

Zellfraktionierung

Enzymaktivitätsbestimmung

Versuch 3

Grundpraktikum Biowissenschaften
für Bioinformatiker
März 2006

Martina Palzer, Ulrich Dossou, R.W. Hartmann

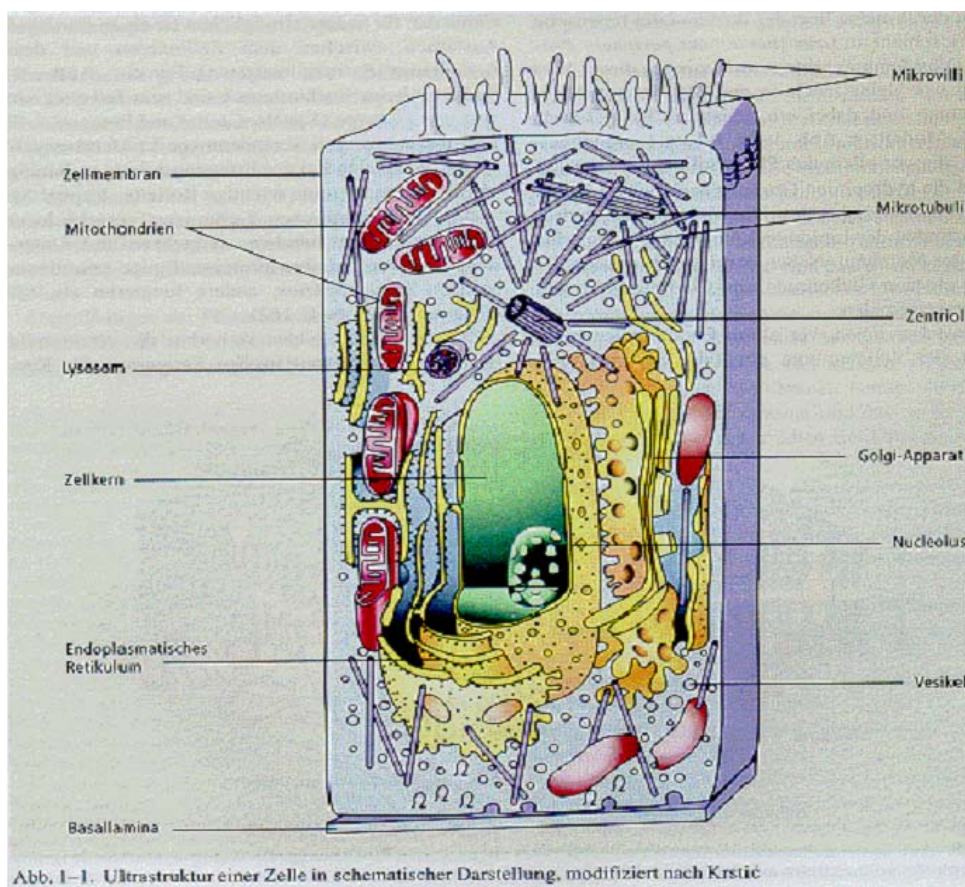
Pharmazeutische und Medizinische Chemie
Universität des Saarlandes



