

Molekularna mašinerija za proizvodnju energije

Miloš, Frano

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:925925>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MOLEKULARNA MAŠINERIJA ZA PROIZVODNJU ENERGIJE
MOLECULAR MACHINERY INVOLVED IN ENERGY PRODUCTION
SEMINARSKI RAD

Frano Miloš

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study – molecular biology)

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED GLAVNIH PROCESA UKLJUČENIH U PROIZVODNJU ENERGIJE.....	2
2.1 Glikoliza.....	2
2.2 Ciklus limunske kiseline.....	3
3. OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA.....	4
3.1 Nosači elektrona.....	5
3.2 Kompleks I.....	6
3.3 Kompleks II.....	8
3.4 Kompleks III.....	10
3.5 Kompleks IV.....	12
3.6 Kompleks V.....	15
4. SUPERKOMPLEKSI DIŠNOG LANCA.....	19
4.1 Otkriće respirasoma.....	19
4.2 Uvjeti nastanka superkompleksa.....	22
4.3 Funkcije superkompleksa.....	23
4.4 Sastavljanje superkompleksa.....	23
4.5 Plastičnost superkompleksa.....	25
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. LITERATURA.....	27
7. SAŽETAK.....	29
8. SUMMARY.....	29

1. UVOD

Svi organizmi trebaju energiju za rast, razmnožavanje i održavanje homeostaze pa stoga mogućnost uzimanja i pretvaranja energije predstavlja temeljnu značajku života. Organizmi mogu koristiti Sunčevu svjetlost ili oksidirati energetske bogate tvari kao izvore energije. Energija uzeta iz okoliša se pretvara u iskoristiv oblik i koristi za obavljanje različitih staničnih procesa. U stanicama se termodinamički nepovoljni procesi sprežu s reakcijama koje oslobađaju energiju čine te procese povoljnijima. Najvažnije reakcije oslobađanja energije su cijepanja fosfoanhidridnih veza u molekulama ATP. Budući da stanica održava visoku koncentraciju tih molekula, njihovo cijepanje je termodinamički vrlo povoljno pa upravo te molekule predstavljaju glavnu energetske valutu stanice.

Stanice imaju složenu molekularnu mašineriju kojom energiju pretvaraju u iskoristiv oblik, a glavna mjesta odvijanja tih procesa su mitohondriji. Mitohondriji sadrže sve enzime i kofaktore potrebne za odvijanje energetski važnih reakcija te se u njima proizvodi najveći udio molekula ATP u stanici. Endosimbiotskog su podrijetla te je postojanje dvostruke membrane i nezavisnog genetičkog materijala od izuzetne važnosti za njihovu funkciju. U unutarnjoj membrani se nalaze enzimske kompleksi koji koriste energiju oslobođenu prijenosom elektrona za stvaranje protonskog gradijenta između međumembranskog prostora i matriksa koji se koristi za sintezu ATP-a. Usto, unutarnja membrana je naborana što osigurava veću površinu za ugradnju enzimskih kompleksa dišnog lanca. Osim mitohondrija, biljne stanice posjeduju i kloroplaste koji na svjetlu proizvode velike količine ATP-a koristeći upravo svjetlosnu energiju za prijenos elektrona i cijepanje vode pri čemu nastaje kisik i elektrokemijski gradijent protona koji se, kao i u mitohondrijima, koristi za stvaranje molekula ATP.

2. PREGLED GLAVNIH PROCESA UKLJUČENIH U PROIZVODNJU ENERGIJE

Svi kemijski procesi sinteze i razgradnje u stanici predstavljaju stanični metabolizam. Energija se dobiva metaboličkim putevima razgradnje energetske bogatih tvari u koje spadaju proteini, ugljikohidrati i masti. Tim kataboličkim procesima nastaju molekule ATP te različiti reducirani nosači elektrona koji se koriste i u procesima sinteze (anabolizma).

2.1 Glikoliza

Glukoza je jedan od najvažnijih spojeva u metabolizmu živih bića te predstavlja važan izvor energije. Osim toga, bitan je prekursor mnogih strukturnih polimera (stanična stijenka, izvanstanični matriks) i nukleotida pa se metabolički put kojim se glukoza razgrađuje i iskorištava u stanici razvio vrlo rano u evoluciji.

Glikoliza je univerzalan proces kojeg, uz manje varijacije, možemo naći u gotovo svim živim bićima. Budući da se razvio u vrijeme kad su na Zemlji vladali anaerobni uvjeti, ovaj proces ne treba kisik te je jedini izvor energije u uvjetima kad nema dovoljno kisika za optimalnu opskrbu stanica. Nekim stanicama (eritrociti, spermiji, stanice mozga), glikoliza je i jedini proces kojim dobivaju energiju.

Cijeli proces se odvija u citoplazmi preko 10 uzastopnih reakcija kojima se od jedne molekule glukoze dobiju dvije molekule piruvata i dvije molekule ATP-a prema ukupnoj jednadžbi:



Samo mali dio energije se oslobodi fosforilacijom na razini supstrata i pohrani u obliku ATP-a dok se ostatak dobiva razgradnjom piruvata i oksidativnim reakcijama ciklusa limunske kiseline i oksidativne fosforilacije.

Piruvat je važan prekursor u anaboličkim procesima, no ima i važnu ulogu u regeneraciji zalihe NAD^+ u citosolu koji je neophodan za glikolizu. Ovisno o uvjetima, piruvat se može razgraditi u tri procesa. U anaerobnim uvjetima piruvat se alkoholnim vrenjem razgrađuje do etanola i ugljikovog dioksida (kvasci) te mliječno - kiselim vrenjem do laktata (eritrociti, pojačano aktivni mišići). U aerobnim uvjetima piruvat se oksidira uz dodatak koenzima A te nastaje acetyl-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline.

2.2 Ciklus limunske kiseline

Ciklus limunske kiseline ili Krebsov ciklus je kružni metabolički proces koji predstavlja čvorište kataboličkih i anaboličkih putova u stanici. Produkti razgradnje masnih kiselina, ugljikohidrata te nekih aminokiselina u aerobnim uvjetima ulaze u ciklus limunske kiseline u obliku acetil-CoA (većina), oksaloacetata i α -ketoglutarata. Cijeli proces se odvija u matriksu mitohondrija zajedno s ostalim procesima razgradnje (osim glikolize).

U svakom krugu acetil-CoA se spaja s oksaloacetatom i nastaje citrat (limunska kiselina) te se regenerira oksaloacetat uz otpuštanje 2 molekule ugljikova dioksida. Energija oksidacije je očuvana u obliku reduciranih nosača elektrona (3 NADH i FADH₂ po ciklusu) koji svoje elektrone predaju kompleksima dišnog lanca u procesu oksidativne fosforilacije. Osim uloge u proizvodnji energije, ovaj proces stvara prekursore različitih važnih spojeva.

Postoje brojni dokazi o postojanju superkompleksa različitih enzima ciklusa limunske kiseline. Prednost postojanja takvih multienzimskih kompleksa (metabolona) je u efikasnijem prenošenju supstrata bez difuzije intermedijera u okolni medij. Slično agregiranje je primjećeno i kod kompleksa dišnog lanca (4. poglavlje).

3. OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA

Oksidativna fosforilacija je vrhunac oksidativnih reakcija razgradnje ugljikohidrata, masnih kiselina, aminokiselina te završna faza staničnog disanja. Proces uključuje prijenos elektrona s reduciranih nosača, nastalih razgradnjom različitih spojeva, na komplekse dišnog lanca koji se nalaze u unutarnjoj membrani mitohondrija. Dišni lanac se sastoji od 4 kompleksa koji primaju elektrone pomoću pokretnih nosača (citokrom c, ubikvinon) i prenose ih na kisik čime nastaje voda. Energija oslobođena tim prijenosom se koristi za izbacivanje protona u međumembranski prostor i povećanje transmembranskog elektrokemijskog potencijala kojeg koristi ATP-sintaza (kompleks V) za proizvodnju ATP-a (Slika 1.). Nastali ATP se premješta u citoplazmu preko ADP/ATP translokaze koja uzima ADP iz citoplazme i zamjenjuje ga za ATP. Istraživanjem mitohondrija stanica goveđeg srca dobiven je omjer količine svih kompleksa dišnog lanca – 1 kompleks I:3 kompleks II:3 kompleks III:6,7 kompleks IV:0,5 ATP-sintaza:3-5 ADP/ATP translokaza (Schäger i Pfeiffer, 2001).

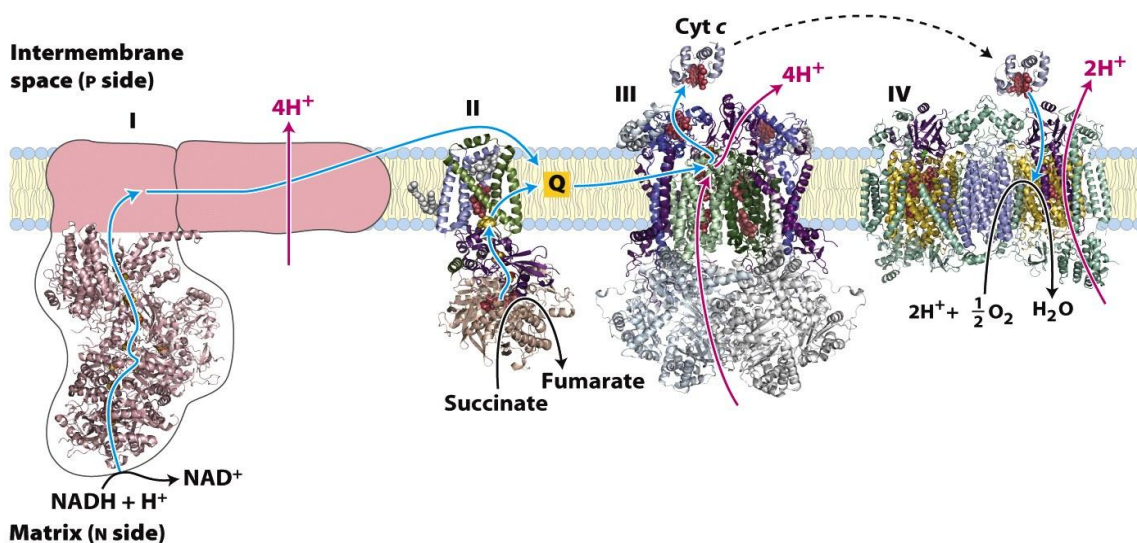


Figure 19-16
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Slika 1. Prijenos elektrona i protona kroz 4 kompleksa dišnog lanca. Kompleksi I i II predaju svoje elektrone ubikvinonu (Q) koji difundira u dvosloju i predaje elektrone i protone kompleksu III. Kompleks III prenosi elektrone na citokrom c koji difundira u međumembranskom prostoru (strana P) i predaje elektrone kompleksu IV. Kompleks IV reducira kisik te nastaje voda. Prijenos elektrona kompleksima I, III, IV je spregnut s izbacivanjem protona iz matriksa (strana N) u međumembranski prostor. Prikazane strukture su iz nekoliko organizama: kompleks I, *Thermus thermophilus* (PDB ID 2FUG); kompleks II, srce svinje (PDB ID 1ZOY); kompleks III, srce goveda (PDB ID 1BGY); citokrom c, srce konja (PDB ID 1HRC); kompleks IV, srce goveda (PDB ID 1OCC). Preuzeto iz Lehninger Principles of Biochemistry, 5. izdanje

