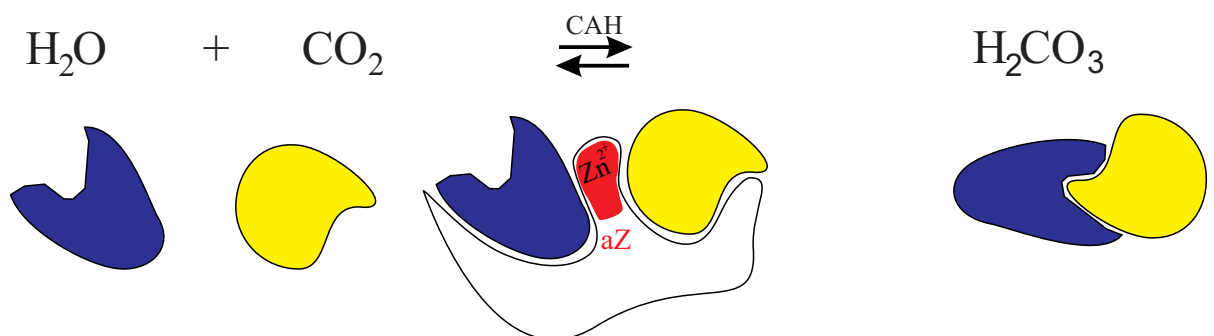


Enzymaktivitätsbestimmung 1

Die Existenz des Lebens ist an die biologische Aktivität von Enzymen gebunden. Enzyme ermöglichen bei 37°-C Reaktionen, die ohne sie nicht möglich wären. Sie setzen die zur Reaktion benötigte Energie herab und beschleunigen so die Reaktion. Sie aktivieren andere Enzyme und lösen Reaktionskaskaden aus: Blutgerinnung, Apoptose oder Zellzyklus).

Carboanhydrase erzeugt bei einem Druck von nur 5 kPa Kohlenstoffdioxid 1,2 mmol Kohlensäure pro Liter Blut. Lediglich 0,2 % Kohlensäure entstehen bei der spontanen Reaktion von Kohlenstoffdioxid mit Wasser bei 25°-C und einem Druck von 101,3 kPa. Die Bedingungen sind zwar nicht vollständig vergleichbar, doch stehen hier 6,2 % (1,2 mmol/l) und 0,2 % gegenüber. Die Carboanhydrase erzielt bei diesem Vergleich eine 31-mal höhere Ausbeute.

Die Carboanhydrase (CAH) gehört zu den Enzymen mit dem höchsten Substratumsatz. Ein Mol CAH kann in der Sekunde eine Million Reaktionen katalysieren. Der Substratumsatz wird auch als Wechselzahl bezeichnet. Für ein Isoenzym der CAH wurde die Wechselzahl von 600 000 nachgewiesen.



Enzymologische Begriffe

Holoenzym, Apoenzym, Koenzym, prosthetische Gruppe, Substratbindungsstelle und aktives Zentrum

Holo (gr. ganz scheidend) steht für das gesamte Enzym. Der Begriff Enzym wurde von Kühne in die Sprache eingeführt und nimmt Bezug auf die Tatsache, dass der Inhalt von Hefezellen biologisch aktiv ist (Enzym: in Hefe) und keine lebenden Hefezellen für eine Gärung notwendig sind.

Mit Apoenzym wird der proteinäre Teil bezeichnet und die Abgrenzung zum Koenzym vorgenommen. Nicht jedes Enzym benötigt ein Koenzym. Das bekannteste Koenzym ist NADH. Koenzyme sind helfende Werkzeuge für die benötigte Reaktion und haben eine nichtproteinäre Struktur. Das Apoenzym bedient sich des helfenden Werkzeuges bei Bedarf. Eine ständige Verbindung der beiden Anteile des Holoenzymen ist deshalb nicht erforderlich.

Ist die Verbindung zwischen Apoenzym und der reaktionsbestimmenden nichtproteinären Struktur fester Natur, so wird diese mit prosthetischer Gruppe benannt. Wichtige Vertreter sind ATP und Häm.

Die Substratbindungsstelle kann für ein Substrat ausgelegt sein oder wie bei der Carboanhydrase für zwei. Mit der Substratbindungsstelle entsteht der Enzym-Substrat-Komplex und damit die Grundlage für das Senken der Aktivierungsenergie. Die Carboanhydrase bringt Kohlenstoffdioxid und Wasser so dicht zusammen, dass diese reagieren.

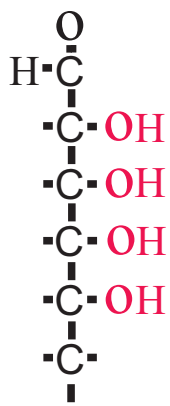
Wie spezifisch die Bindungsstelle für das Substrat sein kann, zeigt die Glucokinase, die nur Glukose und keinen weiteren der sieben isomeren Sechszucker bindet. Dagegen sind die Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase weniger substratspezifisch. Einige von ihnen binden neben Lactat auch andere Substrate wie Hydroxybuttersäure.

Das aktive Zentrum bestimmt die chemische Natur der Reaktion und führt zu einer Klassifikation der Enzyme wie beispielsweise Oxidoreduktase, Transferase oder Hydrolase. Die Carboanhydrase benutzt im aktiven Zentrum für die Katalyse ein Zinkion. Das Zinkion ist ein Kofaktor und kein Koenzym.

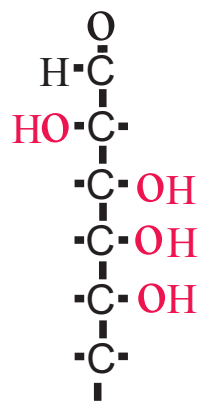
Enzymaktivitätsbestimmung 2

Substratspezifität der Glucokinase

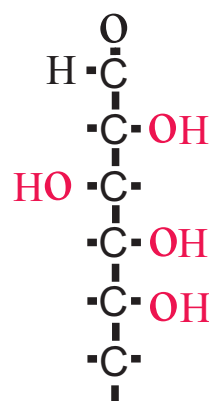
An der Substratbindungsstelle wird nur die Glukose umgesetzt. Der Vergleich der Isomere verdeutlicht, wie spezifisch die Substratbindungsstelle arbeitet.



