

Block 3

Vom Molekül zur Zelle

Biochemie Seminar & Praktika

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

Zentrum für Medizinische Biochemie

georg.weitzer@univie.ac.at



SEMINAR 2:

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

Rf-Werte Dünnschicht- chromatographie?

MEDICAL UNIVERSITY
OF VIENNA

Seminar 2
Medizinische Chemie

3

Pipettierübung

Ergebnis?

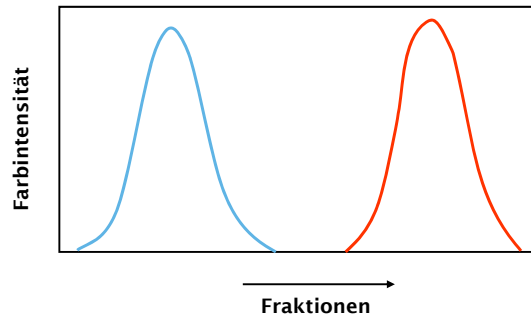
Siehe xlsx files

MEDICAL UNIVERSITY
OF VIENNA

Seminar 2
Medizinische Chemie

4

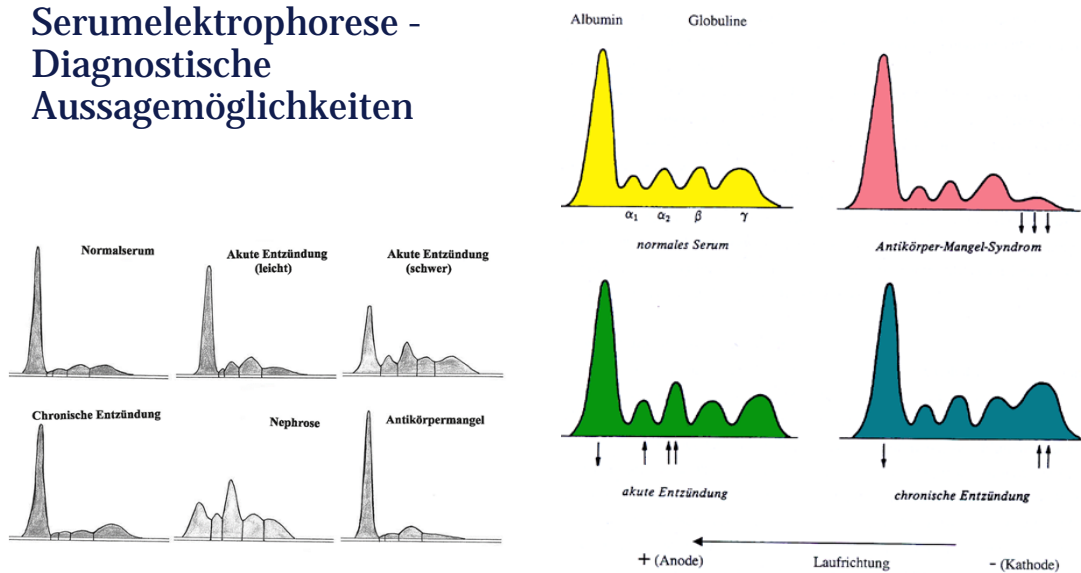
Auswertung - Gelfiltration



Dextranblau: Fraktion 3-4 (6)

Methylrot: Fraktionen 10-15 (17)

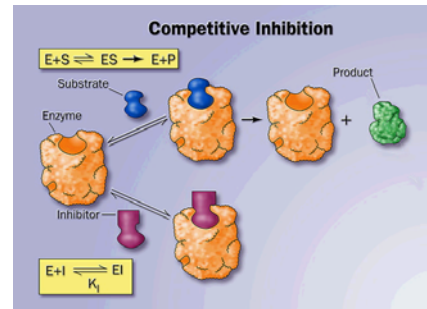
Serumelektrophorese - Diagnostische Aussagemöglichkeiten



Was Sie wissen müssen:

Die Aktivität von Enzymen (Biokatalysatoren) wird beeinflusst durch

- pH- Wert (Optimum, aber auch Denaturierung)
- Temperatur (Optimum, aber auch Denaturierung)
- Hemmstoffe (in der Medizin: Medikamente!)
 - kompetitive (erhöhen die Michaelis Konstante K_m)
 - nicht-kompetitive (verkleinern die max. Geschwindigkeit V_{max})



Anmerkung:

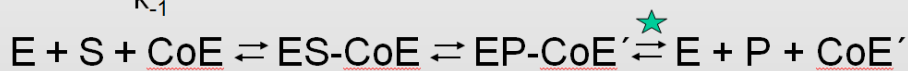
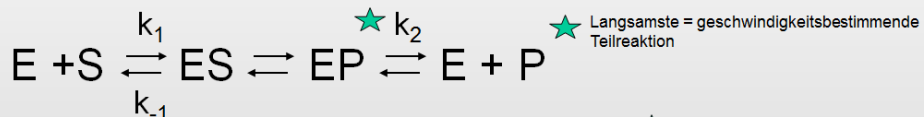
Bei der **kompetitiven Hemmung** konkurrieren ein Agonist (Substrat) und ein Antagonist (Hemmstoff) um die Bindungsstelle an einem Enzym.

Bei der **nicht-kompetitiven Hemmung** bindet der Antagonist an einer Anderen als der Substrat-Bindungsstelle.

Enzymatische Methoden

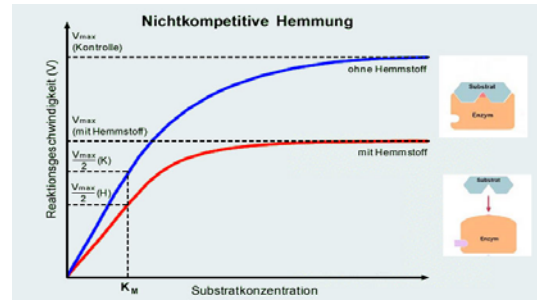
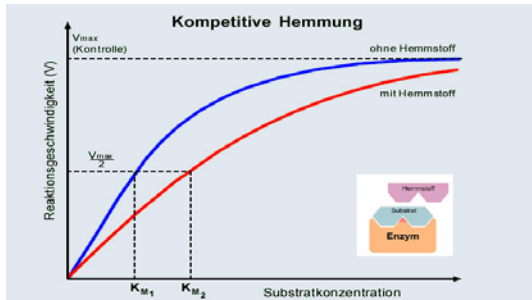
Enzymatische Reaktionen

- Enzym = **E**
- Substrat = **S**
- Produkt = **P**
- Coenzym (Cosubstrat) = **CoE**



Das Coenzym wird kovalent verändert (CoE, CoE'), wird aber in einer anderen Reaktion wieder hergestellt, daher auch der Name "Cosubstrat".

Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration einer enzymatische katalysierten Reaktion

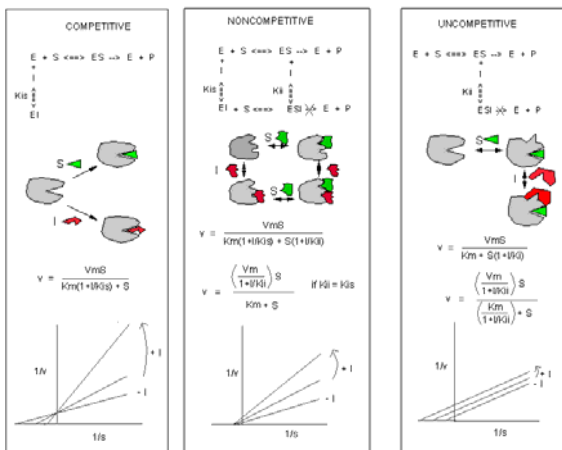


Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor außerhalb des aktiven Zentrums, wie bei der nichtkompetitiven Hemmung, aber nur dann, wenn bereits ein Substrat an das Enzym gebunden ist.

Quelle: http://www3.hhu.de/bioididaktik/Steuerung_Regelung/enzyme/enzy2_2.html

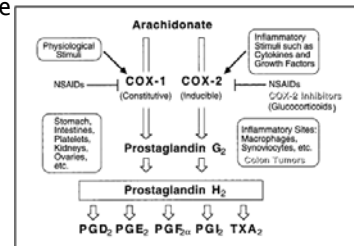
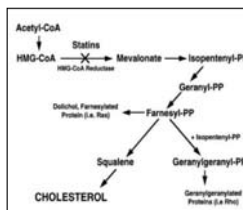
Enzymhemmung



- Irreversibel: chemische Modifikation von wichtigen Gruppen
- Reversibel: z.B. Produkthemmung
- Kompetitiv: I wie S
 Km höher
 Vmax gleich
- Nichtkompetitiv: I unabhängig von S
 Km gleich
 Vmax niedriger
- Unkompetitiv: I braucht ES-Komplex
 Km niedriger
 Vmax niedriger

Hemmstoffe in der Medizin - Beispiele

- Kompetitive Hemmung – Statine: z.B. Atorvastatin, Lovastatin
 - 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



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 Substrat-Konzentration, 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. →

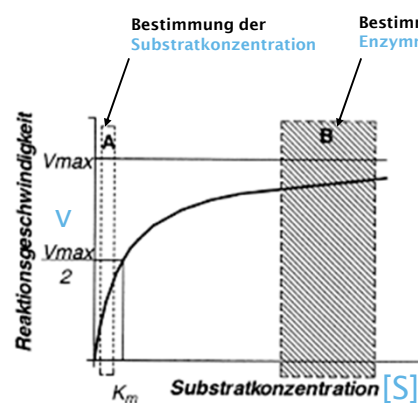
Physiologische Bedeutung der Michaeliskonstante

- 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 Koeffizient

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 $V_{max}/2$: $[E] = [ES]$

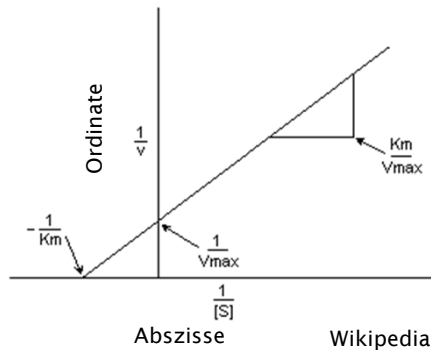
Abbildung aus: Ergänzung der theoretischen Grundlagen und biochemisches Praktikum im Block 3 - Vom Molekül zur Zelle, Facultas Verlag, Hans Goldenberg (Hg.)

Lineweaver-Burk Diagramm

Geradengleichung $y = k \cdot x + d \rightarrow y = d + k \cdot x$
 k = Steigung

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

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

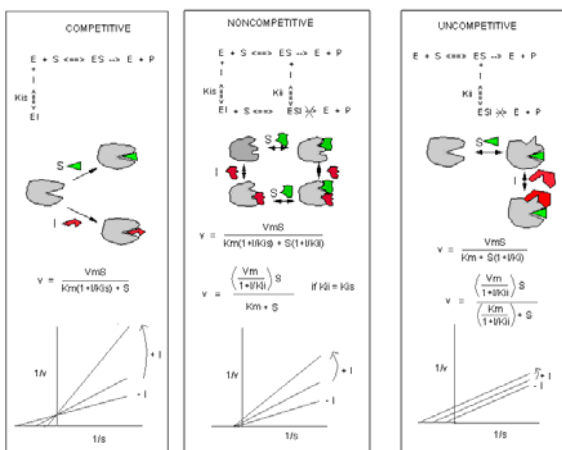


Durch Umformung der Michaelis-Menten Gleichung in eine doppelt-reziproke Form kann die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion in einem **Lineweaver-Burk Diagramm** dargestellt werden.

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

k wie e, eine Material-spezifische Konstante

Enzymhemmung

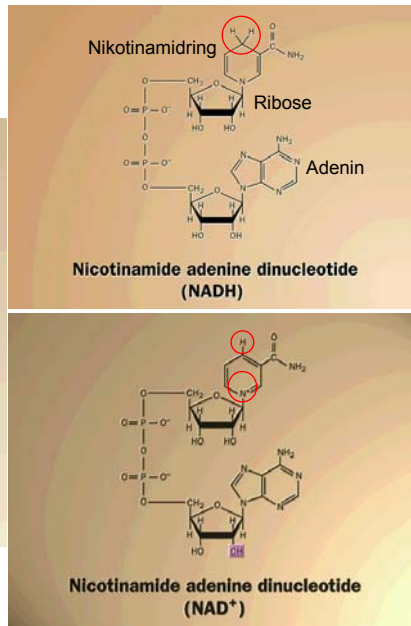
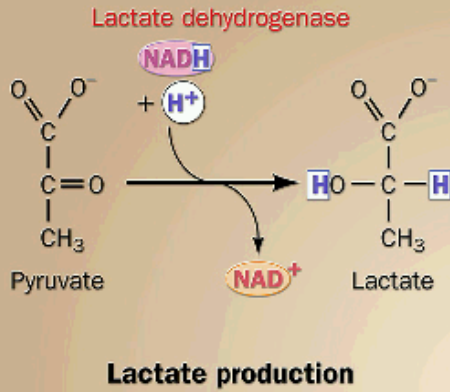


- Irreversibel: chemische Modifikation von wichtigen Gruppen
- Reversibel: z.B. Produkthemmung

- Kompetitiv: I wie S
K_m höher
V_{max} gleich
- Nichtkompetitiv: I unabhängig von S
K_m gleich
V_{max} niedriger
- Unkompetitiv: I braucht ES-Komplex
K_m niedriger
V_{max} niedriger

$E + S \rightleftharpoons ES$ Gleichgew. nach rechts verlagert, daher K_m app. Niedriger.

