

Rapport

Mave, tarm, lever

B I O K E M I

REGULATORISKE MEKANISMER I DET INTERMEDIÆRE STOFSKIFTE

Udført af:

Dato	Hold	Navn	Underskrift
7. oktober 2014	406	Ronja Lagström	
7. oktober 2014	406	Birgitte Thomsen	

Vejleder:

Dato	Godkendt	Navn	Underskrift

Kommentarer:

Glukose/glykogen

Ronja Lagström og Birgitte Thomsen

Hold 406

Delhold 2C

Vejleder: Inger Spangsberg

Datoer for udførelse

Øvelsesforberelse: 3. oktober

Forsøgsudførelse: 7-8. oktober

Efterbehandling: 10. og 13. oktober

Dato for aflevering

20. oktober

Indholdsfortegnelse

Formål	Side 4
Analysemetoder	Side 4
Resultater	Side 5-8
Diskussion	Side 8-9

Formål

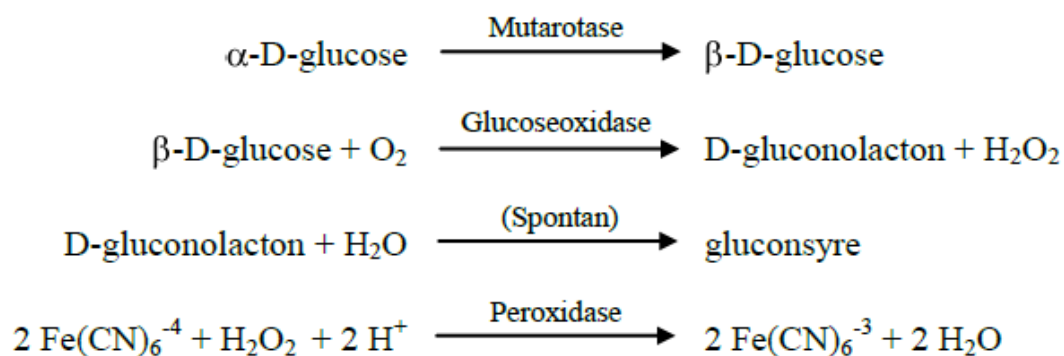
Formålet med forsøget er at foretage en kvantitativ bestemmelse af glykogen koncentrationen i forskellige væv, i vores tilfælde muskel og levervæv. Samt semikvantitativ glukose koncentrationsbestemmelse i blod og urin. Vi undersøger i begge tilfælde for både en normal og en diabetisk rotte.

Vi vil sammenligne resultaterne for den normale og diabetiske rotte og se om der er en forskel og diskutere, hvad denne forskel skyldes.

Analysemetoder

Forsøget foretages for blod vha. et blod-sukker apparat og for urin vha. urinsticks tilsvarende de metoder, man bruger i klinikken.

Til bestemmelse af glukose koncentration i muskel og levervæv bruger vi spektrofotometrisk metode. Da glukose ikke kan måles spektrofotometrisk omsættes glukose til en målbar metabolit i vores tilfælde cyanoferrat(III)-ion, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, der spektrofotometrisk kan bestemmes ved 421 nm.



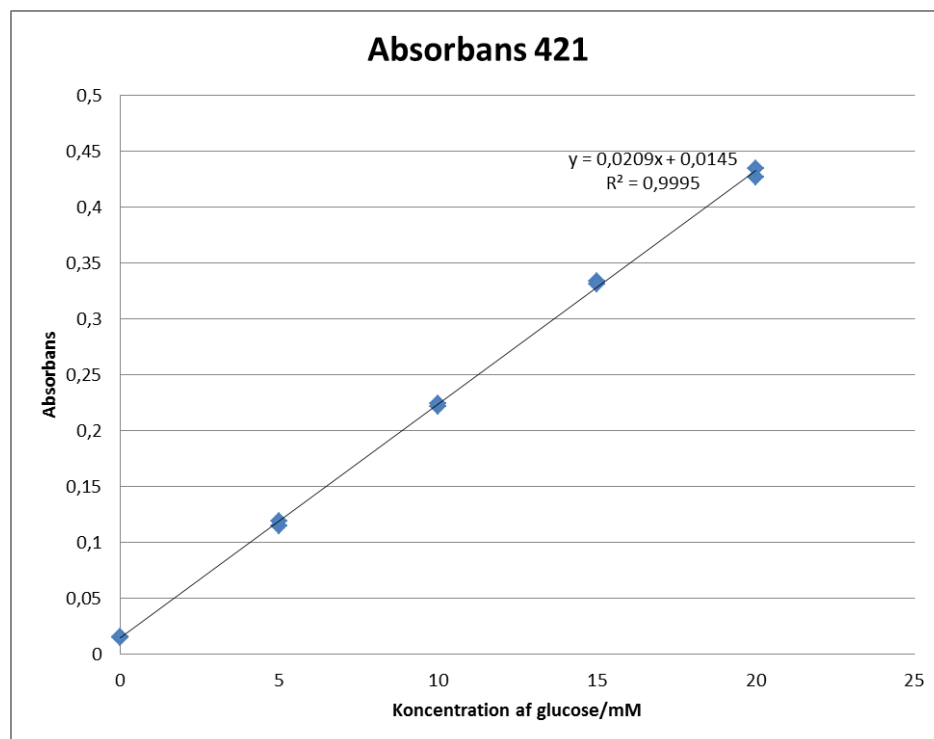
Vi laver standardprøver med forskellige glukosekoncentrationer og prøver med muskel og levervæv. Vi måler absorbansen spektrofotometrisk for standardprøverne og vævsprøverne og laver en standardkurve med et lineært fit. Vi bruger regneforskriften for denne kurve til at udregne glukose koncentrationen i lever og muskel.

RESULTATSKEMAER, Glucose/glycogen**Væsvægt**

	Vægt (g)
Lever	0,22
Muskel	0,23

Glucose bestemmelse

Prøve	A421		Gennemsnit
	1	2	
Blind	0,015	0,016	
Standard, 5 mM	0,115	0,119	
Standard, 10 mM	0,222	0,224	
Standard, 15 mM	0,334	0,331	
Standard, 20 mM	0,427	0,435	
Lever	0,137	0,164	0,1505
Muskel	0,078	0,081	0,0795



$$A = \epsilon \cdot l \cdot c + b$$

($y = ax + b$) og vores ligning: $y = 0,0209x + 0,0145$

Dvs.

$$A = 0,0209 \text{ mM}^{-1} \cdot c + 0,0145$$

r^2 værdien fortæller os noget om, hvor godt det lineære fit passer til vores måleresultater. Hvis $r^2 = 1$, passer punkterne perfekt. Da vores $r^2 = 0,9995$ passer vores resultat særdeles godt til det lineære fit.

$$c_{\text{kuvette}} = \frac{A - b}{\epsilon \cdot l}$$

$$n_{(\text{glu, væv})} = c_{(\text{glu, kuvette})} \cdot 0,002 \text{ l}$$

Da vi fortyndede prøven for den normale rotte 4 gange skal svaret ganges med 4.

