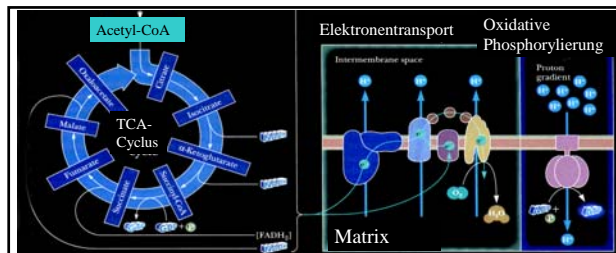


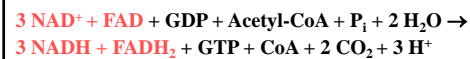
BIOCHEMIE des Stoffwechsels (772.113)

8. Einheit

Oxidative Phosphorylierung



Im Citronensäure-Cyclus werden die (u.a. durch Pyruvat-Dehydrogenase) gebildeten Acetyl-CoA-Einheiten formal zu CO_2 oxidiert. Nettoreaktion:



Die gebildeten Reduktionsäquivalente werden anschließend in der Atmungskette mittels molekularem Sauerstoff reoxidiert.

Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

Respiratorischer Elektronentransport

Chemiosmotische Theorie

ATP-Synthase

Entkoppler

Bilanz

Arten der Phosphorylierung

Arten der Phosphorylierung

- ATP-Produktion in der Glycolyse und im Citrat-Cyclus mittels einfacher enzymatischer Reaktionen:

SUBSTRATKETTENPHOSPHORYLIERUNG

Beispiele: Phosphoglycerat-Kinase

Pyruvat-Kinase

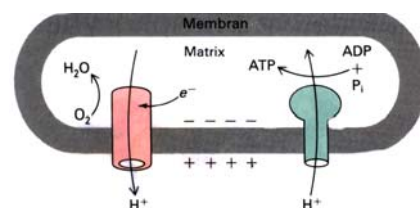
Succinyl-CoA-Synthetase

- ATP-Produktion gekoppelt mit respiratorischer Elektronentransportkette (Atmungskette):

OXIDATIVE PHOSPHORYLIERUNG

- NADH bzw. FADH_2 -abhängige ATP-Synthase

- Elektronen aus Reduktionsäquivalenten werden entlang einer hoch organisierten Elektronentransport-Kette aus Proteinen und Cofaktoren letztendlich auf molekularen Sauerstoff übertragen
- Kopplung zwischen Elektronentransport und ATP-Synthese über Protonengradienten (chemiosmotische Theorie)



3. ATP-Produktion gekoppelt mit photosynthetischer Elektronentransportkette (Lichtreaktion der Photosynthese):
PHOTOPHOSPHORYLIERUNG

Die Prinzipien der ATP-Synthese in den Chloroplasten der Pflanzen oder in photosynthetisierenden Prokaryoten sind mit der oxidativen Phosphorylierung nahezu identisch: Kopplung zwischen Elektronentransport und ATP-Synthese über Protonengradienten (chemiosmotische Theorie).

Nur die Komponenten des Elektronentransports, die Elektronenquelle (Wasser bei oxygenen phototrophen Organismen) und die thermodynamische „Richtung“ (NADP⁺ als Akzeptor!) ist unterschiedlich.

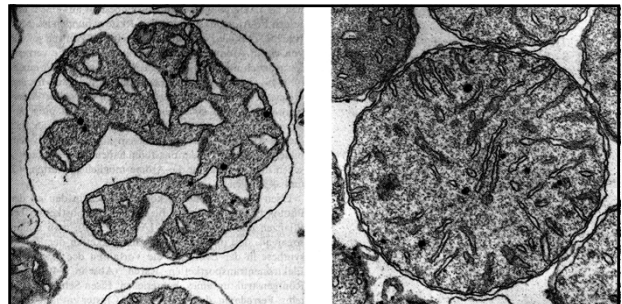
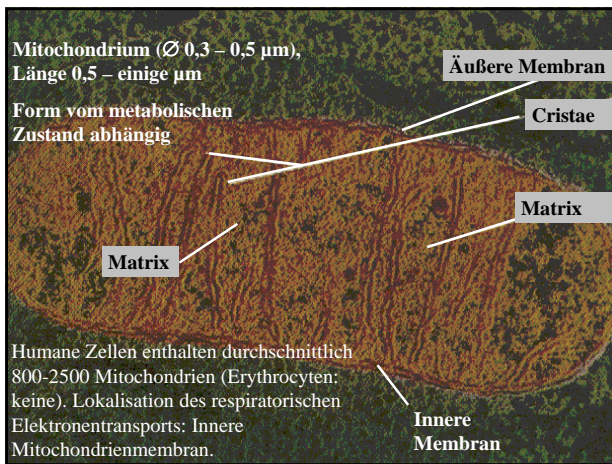
Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Mitochondrien

Die oxidative Phosphorylierung findet bei Eukaryoten in den **Mitochondrien** statt.

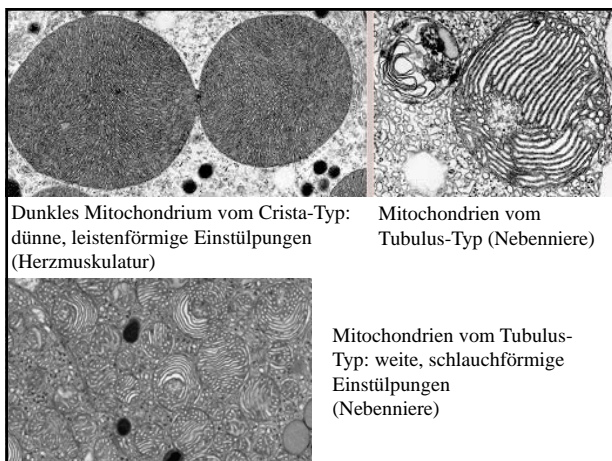
In den Mitochondrien sind die Enzyme des Citrat-Cyclus, der Fettsäure-Oxidation sowie die Komplexe der Atmungskette lokalisiert.



Mäuseleber-Mitochondrium im Zustand aktiver Atmung

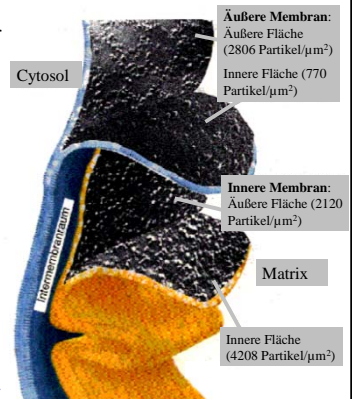
Mäuseleber-Mitochondrium im Ruhezustand

Während aktiver Respiration scheint die Innere Mitochondrienmembran zu schrumpfen und der Intermembran-Raum nimmt an Volumen zu.

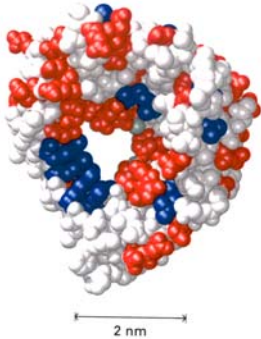


Äußere Membran: 30-40% Lipid, 60-70% Protein; Hoher Anteil an Phosphatidylinositol. Signifikante Mengen des transmembranalen Proteins **Porin**, das durch Kanalbildung die freie Diffusion von Molekülen bis etwa 600 Da erlaubt. Die äußere Membran dient vor allem der Formgebung des Mitochondriums.

Intermembranraum: Sitz von einigen ATP umsetzenden Enzymen: z.B. **Creatin-Kinase** und **Adenylat-Kinase**.



Porin ist ein Transmembranprotein der äußeren mitochondrialen Membran, das große Kanäle bildet. Porine gibt's auch bei Prokaryoten.



Das mitochondriale **Porin** wird auch als **VDAC** bezeichnet (**v**oltage dependent **a**nion **c**hannel): geregelter Durchtritt von anionischen Molekülen (Phosphat, Chlorid, Nucleotiden) durch die äußere Membran.

PDB-Code: 2por
(β-Barrel Struktur: 30-35 kDa)
Saure Reste: rot;
basische Reste: blau

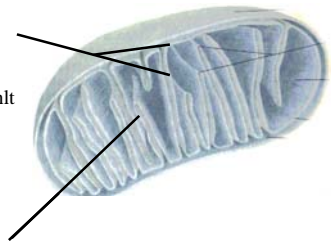
Innere Membran: Reich an Proteinen (80%). Hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren. Hauptsächlich Cardiolipin und Diphosphatidylglycerol. Es fehlt Cholesterin.

Permeabilitätsschranke. Nur spezifischer Transport mittels Transportproteine.

Die Innere Membran ist stark gefaltet (Cristae-Bildung).

Matrix: Enzyme des Citronensäure-Cyclus (Ausnahme **Succinat-Dehydrogenase**) und der Fettsäure-Oxidation.

Außerdem: circulare DNA, Ribosomen und Enzyme zur Proteinsynthese. Mitochondrien sind **semiautonom**.



Mitochondrien sind **semiautonome Organellen**, die in einer endosymbiotischen Beziehung zur Wirtszelle leben: Doppelmembran, eigene (circuläre) DNA, eigene Transkriptions- und Translationsmaschinerie.

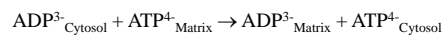
Endosymbiontentheorie: Aufnahme von Prokaryotenzellen durch größere Zellen. Das Bakteriengenom von *Rickettsia prowazekii* (Typhus-Erreger) ist dem mitochondrialen Genom am ähnlichsten.

Mitochondriengenom des Menschen (16,6 kbp) codiert für 13 Proteine der Atmungskette, kleine und große ribosomale RNAs und genug tRNAs zur Translation aller Codons.

Verschiedene Spezies haben unterschiedlich große Mitochondriengenome: Landpflanzen > 200 kbp

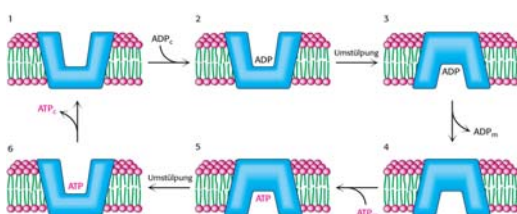
Die Innere Mitochondrienmembran ist für die meisten hydrophilen Substanzen impermeabel. Es werden spezifische Transportsysteme für Ionen und geladene Metaboliten benötigt:

- Der Eintritt von ADP in die Mitochondrien ist mit dem Austritt von ATP über eine sog. **ATP-ADP-Translocase** (**Adeninnucleotid-Translocase** oder **ANT**) gekoppelt:

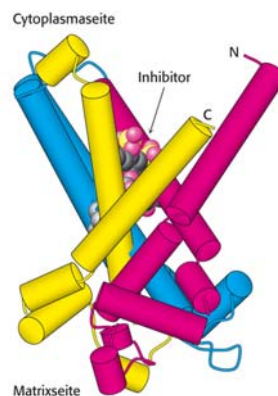


Fast 15% der Proteine der Inneren Mitochondrienmembran sind **ANTs**. Triebkraft des Transports: Membranpotential.

