

Lösung 6

Musterlösung zum Übungsblatt 6 vom 26.6.2018

1 Gleichgewichtszentrifugation

1. Ausgehend von der im Lambert-Beer'schen Gesetz gegebenen Beziehung, dass $c_{\text{HK}} \propto A_{280}$, kann man die beiden Werte aus der Grafik herauslesen und für die Berechnung der Masse verwenden:

$$\begin{aligned}
 m &= \frac{2kT \ln\left(\frac{c(R_2)}{c(R_1)}\right)}{\omega^2(1 - \tilde{V}_p \rho_{fl})(R_2^2 - R_1^2)} \\
 &= \frac{2 \cdot 1.38066 \times 10^{-23} \text{ J/K} \cdot 283.15 \text{ K} \ln\left(\frac{0.96}{0.13}\right)}{(2\pi \cdot 13000 \text{ 1/min} \cdot 1/60 \text{ min/sec})^2 (1 - 0.73 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg} \cdot 998 \text{ kg/m}^3) \left((0.0611 \text{ m})^2 - (0.0597 \text{ m})^2\right)} \\
 &= 1.84 \times 10^{-22} \text{ kg} \div 1.66 \times 10^{-27} \text{ kg/Da} = 111 \text{ kDa}
 \end{aligned}$$

2. Das funktionale Enzym ist ein Homodimer.

3.

$$D = \frac{kT}{6\pi r \eta} \Leftrightarrow r = \frac{kT}{6\pi D \eta}$$

mit $\rho = \frac{m}{V}$ und $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ folgt

$$\begin{aligned}
 m &= \rho \cdot V = \rho \cdot \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi \rho \left(\frac{kT}{6\pi D \eta}\right)^3 \\
 &= \frac{4}{3}\pi \cdot 1400 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \left(\frac{1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} \cdot (293.15) \text{ K}}{6\pi \cdot 7.4 \times 10^{-11} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \cdot 0.9 \times 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}}\right)^3 \\
 &= 1.96 \times 10^{-22} \text{ kg} \div 1.66 \times 10^{-27} \text{ kg/Da} = 118 \text{ kDa}
 \end{aligned}$$

In Teilaufgabe 1 rechnet man mit einem mittleren spezifischen Volumen des Proteins. Dieses ist nur eine Mittelung und hat einen gegebenen Fehler. In Teilaufgabe 2 rechnet man hingegen mit einer mittleren Proteindichte. Verwendet man nur den Diffusionskoeffizienten, besteht das grössere Problem jedoch darin, dass dieser Effekte der Lösungsmittelwechselwirkungen, einschliesslich der Solvathülle, beinhaltet, die zum für eine Stokes-Kugel berechneten effektiven Volumen beitragen. Noch schlimmer ist aber, dass bei der Stokes-Einstein-Gleichung das Protein als Kugel betrachtet wird. Für ein längliches Molekül bedeutet dies, dass es einen grösseren hydrodynamischen Radius besitzen wird als ein kugelförmiges Molekül gleicher Masse und somit einen grösseren berechneten Radius, falls es fälschlicherweise als kugelförmig angenommen wird.

4. Das Gleichgewicht in Teilaufgabe 1 beschreibt eine Balance zwischen dem Diffusionsfluss gemäss des 1. Fick'schen Gesetzes (proportional zum Diffusionskoeffizienten) und dem Zentrifugalfuss (ebenfalls Proportional zum Diffusionskoeffizienten). Im Gleichgewicht kürzt sich der Diffusionskoeffizient in den beiden Flüssen raus.

