



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus. Oxidativní fosforylace (9).

Prof.RNDr. Pavel Peč, CSc.
Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc



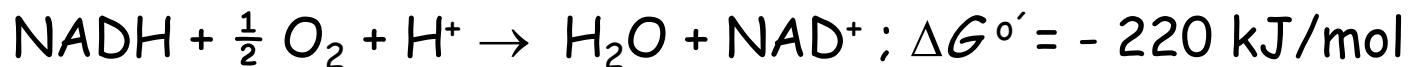
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Oxidativní fosforylace. Stručná charakteristika.

Denní energetická potřeba 70 kg muže je asi 8 400 kJ. Tomuto množství odpovídá 83 kg ATP. Běžná zásoba ATP je 250 g.

Pro dosažení potřebného množství energie je nutné recyklovat ADP na ATP. Každá molekula ATP je recyklována 300x za den.

Potřebná energie se získává oxidací redukovaných koenzymů NADH a FADH₂. Elektrony z redukovaných koenzymů se přenáší přes čtyři velké komplexy proteinů na kyslík. Přenos je lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně a nazývá se dýchací řetězec nebo elektronový transportní řetězec.



Tři komplexy elektronového transportního řetězce využívají energii přenosu elektronů k transportu protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Generuje se tak pH gradient a transmembránový elektrický potenciál, který vytváří proton-motivní sílu.

Oxidativní fosforylace. Stručná charakteristika

ATP je syntetizován, když protony putují zpět do matrix přes proteinový komplex ATPasy.



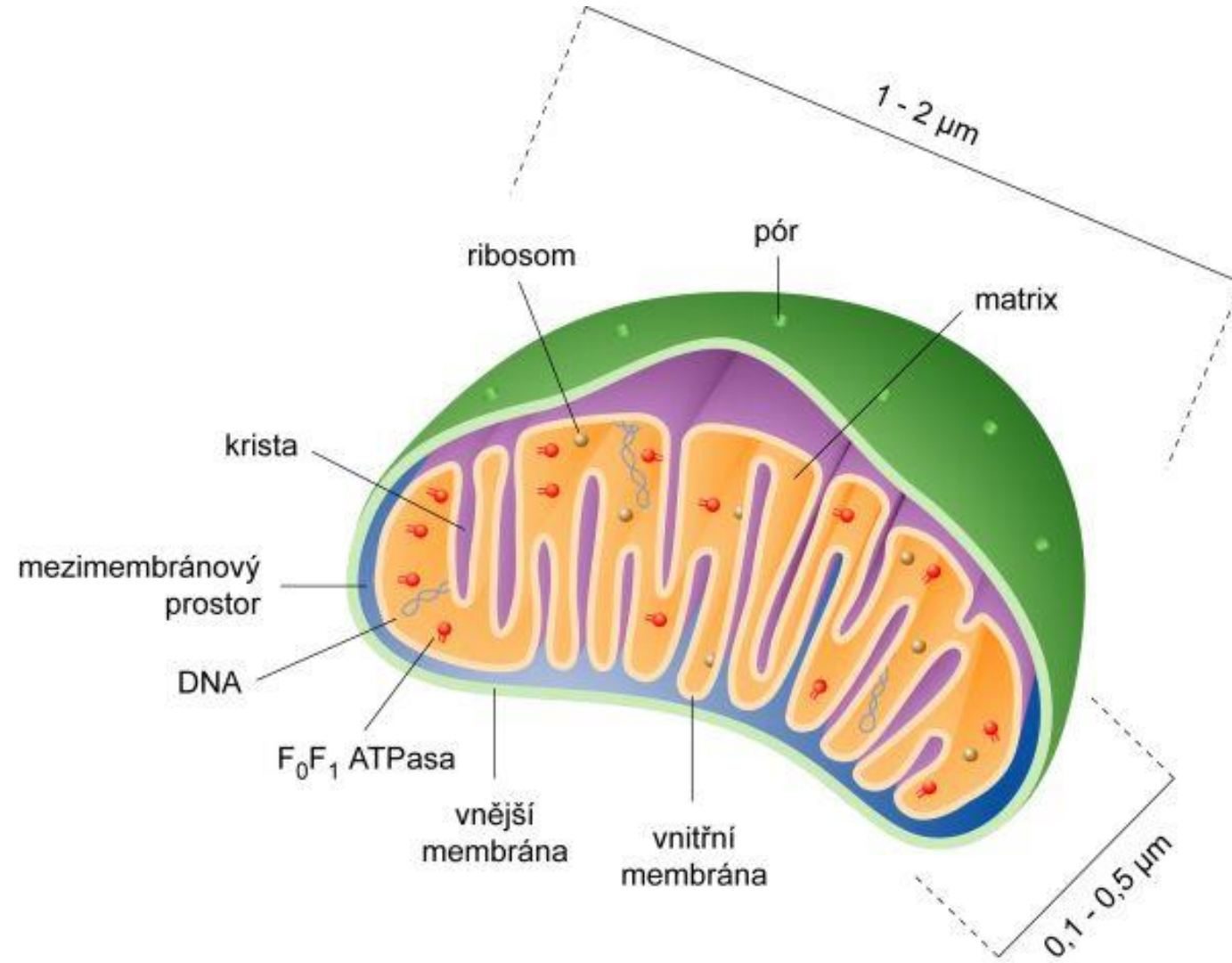
Oxidace energeticky bohatých sloučenin a fosforylace ADP jsou spojeny s protonovým gradientem přes vnitřní mitochondriální membránu.

Proces se nazývá respirace nebo buněčná respirace.

Respirace je proces tvorby ATP při kterém anorganická látka (jako je molekulární kyslík) slouží jako terminální akceptor elektronů. Donorem elektronů může být organická nebo anorganická látka.

Proces se uskutečňuje v mitochondrii.

Obrázek mitochondrie.



Komplexy přenosu elektronů.

Elektrony jsou přenášeny z NADH na O_2 přes řetězec tří velkých proteinových komplexů:

- a) NADH-Q oxidoreduktasa (komplex I)
- b) Q-cytochrom *c* oxidoreduktasa (komplex III)
- c) cytochrom *c* oxidasa (komplex IV)

Čtvrtý velký proteinový komplex sukcinát-Q reduktasa obsahuje sukcinádehydrogenasu generující $FADH_2$ v citrátovém cyklu.

Elektrony z $FADH_2$ vstupují do dýchacího řetězce v Q-cytochromoxidoreduktase.

Sukcinát-Qreduktasa nepumpuje protony !!

Komplexy I, III a IV jsou svým způsobem na sebe navazující a spojené (supramolekulární komplex) nazývaný respirasom.

Elektrony mezi komplexy přenáší speciální přenašeč. Koenzym Q také nazývaný ubichinon, v redukované formě ubihydrochinon.

Komplexy přenosu elektronů.

Ubichinon je hydrofobní chinon (má řetězec složený z isoprenových jednotek), který rychle difunduje přes vnitřní mitochondriální membránu. Nejznámější koenzym Q (savčí) má 10 isoprenových jednotek (Q_{10}).

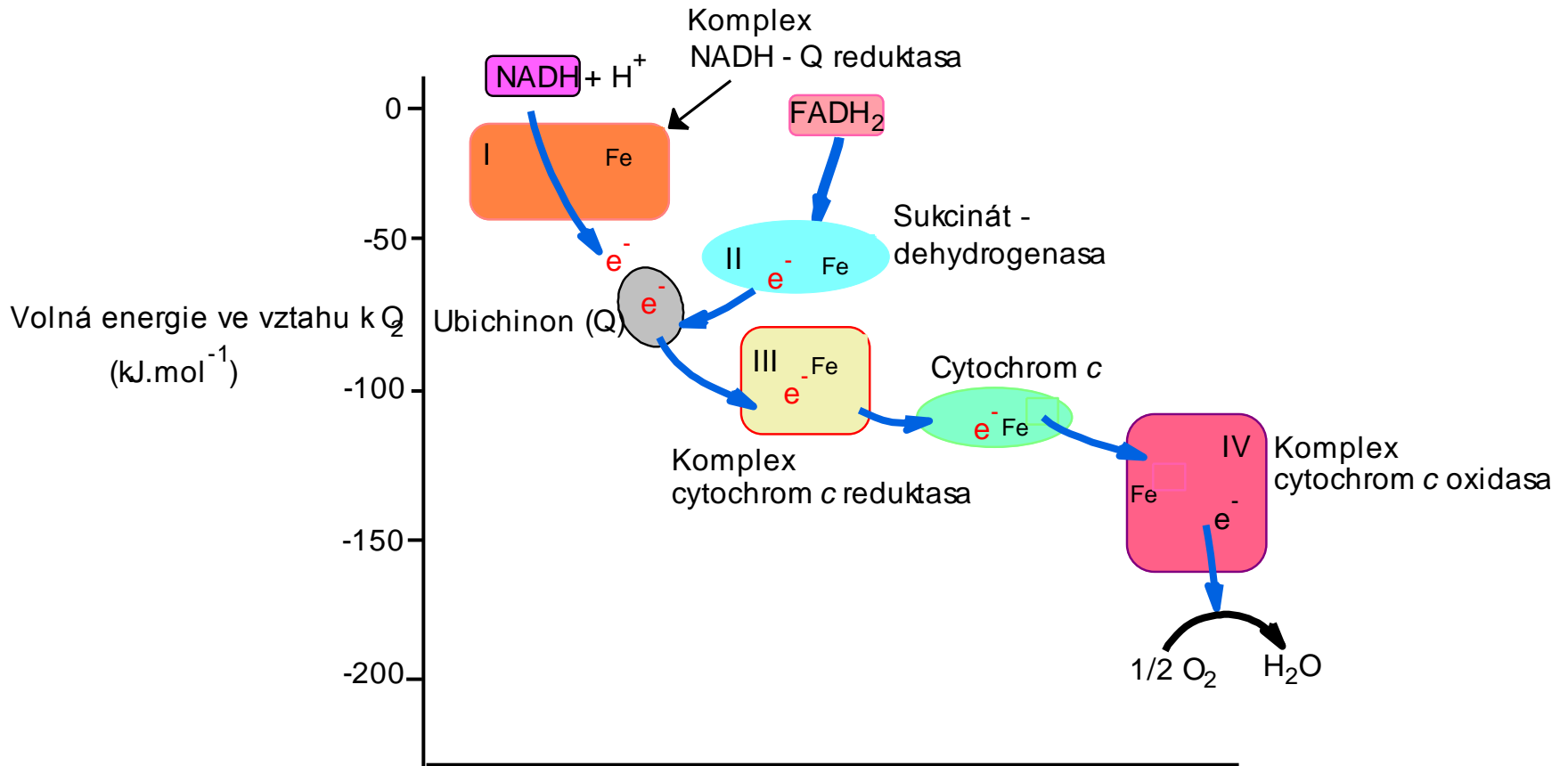
Ubichinon přenáší elektrony z NADH-Q oxidoreduktasy na Q-cytochrom c oxidoreduktasu ve formě ubihydrochinonu.

Elektrony z $FADH_2$ generované citrátovým cyklem jsou přeneseny na ubichinon a poté na Q-cytochrom c oxidoreduktasový komplex.

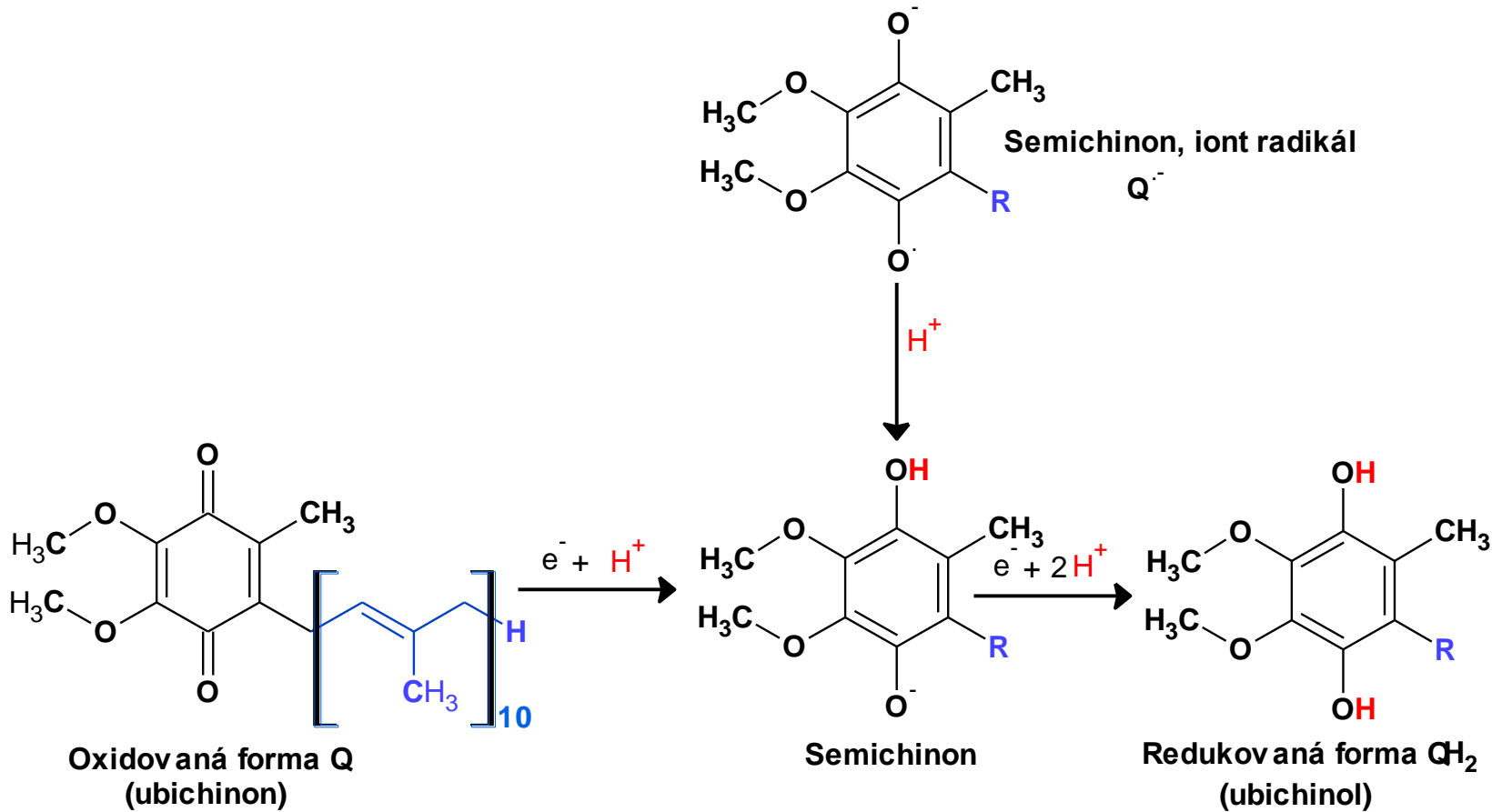
Chinony obecně mohou existovat ve třech oxidačních stavech: plně oxidovaná forma Q; s jedním elektronem semichinon QH^- , po ztrátě protonu vznikne semichinonový radikál $Q^{\cdot-}$; plně redukováná ubichinn je ubichinol QH_2 .

