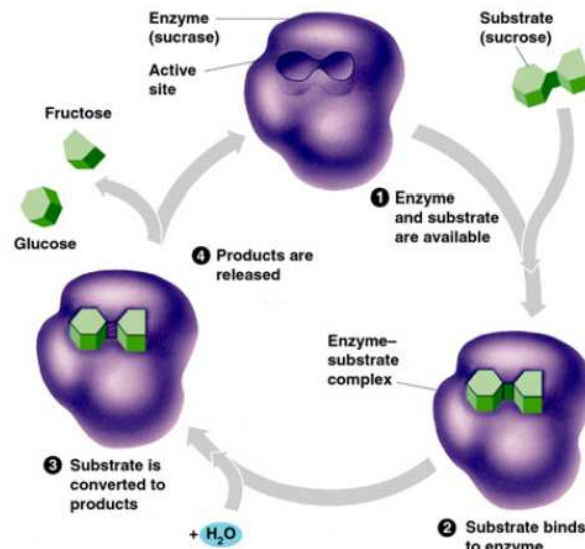


# Analytische Chemie III - Teil 3 – Allmaier (2010/11)

## Biochemische Assays

### Enzyme

Im Griechischen heißt "zymoma" Hefe (oder Sauerteig), die Silbe "en-" steht im Griechischen für "in". Hefezellen enthalten Enzyme (früher auch Fermente genannt). Die Enzymwirkung kann eine Reaktion Tausend-Milliarden-fach ( $10^{12}$ ) und noch viel mehr beschleunigen (Bereich etwa  $10^8$  bis  $10^{20}$ -fach). Viele Stoffwechselfvorgänge in Organismen würden ohne Enzyme praktisch nicht ablaufen können. Reaktionen, die nur msec brauchen, würden ohne Enzyme Jahre benötigen. In biologischen Prozessen sind Enzyme Proteine.



Enzym: Saccharose. Diese hat aktive Zentren: besitzt eine 3D Struktur wo es zur Umsetzung von einem bestimmten Produkt kommt. In diesem Fall ist das Produkt (stellt das Substrat dar) die Saccharose (Disaccharid). Dieses Substrat passt in das aktive Zentrum hinein. Es bildet sich ein Enzym-Substrat Komplex, welcher für eine bestimmte Zeit stabil ist. Der entstandene Komplex ist nun in der Lage seine 3D Struktur zu ändern und dazu beizutragen, dass eine chemische Reaktion abläuft. Unter Zufuhr von Wasser kommt es zu einer Spaltung von der Saccharose zu Glucose und Fructose. Das Enzym, welches die Katalysatorfunktion übernommen hat, wandelt sich nun wieder in die ursprüngliche Form zurück (mit aktivem Zentrum).

### Definitionen

Der Stoff, dessen Reaktion/Umsetzung das Enzym beschleunigt, nennt man das **Substrat (S)**.

Der Stoff, der bei einer enzymvermittelten Umwandlung entsteht, nennt man das **Produkt (P)**.

#### Enzyme sind wählerisch (= spezifisch)

**Substratspezifität:** Ein Enzym reagiert meist nur mit einem ganz bestimmten S (Stoff). Andere, selbst sehr ähnliche Stoffe, passen nicht in das aktive Zentrum des Enzyms.

Manche Enzyme reagieren zwar mit verschiedenen Stoffen, aber dann meist mit einer ganz bestimmten chemischen Gruppe oder Verbindungsart, die in diesen verschiedenen Stoffen in gleicher Weise vorkommt.

