

# Lösung 5

Musterlösung zum Übungsblatt 5 vom 19.3.2018

## 1 pH-Wert an der Zelloberfläche

1. Die Debye-Länge ergibt sich aus der Gouy-Chapman Theorie zu

$$l_D = \frac{1}{F} \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon R T}{2I}}. \quad (1)$$

*Anmerkung* : In der Formel wird - im Gegensatz zum Skript - mit der so genannten Ionenstärke gerechnet. Lesen sie dazu die Anmerkung im Skript auf S. 45. Die Ihnen bekannte Formel auf Seite 43 erhält man, da es sich um eine symmetrisch geladene Substanz handelt mit  $z = 1$ . Die Debye-Länge  $l_D$  ergibt sich dann zu

$$\begin{aligned} l_D &= \frac{1}{F} \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon R T}{2c_0}} \\ &= \frac{1}{9.65 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}} \sqrt{\frac{8.85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-1} \cdot 80 \cdot 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \cdot 330 \text{ K}}{2 \cdot 0.08 \text{ mol l}^{-1}}} \\ &= 1.14 \text{ nm}. \end{aligned} \quad (2)$$

2. Die Ladungsdichte  $\sigma$  ist als eine Elementarladung pro  $50 \text{ nm}^2$  gegeben durch

$$\sigma = \frac{-1.6022 \times 10^{-19} \text{ C}}{50 \cdot (10^{-9} \text{ m})^2} = -3.2 \times 10^{-3} \text{ C m}^{-2}. \quad (3)$$

Diese kann direkt in die Gleichung für das Grenzflächenpotential  $\varphi_0$  (Skript Gl. II.32) eingesetzt werden

$$\varphi_0 = \frac{\sigma l_D}{\varepsilon_0 \varepsilon} = -5.15 \text{ mV}. \quad (4)$$

3. Zur Prüfung der Annahme  $|\varphi_0| \ll RT/F$  wird  $RT/F$  bestimmt

$$\frac{RT}{F} = 28.4 \text{ mV}. \quad (5)$$

Das Grenzflächenpotential  $|\varphi_0|$  ist somit etwa sechs mal kleiner als  $RT/F$ . Die Annahme ist also nicht strikt gültig.

4. Der pH-Wert nimmt in unmittelbarer Nähe zur Zelloberfläche ab, da das negative Potential an der Oberfläche zu einer Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration führt. Dies bewirkt dementsprechend eine Abnahme des pH-Werts.

## 2 Sedimentation in einem Schwerefeld

1. Im statischen Fall wirken auf das Enzym die Gewichtskraft  $\vec{F}_G = m_p \vec{g}$  und die Auftriebskraft  $\vec{F}_A = -\rho_w V_p \vec{g} = -m_w \vec{g}$ . Wie bereits durch das Minuszeichen angedeutet, wirken beide Kräfte in entgegengesetzte Richtungen. Dabei ist  $V_p$  das Proteinvolumen,  $m_p$  die Masse des Enzyms und  $m_w$  die Masse des durch das Enzym verdrängten Wassers. Zusätzlich wirkt im dynamischen Fall eine der Bewegung entgegengesetzte Reibungskraft  $\vec{F}_R = -f \vec{v}$ , mit dem Reibungskoeffizienten  $f$  und der Sedimentationsgeschwindigkeit  $v$ .
2. Im Gleichgewichtsfall hat das Enzym seine maximale Endgeschwindigkeit  $v_{gg}$  (oder auch  $v_{drift}$  und  $v_{sed}$ ) erreicht und es wirken netto keinerlei Kräfte mehr

$$\begin{aligned} 0 &= \vec{F}_g + \vec{F}_A + \vec{F}_r \\ &= m_p \vec{g} - \rho_w V_p \vec{g} - f \vec{v}_{gg} \\ &= (m_p - \rho_w V_p) \vec{g} - f \vec{v}_{gg} \end{aligned}$$