Druhým přenašečem elektronů je malý rozpustný protein cytochrom c. Přenáší elektrony z komplexu III na komplex IV.

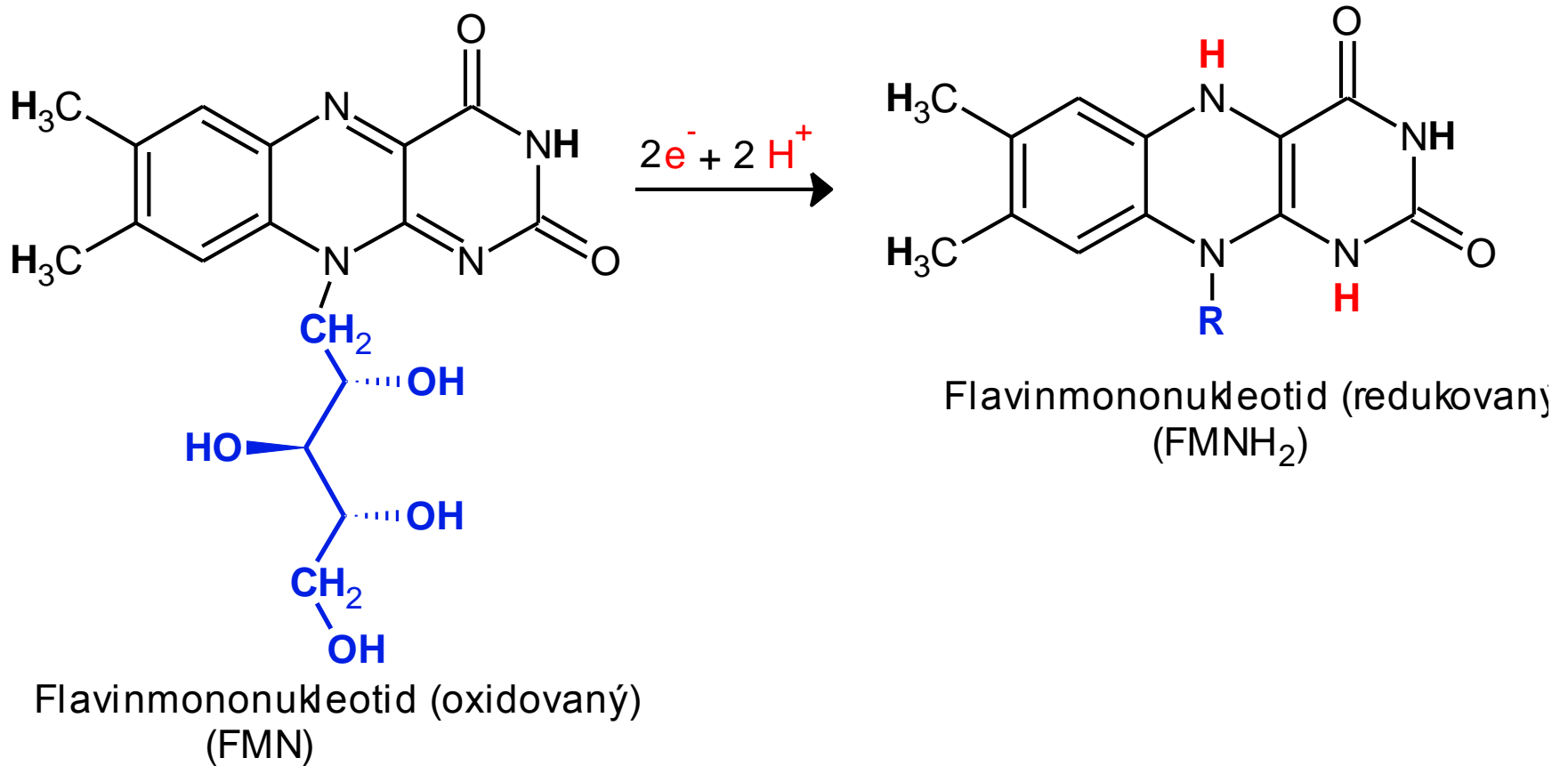
Složky dýchacího řetězce.



Oxidační stavy ubiquinonu (chinonů)



Oxidační stavy flavinů.



Komplexy elektronového řetězce.

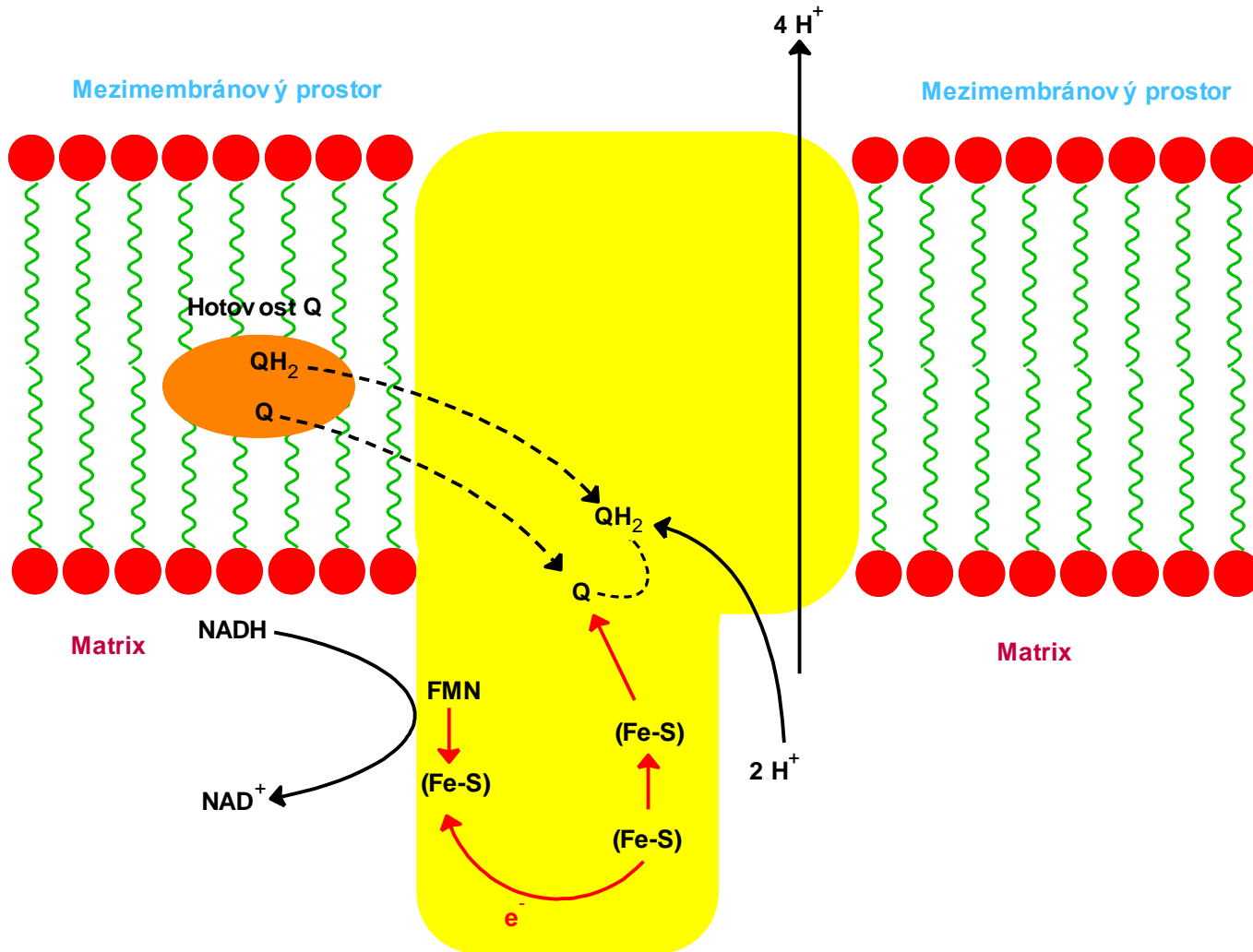
NADH-Qoxiodoreduktasa (komplex I).

Obrovský enzym (> 900 kD), asi 46 polypeptidových řetězců. Protonová pumpa. Integrální protein ve vnitřní mitochondriální membráně. Prosthetickou skupinou je FMN - redukovaný FMNH₂. Elektrony jsou poté přeneseny na Fe-S klastry. Atom Fe je buď v oxidovaném stavu Fe³⁺ nebo v redukovaném Fe²⁺. Klastry nepumpují protony. Konečným akceptorem elektronů v komplexi I je ubichinon (Q) přecházející na ubichinol (QH₂).

Katalyzovaná reakce:



Komplex I - přenos elektronů spojený s pumpováním protonů do matrix

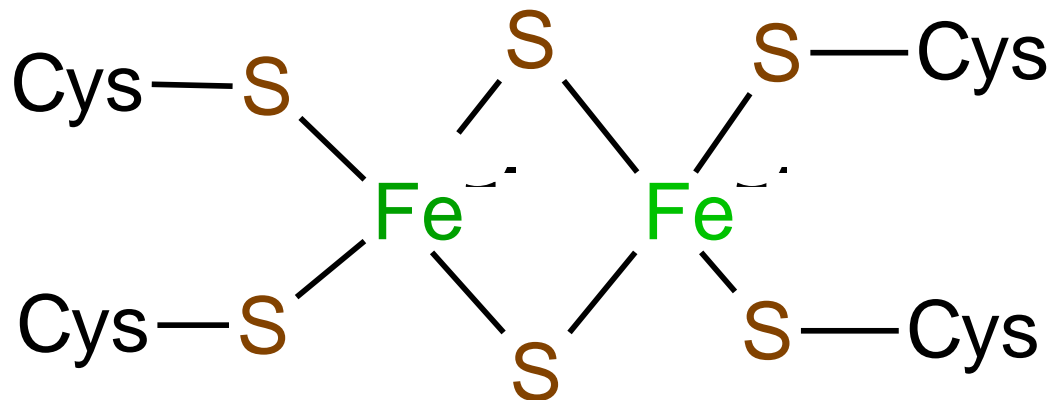


Komplexy elektronového řetězce.

Sukcinát-Qreduktasa (komplex II) je součástí vnitřní mitochondriální membrány. Elektrony z FADH_2 jsou přenášeny přes klastry Fe-S na ubiquinon. Komplex II nepumpuje protony.

Další dva enzymy - glycerol-3-fosfátdehydrogenasa a acyl CoAdehydrogenasa (mastné kyseliny) přenáší elektrony z FADH_2 na Q za tvorby QH_2 . Oba enzymy také nepumpují protony.

Příklad 2Fe-2S klastru. Všechny Fe-S klastry podléhají oxidačně-redukční reakci na atomu Fe.



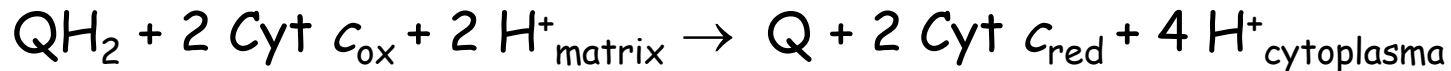
Komplexy elektronového řetězce.

Q-cytochrom *c* oxidoreduktasa (komplex III nebo cytochromreduktasa).

Funkcí komplexu III je přenos elektronů z QH₂ na oxidovaný cytochrom *c* (Cyt *c*).

Komplex III je ve vodě rozpustný a pumpuje protony ven z matrix. Pumpuje 2 H⁺. Je to polovina protonů než pumpuje komplex I (menší termodynamická síla).

Rovnice:



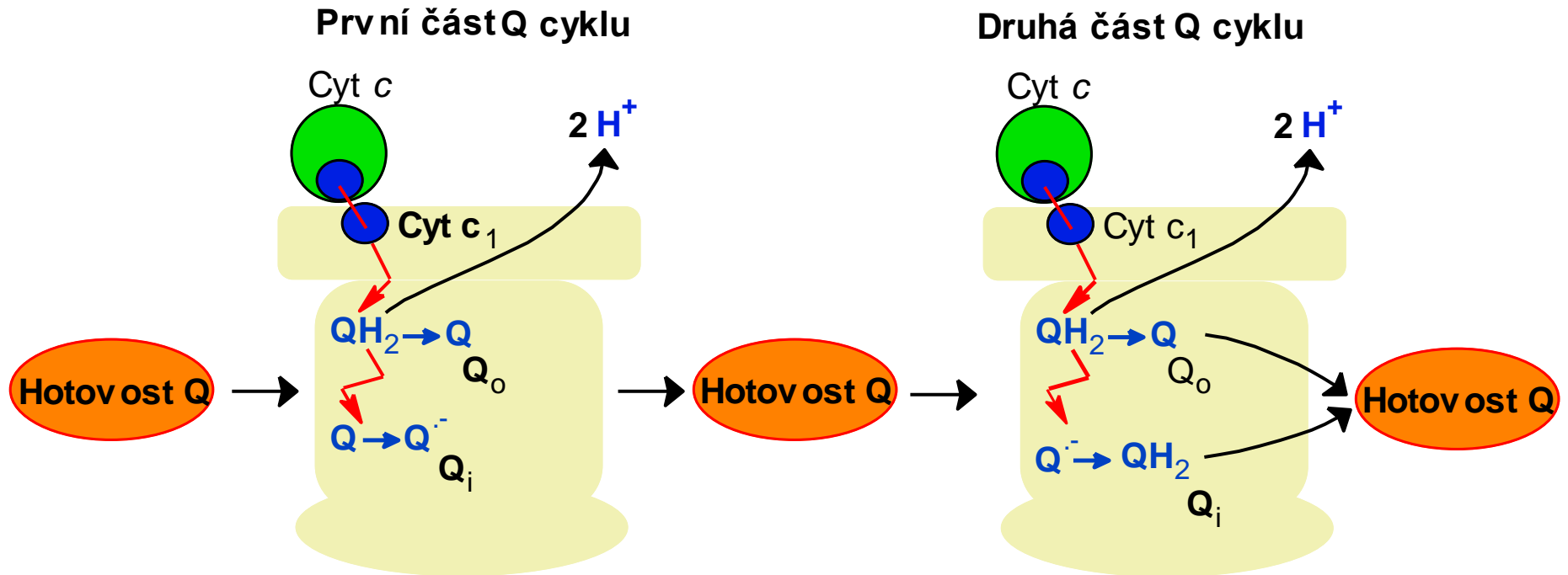
Komplex III obsahuje dva typy cytochromů - *b* a *c*₁.

