

**V-MODUL 427**

**Methoden der Zellfraktionierung  
und Proteomanalyse**



**Institut für Molekulare Evolution**

**Wintersemester 2011/2012**

**05.12.2011 bis 16.12.2011**



## **Zielsetzung des Praktikums**

Die Analyse der Funktionen von Zellbestandteilen, sowohl von ganzen Organellen als auch von Makromolekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen, erfordert häufig die Reinigung dieser Bestandteile aus den Zellen bzw. Geweben. Ziel aller Reinigungsmethoden ist hierbei die Darstellung der zu untersuchenden Zellbestandteile in möglichst hoher Reinheit unter möglichst geringer Beeinträchtigung ihrer biologischen Funktionen. Bei der Wahl der Zellaufschluss- und Reinigungsmethoden sind neben den Eigenschaften des Ausgangsmaterials (Zellstruktur, Zellwandauflagerungen etc.) auch die geplanten weiteren Nutzungen des gereinigten Materials zu bedenken, z.B. Versuche an intakten Organellen oder biochemische Untersuchungen an Enzymen.

In diesem Praktikum sollen am Beispiel von Mitochondrien und ihren anaeroben Verwandten, den Hydrogenosomen, Wege zur Isolierung von Organellen aus Zellen und zur weiteren Trennung von Organellen in ihre Matrix- und Membran-Fraktion aufgezeigt werden. Die Reinheit der Organellpräparationen, bzw. ihre Kontamination mit anderen Zellbestandteilen, wird sowohl anhand der Aktivitäten von kompartimentspezifischen Markerenzymen als auch im Immunoblot überprüft. Im Anschluss soll als eine Möglichkeit der weiteren Untersuchung gereinigter Organellen die Trennung der Organellen-Proteine durch 2D-Gelelektrophorese vorgestellt werden.

## Zeitplan Gruppen 1-3

### 1. Woche

- Montag:** Lösungen und Medien ansetzen (siehe ausgeteilte Lösungen-Liste)
- Dienstag:** Trichomonaden animpfen (Seite 31)  
gestellte Hydrogenosomen für die IEF vorbereiten und die IEF starten (Seiten 45-47)  
Kalibrierung (Bradford) (Seite 36)
- Mittwoch:** Isolation von Hydrogenosomen (Seite 32-35)  
Bestimmung der Proteinkonzentration der isolierten Fraktionen (Seite 37)
- Donnerstag:** Äquilibration des IPG-Strips und 2. Dimension (2D-SDS-PAGE) bis zur Coomassie-Färbung (Seiten 48-51)  
Enzymassays (Seiten 39-44)  
Hefe-Medien ansetzen (Seite 67)
- Freitag:** Gele für Western Blot laufen lassen und blotten, ü. WE blocken (Seiten 59-63)  
Silberfärbung der 2D-Gele (Seiten 52-53)

### 2. Woche

- Montag:** Hefen animpfen (Seite 67)  
Membranpräparation der Hydrogenosomen von *T. vaginalis* (Seite 54) und Fällung der Matrixproteine (Seite 55)  
Western Blot: 2. AK und Detektion (Seiten 63-64)
- Dienstag:** Fluoreszenzmikroskopie vorbereiten (Seiten 65-66)  
Fortsetzung der Fällung der Matrixproteine (Seiten 55-56)  
2D-SDS-Gele gießen (Seite 49)  
1D-SDS-Gele gießen (Seiten 57-58)
- Mittwoch:** Isolation von Mitochondrien aus Hefe (Seite 68)  
Bestimmung der Proteinkonzentration der isolierten Fraktionen (Seite 37)  
Fluoreszenzmikroskopie (Seite 66)
- Donnerstag:** 1D-SDS-PAGE mit Mitochondrien und Proben der Membranpräparation (Hydrogenosomen) (Seiten 59-60)
- Freitag:** AUFRÄUMEN

## Zeitplan Gruppen 4-6

### 1. Woche

- Montag:** Lösungen und Medien ansetzen (siehe ausgeteilte Lösungen-Liste)  
Hefen animpfen (Seite 67)
- Dienstag:** Isolation von Mitochondrien aus Hefe (Seite 68)  
Membranpräparation der Hydrogenosomen von *T. vaginalis* (Seite 54) und  
Fällung der Matrixproteine (Seiten 55-56)  
Kalibrierung (Bradford) (Seite 36)  
Bestimmung der Proteinkonzentration der isolierten Fraktionen (Seite 37)
- Mittwoch:** Fluoreszenzmikroskopie vorbereiten (Seiten 65-66)  
Fortsetzung der Fällung der Matrixproteine (Seiten 55-56)  
2D-SDS-Gele gießen (Seite 49)  
1D-SDS-Gele gießen (Seiten 57-58)
- Donnerstag:** 1D-SDS-PAGE mit Mitochondrien und Proben der Membranpräparation  
(Hydrogenosomen) (Seiten 59-60)  
Fluoreszenzmikroskopie (Seite 66)
- Freitag:** Lösungen und Medien ansetzen

### 2. Woche

- Montag:** Trichomonaden animpfen (Seite 31)  
gestellte Hydrogenosomen für die IEF vorbereiten und die IEF starten  
(Seiten 45-47)
- Dienstag:** Isolation von Hydrogenosomen (Seite 32-35)  
Bestimmung der Proteinkonzentration der isolierten Fraktionen (Seite 37)
- Mittwoch:** Äquilibrierung des IPG-Strips und 2. Dimension bis zur Coomassie-  
Färbung (Seiten 48-51)  
Enzymassays (Seiten 39-44)  
Gele für Western Blot laufen lassen und blotten und 1. AK über Nacht  
(Seiten 59-63)
- Donnerstag:** Western Blot: 2. AK und Detektion (Seiten 63-64)  
Silberfärbung der 2D-Gele (Seiten 52-53)
- Freitag:** AUFRÄUMEN

# INHALTSVERZEICHNIS

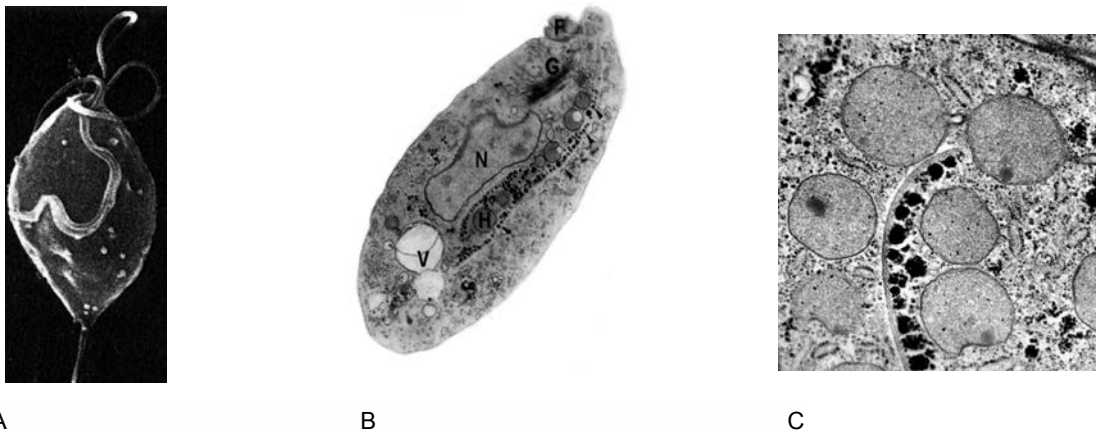
<b>1. THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>6</b>
1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> und <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	6
1.2 Energiestoffwechsel der Hydrogenosomen .....	7
1.3 Ultrastruktur und Biogenese der Hydrogenosomen in <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	8
1.4 Fraktionierung von Zellen und Reinigung von Organellen .....	11
1.4.1 Zellaufschluss .....	11
1.4.2 Zentrifugation .....	13
1.4.2.1 Differentielle Zentrifugation .....	14
1.4.2.2 Zonenzentrifugation .....	15
1.4.2.3 Isopyknische Zentrifugation .....	15
1.4.2.4 Gradienten .....	15
1.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten mittels Enzymassays .....	16
1.5.1 Grundlagen der Enzymkinetik .....	16
1.5.2 Maßeinheiten der Enzymaktivitäten .....	17
1.5.3 Aktivitätstests .....	18
1.5.3.1 Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) (EC 1.2.7.1) .....	22
1.5.3.2 Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2) .....	23
1.5.3.3 Malat Dehydrogenase (EC 1.1.1.37 und 1.1.1.82) .....	23
1.6 Proteinbestimmung nach Bradford .....	24
1.7 2D-Gelelektrophorese .....	24
1.7.1 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	24
1.7.2 2. Dimension: SDS-PAGE .....	26
1.8 2D-gelelektrophoretische Trennung von hydrogenosomalen Proteinen .....	26
1.8.1 1. Dimension: IEF .....	26
1.8.1.1 Probenvorbereitung für die IEF .....	26
1.8.1.2 Rehydratisierung und Beladung von IPG-Strips .....	27
1.8.2 2. Dimension: SDS-PAGE – Äquilibration von IPG-Strips .....	27
1.9 2D-Gelelektrophorese: Alternativen zur Isoelektrischen Fokussierung .....	28
1.10 Membranpräparation aus Hydrogenosomen .....	28
1.11 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	28
1.12 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot .....	29
1.13 Fluoreszenzmikroskopie .....	29

<b>2. PRAKTISCHER TEIL</b> .....	<b>31</b>
2.1 Anzucht von <i>Trichomonas vaginalis</i> und <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	31
2.2 Isolation von Hydrogenosomen aus <i>T. vaginalis</i> und <i>T. foetus</i> .....	32
2.3 BSA-Kalibrierungsgerade für die (Proteinbestimmung nach Bradford) .....	36
2.4 Proteinbestimmung nach Bradford .....	37
2.5 Enzymassay der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) (EC 1.2.7.1) .....	39
2.6 Enzymassay der Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2) .....	41
2.7 Enzymassay der Malat Dehydrogenase (EC 1.1.1.37 und 1.1.1.82) .....	42
2.8 2D-Gelelektrophorese – 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	45
2.8.1 Probenvorbereitung .....	45
2.8.2 Rehydratisierung und Beladung der IPG-Strips .....	47
2.9 2D-Gelelektrophorese – 2. Dimension: SDS-PAGE .....	48
2.9.1 Äquilibrierung der IPG-Strips für die SDS-PAGE .....	48
2.9.2 2D-SDS-PAGE .....	49
2.10 Proteingel-Färbung mit Coomassie R350 .....	51
2.11 Silberfärbung von Proteingelen (nach Blum <i>et al.</i> , 1987) .....	52
2.12 Extraktion von Membranproteinen aus Hydrogenosomen .....	54
2.13 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	55
2.14 1D-SDS-PAGE .....	57
2.14.1 Gießen der Gele .....	57
2.14.2 Auftragen der Proben .....	59
2.15 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot .....	61
2.15.1 Elektrotransfer von Proteinen im Semi-Dry-Blot .....	61
2.15.2 Immunodetektion der ASCT mit einem polyklonalen Antikörper .....	63
2.15.3 Detektion mit dem Luminol-Nachweissystem .....	64
2.16 Fluoreszenzmikroskopie .....	65
2.17 Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67
2.18 Isolierung von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	68

## 1. THEORETISCHER TEIL

### 1.1 *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*

Im Praktikum sollen verschiedene Möglichkeiten zur Isolierung von Organellen durchgeführt werden. Im ersten Versuch sollen die Zellen von *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus* durch Mörsern mit Glasperlen als Abrasionsmittel aufgeschlossen und die Hydrogenosomen (anaerobe Formen der Mitochondrien) über isopyknische Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten gereinigt werden. Im zweiten Versuch werden *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen aufgeschlossen und die Mitochondrien mittels Zonenzentrifugation über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten isoliert.



**Abbildung 1:** Darstellungen von:

**A** *Trichomonas vaginalis*

**B** *Tritrichomonas foetus*, N: Nukleus, V: Vakuole, G: Golgi, H: Hydrogenosomen

**C** Anordnung der Hydrogenosomen in *T. vaginalis* nahe dem Axostyl

Der anaerobe Flagellat *Trichomonas vaginalis*, ein auf sexuellem Weg übertragenes Humanpathogen des Urogenitaltraktes, ist ein sowohl aus medizinischer als auch aus evolutionsbiologischer Sicht interessanter Organismus. *Trichomonas vaginalis* ist weltweit mit einer Häufigkeit von 5% bis 20% in nicht selektierten, weiblichen Populationen verbreitet. Seine Pathogenität beruht auf einer kontaktabhängigen Zytotoxizität, die durch Virulenzfaktoren, wie z.B. eine an der Zelloberfläche lokalisierte Protease, vermittelt wird. Die Symptomatik der *Trichomonas*-Infektion reicht von milder bis sehr stark ausgeprägter Vaginitis, verbunden mit Juckreiz und blutigem Ausfluss. Neugeborene von infizierten Müttern können unter geringem Geburtsgewicht leiden. Zudem wird die *Trichomonas*-Infektion zu den potentiellen Risikofaktoren gerechnet, die eine HIV-Infektion begünstigen. Zur effektiven Therapie von *Trichomonas*-Infektionen stehen 5-Nitroimidazol-Derivate, insbesondere Metronidazol, zur Verfügung. Allerdings sind bereits einige Metronidazol-resistente Stämme aufgetreten. Die Resistenz gegen Metronidazol ist derzeit noch nicht alarmierend, sollte aber aufmerksam

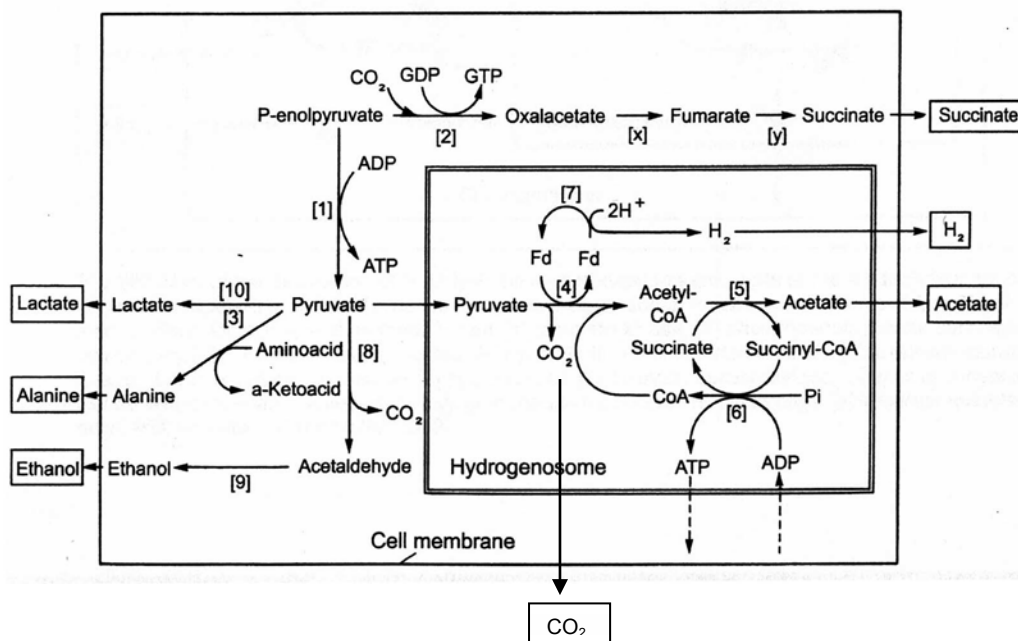
beobachtet werden, da 5-Nitroimidazol-Verbindungen die einzigen wirksamen Therapeutika gegen die Trichomoniasis sind, und die Entwicklung eines Impfschutzes gegen *Trichomonas* aufgrund der hohen antigenischen Variabilität von Protozoen als schwierig gelten muss. *Trichomonas foetus* ist ein Verwandter von *Trichomonas vaginalis* und lebt im Urogenitaltrakt von Rindern, wo er häufig zu Fehlgeburten und damit wirtschaftlichen Schäden führt.

In Studien zur Evolution der eukaryotischen Zelle nehmen Trichomonaden seit einigen Jahren eine zentrale Stellung ein, da sie, unter anderem aufgrund von phylogenetischen Analysen von rRNA-Daten, als ursprünglichste derzeit bekannte Eukaryoten gelten. Eine in diesem Zusammenhang interessante Besonderheit von Trichomonaden sind die Hydrogenosomen, anaerobe, stark reduzierte Formen der Mitochondrien. Hydrogenosomen kommen in einer Reihe von phylogenetisch weit voneinander entfernten Organismen vor, darunter die als eine der ersten Linien vom eukaryotischen Stammbaum abzweigenden Trichomonaden, sowie einzelne Ciliaten, Amöboflagellaten und Chytridiomyceten. Die drei letztgenannten Gruppen umfassen jeweils sowohl Gattungen mit Hydrogenosomen als auch Gattungen mit Mitochondrien. Die Hydrogenosomen müssen also mehrfach unabhängig voneinander entstanden sein. Allen Organismen mit Hydrogenosomen gemeinsam sind das Fehlen von Mitochondrien und ein anaerober Lebensraum. Die charakteristische Funktion der Hydrogenosomen, die Oxidation von Pyruvat zu Acetat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$ , verbunden mit der Produktion von ATP durch Substratkettenphosphorylierung, macht dieses Organell funktionell zu einem anaeroben Äquivalent der Mitochondrien. Durch die molekulare Analyse und phylogenetische Rekonstruktion einer Reihe von hydrogenosomalen Proteinen sowie Studien zur Biogenese von Hydrogenosomen, vorwiegend in *Trichomonas vaginalis*, konnten in den letzten Jahren Einblicke in das Verwandtschaftsverhältnis zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien gewonnen werden, die trotz deutlicher Unterschiede in Ultrastruktur und biochemischen Fähigkeiten einen gemeinsamen eubakteriellen Vorfahren für beide Organellen implizieren.

