

Elektronový transportní řetězec

a

Oxidativní fosforylace



Vnější a vnitřní membrána

- Vnější membrána je hranice mezi matrixem a cytosolem
- Je poměrně propustná za velké molekuly
- Různé metabolické dráhy jsou lokalizovány v mitochondriích

VNITŘNÍ

Tloušťka

5 -7 nm

Tvar

zvláště složená

Povrch

VNĚJŠÍ ČÁST:

hladká

VNITŘNÍ ČÁST:

pravidelné jednotky

Extrakce

Fosfolipidů: membrána zůstává intaktní

VNĚJŠÍ

5 -7 nm

hladká

VNITŘNÍ ČÁST :

hladká

VNĚJŠÍ ČÁST:

nepravidelná

porušena

VNITŘNÍ**VNĚJŠÍ**

Permeabilita	selektivní	propustná pro velké molekuly
Poměr fosfolipidy/ bílkoviny	0,27	0,82
Obsah kardiolipinu	vysoký	nízký
Obsah Pi	vysoký	nízký
Cholesterol	nízký	vysoký
Koenzym Q	přítomen	není
Monoamine oxidase	není	přítomen
Cytochrom oxidase	přítomen	není

Vnitřní mitochondriální membrána je pro většinu hydrofilních látek nepropustná

Specifické transportní systémy:

NADH produkovaný glykolýzou musí získat přístup do řetězce transportu elektronů aby mohl být aerobně oxidován

VNITŘNÍ membrána :
skládá se z mnoha enzymů – 80% sloučenin jsou proteiny Enzymy komplexu dýchacího řetězce

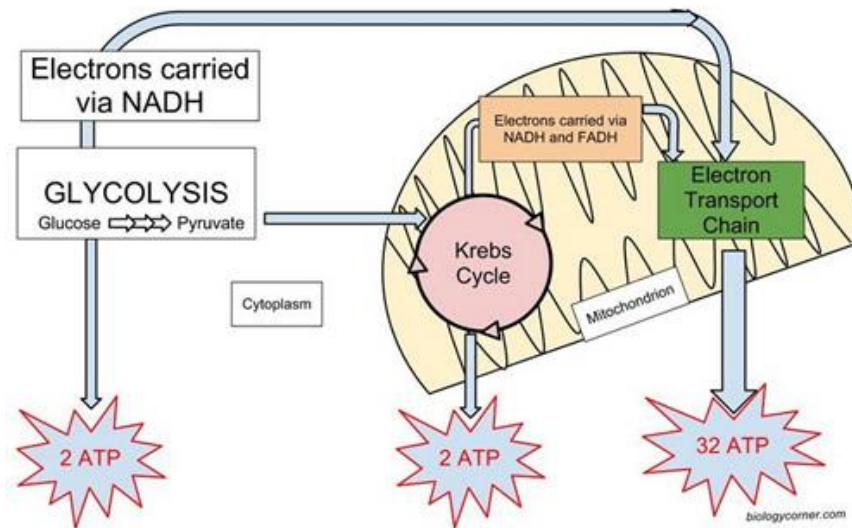
Transportér:	malate	<----->	citrate
	malate	<----->	alpha-ketoglutarate
	pyruvate	<----->	OH ⁻
	OH ⁻	<----->	P _i
	P _i	<----->	malate
	ATP	<----->	ADP
	GLU	<----->	ASP
	ornithin	<----->	citrulin

Člunky: malát – aspartátový (ve svalech)
glycerofosfátový (v játrech)

Karnitin transportní systém:
přenáší mastné kyseliny do mitochondrie, kde probíhá jejich oxidace

Respirační řetězec

Dýchací (respirační) řetězech je metabolická dráha, ve které dochází k oxidaci molekul za účelem výroby energie. Energie je následně uchována do chemické vazby ATP. Zahrnuje **Glykolýzu, Citrátový cyklus, Elektronový transportní řetězec a oxidativní fosforylaci.**

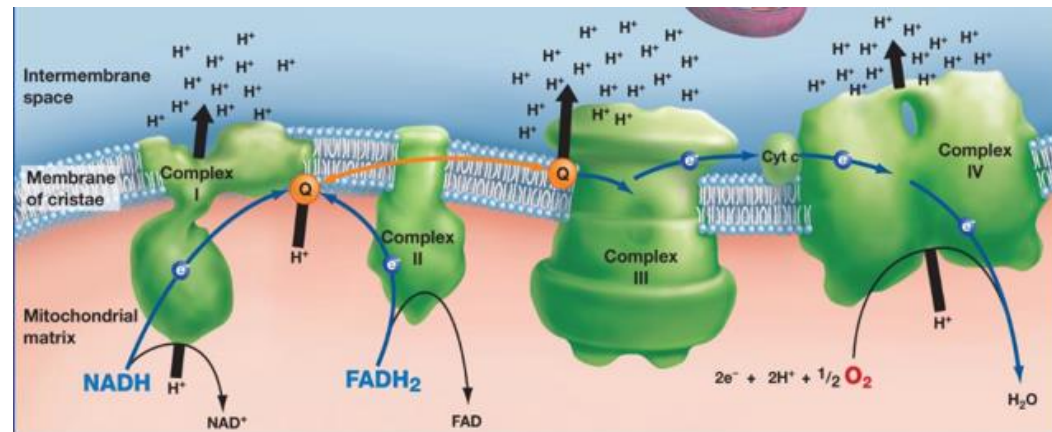


Oproti fermentaci (kvašení) je respirační řetězec mnohem účinnější. Nevýhodou je ale tvorba vysoce reaktivních kyslíkových radikálů, které mohou interagovat s proteiny nebo DNA a narušovat jejich funkci.

Elektronový transportní řetězec

U eukaryot je další fáze respiračního řetězce umístěna do velkých enzymatických komplexů umístěných na vnitřní mitochondriální membráně. Ty jsou také známy jako **Elektronový transportní řetězec**.

Během **oxidace** molekul dochází k uvolnění elektronů. Pomocí komplexů jsou elektrony transportovány do prostoru vnitřní mitochondriální membrány nebo do mezimembránového prostoru. Hromadění elektronů na druhé straně vnitřní membrány vytváří **elektrický potenciál**.

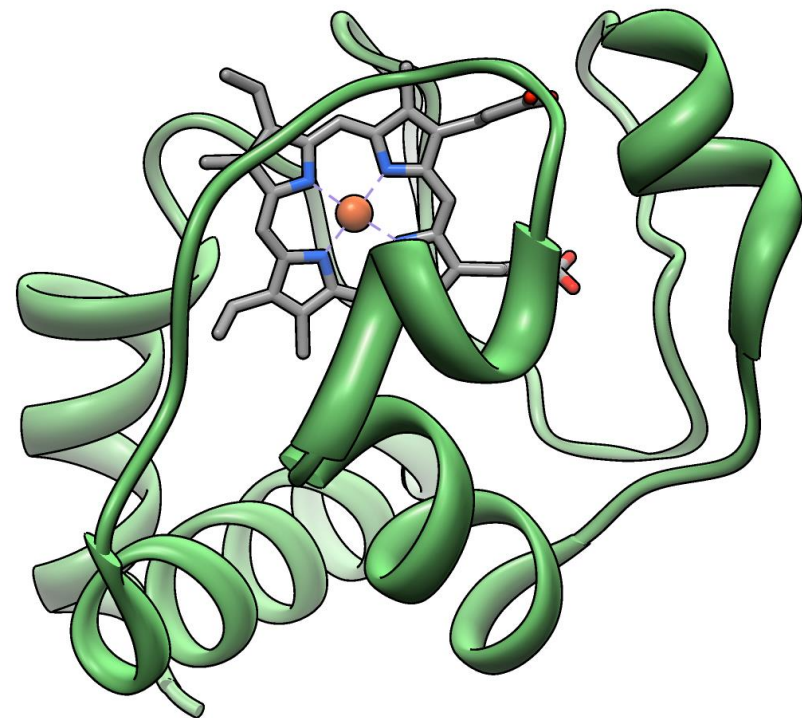
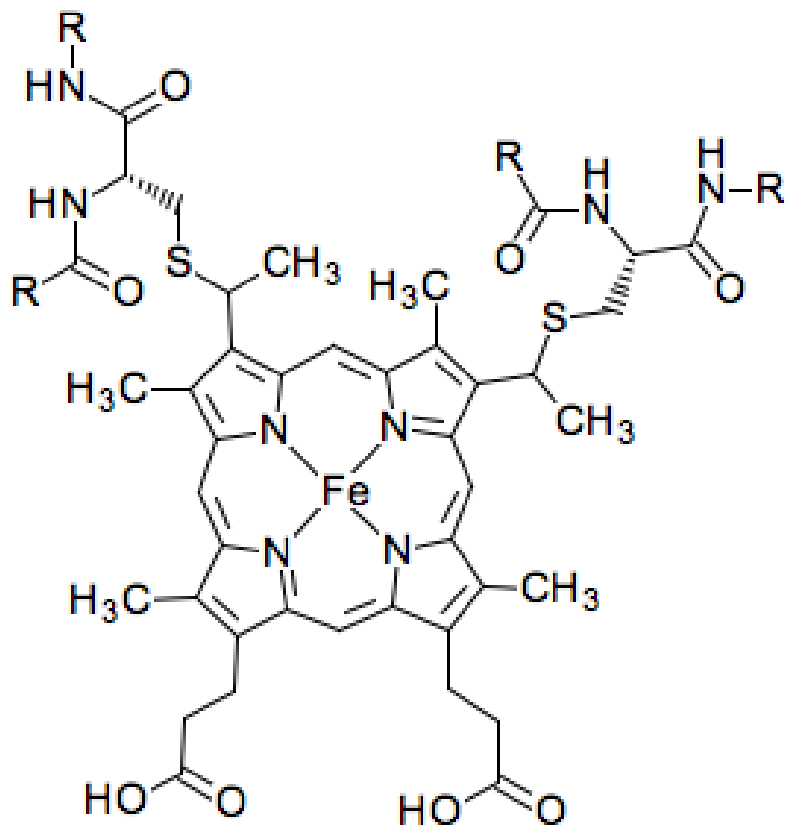


Společně s elektrony jsou na druhou stranu membrány z mitochondriální matrix transportovány protony. Tím dochází ke **zvýšení koncentrace H⁺** a **snížení pH** v **mezimembránovém prostoru**. Tento pH gradient je nakonec využit pro syntézu ATP.

Enzymy **Elektronového transportního řetězce** obsahují kofaktory, umožňující přesun elektronů i protonů.

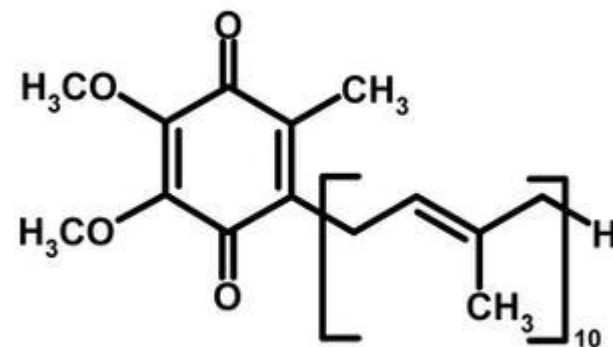
Malé proteiny nesoucí hemovou skupinu - Cytochromy, jako např. **Cytochrom c** jsou schopny přenášet 1 elektron. Elektrony jsou v respiračním řetězci zachytávány **atmem železa v molekule podobné hemu**.

Cytochrom c je navíc důležitý v regulaci buněčné smrti, apoptózy.

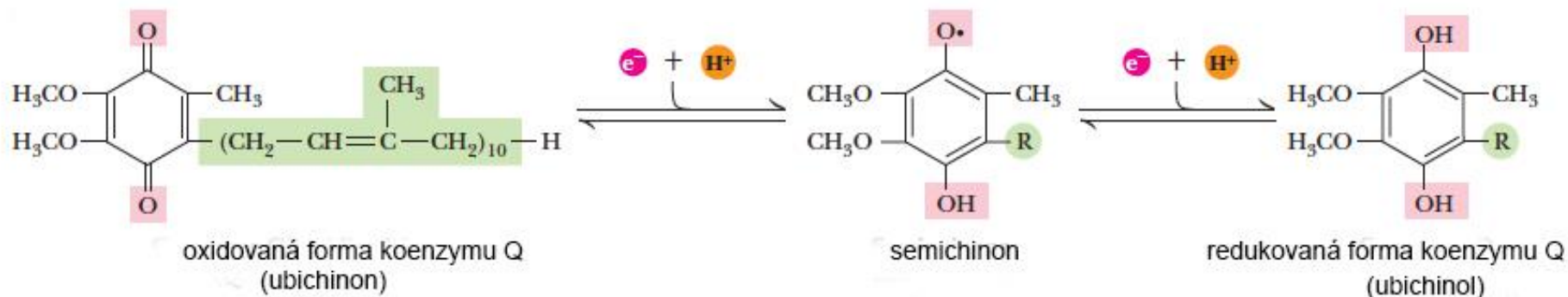


Vnitřní mitochondriální membrána je tvořena dvěma vrstvami fosfolipidů. Uvnitř membrány zajišťuje vychytávání a transport elektronů a protonů molekula **Koenzymu Q10 (Ubichinon, CoQ)**.

Molekula je složena z **benzochinonového** cyklu na které je napojeno několik isoprenových jednotek (nenasyčené alifatické uhlovodíky, dávají molekule hydrofobní charakter). Nejčastější počet jednotek je 10 (proto také CoQ10).



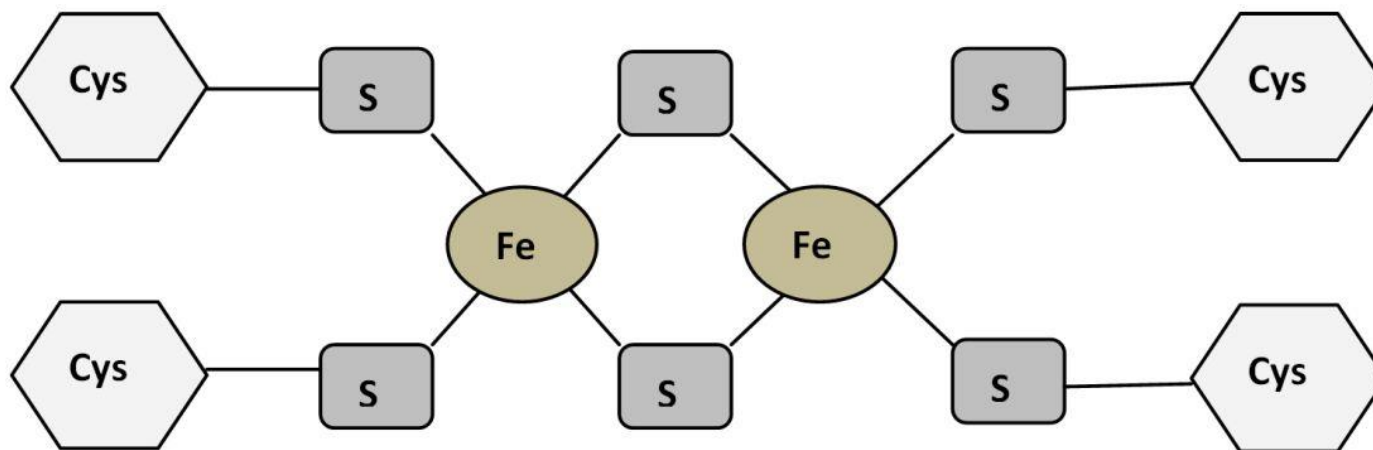
Molekula je rozpustná v tucích a může existovat ve třech redoxních stavech. Ubichinon (CoQ) může být redukován **1e a 1 H+** na semichinon. Další elektron a proton napadá druhou ketoskupinu a vzniká druhé hydroxylová alkoholová skupina – ubichinol.



