

INHALT

INHALT	1
A. HYDROLYSE VON ATP	2
A.1 THEORETISCHE VORBEREITUNG	2
A.2 VERSUCHSAUSWERTUNG	4
A.2.a Aufnahme der Phosphat-Kalibrierkurve	4
A.2.b ATP-Hydrolyse (Teil I).....	5
A.2.c ATP-Hydrolyse (Teil II)	6
A.2.d Dünnschicht-Chromatographie.....	10
B. SUPEROXID-DISMUTASE (SOD)	12
B.1 THEORETISCHER HINTERGRUND.....	12
B.2 VERSUCHSAUSWERTUNG	14
B.2.a Präparation der SOD-haltigen Fraktionen	14
B.2.b Bestimmung der SOD-Aktivität	20
B.2.c Messung der Aktivität eines SOD-aktiven Kupferkomplexes.....	23
C. PEROXYDASE-AKTIVITÄT VON METALLKOMPLEXEN	25
C.1 EINLEITUNG	25
C.2 AUSWERTUNG.....	26
C.2.a Kalibrierung.....	26
C.2.b Herstellung der Kupfer-Komplexe (pH 9) und der Katalase-Lösung.....	27
C.2.c Messung der Peroxydase-Aktivität.....	28
D. SAUERSTOFFRADIKALE	32
D.1 THEORETISCHER HINTERGRUND.....	32
D.2 VERSUCHSAUSWERTUNG	33
D.2.a Depolymerisierung von Hyaluronsäure	33
D.2.b Zerstörung der Desoxyribose	36
E. LABORJOURNAL (PRIMÄRDATEN)	39
E.1 TAG 1 (ATP-HYDROLYSE)	39
E.2 TAG 2 (ATP-HYDROLYSE, PEROXIDASEN / KATALASEN)	40
E.3 TAG 3 (SOD)	42
E.4 TAG 4 (SOD, RADIKALE).....	42

A. HYDROLYSE VON ATP

A.1 Theoretische Vorbereitung

In diesem Versuch soll die ATP-Hydrolyse-Aktivität verschiedener Metallkationen (Zn^{2+} und Ce^{3+}) sowie von Alkalischer Phosphatase (AP) aus Kälberdarm verglichen werden. Die folgende Abbildung zeigt Alkalische Phosphatase, ein Enzym mit 138 kDa und vier Zn-Atomen in den aktiven Zentren.

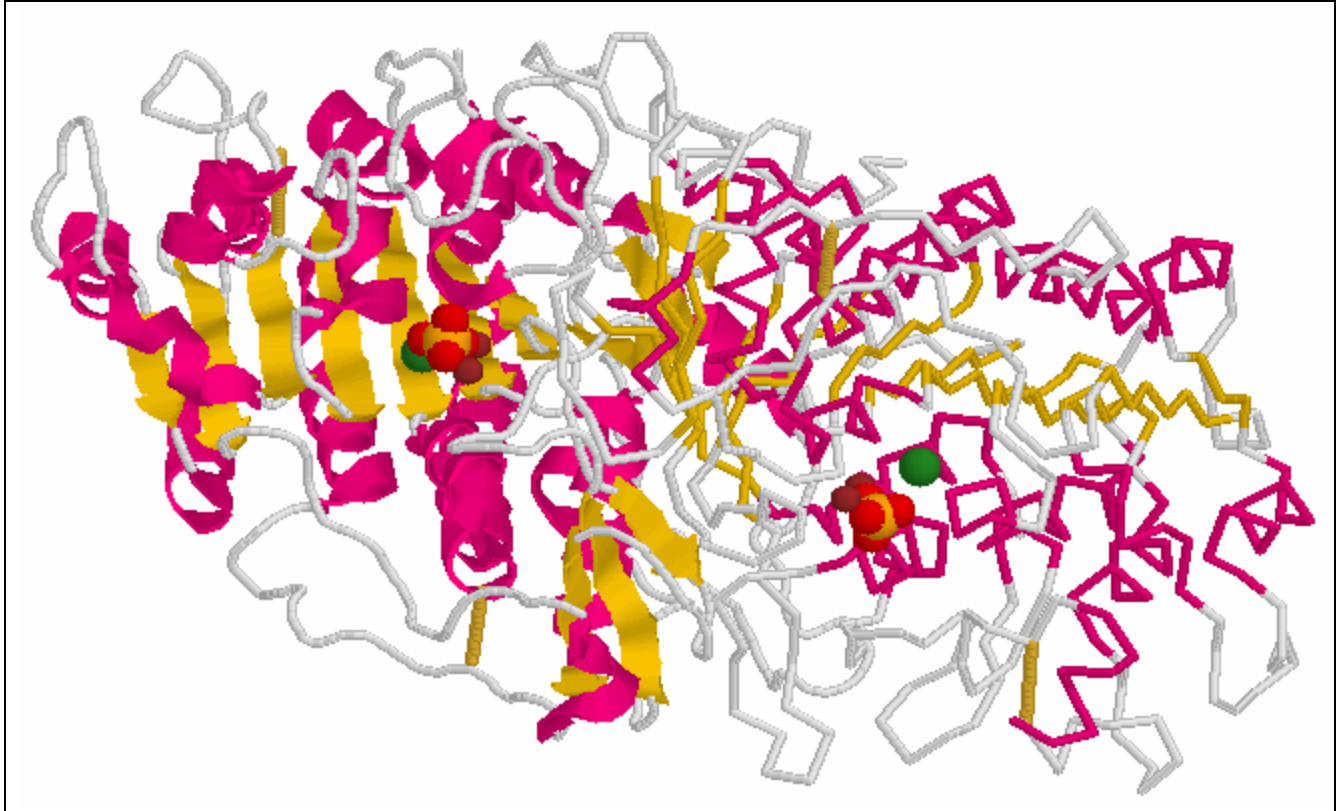


Abbildung A-1: AP aus *E. Coli*¹ (1ALK.pdb), mit Phosphat (und Mg) an den aktiven Zentren

Die Phosphatester-Hydrolyse geschieht nach dem unten abgebildeten Mechanismus einer konzertierten $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion. Die Metallkationen kompensieren die hohe negative Ladung und verringern so (bei Pyrophosphaten auch anders) die Aktivierungsbarriere der Hydrolyse und aktivieren als Lewis-Säuren das Wasser zu einem starken Nucleophil.

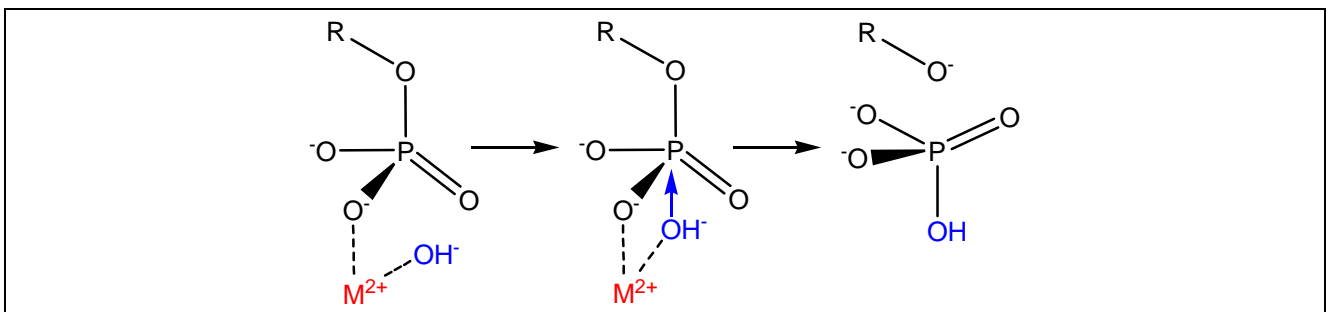


Abbildung A-2: Modell einer durch M^{2+} -Ion katalysierten Phosphatesterhydrolyse

¹ Kim, E. E., Wyckoff, H. W.: Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol Biol* 218 (1991)

Im Falle des Polypyrophosphates ATP binden die Metallkationen (in Lösung oder im Enzym gebunden) an mehrere Sauerstoffatome gleichzeitig und zusätzlich noch an Wasser und koordinieren so beide Reaktanden, was den oben abgebildeten Reaktionsmechanismus begünstigt (vgl. Abbildung).

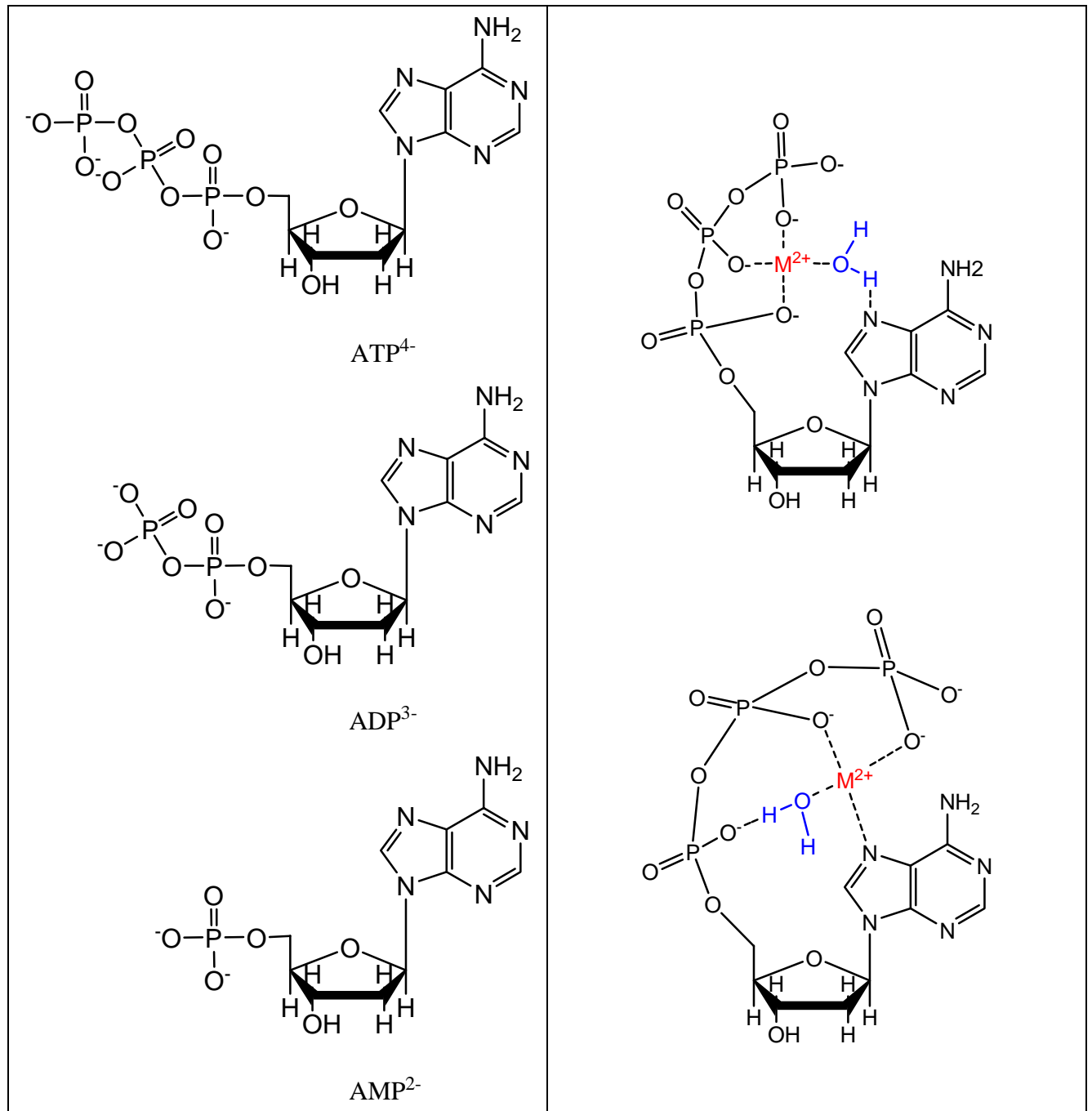


Abbildung A-3: (a) Strukturen von ATP, ADP und AMP. (b) Hydrolyse-produktive (ATP⁴⁻)(M²⁺)-Strukturen nach Sigel

In Enzymen (ebenso in der Alkalischen Phosphatase) befinden sich zwei Metallkationen im aktiven Zentrum, in dem eines zur Kompensation der Ladung dient und das andere das Wasser aktiviert. Die phosphatübertragenden Enzyme können meist durch Vanadat gehemmt werden, was wiederum auf eine konzertierte S_N2-Reaktion hinweist, da das fünffach koordinierte Vanadat ein Analogon des fünffach koordinierten (instabileren) Phosphors, so wie er im Übergangszustand vorliegt, ist.

A.2 Versuchsauswertung

A.2.a Aufnahme der Phosphat-Kalibrierkurve

Zur Aufnahme der Phosphat-Kalibrierkurve wurde eine Lösung mit 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat ($M = 136.09 \text{ g / mol}$) angesetzt und entsprechend der Anleitung die Kalibrierkurve aufgenommen.

Ansatz (berechnet): 0.13609 g / 500 mL

Ansatz (hergestellt): 0.1347 g / 496 mL

Tabelle A-1: Phosphat-Kalibrierkurve (Leerwert: Glas 0, Messwellenlänge: 600 nm)

Glas	Standard [μl]	Wasser [μl]	Konzentration [mM]	Extinktion
0	000	500	0.0	0.000
1	100	400	0.4	0.090
2	200	300	0.8	0.209
3	300	200	1.2	0.326
4	400	100	1.6	0.432
5	500	000	2.0	0.520

Wir erhalten das folgende Diagramm und können mittels linearer Regression die Kalibrierfunktion ermitteln.

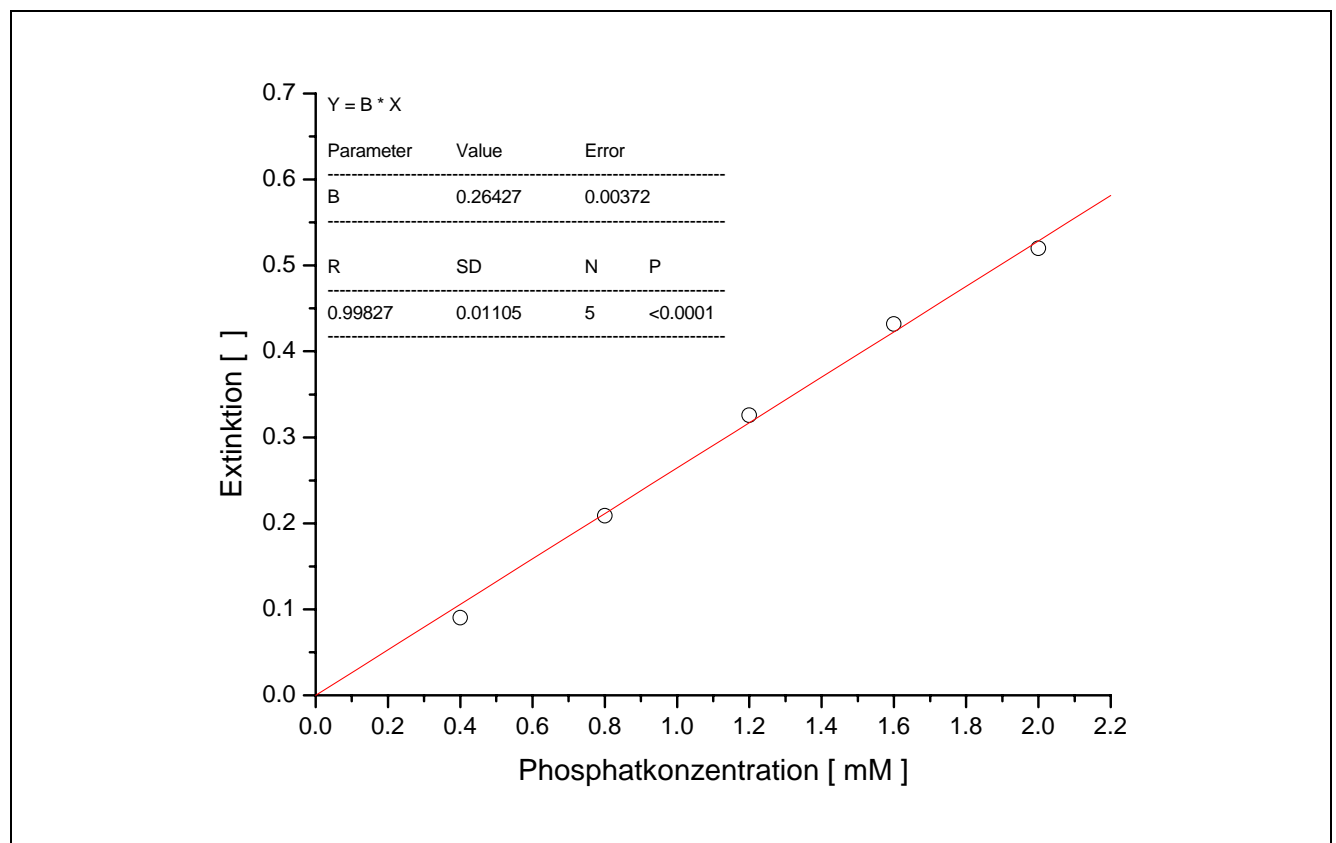


Abbildung A-4: Phosphat-Standard (Kalibrierkurve)

Die Phosphat-Konzentration einer Probe, die mit Hilfe dieser Methode bestimmt wird, ergibt sich daher zu:

$$c = \frac{E}{B} = \frac{E}{0.264 \text{ mM}^{-1}} \quad (\text{A.1})$$

A.2.b ATP-Hydrolyse (Teil I)

Zur Untersuchung der katalytischen Eigenschaften wurden Ansätze von Zn- und Ce-Salzen sowie ein Ansatz von Alkalischer Phosphatase hergestellt.

Ce-Einwaage ($M = 434.23 \text{ g/mol}$): 0.3126 g in 10 mL Puffer pH 8.5 $c = 71.99 \text{ mM}$

Zn-Einwaage ($M = 261.44 \text{ g/mol}$): 0.3125 g in 10 mL Puffer pH 8.5 $c = 119.53 \text{ mM}$

Alkalische Phosphatase ($M = 138 \text{ kDa}$) 10 μL (72 μM) in 990 μL Wasser $c = 720 \text{ nM}$

Die Ansätze wurden entsprechend der Anleitung hergestellt.

Tabelle A-2: Endkonzentrationen der Metallsalze bzw. des Enzyms (Versuch I)

	Stammlösung [ml]	Gesamtvolumen [ml]	Endkonzentration
Ce	1	12	6 mM
Ce	0.5	12	3 mM
Zn	1	12	9.96 mM
Zn	0.5	12	4.98 mM
AP	0.6	12	36 nM
AP	0.3	12	18 nM

Die Ansätze mit Zink und der Leerwert wurden bei 85 °C, die anderen Proben bei 37 °C inkubiert.

Tabelle A-3: Messergebnisse von Versuch I (Extinktions-Zeit-Verläufe)

Zeit [min]	Leerwert	5mM Zn	10mM Zn	3mM Ce	6mM Ce	18 nM AP	36 nM AP
0	0.133	0.144	0.145	0.148	0.153	0.142	0.143
12	0.166	0.171	0.180	0.179	0.200	0.198	0.180
24	0.188	0.198	0.207	0.309	0.183	0.163	0.171
36	0.143	0.156	0.118	0.131	0.149	0.132	0.253
48	0.162	0.193	0.128	0.134	0.162	0.140	0.118
60	0.188	0.351	0.267	0.163	0.198	0.219	0.280
72	0.199	0.320	0.275	0.181	0.244	0.217	0.313
84	0.195	0.242	0.212	0.203	0.226	0.251	0.299
96	0.205	0.327	0.391	0.180	0.287	0.279	0.377
108	0.275	0.413	0.463	0.205	0.253	0.251	0.383
120	0.306	0.442	0.449	0.244	0.289	0.303	0.363

Eine Auftragung der Extinktion gegen die Zeit weist auf gravierende Fehler im Versuchsablauf hin.

