

# Klausur Enzymtechnologie (BSc 16)

24. September 2014

Name: \_\_\_\_\_

Matr.-Nr.: \_\_\_\_\_

1 (4 P.) \_\_\_\_\_

2 (4 P.) \_\_\_\_\_

3 (6+1 P.) \_\_\_\_\_

4 (4 P.) \_\_\_\_\_

5 (3 P.) \_\_\_\_\_

6 (7+1 P.) \_\_\_\_\_

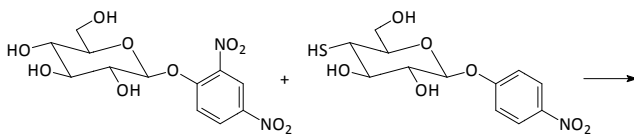
7 (6 P.) \_\_\_\_\_

8 (6 P.) \_\_\_\_\_

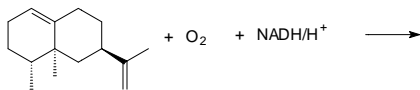
Summe (40+2 P.)

1 (4 P.) Enzyme können artifizielle, auf synthetischem Weg erzeugte Moleküle umsetzen. Ergänzen Sie die nachstehenden Reaktionsgleichungen mit den zu erwartenden Produkten.

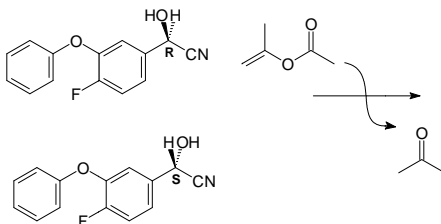
a)  $\beta$ -Glucosidase



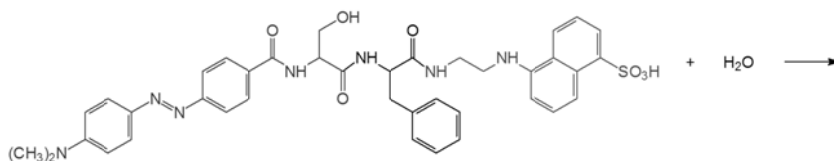
b) Monooxygenase P450



c) Lipase



d) P1'-Endoprotease (Thermolysin)



2 (4 P.) Pectin ist eine alpha-verknüpfte Poly-D-galacturonsäure, deren Carboxylfunktionen zum Teil mit Methanol verestert sind.

a) Formulieren Sie einen Pectinausschnitt (zwei Zuckereinheiten) mit und ohne Methylestergruppe. (1)

b) Pectinasen (Polygalacturonidasen) besitzen im Aktivzentrum einen Aspartyl- und einen Histidinrest. Formulieren Sie die beiden Reste mit ihrer wahrscheinlichen Protonenausstattung (welche Aminosäure ist Protonendonator, welche Nukleophil?). (1)

c) Formulieren Sie den Mechanismus der Poly-D-galacturonsäure-Hydrolyse. Verwenden Sie dazu den Pectinausschnitt von Frage 2a. (2)

3 (6+1 P.) Cysteinproteasen der Papainfamilie sind Angriffs- und Verteidigungswaffen von Pflanzen und Bakterien.

a) Vergleichen Sie das Aktivzentrum von Papain mit dem einer Serinprotease und erläutern Sie die Unterschiede. (2)

b) Ein spezifisches Substrat von Papain ist Cbz-Phe-Arg-pNA. Formulieren sie das Molekül. (1)

c) Wie verläuft die Hydrolyse von Cbz-Phe-Arg-pNA durch Papain mechanistisch? Verwenden Sie geeignete Abkürzungen. (2)

d) Warum verschiebt sich durch die Hydrolyse die Absorptionswellenlänge des freigesetzten Chromophors bathochrom (nach längeren Wellenlängen)? Erläutern Sie mit geeigneten Grenzstrukturen. (1+1)

4 (4 P.) Für die technische Umwandlung von D-Glucose in D-Fructose zur Erhöhung der Süßkraft von Glucosesirup wird in der Regel eine Xyloseisomerase verwendet. Diese besitzt im Aktivzentrum Histidin und Asparaginsäure, die die Protonenverschiebung katalysieren.

