

## BIOLOGISCHE OXIDATION

*Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles:* Redoxreaktionen aus der anorganischen (z. B.  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ) und organischen Chemie (z. B. Chinon/Chinol), elektrochemische Spannungsreihe, Radikalchemie, Gibbs' freie Energie, Hauptsätze der Thermodynamik, Konzept der energiereichen Bindung, Koordinationsbindung.

### *Schlüsselwörter:*

Aufbau der Mitochondrien, Beispiele für Kompartimentierung von Stoffwechselwegen ( $\beta$ -Oxidation [inkl. ungesättigter Fettsäuren], Citratzyklus, Atmungskette, Carbamoylphosphatsynthasen für Pyrimidinbiosynthese und Harnstoffzyklus sowie dessen Kompartimentierung), Transportsysteme zwischen Mitochondrien und Cytosol (Citrat/Malat, 2-Oxo (oder  $\alpha$ -Keto-) glutarat (Aspartat)/Malat, Glycerolphosphatshuttle), Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung (Glykolyse und Citratzyklus), Bewertung des Energiegehaltes von Donatoren der Phosphorylierung (z. B. ATP, Kreatinphosphat, 3-Phospho-glyceroyl-1-phosphat, Phosphoenolpyruvat, Succinyl-CoA), Pasteureffekt und Funktion der Milchsäurebildung (inkl. Cori-Zyklus), Citratzyklus (Ablauf, Regulation, Lieferant für Synthesen am Beispiel der Hämbiosynthese, Glukoneogenese sowie Fettsäuresynthese via Citratexport), anaplerotische Reaktionen (z. B. Oxalacetatsynthese; hier Schnittstelle zu Aminosäureabbau, d.h. Aminosäuren als Lieferanten für Fumarat, Succinyl-CoA, Acetoacetat/Acetyl-CoA, Glutamat/2-Oxoglutarat, Oxalacetat, Pyruvat), das Warum und der Ablauf des Glyoxylatzyklus,  $\text{NAD}^+/\text{FAD}$  als Redoxkatalysatoren, Lokalisation, Aufbau und Funktion der Atmungskette (Einteilung in Komplexe und ihre Redoxdonatoren, z. B. NADH, Succinat, Fe-S Proteine, Ubichinon, Cytochrom c sowie ihre Funktion im vektoriellen Transport von Protonen), Hämbiosynthese und die Beteiligung von Cytochromen an der Reaktion von Monooxygenasen, chemiosmotische Theorie der ATP-Gewinnung, Atmungskettenphosphorylierung (Struktur und Funktion der ATP-Synthase, Adeninnukleotid-Translokase), P/O-Quotient, Wirkung von Entkopplern (z. B. Dinitrophenol) und Giften (z. B. Cyanid), biochemische Aspekte der Chemie des Sauerstoffs (Elektronenverteilung, Bildung von „reactive oxygen species“ wie  $\text{O}_2^- \cdot$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ihre Funktion und Entgiftung durch z. B. Katalase).

*Literatur:*

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“.

Vorbemerkung:

In den Mitochondrien der eukaryotischen Zelle wird der größte Teil der zum Leben benötigten Energie erzeugt. NADH und FADH<sub>2</sub>, die in der Glykolyse, bei der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren und im Citratzyklus gebildet werden, sind energiereiche Moleküle. Sie besitzen Elektronenpaare mit einem hohen Übertragungspotential. In diesem Zusammenhang versteht man unter oxidativer Phosphorylierung einen Prozeß, in dessen Verlauf die Übertragung von Elektronen von NADH und FADH<sub>2</sub> auf molekularen Sauerstoff O<sub>2</sub> mit Hilfe mehrerer Elektronenüberträger zur Bildung von ATP führt. Diese Überträgermoleküle sind in der inneren Mitochondrienmembran zur sog. Atmungskette angeordnet. Sie erzeugen einen Protonengradienten zwischen Matrix und cytosolischer Seite, der zur Phosphorylierung von ADP durch eine ATP-Synthase benötigt wird.