Hydrolyse von ATP - Versuchsauswertung

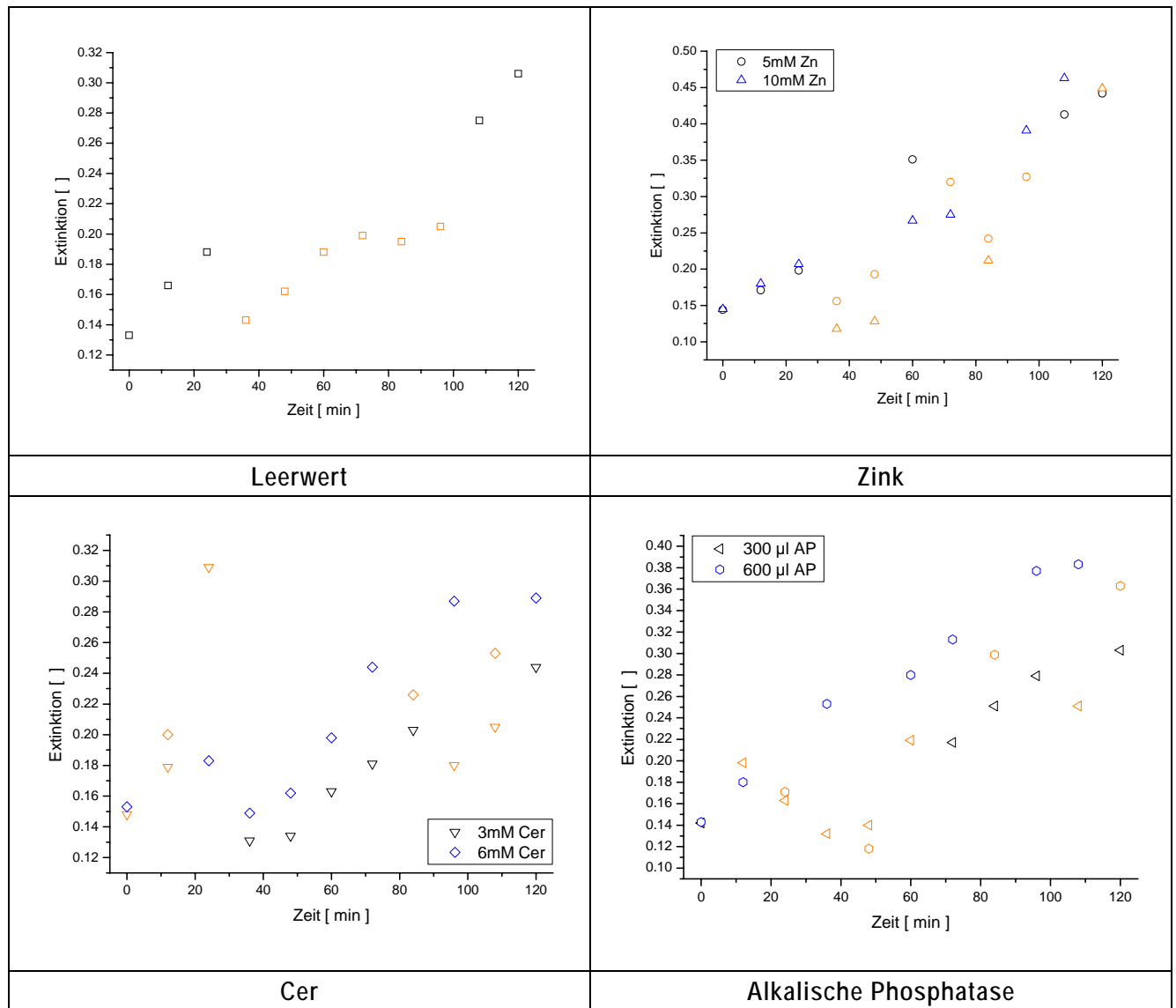


Abbildung A-5: Extinktions-Zeit-Verläufe des ersten Versuchs (orange Punkte sind maskiert)

Am Beispiel des Leewertes zeigt sich, dass wohl ein Fehler bei der Phosphatbestimmung vorlag, darüber hinaus zeigen sich bei diversen Extinktions-Zeit-Verläufen Ergebnisse, die wenig Sinn ergeben. Die Ursache für das Misslingen ist uns nicht bekannt, wegen der schlechten Ergebnisse wurde der Versuch wiederholt. Eine mögliche Ursache war wahrscheinlich, dass die Metallsalze nicht in Wasser, sondern in Puffer gelöst wurden, was zur sofortigen Hydroxidbildung führte.

A.2.c ATP-Hydrolyse (Teil II)

Die Lösungen wurden neu angesetzt, es wurde ein verkürzter Versuch durchgeführt. Die Ansätze der Salze und des Enzyms ergaben sich zu:

Ce-Einwaage ($M = 434.23 \text{ g/mol}$):	0.3138 g in 10 mL Wasser	$c = 72.27 \text{ mM}$
Zn-Einwaage ($M = 261.44 \text{ g/mol}$):	0.3143 g in 10 mL Wasser	$c = 120.22 \text{ mM}$
Alkalische Phosphatase ($M = 138 \text{ kDa}$)	10 µL (72 µM) in 990 µL Wasser	$c = 720 \text{ nM}$

Tabelle A-4: Endkonzentrationen der Metallsalze bzw. des Enzyms (Versuch II)

	Stammlösung [ml]	Gesamtvolumen [ml]	Endkonzentration
Ce	1	12	6.02 mM
Zn	1	12	10.02 mM
AP	0.6	12	36 nM

Es wurden bei der Durchführung größere Zeitabstände gewählt, leider wurde keine Probe direkt zu Beginn des Versuchs entnommen.

Tabelle A-5: Messergebnisse von Versuch II (Extinktions-Zeit-Verlauf)

Zeit [min]	Leerwert	10 mM Zn	6 mM Ce	36 nM AP
20	0.051	0.218	0.232	0.078
40	0.052	0.335	0.406	0.153
60	0.149	0.507	0.507	0.114
80	0.159	0.617	0.538	0.206
100	0.191	0.408	0.403	0.365
120	0.232	0.845	0.874	0.443

Mit Hilfe der Kalibriergeraden können wir aus der Extinktion die Konzentration des in der entnommenen Probe vorhandenen Phosphates berechnen.

Tabelle A-6: Messergebnisse von Versuch II (Konzentrations-Zeit-Verlauf), Konzentrationen in mM

Zeit [min]	Leerwert	10 mM Zn	6 mM Ce	36 nM AP
20	0.19	0.82	0.88	0.30
40	0.20	1.27	1.54	0.58
60	0.56	1.92	1.92	0.43
80	0.60	2.33	2.04	0.78
100	0.72	1.54	1.52	1.38
120	0.88	3.20	3.31	1.68

Die Auftragung der Extinktions-Zeit-Verläufe liefert das folgende Diagramm. Unter Maskierung weniger Ausreißer (vor allem bei dem Ansatz mit AP) wurden Geraden an die Extinktions-Zeit-Verläufe angepasst.

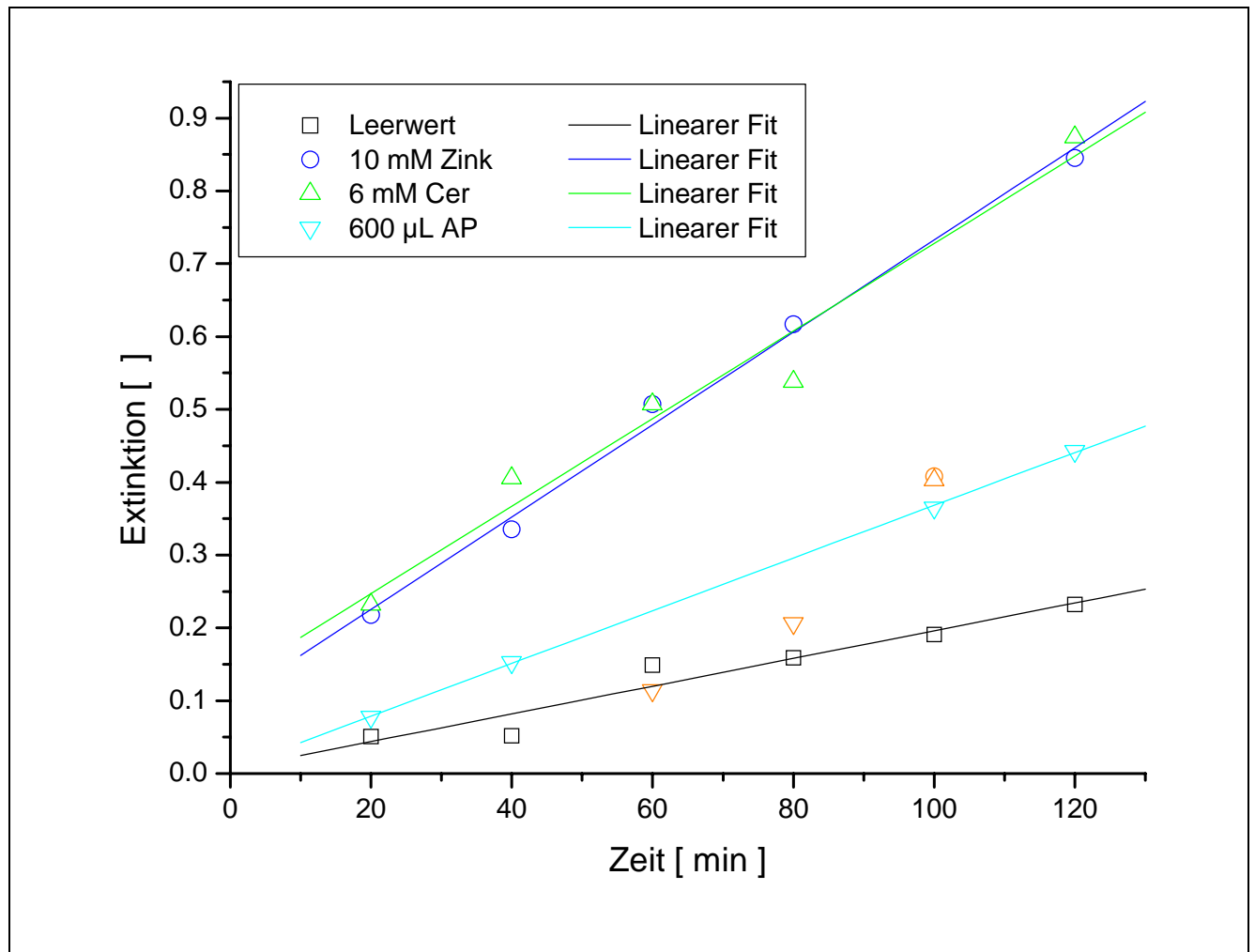


Abbildung A-6: Extinktions-Zeit-Verläufe (mit linearer Regression) von Versuch II

Mit Hilfe der linearen Anpassung gewinnen wir als Steigung der Geraden die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung.

Tabelle A-7: Ergebnisse der linearen Regression

E(t) = E ₀ + (ΔE/Δt) * t			
Leerwert			
Parameter	Value	Error	
E ₀	0.0058	0.01986	
ΔE/Δt [min ⁻¹]	0.0019	2.54947E-4	
R	SD	N	P
0.96592	0.02133	6	0.00172
Zink			
Parameter	Value	Error	
E ₀	0.09865	0.02089	
ΔE/Δt [min ⁻¹]	0.00634	2.87443E-4	
R	SD	N	P
0.99693	0.02212	5	2.04024E-4

Hydrolyse von ATP - Versuchsauswertung

E(t) = E ₀ + (ΔE/Δt) * t			
Cer			
Parameter	Value	Error	
E ₀	0.12684	0.04764	
ΔE/Δt [min ⁻¹]	0.00601	6.55656E-4	
R	SD	N	P
0.98261	0.05045	5	0.00275
Alkalische Phosphatase			
Parameter	Value	Error	
E ₀	0.00641	0.00314	
ΔE/Δt [min ⁻¹]	0.00362	3.86012E-5	
R	SD	N	P
0.99989	0.00318	4	1.13742E-4

Genauso können wir die Phosphatkonzentrationen in Abhängigkeit der Zeit auftragen und eine lineare Anpassung vornehmen.

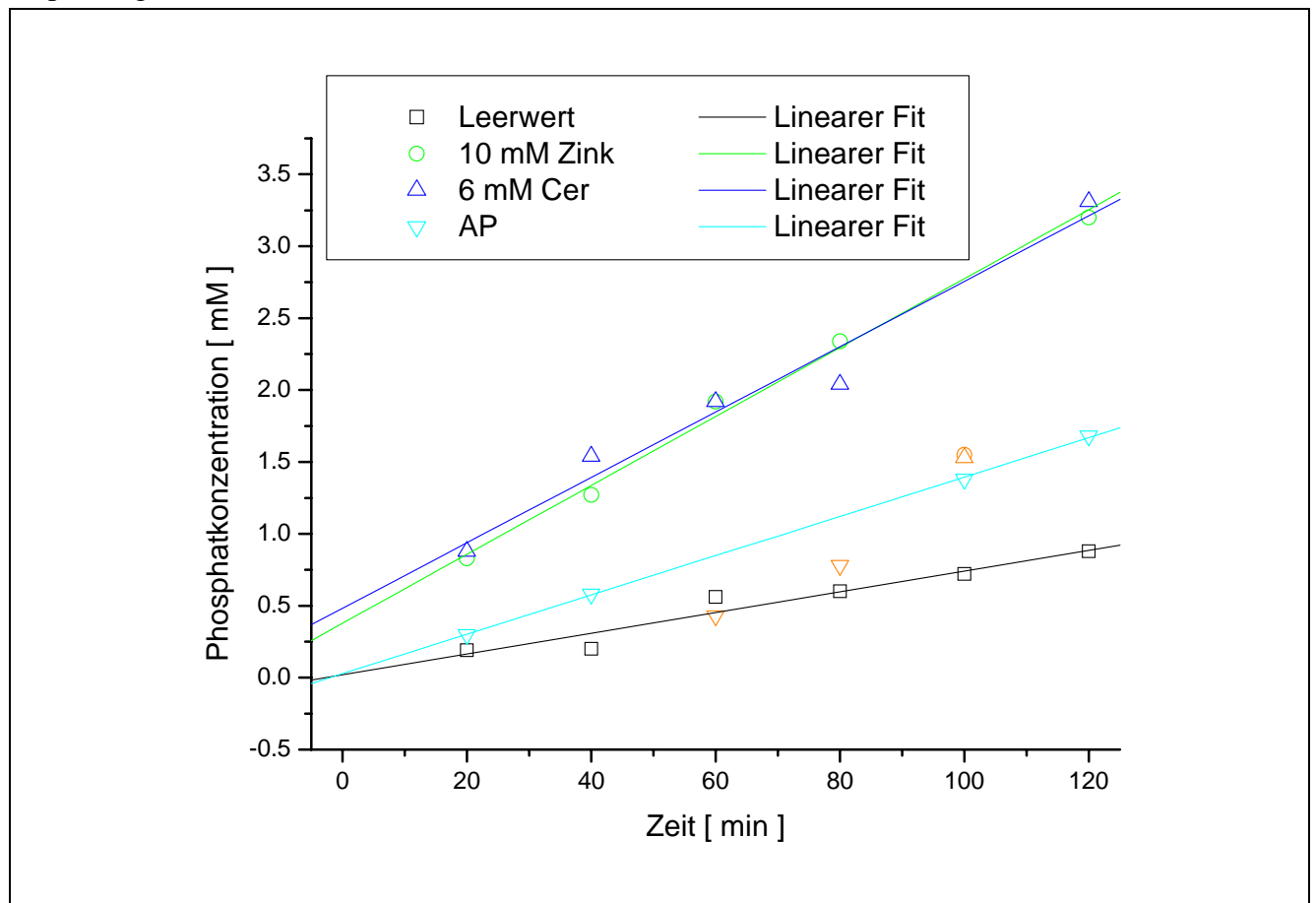


Abbildung A-7: Konzentrations-Zeit-Verläufe (mit linearer Regression) von Versuch II

Wir wollen uns jedoch mit den Anpassungsergebnissen aus dem vorherigen Diagramm (Extinktions-Zeit-Verläufe) beschäftigen und die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse berechnen; wir erhalten die absolute Änderung der Phosphatkonzentration sowie die Geschwindigkeit der Phosphatbildung.

Tabelle A-8: Berechnete Phosphat-Bildungsgeschwindigkeiten und absolute Konzentrationsänderungen

	$(\Delta E/\Delta t)$ [min ⁻¹]	$(\Delta E/\Delta t) -$ $(\Delta E/\Delta t)_{\text{Leerwert}}$ [min ⁻¹]	$(\Delta c/\Delta t)$ [μM min ⁻¹]	$\Delta E = E_{120} - E_0$ []	Δc [mM]
Leerwert (85 °C)	0.0019	0	7.19	0.2262	0.86
10 mM Zink (85 °C)	0.00634	0.00444	24.00	0.74635	2.83
6 mM Cer (37 °C)	0.00601	0.00411	22.75	0.74716	2.83
36 nM AP (37 °C)	0.00362	0.00172	13.70	0.43659	1.65

Schließlich können wir die Geschwindigkeiten (unter Berücksichtigung des Leerwertes) auf die in der Lösung vorhandene Metallionen-Konzentration (Alkalische Phosphatase enthält vier Zink-Ionen) normieren

Tabelle A-9: Normierte Geschwindigkeiten der Phosphatbildung

	$\Delta c - \Delta c_{\text{Leerwert}}$	Δc je min und mM Metallion / Enzym
10 mM Zink (85 °C)	1.97 mM	1.64 μM
6 mM Cer (37 °C)	1.97 mM	2.74 μM
36 nM AP (37 °C) [Zink]	0.79 mM	45.72 mM
36 nM AP (37 °C) [Enzym]	0.79 mM	182.87 mM

Es zeigt sich, dass die Alkalische Phosphatase bzw. die in ihr wirkenden Zink-Ionen ungleich effizienter sind als die freien Metallionen, wobei die durch Cer katalysierte Hydrolyse noch einmal effizienter ist als die durch (freies) Zink katalysierte, da die Lanthanidenhydroxide i.A. Wasser besonders gut aktivieren können.

