

Grunder i elektrontransportfosforylering (Alberts, kap. 14)

Introduktion

Eukaryoter (som Alberts, med något litet undantag, handlar om) har ett ganska begränsat urval av energigivande metabolismer. Aerob respiration, syrebildande fotosyntes, och ett par jäsningsvägar (mjölksyra och etanoljäsning). Inom gruppen prokaryoter (Bacteria och Archaea) finns alla dessa, plus många fler jäsningsvarianter, flera anaeroba respirationer och icke-syrebildande fotosynteser (se också Madigan avsnitt 5.14 för en kort inledning). Mångfalden kan synas förvillande, men det finns dock stora likheter mellan olika fotosynteser, mellan olika respiration och mellan olika jäsningsvägar. Många av dessa energimetabolismer går igenom noggrannare i Madigan, kap. 17.

Hos de flesta kemotrofer bildas den mesta ATP:n i de membranassocierade processer som kallas respiration, eller oxidativ fosforylering. Hos fototrofer kommer ATP från fotosyntesen. Dessa processer har stora likheter, framförallt när det gäller ATP-bildningen, som hos både respirerare och fotosyntetiserare sker genom elektrontransportfosforylering. Denna består av två processer som kopplas samman, inte genom en direkt fysisk kontakt i membranet, utan genom en protongradient. De kan därför också drivas separat från varandra på laboratoriet, men i en normalt fungerande cell arbetar de ihop.

De två processerna (som visas schematiskt i Alberts fig. 14-1, och som också diskuteras kortfattat i Madigan, avsnitt 5.12) är:

1. En elektrontransportkedja där energin i ett reducerat ämne används till att skapa en protongradient över ett membran. Den fria energin för skapandet av protongradienten fås genom att elektroner från det reducerade ämnet går mot en ökande redoxpotential.
2. En ATP-syntes, som drivs genom att protonerna strömmar tillbaka på ett kontrollerat sätt genom ett enzymkomplex, ATP-syntas, som sitter i membranet. Eftersom man upphäver den ordning som skapats genom bildandet av protongradienten frigörs energi, som kan kopplas till syntes av ATP.

Evolution

Detta kan tyckas vara en avancerad metod för att syntetisera ATP, och som sådan vara ett sent inslag i evolutionen. Som kan ses i Alberts fig. 14-44, tror man istället att detta är ett system för ATP-syntes som kommit tidigt under utvecklingen, eftersom även fotosyntes använder detta system för ATP-production. Utnyttjande av ljusenergi sker ju faktiskt enbart med hjälp av kemiosmotisk koppling. Det stöds också av att kemiosmotisk koppling finns i alla större organismgrupper, och därför borde ha utvecklats i åtminstone en ursprunglig form innan dessa grupper skildes åt i evolutionen.

En tänkbar evolution av elektrontransportfosforylering presenteras i Alberts (fig 14-41). Första steget var att en aktivitet av jäsnande organismer (som antas vara den mest ursprungliga energimetabolismen) bildade syror. Detta ledde till en pH-sänkning som i sin tur gynnade utvecklingen av en ATP-driven protonpump för att hålla rätt pH i cytosolen. En fortsatt aktivitet av fler och fler jäsnande organismer ledde senare också till en brist på ämnen att jäsa. Detta i sin tur gynnade utvecklingen av en protonpump som inte förbrukar ATP, utan istället utgjordes av komponenter i en elektrontransportkedja (som ju kan drivas av andra ämnen än vad som används vid jäsnings).

Allt effektivare elektrontransportkedjor skapade senare en protongradient som var så stor att den tillät den ATP-drivna protonpumpen (som är reversibel) att gå åt andra hållet → ATP-produktion. Detta gjorde att organismerna dels fick ut mer energi än genom jäsnings (idag upp till 30 ATP i stället för 2 per glukos), dels kunde använda nya substrat som inte fungerade i en jäsningsprocess. Detta var troligen faktorer som möjliggjorde utvecklingen av flercelliga organismer.

Alberts fig. 14-42 visar även ett exempel (av de många som man kan hitta i naturen) på en nutida enkel elektrontransportkedja som skapar protongradient utan att innefatta en pumpning av protoner över membranet. Det kan räcka med att protoner konsumeras på ena sidan och produceras på andra för att en protongradient ska bildas.

