

Versuch 4: Lipide

Versuche:

1. **Nachweisreaktionen von Lipiden**
2. **Trennung von Cholesterinderivaten durch Dünnschichtchromatographie**
3. **Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern**
4. **Dünnschichtchromatographie von Steroidhormonen**

Analysen:

1. **Aceton in Wasser**
2. **Hormongemisch**

Wissensgebiete

Strukturen:

Chemische Strukturen der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren
Seifen und Verseifung
Eicosanoide: Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane
Allgemeine Struktur der Glyceride
Strukturen des Cholesterins und der Cholesterinderivate
Aufbau der Phospholipide und der Sphingolipide
Membranbausteine, Aufbau von Membranen
Lipasen und Phospholipasen

Biosynthesen:

Biosynthese der Fettsäuren, β -Oxidation, Energiebilanz
Biosynthese der Lipide
Cholesterinbiosynthese
Regulation der Cholesterinbiosynthese
Umwandlung des Cholesterins zu Gallensäuren und Steroidhormonen
Galle, Zusammensetzung und Funktion, enterohepatischer Kreislauf
Steroidhormone: allgemeine Struktur und Funktion

Methoden:

Prinzip der Chromatographie
Gaschromatographie
Dünnschichtchromatographie

Einführung – Biochemie und Pathobiochemie des Lipidstoffwechsels

Bedeutung der Lipide für den Stoffwechsel und für die Bildung von Membranen

Lipide besitzen sehr unterschiedliche Funktionen! Für viele Organe sind Fettsäuren Energiesubstrate. Im Fettgewebe sind sie in Form der Triglyceride der quantitativ wichtigste Energiespeicher des Organismus. Das Fettgewebe hat außerdem noch mechanische Schutzfunktionen und dient der Wärmeisolierung. Fettsäuren sind aber auch Bausubstrate bei der Synthese von Membranbestandteilen wie Glykolipiden und Phospholipiden. Das Neutrallipid Cholesterin ist einerseits Strukturkomponente von Membranen und andererseits Vorstufe für die Synthese von Steroidhormonen, Gallensäuren und Vitamin D.

Fettsäuren können im tierischen Organismus synthetisiert werden, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Linolsäure, Linolensäure) müssen jedoch mit der Nahrung zugeführt werden und gelten daher als essentielle Fettsäuren.

Verdauung und Resorption von Lipiden

Die Lipide der Nahrung, Triglyceride, Cholesterin, Cholesterinester und Phospholipide werden im Magen und Dünndarm mechanisch zu Fetttröpfchen emulgiert, an denen die Verdauungsenzyme angreifen. Die Pankreaslipase spaltet die Triglyceride in β -Monoglyceride, Fettsäuren und Glycerin. Die Cholesterinesterase des Pankreas hydrolysiert die Cholesterinester. Die Phospholipasen und Phosphatasen des Pankreas, sowie die Phosphodiesterasen des Dünndarms verdauen die Phospholipide. Die Produkte sind Fettsäuren, Glycerin, Phosphat und Aminoalkohole.

Die Endprodukte der Verdauung sind kurzkettige Fettsäuren, Glycerin, Phosphat, Aminoalkohole und die gemischten Micellen. Die Micellen sind aus langkettigen Fettsäuren, Monoglyceriden, Cholesterin, Phospholipiden sowie Gallensäuren aufgebaut. Die unterschiedlichen Substrate werden im oberen und mittleren Dünndarm entlang eines Konzentrationsgradienten resorbiert. In der Mucosazellen findet aus β -Monoacylglycerid und Acyl-CoA eine Synthese zu Triglyceriden statt. Zusammen mit Cholesterin, Cholesterinestern, Phospholipiden und Apo-Lipoproteinen werden die Triglyceride als Chylomikronen in die Lymphbahn sezerniert.

Bildung der Lipidspeicher

In der Resorptionsphase werden die Kohlenhydrate der Nahrung, sofern sie den Energiebedarf des Organismus und die Glykogenspeicherkapazität übersteigen, zur Liponeogenese genutzt. Die Fettsäuren der Nahrung werden als Triglycerid gespeichert.

Liponeogenese

Die Liponeogenese (Triglyceridneusynthese) findet in der Leber und im Fettgewebe statt. Sie gliedert sich in die Fettsäuresynthese und die Veresterung mit Glycerin zum Triglycerid. Die Fettsäuresynthese läuft im Cytoplasma ab. Ausgangssubstrat ist Acetyl-CoA, das aus Mitochondrien mittels Citrat über den Citrat-Malat-Zyklus in das Cytoplasma transportiert wird. Acetyl-CoA wird unter ATP-Hydrolyse zu Malonyl-CoA carboxyliert. Diese Schlüsselreaktion wird durch die Acetyl-CoA Carboxylase katalysiert.

Die Palmitoyl-CoA Synthese wird an einem Enzymdimer, der Fettsäuresynthase, durchgeführt. Jede Untereinheit enthält mehrere katalytische Aktivitäten. Eine periphere und eine zentrale SH-Gruppe dienen als Träger der sich verlängernden Acyl-CoA Kette bzw. als Bindungsort für das Malonyl-CoA. Aus einem Acetyl-CoA und sieben Malonyl-CoA wird mit Hilfe von Decarboxylierung und Reduktion das Palmitoyl-CoA gebildet. Als Reduktionsmittel dienen pro Palmitoyl-CoA Molekül 14 NADPH Moleküle. Sie werden über den Pentosephosphatweg im Zytoplasma und über den Citrat-Malat-Pyruvat-Zyklus bereitgestellt.

Triglyceridesynthese

Die Triglyceridsynthese ist am glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Ausgangssubstrate sind das Acyl-CoA und das Glycerinphosphat. Das Glycerinphosphat entsteht entweder aus Dihydroacetonphosphat (Glykolyse!) oder aus Glycerin selbst. Die Triglyceridsynthese wird von Acyltransferasen katalysiert, die sich in ihrer Spezifität für das Acyl-CoA unterscheiden. Dies erklärt die asymmetrische Fettsäureverteilung in den Glycerolipiden. Das gebildete Triglycerid wird im Fettgewebe direkt gespeichert, von der Leber dagegen in Form von VLDL an das Blut abgegeben. Die VLDL-Partikel werden von der Lipoproteinlipase der Endothelzellen im Fettgewebe zu Fettsäuren, Glycerin und Chylomikronenrestpartikel bzw. LDL abgebaut. Die Fettsäuren werden in das Fettgewebe aufgenommen, unter ATP-Spaltung zu Acyl-CoA verestert, und mit Glycerinphosphat zu Triglyceriden synthetisiert. In der Leber können aus den Chylomikronenrestpartikeln ebenfalls Triglyceride synthetisiert werden, die denn als VLDL wieder an das Blut abgegeben werden.

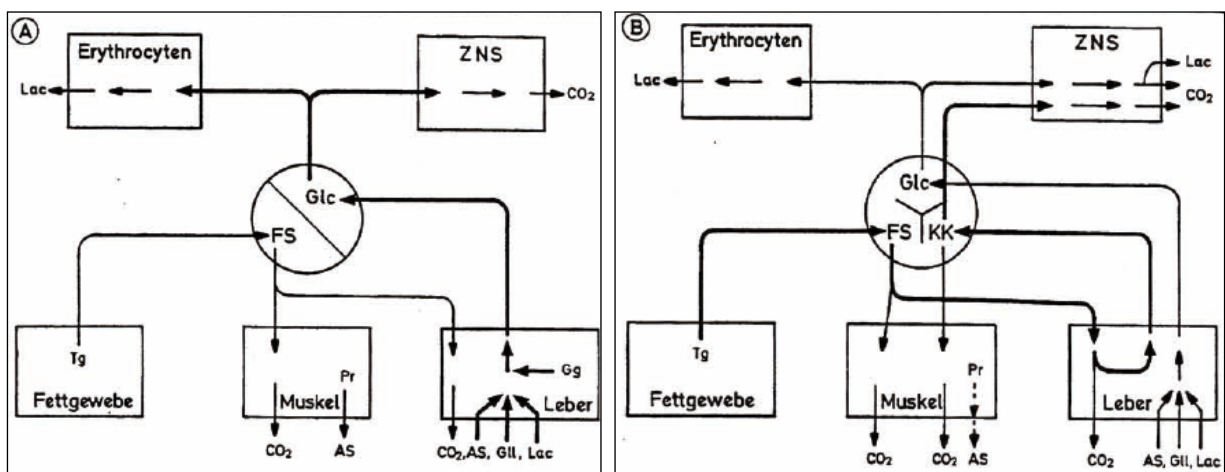


Abbildung 4-1: Metabolische Abläufe zur Aufrechterhaltung der calorischen Homöostase in der Postresorptionsphase (PRP): A: Hunger (PRP < 24 h), B: Fasten (PRP > 36 h)

