenmarker (PAMPs) von Mikroorganismen. In Folge der Opsonisierung durch Komplementproteine kommt es zur Bildung des Membran-Attack-Complex. Dies führt zur Lyse der Zelle. Weiters kommt es zur Chemotaxis (Beeinflussung der Fortbewegungsrichtung durch Stoffkonzentrationsgradienten) von phagozytotischen Zellen. Mit Komplement opsonisierte Zellen sind markiert für Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Die Abtötung findet durch freie Radikale statt.

- **Warum spielen die Zahlen 3 und 6 eine Rolle, wenn es um die Wirtsspezifität von Influenza-Viren geht?**

Das Hämagglutinin ist ein Lektin und bewirkt die Verklumpung von Erythrozyten und vermittelt bei der Infektion die Anheftung des Virions an eine Wirtszelle. Das Ankoppeln des Hämagglutinins an eine Zelle geschieht durch eine Anlagerung eines Teils des Hämagglutininmoleküls an Sialinsäuren auf Proteinen der Wirtszellenhülle, die als Rezeptoren fungieren. Diese Sialinsäuren sind bei Vögeln gehäuft  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3-verknüpft und bei Säugern gehäuft  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6-verknüpft. Von der Verknüpfung der Sialinsäuren hängt unter anderem die Wirtsspezifität ab.

### Wirtsspezifität:

Vögel

Neu5Ac- $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3-Gal-..



Säugetiere / Menschen

Neu5Ac- $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6-Gal-....



- **Beschreiben Sie die Blutgerinnung! Welche Rolle spielen Fibrin, Fibrinogen und Thrombin dabei?**

Die Blutgerinnung führt letztendlich zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, welches gemeinsam mit den Thrombozyten die Wunde verschließt. Die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin erfolgt durch Abspaltung von zwei kleinen Peptiden. Als spezifische Protease dient dabei Thrombin. Alle proteolytisch aktiven Gerinnungsfaktoren sind Serin-Proteasen und mit dem Verdauungsenzym Trypsin verwandt.

• **Wofür stehen die Abkürzungen IL-1 und TNF- $\alpha$ ? Welche Wirkungen haben diese Substanzen?**

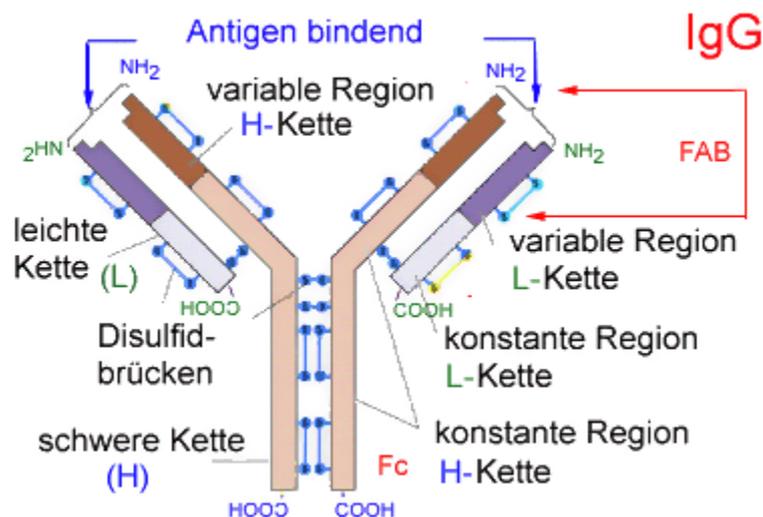
IL steht für Interleukin und TNF für Tumornekrosefaktor. IL-1 und TNF- $\alpha$  stellen zusammen mit IL-6 die wichtigsten Entzündungsmediatoren dar, die auch systemische Effekte wie z.B. Fieber oder Kreislaufversagen auslösen. Sie werden überwiegend von aktivierten Makrophagen abgegeben.

• **Was sind "neutrale Killerzellen"?**

Natürliche Killerzellen sind Nicht-B-Nicht-T-Lymphozyten. Ähnlich den zytotoxischen T-Zellen können Sie Zielzellen durch Sekretion von Perforin und Granzymen abtöten. Sie töten bevorzugt Zellen, die keine oder nur wenige MHC-I-Proteine exponieren. Dieses System ermöglicht die Elimination von Zellen, die von Viren infiziert worden sind und den Transport von MHC-I-Proteinen an die Zelloberfläche unterdrücken.

• **Beschreiben Sie den Aufbau und die Funktion von IgG-Antikörpern!**

Immunglobulin G besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Beide Ketten weisen einen konstanten und einen variablen Bereich auf. Der konstante Teil der schweren Ketten kommt in 5 Klassen vor (G, M, A, D, E). Genetische Unterschiede werden als Allotypen bezeichnet und Unterschiede in der variablen Domäne als Idiotypen.



