

Universität Ulm

Praktikum Stoffwechselphysiologie

WS 2011/2012

Versuch: Muskelbiochemie

Gruppe XY

Betreuer:

Praktikanten:

Versuchstag:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1 Kohlenhydrate	3
1.2 Fette	4
1.3 Aminosäuren (AS).....	5
1.4 Glykolyse und Milchsäuregärung	5
1.5 Adenosintri-phosphat (ATP)	6
1.6 Typen von Muskeln	7
1.7 Aufbau der Muskulatur	8
1.8 Struktur der quergestreiften Muskulatur.....	9
1.9 Funktion der quergestreiften Muskulatur.....	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Präparation und Aufschluss der Froschmuskeln	12
2.2 Lactatbestimmung.....	13
2.3 Glykogenbestimmung.....	14
3. Ergebnisse.....	15
4. Diskussion.....	20
5. Quellenangaben	20

1. Einleitung

1.1 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate sind Zucker (Saccharide), die meist die Form $(\text{CH}_2\text{O})_n$ besitzen, wobei n meist größer oder gleich drei ist. Unterschieden werden die Kohlenhydrate in drei Größenklassen: **Mono-, Oligo-** und **Polysaccharide**. Ein Monosaccharid besteht nur aus einem Zuckerbaustein, während sich ein Oligosaccharid aus acht bis zehn Zuckerbausteinen, die glykosidisch mit einander verbunden sind, zusammensetzt. Die längsten Strukturen bei den Kohlenhydraten bilden die Polysaccharide, die aus mehreren tausend Monomeren aufgebaut sein können. Zucker können sowohl in linearer Form (eher selten), wobei hier die Pentosen (Fünf-Kohlenstoffzucker) und die Hexosen (Sechs-Kohlenstoffzucker), eine wichtige Rolle spielen, wie auch als Ringstrukturen (häufigste Form) auftreten, bei denen meist zwischen Furanosen (Fünf-Ring-Zucker) und Pyranosen (Sechs-Ring-Zucker) unterschieden wird. Die linearen Zuckermoleküle können noch weiter unterschieden werden in Ketosen und Aldosen, wobei sich bei den Aldosen die C-O-Doppelbindung an einem endständigen C-Atom befindet, während sich die C-O-Doppelbindung bei Ketosen an einem C innerhalb des Moleküls befindet.

Auch unterscheidet man die Zucker nach D- und L-Form, wobei im Körper nur die D-Form verwendet und auch verarbeitet wird. Bei der D-Form befindet sich die OH-Gruppe des Kohlenstoffs, welcher vom höchst oxidiertesten C-Atom am weitesten entfernte ist, auf der rechten Seite, während diese funktionelle Gruppe sich bei der L-Form auf der linken Seite des Moleküls befindet (in der Fischer-Projektion). Die D- und die L-Form können nicht ineinander überführt werden, da das besagte C-Atom ein chirales C-Atom ist, also vier verschiedenen Bindungspartner besitzt.

Zur Bildung einer Ringstruktur aus einer linearen Form kommt es, indem eine intramolekulare Halbacetal- (Bildung einer Pyranose aus einer Aldose) bzw. eine Halbketalbindung (Bildung einer Furanose aus einer Ketose) stattfindet. Hierbei wird das erste C-Atom (nach dem Sauerstoff im Urzeigersinn gezählt) zu einem chiralen Kohlenstoffatom, wodurch man bei den zu Ringen geschlossenen Zuckern eine weitere Einteilung machen kann, nämlich in die α - und die β -Form. Bei einem α -Zucker befindet sich die OH-Gruppe des 1. C-Atoms unterhalb der Ringebene und bei einem β -Zucker sitzt die OH-Gruppe des 1. C-Atoms oberhalb der Ringebene in der Haworthprojektion.

Bekanntere Beispiele für **Monosaccharide** sind die Glucose, die Fructose oder auch die Ribose, die in unserem Körper häufig auftreten. Die Glucose und die Fructose dienen als Energielieferanten aus denen schließlich ATP gewonnen werden kann. Die Ribose dient als Grundgerüst für Moleküle, beispielsweise des ATP-Moleküls.

Ein wichtiges **Disaccharid** ist zum Beispiel die Saccharose, also der normale Haushaltszucker, den wir mit der Nahrung aufnehmen und aus dem schließlich die Glucose und Fructose zur ATP-Synthese

gewonnen werden kann. Die Bindung der beiden Monosaccharide kann sowohl α -, wie auch β -glykosidisch geknüpft sein. Desweiteren ist auch ein Unterschied zu bemerken, ob die Verbindung zwischen dem 1. und dem 4. oder dem 1. und dem 1. C-Atom der beiden Monosaccharide gebunden wurde.

Eine wichtige Aufgabe in den Organismen übernehmen auch die **Polysaccharide**, diese Kohlenhydrate dienen als Energiespeicher, da sie osmotische wenig aktiv sind, oder auch als Strukturelemente, die den Zellen ihre Form und Festigkeit geben. Wichtige Zucker-Speicherformen sind die Stärke der Pflanzen, die sich aus Amylose (α -1,4-glykosidische Bindung zwischen Glucosemolekülen), einem linearen Molekül und dem Amylopektin, ein verzweigtes Molekül (Grundgerüst wie Amylose, jedoch mit α -1,6 glykosidischen Verzweigungen alle 25 Monomere), zusammensetzt, oder auch das Glykogen der Tiere, welches stark der Struktur des Amylopektins ähnelt, wobei das Glykogen jedoch stärker verzweigt ist (Verzweigung ca. alle 8 Monosaccharideinheiten). Das Glykogen ist so stark verzweigt, damit es vom Körper schneller abgebaut werden kann. Ein typisches Struktur-Polysaccharid ist die Cellulose (β -1,4-glykosidische Verknüpfung von zwei Glucose-Molekülen), die von Pflanzen synthetisiert wird.