Was macht NAD⁺?



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

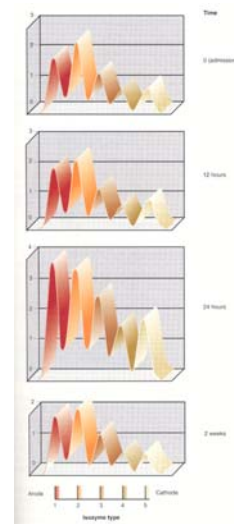
LDH Isoenzyme nach Herzinfarkt:

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

Die Km der Isoenzyme sind unterschiedlich (für Lactat):

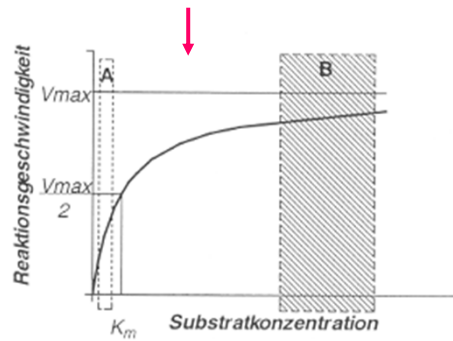
niedrig in Skelettmuskel (LDH5)

hoch im Herzmuskel oder im embryonalen Gewebe (LDH1)



Beispiel 1: Bestimmung der K_m der LDH:

Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei 6 verschiedenen Substratkonzentrationen

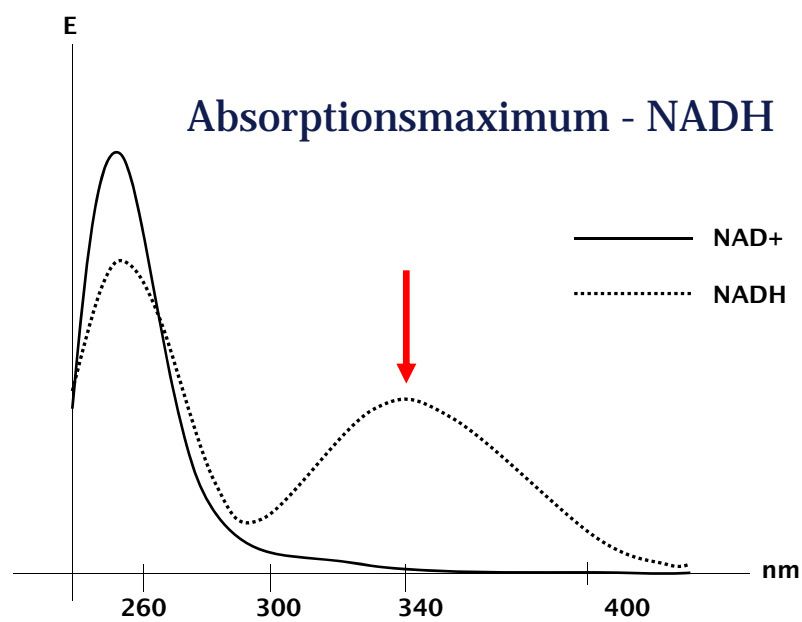


$$K_m = [S] \text{ bei } V_{\max}/2$$

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

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

Messgröße: Das bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat verbrauchte Cosubstrat NADH

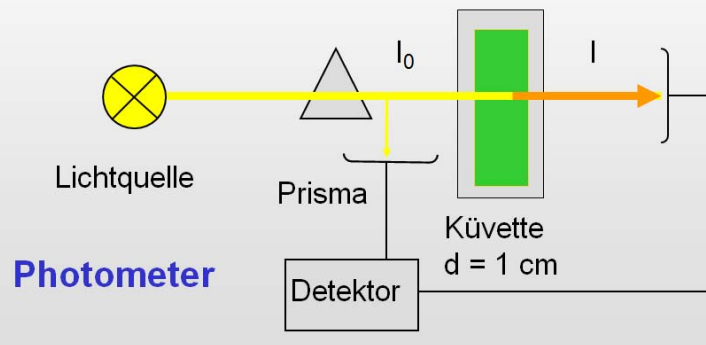


Lambert-Beersches Gesetz

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

$$E = \log(1/T) = \log(I_0/I)$$

E = Extinktion ϵ = spez. Molarer Extinktionskoeff.
 c = Konzentration d = Schichtdicke T = Transmission

