

## A mitokondrium

Mitokondriumok minden eukarióta sejtben megtalálhatók és alapvető funkciójuk a kémiai energia átalakítása illetve termelése. Evolúciós eredetét tekintve prokarióta származású organellum, ami egy aerob baktérium bekebelezése eredményeként keletkezett. Tekintve, hogy ez az endoszimbiózis mintegy 1.5 milliárd évvel ezelőtt játszódott le, ezért a mitokondriumok ezen idő alatt sokat változtak. Ennek ellenére prokarióta eredtük még ma is felismerhető. Erre utal például a baktériumokra emlékeztető alakjuk és méretük. A mitokondriumok 0.5-1  $\mu\text{m}$  átmérőjű, hengeres alakú képződmények. Ugyancsak prokarióta eredetükre utal, hogy saját genomjuk van, ami egy köralakú DNS molekula (akárcsak a baktériumoké). Mivel hosszú fejlődési folyamaton mentek keresztül, mialatt elvesztették genomjuk egy részét, ezért ma már nem lennének képesek önálló életre. Éppen ezért az eukarióta gazdasejtre vannak utalva olyan fehérjék tekintetében, amilyenek előállítására ma már nem képesek. Természetesen a gazdasejt peig a mitokondriumjaira van utalva ATP termelés tekintetében.

## A mitokondriumok felépítése

A mitokondriumok az eukarióta sejt citoplazmájának jelentős részét elfoglalják. Amint azt már említettük hengeres alakú, bakteriális méretű sejtoganellumok. Bizonyos sejtekben a mitokondriumok mozognak (mobilisak), más sejtekben viszont helyzetük rögzített: általában az intenzív energiatermelést végző sejtekben pl. izomsejt és spermium.

A mitokondriumok fénymikroszkópban láthatók és ez magyarázza felfedezésüket a 19. században. Működésük megismerésében jelentős előrehaladás csak a sejtekből tröténő frakcionált, tisztításuk után volt lehetséges. Leggyakrabban májsejtekből szokás mitokondriumokat izolálni, mert azokban nagy mennyiségben, sejtenként 1000-2000 mitokondrium, fordul elő. A mitokondriumok össtérfogata a májsejtek citoplazma térfogat 1/5-ét is eléri.

A mitokondriumokat két (külső és belső membrán) membrán határolja, aminek oka egyszerűen következik az endoszimbiózis létrejöttkor bekövetkezett bekebelezésből. Ennek megfelelően a mitokondrium külső membránja a proto-eukarióta lefűződött citoplazmamembránjának felel meg,

míg a belső membránja az aerob baktérium citoplazmamembránjának felel meg. A két membrán következtében két mitokondriális kompartment különböztetünk meg:

1. **mátrix**
2. **intermembrán tér.**

A két membrán permeabilitási tulajdonságai alapvetően eltérnek. Külső membrán gyakorlatilag permeábilis 5000 Da-nál kisebb molekulatömegű molekulákra. Ennek következtében az intermembrán tér összetétele azonos a citoplazmáéval. transzport proteinek sokasága (porinok) van itt: nagy vizes csatornákat képeznek a membránon keresztül.

**Belső membrán:** specializált.

1. Kardiolipin: kettős foszfolipid: 4 zsírsav; az ionokra nagyon impermeábilissá teszi a membránt.
2. **Transzport fehérjék:** kis molekulák transzportja.
3. **Légzési lánc enzimek:** elektrontranszport lánc enzimek, amik az oxidatív foszforilációt végzik.
4. **Kriszták:** a belső membrán betüremkedései; a felületet növelik. Az izom mitokondriumában 3-szor több van, mint a májében; feltételezhetően a nagyobb ATP igény miatt.

### **A mátrix enzimek nagy mennyiségű acetyl-CoA-t termelnek**

Az Ac-CoA két forrásból eredhet:

1. szénhidrátból: a mátrixba már a piruvát lép be,
2. zsírsavból.

Mindkét forrásból acetyl-CoA keletkezik, és az a citrát-ciklusba lép be. Piruvát lép be a citoplazmából, ami szén-dioxidá és vízzé oxidálódik.