1.2 Fette

Fette oder auch Triglyceride sind Fettsäureester des Glycerins. Hierbei ist die OH-Gruppe des jeweiligen C-Atoms des Glycerins (Glycerin ist ein C_3 -Körper) mit jeweils einer Säuregruppe der Fettsäure verestert. In der Natur kommen so gut wie nur gemischte Triglyceride vor, als Glycerinmoleküle, die mit verschiedenen Fettsäuren verestert sind vor. Die Fettsäuren besitzen einen hydrophilen Kopf, die Säuregruppe, mit dem sie an das Glycerin gebunden sind und einen hydrophoben Schwanz, der aus Kohlenwasserstoffen besteht und meist eine Länge von 16 – 20 Kohlenstoffatomen besitzen. Je nachdem, ob die Kohlenstoffe nur über Einfachbindung verknüpft sind oder auch Doppelbindungen enthalten unterscheidet man zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Die Unterscheidung gibt es auch bei den Fetten, je nachdem, ob größtenteils gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren enthalten sind. Gesättigte Fettsäuren sind bei Raumtemperatur fest, da sie sich gut aneinander lagern können und somit eine dichte Packung ergeben und starke Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte) untereinander ausbilden können. Ungesättigte Fettsäuren erhalten durch die C-C-Doppelbindung einen Knick in der Struktur und sind nicht mehr linear wie die gesättigten, deshalb können sie sich nicht so gut aneinander lagern und so starke Wechselwirkungen untereinander aufbauen, weshalb sie bei Zimmertemperatur flüssig sind. Fette werden im Körper als Langzeitenergiespeicher genutzt, da sie nicht hygroskopisch sind, also kein Wasser anlagern und sich deshalb leicht und platzsparend lagern lassen.

1.3 Aminosäuren (AS)

Aminosäuren (AS) sind die Grundbausteine der Proteine. Der Körper kann aus 20 verschiedenen Aminosäuren tausende verschiedener Proteine aufbauen. Diese Proteine benötigt der Körper, als Bausteine für die Zelle, wie Ionenkanäle und auch als Enzyme, damit der Stoffwechsel stattfinden kann.

AS bestehen aus einer Carboxyl- und einer Aminogruppe, die sich jeweils am gleichen C-Atom befinden. Diese beiden funktionellen Gruppen sind für die Erstellung der Peptide (Proteine) äußerst wichtig, da die Verknüpfung jeweils zwischen diesen beiden Gruppen zweier AS unter Abspaltung eines Wasser-Moleküls erfolgt (Peptidbindung). Ein Protein kann aus mehr als tausend über eine Peptidbindung verknüpfte AS bestehen. Weiterhin befindet sich an dem Kohlenstoffatom noch ein Wasserstoffatom und ein organischer Rest. Durch diesen Rest können die einzelnen AS voneinander unterschieden werden. Der Rest ist verantwortlich für die Eigenschaften der AS, es gibt sowohl unpolare, polare, basische wie auch saure AS. Die Basizität der AS entsteht durch eine weitere Amino-Gruppe im Rest, während die sauren AS noch eine weitere Carboxyl-Gruppe im Rest einhalten.

Da das Kohlenstoffatom mit dem Rest, dem H-Atom, der Amino- und der Carboxyl-Gruppe vier unterschiedliche Bindungspartner besitzt (außer bei Glycin: Rest ist ein H-Atom) handelt es sich hierbei um ein asymmetrisches bzw. chirales C-Atom. Wodurch man wieder zwei Formen unterscheiden kann, D- und L-Form. Jedoch kann der Körper nur die L-Form verwenden.

1.4 Glykolyse und Milchsäuregärung

Die **Glykolyse** ist ein wichtiger Schritt zur Energiegewinnung, hierbei wird die Glucose zuerst mit ATP aktiviert, sodass sie schließlich über mehrere weitere Reaktionsschritte zu Pyruvat abgebaut wird (siehe Abb. 1). Während dieses Prozesses entsteht pro Mol Glukose jeweils 2 Mol ATP aus ADP, 2 Mol NADH aus NAD^+ und 2 Mol Pyruvat. Damit die Glykolyse weiter ablaufen kann, müssen die Reduktionsequivalente zurückgewonnen werden, also NADH wieder zu NAD^+ reagieren. Unter aeroben Bedingungen geschieht dies über den Citratcyclus und die Atmungskette. Ist aber kein Sauerstoff vorhanden, wird das NAD^+ über die **Milchsäuregärung** zurückgewonnen, indem das Pyruvat zum Lactat reduziert wird (siehe Abb. 2), also werden pro Mol Glucose insgesamt 2 Mol Lactat gebildet.

Die Milchsäuregärung läuft oftmals in Muskelzellen ab, wenn diese bei starker Belastung nicht schnell genug mit Sauerstoff versorgt werden können. Damit sich das Lactat nicht im Muskel anreichert wird es zur Leber transprotiert, wo es wieder in Pyruvat umgewandelt wird. Die Milchsäuregärung wird im Muskel nur unter starker Belastung, bei anaeroben Bedingungen und unter akutem ATP-Mangel durchgeführt, denn die Muskelzelle kann über den aeroben Glucose-

Abbau mit Glykolyse, Citratcyclus und Atmungskette pro Mol Glucose 36 ATP gewinnen, während sie bei dem anaeroben Glucoseabbau mit Glykolyse und Milchsäuregärung pro Mol Glucose nur 2 ATP erhalten kann.

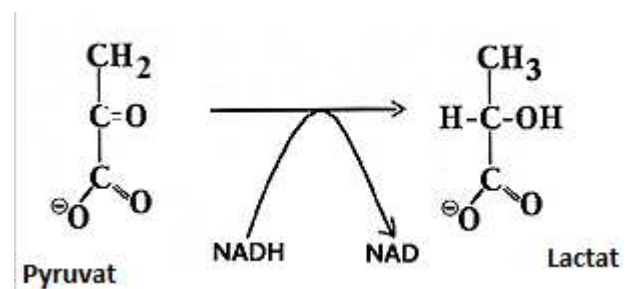
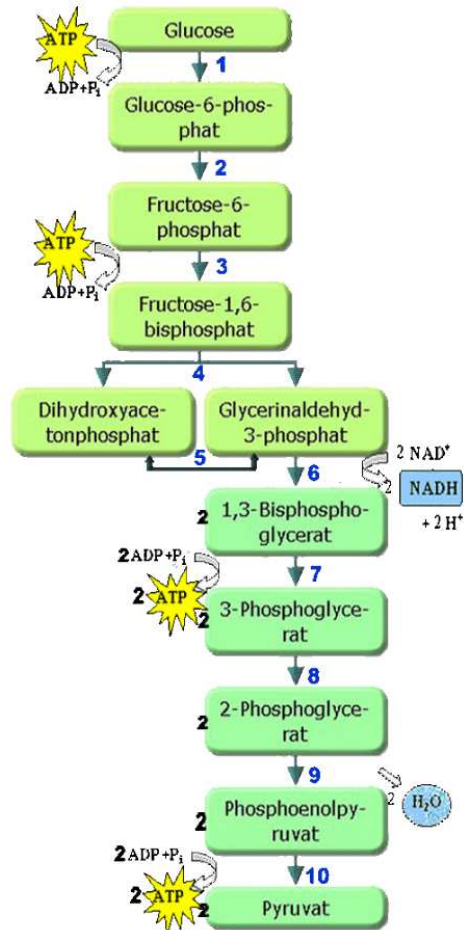