Koncentrationen af glucose i en normal lever er så høj at resultatet ville falde udenfor standard kurven.

Lever for normal rotte:

$$C_{(\text{glu, kuvette})} = \frac{0,1505 - 0,0145}{0,0209 \text{ mM}^{-1}} = 6,507 \text{ mM}$$

$$n_{(\text{glu})} = 6,507 \text{ mM} \cdot 0,002 \text{ l} \cdot 4 = 0,052056 \text{ mmol}$$

$$0,22 \text{ g} \approx 0,22 \cdot 10^{-3} \text{ l}$$

$$c_{(\text{glu, væv})} = 0,052056 \text{ mmol} / 0,22 \cdot 10^{-3} \text{ l} \\ = 236,618 \text{ mM} \approx 237 \text{ mM}$$

Muskel for normal rotte:

$$C_{(\text{glu, kuvette})} = \frac{0,0795 - 0,0145}{0,0209 \text{ mM}^{-1}} = 3,110 \text{ mM}$$

$$n_{(\text{glu})} = 3,110 \text{ mM} \cdot 0,002 \text{ l} = 0,00622 \text{ mmol}$$

$$0,23 \text{ g} \approx 0,23 \cdot 10^{-3} \text{ l}$$

$$c_{(\text{glu, væv})} = 0,00622 \text{ mmol} / 0,23 \cdot 10^{-3} \text{ l} \\ = 27,043 \text{ mM} \approx 27,0 \text{ mM}$$

Glucose i blod og urin og glycogen i lever og muskel

	Hold A (normal)	Hold B (diabetes)	Hold C (normal)	Hold D (diabetes)	Hold E (normal)
Blod, mM (teststr.)	8,3	23,9	8,4	25,8	8,6
Urin, mg/dl (teststr.)	Neg	1000	Neg	1000	Neg
Lever, mM	240	40,8	237	19,3	250
Muskel, mM	18,1	27,9	27,0	18,9	72,6

Vi beregner gennemsnittet af glykogenkoncentrationen i leveren hos den normale og diabetiske rotte:

Normal: 242 mM

Diabetisk: 30,1 mM

Forhold: $242 \text{ mM} / 30,1 \text{ mM} = 8,0398\dots$

Dvs. glykogen koncentrationen i leveren er ca. 8 gange større hos den normale rotte.

Tilsvarende beregner vi gennemsnittet af glykogen koncentrationen i muskeltvæv i den normale og diabetiske rotte.

Normal: 39,2 mM

Diabetisk: 23,4 mM

Forhold: $1,6752\dots \text{ mM}$

Forholdet mellem glykogen koncentrationen ser ud til at være ca. 1,7 gange så stor, men det kan skyldes, at der er et resultat, der varierer meget fra de andre. Hvis man ser bort fra det

sidste resultat får vi et forhold på 0,96 (dvs. næsten det samme).

De meget varierende resultater kan skyldes, at der er mindre glycogen i muskelvæv end i levervæv og derfor en større måleusikkerhed. Nogle værdier ligger tæt på hinanden selvom den ene er fra en normal rotte og den anden fra en diabetisk rotte. Vi kan derfor ikke drage nogen sammenhæng mellem diabetes og glykogen koncentrationen i muskelvæv.

Diskussion

Hvis man har diabetes type 1 producerer man ikke insulin i de Langerhanske øer i pancreas. Insulin udskilles, når glukosekoncentrationen i blodet er høj og stimulerer til dannelse af glykogen (glykogenese) og inducerer glukokinase som fosforylerer glukose til glukose-6-fosfat. Modsat glukose kan glukose-6-fosfat ikke forlade cellen. Glukokinase er en isotype af hexokinase, som findes i leveren. Insulin stimulerer anabolisme og hæmmer desuden katabolisme. Insulins primære mål er lever, muskler og fedtvæv.

Glukose optages ved faciliteret transport, styret af en koncentrationsgradient gennem forskellige transportproteiner i membranen, GLUT. Fx GLUT2 i enteocytter, hepatocytter og GLUT4 i myocytter.

Insulin øger optagelse af glukose ved at binde til insulinreceptorer på cellerne dog ikke i leveren, hvis glukosetransport (GLUT2) er uafhængig af insulin.

Hvis man ikke producerer insulin optages der ikke glukose fra blodet, da nogle af glukose transportproteinerne fx GLUT4 har receptorer for insulin. Når de aktiveres sker der en translokation af GLUT4 fra intracellulære vesikler til plasmamembranen af myocytter og adipocytter. Hvis man mangler insulin kan man ikke optage glukose gennem GLUT4. Blodsukker koncentrationen er derfor høj. Normalt ligger glukose koncentrationen i blodet på 4 til 8 mM.

Vi fandt at glukose koncentrationen i urin var høj hos den diabetiske rotte. Nyrerne optager glukose fra blodet. De kan dog kun optage en hvis mængde, hvis blodsukker koncentrationen er meget høj tabes noget af glukosen i urinen. Det er dette, der sker hos den diabetiske rotte, hvilket vi ser ved, at glukose koncentrationen er høj, 1000 mg/dl, hvor man hos den normale ikke vil kunne spore målbare mængder af glukose i urinen.

I leveren fandt vi, at glykogenkoncentrationen i leveren var betydeligt lavere hos den diabetiske rotte i forhold til den normale. For at tilbageholde glukose inde i cellen skal det omdannes til glukose-6-fosfat. Hvis man mangler insulin, har man en lavere koncentration af glukokinase i leveren og man får ikke omdannet lige så meget glukose (der så videre kan omdannes til glykogen). Da insulin stimulerer glykogenesen vil den diabetiske rotte ikke syntetisere lige så meget glykogen og koncentrationen er derfor lav.

I muskelceller optages glukose vha. GLUT4 transportproteiner som er insulinafhængige dvs. de kun er åbne, når der er insulin. I muskelvæv fandt vi dog ikke nogen sammenhæng mellem glukosekoncentrationen og diabetes. Dette skyldes at muskelceller godt kan optage glukose vha. kontraktionsinduceret glukose optagelse under arbejde, som er uafhængig af insulin. Det kan være grunden til, at vi ikke ser nogen forskel hos den diabetiske og normale rotte.