Redoxpotentiale und der sich daraus ergebende Elektronengradient sind in diesem Prozeß somit von grundlegender Bedeutung. Elektrochemisch wird das Redoxpotential eines Redoxpaares im Vergleich zu einer Normalwasserstoffelektrode bestimmt. So bedeutet ein negatives Redoxpotential, dass die reduzierte Form einer Substanz eine geringere Affinität für Elektronen besitzt als H<sub>2</sub>. Umgekehrt besteht bei einem positiven Redoxpotential eine höhere Affinität. Im Falle der Atmungskette, die eine Reihe biologisch wichtiger Redoxpaare umfaßt, besitzt eine stark reduzierende Substanz wie NADH ein negatives Redoxpotential und gibt Elektronen ab, während eine stark oxidierende Substanz wie O<sub>2</sub> ein positives Redoxpotential besitzt und Elektronen aufnimmt. Von vielen biologischen Redoxpaaren ist das Standardpotential bekannt. Die Änderung der (Gibbs) freien Standardenergie steht in Bezug zur Änderung des Redoxpotentials

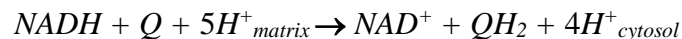
und wird mit der folgenden Gleichung ausgedrückt:

$$\Delta G^{0'} = -n \cdot F \cdot \Delta E'_{0'}$$

(n=Anzahl der übertragenen e<sup>-</sup>, F=Faradaysche Konstante 96,48 kJ•mol<sup>-1</sup>•V<sup>-1</sup>, ΔG<sup>0'</sup> in kJ•mol<sup>-1</sup> und ΔE'<sub>0'</sub> in V)

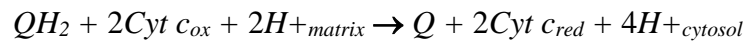
Zwischen NADH und O<sub>2</sub> besteht eine Gesamtpotentialdifferenz von 1,14 V. Nach obiger Gleichung erbringt die Reduktion von O<sub>2</sub> durch NADH ein Gesamtbetrag an ΔG<sup>0'</sup> von -220,1 kJ•mol<sup>-1</sup>. Die freiwerdende Energie wird dazu verwendet einen Protonengradienten aufzubauen, der die Synthese von ATP ermöglicht (für die Hydrolyse von einem ATP beträgt ΔG<sup>0'</sup> -31,4 kJ•mol<sup>-1</sup>)

Die Elektronen aus den Hydridanionen von NADH werden mittels dreier Enzymkomplexe auf O<sub>2</sub> übertragen. Diese sind als integrale Proteine in der inneren Mitochondrienmembran verankert. NADH und Succinat sind lösliche Substanzen und befinden sich in der Mitochondrienmatrix, während Ubichinon (Coenzym Q), das Elektronen vom Komplex I oder II auf Komplex III überträgt, aufgrund seines hydrophoben Ankers in der Membran lokalisiert ist. Komplex I, NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase), enthält FMN und mehrere Nicht-häm-Eisenproteine, die zumindestens ein Eisen-Schwefel Zentrum besitzen. Elektronen werden von NADH auf CoQ transferiert, wobei ΔE'<sub>0'</sub> für diesen Transfer 0,42 V ergibt. Die freiwerdende Energie reicht aus, um 4 Protonen auf die cytosolische Seite zu pumpen. Es ergibt sich eine Gesamtgleichung von:



Komplex II, Succinat-Ubichinon-Reduktase Komplex, besteht u. a. aus Succinatdehydrogenase, der bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat im Citratzyklus fungiert und FADH<sub>2</sub> als Coenzym besitzt. Die Elektronen werden auf CoQ übertragen. Die Änderung des Redoxpotentials (≈ 0,05 V) ist dabei so gering, dass keine Protonen auf die cytosolische Seite gepumpt werden können.

Reduziertes Coenzym Q (CoQH<sub>2</sub>) diffundiert in der Lipidphase der Membran und gibt seine Elektronen an Komplex III, Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex oder Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, weiter. Er enthält als redoxaktive Proteine zwei b-Typ-Cytochrome (b<sub>L</sub> = low affinity; b<sub>H</sub> = high affinity), ein Cytochrom c<sub>1</sub> und ein Rieske-Eisen-Schwefel-Protein mit einem [2Fe-2S]-Zentrum, das durch ungewöhnliche Komplexierung mit His-Reste anstelle von Cys-Reste eine besonders hohe Elektronenaffinität besitzt. Elektronen werden schließlich an Cytochrom c (siehe Übungsteil 7.2) weitergeleitet und weitere 4 Protonen gelangen auf die cytosolische Seite. Es ergibt sich eine Gesamtgleichung von:



Die Cytochrom-c-Oxidase (siehe Übungsteil 7.2) bildet den Komplex IV. In den Untereinheiten I und II liegen die vier redox-aktiven Zentren: zwei Cu-Ionen (zweikerniges Zentrum Cu<sub>A</sub>-Cu<sub>A</sub>), die die Oxidationsstufen +1 und +2 einnehmen können, und zwei Hämgruppen vom a-Typ (a und a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>).

