Modul Biophysik – SS 2018
Teilklausur „Biophysikalische Grundlagen der Zellphysiologie“

am 24.07. 2018

Name: Muster Rosa **Matrikel-Nr.:** St.N **Semester:** .....

Außer einem Taschenrechner und einem DIN A4 Blatt mit Formeln sind keine sonstigen Hilfsmittel erlaubt!

1. Lipide

Viele Schlangen- und Wespengifte enthalten ein Enzym (Phospholipase A2), das die Hydrolyse von Phospholipiden zu sogenannten „Lyso-Phospholipiden“ katalysiert. Erklären Sie auf der Grundlage struktureller biophysikalischer Überlegungen, warum ein Klapperschlangenbiss bzw. Wespenstich zu außerordentlichen Zellmembranschädigungen führen. (4 Punkte)

- Lipide mit 2 Acylketten: Flächenbedarf der Kopfgruppe und Volumenbedarf (Anzahl der Acylketten) der Acylkette gestatten Bildung einer planaren Lipiddoppelschicht (Skizze !)
- Dialcyllipid wird durch PLA_2 hydrolysiert. → Esterbindung zwischen Fettsäure und Glycerol-Backbone wird gespalten. Lipid mit nur einer Acylkette bilden keine Lipiddoppelschichten → Mizellen → Lyse der Zellmembran

2. Konzentrationsbestimmung

Sie wollen die Konzentration eines Peptids in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch in einer Quarzglasküvette bestimmen.

a) Kennzeichnen Sie die Aminosäuren der folgenden Polypeptidkette, die für die Lichtabsorption bei λ = 280 nm von Bedeutung sind und somit den Extinktionskoeffizienten ε_{280} der Polypeptidkette wesentlich bestimmen. (3 Punkte)

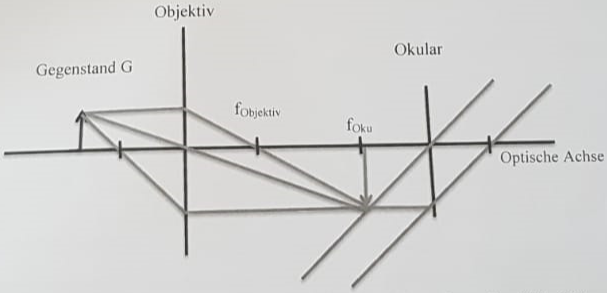
Met-Asn-Ile-Pro-Phe-Phe-Ala-Met-Ala-Trp-Tyr-Leu-Val-
Lys-Pro-Trp-His-Pro-Asp-Glu-Trp-Gly-Arg-Ala-Tyr-His

b) Um mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes die Peptidkonzentration bestimmen zu können, muss der Extinktionskoeffizient ε_λ des oben genannten Polypeptids bekannt sein. Wie ist $\varepsilon_{Polypeptid,\lambda}$ zu berechnen, wenn die Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{Aminosäure,\lambda}$ der von Ihnen ausgewählten Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm gegeben sind? (2 Punkte)

- Optische Dichten (Absorption) sind für ein λ additiv
- ε(Polypeptide) = 2 x ε(Phe) + 3 x ε(Trp) + 2 x ε(Tyr)

3. Lichtmikroskopie

a) Skizzieren Sie den Abbildungsstrahlengang eines klassischen Lichtmikroskops unter der Annahme Köhlerscher Beleuchtung! Beschriften Sie Ihre Skizze genau! (3 Punkte)



b) Wo wird das betrachtete Objekt durch das Okular eines Mikroskops abgebildet? Um was für ein Bild handelt es sich? (1 Punkt)

