

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?

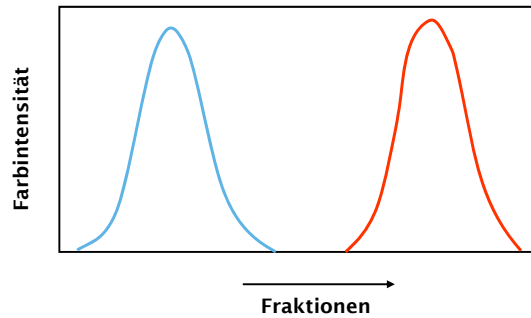
Siehe homepage .xlsx files

MEDICAL UNIVERSITY
OF VIENNA

Seminar 2
Medizinische Chemie

4

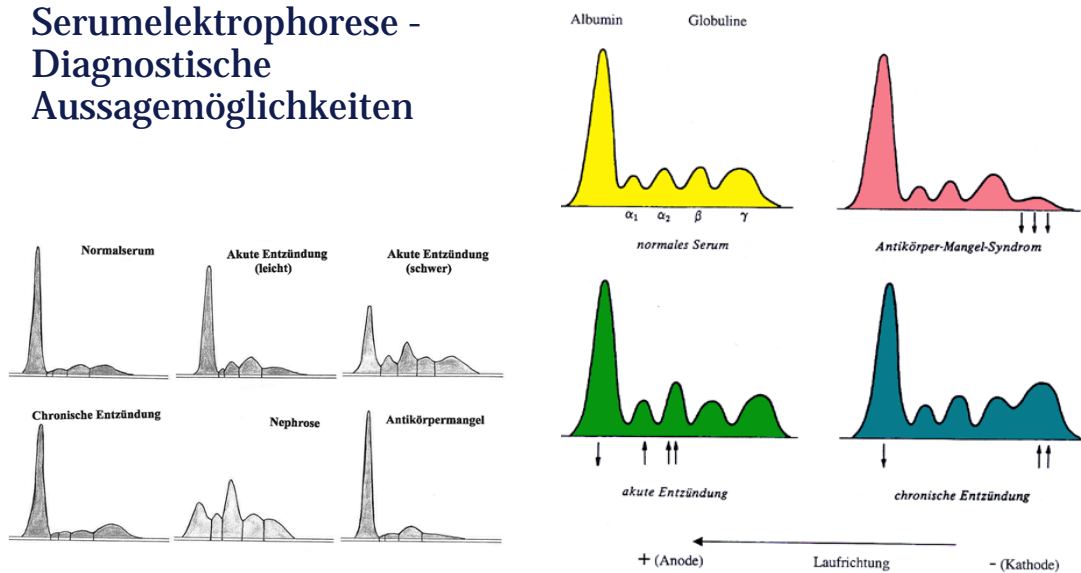
Auswertung - Gelfiltration



Dextranblau: Fraktion 3-4 (6)

Methylrot: Fraktionen 10-15 (17)

Serumelektrophorese - Diagnostische Aussagemöglichkeiten

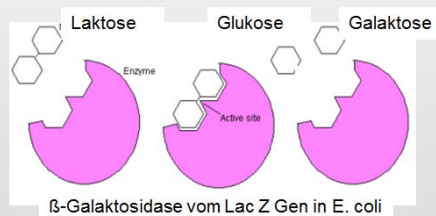
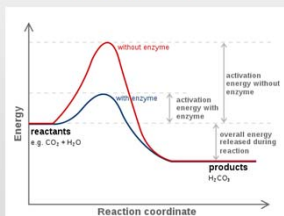
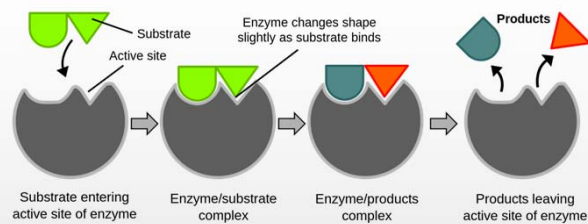


Praktikum 2:

Kinetische Untersuchung der **Lactatdehydrogenase**

- 1) Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante
- 2) Bestimmung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (= Enzymmenge)

Enzymatische Reaktionen



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})

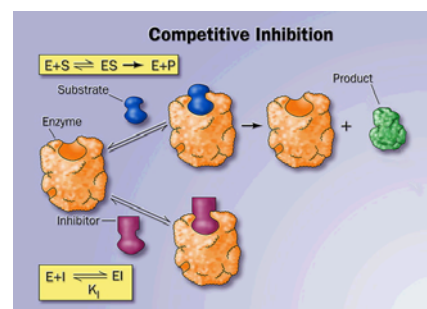
Anmerkung:

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.

Abhängigkeit der Enzymaktivität

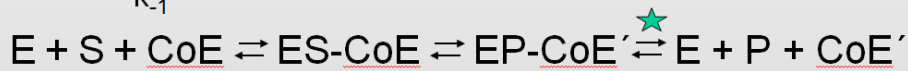
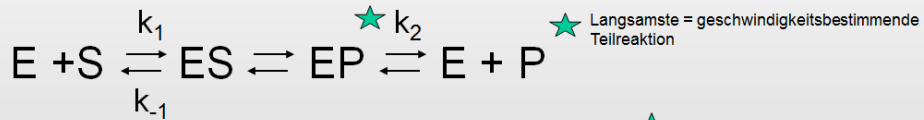
- pH-Wert
(Optimum, aber auch Denaturierung)
- Temperatur
(Optimum, aber auch Denaturierung)
- Hemmstoffe
(in der Medizin: Medikamente!)
 - kompetitive (erhöhen den K_m Wert)
 - nicht-kompetitive (erniedrigen Umsatzgeschwindigkeit)



