

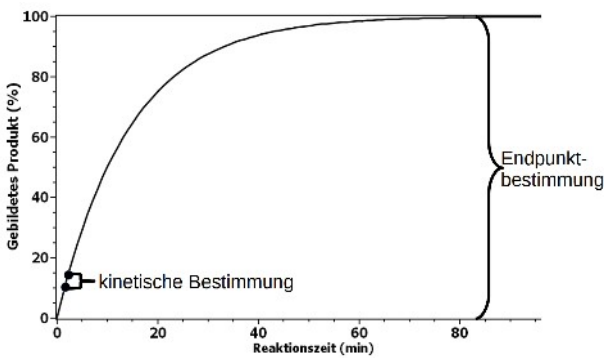
Die herausragende Eigenschaften der Enzyme, die Substrat- und Wirkungsspezifität, macht sie zu idealen Nachweisreagenzien. Sie setzen nur die zu bestimmenden Analyte um, andere Stoffe die in der Probe vorliegen, stören hierbei i.d.R. nicht. So kann man z.B. mit der Alkoholdehydrogenase Ethanol quantifizieren, ohne dass andere Stoffe als Alkohole die Untersuchung stören. Die gleichen Messmethoden können in leicht abgewandelter

Form aber auch genutzt werden, um die Enzymaktivität zu bestimmen, d.h. die katalytischen Eigenschaften einer Enzymportion zu quantifizieren. Der Begriff **Enzymatische Analyse** wird somit doppeldeutig benutzt:

1. Bestimmung von Substraten mithilfe enzymatischer Nachweisreagenzien ODER
2. Bestimmung von Enzym(aktivität)en mithilfe geeigneter Substrate .

1. Bestimmung von Substraten mit enzymatischen Nachweisreagenzien

Der zeitliche Verlauf einer enzymatischen Reaktion verläuft typischerweise in folgender Form:



1.1 Begründen Sie den Kurvenverlauf.

Bei einer **Endpunktbestimmung** setzt man ein großen Überschuss an Enzym ein und wartet ausreichend lang, dass auch wirklich jedes Analytmolekül umgesetzt wurde. Die weitaus meisten Substratbestimmungen funktionieren

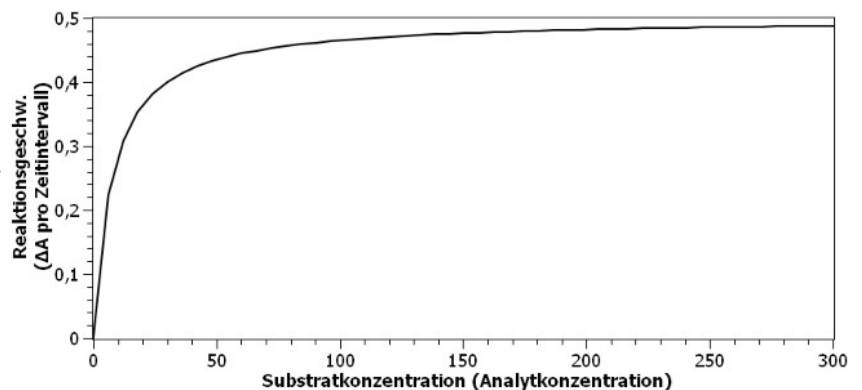
nach diesem Prinzip. Zwei Nachteile dieser Methode sind: Hoher Zeit- und Enzymverbrauch, weil man ja wirklich sicher sein will, dass das gesamte Substrat umgesetzt wird.

1.2 Zu 750 µL einer Glucoselösung (G) werden 250 µL Enzymlösung (E) und 1000 µL Färbereagenz für das Produkt (P) der enzymatischen Reaktion gegeben. Reaktionsschema $E + G \rightarrow E + P$. Nach ca. 120 Minuten beträgt die Absorbanz $A = 0,474$. Eine Vergleichslösung mit 0,5 g/L Glucose besitzt unter gleichen Bedingungen $A = 0,705$. Berechnen Sie $\beta(\text{Glucose})$ und beschreiben Sie, wie sich die Genauigkeit der Bestimmung weiter steigern lässt.

