

# 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

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

MEDICAL UNIVERSITY  
OF VIENNA

Seminar 2  
Medizinische Chemie

3

## Pipettierübung

Ergebnis?

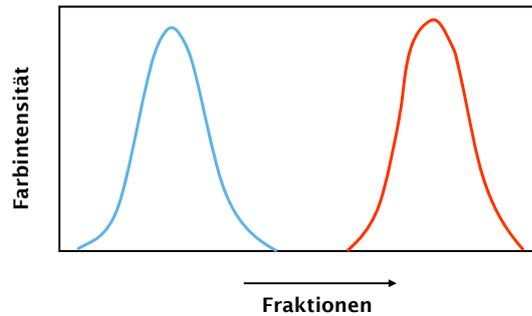
Siehe xlsx files

MEDICAL UNIVERSITY  
OF VIENNA

Seminar 2  
Medizinische Chemie

4

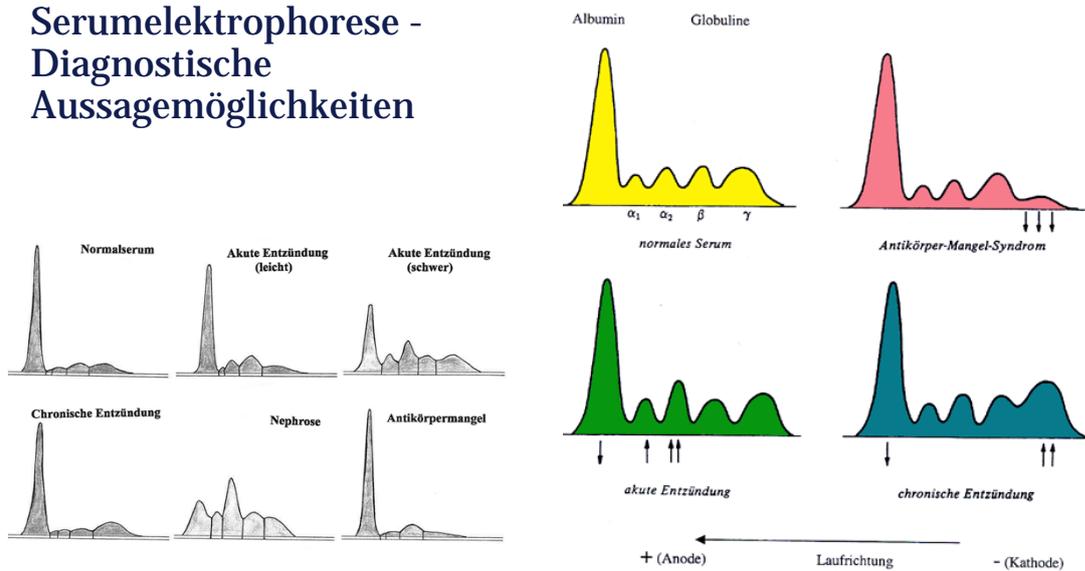
## Auswertung - Gelfiltration



Dextranblau: Fraktion 3-4 (6)

Methylrot: Fraktionen 10-15 (17)

## Serumelektrophorese - Diagnostische Aussagemöglichkeiten

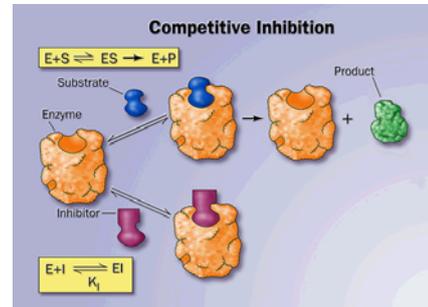




## Was Sie wissen müssen:

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:

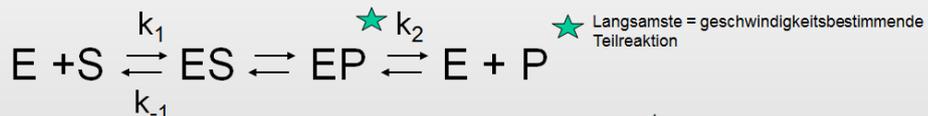
Bei der **kompetitiven Hemmung** konkurrieren ein Agonist (Substrat) und ein Antagonist (Hemmstoff) um die Bindungsstelle an einem Enzym.

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

## Enzymatische Methoden

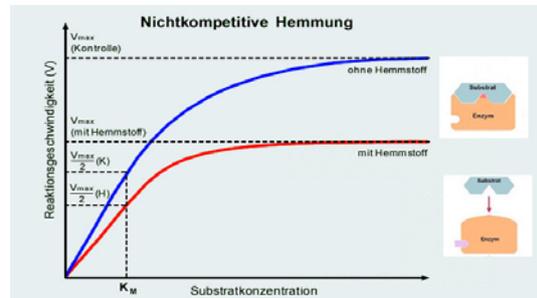
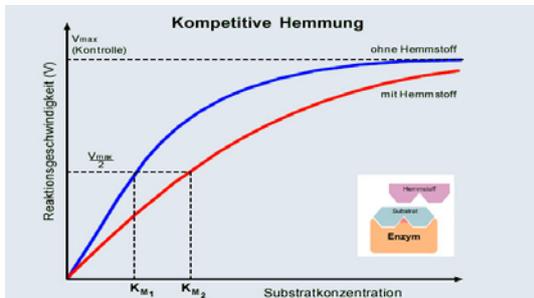
### Enzymatische Reaktionen

- 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](http://www3.hhu.de/bioididaktik/Steuerung_Regelung/enzyme/enzy2_2.html)

