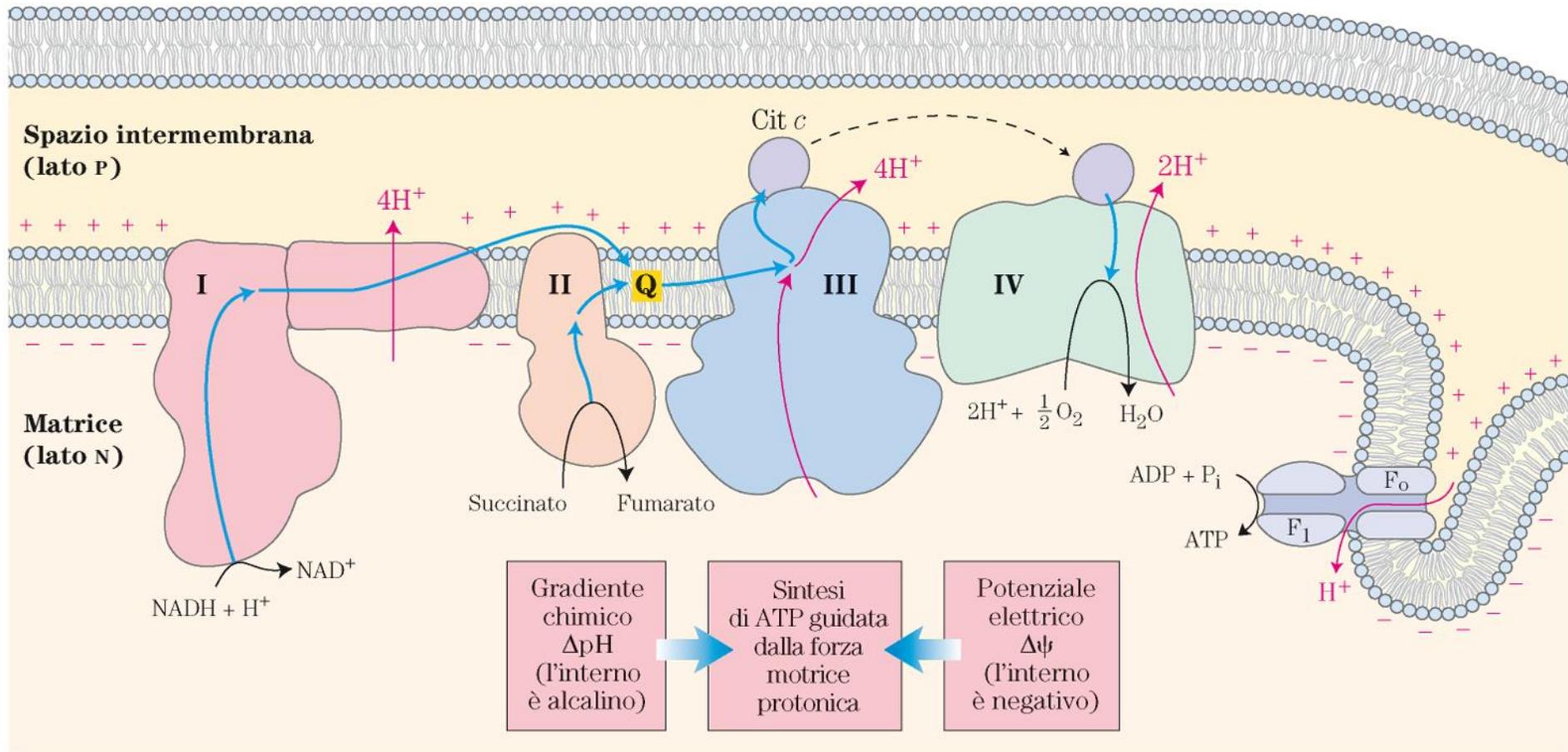


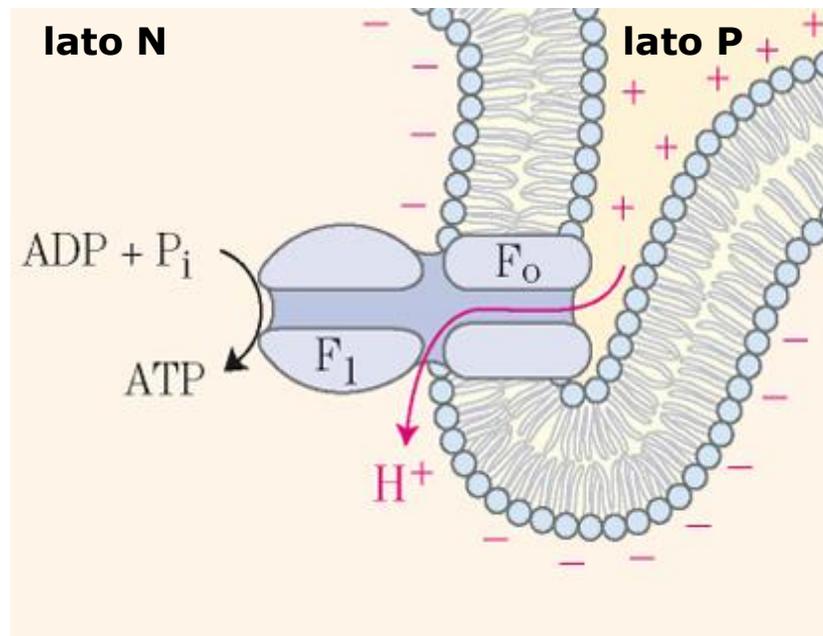
# MODELLO CHEMIOSMOTICO

La forza elettromotrice protonica generata dal gradiente protonico guida la sintesi dell'ATP mediante fosforilazione ossidativa quando il flusso protonico attraverso la membrana è invertito:



# MODELLO CHEMIOSMOTICO (P. Mitchell 1961)

- L'energia elettrochimica conservata nel gradiente protonico consente la sintesi dell'ATP a partire da ADP e  $P_i$  quando il flusso protonico attraverso la membrana interna è invertito
- modello chemiosmotico: accoppiamento di un processo chimico (sintesi di ATP) e di un processo di trasferimento (flusso di  $H^+$  dal lato P al lato N)

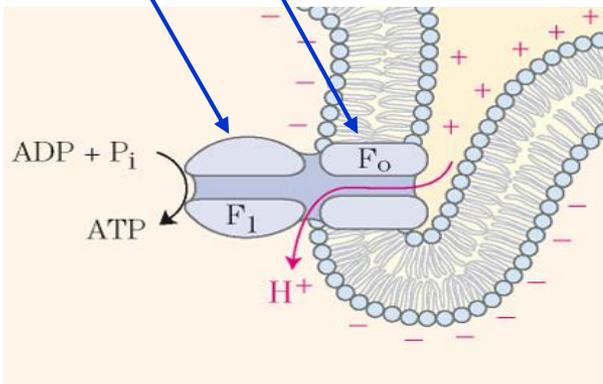


## ATP SINTASI = COMPLESSO V

Si compone di due domini funzionali

**F<sub>1</sub>**: proteina periferica di membrana (sito della sintesi di ATP)

**F<sub>o</sub>**: proteina integrale di membrana (canale protonico)



**F<sub>1</sub>**: se viene disaccoppiata da F<sub>o</sub> possiede solo attività di ATP-asi; non appena viene ricollegata al canale protonico riacquista la capacità di collegare il flusso protonico alla sintesi di ATP

In che modo l'ATP-sintasi riesce a catalizzare la sintesi di ATP, ovvero un processo fortemente endoergonico?

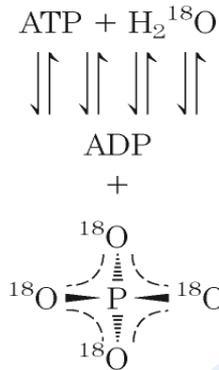


# ATP SINTASI = COMPLESSO V

In che modo l'ATP-sintasi riesce a catalizzare la sintesi di ATP, ovvero un processo fortemente esoergonico?

## •Esperimento di marcatura isotopica

Incubando ATP-sintasi (il solo complesso  $F_1$  purificato) con ATP ed acqua marcata con  $^{18}\text{O}$  si verifica che  $\text{P}_i$  ingloba da tre a quattro atomi marcati, ovvero il  $\text{P}_i$  in  $\gamma$  del pirofostato viene più volte rimosso e riattaccato



Enzima  
(F<sub>1</sub>)



