

# *Oksidativna fosforilacija*

# *Oksidativna fosforilacija*

- *U eukariota u mitohondrijama.*
- *Odigrava se redukcija  $O_2$  do  $H_2O$ .*
- *Donori elektrona su **NADH** i **FADH<sub>2</sub>**.*

- *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

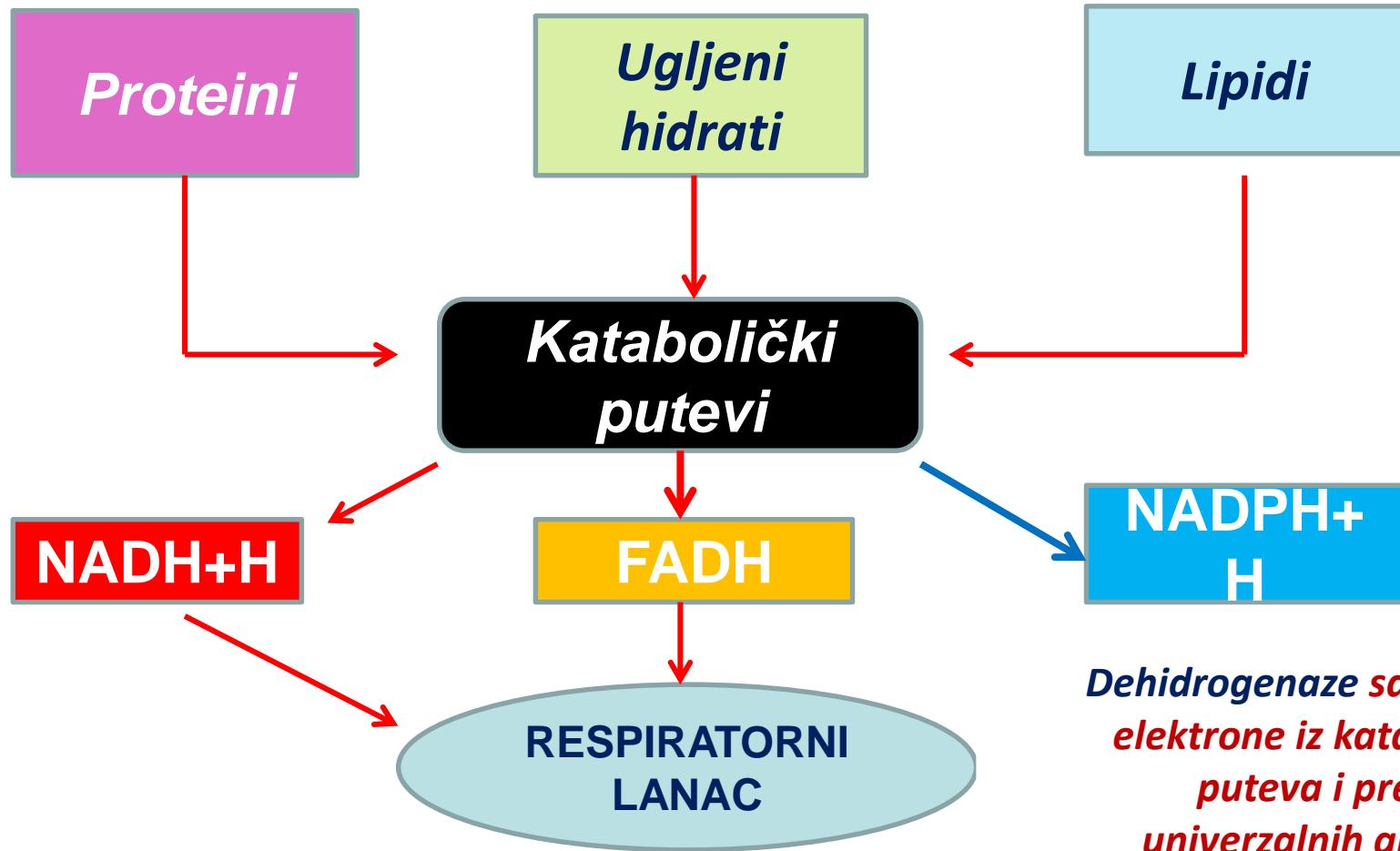
*Peter Mitchell (1961)*

- hemiosmotska teorija –

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

# OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA

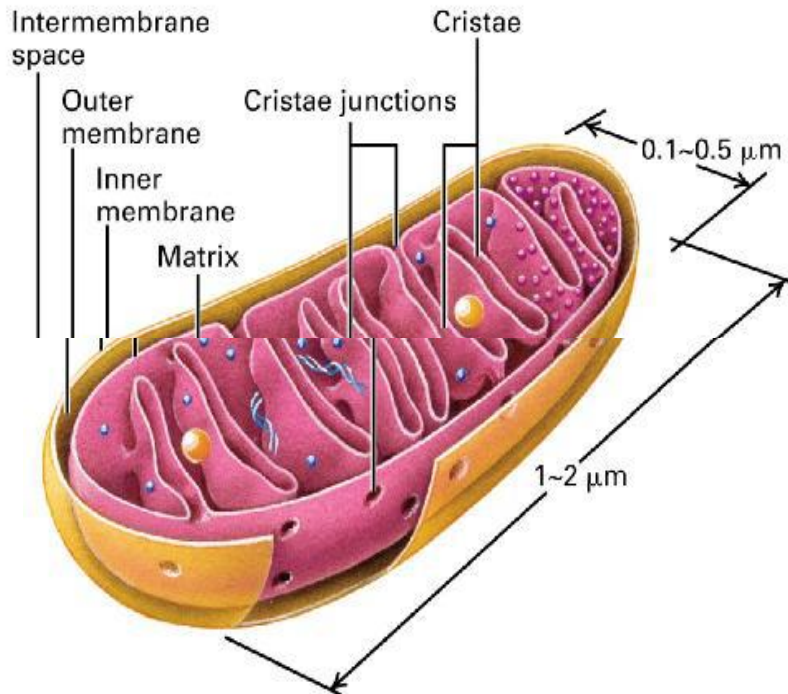
## Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama



*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.

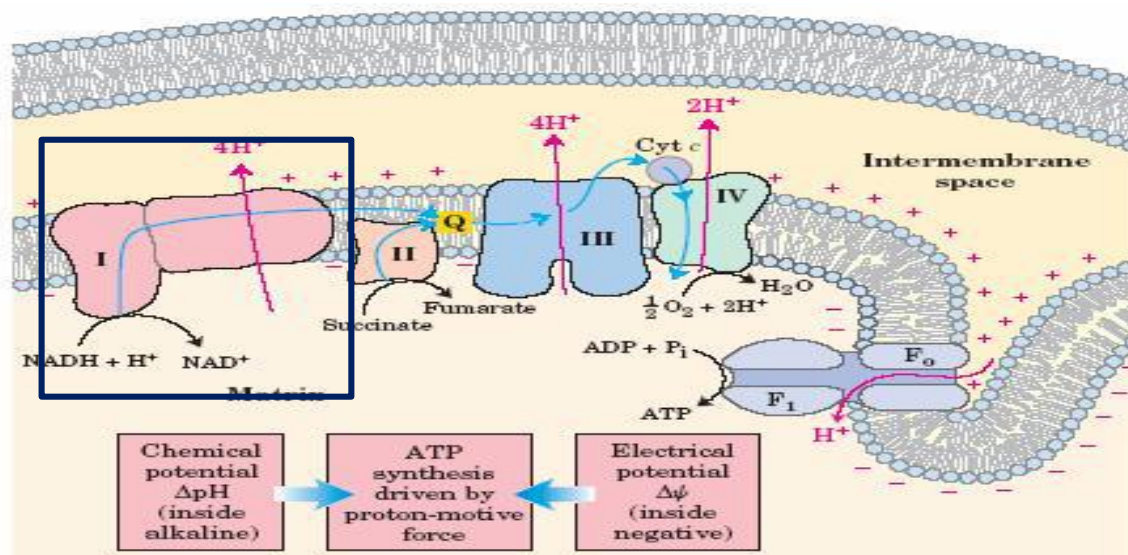
# Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

