

## Sequentielles Stern-Gerlach-Experiment:

- Man erzeugt Lichtstrahl, der in den drei Dimensionen je +/- Komponente hat.
- Filter für Sz, Auslöschen von Sz- und nochmal Sz filtern, dann ist die Sz- Komponente immer noch weg.
- Aber wenn nach dem ersten Ausl. von Sz- Filter für Sx mit Ausl. von Sx-, dann ist nach Sz Filter die Sz- Komponente wieder hier.
- Selektion des Sx+ Strahles im 2. Filter zerstört alle vorherige Information über Sz → Messprozess stört den Zustand des Systems. Es ist nicht möglich, gleichzeitig 2 Komponenten von S zu bestimmen!

Absorptionspektren ausgesuchter Aromaten zeigen mit steigender Zahl konjugierter Doppelbindungen **Rotverschiebung** (Benzol, Naphtalin).

- **Chromophor:** Absorbierende Gruppe (nicht gesättigt).
- **Auxochrom:** Sättigte Gruppe (OH, NH<sub>2</sub>), welche selbst nicht absorbiert, aber Absorptionsmaximum und Extinktionskoeffizienten ändert.
- **Bathochrom:** Rotverschiebung.
- **Hypsochrom:** Blauverschiebung.
- **Hyperchrom:** Erhöhung von  $\epsilon$ .
- **Hypochrom:** Erniedrigung von  $\epsilon$ .
- **Isosbestischer Punkt:**  $\lambda_i$ , bei der verschiedene Spezies denselben Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_i$  besitzen.
- **Photochromes Molekül:** Existiert in unterschiedlichen Formen, welche sich durch Bestrahlung ineinander umwandeln lassen.
- **Chromophore in Proteinen:** Peptidbindung (220 nm);  $\pi$ -Elektronen von Asp, Asn, Glu, Gln, His, Arg (220nm, schwach); aromatische Seitenketten: Phe (250nm,  $\epsilon=200\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), Tyr (274nm,  $\epsilon=1400$ ), Trp (240-290 nm,  $\epsilon=5700$ ); prosthetische Gruppen (z.B. Häm, Übergangsmetalle, Retinal); Cystein SS-Brücken (250–270nm,  $\epsilon=300$ )
- Umgebungseinflüsse beeinflussen die **Quantenausbeute:** Erhöhung durch Bindung=Immobilisierung (z.B. Ethidiumbromid); Erniedrigung durch Quenchen; Faltungsstudien: Trp-Fluoreszenz mit Anregung bei 295nm; Ligandenbindung.
- **Quantitative real-time PCR:** Sonde in zu amplifizierendem Gen mit Fluorescein (5') und Quencher (3'), Polymerase löst zuerst Fluorescein ab → Flzmessung.

## ÜBUNGEN BAUMANN

**(1) Lösungen, welche Tryptophan oder Tyrosin enthalten, können aufgrund der verschiedenen Absorptionseigenschaften bei 240 und 280nm unter alkalischen Bedingungen analysiert werden:**

$$e_{240}(\text{Tyr}) = 11300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad e_{280}(\text{Tyr})=1500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$
$$e_{240}(\text{Trp}) = 1960\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad e_{280}(\text{Trp})=5380\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

**10 mg des Proteins Glucagon werden hydrolysiert und in 100ml 0.1n KOH verdünnt. In einer 1cm-Küvette ist  $E_{240}=0.717$  und  $E_{280}=0.239$ . Berechnen Sie den Tyrosin- und Tryptophangehalt in  $\mu\text{mol/g}$  Protein.**

**Formel:  $E=e \cdot c \cdot d$**

E: Extinktion,  $\epsilon$ : Absorptionskoeffizient [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

c: Konzentration [M], d: Dicke der Küvette [cm]

Gleichung1:  $E_{240}=y \cdot \epsilon_{240(\text{Tyr})} + w \cdot \epsilon_{240(\text{Trp})}$

Gleichung2:  $E_{280}=y \cdot \epsilon_{280(\text{Tyr})} + w \cdot \epsilon_{280(\text{Trp})}$

Gl1:  $0.717=11300 \cdot y + 1960 \cdot w$

Gl2:  $0.239=1500 \cdot y + 5380 \cdot w$

Gl1:  $y=(0.717-1960 \cdot w)/11300$

Gl1 in Gl2:  $0.239=1500 \cdot (0.717-1960 \cdot w)/11300 + 5380 \cdot w=9.5 \cdot 10^{-2} + 5119 \cdot w$

$0.143=5119 \cdot w \rightarrow w=2.8 \cdot 10^{-5} \text{M}=28 \mu\text{M Trp} \rightarrow y=58 \mu\text{M Tyr}$

Protein war in 0.1L gelöst.  $\rightarrow M/10$ , weil  $M=\text{mol/L}$ .

$2.8 \mu\text{mol}/10 \text{mg}=281 \mu\text{mol/g Trp}$  und  $5.8 \mu\text{mol}/10 \text{mg}=585 \mu\text{mol/g Tyr}$

**(2) Die meisten Proteinlösungen zeigen einen ausgeprägten bathochromen Effekt im UV-Bereich zwischen 270 und 320 nm bei pH-Werten  $> 10$ . Welche Gruppe könnte für diesen Effekt verantwortlich sein?**

Bathochromer Effekt: Verschiebung der Emissions-Wellenlänge gegen Rot, in den längerwelligen, energieärmeren Bereich. Tyrosin ( $\text{pK}_R=10.46$ ) wird bei  $\text{pH}>10$  an der OH-Gruppe des Rings deprotoniert. In der deprotonierten Form sind die Elektronen über einen grösseren Bereich delokalisiert. In Quantenphysik nennt man dies eine Vergrößerung der Kastenlänge. Nach der Formel  $\Delta E=n^2/a^2$  (n: Anregungszustand, a: Kastenlänge)

wird dadurch die Energiedifferenz zwischen zwei Anregungszuständen kleiner, was zum bathochromen Effekt führt.

**(3) Wie ändert sich das Spektrum von Azeton, wenn anstelle von Ether Wasser als Lösungsmittel verwendet wird?**

Azeton:  $\text{O}=\text{C}-(\text{CH}_3)_2$ . Die Carbonylgruppe (Doppelbindung) absorbiert, weil sie ein polarer Chromophor ist. Wasser ist polarer als Ether, so dass der polare  $\pi^*$  Zustand stabilisiert wird, weil sich die polaren Moleküle energetisch günstig um ihn anlagern können. Spektral-Linien: Rotverschiebung bei  $\pi \rightarrow \pi^*$  und Blauverschiebung bei  $n \rightarrow \pi^*$ .

**(4) Ein Molekül hat in Cyclohexan ein Absorptionsmaximum von 280 nm. Nehmen sie an, dass in Wasser als einzige Änderung eine H-Brücke zum angeregten Zustand gebildet wird, welche eine Energie von 20 kJ/mol besitzt. Wo liegt das Absorptionsmaximum in Wasser?**

Durch die Wasserstoff-Brücke wird die Energie des angeregten Zustands um 20kJ/mol verkleinert.

**Formel:  $E=h \cdot c \cdot N_A/\lambda$**  (E: Energie [J/mol], h: Plancksches Wirkungsquantum,  $N_A$ : Avogadro-Konstante,  $\lambda$ : Wellenlänge)

$E_{\text{Cyc}}=6.626 \cdot 10^{-34} \cdot 2.997 \cdot 10^8 \cdot 6.022 \cdot 10^{23}/280 \cdot 10^{-9}=427 \text{kJ/mol}$

$E_{\text{Cyc}}-E_{\text{H-Brücke}}=E_{\text{Wasser}}=407 \text{kJ/mol}$

$\lambda_{\text{Wasser}}=h \cdot c \cdot N_A/E=6.626 \cdot 10^{-34} \cdot 2.997 \cdot 10^8 \cdot 6.022 \cdot 10^{23}/407 \cdot 10^3=294 \text{nm}$

**(5) Die Protease Chymotrypsin wird durch einen roten Farbstoff kompetitiv gehemmt. Eine Lösung, welche insgesamt 0.1 mM Protease und eine Gesamtfarbstoffkonzentration von 2mM enthält, hat bei 280 nm eine Extinktion von 1.4 (1cm Küvette). Chymo + Farbstoff  $\otimes$  Komplex. Bei 280 nm sind  $\epsilon(\text{Protease})=12000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon(\text{Farbstoff})=0$ ,  $\epsilon(\text{Komplex})=15000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .**

**(a) Berechnen Sie die Komplexkonzentration!**

Komplex:  $[\text{DP}]=x$  [mM]. Farbstoff:  $[\text{D}]=2\text{mM}-x$ . Protease:  $[\text{P}]=0.1\text{mM}-x$ .

**Formel:  $E=e \cdot c \cdot d$**

$$1.4=(12000 \cdot (0.0001-x) \cdot 1) + (15000 \cdot x \cdot 1) = 1.2-12000 \cdot x+15000 \cdot x$$

$$0.2=3000 \cdot x \rightarrow x=0.2/3000=66\text{E}-6\text{M}=66\mu\text{M}$$

**(b) Berechnen Sie die Gleichgewichtskonstante (Dimension  $\text{M}^{-1}$ )!**

**Formel:  $K=[\text{DP}]/[\text{P}] \cdot [\text{D}]$**

$$[\text{DP}]=66\mu\text{M}, [\text{D}]=2\text{mM}-x=1933\mu\text{M}, [\text{P}]=0.1\text{mM}-x=33\mu\text{M}$$

$$K=66\text{E}-6/1933\text{E}-6 \cdot 33\text{E}-6=1034\text{M}^{-1}$$

**(6) In einem Experiment zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer eines Dansylfluorophors wurde folgende Messreihe aufgenommen: 0ns  $\otimes$  11000 Intensität, 5ns  $\otimes$  4900, 10ns  $\otimes$  2300, 15ns  $\otimes$  1300, 20ns  $\otimes$  560.**

**(a) Wie gross ist die Fluoreszenzlebensdauer?**

**Formel:  $F(t)=F_0 \cdot e^{-k_D \cdot t}$**

$F_t$ : Fluoreszenz-Intensität zum Zeitpunkt t.  $F_0$ : Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0.

$k_D$ :  $1/\tau_D$ .  $\tau_D$ : Fluoreszenzlebensdauer.

$$F_t/F_0 = e^{-k_D \cdot t} \rightarrow \ln(F_t/F_0) = -k_D \cdot t \rightarrow k_D = \ln(F_t/F_0)/-t$$

$$k_{D5} = \ln(4900/11000)/-5 = 0.1617$$

$$k_{D10} = \ln(2300/11000)/-10 = 0.1564$$

$$k_{D15} = \ln(1300/11000)/-15 = 0.1423$$

$$k_{D20} = \ln(560/11000)/-20 = 0.1488$$

$$\text{Gewichteter Durchschnitt: } k_D = 0.1470 \rightarrow \tau_D = 1/k_D = 6.845\text{nsec}$$

**(b) Die Quantenausbeute wurde unter diesen Bedingungen zu 0.7 bestimmt. Wie gross ist die intrinsische Lebensdauer ?**

Die intrinsische Lebensdauer  $\tau_F$  ist die (hypothetische) Lebensdauer, welche gemessen würde, wenn das System nur über Aussendung von Fluoreszenz in den Grundzustand zurückkehren könnte (entspräche einer Quantenausbeute von 1).

$$\text{Formel: } \phi = \tau_D / \tau_F \ (\phi: \text{Quantenausbeute}) \rightarrow \tau_F = \tau_D / \phi = 6.6 / 0.7 = 9.37\text{nsec}$$

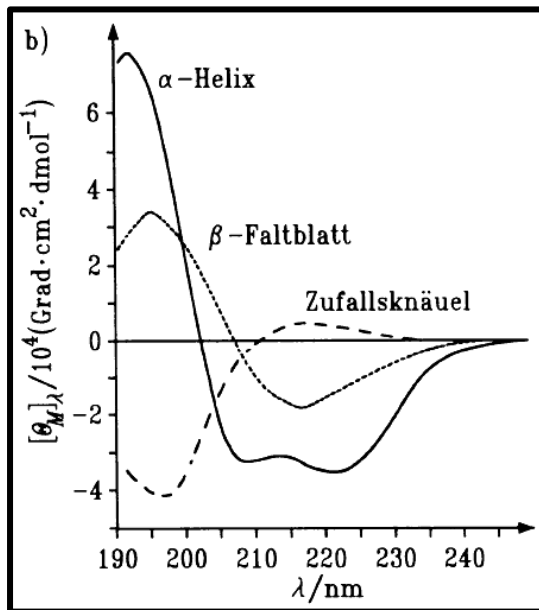
**(c) Die Effizienz des Energietransfers von dem oben untersuchten Chromophor zur 11-cis-Retinal-Gruppe in Rhodopsin ist 50% bei einem Abstand von 20Å. In einem Labeling Versuch wurde der Chromophor an Rhodopsin gekoppelt, die Lebensdauer betrug 6 ns. Wie gross ist der Abstand zwischen dem Fluorophor und Retinal?**

**Förster-Radius ( $R_0=20\text{Å}$ ):** Distanz zw. Donor und Akzeptor mit 50% Energietransfer.

$$E = 1 - \tau_{D\text{gekoppelt}} / \tau_D = 1 - 6 / 6.845 = 0.123 \ (E: \text{Effizienz}, r: \text{Distanz zw. Donor und Akzeptor})$$

$$\text{Förster-Gleichung: } E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \rightarrow r = (R_0^6 \cdot (1-E) / E)^{1/6} \\ = (20^6 \cdot (1-0.123) / 0.123)^{1/6} = 27.7\text{Å}$$

(7) Die folgenden Daten listen CD-Maxima und Minima für  $\beta$ -Lactoglobulin A auf. Beschreiben Sie qualitativ, was beim Uebergang in die saure Ethanollösung passiert. Wässriger Puffer:  $\lambda_{\text{max,min}} = 215\text{nm}/-1.7\text{De}$  und  $196/2.6$   
 99% EtOH, 0.01 M HCl:  $\lambda_{\text{max,min}} = 220\text{nm}/-7.0\text{De}$  und  $208/-8.0$  und  $192/15.5$



Dies ist das CD-Spektrum der möglichen Sekundärstrukturen eines Proteins. Im wässrigen Puffer entsprechen die Daten einem Protein, welches viel  $\beta$ -Faltblätter enthält. In der saueren Ethanollösung haben wir dagegen viele  $\alpha$ -Helizes. Das Proteins nimmt also nach dem Uebergang eine Konformation mit viel mehr  $\alpha$ -Helizes ein.

## PRAKTIKUM BAUMANN

Wir wollen die Auswirkung verschiedener **Punkt-Mutationen** im Gen der Protease C (PrtC) beobachten.

Erstens verwenden wir eine PrtC Gen, auf dem schon die Mutation E189A (Glutaminsäure[sauer] zu Alanin[unpolar]) eingebaut ist.

Dieses Glutamin befindet sich in der Nähe des katalytisch aktiven Zinks und bildet eine Wasserstoffbrücke zum einen Sauerstoff-Atom des zu schneidenden Peptids.

Im Praktikum soll ich nun die Mutationen M226H (Methionin[unpolar, S] zu Histidin[basisch, Ring]) und M226I (Isoleucin[unpolar]) herstellen.

Das Methionin an Position 226 gibt den Metzincinen ihren Namen. Es bildet einen Metallturn, welcher zum Binden des katalytisch wichtigen Zinks gebraucht wird.

Das „original“ (Templat) Gen befindet sich auf einem Plasmid.

Es gibt nun zwei Varianten, um das Gen zu mutieren:

- **Rolling Circle:** Man verwendet zwei Mutagenese-Primer, welche ausser der Mutation genau an die zu mutierende Stelle auf dem PrtC Gen passen. Sie sind zueinander komplementär, es gibt also einen forward und einen reverse Primer. Nun braucht es noch rev und for Hilfsprimer, welche an eine Sequenz möglichst weit weg auf dem Plasmid binden, so dass durch PCR dieses zu zwei linearen Plasmid-Teilen amplifiziert wird. Die beiden PCR Reaktionen muss man getrennt durchführen, weil die Primerpaar aneinander binden würden. Durch Erhitzen und Annealing kann man die beiden Hälften wieder zusammenfügen und durch Transformation in E.coli wird es zu einem ds Plasmid vervollständigt.
- **QuickChange**ä: Man verwendet zwei komplementäre Mutagenese-Primer, welche durch PCR zu einer Kopie des gesamten Plasmids führen. Allerdings können die neu gebildeten Stränge nicht als Matrize dienen, so dass keine exponen-

tielle (nur lineare) Amplifizierung statt findet. Das Templat Plasmid war methyliert, aber die mutierte Kopie nicht. Durch DpnI wird das methylierte Templat entfernt. Die mutierten Plasmide sind nun ss und haben hinter jedem Primer einen Einzelstrangbruch. Dies wird nach der Transformation durch die Bakterien repariert. Damit man erkennt, ob die Mutation im Plasmid eingeführt wurde, hat man auch noch eine stille Mutation (anderes Codon für gleiche AS) verursacht. Diese kann man nachträglich nachweisen, weil durch sie eine Erkennungs-Sequenz für ein Restriktionsenzym zerstört wird. Zum Überprüfen der PCR mache ich ein **Agarose-Gel**:

Slot	1	2	3	4	5	6	7
<b>Methode</b>	QC	RC1	RC2	QC	RC1	RC2	Marker
<b>Mutation</b>	M226I	M226I	M226I	M226H	M226H	M226H	Marker

Man sieht, dass in Slot 2&3 sowie 5&6 jeweils eine Hälfte des Plasmids hergestellt wurde. Die Hälfte in Slot 3 und 6 ist die grössere.

