

# Ligandenbindung

- 2.1 Radioaktive Ligandenmarkierung – 39**
  - 2.1.1 Iodierung von Peptiden und Proteinen – 39
  - 2.1.2 Iodierung von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht – 42
  - 2.1.3 Isolierung einzelner iodierter Spezies – 42
  - 2.1.4 Vor- und Nachteile des Iodierens – 43
  - 2.1.5 Tritiieren – 44
- 2.2 Bindung – 45**
  - 2.2.1 Isolierung von Membranen – 45
  - 2.2.2 Bindungstest – 52
  - 2.2.3 Bindungstests mit Membranen – 55
  - 2.2.4 Entwicklung von Membranbindungstests – 56
  - 2.2.5 Bindungstests mit Proteinen in Lösung – 57
  - 2.2.6 Bindungstests ohne Modifikation der Liganden – 60
  - 2.2.7 Wie entwickelt man einen Bindungstest für Proteine in Lösung? – 82
  - 2.2.8 Keine Bindung, was tun? – 83
- 2.3 Auswertung von Bindungsdaten – 84**
  - 2.3.1 Die Bindung ist im Gleichgewicht – 85
  - 2.3.2 Kinetik – 95
- 2.4 Vernetzen von Liganden – 97**
  - 2.4.1 Drei-Komponenten-Vernetzung (3K-Vernetzung) – 98
  - 2.4.2 Photoaffinitätsvernetzung – 102
  - 2.4.3 Kontrollen bei Vernetzungsversuchen – 104
  - 2.4.4 Vernetzung nicht-radioaktiver Liganden – 107
- 2.5 Sinniges – 107**
  - Literatur – 110**

Die Bindung zwischen zwei Molekülen ist der erste Schritt jeder biochemischen Reaktion und damit Grundlage jeder Funktion. Grundlegendes sollte man gründlich behandeln, und das vorliegende Kapitel wird dies tun. Das Vorurteil meint zwar, Bindungstests seien langweilig, und es hat recht, doch können auch langweilige Tests interessante Ergebnisse liefern.

**Zum Binden braucht es zwei Ligand und Bindungsstelle.** Ein Ligand ist ein Molekül, das reversibel (umkehrbar) an eine Bindungsstelle bindet. Eine Bindungsstelle ist ein „Locus“ eines Proteins, des Bindungsproteins.

Wie läuft ein typisches Bindungsprojekt ab? Etwa so: Ein Ligand (z. B. ein Toxin) zeigt in niedrigen Konzentrationen in einem physiologischen Test eine Wirkung. Der Experimentator überlegt: Diese Wirkung muss über Zellmoleküle vermittelt werden, also muss der Ligand mit einem Zellmolekül wechselwirken, und das kann er nur, wenn er an das Zellmolekül bindet. Die Bindungsstelle auf diesem Zellmolekül ist das erste Glied im Wirkungsmechanismus des Liganden und damit Ihr Ansatzpunkt. Sie markieren den Liganden radioaktiv, entwickeln einen Bindungstest, charakterisieren Bindungsstelle und Bindungsprotein. Danach reinigen Sie das Bindungsprotein, charakterisieren es eingehender, klonieren es, und auf diesem langen Weg erhalten Sie (mit Glück) auch Hinweise auf seine Funktion und damit den Wirkungsmechanismus des Liganden. Der Bindungstest eröffnet Ihnen also eine neue Forschungsrichtung, in der sie sich jahrelang betätigen können. Wenn das Bindungsprotein eine Funktion in der Zelle ausübt, deren molekularer Träger bisher unbekannt war, können Sie sich mit Bindungsexperimenten sogar profilieren.

Zur Suche nach dem Bindungsprotein gehören der radioaktiv markierte Ligand, ein Bindungstest und ein Gewebe, in dem das Bindungsprotein in genügend hoher Konzentration vorkommt. Arbeits- und Zeitaufwand hängen von den Eigenschaften des Liganden ab. Zuerst müssen Sie den Liganden isolieren, denn für Bindungstests sollte dieser sauber sein. Die zweite Hürde ist die radioaktive Markierung des Liganden. Dabei gehen leicht die biologischen Eigenschaften des Liganden verloren, dies

selbst bei großen Peptiden oder Proteinen mit ihren vielfältigen Markierungsmöglichkeiten. Schließlich müssen Sie noch einen Bindungstest entwickeln, der keine „Fahrkarten“ misst und auch keine „Hausnummern“. Ohne Glück und mit 10 h Einsatz täglich braucht der unerfahrene Doktorand je etwa ein halbes Jahr für die Markierung des Liganden (inklusive Reinigung und Nachweis der Funktionalität), die Entwicklung des Bindungstests und die Erstellung der Ergebnisse.

Im Zeitalter der massenspektrometrischen Detektion lässt sich die Markierung der Liganden umgehen, wenn diese in oder aus der untersuchten Lösung ionisiert werden können. Lesen Sie hierzu ► Abschn. 7.5. Natürlich hat auch diese Detektion Nachteile. So können Sie Ihre Liganden nur sehen, wenn diese von der restlichen Suppe abgetrennt werden können. Hierbei können Ihnen die Umkehrphasenchromatographie oder andere Techniken aus ► Kap. 5 helfen. Sie sehen: Die Arbeit wird nicht weniger, aber manchmal wenigstens gesünder.

Viele Proteine haben keine Liganden. Also macht man sich einen. In Epitop-Bibliotheken lässt sich zu jedem Protein eine Reihe von Peptiden finden, die mit fast beliebiger Affinität und an verschiedene Stellen des Proteins binden (Scott und Smith 1990). Voraussetzung ist, dass das Protein rein und in genügenden Mengen vorliegt.

