

Oksidativna fosforilacija

Oksidativna fosforilacija

- *U eukariota u mitohondrijama.*
- *Odigrava se redukcija O_2 do H_2O .*
- *Donori elektrona su **NADH** i **FADH₂**.*

- Najveći deo energije za svoj rast, održavanje i rad ćelija dobija **oksidacijom ugljenih hidrata i lipida**; ova jedinjenja su u značajnoj meri redukovana te mogu da daju veliku količinu redukcionih ekvivalenata koji se prenose do kiseonika; **krajnji proizvodi oksidacije su voda i ugljen dioksid.**
- Pri oksidaciji se oslobađa energija koja se zahvata i pretvara u hemijsku energiju koja se čuva u obliku **visokoenergetskih veza.**

- Oksidacija je u ćeliji postepen proces. U **prvoj fazi** se redukcionim ekvivalenti odvajaju od supstrata delovanjem **dehidrogenaza**.
- U sledećoj fazi **elektroni i protoni** se predaju **lancu prenosilica elektrona – respiratornom lancu**, koji je smješten na unutrašnjoj membrani mitohondrije.
- U **trećoj fazi**, elektroni se prenose **od jednog do drugog člana respiratornog lanca do kiseonika**, krajnjeg primaoca elektrona. Akumulacija energije je ostvarena, **sprezanjem** oslobađanja energije, koje se dešava pri prenosu elektrona sa višeg na niži potencijal, sa reakcijama u kojima se formira visokoenergetska veza u ATP-u.
- Cjelokupan proces je nazvan **oksidativna fosforilacija**.

Oksidativna fosforilacija

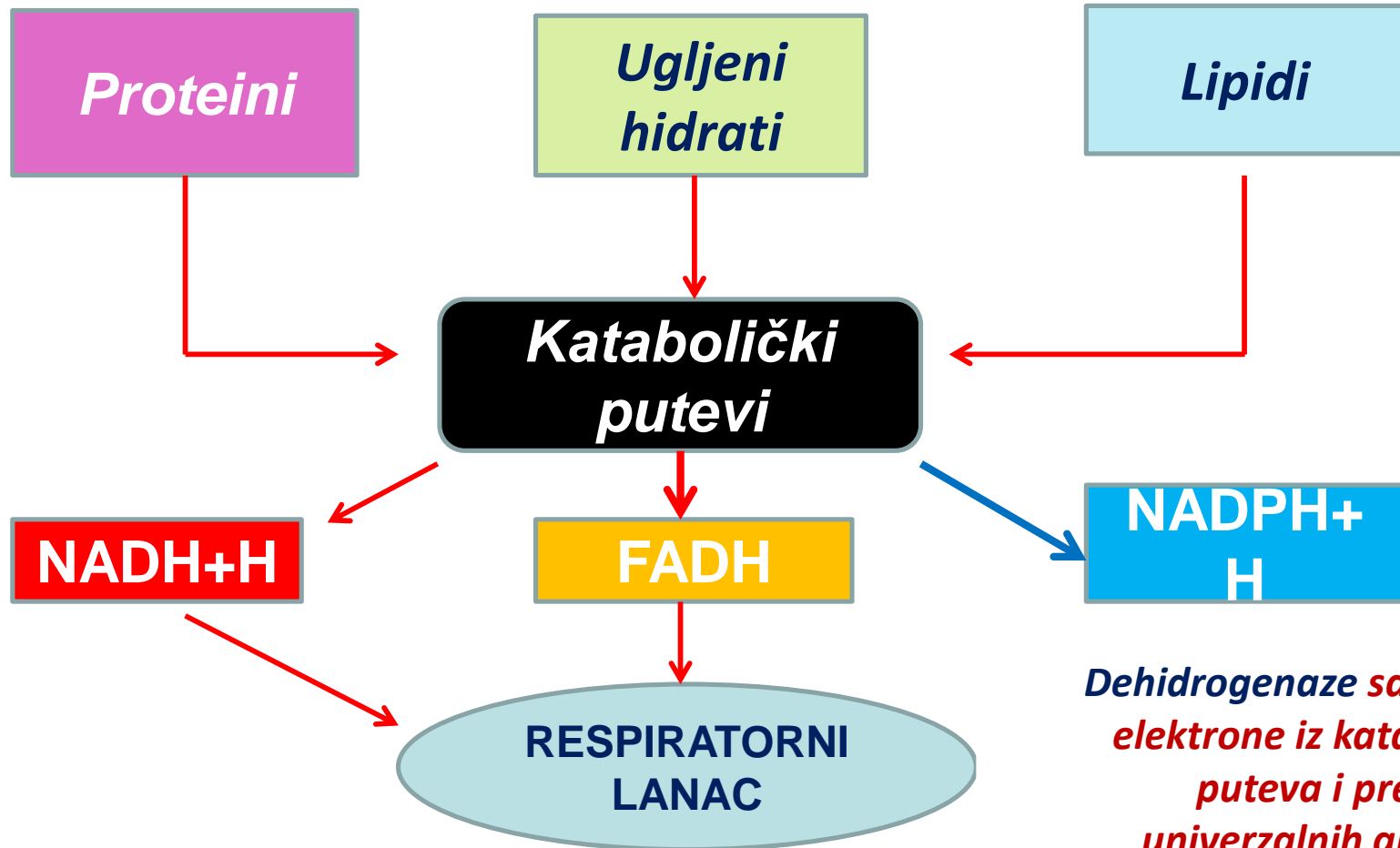
Peter Mitchell (1961)

- hemiosmotska teorija –

Transmembranska razlika u koncentraciji protona rezervoar za dobijanje energije iz bioloških oksidacija.

OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA

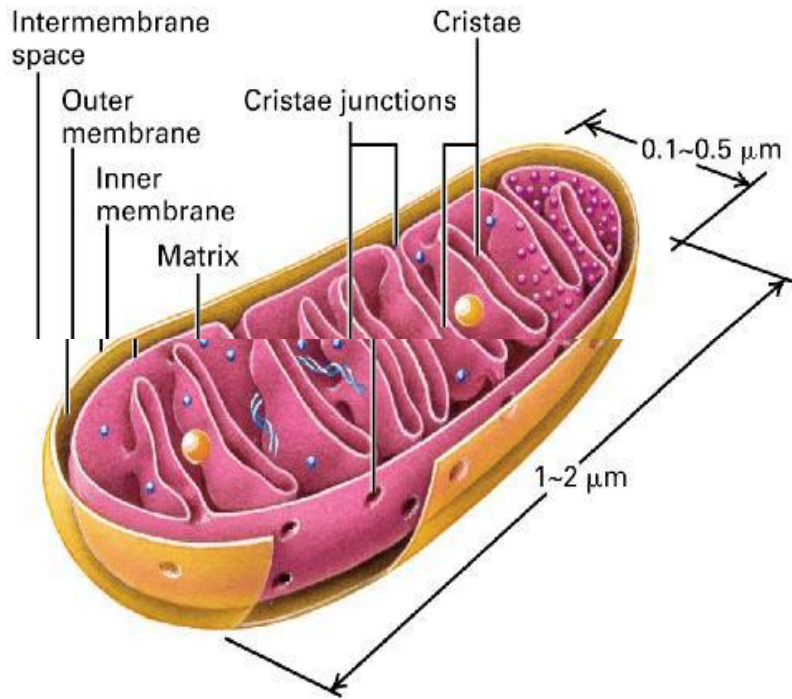
Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama



Dehidrogenaze sakupljaju elektrone iz kataboličkih puteva i prenose do univerzalnih akceptora elektrona NAD^+ , $NADP^+$, FMN ili FAD.

Respiratorni lanac čine prenosioci elektrona čiji je redosled određen rastućim elektropozitivnim potencijalom

- **Respiratorni lanac** je skup katalitičkih proteina lokalizovanih u unutrašnjoj membrani mitohondrija, a čije funkcionalne grupe mogu da primaju i predaju elektrone. Ti proteini su NADH dehidrogenaza, citohrom b, citohrom c1, citohrom c, citohrom a i citohrom a3.
- Uz ove, respiratorni lanac čine i proteini koji sprežu oslobađanje energije koje se dešava pri promeni elektrohemijskog potencijala sa sintezom visokoenergetske veze u ATP-u.
- Koenzim Q, koji prenosi elektrone od flavoproteina do citohroma b takođe pripada ovom sistemu. U samom lancu elektronski nosači su poredani po rastućem elektropozitivnom potencijalu; ukupna potencijalna razlika između prvog i poslednjeg člana lanca je 1,12 V. Ova razlika u elektropozitivnosti omogućava protok elektrona uz oslobađanje energije.



Respiratorni lanac mitohondrija se sastoji od serije nosača elektrona koji djeluju sekvencijalno.

Najveći broj ovih nosača su integralni proteini membrane čije prostetične grupe mogu primiti ili davati jedan ili dva elektrona.

Respiratorni lanac je organizovan u komplekse

- **Lanac prenosilaca elektrona je organizovan sistem, i prostorno i funkcionalno.**
- **Članovi lanca prenosilaca elektrona su poredani u definisanom redosljedu, prevashodno određenim njihovim redoks potencijalom – od najnegativnijeg , NADH dehidrogenaze, do najpozitivnijeg, citohroma aa3.**
- **Prostorno, članovi respiratornog lanca su organizovani u funkcionalne koplekse, smeštene u unutrašnjoj membrani mitohondrija:**

Kompleks I – NADH dehidrogenaza i Fe-S centri enzima

Kompleks II – sukcinat dehidrogenaza sa svojim Fe-S centrima i citohrom b

Kompleks III – citohromi b i c1 i specifični Fe-S centar

Kompleks IV – citohromi a i a3 (citohrom oksidaza)

Kompleks V – F0F1 ATP sintaza

Ubihinon spaja kompleksa I, II i III, dok je **citohrom c** veza između kompleksa III i kompleksa IV.

