

VERSUCH 4: HARNSTOFFZYKLUS

I. VERSUCHSINHALT UND THEORETISCHE VORBEREITUNG

A. Versuchsinhalt und Versuchsziel

Im Versuch soll untersucht werden, welche Edukte bzw. Eduktkombinationen in verschiedenen Reaktionsansätzen von einem Enzymextrakt aus Schweineleber zu Harnstoff umgesetzt werden können. Dazu werden die Reaktionsansätze auf gebildeten Harnstoff anhand von NAD^+ / NADH -Umsatz durch einen gekoppelten optischen Test untersucht. Um die katalytische Aktivität des verwendeten Enzymextrakts zu bestimmen, wird sein Proteingehalt mit Hilfe der Biuret-Methode bestimmt.

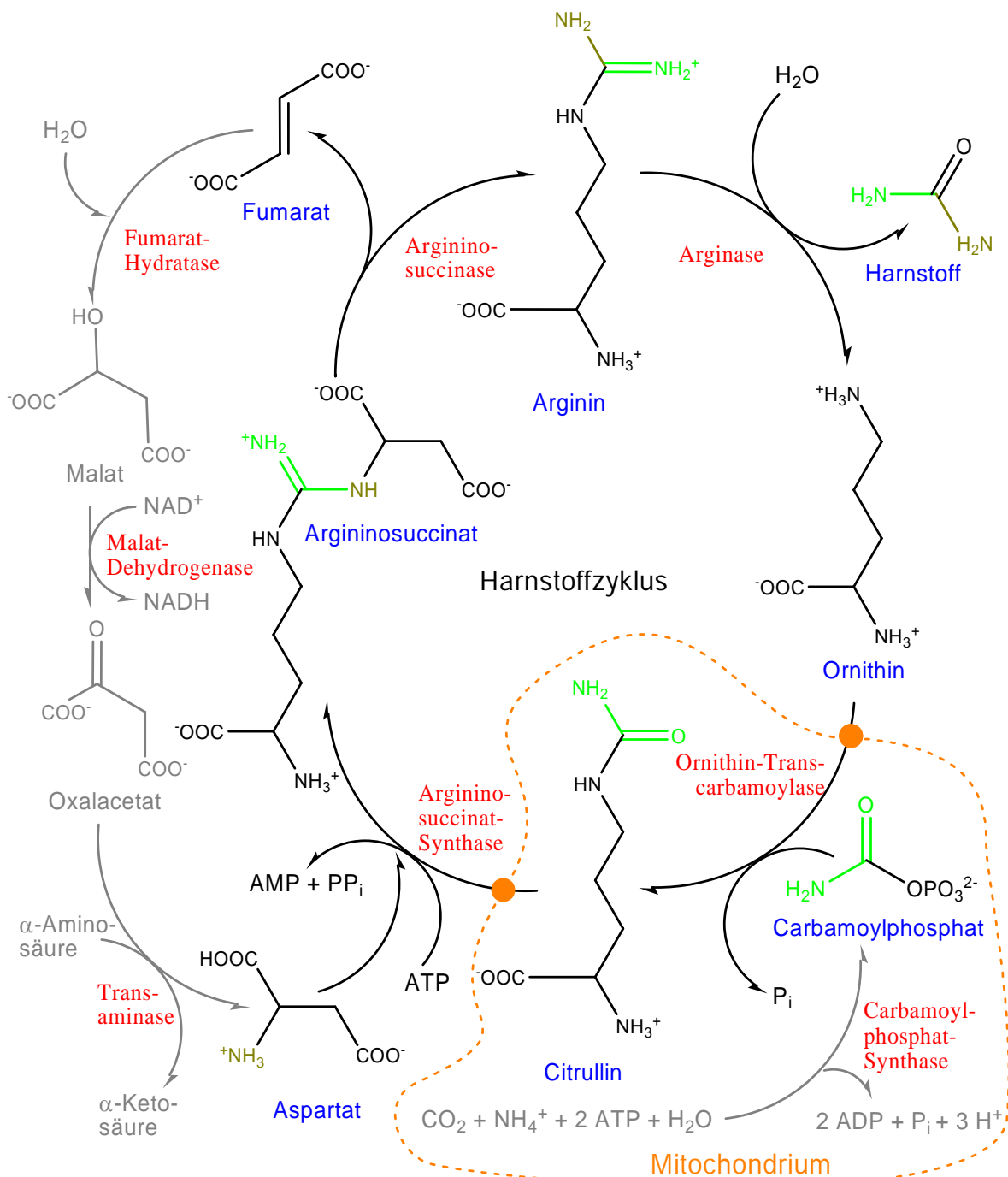


Abbildung I-1: Der Harnstoffzyklus und wichtige assoziierte Reaktionen (grau)

B. Theoretische Vorbereitung

Gegenstand der Untersuchung ist der oben abgebildete Harnstoffzyklus, dieser Kreisprozess ist der erste zyklisch verlaufende Stoffwechselweg, der beschrieben werden konnte (1932 durch Krebs und Henseleit). Im Organismus der meisten Landwirbeltiere sorgt der Harnstoffzyklus für die Umwandlung des vor allem aus dem Abbau von Proteinen bzw. Aminosäuren stammenden Ammoniaks in Harnstoff und wandelt damit einen essentiellen, jedoch in hohen Konzentrationen toxischen Metaboliten in ein gut lösliches, ungefährliches Ausscheidungsprodukt um.

Aminosäuren können nicht wie Glucose oder Fette gespeichert werden, der Abbau von Aminosäuren ist daher notwendig, wenn einerseits aus dem Abbau zellulärer Proteine entstandene Aminosäuren nicht für Neusynthesen direkt wiederverwertet können oder andererseits durch aufgenommene Nahrung eine Überversorgung an Aminosäuren vorliegt. Auch eine Unterversorgung mit Kohlenhydraten oder deren ungenügende Umsetzung (Diabetes mellitus) begünstigt den Abbau von zellulären Proteinen, da diese dann als Brennstoff dienen. Unter den genannten Stoffwechselbedingungen werden die Aminosäuren oxidativ abgebaut; die von den Aminogruppen getrennten Kohlenstoffskelette liegen als α -Ketosäuren vor, die entweder in die Gluconeogenese eingehen oder zu CO_2 und H_2O unter Energiegewinn umgesetzt werden.

Die Entfernung der Aminogruppen findet auf unterschiedlichen Wegen statt, der wichtigste ist die Transaminierung: Die Aminogruppe der Aminosäure (Donator) wird hierbei auf α -Ketoglutarat (Acceptor) übertragen, wobei die der Aminosäure entsprechende α -Ketosäure sowie Glutamat entsteht. Auf diese Weise werden die Aminogruppen der abgebauten Aminosäuren in einem Glutamat-Pool gesammelt, das dann für Biosynthesen oder die Harnstoffbildung genutzt werden kann. Die durch Transaminasen katalysierten Reaktionen sind vollständig reversibel ($K \sim 1$), α -Ketoglutarat ist dabei meistens der einzig verwendete Aminosäuren-Acceptor, es existieren aber unterschiedliche Enzyme, die sich in ihrer Spezifität für die Donator-Aminosäure unterscheiden; alle Transaminasen besitzen den gleichen Reaktionsmechanismus mit dem Coenzym Pyridoxalphosphat (PLP), dem Derivat von Vitamin B₆. Unter Umgehung der Transaminierung auf Glutamat können Aminosäuren auch direkt oxidativ desaminiert werden und so Ammoniak freisetzen.

