

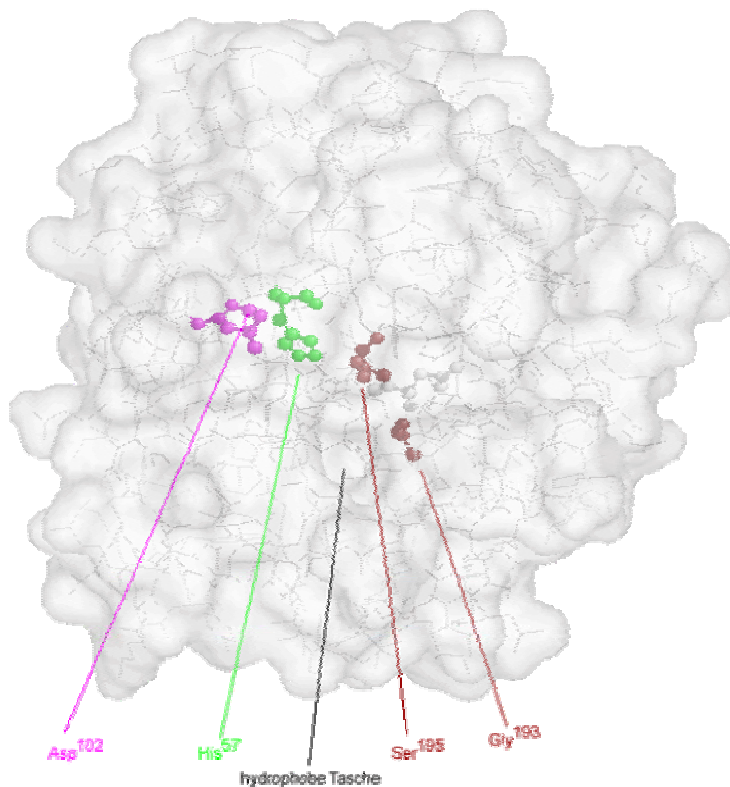
## VERSUCH 6: SERINPROTEASEN

### I. THEORETISCHE VORBEREITUNG

Im Versuch soll der Katalysemechanismus der Serinproteasen, einer Gruppe von proteinspaltenden Enzymen, anhand von einem ihrer Vertreter (Chymotrypsin) untersucht werden.

Die Vorstufe des Chymotrypsin wird in der Pankreas synthetisiert und im Duodenum aktiviert, weitere, ebenfalls im Duodenum aktive Serinproteasen sind Trypsin und Elastase. Diese sind bei dem im Duodenum vorliegenden pH von 7 bis 8 am aktivsten, spalten nicht endständige Peptidbindungen (Endopeptidasen) und sind jeweils für andere Aminosäuren spezifisch. Weitere Gruppen von Proteasen sind die sauren oder Aspartatproteasen, die Zinkproteasen und die Thiol- oder Cysteinproteasen.

Serinproteasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum eine als „katalytische Triade“ bezeichnete, durch Wasserstoffbrücken stabilisierte räumliche Aminosäureanordnung aus Serin, Histidin und Aspartat. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion stellt nicht die direkte Spaltung des Peptids bzw. Esters durch Wasser dar, stattdessen bildet das Enzym mit dem Acyl-Rest ein Zwischenprodukt, welches bei niedrigen pH-Werten (im Versuch bei pH 5) nachgewiesen werden kann, bei physiologischen pH-Werten wird das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt direkt hydrolysiert.



**Abbildung I-1:**  
**Rinder-Chymotrypsin**

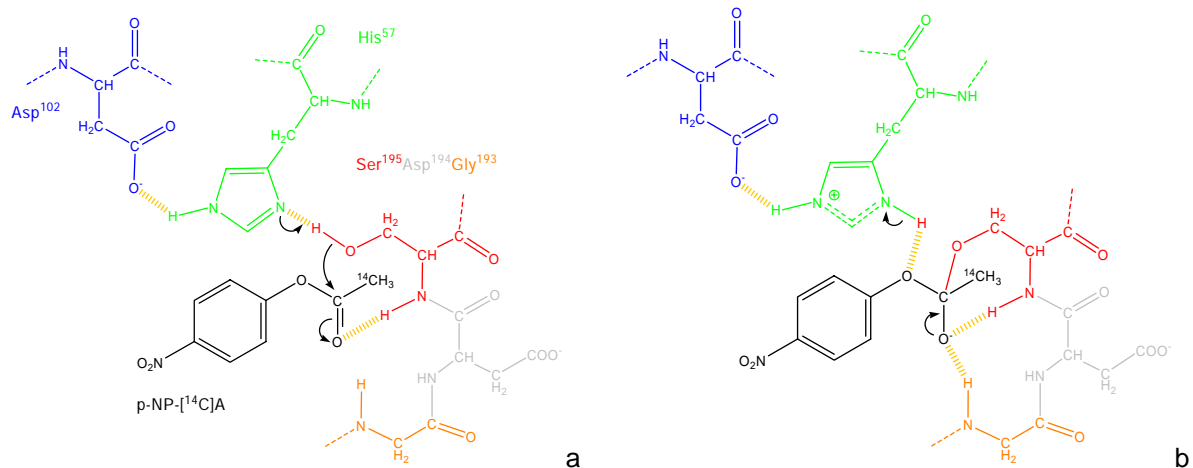
Koordinatensatz  
nach

PDB.1ex3  
(CTRA\_BOVIN)

