



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“

**4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymo(si) metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

---

## **BIO 321. BIOCHEMIJA**

Laboratorinis darbas

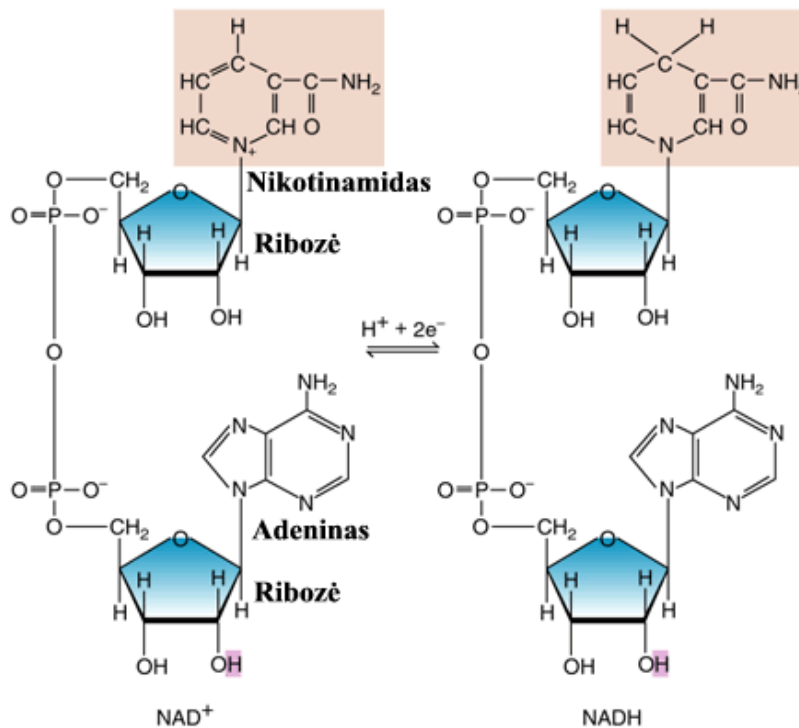
### **Mitochondrijų NAD(P)H fluorescencijos kitimai**

**Nikotinamidadenindinukleotidas (NAD) ir Nikotinamidadenindinukleotido fosfatas (NADP)** yra fermentų dehidrogenazių kofermentai. **Kofermentas, koenzimas** - mažos molekulinės masės organinis junginys, fermento aktyviojo centro dalis. Nuo substratų kofermentai paprastai skiriasi tuo, kad jie dažniausiai yra regeneruojami, nesusinaudoja vykstant apykaitai. Tačiau kartais kofermentai gali būti laikomi kosubstratais, nes jie dalyvauja reakcijose kiekiškai, stochiometriškai pagal reakcijos lygtį atitinkančiais substratų kiekius. Kai kuriais atvejais kofermento dalyvavimas reakcijoje ne mažiau svarbus fiziologiškai, nei substrato virtimas produktu - tarkim, anaerobinėms sąlygom raumenyse piruvatas virsta laktatu kartu su NADH oksidacija iki  $\text{NAD}^+$ . Be  $\text{NAD}^+$  negali vykti glikolizė, anaerobinė ATP sintezė.

Oksidoreduktazės, kurių kofermentas yra NAD, vadinamos **NAD-priklausomomis dehidrogenazėmis**. Jų kofermentas NAD nėra kovalentiškai sujungtas su apofermentu. NAD-priklausomų dehidrogenazių yra ir citoplazmoje, ir mitochondrijų matrikse. Ląstelės membranos nelaidžios kofermentams, todėl susidaro erdviškai atskirti jų fondai, pvz., citozolio ir mitochondrijų NAD/NADH fondai. Kiekvienoje iš šių membranomis erdviškai atskirtų ląstelės dalių esančioms dehidrogenazėms prieinamas to erdvės skyriaus piridino nukleotidų (NAD/NADH) sankaupa. Mitochondrijose susidaręs NADH

tiesiogiai oksiduojamas kvėpavimo grandinėje. Citoplazmos NADH negali būti tiesiogiai oksiduojamas kvėpavimo grandinėje. Jis patenka į mitochondrijas savotiškos pernašos, vadinamųjų malat-aspartato arba gliceraldehid-3-fosfato šuntų pagalba.

