

Hoofdstuk 4: Oxidatieve fosforylatie

4.1. Elektronentransport en ATP synthese: inleiding

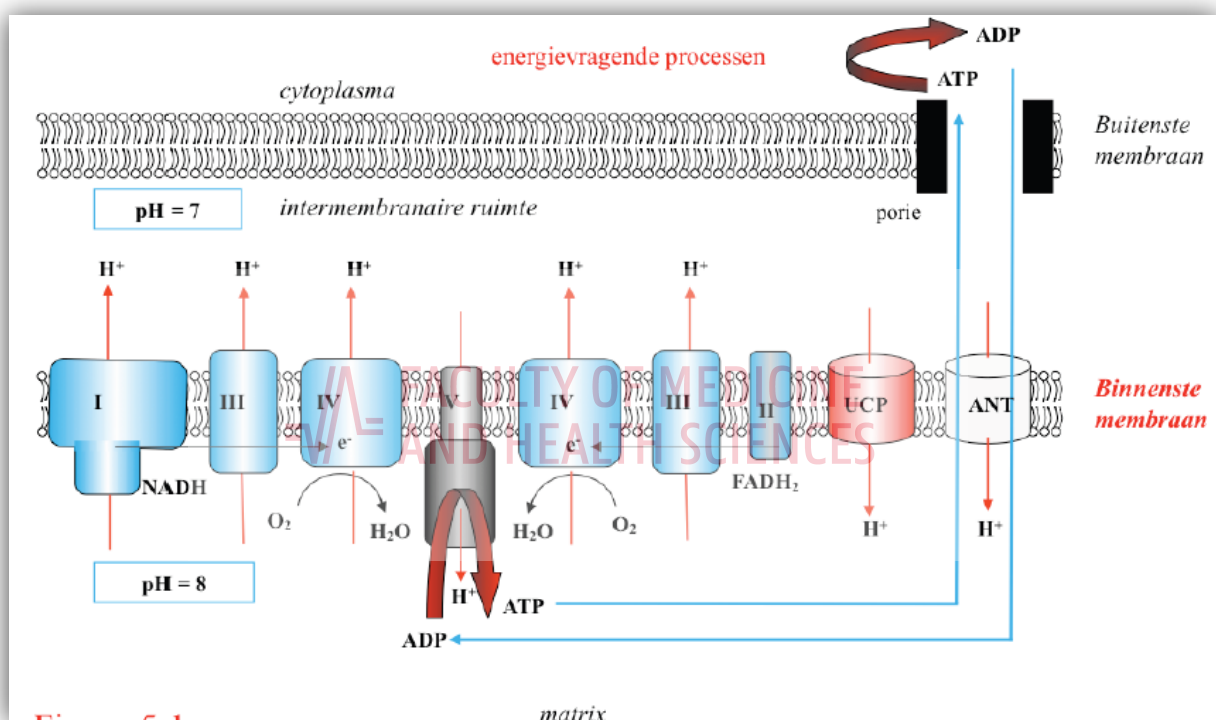
Oxidatieve fosforylatie is een mitochondriaal proces. Het staat in voor ongeveer 90% van alle ATP-productie in ons lichaam. Oxidatieve fosforylatie benut de stroomopwaarts gegenereerde NADH en FADH₂ om ATP te maken. Dat gebeurt via een reeks **redoxreacties** in eiwitcomplexen I tot en met IV. Deze eiwitcomplexen zijn gelegen in de binnenste mitochondriale membraan, die extreem impermeabel is, vooral voor protonen. Deze en een aantal exclusieve moleculen kunnen deze membraan passeren, alleen mits de hulp van de membraaneiwitten en shuttle-systemen.

Energierijke elektronen worden finaal afgestaan aan zuurstof, waarbij het zuurstof gereduceerd wordt tot water. Dit proces verklaart in grote mate waarom wij zuurstof nodig hebben om te overleven.

De energie die ontstaat bij deze laatste overdracht, wordt gebruikt om protonen uit de mitochondriale matrix te pompen naar de tussen-membraanruimte. Op die manier ontstaat een **protonengradiënt**. Dit kan vergeleken worden met het opladen van een batterij. Het is verbluffend dat aan weerszijden van een slechts 30nm dunne membraan een protonenconcentratie met een tienvoudig verschil kan bestaan. De pH in de matrix is één eenheid hoger dan in de intermembraanruimte. Deze gradiënt is de directe energiebron voor de mitochondriale ATP productie. Bovenstaand systeem werkt zeer efficiënt maar een controle hierop wordt verzorgd door de zogenaamde **ontkoppelingseiwitten (UCP's)** in de binnenste mitochondriale membraan. De UCP's verstoren de protonengradiënt en leiden het systeem af van ATP-vorming naar warmte-ontwikkeling. Vanwege de betrokkenheid bij energiemetabolisme is het logisch dat onderzoek naar de werking van de UCP's een rol speelt bij de zoektocht naar het ontstaan, de behandeling en de preventie van obesitas.

Na een serie van redoxreacties in een schakelsysteem verhuizen elektronen van sterke reductoren (NADH en FADH₂) naar een sterke oxidator (O₂). Zie Figuur 4.1. Na het instellen van de protonengradiënt wordt de opgeslagen energie uit deze 'batterij' gebruikt om via een roterend kanaaltje van complex V (mitochondriaal ATP synthase) protonen op een gecontroleerde manier te laten stromen van de tussen-membraanruimte naar de matrix. De vrijgekomen energie laat ook toe om **ATP te vormen uit ADP en P_i**. Het in de matrix gevormde ATP wordt door het **adeninenucleotidetranslocase (ANT)** enzyme gepompt naar de intermembraanruimte. Poriën in de buitenste membraan zorgen verder voor een

goede uitwisseling van ATP en ADP voor energievragende processen in de rest van de cel. Voor de formulering van de **'chemi-osmotische theorie'** en de ontdekking van de processen die gebaseerd zijn op een zogenaamde **'proton-motive force'** ontving Peter Mitchell in 1978 de nobelprijs voor chemie. De chemi-osmotische theorie is het concept dat een protonenconcentratie-gradiënt dienst doet als energie-reservoir voor het aansturen van ATP synthese. De 'proton-motive force' is de energie van de protonenconcentratie-gradiënt. Deze naam werd gekozen doordat het proces sterke parallellen vertoont met de 'electro-motive force' van een electro-chemische cel (waarbij een elektrische potentiaal tussen 2 elektroden wordt gecreëerd, en waar eveneens een redoxreactie aan te pas komt).



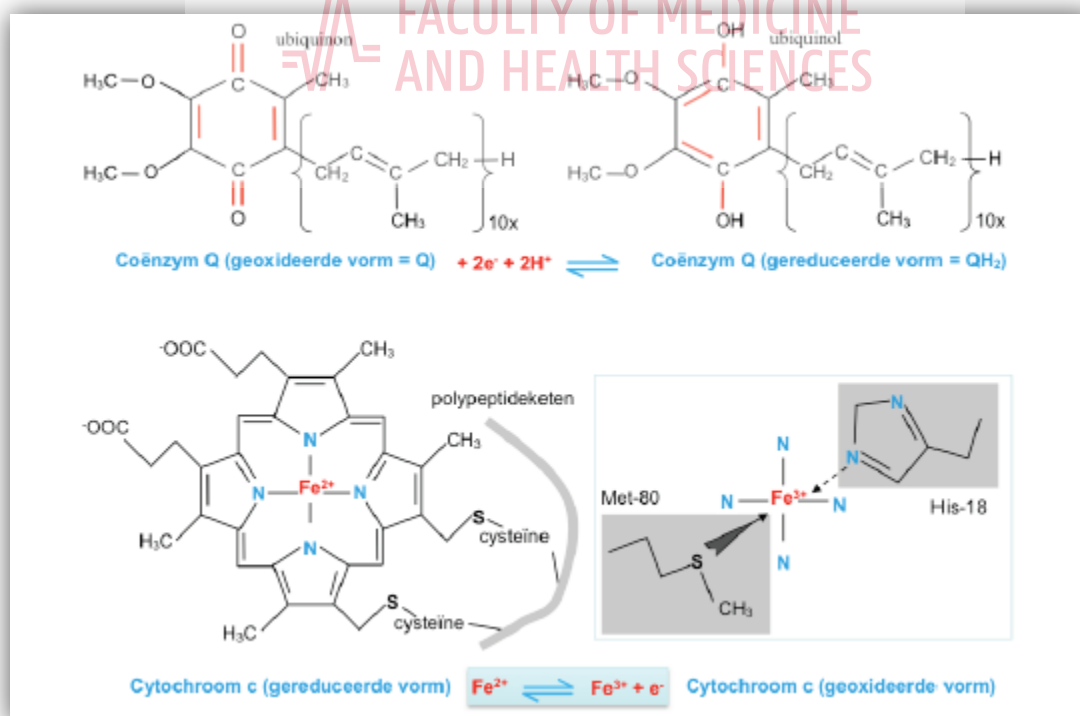
Figuur 4.1. Overzicht van de oxidatieve fosforylatie (Bron: Schuit F.C, Bohn-Stafleu-van Loghum, 2010, p143)

