

# Biochemie-Praktikum: Programm L

## Lipide

### Einleitung

Lipide sind unverzichtbar für alle Arten des Lebens auf diesem Planeten, da sie in schier unerschöpflicher Vielfalt an Einzelverbindungen auftreten und an sehr vielen Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind. Zusätzlich sind Struktur lipide essentielle Bestandteile aller biologischen Membranen; als solche bilden sie die typische Lipiddoppelschicht (lipid bilayer) aus, in der verschiedene Spielarten amphiphiler Verbindungen wie Phospholipide, Sphingolipide und Glykolipide, Verwendung finden.

Eine weitere unerlässliche Funktion dieser Stoffklasse liegt in ihrer optimalen Eignung als Energiespeicher und Energieträger der Nahrung, da bis 39,6 kJ Energie pro Gramm Fett gespeichert werden können, im Vergleich zu 18,6 kJ/g für Proteine oder 17,5 kJ/g für Kohlenhydrate; Vertebraten haben für diesen Zweck sogar ein eigenes Fettspeichergewebe entwickelt. Dieses dient als auch hervorragender thermischer und mechanischer Isolator, in Nervenzellen findet es sogar als elektrischer Isolator Verwendung.

Einige Lipidverbindungen werden als Signalmoleküle eingesetzt, wie z.B. Steroidhormone, Eikosanoide und manche second messenger; einige andere beispielsweise als Cofaktoren enzymatischer Reaktionen, genannt sei hier nur ihre Rolle in der Blutgerinnung oder dem Elektronentransport in Membranen.

Der vielschichte Begriff „Lipide“ ist hierbei folgendermaßen definiert: Eine Gruppe Substanzen biologischen Ursprungs, die sich in organischen Lösungsmitteln, als da wären Chloroform, Benzol o.Ä., gut löst. Dabei gliedern sie sich in eine schier unübersehbare Menge verschiedener Untergruppen; grob eingeteilt gibt es verseifbare (hydrolysierbare) und nicht verseifbare Lipide, die dementsprechend Estergruppen enthalten oder nicht verestert sind. Das einfachste Beispiel für veresterte Lipide sind die Triacylglyceride (= Fette), bei denen jeweils ein „Rückgrat“ aus Glycerin mit drei Fettsäuren kondensiert. Wachse dagegen sind Ester von Fettsäuren und „Fettalkoholen“, die statt einer Carboxyl- eine Alkoholgruppe besitzen; in Sterolestern ist dagegen normalerweise Cholesterol mit Fettsäuren verestert.

Eine nicht minder wichtige Gruppe der hydrolysierbaren Lipide stellen die Phospholipide dar, bei denen das Glycerin nur mit zwei Fettsäuren verestert ist, an der dritten Stelle dagegen mit Phosphorsäure und einem polaren Rest. Ähnlich aufgebaut sind die Sphingolipide, bei denen Sphingosin die Stelle des Glycerols und eines weiteren Fettsäurerestes einnimmt. Glykolipide sind meist Sphingolipide, an die eine oder mehrere Zuckergruppen angehängt wurden (Cerebroside oder Ganglioside sind wichtige Vertreter dieser Gattung).

Die nicht hydrolysierbaren Lipide lassen sich ebenfalls in mehrere Gruppen einteilen, z.B. einfache Kohlenwasserstoffe (Alkane), langkettige, zum Teil zyklisierte Alkohole wie Cholesterol, und langkettige Säuren wie etwa Fettsäuren und Eikosanoide.

Der Wichtigkeit der Lipide entsprechend erfolgt ihre Aufnahme über die normalerweise größte Körperöffnung, den Mund. Allerdings beginnt die Fettverdauung erst sehr spät, nämlich (nach einer unbedeutenden Vorverdauung im Magen) mit dem Gallensaft und Pankreassekret im Dünndarm. Dort werden die Triacylglyceride zu Monoacylglyceriden und freien Fettsäuren zerlegt; diese nun amphiphilen Verbindungen bilden zusammen mit Gallensäuren und Glycerin Micellen, die von den Enterocyten des Dünndarms auf Grund eines Konzentrationsgradienten resorbiert werden können. In den Darmmucosazellen findet nun wieder eine Veresterung zu Triglyceriden statt, die dann zusammen mit anderen aufgenommenen Fetten wie Cholesterolestern und Phospholipiden als Chylomikronen in die Lymphe abgegeben werden, von wo sie über den Venenwinkel ins Blut gelangen.

