

## IV. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

### 4.1 Wie gewinnen Zellen ATP?

- [ATP ist ein universeller Energie-Carrier im Zellstoffwechsel.](#)
- Bakterien erfanden einen effizienten Motor zur Synthese von ATP. Mitochondrien sind symbiontische Nachfahren aerober Bakterien. (Endosymbiontenhypothese: Entstehung der Mitochondrien durch Endosymbiose mit Bakterien)!
- Die bei der Oxidation von NADH freigesetzte Energie wird für die ATP-Synthese genutzt!
- ATP Synthese durch oxidative Phosphorylierung : Mehr als 90% der gesamten ATP-Bildung, mehr als 95% des O<sub>2</sub> wird hier "verbraucht"!

Die Zellatmung entspricht 'in der Summe' der Knallgasreaktion:

- $1/2 \text{ O}_2 + 2 \text{ H} \Rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O}$  ;
- $1/2 \text{ O}_2 + \text{ NADH} + \text{ H}^+ \Rightarrow \text{ NAD}^+ + \text{ H}_2\text{O}$  ;  $\Delta G^\circ = - 240 \text{ kJ/mol}$

Bei der Knallgasreaktion geht die Energie als Wärme verloren!! Im Zellstoffwechsel wird ein Teil der Energie zur ATP-Synthese (oxidative Phosphorylierung) genutzt:

- $\text{ ADP} + \text{ P}_i + \text{ H}^+ \Rightarrow \text{ ATP} + \text{ H}_2\text{O}$  ;  $\Delta G^\circ = + 30.5 \text{ kJ/mol}$

**Die Oxidative Phosphorylierung ist eine „kontrollierten Knallgasreaktion“:**

Die Oxidation von NADH erfolgt nicht direkt mit O<sub>2</sub>. Die Elektronen werden über eine Kette von Redoxproteinen (Atmungskette) übertragen. Diese Proteine enthalten prosthetische Gruppen, die reversibel reduziert und oxidiert werden können. Erst das letzte Redoxzentrum gibt die Elektronen an den terminalen Elektronenakzeptor (O<sub>2</sub>) ab.

- Bei der Oxidation von NADH in der Atmungskette werden Protonen aus dem Matrixraum in den IMR gepumpt. Dadurch wird ein elektro-osmotischer Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut
- Die Energie des Protonengradienten setzt sich aus dem Membranpotential und einem osmotischen Anteil zusammen!
- Der Rückfluß der Protonen treibt die **ATP-Synthase** (ein Enzym in der inneren Mitochondrienmembran).

### Lokalisation von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung

#### Die äußere Mitochondrienmembran:

- reich an Phospholipiden und Cholesterol.
- enthält Porine, die eine freie Diffusion von Molekülen bis zu ca. 10 kDa erlauben.

#### Die innere Membran:

- stark eingefaltet, enthält die Enzymkomplexe der oxydativen Phosphorylierung und Trantportsysteme für Metabolite.
- für Protonen impermeabel!

#### Intermembranraum:

- Hier befindet sich u.a. Cytochrom c und die Adenylatkinase. Die Adenylatkinase katalysiert einen reversiblen Austausch von Phosphorylgruppen im Adenylatsystem:  $2 \text{ ADP} = \text{ ATP} + \text{ AMP}$

#### Die mitochondriale Matrix

- Enthält u.a. die Enzyme des Citratcyclus und der  $\beta$ -Oxidation, das mitochondriale Genom, Ribosomen, RNAs, Metabolite usw.

## 4.2. Prinzip der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung

- Die wichtigsten Substrate sind NADH und FADH<sub>2</sub> (werden u.a. im Citratzyklus gebildet).
- Trennung von Elektronen- und Protonentransport! Die Elektronen werden über Redoxreaktionen weitergeleitet. Die Energie aus dem Elektronentransport treibt Protonenpumpen. Durch Protonenpumpen wird ein Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut.
- Der Rückfluß der Protonen treibt die ATP-Synthese (ADP + Pi => ATP).

## 4.3 Redoxcarrier

Am Elektronentransport in der Atmungskette sind eine Reihe von Elektronencarriern beteiligt. Die mitochondrialen Elektronencarrier sind entsprechend ihres Redoxpotentials „in Serie“ angeordnet !

Redoxreaktion	E <sub>0</sub> ' (V)
2 H <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup> => H <sub>2</sub>	- 0,41
NAD <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup> => NADH	- 0.32
Ubichinon + 2 H <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup> => Ubichinol	+0.04
Cytochrom b (Fe <sup>3+</sup> ) + e <sup>-</sup> => Cytochrom b	+0.08
...	...
1/2 O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> => H <sub>2</sub> O	+0.82

- negatives Vorzeichen: geringe Elektronenaffinität, z.B. NAD<sup>+</sup>/NADH<sub>2</sub> - 0.32 V
- positives Vorzeichen: hohe Elektronenaffinität, z.B. 1/2 O<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O + 0.82 V

### !! Redoxpotentiale sind konzentrationsabhängig (Nernst-Gleichung) !!

Die Richtung des Elektronenflusses und die Energetik der Redoxreaktionen wird durch die konzentrationsabhängigen Redoxpotentiale bestimmt!

