

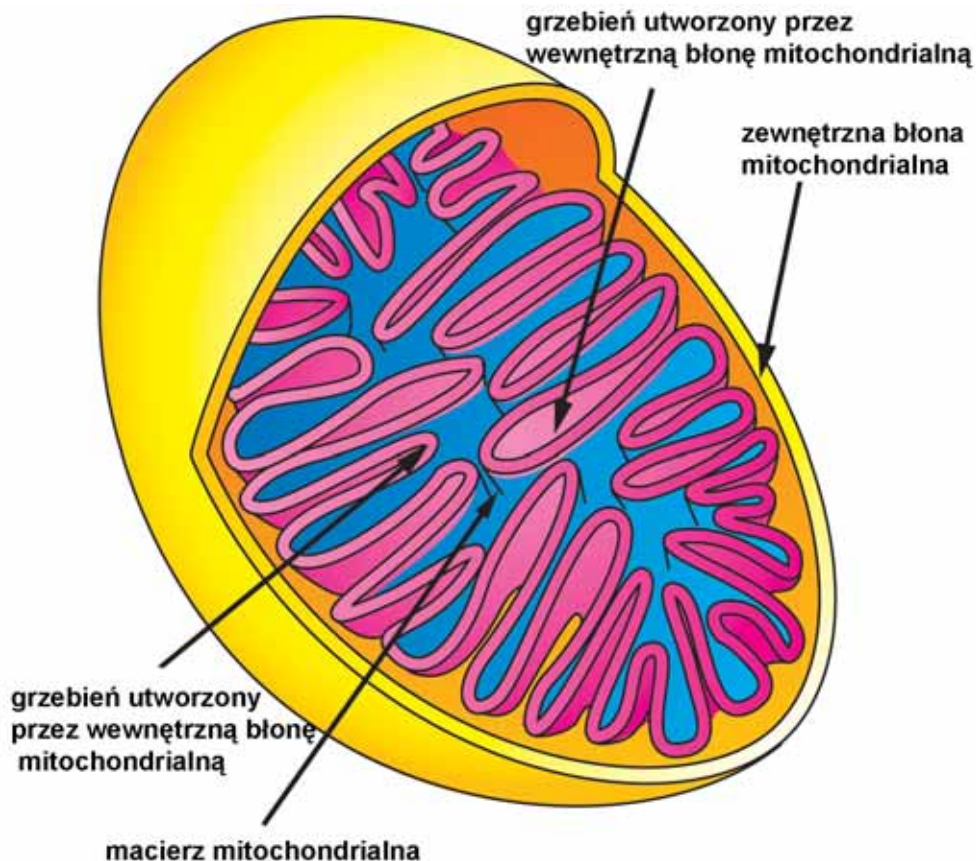
Mitochondria – budowa, wewnątrzkomórkowa organizacja i procesy bioenergetyczne

Bez cienia wątpliwości mitochondrium to organellum niezwykle ważne dla funkcjonowania komórki. Zwykle kojarzone jest z jej gospodarką energetyczną. W rzeczywistości spełnia wiele innych funkcji, równie istotnych zarówno dla komórki jak również, w przypadku organizmów wielokomórkowych, dla całego ustroju. Niniejszy artykuł prezentuje Państwu najnowszą wiedzę o budowie mitochondriów i jej związku z procesami bioenergetycznymi komórki.

■ MARTA ONOPIUK, KATARZYNA WIERZBICKA, KRZYSZTOF ZABŁOCKI

Badania nad mitochondriami mają 150-letnią historię. Odkryte przez cytologów, już na początku XX wieku zostały zidentyfikowane jako organella zużywające tlen (Otto Warburg, Nagroda Nobla w 1913 r.). Opracowanie metody izolacji mitochondriów z tkanek w pierwszej połowie ubiegłego stulecia stało się początkiem nowej ery w badaniach biochemicznych – okresu bioenergetyki komórkowej. W efekcie rozszyfrowano kluczowe dla metabolizmu tlenowego procesy takie jak cykl kwasów trkarboksylowych (Hans Krebs, Nagroda Nobla 1953), zaproponowano mechanizm oksydacyjnej fosforylacji (Peter Mitchell, Nagroda Nobla 1978) i wyjaśniono molekularne podstawy tego procesu (Paul Boyer i John Walker, Nagroda Nobla 1997). W istocie okres największych triumfów bioenergetyki przypadają na początek drugiej połowy XX wieku. Po tak spektakularnych osiągnięciach mogło się wydawać, że mitochondria nie kryją już żadnych tajemnic i bioenergetyka albo szerzej, biochemia mitochondriów straci swoje miejsce w głównym nurcie badań komórkowych. Tymczasem pod koniec drugiej połowy XX wieku dokonano przełomo-

wych odkryć wskazujących na to, że mitochondria mają wielkie znaczenie w przebiegu takich procesów jak starzenie i śmierć komórek oraz są nieodzownym elementem w komórkowych szlakach przekazywania sygnału. Odkrycie i opisanie genomu mitochondrialnego dało nowy impuls do badań ewolucyjnych, oraz stało się podstawą nowej dziedziny medycyny – medycyny mitochondrialnej zajmującej się chorobami dziedzicznymi związanymi z mutacjami zarówno w genomie mitochondrialnym, jak i w szerszym znaczeniu – mutacjami w genomie jądrowym w obrębie genów kodujących białka mitochondrialne. Dzięki tym odkryciom badania nad mitochondriami wzbudzają coraz większe zainteresowanie. Z drugiej strony niewątpliwie podstawową funkcją mitochondriów jest oksydacyjna fosforylacja. Wszystkie inne funkcje tych organelli są ściśle skorelowane z mitochondrialnymi procesami energetycznymi. Dlatego poznanie mechanizmów oksydacyjnej fosforylacji jest konieczne dla pełnego zrozumienia wszechstronnych funkcji, jakie mitochondria pełnią w komórce. Rozważania dotyczące procesów bioenergetycznych



Rys. 1. Ogólna budowa mitochondrium

zachodzących w mitochondriach muszą być poprzedzone przypomnieniem podstawowych wiadomości dotyczących budowy tych organelli.

Budowa i wewnątrzkomórkowa organizacja mitochondriów

Mitochondria zbudowane są z dwóch błon białkowo-lipidowych. Jedna z nich, błona wewnętrzna, ogranicza obszar zwany macierzą mitochondrialną. Druga, położona na zewnątrz w stosunku do pierwszej, jest od niej oddzielona tzw. przestrzenią międzybłonową.