Die Leber ist ein zentraler Ort des Lipidstoffwechsel; dort werden die Chylomikronen aus dem Blut gefischt und die einzelnen Bestandteile verschiedenen Bearbeitungsprozessen zugeführt; beispielsweise werden freie Fettsäuren in der  $\beta$ -Oxidation schrittweise zu Acetyl-CoA zerlegt. Dabei werden die Fettsäuren zunächst im Cytosol aktiviert (Acyl-CoA), über einen Carnithin-Shuttle in die innere Mitochondrienmatrix transportiert und hier in mehreren Zyklen jeweils um zwei C-Atome erleichtert, die als Acetyl-CoA frei werden und entweder dem Citratzyklus und der Atmungskette zugeführt oder zur Ketonkörpersynthese verwendet werden können.

Ungefähr umgekehrt verläuft die Fettsäurebiosynthese in der Leber, wobei allerdings zuerst das Acetyl-CoA, das größtenteils aus dem Aminosäuren- oder Glukoseabbau gewonnen wird, mit Hilfe der Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA verlängert wird; dieses Schlüsselenzym unterliegt hierbei vielfältiger Kontrolle

und Regulation durch z.B. Insulin, Glukagon, Citrat und Acyl-CoA. Die gesamte Fettsäuresynthese findet an der Fettsäuresynthase statt; dort bindet zuerst (als Starter) ein Acetyl-CoA, das sukzessive durch Malonyl-CoA verlängert wird, von dem darauf jeweils ein CO<sub>2</sub> abgespalten wird, so dass die Verlängerung ebenso wie der Abbau in „Zweischritten“ verläuft. Die entstandenen Fettsäuren stehen der Biosynthese komplexerer Lipide zur Verfügung.

Schließlich müssen die synthetisierten Stoffe auch an die restlichen Gewebe des Körpers zum Einlagern (Fettgewebe) oder zur Energiegewinnung abgegeben werden; das ist nicht ganz unproblematisch, da Lipide ihrer Natur folgend in der wässrigen Phase, die das Blut darstellt, schlecht löslich sind. Folglich benötigt man Transportmoleküle; in diesem Fall übernehmen bestimmte Proteine die Aufgabe und bilden mit amphiphilen Lipiden ein Transportvesikel, in dessen Innerem hydrophobe Lipide, ohne sich in der Gefäßwand abzulagern, durchs Blut transportiert werden können. VLDL (very low density lipoproteine) ist die größte Abart dieser Vesikel und dient dem Transport vor allem von freien Fettsäuren von der Leber in andere Gewebe, LDL gibt vor allem Cholesterol ab, während HDL überschüssiges Cholesterol aus den Geweben zur Leber transportiert und „unterwegs“ auch freies Cholesterol und Lipide von anderen Lipoproteinvesikeln aufnehmen kann (deswegen ist es so „gesund“).

## Versuch 1: Enzymatische Triglyceridbestimmung im Serum

### Aufgabenstellung:

Die Bestimmung des Triglyceridspiegels im Blutserum ist eine wichtige Methode zur Erkennung von Hyperlipoproteinämien, die u.A. zu Arteriosklerose führen können. Der Nachweis der Triglyceride ist dabei allerdings eher ein sekundärer Hinweis, der Rückschlüsse auf die Konzentration der Lipoproteine im Blut zulassen kann, je nach Vorkommen von VLDL, LDL und HDL.

Im Versuch soll dabei exemplarisch von jeder Gruppe eins von zwei Rattenserum A und B auf den Gehalt an Triglyceriden untersucht und die für die beiden Seren erhaltenen Werte miteinander verglichen werden.