Virtuelles Bild, links des Okulars, Skizze

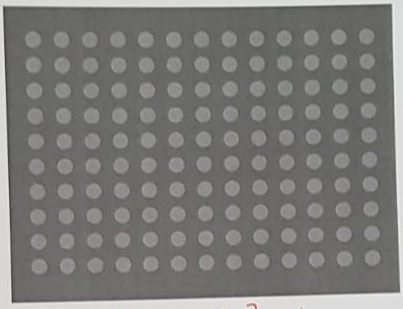
c) Um bei der Phasenkontrastmikroskopie Phasenverschiebungen in Helligkeitsunterschieden darstellen zu können, sind in einem Phasenkontrastmikroskop ein Phasenring sowie eine Ringblende eingebaut. Wo befinden sich diese im Strahlengang des Mikroskops. Begründen Sie Ihre Antwort. (3 Punkte)

→ Ringblende: unmittelbar am Kanden der Phasenring: Brennebene des Objektivs zw. Objektiv u. Okular

→ Durch Ringblende wird sicher gestellt, daß Hauptmax. des Beugungsbild auf Ring-Kreis in der Fokalebene → Phasenversch. um λ/4 durch Phasenring

4. Optische Abbildung im Auge

Erklären Sie biophysikalisch, warum die visuelle Betrachtung der dargestellten roten Punkte vor blauem Hintergrund unangenehm ist. (3 Punkte)



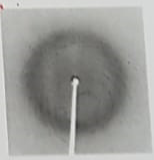
Chromatische Aberration, $\lambda_{blau} < \lambda_{rot}$

$f = f(r)$, $r = r(n)$ und $n = n(\lambda) \Rightarrow f_{Augenlinse} = f(\lambda)$

$\Rightarrow$ Dispersion führt somit zu unterschiedlichen Bildweiten $\Rightarrow$ Regulierung durch Augenlinse nicht möglich!

5. Proteinkristallographie

Exponiert man einen Proteinkristall mit mono-chromatischer Röntgenstrahlung, so wird diese an den Gitterebenen des Kristalls gestreut. In der nebenstehenden Abbildung ist ein typisches Röntgenbeugungsbild eines solchen Kristalls gezeigt. Die im Beugungsbild gefundenen Reflexe werden „Bragg-Reflexe" bezeichnet.



a) Unter welchen Streuwinkeln θ sind Bragg-Reflexe zu beobachten? Entwickeln Sie unter Verwendung der unten stehenden Skizze hierfür einen Zusammenhang zwischen θ, d und λ. d bezeichnet den Abstand zweier Gitterebenen im Kristall; λ ist die Wellenlänge der Röntgenstrahlung. (3 Punkte)

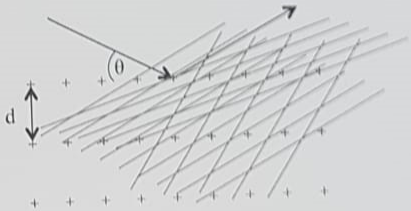
Bragg Bedingung / Konstruktive Interferenz: $2\,\delta = n\,\lambda$
wobei $n = 1, 2, 3, \ldots$

mit $\delta = d \sin\theta$



$2\,d\,\sin\theta_n = n\,\lambda$

b) Warum sieht man so viele konstruktive Beugungsreflexe im Beugungsbild eines Proteinkristalls? (2 Punkte)



- Braggreflexe bei n = 1, 2, 3, 4, ...
- Beugung der Rö-Strahlung an unterschiedlichen Gitterebenen (Skizze) mit unterschiedlichem d_{hkl}

c) Woran kann man an einem Röntgenbeugungsbild erkennen, dass es sich um das Beugungsbild eines Protein- und nicht das eines Salzkristalls handelt? (2 Punkte)

Proteine sind wesentlich größer als Ionen → Gitterabstand in Proteinkristall ist größer in Proteinkristall als in Salzkristall → $\sin\theta_n = n\,\lambda / 2\,d$ → θ_n kleiner → engerer Abstand der Beugungsreflexe

d) Warum ist die kristallographische Strukturbestimmung von Molekülen nur mit Röntgenstrahlung sowie ggf. mit „Elektronenstrahlen" oder „Neutronenstrahlen" möglich, nicht aber mit Mikrowellen oder Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich? (2 Punkte)

