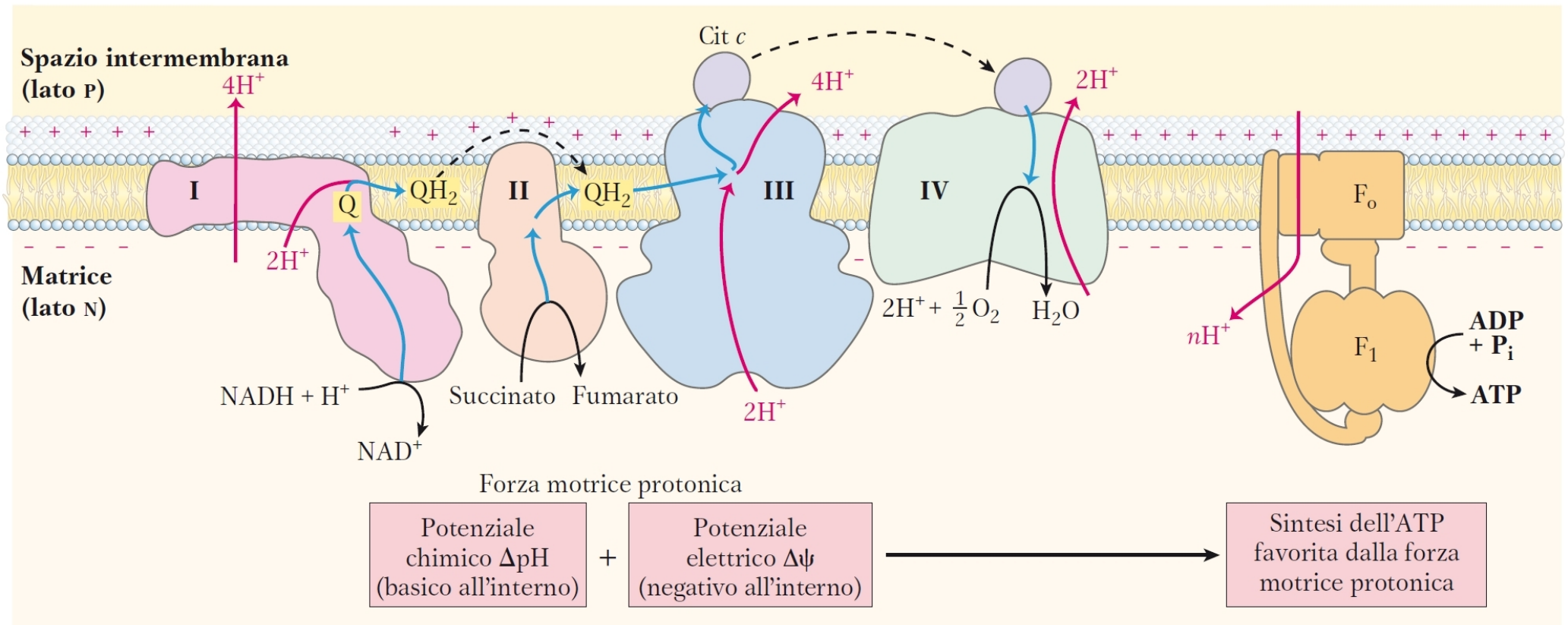


Accoppiamento ossidazione / fosforilazione

Accoppiamento **CHEMIOSMOTICO**

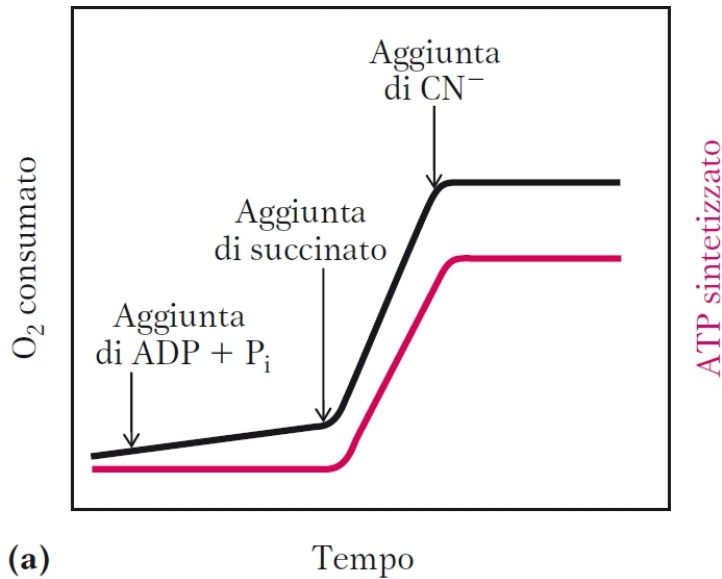


Meccanismo accoppiato: nessuno dei due può procedere senza l'altro. Se non vi è trasporto di elettroni non vi è generazione di gradiente protonico e quindi l'ATP sintasi non può funzionare, ma