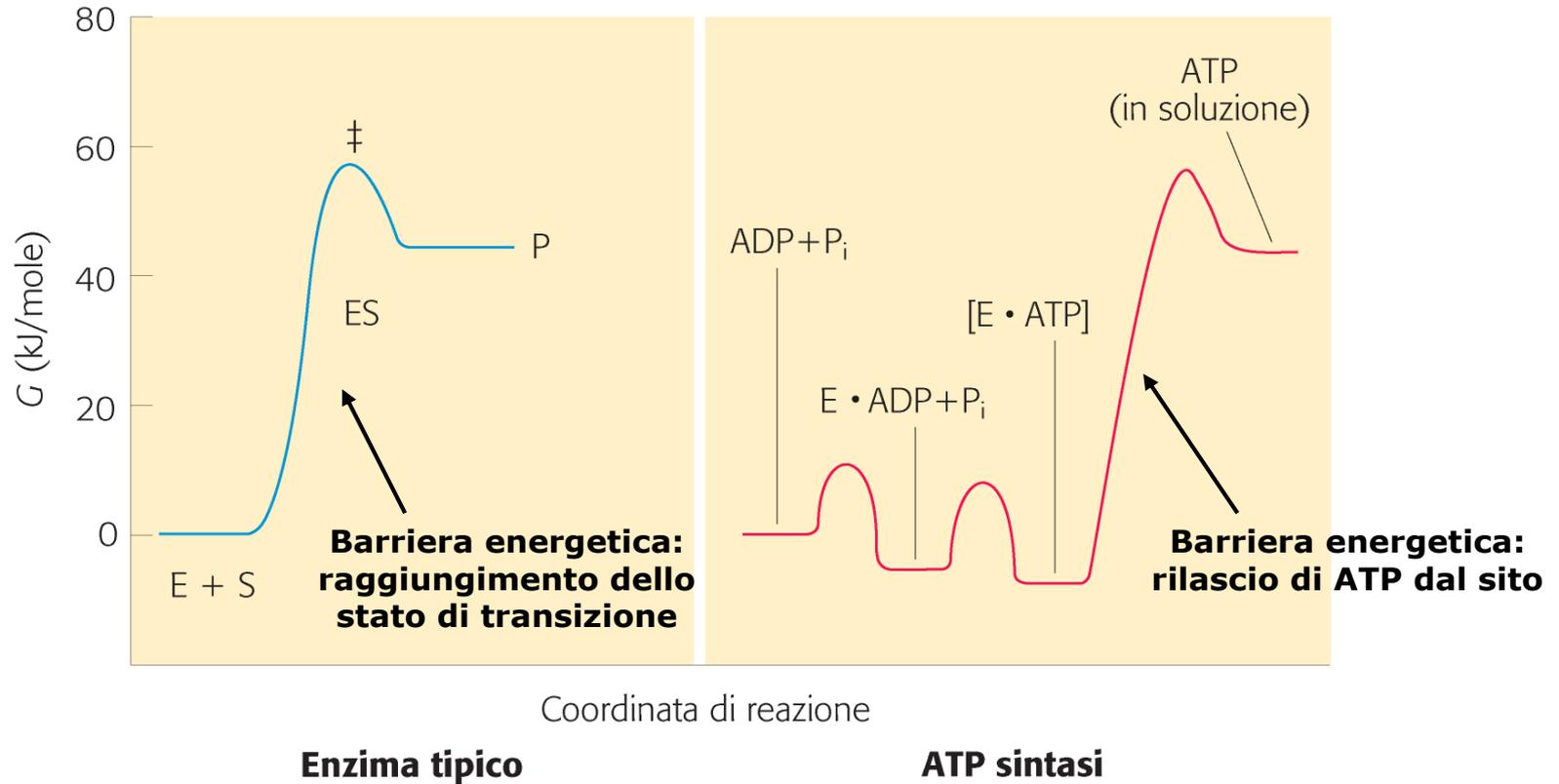
$$\Delta G' = 0 \text{ kJ/mol}$$

➤ sulla superficie di  $F_1$  la reazione è reversibile!

➤ ATP-sintasi rende ATP stabile quanto ADP e  $\text{P}_i$  ovvero rende possibile un equilibrio fra queste specie

➤ Non appena si forma ATP esso viene rilasciato dal sito grazie alla presenza del gradiente protonico

# FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



•Il legame di  $ADP$  e  $P_i$  all'enzima ed il rilascio di  $ATP$  da esso sono le tappe che richiedono maggior energia e non la sintesi di  $ATP$

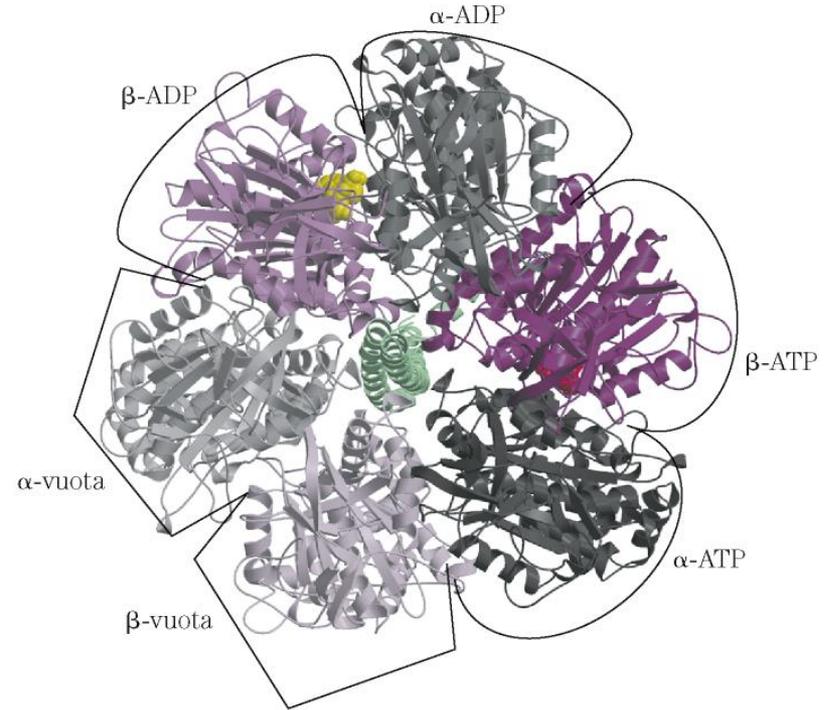
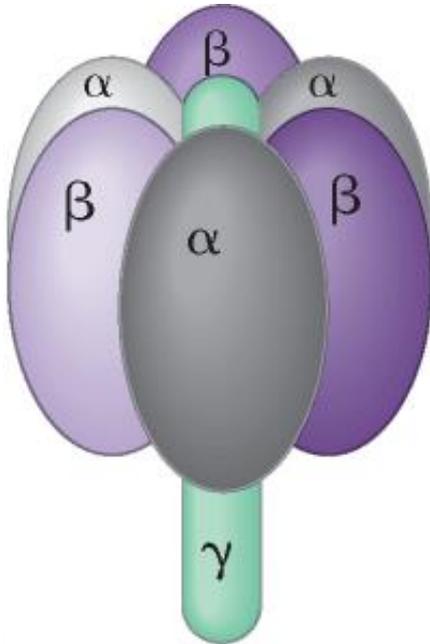
•Per la continua sintesi di  $ATP$  l'enzima compie un ciclo tra una forma che lega saldamente  $ATP$  ed un'altra che invece lo rilascia

# COMPLESSO F<sub>1</sub>

**9 subunità di 5 tipi diversi:**

- **3 di tipo  $\alpha$**
- **3 di tipo  $\beta$  (sito della sintesi di ATP)**
- **1 di ciascun tipo  $\gamma$ ,  $\delta$  ed  $\epsilon$**

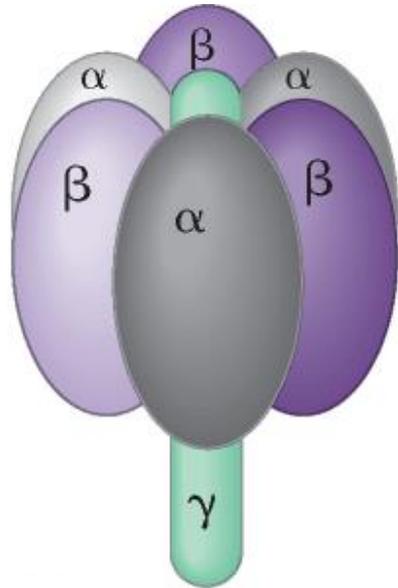
**composizione:  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$**



**Le subunità  $\beta$  assumono tre conformazioni che legano in modo diverso i nucleotidi:  $\beta$ -ATP,  $\beta$ -ADP e  $\beta$ -vuota**

**I polipeptidi che costituiscono la subunità  $\gamma$  sono disposti in modo asimmetrico: un dominio funge da asse centrale del complesso, un altro è associato ad una sola delle subunità  $\beta$  che di conseguenza assume conformazione  $\beta$ -vuota**

## COMPLESSO F<sub>1</sub>

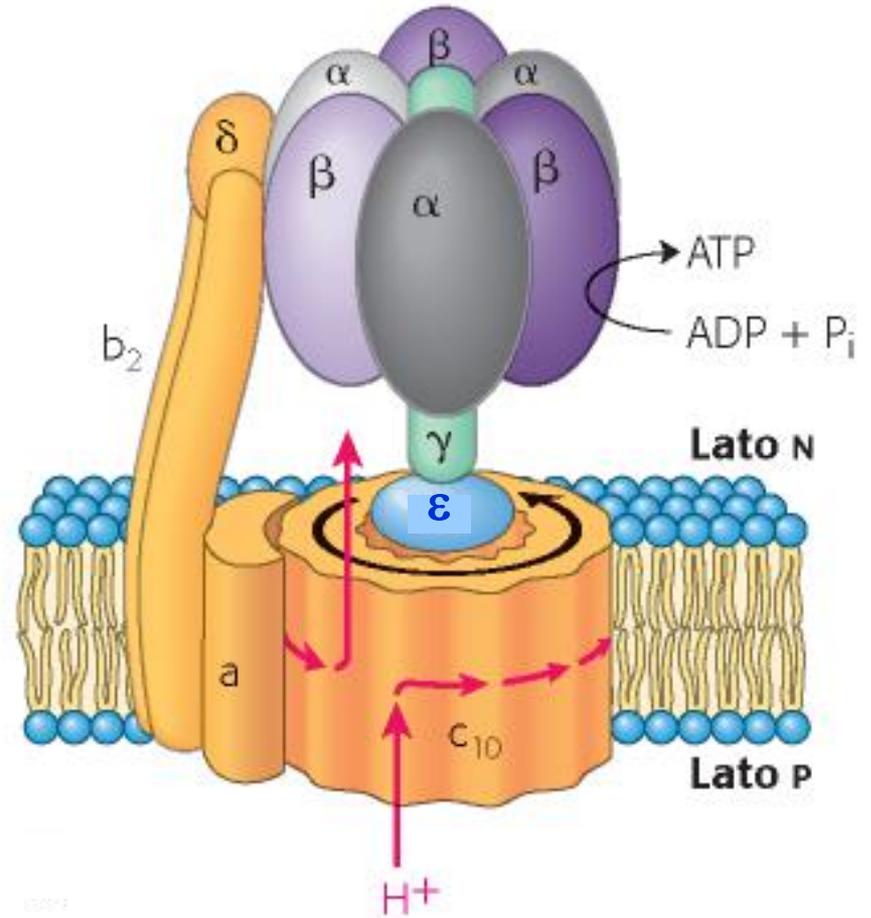


**9 subunità di 5 tipi diversi:**

- 3 di tipo  $\alpha$
- 3 di tipo  $\beta$  (sito della sintesi di ATP)
- 1 di ciascun tipo  $\gamma$ ,  $\delta$  ed  $\varepsilon$