## Redoxcarrier in der Atmungskette

### Ubichinon (Coenzym Q)

- mitochondriales Lipid (hydrophober Schwanz (R)), die Seitenkette (R) ist ein Polypren aus ca. 10 Isopreneinheiten.
- übernimmt Elektronen und Wasserstoff des FMN.
- kann 1e<sup>-</sup> oder 2e<sup>-</sup> transportieren (stabiles Semichinon)!
- Ubichinon übernimmt Elektronen und Wasserstoff von FMN (Komplexe I & II).
- Ubichinol wird im Komplex III reoxidiert, wobei Cytochrom c reduziert wird.

### FMN: Flavinmononukleotid

- Flavoproteine enthalten Flavinnukleotide als prosthetische Gruppen.
- FMN: Flavinmononukleotid, FAD: Flavinadenindinukleotid.
- FAD ist prosthetische Gruppe vieler Enzyme (u.a. der mitochondriale Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase)
- FMN ist Redoxcarrier in der Atmungskette (Komplex I), FAD wird im Komplex II genutzt.
- für die Synthese wird Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) benötigt.
- Die Redoxreaktion findet am Isoalloxazinring statt.
- Die Semichinon-Form ist stabil, kann 1 oder 2 Elektronen übertragen!
- Im Gegensatz zum NAD<sup>+</sup> werden hier beide Protonen vom Ringsystem gebunden.

### Fe-S-Zentren

- kleine Nicht-Häm-Eisen-Proteine.
- [2Fe-2S]: zwei Eisen sind an zwei anorganische Schwefel und vier Cysteine komplexiert.
- [4Fe-4S]: vier Eisen sind an vier anorganische Schwefel und vier Cystein-Schwefel komplexiert.

- können nur ein Elektron transportieren, treten in den Komplexen I, II und III auf

## Cytochrome

- Häm- Proteine, die sich auf Redox-Reaktionen spezialisiert haben.
- enthalten als prosthetische Gruppe Häm.
- 1 e<sup>-</sup>-Transport, verbunden mit Fe<sup>2+</sup> == Fe<sup>3+</sup>-Übergängen am Häm.

Die Cyt b, c1, a und a3 sind Membranproteine, Cytochrom c ist ein lösliches Protein, das nur locker an die Außenseite der Inneren Mitochondrienmembran bindet.

## 4.4 Die Komponenten der Atmungskette

- 4 Enzymkomplexe, 2 Kofaktoren (Ubichinon/Coenzym Q und Cytochrom C )

Komplex	Proteine	prosthetische Gruppe	Protonenpumpe?
<b>Komplex I</b> NADH-Coenzym Q Oxireduktase (NADH-Dehydrogenase)	35	FMN, Fe-S	ja
<b>Komplex II</b> Succinat-Coenzym Q Oxireduktase (Succinat-Dehydrogenase)	4	FAD, Fe-S, Häm b <sub>560</sub>	nein
<b>Komplex III</b> Coenzym Q-Cytochrom C Oxireduktase	10	Häm b <sub>562</sub> , Häm b <sub>566</sub> , Häm c1, Fe-S	ja
<b>Komplex IV</b> Cytochrom C Sauerstoff Oxireduktase Cytochrom C Oxidase	13	Häm a, Häm a3, CuA, CuB	ja

### Komplex I:

NADH<sub>2</sub>/NAD<sup>+</sup> ==> FMNH<sub>2</sub>/FMN ==> FeS( Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ) ==> Q/QH<sub>2</sub>

Inhibitoren: Amytal, Rotenon, Piercidin (Therapie mit Riboflavin), Barbiturate

Amytal hemmt den Elektronentransfer im Komplex I durch Bindung an ein Fe-S-Protein

### Komplex II: keine Protonentranslokation!

Succinat ==> {FAD ==> Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> ==> Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> ==> Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>} ==> Q/QH<sub>2</sub>

### Komplex III

Übergang vom 2e<sup>-</sup>-Transport zu 1e<sup>-</sup>-Transport. 2 Elektronen werden sequentiell transportiert (das zweite e<sup>-</sup> wird durch das Cyt<sub>566/560</sub> System in Warteposition gehalten: **Coenzym-Q-Zyklus**).

QH<sub>2</sub>/Q ==> Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ==> Cyt b ==> Cyt c1 (==> Cyt c)

Inhibitor: Antimycin A blockiert den Elektronentransfer zwischen Cyt b und Cyt c1

### Komplex IV: Cytochrom C-Oxidase, das von Otto Warburg 1924 entdeckte Atmungsferment

- gehört zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Membranprotein, 2 Hämgruppen, CuA und CuB).
- terminales Enzym der Atmungskette. 4 Protonen werden über die Membran gepumpt.