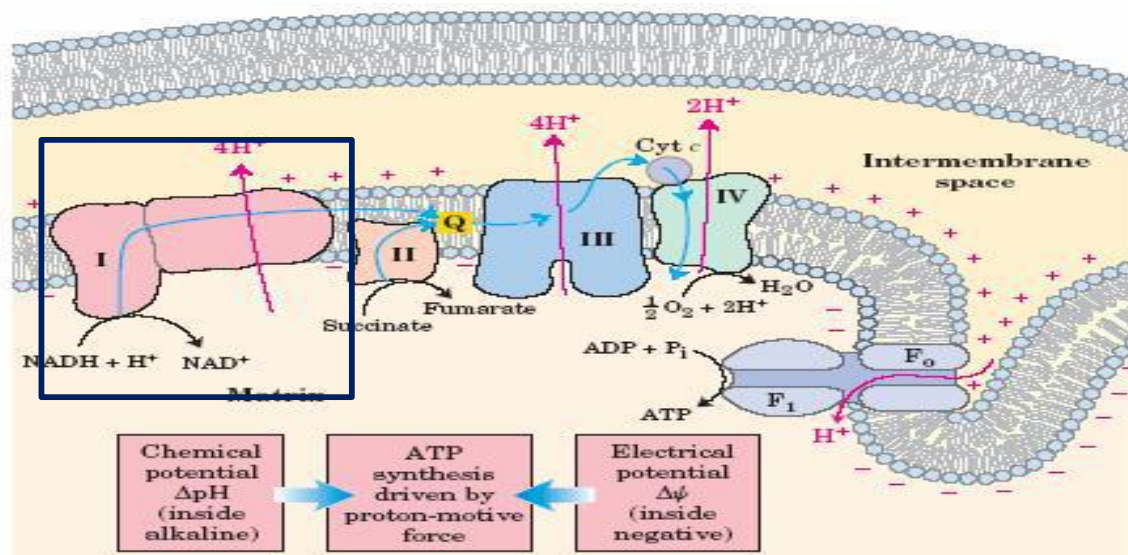
Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

Kompleks I:

- NADH do ubihinona
- NADH dehidrogenaza
- NADH:ubihinon oksidoreduktaza

- ❖ 42 polipeptidna lanca
- ❖ FMN flavoprotein
- ❖ najmanje 6 FeS centara

Elektroni se sa NADH+H⁺ prenose na koenzim Q

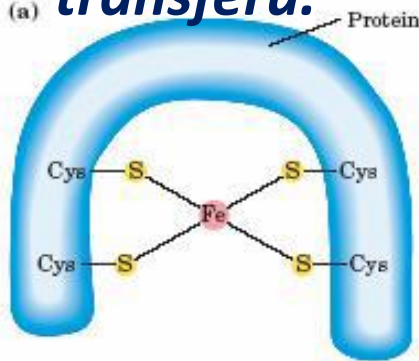


Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

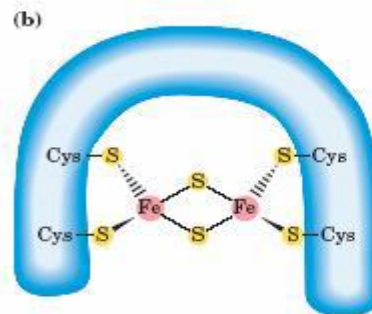
Gvožđe-sumpor proteini

Gvožđe je u asocijaciji sa neorganskim sumporom ili sa atomima sumpora cisteinskih rezidua.

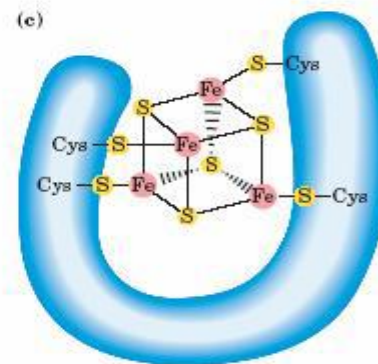
- Svi gvožđe sumpor proteini učestvuju u **jedno-elektronskom transferu** u kome se jedan atom gvožđa oksiduje ili redukuje.
- Najmanje **osam FeS proteina** funkcioniše u mitohondrijalnom transferu.



FeS



2Fe-2S



4Fe-4S



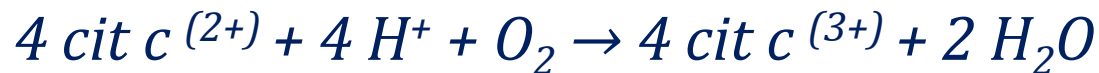
Koenzim Q (ubihinon; CoQ)

Hinon rastvorljiv u mastima sa veoma dugim izoprenoidnim bočnim lancem (10 izoprenoidnih jedinica - CoQ10). Količinski, postoji znatan stehiometrijski višak ubihinona u odnosu na ostale članove respiratornog lanca – **CoQ je pokretan i sakuplja redukzione ekvivalente sa manje pokretnih flavoproteinskih kompleksa.**

Uloga ubihinona je da **prikuplja** redukzione ekvivalente ne samo sa **NADH dehidrogenaze** već i sa drugih flavinzavisnih dehidrogenaza (npr. **Sukcinat dehidrogenaze** i **acil-CoA dehidrogenaze masnih kiselina**) i da ih **predaje citohromima.**

Kako ubihinon prima i predaje po jedan elektron u jednom trenutku, zahvaljujući postojanju **semihinonskog oblika**, CoQ je tačka gdje **dvoelektronski prenos** postaje **jednoelektronski**. Pri određenim uslovima u ćeliji moguće je nagomilavanje semihinonskog oblika CoQ sa posledičnom pojavom slobodnih radikala i mogućim oštećenjima koja iz ovoga proizilaze.

- **Ubihinon** preuzima i redukcijske ekvivalente sa flavin-zavisnih dehidrogenaza, kao što je npr. **sukcinat dehidrogenaza**, enzim ciklusa trikarboksilnih kiselina (kompleks II). Direktni prenos redukcijskih ekvivalenata na koenzim Q vrši se i sa **α -glicerofosfat dehidrogenaze** (enzim koji vrši povratni transport redukcijskih ekvivalenata iz citosola u mitohondrije) i **acil CoA dehidrogenaze** iz β -oksidacije masnih kiselina.
- **Ubihinon** predaje elektrone **citohromu b** kompleksa III, a **citohrom c** preuzima elektrone sa ovog kompleksa i prenosi ih do **kompleksa IV**, citohrom oksidaze, koja katališe prenos elektrona sa redukovanog oblika citohroma c na kiseonik, pri čemu nastaje voda:



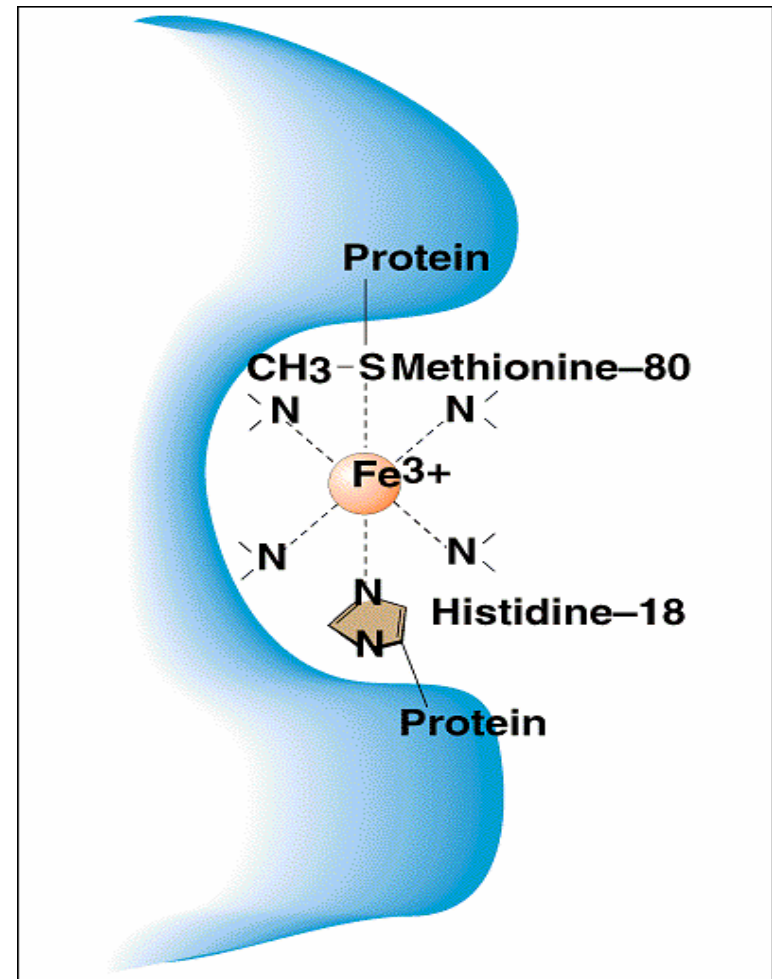
Potpunom redukcijom kiseonika, nastaje bezopasno jedinjenje, voda. Međutim, ukoliko je kiseonik samo djelimično redukovan, nastaju jedinjenja koja su veoma reaktivna i opasna za ćeliju.

