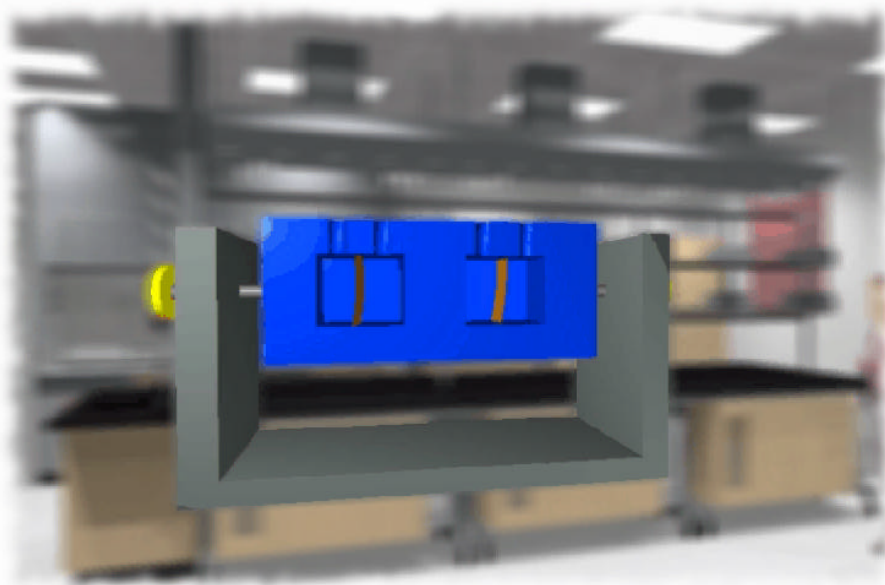


Methoden zur Untersuchung von Ligandenbindungen

Gleichgewichtsdialyse



Modul Enzymkinetik:

Leitung: Prof. Hans Bisswanger

Betreuung: Elena Kracker

Versuchsprotokoll:

Paula Quecke

Stefan Mogk

Titelbild: Dialyseblock

Die Darstellung ist schematisch und bezieht sich nicht auf tatsächlich am Markt befindliche Produkte. Der gezeigte Block ist in zwei Zellen unterteilt, die jeweils von einer Membran in eine innere und äußere Kammer kompartimentiert werden.

1 Index

1.1 Inhaltsverzeichnis

1	Index.....	2
1.1	Inhaltsverzeichnis.....	2
1.2	Abbildungsverzeichnis	2
2	Einleitung	3
3	Material und Methoden	3
3.1	Chemikalien und Instrumente	3
3.2	Indoltest.....	4
3.3	Gleichgewichtsdialyse.....	5
4	Experimenteller Teil.....	7
4.1	Kalibrierung des Indoltests.....	7
4.2	Bestimmung der Dialysezeit	8
4.3	Durchführung einer Gleichgewichtsdialyse	10
5	Zusammenfassung und Diskussion	14
6	Literatur	15

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Indolfärbung mit Ehrlichs Reagenz	4
Abbildung 2:	Funktionsweise einer Gleichgewichtsdialyse	5
Abbildung 3:	Mögliche Auswertungsverfahren	6
Abbildung 4:	Kalibrierung des Indoltests	8
Abbildung 5:	Bestimmung der Dialysezeit	9
Abbildung 6:	Indolverteilung (Extinktion) nach Dialyse.....	12
Abbildung 7:	Indolverteilung (Konzentration) nach Dialyse.....	12
Abbildung 8:	Auswertung mittels direkter Auftragung	13
Abbildung 9:	Auswertung mittels doppelt-reziproker Darstellung.....	13
Abbildung 10:	Auswertung nach Scatchard.....	14

2 Einleitung

Bei Ligandenbindungsversuchen entstehen im Gegensatz zu chemischen oder enzymkatalysierten Umsätzen keine stabilen, vom Substrat verschiedenen Produkte, sondern lediglich lose Assoziationsverbindungen. Jede Störung wie Änderungen von Konzentration, Temperatur oder pH-Wert bewirkt eine sofortige Gleichgewichtsverschiebung. Konventionelle Trennmethode führen entsprechend zum Zerfall des Enzym-Ligand-Komplexes, so dass spezielle Verfahren eingesetzt werden müssen, um multiple Gleichgewichte zu bestimmen.

Die durchgeführte Gleichgewichtsdialyse dient der Bestimmung von Bindungsparametern niedermolekularer Liganden an ein Makromolekül.

Für den Versuch wurde die Bindung von Indol (das als Seitenkettenfunktion in Tryptophan auftritt) an Serumalbumin untersucht. Der Indolnachweis erfolgte photometrisch nach Anfärbung mit Ehrlichs Reagenz. Ziel war die Bestimmung von Dissoziationskonstante und Zahl der Bindungsstellen mittels einer Auswertung nach Scatchard.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Instrumente

Dialyseblock	-	Apparatur nach Englund et al. (vgl. Literaturangaben)
Photometer	-	Shimadzu Spectrophotometer UV-120-01 bei 512 nm
KPP	-	100 mM Kaliumphosphat, pH 7.0
BSA	-	0,1 mM Rinderserumalbumin in KPP
Indol (Stamm)	-	100 mM Indol in Isopropanol
Indol (1:100)	-	1 mM Indol in KPP
Indol (3:100)	-	3 mM Indol in KPP
KOH	-	5,0 N Kaliumhydroxid
Ehrlichs Reagenz	-	<i>gebrauchsfertige Lösung bestehend aus:</i> 1,2 % (w/v) p-Dimethylaminobenzaldehyd 1,7 % (v/v) Schwefelsäure in Ethanol
Tol	-	Toluol
EtOH	-	Ethanol

