

# 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 i 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 matryks, 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  $H^+$  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.

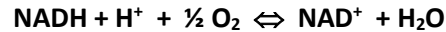
### łańcuch oddechowy

- 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 ( $C_{\text{utl}} = C_{\text{red}}$ ) 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

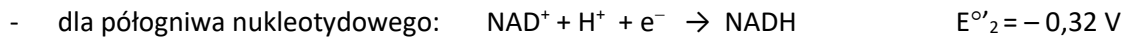
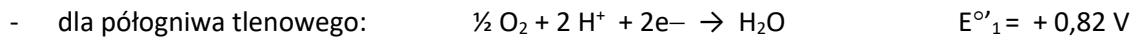
- biologiczny potencjał standardowej elektrody wodorowej jest równy  $-0,42$  wolta (nie  $0,0$  V),

### Sumaryczna reakcja

- opisująca transport elektronów wchodzących do łańcucha oddechowego jako NADH:



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



- zaś różnica biologicznych standardowych potencjałów redoks  $\Delta E^{\circ}$  wynosi:

$$\Delta E^{\circ} = 0,82 \text{ V} - (-0,32) = 1,14 \text{ V}$$

- 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:

$$\Delta G^{\circ} = -n F \Delta E^{\circ} = -2 \cdot (96,5) \cdot 1,14 = -57 \text{ kcal/mol} = -220 \text{ kJ/mol}$$

gdzie :

- $n$  – liczba elektronów przeniesionych w odpowiedniej reakcji półogniwej,
- $F$  – 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 wydzielana się w małych porcjach,
- zatem w organizmie egzoenergetyczna 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

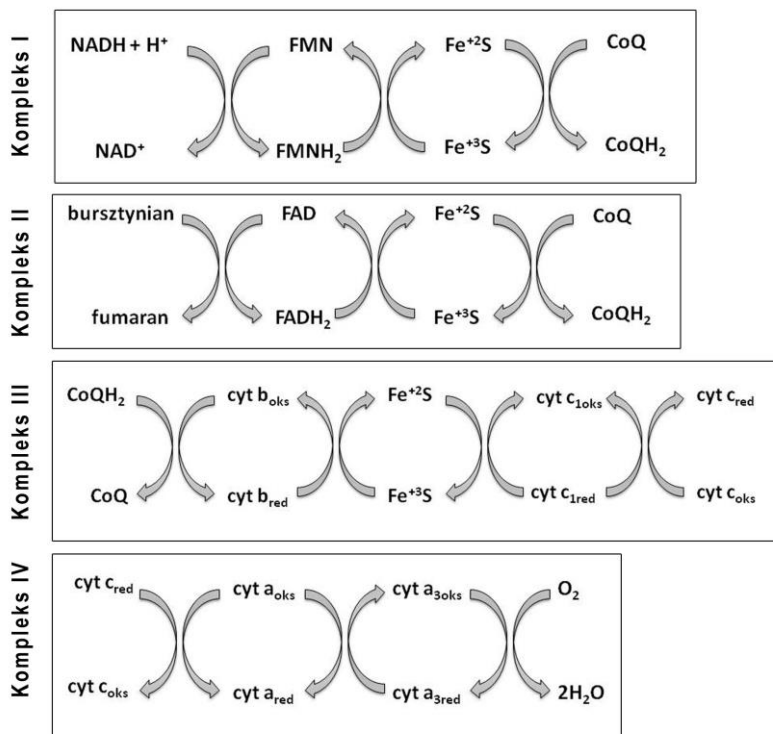
- stanowią zredukowane nukleotydy NADH i FADH<sub>2</sub>, zwane **równoważnikami redukującymi** lub **nośnikami elektronów o wysokiej energii**,

### 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,

### 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 wyzwała 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 wyzwała 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:  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , FMN, FAD, DPT, liponian, koenzym Q. Wyróżnia się następujące podklasy oksydoreduktaz: Dehydrogenazy, Reduktazy, Oksydazy, Oksygenazy, Peroksydazy, Katalaza

## Część doświadczalna

### Zasada metody oznaczania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej

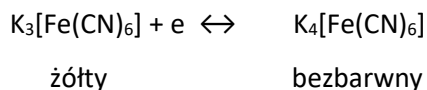
#### Utlenianie kwasu bursztynowego heksacyjanożelazianem potasu

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 10 g wątróbki drobiowej i dodać 50 ml buforu fosforanowego o pH=6. Homogenizować przez 1 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. Próbki 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 7 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.