In Slot 1 und 4 sieht man nichts, aber das Produkt von QuickChange ist vorhanden aber unsichtbar, da ohne Amplifizierung nicht genug da ist.

Nun verwende ich ein QUIquick **PCR Purification** Kit, um die hergestellte DNA von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen zu reinigen. Es funktioniert mit einer Säule, an welche die DNA bindet und die Verunreinigungen durchzentrifugiert werden.

Da die Templat Plasmide die gewünschten Mutationen nicht enthalten, muss ich sie aus den gereinigten PCR Produkten entfernen. Weil sie methyliert sind, kann ich sie mit **DpnI** zerstören. Zielsequenz von DpnI ist GATC ( $p=1/(4^4)=1/256$ ), das Plasmid ist 5.9kB lang, es gibt also 23 Fragmente.

Die beiden Plasmid-Hälften aus dem PCR müssen nun noch durch **Annealing** (Hybridisierung) zusammengebracht werden. Zuerst werden die Proben auf dem Heizblock für 3min auf 94° erhitzt, damit die DNA als Einzelstränge vorliegt. Dann lässt man sie langsam auf unter 40° abkühlen, so dass sich einige Einzelstränge anstatt mit ihrem Komplementärsrang mit einem Einzelstrang der anderen Plasmidhälfte zusammenlegen, so dass ein ss Plasmid entsteht.

Zur **Transformation** gibt man jeweils zu 50ul kompetenten Zellen (E.coli XL2-blue) 25ml Plasmid-DNA. Damit die Bakterien das Plasmid aufnehmen, muss man sie folgendermassen behandeln:

- 30min auf Eis (Stoffwechsel hemmen).
- 45sec bei 42° (Hitzeschock).
- 5min auf Eis.
- 1ml LB (Liquid Broth) zugeben.
- 1h bei 37° Inkubieren (Erholungsphase).

Jetzt die Zellen noch runterzentrifugieren und den Überstand wegschütten. Die resuspendierten Zellen auf kanamycinhaltigen Agarplatten mittels Kügelchen ausplattieren. Über Nacht bei 37° inkubieren. Weil das Plasmid ein Kanamycin-Resistenz Gen enthält, sollten nur Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Am nächsten Tag habe ich die Kolonien auf den Platten **gezählt**: M226I/RC: 4 • M226I/QC: 9 • M226H/RC: 39 • M226H/QC: viele.

Es ist kein gutes Zeichen, dass bei M226H so viele Bakterien gewachsen sind!

## Analyse der Mutationen mit PDB File (mit Molw) von PrtC:

Im unmutierten Zustand stabilisiert Methionin 226 zusammen mit Histidin 188,192 und 198 das Zink-Ion. Wenn an Position 226 ein Isoleucin ist, dann scheint es ziemlich weit von Zink weg zu sein, so dass es vielleicht instabil wird.

Von den vier Bakterien-Platten aus dem Kühlschrank werden je vier Kolonien mit einer sterilen gelben Spitze in Falconröhrchen mit 6ml LB-Medium (mit Antibiotikum wie auf Platte) **transferiert**. Dann lassen wir die Bakterien über Nacht bei 37° wachsen.

Um mit Restriktionsverdau die Mutation nachzuweisen müssen wir das Plasmid wieder aus den Zellen holen. Dazu verwenden wir ein QIAprep spin **miniprep** Kit. Es läuft mit allen 16 Proben folgendermassen ab:

- 1) Bakterien ernten und lysieren: Zentr., Resusp., Lysis Lösung.
- 2) Vorbereitung des Lysats: Neutralisations Lösung.
- 3) Plasmid an Säule binden: Lysat in MiniSpin Säule und Zentr.
- 4) Waschen: Säule mit Waschlösung durch Zentr. waschen.
- 5) Plasmid DNA herauslösen: Mit 50ul Wasser und Zentr.

Nun mache ich von jeder der 16 Proben einen **Restriktionsverdau** mit 8ul Plasmid, 1ul Enzym-Puffer und 1ul Restriktionsenzym. Dann während einer Stunde bei 37° inkubieren und mit 2ul Loading Dye Solution auf ein **Agarose-Gel** laden.

Slot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	C	D	E	F	G
<b>M226</b>	H	H	H	H	H	H	H	H	I	I	I	I	I	I	I	I
<b>MutMet</b>	R	R	R	R	Q	Q	Q	Q	R	R	R	R	Q	Q	Q	Q

MutMet=Mutationsmethode, R=Rolling Circle, Q=QuickChange.

Bei Slot 7 sieht man, dass die Mutation erfolgreich war, weil oben offensichtlich ein grosses (ungeschnittenes) Fragment vorhanden ist, dass beim WildTyp nicht da ist. Die Mutation wurde durch QuickChange hergestellt und ist M226H.

Die positiven Proben sollte man nun erneut **transformieren**, aber da diese zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt waren (Restriktionsenzym war zu alt), verwende ich M226H und M226I Plasmid aus anderer Quelle. Die Transformation funktioniert wie beim letzten Mal, aber wir verwenden kompetente Bakterien, die bereits ein Plasmid mit Sekretionsproteinen für PrtC und einer Chloramphenicol-Resistenz enthalten. Weil diese Transformation besser funktioniert (Plasmid schon intakt und ds), muss man den Bakterien nur 15min Erholungsphase bei 37° geben. Die Bakterien auf Platten mit Kanamycin (mutiertes Plasmid) und Chloramphenicol (Sekretions-Plasmid) ausplattieren.

Am nächsten Morgen ist auf jeder Platte ein Bakterien-Rasen gewachsen. Von jeder Platte wieder eine **Kolonie picken** und in LB Medium in Falconröhrchen mit den gleichen Antibiotika wie Platte geben. Auf den Schüttler stellen und bis am Abend bei 37° wachsen lassen.

Am Abend mache ich mit den gewachsenen Bakterien noch einen **Milk-Agar-Test**. Dazu stanzt man mit einer Pasteur-Pipette Löcher in eine Milk-Agar-Platte, in welche man je 50ul Bakterien-Suspension gibt. Nach der Inkubation bei 37° sollte man dort, wo

durch die PrtC das Casein im Milk-Agar geschnitten wurde, klare Höfe erkennen. Beim WildTyp gab es einen Hof von 4mm Radius und bei den Mutanten gar keinen.

Nun setzen wir noch eine **TCA-Fällung** an. Dazu gebe ich von jeder Zellkultur je 1ml in ein Eppendorf und zentrifugiere ab. Vom Überstand 900ul in ein neues Eppendorf und mit 300ul TCA (Trichloressigsäure) versetzen. Über Nacht stehen lassen. Die Proteine werden denaturiert und aus der Lösung ausgefällt.

Am Morgen 15min abzentrifugieren, Überstand wegschütten, Pellet in 300ul Aceton lösen, 5min zentrifugieren, Überstand weg, in 300ul Ethanol lösen, 5min zentrifugieren und Überstand weg. Pellet bei 37° trocknen lassen, in 20ul Lämmli-Puffer lösen und davon SDS-PAGE machen. Dies hat leider nicht funktioniert, aber man wollte dadurch sehen, ob das mutierte Protein stabil ist oder vielleicht zu Fragmenten zerfällt oder degradiert wird.

**Frage: Warum kann TCA-gefälltes Protein nicht mehr zur Röntgenstrukturanalyse verwendet werden?** Weil es irreversibel denaturiert wird.

Um zu sehen, ob die Bakterien gewachsen sind, bestimmen wir die **Bakterienzahl**, indem wir die Absorbtion der 1:10 mit LB verdünnten Zell-Lösung bei 595nm messen: WildTyp: 0.086, M226H: 0.212, M226I: 0.082.

Für die **Protein-Quantifizierung nach Bradford** gibt man zu 256ul Proteinlösung in einer Plastik-Küvette 200ul Farbreagens sowie 600ul Wasser und misst nach 5min die Absorbtion bei 595nm. Die Proteinlösung wurde durch 5min Zentrifugieren und Transferieren des Überstands (Protein) hergestellt. Das Farbreagens enthält Coomassie-Blue, welches an basische und aromatische AS in Proteinen bindet und dessen Absorbtionsmaximum sich dadurch von 465 auf 595nm verschiebt, so dass man dort die Protein-Konzentration messen kann.  $OD_{595} \cdot 0.057 = \text{Konzentration [mg/mL]}$ .

WildTyp: 0.65 → 37ug/mL = 100%. M226H: 0.447 → 25ug/mL = 69%.

M226I: 0.164 → 9.3ug/mL = 25%.

Die Sekretion des Proteins hat also bei der Mutation zu Histidin ziemlich gut und bei jener zu Isoleucin nicht mehr so gut funktioniert. Aber es ist jedenfalls noch Protein vorhanden, dessen Aktivität man messen kann!

Dies kann man mit dem **quantitativen Aktivitätstest mit Resorufin-Casein**. Dies ist ein Casein Protein, an welches ein Farbstoff gebunden ist. Wenn das Protein nun durch aktive PrtC gespalten wird, dann wird der Farbstoff frei und kann gemessen werden.

Man gibt 50ul Tris Puffer (pH 7.8), 100ul Proteinlösung und 50ul Resorufin-Casein in ein Eppendorf. Dies Inkubiert man für 20min bei 37° und stoppt die Reaktion mit 480ul TCA, welche PrtC ausfällt, denaturiert und daher inaktiviert. Noch 10min im Inkubator stehen lassen und dann 5min abzentrifugieren. Im Überstand ist nun nur noch der abgeschnittene Resorufin Farbstoff, von welchem man 400ul mit 600ul Tris-Puffer (pH 8.8) in eine Küvette gibt und die Absorbtion bei 574nm misst.

WildTyp: 0.506 = 100%

M226H: 0.001 = 0.2% \* 1.4 (Ausgleich Protkonz. 100/69) = 0.28%

M226I: 0.003 = 0.6% \* 4 (Ausgleich) = 2.4%

Histidin und Isoleucin sind also beides Mutationen, die zu einem fast vollständigen **Aktivitätsverlust** führen. Isoleucin ist noch weniger geeignet, weil es zu weit weg vom katalytisch aktiven Zink ist, um dieses stabilisieren zu können. Die Aktivität sollte aber sowieso sehr tief sein, weil wir ja eine Doppelmutterante verwendeten, welche schon die Mutation E189A enthält. Dadurch kann eine wichtige Wasserstoffbrücke zum zu schneidenden Protein nicht gebildet werden, was der katalytischen Aktivität natürlich schadet.

## FRAGEN PRAKTIKUM BAUMANN (Proteasen)

### 1. **Metzincine haben ihren Namen wegen eines konservierten Methionins. Warum sind manche AS in einem Protein konserviert? Warum sollten nicht-konservierte Methionine ziemlich rasch zu anderen AS mutieren?**

Manche AS sind konserviert, weil sie eine entscheidende Funktion im Protein haben, welche nur von genau dieser AS durchgeführt werden kann. Eine Mutation führt zu einem starken Aktivitäts-Verlust, welcher der Zelle einen Selektions-Nachteil bringt, so dass die Mutation nicht weitergegeben wird. Nicht-konservierte Methionine sollten ziemlich rasch zu anderen AS mutieren, weil nur eines (AUG) von  $4^3=64$  Codons für Methionin codiert. Es kann also keine stille Mutation ausgelöst werden, sondern jede Mutation des AUG führt zu einer anderen AS.

### 2. **Vergleiche verschiedene Mutagenese-Prozeduren. Was sind die gemeinsamen Prinzipien? Wie kann man sich versichern, dass eine Mutation wirklich statt fand?**

RollingCircle und QuickChange verursachen beide gezielte Mutationen durch mutierte PCR-Primer. Der Unterschied besteht darin, dass bei RC das Plasmid mit vier Primern als zwei lineare Plasmid-Hälften repliziert wird und bei QC mit zwei Primern das ganze Plasmid auf einmal. QC ist daher einfacher durchzuführen, aber es führt höchstens zu einer Verdopplung der Plasmid DNA, während RC eine Amplifizierung bringt. Um sich der Mutation sicher zu sein, kann man durch den Mutagenese-Primer auch noch eine Stille Mutation einführen, die eine Erkennungs-Sequenz für ein Restriktionsenzym zerstört, so dass man durch ein Agarosegel eine grössere, da ungeschnittene Bande erkennen kann, falls die Mutation eingebaut wurde. Damit man dann wirklich ganz sicher ist, sollte man das Plasmid auch noch sequenzieren, weil die Polymerasen der PCR (Taq) kein 3'→5' Proofreading haben und daher ungewollte Mutationen verursachen können. Entfernen des Templates mit dem Restriktionsenzym DpnI, das methylierte DNA abbaut.

### 3. **Definiere die folgenden Strukturhierarchie-Ebenen:**

- **Primärstruktur:** AS-Sequenz des Proteins.
- **Sekundärstruktur:** Ein lokales Faltungsmuster des Protein-Backbones. Bsp:  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt (sheet), Turns,  $\beta$ -Helix (ähnelt aufgerolltem  $\beta$ -Faltblatt).
- **Super-Sekundärstruktur:** Nennt man auch Motive. Es sind bestimmte häufige vorkommende Anordnungen von Sekundärstruktur-Elementen. Bsp:  $\beta\alpha\beta$ ,  $\beta$ -Hairpin,  $\alpha\alpha$ ,  $\beta$ -Barrel.
- **Tertiärstruktur:** Die Drei-Dimensionale Faltung der verschiedenen Sekundärstrukturelemente eines Proteins.

- **Quartärstruktur:** Die räumliche Anordnung der Polypeptidketten Subunits eines multisubunit Proteins. Bsp: Coiled-Coils (zwei  $\alpha$ helikale Polypeptidketten umeinandergewickelt.)

#### 4. Zu welcher Proteasen-Klasse gehört...

- **Thrombin:** Serin-Prot (Blutgerinnung durch Fibrinogen schneiden).
- **HIV Protease:** Asparginsäure-Prot.
- **Thermolysin:** Metallo-Prot.
- **Carboxypeptidase A:** Metallo-Prot (Pankreas  $\rightarrow$  Verdauung).
- **Cathepsin B:** Cystein-Prot (Lysosom).
- **HCV (Hepatitis C Virus) Protease:** Serin-Prot.

#### Welche Mechanismen verwenden die verschiedenen Klassen?

- **Serin-Prt:** Serin macht einen nukleophilen Angriff auf die Carbonyl-Gruppe der zu schneidenden Peptidbindung. Dadurch wird ein tetrahedrisches Intermediat gebildet, welches durch eine Protonenspende von Histidin (säurekatalysiert) zum Acyl-Enzym-Komplex gespalten wird. Der von Histidin angegriffene Aminotermi-nus des entstandenen Peptidfragments wird durch Wasser ersetzt und die bei-den vorherigen Schritte rückgängig gemacht, so dass das Enzym wieder im ur-sprünglichen Zustand ist.
- **Cystein-Prt:** Durch die Wasserstoffbrückenkette von Asp über His nach Cys wird das Proton der SH-Gruppe von Cys zum His verschoben. Die resultierende  $S^-$  Gruppe bei Cys kann die Carbonylgruppe einer Peptidbindung nukleophil an-greifen. Über ein tetrahedrisches Übergangsprodukt entsteht ein  $H_2N$ -Produkt und ein Acyl-Enzym-Intermediat. Danach wird die Carboxylgruppe auf Wasser als Akzeptor übertragen.
- **Asparginsäure-Prt:** Der Mechanismus funktioniert über generelle Säure und Base Katalyse. Es gibt kein Acyl-Enzym-Intermediat. Zwei Asp im katalytischen Zentrum bilden eine katalytische Diade, bei der immer eines protoniert und das andere deprotoniert ist. Eine Reihe von Protonentransfers aktiviert Wasser, da-mit es das Peptid durch nukleophilen Angriff spaltet.
- **Metallo-Prt:** Zink-Ion wirkt als Lewis-Säure, um den carbonyl Sauerstoff der Peptidbindung zu polarisieren.