Abbildung 2: Reduktion von Pyruvat zu Lactat
aus <http://www.u-helmich.de/bio/stw/reihe3/pics/gaer11.gif>
(vom 26.01.12, bearbeitet)

Abbildung 1: Ablauf der Glykolyse

aus <http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Hefe/allg/bilder/gaerung/glykol1.gif>
(vom 26.01.12)

1.5 Adenosintriphosphat (ATP)

Das ATP besteht aus einer Ribose (Furanose), welche mit einer Adeninbase und drei Phosphatgruppen gekoppelt ist (siehe Abb. 3). Das ATP dient der Zelle als kurzzeitiger Energieträger. Die Energie wird frei, indem die energiereiche Säureanhydridbindung zwischen den Phosphorsäuregruppen hydrolysiert wird, dadurch entsteht ein ADP und ein anorganisches Phosphat, außerdem wird Energie im Wert von 30,5 kJ pro Mol ATP freigesetzt. Diese Energie kann die Zelle dann für Transportvorgänge gegen den Konzentrationsgradient, den Ablauf endothermer Reaktionen oder eine andere Art von Arbeit verwendet werden.

Das ATP dient nur als unmittelbarer Energieüberträger, nicht als Speicherform. Der Umsatz von ATP im Körper ist enorm und beträgt allein beim ruhenden Körper 40 kg pro Tag. Dieser Verbrauch kann bei intensiver Arbeit noch auf 0,5 kg ATP pro Minute gesteigert werden. Aufgrund des hohen Bedarfs von ATP muss es ständig regeneriert werden, dies geschieht durch den Stoffwechsel, wobei zu beachten ist, dass der größte ATP-Gewinn durch die Atmungskette erzielt wird.

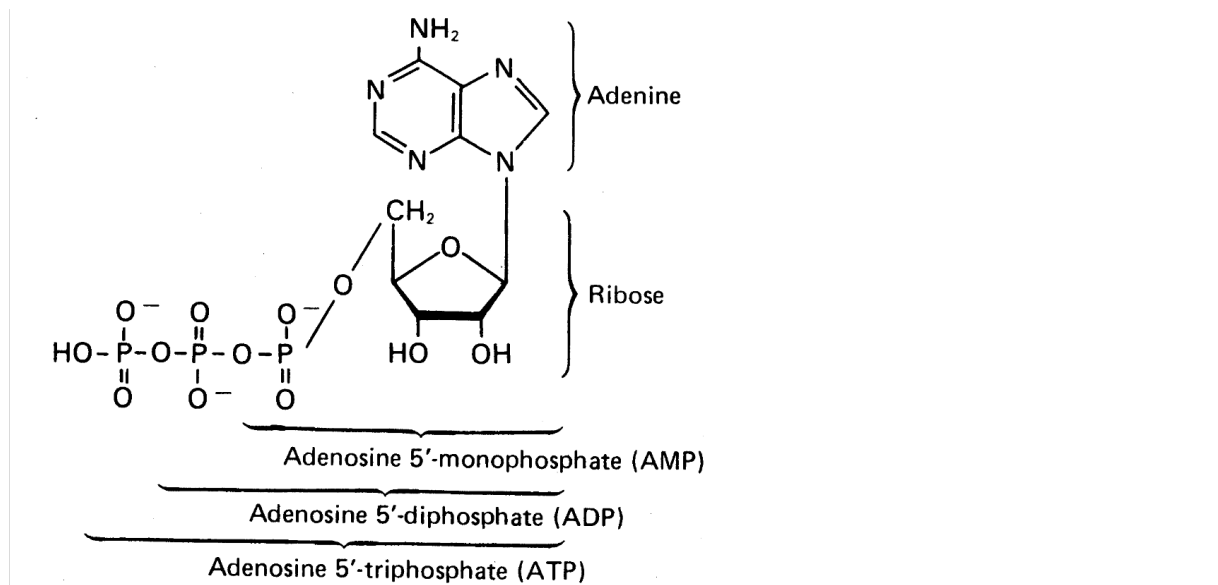


Abbildung 3: Struktur des ATP

Aus <http://www.benbest.com/cryonics/ATP.gif> (vom 26.01.2012)

1.6 Typen von Muskeln

Allgemein werden zwei Arten von Muskeltypen unterschieden, nämlich die glatte und die quergestreifte Muskulatur. Wobei sich die quergestreifte Muskulatur noch in Skelett- und Herzmuskulatur untergliedern lässt. Diese Muskeltypen lassen sich anhand der verschiedenen Anordnung der Muskelfaser unterscheiden, die bei der glatten Muskulatur sehr ungeordnet sind, bei der Skelettmuskulatur jedoch eine hohe Ordnung aufweisen, auch die Herzmuskulatur besitzt eine starke Ordnung der Muskelfasern, jedoch sind die Fasern verzweigt. Desweiteren bildet die glatte Muskulatur keine Synzytien, während die Skelettmuskulatur dies tut. Synzytien sind Zellen mit mehreren Zellkernen. Was den Herzmuskel noch von den anderen Muskeltypen abgrenzt ist, dass dieser einen Reiz benötigt um zu kontrahieren, da der Sinusknoten den Takt für den Herzschlag und damit die Muskelkontraktion steuert. Ein weiterer Unterschied zwischen der glatten und der Skelettmuskulatur ist der, dass nur letztere willentlich angesprochen werden kann, also vor allem für Bewegungsabläufe verantwortlich ist, während die glatte Muskulatur keiner bewussten Steuerung unterliegt, da sie größtenteils als Eingeweidemuskulatur dient.

1.7 Aufbau der Muskulatur

Die Muskulatur ist allgemein aus Muskelfaserbündeln aufgebaut, welche in Muskelfasern untergliedert sind. Diese Fasern bestehen wiederum aus Myofibrillen, die sich aus parallel angeordneten Myofilamenten zusammensetzen. Die kleinste Untereinheit der Myofilamente sind die Aktin- und Myosinfilamente.

