

Proton-motorna sila i sinteza ATP

B. Mildner

Sumarni prikaz aerobnih oksidacija glukoze i masnih kiselina

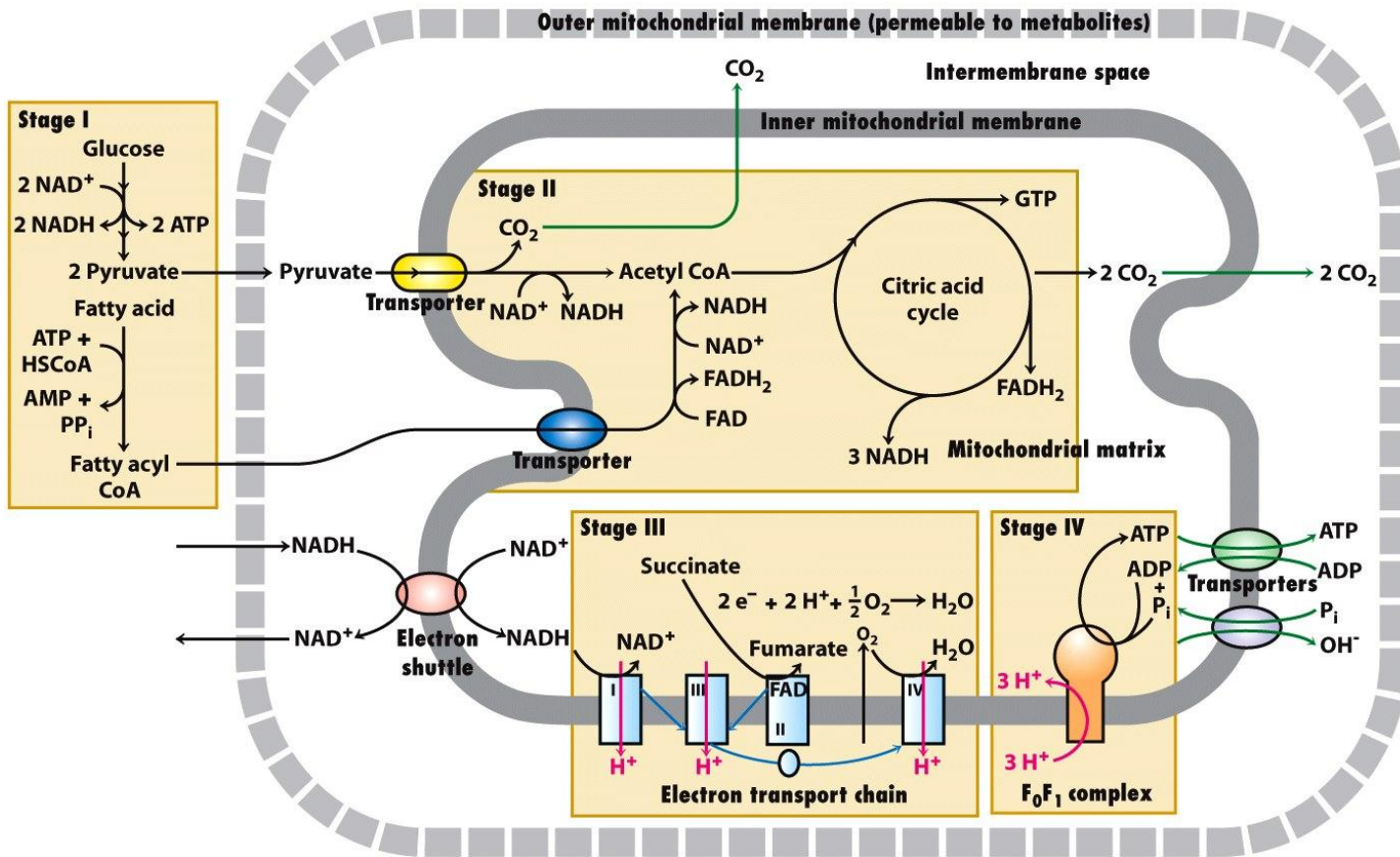


Figure 12-8
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Prijenos elektrona kroz mitohondrijski respiracijski lanac, tj. prijenos elektrona s NADH na O₂ je vrlo egzergona reakcija:



Tijekom protoka elektrona protoni se pumpaju iz matriksa mitohondrija kroz unutarnju mitohondrijsku membranu pri čemu nastaje gradijent protona. Sada ćemo razmatrati kako se energija sačuvana u gradijentu protona koristi za sintezu ATP.



Gradijent protona omogućava sintezu ATP

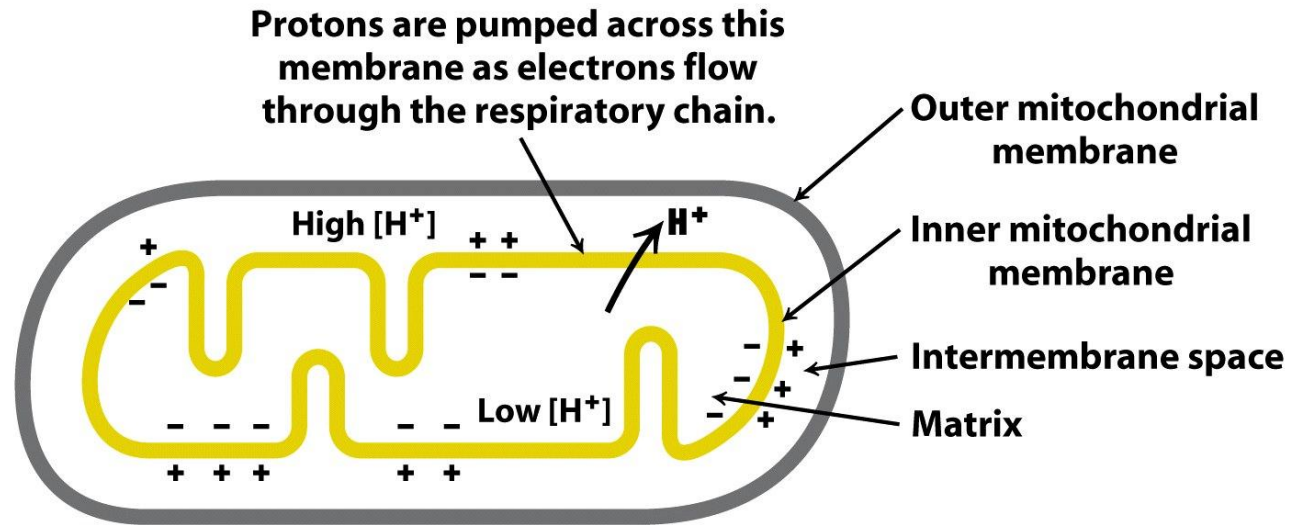


Figure 18-23
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Kemiosmotska hipoteza. Prijenos elektrona kroz respiracijski lanac dovodi do pumpanja protona iz matriksa na citoplazmatsku stranu unutarne mitohondrijske membrane. pH gradijent i membranski potencijal stvaraju proton-motornu silu koja se koristi za sintezu ATP.

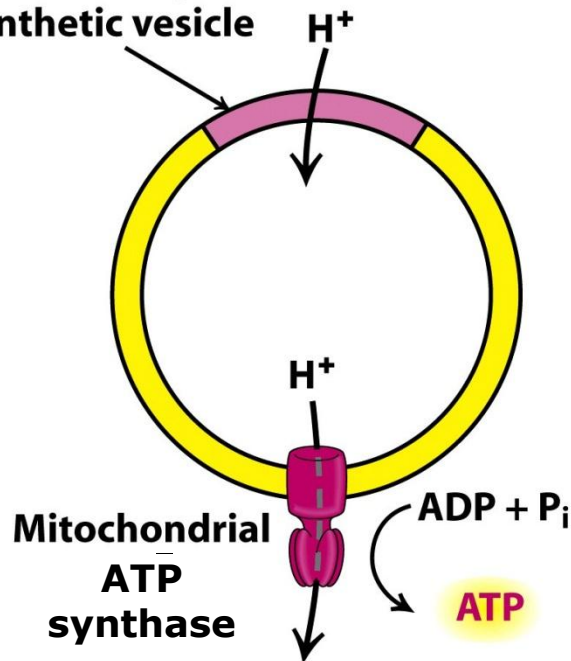
Proton motorna sila (Δp) = kemijski gradijent (ΔpH) + gradijent naboja ($\Delta \Psi$)

Kemijski gradijent za protone može se predstaviti kao pH gradijent, a gradijent naboja nastaje zbog nejednolike raspodjele pozitivno nabijenih protona koji ujedno stvaraju i pH gradijent

Potvrda kemijske hipoteze

U ovom artifičijelnom sustavu, orijentacije respiracijskog lanca i ATP sintaze su obrnute nego što je to u mitohondriju.

Bacteriorhodopsin in synthetic vesicle



Artifičijelni sustav koji predstavlja stanično disanje.