- Der **Phosphat-Carrier** arbeitet in Abstimmung mit der **ATP-ADP-Translocase** und vermittelt den elektroneutralen Austausch von H_2PO_4^- und OH^- oder (nicht unterscheidbar) den elektroneutralen Symport von H_2PO_4^- und H^+ .



ATP-ADP-Translocase katalysiert den Eintritt von cytosolischem ADP_c in die Matrix und den Austritt von mitochondrialem ATP_m in das Cytosol. Ein einzelnes nucleotidbindendes Zentrum. Da ATP eine Ladung mehr trägt als ADP, kann diese Translocase den Protonengradienten an der Membran (siehe unten) nutzen. Dieser wird aber dadurch "angezapft" (durch ATP wird eine negative Ladung auf die Matrixseite transportiert). Durch seine Häufigkeit ist dieser Prozess also sehr energieintensiv.



ATP-ADP-Translocase (mit Inhibitor an Bindungsstelle für ADP/ATP).

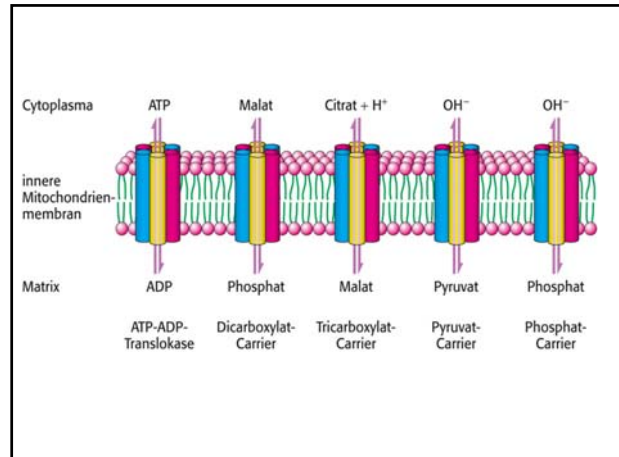
Hemmung der **ATP-ADP-Translocase** führt auch zur Hemmung der Zellatmung. Siehe Atmungskontrolle.

Der **Phosphatcarrier** arbeitet in Abstimmung der **ATP-ADP-Translocase**. Zusammen mit der **ATP-Synthase** (siehe unten) bilden sie einen großen Komplex (**ATP-Synthasom**).

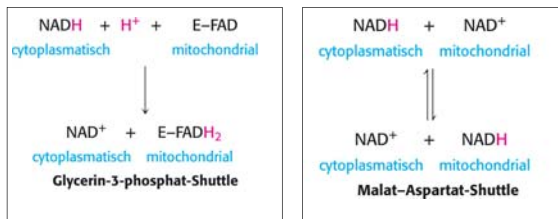
- Der **Dicarboxylat-Carrier** befördert Malat, Fumarat und Succinat im Austausch gegen P_i aus dem Mitochondrium.
- Der **Tricarboxylat-Carrier** befördert Citrat und ein Proton im Austausch gegen Malat.
- Der **Pyruvat-Carrier** befördert entweder im Austausch gegen OH^- (Pyruvat/ OH^- -Antiport) oder zusammen mit H^+ (Pyruvat/ H^+ -Symport) Pyruvat vom Cytosol in die Mitochondrien.
- Zudem muss in der Glycolyse gebildetes NADH in der Atmungskette oxidiert werden. Zwei Wege sind prinzipiell möglich, die die Elektronen, aber nicht NADH selbst, in die Atmungskette einschleusen:

Glycerin-3-phosphat Shuttle

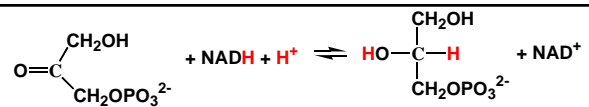
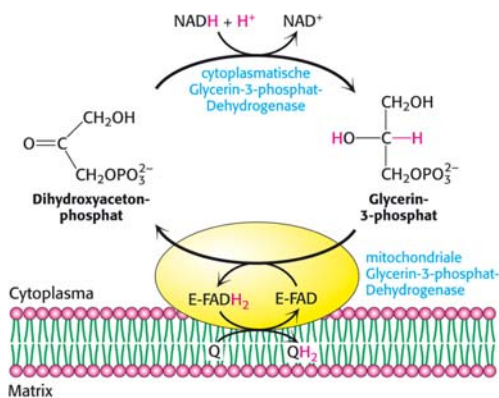
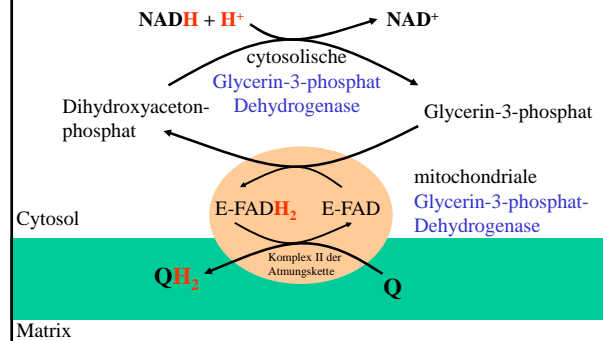
Malat-Aspartat-Shuttle



Die Elektronen des cytoplasmatischen NADH (z.B. aus der Glycolyse) gelangen durch Shuttle-Systeme in die Mitochondrien. Die Atmungskette kann also NAD^+ für die Glycolyse regenerieren. Die innere mitochondriale Membran ist aber für $NADH/NAD^+$ nicht durchlässig. Daher werden nicht das $NADH$, sondern nur die Elektronen transportiert.



Glycerin-3-phosphat-Shuttle



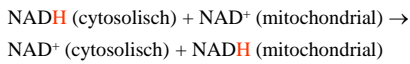
Zwei Isozyme: cytosolische und membrangebundene **Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase**.

Wenn die Elektronen des $NADH$ über diesen Shuttle in die Atmungskette (Komplex II) eingeschleust werden, werden pro cytosolischem $NADH$ 1,5 ATP gebildet. Aus mitochondrialem $NADH$ werden hingegen 2,5 ATP gebildet (siehe 2. Teil dieser Vorlesungseinheit).

Der **Glycerin-3-phosphat-Shuttle** ist wichtig in der Muskulatur, wo er die Aufrechterhaltung einer hohen Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung ermöglicht. Die Verwendung von FAD ermöglicht den Transport der Elektronen aus $NADH$ auch entgegen einem $NADH$ -Konzentrationsgradienten (in der Matrix wird $NADH$ im Citronensäure-Cyclus gebildet!).

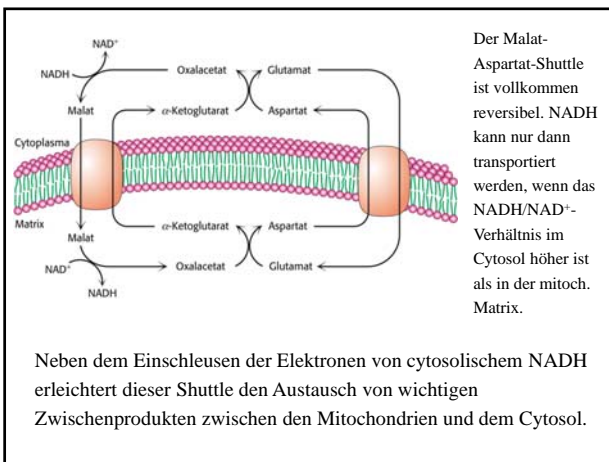
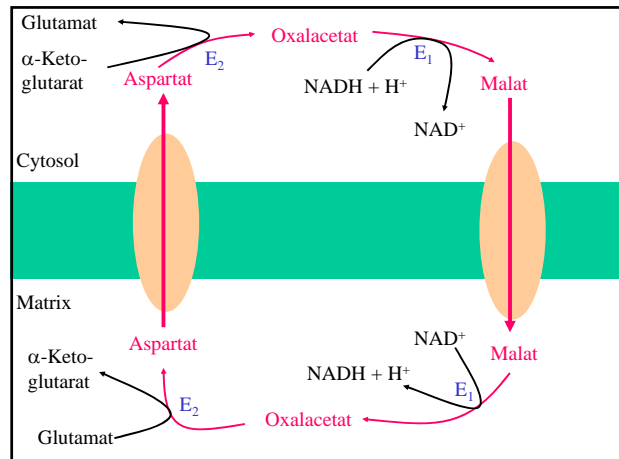
Malat-Aspartat-Shuttle

Hauptsächlich in Leber und Lunge. Die Elektronen des cytosolischen NADH werden auf Oxalacetat übertragen, wobei sich Malat bildet, das die innere Mitochondrienmembran passieren kann:



Isozyme: cytosolische und mitochondriale **Malat-Dehydrogenase (E₁)**
 cytosolische und mitochondriale **Aspartat-Aminotransferase (E₂)**

Der Malat-Aspartat-Shuttle umfasst 4 Enzyme und zwei Membran-Carrier.



Der Malat-Aspartat-Shuttle ist vollkommen reversibel. NADH kann nur dann transportiert werden, wenn das NADH/NAD⁺-Verhältnis im Cytosol höher ist als in der Mitochondrienmatrix.

Neben dem Einschleusen der Elektronen von cytosolischem NADH erleichtert dieser Shuttle den Austausch von wichtigen Zwischenprodukten zwischen den Mitochondrien und dem Cytosol.

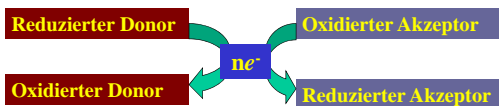
Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

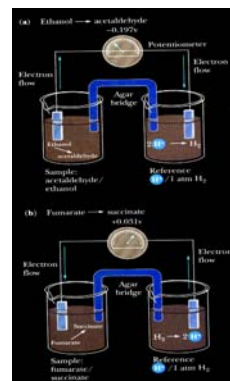
Das Standard-Reduktionspotential E^{\ominus} gibt die Tendenz einer chemischen Spezies an, entweder reduziert oder oxidiert zu werden. Es beschreibt den Elektronentransfer zwischen zwei Spezies:



$$\Delta G^{\ominus} = -n \times F \times \Delta E^{\ominus}$$

- n Zahl der transferierten Elektronen
- F Faraday'sche Konstante (96,485 kJ/V.mol)
- ΔE^{\ominus} Differenz der Reduktionspotentiale zwischen Akzeptor und Donor

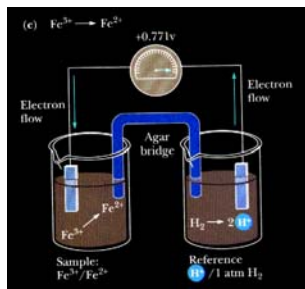
Das Standard-Reduktionspotential E^{\ominus} wird in sog. Halbzellen bestimmt.



Eine Halbzelle enthält 1 M Lösungen der oxidierten und reduzierten Form (Redoxpaar) und eine Elektrode.

Halbzelle mit sog. Referenzzelle über leitende Brücke verbunden. Referenz-Zelle: 1 M H⁺ im Gleichgewicht mit H₂-Gas bei 1 atm. (Referenzzelle hat definitionsgemäß $E^{\ominus} = 0$ V).