Dalšími kofaktory transportu elektronů jsou molekuly složené s železa a síry – **železo/sírné klustry**. Molekuly jsou kovalentně vázány k proteinu. Fe má v molekule 4 koordinační vazby. Nachází se i v jiných enzýmech (např. Akonitáza).

2Fe-2S klustery

Fe je navázáno k proteinům přes 4 cysteiny (nebo v tzv. Rieskeho proteinech přes 2 cysteiny a 2 histidiny). Mezi sebou jsou atomy navázány opět přes síru. Atom železa v redukovaném stavu má oxidační číslo Fe^{2+} , po přijetí elektronu přechází na Fe^{3+} .



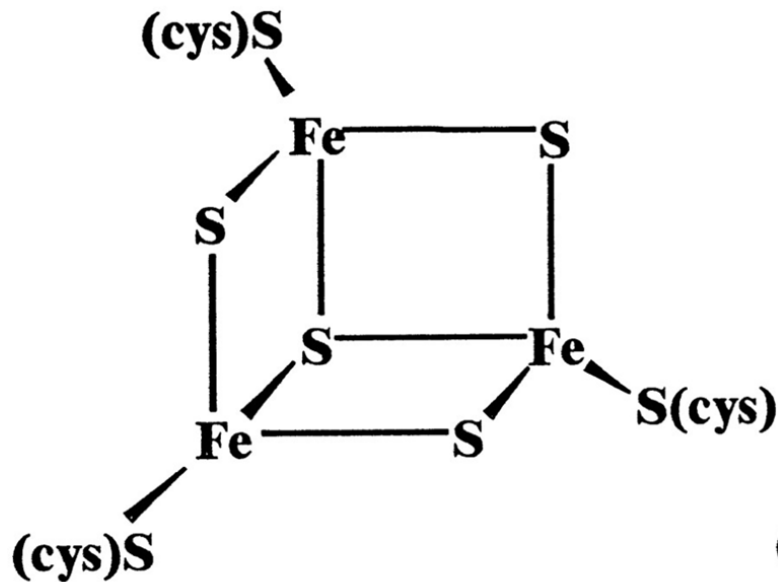
I když kluster obsahuje dva atomy Fe, je oxidován pouze jeden. 2Fe-2S kluster tedy dokáže přenášet pouze **1 elektron**.

4Fe-4S kluster

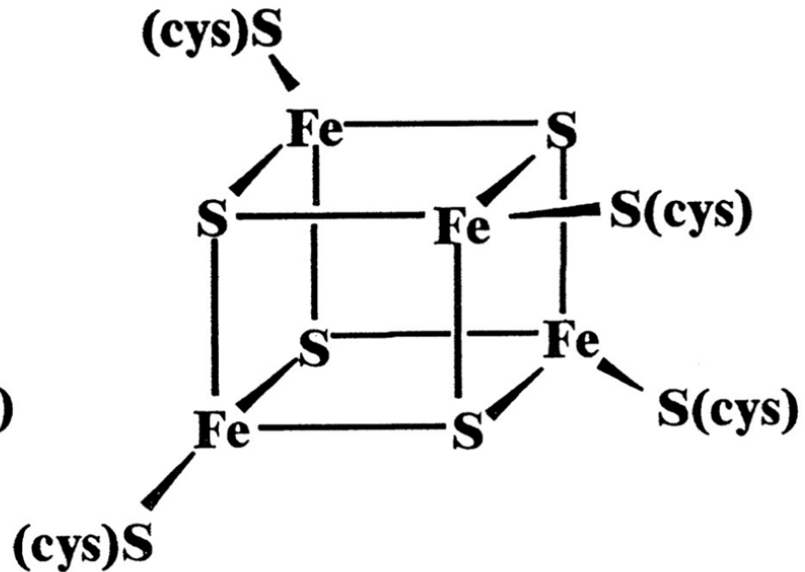
Má kubický tvar molekuly. Vazba Fe k proteinům umožněna přes cysteiny. Komplex je schopen transportovat **2 elektrony** (opět dva atomy zůstávají na Fe^{2+} redoxním stavu).

3Fe-4S kluster

Oproti ostatním mohou být **všechny 3 Fe oxidovány na Fe^{3+}** .



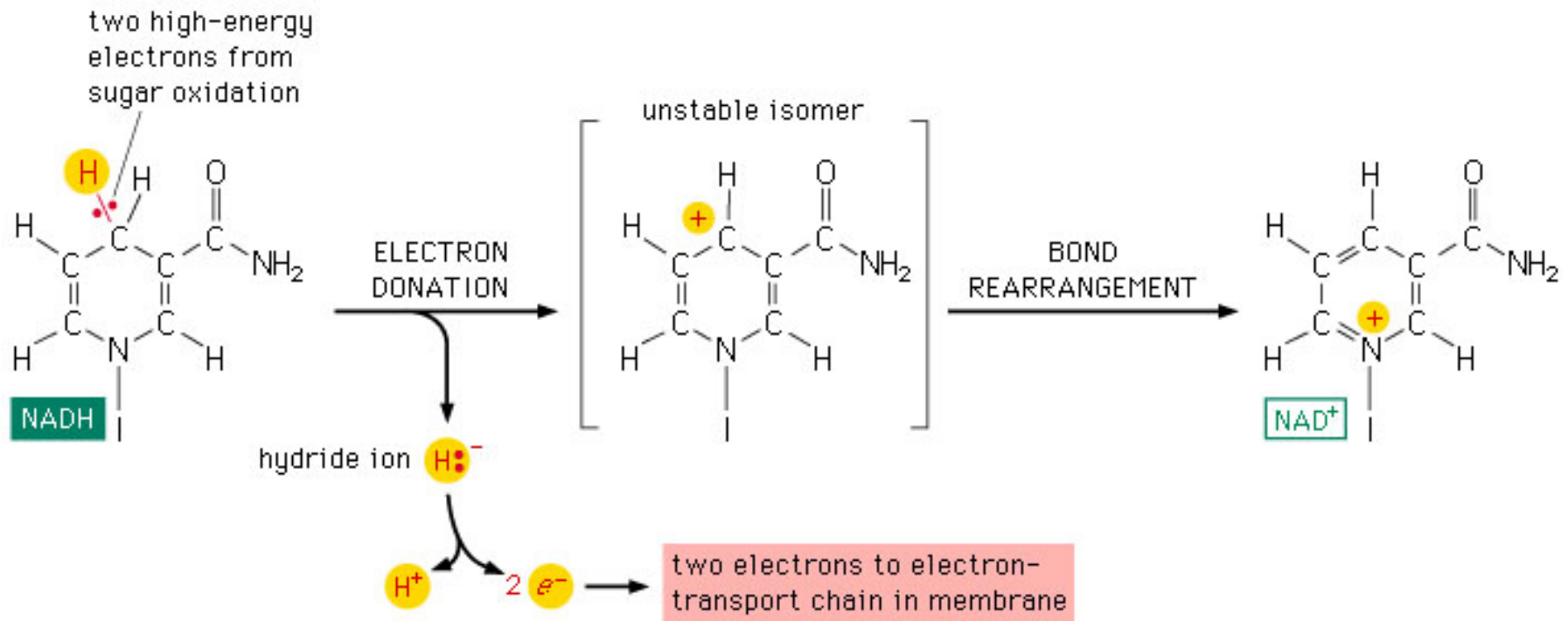
[3Fe-4S]



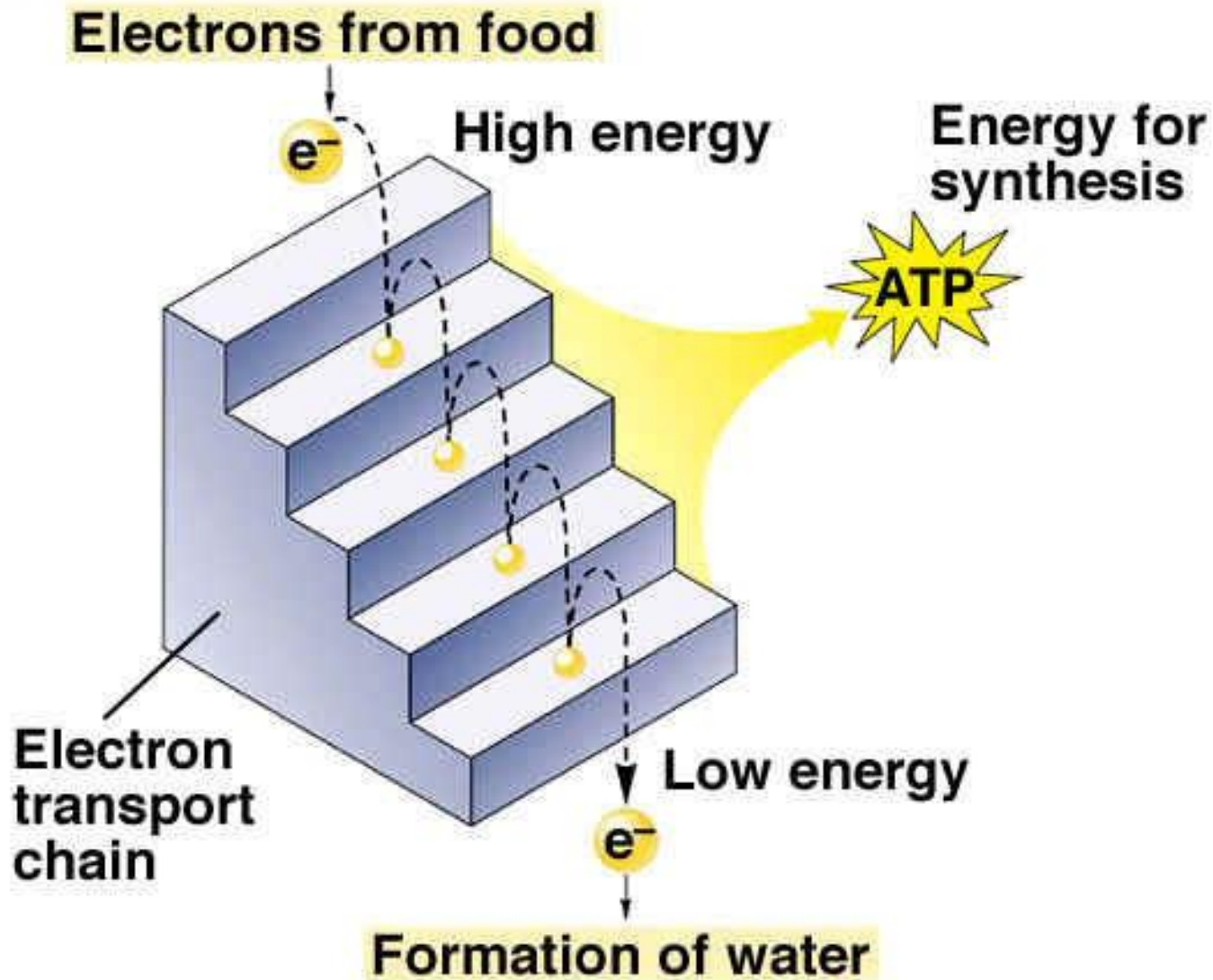
[4Fe-4S]

Katabolické reakce produkují velké množství redukovaných koenzymů – NADH a FADH². Uvolněním elektronů z molekuly dochází také k uvolnění velkého energetického kvanta.

Neřízená oxidace NADH by vedla k tomu, že by uvolněná energie vedla k nekontrolovatelné reakci. Proto elektrony prochází přes další přenašeče a na každém z nich dojde k malé ztrátě energie procházejícího elektronu.

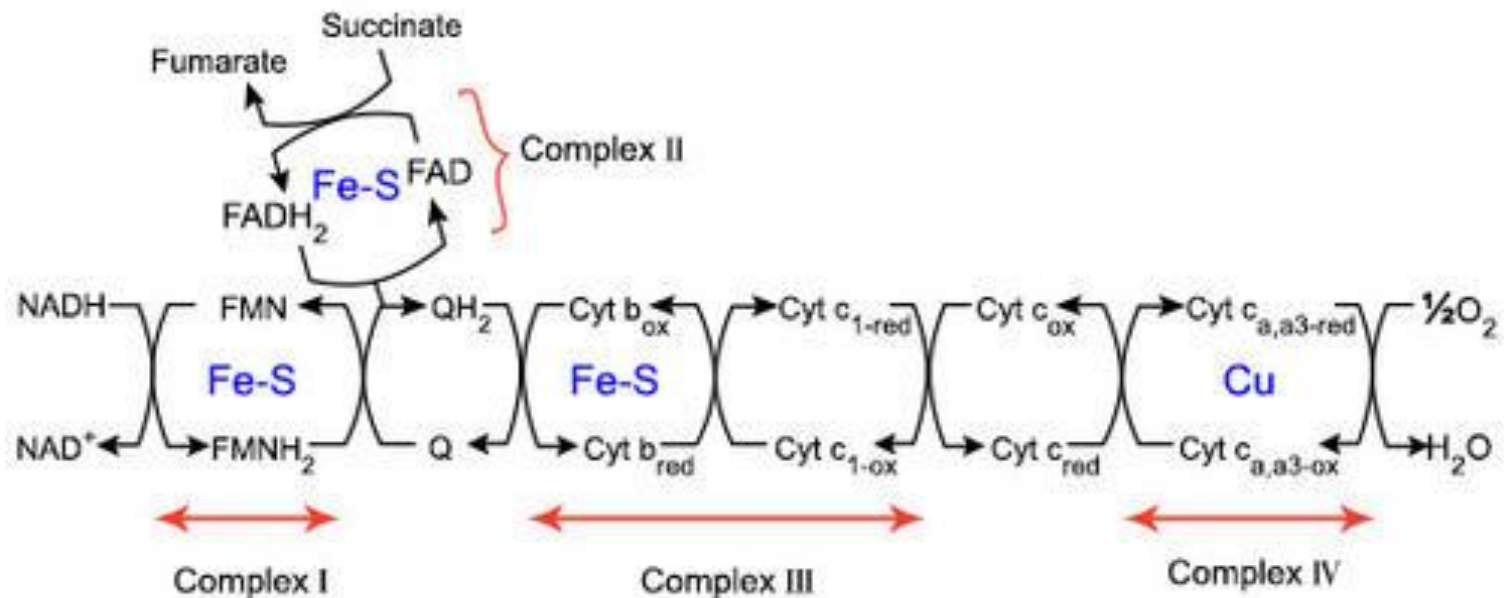


Electron Transport Schematic



Elektronový transportní řetězec se skládá ze **4 komplexů** – **KI**, **KII**, **KIII** a **KIV**. **Komplex II – sukcinát dehydrogenáza** je kromě toho i součástí citrátového cyklu.

