

9. Dýchací řetězec a oxidativní fosforylace

mitochondriální syntéza ATP a fotosyntéza

CHEMIOSMOTICKÁ TEORIE SYNTÉZY ATP

- Heterotrofní organismy získávají hlavní podíl energie (cca 90%) uložené ve struktuře molekul živin, během procesu - **respirace, neboli buněčné dýchání**
- Při tomto ději se elektrony odebrané aktivovaným vodíkům atomům kyslíku přenášejí pomocí složitého **systemu oxidoreduktas** lokalizovaných v oddělených komplexech
- Protony jsou při tomto procesu přesunovány na druhou (cytosolární) stranu nepropustné vnitřní mitochondriální membrány, kde se hromadí.
- Průchod protonů zpět je umožňován speciálním enzymem **ATP-asou**, který využívá jejich energii k syntéze ATP z ADP a kyseliny fosforečné (anorganického fosfátu)
- Proces probíhá v mitochondriích.
- Oxidoredukční komplexy I – IV a ATP-asa- obsaženy v mitochondriální membráně - nepropustná pro ionty a elektroneutrální molekuly s molekulovou hmotností nad 150

ATP prochází touto membránou řízeným přenosem výměnou za ekvivalentní množství ADP.



- Získávání energie - **slučování vodíku a kyslíku na vodu**.
 - **reakce je silně exergonická** ($\Delta G^{\circ} = - 237 \text{ kJ/mol}$)
(**přímá reakce je nerealizovatelná, vzniká třaskavý plyn - exploze**)

-> kaskáda OXIDOREDUKTÁZ

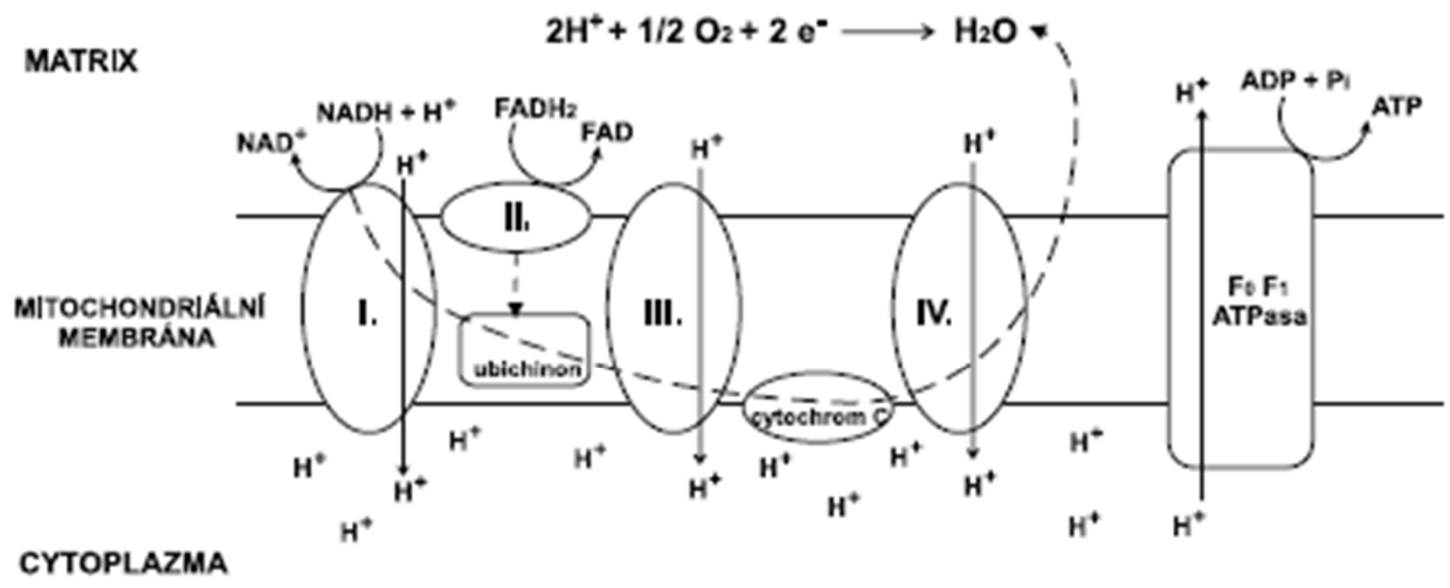
- stupňovitě zvyšují redox potenciál aktivovaného vodíku z hodnoty $-0,32 \text{ V}$ (vázaného v $\text{NADH} + \text{H}^+$) až na redox potenciál kyslíku $+0,82 \text{ V}$.
- Každý komplex redukován komplexem předešlým
- Elektrická práce je transformována na práci osmotickou přenosem protonů proti koncentračnímu spádu.
- Ze dvou aktivovaných vodíků získána energie pro 3 molekuly ATP (cca 105 kJ/mol)
 - >účinnost chemiosmotické syntézy ATP 45%
 - >zbylá energie se přeměňuje na teplo