#### 5. Nenne für jede der vier Proteasenklassen ein natürliches Ereignis, bei dem Mitglieder dieser Klasse eine Rolle spielen!

- **Serinprt:** Verdauung von Proteinen durch Trypsin.
- **Cysteinprt:** Abbau von Fremdprot im Lysosom durch Cathepsin B.
- **Asparginsäure-Prt:** Spaltung HIV Multiprot durch HIV Prt.
- **Metallo-Prt:** Schlangengift Proteasen (HEXXXHXXGXXHD).

#### 6. Nenne ein Beispiel für...

- **Induced Fit:** Hexokinase.
- **Aspartat-Prt:** HIV-Prt.
- **Metalloprotease:** PrtC.
- **Metalloenzym:** Carbo-Anhydrase ( $CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$ ).
- **RTX-Toxin:** Vibrio Cholerae RTX Toxin  $\rightarrow$  depolymerisiert Actin.
- **Protein Import:** Kernkodierte Proteine  $\rightarrow$  Mitochondrien, Chlorpl.
- **Protein Export:** Sekretion von PrtC / ECM Prt.

- **Sekretion über generellen Sekretions-Pathway:** Elastase von *P. Aeruginosa* (Gram Negativ). Transport der Proteine mit Signalpeptid durch innere Membran über GEP (General Export Pathway) und durch äussere Membran mit spezifischen Sekretions-Faktoren.
- **Sekretion über Hämolysin Pathway:** Proteine ohne N-Terminales Signalpeptid (wie PrtC, *E.Coli* Hämolysin) durchqueren beide Membrane in einem Schritt über drei spezifische Sekretions-Fakt.

### 7. Nach einer Mutation einer angeblich für die Katalyse essentiellen AS zeigt das Protein immer noch 0.6% WildTyp Aktivität. Diskutiere dieses Resultat!

Möglicherweise wurde eine AS mutiert, die für die Bindung des Substrats wichtig ist. So kann es zu einer Katalyse kommen, falls das Enzym zufälligerweise in der „richtigen“ Orientierung auf das Substrat trifft.

Es könnte auch sein, dass durch die Mutation eine AS ein katalytisch aktives Metall-Ion nicht mehr genug stabilisieren kann, so dass nur noch in den wenigsten Fällen in der für die Katalyse erforderlichen Position ist.

### 8. Welche Faktoren bestimmen, ob eine bestimmte Peptidbindung eines Proteins von einer Protease geschnitten wird?

- Erkennungs-Sequenz (KR bei Trypsin, FLY bei CyTry).
- Prt arbeiten nur bei bestimmtem pH (vorallem bei AspPrt).
- Peptidbindung muss für die Prt zugänglich sein, also aussen.

### 9. Beschreibe die Sekundärstruktur der alkalischen Protease von *Ps. Aeruginosa*! Wo befindet sich die parallele $\beta$ -Helix? Erkläre die Präferenz verschiedener AS für die neun Positionen des glycinreichen Repeats. Beschreibe die Koordinations-Sphären für Zink und Kalzium Ionen. Finde drei Arg-Asp Salzbrücken. Vergleiche die Wasserstoffbrücken von parallelen und antiparallelen $\beta$ -Strängen.

Die N-Terminal ersten 17 AS bilden eine  $\alpha$ -Helix, welche mit der C-Terminalen Domäne in Kontakt steht. AS 18-250 bilden das aktive Zentrum mit dem Zink. In der Nähe des Zinks hat es eine  $\alpha$ -Helix, welche die konservierte Sequenz H(176)EXXHXXGXXH(186) enthält, die mit ihren Histidinen das Zink bindet. Ausserdem hat es in dieser Domäne noch drei weitere  $\alpha$ -Helizes, welche die aktive Stelle wie einen Halbmond umgeben. Sonst besteht diese Domäne vorallem aus Turns.

Die C-Terminale Domäne besteht aus AS 251-470 und ist vorallem aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut. Dem einen  $\beta$ -Faltblatt beim C-Terminus befindet sich ein anderes gegenüber, so dass ein durch Turns fixiertes  $\beta$ -Sandwich entsteht, welches von Calcium-Ionen stabilisiert wird. Innerhalb des  $\beta$ -Sandwich befindet sich die parallele  $\beta$ -Helix, welche durch sechs Wiederholungen eines **9AS Motivs** (ULUGGXGXD; U=hydrophob) gebildet wird. Die Glycine sind für den Calcium-Loop und nur Glycin kann diesen Winkel bilden. Die letzte AS des Motivs, Asparginsäure, koordiniert das Calcium-Ion.

**Koordination Zink:** Bildet eine trigonale Bipyramide deren Ebene von His176, His186 und einem Wassermolekül gebildet wird. Die Spitzen der Pyramide werden von His180 oben und Tyr216 unten gebildet. Zink ist im Zentrum. Eine trigonale Pyramide ist eine Pyramide, die als Grundfläche ein gleichseitiges Dreieck hat. Berühren sich

zwei solche Pyramiden an den Grundflächen (die eine steht dann aufrecht, die andere auf der Spitze), so erhält man eine trigonale Bipyramide.

**Koordination Calcium:** Ist oktahedrisch mit sechs Proteinliganden um das Ion. Die Koordinationssphäre enthält kein Wasser.

**Drei Arg-Asp Salzbrücken** stabilisieren den Kontakt zwischen der N-Terminalen (Zink) Domäne und der C-Terminalen (Calcium) Domäne.

**Antiparallele  $\beta$ -Stränge:** Bei benachbarte Polypeptidketten, die durch WSB zusammengehalten werden, laufen die WSB in entgegengesetzte Richtungen. WSB sind parallel zueinander ausgerichtet.

**Parallele  $\beta$ -Stränge:** WSB sind parallel und laufen in die gleiche Richtung.

#### 10. Welche Proteine sind homolog zu PrtC?

- Protease C [Pectobacterium chrysanthemi]
- Serralysin [Pseudomonas sp. 'TAC II 18'].
- Protease PrtA [Pseudomonas fluorescens].
- Metalloprotease [Pseudomonas tolaasii].
- AprA [Pseudomonas brassicacearum].
- Major Metallo Protease [Serratia Marcescens]
- Zinc-Binding Metalloprotease [Erwinia amylovora].

#### 11. Was ist der Twist des $\beta$ -Faltblattes? Gibt es eine Vorliebe für eine Händigkeit des Twists?

Aufgrund sterischer Effekte durch die Interaktionen zwischen den L-AS der Polypeptidkette haben  $\beta$ -Faltblätter eine ausgeprägte Rechtshändigkeit. Parallele Faltblätter sind weniger twisted als antiparallele. Der Twist führt dazu, dass die Faltblätter selbst gebogen werden, wenn sie gross genug sind, so dass sich ein Zylinder ( $\beta$ -Barrel,  $\beta$ -Helix) bilden kann.

#### 12. Welche nur $\beta$ -Strukturen kennst du? Nenne drei Beispiele für verschiedene $\beta$ -Barrel, $\beta$ -Sandwich Strukturen!

- $\beta$ -Barrel in Rubredoxin [Clostridium pasteurianum]
- Greek-Key  $\beta$ -Barrel in Prealbumin [Human]
- $\beta$ -Sandwich im Spike und Capsid Protein [Bacteriophage phiX174]
- $\beta$ -Sandwich im IgM Antikörper [Human]
- Gamma-Chymotrypsin (Sandwich)
- Ferredoxin ähnliche Proteine (Sandwich)

#### 13. Welche Bedingungen müssen erfüllt sein, damit man zwei verschiedene Plasmide in einer Zelle haben kann?

Die beiden Plasmide müssen verschiedene Resistenzmarker haben, sonst könnte eines vom Bakterium als überflüssig verworfen werden.

Ausserdem müssen sie verschiedene Origins of Replication haben, weil es sonst zu einer Inkompatibilität kommt. Wenn beide Plasmide den gleichen Origin hätten, dann würde dieser die Kopienzahl der Summe beider Plasmide in der Zelle bestimmen, so dass man effektiv weniger von jedem Plasmid hat, verglichen mit der Situation wenn sie beide verschiedene Origins hätten.

**Atome:**  $10^{-10}\text{m}=1\text{Å}$ . • **Kerne:**  $10^{-15}\text{m}=1\text{fermi}$

**Protonen:**  $2\text{up}^{+2/3} + 1\text{down}^{-1/3}$  Quarks. • **Neutronen:**  $1\text{up} + 2\text{down}$  Quarks.

**Nukleidkarte:** Ordinate(vertikal)=Z(Prot.), Abszisse(horizontal)=N(Neut.).

**Ordnungszahl Z**=Anzahl Protonen im Kern.

**schwerstes nat. Element:** U • schw. Element: Z=118.

$^A\text{O}$ : **A=Massenzahl** (Z+N). • 81 stabile, 34 radioaktive (Z>84) Elemente.

**Atommasseneinheit u:**  $12\text{C} = 12\text{u}$ . •  $1\text{Mol } ^{12}\text{C}=12\text{g}=6.022\text{E}23$  Atome.

Masse von  $1\ ^{12}\text{C}$  Atom= $12/N_L=1.992\text{E}-23\text{g}$ . •  $1\text{u}=1.660\text{E}-24\text{g}$ .

$^{16}\text{O}$  hat  $m=15.995 \rightarrow$  **Bindungsenergien** im Atomkern sind unterschiedlich. Weil  $E=mc^2$  haben Kerne mit hoher BE viel Masse in Form von BE gebunden und umgekehrt.

Maximum der Bindungsenergie bei A von 50-60 (Fe, Ni).

**Fusion:** exothermes Verschmelzen von leichten Kernen.

**Fission:** exothermes Spalten schwerer Kerne ( $\text{N} + ^{235}\text{U} \rightarrow ^{236}\text{U} \rightarrow$  Zerfall).

**Radioaktivität:** Umwandlung von Atomkernen unter Aussendung von Strahlung.

**Geiger-Müller-Zähler:** Hintergrund 0.1cps, Uranerz 650, Hörsaal 12.

**Quelle nat. Strahlung:**  $^{222}\text{Radon}$  (aus dem Boden)  $\rightarrow$   $^{214}\text{Blei}$ . Zerfällt in den Bronchien und  $^{214}\text{Pb}$  lagert sich ab. Je weiter von Küste weg, umso mehr Radon in der Luft.

**a-Zerfall:** Emission Helium-Kern:  $2\text{p}+2\text{n}$ .  $Z_1=Z_0-2$  und  $A_1=A_0-4$ . (Z>84).

**b<sup>-</sup>-Zerfall:**  $\text{N} \rightarrow \text{P}^+ + \text{e}^- + \text{Neutrino}$ . A bleibt gleich und  $Z_1=Z_0+1$ . Bei Nukleiden mit N-Überschuss relativ zur P<sup>+</sup>-Zahl also  $M_0 > M_1$ . ( $\Delta E > 0$ ). Bsp: T,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ .

**b<sup>+</sup>-Zerfall:**  $\text{P}^+ \rightarrow \text{N} + \text{Positron} (\text{e}^+) + \text{Neutrino}$ . A bleibt gleich und  $Z_1=Z_0-1$ . Bei P<sup>+</sup> Überschuss mit  $M_0 > (M_1 + m_{\text{e}^-} + m_{\text{e}^+})$  und  $(M_0 - M_1) \cdot c^2 \geq 1.02\text{MeV}$ .  $\text{e}^+ + \text{e}^- \rightarrow 2\gamma$ , je  $0.511\text{MeV}$   $180^\circ$ .

**Weizsäcker-Bethe-Formel:**  $Z_{\text{optimal}} = A / (1.98 + 0.01493A^{2/3})$ .

**EC (Elektronen Catch):** Hüllenelektron aus K-Schale wird vom Kern eingefangen und reagiert mit einem P zu einem N. Das Loch in der e<sup>-</sup>schale verursacht durch Rückfall von e<sup>-</sup> aus höheren Schalen Röntgenstrahlung. Konkurrenz  $\beta$ -Zerfall, auch  $M_0 > M_1$ .

**g-Strahlung:** Kern bleibt gleich. Nach  $\beta^-$ ,  $\beta^+$  oder EC ist Tochterkern in angeregtem Zustand und bei Rückkehr in Grundzustand sendet er ein energiereiches Photon aus.

**Spontane Kernspaltung:** Schwere Elemente zerfallen durch Teilung/Fission, analog Zellteilung durch Einschnürung.

**Relative Eindringtiefe in Materie:**  $\alpha=1$ ,  $\beta=100$ ,  $\gamma=10'000$ .

**Abschirmen:**  $\alpha$  mit Papier,  $\beta$  mit 3mm Al,  $\gamma$  mit 5cm Pb.

**Zerfallsgesetze:**  $N=N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$ . •  $A=A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$ . •  $\lambda = \ln(2) / T_{1/2}$ . N=Anzahl Atome.

**Aktivität/Zerfallsrate=A=I \*N.** [Becquerel/Bq=dps= $1\text{s}^{-1}$ ]. •  $1\text{Curie/Ci}=3.7\text{E}10\text{Bq}$ .

**BigBang:** vor  $15-20\text{E}9\text{a}$ . Sterne stellen durch Fusion Elemente bis Eisen/Nickel her.

**s-Prozess:** langsamer Neutroneneinfang.  $\rightarrow$  Ni bis Bi.

**p-Prozess:** Protoneninduzierte Reaktion.  $\rightarrow$   $^{124,126}\text{Xe}$ ,  $^{130,132}\text{Ba}$ . Heiss!

**r-Prozess:** Gewisse N-reiche Kerne und alle schweren Elemente (Th, U) werden durch schnellen Neutroneneinfang und anschließende  $\beta$ -Zerfälle produziert. Dazu braucht enormen Neutronenfluss während msec bis sec, wie es ihn nur bei Supernovae findet.

**SuperNovae Typ1:** Schlussphase von kleinem ( $1.2-1.5\text{x}$  Sonnenmasse) Stern  $\rightarrow$  Thermonukleare Explosion mit T von  $10^9$  bis  $10^{10}$  während sec.

**SuperNovae Typ2:** Grosser ( $>10x$  SM) Stern  $\rightarrow$  Kontraktion & Gravitationskollaps.

**Herstellung rad. Nukleide:** Beschuss stabiler Isotope mit Neutronen.

${}^AZ + n \rightarrow {}^{A+1}Z + \gamma$  schreibt man  ${}^AZ(n,\gamma){}^{A+1}Z$ .

**Anwendung radioaktiver Nukleide:** Tracer in Biochemie, PET.

**PET-Tomographie:** Kurzlebige Positronen-Emitter in Medikament einbauen. Positronen annihilieren mit  $e^-$  zu zwei  $\gamma$ -Strahlen im  $180^\circ$  Winkel, welche man mit vielen Detektoren um den Patienten herum messen kann. So kann man die Position des Emitters auf  $\text{mm}^3$  genau zeitlich verfolgen. z.B.  ${}^{18}\text{F}$ -Dopamin für Gehirn-Untersuchung.

**Szintillationszähler:** Verwendet einen Szintillator, welcher die Energie der einfallenden Strahlung in Lichtquanten umwandelt. Sie werden zur Messung von  $\gamma$  (feste S.) oder  $\beta/\alpha$ -Teilchen (flüssige S.) gebraucht. Die Messung muss im Dunkelraum durchgeführt werden, damit keine Lichtquanten von aussen stören. Nachweis der LQ durch Photomultiplier (PM) aus Photokathode (Licht  $\rightarrow$  Elektronen) und Sekundärelektronenvervielfacher (SEV).

**Photokathode:** Aus Alkaliverbindung. 1Lichtquant  $\rightarrow$  0.1 bis 0.2  $e^-$ .

**SEV:** 10 hintereinandergeschaltete Dynoden:  $1e^- \rightarrow 10^6e^-$ .

**Feste Sz:** NaI-Kristalle mit Tallium dotiert (0.1%). Anregung promoviert Elektron aus Valenzband ins Excitonenband  $\rightarrow e^-/\text{Loch}$ -Paar, welches bis zum Tallium wandert und dort durch Lichtemission ins Valenzband fällt. Durch die kurze Zerfallszeit ( $2.5E-7s$ ) ist grosse Radiaktivität messbar und die Totzeit ist klein. Geht nur mit harten  $\beta$ -Emittern wie  ${}^{32}\text{P}$ .