Bei den seltener durchgeführten **kinetischen Substratbestimmungen**, misst man den Substratumsatz in einem bestimmten Zeitintervall, also die Reaktionsgeschwindigkeit. Diese ist unter bestimmten Bedingungen proportional zur Anfangs-Substratkonzentration (= Analyt). Je

höher die Analytkonzentration ist, desto höher wird die Reaktionsgeschwindigkeit, also die Absorbanzänderung in einem Zeitintervall, ausfallen. Das Zeitintervall liegt in der Praxis häufig im Bereich 20 Sekunden - 1 min.

1.3 Welche Substratkonzentrationen erscheinen Ihnen bei der kinetischen Bestimmung geeignet, wenn man die Substratsättigungskurve betrachtet? Begründen Sie!



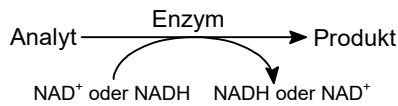
Damit man näherungsweise von einem proportionalen Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit ausgehen kann, darf die Enzymportion nur in sehr geringem Ausmaß ausgelastet sein. Dann gilt: Erhöht man die Substratkonzentration, so steigt die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend. In der Praxis

setzt man bei der Bestimmung häufig sogar noch einen kompetitiven Hemmstoff zum Substrat zu, damit die Affinität zwischen Substrat und Enzym sinkt, d.h. der apparente K_M -Wert zunimmt. So erreicht man insgesamt einen flacheren Verlauf der Substratsättigungskurve und der quasi-lineare Bereich wird breiter.

- 1.4 Zu einer Probelösung werden 250 μL Enzymlösung und 100 μL Cosubstratlösung gegeben und sofort die Stoppuhr gestartet. Innerhalb von 25 Sekunden nimmt die Absorbanz bei 340 nm von $A = 0,250$ auf $A = 0,211$ ab. Bei einer 15 mikromolaren Vergleichslösung ($c = 15 \mu\text{mol/L}$) nimmt bei gleicher Behandlung die Absorbanz im selben Zeitintervall von $A = 0,248$ auf $A = 0,195$ ab. Berechnen Sie den Gehalt an Analyt in der Probelösung und beschreiben Sie, wie sich die Genauigkeit der Bestimmung weiter steigern lässt.

1.1 Optisch-enzymatischer Test (Test nach WARBURG)

Bei diesem Testprinzip wird ausgenutzt, dass die Cosubstrate NADH, NAD^+ , NADP und NADPH bei sehr vielen enzymatischen Reaktion beteiligt sind. Man macht sich folgende allgemeine Reaktion zunutze:



Die meisten Analyte und Produkte sind UV/VIS-inaktiv und können deshalb nicht fotometrisch bestimmt werden. Bei der Reaktion nach dem oberen Schema kommt es jedoch auch zur Umsetzung NADH oder NAD^+ . Die umgesetzte Stoffmenge an Cosubstrat entspricht der Analyt-Stoffmenge, denn die Koeffizientenverhältnisse betragen in der Regel 1:1. Der Umsatz an Cosubstrat kann dabei leicht fotometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt werden, denn die Spektren beider Formen unterscheiden sich:

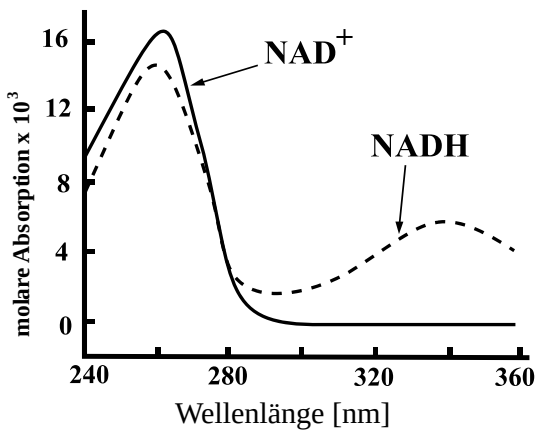


Abb. 1: NAD^+ / NADH -Spektren. Q: commons.wikimedia.org. A: Matt

- 1.5 Bestimmen Sie die molaren Absorptionskoeffizienten graphisch.

$$\epsilon_{260}(\text{NAD}^+) \approx \qquad \qquad \qquad \epsilon_{340}(\text{NAD}^+) \approx$$

$$\epsilon_{260}(\text{NADH}) \approx \qquad \qquad \qquad \epsilon_{340}(\text{NADH}) \approx$$

- 1.6 Nennen Sie mehrere Gründe weshalb die meisten optisch-enzymatischen Tests $\lambda \approx 340 \text{ nm}$ nutzen, und nicht $\lambda \approx 260 \text{ nm}$!