Cytochromy jsou proteiny obsahující hem jako prosthetickou skupinu. Přenášejí elektrony.

Stejný hem jako obsahují myoglobin a hemoglobin.

Enzym také obsahuje protein železo - síra s 2Fe-2S centrem - Rieskeho centrum.

Mechanismus komplexu III - Q cyklus.



Q cyklus.

QH_2 transportuje dva elektrony na komplex III - cytochrom c , který akceptuje pouze jeden elektron.

Mechanismus spojení přenosu jednoho elektronu s transportem protonů z matrix do mezimembránového prostoru se nazývá **Q cyklus**.

Dvě molekuly QH_2 se váží postupně na komplex III na který předávají dva elektrony a dva H^+ . Tyto protony se uvolňují do cytoplasmy.

První molekula QH_2 se váže na první vazebné místo Q_o a dva elektrony putují v komplexu na dvě různá místa. Jeden elektron putuje nejdříve na Rieskeho 2Fe-2S klastr a poté na cytochrom c_1 a konečně na oxidovaný cytochrom c , který redukuje.

Redukovaná molekula cytochromu c difunduje dále na cytochrom c oxidasu.

Druhý elektron putuje přes dva hemy cytochromu b na druhé vazebné místo Q_i .

Q cyklus.

V tomto místě je Q redukován na semichinon radikál aniont ($Q\cdot^-$) elektronem z první molekuly QH_2 . Nově plně oxidovaný Q opouští první Q místo a obnovuje pool Q.

Druhá molekula QH_2 se váže na Q_0 vazebné místo a reaguje analogicky jako první molekula. Jeden elektron je přenesen na cytochrom c. Druhý elektron putuje přes dvě hemové skupiny na cytochrom b k částečně redukovanému ubiquinonu vázanému na Q_i místě.

Po vstupu elektronu z druhé QH_2 molekuly převezme tento chinonový radikál dva protony z matrix za tvorby QH_2 .

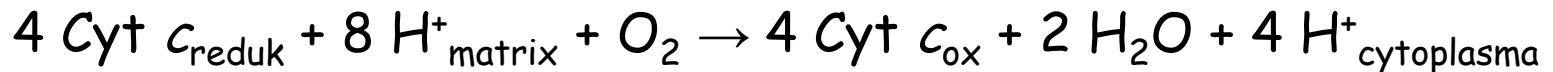
Sumárně:



V jednom Q cyklu jsou oxidovány dvě molekuly QH_2 na Q a jedna je redukována na QH_2

Cytochrom *c* oxidasa.

Cytochrom *c* oxidasa (komplex IV) katalyzuje transfer elektronů z redukovaného cytochromu *c* na molekulární kyslík (terminální akceptor elektronů).



Čtyři elektrony jsou přeneseny na kyslík a současně jsou pumpovány protony z matrix do cytoplasmy.

Reakce je termodynamicky výhodná.

Nejvíce je prostudována hovězí cytochrom *c* oxidasa, která se skládá z 13 podjednotek z nichž 3 jsou kódovány mitochondriální DNA.

Enzym obsahuje 2 skupiny hemu A a tři měďnaté ionty seskupené do dvou center.

Jedno centrum označené $\text{Cu}_A / \text{Cu}_A$ obsahuje dva Cu ionty vázané cysteinovými vedlejšími skupinami. Centrum přijímá první elektrony z Cyt *c*.

Cytochrom *c* oxidasa.

Zbývající Cu (Cu_B) je koordinačně vázán na tři His z nichž jeden je kovalentně vázán na Tyr.

Měďnatá centra oscilují mezi oxidačními stavy Cu^{2+} a Cu^+ .

Další součástí enzymu jsou dvě molekuly hemu A označované jako hem a a hem a_3 .

Hemy se liší redukčním potenciálem, protože jsou lokalizovány v různých místech molekuly enzymu s různým okolím.

Elektron putuje z Cyt *c* na Cu_A/Cu_A , na hem a , na hem a_3 , na Cu_B a na kyslík !! Hem a_3 a Cu_B jsou přímo propojeny s aktivním místem kde dochází k redukci kyslíku.

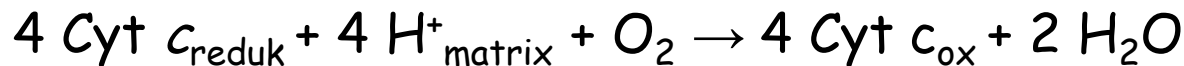
Cytochrom *c* oxidasa.

Elektrony ze dvou molekul redukovaného Cyt *c* putují cytochrom *c* oxidasou - jeden se zachytí na Cu_B a druhý na a₃. Obě redukovaná místa předávají elektrony na kyslík.

Když se molekulární kyslík naváže, přebírá elektrony z obou míst za tvorby peroxidu (O₂²⁻), který tvoří můstek mezi oběma místy.

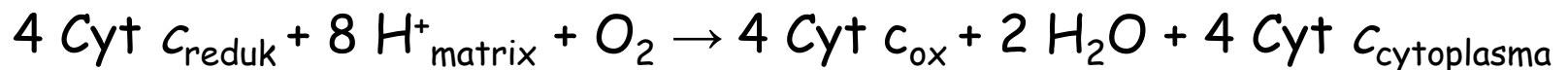
Váží se další dvě molekuly Cyt *c* a elektrony putují do aktivního místa. Přidáním elektronu a H⁺ na každý atom kyslíku dochází k redukci dvou iont - kyslíkových skupin na Cu_B - OH a Fe³⁺ - OH.

Reakcí se dvěma dalšími H⁺ se uvolní dvě molekuly H₂O a enzym se vrací do původního stavu.



Všechny čtyři protony v této reakci mají původ v matrix !!!

Celková rovnice reakce katalyzované cytochrom *c* oxidasou:



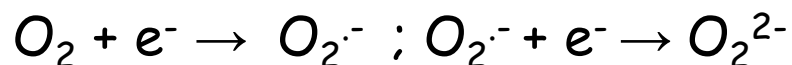
Toxické deriváty molekulárního kyslíku - superoxidový radikál, peroxidy.

Molekulární kyslík je ideálním akceptorem elektronů. Pokud probíhá čtyřelektronová redukce vzniká bezpečná voda.

Částečná redukce vede ke tvorbě nebezpečných produktů.

Transfer jednoho elektronu na O_2 vzniká superoxidový aniont !!

Transfer dvou elektronů vede ke tvorbě peroxidu.



Obě sloučeniny jsou nebezpečné !

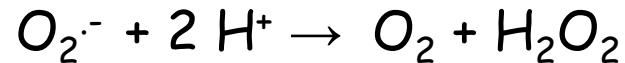
Strategií bezpečné katalýzy cytochrom *c* oxidasy je neuvolňovat meziprodukty.

Vždy se však nějaké množství superoxidových aniontů a peroxidů uvolní. Z peroxidů a superoxidů se můžou formovat $OH\cdot$, což jsou reaktivní deriváty kyslíku (ROS = reactive oxygen species).

Jejich oxidační destruktivní účinky se projevují při stárnutí a vyvolání řady onemocnění.

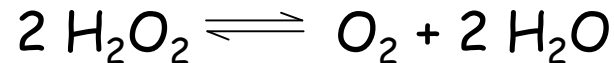
Toxické deriváty molekulárního kyslíku - superoxidový radikál, peroxidy.

Buněčnou obranou před působením superoxidových radikálů je enzym **superoxiddismutasa**:



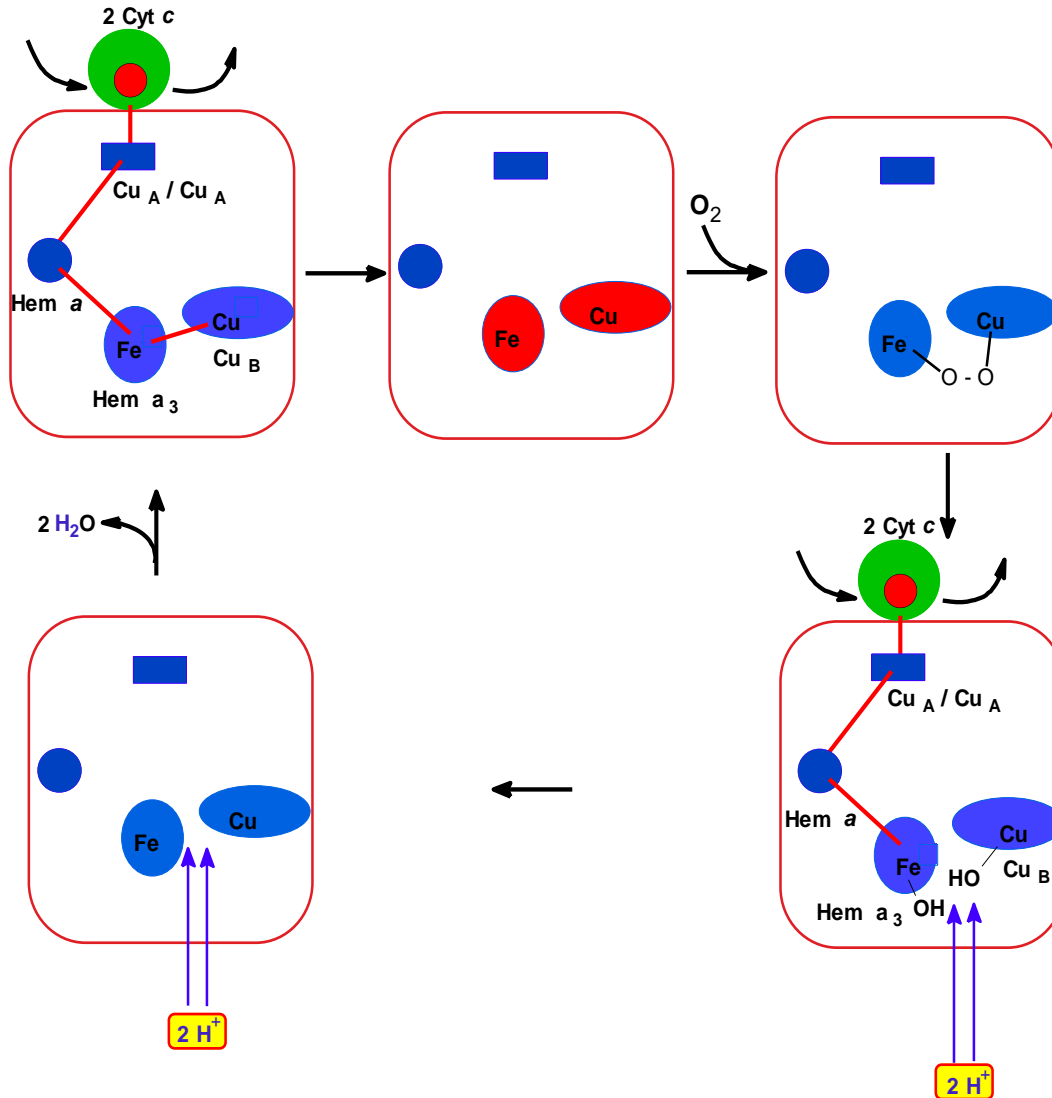
Dismutace je reakce při které je jeden reaktant převeden na dva různé produkty.

Peroxid vodíku vytvořený v superoxiddismutasové reakci je rozkládám všudypřítomným hemovým proteinem **katalasou** (také se jedná o dismutaci):

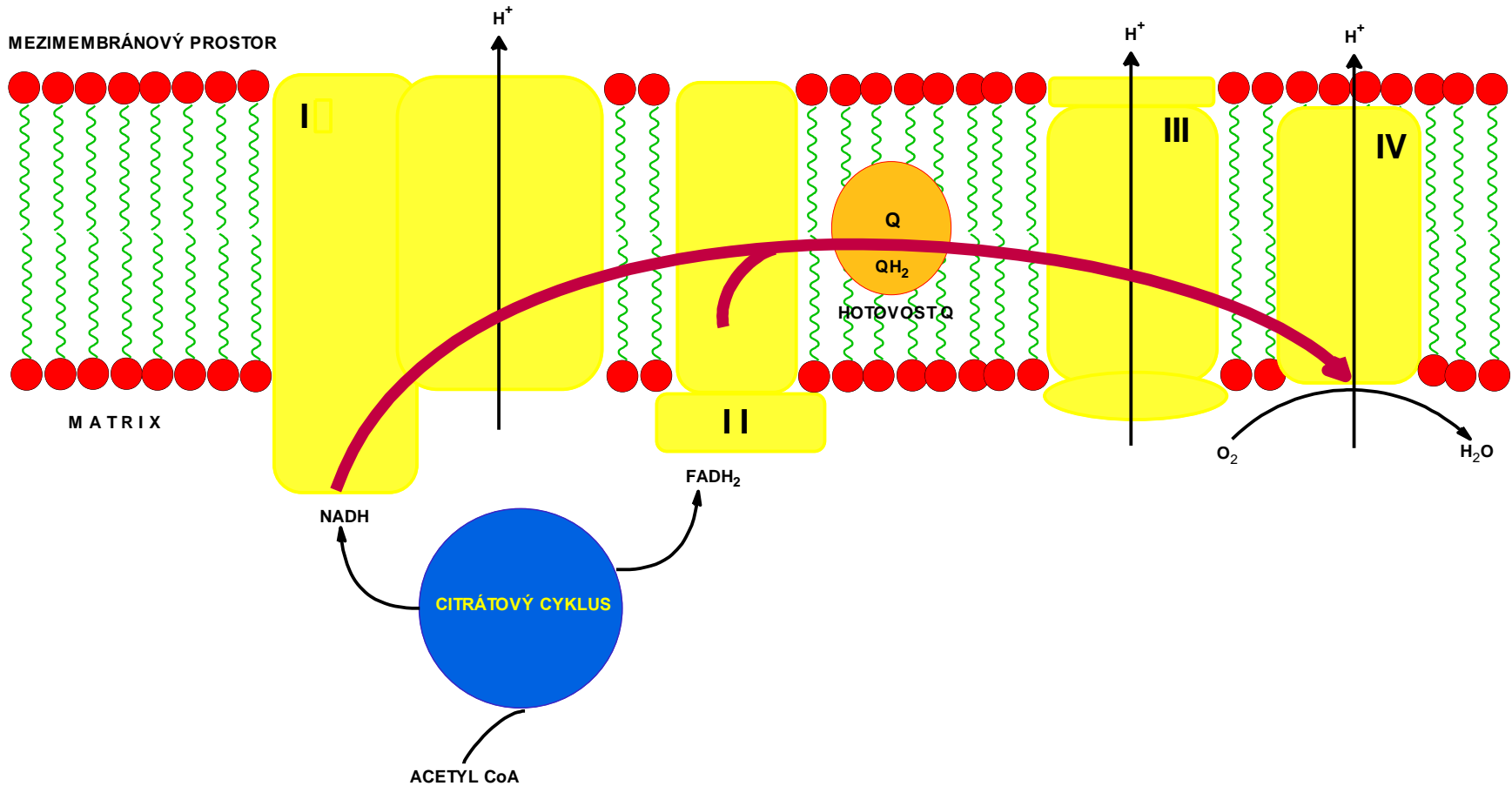


Oba enzymy mají vysokou k_{cat} blížíci se difúzi. Při likvidaci peroxidu vodíku hraje také významnou roli glutathionperoxidasa. Významně se uplatňují antioxidanty jako např. vitaminy E a C.

