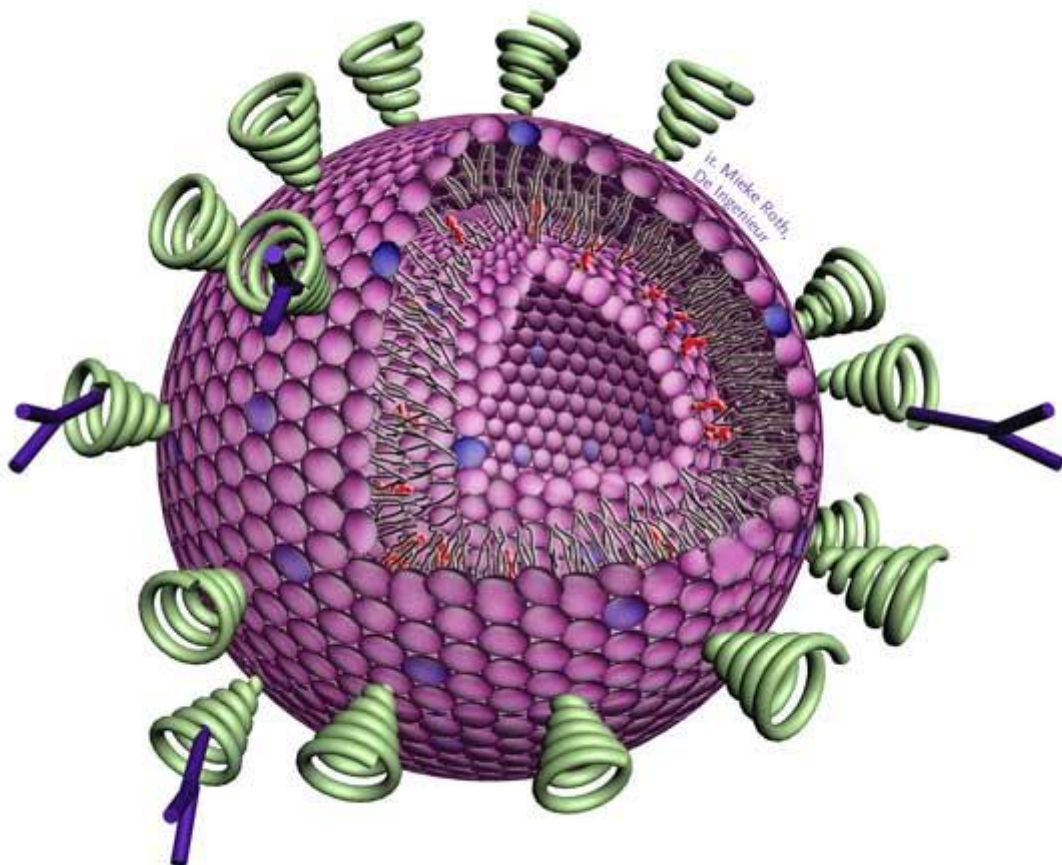


‘The Magic Bullet’

Liposomen in medicijntransport

Scheikunde module voor 6 vwo



Auteur: Coen Klein Douwel

Colofon

Deze module is ontwikkeld door **Coen Klein Douwel**, in samenwerking met het Departement Scheikunde, afdeling Membrane Enzymology van het Bijvoet center for biomolecular research van de Universiteit Utrecht.

De module is gemaakt in het kader van de vernieuwing van het examenprogramma scheikunde. De ontwikkeling is mogelijk gemaakt door het sectorplanproject "VWO docent bij een Scheikunde sectie van de UU".

Voor de totstandkoming is gebruik gemaakt van de expertise van:

Dr. A.I. de Kroon, afdeling Membrane Enzymology van het Bijvoet center for biomolecular research van de Universiteit Utrecht.



Het computerpracticum is door Roelof Stienstra vanuit het sectorplanproject "VWO docent bij een Scheikunde sectie van de UU" ontwikkeld en is met toestemming van het departement Scheikunde van de UU en de auteur Roelof Stienstra overgenomen uit de (nog niet gecertificeerde) NLT-module Eiwitkristallografie.

Het auteursrecht van de module Magic Bullet berust bij de auteur. De auteur is derhalve de rechthebbende zoals bedoeld in de hieronder vermelde creative commons licentie.

Disclaimer

De auteur heeft bij de ontwikkeling van het onderwijsmateriaal gebruik gemaakt van materiaal van derden. Bij het verkrijgen van toestemming, het achterhalen en voldoen van de rechten op teksten, illustraties, enz. is de grootst mogelijke zorgvuldigheid betracht. Mochten er desondanks personen of instanties zijn die rechten menen te kunnen doen gelden op tekstgedeeltes, illustraties, enz. van dit onderwijsmateriaal, dan worden zij verzocht zich in verbinding te stellen met de auteur. Hoewel het onderwijsmateriaal met zorg is samengesteld, is het mogelijk dat het onjuistheden en/ of onvolledigheden bevat. De auteur aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade, voortkomend uit (het gebruik van) dit materiaal.

Creative Commons Naamsvermelding-Niet-Commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland licentie <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl/>

Aangepaste versies van de module Magic Bullet mogen alleen verspreid worden indien het in het colofon vermeld wordt dat het een aangepaste versie betreft, onder vermelding van de naam van de auteur van de wijzigingen.

Januari 2012

Inhoud

1.	Inleiding	1
2.	Paul Ehrlich, vader van de “Magic Bullet”	2
	Kleurstoffen	2
	Selectieve kleuring	3
	Chemotherapie	4
	Salvarsan	5
3.	De “Magic Bullet” in de moderne wereld.	7
	Antibiotica	7
	Kanker	7
	Cis-platine	8
	Moderne cytostatica	8
4.	Entropie, het hydrofoob effect en leven.	9
	Hydrofoob effect	10
5.	Amphifatische moleculen en zelf-assemblage	14
	Celmembranen	14
	Verzadigd-onverzadigd	16
	Cis-trans	16
6.	Liposomen	28
	Liposomen en het afweersysteem	28
7.	Eiwitten	33
	Aminozuren	34
	Peptidebinding	35
	Ruimtelijke eiwitstructuur	38
8.	‘Magische kogels’	44
	I Mechanosensitive channel proteins	44
	II Selective ligand-receptor interaction	46
	De ontdekking van de dubbellaag door Gorter en Grendel (1925)	48
	Computerpractica	52

1. Inleiding

Deze module gaat over de vraag hoe medicijnen hun specifieke bestemming kunnen bereiken en daar hun werk kunnen doen zonder schade toe te brengen aan de reguliere processen in het lichaam. Bekend is dat bij bijvoorbeeld een chemokuur ter bestrijding van tumorgroei de bijwerkingen zeer ernstig zijn. Ook gezond weefsel wordt aangetast, met als mogelijke gevolgen haaruitval, misselijkheid, sterk verminderde weerstand, vermoeidheid e.d. , de zogenaamde off-target-effecten.

Er worden diverse strategieën gevolgd en getest in de bestrijding van tumoren. Zo wordt gekeken of er medicijnen kunnen worden ontwikkeld die specifiek aangrijpen op receptoren die alleen op tumorcellen aanwezig zijn. Typisch voor snelle tumorgroei is de snelle aanmaak van bloedvaten (angiogenese). Stoppen van aanmaak van bloedvatensysteem zou ook de tumorgroei stoppen.

In deze module bekijken we strategieën waarbij in nanocapsules ingepakte cytostatica (medicijnen ter bestrijding van kanker) heel specifiek hun medicijn afgeven in tumorweefsel.

Om deze strategieën te kunnen doorgronden is een heleboel kennis nodig over biochemische stoffen en processen. De module staat dan ook vol met biochemische basiskennis. Daarnaast wordt de historische ontwikkeling van chemotherapie toegelicht en duidelijk gemaakt dat het denken over specificiteit van medicijnen al in een vroeg stadium veel aandacht kreeg.

Opdracht: Bekijk de medicijnbijsluiter op pagina 31 eens.

Snap je er iets van?

Zo niet, ga aan de slag met deze module!

2. Paul Ehrlich, vader van de “Magic Bullet”.



Figuur 1: Paul Ehrlich

Paul Ehrlich (1854-1915) wordt algemeen beschouwd als één van de grondleggers van de moderne farmacie. In het bijzonder heeft Ehrlich buitengewoon bijgedragen aan de ontwikkeling van therapieën met chemicaliën die specifiek werken op ziekteverwekkers, de zogenaamde chemotherapie.

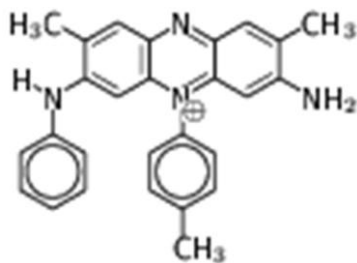
Ehrlich is opgeleid als arts maar heeft zich al snel ontpopt als uitstekende chemicus en bioloog. Op biologisch vlak heeft Ehrlich een doorslaggevende bijdrage geleverd aan de kennis over het immuunsysteem (het concept anti-lichaam).

Dankzij het werk van Ehrlich en zijn medewerkers konden maatschappijontwrichtende infectieziektes als tuberculose, difterie en syfilis veel beter worden behandeld.

Dit hoofdstuk is een beknopte biografie van Paul Ehrlich met enkele uitstapjes naar vooral chemische onderwerpen.

Kleurstoffen

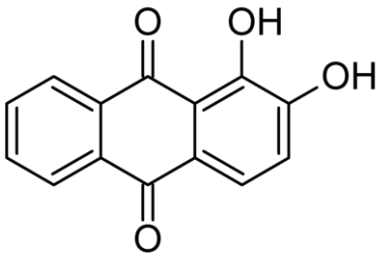
Al tijdens zijn studie experimenteerde Ehrlich met het selectief kleuren van celtypen en celonderdelen. Juist in zijn tijd kwamen er allerhande nieuwe synthetische kleurstoffen beschikbaar via de grote Duitse chemiereuzen Hoechst en BASF. Hoechst was toen bekend onder de naam Teerfarbenfabrik Meister Lucius & Brüning. De naam verwijst naar de grondstof voor veel kleurpigmenten, aniline, dat uit koolteer werd gewonnen. De naam BASF geeft een zelfde soort verwijzing: Badische Anilin- und Soda-Fabrik.



Figuur 2: Mauveïne, de eerste aniline-kleurstof per ongeluk gemaakt door de 18-jarige Engelsman Perkin in 1856

De systematische naam van aniline is fenylamine. Aniline bevat dus een aromatische groep. Zoals te zien in figuur 2 bestaat de eerste anilinekleurstof, mauveïne, uit een viertal gekoppelde aniline-achtige moleculen. Zijn elektronen in een enkele benzeenring al gedelokaliseerd vanwege mesomerie, in mauveïne is in de drie gekoppelde zes-ringen de elektronenwolk volledig uitgesmeerd. Gedelokaliseerde elektronen in een molecuul geven een heel specifiek stralings/licht-absorptiespectrum te zien. Bij benzeen en aniline liggen absorptiemaxima buiten het zichtbare gebied. Bij mauveïne en andere kleurstoffen erbinnen.

Door nu aan mauveïne-achtige structuren kleine wijzigingen aan te brengen (ander zijgroepje, andere plek zijgroepen, etc.) kan de absorptiekenarakteristiek net een klein beetje veranderen. Op deze wijze zijn er allerlei kleurstoffen te maken met net weer een andere tint.



Figuur 3: Alizarine, een natuurlijke kleurstof gewonnen uit de wortel van meekrap. Voor het eerst gesynthetiseerd in 1868 door BASF.

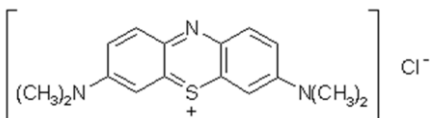
1. Teken de structuurformule van aniline.
2. Waar was Perkins naar op zoek toen hij bij toeval de kleurstof mauveïne ontdekte?
3. In figuur 2 is een grensstructuur getekend van mauveïne. Teken nu zelf twee andere grensstructuren waarbij voldaan is aan de oktetregel. Let op: in de figuur zijn de lone pairs niet getekend.
4. Om textiel te kunnen verven is het van groot belang dat de kleurstoffen goed hechten aan het te kleuren materiaal. Alizarine (zie figuur 3) is wat dat betreft een uitstekend pigment. Leg aan de hand van de moleculaire structuur van de stoffen uit dat alizarine goed bindt aan katoen. Katoen bestaat uit cellulose (Binas!)

Selectieve kleuring

Om cellen en celorganellen onder de microscoop zichtbaar te maken is kleuren noodzakelijk. Door gebruik te maken van verschillende kleurstoffen kunnen heel verschillende cellen worden gekleurd. Voor zenuwcellen zijn heel andere kleurstoffen nodig dan voor bepaalde bloedcellen. Deze selectiviteit is er ook op celniveau. Zo is voor het zichtbaar maken van mitochondriën een andere kleurstof nodig dan voor het kleuren van een celwand.

Kleuring van weefsel chemisch te verklaren!

Methyleenblauw is een stof die in zuurstofrijke omgeving blauw is en in zuurstofarme omgeving kleurloos.



Ehrlich kon hier selectief weefsel mee kleuren. Met name levende zenuw-uiteinden kleurden mooi blauw.

Als methyleenblauw door bepaalde cellen wordt opgenomen en "zijn werk doet" kun je er wellicht ook de cellen mee uitschakelen redeneerde Ehrlich. Methyleenblauw toepassen als malariabehandeling leverde hoopvolle resultaten.

Experiment: "blauwe fles"

Dankzij Ehrlich zijn de mogelijkheden om cellen en celorganellen zichtbaar te maken enorm uitgebreid. Niet alleen heeft Ehrlich nieuwe types cellen ontdekt hij was ook in staat om bacillen in bloed en lichaamsvocht selectief te kleuren. Na het bijwonen van een bijeenkomst waar Robert Koch sprak over zijn ontdekking van de oorzaak van tuberculose had Ehrlich binnen no time een methode ontwikkeld waarmee het tubercul-bacil selectief te kleuren was. Dankzij Ehrlich werd het zo mogelijk voor artsen om een goede diagnose te stellen waar het gaat om besmetting met het tubercul-bacil.

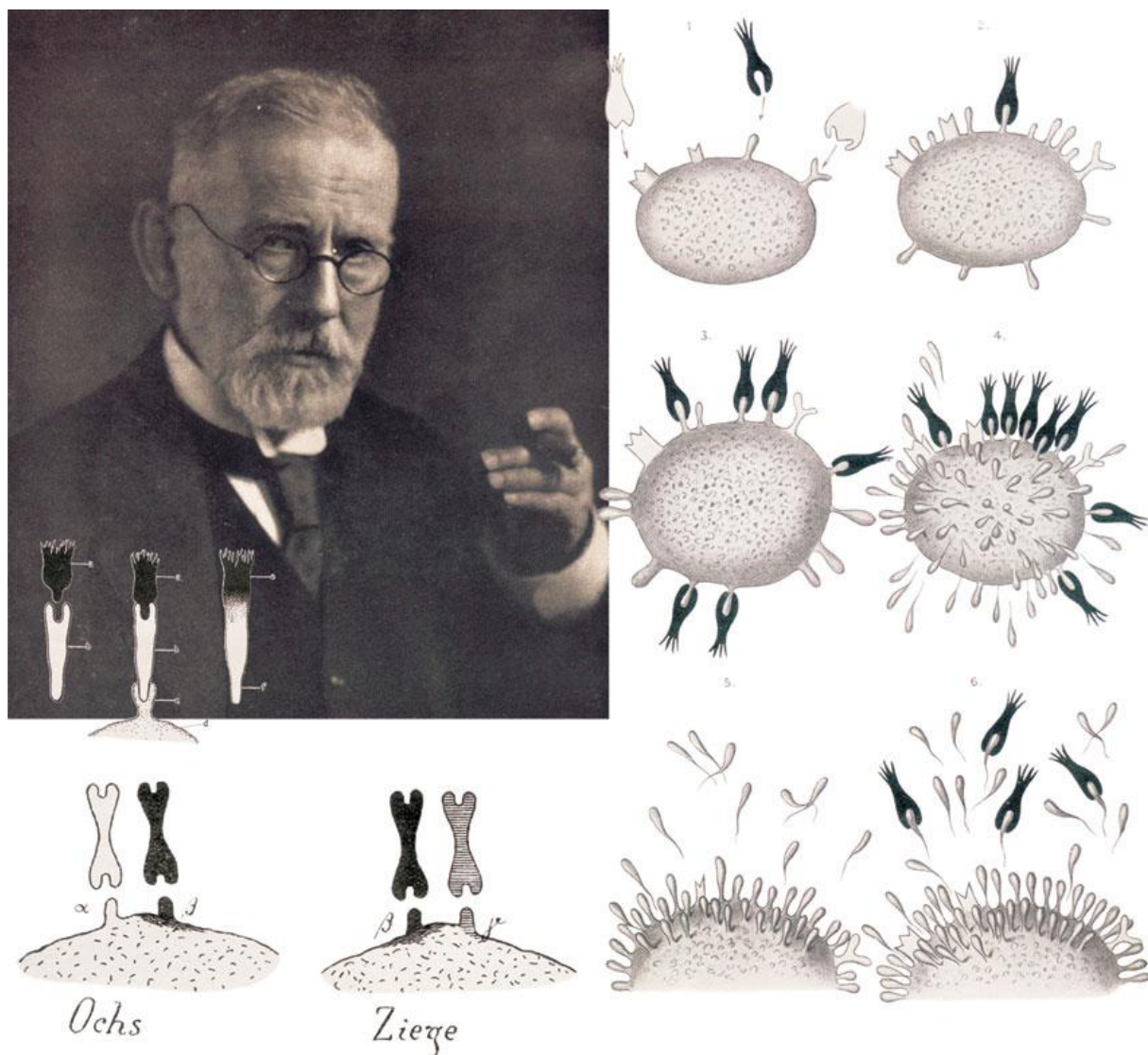
Deze selectiviteit van stoffen berust op een verschil in affiniteit voor verschillende soorten weefsel. Ehrlich was er van overtuigd dat deze affiniteit vooral chemisch van aard was dat wil zeggen te verklaren was vanuit de chemische structuur van de kleurstof en die van het weefsel (het substraat).

Voer experiment 'selectieve kleuring' uit

Chemotherapie

Volgens Ehrlich berustte ook de in zijn tijd bekende geïnduceerde immuunrespons na toedienen van bloedserum aan een patiënt op deze chemische selectiviteit. De idee van chemische interactie tussen toxines en antitoxines (modern: antigenen en antistoffen) vormde de basis van de zogenaamde zijgroepenleer van Ehrlich. De specifieke interactie tussen zijgroep en toxine is een duidelijk voorbeeld van een sleutel-slot-interactie.

Met deze theorie die later overigens is herzien is Ehrlich één van de grondleggers van de moderne immunologie.



Figuur 3: De inmiddels gefalsificeerde zijketen theorie: toxines vallen aan op zijketens van een cel die bedoeld zijn voor het opnemen van voedingsstoffen e.d. Immuniteit ontstaat wanneer cellen dankzij de eerste infectie grote hoeveelheden zijgroepen (receptoren) hebben ontwikkeld en die de bloedbaan ingestuurd hebben. Deze vrije zijgroepen zullen antigenen kunnen uitschakelen voordat zij alle receptoren op de cellen kunnen bezetten.

Een belangrijke gedachte van Ehrlich was dat dan ook allerlei bacteriële infecties chemisch te behandelen zouden moeten zijn met stoffen die heel specifiek hun werk doen, dat wil zeggen, alleen aangrijpen op zijgroepen die aanwezig zijn op de boosdoener en deze kunnen doden.

De geboorte van de chemotherapie was hiermee een feit.

Salvarsan

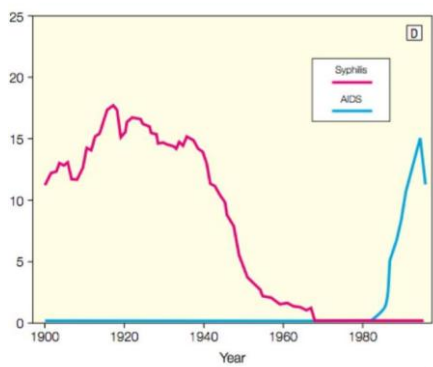
De chemotherapie onderscheidde zich van de reguliere farmacie omdat deze gebaseerd was op de inzet van chemicaliën gericht op een hele specifieke ziekteverwekker. Met deze zogenaamde *magische Kugeln* of *ZauberKugeln* zou de ziekteverwekker kunnen worden uitgeschakeld terwijl de cellen van de patiënt onaangetast bleven.

Een groot deel van zijn wetenschappelijke leven besteedde Ehrlich aan de zoektocht naar een chemotherapeutikum tegen syfilis, in zijn tijd een ernstige en zelfs maatschappijontwrichtende ziekte.

De methode die Ehrlich toepaste was rationeel dat wil zeggen gebaseerd op ideeën over de werking van functionele groepen in verbindingen. Zo was er voor een chemotherapeutikum een groep nodig die zorgde voor de aanhechting aan de ziekteverwekker en een groep die de ziekteverwekker kon vernietigen. Deze gedachte ging eigenlijk terug naar Ehrlichs eerdere werk met kleurstoffen. Ook hier was er een groep verantwoordelijk voor de aanhechting aan het weefsel/substraat en een andere groep voor de kleuring.

Op basis van deze gedachte synthetiseerden Ehrlich en zijn medewerkers honderden arseenverbindingen en testten deze op muizen, ratten en apen. Uiteraard was het van groot belang dat de stof naast aanhechtend en bacilvernietigend vermogen de eigenschap had dat het de cellen van de patiënt niet aantastte.

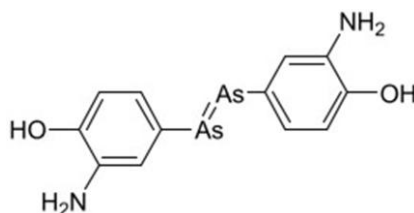
Uiteindelijk was arseenverbinding nummer 606 een verbinding die in aanmerking kwam als medicijn tegen syfilis. Na grondig testen werd het middel door het chemische concern Hoechst onder de merknaam Salvarsan op de markt gezet.



Figuur 4: Mortaliteit door syfilis en AIDS per 100.000 bewoners. Veel meer personen waren ziek.

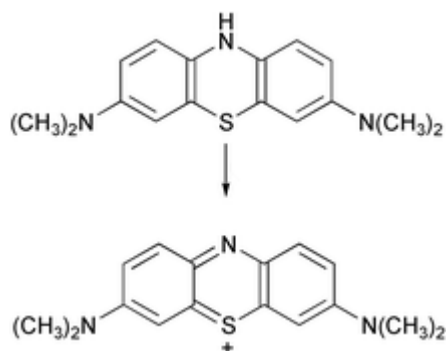


Figuur 5: Aankondiging levering Salvarsan door Hoechst



Figuur 6: structuurformule van Salvarsan. De naam is een samenstelling van de woorden Salvare (redden), arseen en sanus (gezond)

5. In onderstaande figuur is een incomplete vergelijking gegeven van de halfreactie die plaatsvindt als zuurstof in waterig milieu reageert met het ongekleurde moleculaire methyleenblauw tot de ionaire vorm .

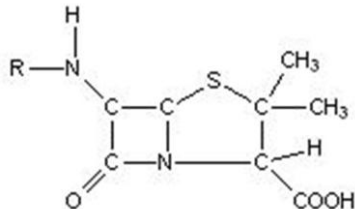


- Leg uit of methyleenblauw zuurstofrijke cellen kleurt of juist zuurstofarme.
 - Neem de figuur over en maak er Lewisformules van die voldoen aan de oktetregel.
 - Maak de halfreactie getekend in onderdeel b kloppend (met hulpstof(fen) en elektronen).
 - Geef de halfreactie voor de omzetting van zuurstof in waterig milieu.
 - Leg met behulp van mesomerie dat de moleculaire verbinding ongekleurd is en de ionaire vorm gekleurd.
6. Wat wordt bedoeld met sleutel-slot-interactie?
7. Wat zijn de overeenkomsten tussen Ehrlichs werk met kleurstoffen en zijn zoektocht naar een middel tegen syfilis?

Link naar filmpje over ontdekking Salvarsan: <http://youtu.be/QfhUCqe7cqs>



3. De "Magic Bullet" in de moderne wereld.



Figuur 7: Penicillinekern. Door restgroep R te variëren kunnen allerlei penicillines worden gemaakt.

Antibiotica

Salvarsan bleek toch niet het wondermiddel tegen syfilis. Na het verder ontwikkelde neosalvarsan duurde het tot de ontdekking van penicilline door Alexander Fleming tot syfilis echt afdoende behandeld kon worden. Penicilline blokkeert een stof die betrokken is bij de bouw van de celwand van de bacterie. Doordat mensen en dieren geen celwand hebben werkt penicilline uitsluitend op bacteriën.

Naast penicillines zijn er inmiddels honderden middelen op de markt die infectieziekten specifiek bestrijden. Al deze antibiotica ten spijt, infectieziekten zijn nog niet de wereld uit. Dankzij aanpassing van bacteriën kan er resistentie ontstaan tegen bepaalde antibiotica. Ontwikkeling van nieuwe ziektebestrijders blijft dus van groot belang.

Kanker

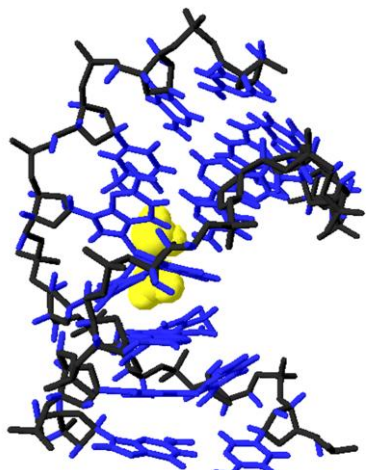
Tot nu toe is er gesproken over middelen gericht tegen stoffen of microorganismen die afkomstig zijn van buiten het lichaam. Nu zijn er ook veel ziektes en aandoeningen die te maken hebben met verstoorde processen in het lichaam die misschien wel een externe oorzaak hebben maar waar we niet te maken hebben met een lichaamsvreemde ziekte. Vele typen kanker, de ziekte van Alzheimer (dementie), allerlei allergiën, genetische aandoeningen als taaislijmziekte en Parkinson zijn hier voorbeelden van.



