



Róka András

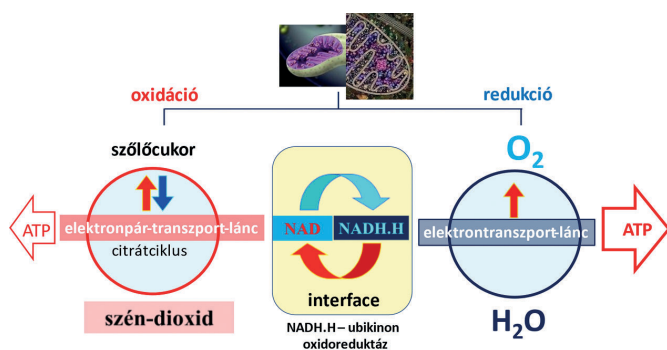
■ ELTE TTK Kémiai Intézet

A „protonpumpák” működése és következménye

A mitokondrium funkcionális elektro-biokémiája (Második rész)

Inzelt György köszöntésére

Az első részben vázoltuk, hogy a mitokondrium funkcióját tekintve folyamatos üzemű, bio-üzemanyagcella, amiben a citrátciklus (a piroszőlősav átalakulásával együtt) az oxidációs térfelet, a terminális oxidáció pedig a redukciós térfelet alkotja (1. ábra).



1. ábra. A mitokondrium térben elválasztott oxidációs és redukciós folyamatai folyamatos üzemű bio-üzemanyagcellát alkotnak

Mitchell nem tekintette a mitokondrium egészét üzemanyag-cellának, csak az elektrontranszport-lánc és a hidrogénüzemű tüzelőanyag-cella hasonlóságát ismerte fel, amikor a folyamatot tüzelőanyag-cella-szerűnek nevezte [1]. Annak ellenére, hogy szinte átláthatatlan irodalma van azoknak az eredményeknek, amelyek alátámasztják Mitchell elméletét, a mechanizmusok tekintetében még mindig vannak hiányosságok [2]. Ilyen például a protonpumpák működése, a protontranszport mechanizmusa vagy az ozmózis „chemi” jellegének magyarázata. Előző cikkem folytatása néhány hiányosság magyarázatára tesz kísérletet olyan eredmények figyelembevételével, melyeket Mitchell még nem ismerhetett, ilyen például:

- Oláh György szupersavakra vonatkozó munkássága és a két-elektronos-háromcentrumos kötés jelentősége,
- a Nafion polielektrolit protonvezető membrán alkalmazása az üzemanyagcellákban,
- a redoxi félvezetők mechanizmusának megismerése a ciklikus voltammetriával egybekötött kvarckristály-nanogravimetria segítségével.

A mátrix és a membránok közötti tér eltérő kémhatása alapján Mitchell hipotézisének egyik posztulátuma, hogy az elektrontranszport-lánc enzimei hidrogénionokat „pumpálnak” a memb-

ránok közötti térbe, és ezáltal koncentrációgradiens alakul ki. A „pumpa” elnevezés találó, mert kifejezi, hogy a protonok növekvő koncentráció irányába történő transzportja munkát igényel. A protonpumpák mechanizmusa azonban ismeretlen volt. Furcsa azonban, hogy Mitchell nem azt a hajtóerőt nevezte el „protonmotive force”-nak, ami a koncentrációgradienst hozza létre, hanem a következmény-folyamatot, mert a ATP-szintézis kapcsolása érdekében a protontranszporhoz külön hajtóerőre volt szüksége.

Javaslat a protonpumpák működésére

Az elektroneutralitás törvénye a redoxireakciók során szigorúan teljesül. Töltés sohasem halmozódik fel, még a galvánelemekben sem. A töltéskiegyenlítőds előbb-utóbb bekövetkezik, különben hátráltatja a folyamatot. Ennek az a következménye, hogy a mitokondrium belső membránja nem válik kondenzátorrá. Az elektromos télerősség kialakulása ugyan kedvező lenne a „megmaradó” energiaátalakulás magyarázata szempontjából, de a termodinamika kezdeti és végállapoton alapuló törvénye nem mondhat semmit a mechanizmusról. Úgy gondolom, hogy a „protonpumpákra” vonatkozó ismeretek azért hiányosak, mert a töltéskiegyenlítőds nem olyan triviálisan játszódik le, mint az oldatokban. Ennek megértéséhez nyújt segítséget a redoxi félvezetők vezetési mechanizmusának megismerése.

