

# Biokemi øvelse 1

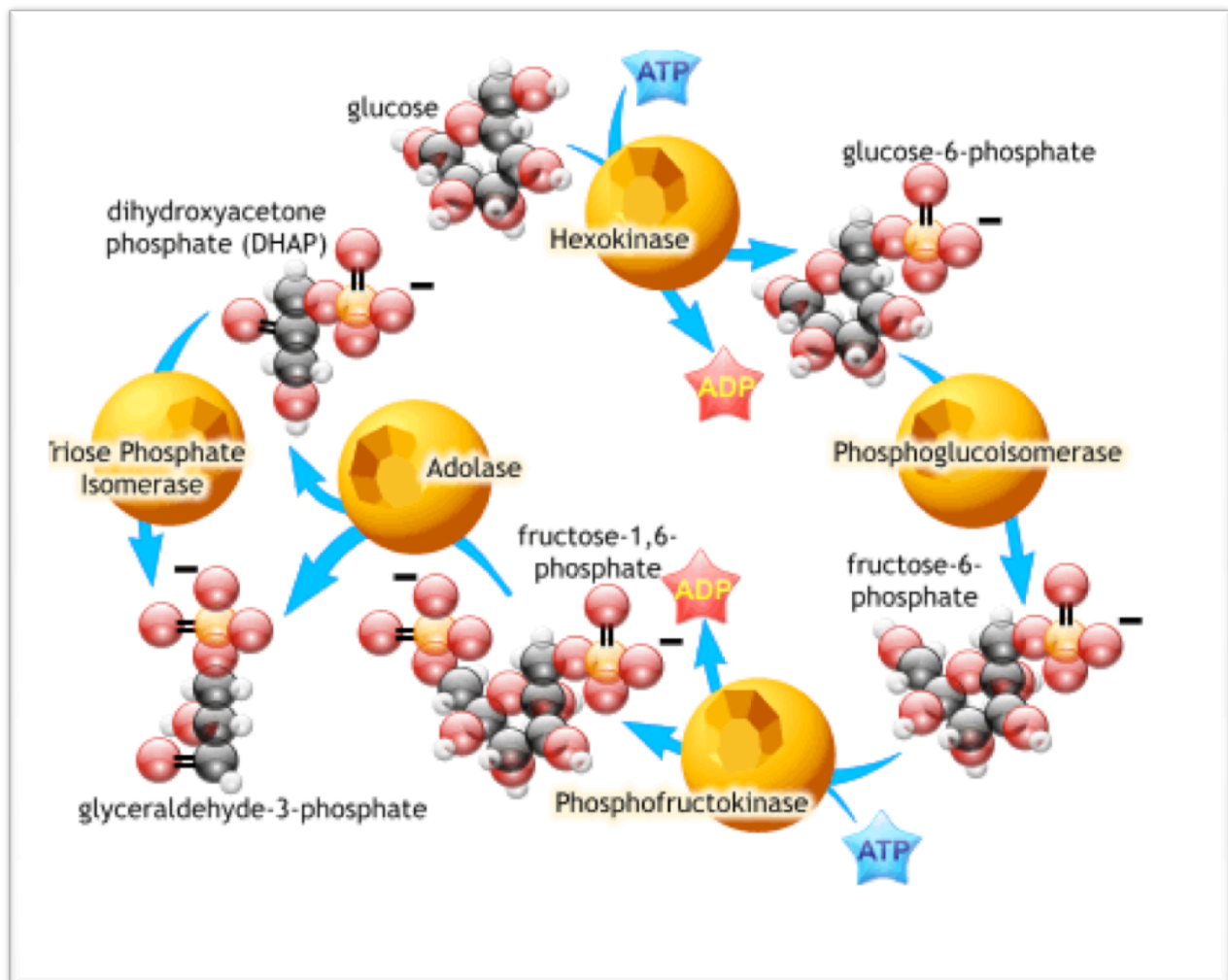
Regulatoriske mekanismer i det intermediære stofskifte

Udarbejdet af: Matilda Lantz og Elif Bayram

Dato: 20. November 2011

Underskrifter: \_\_\_\_\_

Godkendt: \_\_\_\_\_ Dato \_\_\_\_\_



## Regulatoriske mekanismer i det intermediære stofskifte

### Øvelse 1: Glucose/glykogen

1: Formålet er at bestemme mængden af glucose og glykogen i forskellige i muskel, blod, urin og lever fra både en diabetisk og normal rotte.

2: En vævsklump fra muskel og en fra lever. Man skal finde ud af hvor meget glykogen der er i hver, dette gøres ved at koge dem i en base (KOH) i 10 min; hydrolyserer vævet og nedbryder alt fri glukose (fra kar og blod i vævet). Glykogenet forbliver stabilt.

Glykogenet isoleres ved tilsætning af ethanol og nedkløvning på is: fælder glykogen. Ved centrifugering ses to rør med pellet (glykogenet) og supernatant (snask!).

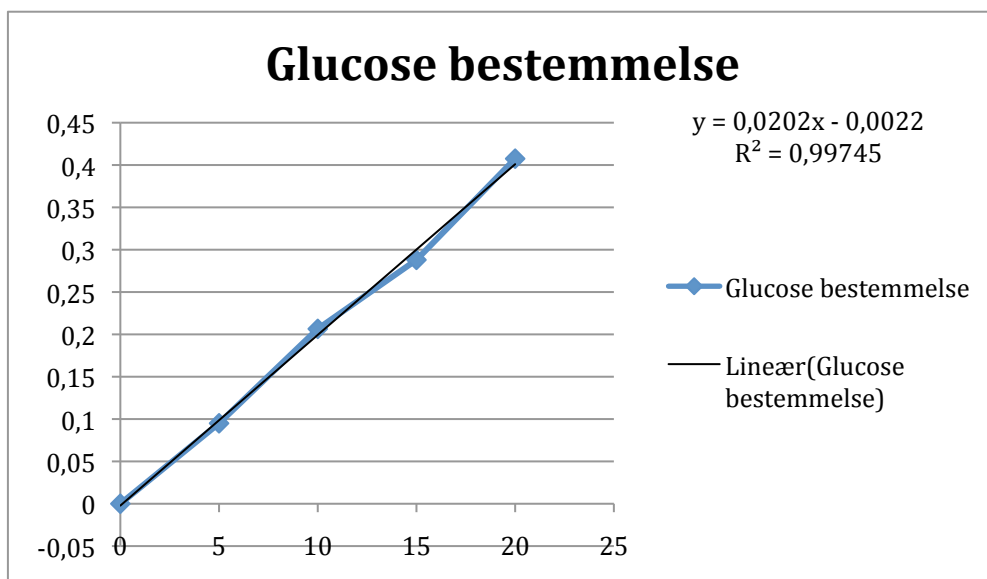
AMG-mix tilsættes glykogenet for at nedbryde det til glukose (lettere at måle på).