Die Konzentration an freiem Ammoniak ist in der Pfortader (V. portae hepatica) am höchsten, während die anderen Blutgefäße einen wesentlich geringeren Ammoniakgehalt aufweisen. Der freie Ammoniak in der Pfortader stammt aus dem Abbau von Aminosäuren der Nahrung durch Mikroorganismen und dem Abbau von in Sekreten vorhandenem Harnstoff durch Mikroorganismen (durch Urease) im Magen-Darm-Trakt.

Dieser freie Ammoniak wird in den Mitochondrien der Leber durch Glutamatdehydrogenase und Glutaminsynthetase gebunden; zwar können auch andere Organe Ammoniak mit Hilfe dieser Enzyme binden, jedoch kann nur die Leber daraus Harnstoff bilden, aus diesem Grund muss der im Organismus anfallende Ammoniak gebunden (da toxisch) in die Leber transportiert werden. Aus den Muskeln wird Ammoniak auf Glutamat und dann auf Pyruvat unter Bildung von Alanin übertragen und über den Blutkreislauf in die Leber transportiert. Dort wird die Aminogruppe unter Freisetzung von Pyruvat wieder auf Glutamat übertragen, das angefallene Pyruvat wird zur Gluconeogenese genutzt, die so gewonnene Glucose wird wieder in extrahepatische Organe transportiert (Glucose-Alanin-Zyklus). Der in anderen Geweben (aber auch Muskeln) anfallende Ammoniak wird in Glutamin gebunden und in die Leber zur Ausscheidung oder zu anderen Stellen für Biosynthesen transportiert (aber auch in Niere und Darm). In der Leber wird analog zu Alanin die Aminogruppe von Glutamin auf α -Ketoglutarat übertragen. Der im Glutamat gebundene Ammoniak kann nun schließlich dem Harnstoffzyklus zugeführt werden, dazu wird er entweder auf Oxalacetat unter Bildung von Aspartat übertragen oder durch Glutamat-Dehydrogenase freigesetzt; der freie Ammoniak wird zu Carbamoylphosphat umgesetzt. Aspartat und Carbamoylphosphat treten in den Harnstoffzyklus ein (siehe Abbildung oben).

II. AUSWERTUNG

1. Proteinbestimmung nach Biuret

Zweck dieses Versuchsteils ist es, die Proteinkonzentration des Enzymextraktes aus Schweineleber zu bestimmen. Die in ihm enthaltenen Enzyme sind für die Bildung von Harnstoff verantwortlich und die im zweiten Versuchsteil eben durch diese Enzyme produzierte Harnstoffmenge kann so auf die Proteinmasse bezogen werden. Zur Bestimmung wird mit Hilfe eines Proteinstandards aus Rinderserumalbumin eine Eichgerade ermittelt, anhand derer die Proteinkonzentration des Enzymextraktes bestimmt werden kann. Die Färbung nach Biuret beruht auf der Bildung eines blauviolettten Kupfertetraaminkomplexes, dessen Absorptionsmaximum bei 560 nm liegt und mit Hilfe der Extinktion bei dieser Wellenlänge untersucht werden kann.

Tabelle II-1: Ansätze und Ergebnisse der Proteinbestimmung (Volumina in μl)

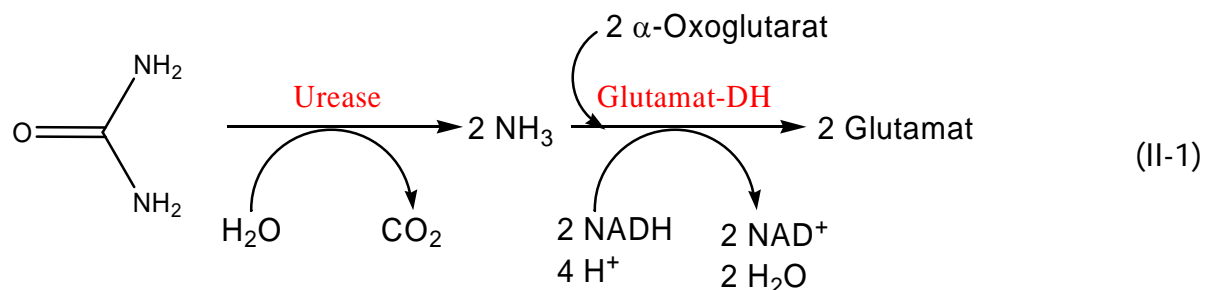
Ansatz	Wasser	Standard	Enzymextrakt	Biuret-Reagenz	Gesamtvolumen	Extinktion
1	100	0	0	1000	1100	0
2	80	20	0	1000	1100	0,19
3	60	40	0	1000	1100	0,355
4	40	60	0	1000	1100	0,579
5	20	80	0	1000	1100	0,764
6	0	100	0	1000	1100	0,847
7	60	0	40	1000	1100	0,156
8	40	0	60	1000	1100	0,254
9	20	0	80	1000	1100	0,327
10	0	0	100	1000	1100	0,404

2. Harnstoffsynthese

Zur Untersuchung der Harnstoffsynthese wurden 8 Ansätze mit verschiedenen Stoffkombinationen (v.a. Edukte, Cofakoren und Intermediate des Harnstoffzyklus) mit dem Enzymextrakt aus Schweineleber versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze anschließend 10 min in ein Wasserbad bei 100 °C gestellt und das ausgefallene Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Die Überstände wurden zur Harnstoffbestimmung genutzt.

3. Harnstoffbestimmung im gekoppelten optischen Test

Zur Bestimmung des im zweiten Versuchsteil produzierten Harnstoffs in den Ansätzen 1-8 und dem im Urin vorhandenen Harnstoff bzw. Ammoniak der Ansätze 15 und 16 wurde mit diesen und mit definierten Harnstoffmengen in den Ansätzen 9-14 ein gekoppelter optischer Test durchgeführt.



Es wurde jedoch *zuerst* die Glutamat-Dehydrogenase und *anschließend* die Urease zugegeben, dabei wurden die Extinktionen bei 340 nm der Ansätze 1-16 vor Zugabe der Glutamat-Dehydrogenase (E_1) gemessen und nach einer Dauer von 18 min vor Zugabe der Urease (E_2). Die resultierenden Extinktionsdifferenzen ΔE_{21} beruhen auf dem Umsatz von gelöstem freiem Ammoniak (u.a. aus der Luft). Nach Zugabe der Urease und einer Dauer von 19 min wurden

die Extinktionen wiederum gemessen (E_3), wobei davon auszugehen ist, dass die entsprechenden Extinktionsdifferenzen ΔE_{32} ausschließlich aus dem Harnstoffumsatz der Urease resultieren, da evtl. vorhandener anorganischer Ammoniak zuvor schon durch Glutamat-Dehydrogenase umgesetzt und in ΔE_{21} berücksichtigt wurde.

Der Extinktions-Zeit-Verlauf wurde anhand von Probe 2 nach der Zugabe von Glutamat-Dehydrogenase bestimmt und nach der Zugabe von Urease anhand von Probe 7, um ein Ende der Reaktionen durch konstante Extinktionswerte erkennen zu können.