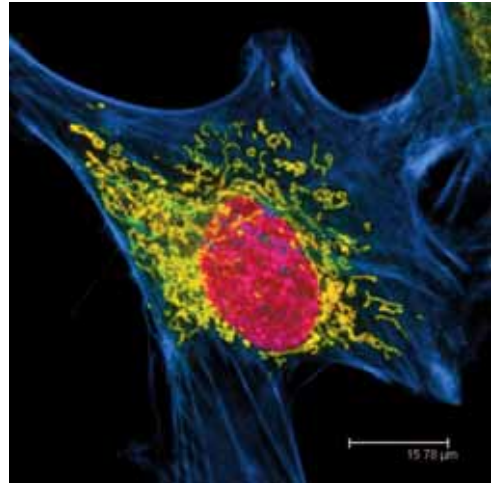
Błona zewnętrzna jest gładka, a jej skład lipidowy oraz stosunek ilościowy lipidów do białek (wynoszący ok. 1:1) przypominają

inne błony występujące w komórce. Błona ta jest w znacznym stopniu przepuszczalna dla substancji drobnocząsteczkowych. Charakterystycznym dla niej białkiem jest tzw. poryna mitochondrialna zwana też VDAC (ang. Voltage – Dependent Anion Channel) – białko tworzące kanał o znacznej przepuszczalności i wbrew angielskiej nazwie o niewielkiej selektywności. To sprawia, że skład roztworu znajdującego się w przestrzeni międzybłonowej, jeżeli bierzemy pod uwagę substancje drobnocząsteczkowe, jest podobny do składu (cytoplazma podstawowa). Natomiast skład białkowy tego przedziału subkomórkowego jest inny niż cytosolu, bowiem białka nie mogą swobodnie przenikać przez zewnętrzną błonę mitochon-

drialną; ich przemieszczanie do przestrzeni międzybłonowej wymaga udziału wyspecjalizowanych systemów transportujących.

W przeciwieństwie do błony zewnętrznej, wewnętrzna błona mitochondrialna jest silnie pofałdowana, przez co tworzy liczne, bardzo zwiększające jej powierzchnię, wypustki zwane grzebieniami mitochondrialnymi. Stopień pofałdowania wewnętrznej błony mitochondriów jest różny w różnych tkankach i zależy od intensywności ich metabolizmu oksydacyjnego. Błona ta składa się w 80% z białek, a wśród lipidów uwagę zwraca charakterystyczna dla niej kardiolipina. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się kompleksy białkowe związane z oddychaniem i oksydacyjną fosforylacją, oraz szereg białek transportujących i kanałów umożliwiających selektywną i podlegającą regulacji przepuszczalność tej błony dla wielu jonów nieorganicznych, a także dla metabolitów takich jak substraty oddechowe, pośredniki metaboliczne, oraz nukleotydy. Ponadto w obu błonach mitochondrialnych występują białka, których funkcja polega na transportowaniu licznych białek mitochondrialnych syntetyzowanych w cytosolu do odpowiednich przedziałów w obrębie tych organelli. Bardzo ograniczona przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej leży u podstaw mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji. W istocie jedynymi substancjami przenikającymi przez tę błonę bez udziału systemów transportujących, takich jak nośniki lub kanały błonowe, są rozpuszczone gazy (np. tlen) oraz substancje silnie lipofilne.

Macierz mitochondrialna jest gęstym roztworem koloidalnym zawierającym liczne białka, m.in. enzymy katalizujące mitochondrialne procesy metaboliczne, w tym reakcje cyklu kwasów trikarboksylowych, utleniania kwasów tłuszczowych, przemian aminokwasów, niektóre reakcje glukoneogenezy i ureogenezy, i szereg innych. Ponadto w macierzy mitochondrialnej znajdują się białka związane z replikacją oraz ekspresją mitochondrialnego DNA oraz białka opiekuńcze.



Fot. 1. Mitochondria tworzą rozbudowane, dynamiczne struktury zwane niekiedy siecią mitochondrialną. Zdjęcie wykonane z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej przedstawia mioblast myszy z widocznymi mitochondriami (kolor żółty), cytoskieletem aktynowym (kolor niebieski) i jądrem komórkowym (kolor czerwony) (Fot. dr Joanna Szczepanowska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego)

Jeszcze do niedawna panował pogląd, że mitochondria są mniej lub bardziej owalnymi strukturami o określonych rozmiarach i występującymi w dającej się określić liczbie. Dzisiaj wiemy, że taki obraz mitochondriów nie w pełni odpowiada prawdzie. **Dzięki nowoczesnym technikom obserwacji struktur subkomórkowych stwierdzono ponad wszelką wątpliwość, że mitochondria są dynamicznymi organellami, mającymi zdolność do odwracalnego łączenia się (ang. fusion) w silnie rozbudowane struktury przypominające do pewnego stopnia siateczkę śródplazmatyczną, oraz do fragmentacji (ang. fission).**

Wewnątrzkomórkowa organizacja mitochondriów nie jest jednakowa we wszystkich komórkach. Na przykład w hepatocytach dominują mitochondria pofragmentowane i rozproszone w cytosolu, natomiast w komórkach HeLa widoczna jest zazwyczaj silnie rozbudowana sieć mitochondrialna. Organizacja mitochondriów zależy również od stanu metabolicznego komórek, a w przypadku komórek podlegających podziałom także od fazy cyklu komórkowego. Mechanizmy molekularne

larne leżące u podstaw łączenia się i fragmentacji mitochondriów nie są do końca poznane. Wiadomo, że fragmentacja przypomina tworzenie się pęcherzyków błonowych w czasie endocytozy i, podobnie jak w endocytozie, biorą w niej udział białka o aktywności enzymatycznej GTP-az, blisko spokrewnione z właściwą dla endocytozy **dynamina**. Nie jest też jasne, co jest naturalnym bodźcem inicjującym zmianę wewnątrzkomórkowej organizacji mitochondriów. Wiadomo, że ich fragmentacja poprzedza podział komórki, a także jest odpowiedzią na zaburzenia energetyczne mitochondriów oraz jest skorelowana z indukcją apoptozy. Wydaje się, że procesy fragmentacji i scalania sieci mitochondrialnej pozwalają na utrzymywanie pewnego zróżnicowania w populacji tych organelli w komórce, a równocześnie umożliwiają mieszanie się i ujednocianie zawartości macierzy mitochondrialnej.