Abkürzungen: AS – Aminosäuren, FS – Fettsäure, Gg – Glykogen, Glc – Glucose, Gll – Glycerin, KK – Ketonkörper, Lac – Laktat, Pr – Protein, Tg – Triglyceride

Wechselbeziehungen zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel

Die Aufrechterhaltung einer annähernd konstanten Blutglukosekonzentration (Glukose-Homöostase) ist eines der übergeordneten Ziele der Stoffwechselregulation. Der Organismus muss die Versorgung von ZNS und Erythrozyten mit Glukose sicherstellen. Beim Übergang von der Resorptionsphase zur Postresorptionsphase (Hunger, Fasten) wird deshalb durch Glykogenolyse und Glukoneogenese die Glukose-Homöostase gewährleistet (Abb. 4-1, A). Das Leberglykogen ist nach 24 Stunden Hunger aufgebraucht und die Glukoneogenese aus Aminosäuren ist wegen der mit der Proteolyse verbundenen biologischen Gefahren nur begrenzt ausnutzbar. Bei längerem Fasten (mehr als 36 Stunden) werden daher die Proteolyserate und die Glukoneogeneserate vermindert und die Leber gibt immer weniger Glukose an das Blut ab. Die Ursache ist der sinkende Insulin/Glukagon-Quotient mit der Dauer des Fastens. Glukagon wird zum bestimmenden Hormon. Das gleiche gilt für das Neugeborene in Nahrungskarenz oder für *Diabetes Mellitus* Patienten. Die Patienten sind durch einen relativen oder absoluten Insulinmangel gekennzeichnet.

Glukagon stimuliert die Lipolyse im Fettgewebe, d. h. die Freisetzung von Fettsäure und Glycerin (Abb. 4-1 A). Die Konzentration der freien Fettsäure im Blut, transportiert als Albumin Fettsäurekomplex, ist erhöht. Die Aufnahme der Fettsäure in die Organe ist proportional zur Konzentration im Blut.

Für den Muskel, die Niere und die Leber sind in der Postresorptionsphase die Fettsäure die Hauptenergiesubstrate. Sie werden dort über β -Oxidation und den Citratzyklus zu CO_2 oxidiert. Fettsäuren können vom ZNS nicht als Energiesubstrate genutzt werden. Dort fehlt die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase für die Oxidation der Fettsäure. Daher wird in der Leber bei Bedarf ein erheblicher Teil der Fettsäure nur bis zum Acetyl-CoA abgebaut und dann zu Ketonkörpern umgewandelt.

Diese Stoffwechsellistung der Leber ermöglicht dem ZNS bei längerer Nahrungskarenz seinen Energiestoffwechsel von der alleinigen Glucose-Oxidation auf die zusätzliche Ketonkörperverwertung umzustellen. Beim Neugeborenen kommt es physiologischerweise zu einer erhöhten Ketogenese. Die Ketonkörper dienen nicht nur als Energie-, sondern auch als Bausubstrate.

In der Postresorptionsphase wird die calorische Homöostase des Organismus durch die gleichzeitige Bereitstellung von Glucose, Fettsäure und Ketonkörpern aufrechterhalten (Abb. 4-1 B).

Verwertung der Lipidspeicher

Lipolyse

Die Triglyceride des Fettgewebes werden durch die hormonsensitive Lipase unter Beteiligung einer Di- und Monoglyceridlipase zu Fettsäure und Glycerin abgebaut. Dieses Enzym unterliegt einer cAMP vermittelten Aktivierung durch Glukagon

β -Oxidation der Fettsäure in der Leber

Die β -Oxidation der Fettsäure erfordert eine Aktivierung der Fettsäure und den Transport der aktivierten Fettsäure in die Matrix der Mitochondrien, wo die β -Oxidation, der Citratzyklus und der HMG-CoA-Zyklus lokalisiert sind.

Die Aktivierung der Fettsäure zu Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Synthetase (Fettsäure-Thiokinase) erfolgt im Bereich der äußeren Membran der Mitochondrien unter Spaltung von ATP zu AMP und Pyrophosphat. Der gebildete Thioester, Acyl-CoA steht an einem Kreuzungspunkt des Stoffwechsels. Es kann einerseits mit Glycerinphosphat zu Phospholipiden und Triglyceriden verestert werden, und andererseits in den Mitochondrien verbrannt werden.

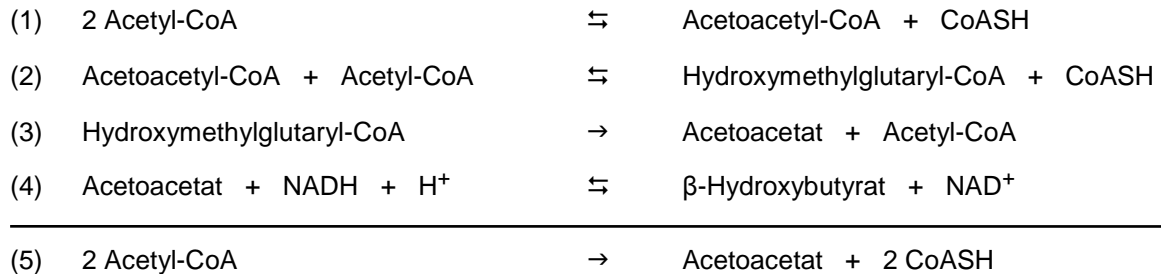
Die innere Membran der Mitochondrien ist undurchlässig für langkettiges Acyl-CoA, z.B. Palmitoyl-CoA. Als Transporthilfe dient Carnitin als Carrier. Carnitin stimuliert daher die Oxidation der langkettigen Fettsäure. Zusätzlich werden Acyl-CoA-Carnitin-Acyl-Transferasen (ACAT) benötigt. Sie katalysiert die Übertragung des Acylrests von Coenzym A auf die OH-Gruppe des Carnitins und umgekehrt. ACAT 1 befindet sich an der äußeren Oberfläche der inneren und ACAT 2 in der inneren Membran der Mitochondrien, die dann das Acyl-CoA in die Matrix der Mitochondrien freisetzt.

Die β -Oxidation des Acyl-CoA vollzieht sich durch eine sukzessive Abspaltung von Acetyl-CoA. Das Acyl-CoA wird zunächst durch die Acyl-CoA Dehydrogenase dehydriert, der Akzeptor der Reduktionsäquivalente ist FAD. Das gebildete Enoyl-CoA wird durch die Enoyl-CoA-Hydratase zu β -Hydroxyacyl-CoA hydratisiert.

Im zweiten dehydrierenden Schritt wird durch die β -Hydroxy-Acyl-Dehydrogenase unter Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ das β -Ketoacyl-CoA (= 3-Ketoacyl-CoA) gebildet. Die thiolytische Spaltung des β -Ketoacyl-CoA liefert unter Verbrauch von CoASH Acetyl-CoA und ein um ein C_2 -Fragment verkürztes Acyl-CoA-Derivat. Die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase katalysiert diese Reaktion. Substrate sind 3-Ketoacyl-Derivate mit einer Kettenlänge $\text{C}_4 - \text{C}_{16}$. Die Produkte der β -Oxidation einer Fettsäure mit $2n$ C-Atomen sind n Acetyl-CoA, $n-1$ FADH_2 und $n-1$ NADH/H^+ .

