

AMINOSÄUREN UND PROTEINE

Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles:

Prinzipien der chemischen Bindung, isoelektrischer Punkt, pH-Stabilität durch Pufferung, Chemie des Ammoniaks (sowie der Amine und Amide), funktionelle Gruppen und deren Reaktivität (z. B. Aktivierung von Biomolekülen für Synthesen und Säureamidbindung), Einteilung und Strukturformeln der proteinogenen Aminosäuren.

Schlüsselwörter:

Struktur: Wiederholung der Einteilung und Strukturformeln der proteinogenen Aminosäuren (inkl. ihres isoelektrischen Punktes); biomedizinische Bedeutung ihrer funktionellen Gruppen in Proteinen (z. B. Hydroxylgruppen als Akzeptor für Substitutionen).

Stoffwechsel: Prinzipien des Aminosäurestoffwechsels: Transaminierung, Decarboxylierung mit Bildung biogener Amine (u. a. Catecholamine/Histamin), oxidative Desaminierung; Einteilung in glukogene/ketogene Aminosäuren und Abbauwege der proteinogenen Aminosäuren; pathobiochemische Aspekte (insbesondere Ahornsirupkrankheit, Albinismus, Alkaptonurie, Homocystinurie, Phenylketonurie (hier Bedeutung des Tetrahydrobiopterin) sowie Nachweis von Folsäuremangel), Ammoniakbildung und -entgiftung (Glutamin-Synthese, Glutamatdehydrogenase-reaktion, Synthesen von Carbamoylphosphat, Harnstoffzyklus).

Peptide und Proteine: Peptidbindung (Chemie und Bedeutung für die Sekundärstruktur von Proteinen, ihre Bildung in der Proteinbiosynthese mit Berücksichtigung der Aminosäureaktivierung und Übertragung auf tRNA); Isopeptidbildung; biologisch wichtige Peptide (Glutathion, Endorphine); Sequenzierung von Proteinen, ko- und posttranslationale Modifikationen von Proteinen: Anheftung von Ubiquitin, N-Glykosylierung (Haupttypen der N-Glykane (Abb. 1 im Anhang)*, Dolicholpyrophosphat, Prozessierung der übertragenen Glykankette im ER und im Golgiapparat, Funktion von N-Glykanketten im endoplasmatischen Retikulum in der Qualitätskontrolle), O-Glykosylierungen, Hydroxylierung (Prolin/Lysin in Kollagenbiosynthese und Tripelhelixbildung, Mechanismus unter Berücksichtigung von Vitamin C und O₂, Skorbut – Vergleich zur Hydroxylierung von Phenylalanin), Phosphorylierung, Sulfatierung (inkl. Nutzung von PAPS als Substrat), Methylierung und Acetylierung von Aminosäuren am Beispiel der Histone (Bedeutung für die Genregulation).

Literatur:

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“;

* Abbildung 3 aus Kapitel 6 („The Sugar Code“, Hrsg. H.-J. Gabius; frei auf Webseite des Buches und als Anhang hier verfügbar).

1. Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Vorbemerkung:

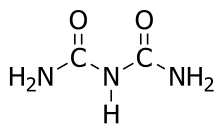


Abb. 1: Biuret

Serum (flüssiger Anteil des Blutes, den man als Überstand erhält, wenn man eine geronnene Blutprobe zentrifugiert) besteht aus einem komplexen Gemisch von ca. 200 (Glyko)proteinen. Der quantitative Nachweis des Proteingehalts erfolgt häufig anhand von

Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffs korreliert direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen und kann in einem Spektralphotometer gemessen werden. Eine, auch in der Labordiagnostik verwendete Proteinbestimmungsmethode ist der *Biuret-Assay*, dessen Bezeichnung auf eine Farbreaktion mit gelöstem Biuret (Carbamoylharnstoff, Abb. 1) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu zurückzuführen ist. Es entsteht ein hellblauer Farbkomplex zwischen den Cu^{2+} -Ionen und je zwei Biuret-molekülen. Die Reaktion ist typisch für Verbindungen mit mindestens zwei CO-NH-Gruppen (Peptidbindungen) und kann daher für den kolorimetrischen Nachweis von Peptiden und Proteinen verwendet werden (siehe Abb. 2). Peptidbindungen ersetzen dabei die Biuret-moleküle (Ligandenaustauschreaktion), daraus resultiert ein Farbumschlag nach blauviolett.

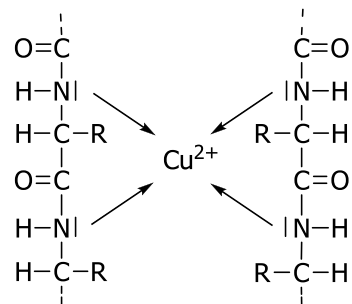


Abb. 2: Der farbige Protein- Cu^{2+} -Komplex, der bei der Biuret-Reaktion entsteht.

Aufgabe:

In einer Serumprobe ist der Gesamtproteingehalt zu bestimmen und in g/100 ml anzugeben.

Prinzip:

Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Kupferionen einen blauvioletten Farbkomplex. Die Intensität der Farbe ist der Proteinkonzentration proportional und wird im Photometer bei 546 nm bestimmt.

Durchführung:

Folgende Versuchsansätze werden benötigt:

	Küvette mit Leerwert	Küvette mit Standardlösung	Küvette mit Probenlösung
Biuret-Lösung	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Plasmaprobe	-	-	20 µl
Standardlösung (6 g BSA* in 100 ml)	-	20 µl	-

* BSA = bovines Serumalbumin

Nach 30 min werden die Extinktionswerte am Photometer abgelesen.

Auswertung:

Der Gesamtproteingehalt der Serumprobe wird mithilfe der angegebenen Konzentration der Standardlösung, sowie der gemessenen Extinktionswerte von Proben- und Standardlösung berechnet.

2. Reinigung von rekombinanten Proteinen

Überlegen Sie sich die Bedeutung der Begriffe: rekombinant, Fusionsproteine, Proteinengineering.

Vorbemerkung:

Green Fluorescent Protein (GFP):

Das Green Fluorescent Protein (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die Besonderheit des Proteins besteht darin, dass es nach entsprechender Anregung (Exzitation) Energie in Form von Licht emittiert. GFP hat eine fass („barrel“-)ähnliche Struktur in dessen Inneren die Aminosäuren Serin65, Tyrosin66 und Glycin67, die das ‚Chromophor‘ bilden, liegen (Abb. 3).