Fosforylacja oksydacyjna

Mitochondria są organellami występującymi w prawie wszystkich komórkach organizmów oddychających tlenowo (u ssaków wyjątkiem są dojrzałe erytrocyty). Ich podstawową i najbardziej znaną funkcją jest dostarczanie energii w formie dostępnej dla komórki i całego organizmu. Energia ta, uzyskiwana podczas utleniania zredukowanych substratów, jest wykorzystywana do syntezy ATP w procesie zwanym fosforylacją oksydacyjną. Dlatego mitochondria określane są często jako „centra energetyczne” lub „siłownie komórkowe”. Jest zrozumiiałe, że występują najliczniej w komórkach tych tkanek i narządów, które zużywają najwięcej energii, takich jak mięśnie szkieletowe, serce, ośrodkowy układ nerwowy, wątroba.

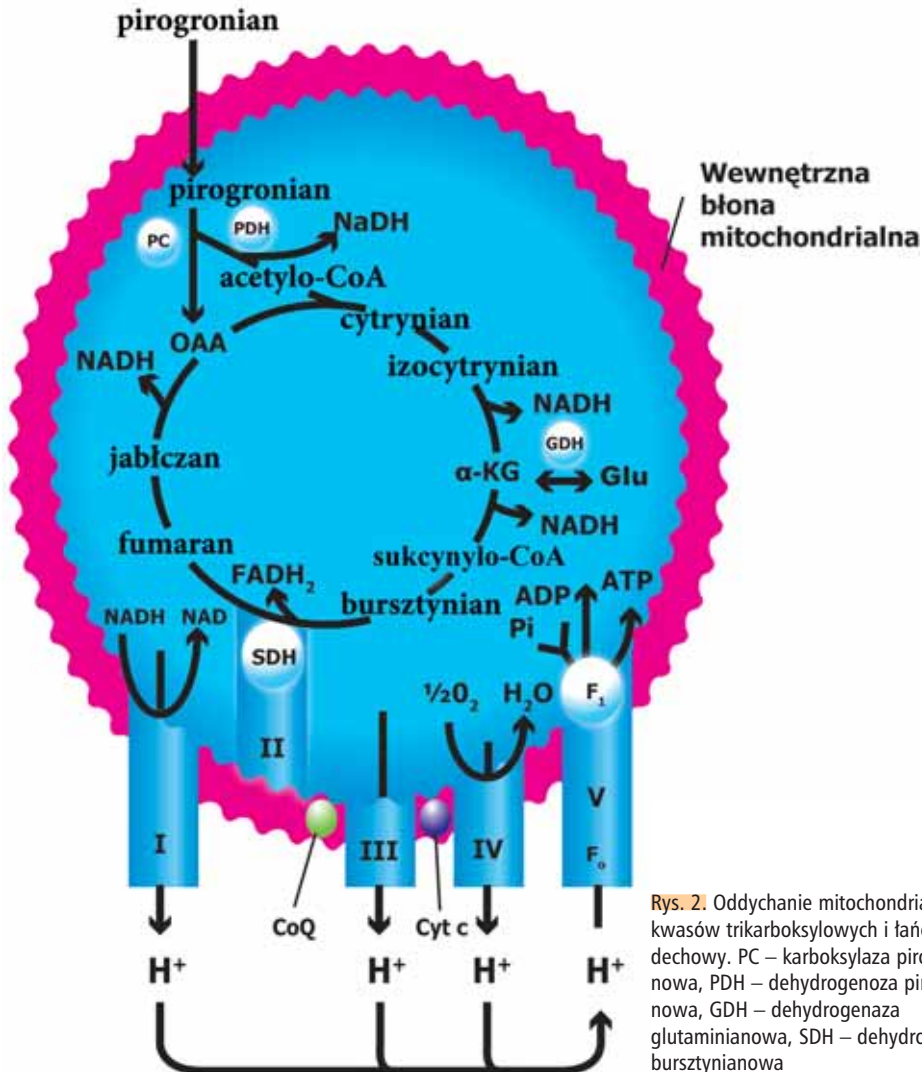
Fosforylacja oksydacyjna jest procesem składającym się z dwóch etapów. Pierwszym z nich jest utlenianie substratów oddechowych w łańcuchu oddechowym. Polega to na kontrolowanym, wielostopniowym przekazywaniu elektronów od zredukowanych nukleotydów NADH (zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) lub FADH₂ (zredukowany dinukleotyd flawinoade-

ninowy) na tlen cząsteczkowy. Drugi etap to silnie endoergiczna reakcja fosforylacji ADP (adenozynodifosforan) z wytworzeniem ATP (adenozynotrifosforan), katalizowana przez mitochondrialną ATPazę zwaną też syntazą ATP. W reakcji tej wykorzystywana jest energia uwolniona w łańcuchu oddechowym i zakumulowana w formie dostępnej dla ATPazy. Powstający w wyniku oksydacyjnej fosforylacji ATP jest nośnikiem energii wykorzystywanym w komórce w niezliczonej liczbie energochłonnych procesów. Przyjrzyjmy się teraz nieco bliżej kolejnym etapom oksydacyjnej fosforylacji.

Łańcuch oddechowy, czyli mitochondrialny system transportu elektronów

Jak wspomniano wcześniej, substratami wykorzystywanymi w łańcuchu oddechowym są zredukowane dinukleotydy NADH i FADH₂. Związki te mają bardzo niski (ujemny) potencjał oksydoredukcyjny, czyli są silnymi reduktorami. Powstają przede wszystkim podczas glikolizy, utleniania kwasów tłuszczowych oraz w cyklu kwasu cytrynowego (cykl kwasów trikarboksylowych, cykl Krebsa). **Glikoliza zachodzi w cytosolu i jest szlakiem przekształcającym glukozę w pirogronian.** Towarzyszy temu wytwarzanie NADH (oraz ATP w tak zwanej fosforylacji substratowej, która nie jest przedmiotem tego artykułu). Dekarboksylacja pirogronianu dostarczająca acetylo-CoA (substrat dla cyklu kwasu cytrynowego) oraz NADH zachodzi, podobnie jak cykl Krebsa, w macierzy mitochondrialnej. W tym samym przedziale komórkowym zachodzi też utlenianie kwasów tłuszczowych, którego produktami są acetylo-CoA oraz NADH i FADH₂. Cykl kwasu cytrynowego jest wspólnym końcowym szlakiem utleniania nie tylko cukrów, ale i innych substratów energetycznych takich jak aminokwasy i kwasy tłuszczowe. Ostatecznie są one włączane do cyklu w postaci acetylo-CoA.