Naast de **aërobe** productie van ATP, wat het onderwerp is van het huidige hoofdstuk, recapituleren we even dat ATP ook kan gegenereerd worden onder **anaërobe** omstandigheden. Dat laatste proces kan op twee manieren: via fosforylatie op substraatniveau (oa. door fosfoglyceraatkinase en pyruvaatkinase in de glycolyse en door succinyl CoA synthetase in samenwerking met nucleoside difosfaat kinase in de Krebs cyclus) en via **fosfocreatine** (zie ook cursusdeel: Inleiding tot biochemische processen). Inzicht in de rol van fosfocreatine en het creatine kinase bij hartspeerwerking heeft een belangrijke rol gespeeld bij de ontwikkeling van een **diagnostische test** (op basis van

creatine kinase dat vrijgesteld wordt in bloed) voor de detectie van een **myocardiaal infarct** en ook van **spierziekten**. Fosfocreatine, dat een hoog-energetische fosfaatgroep draagt, is een belangrijke energiereserve bij noodtoestanden. Het kan bij gebrek aan zuurstof toch ATP produceren voor spiercontracties. Dit mechanisme kan van levensbelang zijn, maar is evenwel van bijzonder korte duur (enkele seconden).

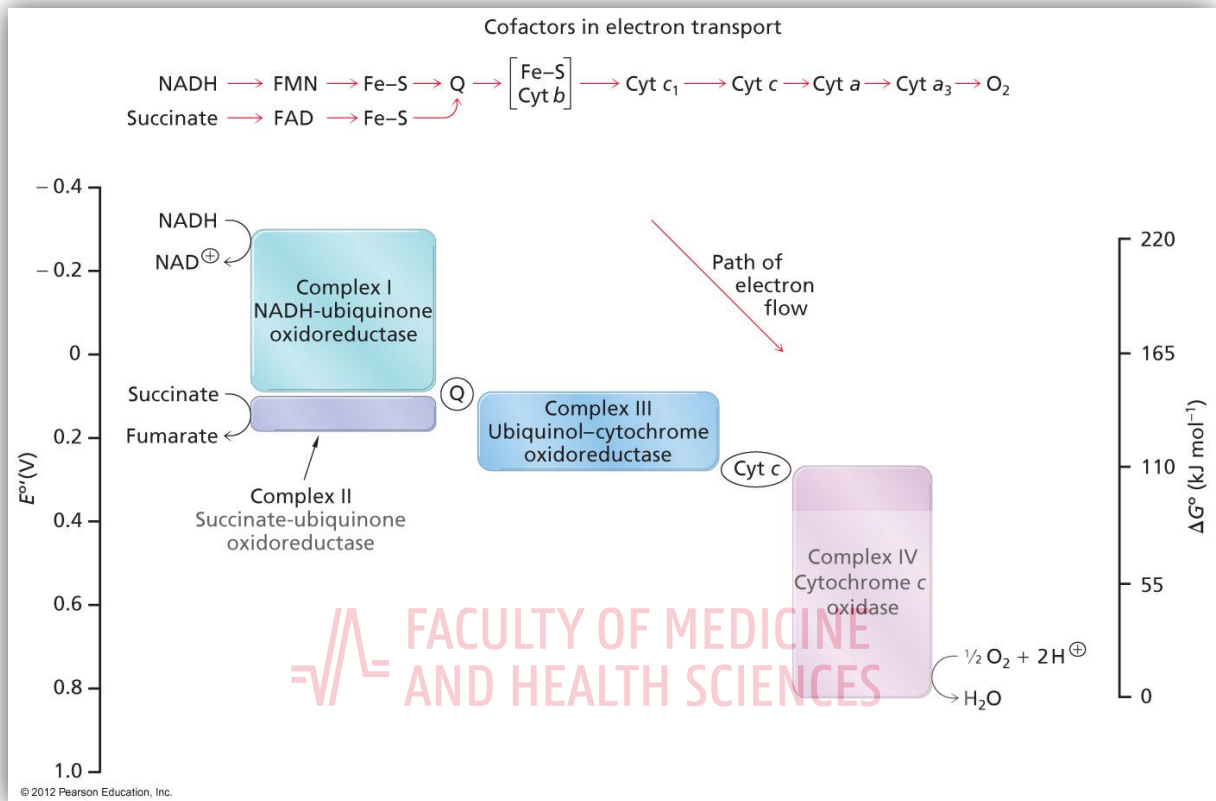
4.2. Hoeveel energie komt vrij bij het elektronentransport?

De complexen van de elektronentransportketen omvatten een combinatie van verschillende eiwiteenheden en cofactoren. In Figuur 4.3. wordt mooi weergegeven dat elk van de 4 complexen van de elektronentransportketen opeenvolgende oxidaties en reducties ondergaan. De verbinding tussen de eiwitcomplexen worden verzorgd door mobiele elektronendragers zoals **Ubiquinone (Q)** (Figuur 4.2.) en **Cyt C (Cytochroom C)** (Figuur 4.2.). De flavine co-enzymen **FAD (Flavine adenine dinucleotide)** en **FMN (Flavine mononucleotide)** zijn ook betrokken bij het elektronentransport. Nog andere redox-centra zijn ijzer-zwavel nanokristallen (Fe-S clusters) en koper-gecomplexeerde eiwitten.



Figuur 4.2. De mobiele elektronendragers Co-enzyme Q en Cytochroom C. Bron: Schuit F.C., *Metabolisme*, Ed. Bohn Stafleu van Loghum, 2010, p149)

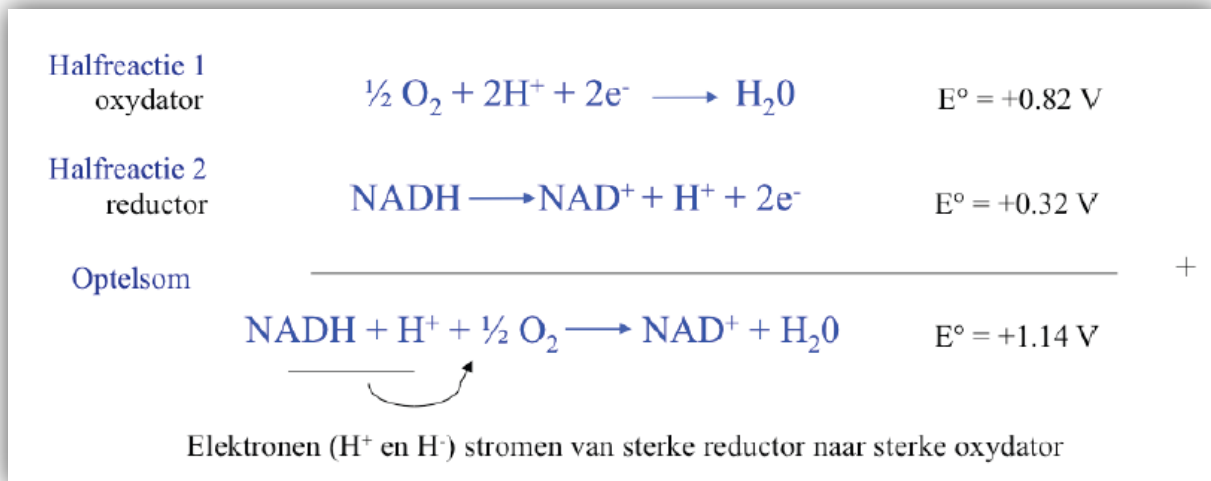
E° geeft de **standaard reductiepotentiaal** weer en wordt weergegeven in de linkse Y-as, terwijl de relatieve schaal van de standaard Gibbs vrije energie-verandering ($\Delta G^{\circ} = -nF \Delta E^{\circ}$) wordt weergegeven in de rechtse Y-as.