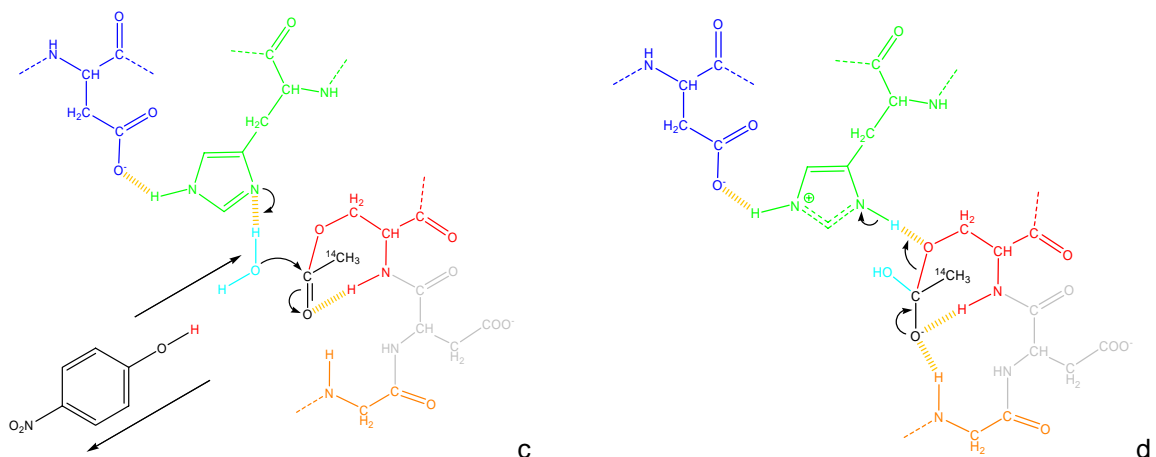
Röntgenstrukturanalyse, Auflösung: 3Å

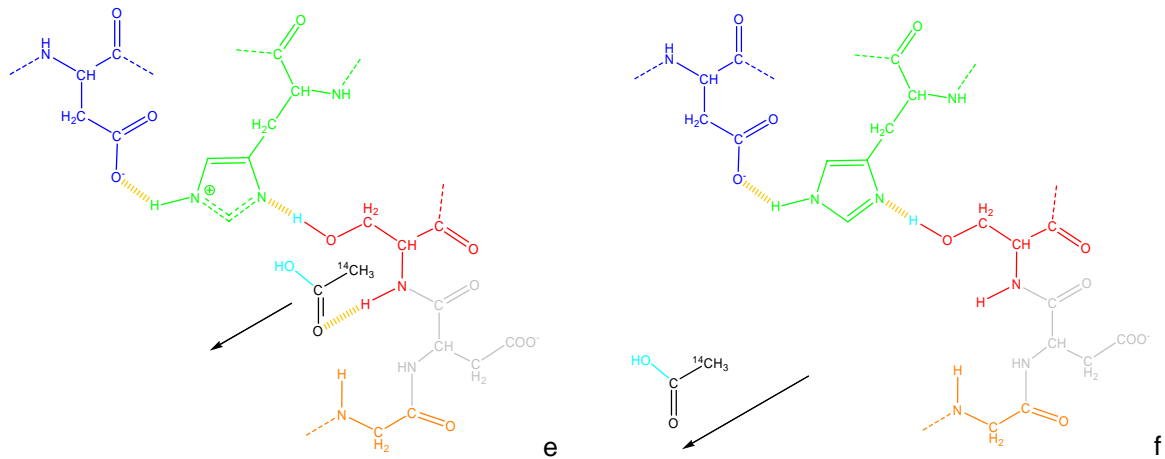
Chymotrypsin kann neben Peptidbindungen auch Esterbindungen spalten, daher wird im Versuch das unphysiologische Substrat p-Nitrophenylacetat (p-NPA) verwendet, welches an der Acetatfunktion mit radioaktivem  $^{14}\text{C}$  markiert wurde (daher: p-NP- $^{14}\text{C}$ A). Dabei könnte ein Acetatrest theoretisch mit zwei radioaktiven Kohlenstoffatomen versehen sein, im Versuch ist jedoch nur ein Kohlenstoffatom markiert. Im Folgenden ordnen wir der Übersichtlichkeit halber dem Methylgruppen-Kohlenstoff die Radioaktivität zu, ebenso könnte jedoch auch der Carbonylkohlenstoff markiert sein.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen den Reaktionsmechanismus, wobei die im Versuch durchgeführte Hydrolyse von p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A dargestellt ist (und keine Peptidspaltung) sowie die im Versuch durchgeführte Hemmung des Chymotrypsins.

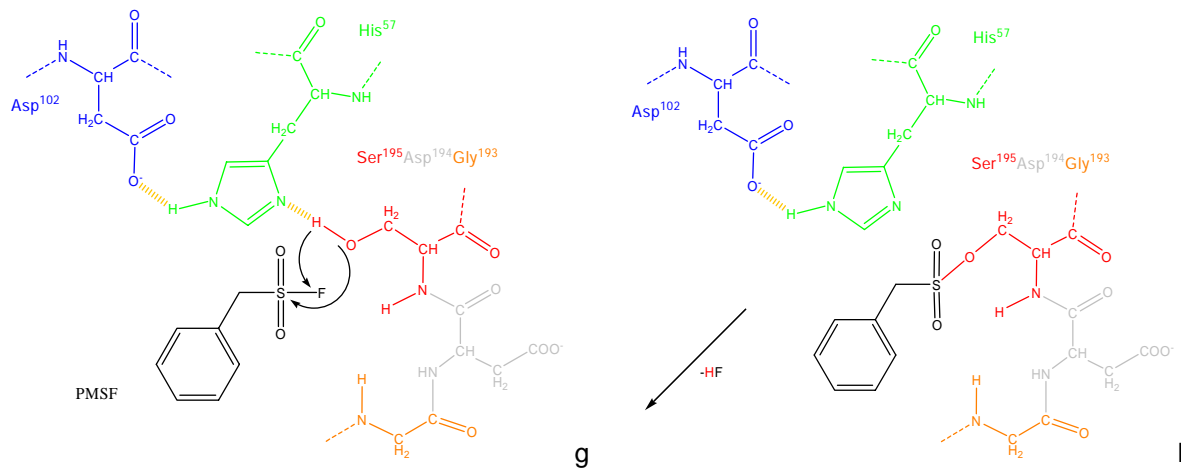


Das Substrat wird durch hydrophobe Wechselwirkungen in die richtige Position gebracht (Chymotrypsin besitzt dazu eine hydrophobe Tasche) und erfährt einen nucleophilen Angriff durch die Hydroxylgruppe des Ser<sup>195</sup>, welche dabei kovalent an den Carbonylkohlenstoff des Substrates bindet; es entsteht ein kurzlebiges, tetraedrisches Zwischenprodukt. Das Proton der Serin<sup>195</sup>-Hydroxylgruppe ist über eine Wasserstoffbrücke mit His<sup>57</sup> verbunden und wird im Rahmen des nucleophilen Angriffs an His<sup>57</sup> abgegeben (allgemeine Basen-Katalyse), die entstandene positive Ladung am His<sup>57</sup> wird durch Asp<sup>102</sup> stabilisiert; so entsteht an Ser<sup>195</sup> keine positive Ladung, wodurch dessen Nucleophilie erhöht wird. Das durch den nucleophilen Angriff aus dem Carbonylsauerstoff entstandene Oxyanion wird durch den Amidstickstoff von Ser<sup>195</sup> und Gly<sup>193</sup> stabilisiert (Oxyanionloch). Das an His<sup>57</sup> gebundene Proton kann nun an den Sauerstoff des Esters abgegeben werden, das entstandene Nitrophenol kann das Enzym verlassen, es bleibt das acylierte und damit radioaktiv markierte Enzym zurück; die **Acylierungsphase** (a-c) ist damit abgeschlossen. Das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt wird in der **Deacylierungsphase** (c-f) durch Wasser gespalten, indem dieses an die Stelle der Alkoholkomponente des Substrats tritt. Dazu wechselwirkt ein Proton des Wassers über eine Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoff des His<sup>57</sup>, wobei der Sauerstoff des Wassers als Nucleophil den Carbonylkohlenstoff angreifen kann. Dabei entsteht wiederum ein tetraedrisches Zwischenprodukt, das Oxyanion wird auch hier durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das Proton des Wassers wird an His<sup>57</sup> gebunden und tritt nun über eine Wasserstoffbrücke mit dem Hydroxylsauerstoff des Ser<sup>195</sup> in Wechselwirkung, dieser wird dabei vom Carbonylkohlenstoff getrennt. Es liegt schließlich das regenerierte Enzym und das radioaktiv markierte Acetat vor.





