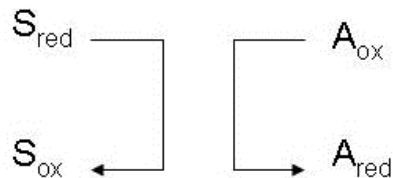


5 BIOLOGISCHE OXIDATION

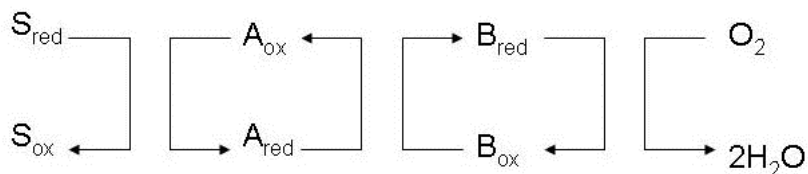
Oxidations-Reduktions-Reaktionen sind im lebenden Organismus die Hauptquelle für chemisch verwertbare Energie. Unter aeroben Bedingungen (in Anwesenheit von O_2) werden die Kohlenstoffatome der Substrate letztlich zu CO_2 , die Wasserstoffatome zu H_2O oxidiert.

Eine Oxidations-Reduktions-Reaktion schreibt man:



Die Schreibweise bedeutet: Vom reduzierten Substrat S_{red} werden Elektronen auf A_{ox} übertragen. Dabei wird S_{red} zu S_{ox} oxidiert und A_{ox} zu A_{red} reduziert. Da Reduktions- und Oxidationsvorgang stets gekoppelt sind, spricht man von Redox-Reaktionen; die beteiligten Enzyme heißen Oxidoreduktasen. Bei gleicher Konzentration bestimmen die Redoxpotentiale der Partner, welche Richtung der Elektronenfluss nimmt, d.h. in welcher Richtung die Reaktion spontan abläuft.

Mehrere Redox-Reaktionen können zu einer Elektronentransport-Kette verbunden sein,
z.B.:



Die Redoxpotentiale werden von links nach rechts positiver; die Elektronen werden auf den Sauerstoff übertragen. In Zellen aerob lebender Organismen werden die Elektronen des Substrat-Wasserstoffs in der Atmungskette ebenfalls auf Sauerstoff übertragen. Der Vorgang findet in den Mitochondrien an Enzymsystemen statt, die in der inneren Membran lokalisiert sind

Die Redoxpotentiale werden von links nach rechts positiver; die Elektronen werden auf den Sauerstoff übertragen. In Zellen aerob lebender Organismen werden die Elektronen des Substrat-Wasserstoffs in der Atmungskette ebenfalls auf Sauerstoff übertragen. Der Vorgang findet in den Mitochondrien an Enzymsystemen statt, die in der inneren Membran lokalisiert sind

Die Substrate mit stark negativen Redoxpotentialen, die die Elektronen an die Atmungskette liefern, stammen aus dem Intermediärstoffwechsel (Citratzyklus, Aminosäureabbau, Glykolyse, Fettsäureabbau).

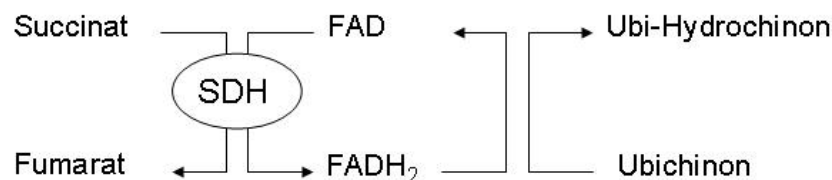
Die Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran ist an die Synthese energiereicher Phosphate gekoppelt (oxidative Phosphorylierung).

5.1 Gewinnung von Mitochondrien aus Herzmuskel und Messung der Succinat-Dehydrogenase-Reaktion

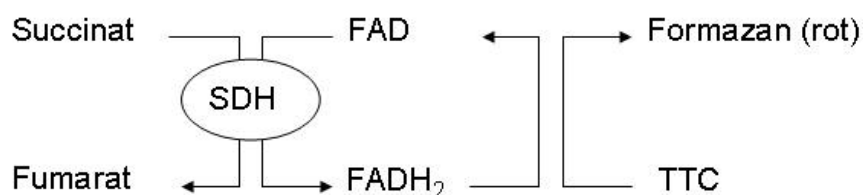
Versuchsprinzip:

Zur präparativen Gewinnung von Mitochondrien muss man Zellen oder Gewebe zerstören. In unserem Versuch geschieht das mit Hilfe eines Homogenisators, einem Teflon- oder Glasstempel, der eng in einem Glaszylinder geführt wird. Zellen, die durch Bewegen des Stempels zwischen Stempel und Glaswand geraten, werden durch die auftretenden Scherkräfte zerrissen. Das Homogenat wird durch niedertouriges Zentrifugieren von groben Zelltrümmern und den Zellkernen befreit. Die im Überstand befindlichen Mitochondrien sedimentieren bei höherer g-Zahl. Sie stellen eine Roh-Mitochondrien-Fraktion dar, die noch durch Membranbestandteile der Zellen verunreinigt ist. Wir verwenden diese Rohfraktion zur Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität.

Succinat wird durch Succinat-Dehydrogenase (SDH), ein FAD-abhängiges Enzym, zu Fumarat dehydriert. Das FAD übernimmt die Wasserstoffe und überträgt sie in vivo auf Ubichinon.



In unserem Versuch bieten wir dem Enzym einen künstlichen Elektronen- und Wasserstoffakzeptor an, das Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). TTC geht bei Reduktion in eine Substanz über, die man Formazan nennt und die intensiv rot gefärbt ist.



Bestimmung der Substratabhängigkeit der Enzymreaktion:

Die Messung der Extinktion des roten Farbstoffs erlaubt die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Bei welcher Substratkonzentration bestimmt man die Enzymaktivität?

Versuchsdurchführung:

Gewinnung von Mitochondrien: 1/3 Rattenherz (ca. 0,3 g) wird mit der Schere in möglichst kleine Stückchen geschnitten und mit 10 ml einer gepufferten isotonen Saccharoselösung in den Homogenisator überführt. Unter Eiskühlung wird von Hand so lange homogenisiert, bis praktisch keine Gewebeteile mehr zu erkennen sind.

Eine solche Behandlung zerstört den größten Teil der Zellen. Das Homogenat wird 10 min bei 1000g (3000 Upm) zentrifugiert. Der trübe Überstand wird abgenommen und nochmals bei 8000g zentrifugiert; jetzt sedimentieren die Mitochondrien als braune Schicht. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in Phosphatpuffer (0,1 mol/l) pH 7,0 suspendiert. Diese Mitochondrien-Fraktion wird als Enzymquelle verwendet.

6 Zentrifugengläser werden mit 1-6 beschriftet und in ein Eisbad gestellt. Nun pipettiert man nach folgendem Schema:

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Puffer-Lösung | 1 ml | — | — | — | — | — |
| 0,06 mmol/l Succinat | — | 1 ml | — | — | — | — |
| 0,15 mmol/l Succinat | — | — | 1 ml | — | — | — |
| 0,30 mmol/l Succinat | — | — | — | 1 ml | — | — |
| 0,60 mmol/l Succinat | — | — | — | — | 1 ml | — |
| 1,20 mmol/l Succinat | — | — | — | — | — | 1 ml |

Nun wird in alle Gläser pipettiert:

je 0,1 ml Mitochondriensuspension
je 0,3 ml TTC-Lösung.

Gut mischen und die Gläser in ein 30°C-Wasserbad stellen.

Nach 20 min Inkubation die Proben **ins Eisbad** zurückstellen und in alle Gläser ca. 1 ml **eiskalte** 10%ige Trichloressigsäure (TCA) pipettieren. Man arbeitet mit einer 10 ml Messpipette, da es auf Schnelligkeit ankommt! Gut mischen und die Gläser weitere 10 min im Eisbad belassen. Nun pipettiert man in jedes Glas **genau** 2,0 ml Ethylacetat, verschließt die Gläser mit Silikonstopfen und schüttelt kräftig. Dabei geht der wasserunlösliche Farbstoff in die organische Phase über. Die unmischbaren Phasen werden durch Zentrifugation (5 min, 3000 Upm) getrennt und die oberen Phasen werden vorsichtig mit einer Pasteurpipette in trockene Zentrifugengläser überführt. Es wird im Fotometer bei 492 nm gegen Probe 1 gemessen.

Zeichnen Sie ein Diagramm:

- **Abszisse** : Substratkonzentration (mmol/l)
- **Ordinate**: E_{492}

Was bedeutet die Kurve?