Ulogu prijenosa elektrona obavlja bakteriorodopsin, membranski protein halobakterije. Bakteriorodopsin pumpa protone kada se osvijetli. Napravljene su vezikule koje su sadržavale bakteriorodopsin i mitohondrijsku ATP sintazu (sintaza iz goveđeg srca). Kada su vezikule izložene svjetlosti sintetiziran je ATP.

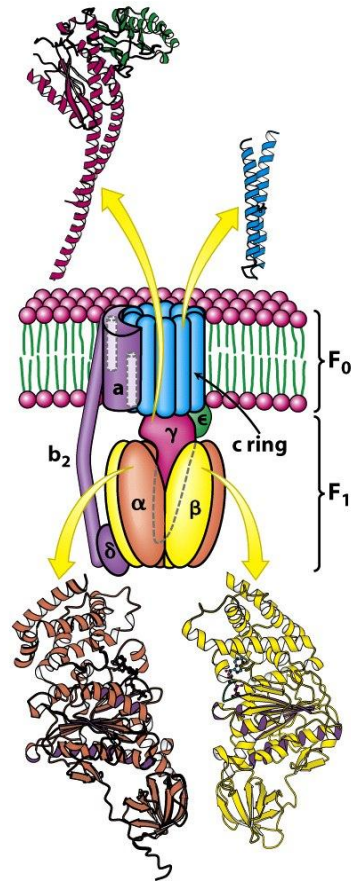
Ovaj ključni pokus ukazuje: **respiracijski lanac i ATP sintaza dva su odvojena biokemijska sustava koje povezuje proton-motorna sila.**

ATP sintazu izgrađuje dio koji provodi protone i dio koji provodi katalitičku sintezu ATP

ATP sintaza je veliki kompleks koji izgleda kao “lopta na štapu”.

Najveći dio “štapa” koji se naziva F_0 podjedinica, uronjen je u unutarnju mitohondrijsku membranu.

“Lopta”, koja ima promjer od 85 Å, a naziva se F_1 podjedinicom nalazi se u matriksu mitohondrija. F_1 podjedinica sadrži katalitičku aktivnost sintaze.



F_1 podjedinicu izgrađuju pet vrsta polipeptida (α_3 , β_3 , γ , δ i ϵ). Tri α i tri β podjedinice naizmjenično se nalaze u heksamernom prstenu. Aktivna mjesta nalaze se na β podjedinicama. Neposredno iznad α i β podjedinica smješteni su γ i ϵ proteini. γ podjedinica ima i dugačku dvostruko zavitinutu uzvojniju koja se proteže do središta $\alpha_3\beta_3$ heksamera. Svaka β podjedinica se razlikuje jer svaka od njih reagira s različitim dijelom γ podjedinice.

F_0 podjedinica izgrađuje kanal za protone. Kanal izgrađuje prsten od 10-14 c podjedinica koje su uronjene u membranu, a dodatno je prisutna i jedna a podjedinica koja veže vanjski dio prstena c podjedinica.

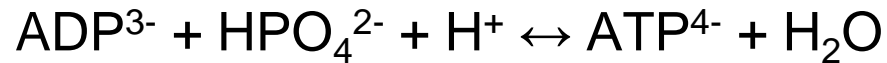
F_0 i F_1 podjedinice povezane su na dva načina: - pomoću središnje $\gamma\epsilon$ osi i pomoću vanjskog držača. Vanjski držač izgrađuju jedna a podjedinica, dvije b podjedinice i δ podjedinica.

Figure 18-25
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Struktura ATP
sintaze.

Protok elektrona kroz ATP sintazu dovodi do otpuštanja čvrsto vezanog ATP

ATP sintaza katalizira sintezu ATP iz ADP i ortofosfata:



Postoje tri aktivna mjesta na enzimu, a svako od njih u određenom trenutku vrši jednu od tri funkcija. Proton-motorna sila omogućava da ova tri aktivna mjesta uzastopce mijenjaju funkciju ovisno o protoku protona kroz dio enzima koji je ugrađen u membranu.

Enzim je ustvari izgrađen kao rotor i stator. Rotor, pokretni dio enzima izgrađuju podjedinice c prstena te γ i ϵ osovina, a stator, nepokretni dio enzima izgrađuju sve ostale podjedinice.

Protok elektrona kroz ATP sintazu dovodi do otpuštanja čvrsto vezanog ATP

Kako se mijenjaju aktivna mjesta ATP sintaze obzirom na protok protona?

β podjedinica, aktivno mjesto enzima, može izvršavati bilo koju funkciju u sintezi ATP time što mijenja konformaciju. Funkcije koje treba izvršiti su:

- a) Vezanje ADP i P_i
- b) sinteza ATP
- c) otpuštanje ATP

β podjedinica u određenom trenutku može biti u L (opuštenoj konformaciji) u kojoj može vezati ADP i P_i ; u sljedećem koraku može biti u napetoj T konformaciji u kojoj se ADP i P_i vežu toliko čvrsto da dolazi do sinteze ATP, te konačno u otvorenoj O konformaciji koja otpušta sintetizirani ATP.

Protok elektrona kroz ATP sintazu dovodi do otpuštanja čvrsto vezanog ATP

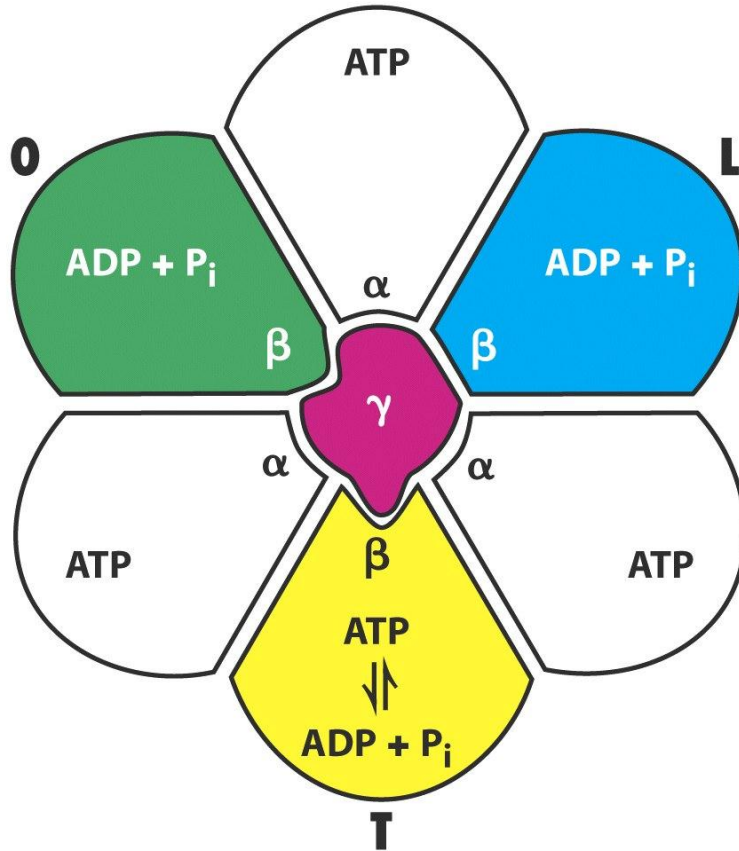


Figure 18-28
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Vezna mjesta za nukleotide u ATP sintazi nisu ekvivalentna.

γ podjedinica prolazi kroz središte $\alpha_3\beta_3$ heksamera i zbog rotacije γ podjedinice svako vezno mjesto u β podjedinici je drugačije.

Rotacija γ podjedinice omogućava konstantnu pretvorbu veznih mjesta β podjedinica. Ovaj mehanizam objašnjava kako dolazi do sinteze ATP. ATP ne napušta katalitičke podjedinice ukoliko nema protoka protona kroz enzim.

Protok elektrona kroz ATP sintazu dovodi do otpuštanja čvrsto vezanog ATP

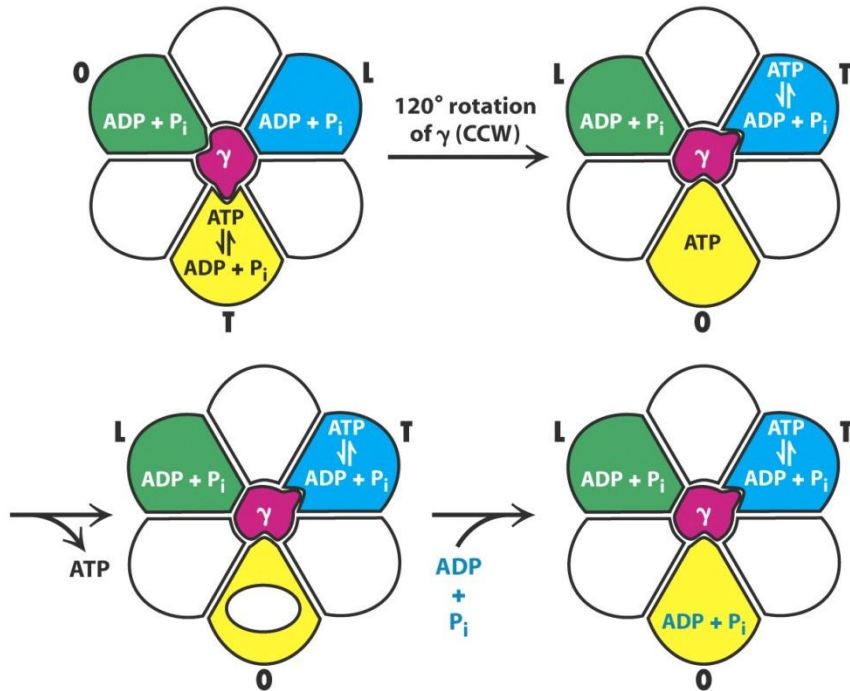


Figure 18-29
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Progressivne promjene oblika tri aktivna mjesta ATP sintaze:

Podjedinica 1 L → T → O → L → T → O...

