

MBBT

Deeltoets 1

CURSUSJAAR 2015-2016

2 november 2015

13.30-16.00 uur

Naam: (in blokletters)

Registratienummer

Begin met je naam en overige gegevens in te vullen op het papier waarop je een vraag dient te beantwoorden

Multiple choice vragen: lees de vraag en antwoorden goed

Open vragen: Antwoord beknopt, maar volledig.

Voor baarlijke nonsens kunnen punten worden afgetrokken.

totaal aantal punten multiple choice: 20 telt voor 25% van het eindcijfer

totaal aantal punten open vragen: 46, telt voor 50% van het eindcijfer

thuiswerkopdracht: telt voor 25% van het cijfer

voor GEPE recidivisten geldt een aangepaste norm

De totale toetsduur is 2 en een half uur (voor dislecten 3 uur)

Succes gewenst

Je bent als onderzoeker een eiwit aan het zuiveren uit een humane cellijn. Tijdens één van de stappen moet je de pH van de eiwitoplossing verlagen naar pH 3.5, maar je neemt een veel te sterke zuuroplossing waardoor de pH ongeveer 0.5 wordt en een eiwitneerslag wordt gevormd.

1a Beschrijf twee mogelijke processen/veranderingen in het eiwit waardoor deze tijdens verlaging van de pH kan zijn neergeslagen. (5)

Je besluit om een deel van het met zuur behandelde eiwitsample toch met sds-page te analyseren. Op de gel is maar 1 peptide van ongeveer 4 kDa zichtbaar. Je besluit de aminozuurvolgorde van de peptideoplossing te bepalen. Veel peptide heb je niet meer over.

1b Welke twee methoden kunnen gebruikt worden om de aminozuurvolgorde te bepalen? Geef aan wat het nadeel is van elke methode. (4)

De sequentie van het peptide blijkt te zijn:

MGQVEISVGAGNLIQQLWNNAPGAGQVHINAGGGVNIDLNGQG

Om meer te weten te komen over het peptide neem je een CD spectrum op en voer je een structuurvoorspelling uit. Uit de CD meting blijkt dat het peptide bestaat uit ~20% α helix, ~45% β strand, en ~35% random coil of loop structuur. De structuurvoorspelling geeft aan dat het eiwit 1 α helix en 3 β strands bevat die samen een twee-laags $\alpha\beta$ -fold vormen: een β sheet met aan één kant daarvan een α helix.

1c Voorspel de positie van de 4 secundaire structuurelementen in de aminozuurvolgorde van het peptide. Houdt hierbij rekening met de eigenschappen van aminozuren en de verschillende secundaire structuurelementen. Geef aan waarom je denkt dat een bepaalde sequentie de betreffende secundaire structuur aanneemt. (4)

MGQVEISVGAGNLIQQLWNNAPGAGQVHINAGGGVNI DLNGQG

1d Bonusvraag: teken de tertiaire structuur van het peptide als gegeven is dat de N- en C-terminus een waterstofbrug met elkaar kunnen vormen. Postuleer hoe dit eiwit vouwt. (5)

Je laat het peptide synthetiseren. Deze wordt geleverd in de volledig geprotoneerde toestand. Na oplossen van dit peptide in water [1 mM], meet je een pH van 1.5. Je voert een pH titratie uit met een 1 mM NaOH oplossing.

1e Geef in de onderstaande tabel aan welke groepen in het peptide titreerbaar zijn en wat de pKa van elke groep is. (2)

1f Geef de lading van elke titreerbare groep na toevoegen van de aangegeven hoeveelheid NaOH equivalenten en schat de pH van de peptideoplossing bij deze hoeveelheid NaOH .Teken de pH titreatiecurve van het synthetische peptide (8)

Titreerbare Groep	Toegevoegde NaOH equivalenten													
	pKa	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6
Overall charge		#+/-												
pH peptideoplossing		1.5												

De tabel hoeft mogelijk niet volledig ingevuld te worden

Als je de pH titratiecurve van het synthetische peptide vergelijkt met die van het peptide dat uit de humane cellijn gezuiverd is (=natieve peptide) dan blijkt dat het natieve peptide 2 NaOH equivalenten minder nodig heeft om volledig gedeprotoneerd te worden.

1g Geef een verklaring voor deze observatie. Wat is hiervan het effect op de pI van het peptide? (4)

1h Teken van de aminozuurresiduen in het peptide die een titreerbare groep hebben de volledige structuurformule zoals die voorkomt bij fysiologische pH (5)

Je besluit te onderzoeken waarom het natieve peptide een andere pH titratiecurve laat zien dan verwacht en wekt daartoe een polyclonaal antilichaam op.