Verwendete Methoden: Enzymatische Triglyceridspaltung, Extinktionsmessung

### Versuchsdurchführung:

20µl des zu untersuchenden Serums (wir wurden für B eingeteilt) werden mit 1000µl Reaktionsgemisch versetzt, das aus ATP, Lactatdehydrogenase (LDH), Lipase, NADH, Phosphoenolpyruvat (PEP), Pyruvatkinase (PK) und Glycerokinase (GK) besteht.

Nun werden zuerst durch die Lipasen und Esterasen die im Serum enthaltenen Triacylglyceride enzymatisch gespalten. Das dabei frei werdende Glycerin wird weiterhin mit ATP unter der katalytischen Wirkung von GK zu Glycerin-1-phosphat phosphoryliert, wobei das ATP eine Phosphorgruppe einbüßt und zu ADP reduziert aus der Reaktion hervorgeht. Allerdings hat das ADP das Glück, sofort wieder mit PEP unter PK-Katalyse zu ATP regeneriert zu werden, so dass freies Pyruvat durch eine Reaktion mit NADH unter LDH-Katalyse zu Lactat und NAD reagieren kann. Nun sind wir endlich soweit, eine quantitative Bestimmung durch den NADH-Verbrauch vornehmen zu können, dessen Abnahme wegen seiner charakteristischen Lichtabsorption bei 340nm leicht bestimmt werden kann.

Da gut Ding Weile haben will, ließen wir die Sache 10 Minuten vor sich hin reagieren, bevor wir die Extinktionsmessung in Angriff nahmen. Dabei ergab sich für unseren Reaktionsansatz (also Serum B) eine Extinktionsdifferenz von 0,709, während sich bei der Befragung einer befreundeten Gruppe mit Serum A ein Wert von 0,583 ergab.

### Versuchsauswertung:

Berechnung der NADH-Konzentrationsabnahme nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$e_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \frac{l}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

$$E = e \cdot c \cdot d$$

| d = 1 cm in unserem Versuch.

$$c = \frac{E}{e \cdot d}$$

Serum B:

$$c = \frac{0,709}{6,22 \cdot 10^3 \frac{l}{mol \cdot cm}} = 0,114 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Serum A:

$$c = \frac{0,583}{6,22 \cdot 10^3 \frac{l}{mol \cdot cm}} = 0,094 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Die Abnahme der Konzentration von NADH entspricht durch den Reaktionsverlauf genau der Menge ursprünglich im Serum vorhandenen Triglyceride, falls diese vollständig umgesetzt wurden.

Umrechnung der Konzentration im Reaktionsansatz auf die Konzentration im Serum:

Serum B:

$$\frac{0,114 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 1020 ml}{20 ml} = 5,81 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Serum A:

$$\frac{0,094 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 1020 ml}{20 ml} = 4,79 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Berechnung der Massenkonzentration der Triglyceride:

Serum B:

$$5,81 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 880 \frac{g}{mol} = 511,6 \frac{mg}{100ml}$$

Serum A:

$$4,79 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 880 \frac{g}{mol} = 421,9 \frac{mg}{100ml}$$

Handwritten calculations on a chalkboard:

$$\Delta E \times 885 \times 1,02 \times 100$$

$$\frac{6,022 \times 10^3 \times 0,02 \times 1}{20}$$

$$\Delta E \times 726 \text{ mg/dl}$$

$$2) \Delta E \times 291 \text{ mg/dl}$$

Ratten scheinen also deutlich höhere Triglyceridwerte als Menschen zu haben, dessen Normalwerte mit 74-172mg/100ml etwa vierfach niedriger als die bestimmten Werte des Rattenserums liegen. Die Konzentration im Serum B war 21,3% höher als die in Serum A, die dazugehörige Ratte könnte etwa kurz vor der Blutentnahme eine fettreiche Mahlzeit gehabt haben.

