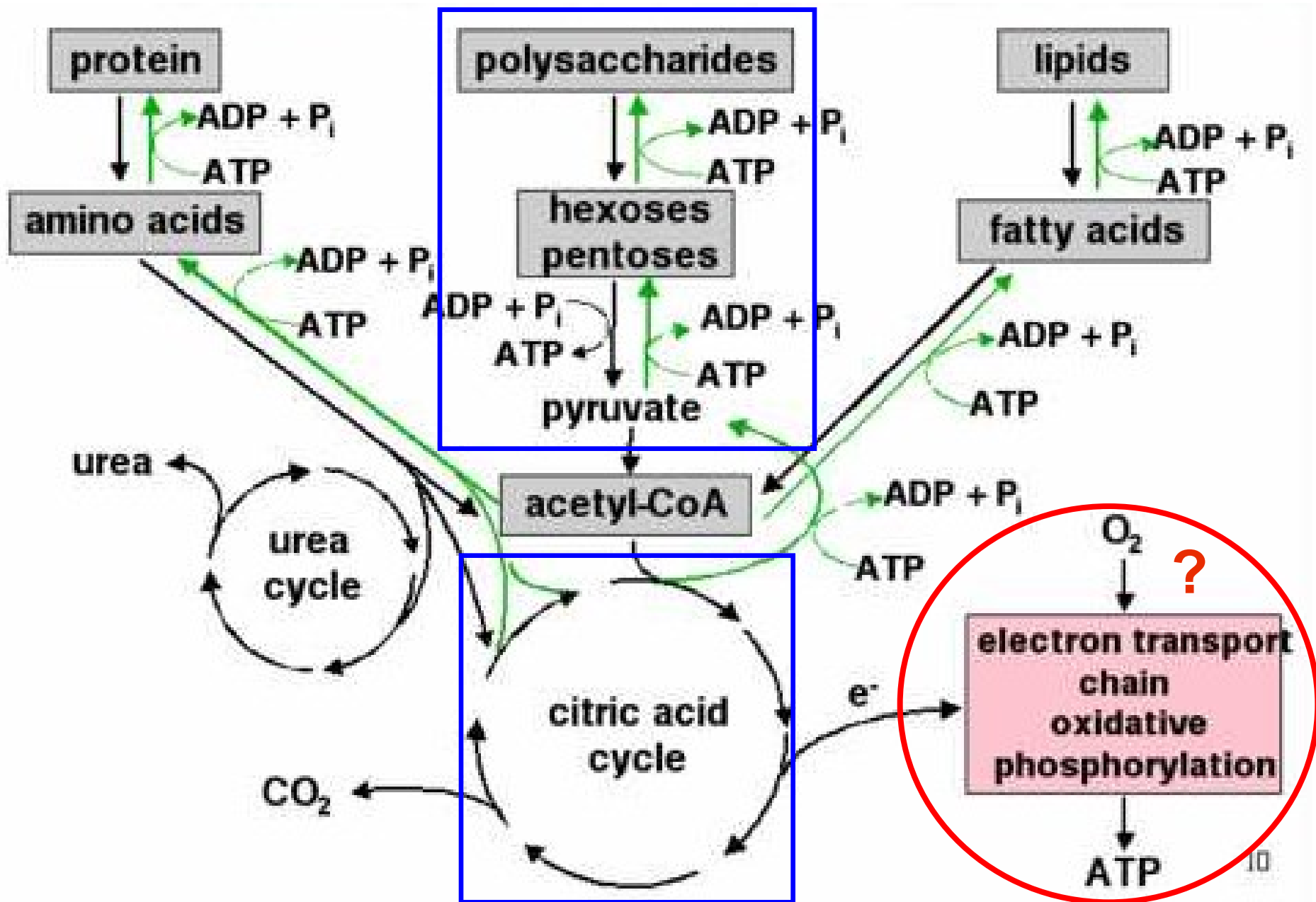




Μεταφορά ηλεκτρονίων και Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Πως οξειδώνουν τα κύτταρα τα NADH και $[\text{FADH}_2]$ και μετατρέπουν το αναγωγικό τους δυναμικό στη χημική ενέργεια του ATP ;

➤ Ενώ το ATP που παράγεται στη γλυκόλυση και τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος είναι το αποτέλεσμα φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος, η εξαρτώμενη από NADH σύνθεση του ATP είναι το αποτέλεσμα της **οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (oxidative phosphorylation)**.

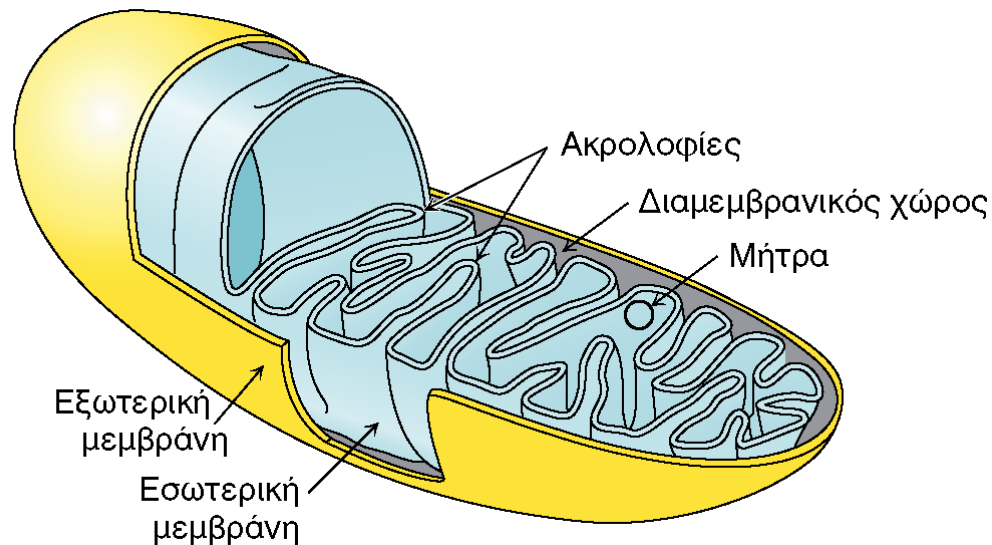
➤ Ηλεκτρόνια αποθηκευμένα στη μορφή ανηγμένων συνένζυμων, NADH ή $[\text{FADH}_2]$, διέρχονται μέσα από μια περίπλοκη και καλά οργανωμένη αλυσίδα πρωτεϊνών και συνενζύμων, την αποκαλούμενη **αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron-transport chain)**, καταλήγοντας στο O_2 (μοριακό οξυγόνο), τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων.

➤ Στην πορεία της μεταφοράς ηλεκτρονίων δημιουργείται μια βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δυο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Είναι αυτή η ενέργεια της βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων που ωθεί τη σύνθεση ATP .

Πού λαμβάνει χώρα η μεταφορά ηλεκτρονίων και η οξειδωτική φωσφορυλίωση στο κύτταρο;

Οι διαδικασίες της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σχετίζονται με τις μεμβράνες.

- Στα προκαρυωτικά κύτταρα που συνήθως αποτελούνται από ένα μοναδικό κυτταρικό διαμέρισμα οι διεργασίες αυτές διεκπεραιώνονται στην πλασματική μεμβράνη.
- Στα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιούνται στα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα στην εσωτερική τους μεμβράνη.



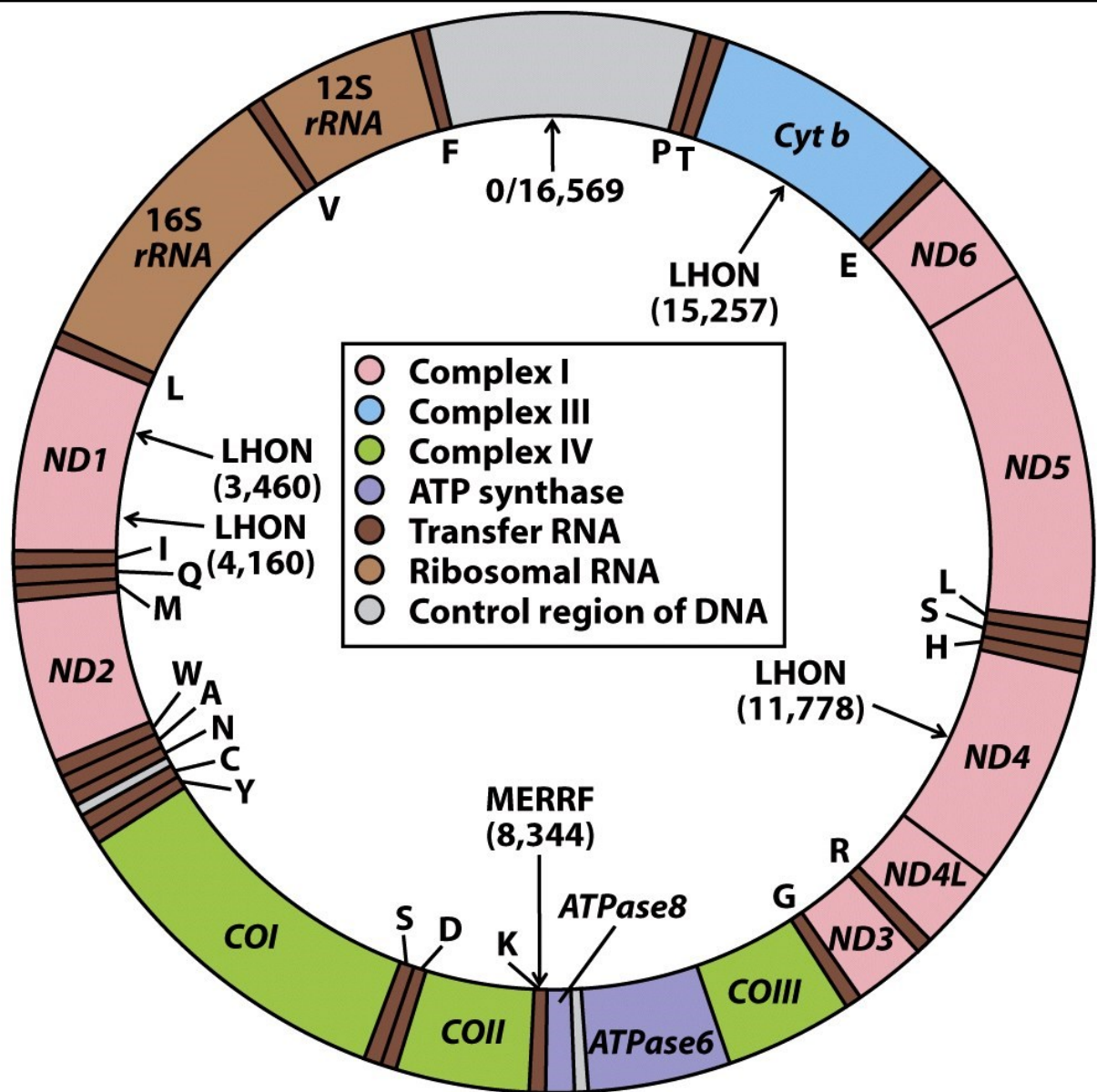
Είναι ημιαυτόνομα οργανίδια, με δυνατότητα αυτοαναπαραγωγής τα οποία συνυπάρχουν σε μια συμβιωτική σχέση με το κύτταρο.

Περιέχουν το δικό τους DNA και προκαρυωτικού τύπου ριβοσώματα.

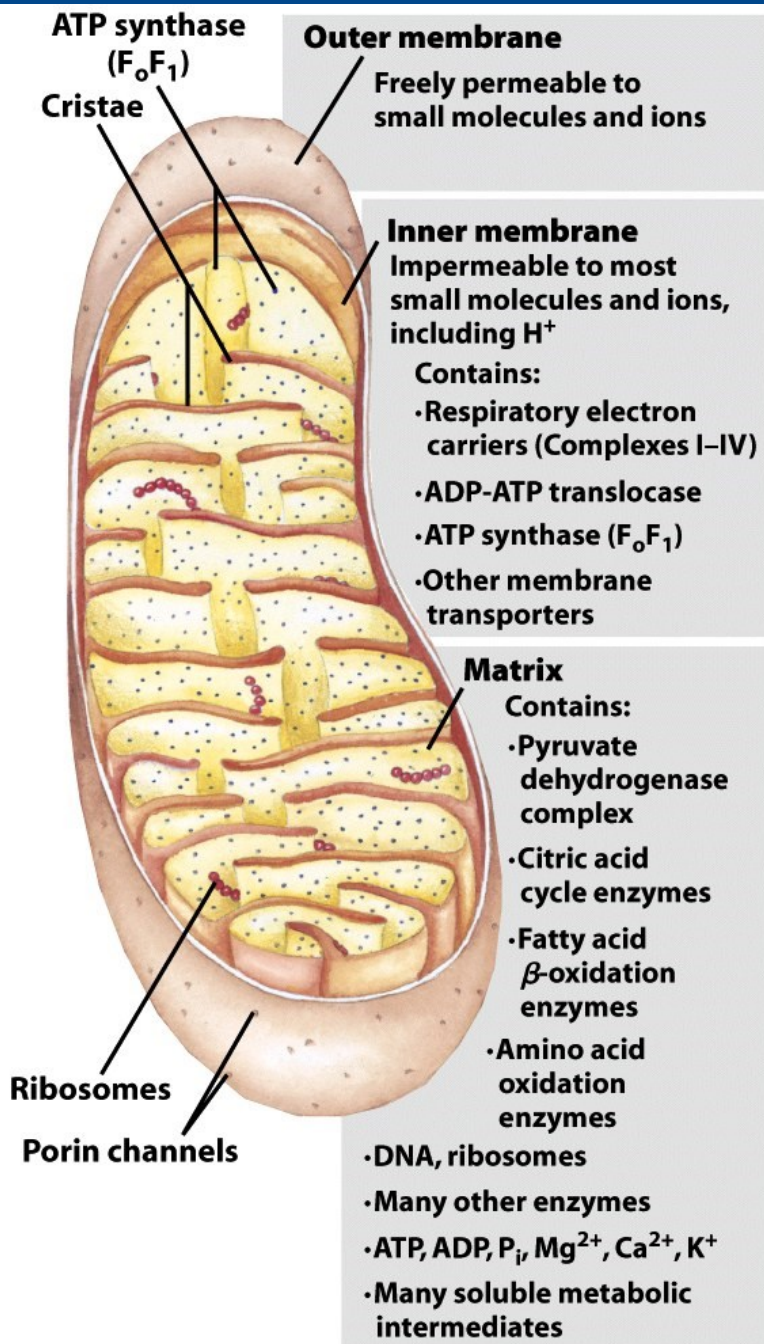
Οργάνωση μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA αποτελείται από 16.569 bp που κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και τα μικρά και μεγάλα ριβοσωμικά RNA και αρκετά tRNA ώστε να μπορούν να μεταφράζονται όλα τα κωδικόνια.

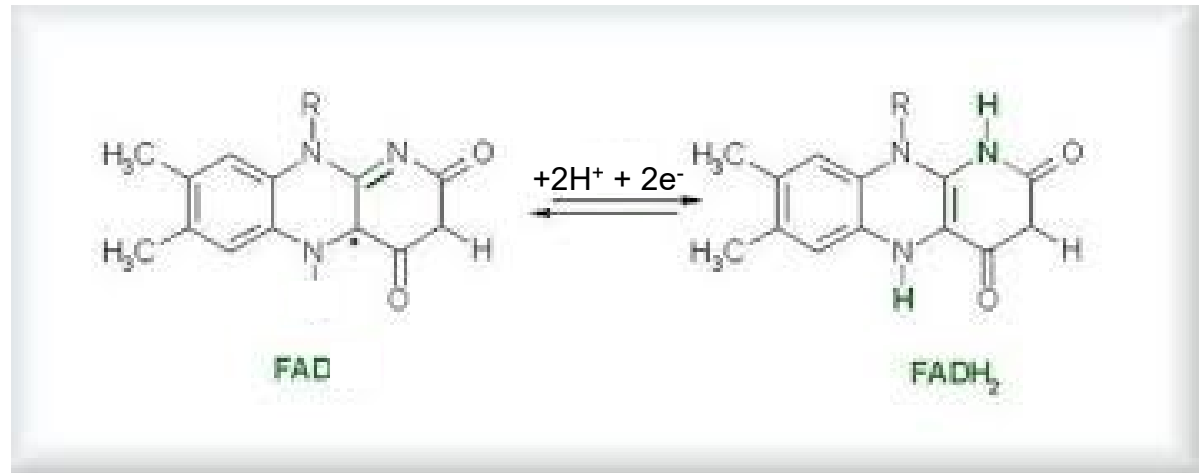
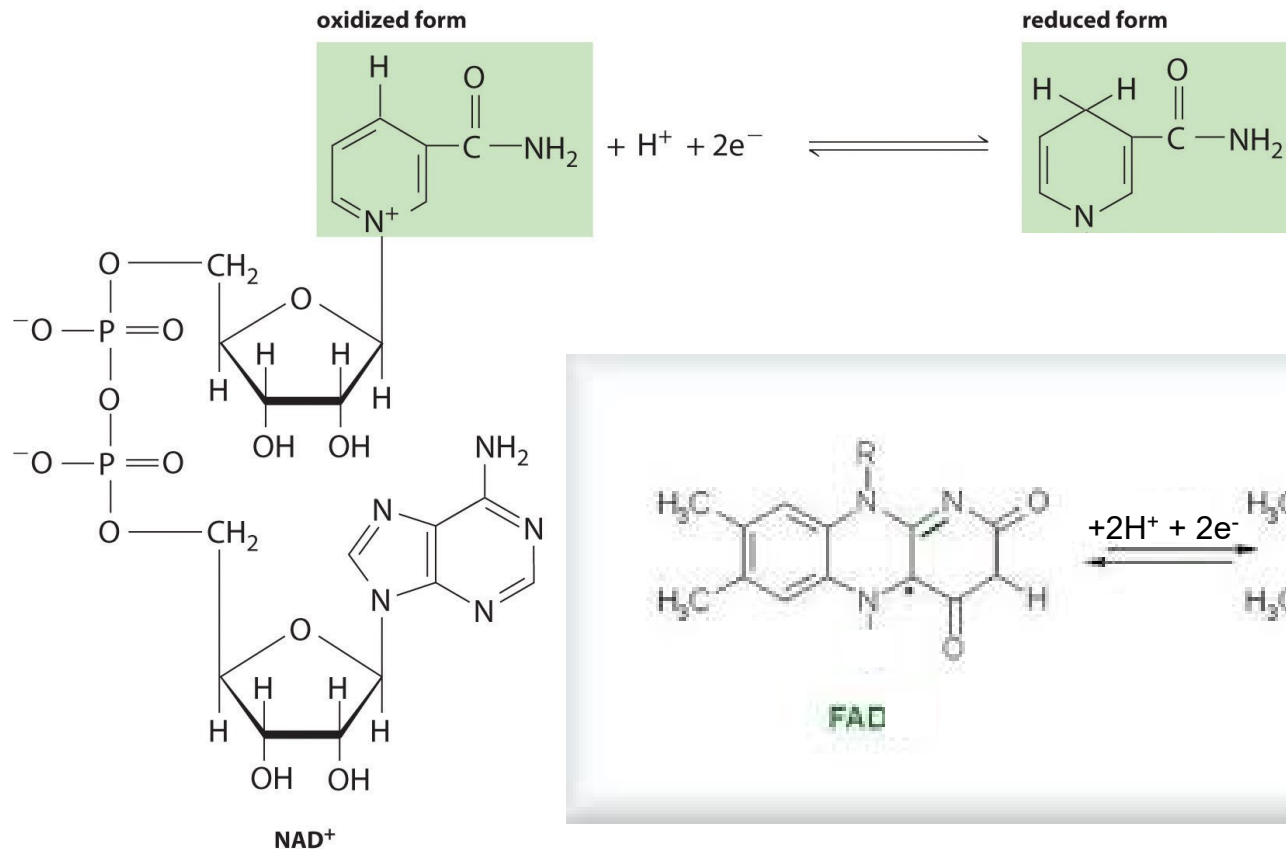
Όμως τα μιτοχόνδρια περιέχουν επίσης και αρκετές πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA.



Χαρακτηριστικά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης



- Αποτελείται από 80% πρωτεΐνες και 20% λιπίδια (κύρια καρδιολιπίνη, φωσφατυδυλοχολίνη και ακόρεστα λιπίδια) και ανταποκρίνεται στη γενική δομή των μεμβρανών.
- Το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών είναι τα ενζυμικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας.
- Στο εσωτερικό τμήμα της εσωτερικής μεμβράνης παρατηρούνται σχηματισμοί που ονομάζονται κομβία, τα οποία αποτελούν τμήμα του συμπλόκου V.
- Η ύπαρξη ακέριας μεμβράνης (ή κυστιδίων) είναι προϋπόθεση για την αποθήκευση της ενέργειας.



- Οι ανηγμένες μορφές των συνενζύμων NADH και FADH_2 που σχηματίζονται (κατά τη γλυκόλυση, την οξειδωση των λιπαρών οξέων, τον κύκλο του κιτρικού οξέος, κλπ.) είναι μόρια πλούσια σε ενέργεια, επειδή **περιέχουν ένα ζευγάρι ηλεκτρονίων το οποίο έχει υψηλό δυναμικό μεταφοράς**.
- Όταν τα ηλεκτρόνια αυτά μεταφέρονται στο μοριακό οξυγόνο προκειμένου να επανοξειδωθούν, ένα ποσό αυτής της ενέργειας χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP .

Ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας: δυναμικό αναγωγής και μεταβολή ελεύθερης ενέργειας.

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, το δυναμικό μεταφοράς ηλεκτρονίων του NADH ή του FADH_2 μετατρέπεται σε δυναμικό μεταφοράς του ανόργανου φωσφορικού του ATP.

Η μέτρηση του δυναμικού μεταφοράς του ανόργανου φωσφορικού είναι ήδη γνωστή και δίνεται από το $\Delta G_o'$ της υδρόλυσης του ATP.

Η αντίστοιχη έκφραση για το δυναμικό μεταφοράς ηλεκτρονίου είναι το **πρότυπο δυναμικό αναγωγής E_o'** , που αποτελεί το μέτρο της τάσης των χημικών μορίων να αναχθούν ή να οξειδωθούν.

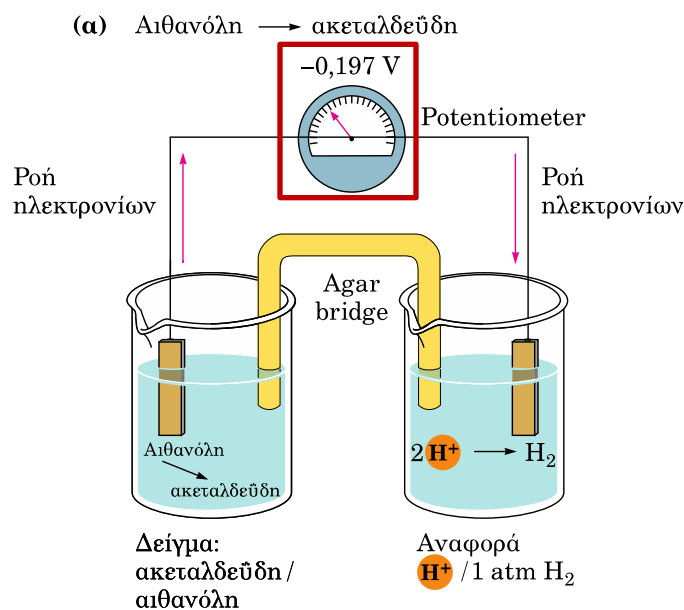
Υψηλό E_o' είναι δηλωτικό ισχυρής τάσης αναγωγής

Τα πρότυπα δυναμικά αναγωγής μετρούνται με αντιδράσεις ημιστοιχείων

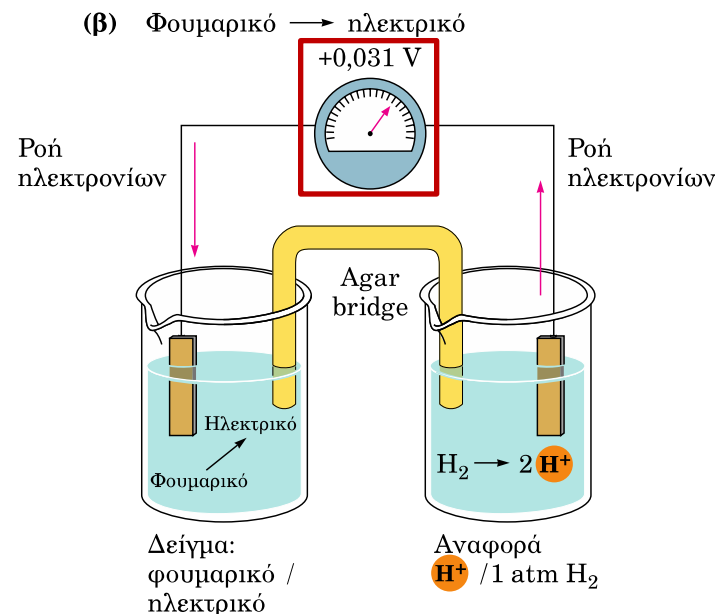
Ένα ημιστοιχείο αποτελείται από διάλυμα με συγκεντρώσεις $1M$ από αμφοτέρους τις οξειδωμένες και τις ανηγμένες μορφές της ουσίας, της οποίας μετρούμε το δυναμικό αναγωγής (που ονομάζεται οξειδοαναγωγικό ζεύγος) και από ένα απλό ηλεκτρόδιο.

Το **ημιστοιχείο του δείγματος** συνδέεται με το **ημιστοιχείο αναφοράς** μέσω μιας αγωγίμης γέφυρας και ένα ευαίσθητο ποτενσιόμετρο (βολτόμετρο) συνδέει τα δύο ηλεκτρόδια, έτσι ώστε να μπορεί να μετρηθεί το μεταξύ τους ηλεκτρικό δυναμικό (τάση).

Το ημιστοιχείο αναφοράς περιέχει $1M H^+$ σε ισορροπία με αέριο H_2 σε πίεση $1 atm$ και έχει αυθαίρετα αντιστοιχιστεί με δυναμικό αναγωγής $0,0 V$, οπότε το δυναμικό που καταγράφει το ποτενσιόμετρο αντιστοιχεί στο πρότυπο δυναμικό αναγωγής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους.



Αν η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ των ηλεκτροδίων κατευθύνεται από το ημιστοιχείο του δείγματος και προς το στοιχείο αναφοράς, τότε το δυναμικό αναγωγής θεωρείται αρνητικό διότι στο ημιστοιχείο δείγματος συμβαίνει οξείδωση.

