

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 ΔG
- 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 FADH₂, czyli w tzw. nośnikach elektronów o wysokiej energii,
- elektrony z NADH i FADH₂ 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⁺ do przestrzeni międzybłonowej,
- wypompowanie jonów H⁺ 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.

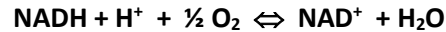
łańcuch oddechowy

- 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° , do tlenu, czyli do związku o najbardziej dodatnim potencjale redoks E° (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°**
 - 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° 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

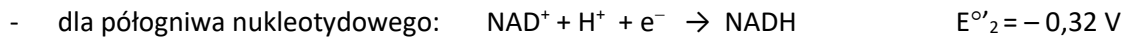
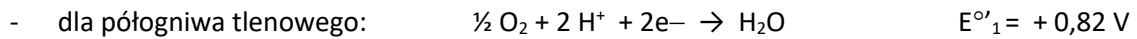
- biologiczny potencjał standardowej elektrody wodorowej jest równy $-0,42$ wolta (nie $0,0$ V),

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 ΔE° 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** ΔG° 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 półokwowej,
- F – stała Faradaya ($96\,556 \text{ kJ}\cdot\text{V}\cdot\text{mol}^{-1}$),
- powyższa reakcja ma dodatnią wartość ΔE° i ujemną wartość ΔG° , czyli jest **egzoenergetyczna (wędrówka elektronów przez łańcuch jest energetycznie korzystna)**,
- sumarycznie w procesie tym uwalnia 220 kJ/mol , czyli około 53 kcal/mol ,
- inaczej: utworzenie 1 cząsteczki wody powinno dostarczyć 220 kJ/mol ,
- jednorazowe wydzielenie tak dużej ilości energii (220 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 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

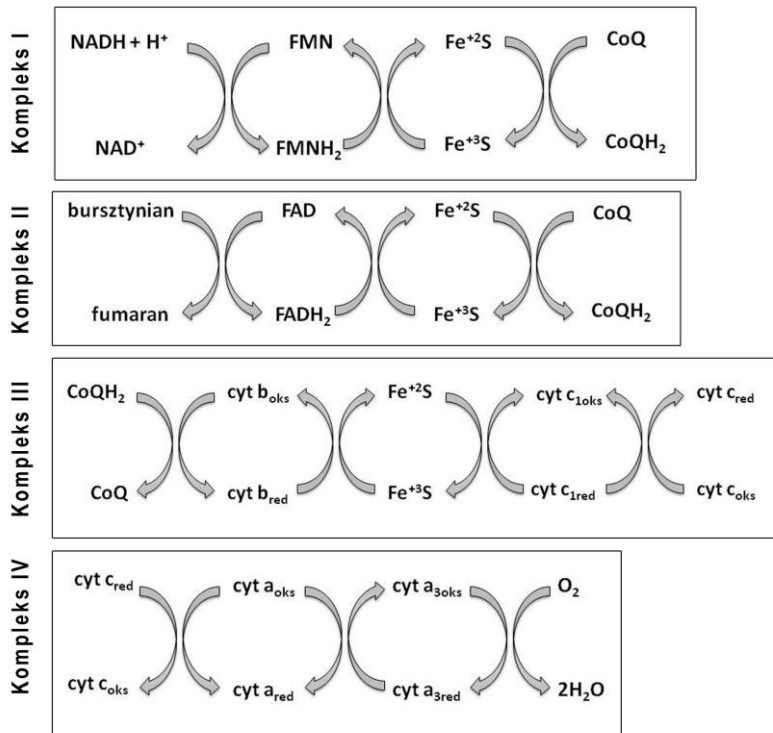
- stanowią zredukowane nukleotydy NADH i FADH₂, zwane **równoważnikami redukującymi** lub **nośnikami elektronów o wysokiej energii**,

W łańcuchu oddechowym

- elektrony są **przenoszone z NADH lub FADH₂ 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⁺,
 - z I kompleksu protony i elektrony są przenoszone na koenzym Q₁₀, który ulega redukcji do Q₁₀H₂,
- **II Kompleks:** reduktazy bursztynian – koenzym Q,
 - kompleks ten przyjmuje elektrony od zredukowanego FADH₂,
 - z II kompleksu protony i elektrony są przenoszone na koenzym Q₁₀, który ulega redukcji do Q₁₀H₂,
- **III Kompleks:** reduktazy zredukowanego koenzymu Q – cytochrom c (zwany też kompleksem cytochromów b-c₁),
 - w III kompleksie następuje utlenianie zredukowanego koenzymu Q₁₀H₂
 - 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: NAD^+ , 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

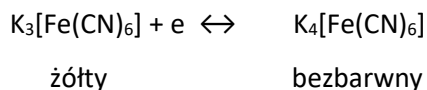
Utlenianie kwasu bursztynowego heksacyjanożelazianem potasu

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 FADH₂. 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
- HgCl₂ – 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 FADH₂ 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 ok. 1,5 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 ₂ (ml)	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
0,5 % K ₃ [Fe(CN) ₆] (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 2 ml 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 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.