Mechanismus cytochrom *c* oxidasy. Označeny jsou chemické **protony** (tvorba vody), další 4 H^+ jsou pumpovány z matrix do cytoplasmy.

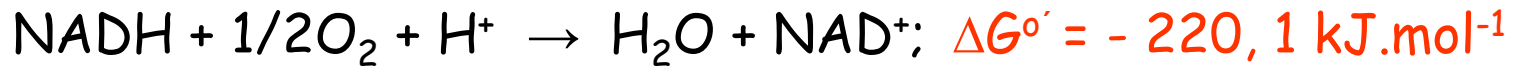


Elektronový transportní řetězec.

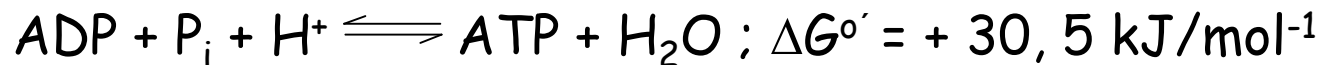


Protonový gradient pohání syntézu ATP.

Transfer elektronů z NADH na O_2 je silně **exergonní proces**:



Proces je spojen s endergonickou syntézou ATP:



Ve vnitřní mitochondriální membráně je lokalizován integrální protein původně nazývaný *mitochondriální ATPasa* nebo

F_1F_0 ATPasa (F_0 čti ef ó, na **oligomycin** citlivá podjednotka).

Původně enzym katalyzoval hydrolýzu ATP.

Současný název **ATPsynthasa**. Další název je **komplex V**.

Dlouho badatelé hledali spojení mezi transportem elektronů a syntézou ATP, analogii substrátové fosforylace.

V roce 1961 přišel P. Mitchell s chemiosmotickou hypotézou tvorby ATP.

Chemiosmotická hypotéza tvorby ATP.

Podstata hypotézy: Transport protonů a syntéza ATP jsou spojeny protonovým gradientem vytvořeným přes mitochondriální membránu.

Koncentrace H^+ je nízká v matrix, elektrické pole v matrix nese negativní náboj. Protony putují zpět do matrix, aby došlo k vyrovnání náboje. Vnitřní mitochondriální membrána protony nepropouští. Protony vstupují do integrálního proteinu ATPsynthasa. Energeticky nerovnovážné rozdělení protonů se nazývá **protonmotivní síla**.

Protonmotivní síla má dvě složky: chemický gradient a gradient náboje.

Chemický gradient reprezentuje gradient pH. Gradient náboje tvořen nerovnovážnou distribucí protonů tvořící chemický gradient.

Obě komponenty pohání syntézu ATP.

Chemiosmotická hypotéza tvorby ATP.

V mezimembránovém prostoru je pH o 1,4 jednotky nižší než v matrix. Membránový potenciál je 0,14 V, vně je kladný.

Membránový potenciál odpovídá volné energii 21,8 kJ.mol⁻¹ na mol protonů.

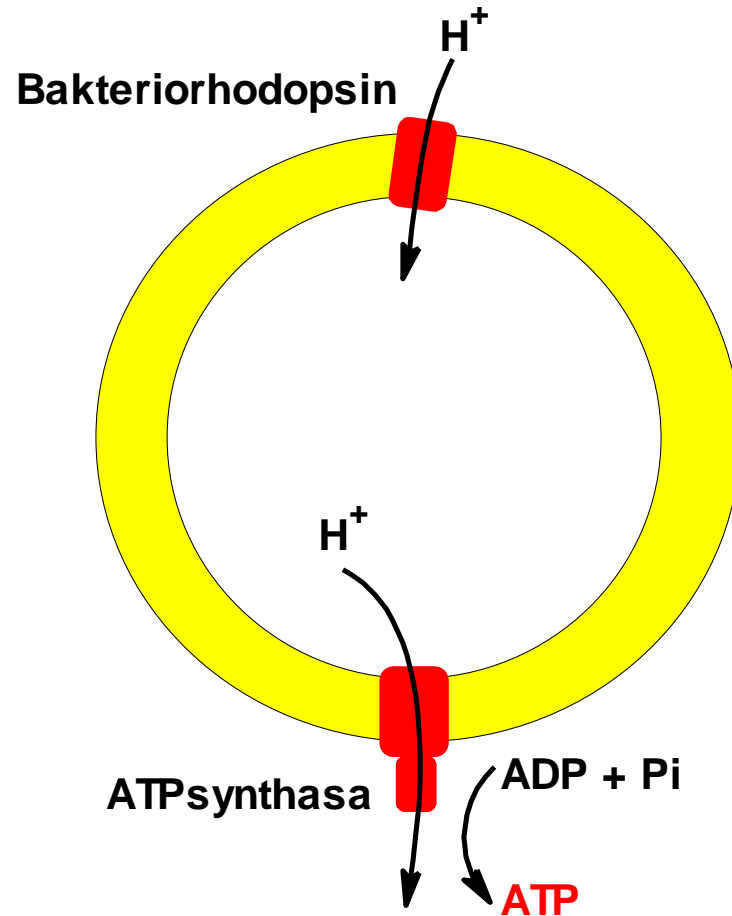
K důkazu chemiosmotické hypotézy byl použit uměle vytvořený systém.

Jako respirační řetězec byl použit bakteriorhodopsin, což je membránový protein z **halobakterie**, který po osvětlení pumpuje protony. Halobakterie, správně Haloarchaea, je třída archeí z kmene Euryarchaeota - nejedná se tedy o bakterie (existují v solných roztocích - Mrtvé moře).

Byly vytvořeny syntetické váčky obsahující bakteriorhodopsin a mitochondriální ATPasu získanou z hovězího srdce.

Po osvětlení váčky syntetizovaly ATP. ATPasa je v liposomu zařazena opačně než v mitochondrii.

Důkaz platnosti chemiosmotické hypotézy.



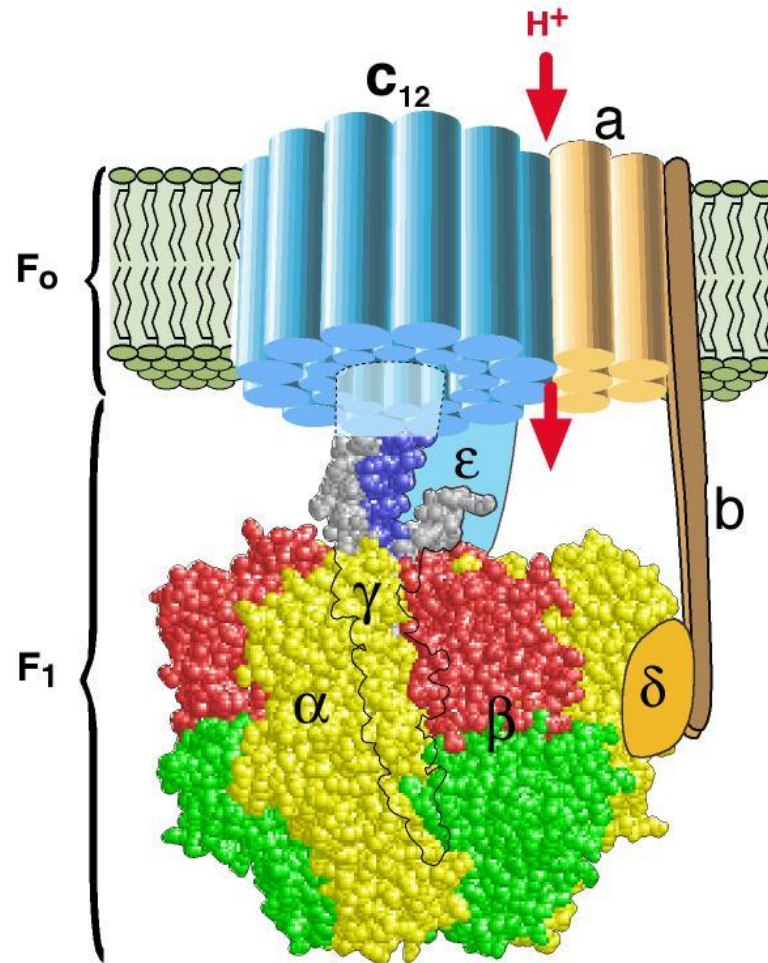
ATPsynthasa.

Tvarem ATPsynthasa připomíná kuličku a tyčinku. Část připomínající tyčinku se nazývá F_0 podjednotka a je integrální součástí vnitřní mitochondriální membrány. Kulička o rozměrech 85 Å nazvaná F_1 podjednotka je umístěna v matrix mitochondrie. Podjednotka F_1 má katalytickou aktivitu synthasy, izolovaná vykazuje ATPasovou aktivitu.

Podjednotka F_1 je složena z pěti typů polypeptidových řetězců ($\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$) s vyznačenou stechiometrií.

Podjednotky α a β , které tvoří kuličku F_1 jsou uspořádány střídavě do hexamerního kruhu. Obě váží nukleotidy, ale jen β podjednotka působí přímo katalyticky. Pod kuličkou jsou proteiny středové tyčinky složené z γ a ϵ podjednotek. Podjednotka γ tvoří helikální vlákno zasahující do středu $\alpha_3\beta_3$ hexameru a narušuje symetrii $\alpha_3\beta_3$ hexameru: každá z podjednotek β se nachází v interakci s jinou stranou (částí) γ .

Model ATPsynthasy.



H. Wang and G. Oster (1998). Nature 396:279-282.

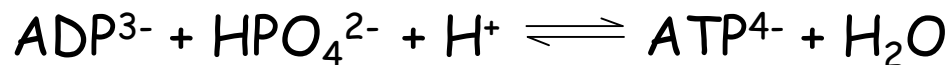
ATPsynthasa.

Podjednotka F_0 je hydrofobní segment lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně. F_0 obsahuje protonový kanál, který je sestavený z 10 až 14 podjednotek **c**, které jsou umístěny v membráně. Jedna podjednotka **a** je na povrchu kanálku.

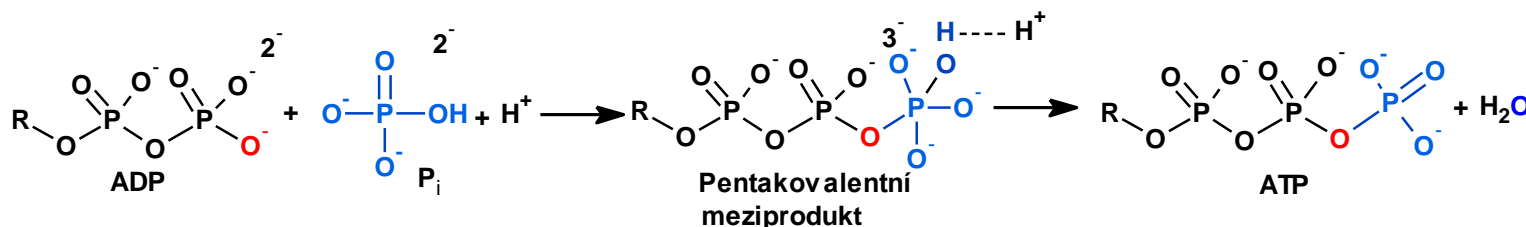
Obě podjednotky F_1 a F_0 jsou spojeny dvěma způsoby: středovou $\alpha\gamma$ tyčkou (vláknem) a vnější spojkou tvořenou jednou α podjednotkou, dvěma β podjednotkami a δ podjednotkou.

Tok protonů přes ATPsynthasu vede ke tvorbě a uvolnění ATP.

ATPsynthasa katalyzuje tvorbu ATP z ADP a orthofosfátu:



Oba substráty mají na fosfáty navázán Mg^{2+} . Atom kyslíku ADP atakuje atom P orthofosfátu za tvorby pentakovalentního meziprojektu, který uvolňuje vodu a přechází na ATP.



Tok protonů přes ATPsynthasu vede ke tvorbě a uvolnění ATP.

Ukázalo se ATPsynthasa katalyzuje spojení ADP a orthofosfátu i bez toku protonů.

ATP však se z katalytického místa neuvolňuje !!

Pro uvolnění ATP je nutný tok protonů přes podjednotku F_o .

Rolí protonového gradientu není tvorba ATP, ale jeho uvolnění z katalytického místa.

Protonmotivní síla vytváří tři aktivní místa, která se sekvenčně proměňují a mění svoji funkci.

ATPsynthasa je složena z pohyblivé části a stacionární části.

Pohyblivá část reprezentuje rotor složený z c prstence a $\gamma\epsilon$ stonku. Stacionární část neboli stator je složen ze zbytku molekuly.

Tvorbu a uvolnění ATP charakterizuje potvrzená hypotéza: binding-change mechanism - mechanismus vazebné změny (konformace).

Tok protonů přes ATPsynthasu vede ke tvorbě a uvolnění ATP.

