**5. MITOKONDRIUM**

**Írták: Merczel Kinga, Marton Zoltán és Matejka Judit biomérnök hallgatók,**

**Dr. Sveiczer Ákos egyetemi docens előadásai alapján**

**A mitokondrium szerkezeti felépítése**

A mitokondrium feladata a kémiai energia átalakítása, „termelése” és leadása. Valószínűleg kb. 1,5 milliárd éve képződött ez a tipikusan 0,5 és 2 μm közötti méretű, ellipszoid formájú sejtalkotó, ami a citoszolban helyezkedik el. Exogén úton alakulhatott ki, azaz keletkezése az endoszimbionta elmélet alapján egy baktérium fagocitózisával történhetett, ám megemésztése helyett szimbiózisba került a baktérium az őt felfaló sejttel. Ennek bizonyítéka a prokarióta jellegű belső membrán és a cirkuláris DNS a mátrixban. A mitokondriumok az emberi test egyes sejtjeiben rögzített formában összpontosulnak a sejt egyes részein (például az izomszövetekben vagy a spermium nyaka körül), más sejtekben azonban nincs ilyen lefixált helyük, hanem mobilisek.

Jellegzetes felépítését a kettős membrán adja, melyek közt helyezkedik el az ún. intermembrán tér. A külső membránon ún. porin csatornák helyezkednek el, így szabad anyagáram zajlik a citoszol és az intermembrán tér között mintegy 5000 Da molekulatömegig (a két tér összetétele így hasonló marad). A belső membrán a speciális biokémiai funkciókat ellátó mátrixot határolja el az intermembrán tértől, a rajta keresztül haladó anyagáram szigorúan szabályozott, így a mátrix összetétele jelentősen eltér a belső membránon kívüli folyadékterekétől. Sűrű lemezes betüremkedéseivel krisztákat alkot, melyek célja a felületnövelés, ugyanis ezen prokarióta jellegű membrán 70%-át fehérjék teszik ki. A belső membránban találhatók a légzési lánc enzimjei és az ATP szintázok is, továbbá a megfelelő membrán transzport proteinek.

**A mátrixban zajló biokémiai folyamatok**

A mátrix elkülönülő összetételének és a belső membrán gazdag enzimkészletének köszönhetően számos biokémiai folyamatnak ad helyet. Itt történik az acetil-koenzim A előállítása egyrészt a glikolízis végtermékéből, a piroszőlősavból, illetve a lipidekből felszabaduló zsírsavak β-oxidációval történő lebontásából. Itt zajlik a citrát- (vagy Krebs-) ciklus, melynek célja a NAD+ redukciója és nagyenergiájú elektronok előállítása (NADH). Egyetlen molekulányi GTP a citrát-ciklus közvetlen energia nyeresége, és ez egy anaerob körfolyamat. A ciklus során az acetil-koenzim A belépésével szállított két C-atom CO2-dá oxidálódik, ami diffúz módon távozik a mitokondriumból, majd a sejtből is. Mindeközben redukált koenzimek, NADH és FADH2 képződnek, melyek a nagy energiájú elektronokat hordozzák.

Végezetül a mátrixban (pontosabban inkább a belső membránban) megy végbe a terminális oxidáció folyamata is, ami a NADH oxidációjával indul. A koenzim leadja elektronjait a belső membránban található elektrontranszport-láncnak, melynek végén egy oxigén-molekulára négy elektron és négy proton kapcsolódik, és így két molekula víz, valamint a lánc elején NAD+ képződik. A lánc néhány tagja mindeközben a rajta keresztülhaladó elektron energiájának egy részét protonok kipumpálására használja fel. Az így kialakuló elektrokémiai protongradiens kisülése teszi lehetővé az oxidatív foszforiláció lejátszódását, melynek során egy ADP és egy inorganikus foszfát közt nagyenergiájú kötés létrejöttével a kémiai energiahordozó ATP keletkezik.

A mátrixban lejátszódó folyamatok jelentősége, hogy bár kis mennyiségű energiát „termel” a glikolízis is a citoszolban, de a fő energiatermelés az oxidatív foszforiláció által megy végbe a mitokondrium mátrixában.