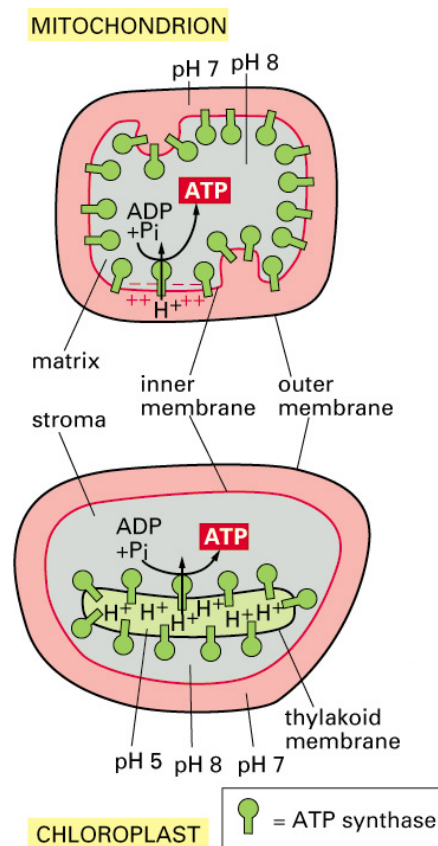
Protongradienten

Denna modell för hur energi som frigörs vid elektrontransporten kopplas till ATP-syntesen kallas *kemiosmotisk koppling*. Den drivkraft som skapas av elektrontransportkedjan, och som utnyttjas av ATP-syntaset kallas på engelska *proton-motive force* (*pmf*). Denna skapas alltså genom att vätejonkoncentrationen höjs på ena sidan av ett membran, men påverkas inte bara av detta. En *proton-motive force*, som alltså är drivkraften som strävar till att transportera tillbaka protoner över membranet, består av två komponenter som samverkar, dels en skillnad i laddning mellan membranets båda sidor (membranpotential) och dels en skillnad i vätejonkoncentration (se fig. Alberts 14-12, som visar två renodlade komponenter, som ju faktiskt finns samtidigt på samma plats i samma membran). Man skulle ju kunna tycka att det vore mer eller mindre samma sak, eftersom varje vätejon också har en plusladdning, men fördelningen av andra joner än vätejoner bidrar också till membranpotentialen (jämför Alberts figur 12-8). I mitokondrien bidrar membranpotentialen mer än koncentrationen till *proton-motive force*. En svensk översättning av detta skulle bli ungefär *protondrivkraft*, men vanligtvis används ordet *protongradient*. Detta ord överbetonar dock koncentrationsgradienten. Kom alltså ihåg att ordet protongradient i detta sammanhang innefattar båda komponenterna som ingår i det engelska *proton-motive force*.

Om man tittar i olika läroböcker så kan man se olika uppgifter på hur många ATP man kan få av en glukosmolekyl. Alberts har en låg siffra (30 ATP / glukos), medan många andra böcker (t.ex. Madigan) säger upp till 38 ATP / glukos. Varför kan man få så olika uppgifter i böcker som behandlar samma ämne och är skrivna ungefär samtidigt? Det finns olika anledningar till detta. En anledning är att den protondrivkraft som bildas används även till andra saker än ATP-syntes, t.ex. transport av ämnen genom membranet (se Alberts fig. 14-16). Alla protoner som pumpas ut används därför inte till ATP-syntes. Det är dessutom svårt att på ett fullständigt säkert sätt mäta experimentellt både hur många protoner som pumpas ut per elektron av elektrontransportkedjan, och hur många protoner som måste passera genom ATP-syntaset för att en ATP ska syntetiseras. När man preparerar fram mitokondrier, kloroplaster eller bakterier på ett sätt som gör det möjligt att undersöka detta, så påverkas de av processen. Det är därför viktigt att tänka på att de modeller för

dessa processer som visas i böckerna är rekonstruktioner som baseras på en sammanställning och tolkning av en mängd individuella undersökningar, där man erhållit mer eller mindre lättolkade, och ibland motsägande, resultat. Alberts beskriver flera av de klassiska experimenten som använts för att stödja teorin om kemiosmotisk koppling, dels i löptexten, men också i några av övningsfrågorna till kapitel 14. Läs dem och tänk efter vad försöken visar.