Figuur 4.3. Energie-vrijstellingsschema bij het elektronentransport. (bron: *Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 424, Fig. 14.6*)

De elektronen vloeien doorheen de componenten van de elektronentransportketen in de richting van een stijgende redoxpotentiaal. Zoals kan afgeleid worden uit de figuur wordt een substantiële hoeveelheid energie vrijgesteld tijdens het elektronentransport, nl. 220 kJ/mol.

We bekijken deze berekening in meer detail in de onderstaande figuur, Figuur 4.4. Hiervoor moeten we de totaal redoxreactie ontbinden in 2 deelreacties.



Figuur 4.4. De redoxreactie van het elektronentransport in deelreacties. Figuur naar Schuit F.C., met dank aan Prof. M. Buellens en collegae)

De optelsom geeft dus voor de totale redoxreactie een samengestelde $\Delta E_0'$ waarde van 1,14 volt. Let op, deze waarde wordt verkregen onder standaardomstandigheden *in vitro*, dus niet onder de condities in het mitochondrion. Toch blijft het interessant om verder te rekenen wat deze 1,14 V oplevert aan potentiële energie.

Via devolgende vergelijking,

FACULTY OF MEDICINE
AND HEALTH SCIENCES

$$\Delta G^\circ = -n F \Delta E_0' = -2 \times 96 \times 1,14 = -220 \text{ kJ/mol}$$

waarbij ΔG° de standaard vrije energieverandering is van de redoxreactie in kJ/mol, n het aantal elektronen is dat tijdens de reactie is 'verhuisd', en F de constante van Faraday is (96 kJ/V.mol), rekenen we uit dat bij deze sterk exergonische reactie heel wat meer energie vrijkomt dat bij de energierijkste stappen uit de voorgaande besproken cycli. Merk op dat deze waarde meer dan een 7-voud bedraagt van de energie die nodig is voor de ATP-synthese (die 30 kJ/mol bedroeg). De redoxpotentiaal van het elektronenkoppel dat van NADH naar O_2 verhuist, bevat dus meer dan voldoende energie voor de productie van meerdere ATP moleculen.

Uit Figuur 4.3. blijkt dat deze redoxreactie niet bestaat uit één grote sprong, maar uit vele kleine deelstapjes. Dit kan visueel voorgesteld worden als het verval van een rivier die niet langs één grote waterval gaat, maar langsheen meerdere kleine watervalletjes, elk met een kleiner verval. De totale potentiële energieverandering blijft echter dezelfde. Het verloop langsheen de keten gaat gepaard met een stapsgewijze stijging in de standaard reductiepotentiaal. Vanuit NADH zijn er 3 plaatsen met een duidelijke val in potentiële

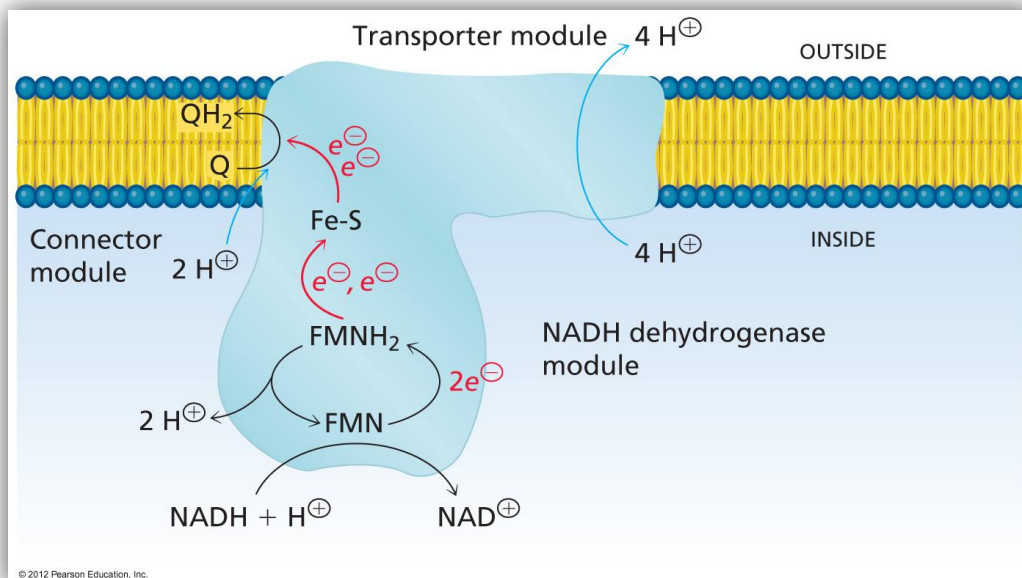
energie van de elektronen; namelijk deze die horen bij complex I, III en IV van de ademhalingsketen. We bespreken de functionaliteit en werking van deze eiwitcomplexen in de volgende paragraaf.

4.3. De eiwitcomplexen van de elektronentransportketen

4.3.1. Complex I

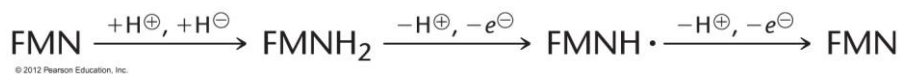
Complex I katalyseert de transfer van 2 elektronen van NADH naar **Q (Ubiquinone)**. Co-enzyme Q is vetoplosbaar en beweegt in de binnenste mitochondriale membraan tussen complexen I en III. Bemerkt in Figuur 4.2. de lange isopreenstaart van Q. De rol hiervan is de verankering van Q in de lipidendubbellaag. Het enzyme dat de katalyse verzorgt, is genaamd **NADH:ubiquinone oxidoreductase**. De structuur van dit enzyme-complex is tot op heden nog niet compleet opgelost. Eukaryoten hebben 14 homologe subeenheden en tot 32 additionele subeenheden, afhankelijk van de soort.

Elektronenmicroscopie leert dat de structuur van het complex de vorm van de letter L aanneemt. Zie figuur 4.5. De kleinere arm van de L is de component die **membraangebonden** is (en bestaat uit meerdere subeenheden). Deze bevat de **protontransportactiviteit**. De grotere arm van de L strekt tot de mitochondriale matrix en bevat de NADH dehydrogenase activiteit, tesamen met FMN. De module tussen beide armen bevat meerdere subeenheden met 8 à 9 Fe-S clusters.

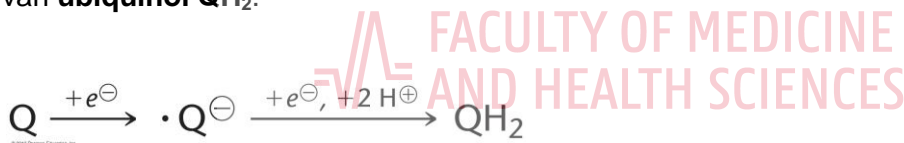


Figuur 4.5. Elektronentransfer en protonen 'flow' in Complex I. (bron: Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 427, Fig. 14.9)

NADH moleculen aan de **binnenzijde** van de membraan geven elektronen aan complex I. De elektronen worden per paar doorgegeven als een hydride ion (H^- , bestaande uit een proton en 2 elektronen). Het hydride ion en een proton worden getransfereerd naar FMN, waarbij FMNH_2 wordt gevormd. FMNH_2 wordt vervolgens terug geoxideerd. Dit gebeurt in 2 stappen. Deze tussenstop verloopt via de vorming van een intermediair intermediair FMNH radicaal. De 2 elektronen worden dus 1 voor 1 verder getransporteerd. Ze worden zo doorgegeven aan de volgende oxiderende Fe-S cluster.



De Flavine FMN cofactor zet dus een 2-elektronentransfer om naar een 1-elektrontransfer. De Fe-S clusters voorzien in een kanaal voor het verder elektronentransport en geven deze door aan de membraangebonden arm van het complex. Daar neemt Q de elektronen één voor één aan, eveneens via een semiquinone anion intermediair ($\cdot\text{Q}^-$), tot de finale vorming van **ubiquinol QH_2** .



Q en QH_2 zijn vetoplosbare cofactoren. De hele elektronenoverdrachtketen is zo complex omdat ze moet toelaten dat de elektronen van een polaire, waterige, omgeving over kunnen naar een hydrofobe omgeving binnenin de membraan.