Figuur 8: chemotherapie kan haaruitval veroorzaken

Medicijnen die aangrijpen op lichaamseigen stoffen hebben het probleem dat ze vaak ernstige bijwerkingen hebben omdat ze ook aangrijpen op plaatsen in het lichaam waar je dat niet wil en vaak niet specifiek genoeg zijn waardoor ze ook onbedoeld andere lichaamsprocessen kunnen beïnvloeden.

Net als bij het uitschakelen van bacteriën moeten er bij de aanpak van kanker hele cellen worden gedood. Naast bestralen is chemotherapie een veelgebruikte methode om tumorcellen aan te pakken. Een groot probleem bij chemotherapie is dat ook gezonde cellen worden gedood.



Figuur 9: Cis-platine bindt covalent aan twee bij elkaar gelegen baseparen aan DNA-streng

Cis-platine

Een bekende tumorceldodende verbinding is cis-platine. De stof werd eigenlijk bij toeval ontdekt toen onderzoek werd gedaan naar de invloed van een elektrisch veld op de groei van de *E. coli*-bacterie. Men zag dat vermenigvuldiging kwam stil te liggen. Nader onderzoek leerde dat dankzij de gebruikte platina-elektroden er een platinahoudende verbinding in de oplossing kwam die zorgde voor de groeiremmende werking. Cis-platine verbindt zich zodanig met DNA dat celdeling door mitose en celreparatie niet mogelijk is.

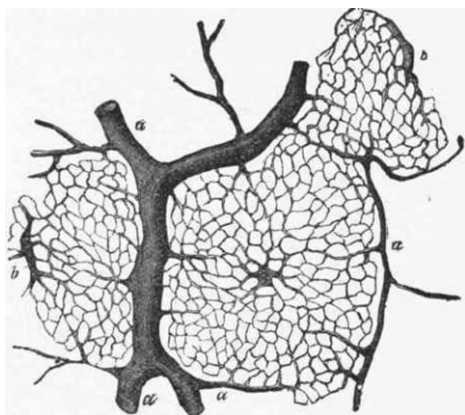
Moderne cytostatica

Celdodende middelen (cytostatica) zijn toxisch voor tumorcellen en meestal ook voor gezonde cellen. Moderne strategieën zijn er dan ook op gericht om zo weinig mogelijk middel toe te passen en dit middel zoveel mogelijk bij de tumorcel zijn werk te laten doen.

Moderne cytostatica moeten derhalve aan de volgende eisen voldoen:

- Stabiel zijn, dat wil zeggen niet te snel worden afgebroken.
- Immunoresistent zijn, dat wil zeggen onzichtbaar zijn voor het immuunsysteem.
- Specifiek zijn, dat wil zeggen alleen in de buurt van tumorcellen hun werk kunnen doen of beter nog alleen op tumorcellen werken.

Bovenstaande kan worden bereikt door de celdodende stoffen in te pakken in hele kleine pakketjes die door de bloedbaan naar de tumor kunnen worden getransporteerd en daar via de haarvaten in het tumorweefsel worden opgenomen. Ter plaatse van de tumor moeten de pakketjes dan hun lading afgeven of zelfs volledig door de cellen worden opgenomen.



Figuur 10: Haarvaten zijn tot 10 keer dunner dan een haar

Omdat haarvaten een gemiddelde doorsnede hebben van 7,5 micrometer en de poriën in de haarvaten van tumorweefsel maximaal 400 nanometer groot zijn moeten de pakketjes bijzonder klein zijn. Zulke pakketjes kun je niet met de hand of met een machine in elkaar zetten. Het kan wel door gebruik te maken van stoffen die zich spontaan tot een pakketje formeren, de zogenaamde zelf-assemblage. De bouwstenen van de pakketjes die wij in de rest van de module gaan bestuderen zijn lipiden. Deze lipiden kunnen zich spontaan formeren tot liposomen. Deze liposomen kunnen we laden met allerlei cytostatica.

4. Entropie, het hydrofoob effect en leven.

Leven is ontstaan in water en kan niet bestaan in haar afwezigheid. Het belang van de unieke eigenschappen van water voor leven wordt alom onderkend. Het is niet alleen het oplossend vermogen van water voor allerlei stoffen (hydrofiel) in het bijzonder de zouten dat van belang is maar ook juist het feit dat vele stoffen onoplosbaar zijn in water (hydrofoob).

En dan zijn er nog stoffen die voor een deel oplosbaar zijn in water en voor een ander deel niet. Deze stoffen oriënteren zich in water op een heel bijzonder wijze en vormen met elkaar georganiseerde structuren die een cruciale rol spelen in levende materie. De spontane vorming van (cel)membranen bijvoorbeeld hangt alleen af van het feit dat de samenstellende moleculen deels hydrofiel en deels hydrofoob zijn. Voordat we deze moleculen nader gaan bestuderen zal eerst aandacht worden geschonken aan de achtergrond van dit menggedrag: waarom mengen hydrofiele stoffen niet met hydrofobe?

Entropie

Om iets te begrijpen van dit menggedrag is het van belang een notie te hebben van het begrip entropie.

Entropie is een grootheid die evenredig is met het aantal manieren waarop een systeem zichzelf kan zijn.

Maximalisatie van entropie is de belangrijkste drijvende kracht bij allerlei chemische en fysische processen.



Figuur 11: De kans op 7 is veel groter dan op 12

Een vergelijking:

Een worp met twee dobbelstenen kan een score opleveren van 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 of 12. De score 7 is de score die op de meeste manieren gerealiseerd kan worden nl met de volgende combinaties: 1,6 en 2,5 en 3,4 en 4,3 en 5,2 en 6,1. Er zijn 6 verschillende manieren om tot de toestand 7 te komen terwijl er bijvoorbeeld maar twee manieren zijn om tot de toestand 3 te komen.

Uit bovenstaande zien we dat de toestand met de meeste realiseringmogelijkheden de toestand is met de grootste waarschijnlijkheid. Dikke kans dat wanneer ik met twee dobbelstenen gooi ik 7 gooi. Toch is er nog een behoorlijke kans dat een worp voor 15% of meer afwijkt van mijn voorspelling, ik zal heus ook wel vaak 5,6,8 of 9 gooien.

Stel je nu eens voor dat ik geen 2 dobbelstenen gooi maar 2000. De kans dat mijn worp percentueel fors afwijkt van de meest waarschijnlijke score (nl. 7000) is nihil. Laat staan wanneer ik te maken heb met een mol dobbelstenen. Hier kan ik met zekerheid zeggen dat

de waarde van de worp altijd zal liggen op of zeer nabij de waarde die hoort bij de meest waarschijnlijke toestand.

We zeggen de toestand met de meeste realiseringmogelijkheden (**microtoestanden**) heeft de hoogste entropie. En in systemen met veel realiseringmogelijkheden zal de toestand met de hoogste entropie veruit de waarschijnlijkste zijn en zal die toestand dan ook gerealiseerd worden.

Een voorbeeld:

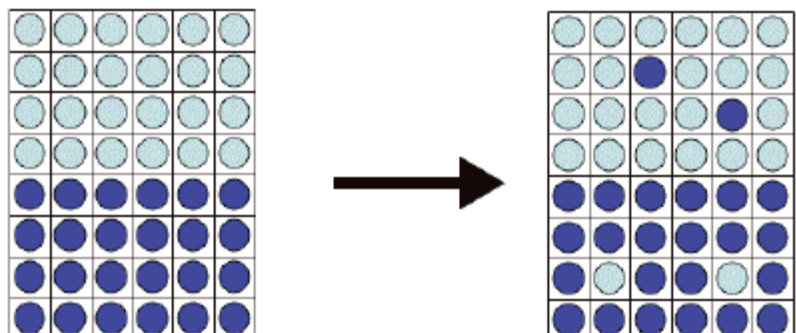
Men brengt met een pipet heel voorzichtig een druppel rode inkt aan op het wateroppervlak van een aquarium met slechts water. Zonder dat er geroerd of geschud wordt zal de inkt zich door het hele water verspreiden.

De toestand waarbij alle inktmoleculen over de hele bak verspreid zijn kan op veel meer manieren worden gerealiseerd dan de toestand waarbij de inktmoleculen zich in slechts een klein deel van de hele waterbak bevinden. De toestand waarin de moleculen zich volledig verspreiden is dus veel en veel waarschijnlijker en zal dan ook worden gerealiseerd. Dit diffusieproces is entropie-gedreven.

Een toename van entropie kan op uiteenlopende manieren worden gerealiseerd. Belangrijk zijn een vergroting van de ruimte waarin deeltjes zich bevinden (er zijn meer beschikbare plekken, dus meer realiseringmogelijkheden), en vergroting van het aantal deeltjes door bijvoorbeeld een chemische reactie en een verhoging van de temperatuur (er is meer energie over de deeltjes te verdelen en dat kan dan op meer verschillende manieren).

Hydrofoob effect

Laten we met bovenstaand gereedschap eens kijken naar het menggedrag van twee vloeistoffen:



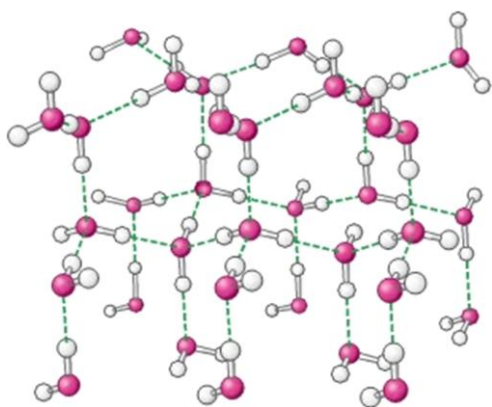
Analoog aan het verhaal met de dobbelstenen kun je zeggen dat de homogeen gemengde situatie de meeste realiseringmogelijkheden

heeft en dus de meest waarschijnlijke is. Toch is het zo dat wanneer je een hydrofobe stof mengt met water de linker situatie ontstaat.

In werkelijkheid zijn deze bolletjes moleculen die elkaar in meer of mindere mate kunnen aantrekken dankzij intermoleculaire interacties als vanderwaals-bindingen en waterstofbruggen. Het vormen en breken van bindingen gaat gepaard met een energieeffect, d.i er komt warmte vrij of er wordt warmte opgenomen. Het vormen van bindingen is exotherm en levert dus een temperatuurverhoging op. Dit op haar beurt leidt tot verhoging van het aantal realiseringmogelijkheden en daarmee een vergroting van de entropie.

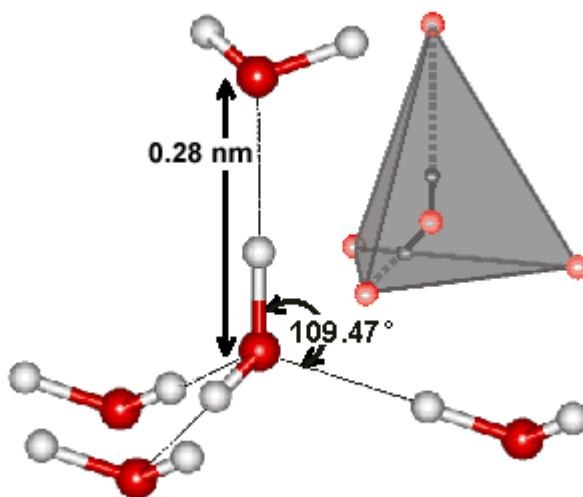
Zo is bijvoorbeeld het mengen van benzeen met water een endotherm proces, dat wil zeggen dat het bij mengen meer energie kost om de sterke bindingen tussen watermoleculen te verbreken dan dat het vormen van nieuwe bindingen aan energie oplevert. Mengen heeft een temperatuurverlaging tot gevolg en dus een vermindering van de entropie. Dit zou er dus de oorzaak van kunnen zijn dat benzeen en water niet mengen.

Bij hexaan en water ligt het anders, het energie-effect bij mengen (bij wat hogere temperatuur, anders lukt het niet) blijkt na meting nihil, het mengen is exotherm noch endotherm. Toch mengen ze niet bij kamertemperatuur terwijl je uit entropieoogpunt zou denken dat de gemengde situatie veel gunstiger is. Hier moet wat anders aan de hand zijn.



Figuur 12: In de vaste fase vormt ieder watermolecuul 4 waterstofbruggen

Laten we eens inzoomen op het watermolecuul. Een watermolecuul kan 4 waterstofbruggen vormen met omringende watermoleculen. In de kristalstructuur van ijs is dat ook daadwerkelijk het geval. In de vloeistoffase heeft een watermolecuul meer bewegingsvrijheid en vormt deze gemiddeld twee waterstofbruggen. Er worden dus voortdurend waterstofbruggen verbroken en gevormd. Stellen we ons een watermolecuul in vloeistof voor als een molecuul dat tetraëdisch omringd is door vier andere watermoleculen dan zijn er 6 manieren waarop dit centrale watermolecuul twee waterstofbruggen kan aangaan (elke combinatie van twee bindingen levert een ribbe op dus 6 mogelijkheden):



Figuur 13: In de vloeibare fase vormt ieder watermolecuul gemiddeld twee waterstofbruggen. Dit kan op 6 manieren.

Wordt één watermolecuul vervangen door bijvoorbeeld hexaan dan blijven er ineens nog maar drie mogelijkheden over waarop dit watermolecuul twee waterstofbruggen kan aangaan!

Dit hexaanmolecuul zorgt dus voor een forse verlaging van het aantal realiseringmogelijkheden van de toestand waarin watermoleculen gemiddeld twee waterstofbruggen vormen. Mengen met hexaan zorgt dus voor een forse verlaging van de entropie. Water en hexaan zullen dus bij kamertemperatuur niet mengen ondanks dat er energetisch gezien geen voorkeur voor de gemengde of ongemengde situatie bestaat. Merk op dat door menging in dit geval het aantal waterstofbruggen niet af zou nemen. Dat menging energieneutraal verloopt mag dan ook niet verbazen.

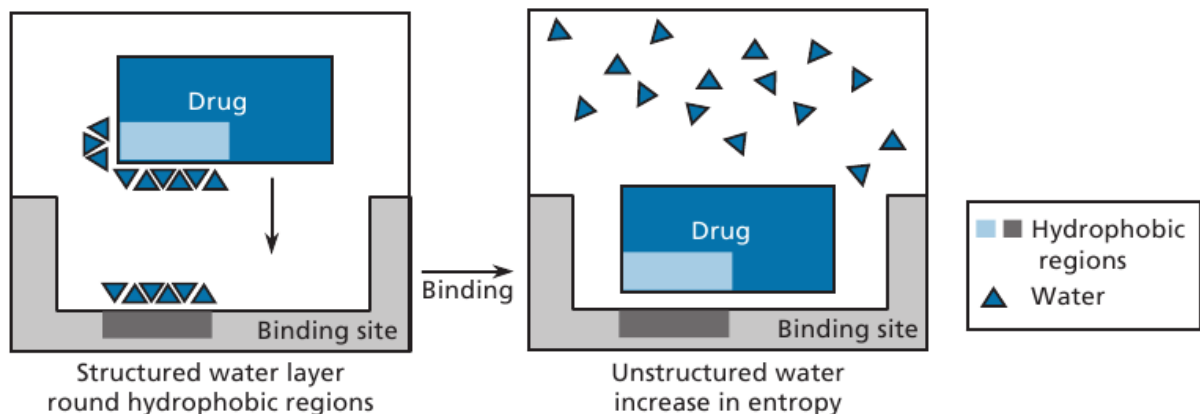
Recent onderzoek met femtolasers van het Amolf toont nu ook aan dat watermoleculen rondom apolaire moleculen/oppervlakken in hun bewegingsruimte zijn beperkt.

Het fenomeen waarbij entropieverlaging door de vermindering van de vrijheidsgraden van water ontmenging in de hand werkt, noemen we **het hydrofoob effect**.

Dit hydrofoob effect is bepalend voor het gedrag van allerhande stoffen in levende organismen. Het is de drijvende kracht achter de vorming van (cel)membranen en het correct vouwen van eiwitten tot functionele structuren.

Ook bij de ontwikkeling van medicijnen wordt rekening gehouden met dit effect. Het aanhechtingsvermogen van medicijnen op bepaalde substraten is afhankelijk van de mate waarin het medicijn in staat is bij hechting te zorgen voor een vergroting van de entropie.

8. *Wat is de waarde van de meest waarschijnlijke worp met 8 dobbelstenen?*
9. *Hoe groot is de kans dat ik met twee dobbelstenen 7 gooi? En dat ik 2 gooi?*
10. *Vul in: Des te dobbelstenen er worden gegooid hoe de percentuele afwijking van de waarde van de worp ten opzichte van de waarschijnlijke waarde.*
11. *Olie en water mengen niet. Waarom verwacht je in eerste instantie dat een volledig gemengde situatie een grotere entropie heeft?.*
12. *Leg uit of een watermolecuul grenzend aan een hydrofoob oppervlak beweeglijker of juist minder beweeglijk is dan een watermolecuul in de waterbulk*
13. *Medicijnen bestaan vaak uit kleine moleculen die binden met een fors substraat zoals een eiwit. De bindingsplekken zijn vaak de actieve plekken van het eiwit.*
Bij de aanhechting van medicijnen op specifieke bindingsplekken speelt het hydrofoob effect vaak een cruciale rol.
Uiteraard worden er bij aanhechting bindingen verbroken en gevormd met het nodige energieeffect. Toch is dit energie-effect zeker niet altijd doorslaggevend. Bij de ontwikkeling van medicijnen wordt getracht het hydrofobe deel van het medicijn zo goed mogelijk aan te laten sluiten op de bindingsplek.
Onderstaande figuur laat zien hoe de entropie wordt vergroot bij aanhechting van bepaalde medicijnen.



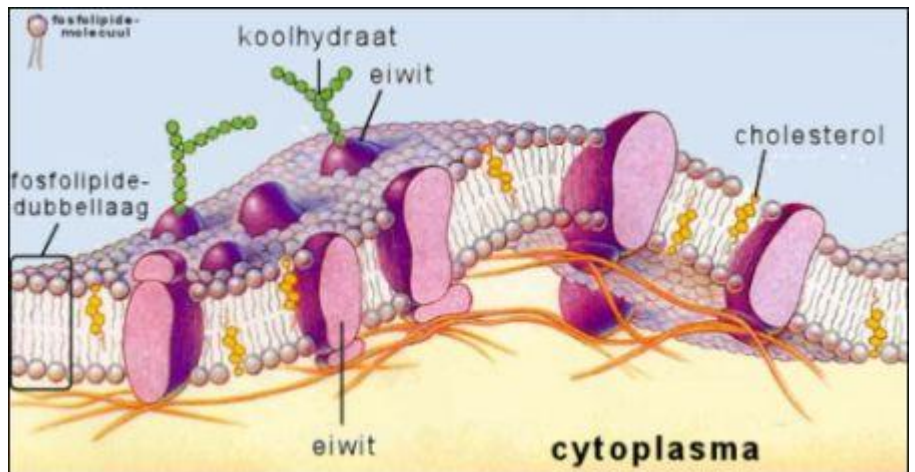
- a. *Waarom zijn medicijnmoleculen meestal maar voor een heel klein deel hydrofoob?*
- b. *Wat zijn de belangrijkste bindingen die bij aanhechting van een medicijn worden verbroken en gevormd?*
- c. *Waarom is het bindingsenergie-effect vaak gering.*
- d. *Waarom moet het hydrofobe deel van het medicijn exact aansluiten op het hydrofobe deel van de bindingsplek?*

5. Amphifatische moleculen en zelf-assemblage

Celmembranen

Celmembranen hebben een hele bijzonder functie. Enerzijds vormen ze de grens tussen leven en dood en moeten processen in de cel worden beschermd tegen allerlei extracellulaire factoren. Anderzijds moeten via het celmembraan allerlei stoffen worden binnengehaald of juist worden uitgescheiden. Tevens zijn cellulaire processen gebaat bij een stabiel milieu. Je moet dan denken aan constante pH en ionconcentraties. Het celmembraan speelt een essentiële rol in de regulering hiervan.

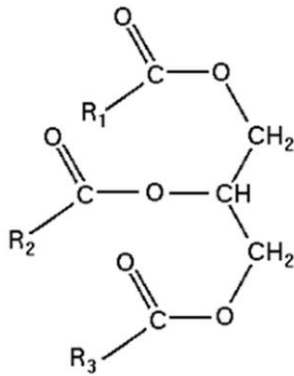
De samenstelling van het celmembraan is zodanig dat celdeling kan plaatsvinden zonder dat er functionaliteit verloren gaat. Ook dit vraagt weer hele bijzondere eigenschappen van de stoffen die het membraan samenstellen. Ook binnen de cel zijn er verschillende onderdelen met verschillende functies die een verschillende en/of afgeschermd milieu behoeven (celkern, golgi-apparaat, endoplasmatisch reticulum). Ook deze organellen (celorganen) worden omgeven door een met het celmembraan vergelijkbare afscherming.



Celmembraan

Het hoofdbestanddeel van membranen wordt gevormd door fosfolipiden. Dit zijn van vetten afgeleide verbindingen die door hun eigenschappen uitermate geschikt zijn als bouwstenen van membranen.

Oliën en vetten die via de voeding in ons lichaam terecht komen worden voor een deel in de cel omgezet tot fosfolipiden.



Figuur 14: algemene structuurformule van een olie/vet

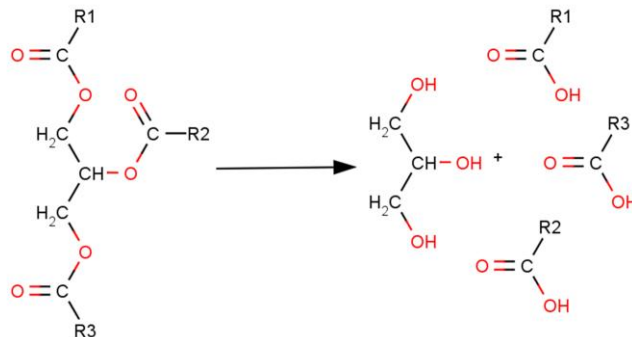
Intermezzo oliën en vetten

Oliën en vetten halen we binnen via zowel dierlijk als plantaardig voedsel. Zonnebloem- en, olijfolie worden beschouwd als ‘gezonde’ oliën in tegenstelling tot frituur- en spekvet. Ook oliën uit vis zouden een bijdrage leveren aan gezonde voeding (omega-3 en omega-6!!!) Oliën en vetten zijn chemisch gezien gelijkwaardig. Het zijn allemaal tri-esters van 1,2,3-propaantriol (glycerol) en carbozuren met koolstofketens variërend in lengte van 18 tot 24 koolstofatomen. Deze lange carbozuren, meestal vetzuren genoemd, kunnen volledig verzadigd zijn dat wil zeggen, geen dubbele bindingen bevatten, maar kunnen ook onverzadigd zijn. Vetten zijn er in alle soorten en maten: je kunt namelijk eindeloos veel combinaties maken van de tientallen vetzuren met glycerol.

In het plaatje zijn de restgroepen R_1 , R_2 en R_3 lange koolwaterstofketens die zowel verzadigd als voor een deel onverzadigd kunnen zijn

Een olie/vet is net als een enkelvoudige ester te hydrolyseren.

In onderstaande figuur is de hydrolyse in zuur milieu weergegeven waarbij het alcohol (in dit geval het triol glycerol) en de 3 vetzuren worden gevormd.



Hydrolyse van een olie

Oliën en vetten hebben diverse functies in het lichaam. Ze spelen een rol in de energieopslag en warmtehuishouding en de vetzuren die ze bevatten zijn belangrijke grondstoffen voor diverse vitamines en zoals gezegd voor de bouw van fosfolipiden die het hoofdbestanddeel vormen van onze celmembranen.

Ons lichaam is in staat om vele vetzuren zelf aan te maken onder andere door bepaalde essentiële vetzuren om te bouwen. Deze essentiële vetzuren maakt het lichaam niet zelf aan en moeten we dus via onze voeding binnen krijgen.

Verzadigd-onverzadigd

Het verschil tussen een olie en een vet is, is dat oliën vloeibaar zijn bij kamertemperatuur en vetten niet. Op grond van het feit dat oliën en vetten apolaire stoffen zijn mag je verwachten dat het smeltpunt van deze stoffen afhangt van de molecuulmassa én de vorm van het molecuul. De vanderwaals-binding is immers afhankelijk van de hoeveelheid elektronen in het molecuul én de mate waarin moleculen elkaar door hun vorm daadwerkelijk kunnen beïnvloeden. Nou verschillen oliën en vetten niet zozeer in molecuulmassa. Een verklaring voor hun verschillende aggregatietoestand bij kamertemperatuur moeten we dan ook zoeken in de vorm van de moleculen en de wijze waarop de moleculen een vanderwaals-interactie met elkaar aangaan.

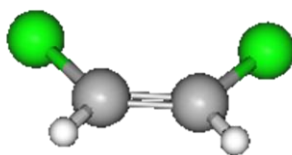
Een simpel experimentje wijst uit dat oliën onverzadigde verbindingen zijn (dat wil zeggen één of meerdere dubbele bindingen bevatten) terwijl vetten in het algemeen verzadigd zijn. Wellicht kan hier de oorzaak van het verschil in eigenschap worden gevonden.

Experiment 1 Additie met broomwater/joodwater.

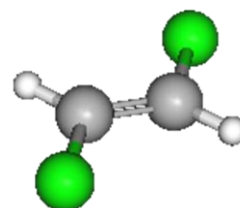
Cis-trans

Er blijken drie verschillende stoffen te bestaan met de molecuulformule $C_2H_2Cl_2$. Zo op het eerste gezicht kun je er maar twee een 'kloppende' molecuulstructuur geven namelijk 1,1-dichlooretheen en 1,2 – dichlooretheen. Indien we er vanuit gaan dat de dubbele binding een binding is die star is dat wil zeggen dat er om de as in de lengterichting van de binding geen draaiing mogelijk is dan kan wel begrepen worden dat er drie isomeren van $C_2H_2Cl_2$ zijn.