Die Aktinfilamente, bestehen aus polymerisierten globulären Aktinmolekülen (G-Aktin), die eine doppelsträngige Helix bilden (siehe Abbildung 4). Der Durchmesser eines solchen Aktinfilamentes beträgt 5 – 9 nm, weshalb sie auch oft als dünnes Filament bezeichnet werden. In der Furche zwischen den beiden Aktinsträngen befindet sich ein dünnes Band von Tropomyosinmoleküle. Über diese Band von Tropomyosin sind globuläre Troponinmoleküle verteilt, welche die Position des Tropomyosinstranges steuern.

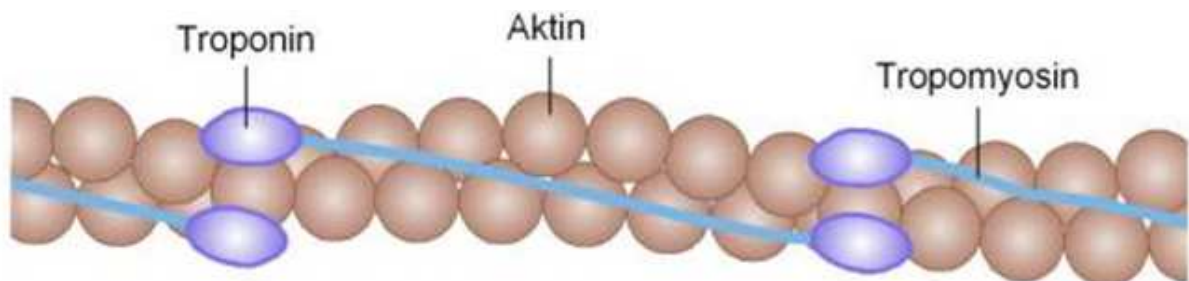


Abbildung 4: Struktur eines Aktinfilamentes

aus <http://www-classic.uni-graz.at/ipcwww/Elearning/Irn/pchem/data/A01NEB014.jpg> (vom 27.01.12)

Die Myosinfilamente sind dicker als die Aktinmoleküle, ihr Durchmesser liegt bei etwa 15 nm, weshalb sie auch als dickes Filament bezeichnet werden. Ein Filament setzt sich aus etwa 200 Myosinmolekülen (siehe Abb. 5) zusammen. Ein Myosinmolekül besteht aus zwei Ketten, die miteinander verdrillt werden, wobei noch zwischen Kopf-, Hals- und Schwanzteil des Myosins zu unterscheiden ist. Das Myosinköpfchen ist für die Bindung an das Aktinmolekül verantwortlich und zeigt in Richtung des Endes des Filamentes.

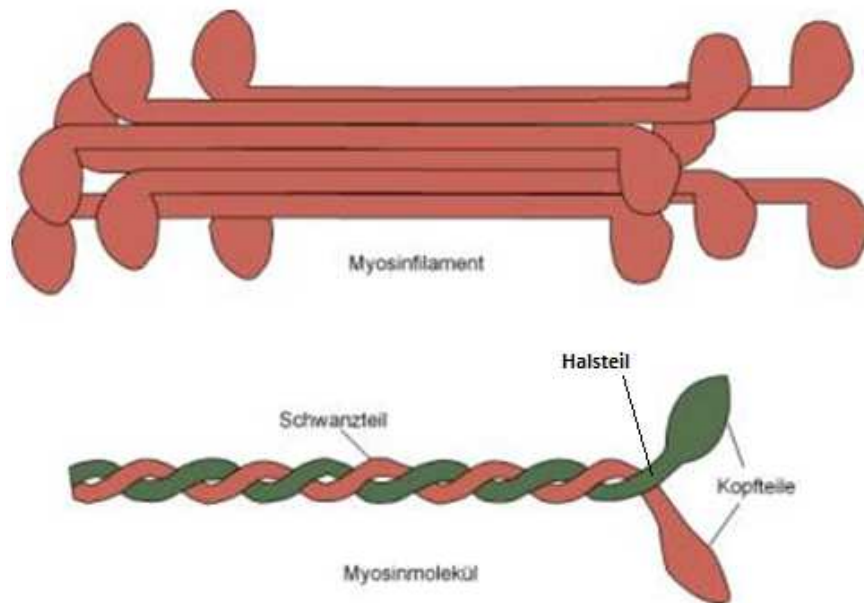


Abbildung 5: Struktur eines Myosinfilamentes und eines Myosinmoleküls

aus <http://www-classic.uni-graz.at/ipcwww/Elearning/Irn/pchem/data/A01NEB015.jpg> (vom 27.01.12, bearbeitet)

1.8 Struktur der quergestreiften Muskulatur

Die quergestreifte Muskulatur ist komplizierter aufgebaut, als die glatte Muskulatur, da die Myosin- und Aktinfilamente bei der quergestreiften eine bestimmte Ordnung haben. Diese Ordnung wird vor allem auch dadurch erreicht, dass die Muskelfasern in Sarkomere eingeteilt sind. Die Sarkomere werden von den Z-Scheiben, an denen die Aktinfilamente verankert sind begrenzt, wie man in Abbildung 6 gut sehen kann. Die Aktinfilamente zweigen von der Z-Scheibe also in beide Richtungen und somit in zwei Sarkomere ab. In der Mitte des Sarkomers befindet sich die M-Scheibe, an welcher die Myosinfilamente befestigt sind und ebenfalls nach rechts und links in das Sarkomer abzweigen. Im Zentrum des Sarkomers kommen nur Myosinfilamente vor. Dieser Bereich wird als H-Bande bezeichnet, während der Bereich, in dem nur Aktinfilamente vorkommen, I-Bande genannt wird. Der Ort, an dem sich die sowohl das dicke, wie auch das dünne Filament vorkommt, hat den Namen A-Bande.

Die quergestreifte Muskulatur hat eben aufgrund dieser Banden, in die sich das Sarkomer unterteilen lässt, so genannt. Denn die I-Bande erscheint unterm Mikroskop weiß, da dort nur die hellen Aktinfilamente vorkommen, währenddessen die A-Bande aufgrund des Myosinanteils dunkler wirkt.