Biosynthese von Ketonkörpern (Ketogenese) in der Leber

Die Produktion von Acetyl-CoA aus Fettsäure in der Leberzelle während der Postresorptionsphase dient sowohl der Gewinnung chemischer Energie (ATP), als auch der Bereitstellung von Substrat für die Ketogenese. Die Biosynthese der Ketonkörper aus Acetyl-CoA über den Hydroxymethylglutaryl-CoA-Zyklus (HMG-CoA-Zyklus) umfasst folgende Reaktionsschritten:



Die Bildung des Acetoacetyl-CoA wird von der Acetoacetyl-CoA-Thiolase katalysiert (1). Im Verlauf des HMG-CoA-Zyklus kondensiert Acetoacetyl-CoA mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu HMG-CoA (2). Diese Reaktion wird von der HMG-CoA-Synthase katalysiert. Durch die HMG-CoA-Lyase wird das HMG-CoA in Acetoacetat und Acetyl-CoA gespalten (3). Acetoacetat wird in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Mitochondrien (NADH/NAD⁺-Verhältnis) in β -Hydroxybutyrat umgewandelt (4). In der Bilanz werden also letztlich zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetat umgewandelt und zwei Moleküle CoASH freigesetzt (5). CoASH steht dann der β -Oxidation der Fettsäure (thiolytische Spaltung der 3-Ketoderivate) zur Verfügung.

Acetoacetyl-CoA kann auch aus dem im Verlaufe der β -Oxidation der Fettsäure gebildeten β -Hydroxybutyryl-CoA entstehen und direkt in den HMG-CoA-Zyklus eingeschleust werden. In Stoffwechselsituationen mit erhöhter Ketogeneserate wie im Hunger entstehen Ketonkörper aber fast ausschließlich aus Acetyl-CoA.

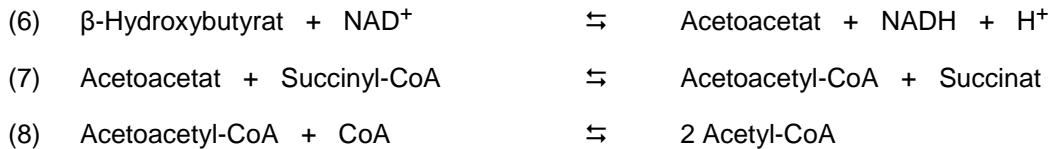
Zusätzliche Reaktionswege des Acetyl-CoA in der Leber

Neben der Ketogenese ist die Oxidation des Acetyl-CoA zu CO₂ im Citratcyclus von erheblicher Bedeutung. Oxalacetat ist der Kondensationspartner des Acetyl-CoA bei der Citratbildung und eine Veränderung der Oxalacetatkonzentration kann die Oxidationsrate des Acetyl-CoA im Citratcyclus und damit auch die Verfügbarkeit des Acetyl-CoA für die Ketogenese beeinflussen.

Acetyl-CoA ist außerdem Ausgangssubstrat für andere Stoffwechselwege in der Leberzelle: die Cholesterinbiosynthese und die Lipogenese. In der Postresorptionsphase sind beide Biosynthesewege, die vollständig oder teilweise im Cytoplasma ablaufen, drastisch vermindert (Gefahr eines Leerlaufzyklus bei der Lipogenese). Lipogenese und Cholesterinbiosynthese erfordern den Transport des Acetyl-CoA aus den Mitochondrien in das Cytoplasma. Im Hunger ist die Transportrate offenbar vermindert.

Oxidation der Ketonkörper in den extrahepatischen Organen

Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat werden in das Blut und damit zu den extrahepatischen Organen transportiert. In Abhängigkeit von ihrer Blutkonzentrationen werden so dort aufgenommen. Die Ketonkörper gelangen auch in das Primärfiltrat des Glomerulum und werden im proximalen Tubulus gegen einen Konzentrationsgradienten resorbiert. Das Transportsystem kann bis zu 70 g Ketonkörper pro Tag resorbieren; ein hoher Anteil davon wird in den Tubuluszellen zu CO₂ oxidiert. Zur vollständigen Oxidation der Ketonkörper ist es notwendig, dass diese zuvor in Acetyl-CoA zurückverwandelt werden. Dieser Umwandlung hat die folgende Reaktionskonsequenz und ist in den Mitochondrien lokalisiert (s. Abb. 4-2).



Die Reaktionen (6) und (8) sind die gleichen Reaktionen wie im HMG-CoA-Zyklus. Die Enzyme, die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (6) und die Acetoacetat-CoA-Thiolase (8) kommen in allen extrahepatischen Organen vor. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ketonkörperwiederverwendung wird von der Succinyl-CoA Acetoacetat-CoA-Transferase katalysiert (7). Dieses Enzym kommt in der Leber praktisch nicht vor. Die Leber ist nicht fähig zur Ketonkörperwiederverwendung.

Im Cytoplasma der Gehirnzelle konnte eine Acetoacetyl-CoA Synthetase nachgewiesen werden, die unter ATP-Verbrauch Acetoacetat direkt zu Acetoacetyl-CoA aktivieren kann (9). Dieser Reaktionsweg ist während der ZNS-Entwicklung, z.B. von Neugeborenen von Bedeutung, bei dem die Ketonkörper auch zum Aufbau von Membranbausteinen benötigt werden (s. Abb. 4-2). Außerdem kann Acetoacetyl-CoA durch die cytoplasmatische Acetoacetyl-CoA Thiolase zu Acetyl-CoA gespalten (10) und zur Lipogenese verwendet werden.

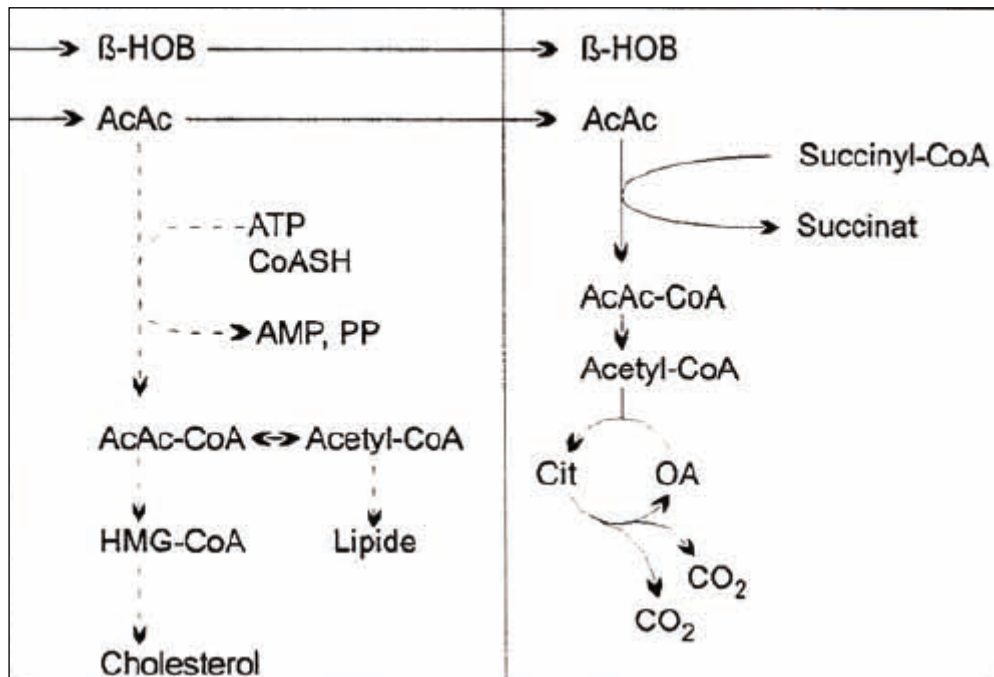
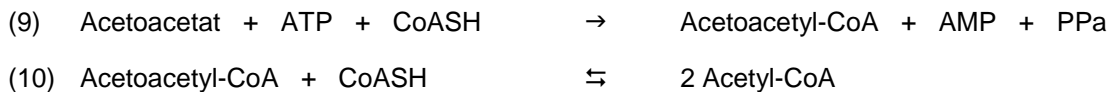


Abbildung 4-2: Ketonkörperwiederverwendung für den Energiestoffwechsel, die Lipid- und Cholesterinbiosynthese. Links ist das Cytosol, rechts die Mitochondrienmatrix

| | |
|--------------|---|
| β -HOB | β -Hydroxybutyrat |
| AcAc | Acetoacetat |
| AcAc-CoA | Acetoacetat-CoA |
| OA | Oxalacetat |
| ----> | Physiologisch bedeutsam beim Neugeborenen |