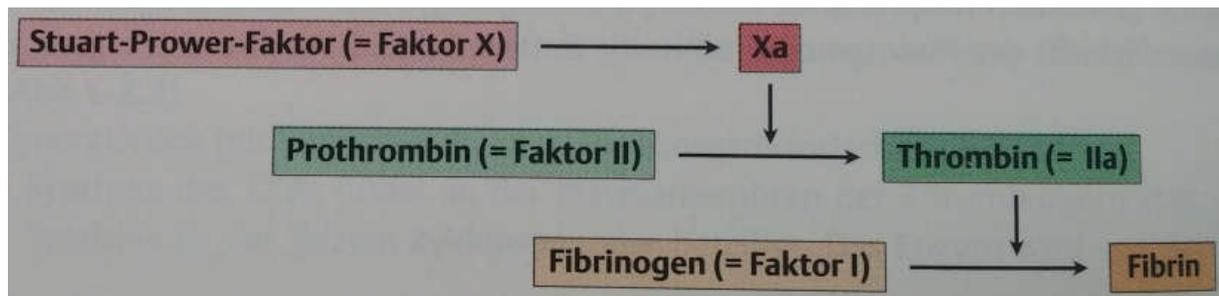
Funktionen:

- Neutralisierung von Bakterien, bakteriellen Toxinen und Viren. IgG binden an Bakterien und Viren und verhindern, dass sich diese festsetzen können. Bakterielle Toxine können durch Bindung an Antikörper daran gehindert werden, ihre toxische Wirkung zu entfalten.
- Opsonisierung: IgG binden mit ihrem Fc-Teil an Fc-Rezeptoren auf Phagozyten. Wenn die Antikörper auf ein Antigen treffen, werden die Phagozyten zur Phagozytose angeregt.
- Aktivierung von Komplement / Auslösen der Komplementkaskade (klassischer Weg)

- **Fibrinogen, Prothrombin, Plasminogen: Was können diese (noch) nicht?**

Die Blutgerinnung führt letztendlich zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, welches gemeinsam mit den Thrombozyten die Wunde verschließt. Die Umwandlung erfolgt durch Abspaltung von zwei kleinen Peptiden durch Thrombin, das seinerseits wiederum durch Proteolyse aus Prothrombin entsteht. Die Proteolyse aus Prothrombin wird durch den Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) katalysiert. Alle proteolytisch aktiven Gerinnungsfaktoren sind Serin-Proteasen.

Für die Auflösung von Fibrin ist die Serin-Protease Plasmin verantwortlich, die Fibrin in wasserlösliche Abbauprodukte spaltet. Plasmin wird aus der Vorstufe Plasminogen gebildet. Aktiviert wird dies durch Gewebe-Plasminogenaktivator (t-PA) und Urokinase.



- **Warum reagieren Birkenpollenallergiker manchmal auch auf Haselnüsse oder Äpfel? Was hat Darwin damit zu tun?**

Die Hauptallergene von Birken, Äpfel und Haselnüsse haben eine strukturelle Ähnlichkeit, die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeführt werden kann. Es handelt sich dabei um orthologe Proteine. Das sind Proteine, die in verschiedenen Arten ähnliche Funktion haben. Die Unterschiede kommen durch Mutationen im Lauf der Zeit zustande. Durch den Prozess der natürlichen Selektion können über viele Generationen unterschiedliche Anpassungen an Umweltbedingungen entstehen. Wenn genetische Differenzen innerhalb oder zwischen Populationen von Lebewesen einer Art immer zahlreicher werden, kann sich diese Art in neue Arten aufspalten. Bestimmte gemeinsame Merkmale aller Lebewesen legen nahe, dass alle bekannten Arten von einer einzigen ursprünglichen Art abstammen und durch diesen Prozess der allmählichen Verstärkung von Unterschieden entstanden sind.

- **Was ist MHC-I, wo ist es zu finden und welche Aufgaben hat es?**

MHC-Proteine dienen der Präsentation von Peptidfragmenten, die beim proteolytischen Abbau von Antigenen entstehen. MHC-Klasse-I Proteine werden von nahezu allen Zellen des Körpers gebildet. Sie bestehen aus einer membranspannenden Polypeptidkette und binden Peptide mit einer Länge von 8 - 10 Aminosäuren. Diese Peptide werden dann zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Das Immunsystem überwacht den Körper fortwährend ob Zellen körpereigene oder fremde Proteine präsentieren und auf das Vorhandensein von MHC-I-Proteinkomplexen. Die präsentierten Peptide stellen ein Abbild der in den Zellen synthetisierten Proteine dar. Die zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+ T-Zellen) sind so selektioniert, dass sie in der Regel mit ihrem T-Zell-Rezeptor nicht an Zellen binden, die ein Peptid präsentieren, das einem körpereigenen Protein entstammt. Dieses Phänomen nennt man Selbsttoleranz und schützt den Körper vor Angriffen des eigenen Immunsystem. Ist jedoch eine Zelle mit Viren infiziert oder von Mutationen betroffen und exprimiert somit neuartige Proteine, werden dem Immunsystem körperfremde Peptide als Teil des MHC-Klasse-I-Komplexes präsentiert und zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert, welche die betroffenen Zellen vernichten.