**composizione:  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$**

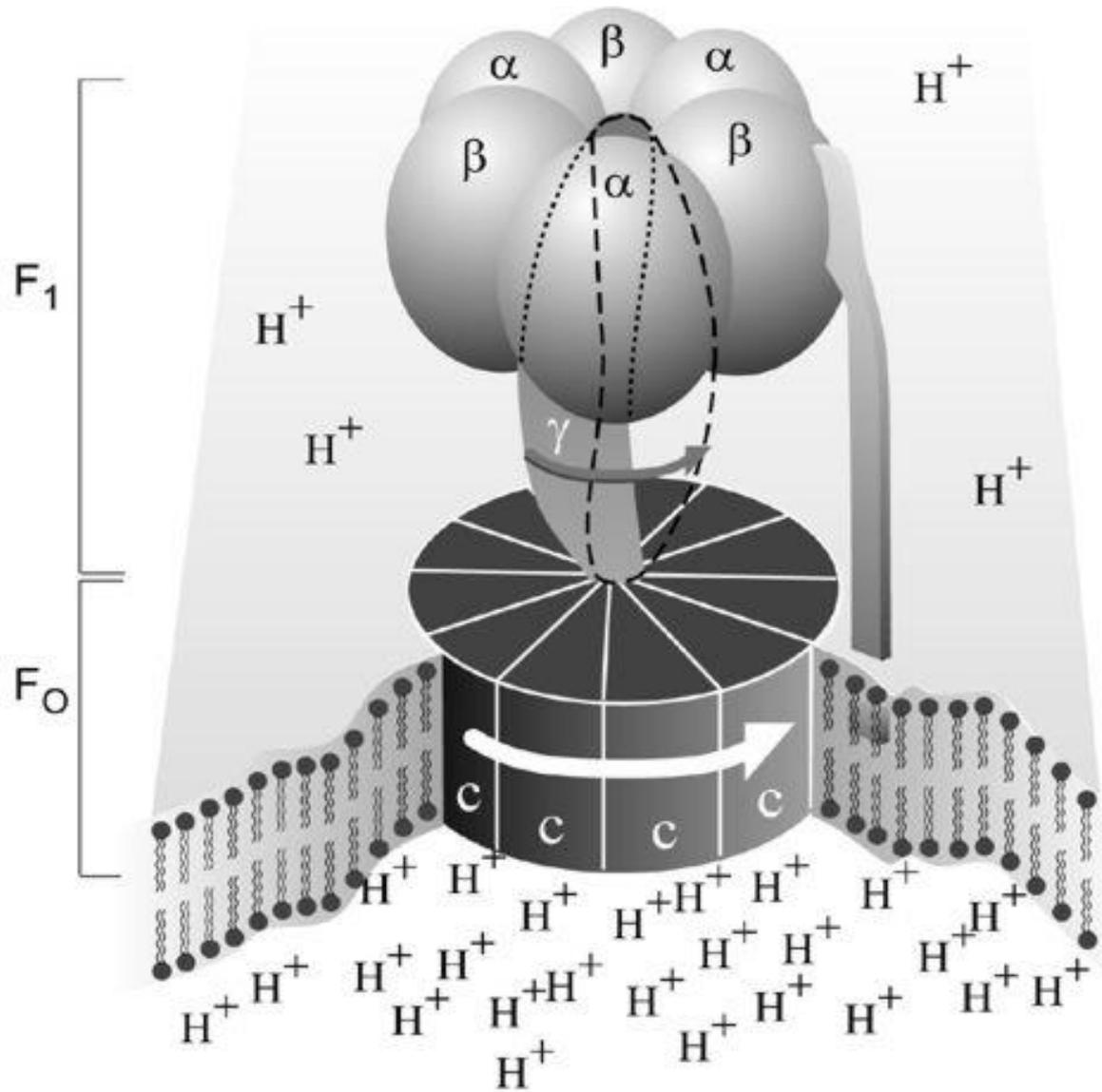
## COMPLESSO F<sub>0</sub>



**subunità di 3 tipi diversi:**

- 1 di tipo  $a$
- 2 di tipo  $b$
- 10-12 di tipo  $c$

**composizione:  $ab_2c_{10-12}$**



**1997 NOBEL PRIZE**

**Prof. Paul D. Boyer, University of California, Los Angeles, USA,**

**Dr. John E. Walker, Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK**

# CATALISI ROTAZIONALE

• Su  $F_1$  ci sono tre siti attivi (subunità  $\beta$ ) che a turno catalizzano la sintesi di ATP

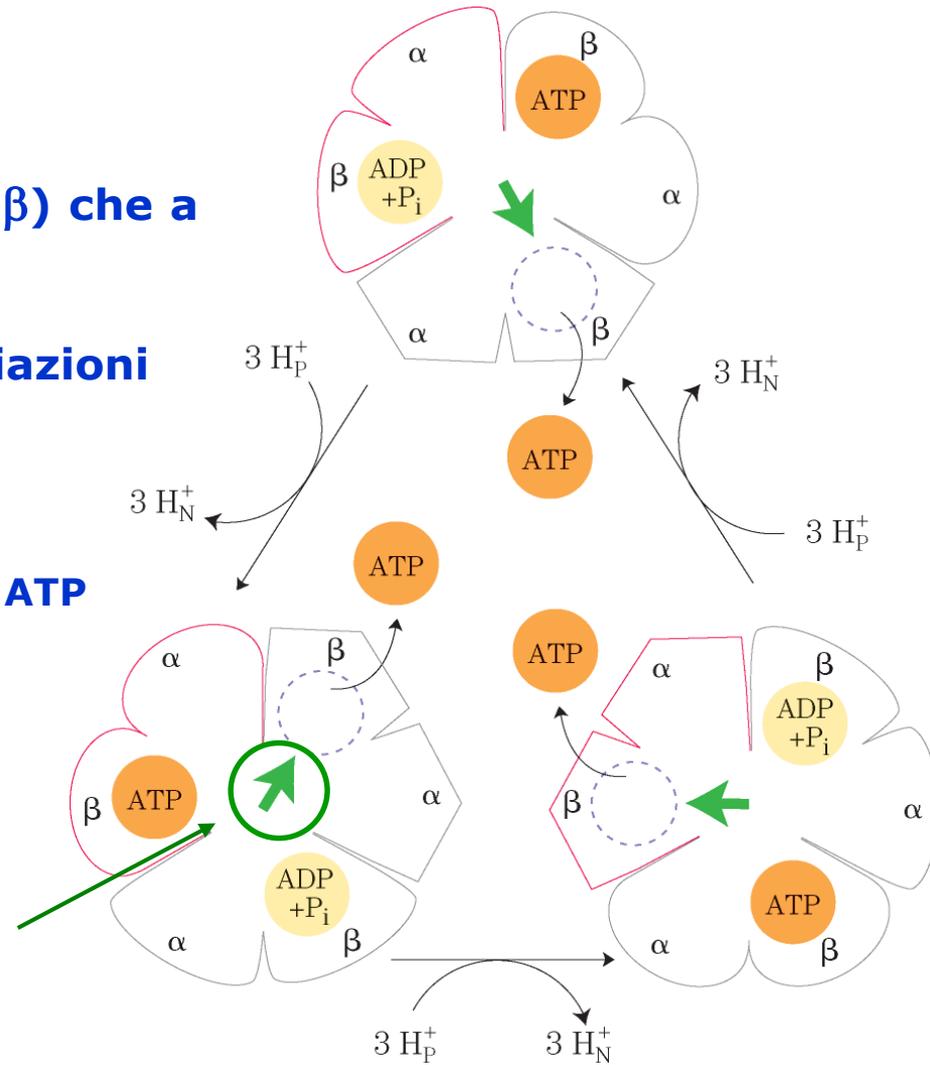
• La catalisi dipende dalle variazioni conformazionali delle tre subunità  $\beta$

$\beta$ -ATP: conformazione che lega saldamente ATP

$\beta$ -ADP: che lega debolmente ATP

$\beta$ -vuota: incapace di legare ATP

subunità  $\gamma$  che si muove grazie alla rotazione del cilindro delle subunità c



Le subunità  $\beta$  interagiscono tra loro in modo cooperativo: quando una assume una data conformazione, quelle adiacenti devono assumere le restanti altre due conformazioni possibili