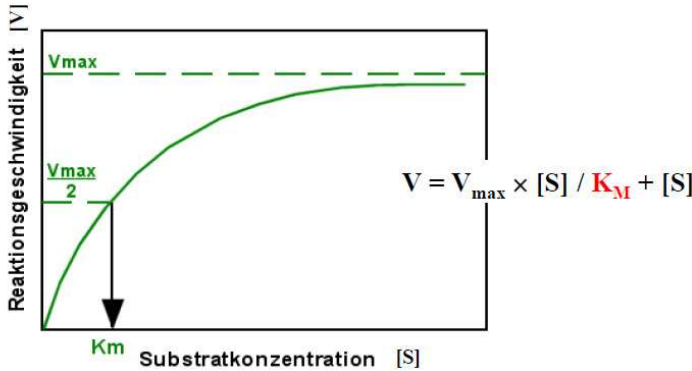
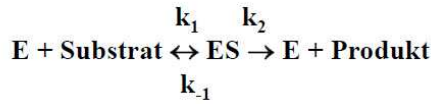
**Reaktionsspezifität:** Ein Enzym löst meist nur eine ganz bestimmte Reaktion aus.

**Enzymklassifizierung:** „nach dem was sie tun“

Oxidoreduktase	Oxidation/Reduktion
Transferasen	Transfer funktioneller Gruppen
Hydrolasen	Hydrolyse
Lyasen	Eliminierung unter Bildung von Doppelbindungen
Isomerasen	Isomerisierung
Ligasen	Bildung kovalenter Bindungen kombiniert mit ATP-Hydrolyse

Lyasen eliminieren z.B. H<sub>2</sub>O

# Enzymreaktion gemäß Michaelis-Menten-Gleichung



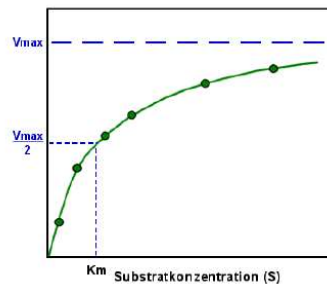
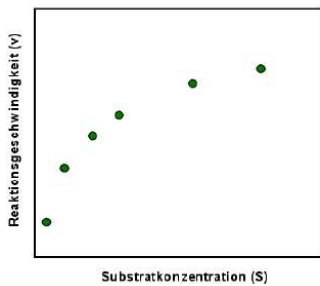
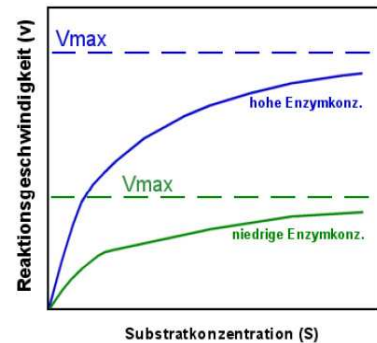
Enzym + Substrat bilden einen Enzym-Substratkomplex, welcher weiterreagiert zu dem Produkt und dem Anfangsenzym.

Diagramm: Wie schnell sich das Substrat in das Produkt umwandelt. Bei  $V_{max}/2$  ist eine Substratkonzentration die als die „Michaeliskonstante =  $K_M$ “ bezeichnet wird. Je kleiner dieser Wert ist desto kleiner ist die Substrataffinität desto

spezifischer passt ein gewissen Substrat zu einem Enzym. (viele Wenn  $K_M$  größer vice versa. (es passen viel Substrate in das Enzym hinein.) Die geschwindigkeit kann mit der Oben angegebenen Gleichung berechnet werden.

Die die Kurve variiert mit unterschiedlicher Enzymkonzentration.

Wie generiert man die Michaeliskonstante? Man hat eine konstante Enzymkonzentration. Dann gibt man unterschiedliche Mengen vom Substrat dazu. Daraus kann man einzelne Messpunkte auftragen und eine Kurve legen und daraus den Wert für die  $V_{max}$  mathematisch ermitteln/annähern.