(Cyt C ==>) Häm a/ CuA ==> Häm a3/CuB ==> O<sub>2</sub>/2H<sub>2</sub>O

**Netto-Reaktion:**  $4 \text{ cyt } c(\text{Fe}^{2+}) + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightleftharpoons 4 \text{ cyt } c(\text{Fe}^{3+}) + 2\text{H}_2\text{O}$

Inhibitoren:  $\text{CN}^-$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ; Cyanid bildet einen Komplex mit der  $\text{Fe}^{3+}$ -Form der Cytochromoxidase, Co bindet an den  $\text{Fe}^{2+}$ -Porphyrin-Komplex des Enzyms.

**Die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch Cyt. C-Oxidase ist ein stark exergoner, irreversibler Prozess!**

## Protonentranslokation in der Atmungskette

**Chemische Protonen:** 4 Matrix-Protonen/  $\text{O}_2$  werden zur Bildung von Wasser (Cytochromoxidase) verbraucht!

**Protonenpumpen:** Protonen bewegen sich entlang von *proton wires* (Kanäle). Die Redoxreaktionen induzieren den Protonentransport über Veränderungen der Konformation der ionisierbaren Seitenketten der Kanalproteine

Im Komplex II ist der Elektronentransport **nicht** mit einer Protonenverschiebung verbunden!.

## 4.5 ATP-Synthese

### Chemiosmotische Kopplung (Mitchell, Nobelpreis 1978)

- Komplexe I, III und IV nutzen Energie aus dem Elektronentransport, um Protonen in den IMR zu pumpen.
- Die innere Mitochondrienmembran ist nicht permeabel für Protonen. Ein Membranpotential entsteht: Ladungsdifferenz plus  $\Delta \text{pH}$ .

### Komplex V: die ATP-Synthase

- Die Energie des Gradienten wird in der ATP-Synthase unter kontrolliertem Rückfluß der Protonen in die Matrix für die Synthese von ATP aus ADP und  $\text{P}_i$  genutzt.
- Die ATP-Synthase besteht aus zwei „Teilen“: der transmembranalen Teil  $\text{F}_0$  (Protonenkanal) und dem mitochondrialen Teil  $\text{F}_1$ . Die ATP-Synthase besteht aus insgesamt 8 verschiedenen Protein-Untereinheiten.
- **Oligomycin** hemmt die ATP-Synthase (Bindung an den  $\text{F}_0$ -Teil).
- Das Enzym wird durch den Protonenflux, ähnlich wie ein Elektromotor, in eine Drehbewegung versetzt. Die Drehbewegung wurde auf der Ebene einzelner Moleküle nachgewiesen!

## 4.6 P/O-Quotienten

- Bei der Oxidation von NADH werden ca. 2.5 mol ATP /1/2 mol  $\text{O}_2$  gebildet (**P/O =2.5**).
- Bei der Oxidation von  $\text{FADH}_2$  werden ca. 1.5 mol ATP/1/2 mol  $\text{O}_2$  gebildet (**P/O =1.5**)

NADH wird über die Komplexe I, III und IV oxidiert (ca. 10 Protonen). Bei der Oxidation von Succinat werden die Komplexe II (keine Protonenverschiebung), III und IV genutzt (ca. 6 Protonen).

### Oxidative Phosphorylierung versus Substratkettenphosphorylierung

Etwa 95% der ATP-Synthese erfolgt durch oxidative Phosphorylierung, der Anteil der Substratkettenphosphorylierung beträgt nur ca. 5% Anteil! Vorteil des **aeroben** Stoffwechsels ist die höhere Energieausbeute: 1 Mol Glucose ergibt 32 bzw. 34 Mol ATP, während durch Substratphosphorylierung in der Glykolyse nur 2mol ATP/mol Glucose gebildet werden.

## 4.7 Energiekopplung

Energieübertragung von der exergonen NADH-Oxidation auf die physikalisch getrennte endergone ATP-Synthese. Die Kopplung erfolgt durch den Protonengradienten. **Entkopplung:** „Kurzschluß“ im  $\text{H}^+$ -Gradienten führt zum Abbau des Membranpotentials unter Wärmebildung.

## Entkoppler:

A) Leicht protonierbare, lipophile Substanzen. Nehmen an der Außenseite der Membran Protonen auf, diffundieren in der Membran, bis sie auf der Matrixseite auftauchen und dort ihr Proton auf Grund der niedrigen  $H^+$ -Konzentration abgeben. **Beispiel: 2,4-Dinitrophenol**

B) UCP-Proteine: Physiologische Entkoppler

Die UCP-Proteine bilden eine Proteinfamilie (UCP-1,... UCP-5) !

UCP-1 (uncoupling protein-1) ist das seit langem bekannte Thermogenin, das im braunen Fettgewebe von Säuglingen und Winterschläfern exprimiert wird.

UCP-2 (ca. 59% Homologie zu UCP-1) wird auch beim Erwachsenen in vielen Geweben exprimiert und ist an der Regulation des Stoffwechsels (Thermoregulation, Körpergewicht,..) beteiligt!