Tartalék tápanyagok állati sejtben:

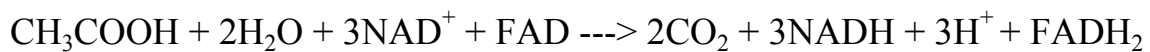
1. **Zsír.** A zsírszövetben található, onnan a véráramba kerül, hogy más sejtek hasznosítsák. A zsír fontosabb, mint a glikogén, mert lebontása kb. 6-szor annyi energiát szolgáltat, mint a glikogéné. Az emberi szervezet 1 napi energia szükségletével azonos glikogént tárol és egy hónapra elegendő zsírt.

Zsír = triacilglicerol, zsírcseppek a citoplazmában. Ezek a zsírszövetekben nagyok, míg a zsírt felhasználó sejtekben kisebbek. Mitokondriumok veszik körül őket utóbbiban. Zsírsav bemegy a mitokondrium mátrixba, és acil-CoA lesz belőle. Ez kétszénatomos egységként Ac-CoA-vá bomlik le.

**2. Glikogén:** nagyon elágazó glükóz polimer. A citoplazmában granulomok formájában található. Szintézise és degradációja szorosan kontrollált. Glükóz-1-P-tá bomlik le, ami a glikolízisbe lép be. A keletkező piruvát a mitokondriumba megy ahol a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex alakítja Ac-CoA-vá (3 enzim több kópiában, 5 koenzim és 2 regulációs alegység).

### **A citrát-ciklus az acetil csoportokat oxidálja, és NADH-t és FADH<sub>2</sub>-t képez**

Másnéven: Krebs-Szent-Györgyi ciklus. 7 lépéses, szekvenciális, enzimes folyamat. A nettó reakcióegyenlet:



A FADH<sub>2</sub> a szukcinát-dehidrogenáz komplex része, és az elektronokat közvetlenül a légzési láncnak adja.

A NADH egy oldható pool-t képez, ami ütközik a membrán-kötött dehidrogenázzal.

### **Kemiozmóztis folyamat alakítja az energiát a belső membránban ATP-vé**

A NADH és FADH<sub>2</sub> keletkezése során nincs molekuláris O<sub>2</sub> felvétel. A végső katabolikus lépések a belső membránban folynak O<sub>2</sub> közvetlen felhasználásával az ATP szintézishez, A folyamat neve: **oxidatív foszforiláció**. A NADH és FADH<sub>2</sub> oxidációjával ADP foszforilezése ATP-vé.

**A kemiozmóztis hipotézis 4 posztulátuma:**

1. A mitokondrium belső membránjában a légzési lánc **proton transzlokáló** tulajdonsággal rendelkezik: miközben elektront szállít, protonokat transzlokál a belső membránon át a mátrixból.

2. A mitokondriális ATP-áz is protonokat transzlokál **reverzibilisen**. Ha sok kint a proton, akkor azokat beviszi, és ATP szintetizálódik.
3. Belső membrán **kARRIER** molekulákat hordoz, amik az esszenciális ionokat és molekulákat szállítják.
4. A belső membrán **egyébként** impermeábilis  $H^+$ -ra,  $OH^-$ -ra és más ionokra.

A **nagyenergiájú intermedier a protongradiens**: kapcsolat a kémiai (kemi) és a transzport (ozmózis) folyamatok között.

### **Az elektron transzfer a NADH-tól az $O_2$ -ig 3 nagy légzési enzimkomplexen keresztül történik**

Az energetikailag kedvező  $H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$  reakció sok kis lépésre van bontva. A hidrogén atomok protonokra és elektronokra szeparálódnak. Az elektronok a belső membrán elektrontranszport láncán haladnak, és néha egyesülnek a protonokkal ugyan, de végső egyesülés csak akkor van, amikor az elektronok az  $O_2$ -t már redukálták.

Minden NADH molekula egy hidridiont ( $H^-$ ) hordoz (egy H atom + egy elektron vagy másképp egy proton + két elektron). Mivel proton van elég az oldatban, ezért ez tulajdonképpen 2 H-atommal, azaz egy  $H_2$  molekulával azonos.

Az elektrontranszport lánc indul, hogy a NADH-ról 2 elektron átadódik a több mint 15 elektronszállítót tartalmazó lánc első tagjának. Az elektron fokozatosan energiáját veszti, miközben fehérjékhez kötött fématomok között vándorol.

