

Biochemisches Grundpraktikum

Versuch Nummer G-11:

Photometrische Bestimmungen
von Phosphat und Ribose in ATP

Gliederung:

I. Informationen zu ATP	2
a) Chemische Struktur.....	2
b) Chemische Eigenschaften.....	2
c) Biochemische Eigenschaften	2
II. Bestimmung des Phosphatgehaltes.....	2
a) Theoretische Grundlagen.....	2
b) Versuchsziele, Aufgaben.....	3
c) Versuchsdurchführung	3
d) Meßergebnisse und Auswertung.....	3
(Auswertung).....	4
(Auswertung).....	5
e) Diskussion	6
III. Bestimmung des Ribosegehaltes	6
a) Theoretische Grundlagen.....	6
b) Versuchsziele, Aufgaben.....	6
c) Versuchsdurchführung	6
d) Meßergebnisse und Auswertung.....	7
e) Diskussion	7
(Auswertung).....	8
(Auswertung).....	9

I. Informationen zu ATP

a) Chemische Struktur

ATP steht für **A**denosin-5'-**T**riphosphat. Die Base Adenin (grün) ist N-glykosidisch an eine Ribose (blau) gekoppelt, die wiederum über eine gemischte Esterbindung an ihrem 5'-Kohlenstoff mit einem Triphosphat (rot) verbunden ist (siehe Abb. I-1). Die für biochemische Reaktionen wichtigen energiereichen Bindungen sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

Durch die Phosphatreste erhält das Molekül in neutralem Milieu eine stark negative Gesamtladung. Da es sich hierbei um Derivate der Phosphorsäure handelt, ist die Ladung stark vom pH-Wert abhängig (siehe b).

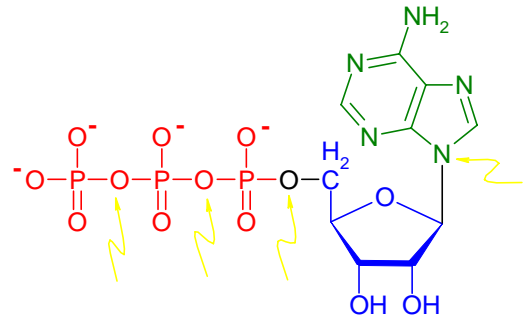


Abb. I-1: Strukturformel von ATP

b) Chemische Eigenschaften

ATP ist eine vierbasige Säure mit einem Molekulargewicht von 507.21, die in reinem Zustand als farbloses wasserlösliches Pulver vorliegt. Als 1%ige wässrige Lösung hat sie einen pH von 2 und ist bei 0° C mehrere Stunden stabil. Das Stabilitätsoptimum liegt bei pH 9. Als Lagerform dienen seine Alkali- oder Erdalkalisalze (meist Na₂-ATP), um die Stabilität zu erhöhen.

c) Biochemische Eigenschaften

Die Synthese des ATP im Stoffwechsel ist sehr vielfältig. Vor allem durch die Atmungskette in den Mitochondrien wird ATP aus ADP und anorganischem Phosphat gewonnen (*oxidative Phosphorylierung*), aber auch bei der Photosynthese durch *Photophosphorylierung*.

In lebenden Systemen ist ATP als universeller Energieträger eingesetzt. Durch die erwähnten energiereichen Phosphodiesterbindungen kann Energie, die bspw. aus dem Fettsäureabbau stammt, gespeichert und transportiert werden. Diese wird freigesetzt, wenn ATP hydrolysiert wird. Die chemische Energie kann dabei in vielfältiger Weise umgewandelt werden:

- mechanische Energie (Bewegung) in Muskeln, bei Geißeln und Cilien
- aktiver Transport durch Zellmembranen
- elektrische Energie bei einigen Fischen

Neben energetischen Funktionen sind ATP und seine Derivate auch an regulatorischen Prozessen beteiligt. Dazu gehört die Aktivierung der Fettsäuren bei ihrem Abbau, der Aminosäuren für die Translation und der Ribonukleinsäuren für die Transkription.

II. Bestimmung des Phosphatgehaltes

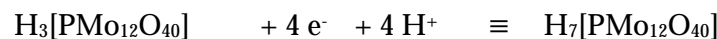
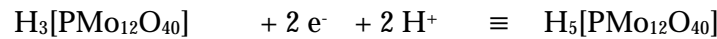
a) Theoretische Grundlagen

Die Abspaltung des freien Phosphats aus ATP erfordert recht drastische Maßnahmen. Sogar bei einstündigem Kochen mit 2 N Schwefelsäure wird eher die Ringbase als

das letzte Phosphat abgelöst. Deshalb wird der Phosphatgehalt erst nach totaler Mineralisierung oder enzymatisch (z.B. mit ATPasen) bestimmt.

Die Bestimmung selbst kann über mehrere Wege geschehen. Enzymatisch verwendet man z.B. den gekoppelten optischen Test mit NADP⁺. Allerdings werden dafür drei Enzyme benötigt, was eine gewisse Ungenauigkeit mit sich bringt.

