

# A BIOFIZIKA ALAPJAI

---

**KEMIOZMOTIKUS ELMÉLET**

**MEMBRÁNON KERESZTÜLI TRANSZPORT**

## Tartalom:

- A REDOXREAKCIÓK ÉS AZ ATP-SZINTÉZIS KAPCSOLATA:  
A KEMIOZMOTIKUS (MITCHELL-) ELMÉLET
  - A protonáramkör
  - Kísérleti bizonyítékok
- A BIOLÓGIAI MEMBRÁNON KERESZTÜLI PASSZÍV TRANSZPORT:
  - Passzív diffúzió
  - Közvetített diffúzió
- A BIOLÓGIAI MEMBRÁNON KERESZTÜLI AKTÍV TRANSZPORT

# A redoxreakciók és az ATP-szintézis kapcsolata

A szabadenergia forrásai és nyelői egymástól elkülönített fehérjerendszerek. Ezekben történnek az elektrontranszport redoxreakciói és a foszforilálás.

Elmélet a kapcsolódásukra:

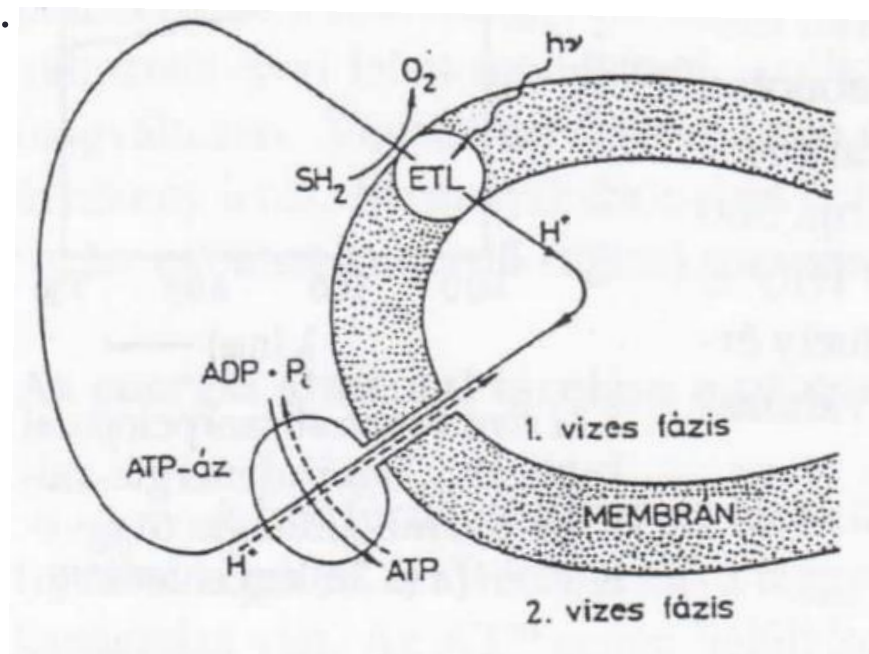
- **Kémiai hipotézis** (Slater, 1953): kémiai intermedierek kötik össze a fehérjepárokat  
Kudarc! – Nem sikerült ilyen vegyületeket találni és azonosítani
- **Kemiozmotikus elmélet** (Mitchell, 1961): A mitokondriumok, a kloroplasztiszok és a baktériumok elektrontranszportláncait az ATP szintéziséhez a proton elektrokémiai potenciálja kapcsolja.

## A kemiozmotikus (Mitchell-) elmélet

A fény abszorpciója vagy a szubsztrát ( $\text{SH}_2$ ) oxidációja során keletkező szabadenergia által meghajtott ETL protonokat pumpál, és az így létrehozott  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  elektrokémiai potenciál hajtja meg az ATPáz protonpumpáját az ATP szintézise irányában.

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\Psi - \frac{2.3 RT}{F} \Delta\text{pH}$$

**Peter Mitchell** (1920 – 1992) brit biokémikus által **1961**-ben posztulált elmélet a mitokondriumokban zajló elektrontranszportlánc elektronszállítása közben létrejött ATP keletkezésére. (kémiai Nobel-díj, 1978)

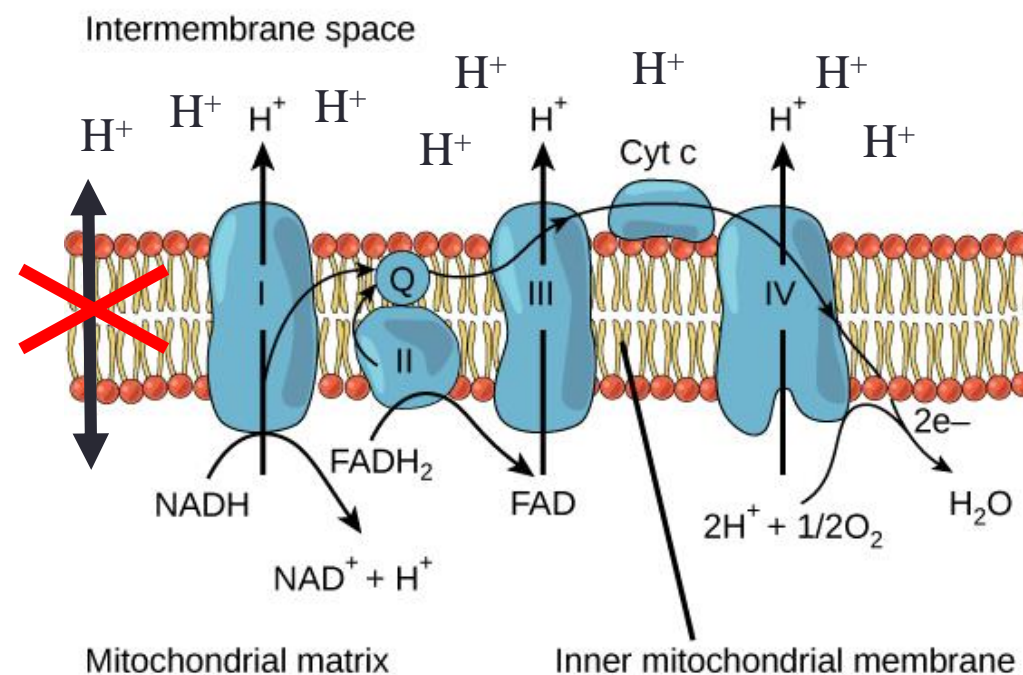


3.12 ábra. A protonok mozgása a membránon át a két protonpumpa (az elektrontranszportlánc, ETL és az ATPáz) hatására.