Tabelle II-2: Verlauf der Extinktionen bei Probe 2 und 7 nach Enzymzugabe

Zeit (min)	Zeit (s)	Extinktion von Probe 2	Zeit (min)	Zeit (s)	Extinktion von Probe 7
0,25	15	1,698	0,25	15	1,718
0,5	30	1,698	0,5	30	1,715
0,75	45	1,696	0,75	45	1,712
1	60	1,692	1	60	1,705
1,25	75	1,689	1,25	75	1,696
1,5	90	1,685	1,5	90	1,689
1,75	105	1,682	1,75	105	1,678
2	120	1,68	2	120	1,668
2,25	135	1,67	2,25	135	1,658
2,5	150	1,675	2,5	150	1,649
2,75	165	1,675	2,75	165	1,638
3	180	1,673	3	180	1,63
3,25	195	1,672	3,25	195	1,62
3,5	210	1,67	3,5	210	1,61
3,75	225	1,668	3,75	225	1,603
4	240	1,667	4	240	1,593
4,25	255	1,667	4,25	255	1,585
4,5	270	1,665	4,5	270	1,578
4,75	285	1,665	4,75	285	1,571
5	300	1,665	5	300	1,563
6	360	1,662	5,25	315	1,558
7	420	1,66	5,5	330	1,55
8	480	1,658	5,75	345	1,547
9	540	1,658	6	360	1,542
10	600	1,657	7	420	1,524
11	660	1,657	8	480	1,511
12	720	1,655	9	540	1,503
13	780	1,655	10	600	1,5
14	840	1,655	11	660	1,498
15	900	1,653	12	720	1,494
16	960	1,653	13	780	1,491
17	1020	1,653	14	840	1,488
18	1080	1,653	15	900	1,487
19	1140	1,653	16	960	1,485
20	1200	1,653	17	1020	1,484
			18	1080	1,483
			19	1140	1,483
			20	1200	

Zur Verdeutlichung des Extinktion-Zeit-Verlaufs und der auftretenden Extinktionsdifferenzen wurde das folgende Diagramm erstellt.

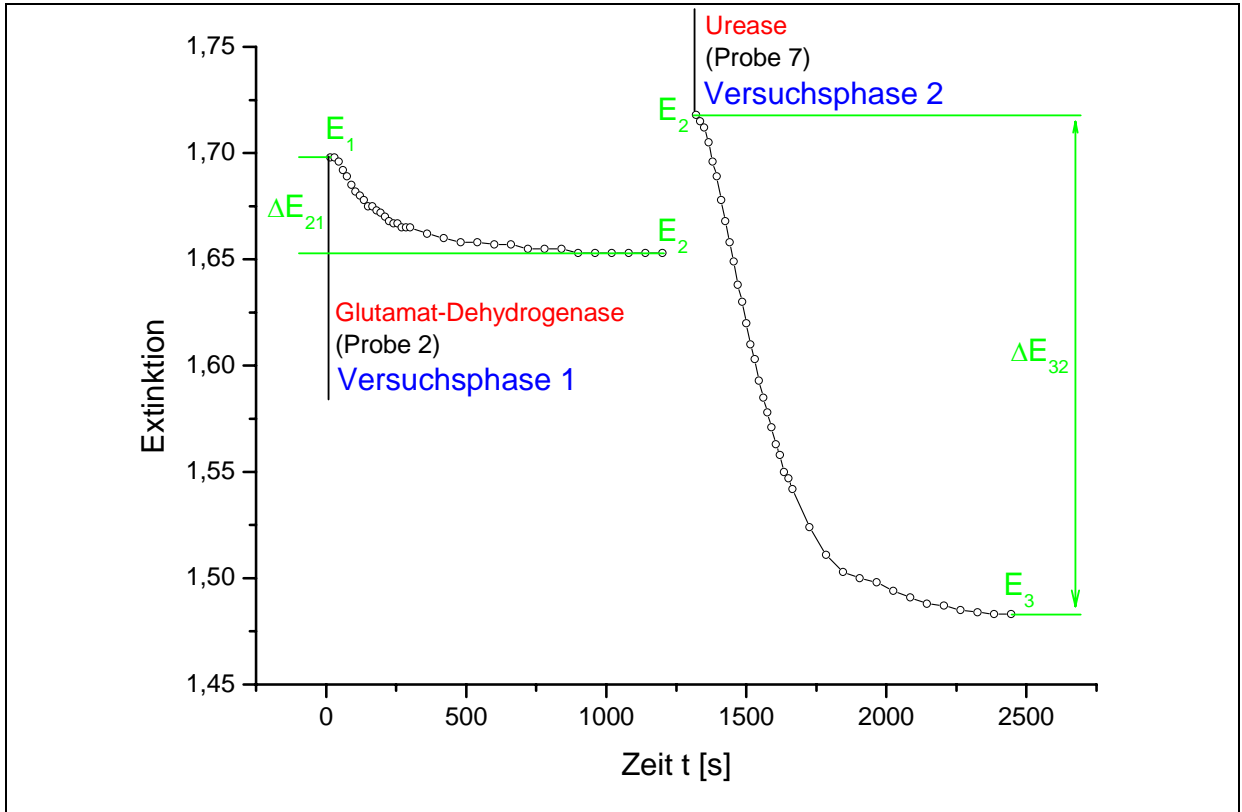


Diagramm II-1: Extinktions-Zeit-Verlauf des gekoppelten optischen Tests

Die aus der Bildung von Harnstoff resultierende und für die Auswertung damit bedeutende Extinktionsdifferenz ΔE_{32} ist im folgenden Diagramm für die Ansätze dargestellt.