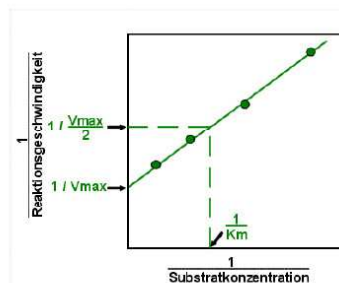
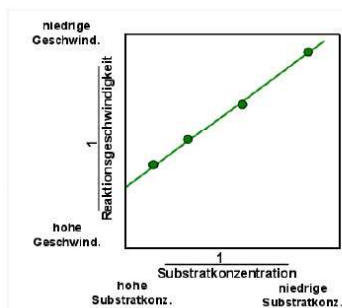


Da es jedoch oft zu Fehler kommt (durch annähern) hat man diese Gleichung umgeformt und man erhält die **Lineweaver-Burk-Gleichung**

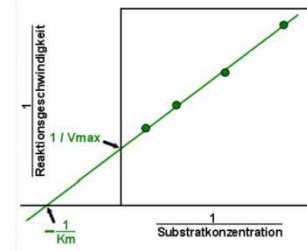
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Dabei erhält man eine Lineare Regressionsgerade. (Diagramm: ungewöhnlich weil durch die Kehrwerte steht die hohe Konz. Links und die niedrige Konz. Rechts)

Variante 1:  $K_M$  erhält man bei diesem Diagramm indem man den Abstand von dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse verdoppelt und danach bei der x-Achse den  $1/K_M$  Wert abliest.



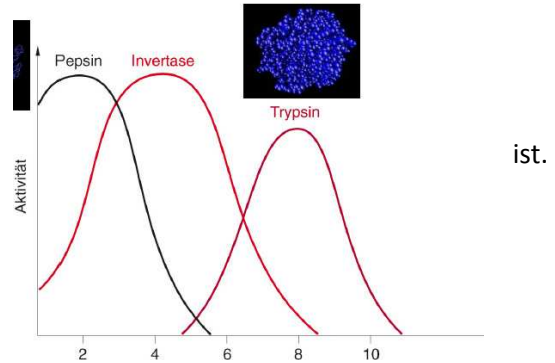
**Variante 2:** Man zieht die Regressionsgerade weiter bis sie die X-Achse schneidet und erhält dann ebenfalls  $-1/K_M$  (!!!aber negativ!!!)



**Umsetzung von Enzym mit Substrat zum Produkt ist von einigen Komponenten abhängig:**

**PH-Abhängigkeit von Enzymfunktionen:**

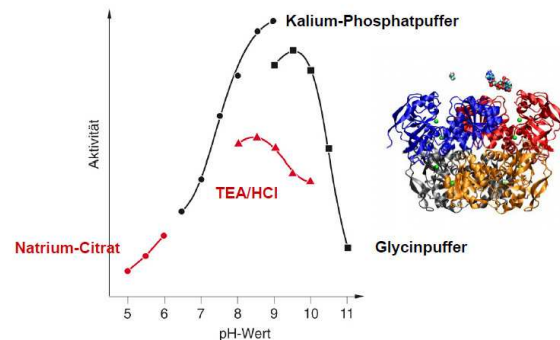
Jedes Enzym hat eigene Bereiche bei denen es aktiv  
Man sollte immer PH-Optimum arbeiten (markant:  
Trypsin asymmetrisch)



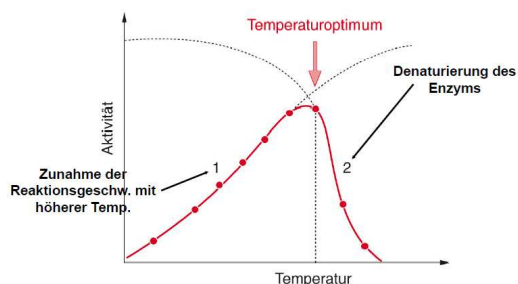
ist.

**Aktivität in Abhängigkeit von Puffern:**

(Beispiel an einer Alkoholdehydrogenase)



**Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur:**



Hier sieht man, dass zuerst mit steigender Temperatur die Aktivität des Enzyms ebenfalls steigt. Bis sie einen gewissen Punkt/Temperatur erreichen bei der das Enzym seine 3D Struktur beginnt zu verlieren (das Enzym denaturiert). dabei fällt die Aktivität bis 0 wo jede Struktur verlorengegangen ist.