Enzymatische Methoden

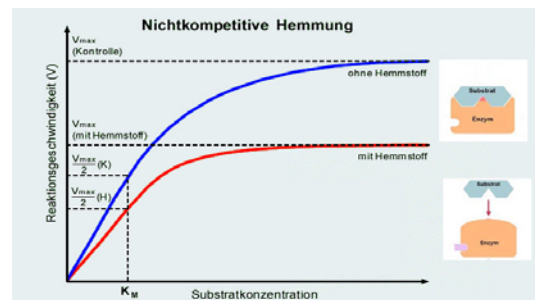
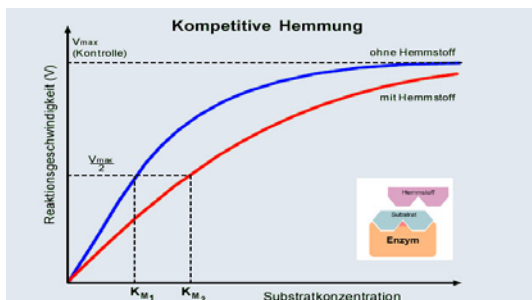
Enzymatische Reaktionen

- 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

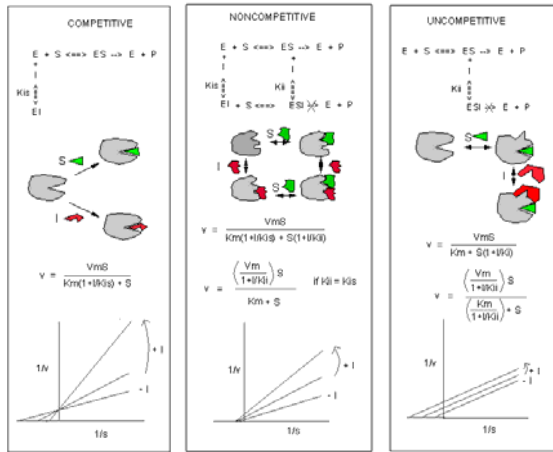


Unkompetitive Hemmung

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 Teilen des Enzyms
- 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

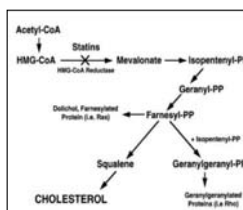
*(E + S ⇌ ES Gleichgew. nach rechts verlagert, daher K_m app niedriger)

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“

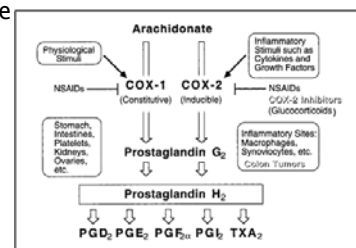


• nicht-kompetitive Hemmung

COX- Inhibitoren: z.B. Aspirin, Paracetamol, Diclofenac

• Cyclooxygenase 1/ 2 (COX-1/2)

- Entzündungsmediatoren
- Prostaglandine
- Leukotriene



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. →

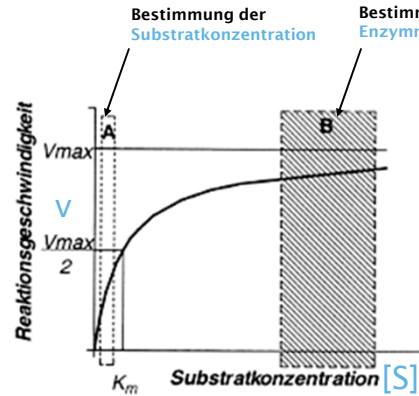
Physiologische Bedeutung der Michaeliskonstante

- 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

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

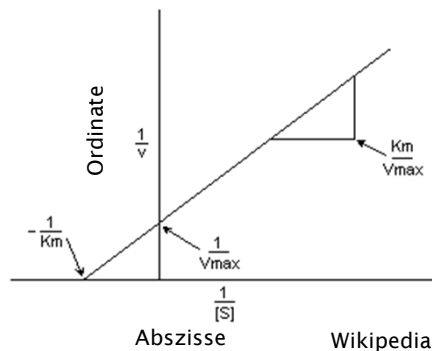
es gilt bei $v_{\max}/2$: $[E] = [ES]$

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

Lineweaver-Burk Diagramm

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

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

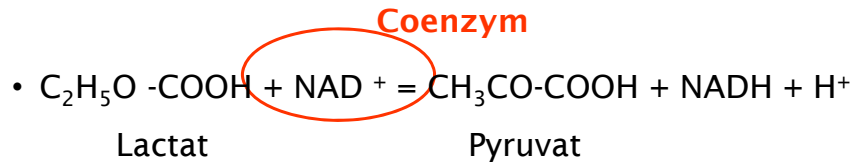


Durch Umformung der Michaelis-Menten Gleichung in eine doppelt-reziproke Form kann die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion in einem **Lineweaver-Burk Diagramm** dargestellt werden.

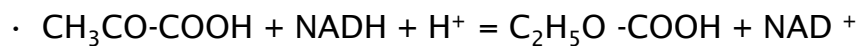
$$k = (1/v_{\max}) / (1/K_m)$$

k wie e , eine Material-spezifische Konstante

Was macht die Lactatdehydrogenase?



Praktische Messung:

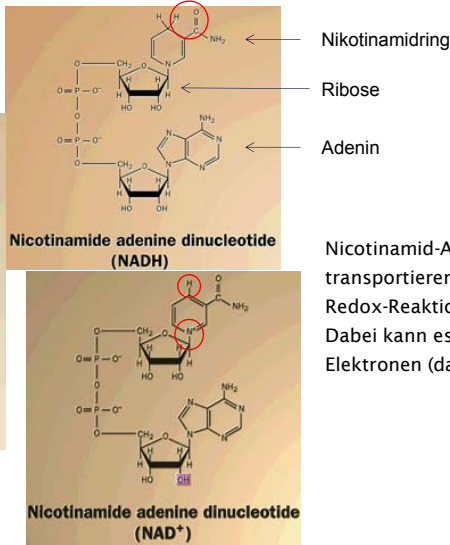
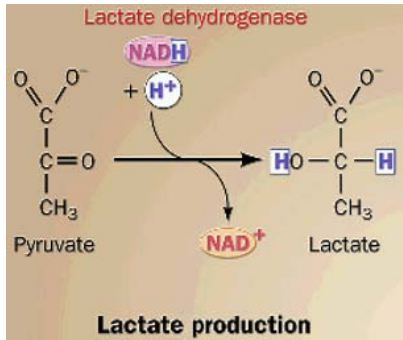