3.1 Nosači elektrona

Različite dehidrogenaze uzimaju elektrone otpuštene u kataboličkim procesima i predaju ih univerzalnim nosačima elektrona – nikotinamidni nukleotidi (NAD^+ , NADP^+) te flavoproteini (sadrže FAD ili FMN). Nikotinamidni nukleotidi primaju elektrone u obliku hidridnih iona te ih predaju NADH dehidrogenazi (kompleks I). Potrebno je naglasiti kako NAD^+ sudjeluje pretežno u kataboličkim reakcijama, dok NADP^+ sudjeluje u anaboličkim reakcijama. Vezane prostetičke skupine FAD i FMN mogu primiti 1 ili 2 elektrona pa flavoproteini služe kao posrednici između donora 2 elektrona i akceptora 1 elektrona. Također, redukcijski potencijali ovih skupina ovise o proteinu, tj. aminokiselinama koje ih okružuju.

Ubikvinon je benzokvinon s dugim izoprenskim lancem, topljiv u lipidima, koji može nositi i elektrone (1 ili 2) i protone (H^+) pa ima važnu ulogu u sprezi prijenosa elektrona i protona. Zbog svoje hidrofobnosti može postojati u tri fizička stanja: u obliku micelarnih agregata, otopljen u lipidnom dvosloju te vezan za proteine. U živim stanicama, 75% molekula ubikvina je otopljen u lipidnom dvosloju dok je ostatak vezan za proteine. Simulacije molekularne dinamike su pokazale da se ubikvinon u lipidnom dvosloju nalazi u konformaciji u kojoj je polarna glava u kontaktu s posljednjom izoprenoidnom jedinicom hidrofobnog repa (Lenaz i Genova, 2009).

Citokrom c je protein otopljen u međumembranskom prostoru (12 kDa) koji sadrži hem, a kodiran je jezgrinim genima. Elektrostatskim interakcijama s fosfolipidnim glavama se veže za vanjsku stranu unutarnje membrane mitohondrija te prenosi 2 elektrona s kompleksa III na kompleks IV. Manji dio zalihe citokroma c je vezan hidrofobnim interakcijama s fosfolipidnim lancima koji strše izvan dvosloja te s kompleksima dišnog lanca. Citokrom c sadrži posebnu šupljinu u koju se veže acilni lanac kardiolipina za kojeg se pokazalo da olakšava vezanje citokroma c i kompleksa IV (Lenaz i Genova, 2009). Osim uloge u prijenosu elektrona, citokrom c sudjeluje i u apoptozi nakon što se otpusti u citoplazmu.

3.2 Kompleks I

Kompleks I (NADH dehidrogenaza) je najveći i najsloženiji enzim dišnog lanca čija je glavna uloga primanje elektrona s NADH te njihov prijenos na ubikvinon. Ima oblik slova L s jednim dijelom u membrani (membranska ruka) dok se drugi dio proteže u matriks (periferna ruka). Sastoji se od središnjih i pomoćnih podjedinica (samo eukarioti), no potpuna struktura holoenzima još nije određena. Središnje podjedinice se dijele na 7 hidrofobnih i 7 hidrofilnih te su većinom kodirane mitohondrijskom DNA (Zickermann i sur., 2009).

Periferna ruka ima oblik slova Y, visine je 140Å te sadrži 7 hidrofilnih podjedinica. U njoj se nalaze prostetičke skupine važne za prijenos elektrona – FMN te 8 Fe-S centara. NADH i FMN su vezani netipičnim Rossmannovim motivom (Zickermann i sur., 2009). FMN je primarni akceptor elektrona koji ih predaje Fe-S centrima. Posljednji centar (N2) predaje elektrone ubikvinonu koji se nalazi u veznom mjestu udaljenom 90Å od FMN (Slika 2.). Također, supstitucijske analize su pokazale da je Tyr144 u blizini centra N2 esencijalan za katalitičku aktivnost.

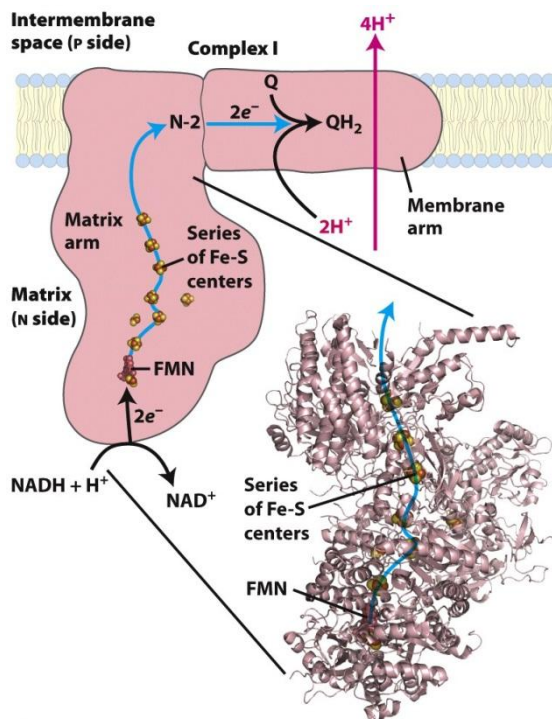
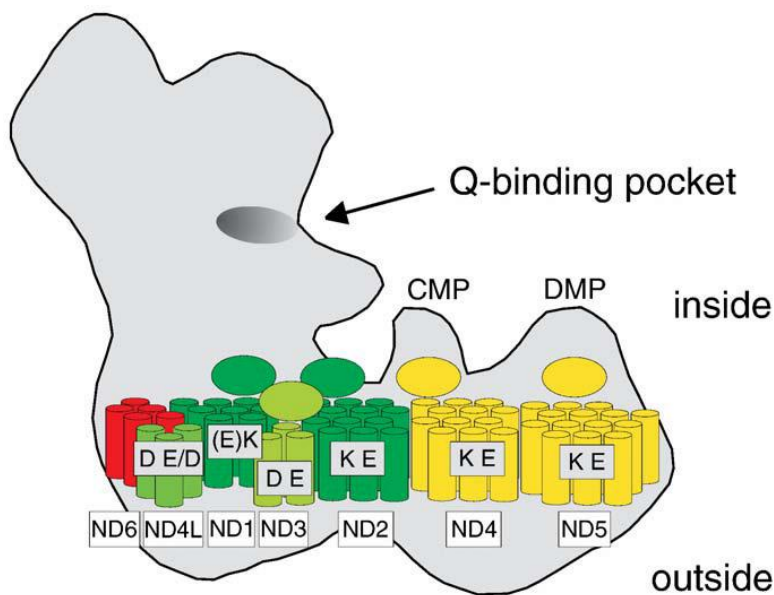


Figure 19-9
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

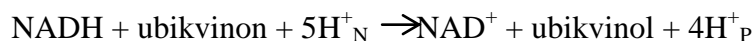
Slika 2. Kompleks I (NADH dehidrogenaza). Kompleks I katalizira prijenos hidridnog iona s NADH na FMN nakon čega 2 elektrona idu nizom Fe-S centara do N2 koji ih predaje ubikvinonu. Prijenos elektrona je spregnut s izbacivanjem 4 protona iz matriksa za svaki par elektrona čime kompleks doprinosi stvaranju transmembranskog potencijala. Struktura periferne ruke je određene (PDB ID 2FUG), dok je potpuna struktura membranske ruke i dalje nepoznata. Preuzeto iz Lehninger Principles of Biochemistry, 5. izdanje.

Membranska rukaje duga 220Å te sadrži dva izbočenja u matriks. Struktura ovog dijela je manje poznata no pretpostavlja se da sadrži oko 60 transmembranskih zavojnica. Podjedinice membranske ruke su važne u translokaciji protona iz matriksa u međumembranski prostor koja je spregnuta s prijenosom elektrona. Iako još nije poznato koje podjedinice sudjeluju u tom procesu, smatra se da trebaju sadržavati transmembranske segmente s aminokiselinama koje se mogu protonirati (Slika 3.). Podjedinice ND2, ND4 i ND5 ispunjavaju ovaj uvjet te se pokazalo da su homologne posebnom tipu Na⁺/H⁺ antiportera mnogih bakterijskih vrsta (Zickermann i sur., 2009).



Slika 3. Središnje hidrofobne podjedinice membranske ruke kompleksa I. Podjedinice čine tri subkompleksa: 1 λ (crveno), 1 γ (zeleno), 1 β (žuto). Elipse predstavljaju izvanmembranske domene. Označene su očuvane nabijene aminokiseline svakog subkompleksa. Prikazano je i vezno mjesto ubikvina u perifernoj ruci te dva izbočenja membranske ruke (DMP i CMP). Preuzeto iz Zickermann i sur., 2009.

Posebnost kompleksa I je u tome što se sve redoks skupine nalaze izvan membrane (u perifernom dijelu). Ukupna reakcija je prikazana jednadžbom:

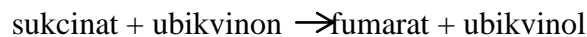


Također, predložen je novi strukturalni model u kojem se vezno mjesto za ubikvinon ne nalazi u membranskoj već u perifernoj ruci što znači da ubikvinon mora izaći iz lipidnog dvosloja. Pretpostavlja se da se to događa preko hidrofobnih kanala u zajedničkom dršku koji veže membransku i perifernu ruku (Zickermann i sur., 2009)

3.3 Kompleks II

Kompleks II (sukcinat dehidrogenaza) je protein mase 124 kDa koji sudjeluje u ciklusu limunske kiseline (oksidacija sukcinata u fumarat), ali i u dišnom lancu elektrona (redukcija ubikvinona u ubikvinol). Jedini je kompleks dišnog lanca potpuno kodiran jezgrinim genima. Sastoji se od 4 podjedinice (A, B, C, D). Podjedinice A i B su hidrofilne dok su C i D hidrofobne te uronjene u membranu (Roy i sur., 2000). Aktivno mjesto za oksidaciju sukcinata se nalazi u podjedinici A, dok se redukcija ubikvinona događa u hidrofobnim podjedinicama.