A.2.d Dünnschicht-Chromatographie

Es wurde mit den Proben nach der Inkubation eine Ionenaustausch-Dünnschicht-Chromatographie durchgeführt. Das Laufmittel war LiCl, dieses wurde aus einer Stammlösung (3 M) hergestellt:

1.5 M:	5 mL Stammlösung	5 mL Wasser	10 mL Gesamtvolumen
1.0 M:	4 mL	8 mL	12 mL
0.5 M:	2 mL	10 mL	12 mL

Hydrolyse von ATP - Versuchsauswertung

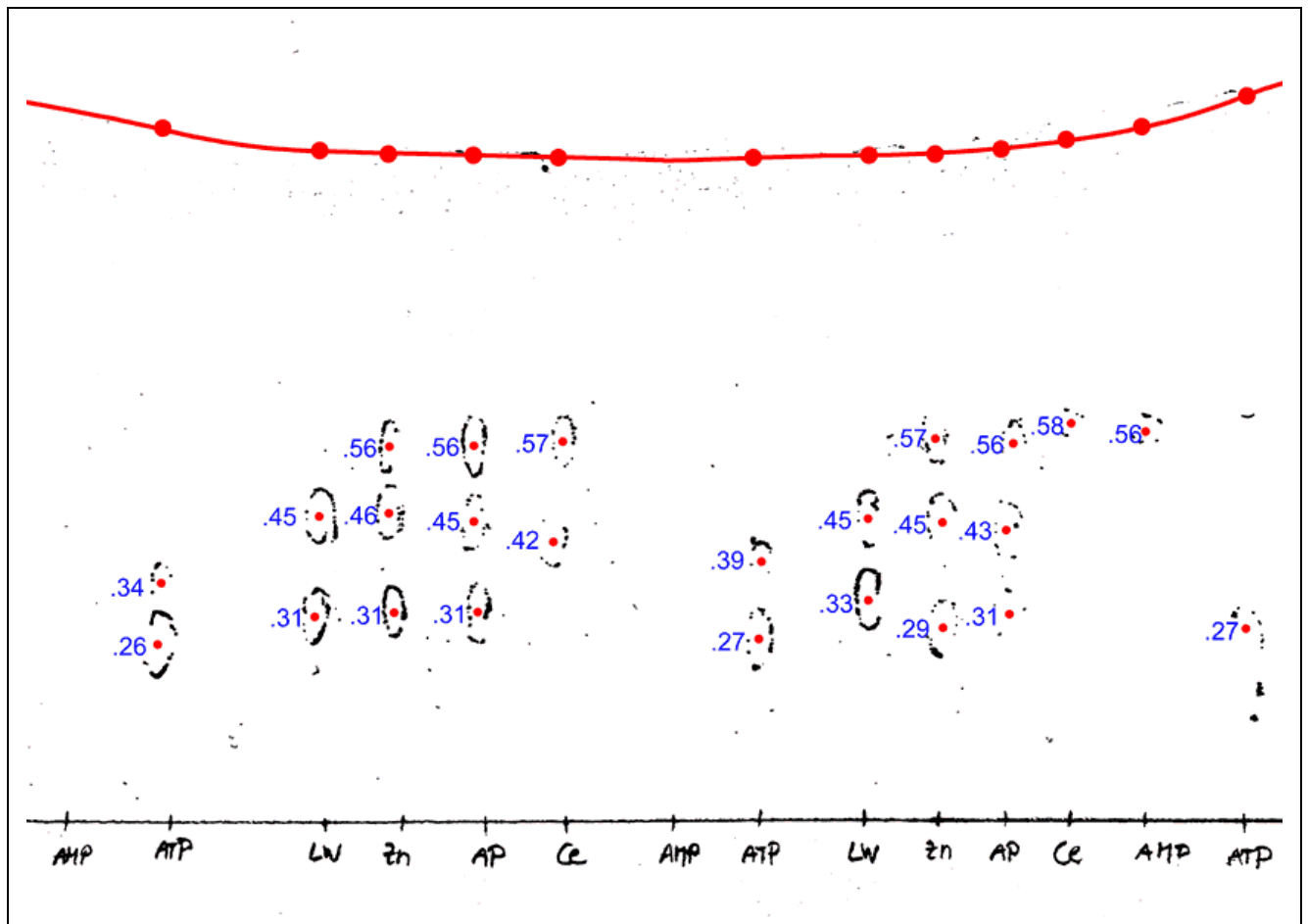


Abbildung A-8: Eingesanntes und bearbeitetes Chromatogramm (mit RF-Werten ohne führende Null)

Man erkennt eine Trennung von ATP, ADP und AMP (aufgrund ihrer Ladung - Struktur siehe Abbildung A-3), sie wurden mittels Fluoreszenz nachgewiesen.

Tabelle A-10: Ergebnisse der Chromatographie (RF-Werte)

Spur	ATP	ADP	AMP
AMP	-	-	-
	-	-	-
	-	-	0.56
ATP	0.26	(0.34)	-
	0.27	(0.39)	-
	0.27	-	-
Leerwert	0.31	0.45	
	0.33	0.45	
10 mM Zink (85 °C)	0.31	0.46	0.56
	0.29	0.45	0.57
6 mM Cer (37 °C)	-	0.42	0.57
	-	-	0.58
36 nM AP (37 °C)	0.31	0.45	0.56
	0.31	0.43	0.56

Vor allem beim Cer sehen wir, dass nur noch AMP und ADP nebeneinander vorliegen, es scheint, dass praktisch das gesamte ATP umgesetzt wurde. Beim Leerwert hingegen liegt vor allem ATP neben ADP vor, im Falle von Zink und Alkalischer Phosphatase liegen alle Spezies nebeneinander vor.

B. SUPEROXID-DISMUTASE (SOD)

B.1 Theoretischer Hintergrund

Das Superoxidradikal $O_2^{\cdot-}$ entsteht im Stoffwechsel durch die unbeabsichtigte, unvollständige Reduktion von Sauerstoff (zum Beispiel in der Atmungskette), obwohl (fast immer) Mechanismen vorhanden sind, die einer unbeabsichtigten Freisetzung des Radikals vorbeugen. Wegen seiner neurotoxischen Wirkung muss das entstandene $O_2^{\cdot-}$ so schnell wie möglich in nicht-toxische Verbindungen umgewandelt werden. Das im gesamten Körper vorkommende Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert die Disproportionierung des Superoxid-Radikals und unterstützt somit den raschen Abbau:



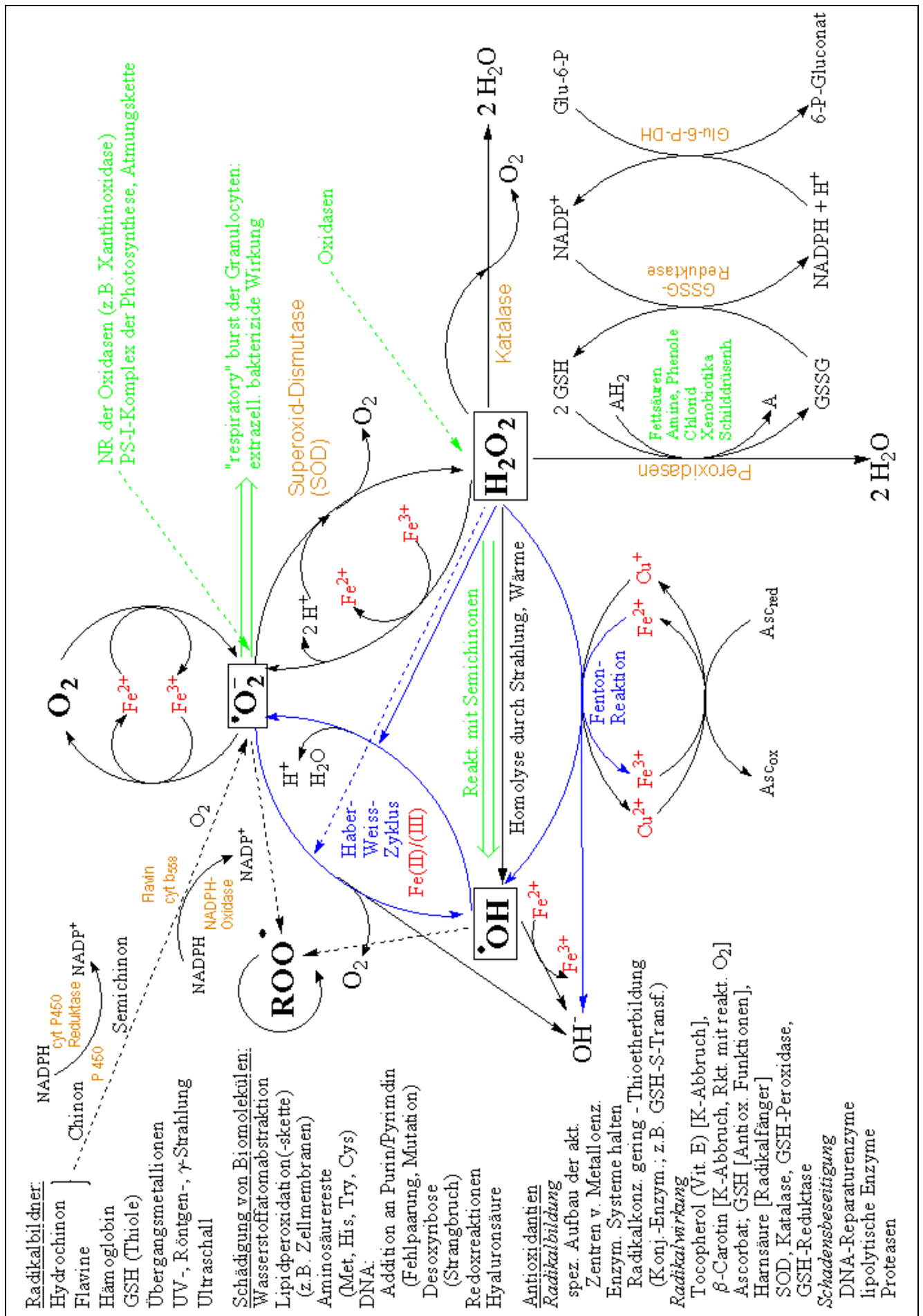
Abbildung B-1: Röntgenstruktur² von Cu_2Zn_2 -SOD (Rind), 1E9P.pdb

Die Entstehung und Wirkung reaktiver (schädlicher) Sauerstoffspezies sowie deren Abbau ist in dem Schema der folgenden Seite dargestellt. Alle weiteren Versuche beschäftigen sich mit reaktiven Sauerstoffspezies; dieser Versuch mit Superoxid-Dismutase (sowie einem SOD-aktiven Kupferkomplex), der nächste Versuch mit Katalase (und der Peroxidase-Aktivität von Kupferkomplexen), der letzte Versuch mit den schädlichen Wirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies. Alle diese Aspekte sind auf der folgenden Seite zusammengefasst.

Abbildung B-2 (folgende Seite): Entstehung, Reaktivität und Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies

² Hough, M. A., Strange, R. W., Hasnain, S. S.: *Conformational Variability of the Cu Site in One Subunit of Bovine Cu_2Zn_2 Superoxide Dismutase: The Importance of Mobility in the Glu119-Leu142 Loop Region for Catalytic Function*; J. Mol. Biol. 304 (2000)

Superoxid-Dismutase (SOD) - Theoretischer Hintergrund



B.2 Versuchsauswertung

Dieser Versuch beinhaltet drei Bereiche:

- Präparation von $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ -haltigen Fraktionen aus Rinderblut
- Eisen- und Kupfer-Bestimmung und Messung der enzymatischen Aktivität
- Darstellung eines SOD-aktiven Kupfer-Komplexes und Messung der Aktivität

Auf die Herstellung des Apo-Enzyms und dessen stufenweise Regenerierung wurde verzichtet.

B.2.a Präparation der SOD-haltigen Fraktionen

Die Superoxid-Dismutase wird bevorzugt aus Erythrocyten isoliert (nach Entfernung des Hämoglobins): Die Aufarbeitung des Rinderblutextraktes erfolgte durch Hitzebehandlung bei $75\text{ }^\circ\text{C}$, wozu jeweils 2 ml von den Proben 1 bis 3 bzw. 4 ml der Proben 3 bis 7 in Eppendorf-Cups für unterschiedliche Zeiträume inkubiert wurden.

Tabelle B-1: Inkubationszeiten der Proben

#	1	2	3	4	5	6	7
Inkubationsdauer [min]	0	2.5	5	10	20	30	45

SOD ist durch das enthaltene Zn sehr hitzestabil, bei der gewählten Temperatur denaturiert Hämoglobin dahingegen und fällt aus. Nach der Hitzebehandlung wurden die Proben deshalb für 5 min zentrifugiert, die Überstände wurden für die Metallbestimmung und die Messung der enzymatischen Aktivität (der SOD) verwendet, die Niederschläge (also vor allem das eben erwähnte Hämoglobin) wurden verworfen.

(1) *Direkte Eisenbestimmung*

Die einzelnen Überstände der Zentrifugate wurden vor der Messung verdünnt, die photometrische Verfolgung erfolgte bei 540 nm, bei der die β -Absorptionsbande des Oxy-Hämoglobins liegt. Als Leerwert wurde Wasser verwendet.

Tabelle B-2: Bestimmung der Eisen-Häm-Konzentration der Proben

#	Inkubationszeit [min]	Verdünnungsfaktor	Extinktion	Häm-Konzentration [mM]
1	0	100	0.796	9.95
2	2.5	100	0.860	10.75
3	5	100	0.353	4.41
4	10	30	1.050	3.94
5	20	3	1.337	0.50
6	30	2	1.282	0.32
7	45	2	0.704	0.18

Die Hämoglobinkonzentration wird unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt:

$$E = \varepsilon \cdot d \cdot c \quad \text{mit} \quad \varepsilon = 8000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad \text{und} \quad d = 1 \text{ cm}. \quad (\text{B.2})$$

Die gesuchte Konzentration ergibt sich daher aus der folgenden Gleichung:

$$c = E \cdot \varepsilon^{-1} \cdot d^{-1} \quad (\text{B.3})$$

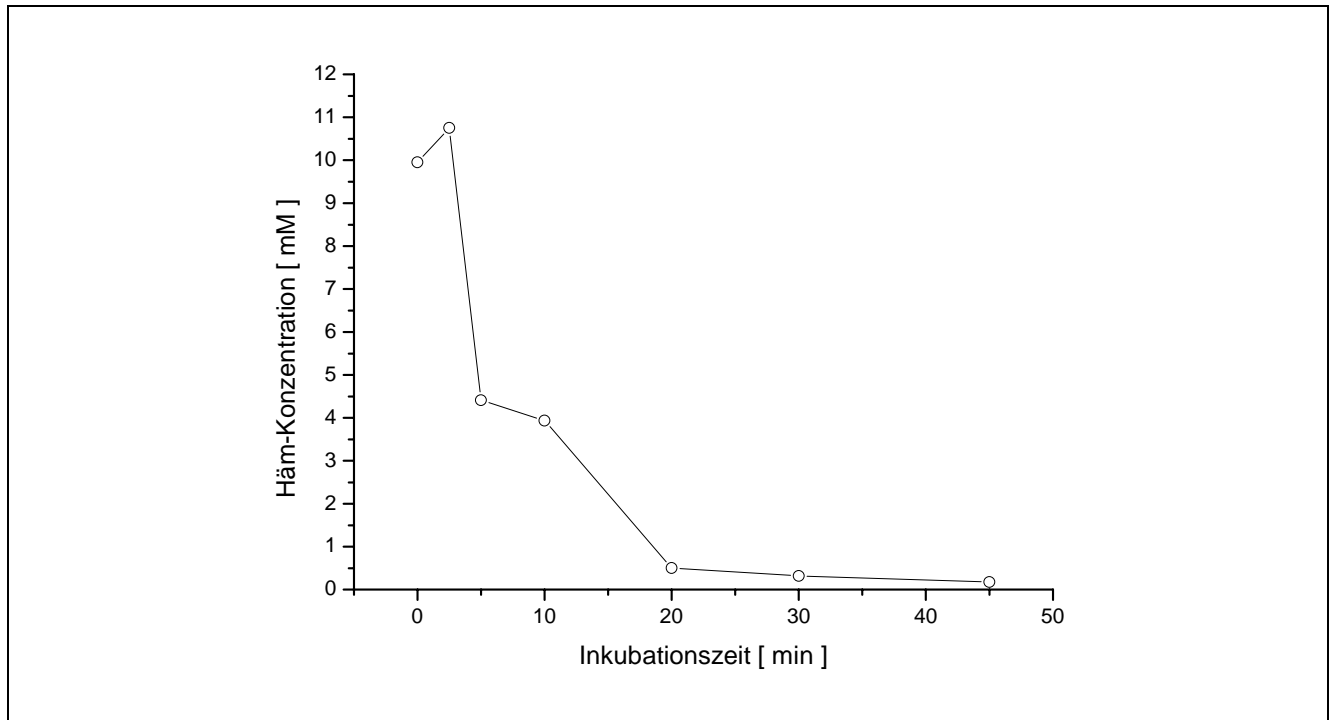


Abbildung B-3: Häm-Konzentration der Proben in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Aus dem Schaubild erkennt man, dass die Konzentration des Häms mit zunehmender Dauer der Hitzebehandlung sinkt; die Kurve passt sich (mehr oder weniger genau) einer Exponentialfunktion an. Nach Beendigung der Inkubation ($t = 45$ min), beträgt die Hämkonzentration nur noch 0.18 mM, das Enzym SOD ist zu diesem Zeitpunkt nahezu komplett vom Hämoglobin gereinigt.

(2) Eisenbestimmung mit Bipyridin

Wir verwendeten eine alternative Methode zur Bestimmung der Eisenkonzentration, diese erforderte die Erstellung einer Kalibrierkurve: Als Eisenstandard wurde eine Lösung von Ammoniumeisensulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ in HCl verwendet, die ausgegebene Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt. Die photometrische Eisenbestimmung mit 2,2'-Bipyridin erfolgte bei 490 nm nach 30 Minuten Inkubationszeit.

Tabelle B-3: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierkurve (Gesamtvolumen 5.5 ml)

Glas-Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Standard [ml]	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2
H ₂ O (dest.) [ml]	3	2.75	2.5	2.25	2	1.75	1.5	1.25	1
Bipyridin [ml]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Na-Sulfit-Lsg. [ml]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1 N HCl [ml]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
µg Fe / 5,5 ml	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
c(Fe) [µg / ml]	0	0.455	0.909	1.364	1.818	2.273	2.727	3.182	3.636
c(Fe) [mM]	0	0.0081	0.0163	0.024	0.0326	0.0407	0.0488	0.057	0.0651
Extinktion []	0	0.058	0.126	0.181	0.24	0.302	0.363	0.424	0.486

Die folgenden Abbildungen zeigen die Kalibrierfunktion (w / v oder n / v), dazu wurden Konzentrationen (wie aus Tabelle B-3 ersichtlich) auf molare Größen umgerechnet, um diese dann mit den Ergebnissen der Häm-Bestimmung vergleichen zu können.