Die hohe Reaktivität des Ser<sup>195</sup> kann zur **Hemmung** des Enzyms ausgenutzt werden: Gute Hemmstoffe sind z.B. das Nervengas DIPF oder die Insektizide Parathion und Malathion sowie das im Versuch verwendete PMSF, der Wirkmechanismus der im Versuch durchgeführten Hemmung des Chymotrypsins ist in den folgenden Abbildungen (g-h) dargestellt.



Dabei konnte nachgewiesen werden, dass diese Inhibitoren ausschließlich an Ser<sup>195</sup> binden, nicht aber an die 27 anderen Serinreste des Enzyms, was die hohe Reaktivität (Nucleophilie) des Ser<sup>195</sup> abermals verdeutlicht. Die (neuro-)toxische Wirkung der voran genannten Substanzen beruht auf der Hemmung der Acetylcholinesterase.

## II. VERSUCHSAUSWERTUNG

## A. Zählausbeute und Aktivitätsbestimmung

1. Zählausbeute des LSC

Die Zählausbeute des Flüssigszintillationszählers (LSC) lässt sich mit Hilfe eines  $^{14}\text{C}$ -Standards bestimmen. Dieser hatte 1989 eine Aktivität (disintegrations per minute) von 100900 dpm. Mit Hilfe der Halbwertszeit des  $^{14}\text{C}$ -Isotops von  $T_H = 5730$  a lässt sich die Aktivität am Versuchstag (2003) bestimmen.

$$A(t) = A(0) \cdot \exp[-\lambda t]$$

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T_H}$$

$$A(t) = A(0) \cdot \exp\left[-\frac{\ln 2}{T_H} t\right] \quad (\text{II-1})$$

$$A(14 \text{ a}) = 100900 \text{ dpm} \cdot \exp\left[-\frac{\ln 2}{5730 \text{ a}} 14 \text{ a}\right] = 100729 \text{ dpm}$$

Von diesem Standard wurde die Anzahl der gemessenen Zerfälle (counts per minute) gemessen, sie betrug  $C = 97022$  cpm. Die Zählausbeute des LSC ergibt sich daher nach

$$z = \frac{C}{A} = \frac{97022 \text{ cpm}}{100729 \text{ dpm}} = 0,963 \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} = 96,3 \% \quad (\text{II-2})$$

Mit Hilfe der Zählausbeute lassen sich die gemessenen Impulse pro Minute in die Aktivitäten der Proben umrechnen:

$$A = \frac{C}{z} = \frac{C}{0,963 \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}} \text{ cpm} = \frac{C}{0,963 \cdot 60 \text{ s}} \text{ dps} = \frac{C}{0,963 \cdot 60 \text{ s}} \text{ Bq} \quad (\text{II-3})$$

2. Aktivitäten der Proben

Für die durchgeführten Radioaktivitätsmessungen berechnen wir die folgenden Aktivitäten, sie wurden um das in der Vorprobe ermittelte Hintergrundrauschen  $A_B$  korrigiert.

| Probe  | C<br>cpm | A<br>dpm | A<br>Bq | A-A <sub>B</sub><br>Bq |
|--|----------|----------|---------|------------------------|
| Eluat (gemessen aus Vorprobe)                      | 1455,95  | 1511,58  | 25,19   | 24,81                  |
| Eluat (für Background, gemittelt) = A <sub>B</sub> | 22,00    | 22,84    | 0,38    | 0                      |
| Referenz (Vorprobe)                                | 5476,70  | 5685,95  | 94,77   | 94,39                  |
| Referenz (Ansatz 2)                                | 7022,46  | 7290,77  | 121,51  | 121,13                 |
| Z1   | 58,85    | 61,10    | 1,02    | 0,64                   |
| Z2   | 606,61   | 629,79   | 10,50   | 10,12                  |
| Z3   | 668,48   | 694,02   | 11,57   | 11,19                  |
| Z6   | 51,87    | 53,85    | 0,90    | 0,52                   |
| Z7   | 67,87    | 70,46    | 1,17    | 0,79                   |
| Flüssigabfall (40 ml)                              | 910,98   | 945,79   | 15,76   | 15,38                  |
| Wischtest (Arbeitsfläche)                          | 24,94    | 25,89    | 0,43    | 0,05                   |
| Wischtest (Eppendorf-Ständer)                      | 32,92    | 34,18    | 0,57    | 0,19                   |

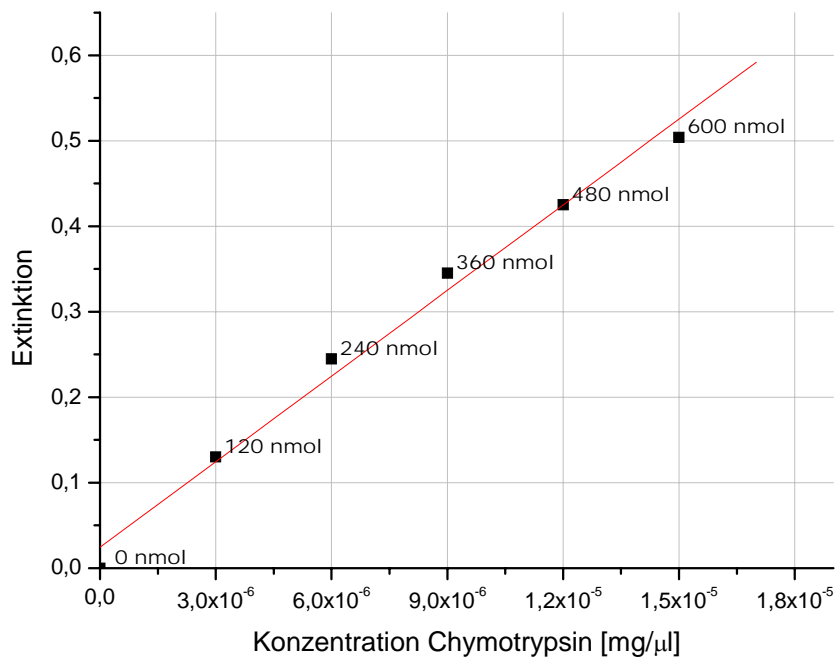
| Probe                       | C<br>cpm | A<br>dpm | A<br>Bq | A-A <sub>B</sub><br>Bq |
|-----------------------------|----------|----------|---------|------------------------|
| Wischtest (Pipette 1000 µl) | 23,94    | 24,85    | 0,41    | 0,03                   |
| Wischtest (Pipette 200 µl)  | 19,95    | 20,71    | 0,35    | -0,04                  |
| Wischtest (Pipette 40 µl)   | 20,94    | 21,74    | 0,36    | -0,02                  |

