

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	2
1 Zusammenfassung	3
2 Einleitung	4
3 Material und Methoden	5
3.1 Messung der Absorptionsspektren	5
3.2.1 Kultivierung der Kartoffel	5
3.2.2 Herstellung des Enzymextrakts/Isolation der Succinatdehydrogenase	5
3.2.3 Kochen des Enzymextraktes	6
3.2.4 Messung des Substratumsatzes der Succinatdehydrogenase	6
4 Ergebnisse	8
4.1.1 Das Absorptionsspektrum der oxidierten Form des Cytochroms c	8
4.1.2 Das Absorptionsspektrum der reduzierten Form des Cytochroms c	8
4.2 Kompetitive Hemmung der Succinatdehydrogenase	9
5 Diskussion	10
5.1 Absorptionsspektren von Cytochrom c	10
5.2 Kompetitive Hemmung der Succinatdehydrogenase	10
6 Literatur	11

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ca.	zirka
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium
ddH ₂ O	Reinstwasser
DTT	Dithioeritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Tab.	Tabelle

1 Zusammenfassung

Die aerobe Dissimilation kann man in vier Schritten gliedern: Glykolyse, oxidative Decarboxylierung, Zitratzyklus und die Endoxidation an der Atmungskette. Die Atmungskette besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, unter anderem Cytochrom c, welches durch die prosthetische Gruppe Häm einen Elektronentransport ermöglicht. Diese unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der beiden Oxidationsstufen werden durch Analyse mit einem Spektralfotometer gezeigt. Es sind eine verschobene- und neue Absorptionsbanden zu erkennen.

Ein weiteres Protein, welches in der Elektronentransportkette involviert ist, wirkt zusätzlich in dem Zitratzyklus mit. Die Succinatdehydrogenase begünstigt die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Nach Isolation der Succinatdehydrogenase aus der Kartoffelknolle kann man mit Hilfe von künstlichen Protonenakzeptoren, wie z.B. 2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium (DCPIP), die Aktivität optisch quantifizieren. Bietet man zu dem eigentlichen Substrat noch ein Strukturähnliches an, so kann eine kompetitive Hemmung auftreten. Das Konkurrenzsubstrat bindet an das aktive Zentrum des Enzyms, reagiert aber nicht, so dass keine Protonenübertragung stattfinden kann.

2 Einleitung

Die aerobe Zellatmung lässt sich grob in vier Schritte untergliedern. Angefangen mit der Glykolyse, dann die oxidative Decarboxylierung, danach der Zitratzyklus und zum Schluss, der primär energieerzeugende Schritt, die Atmungskette. In den ersten drei Schritten der Zellatmung werden durch Hydrolyse Hydroniumionen und Elektronen erzeugt. Die Hydroniumionen liegen hierbei in gebundener Form wie $\text{NADH} + \text{H}^+$ oder FADH_2 vor und reagieren mit gasförmigen Sauerstoff und mit Hilfe der Cytochromoxidase zu Wasser. In der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran werden die Elektronen von einem Redoxpotentialgefälle zum elementaren Sauerstoff geleitet. Diese Elektronentransportkette besteht aus verschiedenen Proteinen, unter anderem dem Cytochrom c und der Succinatdehydrogenase.

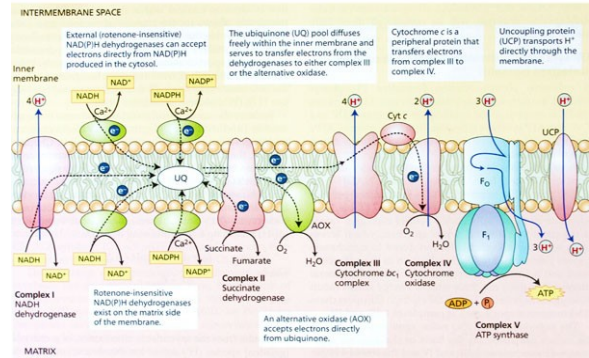


Abb. 1: Die Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran. (aus Plant Physiology, Taiz, Zeiger, Spektrum Verlag)

Das Cytochrom c gehört zu einer wichtigen Gruppe von Proteinen, die für viele Elektronentransportwege in lebenden Organismen elementar sind. Als anästhetische Gruppe enthält es ein Häm, welches durch Wechsel der Oxidationsstufen die Weitergabe der Elektronen ermöglicht. Diesen Wechsel der Oxidationsstufen kann man mit Hilfe eines Spektralfotometers messen.