Gleichgewicht auf seiten des Lactats $\frac{[\text{Pyr}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{Lact}] \cdot [\text{NAD}^+]} = 2,7 \cdot 10^{-12}$

Rolle der LDH im Intermediärstoffwechsel

- Endprodukt der Glykolyse: Pyruvat, NADH
 - Pyruvat kann bei O₂ Mangel (oder in Zellen ohne Mitochondrien) nicht zu Acetyl-CoA, und über Zitratzyklus + Atmungskette zu CO₂ + H₂O, oxidiert werden.
- Über die anaerobe Glykolyse wird NAD⁺ regeneriert und als Produkt entsteht Lactat, welches z.B. in der Leber oder im Herzmuskel verwertet wird (vgl. Cori-Zyklus).

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

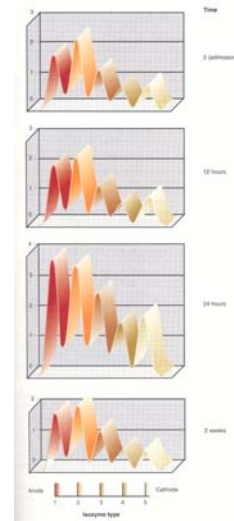
LDH Isoenzyme nach Herzinfarkt:

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):

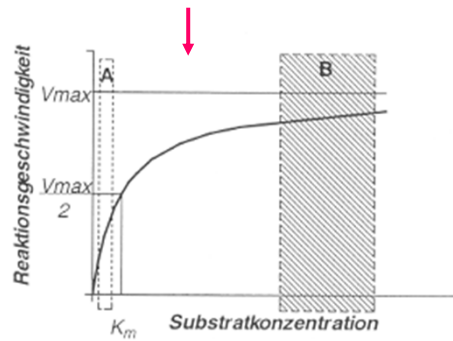
niedrig in Skelettmuskel (LDH5)

hoch im Herzmuskel oder im embryonalen Gewebe (LDH1)



Beispiel 1: Bestimmung der K_m der LDH:

Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten von 6 verschiedenen Substratkonzentrationen



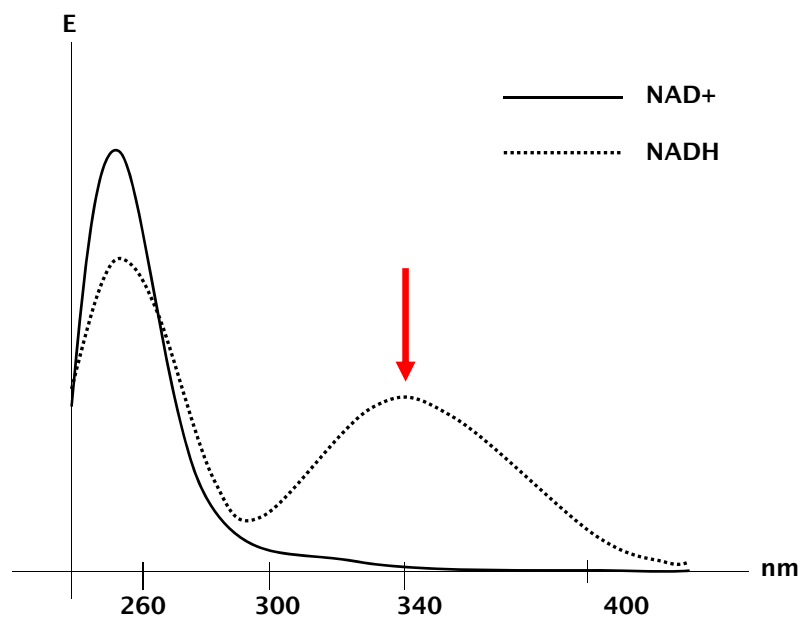
$$K_m = [S] \text{ bei } V_{\max}/2$$

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

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

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

Absorptions-
maximum -
NADH

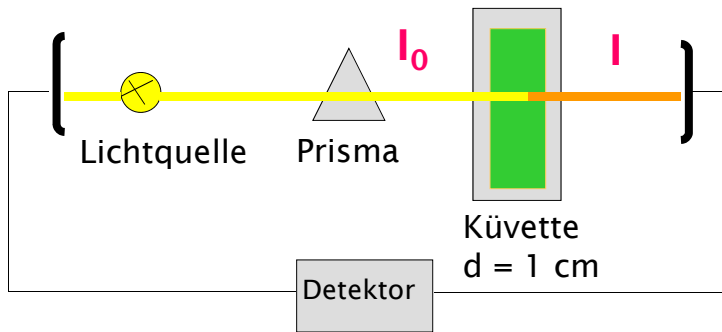


Photometer

Transmission
Extinktion

$$T = I/I_0$$

$$E = -\log T = \log 1/T$$



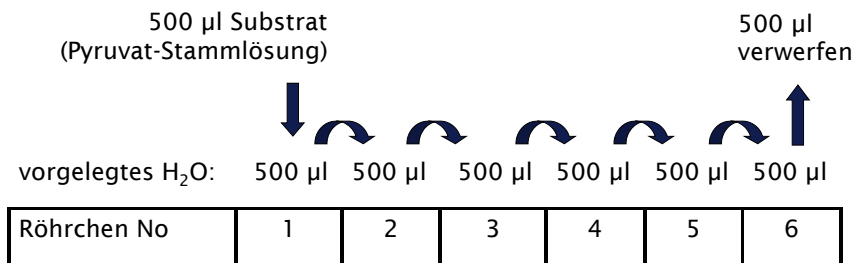
$$E = \epsilon \times c \times d$$

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:

500 µl Substrat
(Pyruvat-Stammlösung)

500 µl
verwerfen



vorgelegtes H₂O 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

Arbeitsplatz



Photometer

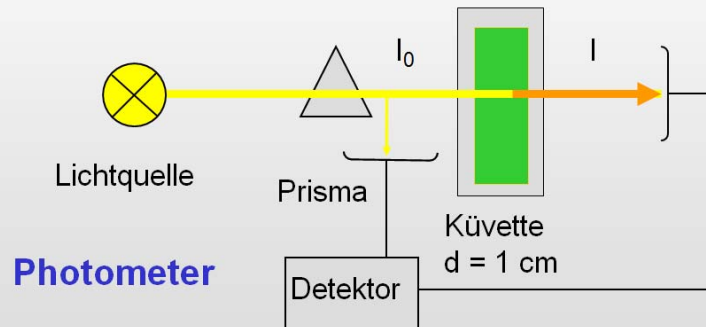


Lambert-Beersches Gesetz

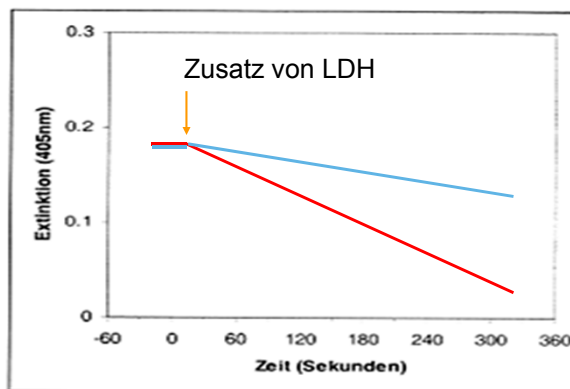
$$E = \varepsilon \times c \times d$$

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

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



Messung der Lactatdehydrogenaseaktivität



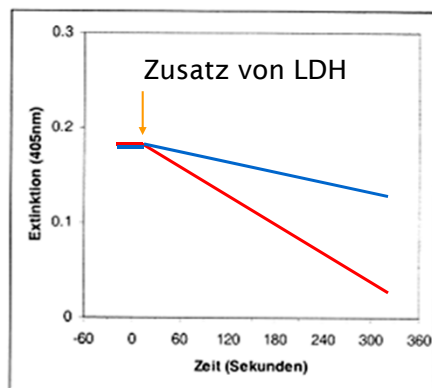
niedrige Pyruvatkonzentration

hohe Pyruvatkonzentration

modifiziert nach „Ergänzung“, H. Goldenberg

$k = v$ für gegebene [S]

Messung der LDH



niedrige Pyruvatkonzentration

hohe Pyruvatkonzentration

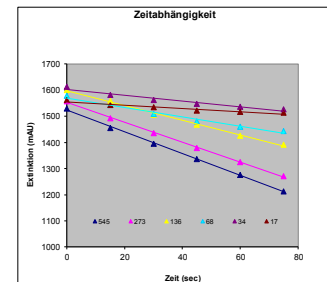
modifiziert nach
„Ergänzung“,
H. Goldenberg

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

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

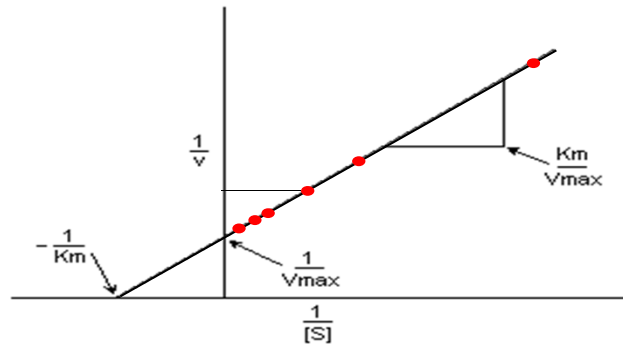
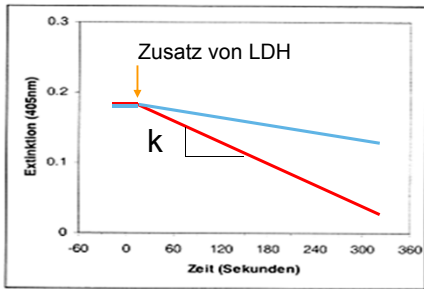
$$E = \epsilon \times c \times d$$

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

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

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)

7-Nr.17 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: Extinktionwerte bitte in mAU eingeben (z.B. 1,360AU entspricht 1360 mAU)
mAU (mit absorbance units) in gelb unterlegten Feldern eingeben

Röhrchen #	1	2	3	4	5	6
sec	545	272,5	136,25	68	34	17
Ext.	1201	1120	1020	1003	1020	1110
15	1176	1120	1110	1104	1101	1110
30	1151	1120	1100	1100	1100	1100
45	1130	1120	1100	1100	1100	1100
60	1106	1100	1100	1100	1100	1100
75	1080	1072	1087	1119	1140	1147

Pyruvatkonzentration (µmol/l)

sec	1	2	3	4	5	6
0	545	272,5	136	68	34	17
15	1176	1168	1178	1181	1187	1170
30	1151	1148	1162	1164	1175	1164
45	1130	1120	1140	1149	1166	1168
60	1106	1100	1109	1136	1157	1151
75	1080	1072	1087	1119	1140	1147

Steigung (ΔmAU/sec)

1	-1,587	-1,596	-1,512	-1,086	-0,695	-0,444
2	1,587	1,596	1,512	1,086	0,695	0,444

[S] (µmol/l)

1	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125
2	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125

v (ΔExt/Δt) (sec)

1	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125
2	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125

1/ΔExt/Δt (sec)

1	0,00173	0,0024	0,0074	0,0146	0,0298	0,0597
2	0,00173	0,0024	0,0074	0,0146	0,0298	0,0597

1/ΔExt/Δt (min)

1	0,00087	0,00098	0,01198	0,01970	0,02977	0,03979
2	0,00087	0,00098	0,01198	0,01970	0,02977	0,03979

Ans Lineweaver-Burk-Diagramm

Zeitabhängigkeit

Lineweaver-Burk Plot

Anpassung einer Hyperbel an die Datenpunkte in nichtlinearisierter Darstellung

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

VORSICHT: Falls die Werte nicht konvergieren, die Option "Help" (Minimierung der Fehlerquadrate) auswählen !!!