## 4. 8 Für die Oxidative Phosphorylierung werden Transportsysteme in der Inneren Mitochondrienmembran benötigt!

Die innere Mitochondrienmembran ist für ATP, ADP,  $H^+$ ,  $P_i$  und NADH **nicht** permeabel. Die ATP-Synthase benötigt ADP und  $P_i$  auf der Matrix-Seite. Das in den Mitochondrien gebildete ATP wird vor allem im Cytosol gebraucht!

- ATP- ADP-Antiporter, Phosphat -  $H^+$  -Symporter
- Transporter für cytosolisch gebildetes NADH: Glycerinphosphat-Shuttle und Malat-Aspartat-Shuttle

### ATP/ADP-Antiporter (ATP/ADP-Translokase): Transport von ATP ins Cytosol!

- macht ca. 14 % des Proteingehalts der IMM aus.
- Pro Transportcyclus wird netto ein  $e^-$  auf die IMR-Seite der Membran transportiert, die dort ein  $H^+$  neutralisiert.
- Energieverbrauch (ca. 20% der Energie des  $H^+$ -Gradienten) ! Hemmbar durch Atractylosid!

### Phosphat / $H^+$ -Symporter ( $P_i$ -Transporter)

- transportiert das für die ATP-Synthese notwendige  $P_i$  in die Matrix.
- nutzt den  $H^+$ -Gradienten als Energiequelle.

### NADH-Shuttle

Es gibt **keine** Transporter für NADH/ $NAD^+$ . Die Oxidation von cytosolischem NADH ist auch für den Ablauf cytosolischer Prozesse wichtig! Um im Cytosol gebildetes NADH in der Atmungskette zu oxidieren, werden nur die Elektronen des NADH in die Mitochondrien transportiert.

### Der Glycerin-3-phosphat-Shuttle

Die Elektronen des NADH werden auf FAD übertragen.  $FADH_2$  gibt die Elektronen an Ubichinon weiter. Da der Komplex I der Atmungskette „übergangen“ wird, werden hier nur ca. 1.5 mol ATP/ mol NADH gebildet!

- irreversibel, kann Elektronen des cytosolischen NADH gegen einen NADH-Konzentrationsgradienten in die Atmungskette pumpen! **Schnell!**

Zwei Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen sind beteiligt:

- cytosolisches ( $NAD^+$ -abhängiges) Enzym
- ( $FAD$ -abhängiges) Enzym an der Außenseite der IMM.

Im Cytosol katalysiert die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase die Oxidation des NADH durch Dihydroxyacetonphosphat. Es entsteht 3-Phosphoglycerin. Die Elektronen des 3-Phosphoglycerins werden auf FAD übertragen und Dihydroxyacetonphosphat zurückgebildet. FADH<sub>2</sub> überträgt seine Elektronen auf Ubichinon.

### Aspartat-Malat-Shuttle

Gewebe mit gleichbleibenden Energieverbrauch (Leber, Niere, Herzmuskel) nutzen den langsameren, aber effizienteren Aspartat-Malat-Shuttle.

Cytosolisches NADH wird durch eine cytosolische MDH oxidiert. Dabei wird Malat gebildet, das mit Hilfe eines Carriers in die Matrix transportiert wird. Durch eine mitochondriale MDH wird in der mitochondrialen Matrix Malat unter NADH-Bildung reoxidiert. Die anderen Reaktionen dienen dem Recycling von Oxalacetat! Dieser Shuttle arbeitet reversibel und ist auf hohe NADH/NAD<sup>+</sup>-Quotient im Cytosol angewiesen!

#### Carrier:

- Malat-  $\alpha$  -Ketoglutarat-Carrier *plus* Aspartat-Glutamat-Carrier

#### Enzyme:

- MDH: Malat-Dehydrogenasen (cytosolisch & mitochondrial)
- ASAT: eine Aminotransferase (cytosolisch & mitochondrial)

## 4.9 Kontrollierte Atmung: Elektronen werden nur dann auf O<sub>2</sub> übertragen, wenn ADP zu ATP phosphoryliert wird.

Die ATP-Synthese wird unter physiologischen Bedingungen durch die Konzentrationen von O<sub>2</sub>, NADH, ADP und P<sub>i</sub> kontrolliert. Wenn ADP der limitierende Faktor ist (*state 4*), spricht man von kontrollierter Atmung.

- **Anpassung der Geschwindigkeit der ATP-Synthese an den ATP-Verbrauch (ADP-Bildung).**

#### Mechanismen:

Protonentranslokation in den Komplexen I, III und IV erzeugt einen Protonengradienten ( $\Delta p$ ), dessen Energie ( $\Delta p$ , proton motive force) sich aus dem Membranpotential und dem Protonengradienten zusammensetzt. Die Atmungskontrolle beruht auf einer Hemmung der Protonentranslokation durch steigende Werte des Membranpotentials. Bei geringem Energieverbrauch kommt es zum Anstieg des Membranpotentials **und** zum Anstieg des mitochondrialen ATP/ADP-Verhältnisses. ADP aktiviert die Cytochromoxidase allosterisch und ist Substrat der ATP-Synthase (Substrataktivierung).