Onder andere uit een verschil in stabiliteit tussen de twee vormen van 1,2-dichlooretheen kunnen we concluderen dat de 4 zijgroepen rondom een dubbele binding in één vlak moeten liggen. Er kunnen dan twee 'soorten' 1,2-dichlooretheen worden voorgesteld.



cis-1,2-dichlooretheen

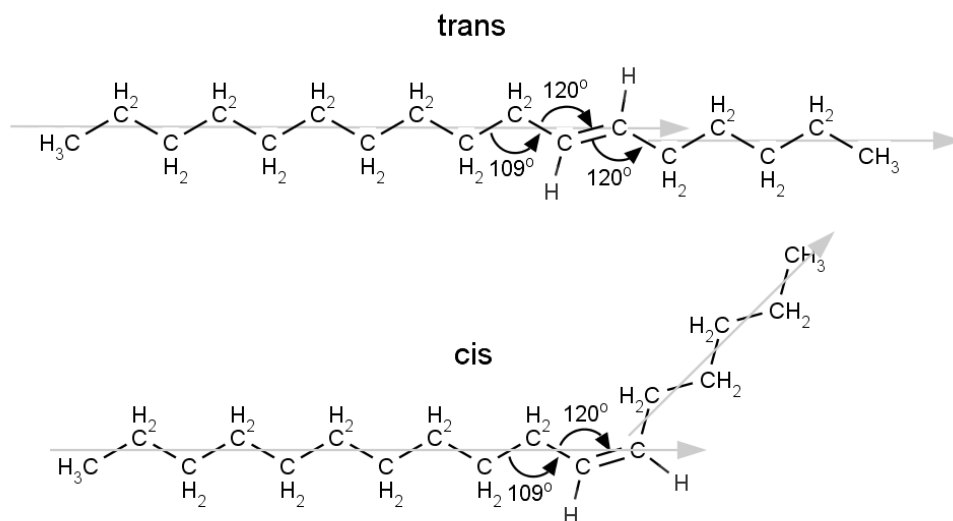


trans-1,2-dichlooretheen

Eén waarbij de beide chloor-atomen aan dezelfde zijde van de dubbele binding liggen, de cis-vorm, en één waarbij ze tegenover elkaar liggen, de trans-vorm. (zie figuur). Deze vorm van isomerie is een vorm van ruimtelijke isomerie (stereoisomerie) in tegenstelling tot de structuurisomerie waarbij de atomen letterlijk in een andere volgorde aan elkaar zitten. Deze cis-trans-isomerie is een vorm van stereo-isomerie. Later in deze module maken we kennis met nog een andere vorm van stereo-isomerie, de spiegelbeeldisomerie.

Ook in vetzuren waarin zich dubbele bindingen bevinden speelt cis-trans-isomerie een belangrijke rol. Dubbele bindingen in vetzuren die in organismen voorkomen zijn allemaal van de cis-vorm, en dat is niet zomaar!

Zoals te zien in onderstaande figuur krijgen koolwaterstofketens met een dubbele binding in de cis-vorm een knik wanneer je alle koolstofatomen in hetzelfde vlak legt. De trans-vorm daarentegen blijft net als verzadigde ketens mooi lineair behoudens een klein sprongetje.



Triglyceriden die volledig verzadigd zijn bevatten dus mooie lineaire ketens en zijn derhalve goed “stapelbaar” terwijl triglyceriden met onverzadigde ketens in een cis-orientatie ketens bevat met knikken en dus veel lastiger ordentelijk te stapelen zijn. Hoe slechter stapelbaar, des te minder direct contact tussen de moleculen, hoe zwakker de vanderwaalsbindingen en hoe lager het smeltpunt. Dat is nou precies wat we zien bij de plantaardige onverzadigde oliën!

14. Welke van de twee vormen van 1,2-dichlooretheen is volgens jou het stabielst. Leg uit.

15. Ook bij cyclische verbindingen tref je cis-transisomerie aan. Zo bestaan er twee vormen van 1,2 –dimethylcyclopropan.
- Maak een ruimtelijke tekening van beide vormen.
 - Leg uit welke van de twee vormen het stabielst is.
16. In bovenstaande figuur vind je hoeken van 109° en van 120° . Leg uit dat deze hoeken daadwerkelijk verschillend moeten zijn en dat ze de betreffende waarde hebben.



Figuur 15: Omega 3 en 6 vetzuren als voedingssupplement

Codering vetzuren

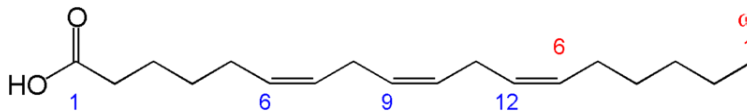
De carbonzuren die veresterd zijn aan oliën en vetten hebben koolstofketens die langer zijn dan 14 gekoppelde koolstofatomen. Om deze zogeheten vetzuren makkelijk te karakteriseren hebben ze een code meegekregen. In deze code staat hoeveel koolstofatomen ze bevatten, hoeveel dubbele bindingen ze bevatten en waar deze dubbele bindingen zich bevinden. Zo is de code voor oliezuur: **C 18:1 ω -9**. Dit betekent dat oliezuur **18** koolstofatomen bevat en **1** dubbele binding. Deze dubbele binding bevindt zich na het **9^e** koolstofatoom gerekend vanaf de staart (ω) van het vetzuur (dus niet vanaf de zuurgroep). Omdat alle natuurlijke vetzuren een cis-orientatie rond hun dubbele bindingen hebben hoeft dit niet meer expliciet te worden weergegeven in de code.

Maar wat nu als er meer dan één dubbele binding in zit. Waar bevindt die tweede of derde dubbele binding zich dan. Wat is nu het geval, bij de vetzuren die in de natuur voorkomen liggen de tweede en eventueel derde of vierde dubbele binding met vaste regelmaat na de eerste dubbele binding. Dus wanneer de plek van de eerste vastligt liggen de plekken van de overige dubbele bindingen ook vast.

Code	Vetzuren
<i>Middel keten vetzuren:</i>	
C 6:0	capronzuur
C 8:0	caprylzuur
C 10:0	caprinezuur
C 12:0	laurinezuur
<i>Lange keten vetzuren:</i>	
C 14:0	myristinezuur
C 16:0	palmitinezuur
C 16:1 ω -7	palmitoleïnezuur
C 18:0	stearinezuur
C 18:1 ω -9	oliezuur
C 18:2 ω -6	linolzuur
C 18:3 ω -3	α -linoleenzuur
C 18:3 ω -6	γ -linoleenzuur
C 20:3 ω -6	dihomo- γ -linoleenzuur
C 20:4 ω -6	arachidonzuur
C 22:6 ω -3	docosahexaenzuur

Figuur 16: codering vetzuren

Hieronder is de structuurformule getekend van γ -linoleenzuur. Onder de structuur is de officiële IUPAC nummering van de koolstofatomen weergegeven met de karakteristieke zuurgroep op nummer 1. Boven de structuur staat de nummering vanaf de vetzuurstaart (ω) weergegeven zoals die in de vetzuurcodering wordt toegepast.



De code voor dit vetzuur is dan **C 18:3 ω -6**.

Let op : tussen de dubbele bindingen in vetzuren bevinden zich iedere keer 2 enkelvoudige bindingen. Met de positie ω -6 van de eerste dubbele binding vanaf de staartkant liggen de posities van de overige dubbele bindingen dus vast.

Figuur 16 geeft de code's voor enkele veelvoorkomende carbonzuren

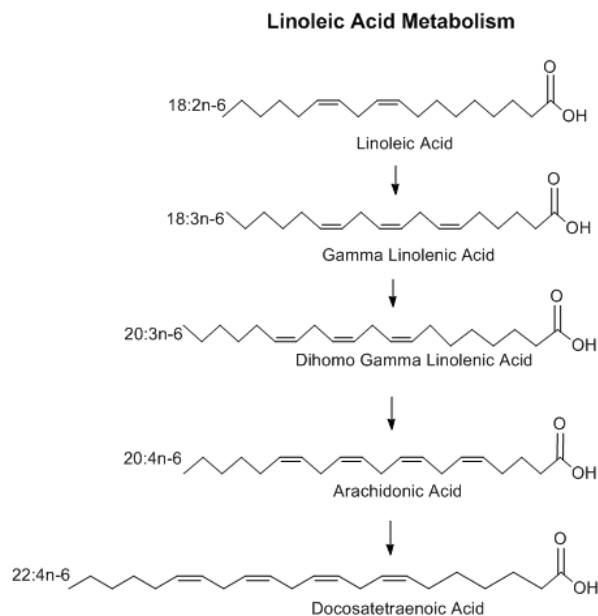
Essentiële vetzuren, zijn vetzuren die het lichaam niet zelf kan aanmaken uit andere vetzuren, terwijl het lichaam ze wel nodig heeft om normaal te kunnen functioneren. Dit betekent dat ze via de voeding moeten worden ingenomen. In feite gaat het hier dus om een soort van vitamines. Essentiële vetzuren zijn "essentieel" genoemd toen onderzoekers er achter kwamen dat wanneer deze vetzuren ontbreken in de voeding, dit de groei van jonge kinderen en dieren schaadt. Deze vetzuren werden daarom vroeger vitamine F genoemd, totdat men er achter kwam dat ze tot de vetten behoorden. Dat deze vetzuren nu niet meer de naam vitamine dragen betekent echter niet dat de mens zonder deze vetzuren kan leven. Het belang van essentiële vetzuren voor de gezondheid van de mens is momenteel onderwerp van grote wetenschappelijke belangstelling.

Essentiële vetzuren

Er zijn maar twee essentiële vetzuren namelijk α -linoleenzuur(ω -3) en linolzuur (ω -6). Uit deze twee vetzuren kan het lichaam twee groepen van langere en onverzadigde vetzuren aanmaken namelijk de andere ω -3- en de ω -6-vetzuren. Alle nodige ω -9 vetzuren zoals oliezuur kan het lichaam zelf aanmaken.

Onderstaande figuur geeft aan hoe het lichaam linolzuur omzet in andere ω -6-vetzuren. Het lichaam kan de keten verlengen en desatureren (méér onverzadigd maken).

(linolzuur is vertaald naar het engels linoleic acid, niet te verwarren met het engelse linolenic acid wat linoleenzuur betekent)



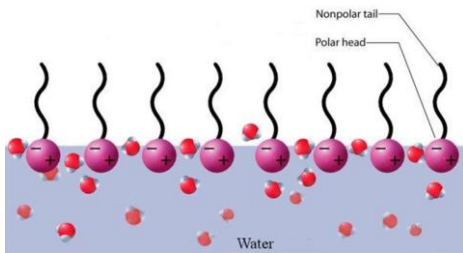
In een goed dieet wordt dus vanzelfsprekend aandacht besteed aan inname van essentiële vetzuren maar kan inname van de ω -3- en de ω -6-vetzuren die wat verder in de keten door het lichaam zelf kunnen worden aangemaakt ook heel zinvol zijn. Met name vis(olie) is een belangrijke bron van ω -3- en ω -6-vetzuren.

17. Geef de reactievergelijking van de hydrolyse van glyceryltriolaat (de tri-ester van glycerol en oliezuur) in zuur milieu. De vetzuurstaarten mogen worden weergegeven met de formule - C_xH_y , waar x en y gehele natuurlijke getallen zijn.
18. De hydrolyse van glyceryltripalmitaat in kaliloog (= basisch milieu) levert naast glycerol het zout kaliumpalmitaat. Geef de kloppende reactievergelijking van dit proces. Idem met - C_xH_y weergegeven

19. *Geef de vetzuurcode voor de stof 10,13,16-nonadecatrieenzuur. (help: Binas tabel 66)*
20. *Visolie bevat weliswaar ω -3- en ω -6-vetzuren maar dit zijn zeker niet allemaal essentiële vetzuren, met andere woorden: het lichaam kan deze visvetzuren zelf maken! Leg uit waarom visolie toch een belangrijke bijdrage kan leveren aan een gezond dieet.*
21. *Bij de omzetting van linolzuur (linoleic acid) in gamma-linoleenzuur (zie figuur op pagina 19) speelt in het lichaam een enzym uit de familie der desaturases een belangrijke rol. Verklaar de naam van deze familie aan de hand van het gekatalyseerde proces.*
22. *Examenopgave 'margarine' 2002-I*

Fosfolipiden

23. Voer opdracht “De ontdekking van de dubbellaag door Gorter en Grendel (1925)” uit.

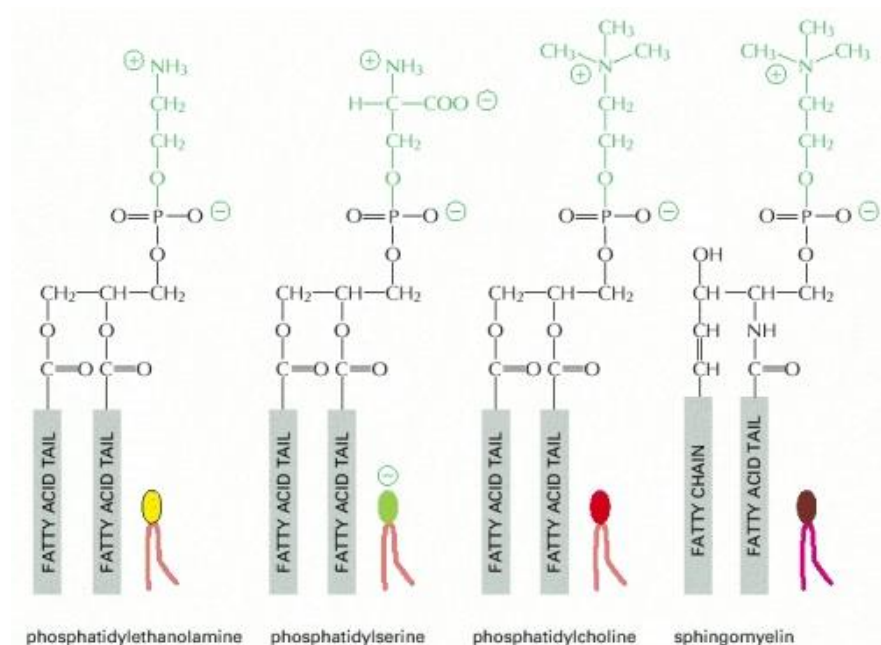
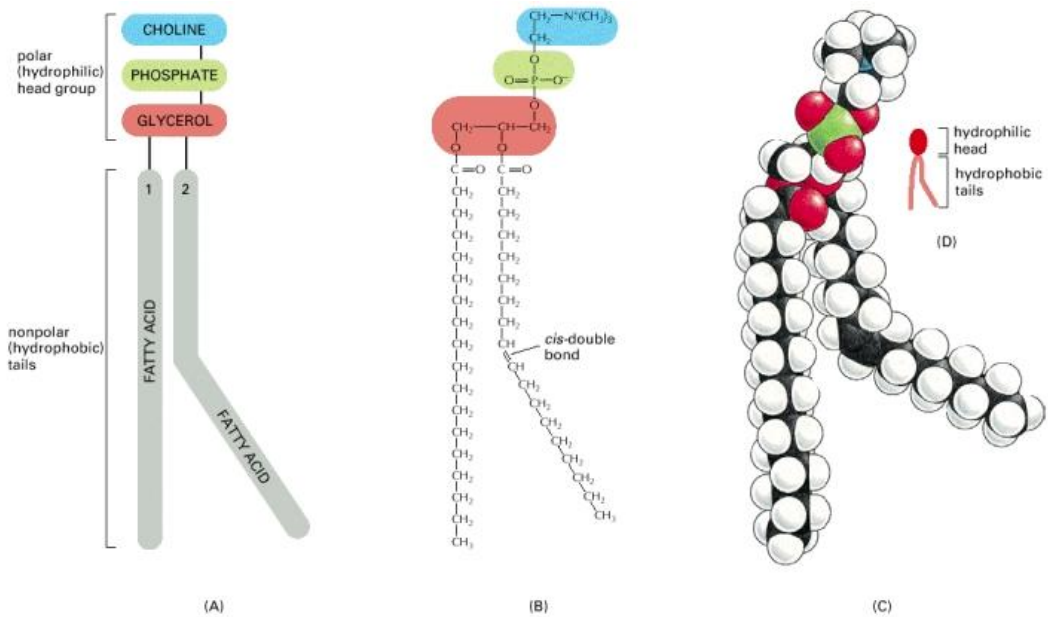


Langmuir verklaarde zijn mono-laag vanuit de structuur van de moleculen en het hydrofoob effect.. Vetzuren hebben een hydrofiele kop (zuurgroep) en een lange apolaire hydrofobe staart. De moleculen zullen zich aan het wateroppervlak zodanig oriënteren dat slechts de hydrofiele kop contact heeft met het water. De apolaire staarten steken naar boven.

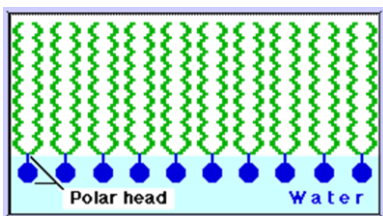
Gorter en Grendel gebruikten de ideeën van Langmuir voor hun experimenten met membranen van bloedcellen. Achteraf bleek dat Gorter en Grendel met enig geluk op de verhouding 1:2 uitkwamen voor de verhouding tussen membraanoppervlak en monolaagoppervlak. Zij extraheerden maar zo'n 75% van de lipiden maar schatten tevens het bloedceloppervlak te klein in waardoor zij toch op de juiste verhouding uitkwamen. Hun hypothese van de dubbellaag was nog niet sterk experimenteel onderbouwd. Nu weten we dat de hypothese juist is. De bouwstenen van de celmembranen zijn echter geen vetzuren zoals bij Langmuir maar fosfolipiden.

Fosfolipiden zijn verbindingen die erg lijken op vetten en oliën: het zijn ook triglyceriden (triesters van glycerol). In fosfolipiden zijn in tegenstelling tot in vetten slechts twee naast elkaar gelegen hydroxylgroepen veresterd met vetzuren. De derde hydroxy-groep is veresterd met een fosfaat (PO_4^{3-}) dat op zijn beurt weer met een andere groep is veresterd. In de figuur hieronder is één en ander verduidelijkt aan de hand van de fosfatidylcholines, dit zijn fosfolipiden met een choline-groep als kop. Fosfatidylcholines (PC) maken zo'n 50% uit van alle fosfolipiden in het celmembraan. Vaak bevatten ze één enkelvoudig onverzadigd vetzuur..

Amphifatische moleculen en zelf-assemblage

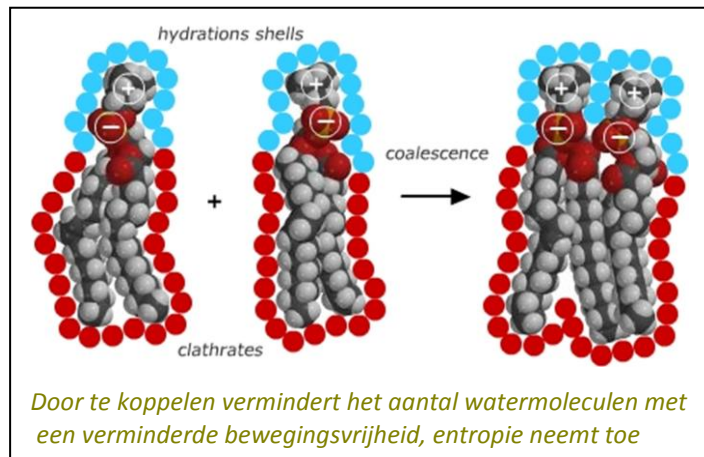


Fosfolipiden zijn de ideale bouwstenen van het celmembraan. Door variatie van de 'kop' en variatie van de gekoppelde vetzuren worden in organismen talloze structuren gecomponeerd met ieder hun specifieke vorm en eigenschap.



Figuur 17: Ook fosfolipiden zullen op een wateroppervlak een mono-moleculaire laag vormen

Fosfolipiden zijn amfifatisch/amfifiel (grieks: amphi = dubbel): zij hebben een hydrofiele kop en een hydrofobe staart. Vanwege het hydrofoob effect zullen fosfolipiden zich in een waterig milieu bij schudden zodanig groeperen/organiseren dat alleen het hydrofiele deel in contact is met het water. De hydrofobe delen zullen zich naar elkaar richten.



Net als vetzuren zullen fosfolipiden aan een wateroppervlak een monomoleculaire laag vormen.



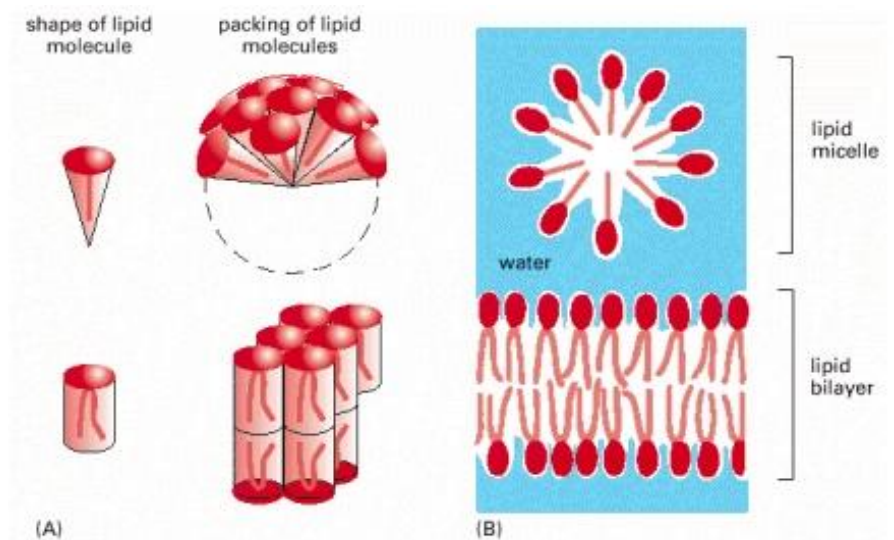
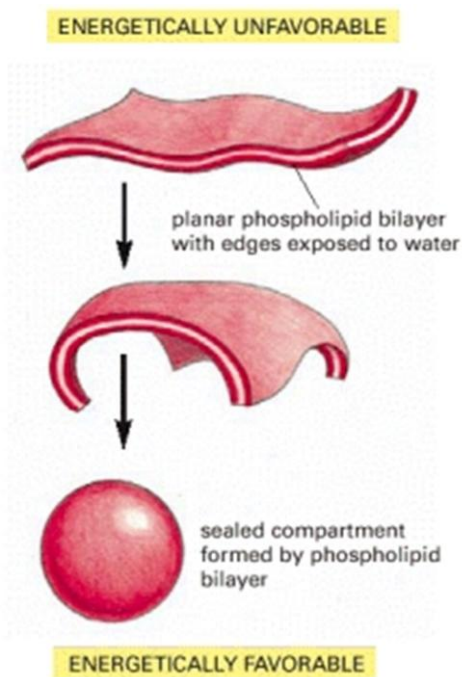
<http://bit.ly/oXCSFy>



Bekijk de volgende sites en maak de vragen die daarbij staan:

http://www.arpe.snv.jussieu.fr/td_2_eng/hyd.html

‘Onder’ water kunnen zij zich op verschillende manieren organiseren: Zo zal een fosfolipide met een cilindrische vorm dubbellen gaan vormen terwijl fosfolipiden met een meer conische (kegel) structuur micellen zullen gaan vormen. Door slim te combineren kunnen er holle en bolle dubbellen worden gevormd.

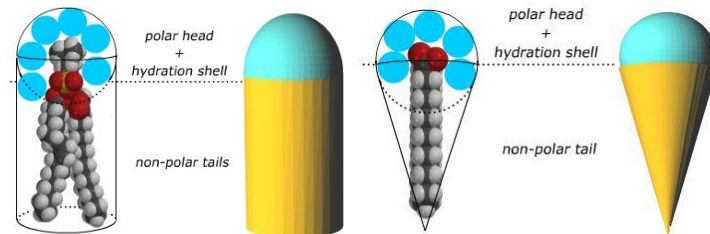


Dubbellen zullen sowieso de neiging hebben om zich te bollen tot

Amphifatische moleculen en zelf-assemblage

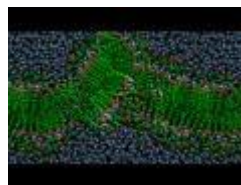
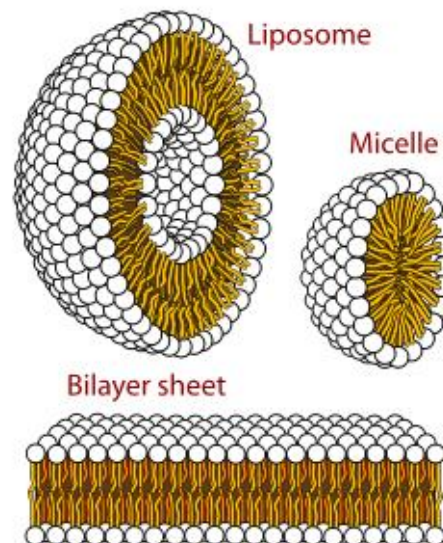
liposomen (bolvormen van dubbellagen) om zodoende al hun hydrofobe delen van het water af te kunnen keren. Dit levert bij slechts cilindrische bouwstenen natuurlijk een zekere spanning op. Introductie van kegelvormige bouwstenen zal deze gebogen/bolvormige structuren sterk stabiliseren.

Holle en bolle dubbellagen worden gevormd.



http://www.arpe.snv.jussieu.fr/td_2_eng/mem.html

Fosfatidylcholines zijn met hun forse kop en vaak onverzadigde vetzuren cilindrisch van vorm en vormen dan ook dubbellagen. Fosfatidylethanolamines bijvoorbeeld (zie figuur..) hebben juist een kleine hydrofiele kop en zijn daardoor kegelvormig. Deze zorgen in membranen dan ook voor de nodige kromming.



<http://bit.ly/pjhK3G>



<http://bit.ly/pv4NMc>



Deze stoffen die zichzelf in waterig milieu spontaan assembleren tot liposomen zijn natuurlijk uitermate geschikt als bouwstenen van celmembranen. Vanwege deze spontane neiging om zich in celvormen te organiseren is er sprake van extreme stabiliteit en een groot zelfherstellend vermogen. Maar er is nog meer dat deze stoffen uitermate geschikt maakt als bouwstenen van het celmembraan.