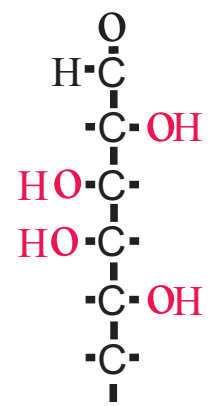
Allose



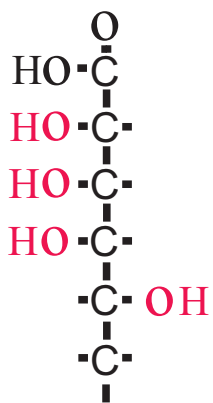
Altrose



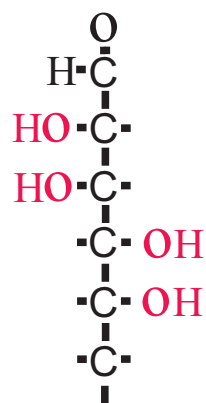
Glukose



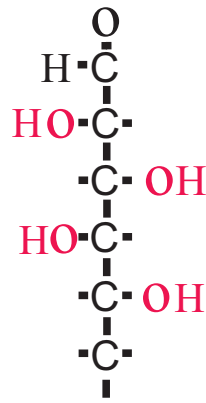
Galaktose



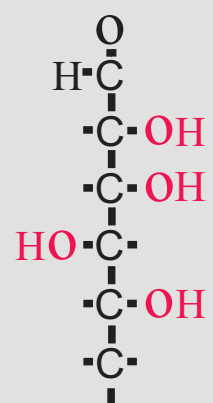
Talose



Mannose



Idose

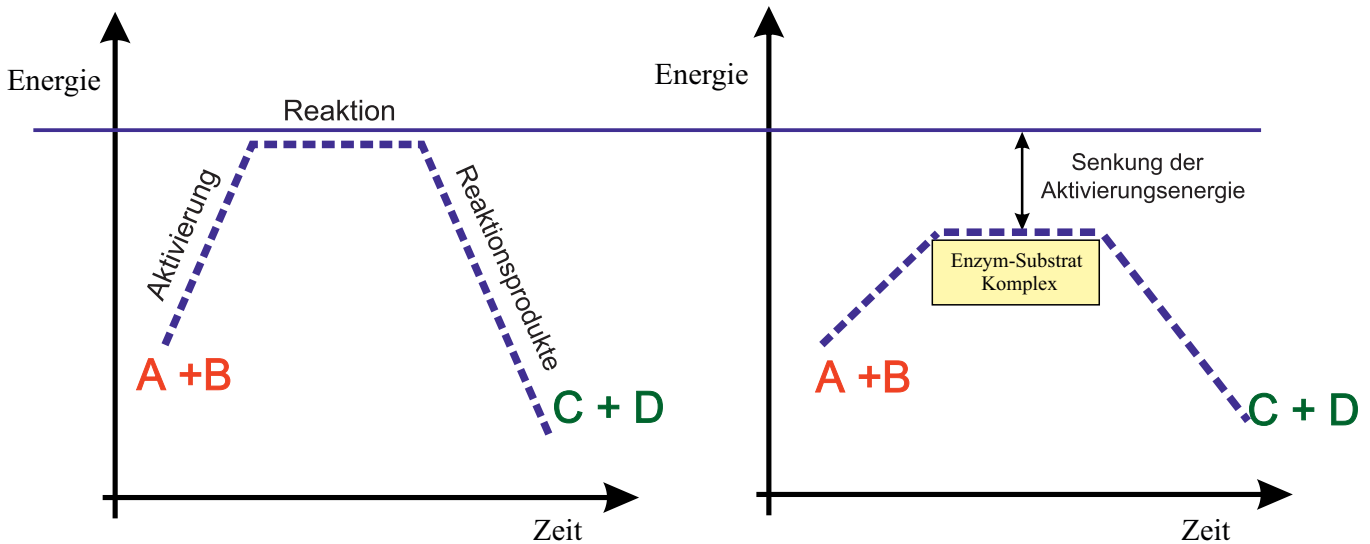


Gulose

Enzymaktivitätsbestimmung 3

Das Wesen der Katalyse

Enzyme senken die Energie, die der Reaktion den Anstoß verleiht. Erst wenn die Reaktionspartner mit ausreichender Energie (angeregter Zustand) aufeinander treffen, können sie reagieren. Dafür ist zumeist eine höhere Temperatur notwendig. Durch das Herstellen des Enzym-Substrat-Komplexes findet die Reaktion auch bei geringerer Temperatur statt.

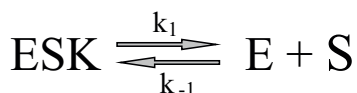


Die enzymatische Reaktion wird in zwei Schritte geteilt. Im ersten entsteht der Enzym-Substrat-Komplex und im zweiten zerfällt dieser in das Enzym und Produkt. Im Enzym-Substrat-Komplex wird die räumliche Anordnung der Reaktionspartner so gestaltet, dass die Reaktion weniger Anregungsenergie bedarf. So beschleunigen Enzyme die Einstellung des Gleichgewichts um den Faktor 10^8 bis 10^{20} . Zu beachten ist, dass Enzyme nur die Reaktionsgeschwindigkeit und nicht das chemische Gleichgewicht verändern.



Wie die Reaktionsgleichung zeigt bestehen drei Reaktionsgeschwindigkeiten (v). Für den Enzym-Substrat-Komplex bestehen zwei Möglichkeiten für den Zerfall. Mit der Geschwindigkeit (v_{-1}) zerfällt er in E und S und mit der Geschwindigkeit (v_2) in E+P. Dabei ist (v_{-1}) wesentlich höher als (v_2). Wenn für die Reaktion gilt ($v_2 \ll v_{-1}$), dann kann (v_2) vernachlässigt werden, wenn der Zustand des Enzym-Substrat-Komplexes untersucht wird. In der nachstehenden Gleichung wird die Geschwindigkeit (v) durch die Zerfallskonstante (k) ersetzt.

Überführung in das Massenwirkungsgesetz



$$k_{-1} [\text{ESK}] = k_1 [E] \cdot [S] \quad /: k_1 \quad /: [\text{ESK}]$$

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[\text{ESK}]}$$

es gilt: $\frac{k_{-1}}{k_1} = K_M$

K_M

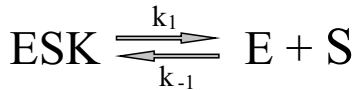
Steht für die Zerfallskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes, die nach Michaelis und Menten benannt ist.

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[\text{ESK}]}$$

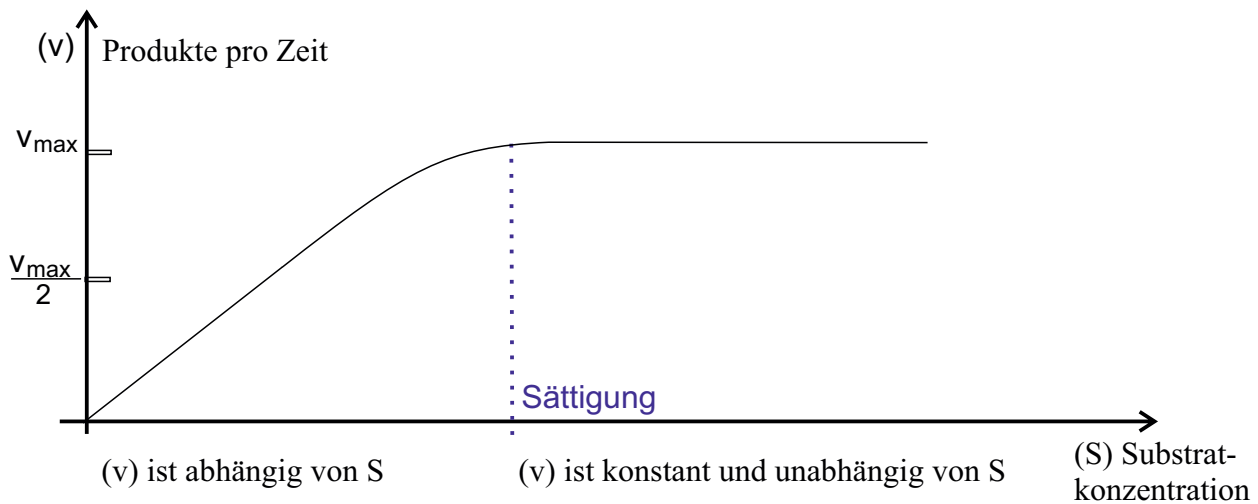
Enzymaktivitätsbestimmung 4

Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität

Der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes durch (k_{-1}) in Enzym und Substrat führt zu einem Gleichgewicht, das durch Erhöhung der Substratkonzentration verändert werden kann.



Zu Beginn der Reaktion besteht eine enge Beziehung zwischen Enzymaktivität und Substratkonzentration ($v \sim S$). Durch Einfügen der Reaktionskonstanten (k) ergibt sich $v = k \cdot S$, eine Steigerung der Substratkonzentration bedingt eine Steigerung des Substratumsatzes pro Zeiteinheit (v).



$v = k (S)^1$	$v = k (S)^0$ $v = k (S \cdot 0)$ $v = k$
---------------	---

Reaktion 1. Ordnung	Reaktion 0. Ordnung
(v) ist eine Funktion von S	(v) ist eine Funktion der Enzymaktivität

enzymatische Substratanalyse	Enzymaktivitätsbestimmung
------------------------------	---------------------------

Wenn jedes Enzymmolekül mit einem Substratmolekül verbunden ist, dann ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht und eine weitere Zugabe von Substrat hat keinen Einfluss auf das Gleichgewicht und die Geschwindigkeit der Reaktion.