Durch den H<sup>+</sup> - Transfer zur cytosolischen Seite entsteht ein chemischer Gradient ΔpH (Innenseite alkalisch) und ein elektrischer Gradient ΔV (Innenseite negativ). Die innere Mitochondrienmembran ist für H<sup>+</sup> undurchlässig, diese können nur durch protonenspezifische Kanäle (F<sub>0</sub>) wieder in die Matrix gelangen. Die protonenmotorische Kraft, die die Protonen in die Matrix zurücktreibt, liefert die Energie für die ATP-Synthese und -Freisetzung durch die ATP-Synthase (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase; Komplex V). Die Änderung der (Gibbs) freien Energie, die für die Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten durch einen Ionenpumpe erforderlich ist, berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln \frac{c_1}{c_2} + Z \cdot F \cdot \Delta V = 2,303 \cdot R \cdot T \cdot \log \frac{c_2}{c_1} + Z \cdot F \cdot \Delta V$$

(Z = elektrische Ladung des Ions, bei  $H^+ = 1$ ,  $\Delta V$  = Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran, entspricht 0,14V, R = 8,3155 J•mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>, T = 298 K,  $\log c_2/c_1 = 1,4$ )

Daraus ergibt sich für jedes Proton, das aus der Matrix zur cytosolischen Seite transportiert wurde, ein Betrag von ca. 20 kJ•mol<sup>-1</sup>.

Die Verwendung spezifischer Hemmstoffe ermöglichte es, das Elektronentransport-System vom Phosphorylierungs-System zu unterscheiden und die Abfolge der Redoxsysteme in der Atmungskette zu bestimmen. Von der Vielzahl der Substanzen sollen hier Inhibitoren der Glykolyse und des Citratzyklus (u. a. Fluoride), der Atmungskette (u. a. Komplex III: Antimycin A, Komplex IV: Cyanide, Kohlenmonoxid, Azide) und Substanzen, die die Atmungskette und das Phosphorylierungssystem entkoppeln können (u. a. Dinitrophenol), erwähnt werden.

|| Bereiten Sie vor: Welche Hemmstoffe inhibieren welche Moleküle? Überlegen Sie sich die Konsequenzen! ||

Der erste Teil des Übungsseminars dient dazu, den Zusammenhang zwischen Glykolyse und Zellatmung aufzuzeigen. In Anwesenheit von Sauerstoff wird der Glucoseverbrauch deutlich verringert. Dieser Effekt wurde nach seinem Entdecker als Pasteur-Effekt bezeichnet. Allerdings übt der Sauerstoff dabei lediglich einen indirekten Einfluss aus. Die Regelgröße ist in diesem Fall die Aktivität der Phosphofruktokinase der Glykolyse.

|| Bereiten Sie vor: Welche Regelmechanismen liegen dieser Beobachtung zugrunde? Überlegen Sie sich, wie die Energiegewinnung von Zellen unter anaeroben Bedingungen erfolgt! ||

Der zweite Teil befasst sich mit der Elektronenübertragung zwischen Cytochrom und Cytochrom-c-Oxidase, während im dritten Teil am Beispiel der Katalase die biologische Bedeutung von Oxidoreduktasen gezeigt wird, die nicht in der Atmungskette lokalisiert sind.

## **Aerober Glucoseabbau in Hefezellen**

Eine 5 %ige Hefesuspension wird vor Beginn des Praktikums für 2-3 Stunden in Abwesenheit von Nährstoffen inkubiert. Während dieser Zeit werden alle Energiereserven verbraucht. Im folgenden Experiment werden Proben dieser Hefesuspension unterschiedlich lange mit Glucose inkubiert. Dabei muß vor allem darauf geachtet werden, dass die Hefesuspension homogen ist und die Inkubationszeit mit Glucose genau eingehalten wird. Die Inkubationszeit wird durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 3000 rpm beendet. Dadurch werden die Hefezellen von der Glucoselösung abgetrennt und der Glucoseabbau gestoppt. Im Überstand wird Glucose enzymatisch nach der Glucoseoxidase-Peroxidase Methode gemessen.

### Versuchsprinzip:

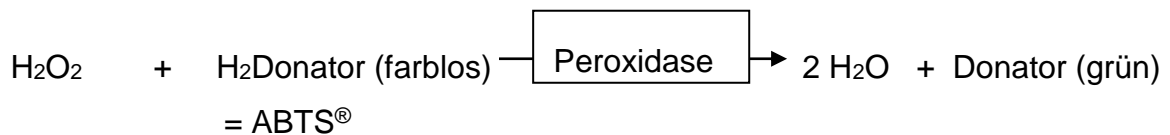
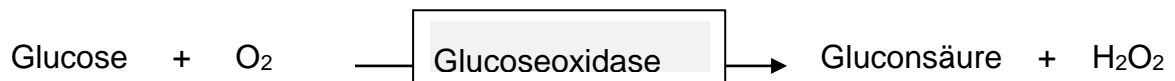
Als einfach zu handhabendes Modell für einen aeroben Organismus dient Bäckerhefe. Durch Ermittlung der Geschwindigkeit des Glucoseverbrauchs (Glykolyse) unter aeroben Bedingungen in Abwesenheit und Anwesenheit eines Hemmstoffes wird die Zellatmung in den Hefezellen beobachtet.