I hvilken tilstand er glykogenolysen størst, og hvad er årsagen hertil?

Glykogenolysen i leveren er omdannelsen af glykogen til glukose. Dette sker i den fastende tilstand, hvor glukose koncentrationen i blod er lav. Det er vigtigt, at glukosekoncentrationen i blod er stabil, da hjernen kræver konstant tilførelse af glukose.

Glykogenolyse sker i muskler under arbejde, hvor glykogen nedbrydes, så der dannes energi.

Hvordan kompenserer organismen energetisk når glykogen er opbrugt?

Kroppens største energilager er dens fedtdepot. Fedt kan nedbrydes ved β -oxidation til ketonstoffer. Det meste fedt bortset fra glycerol kan ikke omdannes til glukose.

Nogle aminosyrer er glukogene og kan omdannes til glukose ved nedbrydelse af muskelvæv. Dette sker under længerevarende faste.

Giv en forklaring på, hvorfor ketonstoffer ikke udnyttes i leveren

Leveren kan ikke forbrænde ketonstoffer, da hepatocytter mangler enzymet succinyl-CoA-acetoacetat-CoA-transferasen. Enzymet katalyserer aktivering af acetoacetat til acetoacetyl-CoA. Ketonstoffer kan godt udnyttes i de fleste andre væv.

Glykogen synthase

Ronja Lagström og Birgitte Thomsen

Hold 406

Delhold 2C

Vejleder: Inger Spangsberg

Datoer for udførelse

Øvelsesforberelse: 3. oktober

Forsøgsudførelse: 7-8. oktober

Efterbehandling: 10. og 13. oktober

Dato for aflevering

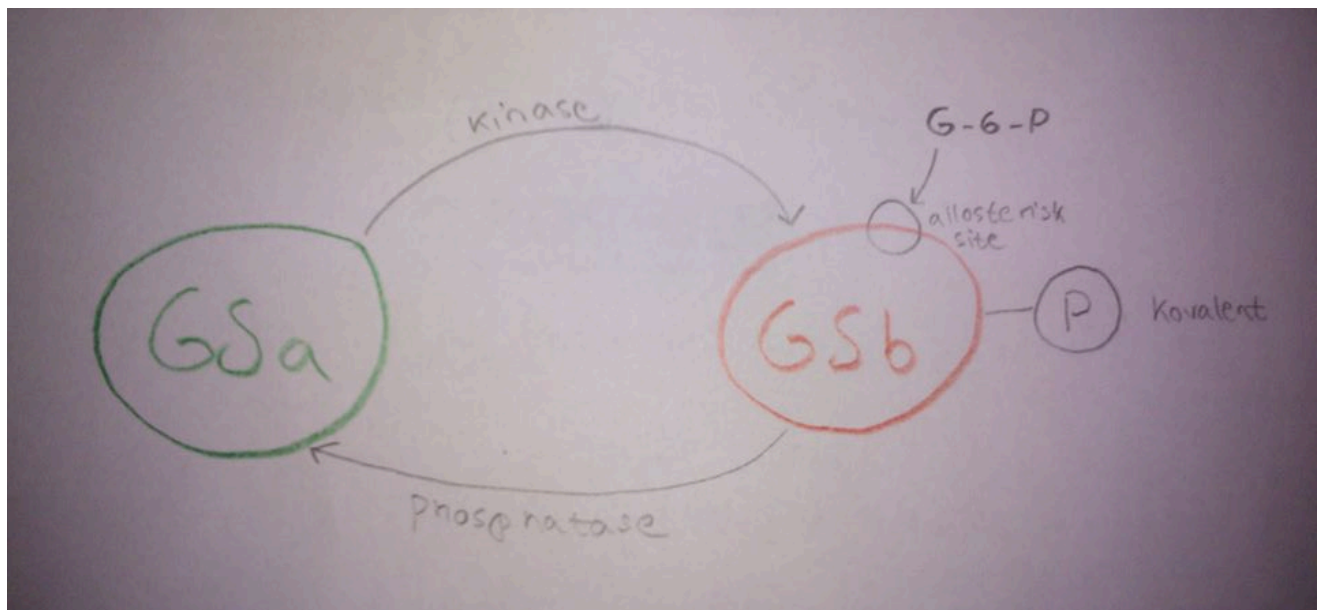
20. oktober

Indholdsfortegnelse

Formål	Side 12
Analysemetoder	Side 12-13
Resultater	Side 14-16
Diskussion	Side 16-18

Formål

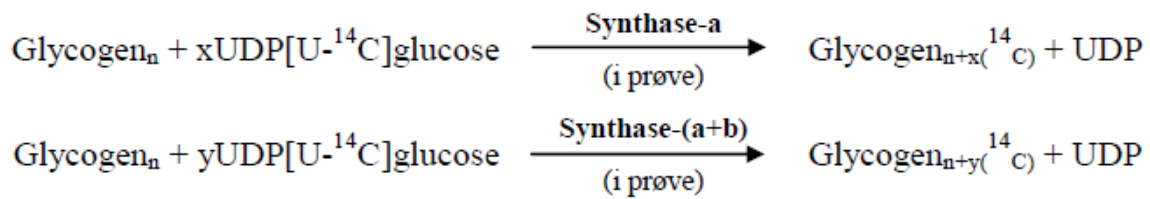
Vi vil undersøge regulering af glykogensynthase. Enzymet kan reguleres kvantitativt, allosterisk og kovalent. Enzymet har en aktiv a-form og en inaktiv b-form. Den kovalente regulering sker ved fosforylering og defosforylering. a-formen er defosforyleret mens b-formen er fosforyleret. b-formen kan allosterisk aktiveres af glucose-6-fosfat. Vi vil undersøge den allosteriske og kovalente regulering samt omdannelsen mellem a og b-formen som funktion af tid.