Enzymaktivitätsbestimmung 5

Enzyme und Substratanalyse

In der Klinischen Chemie werden zahlreiche Enzyme zur Analyse von Substraten verwendet. Mit Urease wird der Konzentration des Harnstoffs ermittelt. Urikase ermöglicht die Analyse der Harnsäure und mit Glukoseoxidase wird die Blutglukose gemessen.

Bei einer enzymatischen Substratanalyse wird das Enzym im Überschuss verwendet, sodass eine lineare Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substrat besteht. Durch das Verwenden einer Vergleichslösung wird die Konzentration im Untersuchungsmaterial berechnet. Aus wirtschaftlicher Sicht ist die Erzeugung eines Farbkomplexes und anschließende fotometrische Messung bei der enzymatischen Substratanalyse weit verbreitet.

Gegenüberstellung	
enzymatische Substratanalyse	Enzymaktivitätsbestimmung
Überschuss Enzym	Überschuss Substrat
Substratumsatz vollständig	Substratumsatz teilweise
Messmethode Endpunkt-messung kinetische Messung	Messmethode kinetische Messung

Michaelis-Menten-Gleichung

Die Gleichung der Enzymkinetik ermöglicht für jede Substratkonzentration die entsprechende Reaktionsgeschwindigkeit zu berechnen, wenn (v_{\max}) und (K_M) bekannt sind.

Die Gleichung beschreibt die Substratkonzentration, bei der die Enzymmoleküle zur Hälfte Substrat gebunden haben und die Reaktionsgeschwindigkeit gleichfalls die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit erreicht hat.

Enzymaktivitätsbestimmung 6

K_M ist ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat. Hohe K_M -Werte stehen für eine geringe Affinität und geringe Reaktionsgeschwindigkeit.

Als allgemeiner Standard für die Messung der Enzymaktivität gilt, dass während der Messung nicht mehr als 20 % des Substrates verbraucht wird, um im linearen Bereich zu arbeiten ($v = k \cdot S$).

Geübte Praxis ist es, bei der 10-fachen Konzentration von K_M zu arbeiten.

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{S}{K_M + S} \quad \frac{v}{v_{\max}} = \frac{S}{K_M + S} \quad / v_{\max}$$

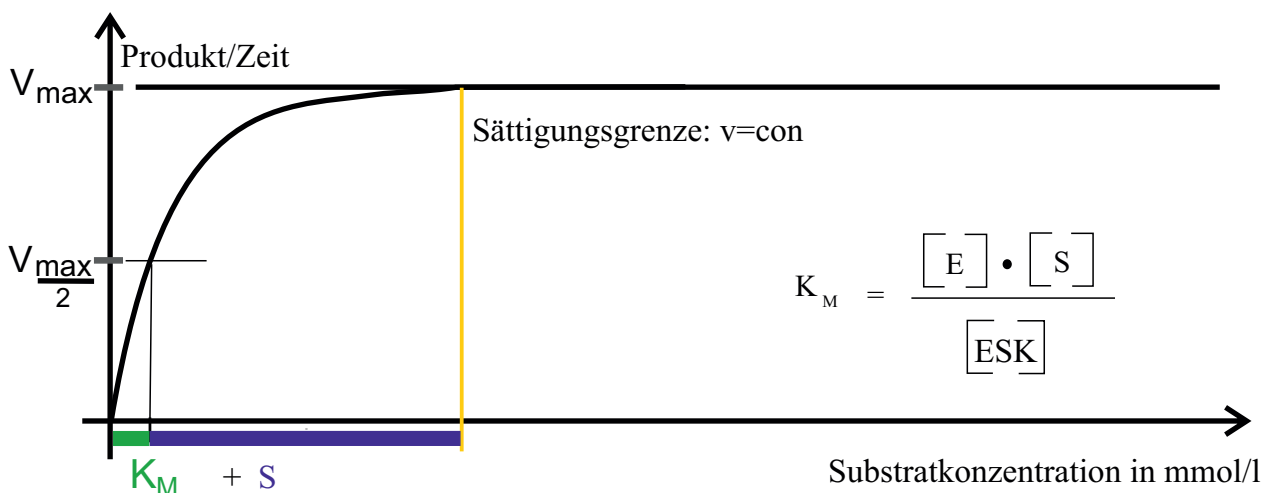
$$v = v_{\max} \frac{S}{K_M + S}$$

Es gilt: $K_M = S$

$$v = v_{\max} \frac{S}{S + S}$$

$$v = v_{\max} \frac{1}{1 + 1}$$

$$v = \frac{v_{\max}}{2}$$

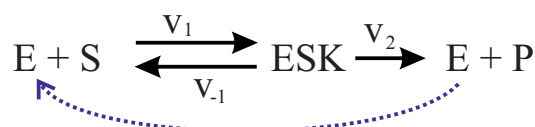


$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{S}{K_M + S}$$

Die Gleichung in Worten:

(v) geteilt durch (v_{\max}) ist gleich dem Substrat (S) geteilt durch K_M plus das Substrat (S), das für das Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit nötig ist.

Mit der Gleichung kann die Substratmenge berechnet werden, bei der die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion zur Hälfte erreicht ist. Hier ist die Hälfte des Enzyms mit Substrat verbunden. Das Freisetzen des Produkts (v_2) bringt das Enzym zurück in den Enzym-Substrat-Komplex und es kann erneut Substrat binden. So entsteht der Kurvenverlauf der Hyperbel und eine Verdoppelung von K_M kann nur zur Steigerung der Geschwindigkeit, nicht aber zur Maximalgeschwindigkeit führen.



Enzymaktivitätsbestimmung 7

Bestimmung der Enzymaktivität

Die in der klinischen Chemie zu untersuchenden Enzyme sind proteinärer Natur. Nichtproteinäre Enzyme wie RNA-Asen sind aktuell nicht in der Routinediagnostik verordnet.

Die Methodik erfordert die Eigenschaften der Enzyme zu beachten. Dazu gehören pH-Optimum, Ionenart und Ionenkonzentration, Temperatur, Stabilisatoren und Substratüberschuss.

In der Klinischen Chemie ist die Unterscheidung der Enzyme nach ihrer Lokalisation von Bedeutung. Die Differenzierung nach Zellenzymen, Enzymen des Blutplasmas und Exkretionsenzymen hat sich als praktikabel erwiesen.

Zellenzyme

Zellenzyme gelangen bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in das Blutplasma. Der geordnete Zelltod (Apoptose) führt zum Übertritt eines geringen Teils der Enzyme ins Bindegewebe und von dort ins Blut. Von Bedeutung sind die kurzlebigen Granulozyten, die im Bindegewebe zugrunde gehen: rund eine Million pro Sekunde. Fast alle Enzyme werden deaktiviert. Das Hauptenzym, die Leukozytenesterase, wird vom Alpha-1-Antitrypsin gehemmt. Findet dies nicht statt, dann werden die Lungenbläschen von der Leukozytenesterase zerstört.

Beim Gesunden aufzufindende Enzyme im Blutplasma ergeben deren Referenzbereiche.

In der Diagnostik von Erkrankungen sind jene Zellenzyme von Bedeutung, die durch pathologische Vorgänge ins Blut gelangen. Dabei kann erkannt werden, wie intensiv die Zellschäden sind, wenn die Lokalisationen der Enzyme bekannt sind. Störungen der Zellmembran zeigen andere Muster als Schäden mit Freisetzung mitochondrialer Enzyme. Die auffindbaren Muster aus Enzymen mit unterschiedlichen Anteilen können einzelnen Organen zugeordnet werden.

Plasmaenzyme

Alle Enzyme mit einer Funktion im Blutplasma entstammen der Leber. Dazu gehören die Enzyme für die Gerinnung und Fibrinolyse. Zur Physiologie des Fettstoffwechsels gehören Lipasen, die aus den von der Leber sezernierten VLDL Triglyzeride spalten. Dazu zählen Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase und Lipoproteinlipase. Die Cholinesterase wird von der Leber freigesetzt, um Cholinester wie Acetylcholin zu spalten.