Terwijl de elektronen bewegen doorheen complex I, worden 2 protonen (één van het hydride ion van NADH en één van binnenin) getransfereerd van FMN naar FMNH_2 . Deze 2 protonen worden vervolgens 'geconsumeerd' om Q te reduceren tot QH_2 . Samengevat worden 2 protonen eigenlijk van binnenin naar QH_2 getransporteerd. Deze protonen worden echter niet vrijgesteld aan de buitenkant in de complex I reactieweg. QH_2 wordt immers terug geoxideerd door complex III (zie verder), en dan pas gaan de protonen naar buiten. Merk op in Figuur 4.5. (rechts) dat door complex I maar liefst 4 (andere) protonen direct getransloceerd worden doorheen de membraan, voor elk elektronenpaar dat passeert van NADH naar QH_2 . Deze beweging wordt vermoedelijk verzorgd door een zogenaamde **H^+/Na^+ antiporter** gelegen in de membraangebonden module van de L. Het mechanisme hiervan is nog steeds onopgehelderd. Onderzoekers vermoeden dat het gekoppeld is aan

conformationele veranderingen in de structuur van complex I die plaatsgrijpen wanneer elektronen van de NADH dehydrogenase kant naar de Q bindingsplaats verhuizen.

4.3.2. Complex II

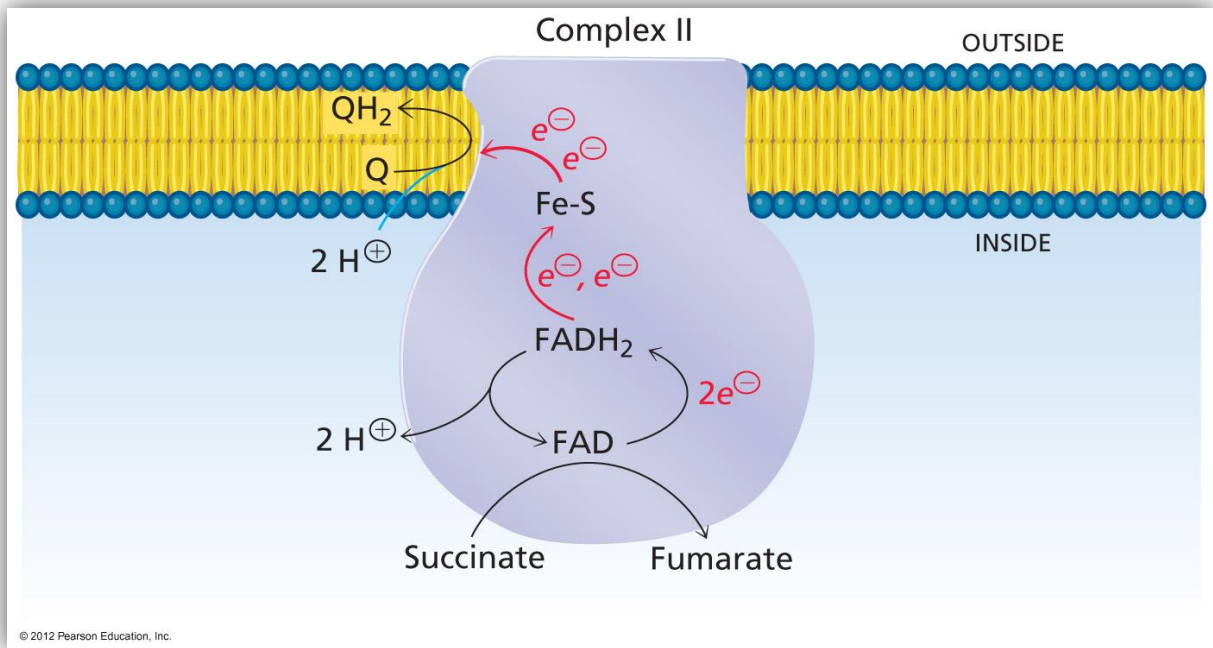
Complex II is een **succinaat:ubiquinone oxidoreductase**, ook genaamd het succinaat dehydrogenase complex (Figuur 4.6). De naam zal je bekend voorkomen, want dit enzyme is ook betrokken bij de citroenzuurcyclus. **Complex II accepteert elektronen van succinaat en katalyseert eveneens de reductie, finaal, van Q naar QH₂**. Hierbij gaan de elektronen wel eerst van FAD naar FADH₂ zoals in Figuur 4.6.

Complex II bestaat uit 3 identieke multisubeenheid enzymen. De vorm van complex II doet denken aan een champignon met het hoedje gericht naar de binnenkant van het membraancompartiment (zie figuur 4.6). Elk van de 3 succinaat dehydrogenase enzymen heeft 2 subeenheden die het hoedje vormen en 1 subeenheid (of 2 afhankelijk van de soort) dat de steel vormt die in de membraan verankerd zit.

De reactie waarbij twee elektronen van succinaat naar FAD en vervolgens naar Q verhuizen begint opnieuw met de reductie van FAD door een hydride ion. Hiernavolgend zijn er opnieuw 2 aparte elektronentransfers van het gereduceerde flavine naar een serie van Fe-S clusters.

Door de reacties gekatalyseerd door complex II wordt weinig energie vrijgesteld. **Dit complex draagt dan ook niet bij aan de protonenconcentratiegradiënt doorheen de membraan. De rol is eerder om extra elektronen te voorzien vanuit de oxidatie van succinaat, halverwege de elektronentransportketen.** Het komt er dus op neer dat ook hier Q finaal elektronen kan accepteren van complex I of complex II, om die dan te schenken aan complex III. Er zijn nog andere reacties die elektronen kunnen doneren aan Q. Een voorbeeld hiervan is de reactie gekatalyseerd door het **GPDH complex** (glycerol-3-fosfaat dehydrogenase)¹. Zie verder in hoofdstuk 9: GPDH katalyseert omzetting van DHAP (dihydroxyacetonfosfaat) naar glycerol-3-fosfaat, en is een belangrijke link tussen suikermetabolisme en vetmetabolisme.

¹ Let op! Dit enzym is verschillend van glyceraat-3-P dehydrogenase dat actief was in de glycolyse (Hoofdstuk 2). Verwar deze niet.



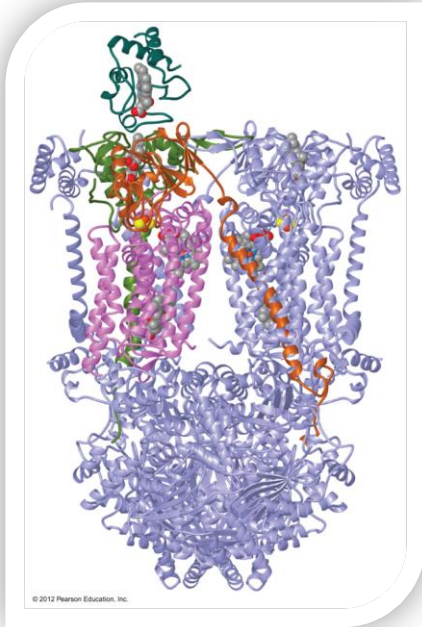
Figuur 4.6. Elektronentransport in complex II. (bron: Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 427, Fig. 14.9)

4.3.3. Complex III

Complex III is **ubiquinol:cytochroom c oxidoreductase** of nog, het cytochroom *bc₁* complex (Figuur 4.8). Dit enzyme katalyseert de oxidatie van ubiquinol (QH₂) moleculen in de membraan, en de reductie van een mobiel water-oplosbaar cytochroom c molecuul aan de buitenzijde van de membraan. Bekijk even terug Figuur 4.2. Cyt c is een eiwit waarvan de actieve haemgroep covalent verbonden is tussen twee Cys zijketens. Temidden van de haemgroep zit een ijzerion; dat ijzerion kan een redoxverandering ondergaan van Fe²⁺ naar Fe³⁺. Het ijzer wordt netjes op zijn plaats gehouden door een ruimtelijk evenwicht met Histidine-18 en Methionine-80 van de cyt c polypeptideketen.

Het elektronentransport doorheen complex III is gekoppeld aan H⁺ transport langsheen de membraan. Dat proces staat geboekstaafd als de **Q cyclus**.

De structuur van het cytochroom *bc₁* complex, zowel van bacteriën als eukaryoten, werd reeds opgelost door x-stralen kristallografie (Figuur 4.7.).