En viktig grupp av ämnen, som spelat stor roll vid experimentella studier av kemiosmotisk koppling är uncouplers (ung. frikopplare på svenska). Dessa gör att en jon, t.ex. vätejoner kan läcka genom membranets lipidskikt, vilket leder till att gradienten för denna jon kommer att utjämnas genom passiv transport. En uncoupler som leder vätejoner, t.ex. 2,4-dinitrofenol, gör att protongradienten i stort sett elimineras, eftersom protonerna läcker tillbaka över membranet. Den energi som fanns lagrad i protongradienten frigörs då helt som värme istället för att användas till arbete. Detta leder i sin tur till att ATP-syntasets ATP-syntes naturligtvis upphör. Däremot går

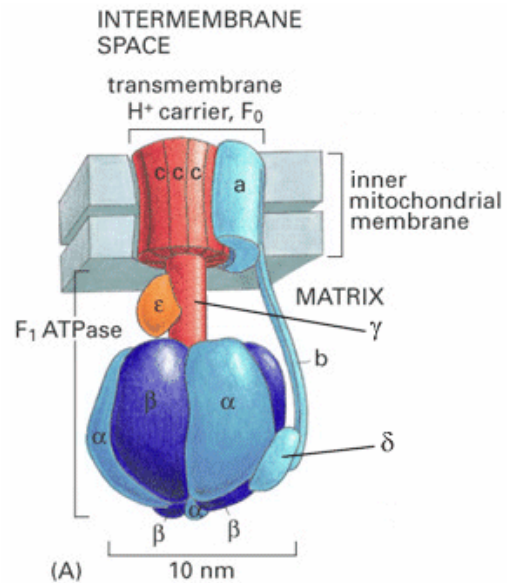


Figur 1. Protongradientens storlek och riktning och ATP-syntasets lokalisering i mitokondrie resp. kloroplast. (Från Alberts m. fl. "Molecular Biology of the Cell, 4 uppl.)

elektrontransportkedjan oftast fortare, därför att det innebär ett arbete att pumpa protoner mot en protongradient. Om gradienten försvinner, så kan protonerna lättare pumpas ut. Om man istället har ett ämne, t.ex. valinomycin, som låter kaliumjoner passera genom membranet så försvinner bara membranpotentialen, eftersom kaliumjonerna kommer att neutralisera laddningen. Vätejongradienten finns däremot kvar, och kan då bestämmas separat.

Energin som krävs för att bilda en protongradient kommer hos mitokondriens elektrontransportkedja från redoxcarriers som NADH och FADH₂ (vilka bildats från andra organiska ämnen). Hos andra organismer, t.ex. bakterier, kan energin komma från andra organiska ämnen eller till och med från oorganiska ämnen, som t.ex. svavelväte. En elektrontransportkedja som bildar en protongradient finns också i fotosyntesen, och denna drivs med elektroner som kommer från exciterat klorofyll (se kommentarerna om fotosyntes).

I mitokondriens elektrontransportkedja finns tre större komplex där redoxprocesserna i vart och ett av komplexen är kopplade till en utpumpning av protoner från mitokondriens insida (matrix) till intermembranutrymmet. Även i fotosyntesen bildas ATP genom en elektrontransport och en därigenom skapad protongradient. Denna sker hos eukaryota fotosyntetiserare i kloroplastens tylakoidmembran (Alberts 13.33). Här skapas protongradienten både genom att protoner pumpas in i tylakoiden och genom att H⁺ bildas inne i tylakoiden och konsumeras på utsidan. Figur 1 visar en jämförelse mellan lokaliseringen av ATP-syntesen i mitokondrier och kloroplaster. Eftersom tylakoiden inte innehåller så många andra processer så kan tylakoidutrymmet ha en betydligt högre vätejonkoncentration (och därmed ett lägre pH) än vad man kan ha på mitokondriens utsida (eftersom ett lågt pH här skulle påverka andra reaktioner i cytoplasman). Skillnaden mellan tylakoidens ut- och insida kan vara så hög som 3 - 4 pH-enheter, och det är här koncentrationsskillnaden av protoner som är den huvudsakliga drivkraften vid ATP-bildningen i kloroplasten. Membranpotentialen hålls nere genom utbyte av andra joner över tylakoidmembranet. Detta kan jämföras med mitokondrien, där det bara skiljer något mer än en pH-enhet över innermembranet, och där membranpotentialen är den största delen av protongradienten.