Exkretionsenzyme

Aus Sicht der klinischen Labordiagnostik sind die Enzyme der Bauchspeicheldrüse relevant. Insbesondere die Aktivitätsbestimmung der Alpha-Amylase. Sie wird nicht nur im Plasma bestimmt, sondern auch im Harn. Andere Enzyme wie Trypsin oder Chymotrypsin des Organs stehen für weitere Differenzierungen zur Verfügung.

Enzymaktivitätsbestimmung 8

Messung der Enzymaktivität

In der Laborpraxis ist die kinetische Messung unter Verwendung des Koenzyms NADH die am meisten verbreitete Methode. Im Spektrum des UV-Bereichs werden Reduktion oder Oxidation des Koenzyms nach dem Lambert-Beer-Gesetz gemessen. Die Änderung der Lichtabsorption (Extinktion) pro Zeiteinheit ist der Aktivität des Enzyms proportional.

Das Dihydropyridinsystem (NADH) hat bei 340 nm ein Absorptionsmaximum und das Hydroxyridinsystem (NAD⁺) kann hier das Licht nicht absorbieren.

Durch Anwendung des molaren Extinktionskoeffizienten (Ek) von 6300 pro cm Schichtdicke wird die Enzymaktivität berechnet.

$$\text{Aktivität in mol/s} \cdot \text{l} = \Delta E \frac{\text{Vol. Prüfansatz}}{\text{molarer Ek} \cdot \text{Zeit} \cdot \text{Vol. Prüfmaterial}} \quad 1 \text{ mol/l}$$

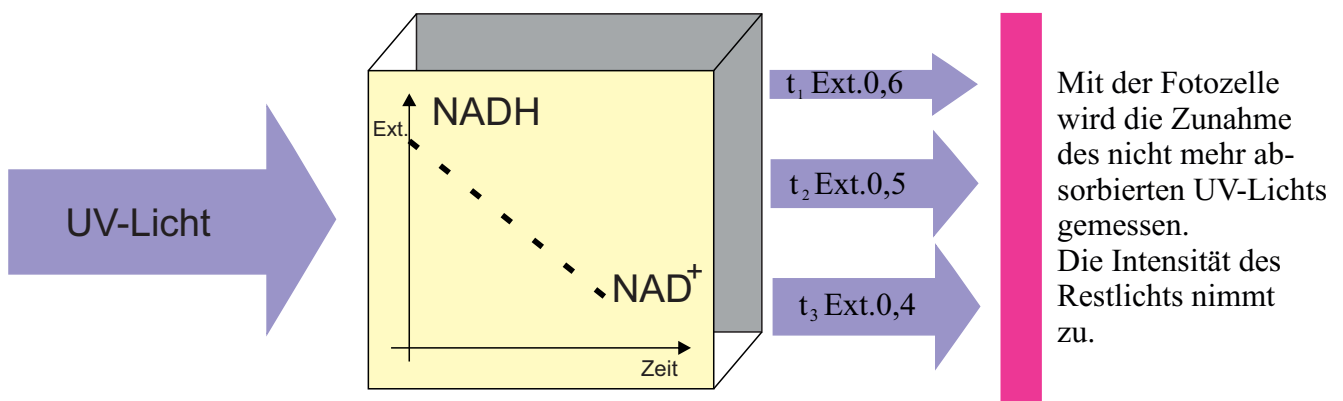
$$\text{Aktivität in mol/s} \cdot \text{l} = \Delta E \frac{\text{ml}}{\text{Sekunden} \cdot \text{ml}} \quad 1 \text{ mol/l}$$

$$\text{Aktivität in } \mu\text{mol/s} \cdot \text{l} = \Delta E \frac{1,5 \text{ ml}}{6300 \cdot 60 \text{ sec} \cdot 0,05 \text{ ml}} \quad 1 \text{ 000 000 } \mu\text{mol/l}$$

$$\text{Aktivität in } \mu\text{mol/s} \cdot \text{l} = \Delta E \cdot 79,37$$

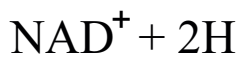
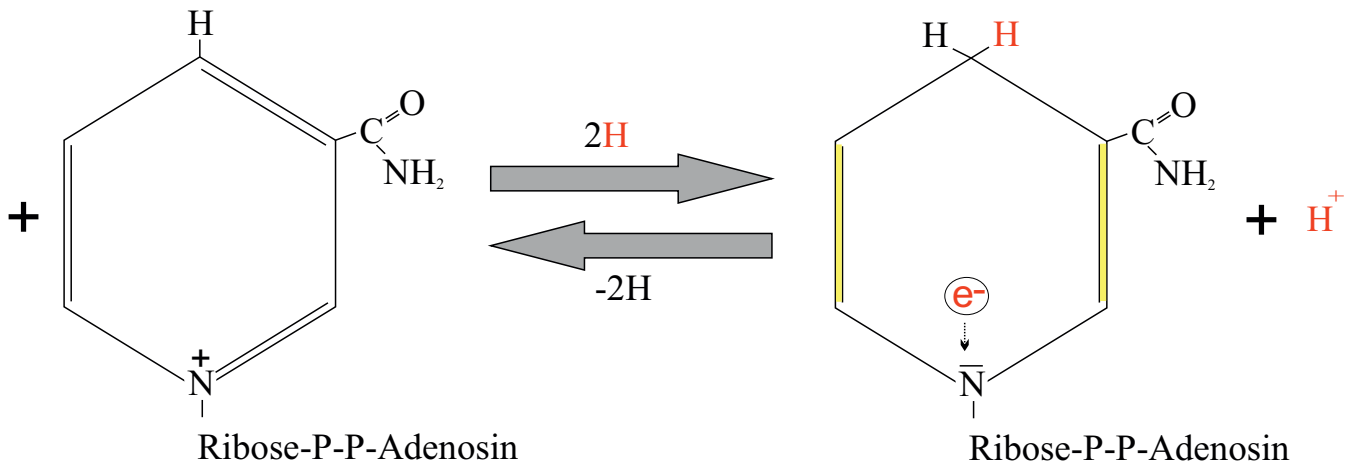
Wird die Änderung der Extinktion pro 60 Sekunden mit dem errechneten Faktor zu multipliziert, dann ist die Enzymaktivität bekannt.

Abnahme der UV-Absorption im Reaktionsgefäß und Zunahme des Restlichts pro Zeiteinheit am Beispiel der LDH