Eine häufig angewandte photometrische Bestimmung ist die nach TAUSKY und SHORR: Durch Komplexierung mit Ammoniumheptamolybdat und anschließender Reduktion mit Eisen(II)-Ionen entstehen tiefblaue charge-transfer Komplexe. Daran sind zwei unterschiedliche Oxidationsstufen des Phosphomolybdatkomplexes beteiligt:



b) Versuchsziele, Aufgaben

Die erste Aufgabe besteht darin, eine Eichkurve mit Verdünnungen einer bekannten Phosphatlösung aufzunehmen. Anhand dieser Geraden kann die Phosphatkonzentration einer ATP-Lösung bestimmt werden, die einer Hydrolyse unterzogen wird. Damit erhält man einen Überblick über die Geschwindigkeit und Stärke der Hydrolyse. Die Werte werden jeweils in einem Diagramm dargestellt.

c) Versuchsdurchführung

Von der ausstehenden Phosphatlösung (0.05 mM) wird laut Versuchsvorschrift eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nach 25 min werden die Extinktionen der Proben bei 578 nm gegen den Inhalt des ersten Reagenzglases als Referenz gemessen.

Für die Aufnahme der Hydrolysenkurve werden 6 Schliffreagenzgläser mit je 1.0 ml 0.5%iger ATP-Lösung und 1.0 ml 2 N Schwefelsäure beschickt, die dann in ein siedendes Wasserbad gestellt werden. Nach 3, 5, 7, 10, 15 und 30 min wird je ein Reagenzglas entnommen, aus der heißen Lösung 1.0 ml in einen 25 ml Meßkolben pipettiert und mit aqua bidest. bis zur Markierung aufgefüllt. Als Leerwert wird 1.0 ml der ATP-Lösung ebenfalls auf 25 ml verdünnt. Zu den sieben Ansätzen werden je 3.0 ml des Phosphatreagenzes gegeben und nach 25 min die Extinktion bei 578 nm gemessen.

d) Meßergebnisse und Auswertung

Die folgenden Tabellen enthalten zum einen die Daten der Eichkurve (Tab. II-1), zum anderen die gemessenen und berechneten Werte der Hydrolysenkurve (Tab. II-2).

Konz./mM	Extinktion
0.000	0.000
0.025	0.046
0.050	0.091
0.075	0.145
0.100	0.189

Tab. II-1: Eichkurve des Phosphatstandards

Zeit/min	Extinktion	Konz./mM
0	0	0
3	0.026	0.014
5	0.052	0.027
7	0.068	0.036
10	0.072	0.038
15	0.077	0.041
30	0.087	0.046

Tab. II-2: Hydrolysedaten der ATP-Lösung

(Auswertung)

(Diagramm „Eichkurve Phosphat“)

(Auswertung)

(Diagramm „Hydrolysenkurve“ aus Excel-File)