**A kemiozmózisos mechanizmus alapelvei**

 A kemiozmózisos mechanizmus az elektrontranszport-lánc (oxidáció) és az (oxidatív) foszforiláció kapcsolatán alapul. A folyamat lefolyása a következő: a citrát-ciklusból származó nagyenergiájú elektronok az elektrontranszport-láncon keresztül alacsonyabb energiaállapotra jutnak, aminek eredményeképpen a fent leírt módon végül víz keletkezik, de a transzportlánc néhány eleme működés közben protonokat pumpál ki (aktív transzporttal) az intermembrán térbe. Így pH különbség jön létre, aminek hatására a protonok passzív transzporttal jutnak vissza a mátrixba az ATP szintázon keresztül, meghajtván azt, és így ADP-ből és inorganikus foszfátból ATP keletkezik (oxidatív foszforiláció).

 A kemiozmózisos mechanizmus lefolyásának különböző feltételei vannak. Fontos, hogy a mátrix a protonokra gyakorlatilag teljesen impermeábilis (átjárhatatlan) legyen. Ez a kardiolipinnek (kettős foszfolipid) köszönhető, és így kb. 0,5-1 egységnyi pH különbség alakul ki a terek közt. Továbbá a belső membránban protonpumpák, ATP szintáz („passzív” H+-transzporter, ld. később!), valamint egyéb transzporterek jelenléte is szükséges.

**Az elektrontranszport-lánc működése; a protongradiens képződése és jellemzői**

Az elektrontranszport-lánc a belső membránhoz kötve zajlik. Az elektronok eredete maga a táplálék eredetű szénhidrát vagy zsírsavmolekula. Innen az elektronok az acetil-koenzim A-n keresztül a citrát-ciklusba jutnak, itt kerülnek rá a NAD+ koenzimre, és így, a NADH segítségével jutnak be a láncba. Az elektronok terminális akceptora a lánc végén pedig a légzési O2, amivel vizet képeznek.

Az elektrontranszport-lánc fehérjéi (számuk 40 feletti) a membránba ágyazottak, és 3 fő légzési enzimkomplexet alkotnak az alábbi szállítási sorrendben:

− NADH-dehidrogenáz komplex

− citokróm c reduktáz komplex

− citokróm c oxidáz komplex.

Ezen enzimkomplexek mindannyian protongradienst létrehozó pumpaként is funkcionálnak. A protonokat a rajtuk áthaladó elektronok energiája egy részének felhasználásával, aktív transzporttal a mátrixból az intermembrán térbe pumpálják ki, így kialakítva a terek közt a 0,5-1 pH különbséget. A komplexek tagjai fémionokat (Fe, Cu) kötnek meg, amik felveszik és leadják az elektront, közöttük pedig az ubikvinon és a citokróm c viszi át az elektronokat. A lánc tagjai sorban szállítják az elektronokat: egy adott elem affinitása az elektronhoz az előző elemhez képest nagyobb, a következő elemhez képest pedig kisebb, így az elektron spontán vándorol. A láncon belül a redoxpotenciál értéke kb. -300 mV-ról (NADH/NAD+) +800 mV-ra (H2O/O2) nő (ld. később). A mitokondrium belső membránján pedig főként a protongradiens miatt kialakul egy kb. 140 mV értékű membránpotenciál (a mátrix felőli oldal a negatívabb), a protongradiens értéke pedig feszültségre átszámítva kb. 60 mV. Mivel a kétféle (az elektromos és a koncentráció-gradiensből származó) erő iránya megegyezik, azt mondhatjuk, hogy a proton hajtóerő (más néven az elektrokémiai gradiens) a mitokondrium belső membránjánál kb. 200 mV.

**Transzportfolyamatok a mitokondrium külső és belső membránjánál**

A külső membránon tulajdonképpen a porin csatornáknak köszönhetően szinte minden molekula átjut, így az intermembrán tér összetétele nem különbözik jelentős mértékben a citoszolétól. A belső membránon keresztül viszont sokkal szigorúbban szabályozott transzportfolyamatok zajlanak, ami biztosítja a mátrix megfelelő összetételét.

A mátrixba másodlagos aktív, kapcsolt szimporttal jut be a negatív töltésű piruvát és a szintén negatív töltésű foszfát is a protongradienssegítségével. A proton-transzport hajtja a szimportert, mivel a mátrix belső tere negatív töltésű, és ott a proton koncentráció is kisebb, mint az intermembrán térben.

