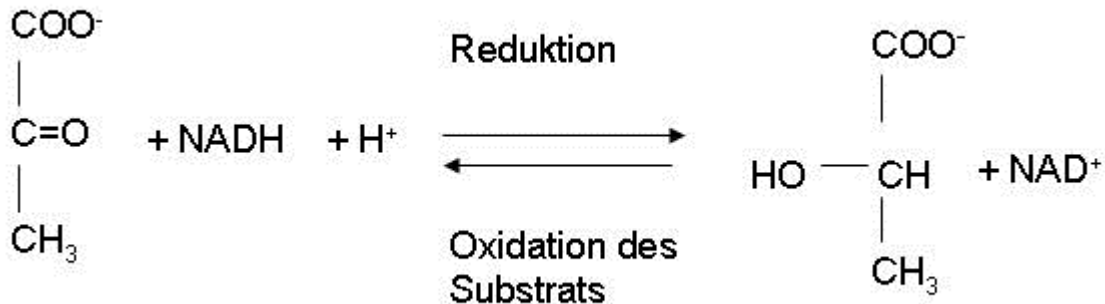


## 2 ENZYME

Das Enzym Lactatdehydrogenase (Bestandteil der anaeroben Glykolyse) katalysiert die folgende Reaktionsgleichung:



$$K = \frac{[\text{Laktat}] \times [\text{NAD}^+]}{[\text{Pyruvat}] \times [\text{NADH}] \times [\text{H}^+]}$$

Bei pH 7,0 ( $[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ mol/l}$ ) beträgt die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion  $3,62 \times 10^4 \text{ l} \times \text{mol}^{-1}$

Das bedeutet, dass das Pyruvat quantitativ zu Lactat umgesetzt wird; Lactat wird unter den gleichen Bedingungen jedoch nicht quantitativ zu Pyruvat oxidiert. Das gelingt nur, wenn Pyruvat und (oder)  $\text{H}^+$  im linken Teil der Reaktionsgleichung ständig aus dem Gleichgewicht entfernt werden.

### Enzymaktivität:

Die Geschwindigkeit des durch ein Enzym unter definierten Bedingungen (Substratüberschuss, pH 7, 25°C) katalysierten Substratumsatzes wird als dessen Aktivität bezeichnet. Als SI-Einheit ist das Katal ( $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ) festgelegt. Daneben ist die Internationale Einheit (I.E. bzw. IU) noch gebräuchlich ( $1 \text{ I.E.} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Eine wechselseitige Umrechnung der Angaben kann nach  $1 \text{ I.E.} = 16,67 \text{ nkat}$  erfolgen. Als spezifische Aktivität wird die auf die Gesamtproteinmenge bezogene Aktivität bezeichnet.

### Enzymstruktur:

Die LDH ist ein Tetramer ( $M_r$  annähernd 140 kDa) und strukturell kein homogenes Enzym. Bei Säugern gibt es zwei unterscheidbare Typen von LDH-Untereinheiten: den Skelettmuskel- (auch Leber-) bzw. M-Typ und den Herzmuskel- bzw. H-Typ. Beide Untereinheiten haben ein ähnliches Molekulargewicht ( $M_r \approx 36500$ ), jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur; der H-

Typ enthält einen höheren Anteil saurer Aminosäuren. Deshalb ergeben sich aus der Kombination beider zu Tetrameren fünf Möglichkeiten für eine Enzymzusammensetzung:

LDH<sub>1</sub> (H<sub>4</sub>), LDH<sub>2</sub> (H<sub>3</sub>M), LDH<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>), LDH<sub>4</sub> (HM<sub>3</sub>), und LDH<sub>5</sub> (M<sub>4</sub>).

LDH<sub>1</sub> und LDH<sub>2</sub> sind die dominierenden Komponenten der Herz-LDH, während LDH<sub>4</sub> und LDH<sub>5</sub> im Skelettmuskel bzw. in der Leber dominieren; LDH<sub>3</sub> ist die LDH des lymphatischen Gewebes. LDH<sub>1</sub> bis LDH<sub>5</sub> sind LDH-Isoenzyme.