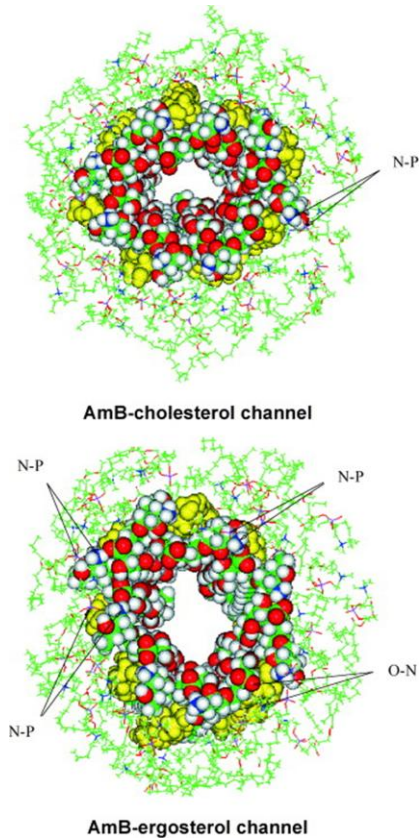
De dubbellagen zijn vanwege de onverzadigde vetzuurstaarten voor een groot deel vloeibaar. In deze feitelijk tweedimensionale vloeibare structuren kunnen allerlei stoffen en deeltjes uitstekend oplossen en zich verplaatsen. Ook maakt dit diffusie van bepaalde stoffen door het celmembraan mogelijk. Tot slot kan vanwege dit vloeibare karakter celdeling plaatsvinden en in- en uitsluiting van stoffen en deeltjes die niet spontaan door het membraan kunnen diffunderen.



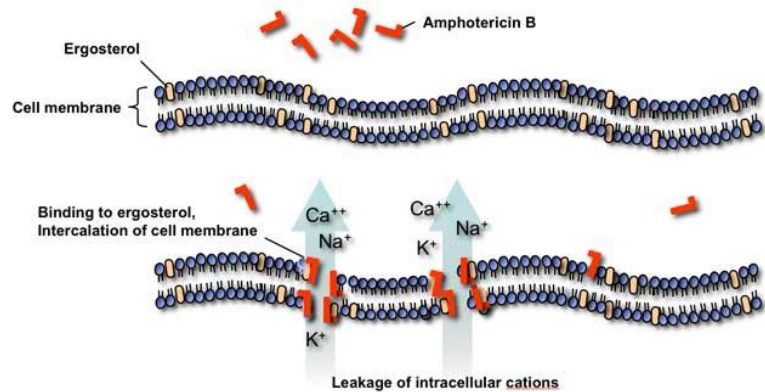
<http://bit.ly/r63g8t>

24. *Teken de structuurformule van dioleolfosfatidylcholine.*
25. *Verklaar aan de hand van de ruimtelijke structuur van fosfatidylethanolamine waarom dit fosfolipide meestal aan de cytoplasmazijde van het membraan te vinden is.*
26. *Leg uit dat onverzadigde vetzuren van fosfolipiden bijdragen aan een vergroting van de flexibiliteit van het celmembraan.*
27. *Cholesterol is een amfifatisch molecuul dat naast fosfolipiden onderdeel uitmaakt van het celmembraan. Cholesterol kan de viscositeit van het membraan wijzigen. Vloeibare membranen worden rigider (stugger), terwijl membranen met veel verzadigde koolwaterstofstaarten juist vloeibaarder worden. Cholesterol wordt vaak aangetroffen rondom membraaneiwitten.*
 - a. *Geef de structuurformule van cholesterol en maak duidelijk dat cholesterol amfifatisch is.*
 - b. *Leg uit dat cholesterol het vloeibare membraan rigider (stugger) maakt.*
 - c. *Waarom zul je cholesterol juist rondom membraaneiwitten in het celmembraan aantreffen?*
28. *Fosfatidylserine (PS) is een fosfolipide met uiteenlopende functies. Zo speelt het een rol bij de botvorming. Bij botvorming worden fosfaationen en calciumionen bij elkaar gebracht en slaat calciumfosfaat neer.*
 - a. *Geef de kloppende reactievergelijking van deze neerslagreactie.*
 - b. *Geef een verklaring voor het feit dat juist PS een rol speelt bij de accumulatie van calcium-ionen*

29. In celmembranen van schimmels komt naast fosfolipiden ergosterol voor, de schimmelvariant van het humane cholesterol. Het medicijn Amphotericine B kan binden aan ergosterol en aan cholesterol en kanalen vormen in het membraan. De kanalen gevormd met ergosterol zijn stabiel en ruimer dan die gevormd met cholesterol en kunnen vanwege een ongehinderd transport van ionen leiden tot de dood van de schimmel.

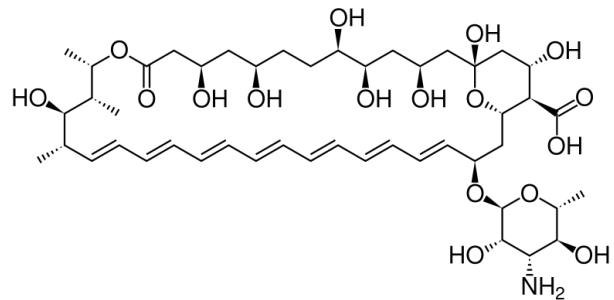


Amphotericine-B-kanalen met ergosterol zijn ruimer dan die met cholesterol



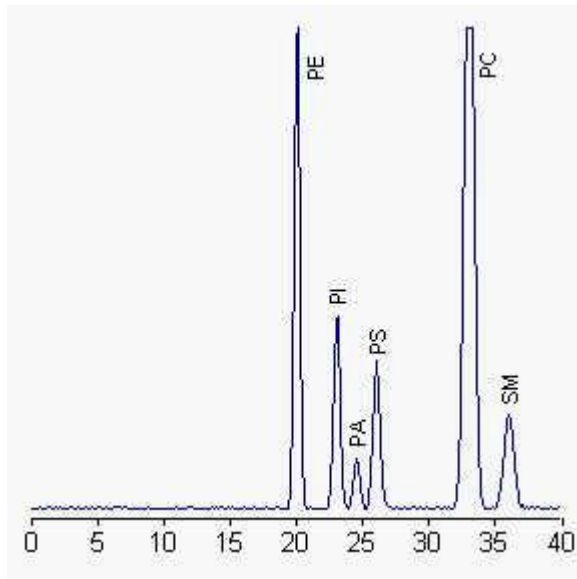
Leg aan de hand van onderstaand structuur van Amphotericine B uit dat dit molecuul

- een kanaal kan vormen in het membraan
- waar doorheen ionen zich kunnen verplaatsen



- Verklaar waarom het medicijn in hoge dosis toch giftig is voor mensen.

30. De lipidsamenstelling van membranen kan worden bepaald met behulp van HPLC (high performance liquid chromatografie). Indien een polaire kolom (stationaire fase) wordt gebruikt met een apolaire mobiele fase dan kunnen fosfolipiden van elkaar worden gescheiden

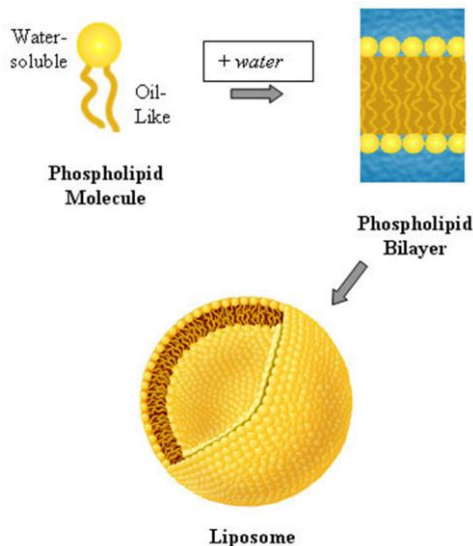


Figuur 18: HPLC-grafiek van een fosfolipidenmengsel. Op de x-as staat de tijd na inspuiten in minuten

- a. Noem twee factoren die in het geval van fosfolipiden van invloed zijn op de retentietijd (de tijd die de stof in de kolom verblijft).
- b. Hoe zou je uit deze grafiek de lipidsamenstelling van het monster in kwantitatieve zin kunnen bepalen?

6. Liposomen

Demoproefje: brandend ether/water doven met oorsmeer



Figuur 19: Fosfolipiden organiseren zich in waterig

Fosfolipiden organiseren zich in waterig milieu spontaan in dubbellagen. Alec Bangham liet in 1964 met de elektronenmicroscop zien dat dit werkelijk het geval is. Dubbellagen in de vorm van afgesloten compartimenten noemen we liposomen. Bangham toonde aan dat de dubbele fosfolipidenlaag net als in een echte cel een barrière vormt voor allerlei stoffen waaronder ionen. Liposomen lijken wat dat betreft prima structuren om te gebruiken bij gericht medicijntransport. Vullen, toedienen en klaar is Kees. De liposomen kunnen worden gevuld met hydrofiele stoffen. Deze zullen zich in het door het liposoom afgesloten waterige deel bevinden. Hydrofobe stoffen daarentegen kunnen opgelost in de dubbellaag worden vervoerd.

In het voorgaande hebben we gezien dat nog aan een aantal andere eisen moet zijn voldaan.

Moderne cytostatica moeten:

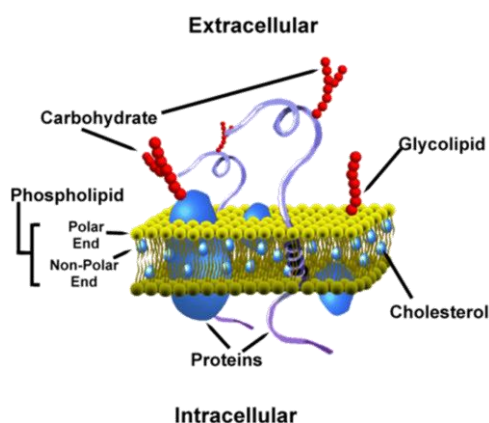
- Stabiel zijn, dat wil zeggen niet te snel worden afgebroken.
- Immunoresistent zijn, dat wil zeggen onzichtbaar zijn voor het immuunsysteem.
- Specifiek zijn, dat wil zeggen alleen in de buurt van tumorcellen hun werk kunnen doen of alleen op tumorcellen werken.

Liposomen en het afweersysteem

Fosfolipiden zijn geen lichaamsvreemde stoffen, iedere cel zit er vol mee. Toch worden liposomen aangepakt door het immuunsysteem. Hoe zit dat?

Levende cellen zitten vol met uitsteeksels in de vorm van eiwitten en suikergroepen. Liposomen daarentegen zijn feitelijk 'kale cellen'. Eiwitten uit het bloedserum plakken vast aan de kale liposomen die vervolgens worden afgevoerd door witte bloedlichaampjes van het immuunsysteem.

De strategie waarvoor vaak gekozen wordt om het immuunsysteem te omzeilen is de zogenaamde stealth-strategie. Hierbij worden liposomen voorzien van uitsteeksels in de vorm van polyetheen-glycolketens (PEG) zodanig dat serumeiwitten de fosfolipidenlaag niet meer kunnen bereiken.



Figuur 20: Levende cellen zitten vol met uitsteeksels.

Liposomen



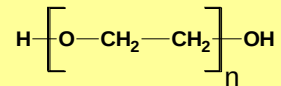
Figuur 21: Gepegyleerd liposoom

De synthetische lichaamsvreemde PEG-ketens die als een soort spaghetti's rondom het liposoom zwieren worden door het afweersysteem niet als vijandig herkend.

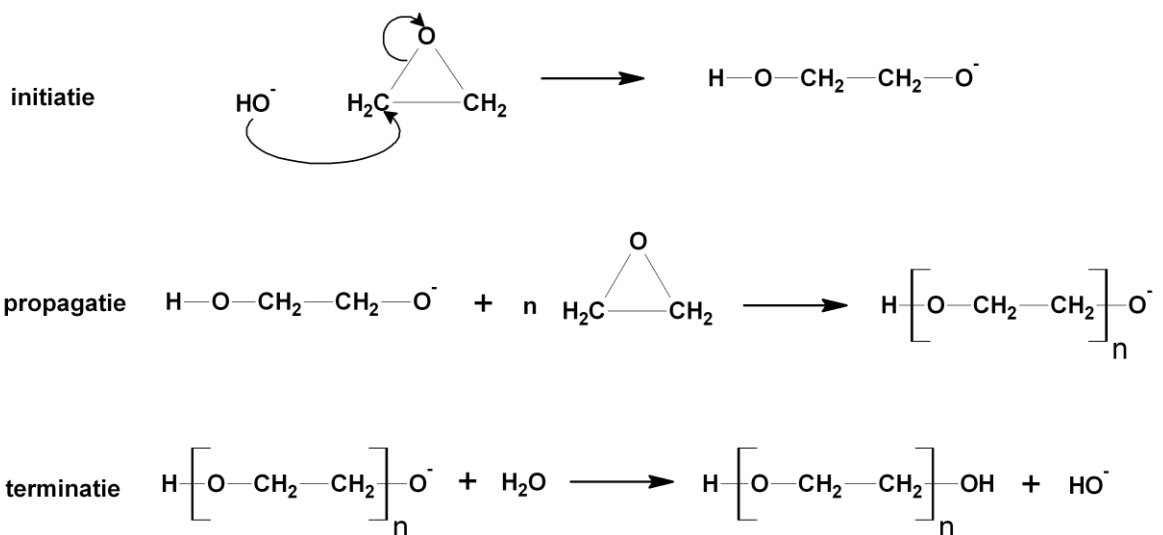
Productie gePEGyleerde liposomen.

Gepegyleerde liposomen worden simpelweg gemaakt van deels gepegyleerde fosfolipiden. Deze worden op hun beurt weer gemaakt van PEG-ketens die gebonden worden aan fosfatidylethanolamines.

De structuurformule van PEG ziet er als volgt uit:

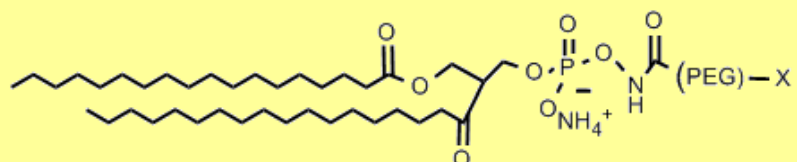


Deze polyether is te beschouwen als een condensatiepolymeer van 1,2-ethaandiol (etheenglycol). In de praktijk wordt de polymeer echter gemaakt door etheenoxide te polymeriseren analoog aan het vrij radicaal mechanisme:



Door oxidatie van de alcoholgroep van PEG tot een carbonzuur ontstaat een stof die via condensatie gebonden kan worden aan de kop van fosfatidylethanolamine.

Resultaat, een gePEGyleerde fosfolipide:



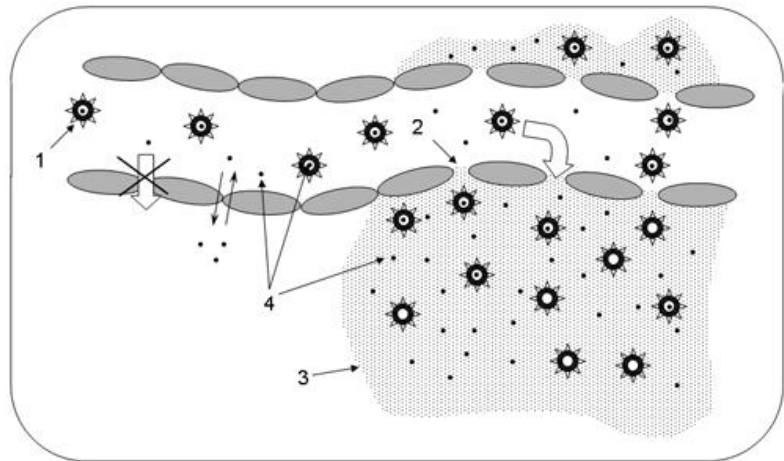
Figuur 22: Stealth-bommenwerper, onzichtbaar voor de radar

Dankzij de uitvinding van deze stealth-technologie blijven liposomen gemiddeld meer dan 2 dagen intact. Medicijntransport door liposomen heeft inmiddels een grote vlucht genomen.

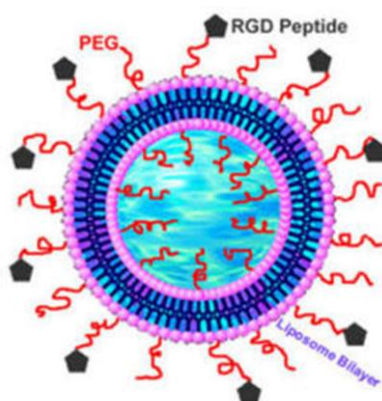
31. Geef de reactievergelijking van de polymerisatie van 1,2-ethaandiol tot PEG weer in structuurformules.
32. Geef de halfreactie van de reactie waarbij PEG wordt omgezet tot een carbonzuur.
33. Hoe noemen we het type reactie tussen het geoxideerde PEG en fosfatidylethanolamine? Welk type binding ontstaat?

Passieve opname van liposomen in tumorweefsel

Een belangrijk aspect van de liposoomtechnologie is het feit dat liposomen gemakkelijk door tumorweefsel worden opgenomen. Rondom tumorweefsel zijn bloedvaten geperforeerd. Rode bloedcellen kunnen er niet door maar deeltjes kleiner dan 400 nm wel. Liposomen (100-200 nm) diffunderen hier het weefsel binnen en geven hun medicijnen af aan de tumorcellen. Afvoer van medicijnen vindt nauwelijks plaats omdat het lymfesysteem, dat verantwoordelijk is voor de afvoer van stoffen, in tumorweefsel slecht ontwikkeld is.



Figuur 23: Lang circulerende met medicijnen geladen liposomen (1) diffunderen door lekke haarvaten (2) in het tumorweefsel (3) en gaan kapot onder afgifte van het medicijn (4). Lokaal wordt een hoge concentratie medicijn bereikt.



Figuur 24: eiwitten kunnen worden gekoppeld aan PEG-uiteinden

Actieve opname van liposoominhoud: targeting

Om gevulde liposomen nog gericht hun lading af te laten geven aan tumorcellen zijn en worden talloze strategieën ontwikkeld. Zo zijn er liposomen die aan de buitenzijde anti-lichamen bevatten die aangrijpen op receptoren die veelvuldig op tumorcellen te vinden zijn. Een ander strategie is het om liposomen van de buitenzijde te voorzien van virale eiwitten die er voor zorgen dat de liposoominhoud door de cel wordt opgenomen (virusvermomming). Ook kun je liposomen zodanig pH of temperatuurgevoelig maken dat ze in het tumorweefsel desintegreren of hun vulling laten gaan. Voordat enkele voorbeelden van deze strategieën zullen worden uitgewerkt zal eerst aandacht worden besteed aan de bouw en

werking van eiwitten. Eiwitten spelen namelijk een belangrijke rol bij de targeting van tumorweefsel.

OPDRACHT DOXIL

Doxorubicine is de werkzame stof in DOXIL, een geneesmiddel dat door Johnson & Johnson op de markt is gebracht.

Lees de bijsluitertekst op de volgende pagina zorgvuldig door. Met name de vetgedrukte stukken zijn van groot belang. Beantwoord dan de volgende vragen:

- a. Er staat dat het werkzame medicijn doxorubicine is verpakt in een liposomale Stealth-capsule. Wat wordt hiermee bedoeld?*
- b. DOXIL wordt intraveneus toegediend (rechtsstreeks in bloedbaan gebracht door injectie/infuus). Leg uit waarom het geen zin heeft en zelfs schadelijk is om Doxil oraal toe te dienen. Let op: de liposomen komen ongeschonden door de zure maag!*
- c. Teken schematisch een DOXIL-liposoom. Geef daarbij de verschillende onderdelen zo weer dat de functies van de verschillende onderdelen goed kunnen worden uitgelegd. Geef ook de namen van de verschillende onderdelen.*
- d. Waarop berust de werking van doxorubicine?*
- e. Wat valt er te lezen over de functie van pegylering?*
- f. Leg aan de hand van de tekst uit waarom DOXIL juist werkzaam is in tumorweefsel en ander weefsel ongemoeid laat.*

Myocet is eenzelfde soort medicijn alleen dan met een gewone liposomale formulering.

- g. Leg uit wat je verwacht van de halfwaardetijd van dit medicijn t.o.v. die van doxil.*
- h. Zoek uit op internet of je verwachting correct is.*

BIJSLUITER DOXIL (JOHNSON&JOHNSON)

DESCRIPTION

DOXIL (doxorubicin HCl liposome injection) is **doxorubicin** hydrochloride (HCl) **encapsulated in STEALTH® liposomes for intravenous administration.**

Doxorubicin is an anthracycline topoisomerase inhibitor isolated from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. The molecular formula of the drug is $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$; its molecular weight is 579.99.

DOXIL is provided as a sterile, translucent, red liposomal dispersion in 10-mL or 30-mL glass, single use vials. Each vial contains 20 mg or 50 mg doxorubicin HCl at a concentration of 2 mg/mL and a pH of 6.5. **The STEALTH® liposome carriers are composed of** $N^-(\text{carbonyl-methoxypolyethylene glycol } 2000)^{-1}, ^2\text{-distearoyl-sn-glycero}^{-3}\text{-phosphoethanolamine}$ sodium salt (MPEG-DSPE), 3.19 mg/mL; fully hydrogenated soy **phosphatidylcholine** (HSPC), 9.58 mg/mL; **and cholesterol**, 3.19 mg/mL. Each mL also contains ammonium sulfate, approximately 2 mg; histidine as a buffer; hydrochloric acid and/or sodium hydroxide for pH control; and sucrose to maintain isotonicity. **Greater than 90% of the drug is encapsulated in the STEALTH® liposomes**

CLINICAL PHARMACOLOGY

Mechanism of Action

The active ingredient of DOXIL is doxorubicin HCl. **The mechanism of action of doxorubicin HCl is thought to be related to its ability to bind DNA and inhibit nucleic acid synthesis.** Cell structure studies have demonstrated rapid cell penetration and perinuclear chromatin binding, rapid inhibition of mitotic activity and nucleic acid synthesis, and induction of mutagenesis and chromosomal aberrations.

DOXIL is doxorubicin HCl encapsulated in long-circulating STEALTH® liposomes. Liposomes are microscopic vesicles composed of a phospholipid bilayer that are capable of encapsulating active drugs. The STEALTH® liposomes of DOXIL are formulated with surface-bound methoxypolyethylene glycol (MPEG), a process often referred to as pegylation, to protect liposomes from detection by the mononuclear phagocyte system (MPS) and to increase blood circulation time.

STEALTH® liposomes have a half-life of approximately 55 hours in humans. They are stable in blood, and direct measurement of liposomal doxorubicin shows that at least 90% of the drug (the assay used cannot quantify less than 5–10% free doxorubicin) remains liposome-encapsulated during circulation.

It is hypothesized that because of their small size (ca. 100 nm) and persistence in the circulation, the pegylated DOXIL liposomes are able to penetrate the altered and often compromised vasculature of tumors. This hypothesis is supported by studies using colloidal gold-containing STEALTH® liposomes, which can be visualized microscopically. Evidence of penetration of STEALTH® liposomes from blood vessels and their entry and accumulation in tumors has been seen in mice with C^{26} colon carcinoma tumors and in transgenic mice with Kaposi's sarcoma-like lesions. Once the STEALTH® liposomes distribute to the tissue compartment, the encapsulated doxorubicin HCl becomes available. The exact mechanism of release is not understood.

7. Eiwitten



Niet alleen het wit van een ei bevat eiwitten, ook het eigeel zit er vol mee

Eiwitten spelen o.a. een rol bij het transport van stoffen in het lichaam. (Zo transporteert het eiwit hemoglobine zuurstof vanaf de longen via het bloed naar spierweefsel. Het eiwit " Na^+/K^+ -ATPase" zorgt voor gelijktijdig kaliumionen-transport de cel in en natriumionen-transport de cel uit.). Daarnaast spelen eiwitten een rol bij:

- structuurversterking (cytoskelet= celskelet)
- signaaloverdracht van cel naar cel en van celmembraan naar het binnenste van de celkern
- het immuunsysteem
- bij de katalyse van allerlei celprocessen
- als moleculaire robot bij bijvoorbeeld het uit de knoop halen van DNA en het verplaatsen van celonderdelen binnen de cel
- en bij nog veel meer.....

Vesicle transport door eiwitten over cytoskelet (microtubuli):



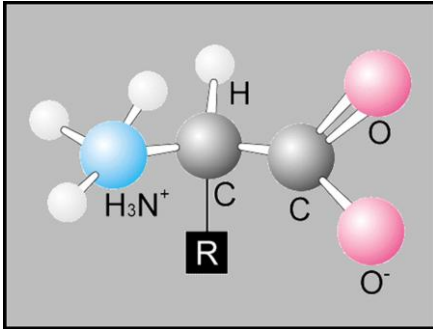
<http://bit.ly/9KF7Be>

Eiwitten zijn dus heel belangrijk, het zijn als het ware de gereedschappen van het organisme. Het is niet voor niets dat eiwitten het grootste deel van de droge celmassa bepalen.

Het zijn hele specifieke eigenschappen die er voor zorgen dat eiwitten een cruciale bijdrage leveren aan een zeer breed scala van functies.

- i. Eiwitten zijn lineaire ketens van aan elkaar gekoppelde eenheden, de aminozuren. Deze ketens kunnen zich spontaan vouwen tot driedimensionale functionele structuren. De driedimensionale structuur wordt bepaald door de volgorde van de verschillende aminozuren.
- ii. Eiwitten bevatten een grote variatie aan karakteristieke groepen waaronder de bekende alcoholen, carbonzuren en amines maar ook thiolen (-SH) en thioethers (-C-S-C-). Vooral bij enzymen spelen de eigenschappen van deze karakteristieke groepen een essentiële rol.

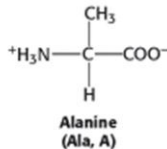
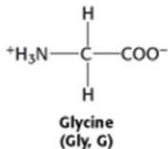
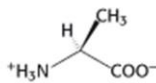
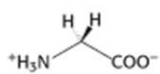
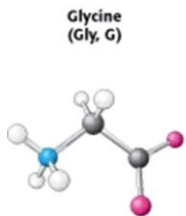
Eiwitten



Aminozuren

Aminozuren zijn de bouwstenen van eiwitten. Een aminozuur, de naam zegt het al, bevat een carbonzuurgroep en een amino-groep beide gebonden aan het centrale koolstofatoom, het α -koolstofatoom. Aan dit α -koolstofatoom zit verder een H-atoom en een specifieke restgroep (R), de zogenaamde zijketen van het aminozuur.

Aangezien de aminogroep een basische groep is en de carbonzuurgroep uiteraard zuur zal in waterig milieu het aminozuur voornamelijk voorkomen in dipolaire vorm. Het proton (H^+) heeft zich van de zuurgroep naar de basische aminogroep verplaatst. Vaak wordt het aminozuur in geïoniseerde vorm getekend soms ook niet.



Aminozuren waaruit eiwitten zijn opgebouwd verschillen van elkaar in de restgroep.

Gewoonlijk worden er 20 verschillende zijketens in eiwitten aangetroffen. Deze verschillen in grootte, vorm, lading, polair karakter, vermogen om waterstofbruggen te vormen en reactiviteit.

