

Physikalische Chemie II

Prüfungstag 18.08.2017

Bitte beachten Sie

- Erlaubt sind 4 Seiten (A4) Zusammenfassung plus ein Periodensystem.
- Erlaubt ist ein Taschenrechner (unprogrammierbar).
- Alle Hilfsmittel, die nicht explizit erlaubt sind, sind verboten!
- Alle Arten von Informationsaustausch (elektronisch oder anders) sind verboten!
- Bitte schalten Sie ihr Mobiltelefon ab.
- Wenn Sie eine Frage haben, heben Sie die Hand. Ein Assistent kommt dann zu Ihnen.
- Dauer der Prüfung ist **2 Stunden**.

Hinweis:

- Am Anfang jeder Aufgabe finden Sie jeweils die dafür erreichbare Maximalpunktzahl.
- Die maximale Note 6 erreichen Sie mit ungefähr 85 % der Punkte.
- Die Note wird berechnet nach der Formel $Note = 1 + 5 \cdot \left(\frac{\text{gesamte Punkte}}{\text{Anzahl Punkte nötig für Note 6}} \right)$
- Ein korrekter Lösungsweg (Gedanken und Gleichungen) ergibt auch dann Punkte, wenn das numerische Ergebnis falsch ist oder fehlt.
- Falls Sie wissen, dass Ihr Ergebnis falsch ist, schreiben Sie dies bitte dazu. So geben Sie uns zu verstehen, dass Sie sich des Fehlers bewusst sind. Dies wird in entsprechender Weise berücksichtigt.
- Ein numerisches Ergebnis mit fehlenden Masseneinheiten ist falsch (keine Punkte).

Folgende Größen könnten bei der Lösung der Aufgaben hilfreich sein:

Avogadro-Konstante	N_A	$6.02214 \times 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}$
Boltzmannkonstante	k_B	$1.38066 \times 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$
Gaskonstante	R	$8.31451 \frac{\text{J}}{\text{K} \cdot \text{mol}}$
Elementarladung	e_0	$1.60218 \times 10^{-19} \text{C}$
Elektrische Feldkonstante	ϵ_0	$8.85419 \times 10^{-12} \frac{\text{C}}{\text{Vm}}$
Faraday-Konstante	F	$9.64853 \times 10^4 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$
Dichte von Wasser	ρ_{H_2O}	$998 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$
Viskosität von Wasser	η_{H_2O}	$0.9 \times 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}$
durchschnittliche Lipiddichte	$\bar{\rho}_{Lipid}$	$1.1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
durchschnittliche Proteindichte	$\bar{\rho}_{Prot}$	$1.4 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
durchschnittliche Detergenzdichte	$\bar{\rho}_{Detergenz}$	$1.12 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
durchsch. spezif. Volumen eines Proteins	\bar{V}_{Prot}	$0.73 \pm 0.02 \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$
durchsch. Gewicht einer Aminosäure	\bar{m}_{As}	115 Da
Masseneinheit Dalton	Da	$1\text{Da} = 1.66 \times 10^{-27} \text{kg}$
Diffusionskonstante von Natrium Ionen Na^+	D_{Na^+}	$1.95 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$
Diffusionskonstante von Chloridionen Cl^-	D_{Cl^-}	$2.02 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$