Das Prinzip des Versuches wird experimentell ermittelt, indem man den

Glucoseverbrauch unter folgenden Inkubationsbedingungen bestimmt:

1. Hefesuspension unter aeroben Bedingungen
2. Hefesuspension unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit von Kaliumfluorid als Hemmstoff der Glykolyse

Die Glucosebestimmung erfolgt enzymatisch nach der Glucoseoxidase-Peroxidase Methode.



### Reagenzien

Für den Versuch werden folgende Lösungen und Materialien benötigt:

- 0,01 M Citrat Puffer, pH 5,4
- 30 mmol/L Glucoselösung
- 5 %ige vorbereitete Hefesuspension (befindet sich im Schüttler)
- 1,2 M Kaliumfluoridlösung
- GOD POD Glucosenachweisreagenz
- Glucosestandard 0,15 mmol/L
- Bechergläser, Reagenzgläser, Eppendorf-Gefäße, Pipetten
- Küvetten / Rührspatel
- Schüttler
- Zentrifuge
- Photometer, Wellenlänge 405 nm

Versuchsdurchführung:

**Ansatz A (A<sub>START</sub>, A1 – A3)**

Für jede Probe wird ein separates Becherglas verwendet.

Folgende Lösungen werden zusammenpipettiert:

1 mL Citratpuffer 0,01 M, pH 5,4

1 mL 5%-ige Hefesuspension

0,2 mL H<sub>2</sub>O dest. (entspricht Verdünnung durch Kaliumfluoridlösung bei Ansatz B)

**Proben unter Zusatz eines Hemmstoffes (B1 – B3)**

Folgende Lösungen werden zusammenpipettiert:

1 mL Citratpuffer 0,01 M, pH 5,4

1 mL 5%-ige Hefesuspension

0,2 mL Kaliumfluoridlösung 0,6 M

**Start des Glucoseabbaus:**

zu allen Proben (**A1 – A3, B1 – B3**, außer **A<sub>START</sub>**, siehe unten) geben Sie möglichst gleichzeitig 0,1 mL der Glucoselösung 30 mmol/L hinzu und starten die Stoppuhr:

Stellen Sie nun alle Proben auf den Schüttler.

Die Proben werden dem Pipettierplan entsprechend in zehnmütigem Abstand (**A<sub>START</sub>** (siehe unten), A1 und B1 nach 10 min, A2 und B2 nach 20 min usw.) vom Schüttler genommen, das Lösungsgemisch wird in je ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Hefezellen in der Zentrifuge (5 min, 50 % Leistung) abzentrifugiert. 500 µl der Überstände werden vorsichtig in jeweils ein neues Reagenzglas überführt und für die spätere Glucosebestimmung aufbewahrt.



### Ausgangswert ( $A_{START}$ )

Für den Glucose-Ausgangswert werden die Lösungen entsprechend dem Ansatz A (zunächst ohne Glucoselösung) in einem Becherglas gemischt.

Kurz vor der Zentrifugation der Ansätze A1 und B1 wird 0,1 mL der Glucoselösung 30 mmol/L hinzugefügt.

Das Lösungsgemisch wird entsprechend den Proben A1 und B1 in einem Zentrifugenröhrchen überführt und gemeinsam mit diesen Proben und einem Gegengewicht (Zentrifugenröhrchen mit der entsprechenden Menge  $H_2O$ ) zentrifugiert. So ist bei der Probe  $A_{START}$  die Inkubationszeit der Glucoselösung mit der Hefe = 0 min.

Nach Beendigung der Entnahme aller Proben ( $A_{START}$ , A1 – A3, B1 – B3) wird die Glucosebestimmung durchgeführt.

### Enzymatische Glucosebestimmung

Für die Glucosebestimmung werden folgende Ansätze in Halbmikroküvetten (Schichtdicke  $d = 1$  cm) pipettiert:

	Leerwert	Standard	Probe
<b>Aqua dest.</b>	0,1 mL		
<b>Standard-Glucose-Lösung</b>		0,1 mL	
<b>Probe</b>			0,1 mL
<b>Glucose-Nachweisreagenz</b>	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Um die Inkubationszeit für alle Proben gleich zu halten, geben Sie die Glucose-haltige Lösung in 30-sekundigen Abständen zu dem Glucose-Nachweisreagenz hinzu. Die Extinktionen werden in der gleichen Reihenfolge, ebenfalls in 30-sekundigen Abständen gemessen. Nach gründlichem Mischen mit dem Rührspatel wird bei 405 nm Wellenlänge im Photometer gemessen.

