

# Ćwiczenie nr 4 – Bioenergetyka. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej.

## Celem ćwiczenia jest:

- Zaznajomienie się modelem (układem) zawierającym wszystkie składniki potrzebne do przebiegu określonej reakcji redoks
- Określenie wpływu niektórych substancji na przebieg reakcji w zaproponowanym modelu doświadczalnym
- Zapis reakcji przebiegającej w tym doświadczeniu
- Obliczenie wartości  $\Delta G$
- Interpretacja rezultatów przeprowadzonego doświadczenia

## Wstęp teoretyczny

Wszystkie komórki wykorzystują ogólny mechanizm dla **uzyskiwania energii**

### 1. reakcje biochemiczne generujące elektrony na wysokim poziomie energetycznym

- są to reakcje utleniania w matriks, głównie: pirogronianu z glukozy oraz acetylo-CoA pochodzących z utleniania kwasów tłuszczowych i szkieletów węglowych aminokwasów w cyklu Krebsa,
- energia uwalniana w reakcjach redoks jest „**wiązana**” w NADH i FADH<sub>2</sub>, czyli w tzw. **nośnikach elektronów o wysokiej energii**,
- elektrony z NADH i FADH<sub>2</sub> są transportowane przez kolejne **przenośniki** łańcucha oddechowego, co stanowi system transportu elektronów,
- na system transportu elektronów, składają się 4 kompleksy białkowe, przy czym trzy z nich istnieją jako oddzielne jednostki, umieszczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej,

### 2. sprzężenie energii uwalnianej w trakcie przepływu elektronów wzdłuż kompleksów łańcucha oddechowego z napędzaniem błonowych pomp protonowych

- **spontaniczny** przepływ elektronów przez poszczególne kompleksy I, III, i IV jest związany z **wymuszonym** wytransportowaniem jonów H<sup>+</sup> do przestrzeni międzybłonowej,
- wypompowanie jonów H<sup>+</sup> prowadzi do ustalenia się elektrochemicznego gradientu protonowego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej,
- czyli system transportu elektronów związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną umożliwia zamianę energii transportu elektronów w gradient protonowy w poprzek błony,

### 3. wykorzystanie gradientu protonowego przez syntazę ATP

- podczas przepływu jonów H<sup>+</sup> z powrotem z **przestrzeni międzybłonowej do matriks**, co zachodzi przez enzym syntazę ATP, następuje synteza ATP z ADP i P,

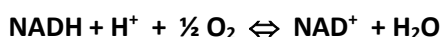
- enzym syntaza wykorzystuje gradient protonowy w poprzek błony do wytwarzania ATP,
- **następuje więc sprzężenie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym z wytwarzaniem ATP.**