Elektroni se prenose sa sukcinata na FAD vezan u podjedinici A te kroz tri Fe-S centra (2Fe-2S, 4Fe-4S, 3Fe-4S) u podjedinici B do veznog mjesta za ubikvinon u hidrofobnim podjedinicama (Slika 4.). Između podjedinica C i D se nalazi hem (hem b) za kojeg se smatra da smanjuje učestalost curenja elektrona iz sustava i stvaranja reaktivnih kisikovih radikala. Ukupna reakcija koju katalizira ovaj kompleks je prikazana jednadžbom:



Reakcija može biti i reverzibilna i događa se tijekom anaerobne respiracije u kojoj je fumarat krajnji akceptor elektrona. Prijenos 2 elektrona sa sukcinata na ubikvinon ne rezultira povećanjem transmembranskog potencijala budući da kompleks II nije protonska crpka.

Kompleks II sudjeluje i u apoptozi kao medijator rane faze procesa koji se inducira aktivacijom receptora smrti te povećanjem proizvodnje kisikovih radikala (Kluckova i sur., 2013). Iz tog razloga je postao zanimljiv kao meta različitih antitumorskih lijekova (analozi vitamina E, malonat, 3-bromopiruvat). Kompleks II ima bitne uloge u signaliziranju sukcinatom, održavanju zalihe reduciranog oblika ubikvinona (antioksidans), funkcioniranju kanala za K^+ ovisnog o ATP-u (Woytovich i sur., 2013). Budući da je uz kompleks III, glavno mjesto stvaranja reaktivnih kisikovih radikala ima važnu ulogu u pospješenu starenja. Također se pokazalo kako mutacije u genima za podjedinice kompleksa II i faktore smatanja tih podjedinica uzrokuju nastanak tumora, budući da defekti u dišnom lancu i oksidativnoj fosforilaciji potiču pojačano korištenje glikolize za dobivanje energije te nekontroliranu proliferaciju (Warburgov efekt).

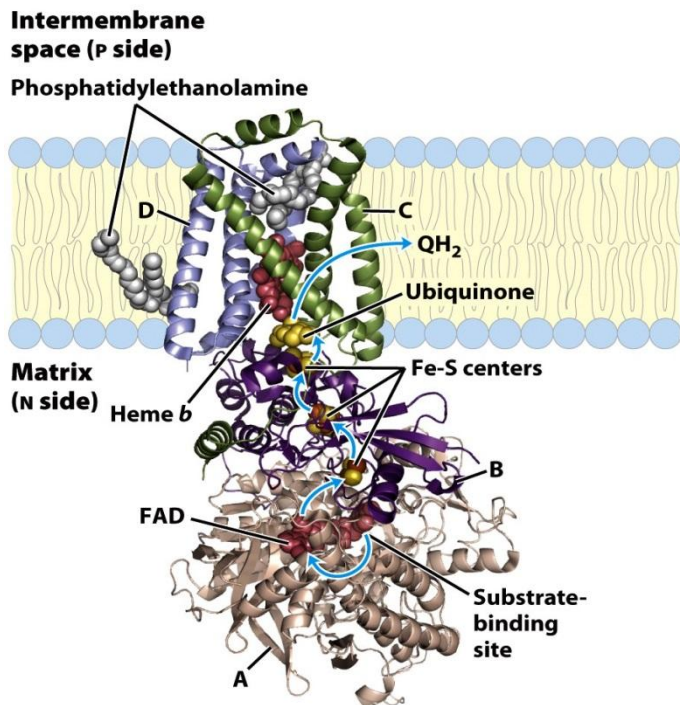


Figure 19-10
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

Slika 4. Kompleks II (sukcinat dehidrogenaza). Kompleks sadrži dvije transmembranske podjedinice (C i D) te dvije periferne podjedinice (A i B). Iza vezanog FAD u podjedinici A se nalazi vezno mjesto za sukcinat. Podjedinica B sadrži 3 Fe-S centra i vezno mjesto za ubikvinon. Hem se nalazi između podjedinica C i D. Elektroni idu od sukcinata (plave strelice) do FAD te kroz 3 Fe-S centra do ubikvinona. Dva fosfatidiletanolamina su jako čvrsto vezana za podjedinicu D te se pojavljuju u kristalnoj strukturi (PDB ID 1Z0Y). Preuzeto iz *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5. izdanje.

Osim kompleksa I i II, postoje i brojne druge dehidrogenaze koje prenose elektrone s različitih supstrata u dišni lanac. ETF dehidrogenaza je vezana za unutarnju membranu te prenosi elektrone dobivene oksidacijom masnih kiselina s flavoproteina (ETF) na ubikvinon. Glicerol 3-fosfat dehidrogenaza se nalazi s vanjske strane unutarnje membrane i prenosi elektrone s glicerol 3-fosfata dobivenog razgradnjom masti na ubikvinon.

3.4 Kompleks III

Kompleks III (citokrom bc_1 kompleks) je enzimski kompleks koji prenosi elektrone s ubikvinola (QH_2) na citokrom c te oslobođenu energiju prijenosa koristi za povećanje transmembranskog potencijala izbacivanjem protona u međumembranski prostor. Struktura dimernog kompleksa je prikazana na Slici 5. Svaki monomer sadrži citokrom b (2 hema), Rieske Fe-S protein s 2Fe-2S centrom te citokrom c_1 (1 hem). Dva citokroma b grade kanal kroz koji se ubikvinon kreće od matriksa (Q_N mjesto) do međumembranskog prostora (Q_P mjesto).

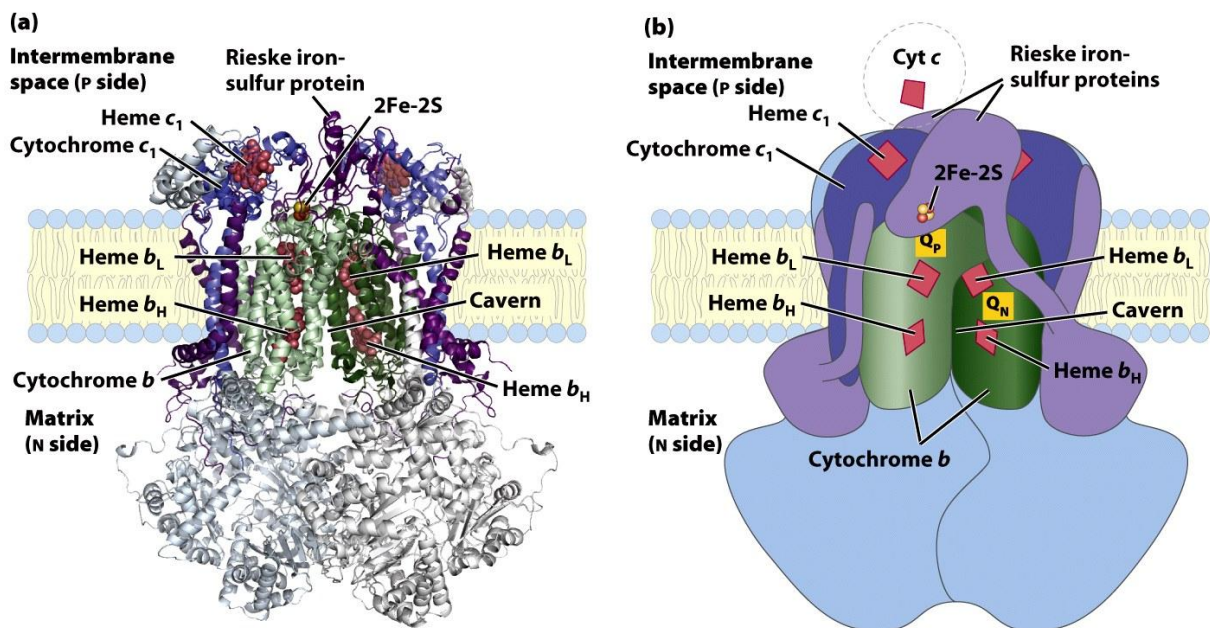
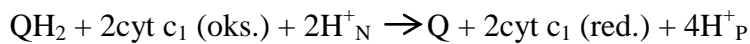


Figure 19-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Slika 5. Kompleks III (citokrom bc_1 kompleks). Kompleks III je dimer identičnih monomera koji sadrže po 11 podjedinica. a) Funkcionalnu jezgru svakog monomera čine 3 podjedinice: citokrom b (zeleno) s dva hema (b_L i b_H), Rieske Fe-S protein (ljubičasto), i citokrom c_1 (plavo) s hemom (PDB ID 1BGY). b) Shematski prikaz kompleksa prikazuje kako citokrom c_1 i Rieske protein strše na P stranu i mogu vezati citokrom c u međumembranskom prostoru. Postoje dva vezna mjesta za ubikvinon (Q_N i Q_P). Dimerna struktura je izuzetno važna za funkciju kompleksa. Monomeri stvaraju dvije šupljine u kojima se nalazi Q_N mjesto jednog te Q_P mjesto drugog monomera. Intermedijeri ubikvinona se kreću tim šupljinama. Preuzeto iz *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5. izdanje.