**Légzési enzimkomplexek:** transzmembrán fehérjék, és mindegyik komplex nagyobb affinitással rendelkezik az elektronhoz, mint a láncban előtte álló.

### **A légzési láncon történő elektronáramlás során felszabaduló energia elektrokémiai proton gradiensben raktározódik**

Az elektronok áramlása  $H^+$  orientált felvétellel jár együtt, és azok kipumpálásával a belső membránon át az intermembrán térbe. A protonok kiáramlásának 2 következménye van:

1. pH gradiens ( $\Delta\text{pH}$ ) alakul ki a membránon keresztül: mert több proton lesz kint, mint bent;
2. membrán potenciál ( $\Delta U$ ): belül negatív, és kívül pozitív.

Minél nagyobb a különbség e két tekintetben a membrán két oldala között, a protonok visszaáramlásának készsége annál nagyobb. Ennek jellemzésére a szabadentalpia változással ( $\Delta G$ ) arányos mennyiséget, az **elektrokémiai protongradienst** vagy **proton hajtóerőt** használjuk.

Mivel koncentráció- és elektromos potenciálkülönbség van, ezért a  $\Delta G$  most két részből áll:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{koncentrációs}} + \Delta G_{\text{elektromos}}$$

A koncentrációs és elektromos munka pedig felírható az alábbi alakban:

$$\Delta G = zF\Delta U + RT * \ln \frac{[\text{H}^+]_{\text{bent}}}{[\text{H}^+]_{\text{kint}}}$$

ahol  $z=1$ , mert a proton egyszeres töltésű.  $F$ -fel osztva és bevezetve a  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$  definíciót:

$$\Delta U + 2.3 * \frac{RT}{F} \Delta\text{pH}$$

egyenletet kapjuk a proton hajtóerőre, aminek egysége mV.

Az elektrokémiai protongradiens értéke a mitokondrium belső membránján kb. 200 mV, és az alábbi módon oszlik meg: 140 mV (elektromos) + 60 mV (koncentrációs).

### **Az elektrokémiai protongradiens ATP szintézisre és metabolitok, szervesen ionok mátrixba való transzportjára fordítódik**

A belső membrán 70%-a fehérje és 30% csak a foszfolipid. A fehérje főbb típusai:

1. elektrontranszport fehérjék,
2. ATP szintáz,
3. carrier proteinek.

Az elektrokémiai protongradiens nemcsak az ATP szintézist hajtja (az ATP szintázsal), hanem molekulák transzportját (általában ko-transzport) is:

1. ATP-ADP antiport: az elektromos potenciálgradiens kedvez ennek a cserének (ADP be, ATP ki), mert az ADP 3-, míg az ATP 4- töltésű.
2. Foszfát transzport: kotranszport protonnal.
3. Piruvát transzport: kotranszport protonnal.

### **A mitokondriális ATP szintézis nagy ATP/ADP arányt tart fenn**

Az ATP a citoplazmában elbomlik ADP-re, ami visszamegy a mitokondriumba, ahol megint ATP keletkezik. Az ATP/ADP konc. arány kb. 10.

### **Az ATP hidrolízis $\Delta G$ -je sokkal negatívabb $\Delta G^0$ -nál**

A szabadentalpia változást a komponensek koncentrációja is befolyásolja:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[\text{ADP}] [\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

ahol  $\Delta G^0$  a standard szabadentalpia változás, amikor minden koncentráció 1 mol / l. Ilyenkor tehát  $\ln(1) = 0$ , vagyis  $\Delta G = \Delta G^0$ . Mivel egyensúlyban  $\Delta G = 0$ , ezért  $\Delta G^0$  meghatározható a reakció egyensúlyi koncentrációiból:

$$-RT \ln \frac{[\text{ADP}^e] [\text{P}_i^e]}{[\text{ATP}^e]} = \Delta G^0$$

vagyis

$$-RT \ln K_{\text{eq}} = \Delta G^0$$

Mivel a sejtben az ATP koncentráció sokkal nagyobb mint az ADP és  $\text{P}_i$ , ezért a  $\Delta G$  -11 és -13 kcal / mol között van szemben a  $\Delta G^0 = -7.3$  kcal / mol értékkel.