### Łańcuch oddechowy

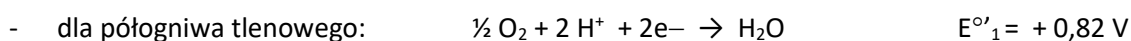
- składa się z białek – enzymów klasy oksydoreduktaz oraz przenośników, **transportujących początkowo protony i elektrony, a następnie elektrony na tlen,**
- jest ostatnim etapem utleniania w mitochondriach cząsteczek organicznych dostarczonych z pożywieniem,
- enzymy i przenośniki są uorganizowane **w kompleksy**, które są umieszczone **w matriks** oraz w **wewnętrznej błonie mitochondrialnej**, zgodnie ze **wzrastającym potencjałem red-oks,**
- przenośnik przyjmujący elektrony ma większe powinowactwo do elektronów od przenośnika oddającego, a to **zapewnia jednokierunkowy przepływ elektronów,**
- **transport elektronów** w łańcuchu oddechowym stanowi **serię połączonych ze sobą reakcji utleniania i redukcji,**
  - jak wiadomo: utlenianie polega na utracie elektronów, zaś redukcja na ich przyjęciu,
  - stąd utlenienie jednego związku zawsze pociąga za sobą redukcję drugiego,
- **w łańcuchu oddechowym** elektrony są przenoszone:
  - **od nukleotydu NADH, o najbardziej ujemnym potencjale redoks  $E^\circ$ , do tlenu,** czyli do związku o **najbardziej dodatnim potencjale redoks  $E^\circ$**  (tlen ma największe powinowactwo do elektronów),
- **elektrony początkowo z dużym ładunkiem energii, stopniowo** tracą ją na poszczególnych reakcjach wzdłuż łańcucha,
- miarą powinowactwa związku do elektronów jest **standardowy potencjał redoks  $E^\circ$** 
  - jest to potencjał półogniwa zbudowanego z elektrody **platynowej**, zanurzonej w roztworze, w którym stężenie jonów potencjałotwórczych, czyli donora i akceptora elektronów jest równe ( $c_{\text{uti}} = c_{\text{red}}$ ) i jest on mierzony w stosunku do standardowego półogniwa wodorowego, którego potencjał umownie przyjęto za równy zero,
- **standardowy potencjał redoks  $E^\circ$**  pozwala przewidzieć kierunek przepływu elektronów z jednej pary redoks na drugą, **w warunkach standardowych**, ale w układach niebiologicznych,
- **biologiczny standardowy potencjał redoks**
  - mierzy się w roztworze, w którym stężenie jonów  $H^+$  **wynosi  $10^{-7}$  mol/l, czyli przy pH=7**, a nie dla pH=0, bo przy 1 mol/l stężeniu jonów  $H^+$ , enzymy tracą aktywność
  - biologiczny potencjał standardowej elektrody wodorowej **jest równy – 0,42 wolta** (nie 0,0 V),

### Sumaryczna reakcja

- opisująca transport elektronów wchodzących do łańcucha oddechowego jako NADH przedstawia się:



- cząstkowe reakcje redoks oraz **biologiczne standardowe potencjały redoks** dla półogniw wynoszą:



- dla półogniwa nukleotydowego:  $\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{NADH}$   $E^{\circ}_2 = -0,32 \text{ V}$
- zaś różnica biologicznych standardowych potencjałów redoks  $\Delta E^{\circ}$  wynosi:

$$\Delta E^{\circ} = 0,82 \text{ V} - (-0,32) = \mathbf{1.14 \text{ V}}$$

- **zmiany energetyczne** podczas transportu elektronów **do tlenu** przez układ przenośników łańcucha oddechowego, podobnie jak dla innych układów, są **opisywane przez zmiany entalpii swobodnej**,
- różnica **biologicznych standardowych entalpii swobodnych**  $\Delta G^{\circ}$  wyraża się wzorem:

$$\Delta G^{\circ} = -n F \Delta E^{\circ} = -n F [E^{\circ}(\text{akceptora}) - E^{\circ}(\text{donora})]$$

- a po podstawieniu danych wynosi:

$$\Delta G^{\circ} = -n F \Delta E^{\circ} = -2 \cdot (96,5) \cdot 1.14 = -57 \text{ kcal/mol} = \mathbf{-220 \text{ kJ/mol}}$$

gdzie :

- $n$  – liczba elektronów przeniesionych w odpowiedniej reakcji półokwowej,
  - $F$  – stała Faradaya ( $96\,556 \text{ kJ}\cdot\text{V}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),
  - powyższa reakcja ma dodatnią wartość  $\Delta E^{\circ}$  i ujemną wartość  $\Delta G^{\circ}$ , czyli jest **egzoenergetyczna (wędrówka elektronów przez łańcuch jest energetycznie korzystna)**,
  - sumarycznie w procesie tym uwalnia  $220 \text{ kJ/mol}$ , czyli około  $53 \text{ kcal/mol}$ ,
  - inaczej: **utworzenie 1 cząsteczki wody powinno dostarczyć  $220 \text{ kJ/mol}$** ,
  - jednorazowe wydzielenie tak dużej ilości energii ( $220 \text{ kJ/mol}$ ) uszkadzałoby komórkę, a ponadto większość z niej rozproszyłaby się w postaci ciepła, stąd **przekazywanie elektronów odbywa się stopniowo, a nie bezpośrednio na tlen**, to energia wydziela się w małych porcjach,
  - zatem w organizmie **egzoergiczna reakcja powstawania wody:  $\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ , jest wieloetapowym procesem kontrolowanej reakcji z tlenem**,
  - energia uwalniana w trakcie transportu elektronów z NADH do tlenu w łańcuchu oddechowym jest „**wiązana**” w wysokoenergetycznych **wiązaniach bezwodnikowych ATP**,
  - synteza **ATP z ADP i ortofosforanu**, zachodząca w miarę przepływu elektronów z **NADH lub  $\text{FADH}_2$  na tlen** przez pośredniki łańcucha oddechowego **nosi nazwę fosforylacji tlenowej**,
- czyli mitochondrialny transport elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego i fosforylacja tlenowa (synteza ATP) są ze sobą ściśle sprzężone ,**