Fragen:

Welche Bedeutung hat die Fettsäurezusammensetzung für die physiologischen Eigenschaften eines Triglycerids (vergl. Depotfett und Polsterfett, z.B. Nierenlager)?

Je nach Anzahl der Doppelbindungen der in den Triglyceriden gebundenen Fettsäuren, also dem Anteil an ungesättigten Fettsäuren, schwankt die Viskosität. Durch Doppelbindungen in den langen hydrophoben Resten ist die Drehbarkeit derselben eingeschränkt und die intermolekulären Kräfte sind durch geringere Kontaktflächen schwächer, folglich kristallisieren sie auch schwerer und sind flüssiger; außerdem haben sie dadurch auch eine geringere Dichte, da sich die Fettsäurereste mit Doppelbindungen nicht ideal an die Umgebung anpassen können und dadurch Freiräume entstehen. In Depotfett ist der Anteil an ungesättigten Fettsäuren höher als in Polsterfett, es ist demnach „leichter“ und flüssiger. Polsterfett wird auch während längeren Hungerphasen nie komplett abgebaut, da es wichtige Stütz-, Halte- und halt Polsterfunktionen erfüllt.

Welche Funktion haben die Enzyme GK, PK und LDH im Stoffwechsel?

Die Glycerokinase erfüllt im Körper dieselbe Funktion wie im Versuchsansatz beschrieben; sie wird u.A. im Fructosestoffwechsel der Leber, bei der Triacylglycerin-Biosynthese, der Gluconeogenese und im braunen Fettgewebe zur Umwandlung von Glycerin in Glycerin-1-phosphat benötigt, das je nach Stoffwechselvorgang weiter verwendet wird.

Die Pyruvatkinase wirkt durch die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Pyruvat bei der Glykolyse mit und wird bei der Glukoneogenese umgangen.

Die Lactatdehydrogenase ist eine Oxidoreduktase, die ebenfalls wichtig für die Glykolyse ist und dort auch zur NAD<sup>+</sup>-Regenerierung verwendet wird; es gibt 5 LDH-Isoenzyme.

## Versuch 2: Enzymatische Cholesterinbestimmung im Serum

### Aufgabenstellung:

Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Serum ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose von arteriosklerotischen Ablagerungen in den Blutbahnen, die eine weit verbreitete Erkrankung darstellen. Solcherart veränderte Gefäßwände verlieren deutlich an Elastizität und werden zudem rauher, so dass sich dort Thrombosen bilden können; insgesamt ist Arteriosklerose ein starker Risikofaktor für Schlaganfälle oder Herzinfarkte, also der kompletten Verstopfung von Blutgefäßen und der Nekrose der nicht mehr versorgten Gewebe.

Im Versuch wird wiederum dasselbe Serum untersucht, nun allerdings auf den Cholesteringehalt.

Verwendete Methoden: Enzymatische Cholesterinumsetzung, Extinktionsmessung

### Versuchsdurchführung:

10µl des zu untersuchenden Serums (diesmal erhielten wir A) werden mit 1000µl Reaktionsgemisch versetzt, bestehend aus TRIS-Puffer (pH 7,7), den Enzymen Cholesterinesterase, Cholesterinoxidase und einer Peroxidase; dazu Aminophenazon, Phenol und Detergentien zur Emulgierung der Lipide im Serum.

Um die volle Ausbeute an Cholesterin zu erhalten, werden zuerst die Cholesterinester von der Cholesterinesterase gespalten. Das freie und neu freigesetzte Cholesterin wird nun mit Hilfe der Cholesterinoxidase zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und  $^4$ -Cholestenon oxidiert, wonach das entstandene  $H_2O_2$  durch eine Peroxidase mit dem Aminophenazon und Phenol reduziert wird, wobei eine extinktorisch nachweisbare farbige Verbindung hervorgerufen wird.

Um die nötige Reife zu erreichen, ließen wir die Sache wiederum 10 Minuten inkubieren, bevor wir die Extinktionsmessung bei 500nm vornahmen. Ergebnis für unseren Ansatz (Serum A) war diesmal eine Extinktionsdifferenz von 0,145, während konkurrierende Gruppen mit Serum B 0,109 angaben.