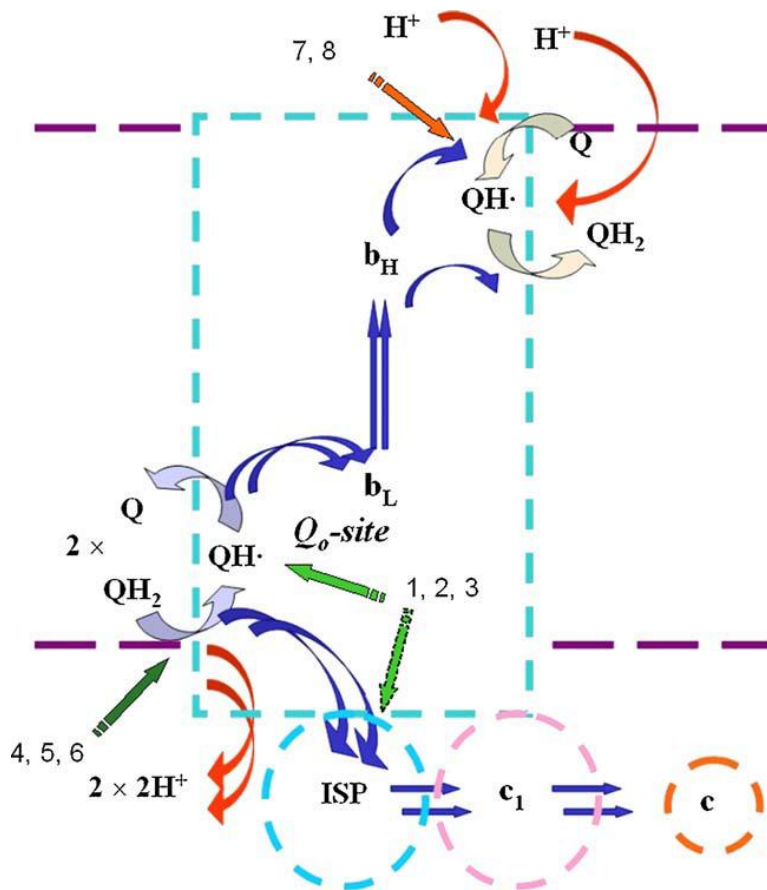
Budući da citokromi bi c mogu primiti samo 1 elektron, a QH₂ donira 2 elektrona, utvrđen je poseban mehanizam koji omogućuje prijelaz s nosioca 2 elektrona na nosioca 1 elektrona – Q ciklus (Slika 6.). Dva elektrona s QH₂ koji se nalazi u Q_o mjestu se prenose preko dva različita lanca. Prvi elektron se prenosi lancem visokog potencijala preko Fe-S centra Rieske proteina te hema citokroma c₁ na hem citokroma c koji se nalazi u međumembranskom prostoru. Drugi elektron se prenosi lancem niskog potencijala preko hemova citokroma b (b_L i b_H) i predaje drugom ubikvinonu vezanom na Q_i mjesto pri čemu se on reducira u QH[•] (semikvinon) te doprinosi povećanju gradijenta protona (uzima proton iz matriksa). Dakle, potrebna je oksidacija dva QH₂ koji otpuste četiri protona u međumembranski prostor i doniraju po dva elektrona svakom lancu da bi se zatvorio cijeli ciklus. Ukupnu reakciju prikazuje jednadžba:



Protoni se izbacuju indirektno prijenosom 2 negativna naboja (elektrona) preko hemova b od Q_o do Q_i mjesta te otpuštanjem i uzimanjem H⁺ oksidacijom odnosno redukcijom ubikvinona.

Istraživani su mehanizmi kojima se sprječava da oba elektrona idu lancem visokog potencijala te stvaranje kisikovih radikala u Q_i mjestu. Pokazalo se da se ES kompleks stvara samo kad je dostupan QH₂, kad je lanac visokog potencijala oksidiran te kad je dotupan oksidirani ubikvinon u Q_i mjestu što znači da je i lanac niskog potencijala djelomično oksidiran pa se semikvinonski intermedijer brzo uklanja (Crofts i sur., 2006).

Fosfolipidi, prvenstveno kardiolipin, imaju važnu ulogu u stabiliziranju i katalitičkoj aktivnosti ovog kompleksa. U kvašćevom enzimu je pronađena molekula kardiolipina (CL_i) vezana u šupljini koju tvore citokrom b, citokrom c₁ i Rieske protein blizu Q_i mjesta. Ta molekula stabilizira strukturu Q_i mjesta važnu u provođenju i uzimanju protona (Wenz i sur., 2009). Sastav lipida utječe i na asorpcijske maksimume te elektrodne potencijale hemova.



Slika 6. Shematski prikaz Q-ciklusa. Prikazani su redoks centri (hemovi b_L i b_H , citokromi b , c_1 i c te Fe-S centar Rieske proteina), putevi prijenosa elektrona (plave strelice), vezanje i otpuštanje supstrata i produkata (široke strelice) te uzimanje i otpuštanje protona (crvene strelice). Isprekidane ljubičaste linije predstavljaju membranu, plavi isprekidani pravokutnik predstavlja kompleks III dok semikvinonski intermedijeri označavaju Q_o i Q_i mjesto. Dva QH_2 (dolje) se oksidiraju u Q_o mjestu otpuštajući $4 H^+$ u međumembranski prostor te svaki daje po 1 elektron Rieske proteinu te ukikvinonu u Q_i mjestu (gore) koji se u dva koraka reducira u QH_2 (uzima $2 H^+$ iz matriksa). Preuzeto iz Crofts i sur., 2006.

3.5 Kompleks IV

Kompleks IV (citokrom c oksidaza) je posljednji enzimski kompleks uključen u prijenos elektrona. Elektroni se prenose s citokroma c na molekularni kisik pri čemu nastaje voda. Kompleks se sastoji od 13 podjedinica ukupne molekularne mase 204 kDa. Tri najveće podjedinice su esencijalne za katalitičku aktivnost kompleksa i kodirane su mitohondrijskim genima. Okružene su s 10 podjedinica kodiranih jezgrinim genima čija je funkcija nerazjašnjena, iako se smatra da služe stabiliziranju i sastavljanju tri glavne podjedinice (Yoshikawa i sur., 2012).

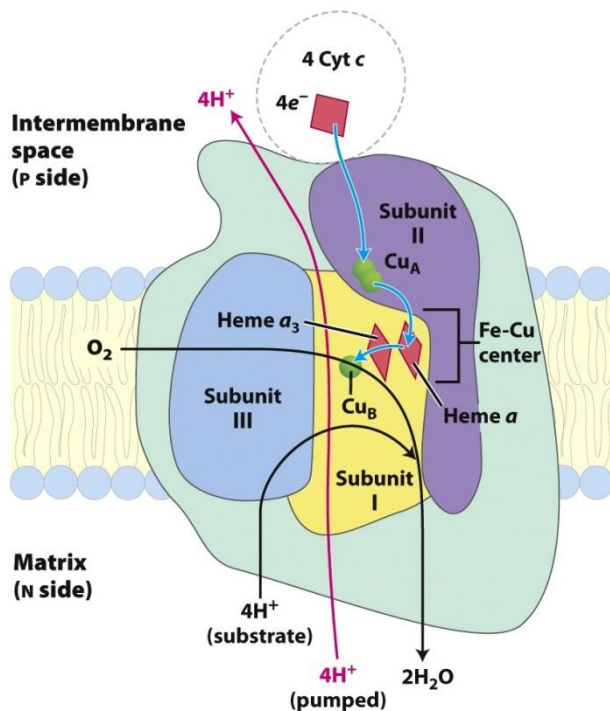


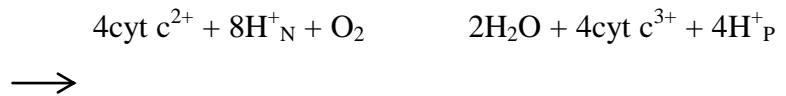
Figure 19-14
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Slika 7. Prijenos elektrona kroz kompleks IV. Podjedinice I, II i III su funkcionalno najvažnije. Pomoćne podjedinice su obojane zeleno. Dvije molekule reduciranog citokroma c prenose svoj elektron na binuklearni centar Cu_A . Elektroni putuju preko hema a do Fe-Cu binuklearnog centra. Kisik se veže za hem a_3 te se pomoću 2 elektrona reducira u O_2^{2-} (nije prikazano). Prijenosom još 2 elektrona peroksid se reducira u H_2O uz korištenje 4 protona iz matriksa te izbacivanje još 4 protona u međumembranski prostor. Preuzeto iz Lehninger Principles of Biochemistry, 5. izdanje.

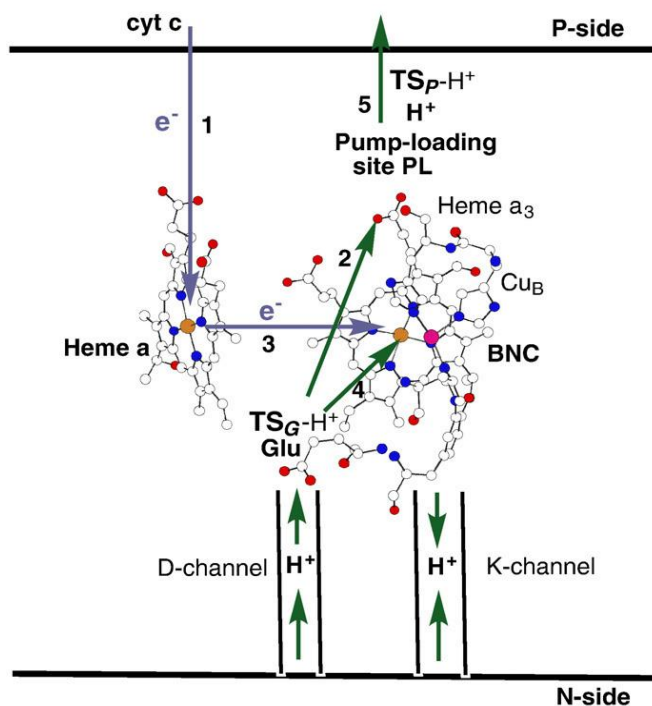
Podjedinica I je najveća i sadrži tri redoks aktivna mjesta: hem a, hem a_3 i Cu_B koordiniran s tri histidina. Hem a_3 i Cu_B čine binuklearni Fe-Cu centar u kojem se reducira kisik. Fe-Cu binuklearni centar je smješten duboko u hidrofobnom središtu pa je svako gibanje nabijenih čestica izuzetno nepovoljno ukoliko nije praćeno gibanjem čestica suprotnog naboja. Također, otkrilo se da je Tyr244 esencijalan za katalitičku aktivnost binuklearnog centra. Tyr244 je kovalentno vezan za histidine u interakciji s Cu_B te time održava pravilan prostorni raspored binuklearnog centra. Smatra se da on donira četvrti elektron za oksidaciju O_2 (3 elektrona doniraju metalni ioni binuklearnog centra). Podjedinica II sadrži binuklearni centar Cu_A (dva atoma Cu koordinirana Cys). Podjedinica III nema metalnih skupina, no preko nje kisik dolazi do aktivnog mjesta.

