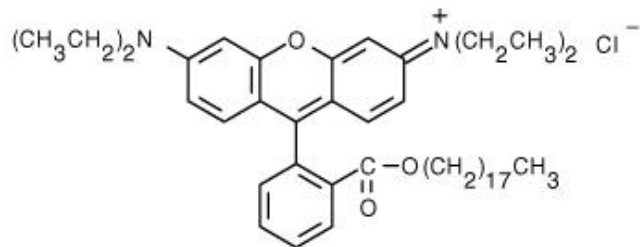


Tentamen Biochemie, , onderdeel Abrahams, 2e jaar MST, 26-09-2014  
Antwoorden

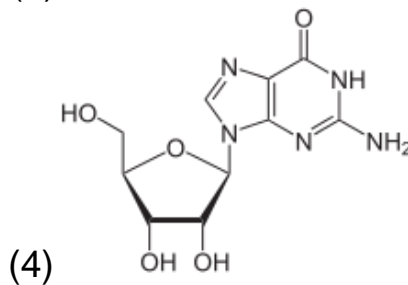
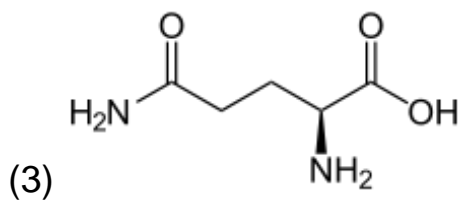
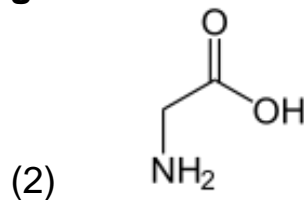
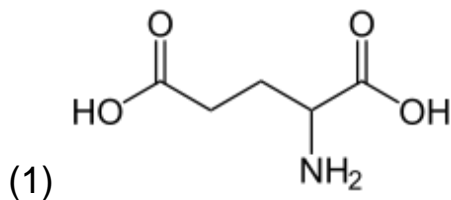
1. Hieronder is de structuur weergegeven van octadecyl rhodamine B chloride. Let op de alifatische  $(\text{CH}_2)_{17}$  keten die is veresterd aan het benzoic acid (benzoëzuur). De aromatische groepen zijn verantwoordelijk voor de rode kleur van deze verbinding.



U voegt deze verbinding toe aan levende cellen. Welke cellulaire structuren verwacht u dat in eerste instantie rood zullen worden gekleurd? Waarom? De cel neemt een bacterie op door deze te omstulpen middels fagocytose. Wat is hiervan de invloed op de aankleuring van de cel?

*In eerste instantie zal de buitenmembraan van de cellen rood worden gekleurd, aangezien de alifatische staart van het rhodamine zal inserteren in de lipide bi-laag van deze membraan. Wanneer een bacterie middels fagocytose wordt opgenomen, zal ook de membraan die de bacterie in de cel omsluit (het 'fagosoom') rood gekleurd worden, aangezien deze membraan een insnoering is van de (rood gekleurde) buitenmembraan van de cel.*

2. Geef de namen van de volgende moleculen:



(1) *Glutaminezuur (glutamaat)*, (2) *glycine*, (3) *glutamine*, (4) *guanosine*

3. Twee homologe eiwitten hebben eiwit kinase activiteit (ze fosforyleren eiwitten). Ze hebben dezelfde tertiaire structuur: na superpositie van beide structuren is de gemiddelde afwijking tussen de coördinaten van de homologe C $\alpha$  atomen minder dan 0.3 Ångström ( $10^{-10}$ m). Slechts 10% van de aminozuur zijketens van deze twee homologe eiwitten verschillen van elkaar. Ook de aminozuur zijketens verantwoordelijk voor de enzymatische reactie zijn identiek in beide eiwitten. Toch hebben beide eiwitten een verschillende functie in de cel. Beschrijf twee mogelijke redenen.

*(i) De aminozuren verantwoordelijk voor de herkenning van het substraat (dus niet voor de reactie met het substraat) verschillen. Beide kinases zullen dan andere eiwitten fosforyleren. (ii) De aminozuren die verschillen, zorgen ervoor dat het eiwit op een andere locatie in de cel aanwezig is (bv. doordat een modificatie van een aminozuur zijketen een alifatische staart aan een van de twee varianten vastzet, waardoor deze membraangebonden wordt).*

4. Hoe wordt het stop-codon herkend? Hoe zorgt deze herkenning van het stop-codon ervoor dat de eiwitketen het ribosoom verlaat? Een stopcodon wordt herkend door een eiwit, niet door een tRNA. Dit eiwit rekruteert ander eiwit dat de hydrolyse van de esterband tussen de eiwitketen en het tRNA op de P-site katalyseert, zodat deze van het ribosoom afvalt. Deze eiwitten worden ook wel 'release factoren' genoemd.

5. Een enkelstrengs (-)RNA virus waarvan het genetisch materiaal complementair is aan het mRNA, moet naast zijn genetisch materiaal minimaal één enzym in het virion dragen. Welke reactie zou dit enzym katalyseren?

