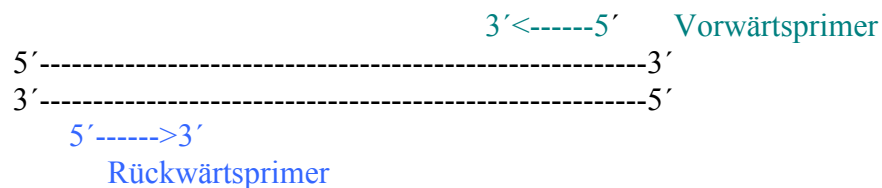
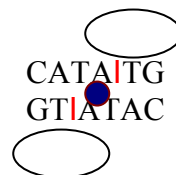


Versuch A1: Klonierung des Tyro3-D1D2-Fragments mittels PCR

- Was wurde in dem Versuch gemacht?
D1D2-Fragment mit PCR amplifizieren, in Vektor einklonieren, Vektor in E.coli transferieren; halt eben der grobe Verlauf des Versuchs
- Was macht die Tyro3-Rezeptor-Kinase, aus welchen Bereichen ist das Molekül aufgebaut?
Phosphoryliert Tyrosine; intrazelluläre Domäne, membranständige Domäne und extrazelluläre Domäne, die die Bereiche D1 und D2 enthalten.
- Für was steht das D?
Domäne
- Was ist dem D1D2-Fragment in der DNA vorgeschaltet?
Irgendeine Signalsequenz, weiß aber nicht, wozu die gut ist
- Warum wird für die PCR cDNA und nicht genomische DNA als Templat genommen, wie erhält man cDNA?
Das Gen stammt aus dem Menschen, also aus eukaryontischen Zellen, und soll in E.coli exprimiert werden. Bakterien haben aber keine Introns. Deswegen wird die mRNA, die ja keine Introns mehr besitzt, mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.
- Lage der Primer mit Richtungsangaben aufzeichnen:



- Wie muss der Vorwärtsprimer aussehen?
Hat Erkennungsschnittstelle für Restriktionsenzym und Startcodon (ATG)
- Wo befindet sich das Startcodon genau und wozu ist es gut?
In der Schnittstelle, Startstelle für Translation
- Wie lang sind die meisten Erkennungsschnittstellen für Restriktionsenzyme durchschnittlich?
6bp, manchmal auch 8bp
- Besonderheit dieser Schnittstellen:
Palindromische Sequenzen
Aus Startcodon ATG Palindrom machen: CATATG
- für welche Aminosäure kodiert ATG
Methionin
- Wie wird geschnitten?
Enzym bindet als Dimer (→Palindrom) :



Um welches Symmetrielement handelt es dabei und wo liegt es?

Zweizählige Drehachse (●)

- wie sieht Rückwärtsprimer aus?
Enthält auch Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und außerdem zwei Stoppcodons

Versuch B1: Modellbau, Elektronendichtekarten und Symmetrie

- Welche Symmetrieelemente gibt es noch neben Drehachse?
Schraubenachsen, außerdem auch noch Spiegelebenen, Inversionszentren usw. aber aufgrund der Chiralität von Proteinen, nur Dreh- und Schraubenachsen für Proteine
- dann kamen einige Fragen über Translationsgitter, Raumgruppe und Asymmetrische Einheit, z.B. wie aus Asymmetrischer Einheit ein Trimer beschrieben werden kann.
das war aber alles recht verworren und durcheinander
- Welches ist das symmetrischste und das am wenigsten symmetrische Gitter?
Symmetrischstes: kubisch
Am wenigsten sym.: triklin
- Wieviele Gittersysteme gibt es?
- 7
- Welche zusätzlichen?
7 nicht primitive

Versuch C1: Präparative Rückfaltung und Reinigung von Tyro3-Mutanten

- Wozu ist richtige Faltung überhaupt wichtig?
z.B. für Enzymaktivität, damit Enzym sein Substrat auch richtig binden und umsetzen kann.
- Welche Kräfte treiben die Faltung?
 - Hydrophober Effekt (hydrophobe Seitenketten eher innen, also im Kern des Proteins)
 - Ionische Wechselwirkungen
 - WasserstoffbrückenbindungenBin auf das vierte nicht gleich gekommen, deswegen hat mich der Benedikt danach gefragt, warum Kunststoffe fest sind. Bin aber trotzdem nicht drauf gekommen.
Gemeint waren natürlich die Van-der-Waals-Kräfte
- Wie funktionieren diese Van-der-Waals-Kräfte?
Keine Ahnung, hab ich nicht so verstanden
- Was haben diese ganzen Interaktionen gemeinsam?
Es sind alles nicht-kovalente
- Wodurch wird die Sekundärstruktur festgelegt?
Durch die Aminosäuresequenz
- Wer hat das herausgefunden, mit welchem Protein wurde es gemacht und wie funktionierte dieser Versuch?
Christian Anfinsen (also bitte, wer merkt sich denn schon solche Namen); weiß leider nicht mehr wie das Protein hieß, der Versuch wurde mal im Seminar erklärt
- was sind Disulfidbrücken?
Kovalente Bindungen zwischen den Schwefelatomen von Cysteinen
- Was ist für deren Ausbildung nötig?
Die Cysteine müssen in nähere Nachbarschaft kommen es müssen oxidierende Bedingungen vorliegen.
- Andere Bezeichnung für Aggregate?
Inclusion Bodies
- Wie kann Aggregation rückgängig gemacht werden?

- Solubilisierung mit hohen Konzentrationen eines chaotropen Agens (Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid), dann wieder entfernen und Rückfaltungspuffer dazu
- Strukturformel von Harnstoff zeichnen
- Wie sieht Guanidiniumhydrochlorid aus und welcher Aminosäure ähnelt es. bzw. welcher Rest von welcher AS ist ähnlich?
Arginin
- Gibt es in Zellen auch Hilfestellungen für die korrekte Faltung eines Proteins?
Chaperone
- Welche Chaperone wurden im Seminar vorgestellt