Het simpelste aminozuur is glycine met twee H-atomen aan het centrale koolstofatoom ($R=H$). Dan volgt alanine met een methyl-groep als zijketen.

De andere 18 aminozuren zijn weergegeven in de figuur aan het einde van deze taak en in Binas. De aminozuren zijn in te delen in 3 groepen: die met apolaire zijgroepen, die met zure dan wel basische zijgroepen (bij $pH=7$ vaak geladen) en die met ongeladen maar polaire zijgroepen. De zure en basische zijgroepen worden hier samengenomen omdat het gaat om zwakke zuren en zwakke basen. Deze komen in waterig milieu zowel in de zure als in de geconjugeerde base vorm voor en vice versa. Afhankelijk van de pH van het milieu waarin deze aminozuren zich bevinden zal meer de zure of meer de basische variant aanwezig zijn.

Zo heeft de restgroep van het aminozuur lysine (in 'zure'toestand) een typische pK_z van 10,8. De zijketen van lysine kan in een eiwit voorkomen in basische vorm ($-NH_2$) en als geconjugeerd zuur ($-NH_3^+$). Bij $pH=7,4$ (typisch voor een celmilieu) kan nu berekend worden hoeveel van deze zijgroepen in de geïoniseerde vorm voorkomen:

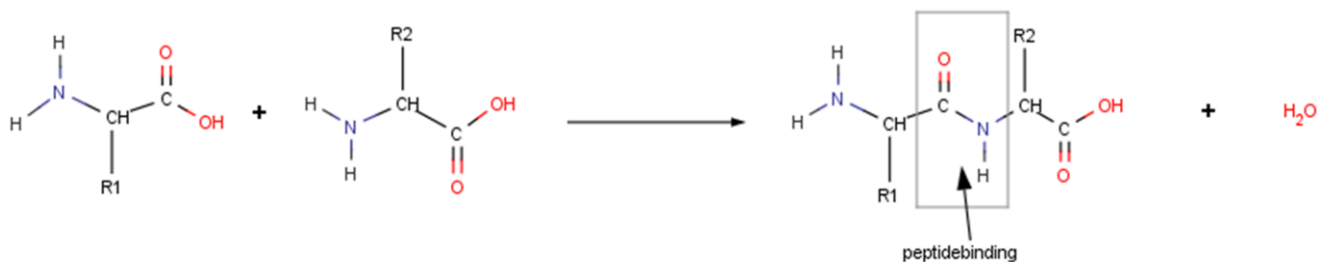
$$K_z = \frac{[H_3O^+] \times [-NH_2]}{[-NH_3^+]} \Leftrightarrow \frac{[-NH_2]}{[-NH_3^+]} = \frac{10^{-10,8}}{10^{-7,4}} = 0,00040$$

De zijketens van lysine komen dus in de cel vrijwel volledig in geïoniseerde en dus positief geladen vorm voor!

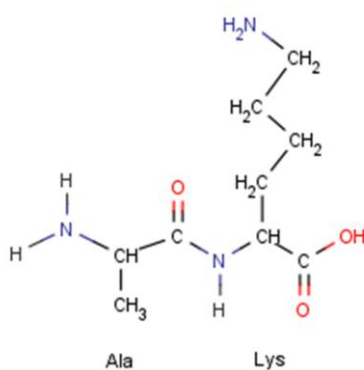
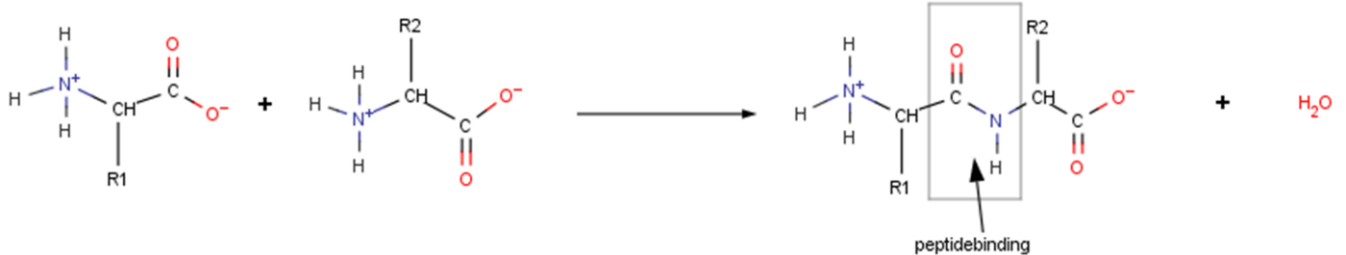
34. Eventueel practicum titratie aminozuren (Bepaling K_z /isoelectrisch punt)

Peptidebinding

Bij de productie van eiwitten worden aminozuren aan elkaar gekoppeld. Deze koppeling is een condensatiereactie waarbij een amino-groep en een carbonzuurgroep met elkaar reageren onder afsplitsing van water: Bij deze reactie ontstaat er een zogenaamde peptidebinding.



De zogenaamde dipolaire notatie geeft:



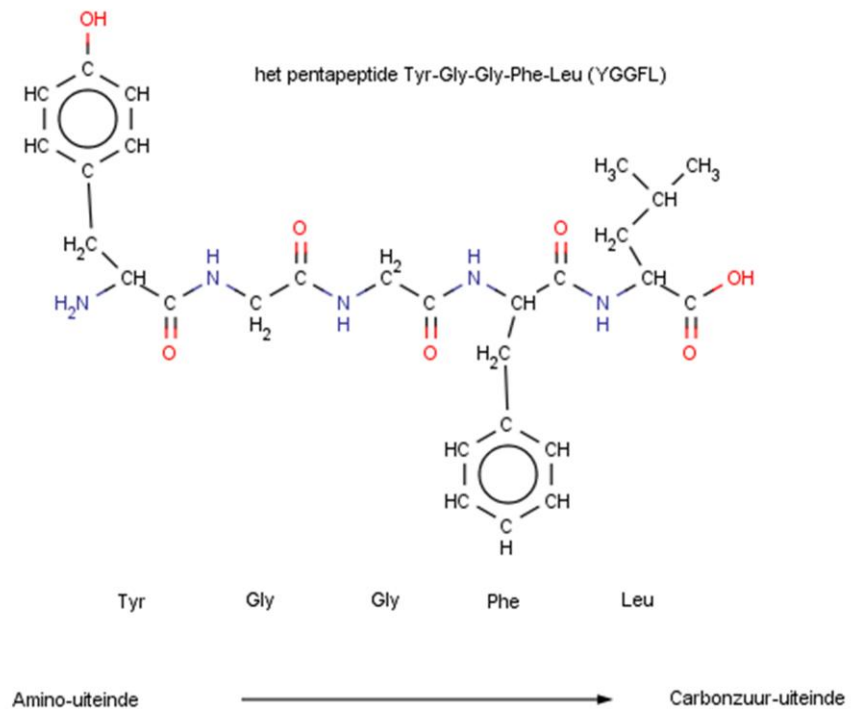
Een verbinding waarbij twee aminozuren aan elkaar gekoppeld zijn noemt men een dipeptide. Zo zijn er ook tripeptiden, tetrapeptiden etc. Worden ze langer dan spreken we van een polypeptide (poly = meervoudig).

In plaats van een weergave met structuurformules wordt de aminozuurvolgorde vaak met andere symbolen weergegeven. Er is het drielettersysteem en er is het éénlettersysteem waarbij de 20 aminozuren ieder een unieke code hebben.

Hiernaast is het dipeptide weergegeven tussen alanine en lycine. De weergave volgens het drielettersysteem wordt dan: **Ala-Lys**. Het éénlettersysteem levert **AK** (de L is al bestemd voor leucine!). Let op: er bestaat nog een ander dipeptide van alanine en lycine namelijk **Lys-Ala (KA)**. Afspraak is dat volgens deze notatie het

Eiwitten

linkeruiteinde de aminogroep bevat en het rechteruiteinde de carbonzuurgroep.



Hierboven staat de structuurformule voor het pentapeptide Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Het moge duidelijk zijn dat het éénletter-systeem, ondanks dat het moeilijker 'leesbaar' is, bij langere polypeptiden zo zijn voordelen heeft.

Ook hier is de volgorde van notatie van belang. Er wordt begonnen met het aminozuur tyrosine aan het amino-uiteinde (**N-terminus**) en geëindigd met het aminozuur leucine aan het carbonzuuruiteinde (**C-terminus**). Van N- naar C-terminus noemen we de richting van de peptideketen.

```
VNPCCYYPCQHGGICVRFGLDRYQCDCTRTGYSG
PNCTIPEIWTWLRITLRPSPSFIHLLTHGRWLWDF
VNATFIRDTLMRLVLTVRNLIPSPPTYNIAHDYISW
ESFSNVSYTRILPSVPRDCPTPMGTGKGGKQLPDA
EFLSRRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQF
FKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHYGDNLERQYQ
LRLFKDGKLKYQMLNGEVYPPSVEEAPVLMHYPR
GIPPQSQMAVGQEVFGLLPGLMLYATIWLRHQQR
VCDLLKAEHPTWGDEQLFQTAKLILIGETIKIVIEEY
VQQLSGYFLQLKFDPELLFGAQFYRNRIAMEFNQ
LYHWHPLMPDSFRVGPQDYSYEQFLFNTSMLVDY
GVEALVDAFSRQPAGRIGGGRNIDHHILHVAVDVIK
ESRVLRLQPFNEYRKRFGMKPYTSFQELTGEKEM
AAELEELYGDIDALEFYPLGLLLEKCHPNISIFGESMIE
MGAPFSLKGLLGNPICSPEYWKASTFGGEVGFNL
VKTATLKKLVCLNTKTCPPVVSFHV
```

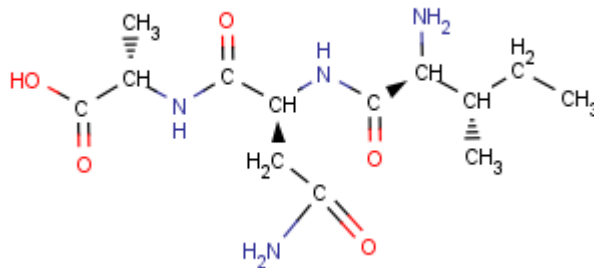
Hiernaast tref je de éénlettercode voor het enzym dat geblokkeerd wordt door een aspirientje. Zo krijg je geen pijnsensatie. Het enzym bevat zo'n 550 aan elkaar gekoppelde aminozuren (je hoeft deze niet uit je hoofd te leren!)

Deze aminozuurvolgorde is bepaald door het enzym te isoleren en vervolgens volgens een hele slimme methode er één voor één aminozuren. van af te snoepen en deze te identificeren (Edman-degradatie). Deze aminozuurvolgorde noemen we de **primaire structuur** van het eiwit.

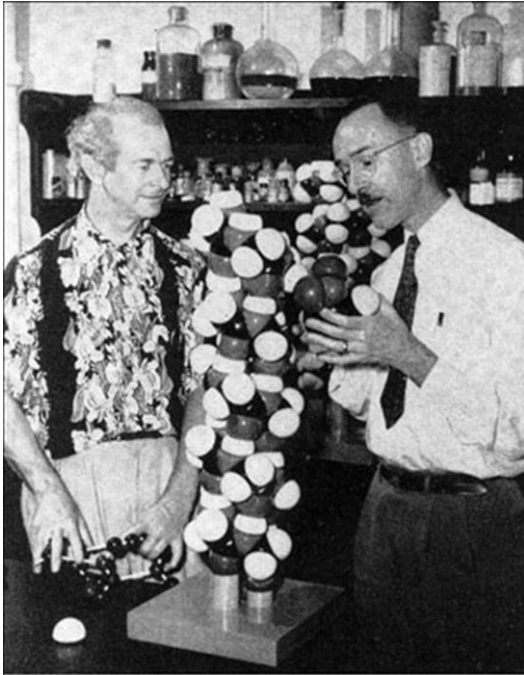
Functionele eiwitten komen in het lichaam niet voor als hele lange aminozuurslierten,. Ze zijn functioneel juist dankzij het feit dat de sliert op een hele specifieke manier is gevouwen. De vraag is nu of we uit de primaire structuur van het eiwit ook de ruimtelijke structuur van het eiwit kunnen bepalen om zodoende meer te begrijpen van zijn specifieke werking?

Nou nee, niet zomaar.

35. Geef in structuurformules de reactievergelijking van de hydrolyse van de tripeptide Ala-Pro-Arg. Gebruik de dipolaire notatie.
36. Teken het peptide met de verkorte code TEK. Gebruik de dipolaire notatie.
37. Een deel van de aminozuren is essentieel.
 - a. Wat wordt bedoeld met essentiële aminozuren?
 - b. Geef de afkortingen van de essentiële aminozuren (Binas).
38. Geef de code voor de volgende tripeptide:



39. De zijgroep van het aminozuur glutaminezuur komt in eiwitten bij fysiologische pH (=7,2) vooral in geladen vorm voor.
 - a. Geef de reactievergelijking van de ionisatie van de zijgroep van glutaminezuur in waterig milieu.
 - b. Toon met een berekening aan dat de zijgroep vooral in geladen vorm voorkomt. De pK_z-waarde is 4,07



Ruimtelijke eiwitstructuur

In 1951 publiceerden twee wetenschappers Linus Pauling and .. Corey in het gerenommeerde tijdschrift Journal of the American Chemical society, een serie van 6 artikelen over de structuur van eiwitten. Met Röntgenstralen-analyse aan talloze zuivere eiwitkristallen concludeerden zij dat aminozuurketens zich op verschillende wijzen kunnen ordenen. De twee belangrijkste structuren waarmee zij op de proppen kwamen waren de alpha-helix en de beta-plaat.

Geschiedenis van röntgenanalyse: <http://bit.ly/6KczZx>

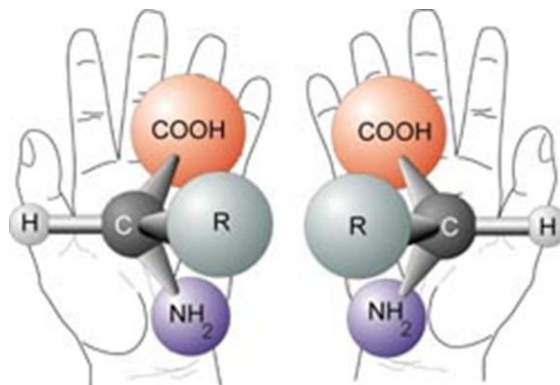


Ontdekking alpha-helix Linus Pauling: <http://bit.ly/p2OUg2>

Röntgenanalyse levert geen foto op van een molecuul maar geeft informatie over de positie van atomen met hun elektronen. Er moest dus als de posities bekend zijn nog een vertaalslag gemaakt worden naar de positie en oriëntatie van de covalente bindingen. Pauling en Corey puzzelden met modellen en stukjes papier! Net zolang totdat er een model was gevonden dat overeenkwam met de röntgenplots. Uitgangspunt daarbij was uiteraard het aminozuur.

40. Maak met een bouwdoos een aminozuur en vergelijk met je burens. Wat valt op?

Nu doet zich bij aminozuren een interessant fenomeen voor: de moleculen zijn asymmetrisch dat wil zeggen, ze hebben geen inwendig spiegelvlak. Dit wordt veroorzaakt doordat er aan het centrale tetraëdisch omringde koolstofatoom 4 verschillende groepen zijn gebonden.

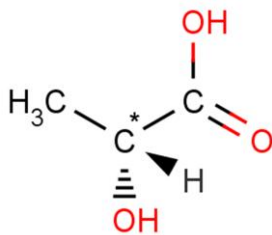


Ieder aminozuur heeft dus een spiegelbeeld dat niet gelijk is aan zichzelf. De ene vorm is de L-isomeer, de andere de D-isomeer.

Vergelijk dit maar met een linker en rechter hand.

Spiegelbeeldisomerie is naast **cis-trans isomerie** een vorm van **stereoisomerie** (isomerie in de ruimte).

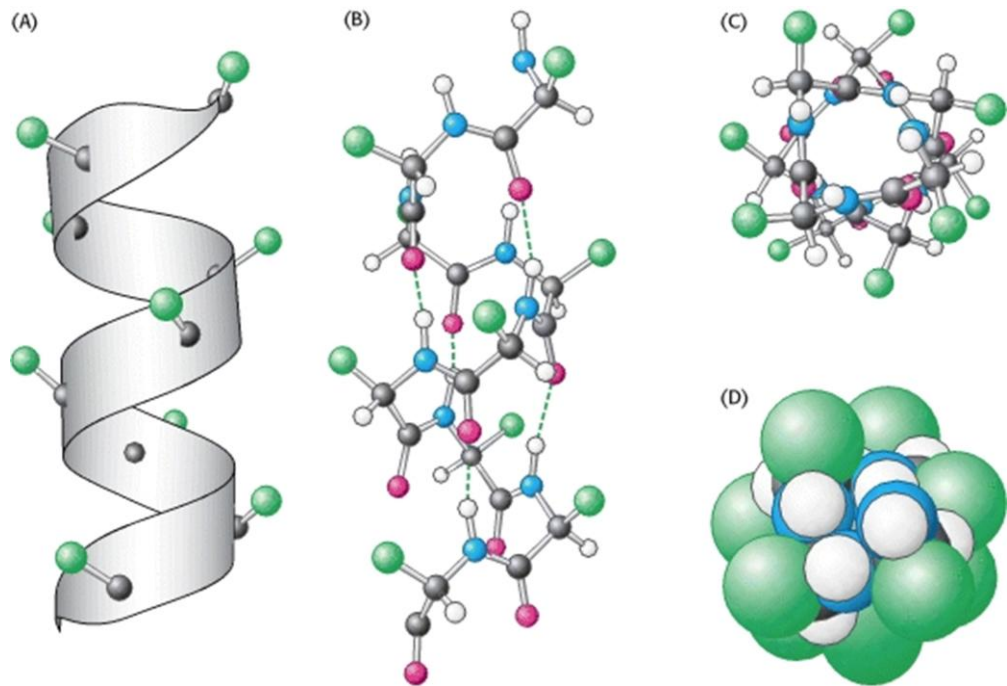
Nu komt in organismen slechts één van de twee stereoisomeren voor, nl de L-isomeer en dat is maar goed ook. Zouden beide vormen voorkomen dan zouden in bovenstaand voorbeeld van een enzym met 550 aminozuren er $2^{550} = 3,7 \times 10^{165}$ verschillende polypeptiden gemaakt kunnen worden met dezelfde primaire structuur (het zijn er wel wat minder aangezien het aminozuur glycine vanwege de H als restgroep geen asymmetrisch koolstofatoom bezit). Slechts enkele van deze vormen zouden zich zodanig kunnen vouwen dat een functioneel enzym ontstaat. De rest kan zich gewoonweg niet op de juiste manier vouwen doordat zijgroepen aan de 'verkeerde' kant zitten. De natuur kan zich zo'n verspilling niet veroorloven.



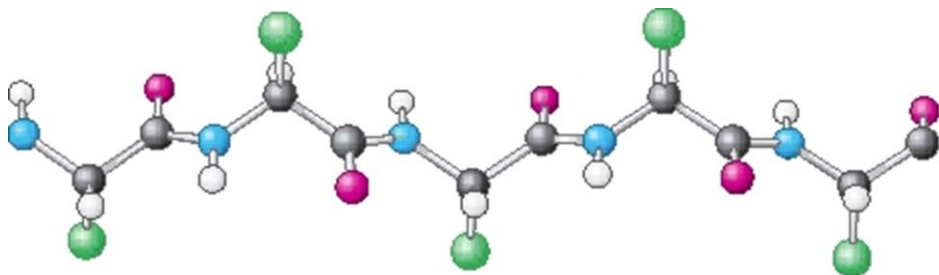
Zo'n asymmetrisch omringd koolstofatoom noemen we vaak een **asymmetrisch koolstofatoom** en markeren we in de structuurformule met een asterix. In zijn algemeenheid wordt een asymmetrisch centrum een **chiraal centrum** genoemd (Grieks: χεῖρ (cheir) = hand). Een mengsel waarin zich beide stereoisomeren in gelijke hoeveelheden bevinden noemen we een **racemisch mengsel**. In organismen is dus wat betreft aminozuren sprake van homochiraliteit, de situatie waarin slechts één van de twee stereoisomeren voorkomt en dan ook nog altijd de L-isomeer. In de discussie rondom het begin van de evolutie van het leven speelt de vraag naar het ontstaan van deze homochiraliteit, die zoals we gezien hebben essentieel is voor de bouw van functionele eiwitten en dus voor leven, een hoofdrol. Het mechanisme achter het ontstaan van homochiraliteit is vooralsnog een raadsel.

Stereoisomerie aan koolstofverbindingen werd al begrepen sinds de tetraëders van van 't Hoff (1874). Pauling en Corey gingen dan ook aan de slag met modellen van uitsluitend L-aminozuren en dit leidde tot de constructie van modellen die voldeden aan de resultaten uit de röntgen-kristallografie : de alpha-helix en de beta-platen.

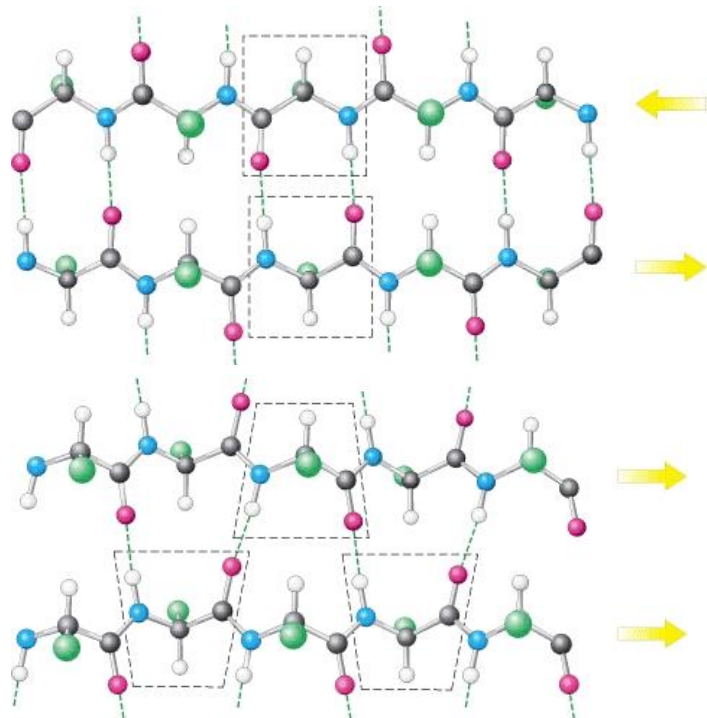
De alpha-helix is een structuur waarbij de aminozuren zodanig zijn georiënteerd dat er een spiraal ontstaat die sterk wordt gestabiliseerd door waterstofbruggen tussen een partieel negatief geladen zuurstofatoom uit een peptidebinding en een partieel positief geladen waterstofatoom uit een peptide binding die wat verderop in de keten ligt. Deze stabilisatie ontstaat dus door interactie tussen groepen uit de ruggengraat van het eiwit, dus is feitelijk onafhankelijk van de aard van de restketens van de betrokken aminozuren.



Beta platen ontstaan wanneer aminozuurstrengen als het ware zo ver mogelijk worden uitgerekt en dus zoveel als mogelijk lineair zijn. Zo'n uitgerekte lineaire streng noem je een betaplaat.



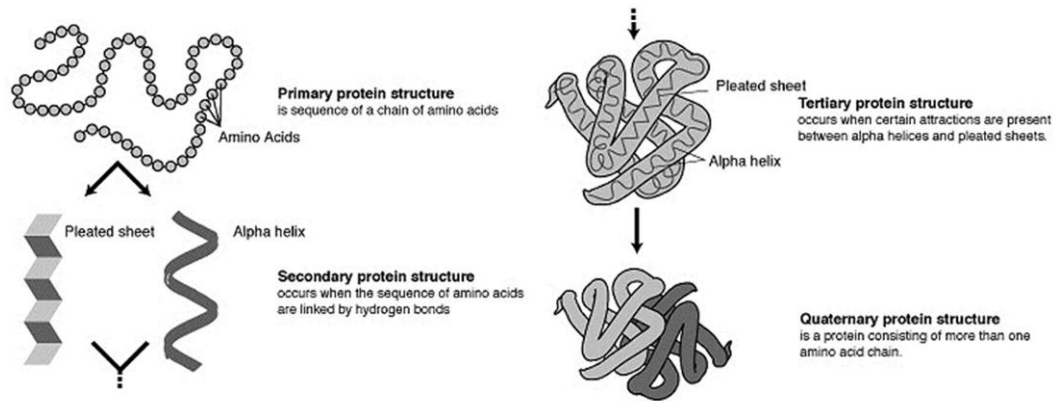
Deze strengen kunnen indien ze naast elkaar liggen een interactie aangaan met elkaar net zoals bij de alpha helix, in de vorm van de vorming van waterstofbruggen. Aangezien deze structuren gestabiliseerd worden door waterstofbruggen tussen de ene en de andere streng komen betaplatten altijd groepsgewijs voor. Twee tegengesteld gerichte strengen leveren antiparallelle betaplatten. Gelijkgerichte strengen leveren parallelle betaplatten.



Deze structuurelementen behoren tot de **secundaire structuur** van een eiwit en komen tot stand dankzij interacties (H-bruggen) tussen atomen die zich in de ruggengraat van het eiwit bevinden.

41. Voer computerpracticum A en B uit

De zijketens bepalen uiteindelijk hoe het eiwit zich in drie dimensies gaat vouwen. Zijketens kunnen met elkaar interacties aangaan (bijvoorbeeld aantrekking en afstoting door tegengestelde resp. gelijke lading). Ze kunnen interacties aangaan met hun omgeving (hydrofiel in celvocht en hydrofoob in celmembraan). Al die mogelijke interacties bepalen uiteindelijk hoe een eiwit zich na productie zal vouwen. De uiteindelijk structuur noemen we de **tertiaire structuur**. Uiteindelijk bepalen de zijketens en de volgorde hiervan ook welke secundaire structuurelementen er gevormd gaan worden en hoe deze zich ten opzicht van elkaar verhouden. Verschillende aminozuurketens kunnen zich groeperen tot een functioneel eiwit. Dit noem je dan de **quaternaire structuur**.



Functionele eiwitten bevatten vaak naast hun aminozuurketens nog ander ingebouwde onderdelen als ionen en heemgroepen.