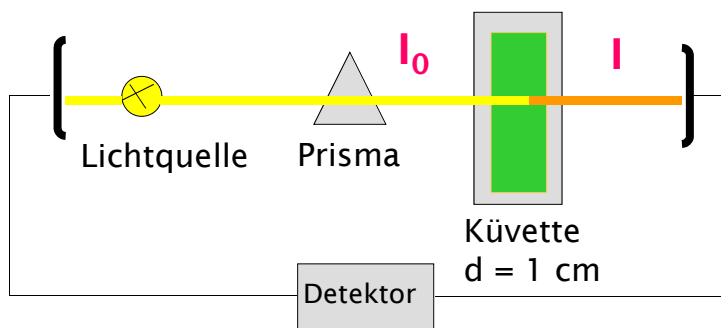


Photometer

Transmission
Extinktion

$$T = I/I_0$$

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



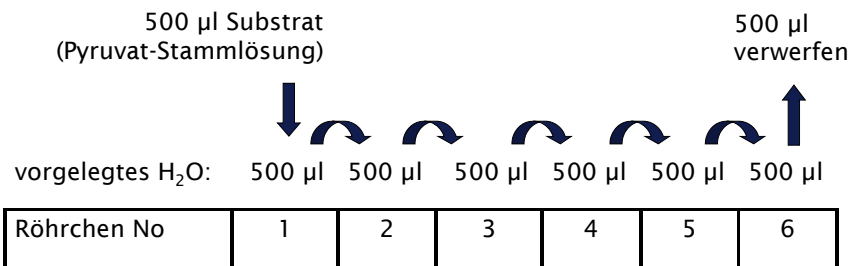
$$E = \epsilon \times c \times d$$

Lambert-Beer'sches Gesetz

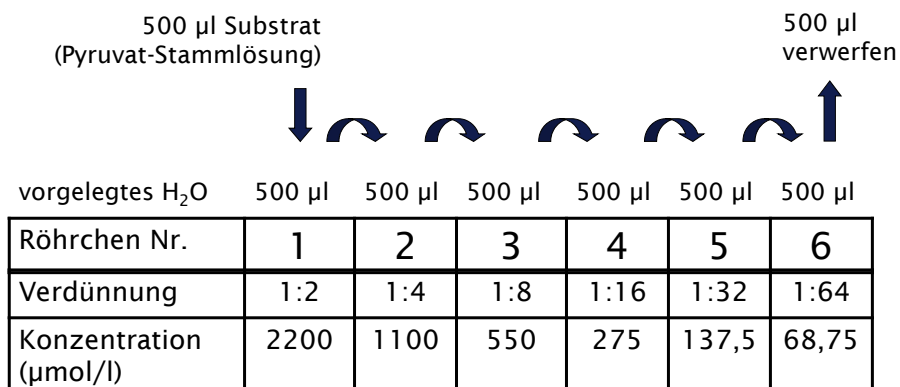
- E Extinktion
- c Konzentration (mol/l)
- d Schichtdicke der Küvette in cm
- ϵ molarer Extinktionskoeffizient in l/mol cm



Verdünnungsreihe



Verdünnungsreihe



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
- Ⓧ kurz mischen
- Ⓧ Probe rasch in die Küvette leeren
- Ⓧ E über 75 sec alle 15 sec ablesen (6 Werte) + notieren
- Ⓧ Röhrchen 5: + 20 µl LDH-Enzymlösung
- Ⓧ kurz mischen

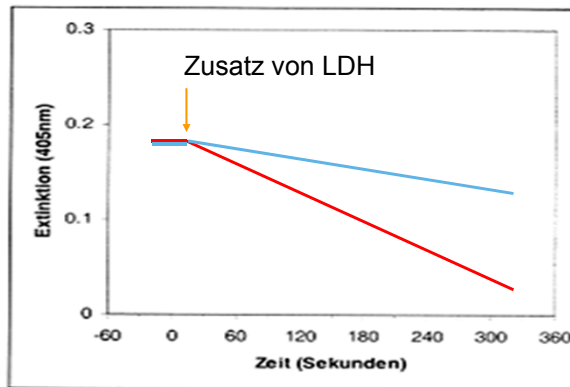
Arbeitsplatz



Photometer



Messung der Lactatdehydrogenaseaktivität



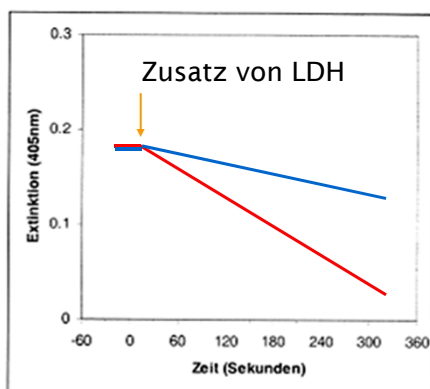
niedrige Pyruvatkonzentration

hohe Pyruvatkonzentration

modifiziert nach „Ergänzung“, H. Goldenberg

$k = v$ für gegebene $[S]$

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 $[S]$

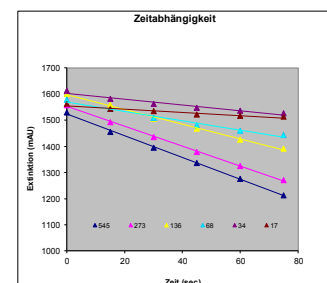
Auswertung:

Excel-Sheet

Lernunterlagen Block 3

LDH (Auswertung, Datenblatt)

Auf PC-Übungssaal vorhanden



Messung der Extinktionsänderung bei jeder Substratkonzentration

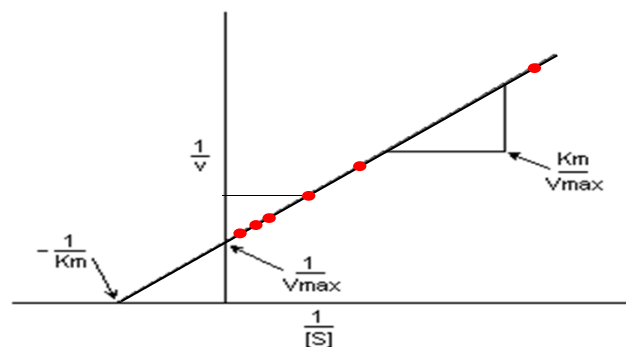
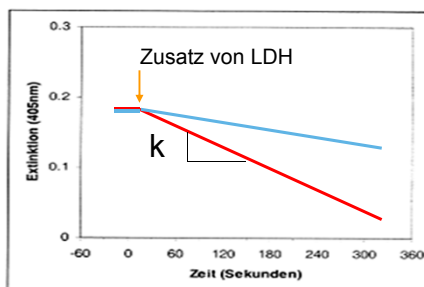
$$E = \varepsilon \times c \times d$$

$$c = E / (\varepsilon \times d)$$

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

Abnahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Dauer der Reaktion messen (wie in der Grafik zuvor dargestellt).

Auswertung der Messdaten durch Umwandlung in ein Lineweaver-Burk Diagramm ...



Jedes "k" (Steigung links) entspricht **einem** Wert auf der Ordinate (y-Achse) im Diagramm rechts.