## 1.2 Energiestoffwechsel der Hydrogenosomen

Ähnlich den Mitochondrien wird in den Hydrogenosomen Pyruvat zu Acetat umgesetzt, verbunden mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP. Allerdings nutzen die Hydrogenosomen hierfür nicht wie die Mitochondrien Krebszyklus und Endoxidation über die Atmungskette, sondern einen fermentativen Prozess mit Substratkettenphosphorylierung (Abbildung 2): Pyruvat aus der Glykolyse oder der Decarboxylierung von Malat wird durch die PFOR (Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase) oxidativ zu Acetyl-CoA und  $\text{CO}_2$  decarboxyliert. Die hierbei freigesetzten Elektronen werden über eine kurze Transportkette aus Ferredoxin (Fd) und Hydrogenase unter Bildung von molekularem Wasserstoff, dem für

das Organell namensgebenden Endprodukt (HYDROGENosomen), auf Protonen übertragen. Acetyl-CoA wird von der ASCT (Acetat:Succinat CoA-Transferase) in Acetat umgewandelt. Das dabei entstehende Succinyl-CoA ist Substrat für die Succinat-Thiokinase (SCS) zur ATP-Bildung durch Substratkettenphosphorylierung. Die Aktivitäten der für Mitochondrien charakteristischen Enzyme des Krebszyklusses und der Atmungskette konnten, mit Ausnahme der Succinat-Thiokinase und Ferredoxin, in den Hydrogenosomen nicht nachgewiesen werden.



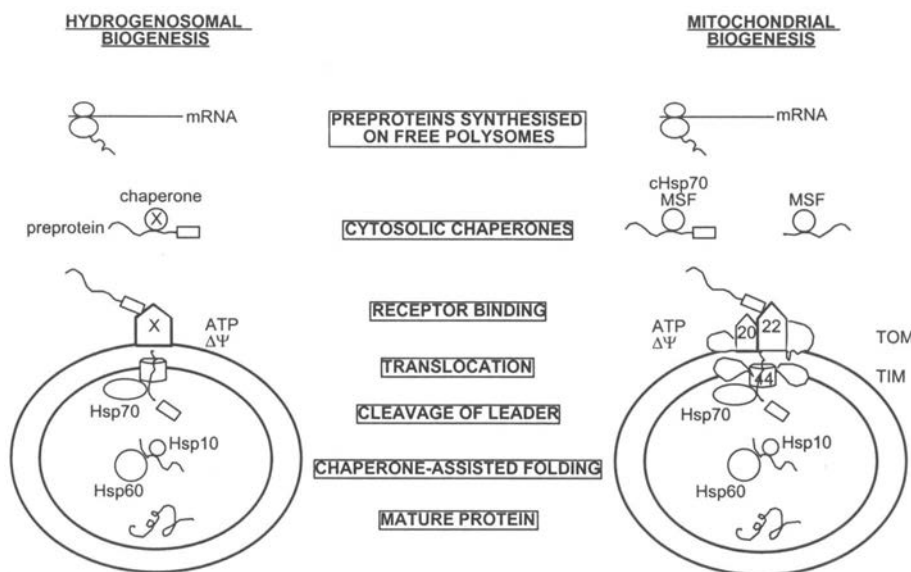
**Abbildung 2:** Auf die Glykolyse folgender Stoffwechsel bei *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*. [1] Pyruvat Kinase, [2] Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (GTP-abhängig), [3] Pyruvat Aminotransferase, [4] Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR), [5] Acetat:Succinat-CoA Transferase (ASCT), [6] Succinyl-CoA Synthetase (SCS), [7] Hydrogenase, [8] Pyruvat Decarboxylase, [9] Alkohol Dehydrogenase, [10] Lactat Dehydrogenase (nur bei *T. vaginalis*), [x] Fumarat Hydratase (nur bei *T. foetus*), [y] Fumarat Reduktase (nur bei *T. foetus*), [Fd] Ferredoxin. [aus: Hausmann und Hülsmann (2003) Protistology. Schweitzerbart'sche Verlagsbuchhandlung]

### 1.3 Ultrastruktur und Biogenese der Hydrogenosomen in *Trichomonas vaginalis*

Die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich von Mitochondrien. Sie enthalten keine DNA, sind von zwei dicht aneinander liegenden Membranen umgeben und die innere Membran weist keine Cristae auf. Ein von der Matrix abgegrenztes Vesikel speichert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wahrscheinlich in Form von Calciumphosphat. Die Funktion dieses  $\text{Ca}^{2+}$  Speichers ist nicht bekannt, könnte aber, ähnlich wie bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung in der mitochondrialen Matrix, in der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Cytosols liegen. An der Membran besteht ein Protonengradient, aber ein pH-

Gradient und eine ATPase-Aktivität konnten bisher nur in den Hydrogenosomen des Chytridiomyceten *Neocallimastix* nachgewiesen werden.

Die Biogenese der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* zeigt dagegen deutliche Parallelen zu Mitochondrien (Abbildung 3): die Vermehrung erfolgt mittels Zweiteilung durch zentrale Einschnürung der inneren Membran und Bildung eines Septums. Hydrogenosomale Proteine werden, wie für Organellen endosymbiontischen Ursprungs typisch, an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und post-translational mit Hilfe eines Transitpeptids in das Organell importiert.



**Figure 3.** Comparison of hydrogenosomal and mitochondrial biogenesis. The N-terminal presequence of the newly synthesised protein is indicated by the rectangular box. X = unknown proteins, cHsp70 = cytosolic Hsp70, MSF = mitochondrial import stimulation factor, TOM = translocase of outer mitochondrial membrane complex, TIM = translocase of inner mitochondrial membrane complex. Tom20, Tom22 and Tim44 are indicated by the numbers 20, 22 and 44 respectively.

**Abbildung 3:** Vergleich der hydrogenosomalen und mitochondrialen Biogenese [aus: Dyall, S. D. und Johnson, P. J. (2000) The trichomonad hydrogenosome. In: Biology of Parasitism, Kluwer Academic Publisher]

Die Transitpeptide hydrogenosomaler Proteine in *Trichomonas vaginalis* sind mit 5 bis 14 Aminosäuren deutlich kürzer als die mitochondrienspezifischer Proteine in höheren Eukaryoten. Die Aminosäurezusammensetzung in hydrogenosomalen und mitochondrialen Transitpeptiden ist vergleichbar (Abbildung 4). Im 2007 publizierten Genom von *Trichomonas vaginalis* sind keine Homologen zu den TOM-Komponenten (Proteinimportkomplexe der äußeren mitochondrialen Membran) identifiziert worden. Existent sind jedoch Homologe zu den TIM-Komponenten (Proteinimportkomplexe der inneren mitochondrialen Membran)

TIM17 und TIM23. Auch ein Homolog des Protein Import Motors Pam18 der mitochondrialen Matrix konnte gefunden werden [Dolezal *et al.*, 2005]. Diese Informationen sind allerdings zur Beschreibung eines Proteinimportmechanismus bei Hydrogenosomen nicht ausreichend.

<i>Trichomonas vaginalis</i> : Hydrogenosomal matrix proteins		
Ferredoxin	MLSQVCR <u>F</u> †GTI	P21149
SuccinylcoA synthetase, αSCS1	MLAGDFSRN†LHK	P53399
SuccinylcoA synthetase, αSCS2	MLSSSFERN†LHQ	P53400
SuccinylcoA synthetase, αSCS3	MLSSSFERN†LHQ	P53401
SuccinylcoA synthetase, βSCS	MLSSSFARN†FNI	Q03184
Adenylate kinase	MLSTLAKR <u>F</u> †ASG	P49983
Heat shock protein hsp60	MSLIEAAKHFT <u>R</u> AF†AKA	Q95058
Malic enzyme subunit A	MLTSSVSV <u>P</u> V <u>R</u> N†ICR	AAA92714
Malic enzyme subunit B	MLTSSVNF <u>P</u> ARE†LSR	AAA92715
Malic enzyme subunit C	MLTSVSY <u>P</u> V <u>R</u> N†ICR	AAA92716
Malic enzyme subunit D	MLTSVSL <u>P</u> V <u>R</u> N†ICR	AAA92717
Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase A	MLR <u>N</u> F†SKR	AAA85494
Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase B	MLR <u>S</u> F†GKR	AAA85494
Fe-hydrogenase subunit A	MLASSATAMKGFANSL <u>R</u> M-KDY	AAC41759
Fe-hydrogenase subunit B	MLASS <u>S</u> RA-AA <u>N</u> IRW-VDT	AAC41760
Heat shock protein hsp70	MLKMFNSIF <u>A</u> RE-KNQ	AAB17251
Heat shock protein hsp10	MLATF <u>A</u> RN-FAA	AAB17249
<i>Trichomonas vaginalis</i> : Hydrogenosomal membrane protein		
Hmp31	MAQPAEQILIAT†SPK	Unpublished
<i>Psalteriomonas lanterna</i> : Hydrogenosomal matrix protein		
Ferredoxin	MVSGV <u>S</u> RN-AAR	P34806
<i>Neocallimastix frontalis</i> : Hydrogenosomal matrix proteins		
SuccinylcoA synthetase, βSCS	MLANVTRSTSKAAPALASIAQTAQ <u>K</u> RF-LSV	X84222
Malic enzyme	MLAPIQTIARPVSSILPATGALAA <u>K</u> RT†FFA	AAC49572
<i>Entamoeba histolytica</i> : Crypton protein		
Heat shock protein hsp60	MLSSSHY <u>N</u> KLLSLNIDC <u>R</u> E†NVL	AAC38819
<i>Leishmania</i> : Mitochondrial matrix proteins		
<i>L. tarentolae</i> Heat shock protein hsp60	MLRS <u>A</u> V <u>R</u> L†AGK	P56281
<i>L. major</i> Heat shock protein hsp70	MFARRVCGSAAASAA <u>C</u> LA <u>R</u> AH†ESQ	P12076
Crown Group Eukaryotes: Mitochondrial matrix proteins		
<i>S. cerevisiae</i> Heat shock protein hsp60	MLRSSV <u>V</u> RSRATLRPLLRRAYSS <u>H</u> K†ELK	P19882
<i>Cucurbita sp.</i> Heat shock protein hsp60	MHFRATGLASKARLARNGANQIASRSN <u>W</u> RRN†AAK	X70868
<i>H. sapiens</i> Heat shock protein hsp60	MLRLPTVFRQMR <u>P</u> VS <u>R</u> VLA <u>P</u> HL <u>T</u> RAY†AKA	P10809
Plantae: Chloroplast luminal proteins		
<i>A. thaliana</i> Heat shock protein hsp60	MASTFTATSSIGSMVAPNGHKSDK <u>K</u> LISKLS <u>S</u> SSFGRRQS VCPRPRSSSAIVCA†AKE	P21240
<i>P. sativum</i> Heat shock protein hsp70	MASSAQIHGLGTASFSS <u>L</u> KKPSSISGNSKTLFFGQRLNSN HSPFTRAAFPKLSK <u>T</u> FKKGF <u>T</u> LRVV <u>S</u> †TEKV	Q02028

**Table 1.** Comparison of N-terminal presequences of proteins from hydrogenosomes, crypton, mitochondria and chloroplasts. Known cleavage sites are indicated by ‘†’ and predicted cleavage sites are shown as ‘-’. Arginine residues found at positions –2 or –3 with respect to the cleavage site are underlined. Accession numbers for the proteins, where available, are given in the right hand column.

**Abbildung 4:** Vergleich N-terminaler Präsequenzen hydrogenosomaler Proteine

[aus: Dyall, S. D. und Johnson, P. J. (2000) The trichomonad hydrogenosome. In: Biology of Parasitism, Kluwer Academic Publisher]

Anhand der N-terminalen Aminosäuren eines Proteins kann ein möglicher Import dieses Proteins in ein Organell vorhergesagt werden. Zwar zeigen viele der als eindeutig hydrogenosomal bekannten Proteine aus *Trichomonas vaginalis* eine wie in Abbildung 4 gezeigte Präsequenz, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Proteine ohne erkennbare Transitsequenzen in die Hydrogenosomen importiert werden.

Bei einer bioinformatischen Untersuchung des Genoms von *Trichomonas vaginalis* nach Präsequenzen konnten 138 Gene mit möglichen Transitsequenzen identifiziert werden [Carlton *et al.* (2007), *Science*: 315,207-212]. Im Vergleich zu ca. 700 mitochondrialen Proteinen der Hefe scheint dies jedoch eine sehr geringe Anzahl zu sein. Deswegen sind neben bioinformatischen Voraussagen auch experimentelle Nachweise der intrazellulären Lokalisierung von Proteinen notwendig.

Die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt durchgeführten Studien an Hydrogenosomen haben die phylogenetische Verwandtschaft von Hydrogenosomen und Mitochondrien bestätigt, sowie die metabolische Hauptfunktion der Hydrogenosomen umfassend charakterisiert. Aus der gemeinsamen Abstammung beider Organellentypen und der Existenz der für Mitochondrien und deren postulierte Vorfahren, die  $\alpha$ -Proteobakterien, ungewöhnlichen Enzyme PFOR und Hydrogenase in den Hydrogenosomen, ergibt sich jedoch die Frage nach der Identität und den metabolischen Fähigkeiten des gemeinsamen Vorfahrens sowie nach den evolutiven Prozessen, die zur Entstehung der verschiedenen Organellen aus diesem gemeinsamen Vorfahren geführt haben.

## **1.4 Fraktionierung von Zellen und Reinigung von Organellen**

### **1.4.1 Zellaufschluss**

Zur Fraktionierung von Zellen in ihre Bestandteile muss zunächst ein Zellaufschluss erfolgen. Der Zellaufschluss kann auf unterschiedliche Weise erfolgen und muss insbesondere der Art des Ausgangsmaterials angepasst werden: der Zellaufschluss muss einerseits rigoros genug sein, um die Plasmamembran der Zelle und eventuell vorhandene Zellwandauflagerungen zu zerstören, andererseits muss der Zellaufschluss vorsichtig genug erfolgen, so dass ggf. membranumgebene Organellen wie Chloroplasten, Mitochondrien, Hydrogenosomen oder Lysosomen intakt bleiben. Möglichkeiten des Zellaufschlusses sind z.B.:

- **Schwache Scherkräfte:** Sehr empfindliche (große) Zellen wie Leukozyten oder Ciliaten können häufig schon durch wiederholtes Pipettieren oder Pressen durch ein engmaschiges Sieb geöffnet werden. Bei stabileren Zellen (z.B. tierische Zellen) werden Scherkräfte durch das Auf- und Abbewegen eines Glas- oder Teflonpistills in einem Glasröhrchen (Dounce-Homogenisator, Potter-Elvehjem-Homogenisator) erzeugt. Für Mikroorganismen wird häufig auch eine French Press eingesetzt, bei der eine Zellsuspension unter Druck durch eine enge Öffnung ( $< 1$  mm) gepresst wird.
- **Zerreiben** der Zellen (z.B. Pflanzen, Hefen, Bakterien) in einem Mörser. Die Zugabe von Seesand oder Glasperlen als Abrasionsmittel erleichtert den Zellaufschluss. Große Organellen wie z.B. Chloroplasten können mit zerstört werden!
- **Ultraschall** im Frequenzbereich von 10 bis 40 kHz erzeugt schnelle Druckänderungen in einer Zellsuspension, welche die Zellen und Organellen effizient aufbrechen. Durch die starke Wärmeentwicklung ist die Methode nur für kleine Volumina geeignet und muss unbedingt auf Eis erfolgen. DNA wird durch Ultraschallwellen fragmentiert!
- **Enzymatischer Verdau der Zellwand**, z.B. mit Lysozym oder Trypsin, gefolgt von mechanischem Öffnen der Zellmembran (z.B. durch Rühren). Hierbei handelt es sich um eine schonende Methode, die auch für die Isolierung von Organellen und Zellkernen geeignet ist.
- **Freeze-Thaw-Zyklen:** Wiederholtes Einfrieren und Auftauen deformiert Zellmembranen und führt zum Aufbrechen der Zellen. Organellen können auch lysiert werden!
- **Trocknen der Zellen oder Entwässern mit organischen Lösungsmitteln:** Proteine können mit wässrigen Lösungsmitteln aus dem Niederschlag extrahiert werden.
- **Zerkleinern von Geweben im Messerhomogenisator:** Entwickelt viel Wärme, bei kleinen Zellen muss ein Abrasionsmittel zugesetzt werden.

Welche Zellaufschlussmethode für ein Experiment geeignet ist, muss für jedes Zellmaterial und jedes Zielorganell bzw. Zielmolekül (DNA oder Protein) gesondert ermittelt werden.

Vorausgesetzt, dass das Homogenisationsmedium sorgfältig gewählt wurde, bleiben den unterschiedlichen Zellbestandteilen die meisten ihrer biochemischen Eigenschaften erhalten. Das Homogenisationsmedium sollte z.B. Organellen vor osmotischem Platzen schützen (isotonische Puffer-Lösung mit neutralem pH) und die in vielen Zellen vorhandenen Proteasen hemmen. Dabei ist zu beachten, dass Proteasehemmer immer nur gegen einen bestimmten Proteasetyp (Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metalloproteasen) wirken und daher als

Cocktail eingesetzt werden müssen, um effektiv die Proteolyse zu verhindern. Das Homogenisationsmedium sollte keine Substanzen enthalten, die bei später geplanten Anwendungen stören (z.B. EDTA, wenn die Aktivität von Enzymen mit Metallionen als Cofaktor gemessen werden soll). Wenn der Balanceakt glückt, entsteht ein Homogenat mit einer Vielzahl membrangebundener Partikel von jeweils kennzeichnender Größe, Ladung und Dichte, die durch verschiedene Zentrifugationstechniken voneinander getrennt werden können.

