

**Klausur zum Vertiefungsmodul
Biochemie- Synthetische Biologie und Proteomik
WS 2011/2012**

Aufgabe 1 (12 Punkte)

Sie haben das Peptid X mit der Sequenz Met – Arg – Lys – Val – Ser – Gly und das Peptid Y mit der Sequenz Glu – Gly – Ala – His – Trp – Leu vorliegen.

- a.) Sagen Sie voraus, welche Nettoladung diese beiden Peptide bei den pH-Werten 2,0; pH 7,0 und 11 besitzen.
- b.) Was bedeutet der isoelektrische Punkt? Wo befindet er sich bei Peptid X bzw. bei Peptid Y?
- c.) Welche der in diesen Peptiden vorkommende Aminosäure kann durch eine Proteinkinase phosphoryliert werden? Welchen Einfluss hat die Phosphorylierung auf die Ladung des Peptids?

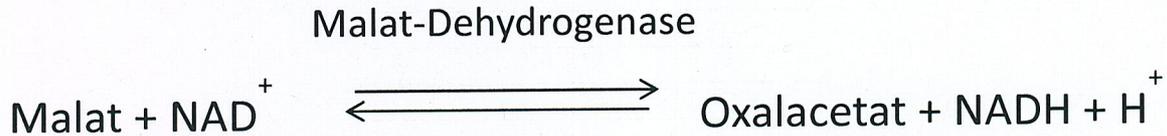
Aminosäure	pK α -COOH	pK α -NH ₂	pK Seitenkette
Alanin	2,3	9,9	
Arginin	2,81	9,09	13,2
Asparagin	2,02	8,80	-
Asparaginsäure	1,88	9,60	3,65
Cystein	1,71	10,78	8,33
Glutaminsäure	2,19	9,67	4,25
Glycin	2,21	9,15	-
Histidin	1,78	8,97	5,97
Isoleucin	2,32	9,76	-
Leucin	2,4	9,6	-
Lysin	2,20	8,90	10,28
Methionin	2,28	9,21	-
Phenylalanin	2,58	9,24	-
Prolin	1,99	10,60	-
Serin	2,21	9,15	-
Threonin	2,10	9,12	-
Tryptophan	2,15	9,12	-
Tyrosin	2,20	10,07	9,11
Valin	2,30	9,60	-

Aufgabe 2 (8 Punkte)

- a) Nennen Sie eine säulenchromatographische Methode, mit der Sie aus einem Gemisch Peptid X von Peptid Y trennen können. Beschreiben Sie das Prinzip der Auftrennung.
- b) Zeichnen Sie ein Chromatogramm dieser Auftrennung und erklären Sie das Elutionsverhalten der Peptide. (Beschriftung der Achsen, Beschriftung der erwarteten Peaks!)
- c) Können Sie diese beiden Peptide an Hand ihres Absorptionsspektrums bei 280 nm unterscheiden? Begründung!

Aufgabe 3 (15 Punkte)

Die mitochondriale Malatdehydrogenase ist ein zentrales Enzym im Citratzyklus, das die Oxidation von Malat zu Oxalacetat katalysiert:



Dadurch, dass NADH im Gegensatz zu NAD^+ UV-Licht bei 340 nm absorbiert, kann dessen Entstehung während der Reaktion und damit die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat leicht photometrisch verfolgt werden. Die Malat-Dehydrogenase wird spezifisch durch Inhibitoren aus der Gruppe der Paullone (7,12-Dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-one) gehemmt, die antiproliferative Eigenschaften besitzen. Mit einer kommerziell erhältlichen Enzympräparation führen Sie 2 Messreihen durch, eine ohne und eine mit dem Inhibitor, den Sie in einer Endkonzentration von 30 μM zugeben. Sie erhalten folgende Messwerte:

[Malat] in mM	ohne Inhibitor $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$	mit Inhibitor $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$
0,5	0,428	0,239
1,0	0,712	0,428
1,5	0,918	0,586
3,0	1,285	0,918
12,0	1,833	1,606

Bitte Rechenwege so darstellen, dass sie nachvollziehbar sind!

a) Entspricht die Reaktion der Malat-Dehydrogenase der Michaelis-Menten Kinetik? Begründen Sie ihre Antwort an Hand einer graphischen Darstellung (Beschriftung!).

Angaben zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten:

Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340\text{nm}}$ von NADH beträgt $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Schichtdicke der Küvette: 1 cm.

b) Bestimmen Sie die Werte für K_M und V_{max} ihrer Malat-Dehydrogenase-Präparation mit und ohne Inhibitor durch eine graphische Darstellung (Lineweaver-Burk).

c) Um welchen Inhibitortyp handelt es sich bei den Paullonen? Begründung! Bestimmen Sie den K_i -Wert für den Inhibitor.

d) Nennen Sie eine weitere Art der reversiblen Inhibition. Wie wirkt in diesem Fall der Inhibitor und welchen Einfluss hat er auf den K_M – Wert und V_{max} – Wert.

Aufgabe 4 (15 Punkte)

Sie klonieren die cDNA einer Proteinkinase in einen Expressionsvektor, der die Expression des rekombinanten Proteins mit einer N-terminalen hexa-Histidin-Sequenz in *E. coli* ermöglicht. Anschließend exprimieren Sie die His-getaggte Kinase in 100 ml *E.coli*-Kultur, schließen die Zellen durch Sonifizieren auf, zentrifugieren unlösliches Material ab und geben den Überstand über eine Ni-NTA-Agarose-Säule. Nach einigen Waschschrinen eluieren Sie die gebundenen Proteine und sammeln diese in 5 Fraktionen à 1 ml. Sie stellen 1:10-Verdünnungen her und messen die Extinktion bei 280 nm. Sie erhalten folgende Werte:

	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5
A_{280}	0.00017	0.00270	0.05780	0.01972	0.00070

- a) Wie nennt sich das angewandte Chromatographieverfahren und auf welchem Prinzip beruht es? Geben Sie zwei Möglichkeiten zur Elution des rekombinanten Proteins von der Säule an.
- b) Berechnen Sie die Konzentration an rekombinantem Protein in den einzelnen Fraktionen (Extinktionskoeffizient ϵ_{280} : $14250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Schichtdicke der Küvette: 1 cm).
- c) Berechnen Sie die Gesamtausbeute (in mg/L) an rekombinantem His-getaggttem Protein (Molekulargewicht: 59850 g/mol), die Sie aus 100 ml *E.coli*-Kultur erhalten haben. Wie hoch ist die prozentuale Ausbeute der Fraktion 3 bezogen auf die Gesamtausbeute.
- d) Worauf beruht die Möglichkeit, Proteinkonzentrationen mit dem UV-Spektrometer zu bestimmen? Nennen Sie zwei weitere Möglichkeiten der Proteinbestimmung und erklären Sie das entsprechende Prinzip.