- $2\,d\,\sin\theta_n = n\,\lambda$
- λ (sichtbarer Wellenlängenbereich) 300 – 700 nm
- Molekülgröße 1 – 10 nm
- d im nm-Bereich
- mit $n \times 300 \times 10^{-9}\ m / 2 \times 10^{-9}\ m > 1$ keine Lösung der Braggbedingung → keine Bragg-Reflexe
- λ (Elektronen, Neutronen) jedoch im Subnanometer oder Nanometer-Bereich → Lösung der Bragg-Bedingung möglich

6. Zentrifugation

Sie wollen die große 50 Svedberg - Untereinheit des prokaryontischen Ribosoms, mit Hilfe einer präparativen Ultrazentrifuge isolieren. Bei ausgeschwungenem Zentrifugenbecher

beträgt der minimale Radius (Flüssigkeitsoberfläche) 50 mm. Der maximale Radius (Boden des Bucket) beträgt 100 mm. Sie zentrifugieren mit der maximal zugelassenen Rotorgeschwindigkeit von 28000 U/min (Umdrehungen/Minute).

a) Wie lange müssen Sie zentrifugieren, um die ribosomale Untereinheit vollständig zu sedimentieren? Leiten Sie aus der Definition des Svedbergkoeffizienten s die Formel für die Klärzeit t her und berechnen Sie diese:

Sedimentationskoeffizient: $s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$, 1S = 1 Svedberg = 10^{-13} sec (6 Punkte)

$$\frac{dr}{r} = S \cdot \omega^2 dt; \quad \int_{r1}^{r2} \frac{dr}{r} = S \cdot \omega^2 \int_0^t dt, \quad \ln(r2) - \ln(r1) = S \cdot \omega^2 \cdot t;, \quad t = \frac{\ln(r2) - \ln(r1)}{S \cdot \omega^2}$$

$$\omega = \frac{2\pi}{T} = \left(\frac{2\pi}{(1/Upm)} \right) = \frac{2\pi}{\frac{60\,\text{sec}}{28000}} = \frac{2\pi}{60\,\text{sec}} 28000 = 2932.15 \frac{1}{\text{sec}}$$

$$t = \frac{\ln(r2) - \ln(r1)}{S \cdot \omega^2} = \frac{\ln(100) - \ln(50)}{50 \cdot 10^{-13}\,\text{sec} \cdot 2932.15^2\,\text{sec}^{-2}} = 16124\,\text{sec} = 4.478h = 4h28\,\text{min}$$

b) Ein Ribosom ist ein Ribonucleoproteinpartikel mit einer Svedbergkonstanten von 70 S. Es besteht aus einer kleinen (30 S) und einer großen (50 S) Untereinheit. Erklären Sie in Worten, warum die Sedimentationskoeffizienten nicht additiv sind. (1 Punkt)

- Reibung, Form → Größe nicht additiv

7. Diffusion

Der Signaltransfer von Neuron zu Neuron, d.h. von Pre- zu Post-Synapse erfolgt über den synaptischen Spalt via Diffusion. Der Diffusionskoeffizient der Neurotransmitter liegt bei $D = 10^{-9}$ m^2/s.

a) Wie lange braucht ein Neurotransmitter im Mittel um einen Spalt von 200 nm per Diffusion zu überbrücken? (2 Punkte)

- Einstein: $2\,D\,\Delta t = \langle x(t)^2 \rangle$
- $\Delta t = \langle x(t)^2 \rangle / 2D = (2 \times 10^{-7}\,\text{m})^2 / (2 \times 10^{-9}\,\text{m}^2/\text{s}) = 2 \times 10^{-14} \times 10^{9}\,\text{s} = 2 \times 10^{-5}\,\text{s} = 20\,\mu\text{s}$

b) Wie lange bräuchte ein Neurotransmitter im Mittel, wenn der Spalt von 200 nm auf 2 µm verbreitert werden würde? (1 Punkt)