### Źródła protonów i elektronów dla łańcucha oddechowego

- stanowią zredukowane nukleotydy NADH i  $\text{FADH}_2$ , zwane **równoważnikami redukującymi** lub **nośnikami elektronów o wysokiej energii**,

**Zredukowany dinukleotyd nikotyn-amido-adeninowy NADH** powstaje w reakcjach:

- **cyklu Krebsa**: dehydrogenaza izocytrynianowa, 2-oksoglutaranowa, jabłczanowa,
- **dekarboksylacji tlenowej 2-oksokwasu**: dehydrogenaza pirogronianowa,
- **utleniania kwasów tłuszczowych** ( $\beta$ -oksydacja): dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA,

- degradacji glukozy w **glikolizie (w cytoplazmie)**: dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerolowego,
- protony i elektrony ze zredukowanego substratu SH<sub>2</sub> są przenoszone na dinukleotyd NAD<sup>+</sup>, który redukuje się do NADH, a reakcję katalizuje dehydrogenaza z koenzymem **NAD<sup>+</sup> o potencjale E°=-0,32**
- reakcję można zapisać: **SH<sub>2</sub> + NAD<sup>+</sup> → S + NADH + H<sup>+</sup>**,
- zredukowane cząsteczki NADH następnie oddają protony i elektrony na przenośniki łańcucha oddechowego i zostają utlenione do NAD<sup>+</sup>,

**Zredukowany dinukleotyd flawino-adeninowy FADH<sub>2</sub>** powstaje w reakcjach katalizowanych przez:

- dehydrogenaza bursztynianowa (cykl Krebsa),
- dehydrogenaza 3- fosfo-glicerolu (transport elektronów z cytoplazmy do mitochondriów),
- dehydrogenaza acylo-CoA (β-oksydacja kwasów tłuszczowych),
- dehydrogenaza dihydrosfingozyny (przemiana fosfolipidów),
- enzymy związane z FAD są integralnymi białkami **wewnętrznej błony mitochondrialnej, ale mogą być położone od strony:**
  - **matriks**, jak dehydrogenaza bursztynianowa oraz dehydrogenaza acylo-CoA,
  - **zewewnętrznej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej**, jak dehydrogenaza 3-fosfoglicerolu,
- protony i elektrony ze zredukowanego substratu SH<sub>2</sub> są przenoszone na FAD, który redukuje się do FADH<sub>2</sub>, zaś substrat utlenia do S, zgodnie z reakcją: **SH<sub>2</sub> + FAD ⇌ S + FADH<sub>2</sub>**
- zredukowane cząsteczki FADH<sub>2</sub>, następnie oddają protony i elektrony na przenośniki łańcucha oddechowego i zostają utlenione do FAD,