3.2 Indoltest

Da insbesondere unter Praktikumsbedingungen die Arbeit mit radioaktiv markierten Liganden vermieden werden soll, wurde ein photometrischer Nachweis des Ligandens durchgeführt. Mit Hilfe von Ehrlichs Reagenz ist eine sehr empfindliche Anfärbung von Indol möglich. Der entstehende Rosindol-Farbstoff stellt eine Elektronenmangelverbindung mit ausgedehntem π -Elektronensystem dar und absorbiert im sichtbaren Spektralbereich bei 512 nm.

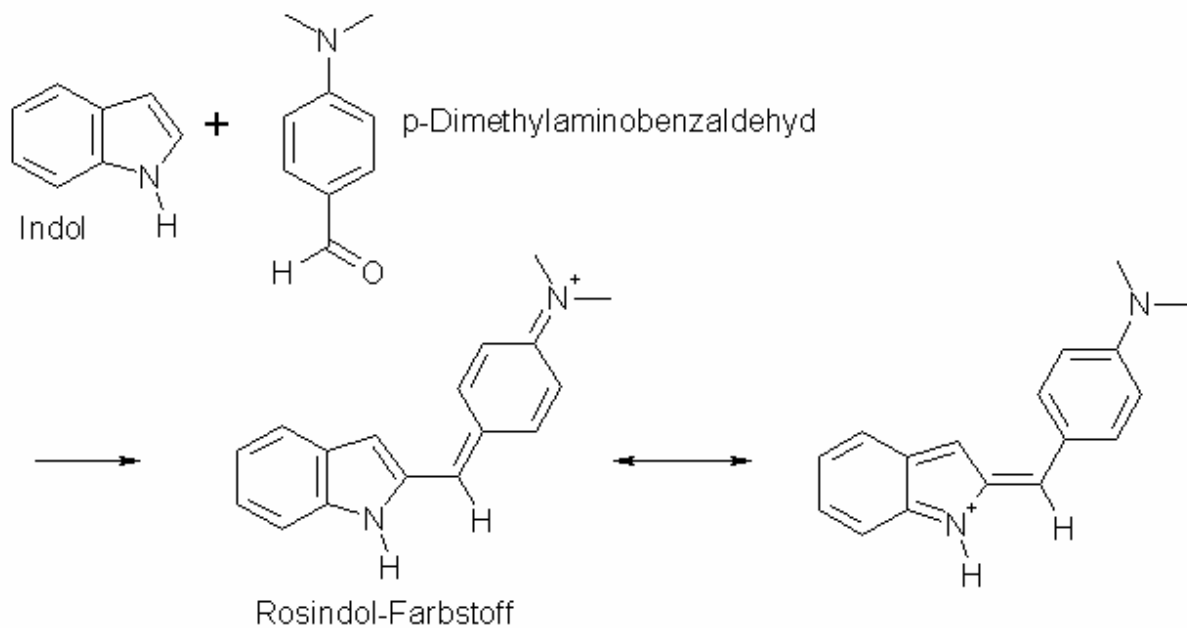


Abbildung 1: Indolfärbung mit Ehrlichs Reagenz

Da der Nachweis in organischer Phase durchgeführt wird, die Dialyse jedoch unter wässrigen Bedingungen, ist zuerst eine Überführung des nachzuweisenden Indols in Toluol notwendig. Hierzu werden 0,25ml der Testlösung mit 10 μ l KOH versetzt und mit 1ml Tol überschichtet. Das basische Kaliumhydroxid verhindert, dass das Indol protoniert und damit geladen vorliegt, so dass ein Übergang in organische Lösemittel möglich wird. Nach gründlichem Ausschütteln mit anschließender Zentrifugation (5 min) werden 200 μ l der organischen Phase (oben) abgenommen und mit 1,2ml gebrauchsfertigem Ehrlichs Reagenz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption wurde bei 512 nm gemessen und auf die Indolkonzentration mit Hilfe einer Kalibrierreihe geschlossen. Den rechnerische Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion beschreibt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

Transmission $T = I / I_0$ [] (1)

Absorption $A = 1 - T$ [] (2)

Extinktion $E = \epsilon * c * d$ [] (3)

$E = \log 1/T$ (4)

ϵ : Extinktionskoeffizient

c : Konzentration

d : Schichtdicke

3.3 Gleichgewichtsdialyse

Eine Dialysezelle wird durch eine semipermeable Membran definierter Porenweite in eine äußere und eine innere Kammer geteilt:

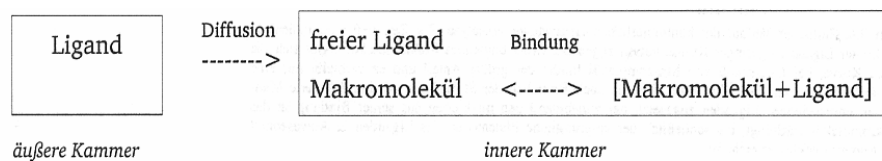


Abbildung 2: Funktionsweise einer Gleichgewichtsdialyse

In die innere Kammer wird eine konstante Menge des Makromoleküls eingefüllt, in die äußere die Ligandenlösung (die je nach Ligand ggf. radioaktiv markiert ist) in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Membran ist nur für den niedermolekularen Liganden durchlässig (Stichwort „Ausschlussgrenze“), das Konzentrationsgefälle wird durch Diffusion ausgeglichen.