TRANSFER PROTONŮ A ELEKTRONŮ V DÝCHACÍM ŘETĚZCI

- Oxidoreduktasy savčích dýchacích řetězců jsou uspořádány do pěti komplexů zakotvených ve vnitřní mitochondriální membráně a označovaných I – IV, jako komplex V je označována ATP-asa
- Komplex II. je periferní, zakotvený na matrixové straně,
- komplexy I a III – V jsou integrální a procházejí celou šířkou vnitřní mitochondriální membrány. Komplex III je spojen s komplexy I a II pomocí mobilních přenašečů na bázi ubichinonu a s komplexem IV pomocí mobilního cytochromu c





Respirační řetězec



FUNKCE KOMPLEXŮ I – V

KOMPLEX I.

- Komplex I = NADH-ubichinonreduktasu
- katalyzuje redukci semichinoidní formy ubichinonu na ubichinol.
- Tento systém funguje přesně podle obecného chemiosmotického mechanismu.
- Jeho základem je flavoprotein NADH-dehydrogenasa, obsahující vedle koenzymu FMN další prosthetické skupiny typu FeS.
- NADH-ubichinonreduktase se na se na matrixové straně redukuje $\text{NADH} + \text{H}^+$, převezme dva aktivované vodíky a na cytosolární straně předá dva elektrony transelektronase Fe_4S_4 .
- Dva protony jsou vytlačeny do cytosolárního prostoru a oxidovaný FMN je připraven pro novou redukci $\text{NADH} + \text{H}^+$.
- Transelektronasa Fe_4S_4 předává dva elektrony transelektronase Fe_2S_2 , která předává jeden elektron po druhém semichinoidní formě ubichinonu opět na matrixové straně.



KOMPLEX II

- Tento komplex je nejjednodušší ze všech.
- Základem jeho funkce je sukcinátdehydrogenasa, flavoprotein obsahující prosthetickou skupinu FAD a dvě skupiny Fe_2S_2 .
- Vedle toho tento protein obsahuje skupinu typu Fe_4S_4 a cytochrom b, jejichž význam není zatím známý.
- Rovněž přenos elektronů v komplexu není zcela vysvětlen.
- Systém produkuje ubichinol.
- Tento komplex II nepřenáší protony do cytoplasmatického prostoru.



KOMPLEX III

- Tento komplex zpracovává ubichinol dodávaný z komplexů I a II
- Jeho funkce spočívá v reoxidaci ubichinolu na semichinoidní formu pomocí ubichinol: cytochrom c-oxidoreduktasy.
- Základní princip chemiosmotického mechanismu je komplikován tím, že transport H^+ se děje cyklickým pochodem.
- Základní funkční složkou systému jsou dvě molekuly cytochromu b (b_T a b_K) z nichž pouze b_T je redukovatelná ubichinolem.
- Dále systém obsahuje cytochrom c_1 a molekulu Fe_2S_2 -proteinu, jehož funkce opět není jasná.
- Komplex cytochromu b přebírá od ubichinolu jeden elektron a oxiduje ho na semichinoidní formu, přičemž je vypuzen jeden proton do cytosolárního prostoru, semichinoidní forma je dále oxidována na ubichinon cytochromem c_1 za současného vypuzení druhého protonu do cytosolárního prostoru.
- Ubichinon pokračuje k cytochromu b (části b_K), kde získává zpět elektron, který na začátku předal, a z matrixového prostoru přibírá jeden proton.
- V tomto okamžiku začíná další okruh s jedním přijatým elektronem.
- Je zřejmé, že na jeden přijatý elektron jsou do cytosolárního prostoru vypuzeny dva protony a jeden elektron je přenesen na mobilní cytochrom c.