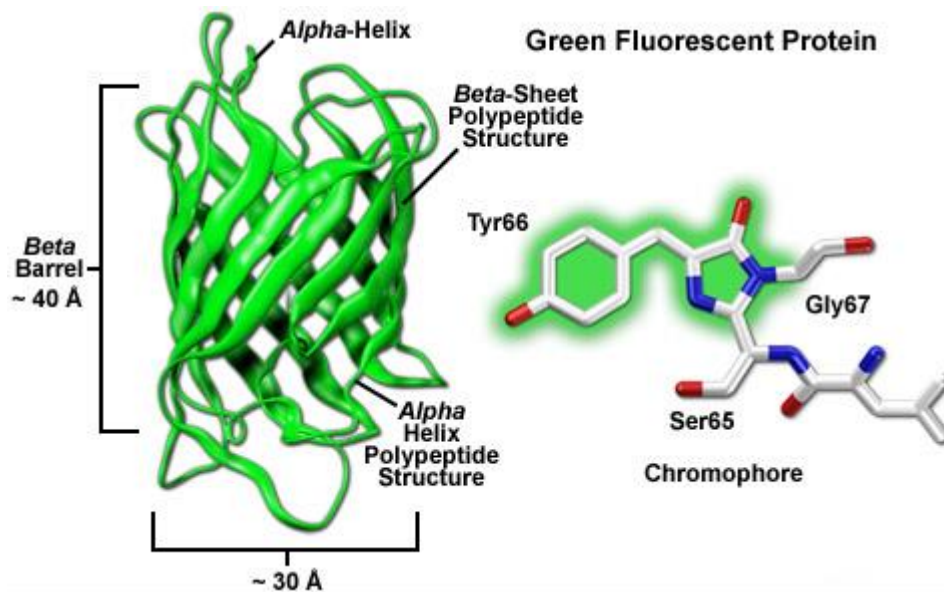


Abb. 3: Struktur des GFP mit hervorgehobenem Chromophor. (Quelle: Zeiss)

Im korrekt gefalteten GFP erfolgt die spontane Bildung des Chromophors aus dem Tripeptid in einer Drei-Schritt-Reaktion. Zunächst greift der nukleophile Stickstoff der Aminogruppe des Glycin67 den elektrophilen Kohlenstoff der Carbonylgruppe des Serin65 an, so dass es zu einer Ringbildung kommt, worauf eine Dehydrierung folgt (Abb. 4). Anschließend wird die C α -C β -Bindung des Thyrosin66 zu einer Doppelbindung oxidiert (Abb. 4). Das Chromophor besitzt zwei Absorptionsmaxima, die

aus der protonierten (397 nm) und deprotonierten (475 nm) Form resultieren. Für die Fluoreszenzemission bei 509 nm ist nur der deprotonierte Zustand verantwortlich.

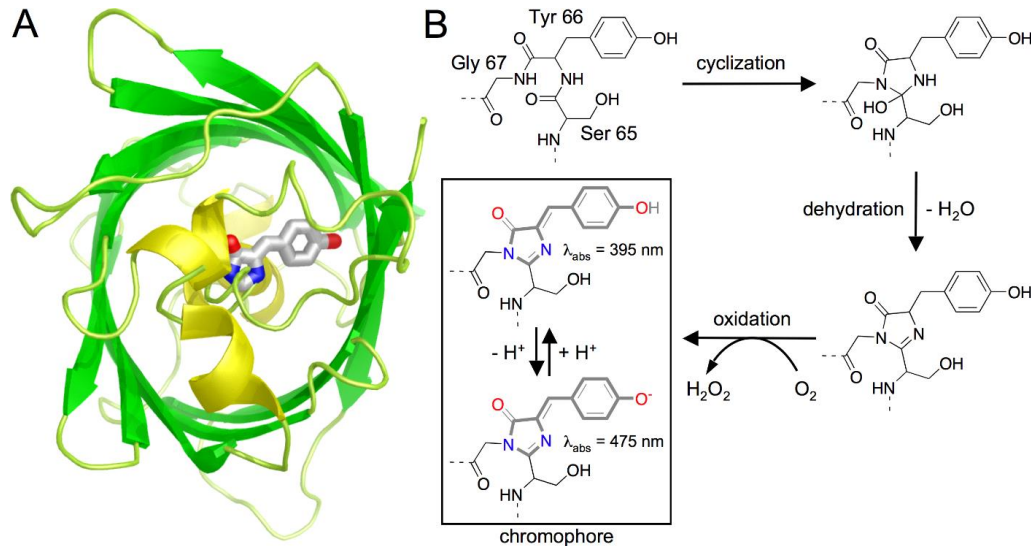


Abb. 4: **A)** Molekulare Struktur des GFP in der Aufsicht. Das Chromophor ist in der Mitte dargestellt. PDB ID [1EMA](#) **B)** Darstellung des Mechanismus in dem aus dem Tripeptid Serin65, Tyrosin66 und Glycin67 das fluoreszierende Chromophor wird (Heim et al. 1994). Quellen: Robert E. Campbell (2008), Scholarpedia, 3(7):5410

GFP lässt sich auf Grund seiner fluoreszierenden Eigenschaft für Nachweisreaktionen nutzen. Beispielsweise kann aus GFP und dem zu untersuchenden Protein gentechnisch ein Fusionsprotein erzeugt werden, so dass sich dessen Produktion nachweisen lässt. Eine andere Anwendungsmöglichkeit ist der Nachweis von fluoreszenz-markierten Proteinen in bestimmten Geweben oder Zellstrukturen.

Mittels „proteinengineering“ wurden weitere Varianten der fluoreszierenden Proteine hergestellt, wie B(blue)FP (Heim et al., 1994, 1996), C(cyan)FP (Heim et al., 1996; Tsien 1998) Y(yellow)FP (Ormo et al., 1996; Wachter et al., 1998).