**Flüssig Sz:** Probe wird in Flüssig-Sz gelöst. Hat hohe Empfindlichkeit auch für weiche  $\beta$ -Strahler wie Tritium ( ${}^3\text{H}$ ) und  ${}^{14}\text{C}$ . Cocktail besteht aus: Lösungsmittel für Szintillator (Toluol, überträgt Anregungsenergie auf Sz und absorbiert Licht wenig), Sekundärlösungsmittel (für Probe), Sz (PBD, Butyl-PBD, TP, PPO, BBOT).

**Messanordnung:** Weil PM recht hohe Untergrundzählrate besitzt, benutzt man Koinzidenzmessanordnung. Dabei hat man zu beiden Seiten der Probe einen PM und es werden nur Pulse registriert, die gleichzeitig registriert werden. Ausserdem verwendet man zur Eichung ein  $\beta$ -Quelle mit bekannter Aktivität.

**Quenching:** Löschung von Photonen, die den PM erreichen sollten.

**Chemisches Quenching:** Fluoreszenzausbeute wird durch nicht-fluoreszierende Moleküle reduziert, weil sie AnregungsEn durch strahlungslose Übergänge in Wärme umwandeln.

**Farbquenching:** Farbige Lösungen absorbieren Photonen.

**Quenchkorrektur:** Nach Messung der Probe wird ein Aliquot eines absolut bekanntes Standards (in ungequenchter Form) zugegeben und die Gesamtprobe nochmals gemessen.  $\rightarrow$  sehr genau, zerstört Probe.

**Cerenkov-Zählung:** Nukleide in wässrigen Lösungen, die  $\beta$ -Teilchen mit Energien grösser als 300keV emittieren, verursachen blaues Licht, das man direkt messen kann. Das  $\beta$ -Teilchen bewegt sich schneller als die Lichtgeschwindigkeit in der Lösung, so dass es den als Cerenkov-Effekt bekannten „Überlichtblitz“ gibt.  $\rightarrow$  Blaues Licht im Kernreaktor.

**Biologische Wirkung radiaktiver Strahlung:** Direkter Effekt ist die Zerstörung von biologisch wichtigen Molekülen wie DNA. Indirekter Effekt ist die Bildung aggressiver Moleküle wie  $\text{OH}^*$  aus  $\text{H}_2\text{O}$ . Besonders gefährlich sind viele Ionisationen ( $\alpha$ ) auf kleinem Volumen.

**Biologische Wirksamkeit W:**  $\alpha=10$ ,  $\beta=1$ ,  $\gamma=1$ .

**Strahlendosis:**  $D=dE/dm$ . [1Gray/Gy=1J/kg] Absorbierte Energie pro Masse.

1rad=10<sup>-2</sup>Gy. 1Roentgen/R=8.7E-3Gy.

**Äquivalentdosis:** =D\*W [Sievert/Sv]. 1rem=10<sup>-2</sup>Sv.

**Ingestionsdosis:** Dosis durch Einnahme. <sup>137</sup>Cs→Urin. <sup>131</sup>I→Schilddrüse.

<sup>90</sup>Sr→Knochen.

## ÜBUNGEN GÄGGLER

**1. Wieviele Protonen und Neutronen hat <sup>208</sup>Pb?**

Protonen: 82 (Ordnungszahl Z)

Neutronen: 126 (126+82=208=Massezahl A)

**3. <sup>238</sup>U ist das in der Natur hauptsächlich vorkommende Isotop von Uran. Es zerfällt durch Emission eines Alphateilchens. Was ist das Produkt?**

Alpha-Zerfall vorallem für schwere Teilchen. Emission eines Helium-Kerns: 2p+2n

Z<sub>1</sub>=Z<sub>0</sub>-2 und A<sub>1</sub>=A<sub>0</sub>-4. Uran: Z=92 → 92-2=90=Z von Thorium → <sup>234</sup>Th

**5. <sup>131</sup>I ist ein in der Nuklearmedizin häufig verwendeter β<sup>-</sup> Emitter. In welches Tochternuklid zerfällt er?**

**Beta-Zerfall:** Neutron wird unter Aussendung von Elektron und Neutrino in Proton umgewandelt. A bleibt gleich und Z<sub>1</sub>=Z<sub>0</sub>+1. → <sup>131</sup>Xenon.

**6. Ötzi hat in seinen Knochen eine <sup>14</sup>C-Aktivität pro Gramm, die 55% derjenigen eines frisch verstorbenen Menschen ist. Wie alt ist Ötzi? T<sub>1/2</sub> von <sup>14</sup>C ist 5730 Jahre.**

**Formel:**  $A=A_0 * e^{-\lambda * t}$ .  $\lambda = \ln(2)/T_{1/2} = 1.209E-4$ .

$A=A_0 * e^{-\lambda * t} \rightarrow A/A_0 = e^{-\lambda * t} \rightarrow 0.55 = e^{-\lambda * t} \rightarrow \ln(0.55) = -\lambda * t \rightarrow t = \ln(0.55)/-\lambda$

$t = -0.597 / -1.209E-4 = 4942$  Jahre

**7. Wie radioaktiv (A) ist ein kg metallisches Uran? T<sub>1/2</sub> von <sup>238</sup>U ist 4.5E9 Jahre.**

**Formel:**  $A = \lambda * N$ .  $\lambda = \ln(2)/T_{1/2} = 4.884E-18$  (in Sekunden einsetzen!)

$N = \text{Masse}/\text{Molmasse} * N_A = \text{Mol} * N_A$  (Avagadro=Teilchen/Mol)

$N = (1000g)/(238g/mol) * 6.022E23 \text{ Teilchen/mol} = 2.53E24$  Atome.

$A = 4.884E-18 * 2.53E24 = 1.23E7$  Bq

**8. Welche Masse besitzt 1mCi <sup>99m</sup>Tc? T<sub>1/2</sub>=6 Stunden.**

**Formel:**  $N = A/\lambda$ .  $A = 1\text{mCi} = 3.7E7 \text{ Bq}$ . (weil 1Curie = 3.7E10 Becquerel.)

$\lambda = \ln(2)/T_{1/2} = 3.209E-5$  (in Sekunden einsetzen!).  $N = 3.7E7 / 3.209E-5 = 1.153E12$  Atome.

$m = (1.153E12 \text{ Atome}) / (6.022E23 \text{ Atome/Mol}) * 99g/\text{Mol} = 0.2ng$

**9. 1µg Natrium wird einen Tag an einem Reaktor bei einem Neutronenfluss (f) von 1E13cm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> bestrahlt. Wie radioaktiv wird dieses Natrium? Reaktion:**

<sup>23</sup>Na(n,γ)<sup>24</sup>Na (= <sup>23</sup>Na+n → <sup>24</sup>Na+γ). <sup>23</sup>Na ist das einzige in der Natur vorkommende Isotop von Na. T<sub>1/2</sub>=15h. Reaktionsquerschnitt σ=0.53barn (1b=10E-24cm<sup>2</sup>).

**Formel:**  $A = (0.6 * S * f * H) * (1 - 0.5^{t/T_{1/2}}) / M$  [Bq/g]

σ=0.53b (Reaktionsquerschnitt). φ=1E13cm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (Neutronenfluss).

H=1 (Häufigkeit von <sup>23</sup>Na in der Natur). t=24h (Bestrahlungszeit).

$T_{1/2}=15\text{h}$  (t und  $T_{1/2}$  in derselben Zeit-Einheit!).  $M=23$  (Massenzahl von  $^{23}\text{Na}$ ).  
 $A=3.18\text{E}12*0.67/23=9.265\text{E}10\text{Bq/g}$ . → 1ug Natrium:  $A=9.265\text{E}4\text{Bq}$

**10. Eine Person hält sich 8 Stunden in 5m Distanz einer 18GBq (=A) Cäsium-137 Quelle auf. Welche Strahlendosis akkumuliert diese Person?**

**Formel:  $DL=k*A/r^2$**

Gamma-Energie  $^{137}\text{Cs}$ : 0.67MeV (Tab).  $k=8.1\text{E}-5\text{ Gy}\cdot\text{m}^2/\text{h}\cdot\text{GBq}$ .

$DL=8.1\text{E}-5*18/25=5.8\text{E}-5\text{Gy/h}$ . Dosis= $DL*8=4.67\text{E}-4\text{Gy}$

Gamma-Strahlen:  $W=1$  (Wirksamkeit). →  $D=0.47\text{mSv}$  (Strahlendosis in Sievert)

**11. Ein Kleinkind nimmt über einen Monat täglich 300ml Milch zu sich, die mit 2000Bq/l an  $^{131}\text{I}$  verseucht ist. Akkumulierte äquivalente Strahlendosis?**

**Formel: Dosis= $C*K*D*t$** .  $C$  = Aktivität des Nahrungsmittels [Bq/kg]

$K$  = Konsumrate [kg/tag].  $D$  = Dosisfaktor [Sievert / Bq] (Tab).

$t$  = Zeit [Tage]. → Dosis= $2000*0,3*1,1\text{E}-7*30=2.0\text{mSv}$

## THEORIE SCHALLER

### Protein Reinigungs-Strategien:

- **Intrazelluläre Prot:** Zelldisruption → Abtrennung von unlöslichem Material → Probleme: Lipide, Proteasen, grosse Proteinmengen → Chromatographische Techniken.
- **Inclusion Bodies** (rekomb. Prot): zusätzlich Isolierung und Renaturierung → Probleme: bei Renat., niedrige Ionenstärke.
- **Extrazelluläre Prot:** Probleme: verdünnt, geringe Mengen.

### Aufschluss-Methoden:

- **Grampos Bak:** Lysozym, EDTA/Tris (zwardperm), French-Press.
- **Gramneg Bak:** Glaskugel Zelmühle, Einfrieren/Auftauen, Ultraschall.
- **Hefen:** Autolyse mit Toluol, French, Glaskugeln, Zymolase.
- **Pflanzen:** Messerhomogenisator, zermahlen nach Trocknen.
- **Fasrige Pflanzen:** Zermahlen in flüssigem Stickstoff.
- **Suspensionskulturzellen:** hypertotonischer Puffer → Osmolyse, Pressen durch Sieb, wiederholtes Pipettieren der Suspension.
- **Fasrige Tierzellen:** Zerkleinern, Dounce-Homogenisator.
- **Muskelgewebe:** Kleinschneiden, Fleischwolf.

**Micellenbildung:** Detergenz → Micellen + Protein → P-M-Komplex.

### Detergenzien:

- **Ionische:** SDS (SodiumDodecylSulfat), Desoxycholat, CTAB.
- **Nichtionische** (schonend): Triton X100, X114, Tween 80.
- **Zwitterionische:** Octylglucosid, CHAPS, Zwittergent 3-12.

**Proteinquantifizierung:** Bradford-Assay, Coomassie, Biuret-Ass.

## Spektroskopische Proteinquantifizierung:

- **Photometrisch:** Tyr/Trp bei 280nm, Peptidb bei 205nm.
- **Fluorometrisch:** Tyr/Trp bei 280nm → Emission bei 320-350nm.
- **Protkonz [mg/ml]:**  $31 \cdot A_{205} \rightarrow 10\% \text{err. } 27 + 120 \cdot (A_{280}/A_{205}) \rightarrow 2\% \text{err.}$

**Proteine Ausfällen:** Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Steigende [EtOH].

**Niedermolekulare Substanzen entfernen:** Dialyse, Ultrafiltration.

## Chromatographische Theorie:

- **Totzeit ( $t_0$ ):** Zeit bis zum ersten Peak.
- **Halbwertsbreite:** Peakbreite auf halber Peakhöhe.
- **Analyt:** Substanzgemisch.
- **Mobile Phase:** Lösungsmittelgemisch.
- **Stationäre Phase:** Material mit Poren (10-100nm), Bio/Synthetischer Polymer.
- **Retentionszeit/Volumen:** Injektion bis Elution.
- **Eluat:** Das was rauskommt.
- **Isokratisch:** Zusammensetzung konstant.
- **Dispersion:** Peakverbreiterung.
- **Kapazitätsfaktor:**  $k' = t_R/t_0 - 1 = V_R/V_0 - 1$ .
- **Selektivität:**  $a = k'_1/k'_2$ . Wenn  $a=1 \rightarrow$  Trennung unmöglich.
- **Resolution:**  $R = 2 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2)$ . w: Peakbreite.
- **Peaks:**  $R=1 \rightarrow$  benachbart,  $R>1 \rightarrow$  getrennt,  $R<1 \rightarrow$  überlappend.
- **Van-Deemter-Gleichung:**  $h = A + B/u + C \cdot u$ . h: Bodenhöhe (Qualität), u: Flussrate, A: Säule-Konstante, B/u: Längendiffusion,  $C \cdot u$ : Wechselwirkung der Probe mit stat. Phase (=Massentransfer-Effekt).

## Chromatographische Trennmethoden:

- **Grösse/Form:** Gelfiltration SEC (size exclusion chrom). Kleine Moleküle bleiben in Poren im Gel → Kommen am Schluss.
- **Ladung:** Ionenaustausch IEC (ion exchange chrom). Zuerst Adsorbition und dann Desorbition durch mehr Ionenstärke (Salz) oder pH-Gradient (→ Ladungsänderung im Prot). Bindung an Kationenaustauscher ( $\text{Prot}^+$ ) bei  $\text{pH} < \text{pI} - 1$  und an Anionenat ( $\text{Prot}^-$ ) bei  $\text{pH} > \text{pI} + 1$ . Prot kann am pI ausfällen! Bsp Anion: Diethylaminoethyl. Kation: Sulfomethyl.
- **Hydrophobizität:** RP-HPLC. Stat. Phase anstatt polar apolar.
- **Biospezifität:** spezifische Affinität. Hydrophobe/elektrostat. WW.
- **Komplexierung:** Metallchelat ( $\text{Ni}^{2+}$  Chelat).
- **Freie Thiolgruppen:** kovalente Vernetzung.

**Affinitätschromatographie:** Lectine → Glykoprot. • Heparin → Koagulationsprot. • Prot A/G → IgG. • Calmodulin →  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Prot. • Farbstoffe → Enzyme. • Nucleinsäuren → Dehydrogenasen und Kinasen. • Antikörper → Antigen. • Inhibitoren → Enzym. • Hormon → Rezeptor. •  $K_D$  sollte zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-7}$  sein für biospezifische Adsorbition.

## HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography):

- **RP-HPLC:** reverse Phase HPLC.
- **Stationäre Phase:** Modifiziertes Kiesgel, z.B. C18, C8, C4.
- **Mobile Phase:** Gradient-Elution. A&B mischen in zeitlich änderndem Verhältnis.
- **Phase A:** 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser.
- **Phase B:** 0.08% TFA in Acetonitril (apolar).
- **Warum TFA?** Ist durchlässig für UV bei 210nm. Stärkste org. Säure.
- **Warum Acetonitril?** UV durchlässig bei 210nm. Tiefe Viskosität → Druck ist ok.

## Theorie Elektrophorese:

- **Elektrophorese:** Wanderung eines geladenen Teilchens im elektrischen Feld.
- **Beschleunigende Kraft:**  $F_e = q \cdot E$ .  $q = z \cdot e$ . z: Ladung, e: Elementarladung.
- **Wanderungsgeschwindigkeit:**  $v = q \cdot E$ . E: elektrische Feldstärke.
- **Reibungskraft:**  $F_{Hr} = f \cdot v$  • **Reibungskoeff:**  $f = u \cdot E$ . u: elektrophoretische Mobilität.
- **Elektroosmotischer Fluss (EOF):** Ist Fluss trennender Teilchen entgegengesetzt.

## Methoden der Elektrophorese:

**Zonenelektrophorese:** Homogene Puffer, Komponenten haben verschiedene Geschwindigkeit, konstanter pH, schlechte Auflösung, Trennung nach Masse.

**Isotachophorese** (=diskontinuierliche Elektroph.) : Heterogenes Puffersystem, Leit-Ion mit hoher Mobilität, Tail-Ion mit tiefer Mobilität, Komponenten werden gestapelt.

**Isoelektrische Fokussierung:** pH-Gradient, Teilchen werden nach Ladung getrennt und lagern sich am isoelektrischen Punkt ab.

## Gelmedien:

- **Agarosegele:** Galaktose verbunden mit anhydro Galaktose, recht grosse Poren → gut für DNA/RNA, sind trüb → Probleme bei Färbung, EOF gross.
- **Polyacrylamidgele:** Verhältnis Acylamid zu Bisacrylamid bestimmt den Vernetzungsgrad und damit die Porengrösse.