Figuur 4.7. De subeenheden van complex III. De 3 katalytische subeenheden van elk dimeer zijn cytochrom c1 (groen), cytochrom b (blauw) en het Rieske ijzer-zwavel eiwit (ISP, Iron-Sulfur Protein) (rood). Cytochrom c (paars) bindt aan de cytochrom c1 subeenheid (PDB 1PP9). (bron: Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 429, Fig. 14.13)

FACULTY OF MEDICINE
AND HEALTH SCIENCES

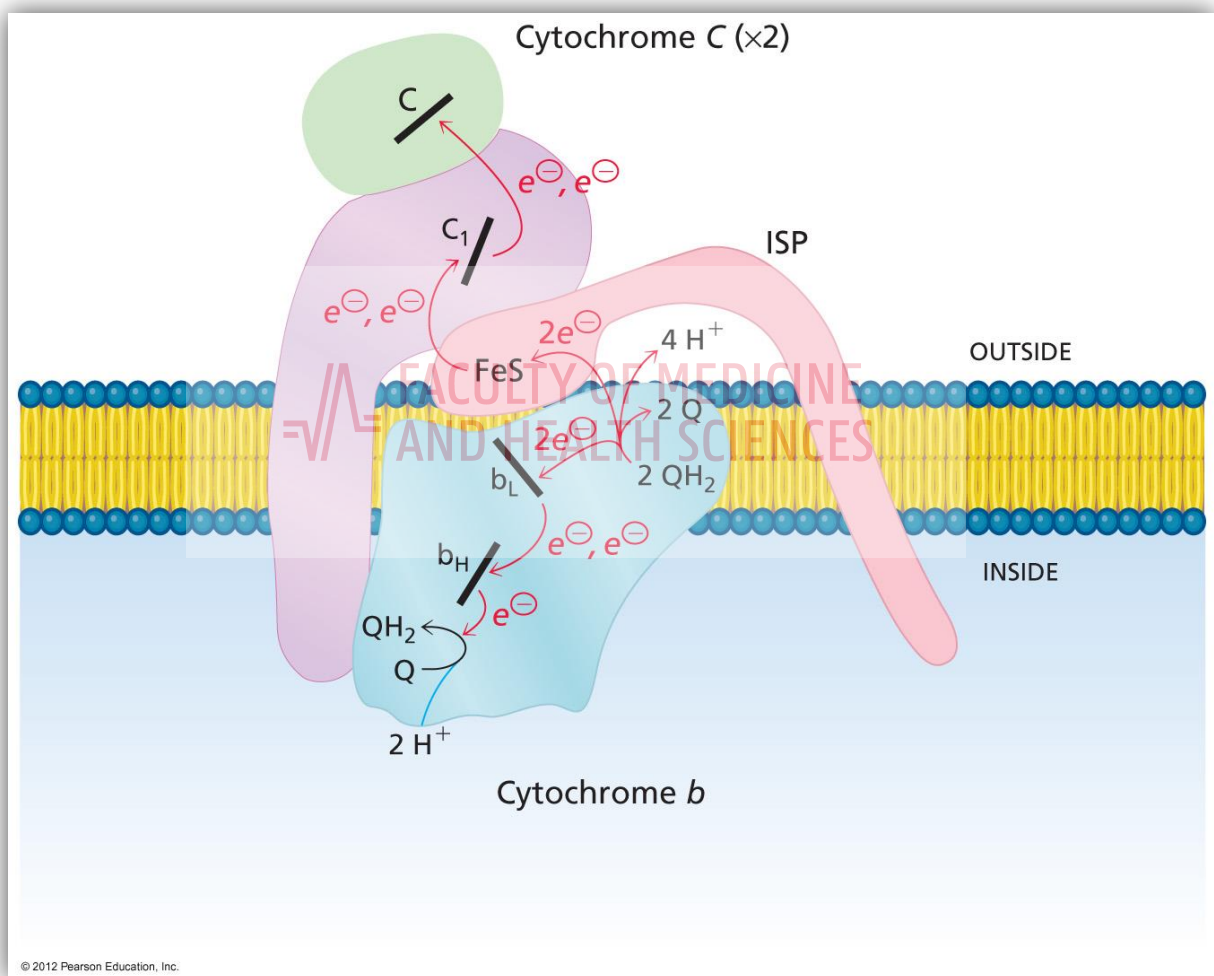
Het pad dat de elektronen volgen is weergegeven in Figuur 4.8. QH_2 (afkomstig van complex I of II) bindt aan de “ Q_0 zijde”² in de cytochrom b subeenheid. QH_2 wordt geoxideerd tot het semiquinone (niet weergegeven in de figuur) en telkens één enkel elektron wordt doorgegeven aan het ijzer-zwavel complex in de ISP subeenheid. Daaropvolgend verhuist het elektron naar de haemgroep in Cyt c1. Oplosbaar Cyt c ontvangt een elektron van de membraan-gebonden Cyt c1 subeenheid van complex III. Dus, de terminale elektronenacceptor in deze reeks is Cyt c.

De oxidatie van QH_2 nabij de Q_0 zijde is een tweestapsproces. Eén enkel elektron wordt getransfereerd bij elke stap. De weg die de elektronen volgen bij de tweede stap, nl. oxidatie van het semiquinone intermediair, is verschillend van de eerste stap. In de tweede stap worden elektronen immers sequentieel doorgegeven aan twee verschillende b-type haemgroepen. In deze keten wordt vervolgens een tweede elektron getransfereerd waarbij semiquinone gereduceerd wordt tot QH_2 . Dit deel is vrij complex. Het is van belang om zich

² Q_0 zijde: zijde waar QH_2 geoxideerd wordt tot Q; Q_1 zijde: zijde waar Q gereduceerd wordt tot QH_2

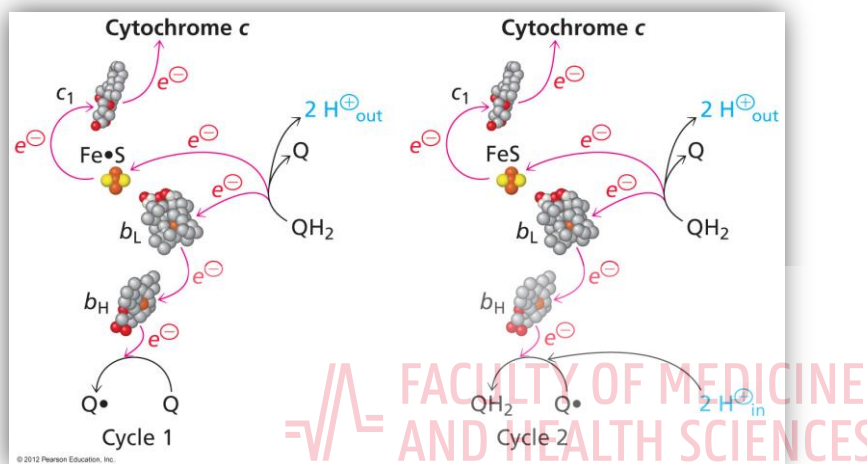
te realiseren dat het nettoresultaat is dat de oxidatie van twee moleculen QH_2 aan de Q_0 zijde twee moleculen van gereduceerd Cyt c produceert en één molecule QH_2 regeneert aan de Q_1 zijde.

Vier protonen worden geproduceerd tijdens de oxidatie van twee moleculen QH_2 aan de Q_0 zijde. Deze protonen worden losgelaten aan het buitenste membraancompartiment. Zij dragen zo bij tot de protonengradiënt die opgebouwd wordt tijdens het membraangeassocieerde electronentransport.



Figuur 4.8. De elektrontransfer en elektronenflow doorheen complex III. (bron: Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 429, Fig. 14.14). *Bemerk de fout: onderaan dient er nog een extra e^- toegevoegd, van b_H naar Q.*

Figuur 4.9. verduidelijkt de moeilijke materie van de Q cyclus nog iets beter. In principe bestaat de Q cyclus uit twee cycli. **Een molecule QH₂ wordt geoxideerd in cyclus 1, en een aparte molecule QH₂ wordt geoxideerd in cyclus 2.** Elke cyclus genereert een gereduceerd cytochroom c molecuul. De combinatie van cyclus 1 en cyclus 2 zorgt voor de reductie, in 2 stappen dus, van Q terug naar QH₂. Hierbij worden 4 protonen vrijgesteld aan de buitenzijde van de mitochondriale membraan. Samengevat levert de Q cyclus als nettoresultaat de transfer van 4 protonen op, voor de twee elektronen die één voor één getransfereerd worden van twee QH₂ naar twee Cyt c.

