

Bepaling van de activiteit van het
enzym Glycerokinase (ATP:
Glycerolfosfotransferase EC.2.7.1.30)
in vetweefsel van varkens

Th.H.Mousset

Rapport no. 101

Inleiding.

De groei van varkens wordt in belangrijke mate bepaald door de eiwitaanzet en de vetaanzet. De eiwitaanzet vindt vooral plaats in de spieren, de vetaanzet in het vetweefsel. Gedurende de groei van 30 kg naar 100 kg lichaamsgewicht is, bij normale voeding, de eiwitaanzet per dag nagenoeg constant, terwijl de dagelijkse vetaanzet steeds toeneemt (1).

Men kan voor de bestudering van de regulering van groei zowel de eiwitaanzet als de vetaanzet onderzoeken. Omdat de vetaanzet een belangrijk percentage van de groei uitmaakt en energetisch zeer veel voer per gram vraagt, is besloten om op dit instituut de regulering van deze aanzet te bestuderen.

De vetaanzet is de resultante van twee processen n.l. de vetsynthese of lipogenese en de vetsplitsing of lipolyse. In eerste instantie is aandacht geschonken aan de rol van de lipolyse met betrekking tot de regulatie van de vetaanzet. De lipolyse wordt gemeten in vetweefsel in vitro door de afscheiding van glycerol uit het vetweefsel naar het incubatiemedium te bepalen. Dit is alleen een juiste maat als vrij glycerol niet meer verbruikt wordt, door de vetcel of in het vetweefsel opgeslagen wordt, maar quantitatief afgescheiden wordt aan het incubatiemedium.

Vetweefsel van ratten (2), varkens (3) en levers van duiven (4) bevatten het enzym Glycerokinase. Onder invloed van dit enzym wordt glycerol met behulp van ATP omgezet in α -Glycerolfosfaat, een precursor voor de lipogenese. α -Glycerolfosfaat kan de celwand niet passeren; het op deze wijze gebonden glycerol wordt dus niet afgescheiden aan het incubatiemedium. De in het incubatiemedium gemeten glycerolafschieding bij vetweefsel van deze diersoorten is dan geen juiste maat voor de lipolyse, tenzij deze omzetting kwantitatief van geen betekenis is.

Onderzoek naar de activiteit van Glycerokinase in varkensvetweefsel is dus zinvol voor het verkrijgen van een beter inzicht in de grootte van de lipolyse.

In dit verslag zal een bepalingmethodiek voor de activiteit van Glycerokinase beschreven worden, alsmede een toetsing van deze methodiek al dan niet met vetweefsel van varkens. Tevens zullen enige resultaten gegeven worden van metingen van de activiteit van Glycerokinase in vetweefsel van varkens.

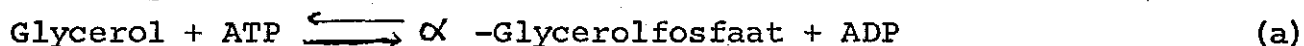
Materialen.

Glycerokinase (Candida mycoderma, 85 U/mg, 5 mg/ml), α -glycerol-fosfaatdehydrogenase (konijnespier, 60 U/mg, 2mg/ml), ATP (di-Na-zout), α -glycerolfosfaat (dicyclohexylammoniumzout) en NAD^+ (β - NAD^+ , Grade I) waren van Boehringer Mannheim. Runderserumalbumine was van Fluka. Hydrazinehydraat en 2-mercaptoethanol waren van Schuchardt. Alle andere chemicaliën waren van Merck (Analytical Grade). Alle oplossingen werden gemaakt in aqua bidest.

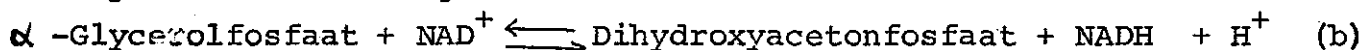
Gemeten werd met een spectrofotometer van Beckman, de DB-GT, bij een golflengte van 340 nm met een H_2 -lamp en glascuvetten van 1 cm op de Double-Beam mode.

Bepalingsprincipe.

Glycerokinase katalyseert de volgende reactie:



De activiteit van Glycerokinase wordt gemeten door de hoeveelheid α -Glycerolfosfaat (4, 5, 6, 7) of de hoeveelheid ADP (8) die ontstaat te bepalen. Gekozen werd voor het bepalen van de ontstane hoeveelheid α -Glycerolfosfaat volgens de reactie:



Vanwege verschillen in pH-optimum van reacties (a) en (b) (3, 4, 6, 7, 8) werd reactie (a) uitgevoerd volgens Robinson en Newsholme (6), met enige modificaties, waarna het in reactie (a) gevormde α -Glycerolfosfaat gemeten werd volgens Wieland en Suyter (4).

Bepalingsprocedure.