Redukcija kisika se događa u 4 koraka, a u svakom binuklearni centar uzima 1 elektron i 1 proton te se izbacuje 1 proton u međumembranski prostor (Slika 7.). Svi intermedijeri ostaju čvrsto vezani za kompleks dok

ne nastane voda kako bi se izbjeglo stvaranje reaktivnih kisikovih radikala. Transmembranski gradijent protona se povećava direktnim izbacivanjem protona iz matriksa ali i uzimanjem protona iz matriksa i korištenjem u redukciji kisika. Od 8 protona koji se uzmu iz matriksa, 4 protona se izbace u međumembranski prostor dok se ostatak iskoristi u redukciji kisika. Ukupna reakcije se može opisati jednadžbom:



Postoje dva kanala koja uzimaju i prenose protone iz matriksa (Blomberg i Siegbahn, 2009). Ako ciklus počne kad je enzim potpuno oksidiran, kanal K uzima 2 protona za redukciju kisika. Kanal D sudjeluje u sljedećim koracima, uzimajući 4 protona koja se izbacuju u međumembranski prostor. Kanal K grade Ser291, Lys354 (K), Thr351, hidroksilne skupine hema a_3 te Tyr244 dok kanal D grade Glu124 (D), Asn131 i Glu278.



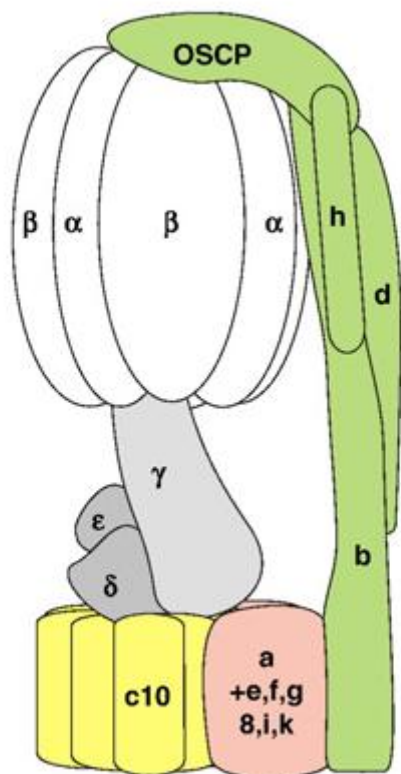
Slika 8. Prikaz prijenosa elektrona i protona kroz kompleks IV. Prijenos elektrona je označen ljubičastim strelicama dok je prijenos protona kroz kanale D i K označen zelenim strelicama. 1) Prijenosom 1 elektrona s citokroma c na hem a povećava se pK_a vrijednost PL mjesta u kojem se protoni privremeno spremaju tijekom prijenosa kroz membranu. 2) H^+ se uzima iz matriksa preko D kanala i prenosi do PL mjesta. 3) Elektron se prenosi od hema a do binuklearnog centra (BNC). 4) BNC uzima H^+ iz matriksa. 5) pK_a vrijednost PL mjesta se vrati na početnu te se H^+ izbaci u međumembranski prostor. Ovaj proces se ponavlja 4 puta s tim da se u 2 slučaja kanal K koristi za uzimanje protona za redukciju (razlog nepoznat). Prikazana su i prijelazna stanja koja sprječavaju pogrešno uzimanje i izbacivanje protona (TS_P i TS_G).

Kako bi se objasnio mehanizam koji sprječava da se protoni uzimaju iz međumembranskog prostora ili da se izbacuju u matriks predloženo je postojanje prijelaznih stanja – TS_P između P strane i PL_S te TS_G na kraju kanala D u blizini Glu278 (Blomberg i Siegbahn, 2010). TS_P mora spriječiti ulazak protona iz međumembranskog prostora ali istovremeno dopuštati izbacivanje protona. TS_G mora omogućiti ulazak protona iz matriksa ali i sprječavati njihovo vraćanje u matriks (Slika 8.).

3.6 Kompleks V

Kompleks V (ATP-sintaza) je veliki enzimski kompleks koji koristi energiju transmembranskog gradijenta protona za sintezu ATP-a. To je posljedni korak oksidativne fosforilacije (i fotofosforilacije) kojim se stvara većina ATP-a u stanici. ATP-sintaza je ATPaza F tipa smještena u unutarnjoj membrani mitohondrija. Sastoji se od F_1 dijela koji katalizira sintezu/hidrolizu ATP-a te F_0 dijela koji predstavlja protonsku poru kroz koju protoni pasivno prolaze iz međumembranskog prostora u matriks. Cijeli enzim se sastoji od 17 različitih podjedinica: α (3), β (3), γ (1), δ (1), ϵ (1), a (1), b (1), c (10), d (1), e (1), f (1), g (1), i (1), k (1), F6 (1), A6L (1) i OSCP (Wittig i Schägger, 2008). Pronađena su i dva nova proteina (MLQ i AGP) čija je uloga još nepoznata. F_1 se sastoji od α , β , γ , δ , ϵ i OSCP podjedinica dok se F_0 sastoji od a, b, c, d, e, f, g, h, F6 i A6L (Slika 9.).

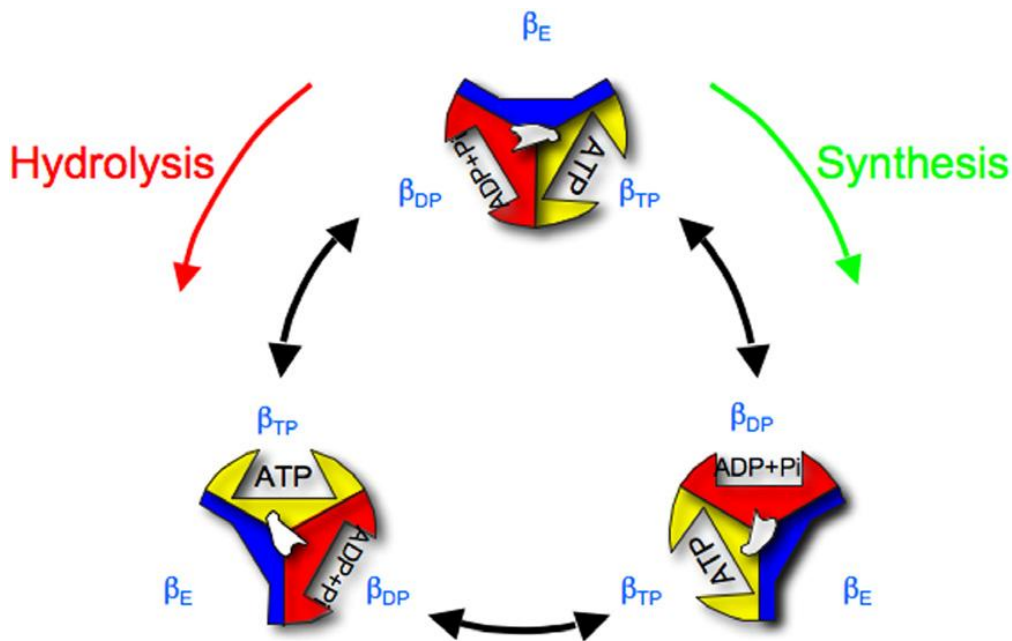
Enzim se može podijeliti na dva funkcionalna dijela - rotor i stator. Stator se sastoji od $\alpha_3\beta_3$ pseudoheksamera sferičnog oblika na koji se nastavlja centralni držak rotora. Podjedinice γ , δ , ϵ grade centralni držak koji je preko podjedinice γ vezan za jednu podjedinicu β preko duge zavojite uzvojnice te za cilindar rotora (δ , ϵ). Cilindar je građen od 10 podjedinica c koje sadrže mnogo transmembranskih zavojnica. Povezan je sa strukturom koju čine podjedinice a, e, f, g, i, k, A6L preko koje protoni dolaze do cilindra koji ih onda translocira. Katalitički $\alpha_3\beta_3$ pseudoheksamer je vezan za podjedinicu a preko perifernog drška kojeg čine b (2), d (1) i F6 (1). Pokazalo se da $\alpha_3\beta_3$, OSCP te F6 svojim interakcijama s perifernim drškom stabiliziraju rotor (Wittig i Schägger, 2008). Specifične interakcije između rotora i statora su važne za spregu transporta protona i katalize.



Slika 9. Shematski prikaz ATP-sintaze. Domena F1 sadrži katalitički pseudoheksamer $\alpha_3\beta_3$ (bijelo) te centralni držak (sivo). F₀ domena se sastoji od cilindra kojeg grade 10 podjedinica c (žuto), podjedinica a, 8, e, f, g, i, k (ružičasto) te perifernog drška (zeleno). Rotor se sastoji od cilindra i centralnog drška dok stator čine sve ostale podjedinice. Preuzeto i prilagođeno iz Wittig i Schagger, 2008.

ATP-sintaza ima posebno zanimljiv mehanizam katalize (Slika 10.). Katalitički centar sadrži 3 aktivna mjesta (β) koja izmjenjuju konformacije srazličitom afinitetom za ATP/ADP. β_{ATP} konformacija ima visok afinitet za ATP, β_{ADP} za ADP i P_i te β_E ima nizak afinitet za ATP te ga otpušta (E – empty). Prolazak protona kroz poru uzrokuje rotaciju cilindra. Protoni idu preko podjedinice a u interakciji s c do esencijalne karboksilne skupine (najčešće Glu) blizu središta dvosloja u podjedinici c. Nakon protonacije podjedinica c se rotira u smjeru kazaljke na satu dok ne dođe do podjedinice a nakon čega slijedi deprotonacija i otpuštanje protona u matriks. Važnu ulogu u deprotonaciji ima i očuvani Arg210 u podjedinici a (Nakamoto i sur., 2008). Budući da je za translokaciju protona važna interakcija između podjedinice a i cilindra (c) potrebno je dobiti prikaz cijele strukture u visokoj rezoluciji kako bi se odredio molekularni mehanizam translokacije. Svakom rotacijomod 120° , podjedinica γ drugom regijom stupa u interakciju s β podjedinicama i potiče njihovu promjenu konformacije. Arg376

u α podjedinici detektira vezanje P_i u β_{ADP} konformaciji te omogućuje rotaciju γ podjedinice i promjenu konformacije u β_{ATP} i tako stvara mjesto za sintezu ATP-a. Svakom rotacijom od 360° nastanu 3 molekule ATP. Ako se rotacija događa u smjeru kazaljke na satu dolazi do stvaranja ATP-a, no ako se rotacija događa u suprotnom smjeru dolazi do hidrolize ATP-a (Nakamoto i sur., 2008).



Slika 10. Rotacijski mehanizam katalize ATP-sintaze. Shema prikazuje promjenu konformacije podjedinica β uslijed rotacije podjedinice γ . Kad se rotacija odvija u smjeru kazaljke na satu ATP se sintetizira. β_{DP} konformacija veže ADP i P_i te prelaskom u β_{TP} sintetizira se molekula ATP koja je čvrsto vezana za aktivno mjesto. Sljedeća rotacija od 120° uzrokuje prelazak u β_E konformaciju koja otpušta ATP. Rotacija u suprotnom smjeru uzrokuje hidrolizu ATP-a. Preuzeto iz Nakamoto i sur., 2008.