A hexaciano-ferrátok redoxi elektrontranszport-lánca

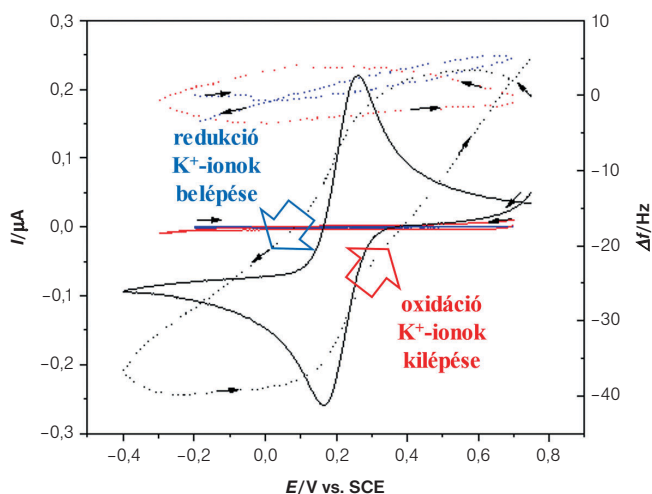
A vasionok cianidionokkal alkotott komplexei önmagukban is nagy stabilitásúak (kálium-hexaciano-ferrát (II) és (III)). Redoxreakcióik során a ligandumszféra sértetlen marad, ezért a központi ion töltésváltozását az elektrolit kationjainak kell kompenzálnia. Oldatban ennek nincs különösebb jelentősége, mert az ionok mobilitása észrevétlenül biztosítja a gyors töltéskiegyenlítőds. Valószínűleg ezért nem is gondolunk arra, hogy más a helyzet szilárd fázisban, mert a kristályrács helyhez kötöttsége következményekkel jár.

A vas(III)ionok a kálium-hexaciano-ferrát(II)-vel oldhatatlan csapadékot alkotnak. A Berliini kék, és a hozzá hasonló hexaciano-ferrátok olyan többmagvú multikomplexek, amelyekben maguk a komplexionok is ligandumokká válnak (pl. ittrium-hexaciano-ferrát(II)). A komplex ionok közé ékelődő kationok – híd-ként – lehetővé teszik az elektronszerkezet sávyszerkezetté szerveződését [3].

A vékony rétegek különleges tulajdonsága, hogy potenciálkülönbség hatására – a tovaterjedő redoxreakció eredményeképp-



pen – vezetőkké válnak. Vezetési mechanizmusukat tekintve redoxi félvezetők, mert az elektronok „átugrása” a centrumokban redoxireakciót idéz elő, és a „lyukak” az elektronokkal ellentétes irányba vándorolnak. Mivel a koordináló cianidionok száma és töltése nem változik, a redoxi reakciólánc során a töltések kompenzációja szükségszerűen az elektrolitoldat kationjaival történik. Csak az arannyal bevont kvarckristály felületére leválasztott Berlini kék-réteg nanogravimetriás vizsgálata mutatja ki a vékony réteg tömegváltozását, ami azt bizonyítja, hogy a redukciós ciklusban az elektrolitoldatból ellenionok épülnek be a szilárd fázisba, melyek az oxidációs ciklus során távoznak [3, 4] (2. ábra).



2. ábra. Aranyfelületre elektrokémiai úton leválasztott vas(III)-hexacianoferrát (II) vékony réteg ciklikus voltammetriával kombinált kvarckristály-nanogravimetriás vizsgálata 0,5 mol/dm³ koncentrációjú kálium-szulfát-oldatban. A kvarckristály saját-frekvenciájának változása bizonyítja a felületi tömegváltozást. A redukciós fázisban káliumionok épülnek be a szilárd fázisba (pontosított vonal kék nyíllal), míg az oxidációs ciklusban a káliumionok távoznak (pontosított vonal piros nyíllal). Az ábrán összehasonlításként az alkalmazott elektrolitoldatok által okozott tömegváltozás is fel van tüntetve