1. Het vetmonster wordt in vetvrij papier verpakt en getransporteerd in een ijs-zoutmengsel van de plaats van monsternamen naar het laboratorium.
2. Het monster wordt fijngeknipt en gehomogeniseerd in porties van 0,5 g met 1 ml buffer 1 m.b.v. een Potter-Elvehjemhomogenisator en teflonstamper. Buffer 1 heeft de volgende samenstelling:
0,01 M Natriumacetaat + 0,001 M EDTA (di-Natriumzout) + 0,01 M Glycerol + 0,01% Runderserumalbumine. De pH is 5,4.
3. Aan 0,40 ml homogenaat wordt toegevoegd 0,12 ml 60 mM ATP (di-Natriumzout), 0,08 ml 50 mM Glycerol en 0,60 ml buffer 2, bestaande uit:

- 8 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mM EDTA (di-Natriumzout), 50 mM NaF, 40 mM 2-Mercaptoethanol en 200 mM Tris(hydroxy)methylaminomethaan (de pH is 7,95).
4. Incubeer gedurende 0, 60 en 120 minuten bij $37^\circ C$ op een schudwaterbad (100 schudbewegingen/min) en voeg dan toe 0,80 ml 9% $HClO_4$ onder goed schudden op een Vortex-mixer.
 5. Na centrifugeren gedurende 5 minuten met behulp van een tafelfentrifuge (300 rpm) wordt aan 1 ml bovenstaande vloeistof toegevoegd 0,08 ml $5MK_2CO_3$ en 0,92 ml aqua bidest, waarna goed geschud wordt m.b.v. een Vortex-mixer.
 6. Na bezinking van het neerslag wordt 1,50 ml bovenstaande vloeistof gepipetteerd in een glascuvet, waarna 1,35 ml buffer 3 en 0,15 ml NAD^+ (40 mg/ml) toegevoegd wordt. Buffer 3 bestaat uit: 5 ml Hydrazinehydraat, 200 mg EDTA (diNatriumzout) en 7,5 g Glycine per 100 ml. De pH is 9,5.
 7. Na goed mengen wordt de extinctie bij 340 nm gemeten tegen een blanco bestaande uit 1,50 ml aqua bidest, 0,15 ml NAD^+ (40 mg/ml) en 1,35 ml buffer 3 (E_1).
 8. Na toevoeging van 0,05 ml onverdunde α -Glycerolfosfaatdehydrogenase (2 mg/ml, 40 U/mg) wordt goed gemengd en opnieuw de extinctie bij 340 nm gemeten, totdat deze constant is (E_2).
 9. Het verschil tussen de extincties gemeten bij stap 8 en stap 7 is een maat voor de hoeveelheid α -Glycerolfosfaat, dus
$$(E_2 - \frac{3,00}{3,05} E_1) \times 3,05 \times \frac{1}{6,22} \times \frac{4}{1,5} \times \frac{1}{0,4} = \mu \text{ molen } \alpha\text{-Glycerolfosfaat}$$
 gevormd door 1 ml homogenaat.
 10. Bereken hieruit met behulp van de incubatietijden van 0, 60 en 120 minuten de activiteit van Glycerokinase uitgedrukt in μ molen α -Glycerolfosfaat gevormd per minuut per ml homogenaat.
 11. Met behulp van het volume van het homogenaat en het aantal grammen gehomogeniseerd vetweefsel is de Glycerokinase-activiteit uit te drukken in:
 μ molen α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel.

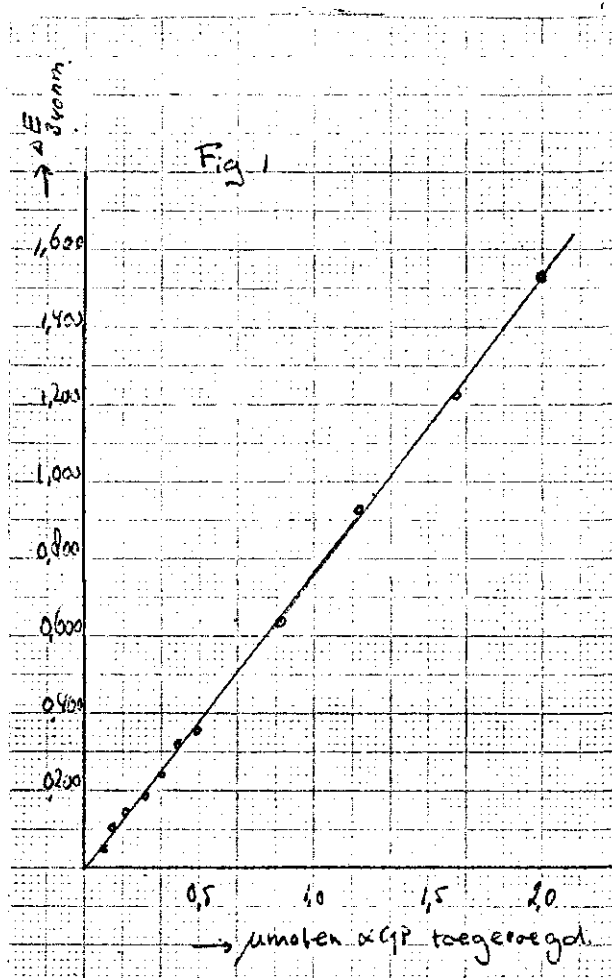
Resultaten.

a. Zonder vetweefsel.