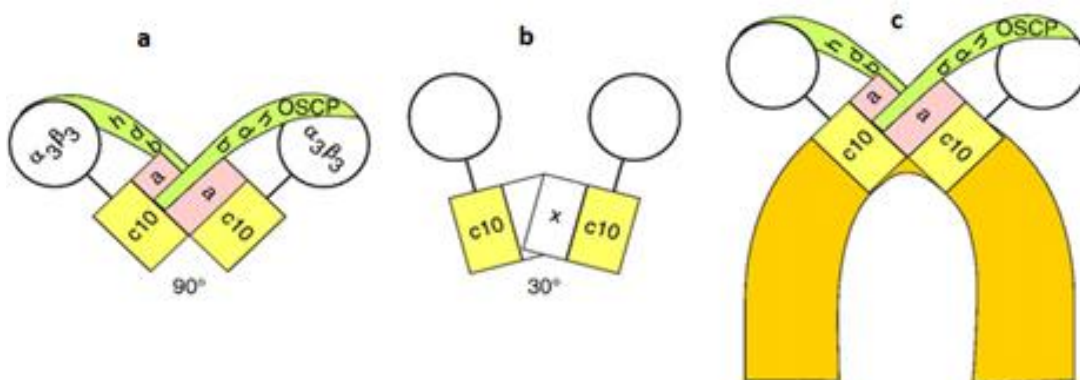
U kasnijim istraživanjima pokazalo se da tijekom jednog okreta od 120° postoji zastoj između 80° i 20° čija duljina ovisi o količini ATP-a pa je zaključeno da se tada događa vezanje ATP-a (Nakamoto i sur., 2008). Također, pokazalo se da najveći dio katalitičke energije dolazi od energije vezanja koja se oslobađa prilikom promjena afiniteta.

ATP-sintaza se eksperimentalno izolira u obliku funkcionalnih monomera, no koristeći blaže metode detekcijedobiveni su i dimeri za koje se smatra da mogu tvoriti oligomere u fiziološkim uvjetima. Elektronskom mikroskopijom su primjećeni zavojiti dvostruki redovi F_1 glava za koje se smatra da predstavljaju dimere ATP-sintaze (Wittig i Schägger, 2008).

Pretpostavlja se da postoji veza između morfologije mitohondrija i dimerizacije/oligomerizacije budući da je primjećen nestanak kristi u uvjetima koji destabiliziraju dimere/oligomere. Podjedinice e i g su važne u interakcijama i stabilizaciji dimera i oligomera iako nisu esencijalne za njihovo formiranje u membrani. Motiv GXXXG u transmembranskoj domeni podjedinice e je važan za stabilnost i podjedinice g i dimera (Wittig i Schägger, 2008). Proteini perifernog drška (b, h) su također bitni u stabilizaciji. Ipak, smatra se da je podjedinica a najvažnija u interakcijama monomera (Slika 11a). Svi dokazi upućuju na to da interakcije monomera uključuju samo membranski F_o dio ili dijelove perifernog drška.

Postoje dvije vrste dimera: „pravi dimer“ s velikim kutom (70°-90°) između dva monomera (Slika 11a) te „pseudodimer“ s manjim (<40°) kutom (Slika 11b). Dimer-dimer interakcije su manje istražene, no mogući kandidati za njihovu stabilizaciju su podjedinice e, g, f, A6L. Smatra se da su i transporteri P_i te ADP/ATP također uključeni u stabilizaciju oligomera. Ti transporteri mogu biti asocirani s ATP-sintazom u superkomplekse (ATP sintasomi) što je potvrđeno brojnim eksperimentima.

Iako funkcije dimera i oligomera još nisu utvrđene, isti imaju nekoliko bitnih prednosti: (i) zbog dinamičnosti interakcija rotora i statora povezivanje dva statora može stabilizirati holoenzim, (ii) budući da su monomeri asocirani pod određenim kutem to može dovesti do savijanja membrane i stvaranja krista (Slika 11c), (iii) veći broj kristi znače veću površinu za ugradnju enzima dišnog lanca (Wittig i Schägger, 2008).



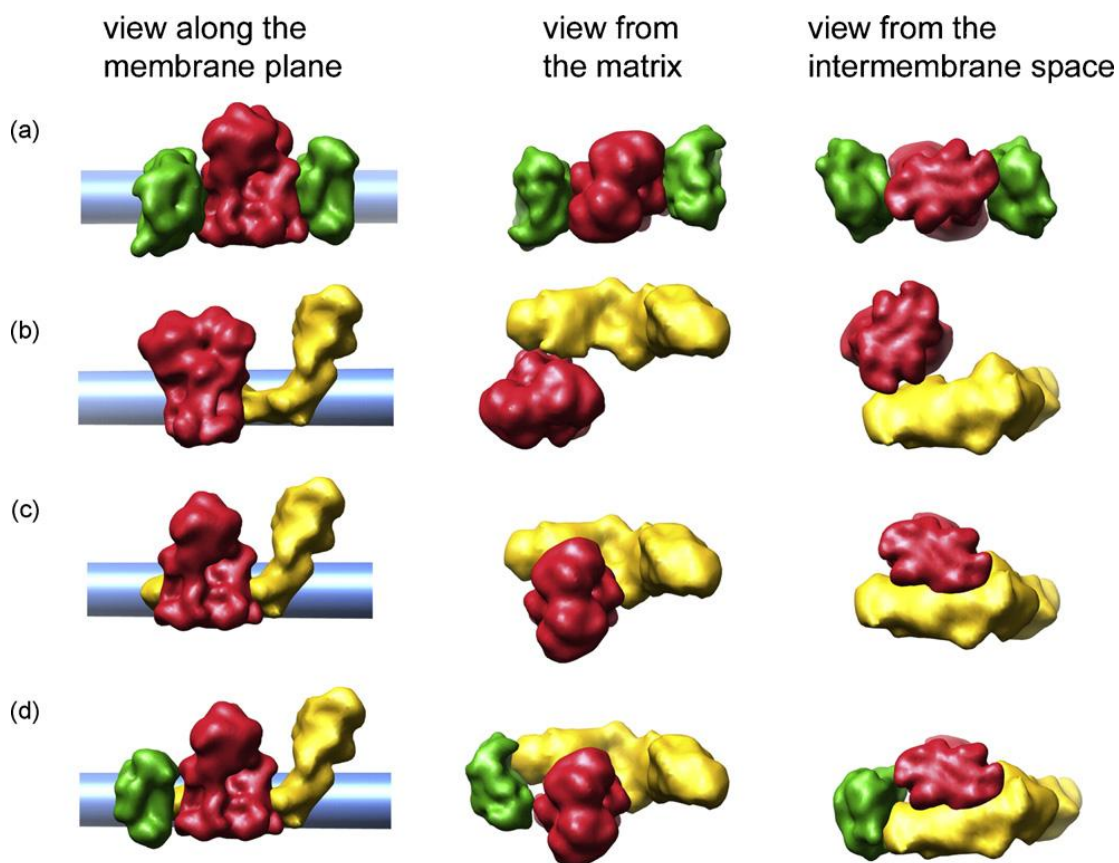
Slika 11. Model organizacije podjedinica u dimerima ATP-sintaze. a) Shematski prikaz pravog dimera u kojem kut između dva monomera iznosi 90°. Monomeri su u interakciji preko podjedinice a i stabilizirani podjedinicama e i g. b) Shematski prikaz pseudodimera u kojem kut između dva monomera iznosi 30°. Monomeri su u interakciji preko još nepoznatog proteina X. c) Dimer ATP-sintaze uzrokuje velika zakrivljenja membrane (žuto). Preuzeto i prilagođeno iz Wittig i Schägger, 2008.

4. SUPERKOMPLEKSI DIŠNOG LANCA

Häckenbrock i sur. su prvi predložili model slučajnih sudara prema kojem su respiratorni kompleksi nasumično raspoređeni u unutarnjoj membrani i povezani brzom difuzijom malih nosača elektrona (ubikvinon i citokrom c). Model je poduprt nizom eksperimenata i dugo je bio jedini prihvaćen, usprkos dokazima o postojanju agregacija respiratornih enzima. Takve agregacije su obično opisivane kao artefakti specifičnih eksperimentalnih uvjeta.

4.1 Otkriće respirasoma

Početakom 21. stoljeća Cruciat i Schägger su iznijeli konkretne dokaze o postojanju superkompleksa respiratornih enzima u mitohondrijima kvasaca i sisavaca dobivene metodom BN-PAGE (Blue Native gel elektroforeza). Otkriveni su superkompleksi III₂IV₁, III₂IV₂ te I₁III₂IV₁₋₂ (Slika 12.). Pokazalo se da 14-16% kompleksa I, 30% kompleksa II te 85% kompleksa IV nije vezano u superkomplekse, dok asocijacije kompleksa II s drugim kompleksima nisu otkrivene (Lenaz i Genova, 2009). Superkompleks I-III je dokazan i analizom metaboličke kontrole protoka koja predviđa da ako je metabolički put sastavljen od slobodnih odvojenih enzima, svaki enzim će različito doprinositi kontroli protoka u prisustvu specifičnog inhibitora te da će zbroj svih koeficijenata kontrole protoka (C_i) iznositi 1. Ukoliko metabolički put uključuje superkompleks enzima, inhibicija bilo kojeg od njih će rezultirati istom kontrolom protoka. Analiza je potvrdila postojanje superkompleksa budući da su specifične inhibicije svakog enzima imali isti učinak na protok kroz metabolički put (Lenaz i Genova, 2009).

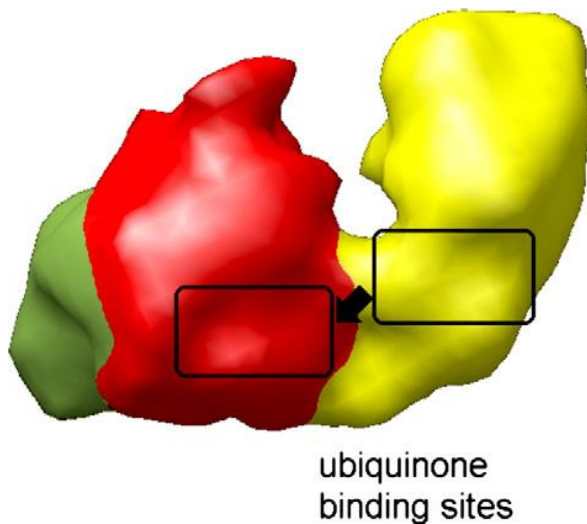


Slika 12. Modeli superkompleksa dišnog lanca. a) III₂IV₂ izoliran iz *S. Cerevisiae*. b) I₁III₂ iz *A. Thaliana*. c) I₁III₂ iz *B. Taurus*. d) I₁III₂IV₁ iz *B. Taurus*. Strukture dimera kompleksa I su prikazane žutom, kompleksa III crvenom, a kompleksa IV zelenom bojom. Membrana je prikazana plavom bojom. Preuzeto iz Lenaz i Genova, 2009.