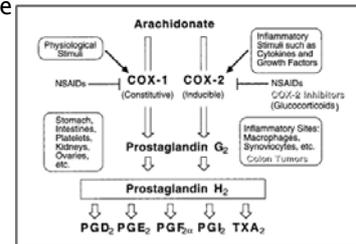
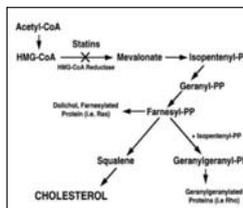
# Enzymhemmung

COMPETITIVE	NONCOMPETITIVE	UNCOMPETITIVE
$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $K_{M1}$ $E + I \rightleftharpoons EI$ $v = \frac{V_m S}{K_M(1 + \frac{I}{K_I}) + S}$	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $K_{M1}$ $E + I \rightleftharpoons EI$ $E + S + I \rightleftharpoons ESI \rightarrow E + P$ $v = \frac{V_m S}{K_M(1 + \frac{I}{K_I}) + S(1 + \frac{I}{K_{IS}})}$ $v = \frac{V_m}{K_M + S} \quad \text{if } K_{IS} = K_{IS}$	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $K_{M1}$ $E + I \rightleftharpoons EI$ $E + S + I \rightleftharpoons ESI \rightarrow E + P$ $v = \frac{V_m S}{K_M + S(1 + \frac{I}{K_{ISI}})}$ $v = \frac{V_m}{K_M + S} \cdot \frac{S}{(1 + \frac{I}{K_{ISI}})}$ $v = \frac{V_m}{K_M + S} \cdot \frac{S}{(1 + \frac{I}{K_{ISI}})}$

- 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 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. →

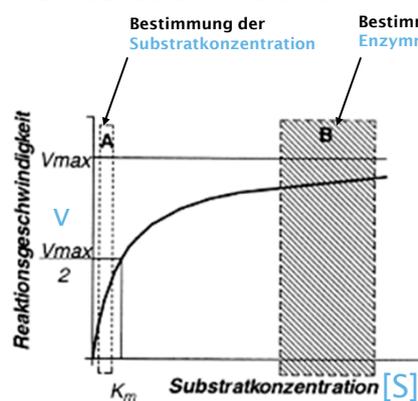
## Physiologische Bedeutung der Michaeliskonstante

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

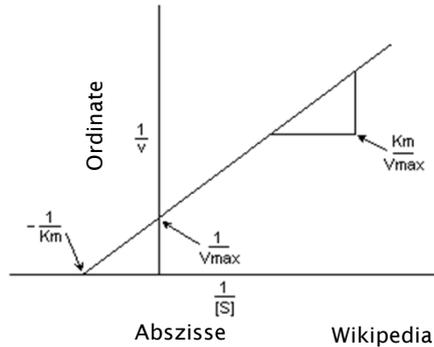
Abbildung aus: Ergänzung der theoretischen Grundlagen und biochemisches Praktikum im Block 3 - Vom Molekül zur Zelle, Facultas Verlag, Hans Goldenberg (Hg.)

# Lineweaver-Burk Diagramm

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

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

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

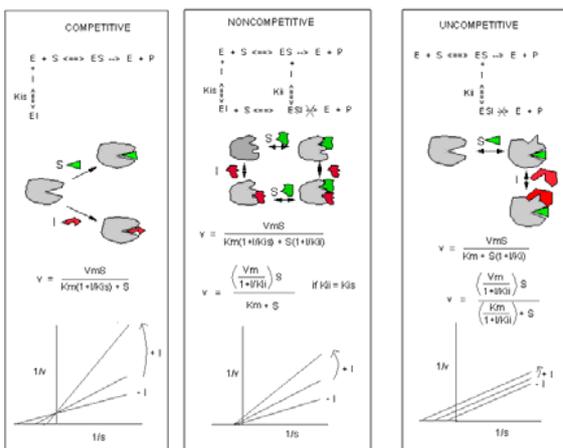


Durch Umformung der Michaelis-Menten Gleichung in eine doppelt-reziproke Form kann die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion in einem **Lineweaver-Burk Diagramm** dargestellt werden.

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

k wie e, eine Material-spezifische Konstante

# Enzymhemmung



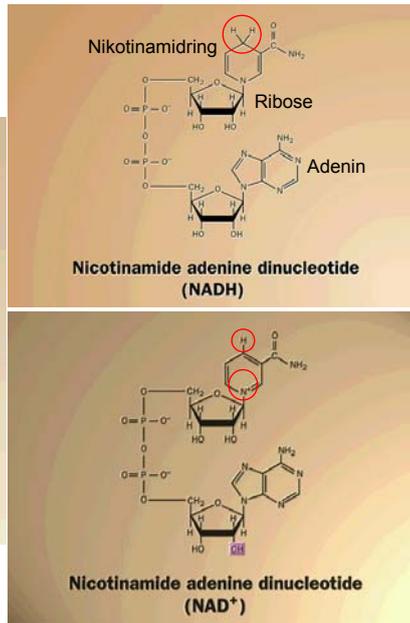
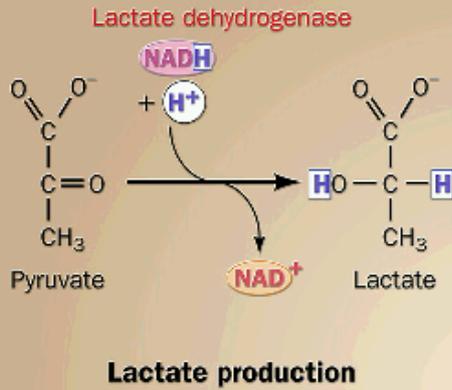
- Irreversibel: chemische Modifikation von wichtigen Gruppen
- Reversibel: z.B. Produkthemmung

- Kompetitiv: I wie S  
K<sub>m</sub> höher  
V<sub>max</sub> gleich
- Nichtkompetitiv: I unabhängig von S  
K<sub>m</sub> gleich  
V<sub>max</sub> niedriger
- Unkompetitiv: I braucht ES-Komplex  
K<sub>m</sub> niedriger  
V<sub>max</sub> niedriger

$E + S \rightleftharpoons ES$  Gleichgew. nach rechts verlagert, daher K<sub>m</sub> app. Niedriger.