Nun werden die Vektorpfeile weggelassen weil  $\vec{v}$  und  $\vec{g}$  in die gleiche Richtung zeigen

$$v_{gg} = g \cdot \frac{m_p - \rho_w V_p}{f} \quad (6)$$

Der Sedimentationskoeffizient  $s$  ist definiert als Geschwindigkeit, die ein Teilchen unter Einfluss eines Gravitationsfeldes erreicht ( $s = \frac{v}{g}$ ). Deshalb zeigt Gleichung 6 zusätzlich, dass

$$s = \frac{m_p - \rho_w V_p}{f} \quad \text{ist.} \quad (7)$$

Der Sedimentationskoeffizient hängt also von der Masse des Enzyms  $m_p$ , der Masse des verdrängten Wassers  $m_w$ , sowie dem Reibungskoeffizienten  $f$  ab. Der Reibungskoeffizient steht in Beziehung zum Radius eines kugelförmigen Teilchens über die Stokes-Gleichung, sowie zum Diffusionskoeffizienten und der Temperatur über die Einstein-Gleichung. Kombination beider Gleichungen ergibt die Stokes-Einstein-Gleichung.

3. Wenn man das erste Fick'sche Gesetz ignoriert, kann man die Zeit berechnen, die ein Molekül bräuchte, um die gefragte Strecke zurückzulegen.

$$\begin{aligned} s &= \frac{v}{g} \iff v = g \cdot s & (8) \\ v &= \frac{l}{t} \\ t &= \frac{l}{s \cdot g} \\ &= \frac{0.0150 \text{ m}}{22.7 \times 10^{-13} \text{ s} \cdot 9.81 \text{ ms}^{-2}} = 6.74 \times 10^8 \text{ s} \approx 21.4 \text{ a} \end{aligned}$$

In einem endlichen Volumen jedoch werden die Moleküle vom Boden her einen Gradienten bilden, welcher gemäss dem 1. Fickschen Gesetz dem Abwärtsfluss entgegenwirkt. Das Gleichgewicht, das erreicht wird, ist im Skript auf den Seiten 50 und 51 beschrieben. In Wirklichkeit wird ein Protein von mässiger Grösse immer fast gleichmässig verteilt sein in der Lösung, wenn nur die Gravitationskraft abwärts wirkt. Man bräuchte mehrere tausend  $g$ , um einen signifikanten Gradienten in der Proteinkonzentration zu erreichen.

4. Wie in Teilaufgabe 3 werden wir den Diffusionseffekt vernachlässigen, um zu sehen, wie schnell sich Proteine unter starker Zentrifugalbeschleunigung bewegen können. In einer Zentrifuge wirkt die Zentrifugalbeschleunigung  $a_z = \omega^2 r$  auf das Enzym. Diese ersetzt den Ortsfaktor der Gravitation, so dass  $v = a_z s = \omega^2 r s$ . Da die Geschwindigkeit  $v$  der Ableitung des Ortes  $r$  nach der Zeit  $t$  entspricht, kann man mittels Trennung der Variablen integrieren.

$$v = \frac{dr}{dt} = \omega^2 r s \quad (9)$$

$$\int_{r_1}^{r_2} \frac{1}{r} dr = \omega^2 s \int_{t_1}^{t_2} dt$$

$$\ln \frac{r_2}{r_1} = \omega^2 s (t_2 - t_1) = \omega^2 s \Delta t \quad (10)$$

Unter Verwendung der Beziehung  $\omega = 2\pi\nu$  zwischen Kreisfrequenz  $\omega$  und Frequenz  $\nu$  kann man nach der Frequenz auflösen

$$\nu = \sqrt{\frac{\ln(r_2/r_1)}{4\pi^2 s \Delta t}} \quad (11)$$

$$= \sqrt{\frac{\ln(10.0/6.00)}{4\pi^2 \cdot 22.7 \times 10^{-13} \text{ s} \cdot 3600 \text{ s}}}$$

$$= 1.26 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \approx 75\,500 \text{ rpm}$$