Zur Herstellung des im Versuch verwendeten rekombinanten GFP wird die kodierende Nukleinsäuresequenz in einen geeigneten bakteriellen Expressionsvektor eingefügt und N-terminal mit einem Hexahistidin-Tag (His-Tag) versehen. Dieser wird in einen passenden Bakterienstamm eingebracht, der Stamm kultiviert und über Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) die Expression von GFP induziert. Nach 16 h Wachstum werden die Bakterienzellen geerntet und mittels

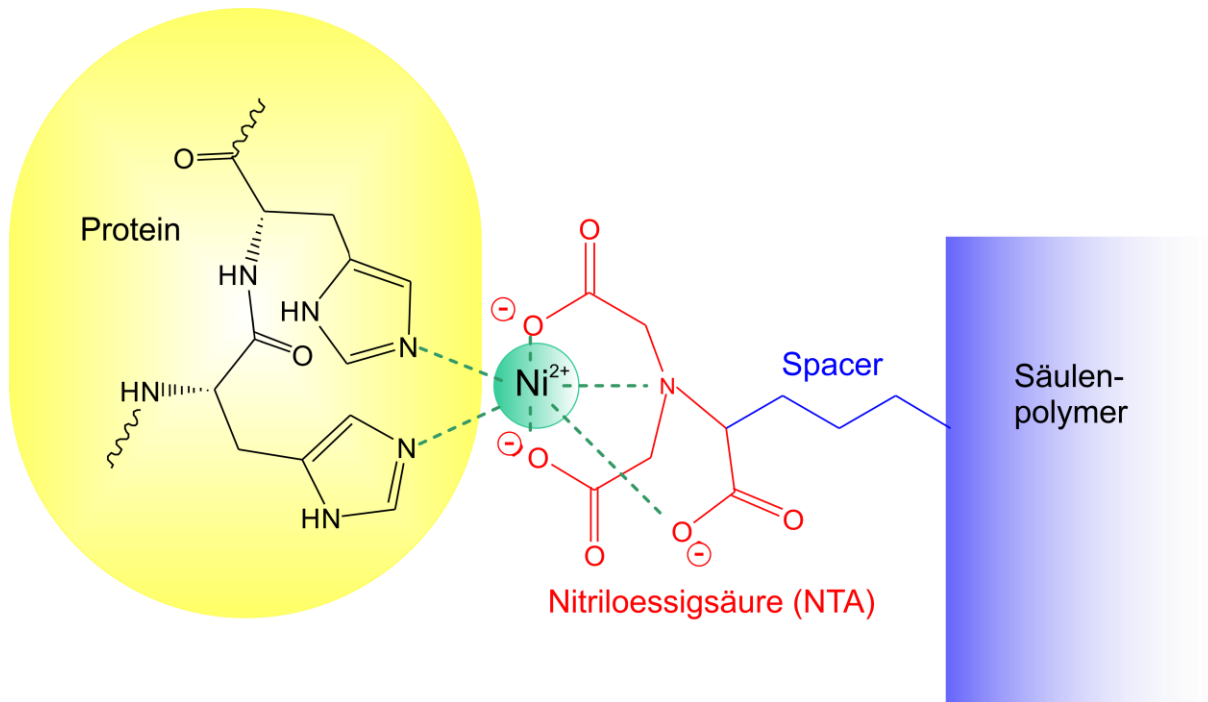
Ultraschall aufgeschlossen, so dass das Bakterienlysat vorliegt. Diese Mischung wird für die Durchführung der Chromatographie genutzt.

Affinitätschromatographie:

Affinitätschromatographie gehört neben Gelfiltrations- und Ionenaustauschchromatographie zu den klassischen säulenchromatographischen Verfahren, die dazu dienen, bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren. Grundlage für die Affinitätschromatographie ist die spezifische und reversible Bindung eines Moleküls an einen Liganden, der kovalent an chemische Gruppen der stationären Phase (Gelkugeln aus Agarose oder Dextrane) gekoppelt ist. Die Elution (Freisetzung des spezifisch gebundenen Proteins) wird i.d.R. durch kompetitive Verdrängung des im Überschuss zugegebenen freien Liganden erreicht.

Die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) ist eine besondere Art der Affinitätschromatographie, bei der eine metall-chelatierende Gruppe an die stationäre Phase gekoppelt ist. An diese Gruppen können Aminosäuren, insbesondere Histidinreste, binden. Die am häufigsten genutzten Metalle sind Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} . Die hier verwendete Nickel-Affinitätschromatographie nützt die Tatsache aus, dass Proteinmotive mit mehreren Histidin-Resten hintereinander (dem oben erwähnten His-Tag) an Materialien mit Nickel-Chelaten binden.

Für die Isolierung dieser Fusionsproteine wird z.B. Sepharose verwendet, die Ni^{2+} , gebunden an Nitrilotriessigsäure (NTA), enthält (Abb. 5). Die Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (NTA-Ni) wird mit Proteinen beladen, die ein Sequenzmotiv aus sechs Histidin-Resten (His-Tag siehe oben) tragen. Durch einen Imidazol-Gradienten kann das Protein von der Säule eluiert werden.



© *Physiologische Chemie*

Abb.5: Der Protein-Nickel-Chelatkomplex. Ni²⁺ kann im Austausch gegen Wasser mit zwei His-Resten des Proteins interagieren. Eluiert wird bei diesem Verfahren in den meisten Fällen mit einem Imidazol-Gradienten. Auch über eine Veränderung des pH-Wertes kann das Protein von der Säule eluiert werden, was aber bei pH-empfindlichen Proteinen mitunter zu einer Denaturierung des Proteins führen kann.

Im nachfolgenden wird der Ablauf der Affinitätschromatographie von Proteinen erläutert. Im ersten Schritt wird das Bakterienlysat auf die Säule gegeben und passiert das Material, um die Proteine an die stationäre Phase der IMAC zu assoziieren. Danach wird die Säule proteinfrei gewaschen. Im letzten Schritt erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteinmoleküls durch kompetitive Verdrängung.

Aufgabe:

Aus einem Bakterienlysat wird selektiv das mit His-Tag versehene GFP an die stationäre Phase eines HIS-Select® HF Nickel Affinity Gels gebunden. Durch die Zugabe von Imidazol in die Pufferlösung (mobile Phase) werden die gebundenen Proteine wieder freigesetzt (eluiert).