MHC-Klasse-I-Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum mit Peptiden beladen.

● **Was ist MHC-II, wo ist es zu finden und welche Aufgaben hat es?**

MHC-Klasse-II-Proteine werden von Phagozyten und B-Lymphozyten exprimiert. Sie bestehen aus zwei membranspannenden Ketten und binden Peptide mit einer Länge von 10 - 12 Aminosäuren. Sie werden von T-Helferzellen (CD4+ T-Zellen) erkannt. Monozyten, Makrophagen und interdigitierende Dendritische Zellen präsentieren MHC-II-Proteine. Die Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Proteinen präsentiert werden, stammen von extrazellulären Proteinen ab, die z. B. durch rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose Zugang zum sekretorischen Weg der Antigen-präsentierenden Zellen gefunden haben. Wie die T-Killerzellen sind auch die T-Helferzellen so selektioniert, dass sie nur dann mit ihrem T-Zellrezeptor an einen MHC-Klasse-II-Komplex binden und damit aktiviert werden, wenn ein körperfremdes Antigen präsentiert wird.

MHC-Klasse-II-Proteine werden in den Lysosomen beladen.

● **Was sind Dendritische Zellen? Welche Funktionen haben sie und welcher Rezeptor spielt eine Rolle?**

Dendritische Zellen sind Antigenpräsentierende Zellen. Man unterscheidet zwischen interdigitierenden und follikulären Dendritischen Zellen. Mithilfe von MHC-II-Proteinen präsentieren sie das prozessierte Antigen. Die Erkennung der Pathogene erfolgt unter anderem durch Toll-like Rezeptoren und Scavenger Rezeptoren. Interdigitierende Dendritische Zellen präsentieren das prozessierte Antigen den T-Zellen. Follikuläre Dendritische Zellen präsentieren das Antigen, welches von einer B-Zelle aufgenommen und prozessiert wird.

● **Was sind monoklonale Antikörper und wie werden sie hergestellt?**

Monoklonale Antikörper sind identische Antikörper die gegen dasselbe Epitop des Antigens gerichtet sind. Sie stammen alle aus der selben B-Zelle. Mäuse werden mit dem Antigen immunisiert. Anschließend werden die Lymphozyten aus der Milz isoliert. Die antigenspezifischen B-Zellen werden mit Myelomzellen fusioniert. Dadurch gewinnt man Zellen die sich unbegrenzt vermehren lassen und stets den gewünschten Antikörper bilden. Nun werden einzelne Klone der Zellhybride isoliert und die von ihnen gebildeten Antikörper getestet.

Myelomzellen = entartete Lymphozyten

● **Damit B-Zellen aktiviert und zu antikörperproduzierenden Plasmazellen werden, braucht es zunächst einmal ein passendes Antigen. Was noch?**

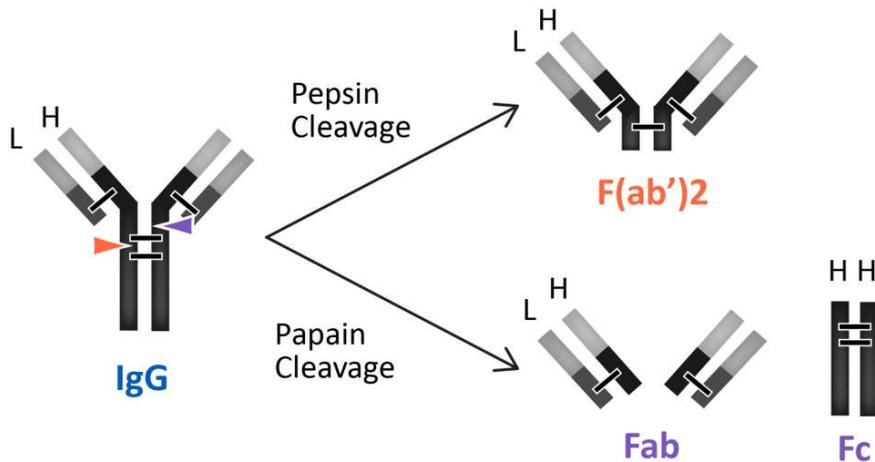
Das Antigen wird von einer follikulären Dendritischen Zelle präsentiert. Wenn die B-Zelle vorbeikommt und den passenden Rezeptor hat, nimmt die B-Zelle das Antigen auf und wird in den Lysosomen der B-Zelle abgebaut. Anschließend wird das prozessierte Antigen präsentiert. T<sub>H</sub>2-Helferzellen strömen vorbei. Wenn eine T<sub>H</sub>2-Helferzelle das prozessierte Antigen erkennt, bindet es an die B-Zelle. Die Verbindung wird durch CD40 und CD40L hergestellt. Einige Interleukine werden nun sezerniert wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-6. Es kommt zur Proliferation der B-Zelle, Klassenwechsel der Antikörper und Sekretion von Antikörpern.