Produktami cyklu kwasów trikarboksylowych są: CO₂ (usuwany w wydychanym powietrzu), jedna cząsteczka GTP (fosforylacja substratowa GDP) oraz zredukowane



Rys. 2. Oddychanie mitochondrialne; cykl kwasów trikarboksylowych i łańcuch oddechowy. PC – karboksylaza pirogronianowa, PDH – dehydrogenaza pirogronianowa, GDH – dehydrogenaza glutaminianowa, SDH – dehydrogenaza bursztynianowa

nukleotydy (NADH i FADH₂). Nukleotydy te są utleniane w łańcuchu oddechowym. Ostatecznie dochodzi do czteroelektronowej redukcji O₂ i wytworzenia wody.

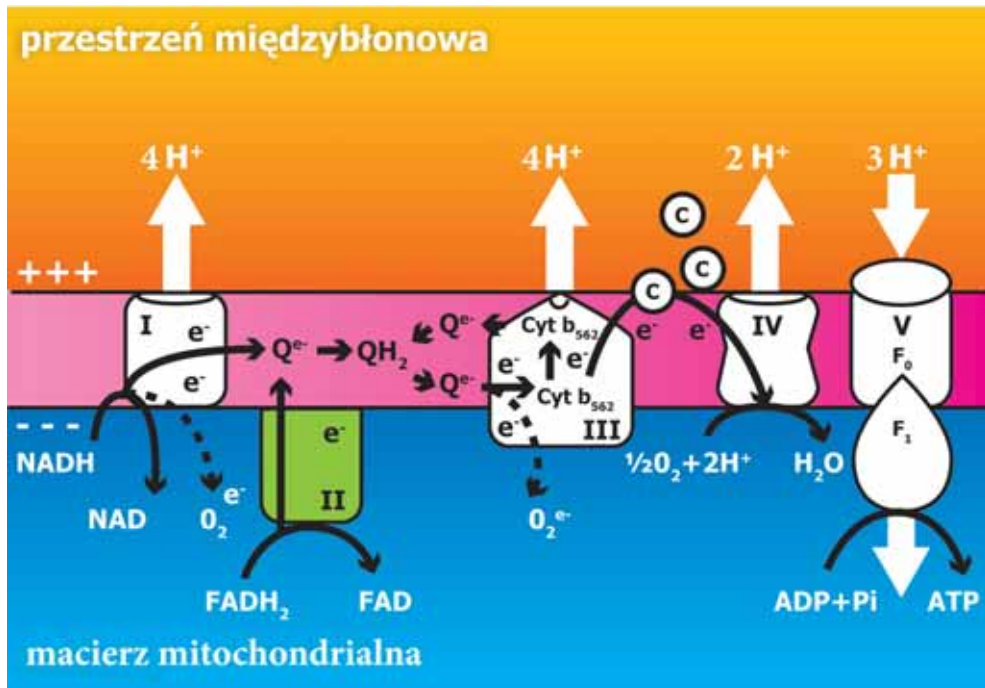
Łańcuch oddechowy złożony jest z ponad 80 rodzajów białek zgrupowanych w czterech kompleksach zwanych kompleksami oddechowymi. Kompleksy I, III i IV są integralnymi białkami wewnętrznej błony mitochondrialnej, natomiast kompleks II, którego podjednostką jest dehydrogenaza bursztynianowa (jeden z enzymów cyklu

Krebsa), jest związany z wewnętrzną powierzchnią wewnętrznej błony mitochondrialnej. Kompleksy oddechowe są enzymami katalizującymi kolejno utlenianie zredukowanych nukleotydów, redukcję i utlenianie przekaźników elektronów oraz redukcję tlenu. Przekaźnikami elektronów są ubiquinon (koenzym Q, CoQ) redukowany przez kompleks I lub II oraz utleniany przez kompleks III, jak również cytochrom c redukowany przez kompleks III i utleniany przez kompleks IV.

Kolejne elementy łańcucha oddechowego są uszeregowane zgodnie ze wzrastającym potencjałem oksydoredukcyjnym. Różnica potencjałów istniejąca pomiędzy dwoma układami oksydoredukcyjnymi jest miarą energii swobodnej, jaka jest uwalniana w wyniku reakcji utleniania i redukcji. W przypadku łańcucha oddechowego różnica potencjałów pomiędzy pierwszym donorem elektronów (NADH) a ostatecznym ich akceptorem (O_2) wynosi 1,13 V. Odpowiada to spadkowi energii swobodnej o 217,7 kJ. Sekwencyjny system przenośników elektronów pozwala na stopniowe uwalnianie energii, co minimalizuje jej rozpraszanie i podnosi efektywność jej wykorzystywania.

Kompleks I ma aktywność oksydoreduktazy NADH-koenzym Q (dehydrogenaza NADH). Jest to bardzo duży enzym, złożony z ponad 40 podjednostek o łącznej masie prawie 1000 kDa. W jego cen-

trum katalitycznym znajduje się FMN (mononukleotyd flawinowy) oraz centra żelazowo-siarkowe. Kompleks I katalizuje przeniesienie elektronów na CoQ. Tej dwuelektrodowej redukcji towarzyszy przyłączenie 2 protonów. CoQ jest też akceptorem elektronów pochodzących od $FADH_2$ związanego z kompleksem II, który składa się z 4 podjednostek, w tym z podjednostki o aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i – podobnie jak kompleks I – zawiera centra żelazowo-siarkowe. Donorami elektronów dla CoQ może być też $FADH_2$ powstający w wyniku utleniania glicerolo-3-fosforanu przy udziale dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej przyłączonej do zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej, oraz $FADH_2$ powstający w czasie utleniania kwasów tłuszczowych. W tym drugim przypadku w procesie redukcji CoQ uczestniczy tzw. flawoprote-