### 1.4.2 Zentrifugation

Mittels Zentrifugation werden Zellkomponenten nach Größe und Dichte getrennt. Die Teilchen erfahren durch die Zentrifugation eine Beschleunigung nach außen. Die Beschleunigung  $B$  ist hierbei abhängig von der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  und dem Abstand  $r$  von der Rotationsachse:  $B = \omega^2 r$ .

Bezogen auf die Erdbeschleunigung  $g$  und unter Einbeziehung der Rotationsgeschwindigkeit in Rotationen pro Minute (rpm) ergibt sich die **relative Zentrifugalbeschleunigung RZB** (engl. RCF für *relative centrifugal force*):

$$\text{RCF [g]} = 11,17 \times r \times \left( \frac{\text{rpm}}{1000} \right)^2$$

An den meisten Zentrifugen wird die Geschwindigkeit in rpm eingestellt. Die zum Erreichen der gewünschten Zentrifugalbeschleunigung nötigen rpm können nach Umstellen der Formel mit dem Radius des jeweiligen Rotors berechnet werden.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit von sphärischen Partikeln in einer viskosen Lösung wird durch die **Svedberg-Gleichung** beschrieben:

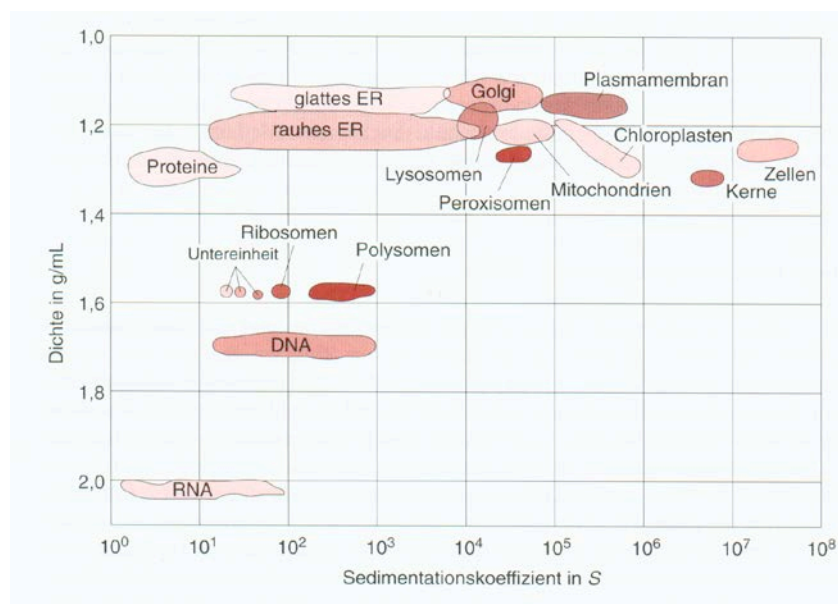
$$v = \frac{d^2 \times (Q_p - Q_m) \times g}{18 \times \eta}$$

$v$ :	Sedimentationsgeschwindigkeit	$Q_p$ :	Dichte des Teilchens
$d$ :	Durchmesser des Teilchens	$Q_m$ :	Dichte des Mediums
$\eta$ :	Viskosität des Mediums	$g$ :	rel. Zentrifugalbeschleunigung

Die Sedimentationsgeschwindigkeit wächst also mit der Teilchengröße und der Differenz der Dichte von Teilchen und Medium und nimmt mit der Viskosität des Mediums ab (Abbildung 5). Der **Sedimentationskoeffizient  $s$**  ist die Sedimentationsgeschwindigkeit unter den Bedingungen des Zentrifugalfeldes:

$$s = \frac{v}{r \times \omega^2}$$

Der Koeffizient wird in **Svedberg-Einheiten  $S$**  angegeben (1  $S$  entspricht  $10^{-13}$  Sekunden).



**Abbildung 5:** Dichte und Sedimentationskoeffizienten einiger Zellkompartimente

### 1.4.2.1 Differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation nutzt die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten verschiedener Teilchen aus. So befinden sich z.B. Zellkerne bei ca.  $1000 \times g$  nach 5-10 min im Pellet, Mitochondrien nach 10 min bei  $10.000 \times g$  und Mikrosomen nach 1 h bei  $100.000 \times g$ . Die einzelnen Fraktionen sind nach differentieller Zentrifugation aber nicht rein, da kleine Teilchen am Boden des Röhrchens die schnellen Teilchen mit langem Sedimentationsweg kontaminieren! Teilchen ähnlicher Größe können mit dieser Technik nicht getrennt werden.

### 1.4.2.2 Zonenzentrifugation

Bei der Zonenzentrifugation wird die zu zentrifugierende Probe über einen vorgeformten Gradienten (meistens Saccharose) geschichtet. Die Teilchen, die liegen hier im Gegensatz zur differentiellen Zentrifugation zu Beginn in einer schmalen Zone vor, werden nach Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt. Die Zentrifugation wird gestoppt, bevor die Teilchen sedimentieren.

### 1.4.2.3 Isopyknische Zentrifugation

Die isopyknische Zentrifugation (Sedimentations-Gleichgewichts-Zentrifugation) ist zur Trennung von Teilchen ähnlicher Größe aber unterschiedlicher Dichte geeignet. Es wird über längere Zeit bei hoher Geschwindigkeit über einen Dichtegradienten bis zur Einstellung des Gleichgewichts zentrifugiert. Nach der Svedberg-Gleichung bleiben Teilchen im Schwebestand, wenn ihre Dichte der des Mediums entspricht. Im Gradienten wandern also die Teilchen aufwärts oder abwärts, bis sie den Bereich erreichen, an dem die Dichte des Mediums ihrer eigenen Dichte entspricht. Die größte Gradientendichte muss dabei die aller zu zentrifugierenden Teilchen übersteigen.

### 1.4.2.4 Gradienten

Gradienten können kontinuierlich oder diskontinuierlich hergestellt werden. Häufig eingesetzte Substanzen sind z.B.:

- **CsCl**: kann in hoher Dichte hergestellt werden. Eine niedrige Viskosität, aber hohe Ionenstärke lässt einige biologische Materialien wie z.B. Ribosomen dissoziieren. Wegen hoher Osmolalität ist CsCl ungeeignet für osmotisch empfindliche Zellen, jedoch besonders gut geeignet für die Auftrennung von Nukleinsäuren.
- **Saccharose**: wird häufig für die Zonenzentrifugation zur Reinigung von Organellen eingesetzt. Der Gradient ist leicht herzustellen und billig. Wegen hoher Viskosität hochkonzentrierter Saccharose-Lösungen ergibt sich bei der isopyknischen Zentrifugation eine schlechte Auflösung. Wegen hoher Osmolalität ist Saccharose für osmotisch empfindliche Zellen ungeeignet.
- **Percoll**: kolloidale, mit Polymer (Polyvinylpyrrolidon) beschichtete Silicapartikel von 15-30 nm Durchmesser. Percoll hat eine niedrige Osmolalität. Durch die kolloidale Natur bildet sich der Dichtegradient schnell von selbst aus (Profil ändert sich aber während der Zentrifugation). Durch Zugabe von Saccharose oder Salzen kann ein isotonischer Gradient erzeugt werden.

## 1.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten mittels Enzymassays

Enzymatische Testmethoden dienen der Bestimmung von Molekülen, die an einer durch ein Enzym katalysierten chemischen Reaktion teilnehmen oder zur Bestimmung der katalytischen Aktivität des Enzyms selbst. Sie werden oft durchgeführt, um die Reinheit der bei einer Zellfraktionierung erhaltenen Fraktionen zu bestimmen.

### Literatur

Lottspeich F., Zorbas H. (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.

Rafael, J. (1983) In: *Methods of Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer, ed.), Vol. 3. Seite 266, Verlag Chemie, Weinheim

Voet D., Voet J.G. (1990) Biochemistry, 1st Ed. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapur

### 1.5.1 Grundlagen der Enzymkinetik

Für die Wirkung der Enzyme als Katalysatoren ist das „*aktive Zentrum*“ verantwortlich, das entweder (a) ein Teil des Moleküls selbst ist oder (b) zusätzlich ein *Coenzym* mit Nichtprotein-Charakter benötigt, das sich mit dem allein unwirksamen *Apoenzym* zum aktiven *Holoenzym* verbindet. Wesentlichstes Charakteristikum der Wirkungsweise eines Enzyms ist die Bildung eines reaktionsfähigen, aber kurzlebigen *Enzym-Substrat-Komplexes*, der vereinfacht formuliert werden kann als:



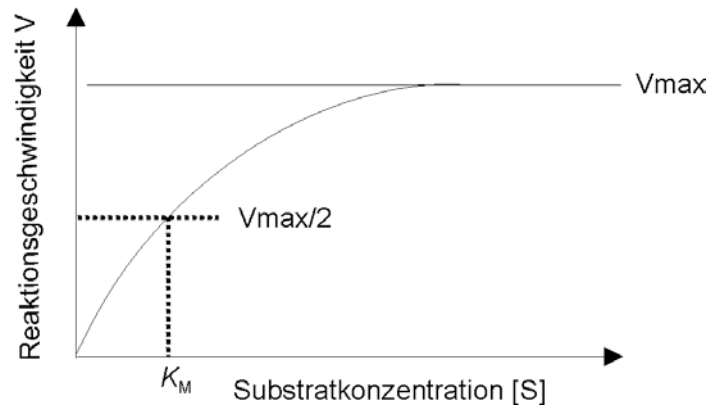
E = Enzym   S = Substrat   P = Produkt

Im Enzym-Substrat-Komplex ES wird die Aktivierungsenergie des Übergangszustands herabgesetzt und damit die chemische Reaktion beschleunigt.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit V von der Substratkonzentration [S] wird im einfachsten Fall durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Die hierdurch definierte Beziehung ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung.

Diejenige Substratkonzentration, bei der eine Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, die gerade halb so groß ist wie ihr theoretischer Maximalwert  $V_{\max}$  bei Substratsättigung, wird als Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  bezeichnet. Sie ist ein wichtiges Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat: Je höher  $K_M$ , desto höher muss die Substratkonzentration sein, damit die Reaktionsgeschwindigkeit (bei gegebener Enzymkonzentration) mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft, und desto geringer ist folglich die Substrataffinität eines Enzyms.

### 1.5.2 Maßeinheiten der Enzymaktivitäten

Die *katalytische Aktivität* eines Enzyms wird durch die Geschwindigkeit  $V$ , mit der die katalysierte Reaktion abläuft, gegeben. Sie wird unter kontrollierten Versuchsbedingungen durch Messung des Substratverbrauchs oder der Produktzunahme pro Zeiteinheit bestimmt. Für die Einheit der Enzymaktivität wird die SI-Einheit „katal“ empfohlen. Sie hat sich jedoch aufgrund der Unhandlichkeit kaum oder nicht durchgesetzt.

**Ein katal (kat) ist diejenige Enzymmenge, die 1 mol Substrat pro Sekunde umsetzt.**

Die klassische, 1961 eingeführte „enzyme unit“ ist als diejenige Enzymmenge definiert, die unter Standardbedingungen je Minute ein  $\mu\text{mol}$  Substrat umsetzt. Da dieses jedoch keine universelle und allgemein gültige Definition ist, muss bei Enzymaktivitäten, die in „enzyme units“ angegeben sind, immer die genaue Definition mitangegeben werden. Wir definieren die „Unit“ (U) so:

**Eine Einheit (unit, U) entspricht derjenigen Enzymmenge, welche die Umsetzung von einem mol Substrat pro Minute unter genau festgelegten Versuchsbedingungen katalysiert.**

Als Umrechnungsfaktoren zwischen katal und unit können folgende Formeln verwendet werden:

$$1 \text{ Unit} = 16.67 \text{ nkatal}$$

$$1 \text{ katal} = 6 \times 10^7 \text{ Unit}$$

Eine wichtige abgeleitete Einheit ist die **spezifische Enzymaktivität**, gemessen in U/mg, bzw. in SI-Einheiten in katal/kg Protein. Sie dient einerseits zur Charakterisierung der Eigenschaften eines Enzyms, andererseits stellt sie eine Maßzahl für die Reinheit eines Enzympräparats dar, sofern die spezifische Aktivität des Reinenzyms bekannt ist.

### 1.5.3 Aktivitätstests

Die spezifische Aktivität eines Enzyms lässt sich mittels Enzymassays messen. Im Folgenden wird sich dabei auf die (im Praktikum angewandten) photometrischen Aktivitätstests beschränkt, da sie mit geringem apparativen Aufwand durchgeführt werden können und schnell genaue und reproduzierbare Resultate liefern.

Bei dem photometrischen Aktivitätstest wird meistens die Absorption A verfolgt:

$$A = \log \left[ \frac{I_0}{I} \right]$$

$I_0$  = Intensität des eintretenden Lichts

$I$  = Intensität des austretenden Lichts

Zwischen der Absorption A [dimensionslos] und dem molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  [ $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ] (siehe Tabelle 1), der Konzentration  $c$  [mol/l] und der Schichtdicke der Küvette  $d$  [in der Regel 1 cm] existiert die folgende Relation (**Lambert-Beersches Gesetz**):

$$A = \epsilon \times c \times d$$

nach Umformung ergibt sich:

$$c = \frac{A}{\epsilon \times d}$$

Die Aktivität U [mol/min] des Enzyms in der Küvette unter Einbeziehung des Küvettenvolumens [in l] wird dann wie folgt berechnet:

$$U = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times d}$$

Hierbei entspricht die gemessene Absorptionsänderung  $\Delta A$  mit der Zeit t [min] einer Ab- oder Zunahme der Lichtabsorption, je nachdem ob der Verbrauch eines lichtabsorbierenden Substrats oder die Bildung eines Produkts gemessen wird.

Zur praktischen Anwendung muss nicht nur das Gesamtvolumen V (in der Regel 0,001 l, Achtung: beim Acid Phosphatase Assay entspricht das Volumen 0,00522 l) sondern auch das eingesetzte Probenvolumen  $V_p$  der Proteinfraction [in ml] berücksichtigt werden. Es ergibt sich so die **Volumenaktivität (VA)**:

$$U \text{ [mol/min}\times\text{ml]} = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times d \times V_p}$$

Die **spezifische Aktivität (SA)** ergibt sich aus der gemessenen Aktivität in der Küvette (Volumenaktivität) unter Berücksichtigung der Gesamtmenge an Protein [mg/ml] durch:

$$SA \text{ [mol/min}\times\text{mg]} = \frac{U}{\text{Proteinkonzentration}}$$

Achtung: Wenn bei der Reaktion pro Mol umgesetztes Substrat nicht z. B. 1 Mol NAD(H) bzw. NADP(H) oder Methylviologen entsteht, muss das Ergebnis entsprechend korrigiert werden. Als Beispiel entstehen bei der Pyrophosphat:Fructose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase (PFK) pro Mol Fructose-6-Phosphat 2 Mol  $\text{NAD}^+$ , entsprechend muss das Ergebnis mit 0,5 multipliziert werden.

Die **Totalaktivität (TA)** in einer Fraktion ergibt sich als:

$$TA \text{ [mol/min]} = \text{Spezifische Aktivität} \times \text{Gesamtmenge Protein in der Fraktion}$$

**Tabelle 1:** Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten für die photometrische Messung einiger ausgewählter Chromophore

<b>Chromophor</b>	<b>Absorptions- maximum [nm]</b>	<b>Absorptionskoeffizient [<math>\text{l}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}</math>]</b>
NADH	340	6290
NADPH	340	6220
Cytochrom c	550	28000
5-Amino-2-nitrobenzoat	405	9500
p-Nitrophenol	405	18500
Methylviologen	600	13000

Sofern die Umsetzung des im Test verwendeten Substrats nicht selbst zu einer Änderung der Lichtabsorption führt, kann die Enzymreaktion mit einer nach- oder manchmal auch vorgeschalteten Indikatorreaktion gekoppelt werden, die zu chromophoren Produkten führt (= **gekoppelter Enzymassay**). In der Regel wird hierzu ein zweites Enzym verwendet (ein sogenanntes Indikatorenzym). Die Indikatorreaktion führt dabei häufig zur Bildung oder zum Verbrauch von NAD(P)H (gemessen bei 340 nm) durch Verwendung einer Dehydrogenase. Die Enzymaktivität ist von mehreren Faktoren abhängig, die bei Etablierung und Optimierung eines Enzymassays berücksichtigt werden müssen:

- pH-Wert und Puffersystem
- Temperatur
- Auswahl des Substrats
- Substratkonzentration
- Enzymkonzentration
- Enzymstabilität

Ein Enzymassay funktioniert nur dann korrekt, wenn nachgewiesen ist, dass die Anwesenheit aller Substrate und Cofaktoren für die Aktivität des Enzyms erforderlich ist und diese linear von der Zeit und der Menge an eingesetztem Protein abhängt. Auch muss erfasst werden, ob unkatalysiert Produkt entstanden ist. Dieses ist die sogenannte **Hintergrund-Aktivität**, die vom eigentlichen Messwert abgezogen werden muss.