1 Theorie (14 Punkte)

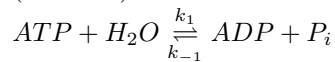
- Welches sind die jeweils scheinbaren Reaktionsordnungen der folgenden Reaktionen (mit Erklärung)? (2 Pkte)
 - $A + B \xrightarrow{\text{Katalyst}} C$, der Katalyst ist mit dem Reaktant gesättigt.
0. ordnung (unabhängig von [A] und [B])
 - $2A \rightarrow B$
2. ordnung
 - $A \rightarrow B + C$
1. ordnung
 - Ethylacetat + H₂O → Essigsäure + Ethanol Diese Reaktion findet in wässriger Lösung statt.
1. ordnung (da H₂O Lösungsmittel ist, ist seiner Konzentration mehr or weniger konstant)
- Beschreiben Sie einen Wirkungsmechanismus eines Medikamentes zur Bluthochdrucksenkung? (1 Pkt)
Vasoactive compounds can dilate the blood vessels and reduce the pressure needed for the blood to flow. The physical principle is based on Hagen–Poiseuille equation.
- Erklären Sie aus physikochemischer Sicht, wieso die Zellen von Prokaryoten normalerweise viel kleiner sind als die von Eukaryoten. (1 Pkt)
The diffusion of molecules in the cell is a limiting factor on the size that a microorganism can reach. Eukaryotic cells overcome this limitation by utilizing active transport networks to deliver many molecules directly to their destination in the cell.
- Erkläre in Worten (nicht Formeln), was eine diffusionskontrollierte Reaktion ist. (1 Pkt)
The rate at which the reaction proceeds is equal to the rate at which the molecules encounter (collide with) each other. In other words, the 2nd order rate constant for the reaction is equal the the 2nd order rate constant for the bi-molecular colisions.
- Bei einer Reaktion 1. Ordnung ist die Gleichgewichtskonstante gleich dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion. Leiten Sie diese Beziehung mittels kinetischer Argumente her. (2 Pkt)
For $A \rightleftharpoons B$, equilibrium reached when $k_1[A] = k_{-1}[B]$. Thus, $\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]_{GG}}{[A]_{GG}} = K_{GG}$
- Welche Annahmen werden gemacht, um den Permeabilitätskoeffizienten eines Moleküls mit $P = \frac{D\gamma}{d}$ zu beschreiben? (2 Pkte)
The membrane is homogenous phase (Diffusion and verteilung überall gleich). The concentration in the membrane is in fast equilibrium with aqueous phase.
- Beschreiben Sie mit eigenen Worten die räumliche Verteilung des pH-Wertes in der Nähe einer negativ geladenen Zellmembran. (1 Pkt)
The negative charge of the membrane surface attracts protons so that their concentration is higher near the membrane than in the bulk solution \Rightarrow pH is lower near membrane. The rate that the pH increases back to the bulk value with distance from the membrane depends on the ionic strength of the solution (see Debye-Länge).
- Wie kann man experimentell eine kompetitive Enzymhemmung von einer unkompetitiven Hemmung unterscheiden? (2 Pkte)
With a Lineweaver-Burk plot. The competitive inhibitor does not alter v_{max} , while the unkompetitive hemmung changes both K_M and v_{max} .
- Zwei der folgenden Gleichungen gehen aus einer Gleichgewichts-Situation von entweder Kraft oder Fluss hervor. Markieren Sie die beiden. (pro richtige Antwort bekommen Sie einen Punkt, pro falsche Antwort -1 Pkt, maximal können Sie 2 Pkte bekommen, minimal -2 Pkte)
Only (a) and (c) describe steady state conditions. (b) and (d) describe the flux of molecules in non-equilibrium gradients of concentration and or electric potential.

- (a) Driftgeschwindigkeit eines Ions in Wasser unter einem elektrischen Feld, $\vec{v} = -D \frac{zF}{RT} \frac{d\varphi}{dx}$
- (b) 1. Fick'sches Gesetz, $\Phi = -D \frac{dc}{dx}$
- (c) Nernst Gleichung, $V_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c^a}{c^i}$
- (d) Nernst-Planck Gleichung, $\Phi = -D \left(\frac{dc}{dx} + \frac{qN}{kT} \frac{d\varphi}{dx} \right)$

2 ATP Hydrolyse (12 Punkte)

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein wichtiger Energiespeicher in allen lebenden Organismen. Bei physiologischen Bedingungen wird ATP zu Adenosindiphosphate (ADP) and anorganischem Phosphat (P_i) hydrolysiert mit einer freien Enthalpieänderung von $\Delta G_{\text{hyd}} = -50 \text{ kJ/mol}$.

1. Schreiben Sie eine mögliche chemische Reaktion für die reversible Hydrolyse von ATP in Wasser. (1.5 Pkte)



2. Welche Reaktionsordnungen haben die beiden Teilreaktionen? (1 Pkt)
Both 2nd order, however, the forward is pseudo 1st order.

3. Schreiben Sie die dazugehörigen zeitabhängigen Differentialgleichungen auf. (2 Pkte)

$$\frac{d[ATP]}{dt} = \frac{d[H_2O]}{dt} = -k_1[ATP][H_2O] + k_{-1}[ADP][P_i]$$

$$\frac{d[ADP]}{dt} = \frac{d[P_i]}{dt} = k_1[ATP][H_2O] - k_{-1}[ADP][P_i]$$

4. Die Publikation von Mildvan (1997) dokumentiert eine pseudo-1. Ordnung Reaktionskonstante von der ATP-Hydrolyse in Wasser von $4 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ (bei einem pH 7.0).

