

Biologische Oxidation/Energiestoff- wechsel (V 8)

Biologische Oxidation/Energiestoffwechsel

Cytochrom c, Cytochromoxidase, Redoxsysteme

Einführung

Cytochrom c ist ein mitochondriales Hämoprotein und Bestandteil der Atmungskette. Es ist leicht isolierbar, leicht wasserlöslich und weist in wässriger Lösung ein Standardredoxpotential von + 264 mV auf. Seine molare Masse M beträgt aufgerundet 13.000 g/mol. Die Beobachtung von Änderungen des Redoxzustandes der Hämoproteine anhand ihrer spektralen Absorptionseigenschaften kann am Beispiel des Cytochroms c besonders leicht untersucht werden.

Die meisten Cytochrome besitzen sogenannte α -, β -, und γ -Absorptionsbanden. Die α -Banden liegen am weitesten im langwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums und werden in diesem Versuch messtechnisch angesprochen.

Cytochrom c reagiert außer mit seinen natürlichen Reaktionspartnern innerhalb der Atmungskette auch mit verschiedenen anderen Redoxsystemen als Elektronendonator oder -akzeptor. In den folgenden Versuchen wird als Oxidationsmittel Sauerstoff (aus der Luft) unter dem katalytischen Einfluß der Cytochromoxidase (Komplex IV der Atmungskette) eingesetzt. Die Reduktion wird hier durch Ascorbinsäure erzielt.

Als "Cytochromoxidase" dient eine mittels Detergens erhaltene Suspension von submitochondrialen Partikeln (SMP). Das Enzym ist darin in hoher Aktivität enthalten.

Für energetische Betrachtungen von Redoxsystemen ist der Zusammenhang zwischen dem Redoxpotential (ΔE) und der Änderung der freien Enthalpie des Systems (ΔG) von Bedeutung, der sich nach der reversiblen Thermodynamik wie folgt formulieren läßt:

$$\Delta G = - n \cdot F \cdot \Delta E$$

n = Anzahl der übertragenen Elektronen

F = Faraday-Konstante = 96 487 A · s · mol⁻¹

E = Redoxpotential in Volt

Aufgabenstellung

Es wird ein Teil der Atmungskette in vitro nachgebildet und verschiedene Energiezustände (Chemisches Gleichgewicht, Fließgleichgewicht) eingestellt. Gemessen wird die optische Dichte des Cytochroms c mit Hilfe eines Photometers bei 550 nm Wellenlänge.

Versuchsbeschreibungen

a) Material und Reagenzien:

Photometer, Küvetten
Pipetten: 5 mL, 0,5 mL, 20 μ L und 10 μ L
Phosphatpuffer 0,1 mol/L, pH 7,0

Cytochrom-c-Lösung (oxidiert): $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L
Ascorbatlösung (frisch) 0,04 mol/L

KCN-Lösung 0,1 mol/L (Vorsicht! KCN-Lösung nur mit Automatik-Pipetten pipettieren!)
Die Cytochromoxidase-Suspension wird vom Assistenten ausgegeben.

Alle Lösungen erst vollständig auftauen lassen und durchmischen.

b) Durchführung:

1. Aufnahme der Absorption von Cytochrom c in oxidiertem bzw. in reduziertem Zustand zur Berechnung des differentiellen Extinktionskoeffizienten

Zwei Küvetten ansetzen:

Referenz: 2,5 mL Phosphatpuffer, 0,5 mL Wasser.
Probe: 2,5 mL Phosphatpuffer, 0,5 mL Cytochrom-c-Lösung (oxidiert).

Abgleich des Photometers mit der Referenz bei 550 nm.
Ablese der Extinktion der Probe, Wert notieren.

Zugabe von je 40 μ L Ascorbatlösung **in Referenz und Probe**. Gut umrühren, 15 min. warten.
Erneuter Abgleich des Photometers mit der Referenz.
Ablese der Extinktion der reduzierten Probe, Wert notieren.

2. Aufnahme der Absorptionsänderung (Kinetik) des Cytochroms c in Abhängigkeit vom Redoxzustand:

Der Zeitverlauf der Cytochrom-c-Reduktion durch Ascorbat und die Einstellung verschiedener Redoxzustände werden in diesem Versuch dargestellt (Kinetik). In Abständen von **30 Sekunden** erfolgen Extinktionsmessungen. Dabei verbleibt die Probenküvette immer im Strahlengang. Die Messung wird bei 550 nm vorgenommen. Zu Beginn **und nach Zugabe von Cytochromoxidase** wird das Photometer gegen die Referenzlösung abgeglichen.