### Einige Grundregeln zum Arbeiten mit Enzymen:

- Enzyme werden **immer auf Eis** gehalten
- Enzyme werden erst dann in einen Ansatz gegeben, wenn der passende Puffer schon in der richtigen Konzentration vorliegt, d.h. das Enzym wird immer erst kurz vor Gebrauch und möglichst **als letztes pipettiert**.
- Enzyme werden häufig in einem glycerinhaltigen Puffer gelagert. Aufgrund der Viskosität des Puffers muss deshalb **sehr langsam pipettiert** werden.
- Enzymverdünnungen mit Pufferlösungen anfertigen. Achtung: Stark verdünnte Enzymlösungen sind instabil und nur wenige Stunden haltbar!

### Für die Durchführung der Enzymassays im Praktikum ist folgendes zu beachten:

- Es werden jeweils **10 und 20 µg Protein** aus den einzelnen Fraktionen für die Enzymassays eingesetzt.
- Es werden Küvetten mit einem Probenvolumen von **1 ml** eingesetzt.
- Nach Zugabe des Substrats muss der Reaktionsansatz **gründlich durchmischt** werden.
- Zur Messung der Hintergrundaktivität wird das Reaktionsgemisch **zunächst ohne Substrat** gemessen und dieser Wert von der eigentlichen Aktivität abgezogen.
- Die Messung erfolgt bei **Raumtemperatur** für **5 min**.
- Die kursiv gedruckten Lösungen werden gestellt. Die anderen Lösungen werden selbst angesetzt. Die Menge der anzusetzenden Stammlösungen ist so zu berechnen, dass sie für alle Enzymassays reicht.

Nachfolgend sind die einzelnen Enzymassays aufgeführt. Als Marker für die einzelnen Kompartimente werden die in Tabelle 2 aufgelisteten Enzyme eingesetzt:

**Tabelle 2:** Markerenzyme der einzelnen Fraktionen

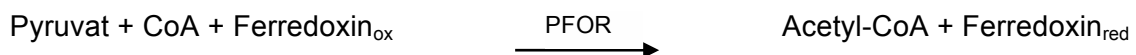
<b>Fraktion</b>	<b>Markerenzym</b>
Hydrogenosomen	Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR)
Lysosomen	Acid Phosphatase
Cytosol	Malat Dehydrogenase

### 1.5.3.1 Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) (EC 1.2.7.1)

#### Literatur

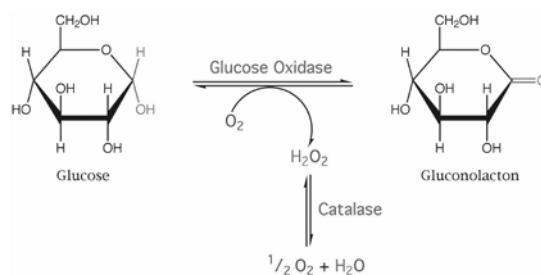
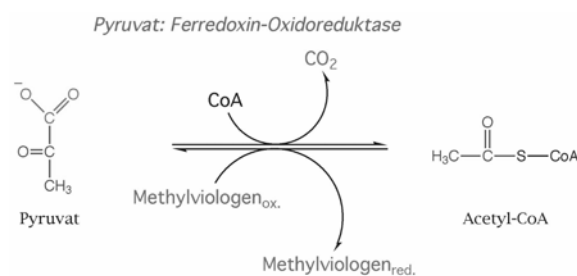
Williams *et al.* (1987) Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. J.* 246(2): 529-536

Die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, die dabei frei werdenden Elektronen werden auf oxidiertes Ferredoxin übertragen:



PFOR kommt nur in anaeroben Organismen vor und ist dementsprechend sauerstoffempfindlich. Die Inaktivierung des Enzyms durch O<sub>2</sub> ist jedoch reversibel, darum muss im Assay nicht unter anaeroben Bedingungen gearbeitet werden. Vorhandener Sauerstoff im Assay wird durch ein „Scavenging System“ aus Glucose, Glucose-Oxidase und Katalase aufgebraucht und PFOR dadurch wieder aktiv. Eine Übersichtung des Reaktionsansatzes mit wassergesättigtem Butanol schützt das Enzym vor weiterem Sauerstoff aus der Umgebung. Im Assay wird Ferredoxin durch Methylviologen als Elektronenakzeptor ersetzt, das bei Reduktion sein Absorptionsverhalten verändert und zur Aktivitätsmessung genutzt werden kann.

Reaktionen im Assay:



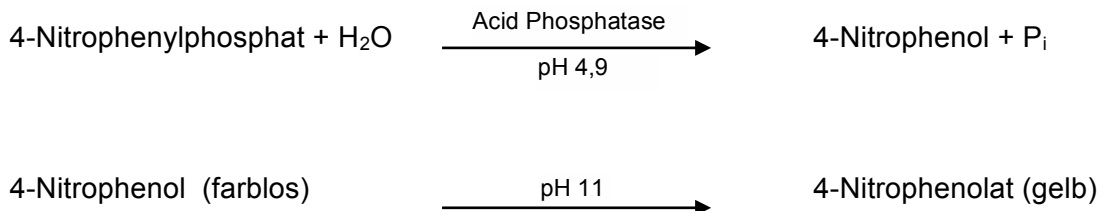
### 1.5.3.2 Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2)

#### Literatur

Moss *et al.* (1985) An enzyme-amplified monoclonal immunoenzymometric assay for prostatic acid phosphatase. *Clinica Chimica Acta* 152: 85-94

Die Acid Phosphatase dephosphoryliert in den Lysosomen Orthophosphat-Monoester zu Alkohol und Phosphat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Das Enzym ist in den Lysosomen gespeichert und wird bei deren Fusion mit Endosomen aktiv. Endosomen sind im aktiven Zustand angesäuert. Deswegen hat die Acid Phosphatase ein saures pH-Optimum.

Reaktionen im Assay:



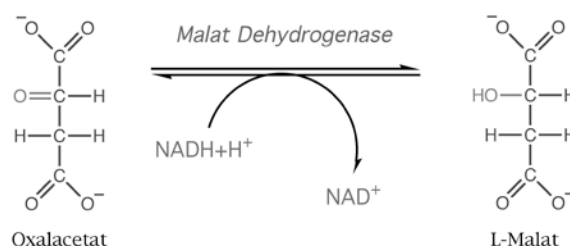
### 1.5.3.3 Malat Dehydrogenase (MDH) (EC 1.1.1.37 und 1.1.1.82)

#### Literatur

Ochoa, S. (1955) Malic Dehydrogenase from pig heart. *Method. Enzymol.* 1: 735-739  
Baernstein, H. D. (1961) Malic Dehydrogenase in *T. vaginalis*. *J. Parasitol.* 2: 279-284

Die Malat Dehydrogenase katalysiert die  $\text{NAD}^+$ -abhängige, reversible Umwandlung von Malat in Oxalacetat. Malat Dehydrogenasen kommen in eukaryotischen Zellen in vielen Isoformen und diversen subzellulären Lokalisationen vor. Sie spielen eine große Rolle im Katabolismus, in anaplerotischen Prozessen (= Reaktionen, die Zwischenprodukte des Citratzyklusses bilden) und im Austausch von Metaboliten zwischen Kompartimenten. Bei *Trichomonas vaginalis* ist die Malat Dehydrogenase im Cytosol lokalisiert.

Reaktion im Assay:



## 1.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbarkeit von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Blue G250. Dieser Farbstoff besitzt eine negative Ladung, die mit den positiven Ladungen eines Proteins bindet. Coomassie-Blue G250 existiert in einer roten Form ( $A_{\max}= 465 \text{ nm}$ ) und einer blauen Form ( $A_{\max}= 595 \text{ nm}$ ). Die rote Form ist in Lösung die vorherrschende Form, wenn jedoch die negativen Ladungen des Farbstoffs an die positiven Ladungen der Proteine binden, erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm, gleichzeitig steigt die Absorption bei 595 nm an. Bei der Konzentrationsbestimmung wird diese Änderung photometrisch verfolgt.

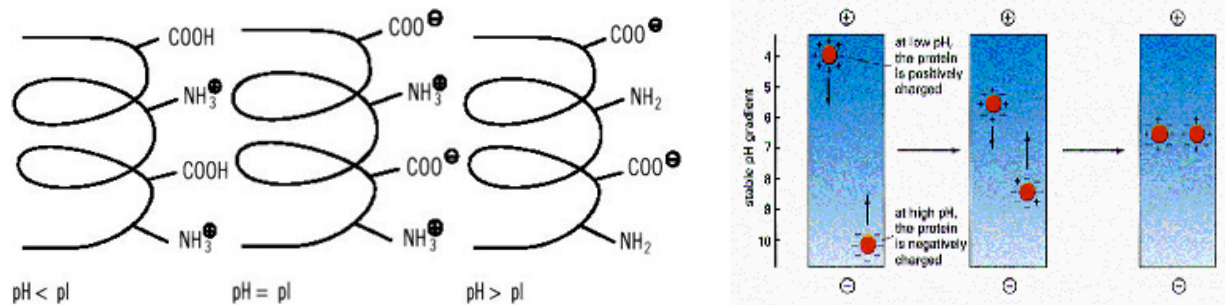
## 1.7 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese als hochauflösende Trenntechnik für komplexe Proteingemische wurde 1975 von O'Farrel und Klose unabhängig voneinander veröffentlicht. Bei der 2D-Gelelektrophorese werden Proteine in zwei diskreten Schritten nach zwei unabhängigen Eigenschaften getrennt: in der ersten Dimension trennt eine isoelektrische Fokussierung die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI), in der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Molekulargewicht (MW). Jeder Spot auf dem resultierenden 2D-Gel entspricht einem einzelnen Protein. Auf diese Weise können tausende Proteine separiert werden und aus dem Gel direkt pI und apparentes MW der Proteine bestimmt werden. Die 2D-Elektrophorese findet breite Anwendung, so z.B. bei der Analyse der Zelldifferenzierung, der Suche nach Krankheitsmarkern, dem Monitoring von Therapien, der Suche nach pharmazeutisch wirksamen Substanzen, der Krebsforschung, der Microsequenzierung von Proteinen etc.

### 1.7.1 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrische Fokussierung werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt (Abbildung 7). Proteine sind amphotere Moleküle, sie tragen abhängig vom pH-Wert ihrer Umgebung eine negative, positive oder gar keine Nettoladung. Die Nettoladung eines Proteins ist die Summe aller positiven und negativen Ladungen der Aminosäure-Seitenketten sowie des Carboxyl- und Aminoterminus. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist der pH-Wert, an dem die Nettoladung 0 beträgt. Proteine sind bei pH-Werten unterhalb ihres pI positiv und bei pH-Werten oberhalb ihres pI negativ geladen. Diese Eigenschaft wird für die IEF genutzt: In einem pH-Gradienten unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wird ein Protein zu der Stelle im Gradienten wandern, an dem seine Nettoladung 0 beträgt. Ein Protein mit einer positiven Nettoladung wandert in Richtung der Kathode und wird dabei immer weniger positiv bis es seinen pI erreicht. Dementsprechend wandert ein Protein mit

negativer Nettoladung in Richtung der Anode und verliert zunehmend negative Ladungen bis es seinen  $pI$  und damit die Nettoladung 0 erreicht hat. Diffundiert ein Protein aus dem Bereich seines  $pI$  heraus, nimmt es wieder Ladungen auf und wandert zurück zum  $pI$ . Dieser Fokussierungseffekt erlaubt die Trennung von Proteinen mit sehr kleinen Ladungsunterschieden. Die Auflösung der IEF ist von der Steilheit des pH-Gradienten und der Feldstärke abhängig.



**Abbildung 7:** Das Prinzip der Isoelektrischen Fokussierung

Die ursprüngliche Methode für die Isoelektrische Fokussierung waren durch Carrier-Ampholyte gebildete pH-Gradienten in Polyacrylamid-Röhrchengelen. Carrier-Ampholyte sind kleine, amphotere Moleküle mit hoher Pufferkapazität im Bereich ihres  $pI$ . Im elektrischen Feld wandern die Ampholyte mit dem niedrigsten  $pI$  (und der negativsten Ladung) zur Anode, die Ampholyte mit dem höchsten  $pI$  (und der positivsten Ladung) zur Kathode. Die anderen Ampholyte ordnen sich dazwischen gemäß ihrem  $pI$  an und bilden einen kontinuierlichen pH Gradienten aus. Diese Methode hat jedoch einige Nachteile:

- Carrier-Ampholyt-Mischungen variieren von Charge zu Charge. Diese Unterschiede beeinträchtigen die Reproduzierbarkeit.
- pH-Gradienten aus Carrier-Ampholyten sind instabil und driften während des Laufs in Richtung der Kathode. Dadurch flacht der Gradient an den Enden, besonders über einem pH-Wert von 9,0 ab. Proteine mit hohem  $pI$  gehen verloren.
- Die dünnen Röhrchengele sind instabil und schwierig zu handhaben, die Reproduzierbarkeit ist nicht ausreichend.

Seit 1982 wurden immobilisierte pH-Gradienten (IPG) entwickelt, die diese Nachteile nicht mehr aufweisen. Bei IPGs werden saure und basische Puffergruppen kovalent an das Poly-acrylamid gebunden. Diese immobilisierten Gradienten können nicht im Gel wandern.

Zur Stabilisierung werden diese Gele auf Plastikunterlagen gegossen. Sie werden getrocknet und vor Gebrauch mit den für die IEF nötigen Pufferkomponenten rehydratisiert. IPG-Strips werden von verschiedenen Herstellern in dehydratisierter Form angeboten und sind in unterschiedlichen Längen und verschiedenen pH-Spannen mit linearen und nicht-linearen Gradienten erhältlich. Sie haben eine höhere Ladekapazität, da die Probe während der Rehydratisierung auf der gesamten Striplänge aufgebracht werden kann.

### **1.7.2 2. Dimension: SDS-PAGE**

In der 2. Dimension der 2D-Gelelektrophorese werden die fokussierten Proteine in einem SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht (MW) getrennt. Dafür werden die Proteine mit dem anionischen Detergens SDS (Natrium-Dodecyl Sulfat) abgesättigt um eine nach außen negative Ladung an allen Proteinen herzustellen. Die Eigenladung der Proteine wird so überdeckt und die Trennung kann allein nach dem MW erfolgen. SDS unterbricht zudem Wasserstoffbrücken und blockiert hydrophobe Interaktionen, so dass die Proteine denaturiert vorliegen.

## **1.8 2D-Gelelektrophoretische Trennung von hydrogenosomalen Proteinen**

### **1.8.1 1. Dimension: IEF**

#### **1.8.1.1 Probenvorbereitung für die IEF**

Eine sorgfältige Denaturierung und Solubilisierung der Proteine in der Probenvorbereitung ist essentiell für gute 2D-Resultate. Aufgrund der großen Diversität von Proteingemischen muss die optimale Vorbereitung für jedes Material empirisch bestimmt werden. Im Idealfall resultiert die Vorbereitung in der vollständigen Solubilisierung, Denaturierung und Reduktion aller Proteine in einer Probe. Die Solubilisierungspuffer müssen bestimmte Komponenten enthalten, um die vollständige Solubilisierung und Denaturierung der Proteine vor dem Auftragen auf die IEF-Gele zu gewährleisten. Dazu gehören insbesondere Harnstoff und ein oder mehrere Detergentien. Harnstoff ist ein neutrales Chaotrop, das denaturierend wirkt und in Konzentrationen von mindestens 8 M eingesetzt wird. Harnstoff entfaltet die meisten Proteine vollständig, so dass alle ionisierbaren Gruppen exponiert werden. Die denaturierende Wirkung, besonders auf schwerlösliche Membranproteine, kann durch Zusatz von 2 M Thioharnstoff verstärkt werden. Nicht-ionische oder zwitterionische Detergentien in Konzentrationen bis 4% im Probenpuffer verhindern zusätzlich die Aggregation von Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkungen. Hier ist das zwitterionische CHAPS besonders effektiv. Alternativ wird auch Triton X 100 eingesetzt. Das anionische SDS solubilisiert Proteine sehr effektiv, bildet aber aufgrund seiner Ladung Komplexe mit den Proteinen und kann nicht als

alleiniges Detergens eingesetzt werden. Auch Reduktionsmittel werden häufig zugesetzt, um Disulfidbrücken zu lösen und die Proteine in vollständig reduziertem Zustand zu halten. DTT in Konzentrationen von 20-100 mM ist das am häufigsten benutzte Reduktionsmittel.  $\beta$ -Mercaptoethanol ist weniger geeignet, da es in höheren Konzentrationen eingesetzt werden muss und durch inhärente Unreinheiten zu Artefakten bei der Fokussierung führen kann. Es können Carrier-Ampholyte oder IPG-Puffer bis 2% eingesetzt werden. Sie verhindern die Aggregation der Proteine durch Ladungsinteraktionen.

### **1.8.1.2 Rehydratisierung und Beladung von IPG-Strips**

Es gibt generell zwei Möglichkeiten, die IPG-Strips zu beladen. Zum einen können die Proteine in den Rehydratationspuffer gegeben werden und während der Rehydratisierung über die gesamte Länge des Strips in das Gel diffundieren. Dies ermöglicht die Beladung mit größeren Proteinmengen. Zum anderen können die Strips ohne Proteine mit Rehydratationspuffer rehydratisiert werden (Cup-loading). Die Proteinproben werden danach in die Wells der Striphalter pipettiert. Hier kann das Protein wahlweise am anodischen oder kathodischen Ende aufgebracht werden. Dies kann bei manchen Proben und Gradienten von Vorteil sein. Die Wells fassen aber nur maximal 30  $\mu$ l, dieses Verfahren ist also nur bei kleinen Proteinmengen geeignet. Inzwischen gibt es aber Striphalter mit Sample-loading Cups im Handel, die bis zu 100  $\mu$ l Probenvolumen fassen und damit auch präparative Ansätze mit Cup-loading ermöglichen.