2a Waarmee ga je immuniseren en waarom gebruik je deze bron? In welk dier ga je het antilichaam opwekken. (3)

Je doet een ELISA om te bepalen of je een antilichaam tegen het peptide hebt verkregen.

2b Waar staat de afkorting ELISA voor? Geef de volledige (engelse) bewoording. Beschrijf de stappen van een ELISA en geef duidelijk aan welke oplossingen/reagentia je bij elke stap gebruikt. (5)

Met het opgewekte polyclonale antilichaam doe je een immuunprecipitatie en toont uiteindelijk aan dat het antilichaam een eiwit van 4 en 24 kDa herkent.

2c Beschrijf de stappen die je hebt uitgevoerd om dit aan te kunnen tonen. (3)

Verder toon je aan dat het 24 kDa eiwit niet door co-immunoprecipitatie is mee gezuiverd met het 4 kDa peptide en dat zowel het 4 kDa peptide als het 24 kDa eiwit specifiek reageert met het antilichaam.

2d Welke alternatieve proef (anders dan die je genoemd hebt in vraag 2c) had je kunnen gebruiken om dit aan te tonen. (2)

Het blijkt dat voor de vorming van het 24 kDa eiwit een covalente binding tussen het 4 kDa peptide en een 20 kDa eiwit nodig is.

2e Hoe kan je aantonen dat er een covalente binding aanwezig moet zijn tussen het 4 kDa peptide en het 20 kDa eiwit en geen transiente reversibele interactie? Hoe kun je uitsluiten dat de covalente binding een zwavelbrug is? (3)

Bonusvraag

Je hebt een pulse chase experiment gedaan met het antilichaam opgewekt tegen het peptide. Je hebt daarbij gevonden dat na 15 minuten alleen het 4 kDa eiwit detecteerbaar is. Na 30 minuten is ook het 24 kDa eiwit detecteerbaar. 1 uur later wordt er geen 24 kDa eiwit meer gevonden maar alleen het 4 kDa peptide. Je postuleert dat dit eiwit overeen komt met het natieve peptide zoals ook vermeld in vraag 1g.

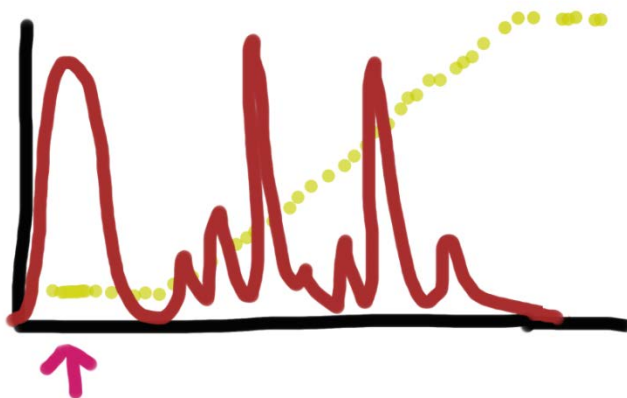
2f Postuleer een rol voor het 20 kDa eiwit (5)

Je wilt de identiteit van het 20 kDa eiwit achterhalen en besluit een assay te ontwikkelen om het eiwit te kunnen detecteren tijdens de zuivering. Hierbij maak je gebruik van de observatie dat het synthetische peptide in vitro kan reageren met het 20 kDa eiwit dat je wilt zuiveren.

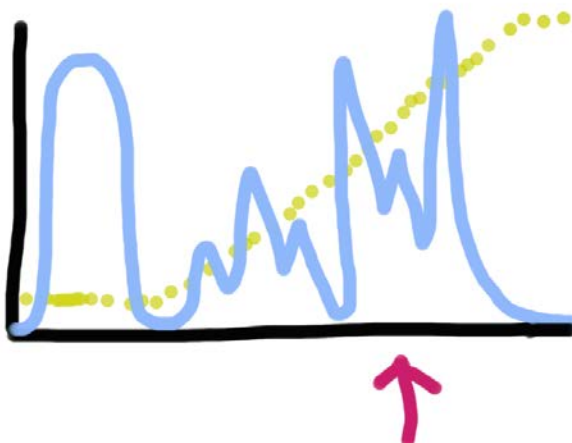
3a Beschrijf de in vitro reactie die je uitvoert om aan te tonen dat een eiwitoplossing het 20 kDa eiwit bevat dat kan reageren met het synthetische peptide (3).

