

## Biochemia - laboratorium

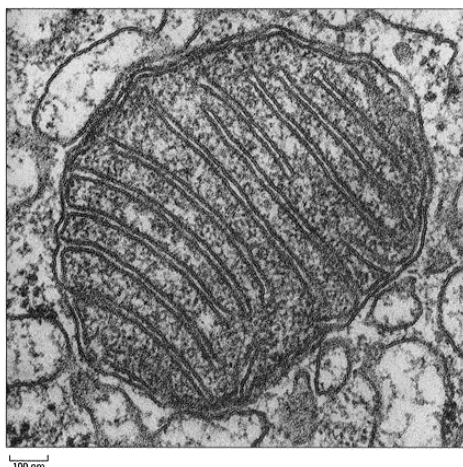
### ***Izolacja mitochondriów z komórek eukariotycznych***

Ćwiczenie i instrukcję przygotował: dr inż. Andrzej Składanowski

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodą izolacji mitochondriów z komórek eukariotycznych i oznaczanie aktywności znacznikowego enzymu mitochondrialnego – dehydrogenazy bursztynianowej.

#### **WSTĘP**

Mitochondria występują w prawie wszystkich komórkach eukariotycznych i pełnią w komórce ważne role w metabolizmie i oddychaniu tlenowym. Następuje w nich konwersja energii do form możliwych do użycia jako źródła energii w reakcjach chemicznych jakie zachodzą w mitochondrium oraz komórce. W mitochondrium prowadzone są różne rodzaje reakcji anaboliycznych i katabolicznych m.in. cykl kwasów trójkarboksylowych (Krebsa), reakcje łańcucha oddechowego,  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych, część etapów syntezy mocznika i układu porfirynowego, synteza długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.



Rys. 1 Przekrój przez mitochondrium pokazujący strukturę „grzebieniową”.

Organelę tę przedstawia się zwykle jako wydłużony cylinder o wymiarach 0.5-1  $\mu\text{m}$  (jest wymiar zbliżony do rozmiaru bakterii). Trzeba jednak pamiętać, że mitochondria są bardzo plastyczne strukturalnie i mogą zmieniać kształt, podlegać fuzji pomiędzy sobą i ponownemu rozłączeniu. W cytoplazmie są zwykle związane z cytoszkieletem a dokładnie z mikrotubulami, stąd stopień i kierunek polimeryzacji mikrotubul wpływa na orientację i rozmieszczenie mitochondriów w komórce. W zależności od rodzaju komórek mogą tworzyć przesuwające się łańcuchy mitochondrialne lub mitochondria mogą zajmować ustaloną pozycję w komórce i dostarczać ATP w miejscu gdzie jest ono zużywane. Dotyczy to szczególnie takich komórek jak komórki mięśnia sercowego lub wici plemnika.

Mitochondrium zbudowane jest z układu podwójnych błon (zewnętrznej i wewnętrznej), które dzielą tę organelę na dwa obszary funkcjonalne: przestrzeń międzybłonową i macierz mitochondrialną.

W **macierzy mitochondrium** znajdują się enzymy (kilkaset) o różnych funkcjach np. przeprowadzających reakcję utleniania pirogronianu, kwasów tłuszczowych, enzymy szlaku kwasu cytrynowego. W macierzy znajduje się również kilka kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA), rybosomy mitochondrialne, tRNA i enzymy potrzebne do ekspresji genów na matrycy mtDNA.

W **błonie wewnętrznej** znajdują się trzy typy białek 1) białka łańcucha oddechowego; 2) kompleks enzymatyczny syntazy ATP; 3) białka przenoszące (transportowe), które regulują przenoszenie metabolitów pomiędzy macierzą a przestrzenią międzybłonową. Ze względu na to, że syntaza ATP napędzana jest tzw. gradientem elektrochemicznym, błona ta jest nieprzepuszczalna nawet dla małych jonów. Ta własność błony wewnętrznej mitochondrium związana jest m.in. z zawartością specyficznego dla niej fosfolipidu – kardiolipiny. Kardiolipina zawiera aż 4 kwasy tłuszczowe na cząsteczkę co prowadzi do tego, że błona, w której skład wchodzi ten fosfolipid ma bardziej zwartą strukturę i w konsekwencji zmniejszoną przepuszczalność.