### **1.8.2 2. Dimension: SDS-PAGE – Äquilibrierung von IPG-Strips**

Der Äquilibrierungsschritt sättigt die IPG-Gele mit dem SDS-Puffersystem für die zweite Dimension. Die Funktionen der Bestandteile der Äquilibrierungslösung sind:

- Tris-HCl pH 8,8 hält den pH-Wert in für die Elektrophorese im geeigneten Bereich.
- Harnstoff und Glycerin reduzieren den Effekt der Elektroendosmose, indem sie die Viskosität des Puffers erhöhen.
- DTT hält die Proteine in vollständig reduziertem Zustand.
- SDS denaturiert die Proteine vollständig und bildet negativ geladene Protein-SDS-Komplexe. Die Menge von SDS an einem Protein ist direkt proportional zur Masse des Proteins. Dadurch wird die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich.

## **1.9 2D-Gelelektrophorese: Alternativen zur Isoelektrischen Fokussierung**

Neben der beschriebenen 2D-Gelelektrophorese mit IEF in der ersten Dimension werden auch andere Methoden zur Trennung von Proteinen in der ersten Dimension eingesetzt, die insbesondere für die Auftrennung von schwer für die IEF zu solubilisierenden, hydrophoben Membranproteinen geeignet sind. Ein Beispiel ist die Blau-Native-Gelelektrophorese (BN), bei der Proteine unter nativen Bedingungen mit einem milden Detergens (z. B. Laurylmaltosid, Triton X 100) solubilisiert und anschließend in Anwesenheit von Coomassie Brilliant-Blau im Polyacrylamid-Gel getrennt werden. Das anionische Coomassie bindet während der Elektrophorese an hydrophobe Bereiche der Proteine und bewirkt eine Ladungsverschiebung. Die Proteine wandern in Richtung der Anode, Proteinkomplexe bleiben dabei erhalten und können in der anschließenden SDS-PAGE in ihre Komponenten getrennt werden.

Eine weitere Methode ist die 16-BAC/SDS-PAGE. Hier wird in der ersten Dimension ein saures Puffersystem und statt anionischem SDS das kationische Detergens Benzyl-dimethyln-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) eingesetzt. Die positiv geladenen Protein-BAC Komplexe wandern entsprechend ihrem Molekulargewicht in Richtung der Kathode, in der zweiten Dimension erfolgt eine SDS-PAGE. Alternativ zu 16-BAC können auch andere kationische Detergentien wie z.B. CTAB eingesetzt werden.

## **1.10 Membranpräparation aus Hydrogenosomen**

Eine schnelle und einfache Methode zur Isolation von Organellenmembranen und deren Proteine ist die Behandlung mit eiskaltem Natriumcarbonat mit stark alkalischem pH-Wert gefolgt von einer Zentrifugation, um die Membranen zu pelletieren. Bei dieser Methode werden die geschlossenen Organellen zu geöffneten Membranplatten. Die in den Organellen enthaltenen Proteine und die peripheren Membranproteine werden in löslicher Form freigesetzt. Nach einer Zentrifugation befinden sich die löslichen Bestandteile im Überstand und die Membranen und die integralen Proteine im Pellet.

## **1.11 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Die Fällung (Präzipitation) von Proteinen beruht auf der Interaktion von präzipitierenden Agenzien mit den in Lösung befindlichen Proteinen. Die Wirkung der Agenzien ist dabei entweder unspezifisch oder spezifisch. Unspezifische Agenzien fällen praktisch alle Proteine aus einer Lösung aus. Bei der Verwendung spezifischer Agenzien wird eine Fraktionierung der Bestandteile einer Lösung möglich. Eine häufig angewendete Methode zur Proteinfällung ist die Fällung mit Trichloressigsäure. Dabei werden die Proteine denaturiert, so dass diese

Art der Fällung meist nur zur Konzentrierung für eine Gelelektrophorese oder vor enzymatischen Spaltungen angewendet wird.

### 1.12 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot

Im Western Blot soll die Lokalisation des Proteins ASCT (Acetat:Succinat-CoA Transferase) in Zellen von *Trichomonas vaginalis*- und *Tritrichomonas foetus* bestimmt werden.

Beim Western-Transfer werden zuvor durch eine SDS-PAGE getrennte Proteine zur späteren Immunodetektion auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Dabei wird mittels Spannung eine Wanderung der geladenen Proteine auf die Membran induziert. Die Nitrozellulosemembran wird dann zunächst mit einem Blockingreagenz behandelt, das Stellen auf der Membran absättigt, an die kein Protein gebunden hat. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem Erstantikörper (Anti-ASCT). Dieser bindet spezifisch an die ASCT. Danach wird die Membran mit einem Zweitantikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an den Erstantikörper und ist mit einer Peroxidase verbunden. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid in alkalischem Milieu. Luminol gerät durch die Reaktion in einen angeregten Zustand, welcher durch die Emission von Licht der Wellenlänge  $\lambda = 428 \text{ nm}$  abklingt. Das Maximum der Lichtemission kann über einen Film erfasst werden. Die geschwärzte Stelle auf dem Film entspricht der Position des gesuchten Proteins im Polyacrylamidgel.

### 1.13 Fluoreszenzmikroskopie

Die wichtigsten Anwendungen der Fluoreszenzmikroskopie basieren auf der spezifischen Färbung einzelner Zellbestandteile, meist bestimmter Proteine. Diese werden zuvor mit Hilfe spezifisch bindender fluoreszenzmarkierter Liganden (z.B. DAPI für DNA), spezifischer Antikörper (Immunofluoreszenz) oder durch Fusion mit einem fluoreszierenden Protein wie GFP (Green Fluorescent Protein) markiert. Die fluoreszierenden Proteine müssen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden (excitation). Sie emittieren dann Licht, welches durch die Stokes-Shift in der Regel langwelliger als das anregende Licht ist (emission).

Der Aufbau der meisten Fluoreszenzmikroskope entspricht dem eines normalen Mikroskops. Sie besitzen zu der normalen Leuchte jedoch noch eine UV-Lampe. Das zu beobachtende Objekt wird mit UV-Licht bestrahlt, das einen Filter passiert, der nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches durchlässt. Das vom Objekt emittierte Licht trifft ebenfalls auf einen Filter für einen bestimmten Wellenlängenbereich. So wird nur Licht bestimmter Wellenlängen vom Betrachter des Objektes wahrgenommen. Aus dem fluores-

zenzmikroskopischen Bild können Rückschlüsse auf die Lokalisation des Proteins in der Zelle gezogen werden (z.B. im Kern, im Cytosol, in bestimmten Organellen).

Im Praktikum soll die Lokalisierung eines Proteins von *Trichomonas vaginalis* (ASCT) *in vivo* nachgewiesen werden. Dazu wird neben dem Erst-Antikörper (Anti-ASCT) gegen das spezifische Protein ein Zweit-Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, verwendet. Bei dem fluoreszierenden Farbstoff handelt es sich um Alexa Fluor. Als Alexa Fluor werden eine ganze Reihe von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die von Molecular Probes (Invitrogen), hergestellt werden, bezeichnet. Die Farbstoffe werden typischerweise als Zell- oder Gewebe-Marker bei der Fluoreszenzmikroskopie und in der Zellbiologie verwendet. Die Anregungs- und Emissionsspektren von Alexa Fluor decken den gesamten sichtbaren Spektralbereich sowie den Infrarot-Bereich ab. Die verschiedenen Alexa Fluor-Farbstoffe werden anhand ihrer Anregungsmaxima (in nm) unterschieden. Im Praktikum wird Alexa Fluor 594 (orange-rot) verwendet.

## 2. PRAKTISCHER TEIL

### 2.1 Anzucht von *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*

Die Anzucht der Trichomonaden erfolgt in Flüssigkultur in Diamond's Medium bei 37°C ohne Schütteln in fest verschließbaren Röhrchen oder Flaschen. Die sauerstoffarmen Bedingungen stellen sich in den Kulturgefäßen von selbst ein. Die Generationszeit beträgt ca. 8 h, geerntet wird bei ca.  $10^6$  Zellen/ml. Ab  $8 \times 10^6$  Zellen/ml sterben die Kulturen sehr schnell ab.

Jede Gruppe zieht je 1 Liter *T. vaginalis* und *T. foetus* für die Isolierung der Hydrogenosomen an. Es sind ca. 2 bis 3 g Zellen/l zu erwarten.

#### Diamond's Medium

Tryptose	22,22 g
Hefe Extrakt	11,11 g
Maltose	5,55 g
Cystein (Freie Base)	1,11 g
Ascorbinsäure	0,22 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,88 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,88 g

ca. 700 ml dest. H<sub>2</sub>O zugeben und unter Rühren die Stoffe lösen

**pH-Wert einstellen** mit HCl bzw. KOH: **pH 6,2** für *T. vaginalis*

**pH 7,2** für *T. foetus*

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 893 ml auffüllen, in eine 1 Liter-Flasche füllen (SPEZIELLE Flasche!)

im Zuckerprogramm autoklavieren

**Vor dem Animpfen** mit Kultur wird unter sterilen Bedingungen pro 893 ml Medium zugeben:

hitzeinaktiviertes Pferdeserum	100 ml
Eisenlösung (s.u.)	7 ml
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	10 ml

**ANIMPFEN:** Pro Gruppe je 1 l Medium mit 100 ml dicht bewachsener Vorkultur (*T. vaginalis* und *T. foetus*, AUF pH-WERTE ACHTEN!!) animpfen und bei 37°C ca. 24 h inkubieren.

#### Eisenlösung (1× für alle ansetzen)

Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )×6H <sub>2</sub> O	0,5 g
5-Sulfosalicylsäure	0,05 g

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern (max. 2 Wochen)

## 2.2 Isolation von Hydrogenosomen aus *T. vaginalis* und *T. foetus*

benötigte Materialien und Lösungen:

Mörser und Pistill	am Vortag in den Kühlschrank stellen
1 M Saccharose	3 l für den Kurs ansetzen
1 M MOPS/KOH pH 7,2	150 ml für den Kurs ansetzen
Isotonische Saccharose	100 ml für den Kurs ansetzen
SMB	500 ml pro Gruppe ( <b>Wasser am Vortag kaltstellen</b> )
SMDI	250 ml pro Gruppe ( <b>Wasser am Vortag kaltstellen</b> )
SMDI $\frac{1}{10}$	200 ml pro Gruppe ( <b>Wasser am Vortag kaltstellen</b> )
90% Percoll	130 ml für den Kurs ( <b>frisch ansetzen</b> )
1 M DTT wird gestellt	
TLCK (Protease-Inhibitor; 25 mg/ml in 0,5 M Na-Acetat pH 5,2) wird gestellt	
Leupeptin (Protease-Inhibitor; 5 mg/ml in Wasser) wird gestellt	

**Isotonische Saccharose** (2,5 M Saccharose/100 mM MOPS/KOH pH 7,2) 1× für alle  
in einen 250 ml Erlenmeyerkolben 100 ml dest. H<sub>2</sub>O geben und Wasserstand markieren  
ausgießen und folgendes in den Erlenmeyerkolben geben:

85,85 g Saccharose  
10 ml 1 M MOPS/KOH pH 7,2

dest. H<sub>2</sub>O bis zur Markierung zugeben und über Nacht bei 37°C schütteln

Lösungen sind wie folgt anzusetzen:

**SMB (Sucrose/MOPS/ $\beta$ -Mercaptoethanol) 500 ml**

dest H <sub>2</sub> O	370 ml (über Nacht kalt stellen)
1 M Saccharose	125 ml
1 M MOPS/KOH pH 7,2	5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	350 $\mu$ l

**SMDI (Sucrose/MOPS/DTT/Inhibitoren) 250 ml**

dest. H <sub>2</sub> O	182 ml (über Nacht kalt stellen)
1 M Saccharose	63 ml
1 M MOPS/KOH pH 7,2	2,5 ml
1 M DTT	2,5 ml
TLCK (25 mg/ml)	500 $\mu$ l
Leupeptin (5 mg/ml)	500 $\mu$ l

**SMDI <sup>1</sup>/<sub>10</sub> (Sucrose/MOPS/DTT/<sup>1</sup>/<sub>10</sub> Konz. an Inhibitoren) 200 ml**

dest. H <sub>2</sub> O	146 ml (über Nacht kalt stellen)
1 M Saccharose	50 ml
1 M MOPS/KOH pH 7,2	2 ml
1 M DTT	2 ml
TLCK (25 mg/ml)	40 $\mu$ l
Leupeptin (5 mg/ml)	40 $\mu$ l

**90% Percoll 130 ml 1× für alle ansetzen**

Percoll	117 ml
Isotonische Saccharose	13 ml
1 M DTT	1,3 ml
TLCK	260 $\mu$ l
Leupeptin	260 $\mu$ l

**Alle Schritte erfolgen unbedingt auf Eis bzw. bei 4°C! Rotoren am Vortag kalt stellen!**

1. einen 500 ml Zentrifugenbecher wiegen
2. die Kulturen sukzessive in 500 ml Zentrifugenbechern im SLA3000-Rotor (Sorvall Zentrifuge) bei 3100 rpm (1000×g) 10 min pelletieren
3. Überstand abgießen (zurück in die Flaschen, da er totautoklaviert werden muss!)
4. Zellen in 100 ml eiskaltem SMB resuspendieren
5. 10 min bei 3100 rpm und 4°C zentrifugieren (SLA3000-Rotor, Sorvall Zentrifuge)
6. Überstand verwerfen und Zellen in 100 ml eiskaltem SMB resuspendieren
7. 10 min bei 3100 rpm und 4°C zentrifugieren (SLA3000-Rotor, Sorvall Zentrifuge)
8. Überstand verwerfen und den Zentrifugenbecher wiegen (zur Gewichtsbestimmung des Pellets; Gewicht notieren!)
9. Pellet in 30 ml eiskaltem SMDI resuspendieren und auf Eis stellen
10. Zellaufschluss: das resuspendierte Pellet in einen vorgekühlten und mit SMDI ausgespülten Mörser überführen, auf Eis stellen und 20-30 min mit Glasperlen mörsern (Luftblasen vermeiden)
11. zwischendurch den Zellaufschluss unter dem Mikroskop kontrollieren
12. das Mörsern beenden, wenn nur noch wenige Zellen intakt sind
13. alles aus dem Mörser in ein vorgekühltes 50 ml Falcon-Röhrchen überführen  
Mörser mit soviel SMDI spülen, dass das Volumen mit Glasperlen 45 ml ergibt
14. 10 min bei 755×g und 4°C zentrifugieren (Heraeus-Zentrifuge, 2000 rpm)
15. Überstand (= Organellen und Cytosol) vorsichtig in Nalgene-Röhrchen überführen und auf Eis stellen, Pellet (= Zellkerne und nicht lysierte Zellen) verwerfen  
Volumen des Überstands notieren und 2 ml für Bradford-Test, Enzymassays und 1D-SDS-Gele abnehmen (= **Gesamtzelleextrakt**, auf Eis im Kühlschrank lagern)
16. den Überstand in den Nalgene-Röhrchen 10 min bei 7500×g, 4°C zentrifugieren (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 8000 rpm)
17. 130 ml 90% Percoll für alle Gruppen vorbereiten (während der Zentrifugation)
18. Überstand (= **Cytosol**) abnehmen und für Bradford/Enzymassays/1D-SDS-Gele aufbewahren
19. das Pellet vorsichtig in 10 ml SMDI resuspendieren (Nalgene-Röhrchen NICHT wegwerfen, sondern spülen!!)
20. auf 19 ml mit SMDI auffüllen und in ein Becherglas auf Eis stellen
21. zu dem resuspendierten Pellet im Becherglas das gleiche Volumen (19 ml) 90% Percoll geben und mischen
22. die Suspension in ein Beckmann OptiSeal Ultrazentrifugenröhrchen füllen (mit einer 5 ml-Glaspipette), keine Luftblasen erzeugen, die Röhrchen mit Stopfen (schwarz) und Deckel (gold) verschließen und **genau** gegeneinander austarieren

23. 45 min bei 30000 rpm und 4°C im VTi-50-Rotor mit Bremsen bis 800 rpm zentrifugieren (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann); die Zentrifugation dauert ca. 60 min (Mittagspause)
24. Röhrchen **vorsichtig** aus dem Rotor nehmen und auf Eis stellen
25. es sollten zwei distinkte Banden entstanden sein: obere weiße Bande = **Lysosomen**, untere braune Bande = **Hydrogenosomen**. An der Seitenwand befindet sich ein Polysaccharid-Pellet.
26. alles bis 1 cm über den Lysosomen abnehmen und werfen (lange Pasteurpipette; Achtung: nicht in das Polysaccharid-Pellet stechen, sonst verstopft die Pasteurpipette)
27. **Lysosomenbande** mit Pasteurpipette abnehmen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen und für Bradford und Enzymtests auf Eis im Kühlschrank lagern, Volumen notieren
28. alles bis 1 cm über der Hydrogenosomen-Bande abnehmen und werfen
29. **Hydrogenosomen** sauber mit einer langen Pasteurpipette abnehmen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführen; Volumen bestimmen
30. Hydrogenosomen zu Entfernung des Percolls 1:10 mit SMDI  $1/10$  verdünnen und in einen kleinen Zentrifugenbecher (250 ml) füllen
31. 15 min bei 7500×g (8000 rpm) und 4°C im SLA1500-Rotor (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugieren, das Percoll bleibt im Überstand
32. das Hydrogenosomen-Pellet vorsichtig in 40 ml SMDI resuspendieren
33. 15 min bei 7500×g (8000 rpm) und 4°C im SLA1500-Rotor (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugieren
34. den Überstand so vollständig wie möglich abnehmen
35. das Pellet (= **Hydrogenosomen**) in 100 µl SMDI resuspendieren und das Volumen notieren
36. alle gesammelten Proteinfractionen auf Eis im Kühlschrank lagern
37. für Gesamtzellextrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen den Proteingehalt nach der Bradford-Methode bestimmen
38. Enzymassays (PFOR, Acid Phosphatase und Malat Dehydrogenase) zur Reinheitsbestimmung der erhaltenen Fraktionen durchführen
39. 1D-SDS-Gel, Western Blot mit ASCT-Nachweis

### 2.3 BSA-Kalibrierungsgerade (für die Proteinbestimmung nach Bradford)

Um die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben nach Bradford bestimmen zu können, wird zuvor eine **BSA-Kalibrierungsgerade** angefertigt, aus der später die Proteinkonzentrationen abgelesen bzw. errechnet werden können.

benötigte Lösung:

#### Bradford-Lösung

100 mg Coomassie-Blue **G250** (nicht R250!)