Ein Potentiometer (Voltmeter) verknüpft die Elektroden.

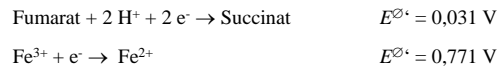


Fließen Elektronen von der Referenz-Halbzelle in Richtung der Proben-Halbzelle, ist das Reduktions-Potential definitionsgemäß positiv.

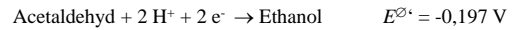
Fließen Elektronen von der Proben-Halbzelle Richtung Referenz-Halbzelle, so ist das Reduktions-Potential definitionsgemäß negativ.

Beachte: Das Reduktionspotential der Referenz-Halbzelle ist pH-abhängig. $E^{\ominus} = 0,0 \text{ V}$ gilt für $[\text{H}^+] = 1 \text{ M}$. Bei **pH 7,0** ist $E^{\ominus} = -0,421 \text{ V}$ (Unterschied zwischen chemischen und biologischen Standardzuständen!).

Bei den Redoxpaaren Fumarat/Succinat und $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ fließen Elektronen von der Referenzhalbzelle zur Proben-Halbzelle: Fumarat und Fe^{3+} werden reduziert: positives Redoxpotential.



Beim Redoxpaar Acetaldehyd/Ethanol (negatives Redoxpotential) fließen Elektronen von der Proben-Halbzelle zur Referenz-Halbzelle. Hier läuft also die Oxidation von Ethanol ab:

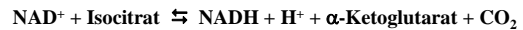


Wichtig: In Tabellenwerken sind die Halbzellen-Reaktionen immer als Reduktions-Reaktionen formuliert, unabhängig davon was nun tatsächlich in einer Halbzelle passiert. Das Vorzeichen des Standard-Reduktionspotentials zeigt an, welche Reaktion tatsächlich passiert, wenn diese Halbzelle mit der Referenzzelle verbunden wird.

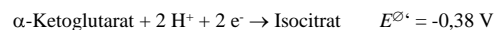
Oxidierter Form	Reduzierter Form	n	E^{\ominus} (V)
Succinat + CO_2	α -Ketoglutarat	2	-0,67
Acetat	Acetaldehyd	2	-0,60
Ferredoxin (ox)	Ferredoxin (red)	1	-0,43
2H^+	H_2	2	-0,42
NAD^+	$\text{NADH} + \text{H}^+$	2	-0,32
NADP^+	$\text{NADPH} + \text{H}^+$	2	-0,32
Liponsäure (ox)	Liponsäure (red)	2	-0,29
Glutathion (ox)	Glutathion (red)	2	-0,23
Acetaldehyd	Ethanol	2	-0,20
Pyruvat	Lactat	2	-0,19
Fumarat	Succinat	2	+0,03

Oxidierter Form	Reduzierter Form	n	E^{\ominus} (V)
Fumarat	Succinat	2	0,03
Cytochrom $b(+3)$	Cytochrom $b(+2)$	1	0,07
Dehydroascorbat	Ascorbat	2	0,08
Ubichinon (ox)	Ubichinol (red)	2	0,10
Cytochrom $c(+3)$	Cytochrom $c(+2)$	1	0,22
$\text{Fe}(+3)$	$\text{Fe}(+2)$	1	0,77
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}^+$	H_2O	2	0,82

Beispiel: Berechnen Sie mit Hilfe der tabellierten Standard-Reduktionspotentiale, ob die folgende Reaktion bei pH 7.0 exergonisch oder endergonisch ist:



Halbzellen-Reaktionen:



ΔE^{\ominus} ergibt sich aus AKZEPTOR -DONOR

$$\Delta E^{\ominus} = E^{\ominus}(\text{Akzeptor}) - E^{\ominus}(\text{Donor}) = -0,32 \text{ V} - (-0,38 \text{ V}) = +0,06 \text{ V}$$

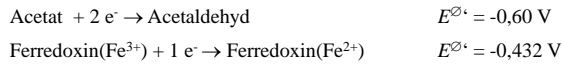
$$\Delta G^{\ominus} = -n \times F \times \Delta E^{\ominus}$$

$$\Delta G^{\ominus} = -(2)(96485 \text{ J/V.mol})(0,06 \text{ V}) = -11580 \text{ J/mol} = -11,58 \text{ kJ/mol}$$

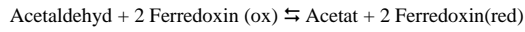
= exergonische Reaktion

Beispiel: Berechnen Sie die Gleichgewichtskonstante der Oxidation von Acetaldehyd (Ethanal) in Acetat durch Ferredoxin bei pH 7.0 und 30°C!

Die involvierten Redoxpaare sind:



Reaktion:



$$\Delta E^{\ominus'} = E^{\ominus'} (\text{Akzeptor}) - E^{\ominus'} (\text{Donor}) = -0,432 \text{ V} - (-0,60 \text{ V})$$

$$\Delta E^{\ominus'} = +0,168 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\ominus'} = -n \times F \times \Delta E^{\ominus'} = -2 \times 96485 \text{ (J/V.mol)} \times 0,168 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\ominus'} = -32\,419 \text{ J/mol} = -32,42 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G^{\ominus'} = -32\,419 \text{ J/mol} = -32,42 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G^{\ominus'} = -n \times F \times \Delta E^{\ominus'} = -R \times T \times \ln K_{\text{eq}}$$

Mit $T = 303 \text{ K}$ und $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ gilt:

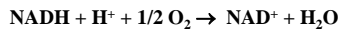
$$\ln K_{\text{eq}} = -\Delta G^{\ominus'} / (R \times T) = (32420 \text{ J/mol}) / [(303 \text{ K}) \times (8,314 \text{ J/K.mol})]$$

$$\ln K_{\text{eq}} = 12,87 \text{ und somit } K_{\text{eq}} = 3,9 \times 10^5$$

Ein wichtiger Zusammenhang ist daher

$$\Delta G^{\ominus'} = -n \times F \times \Delta E^{\ominus'} = -R \times T \times \ln K_{\text{eq}}$$

Atmung ist formal die Reoxidation von NADH entsprechend der folgenden Nettogleichung:



Halbzellen-Reaktionen:

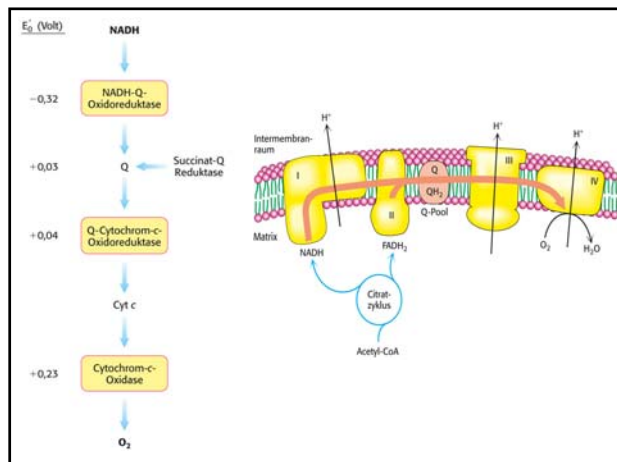


$$\Delta E^{\ominus'} = 0,816 - (-0,32) = 1,136 \text{ V bzw. } \Delta G^{\ominus'} = -n.F.\Delta E^{\ominus'}$$

$$\Delta G^{\ominus'} = -n.F.\Delta E^{\ominus'} = -2 \times 96485 \times 1,131 = -219\,213 \text{ J/mol}$$

$$\Delta G^{\ominus'} = -219 \text{ kJ/mol}$$

Komponenten der Elektronentransport-Kette haben Standard-Reduktionspotentiale zwischen dem (NAD⁺/NADH + H⁺) und dem (1/2 O₂ + 2 H⁺/H₂O) - Redoxpaar.

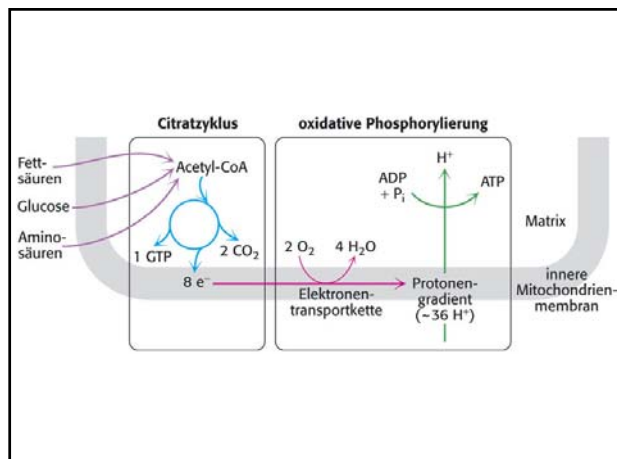


Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

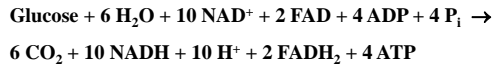
Respiratorischer Elektronentransport



Zwischenbilanz Glycolyse und Citronensäure-Cyclus

Glycolyse: Pro Glucose entstehen **2 Pyruvat bzw. 2 Acetyl-CoA**

Nettoreaktion unter Kombination von Glycolyse und Citronensäure-Cyclus (inkl. **Pyruvat-Dehydrogenase**):

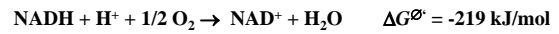


Kohlenstoffbilanz: Glucose \rightarrow 6 CO₂

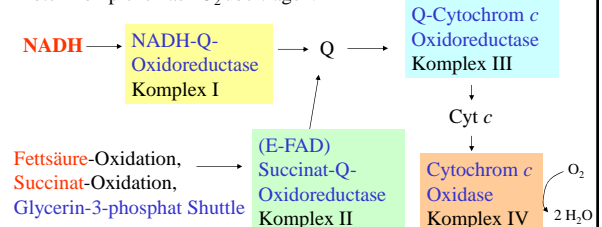
ATP-Bilanz: 4 ATP durch Substratketten-phosphorylierung gebildet, zwei in der Glycolyse und zwei im Citrat-Cyclus (GTP = ATP)

NADH-Bilanz: 2 (Glycolyse) + 2 (Pyruvat-Dehydrogenase) + 6 (Citrat-Cyclus) = 10

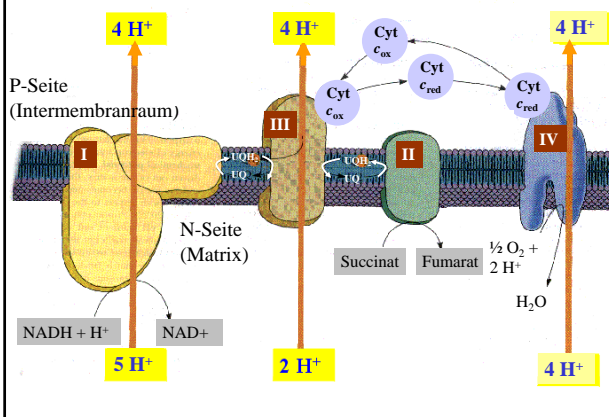
Respiratorischer Elektronentransport



In der Atmungskette der Mitochondrien wird NADH allerdings nicht direkt durch molekularen Sauerstoff oxidiert. Die Elektronen des NADH werden durch eine Kette aus drei großen Proteinkomplexen auf O₂ übertragen:



Respiratorischer Elektronentransport

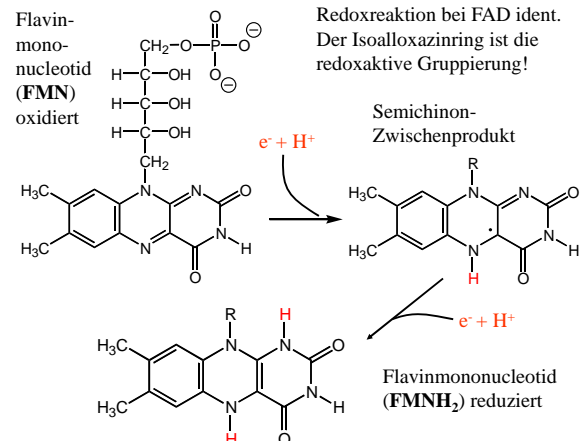


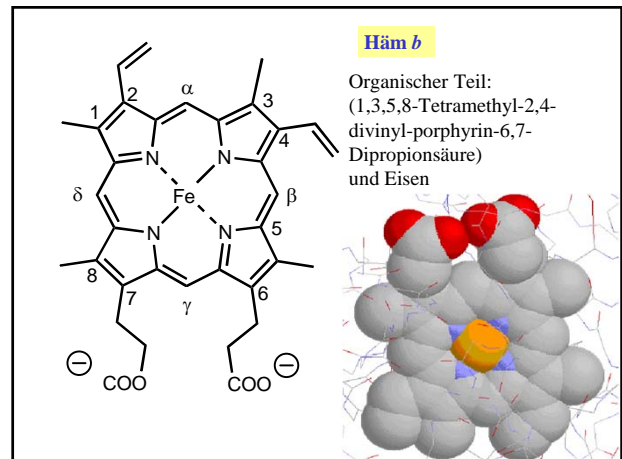
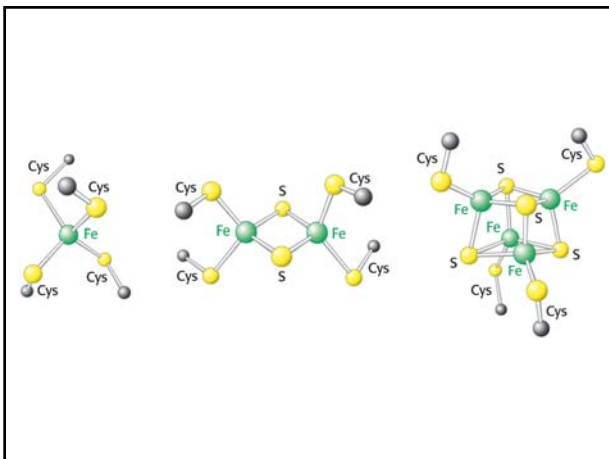
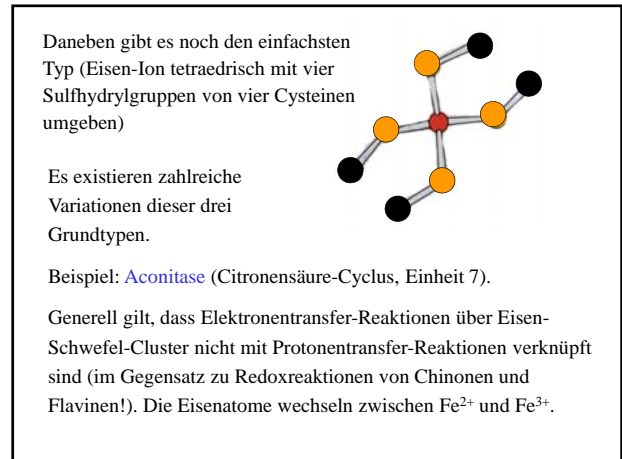
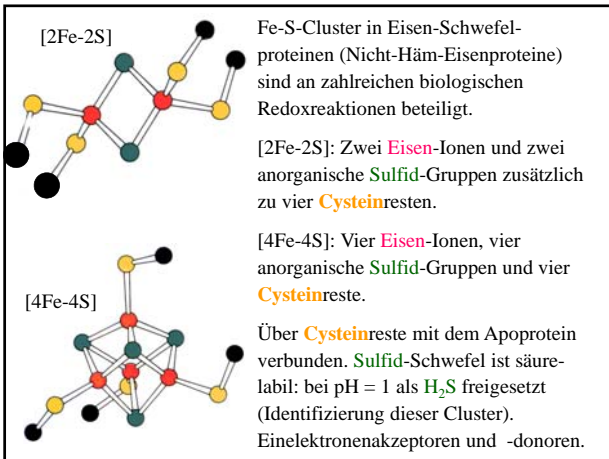
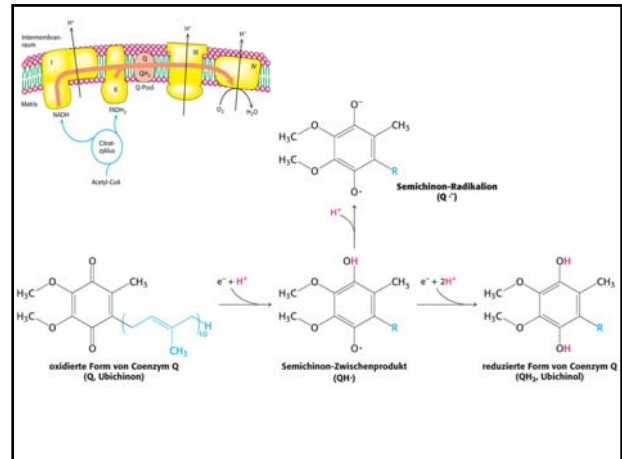
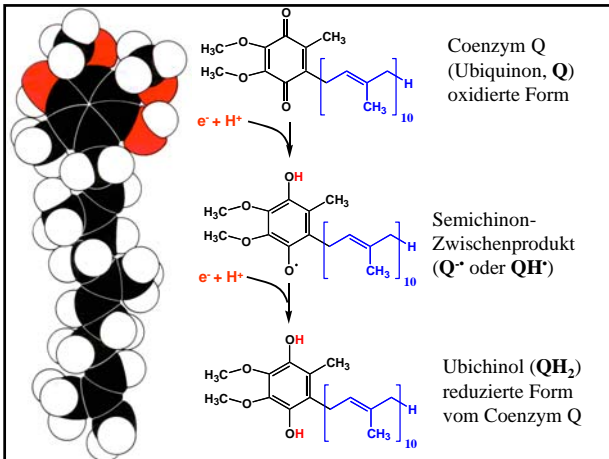
Die Komplexe des mitochondrialen respiratorischen Elektronentransports enthalten zahlreiche elektronenübertragende Gruppen: Flavine, Eisen-Schwefel-Cluster, Chinone, Hämgruppen und Kupfer-Ionen.

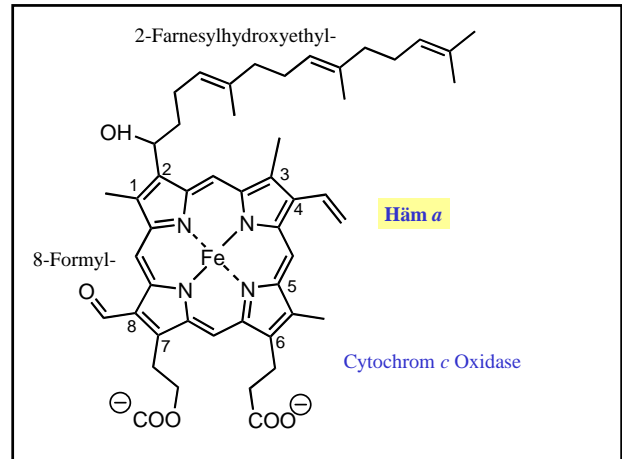
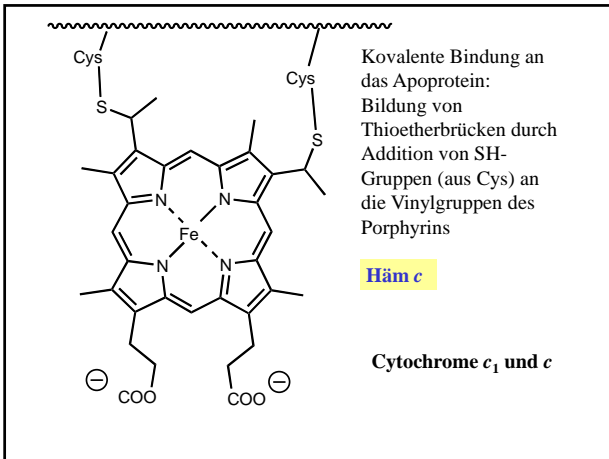
Enzymkomplex	Masse (kDa)	UE	prothetische Gruppen
NADH-Q-Oxidoreductase	>900	46	FMN, Fe-S
Succinat-Q-Oxidoreductase	140	4	FAD, Fe-S
Q-Cytochrom c Oxidoreductase	250	11	Häm b _H , Häm b _L , Häm c ₁ , Fe-S
Cytochrom c Oxidase	160	13	Häm a, Häm a ₃ , Cu _A und Cu _B

Die in der mitochondrialen Atmungskette vorkommenden **Elektronencarrier (Redox-Cofaktoren)** kommen quasi in allen Lebewesen in Elektronentransportketten vor. Die Kenntnis ihrer Funktionalität (Redoxchemie) ist für das Verständnis von allen respiratorischen oder photosynthetischen Atmungsketten wichtig.

Für das Verständnis der Kopplung zwischen Elektronentransport und Protonentranslokation ist die Tatsache wichtig, dass manche Elektronencarrier bei der Reduktion Elektronen und Protonen aufnehmen und manche nur Elektronen (bzw. bei der Oxidation Elektronen und Protonen oder nur Elektronen abgeben). Durch alternative Anordnung in Elektronentransportketten innerhalb der Komplexe der Atmungskette, wird so eine mechanistische Kopplung zwischen Elektronentransport und Protonentranslokation möglich.







Cytochrome sind redoxaktive Proteine, die die Hämgruppe als prosthetische Gruppe enthalten. Cytochrome *b* enthalten Häm *b* und Cytochrome *c* (oder c_1) enthalten Häm *c*.

Thunfisch *Rhodospirillum rubrum* *Paracoccus denitrificans*

Cytochrome *c* aus verschiedenen Organismen.