se l'ATP sintasi non può funzionare, allora c'è un'accumulo di protoni che ad un certo punto costituisce un blocco al trasporto di elettroni.

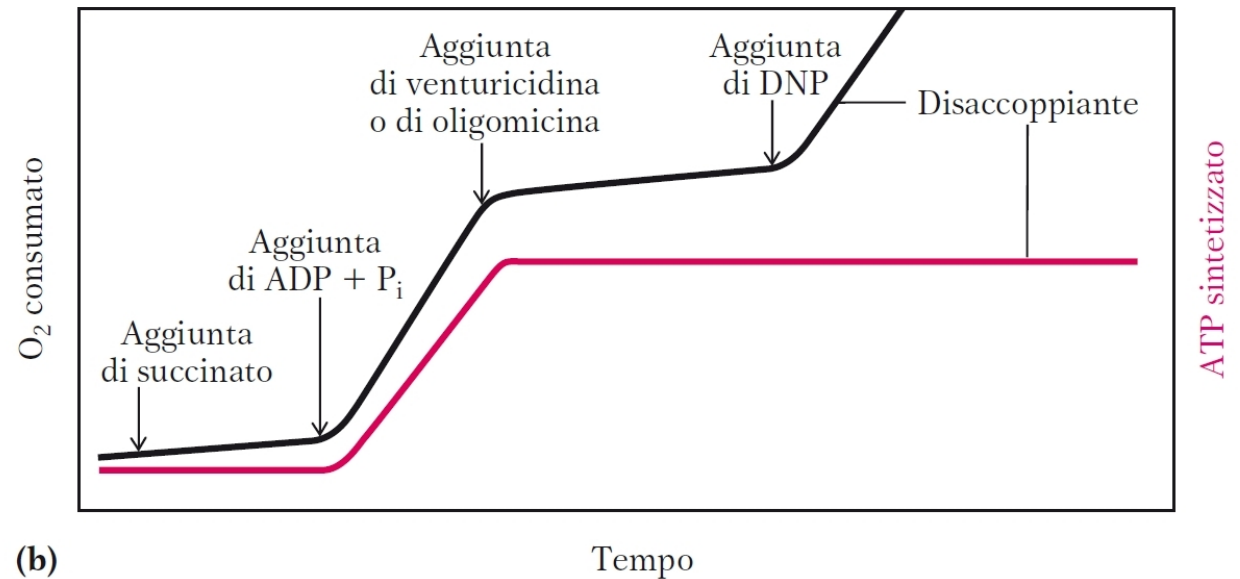
Accoppiamento ossidazione / fosforilazione

Evidenze sperimentali

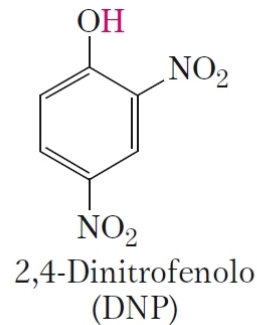
(cianuro) CN^- :
 blocca
 trasferimento
 elettroni all' O_2