Was wird benötigt?

- Antigen
- follikuläre Dendritische Zelle
- T<sub>H</sub>2-Helferzelle
- Membranproteine CD40 und CD40L
- Interleukine 4,5 und 6

- **Welches Molekül kann man in einen F<sub>C</sub>- und einen F<sub>ab</sub>-Teil spalten ? Womit spaltet man ?  
Machen Sie eine Skizze mit Bezeichnung der Domänen.**

Immunglobulin G lässt sich in einen F<sub>C</sub>-Teil und einen F<sub>ab</sub>-Teil spalten. Mittels Papain erhält man 2 F<sub>ab</sub>-Teile und 1 F<sub>C</sub>-Teil. Spaltet man mit Pepsin erhält man ein (F<sub>ab</sub>)<sub>2</sub>-Fragment und Fragmente des F<sub>C</sub>-Teils.



- **Was sind Interferone und welche Aufgaben erfüllen sie?**

Interferone (wie z.B. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) werden von virusinfizierten Zellen sezerniert. Sie binden an Interferonrezeptoren der selben Zelle und der Nachbarzelle. Dadurch wird die Zellteilung gehemmt und es werden vermehrt MHC-I-Proteine gebildet. Dies führt dazu, dass zytotoxische Zellen leichter erkennen und anschließend abtöten können. Desweiteren wird durch Interferone das Immunsystem stimuliert. IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und beeinflusst den Klassenwechsel in B-Zellen.

- **Was sind Interleukine und welche Zweck haben sie?**

Die Interleukine regulieren die Kommunikation zwischen Makrophagen, B- und T-Zellen und anderen an der Immunantwort beteiligten Zellen.

IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sind die wichtigsten Entzündungsmediatoren.

IL-2 ist der wichtigste T-Zell-Wachstumsfaktor.

IL-5 lockt Eosinophile, Basophile und Mastzellen an und stimuliert die Bildung von IgE. Fördert also die Entstehung von Allergien.

- **Beim Kartoffelschälen sieht Amoba sin Dalen fern und beobachtet plötzlich, wie ein großes Flugzeug in ein Hochhaus kracht. Vor Überraschung schneidet er sich kräftig in den Finger. Welches Protein, welche Protease und welche Zellen des Blutes bewahren ihn vor dem verbluten?**

Der Faktor X katalysiert die Proteolyse von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin wiederum katalysiert die Proteolyse von Fibrinogen zu Fibrin. Fibrin verschließt zusammen mit den Thrombozyten die Wunde.

• Warum werden Substanzen von der Matrix gebremst?

Trennprinzip	Methode
Elektrische Ladungen	Ionenaustauschchromatografie
Polarität	Adsorptionschromatografie
Hydrophobe Wechselwirkungen	Reversed-phase Chromatografie
Alles Zusammen	Affinitätschromatografie
Versteckspiel	Gelfiltration

• Wie wird eine Probe für die Aminosäureanalyse vorbereitet?

Das Protein wird mittels 6M HCl für 20 Stunden bei 115°C hydrolysiert. Dadurch werden fast alle Peptidbindungen hydrolysiert. Manche Aminosäuren werden zerstört oder umgewandelt. Tryptophan wird vollständig zerstört und wird deshalb mit der alkalischen Hydrolyse auf die Analyse vorbereitet.

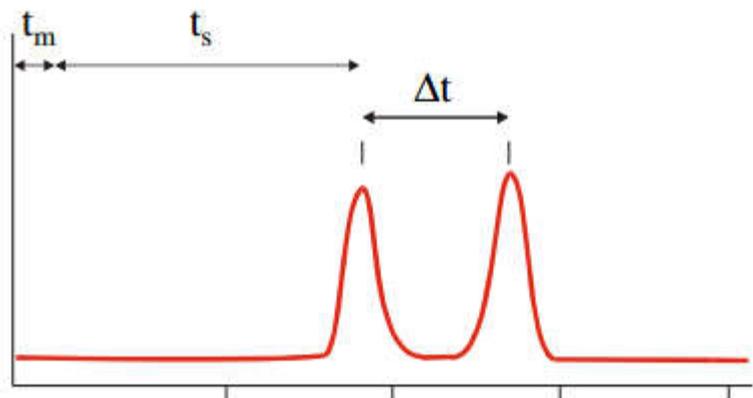
• Wie können Sie bei der Chromatografie die Eluenten detektieren?