Přesun elektronů a protonů mezi jednotlivými komplexy lze vyjádřit takto:



Komplex I

(NADH: ubichinon oxidoreduktáza).

Největší z komplexů. Komplex I je složen ze 44 polypeptidů a 8 Fe-S klusterů. Pouze 7 polypeptidů je kódováno mitochondriálním genomem.

Dochází v něm k oxidaci NADH na NAD⁺ a H⁺. Elektrony jsou transportovány řetězcem redoxních kofaktorů do vnitřní mitochondriální membrány na CoQ. Elektrony společně s protony z matrix pak slouží k redukci CoQ na CoQH₂.

Enzymatický proces může být reverzibilní

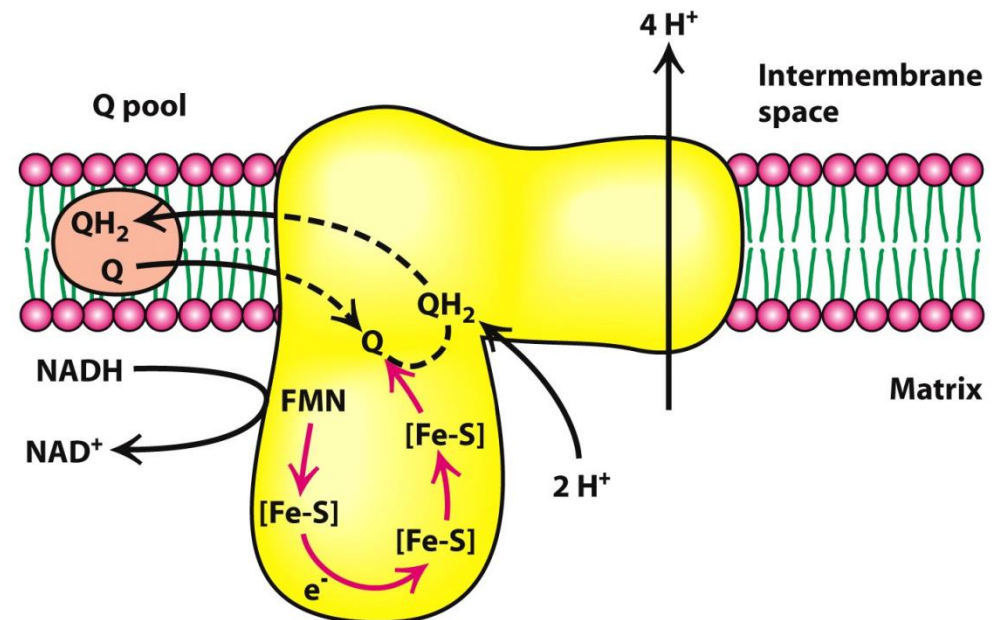


Figure 18.10
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Komplex obsahuje membránovou a mitochondriální hydrofilní doménu. Hydrofilní doména obsahuje všechny redoxní centra a místo pro vazbu NADH.

V první fázi se **NADH** naváže do katalytického místa **Komplexu I**.

Dojde k jeho oxidaci a uvolnění 2 elektronů.

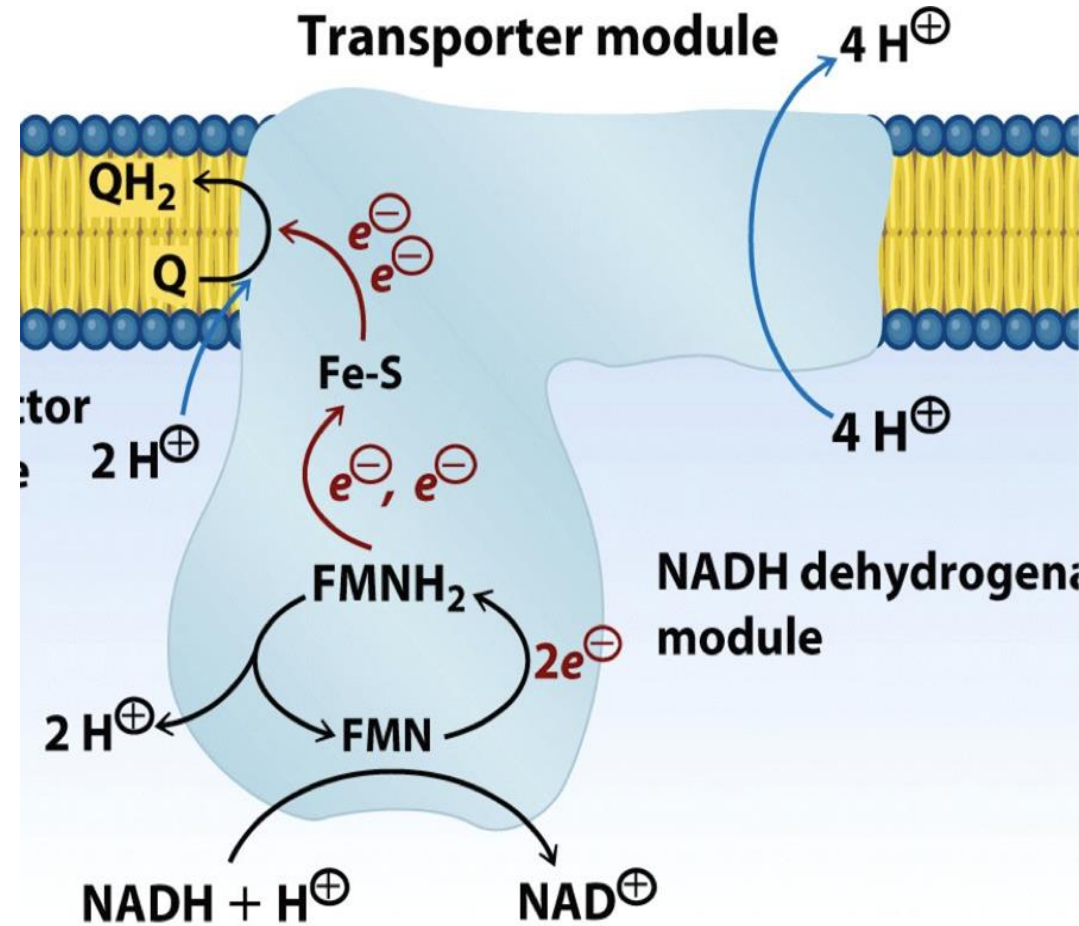
Oba se přenesou na první redoxní kofaktor



FMN (**flavinadenin mononukleotid**), molekula podobná FAD). Ten se redukuje na FMNH_2 .

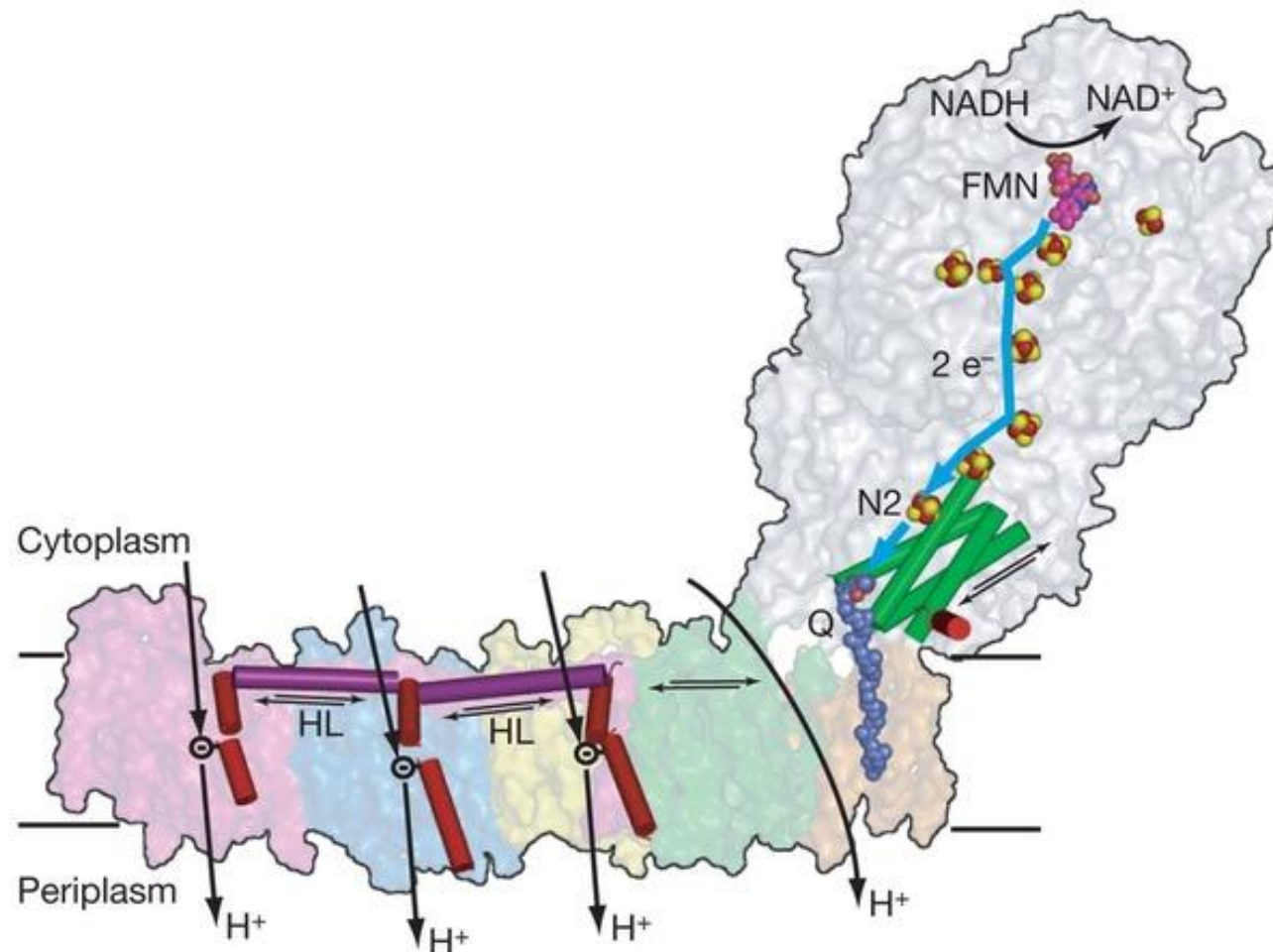
Následně jsou elektrony transportovány přes sérii **Fe-S** klusterů na **CoQ**.

Redukovaný CoQH_2 je poté redukován na Komplexu III.



**NADH:ubichinon
oxidoreduktáza**

Průtok elektronů komplexem vede ke změnám redoxního stavu aminokyselin a následné změny jeho struktury. Dojde k otevření protonového transportéru a přenesení 4 H⁺ na vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány.

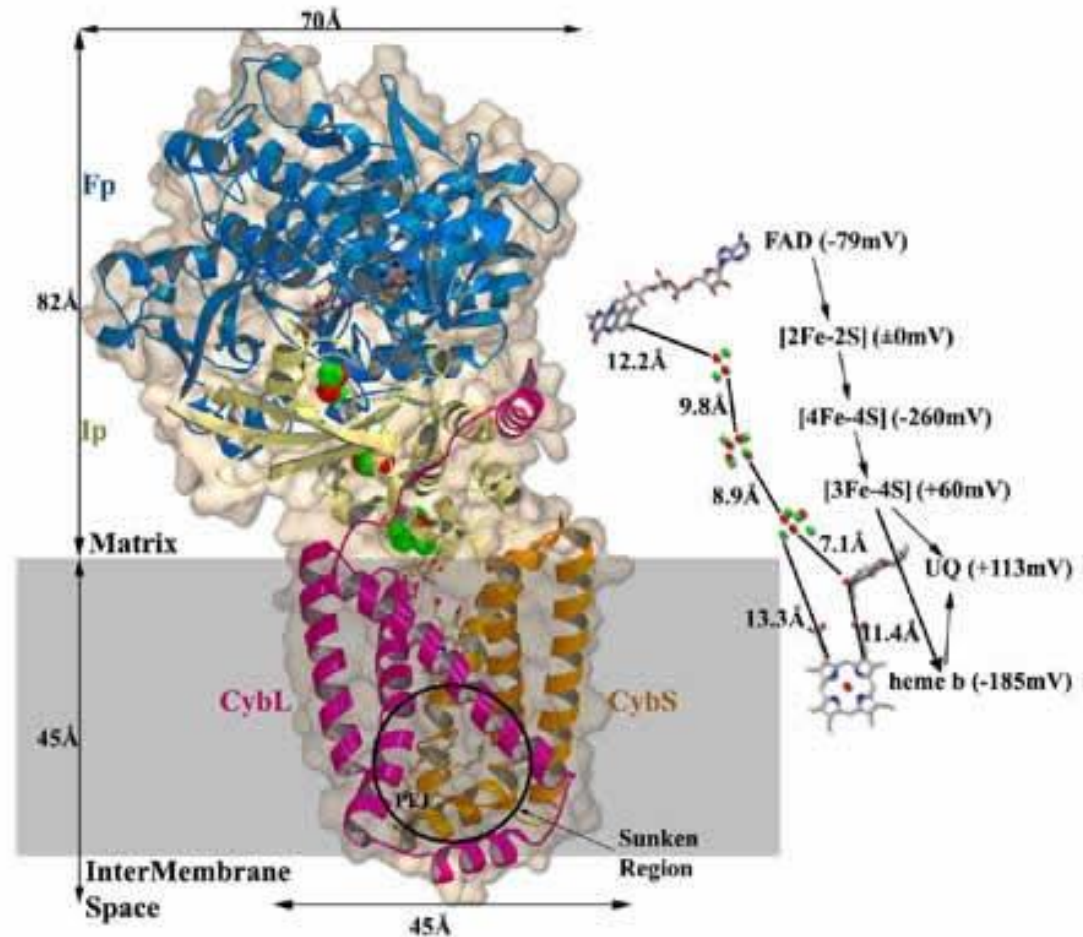


Komplex II

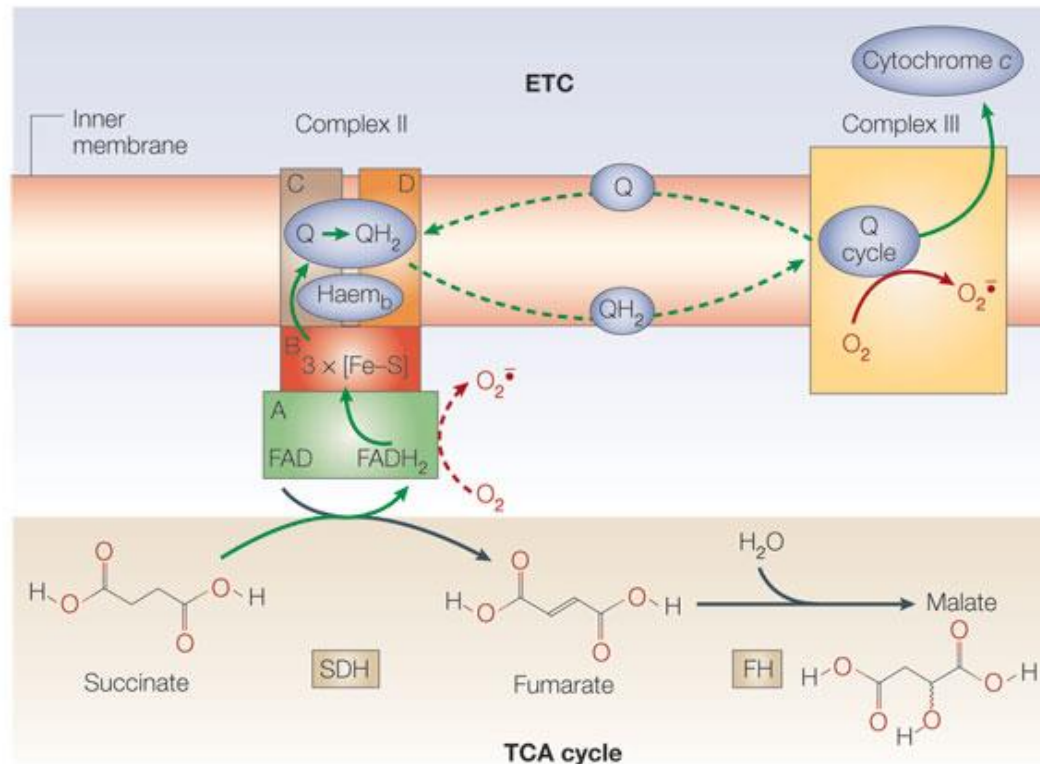
(sukcinát dehydrogenáza)

Enzym citrátového cyklu. Oxidací sukcinátu na fumarát vede k uvolnění elektronů, které jsou pak využity pro redukci CoQ.