Glukose-konc. findes ved at tilsætte glukosereagens (glukoseoxidase og peroxidase); graden af gulhed afspejler mængden af glukose; jo mere gult; jo mere glukose. Til sidst måles absorbans ved spektrofotometer. Herfra kan vi bruge de fundne resultater til at bestemme glucosekoncentration.

### 3: Resultater:

	Vægt
Lever	0,45 g
Muskel	0,36 g

Prøve	A421 (1)	A421 (2)	Gennemsnit	Gennemsnit - blind
Blind	0,026	0,036	0,031	0
Standard 5 mM	0,127	0,125	0,126	0,095
Standard 10 mM	0,221	0,254	0,2375	0,2065
Standard 15 mM	0,319	0,319	0,319	0,288
Standard 20 mM	0,422	0,455	0,4385	0,4075
Lever	0,204	0,215	0,2095	0,1785
Muskel	0,098	0,112	0,105	0,074



	Hold A	Hold B	Hold C	Hold D	Hold E	Hold F
Blod, mM	3,3	44,4	6,7	44,4	6,7	44,4
Urin, mM	Neg	55,5	Neg	55,5	Neg	55,5
Lever, mM	250	90,9	316	39,9	244	60,5
Muskel, mM	28,9	21,7	23,5	20,9	28	>9,8

### For leveren:

Glut-2 er ikke insulin afhængig, dvs., insulin eller ej, glukose kommer ind i leveren (pga. gradienten. Dvs. det strømmer ind indtil gradienten er i balance).

Mindre glykogen i lever med rotte uden insulin pga. glykogensyntasen stimuleres af insulin, og der laves derfor ikke glykogen. Enzymerne kan ikke mærke glukose-tilstedeværelsen.

### For muskel:

Muskelceller optager glukose gennem GLUT-4. GLUT-4 er stærkt påvirkelig af insulin; da GLUT-4 translokteres til cellemembranen efter insulinstimulering.

Kontraktionsinduceret glukose optagelse i muskelceller medvirker til, at der er forekomst af glykogen i muskelcellerne, selvom insulin funktioner er defekte.

### For blod:

Insulin stimulerer til optagelse af glucose i cellerne, og da de diabetiske rotters celler ikke optager glucosen fra blodet vil der være mere glucose i blodet end hos en normal rotte.

**For urin:**

Den diabetiske rotte kan ikke reabsorbere alt glucosen i urin, hvorfor vi ser en stor udskillelse.

Konklusionen er, at vores resultater stemmer godt overens med den biokemiske forklaring herpå.

**Besvarelsen af spørgsmål fra rapporten:**

1: Den er størst i den normale rotte, da insulin insufficiensen hos den diabetiske rotte medvirker, at glykogenolysen nedsættes, dette skyldes, at insulin normalt sørger for opbygningen af glykogen øges og derfor vil den diabetiske rotte have mindre glykogen, og derfor mindre, der kan nedbrydes.

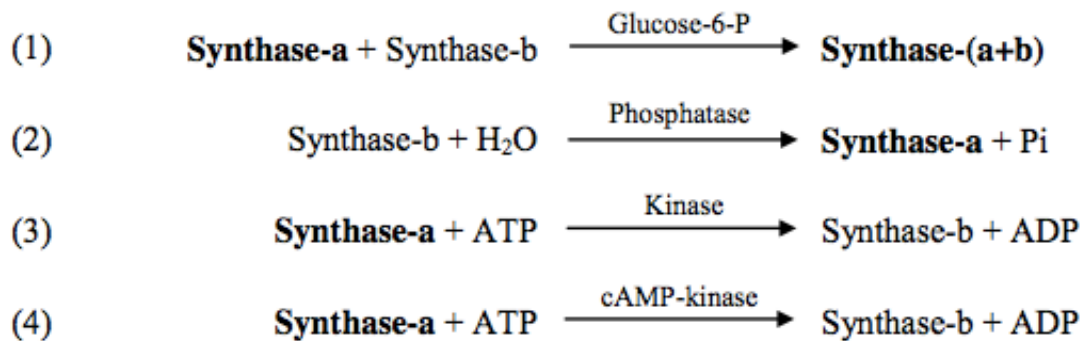
2: Når glykogen er opbrugt begynder nedbrydningen af aminosyrer og fedt, hvilket danner ketonstoffer og glucogen.

3: Leveren kan ikke selv forbrænde ketonstoffer, da hepatocytterne ikke indeholder succinyl-CoA:acetoacetat-CoA-transferasen ( $\beta$ -ketoacyl-CoA-transferasen), der katalyserer aktivering af acetoacetat til acetoacetyl-CoA. De fleste andre væv indeholder enzymet, og ketonstoffer kan derfor udnyttes i dem.