1. Refraktionsindex
2. UV/VIS Detektor
3. Fluoreszenzdetektion
4. Lichtstreuendetektor
5. Massenspektrometer

• Sie haben nach einer Messung ein Chromatogramm vor Ihnen liegen. Wie können Sie die Trennung zweier Substanzen beurteilen?

$t_m$ ...Totzeit  
 $t_s$ ...Retentionszeit  
 $\Delta t$ ...Abstand zwischen Peakmaxima  
 $B$ ...Peakbreite bei halber Höhe

$$R = \frac{\Delta t}{2B}$$



Das Signal zwischen zwei Peaks sollte wieder die Basislinie erreichen. Die Auflösung R ist ein Maß für die Trennung zweier Substanzen.

• Wie können Sie die Trennung zweier Substanzen verbessern?

1. Erhöhung der relativen Retention = Erhöhung der Selektivität. Dies kann man erreichen durch Veränderungen des pH-Werts, der Salzkonzentration, Salzart, Temperatur, etc. .
2. Verringerung der Peakbreite = Erhöhung der Trennleistung

• Wie wird die Trennleistung einer Chromatografie-Säule angegeben?

Die Trennleistung wird angegeben in der Zahl der theoretischen Böden pro Säule. Die Trennleistung ist ein Maß für die Peakbreite in Relation zur Retentionszeit. Die Trennleistung ist unter anderem auch von der Flussrate abhängig.

$$n = 5.54 \times \left(\frac{t_{m+s}}{B_{0.5}}\right)^2$$

• Was kann Dithiothreit oder 2-Mercaptoethanol in kleinen einerseits und in höheren Konzentrationen andererseits bewirken?

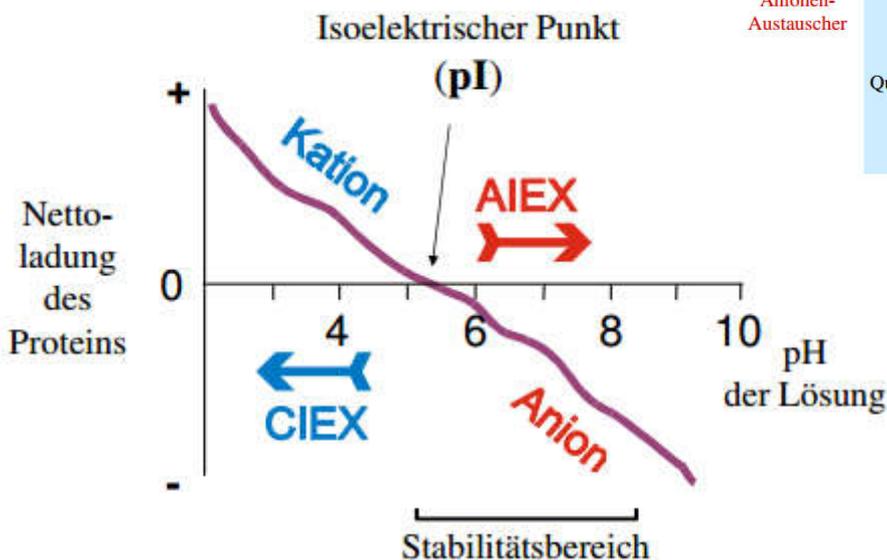
Bei geringer Konzentration konserviert Dithiothreit (DTT) Proteine des Zellinneren in ihrer funktionalen Form, indem es die Oxidation von Thio-Gruppen (SH-) zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert.

Bei hoher Konzentration kann es die Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, durch deren Reduktion zerstören. Es ist ein wichtiges Reagenz im Probenpuffer bei der SDS-PAGE und dem Western Blotting.

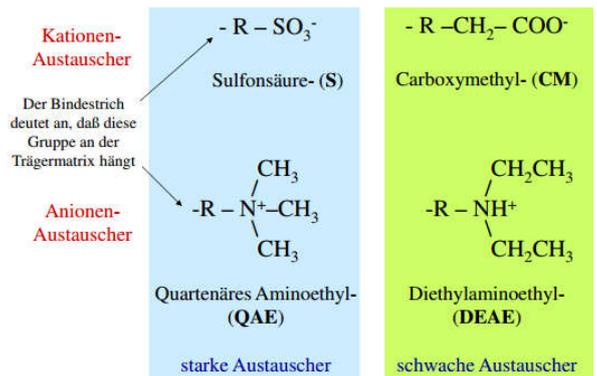


• Zwei Arten von Matrix bei Anionenaustausch, das Protein hat einen pI = 6. Welchen pH-Wert stellt man ein? (QAE und DEAE)

Bei pI = 6 und Bindung an einen Anionenaustauscher, wählt man einen pH-Wert der 1 über dem pI liegt. Wir stellen also einen pH-Wert von 7 oder höher ein.



