

In diesem Versuch untersuchen wir den Glykogengehalt und die Umsetzungsaktivität des Enzyms Glucose – 6 – Phosphat – Dehydrogenase an der Leber einer Ratte. Diese beiden Versuche wenden wir auf eine Hungerleber und eine „normale“ Leber an. Ziel des Versuches ist es die Unterschiede herauszuarbeiten und anhand der theoretischen Grundlagen zu interpretieren

Bestimmung der Glucose – 6 – Phosphat – Dehydrogenase – Aktivität über die Bildungsgeschwindigkeit von NADPH, welche ein Maß für die Enzymaktivität ist.

Für unseren Versuch benötigen wir zwei Leberproben von zwei verschiedenen Versuchstieren, die in einem Zeitraum von 48 Stunden unterschiedlichen Ernährungssituationen ausgesetzt wurden.

Ratte 1 wurde 48 Stunden nüchtern gehalten → Ihre Leber dient uns als Hungerleber H

Ratte 2 wurde normal gefüttert → Ihre Leber sehen wir als normal an N

Zur Enzympräparation werden die Leberproben mit 5 ml Extinktionspuffer versetzt. Dieser beinhaltet eine physiologische NaCl/EDTA Lösung.

Die Zugabe dieser Lösung ist von besonderer Bedeutung:

Zur Enzymerhaltung ist EDTA in der Lage mit freiem Mg^{2+} einen Komplex zu bilden und dieses somit aus dem Verkehr zu ziehen. Freies Mg^{2+} würde auf bestimmte Proteasen als Coenzym wirken, diese somit aktivieren und unser Enzym zerstören.

9 g NaCl wird in 1000 ml Lösung gegeben, wodurch verhältnismäßig physiologische Kochsalzlösung entsteht. Diese liefert die benötigte Ionenstärke, die Enzyme zur optimalen Aktivität fordern.

Unser eigentlicher Einsatz beginnt mit dem Abpipettieren folgender Lösung in je 2 Küvetten einer Hunger – und einer normalen Leber.

In jede Küvette wird gegeben:

- 100 ml Probenlösung aus unserer Enzympräparation
- 2,5 ml Reaktionspuffer → Dieser besteht aus Triäthanolamin und HCl und soll den pH – Wert während des Versuches möglichst konstant (bei pH 7,5) halten.
- 50 μ l $NADP^+$ - Lösung → sie ist der Reduktionspartner für unsere Redoxreaktion:



Die Küvetten werden einige Minuten gelagert um sie auf Raumtemperatur zu bringen. Dies ist wichtig, damit die gesamte Reaktion bei konstanter Temperatur abläuft und somit alle Reaktionen unter ähnlichen Bedingungen ablaufen können und eventuellen Fehlerquellen von Seiten der Temperatur entgegengewirkt wird. Aus den selben Gründen wird das Photometer auf 366 nm konstant gehalten.

Nun beginnt die Extinktionsmessung am Photometer:

Vor jeder Messung wird mit der Grundmischung (Reaktionslösung) das Photometer auf 0 geeicht.

Zur Reaktionslösung wird nun 50µl unseres Enzyms G – 6 – P – Lösung gegeben und nach gutem Durchmischen in das Photometer gestellt. In 30 Sekunden Abständen wird 5 Minuten lang gemessen.

Die Extinktion gibt uns Aufschluss über die Aktivität unseres Enzyms.

Folgende Ergebnisse haben wir Ermittelt:

Zeit (s)	Extinktion bei 366 nm für			
	H1	H2	N1	N2
Start 0	0	0	0,005	0,02
30	0	0,01	0,01	0,02
60	0	0,015	0,02	0,021
90	0	0,02	0,025	0,023
120	0,005	0,025	0,03	0,023
150	0,005	0,03	0,035	0,023
180	0,005	0,03	0,044	0,023
210	0,005	0,035	0,0475	0,023
240	0,005	0,04	0,05	0,023
270	0,005	0,042	0,055	0,023
300	0,005	0,045	0,055	0,023

Weder aus den Werten der Hungerleber, noch aus den Werten der Normalleber ist eine deutliche Extinktionsänderung ersichtlich. Dies lässt darauf schließen, dass die Glucose – 6 – Phosphat – Dehydrogenase in unserem Versuch keine nennenswerte Aktivität aufweist.