Komplex I: NADH-Q-Oxidoreductase

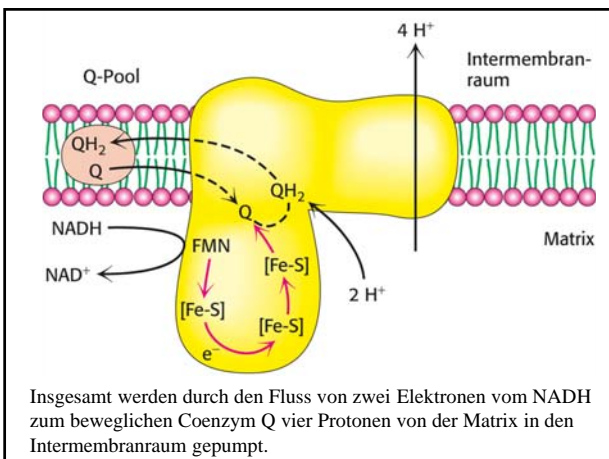
Auch **NADH Dehydrogenase** genannt. Größter Komplex der Inneren Mitochondrienmembran (880 kDa) aus mindestens 46 Polypeptid-Ketten.

Prosthetische Gruppen: 1 FMN (daher Flavoprotein), zahlreiche Fe-S-Cluster

Reaktion dieser **Protonenpumpe**:

$$\text{NADH} + \text{Q} + 5 \text{H}^+_{\text{Matrix}} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4 \text{H}^+_{\text{Cytosol}}$$

Struktur von Komplex I in 22 Å Auflösung (J. Mol. Biol. 277 (1998) 1033-1048)



Komplex II: Succinat-Q-Oxidoreductase

Die **Succinat-Dehydrogenase** des Citrat-Cyclus oxidiert Succinat zu Fumarat und erzeugt dabei FADH₂. **Succinat-Dehydrogenase** ist Teil des **Succinat-Q-Reductase-Komplexes** (140 kDa, 4 UE).

Prosthetische Gruppen: FAD, zahlreiche Fe-S-Cluster

Weg der Elektronen: Succinat → FAD → Fe-S-Cluster → bewegliches Coenzym Q

Reaktion dieses Komplexes (**keine Protonenpumpe**):

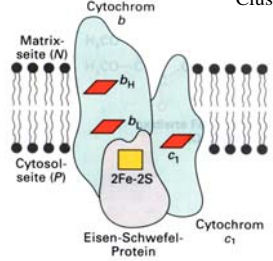
$$\text{Succinat} + \text{Ubichinon} \rightarrow \text{Fumarat} + \text{Ubichinol}$$

Zahlreiche andere Enzyme [z.B. **Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase** (NADH-Shuttle) und **Acyl-CoA-Dehydrogenase** überführen ebenso Elektronen von ihren Substraten direkt über FAD von Komplex II auf bewegliches Ubichinon. **Keine Protonenpumpe!**

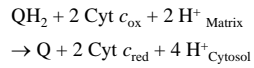
Komplex III: Q-Cytochrom c Oxidoreductase

Auch **Cytochrom Reductase** (oder **Cytochrom bc_1 -Komplex**) genannt (250 kDa, 11 UE).

Prothetische Gruppen: Häm b_H , Häm b_L , Häm c_1 , Fe-S-Cluster (Rieske-Fe-S-Protein)



Reaktion (**Protonenpumpe**):



Elektronenübertragung von QH_2 auf oxidiertes Cytochrom c .

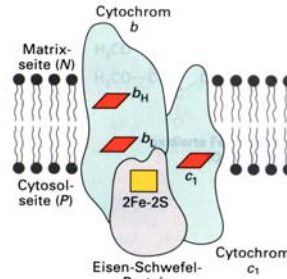
b_L, b_H unterschiedliche Affinität für Elektronen (unterschiedl. Redoxpotentiale!). b_L : höhere Affinität (pos. Redoxpotential)

Häm b_H high-potential Häm b ($E^{\circ'} = +0,05 \text{ V}$)

Häm b_L , low-potential Häm b ($E^{\circ'} = -0,1 \text{ V}$)

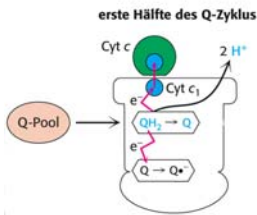
Zwei getrennte Bindungsstellen für die Ubichinone: Q_o und Q_i ,

wobei Q_i näher an der Matrix liegt.



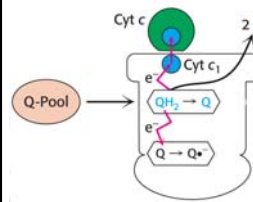
Wichtig: Der Elektronendonator (QH_2) ist ein Zwei-Elektronenüberträger, während der Elektronenakzeptor (Cytochrom c) ein Ein-Elektronenüberträger ist (**Q-Cycle**).

Der Mechanismus der Verknüpfung des Elektronentransfers von QH_2 zu Cytochrom c mit dem Transmembrantransport von Protonen wird als **Q-Cyclus** bezeichnet. Der Q-Cyclus gewährleistet den Übergang vom Zwei-Elektronendonator Ubichinol zum Ein-Elektronenakzeptor Cytochrom c .



Der Cyclus beginnt mit der Bindung von beweglichem Ubichinol (QH_2) an die Q_o -Stelle.

erste Hälfte des Q-Zyklus

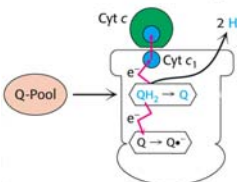


Das bewegliche Ubichinol überträgt seine Elektronen einzeln! Zuerst fließt ein Elektron über Fe-S-Cluster und Cytochrom c_1 zum Cytochrom c , das reduziert wird ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) und vom Komplex III abdissoziiert.

Das zweite Elektron wird auf Cytochrom b_L , dann auf Cytochrom b_H und schließlich auf oxidiertes Ubichinon an der Q_i -Bindungsstelle übertragen, das zu einem Semichinonradikalanion ($Q^{\cdot-}$) reduziert wird.

Bei der Oxidation von QH_2 zu Q in der Q_o -Bindungsstelle werden zwei Protonen an die cytosolische Membranseite abgegeben.

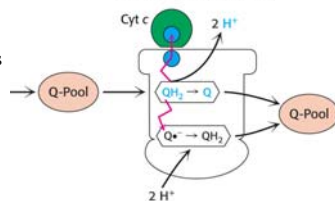
erste Hälfte des Q-Zyklus



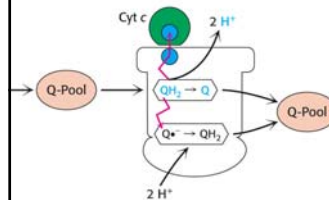
Ein weiteres Cytochrom c Molekül wird reduziert und das zweite Elektron wird über Cytochrom b_L und Cytochrom b_H zu $Q^{\cdot-}$ in der Q_i -Bindungsstelle transportiert.

In der Q_i -Stelle sitzt nun das Semichinonradikalanion ($Q^{\cdot-}$). Nun bindet ein weiteres bewegliches QH_2 -Molekül an die Q_o -Stelle und der Cyclus wiederholt sich.

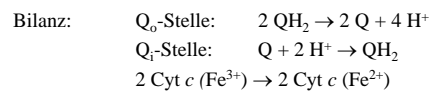
zweite Hälfte des Q-Zyklus



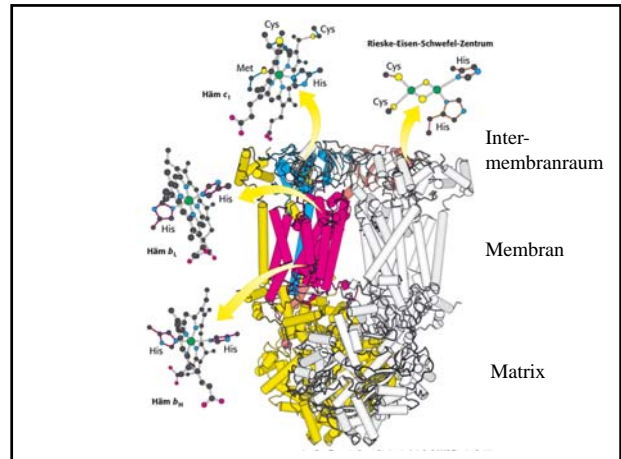
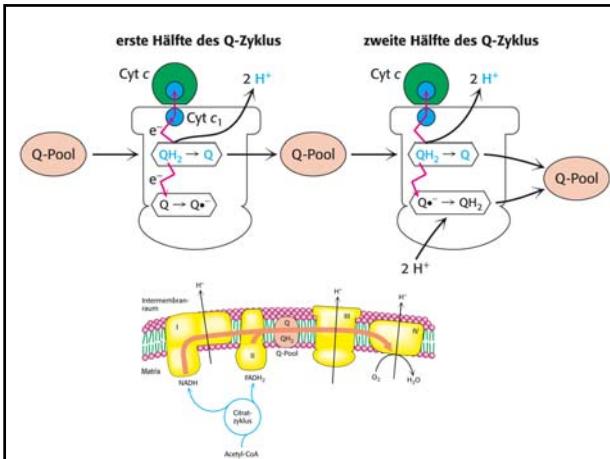
zweite Hälfte des Q-Zyklus



Bei der Reduktion von $Q^{\cdot-}$ zu QH_2 werden aus der Matrix zwei weitere Protonen aufgenommen. Diese beiden Protonen tragen letztendlich zur Bildung des Protonengradienten durch Komplex III bei.



2 Protonen werden auf der Matrixseite aufgenommen und vier werden auf der cytosolischen Seite freigesetzt.



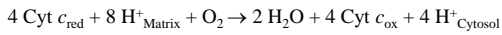
Komplex IV: Cytochrom c Oxidase

Im letzten Schritt des respiratorischen Elektronentransports werden die Elektronen vom Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff, O₂, übertragen.