# 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

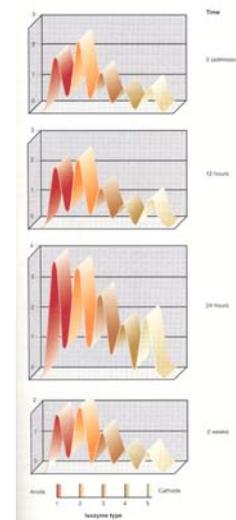
LDH Isoenzyme nach Herzinfarkt:

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):

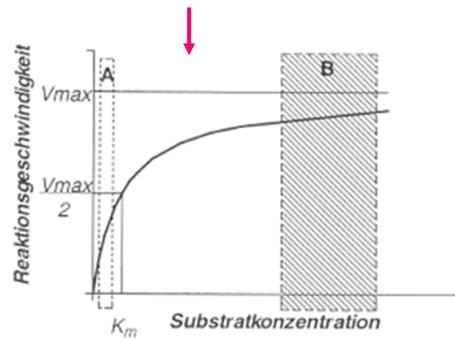
niedrig in Skelettmuskel (LDH5)

hoch im Herzmuskel oder im embryonalen Gewebe (LDH1)



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

Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei 6 verschiedenen Substratkonzentrationen

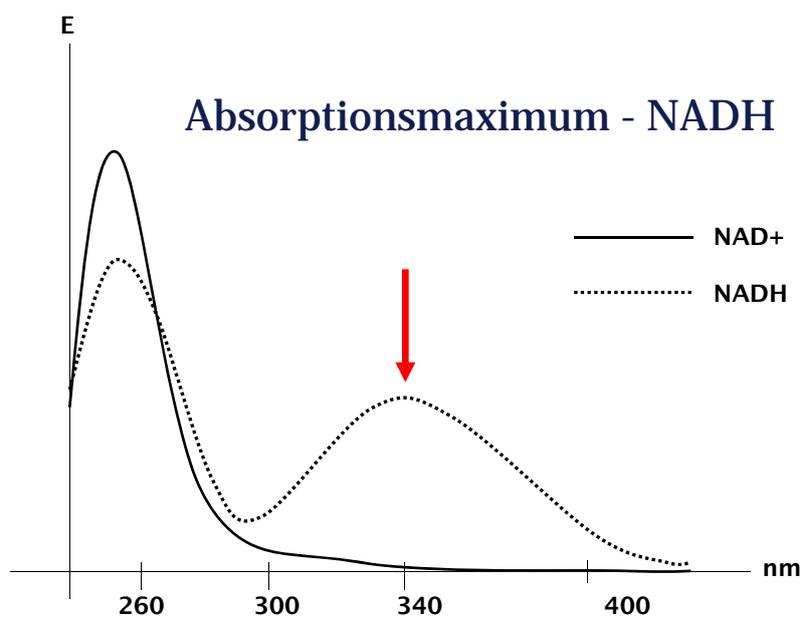


$$K_m = [S] \text{ bei } V_{\max}/2$$

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

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

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

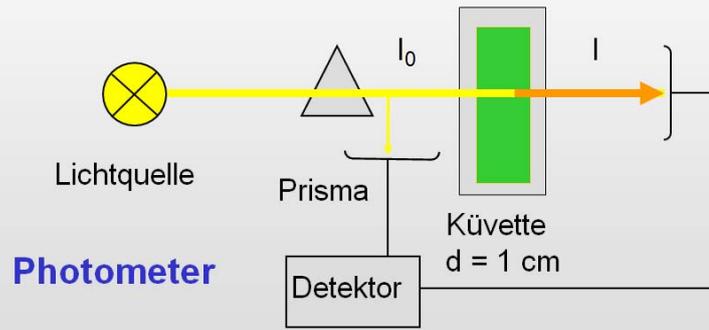


## Lambert-Beersches Gesetz

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

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

E = Extinktion     $\epsilon$  = spez. Molarer Extinktionskoeff.  
 c = Konzentration    d = Schichtdicke    T = Transmission