KOMPLEX IV

- Funguje jako ferrocytochrom c: kyslík-oxidoreduktasa (cytochromoxidasa).
- Mechanismus funkce tohoto komplexu je nejméně jasný ze všech oxidoredukčních mitochondriálních systémů.
- Komplex se skládá ze sedmi bílkovinných podjednotek a jeho funkčními složkami jsou cytochromy a, a₃ a ionty mědi ve stechiometrickém poměru 1:1:2.
- Má tvar písmene Y, jehož „noha“ směřuje na cytosolární stranu membrány a obě ramena pronikají jeho matrixovou stranou. Ionty mědi tvoří páry s jednotlivými cytochromy; oxidovaná forma přijímá elektrony na cytosolární straně od cytochromu c a vytváří plně redukovanou formu (Cu₂⁺Fe₂²⁺), která na matrixové straně postupně redukuje O₂ na dva oxidové ionty a přechází na plně oxidovanou formu (Cu₂²⁺Fe₂³⁺).
- Tento komplex nezpůsobuje přenos H⁺ přes membránu, ale přesto zvyšuje pH matrixového prostoru protonací vzniklých oxidových iontů.
- Součinností komplexů I, III a IV jsou tedy přeneseny dva elektrony ze dvou aktivovaných vodíků NADH + H⁺ na kyslík za vzniku 1/2O₂²⁻ a současně je přesunuto šest protonů do cytosolárního prostoru.
- Ty podle diagramu umožní syntézu 3 molekul ATP.
- Součinností komplexů II, III a IV jsou přeneseny dva elektrony z aktivovaných vodíků FADH₂ na kyslík za vzniku 1/2O₂²⁻ a současně jsou přesunuty čtyři protony na cytosolární stranu, které umožňují syntézu 2 molekul ATP.



KOMPLEX V

- Výroba ATP probíhá v komplexu V označovaném jako ATP-synthasa.
- Úplný komplex má podjednotkovou strukturu a skládá se ze dvou částí.
- Část označovaná CF_0 je uložena v membráně a skládá se z bílkoviny F_0 (obsahuje čtyři podjednotky) tvořící protonový kanál umožňující návrat protonů z cytoplasmového prostoru.
- Na F_0 se váže část OSCP (oligomycine-sensitivity-conferring-protein) citlivá k antibiotiku oligomycinu.
- Na složku CF_0 se váže složka F_1 , která je vlastní mitochondriální ATP-ase.
- Skládá se z pěti podjednotek α , β , γ , δ a ϵ , z nichž každá je obsažena dvakrát.
- Průchod dvou protonů kanálem vede na katalytické složce F_1 k syntéze ATP z ADP a P_i .
- Pro mechanismus této reakce byly navrženy dva modely.



- Přímý mechanismus vzniku ATP předpokládá odtržení jednoho kyslíkového atomu fosfátového iontu působením transferasových protonů a „neutralizaci“ tím vzniklého kladného náboje na atomu fosforu volným elektronovým párem kyslíku koncového fosfátu ADP
- Nepřímý mechanismus je založen na konformační změně složky F_1 při průchodu obou protonů kanálem F_0 .
- Předpokládá se, že aminokyselinové složení aktivního místa v základním stavu kompletního systému vede k vytvoření vazby mezi ADP a fosfátem (tj. eliminaci H_2O a tvorbě ATP), pokud jsou reakční složky vázány na bílkovinu.
- Průchodem dvou elektronů se změní konformace aktivního místa, takže se předtím vytvořený ATP uvolní od složky F_1 .
- Systém se pak vrací do základního stavu, čímž se vytvoří další pevně vázaná molekula ATP.



- Pevné spojení mezi oxidací a fosforylací narušují látky zvané „odpojovače“.
- Jedním z typů těchto sloučenin jsou slabé lipofilní kyseliny (2,4-dinitrofenol).
- Jejich lipofilita umožňuje snadnou difúzi membránou z cytosolární na matrixovou stranu.
- Zvýšení pH na této straně vede k odštěpení protonu do matrixu a k tvorbě lipofilního fenolátového iontu, který difunduje zpět na cytosolární stranu, kde v oblasti nízkého pH přijímá proton a celý proces se opakuje.
- Obdobně působí antibiotika např. valinomycin.
- Ten má schopnost vázat iont K^+ polárními atomy peptidových vazeb.
- Nepochární postranní řetězce aminokyselinových zbytků peptidu způsobují lipofilitu vnějšího okraje kruhu a draselný iont se stává rozpustným v organických rozpouštědlech a může difundovat membránou.
- Tímto přenosem se vyrovnává záporný potenciál membrány způsobený neutralizací aniontů (od kterých byly protony přeneseny do cytosolu) a tím se snižuje účinnost komplexu V.