5.2 Aufnahme der Absorptionsspektren von oxidiertem und reduziertem Cytochrom C

Versuchsprinzip:

Das Hämoprotein Cytochrom C ist ein Elektronenüberträger. Es wird in der Atmungskette von Cytochrom C-Oxidase oxidiert. Cytochrom C besitzt in seiner reduzierten Form ein anderes Absorptionsspektrum als in der oxidierten Form.

Versuchsdurchführung:

Die Lösungen sind bei gleicher Temperatur aufzubewahren. Das Fotometer ist bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllte Küvette abzugleichen. Für die Messung werden 2 ml Cytochrom C-Lösung (40 $\mu\text{mol} / \text{l}$) in die Messküvette pipettiert. Man liest die Extinktion der Lösung bei 500 nm ab und stellt nachfolgend die Extinktionen in Schritten von 10 nm bis zu einer Wellenlänge von 600 nm fest.

(Achtung ! Bei jeder neu eingestellten Wellenlänge muss ein neuer Abgleich gegen eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllte Küvette erfolgen!)

Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums von reduziertem Cytochrom C werden zum Küvetteninhalt (Cytochrom C-Stammlösung) 20 μl Ascorbinsäure (20 mmol/l) pipettiert. Nach gründlichem Mischen wird die Reduktion abgewartet, die nach ca. 20 min beendet ist. Dann verfährt man wie oben beschrieben.

Auswertung:

Die Absorptionsspektren von Cytochrom C (oxidierte Form und reduzierte Form) sind aufzunehmen und auf Millimeterpapier zu zeichnen.

Die Absorptionsmaxima sind anzugeben.

5.3 Untersuchung der Cytochrom C-Oxidase

Versuchsprinzip:

Cytochrom C-Oxidase ist das Enzym, das die letzte Stufe der Atmungskette katalysiert. Das Enzym überträgt Elektronen, die es vom Cytochrom C übernimmt, auf molekularen Sauerstoff. Cytochrom C-Oxidase kann durch CN^- -Ionen gehemmt werden (Giftwirkung von Blausäure!)

Versuchsdurchführung:

Die Messung wird im Eppendorf-Fotometer mit 1 cm-Küvetten durchgeführt (Vergleiche vorherige Aufgabe). Es wird gegen eine Leerküvette gemessen.

In die Küvette pipettiert man 2 ml Cytochrom C-Lösung und die Startextinktion wird abgelesen. Nach Zugabe von 0,2 ml Ascorbinsäure wird die Extinktion im Minuten-Abstand abgelesen, bis nach ca. 6 Minuten ein konstanter Wert erreicht ist.

Nach Zugabe von 0,1 ml Herzmuskelextrakt (Enzymquelle) werden die Extinktionswerte in Minutenabständen abgelesen, bis nach ca. 8 min wieder ein Endwert erreicht ist. Erst jetzt ist das Gleichgewicht zwischen von Cytochrom C-Oxidase katalysierter Oxidation und Reduktion durch Ascorbinsäure erreicht.

Die weitere Zugabe von 0,05 ml Ascorbinsäure verschiebt dieses Gleichgewicht nur geringfügig: 6 x in Minutenabständen ablesen. Nach Zugabe von 0,02 ml KCN (0,1 mol/l) wird 6x im Minutenabstand die Extinktion festgestellt. Am Ende der Messung liegt Cytochrom C durch den Ascorbatüberschuss wieder vollständig reduziert vor.

Cytochrom C-Oxidase-Extinktionen (550 nm gegen leere Küvette)

| | | | | | | | | |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 2 ml Cytochrom C | 0' | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 0,2 ml Ascorbinsäure | 1' | 2' | 3' | 4' | 5' | 6' | | |
| | | | | | | | | |
| 0,1 ml Herzmuskelextrakt | 7' | 8' | 9' | 10' | 11' | 12' | 13' | 14' |
| | | | | | | | | |
| 0,05 ml Ascorbinsäure | 15' | 16' | 17' | 18' | 19' | 20' | | |
| | | | | | | | | |
| 0,02 ml KCN | 21' | 22' | 23' | 24' | 25' | 26' | | |
| | | | | | | | | |

Auswertung:

Zeichnen Sie ein Diagramm. Auf der Zeitachse ist der Zusatz der Agenzien durch Pfeile zu markieren.