Analyse metoder

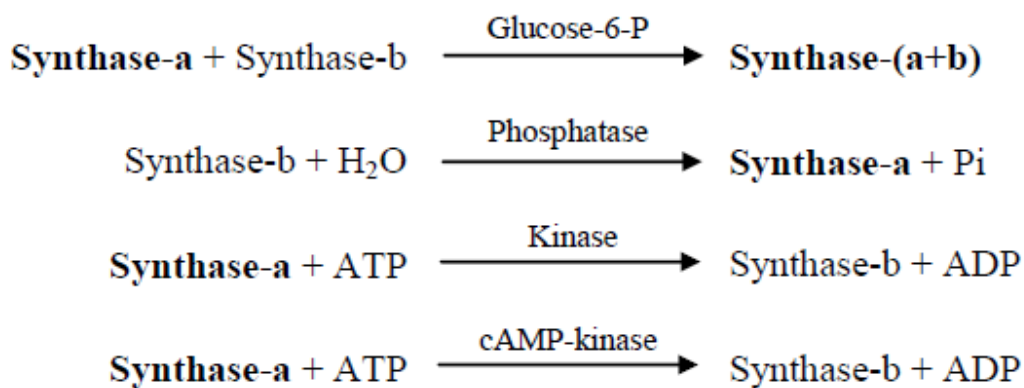
Først fremstiller vi 10 % leverhomogenat fra en fodret rotte, der stilles ved stuetemperatur. Noget tid efter fødeindtagelse er glykogensynthasen primært på b-formen. Kinaserne vil ikke være aktive, da ATP koncentrationen er lav efter fremstillingen af homogenatet. Dvs. at der ikke vil ske omdannelse af a til b-formen. Derfor kan vi undersøge, hvordan b-formen omdannes til a-formen over tid.

Enzymaktiviteten måles ved at undersøge mængden af dannet glykogen. Inden forsøget ødelægges frit glukose ved at tilsætte stærk KOH-opløsning under kogning. Der er tilsat en glykogenprimer og radioaktivt UDP-glukose. Jo mere glykogen, der bliver dannet, jo mere af den radioaktive isotop ^{14}C vil kunne spores. Frit glukose skyldes til sidst fra med ethanol.



Hvert 20. min udtages homogenat, som tilsættes stopbuffer, der forhindrer b-formen i at omdannes til a-formen ved at inaktivere fosfatasen. Dette overføres til to glas. Det ene glas tilsættes reaktionsblanding a, som ikke indeholder glucose-6-fosfat, så der kun måles på a-formens aktivitet, mens det andet tilsættes reaktionsblanding t, som indeholder glucose-6-fosfat, så der måles på både a og b-formens aktivitet dvs. den totale aktivitet. Vi kan finde aktiviteten af b-formen ved at trække aktiviteten af a-formen fra den totale aktivitet.

Efter 65 min udtages homogenat, hvor der tilsættes henholdsvis ATP-Mg⁺ og ATP-Mg⁺+cAMP, der aktiverer kinasen, så a-formen kan omdannes til b-formen. Efter yderligere 15 min tilsættes stopbuffer og dette kommer ned i glas med reaktionsblanding a.



Efter tilsætning af stopbuffer sættes glassene på varmeblok ved 37°C, hvor enzymerne kan virke i 10 min. Herefter udtages 75 µL til Whatman filterpapir og sættes i et glas iskoldt ethanol, så enzymaktiviteten stoppes.

[¹⁴C] måles i Whatman filterpapirerne i en scintillationstæller.

RESULTATSKEMA, Glycogen synthase**Specifik radioaktivitet af UDP-glucose**

$$\text{cpm}_{\text{Sta}} = 19732 ; \text{s.a.} = 43,849$$

$$\text{cpm}_{\text{Stt}} = 18043 ; \text{s.a.} = 40,096$$

$$\text{S.A (specifik radioaktivitet)} = \text{cpm}/n_{(\text{glu})}$$

$$n_{\text{glu}} = 6,0 \text{ nM} * \frac{10^6 \text{ nM}}{\text{mM}} * 75 \text{ } \mu\text{L} * \frac{10^{-6} \text{ L}}{\mu\text{L}} = 450 \text{ nmol}$$

(Stofmængden for glucose er angivet i instruktionerne.)

$$\frac{\text{mU}}{\text{mL}} = \frac{(A - B) * C}{\text{s. a.}}$$

A= cpm pr. 10 min inkubation

B= cpm i blindprøven

C= 6,0 (for 0, 20, 40, 60 og 80 min-prøverne) og 6,3 (for 80A og 80C prøverne)

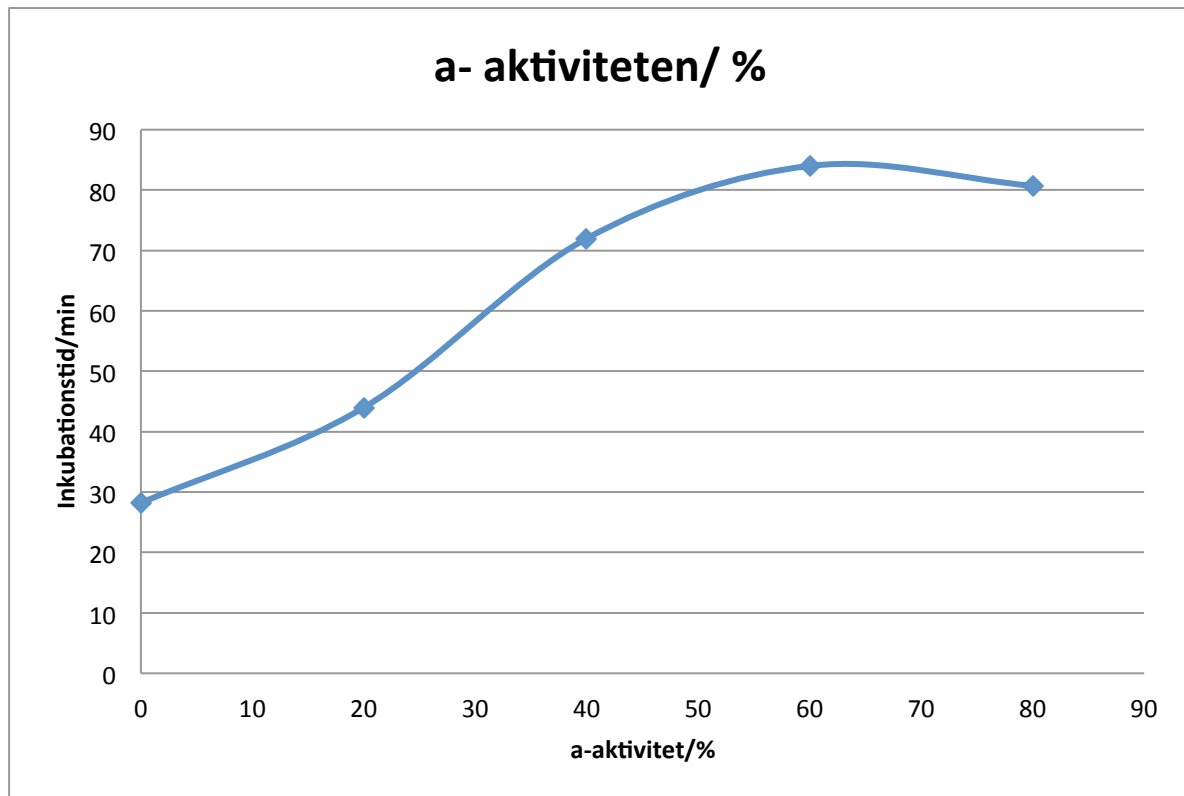
Glycogen synthase aktivitetEksempel

0a:

$$A-B = 440 - 27,4 = 412,6$$

$$\text{Koncentration} = \frac{412,6 * 6,0}{43,849} = 56,457 \text{ mU/mL}$$

Tid min	Prøve	cpm	cpm - cpm _{blind}	mU/ml	U/g	b-form	a-form *100 t-form/ %
	Blind a	27,4					
	Blind t	20,2					
0	a	440	412,6	56,457	5645,7	14352,3	28,231
	t	1356,6	1336,4	199,980	19998,0		
20	a	647	619,6	84,782	8478,2	10792,6	43,995
	t	1308	1287,8	192,708	19270,8		
40	a	936,2	908,8	124,354	12435,4	4854,1	71,925
	t	1176,5	1155,4	172,895	17289,5		
60	a	1042	1014,6	138,831	13883,1	2652,2	83,960
	t	1125,2	1105	165,353	16535,3		
80	a	933,2	905,8	123,944	12394,4	2961,7	80,713
	t	1046,4	1026,2	153,561	15356,1		
	aA	877,2	849,8	122,095	12209,5		
	aC	836	815,8	117,210	11721,0		



Diskussion

Vi kan se, at a-aktiviteten stiger over tid, hvilket vi også forventede, da kinaserne er inaktive, så b-formen omdannes til a-formen over tid, mens den modsatte reaktion ikke sker pga. inaktive kinaser. Efter 80 min falder a-aktiviteten dog igen, hvilket kan skyldes, at fosfataserne er brugt op eller, at vi har lavet en fejl.

Glukose-6-P fungerer som en allosterisk aktivator af b-formen. Hvis koncentrationen af glukose-6-P er tilstrækkelig høj vil b-formen omdannes kovalent til a-formen ved defosforylering.

I målingerne a80A og a80C tilsatte vi henholdsvis ATP og ATP + cAMP. Både ATP og cAMP aktiverer kinase og derfor forventer vi, at der er størst kinase aktivitet i reaktionsblandingen, der indeholder både ATP og cAMP. Kinaserne kan omdanne den aktive a-form til den inaktive b-form. Vi forventer derfor, at aktiviteten af a-formen vil falde. Dette viser sig også at være tilfældet i forhold til aktiviteten til tiden 60 min uden aktive kinaser. Vi

sammenligner med resultaterne fra målingerne til tiden 60 min, da dette er tættest på det tidspunkt, vi udtog prøverne, nemlig til tiden 65 min.

Vi udregner procentdelen af a-aktivitet i forhold til a-aktiviteten til tiden 60 min

$$a - \text{aktivitet (tilsat ATP)} = \frac{12209,5 \text{ U/g}}{13883,1 \text{ U/g}} * 100\% = 88,0 \%$$

Dvs. a-aktiviteten faldt med 12 % ved tilsætning af ATP

$$a - \text{aktiviteten (tilsat ATP + cAMP)} = \frac{11721,0 \text{ U/g}}{13883,1 \text{ U/g}} * 100\% = 84,4 \%$$

Dvs. a-aktiviteten faldt med 15,6 % ved tilsætning af ATP og cAMP

a-aktiviteten er som forventet faldet ved tilsætning af ATP og endnu mere ved tilsætning af ATP og cAMP, da flere kinaser er aktive og mere af a-formen omdannes til b-formen.

Hvilken funktion har den tilsatte glycogen i inkubationsblandingen?

Den tilsatte glycogen fungerer som en primer, der initierer glukogensyntesen, da glukose ikke kan dannes uden en primer, som enten er glykogenin eller allerede eksisterende glycogen. Syntesen af glykogen fungerer ved, at der sættes en glukose på et glukogenmolekyle eller glykogenin.

Hvilken effekt har insulin på glykogensyntesen?

Insulin udskilles efter et måltid, hvor blodsukker koncentrationen er høj. Insulin stimulerer glykogensyntesen og sænker dermed blodsukker koncentrationen indirekte ved at aktivere syntesen af glykogen.

Hvordan formodes insulin at virke?

Insulin aktiverer glykogensyntasen kovalent.

PKA (protein kinase A) og GSK (glykogen synthase kinase) inaktiverer glykogensyntasen.

PP1 (protein phosphatase 1) aktiverer glykogen syntasen.

Insulin inducerer aktiveringen af PP1 og inducerer inhibering af GSK. Insulin nedsætter også aktiviteten af PKA, ved at mediere nedbrydning af cAMP til AMP (AMP virker hæmmende på PKA).

Pyruvat kinase

Ronja Lagström og Birgitte Thomsen

Hold 406

Delhold 2C

Vejleder: Inger Spangsberg

Datoer for udførelse

Øvelsesforberelse: 3. oktober

Forsøgsudførelse: 7-8. oktober

Efterbehandling: 10. og 13. oktober

Dato for aflevering

20. oktober

Indholdsfortegnelse

Formål	Side 21
Analysemetoder	Side 21
Resultater	Side 22-25
Diskussion	Side 25-28

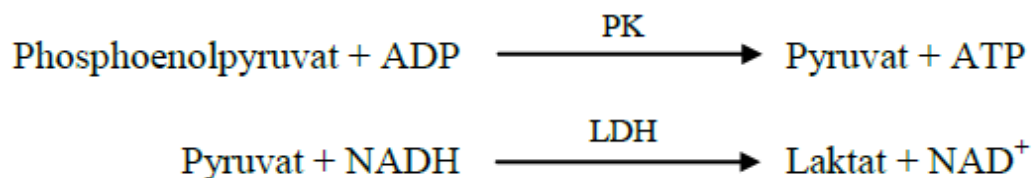
Formål

Pyruvat kinase er et enzym, der findes i flere isoformer. De forskellige isoformer har forskellige kinetiske egenskaber. Fx M1, der findes i tværstribet muskulatur udviser Michaelis-Menten kinetik overfor phosphoenolpyruvat (PEP), mens andre fx L, der findes i lever, reguleres allosterisk. L enzymet hæmmes af ATP og alanin og aktiveres af fructose-1,6-bisfosfat.

Vi vil undersøge pyruvatkinase aktiviteten i muskel og levervæv samt virkningen af ATP, F-1,6-P₂ og alanin og aktiviteten af leverenzymet som funktion af PEP-koncentrationen undersøges.