## Kompleks I:

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

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

Elektroni se sa NADH+H<sup>+</sup> prenose na koenzim Q

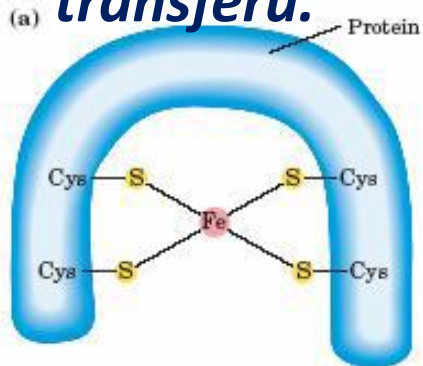


# Reakcije transfera elektrona u mitohondrijama

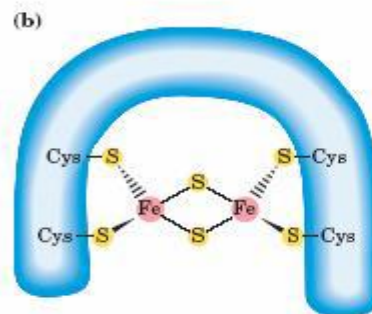
## Gvožđe-sumpor proteini

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

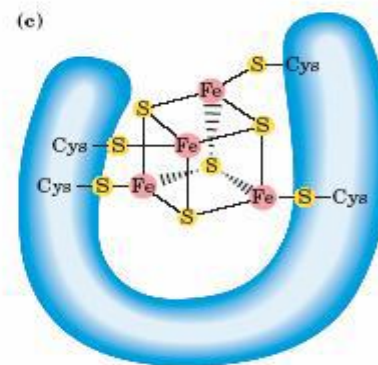
- Svi gvožđe sumpor proteini učestvuju u **jedno-elektronskom transferu** u kome se jedan atom gvožđa oksiduje ili redukuje.
- Najmanje **osam FeS proteina** funkcioniše u mitohondrijalnom transferu.



**FeS**



**2Fe-2S**



**4Fe-4S**



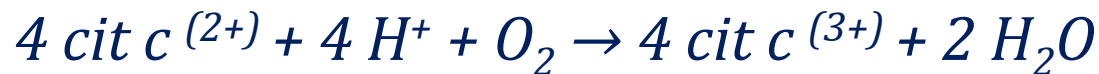
# Koenzim Q (ubihinon; CoQ)

**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 redukcione ekvivalente sa flavin–zavisnih dehidrogenaza, kao što je npr. **sukcinat dehidrogenaza**, enzim ciklusa trikarboksilnih kiselina (kompleks II). Direktan prenos redukcionih ekvivalenata na koenzim Q vrši se i sa  **$\alpha$ -glicerofosfat dehidrogenaze** (enzim koji vrši povratni transport redukcionih ekvivalenata iz citosola u mitohondrije) i **acil CoA dehidrogenaze** iz  $\beta$ -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 redukovane forme citohroma c na kiseonik, pri čemu nastaje voda:



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

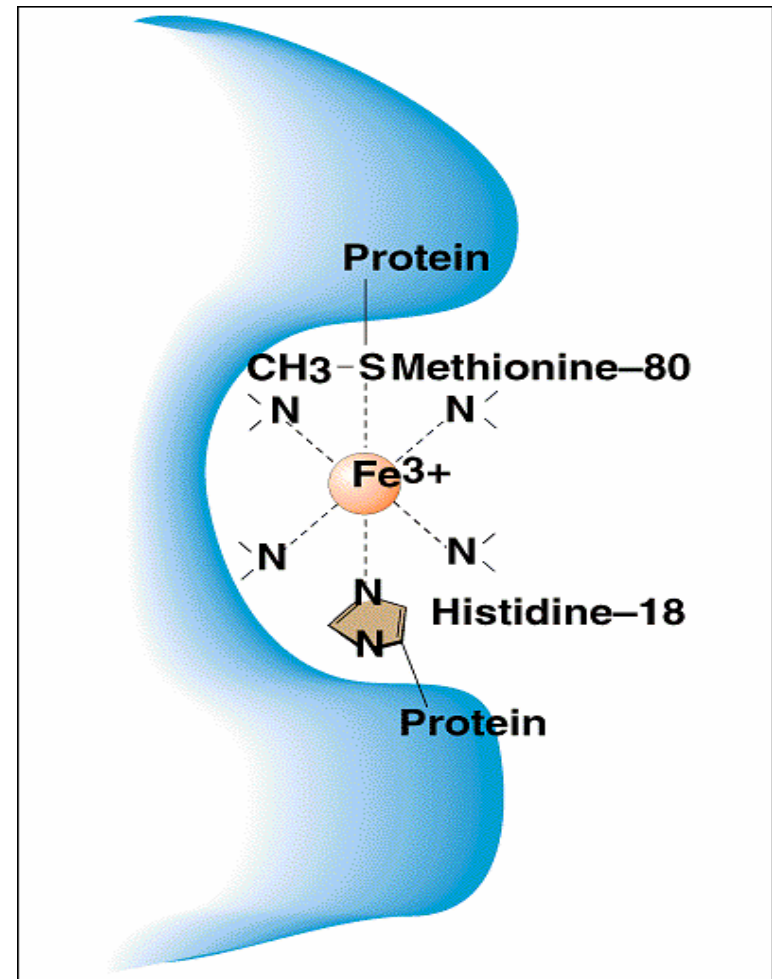


# Citohromi, gvožđe-sumpor proteini i koenzim Q imaju funkcionalne grupe koje mogu da primaju i otpuštaju elektrone

*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.*



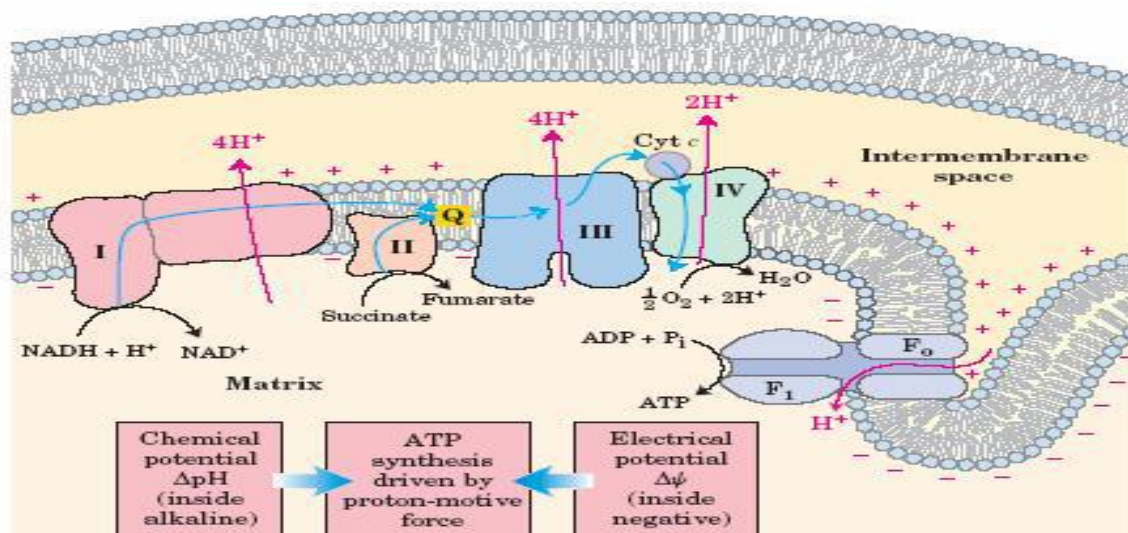
- **Citohromi su jednoelektronski prenosioци – gvođđe prelazi iz +3 u +2, a bakar iz +2 u +1 stanje.**
- **Uobičajeno je svih 6 koordinativnih veza Fe popunjeno, te se O<sub>2</sub> ne može direktno vezati za njih. Izuzetak je citohrom aa<sub>3</sub>, citohrom oksidaza, jedini član respiratornog lanca 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