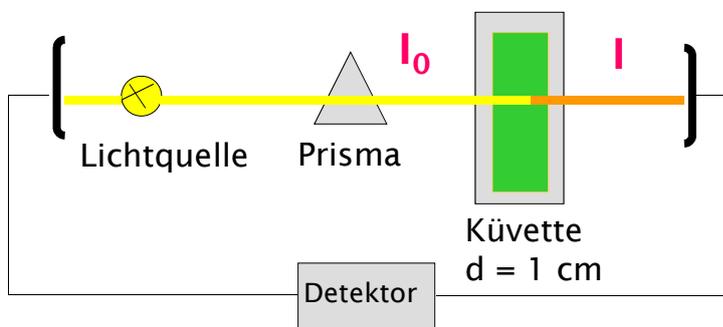


## Photometer

Transmission  
Extinktion

$$T = I/I_0$$

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



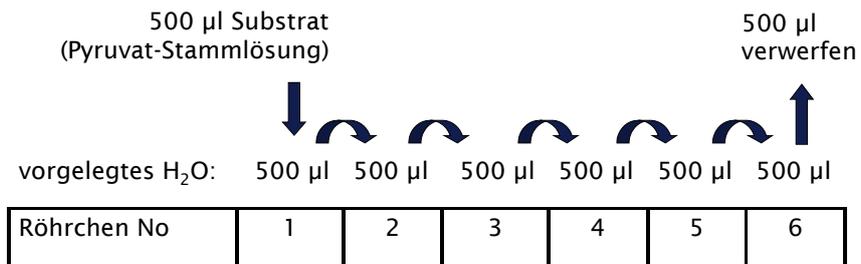
$$E = \epsilon \times c \times d$$

## Lambert-Beer'sches Gesetz

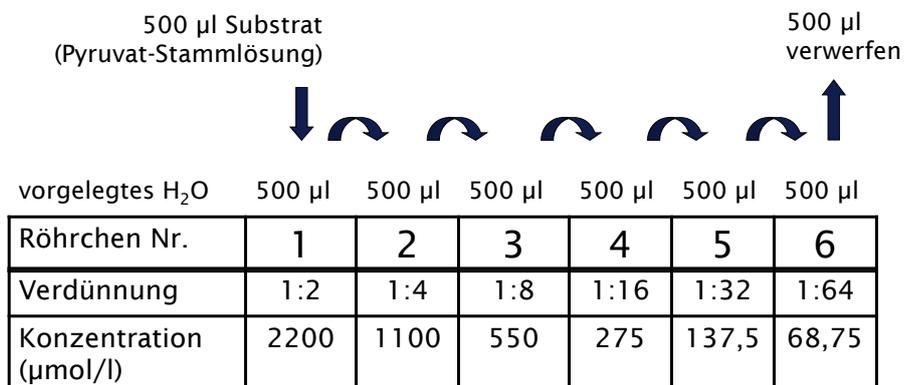
- E Extinktion
- c Konzentration (mol/l)
- d Schichtdicke der Küvette in cm
- $\epsilon$  molarer Extinktionskoeffizient in l/mol cm



## 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 ....

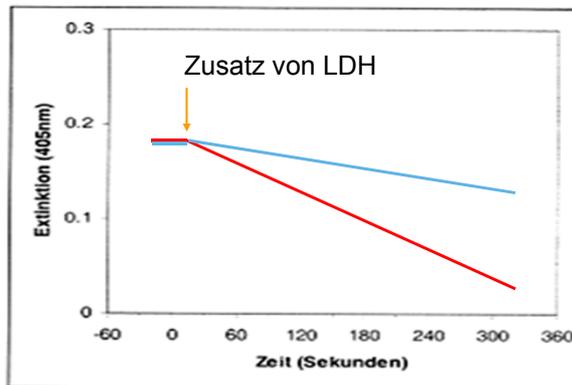
## Arbeitsplatz



## Photometer



## Messung der Lactatdehydrogenaseaktivität



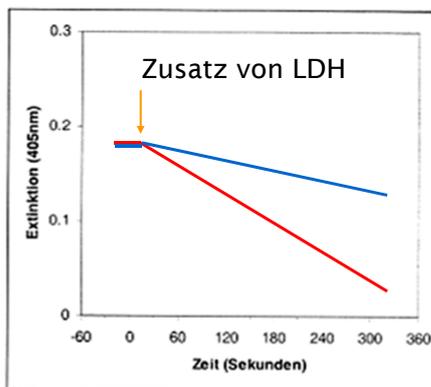
niedrige Pyruvatkonzentration

hohe Pyruvatkonzentration

modifiziert nach „Ergänzung“, H. Goldenberg

$k = v$  für gegebene  $[S]$

## Messung der LDH



niedrige Pyruvatkonzentration

hohe Pyruvatkonzentration

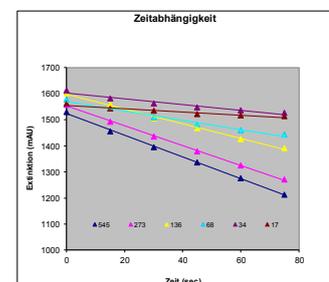
modifiziert nach  
„Ergänzung“,  
H. Goldenberg

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

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

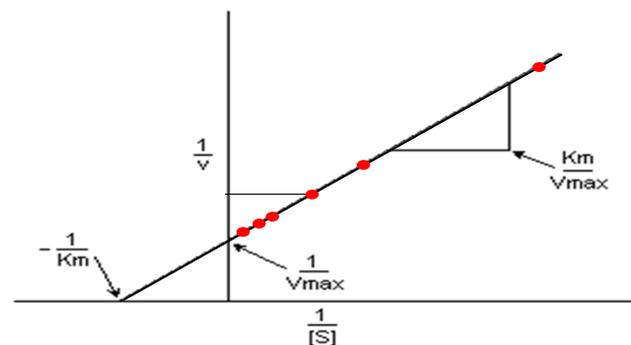
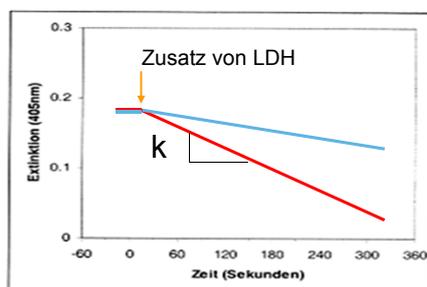
$$E = \varepsilon \times c \times d$$

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

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

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

**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!!!**

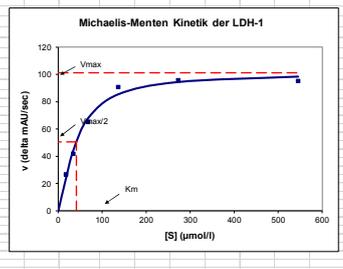
Variable Zellen: (S) (μmol/l) 545, 272,5, 136,25, 68,125, 34,0625, 17,03125

Zelle für Solver: Fehlerquadrate 89

Ich will ausgewählte Datenpunkte nicht für die Kurvenanpassung verwenden: Zellen mit der jeweiligen Konzentration zugeordnete Zelle mit 0 (Null) überschreiben

gemessen: Vmax = 6,68 1/s, Km = 0,63 1/s

Nichtlineare Kurvenanpassung aus Lineweaver-Burk-Diagramm



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) Sigma/Aldrich 8,5 mg/ml  
 EC 1.1.1.27 621 U/mg Protein  
 Gesamtverdünnung aus LDH Stammlösung 1:1500