1. Einführung

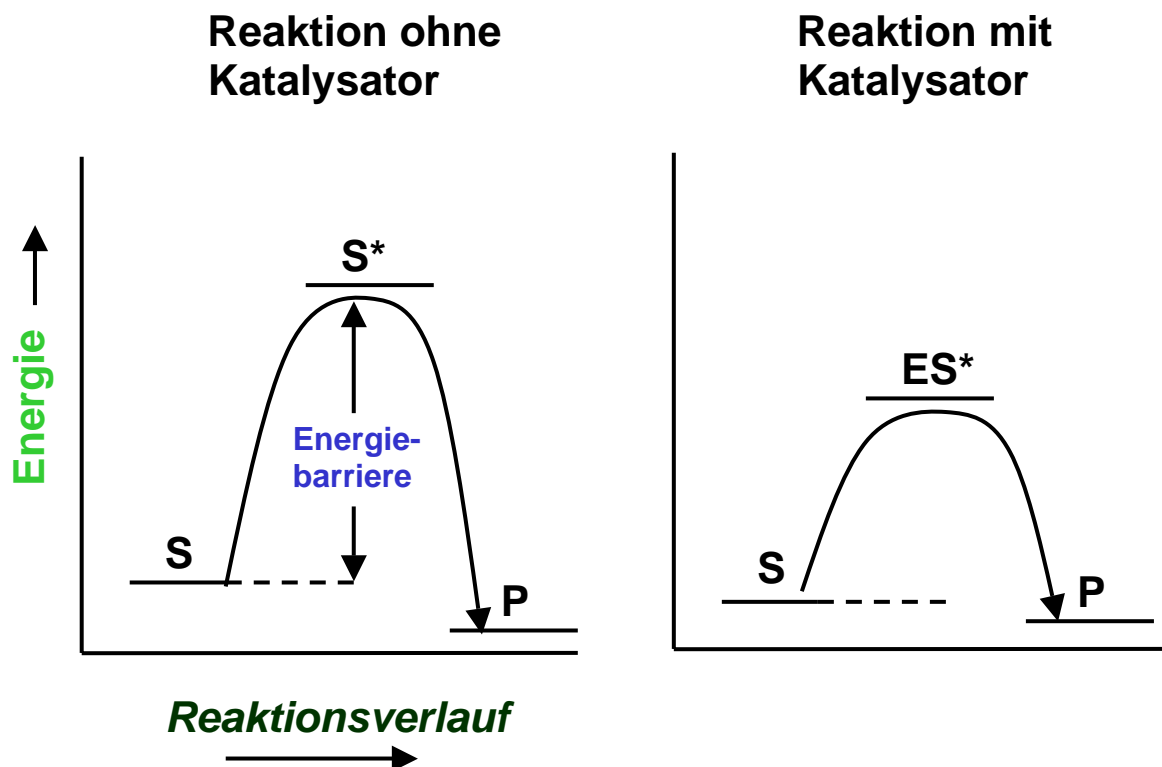
1.1 Die Zelle

Zellen sind die kleinsten selbständigen Funktionseinheiten des Organismus. Sie sind aufgrund ihres Stoffwechsels befähigt, ihre eigene Struktur aufrechtzuerhalten und Arbeit zu leisten. Weiterhin besitzen sie die Fähigkeit zu Wachstum und Vermehrung. Größe, Form und Struktur der Zellen sind vielfältig und stehen in unmittelbarer Beziehung zu ihrer Funktion. Obwohl alle Zellen einen prinzipiell gemeinsamen Bauplan aufweisen, ist es wegen des hohen Grades der Zelldifferenzierung nicht möglich, eine „typische“ Zelle zu beschreiben. Die zellulären Funktionseinheiten: Zellmembran, Zytoplasma, Zellorganellen, Zytoskelett und Zellkern sind jedoch allen Zellen gemeinsam (1).



1.3 Das Enzym Aromatase

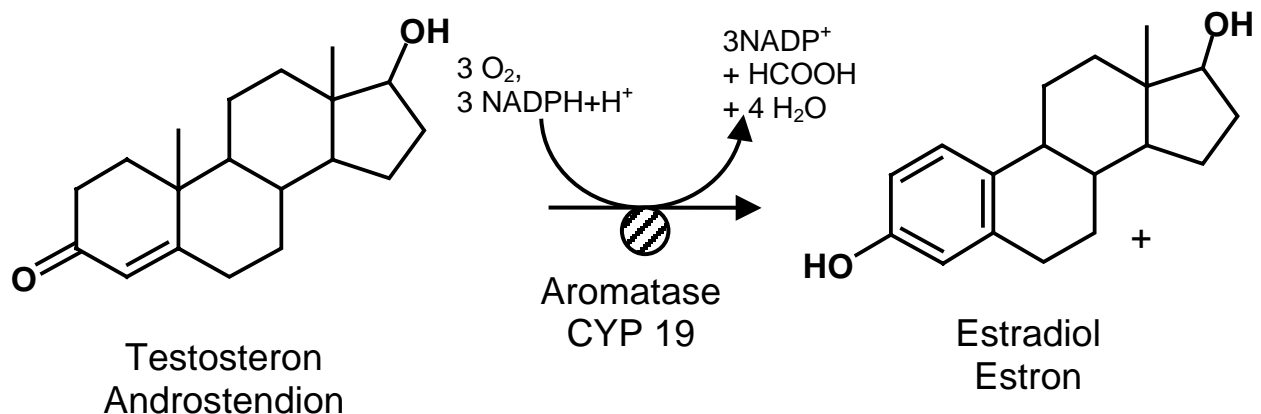
Damit eine chemische Verbindung in eine andere umgewandelt werden kann, ist zunächst viel Energie notwendig. Man sagt, eine Energiebarriere muß überwunden werden. Da diese häufig sehr hoch ist, laufen die meisten Reaktionen nicht spontan ab, sondern bedürfen eines Katalysators. Ein Katalysator ist ein Stoff, der die Energiebarriere einer Reaktion (häufig drastisch) reduziert. Enzyme (E) sind Biokatalysatoren und von Natur aus Proteine. Sie ermöglichen die Umsetzung eines Substrates (S) zum Produkt (P) (3).