Bei gleicher oder ähnlicher katalytischer Aktivität unterscheiden sie sich in der Primärstruktur und in den physikalisch-chemischen Eigenschaften wie IP (iso-elektrischer Punkt), pH-Optimum, Substratspezifität, Thermostabilität und Hemmbarkeit sowie grundlegenden kinetischen Eigenschaften und den K<sub>m</sub>-Werten.

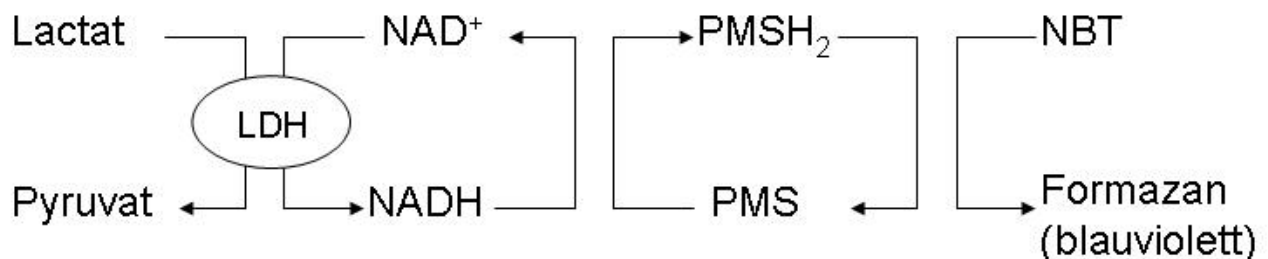
So wird z.B. die LDH des Herzmuskels wird von 1,6 mol/l Pyruvat gehemmt, für die LDH des Skelettmuskels ist diese Konzentration nahezu optimal; LDH<sub>4</sub> und LDH<sub>5</sub> sind kälteempfindlich, LDH<sub>1</sub> und LDH<sub>2</sub> nicht; das pH-Optimum für LDH aus Schweineherz beträgt 7,0 für LDH aus Kaninchenskelettmuskel 6,0.

## 2.1 Elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme im Agarosegel

### Versuchsprinzip:

Zur Trennung von Proteinen im elektrischen Gleichspannungsfeld wird die Lage der I.P. ausgenutzt. Mit der Wahl des pH-Wertes des Elektrodenpuffers wird dabei die Ladung der zu trennenden Proteine und damit deren Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmt. Bei einem bestimmten pH-Wert des Elektrodenpuffers und I.P. eines Proteins liegt dieses überwiegend als Anion bzw. Kation vor. Als Trägermedium für die Elektrophorese dient Agarose, ein sulfathaltiges Polysaccharid, das in wässriger Lösung ein Gel ausbildet.

Nach der Elektrophorese werden die Agaroseplatten mit den in der Elektrophorese getrennten LDH-Isoenzymen zu deren Nachweis in einer Lösung inkubiert, die Lactat,  $\text{NAD}^+$ , PMS (Phenazinmethosulfat) und NBT (Nitroblautetrazoliumsalz) enthält. Dabei werden unter der katalytischen Wirkung der LDH-Isoenzyme jeweils Lactat und  $\text{NAD}^+$  in Pyruvat und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  umgewandelt. Das  $\text{NADH}$  reduziert dann sekundär über den Elektronenüberträger PMS das NBT zum blauviolett gefärbten schwerlöslichen Formazan, das am Ort des Enzyms im Gelträger ausfällt.



### Versuchsdurchführung:

Mit Hilfe einer Stanze werden die Gelträger mit 1 cm breiten Auftragungsschlitz versehen. Anschließend werden 50  $\mu\text{l}$  des Skelettmuskelextraktes (Schweinefleisch vom Schlachthof) bzw. 50  $\mu\text{l}$  eines Herzmuskelextraktes (vom Versuch Biologische Oxidation) mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  der im kochenden Wasserbad gelösten und bei 56°C flüssig gehaltenen Agaroselösung in einem Reaktionsgefäß vermischt und jeweils 20  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches schnell mit einer Hubkolbenpipette in die Auftragungsschlitz pipettiert.