2 Tonizität von Erythrozyten

1. Osmose ist die Bewegung von Wasser entlang seines osmotischen Gradienten durch eine selektiv-permeable Membran. Das Einstellen des osmotischen Drucks, d.h. des Drucks, welcher benötigt wird, um das Bewegen von Wasser entlang seines Gradienten zu verhindern, ist das Resultat der Differenz der Anzahl an impermeablen Teilchen in Lösung auf beiden Seiten der Membran. Wasser kann sich direkt durch eine Zellmembran bewegen. Jedoch ist dieser Prozess aufgrund der Doppellipidschichteigenschaften der Membran vergleichsweise langsam. Es war die Entdeckung von wassertragenden, porenbildenden Proteinen, bekannt als Aquaporine, die dabei half, das Wissen darüber, wie sich Wasser von der intrazellulären zur extrazellulären Flüssigkeit und umgekehrt bewegt, zu verbessern. Der Wasserausgleich ist entscheidend in der Homeostase. Hormone, wie das antidiuretische Hormon (ADH) oder das atriale natriuretische Peptid, werden freigesetzt als Antwort auf Veränderung in Plasmazusammensetzung und -volumen und wirken auf die Nieren, um Plasmaosmolarität und -volumen zu regulieren. Der physikalische Ursprung des osmotischen Drucks ist die Differenz des chemischen Potentials über eine Membran. Eine Zunahme der Konzentration der gelösten Stoffe in Wasser vermindert die Aktivität des Wassers und somit sein chemisches Potential (Erinnern Sie sich, dass in PC-I dies der partiellen molaren freien Energie $\left(\frac{\partial g}{\partial n_i}\right)_{T,p,n_j}$ entspricht). Für eine ideale Lösung ist das chemische Potential einer Spezies mit Aktivität a gegeben als $\mu = \mu_0 + RT \ln a$ mit μ_0 als das chemische Potential des Standardzustands. Der osmotische Druck stammt von der Kraft, welche notwendig ist, um Wasser, welches sich bei einem höheren chemischen Potential befindet (mit weniger gelösten Stoffen), davon abzuhalten, sich zu einer Region mit kleinerem chemischen Potential zu bewegen (mit mehr gelösten Stoffen). Falls die Membran für die gelösten Stoffe ebenfalls permeabel ist, werden die gelösten Stoffe sich ebenfalls entlang ihres Gradienten im chemischen Potential bewegen, jedoch entgegengesetzt der Richtung von Wasser.
2. Die Osmolarität einer Lösung wird durch die Gesamtzahl aller vorhandenen Teilchen, auch Osmolytteilchen genannt, bestimmt und wird nicht von der Identität dieser Moleküle beeinflusst. Desto höher die Osmolarität einer Lösung, desto größer ist die Osmolytkonzentration und die physikalischen Eigenschaften einer Lösung, wie der osmotische Druck oder der Gefrierpunkt, werden davon abhängen. Die Osmolarität wird berechnet als die Summe der molaren Konzentrationen jedes gelösten Stoffes jeweils multipliziert mit dem osmotischen Koeffizienten ebendieser. Der osmotische Koeffizient wird bestimmt durch den Grad, zu welchem der gelöste Stoff (zum Beispiel eine ionische Verbindung) in Lösung dissoziiert. Daher bedeutet ein osmotischer Koeffizient von "1", dass der gelöste Stoff in Lösung komplett dissoziiert. Die Tonizität wird bestimmt durch die Osmolyten, welche die Membran nicht frei durchqueren können ($\sigma \rightarrow 1$). Diejenigen, welche frei die Membran durchqueren können, tragen nichts zur Tonizität bei, da sie auf beiden Seiten die gleiche Konzentration haben ($\sigma \rightarrow 0$). Da NaCl komplett dissoziiert, beträgt die effektive Osmolytkonzentration in einer isotonischen Lösung 308 mM.
3. Sobald das Zellvolumen das Gleichgewicht erreicht hat, hängt der osmotische Druck von der endgültigen Konzentrationsdifferenz der gelösten Stoffe innerhalb und außerhalb der Zelle ab. Die extrazelluläre Konzentration kann aufgrund ihres viel

grösseren Volumens als konstant angenommen werden. Die intrazelluläre Konzentration wird proportional zur Volumenzunahme abnehmen (nur Wasser fliesst in die Zelle). Das Endvolumen ist 1.25x grösser und somit wird die Konzentration der gelösten Stoffe 1.25x kleiner oder $308 \text{ mM} / 1.25 = 246.4 \text{ mM}$ sein. Die Starling-Gleichung (III.9 im Skript) beschreibt die Beziehung zwischen der Volumenflussdichte, dem osmotischen Druck und der Konzentrationsdifferenz:

$$J_v = L_P (\Delta p - \sigma k T \Delta N) \quad \Leftarrow \quad \text{Starling-Gleichung, Skript Gl. (III.9)}$$

Mit einer Volumenflussdichte von 0 im Gleichgewicht steht der Druck im Zusammenhang mit der Konzentrationsdifferenz (beachten Sie, dass die Osmolytkonzentration $2 \times c_{\text{NaCl}}$ ist):

$$\begin{aligned} \Delta p &= \sigma k T \Delta N \\ &= \sigma R T \Delta c \\ &= 1 \cdot 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol K}} 310 \text{ K} \left(200 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} - 246.4 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right) \\ p_{\text{out}} - p_{\text{in}} &= -1.2 \times 10^5 \text{ Pa} = -1.2 \text{ bar} \end{aligned} \quad (1)$$

