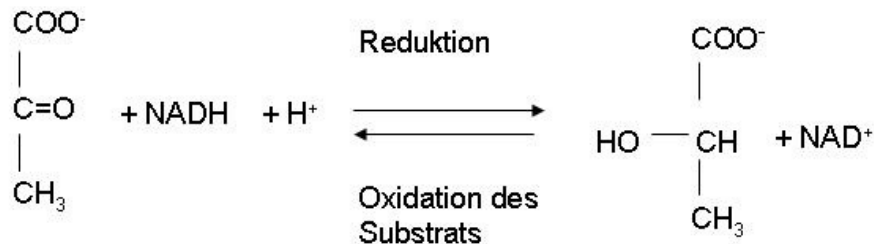


1 PROTEINE und ENZYME

1.1 Elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme im Agarosegel

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) ist Bestandteil der anaeroben Glykolyse und katalysiert die folgende Reaktion:



Proteinstruktur:

Die LDH ist ein Tetramer (M_r annähernd 140 kDa) und strukturell kein homogenes Protein. 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 fünf Möglichkeiten für eine Tetramer-Zusammensetzung:

LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃), und LDH₅ (M₄).

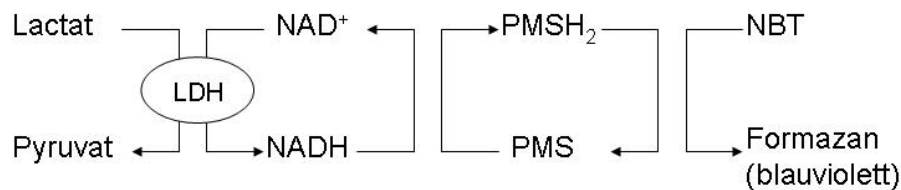
LDH₁ und LDH₂ sind die dominierenden Isoenzyme im Herzmuskel, während LDH₄ und LDH₅ im Skelettmuskel bzw. in der Leber dominieren; LDH₃ ist das Isoenzym des lymphatischen Gewebes. Die LDH-Isoenzyme (LDH₁ bis LDH₅) unterscheiden sich bei gleicher oder ähnlicher katalytischer Aktivität in der Primärstruktur und in den physikalisch-chemischen Eigenschaften wie IEP (isoelektrischer Punkt), pH-Optimum, Substratspezifität, Thermostabilität und Hemmbarkeit sowie grundlegenden kinetischen Eigenschaften und den K_m -Werten.

Versuchsprinzip:

Zur Trennung von Proteinen im elektrischen Gleichspannungsfeld wird die Lage der IEP 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 IEP 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, NAD⁺, PMS

(Phenazinmethosulfat) und NBT (Nitroblautetrazoliumsalz) enthält. Dabei werden unter der katalytischen Wirkung der LDH-Isoenzyme jeweils Lactat und NAD^+ in Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ umgewandelt. Das 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 20 μl des 1:10 verdünnten Skelettmuskelextraktes (Schweinefleisch vom Schlachthof) bzw. 20 μl eines Herzmuskelextraktes (vom Versuch Biologische Oxidation) mit jeweils 20 μl der im kochenden Wasserbad gelösten und bei 56°C flüssig gehaltenen Agaroselösung in einem Reaktionsgefäß vermischt und jeweils 20 μl dieses Gemisches schnell mit einer Hubkolbenpipette in die Auftragungsschlitz pipettiert.

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

Zur Elektrophorese werden beide Elektrodengefäße der Elektrophoreseapparatur 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 4 mA pro Gelträger eine Stunde lang durchgeführt.

Zur Darstellung der Isoenzyme wird 2 Minuten vor Beendigung der Elektrophorese aus 23,3 ml der Stammlösung I, 0,7 ml der Stammlösung II und 28 mg NAD^+ gelöst in 1ml Phosphatpuffer, 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°C nach ca. 30 Minuten 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?

1.2 Proteinbestimmung im Skelettmuskelextrakt

Zur Durchführung einer Elektrophorese wie unter Punkt 1.1 durchgeführt, sollte zuerst die Proteinkonzentration einer Probe bestimmt werden. In diesem Versuchsteil soll nun die Proteinkonzentration des zuvor eingesetzten Skelettmuskelextrakts ermittelt werden.

Prinzip:

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

Versuchsdurchführung:

Herstellung einer Eichkurve aus einer BSA (Rinderserumalbumin)-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml:

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5
	... mg/ml	... mg/ml	... mg/ml	... mg/ml	... mg/ml
BSA-Stammlösung (10 mg/ml)	400 µl	800 µl	1200 µl	1600 µl	2000 µl
H ₂ O	1600 µl	1200 µl	800 µl	400 µl	-

Der Skelettmuskelextrakt muss vor der Messung 1:5 mit H₂O verdünnt werden. Dazu pipettiert man 0,4 ml Extrakt und 1,6 ml H₂O in ein Zentrifugenglas und mischt gut durch Schütteln.