A redukciós ciklusban a központi ion pozitív töltésének csökkenése mellett a ligandumszféra negatív töltése változatlan marad, ezért a kiegyenlítődség érdekében a töltésfelesleg kationokat vonz a rétegbe. Az oxidációs ciklusban ennek ellenkezője történik: A központi ionok pozitív töltésének növekedése a ligandumszféra változatlansága miatt most kitaszítja a korábban belépő (pozitív töltésű) ellenionokat, ezáltal a töltés újra kiegyenlítetté válik. A redoxilépéseket a ligandumszféra változatlansága miatt töltéskiegyenlítő iontranszport követi, aminek a hajtóereje a töltésfelesleg által kiváltott elektrosztatikus vonzás, illetve taszítás.

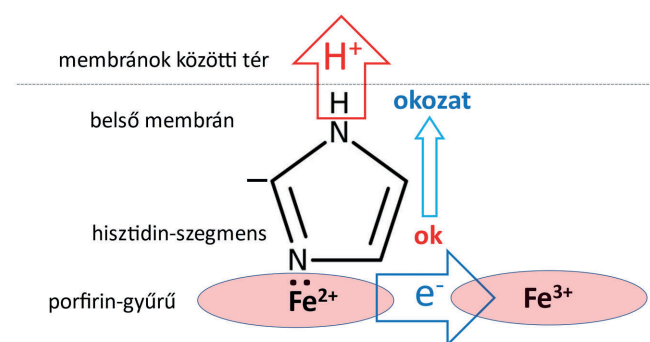
A citokrómok mint biológiai redoxi félvezetők

A multikomplexeknél szerzett tapasztalatok azért hasznosíthatók a citokrómok esetében is, mert a szerkezet és a betöltött funkció között nagy a hasonlóság. A belső membrán a folyadékkristályos szerkezet miatt szilárd vékony rétegnek tekinthető, ami ugyanúgy a redoxicentrumok helyhez kötöttségével jár, mint a hexacianát-rétegek esetében. A citokrómok éppúgy hatos koordinációjú, nagy stabilitású komplexek, mint a hexacianátok. A központi vasionok töltése ugyanúgy reverzibilisen változik 2+ és 3+ között,

mint hexacianátokban. A citokrómok éppúgy readoxireakciók láncával vezetnek az elektronokat, mint például a Berlini kék vékony rétege. Ezért az elektroneutralitás szintén nem az oldatokról, hanem a szilárd vékony rétegekre jellemzően valósul meg.

A citokrómokban azonban az egyhangú cianidionok helyett változatos a ligandumszféra. A porfiringyűrű nitrogénjei mellett a fehérje két aminosavszegmense adja a másik két ligandumot. A citokróm-oxidáz Hem₃ egysége például két imidazol jellegű nitrogénligandummal köt (hisztidin 61 és hisztidin 378) [5]. Ez a változatosság nemcsak a citokrómok redoxipotenciáljának „hangolhatóságát” eredményezi, hanem a töltéskiegyenlítődségben is meghatározó szerepet játszik. A citokrómok hisztidin N-H csoportjának köszönhető, hogy a redoxireakció során a ligandumszféra töltése – a cianidionokkal ellentétben – megváltozhat. Ezért a töltéskiegyenlítődség ellenionok vándorlása nélkül is bekövetkezik. Az aktív centrumok redoxiváltozását a citokrómok esetében savbázis reakcióval történő töltéskiegyenlítődség követi. Az oxidációs lépés során a központi ion pozitív töltésének növekedését – egy proton „letaszításával”, de leginkább átadásával, a ligandumok negatív töltésének növekedése kompenzálja.

Az aromás szerkezet miatt az imidazolgyűrű N-H csoportja eleve savas tulajdonságú. Az elektronpádonor nitrogénatom Fe²⁺-ionokkal történő komplexképzése miatt a gyűrű elektronellátottsága csökken, ezért az N-H csoport savassága nő. A központi ion oxidációjakor az indukált effektus és vele a savasság tovább fokozódik (3. ábra). A saverősség oxidáció által kiváltott növekedése válik a „protonpumpa” hajtóerejévé, ami nagyobb „hidrogénion-koncentrációjú” tér felé is képes távozásra készíteni a protonokat.