### Øvelse 2: Glykogensyntase

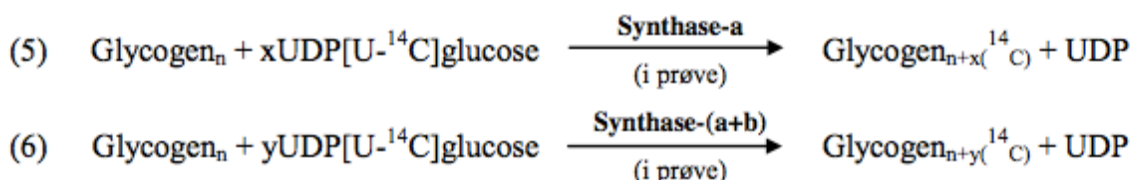
1: Formålet er at bestemme aktiviteten af de to forskellige enzymer for glykogensyntase.

2: Glykogensyntase findes på en a form og en b form. B form er fosforyleret og mindre aktiv.



Vi måler glykogensyntase aktiviteten med og uden glucose-6-P.

Vi anvender radioaktivitet i denne øvelse (dog en ufarlig mængde). Vi tilsætter en glykogen primer og UDP glukose (radioaktivt mærket er glukosen). Jo mere radioaktivt glukose, der bliver indbygget desto mere aktiv glykogensyntasen er.



Man laver et leverhomogenat i fællesskab. Vi klipper vævet i stykker med en saks, vi homogeniserer det sammen. Vi giver den ultralyd for at slå membraner helt i stykker. Derefter centrifugerer vi det. Resultatet er et rør med leverhomogenat = et snask i bunden. Det nederste er pelleten og så har vi supernatanten. Vi skal bruge supernatanten. Vi får et 10 %'s homogenat. Vi tilsætter homogeniseringsbuffer for at gøre det til et 10 %'s homogenat. Vi antager at 1 g lever fylder 1 mL. Alt dette gøres i fællesskab.

Vi starter med at skulle lave en nulprøve, mens homogenatet er på is. Vi vortexer røret og udtager med det samme 200 µL til et rør på is, vi udtager med det samme 2 gange 50 µL, til et A og et T rør på stuetemperatur. Her bliver glykogenkæden forlænget med radioaktivt UDP glukose. Vi tager det op efter præcis 10 min og kommer på filterpapir. Vi smider filterpapiret i

iskold ethanol, hvorved glykogenet bliver siddende på filterpapiret, det overskydende glukose bliver fjernet.

Vi tager homogenatet fra is og venter 20 min, hvorefter vi gør det samme som ovenstående. Sådan kører det hvert 20. Minut indtil forsøget slutter efter 80 min. I løbet af de her 80 min bliver homogenatet varmet op, hvorved kinaser og ATPaser kan påvirke homogenatet. Ved opvarming bliver ATP'en brugt, da alle enzymer bliver aktive i homogenatet. Vi har ødelagt mitokondrierne således at der heller ikke bliver dannet mere ATP.

Fosfortaser er stadig aktive da de kræver  $Mg^{++}$ . Stofbufferen indeholder EDTA, der binder divalente ioner, hvorved at man ved tilsættelse får bundet alle  $Mg^{++}$  ioner til EDTA, hvorved fosfortaser ikke kan påvirke reaktionerne. Forholdet mellem A glykogensyntase og B glykogensyntase afspejler det vi udtog fra vores homogenat.

### 3: Resultater

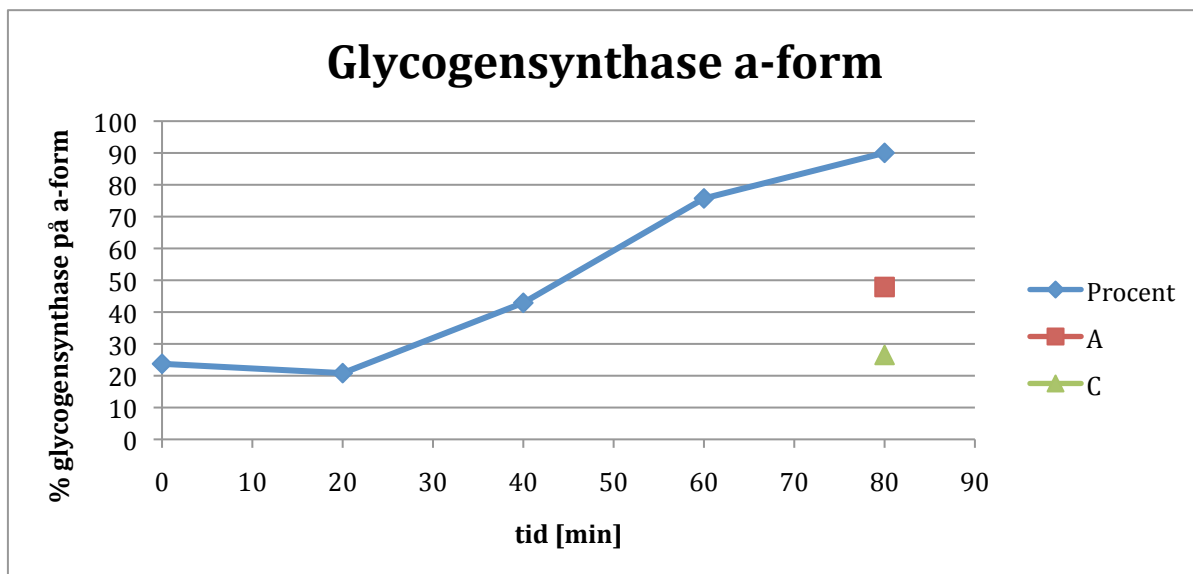
cpmSta: 18988,6 s.a.: 42,20

cpmStt: 20792,8 s.a.: 46,21

Tid Prøve min	cpm	Cpm- cpm blind	mU/mL	U/g	b-form	a-form*100 t-form
Blind a	30,4	0				
Blind t	56,2	0				
a0	410,4	380	54,02	0,54	1220,4	23,74
t0	1656,6	1600,4	207,82	2,08		
a20	387,2	356,8	50,73	0,51	1357	20,82
t20	1770,0	1713,8	222,54	2,23		
a40	878,6	848,2	120,61	1,21	1128,2	42,92
t40	2032,6	1976,4	256,64	2,57		
a60	1676,0	1645,6	233,99	2,34	527,8	75,72
t60	2229,6	2173,4	282,22	2,82		

a80	2271,4	2241	318,65	3,19	248	90,04
t80	2545,2	2489	323,20	3,23		
aA80	1222,2	1191,8	177,94	1,78	1297,2	47,53
aC80	690,8	660,4	98,60	0,99	1826,6	26,53

4:



5: Vi vurderer vores resultater til at være fine, med undtagelse for første måling (a0 og t0), da denne er lidt højere end forventet. Dette kan måske skyldes, at vi i første omgang glemte at komme filterpapiret i ethanol med det samme. Derudover fremgår det af vores resultater, at jo længere tid, der går (dvs. Jo varmere det bliver), desto mere er a-formen den dominerende form.