Podjedinica 2 O → L → T → O → L → T...

Podjedinica 3 T → O → L → T → O → L...

Promjene mehanizma vezanja nukleotida u ATP sintazi.

Rotacija γ podjedinice mijenja konformacije β podjedinica. Podjedinica u T stanju pretvara ADP i P_i u ATP ali ne dozvoljava disocijaciju ATP. Kada se podjedinica zarotira za 120° suprotno od kazaljke na satu T podjedinica se pretvara u O jedinicu koja omogućava disocijaciju sintetiziranog ATP a također omogućava i ponovno vezanje ADP i P_i . Još jednom rotacijom za 120°, podjedinica dolazi u L stanje.

Potvrda rotacijske katalize

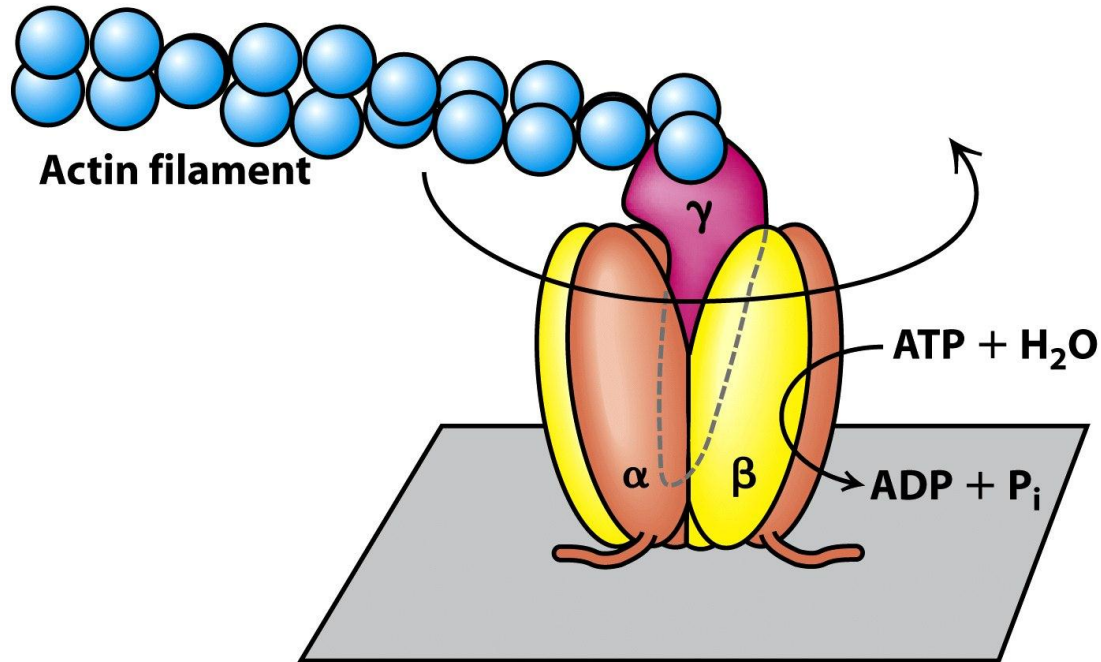


Figure 18-30
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Direktno mjerenje rotacije ATP sintaze potaknuto hidrolizom ATP.

$\alpha_3\beta_3$ heksamer ATP sintaze fiksiran je za podlogu tako da je γ podjedinica prema gore i na nju je povezano vlakno aktina koje je fluorescentno obilježeno. Dodatkom ATP i njegovom hidrolizom došlo je do okretanja γ podjedinice u smjeru suprotnom od kazaljke na satu. Okretanje fluorescentnog aktinskog vlakna praćeno je fluorescentnim mikroskopom.

Protok protona oko c prstena omogućava sintezu ATP

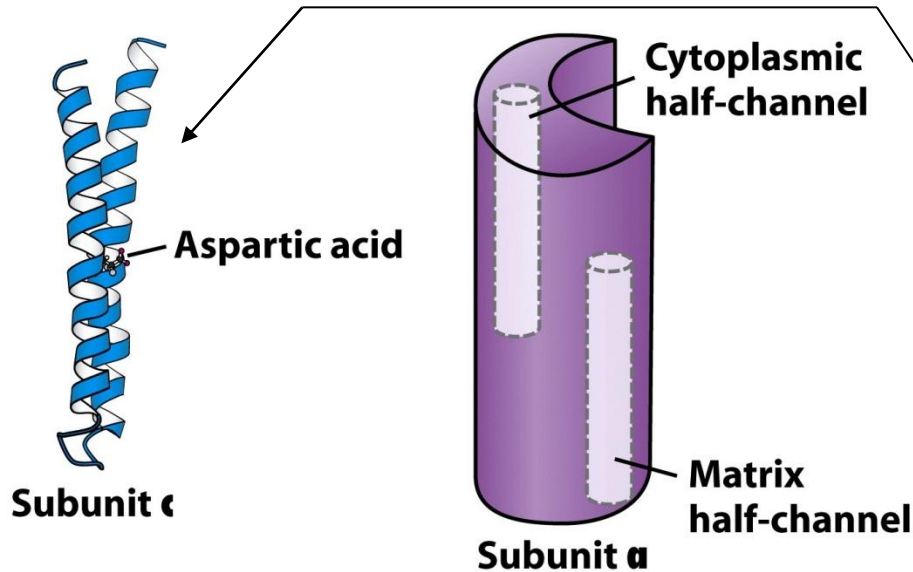


Figure 18-31
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

a podjedinica okružuje prsten kojeg grade 10-14 **c** podjedinica. Kako podjedinica **a** ima dva polukanala, protoni mogu doći bilo kojim od tih kanala ali ne mogu proći kroz cjelokupni membranski sloj. Podjedinica **a** je smještena tako da je svaki od polukanala direktno u kontaktu s jednom **c** podjedinicom.

Dijelovi ATP sintaze koji omogućavaju protok protona.

c podjedinica izgrađena je od dvije α uzvojnice koje prodiru kroz membranu. Aspartat u jednoj uzvojnici nalazi se u sredini membranskog sloja. Struktura **a** podjedinice je izgrađena od dva polukanala koji dozvoljavaju protonima da prodru samo do polovice membrane, ali ne i da prođu kroz membranu.