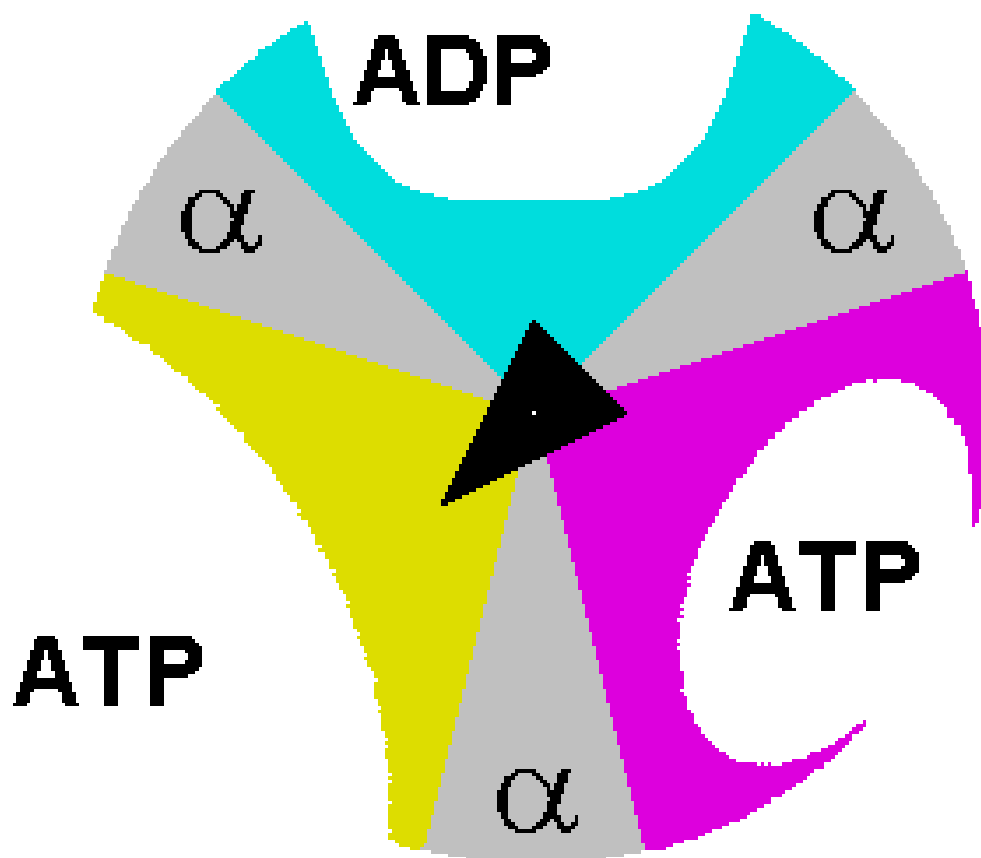
Průtokem protonů se otáčí rotor měnící konformaci statorové části ve třech stupních: 1) ATP a P_i se váží, 2) Syntéza ATP, 3) Uvolnění ATP.

Pohybem γ rotoru nejsou tři β podjednotky ekvivalentní.

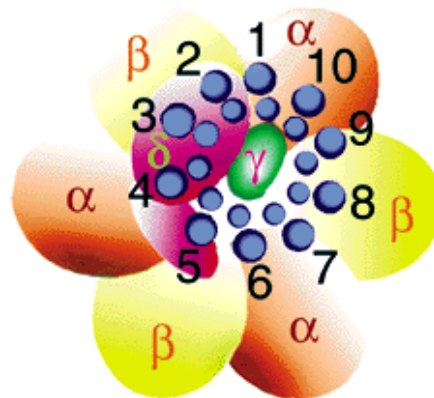
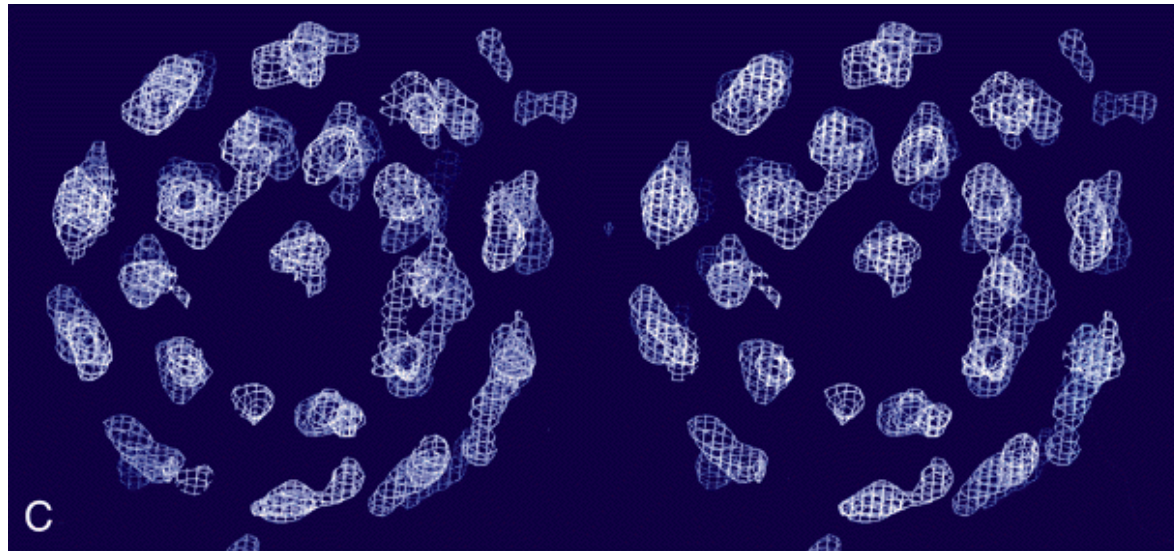
V každém momentu je jedna β podjednotka ve stavu L (loose = otevřená). Tato konformace váže ADP a P_i . Druhá podjednotka je ve stavu T (tight = pevně sevřený). Dochází k tvorbě ATP. Obě tyto konformace neuvolňují ATP ani ADP nebo P_i . Poslední podjednotka je ve stavu O (open = otevřený), uvolňuje ATP.

Rotor γ rotuje ve směru hodinových ručiček po 120° .

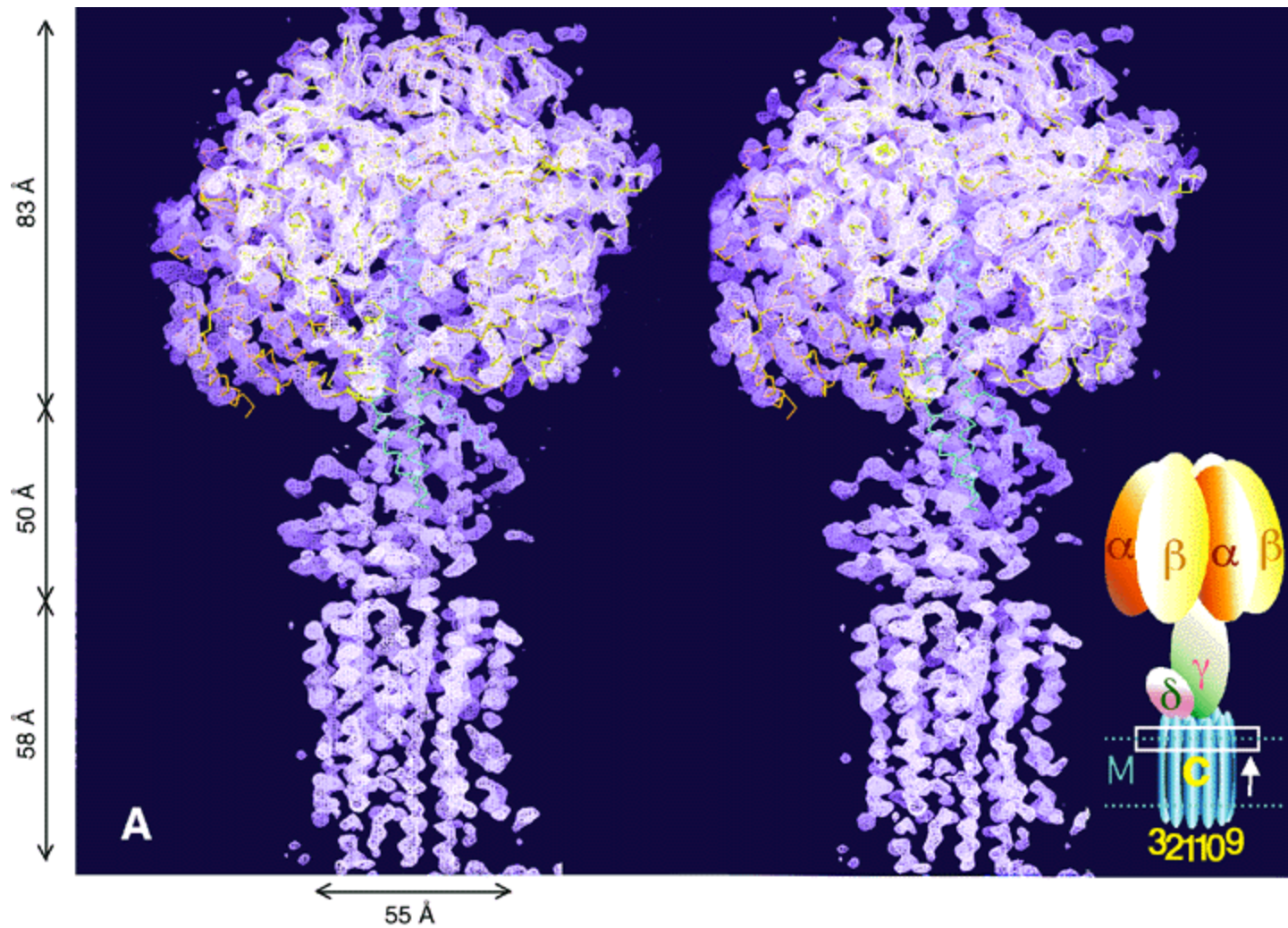
Model F_1 ATPsynthasy. Trojúhelník naznačuje γ podjednotku (rotor), β podjednotky jsou naznačeny ve stavech L (zelená), T (lila) a O (žlutá).



Pohled shora na F_1 ATPsynthasu. Nahoře výpočet atomové hustoty. Dole modré kroužky naznačují ADP (větší) a orthofosfát (menší).



F₁ ATPsynthasa - struktura z polypeptidových řetězců.
Vpravo dole model s označením podjednotek.



Z historie bádání o ATPsynthase.

1937 - Herman KALCKAR objevil souvislost mezi syntézou ATP a respirací.

1961 - Ephraim RACKER izoloval části ATP synthasy.

1961 - Peter MITCHELL publikoval „chemiosmotickou hypotézu tvorby ATP“.

1964 - Paul D. BOYER postuloval hypotézu „syntézy ATP na základě konformačních změn enzymu“.

1973 - Paul D. BOYER „ Binding Change Mechanisms“. Klíčovým krokem je mechanické uvolnění syntetizovaného ATP.

1981 - John E. WALKER sekvenoval gen pro syntézu ATPsynthasy.

1994 - John E. WALKER a spol. publikoval strukturu ATPsynthasy.

1996 - 97 - publikovány tři různé postupy modelování rotace spojené se syntézou ATP. Mikroskopicky - Masasuke YOSHIDA.

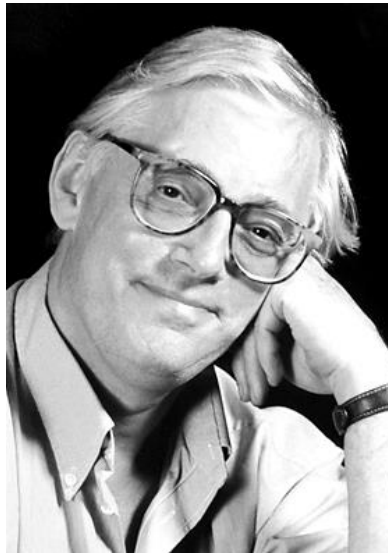
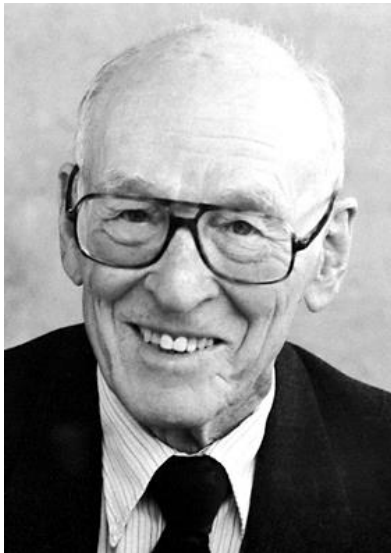
Nobelova cena za chemii 1978 Peter MITCHELL.

The Nobel Prize in Chemistry 1978 was awarded to Peter Mitchell "for his contribution to the understanding of biological energy transfer through the formulation of the chemiosmotic theory".

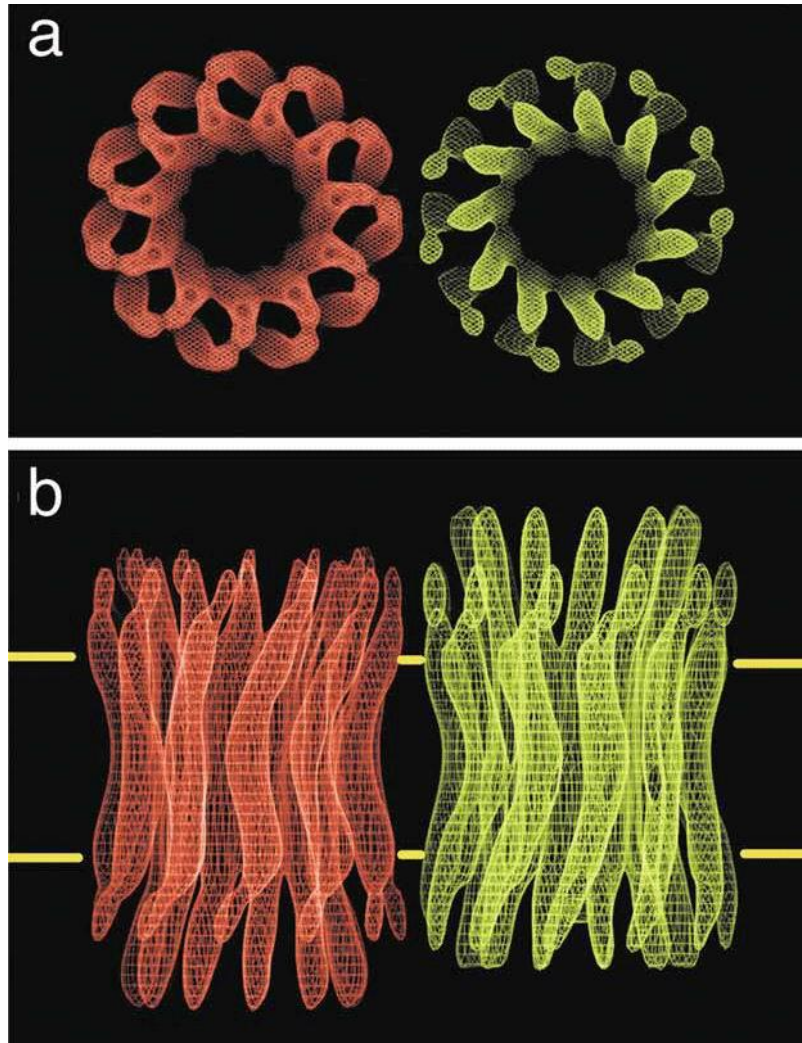


Nobelova cena za objev v kemii 1997.