4. Die Annahme, dass nur Wasser die Membran durchquert, ist offensichtlich nicht richtig, oder das Leben wäre in der Tat sehr kurz. Um die Grössenordnung des Drucks zu schätzen, ist es jedoch keine schlechte Annahme, da sich das Wasser schneller durch die Membran bewegt als die relevanten Osmolyten (gelöste Stoffe in der Zelle). Wenn also die Annahmen korrekt sind, dann ist die totale Flussdichte der gelösten Stoffe 0. Somit muss nach

$$\Phi = P \Delta N + N (1 - \sigma) J_v \quad \Leftarrow \quad \text{Skript Gl. (III.8)}$$

die Permeabilitätskonstante 0 und $\sigma = 1$ sein.

5. Die Geschwindigkeit der Volumenänderung ist gegeben durch die Volumenflussdichte multipliziert mit der Zelloberfläche:

$$\frac{dV}{dt} = A \cdot J_v = A \cdot L_P (\Delta p - \sigma R T \Delta c)$$

Der anfängliche Volumenfluss, bevor sich die Membrane dehnt, findet ohne Druckdifferenz über die Membran statt. Somit ist der anfängliche Volumenfluss für eine durchschnittliche Zelle:

$$\begin{aligned} \frac{dV}{dt} &= 136 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot 10^{-7} \frac{\text{m}}{\text{bar} \cdot \text{s}} \left[0 - 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol K}} 310 \text{ K} \left(200 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} - 308 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right) \right] \\ &= 3.8 \times 10^{-12} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} = 3.8 \frac{\text{nl}}{\text{s}} \end{aligned}$$

Da das Gesamtvolumen der Zelle $\sim 90 \text{ fl}$ beträgt, würde es mit dieser anfänglichen Geschwindigkeit etwa $6 \mu\text{s}$ dauern um das Volumen um 25 % zu vergrössern. Dies ist natürlich eine niedrige Schätzung, da sich die Geschwindigkeit verlangsamen wird, sobald der Druck in der Zelle zu- und die Konzentrationsdifferenz abnimmt. Es ist jedoch nicht möglich, die Geschwindigkeit der Druckzunahme vorherzusagen, ohne die Elastizitätskonstante der Zelle zu kennen. Man kann aber sagen, dass die

Volumenänderung praktisch vollständig in unter einer Sekunde abläuft. Das Gleichgewichtsvolumen wird erreicht, sobald die Kraft, verursacht durch das Dehnen der Membran, die Kraft des Wassers, welches sich entlang seines elektromchemischen Gradienten bewegt, ausgleicht. Wie beschrieben in Gl. (1), kann dies ebenfalls geschrieben werden als das Druckgleichgewicht mit Δp als den Membrandruck und $\sigma kT \Delta N$ als den effektiven osmotischen Druck.

3 Diffusion durch eine Lipidmembran

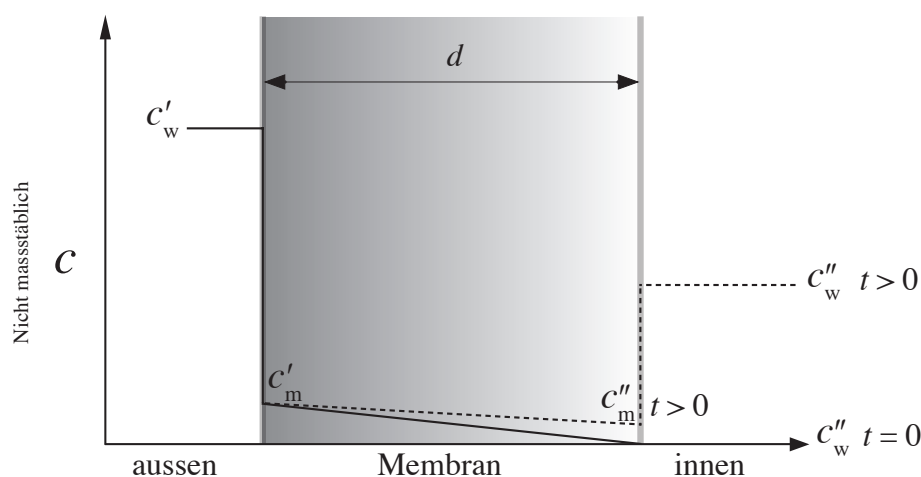
1. Die Flussdichte über die Membran ($\Phi_{\ddot{u}} = P \Delta c$) entspricht derjenigen innerhalb der Membran ($\Phi_{\text{i}} = -D \frac{dc}{dx}$). So kann man die beiden gleichsetzten und nach P auflösen.