Nichtlineare Kurvenanpassung

variable Zellen	1	2	3	4	5	6
[S] (µmol/l)	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,03125
v (ΔExt/Δt) (sec)	1	1	1	1	1	1

Fehlerquadratsumme

1	1	1	1	1	1	1
---	---	---	---	---	---	---

Zelle für Solver

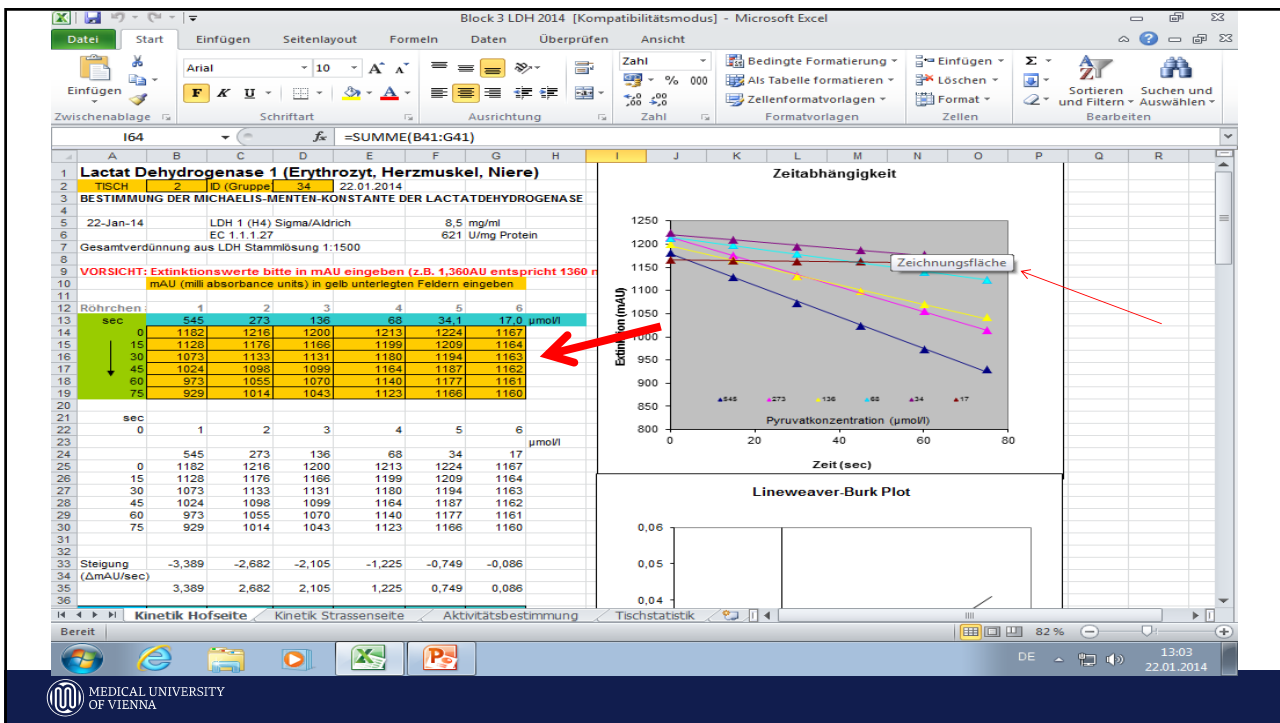
gemessen

Vmax =	0,48	U/l
Km =	6,83	U/l

Nichtlineare Kurvenanpassung aus Lineweaver-Burk-Diagramm

Michaelis-Menten Kinetik der LDH-1

Was tun, wenn einzelne Messwerte falsch sind?



Block 3 LDH 2014 [Kompatibilitätsmodus] - Microsoft Excel

Formelzeile: =SUMME(B41:G41)

	A	B	C	D	E	F	G	H
19	75	929	1014	1043	1123	1168	1160	
20								
21	sec	1	2	3	4	5	6	
22								
23								
24		545	273	136	68	34	17	µmol/l
25	0	1182	1216	1200	1213	1224	1167	
26	15	1128	1176	1166	1199	1209	1164	
27	30	1073	1133	1131	1180	1194	1163	
28	45	1024	1098	1099	1164	1187	1162	
29	60	973	1055	1070	1140	1177	1161	
30	75	929	1014	1043	1123	1166	1160	
31								
32								
33	Steigung	-3,389	-2,682	-2,105	-1,225	-0,749	-0,086	
34	(ΔmAU/sec)							
35		3,389	2,682	2,105	1,225	0,749	0,086	
36								
37	[S] (µmol/l)	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,0313	0
38	v (ΔE/min)	203	161	126	73	45	5	0
39		200	165	122	74	38	17	0
40								
41		14	57	15	0	53	147	
42		14	57	15	0	53	147	
43								
44								
45	LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMM							
46	[S] (µmol/l)	545	272,5	136,25	68,125	34,0625	17,0313	
47	1/[S]	0,00183	0,00367	0,00734	0,0146789	0,02936	0,05872	-0,0059
48	1/v	0,00492	0,006214	0,00792	0,0136081	0,02226	0,19444	
49	1/delta E/min	0,00492	0,006085	0,00842	0,0130847	0,02242	0,04108	3,1E-08
50								
51								
52								
53								
54								

Lineweaver-Burk Plot: 1/v vs 1/[S]. A red dot labeled 'Rörschen 6' is highlighted with a red arrow.

Km: 169 µmol/l

... Pipettierfehler oder Messfehler ?