FOTOSYNTÉZA A FOTOCHEMICKÁ PRODUKCE NADP + H⁺ A ATP

- Fotosyntéza zahrnuje:
 - necyklickou fosforylaci (vyrábí NADPH + H⁺ a ATP)
 - cyklickou fosforylaci (vyrábí jen ATP)
 - Calvinův cyklus (z CO₂ a H₂O se pomocí NADPH + H⁺ a ATP syntetizuje D-glukosa).



NECYKLIČKÁ FOSFORYLACE

- Podílí se na ní oba chlorofylové systémy označované P_{700} a P_{680} , označované podle absorpčního maxima.
- Fotosystém P_{700} , který má v základním stavu redoxpotenciál $E^{\circ} = +0,45 \text{ V}$, se ozářením slunečním světlem excituje na P_{700}^* s redoxpotenciálem $E^{\circ} = -0,55 \text{ V}$.
- Excitované elektrony z P_{700}^* jsou na stromatické straně thylakoidní membrány odebrány ferredoxinem ($E^{\circ} = -0,42 \text{ V}$), který je dále předává FAD a ten pomocí H^+ odebíraných ze stromatického prostoru vytvoří $FADH_2$.
- $FADH_2$ je oxidován $NADP^+$ ($E^{\circ} = -0,32 \text{ V}$) za tvorby $NADPH + H^+$.
- V průběhu této redukce se ze stromatického prostoru odeberou na 4 elektrony 2 H^+ (na tvorbu 2 $FADH_2$ se spotřebují 4 H^+ , ale při tvorbě 2 $NADPH + 2 H^+$ jsou 2 H^+ vázány jako hydrid na 2 $NADP^+$ a jen 2 H^+ se regenerují



- Fotosystém P_{680} , který má v základním stavu redoxpotenciál $E^\circ = +0,82 \text{ V}$, se ozářením slunečním světlem excituje na P_{680}^* s redoxpotenciálem $E^\circ = 0 \text{ V}$.
- Čtyři excitované elektrony z P_{680}^* jsou na stromatické straně thylakoidní membrány odebrány plastochinonem, který současně odebírá ze stromatického prostoru 4H^+ , ty přenesou do thylakoidního prostoru a elektrony předá cytochromu c_{552} .
- Ten je předá plastocyaninu, který s jejich pomocí zredukuje P_{700}^+ na výchozí P_{700} .
- Oxidovaný chlorofyl P_{680}^+ je velmi silné oxidační činidlo, které získá čtyři elektrony z oxidace vody a tím přejde na výchozí formu P_{680} .
- Dalším produktem oxidace vody je kyslík a $4 \text{H}^+_{\text{thyl}}$ uvolněné do thylakoidního prostoru.
- Protony shromažďované v thylakoidním prostoru jsou využívány k syntéze ATP.
- Na 4 elektrony, využitě k produkci $2 \text{NADPH} + 2 \text{H}^+$ se v thylakoidním prostoru shromáží celkem 14H^+ (2H^+ se v thylakoidním prostoru spotřebují na tvorbu 2NADPH , $4 e^-$ se uvolní z P_{680}^* a s jejich pomocí jsou 4H^+ přeneseny ze stromatického prostoru do thylakoidního – absolutní diference je 8H^+ a 4H^+ se v thylakoidním prostoru generují při oxidaci vody).
- V procesu fotosyntézy je na jednu syntetizovanou molekulu ATP nutná energie 3H^+ , z nichž 2H^+ zreagují na vodu, ale třetí H^+ je volný a snižuje diferenci H^+ ve stromatu oproti thylakoidnímu prostoru.
- Ze 14H^+ je tedy možno vyrobit více než 3 ATP a méně než 4 ATP ($14 - 3,5 = 10,5 : 3 = 3,5 \text{ ATP}$). Toto množství postačuje pro syntézu glukosy v Calvinově cyklu (spotřeba $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP je v poměru $2 : 3$).
- V případě, že rostlinná buňka má z jiných důvodů nedostatek ATP, fotosystémy se mohou modifikovat na cyklickou fosforylaci, která produkuje pouze ATP.