**Disk(ontinuierliche) Elektrophorese:** Sammelgel mit tiefer Konz und Trenngel mit hoher Konz. Probe wandert an Grenze der Gels und wird von Glycin überholt → Stau-Effekt → Bandenverstärkung. Proteine wandern anhand ihrer Grösse im Gel.

**SDS-PAGE** (Polyacrylamidgel Elektrophorese): SDS → Alle Proteine in Lösung und gleiche Ladung. Diese Proteintrennmethode.

## Hochauflösende 2D-Elektrophorese:

- **1. Dimension:** Isoelektrische Fokussierung im IPG-Streifen. Dies sind immobilisierte pH Gradienten, bei welchen Immobiline in die Gel-Matrix eingeführt wurden. Dadurch wandern Proteine horizontal an ihren isoelektrischen Punkt.
- **2. Dimension:** SDS-PAGE → Vertikale Trennung nach Grösse.
- **Blot:** Membran aus Nitrozellulose oder PVDF.
- **Tank/Vertikal-Blot:** Blot ist schwimmt im Puffer (alte Methode).

**Oxidation von Disulfidbrücken:** Perameisen-Säure.

**Reduktion von SS-Brücken:** Dithiothreitol (DTT), 2-Mercaptoethanol.

**Alkylierung von Cystein:** Iodessigsäure, 4-Vinylpyridin, Iodacetamid.

**Fluoreszenzmarkierung:** Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), Fluoresceincadaverin, Dansylchlorid, Dansylcadaverin.

**Bifunktionelle Reagenzien:** Zur Vernetzung von Prot. Formaldehyd, ...

**Chemische Fragmentierung:** Bromcyanspaltung nach Methionin führt zu grossen Fragmenten. Oxidative Halogenisierung spaltet bei Trp.

**Enzymgruppen:** Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen (spalten Doppelbindung), Isomerasen, Ligasen.

### Proteolysebedingungen:

- **Puffer:** pH8 für viele Enzyme OK, zb Ammoniumbicarbonat.
- **Detergenzien:** SDS 0.1%, Octylglycosid: bis 2%.
- **Organische Lösungsmittel:** Acetonitril (Pepsin, Trypsin), Isopropanol (Papain, Thermolysin, Elastase).
- **Spaltzeiten:** 4 bis 16h bei 37° für vollständige Proteolyse. Minuten bis Stunden für lymitierte Proteolyse.
- **Enzym/Substrat-Verhältnis:** Lösung 1:20-1:200, Membran 1:1-1:10.
- **Reduktionsmittel:** Mercaptoethanol

**Endopeptidasen:** Chymotrypsin (YFW). • Trypsin (RK). • Glu-C (DE). • Lys-C (K). • Arg-C (R). • Subtilisin (unspec). • Papain (RKEHY). • Asp-N (D). • Thermolysin (hydrophob), Pepsin (FMLW). • Faktor Xa (IEGR). • Enterokinase (D<sub>4</sub>K).

**Exopeptidasen:** Carbopeptidase Y/P (C-Term). • Pyroglutamat-Aminopeptidase (Pyroglutamat, N-Term). • Acylaminoacid releasing enzyme (N-Acyl AS, N-Term).

**Struktur Chymotrypsin:** 2  $\beta$ -Barrel Domänen aus je 6  $\beta$ -Faltblättern. Katalytische Triade in der Mitte.

### ASanalyse (ASA):

- **Saure Hydrolyse:** 6M HCl, 24h, N<sub>2</sub>-Gas.
- **Ser, Thr, Met:** 10-20% zerstört.
- **Cys, Trp:** 50-100% zerstört.
- **Umwandlung:** Asn  $\rightarrow$  Asp. Gln  $\rightarrow$  Glu.
- **Gute Cys-Werte:** Iodacetamid Modifizierung  $\rightarrow$  stabiles CAM.
- **Hydrophobe Bindungen:** Ile-Val, Val-Val, Ile-Ile sind schwer zu spalten.
- **Mercaptoethanol:** Cys + Met schützen.
- **Detektions:** PITC (UV245nm), Fluorescamin (Fluz 390/475nm).
- ASA ist in der **Klinik** sehr wichtig, da Anzeichen von Krankheit oft die Überproduktion von bestimmten AS ist.
- **Derivatisierung:** Kopplung der AS an Detektions-Reagenzien.

### Massenspektrometrie (MS):

- Teilchen müssen **geladen** sein. Man misst **m/z**.
- **Ionenquelle:** Elektronenstoss-Ionisation (EI), Chemische Ionisation, Fast Atom Bombardment (FAB), Elektrospray-Ionisation (ESI), Matrixunterstützte Laser-desorption/Ionisation (MALDI).

- **Ionentrennung:** Quadrupol, Magnetisches Sektorfeld, Elektisches Sektorfeld, Flugzeitanalysator (TOF), Elektische Ionenfalle (ion trap), Elektromagnetische Ionenfalle (Ionencyclotron).
- **Ionennachweis:** Faraday-Cup, Konversionsdynode mit SEV, Szintillationszähler, Vielkanalplatte.
- **ESI:** schonende MS. Beruht auf Coulomb-Explosion, dem Moment, in dem die Coulomb-Abstossung die Oberflächenspannung eines Tröpfchens überwiegt → Spray. Dispersion einer Flüssigkeit in viele kleine, geldadene Teilchen mit Hilfe von e-Feld.
- **Desolvatisierung:** Lösungsmittel muss weg. Mit geheiztem N<sub>2</sub>. Curtain-Gas verhindert auch Eintritt neutraler Teilchen in Hochvakuum.
- **Monoisotopische Masse:** Masse des häufigsten Isotops.
- **Nominelle Masse:** Ganzzahliger Wert des häufigsten Isotops.

### Co/Posttranslationale Modifikationen (PTM):

**Glykosylierung:** N-Gl. an Asn / O-Gl. an Ser/Thr. • **Phosphorylierung:** Ser, Thr, Tyr.

**Sulfatisierung:** Tyr. • **Hydroxylierung:** Pro, Lys, Asp, Asn.

## PRAKTIKUM SCHALLER

### Ansetzen tryptischer Spaltung:

- Unbekanntes Protein (500ug) in 100ul Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gelöst.
- Zugabe von 10ul Trypsin in Salzsäure. Diese damit Trypsin nicht aktiv ist, da sein pH Optimum bei 7 liegt. Durch den NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer wird die Salzsäure neutralisiert. Trypsin schneidet unser unbekanntes Protein jeweils nach der basischen AS Lysin oder Arginin, ausser es folgt Prolin.
- Vortexen und 24 Stunden bei 37° Celsius inkubieren.

### SDS-PAGE:

Das unbekannte Protein (100ug) wird in 100ul Probenpuffer (mit Bromphenolblau-Marker) gelöst und das Gel folgendermassen geladen:

Slot	1	2	3	4	5	6
<b>Probe</b>	Eichprot	Unbek	Unbek	Mix	Mix	Eichprot
<b>Vol</b>	5ul	5ul	10ul	5ul	10ul	10ul

Mix: Proteingemisch aus HPg, HPg K1-3, HPg K4

Gel bei 200V entwickeln, bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Gels erreicht hat.

### Blotting:

Polplatte<sup>-</sup>, Filterpapiere, Trenngel, Transfermembran, Filterpapiere, Polplatte<sup>+</sup>.

Als Transfermembran verwenden wir Imobilon-PSQ, weil Nitrozellulose im Edman-Abbau nicht stabil wäre. Zuerst gibt man sie in Methanol und dann in Transferpuffer. Die Filterpapiere müssen tiefend nass vor Transferpuffer sein. Transfer während einer Stunde bei 120mA (und nahezu 0 Volt, U=RI, Widerstand sehr klein). Transfermembran 2min in Coomassie Blue R250 (in Methanol und Essigsäure) färben, in Ethanol und Essigsäure den Hintergrund entfärben und an der Luft trocknen.

Am Marker kann man ablesen, dass die Bande des unbekanntes Proteins (Slot 2) bei 14kD liegt. Sie wird ausgeschnitten und für die Sequenz-Analyse verwendet.

Bei der Färbung mit **Coomassie Brilliant Blue** in einer sauren, alkoholischen Lösung wird das Protein durch diese denaturiert und auf der Membran fixiert sowie der Farbstoff mit dem Protein komplexiert. Der überschüssige ungebundene Farbstoff kann mit einer sauren Lösung abgewaschen werden. Damit können Proteine im Mikrogramm-Bereich sichtbar gemacht werden. Für 50mal mehr Empfindlichkeit kann man eine Silber-Färbung anwenden.

### Quantitative ASanalyse (Hydrolyse):

Wir wollen herausfinden, zu welchem Anteil das Protein aus jeder der AS aufgebaut ist.

- Das unbekannte Protein (200ug) wird in 200ul Ameisensäure gelöst und in ein Hydrolyse-Röhrchen gegeben.
- Man gibt 5ul **EDTA**-Lösung bei, damit Metallionen komplexiert werden, welche sonst mit den hydrolysierten AS reagieren könnten.
- Probe im SpeedVac (Zentrifuge mit Vakuum) trocknen.
- Nun in das Hydrolysegefäß (enthält 200ul 6M HCl, → Photo) geben, dreimal evakuieren, mit N<sub>2</sub> belüften und dann im Vakuum lassen.
- Das Gefäß während 22 Stunden auf einen Heizblock bei 115° Grad stellen, so dass alle Peptidbindungen des Proteins hydrolysiert werden.

Der Hydrolyse wurde **Phenol** zugegeben, damit **Tyrosin** vor der Zerstörung durch die Hydrolyse geschützt ist.

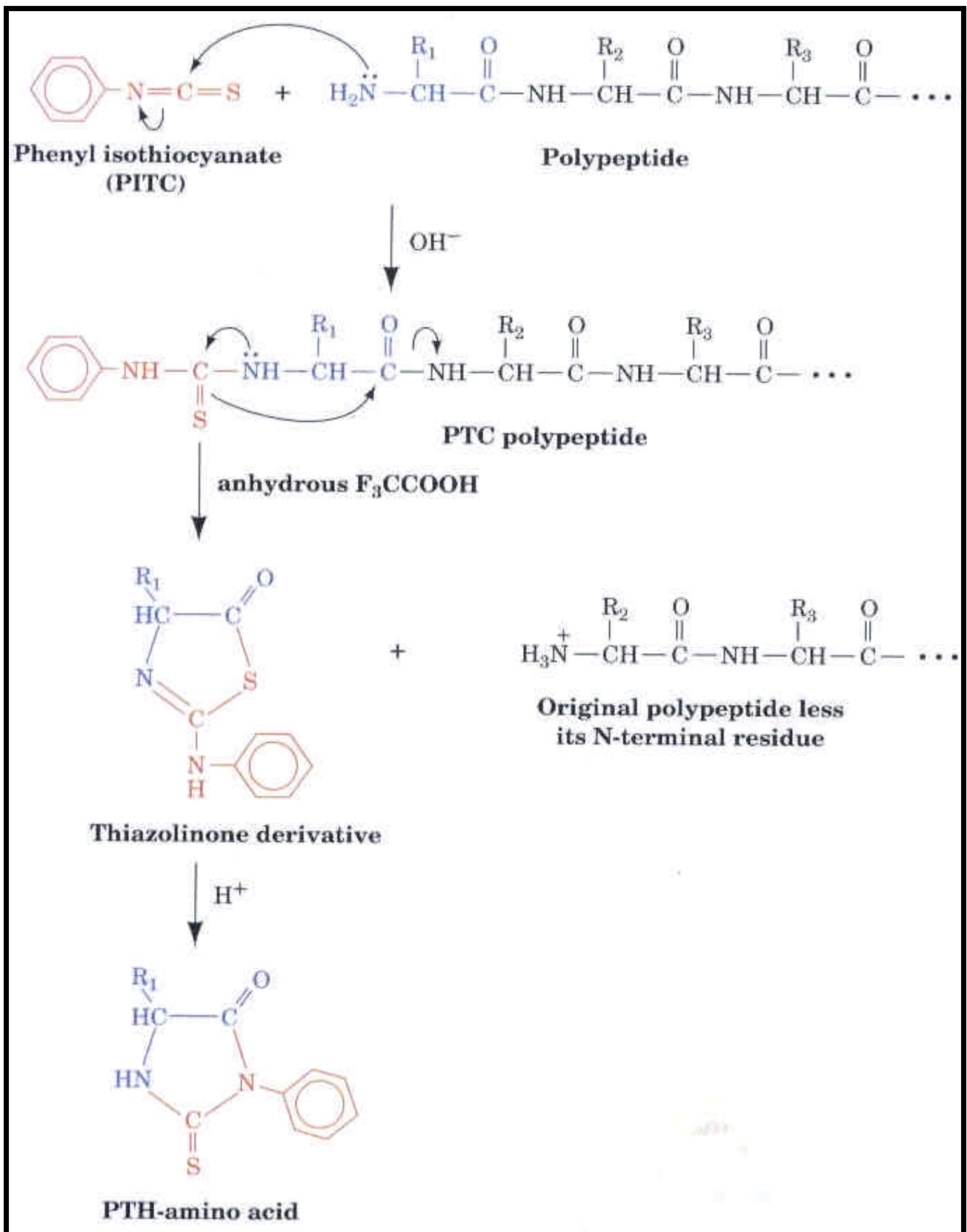
### Stoppen der tryptischen Spaltung:

- Reaktion durch Ansäuern mit 10ul TFA beenden. Schneidet nur bei pH 7.
- Von diesem Gemisch gibt man zweimal 12ul (=10%) in neue Eppendörfer, welche wir für Massenspektrometrie und analytisches RP-HPLC (Wo sind Peaks der Fragmente?) brauchen. Die restlichen 80% brauchen wir, um im präparativen RP-HPLC die Fragmente des trypsinverdauten unbekanntes Proteins zu reinigen.

### Sequenzanalyse:

Edman-Abbau ist beste Methode zur N-Terminalen AS-Sequenz Bestimmung. Die Probe wurde aus dem Blot ausgeschnitten, in TFA gelöst und auf die Glasfaserfilter-Scheibe gegeben. Diese hat man vorher mit Polybren (polymeres Ammoniumsalz) behandelt hat, damit das Protein auf der Scheibe fixiert wird, aber trotzdem von den Reagenzien erreicht werden kann. Man verwendet TFA und nicht HCl, weil HCl zu korrosiv für das Gerät ist, obwohl es für die Reaktion besser wäre. Jetzt gibt man die Glasfaserfilter-Scheibe in die Reaktionskammer und Sequenzierung läuft automatisch. Diese Prozedur wiederholt man nun so lange, bis man sich der oberen Limite von 50 AS nähert, bei der das Signal der Sequenz im Hintergrundrauschen versinkt.

Das HPLC ist Geschwindigkeits-Limitierend, weil eine Auftrennung 40 Minuten dauert.



- Kupplung:** PITC (**PhenylIsoThioCyanate**) verbindet sich unter leicht alkalischen Bedingungen (damit  $\alpha$ -Aminogruppe deprotoniert) mit der N-terminalen AS des Proteins zu einem PTC (**PhenylThioCarbonyl**) Polypeptid.
- Spaltung:** Dieses behandelt man mit der starken Säure TFA, welche die N-terminale AS abspaltet, aber andere Peptidbindungen nicht schneidet. Die abgeschnittene AS (Thiazolinon-Derivat) wird in organisches Lösungsmittel extrahiert.
- Konversion und Identifikation:** Durch Behandlung mit wässriger Säure wird sie in die stabilere PTH (PhenylThioHydantoin) Form übergeführt, welche man mit RP-HPLC durch Vergleich mit bekannten Werten der AS bestimmen kann. Nach

dem Auftrennen in der Säule des HPLC werden die PTH-AS bei 269nm detektiert.

**Erster Schritt:** Der linke hohe Peak kommt von Glutaminsäure (Glu) und der rechte ist **DPT**, ein Produkt, das aus PITC und H<sub>2</sub>O entsteht.

Zum Beweis kann man dann noch auf der numerischen Auswertung nachsehen.

Bei der nächsten AS bekommt man auch noch ein bisschen von der letzten mit, so dass man diesen Peak ignorieren muss, ausser wenn seine Intensität nicht abgenommen hat und kein neuer Peak dazugekommen ist.

Die Auswertung aller zehn Schritte des Abbaus führt zu dieser N-Terminale Aminosäuresequenz unseres Proteins: EQLTKCEVFR.

Beim Cystein waren wir nicht sicher, weil es vermutlich von einer **Disulfidbrücke** zurückgehalten wurde und deshalb nicht auf dem HPLC erschien. Doch durch die Proteindatenbank wurde die Vermutung bestätigt.