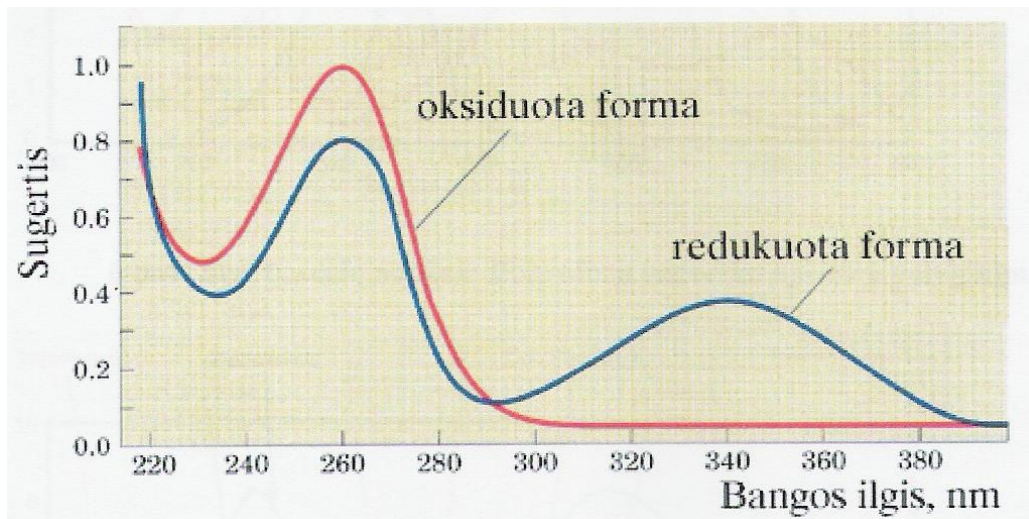
**NAD(P)H cheminė struktūra.** Piridino dinukleotidai – nikotinamido adenino dinukleotidas ( $\text{NAD}^+$ ) (6 pav.) ir nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas ( $\text{NADP}^+$ ) (1 pav.). Šie kofermentai vadinami piridino kofermentais, nes savo molekulėse turi piridino žiedą (nikotinamidas). Jie vadinami dinukleotidais, nes jų struktūrą sudaro du mononukleotidai (fosforilintos adenilil-ribozė ir nikotinamido ribozė), sujungtos fosfodiesterine jungtimi.  $\text{NADP}^+$  molekulė turi dar vieną fosforo rūgšties grupę, prijungtą prie AMP-ribozės antrojo C atomo (1 pav.).



**1 pav.** Nikotinamidadenino dinukleotidas ( $\text{NAD}^+$ ), jo redukuota forma ( $\text{NADH}$ ). Rausvai pažymėtas vandenilio atomas  $\text{NADP}^+$  ir  $\text{NADPH}$  molekulėje pakeistas fosfato grupe. <http://fig.cox.miami.edu>.

Redukcijos metu prie nikotinamido žiedo C-4 atomo prisijungia hidrido anijonas  $H^-$ , turintis du elektronus. Kartu kinta *para* padėtyje esančio teigiamą krūvį turinčio N atomo valentingumas ir dvigubų ryšių išsidėstymas piridino žiede, bei susidaro  $H^+$  jonas, kuris pereina į terpę. Nors  $NAD^+$  ir  $NADP^+$  cheminė sudėtis yra panaši, bet jų biologinės funkcijos yra skirtingos.  $NAD^+$  dažniausiai dalyvauja oksidacijos procesuose, o jo fosfatas – redukcijos (biosintezės) procesuose.

**NAD(P)H spektrinės savybės.** Piridino dinukleotidų sugebėjimą sugerti šviesą lemia adenino ir nikotinamido žiedai. Adenino žiedui būdingas sugerties maksimumas ties 260 nm bangos ilgiu, jis nepriklauso nuo piridino žiedo redukcijos laipsnio, todėl vienodas visoms piridino nukleotidų formoms ( $NAD^+$ , NADH,  $NADP^+$ , NADPH). Piridino žiedas sugeria šviesą tik redukuotos būsenos, jo šviesos sugerties maksimumas yra ties 340 nm ir būdingas tik NADH ir NADPH. Oksiduotos piridino nukleotidų formos 340 nm bangos ilgio šviesos nesugeria. Redukuotos formos (NADH ir NADPH) yra natūralūs endogeniniai ląstelės fluoroforai. Sugėrus 340 nm bangos ilgio šviesą jų molekulės sužadinamos ir fluorescuoja, išspinduliuodamos 470 nm bangos ilgio šviesą (2 pav.), kurios intensyvumą lemia elektroninių bei molekulinė orbitalių išsidėstymas NAD(P)H molekulėse.