Auswertung:

Die Glucosekonzentrationen der Proben werden nach folgender Gleichung berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = \Delta E_{\text{Probe}} \times C_{\text{Standard}}(0,15 \text{ mmol/mL}) \div \Delta E_{\text{Standard}}$$

**Pipettierpläne**

<b>Ansatz A (aerob)</b>				
Becherglas Nr.	A <sub>START</sub>	A1	A2	A3
mL Citratpuffer 0,01 M, pH 5,4	1,0	1,0	1,0	1,0
mL H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	0,2	0,2
mL Glucose 30 mmol/l	0,1	0,1	0,1	0,1
mL Hefesuspension 5 %, in 0,01 M Citratpuffer, pH 5,4	1,0	1,0	1,0	1,0
Inkubationszeit (min)	0	10	20	30
E (405)				

Ansatz B (aerob mit Hemmstoff)				
Becherglas Nr.		B1	B2	B3
mL Citratpuffer 0,01 M, pH 5,4		1,0	1,0	1,0
mL H <sub>2</sub> O		-	-	-
mL Glucose 30 mmol/l		0,1	0,1	0,1
mL Kaliumfluorid 0,6 M		0,2	0,2	0,2
mL Hefesuspension 5 %, in 0,01 M Citratpuffer, pH 5,4		1,0	1,0	1,0
Inkubationszeit (min)		10	20	30
E (405)				
E (405) Standard 0,15 mmol/L				

## Elektronentransport in der Atmungskette: Cytochrom c und Cytochrom-c-Oxidase

Cytochrome sind redoxaktive Proteine, die bei allen Organismen mit Ausnahme einiger obligater Anaerobier vorkommen. Diese Proteine enthalten Hämgruppen, bei denen der Redoxstatus des zentralen Eisen-Ions während des Elektronentransports reversibel zwischen dem reduzierten Fe<sup>2+</sup> und dem oxidierten Fe<sup>3+</sup> wechselt. Die Hämgruppen der reduzierten Fe<sup>2+</sup>-Cytochrome haben im sichtbaren Bereich typische Absorptionsspektren, die drei Peaks aufweisen:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Der  $\alpha$ -Peak, der bei oxidiertem Fe<sup>3+</sup>-Cytochrom fehlt, wird bei einer für die jeweilige Cytochromart charakteristischen Wellenlänge bestimmt. Dieser Befund lässt sich zur

Unterscheidung der verschiedenen Cytochrome heranziehen. Reduziertes Cytochrom c, das in diesem Versuch verwendet wird, zeigt diesen Peak bei einer Wellenlänge von 551 nm (siehe Abbildung unten). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Cytochrome besteht darin, dass jede Gruppe von Cytochromen einen anders substituierten Porphyrinring, der das redoxaktive Eisenatom koordiniert, enthält. Im Falle der Cytochrome vom c-Typ bilden Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten, die an die Doppelbindungen der Porphyrinvinylgruppen addiert sind, Thioethergruppen zum Protein. Ein Histidin- und ein Methioninrest des Proteins bilden die axialen Liganden.

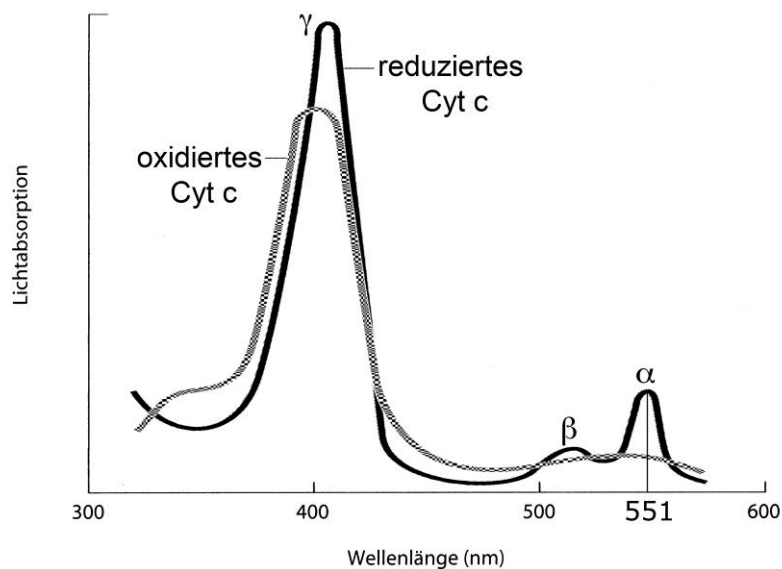
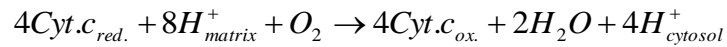


Abb. nach und zusätzlich modifiziert: Lehninger Biochemie. Nelson, Cox. Abb. 19-4, p. 717, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2001

Cytochrom c ist ein peripheres Membranprotein, das locker an die äußere Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran gebunden ist. Es bindet sich abwechselnd an Cytochrom-c<sub>1</sub> von Komplex III und an Cytochrom-c-Oxidase, wobei es als „Elektronen-Shuttle“ fungiert.