### **ASanalyse (Umsetzung):**

Mit der digitalen Pipette folgende Puffer anmischen:

**Puffer A:** Methanol, Wasser, TEA (Triethylamin) auf pH 12.

**Puffer B:** Methanol, Wasser, TEA, PITC.

Die hydrolysierten Proben werden in 10ul Puffer A gelöst und dann im SpeedVac getrocknet. Nun in Puffer B lösen und mindestens eine Stunde im SpeedVac trocknen.

Man löst zuerst im Puffer A ohne PITC, damit wirklich alle Salzsäure **neutralisiert** wird. Das PITC verursacht eine **Kupplung** (Derivatisierung) der hydrolysierten AS, damit man diese durch deren charakteristische Retentions-Zeit im RP-HPLC auftrennen und durch die UV-Absorption der PTC-AS quantifizieren kann. Hydrolyse im Vakuum, damit die Schwefel-Enthaltenden AS nicht durch die Luft oxidiert werden. Lange Hydrolyse-Dauer war nötig, damit auch die aliphatischen (kein Ring) AS Valin, Leucin, Isoleucin befreit werden können. Leider werden durch die Hydrolyse **Serin, Threonin, Tyrosin** und **Tryptophan** teilweise zerstört. Dies kann man aber durch den Vergleich mit der Hydrolyse eines **Referenz-Proteins** ( $\beta$ -Laktoglobulin) kompensieren. Zudem werden **Asparagin** und **Glutamin** durch Abspaltung eines Ammonium-Ions zu Asparginsäure und Glutaminsäure konvertiert, so dass nur jeweils die Summe der beiden Formen gemessen werden kann. Aus der Fläche der Peaks konnte die Menge jeder AS in unserem hydrolysierten Protein berechnet werden. Die AS Asparagin, Glutamin, **Cystein** und Tryptophan wurden durch die Hydrolyse zerstört und daher nicht in die Analyse einbezogen. Nun nimmt man die Summe aller zu berücksichtigenden AS und rechnet den Anteil jeder einzelnen aus.

### **RP-HPLC:**

Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography besteht aus einer dünnen aber relativ langen Säule, welche mit einer apolaren Matrix aus modifiziertem Kieselgel gefüllt ist. Auf dem Kieselgel sind Butylgruppen fixiert, welche die apolare stationäre Phase bilden.

Die mobile Phase besteht aus einer polaren Phase A und einer apolaren Phase B. Zuerst wird nur Phase A durchgelassen, dann mit immer mehr Phase B gemischt, so dass ein Polaritäts-Gradient entsteht.

Daraus entstehen folgende **Vorteile:** Hohe Auflösung, hohe Geschwindigkeit (<1h), hohe Empfindlichkeit (<1pM), Automatisierbar!

Zuerst machen wir einen analytischen Lauf mit 10% des tryptischen Verdau. An diesem können wir schon erkennen, welche Peaks die besten sind, so dass wir beim präparativen Lauf wissen, bei welcher Retentionszeit ein Röhrchen zum Auffangen der Fraktion bereit sein muss. Die höchsten/schärfsten Peaks des präparativen Laufs wurden gesammelt.

**Säule:** Aquapore Butyl (UNPOLAR)

**Puffer A:** 0.1% TFA (POLAR)

**Puffer B:** 0.1% TFA, 80% Acetonitril, 20% Wasser (UNPOLAR)

**Gradient:** 0-60% Puffer B in 60min.

Die **Fluoreszenz** wurde bei 210nm (Peptidbindung) und 280nm (Typtophan) gemessen. Beide Messungen zeigen etwa das gleiche Bild. Der erste Peak enthält normalerweise alles in der Probe enthaltene Salz, weil es polar ist und schlecht an die Säule bindet.

### Massenspektrometrie:

Wir verwenden einen **Elektrospray-Massenspektrometer**. Für das Bestimmen der Masse von Proteinen ist dieser ideal, weil man sie nicht durch Erhitzen in die Gasphase bringen kann. Sie würden nur verkohlen. Die Proteine werden mit **Ameisensäure** (stört die Messung nicht) angesäuert, wodurch sie an  $\text{NH}_2$  oder OH protoniert werden. Sie haben nun also eine positive Ladung, werden in einer unter Hochspannung stehenden **Kapilare** beschleunigt und mit Stickstoff-Gas **zerstäubt**. Durch Temperatur von 50 bis 100° und ein Drying Gas wird dann noch das Lösungsmittel weggetrocknet. Durch den Einlass kommen die Proteine nun in den Massenanalysator, in dem Vakuum herrscht. Der **Quadrupol** besteht aus zwei Polen mit Wechselfspannung und zwei mit Gleichspannung. Durch die Einstellung von Strom, Spannung und Frequenz kann man nur Teilchen von einem bestimmten Masse/Ladungs Verhältnis durchlassen. Deren Ankunft (oder nicht) wird dann auf dem **Detektor** registriert. Auf diese Art werden der Reihe nach alle M/Z Werte im vorgegebenen Bereich analysiert. Die Messgenauigkeit liegt bei  $\pm 0.01\%$ .

- Bei der Analyse der **Fraktion** bei 27.077min Retentionszeit der HPLC Auftrennung der **tryptischen** Fragmente sieht man, dass wir ein Fragment der Masse 1200 Dalton isoliert haben. Verglichen mit theoretischem Trypsin-Verdau (PeptideCutter) von LCA\_BOVIN könnte sich um das Fragment LDQWLCEK von 1159Da handeln!
- Die Masse des **reinen Proteins** ist, wie schon beim SDS-PAGE vermutet, tatsächlich 14176 Dalton! In der Datenbank steht für unser Protein aber 14186 Da wiegen sollte. Unsere Messung ist tiefer, weil bei unserem Protein die Cysteine Disulfidbrücken bilden. Ihre S-Gruppe ist daher **oxidiert** (Prot-S-S-Prot) **anstatt reduziert** (Prot-SH) wie in der Datenbank. Weil unser Protein vier Disulfidbrücken hat, sollte es noch 8Da schwerer sein, also 14184Da. Wir haben also nur 2Da Abweichung!
- Im **Gemisch** ist das 1200Da Fragment wieder sichtbar, aber sonst kann ich leider keines der Fragmente erkennen.

### Biocomputing:

Mit dem ganzen Berg von Daten herausfinden, wie unser Protein heisst. Da wir eine 10AS lange N-terminale **Assequenz (Tag)**, die prozentuale **ASzusammensetzung** und die **Masse** eines **Trypsin Fragments** haben, kann man dies leicht durch eine An-

frage an das Multident Tool herausfinden. Man gibt auch die ASzusammensetzung des **Eichproteins** an. → **LCA\_BOVIN**:  $\alpha$ -Lactalbumin wird nur in der Brustdrüse hergestellt. Als eine regulatorische Untereinheit der Lactose-Synthase ändert es die Substratspezifität der Galactosyltransferase, so dass Glukose ein gutes Akzeptor-Substrat wird. In anderen Geweben transferiert die GT Galaktose auf die N-Acetylglucosamine der Oligosaccharidketten der Glykoproteine. Signalsequenz: 1-19.

## PRAKTIKUM ERNI

### Experiment 1: Zell Fraktionierung

1. 5g Zellpaste in 10ml Buffer E resuspendieren und 25ul PMFS zugeben.

Die Zellen sind ein E. coli Stamm mit folgenden Genen deletiert:

- Glukose-Kinase (Phosphoriliert Glukose)
- ptsG (Phosphotransferase für Glukose) → IICB<sup>Glc</sup> Protein
- Manose-Transporter (transportiert oft auch Glukose)

Sie haben ein Plasmid mit dem ptsG Gen darauf. Die **Deletionen** sind nötig, damit Glukose nur mit dem makrierten IICBGlc Transportiert und Phosphoriliert wird, so dass man es messen kann. Auf dem Plasmid hat es noch das bla (beta Laktam Inhibitor) Gen, welches zu **Resistenz** gegen beta-Laktam Antibiotika wie **Ampicilin** führt.

Buffer E enthält:

- Tris Puffer auf pH 7.5
- **Beta-Mercaptoethanol**: Spaltet (reduziert) Disulfidbrücken, aber weniger stark als DTT, welches jedoch mit dem Nickel in der Säule komplexieren würde. Disulfidbrücken sollen nicht entstehen, weil durch sie Proteine zusammenkleben.
- 0.4M NaCl (0.15M wäre Isotonisch). → Plasmolyse?

**PMSF** ist ein Protease-Hemmer, welcher verhindert, dass unser gewünschtes Protein verdaut wird. Wir arbeiten auf Eis, weil durch das Zerstören der Zellen deren Inhalt um das 1000fache Verdünnt wird, so dass Proteasen nicht mehr in Kontakt mit ihren Inhibitoren sind. Dadurch werden sie aktiviert, aber in Eises-Kälte arbeiten sie schlecht.

2. Zellen mit der **French Press** öffnen.

Durch den Druck von 1000 psi (Pound per Square Inch → 70kg/cm<sup>2</sup>) platzen die Zellen und es entstehen **inside-out Vesikel**. Das ist gut, weil die gesuchte Phosphotransferase auf der zytoplasmatischen Seite der Membran ist, also nun aussen auf dem Vesikel.

3. Lysat (geplatze Zellen) in Sorvall Zentrifuge 10min bei 10krpm.

**Zelltrümmer** sedimentieren. Im Überstand bleiben lösliche Proteine und Membranprotein-Vesikel.

4. Überstand In die Beckman Zentrifuge für 50min bei 50krpm.

Bei dieser **Ultrazentrifugation** gehen die Vesikel zu Boden (Pellet) und die löslichen Proteine bleiben im Überstand. Muss im Vakuum ablaufen, weil sich die Zentrifuge durch die schnelle Drehung (Überschallgeschwindigkeit) erwärmen würde. Muss aber auf 4° Celsius bleiben, wegen den **Proteasen**. Diese erste Reinigung der Membranproteine nennt man **Differenzial-Zentrifugation**.

5. Pellet in Puffer F resuspendieren und mit dem Glass/Teflon Homogenisierer (Dreh-Wattestäbchen) homogenisieren und gefrieren.

Weil das Pellet extrem zäh und klumpig ist. Puffer F: Wie Puffer E, aber auf pH 9.3 (Protein stabiler?) und ohne NaCl (nicht mehr hypertonisch).

## Experiment 2: Solubilisierung der Membran & Reinigung von IICB<sup>Glc</sup>

1. 20ul der Membranproteine in Eppendorf für später aufbewahren. Zum Rest (800ul) das gleiche Volumen DDM geben. Die Suspension war trüb (streut Licht durch Reflexion an Partikeln) und wird klar. Eine Minute ins Ultraschallbad stellen und dann 15min auf Eis.

**DDM (Dodecyl-Maltopyranosid)** ist ein nicht-ionisches Detergens, welches die Membranproteine in Lösung bringt. Das **Ultraschallbad** zerkleinert grössere Partikel, die dann auch in Lösung gehen.

2. 30min in TLA-100 Zentrifuge bei 90krpm. Überstand auf zwei Röhrchen verteilen (50ul für später und der Rest). Pellet in Puffer F Resuspendieren, umrühren und Klumpen im Ultraschallbad zerkleinern. Diese Suspension der unlöslichen Membranteile in Eppendorf aufbewahren.

Ultra-Zentrifuge lässt die ungelösten Membrankomponenten absinken und die durch DDM gelösten bleiben im Überstand. Grosse Geschwindigkeit notwendig wegen kleinem Gewicht der Membrankomponenten.

3. Gelöste Membranproteine auf vorbereitete **Ni-NTA Chromatographie-Säule** geben und 30min auf einer Schaukel-Plattform einwirken lassen.

Dem IICB<sup>Glc</sup> Protein wird 30min Zeit gegeben, um mit dem **His-Tag** an den Nickel-Chelator zu binden. Vorbereitung der Säule: Spülen mit 3x Bedvolume (Volumen der Säulen-Matrix = 2ml) Puffer G\* und dann 2x Buffer G.

Puffer G\*:

- Natriumphosphat-Puffer auf pH 8
- 0.5 M NaCl. (Viel Salz zum **Abwaschen** von Proteinen)
- **Mercaptoethanol** (verhindert Disulfidbrücken)

Puffer G: Wie G\*, aber mit DDM. Teures Detergenz, darum erst am Schluss, wenn es nötig ist, um dann die Proteine durch die Säule in Lösung zu behalten.

4. Überschüssige Flüssigkeit abfliessen lassen. Säule nacheinander mit je 10ml Puffer G, Puffer H und Puffer I<sup>25</sup> spülen und 2ml **Fraktionen sammeln**. Mit Puffer I<sup>200</sup> spülen und 1ml Fraktionen sammeln.

Puffer H: Wie Puffer G, aber auf pH 6. Löst ebenfalls ungebundene Proteine ab.

Puffer I<sup>25</sup>: Wie Puffer G, aber mit 25mM **Imidazol** und pH 7.5. Imidazol ist der Benzolring mit einem N-Atom drin, der die Seitenkette von **Histidin** ist. Dadurch **verdrängt** er das an die Säule gebundene Protein und es wird in die Fraktionen gelöst. Puffer I<sup>200</sup>:

Wie I<sup>25</sup>, aber mit 200mM Imidazol. Durch die hohe Konzentration wird der grösste Teil des gebundenen His-Taged Proteins losgelöst.

5. Im Spektrophotometer die Absorbanz bei 280nm jeder Fraktion messen. Als Referenz jeweils die Reinform des gleichen Puffer wie in der Fraktion verwenden.

Puffer G.

#	1	2	3	4	5
A	2.8	2.5	1.57	1.05	0.67

Puffer H.

#	1	2	3	4	5
A	0.91	1.37	0.91	0.54	0.27

Puffer I<sup>25</sup>:

#	1	2	3	4	5
A	0.22	1.07	0.36	0.15	0.11

Puffer I<sup>200</sup>:

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	-0.25	0.27	0.57	0.11	0.10	0.09	0.08	0.09	0.09	0.10

Die Absorbanz sinkt durch das Waschen von 2.8 auf 0.27. Dies zeigt uns, dass wir die ungebundenen Proteine sehr gründlich aus der Säule herausgespült haben. Fraktion 2 und 3 bei Puffer I<sup>200</sup> haben die höchste Absorbanz und daher die grösste Konzentration vom gesuchten IICB<sup>Glc</sup> Protein.

6. Graph machen von optischer Dichte (Absorbanz) gegen Elutions-Volumen und Bufferänderungen angeben.

Man erkennt jedesmal beim Spülen mit einem neuen Buffer einen Peak, der uns anzeigt, dass tatsächlich Protein herausgewaschen wurde. Bei der ersten Fraktion von I<sup>200</sup> ist der Wert unter Null, weil noch etwas vom letzten Buffer (I<sup>25</sup>) durchkam.

7. Die drei (bei uns zwei) Fraktionen mit der grössten Konzentration (2 und 3) **poolen**.

8. Fraktionen in einen **Dialyse-Schlauch** geben und über Nacht in 200ml Puffer X lassen.

Puffer X:

- 10mM NaPi pH 7 (im Schlauch 50mM)
- 50mM NaCl (innen 500mM)
- 0.1mM **DTT (Dithiothreitol)**. SH-CH<sub>2</sub>-COH-COH-CH<sub>2</sub>-SH. Modifizierter Zucker-Alkohol. Stärker als als Merkatethanol im Spalten von Disulfidbrücken. Konnte man vorher nicht verwenden, da es mit Nickel-Chelator in der Säule komplexiert hätte.
- 0.4 mM DDM (Dodecyl Maltopyranosid), nichtionische Detergenz. Gleiche Konz.

Bei den ersten beiden Indigrenzien weniger konzentriert, so dass sie aus dem Schlauch raus diffundieren. Bei DDM gleich, weil es natürlich im Schlauch über dem cmc bleiben muss. Das starke DTT kommt neu dazu, damit keine SS Brücken entstehen, die Proteine verklumpen könnten.

9. & 10. Zum Schluss Säule **regenerieren** und Kontroll-Samples auf Eis.

## FRAGEN PRAKTIKUM ERNI (Proteinreinigung)

1. Wie könntest du rausfinden, ob und wie stark deine Membrane mit zytosolischen Proteinen verunreinigt sind?

Antikörper gegen bestimmte zytosolische Enzyme.

Enzym-Assay für ein zytosolisches Enzym (z.b. aus der Glykolyse)

## 2. Welche Eigenschaften eines Detergens müssen berücksichtigt werden, bevor man es für die Lösung von Membranproteinen verwenden kann?

Es gibt anionische, kationische und ungeladene Detergenzien.