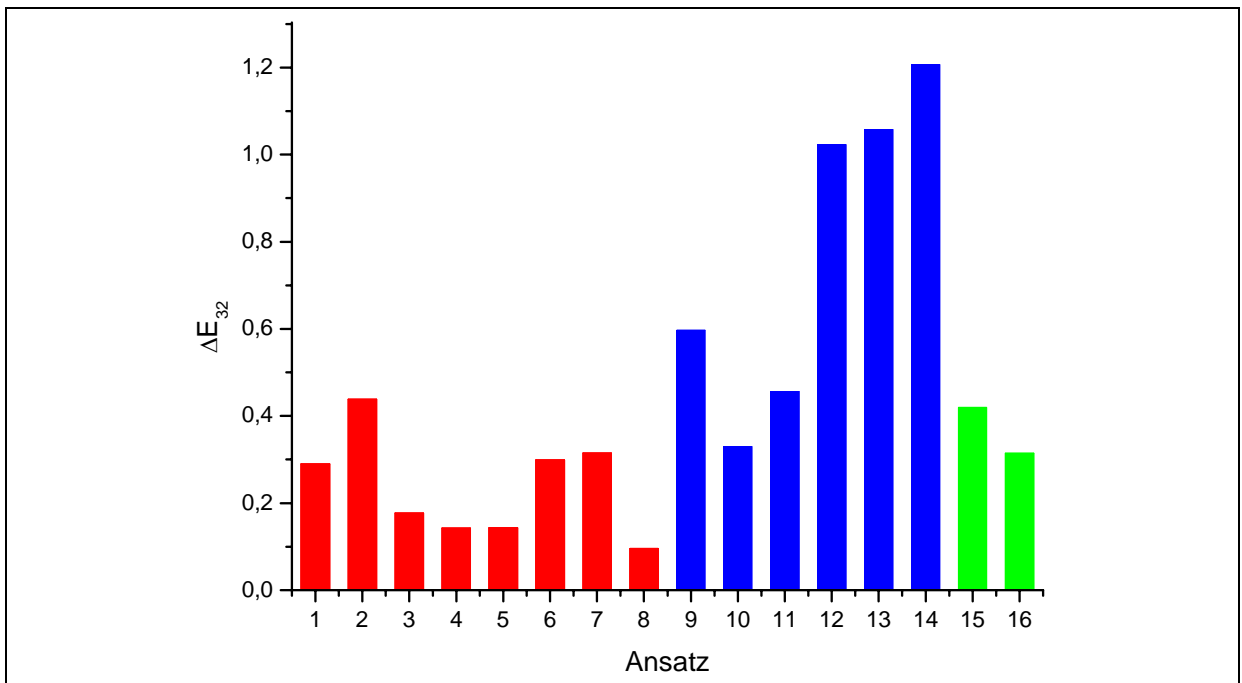


Diagramm II-2: ΔE_{32} der Ansätze 1-16 (1-8: Zentrifugate aus Versuchsteil 2, 9-14 Harnstoffstandard, 15-16 Urin)

In der auf der folgenden Seite dargestellten Tabelle sind die Extinktionsänderungen aller 16 Ansätze sowie ihre Zusammensetzungen aufgeführt.

Tabelle II-3: Ansätze und gemessene Extinktionen (Harnstoffbestimmung)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Verdünnung	1,00	0,10	1,00	1,00	0,10	0,10	0,05	0,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,001	0,0003
Harnstoff	0	0	0	0	0	0	0	0	10	20	40	60	80	100	0	0
Harn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
Aspartat-Energie-Mix	350	350	0	350	350	350	350	350	0	0	0	0	0	0	0	0
MgCl ₂	0	50	50	50	50	50	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0
EDTA	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Citrullin	50	50	50	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
Arginin	0	0	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0
Ornithin	0	0	0	50	0	50	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
Carbamoylphosphat	0	0	0	0	50	50	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
Phosphat-Puffer	50	50	100	50	50	50	50	150	0	0	0	0	0	0	0	0
Wasser	50	50	350	50	50	0	50	200	0	0	0	0	0	0	0	0
Enzymextrakt	450	450	450	450	450	450	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E ₁	1,749	1,721	1,731	1,727	1,696	1,710	1,860	1,727	1,701	1,698	1,698	1,692	1,696	1,696	1,718	1,673
E ₂	1,471	1,653	1,437	1,482	1,624	1,648	1,798	1,698	1,705	1,624	1,602	1,655	1,662	1,642	1,586	1,589
ΔE ₂₁ = E ₁ -E ₂	0,278	0,068	0,294	0,245	0,072	0,062	0,062	0,029	-0,004	0,074	0,096	0,037	0,034	0,054	0,132	0,084
E ₃	1,181	1,215	1,260	1,340	1,481	1,349	1,483	1,603	1,108	1,294	1,146	0,632	0,604	0,435	1,166	1,274
ΔE ₃₂ = E ₂ -E ₃	0,290	0,438	0,177	0,142	0,143	0,299	0,315	0,095	0,597	0,330	0,456	1,023	1,058	1,207	0,420	0,315

B. Extinktionskoeffizient für NADH

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von NADH werden die Ansätze 9-14 mit definierten Harnstoffkonzentrationen verwendet.

Tabelle II-4: Extinktionsänderungen der Ansätze 9-14 (Harnstoffstandard)

Ansatz	Harnstoff-Standard (1mM) μl	Vor Zugabe Glutamat-DH E_1	Vor Zugabe Urease E_2	ΔE_{21} $E_2 - E_1$	Versuchsende E_3	ΔE_{32} $E_3 - E_2$
9	10	1,701	1,705	-0,004	1,108	0,597
10	20	1,698	1,624	0,074	1,294	0,330
11	40	1,698	1,602	0,096	1,146	0,456
12	60	1,692	1,655	0,037	0,632	1,023
13	80	1,696	1,662	0,034	0,604	1,058
14	100	1,696	1,642	0,054	0,435	1,207

Ausgehend von der Annahme, dass am Ende der ersten Versuchsphase kein freier Ammoniak mehr in den Lösungen vorhanden war und am Ende der zweiten Versuchsphase der gesamte vorhandene Harnstoff umgesetzt wurde, können wir unter der Berücksichtigung, dass bei einem Mol Harnstoff zwei Mol NH_3 bzw. NADH umgesetzt werden, aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ableiten, dass die Extinktionsdifferenz ΔE_{32} für die entsprechende Konzentrationsdifferenz Harnstoff der doppelten Konzentrationsdifferenz NH_3 bzw. NADH entspricht und wir erhalten die folgende Gleichung für den molaren Extinktionskoeffizienten.

$$\begin{aligned} \Delta c_{\text{NADH}} &= 2\Delta c_{\text{Harnstoff}} \\ \Delta E &= \varepsilon d \Delta c_{\text{NADH}} \\ \frac{\Delta E}{d} &= \varepsilon \Delta c_{\text{NADH}} \\ \frac{\Delta E}{2d} &= \varepsilon \Delta c_{\text{Harnstoff}} \end{aligned} \quad (\text{II-2})$$

Aus dem zugegebenen Volumen der Harnstofflösung ($c = 1 \text{ mM}$) und dem Volumen der Küvette ($1000 \mu\text{l}$) können nun die umgesetzten Harnstoff- bzw. NADH-Mengen und -Konzentrationen abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} 2\Delta c_{\text{Harnstoff}} &= \Delta c_{\text{NADH}} \\ c_{0, \text{Harnstoff}} &= \frac{c_{\text{Standard}} V_{\text{Standard}}}{V_{\text{Küvette}}} \\ \Delta c_{\text{Harnstoff}} &= \frac{c_{\text{Standard}} V_{\text{Standard}}}{V_{\text{Küvette}}} - 0 = c_{0, \text{Harnstoff}} \\ \Delta n_{\text{Harnstoff}} &= c_{0, \text{Harnstoff}} V_{\text{Küvette}} \\ \Delta c_{\text{NADH}} &= 2c_{0, \text{Harnstoff}} \\ \Delta n_{\text{NADH}} &= 2c_{0, \text{Harnstoff}} V_{\text{Küvette}} \end{aligned} \quad (\text{II-3})$$

Tabelle II-5: Stoffmengen-, Konzentrations- und Extinktionsänderungen

Ansatz	V (Harnstoff) μL	Δn (Harnstoff) nmol	Δn (NADH) nmol	Δc (Harnstoff) mM	Δc (NADH) mM	ΔE ₃₂ /d cm ⁻¹
9	10	1	2	0,01	0,02	0,597
10	20	2	4	0,02	0,04	0,330
11	40	4	8	0,04	0,08	0,456
12	60	6	12	0,06	0,12	1,023
13	80	8	16	0,08	0,16	1,058
14	100	10	20	0,1	0,2	1,207

Wird nun anhand der obigen Gleichung nach Lambert-Beer die Extinktionsdifferenz ΔE₃₂ geteilt durch die Schichtdicke gegen die Konzentrationsänderung von NADH der jeweiligen Ansätze aufgetragen, erhalten wir aus der Steigung der ermittelten Ausgleichsgeraden direkt den molaren Extinktionskoeffizienten von NADH.