Citohromi, gvožđe-sumpor proteini i koenzim Q imaju funkcionalne grupe koje mogu da primaju i otpuštaju elektrone

Dva su osnovna tipa proteina koji se nalaze lancu za prenos elektrona: citohromi i proteini koji sadrže gvožđe i sumpor (Fe-S proteini).

***Citohromi** su integralni membranski proteini, sadrže gvožđe i na osnovu apsorpcionih spektara se dele u tri grupe: **a, b i c.** (Izuzetak je citohrom c, koji je, uz CoQ, pokretan član lanca).*

Postoje tri tipa citohroma b, zatim citohromi c i c1 i citohromi a i a3. Svaki hem je udružen sa jonom Cu koji je smešten blizu Fe.



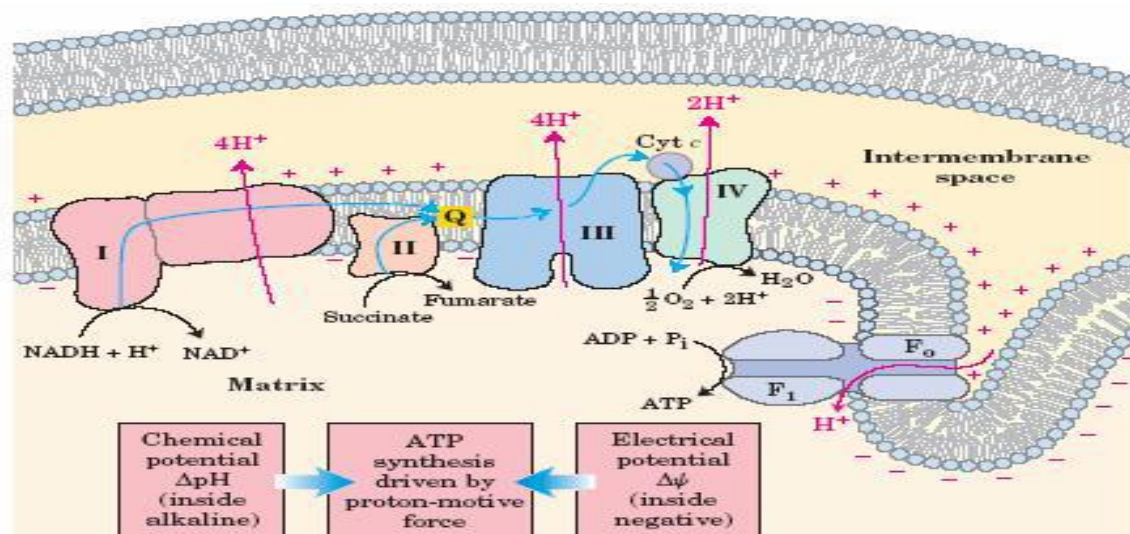
- **Citohromi su jednoelektronski prenosioci – gvožđe prelazi iz +3 u +2, a bakar iz +2 u +1 stanje.**
- **Uobičajeno je svih 6 koordinativnih veza Fe popunjeno, te se O₂ ne može direktno vezati za njih. Izuzetak je citohrom aa₃, citohrom oksidaza, jedini član respiratornog lanca koji može da reaguje sa kiseonikom, za koji ima veoma veliki afinitet; reakcija prenosa redukcionih ekvivalenata na kiseonik je jedina nepovratna reakcija u lancu. Ove dve osobine omogućavaju neprekidni jednosmjerni prenos elektrona, čak i kada je parcijalni pritisak kiseonika mali.**

OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA

Respiratorni lanac

Prenosioci elektrona funkcionišu u okviru multienzimskih kompleksa

- **Kompleksi I i II** katalizuju prenos elektrona do koenzima Q
- **Kompleks III** sa redukovanog koenzima Q do citohroma c
- **Kompleks IV** sa citohroma c do O_2



Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

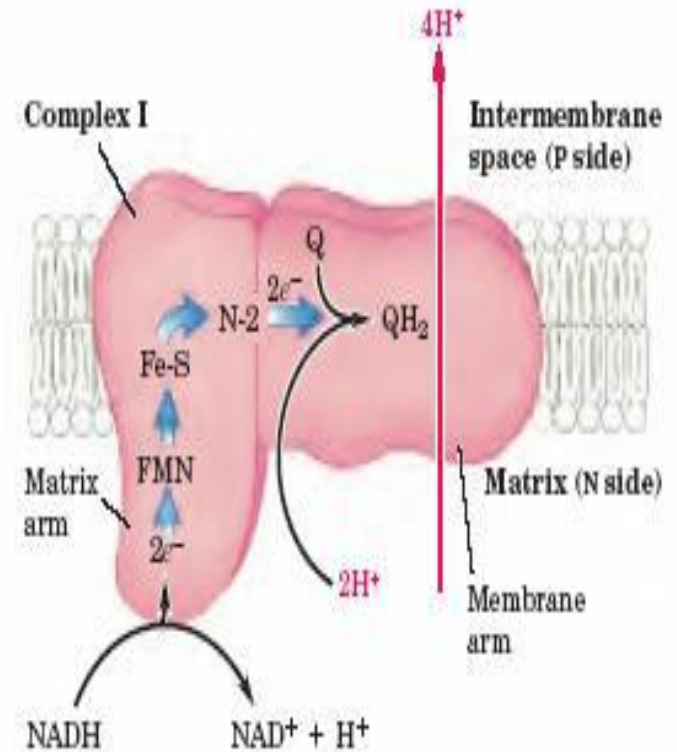
Kompleks I

Katalizuje dva simultana i povezana procesa.

Najveći, transmembranski kompleks, sadrži: 25 polipeptida, FMN i 7 FeS.

- ✓ Egzergoni prenos hibridnog jona (:H-) sa NADH i protona iz matriksa.
- ✓ Endergoni prenos 4 protona iz matriksa u međumembnski prostor.

To je dakle **protonska pumpa** koja energiju dobija od prenosa elektrona.



Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

Kompleks II

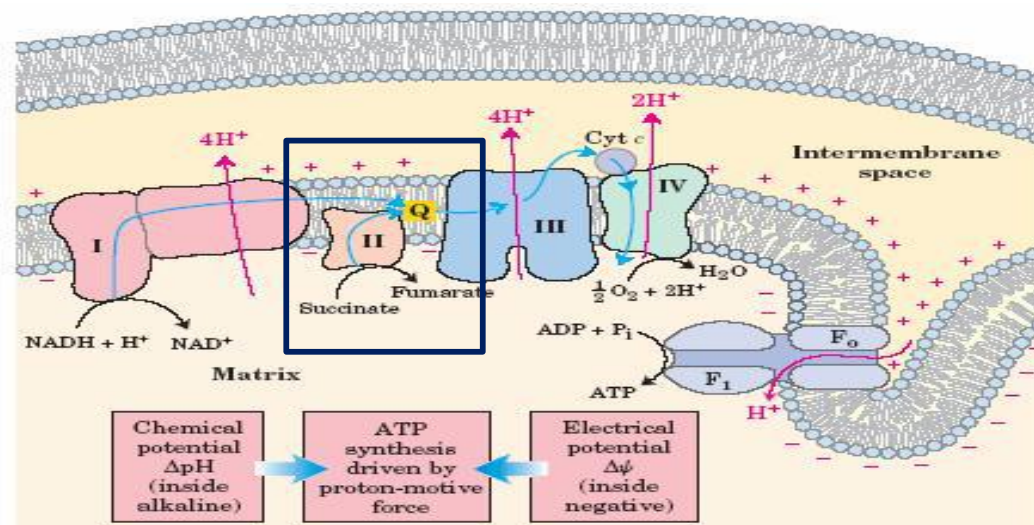
✓ *Sukcinat do ubihinona*

✓ *Sukcinat dehidrogenaza*

– *enzim ciklusa trikarbonskih kiselina (CTK)*

– *jedini enzim CTK vezan za membranu*

Prenosi elektrone sa sukcinata do koenzima Q



Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

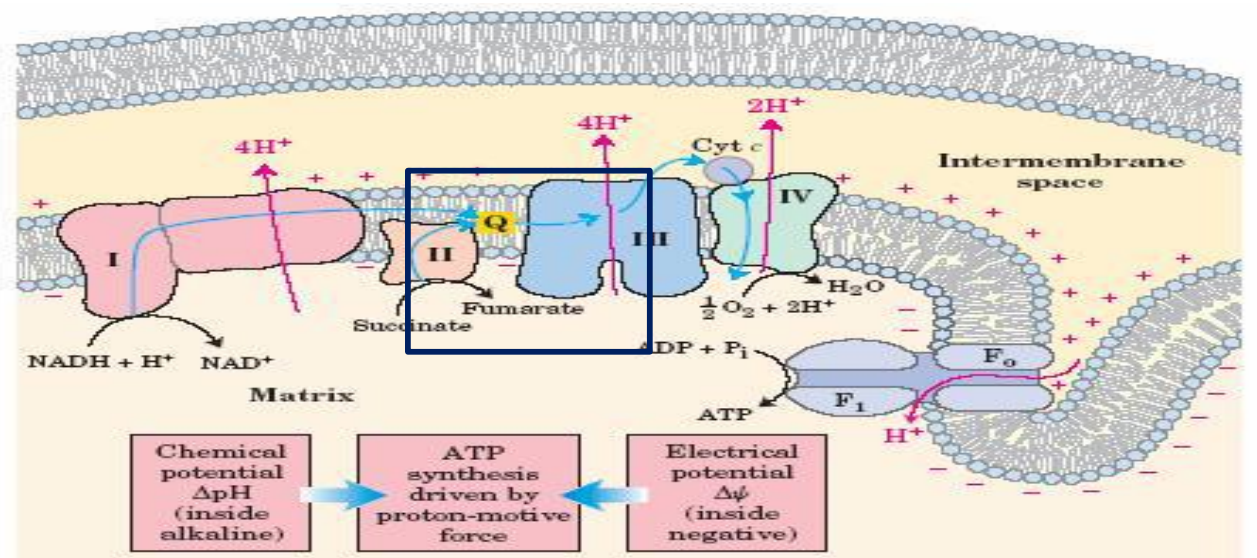
Kompleks III

Ubihinon: citohrom c oksidoreduktaza

Ubihinon do citohroma c

Citohrom bc1 kompleks

Povezuje prenos elektrona sa ubihinola (QH₂) na citohrom c, uz transfer protona iz matriksa u međumembranski prostor.



Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

Kompleks III

Dimer – sastavljen od dva identična monomera.

Svaki monomer sadrži 11 različitih subjedinica.

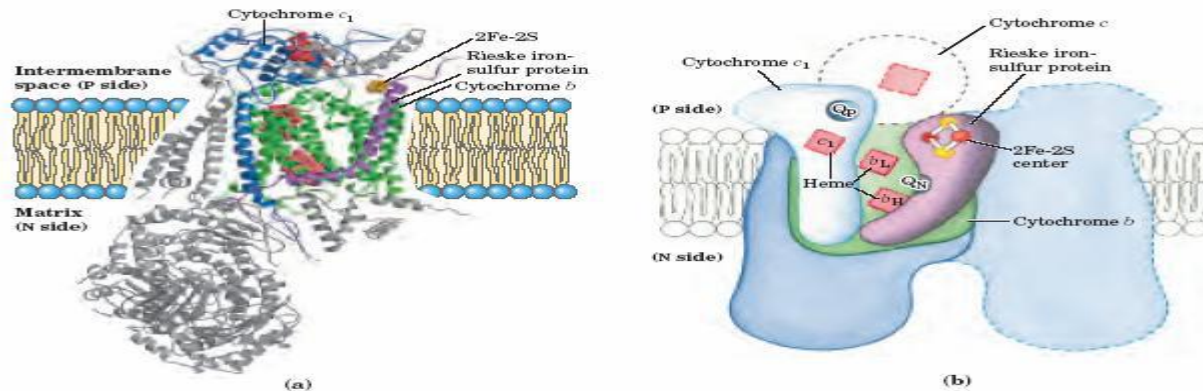
Struktura monomera

Funkcionalno jezgro čine tri subjedinice.

Citohrom b (zeleno) sa svoja dva hema (bh i b1).

Rieske gvožđe-sumpor protein (ljubičast) sa 2Fe-2S centrom (žuto).

Citohrom c1 (plavo) sa svojim hemom (c1, crveno).

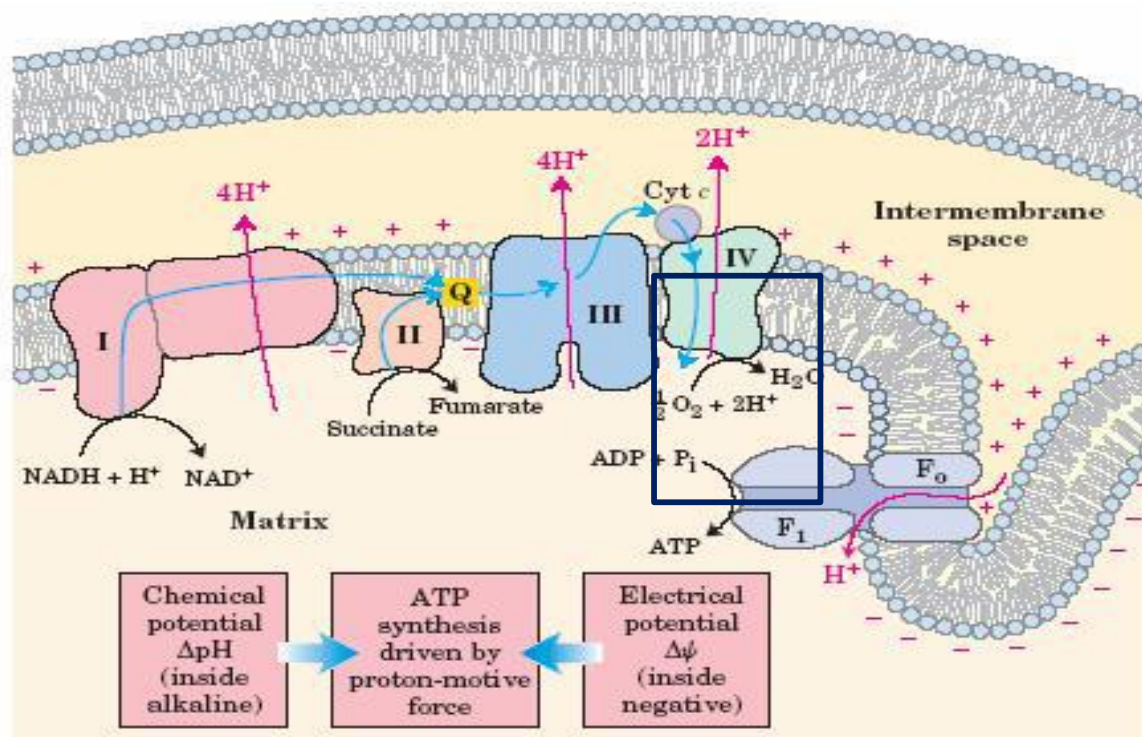


Kompleks IV

Citohrom c do O₂

Citohrom oksidaza - Warburgov enzim

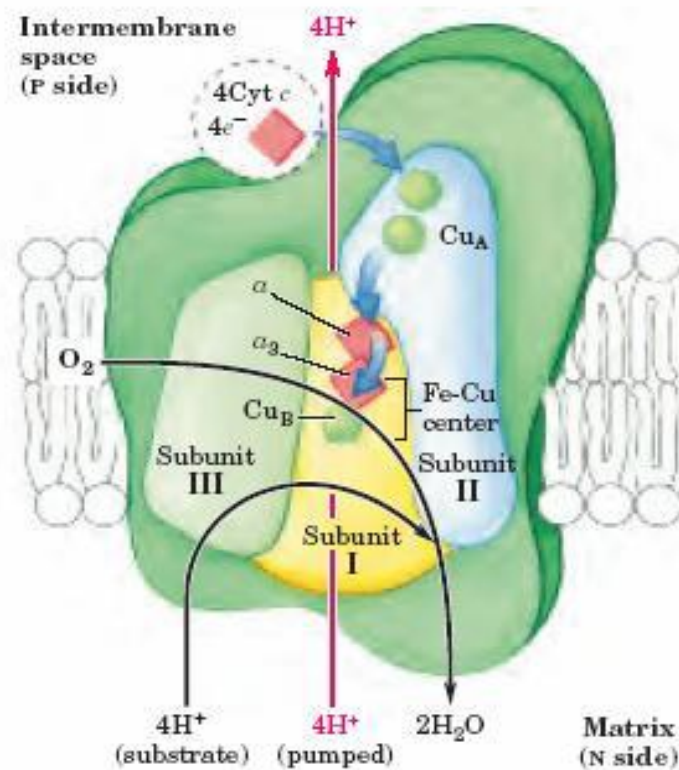
Prenosi elektrone sa citohroma c do molekularnog kiseonika dajući vodu.



Kompleks IV

Za svaka 4 elektrona koja prođu kroz ovaj kompleks enzim preuzima 4 "supstrata" H^+ iz matriksa (N strana) za prevođenje O_2 u $2H_2O$.