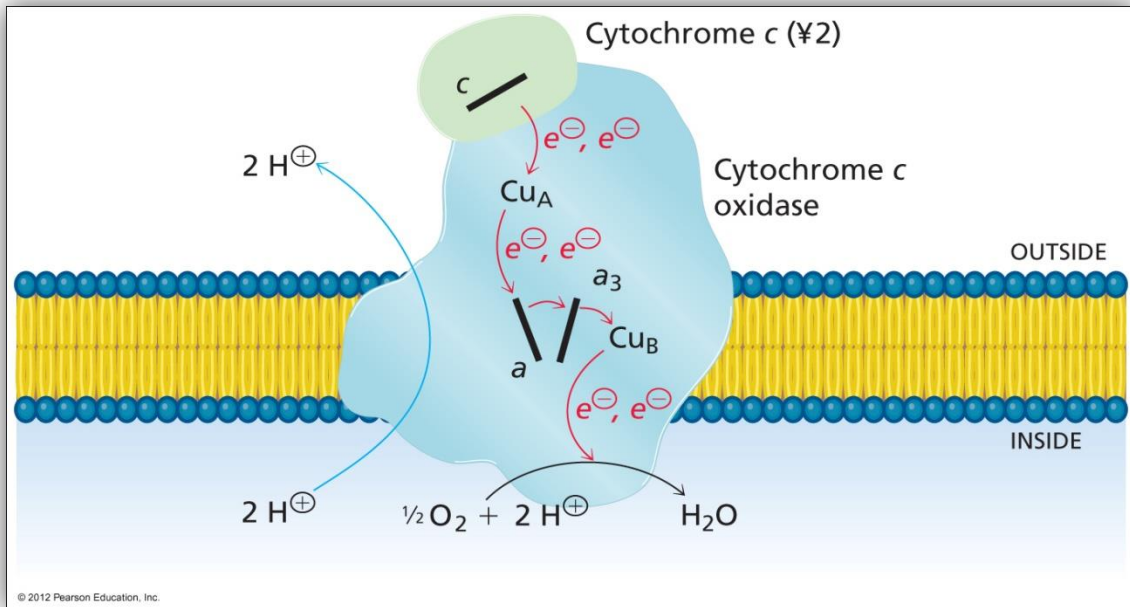


Figuur 4.9. Het sleutelconcept van de Q cyclus (bron: *Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 430, Fig. 14.16*)

4.3.4. Complex IV

Complex IV is een **cytochroom c oxidase** dat de oxidatie van het door complex III gereduceerde cytochroom c katalyseert (Figuur 4.10). In deze reactie worden 4 elektronen gebruikt om 1 molecule O₂ te reduceren tot 2 moleculen H₂O, en worden 4 protonen opgenomen langsheen de binnenzijde van de membraan.

Complex IV bevat 2 functionele eenheden van cytochroom c oxidase. De componenten van cytochroom c oxidase worden in alle eukaryoten gecodeerd door mitochondriale genen.



Figuur 4.10. De elektronentransfer en elektronenflow doorheen complex IV. (bron: *Principles in Biochemistry, 5th Ed., Moran et al., pagina 432, Fig. 14.19*)

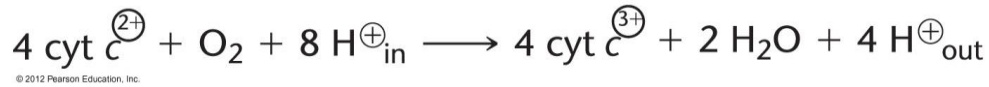
De volgorde van elektronentransfer is weergegeven in Figuur 4.10.

Cyt c bindt aan cyt c oxidase, dat de transfer van een elektron aan de **Cu_A zijde** (= een koper redox center, samengesteld uit 2 koperionen) verzorgt. Het paar koperionen werkt zoals de Fe-S cluster en kan slechts één elektron per keer doorgeven. De complete reductie van 1 molecuul O₂ vereist 4 elektronen. Bijgevolg moeten 4 cyt c moleculen binden en elk sequentieel een elektron transfereren aan het Cu_A center. Vervolgens worden de **elektronen doorgegeven aan een haem a prosthetische groep** van hetzelfde cyt c oxidase enzym. Van hieruit worden ze **getransfereerd naar het haem a₃-Cu_B bi-nucleair center** (zie de bijhorende slides voor een visuele weergave). Het verschil tussen a en a₃ is niet de structuur, die is identisch, maar wel de standaard reductiepotentiaal. Die wordt mede bepaald door de aminozuren uit de omgeving. Elektronen accumuleren in het bi-nucleair center als het haem ijzer omgezet wordt van Fe³⁺ naar Fe²⁺ en ook het koperion gereduceerd wordt van Cu²⁺ naar Cu⁺ (zie ook verder p. 78, Figuur 4.13). Het exacte moleculaire mechanisme voor de reductie van O₂ ter hoogte van het binucleaire center is nog steeds niet opgehelderd maar de eerste stap is in elk geval een snelle splitsing van moleculair O₂. Eén zuurstofatoom is gebonden aan het ijzeratoom van de a₃ haemgroep en het ander is gebonden aan het koperatoom. De daaropvolgende protonering en elektronentransfer leiden vervolgens tot de vrijstelling van een watermolecule aan de Cu_B koperzijde. Het volgende watermolecuul dat vrijgesteld wordt, komt dan van de ijzerzijde.

Dit is de reactie wanneer 1 molecuul O₂ in beschouwing wordt genomen:



De stoichiometrie van de complete reactie gekatalyseerd door complex IV is:



Complex IV draagt bij tot de protonengradiënt die ATP synthese aandrijft. Twee protonen transloceren voor elk elektronenpaar dat doorheen dit complex passeert. Herinner je dat zowel complex I als complex III vier protonen transfereren voor elk paar elektronen.

De slotsom is dat het membraan-geassocieerde transportsysteem (in theorie maximaal) 10 protonen pompt doorheen de membraan voor elke molecuul NADH dat geoxideerd wordt.

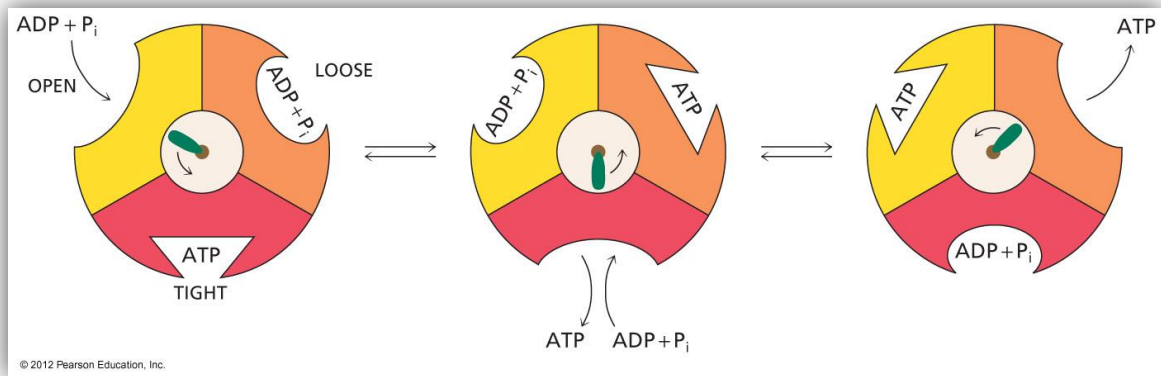
4.3.5. Complex V

Complex V is het **mitochondriale ATP synthase**. Dit enzym katalyseert de synthese van ATP, vanuit ADP en P_i.

De reactie wordt gedreven door de protonengradiënt. Deze zorgt voor een electrochemische potentiaal over de binnenste mitochondriale membraan, die benut wordt om in kleine deelpakketjes de endergonische synthese van ATP mogelijk te maken. Complex V bestaat uit twee grote onderdelen: 1) een protonenkanaal F₀, dat de binnenste mitochondriale membraan overspant (=transmembranair); 2) de eigenlijke plaats van ATP synthese, F₁ genaamd.