- Steigende Werte des  $\Delta p$  Gradienten 'hemmen' die Protonenpumpen!
- ADP aktiviert die Cytochromoxidase und die ATP-Synthase,

## 4.10 Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung kann auf verschiedenen Stufen gehemmt werden:

- Elektronentransport in der Atmungskette, ATP-Synthase, Transportproteine

Hemmstoff	Funktion	Wirkungsort
Rotenon, Amytal	Hemmung des e <sup>-</sup> -Transports	Komplex I
Antimycin A	Hemmung des e <sup>-</sup> -Transports	Komplex III
Cyanid, CO	Hemmung des e <sup>-</sup> -Transports	Komplex IV
2,4-Dinitrophenol	Entkoppler	H <sup>+</sup> -Carrier
Oligomycin	Hemmstoff der ATP-Synthase	ATP-Synthase (F <sub>0</sub> )

Aurovertin	Hemmstoff der ATP-Synthase	ATP-Synthase (F <sub>1</sub> )
Attractylosid	Hemmung der ATP-Ausschleusung	ATP-ADP-Antiporter

## 4.11 Pathobiochemie

**A) Cyanidvergiftung** ("Agatha Christie", Metallindustrie, Galvanisierung )

**B) Hypovitaminosen** (Riboflavin (FMN, FAD), Niacin (NADH))

### C) Angeborene Störungen: Mitochondriopathien

Die mitochondriale DNA (mt-DNA) codiert ca. 12 Untereinheiten von mitoch. Proteine ( plus 22 tRNAs und 2 rRNAs), ca. 70 der Proteine, die an der ox. Phosphorylierung beteiligt sind, werden durch Kern-DNA codiert! Die Untereinheiten der Enzymkomplexe sind teils kerncodiert, teils mitochondrial codiert. Defekte mitochondrial codierter Untereinheiten werden maternal vererbt!

Die Bildung freier Radikale (z.B. in der Cyt c-Oxidase-Reaktion) führen zu mt-DNA-Schäden! In den Mitoch. sind DNA-Reparaturmechanismen wenig effektiv, deshalb resultieren DNA-Schäden vergleichsweise häufig in Mutationen ! Mit zunehmenden Alter akkumulieren somatische mt-DNA-Mutationen und tragen zu degenerativen Erkrankungen bei. Beschrieben sind Defekte aller Komplexe der oxidativen Phosphorylierung mit überwiegend neuromuskulären Symptomen und Stoffwechseldefekten.

#### Kerncodierte Defekte

- Leigh-Syndrom, eine hereditäre mitochondriale Encephalomyopathie, oft durch [Defekte der Cytochrom c-Oxidase](#).

#### Maternal vererbte Defekte der mitochondrialen Multienzym-Komplexe

- [LHON: Lebersche hereditäre Optikus-Neuropathie](#) (Komplex I & III)
- [MELAS \(Komplex IV\)](#): mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactacidose, Schlaganfall
- [MERRF](#) & [NARP](#) (ATP-Synthase)

## 4.12. Extramitochondrialer O<sub>2</sub>- "Verbrauch"

**Ca. 95% des O<sub>2</sub> werden in den Mitochondrien bei der oxidativen Phosphorylierung "verbraucht"!**

### 4.12.1 Oxidasen und Oxygenasen (Oxidoreduktasen)

#### 4.12.1.1 Oxidasen

- katalysieren Reaktionen, bei denen O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor dient, übertragen Substrat-Wasserstoff auf Sauerstoff!
- Flavoenzyme (FMN, FAD.), Metalloenzyme!

A) Bei der Reduktion von O<sub>2</sub> mit 2 e<sup>-</sup> wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet!

B) Bei der Reduktion von O<sub>2</sub> mit 4 e<sup>-</sup> wird H<sub>2</sub>O gebildet!

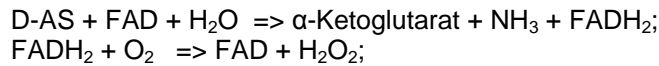
#### Beispiele:

##### **L- und D-Aminosäureoxidasen**

dehydrieren α -Aminosäuren zu Iminosäuren und übertragen den aufgenommenen Wasserstoff auf O<sub>2</sub> hydrolysieren die Iminosäuren unter NH<sub>3</sub>-Bildung. Irreversible Reaktionen!

- L-Aminosäureoxidasen im ER (FMN)
- D-Aminosäureoxidasen in Peroxisomen (FAD)

## Reaktion der D-AS-Oxidasen



## NADPH-Oxidase

- katalysiert die Bildung reaktiver Superoxidanionen in Phagosomen und Peroxisomen von neutrophilen Granulozyten. Membranprotein!
- $2 \text{O}_2 + \text{NADPH} \Rightarrow 2 \text{O}_2^{\cdot -} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$

**Monoaminoxidasen (MAO, EC 1.4.3.4).** FAD-Proteine, oxidieren vorwiegend primäre Amine mit einer basischen Gruppe im Molekül. (z.B. GABA).