- (a) Ist ATP in Wasser bei pH 7.0 stabil (mit Erklärung) ? (1 Pkt)

Yes, $\tau = \frac{1}{k} = 7.9 \text{ years}$

- (b) Wieso hat Mildvan eine Reaktionskonstante pseudo-1.Ordnung publiziert? (1 Pkt)

Since the reaction is water and the concentration of water does not significantly change during the reaction, it can be considered a constant (55M).

- (c) Berechnen Sie die dazugehörige (richtige) Reaktionskonstante 2. Ordnung. (1 Pkt)

As noted in the answer to 2.2, the forward reaction is 2nd order. The true 2nd order rate constant is equal to the apparent 1st order constant divided by the water concentration.

5. Vier publizierte Ratenkonstanten der ATP Hydrolyse in Wasser sind in der Tabelle unten aufgeführt.

$T [^\circ\text{C}]$	$k [\text{s}^{-1}]$	Referenz
23	4×10^{-9}	Mildvan, 1997
50	5×10^{-7}	Milburn et al., 1985
60	2×10^{-6}	Admirall und Herschlag, 1995
80	1×10^{-5}	Tetas und Lowenstein, 1963

Tabelle 1: Gemessene Raten der ATP-Hydrolyse bei verschiedenen Temperaturen (in Abwesenheit eines Enzymes)

- (a) Erklären Sie in Worten, wieso die Reaktionsrate der ATP-Hydrolyse temperaturabhängig ist. (1 Pkt)

The increased kinetic energy of the molecules at higher temperature increases the chances that their collisions will have enough energy to overcome the activation energy. Also at higher temperature, there will be a higher rate of collisions.

- (b) Basierend auf den tabellierten Werten schreiben Sie eine mögliche Gleichung für $k(T)$ auf. Wie heisst diese Gleichung? (1 Pkt)

Arrhenius equation $k = \alpha e^{-E_a/RT}$

- (c) Basierend auf den tabellierten Werten, berechnen Sie die Aktivierungsenergie der ATP-Hydrolyse. Erwähnen Sie dabei auch Ihre gemachten Annahmen. (3 Pkte)

Plot $R \ln k$ versus $1/T$. Slope is $-E_a/R = 123 \text{ kJ/mol}$.

3 ATP Synthese im Mitochondrium (8 Punkte)

Die ATP Synthase ist ein Enzym, welches bei der Herstellung von ATP im Mitochondrium beteiligt ist. Das Mitochondrium beliefert die Zelle mit Energy in Form von ATP (Adenosintri-phosphat). Um die ungünstige Synthese von ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischem Phosphat (P_i) zu ermöglichen, wird die im Protonengradienten über der mitochondrialen Membran gespeicherte Energie verwendet. Wie auch bei anderen Enzymen ist die Reaktion der ATP Synthase reversibel und kann dafür verwendet werden, einen Protonengradienten über der Membran durch ATP-Hydrolyse aufzubauen. Das Innenmembranpotential $\Delta\varphi_m$ ($\Delta\varphi_m = \varphi_{\text{Matrix}} - \varphi_{\text{Cytosol}}$) sei -140 mV.