Recovery α -Glycerolfosfaat.

Allereerst werd nagegaan of er een lineair verband is tussen het gevormde α -Glycerolfosfaat (in μ molen) en de gemeten extinctie bij 340 nm. Hiertoe werd de bepalingprocedure uitgevoerd vanaf stap 4 (zonder incubatie) met α -Glycerolfosfaat van Boehringer. De resultaten zijn weergegeven in figuur 1.

Figuur 1.



Bepaling ijklijn

α-Glycerolfosfaat (n=4)

$$E_{340\text{nm}} = 0,764 \times \mu\text{molen } \alpha \text{ G}$$

Uit figuur 1 blijkt, dat er een lineair verband is tussen de gemeten extinctieverandering bij 340 nm en de hoeveelheid toegevoegd α-Glycerolfosfaat. De recovery is 99,9% ± 0,2%.

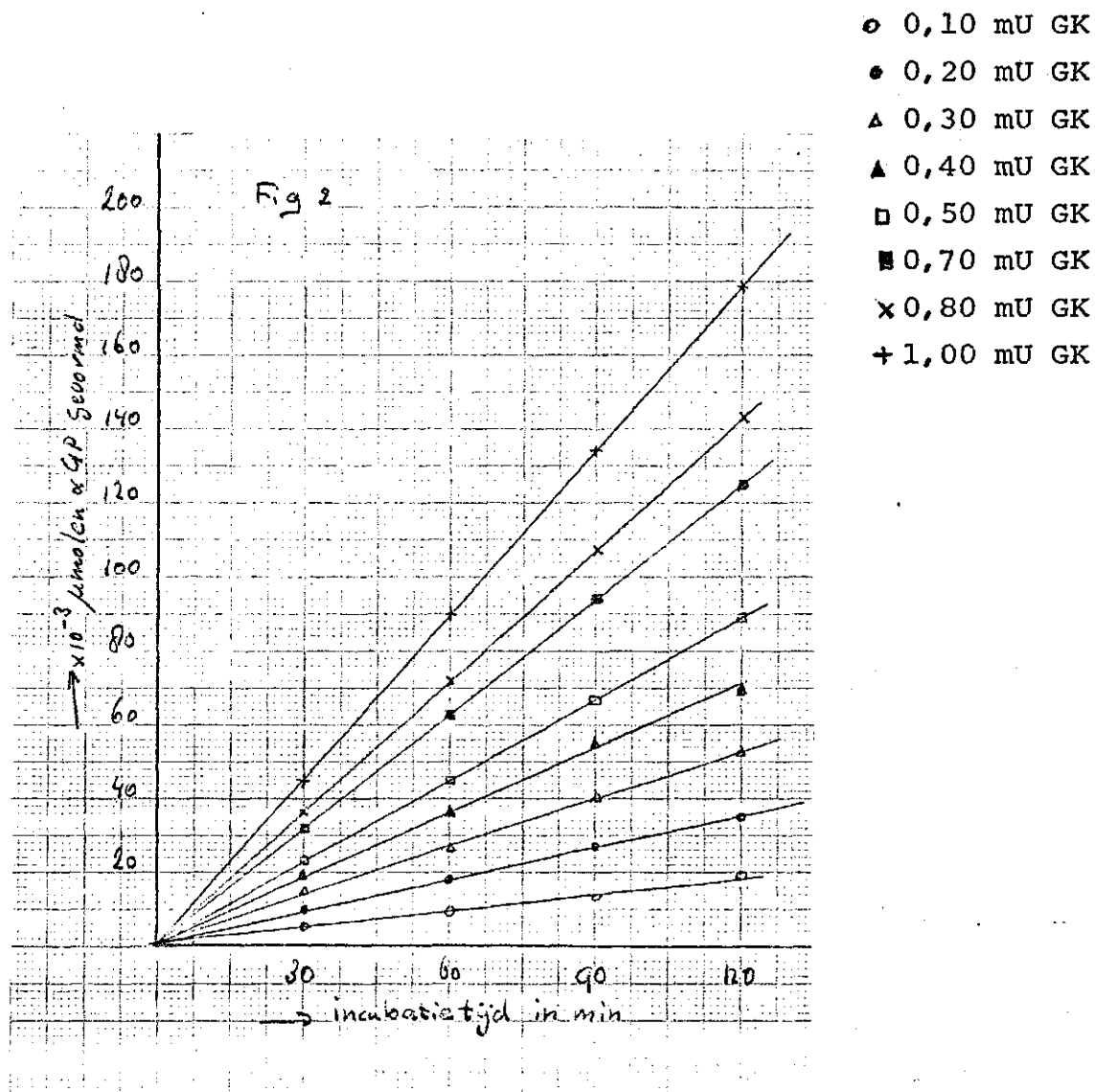
In stap 4 van de bepalingprocedure wordt de Glycerokinase-reactie gestopt met HClO₄. Dit zou het gevormde α-Glycerolfosfaat kunnen ontleden. Bij nader onderzoek bleek dat 2 uur incuberen met HClO₄ niet van invloed was op de recovery van α-Glycerolfosfaat.