Protok protona oko c prstena omogućava sintezu ATP

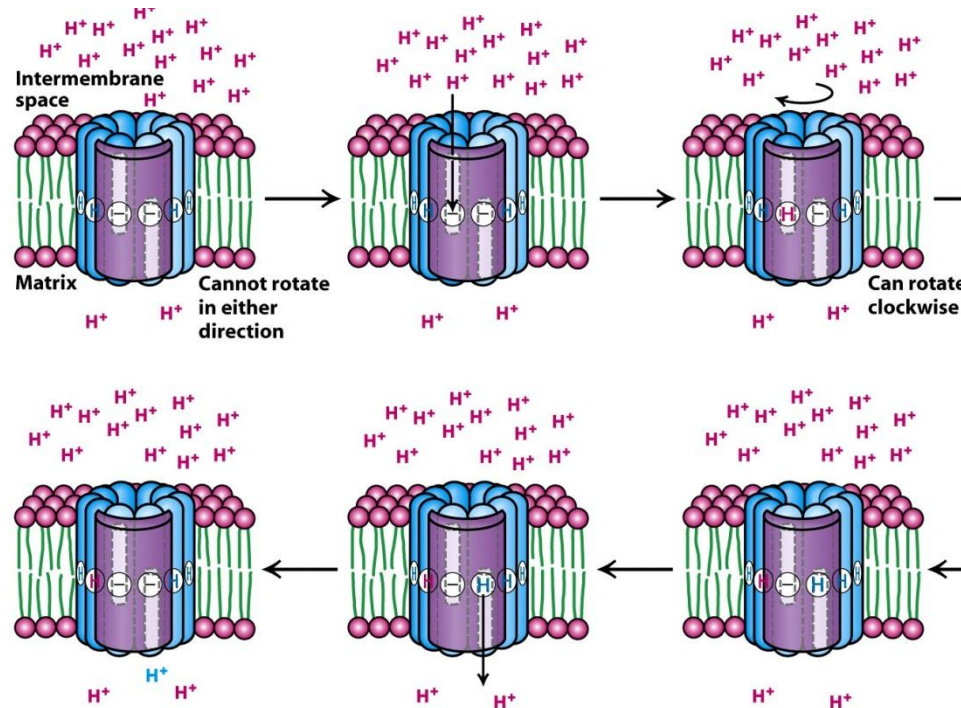
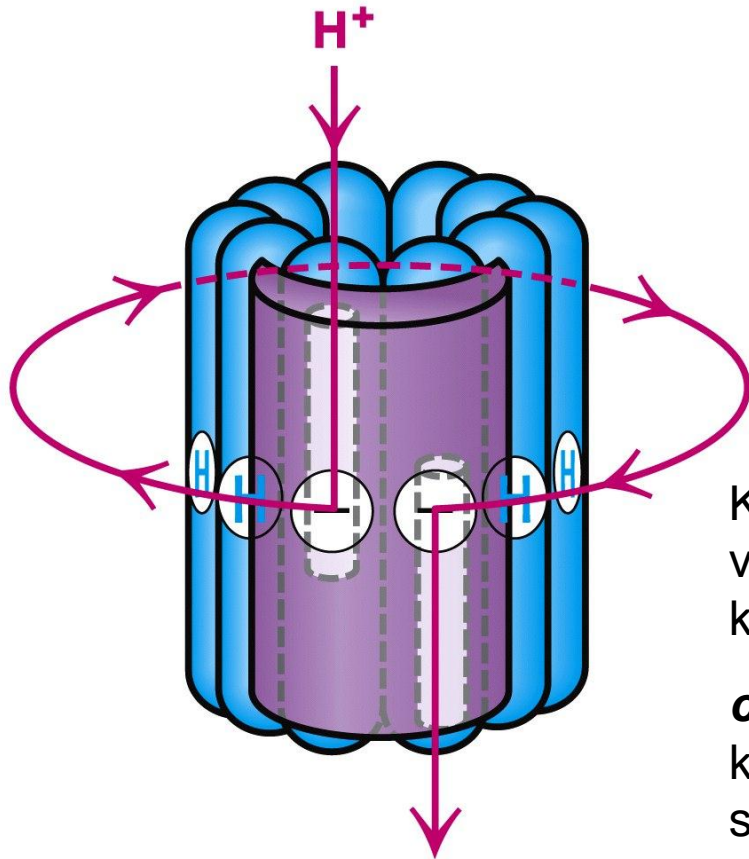


Figure 18-32
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Kretanje protona kroz membranu pokreće rotaciju **c** prstena.

Proton ulazi iz međumembranskog prostora u citoplazmatski polukanal kako bi neutralizirao naboj aspartata u **c** podjedinici. Kada je naboj neutraliziran, **c** prsten se može pokretati u smjeru kazaljke na satu za jednu **c** podjedinicu te tako pokreće aspartat iz membrane u polukanal matriksa. Proton koji je došao do polukanala matriksa odlazi u bazični matriks, a sustav se vraća u početni položaj.

Protok protona oko c prstena omogućava sintezu ATP



Put protona kroz membranu.

Svaki proton ulazi u citoplazmatski polukanal, te slijedi potpuni zakret **c** prstena i izlazi kroz drugi polukanal **a** podjedinice u matriks mitohondrija.

Kretanje protona kroz polukanale iz okoliša gdje je velika koncentracija protona u okoliš gdje je mala koncentracija protona pokreće rotaciju **c** prstena.

c prsten je čvrsto povezan s γ i ϵ podjedinicama, pa kako se se **c** prsten okreće, dolazi do promjena stanja u β podjedinicama $\alpha_3\beta_3$ heksamera.

Vanjska drška ATP sintaze koju izgrađuju **b** lanci i δ podjedinica sprječavaju rotaciju $\alpha_3\beta_3$ heksamera.

Protok protona oko c prstena omogućava sintezu ATP

- Svaka rotacija γ podjedinice za 360° dovodi do sinteze i otpuštanja 3 molekule ATP.
- Ako prsten **c** podjedinica izgrađuje 10 **c** podjedinica, kako je to nađeno u mitohondriju kvasca, za svaki nastali ATP potrebno je $10/3 = 3,33$ protona.
- Za čovjeka u mirovanju potrebno je 85 kg ATP, a za tu sintezu potreban je protok od $3,3 \times 10^{25}$ protona tijekom dana odnosno $3,3 \times 10^{21}$ protona u sekundi.

Sumarni prikaz oksidacijske fosforilacije

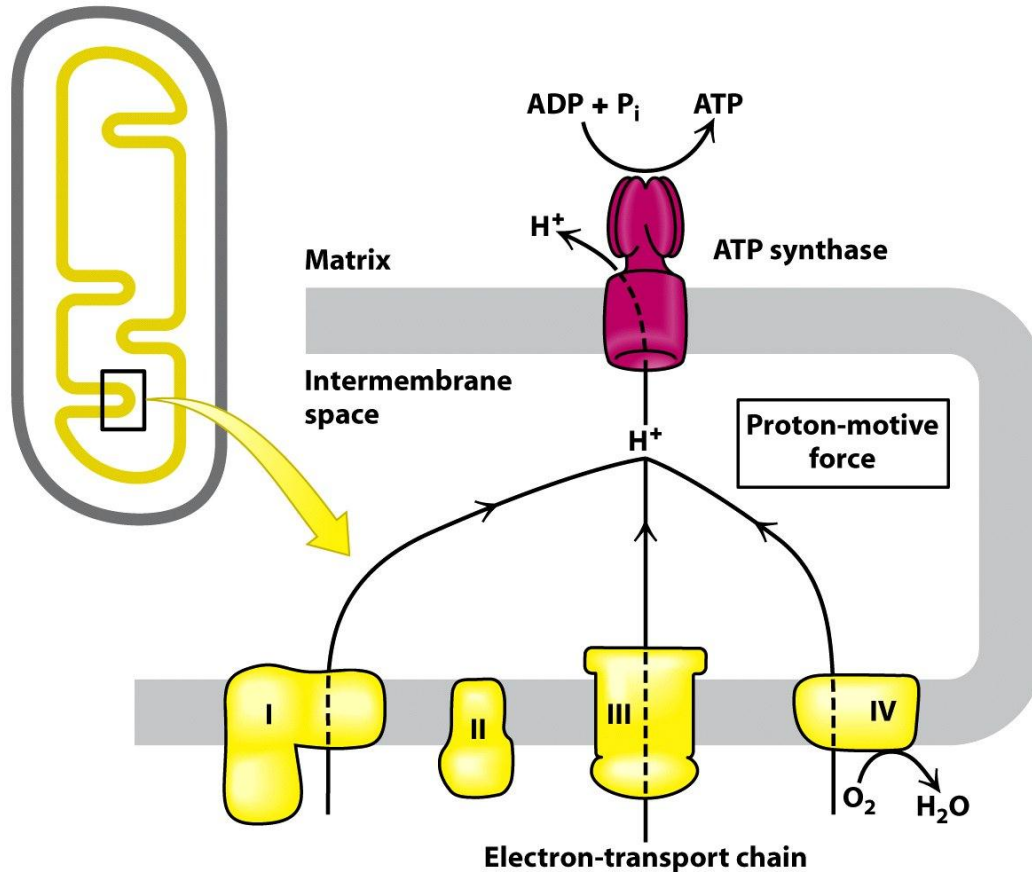


Figure 18-34
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Lanac za prijenos elektrona omogućava nastajanje gradijenta protona koji zatim dovodi do sinteze ATP.

Transporteri omogućavaju prijenos iona i elektrona kroz mitohondrijsku unutarnju membranu

- Unutarnja mitohondrijska membrana mora biti nepropusna za većinu molekula, ali izmjena tvari između citoplazme i mitohondrija mora se odvijati.
- Izmjenu tvari između mitohondrija i citoplazme vrše transmembranski transporteri.