**2 pav.** Piridino dinukleotidams būdingas sugerties spektras. Raudona linija – oksiduotų formų sugerties spektras, mėlyna – redukuotų formų sugerties spektras.

NADH ir fosforilintos jo formos NADPH sužadavimo ir fluorescencijos spektrai nesiskiria ir pastovaus bangos ilgio fluorescencijos metodas negali jų kokybiškai išskirti, todėl matuojama bendra NADH ir NADPH fluorescencija.

Dėka NADH ir NADPH spektrinių savybių, jų koncentracija biologiniuose tirpaluose yra nustatoma spektrofotometriškai. Baltymų tirpaluose, organelių ir ląstelių suspensijose NAD(P)H koncentracija arba jos kitimai nustatomi matuojant šviesos sugertį, esant 340 nm bangos ilgiui arba fluorescenciją (sužadavimo šviesos bangos ilgis 340 nm, emisijos – apie 470 nm), pastarasis metodas yra ~10 kartų jautresnis [29]. Tiriant sudėtingesnius objektus, dėl mažo laidumo šviesai, vidinio filtro ir audinio šviesos išsklaidymo efektų, tikslūs tiesioginiai sugerties matavimai nėra galimi. Piridino dinukleotidų kiekis tokiuose biologiniuose objektuose gali būti nustatomas šiais metodais:

1. Ekstrahuojant audinio mėginius (biopsijas) ir nustatant NAD(P)H koncentracija juose chromatografijos arba fermentiniais metodais (spektrofotometru arba spektrofluorimetru);

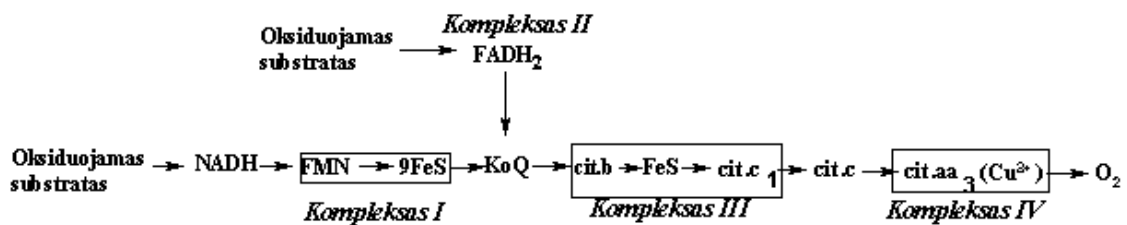
2. Audinių arba organų paviršiaus fluorimetrija. Tokiems matavimams gali būti taikomi optinio pluošto technologija arba CCD kamerų panaudojimu pagrįsti metodai.

3. Fluorescentinės mikroskopijos dėka galima įvertinti ne tik NAD(P)H, bet ir kitų gamtinių arba sintetinių fluoroforų pasiskirstymą biologiniuose objektuose. Šis metodas leidžia mikroskopiniame lygmenyje nustatyti fluoroforo buvimo vietą ląstelės viduje arba audinio pjūvyje, taip pat suteikia informacijos apie fluoroforą supančią aplinką. Fluorescencijos registravimui naudojama foto-, video-, CCD kameros arba optinio pluošto laidas.

**Mitochondrijos ir jų funkcijos.** Mitochondrijos, ląstelių organelės, turinčios DNR ir atskirtos nuo citozolio dviguba membrana. Daugumoje žinduolių ląstelių didžioji dalis ląstelės ATP yra sintezuojama mitochondrijose oksidacinio fosforilinimo metu. Energijos, atsipalaiduojančios įvairių substratų oksidacijos metu, transformacija į ATP cheminius ryšius yra viena iš pagrindinių šių organelių funkcijų. Išorinė mitochondrijų membrana yra sąlyginai laidi mažoms (iki maždaug 1000 Da), neigiamai įkrautoms molekulėms (nukleotidams, fosforilintiems junginiams), nes membranoje yra daug

baltymo porino, kuris formuoja kanalus. Vidinė mitochondrijų membrana nėra laidus jonams ir hidrofiliniams metabolitams. Čia jonų ir kitų junginių pernaša vyksta dalyvaujant specifiniams nešikliams.