3. ábra. A töltésszétválás érzékeltetése a citokróm aktív centrumában az oxidációs elemi lépés során. A központi ion oxidációjakor a Fe³⁺-ionok megnövekedett elektronpárvonzása miatt a hisztidinligandum N-H csoportjának savassága, protonálókészsége fokozódik

A jelenség megfelel az Oláh György által alkalmazott „mágikussav-effektus” biológiai megvalósulásának: A fluorkénsav azért válik „szupersavvá”, mert az antimon-pentafluorid a fluoridionnal egy elektronpárt vonz el a központi kénatomtól. A hatás továbbterjedésével az O-H kötés még polárisabbá válik. A Lewis-sav fokozza a Brønsted-sav erejét: H⁺ → OSO₂ → F⁻ → SbF₅. A Fe²⁺-ion elektronvesztése szintén fokozza a Lewis-sav erősséget, ami által a Brønsted-sav is erősebbé válik.

A fizikai kémiai folyamatok mellett ekkor jut szerephez a biológia, a mitokondrium speciális felépítése: a kettős membrán tér-elválasztása és az enzimek elhelyezkedése. Mivel a belső membrán enzimkomplexei (a II. komplex kivételével) a membrán közötti tér felé helyezkednek el, a kitaszított protonok csak a „zárt térbe” távozhatnak. Ezáltal növekedhet a „hidrogénion-koncent-



ráció”, ami valójában az oxóniumionok, de leginkább a hidratált oxóniumionok koncentrációjának felel meg.

A redukciós lépés során hasonló a helyzet, csak ekkor a központi ion pozitív töltésének csökkenése miatt az induktív effektus csökken, valamint a negatív töltés marad feleslegben. A hisztidinszegmens anionjának bázikussága növekszik, és a fokozott elektrosztatikus vonzás eredményeképpen protonot vonz magához. Csakhogy nem a membránközi térbe „taszított” protonok közül, hanem például a citokróm-oxidáz esetében felfedezett D és K protoncsatornának mint „protonszivattyúk” segítségével a mátrix felől [6].

Az ubikinon-ubikinol átalakulás protonpumpa-járuléka

Az ubikinon-ubikinol reverzibilis átalakulása kettős szerepet tölt be: Egyrészt a NADH.H-ubikinon oxidoreduktáz (I.) enzimkomplex tagja a protonpumpa sorozatnak. Másrészt összeköti a citrátciklus elektronpártranszport-láncát az oxigénmolekulák citokrómok által támogatott redukciójának egy elektronos lépésével.

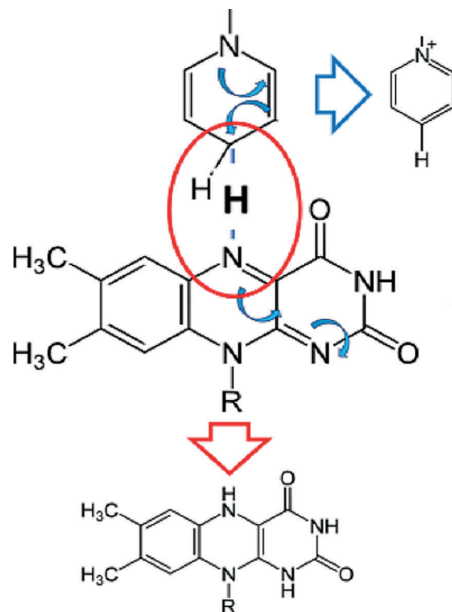
Az ubikinol molekulának azért kedvező az oxigénmolekulák párosítatlan elektronjai által igényelt mechanizmus, mert az egy elektron leadásával keletkező szemikínonyok még aromás marad, és párosítatlan elektronja konjugációs kölcsönhatásba lép a delokalizált elektronszerkezettel. Ezáltal a többlettöltés megoszlik [7]. A kinoidális szerkezet csak a második elektron elvesztése után alakul ki, és a molekula karbokationok által segített elektronpár-átrendeződéssel stabilizálódik. A második elektron elvesztése után már nincs lehetőség a többlettöltés megosztására, és az amúgy is nagy elektronegativitásával, ráadásul elektronhiánnyal való oxigénatom egy elektronpár elvonásával megbontja az aromás szerkezetet. A második elektron eltávolítása ezért több energiát igényel. Minden bizonnyal ez indokolja a növekvő redoxipotenciálú redoxicentrumok, a vas-kén fehérjék, valamint a citokróm b és c₁ szükségességét [8, 9].