Elektrone s citoplazmatskog NADH prenose transporteri

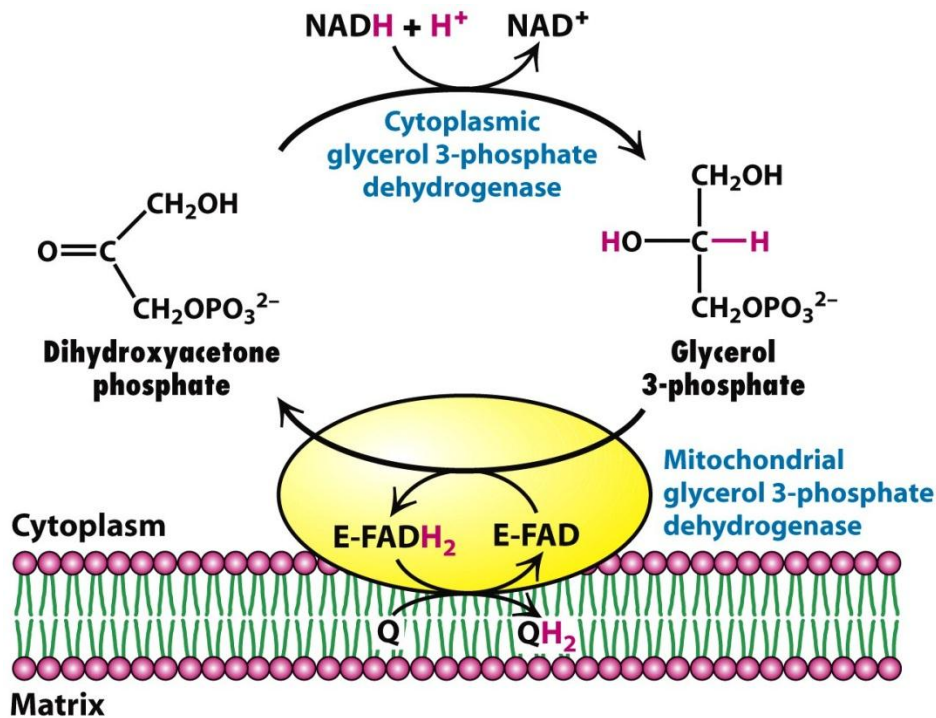


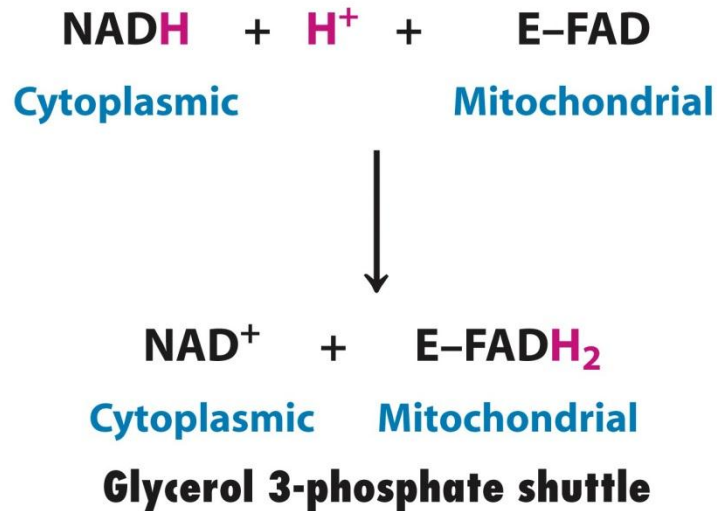
Figure 18-35
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Kada se citoplazmatski NADH prenosi ovim transporterom sintetizira se 1,5 molekula ATP iz jedne molekule NADH.

Transporter glicerol-3-fosfata.

Elektroni s NADH iz citosola mogu ući u mitohondrijski lanac za prijenos elektrona ukoliko se koriste za redukciju dihidroksiaceton fosfata u glicerol-3-fosfat. Elektroni se prenose na FAD prostetsku skupinu mitohondrijskog enzima tijekom oksidacije glicerol-3-fosfata. Mitohondrijski enzim je vezan za membranu mitohondrija te njegova FAD skupina predaje elektrone na ubikinon (Q) te nastaje QH₂. Elektroni s QH₂ dalje se prenose respiracijskim lancem.

Elektrone s citoplazmatskog NADH prenose transporteri



Unnumbered figure pg 527
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Kada se elektroni s NADH transportiraju transporterom glicerol-3-fosfata nastaje 1,5 molekula ATP budući da se elektroni prenose na FAD. Korištenje FAD omogućava da se elektroni prenose suprotno gradijentu koncentracije NADH koja je velika u aktivnom mitohondriju. Transport elektrona pomoću glicerol-3-fosfatnog transportera naročito je izraženo u mišićima i omogućava im da postignu veliku oksidacijsku fosforilaciju.

Neki insekti nemaju laktat dehidrogenazu i u potpunosti ovise o transporteru glicerol-3-fosfata kako bi regenerirali citoplazmatski NAD⁺.

Elektrone s citoplazmatskog NADH prenose transporteri

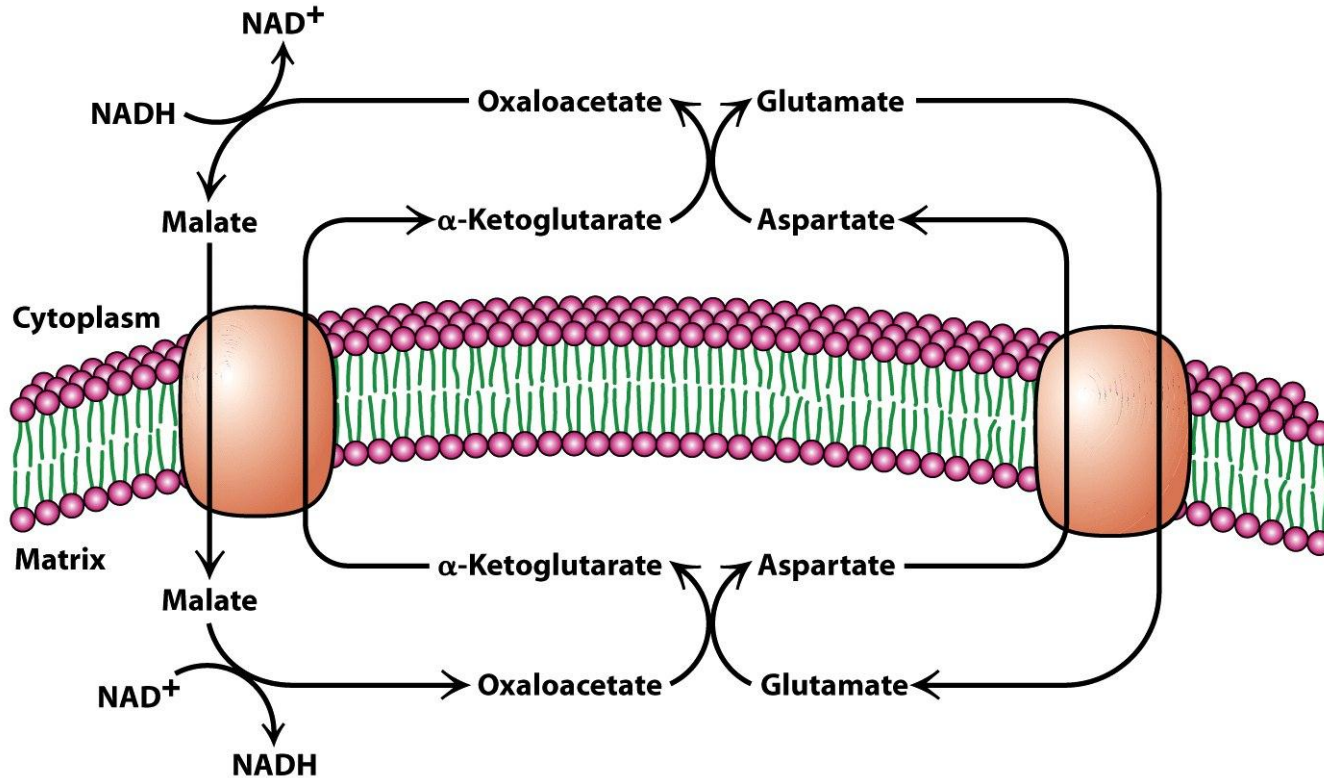
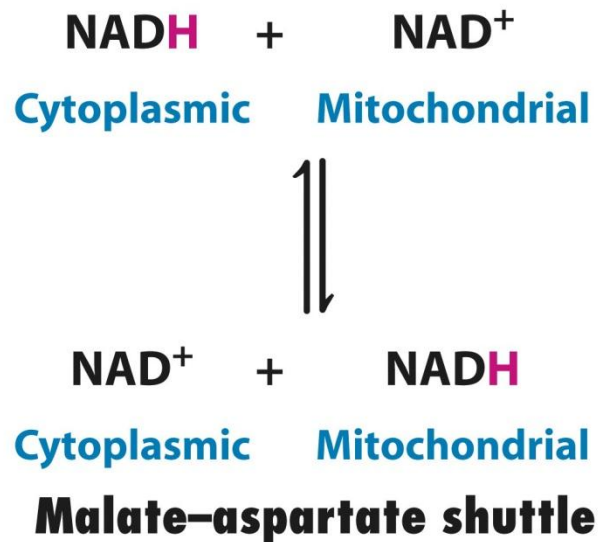


Figure 18-36
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Malat-aspartat transporter prenosi elektrone s citoplazmatskog NADH na mitohondrijski NADH. Iz jednog citoplazmatskog NADH sintetizira se 2,5 molekule ATP.

Elektrone s citoplazmatskog NADH prenose transporteri

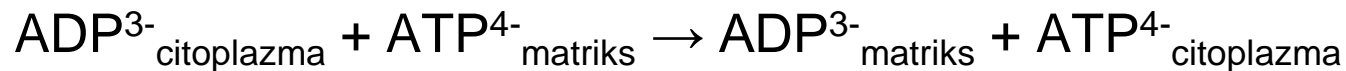


Unnumbered figure pg 528
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

U srcu i jetrima elektroni se s citoplazmatskog NADH prenose u mitohondrije transporterom malat-aspartat. Prijenos vrše dva membranska transportera (antiportera) i četiri enzima.