**Eine Warnung** So einfach das Binden zweier Partner zu sein scheint, die Beziehungen scheitern oft an Kleinigkeiten und können erstaunlich kompliziert werden. Vielleicht verliert der Ligand seine biologische Aktivität bei der radioaktiven Markierung, oder er bindet nicht spezifisch (d. h. an mehrere verschiedene Bindungsstellen), oder es werden aufwendige chemische Synthesen notwendig, oder es stellt sich heraus, dass die mit viel Mühe gefundene Bindungsstelle auf einem schon bekannten Protein liegt. Ist Letzteres der Fall, so wurde lediglich ein neuer Ligand für ein altes Protein gefunden. Das wirft eine Publikation ab und danach steht der Experimentator im Regen.

Genug der Schwarzmalerei. Bindungsprojekte sind eher berechenbar als andere, und wenn ihre Methoden auch wenig Prestige bringen, so sind sie doch unentbehrlich.

» Wahrhaftig, gnädiger Herr, ich bin der Meinung, dass der Arme mit dem zufrieden sein muss, was er findet, und auf keine gebratenen Tauben aus der Luft warten soll.

## 2.1 Radioaktive Ligandenmarkierung

Bevor Sie sich auf das Betreten des Isotopenlabors einlassen, sollten Sie den Liganden pharmakologisch charakterisieren, also eine biologische Reaktion messen. Das kann die Wirkung eines Neurotoxins an der Nerv-Muskel-Endplatte sein oder auch nur eine stumpfsinnige LD<sub>50</sub>. Sie erfahren, in welchen Konzentrationen, wo und wie der Ligand seine Wirkung entfaltet. Das ist nicht nur für die Wahl des Isotops wichtig, sondern auch für den später zu entwickelnden Bindungstest. Vor allem ermöglicht ein quantitativer pharmakologischer Test, den mit z. B. <sup>127</sup>Iod (nicht-radioaktiv) markierten Liganden auf biologische Aktivität zu testen. Ohne pharmakologischen Test tapen Sie im Dunkeln.

Die gängigsten Isotope für die Ligandenmarkierung sind <sup>125</sup>Iod und <sup>3</sup>H. <sup>125</sup>Iod ist das Isotop der Wahl. Mit <sup>125</sup>Iod werden Proteine, Peptide und Verbindungen mit Phenylgruppen oder primären Aminogruppen markiert.

### 2.1.1 Iodierung von Peptiden und Proteinen

Für eine Iodierung müssen Proteine und Peptide ein Tyrosin, Histidin oder primäre Aminogruppen besitzen (■ Abb. 2.1). Außerdem muss die biologische Aktivität die Iodierungsprozedur überstehen.

Tyrosinreste werden gerne mit **Chloramin-T** iodiert. Chloramin-T zersetzt sich in wässriger Lösung langsam zu Hypochlorsäure, die <sup>125</sup>I<sup>-</sup> zu <sup>125</sup>I<sup>+</sup> oxidiert. <sup>125</sup>I<sup>+</sup> reagiert mit der anionischen Form des Tyrosins zu <sup>125</sup>I-Tyrosin. Die Reaktion hat ein pH-Optimum von 7,5 und wird von Thiocyanat in mikromolaren Konzentrationen gehemmt. Da das Na<sup>125</sup>I in NaOH geliefert wird, neutralisiert man die Reaktionsmischung durch einen starken Puffer, meistens Natriumphosphat. Am Ende der Reaktion

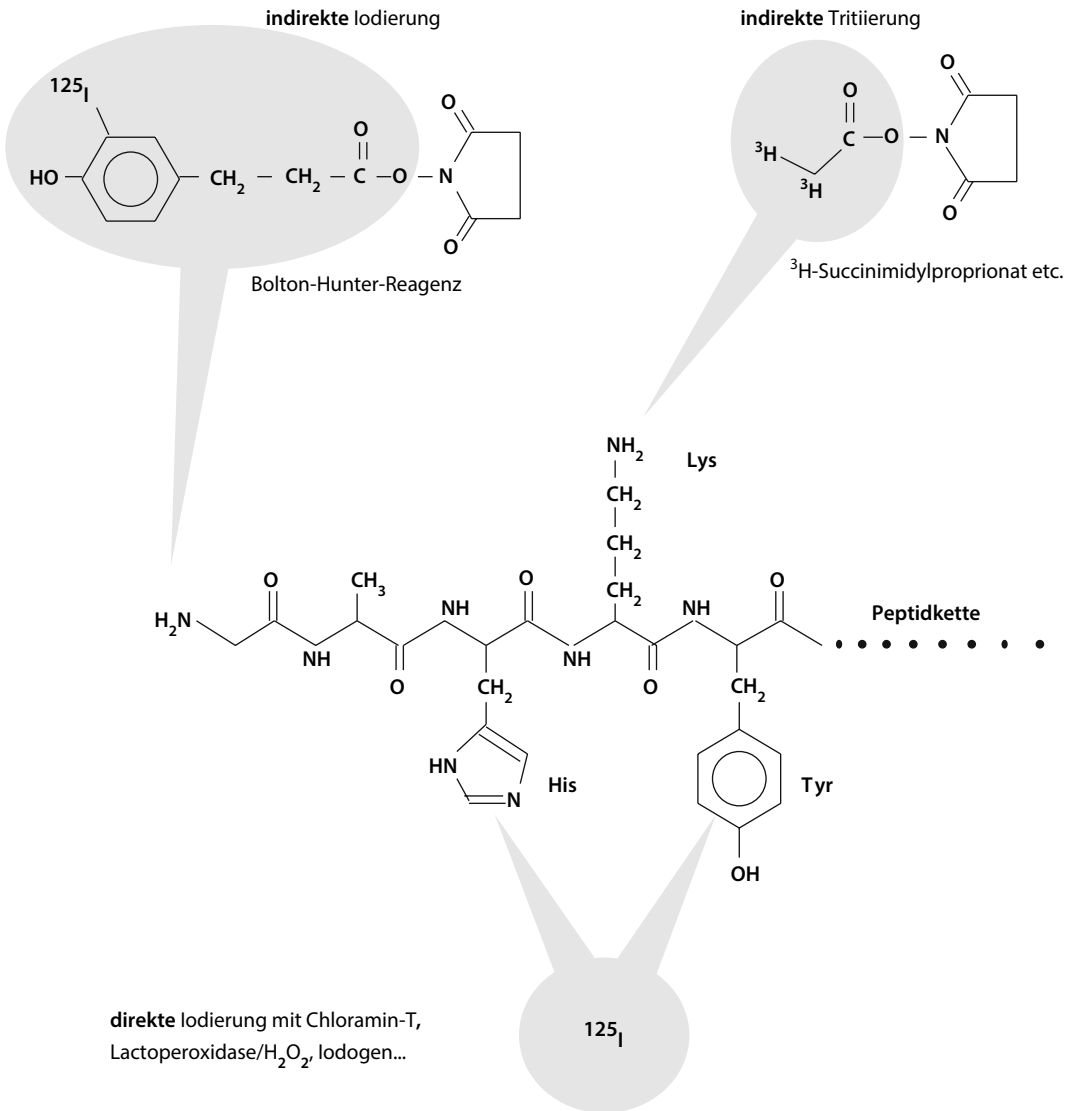
wird das Oxidationsmittel Chloramin-T durch ein Reduktans, meistens Bisulfit, zerstört.