**Ziele enzymatischer Aktivitätstests bei biochemischen Assays**

- Konzentrationsbestimmung von **Enzymen** in biologischen Systemen
- Mengenbestimmung von Enzymen
- Enzymausbeuten bei Isolierung und Reinigung
- Charakterisierungen von Enzympräparationen (wie rein sind die Enzyme, haben sie Katalytische Eigenschaften...)
- **Substrat**konzentrationen
- Markierung von WW-Reaktionen

**Auswahl an Messtechniken in enzymatischen Aktivitätstests (durch die Bestimmung des Produkt, des Enzyms, oder die Abnahme des Substrats)**

- Lichtabsorption (Photometrie)
- Fluoreszenz (Fluorimetrie)

- Lumineszenz (Luminometrie)
- Sauerstoffgehalt (Polarographie, Sauerstoffelektrode)
- Isotopengehalt (Radiometrie)
- pH-Wert (Titrimetrie)
- Leitfähigkeit (Konduktometrie)
- Chromatographisches oder elektrophoretisches Verhalten (HPLC, CE oder CE-on-a-Chip)

### Substratauswahl

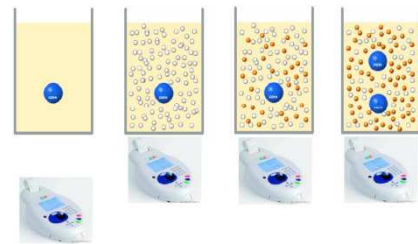
- Messbarkeit der Reaktion (Zeitlich Erfassbarkeit ebenfalls berücksichtigen)
- Zugänglichkeit des Substrats (Reinheit, Kosten, ob selbst Synthetisierung möglich?)
- Stabilität des Substrats
- Affinität zum Enzym (Wie ist die max. Reaktionsgeschwindigkeit?)
- Reaktionsgeschwindigkeit
- Löslichkeit (darf keine Suspension sein, weil es sonst nicht in das aktive Zentrum gelangen kann)
- Kosten

### Fehlermöglichkeiten bei Enzymassays

- **Leerwert (Blindwert):** Partikeleffekte (bei Kontrollmessungen bei welchen die Lichtabsorption gemessen wird), Fällungen, Adsorption (am Reaktionsgefäß), Verunreinigungen, nichtenzymatische Reaktionen
- **Linearität (für die Quantifizierung):** Substratverbrauch, Produkthemmung (Hemmung auf die Enzymaktivität), Instabilität, Artefakte, Annäherung an das thermodynamische Gleichgewicht

Beispiel eines Enzymassays: Bestimmung der Aktivität eines Enzyms im Serum (direkte Bestimmung) mittels Photometers

Enzym ist in gelöster Form vorhanden. Zuerst wird Blindwert gemessen. Dann werden Substratmoleküle dazugegeben. Am Anfang ist noch nichts umgesetzt. Es entstehen die (Orangen) Produkte die, wenn sie photometrisch aktiv sind, gemessen werden kann, und damit quantitative Bestimmungen durchgeführt werden. Bild 4 wenn mehr vom Enzym enthalten ist, entsteht auch mehr vom Produkt welches gemessen werden kann.