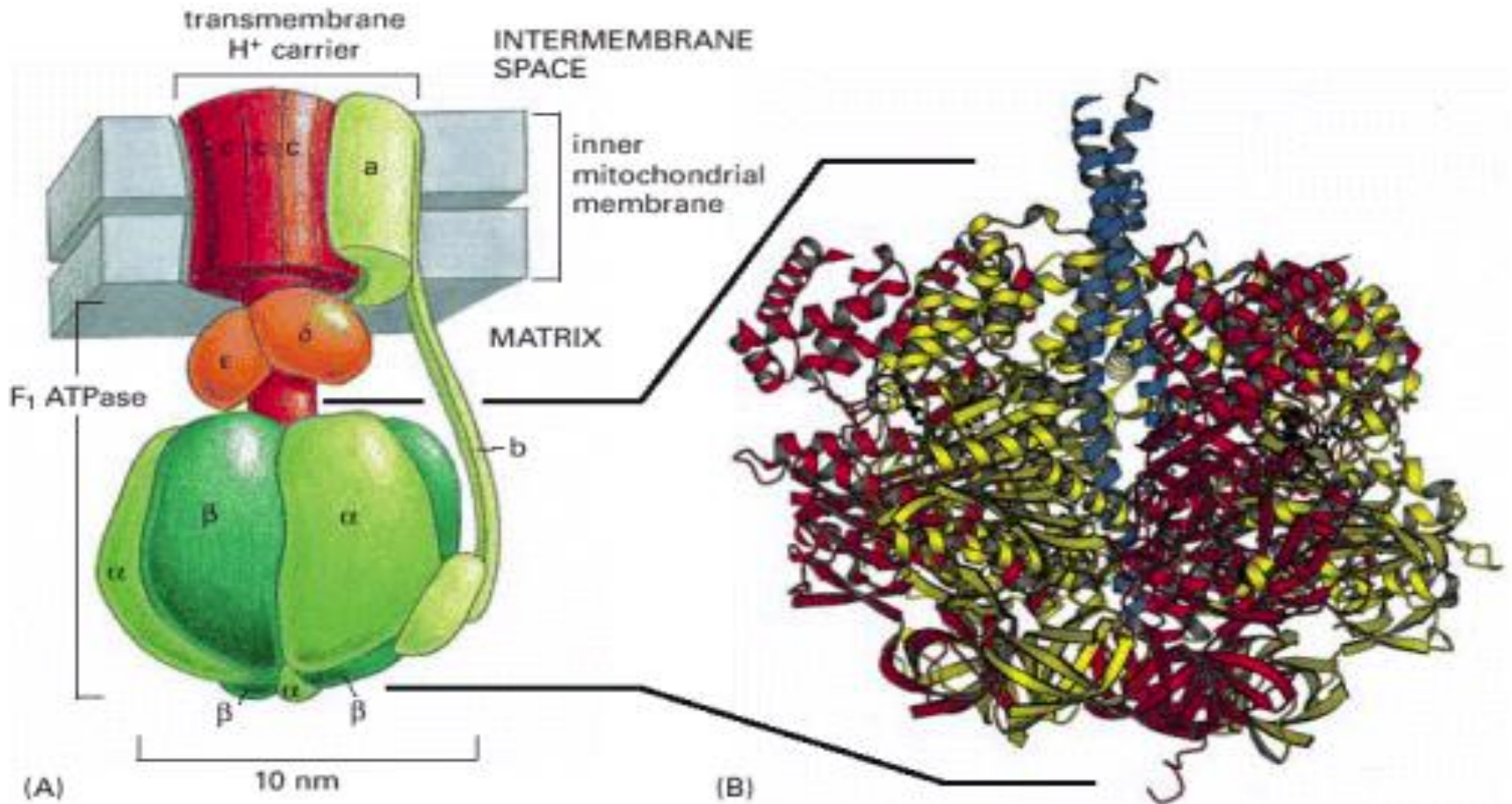
Takođe se energija ove redoks reakcije upotrebljava za pumpanje jednog protona u intermembranski prostor (P strana) za svaki elektron koji Prolazi – PROTONSKA PUMPA.



Oksidativna fosforilacija – Sinteza ATP-a

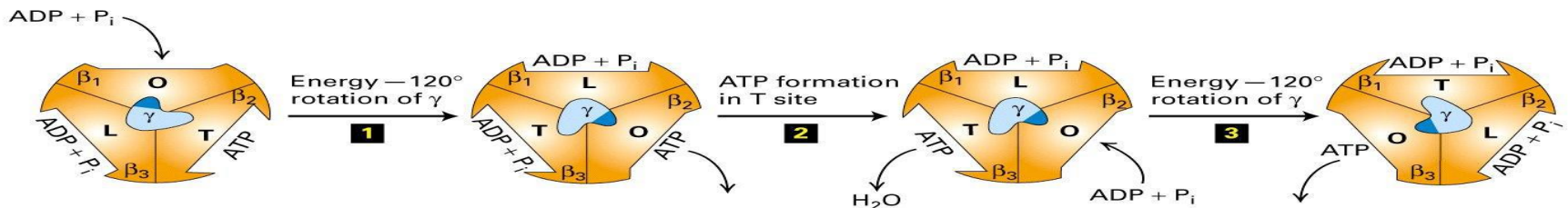
- Translokaciju protona vrše kompleksi respiratornog lanca, a sintezu ATP-a **ATP sintaza**.
- **FoF1 ATP sintaza** je enzim koji sintetiše ATP.
- FoF1 kompleks, ATP sintaza, sačinjena je od **pet vrsta proteina (a,b,g, d i e)**, koji čine čvor i peteljku; čvor i peteljka zajedno čine F1, čiji je sastav a_3b_3gde . Uz to se nalazi osnova, Fo, ugrađena u unutrašnju membranu mitohondrija.
- U osnovi ATP sintaze nalazi se **kanal kroz koji prolaze protoni**. Prolazak protona daje energiju za obrtanje osnove koje se prenosi na peteljku i menja konformaciju proteina u čvoru.

ATP sintaza



Kako se energija protonskog gradijenta pretvara u hemijsku vezu u ATP-u ?

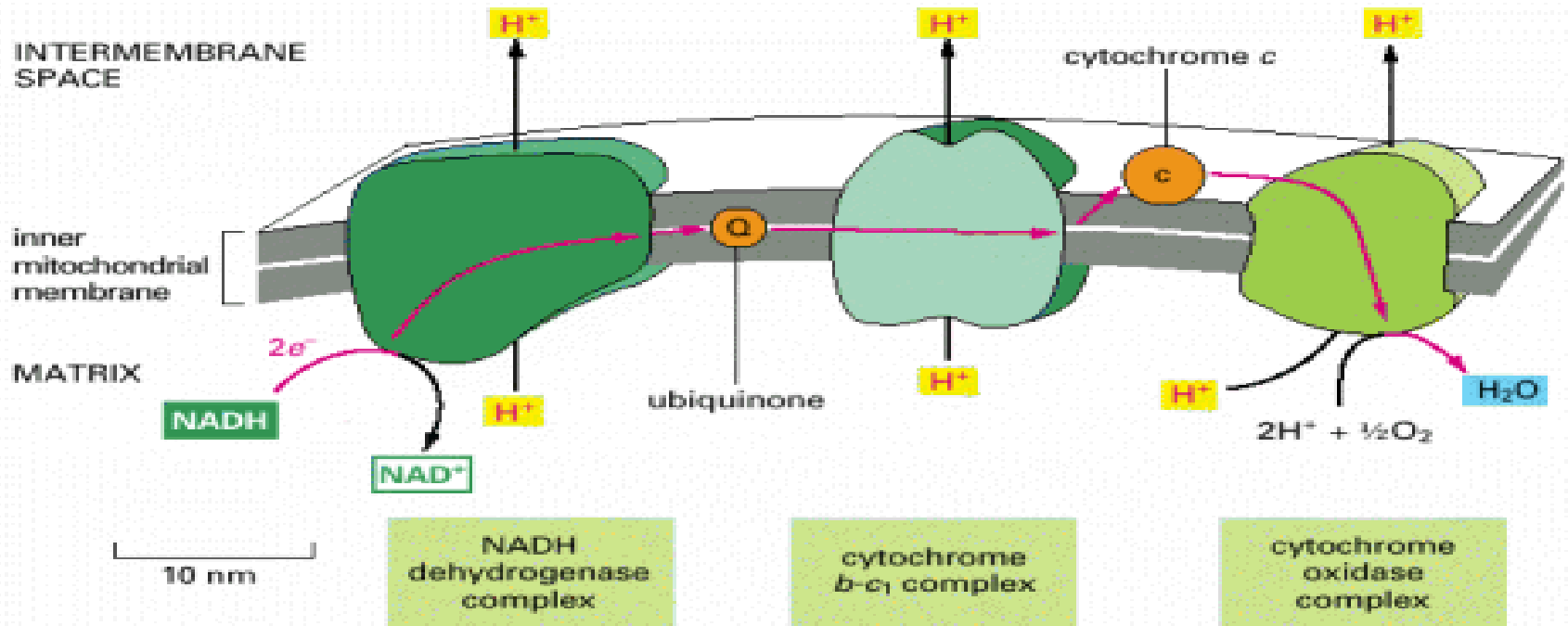
- Katalitičko mesto ATP sintaze se nalazi na spoju a i b subjedinica. b subjedinica može da bude u tri konformaciona oblika, **otvorenom, opuštenu i stegnutom**, što je određeno asimetričnim interakcijama sa centralno postavljenom g subjedinicom. **ADP i Pi** su vezani za **opušteni oblik**, dok se **ATP** nalazi vezan za **stegnuti oblik** b subjedinice.**



Fosforilacija ADP u ATP ide kroz 3 faze:

- 1. prolazak protona kroz kanal F_0 komponente - ceo a_3b_3 skup se okrene,**
- 2. Konformacione promjene F_1 subjedinice, dovodi da stegnuto mjesto postane otvoreno i ATP se otpušta a za mjesto, koje postaje opuštenu vezuju se ADP i P_i , koji stvaranjem fosfoanhidridne veze prelazi u ATP.**
- 3. otpuštanje ATP-a zahteva utrošak energije koja se dobija promjenama u elektrohemijском gradijentu.**

Translokacija protona se dešava na tri mesta u respiratornom lancu, u kompleksima I, III i IV



Smatra se da prolazak jednog para elektrona kroz cjelokupni respiratorni lanac ispumpava ukupno 10 protona. To je dovoljno za sintezu 2,5 ATP-a (deo energije se troši za izmjenu ADP:ATP između citosola i mitohondrije).