### Spørgsmål til besvarelse i rapporten:

1: Den glycogen vi tilsætter har til formål at initiere dannelsen af mere glycogen. Dette gør den fordi den danner det første led i et større glycogen-net, der kan bygges op omkring den.

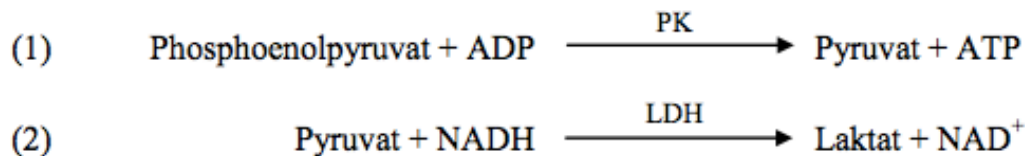
2: Den øger glycogensyntesen.

3: Insulin inducerer defosforyleringen og aktivering af glykogensyntasen i leveren, hvorved glykogenese indledes. Insulin stimulerer optagelse af glukose i myocytter via GLUT4.

### Øvelse 3 Pyruvatkinase:

1: At finde ud af hvordan visse stoffer påvirker pyruvatkinasen.

2: Dette er generelt øvelsesfremgangsmåden for alle grupper.



Vi kobler de to reaktioner til hinanden, for ellers kan vi ikke måle noget. Pyruvat bliver i reaktion (2) reduceret. Ved en koblet reaktion skal man tænke på at den hjælpereaktion vi skal måle på ikke må være begrænsende, hvorved vi tilsætter rigeligt af enzymet og NADH. Vi følger reaktionen live via et spektrofometer så vi hele tiden har styr på vores koncentrationer.

Man får to kuvetter, der hver tilsættes nogle forskellige ting, buffer A, NADH, LDH, ADP og enzym (fra lever). Vi analyserer kun en kuvette af gangen. Der sker ikke noget før substratet PEP tilsættes.

Leverenzym: De første to tre minutter når man ikke har tilsat substratet har vi en vandret linje. Ved tilsætning af substrat sker en omdannelse af PEP til Pyruvat, hvorved vi får en negativ hældning, hvorefter vi tilsætter noget fruktose1,6bifosfat, hvorved der omdannes mere PEP. Glukose6bifosfat er en Positiv allosterisk regulator.

Ved muskelenzym: Sker der ingenting ved fruktose1,6bifosfat, hvorfor den ikke er en allosterisk regulator.

ATP eller Fruktose1,6bifosfat påvirker ikke muskelkinasen allosterisk, mens den påvirker leverkinasen.

Alanin titrering: Vi tilsætter alanin af flere omgange, hvorved man tjekker om det påvirker reaktionshastigheden. Alanin er en negativ allosterisk hæmmer af leverpyruvatkinasen.

Fruktose1,6bifosfat overkommer den negative allosteriske hæmning fra alanin.

Muskelpyruvatkinasen er ikke påvirket af alanin.

Man udfører første måleserie med og anden måleserie uden fruktose1,6bifosfat. Man tilsætter stigende mængder substrat og ser hvordan dette påvirker reaktionshastigheden. Man ser at når der er tilsat fruktose1,6bifosfat sker der allerede ved den mindste mængde substrat en omdannelse, mens der ved ikke tilsat fruktose1,6bifosfat sker meget lidt ved de små mængder substrat, hvorefter man ved stigende mængder ser, at det går stærkt.



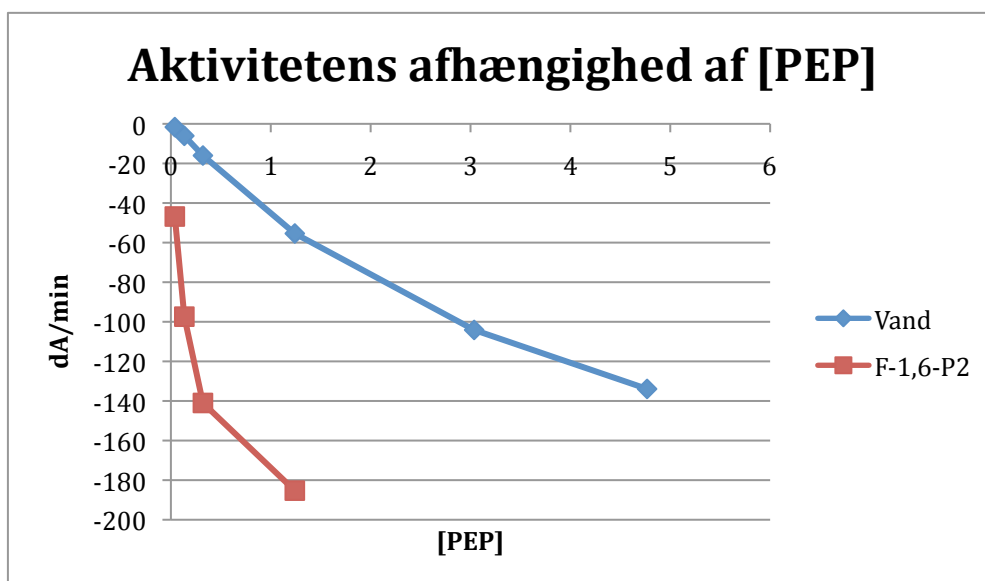
Ved tilsat fruktose1,6bifosfat følger den michaelismentels ligning, hvilket betyder at enzymet udviser positiv cooperativitet overfor substratet. Ved ikke tilsat fruktose1,6bifosfat får vi en sigmoideuskurve.