Structuurgewijs ziet het protonenkanaal eruit als een revolver. De protonen zijn dan als het ware de in de revolver passende kogels, die één voor één vanuit de tussenmembraanruimte worden opgenomen. De 'proton motive force' laat (via de γ-subeenheid) de revolver per 36° omwentelen, hetgeen de weg plaveit voor de verhuis van 1 proton van de tussenmembraan ruimte naar de matrix.

Figuur 4.11. stelt de weergave voor van dit mechanisme:



Figuur 4.11. De door binding veranderende structuur van ATP synthase.

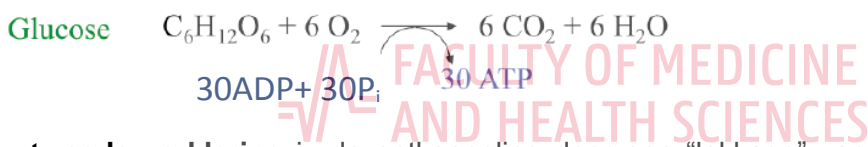
De verschillende conformaties van de 3 katalytische plaatsen worden voorgesteld door verschillende vormen. ADP en orthofosfaat binden aan de gele kant in de open conformatie. Terwijl de γ -subeenheid (groen steeltje) roteert in tegenwijzerszin, wordt de gele zijde omgevormd tot een nog steeds losse conformatie, maar waarin ADP en P_i toch iets vaster gebonden zijn. Tijdens devolgende rotatiestap wordt de gele zijde omgevormd tot een stuggere conformatie waarin ATP gesynthetiseerd wordt. Hierna wordt de site die ATP stevig gebonden had, terug een open site, en daarna terug een losse site die andere ADP en P_i moleculen kan omarmen enz. Samengevat, ATP wordt dus vrijgesteld uit de open site, en gesynthetiseerd in de gesloten site.

4.4. De respiratoire ont koppeling

Het maximaal theoretische rendement van de oxidatieve fosforylatie wordt in de praktijk nooit bereikt.

Eén verklaring voor een zeker verlies aan “proton motive force” is de noodzaak voor het transport van adeninenucleotiden. Dit transport is absoluut nodig om de synthese van ATP in de matrix aan een perifeer verbruik van ATP te kunnen koppelen. Gezien ATP meer negatief geladen is dan ADP, zorgt de uitwisseling van ATP en ADP door ANT in een verlies aan “proton motive force”, van ongeveer 16% (zie Figuur 4.12). Ook de import van fosfaat naar de matrix, hetgeen gepaard gaat met een tegentransport van OH^- van de matrix naar de tussenmembraan ruimte, verbruikt “proton motive force”. Bijgevolg is de **werkelijke opbrengst 2,5 moleculen ATP per molecuul NADH en 1,5 molecuul ATP per molecuul FADH_2** in plaats van de theoretisch berekende waarden van 3 en 2, respectievelijk.

De reactie wordt aldus, voor de glucoseverbranding, herleidt tot:



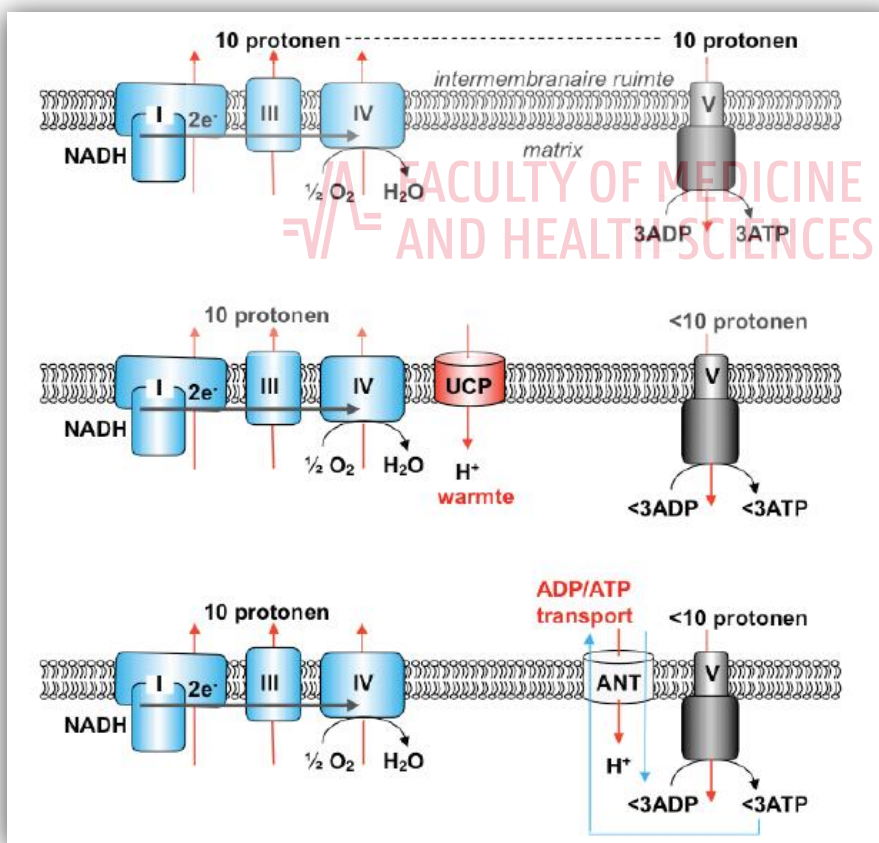
Een **tweede verklaring** is de ont koppeling door een “lekkage” van protonen doorheen de binnenste membraan, gemedieerd door leden van de **uncoupling protein** familie (UCP1, UCP2, UCP3). UCPs zijn kleine transmembranaire eiwitten in de binnenste membraan. Hun expressie is induceerbaar en hun protonenflux is reguleerbaar. Hun werking zorgt ervoor dat de oxidatie van voedingsstoffen geen ATP genereert, maar alleen warmte.

Tijdens de eerste wereldoorlog werd opgemerkt dat sommige arbeiders uit ammunitiefabrieken koorts ontwikkelden (hitte-dissipatie!) en een gewichtsverlies vertoonden. De oorzaak werd gevonden bij DNP (dinitrophenol, zie bijhorend filmpje op UFORA), een explosief dat een protonenlekkage veroorzaakt van de tussenmembraan ruimte naar de matrix. Doordat DNP de metabole snelheid kon doen toenemen, leidde dat in de jaren '30 tot de verwerking en exploitatie ervan in vermageringspillen, maar serieuze neveneffecten hebben ertoe geleid dat deze gevaarlijke “ontkoppelaar” snel van de markt werd gehaald.

UCPs spelen een belangrijke rol bij de **thermogenese**. UCP1 expressie is van belang in de mitochondriën van het bruine vetweefsel, alwaar een intense vetzuuroxidatie plaatsgrijpt (zie

verder in de cursus: β -oxidatie van vetzuren). Het bruin vet beschermt een pasgeboren baby tegen afkoeling buiten de baarmoeder. In de periode die volgt is waargenomen dat bruin vet gestaag afneemt en men nam aan dat in volwassenen bruin vet minimaal was. Een stijging van UCP1 kon echter ook aangetoond worden ten gevolge van hormonale regulatie. Zo drijft het peptidehormoon adrenaline de thermogenese aan, via opregulatie van de UCP1 expressie.