**ACHTUNG! Die Agaroselösung wird bei 35°C wieder fest!**

Zur Elektrophorese werden die beiden Elektrodengefäße der Elektrophorese-apparatur mit jeweils 900 ml Puffer pH 8,4 gefüllt, die Agarosegelträger werden mit dem Auftragungsschlitz in Richtung Kathode auf den Kühlblock gelegt und der Kontakt zwischen den Elektrodengefäßen mit puffergetränkten Filterpapierstreifen hergestellt. Nach Anstellen des Kühlwassers und Auflegen des Deckels wird die Elektrophorese mit 20 mA pro Gelträger eine Stunde lang durchgeführt.

Zur Darstellung der Isoenzyme wird 2 min vor Beendigung der Elektrophorese aus 90 ml der Stammlösung I, 0,7 ml der Stammlösung II und 28 mg  $\text{NAD}^+$  die Reaktionslösung hergestellt. Die Lösung wird in ein entsprechendes Gefäß gefüllt und die Gelträger werden in die Lösung gelegt. Die Isoenzyme werden während der Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  nach ca. 30 min als blaue Farbzonen sichtbar.

Stammlösung I: Nitroblautetrazoliumchlorid, NaCN, Na-Lactat

Stammlösung II: Phenazinmethosulfat

**Auswertung:**

***Wie unterscheiden sich die Isoenzyme strukturell?***

***Welche Auswirkung hat das auf ihre Ladung im basischen Milieu?***

***Was für ein Ergebnis wird erwartet?***

## 2.2 Bestimmung der Anreicherung des Enzyms Lactatdehydrogenase

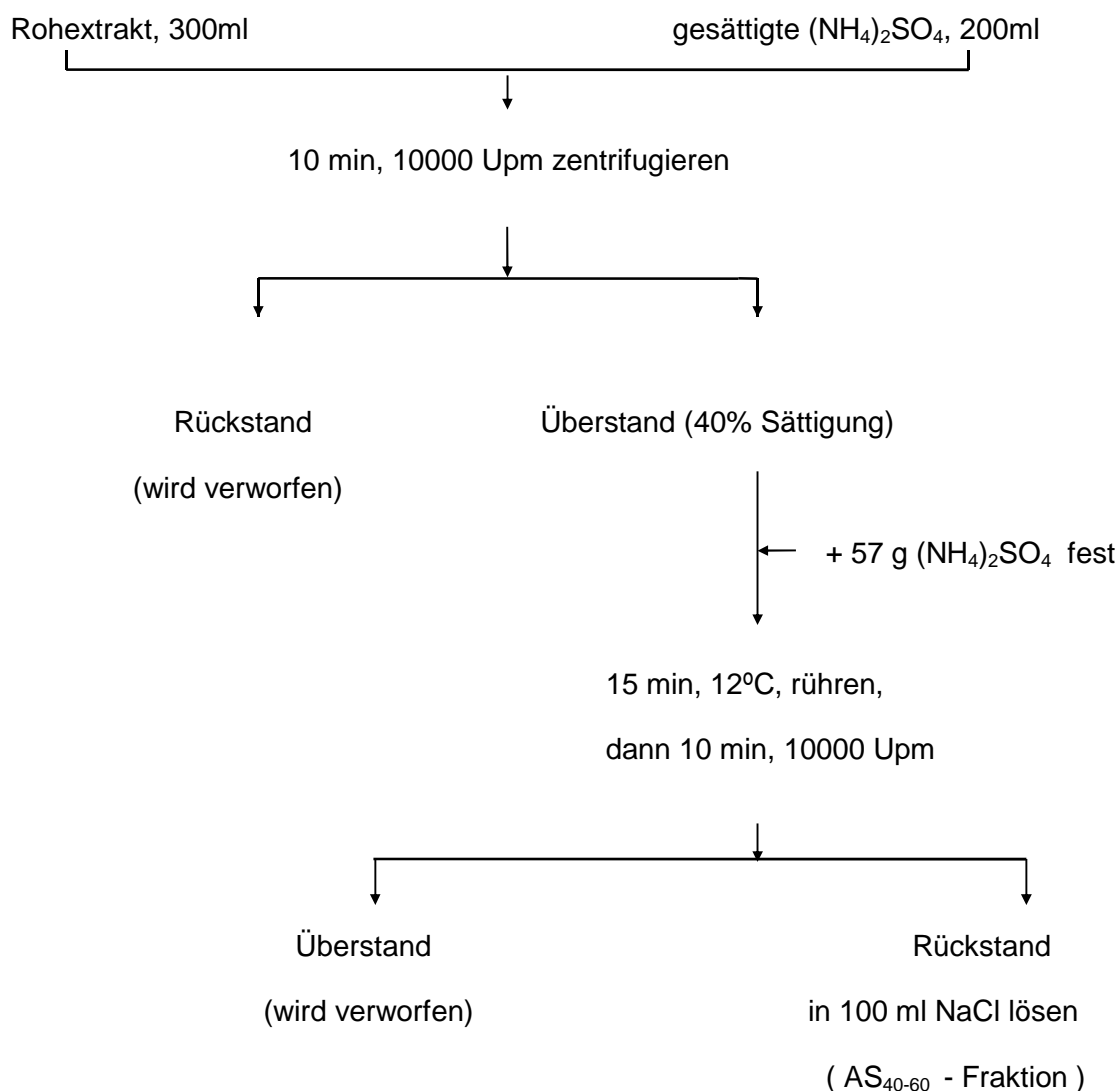
### Versuchsprinzip:

Die Anreicherung von LDH aus einem Muskelfleisch-Rohextrakt (Schweinefleisch vom Schlachthof) erfolgt durch **Ammoniumsulfatfällung**. Zur Überprüfung der Anreicherung werden durch Messung des Proteingehalts und der Enzymaktivität die spezifischen Enzymaktivitäten bestimmt. Das Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten von Ammoniumsulfatfraktion und Rohextrakt ergibt dann den Reinigungsfaktor.

### Ammoniumsulfatfällung:

Mit Ammoniumsulfat lassen sich Proteine auf schonende Weise aus Lösungen reversibel ausfällen. Durch das hohe Wasserbindungsvermögen von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wird die Hydrathülle des Proteins entfernt und dadurch seine Löslichkeitsgrenze überschritten. Die dazu notwendige Ammoniumsulfatkonzentration ist von Protein zu Protein unterschiedlich, wodurch sich oft einzelne Komponenten aus komplexen Proteinmischungen selektiv anreichern lassen. **LDH präzipitiert zwischen 40 und 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - Sättigung.**

Ihre Anreicherung wurde nach folgendem Schema erreicht:



**Versuchsdurchführung:**

- a) **Proteinbestimmung**
- b) **Bestimmung der Enzymaktivität**

a) Proteinbestimmung

**Prinzip:**

Der Proteingehalt der Lösungen wird über die **Biuretmethode** bestimmt. Das Biuretreagenz (im Wesentlichen eine alkalische Tartrat-Kupfersulfat-Lösung) reagiert mit Proteinen unter Blauviolett-färbung. Deren Intensität ist der jeweiligen Proteinkonzentration proportional. Diese Methode erfordert die Aufstellung einer Eichkurve.

**Versuchsdurchführung:**

Vor der Durchführung der Biuretbestimmung muss die AS<sub>40-60</sub> - Fraktion von dem bei der Fällung teilweise mitgerissenen Ammoniumsulfat befreit werden, da dieses den Biuretttest verfälscht. Dazu wird das Protein mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bleibt in Lösung.