Regulation des Fettstoffwechsels

Während der Resorptionsphase werden Fettsäuren aus Glucose neu synthetisiert und als Triglycerid gespeichert. Die cytoplasmatische Acetyl-CoA Carboxylase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäuresynthese, die Malonyl-CoA Bildung. Dieses Kontrollenzym wird in der Leber und im Fettgewebe durch Citrat allosterisch aktiviert und durch Palmitoyl-CoA (Endprodukt) gehemmt. Citrat gelangt aus den Mitochondrien in das Cytosol und transportiert dabei Acetyl-CoA. Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien durch die Pyruvatdehydrogenase bereitgestellt, die bei einem hohen Glucoseangebot in ihrer aktiven, d.h. nicht phosphorylierten Form vorliegt. Im Gegensatz zur Ratte scheint beim Menschen die Fettsäuresynthese aus Kohlenhydraten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In der Postresorptionsphase (Hunger, Fasten) wird Glucagon das bestimmende Hormon. Glucagon aktiviert die hormonsensitive Triglyceridlipase des Fettgewebes über einen *second messenger* Mechanismus. Die vermehrt freigesetzten Fettsäuren sind zwar für die Aufrechterhaltung der calorischen Homöostase von wesentlicher Bedeutung, aber für das ZNS sind sie ohne Nutzen. Die Leber dagegen nimmt vermehrt Fettsäure auf, die β -Oxidation der Fettsäure ist gesteigert, aus Acetyl-CoA werden Ketonkörper gebildet und diese dem ZNS und anderen Organen zur Energiegewinnung bereitgestellt. Diese metabolischen Abläufe unterliegen folgenden Kontrollmechanismen:

Die aktivierte Fettsäure (Acyl-CoA) kann in der Leber zu Triglycerid verestert werden oder in die β -Oxidation eingeschleust werden. Im Hunger ist einerseits die Triglyceridbildung vermindert und andererseits der Transport des Acetyl-CoA in die Mitochondrien erhöht. Der gesteigerte Transport in Mitochondrien beruht darauf, dass Malonyl-CoA, ein Hemmer der Acyl-CoA-Carnitin-Acyl-Transferase (ACAT 1), infolge des Glucosemangels in seiner Konzentration vermindert ist. Die erhöhte Verfügbarkeit des Acyl-CoA in der Leber und die Aufhebung der der ACAT 1 Inhibierung ermöglichen eine gesteigerte β -Oxidationsrate der Fettsäure. Die Folge ist eine erhöhte Verfügbarkeit von Acetyl-CoA, das dann über den HMG-CoA-Cyclus zu Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat umgesetzt wird. Die Reduktion von Acetoacetat zu β -Hydroxybutyrat ermöglicht der Leber – bei gleicher ATP-Syntheserate – eine erhebliche Steigerung der β -Oxidationsrate, da dadurch weitere Reduktionsäquivalente „abgeschöpft“ werden, zusätzlich zur ADP-kontrollierten NADH-Oxidation über die Atmungskettenphosphorylierung. Die Ketogenese erscheint exakt reguliert und die Biosyntheserate mit dem Acetyl-CoA/CoA-Verhältnis korreliert. Offensichtlich ist die Acetoacetyl-CoA Thiolase, die die Bildung von Acetoacetyl-CoA katalysiert, das Kontrollenzym dieses Stoffwechselweges, denn CoA ist ein potenter Inhibitor dieses Enzyms (Produktthemmung!).

Tabelle 4-1: Die Lipidzusammensetzung einiger Membranen

| Komponenten | Myelin (Rind) | Stäbchenzelle | Erythrocyten (Mensch) | Mitochondrien (innen) |
|-------------------------|---------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Trockengewichtsanteile | | |
| Protein + Glykoprotein | 22,0 | 59,0 | 60,0 | 76,0 |
| Gesamtlipide | 78,0 | 41,0 | 40,0 | 24,0 |
| Phosphatidylcholin | 5,7 | 13,0 | 6,9 | 8,8 |
| Phosphatidylethanolamin | 11,7 | 6,5 | 6,5 | 8,4 |
| Phosphatidylserin | 7,1 | 2,5 | 3,1 | |
| Phosphatidylinositol | 0,6 | 0,4 | 0,3 | 0,8 |
| Cardiolipin | | 0,4 | | 4,3 |
| Sphingomyelin | 6,4 | 0,5 | 6,5 | |
| Glykolipid | 22,0 | 9,5 | Spuren | Spuren |
| Cholesterin | 17,0 | 2,0 | 9,2 | 0,2 |

Die Zusammensetzung und Struktur von Membranen

Die Zellmembran (Plasmamembran, intrazelluläre Membran) besteht aus Lipiden und Proteinen. Das Gewichtsverhältnis kann je nach Membrantyp zwischen 4:1 und 1:4 variieren (Tab. 4-1). Die Lipide bauen eine Lipiddoppelschicht auf, in die Proteine eingelagert sind: als integrale Proteine, die sich quer durch die Membran erstrecken oder in die eine Membranhälfte eingelagert sind, und als periphere Proteine, die an die Membranoberfläche angelagert sind. Kohlenhydrate sind fast ausschließlich auf die Plasmamembran beschränkt. Sie sind in Glykoproteinen und Glykolipiden enthalten. Die Membranlipide sind Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin (neutrales Lipid). Die unterschiedlichen Lipide kommen in unterschiedlichen Membrantypen in unterschiedlichen Gewichtsanteilen vor (Tab. 4-1; Abb. 4-3).

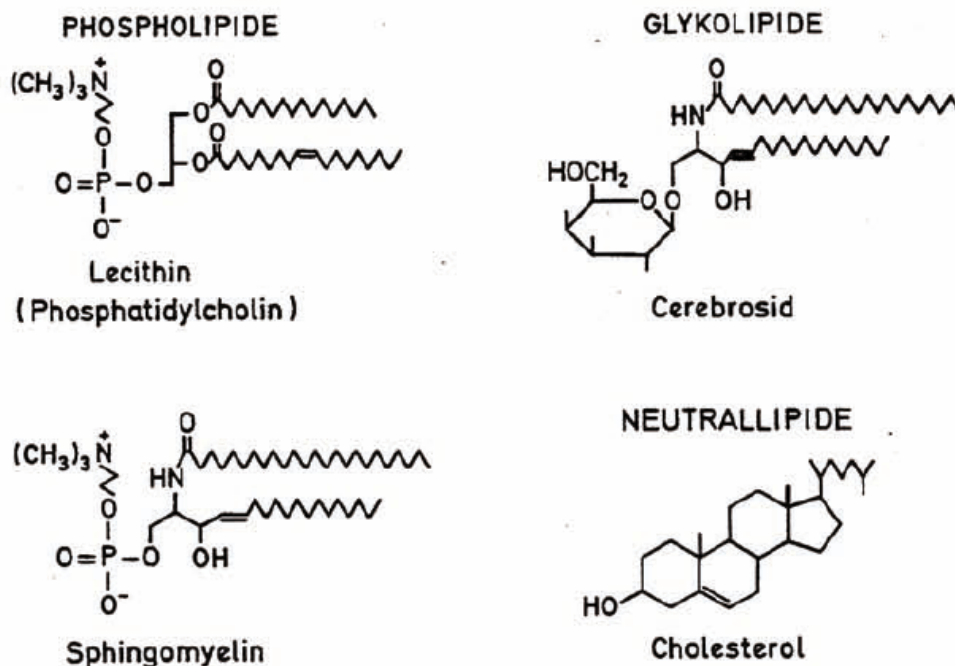


Abbildung 4-3: Die Strukturformel einiger Membranlipide

Phospholipide (Abb. 4-3), Hauptbestandteil aller biologischen Membranen, leiten sich vom Glycerin (Glycerophosphatide) oder vom Sphingosin (Sphingophosphatide) ab. Sie bestehen zusätzlich noch aus Fettsäure, Phosphorsäure und einem weiteren Alkohol (z.B. Cholin). Sie tragen zu den unterschiedlichen Eigenschaften der Phospholipide bei. So enthält z.B. die Plasmamembran der menschlichen Erythrocyten hauptsächlich vier unterschiedliche Phospholipide (Tab. 4-1). Die Fettsäure in Phospholipid und Glykolipiden, in der Regel zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatome lang, sind gesättigt, einfach oder mehrfach ungesättigt. Aufgrund der Struktur der Phospholipid wird offensichtlich, dass die Membranlipide amphipatische Moleküle sind, d.h. sie besitzen eine hydrophile Kopfregion (Phosphorsäureester, Zucker) und eine hydrophobe Schwanzregion (Kohlenwasserstoffkette) und bilden in wässriger Lösung eine kontinuierliche Lipiddoppelschicht (Membranmatrix) aus.