Analysemetoder

Pyruvatkinase aktiviteten bestemmes i et koblet assay. NADH er en målbar metabolit og bruges i dette forsøg som substrat i hjælpereaktionen. Faldet i lysabsorbtion dvs. forbruget af NADH er et mål for aktiviteten af pyruvat kinase. Vi vil derfor aflæse negative hældninger. Den numeriske værdi svarer til aktiviteten af pyruvat kinase. Hjælpereaktionen må ikke være begrænsende, så der tilsættes overskud af ADP, NADH og enzymer.



Der afpippeteres i to kuvette buffer, NADH, LDH, ADP og henholdsvis lever og muskel enzym. ADP og NADH er substrater i reaktionerne og LDH og enzym katalyserer reaktionerne.

Vi var hold C. Efter spektrofotometeret er startet registreres i 3-4 herefter tilsættes PEP, hvor reaktionen startes. Der registreres i et par minutter og herefter tilsættes alanin og F-1,6-P₂ i intervaller, hvor der måles i et par minutter imellem. De forskellige hold tilsætter forskellige regulatorer/forskellige mængder regulatorer.

RESULTATSKEMA 1, Pyruvat kinase**Effekter af F-1,6-P₂ og ATP**

Hold	Tilsætning	Lever		Muskel	
		dA/min	v rel.*	dA/min	v rel.*
A	1.00 mM PEP	- 23,16	1.00	-6,00	1.00
	+0.10 mM F-1,6-P ₂	-80,16	3,46	-6,48	1,08

B	1.00 mM PEP	-31,90	1.00	-8,79	1.00
	+2.35 mM ATP	-8,94	0,28	-9,41	1,07
	+0.10 mM F-1,6-P ₂	-122,71	3,85	-8,70	0,99

* v rel. = den relative hastighed, dvs. dA/min i forhold til dA/min med 1.00 mM PEP.

RESULTATSKEMA 2, Pyruvat kinase**Effekter af F-1,6-P2 og alanin**

Hold	Tilsætning	Lever		Muskel	
		dA/min	v rel.*	dA/min	v rel.*
C	1.00 mM PEP	-30,78	1.00	-8,97	1.00
	+0.25 mM alanin	-14,45	0,45	-7,84	0,87
	+0.50 mM alanin	-9,23	0,30	-8,71	0,97
	+0.98 mM alanin	-6,30	0,20	-8,31	0,98
	+1.92 mM alanin	-4,67	0,15	-9,10	1,01
	+0.09 mM F-1,6-P2	-88,94	2,89	-8,25	0,92

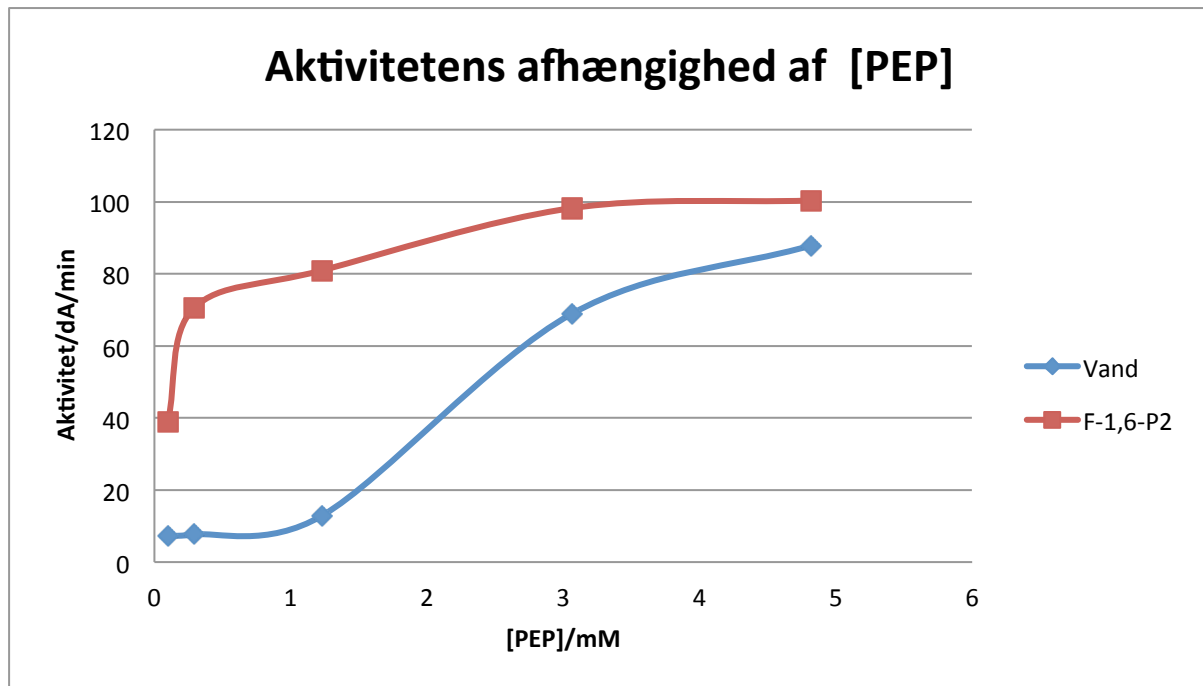
E	1.00 mM PEP	-27,25	1.00	-10,29	1.00
	+0.25 mM alanin	-12,81	0,47	-9,68	0,94
	+0.50 mM alanin	-7,56	0,28	-8,45	0,82
	+0.98 mM alanin	-5,12	0,19	-8,45	0,82
	+1.92 mM alanin	-2,86	0,1	-8,43	0,82
	+0.09 mM F-1,6-P2	-78,76	2,89	-10,02	0,97

* v rel. = den relative hastighed, dvs. dA/min i forhold til dA/min med 1.00 mM PEP.

RESULTATSKEMA 3, Pyruvat kinase**Aktivitetens afhængighed af [PEP]**

Leverenzym

Hold	[PEP] mM	- F-1,6-P ₂ dA/min	+ F-1,6-P ₂ dA/min
D	0.04 mM	-0,34	%
	0.10 mM	-7,26	-38,85
	0.29 mM	-7,65	-70,49
	1.23 mM	-12,88	-80,96
	3.06 mM	-68,85	-98,22
	4.82 mM	-87,87	-100,34



Vurdering

Graf for resultaterne fra hold D.

Vi har ændret fortegnet, så vi kan se, hvordan aktiviteten stiger. Vi har ikke taget målingen ved 0,04 mM med, da der var usikkerhed om resultatet.

Af grafen kan vi se at der ved tilsætning af F-1,6-P₂ fås en større enzymaktivitet, da F-1,6-P₂ virker som en positiv, allosterisk regulator.