Najočitija prednost respirasoma je brži prijenos supstrata bez difuzije intermedijera u medij što ubrzava protok elektrona. Trodimenzionalni modeli respirasoma su pokazali kako su vezna mjesta za ubikvinon i citokrom c pojedinog kompleksa okrenuta prema odgovarajućim mjestima susjednog kompleksa što podržava efikasniji protok elektrona zbog kraćih difuzijskih udaljenosti (Slika 13., Genova i sur., 2008). No, ova teorija se ne slaže s predloženim modelom slučajnih sudara budući da su Kröger i Klingenberg kinetičkim analizama dokazali postojanje slobodnog pokretnog ubikvinona koji lateralno difundira dvoslojem (Lenaz i Genova, 2009).

Usprkos općoj prihvaćenosti ovog modela, primjećene su i određene devijacije od ovakvog ponašanja ubikvinona. Primjećeno je da su kompleksi II i III povezani drukčijim mehanizmom nego kompleksi I i III što je objašnjeno kompartmentalizacijom dijela zalihe ubikvinona unutar superkompleksa I-III (kompleks II ne tvori superkomplekse). To

opovrgava koncept o homogenosti zalihe slobodnog ubikvinona. Zapravo, postoje tri zalihe ubikvinona: (i) zaliha koja se koristi pri respiraciji u normalnim uvjetima, (ii) zaliha koja služi kao rezerva pri promijenjenim uvjetima (mitohondrijski defekti), (iii) zaliha koja se ne mobilizira i ne sudjeluje u respiraciji koja ovisi o sukcinatu. Posljednja zaliha se nalazi u superkompleksu I-III. Sva dosadašnja saznanja upućuju na to da su slobodni i vezani ubikvinon u ravnoteži te da zaliha slobodnog ubikvinona usmjerava vezanje ubikvinona na granicu između kompleksa I i III čime se osigurava brži prijenos elektrona. Osim toga, slobodni ubikvinon je i važan antioksidans (jedan dio zalihe se održava u reduciranom stanju) te veže različite proteine koji raspoređuju prijenos elektrona i stvaranje transmembranskog gradijenta protona.



Slika13. Trodimenzionalni prikaz superkompleksa I₁III₂IV₁. Pojedinačni kompleksi su prikazani žutom (I), crvenom (III) te zelenom (IV) bojom. Vezna mjesta za ubikvinon su označena crnom bojom. Preuzeto iz Genova i sur., 2008.

Budući da nije dokazana prisutnost kompleksa II u superkompleksima očito je da se obrnuti prijenos elektrona sa sukcinata na NAD⁺ događa prema modelu slučajnih sudara. Kako bi se to pomirilo s činjenicom da se većina kompleksa I nalazi u superkompleksima (samo 14-16% je slobodno) predloženo je postojanje dvaju veznih mjesta za ubikvinon u kompleksu I (za direktni i obrnuti prijenos). Budući da se obrnuti prijenos elektrona događa pri visokom transmembranskom gradijentu protona, smatra se da je to signal koji uzrokuje raspad superkompleksa I-III što povećava dostupnost drugog veznog mjesta (Lenaz i Genova, 2009).

Citokrom c se također, nalazi slobodan u međumembranskom prostoru. Najveći dio prijenosa elektrona između kompleksa III i IV se događa prema modelu slučajnih sudara budući da se većina kompleksa IV nalazi u slobodnom obliku. Iako su uspješno izolirani superkompleksi koji sadrže kompleks IV, nisu pronađene vezane molekule citokroma c pa se pretpostavlja da je razlog agregacije strukturne, a ne funkcionalne prirode. Otkriveno je postojanje tri različite zalihe kompleksa IV s obzirom na tvorbu superkompleksa: (i) u sastavu I-III₂-IV_n prima elektrone samo s NADH, (ii) u sastavu III₂-IV prima elektrone samo s enzima koji sadrže flavoprotein (FADH₂), (iii) samostalni kompleks IV prima elektrone s oba nosača (Acin-Perez i Enriquez, 2014).

4.2 Uvjeti nastanka superkompleksa

Budući da su respiratorni kompleksi uronjeni u fosfolipidni dvosloj, jedan od glavnih čimbenika koji utječe na nastanak superkompleksa je sastav lipida koji ih okružuju. Svaki protein je okružen prstenom lipida koji se, ovisno o sastavu, mogu spojiti. Također, viskoznost matriksa, tubularne veze među kristama te interakcije unutarnje i vanjske membrane usporavaju difuziju proteina i potiču njihovo agregiranje. Pročišćeni respiratorni kompleksi se izoliraju u interakciji s kardiolipinom, fosfatidilkolinom, fosfatidiletanolaminom te fosfatidilinozitolom. Fosfolipidi imaju i ulogu u stvaranju lipofilnog okoliša što poboljšava interakcije između respiratornih kompleksa, ali i njihove interakcije s ubikvinonom (Lenaz i Genova, 2009).

Kardiolipin se, za razliku od ostalih fosfolipida, čvrsto veže za respiratorne komplekse te igra ključnu ulogu u stabilizaciji pojedinačnih kompleksa, ali i superkompleksa. Već spomenuti CL_i vezan u blizini Q_i mjestu kompleksa III je važan za interakciju između kompleksa III i IV. Pretpostavlja se da neutralizira nabijene aminokiseline (Lys) u blizini mjesta interakcije i time stabilizira superkompleks (Wenz i sur., 2009).

Nekoliko skupina je neovisno pokazalo kako fosforilacija kompleksa I mijenja njegovu aktivnost i kapacitet za stvaranje kisikovih radikala. Ta pojava je interpretirana kao rezultat stabiliziranja superkompleksa I-III budući da je otkriveno da se fosforilira Tyr304 u podjedinici I. Ta aminokiselina se nalazi na mjestu interakcije s drugim kompleksima pa se smatra da fosforilacija te aminokiseline povećava stabilnost (Lenaz i Genova, 2009).

4.3 Funkcije superkompleksa

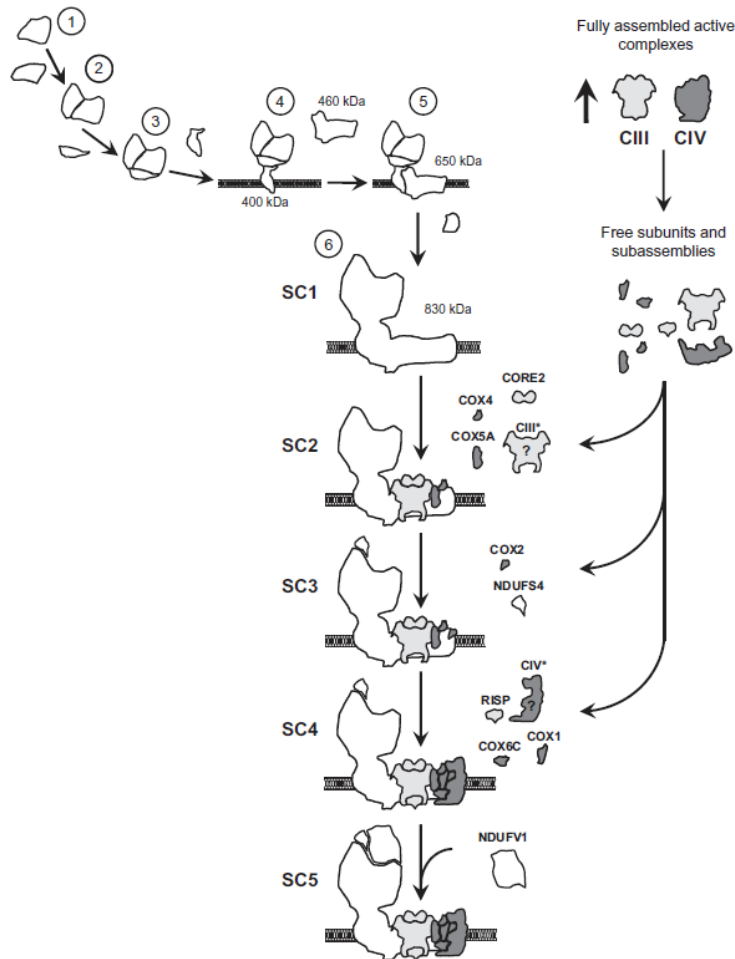
Indirektni dokazi sugeriraju da superkompleksi smanjuju nastanak reaktivnih kisikovih radikala tijekom respiracije. Smatra se da povezivanje pojedinačnih kompleksa sprječava reakcije određenih prostetičkih skupina s kisikom. Primjerice, kompleks I sadrži dva potencijalna mjesta za redukciju kisika (FMN i Fe-S centar N2) koja su, promjenom konformacije kompleksa kad je u interakciji s drugim kompleksima, skrivena unutar strukture i tek disocijacijom kompleksa I postaju izloženi kisiku (Lenaz i Genova, 2009). Budući da je dokazano da visok transmembranski potencijal uzrokuje povećani nastanak kisikovih radikala, ta se pojava objašnjava destabilizacijom i raspadanjem superkompleksa.

Također, stvaranje respirasoma je esencijalno za sastavljanje i stabilnost kompleksa I te su potrebne kritične količine kompleksa III i IV kako bi se stvorili superkompleksi, a time i kompleks I (Genova i sur., 2008). Mjesno-specifična mutageneza gena za pojedine komplekse pokazala kako je stvaranje superkompleksa nužan korak za odvijanje staničnog disanja. Dakle, raspad superkompleksa u uvjetima povišene razine kisikovih radikala zbog različitih mitohondrijskih defekatasmanjuje efikasnost prijenosa elektrona, ali i uzrokuje raspad kompleksa I što dodatno povećava oksidativni stres i inhibira oksidativnu fosforilaciju. Stanice stoga pojačano koriste glikolizu za dobivanje energije. Ovi nalazi su zanimljivi, budući da imaju implikacije u nastanku i proliferaciji tumora i neurodegenerativnih bolesti.