Die Proteinbestimmung wird als Dreifachansatz in 1,5 ml-ReaktionsgefäÙe pipettiert:

- 3 ReaktionsgefäÙe mit 0,5 ml der jeweiligen Standards (1-5)
- 3 ReaktionsgefäÙe mit 0,5 ml Extrakt (1:5 verdünnt)
- 1 ReaktionsgefäÙ mit 0,5 ml H₂O für den Leerwert

dazu werden 0,5 ml Biuretreaqenz pipettiert und durch Schütteln gut gemischt.

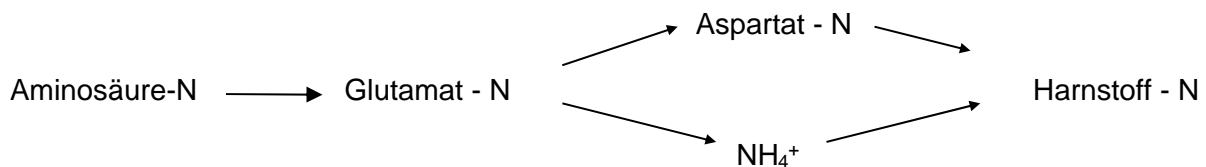
Nach 30 Minuten wird die Extinktion bei 578 nm am Photometer gemessen und die Werte grafisch dargestellt. Beim Zeichnen der Eichgeraden für die Standardkonzentrationen ist die Verdünnung im Versuchsansatz zu beachten!

Mit Hilfe der Grafik lässt sich die Proteinkonzentration des Skelettmuskelextraktes ermitteln, auch hier ist die Verdünnung des Extraktes zu berücksichtigen.

Berechne, welche Proteinmenge vom Skelettmuskelextrakt in der Elektrophorese unter Punkt 1.1 eingesetzt wurde.

1.3 Bestimmung der Enzymaktivität am Beispiel der Arginase in der Leber

Von sogenannten ureotelen Lebewesen wird Aminosäurenstickstoff hauptsächlich in Form von Harnstoff ausgeschieden. Die beiden Stickstoffatome des Harnstoffs stammen von zwei Vorläufern ab: dem Ammoniumion und der Aminosäure Asparaginsäure. Der Weg des Aminosäurenstickstoffs geht aus folgendem Schema hervor:



Die Harnstoffsynthese läuft in der Leber ab. Der letzte Schritt der Harnstoffsynthese ist die Arginasereaktion, in deren Verlauf Arginin zu Ornithin und Harnstoff hydrolysiert wird.

Versuchsprinzip:

Arginin wird mit Leberhomogenat (Enzymquelle, Schweineleber v. Schlachthof) inkubiert. Die nach 10 Minuten entstandene Menge an Harnstoff wird mit Hilfe von Urease enzymatisch bestimmt. Urease spaltet Harnstoff hydrolytisch in Ammoniak und Kohlensäure. Die aus Ammoniak entstandenen Ammoniumionen bilden mit Salicylsäure und Natriumhypochlorit einen Farbstoff, dessen Extinktion der Harnstoffkonzentration proportional ist und bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen wird.

Versuchsdurchführung:

Arginasereaktion:

Probe	0	0'	P1	P2
HClO ₄ 0,5 mol/l	0,1 ml	0,1 ml	—	—
Arginin 0,1 mol/l	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Carbonatpuffer 0,1 mol/l, pH 9,5	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Homogenat	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Der Nullwert und die Probe werden als Doppelbestimmung angesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad wird die Reaktion mit 0,1 ml HClO₄ (0,5 mol/l) in Probe P1 und P2 abgestoppt.

Probe 0 ist ein Probenblindwert, der später von den Werten der Proben 1 und 2 subtrahiert wird.

Für die Harnstoffbestimmung werden jeweils 0,05 ml aus dem Arginase-Versuchsansatz (Probe 0, 0', P1, P2) verwendet.

Der Standard wird als Doppelwert (Standard1 + Standard2) angesetzt.

Harnstoffbestimmung:

	Leerwert	Standard1	Standard2	0	0'	P1	P2
Probe	—	—	—	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Standard	—	0,05 ml	0,05 ml	—	—	—	—
Puffer/Urease Salicylsäure	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Ansätze mischen und mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.

Anschließend in jedes Röhrchen 2,5 ml Na-Hypochlorit pipettieren, gut mischen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Innerhalb von 1 h sind die Extinktionen von Standard und Proben gegen den Leerwert zu messen.

Auswertung:

Es wird zunächst die in der Arginase-reaktion entstandene Harnstoffmenge in μmol berechnet. Die Konzentration des Harnstoffstandards beträgt 30 mg/100 ml, die Molmasse 60 g/mol.

Davon werden 0,05 ml in die Urease-Reaktion eingesetzt:

0,05 ml Harnstoffstandard = μmol Harnstoff

Die Harnstoffmenge in 0,05 ml **Probe** beträgt dann

$$\text{Harnstoffmenge}_{\text{Probe}} (\mu\text{mol}) = \frac{E_{\text{Pr.}}}{E_{\text{St.}}} \times 0,25 \mu\text{mol}$$

Mittels dieses Wertes lässt sich die Arginaseaktivität in $\mu\text{mol}/\text{min} = \text{I.E.}$ des Leberhomogenats errechnen.

E_{st} : Extinktion des Harnstoffstandards

E_{Pr} : Extinktion der Probe