Durchführung:

Zunächst wird die Pufferlösung in der Säule (a) bis zur oberen Grenze der stationären Phase aus der Säule gelassen (optimal: der Meniskus der Flüssigkeit berührt das Gelbett). Die Probe (b) wird vorsichtig auf das Gelbett aufgetragen. Nach dem Einsickern der Probe (die Säulen dürfen nicht trockenlaufen!) wird die Säule mit dem Waschpuffer (c) gewaschen. Im Anschluss wird auf das Gelbett Elutionspuffer (d) aufgetragen und mehrere mL des Eluats gesammelt. Anschließend wird die Regeneration (e) der Säule durchgeführt. Nach Durchfluss der Äquilibrungslösung (f) ist das Gelbett (ca. 1 cm Äquilibrungslösung bedeckt das Gelbett) für einen neuen Zyklus bereit. Jede Fraktion ist in den vorbereiteten Röhrchen separat aufzufangen und für die weiteren Versuche (siehe 3. Gelelektrophorese, Abb. 7) aufzubewahren.

HIS-Select HF Nickel Affinity Gel (1 ml)		
	Lösung	Volumen
Gelbett (a)	20 mM Tris-HCl-Puffer, 500 mM NaCl, pH 8	
Probe (b)	Bakterienlysats in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 500 mM NaCl, pH 8	1 ml
Waschen (c)	20 mM Tris-HCl-Puffer, 500 mM NaCl, pH 8	3 x 10 ml
Eluat (d)	20 mM Tris-HCl-Puffer, 500 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH 8	5 x 1 ml
Regeneration (e)	20 mM Tris-HCl-Puffer, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8	15 ml
Äquilibration (f)	20 mM Tris-HCl-Puffer, 500 mM NaCl, pH 8	20 ml
Die jeweilige Fraktion wird aufgefangen (beachten Sie die beschrifteten Röhrchen!) und aufbewahrt!		

Auswertung:

Wie unterscheidet sich das Prinzip der Affinitätschromatographie von dem der Ionenaustauschchromatographie?

Aliquots der Fraktionen werden für die Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (siehe unten, Abb. 7) verwendet.

Überlegen Sie sich welche Aussagen Sie mithilfe des in Abb. 7 gezeigten SDS-Gels treffen können?

3. Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)

Vorbemerkung:

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Auf diesem Phänomen basiert eine leistungsfähige Methode zur Trennung von Proteinen und anderen Makromolekülen (u. a. DNA, RNA). Unterschiedliche Ladungen und Größe der Teilchen bewirken eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Ein Substanzgemisch wird dabei in einzelne Zonen aufgetrennt. Elektrophoretische Trennungen führt man in unterschiedlichen Medien durch. Dabei gibt es folgende Möglichkeiten:

- a. In Lösung: in offenen Kapillaren oder dünnen Pufferschichten (trägerfreie Elektrophorese) werden die Probenkomponenten hauptsächlich aufgrund der Ladungsunterschiede getrennt. Da bei der Elektrophorese Joulesche Wärme entsteht, können thermische Strömungen (Konvektion) die Trennung stören.
- b. In stabilisierenden (antikonvektiven) Matrices: antikonvektive Membranen (z. B. aus Celluloseacetat) oder Gele (z. B. aus Agarose oder Polyacrylamid) wirken Verbreiterungen von Zonen, die durch Konvektion verursacht werden, entgegen. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Teilchen werden in diesen porösen Matrices je nach Größe unterschiedlich verzögert (retardiert), so dass sie von der Größe und der Ladung abhängig sind. Zudem werden Auflösung und Trennschärfe verbessert.

Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) ist ein anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladung der Proteine so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein). Dieses Prinzip kann u.a. zur Bestimmung der molaren Masse von Proteinen genutzt werden. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuß an SDS auf 95 °C erhitzt. Dies hat zur Folge, dass die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch die Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierend

wirkenden Thiolverbindung, wie z. B. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), gespalten. Als Trägermedium wird das chemisch inerte Polyacrylamid verwendet, das in einer Kopolymerisationsreaktion (siehe Abb. 6) aus Acrylamid und dem quervernetzenden Reagenz, N,N' -Methylenbisacrylamid (Bis) hergestellt wird. Der Vernetzungsgrad C in der Gelmatrix wird bei der Routineanwendung konstant bei ca. 3% gehalten. In diesem Fall werden die Porendurchmesser durch die steigende Totalacrylamidkonzentration T kleiner. Ein Gel mit 5% T hat einen Porendurchmesser von ca. 5,3 nm, eines mit 20% T von ca. 3,3 nm. Die negative Ladung des SDS „maskiert“ die ursprüngliche Ladung des Proteins, so dass zwei Proteine gleicher Masse, die identische Mengen an SDS-Molekülen gebunden haben, im elektrischen Feld gleichweit wandern. Im Polyacrylamidgel werden die Proteine dann nach ihrer Masse aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen mit kleiner Masse wird nicht so stark verzögert wie die von Proteinen mit großer Masse: deswegen legen sie eine größere Wegstrecke zurück. Wegen der hohen Auflösung, die mit der diskontinuierlichen Elektrophorese erreicht werden kann, wird standardmäßig (*auch im experimentellen Teil der Übung!*) für Proteintrennungen ein von U.K. Laemmli eingeführtes SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycinpuffersystem eingesetzt. Die Gelmatrix besteht dabei aus einem kurzen weitporigen Sammelgel und einem daran anschließenden längerem engporigen Trenngel. Durch die im Sammelgel erzielte Konzentrierung der zu trennenden Proteine in einer scharfen Bande wird im Trenngel eine optimale Zonenbildung erreicht (*siehe Anhang: Disk-Elektrophorese*).

