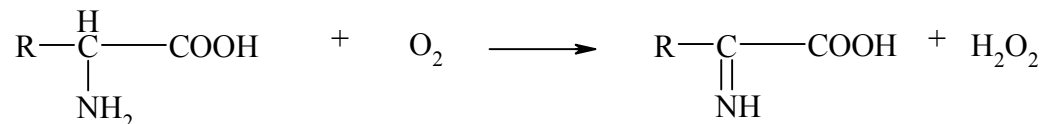


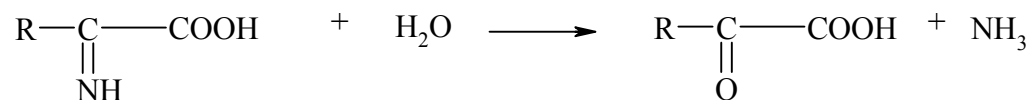
2. Amperometrische Bestimmung des Abbaus von D-Aminosäuren mit D-Aminosäureoxidase

2.1 Einführung in die Problemstellung

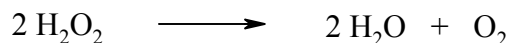
Die D-Aminosäureoxidase ist für den Abbau der unphysiologischen D-Aminosäuren, die z. B. durch Bakterien in den Körper gelangen können, verantwortlich. Sie ist ein autoxidables, FAD-haltiges Enzym, das die folgende Reaktion katalysiert:



Die Iminosäure hydrolysiert spontan zur Ketosäure:



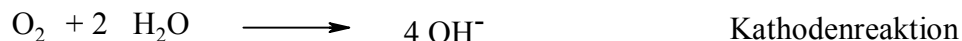
Durch Zugabe von Katalase kann das gebildete Wasserstoffperoxid zersetzt werden:



Die Aktivität der Aminosäureoxidase kann durch Messung des bei dieser gekoppelten Reaktion gebildeten Sauerstoffs mittels einer Sauerstoffelektrode nachgewiesen werden.

Meßprinzip der Sauerstoffelektrode:

Als Meßprinzip liegt der Sauerstoffelektrode die Amperometrie zugrunde. Zwischen zwei Elektroden (Gold-Kathode und Ag/AgCl-Anode) wird eine genügend hohe Polarisationsspannung angelegt. Molekularer Sauerstoff wird an der Kathode reduziert (Abb. 1):



Die Größe des dabei auftretenden Stromflusses ist der Sauerstoffkonzentration direkt proportional.

Nach dem CLARK'schen Prinzip tauchen die Elektroden nicht direkt in die zu messende Lösung, sondern in einen Elektrolyten ein, der durch eine sauerstoffdurchlässige Membran vom Meßgut getrennt ist.

2.2 Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung

Es ist ein D-Aminosäureoxidase enthaltender Rohextrakt aus Schweinenieren zu gewinnen und der Abbau von proteinogenen und nichtproteinogenen D-Aminosäuren durch D-Aminosäureoxidase zu untersuchen. Für den Reaktionsverlauf ist die Zeit-Umsatz-Kurve experimentell zu ermitteln und graphisch darzustellen. Des weiteren ist für den Endwert der Messung der jewei-

lige Umsatz an D-Aminosäure in Mol zu berechnen. Die erhaltenen Ergebnisse sind zu diskutieren.

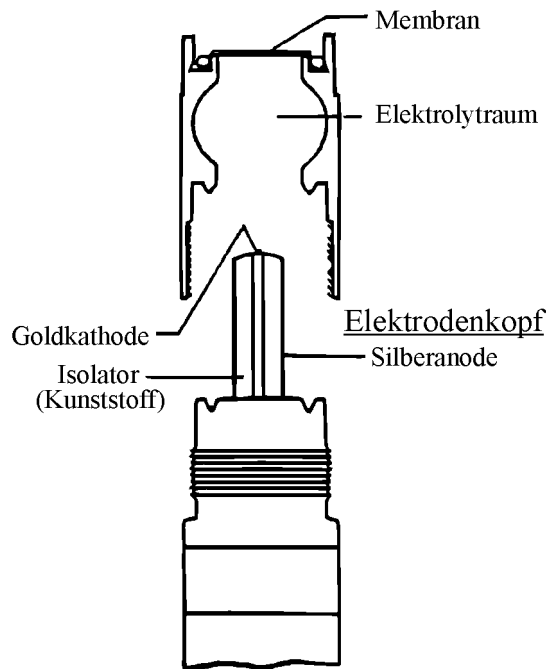


Abb. 1 Aufbau der Sauerstoffelektrode

2.2.1 Gewinnung eines Rohextrakts aus Schweinenieren

!! Alle Arbeiten sollten unter Kühlung verlaufen, daher rasch arbeiten und alle Lösungen/Suspensionen auf Eis stellen !!

Pro Gruppe wird eine Schweineniere (Biochemiker: 2 Schweinenieren) mit dem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten. Fett und Sehnen sind zu entfernen. Die Stücke werden sofort in das 4-fache Volumen eisgekühlten Acetons gegeben und homogenisiert. Die Suspension wird im Büchnertrichter filtriert, der Rückstand nochmals in Aceton suspendiert, abfiltriert und auf dem Filter mit Aceton und Diethylether gewaschen. Das erhaltene Pulver wird im Abzug in dünner Schicht getrocknet, abgefüllt und bei 4°C für den nächsten Tag gelagert.

