

# Block 3

## Vom Molekül zur Zelle

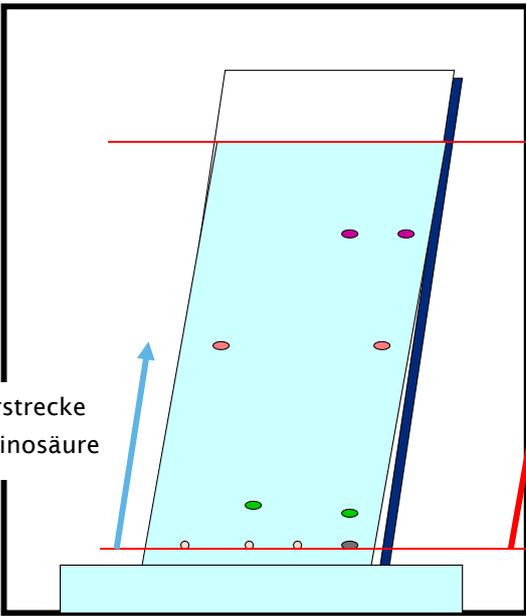
### Biochemie Seminar & Praktika

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Georg Weitzer



## SEMINAR 2:

- Auswertung / Nachbesprechung des 1. Praktikums
- Besprechung d. Ergebnisse u. Fehlerquellen
- Theor. Grundlagen für das kommende Praktikum
- Inhalt des zweiten Praktikumstags