Gründe hierfür könnten sein:

1. Die NADP⁺ - Lösung könnte in zu niedriger Konzentration zugegeben worden sein, wodurch der G – 6 – P – Dehydrogenase das nötige Reduktionsäquivalent zur

Umsetzung von Glucose – 6 – Phosphat fehlt. Somit kann die G – 6 – P – Dehydrogenase nur eine minimale Aktivität aufweisen.

- Die Enzymaktivität der G – 6 – P – Dehydrogenase könnte dadurch eingeschränkt sein, dass die vorbereitete Enzympräparation bereits zu lange gelagert wurde. Im Allgemeinen besitzen Enzyme nur eine Lebensdauer von nur wenigen Stunden
- Weitere Fehler könnten bei der Vorpräparation der verschiedenen Lösungen entstanden sein: Als Beispiel wäre hier wieder die NADP^+ Lösung zu nennen, die in falschem Puffer gelöst worden sein könnte und somit nicht funktionsfähig ist.

Um den Versuch auswerten zu können wurden uns Beispielwerte einer Normalleber gegeben:

Zeit (s)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
E (10^{-3})	0	150	270	380	485	560	640	710	780	850	870

Die Extinktion wird nun gegen die Zeit aufgetragen (Siehe Schaubild!). Zur weiteren Berechnung legen wir über unsere Werte eine Idealgerade. Aus dem Schaubild bestimmen wir anhand des Steigungsdreiecks $\Delta E/\text{min}..$

Gegeben:

Mittels des Lambert – Beerschen Gesetzes ermitteln wir zunächst die Konzentration der G – 6 – P – Dehydrogenase um danach auf deren Aktivität zu schließen:

Um von der Konzentration (mol/l) auf die Stoffmenge (mol) schließen zu können, muss mit dem Volumen $V = 0,1 \text{ ml}$ multipliziert werden.

Hierbei ist besonders der Verdünnungsfaktor zu achten:

1 g Leber wird in 5 ml Extraktionspuffer gelöst → davon nehmen wir $100 \mu\text{l} = 0,1 \text{ ml}$, als $\frac{1}{50}$

Der Verdünnungsfaktor beträgt 50.

Dies entspricht der spezifischen Aktivität der Glucose – 6 – Phosphat – Dehydrogenase. Die Bestimmung der Glucose – 6 – Phosphat – Aktivität bei der Hungerleber ist uns wegen nicht vorhandenen Werten nicht möglich.

Jedoch vermuten wir und wurde uns gesagt, dass die Glucose – 6 Phosphat – Aktivität bei der Hungerleber viel niedriger ist als bei der Normalleber.

Biochemisches Praktikum

Gruppe 10

Protokoll vom 07.06.2006, Versuch 8

Verfasst von: Janine Haupt, Michael Meß, Sarina Birkenmaier, Alfred Eirich

Bestimmung des Glycogengehaltes und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in der Leber von „Normal-“ und „Hunger-“ Tieren.

Teilversuch 1: Bestimmung des Glycogengehaltes.

Glycogen dient dem Organismus als Energiespeicher indem überschüssige Kohlenhydrate gespeichert werden, und bei Bedarf wieder abgegeben werden. Dieser Vorgang der Glycogen-Synthese und des Glycogen-Abbaus findet in der Leber statt.

Die Skelettmuskulatur ist ebenfalls in der Lage Glucose als Glycogen zu speichern, verbraucht dieses nach Abbau jedoch selbst.

Untersucht werden zwei Leberproben von jeweils einer normalen Ratte und einer hungernden Ratte (48 Std ohne Nahrung).

Wir beginnen mit der Freisetzung des Glycogens aus dem Lebergewebe. Dies geschieht durch Zugabe 30%iger KOH zur Leberprobe. Die Kalilauge bewirkt die Zersetzung der Zellmembranen (Esterbindungen der Phospholipide), Proteine (Peptidbindungen) und der Nucleinsäureketten (Phosphodiesterbindungen).

Nach anschließender Zentrifugation erhalten wir ein Pellet (Zelltrümmer) und einen Überstand, welcher neben Aminosäuren und Nucleotiden das zu bestimmende Glycogen enthalten sollte.