Cytochrom-c-Oxidase (siehe auch Vorbemerkung) katalysiert nacheinander die Oxidation von vier reduzierten Cytochrom-c Molekülen unter gleichzeitiger Reduktion

eines O<sub>2</sub>-Moleküls. Folgende Gesamtgleichung ergibt sich dabei:



|| Bereiten Sie die Reaktionsabfolge der Reduktion von O<sub>2</sub> durch Cytochrom-c-Oxidase unter Einbeziehung der redoxaktiven Zentren vor! ||

### Versuchsprinzip:

Die Bestimmung der Absorption von Cytochrom-c bei 550 nm ( $\alpha$ -Peak) in oxidiertem bzw. reduziertem Zustand dient als Messparameter um die Oxidation von Cytochrom-c durch Cytochrom-c-Oxidase darzustellen. Als „Cytochrom-c-Oxidase“ dient eine mittels Detergens aus Rinderherz erhaltene Suspension submitochondrialer Partikel. Das Enzym ist in hoher Aktivität darin enthalten. Um die Spezifität der Reaktion zu belegen, wird Kaliumcyanid als Inhibitor der Cytochrom-c-Oxidase eingesetzt.

### Reagenzien:

- Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,0
- Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,0 + 0,5% Tween 80
- Cytochrom-c-Lösung (oxidiert): c<sub>0</sub> = 5•10<sup>-5</sup> M (MG: 12400)
- Ascorbatlösung (frisch angesetzt) 0,04 M
- KCN-Lösung (Vorsicht!) 0,1 M
- Cytochrom-Oxidase-Suspension (wird ausgegeben):

### Durchführung der Versuche:

#### 1. Aufnahme der Absorptionsspektren:

Die Spektren werden mit einem Ultrospec II – Photometer gemessen und im Bereich von 350 bis 600 nm in 5 nm Schritten aufgenommen. Der jeweilige Wert wird

notiert und in ein xy-Diagramm (*x-Achse: nm, y-Achse:  $\Delta E$* ) auf Millimeterpapier eingetragen. y-Achse: 1 cm = 0,05 OD, x-Achse: 1 cm = 10 nm, Achsen weit links bzw. unten zeichnen!). Die Absorptionsmaxima werden abgelesen.

Es werden folgende Ansätze in Halbmikroküvetten pipettiert:

	Leerwert <sub>ox</sub>	Probe <sub>ox</sub>	Leerwert <sub>red</sub>	Probe <sub>red</sub>
Phosphatpuffer	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL
Cytochrom-c-Lösung	-	0,2 mL	-	0,2 mL
H <sub>2</sub> O	0,2 mL	-	0,2 mL	-
Ascorbatlösung	-	-	0,05 mL	0,05 mL

|| Überlegen Sie warum Ascorbat Cytochrom c reduziert! ||

2. Aufnahme der Absorption von Cytochrom-c in oxidiertem und reduziertem Zustand: Berechnung des differentiellen Extinktionskoeffizienten

Die Ansätze aus Versuch 1 werden bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Photometer gemessen. Führen Sie zunächst den Abgleich mit dem jeweiligen Leerwert durch und bestimmen Sie anschließend  $\Delta E$  der jeweiligen Probe. Notieren Sie sich die Werte und berechnen Sie den differentiellen Extinktionskoeffizienten (siehe Auswertung).

Cyt<sub>ox</sub>:

Cyt<sub>red</sub>:

3. Aufnahme der Absorptionsänderung des Cytochrom c in Abhängigkeit vom Redoxzustand: Einfluß von Ascorbat, Cytochrom-c-Oxidase und Cyanid

a) Es werden zwei Küvetten wie folgt angesetzt:

	Leerwert <sub>ox</sub>	Probe <sub>ox</sub>
Phosphatpuffer + 0,5% Tween 80	0,8 mL	0,8 mL
Cytochrom-c-Lösung	-	0,2 mL
H <sub>2</sub> O	0,2 mL	-

Die Ansätze werden bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Photometer gemessen. Führen Sie zunächst den Abgleich mit dem jeweiligen Leerwert durch und bestimmen Sie anschließend  $\Delta E$  der Probe (Zeitpunkt  $t = 0$ ).