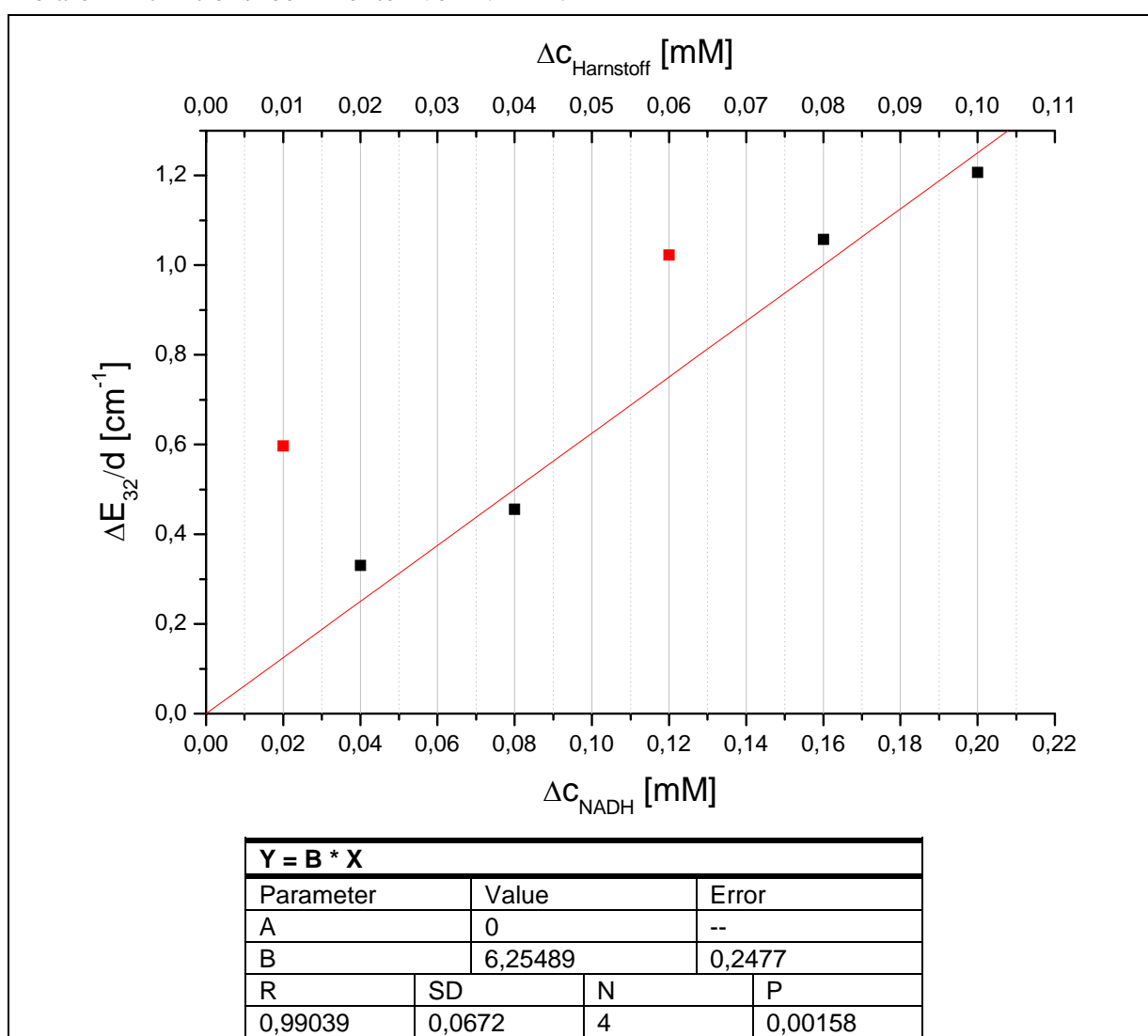


Diagramm II-3: Eichdiagramm zur Bestimmung von Harnstoff

Anhand der Steigung finden wir einen molaren Extinktionskoeffizient für NADH von $\epsilon_{405} = 6,255 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$. Im Vergleich zum Literaturwert von $\epsilon_{405} = 6,22 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ finden wir eine Abweichung von 0,56 %.

C. Harnstoffausbeute Ansätze 1 bis 8

1. Bestimmung der Proteinmenge in den Ansätzen 1 bis 8

Zur Ermittlung der Enzymkonzentration im Rinderextrakt gehen wir von dem verwendeten Rinderserumalbumin mit definierter Konzentration aus und erstellen eine Eichgerade, worin die in der Küvette vorhandene Proteinkonzentration gegen die Extinktion aufgetragen wird. Die Proteinmasse und -konzentration ergibt sich nach folgender Rechnung:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{Protein}} &= 50 \text{ mg/ml} = 0,05 \text{ mg} / \mu\text{l} \\
 m_{\text{Protein}} &= c_{\text{Protein}} V_{\{\text{Standard}\}} = 0,05 \text{ mg} / \mu\text{l} \cdot V_{\{\text{Standard}\}} \\
 c_{\text{Protein}\{\text{Proteintest}\}} &= \frac{m_{\text{Protein}}}{V_{\{\text{Proteintest}\}}} = \frac{c_{\text{Protein}} V_{\{\text{Standard}\}}}{V_{\{\text{Proteintest}\}}} = \frac{0,05 \text{ mg} / \mu\text{l}}{1100 \mu\text{l}} V_{\{\text{Standard}\}}
 \end{aligned}
 \tag{II-4}$$

Tabelle II-6: Proteinmassen/-konzentrationen und gemessene Extinktionen der Standardlösungen

Ansatz	Wasser µl	Rinderserum- albumin µl	Extinktion E ₅₆₀	Proteinmasse mg	Proteinkonzent- ration mg/ml
1	100	0	0	0	0
2	80	20	0,19	1,00	0,909
3	60	40	0,355	2,00	1,818
4	40	60	0,579	3,00	2,727
5	20	80	0,764	4,00	3,636
6	0	100	0,847	5,00	4,545

Anhand der berechneten Proteinmassen kann nun die Eichgerade erstellt werden.