# A kemiozmotikus (Mitchell-) elmélet

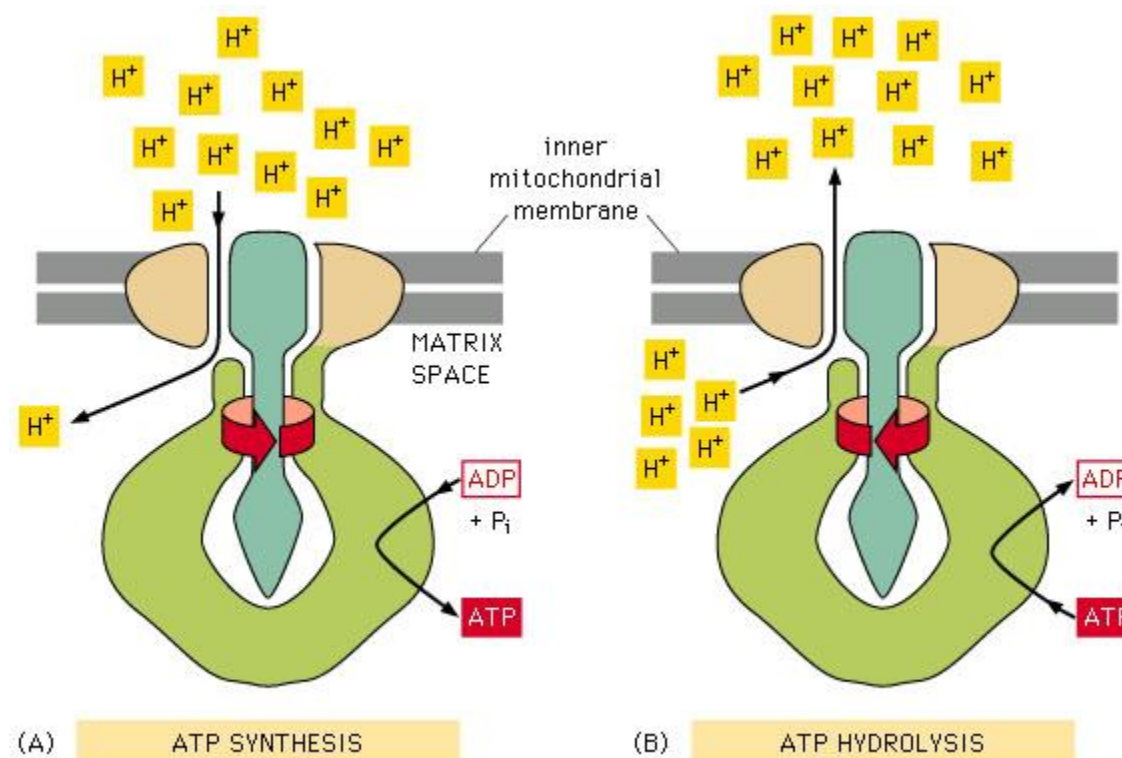
## Mitchell posztulátumai:

1. A mitokondrium belső membránjában helyezkednek el az elektrontranszportlánc enzimekkomplexei, amelyek elektronszállítás közben protonokat pumpálnak ki a külső és belső membrán közötti térbe, ami protongradiens kialakulásához vezet.
2. A belső membrán átjárhatatlan a protonok és hidroxidionok számára.



## A kemiozmotikus (Mitchell-) elmélet

3. A belső membránban található ATP-szintetizáló enzimkomplex reverzibilisen is képes működni. A protonmotoros erő értékétől függően képes ATP elbontásával (és ennek során keletkező szabadenergia felhasználásával) protonokat kipumpálni, vagy ADP-ből ATP-t szintetizálni a protonok ellentétes irányú mozgása közben.



©1998 GARLAND PUBLISHING  
kép: [www.proprofs.com](http://www.proprofs.com)

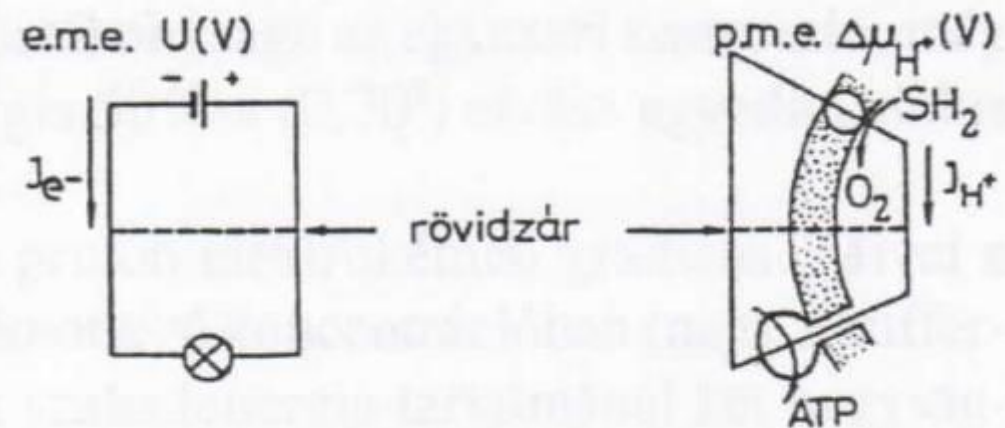
A membránon keresztüli protonmozgáshoz szorosan kapcsolódik az elektrontranszfer ill. az ATP szintézis/hidrolízis!

# A protonáramkör

A két típusú protonpumpa (ATPáz és ETL) által keltett protonmozgás az energia-átalakító membránban hasonlít az elektron mozgásához az elektromos áramkörben.

	elektromos áramkör	biológiai membrán
<b>energiaforrás</b>	redoxpotenciálkülönbség az elemben	redoxpotenciálkülönbség a légzési elektrontranszportlánc elemei között
<b>potenciál (feszültség)</b>	külső feszültség (U)	$\Delta\mu_{H^+}$
<b>áram</b>	elektromos áram	protonáram
<b>fogyasztó</b>	pl. izzó	ATP-áz

forrás: Zimányi László – Bioenergetika



3.13 ábra. Az elektromos (baloldalt) és a protonáramkör (jobbaldalt) analógiája. (e.m.e. ill. p.m.e.: elektro- ill. protonmotoros erő, ⊗: elektromos fogyasztó).

# A kemiozmotikus elmélet kísérleti bizonyítékai

## 1. A $H^+$ /ATP sztöchiometria stacionárius esetben:

Ha ATP szintetizálódik, akkor a protonmotoros erőnek nagyobbnek kell lennie a foszfát-potenciálnál:

$$\Delta\mu_{H^+} > \frac{\Delta G_{ATP}}{F}$$

Kísérletileg meghatározott protonmotoros erő ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) stacionárius viszonyok mellett  $\Delta\mu_{H^+} = 2-300\text{mV}$ . A megfigyelt foszfátpotenciál:  $5-600\text{mV} \Rightarrow$  legalább 2-3 protonnak kell a membránon (ATPáz-on) áthaladni, hogy 1 ATP szintetizálódhasson.

Kísérletileg mérések:  **$3H^+/1ATP$**  [1,2] sztöchiometriát mutattak.