CYKLIČKÁ FOSFORYLACE

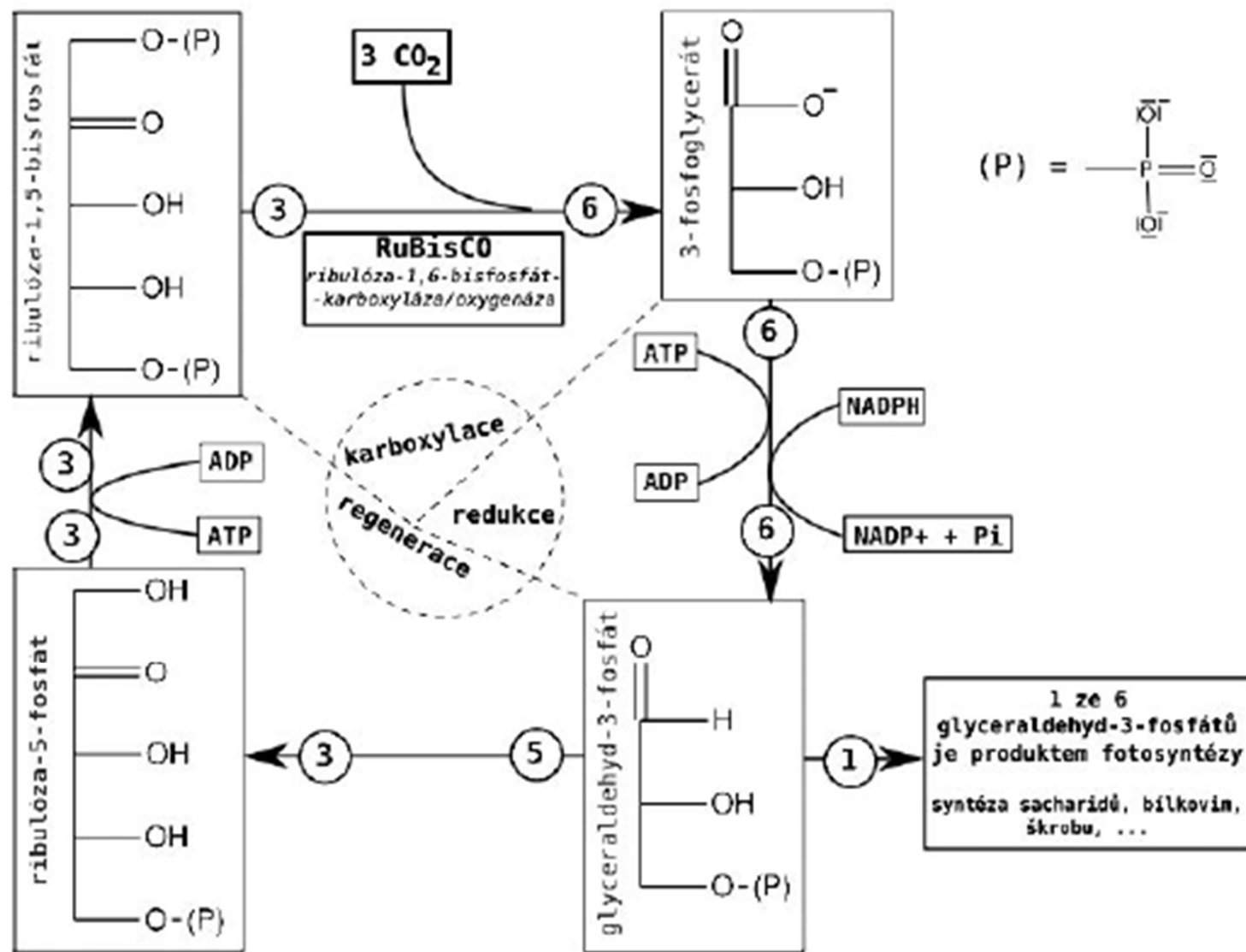
- Podílí se na ní jen chlorofylový systém označený jako P_{700} , jím produkované elektrony jsou přenášeny na ferredoxin a z něho na plastochinon, který přenáší ze stromatického prostoru H^+ do thylakoidního prostoru a elektrony potom předává komplexu cytochromů b a f.
- Závěr kaskádovitého přenosu elektronů tvoří plastocyanin, který je předává zpět chlorofylu P_{700}^+ za vzniku výchozího P_{700} .
- Výsledkem cyklické fosforylace je pouze přenos H^+ přes thylakoidní membránu na thylakoidní stranu a následné využití jejich osmotické síly k produkci ATP podle obecné rovnice: $ADP + PO_3^{2-} + 2 H^+ = ATP + H_2O$