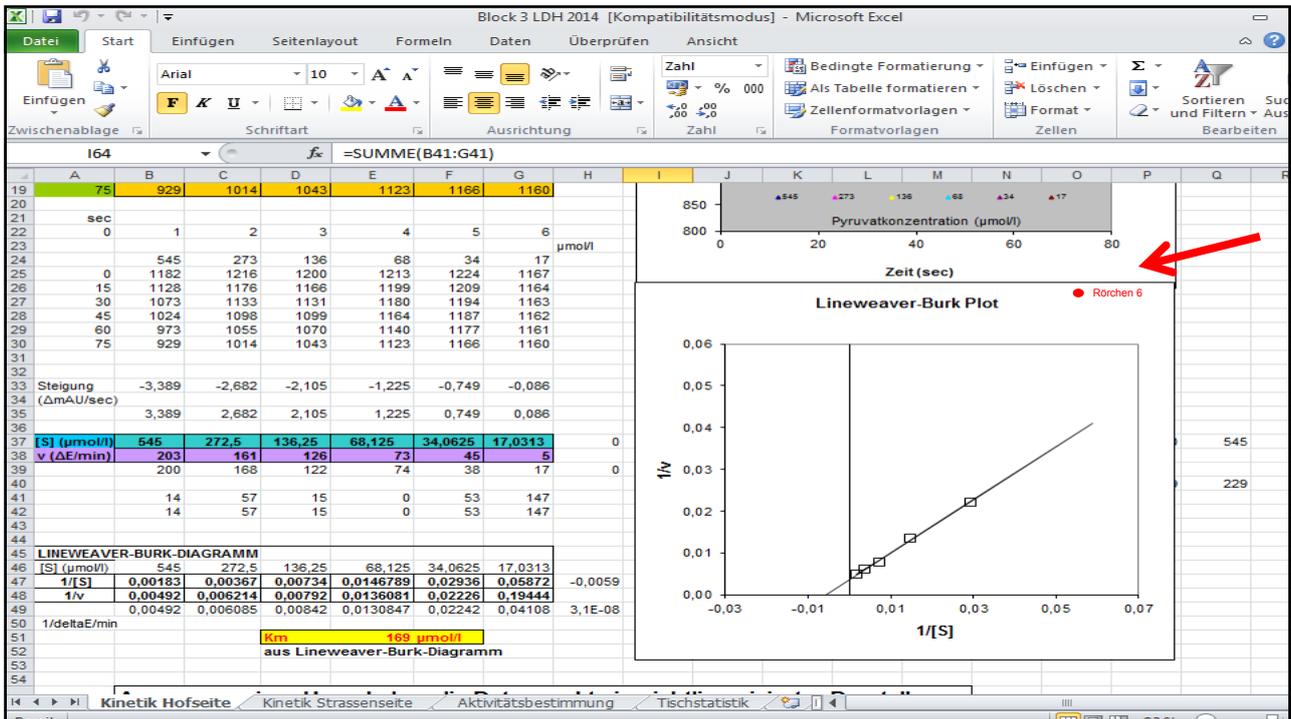
**VORSICHT: Extinktionswerte bitte in mAU eingeben (z.B. 1.360AU entspricht 1360 mAU)**  
 mAU (milli absorbance units) in gelb unterlegten Feldern eingeben

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

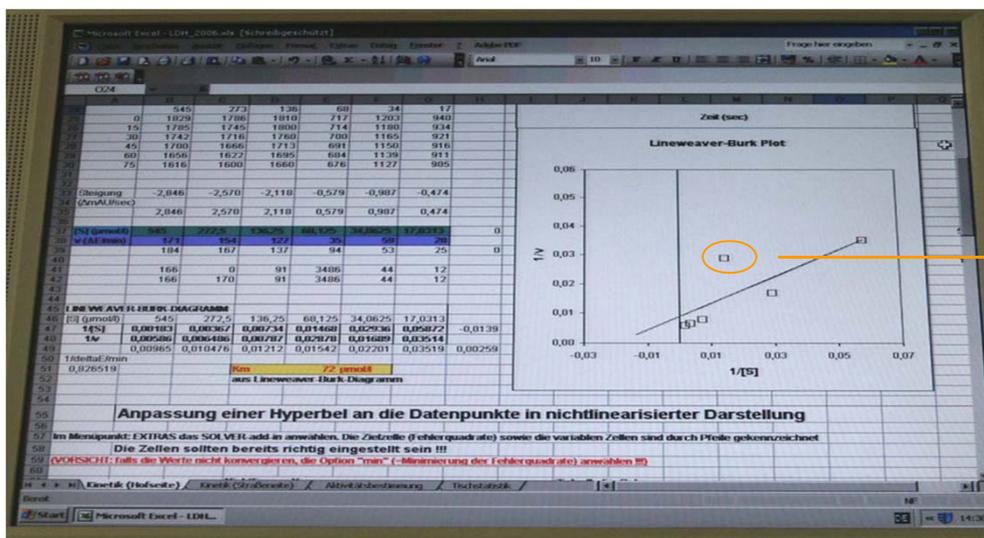
Steigung (ΔmAU/sec): -3,389, -2,682, -2,105, -1,225, -0,749, -0,086