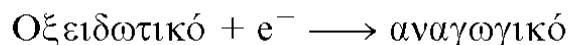


Αν η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ των ηλεκτροδίων κατευθύνεται προς το ημιστοιχείο του δείγματος, τότε, συμβαίνει αυθόρμητη αναγωγή του ημιστοιχείου του δείγματος, και το δυναμικό αναγωγής θεωρείται θετικό.

Πρότυπα δυναμικά αναγωγής μερικών αντιδράσεων.

Οξειδωτικό	Αναγωγικό	n	E'_0 (V)
Ηλεκτρικό + CO ₂	α -Κετογλουταρικό	2	- 0,67
Οξικό	Ακεταλδεΐδη	2	- 0,60
Φερρεδοξίνη (οξειδωμένη)	Φερρεδοξίνη (ανηγμένη)	1	- 0,43
2 H ⁺	H ₂	2	- 0,42
NAD ⁺	NADH + H ⁺	2	- 0,32
NADP ⁺	NADPH + H ⁺	2	- 0,32
Λιποϊκό (οξειδωμένο)	Λιποϊκό (ανηγμένο)	2	- 0,29
Γλουταθείο (οξειδωμένο)	Γλουταθείο (ανηγμένο)	2	- 0,23
Ακεταλδεΐδη	Αιθανόλη	2	- 0,20
Πυροσταφυλικό	Γαλακτικό	2	- 0,19
Φουμαρικό	Ηλεκτρικό	2	0,03
Κυτόχρωμα b (+3)	Κυτόχρωμα b (+2)	1	0,07
Δεϋδροασκορβικό	Ασκορβικό	2	0,08
Ουβικινόνη (οξειδωμένη)	Ουβικινόνη (ανηγμένη)	2	0,10
Κυτόχρωμα c (+3)	Κυτόχρωμα c (+2)	1	0,22
Fe (+3)	Fe (+2)	1	0,77
$\frac{1}{2}$ O ₂ + 2 H ⁺	H ₂ O	2	0,82

Σημείωση: E'_0 είναι το πρότυπο δυναμικό οξειδοαναγωγής (pH 7, 25°C) και n είναι ο αριθμός των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων. Το E'_0 αναφέρεται στη μερική αντίδραση όπως:



Πως χρησιμοποιούνται τα δυναμικά αναγωγής για τον υπολογισμό των μεταβολών ελεύθερης ενέργειας στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις;

Η μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας $\Delta G^{\circ'}$ σχετίζεται με την αλλαγή του πρότυπου δυναμικού αναγωγής $\Delta \mathcal{E}_o'$, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta G^{\circ'} = -n \cdot F \cdot \Delta \mathcal{E}_o'$$

Όπου το n αντιπροσωπεύει τον αριθμό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων, F είναι η σταθερά Faraday (23,06 kcal/mol · Volt) , και $\Delta \mathcal{E}_o'$ είναι η διαφορά στα δυναμικά αναγωγής μεταξύ δότη και δέκτη.

Πόση ενέργεια απελευθερώνεται με την αναγωγή του O_2 από το $NADH$;

Οι αντίστοιχες ημιαντιδράσεις είναι:



Προσθέτοντας την αντίδραση (β) στην (α) έχουμε:



Επομένως με βάση τον τύπο $\Delta G^{\circ'} = -n \cdot F \cdot \Delta E_{\circ}'$

$$\Delta G^{\circ'} = -2 \cdot 23,06 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Volt} \cdot 1,14 \text{ Volt}$$

$$\Delta G^{\circ'} = - 52,6 \text{ kcal/mol}$$

Η ποσότητα των 52,6 kcal/mol που απελευθερώνεται με την επανοξείδωση του NADH από το μοριακό οξυγόνο είναι σημαντική, δεδομένου ότι το ΔG° της υδρόλυσης του ATP είναι: -7,3 kcal/mol.

Στην αναπνευστική αλυσίδα το NADH δεν αντιδρά απευθείας με το O_2 , αλλά μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων μεταφορέων των ηλεκτρονίων (φλαβίνες, ενώσεις σιδήρου που δεν έχουν αίμη, ουβικινόνη, κυτοχρώματα κ.α.) έτσι ώστε το σύνολο των - 52,6 kcal/mol που απελευθερώνονται να κατανέμεται σε «πακέτα» ηλεκτροχημικής ενέργειας με τη μορφή γραμμικά μεταβαλλόμενης κλίσης πρωτονίων, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP.

Πως εκφράζεται ποσοτικά η ενέργεια που αποθηκεύεται σε μια κλίση συγκέντρωσης πρωτονίων;

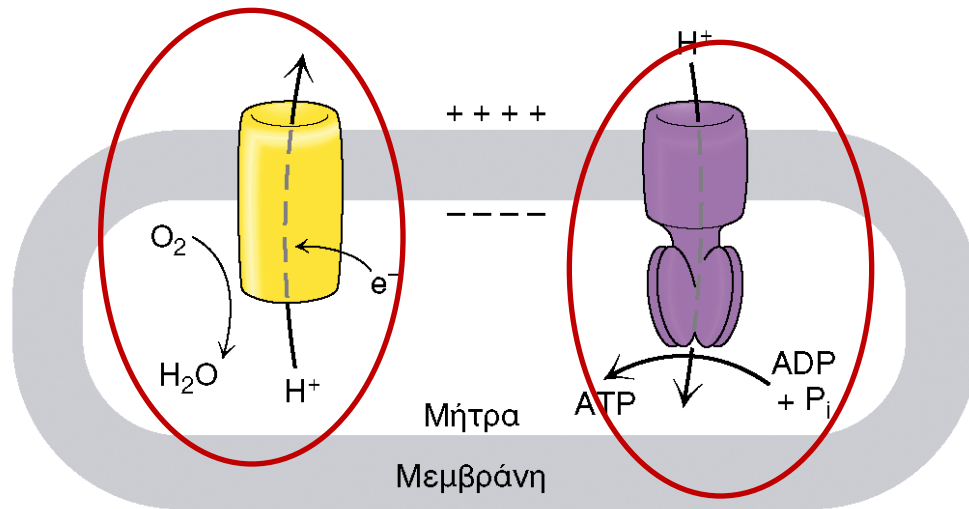
$$\Delta G = 2,302 R T \log (C_2/C_1) + Z F \Delta V$$

Όπου C_1 και C_2 η συγκέντρωση της μεταφερόμενης ουσίας από τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη, Z το ηλεκτρικό φορτίο της μεταφερόμενης ουσίας και ΔV η διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης.

Δεδομένου ότι υπό συνήθεις συνθήκες για την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη το pH της εξωτερικής πλευράς είναι κατά 1,4 μονάδες χαμηλότερο από εκείνο της εσωτερικής (δηλ. $\log (C_2/C_1) = 1,4$) και η διαφορά δυναμικού είναι 0,14 V, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας υπολογίζεται στα 5,2 kcal/mol.

Επομένως, κάθε πρωτόνιο που μεταφέρεται από την μιτοχονδριακή μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο χρειάζεται 5,2 kcal/mol ελεύθερης ενέργειας.

Η οξείδωση των ανηγμένων συνενζύμων και η φωσφορυλίωση του ADP είναι συζευγμένες με μια κλίση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.



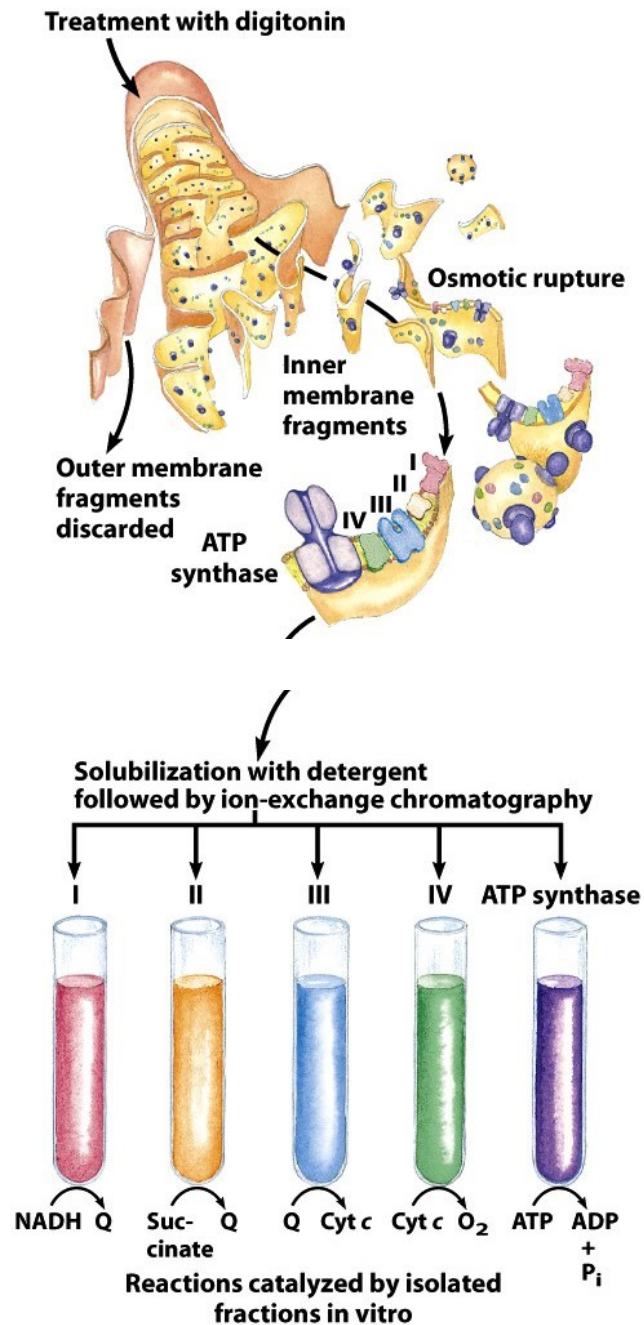
- Η κατά στάδιο μεταφορά των ηλεκτρονίων από τα ανηγμένα συνένζυμα προς το μοριακό O_2 , διαμέσου των φορέων της αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγεί στη μετακίνηση πρωτονίων έξω από το μιτοχόνδριο με συνέπεια τη δημιουργία ενός δυναμικού βαθμίδωσης H^+ στη μιτοχονδριακή μεμβράνη.
- Το ATP συντίθεται καθώς τα πρωτόνια ρέουν πίσω στη μιτοχονδριακή μήτρα, διαμέσου του ενζυμικού συμπλέγματος της συνθάσης του ATP.

Σχήμα της ροής των ηλεκτρονίων διαμέσου των φορέων των διαφόρων οξειδοαναγωγικών συστημάτων για την οξείδωση του NADH.

Με βάση τα πρότυπα αναγωγικά δυναμικά των ημιαντιδράσεων των μεταφορέων ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας.

Redox reaction (half-reaction)	E'° (V)
$2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{H}_2$	-0.414
$\text{NAD}^{+} + \text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADP}^{+} + \text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{NADPH}$	-0.324
$\text{NADH dehydrogenase (FMN)} + 2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{NADH dehydrogenase (FMNH}_2\text{)}$	-0.30
$\text{Ubiquinone} + 2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{ubiquinol}$	0.045
$\text{Cytochrome } b (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } b (\text{Fe}^{2+})$	0.077
$\text{Cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{2+})$	0.22
$\text{Cytochrome } c (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } c (\text{Fe}^{2+})$	0.254
$\text{Cytochrome } a (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } a (\text{Fe}^{2+})$	0.29
$\text{Cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{2+})$	0.35
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.8166





Απομόνωση και διαχωρισμός των λειτουργικών συμπλοκών της αναπνευστικής αλυσίδας.

Αρχικά απομακρύνεται η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη με κατεργασία με το απορρυπαντικό διγιτονίνη και η εσωτερική μεμβράνη διαρρηγνύεται με όσμωση με χρήση υπότονου διαλύματος.

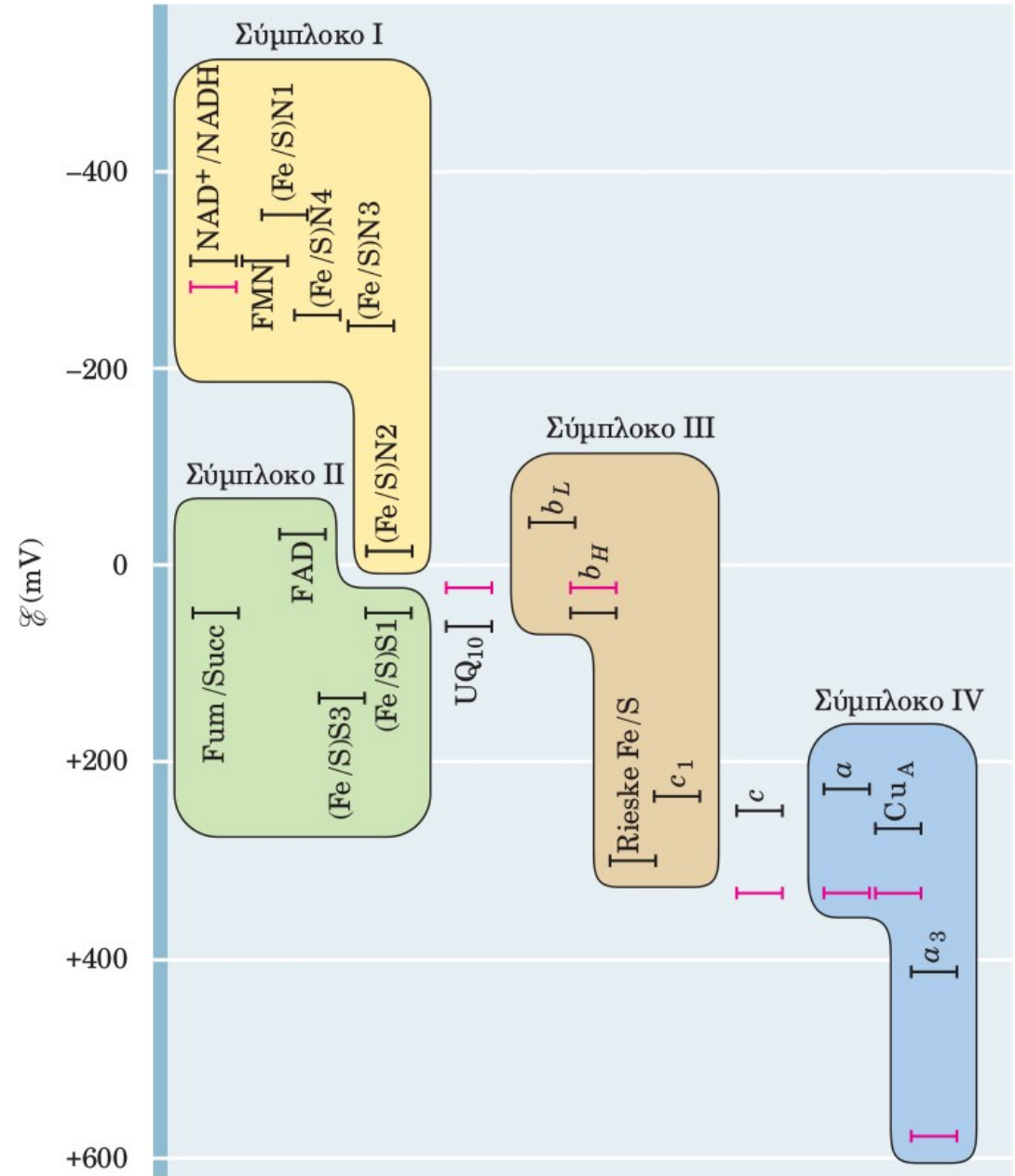
Τα θραύσματα που προκύπτουν διαλύονται απαλά σε ένα δεύτερο απορρυπαντικό και το μείγμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, μέσω της οποίας διαχωρίζονται τα διαφορετικά σύμπλοκα (I έως IV) της αναπνευστικής αλυσίδας.

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα που περιλαμβάνουν αρκετά διαφορετικά μοριακά είδη.

1. Φλαβοπρωτεΐνες που περιέχουν ισχυρά δεσμευμένα FMN ή FAD ως προσθετικές ομάδες και μπορεί να συμμετέχουν σε γεγονότα μεταφοράς ενός ή δύο ηλεκτρονίων.
2. Συνένζυμο Q ή ουβικινόνη (CoQ ή UQ), που μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις μεταφοράς ενός ή δύο ηλεκτρονίων.
3. Διάφορα κυτοχρώματα (πρωτεΐνες που περιέχουν προσθετικές ομάδες αίμης, που λειτουργούν μεταφέροντας ηλεκτρόνια), και περιλαμβάνουν τα κυτοχρώματα *b*, *c*, *c*₁, *a*, και *a*₃. Τα κυτοχρώματα είναι παράγοντες μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου στους οποίους ο σίδηρος της αίμης μετατρέπεται από Fe²⁺ σε Fe³⁺ και το αντίθετο.
4. Ένας αριθμός πρωτεϊνών θείου σιδήρου (iron–sulfur proteins), που συμμετέχουν σε μεταφορές ενός ηλεκτρονίου στις οποίες συναντάμε τις καταστάσεις Fe²⁺ και Fe³⁺.
5. Δεσμευμένος σε πρωτεΐνη χαλκός, μια θέση μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου που αλληλομετατρέπεται μεταξύ Cu⁺ και Cu²⁺.

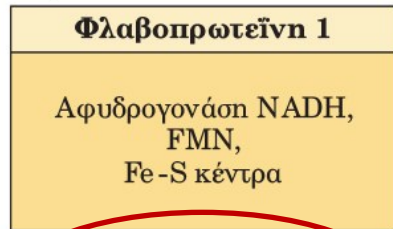
Τιμές E_o' και E για τις συνιστώσες της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Οι τιμές που αναγράφονται είναι τιμές κοινής αποδοχής για ζωικά μιτοχόνδρια. Οι μαύρες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την E_o' και οι κόκκινες ράβδοι την E .



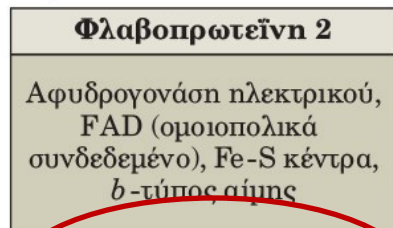
Τα τέσσερα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας

Σύμπλοκο I



Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-συνένζυμου Q

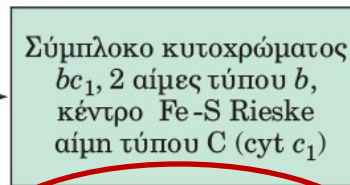
Σύμπλοκο II



Οξειδοαναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-συνενζύμου Q

UQ δεξαμενή
/UQH₂

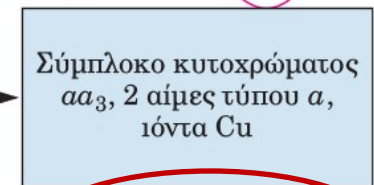
Σύμπλοκο III



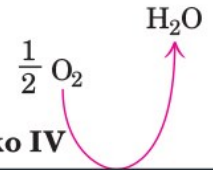
Οξειδοαναγωγή του ζεύγους συνένζυμου Q-κυτοχρώματος c

Κυτόχρωμα c

Σύμπλοκο IV



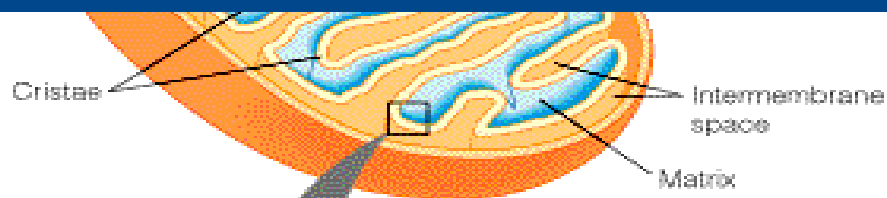
Οξειδάση
κυτοχρώματος c



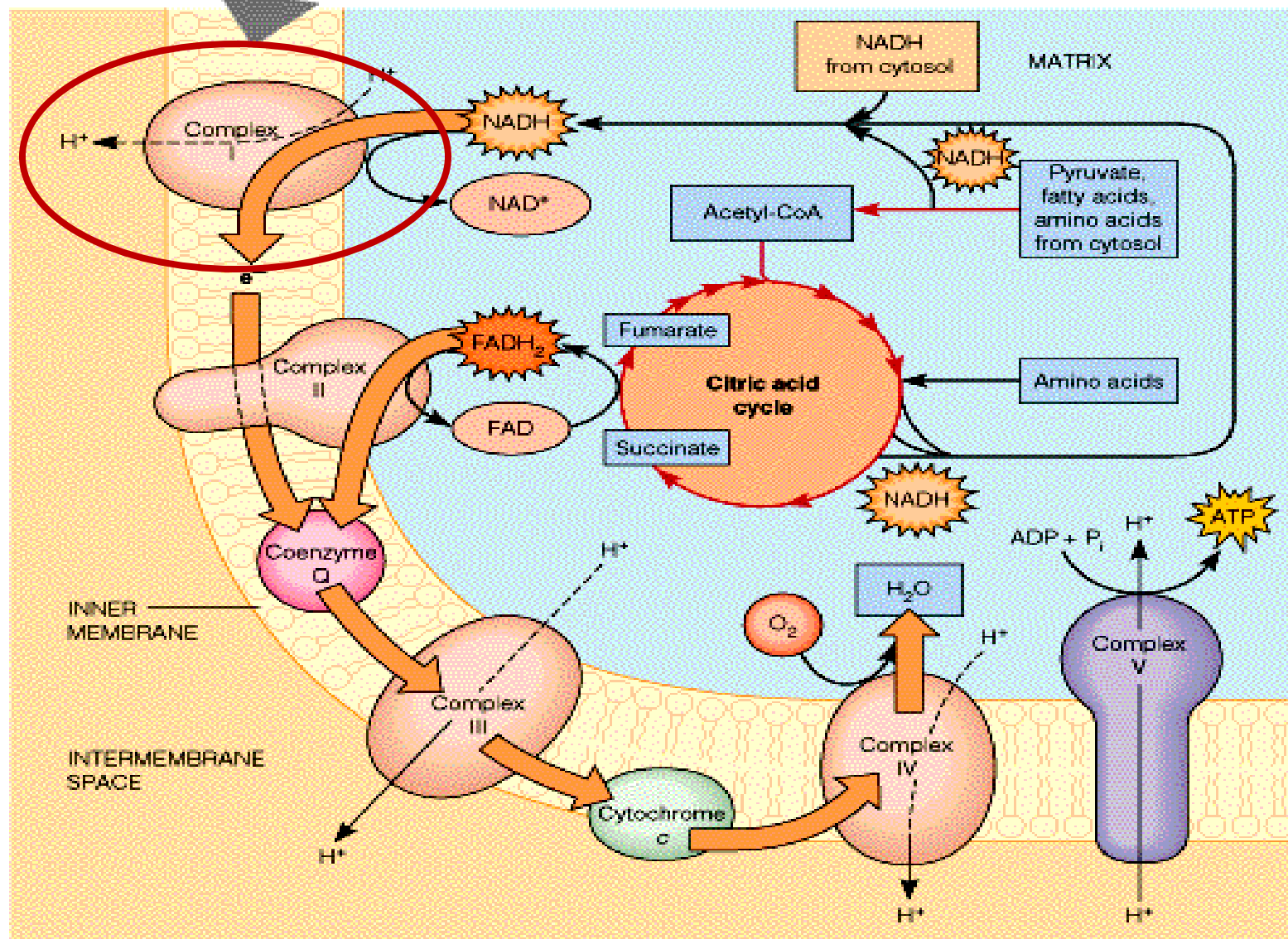
ΠΙΝΑΚΑΣ 20.1

Πρωτεϊνικά σύμπλοκα της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων

Σύμπλοκο	Μάζα	Υπομονάδες	Προσθετικές ομάδες	Θέση πρόσδεσης για:
Αναγωγή NADH-UQ	980	44	FNN Fe-S	NADH (πλευρά μήτρας) UQ (λιπιδικός πυρήνας)
Αναγωγή ηλεκτρικού-UQ	140	4	FAD Fe-S	Ηλεκτρικό (πλευρά μήτρας) UQ (λιπιδικός πυρήνας)
Αναγωγή UQ-κυτοχρώματος c	250	9-10	Αίμν b_L Αίμν b_H Αίμν c_1 Fe-S	Κυτόχρωμα c (πλευρά διαμεμβρανικού χώρου) b120.1
Κυτόχρωμα c	13	1	Αίμν c	Κυτόχρωμα c_1 Κυτόχρωμα a
Οξειδάση του κυτοχρώματος c	162	13	Αίμν a Αίμν a_3 Cu_A Cu_B	Κυτόχρωμα c (πλευρά διαμεμβρανικού χώρου)



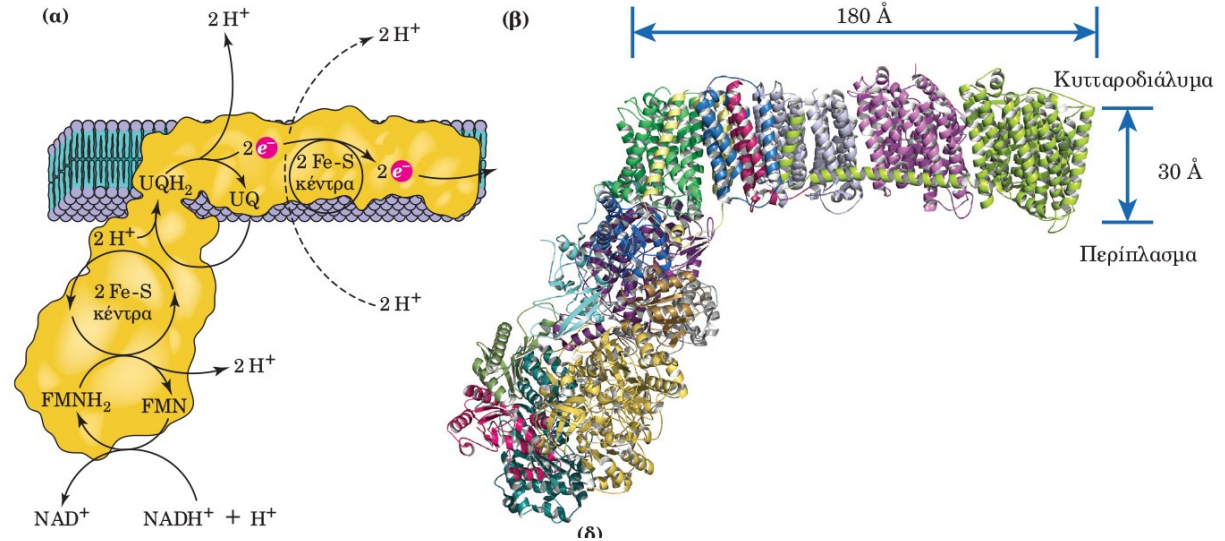
(a)



Το Σύμπλοκο I οξειδώνει το NADH και ανάγει το συνένζυμο Q

Όπως υποδηλώνει το όνομά του, μεταφέρει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q, μια μικρή, υδρόφοβη κίτρινη ένωση.