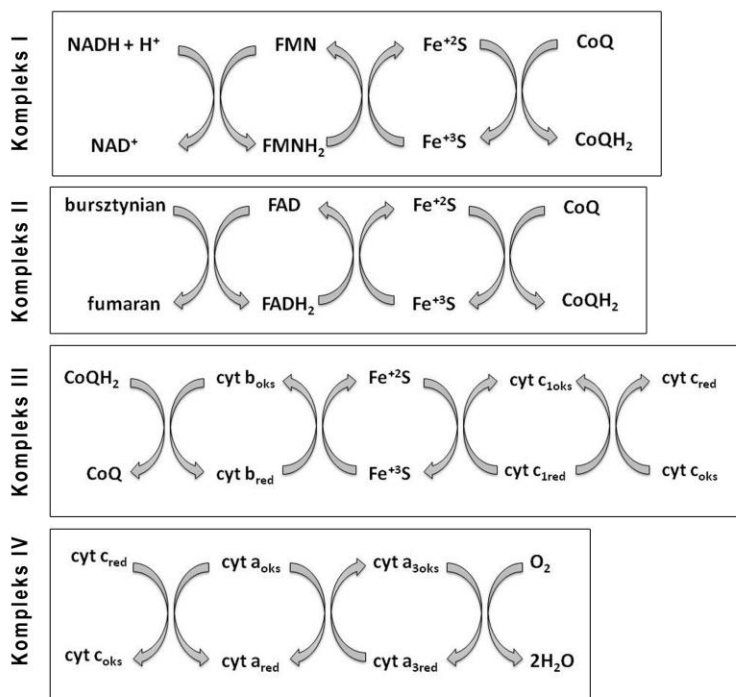
**W łańcuchu oddechowym**

- elektrony są przenoszone z NADH **lub** FADH<sub>2</sub> **na tlen** przez:
  - flawiny,
  - kompleksy żelazo-siarkowe,
  - koenzym Q (chinon),
  - hemy,
- przenośniki elektronów są grupami prostetycznymi białek,
- grupy prostetyczne przechodzą cyklicznie między stanem utlenienia a redukcji, gdy elektrony są przekazywane wzdłuż łańcucha,

Ze względu na podstawowe znaczenie łańcucha oddechowego dla fosforylacji tlenowej należy znać kompleksy wchodzące w skład łańcucha oddechowego,

## Kompleksy łańcucha oddechowego

- **I Kompleks:** reduktazy NADH – koenzym Q (zwany też kompleksem dehydrogenazy NADH),
  - kompleks ten przyjmuje elektrony od zredukowanego NADH + H<sup>+</sup>,
  - z I kompleksu protony i elektrony są przenoszone na koenzym Q<sub>10</sub>, który ulega redukcji do Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>,
- **II Kompleks:** reduktazy bursztynian – koenzym Q,
  - kompleks ten przyjmuje elektrony od zredukowanego FADH<sub>2</sub>,
  - z II kompleksu protony i elektrony są przenoszone na koenzym Q<sub>10</sub>, który ulega redukcji do Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>,
- **III Kompleks:** reduktazy zredukowanego koenzymu Q – cytochrom c (zwany też kompleksem cytochromów b-c<sub>1</sub>),
  - w III kompleksie następuje **utlenianie zredukowanego koenzymu Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>**
  - i przeniesienie elektronów na cytochrom c, który ulega redukcji,
- **IV Kompleks:** oksydazy cytochromowej,
  - w IV kompleksie zachodzi **utlenianie zredukowanego cytochromu c**,
  - końcowe przeniesienia elektronów na tlen zachodzi z wytworzeniem cząsteczki wody,
- **V Kompleks:** zawiera syntazę ATP,



### Powstająca cząsteczka ATP może ulegać hydrolizie na dwa sposoby

- bardziej powszechna jest reakcja przebiegająca z uwolnieniem ADP i fosforanu,
  - cały proces wyzwala entalpię swobodną o wartości ok. – 31 kJ/mol,

- mniej powszechna jest reakcja do AMP i pirofosforanu
  - ta reakcja dostarcza więcej energii, bo pirofosforan jest szybko usuwany ze środowiska w obecności specyficznej pirofosfatazy,
  - cały proces wyzwala entalpię swobodną o wartości ok. – 108 kJ/mol,
- **wartość entalpii swobodnej hydrolizy ATP jest pośrednia pomiędzy wartością entalpii swobodnej dla hydrolizy związków wysoko- i niskoenergetycznych, co umożliwia syntezę ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego**
  - wtedy endoergiczne tworzenie ATP (wiązanie energii) jest sprzężone z reakcjami, które zachodzą z dużym spadkiem entalpii swobodnej, większym niż bezwzględna wartość entalpii swobodnej syntezy ATP,
  - **wykorzystanie energii zawartej w ATP** do przebiegu reakcji endoergicznej, na skutek jej sprzężenia z reakcją hydrolizy ATP
    - **synteza innych wiązań** – tworzenie wiązań kowalencyjnych,
  - możliwe jest też **wykorzystanie energii** zawartej w tym nukleotydzie np. do:
    - **transportu aktywnego** – zachowanie stałości składu środowiska i prawidłowej objętości komórek,
    - **dla skurczów mięśniowych** (ATPaza aktyno-miozynowa)
    - utrzymania cytoszkieletu komórki (interakcje ankiryny, aktyny spektryny)