Figur 2. ATP-syntasets uppbyggnad (principiell bild baserad på ATP-syntas från *E. coli*). Rotordelarna (c, ϵ och γ) visas i rött/orange och statordelarna (a, b, α , β och δ) i blått. (Omritad från Alberts fig. 14-14.)

Redoxpotential

Med redoxpotential menas ett ämnes förmåga att ta upp eller lämna ifrån sig elektroner. Eftersom redoxreaktioner måste ske mellan två ämnen, där det ena reduceras (är elektronacceptor) och det andra oxideras (är elektrondonator), är ett ensamt ämnes redoxpotential egentligen inte intressant. Om det jämföras med ett annat ämnes redoxpotential kan man emellertid säga vilket av ämnena som kommer att reduceras och vilket som oxideras. Det ger också information om hur mycket fri energi som man kan få ut av reaktionen.

Elektrontransportkedjan transporterar elektroner från en elektrondonator (i mitokondrien NADH eller FADH₂) via ett antal mellansteg till en elektronacceptor (i mitokondrien O₂). Vad som egentligen händer är att det första ämnet i elektrontransportkedjan reduceras av elektrondonatorn, som i sin tur då oxideras till sin oxiderade form. Elektrontransportkedjans första komponent reducerar i sin tur nästa komponent i kedjan och oxideras då själv tillbaka till oxiderad form, och kan nu åter reduceras av nästa elektrondonator. Elektrontransportkedjan ska alltså inte ses som ett "rör" som elektronen rinner i, utan som en serie redoxreaktioner. Det som bestämmer i vilken ordning de olika komponenterna sitter i elektrontransportkedjan är deras redoxpotential, d.v.s. deras tendens att lämna ifrån sig elektroner till ett

annat ämne. Ett ämne med låg redoxpotential har större tendens att lämna ifrån sig elektroner än ett ämne med högre redoxpotential. NADH har betydligt lägre redoxpotential än syre. Elektronerna kommer alltså spontant att vilja gå från NADH till syre. Proteinerna i ETP-kedjan ser till att elektronerna går rätt väg och inte hoppar över något led (vilket ju skulle kunna ske rent termodynamiskt, men som säkert skulle leda till ett slöseri med energi).

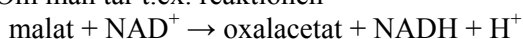
Hur man på ett standardiserat sätt mäter redoxpotentialer visas i Alberts panel 14-1. Där visas också hur man räknar ut ΔG^0 från standardredoxpotentialen. Denna formel är, precis som några av formlerna för DG som visats tidigare, förenklade så att det kan vara svårt att använda dem generellt. Ett mer generellt sätt att uttrycka formeln är

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta E^{0'}$$

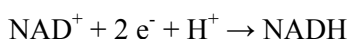
F = Faradays konstant (som Alberts ger som 0,023 med sorten kcal V⁻¹ mol⁻¹).

n = antal elektroner som omsätts i reaktionen
 $\Delta E^{0'}$ = skillnaden i E^{0'} för de båda redoxparen (beräknas som störst E^{0'} - minst E^{0'}, om man avser en spontan reaktion)

När man anger redoxpotentialen för ett ämne så brukar man ange den för en s.k. halvreaktion. Om man tar t.ex. reaktionen



så består den av de två halvreaktionerna



Standardredox-potentialer för några halvreaktioner som används i energimetabolismen visas i Madigan Fig. 5.9. Den elektrondonator som används måste ha lägre redoxpotential än elektronacceptorn.