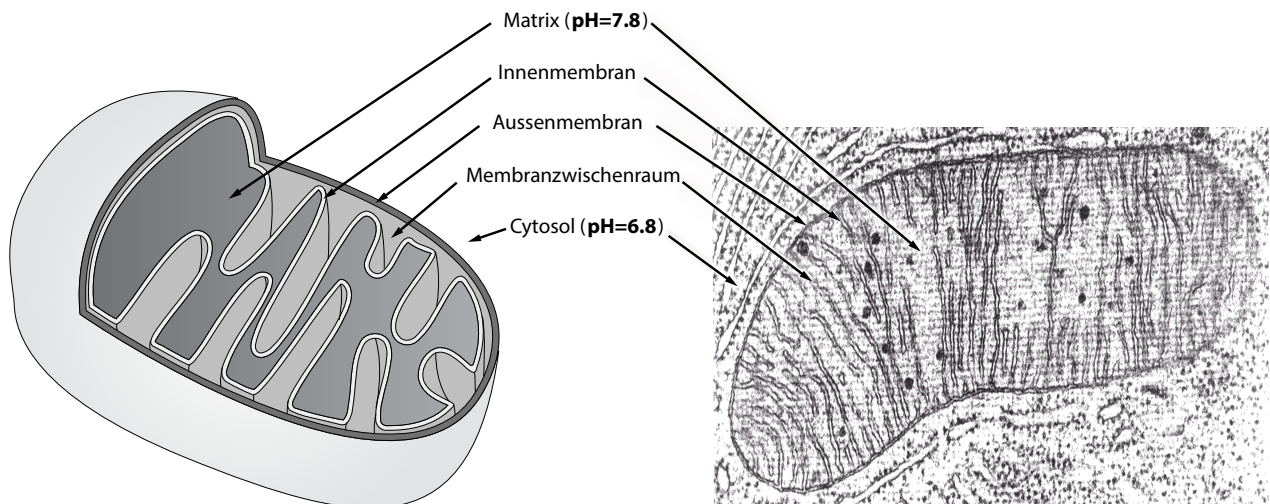


Abbildung 1: Schematische Darstellung (links) und eine Elektronenaufnahme (rechts) eines Mitochondriums. Da die äußere Membran frei durchlässig für kleine Moleküle ist, ist die Konzentrationen von kleinen Molekülen wie Ionen und Zuckern im Membranzwischenraum identisch mit der im Cytosol.

1. Welche Art Transport spielt bei der ATP Synthese durch die ATP Synthase an der mitochondrialen Membran eine Rolle? (0.5 Pkte)

Passive transport

2. Welche Art Transport spielt bei der Umkehrreaktion zum Aufbau des Protonengradienten durch die ATP Synthase eine Rolle? (0.5 Pkte)

Primary active transport

3. Basierend auf den Informationen in Abbildung 1

- (a) wo im Mitochondrium befindet sich die ATP Synthase ? (0.5 Pkte)

Since it couples the proton gradient to ATP synthesis/hydrolysis, it must lie in a membrane with a proton potential gradient. Therefore must be inner membrane since outer membrane is permeable to protons.

- (b) Was ist die Differenz im chemischen Potential des Protons ($\Delta\mu_{H^+}$) in der Matrix verglichen zum Membranzwischenraum (2 Pkte)

$\Delta\mu_{H^+} = RT \ln \frac{H^+}{H_a^+}$. *Since the proton concentration inside the matrix and outside in the cytosol are determined by the $pH = -\log_{10}[H^+]$ and $\Delta pH = 1$, then $\frac{H^+}{H_a^+} = 0.1$ and $\Delta\mu_{H^+} = RT \ln 0.1 = -5934 \text{ J/mol}$.*

- (c) Wie gross ist der Unterschied des chemischen Potentials des Protons ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) zwischen Matrix und Membranzwischenraum? (1.5 Pkte)

$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = RT \ln \frac{H^+}{H_a^+} + zF(\varphi_i - \varphi_a) = -5934 \text{ J/mol} + 9.64853 \times 10^4 \frac{\text{C}}{\text{mol}} \cdot (-0.14 \text{ J/C}) = -5934 - 13508 \text{ J/mol} = -19.4 \text{ kJ/mol}$

4. Die freie Enthalpie für die ATP-Hydrolyse sei gegeben mit $\Delta G_{\text{hyd}} = -50 \text{ kJ/mol}$. Wieviele ATP Moleküle werden synthetisiert pro transportiertem Proton? (2 Pkte)

The free energy of ATP synthesis is equal to 50 kJ/mol (negative of the free energy of hydrolysis). Since $n_{\text{ATP}}\Delta G_{\text{ATP}} + n_{\text{H}^+}\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+} < 0$, only 0.39 ATP moles can be synthesized per proton transported... in other words, at least 3 protons need to traverse the membrane to make one molecule of ATP.

5. Die grosse ATP Menge (und andere Nukleotide) innerhalb der Zelle sollte zu einem sehr hohen osmotischen Druck führen. Argumentieren Sie, wie die Natur dieses potentielle Problem verhindert? (1 Pkt).

The activity, not the concentration, of the molecules determines the osmotic pressure. Much of the ATP and other nucleotides are bound to proteins and so are maintained at a lower activity in the cell.

4 Charakterisierung der ATP Synthase (12 Punkte)

Die F1Fo ATPase ist ein grosser Membranproteinkomplex, welcher durch einen Rotationsmechanismus den Protonengradient mit der Synthese von ATP koppelt. Die F1 Einheit ist ein löslicher Proteinkomplex bestehend aus einigen Untereinheiten. Die F1 Einheit katalysiert die ATP Synthese (oder ATP Hydrolyse) via drei equivalente Stellen. Die Fo Einheit ist ein Membranproteinkomplex, welcher die Bewegung der Protonen mit der katalytischen F1 Einheit koppelt. Beide Einheiten F1 und Fo können einzeln stabil isoliert werden.