### **A légzési lánc nagyon hatékony**

Minden pár elektron a NADH-ban 2.5 ATP szintéziséhez elegendő energiát hordoz. A FADH pedig 1.5 ATP-hez elegendőt.

Ha a zsír és szénhidrát lebontás során ATP-ben tárolt energiát a felszabadított energiához viszonyítjuk, akkor kb. 40%-os hatásfokot kapunk.

## A légzési lánc és az ATP szintáz

### Belsejüket kifelé fordító vezikulák izolálása

Ha a mitokondriumokat ultrahanggal szétverik, **szubmitokondriális partikulák** keletkeznek. A széttört kriszták összeállnak zárt vezikulumokká (átmérő 100 nm). Ezek elektronmikroszkópos felvétele lollipop szerű struktúrákat mutat: fej kis nyakkal, a fej a mitokondriumban a mátrix felé néz. Tehát a szubmitokondriális részecskék kifelé fordított struktúrák. Éppen ezért a membrán impermeábilis anyagokkal etethető (amik normálisan a mátrixban vannak): NADH és ADP adagolására  $O_2$ -fogyasztás és ATP szintézis van.

### ATP szintáz izolálható és visszaadható a membránhoz

Ha a gömbalakú fejeket leszedik ezkről a részecskékről, akkor:

1. a tisztított "fej" ATP-áz aktivitást mutat (ez az **F<sub>1</sub> ATPáz**);
2. a fej nélküli szubmitokondriális partikula oxidálja a NADH-t, de nem szintetizál ATP-t.

A két frakciót összetéve, ismét funkcionális oxidatív foszforilációt kapunk.

Az F<sub>1</sub> ATP-áz egy nagy transzmembrán komplex (500.000 Da) része. Ez az **F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-áz** (vagy **ATP szintáz**). 9 polipeptidből áll, és a belső membrán totál proteintartalmának 15%-át adja. Nagyon hasonló komplex van a kloroplasztban és a baktériumok membránjában. A transzmembrán rész egy H<sup>+</sup> karrier, az F<sub>1</sub> ATP-áz pedig ATP szintézisre képes, ha protonok diffundálnak át rajta. Ha izolálják, akkor fordított irányban (ATP hidrolízis) működik csak.

Meggyőző bizonyíték: tisztított foszfolipidekből készített liposzómába tisztított ATPáz és tisztított bakteriorodopszin építettek be. A preparátumban nincs elektrontranszport fehérje; a bakteriorodopszin protont pumpál befelé, ami kijön az ATPázon keresztül és ATP szintetizálódik.

### Az ATP szintáz fordított irányban is működik

Az ATPáz egy reverzibilis kapcsoló szerkezet: elektrokémiai gradienst és kémiai kötés energiáját alakítja egymásba.

Az ATPáz sztöchiometriája nem biztos, de tegyük fel, hogy 3 proton áthaladása során keletkezik egy ATP.

Hogy melyik irányba működik, azt 2 folyamat  $\Delta G$ -jének viszonya dönti el:

1.  $\Delta G_{3H^+}$ , ami negatív (ha kint több a proton), és arányos a proton hajtóerővel a belső membránon keresztül.

2.  $\Delta G_{ATP}$  szintézis, ami pozitív.

200mV proton hajtóerő ekvivalens:

$$\Delta G_{H^+} = -0.023 \text{ (kcal mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}) * 200 \text{ mV} = - 4.6 \text{ kcal / mol}$$

$$\Delta G_{H^3+} = - 13.8 \text{ kcal / mol}$$

Az ATPáz addig szintetizál, amíg  $\Delta G_{H^3+} + \Delta G_{ATP}$  szint. = 0, vagyis

$\Delta G_{ATP}$  szint. = + 13.8 kcal / mol nem lesz.

Baktériumokban az ATPáz működésének iránya aerob-anaerob átváltással megváltoztatható (ld. később).

### A protontranszport kísérletes bizonyítéka

Izolált mitokondriumok szuszpenziójában anaerob viszonyok között az ATPáz-t gátolják. Egy kis  $O_2$  injektálására a légzés megindul 1-2 sec-ig, amíg az  $O_2$  el nem fogy. Eközben a külső közeg savanyodik a kipumpált protonok miatt. Szubmitokondriális részecskék esetén a közeg bázikusabb lesz.