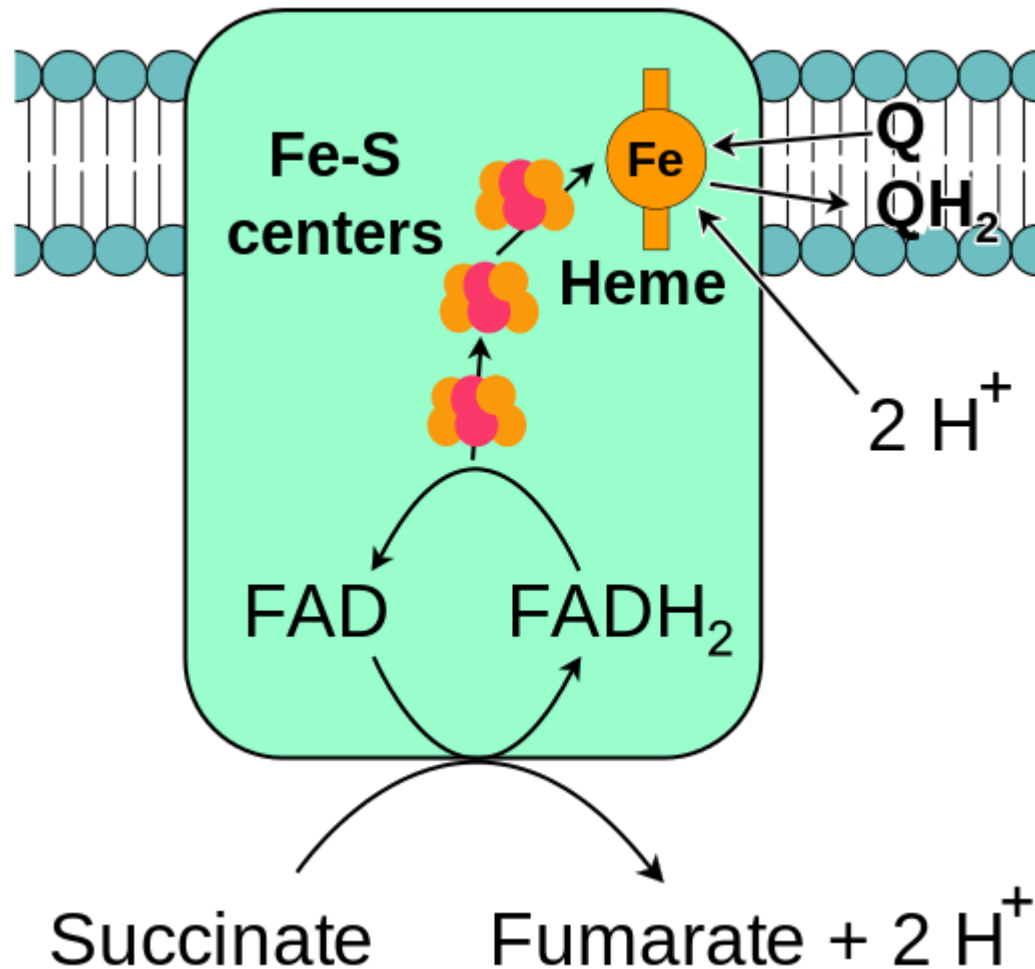
Skládá se ze 4 podjednotek. Hydrofilní podjednotka obsahuje kofaktory transportu elektronů – FAD a 3 Fe-S proteiny. Hydrofobní podjednotky ukotvuje komplex do vnitřní mitochondriální membrány. Tato podjednotka obsahuje molekulu hemu a vazebné místo pro CoQ.



Sukcinát je donorem dvou elektronů. Ty jsou přeneseny přes FADH_2 na **Fe-S** centra (vždy po jednom elektronu). Role **hemu** v komplexu není známá, myslí se že slouží jako molekula skladující první elektron. Po vazbě **CoQ** je pak jeden z elektronů předem přichystaný v oxidovaném hemu a druhý jde z **Fe-S** klusterů. Mechanismu může vést k přímé redukci **CoQ** na CoQH_2 a zabránit příliš dlouhé přítomnosti **semichinonu** (schopného tvorby kyslíkových radikálů).

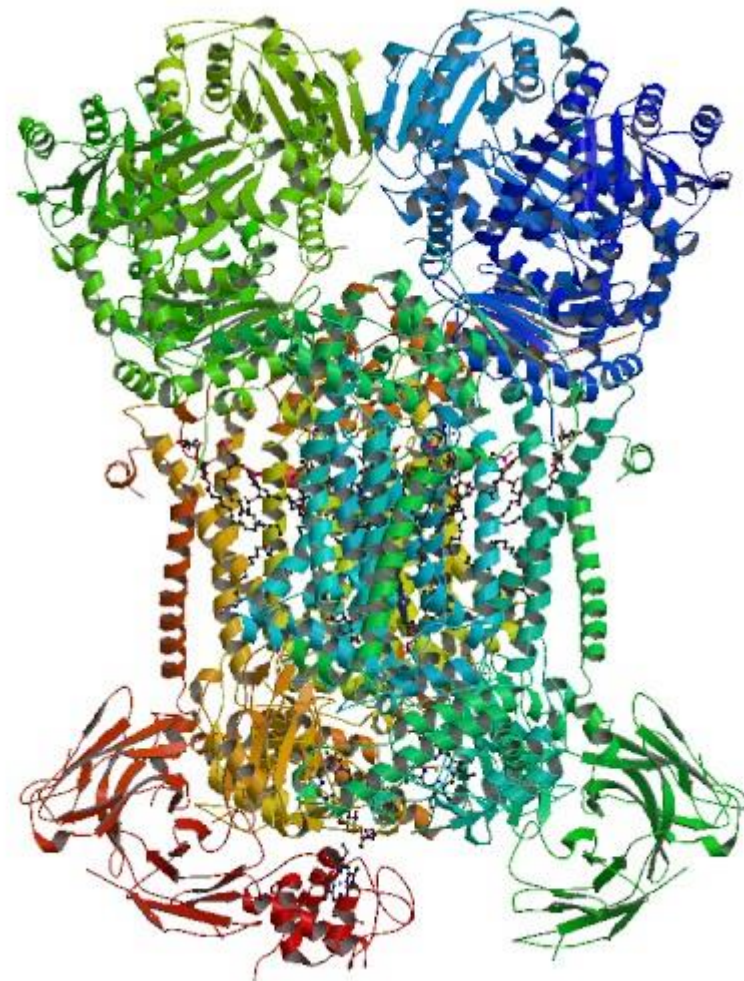
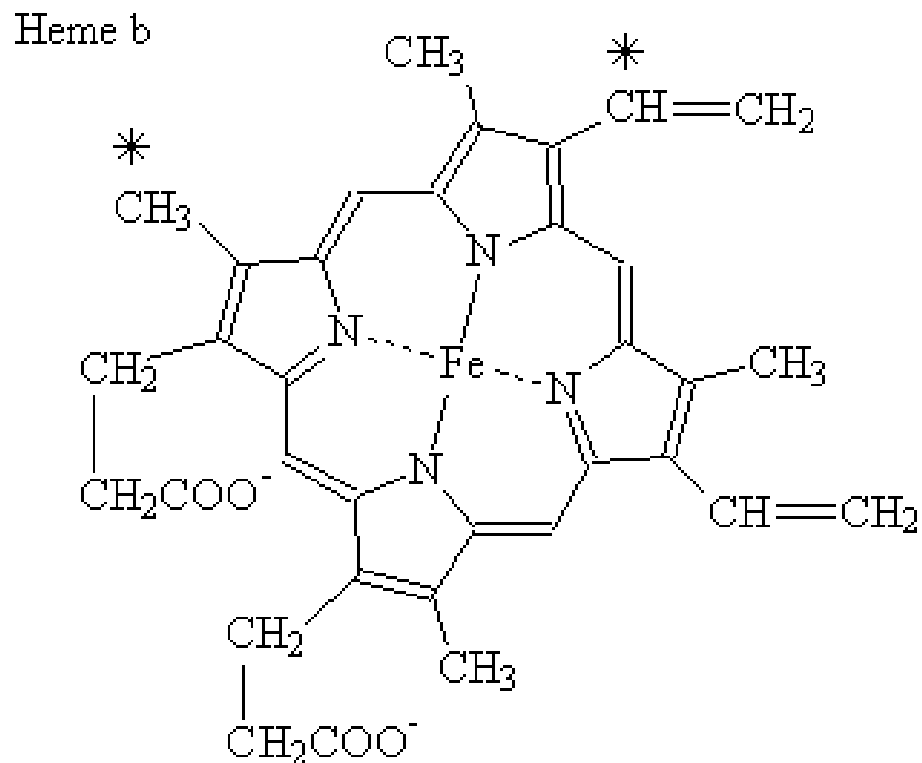


Komplex II má podobnou funkci jako **KI**. Ale nefunguje jako protonová pumpa a **netransportuje přímo přes membránu další protony**. Proto je energetický výtěžek **KII** mnohem nižší.



Redukovaný **CoQH2** transportuje elektrony a protony na **komplex III** (**CoQH2: cytochrom c reductáza**). KIII je transmembránový protein kódovaný **mitochondriální i jaderným genomem**. Komplex katalyzuje přenos elektronů na **cytochrom c**. Zároveň oxiduje/redukuje molekuly **CoQH2/CoQ**.

Komplex obsahuje 4 kofaktory: **cytochrom c1**, **cytochrom b-L**, **cytochrom b-H** a **2 Rieskeho proteiny** (s Fe-S klustery).

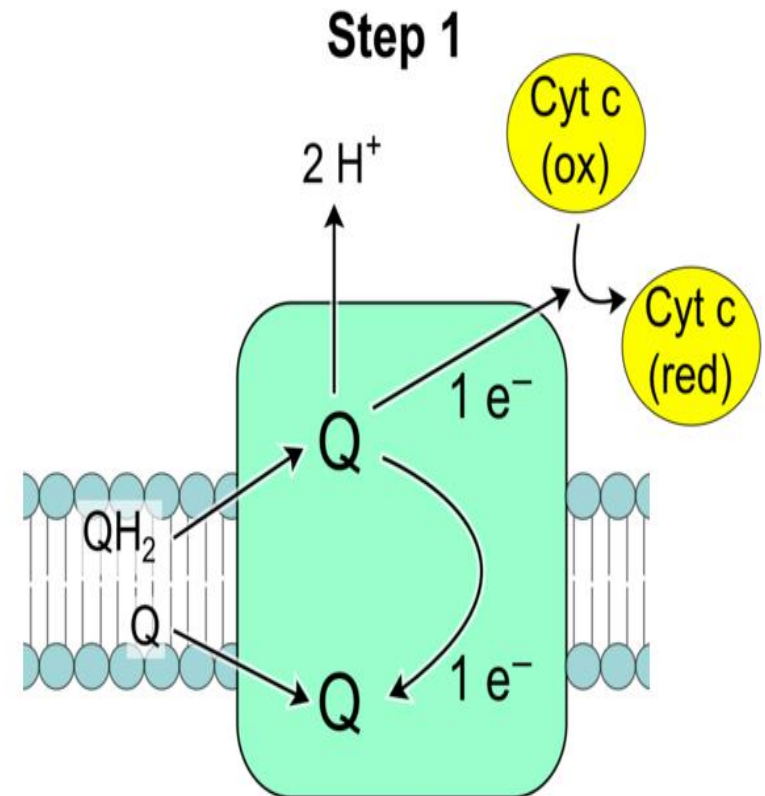


Komplex má více katalytických míst.

CoQH_2 vzniklý z KI a KII je transportován do místa Q_o v blízkosti **Rieskeho proteinů** a **cytochromu b-L**. Dochází k oxidaci CoQH_2 na CoQ .

Uvolněné protony jsou vypuštěny do mezimembránového prostoru. Oxidací vznikají 2 elektrony – jeden z nich je předán **Fe-S klastry** na **cytochrom c** (a redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+}).

Po redukci se ve vodě rozpustný **cytochrom c** odpojí od komplexu do mezimembránového prostoru.