1. Berechnen Sie die Masse des F1 Komplexes anhand des Diffusionskoeffizienten $D = 5.36 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ gemessen bei 37°C in wässriger Lösung. Welche Annahmen müssen Sie machen für Ihre Rechnung? (2 Pkte)

Assuming a spherical molecule that follows stokes law, the diffusion is given by the Stokes-Einstein relation: $D = kT/6\pi\eta r$. With $V = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{kT}{6\pi\eta D}\right)^3$ and $m = V \cdot \rho$, we can calculate $m = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K } 310\text{K}}{6\pi \cdot 0.9 \times 10^{-3} \text{ kg/ms } 5.36 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}}\right)^3 \cdot 1400 \text{ kg/m}^3 = 6.10 \times 10^{-22} \text{ kg} = 368 \text{ kDa}$

2. Eine Gleichgewichts-Analytische-Ultrazentrifugation des F1 Komplexes bei 5000 rpm ist in der Figur unten gezeigt. 2.

- (a) Berechnen Sie das Molekulargewicht des F1 Komplexes anhand der Gleichgewichtszentrifugation. (1.5 Pkte)

The equilibrium distribution of the protein is given by:

$$\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right) = \frac{\omega^2}{kT} m \left(1 - \tilde{V}\rho_{Fl}\right) \frac{(r_2^2 - r_1^2)}{2}.$$

With the A_{280} values at 6.50cm and 6.98cm, the mass can be calculated as:

$$m = \frac{2kT \ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)}{\omega^2 \left(1 - \tilde{V}\rho_{Fl}\right) (r_2^2 - r_1^2)} = \frac{2 \cdot 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K } 310\text{K} \ln\left(\frac{1.02}{0.04}\right)}{(523.6 \text{ s}^{-1})^2 (1 - 0.73 \text{ cm}^3/\text{g} \cdot 0.998 \text{ g/cm}^3) ((0.0698 \text{ m})^2 - (0.065 \text{ m})^2)} = 5.75 \times 10^{-22} \text{ kg} = 347 \text{ kDa}.$$

Note, the angular frequency: $\omega = 2\pi\nu$ and $\nu = \text{RPM frequency} \div 60 \text{ s/min}$

- (b) Welche Annahmen haben Sie für die Rechnung in a) gemacht? 4.2a? (0.5 Pkte)
Protein has average partial specific volume.

- (c) Kommentieren Sie die verschiedenen Ergebnisse (2a <-> 1) 4.1. (0.5 Pkte)

The mass calculated in 4.1 assumes that the protein is spherical. This is often not the case. Also, the Diffusion coefficient of a protein is affected by its interaction with solvent. The water molecules that bind to the protein slow its diffusion \Rightarrow diffusion-based calculation can be overestimate of mass.

- (d) Wieso ist der Diffusionskoeffizient bei der Gleichgewichts-Analytische-Ultrazentrifugation nicht notwendig, während dessen der Diffusionskoeffizient bekannt sein muss für die Sedimentations-Geschwindigkeits-Zentrifugation? (0.5 Pkte)

The equilibrium is a balance between the diffusive flux according to Fick's 1st law and the centrifugal flux which is dependent on the frictional coefficient and hence the Diffusion coefficient. At equilibrium, the diffusion coefficient in the two fluxes cancels out.

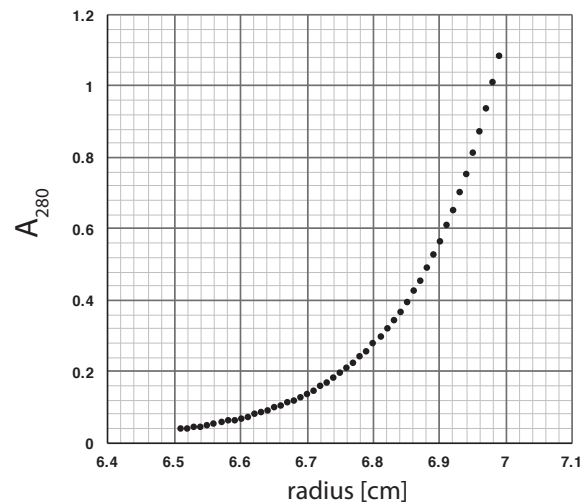


Abbildung 2: Gleichgewichts-Analytische-Ultrazentrifugation der F1 Einheit bei 5000 rpm.