UCP2 en UCP3 expressie in skeletspieren spelen een rol bij globale energiehuishouding van van het lichaam. Hoe hoger hun expressie, hoe minder zuinig het proces van oxidatieve fosforylatie verloopt. Er zou ook een verband zijn tussen het ontstaan van reactieve zuurstofverbindingen (reactive oxygen species, ROS) en de activatie van UCP eiwitten. Door de respiratoire ont koppeling neemt immers de "proton motive force" af, waardoor de snelheid van nieuwe ROS productie vermindert

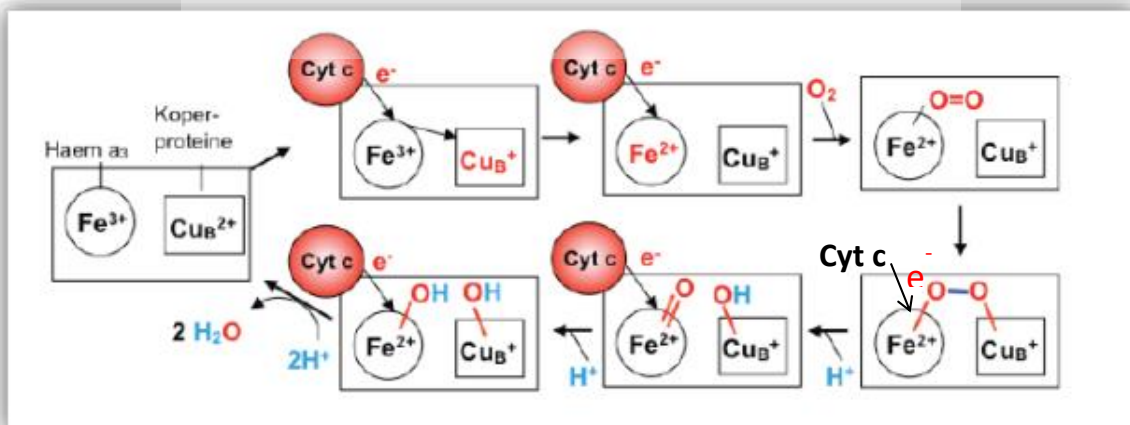


Figuur 4.12. Ontkoppeling van de oxidatieve fosforylatie. Naar Schuit, F.C. Figuur 5.12, *Metabolisme*, Ed. Bohn Stafleu van Loghum, 2010

4.5. Het gevaar van reactieve zuurstofradicalen

De lekkage van elektronen van de ademhalingsketen produceert reactieve zuurstofradicalen (ROS). In theorie zou moleculair zuurstof compleet moeten gereduceerd worden in complex IV door 4 elektronen, met de vorming van water tot gevolg, zonder de vorming van enig intermediair. In de praktijk grijpt echter occasioneel een **partiële reductie** plaats, waarbij zuurstof wordt omgezet tot een **superoxide anion radicaal**.

Om dit goed te kunnen begrijpen, bekijken we nog eens terug hoe de vorming van reactieve zuurstofradicalen in de eerste plaats door complex IV voorkómen worden. Zie hiervoor figuur 4.13. Twee reactieve redoxcentra worden eerst met Cyt c gereduceerd (Fe^{3+} naar Fe^{2+} en Cu_B^{2+} naar Cu_B^+). Pas daarna mag dizuurstof binden. Na een interne redoxreactie waarbij een Tyr residu betrokken is (niet weergegeven) ontstaat een **peroxideverbinding**, waarbij de dubbele binding tussen de O atomen herleid is tot een enkele binding. Vervolgens komen het 3^e en 4^e reducerende elektron binnen. Deze reduceren peroxide tot twee OH-groepen. Via binnenkomen van de laatste 2 chemische protonen ontstaan 2 watermoleculen. Doordat 2 OH⁻ groepen worden losgelaten, worden de 2 redoxcentra weer herleid (geoxideerd) tot hun begintoestand.

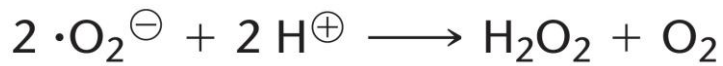


Figuur 4.13. Preventie van de vorming van ROS in complex IV. Naar Schuit, F.C. Aangepaste versie van Figuur 5.13, *Metabolisme*, Ed. Bohn Stafleu van Loghum, 2010

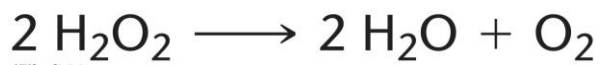
Indien uitzonderlijk (want complex IV voorziet eigenlijk in een heel veilig systeem) echter slechts 1 elektron wordt opgenomen, leidt dat tot het bijzonder reactieve superoxide-anion O_2^- . Dit anion is bijzonder gevaarlijk want het kan membranen, DNA en eiwitten beschadigen.

Ongelukkigierwijs hebben de ubiquinone reacties in complexen I en III ook de neiging om elektronen te lekken, die dan rechtstreeks naar zuurstof kunnen gaan. In totaal kan worden aangenomen dat 2% van het cellulair O₂ aanleiding geeft tot superoxide vrije radicalen. Hiertegen heeft het lichaam echter een mooi verdedigingsmechanisme opgebouwd, namelijk via de werking van **superoxide dismutase**, **glutathion reductase** en **catalase enzymen**.

Superoxide dismutase katalyseert devolgende reactie:



Catalase katalyseert devolgende reactie:



Inzicht in de mechanismen die betrekking hebben op ROS-vorming en –neutralisatie maken deel uit van een onderzoeksdomein dat de laatste jaren aan medisch belang heeft gewonnen. Men heeft immers ontdekt dat overproductie van ROS een rol speelt bij vroegtijdige veroudering van cellen. Hierdoor verhoogt de kans op kanker, degeneratieve ziekten en inflammatie. ROS is van belang bij veel chronische ziekten, oa. COPD.

Zie zeker in de bijhorende slides het concept “**supercomplexen**”.

4.5. Mitochondriale ziekten

Uit het voorgaande blijkt hoe belangrijk mitochondria zijn voor de energievoorziening van cellen, en dat zij tevens een bron kunnen zijn van sterk reactieve zuurstofradicalen. Hierdoor kunnen cellen vroegtijdig aftakelen. Erfelijke aandoeningen kunnen zich situeren op het niveau van de werking van mitochondriën. De mitochondriën hebben een eigen genoom. Dat werd ontdekt als gevolg van de observatie dat de overerving van het fenotype ten gevolge van een mutatie in **mitochondriaal DNA (mtDNA)** de klassieke genetische overervingswetten van Mendel niet volgt. Twee redenen kunnen hiervoor worden aangehaald. Ten eerste zijn de mitochondriën van een embryo bijna uitsluitend afkomstig van de eicel. Mitochondriaal DNA wordt dus vrijwel exclusief overgeërfd via de moeder. Ten tweede bevinden zich in elke cel een paar duizend exemplaren van het mitochondriaal DNA. Elk mitochondrion bevat enkele mitochondriale chromosomen. Indien een mutatie optreedt in het mtDNA, zullen gemuteerde cellen naast mutante ook normale exemplaren mtDNA hebben. Deze toestand wordt **heteroplasmie** genaamd, d.i. dat cellen een mozaïek kunnen zijn van mutante en normale allelen.

De incidentie van mitochondriale ziekten is 1:5000 geboorten, dit is in feite vrij frequent in vergelijking tot andere erfelijke aandoeningen.

De symptomen van ziekten als gevolg van een mutatie in mtDNA omvatten doorgaans afwijkingen van het centrale zenuwstelsel (doofheid en aantasting van de oogzenuw) maar kunnen ook getraceerd worden bij bepaalde vormen van suikerziekte. De verklaring waarom ook zenuwcellen, hartcellen en oogcellen vaak meer aangetast zijn, is omdat de cellen van deze weefsels typisch minder delen dan andere cellen. De mitochondriën in deze cellen worden dus vrij oud en gaan dus langer mee. Bij sneldelende cellen kan immers een 'survival of the fittest' reactie verwacht worden, en m.a.w. een 'zuiveringsreactie' door de snel delende normale cellen, waardoor de heteroplasmie minimaal gehouden wordt.

Eén van de meest karakteristieke metabole veranderingen die wordt waargenomen is een gestegen lactaatconcentratie (=lactatacidose). Dat is logisch, gezien door een mitochondriaal defect pyruvaat moeilijker aëroob kan verbrand worden, en dus een uitweg zoekt via lactaatdehydrogenase.

BOX 5: Superoxide dismutase (SOD) en ALS

Van SOD bestaan twee isovormen, een koper/zink afhankelijk enzym (SOD1) en een mangaanafhankelijk enzym (SOD2). Mutaties in het menselijke SOD1-gen leiden tot de autosomaal dominante vorm van erfelijke amyotrofische lateraalsclerose (ALS). ALS is een chronische aftakelingsziekte van de motorneuronen in het ruggenmerg, die gepaard gaat met een progressieve verlamming. De symptomen zijn blijkbaar niet gelinkt aan een verlies van enzymactiviteit. De autosomale dominante overerving wordt vermoedelijk veroorzaakt door het feit dat mutant SOD1 in motorneuronen toxische radicalen produceert, in plaats van deze op te ruimen. De bekendste persoon met ALS was de inmiddels overleden befaamde wetenschapper Stephen Hawking.



Source: google images "Stephen Hawking"