5. Wie erklärt in Teilaufgabe 3, führt die Sedimentation zu einem Konzentrationsgradient. Aber, nach dem 1. Fick'schen Gesetz werden sich die Moleküle entgegen dem Konzentrationsgradient bewegen. Anders ausgedrückt, die Diffusion der Enzyme wirkt der Sedimentation in der Zentrifuge entgegen. Wenn sich diese Prozesse schliesslich ausgleichen, führt das zu einer Gleichgewichtsdistribution der Moleküle (siehe Abschnitt **II.7.4** im Skript).
6. Den Reibungskoeffizienten erhält man über die Stokes-Einstein-Gleichung

$$f = \frac{k_B T}{D} = \frac{1.38066 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1} \cdot 298.15 \text{ K}}{3.14 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}} = 1.31 \times 10^{-10} \text{ kg s}^{-1} \quad (12)$$

7. Wie wir in Gleichung 7 gezeigt haben, ist der Sedimentationskoeffizient direkt proportional zur Masse des Teilchens. Mit der Definition des spezifischen Volumens  $\tilde{V} = \frac{V}{m}$ , kann die Gleichung 7 wie folgt geschrieben werden:

$$s = \frac{m_p - \rho_w m_p \tilde{V}_p}{f} \quad (13)$$

Aufgelöst nach  $m_p$  ergibt

$$m_p = \frac{s \cdot f}{1 - \rho_w \tilde{V}_p} \quad (14)$$

$$= \frac{22.7 \times 10^{-13} \text{ s} \cdot 1.31 \times 10^{-10} \text{ kg s}^{-1}}{1 - 998 \text{ kg m}^{-3} \cdot 7.34 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}}$$

$$= 1.11 \times 10^{-21} \text{ kg} \Rightarrow M_p = 670 \text{ kDa}.$$

### 3 Sedimentation in einer Zentrifuge

1. Die durchschnittliche Distanz, die die Proteine zurückgelegt haben, kann aus Abbildung 1 abgelesen werden, und beträgt ungefähr 5.2 cm bei  $t = 20$  min und 5.8 cm bei  $t = 175$  min. Analog zur Herleitung von Gleichung 10 berechnet sich der Sedimentationskoeffizient in einer Zentrifuge:

$$\begin{aligned} s &= \frac{\ln(r_2/r_1)}{\omega^2(t_2 - t_1)} = \frac{\ln(r_2/r_1)}{4\pi^2\nu^2\Delta t} \\ &= \frac{\ln(5.8/5.2)}{4\pi^2(50\,000/60\text{ s})^2 9300\text{ s}} = 4.28 \times 10^{-13}\text{ s} \\ &= 4.28\text{ S} \end{aligned} \quad (15)$$

2. Die Stokes-Einstein-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen Diffusion  $D$  und Radius  $r$  eines kugelförmigen Teilchens.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (16)$$

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (17)$$

Woraus sich das Volumen einer Kugel berechnen lässt

$$\begin{aligned} V &= \frac{4\pi}{3} r^3 \\ &= \frac{4\pi}{3} \cdot \left( \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \right)^3 \\ &= \frac{4\pi}{3} \cdot \left( \frac{1.38 \times 10^{-23}\text{ J K}^{-1} \cdot 298\text{ K}}{6\pi \cdot 3.39 \times 10^{-3}\text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1} \cdot 1.41 \times 10^{-11}\text{ m}^2\text{s}^{-1}} \right)^3 \\ &= 3.98 \cdot 10^{-25}\text{ m}^3 \approx 4 \times 10^2\text{ nm}^3 \end{aligned} \quad (18)$$

3. Die Masse des Proteins erhält man nun aus dem partielle spezifische Volumen des Proteins ( $\tilde{V}_p = V_p/m_p$ ) zu

$$\begin{aligned} M_p &= \frac{V_p}{\tilde{V}_p} \cdot N_A \\ &= \frac{3.98 \times 10^{-25}\text{ m}^3}{7.43 \times 10^{-4}\text{ m}^3\text{kg}^{-1}} \cdot 6.022 \times 10^{23}\text{ mol}^{-1} \\ &= 3.23 \times 10^2\text{ kg mol}^{-1} = 323\text{ kDa} . \end{aligned} \quad (19)$$