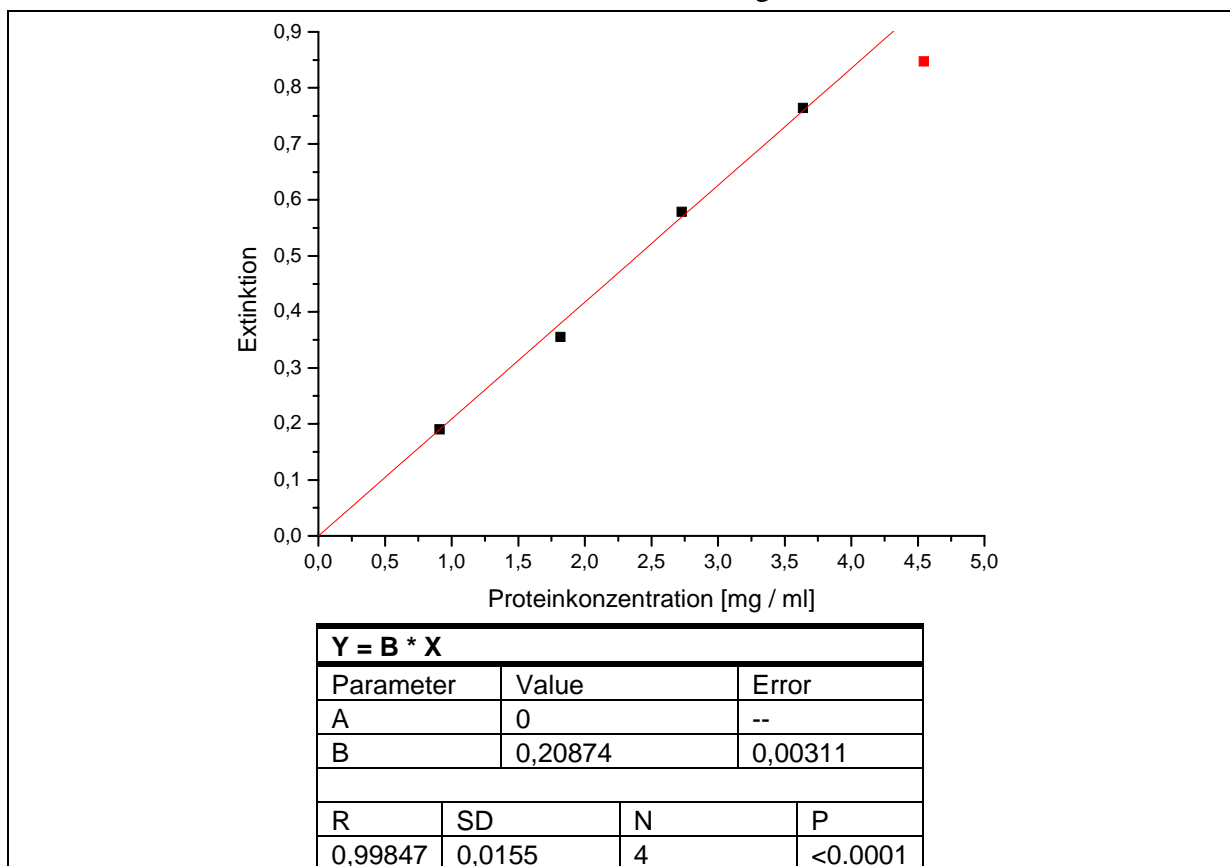


Diagramm II-4: Eichdiagramm zur Proteinbestimmung nach Biuret

Aus der Steigung der Eichgeraden lässt sich anhand der Extinktionen der Lösungen mit Enzymextrakt die Proteinkonzentration bestimmen:

$$\begin{aligned}
 E &= B \cdot m_{\text{Protein}} = \frac{0,20874}{\text{mg}} \cdot m_{\text{Protein}} \\
 c_{\text{Protein}} &= \frac{E}{B} = \frac{E}{0,20874} \text{ mg} \\
 m_{\text{Protein}} &= c_{\text{Protein}} V_{\{\text{Test}\}} \\
 c_{\text{Protein}\{\text{Extrakt}\}} &= \frac{m_{\text{Protein}}}{V_{\{\text{Extrakt}\}}} = \frac{c_{\text{Protein}} V_{\{\text{Test}\}}}{V_{\{\text{Extrakt}\}}} = \frac{V_{\{\text{Test}\}}}{V_{\{\text{Extrakt}\}}} \frac{E}{0,20874} \text{ mg}
 \end{aligned}
 \tag{II-5}$$

Tabelle II-7: Extinktion und Proteinmassen/-konzentrationen des Enzymextraktes

Ansatz	Wasser µl	Volumen Enzymextrakt µl	Extinktion E ₅₆₀	Proteinkonzentra- tion im Proteintest mg/ml	Proteinkonzentration im Enzymextrakt mg/ml
7	60	40	0,156	0,82	20,55
8	40	60	0,254	1,34	22,31
9	20	80	0,327	1,72	21,54
10	0	100	0,404	2,13	21,29

Der Enzymextrakt enthielt also durchschnittlich 21,4225 mg/ml Protein.

2. Bestimmung des Harnstoffumsatzes

Aus der in Auswertung 2 gewonnenen Eichgeraden lässt sich die gebildete Harnstoffmenge der Ansätze 1-8 ermitteln. Dabei ist wiederum zu berücksichtigen, dass die Steigung auf den NADH-Umsatz bezogen wurde, welcher dem halben Harnstoffumsatz entspricht.

$$\begin{aligned}
 \Delta E_{32} &= B \Delta c_{\text{NADH}} = 2B \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \\
 \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} &= \frac{\Delta E_{32}}{2B} = \frac{\Delta E_{32}}{2 \cdot 6,25489 \text{ L/mmol}}
 \end{aligned}
 \tag{II-6}$$

Für die Harnstoffbestimmung wurden 100 µl vom Reaktionsansatz (1000 µl) abgenommen, einige Ansätze wurden darüber hinaus verdünnt (Verdünnungsfaktor $f = 1 : x$), was in die Berechnung der tatsächlichen produzierten Harnstoffmenge eingehen muss.

$$\begin{aligned}
 \Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} &= \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} V_{\{\text{Test}\}} = \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \cdot 1000 \mu\text{l} \\
 \Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Ansatz}\}} &= \frac{1000 \mu\text{l} \cdot \Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}}{f} = \frac{1000 \mu\text{l} \cdot 1000 \mu\text{l}}{f} \cdot \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \\
 \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Ansatz}\}} &= \frac{1000 \mu\text{l} \cdot \Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}}{f \cdot V_{\{\text{Ansatz}\}}} = \frac{1000 \mu\text{l} \cdot 1000 \mu\text{l} \cdot \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}}{f \cdot 1000 \mu\text{l}} \\
 &= \frac{10}{f} \cdot \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}
 \end{aligned}
 \tag{II-7}$$

Tabelle II-8: Bestimmter Umsatz in den Ansätzen 1-8

Ansatz	ΔE_{32}	Δc (Harnstoff) im Test mM	Δn (Harnstoff) im Test mM	Verdünnungsfaktor f	Δc (Harnstoff) im Ansatz mM	Δn (Harnstoff) im Ansatz μmol
1	0,290	0,023	0,023	1,00	0,232	0,232
2	0,438	0,035	0,035	0,10	3,501	3,501
3	0,177	0,014	0,014	1,00	0,141	0,141
4	0,142	0,011	0,011	1,00	0,114	0,114
5	0,143	0,011	0,011	0,10	1,143	1,143
6	0,299	0,024	0,024	0,10	2,390	2,390
7	0,315	0,025	0,025	0,05	5,036	5,036
8	0,095	0,008	0,007	0,20	0,361	0,361

Um die gebildete Harnstoffmenge auf die Proteinmasse zu beziehen, wird die in den Reaktionsansätzen vorhandene Proteinmasse aus der mit Hilfe der Eichgeraden bestimmten Proteinkonzentration des Enzymextraktes berechnet, in die Ansätze 1-7 wurden 450 μl Enzymextrakt zugegeben, in den achten Ansatz wurde kein Extrakt zugegeben.