Enzymaktivitätsbestimmung 9

Änderung des Absorptionsverhaltens

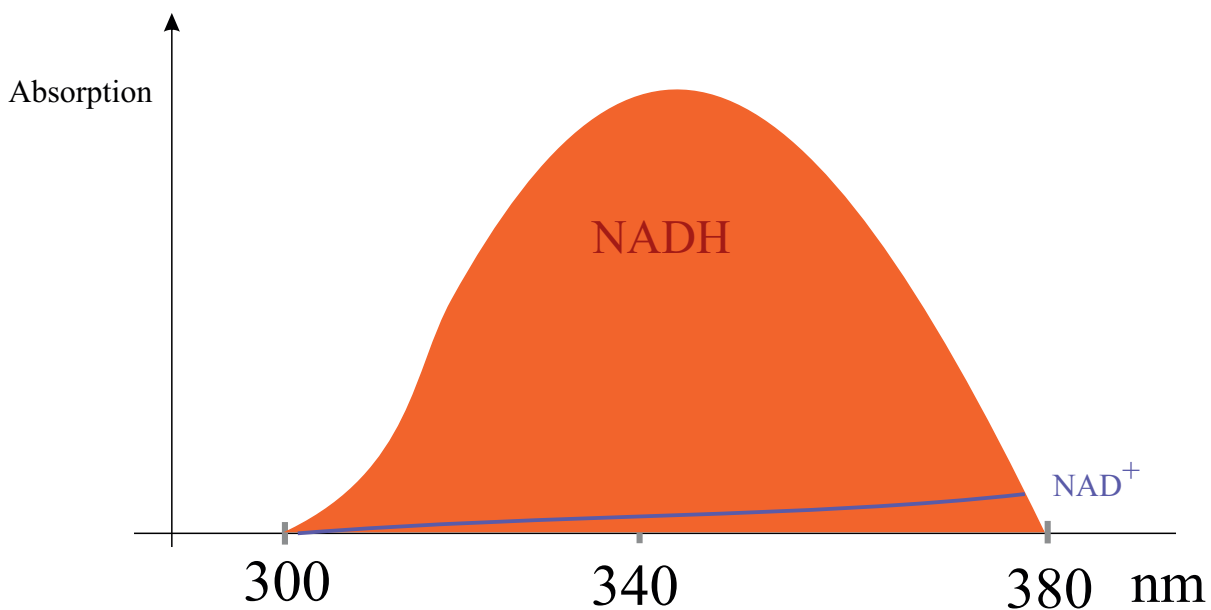


Hydropyridin-System
dehydrierte Form
oxidierte Form

Dihydropyridin-System
hydrierte Form
reduzierte Form

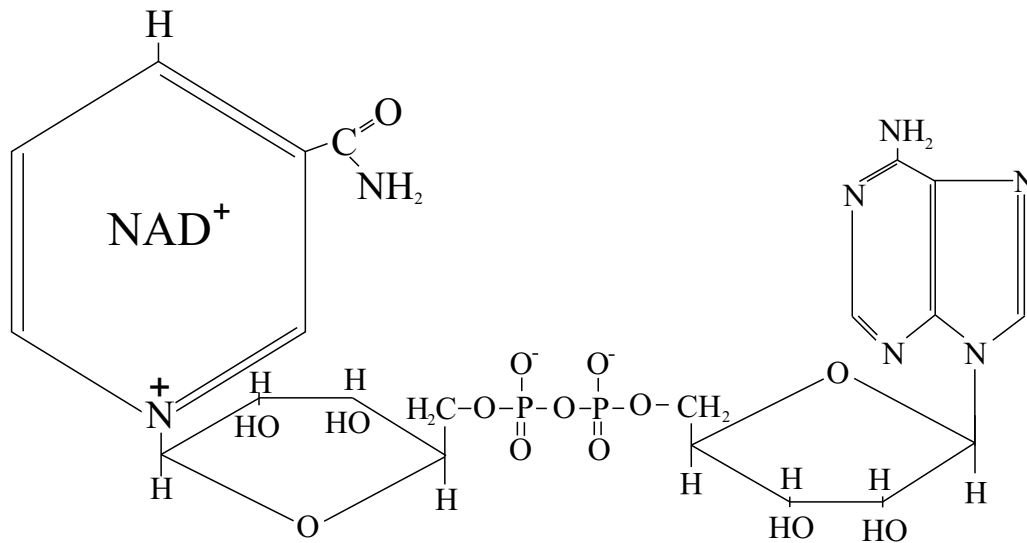
Gelb gekennzeichnet sind die für die Absorptionsänderung verantwortlichen Elektronenpaare. Durch die Hydrierung geht die aromatische Struktur verloren und die Elektronen in den verbleibenden Doppelbindungen treten mit dem UV-Licht in Wechselwirkung, weil sie denselben Energiebetrag haben.

Absorptionsverhalten



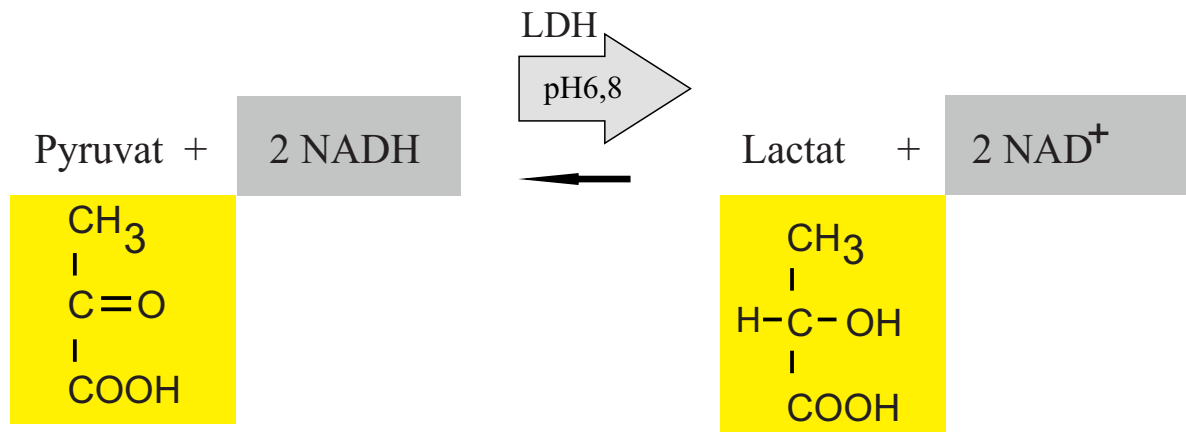
Enzymaktivitätsbestimmung 10

Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

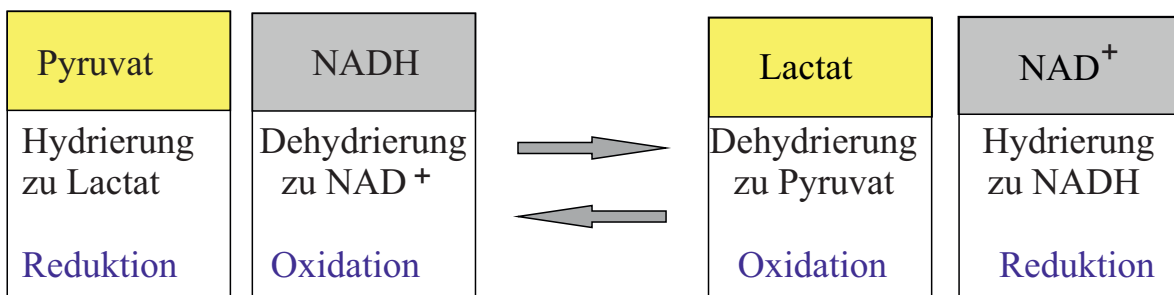


Einfacher optischer Test

Otto Warburg entwickelte die Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung unter Verwendung von NAD^+/NADH als Koenzym. Hier ist die Katalyse der Lactat-Dehydrogenase dargestellt.



Durch den leicht sauren pH und Substratüberschuss an Pyruvat wird das Gleichgewicht zugunsten der Hinreaktion verschoben. Die Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit ist der Aktivität proportional. Die LDH ist aus chemischer Sicht eine Oxidoreduktase und bei biochemischer Betrachtung eine Dehydrogenase.



Enzymaktivitätsbestimmung 11

Erweiterter optischer Test

Die Methode beinhaltet zwei gleichzeitig verlaufende Reaktionen. In der Messreaktion setzt das gesuchte Enzym sein Substrat um. Das Reaktionsprodukt wird in eine enzymatische Indikatorreaktion überführt. Das enthaltene Hilfsenzym katalysiert unter Mitwirkung des Koenzyms NADH. Die gemessene Extinktionsabnahme ist der Aktivität des Enzyms der Messreaktion proportional.

Beispiele für den erweiterten optischen Test

Bestimmung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (ASAT oder AST)

Der ASAT werden die Substrate Asparaginsäure und Alpha-Ketoglutarat im Überschuss angeboten. Die Untersuchung erfolgt in einem Puffer. Hier liegen die Moleküle dissoziiert vor und somit werden die Reaktionspartner mit Aspartat und Alpha-Ketoglutarat bzw. Oxoglutarat benannt.