Funktionelle Gruppen von Ionenaustauschern



● **Beschreiben Sie den Western-Blot und seine Anwendungsbereiche!**

Ein Proteingemisch wird durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS = Natriumdodecylsulfat) aufgetrennt. SDS lagert sich an die Proteine an, sodass unabhängig von ihrem pI-Wert eine weitgehend einheitliche Ladungsdichte entsteht, wodurch eine Trennung nach molarer Masse im elektrischen Feld möglich wird. Der Nachweis erfolgt durch Immundetektion (ähnlich ELISA). Die Position des Proteins auf der Membran wird nun sichtbar.

Anwendungsbereiche: - Nachweis von Proteinbanden geringerer Intensität in komplexen Gemischen  
 - Nachweis inaktiver Vorstufen eines Proteins  
 - Nachweis eines rekombinanten Protein anhand von Tags (His, GST, Flag ....)

● **Wie läuft die Proteinsequenzierung über den Umweg der cDNA-Klonierung ab?**

1. Gereinigtes Protein
2. Mithilfe von Reduktionsmittel (2-Mercaptoethanol, DTT, DTE) werden die Disulfidbrücken gelöst. Anschließend wird Iod-Essigsäure oder Iod-Acetamid hinzugefügt, um die Reoxidation der Disulfidbrücken zu verhindern (S-Alkylierung).
3. Das Protein wird nun einem Trypsin-Verdau unterzogen. Man erhält tryptische Fragmente.
4. Die tryptischen Fragmente werden durch die RP-HLPC getrennt.
5. Die Proteinsequenz einiger Fragmente wird durch Edman-Abbau bestimmt.
6. Die Proteinsequenz wird nun in DNA-Code übersetzt. Da der genetische Code degeneriert ist, lässt sich die Sequenz nicht eindeutig übersetzen.
7. Anhand des DNA-Codes kann man nun Primer entwerfen (Degenerierter Primer)
8. Mit RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction) wird die cDNA isoliert.
9. Nun kann die DNA sequenziert werden.

● **Warum können Protein-Biochemiker ihre Finger nicht vom Nervengift Acrylamid lassen? Welche wichtigen Erkenntnisse kann man bei der Verwendung gewinnen?**

Aus Acrylamid und N,N'-Methylen-di-acrylamid (BIS) wird in situ Polyacrylamid (AA) hergestellt. Polyacrylamid wird zur Herstellung von Gelen für die Gel-Elektrophorese verwendet. Acrylamid ist in der unpolymerisierten Form ein Nervengift, in der polymerisierten Form ist es unschädlich.

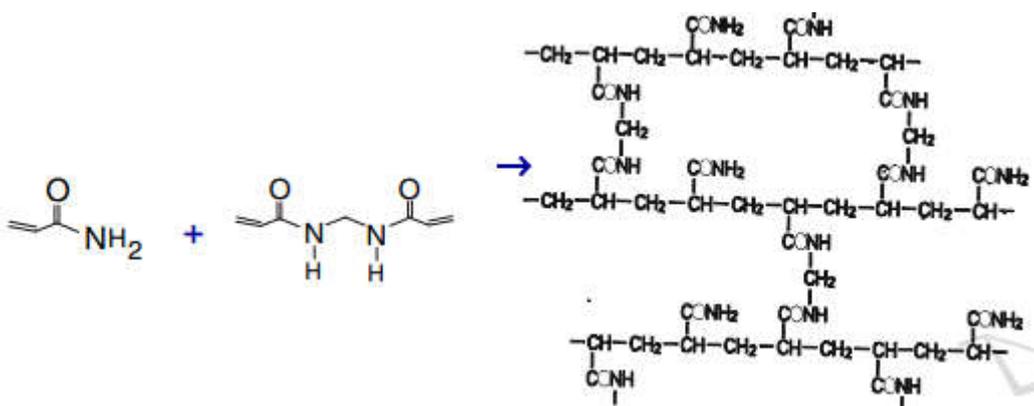
$$(g \text{ AA} + g \text{ BIS}) / 100 \text{ mL Gel} \rightarrow \% \text{ T}$$

$$g \text{ BIS} / 100 g (\text{AA} + \text{BIS}) \rightarrow \% \text{ C}$$

%T...Totale Konzentration von Acrylamid und N,N'-Methylen-di-acrylamid

%C...Konzentration des Vernetzers N,N'-Methylen-di-acrylamid

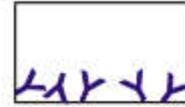
Die Porengröße nimmt proportional zu %T ab. Bei %C ergibt eine Konzentration von 5 % die kleinsten Poren. Der Einfluss des N,N'-Methylen-di-acrylamid auf die Porengröße ergibt eine parabelförmige Kurve.