# CATALISI ROTAZIONALE

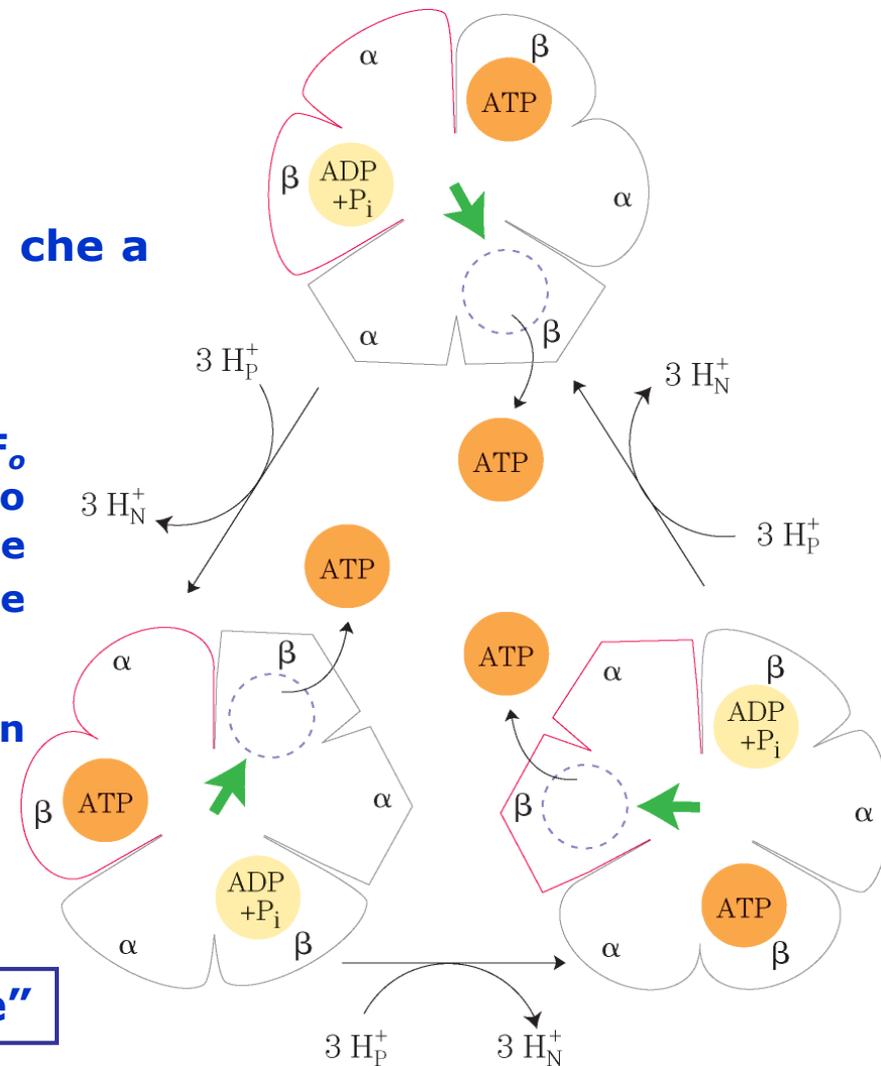
- Su  $F_1$  ci sono tre siti attivi (subunità  $\beta$ ) che a turno catalizzano la sintesi di ATP

- Il flusso di protoni attraverso il complesso  $F_0$  provoca una rotazione del cilindro intramembrana formato dalle subunità c: tale rotazione si trasmette alla subunità  $\gamma$  di  $F_1$  che è legata al suddetto cilindro

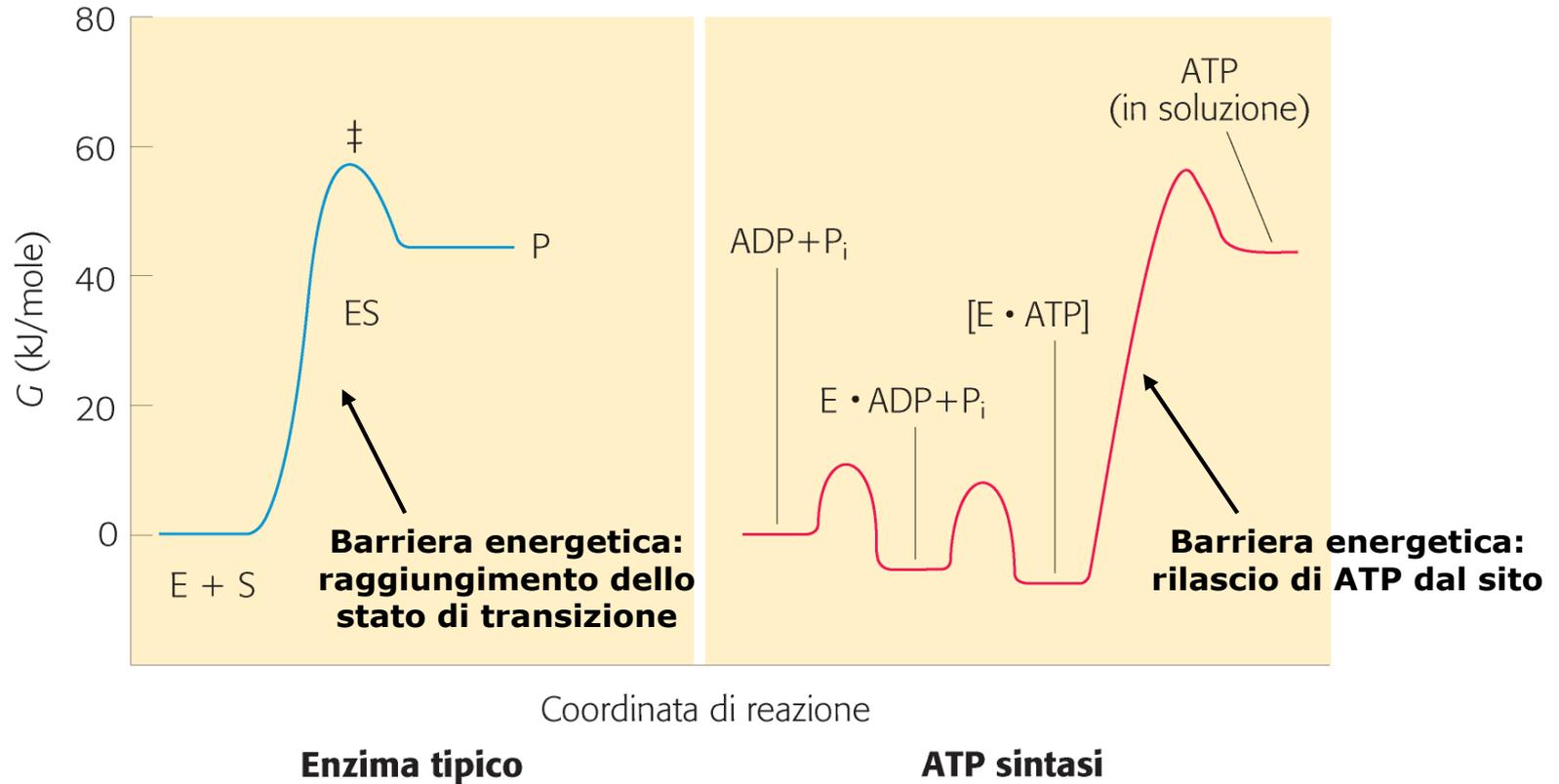
- Ogni rotazione di  $120^\circ$  pone  $\gamma$  in contatto con una diversa subunità  $\beta$

**Modello della "modificazione del legame"**

Una data subunità  $\beta$  inizia il suo ciclo di catalisi nella conformazione  $\beta$ -ADP legando ADP e  $P_i$ ; quindi in virtù della rotazione di  $120^\circ$  di  $\gamma$  assume la forma  $\beta$ -ATP generando l'equilibrio tra  $(ADP + P_i)$  ed ATP; infine l'ulteriore rotazione di  $120^\circ$  della subunità  $\gamma$  determina la modificazione nella forma  $\beta$ -vuota che a sua volta causa il rilascio di ATP appena sintetizzato sulla superficie dell'enzima