**Zeitabhängigkeit**

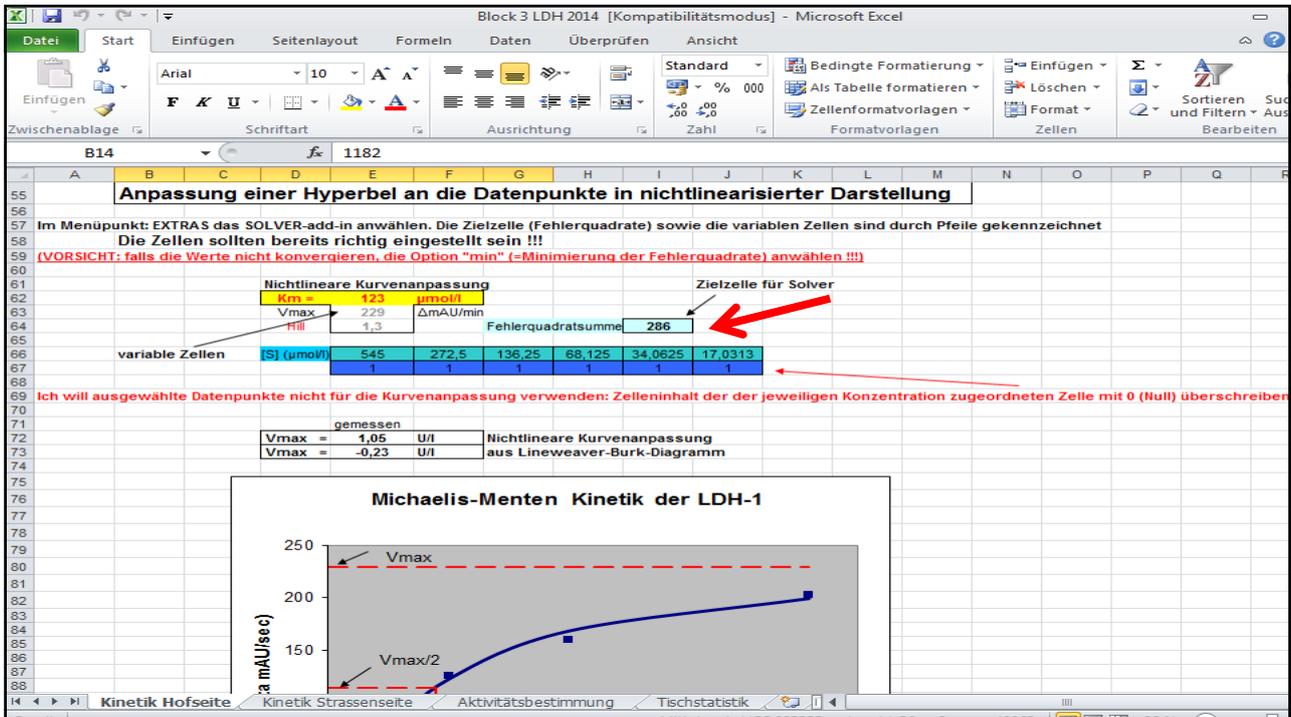
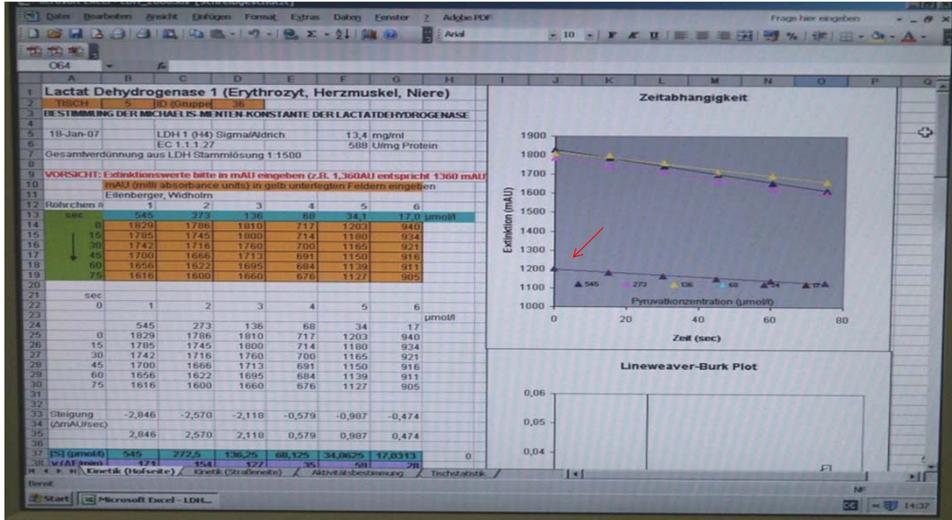
**Lineweaver-Burk Plot**