Venturiricidina/oligomicina:
 Antibiotici che legano ATP
 sintasi e la bloccano



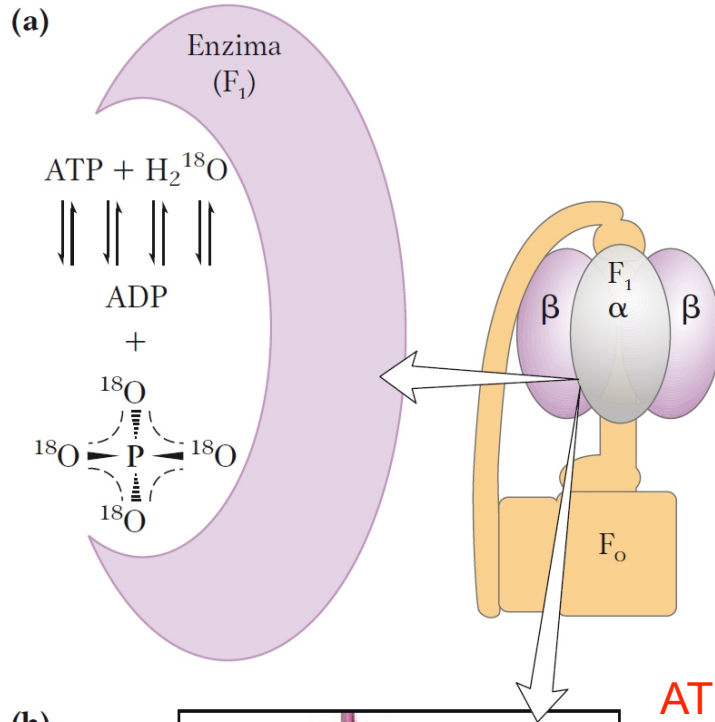
Acidi deboli molto idrofobici: legano
 protone e sono in grado di
 attraversare la membrana
 mitocondriale interna



DNP: disaccoppiante,
 dissipa il gradiente
 protonico. Dissipa il
 gradiente protonico senza
 che intervenga l'ATP
 sintasi!