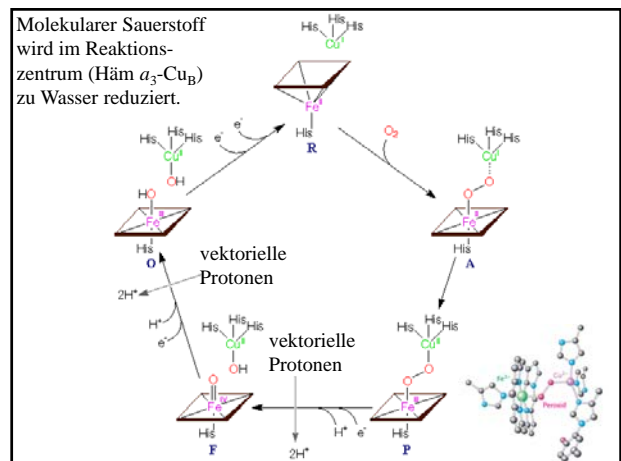
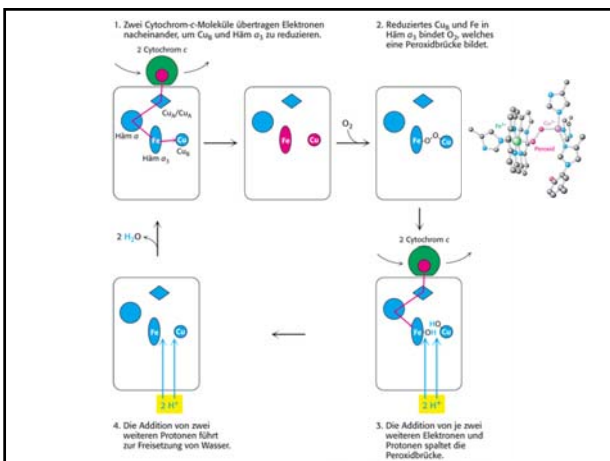
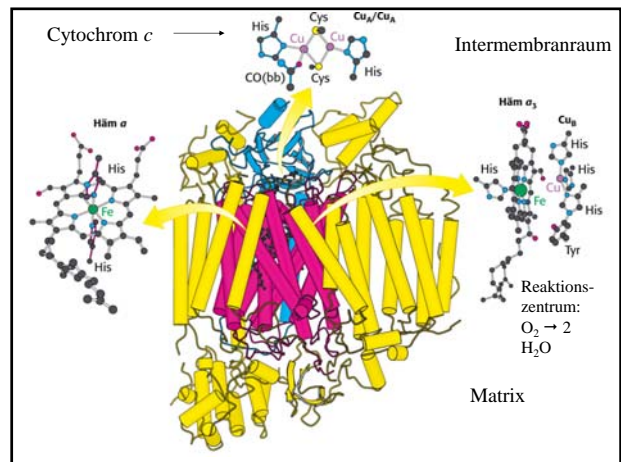
Cytochrom c Oxidase: 160 kDa, 13 UE

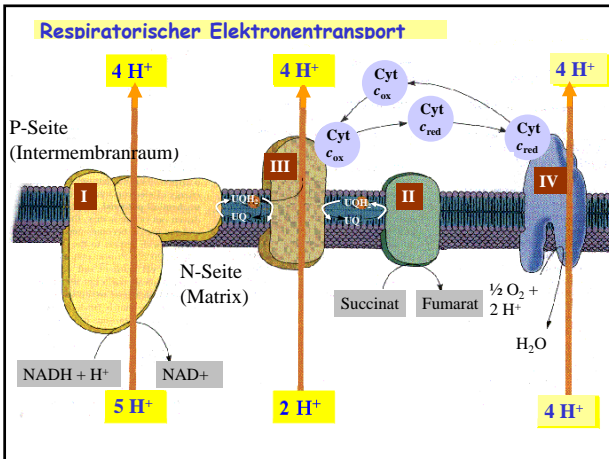
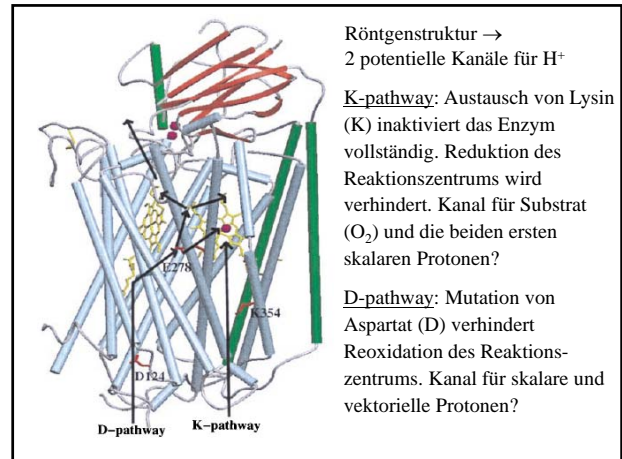
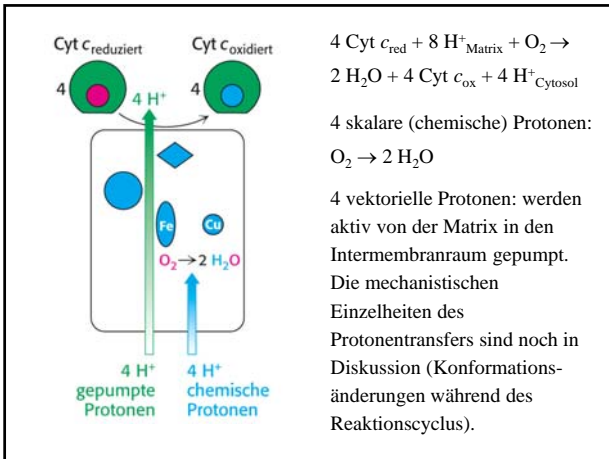
Prosthetische Gruppen: Häm a, Häm a₃, Cu_A und Cu_B

Reaktion (**Protonenpumpe**):



Wie bei allen Komplexen der Atmungskette wird ein Teil der UE im Mitochondriumgenom codiert (bei Cytochrom c Oxidase UE 1-3), der Rest wird im Kern codiert (UE 4-13). Exergonische Reaktion: $\Delta G^{\circ} = -232 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Energie zum Protonenpumpen).





Arten der Phosphorylierung
 Mitochondrien
 Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie
 Respiratorischer Elektronentransport
 Chemiosmotische Theorie

$\text{NADH} + \text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{ O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \quad \Delta G^{\ominus'} = -219 \text{ kJ/mol}$

$\text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \quad \Delta G^{\ominus'} = +30,5 \text{ kJ/mol}$

Die ATP-Synthese wird durch das Enzym **ATP-Synthase** (mitochondriale ATPase oder F_1F_0 -ATPase oder Komplex V) katalysiert.

Wie erfolgt aber nun die Kopplung zwischen dem Elektronentransport ($\text{NADH} \rightarrow \text{O}_2$) und der ATP-Synthese?

1961 Peter Mitchell: **chemiosmotische Theorie**

Elektronentransport und ATP-Synthese sind durch einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt. Im Zuge des Elektronenflusses in der Atmungskette werden Protonen aktiv von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt.

Die respiratorische Elektronentransportkette in Säugetier-Mitochondrien umfaßt drei Protonenpumpen, die einen Protonengradienten erzeugen:

Komplex I:
 $\text{NADH} + \text{Q} + 5 \text{ H}^+_{\text{Matrix}} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4 \text{ H}^+_{\text{Cytosol}}$

Komplex III:
 $\text{QH}_2 + 2 \text{ Cyt } c_{\text{ox}} + 2 \text{ H}^+_{\text{Matrix}} \rightarrow \text{Q} + 2 \text{ Cyt } c_{\text{red}} + 4 \text{ H}^+_{\text{Cytosol}}$

Komplex IV:
 $4 \text{ Cyt } c_{\text{red}} + 8 \text{ H}^+_{\text{Matrix}} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ Cyt } c_{\text{ox}} + 4 \text{ H}^+_{\text{Cytosol}}$

Higher pH, lower $[\text{H}^+]$ in matrix
 Lower pH, higher $[\text{H}^+]$ in intermembrane space

Die H^+ -Konzentration in der Matrix wird geringer, ein elektrisches Feld entsteht, die Matrixseite wird negativ (N-Seite) und der Intermembranraum wird positiv (P-Seite). Diese sog.

protonenmotorische Kraft treibt die ATP-Synthese an:

Chemiosmotische Theorie

Thermodynamische Betrachtungen: $H^+_{in} \rightarrow H^+_{out}$

$$\Delta G^{\mathcal{O}'} = RT \ln(c_2/c_1) + z.F.\Delta\Phi$$

F = Faraday Konstante (96485 J/V.mol)

c_1, c_2 Konzentrationen der Protonen auf den beiden Seiten der Membran

$\Delta\Phi$ = Potentialdifferenz über die Membran in Volt (V)

$$\Delta G^{\mathcal{O}'} = RT \ln(c_2/c_1) + z.F.\Delta\Phi \quad (z = 1)$$

Unter typischen Bedingungen liegt der pH-Wert der inneren Mitochondrienmembran auf der Außenseite um 1,4 Einheiten niedriger als auf der Innenseite: $\log(c_2/c_1) = 1,4$.

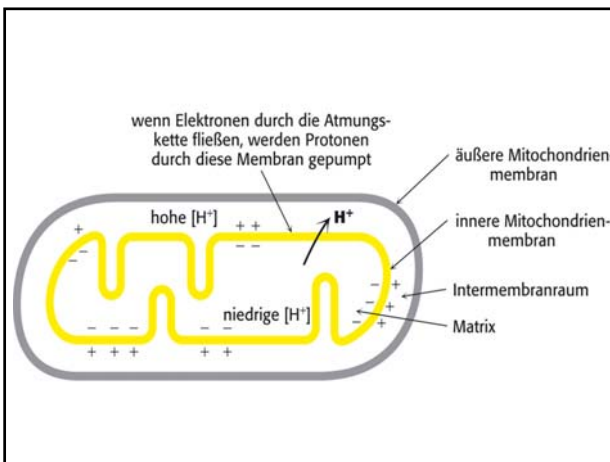
Das Membranpotential beträgt etwa 0,14 V.

Daraus folgt für 37°C (310 K):

$$\Delta G^{\mathcal{O}'} = RT \ln(c_2/c_1) + z.F.\Delta\Phi \quad (z = 1)$$

$$\Delta G^{\mathcal{O}'} = [(2,303) \times (8,315 \text{ J/Kmol}) \times (310 \text{ K}) \times (1,4)] + [(96485 \text{ J/Vmol}) \times 0,14] = 21,8 \text{ kJ/mol}$$

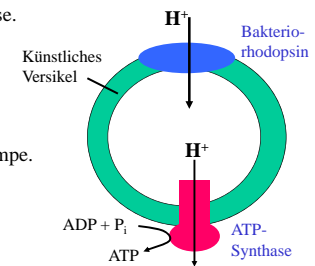
Jedem Mol Protonen, das von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt wird, entspricht ein $\Delta G^{\mathcal{O}'}$ von 21,8 kJ/mol!



Beweise für chemiosmotischen Theorie:

(a) Substanzen, die die Membran für Protonen durchgängig machen, jedoch den Elektronenfluß unbeeinflusst lassen (sog. **Entkoppler**), verhindern die ATP-Synthese.

(b) Das **Bakteriorhodopsin** (ein Membranprotein in Halobakterien) ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe. Wird **Bakteriorhodopsin** gemeinsam mit einer **ATP-Synthase** in eine künstliche Membran eingebaut und belichtet, so baut sich ein pH-Gradient auf und ATP wird synthetisiert.

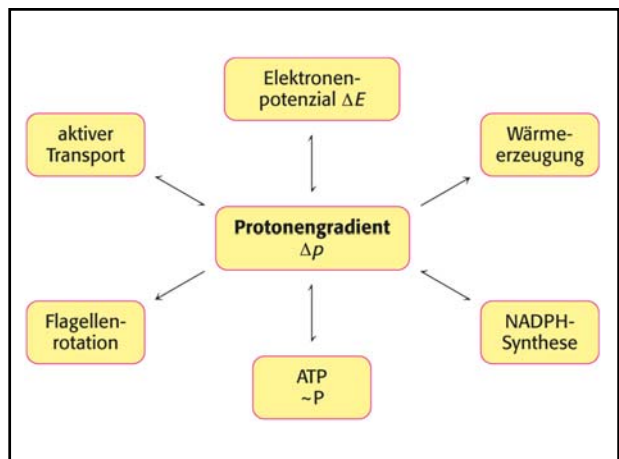


Die ATP-Synthese in Chloroplasten und vielen Mikroorganismen wird ebenfalls von einem Protonengradienten getrieben.