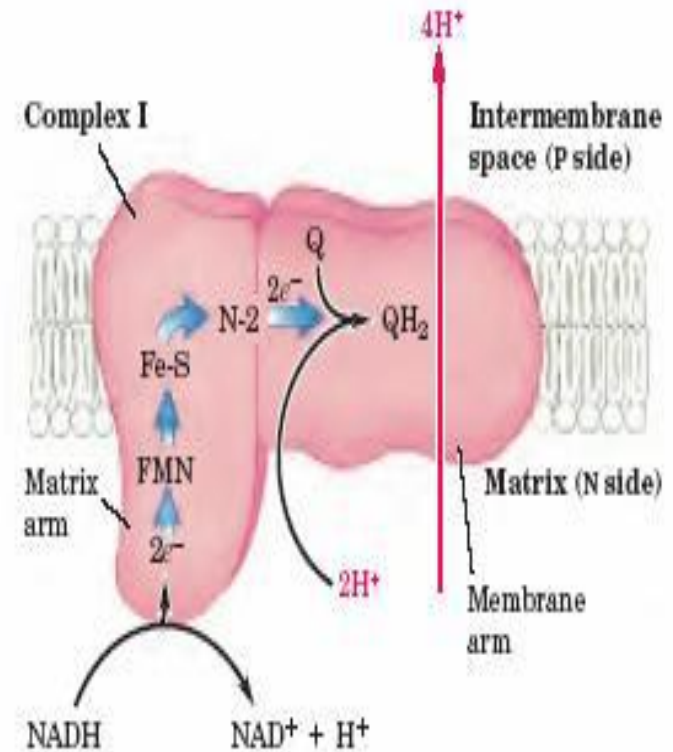
## Kompleks I

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 međumembranski prostor.

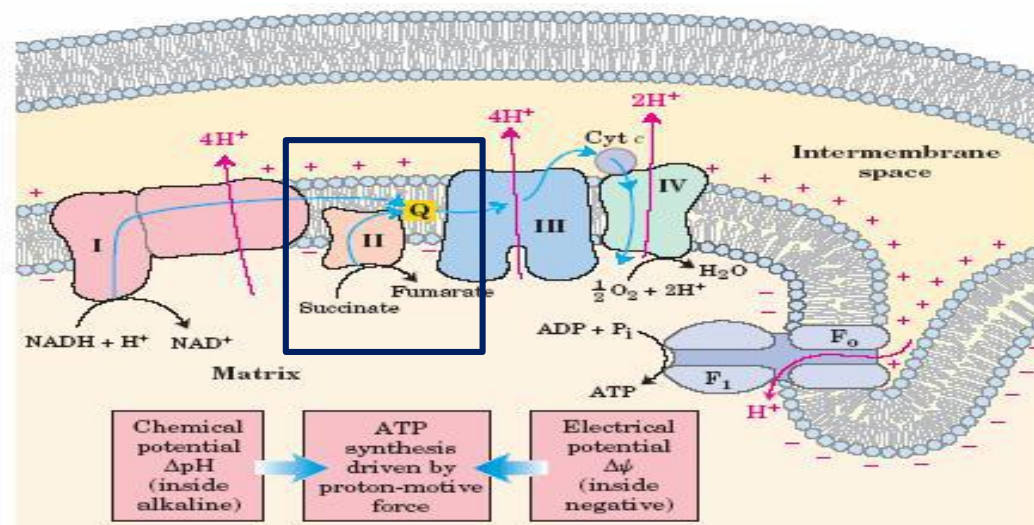
To je dakle **protonska pumpa** koja energiju dobija od prenosa elektrona.



# 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

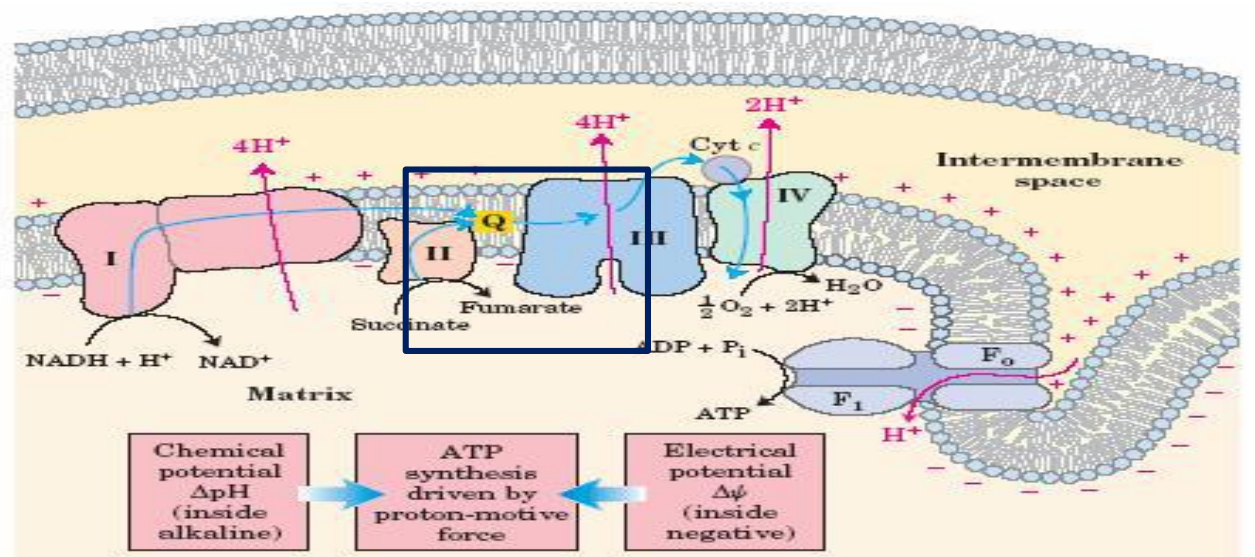
## Kompleks III

### Ubihinon: citohrom c oksidoreduktaza

Ubihinon do citohroma c

Citohrom bc1 kompleks

Povezuje prenos elektrona sa ubihinola ( $\text{QH}_2$ ) 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.*