Το σύμπλοκο από μιτοχόνδρια βόειας καρδιάς (με υπολογιζόμενη μάζα 980 kD) περιέχει 44 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ένα μόριο μονονουκλεοτιδίου φλαβίνης (FMN), και 9 συμπλέγματα Fe-S.

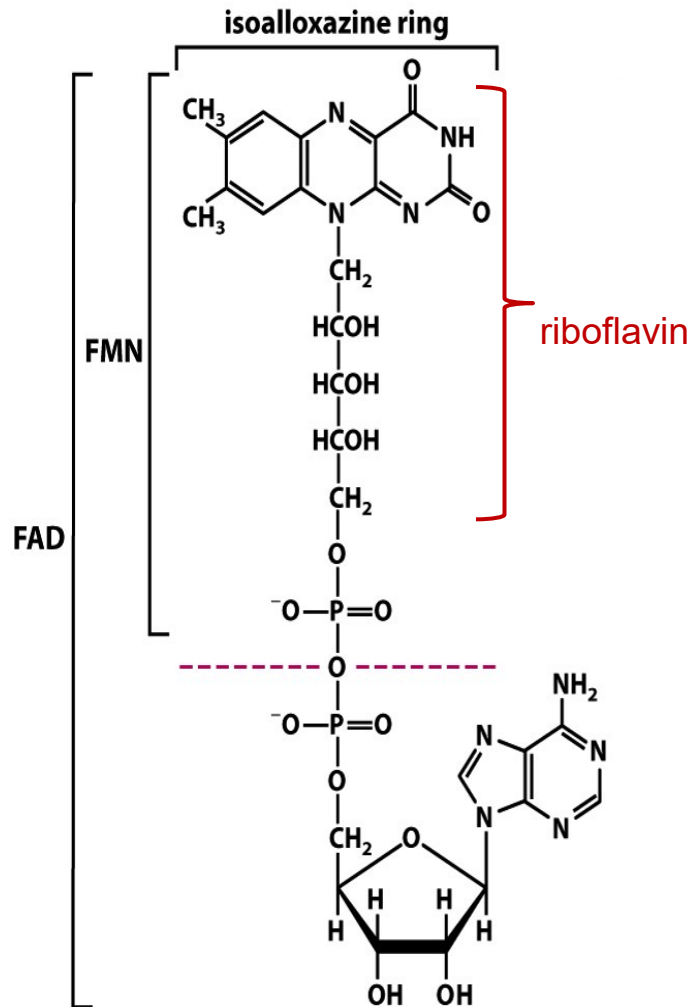


Τα ηλεκτρόνια αρχικά μεταφέρονται στο FMN και στη συνέχεια ρέουν μέσω των συμπλόκων σιδήρου-θείου (δεύτερος τύπος προσθετικής ομάδας) στην ουβικινόνη (ή συνένζυμο Q).

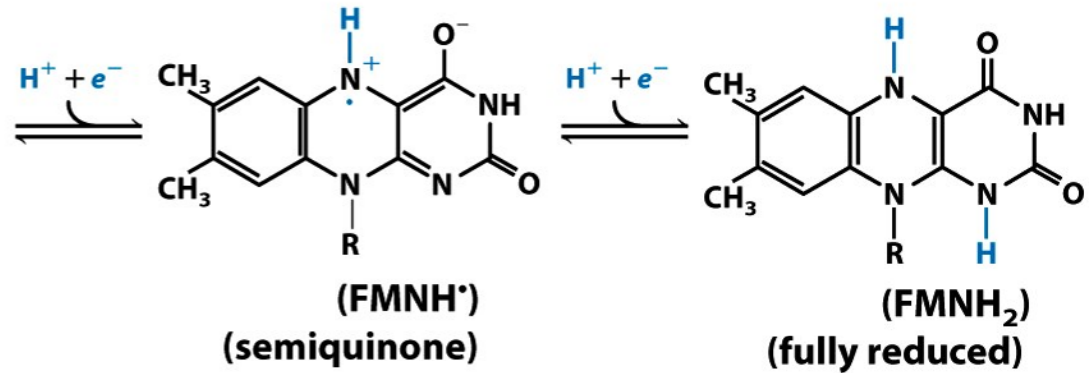
Η συνολική αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αυτό είναι:



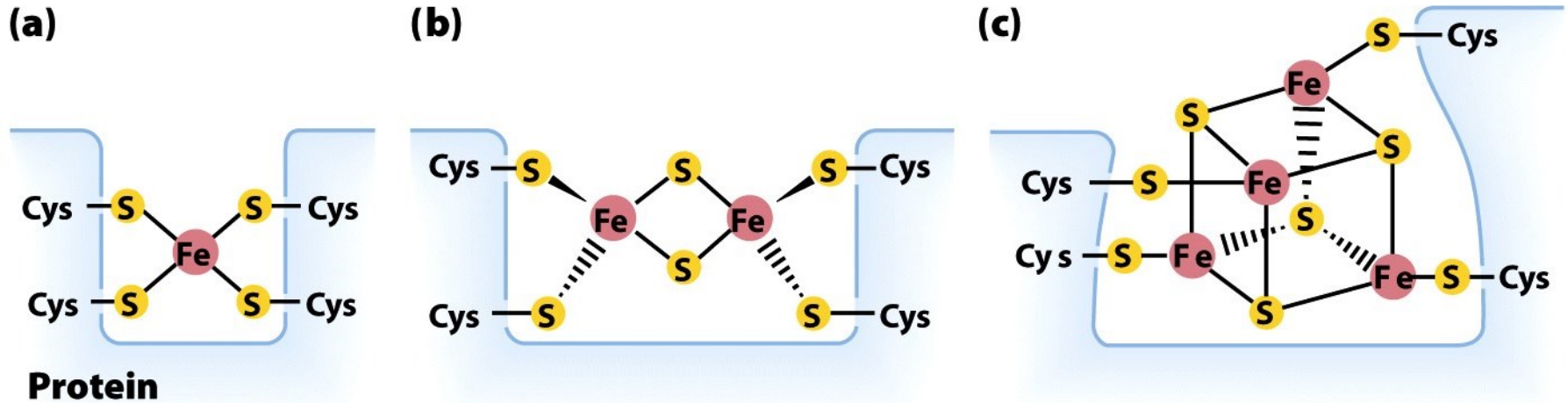
Φλαβινο-μονο-νουκλεοτίδιο (FMN)



Flavin adenine dinucleotide (FAD) and
flavin mononucleotide (FMN)

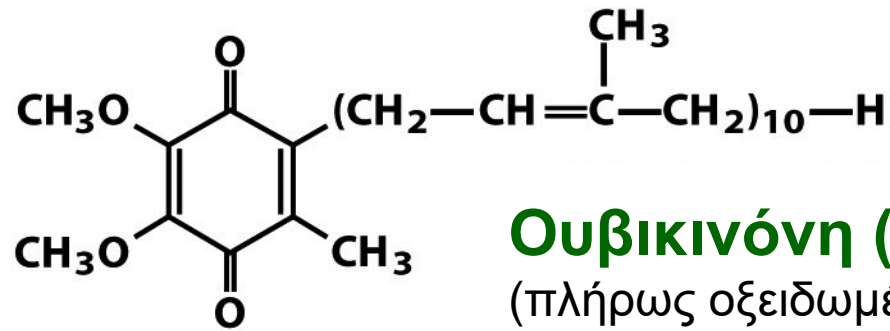
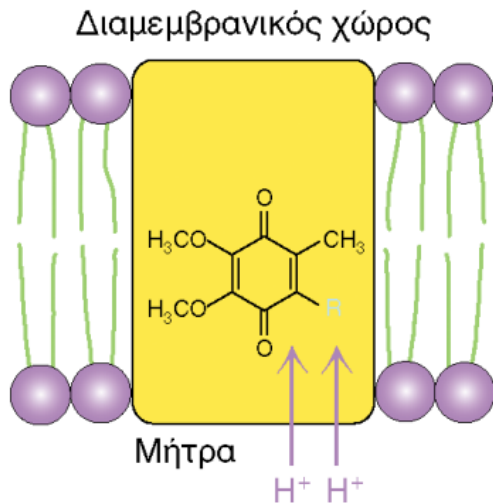


Σύμπλοκα πρωτεϊνών σιδήρου-θείου συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.



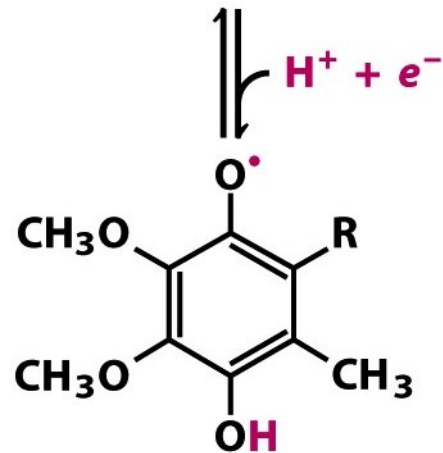
- A. Τύπος Fe-S. Ένα ιόν σιδήρου συντονίζεται με τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης.
- B. Τύπος 2Fe-2S. Δύο ιόντα σιδήρου ενώνονται μεταξύ τους μέσω γεφυρών σουλφιδίου.
- Γ. Τύπος 4Fe-4S. Τέσσερα ιόντα σιδήρου ενώνονται μεταξύ τους μέσω γεφυρών σουλφιδίου.

Συνένζυμο Q

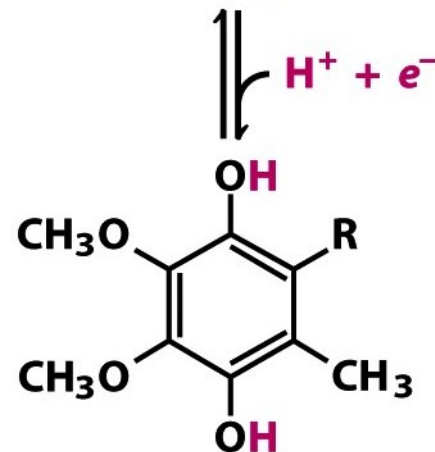


Ουβικινόνη (UQ)

(πλήρως οξειδωμένη μορφή)

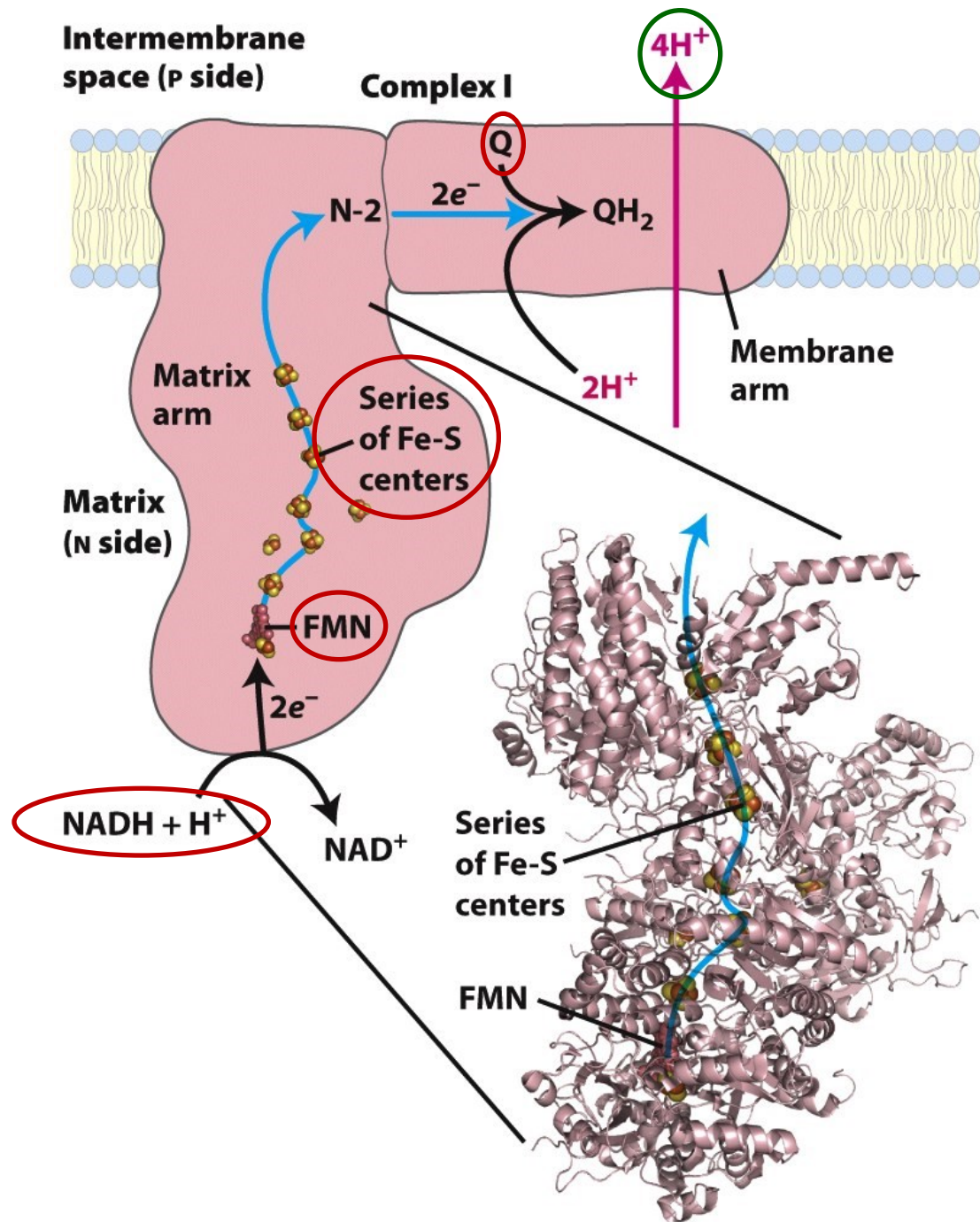


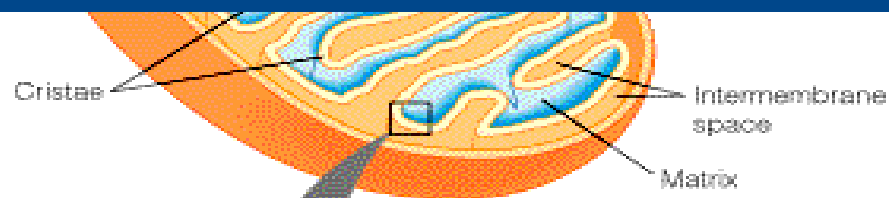
Ενδιάμεσο ημικινόνης (UQH[•])
(μερικώς ανηγμένη μορφή)



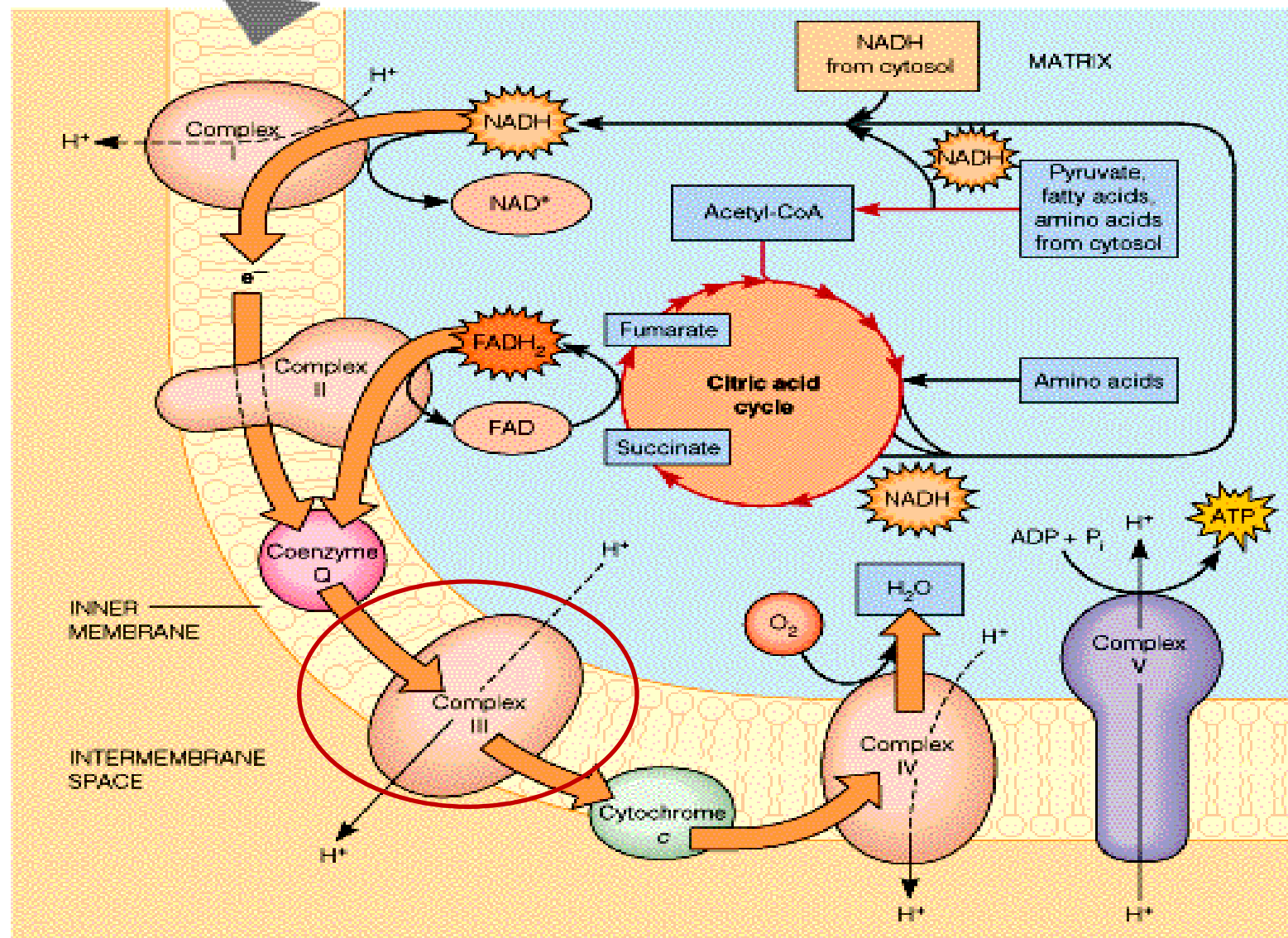
Ουβικινόλη (UQH₂) (πλήρως αναγωγμένη μορφή)

Ροή ηλεκτρονίων διαμέσου του Συμπλόκου I





(a)



Τα ηλεκτρόνια ρέουν από το QH_2 στο κυτόχρωμα c μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-cyt c (Σύμπλεγμα III).

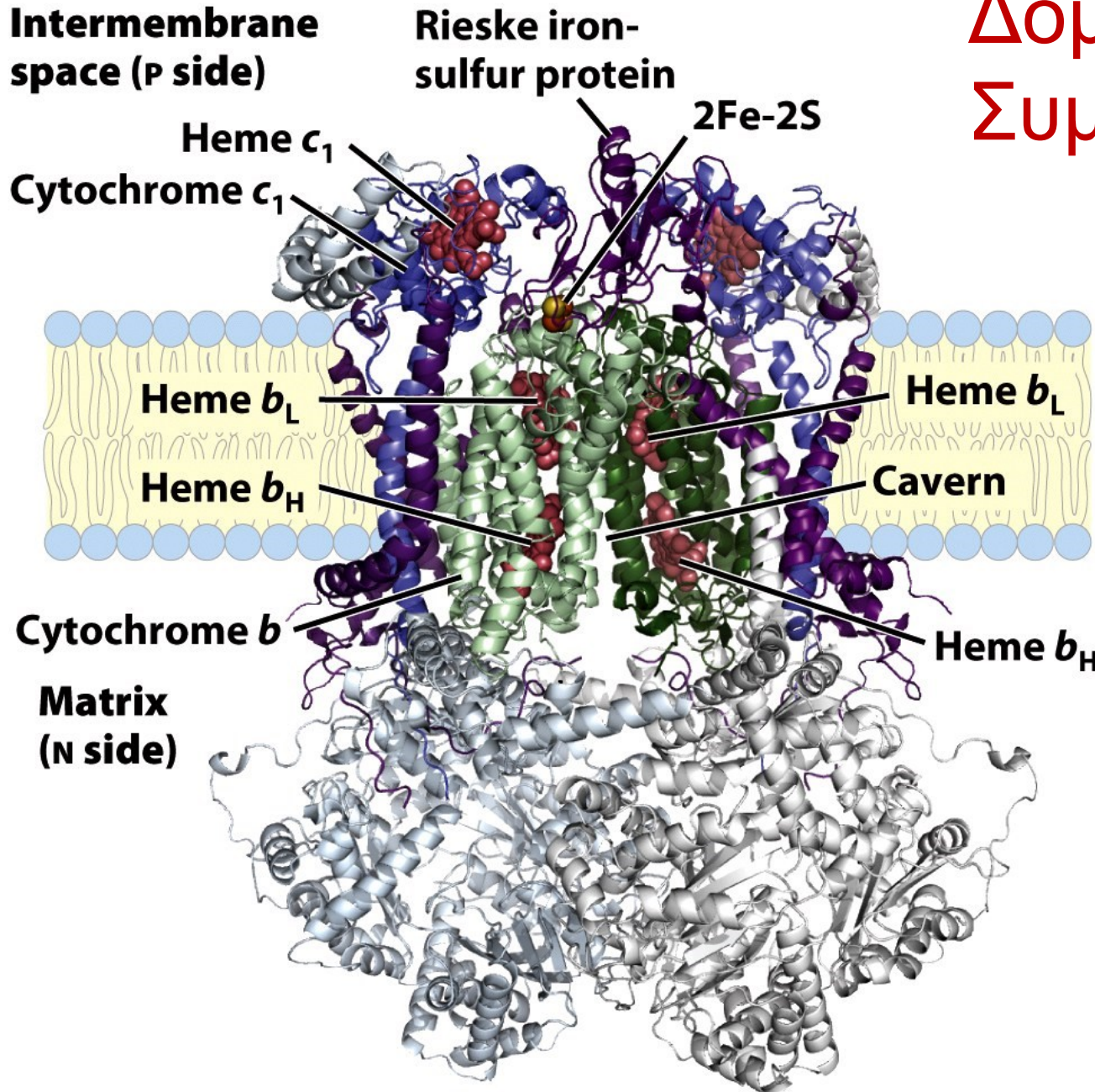
Τα κυτοχρώματα είναι πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι οποίες περιέχουν μια προσθετική ομάδα αίμης. Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων τα ιόντα σιδήρου του κυτοχρώματος εναλλάσσονται μεταξύ της κατάστασης αναγωγής (Fe^{+2}) και της κατάστασης οξείδωσης (Fe^{+3}).

Μέσω του συμπλέγματος III τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το ανηγμένο συνένζυμο Q στο κυτόχρωμα c , το οποίο είναι μια μικρού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη.

Ταυτόχρονα, με την ροή των ηλεκτρονίων στους διάφορους τύπους των προσθετικών ομάδων του συμπλέγματος III, γίνεται άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο.



Δομή του Συμπλόκου III

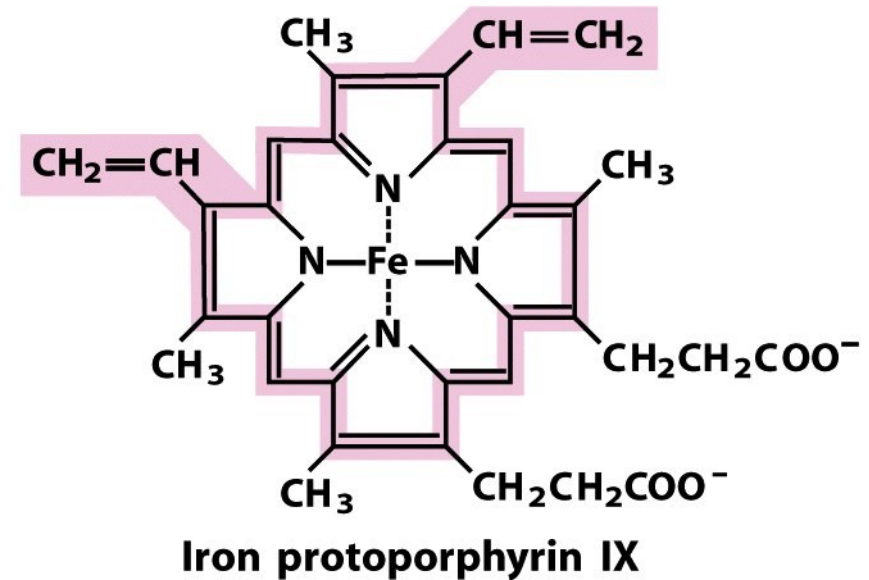


Το ένζυμο είναι ένα ομοδιμερές με 11 διακριτές πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

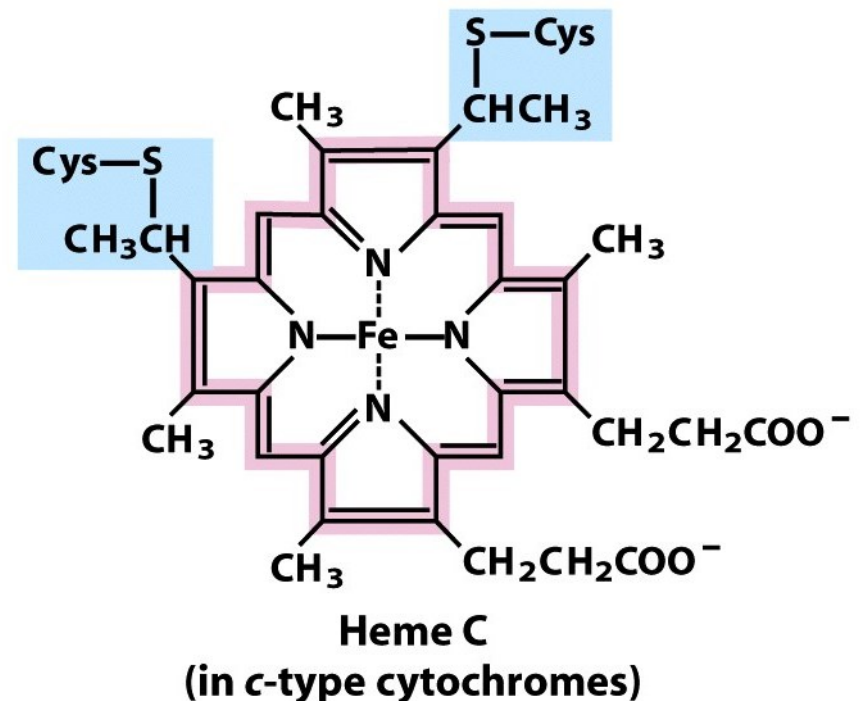
Στο λειτουργικό πυρήνα του κάθε μονομερούς υπάρχουν τρεις υπομονάδες:

Το κυτόχρωμα b (πράσινο) με δύο αίμες (b_H και b_L), μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου με κέντρα 2Fe-2S (μωβ) και το κυτόχρωμα c_1 (μπλε) με την αίμη του.