**Błona zewnętrzna** zawiera poryny (białka tworzące pory) jest więc przepuszczalna nawet dla stosunkowo dużych cząsteczek (ciężar graniczny <5000 Da). W błonie występują enzymy odpowiedzialne za syntezę lipidowych składników błon mitochondrialnych i enzymy przekształcające składniki lipidowe do postaci metabolizowanych w macierzy mitochondrium.

**Przestrzeń międzybłonowa** zawiera kilka enzymów, które zużywają ATP do modyfikacji postranslacyjnych innych białek (np. fosforylacji) i inne niż ATP nukleotydy.

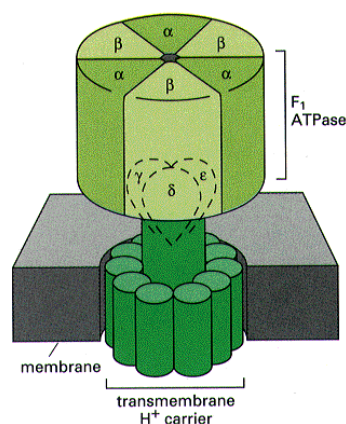
Rozkład białek pomiędzy różne obszary mitochondrium nie jest równomierny:

67% wszystkich białek mitochondrium zawartych jest w macierzy

21% białek znajduje się w błonie wewnętrznej

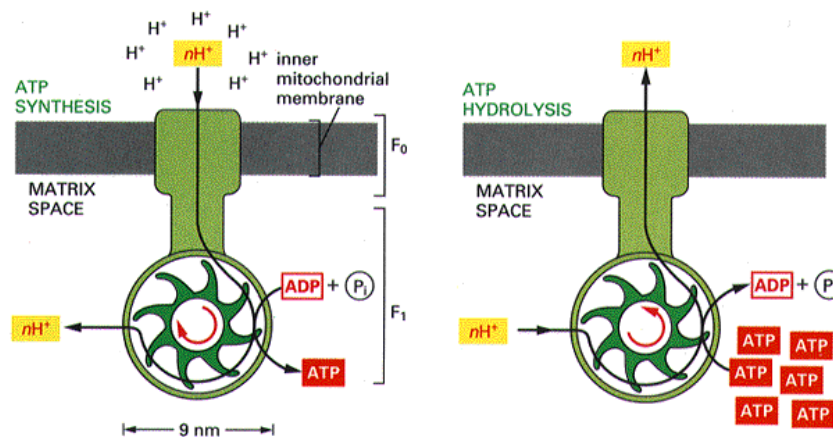
6% w błonie zewnętrznej

i 6% w przestrzeni międzybłonowej



Rys. 2 Wieloskładnikowy kompleks mitochondrialnej syntazy ATP.

Oddychanie tlenowe i produkcja ATP zachodzi w wyniku funkcjonowania procesu nazywanego chemioosmozą. Proces ten polega na tym, że energia pochodząca z utleniania związków chemicznych używana jest do przenoszenia protonów z jednej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej na drugą stronę za pomocą tzw. pomp protonowych. W ten sposób tworzony jest gradient elektrochemiczny protonów, który z kolei używany jest do napędzania innych reakcji, najważniejszą z nich jest praca syntazy ATP – enzymu produkującego ATP. Enzym ten zużywa energii przepływu protonów przez błony mitochondriów do syntezy ATP z ADP i fosforanów. U bakterii energia transferu protonów przez błony używana jest również do poruszania wici, a więc służy do dostarczania energii potrzebnej do lokomocji.



Rys. 3. Syntaza ATP może działać w obie strony, produkując ATP lub je zużywając.