Het onder invloed van Glycerokinase gevormde α-Glycerolfosfaat wordt dus volgens de beschreven bepalingprocedure kwantitatief gemeten.

De Glycerokinasereactie.

Allereerst werd bij een bepaalde Glycerokinaseactiviteit de invloed van de incubatietijd op het gevormde α -Glycerolfosfaat (in μ molen) nagegaan. Hiervoor werd Glycerokinase van *Candida mycoderma* (Boehringer 85 U/mg, 5 mg/ml) verdund met buffer 1 en de activiteiten gemeten volgens de bepalingprocedure vanaf stap 3. De incubatietijden waren resp. 0 min., 30 min., 60 min., 90 min. en 120 min. De resultaten zijn weergegeven in figuur 2.

Figuur 2. Invloed incubatietijd op gevormd α GP (in μ molen) bij een bepaalde GK-activiteit (n=4).



Uit figuur 2 blijkt dat bij bepaalde enzymactiviteit een lineair verband is tussen incubatietijd en gevormd α -Glycerolfosfaat (in μ molen). Uit deze figuur is voor een bepaalde enzymactiviteit de hoeveelheid per minuut gevormd α -Glycerolfosfaat (in μ molen) te berekenen. Dit is opgenomen in tabel 1.

Tabel 1. Relatie tussen enzymactiviteit en μ molen α GP/min. gevormd.

GK in mU	10^{-3} μ molen α GP/min.
0,10	0,149
0,20	0,297
0,30	0,446
0,40	0,594
0,50	0,743
0,70	1,040
0,80	1,188
1,00	1,486

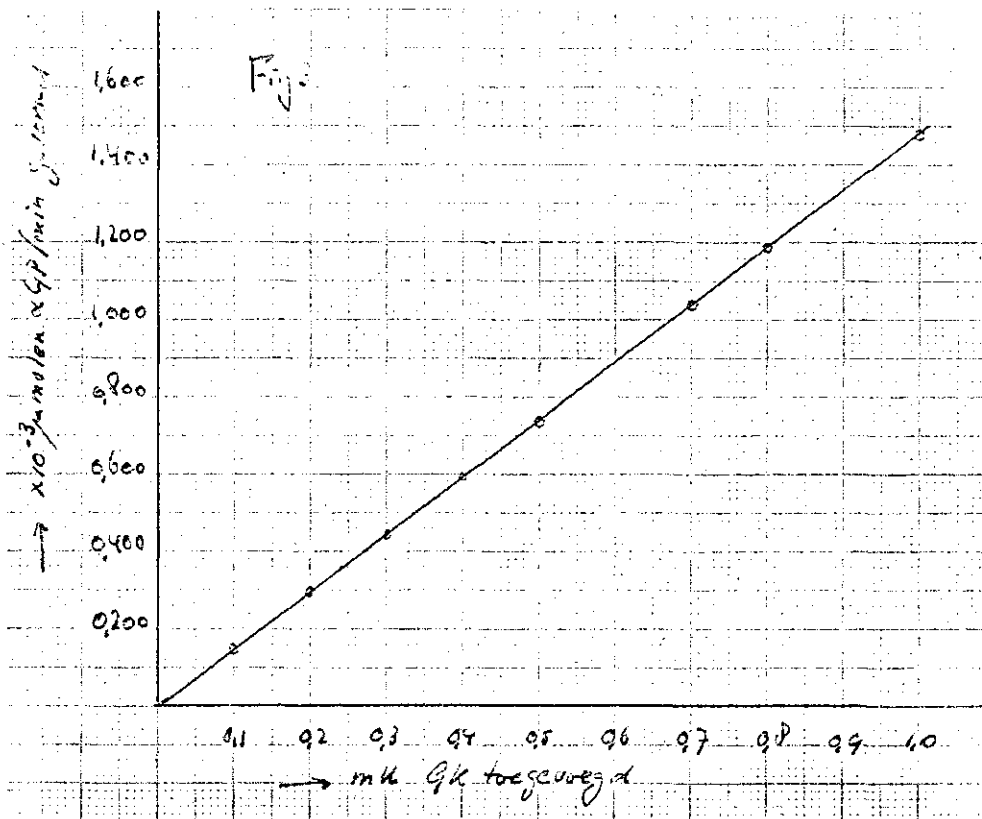
De waarden van tabel 1 zijn weergegeven in figuur 3.