1 Haraux, F., and de Kouchkovsky, Y. (1998) *Photosynth. Res.*, **57**, 231-251.;

2 Tomashuk, J. J., and Brusilov, W. S. A. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**, 493-500.

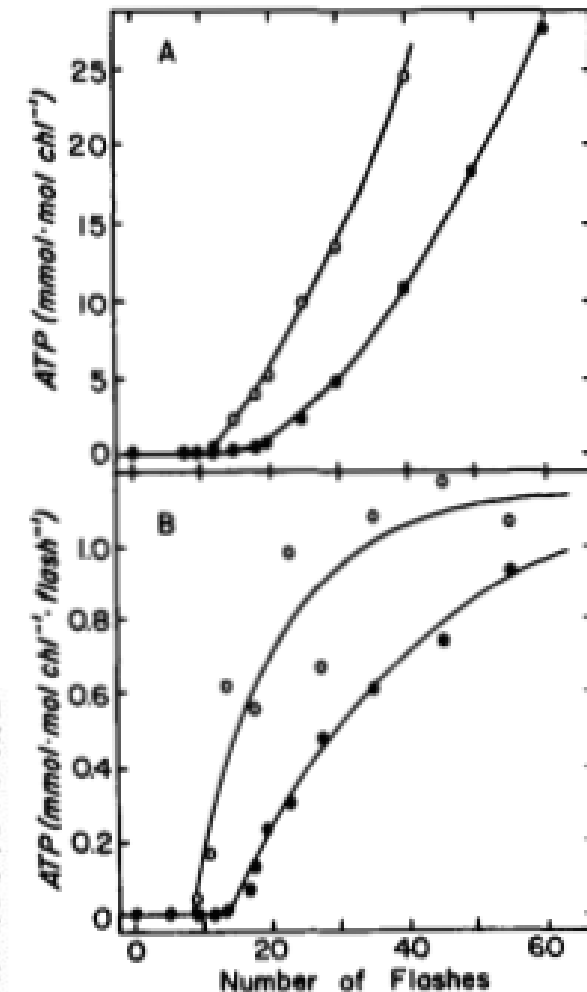


# A kemiozmotikus elmélet kísérleti bizonyítékai

## 2. Indukciós fázis az ATP termelésben

Egyedileg telítési fényfelvillanások (flashek) sorozatára az ATP termelés csak késéssel indul meg az előzőleg sötétben tartott fotoszintetikus membránokban. A néhány tíz felvillanás arra kell, hogy a tiladoid membránon keresztül kiépülhessen a protongradiensnek olyan (küszöb)szintje, amely felett az ATP már szintetizálható

FIG. 3. Dependence of ATP synthesis in DTT-reduced and untreated thylakoid membranes on the number of saturating single-turnover flashes. A shows the yield of flash-induced ATP synthesis measured at  $\Delta G_{ATP}$  of  $38.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . ATP synthesis can be observed after about 10 flashes in membranes that had been pre-treated with DTT (○), whereas unreduced membranes (●) require about 15 flashes. B shows these data expressed as ATP yield per flash. The flash yields were estimated by calculating the average yields between consecutive data points from the experiment shown in A. The data in B were computer-fit to a single first-order rise using a nonlinear least-squares analysis (28). Those data points in which no ATP was synthesized were not included in the curve fitting analysis. These results show that the onset of ATP synthesis mimics the release of tightly bound [ $^{14}\text{C}$ ]ADP (Fig. 2).



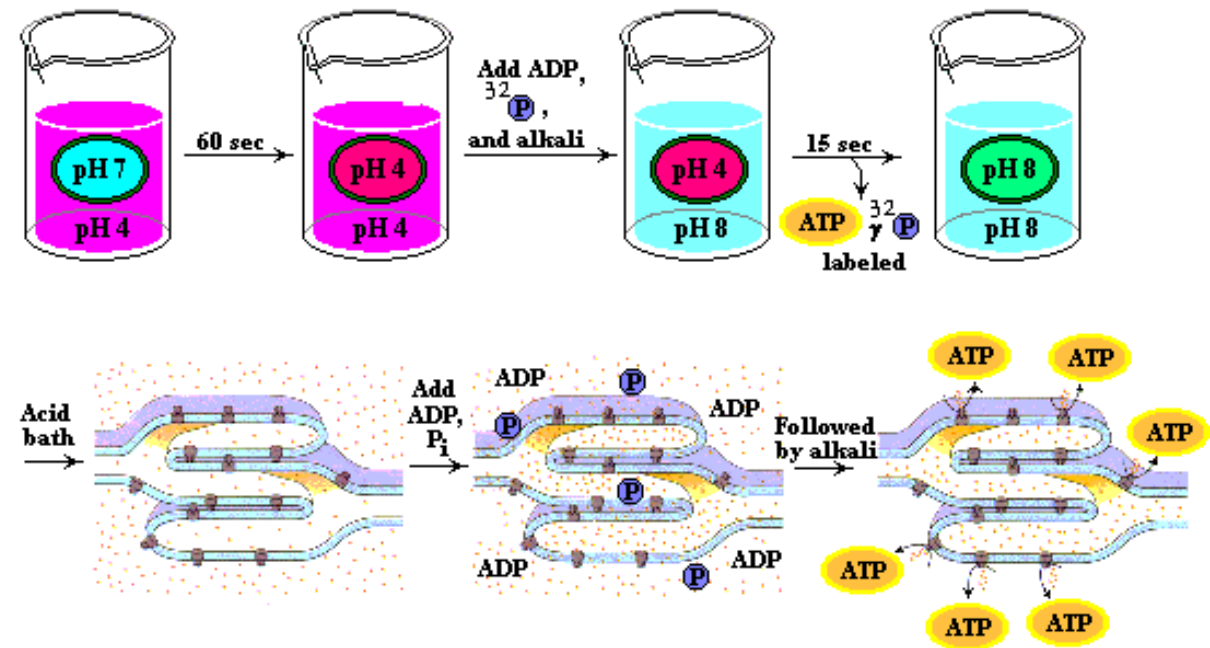
forrás: Roger P. HangarterS, Patricia Grandoni, and Donald R. Ort. The Effects of Chloroplast Coupling Factor Reduction on the Energetics of Activation and on the Energetics and Efficiency of ATP Formation, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 262, No. 28, Issue of October 5, pp. 13513-13519, 1987

# A kemiozmotikus elmélet kísérleti bizonyítékai

## 3. ATP szintézis mesterségesen létrehozott protonmotoros erővel

A foszforiláció független attól, hogy milyen formában áll rendelkezésre a proton elektrokémiai potenciálja, azaz mesterségesen felépített protongrádienssel is lehet működtetni az ATP szintézist.