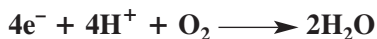
Rys. 3. Cztery kompleksy białkowe łańcucha oddechowego mitochondriów oraz ATPaza zaznaczona jako kompleks V (wg Letters in Drug Design & Discovery, 2004, tom 1, nr 3, str. 279–284)

ina przenosząca elektrony, znajdująca się w macierzy mitochondrialnej. Zredukowany koenzym Q (UQH₂) jest zwany ubichinolem. Kompleks III (kompleks *bc*₁) łańcucha oddechowego tworzy reduktaza ubichinol-cytochrom *c*. Jest to dimer zbudowany w sumie z 22 łańcuchów polipeptydowych. Zawiera kilka centrów żelazo-siarkowych oraz trzy cząsteczki hemu. Dwie z nich są grupami prostetycznymi w białku zwanym cytochromem *b* (grupy hemowe *b*_L i *b*_H), a jedna w cytochromie *c*₁. Enzym ten katalizuje jednoelektronową reakcję redukcji cytochromu *c*. Reakcji tej nie towarzyszy przyłączanie protonu. Przepływ elektronów z ubichinolu na cytochrom *c* odbywa się dwuetapowo. Jeden z elektronów przechodzi z ubichinolu poprzez centrum FeS na cytochrom *c*₁, a następnie na cytochrom *c*. Drugi elektron redukuje najpierw grupę hemową *b*_L, później *b*_H, a następnie ubichinon do semichinonu (rodnik). W kolejnym etapie jeden z elektronów ubichinolu znowu zostaje przeniesiony na cytochrom *c* (poprzez centrum FeS i cytochrom *c*₁). Drugi elektron, po zredukowaniu grupy hemowej *b*_L, a następnie *b*_H, redukuje semichinon z pierwszego etapu do ubichinolu. Ubichinol zasila pulę zredukowanych koenzymów Q gotowych oddać elektron na kompleks III. Ten dość skomplikowany mechanizm nosi nazwę cyklu Q.

Cytochrom *c* znajduje się w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Przypuszcza się, że jego pula jest niejednorodna; część cytochromu *c* jest związana przy udziale kardiolipiny z powierzchnią wewnętrzną błony mitochondrialnej, a część jest w postaci wolnej. Prawdopodobnie ma to znaczenie w aktywacji przez mitochondria jednej z dróg apoptozy.

Kompleks IV zwany oksydazą cytochromową lub oksydazą końcową katalizuje przeniesienie elektronów z cytochromu *c* na tlen. Składa się z 13 podjednostek i zawiera dwie grupy hemowe: hem *a* i hem *a*₃ oraz trzy jony Cu (2Cu_A i Cu_B). Pobranie czterech elektronów od cytochromów *c*

przez cząsteczkę O₂ powoduje wytworzenie dwóch cząsteczek wody.



Ubočnym i nieuchronnym skutkiem metabolizmu tlenowego jest wytwarzanie przez mitochondria reaktywnych związków tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS), cząsteczek z jednej strony potencjalnie bardzo niebezpiecznych ze względu na ich wysoką reaktywność, z drugiej jednak wykorzystywanych w niektórych kaskadach sygnałowych. Szacuje się, że co najmniej 0,2% tlenu zużywanego przez mitochondria w warunkach normalnych jest przekształcana w ROS. W stanach patologicznych ilość ta może znacznie wzrosnąć. Powstawanie ROS wynika z pewnego rodzaju „nieszczelności” łańcucha oddechowego dla elektronów.

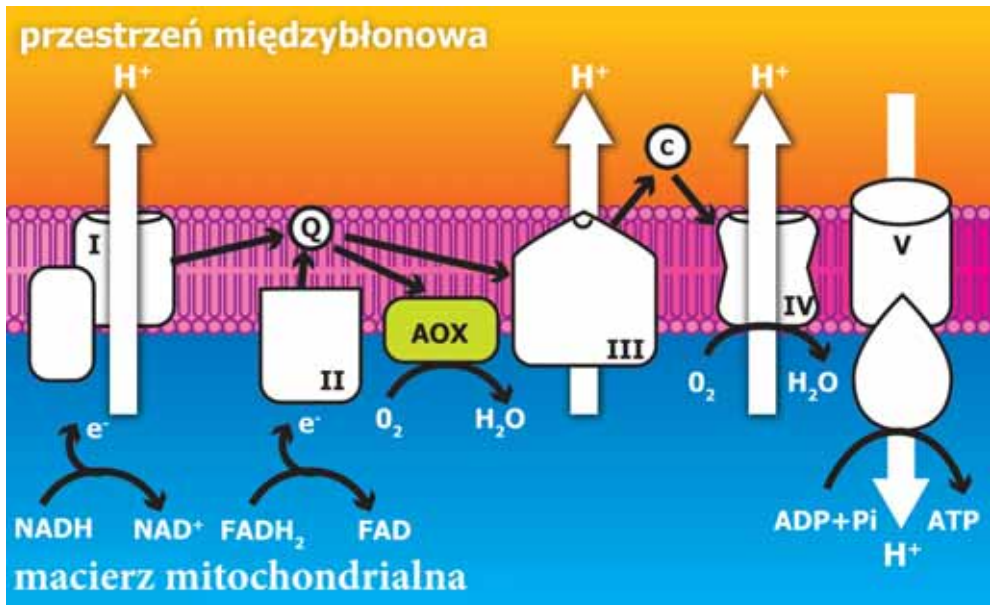
Część elektronów zamiast wędrować od NADH do tlenu przez wszystkie ogniwa łańcucha oddechowego „wydostaje się z łańcucha” i reaguje z tlenem w procesie redukcji jednoelektrodowej, której produktem jest anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻).



Miejsca wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego znajdują się w I i III kompleksie łańcucha oddechowego. Wydaje się, że udział kompleksu I wzrasta w warunkach ograniczonego przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy, gdy dochodzi do nadmiernego nagromadzenia się NADH. Z kolei wytwarzanie ROS przez kompleks III jest związane z wysoką aktywnością wspomnianego cyklu Q.

Anionorodnik ponadtlenkowy jest wysokoreaktywną cząsteczką, która oprócz tego, że reaguje z wieloma składnikami komórki, zapoczątkowuje całą serię reakcji, których skutkiem jest powstawanie kolejnych ROS takich jak nadtlenek wodoru i najbardziej niebezpieczny rodnik hydroksylowy.