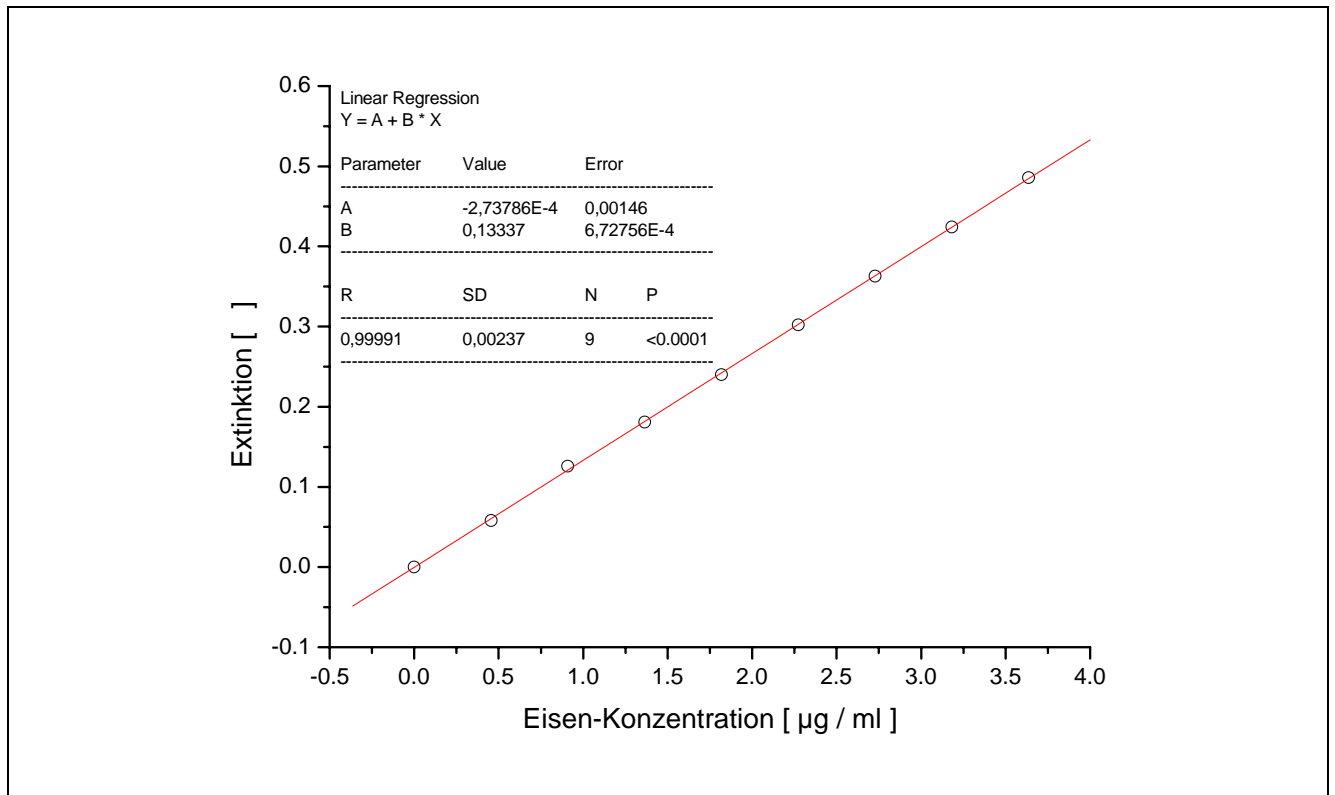


Abbildung B-4: Extinktion gegen die Eisenkonzentration (w/v)

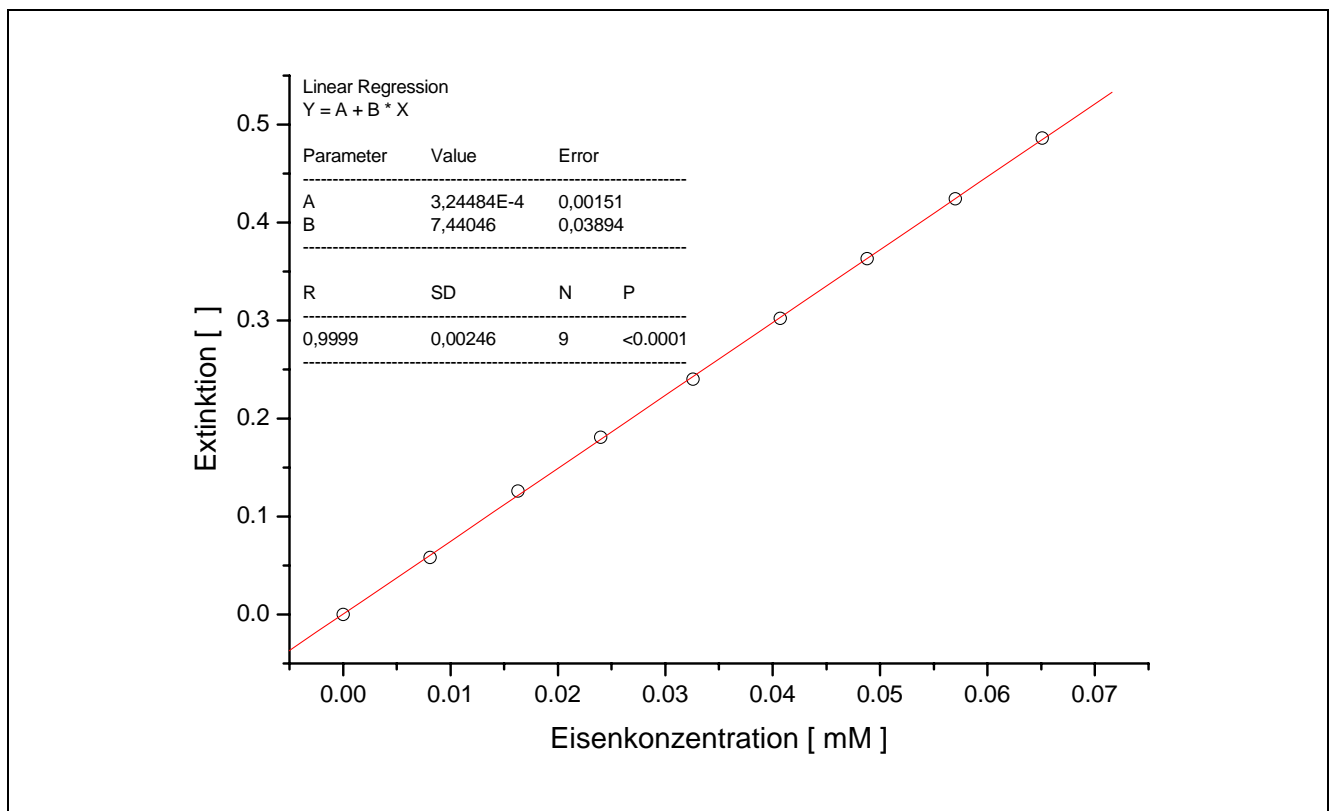


Abbildung B-5: Extinktion gegen die Eisenkonzentration (n/v)

Die eigentlichen Proben (die Überstände) wurden zur Bestimmung der Eisenkonzentration verascht, den Ablauf zeigt das folgende Pipettierschema.

Tabelle B-4: Pipettierschema zur Veraschung (alle Überstände 1:10 verdünnt, Gesamtvolumen 3.5 ml)

#	Inkubationsdauer [min]	Überstand [µl]	H ₂ O [µl]	HCl [µl]	H ₂ O ₂ [µl]	Na ₂ CO ₃ [µl]
1	0	50	1950	250	250	1000
2	2.5	100	1900	250	250	1000
3	5	150	1850	250	250	1000
4	10	200	1800	250	250	1000
5	20	300	1700	250	250	1000
6	30	400	1600	250	250	1000
7	45	500	1500	250	250	1000
LW	-	0	2000	250	250	1000

Zur Bestimmung der Eisen-Konzentrationen der veraschten Überstände wurde analog zur Erstellung der Kalibrierkurve verfahren: zu jeder Probe wurden jeweils 1 ml Bipyridin, 1 ml Na₂SO₃-Lösung und 0.5 ml 1 N HCl zugefügt. Die Eisenkonzentration kann nun nach folgender Formel berechnet werden:

$$c(\text{Fe}) = \frac{E - A}{B} = \frac{E - 3,245 \cdot 10^{-4}}{7,44046} \cdot \text{mM} . \quad (\text{B.4})$$

A und B stammen aus Abbildung B-5. Es ergeben sich die folgenden Ergebnisse.

Tabelle B-5: Eisenbestimmung der veraschten Überstände (Berücksichtigung der Verdünnung der Überstände selbst, der Verdünnung bei der Veraschung und bei der Eisenbestimmung)

#	Probe [ml]	H ₂ O [ml]	Verdünnungsfaktor	Extinktion	c(Fe) [mM]
1	0.25	2.75	1540.00	0.056	11.59
2	0.5	2.5	385.00	0.172	8.90
3	0.75	2.25	171.11	0.237	5.45
4	1	2	96.25	0.165	2.13
5	1.25	1.75	51.33	0.12	0.83
6	1.5	1.5	32.08	0.125	0.54
7	1.75	1.25	22.00	0.134	0.40

Nun können wir abermals die Eisenkonzentration gegen die Inkubationsdauer auftragen und mit den zuvor gewonnenen Ergebnissen vergleichen.

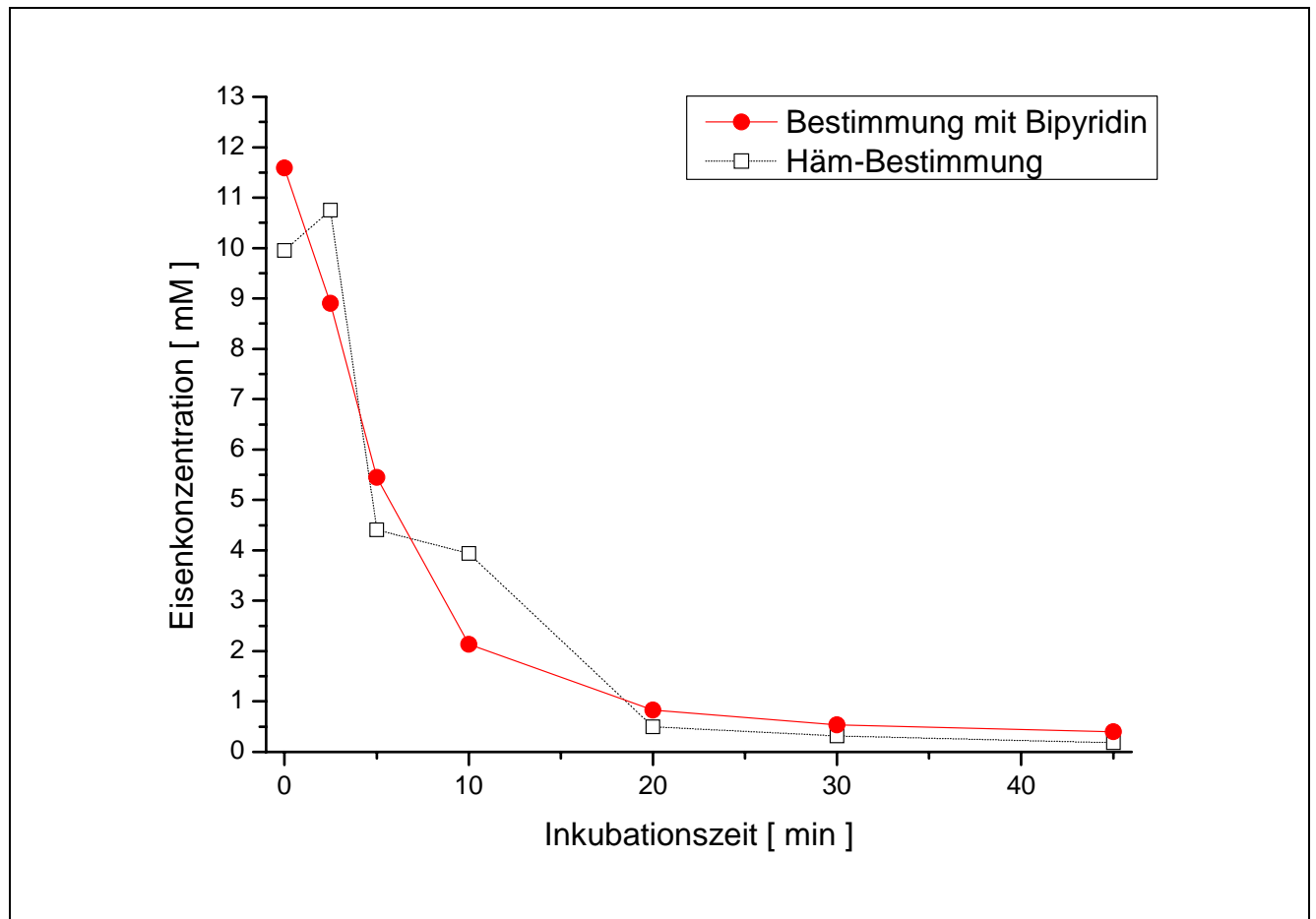


Abbildung B-6: Vergleich zwischen der Eisen-Bestimmung mit Bipyridin und der Häm-Eisen-Bestimmung

Es zeigt sich eine mehr oder weniger gute Übereinstimmung der beiden Methoden, wobei wir der Eisenbestimmung mit Bipyridin den Vorzug geben wollen, da diese eindeutig den exponentiellen Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und Eisenkonzentration wiedergibt. Vielleicht gab es bei Messung der unveraschen Überstände Fehler durch eine ungenügende Abtrennung (durch Zentrifugation) der Zellbestandteile, die bei der Messung (aufgrund ihrer Größe) durch Streuung zu Abweichungen vom Lambert-Beer'schen Gesetz geführt haben.

(3) **Kupferbestimmung**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von SOD in den Überständen der erhitzten Hämolyse (und in der abgegebenen SOD) wurde eine atomabsorptionsspektroskopische (AAS) Kupferbestimmung durchgeführt. Man kann aus den Messergebnissen direkt die SOD-Konzentration ermitteln, da jedes SOD-Molekül zwei Kupferatome enthält. Das in der Probe vorhandene Kupfer wird hierbei durch Erhitzen verdampft und gelangt in den Gaszustand, bei der Messung wird Licht aus einer „Kupfer-Lampe“ mit gleicher Wellenlänge (324 nm) eingestrahlt und durch das gasförmige Kupfer absorbiert. Die Absorption ist proportional zum Schreiberausschlag und proportional zur Kupfer-Konzentration. Zur Kalibrierung wurden zwei Proben bekannter Konzentration (2,5 μM und 5,0 μM) am Anfang und am Ende der Messreihe gemessen.

Tabelle B-7: Kupfer-Bestimmung (alle Überstände wurden zur Messung 1:10 verdünnt)

#	Inkubationsdauer [min]	l [mm]	c(Cu) [μM]
1	0	37	9.43
2	2.5	16	8.16
3	5	15	7.65
4	10	18	9.18
5	20	13	6.63
6	30	9	4.59
7	45	8	4.08

Die Kupferkonzentration sollte auch bei längerer Hitzebehandlung relativ konstant bleiben; die beobachteten Verluste können einerseits dadurch zustande gekommen sein, dass sich durch Mitfällung SOD im Niederschlag befunden hat (und somit nicht in die Kupfer-Bestimmung mit einfließt). Andererseits (aber mit demselben Endergebnis) könnte durch eine geringfügig zu hohe, aber auch für SOD schädliche Temperatur über 75 °C dieses ausfallen und sich im Niederschlag befinden.

B.2.b Bestimmung der SOD-Aktivität

Die Aktivität der SOD wird mit Hilfe eines kompetitiven Tests bestimmt: Superoxid wird enzymatisch durch Xanthinoxidase (XOD) erzeugt und reduziert den Farbstoff NBT (Nitroblautetrazolium). Dessen Extinktion steigt proportional zur Menge des gebildeten $O_2^{\cdot-}$ an; wird Superoxid jedoch durch SOD inaktiviert, erhält man eine geringere Extinktionsänderung, es findet eine Hemmung statt, diese kann man mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Hemmung} = \frac{\Delta E(\text{LW}) - \Delta E}{\Delta E(\text{LW})} \cdot 100\% \quad (\text{B.6})$$

Die Bestimmung erfolgte photometrisch bei 550 nm, der Nullabgleich wurde mit einem Ansatz mit durchgeführt, der 50 μl Wasser enthielt.

Tabelle B-8: Ansatz für SOD-Test

Substanz	Volumen [μl]
NBT	600
Xanthin (1 mM)	25
EDTA (10 mM)	10
Probe / Wasser / Puffer	50
XOD	25

Die Konzentration der SOD-Stammlösung (die ausgegebene SOD-Lösung wurde 1:5 verdünnt) wurde mit Hilfe der AAS bestimmt; es wurden SOD-Proben vermessen, in denen die Stammlösung 1:5 und 1:25 verdünnt wurde. Berücksichtigt man die Tatsache, dass je Molekül SOD zwei Kupferatome vorliegen, so gelangt man zu einer Konzentration der Stammlösung mit 4.655 μM; zur Kalibrierung des SOD-Tests wurden die Extinktionsänderungen bei definierten SOD-Konzentrationen gemessen.

Tabelle B-9: Hemmung durch SOD (mit unterschiedlichen SOD-Konzentrationen)

Probe	SOD-Konzentration [μM]	Extinktion	Hemmung [%]
Leerwert	0.0000	0.391	0.00
1:5	0.9310	0.126	67.77
1:25	0.1862	0.223	42.97
1: 50	0.0931	0.241	38.36
1:250	0.0186	0.391	0.00
<i>1: 500</i>	<i>0.0093</i>	<i>0.387</i>	-
<i>1:1000</i>	<i>0.0047</i>	<i>0.386</i>	-

Die Werte der Proben 1:500 und 1:1000 fanden keine Verwendung, da diese bereits im Bereich der Leerwert-Absorption lagen (*kursiv*). Eine Auftragung der logarithmischen SOD-Konzentration gegen die Hemmung (oder die Extinktion) liefert die Kalibrierfunktion.

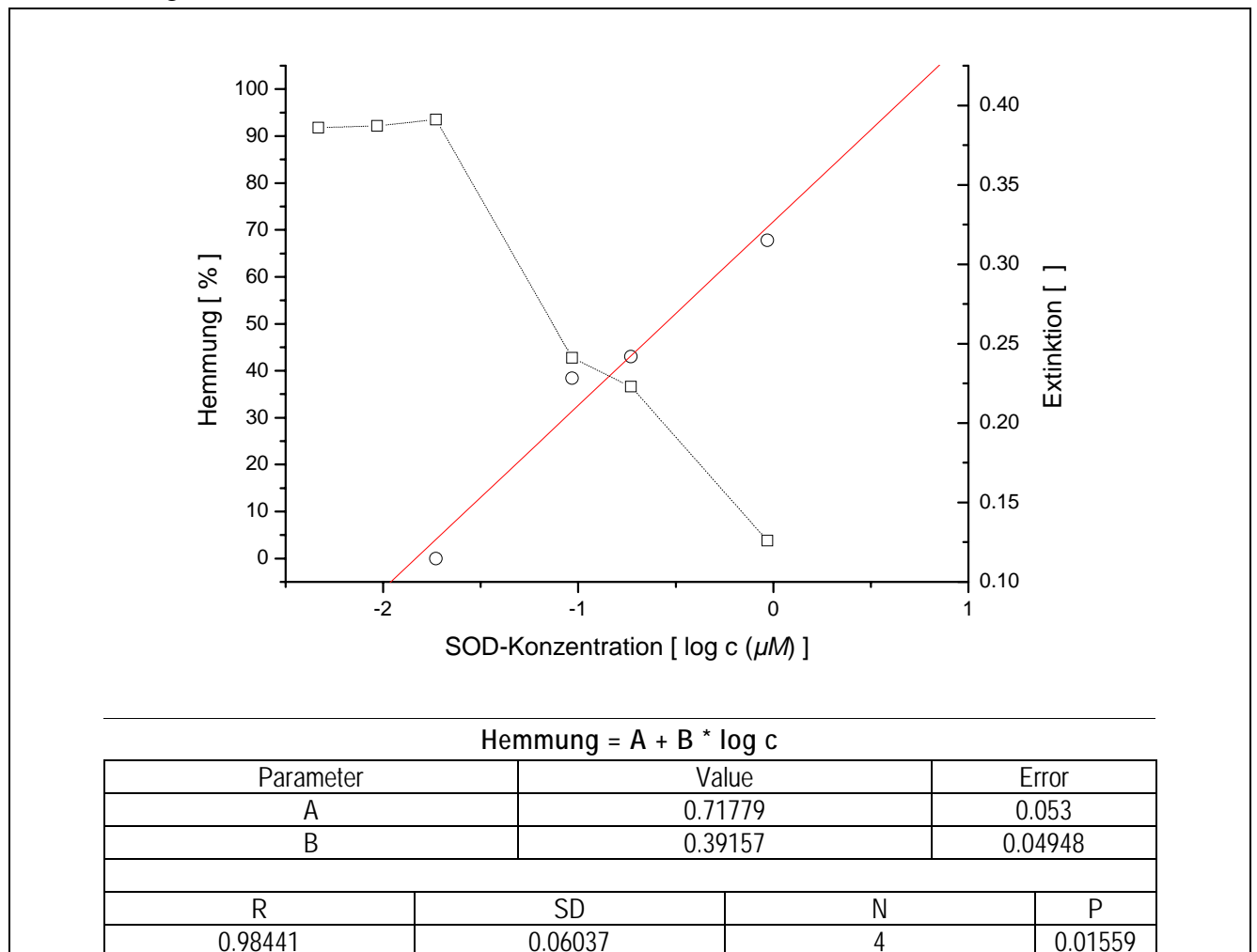


Abbildung B-8: Kalibrierung des SOD-Tests

Es gilt, dass 50% Hemmung einer Unit (U) entspricht, hier gilt dies für eine SOD-Konzentration von 0.278 μM (in der zugegebenen Lösung). Für die Berechnung einer unbekanntem SOD-Konzentration ergibt sich mit den Parametern A und B:

$$c_{\text{SOD}} = 10^{\left(\frac{\text{Hemmung}-A}{B}\right)} \mu\text{M} \tag{B.7}$$

Analog wurde der SOD-Test mit den Überständen der erhitzten Hämolyse durchgeführt.