$$\begin{aligned}
 m_{\text{Protein}\{\text{Ansatz}\}} &= c_{\text{Protein}} V_{\{\text{Extrakt}\}} \\
 &= 21,4225 \text{ mg/ml} \cdot V_{\{\text{Extrakt}\}} = 0,0214225 \text{ mg} / \mu\text{l} \cdot 450 \mu\text{l} \\
 &= 9,640125 \text{ mg}
 \end{aligned}
 \tag{II-8}$$

Wir erhalten schließlich unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass die Inkubationszeit der Ansätze genau eine Stunde betrug, für die Harnstoffausbeute A den folgenden Ausdruck.

$$A = \frac{\Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Ansatz}\}}}{m_{\text{Protein}\{\text{Ansatz}\}} \cdot 1 \text{ h}}
 \tag{II-9}$$

Tabelle II-9: Harnstoffausbeute in den Ansätzen 1-8

Ansatz	Δn (Harnstoff) im Ansatz μmol	Harnstoffausbeute A $\mu\text{mol} / (\text{h mg Protein})$
1	0,232	0,024
2	3,501	0,363
3	0,141	0,015
4	0,114	0,012
5	1,143	0,119
6	2,390	0,248
7	5,036	0,522
8	0,361	-

D. Diskussion der Ergebnisse

Tabelle II-10: Zusammensetzung und Harnstoffausbeute der Ansätze 1-8

Ansatz	Aspartat-Energie-Mix (350 µl)	MgCl ₂ (50 µl)	EDTA (50 µl)	Citrullin (50 µl)	Arginin (50 µl)	Ornithin (50 µl)	Carbamoylphosphat (50 µl)	Enzymextrakt (450 µl)	Phosphat-Puffer (µl)	Wasser (µl)	Harnstoffausbeute A µmol / (h mg Protein)
1	x	-	x	x	-	-	-	x	50	50	0,024
2	x	x	-	x	-	-	-	x	50	50	0,363
3	-	x	-	x	-	-	-	x	100	350	0,015
4	x	x	-	-	-	x	-	x	50	50	0,012
5	x	x	-	-	-	-	x	x	50	50	0,119
6	x	x	-	-	-	x	x	x	50	0	0,248
7	x	x	-	-	x	-	-	x	50	50	0,522
8	x	x	-	x	x	x	x	-	150	200	-

a) Ansatz 8

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass für die Produktion von Harnstoff (mindestens) die vier in der nebenstehenden Abbildung dargestellten Enzyme vorhanden sein müssen, ist die Harnstoffausbeute im 8. Ansatz formal Null, da kein Enzymextrakt zugegeben wurde. Dass trotzdem Harnstoff im Test nachgewiesen werden konnte, beruht entweder darauf, dass noch gelöster Ammoniak nachgewiesen wurde oder in der Inkubationszeit vorhandenes Arginin spontan hydrolysierte.

b) Ansätze 1-3

In den Ansätzen 1-3 wird die von Argininosuccinat-Synthase katalysierte Reaktion untersucht. Diese Reaktion benötigt Aspartat, Citrullin und ATP sowie Mg²⁺ als Co-faktor, um das ATP in der Reaktion komplexieren zu können und so einer Umsetzung zugänglich zu machen. Im 1. Ansatz sind zwar die Edukte sowie ATP vorhanden, es wird aber kein zusätzliches Mg²⁺ zugegeben und evtl. vorhandenes Mg²⁺ mit EDTA gebunden. Die Reaktion ist daher gehemmt, die Harnstoffausbeute dementsprechend gering. Im 3. Ansatz fehlen Aspartat und ATP, die Reaktion kann ebenfalls nicht ablaufen, die Harnstoffausbeute ist ähnlich gering wie bei Ansatz 1. Der 2. Ansatz enthält alle zur Reaktion benötigten Stoffe, die Harnstoffausbeute ist daher hoch (ca. 20-mal größer als bei 1 und 2). Die minimale

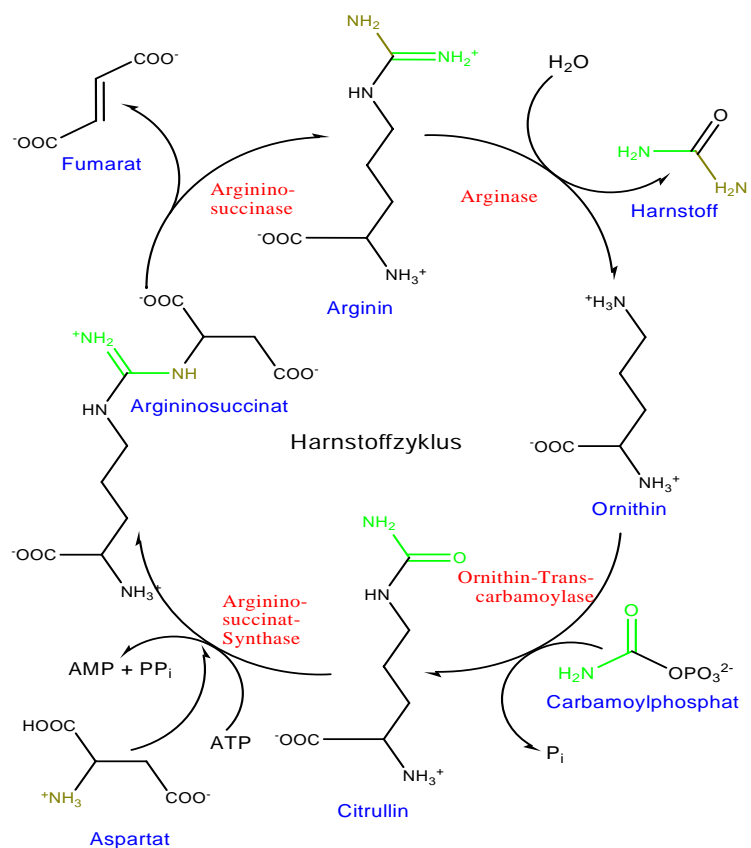


Abbildung II-1: Überblick zum Harnstoffzyklus

Ausbeute der Ansätze 1 und 3 kann mit Verunreinigungen an anderen Intermediaten des Harnstoffzyklus erklärt werden; so würde evtl. vorhandenes Argininosuccinat oder Arginin auch in diesen Ansätzen zu Harnstoff umgesetzt werden können.

c) *Ansätze 4-6*

In diesen Ansätzen wird die von Ornithin-Transcarbamoylase katalysierte Reaktion untersucht, eventuell gebildetes Citrullin kann mit vorhandenem Aspartat weiterreagieren, also analog zu den Ansätzen 1-3 zu Harnstoff umgesetzt werden. Im 4. Ansatz ist Ornithin vorhanden, aber kein Carbamoylphosphat. Aus diesem Grund wird kein Citrullin gebildet, was im Zyklus zu Harnstoff weiterreagieren könnte, die Ausbeute ist dementsprechend niedrig. Ansatz 5 enthält zwar Carbamoylphosphat, jedoch kein Ornithin, die Reaktion kann ebenfalls nicht stattfinden. Trotzdem ist eine relativ hohe Harnstoffausbeute gemessen worden, die jedoch im Vergleich zum 6. Ansatz nur halb so groß ist; im 6. Ansatz befinden sich nämlich Ornithin und Carbamoylphosphat, sodass die Reaktion unter Citrullinbildung ablaufen kann, dass im Zyklus zu Harnstoff weiterverarbeitet werden kann (Ausbeute 20-mal höher als bei Ansatz 4). Eine Erklärungsmöglichkeit für die relativ hohe Ausbeute in Ansatz 5 ist das Vorhandensein einer gewissen Minimalmenge Ornithin, die im vorliegenden Reaktionsgemisch zu Harnstoff unter Regenerierung umgesetzt werden kann; die geringe Ausbeute in Ansatz 4 kann wiederum mit Verunreinigungen begründet werden.