Daneben wird die Energie in Protonengradienten auch bei vielen anderen endergonischen Prozessen verbraucht. Einige Beispiele:

- Aktiver Transport von Ca^{2+} in die Mitochondrien
- Einschleusung von Aminosäuren und Kohlenhydraten in Bakterien (aktiver Transport)
- Rotation von Bakterienflagellen
- Wärmeerzeugung (Winterschlaf)

Protonengradienten sind zentrale, umwandelbare Formen freier Enthalpie.



Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

Respiratorischer Elektronentransport

Chemiosmotische Theorie

ATP-Synthase

Wie erfolgt nun mechanistisch die ATP-Synthese durch die **ATP-Synthase**?



Zu sehen sind etwa 85 Å große „Köpfchen“, die Teil der sog. **ATP-Synthase** sind. „Köpfchen“ zeigen bei intakten Mitochondrien Richtung Matrix. Entfernung dieses Enzymteils (F_1 -Teil) führt zum Verlust der **ATP-Synthase**-Aktivität. Der isolierte (abgetrennte) F_1 -Teil hat aber Hydrolyse-Aktivität (**ATPase-Funktion**).

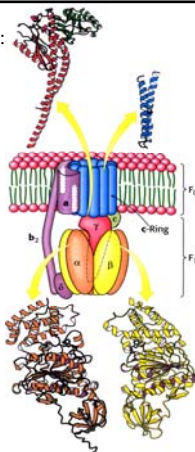
Die **ATP-Synthase** besteht aus 2 Untereinheiten:

Die kugelförmige **F_1 -Untereinheit**, die an der Matrixseite lokalisiert ist, und die membrandurchspannende **Untereinheit F_o** .

F_1 besteht aus fünf verschiedenen Polypeptidketten in folgender Stöchiometrie: **$\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta$ und ϵ**

Die homologen α - und β -Ketten bilden einen hexameren Ring und binden Nucleotide. Nur die β -Ketten sind allerdings an der Katalyse beteiligt.

γ und ϵ bilden den zentralen Stiel. Wichtig: γ unterbricht die Symmetrie des Hexamers. Somit werden die drei β -Ketten unterscheidbar.



Die F_o -Untereinheit bildet den Protonenkanal des Komplexes:

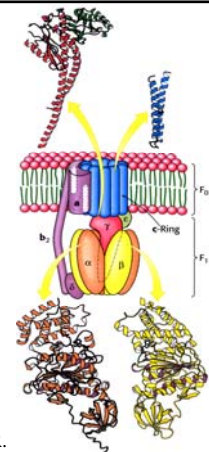
Ring aus 10-14 **c-Peptiden** (je nach Organismus).

Eine einzelne Peptidkette (**a-Peptid**) ist an der Außenseite des Ringes gebunden

F_1 und F_o sind zweifach miteinander verbunden:

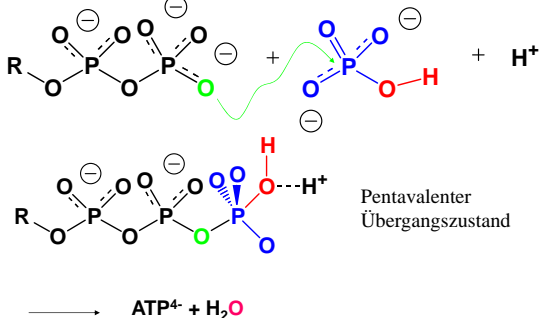
- durch den $\gamma\epsilon$ -Stiel
- durch eine „Säule“ bestehend aus **a-Peptid**, zwei **b-Peptiden** und dem **δ -Peptid**.

ROTOR (c-Ring und $\gamma\epsilon$ -Stiel) und **STATOR**.



Reaktion: $ADP^{3-} + HPO_4^{2-} \rightleftharpoons ATP^{4-} + H_2O$

Substrate sind die Mg^{2+} -Komplexe von ADP und ATP.



Befunde zum Mechanismus:

1. Enzymgebundenes ATP bildet sich auch in Abwesenheit einer protonenmotorischen Kraft. Gibt man in Abwesenheit eines Protonengradienten ADP und P_i in $H_2^{18}O$ zur **ATP-Synthase**, wird ^{18}O durch die Synthese und anschließende Hydrolyse von ATP in P_i eingebaut.
2. Ungefähr gleiche Mengen ADP und ATP stehen im katalytischen Zentrum der **Synthase** im Gleichgewicht, auch in Abwesenheit des Protonengradienten.
3. ATP verläßt das Enzym nur, wenn Protonen durch das Enzym fließen.

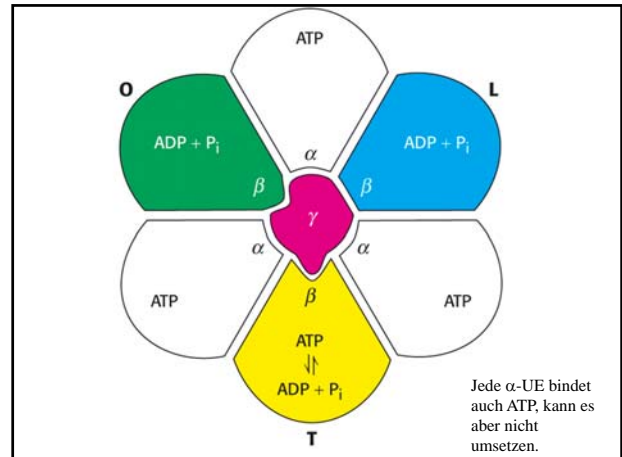
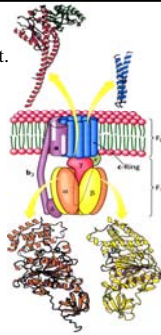
Die Funktion des Protonengradienten ist die Freisetzung des ATP vom Enzym, jedoch nicht die ATP-Synthase!

Durch die Wechselwirkung der γ -Peptidkette mit den drei β -Peptidketten sind letztere nicht äquivalent.

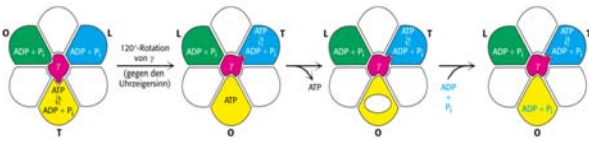
Eine β -Peptidkette kann in einer **T-Konformation** (*tight*) vorliegen, die ATP sehr fest bindet. Die Affinität ist so groß, dass gebundenes $\text{ADP} + \text{P}_i$ zu ATP umgewandelt wird ($K_{\text{eq}} \approx 1$). Durch die hohe Affinität kann sie aber ATP nicht freisetzen.

Die zweite β -Peptidkette befindet sich in der **L-Konformation** (*loose*). Sie bindet ADP und P_i , setzt es aber nicht in ATP um.

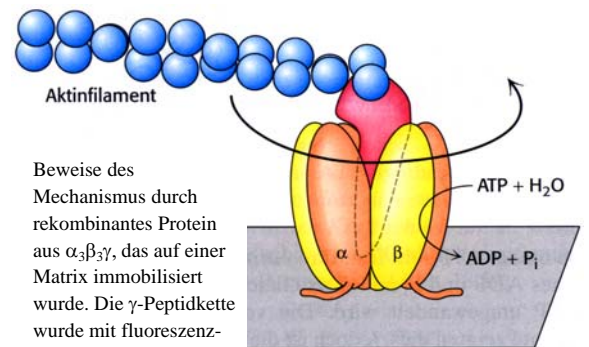
Die dritte β -Peptidkette liegt in der **O-Konformation** vor (*open*). Sie kann ein Nukleotid binden und abgeben.



Die Umwandlung der drei Konformationen ($\text{O} \rightarrow \text{L} \rightarrow \text{T} \rightarrow \text{O}$) wird durch die Rotation der γ -Untereinheit im Uhrzeigersinn angetrieben:

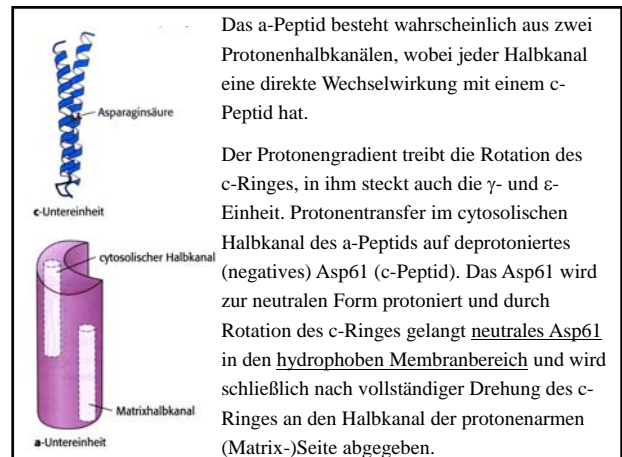
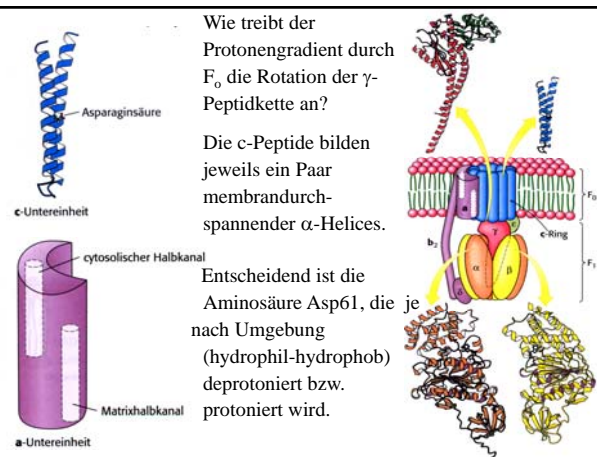


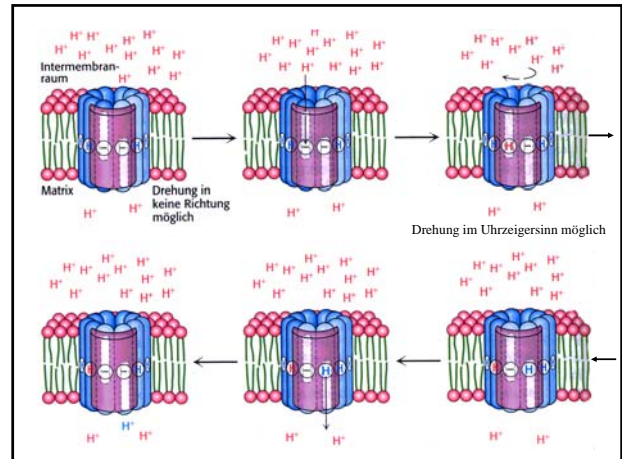
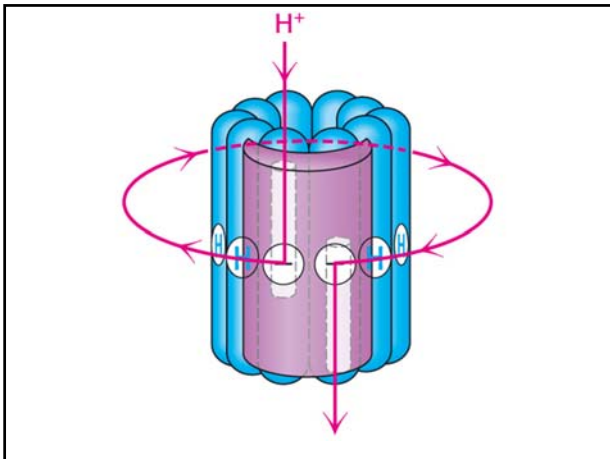
Dieser permanente Konformationswechsel der drei β -Peptidketten ermöglicht ATP-Synthese, ATP-Freisetzung, $\text{ADP} + \text{P}_i$ -Bindung usw.