Powstawanie ROS jest zjawiskiem normalnym. W prawidłowej komórce związki te są efektywnie neutralizowane dzięki wystę-



Rys. 4. Udział oksydazy alternatywnej (AOX) w transporcie elektronów przez roślinny łańcuch oddechowcy.

powaniu enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy i peroksydazy, oraz drobnocząsteczkowych „wymiataczy” wolnych rodników, w tym witamin E, C, A, glutationu oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych. Natomiast w stanach patologicznych, których przykładem jest ischemia, a następnie reperfuzyja (np. podczas epizodów niedokrwienych serca i mózgu), szybkość wytwarzania ROS oraz powstawania związków z tym uszkodzeń gwałtownie wzrasta.

Jak już wcześniej wspomniano, redukcji tlenu przez $NADH$ lub $FADH_2$ (co ma miejsce w łańcuchu oddechowym) towarzyszy uwalnianie energii. Następuje to stopniowo, w każdej reakcji oksydoredukcji składającej się na łańcuch oddechowcy. Żeby energia ta mogła być w jakikolwiek sposób wykorzystana do syntezy ATP, nie może ulec rozproszeniu, lecz musi być zmagazynowana w postaci dostępnej dla enzymu katalizującego tę reakcję. Sposobem zmagazynowania energii uwalnianej w reakcjach oksydoredukcyjnych, zachodzących w mitochondriach jest zbudowanie

protonowego potencjału elektrochemicznego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Reakcjom utleniania i redukcji zachodzącym w kompleksach I, III i IV towarzyszy wypompowywanie protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Na każdą przeniesioną parę elektronową kompleksy oddechowe I i III wypompowują po 4 jony wodoru (H^+), a kompleks IV tylko $2H^+$. A zatem utlenieniu jednej cząsteczki $NADH$ towarzyszy wypompowanie z macierzy mitochondrialnej w sumie 10 protonów. Jeżeli donorem elektronów jest $FADH_2$, liczba wypompowanych jonów wodorowych wynosi 6 (ominięty jest kompleks I).

A zatem istotę działania łańcucha oddechowego sprowadzić można do tego, że jest on pompą protonową, która wykorzystując energię uwalnianą podczas reakcji oksydoredukcyjnych, wytwarza różnicę stężeń jonów wodorowych (protonów) w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Powstały potencjał elektrochemiczny protonów, zwany też siłą protonomotoryczną, ma dwie składowe. Jedną z nich jest skła-

dowa chemiczna, w przypadku różnicy stężenia jonów wodoru wyrażana jako różnica pH, drugą zaś składową elektryczną wynikającą z nierównomiernego rozmieszczenia ładunków. W normalnych mitochondriach różnica pH po obu stronach błony wewnętrznej wynosi ok. 0,5 jednostki (niższe pH po zewnętrznej stronie błony), a różnica potencjału elektrycznego osiąga wartość 180–220 mV (ujemny wewnątrz). Potencjał elektrochemiczny jonów wodoru jest formą zmagazynowania energii, jaka została uwolniona podczas oddychania. Energia ta jest następnie wykorzystywana do syntezy ATP.

Przedstawiony powyżej opis łańcucha oddechowego odnosi się do komórek zwierzęcych. Chociaż ogólna zasada działania mitochondriów jest taka sama u wszystkich organizmów, łańcuch oddechowy mitochondriów roślinnych wykazuje pewne dodatkowe cechy. Mitochondria komórek zwierzęcych są wrażliwe na cyjanki, które hamują aktywność kompleksu IV, uniemożliwiając tym samym redukcję tlenu i wytwarzanie ATP. Tym tłumaczy się wysoką toksyczność cyjanku dla zwierząt. Dochodzi wtedy nie tylko do zatrzymania produkcji ATP, ale także do nagromadzenia zredukowanych przenośników elektronów łańcucha oddechowego. Powoduje to deficyt energetyczny oraz zwiększa wytwarzanie reaktywnych form tlenu. W mitochondriach roślinnych istnieje system pozwalający na uniknięcie toksycznego działania cyjanku na oksydacyjną fosforylację, chociaż odbywa się to kosztem efektywności tego procesu. Jest to możliwe dzięki enzymowi zwanemu alternatywną oksydazą (AOX). Jest on umiejscowiony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i włącza się w łańcuch oddechowy na etapie między kompleksem II a III. Białko to zdolne jest do przenoszenia elektronów z ubichinonu bezpośrednio na tlen, z wytworzeniem wody. Droga ta, zwana drogą alternatywną, pozwala na ominięcie zablokowanych kompleksów III i/lub IV łańcucha oddechowego. Oczywiście aktywna jest wtedy tylko

jedna pompa protonowa związana z kompleksem I, co obniża wydajność energetyczną łańcucha oddechowego. Oksydaza alternatywna nie jest aktywna w sposób ciągły. Jej aktywacja (na poziomie ekspresji) jest uruchamiana wtedy, gdy wzrasta stężenie NADH oraz zwiększa się stres oksydacyjny związany z nadprodukcją reaktywnych form tlenu. Dodatkowe znaczenie ma wzrost temperatury. Obecność alternatywnej oksydazy w mitochondriach roślinnych jest rodzajem przystosowania roślin do potencjalnej ekspozycji na cyjanki, która jest związana z występowaniem w komórkach roślin glikozydów cyjanogennych. Związki te ulegają rozkładowi z wydzieleniem toksycznego cyjanku pod wpływem enzymów (-glikozydazy) uwalnianych w komórce roślinnej, w wyniku jej uszkodzenia np. przez zwierzęta roślinożerne. Może mieć to znaczenie ochronne dla roślin ze względu na toksyczność cyjanoków dla mitochondriów zwierzęcych. Natomiast obecność alternatywnej oksydazy zapewnia komórkom roślinnym bezpieczeństwo.