Wanderstrecke  
der Aminosäure

Front

Wanderstrecke  
der mobilen  
Phase

Start

## R<sub>f</sub>-Werte Dünnschicht- chromatographie?





MEDICAL UNIVERSITY  
OF VIENNA

Seminar 2  
Medizinische Chemie

3

# Pipettierübung

Ergebnis?  
Siehe xlsx files



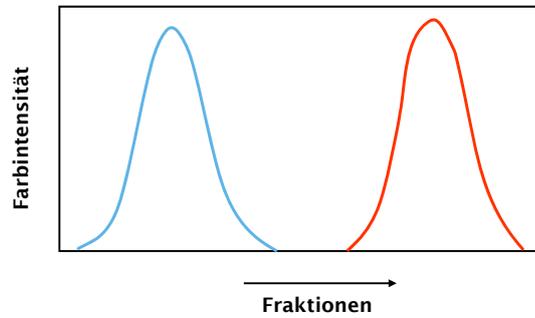


MEDICAL UNIVERSITY  
OF VIENNA

Seminar 2  
Medizinische Chemie

4

## Auswertung - Gelfiltration

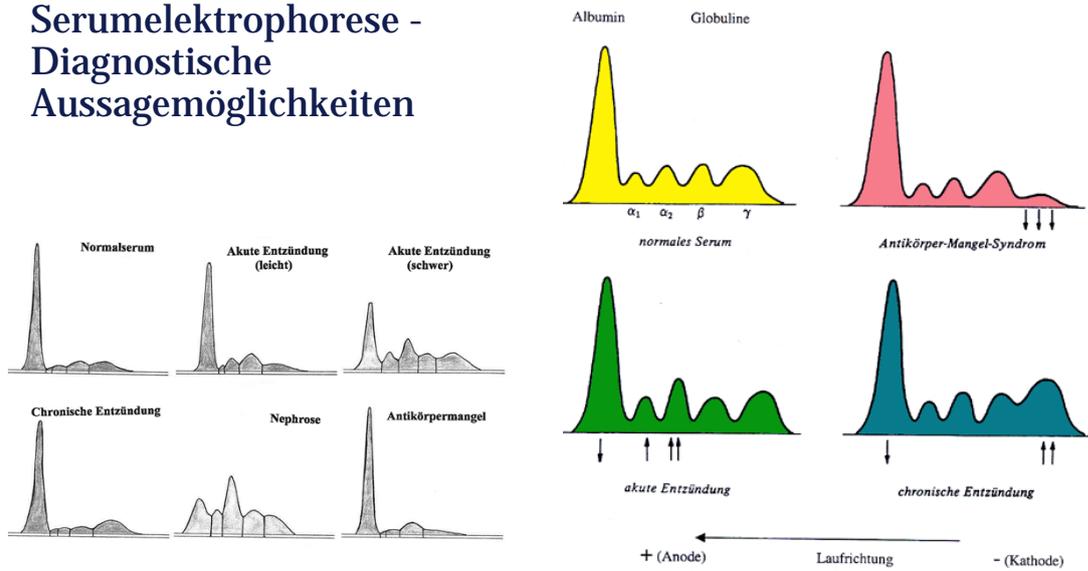


Dextranblau:  
Methylrot:

3-4-5 (1,5ml)

11- 17 (5+/- 1ml)

## Serumelektrophorese - Diagnostische Aussagemöglichkeiten



## Praktikum 2:

Kinetische Untersuchung der **Lactatdehydrogenase**

- 1) Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante
- 2) Bestimmung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion = Bestimmung der Enzymmenge
- 3) Bestimmung der Substratkonzentration = Laktatbestimmung

## Für die Reaktionsgeschwindigkeit $v$ einer enzymatischen Reaktion gilt:

Gleichgewichtskonstante für die vereinfachte enzymatische Reaktion

$$K_m = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

$K_m$  entspricht der Substratkonzentration, bei der das Enzym mit der Hälfte der maximalen Geschwindigkeit arbeitet.

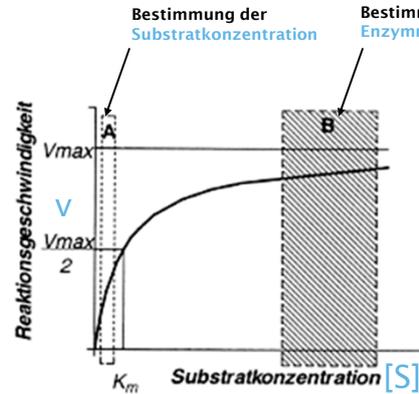
$$v = \frac{v_{\max} \times [S]}{[S] + K_m}$$

**Michaelis-Menten  
Gleichung**

Die Michaelis-Menten Gleichung gilt nur unter der Annahme eines Fließgleichgewichtes, also  $[ES] = \text{konstant}$ .

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  einer enzymatischen Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration  $[S]$  nach der Michaelis-Menten Gleichung kann auch **grafisch** dargestellt werden. →

## Graphische Darstellung der Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion



$v$  ... Umsatzgeschwindigkeit

$v_{\max}$  ... Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

$K_m = [S]$  bei  $v_{\max} / 2$

daher  $K_m$  in mol/l

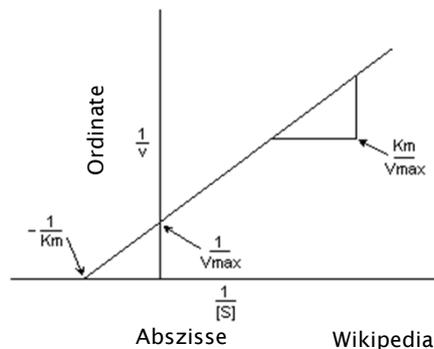
es gilt bei  $v_{\max}/2$ :  $[E] = [ES]$

Abbildung aus: Ergänzung der theoretischen Grundlagen und biochemisches Praktikum im Block 3 - Vom Molekül zur Zelle, Facultas Verlag, Hans Goldenberg (Hg.)