$$\Phi_{\ddot{u}} = P \Delta c = P (c'_{\text{w}} - c''_{\text{w}}) \quad (2)$$

$$\Phi_{\text{i}} = -D \frac{dc}{dx} = -D \frac{c''_{\text{m}} - c'_{\text{m}}}{d} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow P &= \frac{-D}{d} \frac{(c''_{\text{m}} - c'_{\text{m}})}{(c'_{\text{w}} - c''_{\text{w}})} = \frac{-D}{d} \gamma \frac{(c''_{\text{w}} - c'_{\text{w}})}{(c'_{\text{w}} - c''_{\text{w}})} \\ &= \frac{D \gamma}{d} \end{aligned}$$

2. Der Konzentrationsverlauf über die Membran zum Zeitpunkt $t = 0$ (durchgezogene Linie) und zu einem späteren Zeitpunkt (gestrichelte Linie) ist in der unten stehenden Abbildung skizziert. Man beachte hierbei den Konzentrationssprung an der Membranoberfläche. Zur Veranschaulichung ist die Konzentration in der Membran nicht massstabgetreu gezeigt. Der tatsächliche Wert ($c_{\text{m}} = c_{\text{w}} \gamma = c_{\text{w}} \cdot 5 \times 10^{-5}$) ist zu klein, um ihn auf einer linearen Skala zu visualisieren.



3. Der Fluss J ist definiert als Änderung der Stoffmenge n mit der Zeit t

$$J = \frac{dn''_w}{dt} = V \cdot \frac{dc''_w}{dt}. \quad (4)$$

Die Flussdichte über die Zellmembran ist somit ebenfalls proportional zur zeitlichen Ableitung der Konzentration innerhalb der Zelle:

$$\Phi = \frac{J}{A} = V \frac{dc''_w}{dt} \cdot \frac{1}{A} = P (c'_w - c''_w), \quad (5)$$

wobei $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ das Zellvolumen und $A = 4\pi r^2$ die Zelloberfläche ist. Da die Konzentration ausserhalb der Zelle konstant ist, d.h. $\frac{dc'_w}{dt} = 0$, ist die rechte Seite der obigen Gleichung nur abhängig von c''_w . Diese Differentialgleichung kann man nun durch Trennung der Variablen lösen:

$$\begin{aligned} \frac{dc''_w}{(c'_w - c''_w)} &= \frac{PA}{V} dt \\ \int_{c''_w(0)}^{c''_w(t)} -\frac{dc''_w}{(c'_w - c''_w)} &= \int_0^t \frac{PA}{V} dt \\ -\ln |(c'_w - c''_w)| \Big|_{c''_w(0)}^{c''_w(t)} &= \frac{PA}{V} t \\ \frac{c''_w(t) - c'_w}{0 - c'_w} &= \exp\left(-\frac{PA}{V} t\right) \\ c''_w(t) &= c'_w(1 - e^{-t/\tau}) \end{aligned} \quad (6)$$

Wobei τ in unserem Fall gleich

$$\tau = \frac{V}{PA} = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3}{4\pi r^2 P} = \frac{r}{3P} = \frac{r d}{3D\gamma}$$

ist. Nach 150 ms beträgt die Konzentration innerhalb der Zelle somit:

$$c''_w = 3.3 \text{ mM} \cdot \left(1 - \exp\left(-150 \times 10^{-3} \text{ s} / \frac{4 \times 10^{-6} \text{ m} \cdot 5 \times 10^{-9} \text{ m}}{3 \cdot 1.92 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s} \cdot 5 \times 10^{-5}}\right)\right) = 0.64 \text{ mM}$$

Die Zeit, nach der die Konzentration innerhalb der Zelle halb so gross ist wie ausserhalb, lässt sich folgendermassen berechnen:

$$\begin{aligned}
\frac{c_w''}{c_w'} &= 1 - \exp\left(-t/\tau\right) \\
0.5 &= 1 - \exp\left(-t_{\frac{1}{2}}/\tau\right) \\
0.5 &= \exp\left(-t_{\frac{1}{2}}/\tau\right) \\
\Rightarrow -\ln(0.5) &= t_{\frac{1}{2}}/\tau \\
t_{\frac{1}{2}} &= \ln 2 \cdot \tau = 481 \text{ ms}
\end{aligned}$$