**MAO-Enzyme** (FAD-Enzyme, an der äußeren Mitochondrienmembran) katalysieren die oxidative Deamination von Aminen. Die Enzyme sind wichtig für die Inaktivierung von neuroaktiven und vasoaktiven Aminen. Zwei Isoenzyme (MAO-A und MAO-B) werden von zwei X-chromosomalen Genen codiert und unterscheiden sich u.a. in der Substrat- und Inhibitorspezifität

MAO-A oxidiert bevorzugt .Serotonin, Noradrenalin, Adrenalin). MAO-B inaktiviert u.a. Benzylamin und Phenylethylamin.

Reaktion:  $\text{RCH}_2\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 = \text{RCHO} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ .

**MAO-Hemmer:** Anwendung. z.B. als Psychopharmaka. Irreversible und reversible Inhibitoren. Es gibt auch selektive MAO-A-Inhibitoren.

**Diaminoxidasen (DAO, EC 1.4.3.6).** Oft  $\text{Cu}^+$ -Proteine, oxidieren die primäre Aminogruppe in Metaboliten mit insgesamt 2 basischen Gruppen (z.B. Histamin)

## 4.12.1.2 Oxygenasen katalysieren Redoxreaktionen, bei denen Sauerstoff in Substrate eingebaut wird!

### Dioxygenasen

- katalysieren Reaktionen, bei denen **beide O-Atome des  $\text{O}_2$**  in die Substratmoleküle gelangen!
- Oft Häm-Enzyme!

### Beispiele:

Cyclooxygenase (Dioxygenase & Peroxidase)

Lipoxygenase (Synthese der Leukotriene)

### Prokollagen-Prolylhydroxylase:

Prokollagen-Prolin +  $\alpha$ -Ketoglutarat +  $\text{O}_2 \Rightarrow$  Prokollagen-4-Hydroxyprolin + Succinat +  $\text{CO}_2$

Hier wird in ein O-Atom in das Prolin eingebaut, das andere zur Oxidation des  $\alpha$ -Ketoglutrats genutzt!

### Monoxygenasen

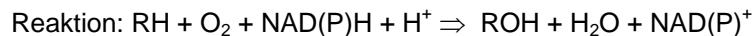
- katalysieren Reaktionen, bei denen ein O-Atom in das Substrat eingebaut wird und das zweite O-Atom im  $\text{H}_2\text{O}$  erscheint!
- werden auch als Hydroxylasen oder mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet!
- benötigen zwei Substrate. Ein Substrat stellt die H-Atome bereit, das andere nimmt ein O-Atom auf!
- $\text{A} + \text{BH}_2 + \text{O-O} \Rightarrow \text{A-OH} + \text{B} + \text{H}_2\text{O}$

### Cytochrome P450 - eine Superfamilie von Proteinen mit verschiedenen Funktionen.

- große Enzymfamilie (> 200), Absorptionsmaxima bei 450 nm.
- enthalten FMN (oder FAD) und Häm!
- $\text{P}_{450}$ -Enzyme im ER von Leberzellen ( $\rightarrow$  Biotransformation) und in Mitochondrien der NNR ( $\rightarrow$

Steroidbiosynthese).

- katalysieren die Inaktivierung vieler Arzneimittel und Xenobiotica in der Leber.
- Viele Medikamente werden durch P<sub>450</sub>-Isoenzyme (1A2, 2C9, 2C19, 2D6,...) inaktiviert!



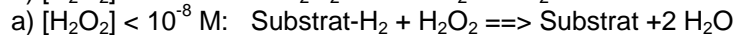
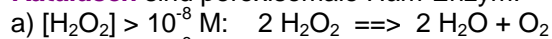
#### 4.12.2 O<sub>2</sub>-Verbrauch in Peroxisomen und im ER

##### A) Peroxisomale Oxidasen

- Acyl-CoA Oxidase
- Polyaminoxidase (Abbau von Spermin/Spermidin)
- D-Aminosäureoxidasen (FAD-Enzyme)

Durch peroxisomale Oxidasen wird **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** gebildet, das durch Katalasen abgebaut wird.

**Katalasen** sind peroxisomale Häm-Enzym!



##### B) Im Endoplasmatischen Retikulum

- Monoxygenasen; Dioxygenasen; Acyl-CoA-Desaturasen

### 4.13. Toxische Derivate des O<sub>2</sub> werden durch Schutzsysteme abgefangen

#### In der Cytochrom c-Oxidase Reaktion entstehen transient Radikale!

- Das Enzym nimmt sequentiell 4 Elektronen (4 Cyt [Fe<sup>2+</sup>]) auf.
- Dabei entstehen als Zwischenprodukte hochreaktive Superoxidradikale:  $\text{O}_2 + \text{e}^- \Rightarrow \text{O}_2^{\cdot -}$ .
- Das Enzym hält diese Radikale fest. Diese „Erfindung“ ist eine Voraussetzung für die Nutzung von O<sub>2</sub> im Stoffwechsel! Die hochreaktiven Radikale könnten u.a. die mitochondriale DNA oder Membranlipide beschädigen, falls sie dem Enzym entwischt!