Η προσθετική ομάδα των κυτοχρωμάτων b , c_1 και c είναι μια **σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX**, όμοια με την αίμη της μυοσφαιρίνης και της αιμοσφαιρίνης.



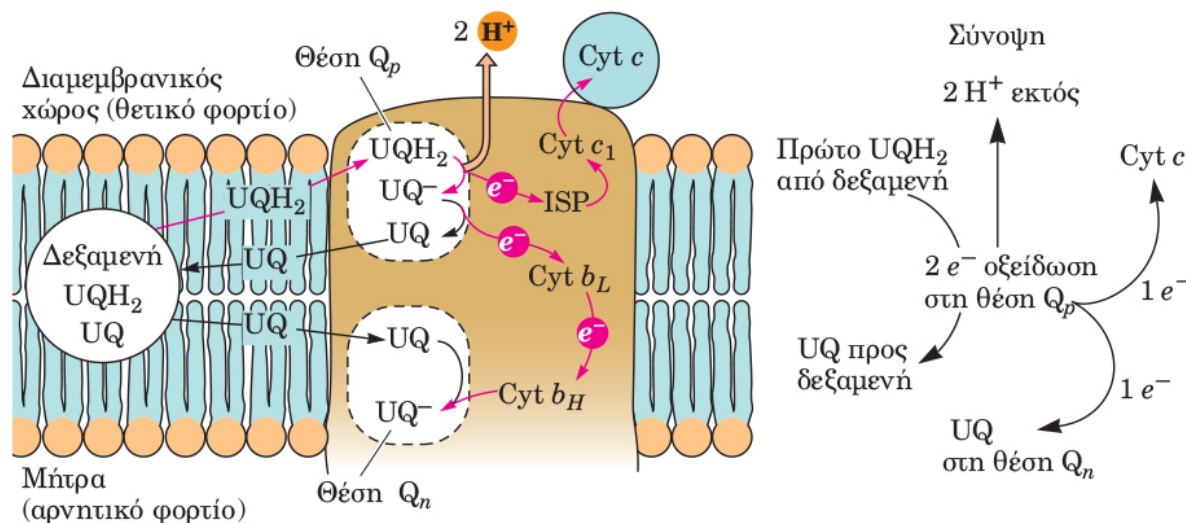
Οι αίμες των κυτοχρωμάτων c_1 και c , σε αντίθεση με εκείνη του κυτοχρώματος b , είναι ομοιοπολικά προσδεδμένες στην πρωτεΐνη μέσω θειοαιθερικών δεσμών.



Ροή ηλεκτρονίων διαμέσου του Συμπλόκου III

Το σύμπλοκο III μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το ανηγμένο συνένζυμο Q (UQH_2) στο κυτόχρωμα c μέσω ενός μοναδικού οξειδοαναγωγικού μονοπατιού, γνωστού ως **κύκλος Q**.

(α) Πρώτο ήμισυ του κύκλου Q



Στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη υπάρχει μια μεγάλη δεξαμενή από UQ και UQH_2 . Ο κύκλος Q ξεκινά όταν ένα μόριο UQH_2 από αυτή τη δεξαμενή διαχέεται σε μια θέση (αποκαλούμενη Q_p) στο Σύμπλοκο III κοντά στην πλευρά της μεμβράνης προς το κυτταροδιάλυμα, όπου και οξειδώνεται σε δύο βήματα.

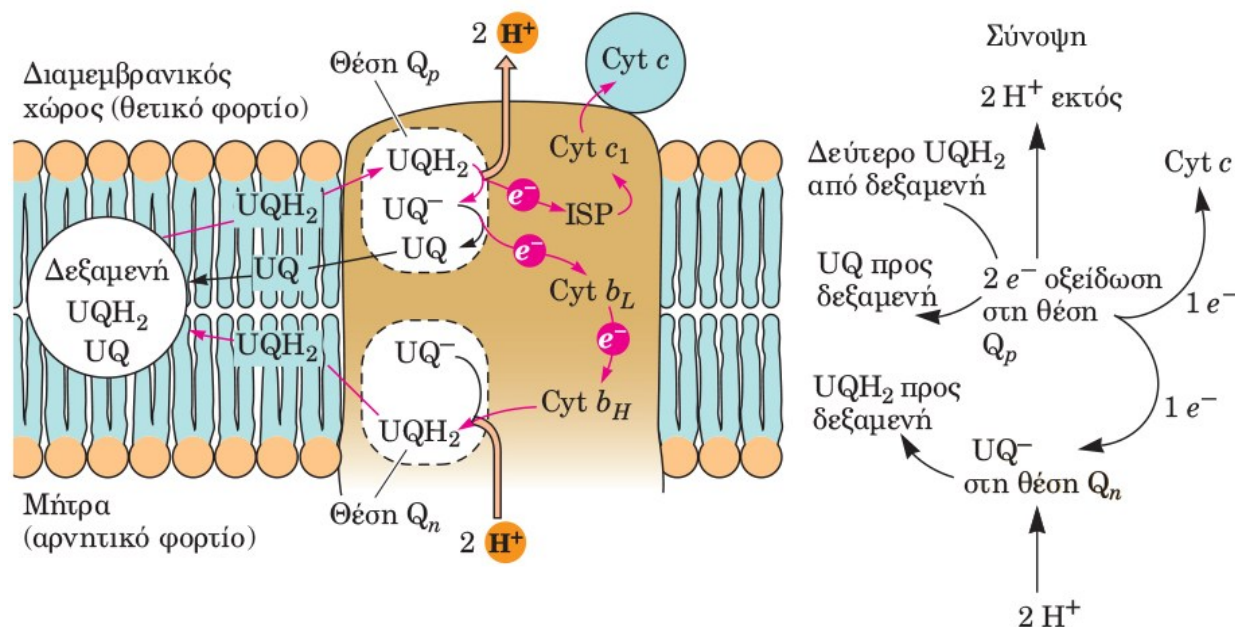
Αρχικά, ένα ηλεκτρόνιο από την UQH_2 μεταφέρεται στην πρωτεΐνη Rieske και κατόπιν μέσω του $\text{Cyt } c_1$ στο κυτόχρωμα c. Αυτή η διαδικασία απελευθερώνει δυο H^+ στο κυτταροδιάλυμα και αφήνει την UQ^- , ένα ανιόν ημικινόνης του συνενζύμου Q, στη θέση Q_p . Το δεύτερο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στη συνέχεια στην αίμη b_L μετατρέποντας την UQ^- σε UQ και στη συνέχεια περνά μέσω της αίμης b_H σε ένα μόριο UQ σε μια δεύτερη θέση πρόσδεσης κινόνης, την Q_n , μετατρέποντάς σε UQ^- , η οποία παραμένει ισχυρά προσδεμένη στη θέση Q_n , ολοκληρώνοντας έτσι το πρώτο ήμισυ του κύκλου Q.

Το δεύτερο ήμισυ του κύκλου είναι παρόμοιο με το πρώτο, με ένα δεύτερο μόριο UQH_2 να οξειδώνεται στη θέση Q_p , και ένα ηλεκτρόνιο να διοχετεύεται στο κυτόχρωμα c και το άλλο να μεταφέρεται στην αίμη b_L και κατόπιν στην αίμη b_H .

Ωστόσο, σε αυτό το τελευταίο ήμισυ του κύκλου Q , το ηλεκτρόνιο από την b_H μεταφέρεται στο ανιόν της ημικινόνης UQ^- , που δημιουργήθηκε στο πρώτο ήμισυ του κύκλου στη θέση Q_n .

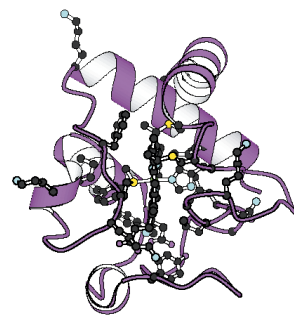
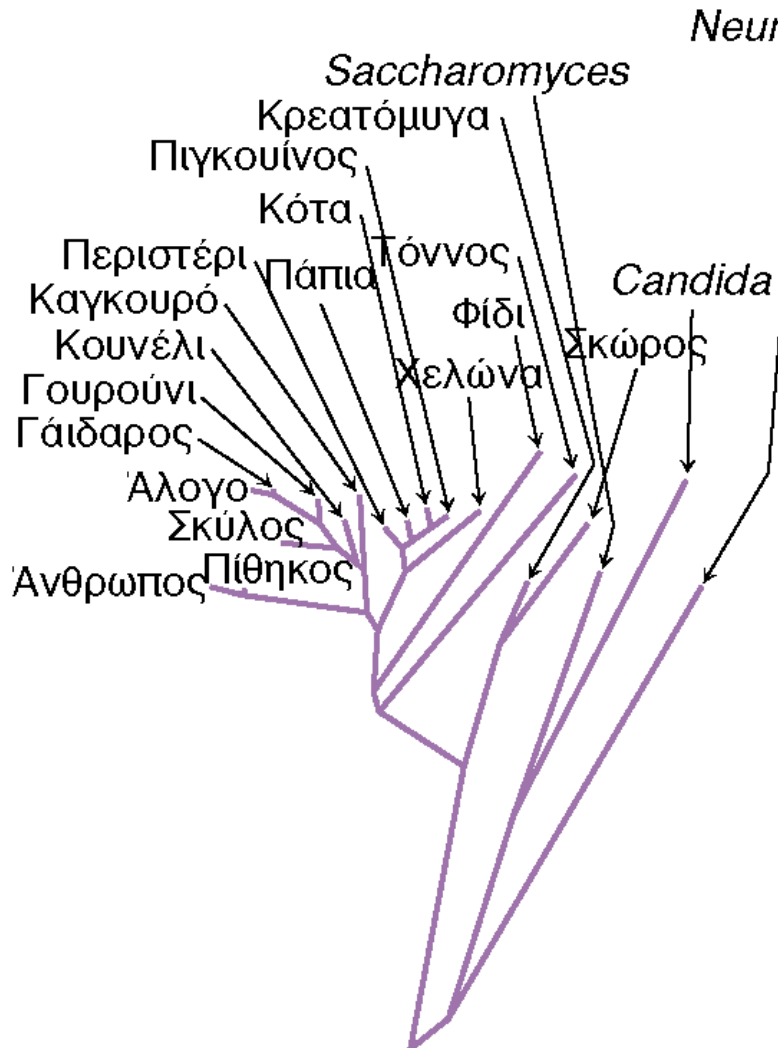
Με την προσθήκη δυο H^+ από τη μιτοχονδριακή μήτρα παράγεται ένα μόριο UQH_2 , που απελευθερώνεται από τη θέση Q_n και επιστρέφει στη δεξαμενή των συνενζύμων Q , ολοκληρώνοντας τον κύκλο Q .

(β) Δεύτερο ήμισυ του κύκλου Q



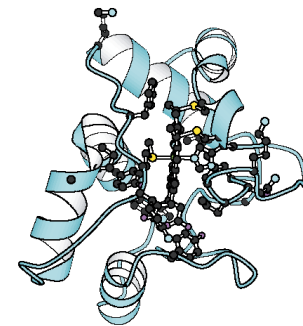
Επομένως σε κάθε κύκλο Q , δυο UQH_2 αφαιρούνται από τη δεξαμενή UQ/UQH_2 και ένα επιστρέφεται διεκπεραιώνοντας την καθαρή οξείδωση του δεύτερου UQH_2 .

Εξελικτικό δένδρο που κατασκευάστηκε με βάση την αμινοξική αλληλουχία των κυτοχρωμάτων c.



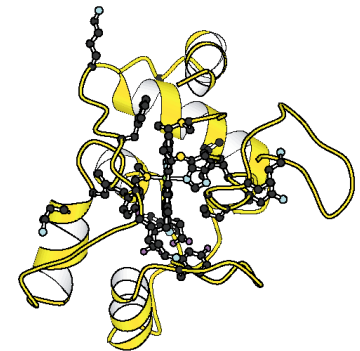
Τόννος

ψάρι



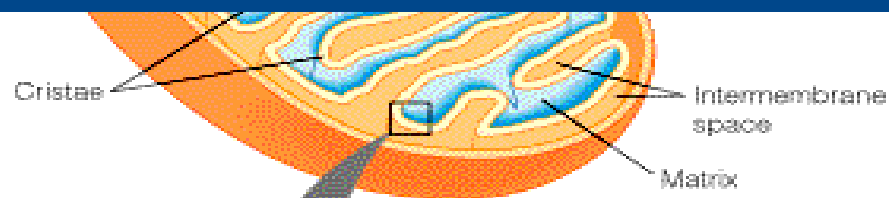
Rhodospirillum rubrum

Φωτοσυνθετικό
βακτήριο

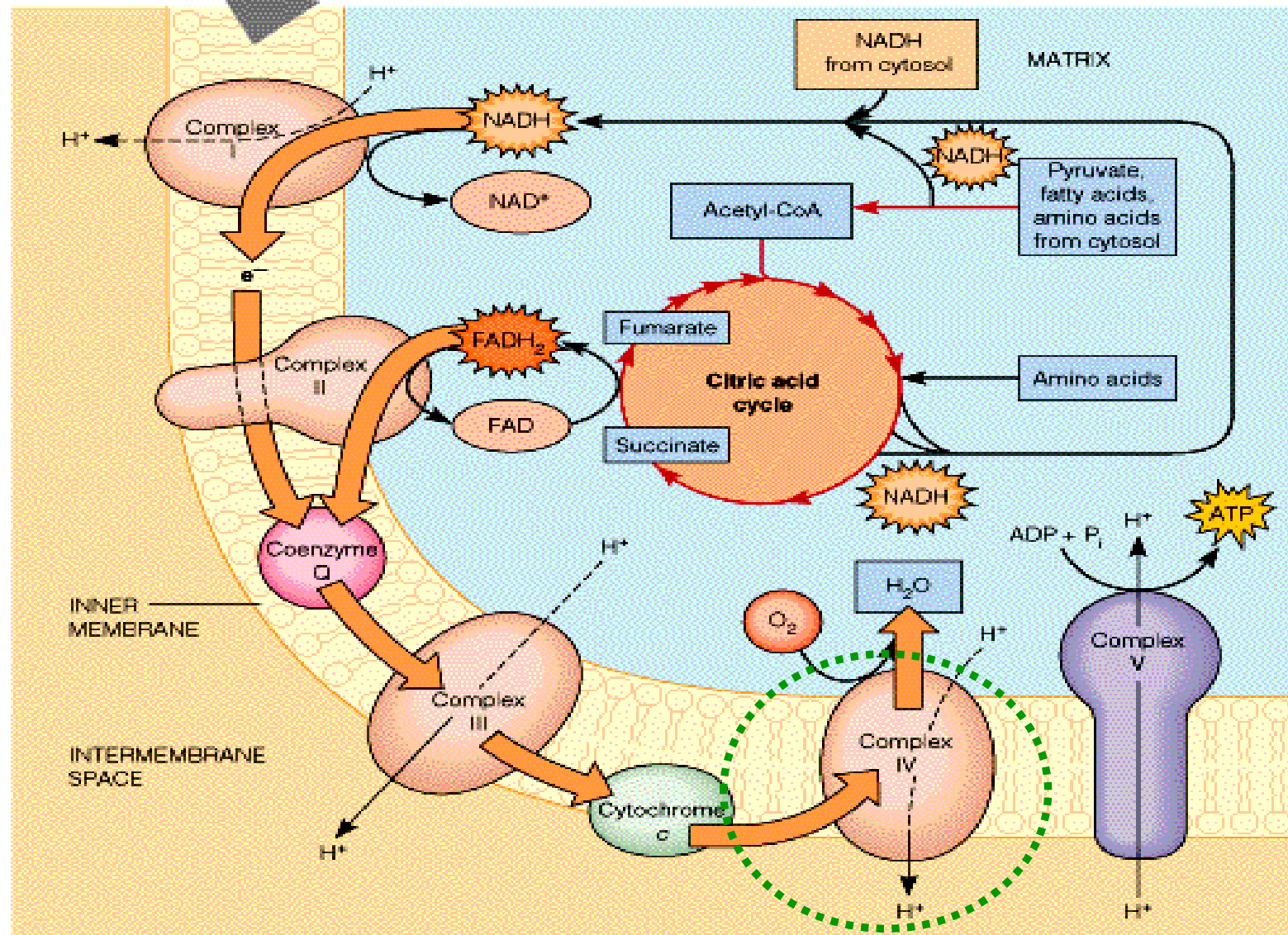


Paracoccus denitrificans

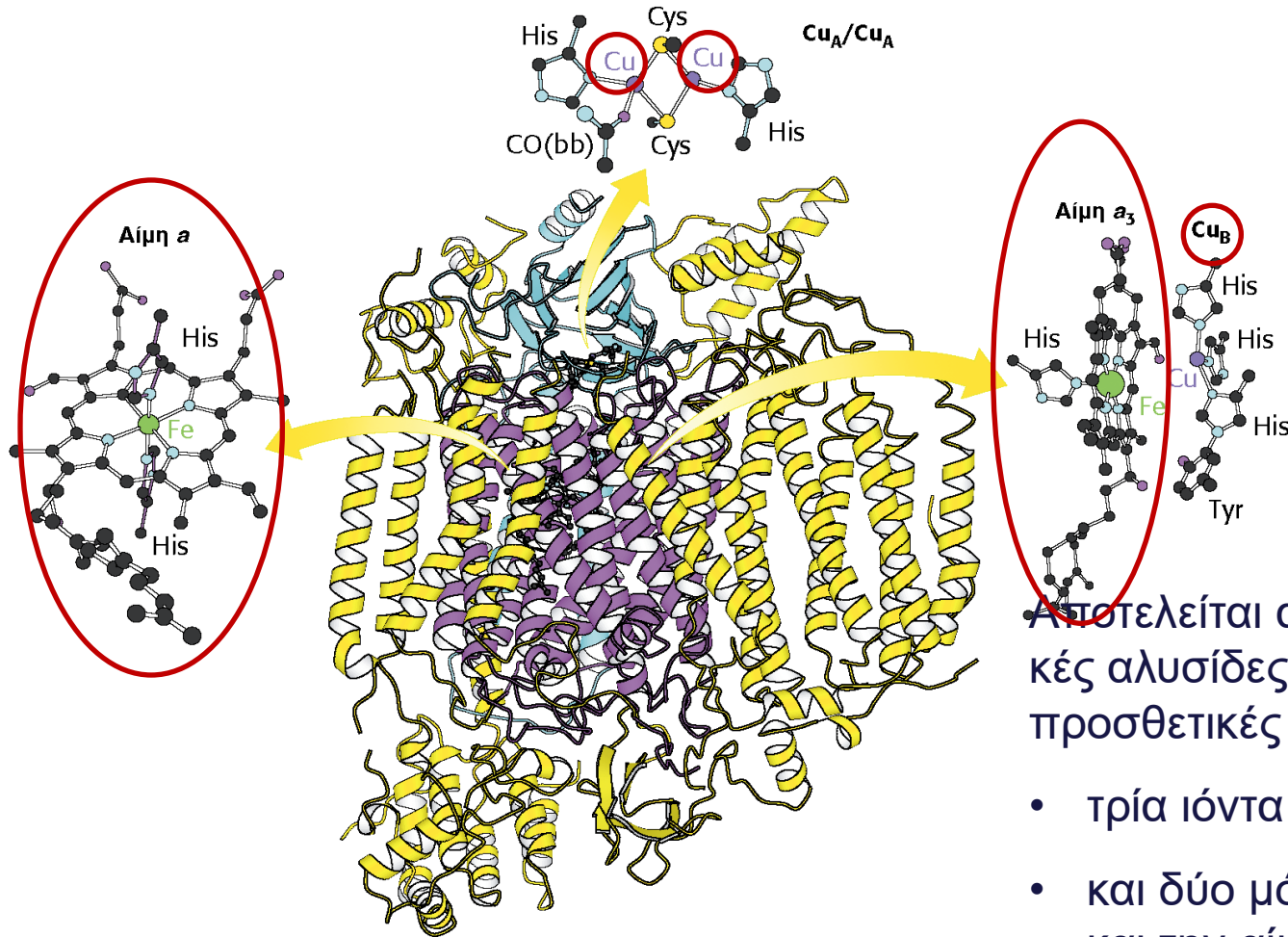
Βακτήριο
απονίτρωσης



(a)



Η οξειδάση του κυτοχρώματος c καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό.



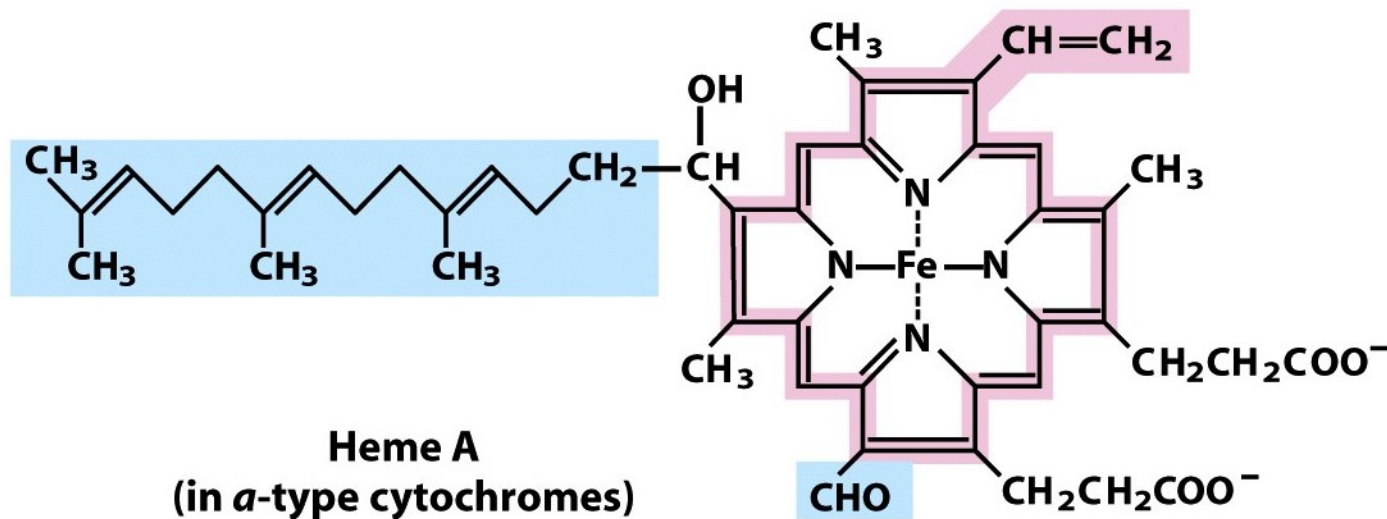
Το τελικό σταδιο της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα καταλύεται από την οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV).

Αποτελείται από 13 πολυπεπτιδικές αλυσίδες και περιλαμβάνει ως προσθετικές ομάδες:

- τρία ιόντα χαλκού
- και δύο μόρια αίμης, την αίμη a και την αίμη a₃.



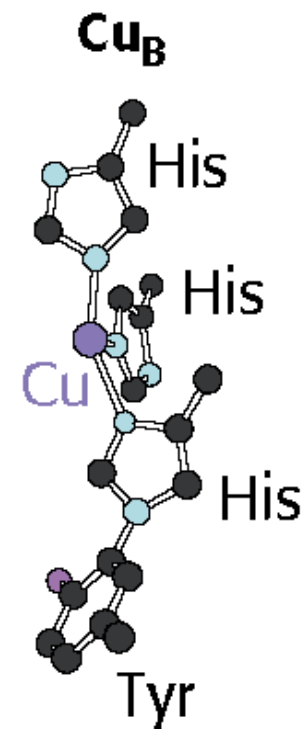
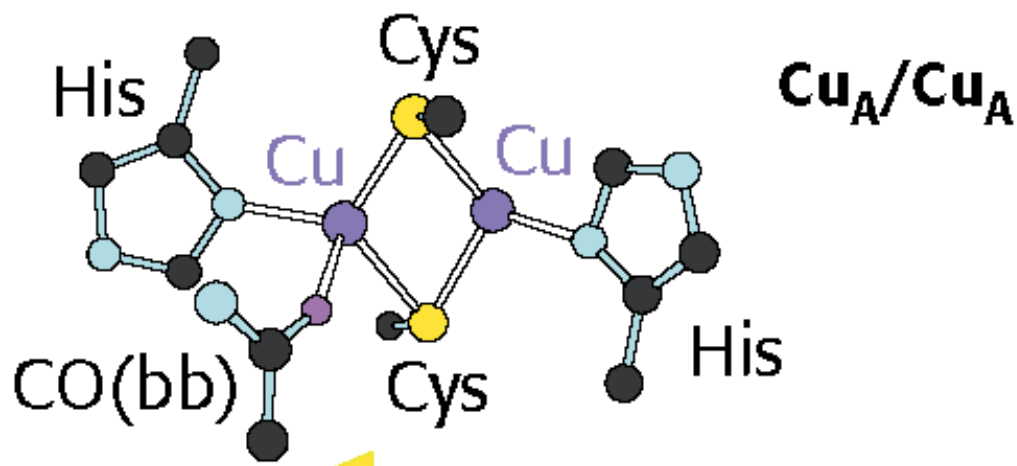
Η αίμη A φέρει μια φορμυλομάδα στη θέση της μεθυλικής ομάδας της αίμης της αιμοσφαιρίνης, και μια μεγάλη υδρογονοανθρακική ομάδα (C_{15}) στη θέση της βινυλικής ομάδας.