0,3 ml der AS<sub>40-60</sub> - Fraktion und 0,3 ml 10% TCA werden in einem Zentrifugenglas (Glas Nr. 3 der untenstehenden Tabelle) vermischt, 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend für 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen (Sonderabfall!), die Flüssigkeitsrückstände mit Filterpapier vorsichtig entfernt und der verbleibende Rückstand in 0,5 ml KOH (1 mol/l) vollständig gelöst. Diese 0,5 ml TCA- gefällte AS<sub>40-60</sub> - Fraktion, wird laut nachfolgender Tabelle zur Biuretbestimmung eingesetzt.

Dann wird folgendermaßen pipettiert:

<b>Probe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Rohextrakt	—	0,1 ml	—
AS <sub>40-60</sub> / TCA-gefällt	—	—	0,5 ml(s.o.)
1 mol/l KOH	0,5 ml	0,5 ml	—
a.dest.	1,0 ml	0,9 ml	1,0 ml
Biuretreagenz	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

Das Biuretreagenz wird erst nach Abschluss der anderen Pipettierschritte in die Röhren pipettiert, dann werden die Ansätze gut gemischt. Nach 30 min werden die Extinktionen der Proben bei 546 nm am Photometer gemessen. Probe 1 dient als Leerwert.

**Auswertung:**

Die Extinktionswerte der beiden Proben können über die ausliegende Eichkurve in mg Protein umgerechnet werden. Die Eichkurve wurde unter Verwendung von Rinderserumalbumin erstellt.

Zur Errechnung der spezifischen Enzymaktivität wird aber die Proteinkonzentration in mg/ml benötigt, diese erhält man indem man die absoluten Proteinmengen durch die jeweils eingesetzten Probenvolumina von Rohextrakt bzw AS-Fraktion dividiert.

	<b>Extinktion</b>	<b>Proteinmenge</b>	<b>eingesetztes V</b>	<b>Proteinkonzentration</b>
Rohextrakt			0,1ml	
AS-Fraktion			0,3ml	

b) Bestimmung der Enzymaktivität

**Prinzip:**

Die Enzymaktivität von LDH wird durch einen **optischen Test** erfasst. Man misst die **Extinktionsabnahme von NADH bei 334 nm**. NAD<sup>+</sup> und die anderen Komponenten absorbieren bei dieser Wellenlänge nicht. Sowohl NADH als auch Pyruvat sind Substrate für LDH und reagieren stöchiometrisch im Verhältnis 1:1.

**Versuchsdurchführung:**

Während die Biuret-Proben stehen müssen, werden die Ansätze für die Enzymaktivitätsmessung vorbereitet.

Dazu pipettiert man in die bereitstehenden Küvetten nach folgendem Schema:

<b>Küvette</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
0,01 mol/l Pyruvat	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
0,1 mol/l Puffer pH 7,4	1,0 ml	0,9 ml	0,9 ml
0,002 mol/l NADH	—	0,1 ml	0,1 ml
a.dest.	1,9 ml	1,8 ml	1,8 ml

Zur Messung werden Rohextrakt bzw. AS<sub>40-60</sub> - Fraktion mit NaCl-Lösung (0,01 mol/l) verdünnt (Verdünnungsfaktor wird vom Betreuer bekannt gegeben). Dann pipettiert man in Küvette 2 genau 0,1 ml des verdünnten Rohextraktes, vermischt schnell und startet gleichzeitig die Uhr. In 30 s-Abständen wird die Extinktion bei 334 nm gemessen. Die Gesamtmessdauer beträgt 3 min. In gleicher Weise wird der Versuch mit der verdünnten AS<sub>40-60</sub> - Fraktion in Küvette 3 durchgeführt. Küvette 1 dient als Leerwert.