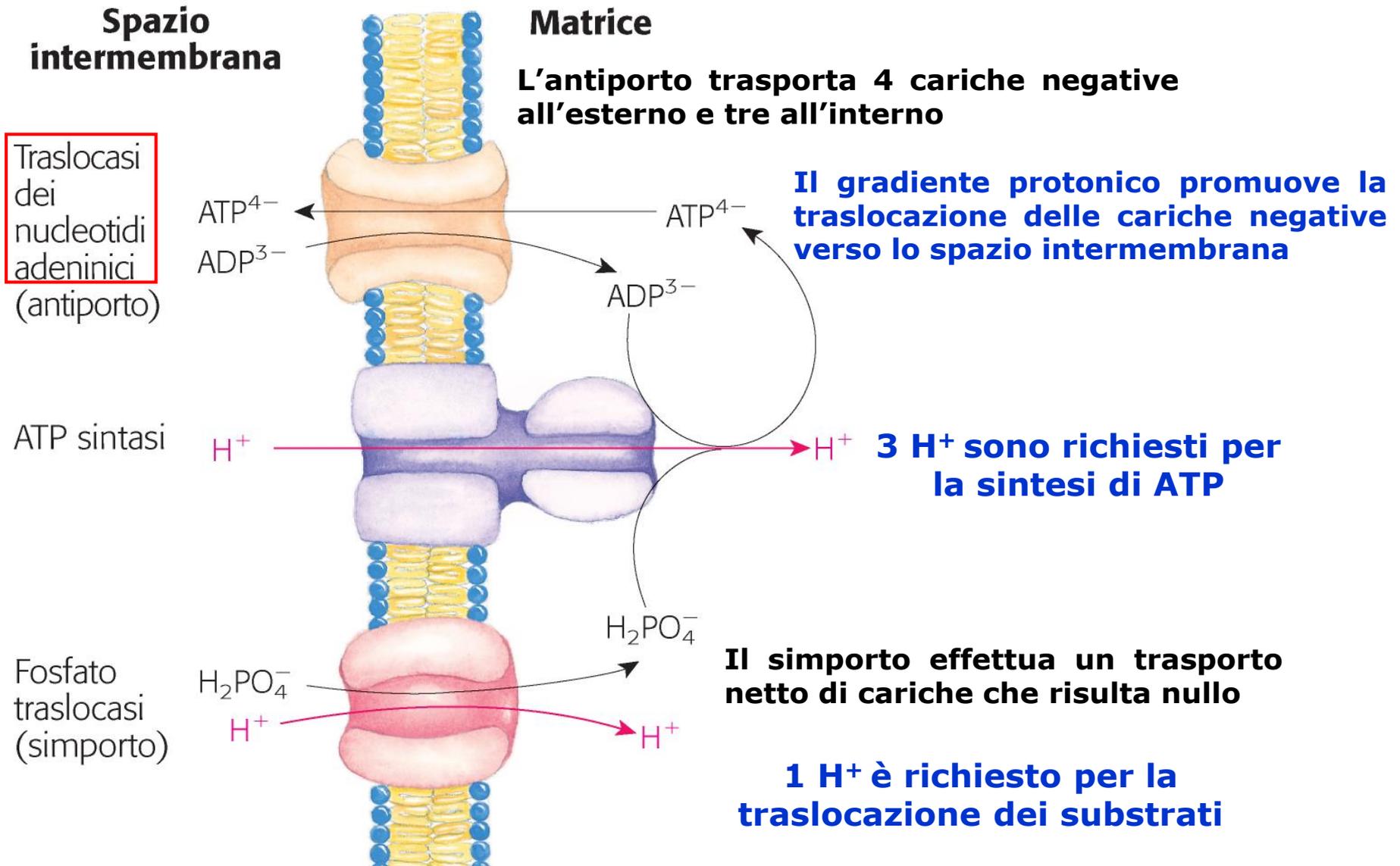
# FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



•Il legame di  $ADP$  e  $P_i$  all'enzima ed il rilascio di  $ATP$  da esso sono le tappe che richiedono maggior energia e non la sintesi di  $ATP$

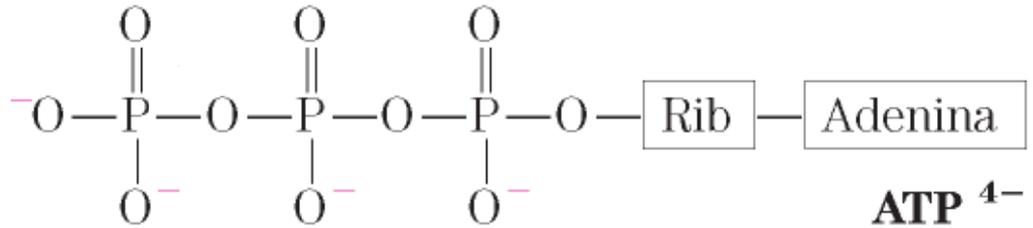
•Per la continua sintesi di  $ATP$  l'enzima compie un ciclo tra una forma che lega saldamente  $ATP$  ed un'altra che invece lo rilascia

# USO DEL GRADIENTE PROTONICO PER LA TRASLOCAZIONE DEI NUCLEOTIDI ADENINICI

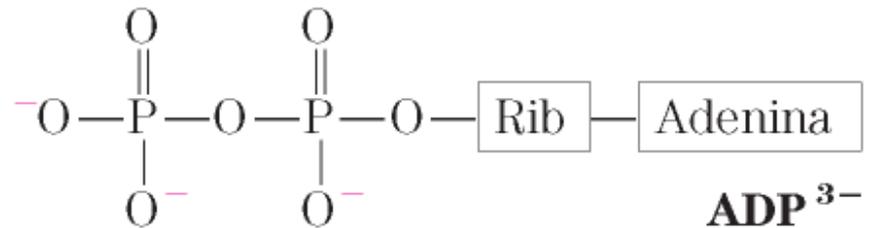


## CARICA NETTA DEI NUCLEOTIDI ADENINICI

**ATP<sup>4-</sup>**



**ADP<sup>3-</sup>**



# MODELLO CHEMIOSMOTICO

## STECIOMETRIA DELLA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



$x$  : rapporto P/O o rapporto P/2e<sup>-</sup>

**Si è concordato che:**

**Per ogni NADH sono pompate fuori 10 H<sup>+</sup>**

**Per ogni molecola di succinato (FADH<sub>2</sub>) sono pompate fuori 6 H<sup>+</sup>**

**Per ogni molecola sintetizzata di ATP sono pompate dentro 4 H<sup>+</sup>**

**quindi**

**$x$  : 2,5 per NADH**

**$x$  : 1,5 per succinato (FADH<sub>2</sub>)**

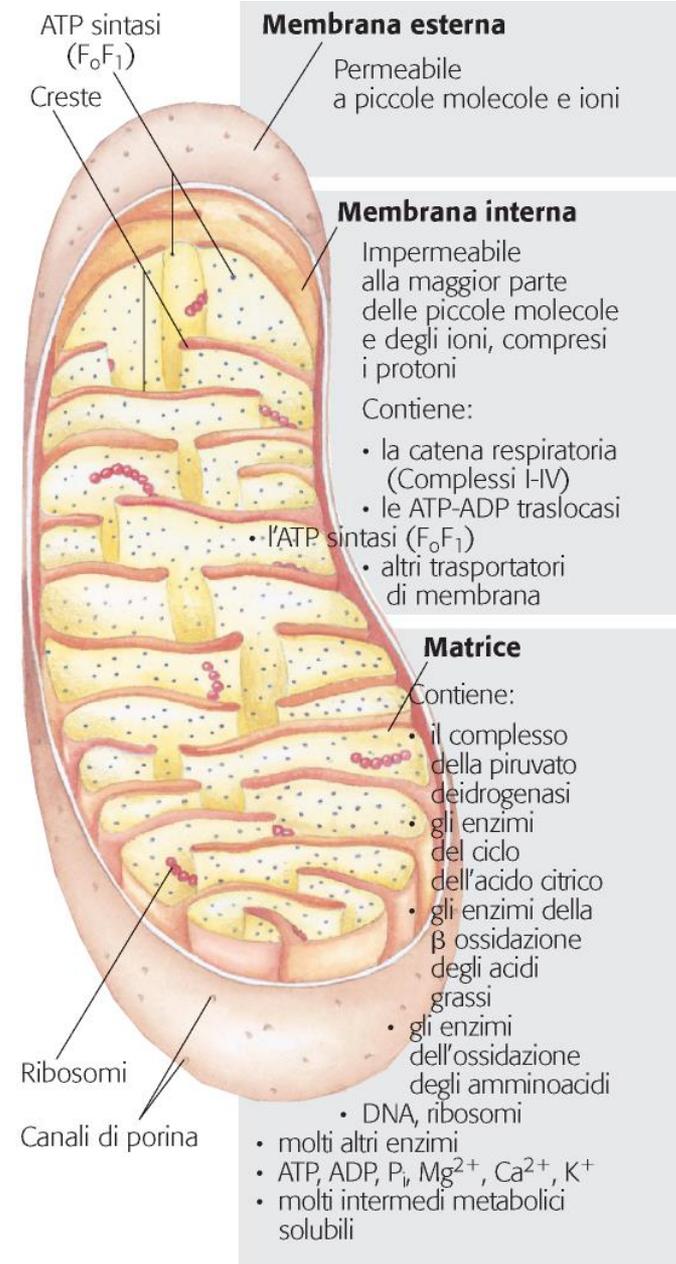
# TRASLOCAZIONE DEI COENZIMI RIDOTTI NEL MITOCONDRIO

## MITOCONDRIO

- **membrana esterna:** permeabile a molecole a basso PM (< 5000Da) e a ioni grazie alle **PORINE**, proteine integrali di membrana

- **membrana interna:** impermeabile a ioni e molecole, è attraversata solo da molecole che posseggono uno specifico trasportatore\*; in essa sono disposti i componenti della catena respiratoria ed il complesso enzimatico che sintetizza l'ATP