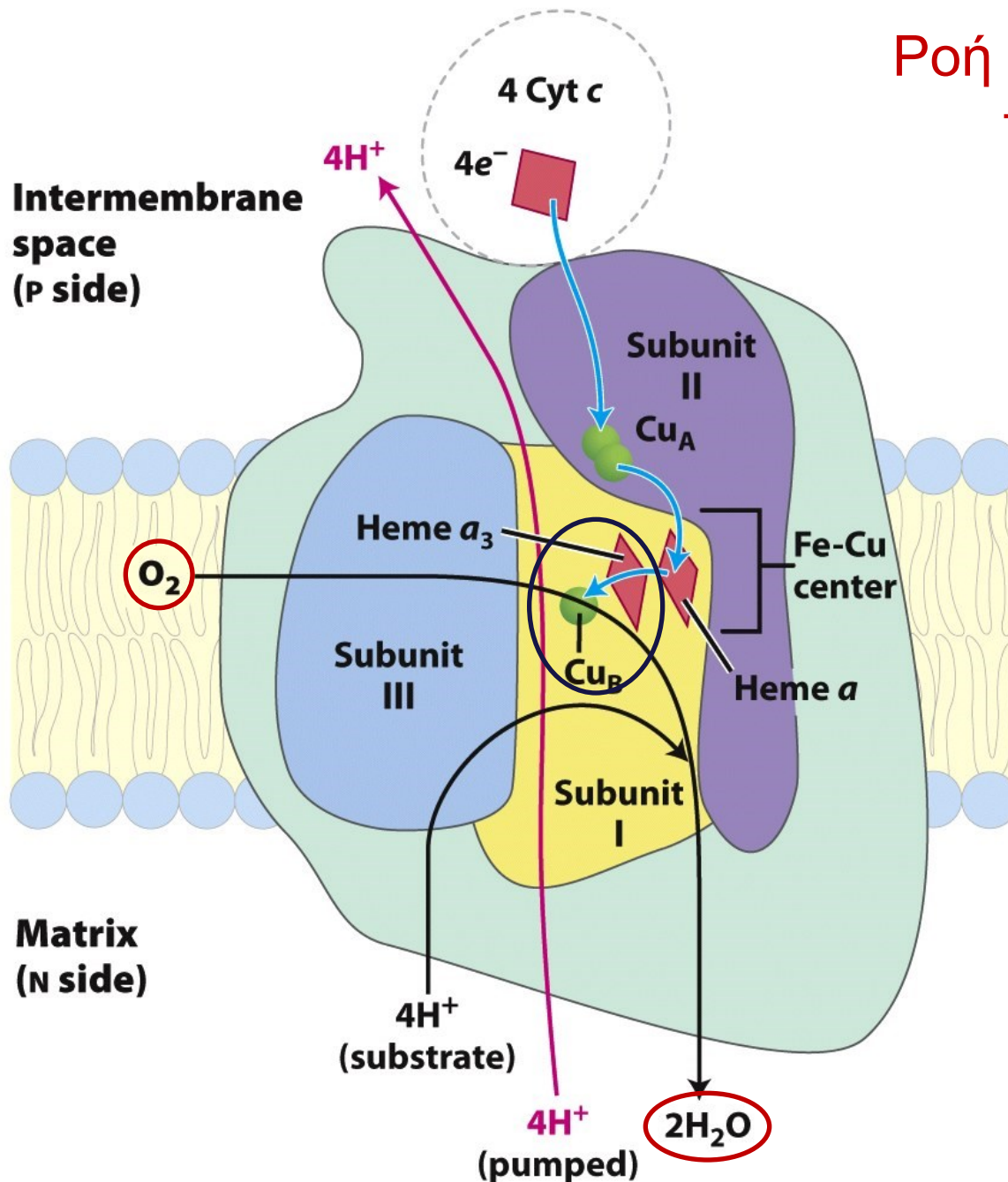
Τα τρία ιόντα χαλκού της κυτοχρωμικής οξειδάσης διατάσσονται σε δύο κέντρα που ονομάζονται Α και Β.

Το κέντρο Α περιέχει δύο ιόντα χαλκού ($\text{Cu}_\text{A}/\text{Cu}_\text{A}$) συνδεδεμένα μεταξύ τους με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης,

ενώ το κέντρο Β περιέχει ένα ιόν χαλκού (Cu_B) που συμπλοκοποιείται με τρία κατάλοιπα ιστοιδίνης.



Ροή ηλεκτρονίων διάμεσου του Συμπλόκου IV



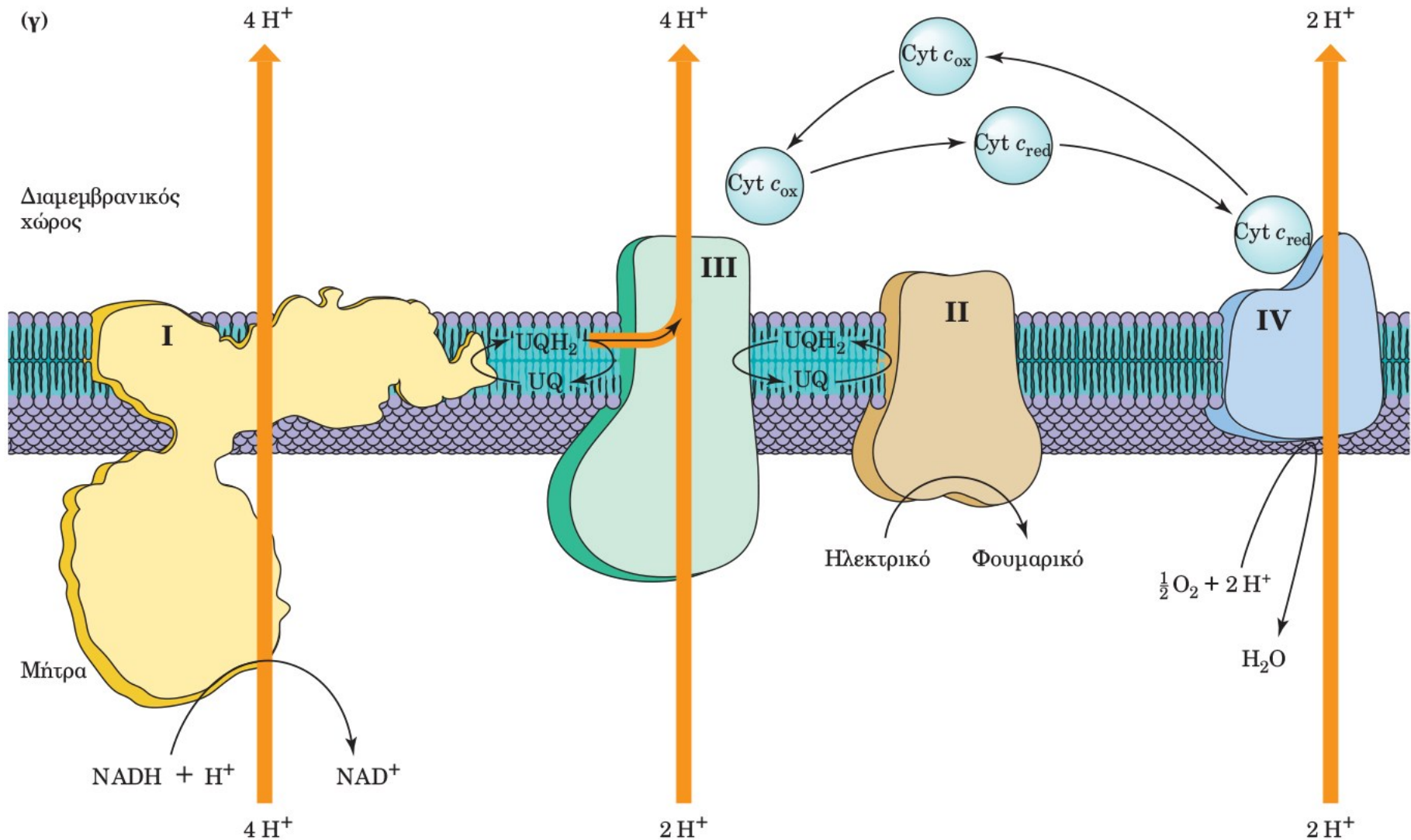
Τα δύο ηλεκτρόνια από δύο μόρια ανηγμένου κυτοχρώματος c μεταφέρονται στο διπυρηνικό κέντρο Cu_A . Από εδώ περνούν μέσω της αίμης α στο κέντρο Fe-Cu (κυτόχρωμα a_3 και κέντρο Cu_B).

Ένα μόριο οξυγόνο δεσμεύεται στην αίμη a_3 και ανάγεται σε ανιόν υπεροξειδίου (O_2^{2-}) παραλαμβάνοντας τα δύο ηλεκτρόνια από το κέντρο Fe-Cu.

Με παράδοση δύο επιπλέον ηλεκτρονίων από άλλα δύο μόρια cyt c ένα δεύτερο μόριο O_2 ανάγεται, οπότε τα δύο O_2^{2-} μετατρέπονται σε δύο μόρια νερού, με την κατανάλωση τεσσάρων πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα.

Την ίδια στιγμή, τέσσερα πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο με έναν άγνωστο ακόμα μηχανισμό.

Σχηματική απεικόνιση της ροής των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων διαμέσου των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας.



Συγκρίνετε το $\Delta G^{\circ'}$ για την οξείδωση του ηλεκτρικού από το NAD^+ και από το FAD και αιτιολογήστε το γεγονός ότι η ηλεκτρική αφυδρογονάση χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το FAD και όχι το NAD^+ . Δίδονται:

NAD^+/NADH $E_o' = -0,32 \text{ Volt}$

FAD/FADH_2 $E_o' = 0 \text{ Volt}$

φουμαρικό/ηλεκτρικό $E_o' = 0,03 \text{ Volt}$

Για τη οξείδωση του ηλεκτρικού από το NAD^+ έχουμε:

(α) $\text{Φουμαρικό} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{ηλεκτρικό}$ $E_o' = 0,03 \text{ Volt}$

(β) $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{NADH}$ $E_o' = -0,32 \text{ Volt}$

Επομένως για την συνολική αντίδραση οξειδοαναγωγής (β)-(α) ισχύει:

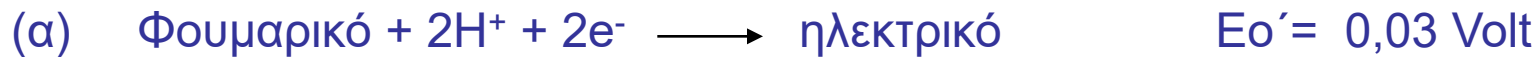
$\text{ηλεκτρικό} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{φουμαρικό} + \text{NADH}$ $\Delta E_o' = -0,35 \text{ Volt}$

Δεδομένου ότι το $\Delta G^{\circ'} = -n F \Delta E_o'$,

Το $\Delta G^{\circ'}$ της οξείδωσης του ηλεκτρικού από το NAD^+ είναι:

$\Delta G^{\circ'} = -2 \cdot 23,062 \cdot (-0,35) = 16,1 \text{ Kcal/mol}$

Ενώ, για τη οξείδωση του ηλεκτρικού από το FAD έχουμε:



Επομένως για την συνολική αντίδραση οξειδοαναγωγής (β)-(α) ισχύει:



Δεδομένου ότι το $\Delta G^{\circ'} = -n F \Delta E_o'$,

Το $\Delta G^{\circ'}$ της οξείδωσης του ηλεκτρικού από το FAD είναι:

$$\Delta G^{\circ'} = -2 \cdot 23,062 (-0,03) = 1,4 \text{ Kcal/mol}$$

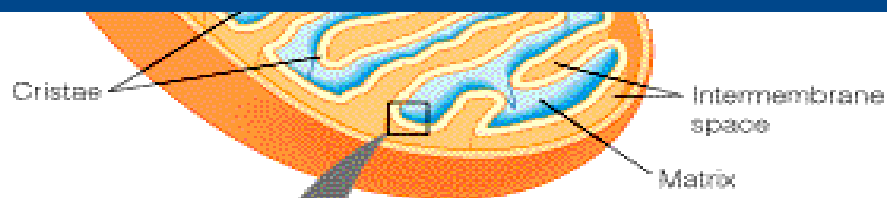
Άρα, η οξείδωση του ηλεκτρικού από το NAD^+ δεν είναι εφικτή θερμοδυναμικά.

Το βακτήριο *arsenophilum sulfospirillum* που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, χρησιμοποιεί ως ανανευστικό οξειδωτικό για την οξείδωση διαφόρων οργανικών υποστρωμάτων τα αρσενικά ιόντα (AsO_4^{-3}). Με βάση τον πίνακα των πρότυπων δυναμικών αναγωγής των αντιδράσεων που δίνονται παρακάτω:

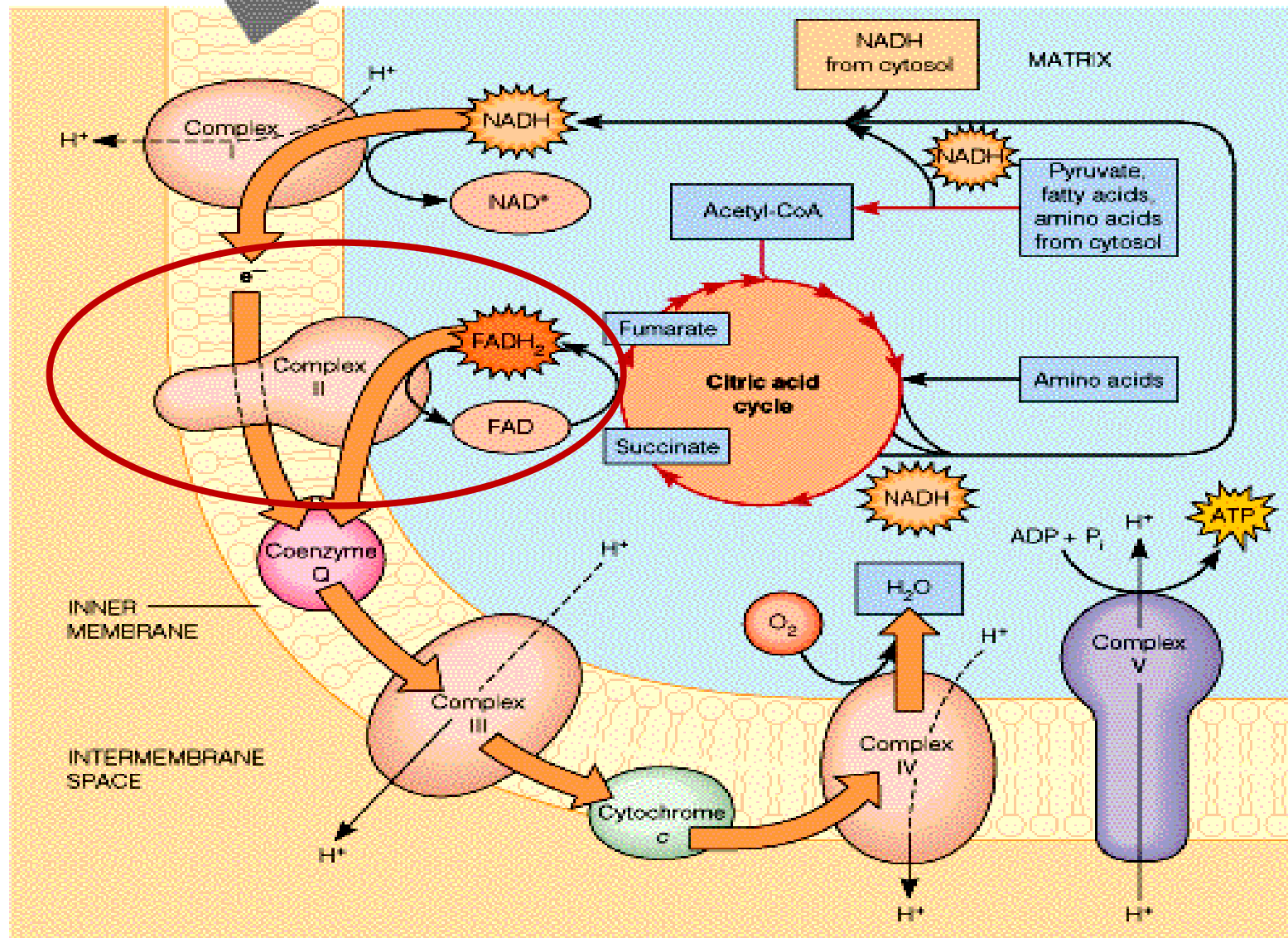
$\text{CoQ} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CoQH}_2$	+ 0,06 V
$\text{Φλαβοπρωτεΐνη c} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Φλαβοπρωτεΐνη c}$	-0,19 V
$\text{Φλαβοπρωτεΐνη b} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Φλαβοπρωτεΐνη b}$	+ 0,10 V
$\text{Οξικό} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ακεταλδεϋδη}$	- 0,59 V
$\text{As (V)} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{As (III)}$	+ 0,16 V
$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	-0,32 V

Διατάξτε τους μεταφορείς ηλεκτρονίων που χρησιμοποιεί το βακτήριο αυτό, έτσι ώστε να επιτρέπεται η αυθόρμητη ροή των ηλεκτρονίων από τον χορηγό των ηλεκτρονίων στον τελικό αποδέκτη.

$\text{Οξικό} \rightarrow \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Φλαβοπρωτεΐνη c} \rightarrow \text{CoQ} \rightarrow \text{Φλαβοπρωτεΐνη b} \rightarrow \text{As (V)}$

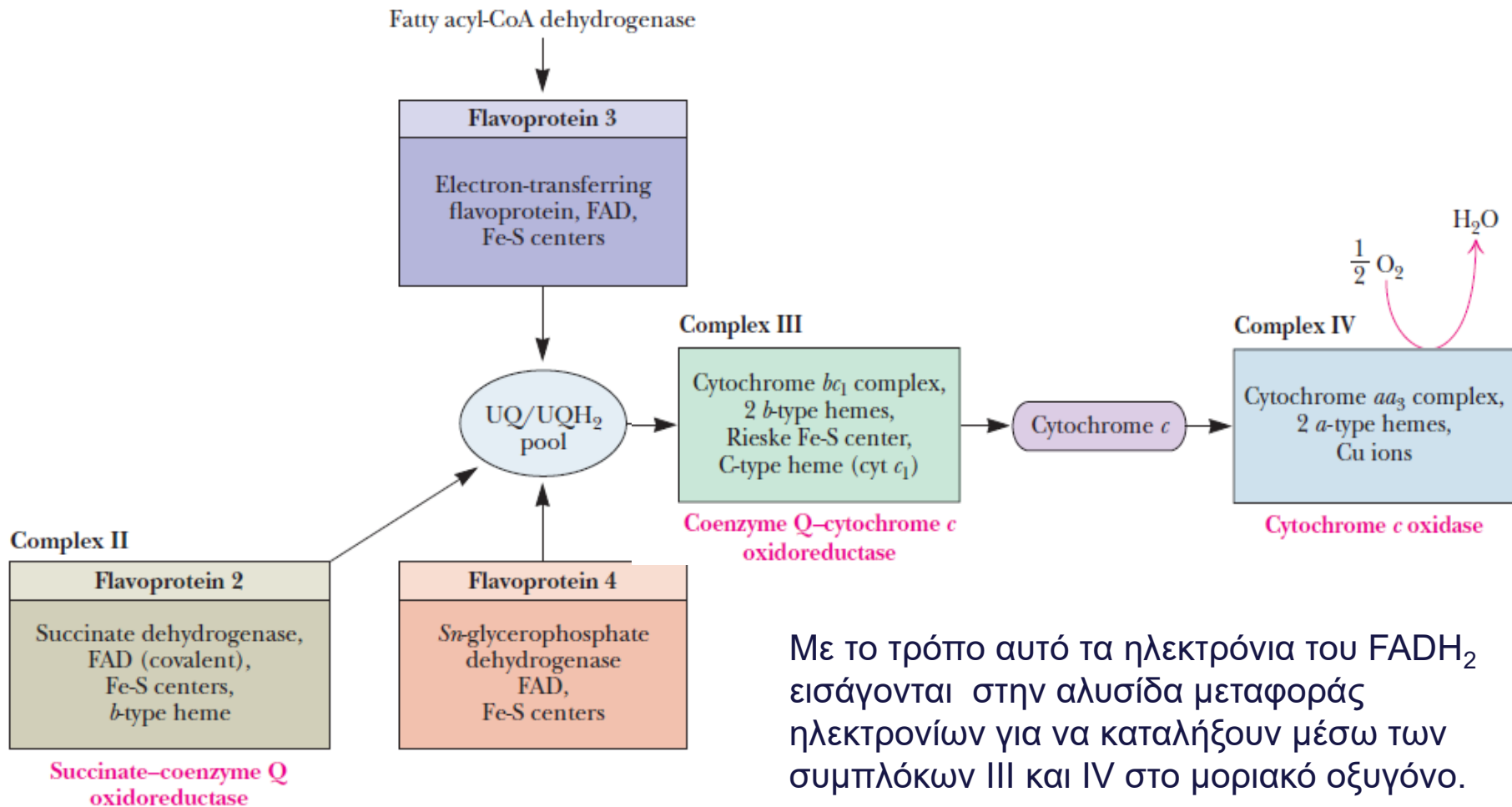


(a)



Πως γίνεται η επανοξείδωση του FADH_2 ;

Το FADH_2 που σχηματίζεται κατά την οξείδωση του ηλεκτρικού στον κύκλο του κιτρικού οξέος, ή μέσω του συστήματος μεταφοράς της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (που χρησιμοποιείται για την επανοξείδωση του κυτταροπλασματικού NADH) ή κατά την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, επανοξειδώνεται με τη μεταφορά του ζεύγους ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού στην **ουβικινόνη**, μέσω του **συμπλόκου του ζεύγους ηλεκτρικού-Q** (**σύμπλοκο II**), καθώς και **άλλων ενζυμικών συστημάτων**.



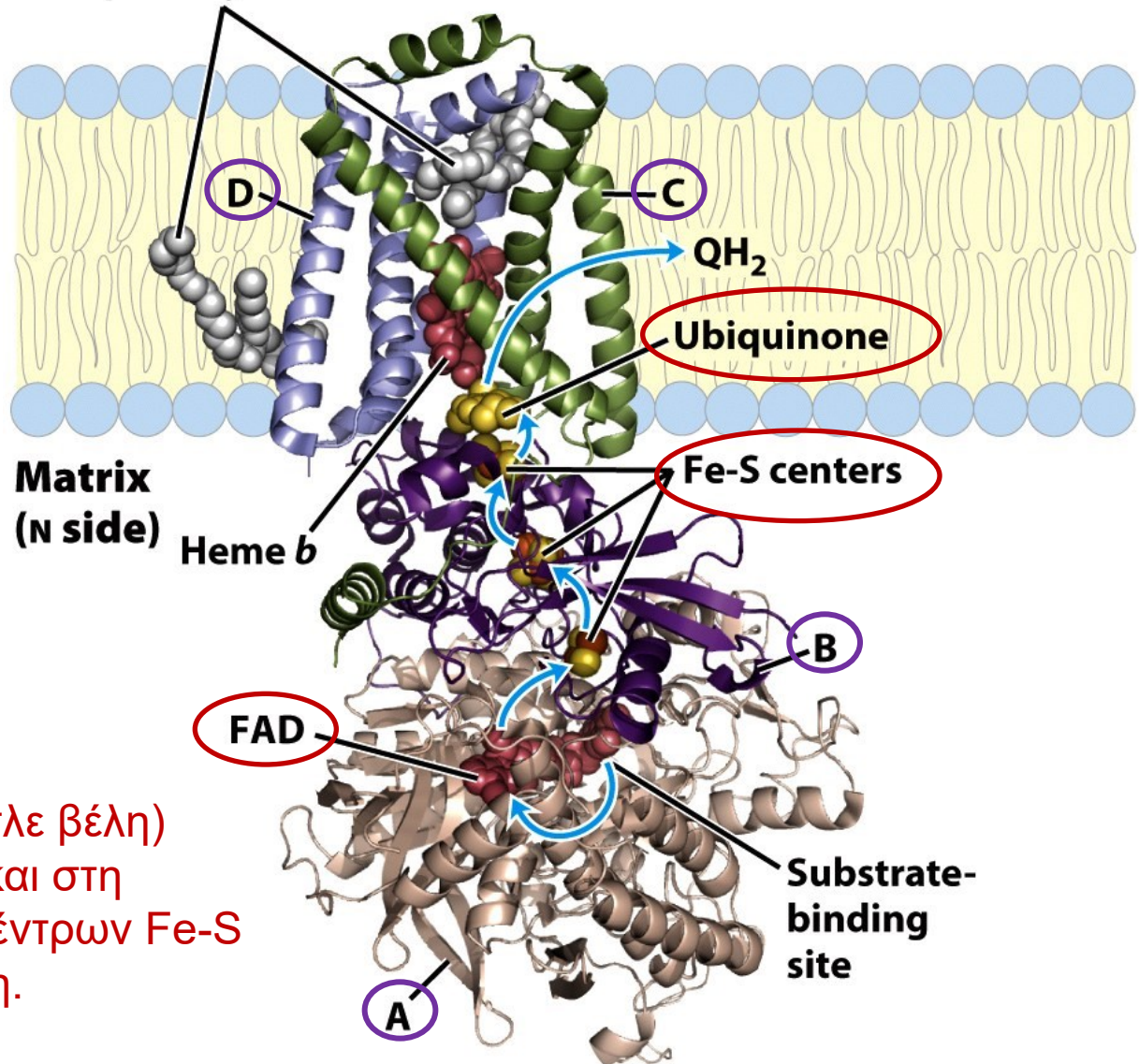
Με το τρόπο αυτό τα ηλεκτρόνια του FADH_2 εισάγονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για να καταλήξουν μέσω των συμπλόκων III και IV στο μοριακό οξυγόνο.

- Το συμπλόκο περιέχει την ηλεκτρική αφυδρογονάση.
- Έχει δύο διαμεμβρανικές υπομονάδες C και D και δύο υπομονάδες (A και B) προς την μιτοχονδριακή μήτρα.
- Στην υπομονάδα A είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένο το FAD και ακριβώς πίσω του είναι η θέση δέσμευσης για το ηλεκτρικό.
- Η B υπομονάδα έχει τρία κέντρα πρωτεϊνών Fe-S καθώς και μια θέση δέσμευσης για την ουβικινόνη.

Τα ηλεκτρόνια κινούνται (μπλε βέλη) από το ηλεκτρικό στο FAD και στη συνέχεια μέσω των τριών κέντρων Fe-S καταλήγουν στην ουβικινόνη.

Intermembrane space (P side)

Phosphatidylethanolamine



Δομή του Συμπλόκου II

Το σύστημα μεταφοράς του γλυκεροφωσφορικού (επίσης γνωστό ως σύστημα μεταφοράς της 3-φωσφορικής γλυκερόλης).