Die Lipiddoppelschicht der Membran ist ausschließlich durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten. Membrane sind keine festen Strukturen, sie befinden sich in einem Zustand der Fluidität. Diese Fluidität wird durch kurzkettige oder ungesättigte Fettsäure (cis-Doppelbindung – Knick!) erhöht, da beide die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten vermindern. Cholesterin – seine Hydroxylgruppen sind den polaren Kopfgruppen der Phospholipide zugeordnet – erhöht einerseits die mechanische Festigkeit einer Membran und sichert andererseits ihre Fluidität: die scheibenartigen

und starren Steroidringe des Cholesterins stabilisieren die Kohlenwasserstoffkette nahe der polaren Kopfregion und erhalten die Beweglichkeit der Restkohlenwasserstoffkette.

Die Membranlipide sind asymmetrisch auf die zwei Hälften der Lipiddoppelschicht verteilt. In der Plasmamembran menschlicher Erythrocyten ist Phosphatidylcholin u. a. mehr in der inneren Hälfte lokalisiert. Da Phosphatidylcholin mehr ungesättigte Fettsäure enthalten, besitzen die zwei Membranhälften außer in der Ladung auch noch Unterschiede in der Fluidität. Die Glykolipide sind ausschließlich in der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht lokalisiert und ihre Zuckergruppen sind an der Zelloberfläche lokalisiert.

Pathobiochemie des Fettstoffwechsels

Hyperlipoproteinämien

Die pathologisch erhöhte Konzentration von Lipoproteinen im Serum kann auf einen ererbten metabolischen Defekt zurückzuführen oder die Folge einer anderen Krankheit sein. Dies ist z.B. beim *Diabetes mellitus* der Fall, wo es auf Grund der gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe in der Leber zu einer Verfettung kommt und vermehrt VLDL in das Blut abgegeben werden.

Pathologische Ketonkörperbildung

Die erhöhte Ketonkörperbildung im Hunger und beim Neugeborenen ist eine sinnvolle, zielgerichtete Maßnahme des Organismus, um Energiesubstrate vor allem für das ZNS zur Verfügung zu stellen. Von dieser physiologischen Ketose abzugrenzen ist die pathologische Ketose.

Dieser Stoffwechselzustand existiert z.B. bei einem dekompensierten *Diabetes mellitus* des Menschen, aber auch bei einer Lactationsketose der Milchkuhe. Sie ist charakterisiert durch eine „überschießende“ Ketonkörperbildung, die zu einer metabolischen Acidose führt. In diesen Stoffwechselsituationen sind offenbar wichtige Kontrollmechanismen der Ketonkörperbildung aufgehoben. Welcher Kontrollmechanismus dabei im Bereich des Kohlenhydrat- oder Fettstoffwechselsituationen unwirksam ist, ist bislang ungeklärt. Hervorzuheben ist noch einmal, dass das ZNS in diesen Stoffwechselsituationen die Ketonkörper als Energieträger nicht benötigt, denn Glucose ist ja ausreichend vorhanden.

Ein angeborener Mangel an Carnitin-Acyltransferase führt bei Säuglingen zu einer Fettleber, weil die Fähigkeit zur β -Oxidation der langkettigen Fettsäure und zur Ketogenese drastisch vermindert ist.

I. Nachweisreaktionen von Lipiden

Geräte:

Reagenzglasgestell mit 10 Reagenzgläsern
Spatel

Lösungen:

2%-iges Aceton
2% Brom in Chloroform
Eisessig
Jod-Jodkalium-Lösung
5%-ige Natriumnitroprussidlösung
2 N NaOH
Olivenöl

A) Fettsäuren

Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren können durch die Addition von Brom nachgewiesen werden: Zwei Tropfen Olivenöl werden in etwa 3 ml Chloroform gelöst und tropfenweise eine 2%-ige Bromlösung in Chloroform zugegeben. Die braune Farbe der Bromlösung entfärbt sich spontan. Überlegen Sie sich, in welchen Naturprodukten Doppelbindungen vorkommen und warum einige Fettsäuren essentiell sind.

B) Ketonkörper

Im Urin eines Diabetikers erscheinen nicht nur Glukose, sondern durch die verstärkte Lipolyse, auch Ketonkörper, u. a. Aceton, das auch über die Atemluft abgegeben werden kann (charakteristischer Geruch im Krankenzimmer!).

Aceton-Nachweise:

Der Nachweis von Aceton in der Analyse wird mithilfe 2 unabhängiger Nachweismethoden durchgeführt. Neben den zu bestimmenden Analysen sind jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitzuführen. Pro Person wird eine Analyse bestimmt.

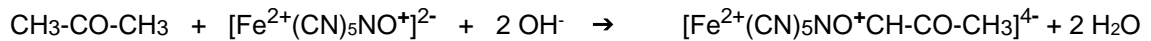


Abbildung 4-4: a) Natriumnitroprussid,

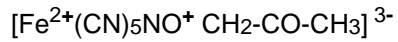
b) Jodoformprobe

a) Natriumnitroprussidprobe

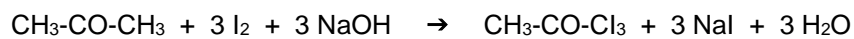
Natriumnitroprussidlösung bildet mit Aceton folgenden rot gefärbten Komplex:



Beim Ansäuern mit Eisessig wird ein Proton an den Komplex angelagert und die Farbe vertieft sich:

**Durchführung:**

Zu 3 ml der Analysenlösung gibt man fünf Tropfen frische Natriumnitroprussidlösung und 1 ml NaOH. Anschließend wird mit wenigen Tropfen Eisessig (unter dem Abzug!) schwach angesäuert. Der Nachweis von Aceton mit Hilfe von Natriumnitroprussidlösung kann aber durch andere Metaboliten gestört werden. Überlegen Sie sich, welche diese sein könnten.

b) Jodoformprobe**Durchführung:**

Zu 3 ml Analysenlösung und 1 ml Jod-Jodkalium-Lösung gibt man tropfenweise 2 N NaOH bis zur Entfärbung. Bei positivem Ausfall der Reaktion tritt ein gelber Niederschlag auf und der typische Jodoform-Geruch ist gut riechbar.

Tragen Sie die Ergebnisse Ihrer Bestimmung in die Analysenliste ein.

II. Trennung von Cholesterinderivaten durch Dünnschicht-Chromatographie

Cholesterin und seine Derivate in der biochemischen Analytik

Theoretischer Hintergrund

Neben Glycerophospholipiden und Sphingolipiden ist Cholesterin der dritte essentielle Bestandteil der meisten Membranen einer menschlichen Zelle (Kennen sie eine Ausnahme? Kennen sie die wichtigsten Vertreter der Membranlipide?).

Daneben ist Cholesterin Grundbaustein für die Synthese von Steroidhormonen (Welche/Wo?), Gallensäuren (Welche/Wo?) und Vitamin-D. Die meisten Zellen sind in der Lage Cholesterin zu synthetisieren (Schlüsselenzym?, wichtige Intermediate?) und können zusätzlich Cholesterin z.B. in Form von LDL durch Rezeptor-vermittelte Endocytose aufnehmen (Erklären sie Lipidtransport im Plasma und den Endocytoseweg). Defekte in der LDL-Endocytose sind eine mögliche Ursache von Hypercholesterinämie und Artherosklerose. Des Weiteren ist die Modulation der Cholesterin-Biosynthese mit Statinen eine verbreitete Möglichkeit, um pathologisch hohe Cholesterinwerte bei Patienten zu kontrollieren (Wie wirken Statine? Welche Konzentrationswerte von Cholesterin sind klinisch relevant?).