Enkele sites ter illustratie:

http://moleculesinmotion.com/jmol/protein_intro/index.html

<http://biochemistry.wur.nl/Hb/protein.html>

<http://www.umass.edu/molvis/tutorials/hemoglobin/index.htm>

<http://www3.interscience.wiley.com:8100/legacy/college/boyer/0471661791/structure/HbMb/hbmb.htm>

42. Melkzuur (2-hydroxypropaanzuur) heeft één chiraal centrum. Er zijn dus twee stereoisomeren van. Teken beide vormen en geef daarbij het chirale centrum aan.
43. Verklaar met het tetraëdermodel van van 't Hoff dat er twee stoffen bestaan met de naam 1-chloorethanol.
44. Teken cis-dichloor-cyclopropaan en haar spiegelbeeld. Kun je asymmetrische koolstofatomen onderscheiden? Is er sprake van spiegelbeeldisomerie?
45. Teken nu trans-dichloorcyclopropaan en haar spiegelbeeld. Is hier sprake van spiegelbeeldisomerie?
46. Luliberine is een hormoon dat een belangrijke rol speelt tijdens de eisprong. Het is een decapeptide (deca = 10) en bevat dus 10 aminozuren waarvan twee glycines (zijgroep= H).
 - a. Hoeveel asymmetrische koolstofatomen bevat de ruggengraat van dit polypeptide ?
 - b. Stel dat in het lichaam zowel L- als D-aminozuren aanwezig zouden zijn. Hoeveel procent van het gesynthetiseerd luliberine zou dan in theorie vermoedelijk niet functioneel zijn?
47. Examenopgave 'absint' examen 2009 -II
48. Examenopgave '1080' examen 2009-I
49. Examenopgave "Parkinson" 2004-II
50. Examenopgave 'Nenatal' 2009-I

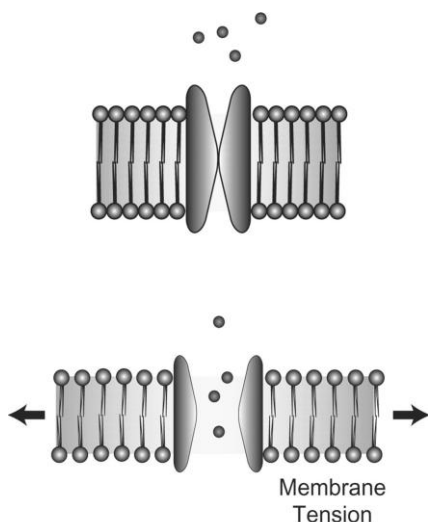
Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter abbreviation
Alanine	<u>Ala</u>	A
Arginine	<u>Arg</u>	R
Asparagine	<u>Asn</u>	N
Aspartic Acid	<u>Asp</u>	D
Cysteine	<u>Cys</u>	C
Glutamine	<u>Gln</u>	Q
Glutamic Acid	<u>Glu</u>	E
Glycine	<u>Gly</u>	G
Histidine	<u>His</u>	H
Isoleucine	<u>Ile</u>	I
Leucine	<u>Leu</u>	L
Lysine	<u>Lys</u>	K
Methionine	<u>Met</u>	M
Phenylalanine	<u>Phe</u>	F
Proline	<u>Pro</u>	P
Serine	<u>Ser</u>	S
Threonine	<u>Thr</u>	T
Tryptophan	<u>Trp</u>	W
Tyrosine	<u>Tyr</u>	Y
Valine	<u>Val</u>	V
Asparagine or aspartic acid	Asx	B
Glutamine or glutamic acid	Glx	Z

8. 'Magische kogels'

We hebben gezien dat dankzij pegylering en een juiste fosfolipiden/cholesterol-mix we hele stabiele liposomen kunnen maken met de noodzakelijke lange levensduur. Tegelijkertijd willen we echter een lekke structuur op de plaats van bestemming, medicijnen moeten afgegeven worden uiteraard. Eén van de manieren om dit **dilemma** te benaderen is door functionele eiwitten te koppelen aan het liposoom. Dit kunnen membraaneiwitten zijn die ingebouwd worden in de lipide-dubbellaag. Het kunnen ook eiwitten zijn die echt aan de buitenzijde van de liposomen gebonden worden.

Deze eiwitten dienen ervoor om op de plaats van bestemming van het getransporteerde medicijn te zorgen voor medicijnafgifte doordat zij reageren op een stimulus vanuit het doel-weefsel.

In deze taak maak je kennis met een tweetal strategieën die zijn ontwikkeld om met behulp van eiwitten en liposomen, medicijnen op een specifieke plek af te leveren.



Figuur 25: Onder invloed van spanning in het celmembraan passeren kleine moleculen/ionen het celmembraan via kanaaleiwitten.

I Mechanosensitive channel proteins

Mechanosensitive channel proteins zijn membraaneiwitten die onder invloed van spanning in het celmembraan kanalen vormen waardoor kleine moleculen het celmembraan kunnen passeren. Deze spanning in het celmembraan kan ontstaan door optredende osmotische druk. Deze zogenaamde kanaal- of porie-eiwitten zouden te gebruiken zijn om in tumorweefsel medicijnen vanuit de liposomen door te laten.

51. Opdracht kanaal- eiwitten

In de bijlage

(http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/MechanosensitiveChannels.pdf) tref je een artikel aan over mechanosensitive channel proteins. Lees het artikel zorgvuldig door en beantwoord de volgende vragen:

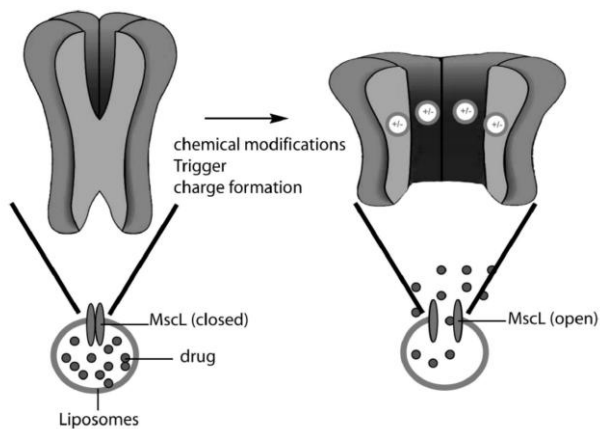
- Leg uit wat bacteriën doen om te voorkomen dat ze onder osmotische druk bezwijken:
 - in zout water
 - in zuiver water
- Wat zou er gebeuren wanneer ook grote moleculen als eiwitten en ribosomen door de poriën uit de bacterie zouden lekken?
- Leg het verschil uit in functie van MscS en MscL.
In de tekst tref je twee afbeeldingen aan waarin de gesloten en de geopende structuur van MscS is weergegeven. De gesloten vorm heeft echter nog steeds een opening.
- Leg aan de hand van interacties op microniveau uit dat water en ionen niet via deze opening het celmembraan kunnen passeren.

Bij spanning in het celmembraan verandert de tertiaire structuur van het membraaneiwit zodanig dat in de porie, groepen met gelijke lading tegenover elkaar komen te zitten.

- e. Welke twee factoren zorgen er voor dat ionen en en water nu wél het celmembraan kunnen passeren?*
- f. Bedenk hoe deze eiwitten een bijdrage kunnen leveren aan de afgifte van medicijnen uit liposomen aan tumorweefsel.*

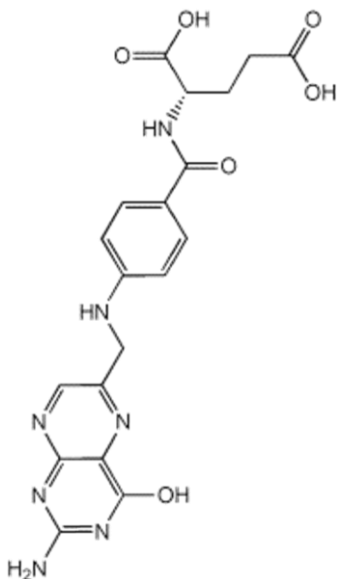
Nadere details over deze eiwitten vind je op:

http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Mechanosensitive_channels: opening_and_closing (docent!)



Figuur 26: Bij pH=6,5 wordt hydrofobe kanaal in gemodificeerd MscL geladen en opent zich

Een onderzoeksgroep in Groningen is er onder leiding van A. Koçer in geslaagd om MscL zo te 'verbouwen' dat het eiwit pH-gevoelig werd. Bij pH=6,5 (de pH rond een tumor) was het eiwit geopend doordat het oorspronkelijk hydrofobe kanaal geladen werd, bij normale fysiologisch pH gesloten. Bovendien zijn zij er in geslaagd om deze pH-gevoeligheid aan- en uit te kunnen zetten met UV-straling. Op deze wijze zouden met cytostatica gevulde liposomen hun medicijn selectief af kunnen geven rondom tumorweefsel.



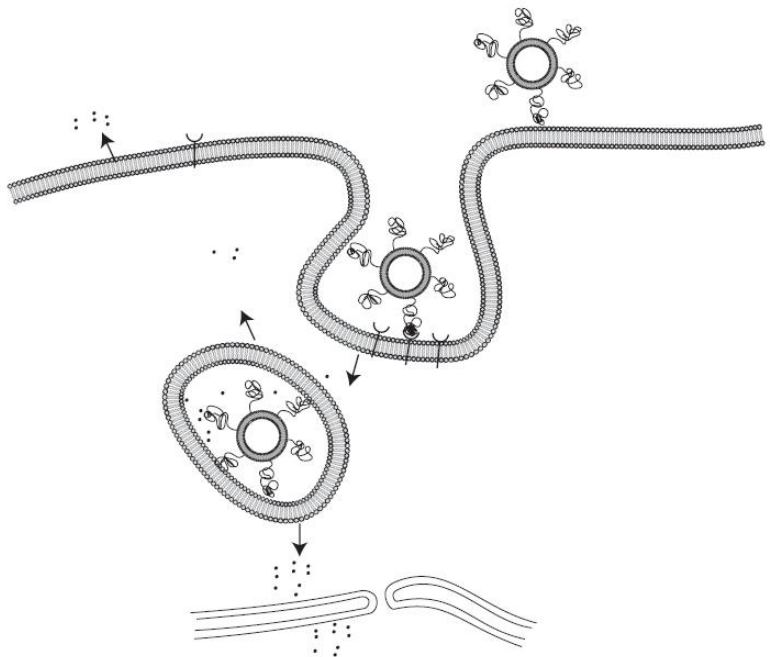
Figuur 27: structuurformule van foliumzuur

II Selective ligand-receptor interaction

Een andere strategie om selectieve medicijnafgifte mogelijk te maken is met behulp van zogenaamde selectieve targeting. Hierbij wordt aan het liposoom een zijgroep gekoppeld die kan binden aan een receptor (een membraaneiwit) die oververtegenwoordigd is in het celmembraan van kwaadaardige cellen.

Een voorbeeld is foliumzuur-receptor-targeting. Foliumzuur-receptor-eiwitten worden in bepaalde typen tumorweefsel (o.a. eierstok-, borst- en longkanker) in hoge mate geproduceerd door overexpressie van het gen voor deze receptor.

Bij de productie van liposomen wordt gebruik gemaakt van gepegyleerde fosfolipiden waaraan een foliumzuur is gebonden. Deze liposomen zullen in tumorweefsel hechten aan de foliumzuurreceptoren op de tumorcellen. Via endocytose zal het liposoom door de cel worden opgenomen en zal het ingepakte medicijn zijn werk kunnen doen.

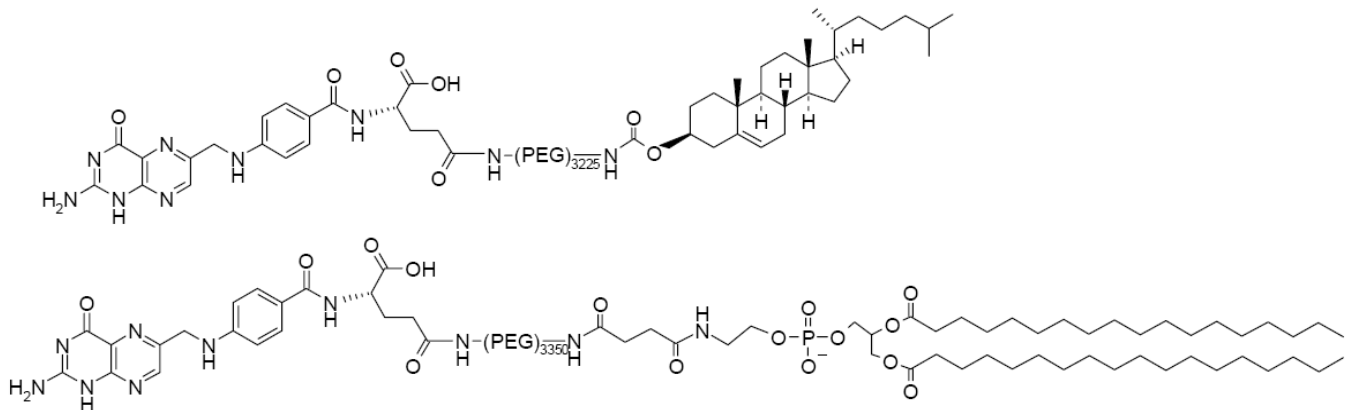


Figuur 28: Met foliumzuur gelabelde liposomen binden aan receptor op tumorcel. Endocytose wordt geïnduceerd en medicijn komt vrij in cel.

52. Foliumzuur hecht aan de receptor via waterstofbruggen. Geef minstens 7 groepen aan in foliumzuur die waterstofbruggen kunnen vormen/ontvangen.

53. In onderstaande figuur tref je twee bouwstenen aan die worden gebruikt voor het maken van liposomen voor foliumzuur-receptor-targeting.

- Benoem de drie onderdelen waaruit elk van deze twee bouwstenen is opgebouwd.
- Via welk type binding is het PEG-deel aan het foliumzuur-deel gekoppeld?
- Leg uit dat deze bouwstenen in combinatie met losse fosfolipiden het gewenste liposoom opleveren.



54. Hoe komt het dat juist tumorcellen door deze liposomen worden aangepakt?

De ontdekking van de dubbellaag door Gorter en Grendel (1925)

Onderzoek aan rode bloedcellen (erythrocyten) toont aan dat het celmembraan van deze cellen is opgebouwd uit een dubbele laag lipiden.

Gorter en Grendel van de universiteit Leiden taptten bloed af van verschillende dieren en mensen, isoleerden de rode bloedcellen en extraheerden er de lipiden uit (vetcomponent). Deze lipideoplossing werd vervolgens op een waterlaag aangebracht alwaar de lipidemoleculen zich na verdamping van het oplosmiddel, in een monomoleculaire laag (één molecuul dik) organiseerden. Het oppervlak van deze **monomoleculaire** laag bleek steevast twee maal zo groot te zijn als het gezamenlijke oppervlak van de afgetapte bloedcellen. Hiermee was 'het bewijs' geleverd dat het celmembraan van bloedcellen is opgebouwd uit een **bimoleculaire** laag lipiden (dubbellaag).

TABLE I.

	Animal.	Amount of blood used for the analysis.	No. of chromocytes per c.mm.	Surface of one chromocyte.	Total surface of the chromocytes (a).	Surface occupied by all the lipoids of the chromocytes (b).	Factor a:b.
		gm.		sq. μ	sq. m.	sq. m.	
1	Dog A	40	8,000,000	98	31.3	62	2
2		10	6,890,000	90	6.2	12.2	2
3	Sheep 1	10	9,900,000	29.8	2.95	6.2	2.1
4		9	9,900,000	29.8	2.65	5.8	2.2
5	Rabbit A	10	5,900,000	92.5	5.46	9.9	1.8
6		10	5,900,000	92.5	5.46	8.8	1.6
7		0.5	5,900,000	92.5	0.27	0.54	2
8	" B	1	6,600,000	74.4	0.49	0.96	2
9		10	6,600,000	74.4	4.9	9.8	2
10		10	6,600,000	74.4	4.9	9.8	2
11	Guinea Pig A	1	5,850,000	89.8	0.52	1.02	2
12		1	5,850,000	89.8	0.52	0.97	1.9
13	Goat 1	1	16,500,000	20.1	0.33	0.66	2
14		1	16,500,000	20.1	0.33	0.69	2.1
15		10	19,300,000	17.8	3.34	6.1	1.8
16		10	19,300,000	17.8	3.34	6.8	2
17		1	19,300,000	17.8	0.33	0.63	1.9
18	Man.	1	4,740,000	99.4	0.47	0.92	2
19		1	4,740,000	99.4	0.47	0.89	1.9

Gorter en Grendel deden hierbij twee belangrijke aannames:

- 1: Het oppervlak van een bloedcel komt overeen met $2D^2$ waarin D de diameter is van de discusvormige bloedcellen.
- 2: Lipiden organiseren zich in een monomoleculaire laag als een lipideoplossing op een waterlaag wordt aangebracht.

Aanname 1 is een betrouwbare wiskundige benadering en aanname 2 is bewezen door Langmuir voor vetzuurlagen op water.

Hiernaast tref je de tabel aan uit het artikel van Gorter en Grendel uit 1925.

De **tweede kolom** geeft de hoeveelheid gebruikt bloed in mL, de **derde kolom** het getelde aantal bloedcellen per mm^3 , de **vierde kolom** het oppervlak van één bloedcel in μm^2 (op basis van $O = 2D^2$), de **vijfde kolom** het berekende totaaloppervlak van de bloedcellen in het bloedmonster in m^2 , de **zesde kolom** het oppervlak van de uit het bloedmonster geëxtraheerde lipiden die op een wateroppervlak zijn aangebracht in m^2 en tot slot de laatste **kolom** waar de verhouding staat tussen het bloedcellenoppervlak en het lipidenoppervlak op het water.

- OPDRACHT 1:** Laat met een berekening zien dat voor Dog A(1) geldt dat het totaaloppervlak van de bloedcellen in het gebruikte monster $31,1 \text{ m}^2$ is. (komma's zijn in het Engels punten en v.v)
- OPDRACHT 2:** Bereken de diameter van een bloedcel van Man (18)
- OPDRACHT 3:** Hoe blijkt nu uit deze gegevens dat membranen van bloedcellen bestaan uit bi-moleculaire lagen?
- OPDRACHT 4:** Rabbit A(6) geeft een oppervlakteratio te zien van 1,6. Noem een mogelijke oorzaak voor deze afwijkende waarde. Ga er vanuit dat er geen meet- en/of experimenteerfouten zijn gemaakt.

Het volgende experiment is gebaseerd op de experimenten van Langmuir (voorwaarde 2 van Gorter en Grendel). Wij gaan in navolging van Langmuir proberen aan te tonen dat een lipidenlaag op een wateroppervlak mono-moleculair is d.w.z uit één laag moleculen bestaat.

Experiment palmitinezuur op water

Allereerst gaan jullie zorgvuldig bekijken wat een druppel wasbenzine doet als deze heel voorzichtig op water wordt gelegd. Daarna nemen jullie een druppel wasbenzine waarin een heel klein beetje palmitinezuur is opgelost.

Materialen

Wasbenzine (hexaan) vluchtige brandbare stof.

Palmitinezuur, vetzuur, officiële naam hexadecaanzuur

Deze proef lukt alleen als alle glaswerk schoon en vetvrij is en ook geen vet van vingers in de wasbenzine kan oplossen.

Vooraf: Maak een grote glazen schaal goed schoon en vetvrij.

Maak palmitinezuur-/en/of stearinezuuroplossing, 50 mg per 100mL wasbenzine

Leg een schone pasteurpipet met ballonnetje klaar.

1. Vul de schaal tot halve hoogte met heet water. Vanaf nu doorwerken zodat de temperatuur niet teveel zakt.
Breng een beetje fijn krijtstof/talkpoeder uit een schoolbordborstel op het water aan. Net genoeg dat je het poeder ziet. Teveel poeder maakt de meting onnauwkeurig.
2. Laat voorzichtig een druppel wasbenzine uit de pipet op het water vallen, hou de pipet zo dicht mogelijk bij het water maar niet erin! Laat de druppel in het midden van de schaal vallen!
Hou de pipet bijna horizontaal met de punt van de pipet dus vlak boven MAAR NIET ÍN het water. Er mag maar één druppel vallen!
Oefen vooraf even met de pipet zodat je gevoel krijgt voor de handeling.
Kijk goed wat er gebeurt en beschrijf wat je ziet. Overleg met elkaar en schrijf het op. Desnoods doe je de proef opnieuw.
3. Zorg dat het hele wateroppervlak bedekt is met een zeer dunne laag krijt/talk. Laat nu een druppel van de palmitine- of stearinezuuroplossing op het water (met krijtpoeder) vallen.
Heel voorzichtig, IN HET MIDDEN.
Beschrijf zorgvuldig wat je ziet gebeuren.
Bepaal het oppervlak van de vlek door een liniaal boven de vlek te houden en de diameter te meten.
Doe dat in minstens vier richtingen en bereken hiermee de gemiddelde diameter en daarmee het oppervlak van de vlek.
4. **Herhaal stap 3** minstens één keer (met een ontvette schoongemaakte schaal.)
5. Bedenk hoe je het volume van een druppel palmitinezuur-/stearinezuuroplossing uit de pasteurpipet kunt vinden. Schrijf het plan op, laat het controleren en voer je plan uit.

Uitwerken proef en vragen

De vlek wordt niet veroorzaakt door de benzine maar door het palmitinezuur.

1. Leg dit uit.

Als je uit kunt vinden hoe groot het volume van een druppel palmitinezuur-oplossing is, kun je uitrekenen hoeveel gram palmitinezuur op het water terecht is gekomen en de vlek gevormd heeft.

2. Uit hoeveel gram bestaat jouw vlek palmitinezuur?
3. Hoeveel mL zuiver palmitinezuur is dat? (dichtheid = $0,85 \text{ kg/dm}^3$)
4. Hoeveel mol is dat?

Voor het volume van de palmitinezuurvlek geldt : Volume = hoogte x oppervlak = $(h \times \pi r^2)$

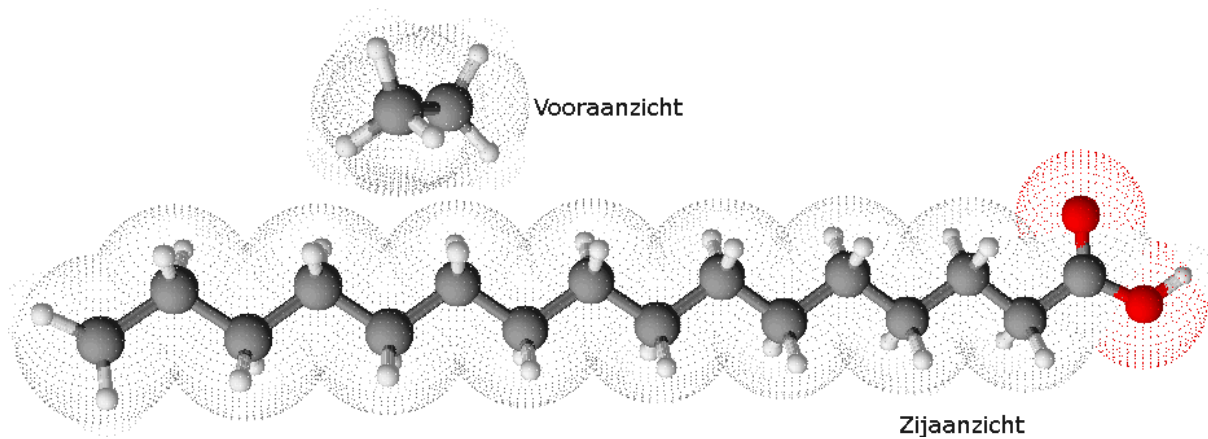
5. Bereken de hoogte/dikte van de vlek in nanometer (10^{-9} meter, een miljardste meter, een miljoenste mm)

In de tijd van Langmuir was het getal van Avogadro bekend ($6,0 \times 10^{23}$ deeltjes per mol)

6. Bereken met behulp van dit getal en het antwoord op vraag 4, het gemiddelde oppervlak dat één molecuul palmitinezuur inneemt in de vetvlek op het water. Ga er daarbij vanuit dat de laag mono-moleculair is.

7. Bereken nu hieruit de gemiddelde diameter van een palmitinezuur molecuul.

8. Bepaal de verhouding tussen berekende hoogte (vraag 5) en berekende diameter (vraag 7) en vergelijk deze met diezelfde verhouding die je uit onderstaand plaatje kunt halen.



Figuur 29: Voor- en zijaanzicht palmitinezuur

9. Leg uit of nu het bewijs is geleverd dat we te maken hebben met een mono-moleculaire laag?

10. Op welke wijze zijn de moleculen geordend/georiënteerd in de mono-laag?

Computerpracticum A: α -helix

Start het programma **Deepview** op. Er verschijnt een **Toolbar**.

File: Open PDB File en open dan de file **alphahelix.pdb**

Het Graphic Window wordt nu geopend, met daarin een α -helix. Deze α -helix is een onderdeel van het eiwit amylase. Je kunt de weergave verfraaien met:

Display: Render in Solid 3D

Dit eiwit wordt nu weergegeven in de kleurcodering CPK. Ook zijn alle waterstofatomen weggelaten om de structuur iets eenvoudiger te maken.

Kleurcodering CPK	
koolstof	wit
stikstof	blauw
zuurstof	rood
zwavel	geel

Met de muis kun je de α -helix van alle kanten bekijken.

Muis-links	Draaien rond centrum
Muis-links + F5	Draaien rond horizontale as in vlak
Muis-links + F6	Draaien rond verticale as in vlak
Muis-links + F7	Draaien door as loodrecht op het vlak
Muis-rechts	Horizontaal verplaatsen
Muis-links+muis-rechts	Inzoomen

Probeer deze combinaties maar eens uit.

Met de **insert** toets wordt de α -helix weer gecentreerd. Je ziet de helix nu weergegeven met het stok-model. In werkelijkheid zijn de atomen natuurlijk ruimtevullend. Dit kunnen we weergeven door:

Select: All gevolgd door

Wind: Control Panel

Nu is een ander scherm geopend namelijk het **Control Panel**. In het Control Panel kun je heel snel een eiwit

naam van het bestand

aantal ketens (hier een)

helix

rood = geselecteerd
zwart = niet geselecteerd

aminozuur met volgnummer

aminozuur zichtbaar

zijgroep zichtbaar

lintstructuur zichtbaar

ruimte-vullend

group	show side labl	chain	col	g
A	ASP173	v	v	
A	h TYR174	v	v	
A	h VAL175	v	v	
A	h ARG176	v	v	
A	h SER177	v	v	
A	h LYS178	v	v	
A	h ILE179	v	v	
A	h ALA180	v	v	
A	h GLU181	v	v	
A	h TYR182	v	v	
A	h MET183	v	v	
A	h ASN184	v	v	
A	h HIS185	v	v	
A	h LEU186	v	v	
A	h ILE187	v	v	
A	h ASP188	v	v	
A	h ILE189	v	v	

bewerken. Als het goed is zijn de eerste kolommen nu rood weergegeven.