Ein weiterer Baustein der Elektronentransportkette ist die Succinatdehydrogenase, welche einerseits im Rahmen des Zitratzyklus' Succinat zu Fumarat oxidiert und andererseits Elektron auf Ubichinon überträgt, welches zu Ubihydrochinon reduziert wird. Die Succinatdehydrogenase enthält sowohl als prosthetische Gruppe ein FAD, als auch noch Eisen-Schwefelcluster, welche beide in der Elektronenübertragung eine wichtige Rolle spielen.

Es gibt verschiedene Wege wie Enzyme gehemmt werden können. Bei der allosterischen Hemmung bindet ein Ion oder Molekül an das Proteingerüst eines Enzym und verändert dessen aktive Form, was einen Verlust der enzymatischen Funktion mit sich bringt. Ein anderer Weg ist das Vorhandensein eines Konkurrenzsubstrats. Es hat eine ähnliche Struktur wie das eigentliche Substrat und kann mit dem Enzym einen Enzym-Substrat-Komplex eingehen, jedoch findet keine Katalyse statt. Diese Hemmung wird kompetitive Hemmung genannt.

3 Material und Methoden

3.1 Messung der Absorptionsspektren

Spektrum des oxidierten Cytochroms: in eine Quarzküvette wird 1 mL ddH₂O (Reinstwasser) gegeben. Dazu wird mit einer Mikropipette 10 µL „Cytochrom c“-Lösung hinzu gegeben und mit einem Enzymspatel durch gerührt. Von der Lösung wird mit einem Spektralfotometer das Absorptionsspektrum im Bereich von 250 - 600nm gemessen.

Spektrum des reduzierten Cytochroms: in die Lösung der Quarzküvette aus dem ersten Versuchsschritt (Spektrum des oxidierten Cytochroms) wird eine Spatelspitze Dithioeritol (DTT) hinzu gegeben. Nach 30 Sekunden warten wurde erneut ein Absorptionsspektrum im Bereich von 250 - 600nm gemessen.

Geräte und Chemikalien:

Quarzküvette (Carl Roth),

Mikropipette (Eppendorf),

„Cytochrom c“-Lösung (Merck, Darmstadt),

Spektralfotometer (Analytik Jena „Spekol 1200“),

Dithioeritol (Sigma)

3.2.1 Kultivierung der Kartoffelknolle

Die Speicherknolle der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) wurde im Supermarkt gekauft.

3.2.2 Herstellung des Enzymextrakts/Isolation der Succinatdehydrogenase

Es wurden 60g gewaschene Knolle der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) in kleine Stücke geschnitten und in einem vor gekühlten Homogenisator mit 40 mL auf 4°C gekühlten Isolationsmedium homogenisiert.

Das entstandene Homogenisat wird durch eine Nylongaze in auf Eis stehende SS34-Zentrifugenbecher gegeben, welche 5 Minuten bei 4°C und 600xg zentrifugiert werden.

Der Überstand wird in saubere Zentrifugenbecher überführt und 15 Minuten bei 4°C und 13.000xg zentrifugiert.

Der Überstand wird nun verworfen. Das Sediment wird in 10 mL Waschmedium resuspendiert und erneut 15 Minuten bei 4°C und 13.000xg zentrifugiert.

Den Überstand erneut verwerfen und Sediment in 10 mL Waschmedium resuspendieren. Dieses Enzymextrakt, welches unter anderem die Succinatdehydrogenase enthält, wird auf Eis aufbewahrt.

Geräte und Chemikalien:

Homogenisator (Waring Commercial Blender),

Isolationsmedium:

- 0,4 M Saccharose (Applichem), 10 mM β -Mercaptoethanol (Serva), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (Boehringer Mannheim, Mannheim), 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 Puffer (Fluka), pH 6.8,

Nylongaze (40 μ m, Sefar GmbH, Wasserburg/Inn),

SS34-Zentrifugenbecher (Carl Roth),

Zentrifuge („Jouan“, Thermo Fisher Scientific),

Waschmedium:

- 0,4 M Saccharose (Applichem), 10 mM β -Mercaptoethanol (Serva), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (Boehringer Mannheim, Mannheim), 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 Puffer (Fluka), pH 6.8

3.2.3 Kochen des Enzymextraktes

Es werden 10 Minuten lang 1,5 mL vom Enzymextrakt in einem Reagenzglas mit Hilfe eines Wasserbades auf 100°C gekocht.