ATP termelődik olyan membránokban (pl.: tilakoid), amelyekben az elektrontranszportot gátolták, és a proton elektrokémiai potenciált mesterségesen (pl.: sav-bázis ugrással) keltették. Erre példa a **Jagendorf-kísérlet**



# A kemiozmotikus elmélet kísérleti bizonyítékai

## 4. ATP szintézis membránmodellekben

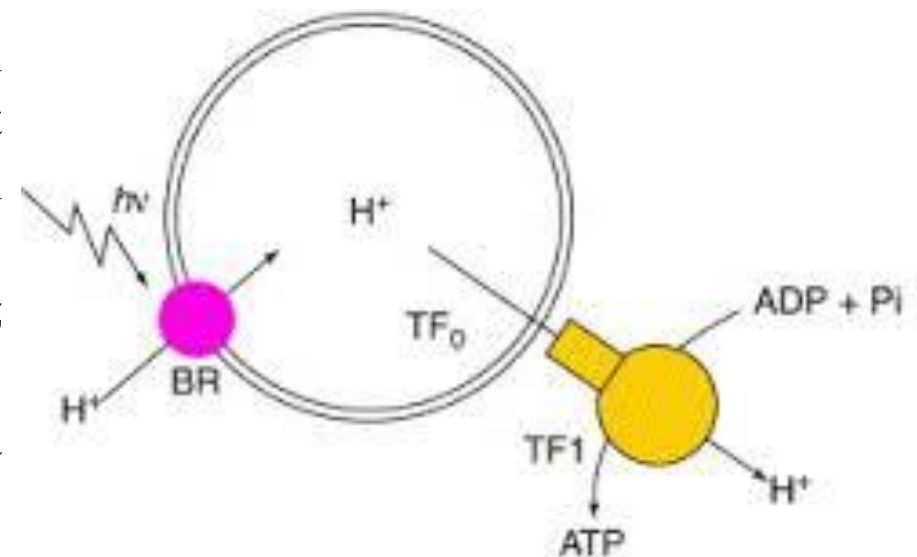
Létre tudtak hozni olyan mesterséges membránrendszert, amelyekbe a beültetett ATPáz ATP-t tudott szintetizálni. **Nincs kémiai intermedier** → tisztán mutatja a kísérlet a **csatolás kemiozmotikus** típusát

**Hibrid vezikula létrehozása:** BR tartalmú bíbor membrán, emlíős ATP-áz és exogén lipidek.

A bakteriorodopszin (BR) a *Halobacterium salinarum* sejtmembránjában működő fény által hajtott protonpumpa. Bíbor membrán formában könnyen tisztítható, és beépíthető lipid vezikulákba.

Ugyancsak tisztítható és vezikulába építhető az ATP-áz fehérje (pl. szarvasmarhából).

A mintát megvilágítva a BR protonokat transzportál a membránon keresztül, és megfigyelhető az ATP szintézis !



# A kemiozmotikus elmélet kísérleti bizonyítékai

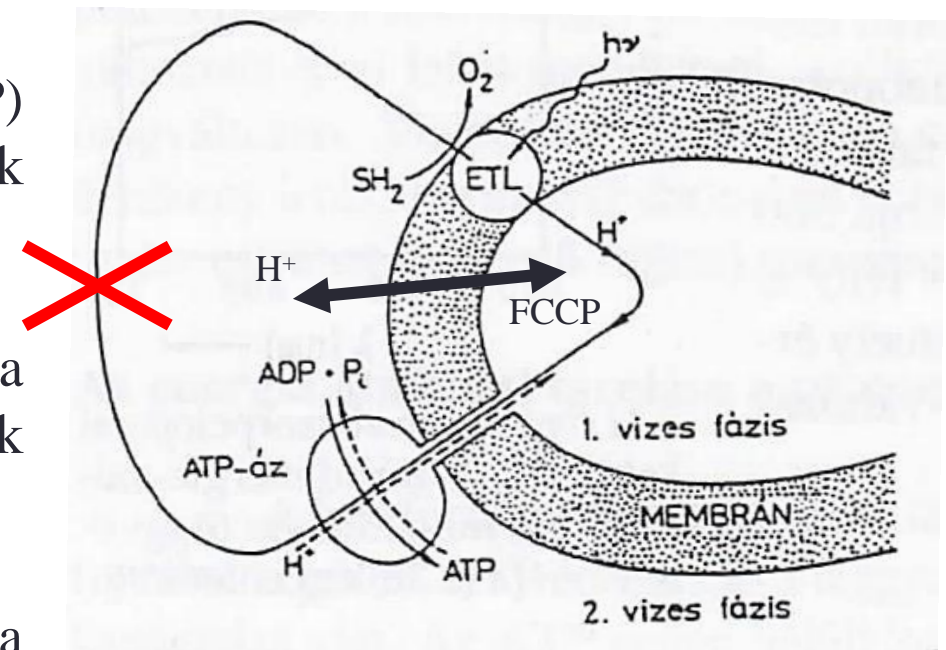
## 5. Szétkapcsoló (uncoupler) anyagok hatása

A kemiozmotikus elmélet egyik legmeggyőzőbb sikere, a szétkapcsolók működésének magyarázata.

A szétkapcsoló anyagok (pl. dinitrofenol, FCCP) elnyomják a foszforilációt, és ugyanakkor megnövelik az elektrontranszport sebességét.

Ezek az anyagok csatornát, pórusokat nyitnak a protonok számára a membránban, és ezzel megnövelik a membrán proton-vezetőképességét.

A membránban létrehozott rövidzár leterheli a protonmozgató erőt  $\rightarrow$  ATP termelés határfoka lecsökken (akár nullává is válhat)



3.12 ábra. A protonok mozgása a membránon át a két protonpumpa (az elektrontranszportlánc, ETL és az ATPáz) hatására.

# A biológiai membránon keresztüli transzport

Az élő sejt biológiailag aktív hártyái, membránok, elhatárolják a sejtet a környezettől másrészt fontos élettani funkciókat látnak el.

A membrán félig áteresztő tulajdonságú! Megszabja, hogy milyen anyagok juthatnak át rajta. A membránon keresztüli anyagtranszportot nagyrészen biofizikai jellemzők határozzák meg: molekulaméret; elektromos töltés; lipid-oldékonyság; szabadenergia

A membránon keresztül történő anyagátviteli folyamatokat három nagy csoportba osztjuk:

**I. Passzív diffúzió**

**II. Közvetített diffúzió**

**III. Aktív transzport**

## A biológiai membránon keresztüli transzport

Összehasonlítási szempont	Passzív diffúzió	Közvetített diffúzió	Aktív transzport
közvetítő anyag	membránlipidek	membránfehérjék (ionofórok)	membránfehérjék
áramlási fluxus	elektrokémiai egyensúlyban megszűnik	elektrokémiai egyensúlyban megszűnik	van még elektrokémiai gradiens ellenében is
energiaforráshoz való csatolás	nincs	esetleg közvetett	közvetlenül (általában ATP)
specifitás	nincs	nagyfokú	nagyfokú
telítés	nincs	igen nagy szubsztrát-koncentrációnál	igen nagy szubsztrát-koncentrációnál
ellentett (ion)transzport	nincs	van	van
iránya	irreverzibilis	reverzibilis	majdnem irreverzibilis
gátolható-e vegyületekkel	nem	igen	igen

4.1 táblázat. Membránon keresztüli transzportfolyamatok tulajdonságai.