Grafen for et allosterisk reguleret enzym vil være s-formet. En positiv allosterisk regulator vil forskyde grafen opad på y-aksen mens en negativ regulator vil forskyde den nedad.

Hvis vi ser på vores graf for vand kan vi se, at den er flot s-formet. Vi kan se at grafen for F-1,6-P₂ er forskudt opad, den er dog ikke ligeså s-formet.

Diskussion

Glykolyse i leveren sker i fodret tilstand for at danne substrat for fedtsyredannelse. Det er ikke for at få energi modsat glykolyse i andet væv. Adrenalin får leveren til at stoppe glykolyse.

Glykolyse i muskler sker, når der er behov for energi. Pyruvatkinase i muskler har en kinetik som ligner Michalis Menten.

Pyruvatkinase er meget fint reguleret.

Glykolyse: Fru-6-P \rightarrow Fru-1,6-P₂ (PFK1 enzym/Phosphofruktokinase 1)

Regulering: Fru-6-P \rightarrow Fru-2,6 bis P (PFK2 enzym, ikke glykolyse). Fru-2,6-P₂ stimulerer PFK1.

Adrenalin

Lever: Adrenalin hæmmer PFK2 - glykolyse stopper - der skal være glucose til blodet.

Mindre F-2,6-P₂ \rightarrow mindre PFK1

Muskel: Adrenalin stimulerer PFK2 \rightarrow mere glykolyse \rightarrow mere energi

Alanin

Alanin er pyruvat med en aminogruppe og er nedbrydningsproduktet fra muskelprotein. Det produceres under hårdt muskelarbejde eller faste og transporteres til leveren (tegn på, at der er mangel på glukose i musklerne). Aminogruppen fjernes og udskilles med urinen. Pyruvat molekylet omdannes til glukose i glukoneogenesen.

ATP

ATP virker allosterisk hæmmende på leverenzym. ATP er produktet af glykolyse, så når ATP-koncentrationen (produktet) er høj hæmmer det reaktionen som negativ feedback.

Hold A

Vi ser at F-1,6-P₂ øger leverenzymets aktivitet, mens muskelenzym-aktiviteten er så godt som uændret.

Hold B

ATP hæmmer leverenzym, men ikke muskelenzymet, mens F-1,6-P₂ igen øger leverenzym aktiviteten, hvor muskelenzym aktiviteten er uændret.

Hold C og E

Alanin får leverenzymaktiviteten til at falde mens F-1,6-P₂ som i de andre forsøg får den til at stige. Muskelenzymaktiviteten er rimelig konstant.

Hvor mange gange skal koncentrationen af PEP øges for at ændre hastigheden fra 0,1 V_{max} til 0,9 V_{max} (uden F-1,6-P₂). Udfør en tilsvarende beregning for et enzym, der følger almindelig Michalis-Menten kinetik.

V_{max} aflæses til ca. 90 dA/min. Dette er dog usikkert, da vi ikke kan se at kurven flader ud, hvilket ville kræve flere målinger. 0,1 af V_{max} er derfor 9 og 0,9 af V_{max} er 81. Vi aflæser [PEP] ved 9 dA/min til 1 mM og ved 81 dA/min til 4 mM.

Dvs. at PEP-koncentrationen skal øges 4 gange for at ændre hastigheden fra 0,1 til 0,9 af V_{max}.

Michalis-Menten kinetik

$$v_{0,1} = 0,1 \cdot v_{max}$$

$$v_{0,9} = 0,9 \cdot v_{max}$$

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

$$v_{0,1} = 0,1 \cdot v_{max} = v_{max} \frac{[S]_{0,1}}{[S]_{0,1} + K_m} \Leftrightarrow 0,1 = \frac{[S]_{0,1}}{[S]_{0,1} + K_m} \Leftrightarrow [S]_{0,1} = \frac{1}{9} K_m$$

$$v_{0,9} = 0,9 \cdot v_{max} = v_{max} \frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,9} + K_m} \Leftrightarrow 0,9 = \frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,9} + K_m} \Leftrightarrow [S]_{0,9} = 9 K_m$$

$$\frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}} = \frac{9 K_m}{\frac{1}{9} K_m} = 81$$

Dvs. koncentrationen af substratet skal øges 81 gange for at øge aktiviteten fra 0,1 v_{max} til 0,9 v_{max} for enzymer, der følger Michaelis-Menten kinetik.

Diskuter resultaterne i relation til de forskellige isoenzymers regulatoriske muligheder.

Leverenzym kan allosterisk reguleres af ATP, alanin (negativt) og F-1,6-P₂ (positivt).

Leverenzym kan også reguleres kovalent ved fosforylering af en cAMP aktiveret proteinkinase. Den fosforylerede form er mindre aktiv end den defosforylerede.

Muskelenzymet følger Michaelis-Menten kinetik overfor substratet PEP.

Diskuter de opnåede resultater i relation til regulering af glykolyse og glukoneogenese.

In vivo koncentrationerne i lever af PEP, ATP, F-1,6-P₂ og alanin er

	fastet	fodret
	mM	mM
PEP	0.07	0.13
ATP	2.4	2.7
F-1,6-P ₂	0.007	0.014
Alanin	0.25	0.40

ATP stiger lidt i fodret tilstand, da glykolyseren øges. ATP koncentrationen er dog rimelig konstant, da syntesen af ATP skal være stabil. ATP hæmmer pyruvat kinase i leveren, så der dannes mindre ATP. Dette er hensigtsmæssigt, da glykogenesen skal dominere under fodret tilstand.

F-1,6-P₂ stiger under fodret tilstand, da det høje insulin niveau stimulerer glykolyseren, så glukose omdannes til F-1,6-P₂.

Alanin stiger, da noget af pyruvat omdannes til alanin.

PEP koncentrationen stiger til ca. det dobbelte i fodret tilstand, da glukose omdannes til PEP i glykolyseren.