Prijenos ADP u mitohondrije povezan je s transportom ATP iz mitohondrija

Osnovna funkcija oksidacijske fosforilacije je sinteza ATP iz ADP. Kako nabijeni nukleotidi ne mogu difuzijom proći kroz membranu, oni se transportiraju antiporterom – **ATP-ADP translokazom**.



ATP-ADP translokaza je vrlo čest protein i čini 15% proteina unutarnje mitohondrijske membrane. **ADP ulazi u matriks mitohondrija samo ako se ATP izbacuje iz matriksa.**

Prijenos ADP u mitohondrije povezan je s transportom ATP iz mitohondrija

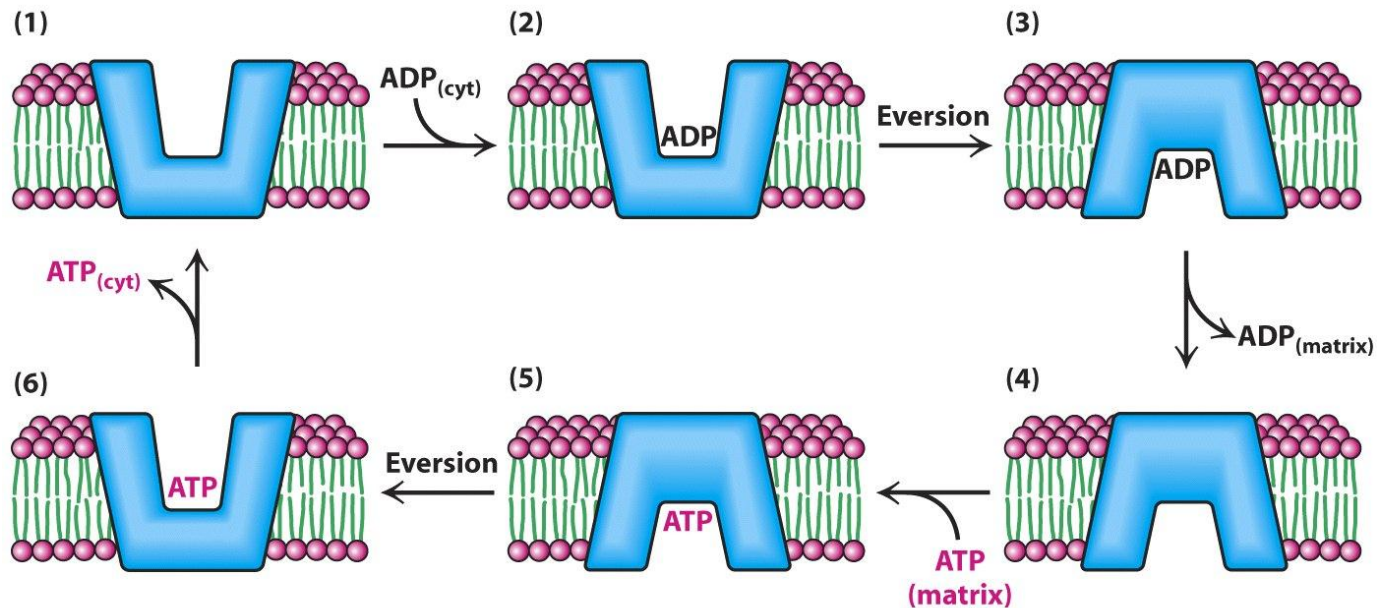


Figure 18-37
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Mehanizam mitohondrijske ATP-ADP translokaze. Translokaza povezuje prijenos ADP u mitohondrij s prijenosom ATP iz mitohondrija. Inhibicijom ATP-ADP translokaze dolazi do inhibicije staničnog disanja.

Mitochondrijski transporteri omogućavaju prijenos metabolita između citoplazme i mitohondrija

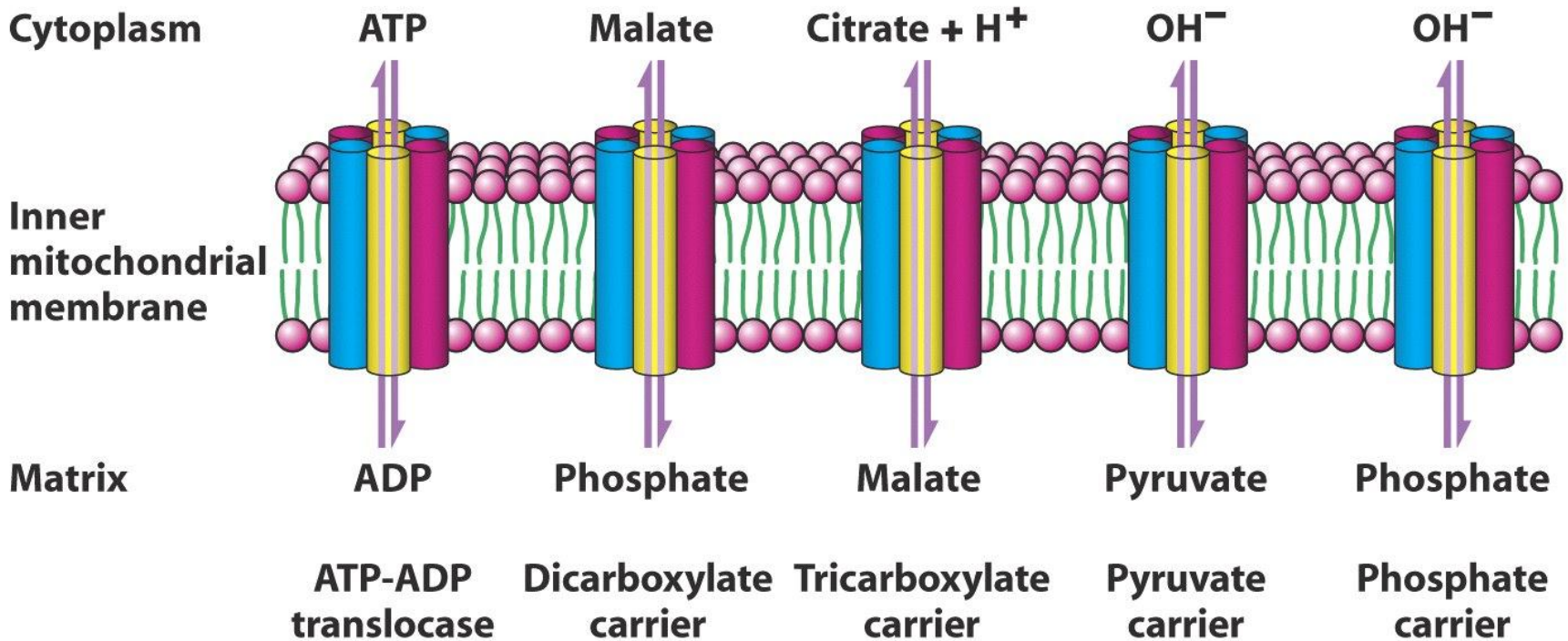


Figure 18-39
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Stanična respiracija regulirana je potrebom za ATP-om

- Kako je ATP krajnji produkt staničnog disanja, potreba stanice za ATP-om određuje brzinu odvijanja respiracije.

Potpunom oksidacijom glukoze dobiva se oko 30 molekula ATP

Reaction sequence	ATP yield per glucose molecule
Glycolysis: Conversion of glucose into pyruvate (in the cytoplasm)	
Phosphorylation of glucose	-1
Phosphorylation of fructose 6-phosphate	-1
Dephosphorylation of 2 molecules of 1,3-BPG	+2
Dephosphorylation of 2 molecules of phosphoenolpyruvate	+2
2 molecules of NADH are formed in the oxidation of 2 molecules of glyceraldehyde 3-phosphate	
Conversion of pyruvate into acetyl CoA (inside mitochondria)	
2 molecules of NADH are formed	
Citric acid cycle (inside mitochondria)	
2 molecules of guanosine triphosphate are formed from 2 molecules of succinyl CoA	+2
6 molecules of NADH are formed in the oxidation of 2 molecules each of isocitrate, α -ketoglutarate, and malate	
2 molecules of $FADH_2$ are formed in the oxidation of 2 molecules of succinate	
Oxidative phosphorylation (inside mitochondria)	
2 molecules of NADH formed in glycolysis; each yields 1.5 molecules of ATP (assuming transport of NADH by the glycerol 3-phosphate shuttle)	+3
2 molecules of NADH formed in the oxidative decarboxylation of pyruvate; each yields 2.5 molecules of ATP	+5
2 molecules of $FADH_2$ formed in the citric acid cycle; each yields 1.5 molecules of ATP	+3
6 molecules of NADH formed in the citric acid cycle; each yields 2.5 molecules of ATP	+15
NET YIELD PER MOLECULE OF GLUCOSE	+30

Source: The ATP yield of oxidative phosphorylation is based on values given in P. C. Hinkle, M. A. Kumar, A. Resetar, and D. L. Harris. *Biochemistry* 30(1991):3576.