Intermembrane space (P side)

Glycolysis

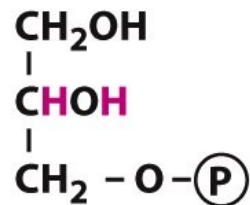
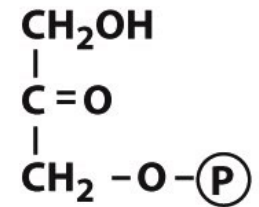
NAD^+

$\text{NADH} + \text{H}^+$

cytosolic
glycerol 3-phosphate
dehydrogenase

Glycerol 3-phosphate

Dihydroxyacetone phosphate



mitochondrial
glycerol 3-phosphate
dehydrogenase

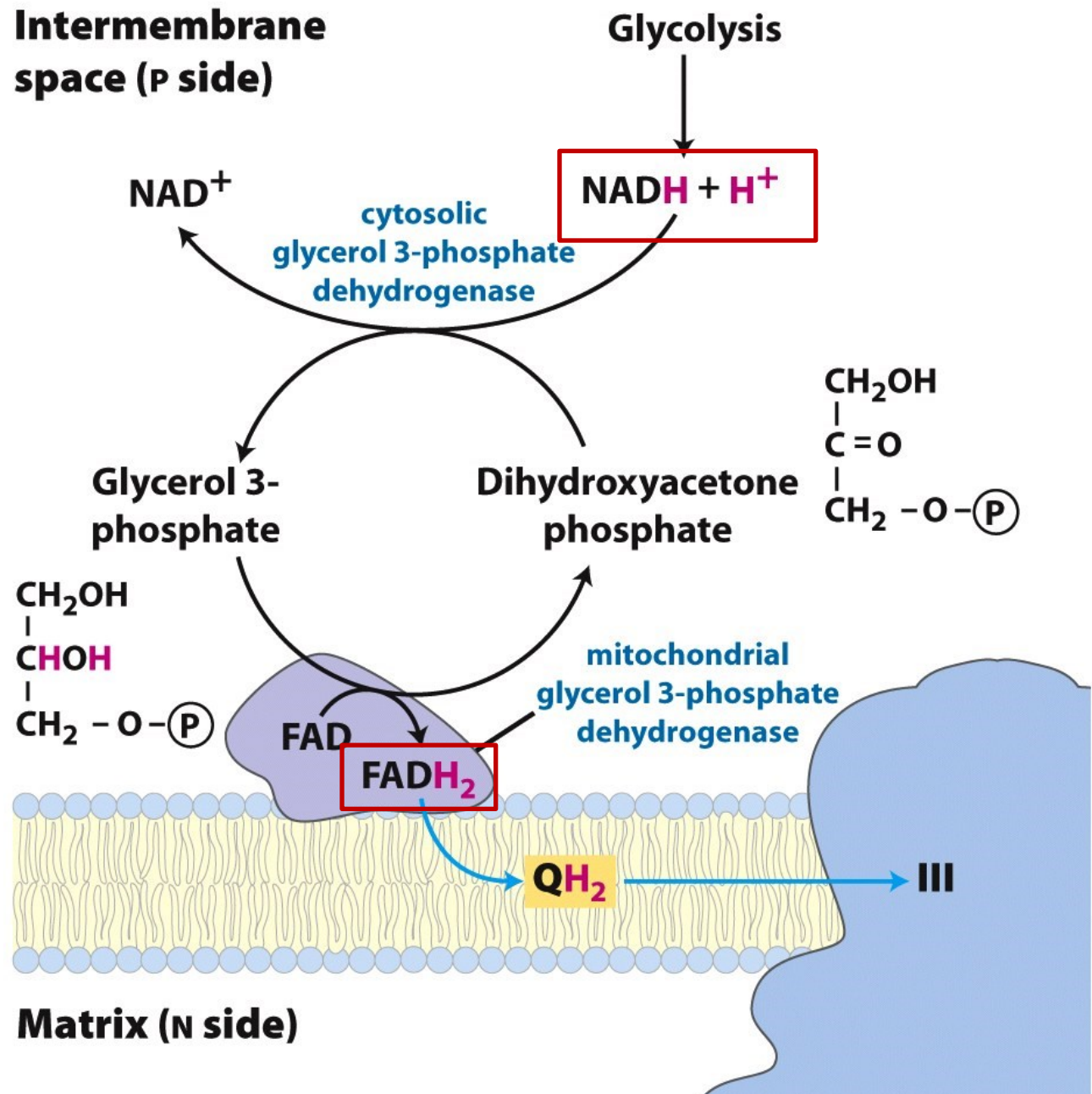
FAD

FADH_2

QH_2

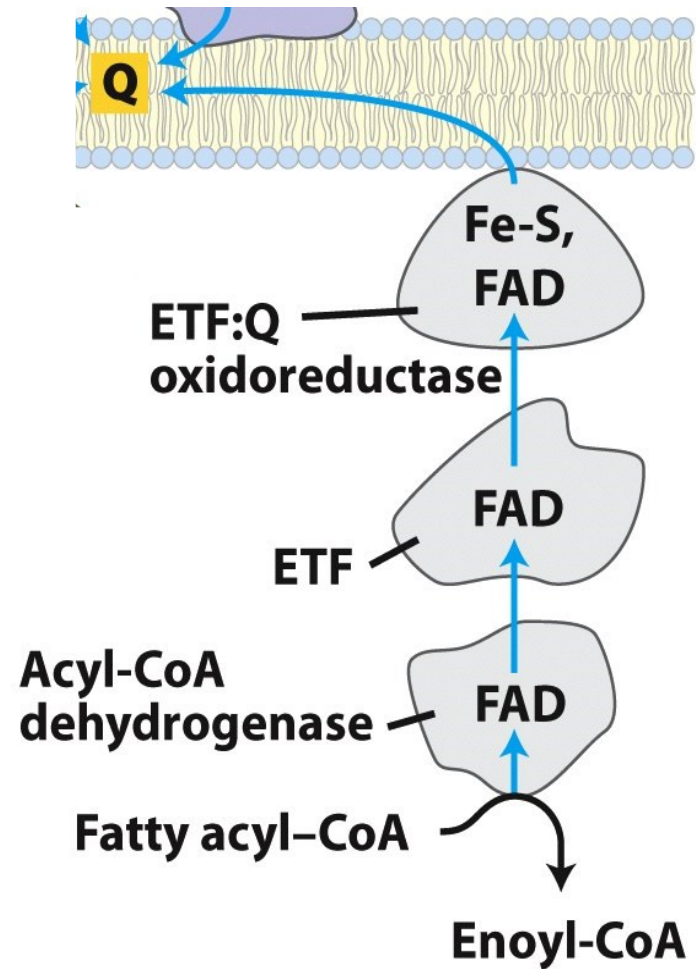
III

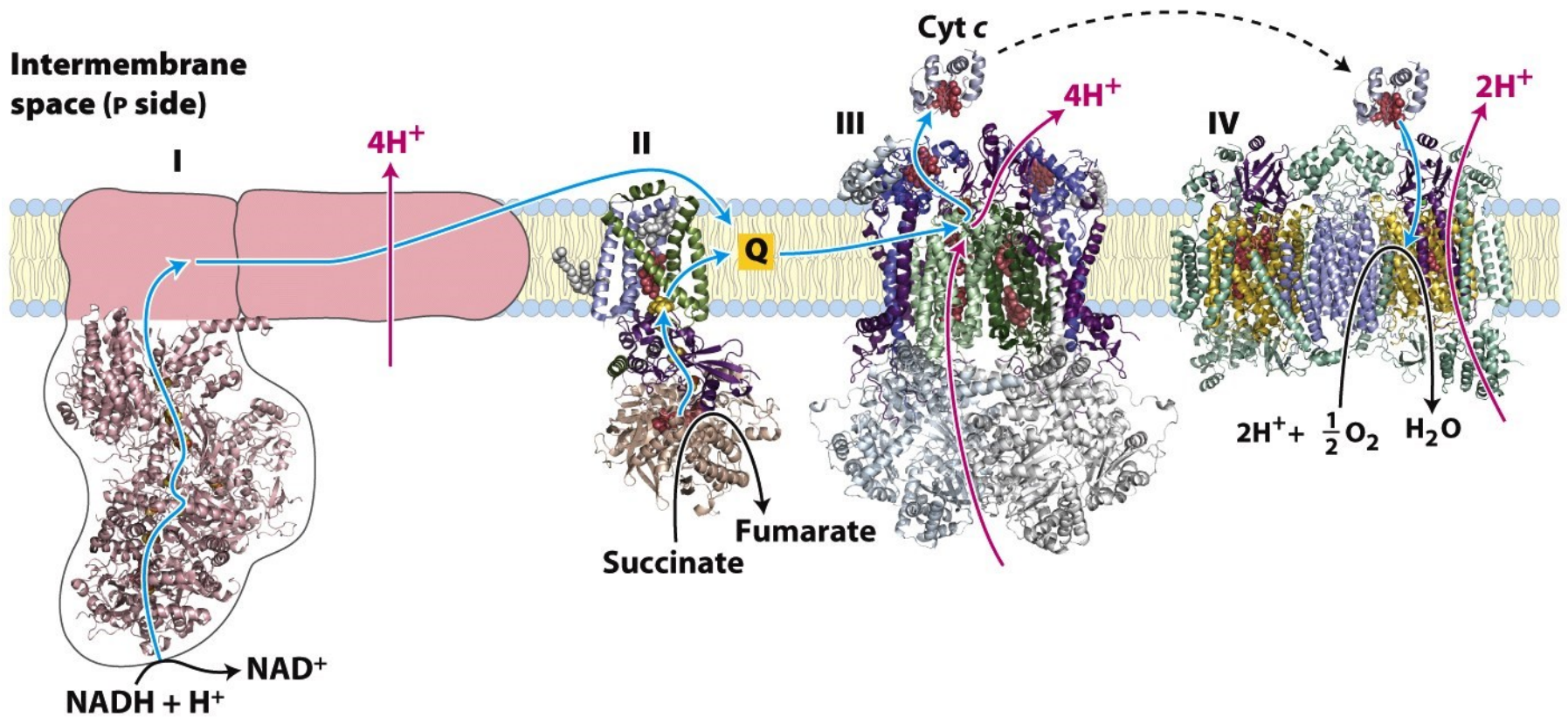
Matrix (N side)



Το FADH_2 που σχηματίζεται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων βρίσκεται προσδεδεμένο στην **αφυδρογονάση του ακυλο-CoA**.

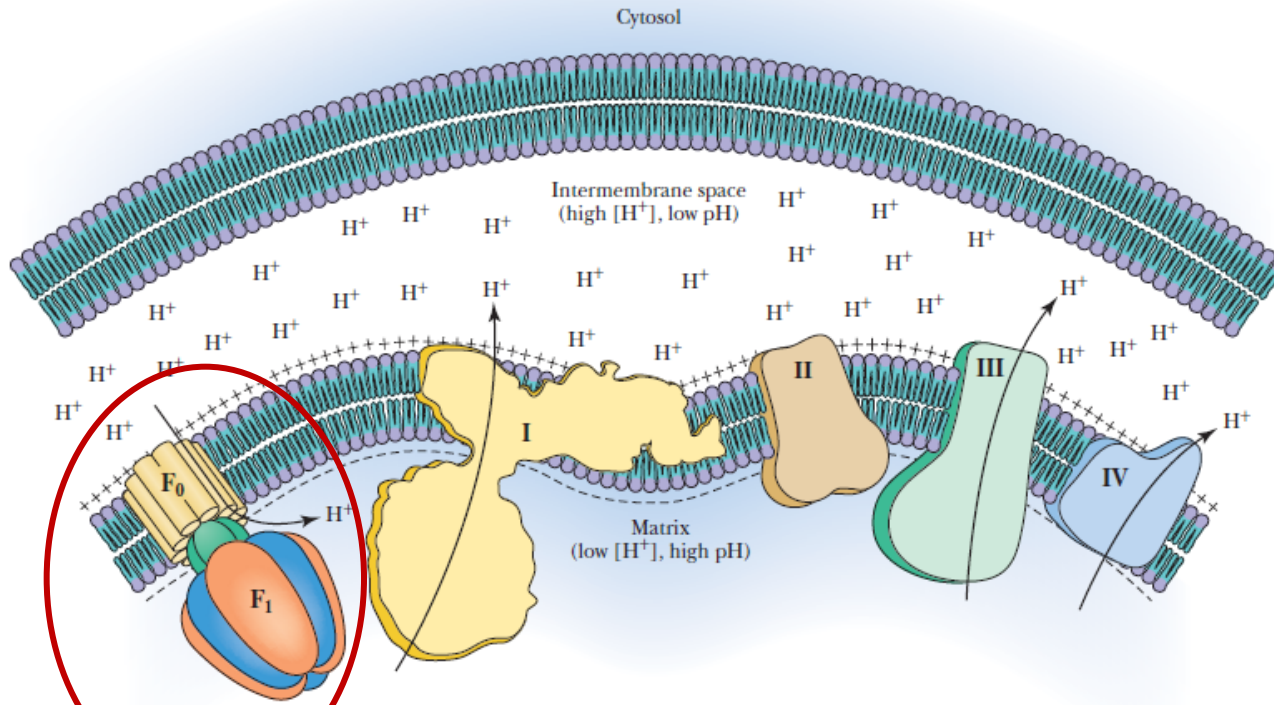
Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε μια δεύτερη φλαβοπρωτεΐνη που ονομάζεται *ETF* (*electron transferring flavoprotein*), η οποία με τη σειρά της τα αποδίδει μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους *ETF*-ουβικινόνης, μιας πρωτεΐνης σιδήρου-θείου, στην ουβικινόνη.





Το σύμπλοκο II, αλλά και τα άλλα ένζυμα που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το FADH_2 στο συνένζυμο Q, **δεν αντλούν πρωτόνια από την μιτοχονδριακή μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο**, με αποτέλεσμα η γραμμικά μεταβαλλόμενη κλίση πρωτονίων που δημιουργείται να έχει μικρότερο ηλεκτροχημικό δυναμικό.

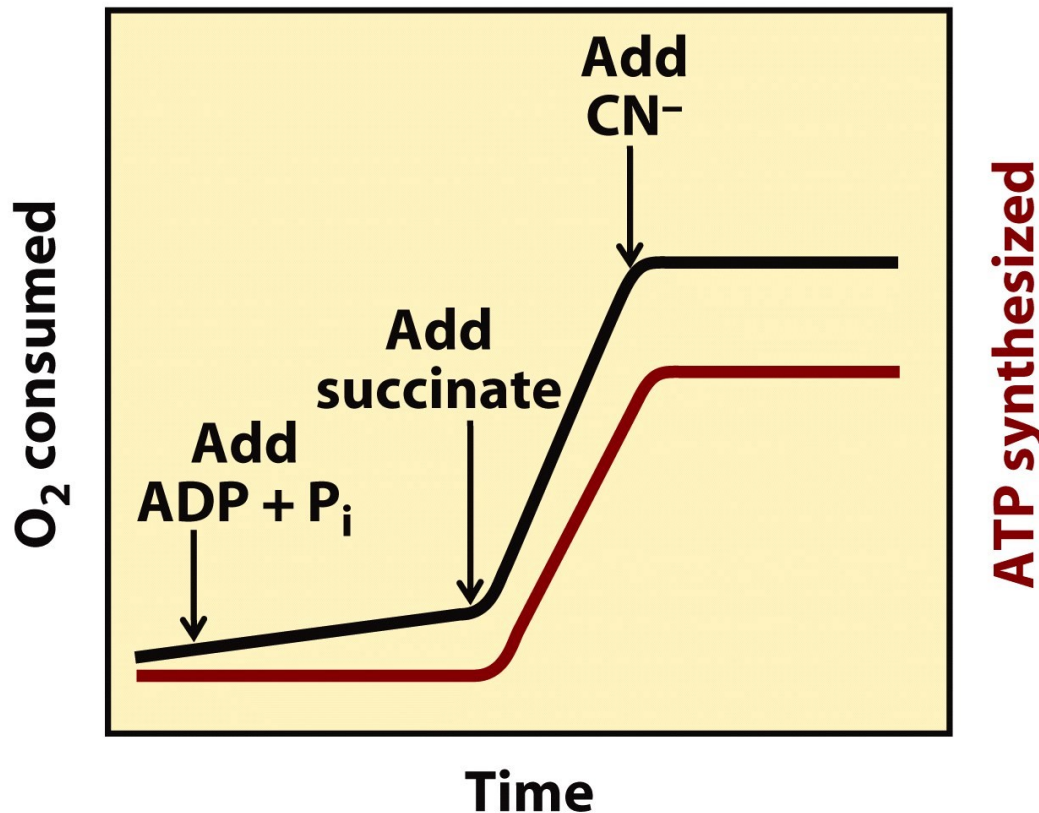
Η οξείδωση των ανηγμένων συνενζύμων και η φωσφορυλίωση του ADP είναι συζευγμένες με μια κλίση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.



Η ύπαρξη ακέραιων μιτοχονδρίων ή κλειστών σωματιδίων (που προκύπτουν από κατεργασία των μιτοχονδρίων με υπερήχους) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη σύνθεση του ATP.

- Η κατά σταδίο μεταφορά των ηλεκτρονίων από τα ανηγμένα συνένζυμα προς το μοριακό O₂, διαμέσου των φορέων της αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγεί στη μετακίνηση πρωτονίων έξω από το μιτοχόνδριο με συνέπεια τη δημιουργία ενός ηλεκτροχημικού δυναμικού στη μιτοχονδριακή μεμβράνη.
- Το ATP συντίθεται καθώς τα πρωτόνια ρέουν πίσω στο matrix του μιτοχονδρίου διαμέσου του ενζυμικού συμπλέγματος της συνθάσης του ATP.

Πειραματική απόδειξη της σύζευξης της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της σύνθεσης του ATP στα μιτοχόνδρια.



Ακέραια μιτοχόνδρια αιωρούνται σε ένα ρυθμιστικό μέσο παρουσία ενός ηλεκτροδίου O_2 που καταγράφει την κατανάλωση του O_2 και κατά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα που αναλύονται για την παρουσία του ATP.

- Η προσθήκη ADP και P_i μόνο οδηγεί σε μικρή ή καθόλου αύξηση της αναπνοής (μαύρο) ή της σύνθεσης ATP (κόκκινο).
- Όταν προστίθεται ηλεκτρικό, η αναπνοή αρχίζει αμέσως να αυξάνεται με παράλληλη αύξηση της σύνθεσης του ATP.
- Η προσθήκη του κυανίου (CN^-), η οποία εμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της οξειδάσης του κυτοχρώματος (Complex IV) και του O_2 , αναστέλλει τόσο την αναπνοή όσο και την σύνθεση του ATP.

Πώς επιτυγχάνεται η σύζευξη της οξειδωσης των ανηγμένων συνενζύμων με την φωσφορυλίωση του ADP ;

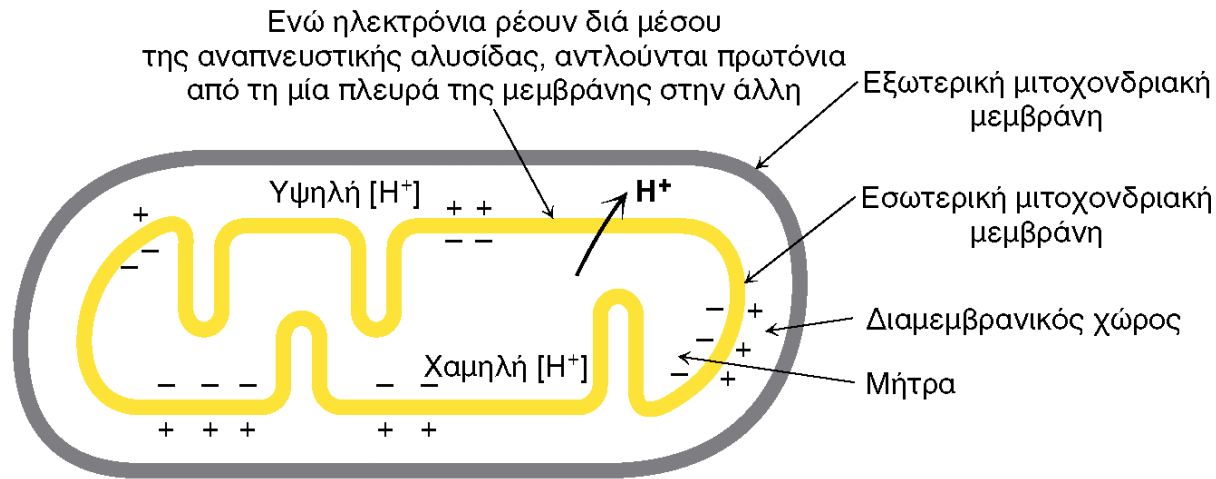
Αρχικά υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η μεταφορά των ηλεκτρονίων οδηγεί στο σχηματισμό ενός ομοιοπολικού ενδιάμεσου υψηλής ενέργειας, το οποίο χρησιμεύει ως ένωση υψηλού δυναμικού για την μεταφορά της φωσφορικής ομάδας στο ADP.

Παράλληλα, αναπτύχθηκε και η θεωρία της δημιουργίας μιας ενεργοποιημένης στερεοδιάταξης μιας πρωτεΐνης, που στη συνέχεια ωθεί στη σύνθεση του ATP.

Όμως η επί δεκαετίες έρευνα για την αναζήτηση των ενεργοποιημένων αυτών ενδιάμεσων απέβει άκαρπη.

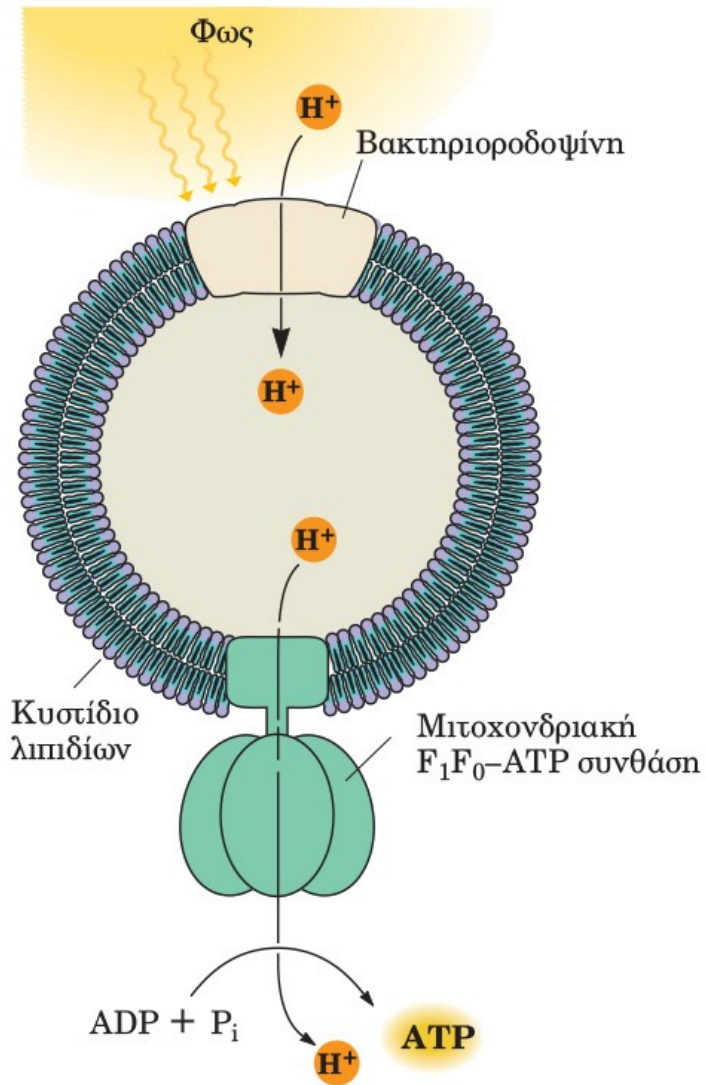
Το 1961, ο Peter Mitchell διατύπωσε την άποψη ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων και η σύνθεση του ATP είναι συζευγμένες με μια **βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης**, παρά με ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας (**μοντέλο χημικής σύζευξης**) ή μια ενεργοποιημένη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης (**μοντέλο αλλαγής της στερεοδομής**).

Η χημειωσμωτική υπόθεση



Σύμφωνα με το μοντέλο της χημειωσμωτικής υπόθεσης, η μεταφορά των ηλεκτρονίων δια μέσου της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγεί σε άντληση πρωτονίων από τη μήτρα, και έτσι δημιουργείται μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης, η οποία αποτελεί την πρωτονιο-κινητήρια δύναμη που οδηγεί στη σύνθεση του ATP από το σύμπλοκο της συνθάσης του ATP.

Έλεγχος της χημειωσμωτικής υπόθεσης



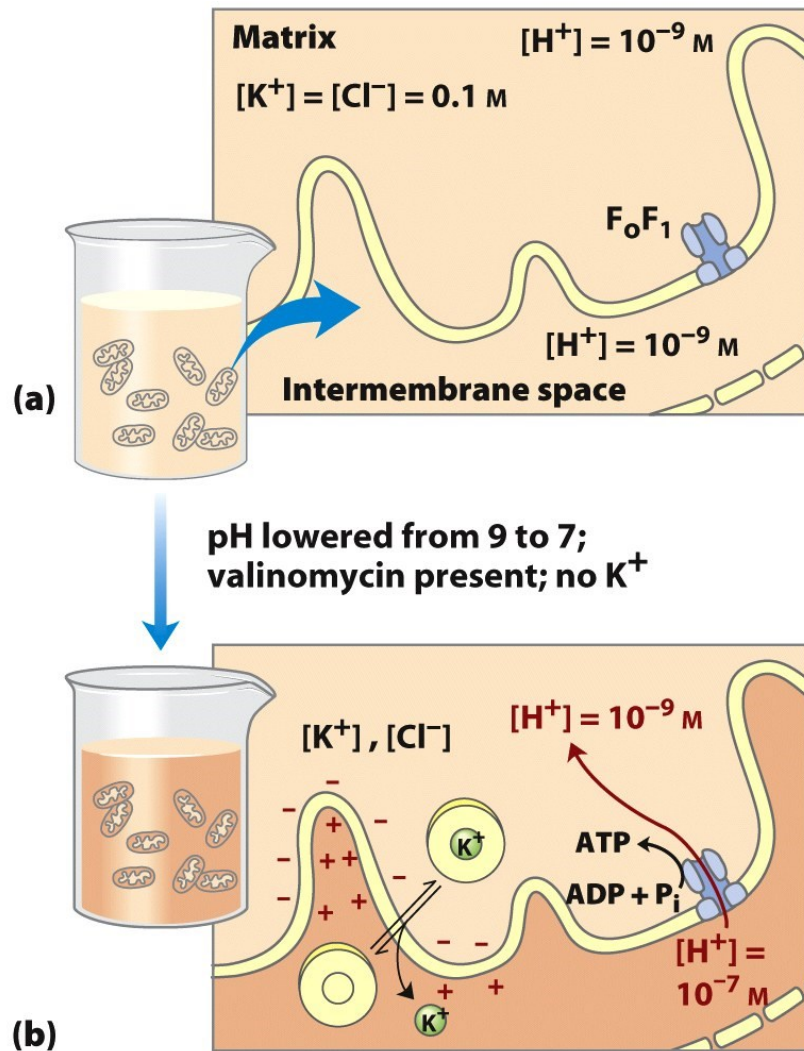
Ο προσανατολισμός της συνθάσης του ΑΤΡ στην ανασυνδυασμένη αυτή μεμβράνη είναι αντίστροφος του φυσιολογικού στα μιτοχόνδρια.