Das Enzym Aromatase katalysiert den letzten und wichtigsten Schritt in der Biosynthese von Estrogenen. Estrogene sind weibliche Sexualhormone. Neben der Steuerung des weiblichen Zyklus spielen sie

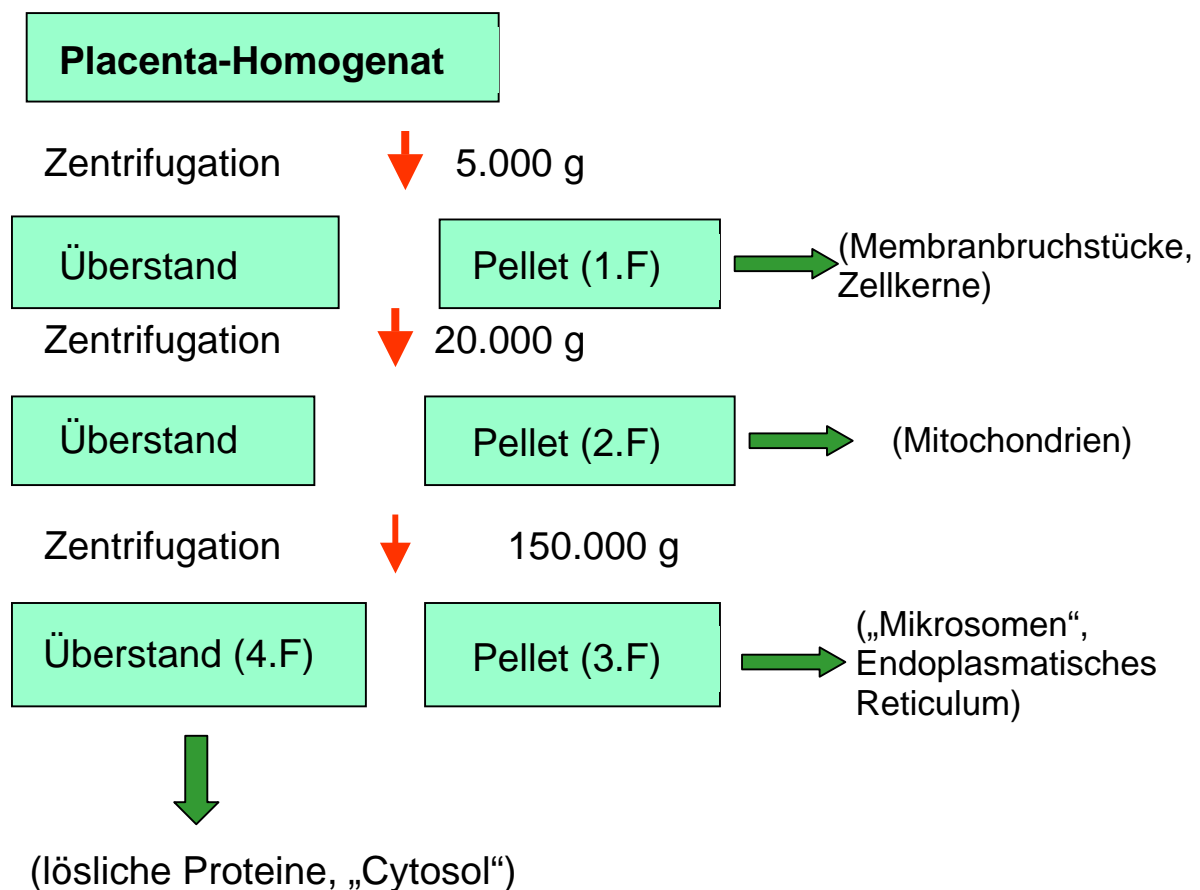
zusammen mit den Gestagenen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Neben den Eierstöcken (Ovarien) spielt die Placenta eine wichtige Rolle für die Estrogenproduktion.