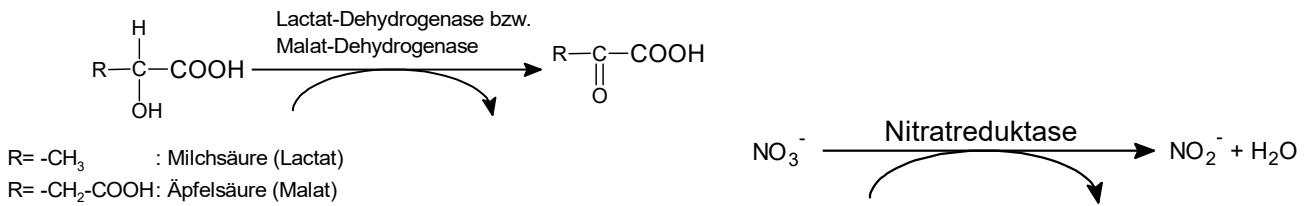
Meistens führt man den optisch-enzymatischen Test als **Endpunktmethode** durch. Man misst die Veränderung der Absorbanz bei 340 nm zu der die enzymatische Reaktion letzten Endes führt. Zuerst misst man die Absorbanz der Lösung, die neben der Probe schon alle Reagenzien enthält, außer das Enzym selbst. Nun gibt man das Enzym im Überschuss hinzu und misst nach längerer Wartezeit (z.B. 45-60 Min) erneut die Absorbanz.

- 1.7 In einer Küvette werden zu 1500 μL einer Pufferlösung 75 μL einer NAD^+ -haltigen Lösung und 150 μL der Probe zugegeben. Sofort nach Zupipettieren von 25 μL eines Alkoholdehydrogenase-Präparat wird gut gemischt und die Absorbanz der Lösung auf $A = 0,000$ eingestellt. Nach einer Wartezeit von ca. 40 Minuten beträgt die Absorbanz nun $A_{340} \approx 0,608$. Reaktion: $\text{Ethanol} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Alkoholdehydrogenase}} \text{Ethanal} + \text{NADH}/\text{H}^+$.

- a) Berechnen Sie die Stoffmengenkonzentration $c(\text{Ethanol})$ in mmol/L in der Probe, indem Sie von dem Literaturwert $\epsilon_{340}(\text{NADH}) = 6,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ausgehen.
- b) Machen Sie Vorschläge zur Erhöhung der Genauigkeit der Untersuchung.

Der optisch-enzymatische Test ist deshalb von so großer Bedeutung, weil er die hochspezifische fotometrische Bestimmung vieler biochemisch wichtiger Stoffe bis in den ppm-Bereich ermöglicht, die an sich UV/VIS-inaktiv sind. Für viele Analyte gibt es fertige **Messbestecke** (=“Kits“) zu kaufen.

1.8 Beispiele häufig genutzter optisch-enzymatischer Substratbestimmungen. Geben Sie das erforderliche Cosubstrat (NADH oder NAD⁺) an und entscheiden Sie, ob es zu einer Abnahme oder einer Zunahme bei λ = 340 nm kommt.