a) Formulieren Sie die Isomerisierungsreaktion von D-Glucose. Nur Reaktionsgleichung. (1)

b) Die Isomerisierung verläuft über ein Endiol. Zeichnen Sie das Endiol in der Fischer-Projektion. (1)

c) Wie entsteht aus dem Endiol D-Fructose? Ergänzen Sie das Endiol von Frage 4b mit basischem Histidin und Asparaginsäure. Kennzeichnen Sie durch Elektronenverschiebung mit Pfeilen die Entstehung von D-Fructose. (2)

5 (3 P.) Lysin ist eine wichtige Aminosäure, die auch für das Wachstum vieler Bakterien essentiell sein kann. Während der Sterilisation von Nährmedien geht Lysin auf verschiedene Weise verloren. Formulieren Sie durch Hitze erzeugte Lysinderivate:

- a) Aus Glucose und Lysin (1):
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- b) Aus proteingebundenem Asparagin und Lysin (1):
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- c) Aus proteingebundenem Dehydroalanin und Lysin (1):

6 (8 P.) Die Metalloprotease Thermolysin wird von dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* in das Produktionsmedium ausgeschieden. Das Translationsprodukt, ein Präproenzym, besteht aus Signalpeptid, N-terminalem Propeptid und reifer Domäne.

- a) Kennzeichnen Sie in der nachstehenden Signalpeptidsequenz von Thermolysin die Bindestellen für SecA (positiv geladene Aminosäuren) und die extrazelluläre Signalpeptidase. (1)

MKMKMKLASFGLAAGLAAQVFLPYNALA

- b) Das Protein SecA fädelt das Signalpeptid in den Transportkanal ein. Beschreiben Sie die Bestandteile des Transportkanals mit ihren Funktionen. (2)
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- c) Nach Entfernung des Signalpeptids unterstützen Propeptid, Zink- und Calciumionen die Faltung von Thermolysin. Welche Proteinseitenketten ordnen sich um  $Zn^{2+}$ , welche binden  $Ca^{2+}$ , damit die native Struktur entsteht und stabilisiert wird? Strukturvorschläge. (2)

- d) Die Entfernung des Propeptids erfolgt bei Metalloproteasen autokatalytisch. Die Schnittstelle zwischen Propeptid und reifem Enzym ist angegeben. Besitzt demnach Thermolysin eine P1- oder P1'-Endoproteasenaktivität? Begründen Sie Ihre Antwort. (1 Zusatzpunkt)

...GDVKS-ITGTS...

- e) Erklären Sie mit dem Dipeptidsegment aus Serin (S) und Isoleucin (I) von Frage 6d, wie die Autolyse von Thermolysin mechanistisch abläuft. Isoleucin ist (2S, 3S)-2-Amino-3-methyl-pentansäure. (2)

7 (6 P.) Ein Enzym soll kovalent an ein Trägermaterial mit primären Aminogruppen gekoppelt werden. Kopplungsreagenz ist ein bifunktionelles Vernetzungsmolekül.

- a) Das Trägermaterial ist poröses Glas. Wie erhält man daraus Glaskugeln mit primären Aminofunktionen? Reaktionsgleichung. (2)
- b) Im zweiten Schritt werden die Aminoglaskugeln mit einem bifunktionellen Vernetzungsmolekül Ihrer Wahl für die Enzymkopplung aktiviert (elektrophile Oberfläche!). Formulieren Sie diese Reaktion. (2)
- c) In der dritten Stufe folgt die Enzyymbindung. Formulieren Sie die Bildung des Immobilisats. (2)

- 8 (6 P.) Die Einschlussimmobilisierung von Enzymen in eine Proteinmatrix erfordert in der Regel die chemische oder enzymatische Vernetzung. Transglutaminase ist dabei das wichtigste Vernetzungsenzym.
- a) Formulieren Sie die Vernetzung von Proteinen mit Transglutaminase. Wählen Sie für die Reaktionsgleichung geeignete Abkürzungen. (2)
- b) Bei einem Analyseverfahren zur Bestimmung von Isopeptidbindungen (= Vernetzungspunkte von Transglutaminase) werden Lysinreste cyanethyliert. Formulieren Sie diese Reaktion. (2 P.)
- c) Beschreiben Sie stichpunktartig das Analyseverfahren zur Bestimmung von Isopeptidbindungen. Vergleichen Sie dabei die Ergebnisse, die mit vernetztem und unvernetztem Protein zu erwarten sind. (2)