Die Aromatase katalysiert in einer dreistufigen Synthese die Umsetzung der Androgene (wie z. B. Testosteron) in die Estrogene (wie z. B. Estradiol). Für die Reaktion wird molekularer Sauerstoff und als Cosubstrat NADPH (Nicotinamidadenindinucleotid) benötigt. Letzteres liefert die für die Reaktion notwendigen Elektronen über eine zweites Protein, die P450 Reduktase (4).

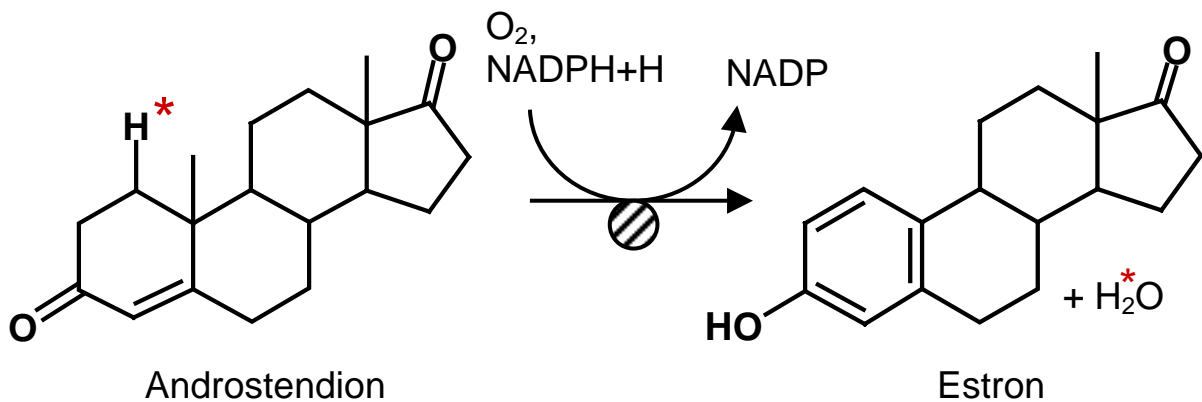


1.4 Homogenisieren, Herstellung der Zellfraktionen und Aromatase-Aktivitätsbestimmung

Für wissenschaftliche Untersuchungen ist es häufig erforderlich die Zellen zu zerkleinern. Dazu müssen die intakten Zellmembranen zerstört werden. Wenn dies schonend geschieht, bleiben zahlreiche Zellfunktionen (Enzymaktivitäten etc.) erhalten. Zur Homogenisierung bewährt haben sich Ultraschallbehandlung oder mechanische Verfahren. Das so erhaltene Homogenat kann durch eine Abfolge von Zentrifugationsschritten in einzelne Fraktionen aufgetrennt werden (fraktionierte Zentrifugation). Im Praktikum werden folgende Fraktionen hergestellt (in Klammern Angabe der enthaltenen wesentlichen Zellbestandteile):



Bei der anschließenden Enzymaktivitätsbestimmung wird die sogenannte $^3\text{H}_2\text{O}$ -Methode verwendet. Dazu wird mit Tritium ($=^3\text{H}, \text{H}^*$) markiertes Androstendion als Substrat verwendet. Es ist an einer Stelle markiert, von der es im Verlauf der Reaktion freigesetzt wird und im gebildeten Wasser erscheint. Nach der Inkubation wird markiertes, nicht umgesetztes Substrat durch Adsorption an eine spezielle Kohle entfernt und die Radioaktivität im Wasser als Maß für die Enzymaktivität bestimmt (5).



Der Arbeitskreis Hartmann hat sich vor einigen Jahren mit der Entwicklung von Aromataseinhibitoren befaßt. Diese Arbeiten haben mit dazu beigetragen, daß heute einige Aromataseinhibitoren zur Therapie des Brustkrebses eingesetzt werden. Heute befaßt sich der Arbeitskreis u.a. mit der Entwicklung von Hemmstoffen ähnlicher Enzyme zur Behandlung des Prostatacarcinoms sowie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (6).

2. Ziel des Versuchs

Es soll ermittelt werden, in welcher Zellfraktion die Aromatase lokalisiert ist und wie hoch die Enzymaktivität ist.