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$ ,

Es ist kationisch und denaturiert daher Proteine. Nicht-Ionische Detergenzien sind schonender. Wir verwenden (DDM) Dodecyl-Maltopyranosid, eine Alkylkette  $(\text{CH}_2)_n$  mit einem Zucker aus zwei Glukose-Einheiten.

Der **cmc** (critical micellar concentration) ist ebenfalls sehr wichtig. Man darf ihn nie unterschreiten, weil sonst das Membranprotein nicht mehr in Lösung bleibt. Er sollte bei  $1.5 \cdot \text{cmc}$  sein und für das erstmalige in Lösung bringen noch höher.

## Wie kann man Detergenzien austauschen?

Mit Gelfiltration oder Dialyse, welche bei hohem cmc besser funktioniert, da der Konzentrationsgradient gross ist.

## 3. Wie und wo werden Affinitäts-Tags an Proteinen befestigt? Welche anderen Tag ausser dem His-Tag kennst du? Was muss man beachten, bevor man entscheidet, welches Tag man verwenden soll?

Das 6His-Tag wurde durch genetische Addition am Carboxy-Ende befestigt.

**Alternativen:** Mit Antikörper gegen das Protein Affinitäts-Chromatographie. Oder genetisch eine Biotin bindende Domäne an das Protein anhängen und dann mit Avidin-Affinität reinigen. Oder ein bestimmtes Epitop genetisch anhängen und dann mit dem Antikörper gegen dieses Epitop Affinitätschromatographie.

## 4. Welches sind die Stärken und Schwächen des His-Tags?

**Vorteil** von His-Tag: Funktioniert auch, wenn das Protein **denaturiert** ist (z.B. bei Incu-sion Bodys, welche in Harnstoff gelöst werden können), weil die Komplexbindung von Imidazol-Ring (His) mit Ni-Chelator immer noch funktioniert.

**Nachteil** von His-Tag: Es gibt **Kreuzreaktionen** mit anderen Proteinen, welche His-Tag ähnliche Stellen haben, z.B. His-Rich-Proteins.

Nachteil von Antikörper gegen das Protein: Man braucht immer einen anderen Antikörper auf der Chromatographie-Säule, während man bei His-Tag, Biotin/Avidin und Epitop immer die gleiche für alle Proteine verwenden kann.

## Experiment 3 – Bestimmung der IICB<sup>Glc</sup> Aktivität

1. Herstellung des Master-Mix. Er enthält Wasser, PEP (Phosphoenolpyruvat), HIC9-Extrakt (mit Enzymen I, HPr, HA<sup>Glc</sup>) und anderes.

Dies sind die Zutaten, welche es braucht, damit das Enzym seine Aktivität unter Beweis stellen kann.

### PTS (Phospho Transferase System):

$\text{PEP} \rightarrow \text{P}_i \rightarrow \text{HIC9 (EI, HPr, IIA}^{\text{Glc}}) \rightarrow \text{IICB}^{\text{Glc}} \rightarrow {}^{14}\text{C-Glukose-P.}$

2. Dreizehn RGs beschriften und je 100ul MasterMix rein.

3. Nun macht man von folgenden Lösungen eine 1:500 Verdünnung (ausser bei der letzten nur 1:10), damit die Aktivität nicht zu hoch wird:

- Membrane (Vesikel mit Proteinen) → **memb**

- Überstand (Mizellen aus Detergenz und Membranprot.). → **sup**
- Unlösliche Membran (Schrott, der auch im Vesikel war) → **insol**
- Gereinigte Membranproteine (nach Nickel-Säule) → **pure**

Von jeder der Verdünnung gibt man nun 1ul, 2ul und 3ul in ein RG. In das 13te gibt man nichts, weil man hier das Hintergrundrauschen messen will.

Man nimmt 1,2 und 3ul, damit man erkennt, ob man ein **Plateau**, also die obere **Grenze** des **Messgeräts**, erreicht hat. Wenn die drei **Messwerte** für eine Proteinform **linear** zunehmen, dann sieht man, dass es eine **gute Messung** war.

4. Im 37 Grad Celsius Wasserbad für 30min **inkubieren** und dann mit je 2ml eiskalten Wasser die Reaktion stopen.

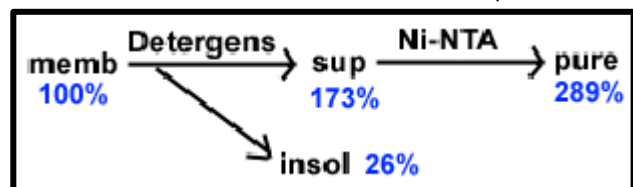
5. Den Anionen-Austauscher durch Waschen mit HCl und dann H<sub>2</sub>O vorbereiten.

6. Inhalt der 13 RGs in **den Anionen-Austauscher** pipetieren. Die nicht phosphorylierte <sup>14</sup>C-Glukose mit Wasser auswaschen. Die **phosphorylierte** Glukose **bleibt** am Anionenaustauscher **haften**, weil sie **negativ** geladen ist. Nun die Scintillations-Röhrchen unter den Austauscher stellen und die phosphorylierte <sup>14</sup>C-Glukose mit HCl auswaschen. Die Röhrchen aus dem Anionenaustauscher nehmen und je 2ml Scintillations-Cocktail zugeben. Röhrchen zuschrauben und mischen.

7. Im Scintillations-Zähler während 2min die Zerfälle messen:

#	Form	Assay [ul]	Total [ul]	Verd. 1:x	Count [cpm]	-HR [cpm]	Total [cpm*ul*x]	Ausbeute [%]	Mittel [%]
1	Control	0	0	0	335	0	0	0.00	
2	Memb	1	800	500	550	215	8600000	100.0	
3	Memb	2	800	500	885	550	22000000	100.0	
4	Memb	3	800	500	2109	1774	70960000	100.0	100
5	Sup	1	1600	500	486	151	12080000	140.5	
6	Sup	2	1600	500	494	159	12720000	57.8	
7	Sup	3	1600	500	3182	2847	227760000	321.0	173.08
8	Insol	1	1000	10	3598	3263	32630000	37.9	
9	Insol	2	1000	10	6943	6608	66080000	30.0	
10	Insol	3	1000	10	9242	8907	89070000	12.6	26.843
11	Pure	1	2000	500	413	78	78000000	90.7	
12	Pure	2	2000	500	929	594	59400000	270.0	
13	Pure	3	2000	500	3928	3593	359300000	506.3	289.01

Man erkennt, dass die Messungen für 1,2 und 3ul nicht linear zunehmen, woraus man auf eine schlechte Messung schliessen kann. Die obere Messgrenze haben wir nicht erreicht. Trotzdem sieht man, dass Protein-Ausbeute durch die Reinigung erhöht werden konnte.



## FRAGE PRAKTIKUM ERNI (Michaelis-Menten)

3. Reaktion als Michaelis-Menten. Was ist hier Substrat, Produkt und Enzym?

**Substrat:** <sup>14</sup>C-Glukose und PEP

**Produkt:** <sup>14</sup>C-Glukose-6-Phosphat und Pyruvat

**Enzym:** PTS (Phospho Transferase System = mehrere Enzyme)

Glukose sollte während der ganzen Inkubation in sättigender Konzentration vorhanden sein. Am Schluss sollte noch ein Substrat-Überschuss von 80% sein, damit die Reaktion nicht verlangsamt. Unter dieser Bedingung ist die Menge an Produkt zur Menge Enzym proportional. Aus unserer Messung können wir daher auf die Enzymkonzentration schliessen. Normaler MM:  $d[P]/dt = k_{cat} * [E] * [S] / (k_m + [S])$ . • MM mit  $[S] \rightarrow \infty$ :

$$d[P]/dt = k_{cat} * [E]_0$$

Problem für MM: Mehrere Produkte, Substrate und Enzyme. Wir haben aber die anderen Enzyme sowie alle Substrate in hoher Konzentration vorhanden, so dass nur IICB<sup>Glc</sup> limitierend ist und gemessen wird.

### Experiment 4 – Proteolyse von IICB<sup>Glc</sup> und phosphoriliertem IICB<sup>Glc</sup>

Wir verwenden **limitierte Proteolyse**. Das bedeutet, dass man eine tiefe Protease-Konzentration und kurze Inkubationszeit verwendet, so dass nur die empfindlichsten Bindungen gespalten werden.

Die Konzentration von IICB<sup>Glc</sup> im MasterMix sollte 200ug/300ul sein. Wir messen unsere Konzentration über die optische Dichte: 585ug/ml. In den MasterMix können wir höchstens 200ul Enzym-Suspension zugeben, welche die gewünschten 200ug enthalten sollte. In 200ul haben wir aber nur 117ug Protein. Deshalb müssen wir es etwa um das doppelte **aufkonzentrieren**. Dazu geben wir es in einen **Centricon-Concentrator** und in die Zentrifuge, so dass Teilchen, die leichter als 50kD sind durch die Membran in das untere Gefäss können und die schwereren wie IICB<sup>Glc</sup> oben bleiben. Nach dem Aufkonzentrieren haben wir 1173ug/ml, also 234ug/200ul. Wir brauchen aber nur 200ug, deshalb nehmen wir vom aufkonzentrierten nur  $1000ul * 200ug / 1173ug = 170ul$ . Noch den Rest vom MasterMix (HIC9, PTF-1, MgCl<sub>2</sub>) zugeben und mit 34ul auf Total 300ul auffüllen. Nun den MasterMix auf zwei gleiche Portionen verteilen. In die eine 1ul PEP geben und in die andere die gleiche Menge H<sub>2</sub>O. Das **PEP** verursacht eine Phosphorilierung am Cys421 von IICB<sup>Glc</sup>, wodurch dieses eine **Konformation-sänderung** macht. Dadurch werden einige Chymotrypsin-Schnittstellen unzugänglich gemacht, was man im SDS-PAGE als eine Veränderung im Bandenmuster feststellen kann. Eine Verdünnungsreihe von Chmyotrypsin von 1:10 bis 1:640 erstellen. Dann gemäss folgender Tabelle je 15ul MasterMix mit und ohne PEP abwechslungweise auf 17 RGs mit je 5ul absteigender Chymotrypsin-Konzentration verteilen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<b>PEP</b>		JA		JA		JA		JA		JA		JA		JA		JA	
<b>ChyTry[1:x]</b>	10	10	10	20	20	40	40	80	80	160	160	320	320	640	640		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	15ul															5ul	5ul

**SDS-PAGE Gel** laden, Strom laufen lassen und mit Coomassie Blau färben:

<b>Slot</b>	<b>Interpretation</b>
<b>1</b>	Verdünnen mit H <sub>2</sub> O zur Kontrolle des Gels → Banden nur halb so stark.
<b>2 &amp; 3</b>	ChyTry Konzentration noch zu hoch. Es wird zu stark verdaut.
<b>4</b>	Durch die Phosphorilierung wurde Protein nur teilweise verdaut.
<b>5</b>	Die obere Bande von Slot4 wurde hier verdaut, da Protein nicht phosphosiliert war. → Untere Bande.
<b>6 &amp; 7</b>	Wie 4&5, aber noch deutlicher!

<b>8 &amp; 9</b>	Fast wie 6&7, aber die obere Bande bei Slot9 wird nicht mehr ganz verdaut, da die ChyTry Konzentration nicht mehr so hoch ist.
<b>10</b>	ChyTry Konzentration nun so tief, dass das Protein noch weniger verdaut wird, wenn es in der phosphorylierten Konformation ist.
<b>11</b>	Durch tiefe Protease-Konzentration unvollständigen Verdau der oberen Bande, aber deutlicher Unterschied zu Slot10.
<b>12, 13, 14, 15</b>	ChyTry Konzentration zu niedrig.
<b>16 &amp; 17</b>	Kontrolle ohne ChyTry. Obere ungeschnittene Bande einigermaßen sichtbar.

## FRAGEN PRAKTIKUM ERNI (Konformationsänderung)

### 1. Wie beeinflusst die Phosphorylierung die Proteolyse von IICB<sup>Glc</sup>?

Durch die Phosphorylierung ändert sich die Konformation des Proteins, so dass eine Erkennungstelle für die Protease nicht mehr zugänglich ist. Daher beobachten wir eine verminderte Proteolyse.

### 2. Welche Form von IICB<sup>Glc</sup> ist stabiler? Die phosphorylierte Form.

### 3. Wie könnte die exakte Position der Protease-Schnittstelle bestimmt werden?

Durch Erzeugen von verschiedenen **Punktmutationen** an allen möglichen Stellen im IICB<sup>Glc</sup> Gen. Mit jedem dieser Punktmutanten Experiment 4 durchführen.

Das Protein IICB besteht aus einer **C-Domäne** (Transmembranteil mit alpha-Helices und Loop) und einer **B-Domäne** (besteht vor allem aus Beta-Sheets, enthält Phosphorylierungs-Stelle). Protease kann nur zwischen den zwei Domänen schneiden, weil dort keine Sekundärstrukturelemente vorhanden sind. B-Domäne ist löslich und geht beim Schneiden sofort kaputt. C-Domäne hingegen ist stabil und auf dem Gel die untere Bande. Um sicher zu gehen, dass das wirklich so ist, könnte man die untere Bande Edman sequenzieren. Dann kennt man den N-Terminus und kann diesen vergleichen mit dem aus der Datenbank. Bei Übereinstimmung handelt es sich um die C-Domäne. Wie könnte man nun die exakte Schnittstelle bestimmen? Ist ein Problem, weil die am C-Terminus der C-Domäne liegt, und diesen kann man nicht Edman-Sequenzieren!

- Man könnte aber ein kleines Fragment von **C-Terminus abschneiden** und es dann vom N-Terminus her **Edman** sequenzieren.
- Man könnte auch den **C-Terminus** mit einer Carboxy-Peptidase her **verdauen** und die einzelnen Fraktionen, die man nach bestimmten Zeitpunkten bekommt, analysieren. Es handelt sich also um eine zeitliche Abfolge, man muss Kinetik machen! Man muss dann einfach schauen, welche AS am meisten vorkommt in den einzelnen Fraktionen. Es wird ja nicht nur ein einziges Protein geschnitten, sondern ganz viele.
- **Massenspektrometrie:** Die Masse der unteren Bande wird bestimmt. Man weiss dann sowohl den N-Terminus wie auch die Masse des Fragmentes. Dann schaut man, wieviele AS es sein müssen, damit man ein Peptid dieser Masse bekommt. Abzählen vom N-Terminus her. AS-Sequenz von IICB ist ja bekannt

#### 4. Welche anderen Methoden gibt es noch, um zu überprüfen, ob sich die Konformation eines Proteins ändert?

Man ist prinzipiell immer angewiesen auf einen indirekten Nachweis, da man die Konformationsänderung ja nicht direkt sieht.

- **Protease-Resistenz** (--> Praktikum)
- **Absorption:** Es könnte durch die Konformationsänderung zu einer Verlagerung der absorbierenden AS kommen. Problem: Es hat nicht so viele absorbierenden AS (Trp, Tyr, Phe). Trp verschiebt sich durch die Konf.änderung von apolar zu polarer Umgebung → Verschiedene Absorptionsspektren. Man sieht aber leider fast keinen Unterschied zwischen den zwei Spektren.
- **Fluoreszenz:** Sehr empfindlicher Reporter für Veränderungen! Sie wird bestimmt durch Intensität und Wellenlänge. Die **Intensität** wird grösser, wenn Trp von einer polaren in eine apolare Umgebung kommt, weil die Quantenausbeute erhöht wird. Dies kommt davon, dass im polaren Medium verglichen mit dem apolaren die von einem Molekül absorbierte Energie besser auf andere Arten als die Fluoreszenz abgegeben werden kann. Dabei wird die Anregungsenergie auf andere Moleküle (zB Wasser) abgegeben oder über Vibration in Wärme umgewandelt. Die **Wellenlänge** hängt von der Umgebung des Chromophors ab. In polarem Medium wird der ebenfalls polare angeregte  $\pi^*$  Zustand stabilisiert, weil sich die polaren Moleküle energetisch günstig um ihn anlagern können. Der Grundzustand  $\pi$  wird destabilisiert, weil die polaren Moleküle der Lösung nach der Energieabgabe des Chromophors immer noch gleich angeordnet sind, was um den nun weniger polaren Chromophor eine energetisch höhere Anordnung ist. Dadurch wird die Energiedifferenz kleiner, die Wellenlänge der emittierten Photonen grösser und wir haben eine Rotverschiebung. Im apolaren Medium bekommen wir aus den selben Gründen eine Blauverschiebung.
- **Acrylamid-Quenching:** Ein Teil der Energie, die als Fluoreszenz ausgestrahlt werden sollte, wird auf Acrylamid übertragen (Excitontransfer). Je exponierter die Trp durch Auffaltung, desto mehr Übertragung der Energie auf Acrylamid (=Quenching). Man vergleicht also die Quenching-Unterschiede zwischen den Konformationen.