LDH-Messung – Auswertung mittels Excel Sheet

Lactat Dehydrogenase 1 (Erythrozyt, Herzmuskel, Niere)
 TISCH ID (Gruppe) 22.01.2014
BESTIMMUNG DER MICHAELIS-MENTEN-KONSTANTE DER LACTATDEHYDROGENASE

3.Nov.17 LDH 1 (H4) SigmaAldrich 8,5 mg/ml
 EC 1.1.1.27 621 U/mg Protein
 Gesamtverdünnung aus LDH Stammlösung 1:1500

VORSICHT: Extinktionswerte bitte in mAU eingeben (z.B. 1.360AU entspricht 1360 mAU)
 mAU (milli absorbance units) in gelb unterlegten Feldern eingeben

Röhrchen #	1	2	3	4	5	6
sec	545	273	136	68	34,1	17,0
0	1201	1193	1201	1203	1203	1193
15	1175	1168	1178	1181	1187	1170
30	1151	1148	1162	1164	1175	1164
45	1130	1122	1130	1149	1168	1158
60	1106	1100	1109	1136	1157	1151
75	1080	1072	1087	1119	1149	1147

Steigung (ΔmAU/sec)

1	1,587	-1,598	-1,512	-1,086	-0,695	-0,444
2	1,587	1,598	1,512	1,086	0,695	0,444

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: 545, 273, 136, 68, 34,0625, 17,03125
 Zelle für Solver: 89

Michaelis-Menten Kinetik der LDH-1

Block 3 LDH 2014 [Kompatibilitätsmodus] - Microsoft Excel

Block 3 LDH 2014 [Kompatibilitätsmodus] - Microsoft Excel

Lactat Dehydrogenase 1 (Erythrozyt, Herzmuskel, Niere)
 TISCH ID (Gruppe) 34 22.01.2014
BESTIMMUNG DER MICHAELIS-MENTEN-KONSTANTE DER LACTATDEHYDROGENASE

22-Jan-14 LDH 1 (H4) SigmaAldrich 8,5 mg/ml
 EC 1.1.1.27 621 U/mg Protein
 Gesamtverdünnung aus LDH Stammlösung 1:1500

VORSICHT: Extinktionswerte bitte in mAU eingeben (z.B. 1.360AU entspricht 1360 mAU)
 mAU (milli absorbance units) in gelb unterlegten Feldern eingeben

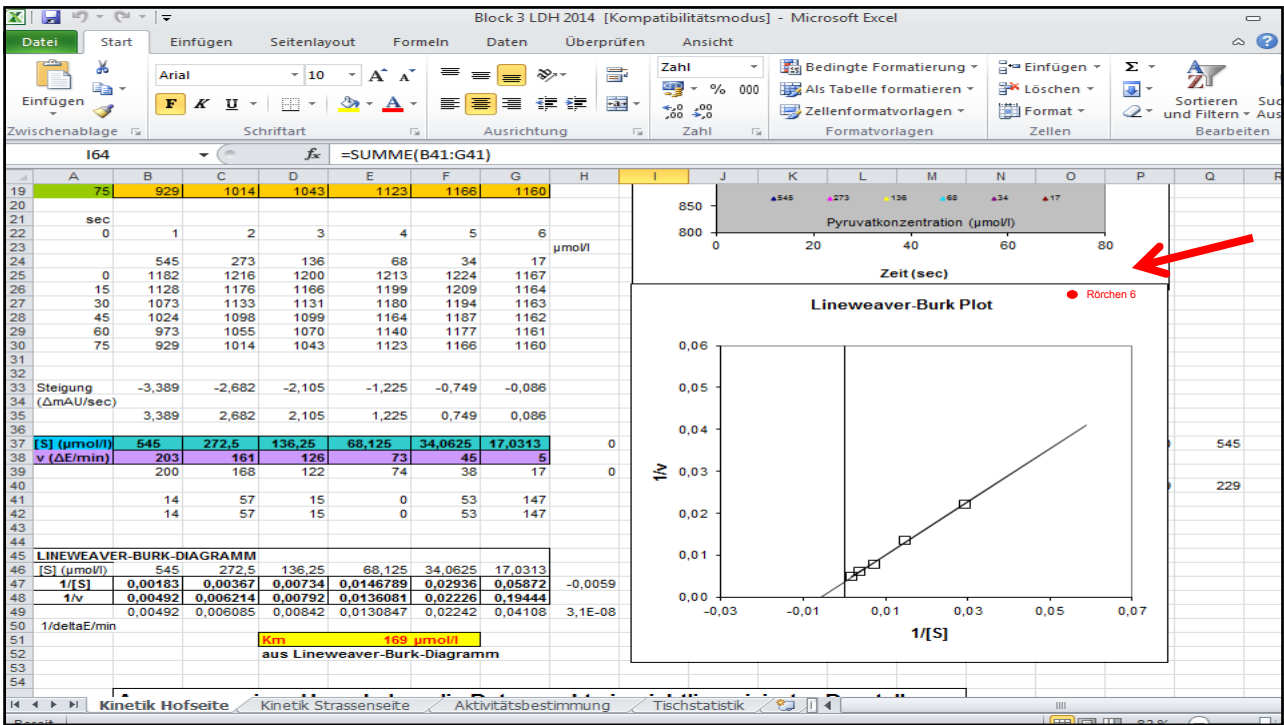
Röhrchen	1	2	3	4	5	6
sec	545	273	136	68	34,1	17,0
0	1182	1216	1200	1213	1224	1167
15	1128	1176	1166	1199	1209	1164
30	1073	1133	1131	1180	1194	1163
45	1024	1098	1099	1164	1187	1162
60	973	1055	1070	1140	1177	1161
75	929	1014	1043	1123	1166	1160

Steigung (ΔmAU/sec)

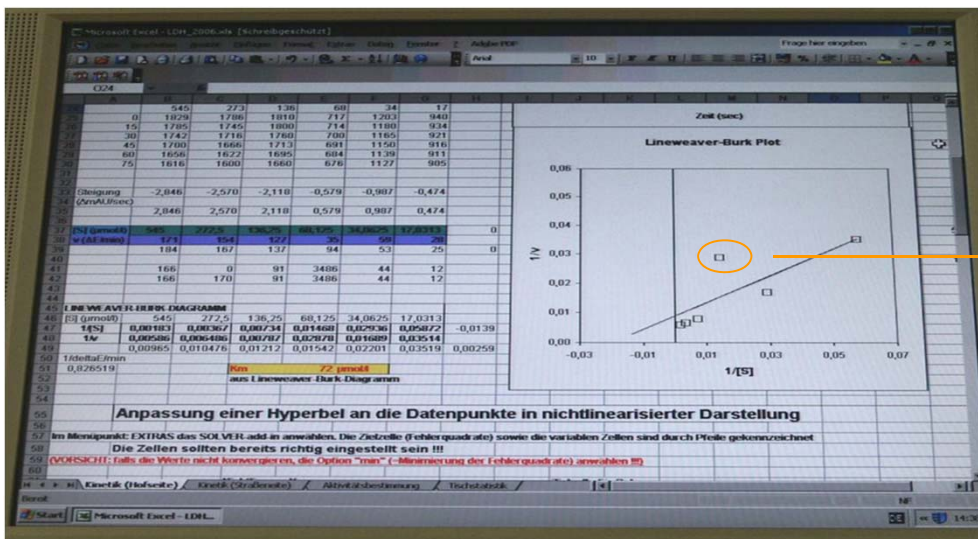
1	-3,389	-2,682	-2,105	-1,225	-0,749	-0,086
2	3,389	2,682	2,105	1,225	0,749	0,086