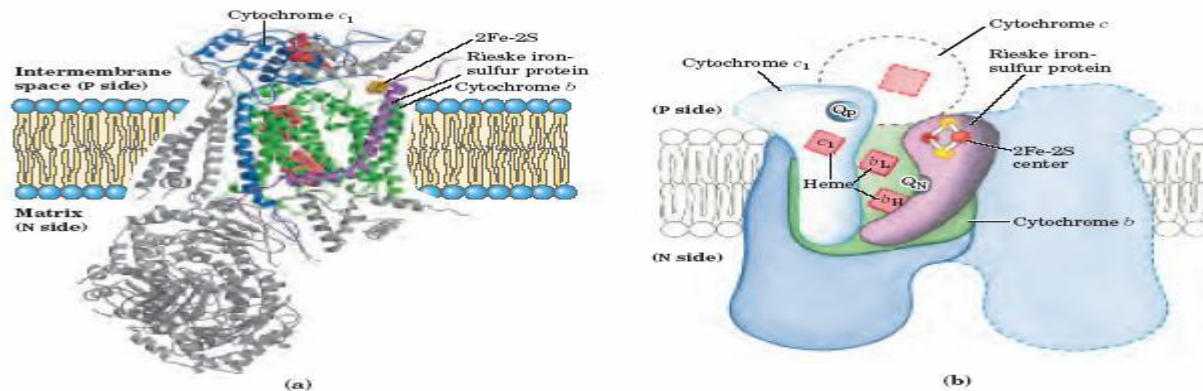
### Struktura monomera

*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).*



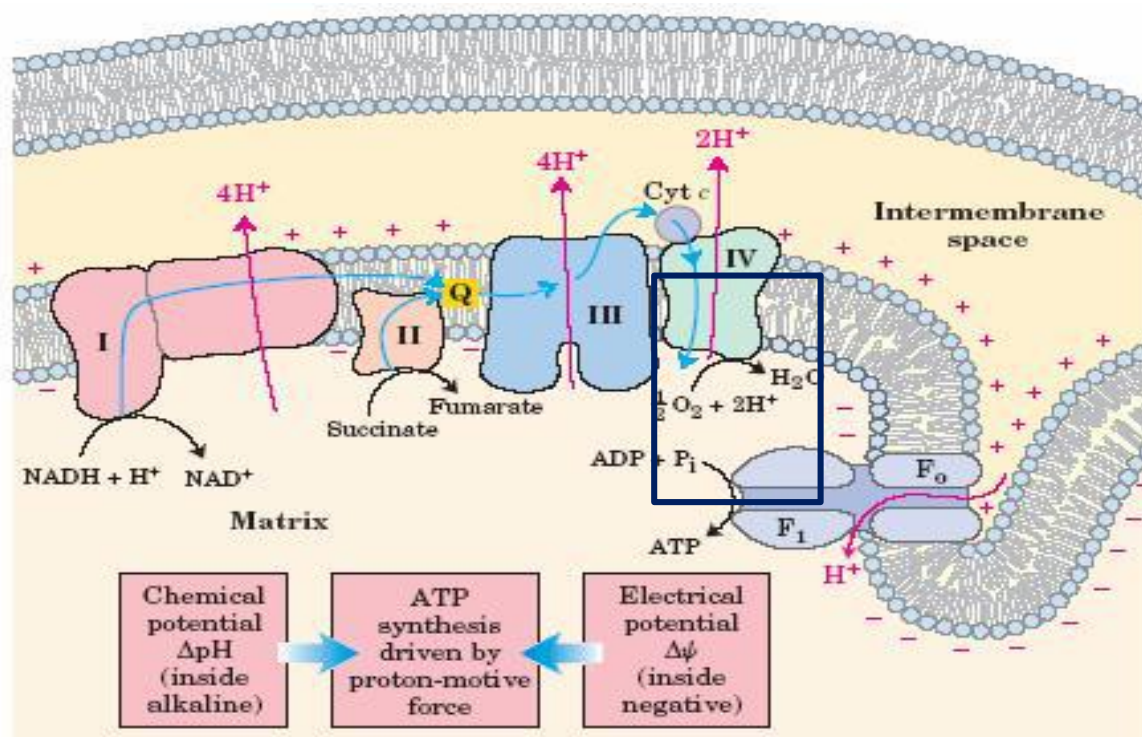


## Kompleks IV

Citohrom c do O<sub>2</sub>

Citohrom oksidaza - Warburgov enzim

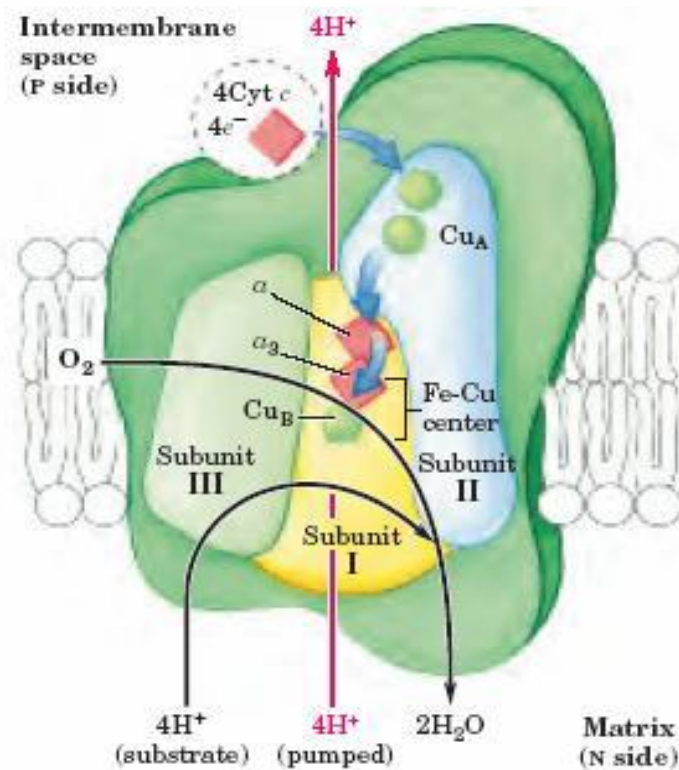
Prenosi elektrone sa citohroma c do molekularnog kiseonika dajući vodu.



## 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  $2H_2O$ .

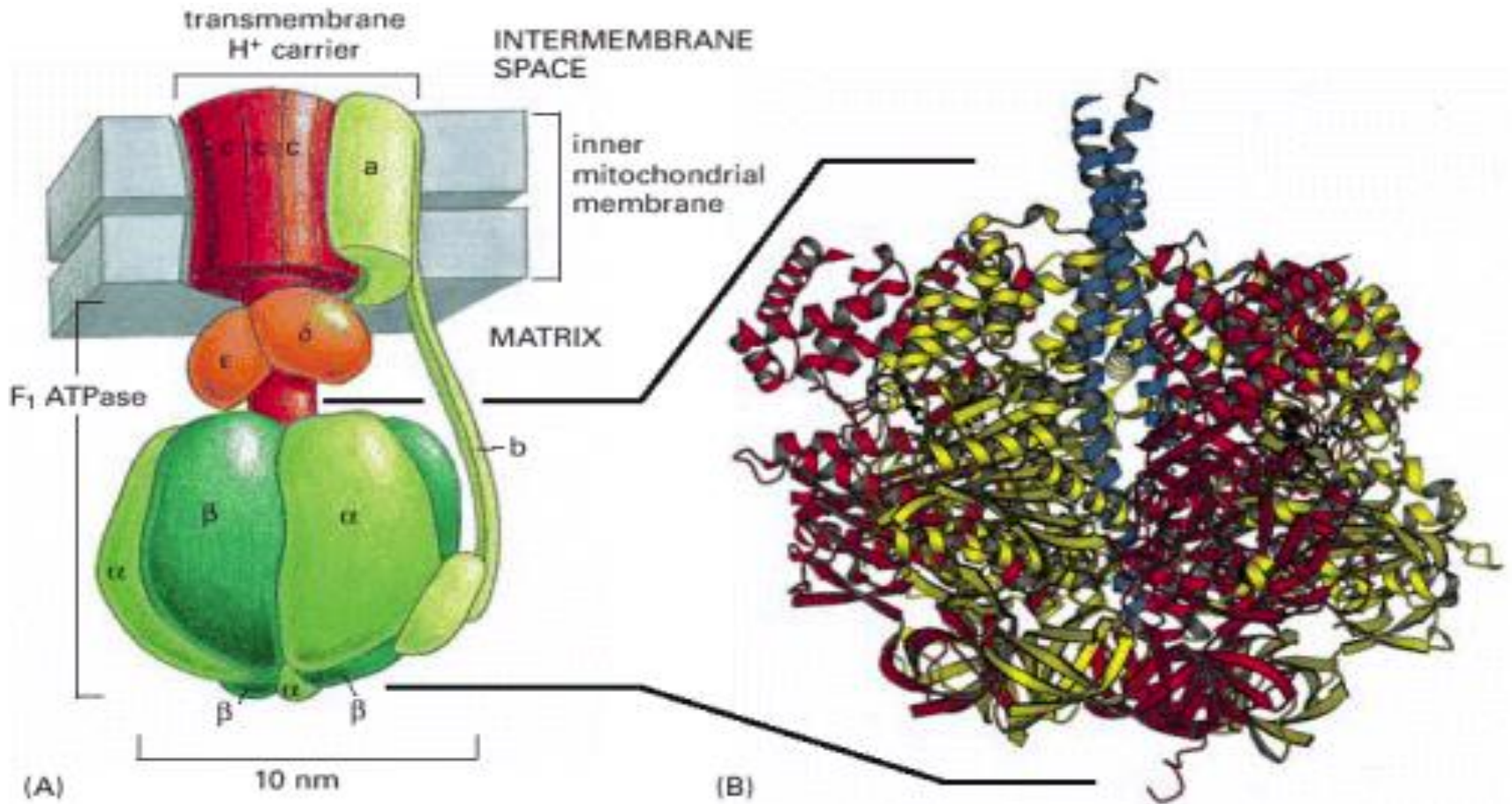
Takođe se energija ove redoks reakcije upotrebljava za pumpanje jednog protona u intermembranski prostor (P strana) za svaki elektron koji Prolazi – PROTONSKA PUMPA.