Die verschiedenen Tyrosinreste eines Proteins reagieren verschieden gut mit <sup>125</sup>I<sup>+</sup>, vielleicht wegen unterschiedlicher Zugänglichkeit, anderen Nachbarn etc.

Das in Rehm und Lazdunski (1992) und Sutter et al. (1979) beschriebene Iodierungsprotokoll wurde für Proteine und Peptide entwickelt, liefert aber auch mit Molekülen mit kleinem MG und einer Phenylgruppe gute Ergebnisse. Das <sup>125</sup>I<sup>-</sup> wird mit niedrigen Chloramin-T-Konzentrationen oxidiert (molares Verhältnis von zu iodierendem Molekül/Chloramin-T/<sup>125</sup>I etwa 1/1–2/0,5–1). Die Iodierungsreaktion wird entweder durch Verdünnen der Reaktionsmischung (Rehm und Lazdunski 1992) oder, wenn es das Protein verträgt, durch Zugabe von Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (30 mg/ml) beendet. Ein Ionenaustauscher oder eine Gelfiltrationssäule, z. B. Sephadex G-25 oder Bio-Gel P-60, trennt Peptide oder Proteine vom restlichen <sup>125</sup>I<sup>-</sup> ab. Triton X-100 und BSA verhindern die Adsorption des iodierten Peptids an Reaktionsgefäße und Pipetten. Nach der Reaktion liegt im Allgemeinen eine Mischung von einfach jodierten, mehrfach iodierten und nicht-iodierten Molekülen vor, wobei die monoiodierte Verbindung überwiegt.

Bei der Iodierung mit Chloramin-T liegen alle Reaktanten in Lösung vor (Ein-Phasen-System). Pierce bietet Oxidationsmittel an, die auf eine feste Phase aufgezogen wurden (Zwei-Phasen-System: Iodobeads, Iodogen). Bei den **Iodobeads** handelt es sich um an Polystyrolkugeln gekoppeltes N-Chlorobenzylsulfonamid, bei **Iodogen** um ein auf die Wand des Reaktionsgefäßes aufgezoogenes, hydrophobes Chloramin-T-Derivat (Iodobeads benutzen Markwell (1982), Iodogen Salacinski et al. (1981) und Tuszyński et al. (1983)). Nach der Reaktion kann bei Iodobeads und Iodogen die feste Phase mit dem Oxidationsmittel leicht vom Reaktionsansatz getrennt werden. Die Zugabe von Reduktionsmittel (Bisulfit) ist daher unnötig, was empfindliche Disulfidbrücken schont. Zudem ist N-Chlorobenzylsulfonamid ein milderes Oxidationsmittel als Chloramin-T.

Als noch schonender gilt die Iodierung der Tyrosinreste mit **Lactoperoxidase** und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Der Experimentator setzt dem Reaktionsansatz mit <sup>125</sup>I<sup>-</sup>, Lactoperoxidase und dem Protein bzw. Peptid wiederholt geringe Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu. Die Lactoperoxidase spaltet das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser und O<sub>2</sub> und oxidiert gleichzeitig das <sup>125</sup>I<sup>-</sup>. Azid hemmt die Lactoperoxidase. Statt wiederholt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zuzugeben,



■ **Abb. 2.1** Radioaktive Markierung von Proteinen und Peptiden

können Sie mit einer Kombination von Glucoseoxidase und Glucose für eine konstante Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Reaktionsmischung sorgen. Die Glucoseoxidase-Lactoperoxidase-Reaktionskette bietet Bio-Rad als Zwei-Phasen-Iodierungssystem an. Vorteile: Der Reaktionsansatz bleibt enzymfrei; die iodierten Glucoseoxidase/Lactoperoxidase-Moleküle (Selbstiodierung) bleiben im Reaktionsgefäß.

Das zu markierende Peptid bzw. Protein besitzt keinen Tyrosinrest? Versuchen Sie einen **Histidin-**

rest zu iodieren! Oberhalb pH 8–8,5 substituiert Iod bevorzugt den Imidazolring des Histidins (Chisholm et al. 1969; Taylor et al. 1984).