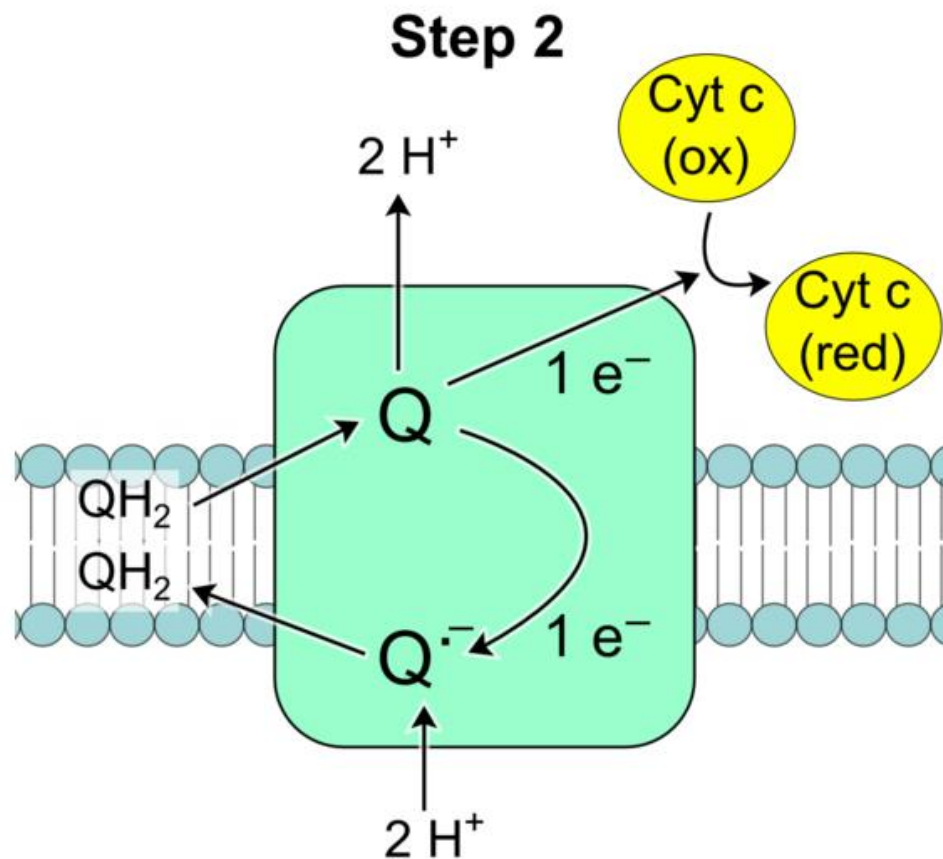


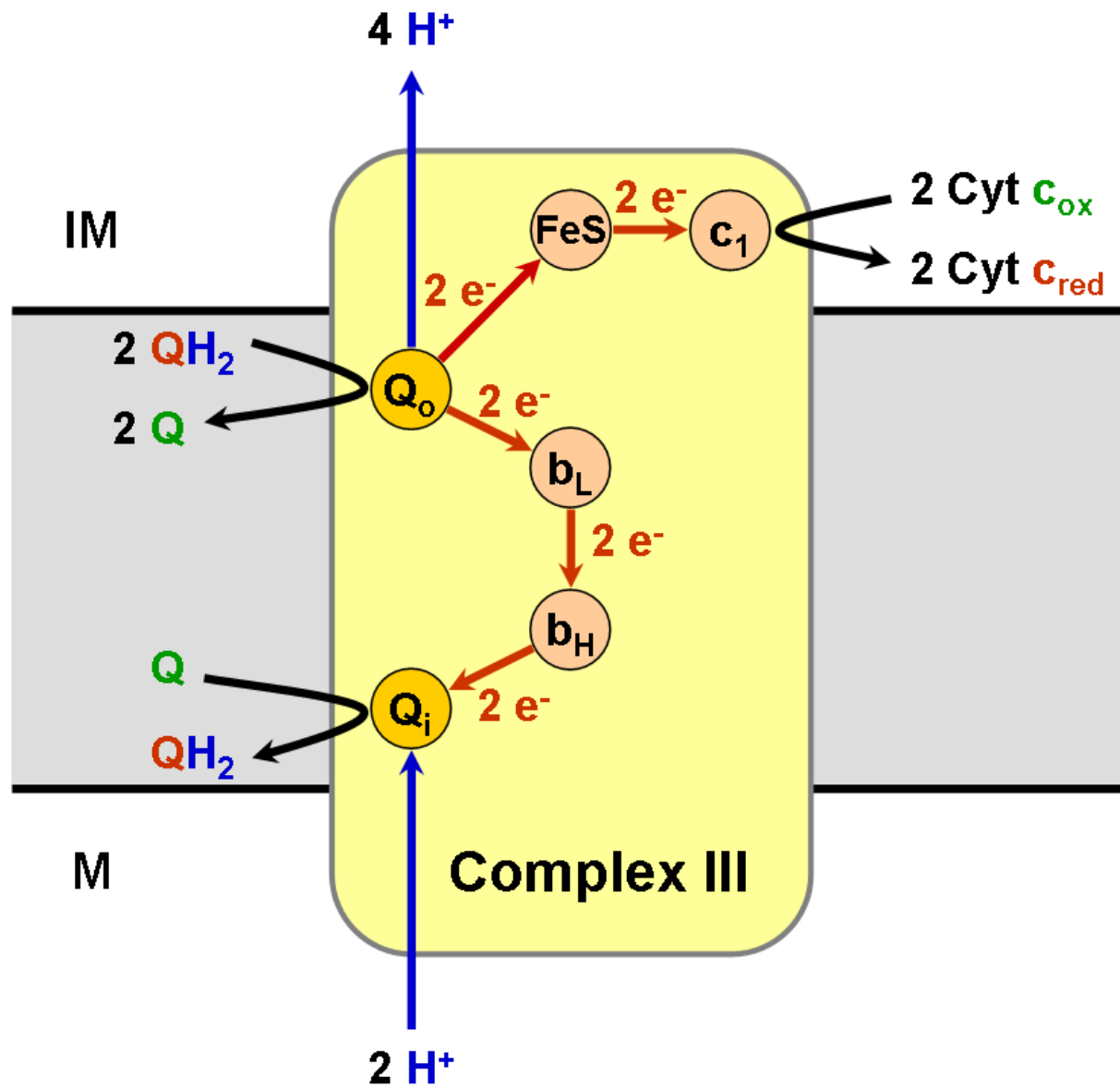
Dalším vazebným místem je **Q_i** – zde dochází k vazbě **CoQ**. Elektron procházející přes **cytochromy b-H** a **b-L** je využit pro jeho redukci a tvorbu semichinonového radikálu.

Pro plnou redukci je třeba druhé molekuly **CoQH₂** v **Q_o** místě. Druhý uvolněný elektron plně redukuje semichinon na **CoQH₂**. Protony pro ubiquinol jsou získány z mitochondriální matrix.

Tak v průběhu 2 otáček **KIII** dochází ke vzniku 2 redukovaných **cytochromu c**, dvou molekul **CoQ** a jedné molekuly **CoQH₂**.

Dva protony jsou transportovány dovnitř membrány, další 4 ven do mezimembránového prostoru.



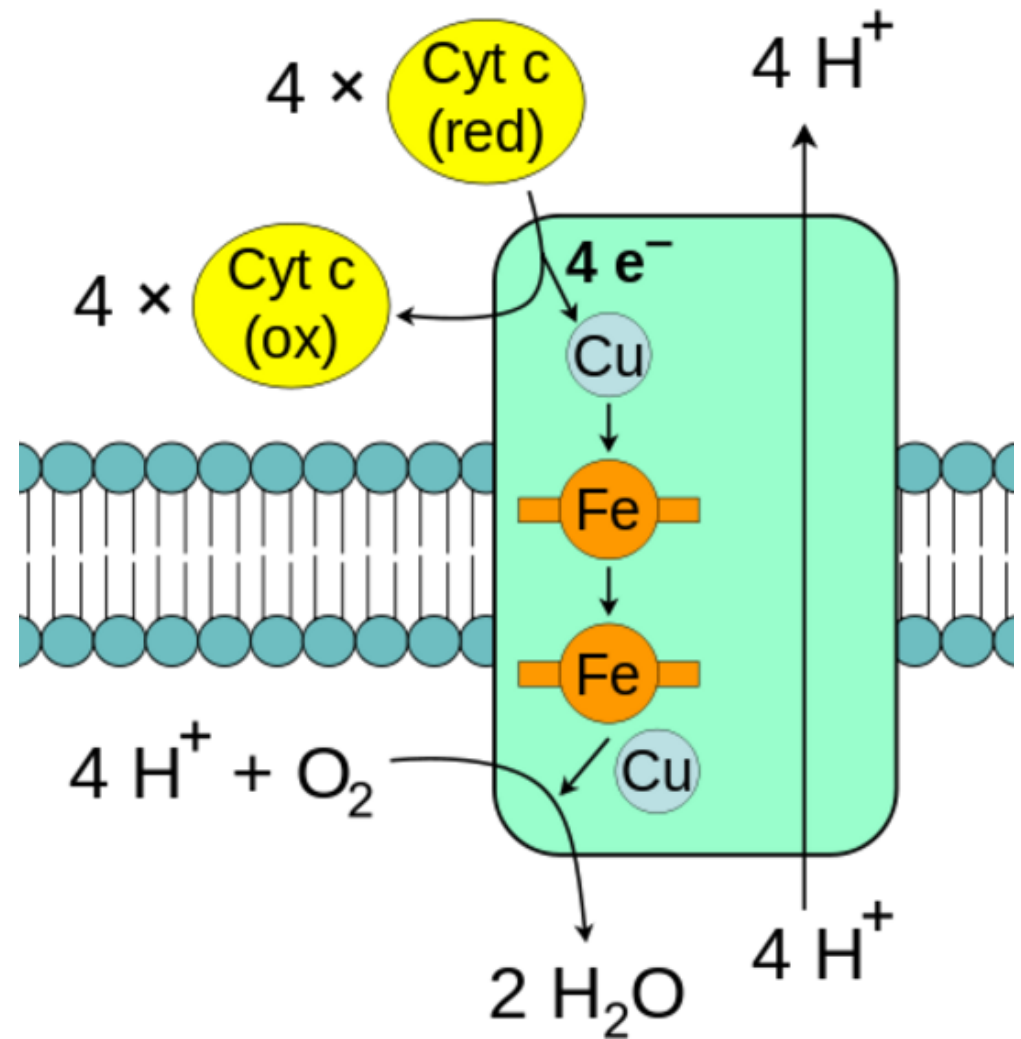


Komplex VI

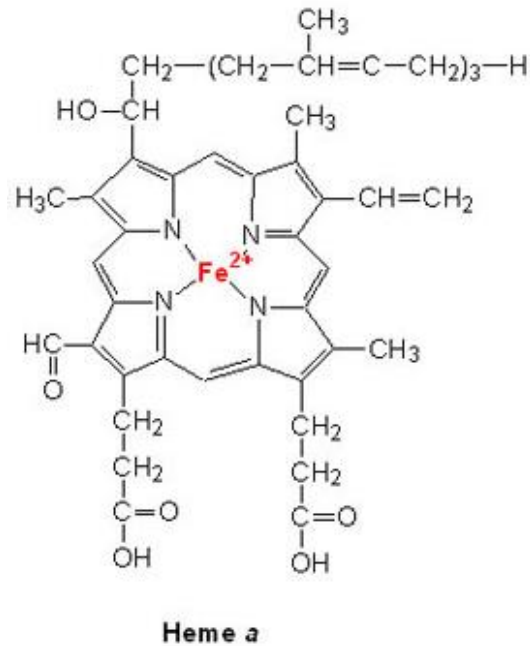
(cytochrom c oxidáza)

je velký transmembránový proteinový komplex. Z volného **cytochromu c** z mezimembránového prostoru přijímá elektrony, které slouží k redukci atomárního kyslíku O_2 na dvě molekuly H_2O . Pro syntézu 2 H_2O je třeba 4 elektronů.

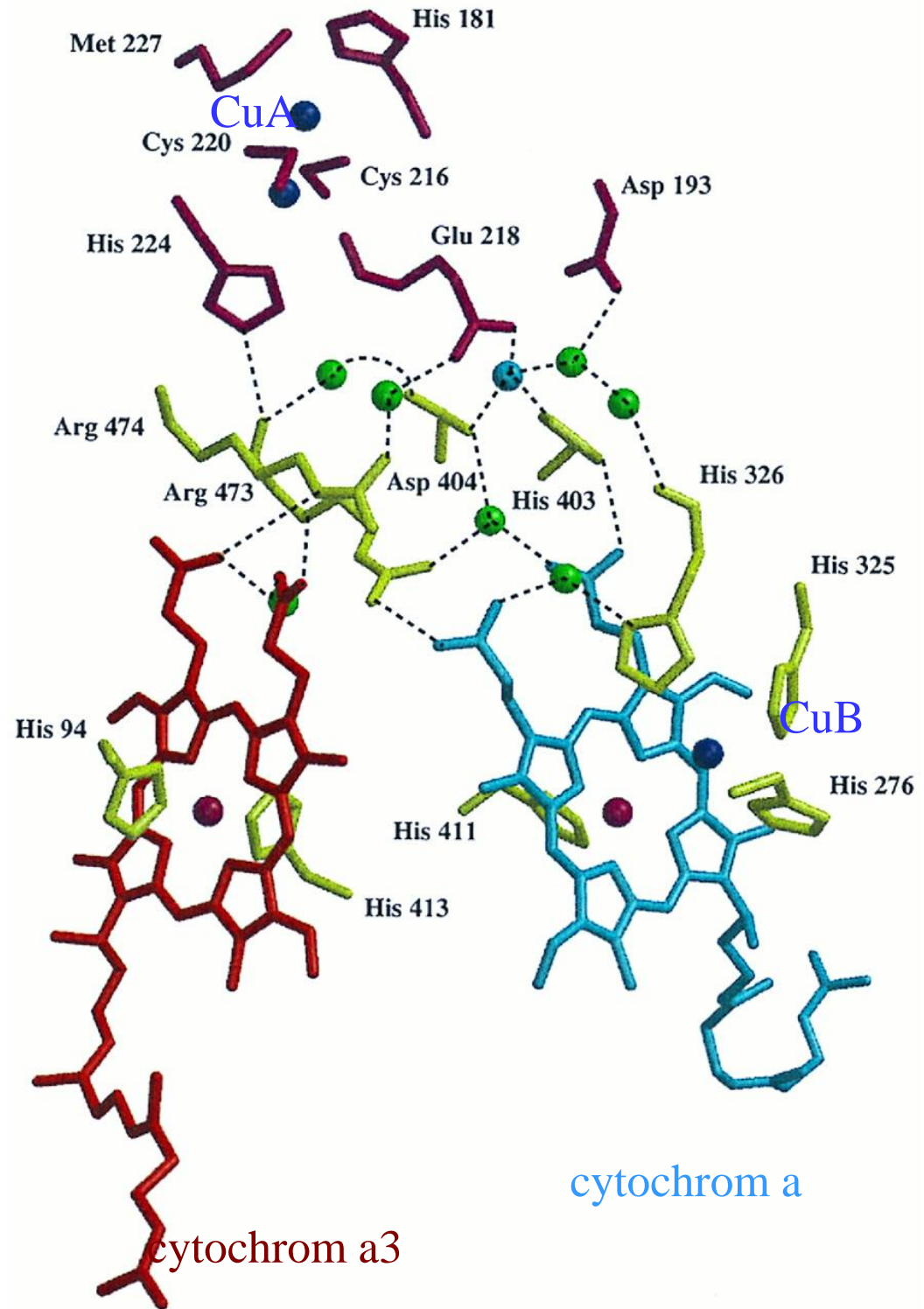
Navíc komplex slouží jako protonový transportér a v průběhu reakce transportuje 4 protony přes membránu do mezimembránového prostoru.