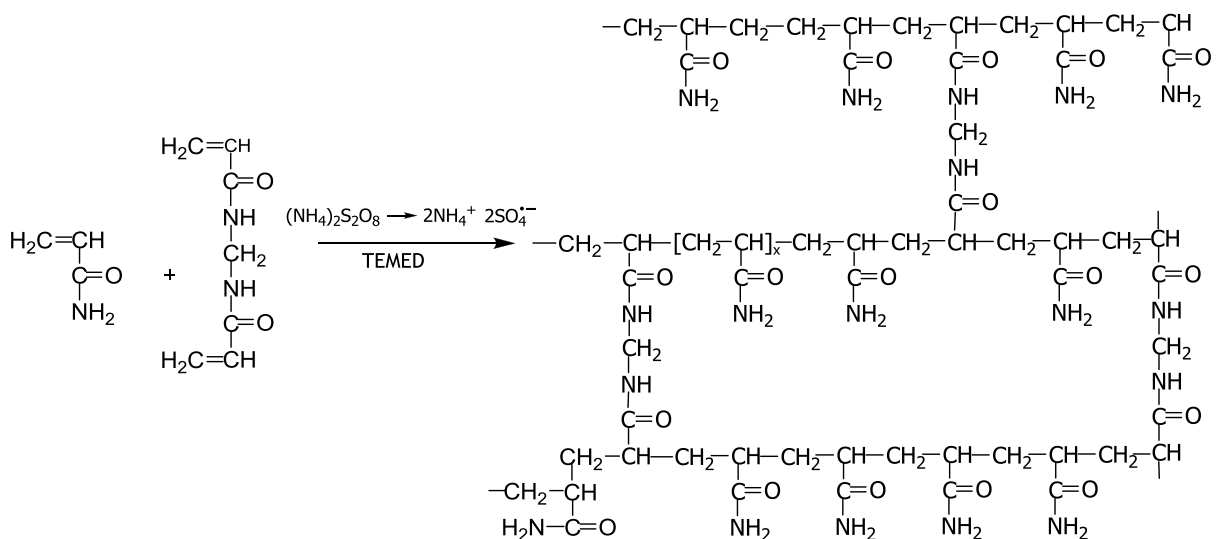


Abb. 6: Struktur eines Polyacrylamidgels. Durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Quervernetzer N,N' -Methylenbisacrylamid erhält man ein transparentes Gel.

Als Initiator dient das Persulfat-Anionradikal, das aus Ammoniumperoxodisulfat entsteht, als Katalysator der Reaktion N,N,N'-N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Prinzip:

Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel mit 0,1% SDS erhält man über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der molaren Masse und den Wanderungsstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen. Mithilfe von Standardproteinen bekannter molarer Massen lassen sich die molaren Massen der zu analysierenden Proteine ermitteln. Bei Gelen mit konstanten T-Werten erstreckt sich die Linearität über einen begrenzten Bereich, der vom Größenverhältnis Molmasse zu Porendurchmesser bestimmt ist. Exakt ermitteln lassen sich jedoch nur die Molmassen von Untereinheiten (Monomere), die durch Spaltung von Disulfidbrücken entstanden sind.

Durchführung:

Zunächst wird das Elektrophoresesystem Protean II der Fa. BioRad (München) erklärt. Das polymerisierte SDS-Gel wird vom Kursassistenten zur Verfügung gestellt. Es besteht aus einem Sammelgel (4% g/v Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1); 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,01% Ammoniumperoxodisulfat; 0,05%-0,1% TEMED), das nach ca. 1,5 cm Laufstrecke in ein Trenngel (12% g/v Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1); 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,01% Ammoniumperoxodisulfat; 0,05%-0,1% TEMED) übergeht. Um ein gefärbtes SDS-Gel (siehe Abb. 7) mit aufgetrennten Proteinen zu erhalten (dazu werden die unter 2. erhaltenen Proben verwendet), werden folgende Schritte durchgeführt:

a) Vorbereitung der Proben:

	Bakterienlysat	Durchlauf	Waschfraktion I	Waschfraktion II	Waschfraktion III	Eluat I	Eluat II	Eluat III	Eluat IV	Eluat V
Probe	5 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
PBS	15 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AP	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Die Proben werden 5 min bei 95 °C erhitzt.

Auftragspuffer: 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 50% (w/v) Saccharose; 10% (w/v) SDS; 2,8 M β-Mercaptoethanol; 0,001% (w/v) Bromphenolblau

b) Elektrophorese:

Der Laufpuffer (20 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,05% SDS, ca. 400 ml) wird in die Gelkammer gefüllt und die Proben werden mithilfe einer Eppendorf Research Pipette (einstellbares Volumen: 1-10 µl) in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Die Gelkammer wird an ein Spannungsgerät angeschlossen und die Elektrophorese bei 200 Volt konstanter Spannung durchgeführt bis die mit Bromphenolblau gefärbten Proben den unteren Gelrand erreicht haben.

c) Färbung/Entfärbung:

Die Färbung des Gels erfolgt in Coomassie-Lösung (0,25% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau-R250; 45% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure). Nach zwei- bis dreistündiger Lagerung des Gels in der Entfärbelösung (45% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure) heben sich die deutlich blau gefärbten Proteinbanden vom leicht bläulich gefärbten Hintergrund ab.

Auswertung:

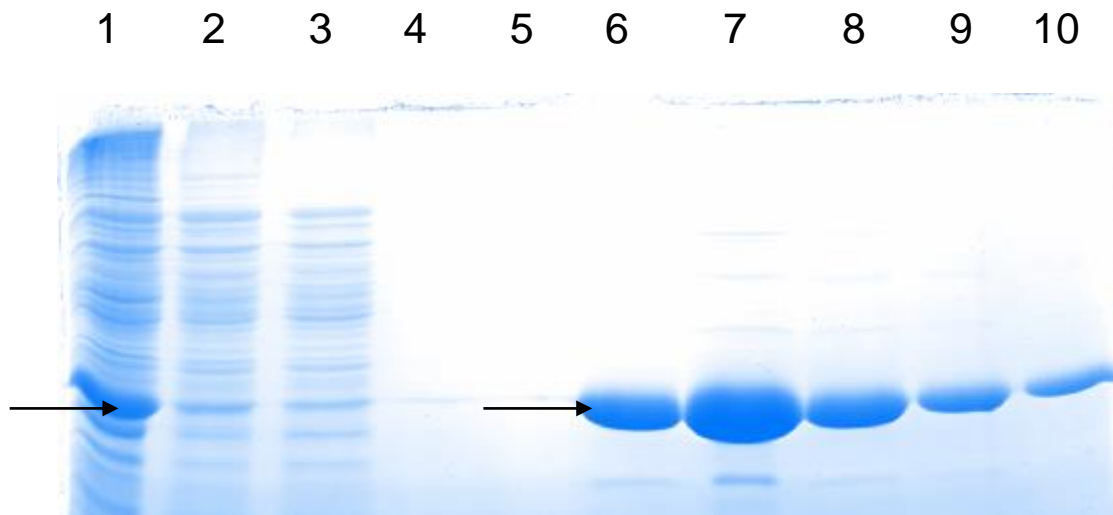


Abb. 7: SDS-Polyacrylamidgel, gefärbt in Coomassie-Lösung (Zusammensetzung siehe oben). **1**, Bakterienlysat, **2**, Durchlauf, **3**, Waschfraktion I, **4**, Waschfraktion II, **5**, Waschfraktion II, **6**, Eluat I, **7**, Eluat II, **8**, Eluat III, **9**, Eluat IV, **10**, Eluat V. (GFP mit Pfeil markiert).