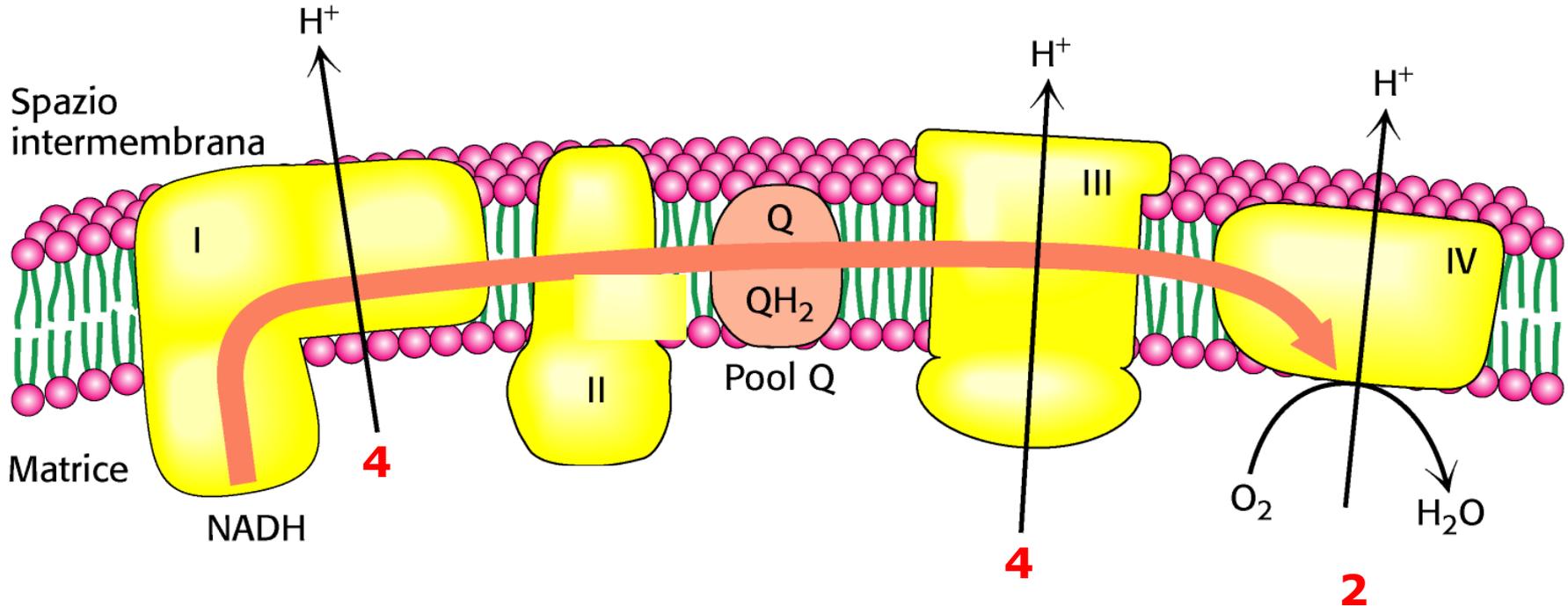
\*piruvato, acidi grassi, amminoacidi e  $\alpha$ -chetoacidi, ADP,  $P_i$  ed ATP



# CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

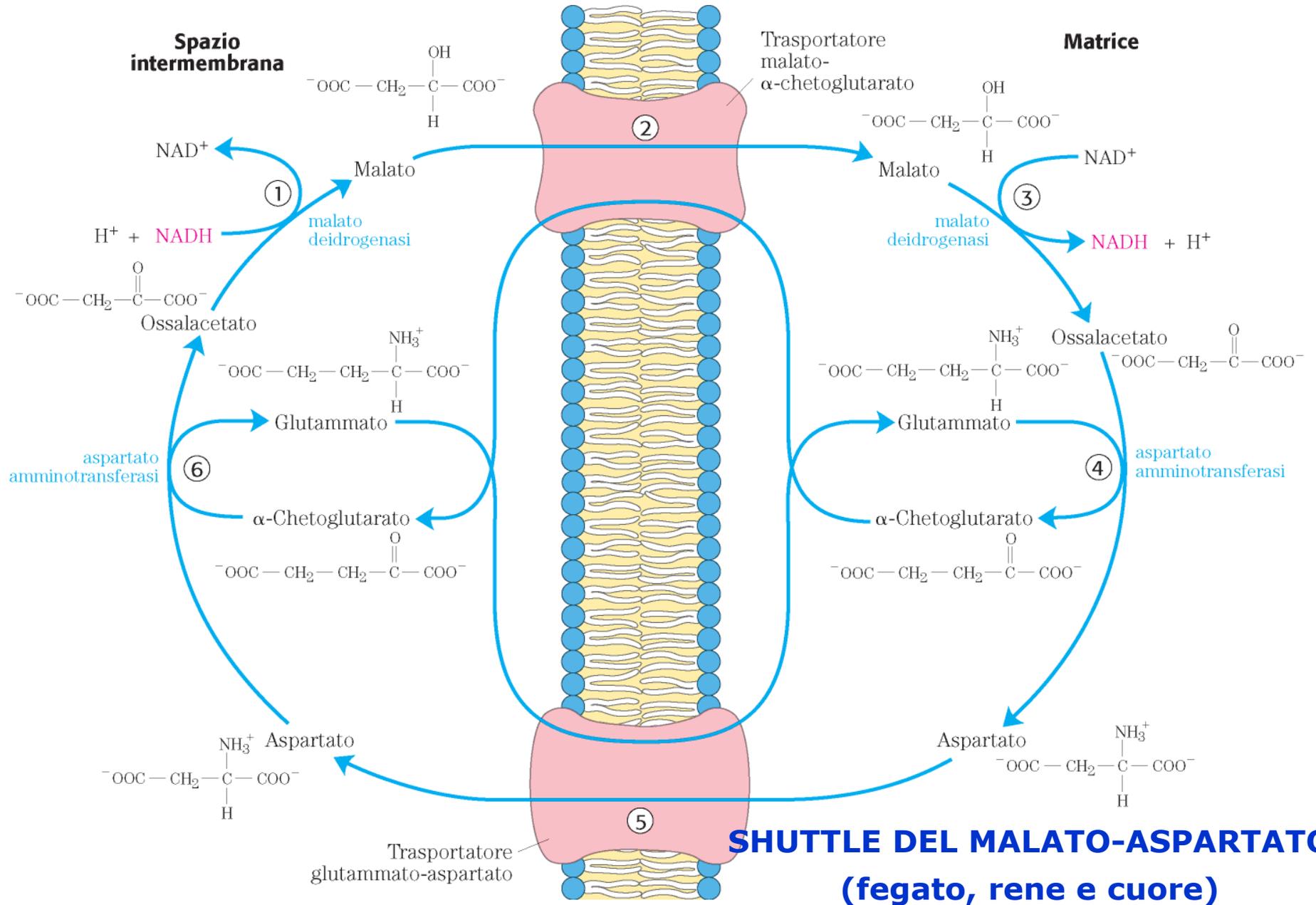
Trasferimento di elettroni da:

- **NADH** mitocondriale
- **NADH** citosolico che utilizza lo shuttle del malato-aspartato