	Tilsætning	Lever v rel.	Muskel v rel.
HOLD A	1.00 mM PEP	1.0	1.0
	+0.10 mM F-1,6-P <sub>2</sub>	3,55	1,09
HOLD B	1. 00 mm PEP	1.0	1.0
	+ 2.35 mM ATP	0,25	0,91
	+ 0.10 mM F-1,6-P <sub>2</sub>	3,55	1,03

	Tilsætning	Lever v rel.	Muskel v rel.
HOLD C	1.00 mM PEP	1.0	1.0
	+ 0.25 mM alanin	0,75	1,01
	+ 0.50 mM alanin	-	1,23
	+ 0.98 mM alanin	0,6156	1,13
	+ 1.92 mM alanin	0,3977	1,19
	+ 0.09 mM F-1,6-P <sub>2</sub>	3,8661	1,35
HOLD E	1.00 mM PEP	1.0	1.0
	+ 0.25 mM alanin	0,92	0,92
	+ 0.50 mM alanin	0,68	1,15
	+ 0.98 mM alanin	0,06	1,09
	+ 1.92 mM alanin	0,50	1,04
	+ 0.09 mM F-1,6-P <sub>2</sub>	1,51	1,01

	[PEP] mM	-F-1,6-P <sub>2</sub> dA/min	+ F-1,6-P <sub>2</sub> dA/min
HOLD D	0.04 mM	-1,64	-46,82
	0.10 mM	-6,06	-97,41
	0.29 mM	-16,01	-141,01
	1.23 mM	-55,39	-185,29
	3.06 mM	-104,12	-161,40
	4.82 mM	-133,91	-
HOLD F	0.04 mM	1,52	51,24
	0.10 mM	3	107,18
	0.29 mM	8,05	139,03
	1.23 mM	29,61	188,74
	3.06 mM	63,16	203,31
	4.82 mM	76,67	(2,86)

2 grafer (for hold D):



**Spørgsmål ønsket besvaret:**

1: Vi finder først  $V_{max}$ , hvorefter vi aflæser PEP koncentrationen ud for 10 % og 90 % for denne. Vi fandt  $V_{max}$  til at være 140 dA/min, hvorefter at vi fandt [PEP] til  $0,1 \cdot V_{max} = 0,3$  mM, mens [PEP] til  $0,9 \cdot V_{max} = 4,3$  mM

Vi finder øgningen i [PEP]:

$$\text{Øgning af PEP} = \frac{[PEP]_{0,9V_{max}}}{[PEP]_{0,1V_{max}}} = \frac{4,3mM}{0,3mM} = 14,33$$

Hvis man ønsker at finde det samme for et enzym der følger Michaelis-Menten kinetik, kan man bruge følgende udregning;

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

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

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

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

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

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

Hvilket betyder at mængden af substrat skal øges 81 gange for at gå fra 0,1  $V_{max}$  til 0,9  $V_{max}$ .

2:

Fra tabel A og B finder vi at ATP hæmmer aktiviteten i pyruvatkinasen og er dermed en negativ allosterisk regulatorer i levervæv, derefter så vi ved tilsætningen af fruktose1,6bifosfat at denne negative allosteriske regulator effekt bliver ubetydelig iforhold til den positive allosteriske regulator som fruktose1,6bifosfat er.

Enzymet har ikke vist sig at have en ændring i aktiviteten hos myocyten, hvorfor ATP og fruktose1,6bifosfat ikke er allosteriske regulatorer i muskelvæv.

Fra Tabel C og E finder vi at aktiviteten i enzymet i leveren falder ved større mængder tilsat alanin, hvorfor alanin er negativ allosterisk regulator i leveren, mens vi igen ingen effekt ser i musklen, hvorfor alanin ikke kan anses for ikke at være en allosterisk regulator.

Fra Tabel D og F kan vi konkludere, at aktiviteten stiger med mængden af substrat, PEP, uden tilsætning af fruktose6bifosfat. Ved tilsætningen af fruktose1,6bifosfat stiger hastigheden en del, hvorved vi kan konkludere (igen) at fruktose1,6bifosfat er en positiv allosterisk regulator for leverens pyruvatkinase.

3: Vi vil normalt forvente, at der i fodret tilstand vil være en øgning af glykolyse i forhold til fastet tilstand. Vi ser på resultaterne in vivo, at ATP koncentrationen falder en smule, Alanin falder også, men dette modsvarer på ingen måde det at fruktose1,6bifosfat falder til det halve. Vi vil derfor se en overvejende inhiberende effekt på vores glykolyse, hvilket også svarer til det vi vil forvente. Dertil kommer at pyruvatkinasen vil være blevet fosforyleret på grund af glukagen, og derfor yderligere hæmmet. Omvendt vil der være en større glykolyse aktivitet hos den normalfodrede rotte.

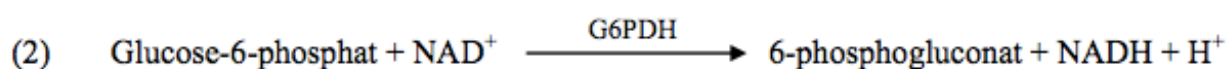
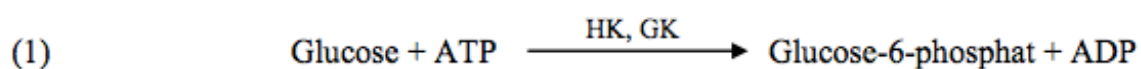
#### Øvelse 4: Hexokinase/glucokinase

1: Bestemme hexokinase- samt glucokinaseaktiviteten fra lever og hjernevæv i diabetiske og normale rotter.