Enzymy **katalizujące** utlenienia i redukcji różnego typu substratów ( **reakcje redoks**) to **oksydoreduktazy (EC. 1...)**. Reakcje te polegają na odebraniu atomów wodoru (protonów i elektronów) lub wprowadzeniu atomów tlenu do substratu. Główne miejsca działania: mitochondria, peroksysomy, a także cytoplazma. Koenzymami mogą być: NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FMN, FAD, DPT, liponian, koenzym Q

**Wyróżnia się następujące podklasy oksydoreduktaz:** Dehydrogenazy, Reduktazy, Oksydazy, Oksygenazy, Peroksydazy, Katalaza

### 1. Dehydrogenazy

Katalizują utlenianie substratu przez **odebranie wodorów**, akceptorem wodorów jest **inna substancja niż tlen**. Uczestniczą głównie w reakcjach degradacji różnych związków organicznych



**1a) dehydrogenazy współdziałające z koenzymami : NAD<sup>+</sup>** (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy)

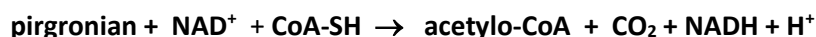
**NADP<sup>+</sup>** (fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego)

W wyniku reakcji następuje utlenianie grup -OH – tworzą się aldehydy bądź kwasy, atomy wodoru przyłączają się do pierścienia niacyny. Przejście NAD<sup>+</sup> do NADH + H<sup>+</sup> **można śledzić metodami optycznymi (340 nm)**, po redukcji pojawia się absorbancja przy 340 nm

**Przykłady:**

- **dehydrogenaza mleczanowa: mleczan + NAD<sup>+</sup> ⇌ pirogronian + NADH + H<sup>+</sup>**

- **dehydrogenazy alfa-ketokwasów:** (kwasu pirogronianowego i alfa-ketoglutazarowego, dehydrogenazy alfa-ketokwasów powstających z aminokwasów, współdziałają z koenzymem A (CoA-SH) oraz difosfotiaminą (DPT) i liponianem (Lip-SH)),



- **dehydrogenazy**

- katalizujące niektóre reakcje w cyklu Krebsa: np. dehydrogenaza: izocytrynianowa i jabłczanowa

- **dehydrogenazy**, które biorą udział w torach metabolicznych przemiany:

- węglowodanowej: dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerolowego,
- lipidowej: dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA,
- aminokwasów: dehydrogenaza glutaminianowa,

### 1b) dehydrogenazy współdziałające z koenzymami flawoproteinowymi FMN i FAD

W wyniku reakcji następuje utlenianie ugrupowania alkilowego – tworzą się wiązania podwójne. Atomy wodoru przyłączają się do N-1 i N-10 pierścienia izoalloksazyny. Przejście FAD w FADH<sub>2</sub> można śledzić metodami optycznymi (280, 380, 450 nm). Po redukcji flawiny stają się bezbarwne i absorpcja o długości fali 450 nm znika

#### Przykłady

- **dehydrogenaza bursztynianowa** (cykl Krebsa): **bursztynian + FAD ⇌ fumaran + FADH<sub>2</sub>**

- **dehydrogenazy** – biorące udział w torach metabolicznych, przemiany:

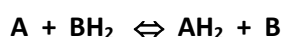
węglowodanowej: dehydrogenaza 3-fosfo-glicerolowa,

lipidów: dehydrogenaza acylo-CoA oraz dehydrogenaza dihydrosfingozyny.

**1c) dehydrogenaza zredukowanego NADH + H<sup>+</sup>** (jako składnik łańcucha oddechowego w mitochondriach katalizuje przeniesienie elektronów z NADH na koenzym Q; umożliwia przejście reakcji dwuelektrodowych w jednoelektronowe

**2. reduktazy** – katalizują reakcję redukcji substratu przez wprowadzenie do jego cząsteczki atomów wodorów.

Koenzymami reduktaz są NADH + H<sup>+</sup> i NADPH + H<sup>+</sup>.



