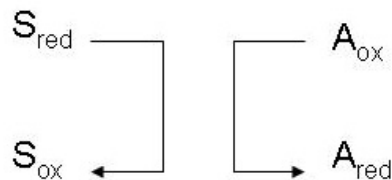


## 4 BIOLOGISCHE OXIDATION

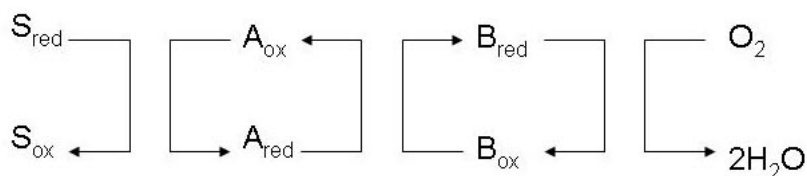
Oxidations-Reduktions-Reaktionen sind im lebenden Organismus die Hauptquelle für chemisch verwertbare Energie. Unter aeroben Bedingungen (in Anwesenheit von  $O_2$ ) werden die Kohlenstoffatome der Substrate letztlich zu  $CO_2$ , die Wasserstoffatome zu  $H_2O$  oxidiert.

Eine Oxidations-Reduktions-Reaktion schreibt man:



Die Schreibweise bedeutet: Vom reduzierten Substrat  $S_{\text{red}}$  werden Elektronen auf  $A_{\text{ox}}$  übertragen. Dabei wird  $S_{\text{red}}$  zu  $S_{\text{ox}}$  oxidiert und  $A_{\text{ox}}$  zu  $A_{\text{red}}$  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 Substrate mit stark negativen Redoxpotentialen, die die Elektronen an die Atmungskette liefern, stammen aus dem Intermediärstoffwechsel (Citratzyklus, Aminosäureabbau, Glykolyse, Fettsäureabbau).

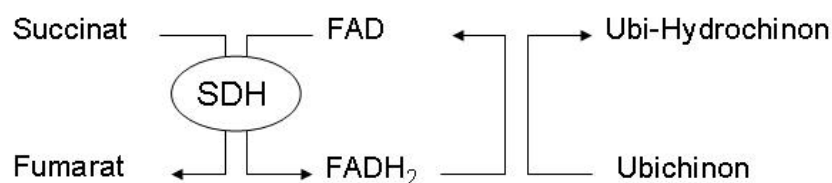
Die Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran ist an die Synthese energiereicher Phosphate gekoppelt (oxidative Phosphorylierung).

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

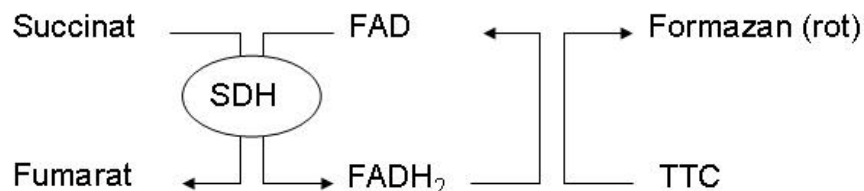
### Versuchsprinzip:

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: Hühnerherz (ca. 0,3 g vom Schlachthof) 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 Minuten bei 1000 g (3000 Upm) zentrifugiert. Der trübe Überstand wird abgenommen und nochmals bei 8000 g 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 es wird nach folgendem Schema pipettiert:

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 0,3 mL TTC-Lösung

je 0,1 mL Mitochondriensuspension

Gut mischen und die Gläser in ein **37 °C-Wasserbad** stellen.

Nach 20 Minuten Inkubation die Proben **ins Eisbad** stellen 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 Minuten 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?*

## 4.2 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  $\mu\text{mol/L}$ ) 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  $\mu\text{l}$  Ascorbinsäure (20 mmol/l) pipettiert. Nach gründlichem Mischen wird die Reduktion abgewartet, die nach ca. 20 Minuten 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.***

### 4.3 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<sup>-</sup>-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 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gefüllte Küvette 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 Minuten 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 **6 x** 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)

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 Millimeterpapier.**

**Abszisse: Zeit in Minuten**

**Ordinate: Extinktion (550nm)**

**Interpretieren Sie die Kurve.**