

# Übung 6

Ausgabe 26.03.2018

Abgabe 16.04.2018

## 1 Gleichgewichtszentrifugation

Der erste Schritt im Metabolismus von Fructose ist deren Phosphorylierung unter Umsatz von ATP nach ADP. Hexokinase ist ein Enzym, welches die Phosphorylierung der Fructose katalysiert.

1. Bestimmen Sie anhand der Daten in Abbildung 1 das Molekulargewicht der Hexokinase in kDa.

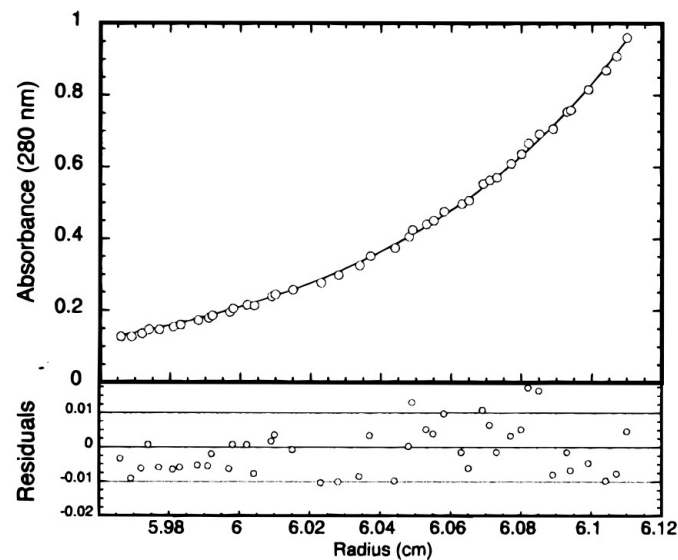


Abbildung 1: Gleichgewichtszentrifugation der Hexokinase bei 13'000 rpm gemessen durch Absorption bei 280 nm (y-Achse) für verschiedene Radien (x-Achse) bei pH 7.4 und einer Temperatur von 10°C.

2. Das Molekulargewicht der Hexokinase, welches bei der SwissProt (einer Proteindatenbank) auf Basis der Aminosäuresequenz berechnet wird, ist 53 kDa. Mit diesem Wissen diskutieren Sie das Ergebnis aus Teilaufgabe 1.
3. Die Diffusionskonstante der Hexokinase, gemessen bei 20° C in wässrigem Puffer, ist  $D = 7.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Berechnen Sie ebenso das Molekulargewicht der Hexokinase

auf Basis seiner Diffusionskonstante. Wieso gibt es Unterschiede zu Teilaufgabe 1 und welche Messung sollte genauer sein?

4. Wieso ist der Diffusionskoeffizient bei der Gleichgewichtszentrifugation nicht notwendig, während er für die Sedimentations-Geschwindigkeits-Zentrifugation (wie in Übung 5 Aufgabe 3) bekannt sein muss?

## 2 Tonizität von Erythrozyten

Die Zellmembran schützt eine Zelle vor seiner Umgebung. Da es sich jedoch um eine semipermeable Membran handelt, muss die Zelle ausserhalb und innerhalb der Zelle ein Osmolyt-Gleichgewicht aufrecht erhalten, um grosse osmotische Drücke zu vermeiden. Die Tonizität ist ein Mass für den effektiven osmotischen Druck. So ist zum Beispiel 154 mM NaCl isotonisch zu roten Blutkörperchen, was bedeutet, dass diese in 154 mM NaCl das gleiche Volumen besitzen wie im Blutplasma. In hypotonischer NaCl (kleinere Konzentration als 154 mM) schwellen rote Blutkörperchen an und können sogar platzen, während in hypertonischer NaCl (höhere Konzentration als 154 mM) diese schrumpfen. Aus Wikipedia (Übersetzt aus dem Englischen):

Eine typische menschliche rote Blutzelle hat einen Scheibendurchmesser von etwa 6.2–8.2  $\mu\text{m}$  und eine Dicke von 2.0–2.5  $\mu\text{m}$  an der dicksten Stelle beziehungsweise 0.8–1.0  $\mu\text{m}$  in der Mitte, was viel kleiner ist als die meisten anderen menschlichen Zellen. Sie besitzen ein durchschnittliches Volumen von 90 fL mit einer Oberfläche von etwa 136  $\mu\text{m}^2$  und können zu einer Kugelform anschwellen mit einem Volumen von 150 fL, ohne die Membran zu dehnen.

1. Definieren Sie Osmose, sowie den osmotischen Druck, und erklären Sie den physikalischen Ursprung des osmotischen Drucks.
2. Was sind die gelösten Stoffe in einem roten Blutkörperchen, die zur Tonizität beitragen?
3. Das Volumen eines Erythrozyten, welcher bei 37 °C von einer isotonischen in eine 100 mM NaCl Lösung überführt wird, nimmt schnell um 25 % zu. Berechnen Sie den Druckunterschied über die Membran in der neuen Lösung unter Annahme, dass die Membran lediglich für Wasser permeabel ist, nicht aber für die gelösten Stoffe (alle gelösten Stoffe besitzen  $\sigma = 1$ ).
4. Mit obiger Annahme, was sind die Werte für  $P$  und  $\sigma$  in Gleichung (III.8) im Skript für die gelösten Stoffe?
5. Schätzen Sie (Grössenordnung), wie lange es für die roten Blutkörperchen dauert in einer hypotonischen Lösung zu ihrem neuen Gleichgewichtsvolumen anzuschwellen. Welches Kräftegleichgewicht spielt in diesem Gleichgewicht eine Rolle?