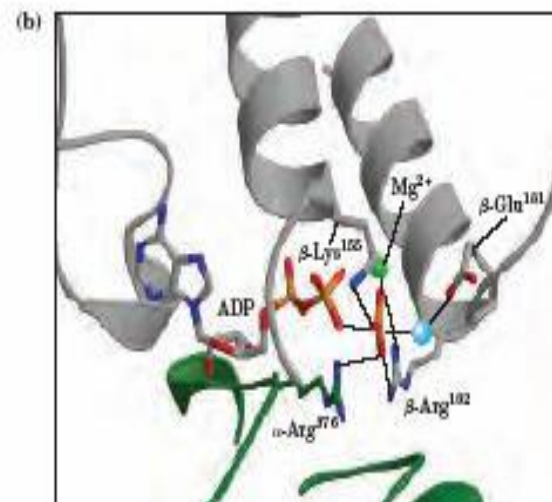
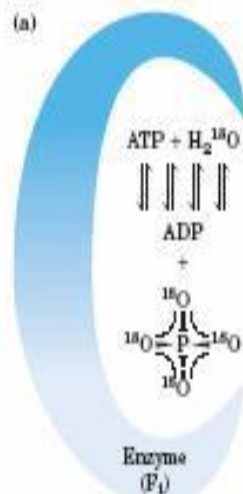
Oksidativna fosforilacija – Sinteza ATP-a

Pri prolasku para elektrona kroz respiratorni lanac dolazi do prebacivanja 10 H⁺ iz matriksa u međumembranski prostor.

Za sintezu jednog molekula ATP-a potrebno je da kroz protonski kanal prođe 4 H⁺.

NADH – 10 protona 2.5 ATP

FADH₂ – 6 protona 1.5 ATP



Energetski bilans lanca prenosilaca elektrona

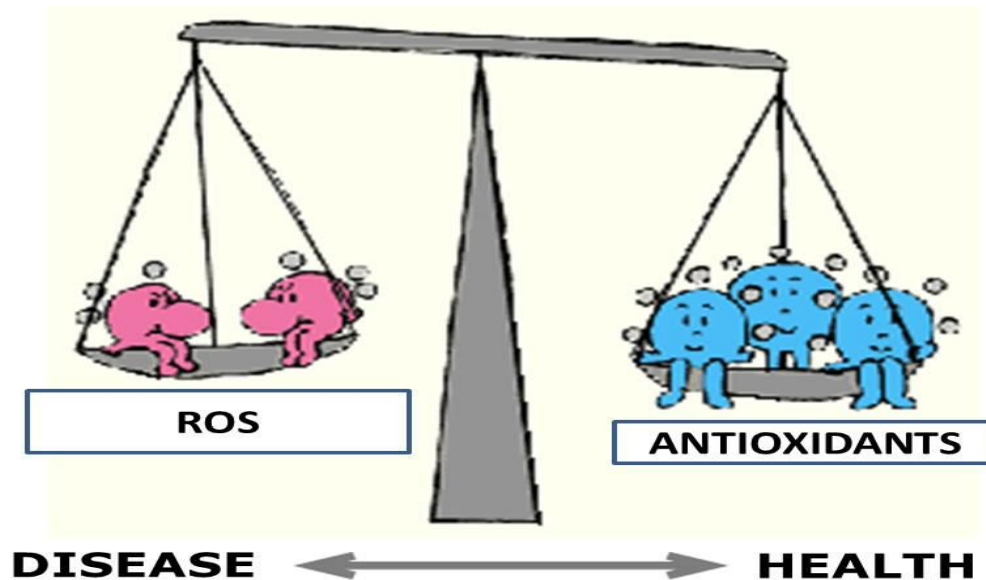
- *Od svakog NADH+H⁺ u lanac prenosilaca elektrona uđu 2 elektrona, što je ekvivalent redukciji $\frac{1}{2}$ O₂.*
- *Ukoliko se 4 protona ispumpaju na nivou kompleksa I, 4 na nivou kompleksa III i 2 protona na nivou kompleksa IV, a procenjuje se da je za **sintezu ATP-a potrebno da se 4 protona vrate kroz molekul ATP sintaze, oksidacijom svakog NADH+H⁺ se dobiju 3 ATP-a, a od FADH₂ - 2 ATP.** To znači da se samo **30% energije dostupne oksidacijom redukovanih koenzima, iskoristi za sintezu ATP-a.***
- *Dio energije se iskoristi za **transport jona**, a ostatak se oslobađa u vidu **toplote.***



SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

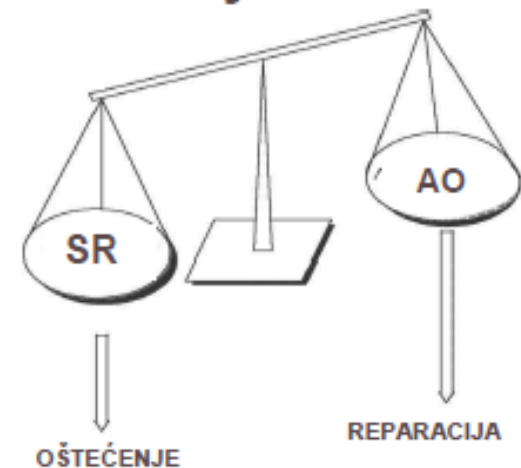
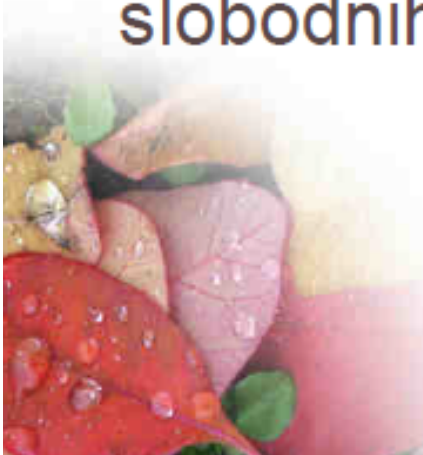
Oksidativni stres

- Oksidativni stres je poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa, koji nastaje zbog prekomjernog stvaranja reaktivnih slobodnih radikala, koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu.



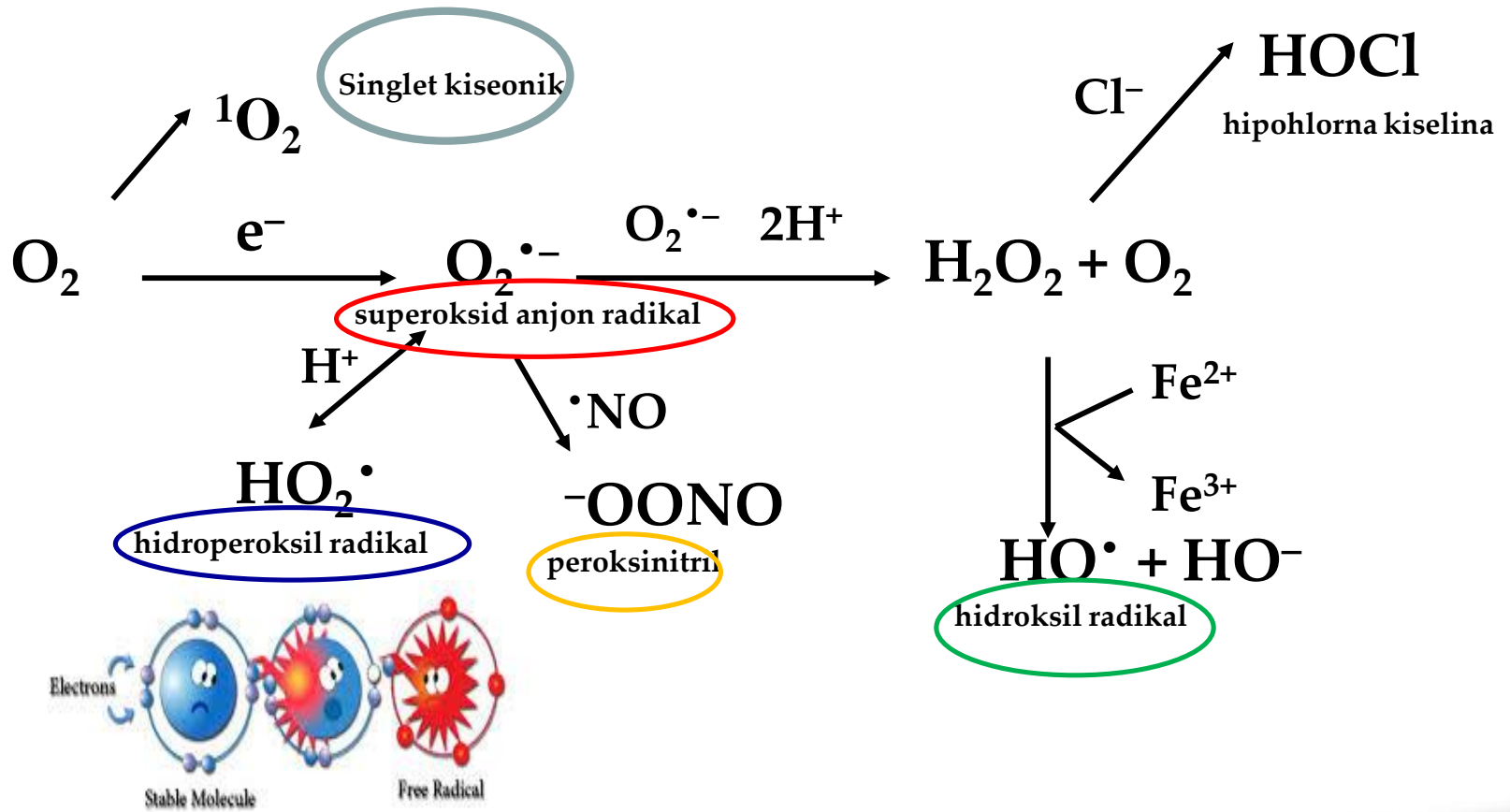
Oksidativni stres

- Stanje koje se javlja kada prooksidansi (slobodni radikali) nadvladaju mehanizme antioksidativne zaštite
- Postoji *povećana produkcija* i *smanjena sposobnost neutralizacije* i *eliminisanja* slobodnih radikala