Zeitabhängigkeit

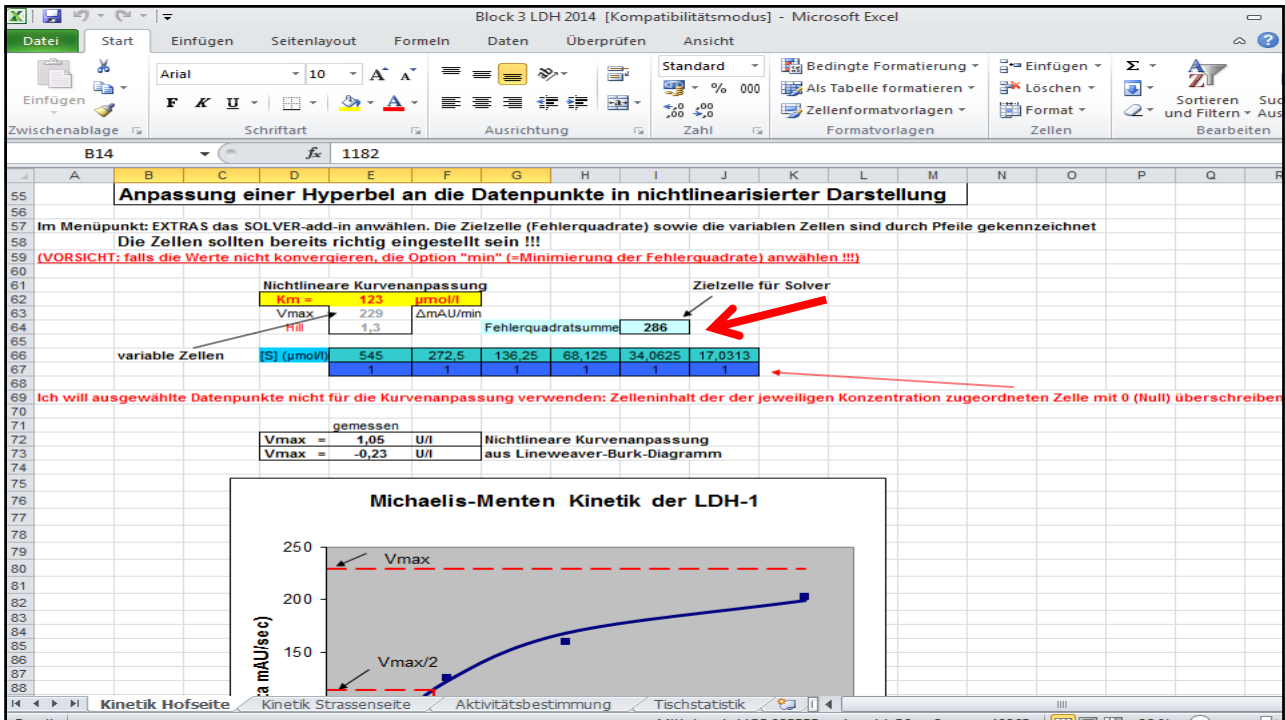
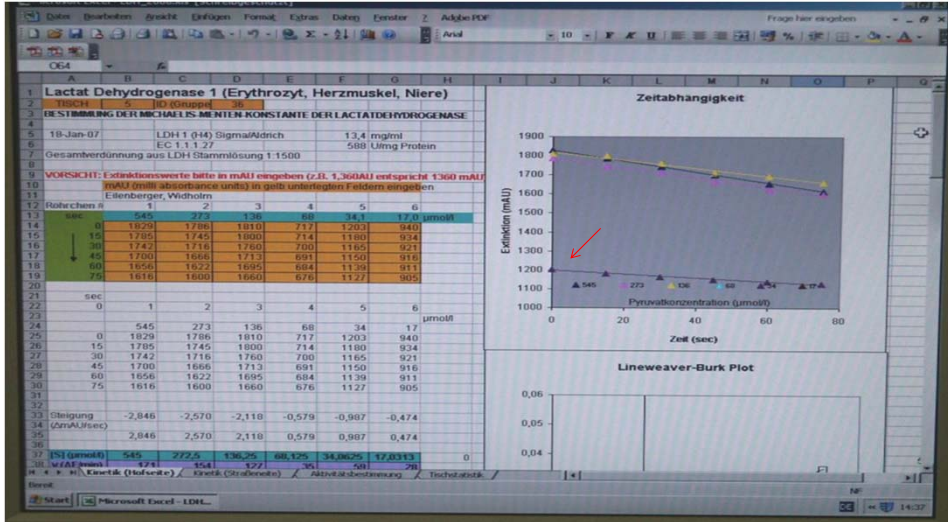
Lineweaver-Burk Plot