Uit figuur 3 is af te leiden dat er een lineaire relatie is tussen de activiteit van het enzym Glycerokinase en de activiteit gemeten volgens de bepalingprocedure. Deze relatie is:

$$\mu\text{molen } \alpha\text{GP/min. gevormd bij } 37^{\circ}\text{C} = 1,486 \times 10^{-3} \times \text{mU GK toegevoegd.}$$

Voor het bepalen van de recovery is het noodzakelijk het verschil te meten tussen de uitvoering van de bepalingprocedure bij een incubatietemperatuur van 25°C en bij 37°C , daar de door Boehringer opgegeven activiteit voor een temperatuur van 25°C geldt. Een maat voor dit temperatuureffect is de Q_{10} .

Figuur 3. Relatie tussen $\mu\text{molen } \alpha\text{GP}/\text{min.}$ gevormd en mU GK toegevoegd.



Bepaling Q_{10} van de reactie: $\text{Glycerol} + \text{ATP} \rightleftharpoons \alpha\text{-Glycerolfosfaat} + \text{ADP}$ onder invloed van het enzym Glycerokinase.

De activiteit van verdunde Glycerokinase (Boehringerenzym verdund met buffer 1) werd gemeten bij 25°C en 37°C met de bepalingprocedure vanaf stap 3. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4.

Uit figuur 4 is af te leiden dat bij een incubatietemperatuur van 37°C het aantal $\mu\text{molen } \alpha\text{-Glycerolfosfaat}$ gevormd per minuut per mU Glycerokinase gelijk is aan $1,505 \times 10^{-3}$. Bij een incubatietemperatuur van 25°C is dit $1,013 \times 10^{-3}$.

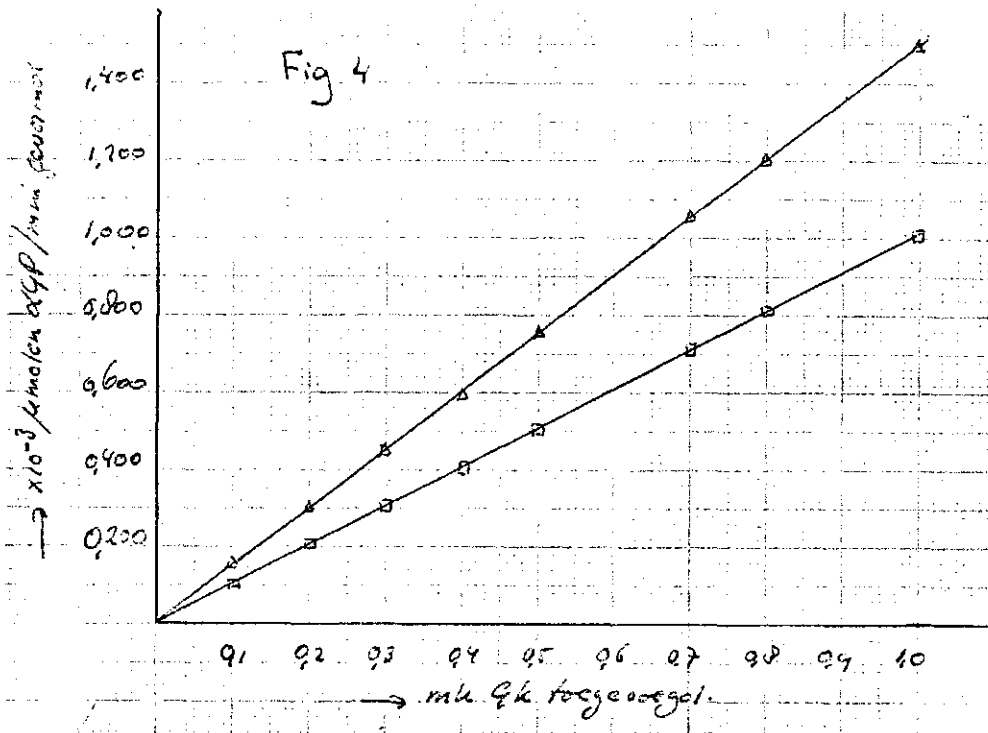
De Q_{10} van de reactie: $\text{Glycerol} + \text{ATP} \rightleftharpoons \alpha\text{-Glycerolfosfaat} + \text{ADP}$, gekatalyseerd door het enzym Glycerokinase is $\frac{1,505 \times 10^{-3}}{1,013 \times 10^{-3}} \times \frac{10}{12} = 1,238$

Per definitie ontstaat door 1 U Glycerokinase bij 25°C 1 μmol

$\alpha\text{-Glycerolfosfaat}$; de hier gemeten recovery is dus $101,3\% \pm 0,5$. De door de fabrikant opgegeven activiteit van Glycerokinase wordt dus kwantitatief teruggevonden. De recovery, gemeten onder het stuk "Glycerokinaseractie" is dus $\frac{1,471 \times 10^{-3}}{1,238} \times \frac{10}{12} \times \frac{100}{1,013 \times 10^{-3}} = 99\%$.