# 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.

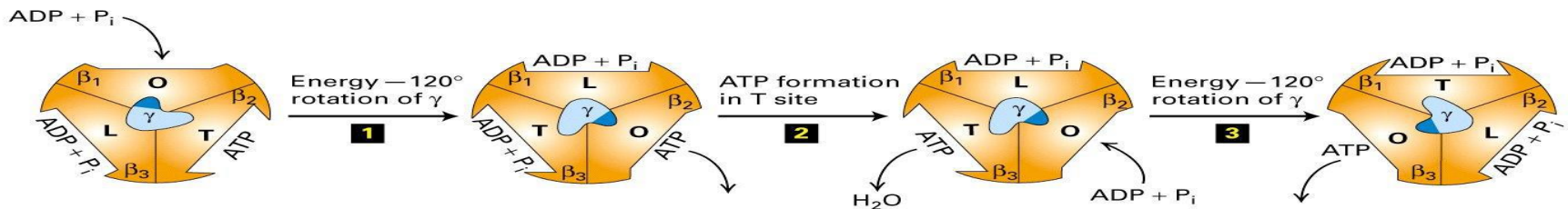
# ATP sintaza





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

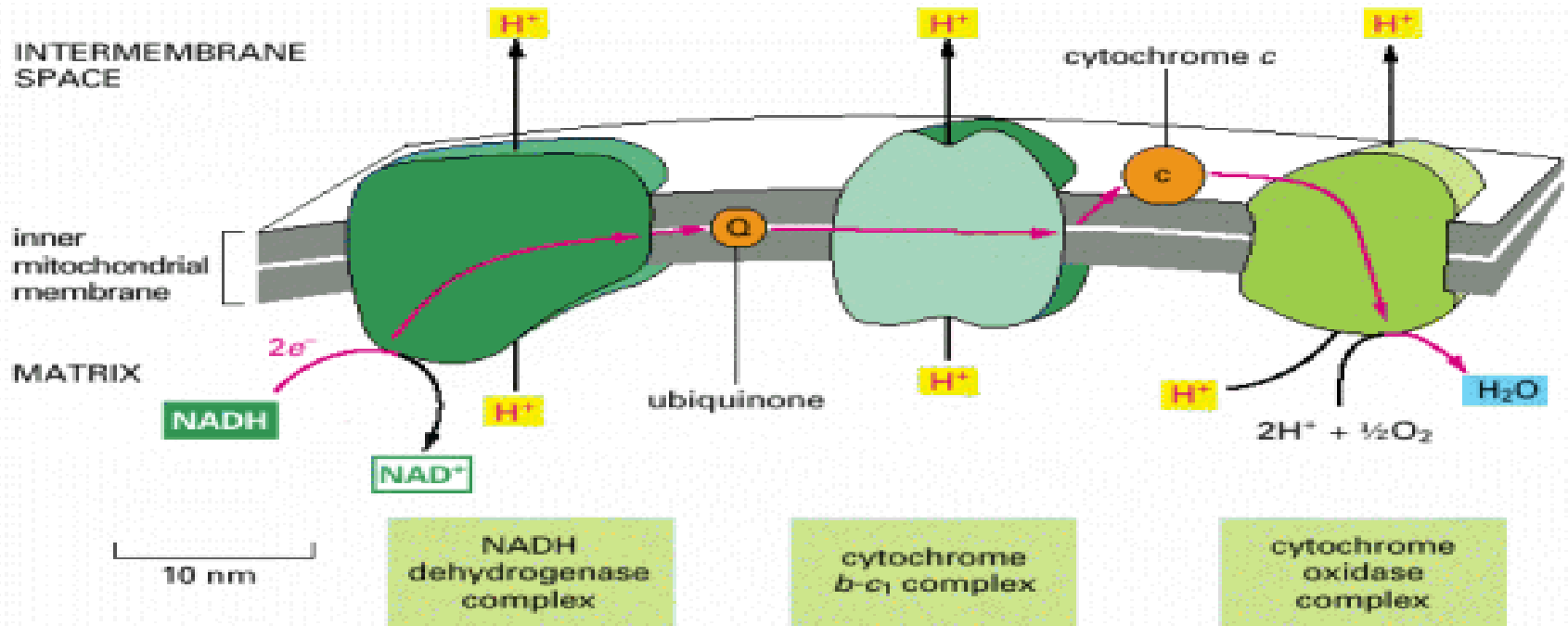
- Katalitičko mesto ATP sintaze se nalazi na spoju a i b subjedinica. b subjedinica može da bude u tri konformaciona oblika, **otvorenom, opuštenu i stegnutom**, što je određeno asimetričnim interakcijama sa centralno postavljenom g subjedinicom. ADP i Pi su vezani za **opušteni oblik**, dok se ATP nalazi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



## Fosforilacija ADP u ATP ide kroz 3 faze:

- prolazak protona kroz kanal  $F_0$  komponente - ceo  $a_3b_3$  skup se okrene,**
- 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 Pi, koji stvaranjem fosfoanhidridne veze prelazi u ATP.**
- 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).*

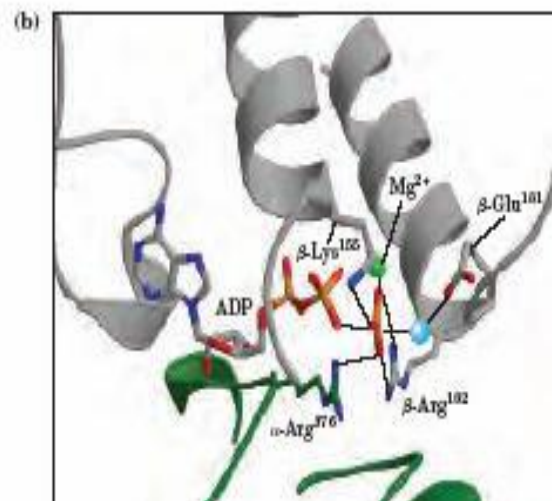
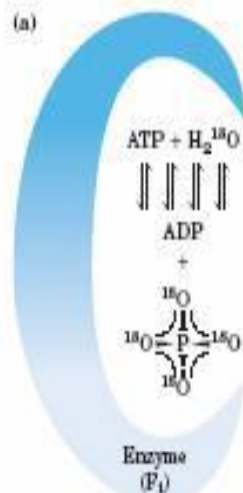
# Oksidativna fosforilacija – Sinteza ATP-a

*Pri prolasku para elektrona kroz respiratorni lanac dolazi do prebacivanja 10 H<sup>+</sup> iz matriksa u međumembranski prostor.*

*Za sintezu jednog molekula ATP-a potrebno je da kroz protonski kanal prođe 4 H<sup>+</sup>.*