#### Experiment 5 – Reversibles Auffalten der dimerischen IAB<sup>Man</sup> Untereinheit

Wir wollen das reversible Auffalten des IAB<sup>Man</sup> Proteins mit **CD (circular dichroism)** und **Fluoreszenz Messung** beobachten. Dazu denaturieren wir das Protein mit **GuHCl** (Guanidium Hydrochloride) und verdünnen nach zwei Stunden mit Puffer, so dass es sich während drei Stunden wieder falten kann.

Zuerst mischen wir die Proben für das Beobachten der reversiblen Auffaltung an. H10C/H175C ist ein durch Komplementierung funktionierender IAB<sup>Man</sup> Transporter.

	H10C/H175C	Puffer	GuHCl	Inkubation	Puffer	GuHCl
<b>N (nativ)</b>	X	X		X	X	
<b>R (refolded)</b>	X		X	X	X	
<b>U (denatured)</b>	X		X	X		X
<b>BgN</b>		X		X	X	
<b>BgU</b>		X	X	X		X

Der erste Puffer braucht es, um das Volumen von GuHCl auszugleichen.

Nach der Inkubation gibt man fast 2ml Puffer zu, um durch diese starke Verdünnung von GuHCl das Protein wieder falten zu lassen. Das GuHCl nach der Inkubation braucht es wieder nur zum Volumen ausgleichen. BgN und BgU dient zur Bestimmung der **Hintergrund-Störung** durch den Puffer bei N und U.

Nun messen wir die **UV-Absorbtion** von bgN, bgU und N zwischen 200 und 340nm, welche für die CD-Messung nicht über 0.3OD sein sollte. Die drei Proben sind repräsentativ. Man kann sehen, dass der OD unterhalb von etwa 230nm höher als 0.3 wird.

Nun messen wir die **CD Spektren** und subtrahieren das Hintergrund-Signal. Das native Protein weist am meisten Sekundärstrukturen auf, wie man an der Abweichung der Kurve von der Null-Linie gegen unten sehen kann. Peak bei 210nm. Das denaturierte zeigt nur noch relativ wenige. Das renaturierte kommt fast wieder an die gleiche Sekundärstruktur wie das native.

Das **CD-Spektrometer** ist folgendermassen aufgebaut:

- **LASER** Lichtquelle
- **Monochromator**: Optisches Gitter filtert durch Winkelveränderung Wellenlängen.
- **Polarisator**: Polarisiert das Licht linear.
- **Modulator**: Piezo-Kristall, welcher durch Anlegen von Spannung seine Form verändert und so zirkulär polarisiertes Licht erzeugt.
- **Probe** in Küvette
- **Photomultiplier**: Misst eintreffende Photonen. Aus dieser Information und der Wechsellspannung, die an den Piezokristall gelegt wurde, kann man nun dem CD ausrechnen. Das heisst, den Unterschied zwischen der Absorbtion von links und rechts polarisiertem Licht.

## FRAGEN PRAKTIKUM ERNI (UV & CD)

### 1. Wie beeinflusst GuHCl und das Protein UV-Absorbtions-Spektrum des Puffers?

**GuHCl** (bgU): Oberhalb von 250nm keine Beeinflussung, aber unterhalb eine grössere Absorbtion von GuHCl. • **Protein**: Hat eine grössere Absorbtion als der Puffer. Der Peak bei 280nm (Peptidbindung) sollte auch nicht mehr als 0.3 OD Differenz zum bg haben.

### 2. Wie unterscheiden sich die CD-Spektren des nativen (gefaltet) und des ungefalteten Proteins? Wo sind die Unterschiede am grössten?

Das gefaltete Protein absorbiert viel mehr rechts polarisiertes Licht als das ungefaltete. Das zeigt, dass das gefaltete mehr Sekundär-Strukturen aufweist, was für ein Protein normal ist. Der Unterschied ist bei 210nm am grössten.

### 3. Weicht dieses Resultat von den theoretischen Voraussagen ab?

Nein! Ausser dass unterhalb von 230nm kein Peak gegen oben kommt, der theoretisch für Sekundärstrukturen typisch ist. Aber in diesem Bereich ist die Absorbtion zu hoch,

wie man an der UV-Messung sehen kann, so dass gar keine Photonen mehr durch das Sample durchkommen.

#### 4. Welche Änderung zeigt an, dass das Protein U ungefaltet ist?

Starke Abnahme der Absorption bei 210nm zeigt, dass es weniger Sekundärstruktur hat.

#### 5. Was für ein Spektrum würde man bei einem Mix von nativen und aufgefaltetem Protein erwarten? Wie könnte man auf diesem Spektrum den prozentualen Anteil von nativem und aufgefaltetem Protein bestimmen?

Ich erwarte ein Spektrum, das in der Mitte zwischen den Spektren der einzelnen Komponenten liegt. Den prozentualen Anteil kann man berechnen, wenn man die Spektren der Anteile kennt. Man nimmt die Amplitude des aufgefalteteten als 0% und den des gefalteteten als 100% und berechnet den prozentualen Anteil der Amplitude des Mixes.

Nun messen wir das **Fluoreszenz-Spektrum** unserer Proben. Dann geben wir zu N und U Acrylamid und messen nochmal. Acrylamid ist ein **Quencher**, welcher die Fluoreszenz von Tryptophan auslöscht, wenn es nicht im Innern des Proteins geschützt ist. Daraus kann man auf die **Sekundärstruktur** schliessen.

### FRAGEN PRAKTIKUM ERNI (Fluoreszenz)

#### 1. Unterschied der Spektren des gefalteten (N) und ungefalteten (U) Proteins?

Die **Intensität** von N ist **größer**, weil Tryptophan beim gefalteten Protein oft im Innern des Proteins, also in einer apolaren Umgebung ist. In dieser Umgebung gibt es keine anderen Arten der Abregung als die Fluoreszenz für ein Molekül. Bei U ist sie kleiner, weil beim aufgefalteten Protein die Tryptophane in polarer Umgebung sind und dort die Anregungs-Energie auch auf andere Moleküle abgegeben werden kann.

Ausserdem ist das **Spektrum** von U gegenüber dem von N **Rotverschoben**, was auch zeigt, dass sich bei U die Tryptophane in einer polaren Umgebung, also nicht im Innern eines gefalteten Proteins befinden.

#### 2. Welche Parameter des Fluoreszenz haben sich zwischen N und U verändert?

Intensität (tiefer bei U) und Wellenlänge (Rotverschiebung bei U).

#### 3. Welche der Änderung zeigen, dass Protein U aufgefaltet ist? Was für ein Spektrum würde man bei einem Mix von N und U erwarten? Wie könnte man die prozentualen Anteile berechnen?

Rotverschiebung und tiefere Intensität, da sie auf polare Umgebung hinweisen, wie sie in der Lösung und nicht im gefalteten Protein vorkommt. Bei einem Mix erwarte ich Peak und Intensität zwischen N und U. Differenz von Peak und Intensität der Messung U und N als 100% annehmen. Messung des Mix mit Proportionalität prozentualen Anteil zuweisen.

#### 4. Beeinflusst die Zugabe von Acrylamid die Fluoreszenz-Spektren?

Jep, das Acrylamid wirkt als Quencher. Das bedeutet, dass es die Anregungs-Energie ableitet und so die Fluoreszenz auslöscht. Acrylamid kann aber nicht ins inne-

re einer gefalteten Proteins gelangen. Da die Intensität von U+Acrylamid deutlich tiefer als N+Acrylamid ist, kann man daraus schliessen, das U aufgefoldet ist.

## Phosphotransferase Assay

Das besondere an diesem Versuch ist, dass wir zwei verschiedene **Mutanten** von II-AB<sup>Man</sup> verwenden:

- **His10Cys**: Das Histidin an Position 10 ist die entscheidende Phosphat-Bindungsstelle in der A Untereinheit von IIAB<sup>Man</sup>. Sie wurde durch Cysteine ersetzt, so dass sie nicht mehr funktionsfähig ist.
- **His175Cys**: P-Bindungsstelle der B Untereinheit ist deaktiviert.

Alleine sind beide Mutanten **ohne Funktion**, aber wenn man sie mischt, denaturiert und renaturiert, dann gibt es interallele **Komplementation**. Der Grund ist, dass IIAB<sup>Man</sup> als **Homo-Dimer** funktioniert. Wenn ein H10C Mutant mit einem H175C einen Dimer bildet, dann kann das Phosphat von A des H175C über das B des H10C auf die Mannose (oder Glukose) übertragen werden.

Diesen Effekt wollen wir durch einen erneuten Aktivitäts-Assay nachweisen. Dazu müssen wir noch vier Proben anmischen:

A	IIAB <sup>Man</sup> nativ.
B	IIAB <sup>Man</sup> mit GuHCl denaturiert.
C	H10C Mutant
D	H175C Mutant

Der MasterMix ist wie bei Experiment 3, aber mit den Enzymen für den Mannose Transporter. Der Assay ist auch wie bei Exp3, also zeige ich einfach die Resultate:

- Bei Wildtyp & Mutant-Mix Refold erwartet man eine grosse Aktivität. Die Aktivität vom Wildtyp ist 100%. Beim Refold ist die Aktivität mit 93% sehr gut.
- Beim nativen Mutanten-Mix sollte noch keine Aktivität da sein, da es dazu erst ein De/Renaturieren braucht. Mit 17% ist auch fast keine da.
- C und D sind tief genug, für dass die Mutanten alleine keine Aktivität haben sollten.
- Beim denaturierten B sollte es nicht 93% sein. Sehr eigenartig ist, dass B und R die gleichen Werte geben. Denaturieren bei B hat vermutlich nicht geklappt.

### FRAGEN PRAKTIKUM ERNI (MutantenMix & PTS-Assay)

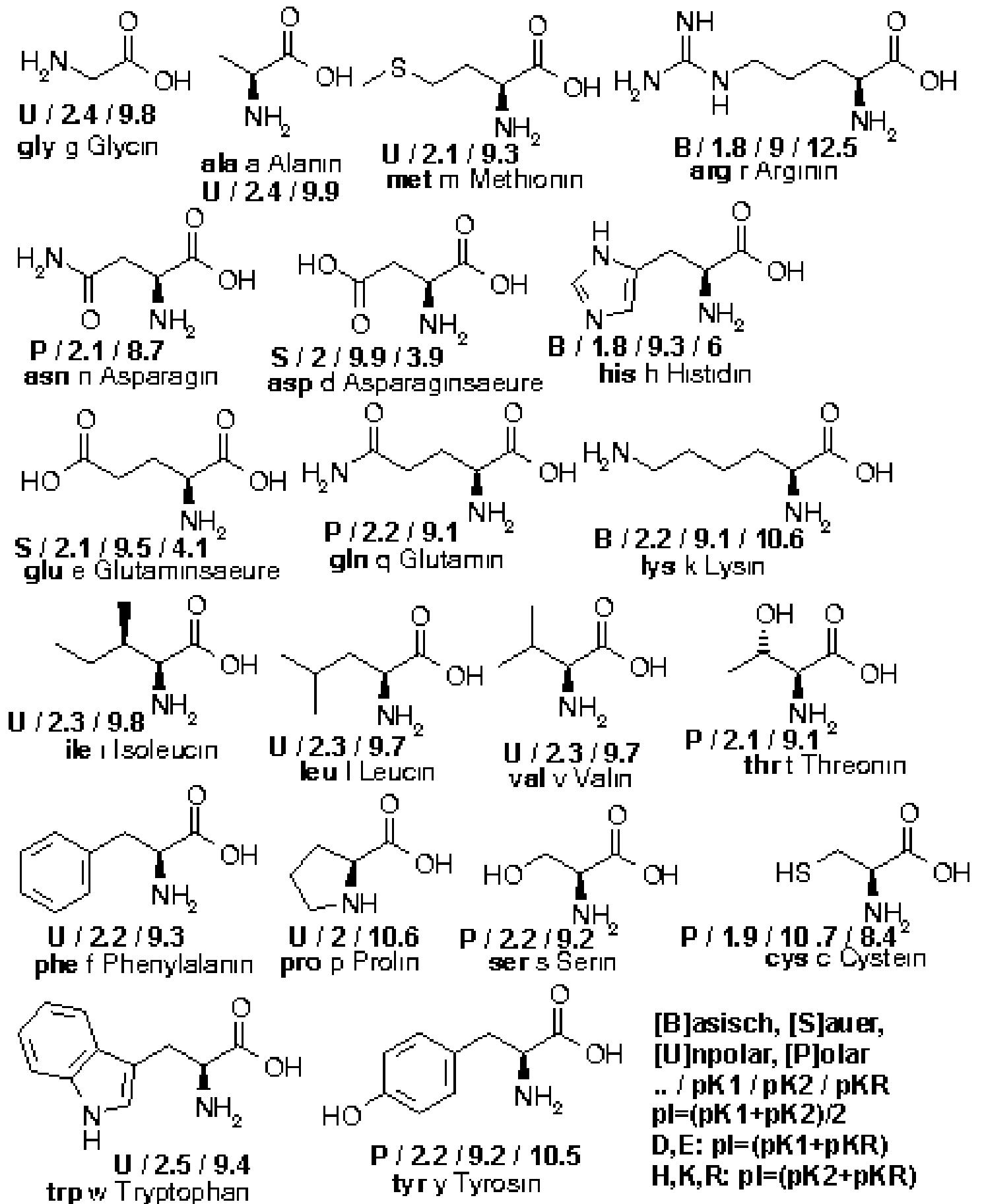
#### 1. Vergleiche Aktivitäten der IIAB<sup>Man</sup> Mixtur (N/R) vor und nach De/Renaturierung.

Die Renaturierung (R) hat funktioniert, da sie fast auf den Wert des Wildtyps kommt. Der native Mix (N) sollte keine Aktivität haben, da sich ohne De/Renaturieren keine Heterodimere bilden können, die zur Komplementation fähig wären.

#### 2. Was sind die Grenzen des Phosphotransferase-Assays im Betracht auf die Konzentration der IIAB<sup>Man</sup> Mixturen?

Man darf keine zu hohe Konzentration des zu messenden **Enzyms** haben, weil es der **limitierende** Faktor der ganzen Reaktion sein muss. Wenn man zuviel hätte, dann wäre das Substrat zu schnell aufgebraucht oder die anderen Enzyme des PTS wären limitierend. Deshalb muss man auch Substrat und PTS-Enzyme in genügender Menge

zugeben. Falls es nötig ist, muss man die Protein-Proben, deren Aktivität man bestimmen will, verdünnen. • **Frank-Condon Prinzip:** Energiereichster Übergang ist vom Grundzustand in den Zustand vertikal darüber. Andere  $\ddot{U}$  weniger Intensiv.



Frequenz (in Hz)	Wellenlänge (in m)	Wellenart	Auftreten und Verwendung	Erzeugung		
$10^1$		elektrische Wellen	Wechselstrom	Wechselstrom-Generatoren		
$10^2$	1000 km				technischer Wechselstrom	Übertragung von Sprache und Musik, Telegraphie
1 KHz $10^3$			tonfrequenter Wechselstrom			
$10^4$					mit	
$10^5$	1 km		Langwellen	Rundfunk	gittergesteuerten Elektronenröhren	
1 MHz $10^6$			Mittelwellen			
$10^7$			Kurzwellen			
$10^8$				Fernsehen	oder	
$10^9$	1 m		Ultrakurzwellen	Radar	Laufzeitröhren	
1 GHz $10^{10}$			kosmische Radiowellen			
$10^{11}$	1 cm	Mikrowellen				
$10^{12}$	1 mm	optischer Bereich	Infrarot	Wärme	Schwingungen von Molekülen und Atomen	
$10^{13}$						
$10^{14}$				sichtbares Spektrum	Glühlampen	Übergänge von Elektronen in äußerer Atomhülle
$10^{15}$				Ultraviolett	Quarzlampen	
$10^{16}$				weiche Röntgenstrahlen		Übergänge von Elektronen in innerer Atomhülle
$10^{17}$	1 nm	Röntgenstrahlen				
$10^{18}$				Röntgenröhren		
$10^{19}$	1 Å	Höhen- und Gammastrahlung	harte Röntgenstrahlen			
$10^{20}$				Gammastrahlen	radioaktiver Zerfall	Kernschwingungen
$10^{21}$						Betatron
$10^{22}$				sekundäre Höhenstrahlung	Stoß kosmischer Materie	Synchrotron
$10^{23}$						
$10^{24}$						
$10^{25}$						
$10^{26}$						