## Lineweaver-Burk Diagramm

$$y = k \cdot x + d \rightarrow y = d + k \cdot x \quad \text{Geradengleichung} \\ k = \text{Steigung}$$

$$1/v = 1/v_{\max} + (K_m/v_{\max}) \times 1/[S]$$

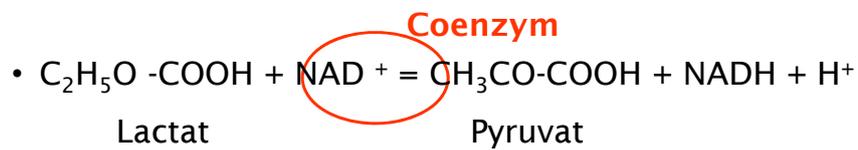


Durch Umformung der Michaelis-Menten Gleichung in eine doppelt-reziproke Form kann die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion in einem **Lineweaver-Burk Diagramm** dargestellt werden.

$$k = (1/v_{\max}) / (1/K_m)$$

$k$  wie  $e$ , eine Material-spezifische Konstante

## Was macht die Lactatdehydrogenase?



### Praktische Messung:

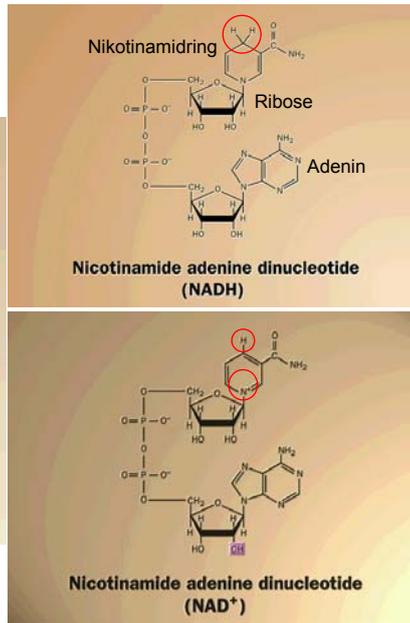
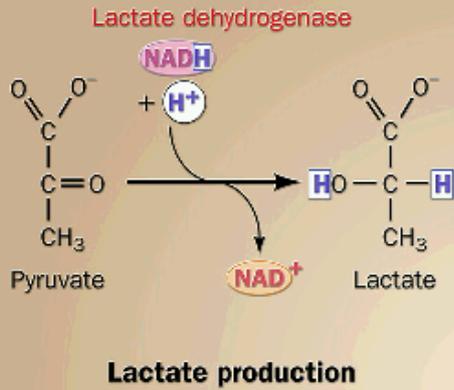


Gleichgewicht auf seiten des Lactats  $\frac{[\text{Pyr}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{Lact}] \cdot [\text{NAD}^+]} = 2,7 \cdot 10^{-12}$

## Rolle der LDH im Intermediärstoffwechsel

- Endprodukt der Glykolyse: Pyruvat, NADH
- Pyruvat kann bei O<sub>2</sub> Mangel (oder in Zellen ohne Mitochondrien) nicht zu Acetyl-CoA, und über Zitratzyklus + Atmungskette zu CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O, oxidiert werden.  
Über die anaerobe Glykolyse wird NAD<sup>+</sup> regeneriert und als Produkt entsteht Lactat, welches z.B. in der Leber oder im Herzmuskel verwertet wird (vgl. Cori-Zyklus).

# Was macht NAD<sup>+</sup>?



Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ist ein Elektronen transportierendes Coenzym, das an zahlreichen Redox-Reaktionen des Stoffwechsels beteiligt ist. Dabei kann es reduziert werden und maximal zwei Elektronen (dann geschrieben als NADH) aufnehmen.