Note: The current value of 30 molecules of ATP per molecule of glucose supersedes the earlier one of 36 molecules of ATP. The stoichiometries of proton pumping, ATP synthesis, and metabolite transport should be regarded as estimates. About two more molecules of ATP are formed per molecule of glucose oxidized when the malate-aspartate shuttle rather than the glycerol 3-phosphate shuttle is used.

Table 18-4
Biochemistry, Sixth Edition

Brzinu stanične respiracije određuje potreba za ATPom

Elektroni se ne prenose respiracijskim lancem ukoliko se istovremeno ne sintetizira ATP iz ADP.

Regulacija brzine oksidacijske fosforilacije naziva se respiratornom kontrolom ili kontrolom akceptora.

Pokusi na izoliranim mitohondrijima ukazuju na važnost koncentracije ADP.

Brzina nastajanja O_2 značajno raste kada se doda ADP, a tada dolazi do platoa kada se ADP fosforilirao u ATP.

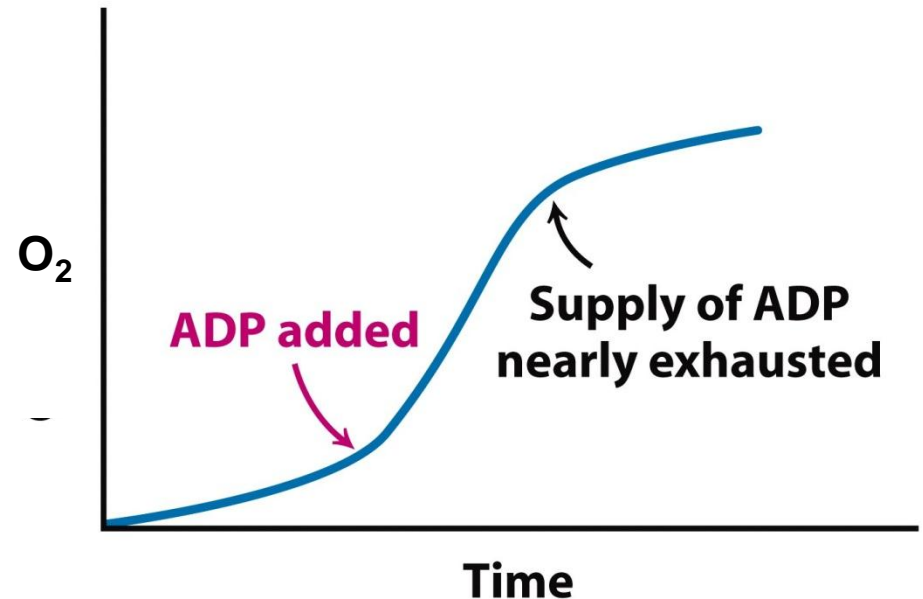


Figure 18-40
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Kontrola respiracije.

Elektroni se prenose na kisik samo ukoliko se ADP fosforilira u ATP.

Brzinu stanične respiracije određuje potreba za ATPom

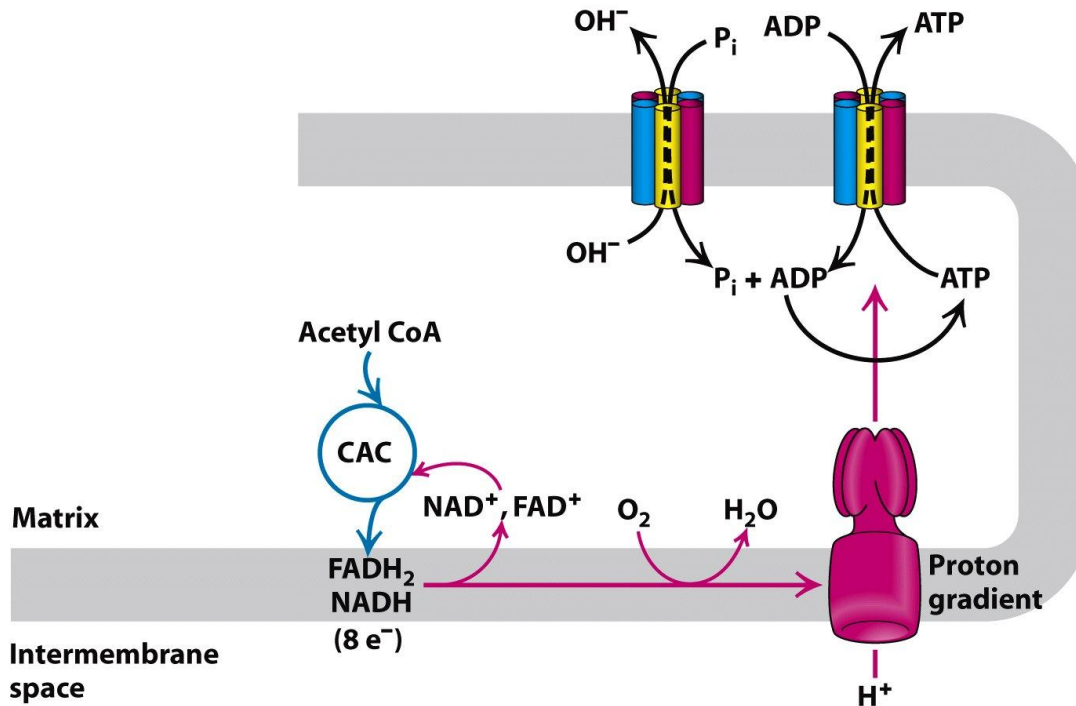


Figure 18-41
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Energetski naboj regulira korištenje metabolita.

Sinteza ATP iz ADP kontrolira brzinu i protok elektrona s NADH i FADH₂ na kisik. Isto tako dostupnost (količina) NAD⁺ i FAD kontrolira brzinu citratnog ciklusa. Elektroni se ne prenose s molekula “goriva” na O₂ ukoliko se ne mora sintetizirati ATP.

Regulirano odvajanje transporta protona od sinteze ATP dovodi do stvaranja topline

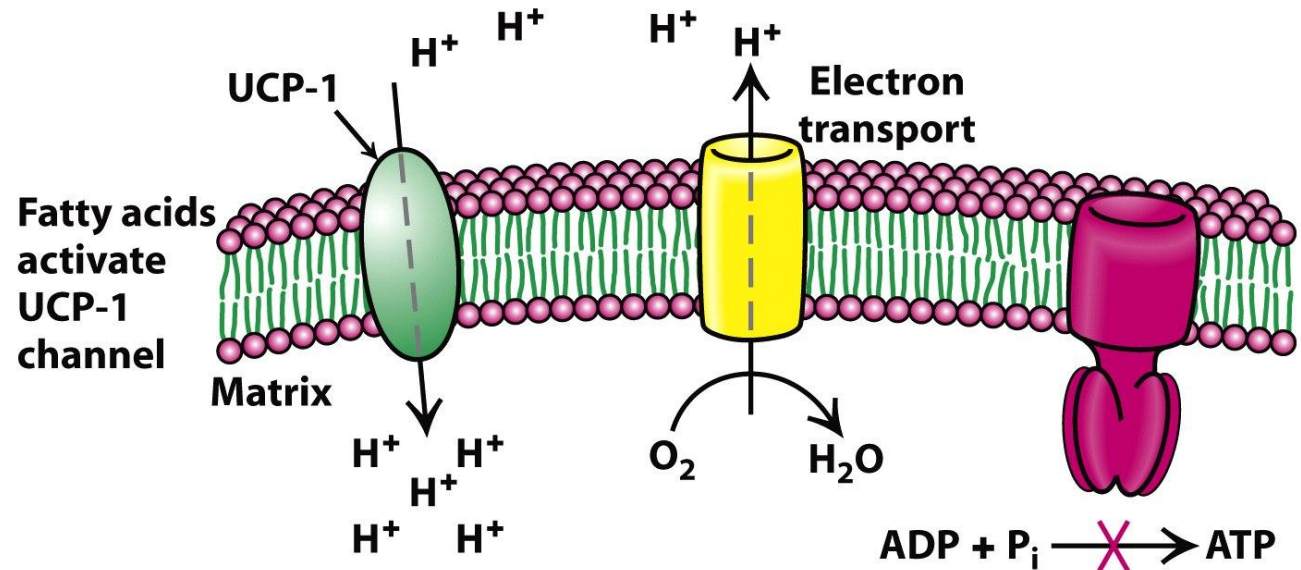


Figure 18-42
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Termogenin (uncoupling protein, UCP-1) odvaja tok protona od sinteze ATP i pri tome nastaje topline. Energija gradijenta protona koja se uobičajeno koristi za sintezu ATP, koristi se za stvaranje topline.