**Primäre Aminogruppen** des Proteins bzw. Peptids lassen sich mit dem Bolton-Hunter-Reagenz oder anderen  $^{125}\text{I}$ -markierten N-Succinimidyl-Verbindungen umsetzen (indirekte Iodierung, ■ Abb. 2.1). Es entsteht ein Säureamid, d.h. die positive Ladung der primären Aminogruppe geht verloren (Bolton und Hunter 1973).  $^{125}\text{I}$ -Bolton-

Hunter-Reagenz ist bei PerkinElmer oder GE Healthcare erhältlich. Statt N-Hydroxysuccinimidyl-Verbindungen können auch Imidoester verwendet werden (Bright und Spooner 1983). Diese reagieren spezifisch mit Lysinresten und erhalten die positive Ladung des derivatisierten Lysins. Schließlich gibt es noch die Möglichkeit, die primäre Aminogruppe mit 4-Hydroxybenzaldehyd zu einem Imin umzusetzen und dieses zu einem sekundären Amin zu reduzieren (Vorsicht bei Disulfidbrücken) (Su und Jeng 1983). Die Ladung und Nukleophilie der primären Aminogruppe bleibt erhalten. Hinterher wird die Phenylgruppe z. B. mit Chloramin-T iodiert.

Nach der Iodierung gilt es, das freie  $^{125}\text{I}$  vom iodierten (und uniodierten) Protein bzw. Peptid abzutrennen. Für Proteine nimmt man dazu kleine Ionenaustauscher- oder Gelfiltrationssäulen, für kleinere stabile Proteine und Peptide die HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Eine HPLC einzusetzen, lohnt, wenn häufig iodiert wird, denn nach einem Lauf mit 1 mCi  $^{125}\text{I}$  ist die Maschine mindestens ein Jahr lang für kaltes Arbeiten nicht mehr zu gebrauchen. Die HPLC vermag oft zwischen mono- und diiodierten Peptiden bzw. Proteinen zu unterscheiden. Bei Iodierungsreaktionen mit gutem Einbau kann man auf die Abtrennung des freien  $^{125}\text{I}$  verzichten, zumal bei der Lagerung des Reaktionsproduktes sowieso wieder freies  $^{125}\text{I}$  entsteht (Rückreaktion).

Falls Sie ein Peptid iodieren müssen, das pH 3 und 100°C verträgt, können Sie es erst mal mit  $^{127}\text{I}$  iodieren. Nach dem Abtrennen des freien  $^{127}\text{I}$  tauschen Sie das ins Peptid eingebaute  $^{127}\text{I}$  gegen  $^{125}\text{I}$  aus (Breslav et al. 1996). Der Vorteil: Die Produkte der  $^{127}\text{I}$ -Iodierung können in aller Ruhe auf der (kalten) *reversed-phase*-HPLC aufgetrennt und anschließend auf ihre biologische Aktivität untersucht werden (► Abschn. 2.1.3). Beim aktiven  $^{127}\text{I}$ -Derivat tauschen Sie dann das  $^{127}\text{I}$  gegen  $^{125}\text{I}$  aus. Sie können auch auf die Iodierungsreaktion verzichten und stattdessen das Peptid mit der entsprechenden  $^{127}\text{I}$ -Aminosäure an der gewünschten Stelle synthetisieren lassen (Peptid-synthesizer).

Die **Iodtausch-Methode** ist auf säurestabile Peptide beschränkt. Zudem tauscht nur 3,5-Diiodtyrosin bereitwillig sein  $^{127}\text{I}$  gegen  $^{125}\text{I}$  aus.

Doch selbst mit diiodtyrosinhaltigen Peptiden brachten Breslav et al. (1996) nur eine spezifische Aktivität von 10 Ci/mmol zustande. Die Methode mag freilich nicht völlig ausgereift sein, sowohl was mildere Austauschbedingungen als auch höhere spezifische Aktivitäten betrifft. Freies  $^{125}\text{I}$  trennen Breslav et al. (1996) mit einer C18-Sep-Pak-Patrone ab:  $^{125}\text{I}$  läuft durch, Peptid bindet und wird nach dem Waschen mit Methanol eluiert.

### The day after

**Kein Einbau von  $^{125}\text{I}$ ?** Wurde im Iodierungsmix nichts vergessen oder falsch zugegeben, enthält das Protein entweder keinen Tyrosinrest oder die Oxidationsbedingungen waren zu schwach. Helfen andere oder stärkere Oxidationsmittel (z. B. mehr Chloramin-T) nicht, liegt die Lösung des Problems vielleicht in der Umsetzung mit Bolton-Hunter-Reagenz,  $^3\text{H}$ -markierten N-Succinimidyl-Verbindungen oder im Versuch, ein Histidin des Proteins zu iodieren.

**Das iodierte Protein zeigt keine spezifische Bindung?** Oft ist das eingebaute  $^{125}\text{I}$  schuld, aber auch die bei der Iodierung verwendeten Reagenzien können das Protein inaktivieren. So oxidiert Chloramin-T nicht nur  $\text{I}^-$ , sondern auch die  $\alpha$ -Aminogruppe von Peptiden und Aminosäuren zum Nitril. Empfindliche Phenolderivate werden ebenfalls zerstört. Auf diesen Reaktionen beruhte, dies nebenbei, der Einsatz von Chloramin-T als Desinfektionsmittel im Ersten Weltkrieg (Dakin et al. 1916). Mildere Oxidationsbedingungen, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Iodobeads statt Chloramin-T, oder andere Reaktionsbedingungen (pH, Ionenstärke, Liganden) bringen oft die Wende.

Die Zahl der eingebauten Iod-Atome pro Protein beeinflusst dessen Bindungsfähigkeit. Faustregel: Je größer das Verhältnis Mol Iod-Atome/Mol Protein im Reaktionsansatz ist, desto mehr Iod wird ins Protein eingebaut, und umso kleiner sind Immunreaktivität und biologische Aktivität des iodierten Proteins. Für das stöchiometrische Verhältnis der Reaktanten im Iodierungsansatz gilt also: zu viel Iod, und das Protein ist tot. Es empfiehlt sich die Reaktion zuerst mit  $^{127}\text{I}$  (nicht-radioaktiv) durchzuführen und die iodierten Spezies, vor allem die einfach iodierte Verbindung, auf ihre biologische Wirkung zu prüfen.