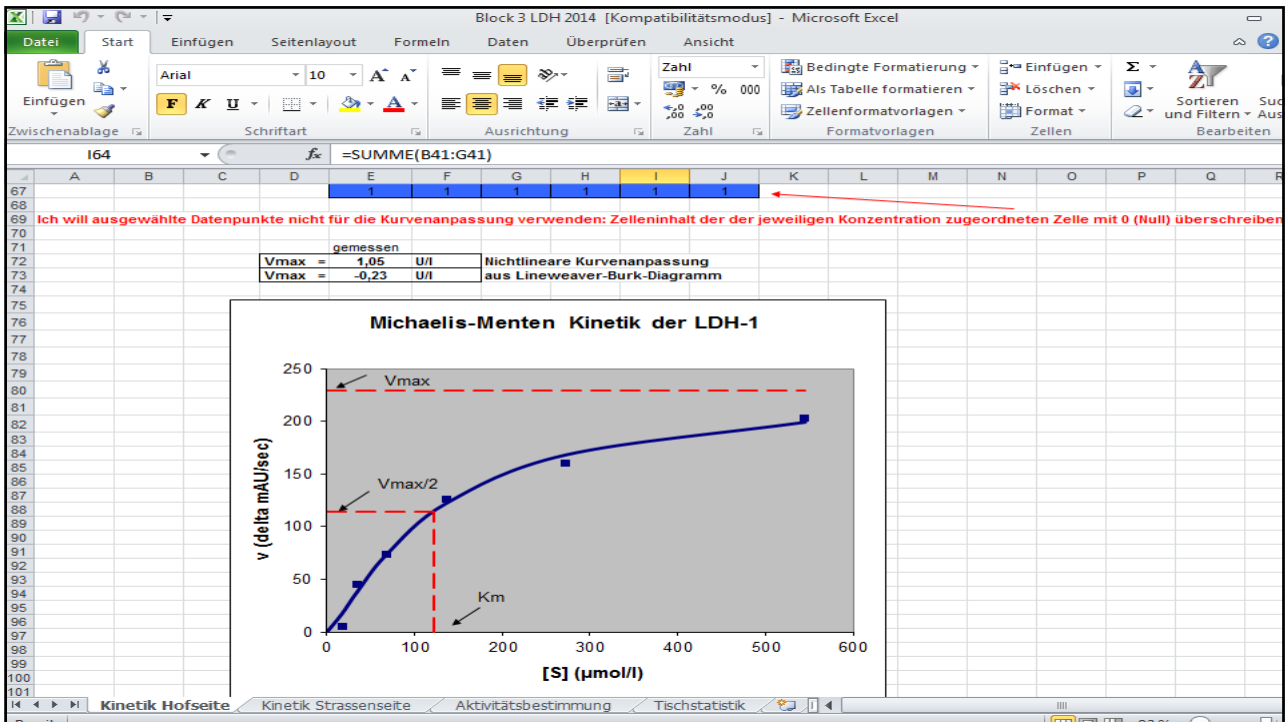


... Pipettierfehler oder Messfehler ?

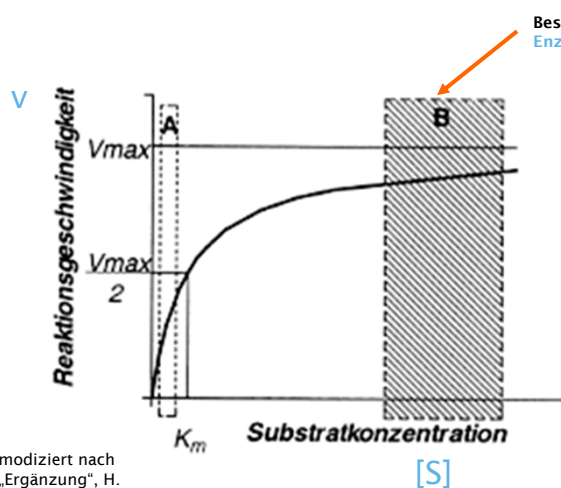


... zu wenig NADH+H⁺ oder aber noch Wasser in der Küvette





Beispiel 2: Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität



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

Bei $[S] \gg K_m$:

$$v = V_{max}$$

Und damit:

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

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

modifiziert nach „Ergänzung“, H. Goldenberg

Messung der LDH-Aktivität

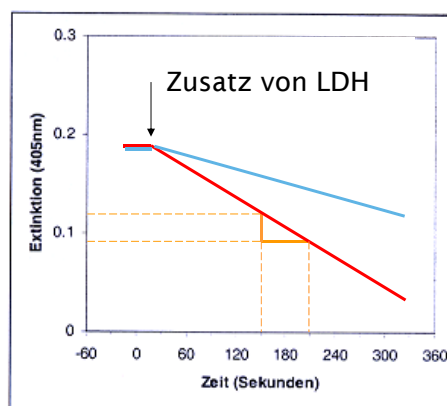
Röhrchen Nr	1	2	3
LDH-Lösung	0,725 U/l	1,45 U/l	2,9 U/l
Phosphatpuffer	500	500	500
Pyruvatstammlsg.	1000	1000	1000
NADH	500	500	500

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



$k = \Delta E / \text{min}$ 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

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

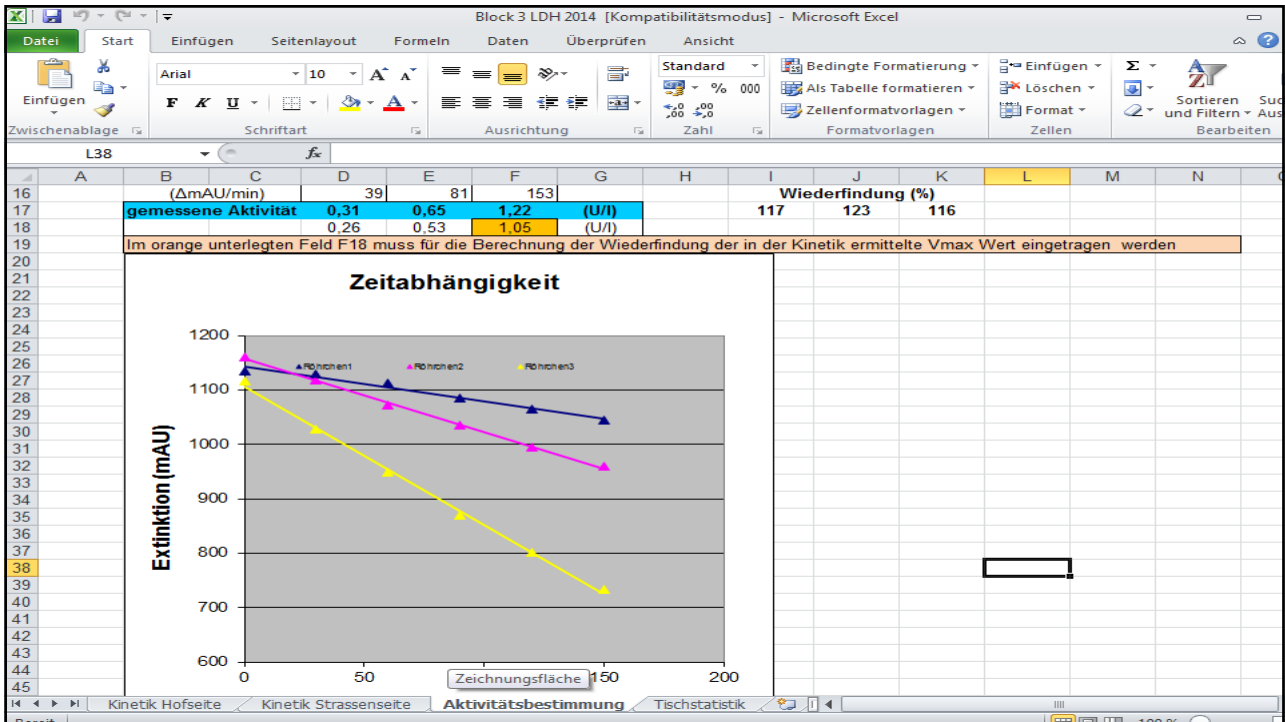
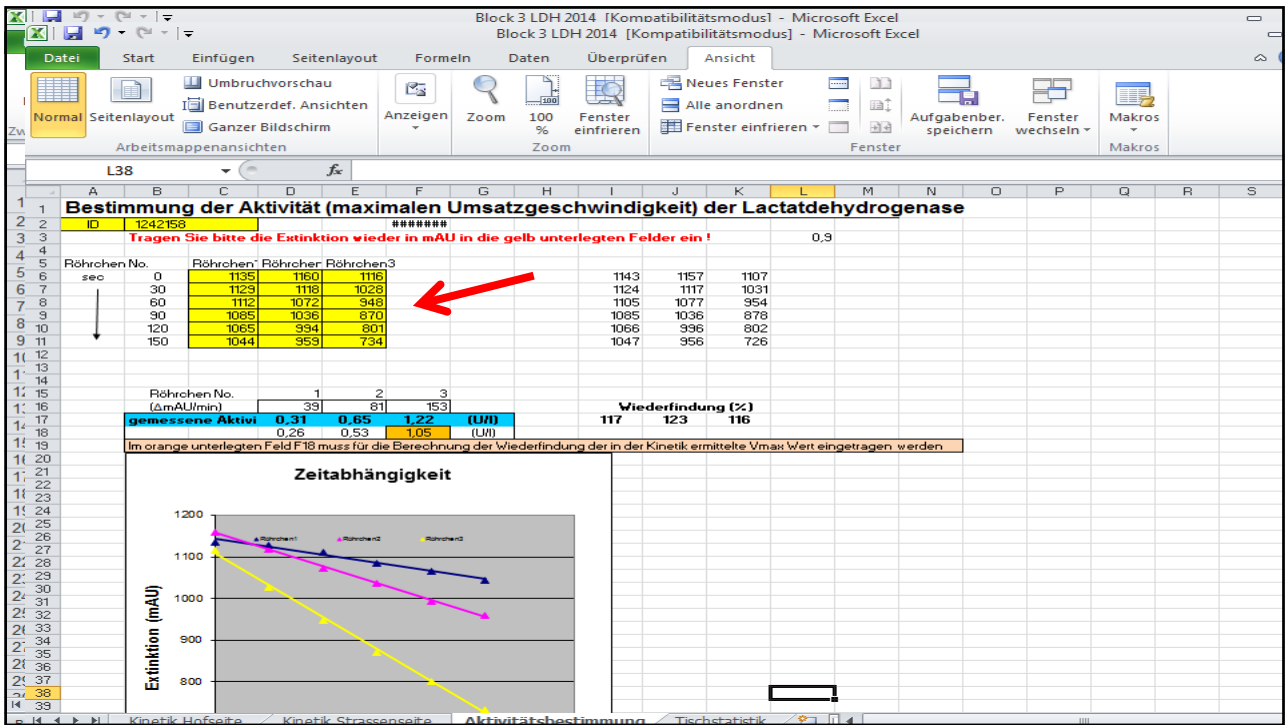
wenig Enzym