- numero di **protoni** trasferiti nello nello spazio intermembrana: **10**

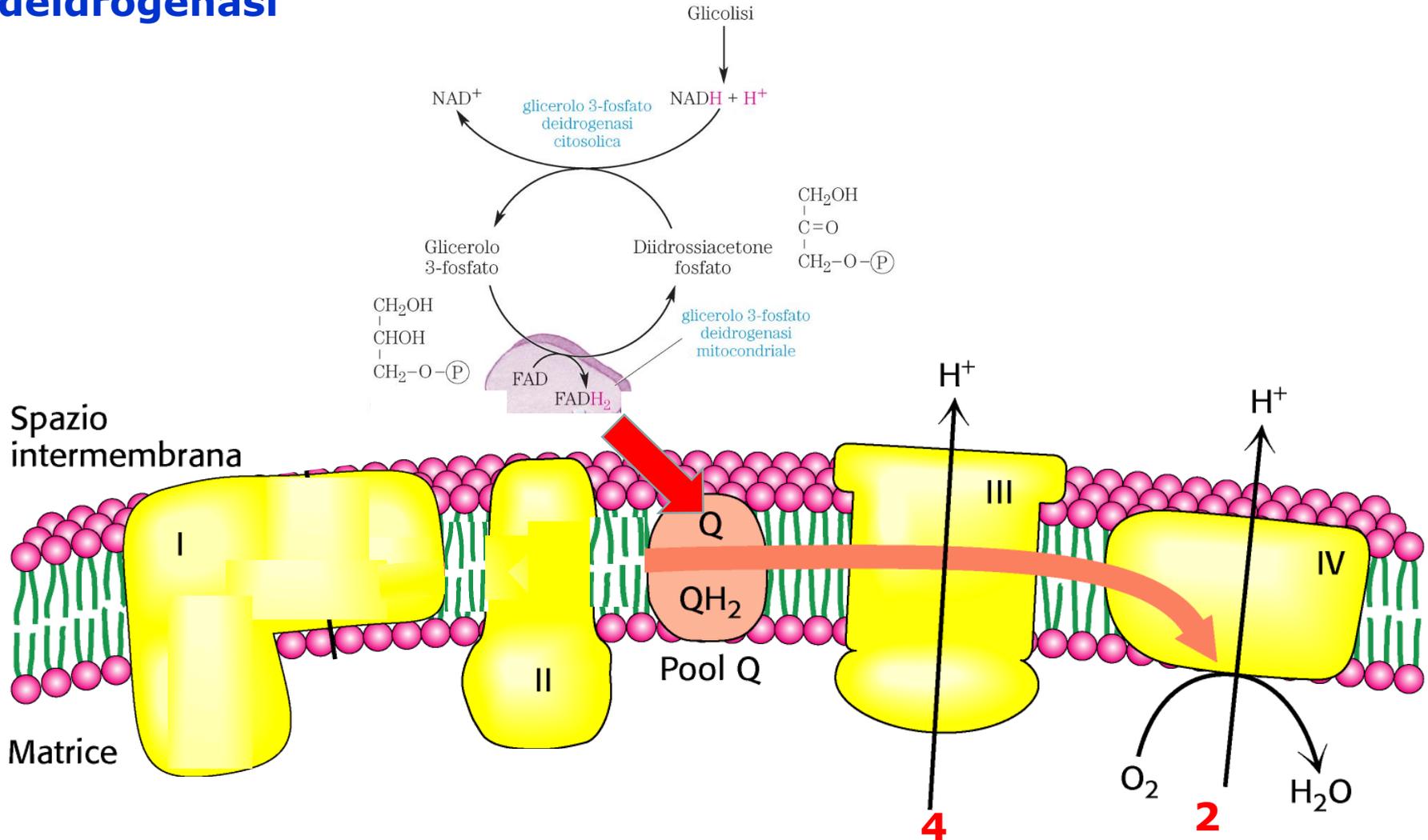
# TRASLOCAZIONE DEI COENZIMI RIDOTTI NEL MITOCONDRIO



# CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

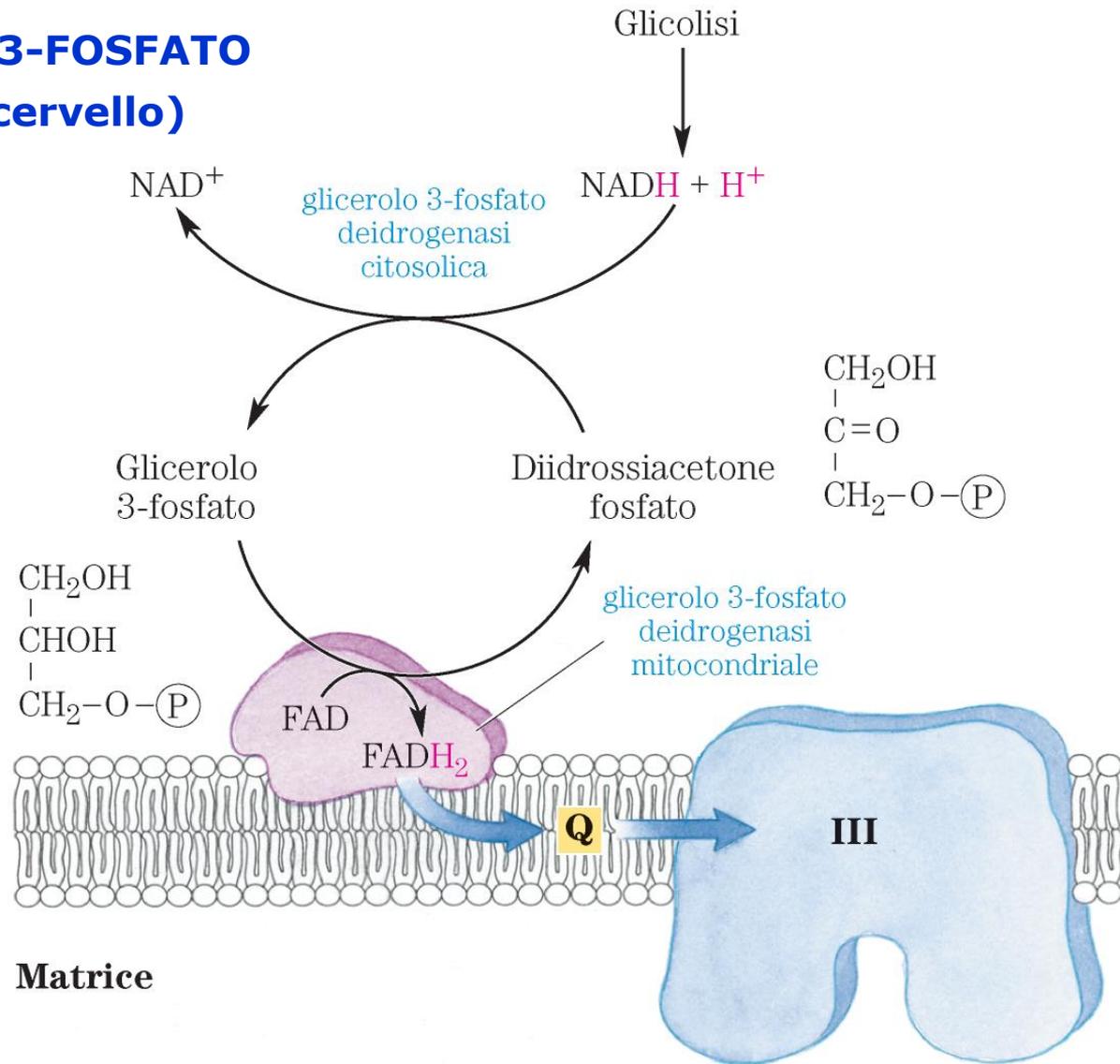
Trasferimento di elettroni da:

- **NADH citosolico che utilizza lo shuttle della glicerolo 3-fosfato deidrogenasi**



- **numero di protoni trasferiti nello nello spazio intermembrana: 6**

# SHUTTLE DEL GLICEROLO-3-FOSFATO (muscolo scheletrico e cervello)

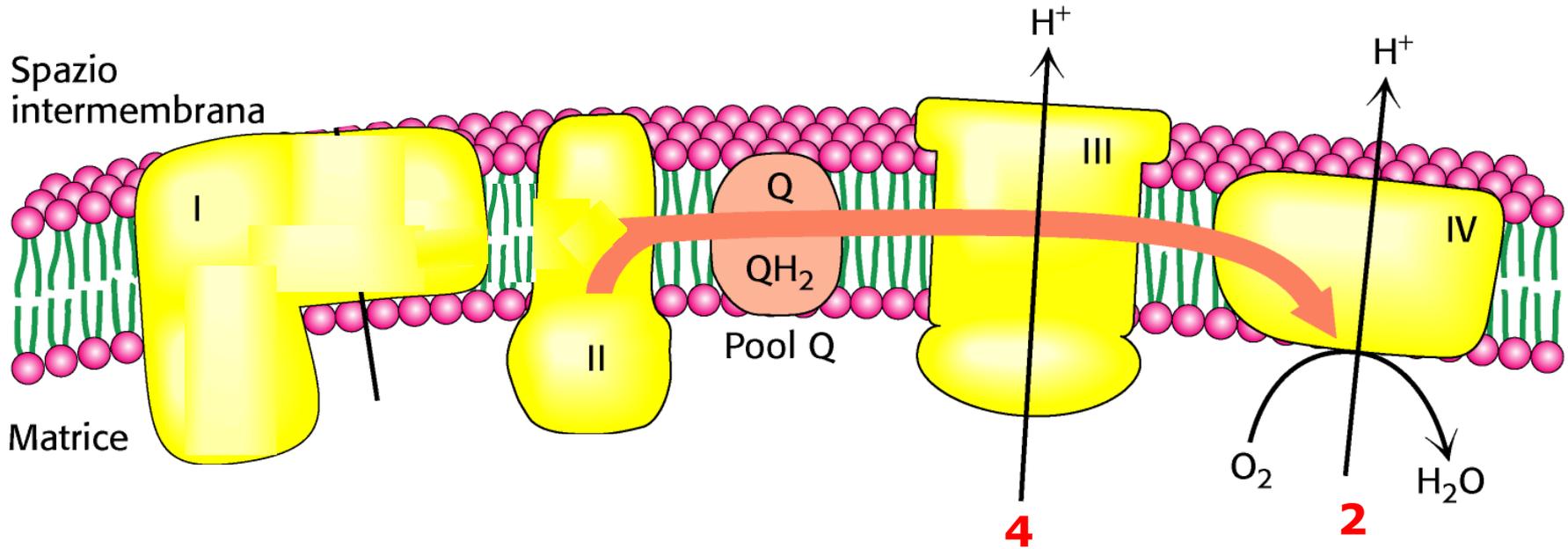


**Gli elettroni del NADH entrano a livello del complesso III, per tale motivo per ogni molecola di coenzima ossidato sono prodotte 1,5 molecole di ATP**

# CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

Trasferimento di elettroni da:

- $\text{FADH}_2$  prodotto nel ciclo di Krebs (Succinato deidrogenasi)