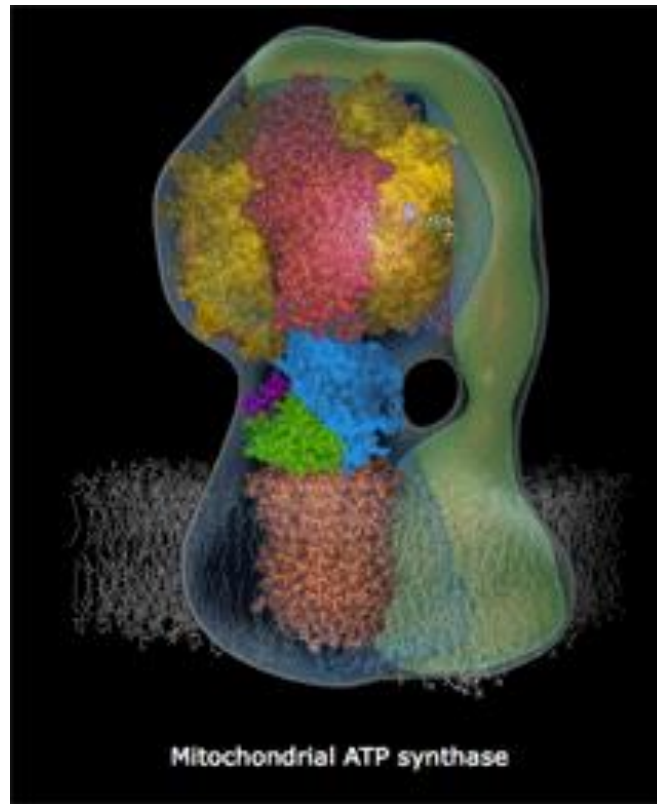
The Nobel Prize in Chemistry 1997 was divided, one half jointly to Paul D. Boyer and John E. Walker "for their elucidation of the enzymatic mechanism underlying the synthesis of adenosine triphosphate (ATP)" and the other half to Jens C. Skou "for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na⁺, K⁺ -ATPase"



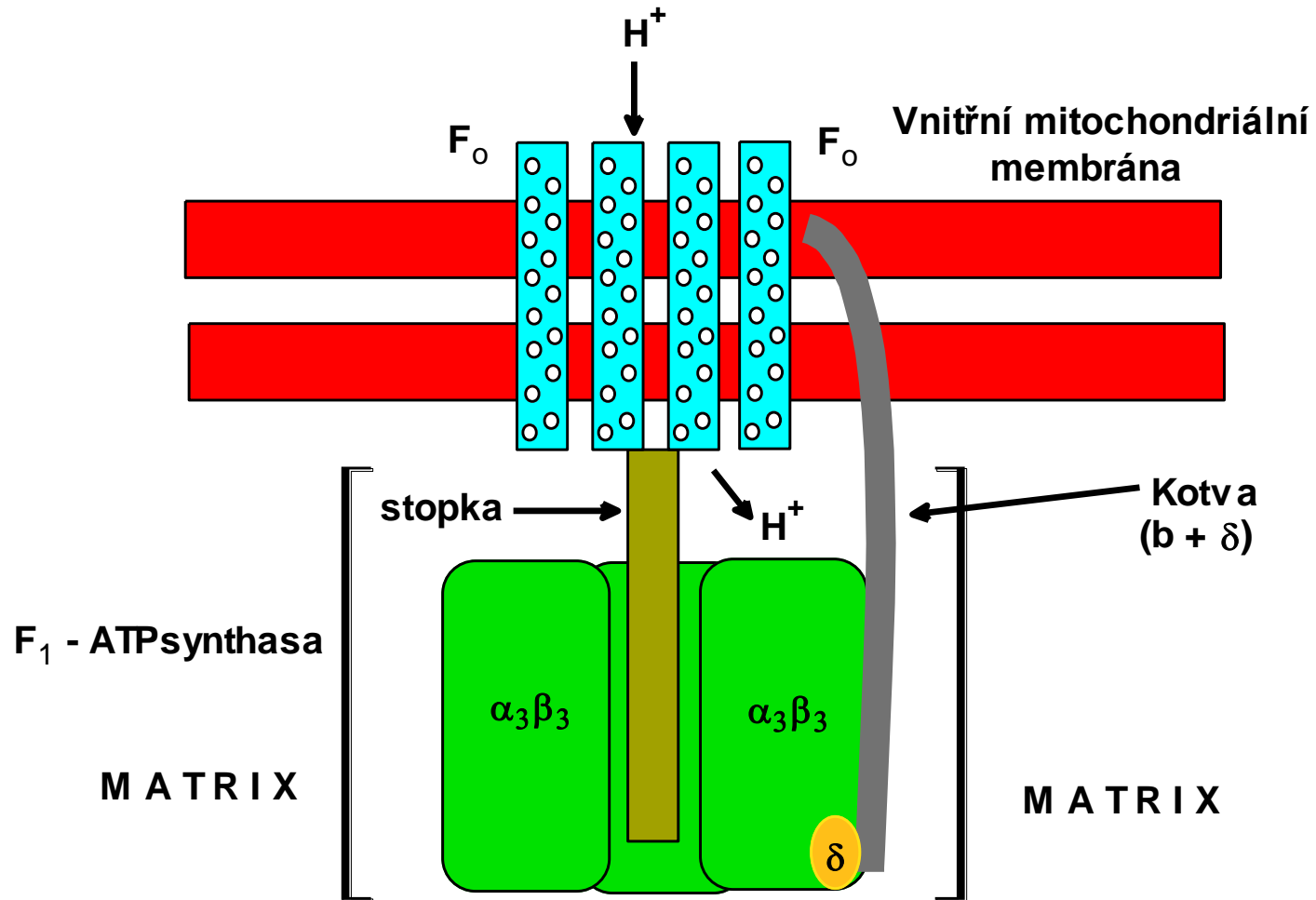
3 D zobrazení prstence c podjednotek jako hlavní součásti F_0 ATP synthasy



<http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/research/atp-synthase>



Schematický náčrt F_0F_1 ATPsynthasy.



Pohyblivý model podjednotky F_0 - tři segmenty. Tvorba
ATP z ADP a P_i .

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/ATPsyn.gif>

Tok protonů přes c kanálky roztáčí rotor (γ).

Mechanismus toku protonů je spojen se strukturou podjednotek a a c F_0 podjednotky ATPsynthasy.

Stacionární podjednotka a prochází membránou a je složena z 10 až 14 podjednotek c.

Struktura a obsahuje dva hydrofilní polokanálky, které neprochází celou membránou.

Protony vstupující do kanálku neprojdou přes membránu.

Podjednotka a je konstruována tak, že každý polokanálek přímo souvisí s jednou podjednotkou c.

Kanálek je tvořen helikální polypeptidovou strukturou obsahující uprostřed řetězce Asp (61).

Proton putující kanálkem z cytoplasmatické strany se naváže na Asp.

Podjednotka c s navázaným protonem se potočí na místo s nízkou koncentrací protonů a tam se proton uvolní.

Tok protonů přes c kanálky roztáčí rotor (γ).

Pohyb protonů půlkanálkem z míst s vysokou koncentrací protonů (cytoplasma) do míst s nízkou koncentrací protonů (matrix) pohání rotaci podjednotky c.

Podjednotka c s protonizovaným Asp se uvolní z kontaktu s cytoplasmatickým půlkanálkem a další c podjednotka ji nahradí. Když se c podjednotka pohybuje, podjednotka a je nepohyblivá (stacionární).

Každý proton, který vstoupí do půlkanálku a podjednotky na straně cytoplasmy se pomocí c podjednotky dostane do matrix.

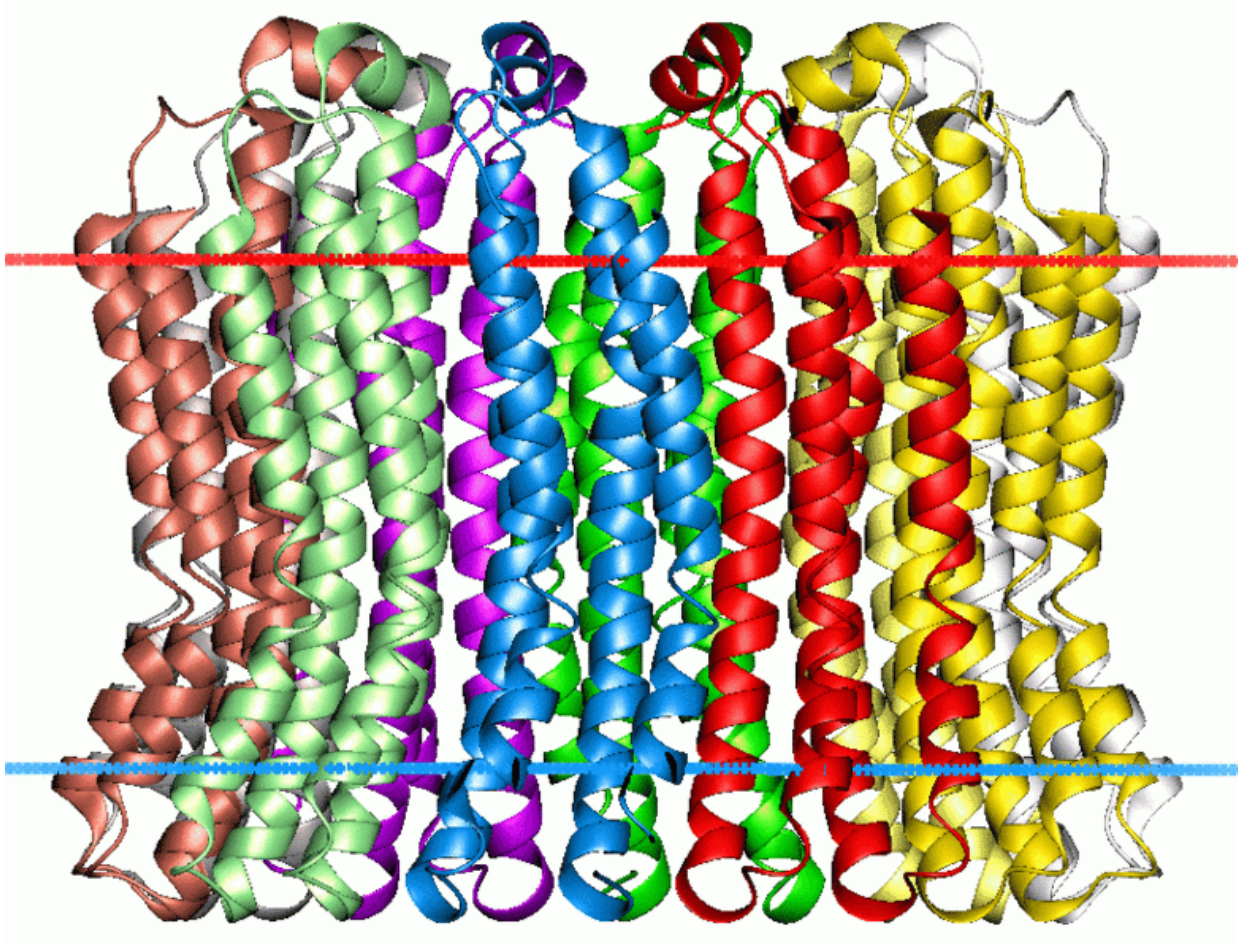
Tok protonů přes c kanálky roztáčí rotor (γ).

Počet c podjednotek v c kruhu se pohybuje mezi 10 až 14. Každá otáčka γ (rotoru) o 360° vede k syntéze tří molekul ATP.

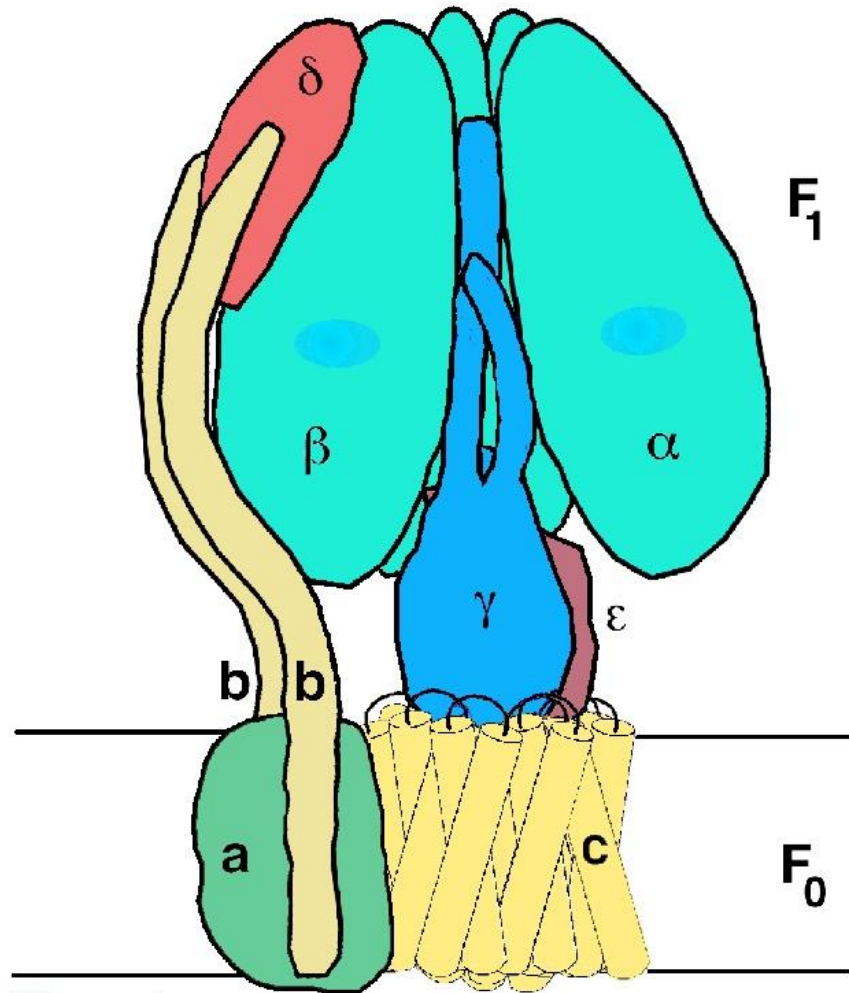
Uvažujme 10 c podjednotek, potom každá vytvořená molekula ATP spotřebuje $10 / 3 = 3,33$ protonů. Pro zjednodušení uvažujme 3 protony z matrix pro každý ATP !!