Sind also monoiodierte Proteine des Experimentators Wunsch und Streben, so kann doch schon ein einziges Iod dem Protein die Lust am Binden vergällen. In diesem Fall: Variieren Sie die Reaktionsbedingungen und versuchen Sie, einen anderen Tyrosin- oder Histidinrest zu iodieren. Dies in der Hoffnung, dass das Iod in der neuen Position die Bindung nicht stört. Ist diese Hoffnung vergebens, oder wollen Sie sich nicht auf endloses Screenen von Reaktionsbedingungen einlassen, bleiben das Bolton-Hunter-Reagenz oder eine  $^3\text{H}$ -Markierung.

**Das Protein ist verschwunden?** Bei dieser, der übelsten aller Möglichkeiten ist das Protein durch die Iodierungsprozedur denaturiert worden und in der Folge aggregiert, präzipitiert oder adsorbiert, z. B. an die Säule, die das iodierter Protein vom freien  $^{125}\text{I}$  trennen sollte. Rettung bringt eine mildere Iodierungsprozedur.

### 2.1.2 Iodierung von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht

Iodierte Moleküle mit niedrigem MG dienen als Liganden in Bindungstests, zur indirekten Iodierung von Proteinen oder als Photoaffinitätsliganden. In der Regel handelt es sich um Phenol-Verbindungen.

Auch bei der Iodierung von Molekülen mit niedrigem MG dient meistens  $\text{Na}^{125}\text{I}$  als  $^{125}\text{I}$ -Quelle und Chloramin-T als Oxidationsmittel (molares Verhältnis der drei Reaktanten etwa 1:1:1). Ein leicht basischer pH im Reaktionsansatz begünstigt die Monoiodierung. Bei wasserempfindlichen Verbindungen wie N-Succinimidyl-Derivaten führt man die Iodierungsreaktion in organischen Lösungsmitteln (z. B. Aceton, Acetonitril) durch. Die Iodierungseffizienz hängt vom verwendeten Lösungsmittel ab. Mit der HPLC oder Dünnschichtchromatographie trennen Sie freies  $^{125}\text{I}$ , iodiertes Molekül und nicht-iodiertes Molekül voneinander ab.

Für die Derivatisierung von primären Aminogruppen gilt, was für Proteine bzw. Peptide gesagt wurde, jedoch können Moleküle mit niedrigem MG oft auch in organischen Lösungsmitteln derivatisiert

werden. Die Eigenschaften (z. B. die Löslichkeit) von Molekülen mit kleinem MG ändern sich bei der Derivatisierung mit z. B. Bolton-Hunter-Reagenz natürlich stärker als bei einem großen Protein.

Als Vorsichtsmaßnahme gegen Radiolyse (► Abschn. 2.1.4) sollte das iodierter Molekül in verdünnter Lösung und in Gegenwart von Radikalfängern wie Ethanol, Ascorbat, Mercaptoethanol aufbewahrt werden. Experimentelle Einzelheiten finden Sie in Ji et al. (1985), Kometani et al. (1985a) und Masson und Labia (1983).

### 2.1.3 Isolierung einzelner iodierter Spezies

Bei einer Iodierungsreaktion entsteht oft eine Reihe von Schwestermolekülen. So liefert die Iodierung von Proteinen, die mehrere Tyrosinreste enthalten, einfach iodierter, doppelt iodierter und uniodierter Proteine, wobei die einfach iodierten Proteine noch an verschiedenen Tyrosinen iodiert sein können usw. Schließlich können Phenylgruppen und Imidazolringe mit Iod mono- und bisubstituiert sein.

Einfach iodierter kann man von uniodierten und mehrfach iodierten Molekülen mittels HPLC (Bizard et al. 1989) oder isoelektrischer Fokussierung (Rehm und Betz 1982) abtrennen. Die Isolierung des einfach iodierten Moleküls aus einem Gemisch einfach iodierter und uniodierter Moleküle gibt nicht nur eine höhere spezifische Aktivität und ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis, sie vereinfacht auch die Interpretation der Bindungsergebnisse.

Gelingt es nicht, die monoiodierter Molekülspezies zu isolieren, liegt also ein Gemisch von iodiertem und uniodiertem Molekül vor, dann müssen Sie die spezifische Radioaktivität bestimmen: die Menge an eingebauter Radioaktivität, dividiert durch die Summe der Mole von iodiertem und uniodiertem Molekül. Die spezifische Aktivität wird in  $\text{Ci}/\text{mmol}$  angegeben. Mithilfe der spezifischen Aktivität lässt sich berechnen, wie viel Atome des radioaktiven Isotops ein Molekül enthält (► Abb. 2.2). So enthält bei einem mit  $^{125}\text{I}$  derivatisierten Protein mit einer spezifischen Radioaktivität von  $2200 \text{ Ci}/\text{mmol}$ , statistisch gesehen, jedes Proteinmolekül ein  $^{125}\text{I}$ -Atom.

Die Menge A einer radioaktiven Verbindung zur Zeit t berechnet sich nach:

$$A = A_0 \cdot \exp \left[ - \frac{\ln 2 \cdot t}{T_{1/2}} \right]$$

$A_0$  ist die Menge an radioaktiver Verbindung zur Zeit  $t = 0$ ;  $T_{1/2}$  die Halbwertszeit des Isotops.