Vom Makromolekül gebundener Ligand wird dem Gleichgewicht entzogen und durch nachströmenden Liganden ersetzt, bis die freien Anteile des Liganden in beiden Kammern gleich sind.

Im Gleichgewicht gilt:

$[Ligand, aussen] = [Ligand, innen, frei]$ (5)

$[Ligand, innen, ges.] = [L.innen, frei] + [L.innen, gebunden]$ (6)

5 in 6 $[L.innen, gebunden] = [L.innen, gesamt] - [Ligand, aussen]$ (7)

Aus beiden Kammern werden Proben entnommen und die Ligandenkonzentrationen durch Szintillationsmessungen oder optische Nachweisverfahren bestimmt.

Vorteile der Methode sind die Sparsamkeit trotz der Verwendung hoher Konzentrationen, da mit geringen Volumina gearbeitet wird. Ferner kann die Ligandenkonzentration gemessen werden, ohne die Gesamtmenge des zugesetzten Ligandens kennen zu müssen. Dadurch entfallen Fehlermöglichkeiten durch Verluste des Liganden infolge unspezifischer Bindung an Membran und Kammerwände.

Fehlerquellen ergeben sich insbesondere aus unzureichender Dialysezeit, ungenauer Konzentrationsbestimmung, unzureichender Stabilität der Enzym-Ligand-Komplexe, Volumenverschiebungen durch Osmose, sowie Beeinflussung des Gleichgewichts durch Ladungsausgleiche (Donnan-Effekt).

Die Auswertung erfolgt mittels direkter Auftragung, doppelt-reziproker Auftragung oder einer Darstellung nach Scatchard :

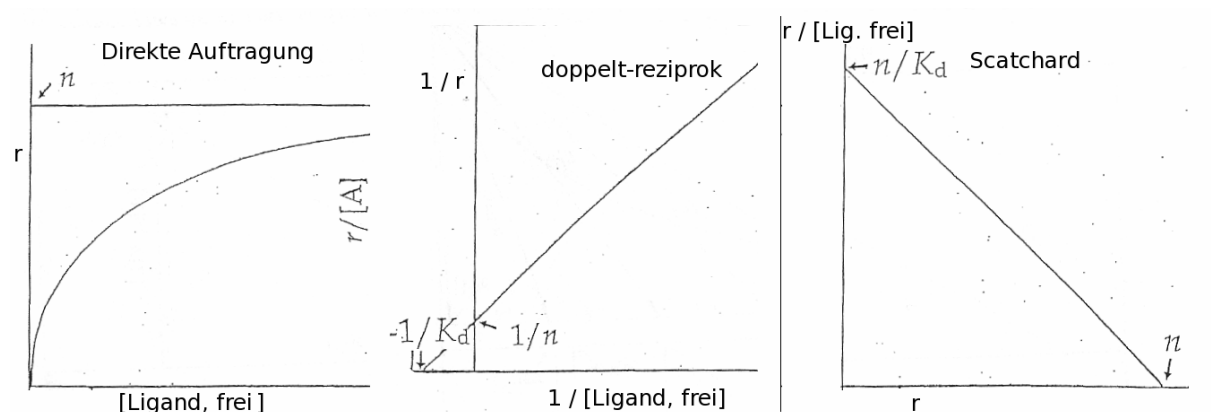


Abbildung 3: Mögliche Auswertungsverfahren

Es gilt :

$$r = [\text{gebundener Ligand}] / [\text{Makromolekül}] \quad (8)$$

$$n = \text{Zahl der Bindungsstellen} \quad (9)$$

Scatchard
$$r / [\text{freier Ligand}] = -r * (1 / K_d) + (n / K_d) \quad (10)$$

Bei der direkten Auftragung nähert sich im Sättigungsbereich die Zahl der besetzten Bindungsstellen der Gesamtzahl der Bindungsstellen an. Dividiert man diesen Wert durch die Zahl der Makromoleküle an sich, erhält man die Zahl der Bindungsstellen pro Makromolekül.

4 Experimenteller Teil

4.1 Kalibrierung des Indoltests

Um aus der gemessenen Extinktion die Indolkonzentration berechnen zu können wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Indolmengen hergestellt und der Indoltest wie beschrieben durchgeführt. Für die Verdünnungsreihe wurden bewusst Konzentrationen im Bereich um die Dissoziationskonstante gewählt.