Tabelle B-10: SOD-Aktivität der Überstände

#	Extinktion	Hemmung [%]	Verdünnung	c(SOD) [μM]	SOD-Aktivität [U]
1	0.155	60.358	10	5.109	18.39
2	0.139	64.450	5	3.249	11.70
3	0.132	66.240	5	3.610	12.99
4	0.125	68.031	5	4.011	14.44
5	0.142	63.683	5	3.106	11.18
6	0.184	52.941	5	1.652	5.94
7	0.178	54.476	5	1.807	6.51
Leerwert	0.391	0.000	-	-	-

Die SOD-Aktivität sollte über den gesamten Zeitraum konstant bleiben, da das Enzym sehr hitzestabil ist. In der folgenden Abbildung wollen wir die mit Hilfe der AAS gefundene Kupferkonzentration mit der bestimmten SOD-Konzentration sowie der SOD-Aktivität vergleichen:

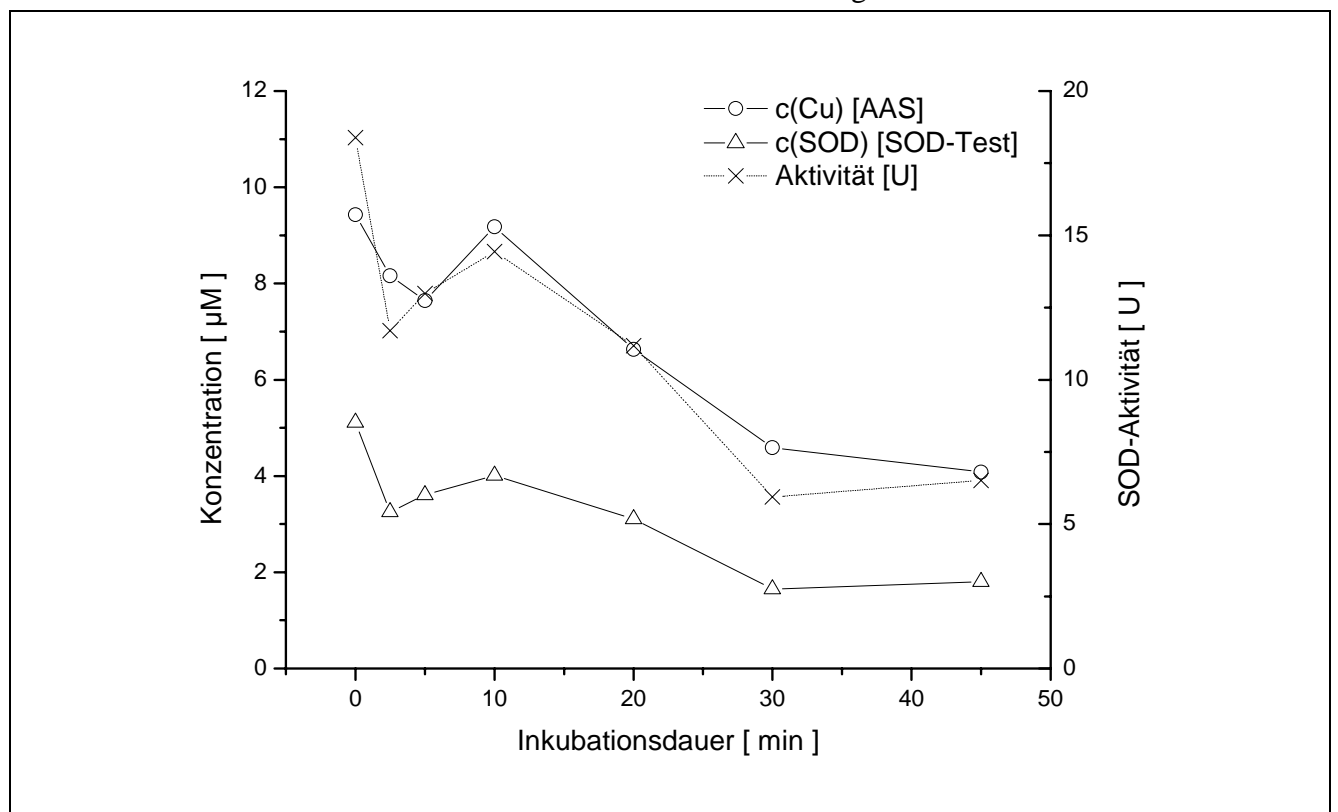


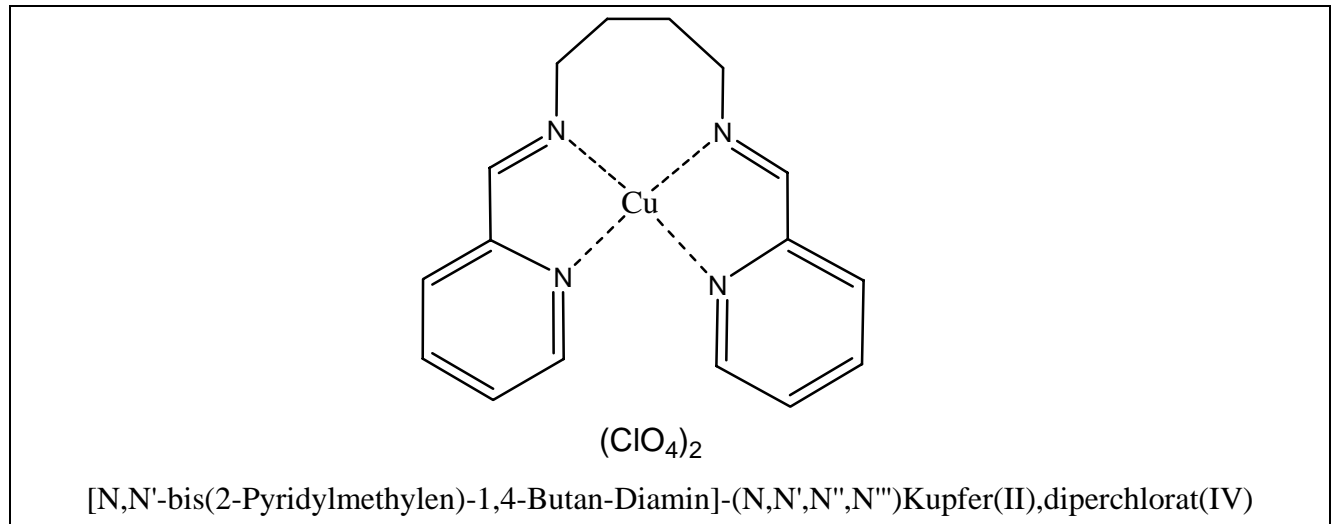
Abbildung B-9: Kupferkonzentration und SOD-Aktivität in Abhängigkeit der Kupferkonzentration

Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den bestimmten Kupfer-Konzentrationen und den SOD-Konzentrationen; die Kupferkonzentration ist immer höher (ungefähr doppelt so hoch) wie die SOD-Konzentration, was mit der stöchiometrischen Zusammensetzung der SOD in Einklang steht. Einhergehend mit der Abnahme der SOD-Konzentration (sowie der Kupferkonzentration) verringert sich auch die SOD-Aktivität, im Test von etwa 17 U auf 7 U, die Aktivität hat sich dementsprechend

auf etwa 40 % des Ausgangswertes verringert, die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich bei einer zu hohen Inkubationstemperatur.

B.2.c Messung der Aktivität eines SOD-aktiven Kupferkomplexes

Mit demselben SOD-Test wurde die Aktivität verschiedener Konzentrationen des *[N,N'-bis(2-Pyridylmethyl)-1,4-Butan-Diamin]-(N,N',N'',N''')Kupfer(II)diperchlorat(IV)-Komplexes* ($M = 538 \text{ g/mol}$) bestimmt.



Dazu wurden 9.3 mg (entsprechen 17.2 μmol) in 1.729 ml H₂O aufgelöst, was einer Konzentration von 10 mM entspricht, dann wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt.

Tabelle B-11: Verdünnungen des Kupfer-Komplexes und Messergebnisse des SOD-Tests

Konzentration [μM]	Extinktion	Hemmung [%]	Aktivität [U]
10000	0.037	91.15	1.82
5000	0.024	94.26	1.89
1000	0.03	92.82	1.86
500	0.04	90.43	1.81
100	0.064	84.69	1.69
50	0.137	67.22	1.34
10	0.355	15.07	0.30
5	0.317	24.16	0.48
LW	0.418	0.00	-

Tragen wir die Hemmung gegen die logarithmische Konzentration des Komplexes auf, erhalten wir das folgende Diagramm.

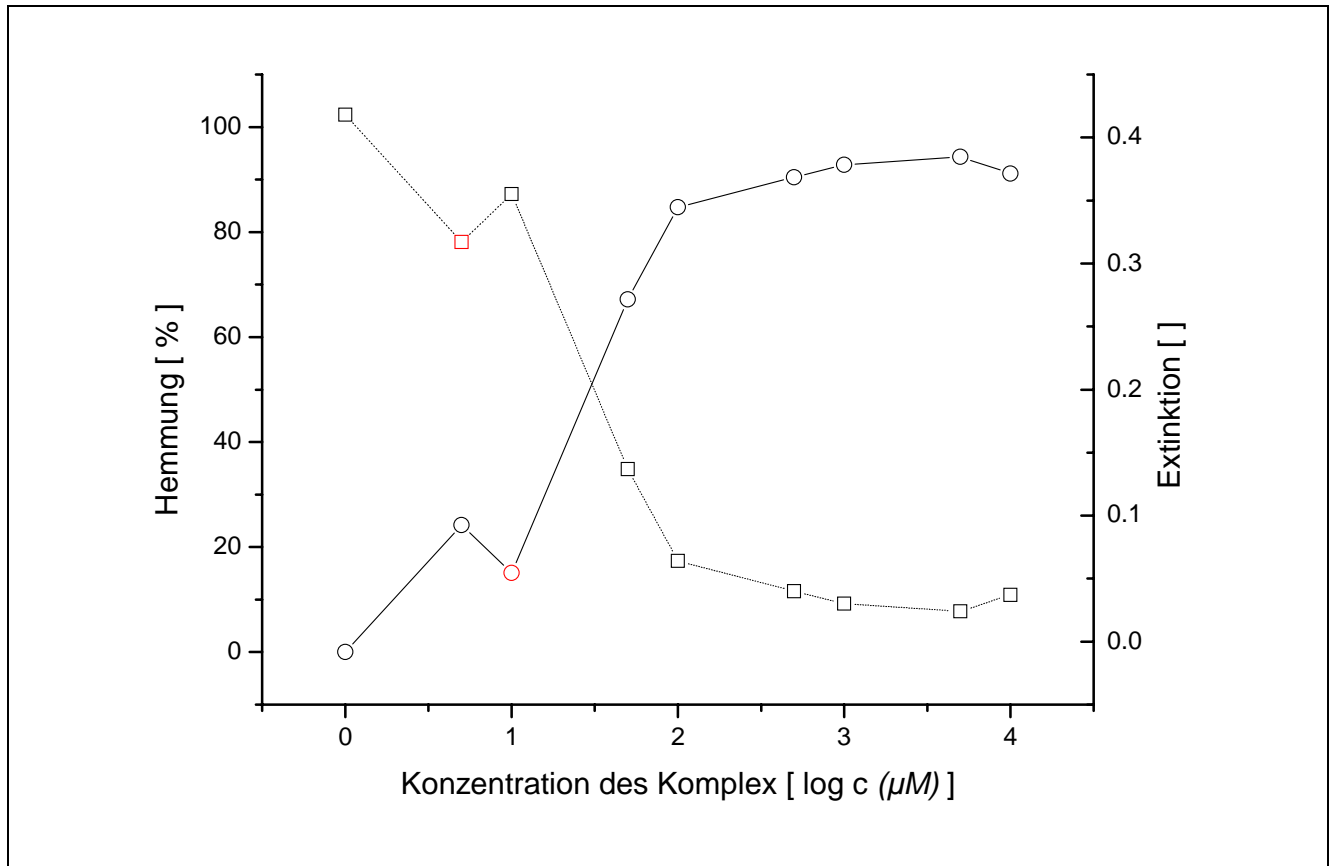


Abbildung B-10: Hemmkurve des Kupfer-Komplexes

Eine 50 %ige Hemmung wird durch eine Konzentration von $17.5 \mu\text{M}$ erreicht, im Falle der SOD reichen $0.278 \mu\text{M}$ aus, die „Effizienz“ des Enzyms ist demnach etwa 63-mal größer.

C. PEROXYDASE-AKTIVITÄT VON METALLKOMPLEXEN

C.1 Einleitung

In diesem Versuch soll untersucht werden, inwieweit Kupferkomplexe eine Peroxydase-Aktivität zeigen, die Aktivität wird mit der Aktivität der Katalase verglichen. Die Funktion des Abbaus von Wasserstoffperoxyd als reaktive Sauerstoffspezies wird im Organismus von der Katalase und weiteren Peroxydasen übernommen (siehe auch: Abbildung B-2); die Katalase katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxyd, Peroxydasen deaktivieren Wasserstoffperoxyd unter Oxidation verschiedener Substrate.

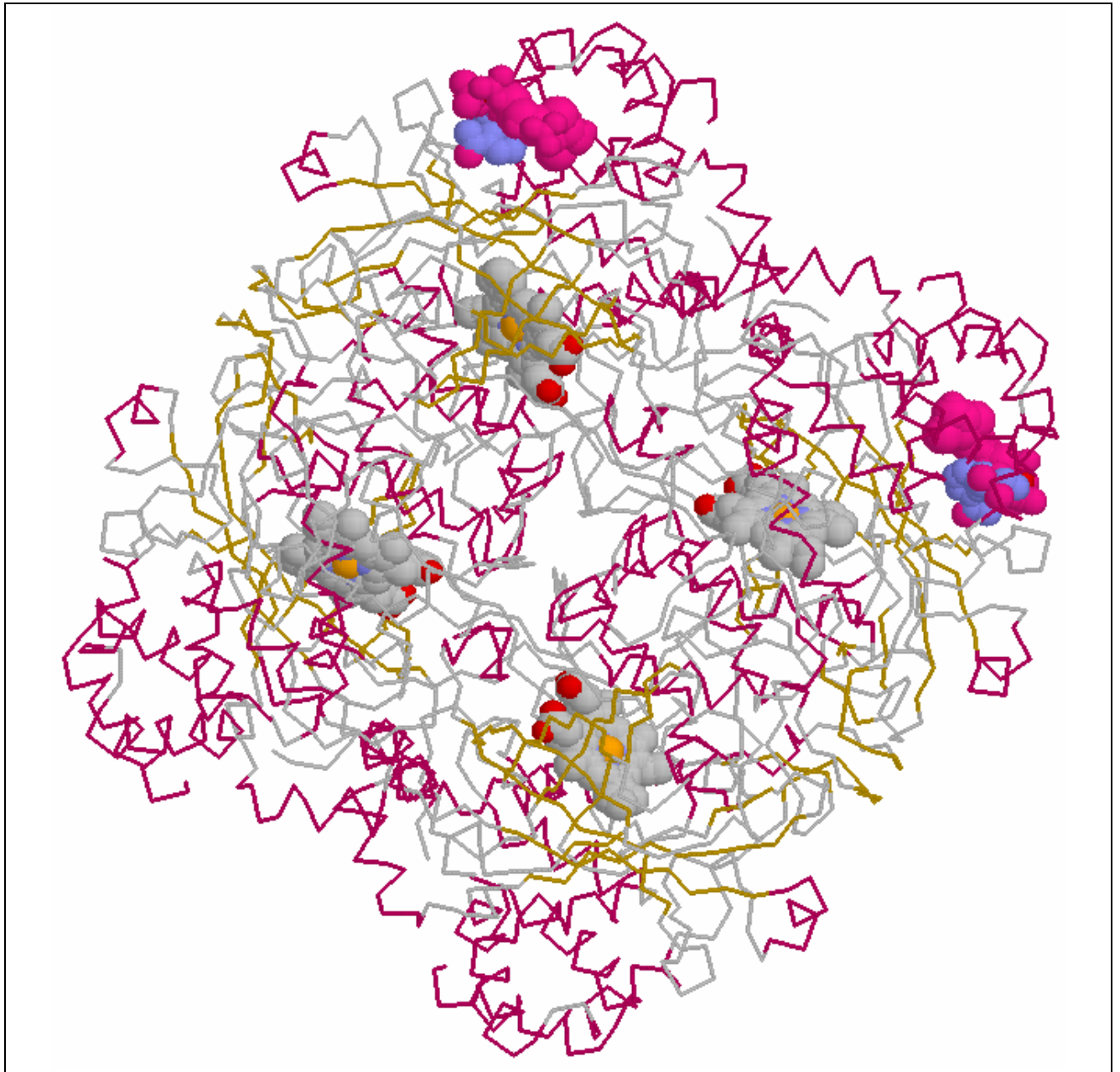


Abbildung C-1: Katalase (1DGB.pdb) aus menschl. Erythrocyten³(mit 4 Häm-Gruppen und 2 NADPH)

³ Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., Tainer, J. A.: *Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism*, J. Mol. Biol. 296 (2000)

Die Kupferkomplexe sind sich in ihrem Aufbau prinzipiell ähnlich, dennoch unterscheiden sie sich in der Koordination des Kupfers. Auf die Untersuchung der Peroxydase-Aktivität des Kupfer-EDTA-Komplexes und der Bestimmung der Aktivität bei verschiedenen pH-Werten wurde verzichtet.

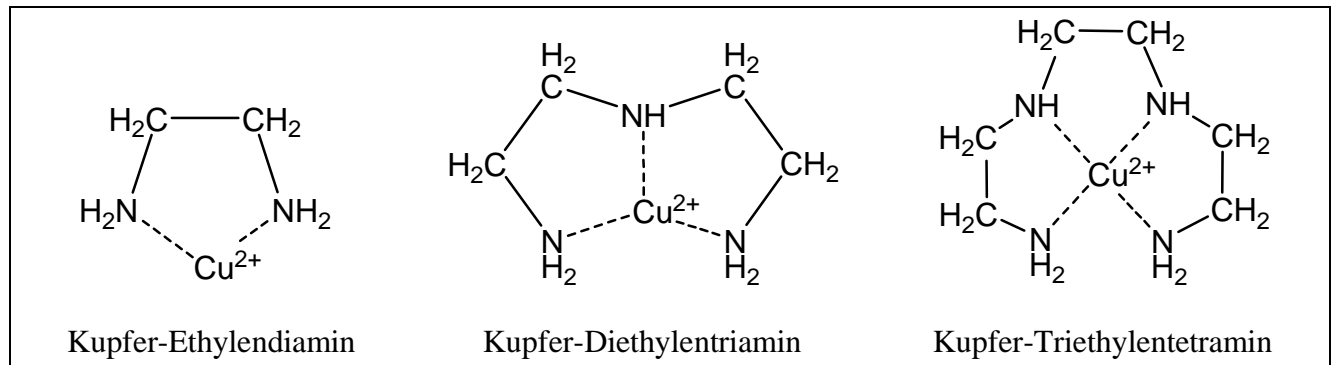


Abbildung C-2: Die ersten beiden Kupfer-Komplexe wurden auf Peroxydase-Aktivität untersucht.