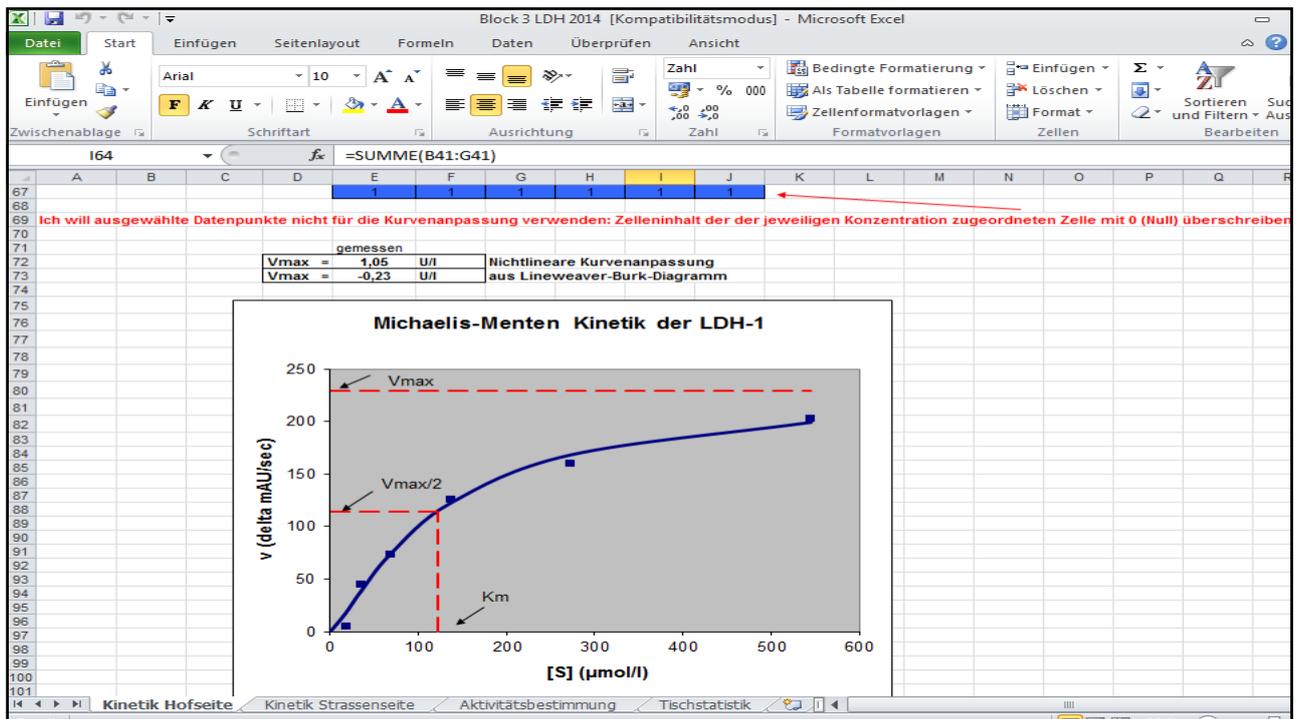


... Pipettierfehler oder Messfehler ?

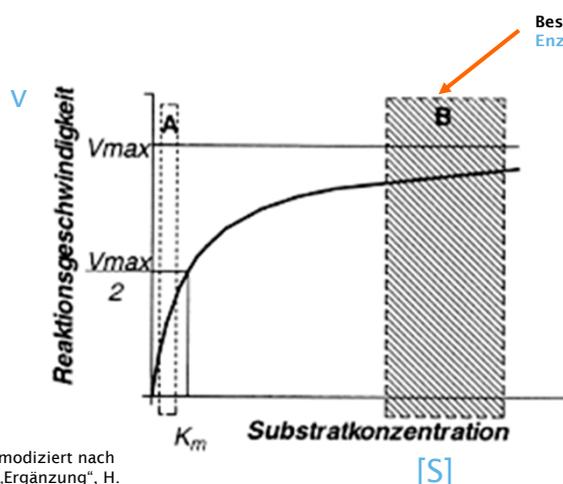


... zu wenig NADH+H<sup>+</sup> oder aber noch Wasser in der Küvette





## 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.

## Messung der LDH-Aktivität

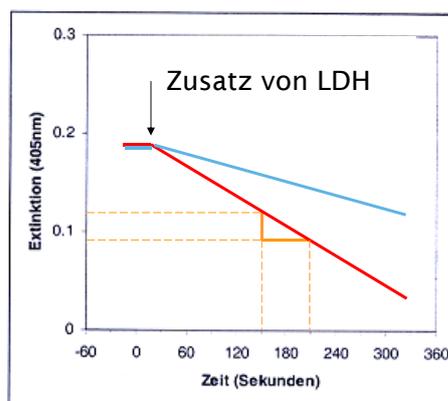
Röhrchen Nr	1	2	3
<b>LDH-Lösung</b>	<b>0,725 U/l</b>	<b>1,45 U/l</b>	<b>2,9 U/l</b>
Phosphatpuffer	500	500	500
Pyruvatstammlsg.	1000	1000	1000
NADH	500	500	500