Beweis des Mechanismus durch rekombinantes Protein aus $\alpha_3\beta_3\gamma$, das auf einer Matrix immobilisiert wurde. Die γ -Peptidkette wurde mit fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten verknüpft.

Bei Zugabe von ATP rotiert das Aktinfilament! Treibende Kraft: ATP-Hydrolyse.

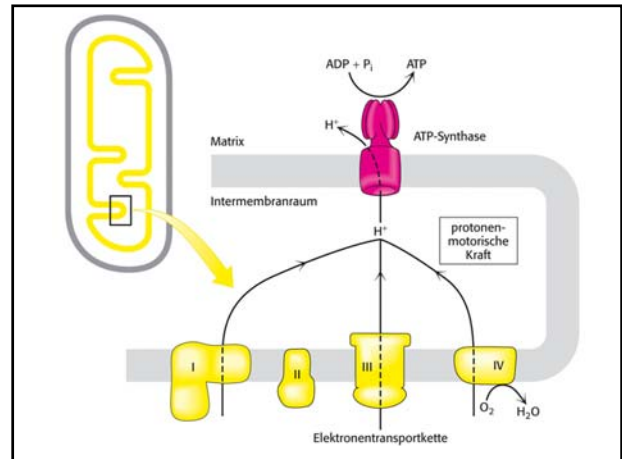




Wenn sich der c-Ring bewegt, bewegen sich auch die Peptide innerhalb des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers von F_1 .

Jede Rotation der γ -Untereinheit um 360° führt zur Synthese und Freisetzung von 3 Molekülen ATP.

Wenn sich 10 c-Peptidketten im Ring befinden (kann von Organismus zu Organismus schwanken), ist für jedes ATP der Transport von $10/3 = 3,33$ Protonen erforderlich. D.h. **etwa 3 Protonen müssen für ein ATP in die Matrix fließen.**



Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

Respiratorischer Elektronentransport

Chemiosmotische Theorie

ATP-Synthase

Entkoppler

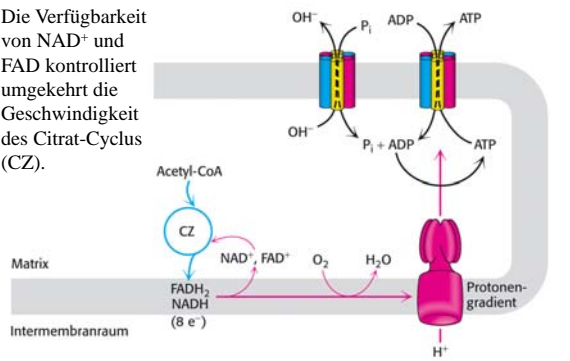
Die Geschwindigkeit der Atmung wird durch die ADP-Konzentration kontrolliert (**Atmungskontrolle**).

Elektronen fließen nur zum O_2 , wenn gleichzeitig ADP zu ATP phosphoryliert wird. Der Sauerstoffverbrauch in Mitochondrien erhöht sich bei ADP-Zugabe und reduziert sich nach ATP-Bildung.

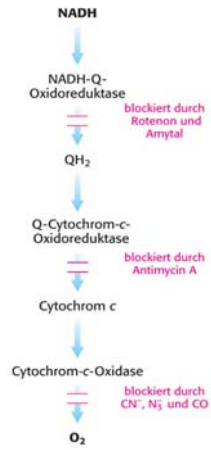
Die ADP-Konzentration beeinflusst auch die Geschwindigkeit des Citrat-Cyclus!

Die Energieladung reguliert die Verwendung von Brennstoffen. Die Synthese von ATP aus ADP und P_i kontrolliert den Elektronenfluss vom NADH und $FADH_2$ zum Sauerstoff.

Die Verfügbarkeit von NAD^+ und FAD kontrolliert umgekehrt die Geschwindigkeit des Citrat-Cyclus (CZ).

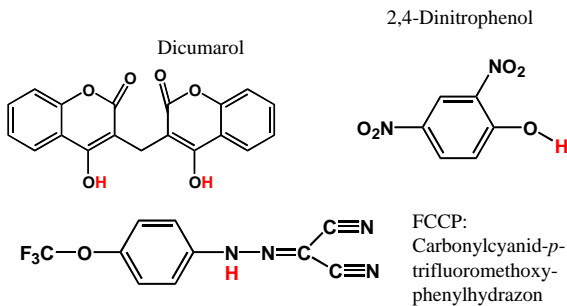


Inhibitoren blockieren spezifisch die enzymatische Aktivität der Komplexe der Atmungskette bzw. der ATP-Synthase.



Entkoppler dissipieren den Protonengradienten und entkoppeln daher den respiratorischen Elektronentransport von der ATP-Synthase.

Beispiele:



Entkoppler sind hydrophobe Moleküle mit dissoziierbarem Proton. Sie nehmen im Intermembranraum Protonen auf, transportieren sie in die Matrix und dissipieren so den pH-Gradienten.

Reaktion der Zelle: Erhöhung der Atmungsrate, vermehrter Sauerstoffverbrauch und NADH Oxidation. Verbrauch großer Mengen an Brennstoffmolekülen. Jedoch keine ATP-Bildung sondern nur Wärme-Freisetzung.

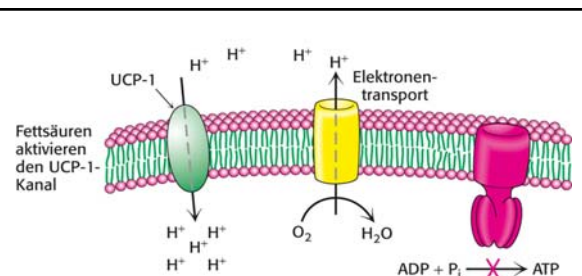
Entkoppler führen zum **Verlust der Atmungskontrolle**.

Endogene Entkoppler, wie z.B. das Protein **Thermogenin** werden von menschlichen Babys oder winterschlafhaltenden oder kälteangepaßten Tieren produziert: **zitterfreie Thermogenese**. Das braune Fettgewebe (reich an Mitochondrien) enthält zahlreiche Varianten des sog. **Entkopplungsproteins (uncoupling protein, UCP-1 oder Thermogenin)**.

Thermogenin (UCP-1) Dimer mit 33 kDa-UE ähnelt der **ATP-ADP-Translocase**. Es bildet einen Nebenweg für den Protonenfluss vom Cytosol zur Matrix. Aktivierung durch freie Fettsäuren, die als Hormonantwort aus Triglyceriden abgespalten werden (UP-1).

Es gibt weitere Varianten (**UCP-2** und **UCP-3**) mit hoher Homologie, die man in anderen Geweben findet (Familie von Entkopplungsproteinen): Rolle in der Energiehomöostase und Regulation des Körpergewichts (Fettleibigkeit (?)).

Ähnliche Proteine auch bei Pflanzen (Aufheizen von Blütenkolben, Freisetzung von Duftmolekülen) usw.



In Tieren ist das braune Gewebe auf zitterfreie Thermogenese spezialisiert. **UCP-1 (Thermogenin)** bildet einen Nebenweg für den Protonenfluss vom Cytoplasma in die Matrix und erzeugt dadurch Wärme ("Kurzschluss der Protonenbatterie"). Aktivierung, wenn die Körpertemperatur fällt. Hormone setzen Fettsäuren frei, die UCP-1 aktivieren.

Arten der Phosphorylierung

Mitochondrien

Reduktionspotentiale und Freie Enthalpie

Respiratorischer Elektronentransport

Chemiosmotische Theorie

ATP-Synthase

Entkoppler

Bilanz

Bilanz

Wieviel ATP wird nun aus Glucose gewonnen, wenn Glucose in der Glycolyse und im Citronensäure-Cyclus metabolisiert wird und die gebildeten Reduktionsäquivalente (NADH und FADH₂) in der Atmungskette oxidiert werden?

Zur Synthese von ATP müssen etwa drei Protonen durch die **ATP-Synthase** fließen. Ein weiteres H⁺ wird verbraucht, um ATP aus der Matrix ins Cytosol zu transportieren: **4 H⁺ / ATP**

Unsicherheitsfaktor (und Ursache für die Diskrepanz in Publikationen bzw. Lehrbüchern) ist die Unsicherheit in der Zahl jener Protonen, die von den drei pumpenden Komplexen von der Matrix auf die Cytosolseite abgegeben werden.

Annahme: Komplex I: 4 Protonen; Komplex III: 2 Protonen und Komplex IV: 4 Protonen

D.h. Bei der Übertragung der Elektronen von NADH auf O₂ werden 10 Protonen transloziert.

Somit werden durch Oxidation von 1 NADH etwa 2,5 Moleküle ATP gebildet.

Fließen die Elektronen über FADH₂ (Komplex II) in die Atmungskette, werden 6 Protonen transloziert und nur etwa **1,5 ATP pro FADH₂** gebildet.

Bilanz: Start mit **Glucose**

Glycolyse: 2 ATP, 2 NADH

Bilanz: Start mit **Glucose**

Glycolyse: 2 × 1 ATP, 2 × 1 NADH

Pyruvat-DH: 2 × 1 NADH

Citronensäure-Cyclus: 2 × 3 NADH

2 × 1 FADH₂

2 × 1 ATP

4 ATP, 10 NADH, 2 FADH₂ entsprechend
4 + (2,5 × 10) + (1,5 × 2) ATP-Molekülen =
32 Moleküle ATP

Dies gilt unter der Annahme, dass cytosolisches NADH über den Malat-Aspartat-Shuttle eingeschleust wird. Wird cytosolisches NADH über den Glycerin-3-phosphat-Shuttle in die Atmungskette eingeschleust, ist die Ausbeute nur etwa **30 ATP**.

Bilanz (glycolytisches NADH über Glycerinphosphat-Shuttle in die Matrix transportiert):



Wirkungsgrad ?

Annahme: 50 kJ/mol stecken unter physiologischen Bedingungen im ATP

Bildung von 30 ATP/Glucose (Weg über Glycerin-3-phosphat-Shuttle) = 1500 kJ/mol Glucose

Die vollständige Oxidation von Glucose liefert $\Delta G^{\ominus\prime} = -2937$ kJ/mol (Summe aller Teilreaktionen)

$$(1500/2937) \times 100\% = 51\%$$