#### 4.13.1. Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS: reactive oxygen species) entstehen im Stoffwechsel und durch äußere Einflüsse (Strahlung, UV-Licht).

##### Sauerstoffradikale:

- Superoxidradikalanion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), Perhydroxylradikal (HOO<sup>•</sup>), Hydroxylradikal (HO<sup>•</sup>), Peroxylradikal (ROO<sup>•</sup>)....
- reaktionsfreudige Moleküle, reagieren mit Lipiden, DNA-Basen und Proteinen!

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und hypochlorische Säure (HOCl) sind keine freien Radikale, tragen aber zum **oxidativen Stress** bei.

ROS entstehen u.a. im Zellstoffwechsel als Reaktionsprodukt verschiedener Oxidasen (Xanthinoxidase, Cyclooxygenase, Lipoxygenase,...), nicht jedoch bei der Cytochromoxidase-Reaktion. Sie werden im Mitochondrium, im ER (Cytochrom P<sub>450</sub>) und in Peroxisomen produziert. Durch die NADPH-Oxidase werden ROS an der Plasmamembran von Lymphozyten gebildet, wo sie der Abwehr von Mikroorganismen dienen.

In den Mitochondrien können ROS durch Übertragung eines ungepaarten Elektrons vom Ubisemiquinon (Komplexe I und II) auf O<sub>2</sub> gebildet werden. Dabei entstehen Superoxidradikalanionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Das Superoxidradikalanion wird schnell durch mitochondriale (Mn<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>-Enzyme) oder cytosolische (Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>) Superoxidismutasen in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgebaut.

Das **Hydroxylradikal (OH<sup>•</sup>)** ist ein extrem kurzlebiger Metabolit (t=10<sup>-9</sup> s) der u.a. durch die *Fenton*-Reaktionen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Eisen- oder Kupferionen entsteht:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \Rightarrow \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$  !

Eine Besonderheit der Reaktionen von freien Radikalen mit anderen Molekülen ist, daß das Reaktionsprodukt wieder ein freies Radikal ist: **Kettenreaktionen**.

Normalerweise wird in den Zellen die Akkumulation von ROS durch enzymatischen Abbau (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase) und/oder durch Antioxidantien (Vitamine C und E, Glutathion, Thioredoxin).

#### 4.13.2 Scavengerenzyme verhindern die Schädigung zellulärer Strukturen durch ROS!

Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase, Katalase

4.13.2.1 Inaktivierung von Superoxidradikalen: Superoxiddismutase

- Inaktivierung von  $O_2^{\bullet-}$
- **Superoxiddismutase**. Reaktion  $2 O_2^{\bullet-} + H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$
- Metalloenzym, enthält  $Cu^+$  und Zink im aktiven Zentrum.  $Cu^+$  ist direkt am katalytischen Prozess beteiligt. Die Superoxiddismutase kommt in allen aeroben Organismen vor.

#### Glutathion-Peroxidase : Eliminierung von Peroxiden

- $2 GSH + ROOH \Rightarrow GSSG + H_2O + R-OH$
- Enthält **Selenocystein** im aktiven Zentrum.

#### Glutathion-Reduktase

- Prosthetische Gruppe: FAD, NADPH ist Coenzym
- $GSSG + NADPH + H^+ \Rightarrow 2 GSH + NADP^+$

#### Glutathion: ein zentrales Redoxsystem im Stoffwechsel

- Detoxifikations-Reaktionen.
- Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen.

Im Zellstoffwechsel wird durch die Glutathion-Reduktase ein Überschuss der reduzierten Form erhalten (GSH/GSSG > 100)!

#### 4.13.2 Radikalfänger ( free radical scavenger)

Eine Besonderheit der Reaktionen von freien Radikalen mit anderen Molekülen ist, daß das Reaktionsprodukt wieder ein freies Radikal ist, z.B:  $C - H + OH^{\bullet} \Rightarrow C^{\bullet} + H_2O$ . Dadurch entstehen gefährliche **Kettenreaktionen**! Radikalfänger unterbrechen diese Kettenreaktionen!

Antioxidantien: Vitamin C, Vitamin E, Harnsäure, Thiole, Transferrin, etc.

#### A) Vitamin C: Ascorbinsäure

Vitamin C wirkt durch Übertragung von **ein** oder zwei Elektronen ( $E^{0'} = +58 \text{ mV}$ ).