### B. Eichgerade für Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde ein Chymotrypsin-Standard mit 30 mg/ml bzw. 0,03 mg/µl verwendet, es wurden von den folgenden Bestimmungstests mit Chymotrypsin-Standard die Extinktionen bestimmt.

| Volumen Standard<br>µl | Masse Chymotrypsin<br>mg | Konzentration<br>Chymotrypsin<br>mg / µl | Extinktion |
|------------------------|--------------------------|--|------------|
| 0                      | 0                        | 0  | 0          |
| 10                     | 0,003                    | 3,00E-06                                 | 0,13       |
| 20                     | 0,006                    | 6,00E-06                                 | 0,245      |
| 30                     | 0,009                    | 9,00E-06                                 | 0,345      |
| 40                     | 0,012                    | 1,20E-05                                 | 0,425      |
| 50                     | 0,015                    | 1,50E-05                                 | 0,504      |

Anhand dieser Werte kann eine Eichgerade für die Chymotrypsinkonzentration in den Bestimmungstests erstellt werden.



| Y = A + B * X |             |            |         |
|---------------|-------------|------------|---------|
| Parameter     | Value       | Error      |         |
| A             | 0,02448     | 0,01573    |         |
| B             | 33380,95238 | 1732,26899 |         |
| R             | SD          | N          | P       |
| 0,99466       | 0,02174     | 6          | <0.0001 |

## C. Beschreibung und Auswertung der durchgeführten Versuche

### 1. Vorprobe

Es wurden 70  $\mu\text{l}$  p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A-Lösung ausgegeben, welche eine Konzentration von 2000 nmol je 50  $\mu\text{l}$ , also 40 nmol /  $\mu\text{l}$  besaß und damit 2800 nmol der Substanz enthielt.

5  $\mu\text{l}$  der ausgegebenen Lösung wurden mit 495  $\mu\text{l}$  NaAc-Puffer zusammengebracht (Verdünnung 1:100), diese Probe enthielt demnach 200 nmol p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A in einer Konzentration von 0,4 nmol /  $\mu\text{l}$ .

Von der verdünnten Lösung wurden 200  $\mu\text{l}$  auf eine Molekularsiebsäule aufgetragen und abzentrifugiert. Von 200  $\mu\text{l}$  des Zentrifugats und von 200  $\mu\text{l}$  der verdünnten Lösung wurden jeweils Radioaktivitätsmessungen durchgeführt, wozu jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Flüssigkeiten mit 5 ml Szintillatorcocktail versetzt wurden.

**Tabelle II-1: Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen der Vorproben**

| Probe                               | C<br>cpm | A<br>dpm | A<br>Bq | A-A <sub>B</sub><br>Bq |
|-------------------------------------|----------|----------|---------|------------------------|
| Zentrifugat (gemessen)              | 1455,95  | 1511,58  | 25,19   | 24,81                  |
| Zentrifugat (a. Gruppen, gemittelt) | 22,00    | 22,84    | 0,38    | 0                      |
| Referenzwert                        | 5476,70  | 5685,95  | 94,77   | 94,39                  |

Eigentlich sollte das p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A von der Molekularsiebsäule zurückgehalten werden, dies war jedoch hier nicht der Fall, wie man an der hohen Aktivität des Zentrifugats (Tabelle II-1: „Zentrifugat gemessen“) erkennen kann. Mögliche Ursachen für das mangelhafte Rückhaltevermögen können ein nicht ausreichendes Gelvolumen oder eine undichte Filtergaze am Boden der Säule sein. Die trocken zentrifugierte Säule enthielt jedoch auf jeden Fall ein ausreichendes Gelvolumen (mehr als 1,5 ml); eine mögliche Erklärung ist dementsprechend eine undichte Filtergaze oder eine eventuelle Kontamination des Zentrifugenröhrchens, was auf eine ungenügende Reinigung dieses Röhrchens an den Vortagen schließen lassen könnte.

Da der betreffende Aktivitätswert zur weiteren Auswertung (Bestimmung des Hintergrundrauschens) benötigt wird, verwenden wir einen Mittelwert der von den anderen Gruppen gemessenen Radioaktivität in diesem Versuch (Tabelle II-1: „Zentrifugat a. Gruppen, gemittelt“), welche deutlich (um den Faktor 66) unter dem von uns gemessenen Wert liegt. Der so erhaltene Aktivitätswert von 0,38 Bq wird dem Hintergrundrauschen zugeordnet und zur Korrektur der anderen gemessenen Radioaktivitäten verwendet (A-A<sub>B</sub>).

Mit Hilfe des Referenzwertes lässt sich die spezifische Aktivität des p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A bestimmen: Die Referenz enthielt 0,4 nmol /  $\mu\text{l}$  p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A, von dieser Lösung wurden 200  $\mu\text{l}$  zur Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt, 80 nmol p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A besitzen demnach eine (korrigierte) Aktivität von 94,39 Bq, womit sich eine Aktivität von 1,18 Bq / nmol p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A ergibt.