Az ubikinon redukcióját a NADH.H hidridion, illetve elektronpár átvitele indítja el. Annak ellenére, hogy a reakciót a NADH.H egy lépésben, közvetlenül is megoldhatná, és az ubikinon a hidridiont fogadhatná, a folyamat több lépésben, a FAD és a vas-kén fehérjék hozzájárulásával történik [8, 9].

A reakciócentrumok elhelyezkedésének sorrendje és funkciója ugyan ismert, de a molekuláris mechanizmus ok-okozati összefüggésének feltárása még továbbfejlesztést igényel.

Ilyen például a FAD átalakulásának mechanizmusa. Ha a FAD-ot a NADH.H redukálja [8, 9] hidridion, vagyis elektronpár átvitelével [10], akkor a redukció során nem keletkezhet belőle szemikínon-gyökanion [8]. Mivel a hidridion vizes közegben éppúgy nem jelenhet meg, mint az izocitromsav dehidrogéneződése során, ezért átvitelében újból szerepet játszhat a kételektronos-háromcentrumos kötés. A proton ebben az esetben is hidat képez a NADH.H szénatomja és a FAD nitrogénatomja között az elektronpár átköltözéséhez, és átlépése után már a nitrogénatomhoz köti a protont (4. ábra). Az érkező elektronpár taszítása elindítja az szinkron elektronpár-átrendeződést, melynek következtében kialakul a redukált FADH.H forma és a NAD aromás szerkezete (4. ábra).

A FADH.H-ról – az átmeneti szemikínonállapot kialakulásának lehetősége miatt – már egyesével haladnak tovább az elektronok a vas-kén centrumokon keresztül az ubikinon felé. A több redoxicentrum mögött rejlő lehetőség elemzésére – terjedelmi okok



4. ábra. A NADH.H hidridion átvitele a FAD-ra egy kételektronos-háromcentrumos kötés segítségével játszódhat le. A proton hidat képez a NAD szénatomja és a FAD nitrogénatomja között az elektronpár átköltözéséhez. Az érkező elektronpár taszítása indítja el a két molekulára kiterjedő szinkron elektronpár-átrendeződést

miatt – itt nem térhetünk ki, de ha lehetséges, még egy következő fejezetben visszatérnék a több centrum funkciójára a vas-kén fehérjék és a citokróm-oxidáz esetében.

A 2Fe–2S vagy 4Fe–4S klasztereket tartalmazó vas-kén fehérjék éppúgy egyesével, reverzibilis lépésekkel továbbítják az elektronokat, mint a citokrómok. A vascentrumok oxidációs állapota szintén +2 és +3 között változik. Ezért ugyanúgy szükségszerű a töltéskiegyenlítő kísérő folyamat, mint a citokrómok esetében. A töltésváltozás kompenzációja történhet ellenionokkal, de a vas-kén fehérjék egyik fontos funkciója, hogy részei a protonpumpasorozatnak [8, 9]. Ezek a centrumok azonban – a citokrómokkal ellentétben – nem rendelkeznek disszociálisan ligandummal. Ezért felmerül a kérdés, hogy ennek ellenére van-e lehetőség protonok leadására.

A 4Fe–4S vas-kén fehérjékben a vascentrumok töltését a „szervetlen kénatomok” (szulfidionok) mellett a fehérje négy cisztein-oldallánca kompenzálja. A ciszteinszegmens peptidkötésének N–H csoportjában a hidrogén eleve poláris kötéssel kapcsolódik. A vas(II)ion oxidációja során az induktív effektus még éppen elérhető távolságban fejtheti ki a polaritást, és ezáltal a sávoerősséget fokozó hatását. Ezért az erősödő Lewis-sav éppúgy fokozhatja a Brösted-sav (az N–H csoport) protonáló erejét, mint a citokrómpumpák esetében.