- $x_2 = 10\,x_1$

– Δt würde um den Faktor 100 zunehmen → $\Delta t = 2 \times 10^{-3}$ s = 2 ms

8. Diffusionsfluss

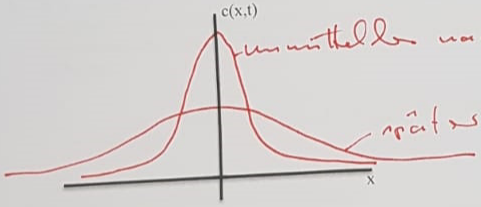
Eine lange Muskelfaser der Querschnittsfläche A wird auf etwa halber Länge mit einer Glaskapillare mit feiner Spitze eingestochen. Zur Zeit t = 0 wird durch diese ein Indikatorfarbstoff der Menge Q lokal in die Faser injiziert. Wählt man die x-Richtung längs der Muskelfaser, so kann die Ausbreitung des Farbstoffs als eindimensionaler Diffusionsvorgang nach folgender Formel beschrieben werden:

$$c(x,t) = \frac{Q}{A\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-\left(\frac{x^2}{4Dt}\right)}$$

a) Skizzieren Sie *qualitativ* die Konzentrationsverteilung des injizierten Farbstoffs

- unmittelbar nach der Injektion, sowie
- zu *einem* späteren Zeitpunkt. (2 Punkte)

– Zwei Gauss'sche Glockenkurven mit etwa gleichen Flächen



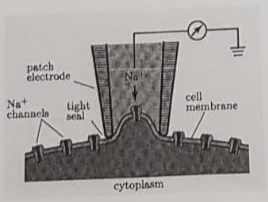
unmittelbar nach Injektion
später
wichtig: gleiche Flächen!

b) Geben Sie eine Formel an, mit der zum Zeitpunkt t der Diffusionsfluss J_x des Farbstoffs durch die Querschnittsfläche A der Faser im Abstand x von der Eintrittsstelle berechnet werden kann. (2 Punkte)

$$J_x = -A \cdot D \frac{dc}{dx} = -AD \frac{Q}{A\sqrt{4\pi Dt}} \frac{-2x}{4Dt} \cdot e^{-\left(\frac{x^2}{4Dt}\right)} \cdot N_A$$

$$= 1{,}38 \cdot 10^{11} \frac{1}{s}$$

9. Ionenkanäle



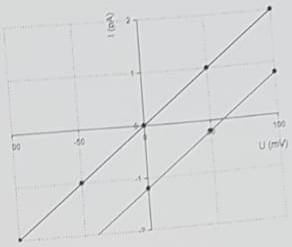
Mit Hilfe von „Patch-Clamp" - Messungen kann die Leitfähigkeit von einzelnen Ionenkanälen in Zellmembranen bestimmt werden.
Bei einer Elektrolytkonzentration von *150 mM NaCl auf beiden Seiten* der Membran beträgt die Leitfähigkeit G_{Na}

eines typischen einzelnen Natriumkanals in einem sog. „inside-out patch“ $G_{Na} = 20\,pS$.

a) Skizzieren Sie im richtigen Maßstab die ohmsche Strom-Spannungskennlinie eines offenen Natriumkanals unter den oben genannten Bedingungen in das vorgegebene Achsenkreuz. Achten Sie auf den richtigen Maßstab und die Beschriftung der Achsen! (2 Punkte)