Synteza ATP

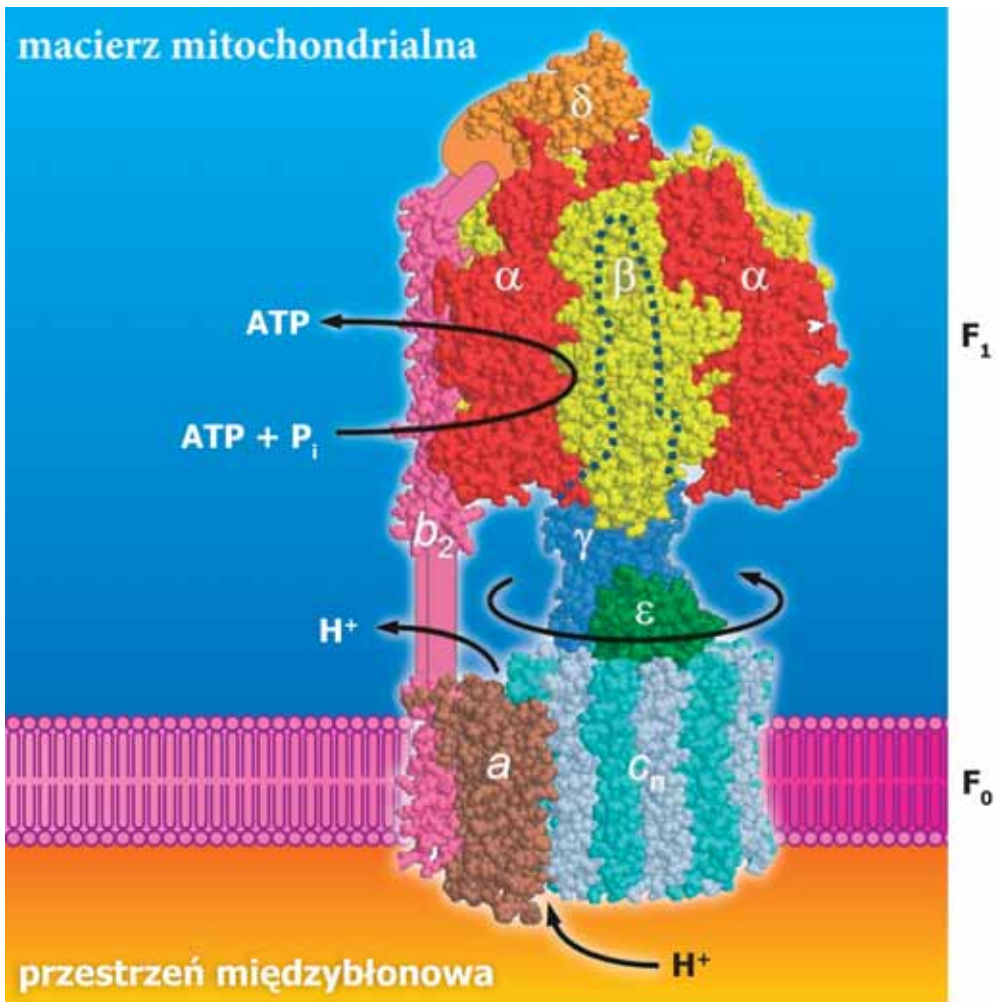
Mitochondrialna syntaza ATP jest czasem nazywana kompleksem V, chociaż – jak wspomniano przed chwilą – nie należy do łańcucha oddechowego. Enzym ten umożliwia kontrolowane „rozładowywanie” potencjału protonowego w taki sposób, że uwalniana energia jest wykorzystywana do energochłonnej reakcji fosforylacji ADP do ATP. W czasie tej reakcji protony „przepliwają” przez syntazę ATP zgodnie z gradientem elektrochemicznym, a zatem z powrotem do macierzy mitochondrialnej. Zależność między siłą protonomotoryczną powstającą podczas oddychania, a syntezą ATP jest podstawą teorii chemiczno-osmotycznego sprzężenia, zaproponowanej przez Petera Mitchella w 1961 roku, za którą siedemnaście lat później otrzymał Nagrodę Nobla. Należy zwrócić uwagę, że związek między łańcuchem oddechowym a ATPazą ma charakter funkcjonalny. W warunkach doświad-

czalnych można wytworzyć gradient protonowy w poprzek sztucznej błony lipidowej bez udziału łańcucha oddechowego. Syntaza ATP wbudowana w tę błonę (jako jedyne białko) jest w stanie katalizować fosforylację ADP do ATP. Dowodzi to, że syntazie ATP jest „wszystko jedno”, jak powstała wykorzystywana przez nią różnica stężeń protonów w poprzek błony.

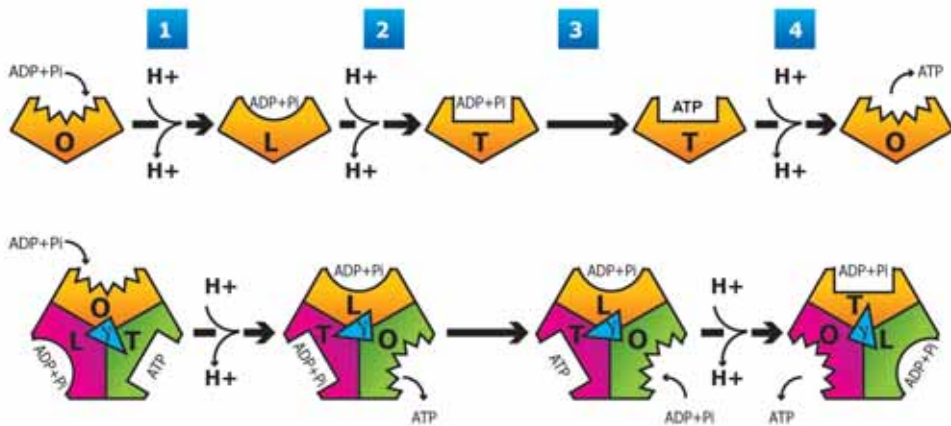
Syntaza ATP jest kompleksem enzymatycznym złożonym z dwóch podjednostek. Podjednostka F_0 jest integralnym białkiem błonowym umożliwiającym przepływ proto-

nów z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondrialnej, natomiast podjednostka F_1 , zlokalizowana na powierzchni błony, ma aktywność katalityczną. Na obrazach uzyskanych dzięki mikroskopii elektronowej syntaza ATP ma wygląd grzybka, z kapeluszem sterzącym poza błonę po stronie macierzy mitochondrialnej, i trzonkiem w znacznej części zanurzonym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Podjednostka F_0 jest zbudowana z trzech rodzajów łańcuchów polipeptydowych: a, b oraz c. 10 łańcuchów c tworzy wewnętrzzbo-



Rys. 5. Budowa syntazy ATP (wg. <http://www.depts.ttu.edu/chemistry/faculty/weber/NSMB1c2.jpg>)



Rys. 6. Model działania syntazy ATP wg

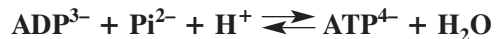
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255atp/ATPase/ATPase_files/mechaction.jpg

nowy pierścień, podczas gdy łańcuchy a oraz b są umieszczone niesymetrycznie, łącząc wspomniany pierścień z „kapeluszem” utworzonym przez podjednostkę F₁. Podjednostka F₁ jest zbudowana z pięciu rodzajów łańcuchów polipeptydowych (α, β, γ, δ, ε). Łańcuchy α i β tworzą „szczyt kapelusza” i są położone naprzemiennie jako 3 układy αβ. To właśnie łańcuchy β tworzą centra katalityczne enzymu.