*Het enzym zou RNA of DNA polymerase activiteit moeten hebben. Dan kopieert het enzym het virale RNA genoom naar mRNA of DNA, waarna de andere virale eiwitten kunnen worden gesynthetiseerd door de transcriptie/translatie factoren van de gastheer. Zo'n RNA kopiërend enzym is normaal niet aanwezig in een gezonde cel en moet dus bij infectie worden ingebracht, samen met het genetisch materiaal. Zonder dit eiwit zal het virus zich niet kunnen repliceren.*

## Tentamen Biochemie, onderdeel Hagen, 2e jaar MST, 26-09-2014

### ANTWOORDEN

- A. **Hoe luidt de Michaelis-Menten vergelijking voor een enzym E gekatalyseerde omzetting van substraat S in product P? Wat betekenen de symbolen in deze vergelijking en in welke eenheden worden ze uitgedrukt?**

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

$v_0$  is initiële snelheid ( $t=0$ );  $V_{max}$  is maximale snelheid ( $[S]=\infty$ )  
Eenheden: 'iets' per tijdseenheid afhankelijk van definitie van activiteit, dus bijvoorbeeld  $s^{-1}$  of M/s of mol/s.

$[S]$  is substraatconcentratie;  $K_M = (k_2 + k_{-1})/k_1$  of  $K_M$  is substraatconcentratie waarvoor  $v_0 = V_{max}/2$ . Eenheden: concentratie, dus bijvoorbeeld M.

- B. **In aanwezigheid van een competitieve remmer verschijnt er een extra factor  $\alpha$  in de Michaelis-Menten vergelijking. Leg uit wat een competitieve remmer is en definieer de factor  $\alpha$ .**

Een competitieve remmer, I, is structureel verwant met het substraat (e.g. chloorethanol en ethanol) en bindt reversibel d.m.v. deze verwantschap in het actieve centrum van het enzym, E, op dezelfde plaats als waar het substraat zou binden onder vorming van het complex EI. Hierdoor is het enzym niet beschikbaar totdat de remmer dissociëert.

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + [S]}; \quad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}; \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$\alpha$  is dimensieloos, de remmerconcentratie  $[I]$  is in M en de dissociatieconstante is ook in M.

- C. **Wat is de specificity constant  $k_{\text{cat}}/K_M$ ?**  
**Wat is een diffusie-gelimiteerd enzym?**  
**Wat is het verband tussen deze twee zaken?**

$K_M$ (M) is gedefiniëerd bij vraag A.  $k_{\text{cat}}$  is de snelheidsconstante van de langzaamste stap in een schema



$k_{\text{cat}}$  is de enzymactiviteit uitgedrukt als moleculen S omgezet door 1 molecuul E in 1 seconde. Eenheden:  $s^{-1}$

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

De verhouding van  $k_{\text{cat}}$  en  $K_M$ , de specificity constant, is een maat voor hoe goed een enzym is.

Een diffusie-gelimiteerd enzym is katalytisch perfect: de reactiesnelheid wordt gelimiteerd door (i.e. is alleen nog afhankelijk van) de diffusie van S en E.

De specificity constant  $k_{\text{cat}}/K_M$  is maximaal  $\approx 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . In dit geval is het enzym diffusie-gelimiteerd.

- D. **Leg uit waarom magnesium een essentiële element is voor aards leven. Gebruik hierbij o.a. het HSAB principe.**

$\text{Mg}^{2+}$  zit relatief hoog en links in het Periodiek Systeem (kolom 2, rij 3) en is dus een hard Lewiszuur. Volgens het HSAB principe heeft het een voorkeur voor de vorming van coordinatiecomplexen met harde Lewisbasen, in het bijzonder met O-liganden zoals fosfaat, carboxylaat (Asp, Glu) en alcohol (Ser, Thr, Tyr). Interactie (binding en katalytische omzetting) van (negatief geladen) nucleotiden zoals ATP met (overall meestal negatief geladen) enzymen vereist altijd  $\text{Mg}^{2+}$  niet alleen voor ladingscompensatie, maar ook voor gerichte coordinatie om het substraat effectief te activeren.

- E. **Cellen koppelen de oxidatie van talloze organische voedingsstoffen aan de reductie van  $\text{NAD}^+$ . Leg uit waarom juist NADH de universele drager van reductie-equivalenten is geworden. Gebruik hierbij o.a. het begrip standaard reductiepotentiaal.**

De cel gebruikt water als universeel oplosmiddel en dit impliceert grenzen aan redoxchemie: Het koppel  $\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$  heeft  $E'^0 = -0.420 \text{ V}$  en het koppel  $2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{O}_2 + 4\text{e}^-$  heeft  $E'^0 = +0.830 \text{ V}$ .

Redoxchemie bij  $\text{pH} \approx 7$  buiten deze grenzen leidt tot  $\text{H}_2$  vorming uit protonen of  $\text{O}_2$  vorming uit water. Het koppel  $\text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + 2[\text{H}]$  heeft  $E'^0 = -0.320 \text{ V}$ . Deze waarde ligt net voldoende boven de waterstofpotentiaal bij  $\text{pH} = 7$  om geen problemen ( $\text{H}_2$  vorming) te veroorzaken, maar ligt wel zo laag mogelijk om het verschil met de water/zuurstof potentiaal zo groot mogelijk te maken zodat uit de oxidatie van NADH met  $\text{O}_2$  zo veel mogelijk energie gehaald kan worden volgens:  $\Delta G = -nF\Delta E$ .

Verder is NADH opgebouwd uit voor de cel gangbare bouwstenen (cf AMP) en dit is efficiënt uit het oogpunt van beperking van het aantal gebruikte bouwstenen en ontwikkeling van een beperkt aantal bindingsmotieven op enzymen. Tenslotte is het koppel  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  als organisch molecuul geschikt voor 2-electron redoxchemie met organische metabolieten.