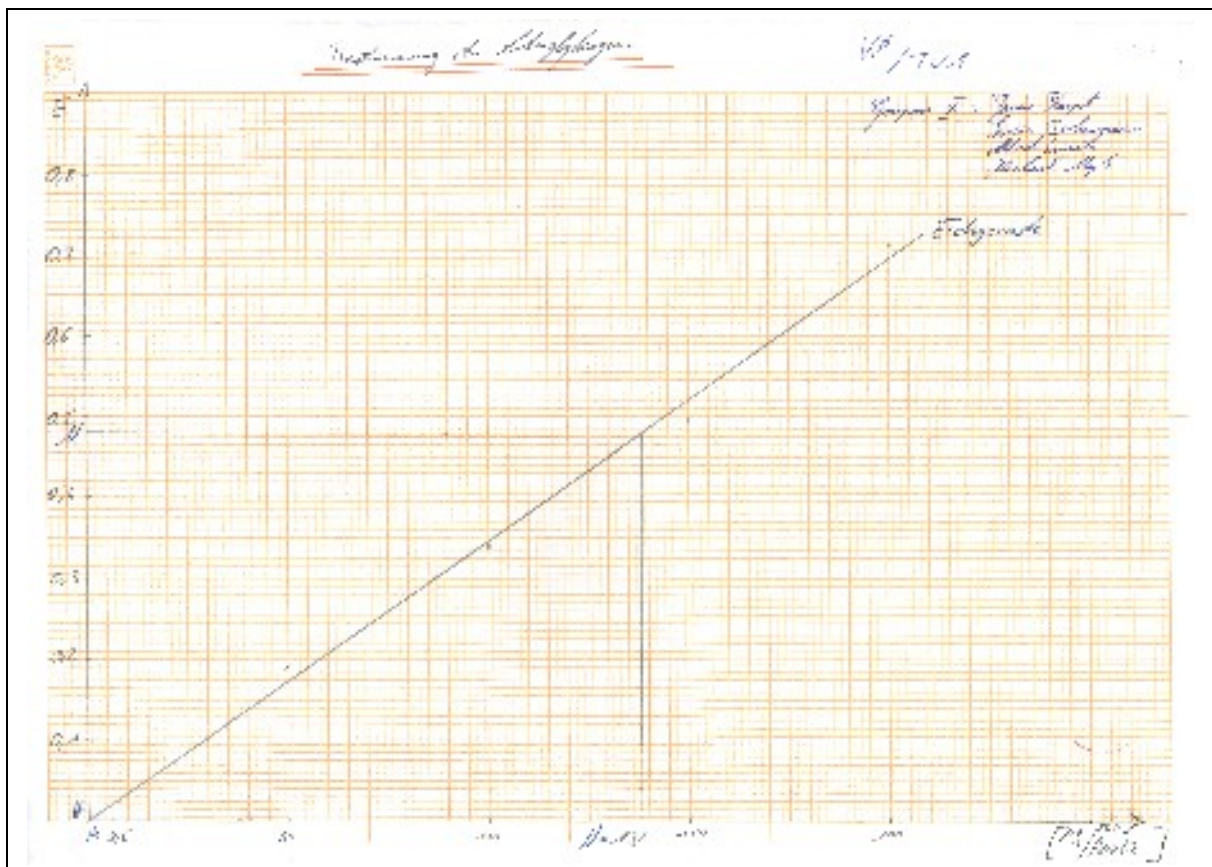
Dem Überstand wird nun Ethanol hinzugefügt, welches aufgrund seiner Apolarität das Glycogen ausfällen lässt.

Durch erneute Zentrifugation erhalten wir das Glycogenpellet, und resuspendieren dieses in dest. H₂O. Glycogen löst sich wieder.

Zugesetzte Schwefelsäure (H₂SO₄) spaltet die säureempfindlichen glycosidischen Bindungen und somit das Glycogen in dessen monomere Bestandteile = Glucose.

Bestimmung der Glycogenglucose über den Anthron-Komplex.

Da Anthron in schwefelsaurer Lösung mit Zuckern konzentrationsabhängig einen blau-grünen Farbkomplex bildet, kann es aufgrund seiner Absorption bei 578nm leicht im Photometer nachgewiesen werden. Weil die Farbtintensität proportional zur Glucosekonzentration ist, kann man durch Auftragen der Normal- und Hunger-Werte die jeweilige Glucose- bzw. Glycogenkonzentration der Leberproben bestimmen.



N = Normal-Tier = 137µg/Ansatz

H = Hunger-Tier = 2,5µg/Ansatz

Bei einem Verdünnungsfaktor 200 gilt:

137µg/Ansatz x 200 = 27,4mg Glucose/1g Leber.

2,5µg/Ansatz x 200 = 0,5mg Glucose/1g Leber

Trockengewichtanteil (TG):

1000mg = 700mg H₂O + 300mg TG

Normal: 27,4mg/300mg x 100 = 9,1% des TG.

Hunger: 0,5mg/300mg x 100 = 0,17% des TG.