# Isoenzyme der LDH

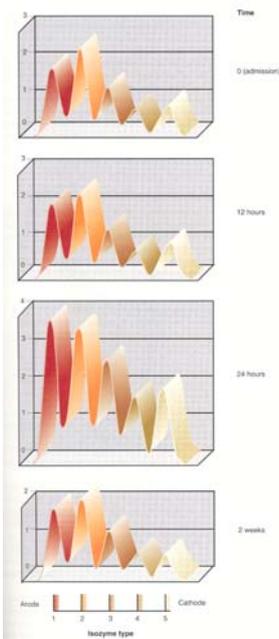
LDH Isoenzyme nach Herzinfarkt:

Type	Composition	Location
LDH <sub>1</sub>	HHHH	Myocardium and RBC
LDH <sub>2</sub>	HHHM	Myocardium and RBC
LDH <sub>3</sub>	HHMM	Brain and kidney
LDH <sub>4</sub>	HMMM	
LDH <sub>5</sub>	MMMM	Liver and skeletal muscle

Die Km der Isoenzyme sind unterschiedlich (für Lactat):

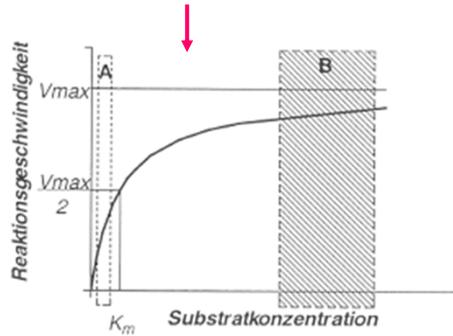
niedrig in Skelettmuskel (LDH5)

hoch im Herzmuskel oder im embryonalen Gewebe (LDH1)



## Beispiel 1: Bestimmung der $K_m$ der LDH:

Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten von 6 verschiedenen Substratkonzentrationen



$$K_m = [S] \text{ bei } V_{\max}/2$$

$$K_m \text{ (mol/l)}$$

$$\text{Es gilt: } [E] = [ES]$$

Messgröße:

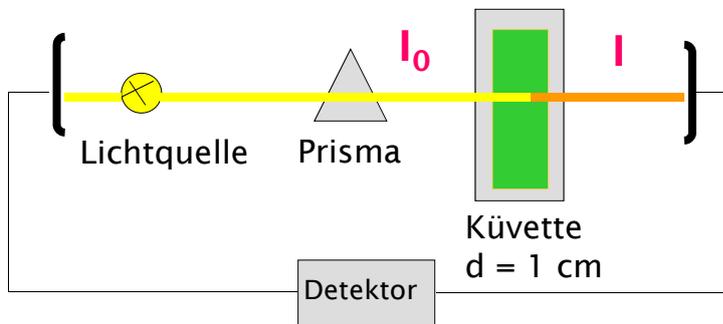
Das bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat verbrauchte Cosubstrat