3. Durchführung der Versuche

3.1 Vorbereitungen zur Testung der Enzymaktivität

A) Geräte

Glasgeräte (kaltgestellt im Kühlschrank):

- 2 x 1 l Bechergläser
- 1 x 600 ml Becherglas
- 2 x 250 ml Bechergläser
- 2 x 50 ml Bechergläser
- 2 x 25 ml Bechergläser
- 1 x 500 ml Messzylinder
- Verbandsmull/Zellstoff
- Zentrifugenröhrchen + Deckel
- gr. Büchnertrichter
- Uhrgläser
- Besteck (Scheren, Pinzetten, Stab für den Handmixer)

Sonstige Geräte:

- grüner Kühlbehälter mit Deckel
- gr. Saugflasche
- 2 - 3 Schüsseln für Eis
- Handmixer
- Ultra-Turrax
- Magnetrührer
- kleiner Rührfisch
- Eppendorfcups (bunt)
- HPLC mit β -Counter
- Ultrazentrifuge mit Rotor RP4

B) Lösungen, die für die Fraktionierung der Zellbestandteile und den Test benötigt werden

- 0,15 M KCl Lösung
- 0,25 M Saccharose-Lösung
- Na P - Puffer (pH 7,40)
- Na P- Puffer zum Einfrieren
- 1mM HgCl₂ Lösung
- Norit A Suspension
- Szintillatorflüssigkeit
- [³HA]/A-Gemisch (Gemisch aus radioaktiver (1β, ³H - Androstendionlösung und unmarkiertem Androstendion.)
- NADPH-regenerierendes System (Gemisch aus NADP, Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)

Gefäße, die mit radioaktiv markierten Substanzen in Berührung gekommen sind, müssen entsprechend gekennzeichnet werden und sind getrennt zu entsorgen !

3.2 Aufbereitung des Gewebes

Für die Enzympräparation der Aromatase (Estrogensynthetase) wird humane Plazenta als Ausgangsmaterial verwendet. Um die Fraktionen zu erhalten, wird tiefgefrorenes Gewebe wie folgt verarbeitet.

Während der Enzympräparation sind Handschuhe zu tragen !!

Alle Arbeiten werden unter Eiskühlung durchgeführt. Die benötigten Lösungen und Geräte (Scheren, Pinzetten, Bechergläser etc.) müssen ebenfalls auf ca. 0 - 4°C abgekühlt worden sein.

Nach dem Auftauen des plazentaren Gewebes wird dieses mit 0,15 M KCl Lsg. gewaschen. Das Gewebe wird mit der Schere oder dem Skalpell in etwa 1 cm³ große Stücke zerteilt, gleichzeitig werden die größeren Blutgefäße entfernt. Nun werden die Gewebestücke in einen Büchnertrichter, der mit Verbandsmull ausgekleidet ist, solange mit 0,15 M KCl Lsg. gewaschen, bis die anfänglich dunkelrot gefärbte Waschflüssigkeit kaum noch gefärbt ist.=> Hierfür werden ca. 2 Liter 0,15 M KCl Lsg. benötigt.

Das gewaschene Gewebe wird in ein tariertes Becherglas überführt und gewogen. Das Gewicht wird für die spätere Auswertung notiert! Pro g Gewebe gibt man nun 1 ml einer 0,25 M Saccharoselslg. hinzu. Das gut gekühlte Gewebe wird mit einem Pürierstab in Intervallen von 1 min 10 mal 10 sec zerkleinert. Zähle Gewebestücke, wie z.B. Gefäße, werden mit der Pinzette entfernt. Anschließend wird der rötliche

Gewebebrei in Intervallen von 1 min 20 mal 10 sec. mit dem Ultra-Turrax (20.000 rpm) homogenisiert.

3.3 Fraktionierte Zentrifugation

Das Homogenat wird quantitativ in große Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Diese werden gegebenenfalls mit Saccharoselsg. aufgefüllt, bis sich der Flüssigkeitsspiegel ca. 1 cm unter dem Rand befindet. Anschließend werden die Zentrifugenröhrchen gegeneinander austariert.