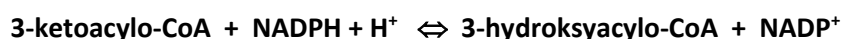
**redukcja substratu A (BH<sub>2</sub> = NADH + H<sup>+</sup> lub NADPH + H<sup>+</sup>)**

zredukowany koenzym **NADH + H<sup>+</sup>** oddaje wodory pośrednikom łańcucha oddechowego w mitochondriach,

zredukowany koenzym **NADPH + H<sup>+</sup>** dostarcza wodory do syntez,

#### Przykład:

- **reduktaza 3-ketoacylo-CoA** : udział w syntezie kwasów tłuszczowych, a dalej lipidów prostych i złożonych



- **reduktazy uczestniczące:**

w syntezie cholesterolu, hormonów steroidowych, kwasów żółciowych

w reakcji redukcji dihydrofolianu do tetrahydrofolianu (FH<sub>4</sub>),

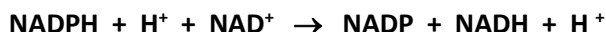
rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów,

### - reduktaza glutationu

katalizuje regenerację utlenionego glutationu (GSSG) do jego formy zredukowanej (GSH)



- **transhydrogenaza** katalizuje reakcję przeniesienia wodorów z zredukowanego koenzymu NADP na koenzym NAD<sup>+</sup>



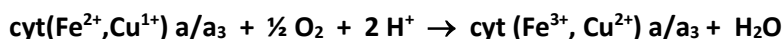
### 3. oksydazy

katalizują reakcje utlenienia substratu **przez usuwanie (odebranie) atomów wodoru, zaś akceptorem** tych wodorów **jest tlen** atomowy lub cząsteczkowy

**3a) oksydazy**, katalizujące reakcje, w których **powstaje woda**:  $\text{AH}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}$

#### Przykład:

- **oksydaza cytochromowa** (hemoproteina, metaloproteina, końcowy składnik łańcucha oddechowego, zawiera jony Fe i Cu, które w sposób odwracalny zmieniają stopnie utlenienia, pełni podwójną funkcję: bierze udział w transporcie elektronów i aktywuje tlen, tak że zachowuje się on jak tlen atomowy:



**3b) oksydazy**, katalizujące reakcje, w których **powstaje nadtlenek wodoru**:  $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$

#### Przykład:

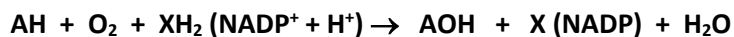
- **oksydaza glukozy lub L-aminokwasów** (flawoproteina):  $\text{aminokwas} + \text{FAD} \rightarrow \text{iminokwas} + \text{FADH}_2 + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$   
toksyczny  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest usuwany przez katalazę

- **oksydaza monoaminowa** (utlenianie adrenaliny, tyraminy)

### 4. oksigenazy

katalizują reakcje utleniania przez **wprowadzenie** do cząsteczki substratu jednego lub dwóch atomów **tlenu**

**4a) monooksygenazy** (zwyczajowo zwane **hydroksylazami**) – katalizują reakcje włączenia do substratu tylko jednego atomu tlenu, z wytworzeniem –OH, zaś drugi atom tlenu ulega redukcji i zostaje włączony w cząsteczkę wody:



**4a1) monooksygenazy pterynowe** katalizują reakcje hydroksylacji w obecności NADPH i **tetrahydrobiopteryny** ( $\text{H}_4$ -biopteryny)

#### Przykład:

- **monooksygenaza fenyloalaniny**:



- **monooksygenaza tryptofanu**



tryptofanu → 5-hydroksytryptofanu (prekursor serotoniny)

**4a2) monooksygenazy miedzio-zależne** katalizują reakcje hydroksylacji, które zachodzą przy współdziałaniu jonów miedzi i kwasu askorbinowego, wytwarzanie hormonów katecholowych (adrenalina, noradrenalina),