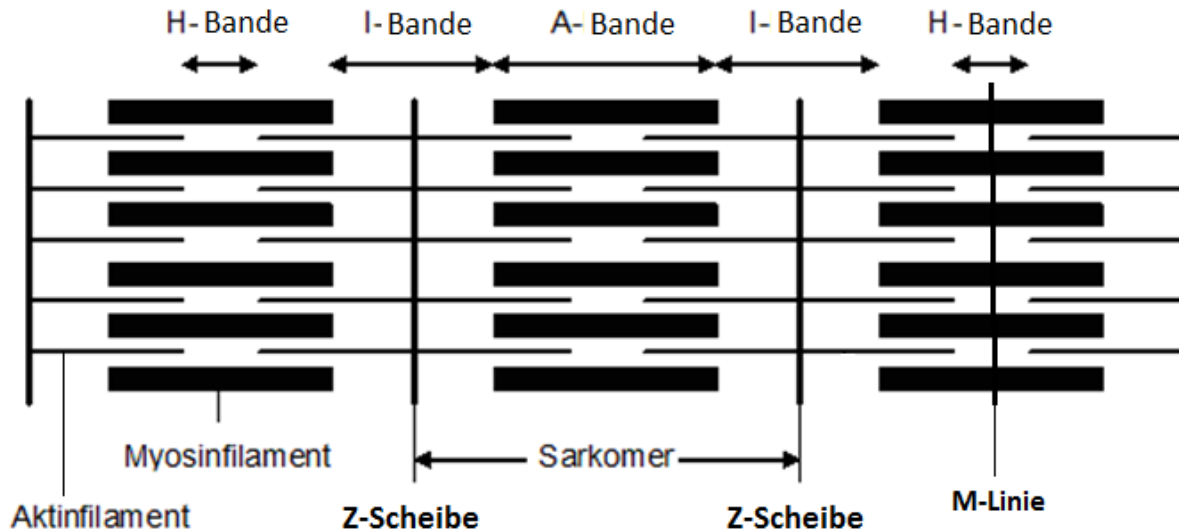


Abbildung 6: Aufbau eines Sarkomers

aus [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/53/Muskelfibrille_\(Sarkomer\).PNG](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/53/Muskelfibrille_(Sarkomer).PNG) (vom 27.01.12, bearbeitet)

1.9 Funktion der quergestreiften Muskulatur

Bevor es überhaupt zu einer Muskelkontraktion kommen kann, muss die Muskelzelle zuerst einen Reiz erfahren, der dafür sorgt, dass der Tropomyosinstrang nicht länger die Bindungsstellen für das Myosins am Aktin besetzt. Die Konformationsänderung des Tropomyosinstranges, der für die Freigabe der Myosinbindungsstellen sorgt, wird durch die Troponinmoleküle gesteuert. Diese verschieben den Tropomyosionfaden, wenn Ca^{2+} -Ionen an sie binden. Damit jedoch die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Muskelzellen ansteigt, ist ein Reiz nötig. Hat der Reiz eine genügend hohe Stärke, sodass der Schwellenwert überschritten wird, wird er von Motoneuronen schließlich bis zu motorischen Endplatte weitergeleitet, wo dann Acetylcholin ausgeschüttet wird, welches zu einem Aktionspotential in der Muskelzelle führt. Dieses Aktionspotential wird dann über transversale Tubuli (T-Tubuli) weit ins Innere der Muskelfasern übertragen. Das Aktionspotential führt zu einer Konformationsänderung der Triade, das heißt, dass die Strukturveränderung des Dihydropyridinrezeptor in der Membran des T-Tubulus eine Änderung der Struktur des Ryanodin-Rezeptors in der Membran des Sarcoplasmatischen Reticulums (SR) zur Folge hat. Das Sarcoplasmatische Retikulum ist eine Sonderform des Endoplasmatischen Retikulums, welche in den Muskelzellen vorkommt und als Calciumspeicher dient. (Die Ca^{2+} -Ionen werden aktiv in das SR transportiert). Nach der Konformationsänderung des Ryanodin-Rezeptor werden Ca^{2+} -Ionen ausgeschüttet, wodurch sich die Calciumionenkonzentration in der Muskelzelle erhöht. Nun können die Ca^{2+} -Ionen an den für sie vorgesehenen Bindestellen am Troponin binden, wodurch sich der Tropomyosinstrang verschiebt und die Myosinbindestellen am Aktin freigelegt werden, sodass die

Myosinköpfchen eine Querbrückenbindung zu den Aktinmolekülen aufbauen können, was schließlich zur Muskelkontraktion führt.

Der Ablauf der Muskelkontraktion wird mit Hilfe der sogenannten Filamentgleittheorie bzw. Gleitfilamenttheorie (siehe auch Abb. 7) beschrieben. Diese Theorie besagt, dass nachdem sich ein ATP an das Myosinköpfchen angelagert hat, dieses zu ADP und einem anorganischen Phosphat (P_i) gespalten wird (ATPase-Aktivität des Myosinköpfchens). Durch die aus dieser Hydrolyse freiwerdende Energie gelangt das Myosinköpfchen in eine energiereiche Konformation, in dem der Winkel des Kopfteils des Myosins sich von ca. 45° auf 90° erhöht hat. Nun kann das Myosinköpfchen an das Aktinfilament binden. Nach der Bindung wird das P_i abgespalten, was zu einer Verfestigung der Bindung zwischen Aktin und Myosin führt. Wird dann schließlich noch das am Myosin gebundene ADP freigesetzt, kommt es zu Umwandlung der Spannenergie des Myosinköpfchens in mechanische Energie. Hierbei klappt der Kopfteil des Myosins wieder in seine Ausgangstellung (energiearme Konformation des Myosinköpfchens) zurück und zieht dabei das Aktinfilament in Richtung der Sarkomermitte. Damit das Myosin sich wieder von dem Aktinfilament lösen kann, ist die Bindung eines weiteren ATP-Moleküls nötig (Weichmacherwirkung des ATP). Ist das Myosin nun wieder vom Aktin entfernt, kann erneut ein ATP binden und für die Herstellung einer Querbrücke zwischen Myosin und Aktin, jedoch an einer weiter hinten am Aktinfilament gelegenen Stelle, ausbilden. Ein Myosinköpfchen kann ca. 50 Querbindungen pro Sekunde machen. Somit gleiten die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbei, was dazu führt, dass die H-Zone ganz und die I-Bande teilweise verschwindet, allein die A-Bande erfährt keine Längenänderung. Insgesamt kann man also sagen, dass das Sarkomer während der Muskelkontraktion kürzer wird. Die Kontraktion des Muskels wird beendet, wenn die Ca^{2+} -Konzentration wieder sinkt und somit die Calcium-Bindungsstellen am Troponin wieder frei werden. Dies führt dazu, dass das Tropomyosin seine Konformation verändert und die Myosinbindungsstellen am Aktinfilament blockiert, sodass keine Querbrückenbindungen mehr entstehen können.