### A légzési elektronszállítók spektroszkópiai azonosítása

Az elektron karrierek többsége oxidációs redukciós állapotától függően változtatja a színét.

Abszorpciós spektrum alapján a citokrómokat 1925-ben fedezték fel (a, b és c típus). Oxidáción és redukción mennek keresztül.

**Citokrómok:** színes fehérjék; kötött **hem** csoportot tartalmaznak: porfirin gyűrű, ahol a 4 N-atom tart egy vasatomot. Elektron felvétele esetén a vas ferri -> ferro átmenet mutat.



**Fe-S fehérjék:** az elektron karrierek másik nagy csoportja; 2 vagy 4 vas azonos számú cisztein S-atomjához kötve. Több Fe-S fehérje van, mint citokróm, de kevésbé jól ismertek, mint a citokrómok. Elektron spin rezonenciával vizsgálhatók csak.

**Ubikinon:** legegyszerűbb elektronszállító: lipidoldékony molekula (**koenzim Q** a másik neve). 1 vagy 2 elektront tud felvenni és azzal együtt 1 vagy 2 protont.

Az egyes elektronszállítók sorrendjét spektrokópiai vizsgálattal határozták meg.

### **A respirációs lánc három nagy enzimkomplexet tartalmaz**

A membránfehérjék csak detergennel szolubilizálhatók, és gyenge detergennel 3 komplex izolálható. Mindegyik komplex, mint egy **elektrontranszport hajtott protonpumpa** működik.

#### **1. NADH dehidrogenáz komplex:**

Ez a legnagyobb komplex (800.000 Da): 22 polipeptid láncból áll. NADH-tól veszi az e<sup>-</sup>-t, flavinon és 5 Fe-S centrumon keresztül ubikinonnak adja.

#### **2. Citokróm b-c<sub>1</sub> komplex:**

8 polipeptid lánc; 2 db 500.000-os Da polipeptid dimerje. Monomerje 3 hem citokrómhoz kötve + 1 Fe-S centrum.

#### **3. Citokróm oxidáz (citokróm aa<sub>3</sub>):**

Dimerként izolálható; molekula tömege 300.000 Da. Monomerje minimum 9 polipeptid, 2 citokróm és 2 Cu.

A citokrómok, a Fe-S centrumok és a Cu csak 1 elektront tudnak szállítani, míg a NADH kettőt ad, az O<sub>2</sub> redukciójához pedig 4 kell. **Elektron gyűjtő és elosztó helyek** vannak a láncban.

### **A citokróm oxidáz katalizálja az O<sub>2</sub> redukcióját**

Az O<sub>2</sub>-ből sok energia szabadítható fel, de veszélyes. Azért toleráljuk az O<sub>2</sub>-t, mert az első elektron felvétele nehézkes. Ha azonban az O<sub>2</sub> felvett egy elektront (**szuperoxid-anion**), akkor a további hármát már könnyen felveszi.

Ez egy gyökanion, ami roppant reakcióképes, ezért toxikus a szervezetre. A citokróm oxidáz azonban egy speciális **bimetálos centrummal** rendelkezik, ami addig fogva tartja az  $O_2$ -t, amíg az a 4 elektronját meg nem kapta.

**Bimetálos centrum:** egy hemhez kötött Fe- és egy Cu-atomot tartalmaz.

### **Az elektrontranszport az akceptorok és donorok random ütközésével valósul meg**

Az ubikinon és a citokróm c szállítja az elektronokat a 3 enzim komplex között. Ezek gyorsan diffundálnak a membránban, és gyakran ütköznek a komplexekkel.

A 3 komplex, mint 3 különböző entitás van a membránban. Bizonyíték: a 3 komplex mennyisége különböző egy bizonyos membránban és membránonként változó.

Minden komponens csak egy meghatározott másikkal lép kapcsolatba, és ezt a redox potenciál magyarázza (molekula affinitása az elektronhoz). A lánc későbbi tagjainak nagyobb az affinitása az  $e^-$ -hoz.

### **A redox potenciál nagy mértékű csökkenése a 3 respirációs komplexen a protonok kipumpálásához vezet**

A  $H_2O / 0.5 O_2$  és a  $NAD^+ / NADH$  **konjugált redox párok** (egyik vegyület a másikba elektron és proton hozzáadással ill. elvétellel alakítható).