### 3 Diffusion durch eine Lipidmembran

Der Fluss einer elektrisch neutralen Substanz (in unserem Beispiel 1,2-Propandiol) über eine Membran kann mit der Flussdichte  $\Phi$  beschrieben werden:

$$\Phi = P (c'_w - c''_w) = P \Delta c$$

wobei  $P$  der Permeabilitätskoeffizient und  $\Delta c$  die Differenz der Konzentration des Stoffes auf beiden Seiten der Membran ist. Für ein in der Lipidmembran und im Wasser lösliches Molekül wie 1,2-Propandiol stellt sich an den Grenzflächen schnell ein Verteilungsgleichgewicht mit Verteilungskoeffizient  $\gamma$

$$\gamma = \frac{c'_m}{c'_w} = \frac{c''_m}{c''_w}$$

ein, wobei  $c'_w$ ,  $c''_w$  die jeweiligen Konzentrationen von 1,2-Propandiol in den wässrigen Lösungen beidseits der Membran und  $c'_m$ ,  $c''_m$  die entsprechenden Konzentrationen an den Grenzflächen innerhalb der Membran sind. Fasst man die Membran als homogenen Flüssigkeitsfilm auf, so stellt sich ein linearer Konzentrationsgradient innerhalb der Membran ein. In den wässrigen Lösungen existiert hingegen kein solcher Gradient, da dort die Diffusion schnell ist relativ zu derjenigen in der Membran. Die Flussdichte durch die Membran wird somit durch den folgenden Ausdruck beschrieben:

$$\Phi = -D \frac{dc_m}{dx} = -D \frac{c''_m - c'_m}{d}$$

wobei  $D$  der Diffusionskoeffizient von 1,2-Propandiol in der Membran und  $d$  die Dicke der Membran ist. Wir betrachten eine Zellsuspension in der 1,2-Propandiol aus dem Medium in Zellen mit dem Radius  $r$  diffundiert. Die Konzentration im Innern der Zelle ist zu Beginn gleich Null und die Konzentration ausserhalb der Zellen (d.h.  $c'_w$ ) kann als konstant angenommen werden.

1. Leiten Sie aus den oben genannten Formeln den Zusammenhang zwischen dem Permeabilitätskoeffizienten  $P$  und dem Diffusionskoeffizienten  $D$  her.
2. Fertigen Sie eine qualitative Skizze der Situation an mit  $c'_w = 3.3 \text{ mM}$ ,  $\gamma = 5 \times 10^{-5}$  und  $d = 5 \text{ nm}$ . Wie sieht der Konzentrationsverlauf zum Zeitpunkt  $t = 0$  aus und wie zu einem späteren Zeitpunkt?
3. Finden Sie mit Hilfe der oben genannten Formeln einen Ausdruck für die Konzentration  $c''_w$  innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  und der Aussenkonzentration  $c'_w$ . Der Radius der Zellen betrage  $r = 4.0 \text{ }\mu\text{m}$  und der Diffusionskoeffizient von 1,2-Propandiol innerhalb der Membran sei  $D = 1.92 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Wie gross ist die Konzentration innerhalb der Zelle nach  $t = 150 \text{ ms}$ ? Nach welcher Zeit ist die Konzentration von 1,2-Propandiol innerhalb der Zelle halb so gross wie ausserhalb?

## 4 Membranpotential

Die Membranen von Muskelzellen enthalten einen Ionenkanal, der durch Bindung von Acetylcholin geöffnet wird und der für  $K^+$  und  $Na^+$  nahezu gleich permeabel ist. Für alle anderen Ionensorten ist der Kanal impermeabel. Die intra- und extrazellulären Konzentrationen seien  $c_{Na^+}^i = 25 \text{ mM}$ ,  $c_{Na^+}^a = 120 \text{ mM}$ ,  $c_{K^+}^i = 150 \text{ mM}$  und  $c_{K^+}^a = 20 \text{ mM}$ .

1. Die allgemeine Goldman-Gleichung für das Membranpotential lautet

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} c_{K^+}^a + P_{Na^+} c_{Na^+}^a + P_{Cl^-} c_{Cl^-}^i}{P_{K^+} c_{K^+}^i + P_{Na^+} c_{Na^+}^i + P_{Cl^-} c_{Cl^-}^a}.$$

Vereinfachen Sie die Gleichung unter der Annahme, dass  $P_{K^+}, P_{Na^+} \gg P_{Cl^-}$ .

2. Wie gross ist das Membranpotential  $V_m$ , wenn dieser Kanal geöffnet ist?
3. Vergleichen Sie das in Aufgabenteil 2 berechnete Membranpotential mit dem Membranpotential, das sich ergeben würde mit der Öffnung eines  $Na^+$ -spezifischen bzw. eines  $K^+$  spezifischen Kanals.
4. Berechnen Sie unter der Annahme in Aufgabenteil 1 ( $P_{K^+}, P_{Na^+} \gg P_{Cl^-}$ ) das Verhältnis der Permeabilitäten  $P_{K^+}/P_{Na^+}$  für das Tintenfischaxon mit den Konzentrationen  $c_{K^+}^a = 20 \text{ mM}$ ,  $c_{Na^+}^a = 440 \text{ mM}$ ,  $c_{K^+}^i = 400 \text{ mM}$  und  $c_{Na^+}^i = 50 \text{ mM}$  und einem Membranpotential  $V_m = -60 \text{ mV}$ .