Syntaza ATP może działać w obie strony: albo zużywa energię z hydrolizy ATP do pompowania protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrium albo wykorzystuje przepływ protonów do syntezy ATP. Kierunek działania enzymu zależy od «kształtu» gradientu protonów w pobliżu tego kompleksu enzymatycznego syntazy ATP oraz od wielkości energii swobodnej  $\Delta G$  reakcji hydrolizy ATP. W pewnych wyspecjalizowanych komórkach organizmów stałocieplnych np. komórkach tkanki tłuszczowej, oddychanie tlenowe zachodzące w mitochondriach nie jest związane z produkcją ATP. Większość energii pochodzącej z utleniania substratów rozpraszana jest w postaci ciepła w ten sposób komórki zużywają zapasy tłuszczu do lokalnej regulacji temperatury (ochrona wrażliwych obszarów organizmu przed przechłodzeniem, hibernacja zimowa).

Mitochondrium posiada własny genom, który składa się z kilku (zwykle od 5 do 50) cząsteczek kolistego DNA. W niektórych komórkach wydaje się, że mogą to być liniowe cząsteczki DNA. Struktura genomu przypomina ze względu na upakowanie chromosom bakteryjny, nie zawiera białek histonowych. Mitochondrialne DNA człowieka koduje tylko 13 białek, 22 różnych tRNA i 2 rodzaje rRNA. Mimo, że tylko niewielka ilość białek i RNA jest kodowana przez genom mitochondrialny to w organellach tych odbywa się niezależna replikacja i transkrypcja DNA oraz synteza białek (translacja).

Większość białek wchodzących w skład mitochondriów kodowanych jest przez jądrowe DNA i transportowane po syntezie w rybosomach cytozolowych, niewielka ilość białek i RNA syntetyzowana jest wewnątrz tych organelli na podstawie własnego DNA. Taki sposób syntezy składników mitochondriów wymaga pewnej synchronizacji z innymi procesami przebiegającymi w komórce szczególnie ze względu na to, że organelle te

dziela się w komórce w zależności od zapotrzebowania na energię i przynajmniej częściowo niezależnie od wzrostu komórki i od jej cyklu komórkowego.

Mitochondria nie są tworzone w komórce *de novo* a powstają w wyniku podziału już istniejących organelli. Przed podziałem organella przyrasta w swojej masie, dalej tworzy się obszar podziału. Proces ten jest ściśle kontrolowany przez specjalne mechanizmy komórkowe a nie jest wynikiem przypadkowego podziału dużego mitochondrium na dwie części. Organella ta dzieli się w czasie interfazy i w sposób niesynchroniczny, podobnie replikacja mtDNA nie jest ograniczona do fazy syntezy S jądrowego DNA ale przebiega w ciągu całego cyklu komórkowego. Możliwe jest także zmniejszenie się ilości mitochondriów w komórce w wyniku degradacji całej organelli lub fuzji mitochondriów.

Mitochondria odgrywają również ważną rolę w indukcji procesu śmierci komórkowej. W wielu wypadkach proces ten rozpoczyna się spadkiem potencjału błonowego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz uwolnieniem białka przestrzeni międzybłonowej – cytochromu C. Białko to wchodzi w skład tzw. apoptosomu, który uruchamia ciąg reakcji enzymatycznych rozpoczynających fazę egzekucyjną procesu śmierci komórkowej.

## **LITERATURA**

W instrukcji wykorzystano ilustracje z książki „Podstawy biologii komórki” wydawnictwa Garland Publishing, Inc.

Zalecana literatura uzupełniająca:

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999

Wójcik C. Apoptoza. W: Seminaria z cytofizjologii dla studentów weterynarii i biologii (J. Kawiak i M. Zabel, eds.), Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2002

Sikora E. Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy). Postępy Biochemii 40: 150-160, 1994

## Część praktyczna

### Materiały

Komórki fibroblastów mysich 3T3

Roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami PBS

### Bufor A

0.32 M sacharoza, 25 mM KCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6)

### Bufor B

(25 mM bufor fosforanowy pH 7.4, 0.4 mM AlCl<sub>3</sub>, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mg/ml MTT, 5 mM bursztynian sodu)