3. Auf einem SDS Gel des F1 Komplexes erscheinen 3 Banden mit den folgenden Massen 55 kDa, 51 kDa und 30 kDa. Die Intensität der 55 kDa und 51 kDa Banden sind ähnlich, während die Intensität der 30 kDa Bande schwächer ist. Basierend auf den berechneten Massen (siehe oben), schlagen Sie die Zusammensetzung des F1 Komplexes vor. (1 Pkt)

With a mass of 347 kDa and an expected 3-fold symmetry due to the 3 equivalent active sites, one possible chain stoichiometry is: $3 \times 55, 3 \times 51, 1 \times 30 = 348$.

4. In Anbetracht dessen, das der F1Fo ATP Synthase sowohl ATP synthetisieren als auch hydrolysieren kann, könnte ADP als ATP-Hydrolyse Inhibitor fungieren und wenn ja, um was für ein Inhibitor handelt es sich? (mit Erklärung) (1 Pkte)

Yes, as a product of a reversible reaction, ADP is likely to be a competitive inhibitor of ATP hydrolysis by the F1 complex: competitive while it binds in the same active site.

5. Wie konnte man zeigen, dass der F1Fo Komplex einen Rotormechanismus hat? (0.5 Pkte)

The F1 complex was observed by single molecule fluorescence microscopy with a fluorescent actin filament attached to the central gamma subunit (30 kD chain).

6. In Isolation (ohne die Fo Einheit), kann die F1 Einheit nur die reverse Reaktion (ATP Hydrolyse) katalysieren. Wieso? (0.5 Pkte)

While the F1 unit can catalyze both reactions, the synthesis of ATP is so energetically unfavorable that it can only proceed with the energy stored in the proton gradient. As given in the introduction to this question, this energy is transduced by Fo unit.

7. In der Figur 3 sehen Sie die kinetischen Daten der ATP Hydrolyse in Anwesenheit von 10 μ M katalytische F1 Einheit. Diese Daten folgen der Michaelis Menten Kinetik.

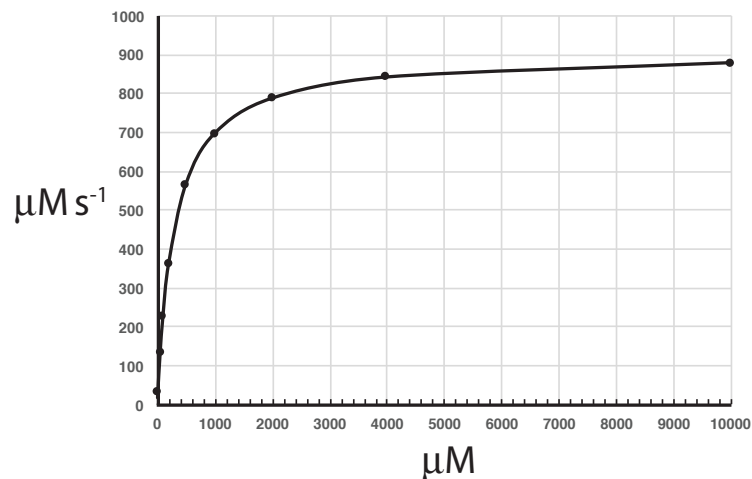


Abbildung 3: ATP Hydrolyse

- (a) Der Student, welcher das Experiment gemacht hat, hat vergessen die Achsen zu beschriften. Beschriften Sie diese. 3? (0.5 Pkte)
y: ATP hydrolysis rate, x: ATP concentration
- (b) Bestimmen Sie den K_M der Reaktion. (1 Pkt)
The K_M is the substrate concentration at one half the maximum rate, or approximately 300 μM .
- (c) Berechnen Sie die maximale ATP Hydrolyse-Rate für eine Reaktion mit 2 μM Enzyme. (1 Pkte)
Since $v_{\max} = k_{\text{cat}}[E]$, the maximum rate with 2 μM enzyme will be one fifth of the maximum rate at 10 μM enzyme, or approx 180 $\mu\text{M s}^{-1}$.
- (d) Bestimmen Sie die katalytische (Umsatz)Raten-Konstante k_{cat} für die F1 katalytische Einheit. (2 Pkte)

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E]} = \frac{900 \mu\text{M s}^{-1}}{10 \mu\text{M}} = 90 \text{ s}^{-1}.$$