1.2 Gekoppelte enzymatische Tests

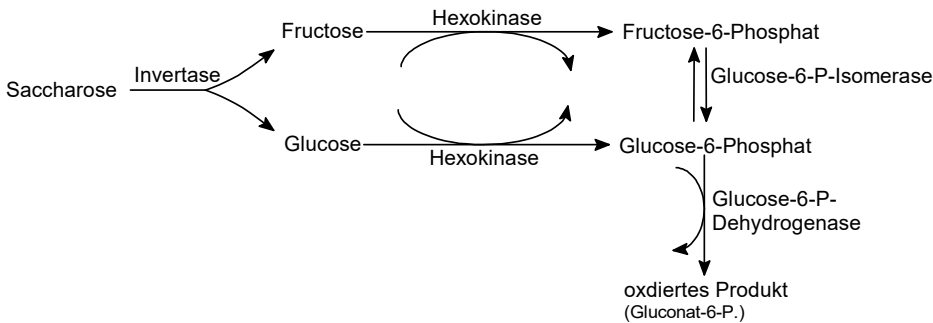
Es gibt auch viele biochemische Stoffe, für die zwar spezifisch umsetzende Enzyme bekannt sind, diese jedoch leider nicht NAD⁺ bzw. NADH als Cosubstrat nutzen. Es ist aber häufig so, dass die primär entstehenden Produkte in einer nachgeschalteten, zweiten Reaktion weiter umgesetzt werden können. Häufig ist diese Folgereaktion dabei auch enzymkatalysiert. So kann das Produkt der ersten enzymatischen Reaktion z.B. durch ein zweites, nun NAD(H)-abhängiges Enzym, weiter umgesetzt werden. Die NADH-Bildung ist dabei dann auch ein Maß für die vorhandene Analytmenge. Es handelt sich also um einen **gekoppelten** oder **zusammengesetzten** enzymatischen Test. Auch diese Messmethoden wurden durch Warburg eingeführt. Durch die Kopplung mehrerer Reaktionen sind die Variationsmöglichkeiten nahezu unerschöpflich.



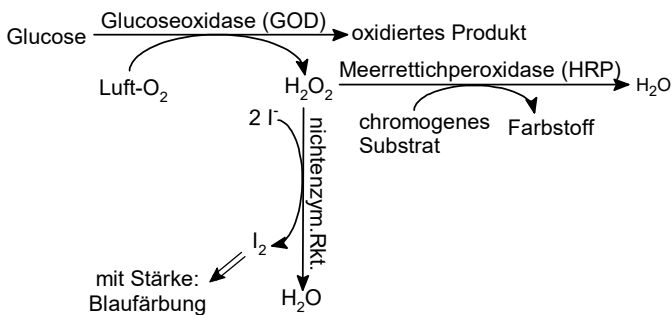
O. WARBURG (1883-1970)
 Nobelpreis Physiologie
 1931; Quelle: wikipedia.de

Beispiel: Bestimmung von Saccharose, Glucose und Fructose nebeneinander

1.9 Eine Probe enthält neben Saccharose, auch Fructose und Glucose (z.B. Honig, Fruchtsäfte, Schokolade etc.). Das folgende Reaktionsschema beschreibt die Bestimmung aller drei Analyte nebeneinander! Ergänzen Sie die fehlenden Cosubstrate und beschreiben Sie dann das Prinzip bzw. die Vorgehensweise.



Weiteres Beispiel: enzymatische Bestimmung von Glucose (2 Untervarianten)



Alle Substrate von Oxidasen lassen sich nach dem links angegebenen Schema bestimmen. Man hat bei diesen gekoppelten enzymatischen Bestimmungen die Wahl zwischen einer nichtenzymatischen und einer enzymatischen Weiterreaktion. Für die HRP sind mehrere **chromogene Substrate (farbbildende Substrate)** kommerziell erhältlich.

1.3 Messbesteck zur Bestimmung von ATP

Ähnlich dem NAD⁺/NADH, ist auch ATP/ADP ein weit verbreitetes Cosubstrat und kann im Labor quantifiziert werden. Dies lässt sich auch für enzymatische Substratbestimmungen nutzen, die dieses Cosubstrat nutzen. Auch hier wählt man die Methode der Endpunktbestimmung. Man legt den Analyten und eine überschüssige Menge ATP vor. Man misst den ATP-Gehalt zu Beginn und gibt anschließend das Enzym hinzu. Nach vollständigem

Substratumsatz bestimmt man den wiederum die verbliebene ATP-Menge. Je größer die Differenz an ATP-Menge, desto mehr Analyt lag vor.