50 ml 96% Ethanol

Farbstoff und Alkohol zunächst 30 min rühren

dann unter dem Abzug

100 ml 85% (v/v) Orthophosphorsäure hinzugeben

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, filtrieren und dunkel (Alufolie) bei 4°C aufbewahren

Durchführung:

1. 1 ml einer 1 µg/µl BSA-Stammlösung herstellen (wird gestellt!)
2. die Bradford-Lösung auf Raumtemperatur erwärmen
3. jeweils 980 µl Bradford-Lösung in Küvetten geben und jeweils mit **0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8; 10** und **16 µg BSA** versetzen, mit **H<sub>2</sub>O** auf **1000 µl** auffüllen, gut mischen!  
(von jeder Konzentration 3 Ansätze anfertigen → **Dreifachbestimmung**, es werden also insgesamt 24 Küvetten benötigt)
4. eine **Blindprobe** anfertigen: 980 µl Bradford-Lösung + 20 µl H<sub>2</sub>O (mischen!)
5. Ansätze 10 min inkubieren

**Für eine Reproduzierbarkeit ist darauf zu achten, dass für alle Proben die Inkubationszeit gleich lang ist.**

6. innerhalb der nächsten Stunde die Absorption der Proben bei **595 nm** gegen die Blindprobe messen
7. **Kalibrierungsgerade** erstellen: Absorption (Mittelwert) gegen die BSA-Konzentration (in µg) auftragen und Geradengleichung berechnen (y-Achsenabschnitt der Geraden bei (0/0) wählen)

## 2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

benötigte Lösung:

### Bradford-Lösung

100 mg Coomassie-Blue G250 (nicht R250!)

50 ml 96% Ethanol

Farbstoff und Alkohol zunächst 30 min rühren

dann unter dem Abzug

100 ml 85% (v/v) Orthophosphorsäure hinzugeben

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, filtrieren und dunkel (Alufolie) bei 4°C aufbewahren

Durchführung:

1. die Bradford-Lösung auf Raumtemperatur erwärmen
2. **Mitochondrien** und **PMS** 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnen (Achtung: nicht die gesamte Probe verdünnen!!!)

### Es werden Dreifachbestimmungen durchgeführt!

3. 980 µl Bradford-Lösung in Küvetten geben und mit den Proben versetzen:

**Mitochondrien:** 1 µl von der 1:10 Verdünnung + 19 µl H<sub>2</sub>O

**PMS:** 1 µl von der 1:10 Verdünnung + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Gesamtzellextrakt:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Cytosol:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Lysosomen:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Hydrogenosomen:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

4. mit H<sub>2</sub>O auf **1000 µl** auffüllen
5. Ansätze gut mischen
6. nach ca. 10 min erreicht die Reaktion ein Plateau und der gebildete Farbkomplex ist für etwa eine Stunde stabil
7. Absorption bei **595 nm** gegen eine **Blindprobe** (980 µl Bradford-Lösung + 20 µl H<sub>2</sub>O) messen
8. Proteinkonzentration mittels der erstellten BSA-Kalibrierungsgeraden errechnen

Bradford

Auswertung:

<b>Organismus</b>	<b>Fraktion</b>	<b>Volumen [ml]</b>	<b>Proteinkonzentration [mg/ml]</b>	<b>Gesamt- Protein [mg]</b>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Gesamtzellextrakt			
	Cytosol			
	Lysosomen			
	Hydrogenosomen			
	Matrixproteine (Hydrogenosomen)			
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Gesamtzellextrakt			
	Cytosol			
	Lysosomen			
	Hydrogenosomen			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrien			
	PMS			

## 2.5 Enzymassay der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) (EC 1.2.7.1)

### ACHTUNG:



Methylviologen ist giftig und umweltgefährdend. Sowohl Flüssig- als auch Festabfälle müssen gesondert entsorgt werden.

Die Messungen werden für jede erhaltene Fraktion (d.h. Gesamtzellextrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen) durchgeführt. Immer sowohl mit 10 µg als auch mit 20 µg Protein.

Zusätzlich wird für jede erhaltene Fraktion **einmal** die **Hintergrundaktivität** bestimmt. Dazu wird eine Messung mit 20 µg Protein durchgeführt, bei der keine Substrate (Glucose und Na-Pyruvat) zugegeben werden, sondern stattdessen dieselbe Menge an Wasser (12,5 µl).

Bei jeder Messung im Photometer muss zudem ein **Blindwert** vorhanden sein. Bei diesem handelt es sich um eine Messung, bei der kein Protein dazugegeben wird (also: 788 µl Reaktionsansatz + 200 µl Wasser). Hier werden die Substrate jedoch dazugegeben.

Zuvor wird mit den Betreuern abgestimmt, wieviel von dem Mastermix für den Reaktionsansatz anzusetzen ist. Als Hilfe für das Ansetzen dient die folgende Tabelle.

Endkonzentration	Stamm- lösung	Menge für 1 Reaktion [1 ml]	Mastermix
<i>100 mM K-Phosphatpuffer pH 7,0</i>	1 M		
<i>20 mM DTT</i>	1 M		
<i>0,25 mM CoA</i>	10 mM		
<i>20 mM Methylviologen</i>	1 M		
<i>0,2% Triton X 100</i>	10%		
<i>10 U Glucose Oxidase</i>	1000 U/ml		
<i>10 U Katalase</i>	1000 U/ml		
H <sub>2</sub> O		583 µl	

*kursiv geschriebene Lösungen werden gestellt*

## PFOR-Assay

Von diesem Mastermix für den Reaktionsansatz werden 788  $\mu\text{l}$  in jeweils eine Küvette gegeben (zuvor überlegen, wie viele Küvetten benötigt werden (an Hintergrund- und Blindwert-Messungen denken)).

Pro Assay in eine Küvette geben:

788 $\mu\text{l}$	Reaktionsansatz
x $\mu\text{l}$	Proteinextrakt (10 und 20 $\mu\text{g}$ Protein)
n $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O (n = 200 $\mu\text{l}$ – x $\mu\text{l}$ )
<hr/>	
$\Sigma$ 988 $\mu\text{l}$	

Küvetten in das Photometer stellen

10  $\mu\text{l}$  2 M *Glucose* zugeben

2,5  $\mu\text{l}$  1 M *Na-Pyruvat* zugeben

### **mischen**

(schnell) mit 100  $\mu\text{l}$  wassergesättigtem Butanol überschichten

### **Messung starten**

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Substrate **Glucose** und **Na-Pyruvat** gestartet.

Es wird die Reduktion des Methylviologens bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  gemessen.

## 2.6 Enzymassay der Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2)

benötigte Lösungen:

**49,5 mM Citrat-Puffer pH 4,9** (100 ml)

1,04 g Citrat in 70 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen (MW: 210,14 g/mol)

den pH-Wert mit HCl auf 4,9 einstellen und auf 100 ml mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen

**Puffer/Substrat-Lösung** (7,6 mM 4-Nitrophenylphosphat; 45 mM Citrat-Puffer pH 4,9)

144 mg Dinatrium 4-Nitrophenyl Phosphat Hexahydrat in 50 ml 49,5 mM Citrat-Puffer lösen

auf 51 ml mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen

**0,1 M Natriumhydroxid (NaOH)** (800 ml)

**1× für alle ansetzen**

3,2 g NaOH in dest. H<sub>2</sub>O lösen und auf 800 ml auffüllen

Die Messungen werden für jede erhaltene Fraktion (d.h. Gesamtzelleextrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen) durchgeführt. Immer mit 10 µg und 20 µg Protein.

Bei jeder Messung im Photometer muss zudem ein **Blindwert** vorhanden sein. Bei diesem handelt es sich um eine Messung, bei der kein Protein dazugegeben wird (also: 1 ml Puffer/Substrat-Lösung + 20 µl 10% Triton X 100 (erwärmen) + 200 µl Wasser (30 min inkubieren) + 4 ml 0,1 M NaOH (s.u.)).

Pro Assay folgendes in kleine Reagenzgläser füllen:

1 ml Puffer/Substrat-Lösung

20 µl 10% Triton X 100

**auf 37°C erwärmen** (Wasserbad, ca. 15-30 min)

200 µl Probe (10 µg bzw. 20 µg Protein) + H<sub>2</sub>O hinzugeben [nur H<sub>2</sub>O für Blindwert]

**30 min bei 37°C inkubieren** (Wasserbad)

4 ml 0,1 M NaOH hinzugeben

sofort gründlich **mischen** und die **Absorption** gegen einen Blindwert bei 405 nm **messen**

## 2.7 Enzymassay der Malat Dehydrogenase (EC 1.1.1.37 und 1.1.1.82)

benötigte Lösung:

1 M Tris-HCl pH 7,2 (100 ml, reicht für alle Gruppen)

### 330 mM Oxalacetat

0,1308 g Oxalacetat in 3 ml MOPS/KOH pH 7,2 lösen und ca.  $\frac{1}{10}$  Vol. 5 M KOH dazugeben mit pH-Papier den pH-Wert überprüfen: er soll bei 7-8 liegen (ggf. KOH nachgeben)

Die Messungen werden für jede erhaltene Fraktion (d.h. Gesamtzellextrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen) durchgeführt. Immer mit 10 µg und 20 µg Protein.

Zusätzlich wird für jede erhaltene Fraktion **einmal** die **Hintergrundaktivität** bestimmt. Dazu wird eine Messung mit 20 µg Protein durchgeführt, bei der kein Substrat (Oxalacetat) zugegeben wird, sondern statt dessen dieselbe Menge an Wasser (50 µl).

Bei jeder Messung im Photometer muss zudem ein **Blindwert** vorhanden sein. Bei diesem handelt es sich um eine Messung, bei der kein Protein dazugegeben wird (also: 750 µl Reaktionsansatz + 200 µl Wasser). Hier werden dann die Substrate dazugegeben!

Zuvor wird mit den Betreuern abgestimmt, wieviel von dem Mastermix für den Reaktionsansatz anzusetzen ist. Als Hilfe für das Ansetzen dient die folgende Tabelle.

Endkonzentration	Stamm-lösung	Menge für 1 Reaktion [1 ml]	Mastermix
50 mM Tris-HCl pH 7,2	1 M		
<i>0,25 mM NADH</i>	10 mM		
<i>0,2% Triton X 100</i>	10%		
H <sub>2</sub> O		655 µl	

*kursiv geschriebene Lösungen werden gestellt*

Von diesem Mastermix für den Reaktionsansatz werden 788 µl in jeweils eine Küvette gegeben (zuvor überlegen, wie viele Küvetten benötigt werden (an Hintergrund- und Blindwert-Messungen denken)).

Pro Assay in eine Küvette geben:

750 $\mu$ l	Reaktionsansatz
x $\mu$ l	Proteinextrakt (10 und 20 $\mu$ g Protein)
n $\mu$ l	H <sub>2</sub> O (n = 200 $\mu$ l – x $\mu$ l)
<hr/>	
$\Sigma$ 950 $\mu$ l	

Küvetten in das Photometer stellen

50  $\mu$ l 330 mM Oxalacetat hinzugeben

**mischen und die Messung starten**

Durch die Zugabe von Oxalacetat wird die Reaktion gestartet. Es wird die NAD<sup>+</sup>-Produktion bei  $\lambda = 340$  nm gemessen.

**Auswertung:**

Fraktion	Volumenaktivität (VA) [ $\mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}\times\text{ml}^{-1}$ ]					
	PFOR <i>T. v.</i>	PFOR <i>T. f.</i>	AP <i>T. v.</i>	AP <i>T. f.</i>	MDH <i>T. v.</i>	MDH <i>T. f.</i>
Gesamtzellextrakt						
Cytosol						
Lysosomen						
Hydrogenosomen						

Fraktion	Spezifische Aktivität (SA) [ $\mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}\times\text{mg}^{-1}$ ]					
	PFOR <i>T. v.</i>	PFOR <i>T. f.</i>	AP <i>T. v.</i>	AP <i>T. f.</i>	MDH <i>T. v.</i>	MDH <i>T. f.</i>
Gesamtzellextrakt						
Cytosol						
Lysosomen						
Hydrogenosomen						

Fraktion	Totalaktivität (TA) [ $\mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}$ ]					
	PFOR <i>T. v.</i>	PFOR <i>T. f.</i>	AP <i>T. v.</i>	AP <i>T. f.</i>	MDH <i>T. v.</i>	MDH <i>T. f.</i>
Gesamtzellextrakt						
Cytosol						
Lysosomen						
Hydrogenosomen						

## 2.8 2D-Gelelektrophorese – 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

### 2.8.1 Probenvorbereitung

Es werden 1 mg Hydrogenosomen aus zwei nah verwandten Arten, *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*, zur Verfügung gestellt. Die Proteine der Organellen sollen in unterschiedlichen pH-Gradienten nach ihrem Isoelektrischen Punkt getrennt werden.

pH-Gradienten	Lysispuffer	Rehydratisierungspuffer
Gruppen 1 und 4:     pH 3-10	L <sub>B</sub>	RB 3-10
Gruppen 2 und 5:     pH 4-7	L <sub>B</sub>	RB 4-7
Gruppen 3 und 6:     pH 6-11	L <sub>B</sub>	RB 6-11

benötigte Materialien:

je 1 mg Hydrogenosomen von *T. vaginalis* und *T. foetus* (werden gestellt)

Lysispuffer (werden gestellt)

Protein Purification Kit (GE Healthcare) (wird gestellt)

Rehydratisierungspuffer für den jeweiligen Gradienten (werden gestellt)

10% (w/v) DTT (wird gestellt)

40% (v/v) Acrylamid (wird gestellt)

IPG-Strips (18 cm) und Stripholder (werden gestellt)

Mineralöl (wird gestellt)

1. Hydrogenosomen (1 mg) 1 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugieren
2. den Überstand verwerfen
3. Pellet in 180 µl Lysispuffer + 20 µl 10% (w/v) DTT resuspendieren (**keine Luftblasen erzeugen**)
4. 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
5. 20 µl 40% (v/v) Acrylamid zugeben (Achtung: Acrylamid ist giftig!)
6. 2 h bei RT inkubieren
7. 300 µl Precipitant (Kit) zugeben, vortexen und 15 min auf Eis inkubieren
8. 300 µl Co-Precipitant (Kit) zugeben und mischen
9. 5 min bei  $V_{max}$  und 4°C in der Eppi-Zentrifuge zentrifugieren
10. Überstand abnehmen, Pellet kurz anzentrifugieren und den Rest des Überstands abnehmen
11. 25 µl dest. H<sub>2</sub>O zugeben und vortexen bis sich das Pellet vom Gefäß ablöst und zerfällt (das Pellet löst sich nicht auf)

## 1. Dimension: IEF – Probenvorbereitung

12. 1 ml eisgekühlten Waschpuffer und 5 µl Waschadditiv (beides aus Kit) zugeben und kräftig vortexen
13. mindestens 30 min bei -20°C inkubieren, dabei alle 10 min kräftig vortexen
14. 5 min bei  $V_{\max}$  und 4°C in der Eppi-Zentrifuge zentrifugieren
15. den Überstand abnehmen und das Pellet leicht trocknen lassen
16. das Pellet in 360 µl Rehydratisierungspuffer + 40 µl 10% (w/v) DTT vollständig resuspendieren (keine Luftblasen erzeugen)
17. 30 min bei RT inkubieren, dabei mehrfach vorsichtig mischen
18. Stripholder spülen (siehe 2.8.2, Punkte 1-2)
19. 10 min bei  $V_{\max}$  und RT in der Eppi-Zentrifuge zentrifugieren
20. mit dem Überstand den IPG-Strip beladen (siehe 2.8.2)

### **Lysispuffer** (Aliquots werden gestellt und bei -20°C aufbewahrt)

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Tris-HCl pH 9,0	40 mM
CHAPS	2%
ASB14	2%

### **Rehydratisierungspuffer** (Aliquots werden gestellt und bei -20°C aufbewahrt)

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	2%
ASB14	2%
IPG-Puffer (entsprechend dem pH des Strips)	0,5%
Bromphenolblau	etwas

### 2.8.2 Rehydratisierung und Beladung der IPG-Strips

Die Stripholder sind aus Keramik und sehr empfindlich. Bitte sehr vorsichtig handhaben, sie kosten 330 €/Stück!