viel Enzym

modifiziert nach
„Ergänzung“, H.
Goldenberg

Es werden praktisch ausschließlich Units verwendet.

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



Durchführung und Diskussion im 3. Seminar

Block 3 LDH 2014 [Kompatibilitätsmodus] - Microsoft Excel

Tischstatistik

Tragen Sie die von Ihnen erhobene LDH-Aktivitäten bitte zusammen mit Ihrer ID-Nummer in die gelb unterlegten Felder ein

Löschen Sie alle Werte, die außerhalb der doppelten Standardabweichung liegen, im rechten Wertblock (rotis unterlegt)

Mittelwert, Standardabweichung und VK ändern sich automatisch

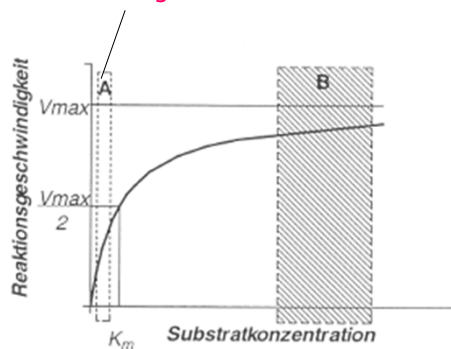
Matrikelnummer	nichtbereinigtes Kollektiv			bereinigtes Kollektiv		
	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L
1	0.14	0.38	0.73	0.14	0.38	0.73
2	0.24	0.33	0.70	0.24	0.33	0.70
3	0.22	0.45	0.33	0.22	0.45	0.33
4	0.15	0.36	0.73	0.15	0.36	0.73
5	0.17	0.13	0.36	0.17	0.13	0.36
6	0.18	0.13	0.34	0.18	0.13	0.34
7	0.13	0.42	0.36	0.13	0.42	0.36
8	0.22	0.49	0.36	0.22	0.49	0.36
9	0.20	0.50	0.31	0.20	0.50	0.31
10	0.30	0.83	1.22	0.30	0.83	1.22
11	0.30	0.65	1.14	0.30	0.65	1.14

Mittelwert	0.20	0.43	0.93	0.20	0.43	0.93
Standardabweichung	0.06	0.20	0.16	0.06	0.20	0.16
Variationskoeffizient (%)	29	48	17	29	48	17
MW minus doppelter Std. Abw.	0.09	0.02	0.62	0.09	0.02	0.62
MW plus doppelter Std. Abw.	0.32	0.83	1.24	0.32	0.83	1.24

Vergleichen Sie Standardabweichungen und VK vor und nach Bereinigung

Enzymatische Bestimmung der Substratkonzentration

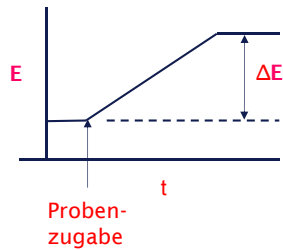
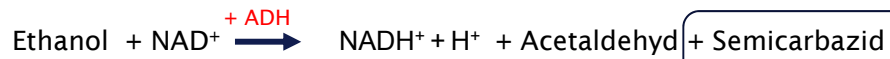
Bestimmung der Substratkonzentration



- Blutglukosebestimmung
- Lactatbestimmung
- Cholesterinbestimmung
- Alkoholbestimmung mittels Alkoholdehydrogenase

- Bestimmung via Teststreifen

Alkoholbestimmung mittels Alkoholdehydrogenase



Wird unlöslich und so dem Gleichgewicht entzogen.

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

Die 2. Übung findet im Übungssaal I,
Währingerstraße 10 1. Stock, rechts statt.

Gruppe 60 Montag 12:30

Gruppe 64 Montag 15:30