**Redox potenciál:** biológiai rendszereknél  $pH = 7$  értéknél mérjük.

Negatív redox potenciál: gyenge affinitás az elektronhoz, inkább leadja;

pozitív redox potenciál: erős affinitás az elektronhoz, inkább felveszi.

A  $NADH / NAD^+$  redox potenciálja  $-320$  mV, míg a  $H_2O / 1/2 O_2$  -é  $+820$  mV.

A lánc tagjainak mérhető a redox potenciálja: a citokrómoké nagyobb, mint a Fe-S centrumoké.

A redox potenciál a láncban 3 nagy lépésben esik: a redox potenciál csökkenés arányos a szabadenergia változással. Minden komplex, mint egy **energiaátalakító gép** működik, ami az energiát proton pumpálásra fordítja.

Bizonyítás: tisztított komponens liposzóma membránba + megfelelő elektron donor -> protongradiens képződik.

### **H<sup>+</sup>-ionofórok disszipálják a H<sup>+</sup>-gradienst és szétkapcsolják az elektrontranszportot az ATP szintézistől**

2,4-dinitrofenol = szétkapcsolószer. ATP szintézis megszűnik, de a légzés nem. A H<sup>+</sup>-gradiens nem épül ki; a szétkapcsolószer lipid oldékony gyenge savak, amik H<sup>+</sup>-carrierek.

A "rövid zár" eredményeként a protongradiens disszipál és nem lesz ATP.

### **Légzési kontroll fogja vissza az elektronáramlást a láncban**

Szétkapcsolószer hatására az O<sub>2</sub> felvétel megnő. **Respirációs kontroll** van tehát. Az elektrokémiai protongradiens gátolja az elektrontranszportot. Amikor a gradiens megszűnik, a lánc felszabadul a gátlás alól.

Ha mesterségesen nagy elektrokémiai gradienst csinálunk a membrán két oldalán, akkor az elektron transzport leáll, és **fordított elektrontranszport** indul el, legalábbis a membrán egy szakaszán.

Respirációs kontroll = egyensúly az e<sup>-</sup>-transzport kapcsolt proton pumpálás és az elektrontranszport szabadenergia változása között.

A respirációs kontroll csak egy eleme a szabályozásnak: a másik az ADP / ATP arány.

ATP-áz gyorsabban működik, ha sok a szubsztrátja. Gyorsabban mennek be a protonok, a gradiens csökken, és az elektrontranszport gyorsul.

### **Természetes szétkapcsolószer a barna zsírsejtekben**

A barna zsírsejtekben óriási mitokondriumok vannak, amik belső membránja egy speciális transzport fehérjét tartalmaz. Proton megy át a membránon, de nem keletkezik ATP, hanem hő képződik.

Jelentősége: hibernáló állatok és csecsemő hideg érzékeny részei.

## A baktériumok is használják a kemiozmózis elvet

Az aerob baktériumok plazmamembránja a mitokondrium belső membránjához hasonlóan működik. Kipumpálja a protont, és a bejövő proton hajtja az ATP-szintézist.

Anaerob baktériumok: van elektron transzport, de az akceptor más:

1. nitrogén vegyület (nitrát vagy nitrit),
2. kén vegyület (szulfát vagy szulfid),
3. szénvegyület (fumarát vagy karbonát).

Olyan aerobok, amikben nincs elektrontranszport, a glikolitikus ATP terhére az ATP-szintézissel csinálnak protongradienst.

Így tehát mindenkinek van protongradiense, ami az alábbi dolgokra fordítható:

1. csilló forgatás,
2.  $\text{Na}^+$  kipumpálás ( $\text{Na}^+$  -  $\text{H}^+$  antiport),
3. tápanyagok aktív transzportja,
4. ATP szintézis.

Állati sejtekben a tápanyag felvétel  $\text{Na}^+$ -nal megy és nem protonnal, amit a  $\text{Na}^+$  -  $\text{H}^+$  ATP-áz csinál.

Alkalikus közegben élő baktériumok nem  $\text{H}^+$ -t pumpálnak, hanem  $\text{Na}^+$ -t.