

Biochemie-Praktikum

Versuch 5: Hormone

Nicolai Mayer, Andreas Zörner, Alexander Widerhöft, Marco Haag und Daniel Mayer

Versuch:

Dünnschichtchromatographische Analyse unterschiedlicher Organextrakte sowie eines Nebennierenrindenextraktes eines Tieres mit genetisch bedingten Defekten im Steroidstoffwechsel.

a. Dünnschichtchromatische Auftrennung von Organextrakten

Methodik und Arbeitsvorschrift

Die vorgereinigten Organextrakte aus **Nebennieren, Hoden** und **Ovarien** des Kaninchens werden dünnstschichtchromatographisch aufgetrennt und die organspezifischen **Metabolitenmuster** durch authentische **Referenzsubstanzen** identifiziert.

Die **Kieselgelplatten** werden an den Ränden mit einem weichen Bleistift markiert: die Startlinie 1,5 cm vom unteren Plattenrand und die Frontlinie 18cm über der Startlinie.

Mit einer **Kapillare** werden die **Organextrakte**, wie im Auftragschema angegeben, **punktförmig** aufgetragen.

Zum Vergleich werden:

- Cholesterin (1)
- Pregnenolon (2)
- 17 α -Hydroxy-Progesteron (3)
- 11-Desoxycortisol (4)
- Cortisol (5)
- 17 α -Hydroxypregnenolon (6)
- Androstendion (7)
- Östradiol (8)
- Testosteron (9)
- Progesteron (10)
- 11-Desoxycorticosteron (11)
- Corticosteron (12)

- Aldosteron (13) als Referenzsubstanzen in gleicher Höhe wie die Organextrakte, aber in einem Abstand von ca. 1cm, punktförmig auf die Dünnschichtplatte aufgebracht.

Der **Auftragspunkt** soll möglichst **klein** gehalten werden.

Als Sorptionsmittel für die Dünnschichtchromatographie von Steroidhormonen dient Kieselgel.

Das Laufmittel soll nicht höher als 1 cm in der Trennkammer stehen.

Das **Chromatographiegefäß** ist stets **geschlossen** zu halten.

Für die kieselgelbeschichteten Glasplatten wird als **Laufmittel** Cyclohexan/Essigester (1:1) verwendet.

Anschließend werden die Dünnschichtplatten in eine **Trennkammer** gestellt und die **Kammer** verschlossen.

Wenn das Laufmittel (mobile Phase) die **Frontlinie** erreicht hat, werden die **Platten** der **Kammer entnommen** und **getrocknet**.

Anschließend werden die Dünnschichtplatten ein zweites Mal im gleichen Laufmittel entwickelt.

b. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Extrakten aus Nebennierenrinden mit Enzymdefekten.

Die vorgereinigten Extrakte (Ether-Chloroform-Extraktion) aus **Nebennierenrinden** von Tieren mit typischen **Steroidenzymdefekten** werden dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und die **Metabolitenmuster** bei **Enzymdefekt** mit den **Metabolitenmustern** aus normalen **Nebennierenrinden** verglichen.

Die **Identifizierung** der **Steroide** erfolgt durch Betrachtung im auffallenden UV-Licht (Löscheffekte auf der Dünnschichtplatte durch UV-aktive Steroide) bzw. durch Ansprühen der Platte mit **ethanolischer Schwefelsäure** (die Schicht muss **gleichförmig feucht** sein).

Anschließend werden die Platten im Trockenschrank bei **100° erhitzt**.

Danach erscheinen die Östrogene, die Androgene und die Corticoide als farbige Flecken.

Tragen Sie die gefundenen Steroidhormone des jeweiligen Organextraktes in das nachfolgende Steroidhormon-Schema durch Schraffierung des jeweiligen Kästchens ein und stellen Sie eine Organdiagnose.

Auswertung:

3.1 Dünnschichtchromatographische Analyse unterschiedlicher Organextrakte

Extrakte:

- I, gesunde Nebennierenrinde → Hormonzusammensetzung
- II + III: Ovar/Hoden → bestimmen
- IV kranke Nebennierenrinde → Identifikation eines Enzymsdefektes

Referenzsubstanzen: 1-13: Reihenfolge sh. Vorne

Ergebnis:

I. Hormonzusammensetzung:

- a. Cortisol
- b. 11-Desoxycortisol
- c. Testosterol
- d. 14α -Hydroxyprogesterol
- e. Androstendion
- f. Östradiol
- g. Cholesterin

II. Hoden: Testesteron sehr hoch
Östradiol sehr niedrig

III. Ovar: siehe oben (umgedreht)

IV. Fehlende Hormone:

- a. Cortisol
- b. 11-Desoxycortisol
- c. Aldosteron
- d. Corticosteron
- e. 11-Desoxycorticosteron

-> 21β -Hydroxylase ist defekt.