Tabelle 1: Kalibrierung des Indoltests

V [µl]	V [µl]	c [µM]	E [] *) (572 nm)	
Indol 1:100 (1000 µM)	KPP (0,1 M)			
0	250	0	0,000	
5	245	20	0,041	
10	240	40	0,082	
15	235	60	0,110	
20	230	80	0,159	(Kd = 100 µM)
25	225	100	0,207	
50	200	200	0,363	Konzentration im Bereich
75	175	300	0,507	1/10 Kd < c < 10 Kd
100	150	400	0,663	
150	100	600	0,824	
250	0	1000	1,096	
*) Lineare Regression liefert: $E = 0,0018 (1/\mu\text{M}) * c$				

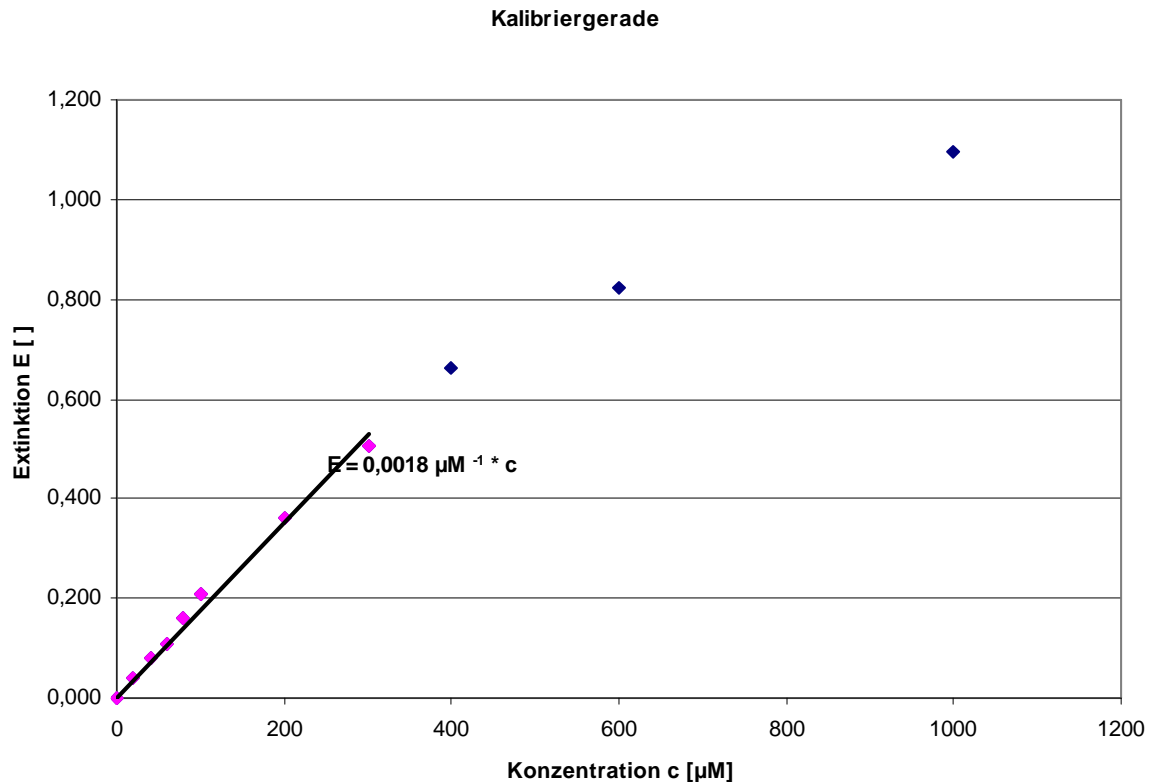


Abbildung 4: Kalibrierung des Indoltests

Die Regression wurde über den linearen Bereich von 0 µM bis 300 µM Indol durchgeführt.

4.2 Bestimmung der Dialysezeit

Für das Experiment muss der vollständige Ausgleich des Konzentrationsgradienten zwischen beiden Kammern gewährleistet sein. In einem Vorversuch sollte die dafür benötigte Dialysezeit bestimmt werden.

Hierzu wurde jeweils 1ml KPP gegen 1ml Indollösung dialysiert und nach unterschiedlichen Zeiten Proben auf ihren Gehalt an Indol untersucht.

Die Messung nach 75 Minuten wurde fehlerhaft durchgeführt und deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Ein vollständiger Ausgleich ist erst nach 120 Minuten zu erwarten. Für den nachfolgenden Versuch wurde diese Zeitspanne zugrunde gelegt.

Tabelle 2: Bestimmung der Dialysezeit

	Indolkammer (Ligand)	KPP Kammer (Puffer)	
t [min]	E []	E []	
10	0,180	0,980	
20	0,275	0,926	
30	0,300	0,867	
40	0,481	0,834	
50	0,496	0,763	
60	0,555	0,758	
75	0,569	0,688 **)	
90	0,597	0,675	
105	0,634	0,889	
120	0,636	0,675	
**) zu wenig Lösung beim Test mit Ehrlich-Reagenz			