Aufgabe (Berechnung ist zum Kurstag mitzubringen):

Um die molaren Massen der aufgetrennten, unbekannt Proteine zu ermitteln (Abb. 8), werden die Laufstrecken der Standardproteine mit ihren bekannten molaren Massen in cm gemessen und diese Werte in einem Koordinatensystem auf der Abzisse (x-Achse) aufgetragen. Demgegenüber werden die bekannten molaren Massen der Standardproteine logarithmisch (Zehnerlogarithmus, log) transformiert und die erhaltenen Werte in Bezug zur Laufstrecke auf der Ordinate (y-Achse) eingetragen. Mithilfe der eingezeichneten Geraden (bitte durch möglichst viele Messpunkte führen!) und den Laufstrecken der Probenproteine in cm werden die entsprechenden logarithmisch transformierten Werte der molaren Massen ermittelt, diese werden entlogarithmiert und man erhält dann die molaren Massen in Da. Tragen Sie die gemessenen und die berechneten Werte in die angefügte Tabelle ein. *Tipp: Ziehen Sie eine Startlinie von der aus Sie alle Laufstrecken ermitteln und messen Sie immer bis zur Mitte der Bande.*

Probe	Molekulargewicht	log des MW (y-Achse)	Laufstrecke (cm) (x-Achse)
Standard	116000 Da 66000 Da 45000 Da 29000 Da 18400 Da 14200 Da	5,064	
1			
2			
4			
5			

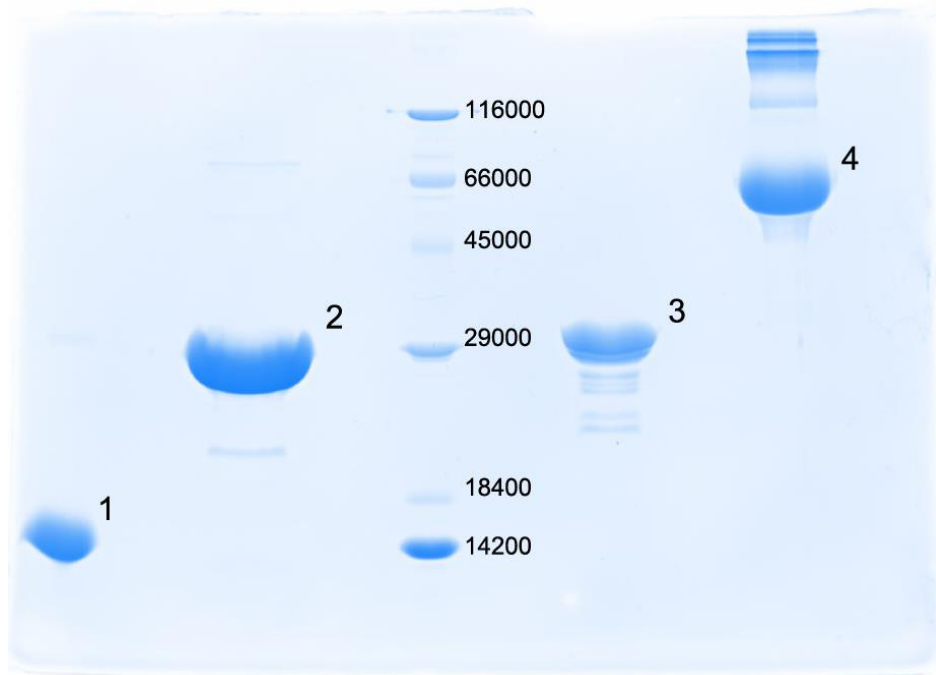


Abb. 8: SDS PAGE zur Bestimmung der molaren Massen.

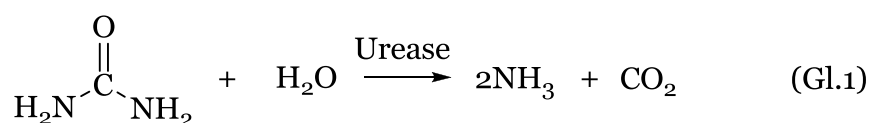
4. Ammoniak- und Harnstoffbestimmung in einer Serumprobe

Vorbemerkung:

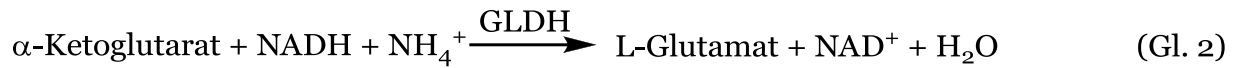
Harnstoff wird in der Leber aus Ammonium-Ionen (im Dissoziationsgleichgewicht mit Ammoniak), die aus dem physiologischen Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel sowie aus dem Proteinabbau im Darm stammen, erzeugt. Zweck der Harnstoffbildung ist die Fixierung des giftigen Ammoniaks in einem ungiftigen Produkt, das über die Nieren ausgeschieden wird. Eine gestörte Leberfunktion kann zu einem Anstieg des Ammoniakgehalts im Serum führen in dessen Folge eine hepatische Enzephalopathie mit komatösen Zuständen entstehen kann.

Prinzip:

Im Experiment wird Harnstoff mithilfe des Enzyms Urease zu Ammoniak und Kohlendioxid gespalten:



Ammoniak und α -Ketoglutarat werden wiederum von dem Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und unter Verbrauch von reduziertem Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) zu L-Glutamat umgesetzt:



In einer Serumprobe wird der Harnstoffgehalt bestimmt. Um eine Fehlerquelle bei der Bestimmung von Harnstoff auszuschließen, wird zunächst die in der Serumprobe bereits vorhandene Konzentration an Ammoniak (diese steigt nach Blutabnahme an, vor allem durch Abbauprozesse und Hämolyse) gemessen. Dazu wird die Ammoniakbestimmung ohne Zugabe des Enzyms Urease durchgeführt. Es läuft somit lediglich die in der Gleichung 2 (Gl. 2) angegebene Reaktion ab. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ammoniakmenge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 365 nm photometrisch zu bestimmen.