Glycogen als universeller Energielieferant im Körper wird nach Nahrungsaufnahme im Muskel zwecks Eigenbedarfs gespeichert, während es in der Leber als universeller Energiespeicher angelegt wird, um den Blutzucker konstant zu halten.

Die meisten Organe können Fettsäuren als Energiesubstrate verwerten. Das ZNS, das Nierenmark und Erythrozyten sind jedoch auf Glucose angewiesen. Somit werden in Hungerzeiten die Glycogenspeicher der Leber abgebaut und die Glucose dem Organismus zur Verfügung gestellt.

Darauf basiert auch unser Versuch. Nachzuprüfen ob im Hungerzustand in der Leber vermehrt Glycogen gespeichert wird, oder ob das Gegenteil der Fall ist. Wie zu erwarten war, konnte in der „hunger-“ Leber kaum noch Glucose bzw. Glycogen nachgewiesen werden. Da dieses während der Hungerphase abgebaut und verstoffwechselt wurde.

Versuchsteil 2: Bestimmung der G-6-P-DH-Aktivität.

Im Rahmen des Pentosephosphatweges wird G-6-P, Produkt des Glycogenabbaus oder Zwischenprodukt der Glycolyse, und NADP⁺ zu G-6-Gluconolacton und NADPH+H umgewandelt. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Ziel des zweiten Teilversuches ist die Bestimmung der Enzymaktivität jeweils einer Leberprobe eines Normal- und Hungertieres.

Stattfindende Enzymatische Reaktion



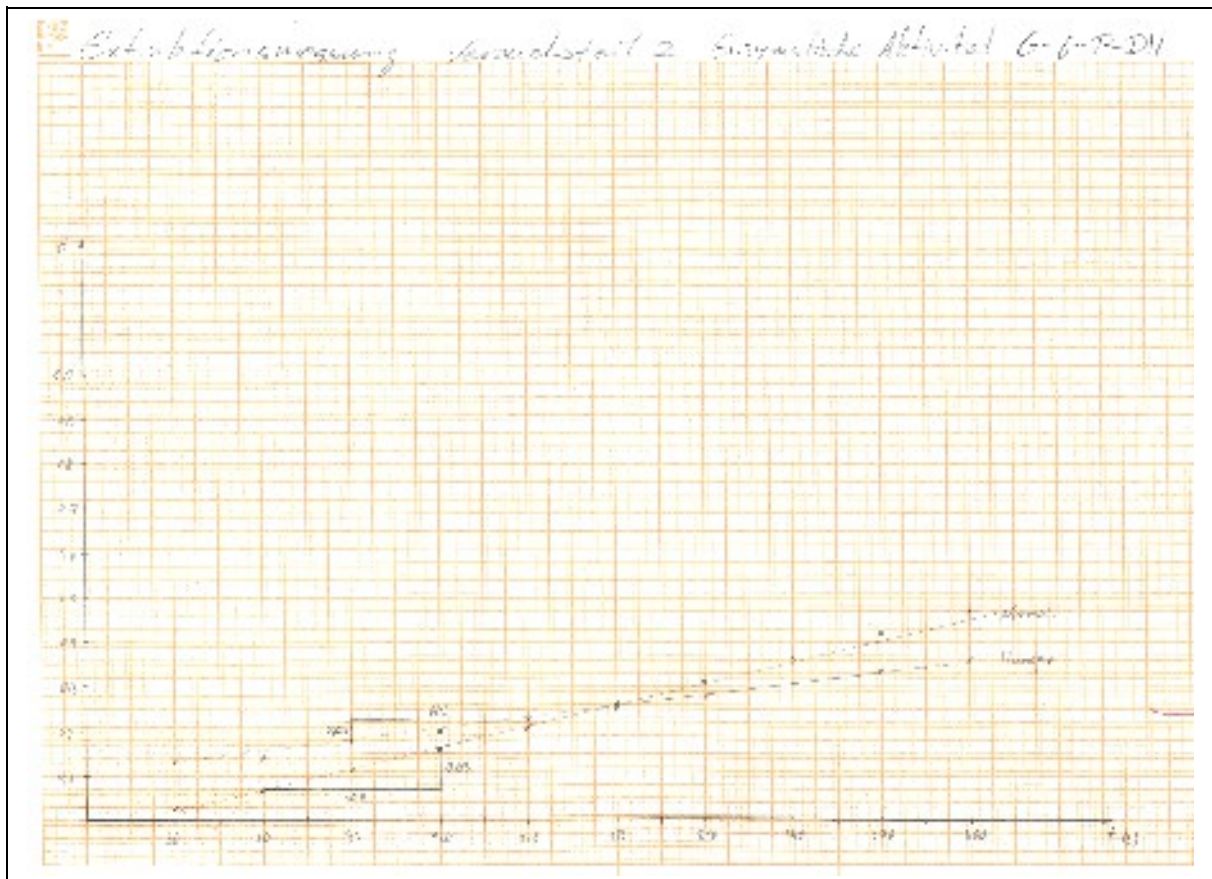
Das Nebenprodukt NADPH+H dient hier der photometrischen Messung, der Extinktionsmessung.