CALVINŮV CYKLUS

- Jedná se o fotosyntetickou fixaci CO_2 na cirkulující substrát **ribulosa-1,5-bisfosfát** pomocí enzymu **ribulosabisfosfátkarboxylasa**.
- Vzniklá nestabilní **β -ketokyselina** se okamžitě **hydrolyzuje za vzniku dvou molekul 3-fosfoglycerátu**.
- Energie fotosyntézy do reakčního procesu vstupuje v následujícím kroku:
 - hydrogenace 3-fosfoglycerátu
- Substrátem hydrogenace je 1,3-bisfosfoglycerát, který nejprve vzniká působením ATP za katalýzy glyceraldehdyfosfátdehydrogenasy specifické pro NADP^+ .
- Stejný enzym pak provede hydrogenaci za vzniku dvou molekul glyceraldehyd-3-fosfátu





- Působením triosafosfátisomerasy přechází jedna molekula glycerinaldehyd-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát a působením aldolasy (pracuje podle reakčního mechanismu aldolizace a přenáší vždy tři substituované uhlíkové atomy) vzniká fruktosa-1,6-bisfosfát.
- Hydrolytickou defosforylací vzniká fruktosa-6-fosfát a působením fosfoglukosaisomerasy se vytváří glukosa-6-fosfát, který hydrolýzou poskytuje D-glukosu.
- Ta je výstupním produktem Calvinova cyklu, ale současně se tímto reakčním sledem spotřebovala ribulosa-1,5-bisfosfát, která musí být regenerována, jinak by se produkce glukosy po jejím vyčerpání zastavila a nejednalo by se o cyklický proces.



- Regenerační sled začíná u **fruktosa-6-fosfátu**, který je substrátem transketolasy (pracuje podle reakčního schématu acyloinové reakce a přenáší vždy dva substituované uhlíkové atomy) a s další molekulou **glyceraldehyd-3-fosfátu** poskytuje **xylulosa-5-fosfát a erythrosa-4-fosfát**.
- Tento aldosa-fosfát zreaguje stejně jako glyceraldehydfosfát v reakci pomocí aldolasy s dihydroxyacetonfosfátem na sedoheptulosa-1,7-bisfosfát.
- Ta se dále hydrolyticky defosforyluje sedoheptulosabisfosfátasou na sedoheptulosa-7-fosfát a z ní transketolasovou reakcí s glyceraldehydfosfátem vznikne ribosa-5-fosfát a xylulosa-5-fosfát.
- Xylulosa-5-fosfát se převádí na ribulosu-5-fosfát fosforibuloepimerasou a ribosa-5-fosfát na ribulosu-5-fosfát fosforibosaisomerasou.
- Fosforibulokinasa ribulosu-5-fosfát pomocí ATP fosforyluje na výchozí ribulosu-1,5-bisfosfát.



- Celková bilance Calvinova cyklu je ve schematu propočtena podle obecných zásad stechiometrie.
- Na vytvoření 1 molekuly glukosy musí zreagovat 6 molekul CO_2 se 6 molekulami ribulosa-1,5-bis-fosfátu, které vytvoří 3 molekuly fruktosa-6-fosfátu, 4 molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu a 2 molekuly dihydroxyacetonfosfátu.
- Z jedné molekuly fruktosa-6-fosfátu se vytvoří produkt cyklu glukosa a další dvě molekuly fruktosa-6-fosfátu zahajují regenerační cyklus.
- V jeho průběhu se ještě spotřebuje 6 molekul triosafosfátů.
- Na začátku cyklu se spotřebovává 12 molekul ATP a 12 molekul $\text{NADPH} + \text{H}^+$ na redukci dvanácti molekul 3-fosfoglycerátu a v jeho závěru ještě 6 molekul ATP na fosforylaci ribulosa-5-fosfátu.
- V průběhu cyklu se spotřebuje celkem 12 molekul vody.
- Calvinův cyklus probíhá i ve tmě a jeho sumární rovnice má následující tvar.



LITERATURA

- Mathews, Ch. K. – Halde, K. E. – Ahern, K. G.,
Biochemistry, 3. vydání, San Francisco,
Benjamin Cummings, 1999, 1186 s., ISBN 99-
043683
- Voet, D. – Voet, J. G. – Pratt, Ch. W.,
Fundamentals of Biochemistry: life at the
molecular level, 2. vydání, USA, Willey, 2006,
1264 s., ISBN 0-471-21495-7