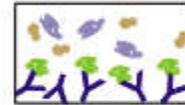
- **Wie kann man Interleukine quantitativ bestimmen?**

Der Antikörper, der spezifisch an das zu bestimmende Interleukin bindet, wird an einer Platte immobilisiert. Die Probe mit dem Interleukin wird nun zu den spezifischen Antikörpern gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Interleukin. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Dadurch werden die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt und zurück bleibt nur das am Antikörper gebundene Interleukin. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper zur Detektion zugegeben an dessen Ende ein Reporterenzym gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Interleukin und es entsteht der Antikörper-Interleukin-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Erst jetzt kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden. Es wird ein zum Enzym passendes Substrat zugegeben, das vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird und auf diese Weise dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz ermöglicht.

„Coaten“ mit Antikörper



Inkubation mit Probe  
„Capturing“



Auswaschen nicht-bindender Stoffe  
Inkubation mit 2<sup>tem</sup> Antikörper



- **Was lassen Sie im Probenpuffer weg, damit es nicht, wie meist, eine reduzierende, sondern eine nicht-reduzierende PAGE wird?**

Man lässt die Reduktionsmittel (2-Mercaptoethanol, DTT, DTE) weg.

- **Die Dimerisierung von biotechnologischen Produkten ist oft ein unerwünschtes Phänomen. Mit welcher Analysetechnik kann man den Gehalt an Dimer bestimmen?**

SDS-Elektrophorese: Das anionische Detergens Natriumlaurylsulfat lagert sich in regelmäßigen Abständen an Proteine an. Alle Proteine bekommen dadurch eine stark negative Ladung. Die Ladung ist proportional zur Größe des Proteins, da große Proteine mehr SDS binden können als kleine. Die Proteine werden wie bei der nativen Elektrophorese auf ein Gel aufgetragen. Da alle Proteine jetzt negativ geladen sind, wandern alle zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zur Ladung und somit zur Größe. Der Nachteil an dieser Methode ist, dass die Proteine denaturiert werden und ihre biologische Aktivität verlieren.

Gelfiltration: Die Gelfiltration ist eine Chromatografiemethode, die in einer mit porösem Material gefüllten Säule durchgeführt wird. Proteine mit kleinem Molekulargewicht dringen in die Poren ein und werden zurückgehalten, während Proteine mit großem Molekulargewicht nicht in die Poren passen und die Säule somit schnell passieren. Am Ende der Säule werden die verschiedenen Fraktionen gesammelt. Wegen der unterschiedlichen Durchlaufgeschwindigkeiten befinden sich in der ersten Fraktion die Proteine mit dem größten Molekulargewicht und in den hinteren die mit dem kleineren Molekulargewicht. Es erfolgt somit eine grobe Trennung nach der Proteingröße.

• **Wie lautet die geläufige Abkürzung für Natriumlaurylsulfat und welche Rolle spielt dieser Stoff bei der Protein-Elektrophorese? Bitte auch mit Formel!**

Die gängige Abkürzung für Natriumlaurylsulfat lautet SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate). SDS lagert sich in regelmäßigen Abständen an Proteine an. Alle Proteine bekommen dadurch eine stark negative Ladung die proportional zur Größe des Proteins ist. Die Proteine werden wie bei der nativen Elektrophorese auf ein Gel aufgetragen. Da alle Proteine jetzt negativ geladen sind wandern sie zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zur Ladung und somit zur Größe. Der Nachteil an dieser Methode ist, dass die Proteine denaturiert werden und ihre biologische Aktivität verlieren.

• **Welche Probleme können bei der Proteinsequenzierung auftreten?**

- Blockierung des N-Terminus (bei ganzen Proteinen)
- Löslichkeit hydrophober Peptide
- Übersehen sehr kleiner Peptide
- Reinheit

● **Welche chromatografische Methode wird zum Entsalzen bzw. Umpuffern verwendet?**

Zum Umpuffern bzw. Entsalzen wird die Gelfiltration verwendet. Moleküle können je nach Größe nur einen mehr oder weniger großen Teil des Porenvolumens in den Gelpartikeln erreichen.