Όταν φωτιστούν ανασυσταμένα μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν βακτηριοροδοψίνη (πορφυρή μεμβρανική πρωτεΐνη από αλοβακτήρια, που αντλεί πρωτόνια όταν φωτίζεται) και καθαρισμένη συνθάση του ΑΤΡ από μιτοχόνδρια καρδιάς βοός, τότε συντίθεται ΑΤΡ.

Το πείραμα αυτό έδειξε κατηγορηματικά ότι:

Η αναπνευστική αλυσίδα και η σύνθεση του ΑΤΡ είναι βιοχημικά διαφορετικά συστήματα που συνδέονται μόνο με μια πρωτονιοκινητήρια δύναμη.

Πειραματικά στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο της βαθμίδωσης πρωτονίων στη σύνθεση του ATP.



Μια τεχνητά επιβαλλόμενη ηλεκτροχημική κλίση μπορεί να οδηγήσει στην σύνθεση ATP απουσία ενός οξειδούμενου υποστρώματος δότη ηλεκτρονίων.

(A) Απομονωμένα μιτοχόνδρια επώαστηκαν απουσία υποστρώματος σε ένα ρυθμιστικό σύστημα με pH 9 που περιείχε 0,1 M KCl, ώστε να επέλθει ισορροπία του ρυθμιστικού και του KCl μεταξύ της μιτοχονδριακής μεμβράνης και του περιβάλλοντος μέσου.

(B) Τα μιτοχόνδρια διαχωρίστηκαν τώρα από το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 9 και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7 που περιείχε βαλινομυκίνη αλλά χωρίς KCl. Η αλλαγή του ρυθμιστικού δημιουργεί μία διαφορά δύο μονάδες του pH κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και η προς τα έξω ροή του K^+ , (που διεξάγεται από τη βαλινομυκίνη), δημιουργεί μια ανισορροπία φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης (μήτρα αρνητική).

Το άθροισμα του χημικού δυναμικού που παρέχονται από τη διαφορά του pH και του ηλεκτρικού δυναμικού είναι μια πρωτόνιο-κινητήρια δύναμη ικανή για να υποστηρίξει τη σύνθεση ATP απουσία ενός οξειδούμενου υποστρώματος.

Πως ωθείται η σύνθεση του ATP από τη βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων;

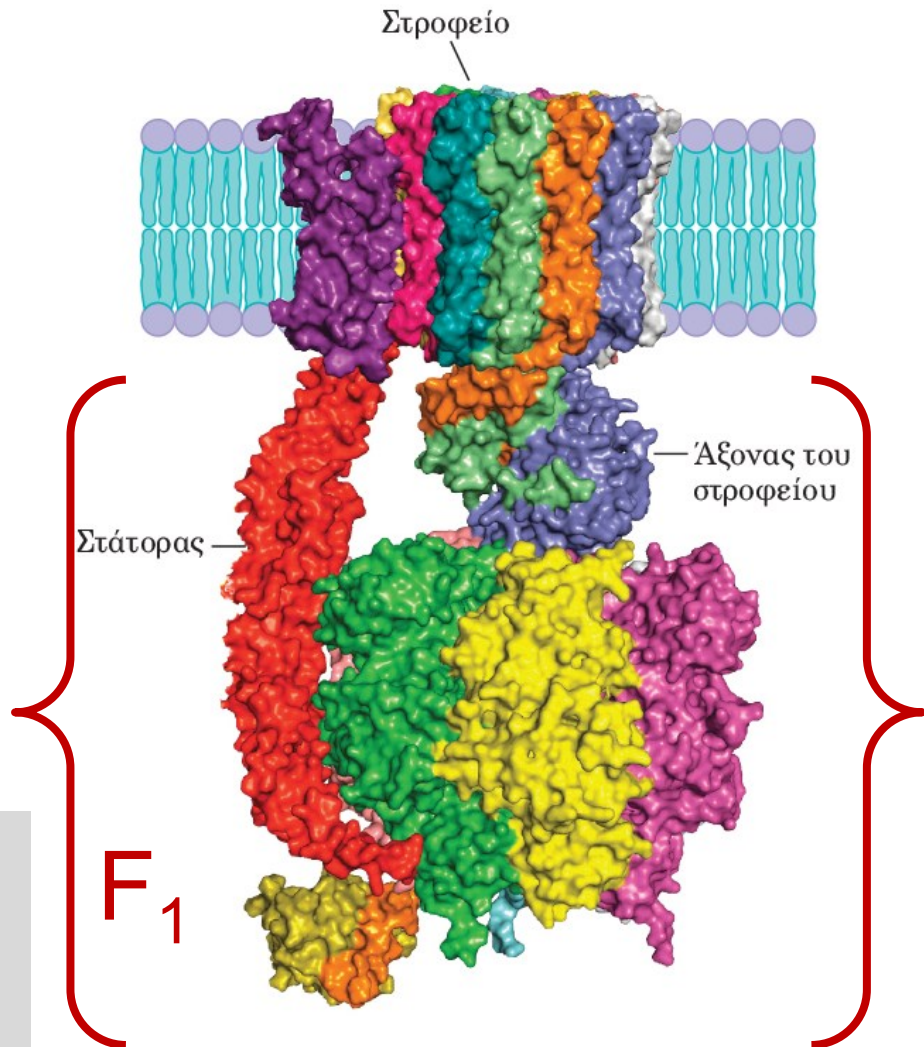
Η απάντηση βρίσκεται στο μιτοχονδριακό σύμπλοκο που αποκαλείται F_1F_0 - συνθάση του ATP.

Το F_1 τμήμα της συνθάσης του ATP αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες μιτοχονδριακών παρασκευασμάτων, με τη μορφή σφαιρικών προεξοχών ή σωματιδίων 8,5 nm στην εσωτερική μεμβράνη.

Τα απομονωμένα σωματίδια καταλύουν την υδρόλυση του ATP, την αντίστροφη αντίδραση της συνθάσης του ATP.

Απογυμνωμένη από αυτά τα σωματίδια, οι μεμβράνες μπορούν ακόμη να διεκπεραιώσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων αλλά δεν μπορούν να συνθέσουν ATP.

Η συνθάση του ATP είναι μια αξιοσημείωτη μοριακή μηχανή. Είναι ένα ένζυμο, μια αντλία πρωτονίων και ένας περιστρεφόμενος μοριακός κινητήρας.



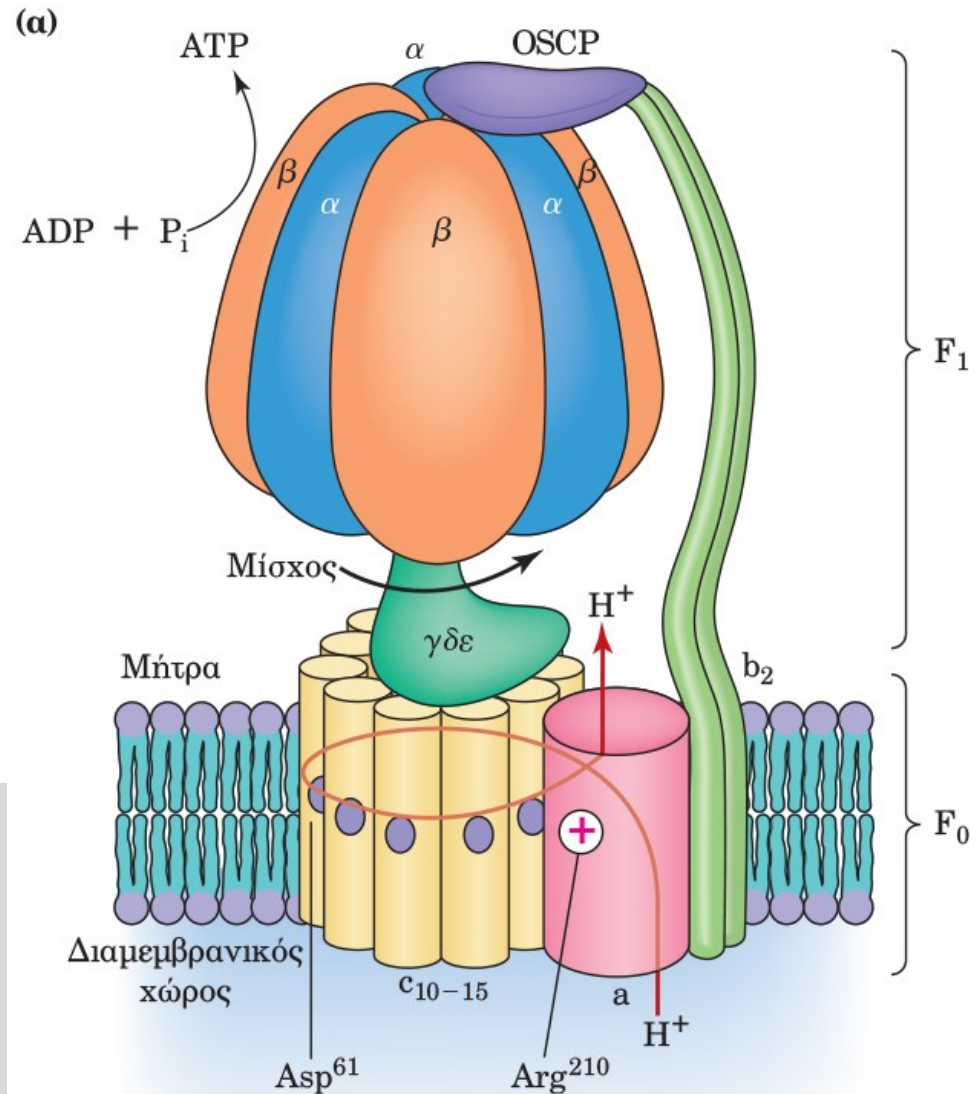
Η δομή της συνθάσης του ATP

Οι σφαιρικές δομές που παρατηρούνται αποτελούν τη **μονάδα F_1** , που καταλύει τη σύνθεση του ATP. Αυτές οι σφαίρες F_1 είναι συνδεδεμένες σε ένα ολομεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποκαλείται **μονάδα F_0 (F_0 unit)**.

Η F_1 αποτελείται από πέντε πολυπεπτιδικές αλυσίδες αποκαλούμενες α , β , γ , δ , και ϵ , με στοιχειομετρία υπομονάδων $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$.

Η F_0 διαμορφώνει τον διαμεμβρανικό πόρο ή διάυλο δια μέσου του οποίου κινούνται τα πρωτόνια για να ωθήσουν τη σύνθεση του ATP και περιλαμβάνει τρεις υδρόφοβες υπομονάδες που συμβολίζονται με a , b , και c , με στοιχειομετρία $a_1b_2c_{8-15}$.

Οι α - και b -υπομονάδες της F_0 διαμορφώνουν μέρος του **στάτορα (stator)** – ενός στατικού στοιχείου αγκυροβολημένου στη μεμβράνη - και ο δακτύλιος με τις 8 έως 15 c -υπομονάδες συνιστά ένα βασικό συστατικό του **στροφείου (rotor)** του κινητήρα.



ΠΙΝΑΚΑΣ 20.2		Οργάνωση των υπομονάδων της F_1F_0 -ATP συνθάσης του ζυμομύκητα		
Σύμπλοκο	Λειτουργία πρωτεϊνικής υπομονάδας	Μάζα (kD)	Στοιχειομετρία	
F_1	α	55,4	3	Στάτορας
	β	51,3	3	Στάτορας
	γ	30,6	1	Στροφείο
	δ	14,6	1	Στροφεϊοτ
	ϵ	6,6	1	Στροφείο
F_0	a	2,9	1	Στάτορας
	b	2,3	1	Στάτορας
	c	7,8	8–15*	Στροφείο
	d	19,7	1	Στάτορας
	h	10,4	1	Στάτορας
	OSCP	20,9	1	Στάτορας

Οι δομές F_0 στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και τα φυτά έχουν 10 έως 15 c-υπομονάδες, ενώ μόνο 8 c-υπομονάδες βρίσκονται στις δομές F_0 των σπονδυλωτών και όλες ή στις περισσότερες δομές των ασπονδύλων.

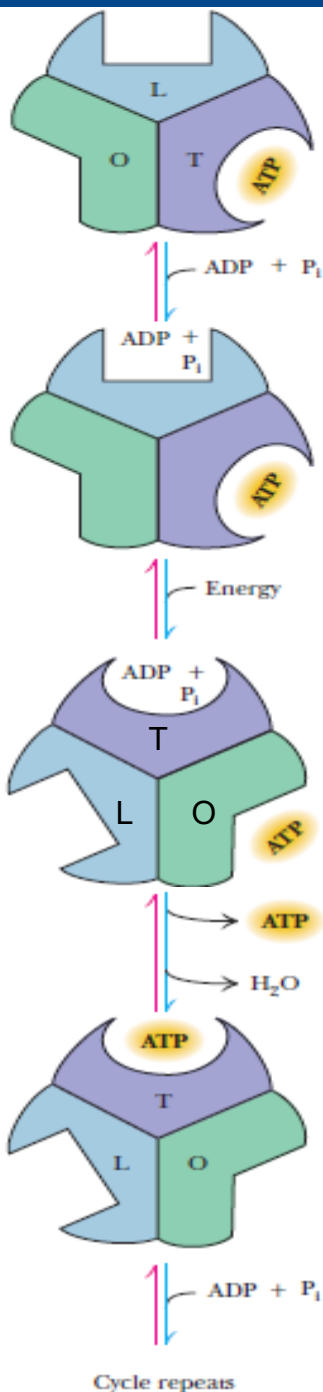
Με ποιο τρόπο η ροή πρωτονίων ωθεί την σύνθεση του ATP;

Αυτό επιτυγχάνεται μέσω περιστροφής της γ υπομονάδας του F_1 που προσδίδει ασυμμετρία στο εξαμερές $\alpha_3\beta_3$ και αναγκάζει τις τρεις καταλυτικές β-θέσεις να έχουν τρεις τελείως διαφορετικές στερεοδιαμορφώσεις:

- την ανοικτή (O) διαμόρφωση με σχεδόν καμία συγγένεια για το υπόστρωμα,
- τη χαλαρή (L) διαμόρφωση με χαμηλή συγγένεια και
- την σφιχτή (T) διαμόρφωση με υψηλή συγγένεια.

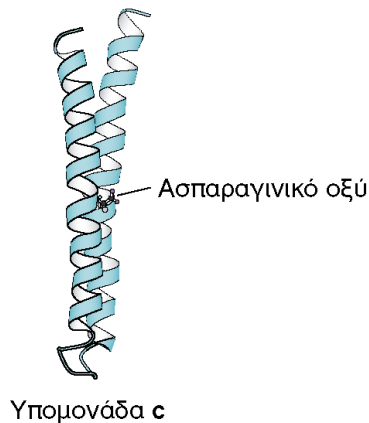
Ο μηχανισμός αλλαγής δέσμευσης για τη σύνθεση του ATP.

- Η σύνθεση του ATP ξεκινά με πρόσδεση των ADP και P_i σε μία θέση L.
- Στο δεύτερο βήμα, μια ενεργειακά εξαρτώμενη αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης, εξαιτίας της περιστροφής της γ υπομονάδας κατά 120° αντίθετα προς τη φορά των δεικτών του ωρολογίου, μετατρέπει τη θέση L σε T, την T σε O και την O σε L.
- Στο τρίτο βήμα, το ATP συντίθεται στη θέση T και απελευθερώνεται από τη θέση O.
- Δύο επιπλέον περάσματα μέσω αυτού του κύκλου παράγουν δύο ακόμη ATP και επιστρέφουν το ένζυμο στην αρχική του κατάσταση.

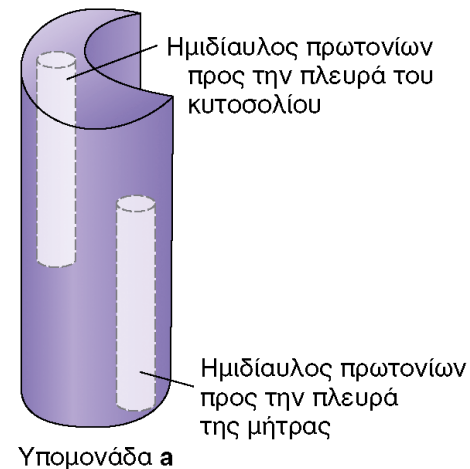


Πως η ροή των πρωτονίων μέσω της F_0 ωθεί την περιστροφή της υπομονάδας γ ;

Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται από τις δομές των υπομονάδων **a** και **c** της πρωτονιοαγωγού μονάδας F_0 της συνθάσης του ATP.

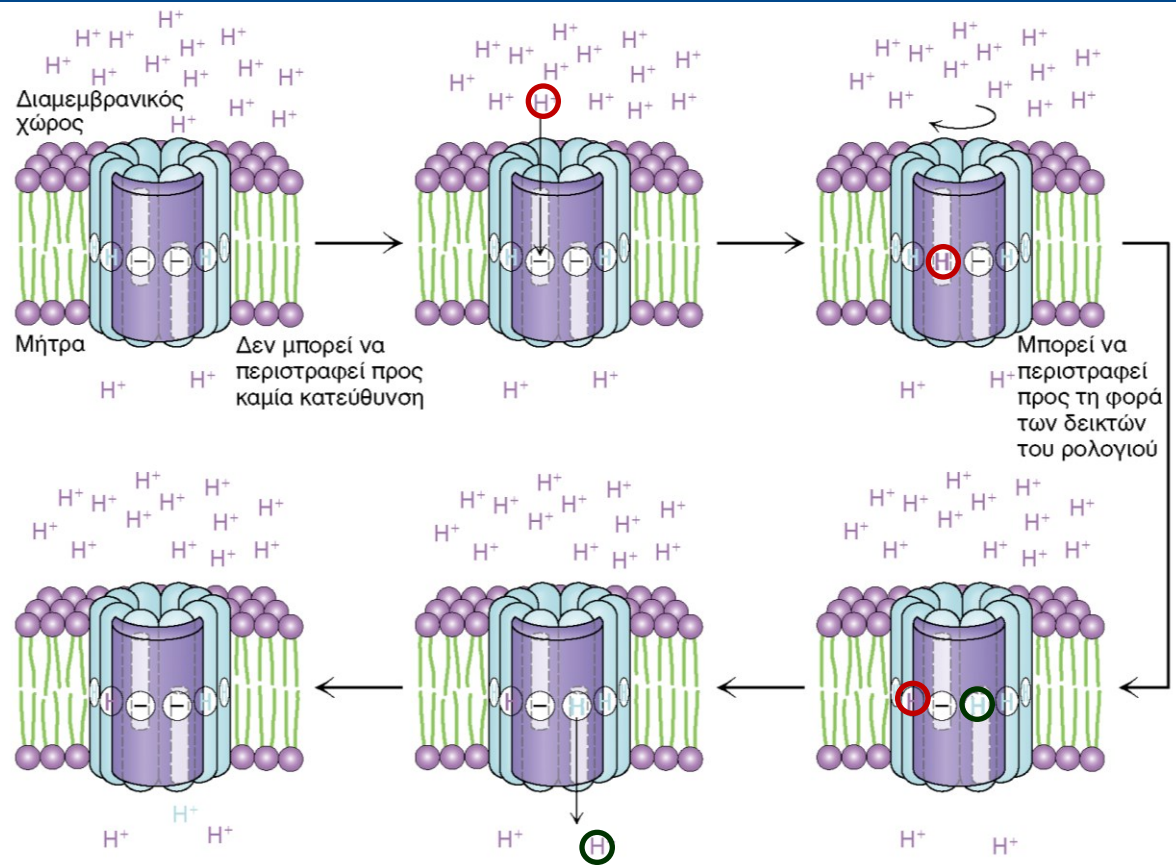


Η υπομονάδα c αποτελείται από δύο α -έλικες, οι οποίες διαπερνούν τη μεμβράνη.



Η υπομονάδα a περιέχει δύο ημιδιάυλους, οι οποίοι επιτρέπουν σε πρωτόνια να εισέλθουν και να διαπεράσουν, εν μέρει και όχι πλήρως, τη μεμβράνη.

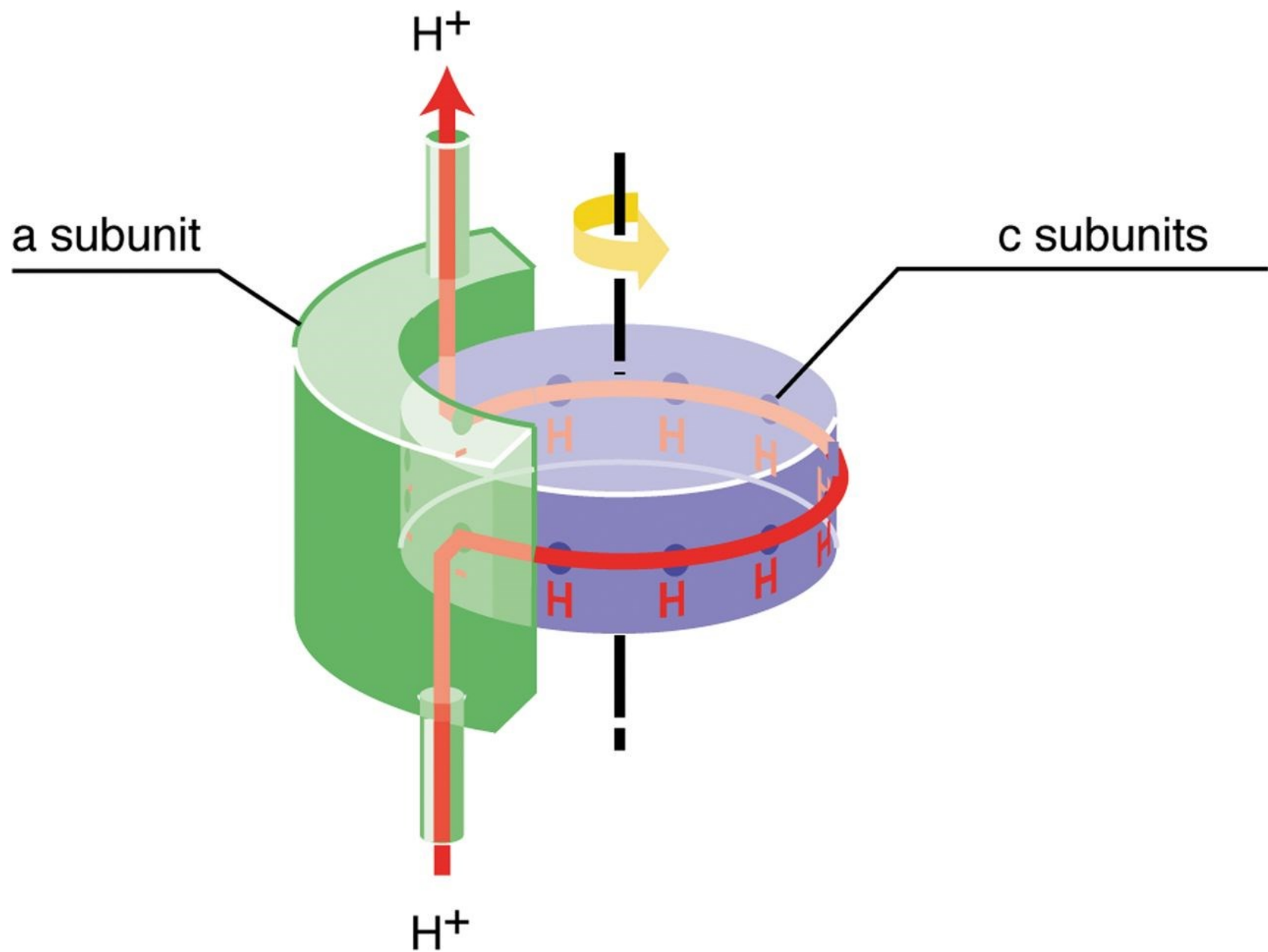
Η κίνηση των πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης ωθεί την περιστροφή του δακτυλίου c.



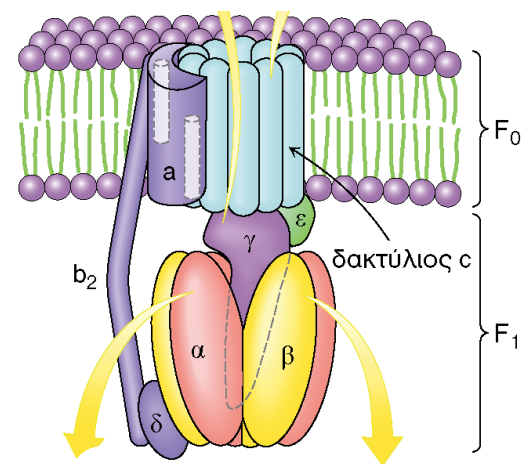
Ένα πρωτόνιο εισέρχεται από τον διαμεμβρανικό χώρο στον διαμεμβρανικό ημιδιάυλο της υπομονάδας a και εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο σ' ένα κατάλοιπο ασπαρτικού της υπομονάδας c.

Με το συγκεκριμένο φορτίο εξουδετερωμένο, ο δακτύλιος c μπορεί να περιστραφεί προς τη φορά των δεικτών του ρολογιού κατά μια υπομονάδα c

Το πρωτόνιο του ασπαρτικού της διπλανής υπομονάδας c έρχεται τώρα σε επαφή με τον ημιδιάυλο της μήτρας και μπορεί τότε να μετακινηθεί προς αυτή, επαναφέροντας το σύστημα στην αρχική του κατάσταση.