Slobodni radikali - atomi, atomske grupe ili molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona → nestabilni i reaktivni

Reaktivne vrste – nastaju u toku metabolizma kiseonika, azota, organskih j-nja



AZOTNI MONOKSID - NO

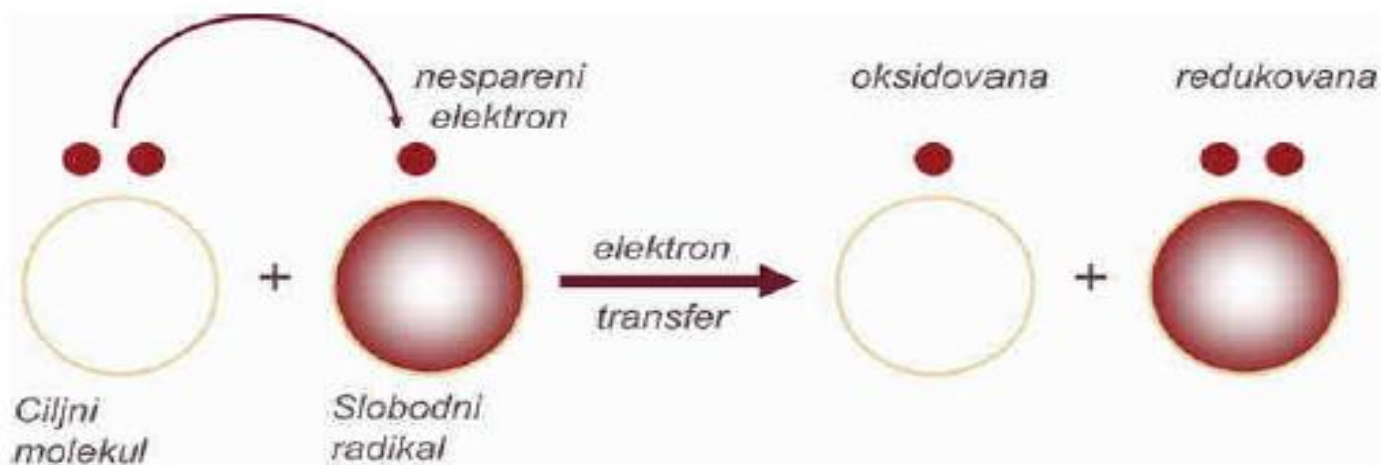
- **NO** pripada grupi **slobodnih radikala**, jer je jako reaktivno jedinjenje, najčešće sa O_2 , gradeći **PEROKSINITRIT** – EFIKASNO OKSIDATIVNO JEDINJENJE.
- Fiziološki značaj:
 1. Učestvuje u **regulaciji ćelijskih procesa** kod imunološkog odgovora kao efektor
 2. **Smanjuje adhezivnost i agregaciju** trombocita
 3. **Pospješuje apsorbciju Ca**
 4. **Regulator** sitosti i gladi, bola i sna.

Slobodni radikali

- Oštećenje membranskih lipida
- Oštećenje receptorskih proteina
- Oštećenje DNK
- Oštećenje organela



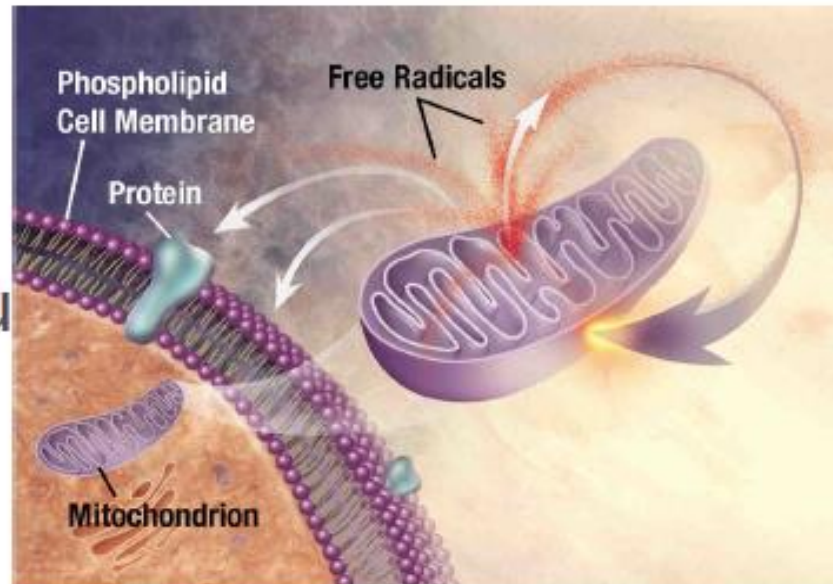
Mehanizam reakcija slobodnih radikala



- Teže da postignu ravnotežu i reaguju sa elektronom najbližeg molekula

Slobodni radikali

- Nestabilne čestice, velike reaktivnosti
- U organizmu stupaju u hemijske reakcije sa delovima ćelije

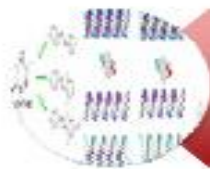


SLOBODNI RADIKALI SE SINTETIŠU UNUTAR BIOHEMIJSKIH PROCESA

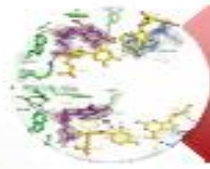
- Fiziološki, slobodni radikali se sintetišu tokom:
 1. **Oksidativne fosforilacije** u respiratornom lancu
 2. **Oksidativna hidroksilacija** u mikrozmima
 3. **Autooksidacije** malih molekula
 4. **Fagocitoze** u leukocitima
 5. **Sinteza** eikosanoida
 6. **Oksidoredukcije** u prisustvu metala **KAO I -**
 7. **Apsorbcije** zračenja
 8. **Izlaganja** toksičnim metalima
 9. **Izlaganju** raznim toksinima (ksenobiotici)

Oksidativno oštećenje DNK

Oštećenje



disocijacija
šećernih
komponenti



modifikacija
baza



pucanje
prstena

Posledice



greške pri
translaciji



inhibicija sinteze
proteina



mutacije

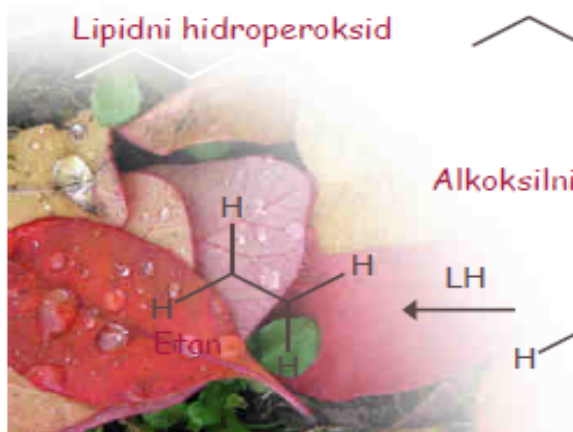
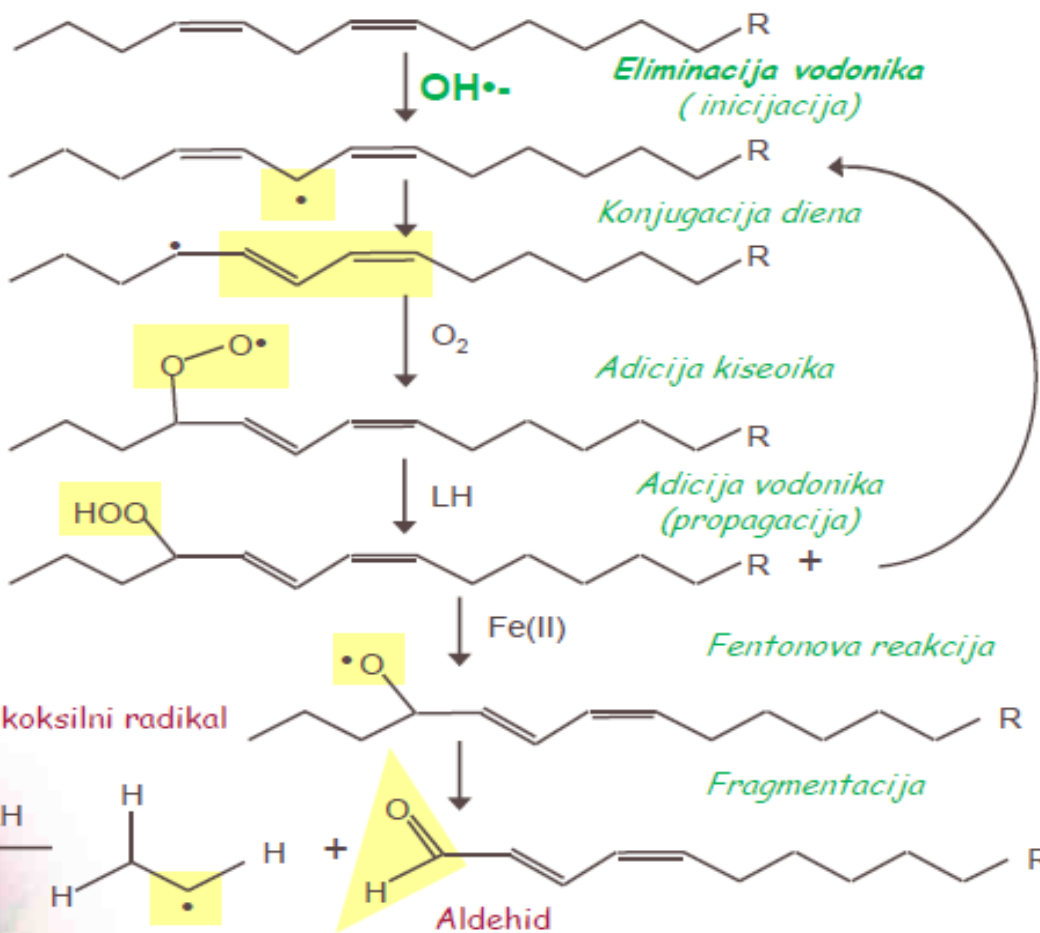


kancerogeneza



Lipidna peroksidacija: inicijacija i propagacija

Linolna kiselina (18:2)