Die Aktivität (Zahl der Zerfälle pro Zeiteinheit) einer radioaktiven Verbindung zur Zeit t ist also:

$$\frac{dA}{dt} = - \frac{A_0 \cdot \ln 2}{T_{1/2}} \cdot \exp \left[ - \frac{\ln 2 \cdot t}{T_{1/2}} \right]$$

Sei  $A_0$  1 mmol z. B.  $^{125}\text{I}$ , so ist  $dA/dt$  zur Zeit  $t = 0$ :

$$\left[ \frac{dA}{dt} \right]_{t=0} = - \frac{A_0 \cdot \ln 2}{T_{1/2}} = \frac{6,02 \cdot 10^{20} \cdot \ln 2}{59,6 \cdot 24 \cdot 60 \text{ min}} = 4,83 \cdot 10^{15} \text{ Zerfälle/min.}$$

Mit 1 Ci =  $2,22 \cdot 10^{12}$  Zerfälle/min folgt  $\left[ \frac{dA}{dt} \right]_{t=0} = 2176 \text{ Ci}$

d. h. 1 mmol  $^{125}\text{I}$  hat die Aktivität 2176 Ci. Seine spezifische Radioaktivität ist also 2176 Ci/mmol.

■ **Abb. 2.2** Zeitabhängigkeit der Aktivität einer radioaktiven Verbindung

## 2.1.4 Vor- und Nachteile des Iodierens

$^{125}\text{I}$  hat eine hohe spezifische Aktivität (■ Tab. 2.1) und ist, z. B. in Autoradiogrammen, leicht und schnell nachzuweisen. Zum Zählen reicht ein  $\gamma$ -Counter, der keinen teuren und giftigen Scintillator benötigt. Der Zeitaufwand für eine Iodierung, einschließlich der Trennung des iodierten Moleküls vom freien Iod, liegt bei 2–3 h. Die Vorbereitungen wie Puffer herstellen, Platz im Jodlabor aufbauen benötigen ca. 1 Tag. Auch ist Iodieren vergleichsweise billig (2 mCi  $^{125}\text{I}$  kosten ca. 120 Euro).

Die üblichen Handmessgeräte reagieren schon auf Spuren von  $^{125}\text{I}$  mit einem beängstigenden Knattern. Daher kommt es bei  $^{125}\text{I}$  selten zu der ausgiebigen Kontamination von Arbeitsgerät und Arbeitsplatz, wie sie bei  $^3\text{H}$  oft zu beobachten ist.  $^3\text{H}$  nämlich muss durch aufwendige Wischtests nachgewiesen werden, und die führt der Forscher

nach unseren Erfahrungen nur alle Jahre mal durch.

Bei der täglichen Arbeit mit kleinen Mengen (< 100  $\mu\text{Ci}$ ) von  $^{125}\text{I}$  schützen 1 mm starke Edelstahlbleche. Diese halten die schwache  $\gamma$ -Strahlung fast genauso gut ab wie Bleibleche und sind handlicher und ungiftig.

Der Umgang mit  $^{125}\text{I}$  hat seine Schattenseiten. Beim Iodieren müssen Sie unter Sicherheitsvorkehrungen, wie mit Iodfiltern versehene Abzüge etc., mit großen Mengen an Radioaktivität (1–5 mCi) umgehen. Die biologische Aktivität vieler Proteine übersteht die oxidierenden Bedingungen der Iodierungsprotokolle nicht, und das große  $^{125}\text{I}$ -Atom verändert die Eigenschaften der Moleküle.

$^{125}\text{I}$  hat eine Halbwertszeit von 60 Tagen, doch nimmt die spezifische Aktivität einer iodierten Verbindung schneller ab, denn während des Lagerns läuft die Rückreaktion zu freiem  $^{125}\text{I}$ . Zudem zerstört die beim Zerfall des  $^{125}\text{I}$  frei



■ Tab. 2.1 Die wichtigsten radioaktiven Isotope

Kritisches Isotop	Halbwertszeit	Strahlungsart	Messung	spez. Aktivität Ci/mmol	Energie max. (MeV)	Reichweite max. (cm)	Kritisches Organ	Tochter-nuklid
<sup>3</sup> H	12,35 Jahre	β	LSC	29	0,0186	0,42 (Luft)		<sup>3</sup> He
<sup>14</sup> C	5730 Jahre	β	LSC	0,062	0,156	21,8 (Luft)		<sup>14</sup> N
<sup>32</sup> P	14,3 Tage	β	LSC	9130	1,71	610 (Luft); 0,76 (Plexiglas)	Auge	<sup>32</sup> S
<sup>35</sup> S	87,4 Tage	β	LSC	1494	0,167	24,4 (Luft)		<sup>35</sup> Cl
<sup>45</sup> Ca	163 Tage	β	LSC	801	0,257	48 (Luft)	Knochen	<sup>45</sup> Sc
<sup>125</sup> I	59,6 Tage	γ	γ-Counter	2191	0,27–0,035	0,02 (Blei)	Schild-drüse	<sup>125</sup> Te

LSC: *liquid scintillation counter*

werdende Strahlung andere Moleküle der iodierten Verbindung und erzeugt mit Wasser freie Radikale. Diese Radiolyse kann iodierte Moleküle mit niedrigem MG innerhalb von Tagen zerstören. Verdünnen der Probe und Radikalfänger verlangsamen die Radiolyse. Temperaturerniedrigung beeinflusst diesen Prozess kaum, hält aber Pilze und Bakterien in Schach. Schließlich aggregieren viele Proteine während der Iodierung und dem anschließenden Lagern. Die nervenaufreibende Prozedur des Iodierens muss also öfter wiederholt werden, als es dem Forscher lieb ist.

Die Plage indirekter Iodierungsmethoden ist die niedrige spezifische Aktivität des Produkts. Denn für eine gute Ausbeute der Konjugationsreaktion muss das zu derivatisierende Molekül im Überschuss zugegeben werden. Ist aber die spezifische Aktivität zu niedrig, muss man die iodierte von der uniodierten Spezies abtrennen, und das kann kitzlig werden (Empfehlung: mit <sup>127</sup>I-Bolton-Hunter und einer Spur <sup>125</sup>I-Bolton-Hunter das <sup>127</sup>Iod-Produkt herstellen und damit die Trennmethode zuvor einschießen). Zudem ist z. B. Bolton-Hunter-Reagenz teuer, instabil in wässriger Lösung, und der Einbau der großen lipophilen Gruppe kann sich noch verheerender auf die Aktivität einer Verbindung auswirken als die Verwandlung eines Phenylrests in einen <sup>125</sup>I-Phenylrest.