***NADH – 10 protona 2.5 ATP***

***FADH<sub>2</sub> – 6 protona 1.5 ATP***



## **Energetski bilans lanca prenosilaca elektrona**

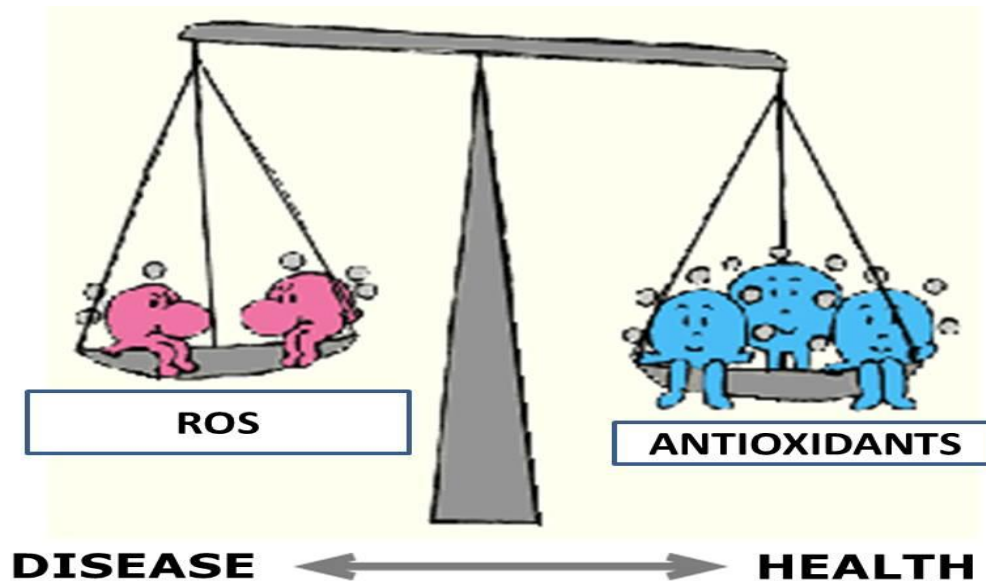
- *Od svakog  $\text{NADH}+\text{H}^+$  u lanac prenosilaca elektrona uđu 2 elektrona, što je ekvivalent redukciji  $\frac{1}{2} \text{O}_2$ .*
- *Ukoliko se 4 protona ispumpaju na nivou kompleksa I, 4 na nivou kompleksa III i 2 protona na nivou kompleksa IV, a procenjuje se da je za **sintezu ATP-a potrebno da se 4 protona vrate kroz molekul ATP sintaze, oksidacijom svakog  $\text{NADH}+\text{H}^+$  se dobiju 3 ATP-a, a od  $\text{FADH}_2$  - 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

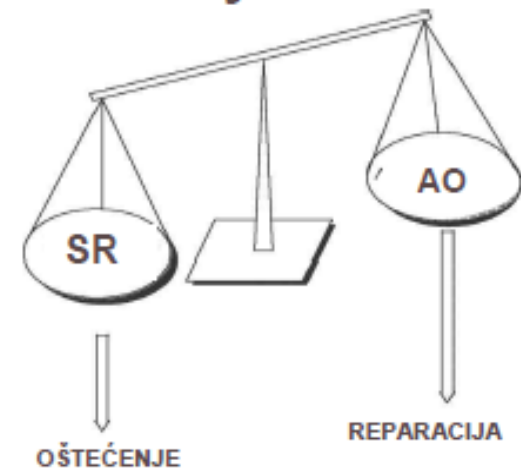
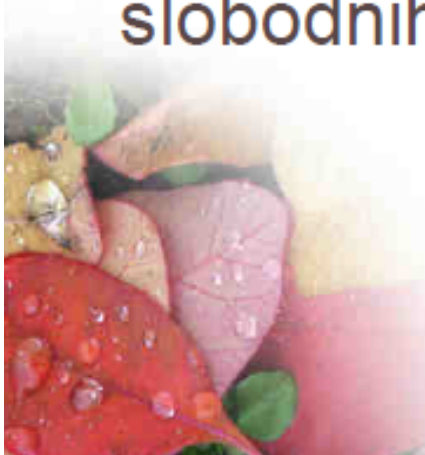
- Oksidativni stres je poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa, koji nastaje zbog prekomjernog stvaranja reaktivnih slobodnih radikala, koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu.