**Przykład:**

- **monooksygenaza DOPA-aminy:**

**DOPA-amina + O<sub>2</sub> + Cu(2+) + kwas askorbinowy → noradrenalina + Cu(1+) + kwas dehydroaskorbinowy + H<sub>2</sub>O**

**4a3) monooksygenazy żelazo-zależne (niehemowe)**

**Przykład:**

- **hydroksylaza tyrozynowa** (w obecności tetrahydrobiopteriny) – **tyrozynaza** (utlenianie fenoli i o-difenoli do chinonów)

tyrozyna → DOPA (= dihydroksyfenyloalanina), DOPA → DOPA-chinon

**4a4) monooksygenazy żelazo-zależne – hemoproteinowe** – katalizują reakcje hydroksylacji substratów w obecności cytochromów P<sub>450</sub>

**Przykład:**

- **monooksygenazy** katalizują reakcje powstawania hormonów steroidowych z cholesterolu, biorą udział, np. w inaktywacji leków, karcynogenów, cyklicznych węglowodorów – związków, które mogą dostać się do organizmu ze środowiska (odtruwanie)

**4b) dioksygenazy** – katalizują reakcje utleniania przez wprowadzenie do substratu dwóch atomów tlenu: **A + O<sub>2</sub> → AO<sub>2</sub>**

**Przykład:**

- **hydroksylaza prolinowa** (kwas askorbinowy, Fe<sup>2+</sup>)

dioksygenaza katalizuje włączenie tlenu do proliny i do α-ketoglutaranu (reakcja utleniania proliny do hydroksyproliny

**– prolina + O<sub>2</sub> + kwas α-ketoglutarynowy → 4-OH-prolina + CO<sub>2</sub> + kwas bursztynowy**

brak witaminy C – objawy skorbutu (krwawienie z dziąseł, kruchość ścian naczyń, wiązadeł)

- **dioksygenazy** katalizują reakcje rozszczepiania aromatycznych układów pierścieniowych: katechol + O<sub>2</sub> → kwas mukonowy

**Przykład:**

- **dioksygenaza tryptofanu:** (np. degradacja tryptofanu): **tryptofan + O<sub>2</sub> → formylokinurenia**

**5. peroksydazy (hemoproteina)** – występuje w mleku, leukocytach, zawiera 4 hematyny, luźniej związane z białkiem niż w katalazie, katalizuje reakcje, w których donorem wodoru mogą być różne związki, ale **akceptorem wodoru jest zawsze nadtlenek wodoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: AH<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → A + 2 H<sub>2</sub>O**

**Przykład:**

- **peroksydaza GSH** = zredukowanego glutationu, Se – zależna

Występuje w erytrocytach – uczestniczy w usuwaniu reaktywnych form tlenu, w leukocytach wykorzystuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  do utleniania bakterii. Występuje w roślinach: chrzan, rzepa, ziemniaki. W tarczycy katalizuje utlenianie jonu jodkowego do aktywnego jodu, który joduje reszty tyrozyny (tyroksyna):  $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{G-S-S-G} + 2 \text{H}_2\text{O}$

### **6. katalaza**

Hemoproteina, zawiera 4 układy hematyny, katalizuje reakcje, w której substratem i akceptorem wodorów jest nadtlenek wodoru. Występuje w erytrocytach, komórkach wątroby i nerek, uczestniczy w usuwaniu reaktywnych form tlenu, powstałych działaniem tlenowych dehydrogenaz, chroni lipidy błony komórki i hemoglobinę przed utlenieniem. Dzięki katalazie erytrocytów stosowana do dezynfekcji woda utleniona rozkłada się wydzielając tlen, który niszczy bakterie i mechanicznie oczyszcza ranę,  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

### **Procesy mogą być napędzane**

zmianą entalpii lub entropii (fałdowanie, tworzenie błon)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S, \Delta G \text{ miara napędu}$$

Reakcja niespontaniczna musi być sprzęgnięta ze spontaniczną

### **Główne źródło energii dla komórki, to synteza wody.**

Transport elektronów, protonów, potem pompowanie  $\text{H}^+$ , powrót  $\text{H}^+$  i wymuszanie zmiany środowiska (polarne  $\text{ADP}^-$  i  $\text{Pi}^-$ ) na niepolarne, aby wytworzyć wiązanie bezwodnikowe w ATP (wiązanie energii w ATP),