Piruvato, TKR tarpinių junginių ir riebalų rūgščių oksidacijos mitochondrijų užpilde metu pasigamina redukuojantys ekvivalentai NADH ir FADH<sub>2</sub>, kurie panaudojami elektronų pernašai kvėpavimo grandinėje (3 pav.). Kvėpavimo grandinės keturi kompleksai (NADH dehidrogenazė, sukcinato dehidrogenazė, kofermento Q-citochromo c oksidoreduktazė, citochromo c oksidazė arba I, II, III, IV kompleksai, atitinkamai) yra vidinėje mitochondrijų membranoje. Du jūdriji elektronų nešikliai (lipiduose tirpus kofermentas Q ir vandenyje tirpus citochromas c) perneša elektronus tarp kompleksų. Kvėpavimo grandinės kompleksai turi didėjantį standartinį potencialą. Tai sudaro sąlygas savaime perduoti elektronus nuo NADH ar kitų elektronų donorų per kompleksus molekuliniam deguoniui. NADH oksidacijos metu elektronai perduodami per I, III, IV kompleksus, tuo tarpu sukcinato oksidacijos atveju, elektronai perduodami per II, III ir IV kompleksus. Išskyrus II kompleksą, elektronų perdavimas yra apjungtas su protonų išmetimu iš mitochondrijų užpildo į tarpmembraninę erdvę. Vidinės membranos nelaidumas protonams lemia elektrocheminio protonų gradiento ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) susidarymą. Tokiu būdu dalis savaiminio elektronų perdavimo laisvosios energijos yra verčiama elektrocheminio protonų gradiento energija. Elektrocheminis protonų potencialas yra energijos forma, naudojama įvairiuose procesuose, bet didžiausia jos dalis panaudojama ADP fosforilinimui. Šią reakciją katalizuoja sudėtingas vidinės membranos fermentas ATP-sintazė, kartais vadinamas V kompleksu.



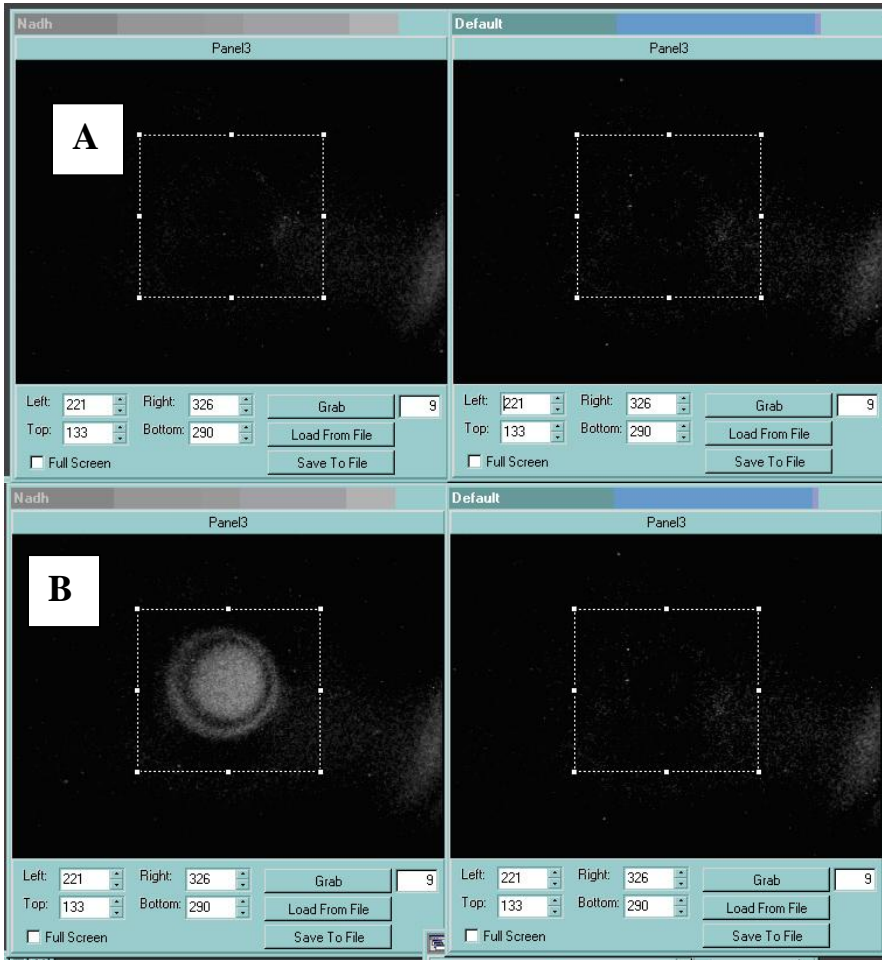
3 pav. Mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų schema.