To je značajno za hibernirajuće životinje kao i za novorođenu djecu koja imaju tzv. smeđu mast.

Oksidacijska fosforilacija može se inhibirati na mnogim mjestima

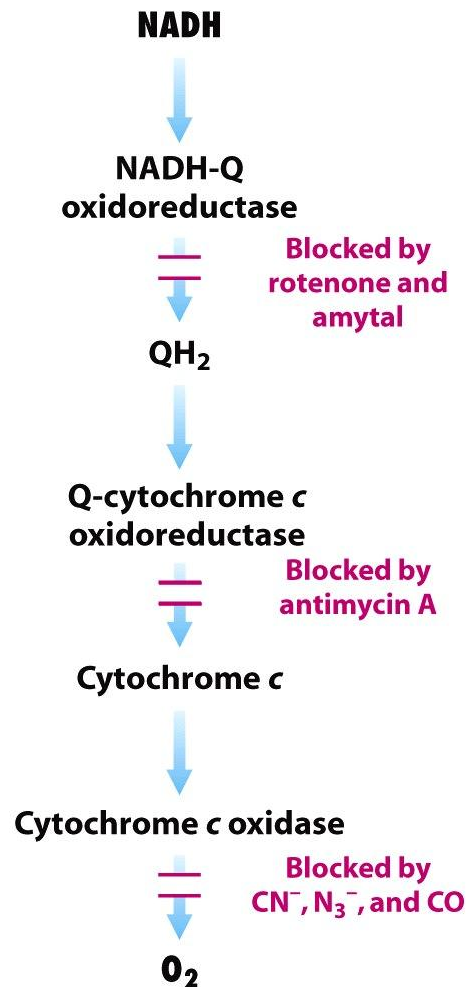


Figure 18-43
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Mnogi potentni i letalni otrovi inhibiraju oksidacijsku fosforilaciju na različitim mjestima.

Inhibitori kompleksa I sprječavaju korištenje NADH kao supstrata, ali to ne sprječava tok elektrona putem FADH₂.

Tok elektrona u kompleksu IV inhibiraju cijanidi, azid i ugljični monoksid. Cijanid i azid reagiraju s Fe³⁺ a CO reagira s Fe²⁺.

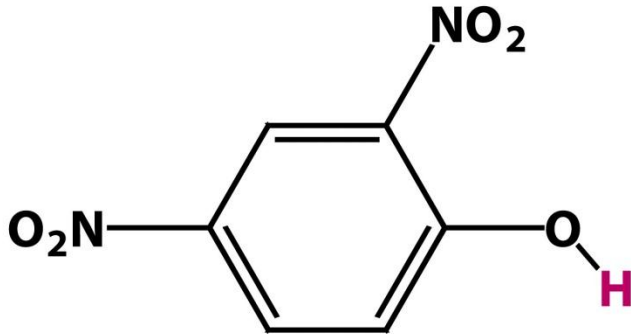
Inhibicija transporta elektrona inhibira i sintezu ATP budući da ne dolazi do stvaranja proton-motorne sile.

Mjesta djelovanja nekih inhibitora

Inhibicija ATP sintaze

- Oligomicin i dicikloheksilkarbodiimid inhibiraju protok protona kroz ATP sintazu
- Ako se aktivni mitohondriji koji provode oksidacijsku fosforilaciju inhibiraju s inhibitorima ATP sintaze prestaje rad i u lancu za transport elektrona. To jasno ukazuje da su lanac prijenosa elektrona i sinteza ATP usko povezani.

Odvajanje transporta elektrona od sinteze ATP



2,4-Dinitrophenol (DNP)

Unnumbered figure pg 534
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Odvajanje transporta elektrona od ATP sinteze može se postići s 2,4-dinitrofenolom ili nekim drugim kiselim aromatskim spojevima.

Ovi spojevi prenose protone kroz unutaraju mitohondrijsku membranu slobodnom difuzijom te time narušavaju gradijent protona.

U prisutnosti ovih spojeva nije spriječen prijenos elektrona s NADH na kisik, ali ne dolazi do sinteze ATP.

Umjesto sinteze ATP, oslobađa se toplina.

Inhibicija transporta ATP

Vrlo male koncentracije atraktilozida (glikozid biljaka) ili bongkrekična kiselina (antibiotik) inhibiraju ATP-ADP translokazu.

Inhibicijom translokaze inhibira se i oksidacijska fosforilacija, te je to dokaz da je ATP-ADP translokaza neophodna za održavanje količine ADP koja je potrebna za prihvaćanje energije koja se oslobađa proton-motornom silom.

Broj bolesti koje nastaju zbog defekta mitohondrija stalno raste

- Broj bolesti koji nastaje zbog mutacija u mitohondrijskoj DNA stalno se povećava.
- Ustanovilo se da 10 – 15 ljudi u 100 000 ima neku mitohondrijsku bolest
- **Leberova nasljedna optička neuropatija**, sljepoća koja se javlja sredinom života, bila je prva bolest koja se biokemijski detektirala i razjasnila.
- Najčešće su mutacije na kompleksu I, iako su mutacije nađene na svim mitohondrijskim proteinima.

Prijenos energije pomoću gradijenta protona koristi se u mnogim procesima

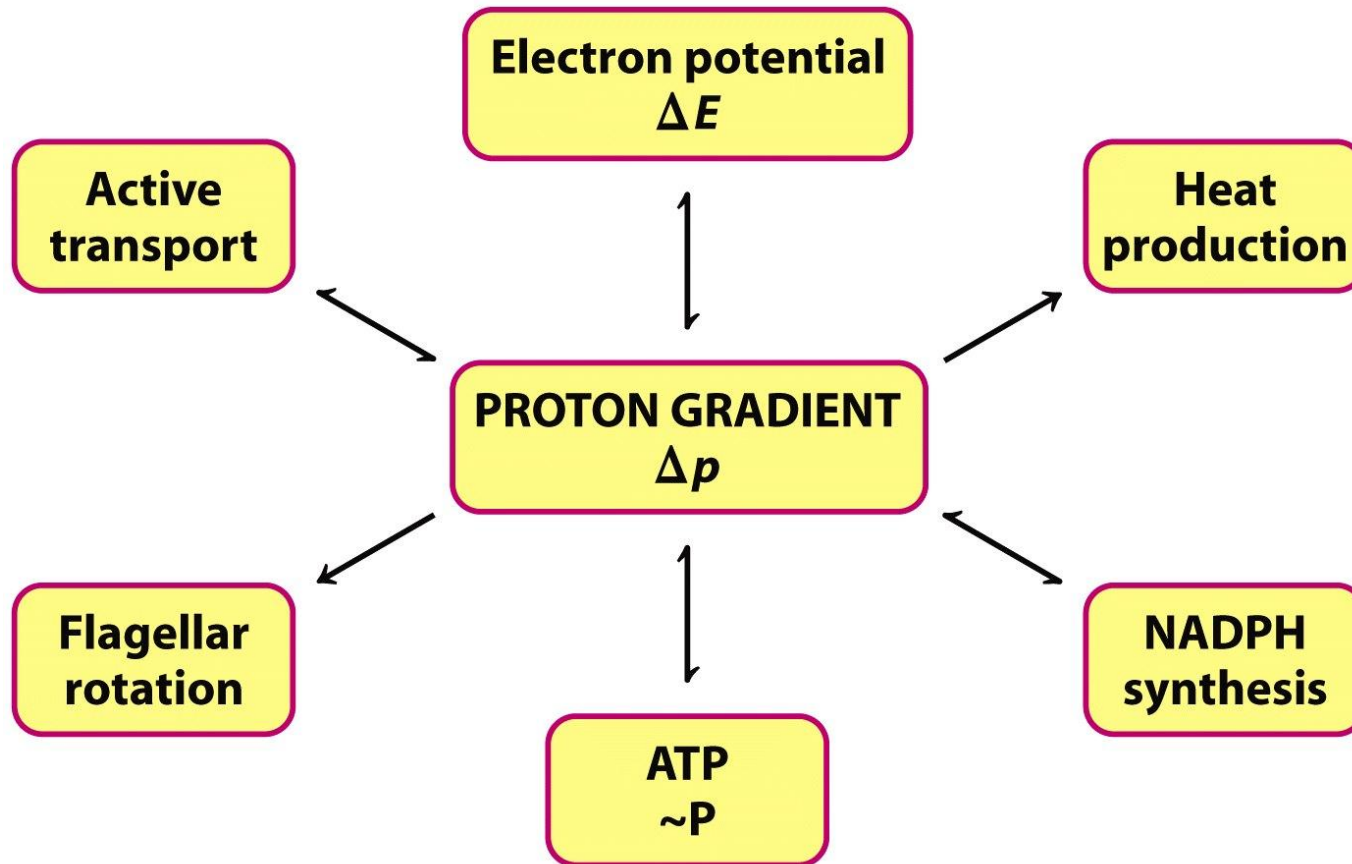


Figure 18-44
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Gradijenti protona stvaraju energiju koja se može pretvarati u različite oblike energije.