Das ausgeteilte p-NP-[ $^{14}\text{C}$ ]A-Volumen von 70  $\mu\text{l}$  mit insgesamt 2800 nmol sollte dementsprechend eine Aktivität von 3304 Bq besitzen.

|   |                      |          |             |                  |
|---|----------------------|----------|-------------|------------------|
| <b>Hintergrundaktivität</b>                                     | <b>A<sub>B</sub></b> | <b>:</b> | <b>0,38</b> | <b>Bq</b>        |
| <b>Spezifische Aktivität p-NP-[<math>^{14}\text{C}</math>]A</b> | <b>A<sub>S</sub></b> | <b>:</b> | <b>1,18</b> | <b>Bq / nmol</b> |

**2. Aufklärung des Reaktionsmechanismus**

Aus den erhaltenen 17,9 mg Chymotrypsin sollte eine 1,25 %ige (w/v) Lösung hergestellt werden; dazu wurde zum Chymotrypsin ein Volumen von 1,432 ml NaAc-Puffer gegeben, die so hergestellte Chymotrypsin-Lösung hatte demnach eine Konzentration von 0,0125 mg / ml. Mit ihr wurden zwei Ansätze hergestellt; für **Ansatz 1** wurden 190 µl Chymotrypsin-Lösung mit PMSF zusammengebracht und nach 30 min Inkubation 10 µl p-NP-[<sup>14</sup>C]A hinzu gegeben und nochmals inkubiert. In **Ansatz 2** wurden 950 µl Chymotrypsin mit 50 µl verdünnten (Pipettierfehler) und 50 µl unverdünnten p-NP-[<sup>14</sup>C]A zusammengebracht und ebenfalls inkubiert. Beide Ansätze hatten einen durch Natrium-Acetat gepufferten pH-Wert von 5; wie in der Theorie erwähnt, befindet sich bei diesem pH-Wert das [<sup>14</sup>C]Acyl-Chymotrypsin-Zwischenprodukt in einem stabilen Zustand und kann aufgrund der radioaktiven Markierung quantitativ bestimmt werden.

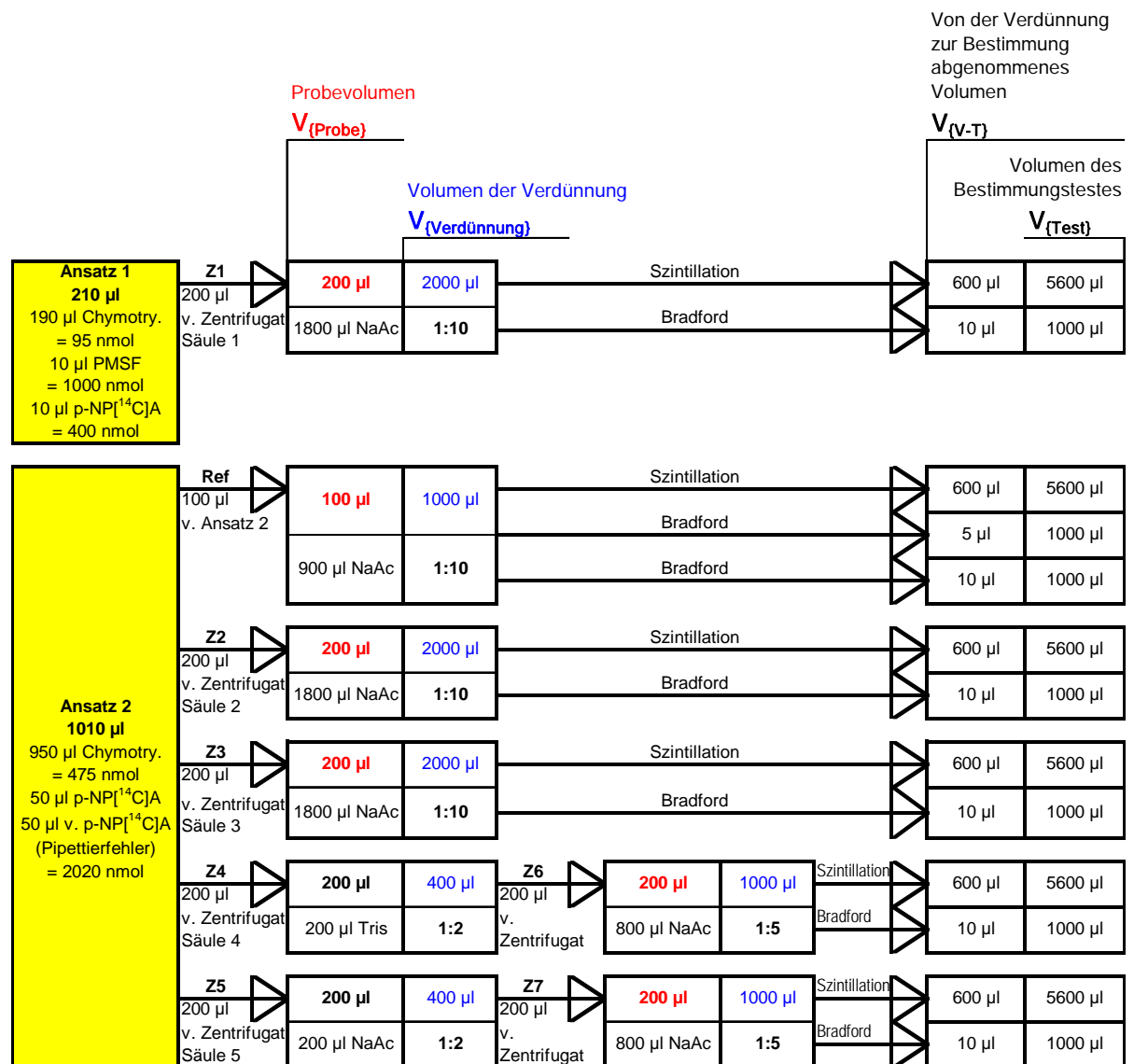


Abbildung II-1: Schema der von den Ansätzen 1 und 2 abgeleiteten Proben. (Abkürzungen: Pro.: Proteinbestimmung; cpm: Radioaktivitätsmessung). Die hier angegebenen Volumenbezeichnungen werden in der folgenden Auswertung verwendet.

Nach erfolgter Inkubation wurden vom 1. Ansatz 200  $\mu\text{l}$  abgenommen, auf eine Molekularsiebsäule aufgebracht und zentrifugiert (**Z1**); das Zentrifugat wurde mit NaAc-Puffer verdünnt und von dieser Verdünnung die Radioaktivität sowie der Proteingehalt bestimmt.

Ebenso wurde zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  des 2. Ansatzes verfahren (**Z2, Z3**). Darüber hinaus wurden je 200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes 2 auf Molekularsiebsäulen aufgebracht und diese abzentrifugiert (**Z4, Z5**), die Zentrifugate wurden diesmal jedoch mit 200  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (pH 8) bzw. mit 200  $\mu\text{l}$  NaAc-Puffer versetzt und nochmals je 200  $\mu\text{l}$  auf Molekularsiebsäulen aufgebracht und abzentrifugiert (**Z6, Z7**). Die Zentrifugate wurden anschließend mit NaAc-Puffer auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und der Proteingehalt und die Radioaktivität bestimmt. Schließlich wurden 100  $\mu\text{l}$  des 2. Ansatzes zur Herstellung einer Referenzlösung verwendet, deren Proteingehalt und Radioaktivität ebenfalls bestimmt wurde.