A belső membránban szükség van egy ADP-ATP antiporterre is, ami az ADP-t a mátrixba juttatja be, a frissen képződött ATP-t pedig a citoszolba juttatja ki. A belső membrán mátrix felőli oldala negatív, valamint mindkét ion negatív, de az ADP csak háromszoros, míg az ATP négyszeres negatív töltésű, ezért kedvező energetikailag az ADP-ATP csere. Így a membránpotenciál képes hajtani az antiporter működését.

**Az ATP szintáz működése és annak felfedezése**

 Az F0F1 ATP szintáz a belső mitokondriális membránba ágyazódó, több alegységes fehérjekomplex: egy forgó transzmembrán részből (F0) és egy a mátrixba benyúló fejből (F1) áll. Általa egyenlítődik ki az elektrokémiai gradiens: a protonok visszatérnek a membrán mátrix felőli oldalára az ATP szintázon keresztül, eközben pedig lejátszódik az ADP + Pi → ATP reakció, azaz az oxidatív foszforiláció. A legtöbb elkészült ATP molekula a citoszolba jut, de egy része a mitokondrium fenntartására fordítódik.

A szintáz alegységei a következőképpen vizsgálhatóak. A sejtroncsolást követően centrifugálással különítik el a sejtalkotókat. A mitokondrium frakciót ultrahanggal roncsolják, így a membránrendszer kisebb darabokra szakad szét. Ezek vizes közegben önhegedéssel vezikulumokat (szubmitokondriális részecskék) képeznek, melyek jelentős részben a krisztákból származnak, és ezekben többnyire az ATP szintáz feje kifelé néz („kifordított” vezikulumok előállítása). Kisózással a perifériás fejek (F1) eltávolíthatók az integráns F0 részt megtartó szubmitokondriális részecskékről, és centrifugálással ezek is elkülöníthetők egymástól. Megfigyelhető, hogy a szintáz fejei önmagukban ATP-t hidrolizálnak, így csak az F1 résszel összekapcsolódva működnek ATP szintázként. A „fej nélküli” szubmitokondriális részecskék pedig oxidálják a NADH koenzimeket és ehhez oxigént fogyasztanak, de az ATP-t nem képesek sem szintetizálni, sem hidrolizálni.

Ezen biokémiai vizsgálatok révén derült ki az is, hogy az ATP szintáz reverzibilis működésű. A mitokondrium belső membránjában azt a „természetes” működési irányát figyelhetjük meg, amikor a protongradiens passzív kisülése során ATP-t termel. Ezzel szemben a protongradiens megváltoztatásával mindezt meg is lehet fordítani: ilyenkor ez a fehérjekomplex ATP-t hidrolizál, és ennek energiáját felhasználva aktívan pumpálja a protonokat. Anaerob baktériumokban ennek a reverzibilitásnak nagy a jelentősége.

**A légzési lánc protonpumpáinak mechanizmusa**

A légzési lánc nagy komplexei egyben protonpumpák is: aktív transzporttal az intermembrán térbe juttatnak H+-okat. A láncban mintegy 15 elektronszállító található, és a negatív redoxpotenciáljuk fokozatosan csökken, ettől lesz az affinitásuk egyre nagyobb az elektronokhoz, és az elektronvándorlás pedig spontán folyamat. Közben az elektronok energiája is folyamatosan csökken, de van három olyan lépés is, amikor az hirtelen esik nagyot. A lánc ezen elemeinél a konformáció megváltozása olyan, hogy az elektron energiája lehetővé teszi a protonok kipumpálását a mátrixból.

A komplexet alkotó fehérjék alapállapotukban oxidált állapotúak és elektromosan semlegesek, de ha az előttük álló tag redukálja őket elektron átadással, akkor negatívvá válnak. A nagy komplex protonpumpa része ilyenkor a mátrix felé nyitott, és hogy újra elérje semleges állapotát, a mátrixból egy protont vesz fel. Azonban ezáltal megváltozik a konformációja, és leadja az elektront a komplexen belül a következő elektronszállítónak. Így viszont már a protonra lesz kicsi az affinitása a pozitív töltése miatt, ezért újabb konformáció változással leadja a protont, de ilyenkor az intermembrán tér felé!