1. Stripholder mit Stripholder-Spülmittel und Zahnbürste waschen, um Proteinreste zu entfernen, und gründlich mit dest. H<sub>2</sub>O abspülen
2. an der Luft trocknen lassen oder mit fusselfreiem Papiertuch trocknen und nur noch mit Handschuhen anfassen
3. 400 µl Proteine im Rehydratisierungspuffer nach der Zentrifugation (2.8.1, Punkt 20) langsam in die Mitte des Striphalters pipettieren und Luftblasen unbedingt entfernen
4. Schutzfolie von den IPG-Strips abziehen und mit Gelseite nach unten und dem anodischen(+)-Ende zum spitzen Ende des Halters hin langsam auf die Flüssigkeit gleiten lassen, dabei den Strip leicht auf- und abbewegen und vor- und zurückschieben, damit er gleichmäßig und vollständig benetzt wird (aber nicht untertauchen)
5. kathodisches(-)-Ende in den Halter gleiten lassen und sicherstellen, dass das Gel Kontakt zu den Striphalter-Elektroden an beiden Enden hat. Dabei keine Luftblasen unter dem Gel einfangen!
6. Mineralöl tropfenweise in ein Ende des Striphalters pipettieren, bis der ganze IPG-Strip bedeckt ist. Der Striphalter darf aber nicht überlaufen.
7. die Abdeckung auf den Striphalter legen und die Stege an der Unterseite andrücken, damit das Gel mit den Elektroden in Kontakt bleibt
8. Striphalter im Gerät platzieren (das spitze Ende dabei auf die Anode am hinteren Ende des Gerätes legen) und die Elektrodenkontakte überprüfen
9. Deckel schließen und Protokoll starten

#### Protokoll für IEF

alle Schritte bei 20°C und 50 mA/Strip durchführen

Rehydratisierung	mind. 10 h
100 V	1 h step `n hold
200 V	1 h step `n hold
500 V	1 h step `n hold
1000 V	1 h step `n hold
1000 V bis 8000 V	1 h Gradient
8000 V	4 h step `n hold

Nach Ende des Protokolls sofort zur 2. Dimension übergehen oder die Strips bei -80°C lagern (Punkt 2.9).

2. Dimension: SDS-PAGE – Äquilibrierung der IPG-Strips

## 2.9 2D-Gelelektrophorese – 2. Dimension: SDS-PAGE

### 2.9.1 Äquilibrierung der IPG-Strips für die SDS-PAGE

benötigte Materialien:

DTT

Iodacetamid

#### Äquilibrierungslösung (1× 300 ml für alle ansetzen)

1,5 M Tris-HCl pH 8,8	10 ml
Harnstoff	108 g
100% Glycerin	90 ml
SDS	6 g
Bromphenolblau	einige Körner

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 300 ml auffüllen

in 20 ml Aliquots bei -20°C lagern

1. Äquilibrierungslösung auftauen, DTT (200 mg/20 ml) zugeben und lösen
2. jeden IPG-Strips mit der Plastikseite an der Wand in ein Glasröhrchen (20 mm Durchmesser) legen
3. 10 ml Äquilibrierungslösung mit DTT in jedes Röhrchen geben und das Röhrchen mit einem Gummistopfen verschließen
4. vorsichtig auf dem Schüttler 15 min schütteln
5. Äquilibrierungslösung auftauen, Iodacetamid (500 mg/20 ml) zugeben und lösen
6. Äquilibrierungslösung (mit DTT) aus den Röhrchen abgießen
7. 10 ml Äquilibrierungslösung mit Iodacetamid auf jeden IPG-Strip geben
8. erneut 15 min schütteln
9. den äquilibrierten IPG-strip auf ein SDS-Gel setzen (siehe 2.9.2, Punkt 8)

### 2.9.2 2D-SDS-PAGE

Am Vortag der 2. Dimension (SDS-PAGE) werden pro Gruppe zwei 20 cm × 20 cm große SDS-Gele mit 12%igem Acrylamid-Anteil gegossen (Aufbau der Gele von den Betreuern zeigen lassen).

Der Aufbau wird mit 2 ml PLUG (Mix aus Acrylamid und TEMED; wird gestellt) + 30 µl 10% (w/v) APS (startet die Polymerisation) abgedichtet, bevor das Gel gegossen wird. Sobald der Aufbau abgedichtet ist, wird ein 12%iger Gelmix vorbereitet (s.u., 100 ml reichen für 2 Gele) und die SDS-Gele gegossen.

benötigte Materialien:

30% Acrylamidmix (wird gestellt)

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

10% SDS

10% APS (Ammoniumpersulfat) (Aliquots von 1 ml bei -20°C einfrieren)

TEMED (wird gestellt)

**12% Gelmix** 100 ml (reicht für 2 Gele)

40 ml                    30% Acrylamidmix (= Rotiphorese-Gel 30)

25 ml                    1,5 M Tris-HCl pH 8,8

1 ml                      10% (w/v) SDS

33 ml                    dest. H<sub>2</sub>O

40 µl                    TEMED

1. Gelsandwich zusammenbauen
2. den Aufbau mit 2 ml PLUG (Mix aus Acrylamid und TEMED) + 30 µl APS abdichten
3. 12% Gelmix zusammenpipettieren (im Becherglas)
4. 1 ml 10% (w/v) APS zum 12% Gelmix geben und vorsichtig mischen
5. die Gelsandwiches bis ca. 1 cm unter den Rand mit dem 12% Gelmix füllen
6. Gel mit 0,1% (w/v) SDS überschichten
7. bei RT über Nacht auspolymerisieren lassen

## 2. Dimension: SDS-PAGE

am nächsten Tag erfolgt die Beladung des SDS-Gels mit dem IPG-strip

8. Agarose sealing solution im Wasserbad bei ca. 90°C bis 100°C schmelzen (Deckel andrehen)
9. 0,1% (w/v) SDS von den Gelen abgießen
10. den IPG-Strip mit dem sauren(+)-Ende nach links mit Pinzette auf dem Gel platzieren, dabei die Plastikrückseite an der hinteren (ausgeschnittenen) Glasplatte anliegen lassen. Den IPG-Strip mit einem dünnen Spatel vorsichtig auf die Geloberfläche hinunterschieben. **Keine Luftblasen unter dem Strip einfangen!**
11. den IPG-Strip mit Agarose sealing solution überschichten und die Agarose einige Minuten erstarren lassen
12. das Gel in die Elektrophorese-Kammer setzen und 1× Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer einfüllen (max. Füllhöhe in der unteren Pufferkammer beachten)
13. zuerst 15 min bei ca. 100 V und dann ca. 4 h bei 240 V laufen lassen
14. den Lauf stoppen, wenn der Farbstoff ca. 1 cm vor dem Ende des Gels angekommen ist
15. Gel abbauen und mit Coomassie färben
16. (eventuell) mit Silber nachfärben

benötigte Lösungen:

### **5× Tris-Glycin Elektrophoresepuffer**

15,1 g Tris  
72,1 g Glycin  
5,0 g SDS

auf 1000 ml mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen

### **Agarose sealing solution**

100 ml **1× (!)** Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer  
0,5 g M-Agarose  
einige Körner Bromphenolblau

alle Bestandteile in einen 500 ml Erlenmeyerkolben geben, in der Mikrowelle bei niedriger Leistung lösen, aliquotieren (ca. 10 ml in 15 ml Falcon-Röhrchen) und bei RT lagern.

## 2.10 Proteingel-Färbung mit Coomassie R350

benötigte Lösung:

### **Coomassie R350-Stammlösung (0,2%)**

1. 1 Tablette Coomassie R350 in 80 ml dest.H<sub>2</sub>O lösen und 10 min rühren
2. 120 ml Methanol zugeben und rühren, bis der Farbstoff vollständig gelöst ist
3. Lösung filtrieren und bei 4°C lagern (Lösung ist ca. 4 Wochen haltbar)

### **Färbung des Gels:**

Die Coomassie R350-Stammlösung 1:10 mit 10%iger (v/v) Essigsäure verdünnen und auf 90°C erwärmen. Unter dem Abzug über das Gel geben und ca. 1 h schütteln.

Alternativ können die Gele auch mit kalter (nicht erhitzter) 1:10 verdünnter Coomassie R350-Lösung über Nacht gefärbt werden.

### **Entfärbung:**

Das Gel mehrere Stunden bis über Nacht in 10%iger Essigsäure oder H<sub>2</sub>O schütteln (zwei Zellstofftücher (Kleenex) zugeben).

## Silberfärbung

### 2.11 Silberfärbung von Proteingelen (nach Blum *et al.*, 1987)

benötigte Materialien:

Färbeschalen und Schüttler

benötigte Lösungen (jeweils 200 ml sind ausreichend für ein großes Gel):

#### Lösung 1

60 ml 100% Methanol (= 30%)

24 ml konz. Essigsäure (= 12%)

116 ml dest. H<sub>2</sub>O

#### Lösung 2

400 mg Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>) (= 0,2% (w/v))

200 ml dest. H<sub>2</sub>O

vor Gebrauch frisch zugeben: 150 µl 37% Formaldehyd (= 0,075%)

#### Lösung 3

12 g Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (= 6% (w/v))

0,5 mg Natriumthiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 4×10<sup>-4</sup>%

200 ml dest. H<sub>2</sub>O

vor Gebrauch frisch zugeben: 100 µl 37% Formaldehyd (= 5×10<sup>-2</sup>%)

#### Lösung 4

100 ml 100% Methanol (= 50%)

24 ml konz. Essigsäure (= 12%)

76 ml dest. H<sub>2</sub>O

#### 30% Ethanol

180 ml 97% Ethanol (tech.) (= 30%)

420 ml dest. H<sub>2</sub>O

#### 0,02% Natriumthiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

400 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (= 0,02%)

200 ml dest. H<sub>2</sub>O

**Färbung** (Handschuhe tragen und sehr saubere Schalen benutzen):

1. das Gel 1 h in Lösung 1 fixieren, dabei schütteln
2. das Gel über Nacht in dest. H<sub>2</sub>O schütteln
3. 3× 20 min in 30% Ethanol schütteln lassen
4. 1 min in 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> inkubieren
5. 3× 20 sec mit dest. H<sub>2</sub>O waschen
6. das Gel 30 min in Lösung 2 schütteln
7. das Gel 2× 2 min mit dest. H<sub>2</sub>O waschen
8. das Gel mit Lösung 3 bis zur gewünschten Färbung inkubieren
9. mit Lösung 4 die Färbung stoppen
10. ggf. Lösung 4 gegen dest. H<sub>2</sub>O austauschen
11. Gele einscannen

## 2.12 Extraktion von Membranproteinen aus Hydrogenosomen

benötigte Materialien:

SMDI (30 ml für alle Gruppen, bleibt von der Isolierung der Hydrogenosomen übrig)

0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11,5 300 ml für alle Gruppen frisch ansetzen

3,18 g auf 300 ml Endvolumen, pH mit 1 M HCl einstellen

eiskaltes dest. H<sub>2</sub>O

Beckmann OptiSeal bell-top Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen mit Stopfen und Amber Ultem Adapter (32,4 ml)

Beckmann-Rotor Ti70 (kalt stellen)

1. 30 ml eiskaltes Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in ein 50 ml Plastikröhrchen füllen
2. 2 mg Hydrogenosomen dazugeben
3. schütteln und 45 min auf Eis inkubieren, dabei alle 10 min schütteln
4. Lösung in UZ-Röhrchen überführen, den Röhrchenboden beschriften und Pelletposition vor der Zentrifugation markieren (= Außenseite des Röhrchens im Rotor)
5. bei 45.000 rpm (208.000×g) und 4°C 1 h zentrifugieren, mit max. Bremse stoppen
6. die Deckel von den Röhrchen vorsichtig so viel vom Überstand abnehmen, dass noch ca. 2 cm über dem Pellet stehen bleibt. Alles sammeln und aufbewahren [Überstand = **Matrixproteine**]. Das Röhrchen vorsichtig umdrehen, ohne dass das Pellet aufgewirbelt wird und den restlichen Überstand aus dem Röhrchen drücken (diesen Teil des Überstandes verwerfen).
7. Röhrchenboden abschneiden und umgedreht auf ein Papiertuch 5 min ablaufen lassen
8. Pellet = **Hydrogenosomen-Membranen** mit 100 µl eiskaltem H<sub>2</sub>O waschen (H<sub>2</sub>O an die Wand pipettieren und dann vorsichtig ca. 10× über das Pellet laufen lassen)
9. das Wasser abnehmen und das Waschen wiederholen
10. das Pellet 5 min trocknen lassen
11. Pellets mit Parafilm einwickeln und bei -80°C lagern
12. Da die Matrixproteine erfahrungsgemäß sehr gering konzentriert sind, werden sie gefällt und in weniger Volumen aufgenommen. So wird eine Konzentrierung der Proteine erreicht.
13. Die Proteine der Membranen und der Matrix der Hydrogenosomen werden dann in einem 1D-SDS-Gel getrennt.

Dazu wird kurz bevor das Gel beladen wird das Pellet in 40 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 5× Lämmli-Puffer vollständig gelöst und bei 90°C 5 min aufgekocht. Von der Matrixfraktion wird nach der Fällung und Acetonwaschung die gesamte Probe aufgetragen.

## 2.13 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

benötigte Materialien:

50% (w/v) Trichloressigsäure (wird gestellt)

eiskaltes Aceton (wird gestellt)

Rehydratationspuffer (wird gestellt)

konz. Tris-Lösung (wird gestellt)

### Rehydratationspuffer

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

4% (w/v) CHAPS

1. Volumen der Matrixproteine bestimmen
2. zu 1 ml Matrixproteine sollen 760 µl eines Aceton/TCA-Gemisches gegeben werden
3. berechnen, wieviel von dem Aceton/TCA-Gemisch benötigt wird
4. Aceton/TCA-Gemisch herstellen: Mischung im Verhältnis 7,5:1  
zum Beispiel: 6 ml eiskaltes Aceton und 1,6 ml kalte 50% (w/v) Trichloressigsäure
5. Matrixproteine mit dem entsprechenden Volumen an Aceton/TCA versetzen
6. 1 h auf Eis inkubieren (Alternativ über Nacht bei -20°C)
7. 3 h bei 3.345×g und 4°C zentrifugieren
8. Überstand abnehmen und als Aceton-Abfall sammeln
9. zum Pellet 1 ml eiskaltes Aceton geben und 2 sec vortexen
10. das Pellet mit der Pipettenspitze vollständig vom Rand lösen und durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
11. Da das Pellet oft nicht vollständig resuspendierbar ist, sollte es zumindest in kleine Stückchen zerfallen.
12. Die Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen.
13. 5 min bei RT und 500 rpm schütteln (Eppendorf-Schüttler)
14. 10 min bei RT und max. rpm-Zahl (Eppi-Zentrifuge) zentrifugieren
15. den Überstand abnehmen (Aceton-Abfall)
16. zum Pellet 1 ml eiskaltes Aceton geben und das Pellet resuspendieren
17. 20 min bei RT und 500 rpm schütteln (Eppendorf-Schüttler)
18. 10 min bei RT und max. rpm-Zahl (Eppi-Zentrifuge) zentrifugieren

## Proteinfällung

19. den Überstand abnehmen (Aceton-Abfall)
20. zum Pellet 1 ml eiskaltes Aceton geben und das Pellet resuspendieren
21. 20 min bei RT und 500 rpm schütteln (Eppendorf-Schüttler)
22. 10 min bei RT und max. rpm-Zahl (Eppi-Zentrifuge) zentrifugieren
23. den Überstand abnehmen (Aceton-Abfall)
24. das Pellet bei RT fast vollständig trocknen lassen
25. Pellet in 70 µl Rehydratationspuffer lösen
26. 30 min bei 600 rpm und 30°C schütteln (Eppendorf-Schüttler)
27. 10 µl konz. Tris-Lösung dazugeben
28. 20 µl 5× Lämmli-Puffer dazugeben
29. nach Aufkochen kann diese Probe auf ein 1D-SDS-Gel geladen werden

## 2.14 1D-SDS-PAGE

### 2.14.1 Gießen der Gele

Am Vortag der 1D-SDS-PAGE werden mittlere SDS-Gele mit 12%igem Acrylamid-Anteil im Trenngel und 5%igem Acrylamid-Anteil im Sammelgel gegossen (Aufbau der Gele von den Betreuern zeigen lassen).

Der Aufbau wird mit 2 ml PLUG (Mix aus Acrylamid und TEMED; wird gestellt) + 30 µl 10% (w/v) APS (startet die Polymerisation) abgedichtet, bevor das Gel gegossen wird. Sobald der Aufbau abgedichtet ist, wird ein 12%iger Gelmix vorbereitet (s.u., 50 ml reichen für 2 Gele) und die SDS-Gele gegossen.

benötigte Materialien:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (wird gestellt)

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

1 M Tris-HCl pH 6,8

10% (w/v) SDS

10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

TEMED (wird gestellt)

**12% Trenngel** 50 ml (reicht für 2 Gele)

20 ml                    30% Acrylamidmix (= Rotiphorese-Gel 30)

12,5 ml                1,5 M Tris/HCl pH 8,8

0,5 ml                  10% SDS

16,5 ml                dest. H<sub>2</sub>O

20 µl                    TEMED

1. Gelsandwich zusammenbauen
2. Kamm einstecken
3. Gießhöhe des Trenngels markieren
4. Kamm entfernen
5. den Aufbau mit 2 ml PLUG (Mix aus Acrylamid und TEMED) + 30 µl APS abdichten
6. 12% Gelmix zusammenpipettieren (im Becherglas)
7. 0,5 ml 10% (w/v) APS zum 12% Gelmix geben und vorsichtig mischen
8. die Gelsandwiches bis zur Markierung mit dem 12% Gelmix füllen
9. Gel mit 0,1% (w/v) SDS überschichten
10. auspolymerisieren lassen

## 1D-SDS-PAGE – Gießen der Gele

Wenn das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet.