## Photometer

Transmission  
Extinktion

$$T = I/I_0$$

$$E = -\log T = \log I/I_0$$



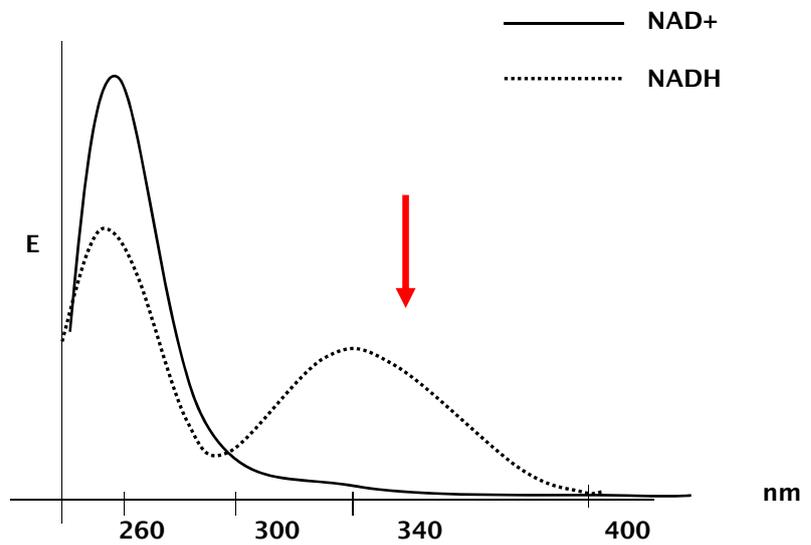
$$E = \epsilon \times c \times d$$

### Lambert-Beer'sches Gesetz

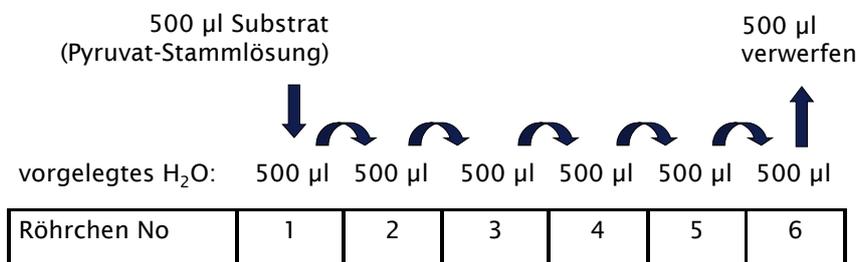
- E Extinktion
- c Konzentration (mol/l)
- d Schichtdicke der Küvette in cm
- $\epsilon$  molarer Extinktionskoeffizient in l/mol cm



## Absorptions-maximum - NADH



## Verdünnungsreihe



## Verdünnungsreihe

500 µl Substrat  
(Pyruvat-Stammlösung)

500 µl  
verwerfen



vorgelegtes H<sub>2</sub>O    500 µl    500 µl    500 µl    500 µl    500 µl    500 µl

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6
Verdünnung	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Konzentration (µmol/l)	2200	1100	550	275	137,5	68,75

Pyruvat-Stammlösung 4,4 mM

## Verdünnungsreihe → Messansatz

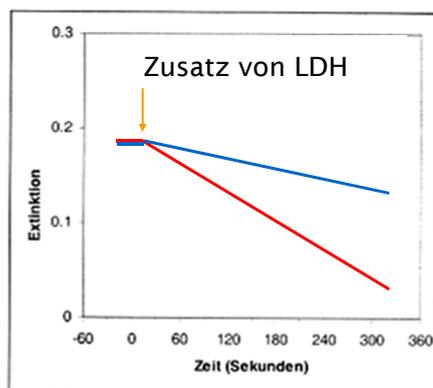
Röhrchen Nr	1	2	3	4	5	6
Pyruvat- Verdünnung	500	500	500	500	500	500
Phosphatpuffer	500	500	500	500	500	500
Dest. Wasser	500	500	500	500	500	500
NADH	500	500	500	500	500	500

## Messen

Röhrchen Nr	1	2	3	4	5	6
-------------	---	---	---	---	---	---

- Photometer auf 340 nm einstellen
- mit dest. Wasser auf Null stellen
- Ⓧ Röhrchen 6: + 20 µl LDH-Enzymlösung
- Ⓧ mischen
- Ⓧ Probe in die Küvette leeren
- Ⓧ E über 75 sec alle 15 sec ablesen (6 Werte) + notieren
- Ⓧ Röhrchen 5: + 20 µl LDH-Enzymlösung
- Ⓧ mischen ....

## Messung der LDH



niedrige Pyruvatkonzentration

hohe Pyruvatkonzentration

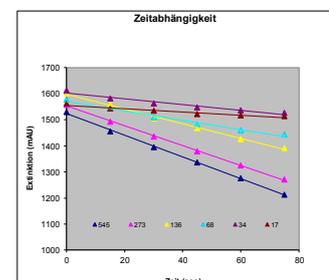
modifiziert nach  
„Ergänzung“,  
H. Goldenberg

$$\Delta c / \Delta t = \Delta E / (\epsilon \times d \times \Delta t) = v$$

Steigung der Geraden:= Reaktionsgeschwindigkeit für gegebene [S]

## Auswertung:

Excel-Sheet  
Lernunterlagen Block 3  
LDH (Auswertung, Datenblatt)  
Auf PC-Übungssaal vorhanden