– przygotować bezpośrednio przed użyciem

10% roztwór digitoniny

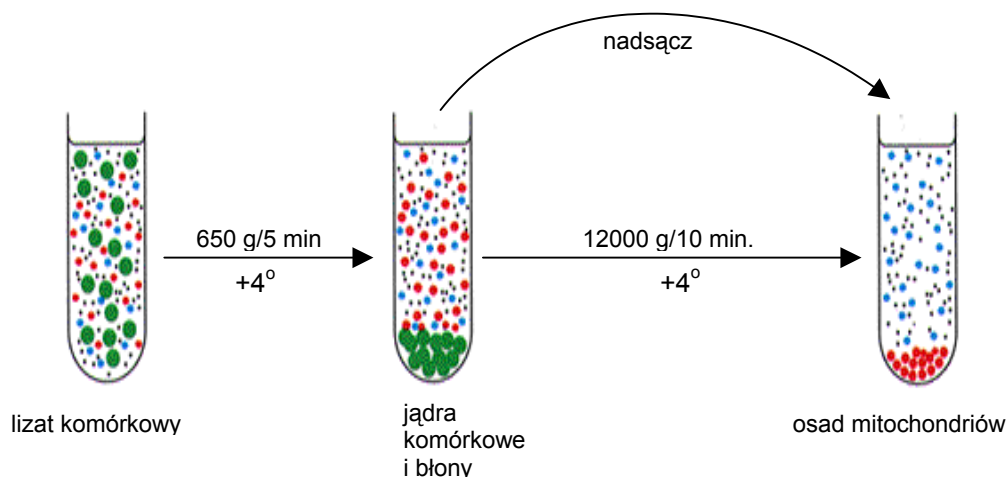
roztwór erytrozyny B (0.4% w/v erytrozyna B, 0.81 % NaCl, 0.06 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

### Aparatura i sprzęt

Wirówka chłodzona pozwalająca wirować przy 200g, 650g i 12000g

strzykawka o poj. 2 ml z igłą 20G

probówki Eppendorfa a 1.5 ml



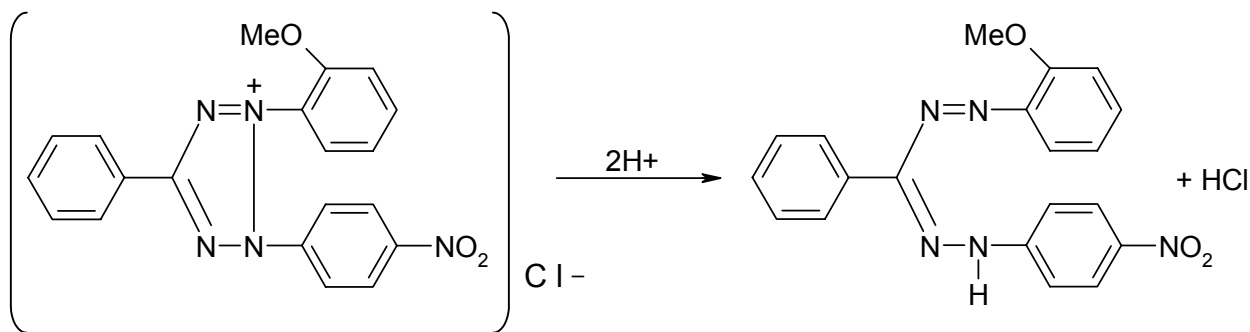
Rys. 4. Schemat postępowania podczas izolacji mitochondriów.

### Wykonanie ćwiczenia

Funkcjonalne mitochondria można wyizolować z komórek poprzez oddzielenie ich od innych organelli po zniszczeniu ciągłości błon komórkowych np. przez homogenizację i wirowanie różnicowe.

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej można oznaczyć w mitochondriach w reakcji redukcji chlorku trójfenylotetrazolowego (żółty) do nierozpuszczalnego formazanu (kolor purpurowy). Schemat reakcji przedstawiono na Rys. 5.