De gemiddelde recovery van de activiteit van Glycerokinase, gemeten volgens de beschreven bepalingprocedure is 100%.

Figuur 4. Bepaling Q_{10} van de door Glycerokinase gestimuleerde reactie.



incubatiestemp 37°C Δ—Δ
incubatiestemp 25°C □—□

Invloed homogeniseren op de activiteit van Glycerokinase.

Door het homogeniseren stijgt de temperatuur in het vetweefsel tot $\pm 65^{\circ}\text{C}$. Deze temperatuurstijging kan van invloed zijn op de te meten Glycerokinaseactiviteit. Bekend is, dat men bij de isolatie van Glycerokinase gebruik maakt van een verhittingsstap, n.l. verhitting gedurende 60 minuten bij 60°C (4, 5, 9). Het is dus niet waarschijnlijk dat de temperatuursverhoging, die optreedt door het homogeniseren, van invloed is op de te meten activiteit van Glycerokinase. Om alle twijfels uit te sluiten werd dit nader onderzocht.

Glycerokinase (*Candida mycoderma*) werd verdund tot 0,94 mU/ml met buffer 1. Daarna werd 0,5 g vetweefsel gehomogeniseerd met 1 ml van deze Glycerkinaseoplossing en de activiteit gemeten volgens de bepalingprocedure. Ter controle werd 0,5 g vetweefsel gehomogeniseerd met 1 ml buffer 1. Na toevoeging van 0,10 ml van de Glycerokinaseoplossing aan het medium van de incubatiestap werd de activiteit volgens de bepalingprocedure gemeten. De resultaten zijn vermeld in tabel 2.

Tabel 2. Invloed homogeniseren op de activiteit van Glycerokinase (n=4).

Monster	Activiteit (in $\mu\text{molen } \alpha\text{GP}/\text{min/ml GKopl gevormd}$)
vetweefsel+GK(0,94 mU/ml) gehomogeniseerd	$1,39 \times 10^{-3} \pm 0,02 \times 10^{-3}$
gehomogeniseerd vetweefsel + + GK (0,94 mU/ml)	$1,41 \times 10^{-3} \pm 0,03 \times 10^{-3}$

Uit tabel 2 blijkt dat homogeniseren de volgens de bepalingprocedure gemeten activiteit van Glycerokinase niet beïnvloedt.

b. Met vetweefsel.

Tussen 30 en 100 kg levend gewicht groeit het vetweefsel van de binnenste rugspeklaag van een varken sneller dan het vetweefsel van de buitenste (10, 11). Het is te verwachten dat, als Glycerokinase mede de lipogenese bepaalt, de activiteit van Glycerokinase in het vetweefsel van de binnenste rugspeklaag groter is dan de activiteit in de buitenste. Daarom werden op 4 verschillende plaatsen stukjes vetweefsel van de binnenste rugspeklaag genomen van een varken van \pm 100 kg, geslacht op het Slachthuis te Kampen. De plaatsen waren als volgt gekarakteriseerd:

- plaats 1: achterkant schouderblad
- plaats 2: 10 cm na achterkant schouderblad
- plaats 3: 20 cm na achterkant schouderblad
- plaats 4: 30 cm na achterkant schouderblad.

De vetmonsters werden gekoeld met behulp van een ijs-zoutmengsel, vervoerd naar het laboratorium te Lelystad en geanalyseerd op de activiteit van Glycerokinase volgens de beschreven bepalingprocedure. De resultaten zijn vermeld in tabel 3.

Tabel 3. Activiteit Glycerokinase in vetweefsel, genomen op 4 verschillende plaatsen van de binnenste rugspeklaag van een varken geslacht op een gewicht van \pm 100 kg (n=4).

Plaats	Activiteit in $\mu\text{molen } \alpha\text{GP gevormd per min. per ml homogenaat}$	Volume homogenaat (ml)	Gram vetweefsel gehomogeniseerd	Activiteit : $\mu\text{molen } \alpha\text{GP gevormd per uur per gram vetweefsel}$
1	$1,39 \times 10^{-3}$	9	3	0,250
2	$1,24 \times 10^{-3}$	13,5	4,5	0,223
3	$1,48 \times 10^{-3}$	9	3	0,266
4	$1,38 \times 10^{-3}$	9	3	0,248
Gemiddeld				$0,247 \pm 0,009$

Discussie.