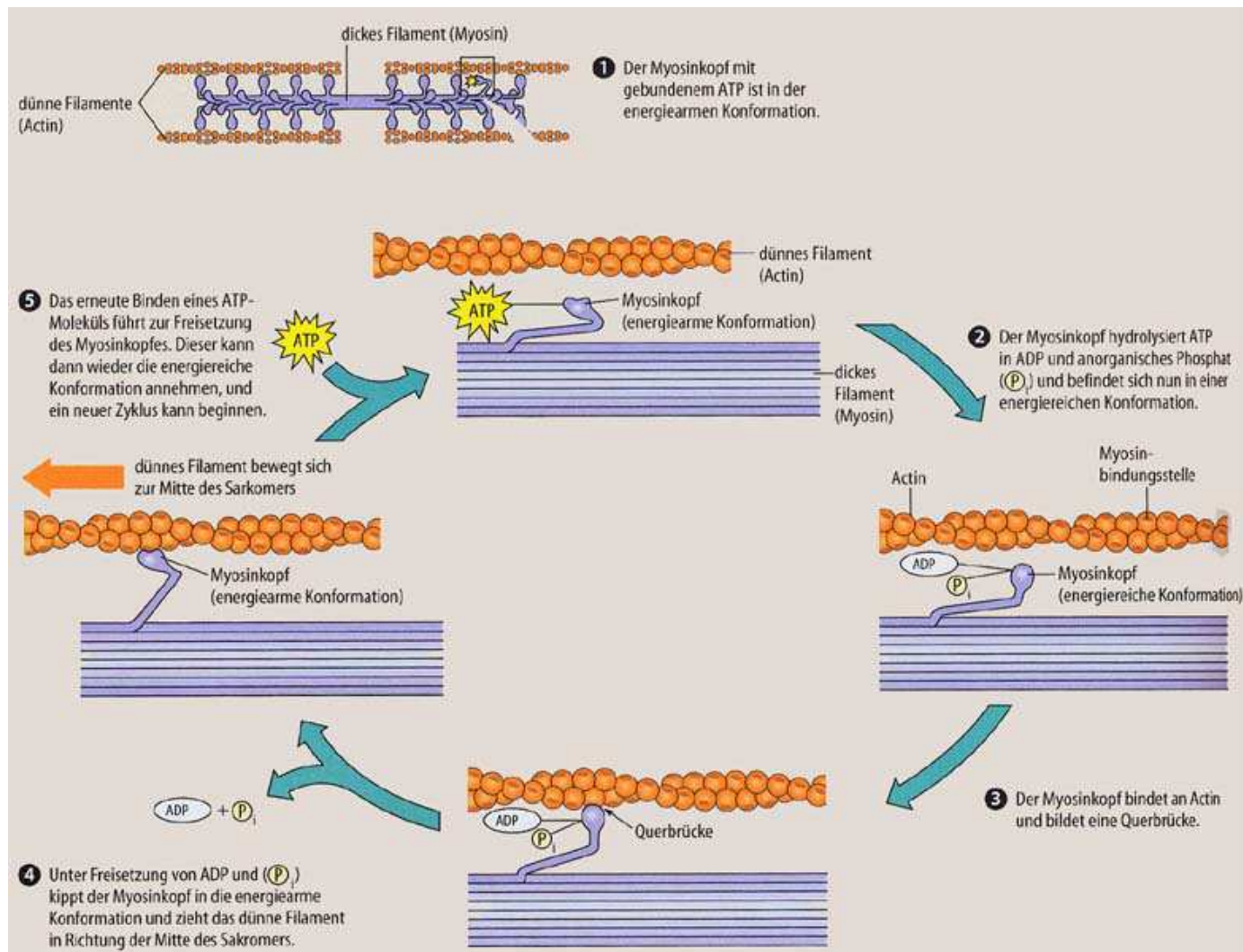


Abbildung 7: Ablauf des Filamentgleitens

aus <http://www.biofachforum.ch/BIOPIC/humloes/musk20.JPG> (vom 27.01.12)

2. Material und Methoden

Der Versuch zur Reizung des Arbeitsmuskels wurde nicht selbst durchgeführt. Stattdessen wurde vom Assistenten ein XY-Schreiberauszug von der Messung zur Auswertung übergeben.

2.1 Präparation und Aufschluss der Froschmuskeln

Materialien:

Arbeitsmuskel von *Xenopus* (0,794 g), Ruhemuskel von *Xenopus* (0,646 g), Präparierbesteck

(Skalpelli und Pinzette), Reagenzgläser, Eis und Eiswasser zur Kühlung, Potter, Kühlzentrifuge, Pipetten

Reagenzien:

6 ml HClO_4 (Perchlorsäure, eisgekühlt)

Durchführung:

Die gekühlten Ruhe- und Arbeitsmuskeln wurden jeweils mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Nacheinander wurden die Muskeln nun einzeln homogenisiert. Dazu wurden sie je in das Homogenisatorglas gegeben und mit je 1 ml eisgekühlter HClO_4 versetzt. Anschließend wurden sie einige Minuten lang mit dem Potter unter Eiskühlung zerkleinert, bis ein Homogenisat entstanden war. Die Suspensionen wurden daraufhin je in ein Reagenzglas überführt und der Mixerstab mit je 2 ml HClO_4 in die Reagenzgläser hinein gewaschen, wodurch eine Gesamtmenge von 3 ml pro Reagenzglas entstand. Anschließend wurden die Lösungen in der Kühlzentrifuge für 5 min bei 5000 rpm und 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann weiterverwendet.

2.2 Lactatbestimmung

Materialien:

Reagenzgläser, Küvetten, Kühlzentrifuge, Whirlmix, Wasserbad, Photometer, Pipetten

Reagenzien:

400 μl K_2CO_3 (Kaliumcarbonat); 3 ml Lösung 1: Glycylglycinpuffer pH 10, L-Glutaminsäure; 600 μl Lösung 2: NAD; 60 μl Lösung 3: Glutamat-Pyruvat-Transaminase; 60 μl Lösung 4: L-Lactat-Dehydrogenase; 2960 μl Bidest H_2O

Durchführung:

Von dem Aufschluss wurden jeweils 2 ml entnommen, in Reagenzgläser überführt und mit je 200 μl K_2CO_3 neutralisiert. Anschließend wurde wieder für 5 min bei 5000 rpm und 0 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Mit den Überständen des Zentrifugats wurden danach für eine Doppelbestimmung Ansätze nach folgendem Pipettierschema (Tab. 1) hergestellt, wobei die Ruhe- und Arbeitsmuskellösungen je zweimal hergestellt wurden.