Zwei Küvetten ansetzen:

Referenz: 2,5 mL Phosphatpuffer, 0,5 mL Wasser, **20 μ L** Ascorbatlösung.
Probe: 2,5 mL Phosphatpuffer, 0,5 mL Cytochrom-c-Lösung (oxidiert).

Abgleich des Photometers mit der Referenz bei 550 nm, Ablesen der Extinktion der Probe (Zeitpunkt $t = 0$), dann

1. Zusatz von **20 μL Ascorbat in die Probe**, gut umrühren, Ablesen der Extinktionsänderungen alle 30 sec bis zum Erreichen eines Plateaus (ca. 10 min.). Zeiten und zugehörige Extinktionswerte in eine Tabelle eintragen.
2. Nach Ablauf dieser Reaktion wird **Cytochromoxidase-Suspension** (nach dem Volumen fragen) **sowohl der Probe als auch der Referenz** zugesetzt, und es wird gründlich umgerührt. Abgleichen gegen die Referenz, Aufnahme der Reaktion wie oben bis zum Erreichen eines zweiten (jetzt tieferen) Plateaus.
3. Nach Erreichen eines annähernd konstanten Wertes werden **sowohl der Referenz als auch der Probe 20 μL KCN-Lösung** (Vorsicht!) zugesetzt, und es wird wieder gut umgerührt. Registrieren, bis ein drittes (jetzt wieder höheres) Plateau erreicht wird.

3. Aufnahme von Cytochrom c – Spektren an Novaspec II - Photometern

1. Einrichtung von Photometer und Schreiber gemäß der aushängenden Anleitung
2. Küvetten ansetzen. Nach Zugabe von je 40 μl Ascorbatlösung in Probe 2 und 3 gut umrühren und 10 min warten.
3. Erstellen einer Basislinie
4. Messung der Spektren
 1. Probe: 2,5 mL Phosphat-Puffer + 0,5 mL Cytochrom c - Lsg. (ox.)
Spektrum von 325 bis 900 nm aufnehmen, mit Schreiber registrieren
 2. Probe: 2,5 mL Phosphat-Puffer + 0,5 mL Cytochrom c - Lsg. (ox.) + 40 μL Ascorbat-Lsg.
Spektrum von 325 bis 900 nm aufnehmen, mit Schreiber registrieren
 3. Probe: 3,0 mL Phosphat-Puffer + 40 μL Ascorbat - Lsg.
Spektrum von 325 bis 900 nm aufnehmen, mit Schreiber registrieren

Auswertung und Beantwortung von Fragen (Protokoll)

1. Berechnen Sie mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes den differentiellen Extinktionskoeffizienten aus den Extinktionen für Cytochrom c in oxidiertem und reduziertem Zustand und der zugehörigen Konzentration c_0 für Cytochrom c.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

c = Konzentration in mol/L

d = Schichtdicke in cm, (hier 1 cm)

Der differentielle Extinktionskoeffizient berechnet sich zu

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

2. Graphische Darstellung der Kinetik:
Zeichnen Sie auf Millimeterpapier den Verlauf der beobachteten Reduktions- und Oxidationsreaktionen hintereinander ein.
(DIN A4 quer; Ordinate: Extinktion; Abszisse: Zeit in min.)
3. Markieren Sie im Diagramm die Zustände des **Chemischen Gleichgewichtes** und des **Fließgleichgewichtes**.
4. Errechnen Sie mit Hilfe des differentiellen Extinktionskoeffizienten die Konzentrationen an reduziertem Cytochrom c (c_1 , c_2 , c_3) für jeden **dieser drei** erreichten stationären Redox-Zustände.

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

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

5. Formulieren Sie die gesamte Reaktionsfolge (ein Teil der Atmungskette!) im obigen Experiment, d.h. den Elektronenfluß zwischen Ascorbat und Sauerstoff, indem Sie es als **Fließgleichgewicht** darstellen und es in das Diagramm einzeichnen.
6. Auswertung der Spektren
Bestimmen Sie die Wellenlängen der Absorptionsmaxima nach Einteilung des Schreiberpapiers anhand des Vorschubs.
Wie verändert sich das Spektrum von Cytochrom c nach Zugabe von Ascorbat?
Warum ist die Aufnahme eines separaten Ascorbat - Spektrums notwendig