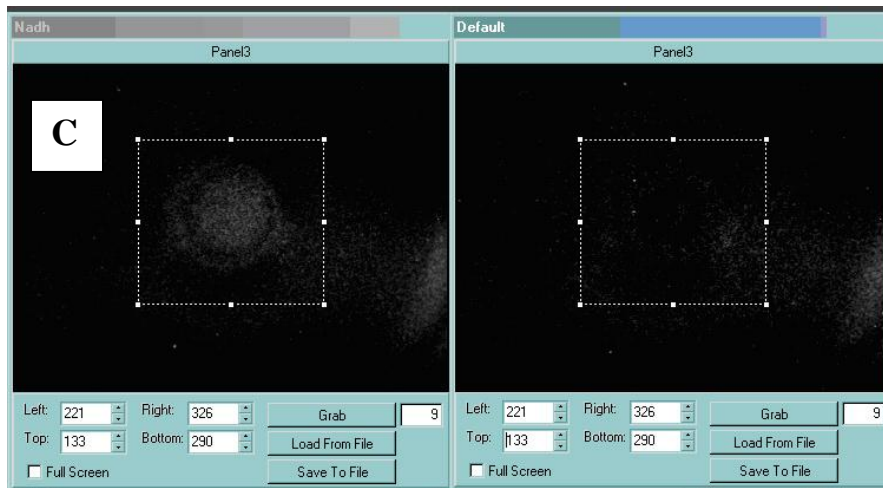
Kaip teigia P. Mitčelo pasiūlyta chemiosmozinė oksidacinio fosforilinimo teorija, elektrocheminis protonų gradientas yra ATP sintezės iš ADP ir neorganinio fosfato dalyvaujant ATP sintazei varomoji jėga.

Oksidacinio fosforilinimo procesui vykti, būtinas nuolatinis ADP tiekimas į mitochondrijų užpildą. Tačiau daugelis ATP vartojančių vyksmų yra citozolyje ar kitose organelėse, todėl pagamintas mitochondrijų užpilde ATP turi išeiti iš mitochondrijų. Vidinės mitochondrijų membranos baltymas, vadinamas adenino nukleotidų nešikliu (ANT), maino užpildo ATP į citozolinį ADP.

Oksidacinis fosforilinimas yra dviejų procesų – substratų oksidacijos ir ADP fosforilinimo junginys. Kad vyktų oksidacinis fosforilinimas yra reikalingi du substratai tai kvėpavimo substratas, juo gali būti piruvatas, ar kitas Krebso ciklo tarpinis metabolitas, kurio oksidacijos metu susidaro redukuoti kof fermentai (NADH ir FADH<sub>2</sub>), ir ADP.

Registruojant mitochondrijų funkcijas *in vitro* šiuos procesus galima įvertinti atskirai. Kai į mitochondrijų inkubavimo terpę yra pridodamas tik kvėpavimo substratas, jis yra oksiduojamas susidarant NADH ir FADH<sub>2</sub>, šie metabolitai toliau nėra oksiduojami kvėpavimo grandinėje, nes procesą stabdo susidaręs aukštas elektrocheminis protonų gradientas. Tokia mitochondrijų būseną yra vadinama antrąja metaboline būseną. Kai į terpę yra pridodamas fosforilinimo sistemos substratas ADP, ATP sintazė panaudodama elektrocheminio protonų gradiento formoje sukauptą energiją, sintetina ATP. Elektrocheminis protonų gradientas mažėja NADH ir FADH<sub>2</sub> yra oksiduojami kvėpavimo grandinėje, jų kiekis mažėja ir susidaro NAD<sup>+</sup> ir FAD bei H<sub>2</sub>O. Tokia mitochondrijų būseną yra vadinama trečiąja metaboline būseną. Jei mitochondrijų kvėpavimo substratas yra oksiduojamas NADH priklausomų dehidrogenazių (piruvatas, glutamatas ir kt.), tuomet u pagal redukuoto NADH kiekio kitimus galima įvertinti mitochondrijų metabolinę būseną, jų kokybę. Antroje metabolinėje būsenoje yra susikaupęs redukuotas NADH, todėl šioje būsenoje mitochondrijų NAD(P)H fluorescencija yra santykinai didelė (4 pav, B). Mitochondrijoms pereinant į trečią metabolinę būseną, NADH yra oksiduojamas jo kiekis mitochondrijose mažėja ir NAD(P)H fluorescencija mažėja (4 pav., C).