Hinweis: $1[S] = 1\left[\frac{1}{\Omega}\right]$

– Lösung: $U = R \cdot I \Rightarrow I = G_{Na} \cdot U$

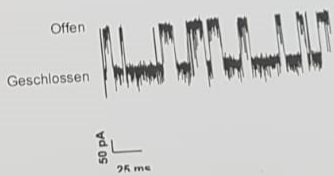


b) Wie verändert sich die Kennlinie für den Natriumstrom, wenn die cytoplasmatische Natriumionenkonzentration der physiologischen Konzentration von 15 mM Na^+ in der Zelle entsprechen würde? Tragen Sie die neue Kennlinie in das obige Achsenkreuz ein! (2 Punkte)

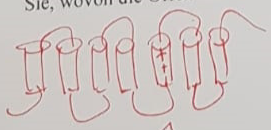
– Lösung: $I = G_{Na} \cdot (U - U_{Nernst}), \quad U_{Nernst} = 60mV \log\frac{150}{15} = 60mV$

10. Offenwahrscheinlichkeit von Ionenkanälen

Ionenkanäle stellen keine starren kontinuierlich geöffneten oder geschlossenen Membranporen dar, sondern lassen intermittierend einen Ionenfluss durch die Membran zu. Die Kanäle schalten also ständig zwischen einem Offen- und einem Geschlossen-Zustand. Dieses Phänomen nennt man „Gating“.



a) Erklären Sie dieses Phänomen für spannungs-abhängige Ionenkanäle und beschreiben Sie, wovon die Offenwahrscheinlichkeit eines solchen Kanals abhängt. (3 Punkte)



× 4 → „Tetramer“

$k_B T \sim 25\,meV$

$i\, z \cdot e \cdot \Delta V \cdot \delta = \Delta E$

$\approx 2\text{-}3\, k_B T$!

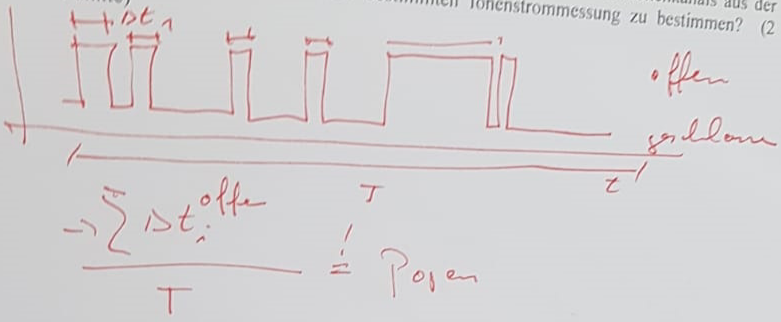
– S4 Segment typ. Ionenkanäle pos. geladen

→ ΔV ⇒ Verschiebung des S4 Segments

→ 2 Energiezustände → Differenz d. Energiezustand $\Delta E = \delta z \cdot e \cdot \Delta V$

→ Boltzmannvert. erklären → spontanes Öffnen wenn $\Delta E \sim k_B T$

b) Wie müsste man vorgehen, um die Offenwahrscheinlichkeit eines Ionenkanals aus der oben dargestellten experimentell bestimmten Ionenstrommessung zu bestimmen? (2 Punkte)



c) Der Selektionsfilter von Kaliumkanälen verhindert die Passage von Natriumionen, obwohl diese kleiner als Kaliumionen sind. Erklären Sie diesen Sachverhalt. (3 Punkte)

- Hydratisierung von Na^+- und K^+-Ionen diskutieren
- Ionen – Dipol WW mit Wasser diskutieren
- Abstandsabhängikkeit der WW sehr stark ($1/r^4$ bis $1/r^6$)

- Skizze der Filterregion eines K^+-Kanals

- Diskussion der Dipole in der Filterregion eines K^+-Kanals
- Energetischer Vergleich Stripping von hydratisierten Na^+- und K^+-Ionen
- Wie wahrscheinlich ist es, dass Na^+- bzw. K^+-Ionen dehydratisiert werden?

~~33 Punkte~~
50 Punkte