Um die 1. Fraktion (Membranbruchstücke und Zellkerne) zu isolieren, werden die aufgeschlossenen Zellen bei 4°C zentrifugiert. Dies geschieht bei einer Geschwindigkeit von 8000 rpm (=5.000g) über 50 min. mit dem Rotor RP 45. Der Überstand wird in saubere UZ-Röhrchen überführt. Das entstandene Pellet wird in Saccharoselösung resuspendiert und in Intervallen von 1 min 3 mal 10 sec. lang mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in Na P Puffer aufgenommen und resuspendiert. Diese Suspension stellt die Fraktion 1 dar. Die homogene Suspension wird unter Rühren in Portionen von 300 µl in Eppendorfgefäße pipettiert. Anschließend werden diese bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

Die Röhrchen mit dem Überstand werden wieder mit Saccharoselsg. aufgefüllt und erneut austariert. Die nun folgende Zentrifugation dient zum Abtrennen der Mitochondrien. Sie erfolgt bei 16.000 rpm (= 20.000g) über einen Zeitraum von 50 min.

Der Überstand wird wie beim ersten Mal in saubere Zentrifugengläschen gefüllt. Zum Pellet mit den Mitochondrien wird etwas Saccharoselösung gegeben und der Rest von der Gefäßwand vollständig abgekratzt. Das Ganze wird dann in Intervallen von 1 min 3 mal 10 sec mit dem kleinen Ultra-Turrax homogenisiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Na P-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Diese Suspension stellt Fraktion 2 dar. Der Ansatz wird in Portionen von 300 µl pro Eppendorfgefäß bei -70°C eingefroren.

In einem letzten Zentrifugationsschritt werden die Mikrosomen vom Cytosol getrennt. Dazu wird der Überstand des vorangehenden Schritts bei 43000 rpm (=150.000g) für 65 min zentrifugiert. Der Überstand enthält das Cytosol und bildet die Fraktion 4. Er wird in 300µl Portionen verpackt bei -70°C eingelagert.

Das Pellet wird wie zuvor mit Saccharoselösung suspendiert und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. In dem zusätzlichen Waschschrift wird diese nochmals bei 43000 rpm zentrifugiert. Mit diesem Waschschrift soll das Cytosol quantitativ herausgelöst werden. Der Überstand des Waschschriftes wird verworfen. Das aufgereinigte Pellet mit den Mikrosomen wird in NaP-Puffer resuspendiert und homogenisiert bevor es in die Eppendorfgefäße portioniert und eingefroren wird. Bei dieser Suspension handelt es sich um Fraktion 3.

3.4 Bestimmung der Aromataseaktivität und Lokalisierung des Enzyms

A) Inkubation der Proben

Für den Aromatasetest werden in 16 Eppendorfgefäße folgende Lösungen einpipettiert:

- 100 µl Na P -Puffer
- 50 µl NADPH regenerierendes System
- 50 µl ³HA/A – Gemisch (Androstendion)

8 dieser Eppendorfgefäße dienen der Bestimmung des Nullwertes. Die anderen 8 zur Bestimmung der Enzymaktivität.

Die so vorbereiteten Proben und die 4 Fraktionen aus der Zentrifugation werden im Wasserbad bei 30°C 5 min präinkubiert.

Nach der Präinkubation wird die enzymatische Reaktion in den Eppendorfgefäßen nacheinander in Abständen von exakt 30 sec durch Zugabe von 50 µl Suspension aus den einzelnen Fraktionen gestartet (siehe Pipettierschema in Kapitel 4). Jede Fraktion wird zwei Mal vermessen. Exakt 14 min nach Start der Inkubation wird aus jedem Eppendorfgefäß 100 µl entnommen und in 200 µl HgCl₂ Lsg. pipettiert.

B) Bestimmung der Nullwerte

Es werden 8 leere Eppendorfgefäße mit je 500 µl HgCl₂-Lösung gefüllt. 50 µl der Suspensionen aus den 4 Fraktionen werden auf die HgCl₂ - Lsg. pipettiert. Jede Fraktion

wird in zwei Gefäße pipettiert. Anschließend wird zu den 8 Proben Androstendion, das oben bereits vorbereitet wurde darauf gegeben. D.h. in jedes Gefäß mit HgCl_2 und Suspension kommen 200 μl des Gemisches aus NaP-Puffer, NADPH regenerierendem System und $^3\text{HA/A}$ -Gemisch. Alle werden gut geschüttelt. 300 μl aus jedem Eppendorfgefäß, werden in ein sauberes Gefäß überführt, das entsprechend gekennzeichnet wird.

Diese Gefäße sind die oben erwähnten Nullwerte. Für jede Fraktion wird zwei Mal der Nullwert bestimmt. Durch diese Prozedur wurde erreicht, dass im Nullwert die gleiche Konzentration an Androstendion ist, wie in den Proben.