Tabelle 1: Pipettierschema zur Lactatbestimmung

	Leerwert	Ruhemuskel	Arbeitsmuskel
Lösung 1	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Lösung 2	200 µl	200 µl	200 µl
Lösung 3	20 µl	20 µl	20 µl
Bidest H ₂ O	1000 µl	980 µl	980 µl
Probelösung (Überstand)	-	20 µl	20 µl
Lösung 4	20 µl	20 µl	20 µl
Gesamtvolumen	2,24 ml	2,24 ml	2,24 ml

Auf dem Whirlmix wurden die Ansätze gevortext und anschließend 1 h im Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Danach wurden sie in Küvetten überführt.

Die Extinktionsmessung fand danach im Photometer bei 340 nm statt.

2.3 Glykogenbestimmung

Materialien:

Reagenzgläser, Whirlmix, Eisbad, Wasserbad, Photometer, Küvetten, Pipetten, Zentrifuge, 50 ml-Messzylinder

Reagenzien:

4 ml Ethanol, demin. H₂O, 1 ml Glykogenstandard (25µg/ml), 6 ml Farbreagenz (enthält Anthron (0,2%) in H₂SO₄ (konz.))

Durchführung:

Die restlichen 1 ml der Muskelaufschlüsse aus 3.1 wurden mit jeweils 2 ml Ethanol versetzt, auf dem Whirlmix gevortext und eine Stunde im Eisbad inkubiert. Das ausgefallene Glykogen

wurde daraufhin abzentrifugiert, das Ethanol dekantiert und das Pellet mit etwas H₂O unter Zuhilfenahme des Whirlmix wieder gelöst. Die beiden Lösungen wurden in die Messzylinder überführt und bis 50 ml mit H₂O aufgefüllt. Für eine Doppelbestimmung wurden nun Ansätze hergestellt (Tab. 2), wobei die Muskelansätze jeweils doppelt hergestellt wurden.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Glykogenbestimmung

Arbeits-/Ruhemuskel	Leerwert	Glykogenstandard (25 µg/ml)
1 ml Lösung	1ml H ₂ O	1 ml Standard
2 ml Farbreagenz	2 ml Farbreagenz	2 ml Farbreagenz

Die Ansätze wurden auf dem Whirlmix durchgemischt und 10 min im Wasserbad bei 100 °C inkubiert. Danach wurden sie auf 25 °C abgekühlt, in Küvetten überführt und die Extinktion wurde im Photometer bei 650 nm gemessen.

3. Ergebnisse

Der Kurvenverlauf zeichnet sich dadurch aus, dass mit steigender Anzahl an Erregungen bei gleichbleibender Reizstärke die Ausschläge des X-T-Schreibers kleiner werden und dann vollständig gegen Null gehen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Muskel nicht mehr mit Sauerstoff versorgt wird. Außerdem kommt es zu einem Rückgang der ATP-Konzentration, da tote Lebewesen keines mehr synthetisieren.

Tabelle 3: Ergebnisse des Kurvenverlaufs der Muskelkontraktionen

Reizstärke	Ausschlag/ Skaleneinheiten	Anzahl Peaks	Zurückgelegter Weg/ m
5 V	31	85	0,496
	27	98	0,432
	26	105	0,416
	18	92	0,288
	9	88	0,144
	2	68	0,032
8 V	15	4	0,24
	7	38	0,112
	3	91	0,048
10 V	16	6	0,256
	7	65	0,112
	2	92	0,032
Maximale Spannung	1	22	0,016
Summe	164	854	2,624

In Tab. 3 sind die Mittelwerte zu sehen die aus dem Kurvenverlauf gewonnen wurden. Der zurückgelegte Weg wurde ermittelt, in dem für eine Skaleneinheit ein zurückgelegter Wert von 0,016 m angenommen wurde.

$$W=m*g*h \quad (1)$$

Mit Formel (1), einem Gewicht $m=0,020$ kg, dem Ortsfaktor $g=9,81$ N/kg und dem zurückgelegten Weg h ergibt sich für die geleistete Arbeit folgendes Ergebnis:

$$W= 0,51 \text{ J}$$

Lactatbestimmung:

Tabelle 4: Ergebnisse der Extinktionsmessung bei 340 nm

	Extinktion E		Extinktion E
Ruhemuskel 1	1,514	Arbeitsmuskel 1	1,333
Ruhemuskel 2	1,636	Arbeitsmuskel 2	1,182
Mittelwert	1,575	Mittelwert	1,258

$$E = \varepsilon \times c \times d \quad (2)$$

$$\varepsilon = 6,3 \text{ cm}^3/\mu\text{mol}; \quad d = 1 \text{ cm}$$

E: Extinktion; ε : substanzspezifischer Extinktionskoeffizient; c: Konzentration;

d= Küvettendicke

Nach umstellen von Formel (2) ergibt sich:

$$\text{Ruhemuskel: } c = 0,25 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 = 0,25 \mu\text{mol}/\text{ml}$$

$$\text{Arbeitsmuskel: } c = 0,2 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 = 0,2 \mu\text{mol}/\text{ml}$$

Unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors von 123,2 erhalten wir folgende Stoffmengen von Lactat in dem Lactat/ HClO₄ – Homogenisat mit dem Volumen 3 ml:

$$\text{Ruhemuskel: } n = 0,25 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 * 123,2 * 3 \text{ ml} = 92,4 \mu\text{mol}$$

$$\text{Arbeitsmuskel: } n = 0,2 \mu\text{mol}/\text{cm}^3 * 123,2 * 3 \text{ ml} = 73,92 \mu\text{mol}$$

Auf das Frischgewicht bezogen ergibt sich mit M(Lactat)= 90,08 g·mol⁻¹:

$$\text{Ruhemuskel: } 92,4 \mu\text{mol}/0,646 \text{ g} = 143,03 \mu\text{mol}/\text{g} = 0,013 \text{ mg}/\text{g Frischgewicht}$$

$$\text{Arbeitsmuskel: } 73,92 \mu\text{mol}/0,794 \text{ g} = 93,10 \mu\text{mol}/\text{g} = 0,008 \text{ mg}/\text{g Frischgewicht}$$

Erwarten würden wir hier, dass der Arbeitsmuskel durch die verrichtete Arbeit einen höheren Lactatgehalt besitzt. Die Proben wurden wahrscheinlich im Laufe des Versuches vertauscht. In den folgenden Rechnungen gehen wir von einer Vertauschung aus.