b) Zusatz von einmalig 50  $\mu$ l Ascorbatlösung jeweils zum Leerwert und - nach dem Null-Abgleich - zur Probe, gut umrühren. Ablesen der  $\Delta E$ -Werte bis zum Erreichen eines Plateaus (max. 3 min). Zeiten und dazugehörige  $\Delta E$ -Werte in eine Tabelle eintragen.

c) Nach Ablauf dieser obigen Reaktion wird Cytochrom-c-Oxidase-Suspension (50  $\mu$ l) sowohl dem Leerwert (Null-Abgleich sofort durchführen) als auch der Probe zugesetzt. Anschließend wird die Lösung vorsichtig gemischt. Die Reaktion wird wie oben bis zum Erreichen eines zweiten (jetzt tieferen Plateaus) aufgezeichnet (max. 3 min).

d) Nach Erreichen eines annähernd konstanten Wertes werden sowohl dem Leerwert (Null-Abgleich) als auch der Probe 50  $\mu$ l KCN-Lösung (Vorsicht!) zugesetzt. Nach

dem Mischen werden die Werte wieder registriert, bis ein drittes (jetzt wieder höheres) Plateau erreicht wird.

e) Notieren Sie sich die Extinktionswerte für die stationären Zustände

1. Ausgangswert:
2. Ascorbatwert:
3. Cytochrom c Oxidase-Wert;
4. KCN-Wert:

Korrigieren Sie nun die Verdünnungen dieser Werte hin zu einem Volumen von 1 mL. Hierfür multiplizieren Sie die jeweiligen Extinktionswerte mit einem (jeweils eigenen) Verdünnungsfaktor. Dieser ergibt sich folgendermaßen:

G = Gesamtvolumen der Lösung in der Küvette [mL], jeweils unterschiedlich!

A = Ausgangsvolumen = 1 mL

Verdünnungsfaktor  $F = G / A$

Korrigieren Sie nun die Extinktionswerte!

#### Auswertung:

- Aufgabe 1: Bestimmen Sie die Wellenlängen der Absorptionsmaxima vor und nach der Zugabe von Ascorbat!
- Aufgabe 2: Berechnen Sie mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes den differentiellen Extinktionskoeffizienten aus den Extinktionen für Cytochrom c in oxidiertem und reduziertem Zustand (diese Werte wurden unter 2 bestimmt) und der zugehörigen Konzentration  $c_0$  für Cytochrom c

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

(E = Extinktion,  $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient in  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ , c = Konzentration in mol/L, d = 1 cm)



Der differentielle Extinktionskoeffizient wird berechnet wie folgt ( $c_0 = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/L):

$$\epsilon_{red-ox} = \frac{E_{red} - E_{ox}}{c_0 \cdot d}$$

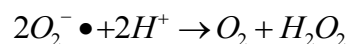
- Aufgabe 3: Errechnen Sie mit Hilfe des differentiellen Extinktionskoeffizienten die Konzentrationen an umgesetzten Cytochrom c ( $c_1, c_2, c_3$ ) für jeden der drei erreichten stationären Zustände.

$$c_i = \frac{E_{red} - E_{ox}}{\epsilon_{red-ox} \cdot d}$$

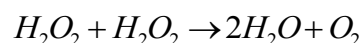
Geben Sie die Werte in % des gesamten Cytochroms c an.

### Protektive Oxidoreduktasen: die Katalasereaktion

Obwohl die katalytischen Strategien von Cytochrom-c-Oxidase und anderer Proteine, die  $O_2$  reduzieren dazu führen, dass die Freisetzung von Zwischenprodukten weitgehend vermieden wird, ist die Bildung kleiner Mengen von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid nicht zu vermeiden. Superoxidanionen werden zunächst durch das Enzym Superoxiddismutase in molekularen Sauerstoff und Wasserstoffperoxid jeweils oxidiert und reduziert:

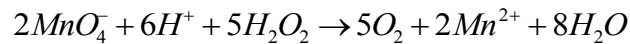


Das anfallende Wasserstoffperoxid wird von der ubiquitär vorkommenden Katalase ( $H_2O_2:H_2O_2$ -Oxidoreduktase) in einer Redoxreaktion zwischen zwei  $H_2O_2$ - Molekülen, also eine Disproportionierung, zu Wasser und molekularen Sauerstoff abgebaut:



Versuchsprinzip:

Die enzymatische Aktivität der Katalase wird bestimmt. Die Wirkung von Cyanid (CN<sup>-</sup>) Ionen auf die enzymatische Aktivität wird gemessen. Der Verbrauch an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird durch eine Redox titration mit Kaliumpermanganat ermittelt:



Stellen Sie die Redox teilgleichungen auf!
--

Reagenzien:

- Katalaselösung: 6,25 mg/mL, davon 100 µL mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 auf 10 mL verdünnen. Wie ist die neue Konzentration der Katalaselösung?
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Lösung (0,03%ig): 0,1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Lösung (30%ig) wird in einem Messkolben mit Aqua bidest. auf 100 mL aufgefüllt und im Eisbad aufbewahrt
- 10 %ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Vorsicht!)
- 5 mM KMnO<sub>4</sub>-Lösung
- 0,1 M KCN-Lösung (Vorsicht!)
- 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0

Durchführung der Versuche:

1. Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Menge in 10 ml der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung:

10 mL der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in einen Titrierkolben pipettieren. 10 mL Phosphatpuffer und 2 mL 10 %ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugeben, mit KMnO<sub>4</sub> bis zu schwacher Rosafärbung (weißes Papier unterlegen) tropfenweise titrieren. Bürettenvolumen ablesen und den Verbrauch an KMnO<sub>4</sub>-Lösung (mL) in die untenstehende Tabelle zur Berechnung eintragen.

2. Für jeden Ansatz (1-3) steht ein Erlenmeyerkolben zur Verfügung. Folgende Ansätze werden nacheinander vorbereitet:

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Phosphatpuffer	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL
Katalaselösung	1,0 mL	0,5 mL	0,5 mL
KCN-Lösung, <u>vor</u> der Katalaselösung hineinpipettieren!	-	-	20 µL

3. Nach 90 sec. vorsichtig jeweils 2 mL 10%-ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugeben, gut mischen und sofort mit KMnO<sub>4</sub>-Lösung titrieren. Den Verbrauch an KMnO<sub>4</sub>-Lösung (mL) in die untenstehende Tabelle (Spalte 3) eintragen und die Berechnungen durchführen. Die Titrationen erfolgen nacheinander!

Meßwerte und Auswertung:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Ansatz</b>	<b>Katalase- lösung</b>	<b>titrierte KMnO<sub>4</sub>- Lösung</b>	<b>titrierte KMnO<sub>4</sub>- Stoffmenge</b>	<b>berechnete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>verbrauchte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Absolute Enzymat. Aktivität U im Ansatz</b>	<b>Spezifische Aktivität der Katalase</b>	<b>Molekulare Aktivität der Katalase</b>
	(mL)	(mL)	( $\mu\text{mol}$ )	( $\mu\text{mol}$ )	( $\mu\text{mol}$ )	( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	(U/mg Enzym)	(U/ $\mu\text{mol}$ Enzym)
nur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-							
	1							
	0,5							
+ KCN	0,5							

Katalasestammlösung 6,25 mg Protein/mL

Katalaselösung, verdünnt: 100  $\mu\text{L}$  in 10 mL: Neue Konzentration?

3 KMnO<sub>4</sub>-lösung: 5 mmol/L (= 5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )

4 Umrechnen auf Stoffmenge: ml zu  $\mu\text{mol}$

5 Wieviel  $\mu\text{mol}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren mit 1  $\mu\text{mol}$  KMnO<sub>4</sub>? Siehe Reaktionsgleichung KMnO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ! Verbrauch  $\mu\text{mol}$  KMnO<sub>4</sub> als berechnete  $\mu\text{mol}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausdrücken.

6 Ziehen Sie den Wert aus Spalte 5 vom entsprechenden Wert für den Ansatz ohne Katalase ab = Reduktion durch Wirkung der Katalase.

7 Reaktionszeit von 90 Sekunden berücksichtigen! Verbrauch pro 90 sec zu Verbrauch pro min.

8 Wieviel mg Enzymprotein wurden jeweils eingesetzt? Verdünnung der Katalaselösung berücksichtigen. U pro eingesetzte Enzymmenge (Spalte 7) auf U pro 1 mg Enzym umrechnen.

9 U pro 1 mg Enzym (Spalte 8) auf U pro 1  $\mu\text{mol}$  Enzym umrechnen: Molare Masse der Katalase:  $M_r = 240000 \text{ g} = 1 \text{ mol}$ ; 240 mg = 1  $\mu\text{mol}$ ; 1 mg = 1/240  $\mu\text{mol}$ ; U pro 1 mg entspricht daher U pro 1/240 (=0,004167)  $\mu\text{mol}$  (Spalte 8). Auf 1  $\mu\text{mol}$  umrechnen!

Fragen:

1. In welchem Ansatz ist die absolute enzymatische Aktivität U am höchsten?

2. In welchem Ansatz ist die molekulare enzymatische Aktivität am höchsten?

Warum?