Neben der hier diskutierten nicht-enzymatische Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies wirkt Ascorbat als Cosubstrat von Monooxygenasen (Dopamin- $\beta$ -monooxygenase,  $Cu^{3+} \Rightarrow Cu^{2+}$ ) und bei der Regeneration von oxidierten Dioxygenasen (Prolylhydroxylase,  $Fe^{3+} \Rightarrow Fe^{2+}$ )

Bei der Interaktion von Ascorbat mit einem Radikal entsteht ein **Ascorbatradikal**, das in Ascorbat und Dehydroascorbat dismutiert!

**$2 \text{ Ascorbat}^{\bullet} + H^+ \Rightarrow \text{Ascorbat-} + \text{Dehydroascorbat}$**

Die GSH-abhängige Dehydroascorbatreduktase bildet Dehydroascorbat zu Ascorbat zurück.

#### **B) Vitamin E: Tocopherole und Tocotrienole.**

Lipidlösliches Vitamin, Membranbausteine! Vitamin E schützt Lipide vor oxidativer Zerstörung durch Sauerstoffradikale. Dabei entsteht ein Vitamin E-Radikal, das durch Ascorbat inaktiviert werden kann.

### C) Harnsäure.

Harnsäure entsteht beim Purinababau (Xanthinoxidase-Reaktion) und stellt den größten Anteil des antioxidativen Potentials des Plasmas. Hydroxylradikale und Superoxid werden inaktiviert, indem sie mit Harnsäure reagieren und diese zu Allantoin oxidieren! In der Reaktion der Harnsäure mit Radikalen kann auch ein Harnsäure-Radikal ( $\text{HS}^\bullet$ ) entstehen, das im Blut durch Ascorbinsäure reduziert wird.

### Anhang: Vitamin C (Ascorbinsäure)

#### Bedarf: ca. 50-100mg/Tag.

Vitamin C ist ein fast ubiquitärer Metabolit. Mensch, Meerschweinchen und einige andere Tiere haben die für die Synthese aus Glucose nötige **L-Gulonolacton-Oxidase** verloren! Die Aufnahme im Darm ist  $\text{Na}^+$ -abhängig (sekundär aktiv). Ausscheidung: als Ca-Oxalat im Urin

#### Funktionen:

Vitamin C ist ein Reduktionsmittel und ein wichtiger Cofaktor bei Hydroxylierungen, z.B. in der Catecholamin-Synthese und in der Kollagen-Synthese. Verminderte Hydroxylierung von Prolin-Resten in Kollagen ist Ursache wichtiger Symptome bei Vitamin C-Defizienz.

Vitamin C wirkt durch Übertragung von **ein** oder zwei Elektronen ( $E^0 = +58 \text{ mV}$ ). Bei der Interaktion von Ascorbat mit einem Radikal entsteht ein **Ascorbatradikal**, das in Ascorbat und Dehydroascorbat dismutiert!

Die **Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase** (Dopamin- $\beta$ -monooxygenase) ist ein Kupferenzym, das **Ascorbat als Coenzym** nutzt: Dopamin + Ascorbat +  $\text{O}_2 \Rightarrow$  Noradrenalin + Dehydroascorbat +  $\text{H}_2\text{O}$ .

- Die **Prokollagen-Prolin-Hydroxylase** ist eine Dioxygenase die  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und **Ascorbat** benötigt! Dioxygenase: ein Halbmolekül des  $\text{O}_2$  wird für die Bildung von Succinat, das andere für die Bildung der Hydroxylgruppe genutzt!  
Procollagen-Prolin +  $\alpha$ -Ketoglutarat +  $\text{O}_2 \Rightarrow$  Procollagen trans-4-Hydroxyprolin + Succinat +  $\text{CO}_2$

Die Prokollagen-Lysylhydroxylase katalysiert die entsprechende Reaktion an Prokollagen-Lysylresten. **Vitamin C dient hier der Regeneration von oxidiertem Enzym ( $\text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ).**

#### Vitamin C ist an der Inaktivierung von freien Radikalen im Zellstoffwechsel beteiligt!

Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) wirkt in der Lipidphase als Antioxidant. Das entstehende Tocopheroxyl-Radikal könnte durch die Kooperation mit Ascorbat inaktiviert werden. Das in der Radikalkette entstehende Ascorbatradikal dismutiert (nichtenzymatisch oder enzymatisch) unter Bildung von Dehydroascorbat, das mit Glutathion zu Ascorbat reduziert wird. Neben der nicht-enzymatischen Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Reduktion von Hämgruppen von Fe(IV) (Ferrylform) zu  $\text{Fe}^{2+}$ , wirkt Ascorbat als Cosubstrat von Monooxygenasen (Dopamin- $\beta$ -monooxygenase,  $\text{Cu}^{3+} \Rightarrow \text{Cu}^{2+}$ ) und bei der Regeneration von oxidierten Dioxygenasen (Prolylhydroxylase,  $\text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$ )

#### Vitaminmangel:

Vitamin C-Mangel führt zu **Skorbut** (Kollagen-Schäden wegen Defizienz in Hydroxyprolin). Überdosierung bewirkt Bildung von Oxalat-Steinen.