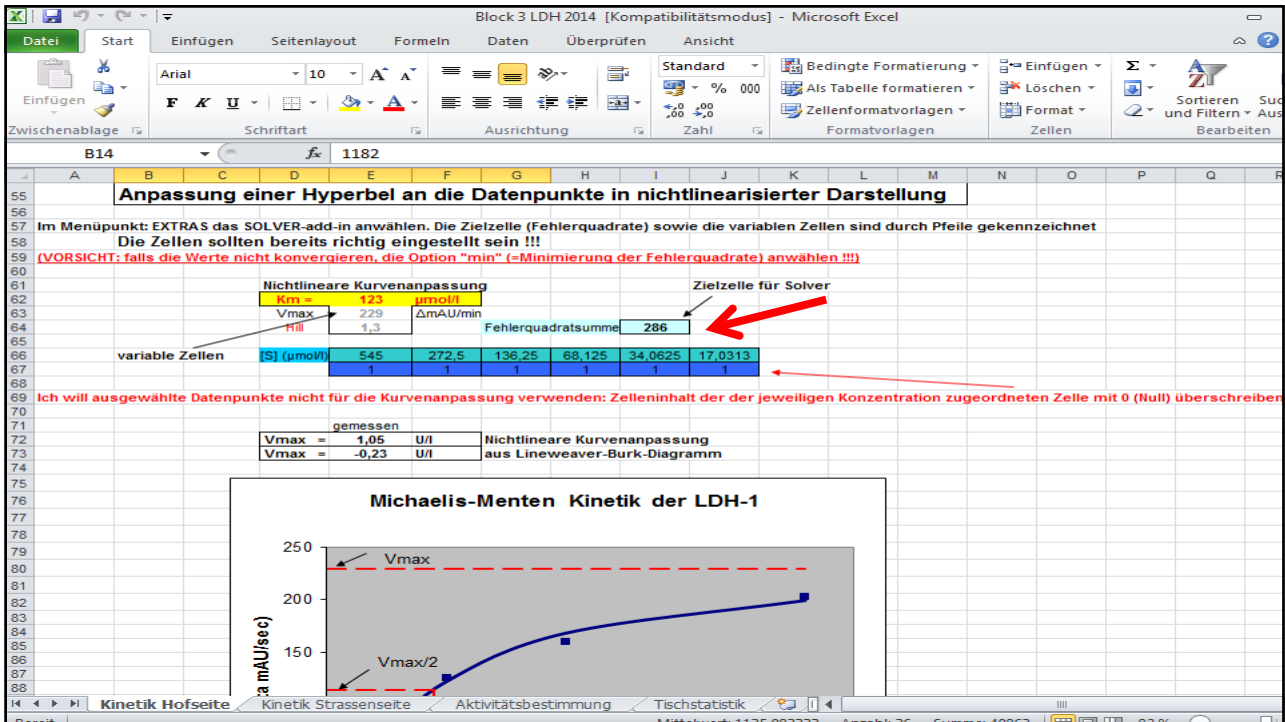
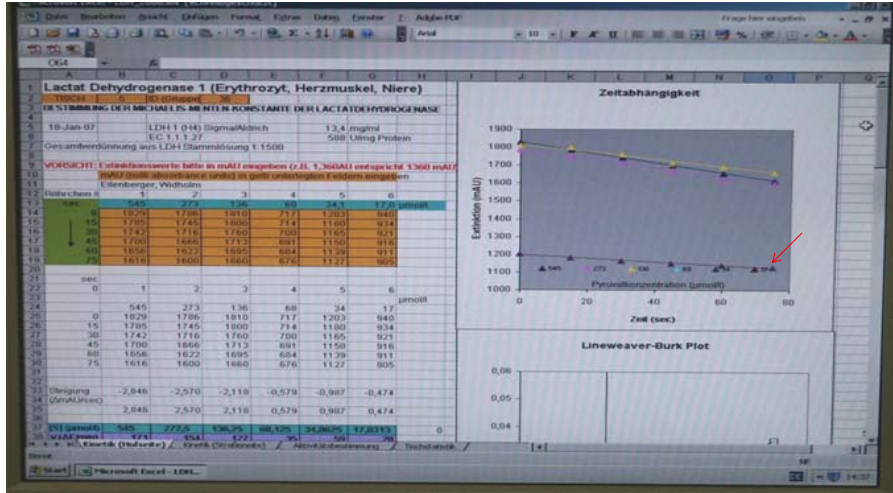
Lineweaver-Burk Plot

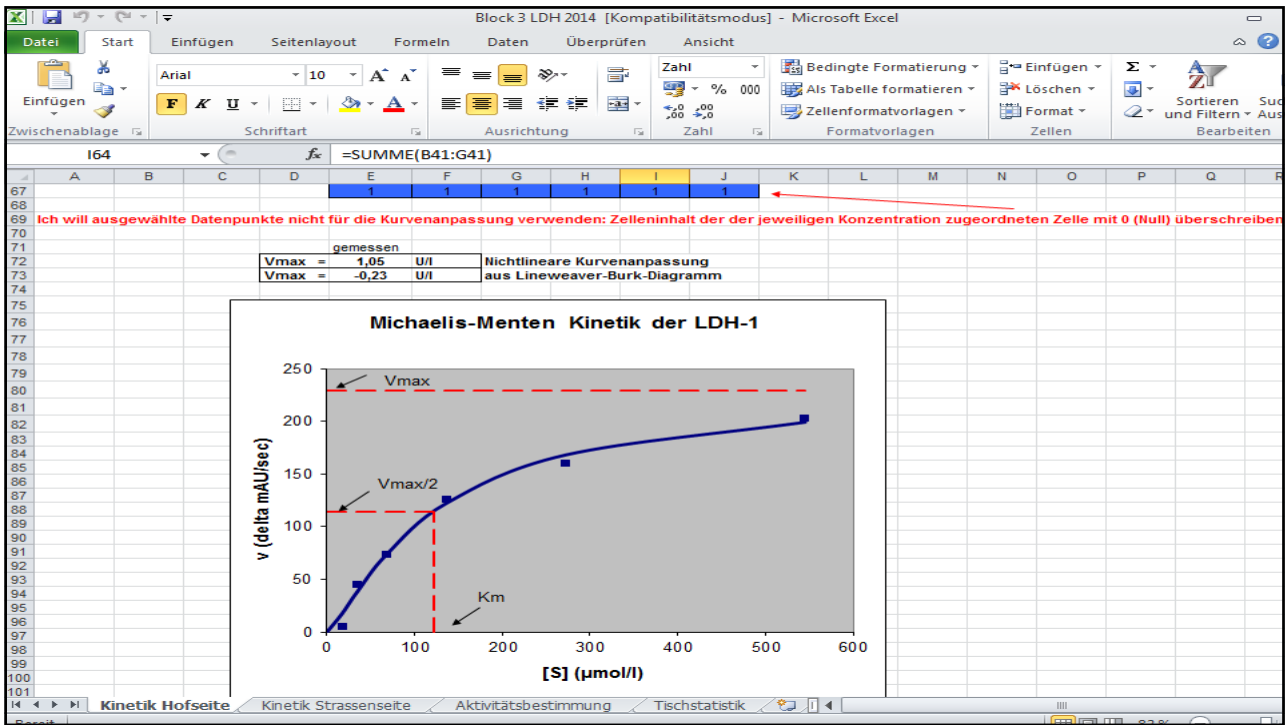
1/v vs 1/[S]