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



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

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

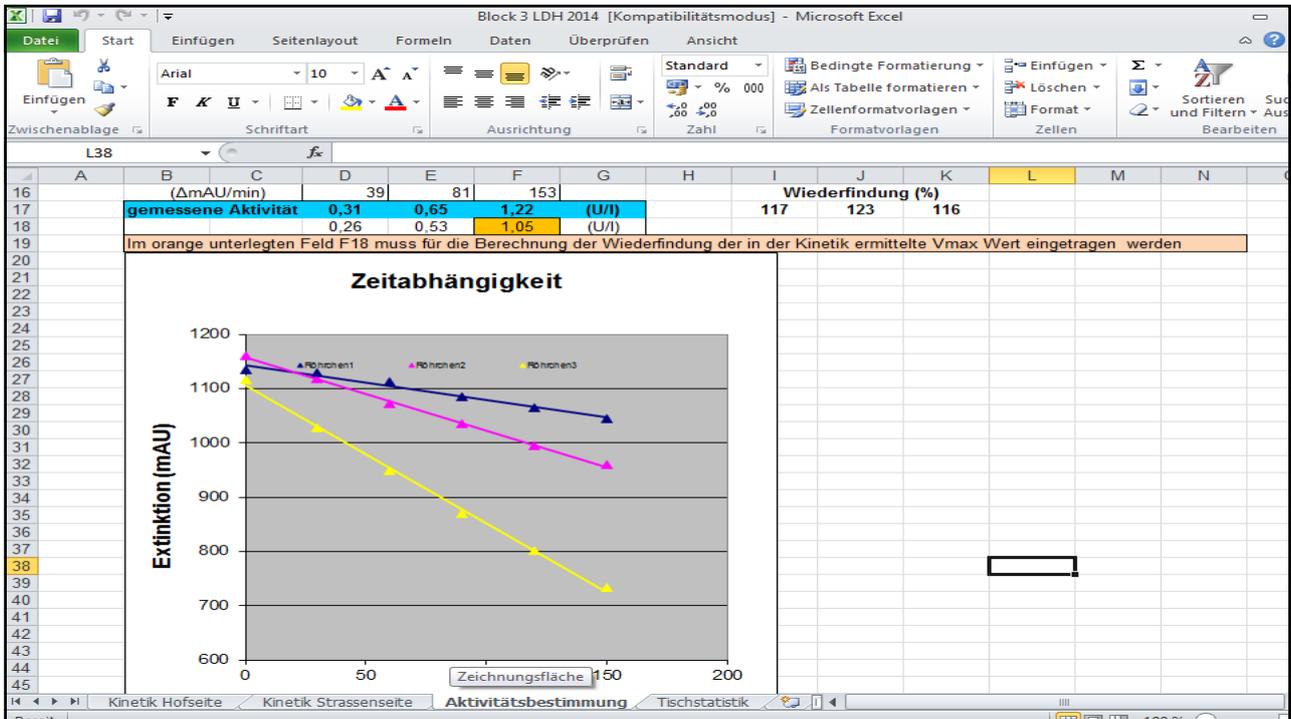
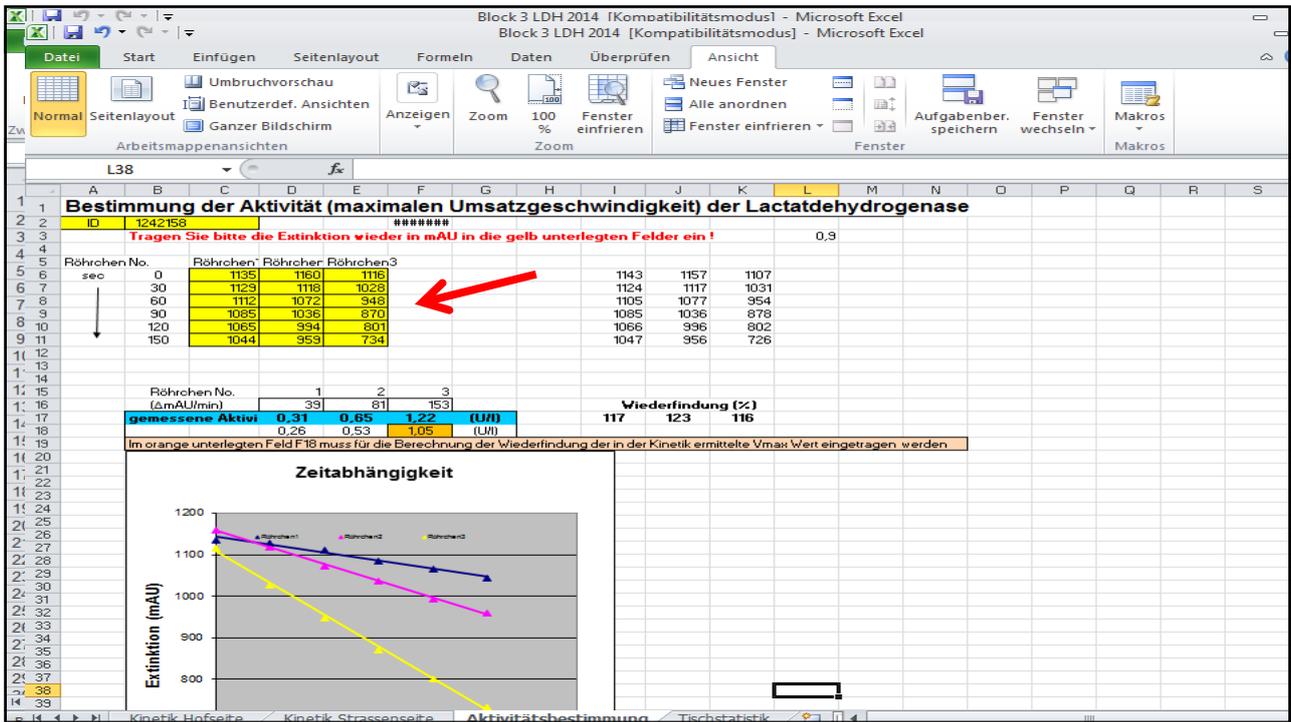
wenig Enzym

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

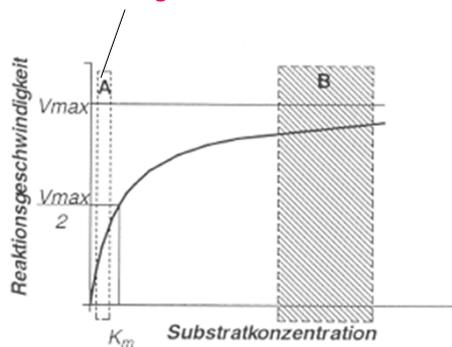
Matrikelnummer	nichtbereinigtes Kollektiv			bereinigtes Kollektiv		
	LDH1 [U/L]	LDH2 [U/L]	LDH3 [U/L]	LDH1 [U/L]	LDH2 [U/L]	LDH3 [U/L]
1	0.14	0.38	0.73	0.14	0.38	0.73
2	0.24	0.33	0.70	0.24	0.33	0.70
3	0.22	0.45	0.33	0.22	0.45	0.33
4	0.15	0.36	0.73	0.15	0.36	0.73
5	0.17	0.13	0.36	0.17	0.13	0.36
6	0.18	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

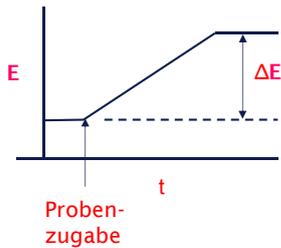
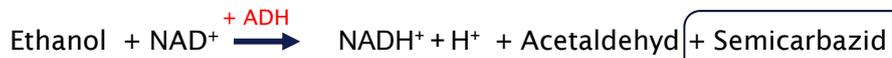
### Bestimmung der Substratkonzentration



- 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