Mit einer Stoffmengendifferenz an Lactat zwischen Arbeitsmuskel und Ruhemuskel $\Delta\text{Lactat}=18,48 \mu\text{mol/ g}$, einer geleisteten mechanischen Arbeit von 0,51 J und einer frei werdenden Energie von 119 kJ/ mol Lactat ergibt sich für die Arbeitseffizienz P und die freigegebenen Energie ΔE :

$$\Delta E = 0,00001848 \text{ mol} * 119000 \text{ J/mol} = 2,2 \text{ J}$$

$$P = W/ \Delta E = 0,51 \text{ J} / 2,2 \text{ J} = 0,23 = 23 \%$$

Bezogen auf die ATP Spaltung ergibt sich mit $\Delta G^0(\text{ATP}) = -29 \text{ kJ}$ und einem 1 ATP/ Lactat:

$$\Delta E = 0,00001848 \text{ mol} * 29000 \text{ J} = 0,54 \text{ J}$$

$$P = W/ \Delta E = 0,94 = 94 \%$$

Glykogenbestimmung:

Tabelle 5: Ergebnisse der Extinktionsmessung von Glykogen bei 650 nm

	Extinktion E		Extinktion E
Ruhemuskel 1	0,190	Arbeitsmuskel 1	0,207
Ruhemuskel 2	0,229	Arbeitsmuskel 2	0,278
Mittelwert	0,210	Mittelwert	0,243

$$E = \varepsilon \times c \times d \quad (2)$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

E: Extinktion; ε : substanzspezifischer Extinktionskoeffizient; c: Konzentration;

d= Küvettendicke

Nach Umformen von Formel (2), einer Extinktion des Glykogenstandards $E = 0,272$ und einer Konzentration des Standards von $0,025 \text{ mg/ml}$ ergibt sich:

$$\varepsilon = \frac{0,272}{0,025 * 1} = 10,88 \text{ cm}^2/\text{mg}$$

Daraus erhalten wir mit Formel (2) für den Ruhemuskel und den Arbeitsmuskel:

Ruhemuskel: $c = 0,019 \text{ mg/cm}^3 = 0,019 \text{ mg/ml}$

Arbeitsmuskel: $c = 0,022 \text{ mg/cm}^3 = 0,022 \text{ mg/ml}$

Unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors von 50 erhalten wir folgende Stoffmengen von Lactat in dem Lactat/ HClO_4 – Homogenisat mit dem Volumen 3 ml:

Ruhemuskel: $n = 0,019 \text{ mg/ml} * 50 * 3 \text{ ml} = 2,85 \text{ mg}$

Arbeitsmuskel: $n = 0,022 \text{ mg/ml} * 50 * 3 \text{ ml} = 3,30 \text{ mg}$

Auf das Frischgewicht bezogen ergibt sich:

Ruhemuskel: $2,85 \text{ mg} / 0,646 \text{ g} = 4,41 \text{ mg/g Frischgewicht}$

Arbeitsmuskel: $3,30 \text{ mg} / 0,794 \text{ g} = 4,16 \text{ mg/g Frischgewicht}$

Es wird nun wieder von einem Vertauschen der Proben ausgegangen.

Es ergibt sich ein Glykogenverbrauch von $4,41 \text{ mg/g} - 4,16 \text{ mg/g} = 0,25 \text{ mg/g Frischgewicht}$.

Mit $M(\text{Glucose}) = 180 \text{ g/mol}$ ergibt sich für den molaren Glykogenverbrauch:

$\Delta \text{Glucose} = 1,3 \text{ } \mu\text{mol/g}$

Verglichen mit $\Delta \text{Lactat} = 18,48 \text{ } \mu\text{mol/g}$ ergibt sich folgendes Verhältnis der beiden Größen zueinander:

$\Delta \text{Lactat} / \Delta \text{Glucose} = 14,21$

4. Diskussion

Die Lactatanhäufung in den Muskeln ist darauf zurückzuführen, dass der Muskel ohne Sauerstoffzufuhr erregt wird. Energie wird demnach über Milchsäuregärung gewonnen. Es ist nicht genau bekannt wie aktiv der Frosch zuvor war, deswegen sind die absoluten Werte der Lactat-Konzentrationen wenig aussagekräftig, von Interesse sind hier die Vergleichswerte von Arbeits- und Ruhemuskel.

Es fällt auf, dass die Mengen von Lactat bezogen auf das Frischgewicht im Ruhemuskel höher sind als im Arbeitsmuskel. 0,013 mg/ g Frischgewicht im Ruhemuskel stehen 0,008 mg/ g Frischgewicht im Arbeitsmuskel gegenüber. Theoretisch müsste es aber andersherum sein. Es wird davon ausgegangen, dass die Proben im Verlauf des Versuchs vertauscht wurden. Das gleiche Problem ergab sich bei der Glykogenbestimmung.

Außerdem ergeben sich für Energieausbeuten sehr hohe Werte, bei ATP z.B. eine Effizienz von 94 % und bei Lactat 23 %. Durch Wärmeverluste waren hier deutlich niedrigere Werte erwartet worden.

Von Bedeutung ist ebenfalls, dass die Beschaffenheit der Proben nicht bei beiden gleich war. Der Ruhemuskel war deutlich stärker von Sehnen durchzogen. Diese könnten sich bei der Extinktionsmessung als noch vorhandene Verunreinigungen bemerkbar gemacht haben. Darüber hinaus müssen weitere Verunreinigungen berücksichtigt werden, die das Messergebnis verfälscht haben könnten.

Weitere Fehler und Ungenauigkeiten könnten bei der Versuchsdurchführung aufgetreten sein. Fehlerfreies bedienen der Geräte und gleichzeitiges beachten der korrekten Vorgehensweise ist für Anfänger nicht immer möglich. Außerdem ergeben sich Ungenauigkeiten durch das Mittel der Peaks bei der Auswertung des Kurvenverlaufs, der durch die Reizung des Muskels gewonnen wurde.

5. Quellenangaben

- <http://de.wikipedia.org/wiki/Muskulatur>
- Biochemieskript
- <http://cgi.server.uni-frankfurt.de/fb14/fsbc/cms/lexikon/artikel.php?a=Actinfilamente>
- <http://flexikon.doccheck.com/Myosin#Definition>
- http://de.wikipedia.org/wiki/Kontraktiler_Mechanismus

Erstabgabe:

Muskelbiochemie

- Versuchsanleitung Praktikum Stoffwechselphysiologie WS 2011/2012
- Tierphysiologie - Roger Eckert/ 3. Auflage Thieme Verlag 2000 Stuttgart