C.2 Auswertung

Die Peroxydase-Aktivität wurde als zeitabhängige Spaltung von H_2O_2 untersucht, zu diesem Zweck verwendeten wir einen photometrischen Test zur Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration.

C.2.a Kalibrierung

Die Messung des in der Lösung vorhandenen Wasserstoffperoxyds geschieht mit Titanylsulfat.

Testansatz	1.5 ml Probelösung mit 1.5 ml Titanylsulfat-Reagenz
Messwellenlänge	410 nm
Leerwert	Wasser

Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe aus der Stammlösung 1:200 (aus Perhydrol 30 % mit 1.11 g / ml) hergestellt:

10 μL Perhydrol (34.016 g / mol) in 1990 μL Wasser bzw.

25 μL in 4975 μL Wasser

(Perhydrol 30 %: Lösung mit 333 g / l bzw. 9.79 M)

Tabelle C-1: Ergebnisse der Kalibrierung

Probe	Volumen [μl]	Wasser [μl]	c (H_2O_2) [mM]	Extinktion
Stammlösung	-	-	48.95	2.728
Stammlösung	-	-	48.95	2.752
1:10	200	Stammlösung	4.89	2.110
1:10	-	-	4.89	1.740
1:20	100	Stammlösung	2.45	0.739
1:40	50	Stammlösung	1.22	0.246
1:50	10	Stammlösung	0.98	0.229
1:60	500	1:20	0.82	0.222
1:80	1000	1:20	0.61	0.183
1:100	200	1:10	0.49	0.227
1:100	-	-	0.49	0.141

Die folgende Abbildung zeigt die Kalibrierfunktion. Die Extinktionen der Stammlösung sowie die farbig markierten Datenpunkte wurden zur Erstellung der Kalibrierkurve nicht verwendet.

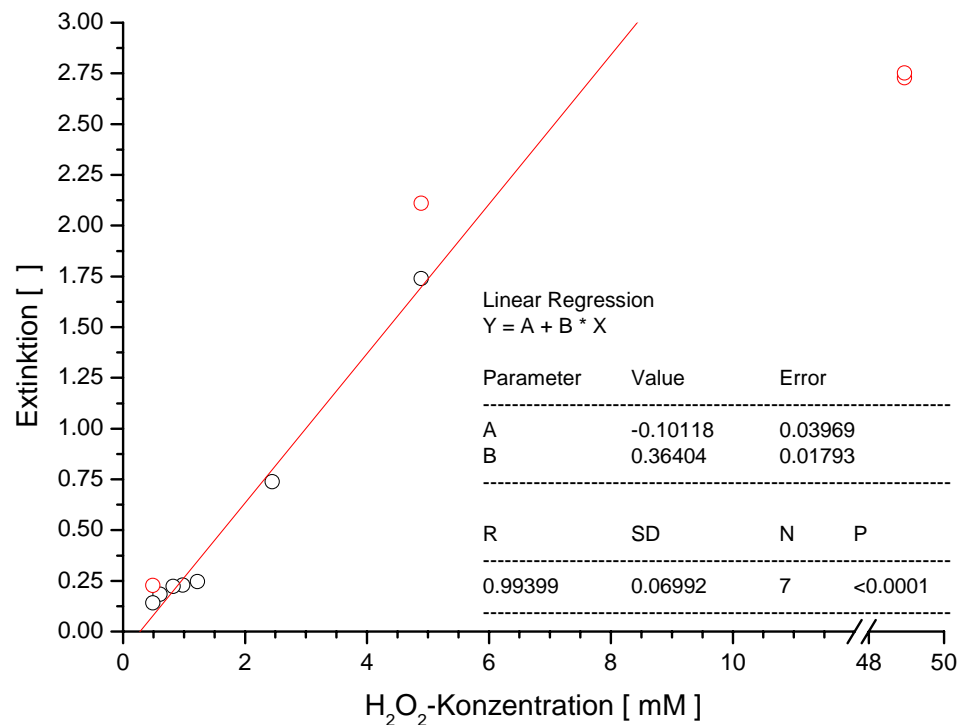


Abbildung C-3: Wasserstoffperoxyd-Kalibrierkurve

C.2.b Herstellung der Kupfer-Komplexe (pH 9) und der Katalase-Lösung

Wir untersuchten die Peroxydase-Aktivität zweier Kupfer-Komplexe, die sich durch die Zahl der besetzten Koordinationsstellen am Kupfer unterscheiden. Die Komplexe wurden folgendermaßen hergestellt (der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 9 eingestellt):

- 5 mL Wasser und

15 mL 0.01 M Ethylendiamin (60.10 g / mol mit 900 g / L) „EDA“
0.601 g / L oder 0.00901 g / 15 mL
Ansatz: 10.02 µL in 15 mL

10 mL 0.01 M Kupfersulfat-Lösung
- 20 mL 0.1 M Diethylentriamin (103.19 g / mol mit 950 g / L) „DETA“
10.319 g / L oder 0.20638 g / 20 mL oder
Ansatz: 217.24 µL in 20 mL

10 mL 0.1 M Kupfersulfat-Lösung

Darüber hinaus wollen wir noch den gleichen Versuch mit Katalase durchführen:

3. 5 μL Katalase-Suspension (20 mg / ml) auf 50 ml, Konzentration 7.7 nM

C.2.c Messung der Peroxydase-Aktivität

Zur Messung der Peroxydase-Aktivität wurden Ansätze der hergestellten Lösungen mit Wasserstoffperoxyd (1 ml Stammlösung) versetzt und nach gewissen Zeitabständen ein Aliquot entnommen und mit diesem der oben beschriebene Wasserstoffperoxyd-Test mit Titanylsulfat durchgeführt. Die Peroxydase-Aktivität des Kupfer-Ethylendiamin-Komplexes war in der oben hergestellten Konzentration so hoch, dass dieser sukzessive verdünnt werden musste. Bei einer Verdünnung von 1:6 konnte der Extinktions-Zeit-Verlauf gut verfolgt werden.

Die Ausgangskonzentration des vorhandenen Wasserstoffperoxyds ergibt sich zu 3.77 mM im Ansatz.

Tabelle C-2: Peroxydase-Aktivität, Extinktion (Testansatz: 12 ml Kupferkomplex bzw. Katalase mit 1 ml H_2O_2 -Stammlösung, Entnahme von 1.5 ml Lösung, Zugabe zu 1.5 ml Titanylsulfat-Reagenz)

Zeit [min]	Katalase (I)	Katalase (II)	Cu-DETA			Cu-EDA	
			(1:2)	(1:3)	(1:6)		
0	1.305	1.259	1.053	0.036	1.151	0.303	
0.5	1.229	1.144	1.004	0.004	0.007	0.907	
1	1.133	1.064	0.931	0	0.007	0.618	
2	0.915	0.886	0.825	-0.02		0.311	
4	0.632	0.726	0.632	-0.02		0.112	
6	0.343	0.433	0.589	-0.04		0.055	
8	0.283	0.325	0.506			0.036	
10	0.186	0.242	0.466			0.018	
12	0.128	0.162	0.434				
14	0.069	0.147	0.44				
16			0.373				
18			0.366				
20			0.331				

Mit Hilfe der Kalibrierkurve können wir die Konzentrationen des Wasserstoffperoxyds berechnen.

Tabelle C-3: Konzentrations-Zeit-Verlauf (Konzentrationen in mM)

Zeit [min]	Katalase (I)	Katalase (II)	Cu-DETA			Cu-EDA	
			(1:2)	(1:3)	(1:6)		
0	3.83	3.70	3.14	0.38	1.11	3.41	
0.5	3.62	3.39	3.01	0.29	0.30	2.74	
1	3.36	3.17	2.81	0.28	0.30	1.96	
2	2.77	2.69	2.52			1.12	
4	2.00	2.25	2.00			0.58	
6	1.21	1.46	1.88			0.43	
8	1.05	1.16	1.65			0.38	
10	0.78	0.94	1.54			0.33	
12	0.63	0.72	1.46				
14	0.47	0.68	1.47				
16			1.29				
18			1.27				
20			1.18				

Die graphische Darstellung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs liefert das folgende Diagramm.

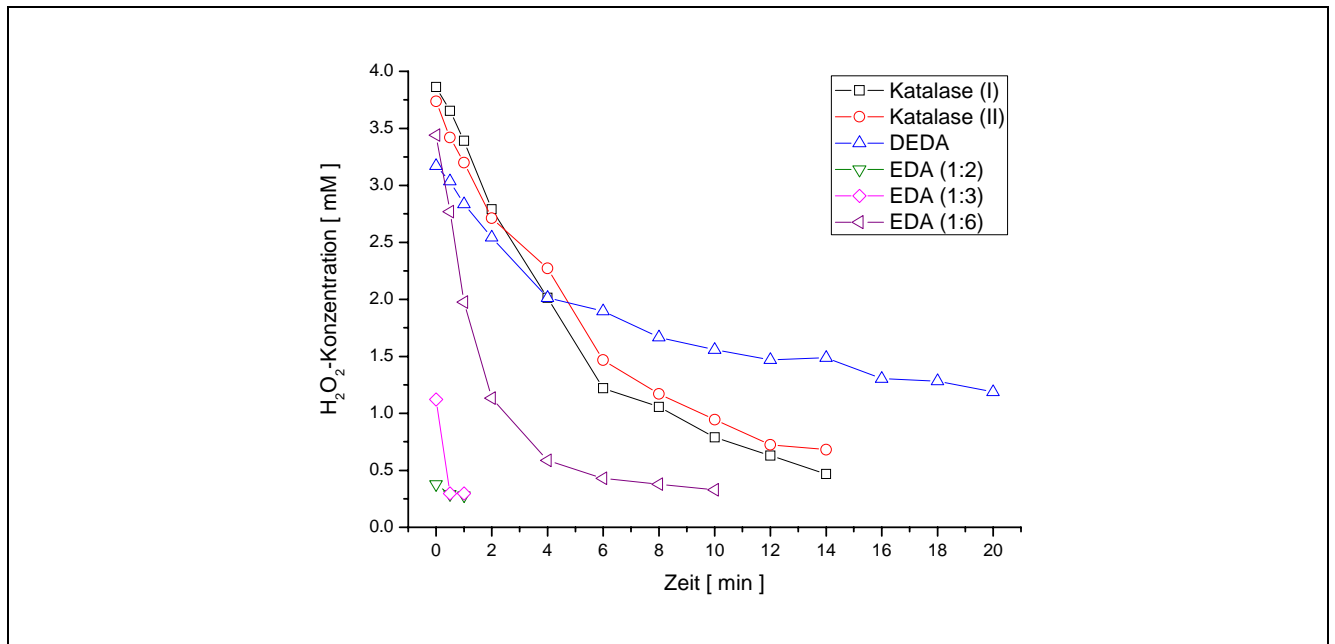


Abbildung C-4: Konzentrations-Zeit-Verlauf

Man erkennt eine exponentielle Abnahme der Wasserstoffperoxyd-Konzentration. Um die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion pseudo-erster Ordnung zu erhalten, verwenden wir die folgende Gleichung:

$$k = -\frac{\ln\left(\frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_0}{[\text{H}_2\text{O}_2]_t}\right)}{t} \quad (\text{min}^{-1}) \quad (\text{C.1})$$

Tragen wir nun den logarithmischen Term gegen die Zeit auf, so erhalten wir das folgende Diagramm.

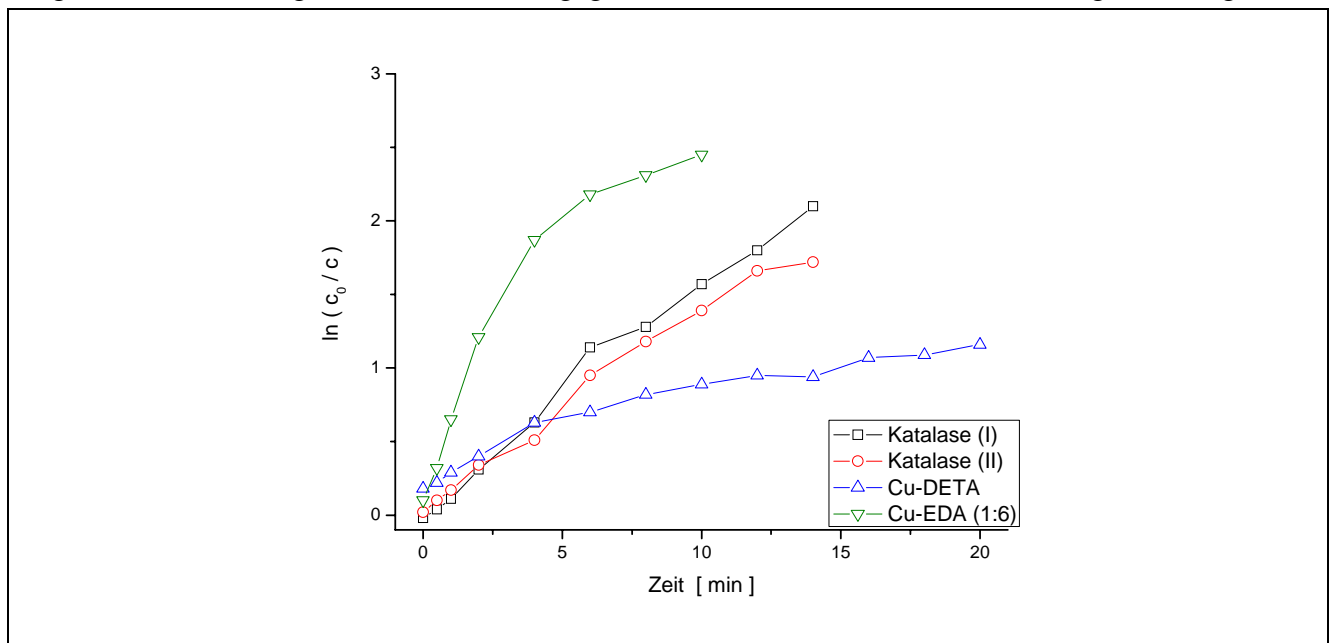


Abbildung C-5: Auftragung nach Gleichung (C.1)

In dieser Form der Auftragung zeigen die Kurven einen linearen Verlauf zu Beginn der Reaktion.

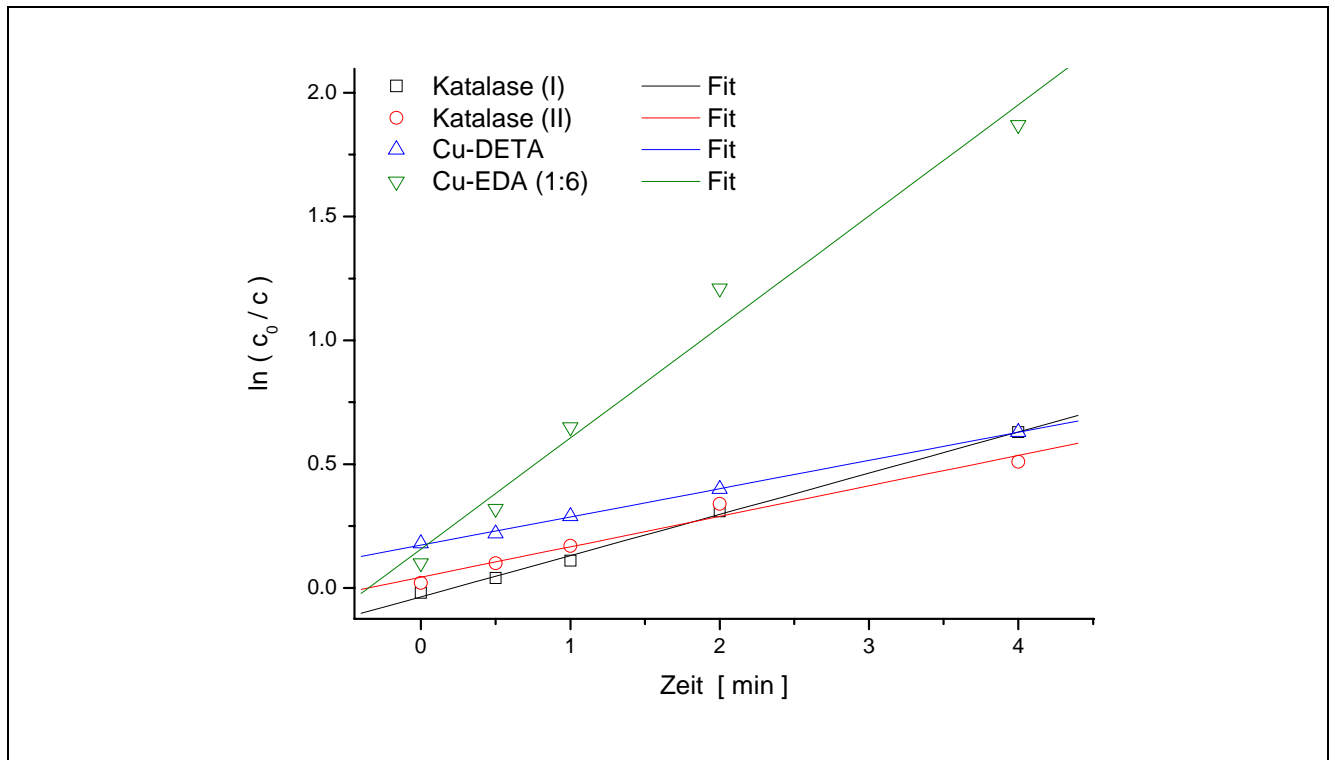


Abbildung C-6: Auftragung nach Gleichung (C.1); Vergrößerung des Anfangsbereichs

Die Verläufe können wir mit Geraden durch lineare Regression beschreiben, die Steigung entspricht k .

Tabelle C-4: Ergebnisse der linearen Regression

In (c ₀ / c) = kt + A			
Katalase (I)			
Parameter	Value		Error
A	0.03575		0.01128
k [min ⁻¹]	0.1665		0.00547
R	SD	N	P
0.99839	0.0173	5	<0.0001
Katalase (II)			
Parameter	Value		Error
A	0.047		0.02308
k [min ⁻¹]	0.122		0.0112
R	SD	N	P
0.9876	0.0354	5	0.00165
Cu-DETA			
Parameter	Value		Error
A	0.173		0.00476
k [min ⁻¹]	0.114		0.00231
R	SD	N	P
0.99938	0.0073	5	<0.0001

In (c ₀ / c) = kt + A			
Cu-EDA (1:6)			
Parameter	Value		Error
A	0.15725		0.07516
k [min ⁻¹]	0.4485		0.03646
R	SD	N	P
0.99023	0.11529	5	0.00116

Wir finden also die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion und können diese auf die in der Lösung vorhandene Metallionen-Konzentration normieren (Katalase enthält vier Häm-Eisen).

Probe	Konzentration	k [min ⁻¹]	k (normiert) [min ⁻¹ mM ⁻¹]
Katalase (4 Häm-Fe)	30.77 nM	0.14475	4688
Katalase (Enzym)	7.7 nM	0.14475	18752.5
Cu-EDA (1:6)	0.513 mM	0.4485	0.874
Cu-DEDA	30.76 mM	0.114	0.004

Wir finden eine sehr hohe Peroxydase-Aktivität der Katalase (was nicht sonderlich verwunderlich ist, da diese die höchste bekannte Wechselzahl von 10 Millionen besitzt). Ungleich weniger reaktiv sind die Kupferkomplexe, wobei sich zeigt, dass weniger koordiniertes Kupfer (im Kupfer-Ethylendiamin-Komplex) eine höhere Peroxydase-Aktivität besitzt, das von uns nicht untersuchte Kupfer-EDTA eine noch geringere (bzw. praktisch keine) Aktivität gezeigt hätte. Offensichtlich ist die Effizienz der Peroxydase-Aktivität davon abhängig, inwieweit das Substrat (H₂O₂) mit dem Kupfer einen Komplex bilden kann..