Wortgleichungen

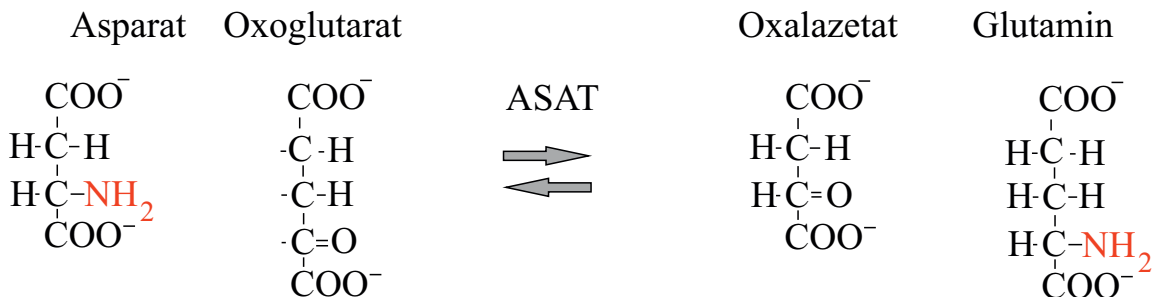
Messreaktion



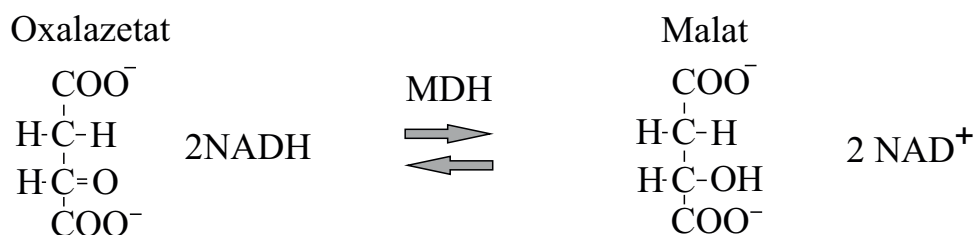
Indikatorreaktion



Die Bestimmungsmethode ist so konstruiert, dass durch die Überschussmengen an Aspartat, Oxoglutarat und NADH sich die Gleichgewichte zugunsten der Hinreaktionen verschieben. Die Menge an Malat-Dehydrogenase ist so gewählt, dass es das Oxalazetat sofort an sich bindet und mit dem Koenzym zu Malat wandelt. Die Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit ist somit der Aktivität der ASAT proportional.



Mit der Transaminierung entsteht aus der Aminosäure die strukturidentische Ketonsäure und umgekehrt. Dies dient sowohl dem Aufbau von Proteinen als deren Abbau. Beim Abbau entsteht Oxalazetat, das in den Citratzyklus eingeführt werden kann. Deshalb zählt die Asparaginsäure zu den glukoplastischen Aminosäuren. Wichtig ist zudem, dass nur Asparaginsäure und Glutaminsäure ihre Aminogruppe in den Harnstoffzyklus überführen können.

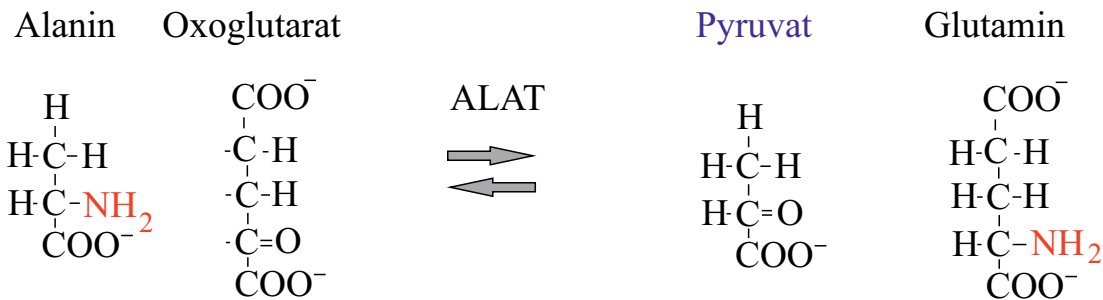


Die Malat-Dehydrogenase erzeugt die messbare Abnahme der Lichtabsorption pro Zeiteinheit.

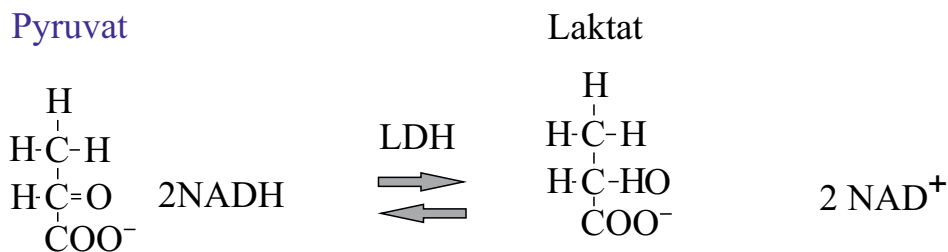
Enzymaktivitätsbestimmung 12

Bestimmung der Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALAT oder ALT)

Der ALAT werden die Substrate Alaninsäure und Alpha-Ketoglutarat im Überschuss angeboten. Im Puffer des Prüfansatzes sind LDH und NADH in hoher Konzentration enthalten. Bei sehr starker Schädigung der Hepatozyten ist es jedoch möglich, dass die Konzentrationen nicht ausreichen und das Serum verdünnt werden muss. Das Verdünnen ist wirtschaftlicher, als ständig mit hochkonzentrierten Prüfansätzen zu arbeiten.



Das gebildet Pyruvat wird sofort durch die LDH gebunden und die Rückreaktion so verhindert. Alanin gehört mit zu den glukoplastischen Aminosäuren.



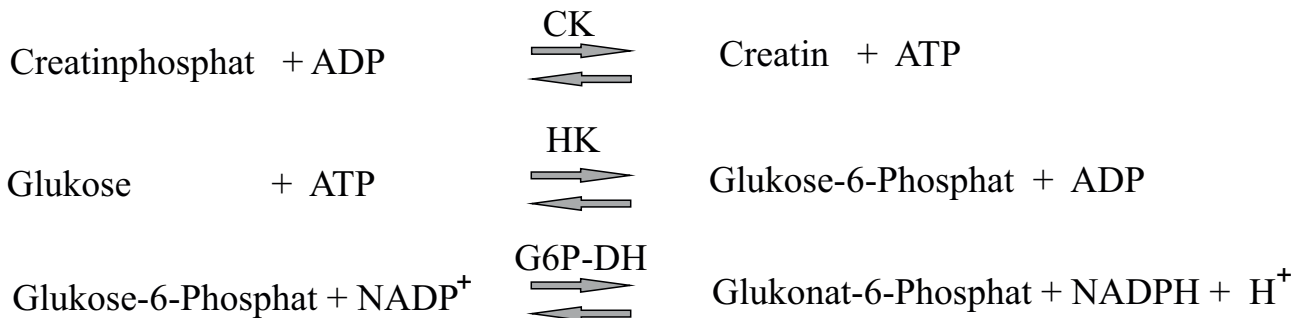
Die LDH katalysiert die Indikatorreaktion und erzeugt die Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit. Diese und der Aktivität der ALAT proportional.

Doppelt erweiterter optischer Test

Diese Methode ermöglicht das Messen der Aktivität der Creatinkinase (CK) unter Zunahme der Extinktion pro Zeiteinheit. Neben Mess- und Indikatorreaktion ist eine Hilfsreaktion nötig. Eine Besonderheit des Testes besteht seiner Optimierung durch N-Azetylcystein. Vom Luftsauerstoff wird die CK in der Konformation verändert. Der Grund besteht in den -SH Gruppen der Polypeptidketten, die durch den Sauerstoff Disulfidbrücken erzeugen. Das Reduktionsmittel N-Azetylcystein löst diese wieder auf und die ursprüngliche Proteinstruktur kehrt zurück. Zudem besteht die Möglichkeit, das aus Erythrozyten und Thrombozyten freigesetzte Adenylatkinase das Messergebnis in positiver Richtung verfälscht. Deshalb befindet sich im Prüfansatz Diadenosinpentaphosphat zur Hemmung der Adenylatkinase.

Enzymaktivitätsbestimmung 13

Testprinzip



G6P-DH

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

HK

Hexokinase

Die Zunahme der Extinktion pro Zeiteinheit ist der Aktivität der CK proportional.