2 Messformen:

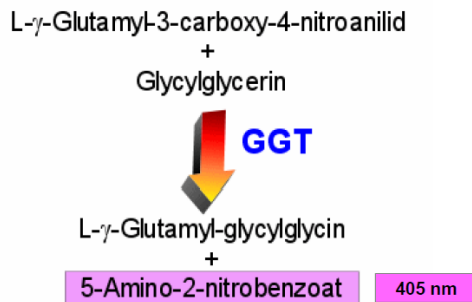
- entweder man misst das Entstehen des Produktes
- Substratkonzentration wird am Anfang gemessen und mit verfolgt wie sie mit der Zeit abnimmt

## Enzymbestimmung - Organschädigung (human)

Enzym (Abkürzung)	Mögliche Ursache einer Vermehrung des Enzyms im Blut
<a href="#">Alanin-Aminotransferase</a> (ALT, ALAT) [früher Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)]	Schädigungen der Leber
<a href="#">Aspartat-Aminotransferase</a> (AST, ASAT) [früher Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)]	Schädigungen der Leber und des Muskels
<a href="#">Gamma-Glutamyl-Transferase</a> (GGT)	Krankheiten der Leber und der Gallenwege
<a href="#">Alkalische Phosphatase</a> (AP, ALP)	Krankheiten der Leber, der Gallenwege und des Knochens
<a href="#">Lipase</a>	Schädigungen der Bauchspeicheldrüse (z.B. Pankreatitis)
<a href="#">Kreatinphosphokinase</a> (CK)	Muskelschäden (Herzmuskelschäden)
<a href="#">Kreatinphosphokinase MB-Typ</a> (CK-MB)	Herzmuskelschäden (z.B. Infarkt)

Wenn ein bestimmtes Enzym im Körper nachgewiesen werden kann weist es auf eine bestimmte Krankheit hin.

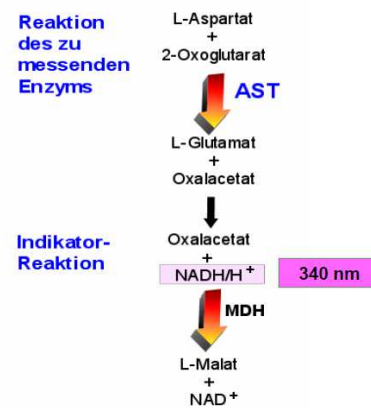
## Messung der Aktivität von Gamma-GT



2 Substrate werden mit Enzym umgesetzt zu einem Produkt welche jedoch nicht gemessen werden kann. Daher wird das Gebildete Produkt weiter mit einem Indikator (NADH) umgesetzt (+ weiteres Enzym). Da der Indikator gemessen werden kann, kann während der Reaktion die Abnahme dieser Reaktion beobachtet werden.

2 Substrate reagieren mit einem Enzym zu einem Produkt welche nicht, und einem welches bei 405nm gemessen werden kann.

## Messung der Aktivität von AST via Indikator



## Endpunktmethode zur Bestimmung von Harnsäure im Serum:

Für die Harnsäure gibt es ein ideales Enzym, das ist die Uricase. Die Uricase baut Harnsäure ab. Gibt man Uricase zum Serum dazu, wird die Harnsäure abgebaut. Da die Harnsäure bei 290 nm Licht absorbiert, kann man das glücklicherweise im Photometer beobachten.

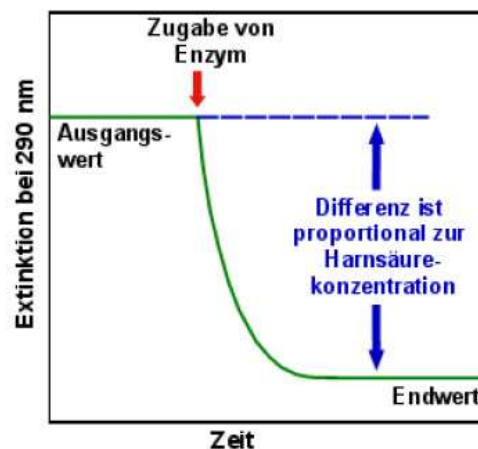
Dann kann man am Ende der Reaktion (entweder ist kein Enzym oder keine Harnsäure mehr vorhanden) die Differenz des Ausgangswerts und Endwerts bestimmen und somit die Harnsäurekonzentration ausrechnen.