D. SAUERSTOFFRADIKALE

D.1 Theoretischer Hintergrund

Reaktive Sauerstoffradikale können in Gegenwart von Sauerstoff und Übergangsmetallionen (Fe^{2+} und Cu^+) gebildet werden. Neben den Hydroxylradikalen (OH-Radikal) existieren vor allem die Superoxidradikale (O_2^-) und das Sauerstoffdiradikal (O_2). Die OH-Radikale werden hauptsächlich durch homolytische Spaltung von H_2O_2 in Gegenwart von Fe^{2+} gebildet:



Diese Reaktion wurde nach ihrem Entdecker als „Fenton-Gleichung“ bekannt (1894).

OH^\bullet als äußerst reaktive Sauerstoffspezies kann im menschlichen Körper mit Makromolekülen (wie Zucker, DNA, usw.) reagieren. Diese werden dabei zerstört und es kommt zur Schädigung des Gewebes (siehe auch: Abbildung B-2)

- Wasserstoffatom-Abgabe (z.B. von Methanol): $CH_3OH + OH^\bullet \rightarrow H_2O + C^\bullet H_2OH$
- Elektronentransfer: $Cl^- + OH^\bullet \rightarrow Cl^\bullet + OH^-$
- Addition an aromatische Ringstrukturen (z.B. DNA-Basen)
- Zerstörung von Desoxyribose (Versuch)

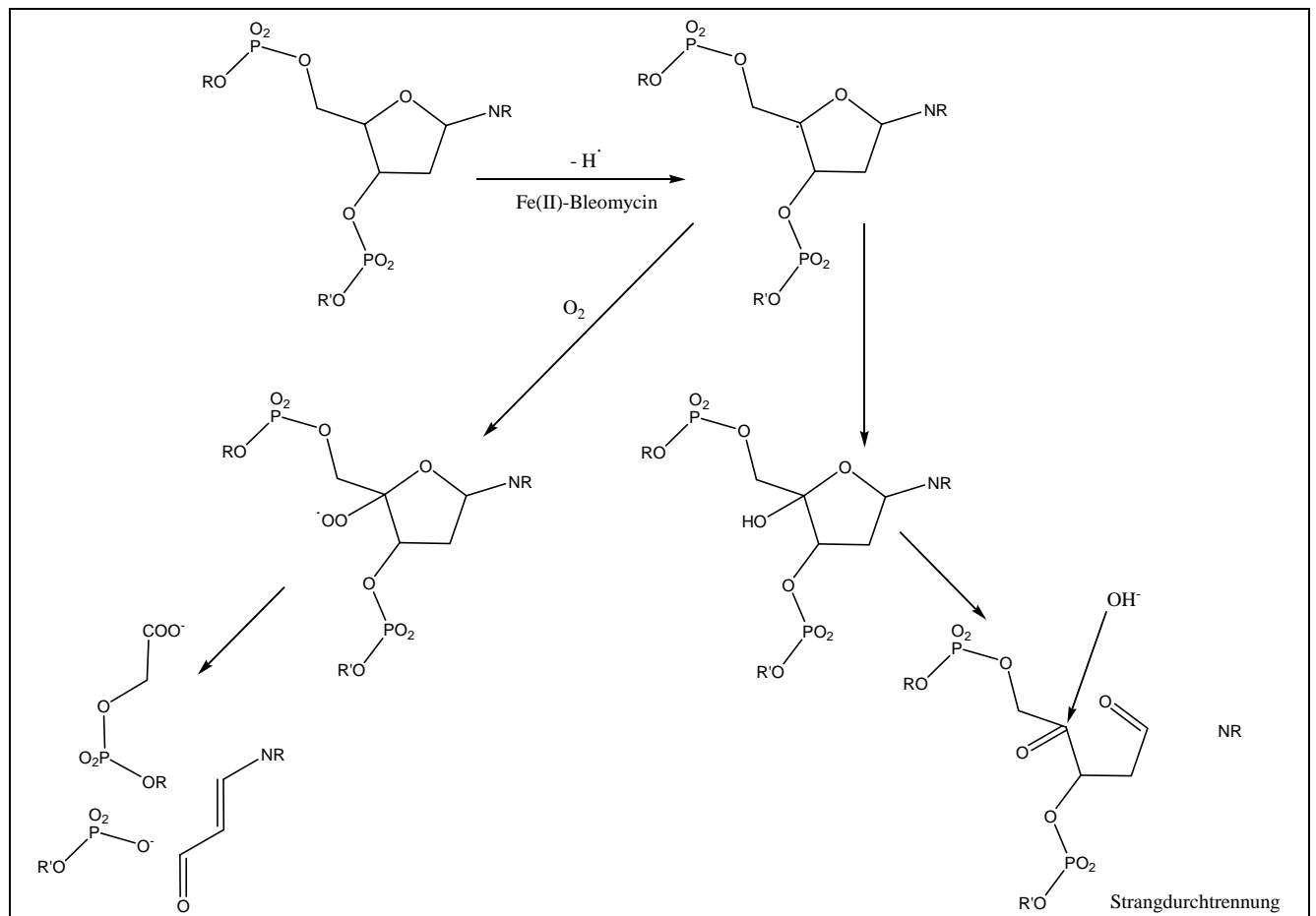


Abbildung D-1: Zerstörung von Desoxyribose / DNA durch Bleomycin (Glykoprotein; gegen Tumore verwendetes Antibiotikum) [aus: Lippard/Berg]

D.2 Versuchsauswertung

Dieser Versuch behandelt zwei Themengebiete:

- Depolymerisierung von Hyaluronsäure
- Zerstörung von Desoxyribose / Radikalfänger

D.2.a Depolymerisierung von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure ist ein Mucopolysaccharid, das sehr hochmolekular und äußerst viskos ist. Zusammen mit Kollagen dient es im menschlichen Körper als Gelenkschmiermittel. Des Weiteren findet man es im Glaskörper des Auges und in der Nabelschnur.

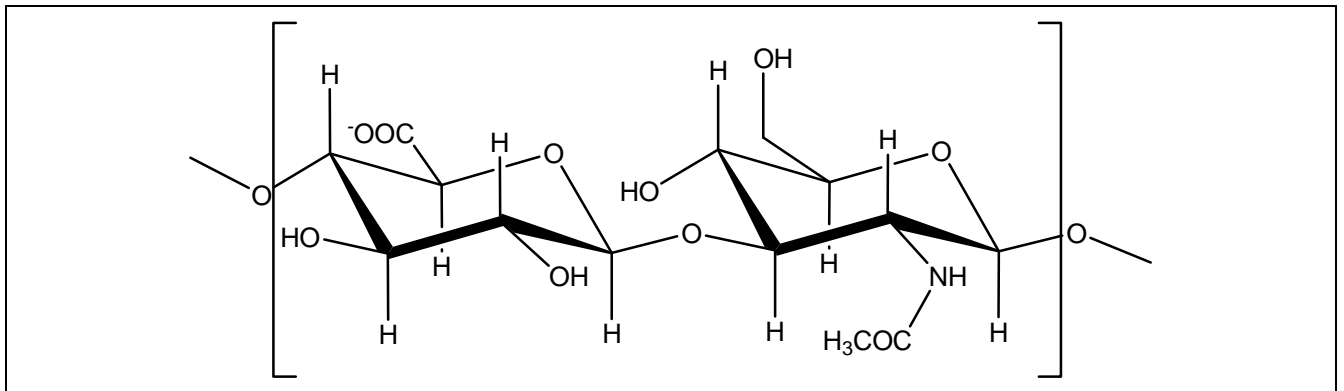


Abbildung D-2: Hyaluronsäure

Im Versuch soll gezeigt werden, dass sich die Viskosität der Hyaluronsäure durch OH-Radikal-Angriff herabsetzt, wobei die Hyaluronsäure in niedermolekulare Bruchstücke gespalten wird.

(1) *Versuchsaufbau*

Als Viskosimeter diente uns im Versuch eine Plastikspritze mit Kanüle. Diese wurde senkrecht an einem Stativ befestigt. Unter der Plastikspritze stand ein Reagenzglas bereit, um die Flüssigkeit wieder aufzufangen.

Bei diesem Versuch soll die Durchflusszeit zwischen oberer und unterer Markierung auf der Spritze gemessen werden, diese kann als Maß für die relative Viskosität herangezogen werden.

(2) *Reagenzien*

- Hyaluronsäure: 5 mg / 5 ml in 10 mM Kaliumphosphatpuffer
- Eisensulfat-EDTA-Komplex-Lösung: 25 mM
- Kupfersulfat-EDTA-Komplex-Lösung: 1 mM
- Ascorbinsäure: 0.034 g/ml

(3) *Durchführung*

Zuerst wurde die relative Viskosität von Hyaluronsäure allein bestimmt. Der eigentliche Reaktionsstart erfolgte dann mit einer Eisen-EDTA-Komplex-Lösung bzw. mit einer Kupfer-EDTA-Komplex-

Lösung. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) setzt die Konzentration freier Metallionen durch Chelatisierung herab. Dadurch wird hier eine Hydroxidbildung des Eisens bzw. des Kupfers verhindert.

1.5 ml der jeweiligen Lösung wurde mit dem Spritzenstempel aus einem Eppendorf-Cup vorsichtig (ohne Luftblasen) aufgezogen. Wenn die Spritze vollständig gefüllt war, wurde der Stempel ganz herausgezogen, um die Durchflusszeit zu bestimmen. Die Messung erfolgte so lange, bis keine Änderung mehr festzustellen war.

(4) *Messung mit Fe-EDTA-Lösung*

Die Durchflusszeit der Hyaluronsäure allein betrug bei zwei Messdurchläufen jeweils 95 s. Durch Zugabe von 15 μl der Eisen-EDTA-Komplex-Lösung zur Hyaluronsäure wurde die Reaktion gestartet.

Tabelle D-1: Messergebnisse (Fe-EDTA)

Zeit t [s]	Durchflusszeit t [s]	Zugabe von Fe ²⁺ [μl]
0	95	15
88	51	
196	40	
286	35	
375	34	
470	34	
540	34	15
610	30	
1032	25	15
1080	25	

Die Messwerte tragen wir nun graphisch auf.

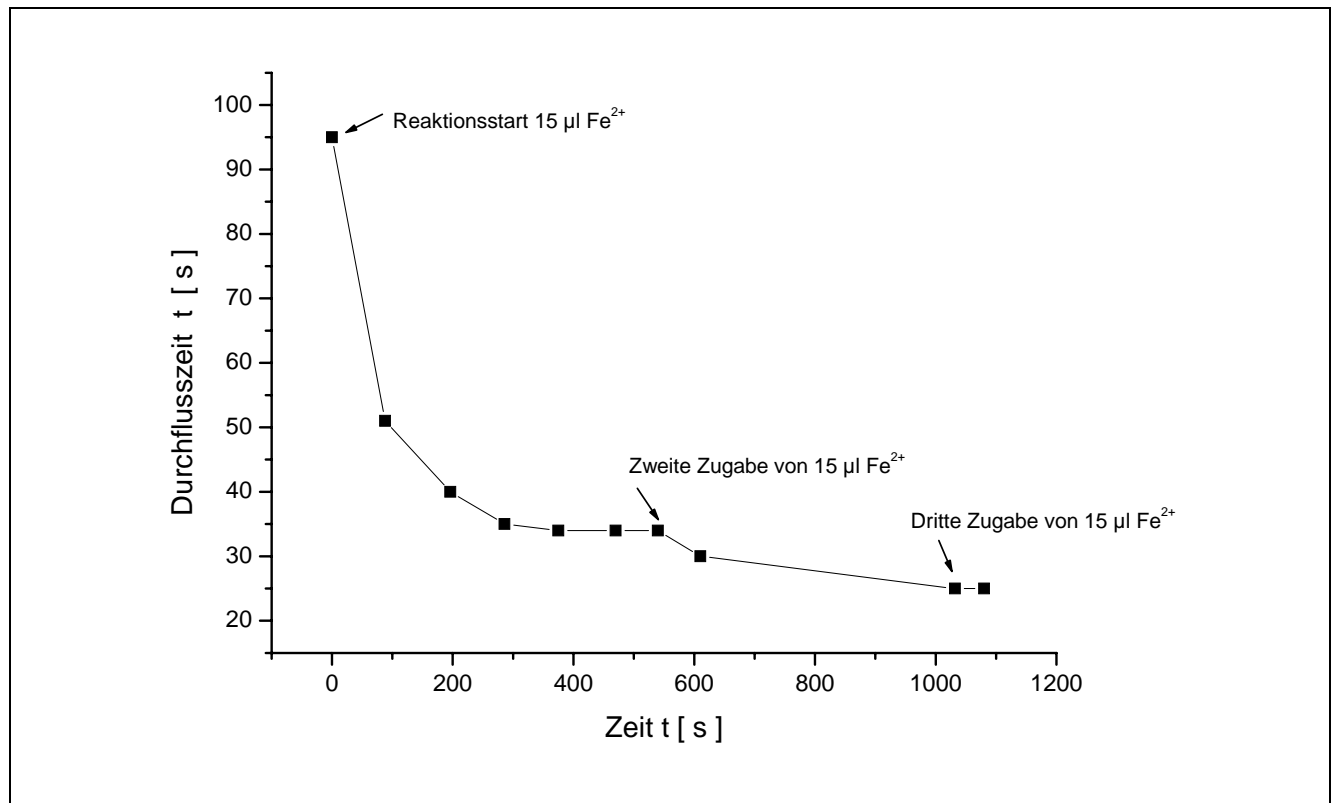


Abbildung D-3: Graphische Auftragung der Messwerte (Fe-EDTA)

Wie zu erwarten war, bewirkte das zugesetzte Fe^{2+} eine Herabsetzung der Viskosität. Entstandene Hydroxylradikale reagierten mit der Hyaluronsäure und setzten durch Bindungsspaltungen die Viskosität herab. Im Verlauf der Reaktion verkürzte sich dadurch die Durchlaufzeit um mehr als ein Drittel. Die Kurve zeigt außerdem einen exponentiellen Verlauf.

(5) Messung mit Kupfer-EDTA-Lösung

Die Durchflusszeit der Hyaluronsäure allein betrug im ersten Messdurchlauf 85 s, im zweiten 87 s. Der Mittelwert betrug somit 86 Sekunden Durchlaufzeit für die Hyaluronsäure. Wie oben wurde die Reaktion durch Zugabe von 45 µl der Kupfer-EDTA-Komplex-Lösung zu 1.5 ml Hyaluronsäure gestartet und anschließend Ascorbinsäure hinzu gegeben.

Tabelle D-2: Messergebnisse (Cu-EDTA)

Zeit t [s]	Durchflusszeit t [s]	Zugabe von Kupfer / Ascorbins. [µl]
0	86	45 Cu^{2+}
38	90	
273	90	45 Ascorbinsäure
440	70	
572	57	
710	45	15 Ascorbinsäure
1085	41	
1230	37	
1541	35	
2526	34	

Die Messwerte tragen wir nun graphisch auf.

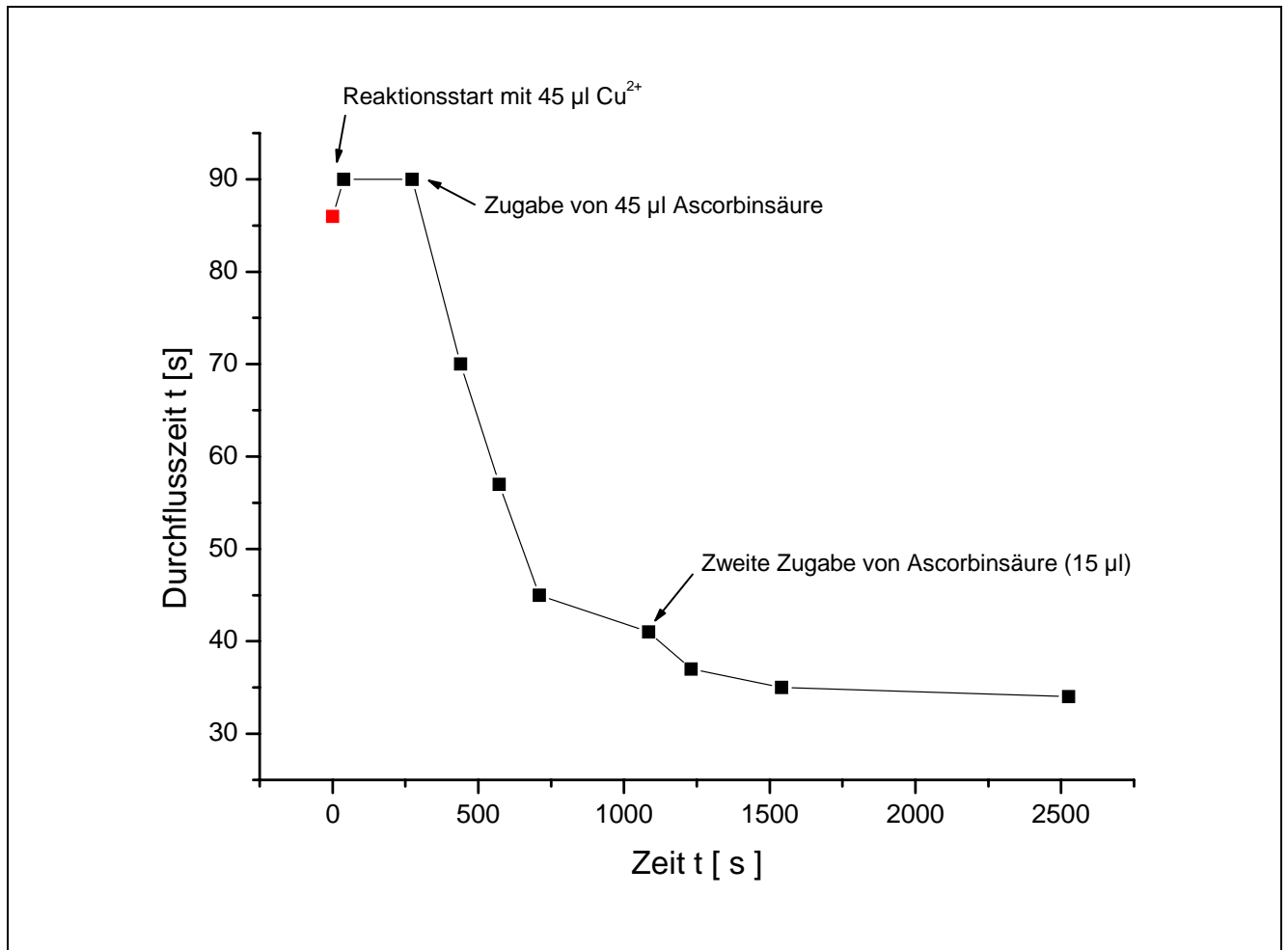


Abbildung D-4: Graphische Auftragung der Messwerte (Cu-EDTA)

Wie bereits beim Eisen gesehen, zeigt sich auch hier eine Verkürzung der Durchlaufzeit durch Zugabe von Übergangsmetall-Ionen (hier Cu^{2+}) und Reduktion mit Ascorbinsäure. Hier ist also nur Cu^+ in der Lage, Sauerstoffradikale zu produzieren; da dieses durch Ascorbinsäure immer wieder regeneriert wird, würden katalytische Mengen an Kupfer für die Reaktion ausreichen.