4 Membranpotential

1. Die vereinfachte Goldman-Gleichung lautet für den Fall, dass $P_{K^+}, P_{Na^+} \gg P_{Cl^-}$ (und unter biologisch relevanter Cl^- Konzentration):

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} c_{K^+}^a + P_{Na^+} c_{Na^+}^a}{P_{K^+} c_{K^+}^i + P_{Na^+} c_{Na^+}^i}. \quad (7)$$

2. Wenn sich der Kanal öffnet, wird die Permeabilität von Na^+ und K^+ viel grösser als die von allen anderen Ionen. Deshalb sind es Na^+ - und K^+ -Ionen, die das Membranpotential bestimmen. Daher verwenden wir die Goldman-Gleichung mit gleichen Permeabilitätskoeffizienten für Na^+ und K^+ , und null Permeabilität für andere Ionen:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{c_{Na^+}^a + c_{K^+}^a}{c_{Na^+}^i + c_{K^+}^i} \right).$$

Einsetzen der angegebenen Konzentrationen liefert

$$V_m = \frac{8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \cdot 310 \text{ K}}{9.65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}} \ln \left(\frac{120 \text{ mM} + 20 \text{ mM}}{25 \text{ mM} + 150 \text{ mM}} \right) = -5.9 \text{ mV}.$$

3. Das Membranpotential für den Fall eines spezifischen Na^+ - Kanals ist

$$V_{m,Na^+} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{c_{Na^+}^a}{c_{Na^+}^i} \right) = \frac{8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \cdot 310 \text{ K}}{9.65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}} \ln \left(\frac{120 \text{ mM}}{25 \text{ mM}} \right) = 41.9 \text{ mV}.$$

Dabei wurde die Goldman-Gleichung verwendet und die Permeabilitätskoeffizienten für nicht transportierte Ionen gleich 0 gesetzt. Analog erhält man für einen spezifischen K^+ -Kanal

$$V_{m,K^+} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{c_{K^+}^a}{c_{K^+}^i} \right) = \frac{8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \cdot 310 \text{ K}}{9.65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}} \ln \left(\frac{20 \text{ mM}}{150 \text{ mM}} \right) = -53.8 \text{ mV}.$$

4. Auflösen der Gleichung 7 nach dem Verhältnis P_{K^+}/P_{Na^+} ergibt

$$\begin{aligned}
\frac{FV_m}{RT} &= \ln \frac{P_{K^+} c_{K^+}^a + P_{Na^+} c_{Na^+}^a}{P_{K^+} c_{K^+}^i + P_{Na^+} c_{Na^+}^i} \\
\exp\left(\frac{FV_m}{RT}\right) &= \frac{P_{K^+} c_{K^+}^a + P_{Na^+} c_{Na^+}^a}{P_{K^+} c_{K^+}^i + P_{Na^+} c_{Na^+}^i}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}bP_{K^+}c_{K^+}^i + bP_{Na^+}c_{Na^+}^i &= P_{K^+}c_{K^+}^a + P_{Na^+}c_{Na^+}^a \\bP_{K^+}c_{K^+}^i - P_{K^+}c_{K^+}^a &= P_{Na^+}c_{Na^+}^a - bP_{Na^+}c_{Na^+}^i \\P_{K^+}(bc_{K^+}^i - c_{K^+}^a) &= P_{Na^+}(c_{Na^+}^a - bc_{Na^+}^i) \\ \frac{P_{K^+}}{P_{Na^+}} &= \frac{c_{Na^+}^a - bc_{Na^+}^i}{bc_{K^+}^i - c_{K^+}^a},\end{aligned}\tag{8}$$

wobei b definiert wurde als

$$b = \exp\left(\frac{FV_m}{RT}\right).$$

Einsetzen der angegebenen Werte liefert dann

$$\frac{P_{K^+}}{P_{Na^+}} = \frac{440 \text{ mM} - b \cdot 50 \text{ mM}}{b \cdot 400 \text{ mM} - 20 \text{ mM}} = 19.4,$$

mit

$$b = \exp\left(\frac{9.65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1} \cdot (-0.06) \text{ V}}{8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \cdot 310 \text{ K}}\right) = 0.106.$$