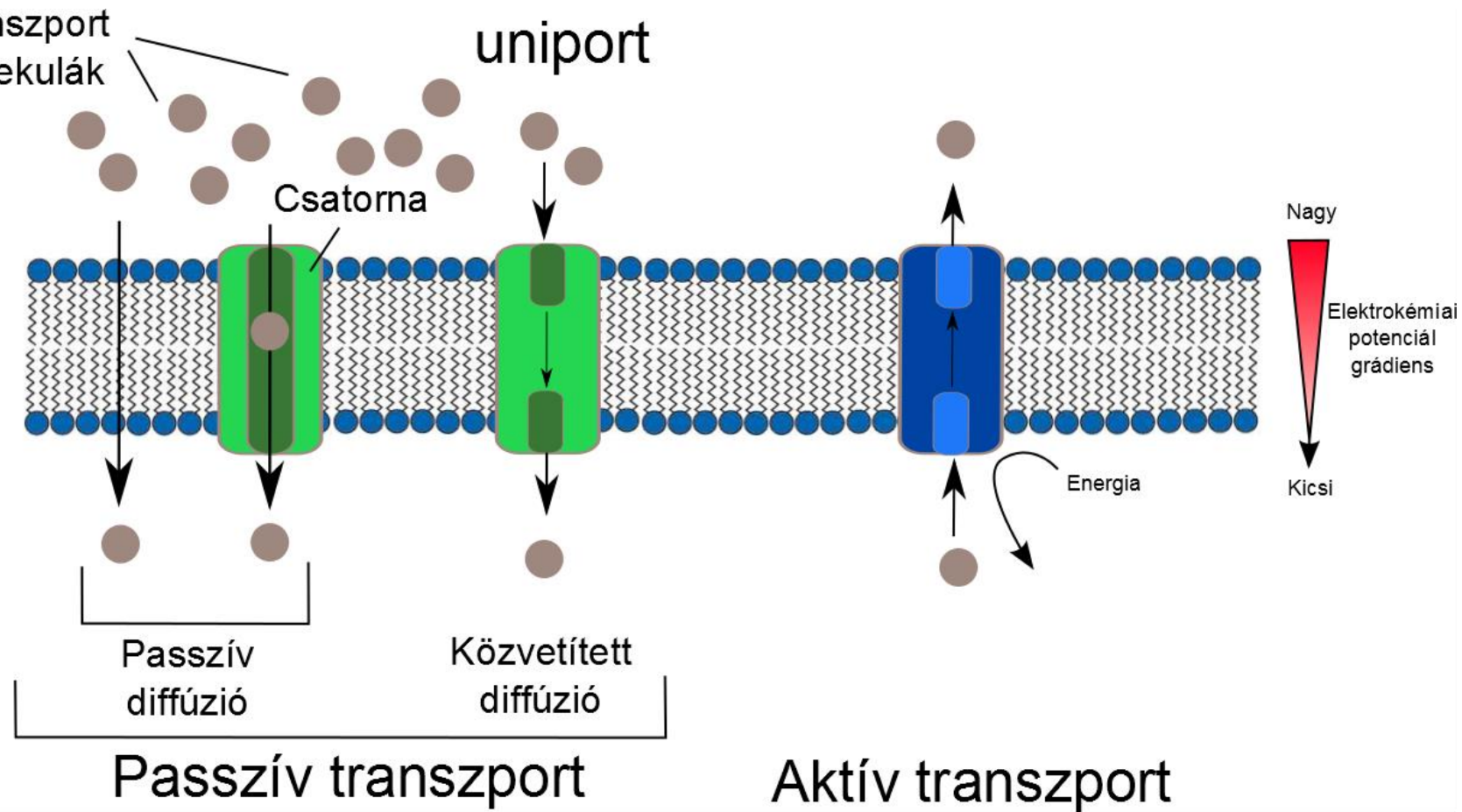
# A biológiai membránon keresztüli transzport

## Passzív transzport:

A transzportált anyag az energia-grádiens mentén „lefelé” halad

## Aktív transzport:

Valamilyen energetikailag kedvező folyamat felhasználásával (ált. ATP hidrolízis) egy más szubsztrát transzportja az energiagrádinse ellenében



# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

## Passzív diffúzió

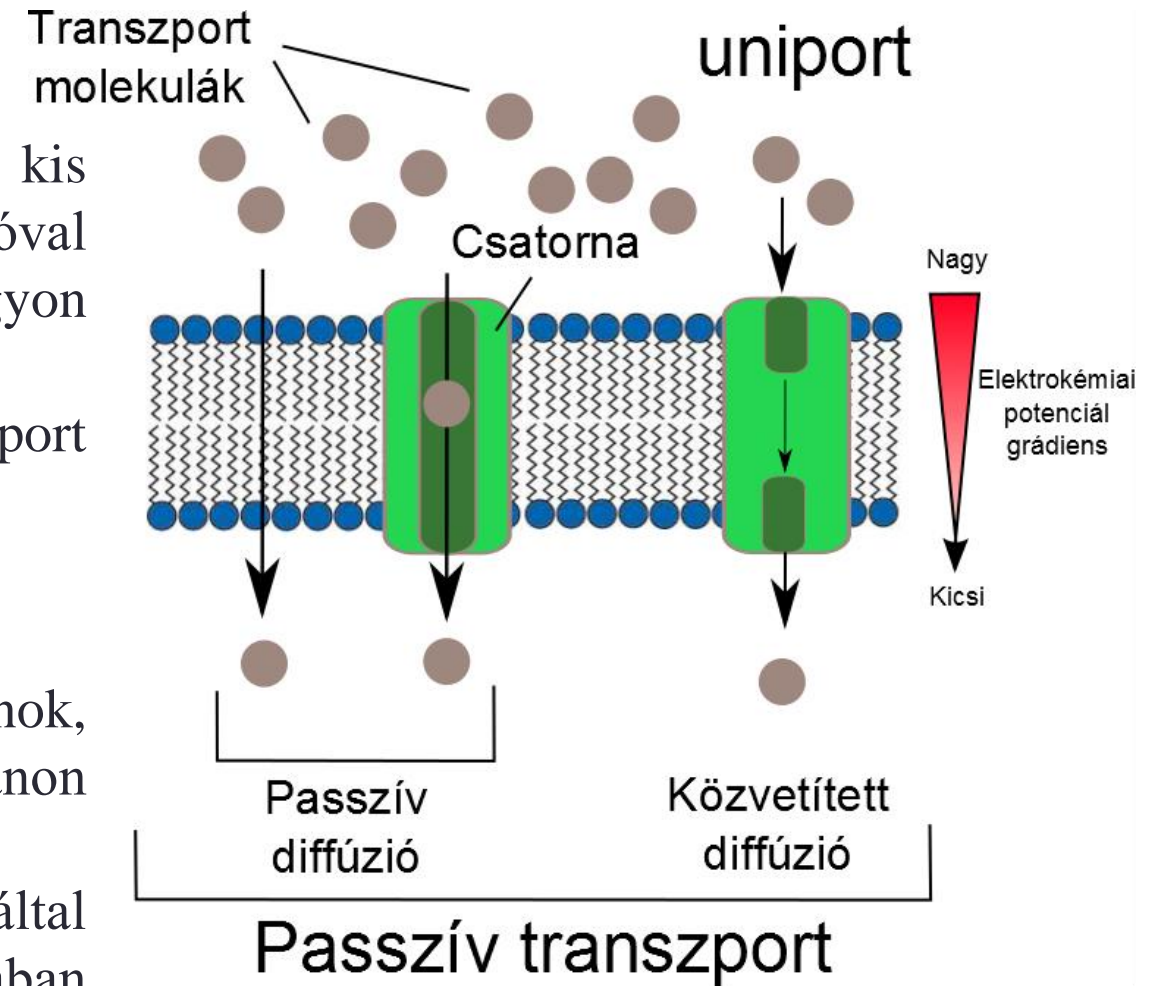
A koncentráció gradiens irányában a kis molekulasúlyú vegyületek egyszerű diffúzióval szabadon átjuthatnak a membránon, nagyon korlátozott a szervezetben