Das Absorptionsmaximum liegt bei 366nm.

Die Versuchsabschnitte der Extraktionspufferherstellung, der Homogenisierung und der Zentrifugation wurden für uns bereits getätigt.

Durchführen der Enzymreaktion:

Nach dem Mischen des Reaktionspuffers (Triethanolamin/HCL) mit der jeweiligen Probelösung (100 μ l), Zugabe von NADP (50 μ l) und anschließender Retemperierung auf Raumtemperatur (5min) wurde das Enzymsubstrat Glucose-6-Phosphat zugegeben. Anschließend fand die Aufzeichnung des Extinktionsverlaufs durch Messung im Photometer statt.



Die eingetragenen Werte zeigen eine lineare Zunahme der Extinktion, da aufgrund des Reaktionspuffers konstante Bedingungen über die gesamte Reaktionsdauer vorlagen.

Bei der Probe des Normal-Tieres ist der Verlauf steiler als bei der Probe des Hunger-Tieres.

Extinktionssteigerung pro Minute ($\Delta E/\text{min}$): Diagramm

Normal-Tier: 0,09 /min

Hunger-Tier: 0,05 /min

G-6-P-DH-Aktivität:

Lambert-Beer $\Delta E = \varepsilon \times \Delta c \times \Delta d \Rightarrow \Delta c = \Delta E / \varepsilon \times \Delta d$

$$d = 1 \text{ cm}, \varepsilon = 3,3 / \text{mM} \times \text{cm}$$

Normal:

$$\Delta c = \Delta E / \varepsilon \times \Delta d$$
$$\Delta c = 0,09 \text{ min}^{-1} / 3,3 \cdot (\text{mmol} \times \text{l}^{-1} \times \text{cm})^{-1} \times 1 \text{ cm}$$
$$\underline{\Delta c = 0,027 \text{ mmol/min}}$$

Stoffmenge

$$= 0,027 \text{ mmol/min} \times 100 \mu\text{l}$$
$$= 0,0027 \text{ mmol/min}$$
$$= \underline{2,7 \mu\text{mol/min}}$$

Aktivität

$$= \text{Stoffmenge} \times \text{FV}$$
$$= 2,7 \mu\text{mol/min} \times 50$$
$$= \underline{135 \mu\text{mol/min/1g Leber}}$$

Hunger:

$$\Delta c = \Delta E / \varepsilon \times \Delta d$$
$$\Delta c = 0,05 \text{ min}^{-1} / 3,3 \cdot (\text{mmol} \times \text{l}^{-1} \times \text{cm})^{-1} \times 1 \text{ cm}$$
$$\Delta c = 0,015 \text{ mmol/min}$$

Stoffmenge

$$= 0,015 \text{ mmol/min} \times 100 \mu\text{l}$$
$$= 0,0015 \text{ mmol/min}$$
$$= \underline{1,5 \mu\text{mol/min}}$$

Aktivität

$$= \text{Stoffmenge} \times \text{FV}$$
$$= 1,5 \mu\text{mol/min} \times 50$$
$$= \underline{75 \mu\text{mol/min/1g Leber}}$$

Anhand des Diagramms und der errechneten Werte wird deutlich bei welcher Probe die Enzymaktivität höher ist. Da bei der Probe des Normal-Tieres der Verlauf der Extinktion steiler ist als beim Hunger-Tier, lässt sich daraus ableiten, dass in gleicher Zeit mehr Substrat umgesetzt wurde, und dies weist auf eine höhere Enzymaktivität. Bei der Probe des Hunger-Tieres ist die Extinktionsteigerung geringer, somit war hier auch die enzymatische Aktivität geringer. Verständlich, da die Leber des hungernden Tieres vor dem Ableben keinen Bedarf an hohen Konzentrationen des Enzyms hatte, weil eben auch wenig Substrat vorhanden war.