Klik op de + boven ::v (Control Panel)

Je ziet nu een ruimte-vullende weergave van de helix. Helaas wordt het met zoveel informatie wel erg moeilijk om de precieze bouw van de ruggengraat van de helix te achterhalen. Doe daarom het volgende:

Klik op de – boven ::v en op de – boven side (Control Panel)

Je ziet nu een stok-model van de ruggengraat van de helix.

- Leg aan de hand van de structuur uit hoe je het begin van de helix kunt vinden.

Controleer je antwoord als volgt:

Plaats in de kolom labl bij ASP173 een vinkje (Control Panel)

Als je het goed hebt gedaan staat het labeltje nu op de plaats die jij had voorspeld.

Verwijder het vinkje in de kolom labl.



- b. Bepaal de lengte van een binding tussen de C en de N van een peptidebinding.
Bepaal ook de lengte van de binding tussen de N, van de peptide-binding en het C α -aatom. (Tip: als je met de muis over de atomen gaat, kun je in de toolbar zien of dit een C α -aatom is.)
Doe dit voor 4 aminozuren.

Noteer je meetgegevens in een tabel:

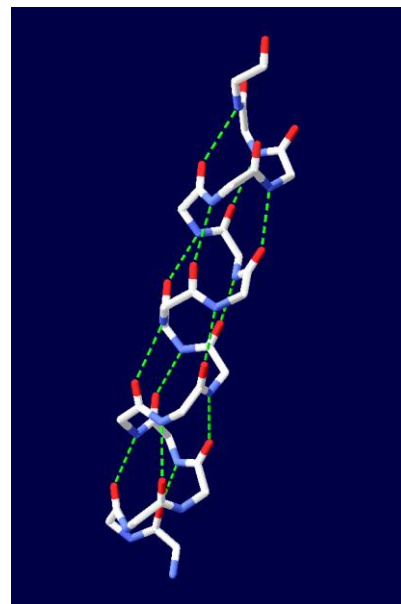
Lengte C-N binding (peptide) [Å]	Lengte N-C α binding [Å]

Als je de labels wilt verwijderen, kun je dit doen door tegelijk de **Alt-toets** en de **-toets** in te duwen.

- c. Vergelijk jouw getallen met de getallen in Binas 53. Wat valt je op?

De helixstructuur komt tot stand door het 'krullen' van de ruggengraat van de keten. De drijvende kracht achter de vorming van de helix is het ontstaan van waterstofbruggen tussen de C=O van een peptide-binding en een H-N van een peptidebinding.

In Deepview worden waterstofatomen niet weergegeven. Dus ook het waterstofaatom aan de N is niet zichtbaar. In het figuur hiernaast zijn plaatsen waar waterstofbruggen worden gevormd, weergegeven met stippellijnen.



- d. Noteer voor vier verschillende plaatsen van waterstofbruggen de afstand van een C=O tot een N. Noteer je antwoord als volgt:

plaats	1	2	3	4
Afstand C=O...N [Å]				

De afstand van een N-H binding in een helix is gemiddeld 1,10 Å.

De lengte van een binding wordt gemeten tussen de kernen van de atomen.

- e. Bepaal de volgende gegevens:

α -helix	minimale afstand [Å]	maximale afstand [Å]	gemiddelde afstand [Å]
tussen C=O en N			

waterstofbrug			
---------------	--	--	--

- f. De gemiddelde lengte van een waterstofbrug van een α -helix is 1,60 to 2,00 Å.ⁱ Komt dit overeen met jouw meting?

Ga terug naar de beginsituatie. Dat gaat het gemakkelijkst met

File: Close All Layers

File: Open PDB File en open dan de file **alphahelix.pdb**

Wind: Control Panel

Verplaats de helix tijdens dit gedeelte van de opdracht niet.

De α -helix vormt zich door het oprullen van de ruggengraat. Bepaal hoeveel aminozuren deze helix heeft per omwenteling. Een hulpmiddel hierbij is:

Klik op de + boven ribn (Control Panel)

- g. Bereken nu het gemiddelde aantal aminozuren per omwenteling.

Aan de rechterkant van de helix zie je een vijftal zijgroepen; rechts onderaan vind je Tyr-174.

- h. Neem de onderstaande tabel over en noteer de naam en het nummer van de andere aminozuren die zich aan de rechterzijde van de helix bevinden. Bereken ook het verschil tussen de nummers van de

aminozuren. Het opzoeken van de aminozuren kun je doen met  van de toolbar. De naam van het aminozuur verschijnt dan in de toolbar.

Aminozuren rechts van de helix van onder naar boven					
Tyr-174					

- i. Bereken het gemiddelde van het verschil tussen de nummers van de aminozuren.
j. Komt dit gemiddelde overeen met je antwoord op vraag g hierboven?

Eiwitten komen voor in levende wezens. Levende wezens bestaan voor een groot deel uit water. De meeste eiwitten bevinden zich dan ook in een waterige omgeving. Van de 20 aminozuren zijn er 10 hydrofiel en 10 hydrofoob. De hydrofiele aminozuren willen graag in de buurt van water zijn en kunnen dus aan de buitenzijde van een eiwit zitten; de hydrofobe aminozuren zullen de binnenzijde van een eiwit opzoeken. Immers bij oplossen geldt: soort zoekt soort. Doordat de zijgroepen van hydrofobe aminozuren onderling met elkaar in contact staan, hoeven ze niet meer in contact te komen met water.

De helix die we nu bekijken is een deel uit van het eiwit amylase. Het eiwit amylase zit bijvoorbeeld in speeksel en breekt lange zetmeelmoleculen in stukjes.

Zoek nu uit welke kant zich bevindt aan de buitenzijde van het eiwit en welke kant naar de binnenkant van het eiwit is gericht.

Doe daarom het volgende:

Klik op de + boven ::v (Control Panel)

Er moet een vinkje staan voor **Display: Render in Solid 3D (Toolbar)**

Color: Act on Backbone + Sidechains (bovenste keuze in het menu)

Color: Type

Nu worden de aminozuren ruimtevullend weergegeven. Bovendien zijn ze nu gekleurd naar type.

- rood = zuur
- blauw = basisch
- geel = polair
- grijs = apolair



Door te klikken op  kun je de helix weer draaien met de muis.

- Leg uit welke zijde van de helix in contact staat met water.
- Welke zijde van de helix is naar de binnenkant van het eiwit gericht?

Controleer je antwoord door

Verwijder het vinkje voor visible (Control Panel)

Klik vervolgens op de naam alphahelix en kies dan voor amylase (Control Panel)

Plaats dan een vinkje voor visible (Control Panel)

Je ziet nu weergave van het eiwit amylase. De helix die we bekeken hebben is ruimtevullend en gekleurd naar type weergegeven. Draai het eiwit en kijk of je de juiste voorspelling hebt gedaan.

Sluit af met: **File: Close All Layers**

Computerpracticum B: De β -sheet

Start het programma **Deepview** op. Er verschijnt een **Toolbar**.

File: Open PDB File en open dan de file **betasheets.pdb**

Het Graphic Window wordt nu geopend, met daarin een β -sheet. Verfraai de weergave met:

een vinkje voor **Display: Render in Solid 3D**

Select: All

Wind: Control Panel

Je ziet nu een parallelle β -sheet. De β -strands van deze sheet liggen in dezelfde richting.

a. Leg uit hoe je kunt zien dat deze β -sheet parallel is.

De strands van de β -sheet worden bijeen gehouden door waterstofbruggen. Dit kunnen we zichtbaar maken door:

<Shift> + Tools: Compute H-bonds

(tegelijk shift-toets indrukken en compute H-bonds aanklikken)

Je ziet nu groene stippellijnen op de plaatsen waar Deepview waterstofbruggen verwacht.



Klik op (Toolbar)

Bepaal de afstanden van de 4 groene stippellijnen tussen twee strands. Een zo'n groene stippellijn gaat van de N naar de C=O. Hierdoor bestaat deze stippellijn uit een waterstofbrug en de N-H binding. Immers H-atomen worden niet weergegeven in Deepview. Een N-H binding in een waterstofbrug is gemiddeld 1,10 Å

- b. Bereken de gemiddelde afstand van de 4 waterstofbruggen.
- c. Komt je antwoord overeen met de lengte van de waterstofbruggen in een α -helix?

Een β -sheet wordt in cartoonweergave weergegeven met pijlen. Deze pijlen geven de richting van de β -strands aan.

Klik op de + boven ribn. in het Control Panel

De plaats van de zijgroepen kun je bekijken door:

Klik op de + boven side in het Control Panel

Bekijk nu eens goed hoe de zijgroepen van een β -strand zijn geplaatst ten opzichte van elkaar. Dit doe je door in de kolom **::v** van het Control Panel vinkjes te plaatsen

Plaats vinkjes in de kolom ::v bij achtereenvolgens ILE 230, TYR231, GLN232 in het Control Panel.

d. Beschrijf hoe de zijgroepen van een β -strand zijn geplaatst ten opzichte van elkaar.

Klik op de – boven ribn. in het Control Panel

Klik op de – boven side in het Control Panel

Klik op de – boven ::v in het Control Panel

Behalve een parallel kan een β -sheet ook antiparallel zijn.

Klik op de naam PAR betasheet in het Control Panel.

Kies dan de naam antiPAR betasheet.

Plaats een vinkje voor visible

Met <insert> zie je beide betasheets tegelijk.

Je kunt de antiparallelle sheet opsporen door het vinkje voor visible (control panel) te verwijderen. De antiparallelle sheets is dan niet zichtbaar. Plaats het vinkje terug en je krijgt de antiparallelle sheet weer terug

e. Noteer zo veel mogelijk verschillen tussen de parallelle en de antiparallelle β -sheet. Let hierbij op:

- de primaire structuur
- de plaatsing van de waterstofbruggen. Als de waterstofbruggen niet zichtbaar zijn doe dan
Tools: Compute H-bonds
- de plaatsing van de R-groepen ten opzichte van de keten. De R-groepen maak je zichtbaar door: **klik op + boven ribn en op de + boven side in het Control Panel**

De sheets die we nu bekijken maken ook deel uit van het eiwit amylase. Zoek nu uit welke kant van de antiparallelle sheet zich bevindt aan de buitenzijde van het eiwit en welke kant naar de binnenkant van het eiwit is gericht.

Doe daarom het volgende:

Select: All

Klik op de + boven ::v (Control Panel)

Controleer of een vinkje staat voor **Display: Render in Solid 3D (Toolbar)**

Color: Act on Backbone + Sidechains (bovenste keuze in het menu)

Color: Type

Nu worden de aminozuren ruimtevullend weergegeven. Bovendien zijn ze nu gekleurd naar type.

- rood = zuur
- blauw = basisch
- geel = polair
- grijs = apolair

- f. Voorspel hoe de antiparallelle β -sheet geplaatst zal zijn in het eiwit. Let hierbij op de zijkant en de uiteinden van de sheet.

Controleer je antwoord door:

Klik op de naam antiPAR betasheet en kies dan voor amylase (Control Panel)

Plaats een vinkje voor visible (Control Panel)

Met <insert> kun je het eiwit centreren.

De parallelle β -sheet is nog steeds zichtbaar in het stokmodel met CPK-kleuren. Ook voor de parallelle sheet gaan we bekijken wat de relatie is tussen type aminozuur en de plaatsing van de sheet. Dit doen we door:

Verwijder het vinkje voor visible (control panel)

Klik op de naam amylase en stap over naar antiPAR betasheet.

Verwijder ook hier het vinkje voor visible

Stap over naar PAR betasheet.

Met <insert> kun je de sheet centreren.

Klik op de + boven side en op de + boven ::v (Control Panel)

Color: Act on Backbone + Sidechains (bovenste keuze in het menu)

Color: Type

- g. Voorspel hoe de parallelle β -sheet geplaatst zal zijn in het eiwit. Let hierbij op de zijkant en de uiteinden van de sheet.

Controleer je antwoord door:

Klik op de naam PAR betasheet en kies dan voor amylase (Control Panel)

Plaats dan een vinkje voor visible (Control Panel).

Met <insert> kun je het eiwit centreren.

Het opmerkelijke is dat juist de polaire groepen nu deel uitmaken van de binnenzijde van het eiwit. Als je goed kijkt zie je dat de getoonde strands van de parallelle sheet deel uitmaken van een groep parallelle sheets, die samen een ronde structuur vormen. Zo'n structuur wordt een 'barrel' genoemd. (Engels voor vat). De barrel kun je oproepen door:

Klik op de naam amylase en kies dan voor barrel (Control Panel)

Plaats dan een vinkje voor visible (Control Panel).

Dit is iets te veel informatie om handig mee te kunnen werken.

Verwijder de vinkjes voor visible bij PAR betasheet en bij amylase. (via de namen in het control panel)

Klik op barrel (Control Panel)

Select: All

Edit: Assign Strand-Type to Selected Residues

Klik op de – boven show

- h. Uit hoeveel strands is de barrel opgebouwd?
- i. Zijn alle strands van de barrel parallel?

Klik op de + boven ::v, op de + boven side en op de + boven show (Control Panel)

Controleer of een vinkje staat voor **Display: Render in Solid 3D (Toolbar)**

Color: Act on Backbone + Sidechains (bovenste keuze in het menu)

Color: Type

- j. Waar zitten de meeste hydrofobe groepen
- k. Waar zitten de meeste hydrofiele groepen?

Klik op de naam barrel, stap over naar amylase. Plaats een vinkje voor visible (Control Panel).

- l. Welk gedeelte van de barrel zit aan de buitenzijde van het eiwit?

De barrel is dus niet zo maar een bouwblokje van het amylase. Dit is de plek waar hydrofiele deeltjes het eiwit in kunnen dringen. En dat is ook nodig, want suiker is een hydrofiele stof. De barrel is dan de plaats waar de katalyse plaatsvindt.

Examenopgave 2009-I

Nenatal[®]

Ruim 6% van de baby's wordt te vroeg geboren. Deze zuigelingen hebben een grote behoefte aan voeding met de juiste vetten. Nutricia, een bekende fabrikant van babyvoeding, heeft hiervoor een speciaal product ontwikkeld en onder de naam Nenatal[®] op de markt gebracht. De fabrikant heeft veel informatie verstrekt over deze nieuwe babyvoeding. Een deel van deze informatie is afgedrukt in de bijlage die bij dit examen hoort. Lees deze informatie en beantwoord daarna onderstaande vragen.

De vetzuren die in Nenatal[®] zijn verwerkt, staan vermeld in tabel 1 op pagina 3 van de bijlage die bij dit examen hoort.

In Nenatal[®] komen zowel enkelvoudig onverzadigde vetzuren als meervoudig onverzadigde vetzuren voor. Een voorbeeld van een meervoudig onverzadigd vetzuur is arachidonzuur. Onder voedingsdeskundigen is het gebruikelijk om vetzuren met een bepaalde code aan te geven. In tabel 1 zijn deze codes ook opgenomen. De code van een vetzuur is gebaseerd op de structuurformule van dat vetzuur. Met behulp van gegevens uit Binas-tabel 67B is af te leiden wat de betekenis is van die codes. Niet alle informatie over de structuurformule van arachidonzuur is echter in de code opgenomen.

- 2p 11 Geef de betekenis van de code van arachidonzuur.
- 2p 12 Noem een aspect uit de structuurformule van arachidonzuur dat niet in de code is opgenomen en geef een mogelijke verklaring voor het feit dat die informatie niet in de code is opgenomen. Betrek in je verklaring ook andere meervoudig onverzadigde vetzuren.

In het tekstfragment is op sommige plaatsen sprake van onnauwkeurig chemisch taalgebruik. Een voorbeeld daarvan is te vinden in de beschrijving van de vorming van de calciumzepen (regels 9 en 10). In het darmkanaal, waar de vorming van calciumzepen plaatsvindt, is de pH ongeveer 8,0. Zuren zoals palmitinezuur hebben een pK_z van 5,0 - 6,0. Bij een pH van ongeveer 8 komen deze zuren vrijwel volledig voor in de vorm van de geconjugeerde base.

- 3p 13 Laat aan de hand van een berekening zien dat een zuur met een $pK_z = 5,5$ bij een $pH = 8,0$ vrijwel volledig voorkomt in de vorm van de geconjugeerde base van dat zuur. Gebruik voor het zuur de notatie HZ en voor de geconjugeerde base Z^- .

Met 'onoplosbare calciumzepen' in regel 10 wordt calciumpalmitaat bedoeld.

- 3p 14 Geef de vergelijking van de reactie die optreedt bij het ontstaan van calciumpalmitaat in het darmkanaal. Noteer hierin de koolwaterstofrest van het palmitaat als C_xH_y met daarin de juiste getallen voor x en y .
- 2p 15 Geef de naam van nog een onoplosbare calciumzeep die kan worden gevormd in het darmkanaal van een baby die met Nenatal[®] is gevoed.

Een ander voorbeeld van onnauwkeurig chemisch taalgebruik is te vinden in kolom 3 van tabel 1. Daar staat boven: 'g vetzuur per 100 g vet'. Hierin zou 'g vetzuur' moeten zijn 'g gebonden vetzuur'. Ook 'per 100 g vet' is niet juist, want de som van de massa's van de vetzuren in deze kolom is, afgerond, 100,0 g. Boven kolom 3 van tabel 1 zou dus iets anders moeten staan, bijvoorbeeld: 'g gebonden vetzuur per ... g vet'.

- 2p 16 Leg uit of het getal dat op de plaats van de puntjes in 'g gebonden vetzuur per ... g vet' moet komen te staan groter of kleiner is dan 100.

In het tekstfragment wordt beschreven hoe de grondstof BETAPOL[®] wordt gemaakt (regels 37 t/m 42).

- 3p 17 Geef, met behulp van structuurformules, de vergelijking van de reactie die is beschreven in de regels 37 en 38. Noteer hierin de koolwaterstofrest van het palmitaat als C_xH_y met daarin de juiste getallen voor x en y .

De reactie die is beschreven in de regels 37 en 38 vindt plaats in een andere reactor (reactor 1) dan de reactie die is beschreven in regel 39 (reactor 2). De reactie die is beschreven in de regels 40 t/m 42 vindt plaats in een derde reactor (reactor 3) met reactieproducten uit reactor 1 en reactor 2.

Behalve de reacties die in de regels 37 t/m 42 zijn beschreven, worden in het om-esteringsproces ook enkele scheidingen uitgevoerd.

- 3p 18 Welke stof(fen) moet(en) worden verwijderd uit de volgende reactiemengsels:
- het reactiemengsel dat is ontstaan in reactor 1 (zie regels 37 en 38);
 - het reactiemengsel dat is ontstaan in reactor 2 (zie regel 39)?

Geef ook aan waarom het ongewenst is dat deze stoffen in reactor 3 terechtkomen.

Noteer je antwoord als volgt:

Uit het mengsel dat in reactor 1 is ontstaan, moet(en) ... worden verwijderd, omdat ...

Uit het mengsel dat in reactor 2 is ontstaan, moet(en) ... worden verwijderd, omdat ...

Examenopgave 2002-I

Margarine

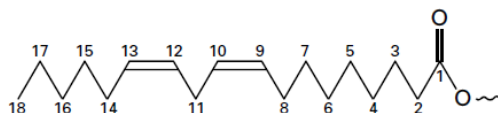
Plantaardige olie is een belangrijk bestanddeel van onze voeding. Plantaardige olie bestaat voornamelijk uit glyceryltri-esters van diverse vetzuren; in deze opgave wordt aangenomen dat er geen andere molecuulsoorten in aanwezig zijn. Van de veresterde vetzuren in plantaardige olie is een groot deel onverzadigd. Door plantaardige olie te schudden met een bepaald reagens kan direct zichtbaar gemaakt worden dat plantaardige olie onverzadigde verbindingen bevat.

- 2p 7 ☐ Geef de naam van dat reagens én geef de waarneming die men kan doen als dit reagens aan een onverzadigde verbinding wordt toegevoegd.

Plantaardige oliën hebben een laag smeltpunt. Om plantaardige olie te kunnen toepassen in margarine of in frituurvet wordt de olie zodanig bewerkt dat een product ontstaat dat bij een hogere temperatuur vloeibaar wordt. Daartoe past men vetharding toe. Bij vetharding wordt, door het toepassen van een bepaalde reactie, een groot deel van de dubbele koolstof-koolstof-bindingen in de onverzadigde veresterde vetzuurmoleculen omgezet tot enkelvoudige koolstof-koolstof-bindingen.

- 2p 8 ☐ Geef de naam van de stof waarmee men bij de vetharding de olie laat reageren én geef de naam van het type reactie, dat daarbij plaatsvindt.

In plantaardige oliën hebben de dubbele bindingen in de onverzadigde veresterde vetzuren de *cis*-configuratie. Zo kan de configuratie van een deel van een veresterd molecuul linolzuur als volgt schematisch worden weergegeven:



In deze schematische weergave zijn de koolstofatomen van het veresterde linolzuurmolecuul genummerd.

Wanneer in deze opgave wordt gesproken over dubbele bindingen in de *cis*- respectievelijk *trans*-configuratie, wordt daarmee bedoeld dat het gedeelte van het molecuul rond de desbetreffende dubbele binding de *cis*- respectievelijk *trans*-configuratie bezit. Behalve de reactie waarbij dubbele bindingen worden omgezet tot enkelvoudige bindingen, vindt tijdens de vetharding nog een andere omzetting plaats. Het is namelijk gebleken, dat tijdens de vetharding de configuratie rond de dubbele bindingen kan overgaan van *cis* in *trans*.

- 3p 9 ☐ Teken schematisch de configuratie van het gedeelte van het achtste tot en met het veertiende koolstofatoom van een veresterd molecuul linolzuur, als daarin de configuratie rond beide dubbele bindingen is overgegaan van *cis* in *trans*.

Bij vetharding kunnen uit veresterd linolzuur veresterde octadeceenzuren (octadeca = 18) ontstaan. De koolstofketen van een veresterd molecuul octadeceenzuur bevat één dubbele koolstof-koolstof-binding.

- 3p 10 ☐ Leg uit hoeveel verschillende veresterde octadeceenzuren kunnen ontstaan bij vetharding van veresterd linolzuur.

Uit onderzoek is gebleken dat veresterde vetzuren met dubbele bindingen in de *trans*-configuratie een nadelige invloed hebben op de gezondheid. Daarom wordt er veel onderzoek gedaan naar de samenstelling van margarine en frituurvet. Bij dit onderzoek aan vetten en oliën wordt onder andere gebruik gemaakt van dunnelaagchromatografie.

Bij deze analysemethode hebben de volgende factoren invloed op de loopsnelheid en dus op de afstand die de glyceryltri-esters vanaf de start afleggen:

- het aantal dubbele bindingen in het molecuul van de glyceryltri-ester: hoe minder dubbele bindingen, hoe groter de loopsnelheid;
- de plaats van het veresterde onverzadigde vetzuur in het molecuul van de glyceryltri-ester: wanneer het onverzadigde vetzuur aan het middelste koolstofatoom van het glycerolmolecuul is veresterd, is de loopsnelheid van de glyceryltri-ester groter dan wanneer het onverzadigde vetzuur aan een van de twee buitenste koolstofatomen van het glycerolmolecuul is veresterd;
- de configuratie van de dubbele binding: glyceryltri-esters met dubbele bindingen in de *trans*-configuratie hebben een grotere loopsnelheid dan de overeenkomstige glyceryltri-esters met dubbele bindingen in de *cis*-configuratie.

De grootte van de koolwaterstofgroep blijkt niet van invloed te zijn op de loopsnelheid. Zo zijn de loopsnelheden van glyceryltripalmitaat en glyceryltristearaat, beide glyceryltri-esters van verzadigde vetzuren, aan elkaar gelijk. Ook blijkt dat de loopsnelheden van spiegelbeeldisomeren aan elkaar gelijk zijn.

In de figuur hiernaast zijn chromatogrammen afgebeeld van mengsels die bij de margarinebereiding van belang zijn.

In deze chromatogrammen zijn de glyceryltri-esters met uitsluitend veresterde verzadigde

vetzuren schematisch met $\begin{Bmatrix} \text{verz} \\ \text{verz} \\ \text{verz} \end{Bmatrix}$ weergegeven.

De afkorting 'onverz' staat voor een onverzadigd veresterd vetzuur met één dubbele koolstof-koolstof-binding.

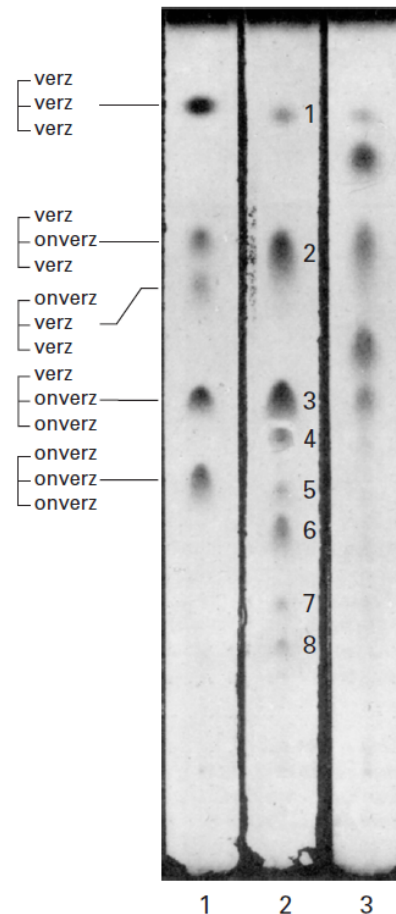
De afgebeelde chromatogrammen zijn van:

1. een synthetisch mengsel van vijf glyceryltri-esters; de dubbele bindingen in de veresterde onverzadigde vetzuren hierin hebben alle de *cis*-configuratie.
2. (ongeharde) natuurlijke palmolie;
3. gedeeltelijk geharde palmolie.

Bij het maken van deze chromatogrammen is telkens dezelfde loopvloeistof (mobile fase) en hetzelfde dragermateriaal (stationaire fase) gebruikt.