Bestimmung der Dialysezeit

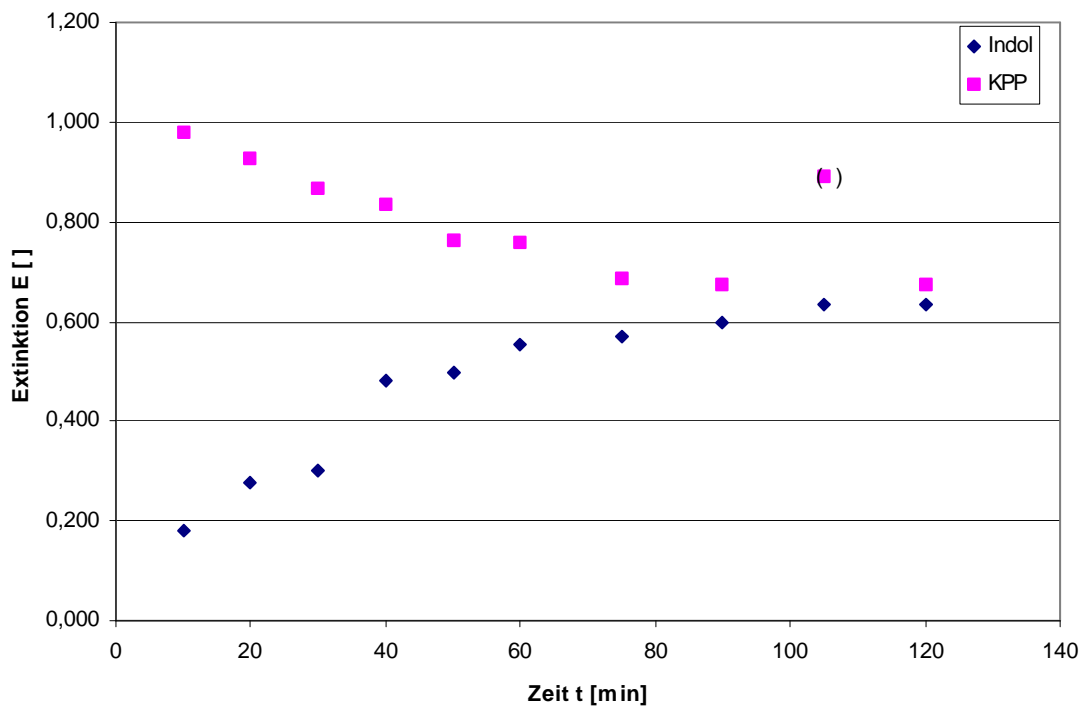


Abbildung 5: Bestimmung der Dialysezeit

4.3 Durchführung einer Gleichgewichtsdialyse

Die Dialysezellen wurden jeweils mit 1ml BSA in der Makromolekülkammer und mit variablen Indolverdünnungen in der Ligandenkammer befüllt. Aufgrund von Erfahrungswerten wurden 3-fach konzentrierte Indolkonzentrationen gewählt als bei der Kalibrierung des Indoltests. Die Inkubationszeit betrug 120 Minuten bei Raumtemperatur.

Tabelle 3 fasst sowohl den Pipettierplan, die Konzentrationen, als auch die Ergebnisse des Indoltests zusammen. Ebenso sind die zur Auswertung nötigen benötigten Parameter r , $r / [\text{freier Ligand}]$, $1 / [\text{freier Ligand}]$ und $1 / r$ dargestellt.

Weder in der direkten Auftragung, noch in der doppelt-reziproken Darstellung oder im Scatchard-Diagramm ist ein eindeutiger Trend festzustellen. Eine Regression oder gar eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten, sowie der Anzahl der Bindungsstellen ist mit den vorhandenen Messwerten nicht möglich.

Lediglich die Bemerkung, dass r maximal im Bereich von 0,6 liegt, lässt die Vermutung zu, dass jedes Molekül Rinderserumalbumin nur über eine einzelne Bindungsstelle für Indol verfügt. Angesichts der immensen Fehlerstreuung ist allerdings auch hier eine gesicherte Aussage illusorisch.

Tabelle 3: Bindungsmessung von Indol an BSA

Pipiettierplan			Messung nach 120 min		Auswertung						
Indol 3:100 (3000 µM)	KPP (0,1 M)		Indoltest in		Indolkonzentration in		SCATCHARD		Doppelt-reziprok		
			Lig. Kammer	MM-Kammer	Lig. Kammer (frei)	MM-Kammer (geb+frei)	r	r/[Lig] Lig.Kammer	1/[Lig] Lig.Kammer	1/r	
V [µl]	V [µl]	c [µM] (Indol)	E [] (572 nm)	E [] (572 nm)	c [µM])	c [µM])	[])	[1/µM]	[1/µM]	[]	
20	980	60	0,075	0,053	41,7	29,4	-0,1222	-2,93E-03	2,40E-02	-8,1818	
40	960	120	0,111	0,095	61,7	52,8	-0,0889	-1,44E-03	1,62E-02	-11,2500	
60	940	180	0,147	0,170	81,7	94,4	0,1278	1,56E-03	1,22E-02	7,8261	
80	920	240	0,233	0,224	129,4	124,4	-0,0500	-3,86E-04	7,73E-03	-20,0000	
100	900	300	0,245	0,260	136,1	144,4	0,0833	6,12E-04	7,35E-03	12,0000	
200	800	600	0,409	0,501	227,2	278,3	0,5111	2,25E-03	4,40E-03	1,9565	
300	700	900	0,573	0,679	318,3	377,2	0,5889	1,85E-03	3,14E-03	1,6981	
400	600	1200	0,725	0,817	402,8	453,9	0,5111	1,27E-03	2,48E-03	1,9565	
600	400	1800	0,974	0,980	541,1	544,4	0,0333	6,16E-05	1,85E-03	30,0000	
1000	0	3000	1,140	1,144	633,3	635,6	0,0222	3,51E-05	1,58E-03	45,0000	
<p>*) $c = E / 0,0018 \mu\text{M}$, vgl. Kalibrierung des Indoltests</p> <p>**) $r = ([\text{Ligand}]_{\text{MM-Kammer, gesamt}} - [\text{Ligand}]_{\text{Lig.Kammer}}) / [\text{Makromolekül}]$ $= [\text{Ligand}]_{\text{MM-Kammer, geb}} / [\text{Makromolekül}]$</p>											