d) *Ansatz 7*

Im 7. Ansatz ist Arginin vorhanden, was durch Arginase unter Bildung von Ornithin direkt zu Harnstoff umgesetzt wird. Das gebildete Ornithin kann aufgrund des Fehlens von Carbamoylphosphat nicht wieder in den Zyklus integriert werden, dennoch liefert die direkte Hydrolyse von Arginin die im Versuch höchste Harnstoffausbeute.

e) *Zusammenfassung*

Die hohen Harnstoffausbeuten der Ansätze 2, 6 und 7 sind unter Berücksichtigung der zugesetzten Stoffe und des Reaktionsverlaufs erklärbar, ebenso wie die geringe Harnstoffproduktion in den Ansätzen 1, 3, 4 und 8. Vergleichbar hoch, jedoch nicht erwartet ist die Harnstoffausbeute von Ansatz 5.

E. Harnstoffgehalt im Urin

1. Harnstoffbestimmung

Analog zu Auswertung 3 (Diagramm II-3) kann mit Hilfe der Harnstoffstandards die umgesetzte Harnstoffmenge im Urin bestimmt werden. Die Ansätze wurden unterschiedlich stark verdünnt (Verdünnungsfaktor $f = 1 : x$), das Volumen des verdünnten Urins betrug 100 μl .

$$\begin{aligned} \Delta E_{32} &= B \Delta c_{\text{NADH}} = 2B \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \\ \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} &= \frac{\Delta E_{32}}{2B} = \frac{\Delta E_{32}}{2 \cdot 6,25489 \text{ L/mmol}} \\ \Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} &= \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} V_{\{\text{Test}\}} = \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \cdot 1000 \mu\text{l} \\ \Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Urin}\}} &= \frac{\Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}}{f} = \frac{\Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \cdot 1000 \mu\text{l}}{f} \\ \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Urin}\}} &= \frac{\Delta n_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}}{f \cdot V_{\{\text{Urin}\}}} = \frac{1000 \mu\text{l} \cdot \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}}}{f \cdot 100 \mu\text{l}} = \frac{10}{f} \cdot \Delta c_{\text{Harnstoff}\{\text{Test}\}} \end{aligned} \quad (\text{II-10})$$

Anhand dieser Gleichungen lässt sich wiederum die Harnstoffkonzentration im Urin bestimmen.

Tabelle II-11: Harnstoffkonzentrationen im Urin (Ansätze 15 & 16)

Ansatz	Δc (Harnstoff) im Test mM	Δn (Harnstoff) im Test μmol	Verdünnungsfaktor f	Δn (Harnstoff) im Ansatz mmol	Δc (Harnstoff) im Ansatz mM
15	0,034	0,034	1/1000	0,336	335,737
16	0,025	0,025	1/3000	0,755	755,409

2. Ammoniakbestimmung

Die Bestimmung des Ammoniakgehaltes im Urin erfolgt analog zur Harnstoffbestimmung, jedoch wird hier die einfache Steigung der Eichgeraden aus Diagramm II-3 verwendet, da diese auf die Konzentrationsänderung von NADH und damit NH_3 bezogen ist. Darüber hinaus muss die Extinktionsänderung ΔE_{21} zur Auswertung benutzt werden, da diese auf der Umsetzung von Ammoniak durch Glutamat-Dehydrogenase beruht. Damit ergibt sich die folgende Berechnung für die Harnstoffbestimmung.

$$\begin{aligned} \Delta E_{21} &= B \Delta c_{\text{NADH}} = B \Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} \\ \Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} &= \frac{\Delta E_{21}}{B} = \frac{\Delta E_{21}}{6,25489 \text{ L/mmol}} \\ \Delta n_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} &= \Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} V_{\{\text{Test}\}} = \Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} \cdot 1000 \mu\text{l} \\ \Delta n_{\text{Ammoniak}\{\text{Urin}\}} &= \frac{\Delta n_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}}}{f} = \frac{\Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} \cdot 1000 \mu\text{l}}{f} \\ \Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Urin}\}} &= \frac{\Delta n_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}}}{f \cdot V_{\{\text{Urin}\}}} = \frac{\Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} \cdot 1000 \mu\text{l}}{f \cdot 100 \mu\text{l}} = \frac{10}{f} \cdot \Delta c_{\text{Ammoniak}\{\text{Test}\}} \end{aligned} \quad (\text{II-11})$$

Diagramm II-5: Ammoniakkonzentrationen im Urin (Ansätze 15 & 16)

Ansatz	Δc (Ammoniak) im Test mM	Δn (Ammoniak) im Test μmol	Verdünnungsfaktor f	Δn (Ammoniak) im Ansatz mmol	Δc (Ammoniak) im Ansatz mM
15	0,021	0,021	1/1000	0,021	211,035
16	0,013	0,013	1/3000	0,040	402,885

3. Urinausscheidung in 24 h

Werden diese Konzentrationen auf ein Volumen von 1,5 l (für 24 h) bezogen und mit den molaren Massen für Harnstoff (60 g / mol) und Ammoniak (17 g / mol) multipliziert, ergeben sich die in 24 h ausgeschiedenen Harnstoff- bzw. Ammoniakmassen.

Diagramm II-6: Ermittelte Ausscheidungen von Harnstoff und Ammoniak

Ansatz	Δc (Harnstoff) im Ansatz mM	Harnstoff-ausscheidung mmol / 24h	Harnstoff-ausscheidung g / 24 h	Δc (Ammoniak) im Ansatz mM	Ammoniak-ausscheidung mmol / 24 h	Ammoniak-ausscheidung g / 24 h
15	335,737	503,60	30,22	211,035	316,55	5,38
16	755,409	1133,11	67,99	402,885	604,33	10,27

Der ermittelte Wert für die Harnstoffausscheidung im Ansatz 5 (Verdünnung 1: 1000) stimmt mit dem Normalwert von 27 g Harnstoff relativ gut überein, bei Ansatz 16 wurde offensichtlich ein Verdünnungsfehler gemacht, da die entsprechende Harnstoffausscheidung viel zu hoch ist. Dementsprechend lässt sich nur die Ammoniakausscheidung von Ansatz 15 mit dem Normalwert vergleichen, dennoch wurde ein ca. um den Faktor 6 zu hoher Wert ermittelt. Diese Ursache hierfür liegt entweder in einem Messfehler oder der Tatsache, dass in der Probe zusätzlich Ammoniak gelöst war, der die Messung verfälschte. Eine ungewöhnlich hohe Harnstoffausscheidung wäre durch Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Gruppen, die die entsprechende Probe zum Versuch verwendet haben, zu ermitteln.

Tübingen, am 10.11.2003

(Martin Thunemann)

(Torsten Barth)

(Natali Leiprecht)