Natomiast łańcuchy peptydowe γ oraz ε tworzą łącznik między pierścieniem utworzonym przez białka c podjednostki F₀ z kompleksem łańcuchów peptydowych αβ.

Wyjaśnienie mechanizmu działania tak skomplikowanego enzymu zostało wyróżnione w 1997 roku Nagrodą Nobla. Uważa się, że każdy z trzech łańcuchów peptydowych b może przyjmować trzy stany konformacyjne, stan otwarty „O” (o niskim powinowactwie do ATP), w którym powstałe ATP opuszcza centrum aktywne, stan „L”, w którym substraty związane są „luźno”, czyli ze stosunkowo niskim powinowactwem i w pewnym oddaleniu od siebie, stan „T”, w którym substraty związane są silnie i zbliżają się do siebie, stwarzając układ przestrzenny, sprzyjający reakcji. W stanie „T” dochodzi do syntezy ATP. W cząsteczce syntazy ATP każdy z 3 łańcuchów b wy-

stępuje w danym momencie w innej konformacji. **Podczas działania enzymu stany konformacyjne łańcuchów β zmieniają się cyklicznie w sekwencji T → O → L.** Gdy utworzone ATP odłącza się od łańcucha β, który właśnie uzyskał konformację „O”, sąsiedni łańcuch β przyjmuje formę „T”, a jeszcze wcześniejszy ulega przekształceniu z „O” w „L”. W efekcie synteza jednej cząsteczki ATP wymaga od podjednostki β przejścia pełnego cyklu przemian konformacyjnych. Ponieważ w tym samym czasie ulegają przekształceniom trzy takie podjednostki, to w istocie pełnemu „obrotowi” towarzyszy, zgodnie z niższą reakcją, fosforylacja 3 cząsteczek ADP.



Słowo „obrót” nie zostało tu użyte przypadkowo, bowiem zgodny z różnicą stężeń przepływ protonów przez specyficzny kanał utworzony przez podjednostkę F₀ wymusza obrót pierścienia złożonego z łańcuchów peptydowych c, a wraz z nim obrót łańcucha peptydowego γ. Ten zaś, zanurzony w „kapeluszu” ATPazy utworzonym przez peptydy αβ, powoduje zmiany konformacji łańcuchów peptydowych β. Innymi słowy energia zawarta w potencjale protonowym

jest wykorzystana do spowodowania takich zmian konformacyjnych w białku syntazy ATP, które prowadzą do połączenia fosforanu nieorganicznego z ADP z jednoczesną eliminacją wody. Zgodnie z uznaną stechiometrią tego procesu do wytworzenia jednej cząsteczki ATP konieczne jest, by przez podjednostkę F_0 syntazy ATP przepłynęły trzy protony. A zatem, łącząc stechiometrię łańcucha oddechowego ze stechiometrią syntazy ATP, można przyjąć, że przeniesienie jednej pary elektronów z NADH na tlen umożliwia syntezę ok. 3 cząsteczek ATP, a z $FADH_2$ ok. 2 (bardziej precyzyjne obliczenia wskazują, że liczby te wynoszą odpowiednio 2,5 i 1,5).

Kierunek rotacji peptydu γ podczas syntezy ATP jest przeciwny do kierunku ruchu wskazówek zegara (jeżeli patrzymy od strony błony mitochondrialnej). W pewnych sytuacjach, gdy mitochondria są zdeenergowane, tzn. pozbawione potencjału błonowego, ale wewnętrzna błona mitochondrialna jest nadal nieprzepuszczalna dla protonów, możliwe jest zachodzenie procesu przeciwnego: syntaza ATP katalizuje hydrolizę ATP z jednoczesną segregacją protonów w poprzek błony. A zatem enzym ten może działać jako pompa protonowa

wytwarzająca protonowy potencjał elektrochemiczny kosztem energii uwalnianej podczas hydrolizy ATP. W takim przypadku rotor γ obraca się w przeciwnym kierunku niż podczas syntezy ATP.

Związek między oddychaniem (transportem elektronów w łańcuchu oddechowym) a syntezą ATP (lub hydrolizą ATP, której towarzyszy odtwarzanie potencjału błonowego) zachodzi pod warunkiem, że mitochondria są sprzężone. Oznacza to, że łańcuch oddechowy wykonuje pracę wbrew powstającemu potencjałowi błonowemu. Jeżeli potencjał ten nie jest rozładowywany w sposób kontrolowany (np. wykorzystywany do syntezy ATP), osiąga tak dużą wartość, że skutecznie przeciwstawia się dalszemu wypompowywaniu protonów. W takich warunkach transport elektronów w łańcuchu oddechowym ustaje. Jeżeli błona mitochondrialna stanie się przepuszczalna dla protonów, mitochondria są rozprężone. Szybkość oddychania jest wtedy bardzo duża, ponieważ łańcuch oddechowy nie wykonuje pracy przeciwko potencjałowi protonowemu. Oczywiście synteza ATP nie zachodzi. W warunkach naturalnych potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej jest stale wykorzystywany do syntezy ATP i stale odbudowywany przez łańcuch oddechowy. Ustala się pewien stan równowagi między tymi procesami.

W badaniach oksydacyjnej fosforylacji szczególne znaczenie ma stosowanie substancji, które w sposób selektywny wpływają na poszczególne etapy tego procesu. Wyróżnia się wśród nich inhibitory łańcucha oddechowego (inhibitory transportu elektronów), inhibitory ATPazy oraz substancje rozprzegające. Inhibitory łańcucha oddechowego hamują przepływ elektronów i wykazują specyficzność w stosunku do poszczególnych kompleksów oddechowych. I tak inhibitorami kompleksu I są rotenon, amytal

DOBRE, ŻE MOJE MITOCHONDRIA NIE POTRAFIĄ MOWIĆ...