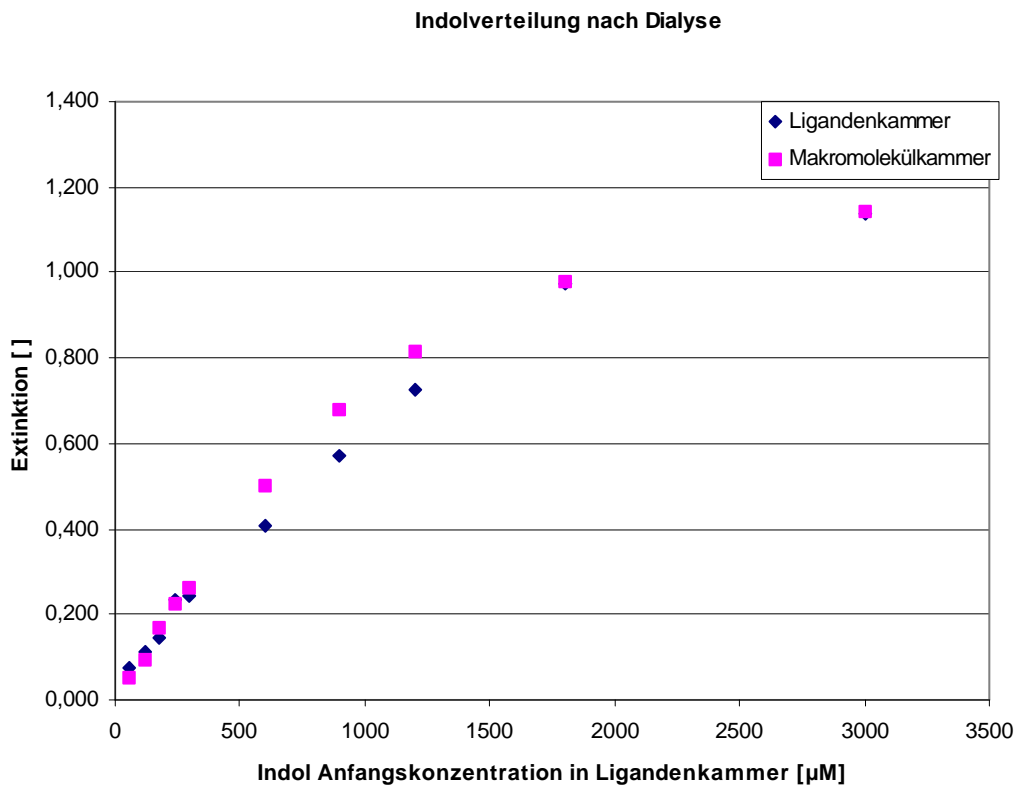


Abbildung 6: Indolverteilung (Extinktion) nach Dialyse

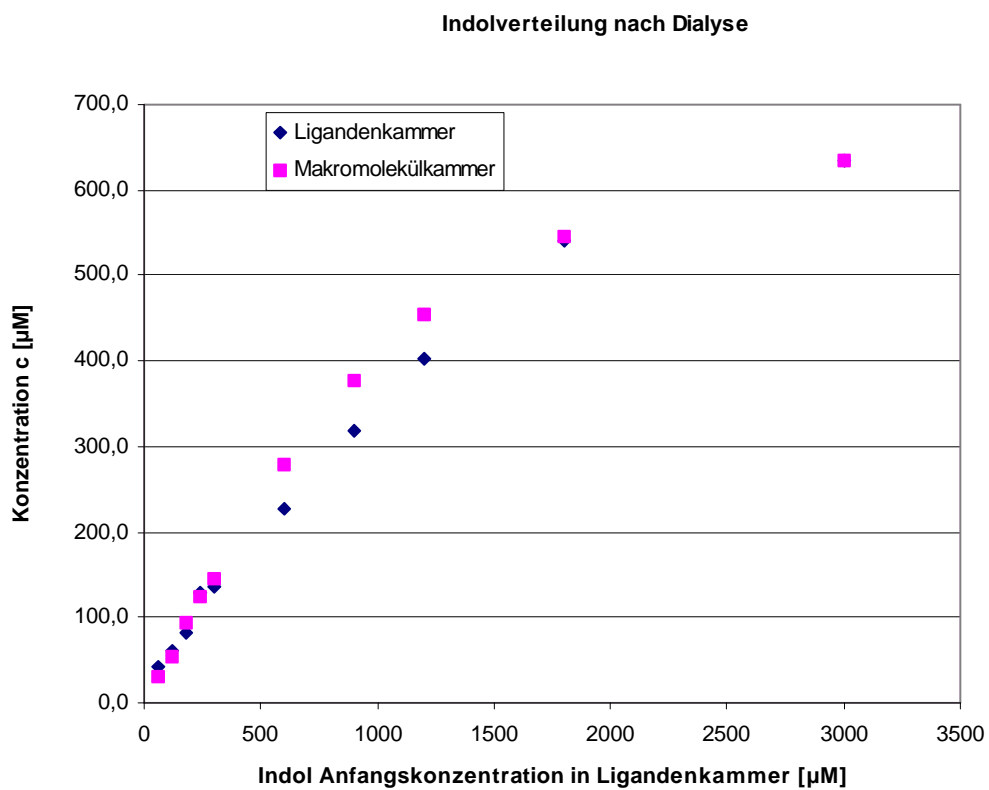


Abbildung 7: Indolverteilung (Konzentration) nach Dialyse

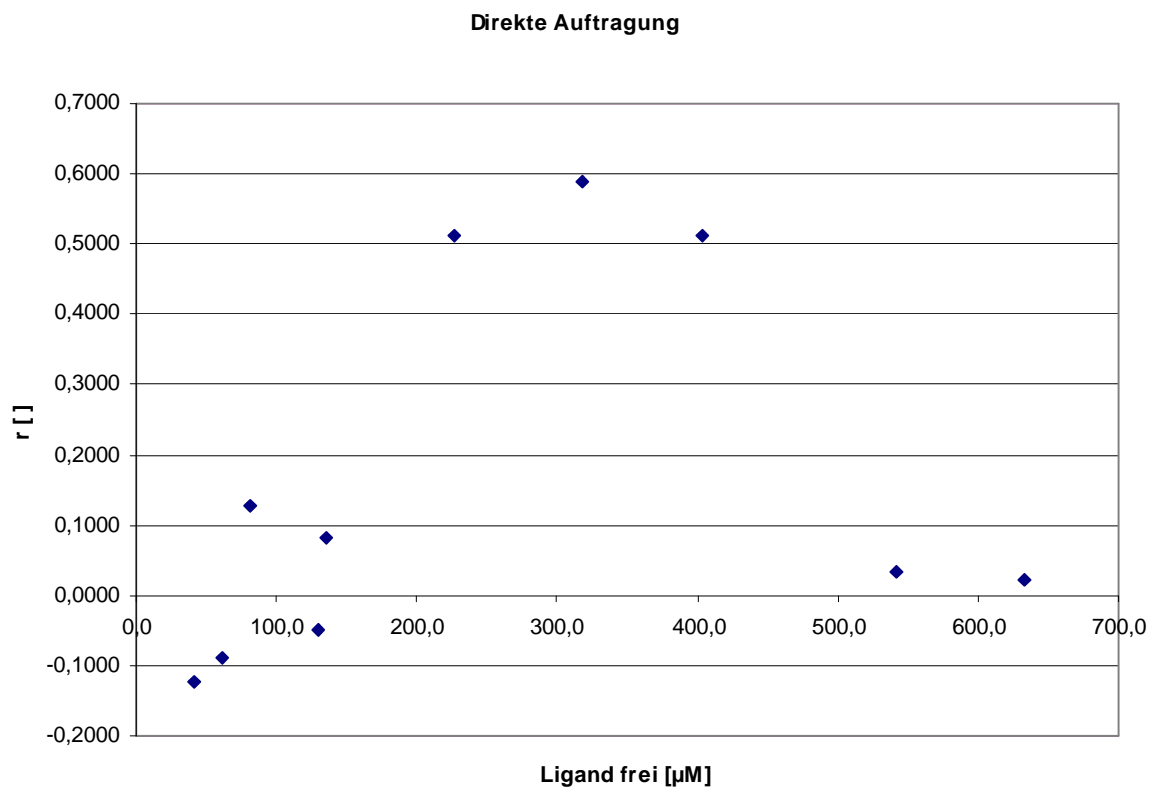


Abbildung 8: Auswertung mittels direkter Auftragung

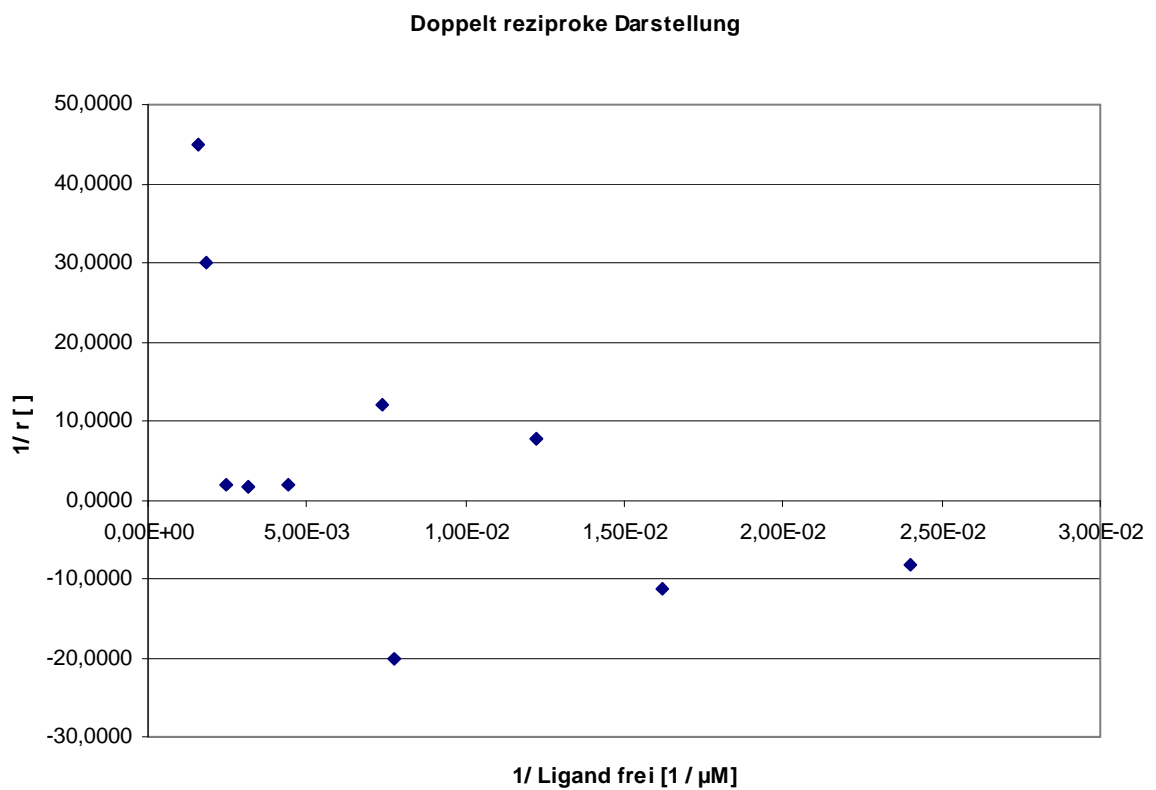


Abbildung 9: Auswertung mittels doppelt-reziproker Darstellung

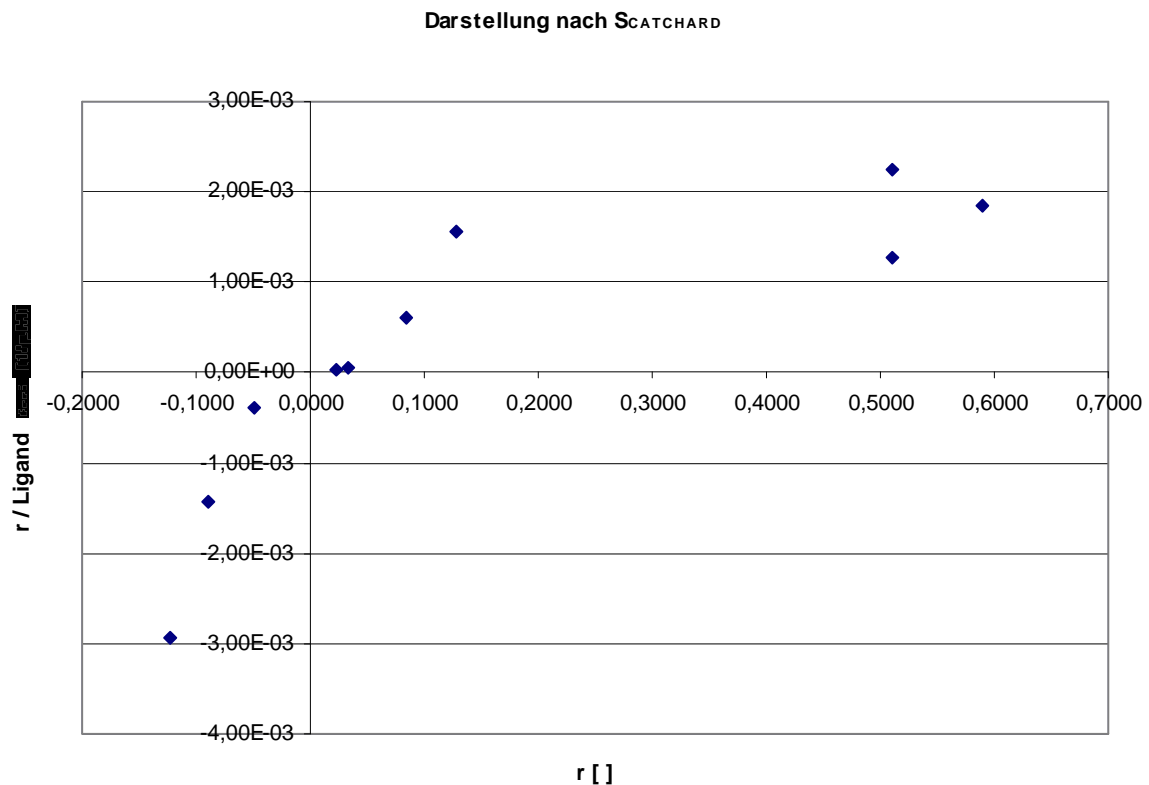


Abbildung 10: Auswertung nach Scatchard

5 Zusammenfassung und Diskussion