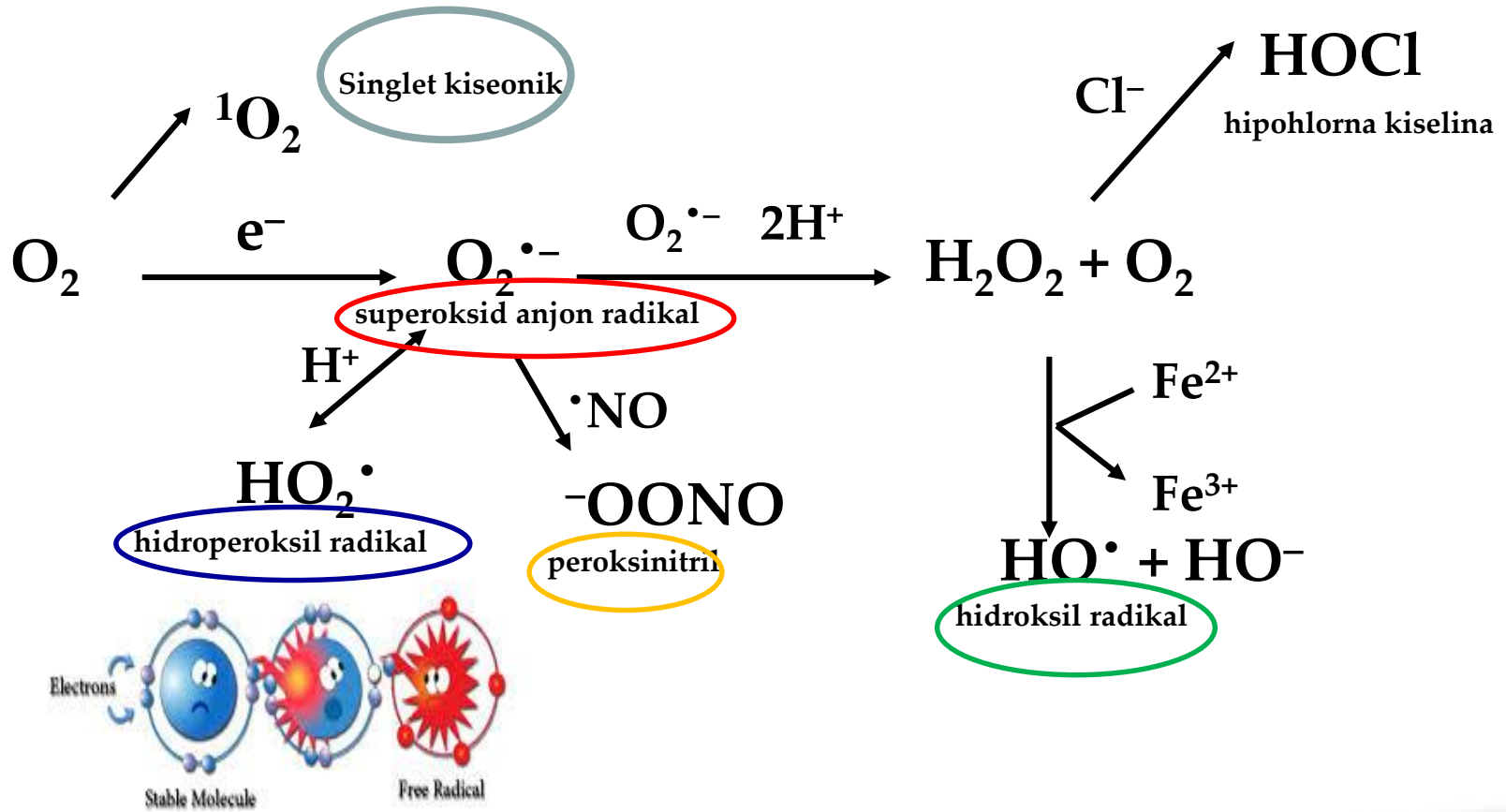
# Oksidativni stres

- 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

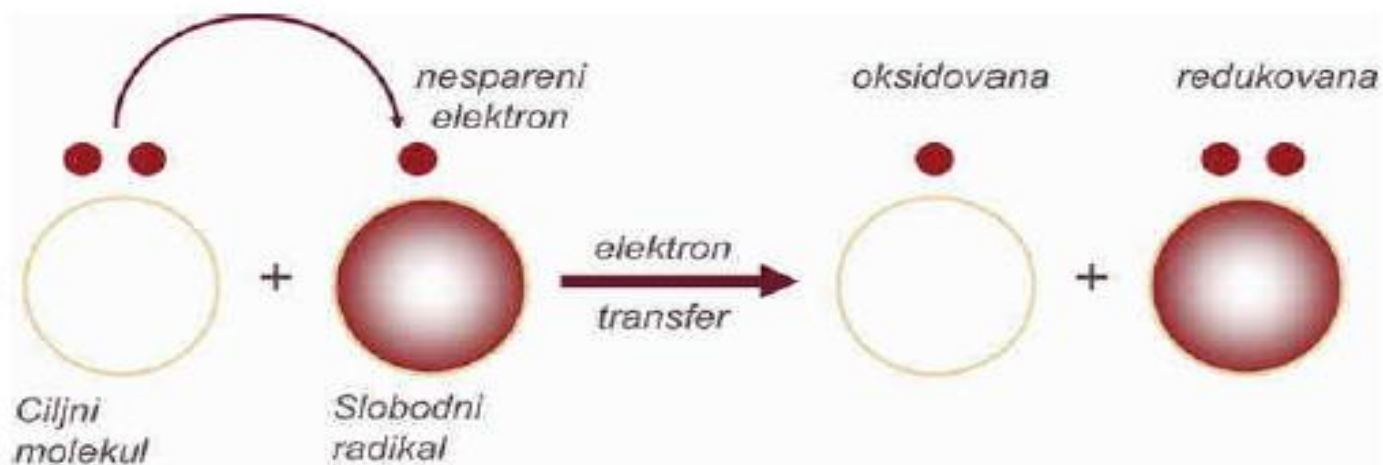
- **NO** pripada grupi **slobodnih radikala**, jer je jako reaktivno jedinjenje, najčešće sa  $O_2$ , gradeći **PEROKSINITRIT** – EFIKASNO OKSIDATIVNO JEDINJENJE.
- Fiziološki značaj:
  1. Učestvuje u **regulaciji ćelijskih procesa** kod imunološkog odgovora kao efektor
  2. **Smanjuje adhezivnost i 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



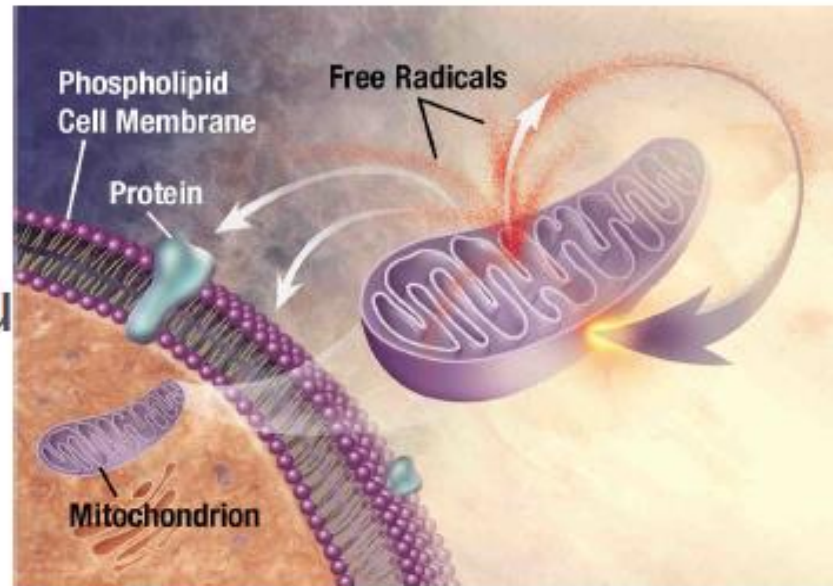
# Mehanizam reakcija slobodnih radikala



- 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



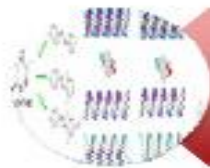
# SLOBODNI RADIKALI SE SINTETIŠU UNUTAR BIOHEMIJSKIH PROCESA

- 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)

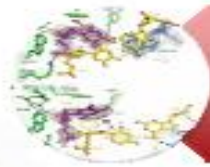


# Oksidativno oštećenje DNK

## Oštećenje



disocijacija  
šećernih  
komponenti



modifikacija  
baza



pucanje  
prstena

## Posledice



greške pri  
translaciji



inhibicija sinteze  
proteina



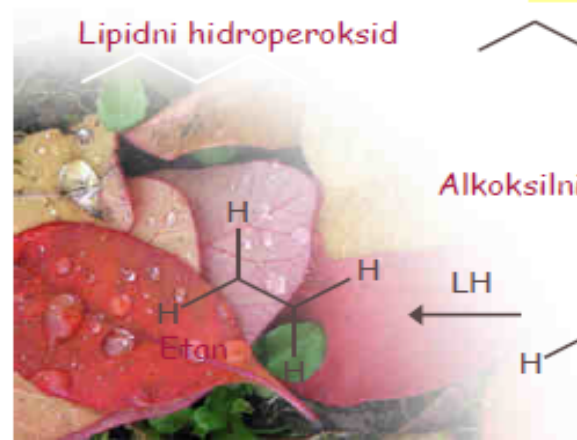
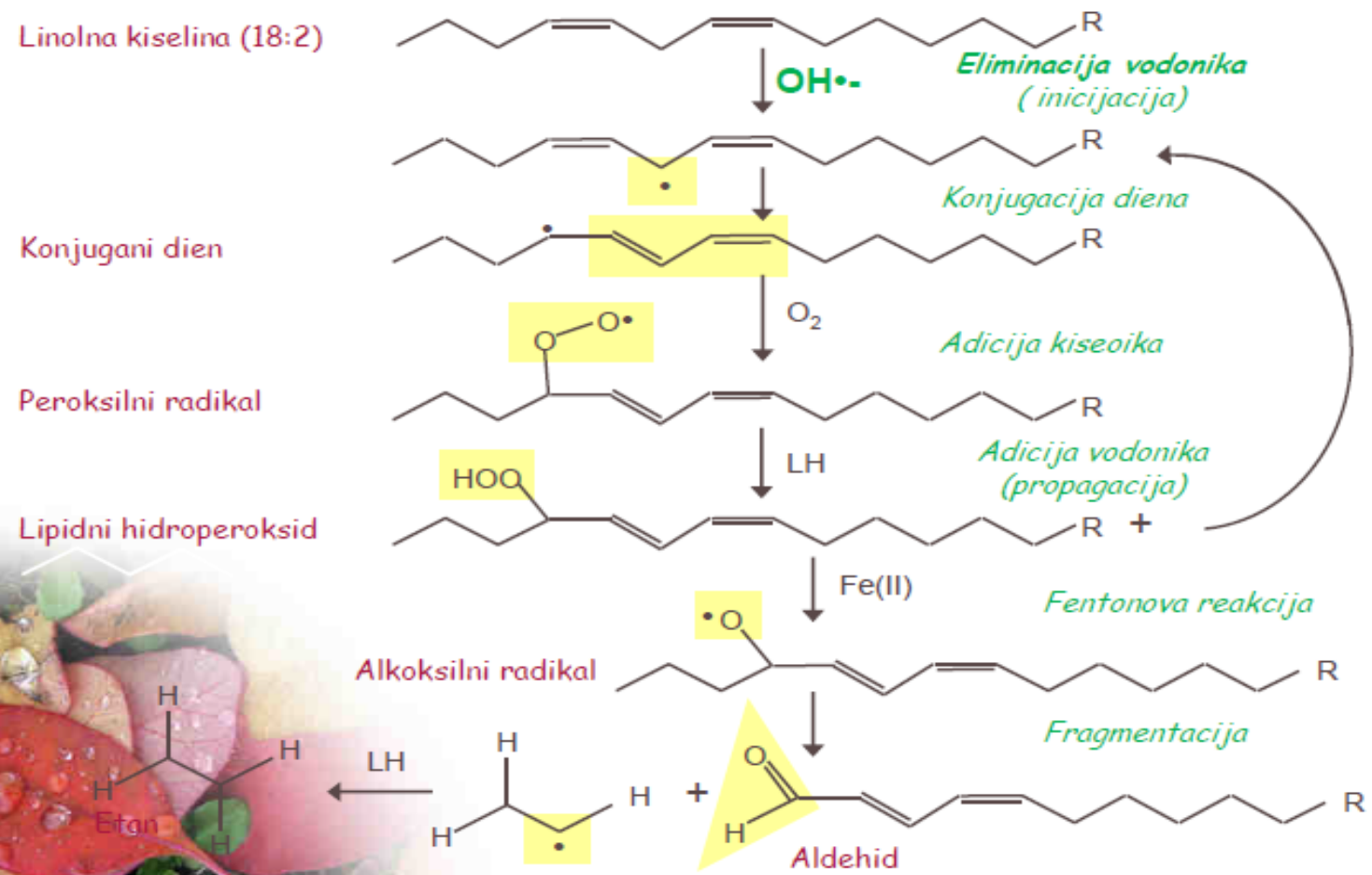
mutacije