Ein Datenpunkt ist als Quadrat markiert und mit einem roten Kreis hervorgehoben.

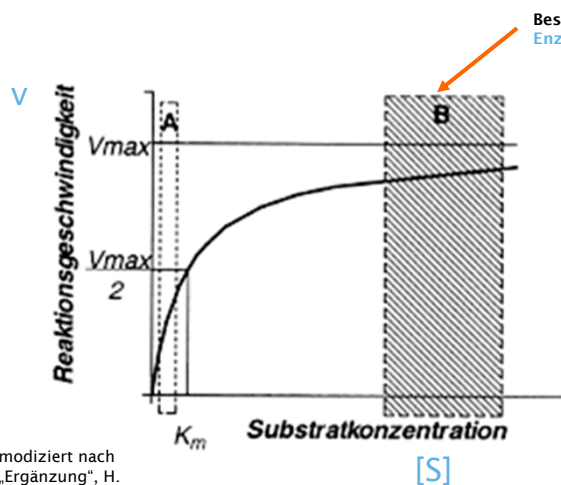
nicht alles muss immer stimmen ...

... 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 Routinebestimmung daher:
- Messung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit
- Substratkonz. 20 x K_m , Enzym zu 95% gesättigt
- v hängt nur von der Menge des Enzyms ab

modifiziert nach „Ergänzung“, H. Goldenberg

Messung der LDH-Aktivität

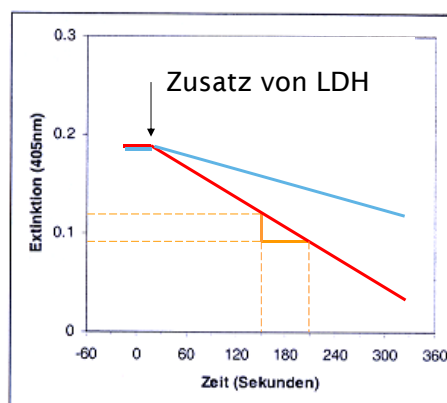
Röhrchen Nr	1	2	3
LDH-Lösung	0,725 U/l	1,45 U/l	2,9 U/l
Phosphatpuffer	500	500	500
Pyruvatstammlsg.	1000	1000	1000
NADH	500	500	500

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

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

wenig Enzym

Einheit: 1 U = 1 µmol/min (Umsatz)

(spezifische Aktivität: U/µg Protein)