### Versuchsauswertung:

Berechnung der 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon-Konzentrationszunahme nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$e_{500} = 1,34 \cdot 10^4 \frac{l}{mol \cdot cm}$$

$$E = e \cdot c \cdot d \quad | d = 1 \text{ cm in unserem Versuch.}$$

$$c = \frac{E}{e \cdot d}$$

#### Serum A:

$$c = \frac{0,145}{1,34 \cdot 10^4 \frac{l}{mol \cdot cm}} = 0,011 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

#### Serum B:

$$c = \frac{0,109}{1,34 \cdot 10^4 \frac{l}{mol \cdot cm}} = 0,0081 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Umrechnung der Konzentration im Reaktionsansatz auf die Konzentration im Serum:

#### Serum A:

$$\frac{0,011 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 1010 ml}{10 ml} = 1,111 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

#### Serum B:

$$\frac{0,0081 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 1010 ml}{10 ml} = 0,818 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Da zur Synthese eines Mol Farbstoffs zwei Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  vonnöten sind, ist die Cholesterinkonzentration doppelt so hoch wie die errechneten Werte für den Farbstoff.

Serum A:

$$1,111 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 2 = 2,222 \cdot 10^3 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Serum B:

$$0,818 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 2 = 1,636 \cdot 10^3 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Berechnung der Massenkonzentration des Cholesterols:

Serum A:

$$2,222 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 386 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 85,8 \frac{\text{mg}}{100\text{ml}}$$

Serum B:

$$1,636 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 386 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 63,1 \frac{\text{mg}}{100\text{ml}}$$

Fragen:

*Welche Bedeutung hat die Veresterung des Cholesterins mit höheren Fettsäuren?*

*Welche Fettsäuren werden in diesem Zusammenhang verwendet?*

Die Cholesterolveresterung dient der Stabilisierung vor allem der HDL, indem es mit meist mehrfach ungesättigten Fettsäuren verbunden wird, die das Cholesterin in den lipophilen Kern der HDL-Kugel „ziehen“ und somit die Oberfläche für weitere Cholesterinaufnahme frei machen.

*Warum werden Lipide im Serum in Form von Lipoproteinen transportiert?*

Definition der Lipide: Stoffe, die gut in organischen Lösungsmitteln, aber meist schlecht in polaren Lösungsmitteln (z.B. Serum = wässrige Lösung) löslich sind. Deshalb sind Lipoproteinkomplexe notwendig, die nach „außen“ hin eine hydrophile Oberflächenbeschaffenheit durch Proteine und amphiphile Lipide aufweisen und „innen“ andere, auch komplett hydrophobe Moleküle transportieren können, ohne dass diese aus der Lösung ausfallen und sich z.B. an der Gefäßwand ablagern.

*Wie erklärt sich die Bedeutung der HDL als Arteriosklerose-Schutzfaktor?*

HDL ist in der Lage, freies Cholesterin im Blut oder aus Gefäßwänden aufzunehmen; dieses kann mit Hilfe der LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase) verestert und auch an andere Lipoproteinkomplexe abgegeben werden.

### **Versuch 3: Triglyceridspaltung durch Lipase: Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren**

Aufgabenstellung:

Die enzymatische Aktivität der Lipase des Pankreassekrets, die unter physiologischen Bedingungen im Duodenum abwärts Triacylglyceride in  $\beta$ -Monoacylglyceride und je zwei freie Fettsäuren spaltet, soll unter verschiedenen Bedingungen (mit  $\text{H}_2\text{O}$ , mit Galle und im durch Erhitzung denaturierten Zustand) untersucht werden.