In natuurlijke palmolie komen uitsluitend glyceryltri-esters voor. De dubbele bindingen in de veresterde onverzadigde vetzuren in deze glyceryltri-esters hebben alle de *cis*-configuratie. Behalve de vijf glyceryltri-esters die in het mengsel zaten dat voor chromatogram 1 is

gebruikt, bestaat er nog een glyceryltri-ester, namelijk $\begin{Bmatrix} \text{onverz} \\ \text{verz} \\ \text{onverz} \end{Bmatrix}$. Zulke glyceryltri-esters komen wel in natuurlijke palmolie voor.



- 2p 11 ☐ Geef het nummer van de vlek in chromatogram 2 waarin de glyceryltri-esters van het type $\begin{Bmatrix} \text{onverz} \\ \text{verz} \\ \text{onverz} \end{Bmatrix}$ terecht zijn gekomen. Geef een verklaring voor je antwoord met behulp van gegevens uit deze opgave.
- 3p 12 ☐ Leg uit of uit deze chromatogrammen de conclusie getrokken mag worden dat bij de vetharding van deze palmolie dubbele bindingen in de *cis*-configuratie zijn overgegaan in dubbele bindingen in de *trans*-configuratie.

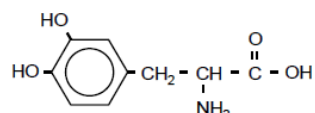
Examenopgave 2004-II

 Parkinson

De ziekte van Parkinson is een neurologische aandoening. Wanneer van een bepaalde soort hersencellen een aanzienlijk deel is afgestorven, komt deze ziekte tot uiting. Deze hersencellen produceren de stof dopamine. Dopamine speelt een rol in de overdracht van impulsen vanuit de hersenen naar het ruggenmerg.

In deze hersencellen wordt dopamine gevormd via twee opeenvolgende reacties.

In de eerste reactie wordt uit L-tyrosine met behulp van een enzym L-dopa gevormd. De structuurformule van L-dopa is:



In de tweede reactie ontstaat dopamine uit L-dopa, onder invloed van het enzym L-dopadecarboxylase. Bij deze reactie ontleedt L-dopa tot dopamine en koolstofdioxide. De aanduiding 'L' in L-tyrosine en L-dopa geeft informatie over de ruimtelijke structuur van de moleculen van deze stoffen. In de naam van dopamine is de aanduiding 'L' niet nodig.

- 3p 1 ☐ Geef de reactievergelijking voor de ontleding van L-dopa tot dopamine en koolstofdioxide. Gebruik daarbij structuurformules voor L-dopa en voor dopamine.
- 2p 2 ☐ Leg aan de hand van de structuurformules uit waarom in L-dopa de aanduiding 'L' wel nodig is en waarom die aanduiding in de stofnaam dopamine ontbreekt.

L-dopa wordt vaak aan Parkinson-patiënten toegediend. De bedoeling is dat het toegediende L-dopa in de hersenen wordt omgezet tot dopamine. Het enzym L-dopadecarboxylase komt echter ook in de bloedbaan voor, zodat de omzetting van L-dopa tot dopamine al voor een groot deel buiten de hersenen plaatsvindt. Om dit te voorkomen, wordt het L-dopa vaak samen met een zogenoemde enzymremmer toegediend. Deze enzymremmer bestaat uit moleculen die niet tot de hersencellen kunnen doordringen.

- 2p 3 ☐ Stel een hypothese op waarmee kan worden verklaard dat de enzymremmer de omzetting van L-dopa tot dopamine in de bloedbaan tegengaat.

Over de oorzaak van het afsterven van dopamine-producerende hersencellen bestaan verschillende theorieën. Veel onderzoek wordt gedaan naar een mogelijk genetische oorsprong van deze ziekte.

In een artikel in NRC Handelsblad wordt melding gemaakt van de ontdekking van een gen dat bij de ziekte van Parkinson is betrokken: het gen DJ-1. Dit gen bevat de code voor een eiwit, dat ook de naam DJ-1 heeft. De functie van dit eiwit is nog niet geheel duidelijk. Wel heeft men aanwijzingen gevonden dat verlies van de functie van DJ-1 leidt tot het afsterven van de dopamine-producerende hersencellen.

Een Italiaanse onderzoeksgroep heeft onderzoek gedaan binnen één familie waarin de ziekte van Parkinson veel voorkomt. In het artikel waarin dit onderzoek wordt beschreven, staat onder andere het volgende:

tekst-
fragment

Mensen uit deze familie bleken een fout in hetzelfde gen te hebben. Dat was een puntmutatie. Het veranderde basenpaar leidt bij die patiënten tot een ander aminozuur in het eiwit DJ-1. Het aminozuur proline werd ingebouwd op de plaats van een leucine. Dat verstoort de kokervorm (α -helix) die het eiwitmolecuul daar heeft.

naar: NRC Handelsblad

In het normale eiwit DJ-1 komt het fragment $\sim \text{Ala} - \text{Leu} - \text{Ala} \sim$ voor, in het afwijkende eiwit het fragment $\sim \text{Ala} - \text{Pro} - \text{Ala} \sim$. Dit zijn de aminozuren 165, 166 en 167 van het eiwit.

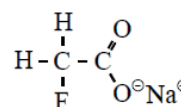
In het tekstfragment wordt verwezen naar de secundaire structuur van het eiwit: de 'kokervorm' of α -helix. Deze structuur wordt door een bepaalde soort bindingen in stand gehouden. Blijkbaar heeft het inbouwen van het aminozuur proline invloed op deze bindingen.

- 3p 4 ☐ Geef het fragment $\sim \text{Ala} - \text{Pro} - \text{Ala} \sim$ in een structuurformule weer.
- 2p 5 ☐ Leg mede aan de hand van deze structuurformule uit dat de aanwezigheid van proline op de plaats van leucine de 'kokervorm' van het eiwit kan verstoren. Noem in je uitleg ook de soort bindingen die de 'kokervorm' in stand houdt.

Examenopgave 2009-I

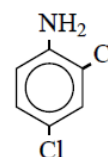
1080

1080 (ten-eighty) is de triviale naam van het natriumzout van fluorazijnzuur. 1080 is zeer giftig en wordt gebruikt als bestrijdingsmiddel tegen ongedierte. De structuurformule van 1080 is hiernaast afgebeeld.



In Nieuw-Zeeland wordt 1080 vaak gebruikt om schadelijke knaagdieren te bestrijden. Boven bebost gebied worden brokken lokaas met 1080 vanuit vliegtuigen over het terrein uitgeworpen. Eén van de risico's aan deze manier van verspreiden, is dat 1080 in rivieren en meren, en dus ook in het drinkwater terecht kan komen. Hierdoor kunnen ook mensen onbedoeld in aanraking komen met het gif.

Er is een aantal methoden ontwikkeld om gehalten aan 1080 in water te bepalen. Bij één van die methoden wordt gebruik gemaakt van een stof die wordt aangeduid met de afkorting DCA. De structuurformule van DCA is hiernaast afgebeeld.



- 3p **6** Geef de systematische naam van DCA.

Bij deze analysemethode laat men 1080 reageren met DCA en wordt de concentratie van het ontstane product bepaald. De laagste concentratie 1080 die men met deze methode kan meten, bedraagt $6 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

In Nieuw-Zeeland is de maximale concentratie waarin 1080 in het (drink)water mag voorkomen, vastgesteld op $2 \cdot 10^{-3}$ massa-ppm.

- 3p **7** Laat aan de hand van een berekening zien dat 1080 met de hierboven beschreven analysemethode kan worden aangetoond wanneer deze stof voorkomt in de maximaal toelaatbare concentratie in Nieuw-Zeeland. De dichtheid van (drink)water is $1,0 \cdot 10^3 \text{ g L}^{-1}$.

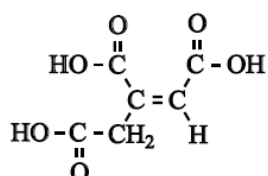
De giftigheid van 1080 komt voort uit het feit dat na inname van de stof de citroenzuurcyclus wordt geblokkeerd. De citroenzuurcyclus is een reeks van enzymatische omzettingen die een belangrijke rol speelt bij de energievoorziening in levende organismen. Door blokkade van de cyclus als gevolg van inname van 1080 komt de energievoorziening van het organisme in gevaar, wat de dood tot gevolg kan hebben. De reacties die optreden in de citroenzuurcyclus staan in Binas-tabel 68C.

Na inname van 1080 wordt deze stof in een aantal stappen enzymatisch omgezet tot de stof fluorcitraenzuur. Deze stof lijkt veel op citroenzuur. Het verschil tussen fluorcitraenzuur en citroenzuur is dat in een molecuul fluorcitraenzuur één fluoratoom aan een koolstofatoom is gebonden op de plaats waar in een molecuul citroenzuur een waterstofatoom aan een koolstofatoom is gebonden. Van fluorcitraenzuur bestaan verschillende stereo-isomeren, van citroenzuur niet.

- 3p **8** Geef de structuurformule van fluorcitraenzuur. Geef hierin met een sterretje aan welk koolstofatoom asymmetrisch is of welke koolstofatomen asymmetrisch zijn.

Onder normale omstandigheden wordt citroenzuur in de eerste twee stappen van de citroenzuurcyclus door het enzym aconitase omgezet tot isocitroenzuur. Als tussenproduct wordt hierbij een stof gevormd die *cis*-aconietzuur wordt genoemd. Aconietzuur is geen systematische naam; behalve *cis*-aconietzuur bestaat ook *trans*-aconietzuur.

Uit Binas-tabel 68C is af te leiden dat de structuurformule van *cis*-aconietzuur als volgt kan worden weergegeven:



Aconitase kan echter ook fluorcitoenzuur omzetten.

Om te onderzoeken welke stereo-isomeer van fluorcitoenzuur verantwoordelijk is voor de blokkade van de citroenzuurcyclus, liet men stereo-isomeren van deze stof reageren met het enzym aconitase.

Men vond dat één van de stereo-isomeren van fluorcitoenzuur door aconitase wordt omgezet tot een stof die wordt aangeduid met de naam 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur en dat geen verdere omzetting tot isocitroenzuur plaatsvindt.

- 2p 9 Geef de structuurformule van 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur. Ga ervan uit dat de plaatsaanduiding van een OH groep een lagere prioriteit heeft dan de plaatsaanduiding van een C = C binding.

Men neemt aan dat in een levend organisme uit de stof 1080 de stereo-isomeer van fluorcitoenzuur wordt gevormd die door aconitase wordt omgezet tot 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur. Dit 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur zorgt ervoor dat aconitase niet meer in staat is citroenzuur om te zetten (tot isocitroenzuur). Als gevolg daarvan komt de energievoorziening van het organisme stil te liggen en hoopt citroenzuur zich op. Beide effecten leiden tot de dood van het organisme. Het moleculaire mechanisme van de omzetting door aconitase van fluorcitoenzuur tot 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur is onderzocht. Dit onderzoek heeft uitgewezen dat per molecuul aconitase slechts één molecuul fluorcitoenzuur wordt omgezet tot een molecuul 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur.

- 2p 10 Geef een mogelijke verklaring voor het feit dat aconitase door de vorming van 4-hydroxy-*trans*-aconietzuur niet meer in staat is citroenzuur om te zetten. Maak hierbij gebruik van de gegevens uit het onderzoek naar het moleculaire mechanisme.

Examenopgave 2009-II

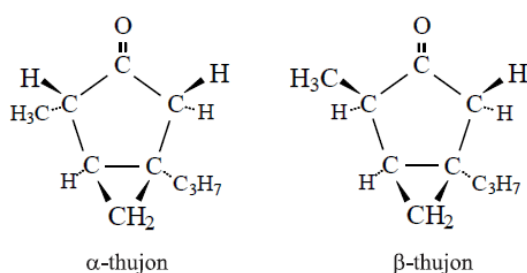
Absint

Absint is een sterk alcoholisch extract van diverse kruiden, waaronder alsem (*Artemisia absinthium*). De drank kreeg een slechte naam, doordat sommige drinkers tekenen van waanzin gingen vertonen of blind werden. Daarom is absint in veel landen lange tijd verboden geweest.

De genoemde gezondheidseffecten worden niet alleen veroorzaakt door het hoge alcoholgehalte. Rond 1900 werd ontdekt dat in absint ook de verbinding thujon voorkomt. In experimenten met proefdieren bleek deze stof schadelijke werkingen te hebben.

In de natuur komen twee soorten thujon voor: α -thujon en β -thujon.

Hieronder staan de ruimtelijke structuurformules van α -thujon en β -thujon.



De bindingen die zijn getekend met – liggen in het vlak van tekening, de bindingen die zijn getekend met $\blacktriangleright$ komen uit het vlak van tekening naar voren en de bindingen die zijn getekend met $\cdots$ liggen achter het vlak van tekening.

Met de groep C_3H_7 wordt de isopropylgroep bedoeld: $CH_3 - CH - CH_3$.

α -Thujon is een stereo-isomeer van β -thujon.

- 2p **6** Leg aan de hand van de structuurformules uit of een molecuul α -thujon het spiegelbeeld is van een molecuul β -thujon.
- 2p **7** Leg aan de hand van de structuurformules uit of α -thujon en β -thujon *cis-trans*-isomeren zijn.

Uit onderzoek is gebleken dat tijdens de stofwisseling van α -thujon en β -thujon een zogenoemde hydroxylering plaatsvindt. Bij hydroxylering worden één of meer OH groepen in het molecuul ingebouwd. Hydroxylering van thujon kan onder andere plaatsvinden aan de isopropylgroep. Hierbij wordt de C_3H_7 groep omgezet tot een C_3H_6OH groep. Deze omzetting kan worden opgevat als een redoxreactie.

- 3p **8** Geef de vergelijking van de halfreactie voor deze hydroxylering van thujon. In deze vergelijking komen onder andere H_2O en H^+ voor. Noteer in deze vergelijking thujon als $R - C_3H_7$ en het reactieproduct als $R - C_3H_6OH$.
- 1p **9** Leg aan de hand van de vergelijking van deze halfreactie van thujon uit of voor de hydroxylering van thujon een oxidator dan wel een reductor nodig is.

MOLECULE OF THE MONTH: MECHANOSENSITIVE CHANNELS

doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2008_11

We are remarkably resistant to changes in our surrounding environment.

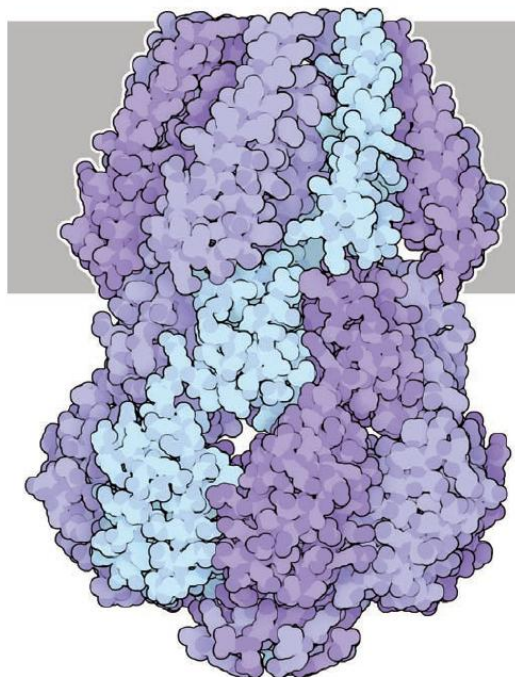
Our bulky bodies allow us to weather extremes of heat and cold, and our skin protects us if we go for a swim in fresh water or salty water. If things get too uncomfortable, we can always get up and walk away, finding a warmer or cooler or drier place. Bacteria don't have as many options. They are tiny and they are immersed in water, so changes in the environment can pose life-threatening challenges.

For instance, if it rains they may be suddenly surrounded by fresh water. This is dangerous because the water seeps into the cell through osmosis and increases the pressure inside. At other times, the bacterium may be shifted suddenly to salty conditions, which pulls water out and dehydrates the cell. Bacteria have methods for resisting these changes, so they can keep a steady, comfortable osmotic pressure inside.

Under Pressure

Bacteria control their internal pressure by changing the concentration of molecules inside. If they are placed in salty conditions, they resist dehydration by transporting ions into the cell and by synthesizing more small molecules. However, if they are placed in pure water, they must reduce their inner concentration of ions and small molecules. In that case, they use mechanosensitive channels that open and allow small molecules to leak out.

For instance, in laboratory tests, cells that are placed in fresh water rapidly lose more than 95% of small molecules like amino acids, sugars, and potassium ions. However, they keep their proteins or ribosomes safely inside, so they recover quickly and can start up protein synthesis minutes after the conditions return to normal.



Pressure Valve

Mechanosensitive channels respond to pressure inside the cell, opening when it gets to dangerous levels. They sense this pressure by sensing changes in the properties of the membrane. When the membrane is stretched by high internal pressures, it triggers the conformational change that opens the channel. The cell has several different channels that open at different levels of pressure. The MscS channel shown here (PDB entry 2oau) opens at low and moderate pressures, and the one on the following page opens at higher pressures.

Small Channel

MscS, the mechanosensitive channel of small conductance, is composed of seven identical chains arranged to form a tube. A portion of it crosses the membrane and forms a pressure-sensitive pore about 13 Angstroms in diameter. This is just big enough to pass small molecules and ions. The cytoplasmic portion (shown at the bottom here) forms a cap over the pore, creating an antechamber that limits the size of molecules that can reach the pore when it opens.

About the RCSB PDB Molecule of the Month

Using selected molecules from the PDB archive, each feature includes an introduction to the structure and function of the molecule, a discussion of its relevance to human health and welfare, and suggestions for viewing and accessing further details.

The RCSB PDB Molecule of the Month is read by students, teachers, and scientists worldwide at www.pdb.org.

This edition was written and illustrated by David S. Goodsell (RCSB PDB and The Scripps Research Institute).

RCSB Protein Data Bank

The Protein Data Bank (PDB) is the single worldwide repository for the processing and distribution of 3D structure data of large molecules of proteins and nucleic acids. The RCSB PDB is operated by Rutgers, The State University of New Jersey and the San Diego Supercomputer Center and the Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences at the University of California, San Diego—two members of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB).

It is supported by funds from the National Science Foundation, the National Institute of General Medical Sciences, the Office of Science, Department of Energy, the National Library of Medicine, the National Cancer Institute, the National Center for Research Resources, the National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, the National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases.

The RCSB PDB is a member of the worldwide PDB (www.pdb.org).

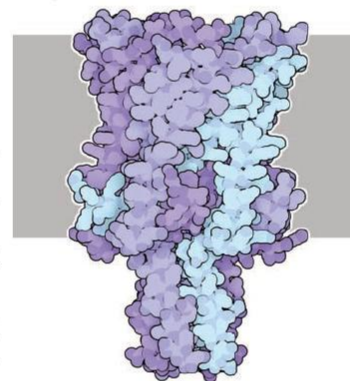
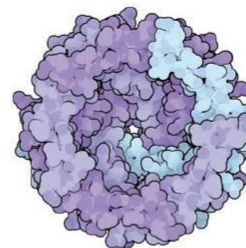
Topics for Further Exploration

1. Several other membrane channels are composed of identical protein subunits arranged to form a tube. Can you find other examples in the PDB?
2. The potassium channel is highly specific, allowing passage of potassium ions, whereas mechanosensitive channels allow passage of many types of ions and small molecules. What aspects of these structures lead to these different functional characteristics?

MECHANOSENSITIVE CHANNELS

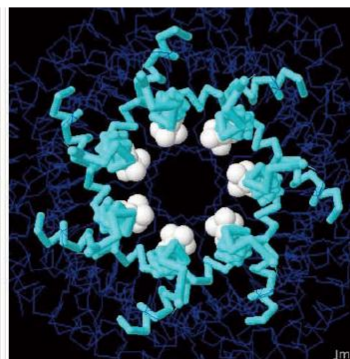
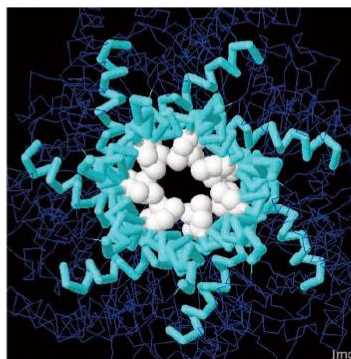
Large Channel

MscL, the mechanosensitive channel of large conductance (PDB entry [2oar](#)), comes into play in dire emergencies, when the pressure gets so high that the cell might burst. It opens to form a larger pore than the MscS channel with an opening of 30-40 Angstroms. It is composed of five identical chains that open like a camera iris when the cell membrane is stretched tightly. The structure shown here is the closed form. To see models of the opening of this channel, take a look at the related page at Proteopedia.



Exploring the Structure

You can see MscS in action in two PDB files: the closed form is shown on the left from PDB entry [2oau](#), and the open form is shown on the right from PDB entry [2vv5](#). In both pictures, we are looking down the pore. Two leucine amino acids in each chain, shown in white, form a circular gate that blocks passage in the closed form. It may look like this ring of amino acids is open enough to allow passage, but since these amino acids are so hydrophobic, they actually block the movement of water molecules. This ring has been termed a "vapor seal" because of this resistance to wetting by water.



Additional Reading:

- C.S. Gandhi, D.C. Rees (2008) Opening the molecular flood-gates. *Science* 321: 1166-1167.
 I.R. Booth, M.D. Edwards, S. Black, U. Schumann, S. Miller (2007) Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nature Reviews Microbiology* 5: 431-440.
 A. Anishkin, C. Kung (2005) Microbial mechanosensation. *Current Opinion in Neurobiology* 15: 397-405.
 C. Kung (2005) A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436: 647-654.

E. Perozo, D. C. Rees (2003) Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 432-442.

References:

- [2oau](#) and [2oar](#): S. Steinbacher, R. Bass, P. Strop, D.C. Rees, (2007) Structures of the Prokaryotic Mechanosensitive Channels MscL and MscS. *Current Topics in Membranes* vol 58.
[2vv5](#): W. Wang, S.S. Black, M.D. Edwards, S. Miller, E.L. Morrison, W. Bartlett, C. Dong, J.H. Naismith, I.R. Booth, (2008) The structure of an open form of an *E. coli* mechanosensitive channel at 3.45 Å resolution. *Science* 321: 1179.

Bronnen

1. http://nl.wikipedia.org/wiki/Bestand:Paul_Ehrlich.png
- 2.
- 3.
4. *Proc. R. Soc. Lond.* 1 January 1899 vol. 66 no. 424-433 424-448
5. Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW, *Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. JAMA.* 1999;281(1):61-66
6. <http://www.georg-speyer-haus.de/>
- 7.
- 8.
9. Adam P. Silverman, Weiming Bu, Seth M. Cohen, and Stephen J. Lippard, 2.4-Å Crystal Structure of the Asymmetric Platinum Complex Pt(amine)(cyclohexylamine)}²⁺ Bound to a Dodecamer DNA Duplex, , *December 20, 2002 The Journal of Biological Chemistry*, 277, 49743-49749.
10. Uit: A Manual Of Physiology, Gerald F. Yeo, P. Blakiston, Son & Co. ,1889
- 11.
12. http://www.bio.brandeis.edu/classes/biochem104/hydrophobic_effect.pdf
13. <http://www.btinternet.com/~martin.chaplin/hbond.html#bj>

figuur p. 13: Drugs and drug targets: an overview

<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199234479/ch01.pdf><http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199234479/ch01.pdf>

vraag amphotericine http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.php

Maciej Baginski, Haluk Resat, Edward Borowski, Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1567, 23 December 2002, Pages 63-78

Figuren hfdst 5: NCBI Bookshelf Stryer e.a., biochemistry/ Alberts e.a, Molecular biology of the cell

23. Enhanced Permeability and Retention-effect: naar , Torchilin VP. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *AAPS Journal*. 2007; 9(2): Article 15. DOI: [10.1208/aapsj0902015](https://doi.org/10.1208/aapsj0902015)
- 24.
- 25.
26. A. KOÇER, A Remote Controlled Valve in Liposomes for Triggered Liposomal Release, *Journal of Liposome Research*, 17:219-225, 2007
- 27.
28. Xiaogang Pan & Robert J. Lee, Tumour-selective drug delivery via folate receptor-targeted liposomes, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2004) 1 (1):7-17

Computerpractica A en B zijn ontwikkeld door R. Stienstra. Opgenomen in (nog niet gecertificeerde) NLT-module Eiwitkristallografie.

Overige bronnen:

Martha Marquardt, "Paul Ehrlich", uitgeverij Henry Schuman, New York, 1951

J. Parascandola, "The theoretical basis of Paul Ehrlich's Chemotherapy", *Journal of the History of Medicine*, jan. 1981

A.M. Silverstein, "Paul Ehrlich's Passion: The Origins of His Receptor Immunology", *Cellular Immunology* **194**, 213-221 (1999)

Article ID cimm.1999.1505, available online at <http://www.idealibrary.com>

F.H. Kasten, "PAUL EHRLICH: Pathfinder in Cell Biology 1. Chronicle of His Life and Accomplishments in Immunology", *Cancer Research, and Chemotherapy', BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY*, Volume 71, 1, 1996

A. Sakula, "Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882", *Thorax* 1982;37:246-251

E. Knecht, "The Chemistry of the Coal-tar Colours", R. Benedikt, London, Georg Bell & Sons, 1869

Charles Tanford, "The Hydrophobic Effect: Formation Of Micelles And Biological Membranes", J. Wiley & Sons, 1973

Todd P. Silverstein, "The Real Reason Why Oil and Water Don't Mix", *Journal of Chemical Education* • Vol. 75 No. 1 January 1998

Langmuir, I., "The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II", *J. Am. Chem. Soc.*, 1917, xxxix, 1848.

E Gorter and F Grendel. "On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood." *Journal of Experimental Medicine*, (1925) 41. 439-443.

Edidin M., "Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers", *NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY* VOLUME 4 | MAY 2003

Mahendra Kumar Jain, "Introduction to the Complexities of Membrane Structure", *Journal of Chemical Education*, Volume 50, Number 9. September 1973

Weijun Li, "Lipid formulation: successful stories and prospective future", *Trends In Bio/Pharmaceutical Industry* | 3-2006

M. SAEED ARAYNE AND NAJMA SULTANA, " NANOPARTICLES IN DRUG DELIVERY FOR THE TREATMENT OF CANCER", *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2006, Vol.19(3), 258-268

Costas Kaparissides, Sofia Alexandridou, Katerina Kotti and Sotira Chaitidou, "Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems", *Journ. of Nanotech. Online*, March 25th, 2006