Die Vorversuche zur Kalibrierung des Indoltests und zur Ermittlung der Dialysezeit lieferten plausible Ergebnisse. Das deutete darauf hin, dass der Versuch prinzipiell korrekt funktionierte. Dennoch konnte mit den Daten des Hauptversuches zur Bestimmung des Bindungsgleichgewichts von Indol an BSA keine sinnvolle Auswertung vorgenommen werden.

Es ist bekannt, dass die Gleichgewichtsdialyse eine sehr starke Fehlerstreuung aufweist. Ferner ergeben sich Fehlerfortpflanzungen, da die Konzentrationen des gebundenen Liganden nur aus der Differenz anderer Konzentrationen ermittelt werden können.

Der Hauptversuch wurde mit 3fach konzentrierteren Indolkonzentrationen durchgeführt als der Vorversuch. In vergangenen Praktika hatte sich dieses Vorgehen als sinnvoll erwiesen. Möglicherweise muss die Wahl der Indolverdünnungen nun erneut an veränderte Rahmenbedingungen angepasst werden.

Da keine Auswertung erfolgen konnte sei an dieser Stelle auf den Methodenteil (Kapitel 3) verwiesen, der die theoretischen Kurvenverläufe vorstellt.

6 Literatur

Bisswanger, Hans: Enzymkinetik. Theorie und Methoden. (Wiley-VCH)
Englund et al., **1969**, J. Biol. Chem. 244, 3038-3044