Verwendete Methoden: Enzymatische Triglyceridspaltung, Titration

Versuchsdurchführung:

Jede Gruppe stellte drei Versuchsansätze mit je 2ml Pankreasextrakt her, der im Versuchsansatz 2 gekocht und im Ansatz 3 mit Galle versetzt wurde. Dazu wird die enzymatisch aufzusplattendes Ölemulsion gegeben, die aus 11ml Speiseöl und 6 Tropfen 0,1M NaOH besteht. Nach eingehender und sorgfältiger Durchmischung der Ingredienzien mittels Muskelkraft und unter Verbrauch der vorher zugeführten Mensaenergie wurde ein Schütteldienstplan aufgestellt, nach dem sämtliche Versuchsansätze von jeder Zweiergruppe je 10 Minuten lang für insgesamt eine Stunde bei ihrer Inkubierung bei  $37^\circ\text{C}$  auf das Genaueste überwacht und alle zwei Minuten inniglich geschüttelt wurden. Anschließend fand eine Titrierung mit 0,1M NaOH und Phenolphthalein als Indikator statt.

Versuchsauswertung:

Bei der Titration wurden folgende Volumina 0,1M NaOH verbraucht:

- Reagenzglas 1: 4,4ml
- Reagenzglas 2: 1,0ml
- Reagenzglas 3: 8,1ml

Entsprechend folgenden Stoffmengen:

- Reagenzglas 1:  $4,4\text{ml} \cdot 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 0,44\text{mmol}$
- Reagenzglas 2:  $1,0\text{ml} \cdot 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 0,1\text{mmol}$
- Reagenzglas 3:  $8,1\text{ml} \cdot 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 0,81\text{mmol}$

Da aus einem Mol Triglycerid bei vollständiger Umsetzung zwei Mol Fettsäuren abgespalten werden, wurden in den einzelnen Ansätzen folgende Stoffmengen an Triglyceriden umgesetzt:

- Reagenzglas 1:  $0,44\text{mmol} \div 2 = 0,22\text{mmol}$
- Reagenzglas 2:  $0,1\text{mmol} \div 2 = 0,05\text{mmol}$
- Reagenzglas 3:  $0,81\text{mmol} \div 2 = 0,405\text{mmol}$

Die nur durch die Lipasewirkung freigesetzten Fettsäuren errechnen sich für Ansatz 1 mit  $0,22\text{mmol} - 0,05\text{mmol} = 0,17\text{mmol}$  und für Ansatz 3 mit  $0,405\text{mmol} - 0,05\text{mmol} = 0,355\text{mmol}$ , da in Ansatz 2 die Lipase durch das Kochen denaturiert vorliegt und keine Aktivität mehr aufweisen kann; somit werden die schon vor der Lipasewirkung des Pankreas vorhandenen Fettsäuren aus der Berechnung entfernt. Der Vergleich von Ansatz 1 mit Ansatz 3 zeigt ziemlich eindeutig, dass die Lipasewirkung durch das Zusetzen von 1ml Galle gut verdoppelt wurde.

Fragen:

*Was sind Gallensäuren?*

Die Synthese der Gallensäuren erfolgt, ausgehend vom Cholesterin, durch eine Verkürzung der Seitenkette und Anheftung einer Carboxylgruppe und bis zu zwei zusätzlicher OH-Gruppen, so dass der Stoff einen amphiphilen Charakter erhält, der für die Micellenbildung bei der Verdauung wichtig ist; außerdem wird die Pankreaslipase durch Gallensäuren aktiviert und die Umsetzung ist bei vorhandenen Micellen sehr viel effektiver.

*Wie erfolgt deren Biosynthese?*

Die Biosynthese primärer Gallensäuren erfolgt in der Leber wie oben beschrieben, die sekundären Gallensäuren entstehen im Darm durch Dehydroxylierung der OH-Gruppe an C-7; in der Leber können die Gallensäuren zudem mit CoA aktiviert und mit Glycin oder Taurin über eine Peptidbindung verknüpft werden, wobei Gallensalze entstehen.

*Erklären Sie die Oberflächenaktivität der Gallensäuren aus ihrer Struktur!*

Durch die Carboxylgruppe an der der Seitenkette sowie die ein bis drei  $\alpha$ -ständigen OH-Gruppen ergibt sich auf einer Seite des Moleküls durch die Polarität ein hydrophiler Charakter, so dass insgesamt ein amphiphiles Molekül vorliegt, das Grenzflächen zwischen hydrophiler und lipophiler Phase auszubilden vermag.