Om het eiwit te kunnen zuiveren doe je anion en cation exchange chromatografie bij een pH van 7 met een deel van het cel lysaat van de eukaryote cellijn en test de fracties op de aanwezigheid van het 20 kDa eiwit. De met een pijl aangegeven piek(en) bevat(ten) op basis van de ontwikkelde assay het eiwit dat je wil isoleren.

Anion exchange



cation exchange



3b Welke ion exchange techniek kan je het best gebruiken? Leg uit waarom. Wat kan je zeggen over de pI van het eiwit? (5)

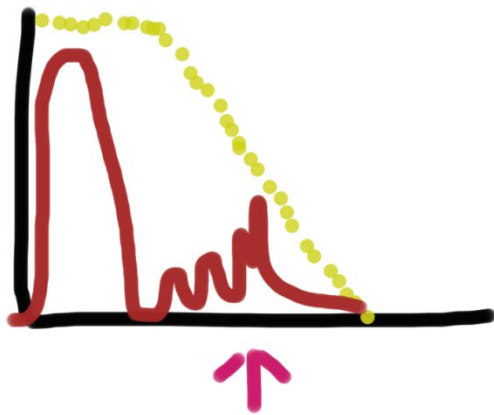
Nadat je de door jou gekozen ion exchange chromatografie zuivering hebt uitgevoerd op preparatieve schaal blijkt uit een 2D gel electrophorese experiment dat het eiwit nog niet erg zuiver is.

3c Teken schematisch een 2D electroforese gel van de positieve fractie; houd hierbij rekening met de aanwezigheid van vervuilingen. (6)

In de volgende zuiveringsstap laad je de actieve fractie(s) van de ionexchange rechtstreeks op een kolom. Deze kolom elueer je vervolgens met een zoutgradient.

3d Wat voor soort chromatografie techniek heb je gebruikt en op welk principe is de scheiding op deze kolom gebaseerd? (4)

Het resultaat van de scheiding is hieronder weergegeven. De positieve fractie bestaat nog uit twee pieken en op de SDS-PAGE zijn nog twee banden te zien.



3e Welke twee aanpassingen van deze zuiveringsstap zou je kunnen doen om die twee pieken beter te scheiden? (4)

3f Hoe kun je aantonen dat het zuivere 20 kDa eiwit in oplossing een tetrameer van 80 kDa vormt? Teken de resultaten van deze proef, geef hierbij de positie van de standaard/referentie eiwitten aan. (5)

4a Wat is de Stokes shift en waarom is het belangrijk dat deze zo groot mogelijk is? (3)

4b De excitatie en emissie spectra van een fluorofoor laten regelmatig een “mirror image” (spiegelbeeld) zien. Beschrijf de mirror image rule aan de hand van een tekening en verklaar hoe deze ontstaat. (4)

4c Gegeven de aminozuurvolgorde van het peptide uit vraag 1, welke koppelingschemie zou jij gebruiken om het peptide te labelen met fluoresceïne? Hoeveel fluoresceïne groepen verwacht je maximaal per peptide? (2)

4d Bepaal met behulp van onderstaande gegevens hoeveel keer gevoeliger tryptofaan detectie met behulp van fluorescentie is ten opzichte van tryptofaan detectie met behulp van UV absorptie. (6)

Je hebt de beschikking over een Spectramax I3 met als specificatie

- detectielimiet fluoresceïne: 0.5 pM
- detectielimiet tryptofaan fluorescentie: 1 nM
- Fotometrische precisie (detectielimiet) 0.010 OD
- Je meet 100 μ l oplossing
- de molaire extinctie coëfficiënt van het peptide is $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- bij het microtiterplaattype dat voor de UV meting gebruikt wordt is de diameter van de well 5 mm

4e Wat is het minimaal aantal eiwitmoleculen dat je met behulp van fluorescentie nog net kunt detecteren als het eiwit met een efficiëntie van 50% gelabeld is met fluoresceïne? Ga uit van de detectielimiet gegeven in de vorige vraag? (5)

4f Je labelt het peptide met ^{35}S methionine. Hoeveel keer gevoeliger is radioactiviteit tov fluorescentie? (5)

Gegeven:

- $t_{1/2} \text{ } ^{35}\text{S} = 87.4 \text{ dagen}$
- specifieke activiteit ^{35}S methionine $14.9 * 10^3 \text{ Ci/mol}$
- $1 \text{ Ci} = 3.7 * 10^{10} \text{ Bq}$
- Labelingsefficiency 50%
- met een vloeistof scintillatie teller wordt voor 100 μl buffer waarin het eiwit is opgelost een achtergrond gemeten van $0.01 \pm 0.001 \text{ dpm}$.
- De teller efficiëntie is 100%