Uvažujme, že odpočívající člověk spotřebuje denně 85 kg ATP, potom musí projít ATPsynthasou $3,3 \times 10^{25}$ protonů.

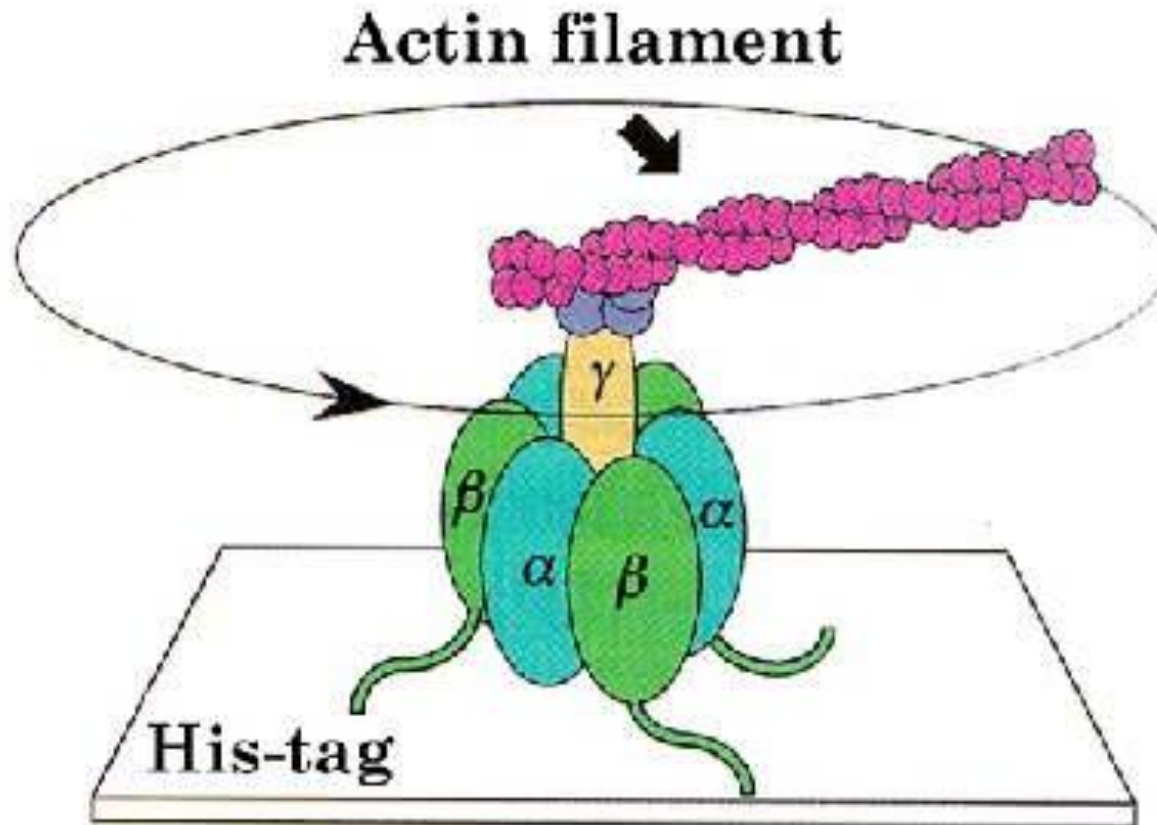
Podjednotka c ATPsynthasy (F_o).



Model F_1F_0 ATPsynthasy.

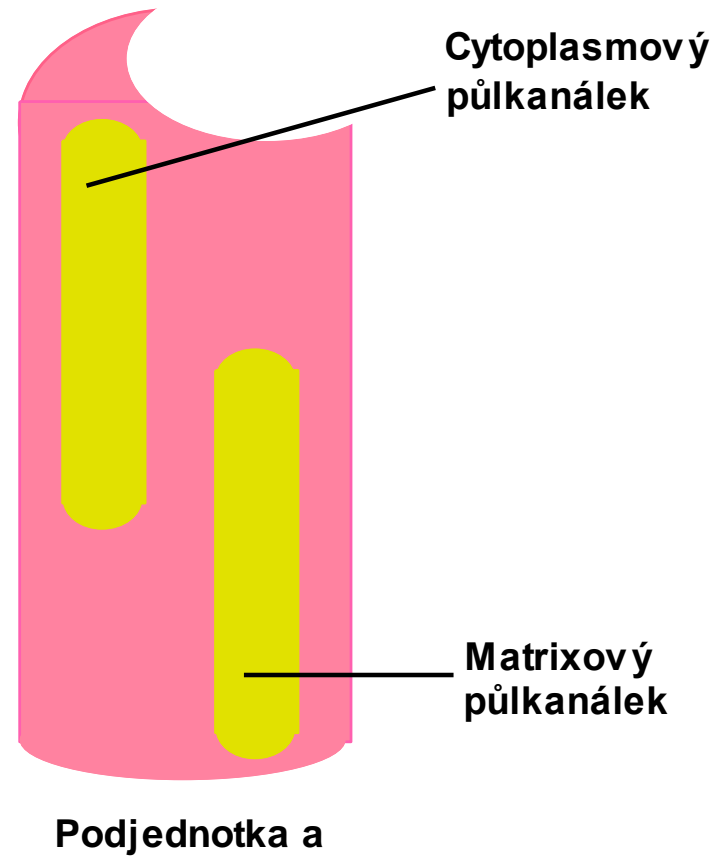
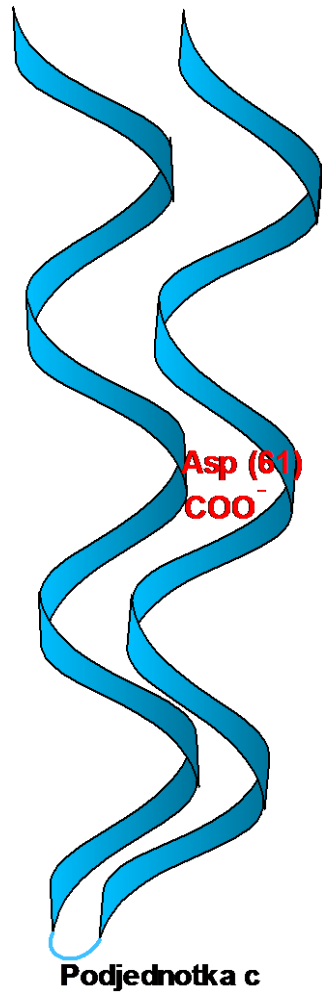


<http://im/index-j.html>www.cc.kyoto-su.ac.jp/~fmotoj



W. Junge, H. Lill & S. Engelbrecht
TIBS 22, 420 - 423 (1997)

Složky protonvodivé jednotky ATP synthasy.



Vstup elektronů z cytoplasmy do dýchacího řetězce.

Jednou z funkcí dýchacího řetězce je regenerace NAD^+ pro využití v glykolýze.

NADH neprochází vnitřní mitochondriální membránou, protože není propustná pro NAD^+ a NADH .

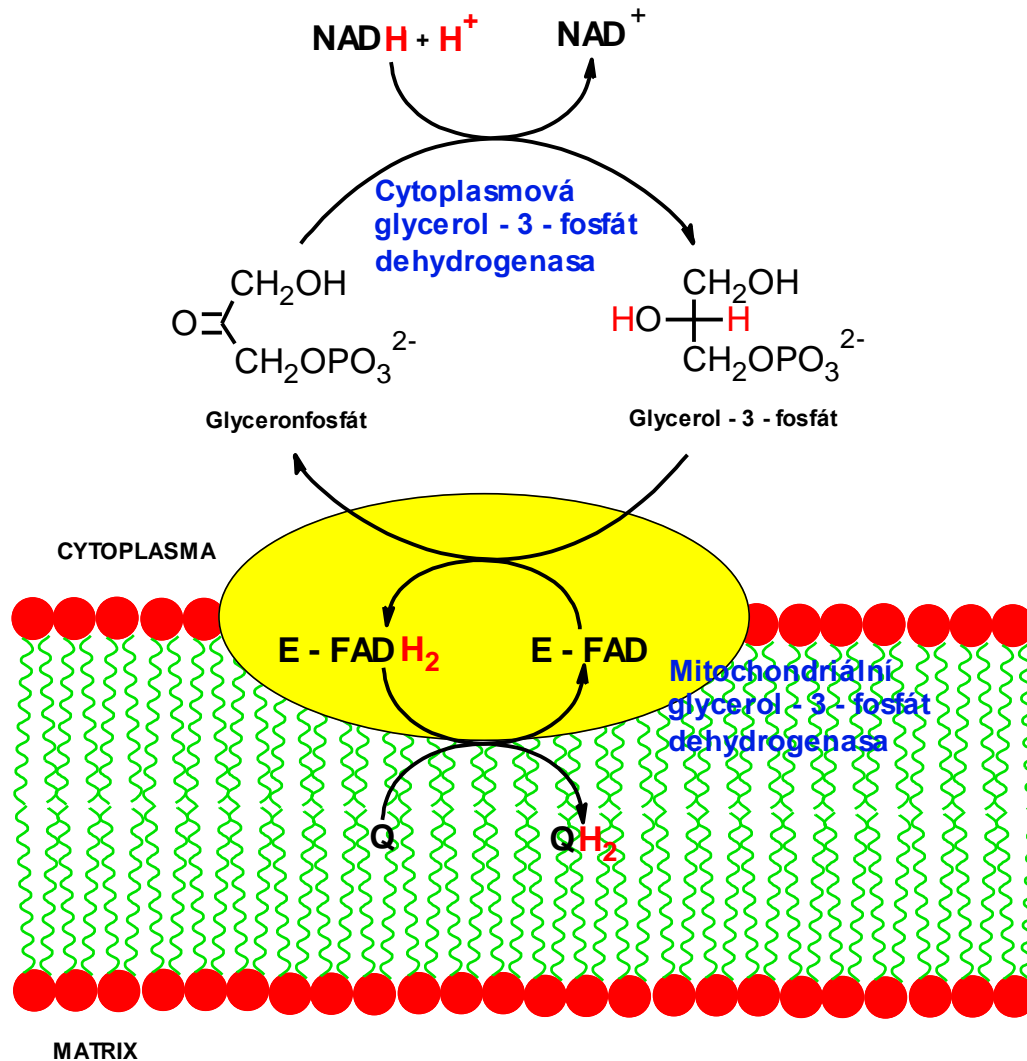
Jednou z cest elektronů z cytoplasmy do dýchacího řetězce je glycerol-3-fosfátový člunek.

Elektrony jsou přeneseny na QH_2 (ubichinol). Ubichinol předává elektrony na komplex III transportního řetězce a proto se vytvoří jen 2 ATP !!

Glycerol-3-fosfátový člunek je typické pro svalové buňky.

Srdeční sval a játra přenáší elektrony (NADPH) z cytoplasmy do mitochondrie malát-aspartátovým člunkem.

Glycerol-3-fosfátový člunek (kosterní svaly).

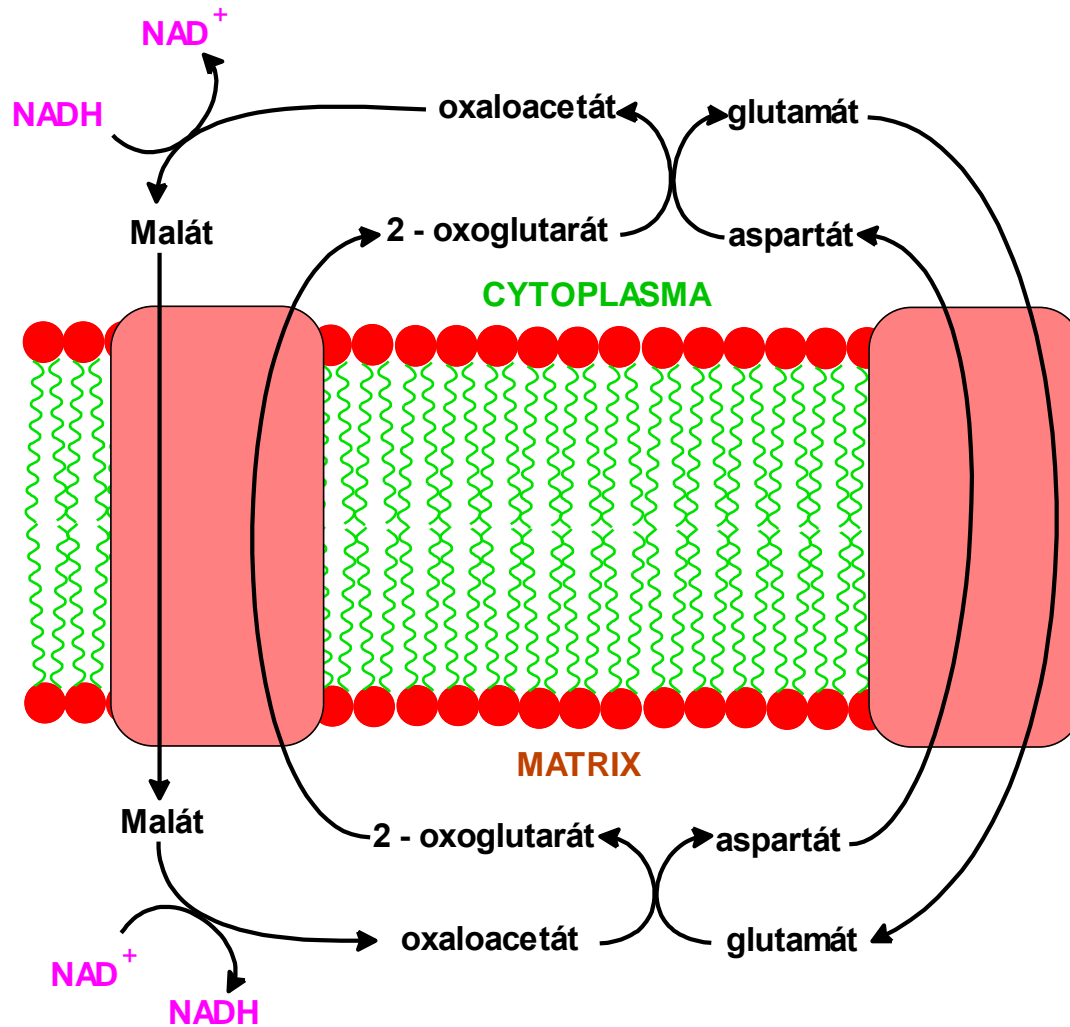


Malát-aspartátový člunek.