Praktische Fragestellung

Cholesterin und drei seiner Derivate werden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) chromatographisch getrennt. Dokumentieren sie das jeweilige Wanderungsverhalten der Metabolite. Überlegen sie, wie physiologisch relevante Modifikationen von Cholesterin das Ergebnis der DC erklären können. Wie könnten Sie das hier verwendete Verfahren einsetzen, um molekulare Ursachen einer Hyperlipidämie anhand von Patientenzellen zu analysieren?

Prinzip:

Auf einer mit Kieselgel beschichteten Glasplatte werden verschiedene Cholesterinderivate nach dem Prinzip der Verteilungschromatographie getrennt und anschließend mit Kupfersulfat nachgewiesen. Die Verteilung findet zwischen der stationären, polaren Hydrathülle des Kieselgels und dem mobilen, unpolaren Laufmittel statt. Daher laufen unpolare Lipide nahe der Laufmittelfront und je stärker der polare Charakter des Lipids ist, umso stärker ist ihre Wechselwirkung mit der polaren, stationären Phase und umso kürzer ist die Laufstrecke dieser Lipide.

Geräte:

1 Dünnschichtplatte 10 x 10 cm, beschichtet mit Kieselgel H
Chromatographietrog mit Laufmittel

Lösungen:

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Essigsäure/Aceton/Wasser = 35:25:4:14:2 (v:v)

Proben:

Sie erhalten vier Proben nummeriert von 1 – 4 (auf dem Türtisch auf Eis). Die Probe 1 enthält Cholesterin, die Proben 2-4 Cholesterinderivate. Überlegen Sie anhand des Laufverhaltens, welche Cholesterinderivate die anderen Proben enthalten könnten.

Durchführung:

Die Proben werden punktförmig mit einer Pipette aufgetragen. Von jeder Probe werden 5µl aufgetragen. Immer eine neue Spitze verwenden und so aufgetragen, dass der Durchmesser der Flecken nicht größer als 3 mm ist. Bitte unbedingt darauf achten, dass die Auftragspunkte soweit vom unteren Rand der Platte entfernt sind, dass sie nicht im Laufmittel "ertrinken". Was passiert im solchen Fall?

Das genaue Auftragsschema aller Proben und die Auswertebögen erhalten sie am Praktikumstag von ihren Assistenten.

Die Platte wird vorsichtig in den Chromatographietrog gestellt, der Trog wird verschlossen und die Chromatographie so lange durchgeführt, bis die Laufmittelfront fast den oberen Rand der Platte erreicht hat. Die Platte wird entnommen und unter dem Abzug getrocknet.

Achtung: Der Trog soll stets verschlossen bleiben. **Warum?**

Für die Färbung der Platten und den Nachweis der Lipide wird die Platte für 5 sec in die Färbelösung getaucht. Zusammensetzung der Färbelösung: 75g CuSO₄ + 900ml H₂O + 150ml 85%ige ortho-Phosphorsäure. Nach dem Eintauchen das überschüssige Reagenz abtropfen lassen und von der Rückseite der Platte vorsichtig abwischen. Anschließend die Platte für ca. 5-10 min bei 170°C im Ofen „entwickeln“.

III. Gaschromatographie der Fettsäuremethylester

Prinzip:

Die Gaschromatographie (GC) ist, ebenso wie die anderen chromatographischen Methoden, eine Verteilungschromatographie. Im Unterschied zur Flüssigkeitschromatographie (s. Versuch 2, Säulenchromatographie und Versuch 4, Dünnschichtchromatographie) ist die mobile Phase bei der GC ein inertes Trägergas. Das Trägergas wird durch eine Spiralröhre, die Gaschromatographiesäule, geleitet (s. Abb. 4-6). Die Gaschromatographiesäule besitzt eine Länge zwischen 5 - 200 Meter. Das Trennvermögen ist proportional zur Länge der Säule. Die „gepackte“ Säule ist ca. 5 m. lang und mit einer inerten Matrix gefüllt, die gleichmäßig mit einer flüssigen stationären Trennphase beschichtet ist. Im Praktikum steht eine 50 m Kapillarsäule zur Verfügung. Die Trennphase wird auf die Innenwand der Kapillarsäule aufgetragen, ohne Füllung. Aufgrund der Länge trennt sie besser als die gepackte Säule.

Mit der GC können nur Substanzen analysiert werden, die sich bei Temperaturen bis zu ca. 350 °C ohne Zersetzung verdampfen lassen. Die in diesem Versuchsteil untersuchten Fettsäuren besitzen auf Grund ihrer Carboxylgruppe einen höheren Siedepunkt. Sie zersetzen sich bereits bevor der Siedepunkt erreicht ist. Daher muss man versuchen, den Siedepunkt herabzusetzen. Dies gelingt durch Derivatisierung zu den entsprechenden Methylestern. Da Fettsäuren in biologischem Material vor allem als Triacylglyceride vorkommen, müssen diese erst alkalisch hydrolysiert und die dabei entstehenden freien Fettsäuren anschließend methyliert werden. Als flüssige stationäre Phase zur Trennung von Fettsäuremethylestern in der GC können z.B. Polyester, Glykole, Siliconöle oder höhere Kohlenwasserstoffe eingesetzt werden.

Die zu analysierende Probe wird in einem niedrig siedenden Lösemittel gelöst und in die Kapillarsäule injiziert. Die einzelnen Komponenten der Probesubstanz werden in der Säule mit Hilfe des Trägergases transportiert und verweilen unterschiedlich lange in der Säule. Im Allgemeinen erfolgt die Lipidtrennung auf unpolaren Gaschromatographiesäulen vorwiegend nach der Anzahl der in den Lipiden enthaltenen Kohlenstoffatomen, während sich bei polaren und mäßig polaren Säulen andere Strukturparameter (z.B. Anzahl, Position und Geometrie von Doppelbindungen) stärker bemerkbar machen.

Der GC-Säule nachgeschaltet ist der Detektor, zu welchem die einzelnen Komponenten getrennt transportiert werden. Dort werden elektrische Signale erzeugt, die über einen Verstärker vom Datensystem aufgezeichnet werden.

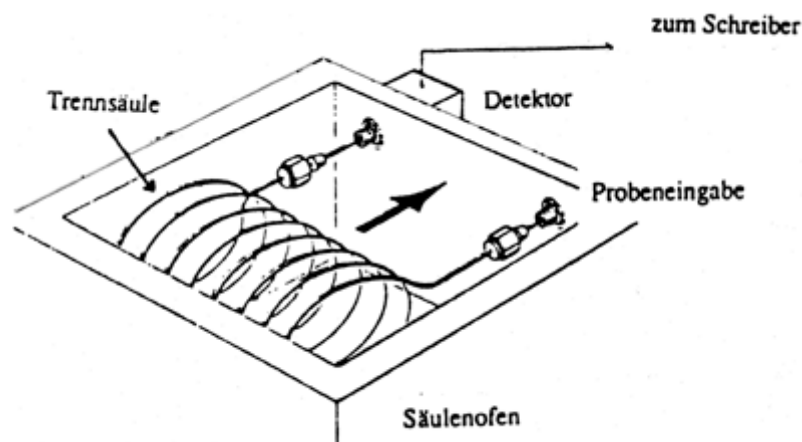


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung eines Gaschromatographen. Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze in den Verdampfungsraum eingegeben.

Fettsäurebestimmung:

Die GC ist in der Lage, die Trennung komplizierter Gemische in μg -Mengen exakt qualitativ und quantitativ durchzuführen.

a) Qualitativ

Jede Verbindung hat eine charakteristische Retentionszeit (Verweildauer in der Säule). Der Vergleich mit Testsubstanzen erlaubt die Identifizierung der Komponenten eines Gemisches, in unserem Fall der einzelnen Fettsäuremethylester. Als Standard dient im Praktikum das Gaschromatogramm einer Mischung von bekannten Fettsäuremethylestern (Abbildung 4-7).

b) Quantitativ

Eine quantitative Bestimmung der einzelnen Fettsäuren erfolgt mit Hilfe der Clarity Software des Gaschromatographen. Sie errechnet die Fläche und den prozentualen Anteil des zu einer bestimmten Fettsäure gehörenden Signals. Alternativ dazu kann das Gaschromatogramm quantitativ nach der Dreiecksmethode ausgewertet werden: $F = h \times b$

Den Flächeninhalt F berechnet man durch Multiplikation der Signalthöhe (h) und der Signalbreite (b) auf halber Höhe (Abbildung 4-7).