# LDH-Messung – Auswertung mittels Excel Sheet

**Lactat Dehydrogenase 1 (Erythrozyt, Herzmuskel, Niere)**  
 EC 1.1.1.27  
 BESTIMMUNG DER MICHAELIS-MENTEN-KONSTANTE DER LACTAT-DEHYDROGENASE

3. Nov.17 LDH 1 (H4) Sigma-Aldrich 8,5 mg/ml  
 Gesamtmerkmale aus LDH Stammlösung 1: 1500 621 U/mg Protein

**VORSICHT:** Extinktionswerte bitte in mAU eingeben (z.B. 1,366AU entspricht 1366 mAU)  
 mAU (mit absorbance units) in geb. unterlegten Feldern eingeben

Röhrennr. #	1	2	3	4	5	6
0	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125
10	1175	1150	1125	1100	1075	1050
20	1135	1120	1105	1090	1075	1060
30	1115	1100	1085	1070	1055	1040
40	1100	1085	1070	1055	1040	1025
50	1085	1070	1055	1040	1025	1010
60	1070	1055	1040	1025	1010	995
70	1055	1040	1025	1010	995	980
75	1040	1025	1010	995	980	965

**Zeitabhängigkeit**

**Lineweaver-Burk Plot**

**Anpassung einer Hyperbel an die Datenpunkte in nichtlinearisierter Darstellung**

In Menüpunkt: EXTRAS das SOLVER-add-in auswählen. Die Zelle (Fehlerquadrate) sowie die variablen Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Zellen sollten bereits richtig eingestellt sein !!!

**(VORSICHT: falls die Werte nicht konvergieren, die Option "min" (=Minimierung der Fehlerquadrate) auswählen !!!)**

**Variable Zellen**

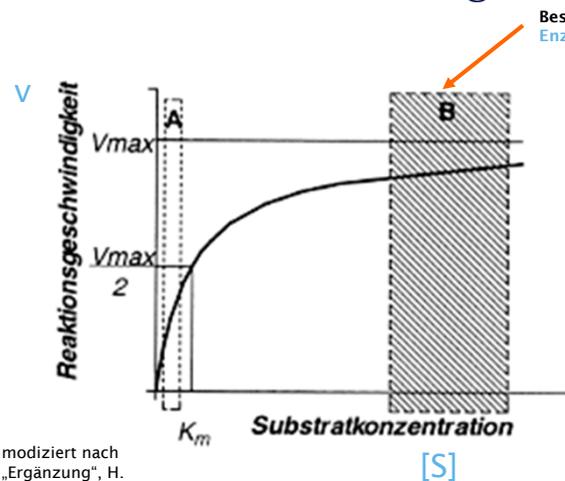
[S] (µmol/l)	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125
v (delta mAU/sec)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

**gemessen**

Vmax	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Km	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43

**Michaelis-Menten Kinetik der LDH-1**

## Beispiel 2: Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität = Bestimmung der Enzymmenge



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

Bei  $[S] \gg K_m$ :

$$v = V_{max}$$

$$v = f\{[E]\}$$

- LDH Konzentration im Plasma zu niedrig für Routinebestimmung daher:
- Messung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit
- Substratkonz. 20 x Km, Enzym zu 95% gesättigt
- v hängt nur von der Menge des Enzyms ab

## Messung der LDH-Aktivität

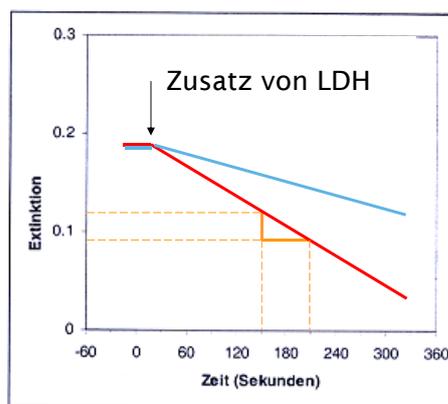
Röhrchen Nr	1	2	3
<b>LDH-Lösung</b>	<b>0,725 U/l</b>	<b>1,45 U/l</b>	<b>2,9 U/l</b>
Phosphatpuffer	500	500	500
Pyruvatstammlsg.	1000	1000	1000
NADH	500	500	500

Röhrchen 1: + 20 µl LDH-Enzymlösung (schwarz/grün/blau)

Extinktions-Abnahme alle 30 sec über 150 sec notieren.....