Der Startwert (vor Zugabe der Lösung) wurde maskiert (rot gefärbt), da dieser etwas zu niedrig war. Die Durchlaufzeit hätte hier ebenfalls 90 s betragen müssen. Insgesamt verkürzte sich die Durchlaufzeit auf etwa ein Drittel.

D.2.b Zerstörung der Desoxyribose

DNA kann, wie bereits oben erwähnt, durch $\text{OH}\cdot$ -Radikal-Wirkung geschädigt werden. Dabei werden sowohl die DNA-Basen als auch die Desoxyribose zerstört. Bei der Zerstörung der Desoxyribose fallen Produkte an, die mit Thiobarbitursäure (TBA) einen Farbstoff bilden, dessen Extinktion mit dem Photometer bei 532 nm gemessen werden kann.

(1) Reagenzien

- 7.5 mM Desoxyribose: 1 mg / ml in Wasser
- 10 mM KPP (Kaliumphosphatpuffer) pH 7.4
- 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: ca. 4 mg / ml (frisch angesetzt)
- 1 %ige TBA (Thiobarbitursäure) in 50 mM NaOH
- 2.8 %ige TCA (Trichloressigsäure) in Wasser

(2) Durchführung

Gemessen wurden insgesamt 8 Proben:

- 1 Leerwert zum Nullabgleich am Photometer,
- 4 Proben, die mit unterschiedlichen Mengen Fe^{2+} versetzt waren,
- 3 Proben, die Fe^{2+} und unterschiedliche Inhibitoren enthielten.

Die Fe^{2+} -induzierte Spaltung der Desoxyribose kann durch Inhibitoren gehemmt werden, da diese eine radikalfangende Wirkung besitzen, in unserem Versuch verwendeten wir Thioharnstoff, L-Histidin und Mannit, jeweils in gleichen molaren Konzentrationen.

Tabelle D-3: Pipettierschema

Probe mit Fe^{2+} [μl]	Desoxyribose [μl]	KPP [μl]	H_2O [μl]	Inhibitor [μl]
0	300	1000	200	0
25	300	1000	175	0
50	300	1000	150	0
75	300	1000	125	0
100	300	1000	0	0
100	300	1000	0	100 Thioharnstoff
100	300	1000	0	100 L-Histidin
100	300	1000	0	100 Mannit

Die Proben wurden nun für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden je 1 ml TBA und 1 ml TCA zu allen 8 Proben zugegeben und diese bei 95 °C für 15 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Messung.

Tabelle D-4: Absorptionen der Proben

Probe mit Fe^{2+} [μl]	H_2O [μl]	Inhibitor [μl]	Extinktion
0	200	0	0
25	175	0	0.783
50	150	0	1.328
75	125	0	1.823
100	0	0	2.325
100	0	100 Thioharnstoff	1.445
100	0	100 L-Histidin	1.307
100	0	100 Mannit	0.185

Die Messwerte tragen wir nun graphisch auf.

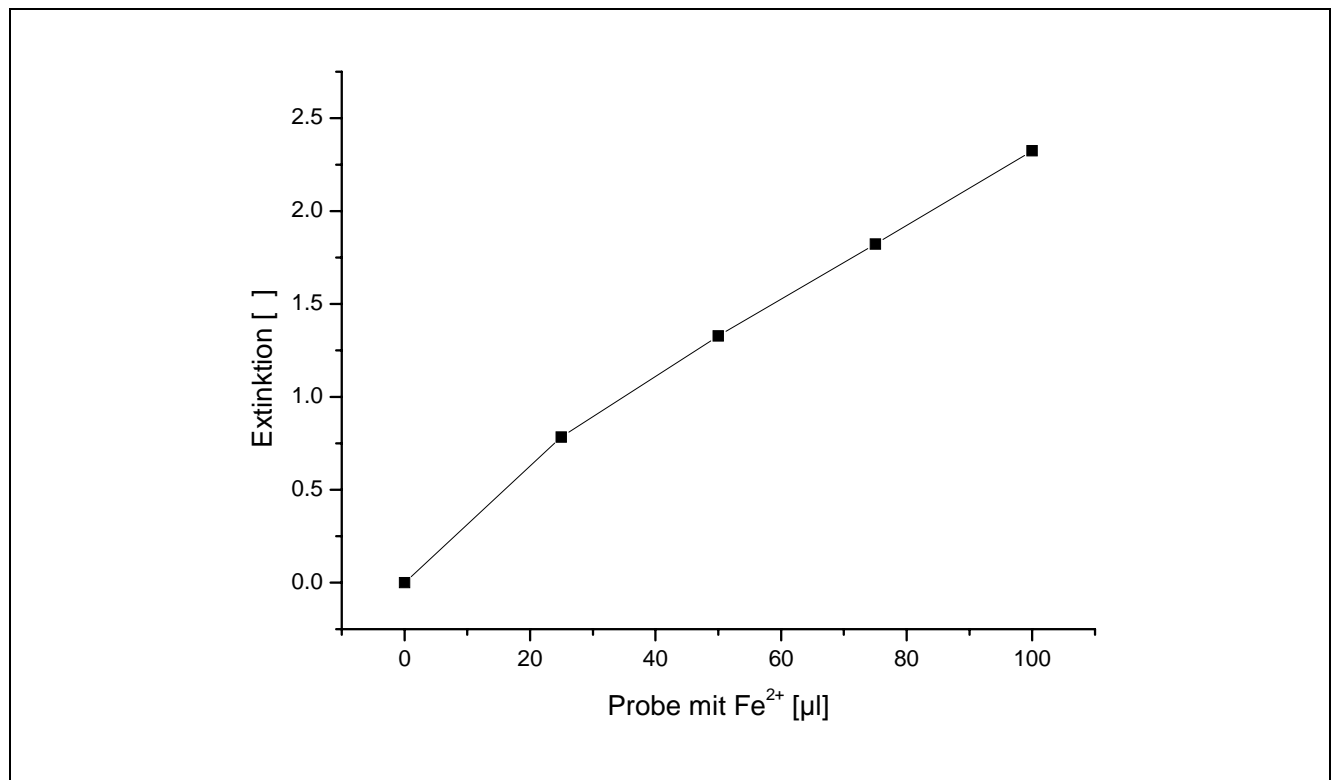


Abbildung D-5: Proben ohne Inhibitoren

Man erkennt, dass mit zunehmender Fe²⁺-Konzentration die Absorption größer wird, was bedeutet, dass mehr Farbstoff aus TBA und Desoxyribose-Produkten gebildet wurde. Mit zunehmender Fe²⁺-Konzentration nahm die Desoxyribose-Konzentration folglich ab. Bei den Proben mit Inhibitoren kann man eine unterschiedlich starke Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen erkennen.

Tabelle D-5: Proben mit Inhibitoren (Inhibitoren lagen in gleichen molaren Konzentrationen vor)

Inhibitor [µl]	Extinktion
-	2.325
Thioharnstoff	1.445
L-Histidin	1.307
Mannit	0.185

Zum Schutz vor Desoxyribose-Zersetzung wirkt Mannit am besten, da hier am wenigsten Farbstoff gebildet wurde. Das bedeutet, dass hier noch am meisten unbeschädigte Desoxyribose vorliegt. Thioharnstoff mit der höchsten Extinktion wirkt also am wenigsten radikal-abfangend.

E. LABORJOURNAL (PRIMÄRDATEN)**E.1 Tag 1 (ATP-Hydrolyse)***Phosphat-Bestimmung*

Testansatz: je 0.5 mL Na-Disulfit, Ammoniummolybdat, Hydrochinon mit 0.5 Probelösung, nach 5 Minuten 5 mL Natriumcarbonat/Natriumsulfit

Phosphat-Standard

2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (136.09 g / mol)

Ansatz für 0.13609 g / 500 mL

Einwaage 0.1347 g / 496 mL

Leerwert: Glas 0

Messwellenlänge: 600 nm

Glas 0	000 µL Standard	500 µL Wasser	0.000 OD
1	100 µL	400 µL	0.090
2	200 µL	300 µL	0.209
3	300 µL	200 µL	0.326
4	400 µL	100 µL	0.432
5	500 µL	000 µL	0.520

ATP-Hydrolyse (10 mL Tris pH 8.5, 1 mL 50 mM ATP, 1 mL Metallsalz / Enzym)

Versuch 1

Cer-Einwaage (M = 434.23 g / mol)

0.3126 g in 10 mL Puffer pH 8.5

Zn-Einwaage (M = 261.44 g / mol)

0.3125 g in 10 mL Puffer pH 8.5

Alkalische Phosphatase (Ausgangskonzentration?)

10 µL Enzym in 990 µL Wasser

Zn & Leerwert bei 85 °C, andere bei 37 °C

Zeit [min]	Leerwert	5mM Zn	10mM Zn	3mM Cer	6mM Cer	300 µl AP	600 µl
0	0.133	0.144	0.145	0.148	0.153	0.142	0.143
12	0.166	0.171	0.180	0.179	0.200	0.198	0.180
24	0.188	0.198	0.207	0.309	0.183	0.163	0.171
36	0.143	0.156	0.118	0.131	0.149	0.132	0.253
48	0.162	0.193	0.128	0.134	0.162	0.140	0.118
60	0.188	0.351	0.267	0.163	0.198	0.219	0.280
72	0.199	0.320	0.275	0.181	0.244	0.217	0.313
84	0.195	0.242	0.212	0.203	0.226	0.251	0.299
96	0.205	0.327	0.391	0.180	0.287	0.279	0.377
108	0.275	0.413	0.463	0.205	0.253	0.251	0.383
120	0.306	0.442	0.449	0.244	0.289	0.303	0.363

E.2 Tag 2 (ATP-Hydrolyse, Peroxidasen / Katalasen)*ATP-Hydrolyse (10 mL Tris pH 8.5, 1 mL 50 mM ATP, 1 mL Metallsalz/Enzym)*Versuch 2

Cer-Einwaage (M = 434.23 g /mol)
0.3138 g in 10 mL Wasser

Zn-Einwaage (M = 261.44 g /mol)
0.3143 g in 10 mL Wasser

Alkalische Phosphatase (Ausgangskonzentration?)
10 µL Enzym in 990 µL Wasser

Zn & Leerwert bei 85 °C, andere bei 37 °C

Zeit [min]	Leerwert	10 mM Zn	6 mM Ce	600 µL AP
20	0.051	0.218	0.232	0.078
40	0.052	0.335	0.406	0.153
60	0.149	0.507	0.507	0.114
80	0.159	0.617	0.538	0.206
100	0.191	0.408	0.403	0.365
120	0.232	0.845	0.874	0.443

Dünnschicht-Chromatographie

LiCl-Laufmittel (Stammlösung 3 M)

LiCl-Konz.	LiCl-Menge	Stammlösung	Wasser
1.5 M	5 mL	5 mL	Wasser
1.0 M	4 mL	8 mL	
0.5 M	2 mL	10 mL	

Peroxidasen / KatalasenPerhydrol-Standard

Testansatz: 1500 µL Probelösung / 1500 µL Titanylsulfat-Reagenz
Messwellenlänge: 410 nm
Leerwert: Wasser

Stammlösung 1:200 (aus Perhydrol 30 %):

10 µL Perhydrol in 1990 µL Wasser bzw.
25 µL in 4975 µL Wasser

Stammlösung	200 µL Stammlösung	1800 µL Wasser	2.728 OD
1 x 1:10	200 µL Stammlösung	1800 µL Wasser	2.110
2 x 1:20	100 µL Stammlösung	1900 µL	0.739
2 x 1:40	50 µL Stammlösung	1950 µL	0.246
1 x 1:60	500 µL 1:20	1500 µL	0.222
1 x 1:80	1000 µL 1:20	1000 µL	0.183
1 x 1:100	200 µL 1:10	1800 µL	0.227
-Messwiederholung-			
Stammlösung			2.752
1:10			1.740
1:50	10 µL Stammlösung	490 µL	0.229
1:100			0.141

Kupfer-Komplexe (pH 9)

5	mL	Wasser und	
15	mL	0.01 M Ethylendiamin (60.10 g / mol mit 900 g / L) 0.601 g / L oder 0.00901 g / 15 mL Ansatz: 10.02 µL in 15 mL	„EDA“
10	mL	0.01 M Kupfersulfat-Lösung	
20	mL	0.1 M Diethylentriamin (103.19 g / mol mit 950 g / L) 10.319 g / L oder 0.20638 g / 20 mL oder Ansatz: 217.24 µL in 20 mL	„DETA“
10	mL	0.1 M Kupfersulfat-Lösung	

Katalase

5 µL Suspension (20 mg / ml) auf 5 ml

Messung der Peroxidase-Aktivität

Testansatz: 12 ml Kupferkomplex / Katalase mit 1 ml Stammlösung (30 % Perhydrol auf 1:200), Entnahme von 1.5 ml Lösung und Zugabe zu 1.5 ml Reagenz

Probe	Zeit	E1	E2	DETA	EDA (1:2)	(1:3)	(1:6)
1	0'	1.305	1.259	1.053	0.036	0.303	1.151
2	0.5'	1.229	1.144	1.004	0.004	0.007	0.907
3	1'	1.133	1.064	0.931	0	0.077	0.618
4	2'	0.915	0.886	0.825	-0.02		0.311
5	4'	0.632	0.726	0.632	-0.02		0.112
6	6'	0.343	0.433	0.589	-0.04		0.055
7	8'	0.283	0.325	0.506			0.036
8	10'	0.186	0.242	0.466			0.018
9	12'	0.128	0.162	0.434			
10	14'	0.069	0.147	0.44			
11	16'			0.373			
12	18'			0.366			
13	20'			0.331			

E.3 Tag 3 (SOD)*Präparation aus Rinderblut*

Hämolsat-Erhitzung auf 75 °C, Proben nach 0', 2.5', 5', 10', 20', 30', 45', Zentrifugation, Abnahme der Überstände, Verdünnung der Überstände

Direkte Bestimmung des Hämoglobin-Eisens

Messwellenlänge: 540 nm

Leerwert: Wasser

45'	1:2	0.704 OD
30'	1:1	1.282
20'	1:3	1.337
10'	1:30	1.050
5'	1:100	0.353
2.5'	1:100	0.860
0'	1:100	0.796

Veraschung der Überstände

Siehe Schema in der Anleitung, Neutralisation mit ges. Na-Bicarbonat-Lösung (1000 µL) Volumina der einzelnen Komponenten (H₂O₂ und HCl)

E.4 Tag 4 (SOD, Radikale)*Eisenbestimmung mit Bipyridin**Kalibrierkurve mit Fe-Standard*

Testansatz: 3 ml Probelösung (Variable Zusammensetzung!), 1 ml Bipyridin, 1 ml Na-Bisulfit und 0.5 ml 1 N HCl

Messwellenlänge: 490 nm

Leerwert: Glas 0

Glas	0	0	ml Standard	3.0	ml Wasser	0.0	OD
	1	0.25		2.75		0.058	
	2	0.5		2.5		0.126	
	3	0.75		2.25		0.181	
	4	1.0		2.0		0.240	
	5	1.25		1.75		0.302	
	6	1.5		1.5		0.363	
	7	1.75		1.25		0.424	
	8	2.0		1.0		0.486	

Bestimmung der veraschten, neutralisierte Proben (unverdünnt)

Leerwert: Glas 0 (aus Standardkurve)

Zusammensetzung der Testansätze:

	0'	2.5'	5.0'	10'	20'	30'	45'
Probe [ml]	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75
Wasser	2.75	2.5	2.25	2	1.75	1.5	1.25
OD	0.056	0.172	0.237	0.165	0.120	0.125	0.134

SOD-Test mit Xanthin / XOD

Testansatz:	600	µL	NBT (pH 8 mit Gelatine)
	25	µL	Xanthin 1 mM
	10	µL	EDTA 10 mM
	50	µL	Probe / Wasser / Puffer
			(Nullabgleich)
	25	µL	XOD (1:20 verdünnt – Ausgangskonzentration?)
Messwellenlänge:	550 nm	Leerwert:	Ansatz mit Wasser

SOD-Verdünnungsreihe (Stamm-Lsg. 50 µL mit 200 µL H₂O - Ausgangskonzentration?)

1:5	20	µL SOD SL	80	µL Wasser	100	µL Gesamt	...	OD
1:25	10	µL SOD SL	240	µL	250	µL	...	OD
1:50	20	µL SOD 1:5	80	µL	100	µL	...	OD
1:250	10	µL SOD 1:25	240	µL	250	µL	...	OD
1:500	100	µL SOD 1:250	100	µL	200	µL	...	OD
1:1000	100	µL SOD 1:500	100	µL	200	µL	...	OD
1:2500	20	µL SOD 1:500	80	µL	100	µL	...	OD
1:5000	10	µL SOD 1:500	90	µL	100	µL	...	OD

SOD-Test mit erhitzten Hämolysaten (Überstände)

45'	1:10	0.178 OD
0'		0.155
2.5'		0.139
5'		0.132
10'		0.125
20'		0.142
30'		0.184

SOD-Aktivität von Kupferaminkomplexen

Herstellung des Kupfer-Komplexes (537.9 g / mol)

Einwaage: 9.3 mg (entsprechen 17.2 µmol) für 10 µM-Lösung auflösen in 1.729 L;
Lösung in 1729 µL entspricht daher 10 mM = Stammlösung

Verdünnungsreihe

10000	µM	Stammlösung	0.037	OD
5000	µM	1:2 10000 µM	0.024	
1000	µM	1:10 10000 µM	0.030	
500	µM	1:2 1000 µM	0.040	
100	µM	1:10 1000 µM	0.064	

50	μM	1:10	500	μM	0.137
10	μM	1:10	100	μM	0.355
5	μM	1:10	50	μM	0.317
Leerwert					0.418

Kupferbestimmung
(AAS, Höhe der Peaks in cm)

Radikalwirkung

Herstellung der Eisen-EDTA-Komplex-Lösungen

50 mM Eisensulfat (278 g / mol)	0.0139 g / ml	0.0142 g / 1021 μL
20 mM	0.0056 g / ml	0.0054 g / 971 μL
50 mM EDTA	0.0186 g / ml	0.0170 g / 910 μL
20 mM	0.0074 g / ml	0.0063 g / 846 μL

Herstellung der Kupfer-EDTA-Komplex-Lösung

2 mM	Cu-Lösung	aus 100 mM,	also 10 μL auf 490 μL
2 mM	EDTA-Lösung	aus 20 mM,	also 50 μL auf 450 μL

Depolymerisierung von Hyaluronsäure

Test mit Eisen (rel. Viskosität)

Startwert	1'35	
	1'35	
0'00		15 μL Fe 25 mM
1'28	0'51	
3'16	0'40	
4'46	0'35	
6'15	0'34	
7'50	0'34	
9'00		15 μL
10'10	0'30	
17'12	0'25	
18'00		15 μL

Test mit Kupfer (rel. Viskosität)

Startwert	1'25	
	1'27	
0'00		45 μL Cu 1 mM
0'38	1'30	
4'33	1'30	45 μL Ascorbinsäure (0.034 g / ml)
7'20	1'10	
9'32	0'57	
11'50	0'45	15 μL Ascorbinsäure
18'05	0'41	
20'30	0'37	

25'41 0'35
42'06 0'34

Zerstörung von Desoxyribose

Herstellung der Inhibitorlösungen

Einwaage für 0.15 M oder 0.0003 mol in 2 mL

Histidin 0.0466 g

TH 0.0228 g

Mannit 0.0547 g

Messwellenlänge: 532 nm

Abgleich: Leerwert (ohne Eisen)

Messung des TBA-Farbstoffs

25	μL Eisen (10 mM)	0.783 OD
50		1.328
75		1.823
100		2.325
100	100 μL His	1.445
100	100 μL TH	1.307
100	100 μL Mannit	0.185