Az elektrontranszport-lánc következménylánca

A membránok közötti tér elsavasodása egyszerre több következménnyel jár. Azáltal, hogy a membrán két oldalán megváltozik a koncentráció, a membrán külső és belső felszíne is különbözővé válik. A mátrix felől, neutrális közegben a diszperziós erők mellett a kalciumionok és a disszociált állapotú foszfocsoportok között kialakuló ionos jellegű elektrosztatikus erők, „sóhida” stabilizálják a membránt. A kalciumionok egy része tehát a foszfocsoportok által kötött állapotba kerül. A membránok közötti sa-

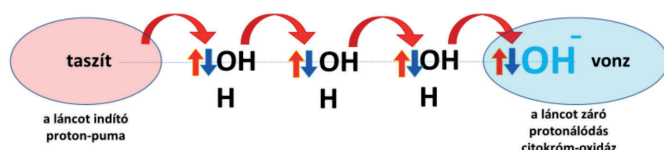


vas térben viszont – a zeolitok és a műgyanták ioncseréjéhez hasonlóan – a kalciumionok hidrogénionokra „cserélődhetnek”, és a „sóhid” helyett a hidrogénkötés veszi át a stabilizáló szerepet. Vagyis a protonok „feldúsulása” valóban megtörténik, de nem kompenzálatlanul, kondenzátor módjára, hanem a hidrogénionok membránba történő beépülésével. Ezáltal ugyanannak a kettős membránnak a belső és külső felszíne különböző szerkezetűvé, tulajdonságúvá, sőt funkciójúvá válik.

Az elsavasodó membránfelszín funkciója

A kardiolipinben gazdag membránban [11] a protonált foszfo csoportok között (szükség esetén vízmolekulák közvetítésével) hosszú távú hidrogénkötés-hálózat alakulhat ki. Véleményem szerint ez a szerkezet – a hidrogénüzemű üzemanyagcella polielektrolit Nafion membránjához hasonlóan – alkalmas a protonok membrán felszínén történő, célirányos transzportjára az ATP-szintázhoz és annak protonvezető csatornáján keresztül a citokróm-oxidázhoz.

Az elektrokémiában közismert, hogy a savas oldatok vezetése a prototróp vezetés miatt nagyobb, mint a sóoldatoké [12], mert a proton az asszociátumokon belül hidrogénkötés-láncban vándorol. A membrán felszínének hidrogénkötés-hálózatában szintén prototróp vezetés alakulhat ki. Mivel az összes sav-bázis reakció vagy a víz autoprotolízise hidrogénkötésen keresztül játszódik le, a protonvezetés elemi lépései éppúgy modellezhetők sav-bázis reakciók láncával, mint a vízmolekulák között lejátszódó prototróp vezetés (5. ábra). Így a redoxi reakciólánc sav-bázis reakciólánccal párosul, ami végül a foszfátionok és az oxigénből képződő ionok protonálódásához vezet.



5. ábra. A protonok transzportja a sav-bázis reakcióláncban. A láncot protonálással a protonpumpa kezdi és a protonálódás fejezi be. A protonok célirányos vándorlását a záró, irreverzibilis lépés kezdeményezi. Az oxigénből keletkező hidroxidion átvonz egy protont a szomszédos pillératomtól. A keletkező hidroxidion „láncvivővé” válik, mert másik protont vonz el a következő láncközi vízmolekuláról és így tovább

Amíg az elektrontranszportot az oxigénmolekulák elektronfelvétele, a protonok folyamatos és célirányos vándorlását a záró, irreverzibilis lépés kezdeményezi. A sav-bázis reakciólánc végén például az oxigénből keletkező hidroxidion elektrosztatikusan át-

vonz egy protont a szomszédos pillératomtól. Vízmolekulák láncával modellezve, a keletkező hidroxidion „láncvivővé” válik, mert másik protont vonz el a következő láncközi vízmolekuláról (vagy protonált foszfocsoportról) és így tovább (5. ábra). Mivel a közbenső „láncvivő” lépések reverzibilisek, a funkciók csoportok, molekulák folyamatos protonugrások következtében át- és visszaalakulnak.