4.4 Sastavljanje superkompleksa

Superkompleksi mogu nastati interakcijom pojedinačnih sastavljenih respiratornih enzima ali i koordiniranim povezivanjem slobodnih podjedinica i djelomično sastavljenih kompleksa. Moreno-Lastres i sur. (2012) su predložili model sastavljanja superkompleksa I-III-IV_n koji uključuje koordinirano i uzastopno povezivanje specifičnih kombinacija djelomično sastavljenih respiratornih kompleksa i slobodnih podjedinica. Prvi korak je sastavljanje pojedinačnih kompleksa III i IV. Kad njihova količina dosegne kritičnu razinu dolazi do akumulacije slobodnih podjedinica i intermedijera ova dva kompleksa. Paralelno se odvija i sastavljanje kompleksa I te nastaje intermedijer od 830 kDa koji nema katalitičku aktivnost jer mu nedostaju određeni Fe-S centri. Zaključeno je da taj intermedijer (SC1) predstavlja prvi intermedijer u sastavljanju superkompleksa budući da ostaje u stabilnom kompetentnom stanju za povezivanje s ostalim podjedinicama i intermedijerima. SC1 je središnja struktura potrebna za stvaranje respirasoma koji onda omogućava potpuno

sastavljanje i aktivaciju kompleksa I (Slika 14.). Predloženo je i postojanje barem dva regulatorna koraka: sastavljanje pojedinačnih kompleksa III i IV te povezivanje slobodnih podjedinica kompleksa III i IV s intermedijerom SC1 kompleksa I.



Slika 14. Model sastavljanja superkompleksa. U prvom koraku se sastavljaju pojedinačni kompleksi III i IV dok njihova količina ne dosegne kritičnu razinu. To potiče akumulaciju slobodnih podjedinica ova dva kompleksa. Istovremeno se odvija i sastavljanje kompleksa I (1-6) te nastaje intermedijer od 830 kDa koji predstavlja i prvi intermedijer sastavljanja superkompleksa (SC2). Intermedijer je stabilan i veže podjedinice CORE2 (kompleks III) te COX4 i COX5A (kompleks IV) te nastaje SC2. SC3 nastaje inkorporacijom NDUF54 (kompleks I) i COX2. Vezanjem katalitičkih podjedinica RISP (III) i COX1 (IV) te strukturne podjedinice COX6C (IV) nastaje intermedijer SC4. Posljednji korak uključuje vezanje katalitičkog modula kompleksa I prije aktivacije respirasoma (SC5).

Ovaj model objašnjava i pojavu da mutacije u genu za jedan respiratorni enzim dovode do deficijencija aktivnosti i drugih enzima. Moguće su i uloge šaperona u sastavljanju

superkompleksa te je identificiran protein (NDUFAF2) koji veže intermedijer SC1 i olakšava inserciju katalitičkog centra (N modul).

4.5 Plastičnost superkompleksa

Nakon otkrića respiratornih kompleksa smatralo se da oni moraju biti gusto pakirani kako bi se povećala efikasnost prijenosa elektrona. Daljnja istraživanja kinetike reakcija su opovrgnula model krutog stanja te je predložen model slučajnih sudara koji je dugo bio jedini prihvaćen.

Model plastičnosti superkompleksa dozvoljava postojanje i slobodnih kompleksa i superkompleksa te je kompatibilan s oba modela (Acin-Perez i Enriquez, 2013). Model predlaže moguću strukturnu ulogu superkompleksa te ulogu zalihe inaktivnih enzima koji se aktiviraju po potrebi. Ovaj model podržava i primjećena dinamička ravnoteža između supekompleksa i pojedinačnih kompleksa na koju utječe protonski gradijent. Dinamičnost stvaranja superkompleksa omogućuje prilagodbu različitim fiziološkim uvjetima te prilagođavanju na različite izvore ugljika. Primjerice, u uvjetima gladovanja stanica preferencijalno koristi oksidaciju masnih kiselina, a ne glukozu, za odvijanje oksidativne fosforilacije te je u skladu s tim primjećeno povećanje količine slobodnog kompleksa I. Budući da je najveći dio kompleksa I u interakciji s kompleksom III (I-III₂), količina slobodnog kompleksa III će se povećati što olakšava prijenos elektrona s FADH₂(ETF dehidrogenaza).

5. ZAKLJUČAK

Proučavanje mitohondrijskih procesa uključenih u proizvodnju energije je izuzetno važno, ne samo zbog mogućih implikacija u brojnim bolestima već i za samo razumijevanje života. Enzimski kompleksi koji čine te procese su strukturno jako složeni te postoji još mnogo nepoznanica. Oni predstavljaju glavna mjesta nastanka reaktivnih kisikovih radikala za koje se smatra da su uzrok starenja. Iako se otkrilo da kisikovi radikali mogu imati i pozitivne signalne uloge, porast njihove koncentracije uzrokuje mutacije u mitohondrijskoj DNA koja sadrži gene za brojne podjedinice respiratornih enzima. Nakupljanje mutacija uzrokuje smanjenje kapaciteta za proizvodnju energije što dovodi do raznih neurodegenerativnih bolesti i nastanka tumora. Istraživanja tih procesa će rasvijetliti brojne nepoznanice o mehanizmima katalize respiratornih kompleksa te pridonijeti boljem razumijevanju uloge mitohondrija u stanicima.

Otkriće

superkompleksa je pobudilo sumnje u teoriju o nasumičnom rasporedu respiratornih enzima u unutarnjoj membrani i pokazalo kako ti enzimi funkcioniraju u bliskim interakcijama. Iz tog razloga je nemoguće proučavati respiratorne enzime kao izdvojene jedinice čija svojstva ovise samo o njihovoj strukturi. Jedino proučavanjem cijelog sustava moguće je otkriti sva njihova svojstva i uloge budući da te interakcije imaju velik utjecaj na svojstva pojedinačnih enzima. To saznanje otvara i brojna pitanja koja još nisu odgovorena. Potrebno je otkriti mehanizme koji reguliraju nastanak superkompleksa te razviti metode za otkrivanje njihove količine *in vivo*. Nedovoljno je razjašnjen i stupanj interakcije različitih zaliha ubikvina što je važno za respiratornu funkciju superkompleksa koju je potrebno podrobnije istražiti. Model plastičnosti predviđa dinamičnu organizaciju respiratornih enzima i implicira novi regulatorni mehanizam kojim mitohondriji mogu kontrolirati fiziološke uvjete u stanicima. Proučavanje reorganizacije superkompleksa pod utjecajem različitih čimbenika i signala te posljedica te pojave može dovesti do razvitka novih metoda liječenja tumora i neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem.

6. LITERATURA

- Acin-Perez R, Enriquez J.A. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1837**:444–450
- Blomberg M.R.A, Siegbahn P.E.M. Quantum chemistry as a tool in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 2010;**1797**:129–142
- Crofts A.R, Lhee S, Crofts S.B, Cheng J, Rose S. Proton pumping in the bc1 complex: A new gating mechanism that prevents short circuit. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1757**:1019–1034
- Genova M.L, Baracca A, Biondi A, Casalena G, Faccioli M, Falasca A.I, Formiggini G, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity?. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1777**:740–746
- Kluckova K, Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Neuzil J. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1827**:552–564
- Lehninger Principles of Biochemistry *Book* (Jun 2008) by Albert Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, pp. 707-773.
- Lenaz G, Genova M.L 2009, Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: A dynamic super-assembly. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;**41**:1750–1772
- Moreno Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, Martín M.A, Arenas J, Barrientos A, et al. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly, *Cell Metab.* 2012;**15**:324–335
- Nakamoto R.K, Baylis Scanlon J.A, Al-Shawi M.K. The rotary mechanism of the ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2008; **476**:43–50

- Roy C, Lancaster D, Kröger A. Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1459**;422-431
- Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation Complexes I–V in bovine heartmitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 2001;**276**:37861–7.
- Wenz T, Hielscher R, Hellwig P, Schägger H, Richers S, Hunte C. Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc₁ complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1787**;609–616
- Wittig I, Schägger H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1777**;592–598
- Wojtovich A.P, Smith C.O, Haynes C.M, Nehrke K.W, Brookes P.S. Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mK_{ATP} channel. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1827**;598–611
- Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K, Mochizuki M. Structural studies on bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1817**;579–589
- Zickermann V, Kerscher S, Zwicker K, Tocilescu M.A, Radermacher M, Brandt U. Architecture of complex I and its implications for electron transfer and proton pumping. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1787**;574-583

7. SAŽETAK

Najveći dio energije u obliku ATP-a se proizvodi u mitohondrijima. Stanični procesi uključeni u proizvodnju i pretvaranje energije u iskoristiv oblik trebaju izuzetno složenu molekularnu mašineriju. Desetljeća istraživanja strukture i funkcije respiratornih enzima su omogućila brojne spoznaje o mehanizmu sprege prijenosa elektrona i protona, no i dalje postoji mnogo nepoznanica. Cilj ovog seminarskog rada je opisati proces oksidativne fosforilacije te dati pregled svih enzima koji sudjeluju u tom procesu. Uključena su i nova saznanja o strukturi, mehanizmu i ulogama pojedinih respiratornih enzima. Također, opisana su i nova istraživanja specifičnih interakcija respiratornih enzima. Istraživanja strukture, sastava, uvjeta i mehanizama nastanka superkompleksa ukazuju na njihovu važnost i ulogu u mitohondrijima. Superkompleksi imaju uloge u regulaciji respiratorne aktivnosti i proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala. Također, važni su i za pravilno sastavljanje kompleksa I te imaju utjecaj na morfologiju unutarnje membrane mitohondrija.

8. SUMMARY

Most of the energy produced in the form of ATP is produced in the mitochondria. Cellular processes involved in energy production and conversion to more useful forms require highly complex molecular machinery. Decades of research into the structure and function of respiratory complexes have given valuable insights on the mechanism of coupling electron transfer to the translocation of protons but there are still many unresolved questions. The aim of this review is to describe the process of oxidative phosphorylation and to outline all enzymes involved. New insights into the structure, mechanism and functions of individual complexes are included. Also new studies of specific interactions of respiratory complexes are described. All the research on the structure, composition, mechanisms and conditions of assembly of supercomplexes indicate their great importance in the function of mitochondria. Supercomplexes have major roles in the regulation of respiratory activity and generation of reactive oxygen species. Also they are important for the correct assembly of complex I and have a large impact on the morphology of the inner mitochondrial membrane.