2: Hexokinase og glucokinase gør det samme. Det er den første reaktion i glykolysen, men glucokinase findes kun i leveren og i betacellerne, mens alle celler har hexokinaser.

Hexokinase  $K_m = 0,01-0,1$  mM, mens glucokinase  $K_m = 10$  mM. Hvorfor der er forskel på hvor aktive de er ved forskellige mængder af substrat.

Vi kobler igen to reaktioner (for at kunne måle på vores reaktion)



Glucokinasens syntese er 100% insulin afhængig, hvorfor vi ved en diabetisk rotte ingen glucokinase aktivitet ser.

I hjernen: ingen glukokinaseaktivitet, da denne jo kun findes i lever og betaceller. Aktiviteten af hexokinase er virkelig høj og er ikke afhængig af insulin.

3+4: Resultater:

	Væv	Enzymaktivitet Hexokinase	Enzymaktivitet Glucokinase
HOLD A	Normal hjerne	6,30	1,48
HOLD B	Diabetisk hjerne	6,87	0,82
HOLD C	Normal lever	0,203	3,92
HOLD D	Diabetisk lever	0,399	0,113
HOLD E	Normal lever	0,22	2,54
HOLD F	Diabetisk lever	0,428	0,056

Her er en tabel over forventede værdier:

Forventede værdier		Normal fodret rotte	Diabetisk rotte
Hjernevæv	Hexokinase	5.5 - 10.0 Units/g	5.5 - 10.0 Units/g
	Glucokinase	0 Units/g	0 Units/g
Levervæv	Hexokinase	0.2 - 0.5 Units/g	0.2 - 0.5 Units/g
	Glucokinase	1.5 - 4.0 Units/g	0 - 0.5 Units/g

Alle fundne resultater stemmer overens med vores forventede resultater. Dog gælder dette kun, hvis man ser bort fra glucokinase aktiviteten fundet i hjernevæv, da disse værdier ikke stemmer overens med teorien. Vi forventer en højere glucokinaseaktivitet i leveren hos den normale rotte end hos den diabetiske, dette skyldes at glucokinaseaktiviteten er 100 % insulinafhængig, og uden insulin vil den derfor være næsten eller lig 0. Det samme forventes ikke set med hexokinaseaktiviteten, da denne er uafhængig af insulin. Dette er ret smart, da hjernen er meget afhængig af glucose, og uden hexokinase aktivitet vil vi derfor ikke kunne fungere. Glucosekinasen bruger glucosen ved at omdanne denne til at lave denne om til glucose6fosfat (se punkt 2), hvorefter dette kan omdannes til bla. pyruvat. Glucosekinasen medvirker altså til at vi får sænket glucose i blodet og uden denne vil der være en øgning af glucose i blodet. Vi ser derfor hos den diabetiske rotte, at ikke nok med at cellerne ikke kan få glucose ind kan det glucose der er i blodet heller ikke bruges til glucokinasen, da denne også er insulinafhængig.

**Bilag:**

**Øvelse 2:**

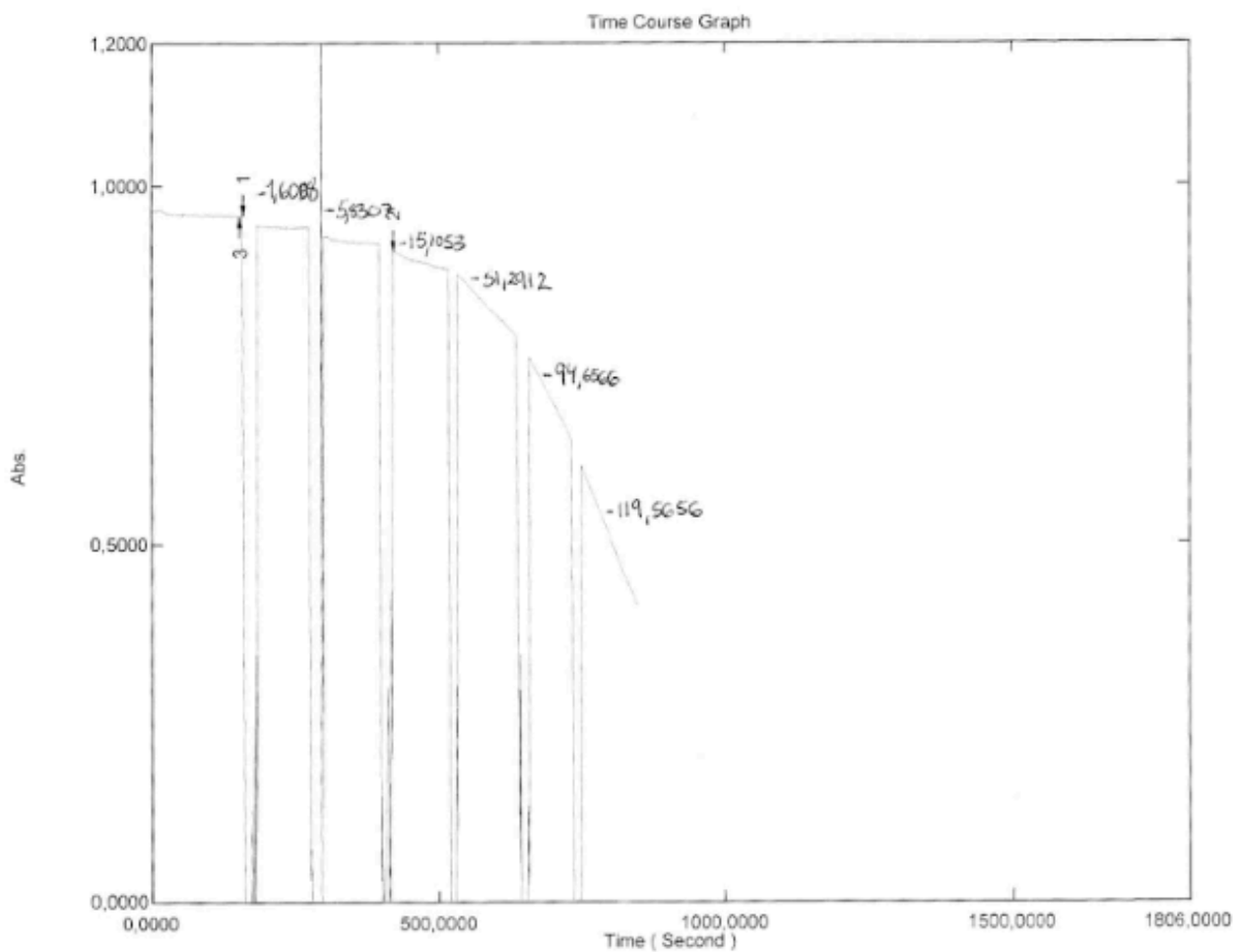
S#	TIME	CPMA	DPM	SIS FLAG
(2 missing vials)				
55	5.00	1656.60	66.840	
56	5.00	1770.00	63.100	
57	5.00	2032.60	68.320	
58	5.00	2229.60	67.310	
59	5.00	2545.20	57.500	
60	5.00	410.40	71.320	
61	5.00	387.20	67.750	
62	5.00	878.60	67.320	
63	5.00	1676.00	63.520	
64	5.00	2271.40	69.750	
65	5.00	1222.20	67.130	
66	5.00	690.80	69.380	
67	5.00	30.40	85.220	
68	5.00	18988.6	70.140	
69	5.00	56.20	82.700	
70	5.00	20792.8	81.220	
(2 missing vials)				