De hier beschreven methode voor de meting van de activiteit van Glycerokinase bestaat uit twee gedeelten. Allereerst wordt door incubatie van Glycerokinase met ATP en Glycerol α -Glycerolfosfaat gevormd. Daarna wordt het gevormde α -Glycerolfosfaat gemeten. Deze methode heeft het nadeel dat geen initiële snelheden gemeten worden. Dit kan betekenen, dat veranderingen in het incubatiemedium, door de activiteit van Glycerokinase, de snelheid van de reactie beïnvloeden, waardoor een onjuiste waarde voor die activiteit gemeten wordt. De in deze studie vermelde resultaten tonen aan, dat dit niet het geval is. Er is een lineair verband tussen de activiteit van Glycerokinase, gemeten volgens de beschreven procedure, en het gevormde α -Glycerolfosfaat uitgedrukt in μ molen/minuut, gedurende een incubatietijd van maximaal 120 minuten. Bovendien waren de recovery's met betrekking tot α -Glycerolfosfaat en Glycerokinase $\pm 100\%$.

De hier beschreven procedure voldoet dus aan de eisen die men aan een enzymatische bepaling mag stellen. Deze bepalingprocedure heeft het voordeel boven andere procedures dat de incubatie met Glycerokinase gescheiden uitgevoerd wordt van de bepaling van het gevormde

α -Glycerolfosfaat. Daardoor kan men de vloeistof van stap 5 invriezen voor de bepaling van α -Glycerolfosfaat op een later tijdstip. Het tegelijk te verwerken aantal vetmonsters ter bepaling van de activiteit van Glycerokinase wordt hiermee aanzienlijk vergroot.

Het resultaat verkregen met vetweefsel van een varken komt overeen met die van Mersmann en Phinney (3). Deze vonden met behulp van Glycerol-2- 14 C waarden tussen de $0,4 \times 10^{-2}$ en $40,5 \times 10^{-2}$ μ molen α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel, afhankelijk van de leeftijd der varkens en van de concentratie van het Glycerol. Bij een varken van 112 dagen oud hebben zij, bij een Glycerolconcentratie van 5×10^{-5} M, een activiteit gemeten van $5,3 \times 10^{-2}$ μ molen α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel. Het resultaat vermeld in dit verslag, wijst bij een varken van ca. 180 dagen in de richting van een activiteit van $24,7 \times 10^{-2}$ μ molen α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel. Een verklaring voor het verschil tussen de resultaten van Mersmann en Phinney (3) bij een varken van 112 dagen en het hier vermelde resultaat bij een varken van ca. 180 dagen zou kunnen zijn andere glycerolconcentratie, voerinvloed, voederregime, leeftijd, rasverschillen en tussendiervariatie.

Martin en Herbein (12) hebben op dezelfde wijze als Mersmann en Phinney (3) Glycerokinaseactiviteit gemeten in geïsoleerde adipocyten van vetzuchtige en nietvetzuchtige varkens. De Glycerokinaseactiviteiten waren resp. 1,9 en 2,5 nanomolen α -Glycerolfosfaat gevormd per minuut per 10^5 vetcellen. Aannemende dat de diameter van een vetcel gemiddeld 0,1 mm is en dat 1 cm^3 vetcel 1 gram weegt, zouden deze activiteiten resp. zijn $217 \times 10^{-2} \mu\text{molen}$ α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel en $287 \times 10^{-2} \mu\text{molen}$ α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel. De verschillen tussen de resultaten van Martin en Herbein (12) enerzijds en de resultaten van Mersmann en Phinney (3) en het in deze studie vermelde resultaat anderszijds kunnen ontstaan door invloeden van voederregime, voersamenstelling, leeftijd van het dier, rasverschillen, tussendiervariatie en isolatieprocedure van adipocyten.

De omstandigheden, waaronder de activiteit van Glycerokinase wordt gemeten, zijn optimaal, zodat een maximale waarde verkregen wordt. Dit geldt vooral met betrekking tot substraatconcentraties en afwezigheid van remmers.

Voor in vivo omstandigheden kan worden aangenomen, dat de adenine nucleotide pool 5 à 10 mM is in vetweefsel (13). Hiervan zal ongeveer 2 à 4 mM de concentratie van ATP vertegenwoordigen. De Michaelisconstante van ATP is $10 \mu\text{M}$ (8). De cellulaire concentratie van ATP in vivo is dus voldoende voor een maximale snelheid van de Glycerokinasereactie. Aangenomen kan worden, dat de Glycerolconcentratie in vetweefsel ca. 2 mM is (14). Aangezien de Michaelisconstante voor Glycerol $10 \mu\text{M}$ (8) is, is de concentratie van het vrije Glycerol geen beperkende factor voor de in vivo activiteit van Glycerokinase.

Voor de in vivo activiteit zijn twee remmers belangrijk namelijk ADP en AMP (8). De cellulaire in vivo concentratie van deze remmers kan gesteld worden op resp. $\pm 2 \text{ mM}$ en $\pm 5 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ (13). Volgens Grunnet en Lundquist (8) is de in vivo concentratie van AMP te laag om een remmend effect op de Glycerokinasereactie uit te oefenen.