4. Analog zu Gleichung 7 kann man den Sedimentationskoeffizienten berechnen.

$$s = \frac{m_p - \rho_w V_p}{f} = \frac{m_p - m_w}{f} \quad (20)$$

Wobei gilt:  $m_w = \rho_w V_p = \rho_w \frac{m_p}{m_p} V_p = \rho_w m_p \frac{V_p}{m_p} = \rho_w m_p \tilde{V}_p$ , und

$$f = \frac{k_B T}{D} \quad (21)$$

was zusammengesetzt Folgendes ergibt

$$s = \frac{D}{k_B T} m_p (1 - \rho_w \tilde{V}_p)$$

und durch die Multiplikation mit  $\frac{N_A}{N_A}$  ergibt

$$s = \frac{D M_p (1 - \rho_w \tilde{V}_p)}{R T} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} M_p &= \frac{s R T}{D (1 - \rho_w \tilde{V}_p)} \\ &= \frac{4.28 \times 10^{-13} \text{ s} \cdot 8.3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \cdot 298 \text{ K}}{1.41 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} (1 - 1022 \text{ kg m}^{-3} \cdot 7.43 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1})} \\ &= 3.23 \times 10^2 \frac{\text{kg}}{\text{mol}} = 313 \text{ kDa} . \end{aligned} \quad (23)$$

Wie man sieht, stimmen die Massen sehr gut überein und weichen nur um ca. 3 % voneinander ab.

5. Wenn das Protein dimerisiert, ändert sich (i) die molare Masse  $M$  und (ii) der Diffusionskoeffizient  $D$ , das partielle spezifische Volumen  $\tilde{V}_p$  hingegen bleibt laut Aufgabenstellung konstant. Eine weitere Näherung, dass das Dimer ebenfalls kugelförmig ist, wird angenommen. Die tiefgestellte 1 steht für das Monomer und die 2 für das Dimer. Für die molare Masse und das Volumen des Dimers gilt damit

$$\begin{aligned} M_2 &= 2 \cdot M_1 \\ V_2 &= 2 \cdot V_1 \end{aligned}$$

Woraus sich der Radius  $r_2$  des Proteins ergibt, den man zum Berechnen des Diffusionskoeffizienten  $D_2$  mittels Stokes-Einstein-Gleichung ( $r \sim \frac{1}{D}$ ) verwenden kann

$$\begin{aligned} V_2 = \frac{4\pi}{3} \cdot r_2^3 &= 2 \cdot \frac{4\pi}{3} \cdot r_1^3 = 2 \cdot V_1 \\ r_2^3 &= 2 \cdot r_1^3 \\ r_2 &= \sqrt[3]{2} \cdot r_1 \\ D_2 &= \frac{1}{\sqrt[3]{2}} \cdot D_1 \end{aligned}$$

Die so gefundenen Zusammenhänge kann man in Gleichung 22 einsetzen

$$\begin{aligned} s_2 &= \frac{M_2 D_2 (1 - \rho_w \tilde{V}_p)}{R T} = \frac{2 \cdot M_1 D_1 (1 - \rho_w \tilde{V}_p)}{\sqrt[3]{2} \cdot R T} \\ &= \frac{2}{\sqrt[3]{2}} \cdot \frac{M_1 D_1 (1 - \rho_w \tilde{V}_p)}{R T} = \frac{2}{\sqrt[3]{2}} \cdot s_1 \\ &= 2^{2/3} \cdot s_1 \approx 1.59 \cdot s_1 \end{aligned}$$

Ein grösserer Sedimentationskoeffizient bedeutet eine grössere maximale Sedimentationsgeschwindigkeit, woraus folgt, dass das Dimer schneller als das Monomer sedimentieren wird.