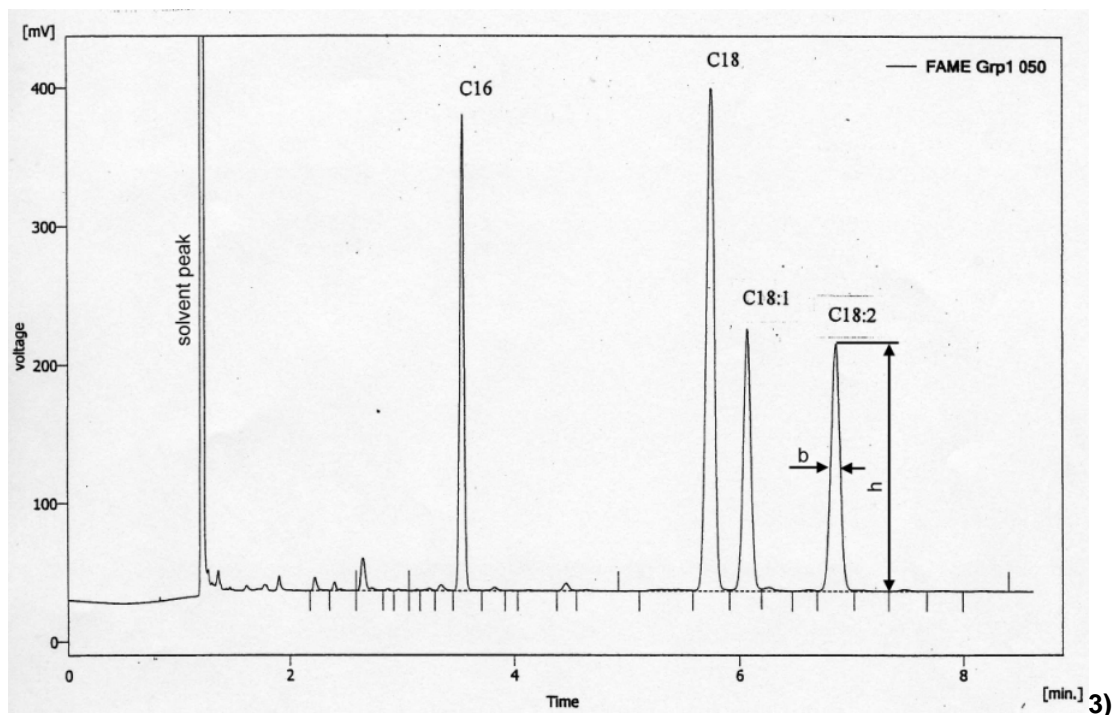


Abbildung 4-7: Das Chromatogramm eines Fettsäuremethylestergemisches

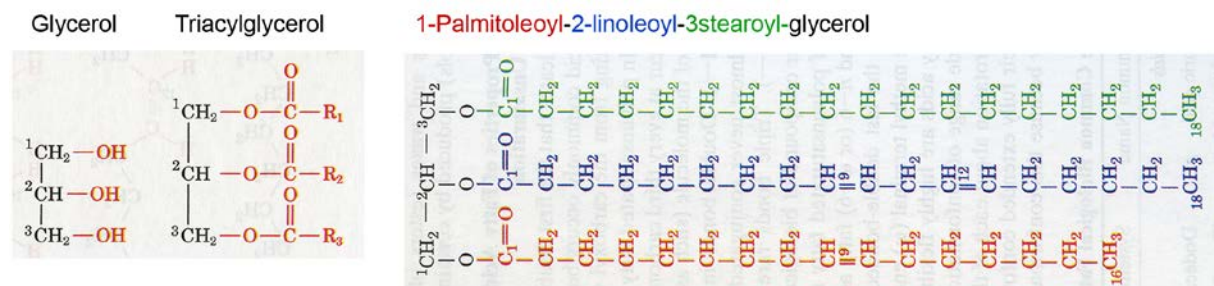


Abbildung 4-8: Von links nach rechts: das GlycerinGrundgerüst; eine allgemeingültige Darstellung der Triacylglycerids (TAG) und ein C16/C18 gemischtes TAG.

Geräte:

Dani Master Gaschromatograph mit Kontroll- und Auswertestation, 25 m DN-Wax Kapillarsäule, 0,32 µm i. d.
Erlenmeyerkolben 100 ml, 20 ml
Wasserbad zur Verseifung und Veresterung
Wasserbad zum Abdampfen von Lösungsmitteln, unter dem Abzug

Lösungen:

Bortrifluorid/Methanol 1:5
Petrolether
Na₂SO₄ wasserfrei
2 N NaOH
Olivenöl
Methanolisches KOH
20 %-iges HCL
Chloroform

1) Verseifung von Triacylglyceriden:

0,1 ml Speiseöl oder ca. 0,1 g Speisefett (eine Spatelspitze) aus dem Haushalt (Margarine, Butter, Salatöl, Speck usw., eventuell von zu Hause mitbringen!) und 5 ml 15%-ige methanolische KOH (Methanol/Wasser = 9:1) werden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Deckel 30 min in einem elektrisch beheizten, siedenden Wasserbad erhitzt. Der kugelförmige Deckel wirkt wie ein primitiver Rückflusskühler und verhindert das Verdampfen des Methanols. Anschließend kühlt man ab und säuert mit 10 ml ca. 20%-iger HCl an. Die freigesetzten Fettsäuren werden in einem Schütteltrichter mit 20 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die untere Phase (wässrige Lösung) wird verworfen, dabei muss der Glasstopfen abgenommen werden. Die obere Phase (Petrolether) wird dann im Schütteltrichter 3 mal mit je 10 ml Wasser gewaschen und in einem 25 ml Erlenmeyerkolben mit 2-3 Spatelspitzen wasserfreiem Na₂SO₄ versetzt ("getrocknet"), um die Wasserreste zu binden. Nach kurzer Zeit und wiederholtem Umschwenken wird die Lösung in einen trockenen 25 ml Erlenmeyerkolben filtriert, in ein Reagenzglas umgefüllt und im Abzug auf einem ebenfalls elektrisch beheizten Wasserbad zur fast vollständigen Trockne eingedampft. Hierbei auf Siedeverzug achten!

2) Veresterung der freien Fettsäuren mit 2% Bortrifluorid-Etherat in Methanol

- 1 ml der BF₃-Methanollösung wird zu den eingedampften Fettsäuren gegeben, durch Schwenken gelöst und sofort in ein Sovirelglas (mit Schraubverschluss) überführt.
- Sovirelglas fest verschließen! 15 min. im siedenden Wasserbad erhitzen.
- 2 ml H₂O zugeben, anschließend mit 2 ml Petrolether durch Schütteln extrahieren.
- Petroletherphase (obere Phase!) mit Pasteurpipette in ein neues Reagenzglas überführen.
- Im Wasserbad im Abzug zur Trockne eindampfen.
- Der trockene Rückstand wird von der Praktikumsleitung in einer entsprechenden Menge CHCl₃ gelöst und auf den Gaschromatographen aufgespritzt. Beschriften Sie Ihre aufgearbeitete Probe mit der Gruppennummer und geben Sie das aufgearbeitete Fett/Öl an.

Aufgabe:

Ihr Chromatogramm erhalten Sie von Ihrem Assistenten. Tauschen Sie Ihre Ergebnisse mit einer Nachbargruppe, die eine andere Probe aufgearbeitet hat, aus. Geben Sie die einzelnen Fettsäuren mit ihren zugehörigen Trivialnamen an. Vergleichen Sie die Anteile aller einzelnen Fettsäurespezies in den beiden Proben. Stellen Sie den Anteil aller gesättigten dem der ungesättigten Fettsäuren gegenüber. Bewerten Sie das Ergebnis hinsichtlich einer Empfehlung für die Ernährung.

IV. Dünnschichtchromatographie von Steroidhormonen.

Einführung:

Die Gaschromatographie kann nur eingesetzt werden, wenn die zu untersuchenden Substanzen flüchtig sind, oder durch geeignete Derivatisierung flüchtig gemacht wurden. Ein solches Verfahren wird in der Gerichtsmedizin oder in der Sportmedizin zum Nachweis kleinster Mengen von Steroidhormonen bzw. ihren Abbauprodukten eingesetzt.