**Auswertung:** Excel-Sheet

Gemessen wird wieder die **Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit**, aber diesmal in Abhängigkeit von der Enzymmenge



$$k = \Delta E / \text{min} \quad \text{Aktivität von Enzymen}$$

Umsatz des Substrates pro Zeiteinheit

$$v = \Delta[S] / t$$

Einheit: 1 U = 1 µmol/min (Umsatz)

(spezifische Aktivität: U/µg Protein)

SI: 1 katal = 1 mol/sec

$$1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$$

modifiziert nach  
„Ergänzung“, H.  
Goldenberg

$$\text{Aktivität (U/l)} = DE / \text{min} \times \text{Konstante}$$

Es werden praktisch ausschließlich U verwendet

## Physiologische Bedeutung der Michaeliskonstante

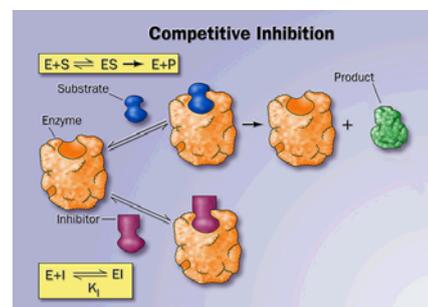
- $K_m$  Werte liegen im Bereich der Konzentrationen der jeweiligen Substrate in den Zellen → Regulation
- Mutationen im Enzym können  $K_m$  verändern
- Isoenzyme mit unterschiedlichen  $K_m$   
z.B. Aldehyddehydrogenase → Unterschiede in der Alkoholtoleranz  
mitochondrial: niedrige  $K_m$   
cytosolisch: hohe  $K_m$

## MM-Kinetik gilt nur für einfache Enzyme!

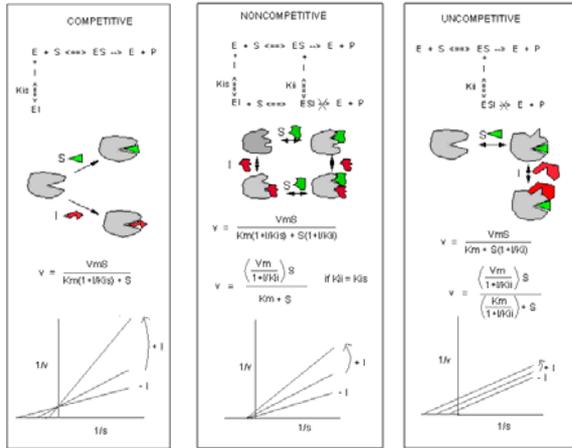
= "hyperbole" Enzyme (die Mehrheit der Enzyme) ≠ regulatorische (allosterische, "sigmoide") Enzyme → Hill Faktor

## Abhängigkeit der Enzymaktivität

- pH-Wert  
(Optimum, aber auch Denaturierung)
- Temperatur  
(Optimum, aber auch Denaturierung)
- Hemmstoffe  
(in der Medizin: Medikamente!)
  - kompetitive (erhöhen den  $K_m$  Wert)
  - nicht-kompetitive (erniedrigen Umsatzgeschwindigkeit)