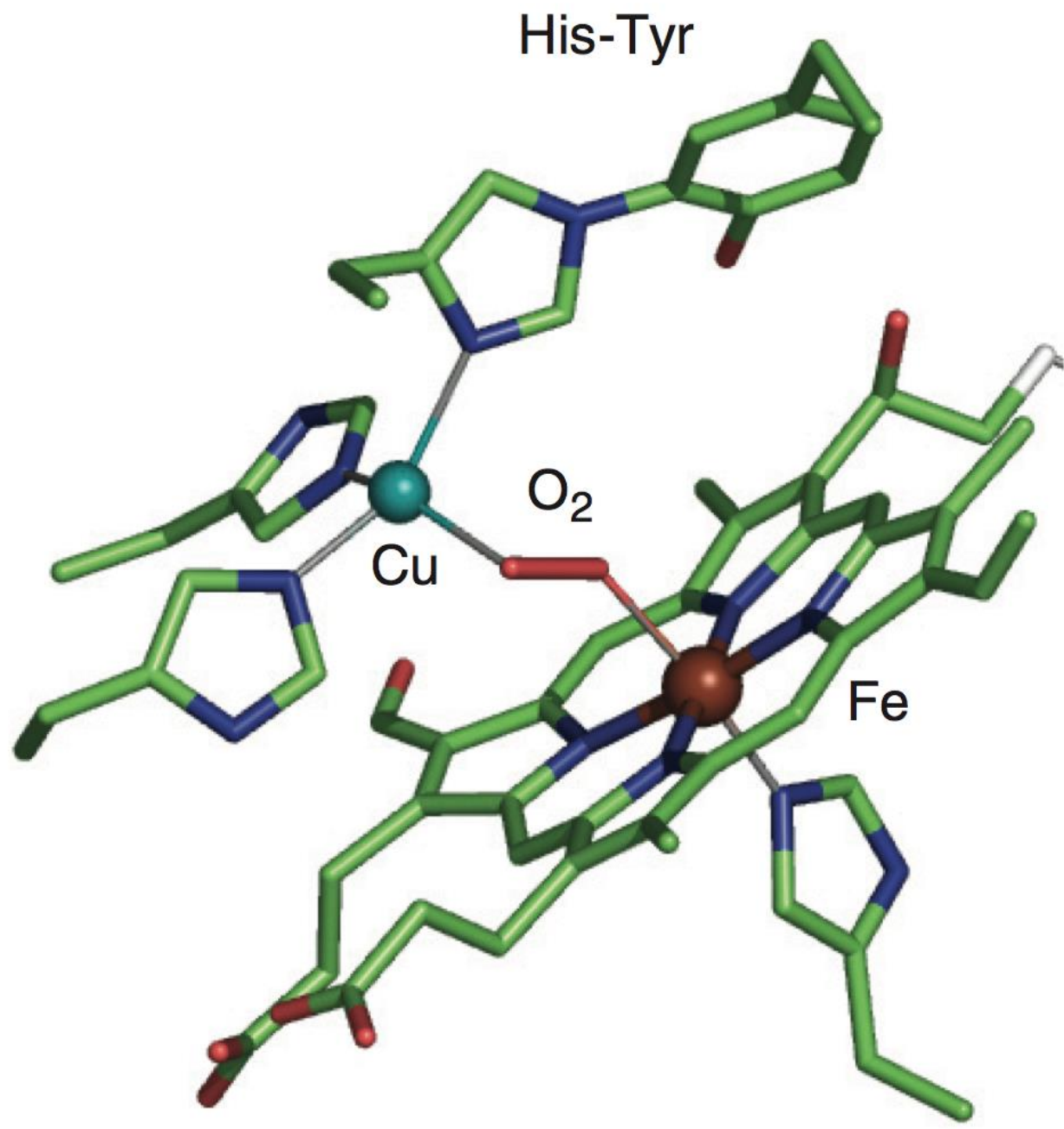


Komplex IV obsahuje 2 hemy – **cytochrom a** a **cytochrom a₃**. Další kofaktory jsou dvě centra obsahující atomy mědi – **CuA** a **CuB**.



Cytochrom c se přesune do katalytického místa komplexu v blízkosti **CuA** a odevzdá elektron. Následně je elektron transportován do **binukleárního centra** (ve které je **CuB** a **cytochrom a₃** v těsné blízkosti).



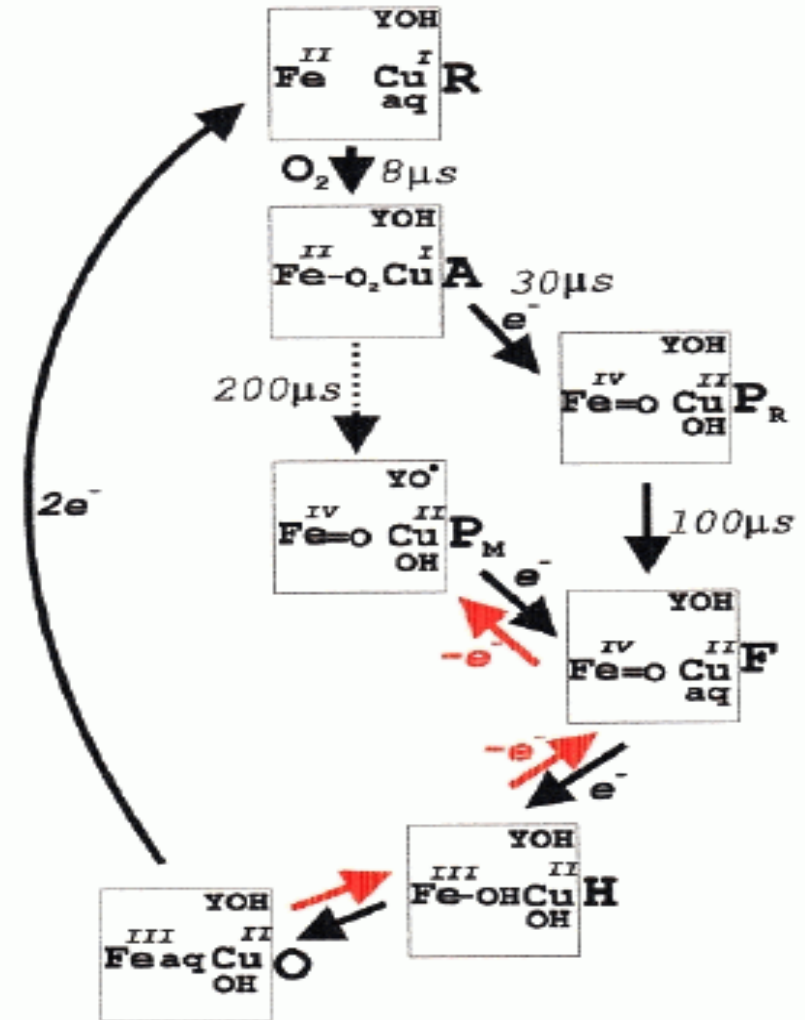


HO-Y tyrosin

V binukleárním centru se Fe v cytochromu redukuje 2 elektrony na Fe²⁺ (z Fe³⁺) a na Cu⁺ (z Cu²⁺). V procesu je také důležitá AMK tyrosin, která se v blízkosti centra nachází.

Do katalytického centra přistoupí molekula kyslíku. Ta se naváže na cytochrom a3 a je redukována díky dvěma elektronům na (Fe⁴⁺; =O) formu.

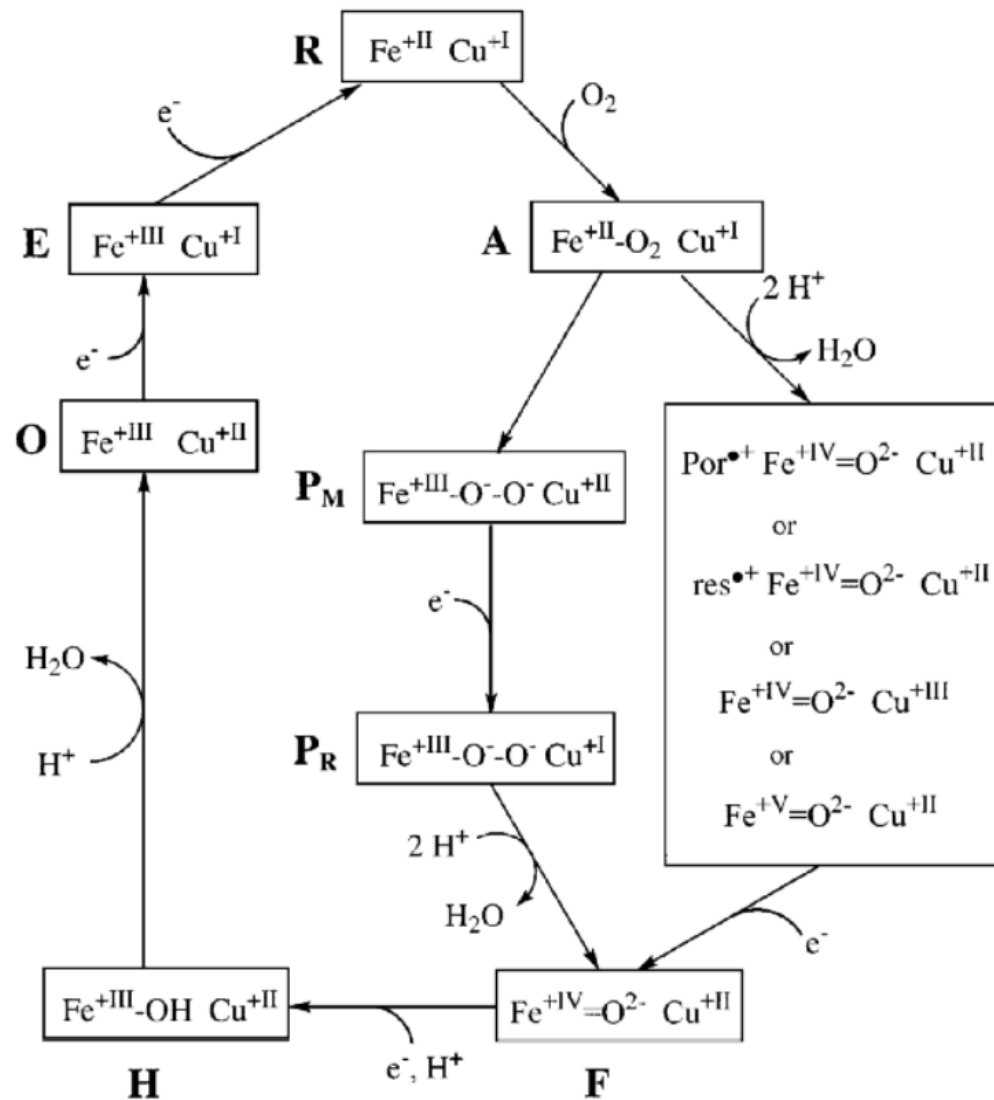
Druhý atom kyslíku přijímá první elektron z Cu⁺ (ta se oxiduje na Cu²⁺) a druhý elektron společně s protonem z tyrosinu. Z tyrosinu se stává tyrosilový radikál. Proton z matrix pak interaguje s hydroxidovým iontem vázaný k Cu za vzniku první molekuly vody.



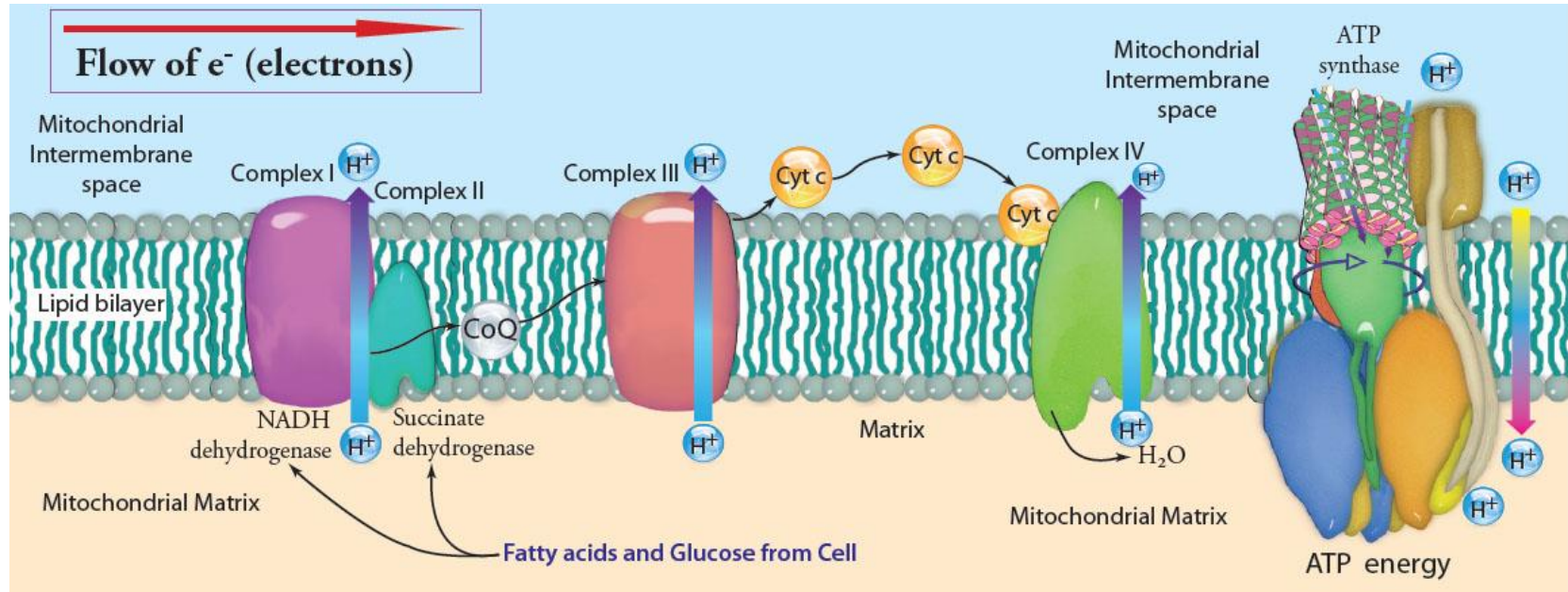
Třetí cytochrom c přináší elektron nutný pro regeneraci tyrosilového radikálu. Proton k obnovení tyrosinu je opětovně získán z mitochondriální matrix.

Čtvrtý elektron společně s dalším protonem slouží k redukci $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ na $\text{Fe}^{3+}-\text{OH}$. Další proton pak vytváří druhou molekulu vody. Ta se uvolní z komplexu.

V dalším cyklu dochází k nové redukci binukleárního centra 2 elektrony a uvolnění dvou molekul vody z komplexu.



Enzymy elektronového transportního řetězce přečerpávají protony z matrix do mezimembránového prostoru. Navíc jsou volné protony v matrix využívány chemickou vazbou do nových molekul (např. H_2O).