Oksidativna oštećenja lipida

Oštećenje



lipidna peroksidacija



oksidacija lipoproteina

Posledice



promena u fluidnosti i permabilnosti membrana



uticaj na integrisane enzime



stvaranje reaktivnih metabolita – malondialdehida (MDA)

Oksidativni stres i ateroskleroza

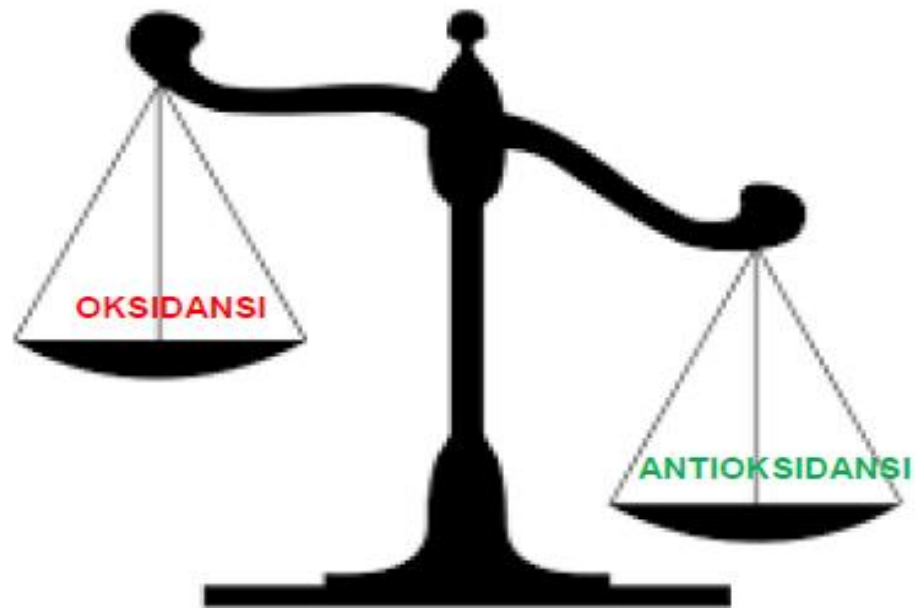
- povećana lipidna peroksidacija povećava rizik od razvoja ateroskleroze i drugih upalnih bolesti
- oksidirani lipidi u lipoproteinima niske gustine (LDL) omogućuju ulazak LDL-a i holesterola u ćelije endotela
- stvaranje plaka povazano je s oksidativnim stresom i porastom GSSG



- porast GSSG dovodi do stvaranja superoksidnog aniona i H_2O_2
- H_2O_2 pospešuje agregaciju trombocita



Sprečavanje nastanka oksidativnog stresa



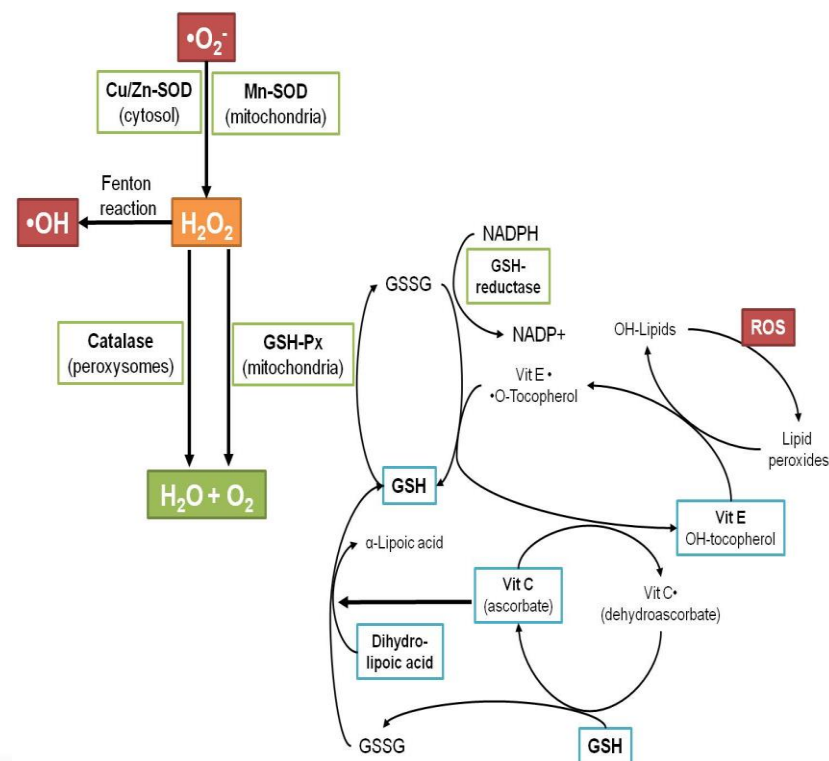
Antioksidativna zaštita

Enzimski antioksidansi

- Superoksid dismutaza (SOD)
- Glutation peroksidaza (GpX)
- Glutation reduktaza (GR)
- Katalaza (CAT)

Neenzimski antioksidansi

- Feritin
- Albumin
- Glutation
- Mokraćna kiselina
- Bilirubin
- Tioli



Dijetarni antioksidansi

- Vitamin A
- Vitamin C
- Vitamin E
- Selen
- Bakar
- Cink
- Mangan
- Koenzim Q10
- Alfa-liponska kiselina
- Polifenoli



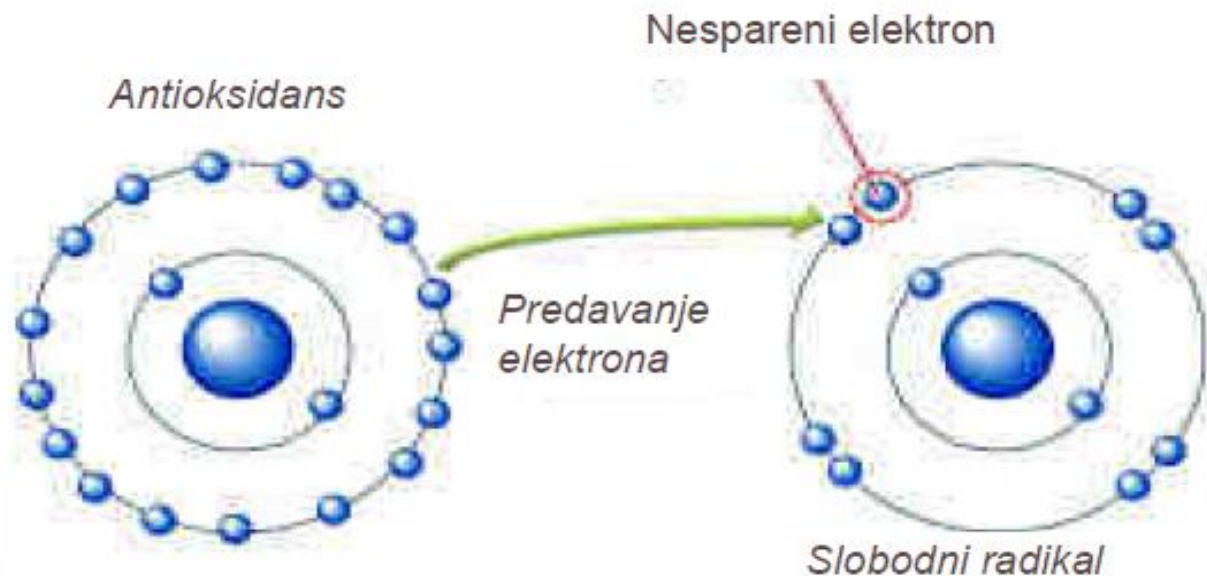
Antioksidativni mehanizmi



Borba protiv slobodnih radikala

Antioksidansi

- Reaguju sa slobodnim radikalima, pretvaraju ih u neradikale dajući im elektron, a sami postaju slabo reaktivni radikali
 - vitamin C
 - vitamin E



Antioksidansi-način delovanja

- Direktno enzimskom katalizom uklanjaju ROS
 - SOD, GSHPx, CAT
- Helatiraju jone gvožđa i bakra
 - transferin, metalotioneini
- Štite biomolekule od oštećenja drugim mehanizmima
 - proteini toplotnog stresa (heat shock proteins, HSP)