### **5% Sammelgel** 20 ml (reicht für 2 Gele)

3,4 ml	30% Acrylamidmix (= Rotiphorese-Gel 30)
2,5 ml	1 M Tris/HCl pH 6,8
0,2 ml	10% (w/v) SDS
13,6 ml	dest. H <sub>2</sub> O
20 µl	TEMED

1. 5% Sammelgel zusammenpipettieren (im Becherglas)
2. das 0,1%ige SDS, mit dem das Trenngel überschichtet wurde, abgießen
3. 0,2 ml 10% (w/v) APS zum 5% Gelmix geben und vorsichtig mischen
4. Gelsandwich mit dem 5% Gelmix füllen
5. Kamm einstecken
6. auspolymerisieren lassen

### 2.14.2 Auftragen der Proben

Es sollen die bei der Isolation der Hydrogenosomen (Gesamtzellextrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen) in einem SDS-Gel getrennt werden. Zudem sollen in einem SDS-Gel die Hefe-Mitochondrien und der PMS und die Matrix- und Membranproteine der Extraktion von Membranproteinen von Hydrogenosomen getrennt werden.

Pro Fraktion werden wie folgt die Proben vorbereitet:

**Mitochondrien:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5x Lämmli-Puffer zugeben

**PMS:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5x Lämmli-Puffer zugeben

**Matrixproteine** (Hydrogenosomen): gesamte Probe nach Fällung und Acetonwaschung

**Membranpellet** (Hydrogenosomen): Pellet in 40 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 5x Lämmli-Puffer vollständig lösen

**Gesamtzellextrakt:** 50 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5x Lämmli-Puffer zugeben

**Cytosol:** 50 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5x Lämmli-Puffer zugeben

**Lysosomen:** 50 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5x Lämmli-Puffer zugeben

**Hydrogenosomen:** 50 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5x Lämmli-Puffer zugeben

**Proben 5 min bei 90°C inkubieren** und auf das Gel auftragen.

Den Protein-Ladder als Marker ebenfalls aufkochen und 25 µl auftragen.

Als Laufpuffer wird **1x (!)** Tris-Glycin (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) verwendet. Die Gele bei 120 V einlaufen und ab dem Trenngel bei 240-280 V mit Kühlung laufen lassen.

Nach Beendigung des Laufs Gel entweder blotten (Gel mit Gesamtzellextrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen; Kapitel 2.15) oder mit Coomassie färben (Gel mit Mitochondrien und fraktionierten Hydrogenosomen; Kapitel 2.10).

## 1D-SDS-PAGE – Auftragen der Proben

benötigte Lösungen:

### **5× Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer (1000 ml)**

15,1 g Tris  
72,1 g Glycin  
50 ml 10% (w/v) SDS

### **5× Lämmli-Puffer**

5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0  
1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
5 g SDS  
25 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,25 g Bromphenolblau  
50 ml Glycerin

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen und bei 4°C lagern

## 2.15 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot

### 2.15.1 Elektrotransfer von Proteinen im Semi-Dry-Blot (Kyhse and Anderson, 1984)

Je 50 µg des Gesamtzellextrakts, des Cytosols, der Lysosomen und der Hydrogenosomen aus *T. foetus* und *T. vaginalis* und werden in einem 1D-SDS-Gel getrennt (Kapitel 2.14) und im Elektroblobverfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Detektiert wird die hydrogenosomale Acetat-Succinat-CoA-Transferase (ASCT) mit einem polyklonalen Anti-ASCT Antikörper aus Kaninchen. Das Molekulargewicht der ASCT beträgt 57 kDa.

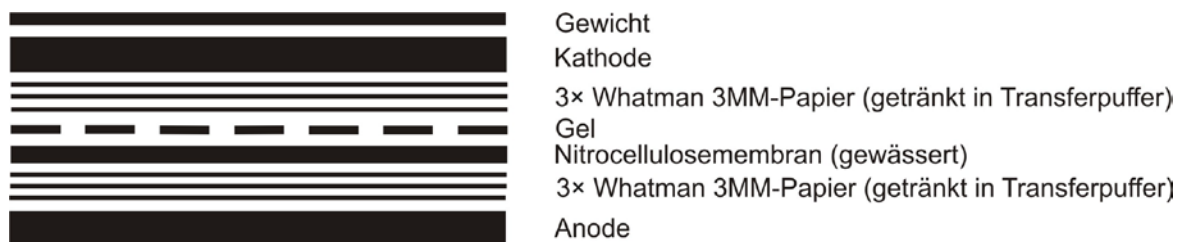
benötigte Lösungen:

#### Transferpuffer (500 ml)

1,45 g	Glycin	(= 40 mM)
2,9 g	Tris	(= 50 mM)
1,85 ml	10% SDS	(= 1 mM)
100 ml	Methanol	(= 20% (w/v))

Durchführung:

1. Gelgröße bestimmen
2. 1× Nitrocellulosemembran und 6× Whatman 3MM-Papier auf Gelgröße schneiden
3. Whatman 3MM-Papier in Transferpuffer tränken
4. Nitocellulosemembran wässern
5. Aufbau des Blots in einer „Semi-Dry-Blotting“-Apparatur: Der Aufbau erfolgt von der Anode zur Kathode.



6. Anode anfeuchten
7. 3× in Transferpuffer getränktes Whatman 3MM-Papier luftblasenfrei auf die Anode aufeinanderlegen
8. gewässerte Nitrocellulosemembran auflegen (luftblasenfrei)
9. 1D-SDS-Gel kurz in Wasser schwenken und luftblasenfrei auflegen
10. 3× in Transferpuffer getränktes Whatman 3MM-Papier luftblasenfrei auflegen

## Western Blot

11. Kathode aufsetzen, eventuelle Luftblasen vor dem Aufsetzen der Kathode entfernen, eventuell mit einem Gewicht beschweren
12. Anode und Kathode mit dem Spannungsgerät verkabeln
13. der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrocellulosemembran findet bei konstantem Stromfluss von  $0,82 \text{ mA/cm}^2$  für 60 Minuten statt
14. den Transfer der Proteine durch Färben der Membran mit Ponceau S überprüfen

### **Ponceau S-Färbung:**

#### **Ponceau S (100 ml)**

0,5 g	Ponceau S	(= 0,5%)
1 ml	Essigsäure	(= 1%)

Die Membran wird für 1 min mit Ponceau S gefärbt, danach solange mit dest. H<sub>2</sub>O entfärbt, bis Banden sichtbar werden. Dann werden auf der Membran die Markerbanden und die Geltaschen markiert. Es folgt die Immunodetektion mit den entsprechenden Antikörpern (ASCT-Nachweis: Kapitel 2.15.2).

### 2.15.2 Immunodetektion der ASCT mit einem polyklonalen Antikörper

benötigte Lösungen:

#### **TBST** (1000 ml)

20 ml	1 M Tris-HCl pH 7,5	(= 200 mM)
43,83 g	NaCl	(= 1,5 M)
0,2 ml	Tween 20	(= 0,2%)

#### **Blockingpuffer** (50 ml, TBST mit 5% (w/v) Magermilchpulver)

50 ml	TBST
2,5 g	Magermilchpulver

#### **Primärer Antikörper (Anti-ASCT aus Kaninchen)**

1:5.000 verdünnt in Blockingpuffer

#### **Sekundärer Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat)**

1:10.000 verdünnt in Blockingpuffer

1. die Nitrocellulosemembran nach der Ponceau S-Färbung in 50 ml Blockingpuffer 1 h bei RT langsam schütteln (kann bei Bedarf in dieser Lösung über Nacht bei 4°C gelagert werden)
2. die Membran 2× kurz mit TBST waschen
3. die Membran 1 h bei RT mit dem primären Antikörper in Blockingpuffer (ca. 15 ml) einschweißen und langsam auf dem 3D-Schüttler schütteln lassen
4. die Membran 3× 10 min in TBST waschen
5. die Membran 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper in Blockingpuffer einschweißen und langsam auf dem 3D-Schüttler schütteln
6. die Membran 3× 10 min in TBST waschen
7. Detektion mit dem Luminol-Nachweissystem (Kapitel 2.15.3)

### 2.15.3 Detektion mit dem Luminol-Nachweissystem

benötigte Materialien:

Overhead-Folien (werden gestellt)

Detektionslösungen A und B (werden gestellt)

A: 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6; 50 mg Luminol

B: 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (wird gestellt)

Chemilumineszenz-Detektionsfilme und Filmkassette (werden gestellt)

Entwickler und Fixierer (werden gestellt)

1. in der Dunkelkammer 4 ml Lösung A + 1,2 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 400 µl Lösung B mischen und auf eine Overhead-Folie geben
2. die Nitrocellulosemembran mit der „Proteinseite“ nach unten auf die Overhead-Folie in die Lösung legen
3. die Membran 2 min inkubieren (Lösung gut verteilen, Membran in der Lösung bewegen)
4. die Membran luftblasenfrei und ohne die Lösung zwischen zwei Folien in eine Filmkassette legen
5. Licht ausschalten und in der Kassette einen Chemilumineszenz-Detektionsfilm auflegen, Kassette schließen
6. nach 1 bis 5 min den Film zum Entwickeln entnehmen (ggf. neuen Film auflegen)
7. den Film entwickeln: erst in Entwickler baden, dann im Fixierer, dazwischen mit dest. H<sub>2</sub>O spülen (ggf. Expositionszeit für den zweiten Film bestimmen)
8. getrockneten Film einscannen

## 2.16 Fluoreszenzmikroskopie

benötigte Materialien:

*Trichomonas vaginalis*-Kultur

Aceton und Methanol bei -20°C

feuchte Kammer (Pipettendose, Whatmanpapier und Parafilm)

beschichtete und unbeschichtete Objektträger

Gummidichtungen und Klammern

Spritze und Kanülen

Vectashield mit DAPI

große Deckgläschen

Nagellack

benötigte Lösungen:

**PBS** (Phosphate buffered saline) (1000 ml)      reicht für 3 Gruppen

8 g      NaCl

0,2 g      KCl

1,44 g      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

in 800 ml mit dest. H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen, auf 1000 ml auffüllen

**Blocking-PBS** (20 ml)      reicht für 3 Gruppen

1 ml      5% Gelatine      (= 0,25%) (wird gestellt)

0,05 g      Magermilchpulver      (= 0,25%)

in 19 ml PBS lösen

Durchführung:

1. eine gut angewachsene Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase verwenden
2. eine anaerobe Kammer aufbauen (→ Betreuer)
3. *Trichomonas vaginalis*-Zellen in die anaerobe Kammer spritzen
4. 15 min bei 37°C inkubieren (→ Zellen haften sich am Objektträger fest)
5. die anaerobe Kammer auseinanderbauen
6. das Medium auf ein Kleenex-Tuch abtropfen lassen (autoklavieren), die Objektträger und die Gummidichtungen in Lysoform einlegen
7. den Objektträger trocknen lassen – er sollte noch glänzen

## Fluoreszenzmikroskopie

8. 5 min bei -20°C in Methanol fixieren
9. 5 min bei -20°C in Aceton inkubieren
10. Objektträger trocknen lassen
11. Objektträger in eine feuchte Kammer legen (Pipettenspitzendose mit in PBS getränktem Whatmanpapier und Parafilm)
12. 1 ml Blocking-PBS auf den Objektträger pipettieren und 1 h inkubieren
13. das Blocking-PBS abgießen
14. den Objektträger 1 h mit dem primären Antikörper (Anti-SCS) in PBS [1 ml PBS + 2 µl Anti-ASCT] in der feuchten Kammer inkubieren
15. den Objektträger 3× 10 min mit PBS waschen (schüttelnd in Petrischalen)
16. den Objektträger 1 h mit dem sekundären Antikörper (Alexa fluor 594 anti rabbit) in PBS [2 ml PBS + 2 µl AK] in der feuchten Kammer im Dunklen inkubieren
17. den Objektträger 3× 10 min in PBS waschen (im Dunklen)
18. auf den Objektträger 1 kleinen Tropfen Vectashield mit DAPI geben
19. ein großes Deckgläschen luftblasenfrei auflegen
20. mit Nagellack versiegeln
21. bei 4°C dunkel über Nacht lagern
22. **Mikroskopieren:** UV-Lampe ca. 10 min aufwärmen lassen
23. fixierte Trichomonaden-Zellen suchen und Foto machen (Hellfeld)
24. Filtersatz 09 Position 1 für DAPI verwenden
25. Filtersatz 09 Position 2 (Mitte) für Alexa fluor 594 verwenden
26. ein hydrogenosomales Protein wie die SCS sollte als kleine rote Pünktchen in einer *Trichomonas vaginalis*-Zelle sichtbar werden, während DAPI die Zellkerne blau färbt

## 2.17 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

benötigte Lösung:

**YPD-Medium** (Yeast Extract Peptone Dextrose, Vollmedium) 1000 ml

10 g Hefeextrakt

20 g Bacto Trypton (Peptone)

20 g Glucose

in ca. 700 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und dann auf 1000 ml auffüllen

Das Medium in einen 2 l-Erlenmeyerkolben geben und im Zuckerprogramm autoklavieren.

Anzucht:

1. es wird eine Starterkultur gestellt; diese schüttelt auf dem 30°C-Schüttler
2. diese Starterkultur ist ausreichend für 3 Gruppen
3. jeweils eine der drei Gruppen impft unter der Sterilbank mit  $\frac{1}{3}$  dieser Kultur ihr Medium in den 2 l-Kolben an
4. bei 30°C über Nacht schüttelnd inkubieren

## 2.18 Isolation von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

benötigte Materialien:

Glasperlen

Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma)

benötigte Lösung:

### Waschpuffer für Hefemitochondrien (20 ml pro Gruppe)

0,4 ml	1 M Tris-HCl pH 7,4	(= 20 mM)
1 ml	1 M NaCl	(= 50 mM)
12 ml	1 M Sorbitol	(= 0,6 M)

Durchführung:

1. die über Nacht herangewachsene Kultur bei 1000×g und 20°C für 5 min zentrifugieren
2. das Pellet in 50 ml dest. H<sub>2</sub>O resuspendieren und erneut zentrifugieren
3. das Pellet in 10 ml Waschpuffer für Hefemitochondrien resuspendieren
4. in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführen und erneut zentrifugieren
5. das Pellet in 5 ml Waschpuffer für Hefemitochondrien resuspendieren
6. 5 µl Protease-Inhibitor Cocktail und ca. 1/2 Volumen Glasperlen hinzugeben und 5 min auf Eis inkubieren

### Alle folgenden Schritte auf Eis und Zentrifugationen bei 4°C durchführen

7. die Zellen 3× für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit vortexen (→ Zellaufschluss)  
zwischen dem Vortexen die Proben für jeweils 1 min auf Eis abkühlen
8. die Suspension 10 min bei 1000×g und 4°C zentrifugieren
9. den Überstand in ein Nalgene-Röhrchen überführen und bei 10.000×g und 4°C für 20 min zentrifugieren
10. den Überstand vorsichtig abnehmen [= **PMS** (post mitochondrial supernatant)]
11. das Pellet in 2 ml Waschpuffer für Hefemitochondrien mit 2 µl Protease-Inhibitor Cocktail aufnehmen, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführen und bei 13.000 rpm in der Eppi-Zentrifuge sedimentieren
12. das Pellet (= **Mitochondrien**) in 1 ml Waschpuffer für Hefemitochondrien mit 2 µl Protease-Inhibitor Cocktail vorsichtig resuspendieren
13. den Proteingehalt der Hefemitochondrien und des PMS nach Bradford bestimmen
14. Proben über Nacht bei 4°C auf Eis lagern
15. 1D-SDS-PAGE

## Aufbau der Protokolle

Gliederung:

1. Einleitung (Ziele des Praktikums, Vorstellung der Organismen)
2. Material und Methoden (die Theorie der Methoden kurz beschreiben; bei der Durchführung der Versuche auf das Skript verweisen und eventuelle Änderungen angeben; beim Material auf das Skript verweisen und eventuelle Änderungen angeben;)
3. Ergebnisse (die Ergebnisse darstellen und beschreiben; spezifische Aktivitäten von Enzymen als Säulendiagramme darstellen; Abbildungen sinnvoll beschriften)
4. Diskussion (die Ergebnisse erklären und diskutieren; ggf. mit den Ergebnissen der anderen Gruppen vergleichen)
5. Literaturverzeichnis (Bücher der Theorie, paper etc.)
6. Anhang (ggf. nicht in den Text eingefügte Bilder o. ä.)

Allgemeines:

im Blocksatz und mit 1,5-fachem Zeilenabstand schreiben

Schriftgröße: 12 (z.B. Times New Roman) oder 11 (z.B. Arial)

Seitenzahlen angeben

keine Zeitwechsel

Abbildungen unten beschriften (Abb. 1: ... → ausführlich!)

Tabellen oben beschriften (Tab. 1: ... → ausführlich!)

bei Abbildungen von Gelen/Filmen die relevanten Markerbanden beschriften

Zitate kenntlich machen, z.B. (Sanger *et al.*, 1977)

Artnamen *kursiv* schreiben (auch bei Restriktionsenzymen (z.B. *EcoRI*))

auf Rechtschreibung achten

**niemals** „man“ schreiben, sondern stets passiv bleiben: „es wurde..., es sind...“