KI – na 1 molekulu NADH – přečerpání 4H^+ a 2H^+ sloužící k redukci CoQ na CoQH₂

KII – na 1 molekulu sukcinátu - 2H^+ sloužící k redukci CoQ na CoQH₂

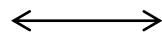
KIII – na 2 molekuly CoQH₂ - přečerpání 4H^+ a 2H^+ sloužící k redukci CoQ na CoQH₂

KIV – na 1 molekulu kyslíku - přečerpání 4H^+ a 4H^+ sloužící k redukci O₂ na H₂O

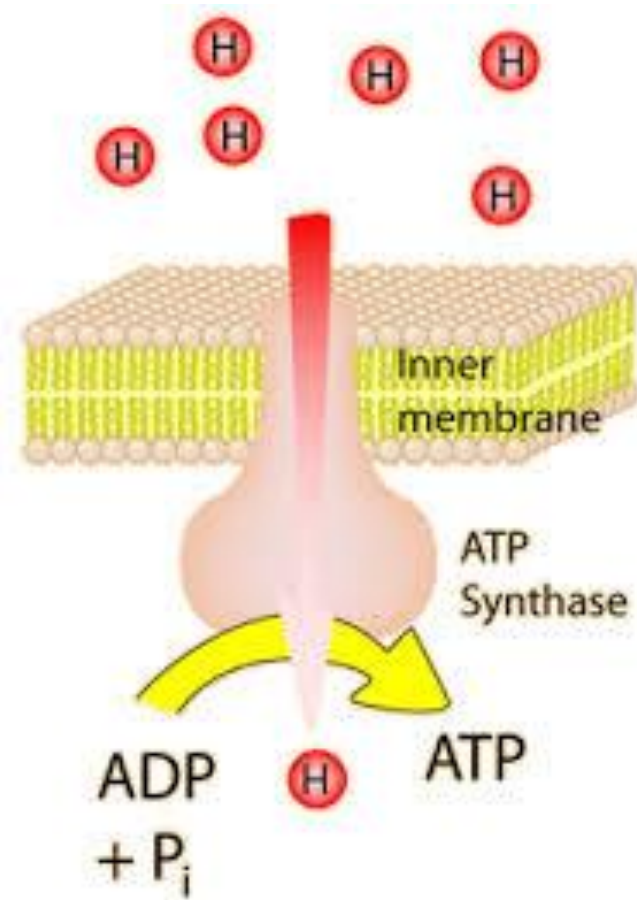
Oxidativní fosforylace

Velký rozdíl v koncentracích protonů na obou stranách membrány je následně využit v procesu oxidativní fosforylace. Je to proces ve které se vytváří nové molekuly ATP v **Komplexu V – ATP syntáze**.

ATP-syntáza vytváří vazbu mezi ADP a anorganickým fosfátem (Pi)



Energie potřebná pro reakci je zprostředkována průtokem protonů z mezimembránového prostoru do matrix.



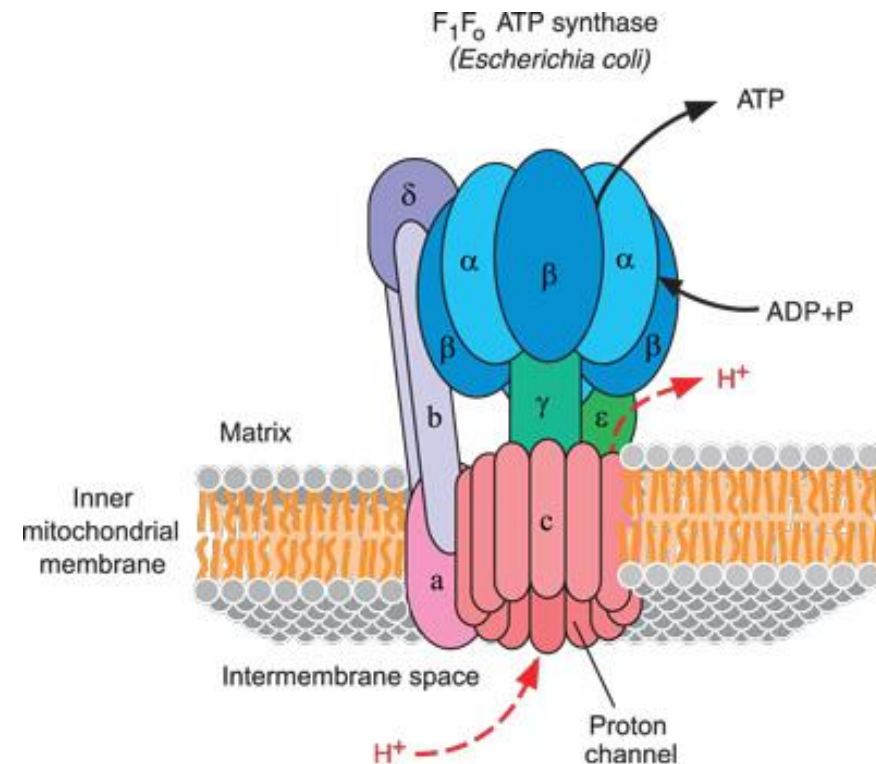
ATP syntáza se skládá ze 2 velkých oblastí.

F_o doména (*F_o*- nikoliv *F₀*, je pojmenována podle antibiotika oligomycinu, který doménu inhibuje).

F_o se nachází v membráně a skládá se ze 3 hlavních podjednotek (**A**, **B**, **C**) a 6 vedlejších ukotvujících doménu do membrány. Celkový komplex se skládá z **A**, **2B** a **10-14C** podjednotek. C podjednotky jsou součástí protonového kanálu.

F₁ doména se nachází v matrix mitochondrií. Skládá se z 5 podjednotek – **α**, **β**, **γ**, **δ**, **ε**. Podjednotky **γ** a **ε** jsou upevněny k **C** proteinům z protonového kanálu. Katalytickým jádrem je hexamer složený ze **3 α** a **3 β** podjednotek. Středem hexameru prochází **γ** protein.

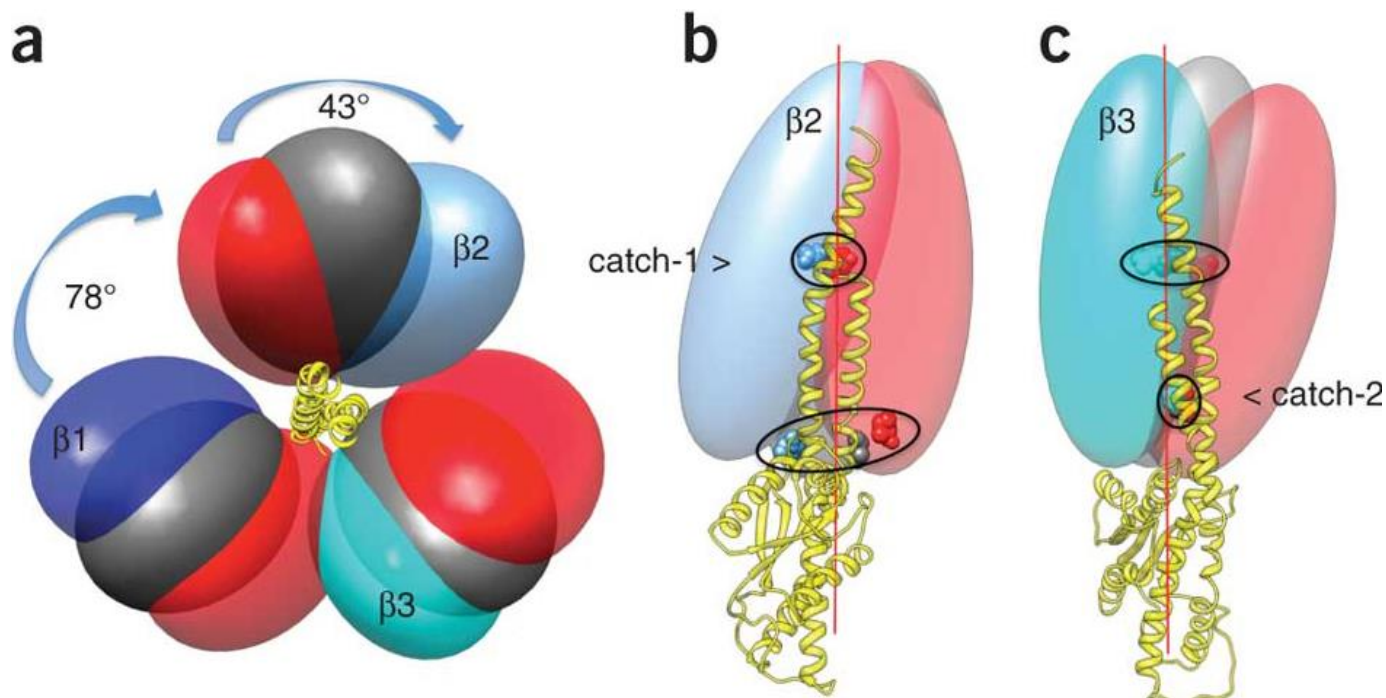
Hexamer je ještě ukotven přes dimer **B** proteinu a **δ** podjednotkou.



ATP syntázu lze rozdělit na dvě nezávislé mechanické jednotky. Protonový kanál společně s ϵ a γ jsou rotorem. Stator představuje zbytek komplexu.

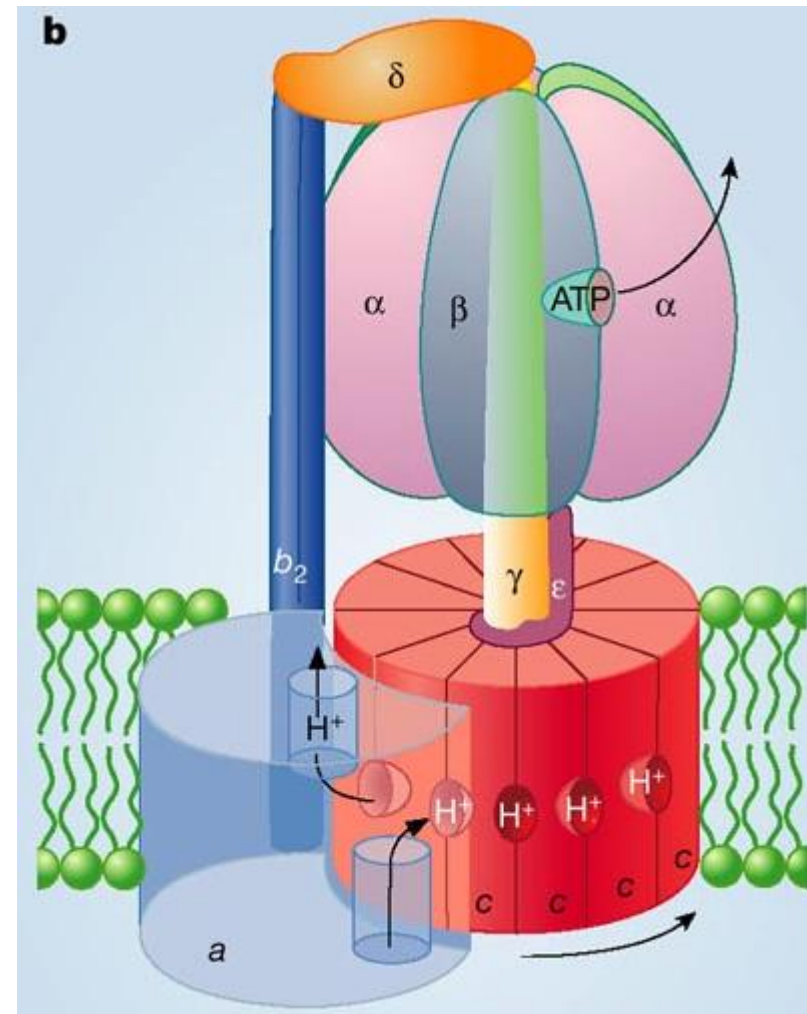
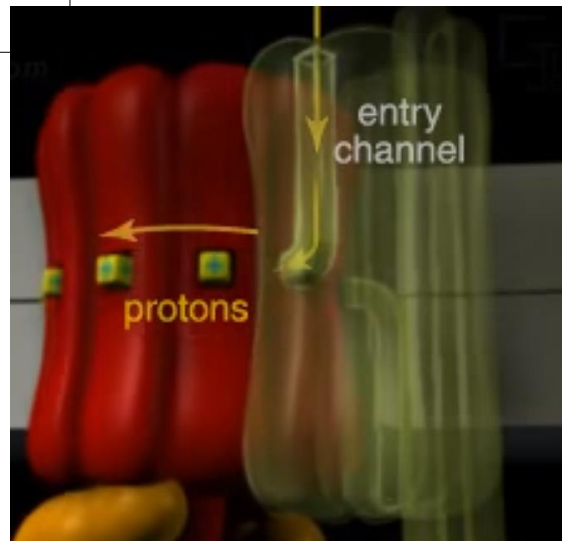
Samotná syntéza ATP probíhá v F1 části v hexamerní podjednotce ($\alpha_3\beta_3$). Obě podjednotky obsahují vazebné místo pro nukleotidy, které se nachází v prostoru mezi α a β . Ke katalýze dochází pouze v β podjednotkách.

V katalytickém místě jsou substráty (ADP, Pi) v chemické rovnováze s produktem (ATP). Vznik ATP tak není energeticky náročný – většina energie vzniklá průtokem protonů je využita pro vazbu substrátů a vypuzení produktu z katalytického místa.



Po průchodu protonu F_0 podjednotkou dochází k ionizaci a změně proteinové konformace **A** a **C** podjednotek.

Zkroucení **F₀** podjednotky je přenášeno na γ podjednotku, která je asymetrická. Rotací γ podjednotky v centrálním kanálu hexameru vede k přenosu konformačních změn na podjednotky $\alpha_3\beta_3$.

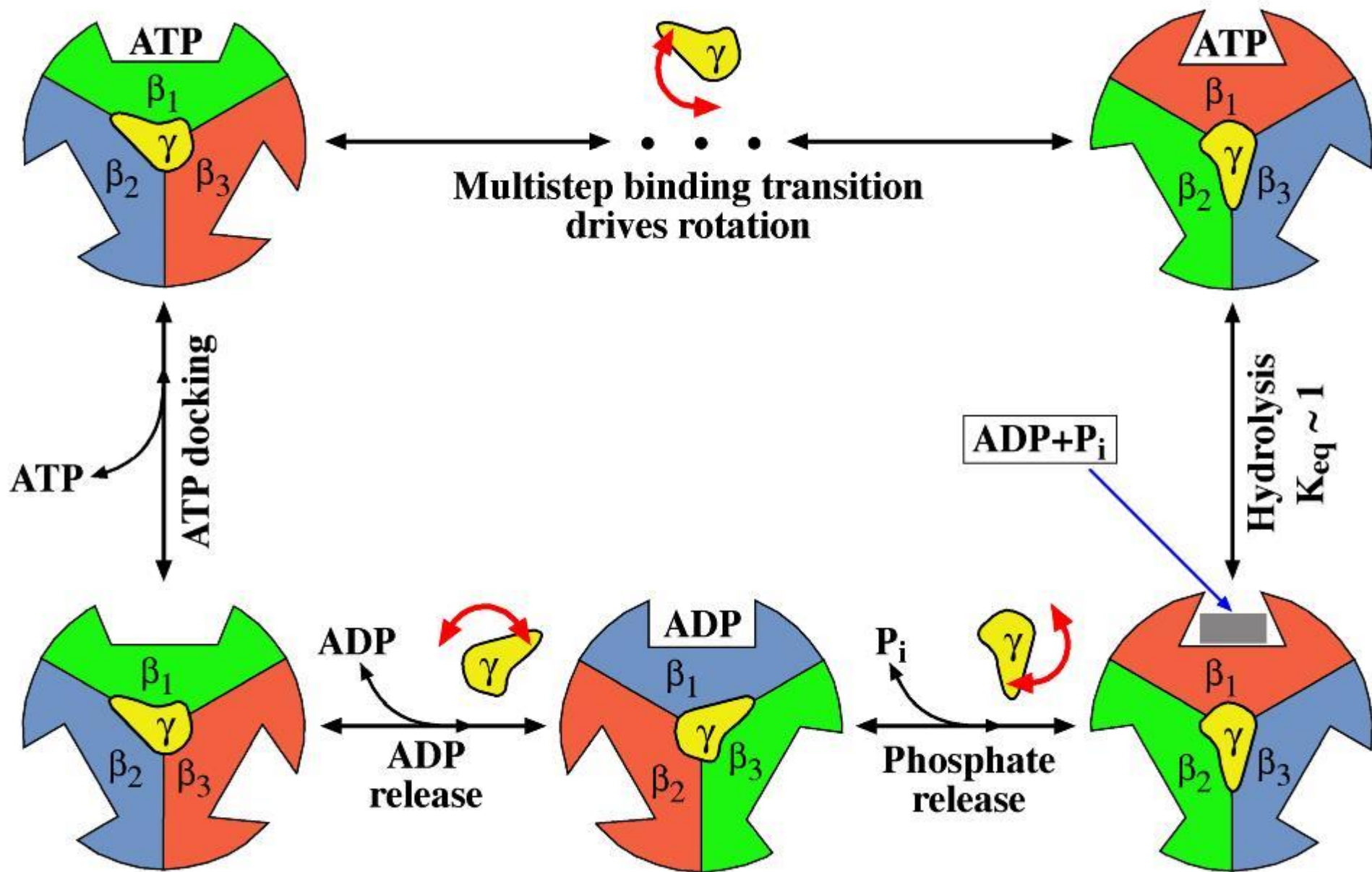


Jak se jednotka pohybuje ve směru hodinových ručiček, konformace katalytických míst zaujímá tři polohy.