Den frigjorda energin kan användas till arbete eller frigöras som värme. Hur mycket energi man kan få ut beror på skillnaden i redoxpotential mellan elektrondonator och elektronacceptor. Som Madigan figur 5.9 visar så blir mängden fri energi större ju större spännvidd man har i redoxpotential mellan de två ämnena. Detta gör att man i anaeroba respirationer och hos kemolitotrofer oftast får ut mindre mängd fri energi per elektrontransport än hos aerob respiration. Ett annat exempel på detta är att FADH₂ ger färre ATP än NADH trots att de båda lämnar två elektroner. Anledningen till det (vilket inte sägs i Alberts) är att FADH₂ har högre redoxpotential. Det måste därför lämna sina elektroner till ett annat komplex som Alberts inte visar. Detta lämnar i sin tur elek-

tronerna vidare till ubiquinon, men på grund av att redoxpotentialen är så hög så räcker energin som frigörs i detta fall inte till att pumpa några protoner. Om elektronerna kommer från FADH₂ så får man alltså protonpumpning endast i de två sista komplexen, och därmed ett mindre bidrag till protongradienten.

ATP-syntaset

ATP-syntaset är sannolikt mycket gammalt evolutionärt. Det förefaller vara från samma ursprung och finns hos vitt skilda grupper och organeller, mitokondrier, kloroplaster, Bacteria och Archaea. Uppbyggnaden av ATP-syntaset visas i fig. Alberts 14-4. Nyare data stöder den något omritade bild som visas i fig.2. Tidigare experiment visade att man kunde separera ATP-syntaset i två enheter, en del som satt stabilt i membranet (som kallades F₀) och en del som relativt lätt kunde avlägsnas (F₁). Denna var associerad till F₀, men stack ut i matrix i mitokondrien, eller cytoplasman i bakterier eller in i tylakoidutrymmet hos kloroplaster. F₀-enheten visade sig innehålla kanal för protoner, och ett membran med F₀ släppte villigt igenom protoner. Frampreparerade F₁-enheter visade sig ha en katalytisk effekt. De hydrolyserade ATP till ADP + fosfat. I en intakt cell sitter däremot de båda enheterna (som var och en består av flera subenheter) ihop, och deras aktiviteter är kopplade till varandra. Det sker alltså ingen protontransport genom F₀-enheten utan att det sker en ADP/ATP-omvandling i F₁.

I figur 2 är F₀-enhetens subenheter namngivna med vanliga bokstäver, och F₁-enhetens med grekiska. Bilden visar i huvudsak ett ATP-syntas från *E. coli*, men andra ser i princip likadana ut. Funktionellt så bildar de olika subenheterna två delar, en rotor (röda subenheter) och en stator (blå subenheter). De aktiva katalytiska sätena sitter i gränsen mellan α - och β -enheterna, och det finns tre stycken per ATP-syntas. Teorin är att ATP-syntesen drivs genom att protoner strömmar in genom a, och därmed driver en rotation av c-ringen. γ , som är fäst vid c-ringen kommer då också att rotera, och eftersom den är assymetrisk och går långt in i mitten av huvudet (α - och β -enheterna), så medför denna rotation en konformationsförändring i de katalytiska sätena. Detta driver en syntes av ATP från ADP och fosfat. Huvudet roterar sig inte, eftersom det är fastlåst vid a med hjälp av b- och d-enheterna. Ett helt varv av c-ringen ger 3 ATP, ett från varje katalytiskt säte.

lytiskt säte. Antalet c-enheter per ring varierar mellan 10 och 14 om man jämför mellan olika organismer. Varje c-ring ger intransport av en proton per varv. Om c-ringen innehåller 10 c-enheter (som i djurmitokondrier) så medför detta att en intransport av 10 protoner ger syntes av 3 ATP, vilket blir 3,3 protoner per ATP. Denna siffran kan alltså variera mellan olika organismer .

ATP-syntaset är reversibelt, vilket visas i figur Alberts 14-15. Figurtexten beskriver detta bättre än löptexten i boken. Åt vilket håll ATP-syntaset går beror alltså på de kopplade reaktionerna $ADP + P_i \leftrightarrow ATP$ och $H^+_{ut} \leftrightarrow H^+_{in}$. I mitokondrien och kloroplasten går det endast åt ett håll, syntes av ATP genom att protongradient förbrukas. I bakterier som hamnar i en miljö där de inte kan respirera, utan tvingas använda sig av jäsning, kan ATP-syntaset istället förbruka ATP och med denna energi pumpa ut protoner för att skapa en protongradient. Denna blir nog inte lika stor som när den bildas av elektrontransportkedjan, men kan användas för att driva aktiv intransport av ämnen och också för drivning av flageller hos rörliga bakterier (fig. Alberts 14-17).

Fred Sörensson 2006