kancerogeneza



# Lipidna peroksidacija: inicijacija i propagacija



# 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

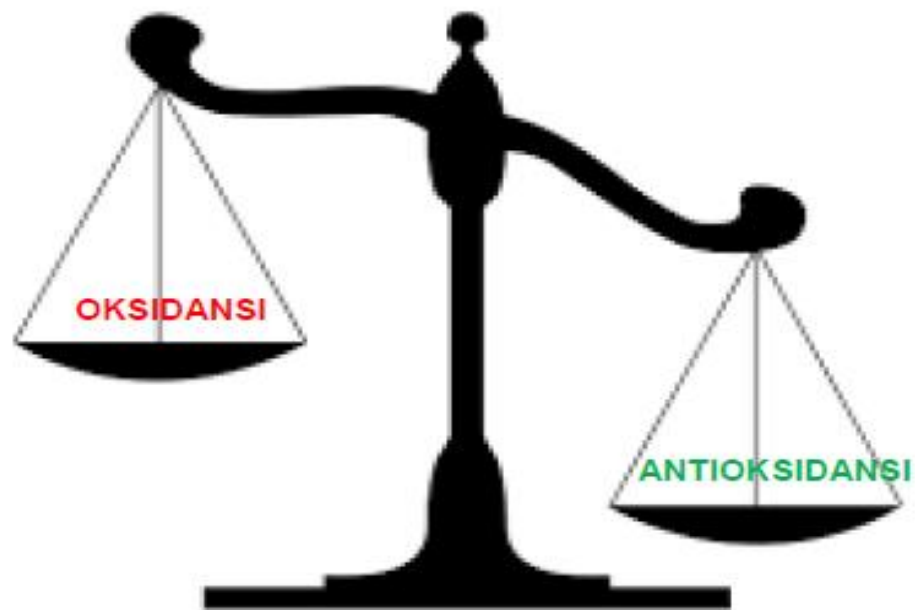
- povećana lipidna peroksidacija povećava rizik od razvoja ateroskleroze i drugih upalnih bolesti
- oksidirani lipidi u lipoproteinima niske gustine (LDL) omogućuju ulazak LDL-a i holesterola u ćelije endotela
- stvaranje plaka povazano je s oksidativnim stresom i porastom GSSG



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



# Sprečavanje nastanka oksidativnog stresa



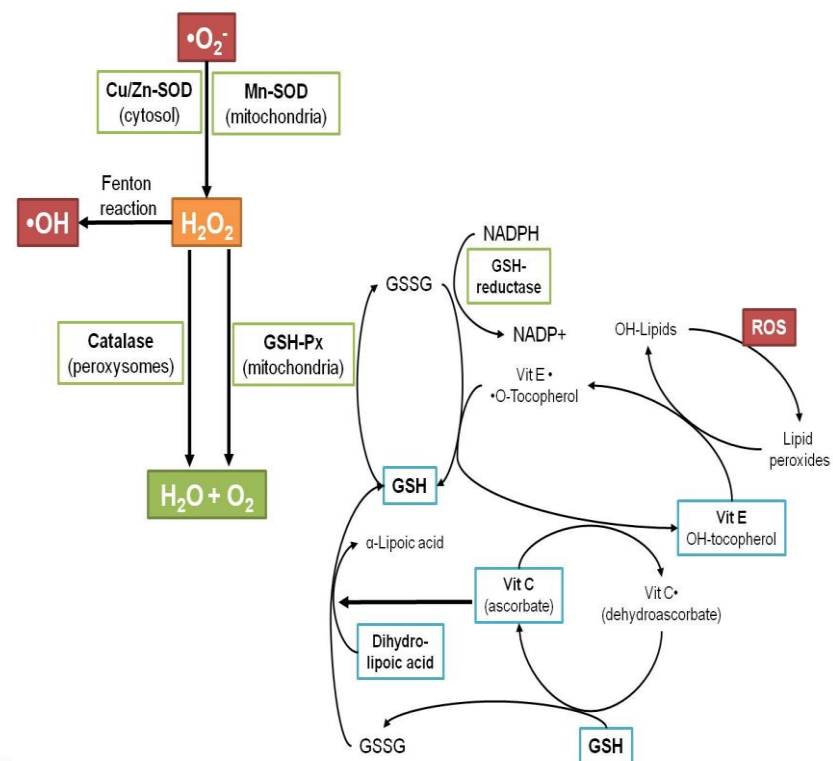
# Antioksidativna zaštita

## 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

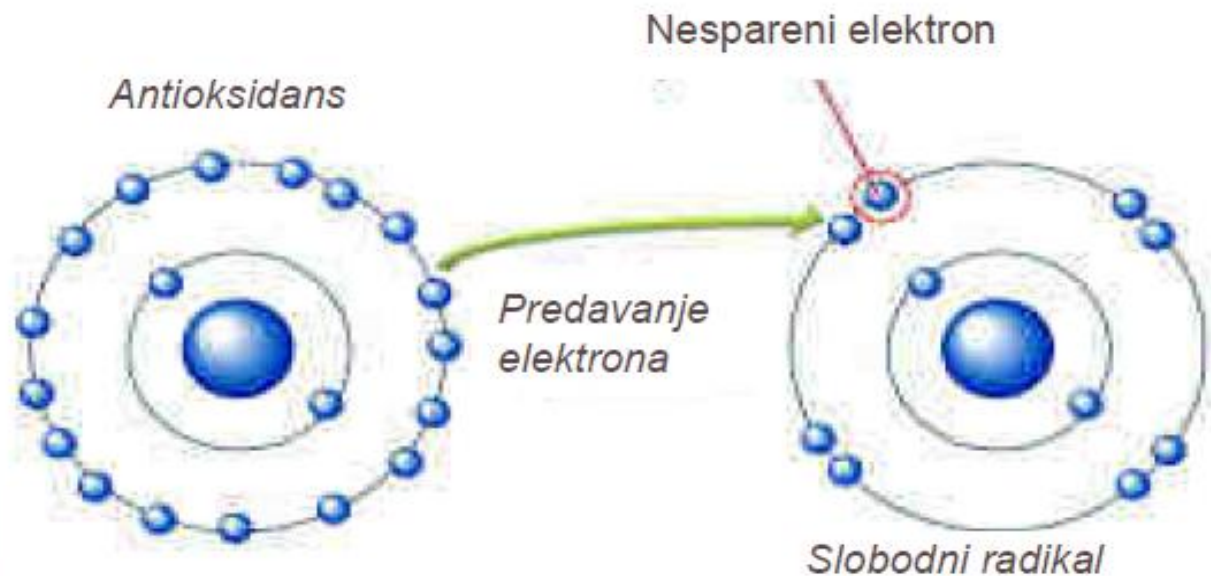




# Borba protiv slobodnih radikala

## 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)