Isoenzyme der CK

Das dimere Enzym tritt als CK-MM, CK-BB und CK-MB auf. Darüber hinaus gibt es die mitochondriale CK (CK-MiMi) sowie Makrovarianten. Makro-CK-Typ 1 tritt als ein Komplex aus IgG und CK-BB auf (Komplexe mit IgA und IgM sind möglich). Makro-CK-Typ 1 wird besonders bei älteren Menschen festgestellt und ist bisher ohne pathologischen Bezug. Makro-CK-Typ 2 (aggregierte mitochondriale CK) tritt zusammen mit anderen Erkrankungen auf. Dazu gehören maligne Erkrankungen und Leberzirrhose.

Zur Bestimmung der CK-MB wird ein Antikörper benutzt, der an CK-M-Ketten bindet und so die CK-MM hemmt. Die CK-MB kann durch ihren B-Anteil die Hälfte der katalytischen Arbeit erzielen.

Eine kardiale Schädigung liegt vor, wenn die Gesamt-CK erhöht ist und der Anteil der CK-MB zwischen 6 und 25 % liegt.

Entsprechend der Lokalisation der Isoenzyme ist eine Erhöhung der CK-BB mit malignen und neurologischen Erkrankungen assoziiert. Bei akuten Psychosen kann der Erhöhung extrem sein.

Die CK-MM ist spezifisch für die Skelettmuskulatur. Eine Erhöhung um bis zu 100 % ist bei extremer körperlicher Belastung möglich. Die Spitze wird rund 12 Stunden nach der Belastung erreicht.

Optimierte Testmethoden

Weitere Zusätze im Prüfansatz bedingen die Verbesserung der Reaktionsbedingungen und steigern die Enzymaktivität. Dazu gehören spezialisierte Pufferlösungen, die die Zugabe ausgewählter Ionen gewährleisten. Insbesondere Metallionen werden von Enzymen als Aktivator genutzt. Aber auch die Ionen wie die von Jod, Selen oder Chlor haben aktivierende Wirkung. Anpassung der osmolaren und osmolalen Bedingungen wirken gleichfalls optimierend und führen zu genaueren Messergebnissen. Es ist zu beachten, dass die Optimierung zu methodenabhängigen Referenzbereichen führt.

Enzymaktivitätsbestimmung 14

Isoenzyme der LDH

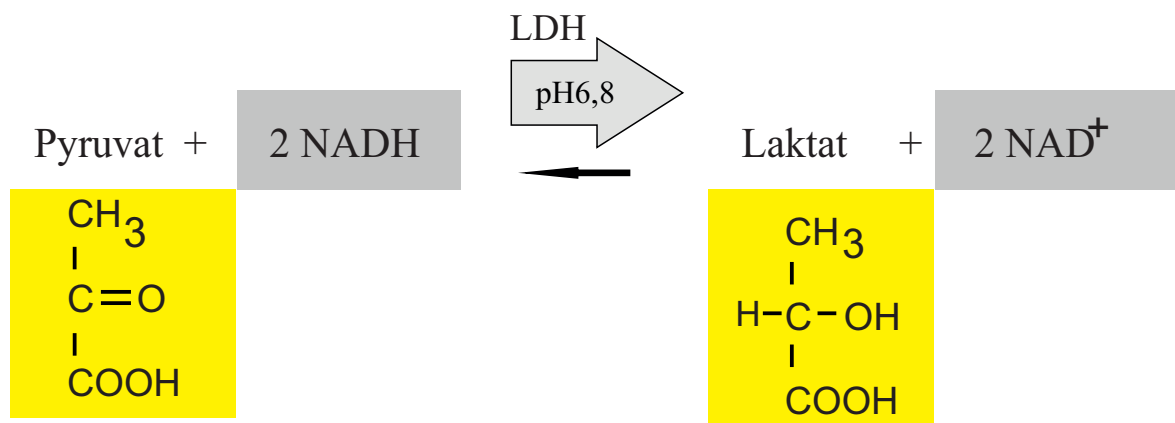
Die Isoenzyme sind Tetramere mit den beiden zwei Untereinheiten (H) und (M). Dabei treten die Homotetramere (HHHH) und (MMMM) auf. Die Isoenzyme verteilen sich mit spezifischen Anteilen im Körpergewebe. Im Herzmuskel ist das Homotetramer (HHHH) lokalisiert und wird mit LDH₁ benannt.

Übersicht zu den Isoenzymen der LDH

LDH ₁₋₅	H-undM- Ketten	Körpergewebe
1	HHHH	Herz
2	MHHH	Herz, Erythrozyt
3	MMHH	lymphatisches .Gewebe, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Herz
4	MMMh	Leber, Skelettmuskel, Lunge, lymphatisches Gewebe
5	MMMM	Leber, Skelettmuskel

Unterschiede in der Substratspezifität bei den Kettentypen

Die Substratspezifität der M-Ketten ist höher. Die H-Ketten katalysieren neben Pyruvat/Lactat auch Alpha-Ketonsäuren. In der Diagnostik wird das Alpha-Ketobutyrat als Substrat verwendet, das von LDH₁ und LDH₂ umgesetzt wird. Aus labordiagnostischer Sicht werden die beiden Isoenzyme mit Alpha-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase bezeichnet (αHBDH).



Erhöhungen der LDH werden bei einer Vielzahl von Krankheiten gefunden.

Enzymaktivitätsbestimmung 15

Enzyme in der Diagnostik von Erkrankungen

Das Untersuchungsmaterial für die Diagnostik ist das Blutserum. Die zu analysierenden Enzyme gelangen physiologisch durch den natürlichen Zelltod in das Serum. Beim nicht natürlichen Tod (Nekrose) sind Enzyme ein Marker für die Schwere und Ausdehnung des pathologischen Geschehens. Eine Erhöhung von Enzymen im Serum ist durch Störung der Membranpermeabilität und dem Lösen membrangebundener Enzyme bei Vergiftungen oder Ödemen gegeben.

Enzymmuster

Enzymmuster helfen bei der Beurteilung von Abweichungen der Normverteilung. Mit dem Muster werden die für eine Erkrankung oder ein Organ spezifischen Enzyme und ihre Aktivität verglichen. Bei der Bewertung zur Schwere der Zellschädigung werden Enzyme aus dem Zytoplasma und den Mitochondrien bewertet. Halbwertszeiten können für die Bestimmung des Zeitpunkts der Schädigung genutzt werden. Bestehende Erkrankungen können überwacht werden. Enzymmuster können den Therapieerfolg anzeigen oder bei der Prognose von Nutzen sein. Insbesondere bei Lebererkrankungen helfen sie bei der Differenzialdiagnose der akuten und chronischen Verlaufsform sowie weiteren Differenzierungsmerkmalen wie der alkoholinduzierten Hepatose.

Allosterisches Zentrum

Ein allosterisches Zentrum ist bei Enzymen vorhanden, die nach Stoffwechsellage gehemmt oder aktiviert werden können. Bei sogenannten Startenzymen, die am Beginn eines Prozesses stehen, sind allosterische Effekte zu beobachten. Die Aminolävulinsäure-Synthetase setzt die Entstehung des Hämoglobins in Gang, indem sie Succinyl-CoA und Glyzin zur Aminolävulinsäure katalysiert. Das Hämoglobin bewirkt durch negative Rückkopplung auf die Aminolävulinsäure-Synthetase eine Verringerung deren Aktivität (kompetitive Hemmung). Eine nicht kompetitive Hemmung erfolgt durch das Schwermetall Blei und bedingt eine Anämie.

Das allosterische Zentrum befindet sich zwar räumlich getrennt vom aktiven Zentrum, nimmt aber durch die Änderung der Konformation am Molekül Einfluss auf das aktive Zentrum.

Eine negative Rückkopplung am allosterischen Zentrum erfährt die Phosphofruktokinase durch ATP, die hier aber auch durch Fruktose-1,6- Diphosphat aktiviert wird.

Neben Metaboliten gibt es im Stoffwechsel weitere aktivierende oder hemmende Stoffe. So wirkt Insulin aktivierend auf die Glykogensynthetase und hemmend auf die Gluconeogenese. Aktivierungen finden bei der Gerinnung oder der Immunabwehr durch Komplementproteine statt.