**4pav.** Mitochondrijų NAD(P)H fluorescencija, nuotraukos darytos CCD kamera CPL-22B (Canadian Photonics Labs, Computar objektyvas ( $f = 25 \text{ mm}$ ,  $1:1.8$ ). Fluorescencijos intensyvumą galima įvertinti santykiniais vienetais pagal apšviestumą. A – į matavimo kiuvetę pridėta tik inkubavimo terpė; B – mitochondrijų antroje metabolinėje būsenoje NAD(P)H fluorescencija; C – mitochondrijų trčioje metabolinėje būsenoje NAD(P)H fluorescencija; Paveiklų dešinėje pusėje palyginimo terpės (bidistiliuoto vandens fluorescencija)

#### **DARBO TIKSLAS:**

Įvertinti mitochondrijų NAD(P)H fluorescencijos kitimus *in vitro*, priklausomai nuo mitochondrijų metabolinės būsenos ir pridėtų kvėpavimo grandinės bei fosforilinimo sistemos fermentų inhibitorių.

#### **DARBO UŽDUOTYS:**

1. Nustatyti mitochondrijų NAD(P)H fluorescenciją mitochondrijų antroje ir trečioje metabolinėse būsenose, kai kvėpavimo substratas yra piruvatas + malatas.
2. Nustatyti mitochondrijų NAD(P)H fluorescenciją kai į matavimo terpę yra pridėtas kvėpavimo grandinės I komplekso slopiklis rotenonas. Paaikinti NAD(P)H fluorescencijos pasikeitimo priežastis.
3. Nustatyti mitochondrijų NAD(P)H fluorescenciją kai į matavimo terpę yra pridėtas ATP sintazės slopiklis oligomicinas. Paaikinti NAD(P)H fluorescencijos pasikeitimo priežastis.



### **DARBO PRIEMONĖS:**

1. Fluorimetras;
2. Svarstyklės;
3. Vandens termostatas;
4. Automatinės pipetės ir mikrošvirkštai;
5. Mėgintuvėliai, maišyklės ir kt.

### **MEDŽIAGOS, REAGENTAI, TIRPALAI:**

1. kepenų mitochondrijų suspensija;
2. Inkubavimo terpė (IT): KCl 110 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,24 mM; Tris-HCl 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, pH 7,2 (37°C temperatūroje).
3. Piruvato + malato tirpalas (0,5 M + 0,5 M);
4. Rotenono tirpalas 1mM;
5. ADP tirpalas 0,1M;
6. Oligomicino tirpalas 0,5mg/ml spirito.

### **DARBO EIGA:**

1. Mitochondrijų inkubavimo terpė (IT) laikoma termostate 37 °C.
2. Į fluorimetro kiuvetę kiuvetę įpilama 2 ml IT, pridedama 20 µl piruvato + malato tirpalo. Kiuvetė uždaroma kamščiu dedama į fluorimetro Tecan GENios Pro<sup>TM</sup> (Tecan Group Ltd., Menedorfas, Šveicarija) termostatuojamą kamerą. Taikant XFluor<sup>TM</sup> kompiuterinę programą (Tecan Group Ltd., Menedorfas, Šveicarija), nustatomas sužadavimo bangos ilgis 340±10 nm, emisijos bangos ilgis - 450±10 nm., termostato temperatūra 37 °C. 2 min. matuojama NAD(P)H fluorescencija, rezultatai pateikiami santykiniais vienetais.
3. Į fluorimetro kiuvetę kiuvetę įpilama 2 ml IT, pridedama 20 µl piruvato + malato tirpalo ir mitochondrijų suspensijos 2 mg baltymo /ml (antroji metabolinė mitochondrijų būseną). Kiuvetė uždaroma kamščiu, turinys lėtai vartant sumaišomas ir kiuvetė patalpinama į fluorimetru termostatuojamą kamerą (37 °C)

