

Hexokinase-Glukokinase aktivitet i lever –og hjernevæv.

ANVENDTE METODER:

Den overordnede metode for måling af Hexokinase-Glukokinase aktivitet i henholdsvis lever- og hjernevæv er at kæde deres produkt (glucose-6-phosphat) sammen med en anden reaktion hvori der indgår et spektrofotometrisk målbart stof – som f.eks NADH.

I denne øvelse har vi følgende reaktioner:



I øvelsen bliver der foretaget spektrofotometrisk måling for henholdsvis lav og høj glucose koncentration i kuglerne 2 og 4 med tilhørende blindprøver i kuglette 1 og 3.

Ved den lave glucose koncentration vil hexokinase være fuldmættet, medens glukokinasen kun ville bidrage lidt.

Ved høj glucose koncentration er hexokinasen stadig fuldt mættet, medens glukokinasen måles med 90 procent af sin V_{MAX} .

Ud fra den totale aktivitet som kugletten med høj glucose koncentration kan vi udregne glukokinasens bidrag ved at trække aktiviteten for lav glucose koncentration fra aktiviteten for

Høj glucose aktivitet.

REGNE-EKSEMPLER:

Udregning af enzymaktiviteter for lever fra normal rotte:

Lav glucose kuglette = hexokinase aktivitet

$$\text{dA/min} = \text{dA/min (kuglette 2)} - \text{dA/min (kuglette 1)} = \\ (0.0049 - 0.0025) \text{ dA/min} = 0.0024 \text{ dA/min}$$

$$\text{umol/min/g væv} = \text{Unit/g væv} = (\text{dA/min} * \text{Vol l} * 10^6) / (6300 \text{ l/(mol*cm)} * \text{g væv} * 1 \text{ cm}) \\ \text{d.v.s vi får: } (0.0024 * 2.91 * 10^{-3} * 10^6) / (6300 \text{ l/(mol*cm)} * 0.005 \text{ g} * 1 \text{ cm}) = 0.2217 \text{ U/g}$$

Høj glucose kuglette = total aktivitet (HK + GK)

$$\text{dA/min} = \text{dA/min (kuglette 4)} - \text{dA/min (kuglette 3)} = \\ (0.0347 - 0.0025) \text{ dA/min} = 0.0323 \text{ dA/min}$$

$$\text{umol/min/g væv} = \text{Unit/g væv} = (\text{dA/min} * \text{Vol l} * 10^6) / (6300 \text{ l/(mol*cm)} * \text{g væv} * 1 \text{ cm}) \\ \text{d.v.s vi får: } (0.0323 * 2.91 * 10^{-3} * 10^6) / (6300 \text{ l/(mol*cm)} * 0.005 \text{ g} * 1 \text{ cm}) = 2.9839 \text{ U/g}$$

$$\text{dvs glukokinasen aktivitet bliver: } 2.9839 - 0.2217 = 2.7622$$

DISKUSSION AF DE OPNÅEDE RESULTATER:

Ud fra resultaterne kan vi se at der i leveren er lav hexokinase aktivitet i modsætning til aktiviteten i hjerne som er meget højere – hvilket skyldes at der i hjernen findes større mængder af HK.

Ved høj glucose konc. ses der i leveren en stigning i glucokinasens aktivitet som desuden er højere end HK aktiviteten – hvilket skyldes at GK har en høj K_m (dvs lav affinitet for glucose) samt at konc. af HK er lav i leveren og at den allerede ved lav glucose konc. er fuldmættet pga af lav K_m (høj affinitet se FIG. 1 i øvelsesvejledning , s. 9).

Der ses ingen GK aktivitet i hjernen (burde i hvert fald ikke ses nogen- men dette skyldes, at vores lave glucosekoncentration er så lav, at HK ikke når op på sit V_{max} – dvs substrat koncentrationen ikke er over $9 * K_m$) – hvilket skyldes at der i hjernen ikke findes GK.

Leveren har brug for at regulere glucose-niveauet i blodet, hvorfor den ved stigende blodglucosekoncentrationer skal kunne omdanne tilsvarende stigende mængder glucose til glycogen, hvilket ses umiddelbart efter indtagelse af føde. Derfor er det vigtigt med GK, idet dens aktivitet stiger med blodglucose koncentrationen.

I hjernen kan kun bruge glucose som energi-kilde, idet hjernen kun indeholder receptorer for glucose. I tilfælde med faldende blodglucosekoncentration, er det derfor en fordel, at HK har en lav K_m -værdi.

FORSKELLE IMELLEM NORMALE OG DIABETISKE ROTTER.

I leveren ses den forskel, at de ikke er nogen GK- aktivitet i diabetiske rotter, dette skyldes at GK er insulin-induceret. I normal og diabetisk hjernevæv ses ingen signifikant forskel i enzymaktivitet, idet insulin ikke påvirker HK- aktivitet (transkription af HK).