Malát-aspartátový člunek je zprostředkován dvěma membránovými transportéry a čtyřmi enzymy.

Elektrony z NADH jsou přeneseny v cytoplasmě na oxaloacetát za tvorby L-malátu, který je přenesen přes vnitřní mitochondriální membránu jako výměna za 2-oxoglutarát. Malát je reoxidován NAD^+ v matrix za tvorby NADH. Reakci katalyzuje enzym citrátového cyklu malátdehydrogenasa. Vzniklý oxaloacetát neprochází membránou, je podroben transaminaci za tvorby aspartátu, který je transportován do cytoplasmy jako výměna s glutamátem. Glutamát předává aminoskupinu na oxaloacetát za tvorby aspartátu a 2-oxoglutarátu. Aspartát je v cytoplasmě deaminován za tvorby oxaloacetátu a cyklus je restartován.

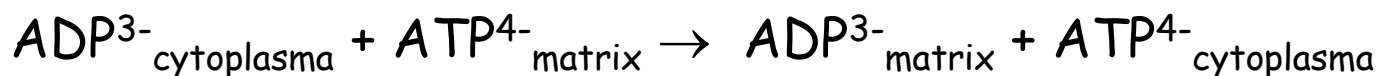
Malát - aspartátový člunek (srdce, játra)



Vstup ADP do mitochondrie - ATP-ADP translokasa.

ATP ani ADP neprochází volně vnitřní mitochondriální membránou.

Funkci plní specifický transportní protein ATP-ADP translokasa. (antiporter, 30kD).



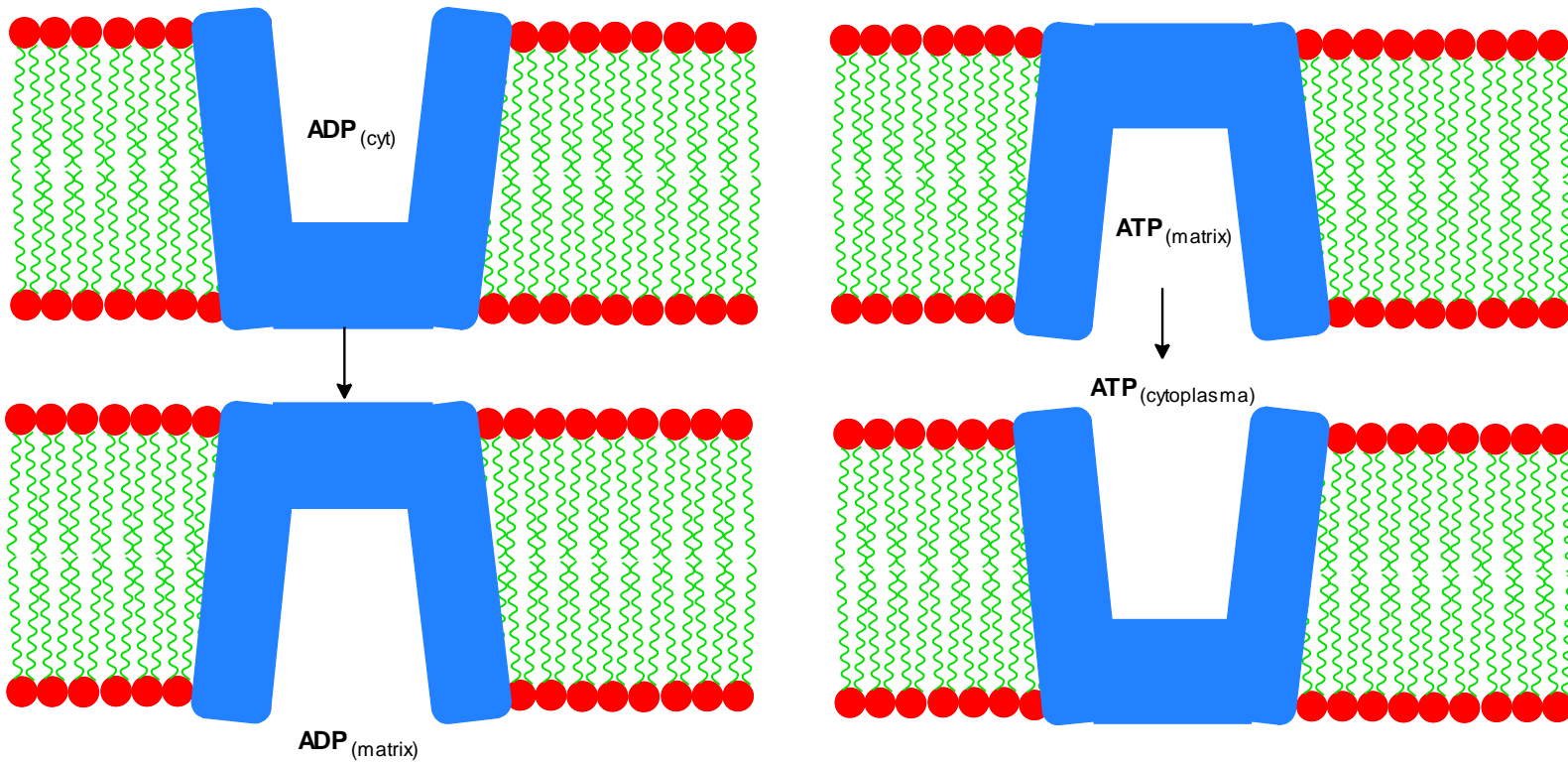
ATP-ADP translokasa tvoří zhruba 15% membránových proteinů.

Dospělý člověk transportuje denně ekvivalent své váhy ATP !!

Translokasa transportuje ADP do matrix a ATP z matrix do cytoplasmy.

ATP i ADP se váží na translokasu bez Mg^{2+} . Transport je energeticky náročný. Spotřebuje se při něm až čtvrtina energie vytvořené respirací (regenerace membrány). **Inhibice tohoto procesu zastavuje buněčnou respiraci !!**

Mechanismus mitochondriální ATP-ADP translokasy.



Další mitochondriální transportéry.

Fosfátový transportér, který spolupůsobí s ATP-ADP translokasou zprostředkovává elektroneutrální výměnu H_2PO_4^- za OH^- . Kombinace působení těchto dvou transportérů vede k výměně cytoplasmového ADP a P_i za matrixový ATP poháněn vstupem H^+ do matrix a výstupem OH^- do cytoplasmy.

Oba tyto transportéry, které doprovází ATP synthasu vytváří velký komplex nazvaný **ATP synthasom**.

Další homologní transportéry: dikarboxylátový transportér přenáší malát, sukcinát a fumarát z matrix jako výměnu za P_i .

Pyruvát z cytoplasmy vstupuje pyruvátovým transportérem do mitochondriální membrány výměnou za OH^- .

Regulace buněčné respirace.

Kompletní oxidace glukosy poskytuje 30 ATP.

Dle publikace: Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A. a Harris, D.L., Biochemistry 30: 3576, 1991.

Syntéza molekuly ATP je poháněna tokem tří protonů přes ATP synthasu. Další jeden proton je spotřebován na transport ATP z matrix do cytoplasmy !! Proto $\text{NADH} = 2,5 \text{ ATP}$ a $\text{FADH}_2 = 1,5 \text{ ATP}$.

P/O, for ATP delivered to the outside of mitochondria, would be $10/(3 + 1) = 2.5$ (NADH) and $6/(3 + 1) = 1.5$ (succinate), each considerably lower than then textbook values of 3 and 2. Subsequently, careful reevaluation of the P/O ratios for NADH and succinate (FADH_2) indicated that the experimental values are close to 2.5 and 1.5

Výtěžek ATP z celkové oxidace glukosy.

Glykolýza: 2 ATP

Pyruvátdehydrogenasa - 2 NADH = 5 ATP.

Citrátový cyklus (přímo): 2 ATP

Oxidativní fosforylace:

2 molekuly NADH (reoxidace z glykolýzy) = 3 ATP

V případě transportu glycerol-3-fosfátovým člunkem !

2 molekuly FADH_2 = 3 ATP

6 molekul NADH = 15 ATP

Součet: 30 ATP. Tradičně v učebnicích 36 ATP.

Regulace buněčné respirace.

Rychlost oxidativní fosforylace je dána potřebou ATP.

Elektronový transport je pevně vázán na fosforylaci. Když není k dispozici ADP, elektronový transport se zastaví.

S rostoucí koncentrací ADP, roste rychlost fosforylace.

Regulace rychlosti oxidativní fosforylace ADP se nazývá respirační kontrola nebo akceptorová kontrola.

Hladina ADP ovlivňuje citrátový cyklus. Při nízké hladině ADP (odpočívající sval) se nespotřebovávají NADH a FADH_2 . CC se zpomaluje - je málo NAD^+ a FAD. V opačném případě se CC aktivuje.

Elektrony netečou z bohatých molekul (glukosa) na kyslík pokud není potřeba syntetizovat ATP.

Regulované odpojení.

Některé organismy mají schopnost odpojovat oxidativní fosforylaci od syntézy ATP jako způsob tvorby tepla. Hibernující živočichové mají hnědou adiposní tkáň bohatou na mitochondrie. Barva je tvořena kombinací zelených cytochromů a mnoha mitochondrií.

Vnitřní mitochondriální membrána těchto živočichů obsahuje velké množství odpojovacího proteinu (UCP-1, uncoupling protein) jinak thermogeninu (dimer 33 kD podobá se ATP-ADP translokase).

UCP-1 generuje teplo zkratem protonového gradientu - přes UCP-1 tečou protony zpět do matrix mimo ATP syntasu.

UCP-1 je aktivován chladem vyvolanou hydrolýzou triacylglycerolů - vzniklé mastné kyseliny aktivují thermogenin.

Ženy mají hnědou adiposní tkáň na prsou (hrudník) a krku aktivovanou chladem.

Inhibice oxidativní fosforylace.

Inhibice elektronového transportního řetězce.

Rotenon využívaný jako insekticid, amytal barbiturátové sedativum - inhibují elektronový transport v NADH-Q oxidoreduktase tím, že zabraňují vstupu substrátu NADH.

Při této inhibici není zasažen tok elektronů z FADH_2 (sukcinátdehydrogenasa)

Antimycin A antibiotikum, interferuje s tokem elektronů z cytochromu b_H Q-cytochrom c oxidoreduktasy.

Kyanid, azid (N_3^-) a oxid uhelnatý blokují elektronový tok v cytochrom c oxidase.

Kyanid a azid reagují z Fe^{3+} hemu a_3 .

Inhibice elektronového toku inhibuje také ATP syntézu.

Inhibice ATP synthasy.

Oligomycin, antibiotikum a dicyklohexylkarbodiimid (DCC) zabraňují toku protonů přes ATP synthasu.

Inhibice oxidativní fosforylace.

Odpojení (rozpojení) elektronového transportu od syntézy ATP.

Na příklad 2,4-dinitrofenol (DNP) a řada dalších aromatických kyselých sloučenin.

Tyto látky přenáší protony zpět z cytoplasmy do matrix mimo ATP synthasu.

Nedochází k tvorbě ATP. Zvyšuje se spotřeba kyslíku a oxidace NADH.

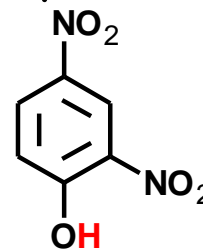
Často se energie uvolňuje jako teplo.

DNP je součástí herbicidů a fungicidů.

Inhibice exportu ATP.

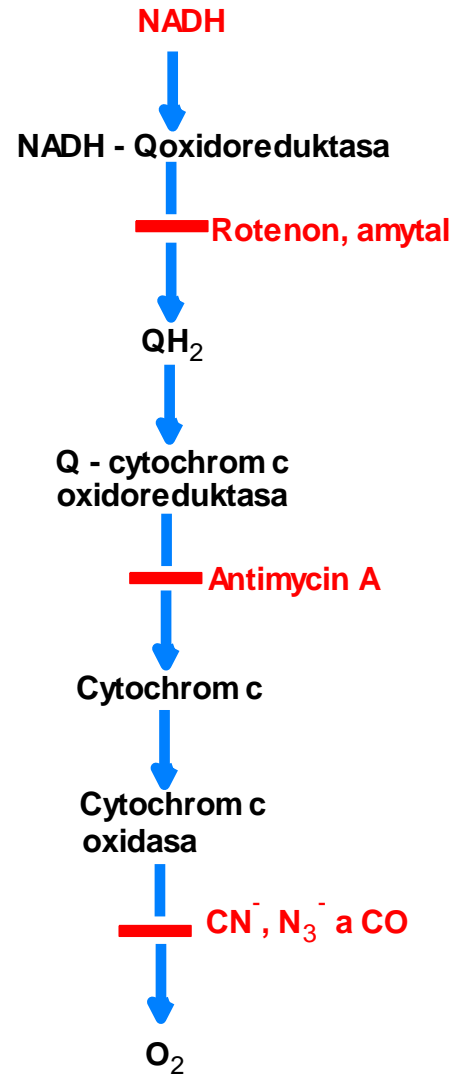
ATP-ADP translokasa je inhibována již malými koncentracemi atraktylosidu (rostlinný glykosid) nebo bongkrekovou kyselinou (antibiotikum).

Atraktylosid se váže na translokasu na straně cytoplasmy, bongkreková kyselina v matrix mitochondrie.



2,4 - dinitrofenol (DNP)

Inhibice a inhibitory oxidativní fosforylace.



Ústřední motiv bioenergetiky.

Oxidativní fosforylace je realizována na bázi protonového gradientu.

Protonové gradienty pohání řadu energií vyžadujících procesů jako je aktivní transport Ca^{2+} iontů v mitochondrii, vstup některých aminokyselin a sacharidů do bakterií, pohyb bakteriálních bičíků a přenos elektronů z NADP^+ na NADPH .

Protonový gradient se také uplatňuje při uvolnění tepla (hibernace).

Obecně: Protonové gradienty jsou ústředním převoditelným platidlem biologických systémů.

Protonový gradient je převoditelná forma volné energie.