*Was sind Choleinsäuren?*

Unter Choleinsäure versteht man eine bemerkenswerterweise wasserlösliche Additions- oder Einschlussverbindung der Desoxycholsäure z.B. mit bis zu acht Fettsäuren; diese liegen dann praktisch feinstemulgiert vor und können direkt resorbiert werden.

*Wieso kann man Cholesterin-Gallensteine durch orale Zufuhr von Gallensäuren auflösen?*

Da Gallensäuren emulgierend wirken, wird durch die Gallensäurekonzentration in der Galle direkt die emulgierbare Menge von Cholesterin bestimmt. Da Gallensteine durch Ausfällen und Aggregieren von Cholesterin zu Stande kommen, können durch eine artifizielle Erhöhung der Gallensäurekonzentration wieder ausgefällte Cholesterine in die Lösung aufgenommen und ausgeschieden werden.

## Versuch 4: Nachweis der Phospholipide der Leber durch Dünnschichtchromatographie

### Aufgabenstellung:

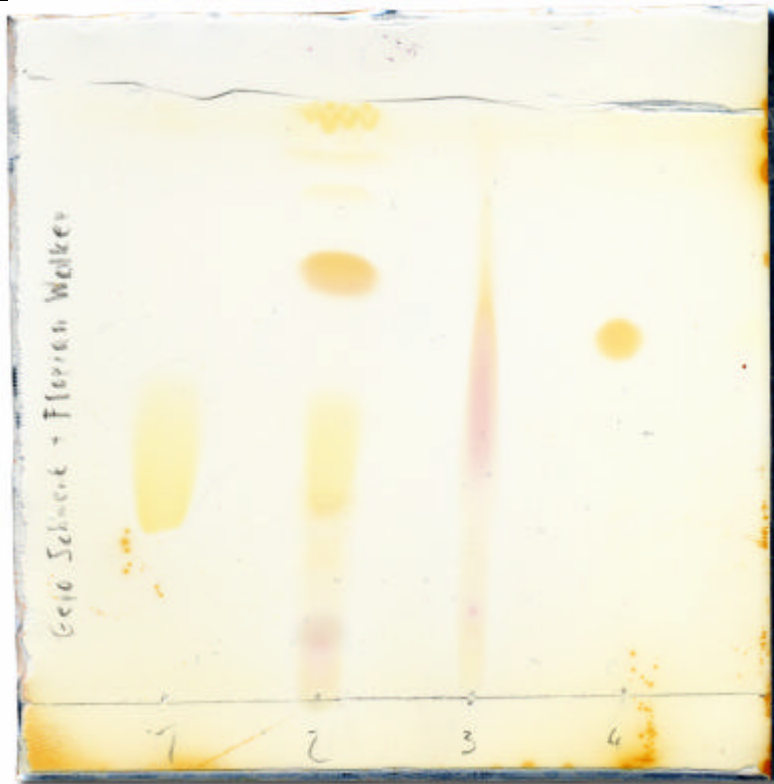
Die Phospholipide der Leber, die essentielle Bestandteile von Membranen darstellen und auch andere wichtige physiologische Funktionen erfüllen, sollen in diesem Versuch analysiert und auf ihre verschiedenen Fraktionen untersucht werden. Außerdem sollen damit wohl auch handwerkliche Fertigkeiten im Umgang mit Mörser und Stößel vermittelt und Hemmungen beim Zermatschen von Rohleber abgebaut werden.