Durchführung:

Die Lösungen entsprechend dem unten angegebenen Schema in Küvetten pipettieren und die Extinktionswerte am Photometer bei 365 nm ablesen:

	Harnstoffbestimmung		Ammoniakbestimmung	
	Reagenzienleerwert	Probenwert	Reagenzienleerwert	Probenwert
Reaktionsgemisch^{a)}	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Serum	-	50 µl	-	50 µl
dest. Wasser	500 µl	450 µl	510 µl	460 µl
Ureaselösung	10 µl	10 µl	-	-
<i>mischen, nach ca. 5 min bei 20-25 °C Extinktionswerte der Lösungen messen (E1), Reaktion starten durch Zugabe von</i>				
GLDH-Lösung	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<i>mischen, nach ca. 20 min bei 20-25 °C Extinktionswerte der Lösungen messen (E2). Falls die Reaktion nach 20 min nicht zum Stillstand gekommen ist, die Extinktionswerte im Zeitintervall von 2 min messen, bis eine konstante Abnahme pro Zeitintervall erreicht ist.</i>				

^{a)} u. a. Triethanolaminpuffer (pH 8,0), α -Ketoglutarat, NADH

Berechnung:

Sowohl für Proben- als auch Reagenzienleerwerte werden zunächst die Extinktionsdifferenzen (E1-E2) berechnet. Danach werden jeweils die Differenz der Leerwerte (ΔE_L) von der Differenz der Proben (ΔE_P) abgezogen. Aus der Harnstoffprobe erhält man $\Delta E_{\text{Harnstoff + Ammoniak}}$ und aus der Ammoniakprobe $\Delta E_{\text{Ammoniak}}$. Die Differenz dieser Werte ergibt: $\Delta E_{\text{Harnstoff}}$.

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \cdot M \cdot \Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot v}$$

V, Testvolumen in ml; v, Probenvolumen in ml; M, Molmasse (g/mol) von Harnstoff bzw. Ammoniak; d, Schichtdicke in cm; ε , molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei einer Wellenlänge von 365 nm = 3427 l • mol⁻¹ • cm⁻¹

Daraus ergibt sich für die Berechnung des Gehalts an Ammoniak (1) und des Gehalts an Harnstoff (2):

$$c = \frac{1,52 \cdot 60,06}{3427 \cdot 1 \cdot 0,05 \cdot 2} \cdot \Delta E_{\text{Harnstoff}} \frac{\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}}{\text{l} \cdot \text{cm} \cdot \text{ml} \cdot \text{mol}} = 0,266 \cdot \Delta E_{\text{Harnstoff}} \text{ g/l} \quad (2)$$

$$c = \frac{1,52 \cdot 17,03}{3427 \cdot 1 \cdot 0,05} \cdot \Delta E_{\text{Ammoniak}} \frac{\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}}{\text{l} \cdot \text{cm} \cdot \text{ml} \cdot \text{mol}} = 0,151 \cdot \Delta E_{\text{Ammoniak}} \text{ g/l} \quad (1)$$

Referenzen:

- Campbell, R. E. (2008) Fluorescent proteins, *Scholarpedia*, **3** (7), 5410
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12501-12504.
- Heim, R. and Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Biol.*, **6**, 178-182.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, **273**, 1392-1395.
- RCSP-PDB (Zugriff 11.10.2018) <https://www.rcsb.org/structure/1EMA>
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544.
- Wachter, R.M., Elsliger, M.A., Kallio, K., Hanson, G.T., and Remington, S.J. (1998) Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein, *Structure*, **6**, 1267-1277.
- Zeiss (Zugriff 11.10.2018)
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>

Anhang (siehe Schlüsselwörter):

Abbildung 1:

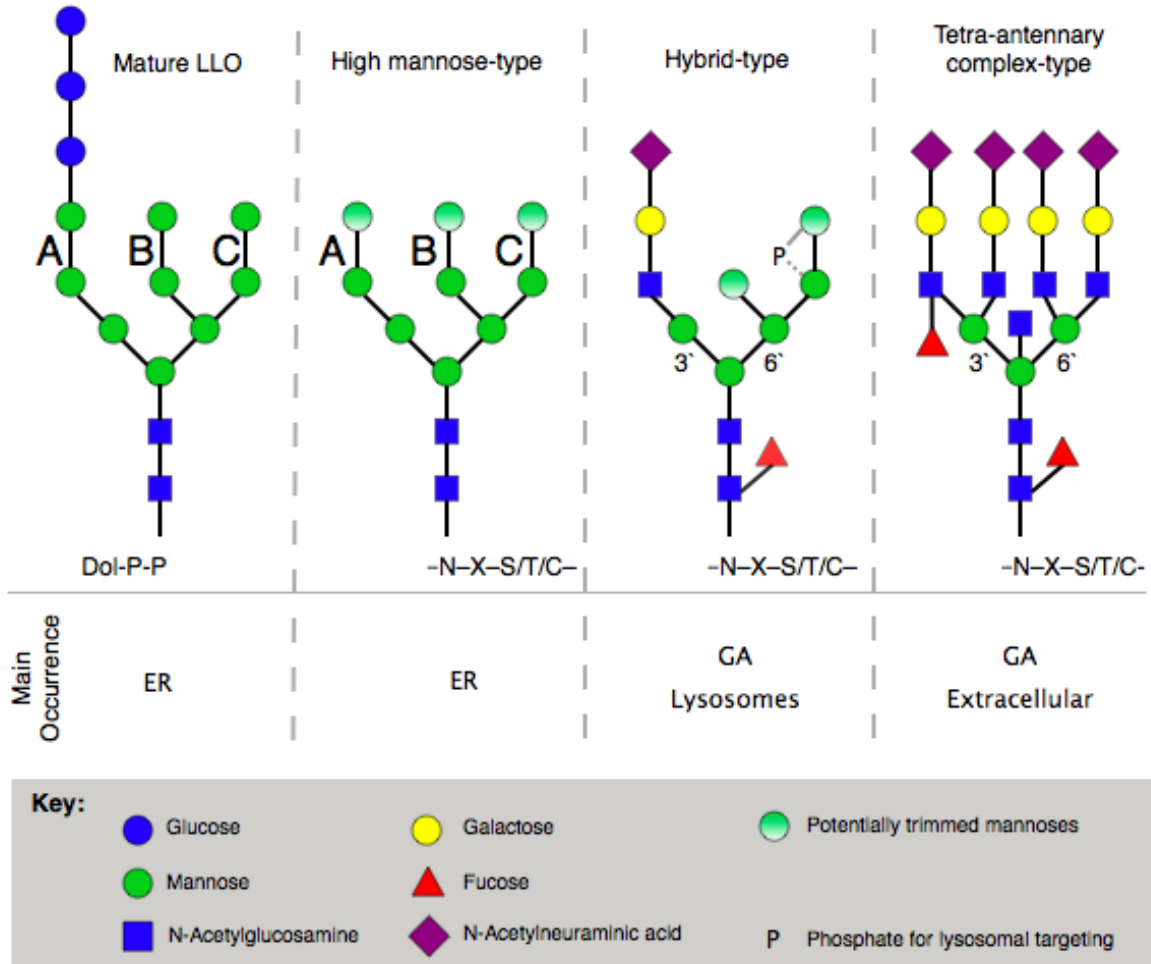


Illustration of principal oligosaccharide structures occurring during the biosynthesis of *N*-glycans. The A, B and C branches are indicated in the LLO precursor and high mannose-type *N*-glycan; 3' and 6' indicate the respective antenna of the *N*-glycan.

Ergänzend zur SDS-PAGE: Disk-(diskontinuierliche)-Elektrophorese¹

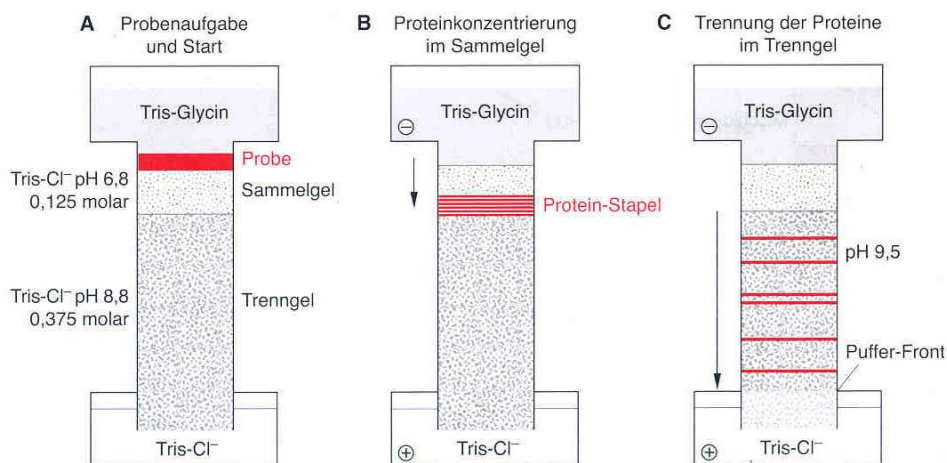
Mit der diskontinuierlichen Elektrophorese verhindert man das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel und erhält schärfere Banden. Die Gelmatrix wird hierfür in das engporige Trenngel und das weitporige Sammelgel eingeteilt, zudem kombiniert man verschiedene Puffer miteinander. Häufig wird dabei das Tris-HCl/Tris-Glycin-System eingesetzt: Das Trenngel enthält 0,375 mol/L Tris-HCl pH 8,8, das Sammelgel 0,125 mol/L Tris-HCl pH 6,8. Dieser pH-Wert liegt sehr nahe beim isoelektrischen Punkt des Glycins im Elektrodenpuffer. Dadurch hat Glycin zum Beginn der Trennung eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität (Folge-Ion). Die Chlorid-Ionen in den Gelpuffern haben hingegen eine sehr hohe Mobilität (Leit-Ion). Wenn man das Probengemisch zwischen diesen Ionen auf das weitporige Sammelgel aufträgt, liegen die Mobilitäten der Protein-Ionen zwischen denen der Leit- und Folge-Ionen.

Beim Anlegen des elektrischen Feldes beginnen in diesem diskontinuierlichen System alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern. Diesen Vorgang nennt man *Isotachophorese*. Keines der Ionen kann aufgrund seiner Mobilität schneller oder langsamer wandern als die anderen, weil sich sonst eine Lücke zwischen den Ionen ergeben würde. Im Bereich der Ionen mit hoher Mobilität (Leit-Ion) stellt sich eine niedrige Feldstärke ein, im Bereich der Ionen mit niedriger Mobilität (Folge-Ion) ist die Feldstärke automatisch sehr hoch. Somit befinden sich die Protein-Ionen in einem Feldstärkegradienten und bilden während der Wanderung einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten (Stapeleffekt oder *stacking*-Effekt): Die Protein-Ionen mit der höchsten Mobilität folgen unmittelbar dem Leit-Ion, die mit der niedrigsten Mobilität werden vor den Folge-Ionen hergeschoben. Der Stapeleffekt hat folgende Vorteile: die Proteine wandern langsam in die Gelmatrix und aggregieren somit nicht mehr, es erfolgt eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der Zonen beim Start.

¹ Quelle: Bioanalytik, 2. Auflage 2006, F. Lottspeich, J.W. Engels (Hrsg.), Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

An der Grenzschicht zum Trenngel angelangt, erfahren die Proteine plötzlich einen hohen Reibungswiderstand, es kommt zum Stau der zur weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Glycin ist davon nicht beeinflusst und überholt die Proteine. Die Proteine befinden sich jetzt in einem homogenen Puffer, dadurch löst sich der Stapel auf und die einzelnen Komponenten beginnen sich nach dem zonenelektrophoretischen Prinzip aufzutrennen. Die Folge der Protein-Ionen arrangiert sich neu, weil im engporigen Trenngel die Molekülgröße einen erheblichen Einfluss auf die Mobilität hat. Die Proteine erhalten höhere Nettoladungen, weil der pH-Wert auf 9,5 ansteigt.

Das Sammelgel wird erst unmittelbar vor der Elektrophorese auf das Trenngel aufpolymerisiert, weil ansonsten die Ionen ineinander diffundieren würden.



11.13 Das Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese: Die Probe wird auf ein weitporiges Sammelgel zwischen Chlorid-Ionen mit hoher Mobilität und Glycin-Ionen mit niedriger Mobilität aufgetragen. Im elektrischen Feld wird während der Ionenwanderung ein Proben-Ionen-Stapel erzeugt, der sich bei Erreichen der Kante des engporigen Trenngels schlagartig auflöst. Ab diesem Moment erhält man automatisch eine Zonenelektrophorese mit scharfen Proteinzonen.