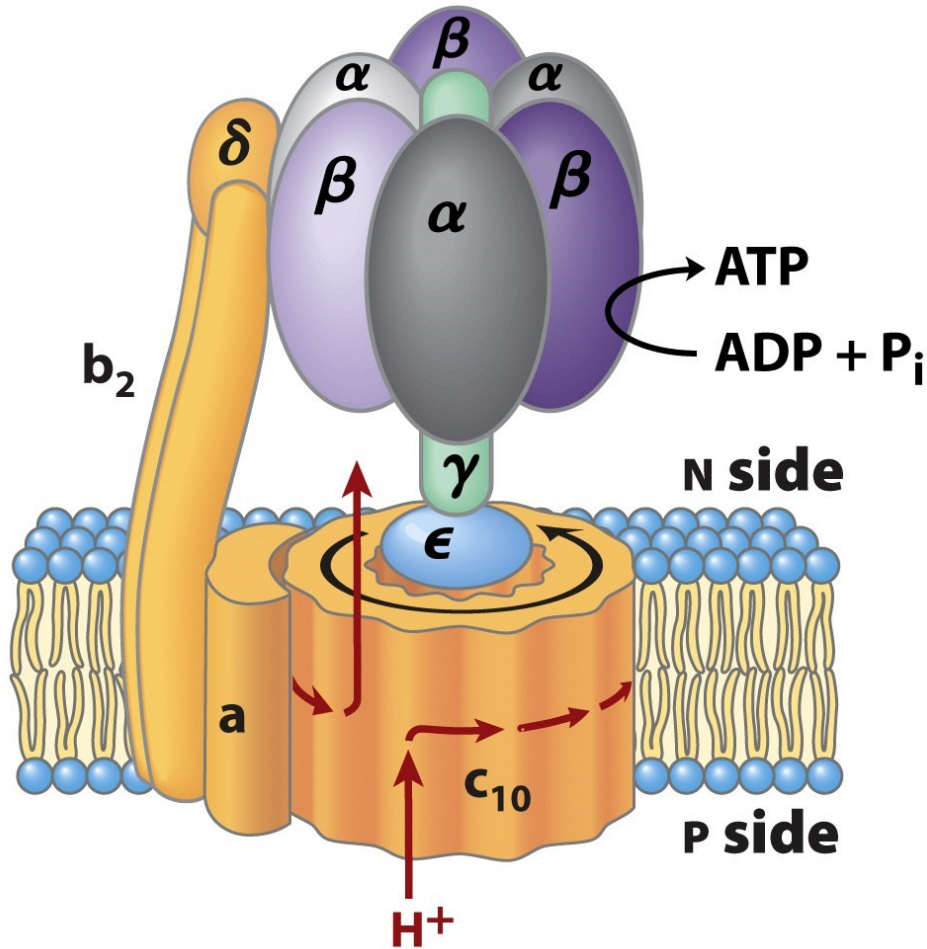
Ο δακτύλιος c είναι στέρεα δεσμευμένος στις υπομονάδες γ και ε. Άρα, η περιστροφή του δακτυλίου c, που ωθείται από τη βαθμίδωση της συγκέντρωσης των πρωτονίων, ωθεί την περιστροφή της υπομονάδας γ. Η παρουσία όμως των αλυσίδων b_2 και δ εμποδίζει την περιστροφή του εξαμερούς. Το γεγονός αυτό εξασφαλίζει **αλλαγή στη συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ της γ υπομονάδας και των τριών υπομονάδων β** του εξαμερούς $\alpha_3\beta_3$, από τη σφιχτή στερεοδιάταξη T, η οποία περιέχει το νεοσυντιθέμενο ATP που δεν μπορεί να απελευθερωθεί, να περνάμε στην ανοιχτή στερεοδιάταξη O και το ATP να απελευθερώνεται στη μιτοχονδριακή μήτρα.



Πόσα πρωτόνια χρειάζονται για τη σύνθεση ενός ATP;

Εξαρτάται από τον οργανισμό. Γιατί;

Το βιοενεργειακό κόστος της σύνθεσης ενός ATP **εξαρτάται από τον αριθμό των υπομονάδων c** του δακτυλίου της ATP συνθάσης, ο οποίος ποικίλει ευρέως μεταξύ των οργανισμών.

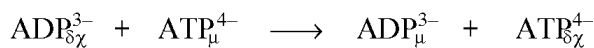
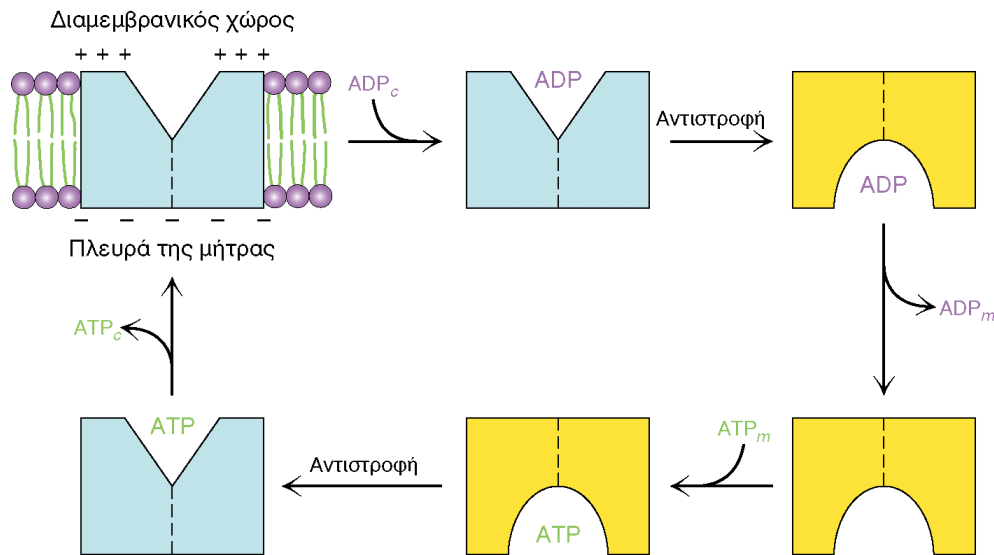


- Από την άλλη πλευρά, τα στοιχεία δείχνουν ότι όλα τα σπονδυλωτά και όλα ή τα περισσότερα ασπόνδυλα περιέχουν δακτυλίους C με οκτώ μόνο υπομονάδες. Έτσι, τα περίπου 50.000 σπονδυλωτά και δύο εκατομμύρια ασπόνδυλα στη γη απαιτούν $8/3$ ή **2.7 πρωτόνια για να σχηματίσουν ένα ATP**.

- Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, τους χλωροπλάστες και τους μύκητες, οι συνθάσες ATP έχουν αναπτύξει μια σειρά μεγθών δακτυλίου c από 10 έως 15 υπομονάδες.
- Από τη στιγμή που μία στροφή του c-δακτυλίου παράγει 3 ATP, το κόστος κατασκευής ενός ATP ποικίλλει από $3,3$ ($10/3$) έως 5 ($15/3$) πρωτόνια.

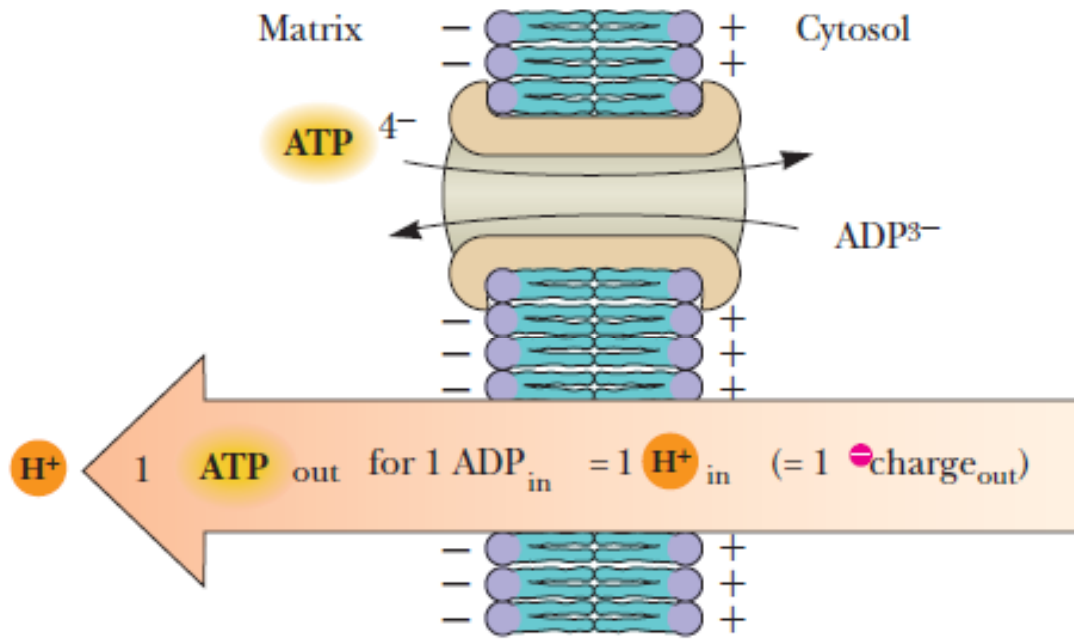
Η είσοδος του ADP στα μιτοχόνδρια απαιτεί την έξοδο του ATP.

Το ADP και ATP δεν διαχέονται ελεύθερα δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ένας ειδικός μεταφορέας – **η μετατοπάση ATP-ADP** είναι υπεύθυνος για την ελεγχόμενη κίνηση αυτών των υψηλά φορτισμένων μορίων. Μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα αυτού του μεταφορέα είναι το γεγονός ότι οι ροές των ATP και ADP είναι συζευγμένες. **Το ADP εισέρχεται στη μιτοχονδριακή μήτρα μόνο εάν εξέρχεται ATP και αντίστροφα.**



Η μετατοπάση ATP-ADP βρίσκεται σε αφθονία στην εσωτερική μεμβράνη, αποτελώντας περίπου το 14% των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Είναι ένα διμερές δύο υπομονάδων και περιέχει μία μόνο θέση σύνδεσης νουκλεοτιδίου, η οποία εναλλακτικά «βλέπει» προς το διαμεμβρανικό χώρο ή τη μήτρα.

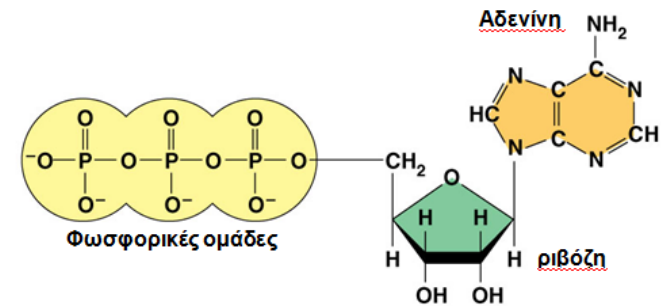
Η μετακίνηση του ATP προς το κυτταρόπλασμα ευνοείται έναντι της αντίστοιχης μετακίνησης του ADP.



Δεδομένου ότι η εσωτερική μεμβράνη είναι θετικά φορτισμένη έξω γίνεται σαφές ότι η εξωτερική κίνηση του ATP ευνοείται από την εξωτερική κίνηση του ADP, εξασφαλίζοντας ότι το ATP θα μεταφερθεί έξω.

Η εσωτερική κίνηση του ADP ευνοείται έναντι της εσωτερικής κίνησης του ATP για τον ίδιο λόγο.

Το φορτίο του ATP σε pH περίπου 7,2 είναι -4, και το φορτίο του ADP στο ίδιο pH είναι -3.



Έτσι, η καθαρή ανταλλαγή ενός ATP (έξω) για ένα ADP (μέσα) έχει ως αποτέλεσμα την καθαρή κίνηση ενός αρνητικού φορτίου από τη μήτρα στο κυτταρόπλασμα.

(Αυτή η διαδικασία είναι ισοδύναμη με την κίνηση ενός πρωτονίου από το κυτοσόλιο στη μήτρα.)

Ποια είναι η αναλογία P/O για την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση στα σπονδυλωτά;

Η αναλογία P/O είναι ο αριθμός των μορίων του ATP που σχηματίζονται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς δύο ηλεκτρόνια ρέουν από την ανηγμένη μορφή ενός συνενζύμου στο μοριακό οξυγόνο.

Η αναλογία αυτή εξαρτάται από τον αριθμό των πρωτονίων που μετακινούνται από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο κατά την επανοξείδωση των συνενζύμων NADH ή FADH₂, καθώς και από τον αριθμό των πρωτονίων που απαιτούνται για τη σύνθεση ενός ATP.

Ο τελευταίος, εξαρτάται από τον αριθμό των υπομονάδων c του δακτυλίου της ATP συνθάσης και υπολογίστηκε για τα σπονδυλωτά σε 2,7 πρωτόνια / μόριο συντιθέμενου ATP.

Εδώ, πρέπει να προσθέσουμε και ένα επιπλέον H⁺ που απαιτείται για τη μεταφορά του σχηματιζόμενου ATP στο κυτταρόπλασμα.

Συνεπώς, η αναλογία P/O για το **NADH είναι $10 \text{ H}^+ / 3,7 \text{ H}^+ = 2.7$**
και για το **FADH₂ είναι $6 \text{ H}^+ / 3,7 \text{ H}^+ = 1.6$**

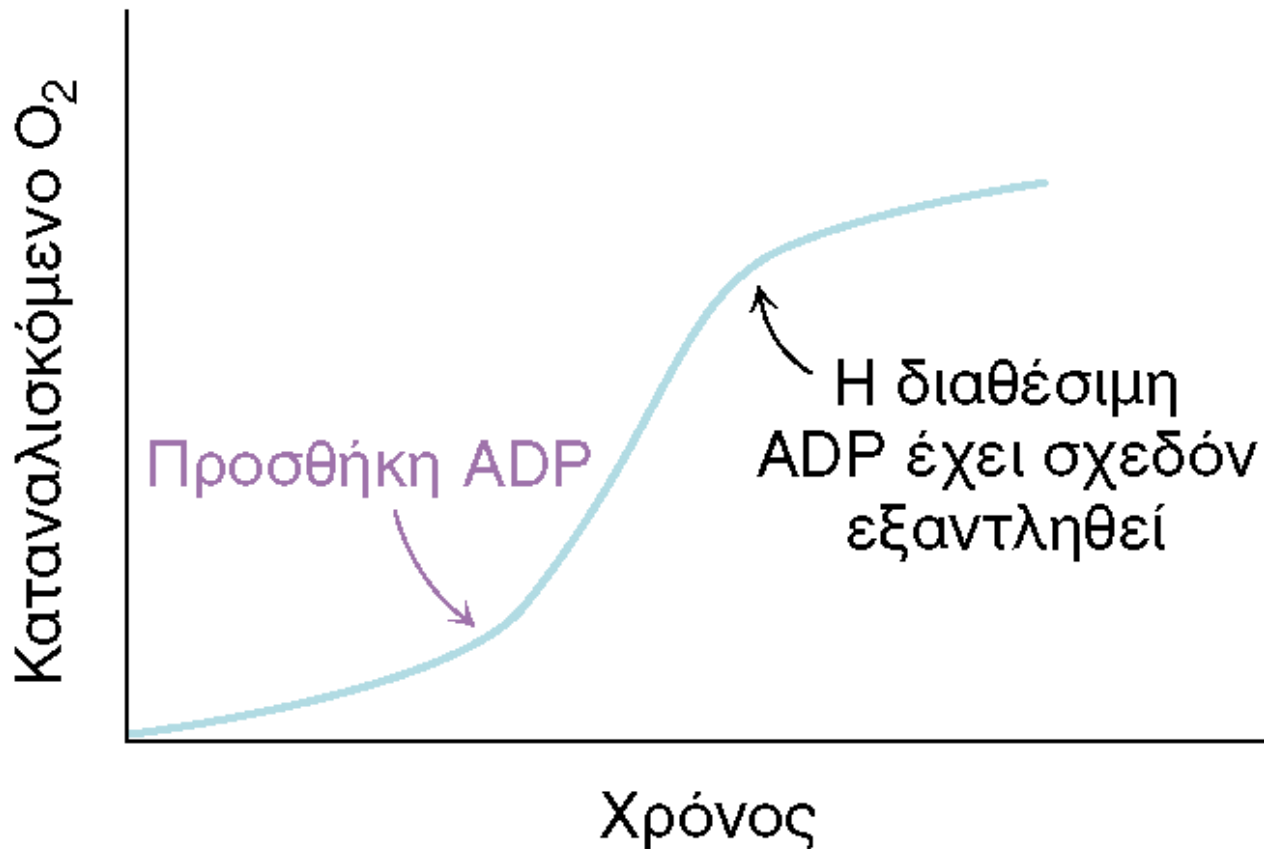
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ

Πώς ελέγχεται ο ρυθμός της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων; Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η μεταφορά των ηλεκτρονίων των ανηγμένων συνενζύμων στο O_2 , είναι στενά συνδεδεμένη με τη φωσφορυλίωση του ATP. Έτσι, η οξειδωτική φωσφορυλίωση απαιτεί:

- NADH (ή άλλη πηγή ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού)
- O_2
- ADP
- P_i

Ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει το ρυθμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι το επίπεδο του **ADP**. Η ρύθμιση αυτή ονομάζεται **αναπνευστικός έλεγχος** και ο μηχανισμός αυτός έχει ιδιότητες αυτορύθμισης.

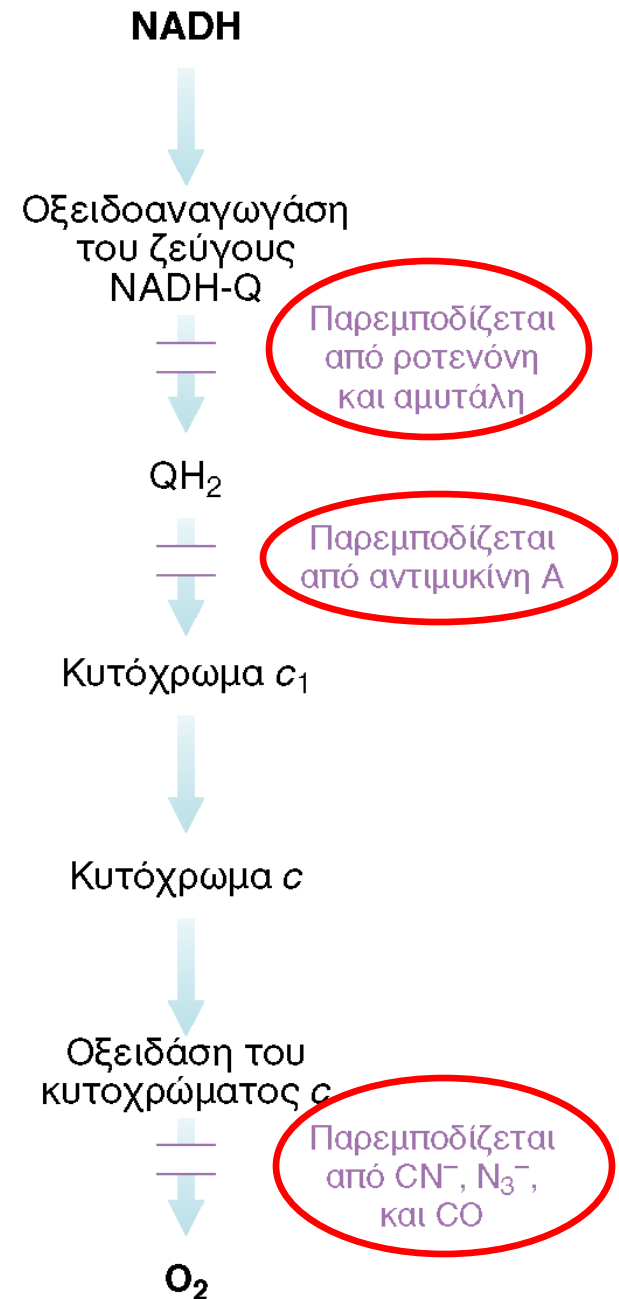
π.χ. σε περίπτωση μεγάλης κατανάλωσης ενέργειας (έντονη μυϊκή εργασία) παράγεται ADP, οπότε διεγείρεται η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και το ADP επαναφωσφορυλιώνεται προς ATP.



Ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου σ' ένα ομοιογενές παρασκεύασμα ιστών αυξάνεται ταχύτατα όταν προστεθεί ADP και μετά μειώνεται στον αρχικό ρυθμό, όταν το ADP που προστέθηκε έχει μετατραπεί σε ATP.

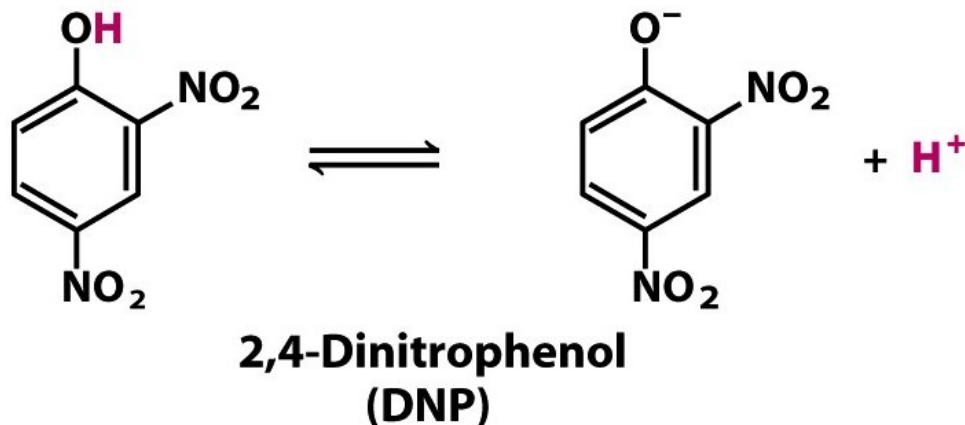
Αναστολείς της αναπνευστικής αλυσίδας και της φωσφορυλίωσης

Η **ολιγομυκίνη** και το **DCCD** (δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμίδιο) είναι αναστολείς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αναστέλλοντας τη δράση της συνθάσης του ATP, αλλά λόγω της σύζευξης αναστέλλεται και η μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας.

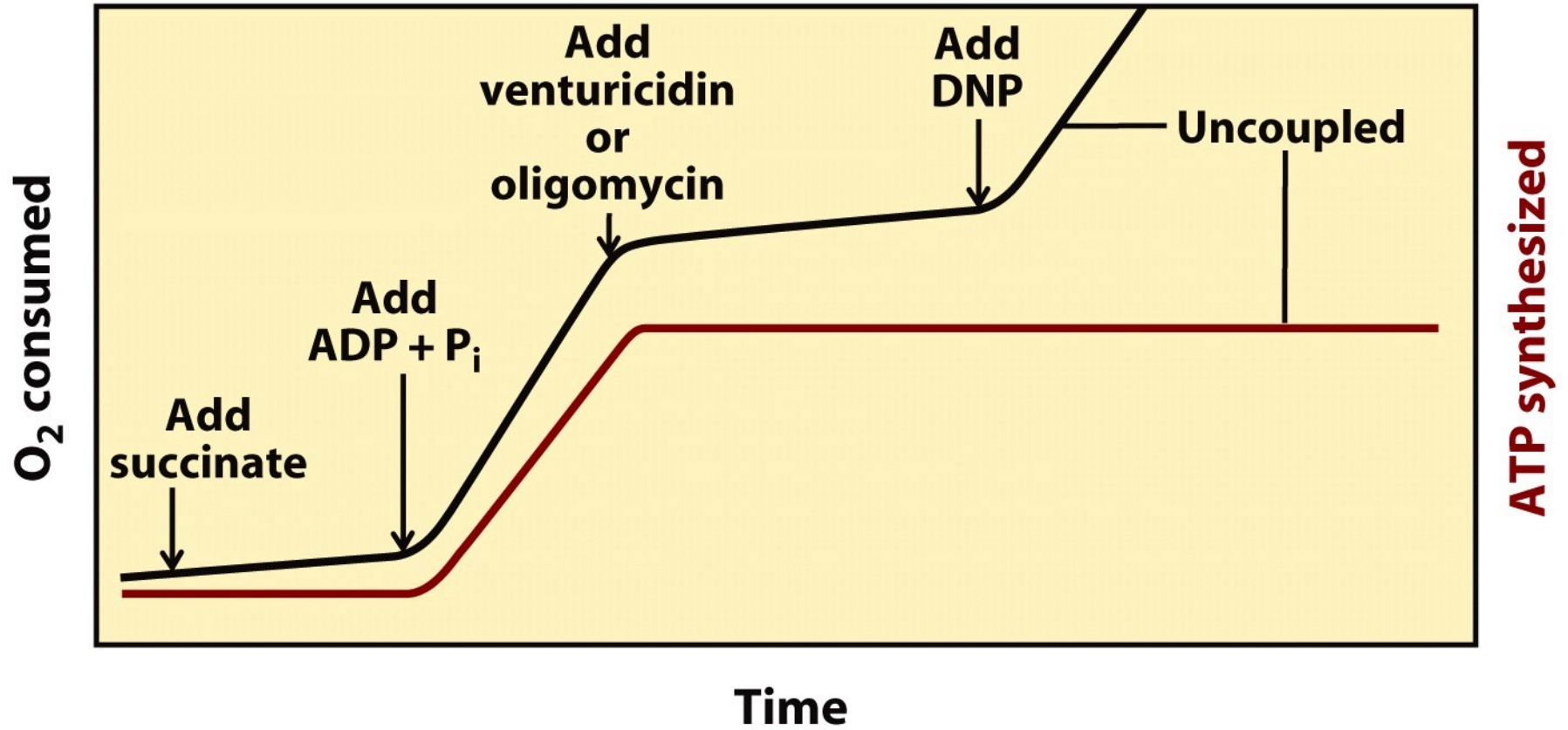


ΑΠΟΣΥΖΕΥΚΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η σφικτή σύζευξη μεταφοράς ηλεκτρονίων και φωσφορυλίωσης διακόπτεται από την **δινιτροφαινόλη (DNP)** και μερικές άλλες όξινες αρωματικές ουσίες (**αποσυζευκτικές ουσίες**).



Οι ουσίες αυτές είναι ισχυρά υδρόφοβες και συνεπώς μπορούν να μεταφέρουν πρωτόνια κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ροή δηλαδή των ηλεκτρονίων από το NADH προς το O₂ προχωρά κανονικά, αλλά δεν σχηματίζεται ATP μια και η γραμμικά μεταβαλλόμενη κλίση πρωτονίων διαταράσσεται.



Αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Η αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ένα μέσο για την παραγωγή θερμότητας ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία του σώματος σε ζώα που βρίσκονται σε χειμερία νάρκη, σε ορισμένα νεογέννητα ζώα, καθώς και σε θηλαστικά προσαρμοσμένα στο ψύχος.

Η πρωτεΐνη αποσύζευξης UCP που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων του λιπώδους ιστού, ενεργοποιείται από τα λιπαρά οξέα ως απόκριση σε ορμονικά ερεθίσματα.