Növekvő koncentrációkülönbséggel a transzport sebessége minden határon túl növekedhet.

## Közvetített (facilitált) diffúzió

A legtöbb anyag - metabolitok, tápanyagok, ionok, makromolekulák - átjutását a membránon transzport fehérjék biztosítják.

Enzimreakciókhoz hasonlít, fehérjék által közvetített, a koncentráció gradiens irányában történik.

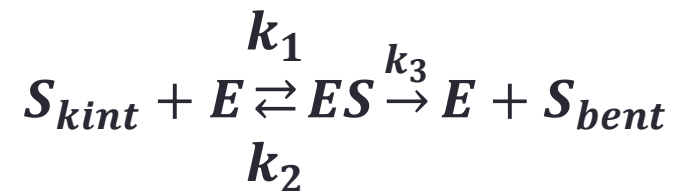




# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

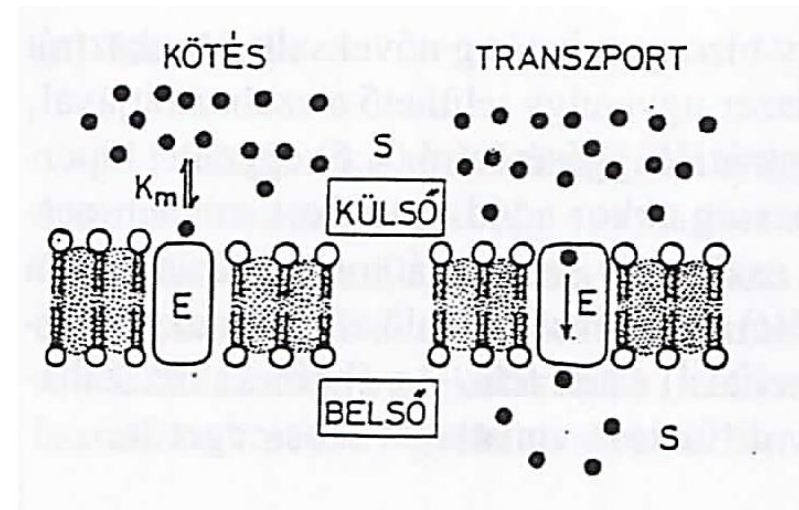
## A közvetített diffúzió kinetikája, a Michaelis-Menten egyenlet

- A  $S$  molekula (szubsztrát) átjutását a membránon egy  $E$  transzporter fehérje (permeáz) segíti.
- A szubsztrátot a permeáz reverzibilisen megköti  $\rightarrow$  komplexet képez ( $ES$ )  $\rightarrow$  átjuttatja  $\rightarrow$  elengedi.
- A folyamatot a reakciók alábbi sorozatával írhatjuk le:



- A transzport sebességének  $[S]$  koncentrációfüggése:

$$v = k_3 \cdot [E]_t \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$



4.1 ábra. A membránon keresztüli egyirányú közvetített transzport legfontosabb lépései. Az  $S$  szubsztrátot az  $E$  permeáz fehérje  $K_m$  kötési állandóval megköti a membrán külső oldalán (baloldal) és átjuttatja a belső oldalra, ahol a leválás (disszociáció) tökéletes (jobboldal). A membránt bimolekuláris lipidréteggel jelöltük.

# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

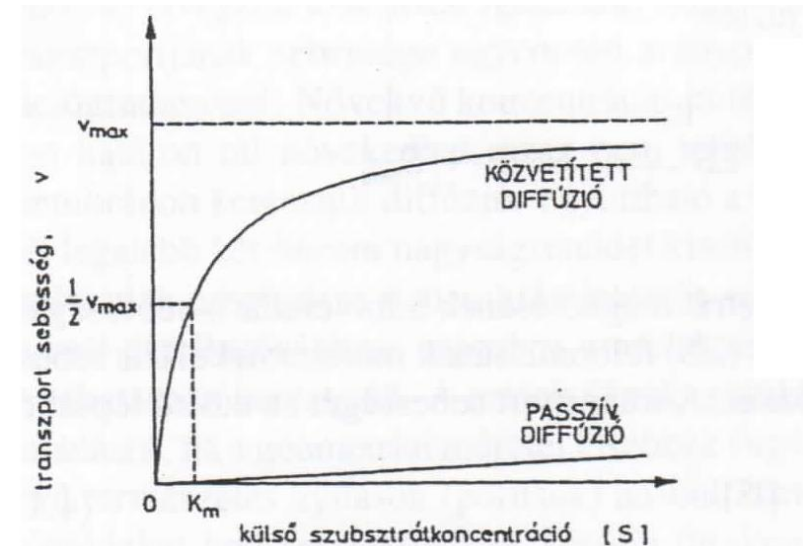
## A közvetített diffúzió kinetikája, a Michaelis-Menten egyenlet

A közvetített transzport sebessége telítési: csak egy bizonyos határig növekszik a szubsztrát koncentrációjának növelésekkor.

$K_m$  a transzportálandó anyagnak az a koncentrációja, melynél a transzport a maximális sebesség felével működik

Mivel a szubsztrát mindkét irányban átjárhatja a membránt. Emiatt a megfigyelhető transzportsebesség a kétirányú folyamat eredője lesz:

$$v = -v_{kint} + v_{bent} = v_{max} \cdot \left( \frac{[S]_{kint}}{K_m + [S]_{kint}} - \frac{[S]_{bent}}{K_m + [S]_{bent}} \right)$$



4.2 ábra. Az egyirányú közvetített transzport (Michaelis-Menten egyenlet) és a passzív diffúzió sebességének ( $v$ ) függése a külső szubsztrátkoncentrációtól. A közvetített diffúzió sebessége  $v_{max}$  értéknél telítődik, ennek felét ( $v_{max}/2$ ) a permeáz-szubsztrát rendszerre jellemző  $K_m$  koncentrációnál éri el. A passzív diffúzió nem specifikus, nem telíthető és kis sebességű.

# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

## Lehetséges transzportmechanizmusok (modellek)

Poláros szubsztrát nem képes közvetlenül átmenni a membrán hidrofób tartományán a nagy inaktivációs energia miatt. → Feltételezünk olyan anyagokat, amelyek az ionok mozgását segítik a vizes fázisból a hidrofób fázisba.

Ezek kétfélék lehetnek:

- a. Ionofórok:** kisméretű, mobilis „ionvivő” molekulák, melyek vagy hidrofób borításba csomagolják a transzportálandó iont vagy ioncsatornákat tudnak formálni a membránban
- b. Permeázok:** nagy integrális fehérjék, amelyek felgyorsítják a specifikus ionok áthaladását a membránon

# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

## Lehetséges transzportmechanizmusok: Ionofórok

Ionofór	Molekulasúly (D)	Mechanizmus	Ionszelektivitás
valinomicin	1100	mobilis hordozó	egyértékű kationok ( $K^+ \gg Na^+$ )
nigericin	724	mobilis hordozó	egyértékű kationok ( $K^+, H^+$ )
A 23187	523	mobilis hordozó	kétértékű kationok ( $Ca^{2+}$ )
gramicidin A	1882	csatornaképzés keresztirányú összekapcsolódással	egyértékű kationok
amfotericin B	924	csatornaképzés laterális összekapcsolódással	anionok > kationok

4.2 táblázat. Ionofórok tulajdonságai.

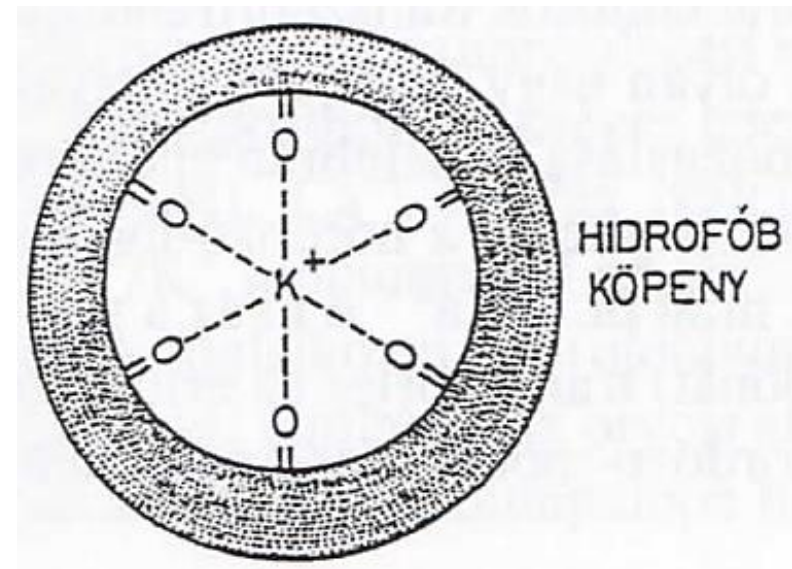
Az ionofórok által segített diffúzió ált. lassú, mivel az ionofórok membránbeli diffúziója limitálja a transzport sebességét.

# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

## Lehetséges transzportmechanizmusok: Ionofórok – mobilis hordozó

A valinomycin antibiotikum tipikus mobilis hordozó – szabadon diffundál a membrán hidrofób tartományán.

- A molekula külső felületét aminosavak hidrofób oldalláncai képezik.
- A hat vagy nyolc karboxilcsoport (C=O) oxigénatomja középre fókuszálódik, és az ide kerülő kationnal kelátot képez.
- A valinomycin nagyfokú specificitása a gyűrű szerkezetéből adódik:
  - ha az ion mérete túl kicsi nem tud kölcsönhatni az oxigénatomokkal
  - ha túl nagy, deformálja a gyűrűt

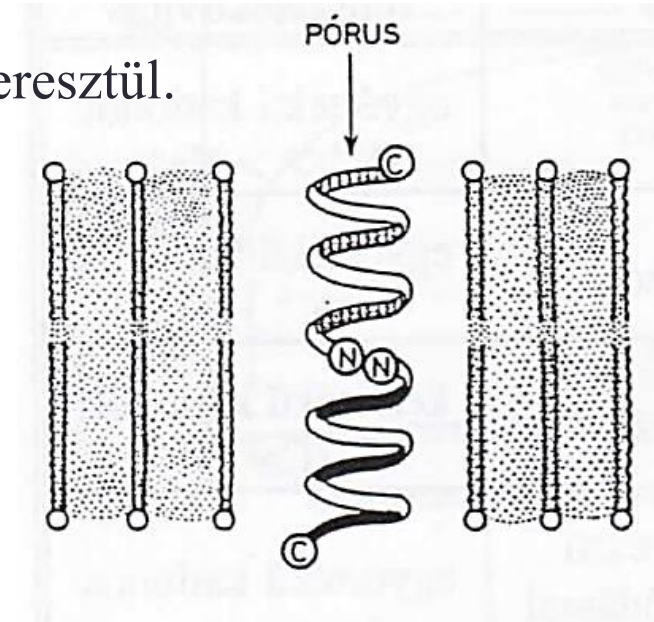


# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

## Lehetséges transzportmechanizmusok: Ionofórok – hidrofil pórusok

Az ionofórok ezen csoportja csatornát képez a membránon keresztül.

- A gramicidin A 15 aminosavja apoláros környezetben 2,5 – 3 nm hosszú és 0,4 nm átmérőjű balsodrásos hélixet képez. → túl rövid, hogy átérje a membránt
- Két gramicidin A az N terminálnál spontán össze tud kapcsolódni → átéri a membránt, rövid időre csatornát vágnak
- A csatorna hidrofil természetű – kedvez az ionáthaladásnak



4.4 ábra. A gramicidin A csatorna-képzése a membránban. Két ionofór az N termináloknál időlegesen összekapcsolódik (dimerizálódik), és néhány vízmolekulával bélelt (hidrofil) pórust (csatornát) nyit, amelyen bizonyos ionok nagy sebességgel át tudnak haladni.