### 2.a) Bestimmung der Radioaktivität

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen der aus den beiden Ansätzen abgeleiteten Proben (Volumen 600 ml).

| Probe    | C<br>cpm | A<br>dpm | A<br>Bq | A-A <sub>B</sub><br>Bq |
|----------|----------|----------|---------|------------------------|
| Referenz | 7022,46  | 7290,77  | 121,51  | 121,13                 |
| Z1       | 58,85    | 61,10    | 1,02    | 0,64                   |
| Z2       | 606,61   | 629,79   | 10,50   | 10,12                  |
| Z3       | 668,48   | 694,02   | 11,57   | 11,19                  |
| Z6       | 51,87    | 53,85    | 0,90    | 0,52                   |
| Z7       | 67,87    | 70,46    | 1,17    | 0,79                   |

Mit Hilfe der in der Vorprobe bestimmten spezifischen Aktivität des p-NP-[<sup>14</sup>C]A lässt sich anhand folgender Gleichung die in den Bestimmungstests vorhandene Stoffmenge bestimmen.

$$n = \frac{A - A_B}{A_s} = \frac{A - A_B}{1,18 \frac{\text{Bq}}{\text{nmol}}} \quad (\text{II-4})$$

Mit Hilfe der Gleichung erhalten wir die Stoffmenge im Test,  $n_{\{\text{Test}\}}$ ; dabei wurde jeweils ein Volumen von  $V_{\{\text{V-T}\}} = 600 \mu\text{l}$  von dem Volumen der zu untersuchenden Verdünnungen verwendet, um die Radioaktivität zu bestimmen. Dementsprechend muss mit der ermittelten Stoffmenge  $n_{\{\text{Test}\}}$  weitergerechnet werden, um die Stoffmenge bzw. Konzentration in der Verdünnung zu erhalten.

$$c_{\{\text{Verdünnung}\}} = \frac{n_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{Verdünnung}\}}} = n_{\{\text{Test}\}} \cdot \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}} \cdot \frac{1}{V_{\{\text{Verdünnung}\}}} = \frac{n_{\{\text{Test}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}} \quad (\text{II-5})$$

Diese Konzentrationen entsprechen jedoch nicht den Konzentrationen der Proben selbst, diese wurden noch mit Puffer verdünnt, dementsprechend ergibt sich:

$$c_{\{\text{Probe}\}} = c_{\{\text{Verdünnung}\}} \cdot \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{Probe}\}}} = n_{\{\text{Test}\}} \cdot \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}} V_{\{\text{Probe}\}}} \quad (\text{II-6})$$

$$n_{\{\text{Probe}\}} = c_{\{\text{Probe}\}} \cdot V_{\{\text{Probe}\}} = n_{\{\text{Test}\}} \cdot \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}} V_{\{\text{Probe}\}}} \cdot V_{\{\text{Probe}\}} = n_{\{\text{Test}\}} \cdot \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}}$$

Tabelle II-2: [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat-Stoffmengen in den aus den Ansätzen gewonnenen Proben

| Probe    | A-A <sub>B</sub><br>Bq | n <sub>{Test}</sub><br>nmol | V <sub>{V-T}</sub><br>µl | V <sub>{Verdünnung}</sub><br>µl | V <sub>{Probe}</sub><br>µl | C <sub>{Probe}</sub><br>nmol / µl | n <sub>{Probe}</sub><br>nmol |
|----------|------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Referenz | 121,132                | 102,654                     | 600                      | 1000                            | 100                        | 1,711                             | 171,091                      |
| Z1       | 0,638                  | 0,540                       | 600                      | 2000                            | 200                        | 0,009                             | 1,801                        |
| Z2       | 10,116                 | 8,573                       | 600                      | 2000                            | 200                        | 0,143                             | 28,576                       |
| Z3       | 11,186                 | 9,480                       | 600                      | 2000                            | 200                        | 0,158                             | 31,600                       |
| Z6       | 0,517                  | 0,438                       | 600                      | 1000                            | 200                        | 0,004                             | 0,730                        |
| Z7       | 0,794                  | 0,673                       | 600                      | 1000                            | 200                        | 0,006                             | 1,121                        |

## 2.b) Bestimmung des Proteingehaltes

Anhand der in II.B bestimmten Eichgeraden kann der Proteingehalt der Bestimmungsansätze ermittelt werden, dieser ergibt sich nach:

$$c_{\{\text{Test}\}} = \frac{E - A}{B} = \frac{E - 0,02448}{33380,95238} \text{ mg} / \mu\text{l} \quad (\text{II-7})$$

Da ausschließlich Chymotrypsin in den Ansätzen vorhanden war, erhalten wir die folgenden Chymotrypsin-Konzentrationen in den Bestimmungsansätzen.

| Probe    | Extinktion | C <sub>{Test}</sub><br>mg / µl |
|----------|------------|--------------------------------|
| Referenz | 0,222      | 5,92E-06                       |
| Referenz | 0,419      | 1,18E-05                       |
| Z1       | 0,326      | 9,03E-06                       |
| Z2       | 0,345      | 9,60E-06                       |
| Z3       | 0,376      | 1,05E-05                       |
| Z6       | 0,323      | 8,94E-06                       |
| Z7       | 0,25       | 6,76E-06                       |

Um die Chymotrypsin-Konzentrationen der Proben ermitteln zu können, müssen analog zur oben durchgeführten Bestimmung der Stoffmenge wieder die Verdünnungen berücksichtigt werden. Dazu werden zuerst die Massen des Chymotrypsins in den Bestimmungsansätzen berechnet:

$$c_{\{\text{Test}\}} = \frac{E - A}{B} \quad m_{\{\text{Test}\}} = c_{\{\text{Test}\}} V_{\{\text{Test}\}} \quad (\text{II-8})$$

Diese lassen sich in die Massen und Konzentrationen der verdünnten Proben umrechnen:

$$m_{\{\text{Verdünnung}\}} = m_{\{\text{Test}\}} \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}} \quad c_{\{\text{Verdünnung}\}} = \frac{m_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{Verdünnung}\}}} = \frac{m_{\{\text{Test}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}} \quad (\text{II-9})$$

Abschließend müssen noch die Verdünnungen der Proben mit Puffer berücksichtigt werden:

$$c_{\{\text{Probe}\}} = c_{\{\text{Verdünnung}\}} \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{Probe}\}}} = \frac{m_{\{\text{Test}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}} \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{Probe}\}}} \quad m_{\{\text{Probe}\}} = m_{\{\text{Test}\}} \frac{V_{\{\text{Verdünnung}\}}}{V_{\{\text{V-T}\}}} \quad (\text{II-10})$$