C) Zählerausbeuten

ZA dienen der Bestimmung der maximal verfügbaren Radioaktivität.

Hierzu werden 100 μl des $^3\text{HA/A}$ - Gemisches mit 400 μl Puffer verdünnt. Von dieser Mischung werden abermals 100 μl mit 400 μl Puffer vermischt. Von dieser Lsg. werden je 200 μl in 2 Szintillatorgefäße gegeben + 2 ml Szintillationsflüssigkeit.

=>ZA verdünnt

Die ZA unverdünnt wird hergestellt in dem man 50 μl des $^3\text{HA/A}$ - Gemisches in ein Szintillatorgefäß gibt + 2 ml Szintillationsflüssigkeit.

Alle Proben werden kräftig geschüttelt, in den β -Counter gestellt und gemessen.

D) Aufarbeitung der Proben und Messung

Auf jedes der 16 Eppendorfgefäße (8x Enzymbestimmung und 8x Nullwert) wird zum Entfernen des überschüssigen (radioaktiven) Androstendions 200 µl einer 2 %-igen Norit A-Suspension (Aktivkohle) gegeben. Die Reaktionsgefäße werden 20 min. geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Kohle (Laborzentrifuge bei ca. 6000 rpm, 10 min) werden ca. 460 µl des Überstandes in ein neues Gefäß überführt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert.

Von dem jetzt erhaltenen Überstand werden je 200 µl in zwei Szintillatorgefäße pipettiert und mit 2 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt, gut verschlossen und geschüttelt. Der Szintillator ist ein Lösemittelgemisch, welches die durch die Radioaktivität entstandenen Lichtblitze verstärkt.

4. Auswertung

Um zu erkennen ob die Aromatase in einer der Fraktionen aktiv ist wird die Radioaktivität der Nullwerte mit der Radioaktivität der *richtigen* Proben verglichen.

Da in den einzelnen Fraktionen unterschiedliche Mengen an Enzym vorliegen, wäre eigentlich eine Proteinbestimmung notwendig. Hier soll die gemessene Aktivität der Einfachheit halber nur auf die vorher notierte Menge an Plazentagewebe bezogen werden.

		Nullwert			Probe		
Fraktion	Zellbestandteile	cpm	% Rest aktivität	Mittelwert	cpm	% Rest aktivität	Mittelwert
1	Membran- bruchstücke, Zellkerne						
2	Mitochondrien						
3	Mikrosomen						
4	Cytosol						

Bezogen auf _____ g Plazentagewebe

Pipettierschema Aromatasetest

Zeit in Minuten	5 Minuten Präinkubation	Bemerkung
0	Testbeginn	
0.30"	Start des ersten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion I in Eppendorfgefäß I.1	Start
1.	Start des zweiten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion I in Eppendorfgefäß I.2	
1.30"	Start des dritten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion II in Eppendorfgefäß II.1	
2	Start des vierten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion II in Eppendorfgefäß II.2	
2.30"	Start des fünften Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion III in Eppendorfgefäß III.1	
3	Start des sechsten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion III in Eppendorfgefäß III.2	
3.30"	Start des siebten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion IV in Eppendorfgefäß IV.1	
4	Start des achten Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100 µl Enzymsuspension aus Fraktion IV in Eppendorfgefäß IV.2	
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
14.30	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus I.1	14 Minuten- Werte
15	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus I.2	
15.30"	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus II.1	
16	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus II.2	
16.30"	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus III.1	
17	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus III.2	
17.30	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus IV.1	
18	Abstoppen einer 100µl großen Probe aus IV.2	
19 bis ... anschließend		Nullwerte und ZA
anschließend		Vorbereitung zur Messung
anschließend	Messung der Proben im β-Counter	Messung

1. G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 1999, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S. 1-32.
2. G. Patrick: An introduction to medicinal chemistry, 2001, Oxford University Press, S. 20-35.
3. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors, U. Madsen: Textbook of drug design and discovery.
4. A. Brodie in: Design of enzyme inhibitors as drugs (Herausgeber: M. Sandler, H. J. Smith) 1994, Oxford University Press, S. 424-437.
5. Rolf W. Hartmann et al. J. Med. Chem. 1995, 38, 2103-2111.
6. www.uni-saarland.de/fak8/hartmann
siehe auch darin zitierte Literatur