Geräte und Chemikalien:

Reagenzglas (Schott-Duran), Wasserbad 100°C (GFL, Burgwedel)

3.2.4 Messung des Substratumsatzes der Succinatdehydrogenase

Neben dem gekochten Enzymextraktes aus dem vorherigen Abschnitt („Kochen des Enzymextraktes“) werden vier weitere Reagenzgläser mit verschiedenen Mengen an Enzymextrakt, Substrat (Natrium-Succinat), Wasser und Hemmstoff (Natrium-Malonat) mit Hilfe von Glaspipetten und einem Saugball befüllt (siehe Tabelle 1). Als Wasserstoffakzeptor wird DCPIP hinzu gegeben, damit man den Substratumsatz der Succinatdehydrogenase optisch messen kann.

3 Materialien und Methoden

Nach Zugabe der Reaktionskomponenten wird noch ein wenig Paraffinöl hinzu gegeben, damit das DCPIP nicht durch Luftsauerstoff reoxidiert wird. Das Reaktionsgemisch wird in einem Wasserbad bei 40°C für 12 Minuten inkubiert.

Tab. 1: Die verschiedenen Konzentrationen des Substrates (Natrium-Succinat), Wassers und eines Hemmstoffes (Natrium-Malonat), dargestellt in einer Tabelle

	1	2	3	4	5
Enzymextrakt	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL (erhitzt)
DCPIP	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Na-Succinat	0,5 mL	0,5 mL	2,0 mL	-	2,0 mL
Na-Malonat	1,5 mL	-	-	-	-
H ₂ O	-	1,5 mL	-	2,0 mL	-
0,1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Geräte und Chemikalien:

Glaspipetten (Carl Roth), Saugball (Carl Roth), Paraffinöl (Merck), Wasserbad 40°C (Memmert, Schwabach)

4 Ergebnisse

4.1.1 Das Absorptionsspektrum der oxidierten Form des Cytochroms c

Im Absorptionsspektrum der oxidierten Form des Cytochroms c (siehe Abb.2) kann man drei Banden sehen. Die Bande mit der größten Extinktion ist die Bande "O2" und liegt ungefähr bei der Wellenlänge von 410 nm (siehe Tab.2). Zwei kleinere Banden (O1 und O3) liegen bei ungefähr 278 und 533 nm.

4.1.2 Das Absorptionsspektrum der reduzierten Form des Cytochroms c

Im Absorptionsspektrum der reduzierten Form des Cytochroms c (siehe Abb.2) kann man nun fünf Banden sehen. Offensichtlich handelt es sich bei der "R3"-Bande im Absorptionsspektrum der reduzierten Form, um die gleiche wie die "O2"-Bande im Absorptionsspektrum der oxidierten Form, nur dass sich hier das Maximum der Bande um ca. 5 nm und die Extinktion um ca. 0.04 erhöht hat. Außerdem hat sich bei der Bande "O1" die Extinktion erhöht, welche bei der analogen Bande "R1" nun bei ca. 0.25 liegt. Die Bande "R2" ist nur bei der reduzierten Form zu sehen. Die analoge Bande zur "O3"-Bande ist schwer zu bestimmen, da im Spektrum der reduzierten Form bei dieser Wellenlänge nun zwei Banden befinden.

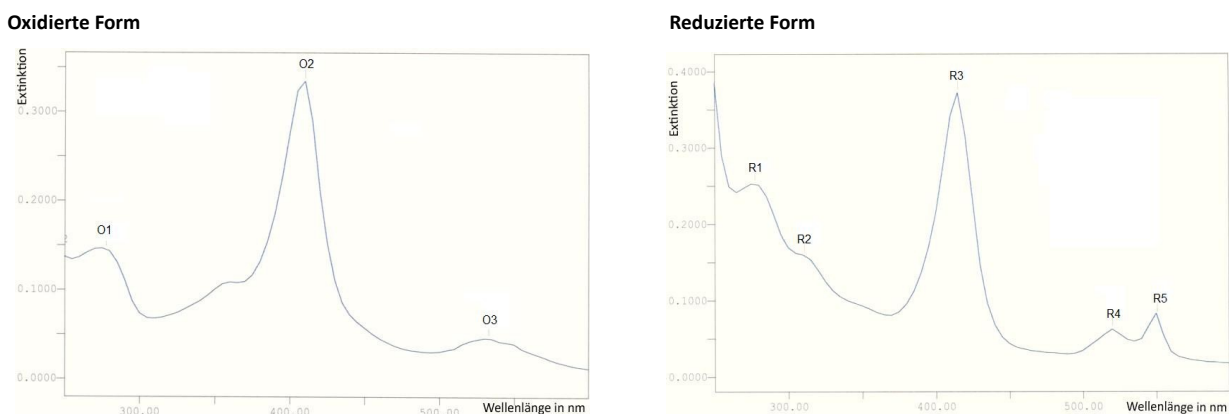


Abb.2: Die Absorptionsspektren des Cytochroms c, aufgetragen ist die Extinktion zur Wellenlänge in Nanometer. Bei der reduzierten Form sind mehr Absorptionsbanden zu erkennen.