! Beim Zerreiben und Abfüllen des Trockenpulvers sind Handschuhe und Mundschutz zu tragen !

2.2.2 Aktivitätsbestimmung

5 g des Trockenpulvers vom Vortag werden in 30 ml Phosphatpuffer suspendiert und 20 min gerührt. Die Suspension wird 30 min bei 4°C zentrifugiert und abdekantiert. Der Überstand enthält das Enzym und wird für die Messungen verwendet.

Reagenzien:

- A 0.1 M Natriumpyrophosphatpuffer, pH 8.3
- B D-Aminosäure-Lösung (5 µmol/ml)
- C Katalaselösung: Handelsübliche Katalase wird im Verhältnis 1:1000 mit Puffer verdünnt.
- D D-Aminosäureoxidaselösung

Folgende Inkubationsansätze (1-8) werden vorgelegt:

Versuchsansatz	1	2	3-6
Puffer	5 ml	6 ml	5 ml
Katalase	1 ml	-	1 ml
D-Alanin	4 ml	4 ml	-
Probe	-	-	4 ml
D-Aminosäureoxidase	1 ml	1 ml	1 ml

(Ansatz 6 enthält L-Alanin anstelle von D-Alanin)

Ansatz 7: 10 ml Puffer, 1ml D-Aminosäureoxidase

Ansatz 8: 9 ml Puffer, 1ml Katalase, 1ml D-Aminosäureoxidase

Die Ansätze 7+8 stellen einen Blindwert dar. Da mit einem Rohextrakt gearbeitet wird, enthält der Ansatz natürlich noch eine Vielzahl anderer Verbindungen und Enzyme, die unter Umständen zu sauerstoffverbrauchenden- oder erzeugenden Reaktionen führen können. Diese Umsatzraten sind mit den Messungen 1-6 sinnvoll zu verrechnen!

Zunächst werden alle Lösungen, außer der D-Aminosäureoxidase, in das Reaktionsgefäß pipettiert. Die Sauerstoffelektrode wird in den Meßansatz überführt und unter Rühren wird die Einstellung eines konstanten Ausgangswertes abgewartet. Die Reaktion wird dann durch die Zugabe der D-Aminosäureoxidase gestartet. Der Sauerstoffverbrauch wird über einen Zeitraum von 10 min in Minutenabständen abgelesen.

2.2.3 Bestimmung des pH-Optimums der D-Aminosäureoxidase

(Dieser Versuch ist nur von den Biochemikern auszuführen.)

Untersuchen Sie den Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der D-Aminosäureoxidase.

Versuchsdurchführung:

Die Enzymaktivität ist mit D-Ala als Substrat bei verschiedenen pH-Werten (pH 7.5, pH 8.0, pH 8.5, pH 9.0, pH 9.5, pH 10.0) zu ermitteln und in einem Diagramm der Umsatz an Substrat gegen den pH-Wert darzustellen.

Die benötigten Puffer werden von den Gruppen gemeinsam angesetzt. Da Phosphatpuffer oberhalb von pH 8.5 keine Pufferwirkung mehr besitzt, wird für die Messungen von pH 8.5 bis pH 10.0 ein Glycinpuffer verwendet. Die Herstellung der Puffer erfolgt entsprechend den Angaben einer ausliegenden Tabelle.

Das Enzym ist in dem jeweiligen Puffer aus dem Rohextrakt zu gewinnen.

Wegen der kleinen Mengen kann die Zentrifugation in Eppendorf tubes erfolgen.

Zeitlicher Ablauf:

1. Ansetzen der Puffer (alle Gruppen gemeinsam)
2. Gewinnung des Enzyms (1g Trockenpulver/5 ml Puffer)
3. Messungen

Diskutieren Sie das Ergebnis. Welche grundsätzlichen Probleme können auftreten, wenn für Messungen über einem breiten pH-Bereich unterschiedliche Puffer verwendet werden?

2.3. Kontrollfragen

1. Formulieren Sie die Bruttoreaktionsgleichung für die Oxidation von D-Aminosäuren durch D-Aminosäureoxidase und die anschließende Umsetzung des gebildeten Wasserstoffperoxids durch Katalase.
2. Welche Reaktion wird durch die Aminosäureoxidase katalysiert? Nennen Sie Unterschiede zur Transaminierung.
3. Können D-Ala und L-Ala oder die Dipeptide D-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala chromatographisch voneinander getrennt werden? Begründen Sie Ihre Aussage.
4. Nennen Sie die prosthetischen Gruppen der D-Aminosäureoxidase und der Glutaminsäuredehydrogenase. Wieviel Mol ATP entstehen bei der oxidativen Phosphorylierung aus je einem Mol NADH, FADH₂ bzw. NADPH? (Begründung)
5. Synthetisch hergestellte, biologisch wirksame Peptide mit N- oder C-terminalen D-Aminosäureresten sind im Organismus länger wirksam als die entsprechenden Verbindungen mit L-Aminosäuren. Warum?
6. Auf welchem Weg kann im Stoffwechsel aus ¹⁴C markierter Brenztraubensäure ¹⁴C markierte Glutaminsäure entstehen? Welches C-Atom in der Glutaminsäure ist am stärksten markiert?

2.4 Literaturhinweise

Stryer, L. (1990) Lehrbuch der Biochemie, Kap. 17, *Die oxidative Phosphorylierung*, S. 438-439, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.

Stryer, L. (1990) Lehrbuch der Biochemie, Kap. 21, *Aminosäureabbau und Harnstoffcyclus*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.