### 2.1.5 Tritieren

Tritieren kommt infrage, wenn das zu markierende Molekül freie Aminogruppen besitzt. Tritierungen durch Halogen-Tritium-Austausch, Reduktion von Doppelbindungen mit <sup>3</sup>H-Gas etc. sollten für den Notfall und auf Speziallabors beschränkt bleiben.

Die Vorteile der <sup>3</sup>H-Markierung liegen in der geringen Strahlenbelastung, die die Arbeit angstfrei macht, der im Vergleich zu <sup>125</sup>Iod längeren Haltbarkeit (Halbwertszeit von <sup>3</sup>H 12,35 Jahre, ■ Tab. 2.1) und darin, dass mit kleinen Seitenketten ohne aromatischem Ring tritiert werden kann. NEN und Amersham bieten etwa ein Dutzend verschiedener <sup>3</sup>H-markierter N-Succinimidyl-Verbindungen an, die mit freien Aminogruppen reagieren. Mit N-Succinimidyl-Verbindungen tritierte Moleküle haben jedoch eine niedrige spezifische Radioaktivität (■ Tab. 2.1) und unterscheiden sich in isoelektrischem Punkt und Löslichkeitsverhalten von der Ausgangsverbindung.

Bei der Inkubation des zu markierenden Moleküls mit der <sup>3</sup>H-markierten N-Succinimidyl-Verbindung gilt es, die Löslichkeit der zwei Moleküle und die Wasserempfindlichkeit der N-Succinimidyl-Verbindung zu beachten. Schließlich darf der verwendete Puffer oder das Lösungsmittel keine Moleküle mit freien Aminogruppen enthalten (Dolly et al. 1981; Othman et al. 1982).



Um die Umsetzung mit der N-Succinimidyl-Verbindung so vollständig wie möglich zu machen und das teure Reagenz nicht zu verschwenden, wird das zu markierende Molekül im Überschuss zugegeben. Nach der Reaktion müssen Sie das nicht-markierte vom markierten Molekül abtrennen oder mit einer niedrigen spezifischen Aktivität zufrieden sein. Hier liegt der Hund begraben. Mit großen Mengen an  $^3\text{H}$  komplizierte Trennungen durchzuführen, ohne dabei die Umgebung zu kontaminieren, ist wie einen Ameisenhaufen versetzen, ohne eine Ameise zu verlieren. Ein einfacher und übersichtlicher Trennschritt muss reichen. Bei Proteinen empfiehlt sich ein Ionenaustauscher oder isoelektrische Fokussierung, bei Peptiden und Molekülen mit niedrigem MG die Umkehrphasen-HPLC oder die Dünnschichtchromatographie.

- » Sei nur ruhig Freund, noch größere Geheimnisse will ich dich lehren, noch größeren Lohn sollst du empfangen.

## 2.2 Bindung

### 2.2.1 Isolierung von Membranen

Viele Ionenkanäle, Neurotransmitterrezeptoren, Transporter oder Ionerpumpen sind integrale Membranproteine. Um ihre Bindungsstellen zu untersuchen, brauchen Sie Membranen. Das Ausgangsmaterial, z. B. Muskel, Leber oder Hirn, liefert, wenn es die Fragestellung erlaubt, der Schlachthof. Schweinehirn ist 100-mal billiger als Rattenhirn und erspart das Rattenschlachten (dazu *Lab Times* 1/2009, S. 66).

Ist es besser, die Membranen gleich aus dem frischen Gewebe zu isolieren, oder das Gewebe bei  $-80^\circ\text{C}$  einzufrieren und aus dem gefrorenen Material, je nach Bedarf, Membranen zu machen?

Das Einfrieren des Gewebes beschädigt die Zellorganellen. Für Experimente, in denen es auf physiologische Funktion und Inhalt der Organellen ankommt, ist also frisches Gewebe notwendig. Für Bindungstests jedoch ist es nach Rehms Erfahrungen (mit neuronalen Ionenkanälen und Rezeptorproteinen) gleichgültig, ob die Membranen aus frischem oder tiefgefrorenem Gewebe stammen.

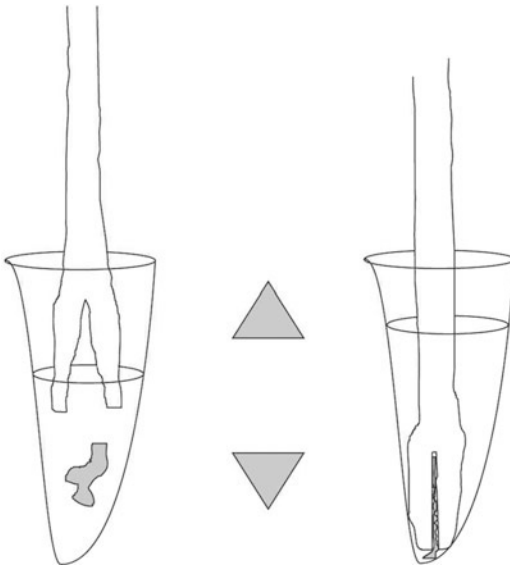
Die Membran scheint integrale Membranproteine gegen Frieren und Tauen zu stabilisieren. Zwar setzen beschädigte Lysosomen Proteasen frei, und mit einmal gefrorenem Gewebe ist eine saubere Trennung der Organellen nicht möglich; doch ist es damit auch bei frischem Gewebe nicht weit her, und die Lysosomen werden ebenfalls beschädigt, z. B. beim Homogenisieren und wenn die Vesikel einen osmotischen Schock erleiden.