Allgemeines zur Dünnschichtchromatographie

Diese Methode wird vorwiegend für **analytische Zwecke** verwendet. Die stationäre Phase ist **in sehr dünner Schicht auf eine stabile Unterlage** gleichmäßig aufgetragen. Die zu untersuchende Probe wird etwa 2cm vom unteren Rand entfernt **strich-** oder **punktförmig** (z.B. mit einer Kapillarpipette) aufgetragen, ohne die Schicht der stationären Phase zu verletzen. Die Platte stellt man dann in eine **Chromatographiekammer**, die ca. 1cm hoch mit der mobilen Phase gefüllt ist.

Kapillarkräfte bewirken nun ein **Aufsteigen** des **Lösungsmittels**, das beim **Passieren** der **Auftragsstelle** die aufgetragene Substanz je nach ihrer Löslichkeit bzw. Affinität zur stationären Phase mehr oder weniger weit mitnimmt. Die **Wanderungsstrecke** der **Substanzen** auf **Dünnschichtchromatogrammen** wird charakterisiert durch den sogenannten **Rf-Wert (Rf=retention factor)**.

Der **Rf-Wert** ist der **Quotient aus der Wanderungsstrecke des Fließmittels der aufgetragenen Substanz und der Wanderungsstrecke des Fließmittels**.

Abgesehen vom Rf-Wert können auch Testsubstanzen, die man im gleichen Chromatogramm mitlaufen lässt, zu **Identifizierung** bzw. **Charakterisierung unbekannter Substanzen** dienen. Werden ungefärbte Substanzen chromatographiert, so muss man nach Beendigung des Experiments zur Erkennung des Ergebnisse sichtbar machen, z.B. durch Besprühen der Chromatogramme mit Reagenzien die mit den getrennten Substanzen einen Farbstoff bilden, organische Verbindungen kann man auch durch Verkohlung mit konzentrierter Schwefelsäure sichtbar machen, aromatische Verbindungen fluoreszieren bei Betrachtung im UV-Licht.

Zur **besseren Auftrennung von Substanzen** kann die **Dünnschichtchromatographie** auch **2-D** durchgeführt werden. Das zutrennende Substanzgemisch wird hierzu **punktförmig** in einer Ecke (Abstand von beiden Rändern ca. 2m) aufgetragen. Man entwickelt das Chromatogramm in einer Richtung, lässt die **Phase trocknen** und stellt sie dann, um **90° gedreht**, in ein **zweites Lösungsmittel**.

Versuch:

Analyse der genomischen Wirkung von Glucocortikoiden

Methodik und Arbeitsvorschrift:

Zur Untersuchung der steroidabhängigen Genexpression verwenden wir als Reporter gen Luziferase.

Als Promotor dient uns der MMTV- Promotor, der stark durch Glucocorticoide und Progesteron aktiviert wird.

Verwendete Substanzen:

- Dexamethason (GR- Agonist) 1 μ M
- Dexamethason 1 μ M mit 1 μ M Mifepriston (GR- Antagonist)

Unterschiedliche Inkubationszeiten: jeweils 1 h, 8 h, 24 h

Danach wurde das Proteinextrakt aus der Zellsuspension gewonnen und die Proteinkonzentration anhand der davor ermittelten Eichkurve abgelesen.

Die **Luziferaseaktivität** wurde dann mit Hilfe der gemessenen **Luziferase- Units** und der **Proteinkonzentration** berechnet.

Schlussfolgerungen :

- **Das Dexamethason fördert die Luziferaseaktivität**
- **Je länger die Inkubationszeit von Dexamethason, desto höher die Luziferaseaktivität**
- **Mifepriston hemmt die Luziferaseaktivität.**

Wie genau die Hemmung von Mifepriston mit der Inkubationszeit zusammen hängt konnten wir auf Grund von Unstimmigkeiten bei unseren Messergebnissen nicht ermitteln. Vermutlich sind Fehler bei der Zusammenstellung der einzelnen Proben oder Fehler bei der Messung der Grund dafür gewesen.