*Handwritten notes:*  
 Cpm 10  
 120  
 140  
 160  
 180  
 a 0  
 a 20  
 a 40  
 a 60  
 a 80  
 a 80A  
 a 80C  
 B19  
 Sta  
 Blt  
 8H

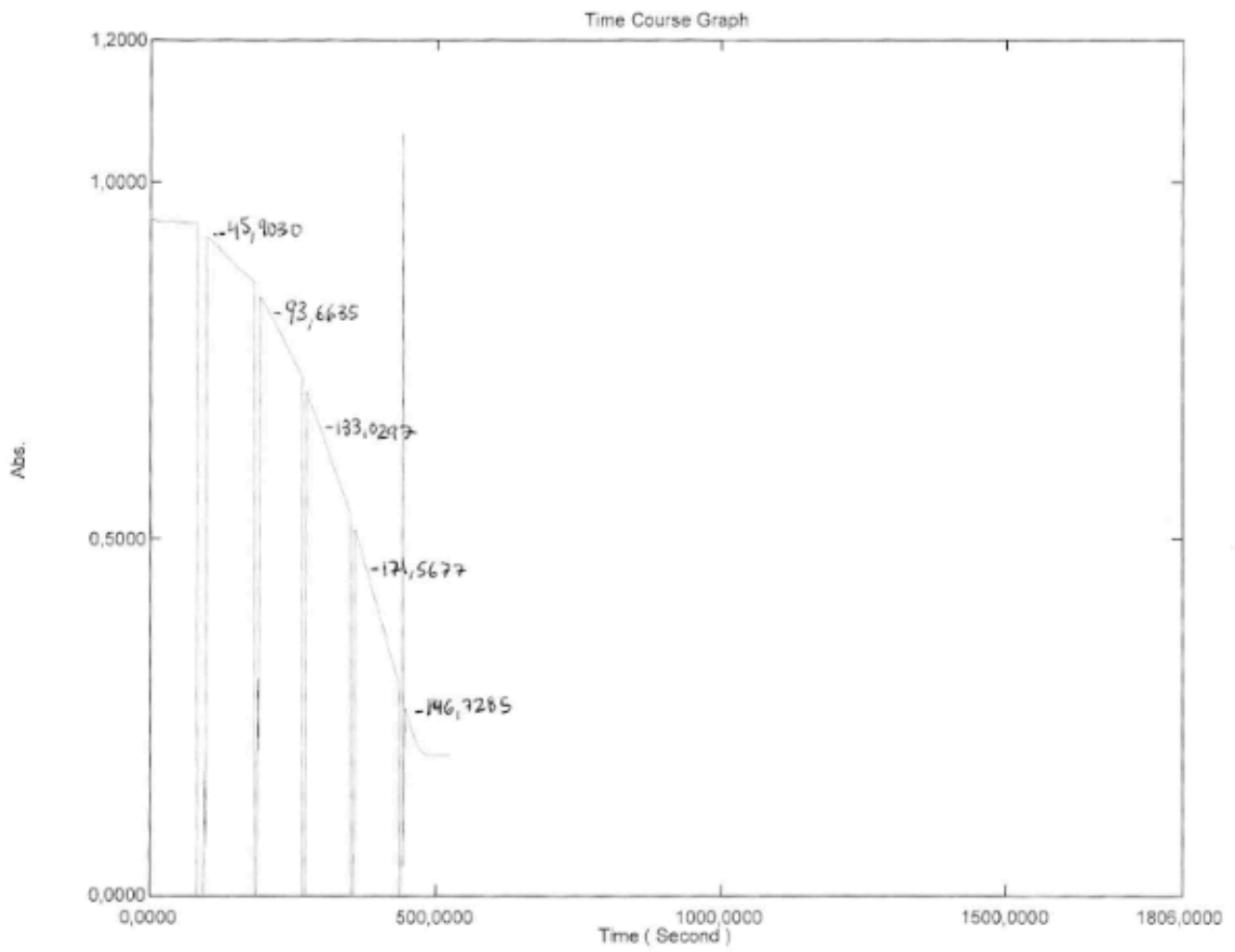
*Handwritten notes on the right:*  
 ELIF + Matilda  
 408  
 2D

**Øvelse 3:**

Vand:



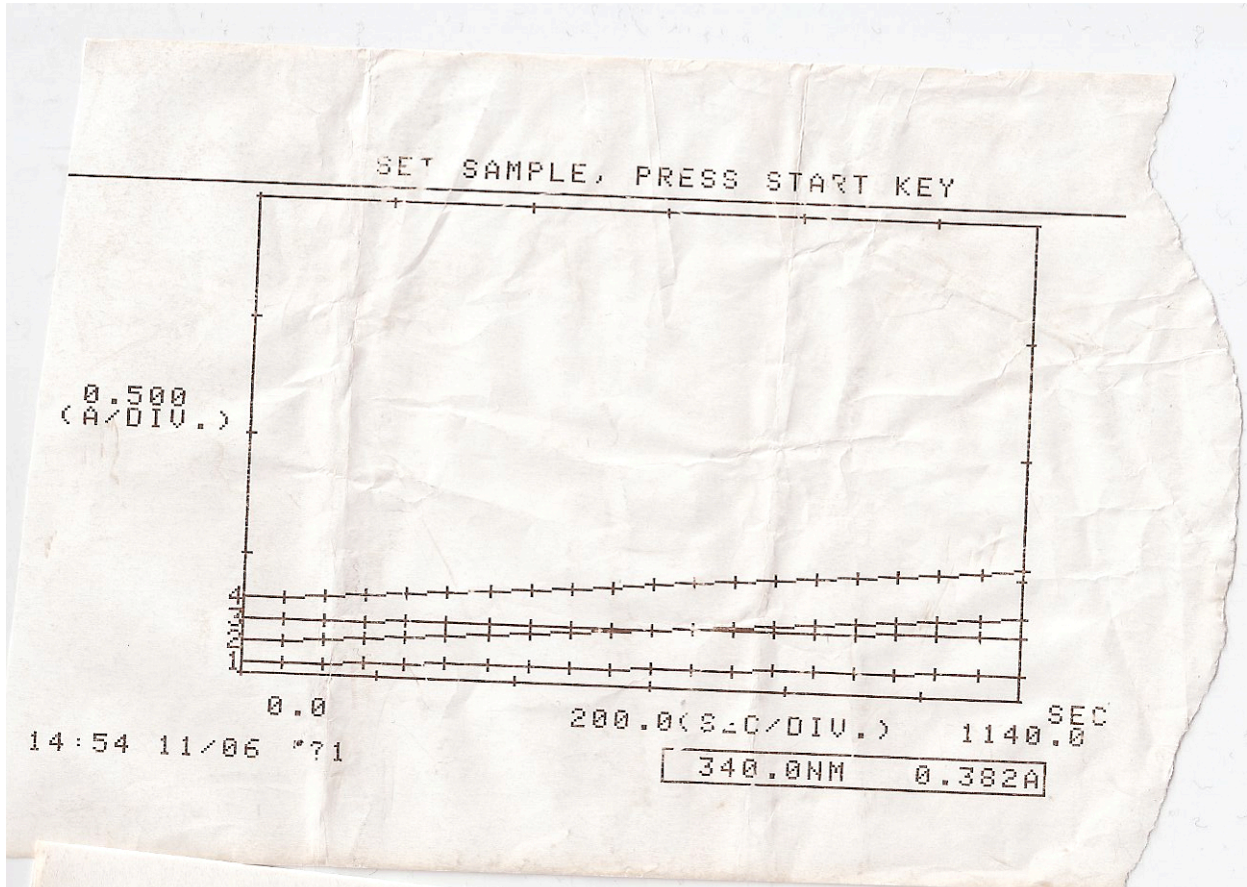
Fruktose1,6bifosfat





Øvelse 4:

CELL No. =1			CELL No. =3		
CYCLE	ABS	dA	CYCLE	ABS	dA
1	0.315		1	0.323	
2	0.319	0.003	2	0.325	0.002
3	0.321	0.001	3	0.326	0.000
4	0.325	0.003	4	0.328	0.001
5	0.327	0.001	5	0.331	0.002
6	0.333	0.006	6	0.333	0.001
7	0.334	0.000	7	0.335	0.001
8	0.336	0.002	8	0.335	0.000
9	0.340	0.003	9	0.338	0.002
10	0.344	0.003	10	0.340	0.001
11	0.346	0.002	11	0.341	0.001
12	0.351	0.004	12	0.344	0.002
13	0.354	0.002	13	0.345	0.001
14	0.356	0.002	14	0.346	0.000
15	0.360	0.003	15	0.349	0.002
16	0.364	0.003	16	0.351	0.001
17	0.366	0.002	17	0.353	0.001
18	0.371	0.004	18	0.354	0.001
19	0.374	0.003	19	0.355	0.000
20	0.376	0.002	20	0.357	0.002
CELL No. =2			CELL No. =4		
CYCLE	ABS	dA	CYCLE	ABS	dA
1	0.325		1	0.321	
2	0.330	0.004	2	0.328	0.006
3	0.336	0.006	3	0.335	0.007
4	0.345	0.009	4	0.345	0.009
5	0.355	0.009	5	0.356	0.010
6	0.366	0.010	6	0.369	0.013
7	0.377	0.011	7	0.381	0.011
8	0.390	0.012	8	0.394	0.013
9	0.401	0.011	9	0.406	0.012
10	0.414	0.012	10	0.420	0.013
11	0.424	0.010	11	0.433	0.012
12	0.437	0.013	12	0.445	0.012
13	0.449	0.012	13	0.458	0.012
14	0.459	0.010	14	0.470	0.012
15	0.472	0.012	15	0.482	0.012
16	0.484	0.012	16	0.496	0.013
17	0.496	0.011	17	0.509	0.012
18	0.508	0.011	18	0.520	0.011
19	0.520	0.011	19	0.534	0.013
20	0.531	0.011	20	0.546	0.012



\*\*\* CPS KINETIC \*\*\*

LAG T= 60SEC      RATE T=1140SEC

CELL No.	dA/MIN.	ACTIVITY
1	0.0032	0.0032
2	0.0113	0.0113
3	0.0018	0.0018
4	0.0123	0.0123