Vorteile beim Umpuffern bzw. Entsalzen:

- rasche Methode
- kurze Säulen
- Auftragsvolumen nicht kritisch

● **Was tat Herr Cohn mit Blut und Alkohol?**

Die Cohn-Fraktionierung ist ein Verfahren zur schonenden Auftrennung von Plasmaproteinen durch Fällung mit Ethanol bei niedrigen Temperaturen (0–10 °C). Ausgehend von verschiedenen Konzentrationen an Ethanol können durch Variation von pH, Ionenstärke, Proteinkonzentrationen und der Temperatur verschiedene Fraktionen für diagnostische und therapeutische Zwecke gewonnen werden. Beispielsweise handelt es sich bei der sog. Cohn-Fraktion I vorwiegend um den Faktor VIII (Blutgerinnung), die therapeutisch zur Stillung von Blutungen eingesetzt wird. Die Cohn-Fraktion II, die diagnostischen Zwecken (Nachweis des Rheumafaktors) dient, besteht hauptsächlich aus  $\gamma$ -Globulinen.

● **Welche Methode für die Proteinreinigung ist sehr selektiv?**

Die Affinitätschromatografie ist eine sehr selektive Methode und kann aufgrund ihrer hohen Selektivität auf die chromatografische Trennleistung verzichten. Die Affinitätschromatografie nützt die spezifische Bindung zwischen einem Protein und seinem Liganden.

Ablauf:

1. Das Proteingemisch durchströmt das Gel mit immobilisierten Liganden.
2. Das gesuchte Protein bindet spezifisch an immobilisierte Liganden. Nichtbindende Proteine werden ausgewaschen.
3. Nach dem Auswaschen wird das gebundene Protein durch einen freien Liganden eluiert.

Bei rekombinanten Proteinen kann man außerdem die Metallchelatchromatografie verwenden. Das rekombinante Protein wird mit einem His-Tag (6 His-Reste, C- oder N-Terminal) versehen. Der His-Tag komplexiert mit dem Metallion. Der Komplex kann dann mit Imidazol eluiert werden.

● **Wozu könnte im Protein-Expressions-Labor ein Anti-His6-Antikörper gut sein?**

Nur wenige natürliche Proteine haben ein His-Tag. Rekombinante Proteine werden oft mit einem His-Tag ausgestattet, damit sie leichter gereinigt werden können. Bei der Metallchelatchromatografie komplexieren die rekombinanten Proteine mit den Metallionen.

Wieso könnte man einen Anti-His6-Antikörper gebrauchen?

- Bei der Anwendung des Western-Blots könnte man die rekombinanten Proteine anfärben.
- Mittels Sandwich-ELISA könnte man ein rekombinantes Protein quantitativ bestimmen (primärer Antikörper).
- Als Antikörper in der Affinitätschromatografie.

- **Welche drei Methoden zur Massenbestimmung von Proteinen kennen Sie? Wählen Sie eine der drei aus und erklären Sie deren Funktionsprinzip.**

SDS-PAGE  
2D-PAGE  
MALDI-TOF  
Tandem-MS

- **Mit welchem Verfahren können Sie eine Proteinlösung trocknen unter Beibehaltung der biologischen Aktivität?**

Mittels Lyophilisation (Gefriertrocknung) kann eine Proteinlösung unter Beibehaltung der biologischen Aktivität getrocknet werden. Die Probe wird gefroren und im Vakuum getrocknet. Das vorhandene Wasser wird sublimiert bis das Produkt völlig trocken ist. Desweiteren werden flüchtige Stoffe entfernt. Es erfolgt keine Abtrennung von Salzen.

- **Warum kann man mit einem Peptid-Massen-Fingerprint ein Protein identifizieren? Was ist dafür Voraussetzung? Werden Sie damit große Erfolge feiern, bei der Forschung an der haarigen West-Kaschmirnatterzunge?**

Das Protein wird in einzelne Fragmente zerteilt (z.B. durch Trypsin-Verdau). Die Massen der einzelnen Peptide wird dann mit einer Datenbank verglichen. Voraussetzung für einen Peptid-Massen-Fingerprint ist, dass das Protein rein vorliegt. Dies ist meistens nicht der Fall. Um die Peptidmassen mit einer Datenbank vergleichen zu können, muss das Protein vorher schon einmal identifiziert worden sein. Da die Kaschmirnatterzunge unbekannt ist und es deswegen auch keine Einträge in der Datenbank gibt, ist dieses Verfahren zur Erforschung dieser Pflanze ungeeignet.

- **Sie haben mittels Edman-Abbau einige Peptide eines hochinteressanten und noch unbekanntes Proteins sequenziert. Jetzt wollen Sie für die Amplifizierung der cDNA Primer herstellen. Vor welchem Problem stehen Sie dabei? Wie werden die Primer schließlich aussehen? Welche Peptidabschnitte werden Sie bevorzugen?**

Die ermittelte Aminosäuresequenz der Peptide lässt sich nicht eindeutig in DNA übersetzen. Man verwendet deshalb sogenannte degenerierte Primer. Die Primer sollten möglichst Methionin- und Tryptophanreich sein, da diese nur jeweils ein mögliches Basentriplett haben.