Banden der oxidierten Form:

Bande	Wellenlänge [nm]	Extinktion
O1	277.59	0.1449
O2	409.85	0.3346
O3	532.82	0.454

Banden der reduzierten Form:

Bande	Wellenlänge [nm]	Extinktion
R1	277.29	0.2522
R2	310.58	0.1590
R3	414.95	0.3719
R4	519.92	0.0617
R5	550.51	0.0792

Tab.2: Die Wellenlängen und Extinktionen der beobachteten Banden

4.2.1 Kompetitive Hemmung der Succinatdehydrogenase

Nach der Inkubationszeit ist zu erkennen, dass sich die Reaktionsgemische vier und fünf gar nicht entfärbt haben (siehe Abb.3). Das Reaktionsgemisch drei zeigt die stärkste Entfärbung, gefolgt von Reaktionsgemisch zwei. Das erste Reaktionsgemisch zeigt eine leichte Entfärbung.

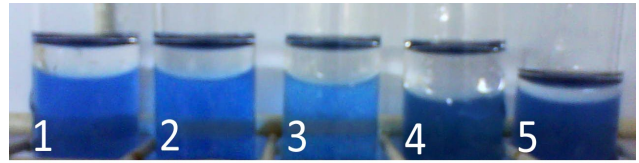


Abb.3: Die ...

5 Diskussion

5.1 Absorptionsspektren von Cytochrom c

Wie erwartet sind die Absorptionsspektren der oxidierten- und reduzierten Form des Cytochroms unterschiedlich. In beiden Spektren sind analoge Banden zu identifizieren, z.B. die „O2“- und „R3“-Bande. Diese besitzen einerseits außergewöhnlich große Extinktionen, andererseits befinden sich die Maxima auf einer ähnlichen Wellenlänge um ca. 410 nm. Wenn man in den niedrigeren Wellenlängenbereich geht, erkennt man, dass dort eine neue Absorptionsbande (R2) hinzugekommen ist. Bei den höheren Wellenlängenbereichen zwischen 500 und 550 nm ist es schwieriger analoge Banden zwischen den beiden Formen des Cytochroms c zu finden, da in diesem Bereich im Absorptionsspektrum der oxidierten Form eine Bande (O3) und bei der reduzierten Form zwei Banden (R4 und R5) zu sehen sind, die ungefähr gleich weit von der „O3“-Bande entfernt sind. Es sind also bei der reduzierten Form des Cytochroms c neue Banden hinzugekommen, die womöglich dem zusätzlichen Elektron des Eisen-II-Ions der Häm-Gruppe zuzuschreiben sind.

5.2 Kompetitive Hemmung der Succinatdehydrogenase

Nach Denaturierung der Proteine, durch Kochen des Reaktionsgemisch, ist keine Entfärbung zu erkennen (Abb.4), da hier keine Wasserstoffe auf das DCPIP übertragen wurde. Auch bei dem vierten Reaktionsgemisch ist keine Entfärbung zu sehen, da hier kein Substrat im Form des Succinats vorhanden war, welches als Wasserstoffquelle dienen konnte. Das dritte Reaktionsgemisch hat sich am stärksten entfärbt, da hier das Enzym ungehemmt vom Substrat Succinat die Wasserstoffe auf DCPIP übertragen konnte. Dadurch, dass die reduzierte Form von DCPIP farblos ist, kann man den Umsatz auch quantitativ auswerten. Im zweiten Reaktionsgemisch war nur ein viertel des Substrat vorhanden, so dass folglich auch weniger Substratumsatz zu beobachten war. Im ersten Reaktionsgemisch war zusätzlich noch das zum Succinat strukturähnliche Malonat vorhanden, welches den Umsatz des Substrates gehemmt hat, so dass hier eine niedrigere Entfärbung als im zweiten Reaktionsgemisch zu beobachten ist.

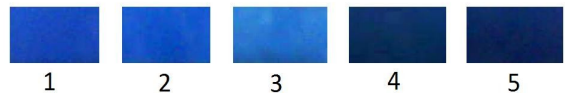


Abb.4: Die Färbungen der Reaktionsgemische

6 Literatur