Komórki ( $5 \times 10^6$ ) odkleić od podłoża za pomocą roztworu trypsyny-EDTA, zatrzymać działanie trypsyny dodając pożywkę i komórki przenieść do probówki wirówkowej 50 ml. Odwirować przy 200g/4°C przez 5 minut, nadsącz odrzucić. Przepłukać osad komórek dwukrotnie 5 ml soli fizjologicznej (o temp. +4°C).



Rys. 5. Redukcja chlorku trójfenylotetrazolowego (żółty) do trójfenyloformazanu (purpurowy) podczas reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową.

Osad komórek zawiesić w 1 ml buforu A, przenieść do probówki Eppendorfa 1.5 ml i odwirować przy 700g/4°C przez 5 minut. Dokładnie usunąć nadsącz i zawiesić komórki w 0.5 ml buforu A. Dodawać stopniowo (np. po 0.5  $\mu$ l) roztworu 10% digitoniny, po każdej porcji delikatnie wymieszać na wytrząsarce. Pobierać małą próbkę zawiesiny i sprawdzać pod mikroskopem stopień uszkodzenia błony komórkowej za pomocą testu kolorymetrycznego z erytrozyną B (zmieszać 10  $\mu$ l zawiesiny komórek z 10  $\mu$ l roztworu erytrozyny B, odczekać 1 minutę i obserwować pod mikroskopem w świetle białym). Po osiągnięciu stanu, w którym ok. 90% komórek będzie barwiona przez erytrozynę B (stężenie końcowe digitoniny 0.1-0.25%), dodać 1 ml buforu A i homogenizować komórki za pomocą strzykawki (20-30 energicznych przeciągnięć strzykawką z igłą 20 G), odwirować przy 700g/4°C przez 5 minut.

**Nadsącz** dokładnie przenieść do innej probówki Eppendorfa i odwirować przy 12000g/4°C przez 10 minut. Osad mitochondriów przepłukać dwukrotnie 0.5 ml buforu H (bez BSA) wirując za każdym razem przy 12000g/4°C/10 minut. Tak wyizolowane mitochondria zachowują aktywność oksydoredukcyjną przez ok. 3 godziny.

Osad mitochondriów dokładnie rozpipetować w 0.1 ml buforu A. Pobrać małą próbkę zawiesiny np. 20  $\mu$ l i dodać 0.1  $\mu$ l roztworu znacznika fluorescencyjnego wiążącego się do błony mitochondrialnej np. MitoTracker Green. Wymieszać delikatnie i obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym przy wzbudzeniu światłem niebieskim. Małe struktury barwione na zielono to mitochondria. Ocenić czystość otrzymanej frakcji mitochondrialnej.

Zawiesinę mitochondriów (50  $\mu$ l) wymieszać ostrożnie w probówce Eppendorfa z 450  $\mu$ l buforu B i tak przygotowane próbki umieścić w temp. 37°C na 30-60 min. Po tym czasie osad mitochondriów opada na dno i jeśli zawiera aktywną dehydrogenazę bursztynianową wybarwia się na kolor purpurowy. Próbkę odwirować przy 12000g/5 min i odessać nadsącz. Po pobraniu próbki osadu mitochondriów sprawdzić pod mikroskopem czy mitochondria zabarwiły się na kolor purpurowy. Jeśli doszło do uszkodzenia błon mitochondriów, na purpurowo zabarwia się cała mieszanina inkubacyjna. Porównać z resztą preparatu mitochondriów.

## SPRAWOZDANIE

Przedstawić procedurę izolacji mitochondriów w postaci schematu blokowego i podać jej krótki opis. Opisać wygląd mitochondriów i czystość otrzymanej frakcji mitochondrialnej oraz wynik testu kolorymetrycznego na aktywność enzymu znacznikowego.

Czy można oznaczyć ilość wyizolowanych mitochondriów? Zaproponuj metodę oznaczania gęstości zawiesiny mitochondriów. Znaleźć w literaturze i podać krótki opis jaką rolę pełni cytochrom C w funkcjonowaniu mitochondriów.