Tabelle II-3: Chymotrypsin-Konzentrationen in den Bestimmungsansätzen und zur Berechnung benötigte Volumina

| Probe    | $c_{\{Test\}}$<br>mg / $\mu$ l | $m_{\{Test\}}$<br>mg | $V_{\{Test\}}$<br>$\mu$ l | $V_{\{V-T\}}$<br>$\mu$ l | $V_{\{Verd\u00fcnnung\}}$<br>$\mu$ l |
|----------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Referenz | 5,92E-06                       | 5,92E-03             | 1000                      | 5                        | 1000                                 |
| Referenz | 1,18E-05                       | 1,18E-02             | 1000                      | 10                       | 1000                                 |
| Z1       | 9,03E-06                       | 9,03E-03             | 1000                      | 10                       | 2000                                 |
| Z2       | 9,60E-06                       | 9,60E-03             | 1000                      | 10                       | 2000                                 |
| Z3       | 1,05E-05                       | 1,05E-02             | 1000                      | 10                       | 2000                                 |
| Z6       | 8,94E-06                       | 8,94E-03             | 1000                      | 10                       | 1000                                 |
| Z7       | 6,76E-06                       | 6,76E-03             | 1000                      | 10                       | 1000                                 |

Wir erhalten schließlich die in der Probe vorhandene Masse des Chymotrypsins und können mit dem Molekulargewicht von  $M_r = 25.000$  die in der Probe vorhandene Stoffmenge des Chymotrypsins sowie unter Berücksichtigung des Probenvolumens die Chymotrypsin-Konzentrationen bestimmen.

Tabelle II-4: Chymotrypsin-Massen/-Stoffmengen/-Konzentrationen der Proben

| Probe    | $m_{\{Probe\}}$<br>mg | $n_{\{Probe\}}$<br>nmol | $V_{\{Probe\}}$<br>$\mu$ l | $c_{\{Probe\}}$<br>mg / $\mu$ l |
|----------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Referenz | 1,18                  | 47,34                   | 100                        | 0,0118                          |
| Referenz | 1,18                  | 47,27                   | 100                        | 0,0118                          |
| Z1       | 1,81                  | 72,26                   | 200                        | 0,0090                          |
| Z2       | 1,92                  | 76,82                   | 200                        | 0,0096                          |
| Z3       | 2,11                  | 84,24                   | 200                        | 0,0105                          |
| Z6       | 0,89                  | 35,77                   | 200                        | 0,0045                          |
| Z7       | 0,68                  | 27,02                   | 200                        | 0,0034                          |

### 3. Diskussion der Ergebnisse

#### 3.a) Referenz

Mit Hilfe der Referenzlösung lässt sich die Stoffmenge des p-NP-[ $^{14}$ C]A und seiner Folgeprodukte sowie der Proteingehalt in Ansatz 2 bestimmen und mit den theoretisch berechneten Werten (siehe Abbildung II-1, links) vergleichen und die Abweichung bestimmen.

|             | Konzentration<br>[ $^{14}$ C]-Acetat | Stoffmenge<br>[ $^{14}$ C]-Acetat | Konzentration<br>Chymotrypsin | Stoffmenge<br>Chymotrypsin |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Referenz    | 0,0118 nmol / $\mu$ l                | 171,091 nmol                      | 0,0118 mg / $\mu$ l           | 47,305 nmol                |
| Ansatz 2    | 1,711 nmol / $\mu$ l                 | 1728,02 nmol                      | 0,473 mg / $\mu$ l            | 477,79 nmol                |
| theoretisch | 2 nmol / $\mu$ l                     | 2020 nmol                         | 0,470 mg / $\mu$ l            | 475 nmol                   |
| Abweichung  | 14,5 %                               | 14,5 %                            | 0,64 %                        | 0,59 %                     |

Die Proteinstoffmenge zeigt eine geringe Abweichung, wohingegen die mit Hilfe der Radioaktivität bestimmte [ $^{14}$ C]-Stoffmenge einen relativ großen Fehler aufweist. Dies beruht entweder auf einem Fehler in der Radiativitätsmessung oder bei der Herstellung des Ansatzes. Problematisch bei dieser Bestimmungsmethode ist – wie im Skript erwähnt – die Verd\u00fcnnung der urspr\u00fcnglichen Proben zur Filtration und der Bestimmung der Radioaktivit\u00e4t und des Proteingehaltes. Ein kleiner Fehler in der Bestimmung hat so auf das Ergebnis einen relativ gro\u00dfen Einfluss, zumal sich (mindestens) die folgenden Fehler aufsummieren: Der Fehler bei der Bestimmung selbst, die Volumenfehler der jeweiligen Verd\u00fcnnungen sowie der Fehler bei der Bestimmung der spez. Aktivit\u00e4t bzw. der Eichgeraden f\u00fcr die Proteinbestimmung.

## 3.b) Zentrifugate

Zur Diskussion der Ergebnisse verwenden wir die aus den Proteinbestimmungen und Radioaktivitätsmessungen gewonnenen Stoffmengen in den Proben, wir nehmen dabei an, dass die niedermolekularen (ggf. radioaktiven) Komponenten mit Hilfe der Molekularsiebmethode von den hochmolekularen Anteilen (hier: ggf. radioaktiv markiertes Chymotrypsin) der Ansätze quantitativ getrennt werden konnten. Eine Radioaktivität im Zentrifugat sollte demnach nur nachgewiesen werden können, wenn die Radioaktivität (als [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat) an Chymotrypsin gebunden ist. Aus dieser Annahme können wir ableiten, *dass wir mit Hilfe der Radioaktivitätsmessungen die Stoffmenge des markierten Chymotrypsins und mit Hilfe der Proteinbestimmung die Gesamtstoffmenge des Chymotrypsins in den Zentrifugaten ermittelt haben. Demnach können wir aus den ermittelten Stoffmengen den Anteil des markierten Chymotrypsins an der Gesamtmenge des vorhandenen Chymotrypsins ermitteln.*

Tabelle II-5: Stöchiometrie des Acetat-Einbaus in den Proben

| Probe | markiertes Enzym<br>nmol | Enzym<br>nmol | markiertes Chymotrypsin |
|-------|--------------------------|---------------|-------------------------|
|       |                          |               | Chymotrypsin            |
| Z1    | 1,80                     | 72,26         | 2 %                     |
| Z2    | 28,58                    | 76,82         | 37 %                    |
| Z3    | 31,60                    | 84,24         | 38 %                    |
| Z6    | 0,73                     | 35,77         | 2 %                     |
| Z7    | 1,12                     | 27,02         | 4 %                     |

Im *ersten Ansatz* wurde das Chymotrypsin durch PMSF gehemmt, eine Bindung des p-NP- $^{14}\text{C}$ A an das Enzym und die daraus resultierende Markierung als [ $^{14}\text{C}$ ]Acyl-Chymotrypsin-Zwischenprodukt ist unmöglich. Im Zentrifugat **Z1** sollte ein dementsprechend geringer Anteil an markiertem Chymotrypsin vorliegen; wir finden im Versuch, dass nur 2 % des Chymotrypsins markiert sind, wobei dieses Ergebnis auch durch Hintergrundrauschen erklärt werden kann.