- ir 2 min. matuojama NAD(P)H fluorescencija, esant toms pačioms eksperimentinėms sąlygoms (prietaiso jautrumas, matavimo laikas ir kt.).
4. Išimama kiuvetė, pridedama 20  $\mu$ l ADP (0,1 M) tirpalo, kiuvetės turinys sumaišomas ir kiuvetė vėl patalpinama į fluorimetro kamerą ir išmatuojama NAD(P)H fluorescencija (trečioji metabolinė mitochondrijų būseną).
  5. Kiuvetė išimama išpilamas turinys ir kiuvetė atsargiai išplaunama 4 – 5 kartus bedestiliuotu vandeniui.
  6. Į fluorimetro kiuvetę kiuvetę įpilama 2 ml IT, pridedama 20  $\mu$ l piruvato + malato tirpalo, pridedama mitochondrijų suspensijos 2 mg baltymo/ml ir pridedama 5  $\mu$ l rotenonu tirpalo. Kiuvetė uždaroma kamščiu, turinys lėtai vartant sumaišomas ir kiuvetė patalpinama į fluorimetru termostatuojamą kamerą (37 °C) ir 2 min. matuojama NAD(P)H fluorescencija, esant toms pačioms eksperimentinėms sąlygoms (prietaiso jautrumas, matavimo laikas ir kt.).
  7. Išimama kiuvetė, pridedama 20  $\mu$ l ADP (0,1 M) tirpalo, sumaišomas turinys ir kiuvetė vėl patalpinama i fluorimetru kamerą ir išmatuojama NAD(P)H fluorescencija.
  8. Į fluorimetro kiuvetę kiuvetę įpilama 2 ml IT, pridedama 20  $\mu$ l piruvato + malato tirpalo, pridedama mitochondrijų suspensijos 2 mg baltymo/ml ir pridedama 5  $\mu$ l oligomicino tirpalo. Kiuvetė uždaroma kamščiu, turinys lėtai vartant sumaišomas ir kiuvetė patalpinama į fluorimetru termostatuojamą kamerą (37 °C) ir 2 min. matuojama NAD(P)H fluorescencija, esant toms pačioms eksperimentinėms sąlygoms (prietaiso jautrumas, matavimo laikas ir kt.).
  9. Išimama kiuvetė, pridedama 20  $\mu$ l ADP (0,1 M) tirpalo, sumaišomas turinys ir kiuvetė vėl patalpinama i fluorimetru kamerą ir išmatuojama NAD(P)H fluorescencija.
  10. Tokie bandymai pakartojami keletą kartų. Apskaičiuojamas fluorescencijos vidurkis esant toms pačioms matavimo sąlygoms (kai kiuvetėje yra tos pačios medžiagos) ir duomenys patalpinami į lentelę.

<b>NAD(P)H fluorescencija, santykiniais vienetais</b>					
Matavim o	Mit. inkubavimo	Antroji mitochondrijų	Trečioji mitochondrijų	Matavimo terpė, mit.,	Matavimo terpė, mit.,

Matavimo Nr. \ sąlygos	terpė piruvatas malats	ir +	metabolinė būsena	metabolinė būsena	piruvatas malatas, rotenonas, ADP	piruvatas malatas, oligomicinas, ADP
1.						
2.						
3.						
Vidurkis						

11. Teoriškai pagrįskite tokius NAD(P)H fluorescencijos pokyčius ir pagrįskite darbo išvadą.

#### LITERATŪRA:

1. Lakowicz JR, Szmacinsk H, Nowaczyk K, and Johnson ML. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Feb 15;89(4):p.1271-1275.
2. Goldenthal, M.J. and J. Marín-García, *Mitochondrial signaling pathways: A receiver/integrator organelle*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004. **262**(1): p. 1-16.
3. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, 1961. **191**(4784): p. 144-148.
4. Minet O., Beuhtan J., Mildaziene V., Baniene R.. Fluorescence techniques in biomedicine: from the monitoring of cell metabolism to image processing in cancer detection. Annual Review of Fluorescence, 1, 2004, 195-219.
5. Zukiene R., Dapkunas A., Cizas P., Buzaitė O., Nauciene Z., Baniene R., Zabarylo U., Minet O., Mildaziene V. Hyperthermia modulates the effect of Ca<sup>2+</sup> overload on respiration and NAD(P)H fluorescence in rat heart mitochondria. Biologija (Vilnius), 2006, 3, 47-52.