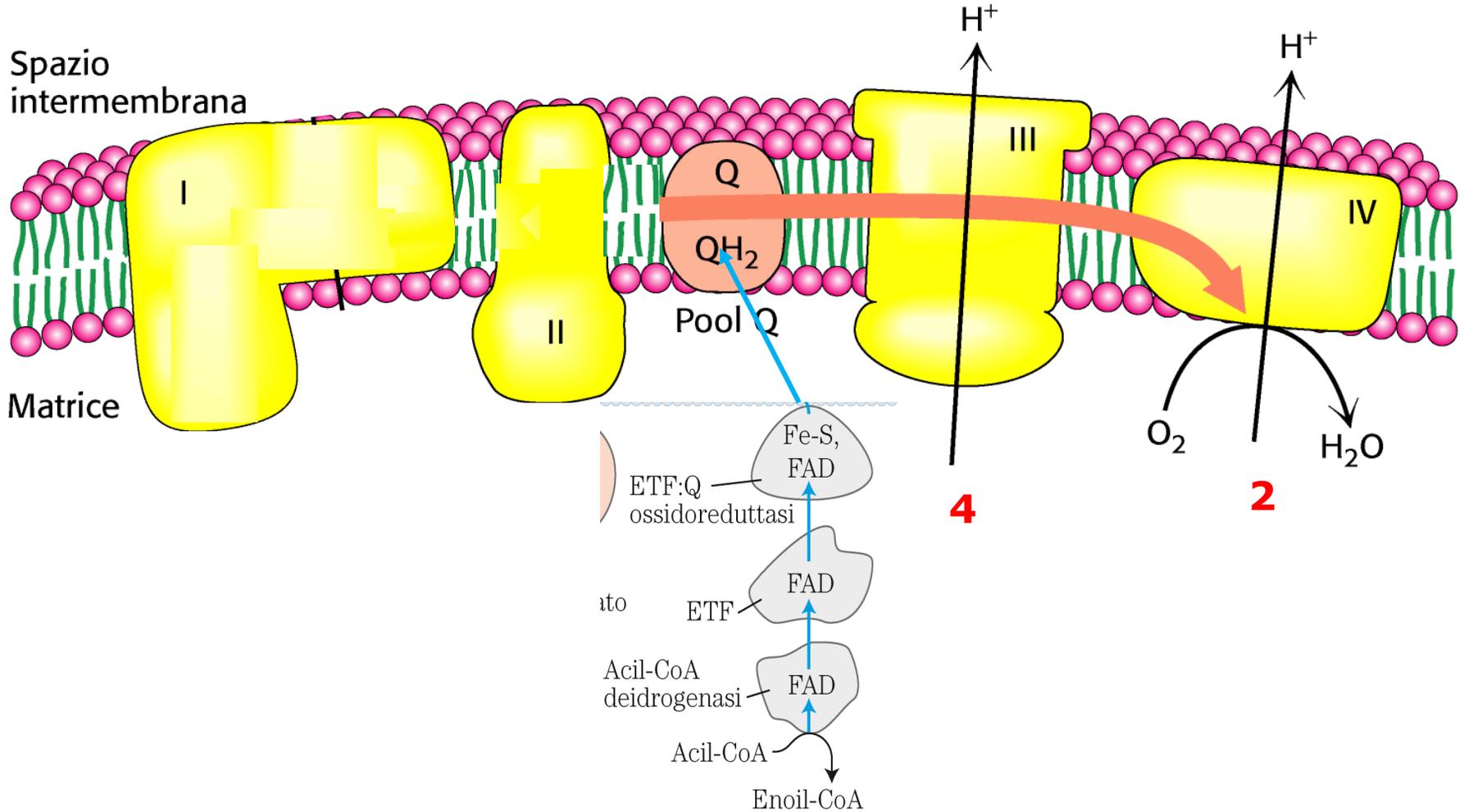


- numero di **protoni** trasferiti nello nello spazio intermembrana: **6**

# CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

Trasferimento di elettroni da:

- $\text{FADH}_2$  prodotto dalla b-ossidazione degli acidi grassi



- numero di **protoni** trasferiti nello nello spazio intermembrana: **6**

## **BILANCIO ENERGETICO DELLA DEGRADAZIONE DI UNA MOLECOLA DI GLUCOSIO ATTRAVERSO LA GLICOLISI, IL CICLO DI KREBS E LA CATENA RESPIRATORIA**

<b>Processo</b>	<b>Prodotto formato nella via</b>	<b>Molecole di ATP prodotte</b>
<b>Glicolisi</b>	<b>2 NADH (citosol) 2 ATP</b>	<b>3 o 5* 2</b>
<b>Ossidazione del piruvato (2 per molecola di glucosio)</b>	<b>2 NADH (mitocondrio)</b>	<b>5</b>
<b>Ossidazione di acetil-CoA nel ciclo di Krebs (2 per molecola di glucosio)</b>	<b>6 NADH (mitocondrio) 2 FADH<sub>2</sub> 2 ATP (GTP)</b>	<b>15 3 2</b>
<b>Resa totale per molecola di glucosio</b>		<b>30 o 32</b>

**\* Questo valore dipende dal sistema navetta usato per trasferire gli elettroni del NADH citosolico all'interno del mitocondrio: 3 per lo shuttle del glicerolo 3-fosfato, 5 per lo shuttle del malato-aspartato**

# REGOLAZIONE DELLA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

La velocità del consumo di ossigeno (**respirazione cellulare**) dipende dallo **stato energetico** della cellula che può essere espresso in termini di

- disponibilità del substrato ADP (**CONTROLLO DELL'ACCETTORE**)
- oppure
- **rapporto di azione di massa**  $[ATP]/([ADP][P_i])$

Normalmente il valore del rapporto di massa è elevato nella maggior parte dei tessuti ma:

aumenta la domanda energetica cellulare → aumenta la demolizione di ATP → aumenta [ADP] ovvero la disponibilità del substrato → aumenta la respirazione e quindi la sintesi di ATP fino a che il rapporto di azione di massa raggiunge il valore massimo → rallenta la respirazione cellulare

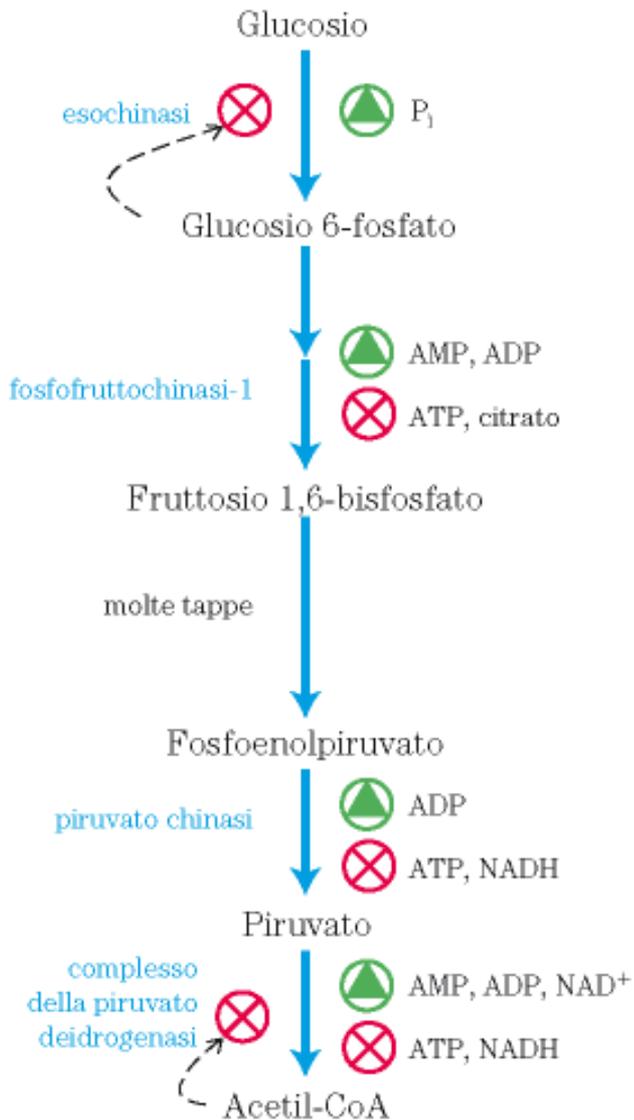
La velocità di ossidazione dei nutrienti è regolata in modo da modificare di poco il rapporto di azione di massa

→ **l'ATP è sintetizzato alla stessa velocità con cui è consumato**

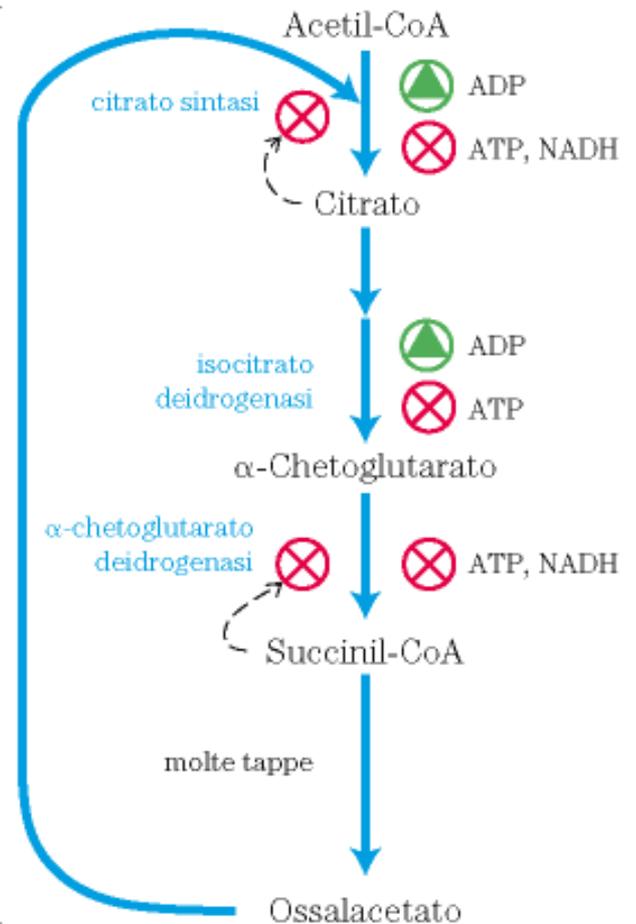
# REGOLAZIONE DELLE VIE CHE PRODUCONO ATP

[ATP] ed [ADP] controllano anche la velocità delle vie cataboliche

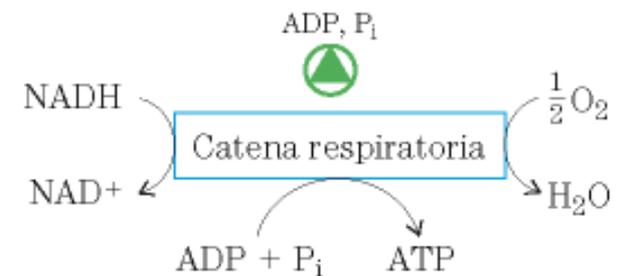
**Glicolisi**



**Ciclo dell'acido citrico**



**Fosforilazione ossidativa**



## GENERAZIONE DI CALORE MEDIANTE DISACCOPPIAMENTO MITOCONDRIALE

**Tessuto adiposo bruno:  
neonati ed animali in letargo**