# Enzymhemmung



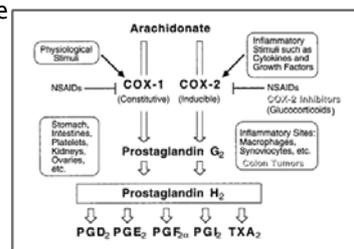
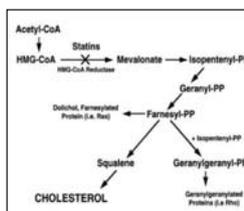
- Irreversibel: chemische Modifikation von wichtigen Gruppen
- Reversibel: z.B. Produkthemmung

- Kompetitiv I wie S -  $K_m$  höher,  $V_{max}$  gleich
- Nichtkompetitiv I unabh. von S -  $K_m$  gleich,  $V_{max}$  niedriger
- Unkompetitiv I braucht ES -  $K_m$  niedriger,  $V_{max}$  niedriger

(E + S ⇌ ES Gleichgew. nach rechts verlagert, daher  $K_m$  app niedriger)

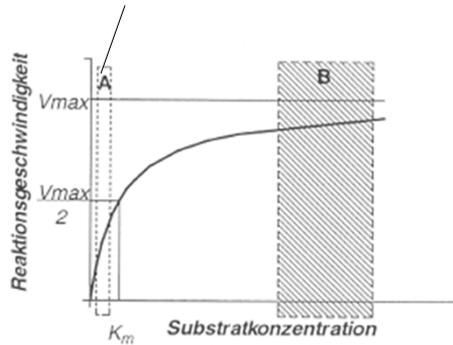
# Hemmstoffe in der Medizin - Beispiele

- Kompetitive Hemmung – Statine: z.B. **Atorvastatin**
  - Sortis (Österreich, Deutschland), Lipitor (USA) (enthält Atorvastatin)
  - Pfizer
  - Umsatz Lipitor 2007: 12,8 Mrd US Dollar heute rund 1,8 Mrd US Dollar
  - „best selling pharmaceutical in history“
- nicht-kompetitive Hemmung - COX- Inhibitoren: z.B. **Aspirin, Paracetamol, Diclofenac**
- Cyclooxygenase 1/ 2 (COX-1/2)
  - Entzündungsmediatoren
  - Prostaglandine
  - Leukotriene



## Enzymatische Bestimmung der Substratkonzentration

### Bestimmung der Substratkonzentration

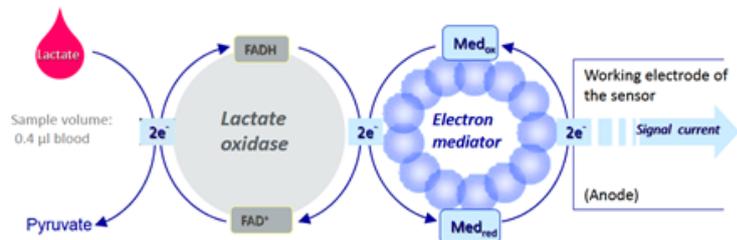


- Blutglucosebestimmung
- **Lactatbestimmung**
- Cholesterinbestimmung
- Alkoholbestimmung mittels Alkoholdehydrogenase

- Bestimmung via Teststreifen

## Milchsäurebestimmung mittels Laktatdehydrogenase

### Measuring principle of the lactate sensor

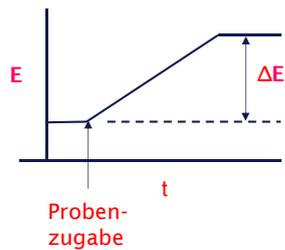


**Lactate oxidation:** Electron transfer from lactate to the prosthetic groups of the LOD (FAD<sup>+</sup>)

**Reversible electron shuttle** between FADH and the surface of the working electrode by the mediator

**Mediator oxidation:** Electron flow vs. reference electrode (= signal current)

## Alkoholbestimmung mittels Alkoholdehydrogenase



- Auswertung:
- $E = \varepsilon \times c \times d$
- Konzentration der Standardlösung ist:  $C_{ST} \rightarrow E_{ST}$
- $\frac{C_{ST}}{E_{ST}} = \frac{C_{Pr}}{E_{Pr}}$