### **Spalanie węgla także źródłem energii – glikoliza – fosforylacja substratowa**

## Część doświadczalna

### Zasada metody oznaczania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej

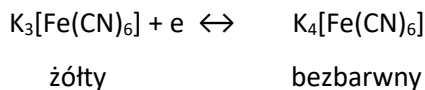
#### Utlennianie kwasu bursztynowego heksacyjanożelazianem potasu

Dehydrogenaza bursztynianowa jest jednym z enzymów cyklu Krebsa, który katalizuje reakcję utleniania bursztynianu do fumaranu. Akceptorem wodoru w tej reakcji jest FAD, który ulega redukcji do FADH<sub>2</sub>. Odtworzenie cząsteczki FAD katalizuje reduktaza bursztynian-koenzym Q wchodzącą w skład kompleks II łańcucha transportu elektronów.

Inhibitorami reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową są m. in.:

- malonian – podobnie jak inne kwasy dikarboksylowe ze względu na podobną budowę strukturalną do substratu jest inhibitorem kompetycyjnym reakcji
- HgCl<sub>2</sub> – jony metali ciężkich, są zdolne do tworzenia trwałych wiązań kowalencyjnych z enzymem poza jego miejscem aktywnym (inhibitor niekompetycyjny)

W warunkach fizjologicznych elektrony pochodzące z utlenienia FADH<sub>2</sub> są przenoszone na centra Fe-S a następnie na ubichinon (CoQ). W warunkach laboratoryjnych można zastosować również sztuczne akceptory elektronów, takie jak heksacyjanożelazian(III) potasu, **Zaletą zastosowania sztucznego akceptora jest możliwość śledzenia zmiany barwy w trakcie reakcji**



### Procedura

#### 1. Przygotowanie homogenatu

Do zlewki wprowadzić (odważyć) 10 g wątróbki drobiowej i dodać 50 ml buforu fosforanowego o pH=6. Homogenizować przez 3 min, a następnie przesączyć przez podwójną warstwę gazy do nowej zlewki. Przesącz zachować do dalszych analiz.

#### 2. Inkubacja wstępna

Przygotować mieszaniny inkubacyjne w 8 erlenmajerkach (falkonach) z korkami według poniższej tabeli.

**Przygotować 8 próbek i ponumerować je kolejno od B1 do B8. Do poszczególnych próbek wprowadzić odpowiednie roztwory, zgodnie z propozycją w tabeli**

Oznaczenie próbek	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
0,1 M bufor fosforanowy pH=6,0 (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,05 M bursztynian sodu (mL)	-	0,1	0,1	2,0	0,1	2,0	0,1	2,0
0,05 M malonian sodu (ml)	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-
0,01 M HgCl <sub>2</sub> (ml)	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
0,5 % K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Woda destylowana (mL)	3,0	2,9	2,9	1,0	2,8	0,9	2,8	0,9
Przygotowane próbki inkubować w temperaturze 37°C przez 5 min (łaźnia wodna).								

### 3. Inkubacja właściwa

Do każdej mieszaniny inkubacyjnej dodać po 0,5 mL przesączu uzyskanego z homogenatu wątroby. Do próbki B2 dodatkowo dodać 2ml kwasu trichlorooctowego. Próbkę dobrze wymieszać i inkubować w temperaturze 37°C. Po 30 min wyjąć wszystkie próbki i dodać do każdej (poza próbką B2) 2,0 mL kwasu trichlorooctowego w celu zatrzymania reakcji.

Oznaczenie próbek	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Przesącz (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
10% kwas trichlorooctowy (mL)	-	2,0	-	-	-	-	-	-
Przygotowane próbki inkubować w temperaturze 37°C przez 30 min (łaźnia wodna).								
10% kwas trichlorooctowy (mL)	2,0		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

### 4. Pomiar absorbancji

Próbki wirować przez 10 min, przy 3000 rpm, a następnie po 2 mL otrzymanego nadsączu przenosić delikatnie do kuwety pomiarowej i oznaczać absorbancję próbek przy długości fali 420 nm względem wody destylowanej.