Hexokinase/glukokinase

Ronja Lagström og Birgitte Thomsen

Hold 406

Delhold 2C

Vejleder: Inger Spangsberg

Datoer for udførelse

Øvelsesforberelse: 3. oktober

Forsøgsudførelse: 7-8. oktober

Efterbehandling: 10. og 13. oktober

Dato for aflevering

20. oktober

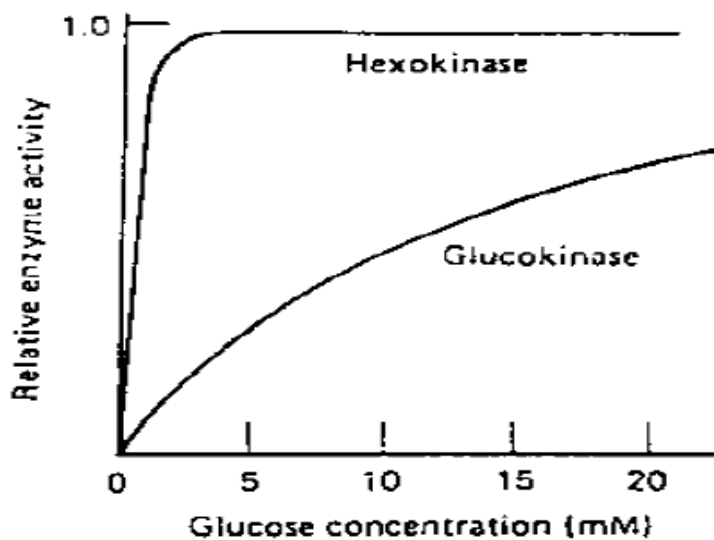
Indholdsfortegnelse

Formål	Side 31
Analysemetoder	Side 31-32
Resultater	Side 32-33
Diskussion	Side 33-34

Formål

Vi vil bestemme hexo-og glucokinase aktiviteten i lever og hjernevæv hos en normal og diabetisk rotte.

Hexo-og glucokinase er isoenzymer og katalyserer derfor samme reaktion. De har dog forskellig kinetik. Hexokinase har en lav K_m -værdi mens glucokinase har en høj K_m -værdi.



Analysemetoder

Vi benytter os af et koblet assay for at fremskaffe en målbar metabolit, nemlig NADH, som vi måler absorptionen af. Hjelpeenzymet glucose-6-phosphat dehydrogenase tilsættes i overskud, så det hastighedsbegrænsende trin bliver fosforyleringen af glukose.



Glukose fosforyleringen måles ved en høj og en lav koncentration af glukose i lever og hjerne hos både normale og diabetiske rotter.

Enzymaktiviteten ved den lave glukosekoncentration (0,5 mM) vil tilnærmelsesvis være lig enzymaktiviteten af hexokinase, da hexokinasen mættes fuldstændig ved lav

glukosekoncentration, mens substratkoncentrationen kun svarer til 5 % af K_m for glukokinase. Enzymaktiviteten ved den høje glukosekoncentration (100 mM) vil være den samlede aktivitet af hexo-og glukokinase. Glukosekinase aktiviteten udregnes ved at trække aktiviteten af hexokinase fra den samlede enzymaktivitet.

RESULTATSKEMA, Hexokinase/glucokinase

Eksempel

Normal rotte

Lav:

$$\frac{\Delta Abs}{min} = \frac{4,0191 \frac{mAbs}{min} - 1,4271 \frac{mAbs}{min}}{1000} = 0,002592 Abs/min$$

$$Aktivitet af enzym pr. g væv = \frac{0,002592 Abs/min * (2869 + 50\mu L)}{6300 * 0,01 * \frac{50\mu L}{100}} = 0,2395 U/g$$

Høj:

$$\frac{\Delta Abs}{min} = \frac{44,2670 \frac{mAbs}{min} - 1,7153 \frac{mAbs}{min}}{1000} = 0,04255 Abs/min$$

$$Aktivitet af enzym pr. g væv = \frac{0,04255 Abs/min * (2860 + 50\mu L)}{6300 * 0,01 * \frac{50\mu L}{100}} = 3,9308 U/g$$

Væv		Enzymaktivitet ($\mu\text{mol}/(\text{min g væv})$) målt med [glucose]		Beregnet enzymaktivitet ($\mu\text{mol}/(\text{min g væv})$) af	
		0.5 mM	100 mM	Hexokinase	Glucokinase
Lever	Normal rotte	0,56	6,59	0,56	6,03
	Diabetisk rotte	0,30	0	0,30	?
Lever	Normal rotte	0,24	3,93	0,24	3,69
	Diabetisk rotte				
Hjerne	Normal rotte	6,40	6,78	6,40	0,39
	Diabetisk rotte	5,91	6,60	5,91	0,69

Diskussion af de opnåede resultater i relation til reguleringen af glukose fosforyleringen i lever og hjernevæv og i relation til organismen blodsukker regulering.

Hexokinase findes bl.a. i hjernevæv og har en lav K_m -værdi samt hæmmes kraftigt af produktet glukose-6-fosfat. Den lave K_m -værdi giver maksimal omsætning af glukose selvom blodsukkerkoncentrationen er lav, hvilket er en fordel i hjernevæv, som har brug for en konstant tilførsel af energi fra glukose.

Glukokinase findes i leveren og har en høj K_m -værdi, hvilket betyder, at blodsukkerkoncentrationen er næsten proportionel med glukokinase-aktiviteten. Leveren kan på denne måde bufre blodsukkerkoncentrationen. Glukokinase syntesen stimuleres af insulin.

Vi har brugt en model hvor der antages at hexokinase aktiviteten ikke øges når koncentrationen øges, altså at forskellen mellem aktiviteten ved 0,5 mM og 100 mM angiver aktiviteten for glukokinase. Vi kan dog ikke med sikkerhed sige, at den værdi kun angiver aktiviteten for glukokinase. Vi forventer ikke at der er glukokinase i hjernen men en høj aktivitet af hexokinase. Vores tabel siger, at der er en lille glukokinase aktivitet i hjernen men dette kan skyldes at modellen ikke er helt perfekt. Hexokinase aktiviteten er høj og det passer

med vores teori.

Vi kan heller ikke være sikre på, at der kun er hexokinase aktivitet ved 0,5 mM glukose.

Selvom substratkoncentrationen kun svarer til 5 % af K_m for glukokinase er der stadig en lille del af enzymaktiviteten, der tilfalder glukokinase.

Kommentarer til fundne forskelle mellem normale og diabetiske rotter.

I hjernen er der høj enzymaktivitet selvom glukose koncentrationen er lav. Hjernen mangler glukokinase og der findes derfor kun hexokinase. Vi forventer ikke at se nogen forskel mellem hjernevæv fra en normal rotte og en diabetisk rotte. I vores tabel ser man at glukokinase aktiviteten er højere for den normale rotte. Dette kan eventuelt skyldes vores model.

Da insulin inducerer glukokinase ses ingen aktivitet hos den diabetiske rotte. Glukokinasen hæmmes af fruktose-6-P. Glukose ophæver denne hæmning (aktiverer altså glukokinase). Vi forventer derfor en lav glukokinase aktivitet hos den diabetiske rotte. Vi har desværre ikke nogle gode resultater at kigge på.