Verwendete Methoden: Mörser und Stößel, Dünnschichtchromatographie

### Versuchsdurchführung:

Jeder Gruppe wurden 5g Leber zugeteilt, die zusammen mit Seesand und Aceton im Mörser zermatscht wurden; zweimal wurde abfiltriert und der im Aceton gelöste Rückstand (vor allem Triglyceride und Steroide) verworfen, dann gaben wir eine Chloroform/Methanol-Mischung dazu, in der sich schließlich die Phospholipide lösen sollten. Das Filtrat wurde mit Glaskapillaren auf eine Kieselgelplatte aufgebracht und zusammen mit Vergleichssubstanzen, nämlich Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, mit einem Laufmittel aus Chloroform, Methanol und Wasser eine halbe Stunde entwickelt. Anschließend wurden die Platten in einer Jodkammer kräftig eingejodet, nur um dann mit cancerogenem (Handschuhe, Abzug!) Ninhydrin besprüht und in den Trockenschrank geworfen zu werden, wo das Ninhydrin bei 100°C für 20 Minuten reichlich Gelegenheit zum Reagieren hatte.

### Versuchsauswertung:



- 1: Phosphatidylcholin
- 2: Phospholipid-Extrakt (unsere Probe)
- 3: Phosphatidylserin
- 4: Phosphatidylethanolamin

Mit einer gewissen Kulanz kann man behaupten, dass in unserer Probe sämtliche Vergleichs-Phospholipide vorhanden waren; das Phosphatidylcholin ist deutlich als gelber Fleck auf gleicher Höhe zu erkennen, das Phosphatidylserin stellt wahrscheinlich den lilafarbenen, tiefen Fleck dar und das Phosphatidylethanolamin wird in unserer Probe durch einen prächtigen, fetten braunen Fleck knapp über seinem Vergleichsfleck repräsentiert. Das Phosphatidylcholin hat eindeutig nicht mit Ninhydrin reagiert, da ihm natürlich die Aminogruppe fehlt.

Die  $R_f$ -Werte errechnen sich nach  $R_f = \text{Laufstrecke Substanz} / \text{Laufstrecke Fließmittel}$ .

$$\text{Phosphatidylcholin:} \quad R_f = \frac{6,5}{16,5} = 0,394$$

$$\text{Phosphatidylserin:} \quad R_f = \frac{8,5}{16,5} = 0,515$$

$$\text{Phosphatidylethanolamin:} \quad R_f = \frac{9,5}{16,5} = 0,576$$

#### Fragen:

*Phospholipide und Glykolipide können in wässrigem Milieu Micellen und Lamellen bilden. Was versteht man darunter und wie ist dies zu erklären?*

Phospholipide und Glykolipide bestehen als amphiphile Substanzen aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil; sie können sich somit in wässriger Lösung kugelförmig anordnen, wobei die hydrophilen Anteile nach „außen“ in die wässrige Phase ragen und die lipophilen Anteile nach „innen“ praktisch eine eigene Phase bilden; man bezeichnet diese Strukturen als Micellen. Lamellen dagegen bestehen aus einer bimolekularen Schicht dieser amphiphilen Stoffe, in der wiederum alle hydrophilen Anteile nach außen ins Wasser ragen und die lipophilen zur gegenüberliegenden Schicht zeigen.

*Wie unterscheiden sich Cerebroside, Sulfatide und Ganglioside?*

Cerebroside sind Moleküle, die aus einer Fettsäure, Sphingosin und einem Monosaccharid bestehen, während Ganglioside aus einer Fettsäure, Sphingosin und einem komplexen Kohlenhydrat aufgebaut sind und Sulfatide sich aus Fettsäure, Sphingosin und Sulfomonosaccharid zusammensetzen.

*Was sind Sialinsäuren?*

Das ist die Gruppenbezeichnung für N- u. O-acylierte Neuraminsäure-Abkömmlinge, die natürliche Bausteine in Gangliosiden, Glykolipoiden u. -proteiden darstellen. Sie kommen vor allem in Drüsensekreten, Zellmembranen und im Blutplasma vor.

*Was sind Lipidosen?*

Darunter versteht man erbliche Störungen des Fettstoffwechsels, die zu einer veränderten Lipid- oder Lipoproteinkonzentration im Blut führen, was eine erhöhte Fettablagerung im Gewebe zur Folge hat (Fettspeicherkrankheit).