<https://www.youtube.com/watch?v=PjdPTY1wHdQ>

V aktivním (open) stavu je katalytické místo připraveno pro přijetí substrátů – ADP a Pi. V další otáčce se konformace β mění a dochází k uzavření katalytického místa. Molekuly ADP a Pi ještě nejsou tlačeny k sobě (loose stav).

Další otáčkou dojde k přiblížení substrátu (tight) a vzniku nové vazby. Vzniklé ATP je pak vytlačeno z katalytického místa následnou otáčkou γ podjednotky – a katalytické místo je znovu připraveno pro přijetí dalších substrátů.

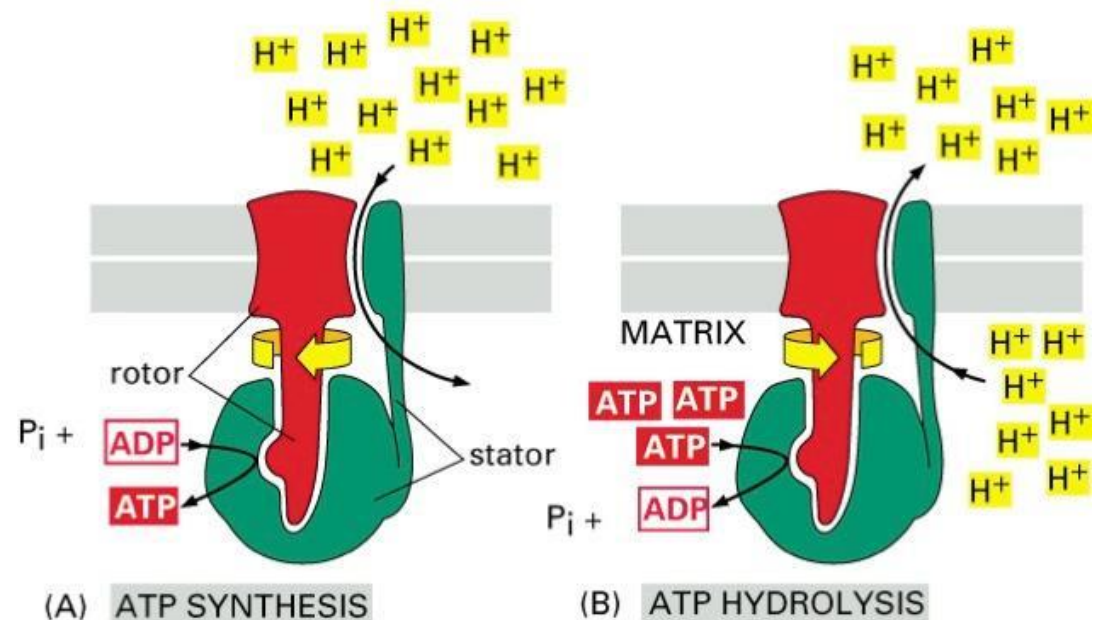


F_o motor přeměňuje transmembrány potenciál do rotačního pohybu γ podjednotky. Nicméně enzym může využívat tuto rotaci i k obrácenému ději – hydrolýze ATP. S jediným rozdílem, a to že γ podjednotka rotuje opačným směrem.

Pokud je H^+ potenciál velký, **F_o** motor je hlavní hnací jednotkou a otáčí γ podjednotku ve směru hodinových ručiček – a vedoucí k syntéze ATP.

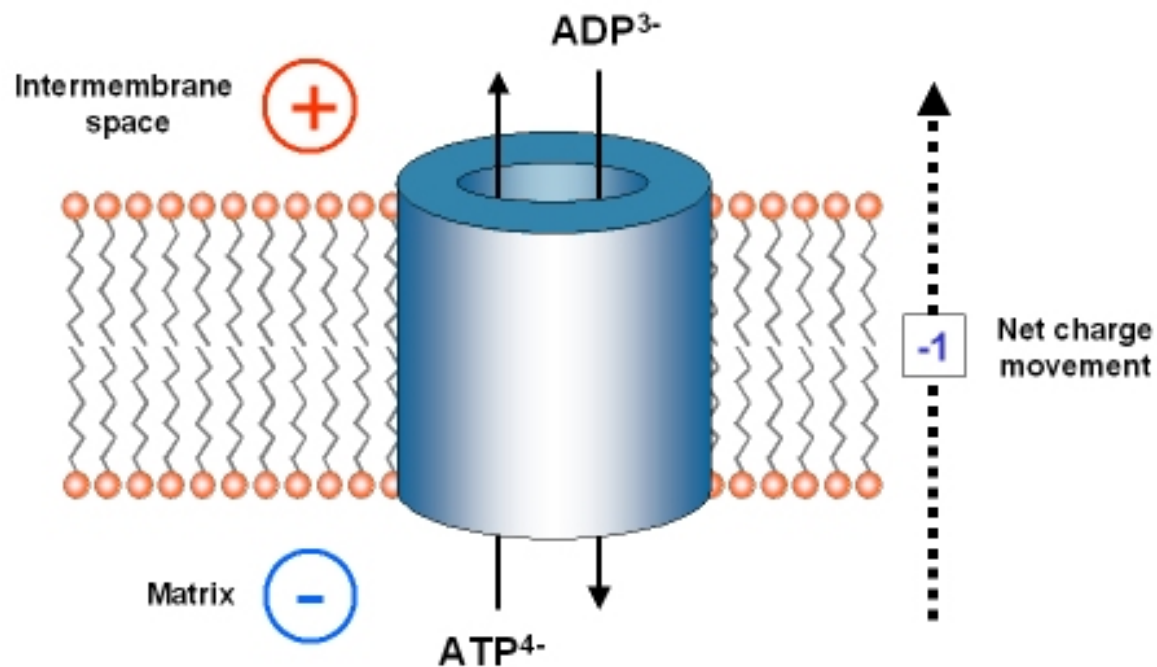
Pokud je potenciál malý, přebírá iniciativu **F₁** podjednotka a využívá hydrolýzy ATP k transportu protonů do mezimembránového prostoru.

Pro tvorbu jedné molekuly ATP je třeba jedné celé otáčky – a průchodu 3 – 4 protonů. Efektivita ATP syntázy je téměř 100%.



ATP se z matrix mitochondrií dostává do cytosolu pomocí **ADP/ATP translokázy** (která tvoří až 10% všech proteinů v mitochondriální membráně).

ATP molekula nese negativní náboj a proto neprochází přes membránu. Translokáza je antiportér a přenáší ATP ven z mitochondrií výměnou za ADP z cytosolu.



Kolik ATP buňka získá z 1 molekuly glukózy?

V glykolýze vzniká přímo 2 molekuly ATP a 2 NADH. Oxidace NADH v mitochondriích vytváří protonový gradient umožňující vzniku 3 ATP.

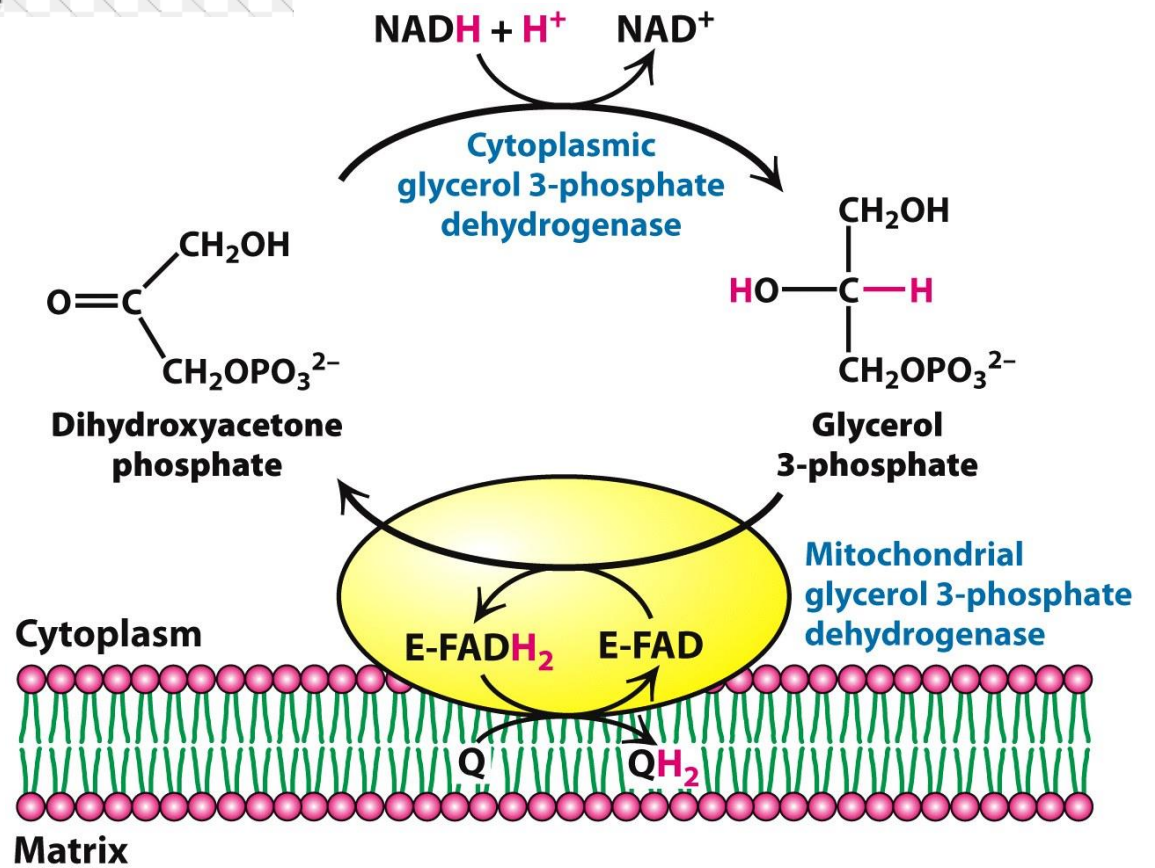
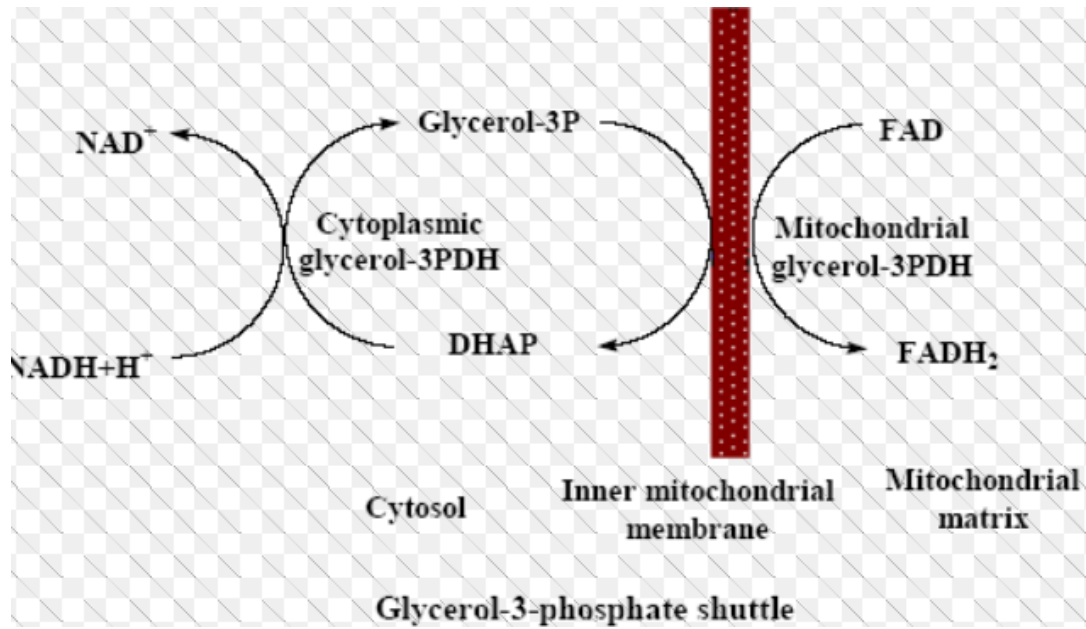
V glykolýze je ale NADH v cytosolu a je transportován do mitochondrií buď přes malát-aspartátový člunek nebo další alternativní drahou – Glycerol-fosfátovým člunkem.

Dihydroxyaceton-P je konvertován cytosolickou **Glycerol-3P dehydrogenázou 1** na glycerol-3P. V reakci dochází k oxidaci NADH na NAD⁺.

Na vnitřní mitochondriální se nachází **Glycerol-3P dehydrogenáza 2**, která zpátky konvertuje glycerol-3P na Dihydroxyaceton-P.

Protony a elektrony ale nejsou přenášeny na NAD⁺ kofaktor, ale na **FAD**. FADH₂ pak redukuje **CoQ** – který vstupuje do Elektronového transportního řetězce.

Z FADH₂ je výtěžkem pouhé 2 molekuly ATP – proto se udává výtěžek 2ATP z cytosolického NADH.



Kolik ATP buňka získá z 1 molekuly glukózy?

V glykolýze vzniká přímo **2 ATP** a **2 NADH (4 ATP)**.

V mitochondrii probíhající:

Dekarboxylace pyruvátu (2 pyruváty) – **2 NADH (6 ATP)**

Dekarboxylace acetyl-Coa (2 acetylové skupiny) – **6 NADH (18 ATP)**, **2 GTP (2 ATP)**, **2 FADH₂ (4 ATP)**.

Oxidací glukózy lze získat až **36** molekul ATP.

ATP - LIKE A RECHARGEABLE BATTERY