**A H+-ionofórok biokémiai és élettani hatása**

A kemiozmózisos mechanizmus egyik feltétele, hogy a belső membrán protonokra átjárhatatlan legyen. A protonok tehát spontán nem szivároghatnak át a membránon, hiszen akkor nem alakulhatna ki a protontöbbletből származó elektrokémiai gradiens, és így nem lenne, ami meghajtaná az ATP szintázt. A proton-ionofórok (pl. a 2,4-dinitro-fenol) olyan molekulák, amelyek a belső membránba beépülve passzívan protonokat szállítanak az intermembrán térből a mátrixba. Ezért is nevezik őket szétkapcsoló szereknek: közvetetten megakadályozzák az ATP termelését. Ugyanis elválik egymástól az elektrontranszport-lánc és az oxidatív foszforiláció: kapcsolatuk, és így a kemiozmózisos mechanizmus megszűnik. Mindennek következtében az erős proton-ionofórok sejtmérgek, hiszen meggátolják az ATP termelését a légzés során. Ennek a legfontosabb oka az, hogy a membránban az ionofórok és az F0 proton transzporterek párhuzamos kapcsolású ellenállásokként foghatók fel, ahol az ionofórok vezetése sokkal jobb, ezért az „áram” zömmel rajtuk folyik keresztül („rövidzár”).

A gyenge ionofórok viszont akár hasznosak is lehetnek, mivel nem zárják olyan erősen rövidre az ATP szintáz működését. Így például a téli álmot alvó állatok barna zsírszövetében a gyenge ionofórok hatására jelentős mennyiségű hő is keletkezik a raktározott tápanyagból, nem csak ATP. Tehát ezek az állatok ilyen módon kerülik el a kihűlést.

**A legegyszerűbb mesterséges ATP-szintetizáló rendszer jellemzése**

Az ATP szintáz felfedezése után ötletes módon bizonyították a működéséről alkotott kezdeti hipotéziseket. Ehhez a halobaktériumokból származó, fény hatására a prokariótából a külvilágba protonokat pumpáló bakteriorodopszint vették segítségül. Mesterséges vezikulumok (liposzómák) membránjába bakteriorodopszint ültettek, amelyek ebben az esetben fény hatására a vezikulum belsejébe pumpálták a protonokat (fordított orientáció!). Ha ugyanekkor ATP szintázt is ültettek a liposzóma membránjába, akkor a fény energiája ATP szintézist is eredményezett. Így bebizonyították azt is, hogy az ATP szintáz csak protongradiens által működik, hiszen bakteriorodopszin nélkül ez a rendszer nem termelt ATP-t. A proton-ionofórok hatása is kiválóan tanulmányozható volt ebben az elrendezésben.

**Baktériumok protongradiens képzése és annak felhasználása**

Baktériumoknál is jellemző a proton kipumpálása a citoszolból a plazmamembránon át a külvilágba. Ez többféleképpen is történhet: légzési elektrontranszport-lánc, bakterioklorofill vagy -rodopszin felhasználásával. Így kialakul a protongradiens is, és ennek köszönhetően képesek a baktériumok ATP-t szintetizálni és másodlagos aktív transzporttal táplálkozni, sőt ennek további felhasználásai is vannak:

− A plazmamembránban H+-Na+ antiporterek vannak jelen: a H+ passzív módon be-, a Na+ aktív módon kiszállítódik, így ennek segítségével a felesleges Na+-tól tud megszabadulni a baktérium.

− Az ostorok/csillók mozgatása: ha a proton a nagyobb koncentrációjú hely felől a kisebb koncentrációjú hely felé áramlik, az ostor az elektrokémiai gradiens kiegyenlítéséből felszabaduló energiát felhasználva forogni kezd.

**Az ATP szintáz és az elektrontranszport-lánc együttes evolúciója**

Az F0F1 ATP szintáz feltehetően hamarabb alakult ki, mint a légzési elektrontranszport-lánc. Az ősi anaerob heterotróf baktériumok anyagcseréje nem oxidatív, hanem fermentatív volt, ezáltal a katabolizmus savanyította a belső teret. Így az ATP szintáz a mai mitokondriumokban megszokotthoz képest ellentétesen működött: protont pumpált ki a savas közegből ATP hidrolízis terhére. Később kialakult az elektrontranszport-lánc, mely már hatékonyabban hajtotta ki a protonokat a sejtből, nagyobb protongradienst volt képes előállítani, ráadásul ehhez nem „pazarolt” ATP-t. Még később pedig az ATP szintáz működése megfordult, és ATP-t kezdett szintetizálni a sejt számára.