Voraussetzung: Reaktion muss fertig abgelaufen sein

**Vorteil:** PH-Wert ist unkritisch, zugegebene Menge an Enzym ist unkritisch, Temperatur auch nicht von großer Relevanz

**Nachteil:** große Menge Enzymmenge muss zugesetzt werden weil die Harnsäure komplett umgesetzt werden muss.

Enzym: Uricase niedrige Mz Wert=hohe Affinität zur Harnsäure => schnell Reaktion => wenig Zeit (+).



### Kinetische Methode zur Bestimmung von Harnsäure im Serum:

Man nimmt wieder die Abnahme der Harnsäure. Man gibt eine ebenfalls das Enzym zu und misst während der Reaktion an 2 Messpunkten.

Aus der Steilheit der beiden Messpunkte kann man zurückrechnen was die Ausgangsmenge von Harnsäure hat. Man braucht eine gute Vorstellung wie die Kurve aussieht. (mathematisch berechnen)

**Vorteil:** sehr schnell, sehr genau (wenn die Kurve gut mathematisch beschrieben ist), benötigt nur sehr geringe Enzymmengen.

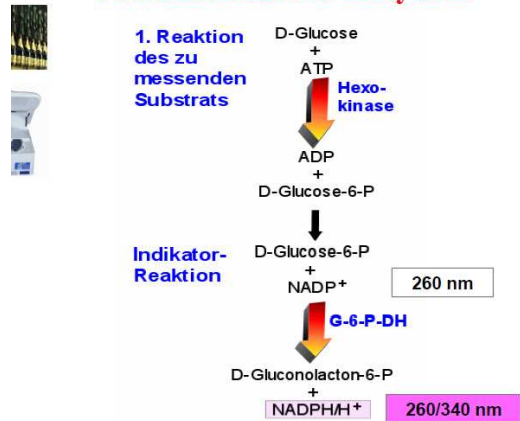
**Nachteil:** die Reaktionsbedingungen müssen sehr genau bekannt sein, (PH, T,... müssen sehr präzise eingehalten werden)

Bei dieser Methode verwendet man normalerweise Enzyme mit einer geringen Spezifität.



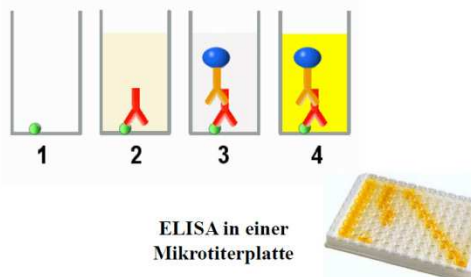
### Photometrische Glukosebestimmung in Getränken mittels Enzymen

Kombination von 2 Enzymen und einer Indikatorreaktion bei welcher die Bildung des Indikators detektiert werden kann.



### ELISA

#### ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)



Der grüne Punkt stellt einen Hepatitis C Virus dar. Dann wird eine Lösung zugegeben in welcher ein Antikörper gegen das Virus vorliegt. Dieser Antikörper bindet sich nun am Virus welcher am Boden fest sitzt. Den Antikörper kann man jedoch nicht Monitoren. Deshalb geben wir einen 2. AK dazu welcher sich an den ersten AK bindet. Beim 2. AK ist auch ein Enzym kovalent gebunden. Dann wird als Substrat zugegeben welches vom Enzym am 2. AK umgesetzt wird und als z.B. gelber Farbstoff sichtbar wird und

detektiert werden kann. Somit kann man auch die Konzentration des Virus bestimmen/oder wie viel AK in einem Serum vorliegen.

### Enzym-unterstützte Analyse von mikroskopischen Gewebspräparaten - Immunhistochemie

Nachweis des Proteins Inhibins, das man in der normalen Mikroskopie nicht erkennen würde, in einer Gewebsprobe mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Inhibin der mit einem Enzym gekoppelt ist. Farbstoffzusatz, der seine rote Farbe erst unter dem Enzymeinfluss entwickelt.