### Homogenisieren

Der erste Schritt zu Membranen ist die Homogenisierung des Gewebes. Es wird bei  $4^\circ\text{C}$  in einem Homogenisierungspuffer suspendiert und zerkleinert. Der Homogenisierungspuffer ist isoosmotisch zur Gewebsflüssigkeit, hat eine niedrige Ionenstärke und enthält Rohrzucker (250–320 mM), Puffer (oft 5–10 mM Tris-Cl oder Na-Hepes pH 7,4) und eine Mischung verschiedener Protease-Inhibitoren (Bacitracin, PMSF, EDTA etc. oder einen kommerziellen Cocktail).

Wie aber zerkleinert man?

- Große Materialmengen, zähe Gewebe (Muskel) oder tiefgefrorene Gewebe zerkleinert der Polytron mit einem rotierenden ringförmigen Schermesser. Um das Homogenat nicht zu erwärmen, zerkleinern Sie das Gewebe stoßweise: (4- bis 5-mal jeweils 15 s bei mittlerer Rotationsgeschwindigkeit mit 3 min Pause dazwischen). Vorsicht: Proteine in Schaumblasen denaturieren leicht, also Schaumbildung vermeiden.
- Manche Experimentatoren zerstoßen das Gewebe in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver und homogenisieren den Gewebestaub mit Potter oder Polytron.
- Pulverisieren mit einem Porzellanmörser ist mühselig und gefährlich und dauert mehrere Stunden (Schutzbrille!). Besser eignet sich ein Eisenrohr mit Boden, in dem Sie das tiefgefrorene Gewebe mit Eisenstab und Hammer zerstoßen. Das macht Spaß und übt auf verzweifelte Doktoranden eine psychotherapeutische Wirkung aus.
- Die zusätzliche Mühe des Pulverisierens mag nützlich sein, wenn es um die Membranen spezieller Organellen wie synaptische Vesikel geht, bei Membranen für die üblichen Bindungstests lohnt der Aufwand nicht.



■ Abb. 2.3 Die Kunst des Schlitzpistill-Homogenisierens

- Leicht zu zerkleinernde Gewebe wie Gehirn oder Leber homogenisiert der Potter. Ein Potter ist ein röhrenförmiges Glasgefäß, in dem ein eingepasster Teflonstab mit verstellbarer Geschwindigkeit rotiert. Der Potter homogenisiert schonender als der Polytron, macht aber mehr Arbeit. Gepottert wird, wenn man aus dem Homogenat stoffwechselaktive Organellen (Mitochondrien, Synaptosomen etc.) oder deren hochgereinigte Membranen gewinnen will.
- Gewebe können Sie auch per Hand zwischen den angerauten Oberflächen eines konischen Glaspistills und eines dazu passenden Glaspotters zerreiben. Diese Technik benutzt man vor allem bei kleinen Gewebeprobe. Der Autor Rehm hat sie als mühsam und sehnenscheidenentzündungsträchtig in Erinnerung, und mehr als einmal ist ihm der gläserne Griff des Pistills abgebrochen.
- Kleine Gewebeprobe, die in großer Zahl anfallen, werden mit (Einmal-)Plastikpistillen in Mikrozentrifugenröhrchen homogenisiert – d. h., man würde es gerne, aber es klappt oft nicht: Teils sind die Oberflächen von Mikrozentrifugenröhrchen und Pistill zu glatt, teils passen die beiden schlecht

zueinander. Zudem tritt bei kleinen Proben und (vergleichsweise) großen Puffervolumina „Probenflucht“ auf: Die Probe denkt nicht daran, sich vom Pistill zermanschen zu lassen, sondern pariert die Bedrohung elegant mit einer Fluchtbewegung: Geht das Pistill nach unten, schwimmt die Probe nach oben und umgekehrt. Kusumoto et al. (2001) lösen dieses Problem, indem sie das aus elastischem Polypropylen bestehende Pistill mit einem Schlitz versehen. Der Schlitz soll folgende Vorteile bieten: Beim Auf- und Niederstoßen in die konische Vertiefung des Mikrozentrifugenröhrchens öffnet bzw. schließt sich der Schlitz. Dadurch werde die Probe, so versichern die Autoren, gründlich zerbissen. Auch könne die Probe nicht mehr so leicht entweichen, weil sie vom Schlitzpistill wie von einer Zange festgehalten werde. Kusumoto et al. (2001) behaupten, dass sie mittels Schlitzpistill aus Mausleber doppelt so viel RNA isolieren können wie mit einem normalen Pistill, welches das Gewebe nur zwischen Pistill und Gefäßwänden zerreibt. Bei kleinen Gewebeprobe (< 50 mg) versage das herkömmliche Pistill sogar vollständig, während das Schlitzpistill auch hier RNA liefere. Ob das mit anderen Geweben auch so gut funktioniert, sei dahingestellt, doch Sexappeal kann man der Methode nicht absprechen (■ Abb. 2.3).

## Differenzialzentrifugation und andere Reinigungsmethoden

Auf das Homogenisieren folgt die Differenzialzentrifugation. Damit teilen Sie das Homogenat in mehrere Pellets (P1, P2, P3) und Überstände (S1, S2, S3) auf. Das P1-Pellet enthält Zelltrümmer und Zellkerne, das P2-Pellet besteht hauptsächlich aus Mitochondrien, enthält aber auch Zellmembranen, Lysosomen und bei Hirngewebe Synaptosomen. Das P3-Pellet (auch mikrosomale Fraktion genannt) besteht aus Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums (Mikrosomen), Zellmembranen, Lysosomen, Golgimembranen etc. Die Membranvesikel sind je nach Homogenisierungsmethode löchrig oder teilweise dicht. Für Bindungstests genügen diese Pellets in der Regel.

Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics

Rehm, H.; Letzel, Th.

2016, XV, 406 S. 158 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-662-48850-8