# A biológiai membránon keresztüli passzív transzport

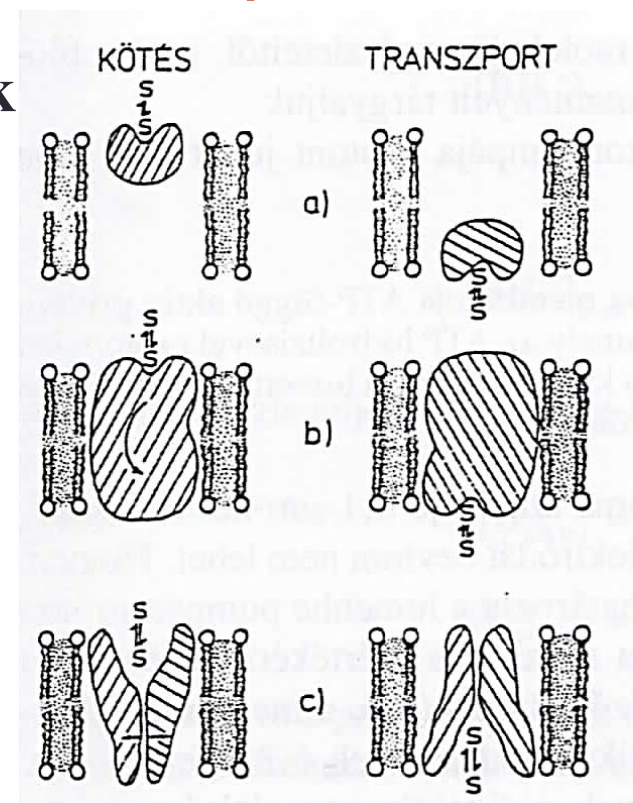
## Lehetséges transzportmechanizmusok: Permeázok

A permeázok kétállapotú kapuzott pórusok.

Korábbi elképzelések olyan hordozókat feltételeztek, amelyek **ingajáratban** közlekednek a membrán két oldala között, vagy **forgó-bukó** mozgásukkal a szubsztrát-kötőhelyet hozták a membrán külső és belső felületére.

A jelenlegi elképzelés:

- szubsztrátkötés
- konformációváltozás
- szubsztrát kiengedése a membrán másik oldalán.



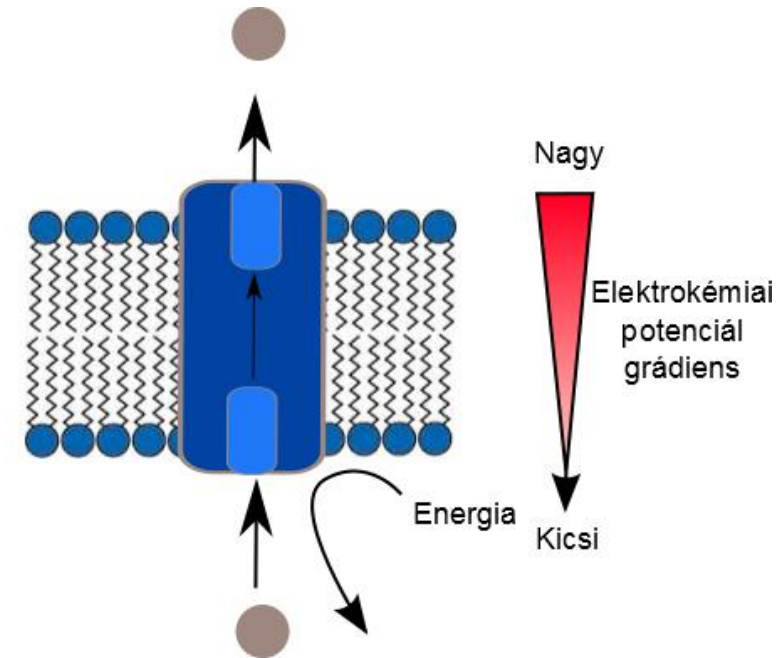
4.5 ábra. A transzportfehérjék működésének néhány elképzelhető modellje. Az S szubsztrát a fehérjéhez eltérő kötésiállandókkal reverzibilisen kötődik a membrán mindkét oldalán. A transzport a fehérjének a membránon keresztüli translációs és rotációs diffúziójával (a), csak rotációjával (b) ill. csekély elmozdulást igénylő kapunyitással (c) történhet. Az első két modell megvalósulása a fehérje jelentős elmozdulásigénye miatt valószínűtlen.

# A biológiai membránon keresztüli aktív transzport

Az aktív transzport energiaigényes, mivel a szállítás során nő a koncentrációkülönbség. A folyamat energiaigényét általában a sejt-működésből származó ATP hidrolízise fedezi.

Három fontos enzimrendszer, amelyben az ATP hidrolízise szolgáltatja a transzporthoz szükséges energiát:

- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz - 3  $\text{Na}^+$ -iont pumpál ki, míg 2  $\text{K}^+$ -iont pumpál be a sejtbe kb. tízszeres koncentráció grádiens ellenében.
- $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz – kalciumot transzportál ki a citoplazmából
- $\text{H}^+$  -pumpa - az élő sejtek működéséhez elengedhetetlen



## Aktív transzport

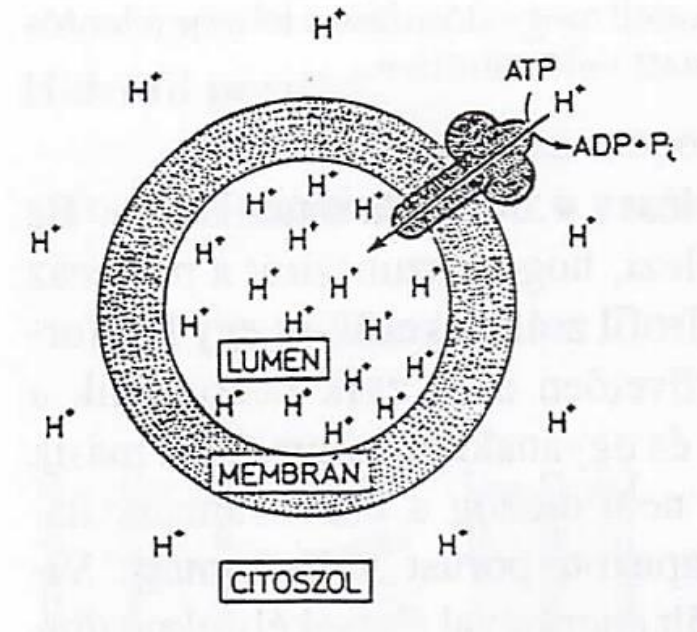


# A biológiai membránon keresztüli aktív transzport

Az orvosi alkalmazás szempontjából fontos megemlíteni, hogy

- a gyomor savasodását is protonpumpa biztosítja, valamint
- a lizoszóma membránja is tartalmaz ATP-függő protonpumpát.

A lizoszómák membránnal körülvett, változó méretű és megjelenésű organellek. Benne a kémhatás savas (pH=4-5), míg a citoszol közel semleges (pH=7,2). Ezt a pH-gradienst a lizoszóma membránjában működő ATP-függő protonpumpa tartja fenn, amely az ATP felhasításából származó kémiai energiát használja fel arra, hogy a citoplazmából protont pumpáljon a lizoszóma belsejébe.



**KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!**