Gemessene Werte Enzymaktivität:

	0 Min.	0,5 Min.	1 Min.	1,5 Min.	2 Min.	2,5 Min.	3 Min.
Rohextrakt							
AS 40/60							

### Auswertung:

Die Extinktionswerte beider Proben werden gegen die Zeit aufgetragen. Es ergeben sich zumindest im Anfangsbereich Geraden. Aus der Steigung dieser Geraden ( $\Delta E / t$ ) lässt sich die Enzymaktivität errechnen. (Steigungsdreieck mit  $\Delta t = 1$  min)

Die Enzymaktivität (z.B. IE) wird gemessen als Konzentrationsabnahme eines Substrats bzw. Konzentrationszunahme eines Produkts pro Zeiteinheit:  $IE = \Delta c / t$ .

Die Grundlage des optischen Tests bildet das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Die Konzentration errechnet sich aus der Extinktion durch Umformung von (1)

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (2)$$

E: Extinktion

$\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient, Proportionalitätsfaktor zwischen E und c für jede Substanz spezifisch und von der Wellenlänge abhängig.

$\varepsilon_{334}$  für NADH = 6,18 l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> bzw. 6,18 ml x  $\mu$ mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>

c: Konzentration

d: Schichtdicke in cm

Dieser Wert gibt an, dass z.B. die photometrische Messung einer NADH- Lösung (1 mol/l) bei 334 nm und eine Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion von 6,18 ergibt.



Durch Einsetzen in Gleichung (2) erhält man:

$$IE = \frac{\Delta c}{t} = \frac{\Delta E}{t \cdot \epsilon \cdot d}$$

Bei der Berechnung der Enzymaktivität pro 1 ml Enzymlösung sind die Verdünnungsfaktoren  $F_1$  und  $F_2$  zu berücksichtigen, die sich aus der Probenvorbereitung und dem Testansatz ergeben.

Verdünnungsfaktoren:

$$F_1 = \frac{x \text{ ml Endvolumen der Verdünnung}}{0,1 \text{ ml Rohextrakt bzw. AS}_{40-60} \text{ - Fraktion}}$$

$$F_2 = \frac{3,0 \text{ ml Gesamtvolumen des Testansatzes}}{0,1 \text{ ml zum Test eingesetzte Menge Enzymverdünnung}}$$

Daraus ergibt sich:

$$IE/ \text{ ml Ausgangsprobe} = \frac{\Delta E}{t \cdot \epsilon \cdot d} \cdot F_1 \cdot F_2$$

Konstante Faktoren:  $t = 1 \text{ min}$ ;  $\epsilon = 6,18 \text{ ml} \times \mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ;  $d = 1 \text{ cm}$ ,  $F_2 = 30$ )

Durch Einsetzen dieser Faktoren erhält man folgende Gleichung:

$$IE/ \text{ ml} = \Delta E \cdot \frac{F_1 \cdot 30}{6,18} \quad [\mu\text{mol/ min/ ml} = IE/ \text{ ml}]$$

Die Enzymaktivität ist in nkat umzurechnen.

Die spezifische Enzymaktivität errechnet sich nach folgender Beziehung (siehe auch Einleitung):

$$\text{spez. IE} = IE/ \text{ mg Protein} = \frac{IE/ \text{ ml}}{\text{mg Protein/ ml}} \quad [IE/ \text{ mg}]$$

Die Enzymaktivität und die Enzymkonzentration sind bei Substratüberschuss (wie hier gegeben) proportional zueinander. Somit ist die spezifische Enzymaktivität ein Maß für den Anteil der LDH an der Gesamtproteinmenge.

Das Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten von AS<sub>40-60</sub> - Fraktion zu Rohextrakt ergibt den Reinigungsfaktor, der durch die Ammoniumsulfatfällung zu erzielen ist.

Der Reinigungsfaktor gibt also an, um welchen Faktor der Anteil der LDH am Gesamtprotein in der AS<sub>40-60</sub> - Fraktion größer ist als im Rohextrakt.

Gesamtauswertung:

	Enzymaktivität		Proteingehalt	spez. Enzymaktivität	
	[IE/ml]	[nkat/ml]		[mg/ml]	[IE/mg]
Rohextrakt					
AS <sub>40-60</sub> -Fraktion					

Reinigungsfaktor:	
-------------------	--