Substrataktivierung

Wird das Hämoglobin als Enzym betrachtet, dann aktiviert der Sauerstoff als Substrat über die Bindungsstelle das Molekül.

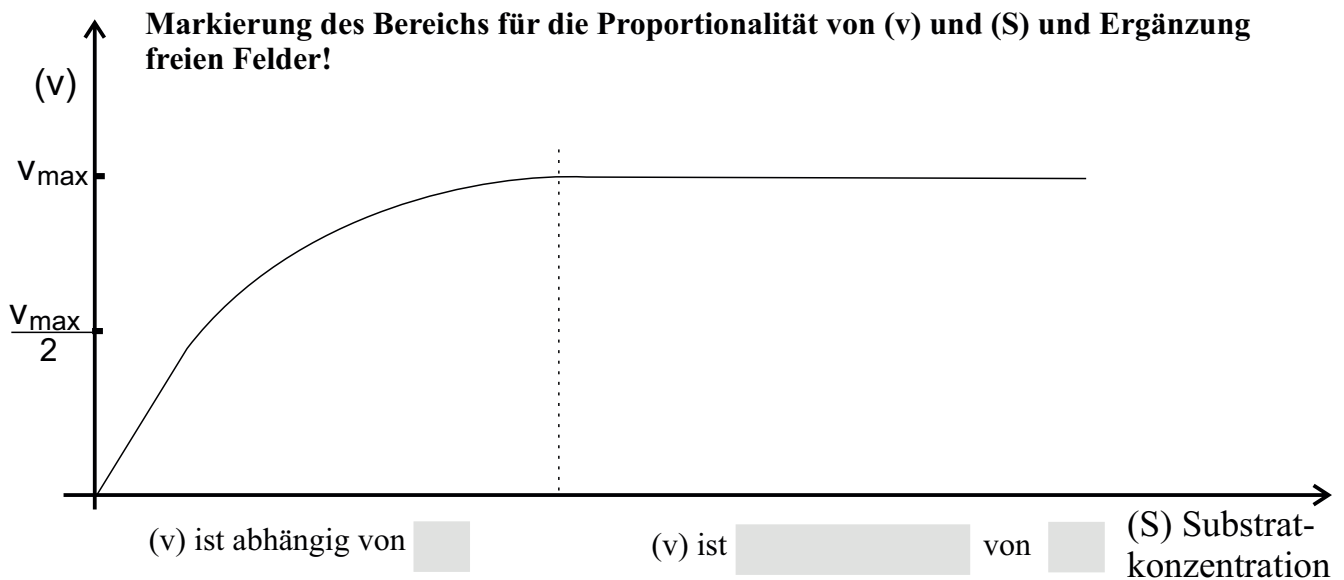
Enzymaktivitätsbestimmung 16

Die Lücken im Text sind zu ergänzen!

Mit der Sättigungsgrenze erreicht die Reaktion ihre _____ Geschwindigkeit. Das Enzym setzt nun stets dieselbe Menge Substrat pro _____ um, und es gilt: $v = \text{_____}$.

Bei der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit befinden sich alle Enzymmoleküle im:

Wie ist (v) definiert?



$v = k (S)^1$

$v = k (S)^0$ $v = k (S \cdot \text{_____})$
 $v = \text{_____}$

Reaktionsordnung

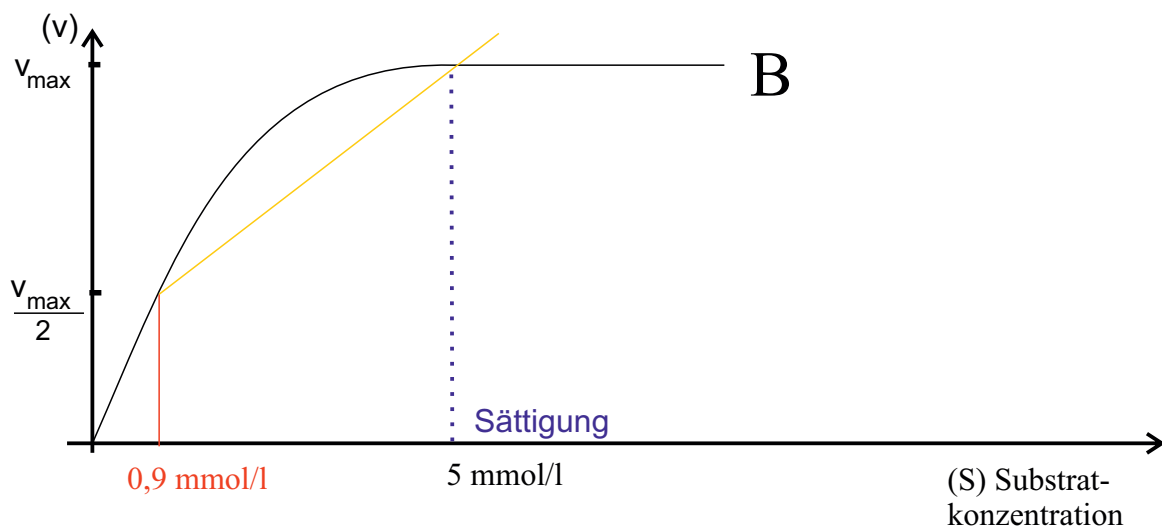
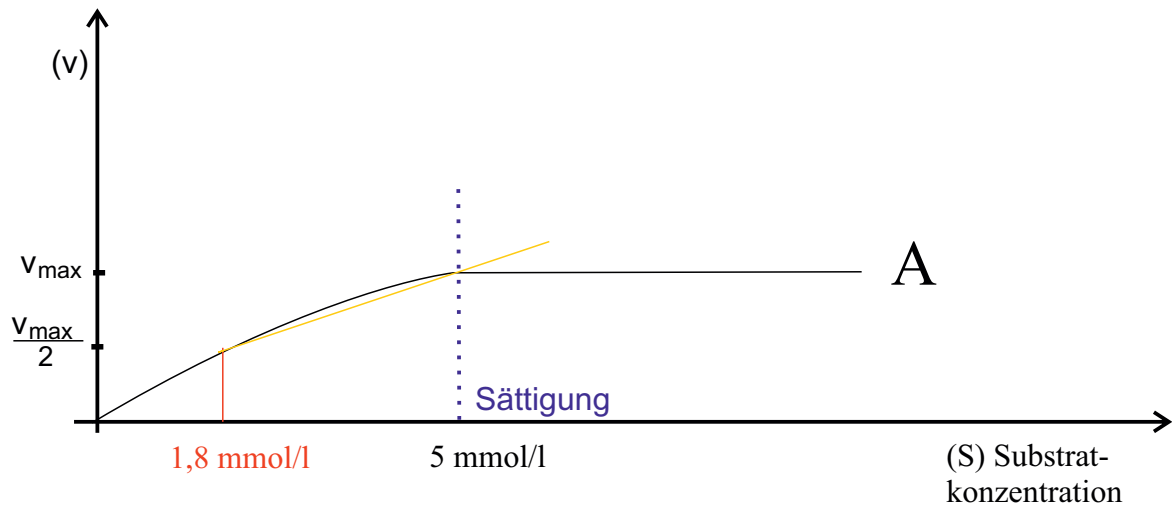
enzymatische Substratanalyse

Enzymaktivitätsbestimmung

Reaktionsbedingung mit Überschuss an:

Enzymaktivitätsbestimmung

Die Diagramme zeigen die Aktivität des Enzym A und B, die beide bei 5 mmol/l Substrat ihr Sättigung haben!



Welche Aussagen sind richtig!

Je kleiner der K_M , desto besser ist die Substrataffinität!

Je größer der K_M , desto besser ist die Substrataffinität!

Je kleiner der K_M , desto höher ist die Reaktionsgeschwindigkeit!

Je größer der K_M , desto höher ist die Reaktionsgeschwindigkeit!

Das Enzym (A) erlaubt längere Zeitintervalle bei Messung der Aktivität!

Das Enzym (B) erlaubt längere Zeitintervalle bei Messung der Aktivität!