Die Methode ist jedoch relativ aufwendig. Sie umfasst die Extraktion aus dem Blut oder Urin, Reinigung und anschließend Derivatisierung der Hormone, damit der Siedepunkt soweit sinkt, dass sie in der Hitze nicht zerstört werden. Daher sollen im Rahmen dieses Praktikums nur die Steroidhormone, die in größeren Mengen vorliegen, mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) getrennt und nachgewiesen werden. Die Steroidhormone Progesteron, Cortison, Testosteron, Östradiol und Cortexon sollen getrennt und parallel dazu die Komponenten eines Gemisches analysiert werden.

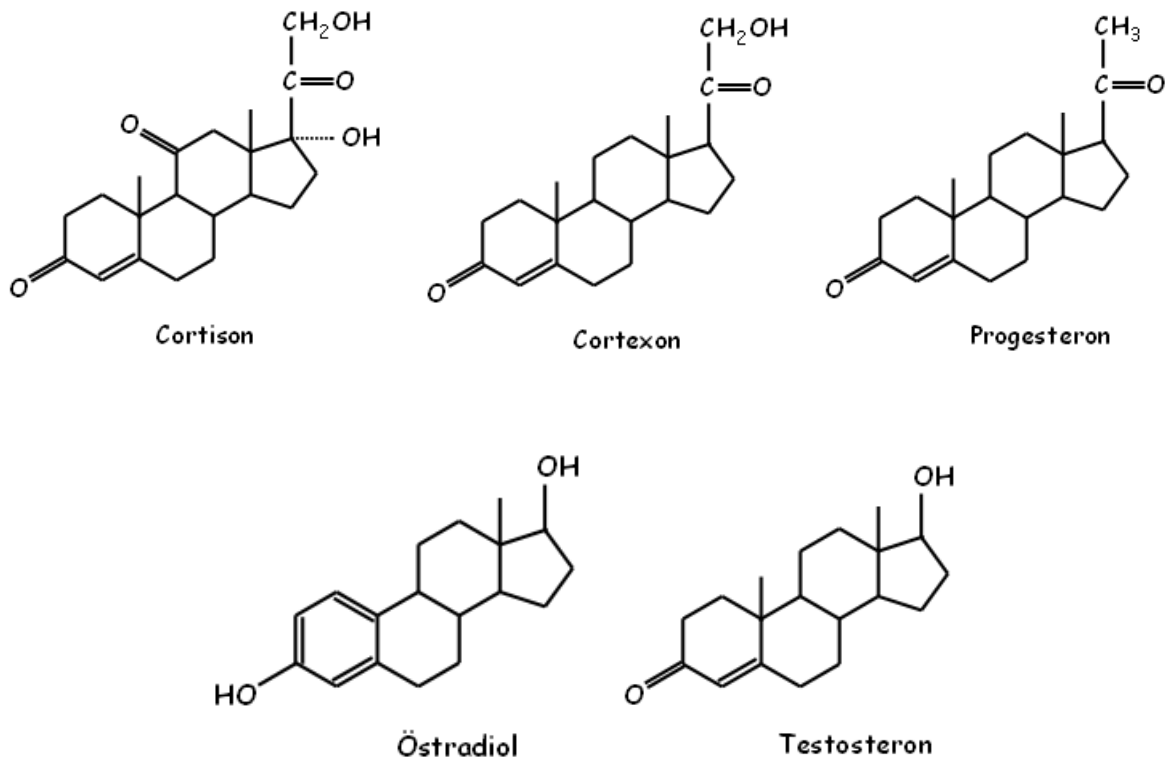


Abbildung 4-10: Die chemischen Formeln der Hormone Cortison, Cortexon, Progesteron, Östradiol und Testosteron.

Durchführung:

Die Testsubstanzen und die Analysen werden in ausreichenden Abständen aufgetragen (siehe Abb. 4-11). Dabei soll jeweils 30 μl (3x10 μl) Probe aufgetropft werden (kleine, weiße Spitzen auf den 50 μl Pipetten verwenden! Für jede Substanz eine neue Spitze verwenden!). Als Laufmittel dient Chloroform/Aceton 9:1. Nehmen Sie die Dünnschichtplatte aus dem Laufmittel, bevor das Laufmittel die obere Kante erreicht. Nach Lufttrocknung (Abzug) wird die Platte zuerst mit 50% H_2SO_4 in Methanol und dann mit 0,1 %-igem 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Ethanol + HCl eingesprüht und zur Farbentwicklung 10 Min. in einem Trockenschrank von 120 $^\circ\text{C}$ gelegt.

Das genaue Auftragsschema aller Proben und die Auswertebögen erhalten sie am Praktikumstag von ihren Assistenten.

Aufgabe:

Notieren Sie die Farben der Flecken und beobachten Sie ihre Fluoreszenz unter der UV-Lampe. Bestimmen Sie die beiden Steroidhormone in Ihrer Analyse. Berechnen Sie die R_f-Werte. Der R_f-Wert ist das Verhältnis der Laufstrecken der Flecken zur Laufstrecke des Laufmittels. Daher ist darauf zu achten, dass die Front des Laufmittels noch nicht den oberen Rand der Dünnschichtplatte erreicht hat.

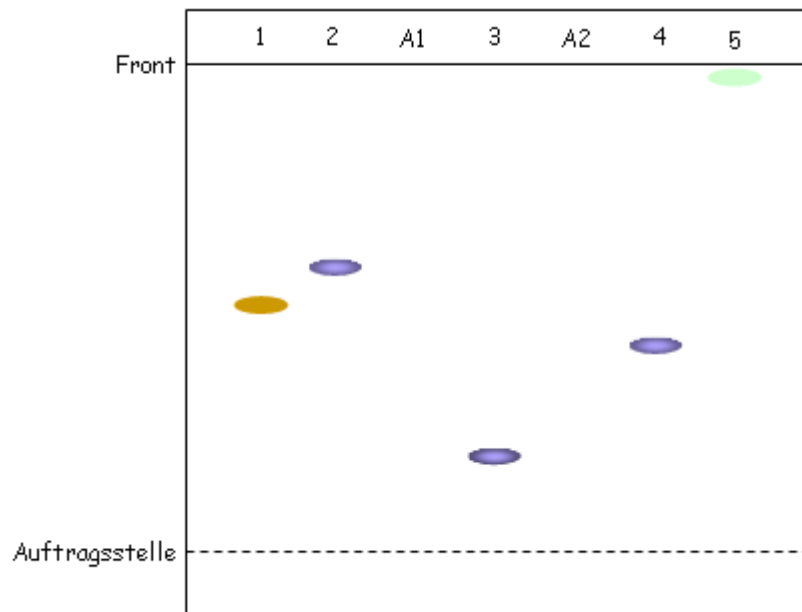


Abbildung 4-11: Das Dünnschicht-Chromatogramm der Steroidhormone.
1 Östradiol; **2** Cortexon; **A1** Analyse 1; **3** Cortison; **A2** Analyse 2;
4 Testosteron; **5** Progesteron

Tragen Sie die Ergebnisse Ihrer Bestimmung in die Analysenliste ein.

Klausuraufgaben

1. Wie kann der Abbau von Triglyceriden zur Glukoneogenese beitragen?
2. Wie beeinflusst der Prozentsatz der ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide die Fluidität einer Membran?
3. Warum ist die Plasmamembran für geladene Moleküle undurchlässig?
4. Nennen Sie drei Substanzen, die aus Membranbausteinen entstehen und an der Übertragung von Signalen mitwirken.
5. N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) ist Bestandteil von:

a)..... und b).....
6. a) Nennen sie das Schlüsselenzym der Biosynthese von Fettsäuren.
b) Formulieren Sie die von ihm katalysierte Reaktion (in Worten).
c) Nennen Sie je ein positives und ein negatives Effektormolekül.
7. Nennen Sie die Namen der drei Ketonkörper:
8. Wo sind in der Zelle die Rezeptoren für:
a) Insulin, b) Cortisol und c) die Schilddrüsenhormone T3/T4 lokalisiert?