Die Bestimmung von ATP kann hier leider nicht direkt fotometrisch erfolgen, wie bei NADH. Sie erfolgt selbst auch enzymatisch, so dass man auch bei diesem Verfahren von einem gekoppelt enzymatischen Test sprechen kann. Es gibt mehrere Detektionsmöglichkeiten.

1.3.1 Fluorimetrisch

Detektion des Fluoreszenzlichts (vgl. Abb. 1.3.1) der folgenden Reaktion:



1.3.2 Fotometrisch. Die Reaktionsfolge kennen Sie schon! siehe Vorseiten!

.....

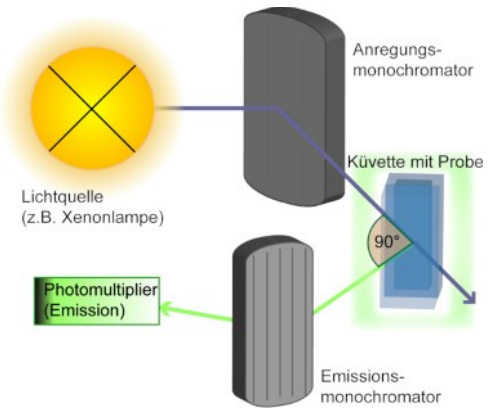


Abb. 1.3.1: Schema eines Fluorimeters
 (commons.wikimedia.org, Autor: Rillke)

2. Bestimmung der Enzymaktivität, d.h. der enthaltenen Enzymportion eines Enzyms

Die Bestimmung der Enzymaktivität ist stets eine **kinetische Bestimmung**, d.h. es wird analysiert, wie viel Produkt **pro Zeiteinheit** gebildet oder wie viel Substrat **pro Zeiteinheit** verbraucht wird. Die Enzymaktivität (Reaktionsgeschwindigkeit) ist nämlich eine *kinetische* Größe. Sie gibt an, wie viel Substrat eine Enzymportion **pro Zeiteinheit** umsetzt. Die Reaktionen sind die gleichen, wie für die Substratbestimmungen. Nur bietet man hier dem zu bestimmenden Enzym optimal hohe Substratkonzentrationen an. Man misst, wie viel Substrat unter i.d.R. optimal gehaltenen Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur) das Enzym umzusetzen vermag. Die Bestimmung von Enzymaktivitäten ist nicht nur in der klinischen Chemie wichtig. So ist die Enzymaktivität in Gemüse ein wichtiger Hinweis über deren Frische. Lange Lagerung oder thermische Behandlung führen zur Zerstörung der thermisch labilen Enzyme.

Beispiel: Will man die Glucose-Oxidase-Aktivität bestimmen, so gibt man zu der zu testenden Flüssigkeit Überschüsse an Glucose und NAD⁺, so dass das Enzym (GOD) optimal versorgt ist. Nun misst man mit dem optischen

Test nach WARBURG, wie viel NAD⁺ in NADH/H⁺ in einem bestimmten Zeitintervall umgewandelt wird, üblicherweise in den ersten Sekunden. Daraus kann man die Enzymaktivität, also den Substratumsatz pro Sekunde berechnen.

Bestimmung einer Substratsättigungskurve am Beispiel der Meerrettichperoxidase (HRP): Will man die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration analysieren, bereitet man viele Ansätze vor, die sich lediglich in der Konzentration des (künstlichen) *chromogenen Substrats* der HRP, dem ABTS, unterscheiden. In jedes Reagenzglas gibt man danach dieselbe Portion Cosubstrat (H₂O₂) und startet die Reaktion durch Zugabe der HRP. Nach einer exakt einzuhaltenden Reaktionszeit (z.B. 45 Sekunden) wird durch Zugabe von HCl_{aq} abgestoppt. Anschließend wird in jedem Ansatz die Konzentration an Farbstoff bestimmt. Durch eine Regression kann man aus den Punkten im Diagramm auf die Substratsättigungskurve (siehe bei Aufgabe 1.3) mit den Parametern K_M und V_{max} schließen.