Az elektrosztatikus vonzóerő tehát molekuláról molekulára haladva újjászületik. Mitchell koncentrációs eleme helyett az így kialakuló, atomi szintű erőcentrum válik láncközi „protonmotoros” erővé, és határozza meg pontról pontra a protonvándorlás irányát. Ezért fontos a hidrogénkötés-hálózat sértetlensége, folytonossága. A membránfelszín kristályrétegszerű rendezettsége miatt ráadásul a protonok átvezetése szinkron módon is bekövetkezhet. A protonvezető rétegben az elektronpárokat hordozó „pillératomok” helyben maradnak, és közöttük csak a „hídprotonok” mozdulnak el egyszerre, ugyanabba az irányba, a protonálódás helyszíné felé. Véleményem szerint a hosszú távú rendezettség miatt ez a mechanizmus még a vizes oldatok prototróp vezetésénél is gyorsabb, ami az eredő reakciósebesség szempontjából fontos tényező. Feltételezem, hogy az összes felfedezett vagy felfedezésre váró protonvezető csatornában szinkron prototróp vezetéssel történik a protonok transzportja a protonálódás irányába (pl. a citokróm-oxidáz protoncsatornáiban [6] és az ATP-szintáz enzimkomplex F_0 protonvezető csatornájában [8]. Az elektrontranszport-lánc által indukált protontranszportra, halmozott következményként – a következő fejezetben részletezett – élettani funkciók épülnek.

IRODALOM

- [1] P. Mitchell: David Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, Nobel Lecture. 8 December, 1978.
- [2] A. M. Morelli, S. Ravera, D. Calzia, I. Panfili: An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. *Open Biology*, 10 April, 2019.
- [3] Róka A.: Ittrium-hexacianoferrát és ruténium-triklorid – polipirrol nanokompozit felületi rétegek kialakítása és vizsgálata elektrokémiai piezoelektromos nanogravimetriával, PhD-értekezés, Budapest, 2010. Témavezető: Prof. Dr. Inzelt György, ELTE, Elektrokémiai és Elektroanalitikai Laboratórium.
- [4] A. Róka, I. Varga, G. Inzelt: Electrodeposition and dissolution of yttrium-hexacyanoferrate layers. *Electrochimica Acta* (2006) 51, 6243-6250.
- [5] Cytochrome oxidase Chemistry Libre text. Letöltés: 2021. 01. 25.
- [6] V. Sharma, M. Wikström: The role of the K-channel and the active-site tyrosine in the catalytic mechanism of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* (2016), 1857/8, 1111–1115. Letöltve: 2021. 02. 13.
- [7] Ruff F., Csizmadia G. L.: Szerves reakciómechanizmusok vizsgálata. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt. Budapest, 2000.
- [8] L. Stryer: Biochemistry. W. H. Freeman and Company, 1995.
- [9] Simonné Dr. Sarkadi L.: Biokémia, Terminális oxidáció, ppt. Letöltve: 2021. 01. 31.
- [10] Kajtár M.: A szénhidrátok szerepe az élő szervezetben, Bruckner Gy.: Szerves kémia 1–2. átdolgozott, ötödik kiadás. Tankönyvkiadó, Budapest, 1974, 1166–1247.
- [11] Nyitrai L., Pál G.: A biokémia és a molekuláris biológia alapjai, e-tankönyv, 2013.
- [12] Inzelt Gy.: Az elektrokémia korszerű elmélete és módszerei I–II. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt. Budapest, 1990.

Úrtudományi képzés indul

A Magyar Űrstratégia célkitűzéseivel összhangban 17 magyar egyetem konzorciumi megállapodást kötött, hogy a UniSpace program keretében négy önálló, de összehangolt és koordinált űrtudományi szakirányú továbbképzést indítson.

A szakirányú továbbképzés során az űrtudomány és űrtechnológia, az űrelletan és -táplálkozás, valamint a nemzetközi jog és az űrgazdaság alapjaival foglalkoznak a hallgatók. A képzésre műszaki, természettudomány vagy informatika területen szerzett, legalább BSc-diplomával lehetett jelentkezni.