viel Enzym

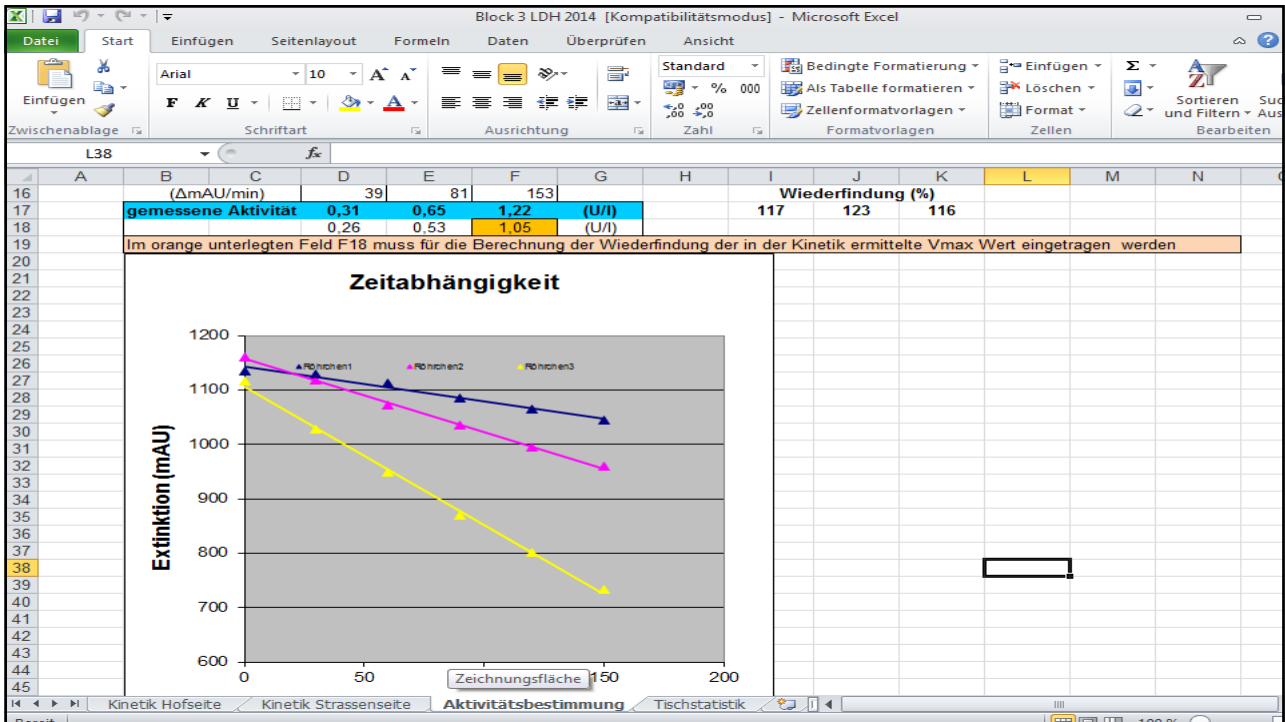
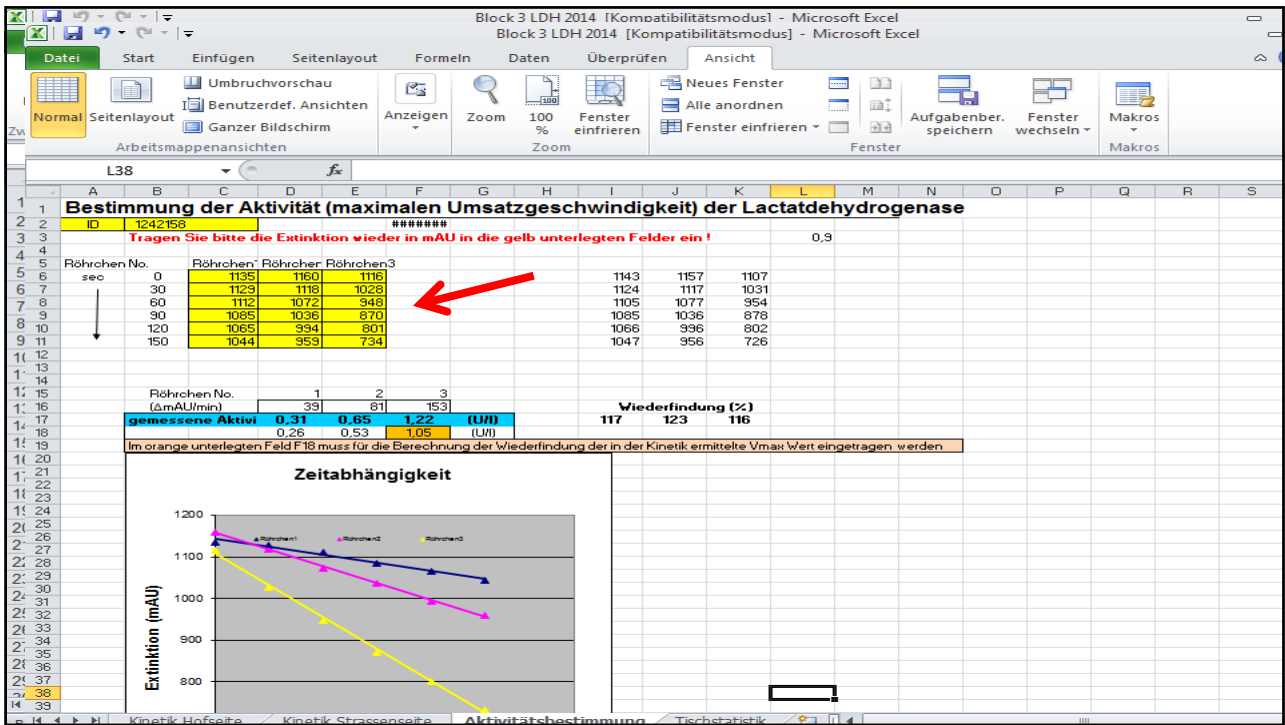
SI: 1 katal = 1 mol/sec

modifiziert nach
„Ergänzung“, H.
Goldenberg

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

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

Es werden praktisch ausschließlich U verwendet



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 Werteblock (rotkis unterlegt)

Mittelwert, Standardabweichung und VK ändern sich automatisch

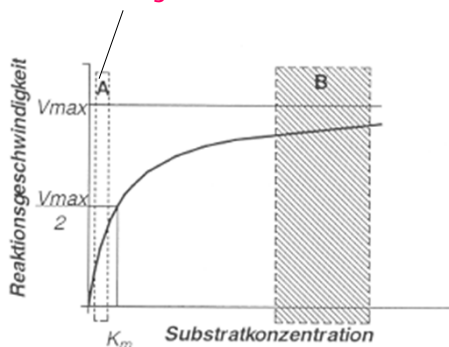
Matrikelnummer	nichtbereinigtes Kollektiv			bereinigtes Kollektiv		
	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L
1	0.14	0.38	0.73	0.14	0.38	0.73
2	0.24	0.33	0.70	0.24	0.33	0.70
3	0.22	0.45	0.33	0.22	0.45	0.33
4	0.15	0.36	0.73	0.15	0.36	0.73
5	0.17	0.13	0.36	0.17	0.13	0.36
6	0.18	0.13	0.34	0.18	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

Tischmittelwert	0.20	0.43	0.93	0.20	0.43	0.93	LDH
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

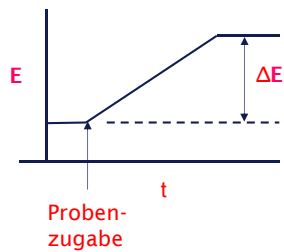


- Blutglucosebestimmung
- Lactatbestimmung
- Cholesterinbestimmung
- Alkoholbestimmung mittels Alkoholdehydrogenase
- Bestimmung via Teststreifen

Alkoholbestimmung mittels Alkoholdehydrogenase



+ Semicarbazid ↓



- 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 1,
Währingerstraße 10 1. Stock, rechts statt.

Gruppe 26 Mittwoch 23.1. 12:30

Gruppe 30 Mittwoch 23.1. 16:00