Het remmend effect van ADP is competitief met betrekking tot ATP. De K_i is gelijk aan 0,20 mM (8). Het effect van ADP op de in vivo activiteit wordt dus mede bepaald door de K_m van ATP en de concentraties van ADP en ATP. Doordat de concentraties van ADP en ATP ongeveer gelijk zijn, maar de K_i van ADP 20x zo groot is als de K_m van ATP, is het effect van ADP in vivo waarschijnlijk gering (ca. 5 % remming).

Op grond van bovenstaande overwegingen moet men er dus rekening mee houden dat de in vitro gemeten activiteit van het enzym Glycerokinase weleens niet veel zou kunnen afwijken van de in vivo optredende activiteit.

In vitro werd een activiteit van Glycerokinase gemeten van 0,247 μ molen α -Glycerolfosfaat gevormd per uur per gram vetweefsel. Aannemend dat het molecuulgewicht van triglyceriden gemiddeld 900 is, komt 1 μ mol α -Glycerolfosfaat overeen met 0,9 mg triglyceriden. Door de activiteit van Glycerokinase in vetweefsel zou dus $0,247 \times 0,9 \times 24 = 5,3$ gram triglyceride per dag per kilo vetweefsel gevormd kunnen worden. Een varken van \pm 100 kg bevat ca. 30 kilo vetweefsel. De totale aanzet door Glycerokinase zou dus ca. 160 gram vet kunnen bedragen. De vetaanzet per dag van een varken van 100 kilo is \pm 300 gram. De vetaanzet door de, in deze studie gemeten, activiteit van het enzym Glycerokinase zou dus maximaal 53% van de totale vetaanzet per dag bij een varken van \pm 100 kg kunnen bedragen.

Bovenstaande cijfers geven de indruk dat het enzym Glycerokinase belangrijk kan zijn voor de vetaanzet in vivo. Daarom is het zinvol om b.v. de activiteit van Glycerokinase te meten onder de omstandigheden van de lipolysebepalingen en met behulp van tracertechnieken onder in vivo omstandigheden. Nader inzicht zal verkregen moeten worden over de relatie leeftijd (gewicht) en Glycerokinaseactiviteit, relatie voederregime, voersamenstelling en voedertechnieken en Glycerokinaseactiviteit. Ook zal bestudeerd moeten worden of deze relaties voor alle vetdepots gelijk zijn.

Pas dan kan men de waarde van het enzym Glycerokinase voor het vetmetabolisme van vetdepots en voor erfelijke afwijkingen met betrekking tot het vetmetabolisme goed schatten.

Samenvatting.

In dit verslag is een bepalingprocedure voor de activiteit van het enzym Glycerokinase beschreven en getoetst.

Met behulp van deze procedure is in vetweefsel van een varken Glycerokinase aangetoond. De aanwezigheid van dit enzym in vetweefsel is van dien aard dat men het belang van Glycerokinase voor het vetmetabolisme nader moet vaststellen. Om dit te kunnen verwezenlijken, zijn enige onderzoekthema's voorgesteld.

Afkortingen.

ADP	: Adenosine-di-fosfaat
AMP	: Adenosine-mono-fosfaat
ATP	: Adenosine-tri-fosfaat
GK	: Glycerokinase
α GP	: α -Glycerolfosfaat

NAD⁺ : β -Nicotinamide-adeninedinucleotide (geoxideerd)
NADH : β -Nicotinamide-adeninedinucleotide (gereduceerd)

Referenties.

1. Bergen W.C.: J. Animal Sci. 38 (1974) 1079-1091
2. Publitz C.; Kennedy E.P.: J. Biol. Chem. 211 (1954) 951-955
3. Mersmann H.J.; Phinney G.: Int. J. Biochem. 4 (1973) 575-579
4. Wieland O.; Suyter M.: Biochem. Zeitschrift 329 (1957) 320-331
5. Publitz C.; Wieland O.: Methods in Enzymology V p. 354-361
Ed. S.P. Golowick & N.O. Kaplan 1962
Acad. Press, New York
6. Robinson J.; Newsholme E.A.: Biochem. J. 104 (1967) 2c-4c
7. Newsholme E.A.; Robinson J.; Taylor K.: B.B.A. 132 (1967) 338-346
8. Grunnet N.; Lundquist F.: Eur. J. Biochem. 3 (1967) 78-84
9. Kennedy E.P.: Methods in Enzymology V p.476-479
Ed. S.P. Golowick & N.O. Kaplan 1962
Acad. Press, New York
10. Metz S.H.M.: persoonlijke mededeling
11. Enser M.B.; Wood J.D.; Restal D.J.; McFie H.J.H.: J. Agric. Sci. Cambr.
86 (1976) 633-638
12. Martin R.J.; Herbein J.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151 (1976) 231-
235
13. v. Dam K.: persoonlijke mededeling
14. Vaughan M.: J. Biol. Chem. 237 (1962) 3354-3358