Vom *zweiten Ansatz* wurden die Proben für die Zentrifugate **Z2** – **Z5** abgenommen. Die Zentrifugate **Z2** und **Z3** wurden wie Z1 behandelt, jedoch wurde das Chymotrypsin hier nicht mit PMSF gehemmt, wir finden dementsprechend einen Anteil von 37 % bzw. 38 % an markiertem Chymotrypsin in den Zentrifugaten. Zwei Proben aus dem zweiten Ansatz wurde abzentrifugiert (**Z4**, **Z5**); Z4 wurde dann mit Tris-Puffer pH 8 versetzt, was eine Spaltung des [ $^{14}\text{C}$ ]Acyl-Chymotrypsin-Zwischenproduktes bewirkt, das abgespaltene [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat wird bei der zweiten Filtration durch das Molekularsieb zurückgehalten, es sollte sich dementsprechend fast ausschließlich unmarkiertes Enzym im Zentrifugat (**Z6**) befinden. Tatsächlich finden sich nur 2 % markiertes Enzym im Zentrifugat, was – wenn man von Z1 ausgeht – einem vollständigen Zerfall des Zwischenproduktes entspräche. Als Vergleichsprobe wurde das Zentrifugat Z5 mit NaAc-Puffer pH 8 versetzt und ebenfalls abzentrifugiert (**Z7**), es sollte sich hier markiertes Chymotrypsin in einem ähnlichen Anteil wie in Z2 und Z3 finden. Im Experiment wurde in dieser Vergleichsprobe ein Anteil an 4 % markiertem Chymotrypsin gefunden, was dem doppelten Anteil an markiertem Chymotrypsin im Vergleich zu der mit Tris-Puffer versetzten Probe entspricht, dennoch ist der Anteil an markiertem Enzym sehr viel geringer als in Z2 und Z3, was darauf hindeutet, dass durch die weitere Behandlung der Probe das [ $^{14}\text{C}$ ]Acyl-Chymotrypsin-Zwischenprodukt größtenteils zerfallen ist oder aber ein Fehler im Versuch gemacht wurde. Dass in Z1 und Z4 jeweils 2 % des markierten Enzyms nachgewiesen werden konnte, kann – wie in II.C.1 und II.C.3.a) diskutiert – auch als Fehler in der Bestimmungsmethode aufgefasst werden, sodass vermutet werden kann, dass tatsächlich keinerlei markiertes

Enzym vorlag. Zusätzlich sollte auch die spontane Hydrolyse des Substrates bei der Fehlerbeurteilung mit berücksichtigt werden (siehe Versuch 1).

### III. RADIOAKTIVITÄTSBILANZ

Ziel dieser Bilanz ist der Nachweis über den Verbleib der ausgehändigten Radioaktivität, diese konnte anhand der Vorprobe bestimmt werden: Die Aktivität des ausgeteilten p-NP- $^{14}\text{C}$ -A-Volumens (70  $\mu\text{l}$  bzw. 2800 nmol) besitzt eine (berechnete) Radioaktivität von **3304 Bq (ausgegebene Radioaktivität)**.

Tabelle III-1: Im Versuch gemessene Radioaktivitäten

| Probe                                     | C<br>cpm | A<br>dpm | A<br>Bq | A-A <sub>B</sub><br>Bq |
|---|----------|----------|---------|------------------------|
| Eluat (gemessen)                          | 1455,95  | 1511,58  | 25,19   | 24,81                  |
| Eluat (Background, gemittelt)             | 22,00    | 22,84    | 0,38    | 0                      |
| Referenz                                  | 5476,70  | 5685,95  | 94,77   | 94,39                  |
| Referenz (Ansatz 2)                       | 7022,46  | 7290,77  | 121,51  | 121,13                 |
| Z1  | 58,85    | 61,10    | 1,02    | 0,64                   |
| Z2  | 606,61   | 629,79   | 10,50   | 10,12                  |
| Z3  | 668,48   | 694,02   | 11,57   | 11,19                  |
| Z6  | 51,87    | 53,85    | 0,90    | 0,52                   |
| Z7  | 67,87    | 70,46    | 1,17    | 0,79                   |
| Flüssigabfall (0,2 ml von 40 ml gemessen) | 910,98   | 945,79   | 15,76   | 15,38                  |
| Wischttest (Arbeitsfläche)                | 24,94    | 25,89    | 0,43    | 0,05                   |
| Wischttest (Eppendorf-Ständer)            | 32,92    | 34,18    | 0,57    | 0,19                   |
| Wischttest (Pipette 1000 $\mu\text{l}$ )  | 23,94    | 24,85    | 0,41    | 0,03                   |
| Wischttest (Pipette 200 $\mu\text{l}$ )   | 19,95    | 20,71    | 0,35    | -0,04                  |
| Wischttest (Pipette 40 $\mu\text{l}$ )    | 20,94    | 21,74    | 0,36    | -0,02                  |

Der Flüssigabfall wurde auf ein Volumen von 40 ml geschätzt, für ein 200  $\mu\text{l}$ -Aliquot wurde eine korrigierte Aktivität von 15,4 Bq ermittelt. Die auf diese Weise ermittelte Aktivität des **Flüssigabfalls** beträgt **3076 Bq**. Diese berücksichtigt nicht die in den Szintillationsgefäßen enthaltene Radioaktivität, da diese verschlossen entsorgt wurden. Die insgesamt ermittelte Radioaktivität der **Szintillationsgefäße** beträgt **264 Bq**. Die im Feststoffabfall enthaltene Radioaktivität wurde nicht gemessen, kann jedoch ermittelt werden, indem von der ausgegebenen Radioaktivität die Aktivitäten des Flüssigabfalls und der Szintillationsgefäße abgezogen werden; es ergibt sich für den Feststoffabfall eine berechnete (negative) Radioaktivität von 36 Bq, diese (geringe) Ungenauigkeit weist auf einen gewissen Fehler in der Radioaktivitätsmessung hin.

Die Wischproben weisen eine Aktivität im Rahmen des Hintergrundrauschens auf; die Flächen und verwendeten Geräte waren folglich nicht kontaminiert.

*Ende*

(Nathalie Leiprecht)

(Martin Thunemann)