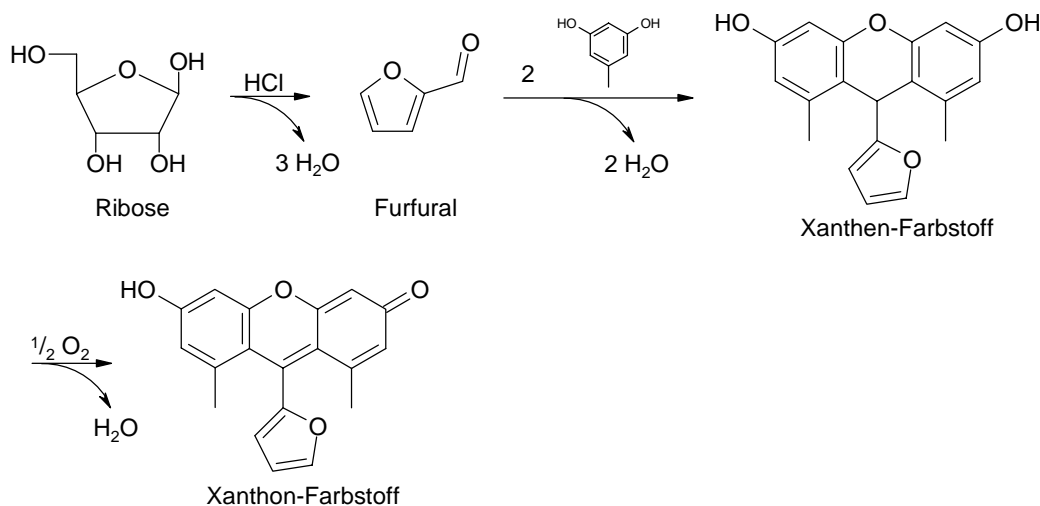
e) Diskussion

Aus der Eichkurve läßt sich erkennen, daß das LAMBERT-BEERSCHE Gesetz im untersuchten Bereich anwendbar ist, da die gemessenen Werte in guter Näherung eine Gerade beschreiben. Der Verlauf der Hydrolysenkurve allerdings entspricht nur teilweise den Erwartungen; die anfangs starke Hydrolyse nimmt zum Ende hin rasch ab, wodurch eine Art Sättigungskurve entsteht. Würde die Messung weiter fortgesetzt, so würde ungefähr eine Konzentration von 0.05 mM erreicht. Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht unbefriedigend. Einerseits sollte pro Mol ATP zunächst ein Mol Phosphat abgespalten werden. Beim 5. Ansatz bspw. entspricht das einer Konzentration von 0.077 mM. Dieser Wert wird nur zu knapp 60% erreicht. Andererseits sollte unter den Versuchsbedingungen auch noch das zweite Phosphat abgespalten werden, was eine noch höhere Konzentration (und damit Extinktion) bewirkt hätte. Die Ursachen sind recht vielfältig. Schlecht dürfte vor allem gewesen sein, daß trotz Hinweisen im Skript keine frisch angesetzten Lösungen verwendet worden sind. Dadurch kann es sein, daß die Hydrolyse nur unvollständig ablaufen konnte. Bei diesen großen Abweichungen sind Verdünnungsfehler und ungenaue Zeitmessung ebenfalls wahrscheinliche Fehlerquellen.

III. Bestimmung des Ribosegehaltes

a) Theoretische Grundlagen

Zur Quantifizierung einer ATP-Lösung kann neben der Phosphatbestimmung auch der Ribosegehalt ermittelt werden. Dabei greift man auf eine Farbreaktion zurück, die vor allem mit Pentosen (z.B. aus Nukleinsäuren) gut reproduzierbar verläuft:



b) Versuchsziele, Aufgaben

Wie im vorigen Versuchsteil muß auch hier zuerst eine Eichkurve aufgenommen werden. Anschließend wird der Ribosegehalt von ATP-Lösungen verschiedener Verdünnungen bestimmt, woraus auf den ATP-Gehalt rückgeschlossen werden kann.

c) Versuchsdurchführung

Nach der Tabelle in der Versuchsvorschrift werden die verschieden konzentrierten Riboselösungen angesetzt und mit dem Testreagenz (bestehend aus einer wäßrigen Lösung von Ammonium-Eisen(II)-Sulfat und Orcin, versetzt mit konz. Salzsäure) für

25 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen werden die Extinktionen bei 578 nm gegen den ersten Ansatz gemessen.

Um den Ribosegehalt der ATP-Lösung bestimmen zu können, muß um den Faktor 100 verdünnt werden. Von dieser Lösung wird folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

Reagenz	Ansatz					
	1	2	3	4	5	6
ATP-Lösung	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
aqua bidest.	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
Testreagenz	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

Mit diesen Ansätzen wird ebenso verfahren wie mit den Ribosestandards.

d) Meßergebnisse und Auswertung

Tab. III-1 enthält die Daten für die gemessene Eichkurve, Tab. III-2 die Meßwerte der ATP-Lösung. Am Graphen der Eichfunktion (Seite 8) ist zu erkennen, daß hier nur bedingt ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration der Riboselösung besteht. Dies macht sich deutlich in den Abweichungen der berechneten ATP-Konzentrationen zu den eingesetzten der Eichfunktion bemerkbar.

Auch die Extinktionen der steigenden ATP-Konzentrationen zeigt qualitativ den gleichen Verlauf wie die Eichfunktion, allerdings stellt man große Abweichungen der Ribosekonzentration (aus Eichkurve berechnet) zur ATP-Konzentration (aus Verdünnungen berechnet) fest. Bildet man den Mittelwert der auf 1 Milliliter hochgerechneten Stoffmenge Ribose (8.17 µmol, letzte Spalte), so ergibt sich trotz allem nur eine geringe Abweichung (16%) von der eingesetzten ATP-Menge (9.711 µmol).

Konz./µM	Extinktion	10 ⁻³ % ATP	E ₅₇₈	[ATP] / µM	[Rib] / µM	n(Rib) pro ml
0.00	0	0	0	0	0	0
1.66	0.008	2	0.008	4.86	0.39	1.93
3.33	0.044	4	0.071	9.71	3.42	8.54
5.00	0.104	6	0.114	14.57	5.49	9.15
6.66	0.154	8	0.122	19.42	5.87	7.34
8.33	0.183	10	0.159	24.28	7.65	7.65
9.99	0.203				Mittelwert:	8.17
11.66	0.236					
13.34	0.265					
16.65	0.359					

Tab. III-2: Bestimmung der Ribosekonzentration

Tab. III-1: Eichkurve Ribose

e) Diskussion

Wie schon angesprochen, sind die Werte nicht besonders zuverlässig. Bedingt durch die starke Streuung der Meßwerte der Eichfunktion, kann keine genaue quantitative Aussage (durch eine Geradensteigung) über die tatsächliche Konzentration an Ribose bzw. ATP gemacht werden. Ein besseres Ergebnis würde vielleicht eine polynomiale Annäherung bringen, da beide Kurven einen ähnlichen Verlauf aufweisen (ist das zulässig?).

Zudem kommen dieselben Probleme (alte Lösungen, Pipettier- und Verdünnungsfehler) wie in der vorigen Aufgabe dazu.

(Auswertung)

(Diagramm „Eichkurve Ribose“ aus Excel-File)

(Auswertung)

(Diagramm „Ribosegehalt“ aus Excel-File)