ATP sintasi

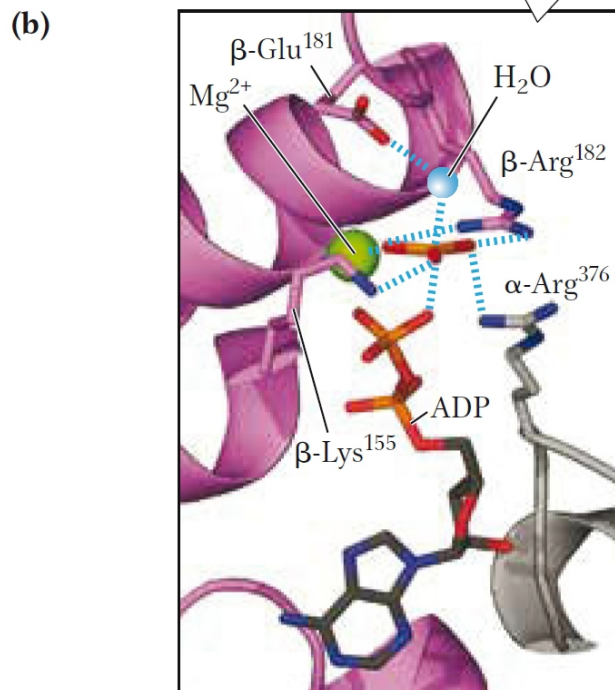
Due subunità (complessi): F_0 e F_1



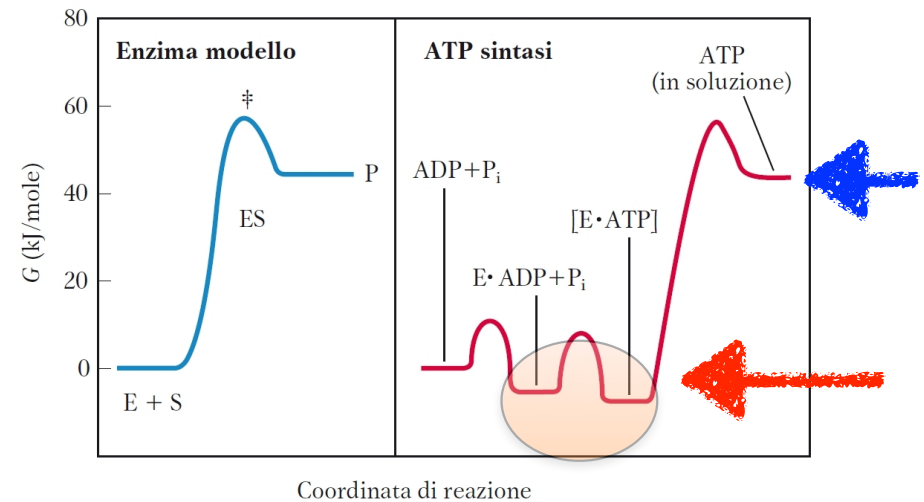
F_0 : integrale di membrana - canale per il passaggio di protoni (rientro)

F_1 : periferica di membrana - capacità di sintetizzare e di idrolizzare l'ATP

Attenzione: sulla superficie di F_1 la reazione di idrolisi dell'ATP ha un ΔG^0 vicino a 0 (reazione facilmente reversibile) e non -30,5 kJ/mole come in soluzione

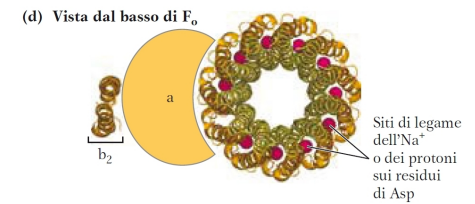
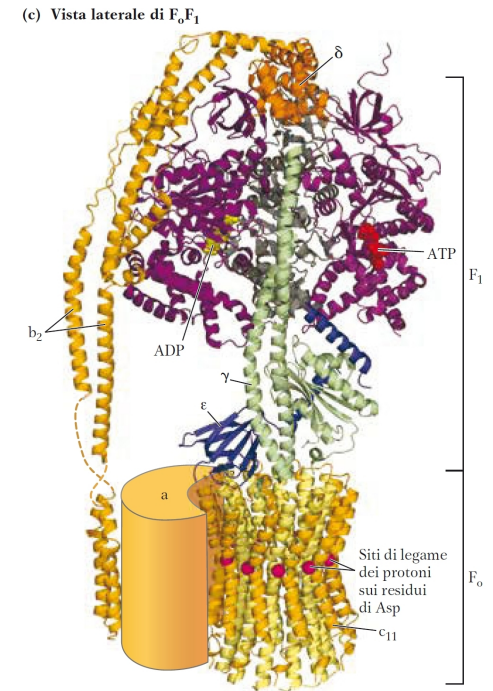
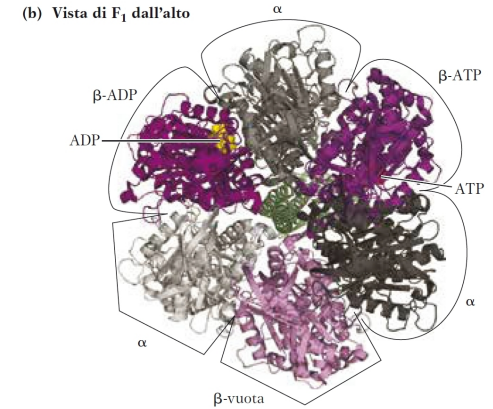
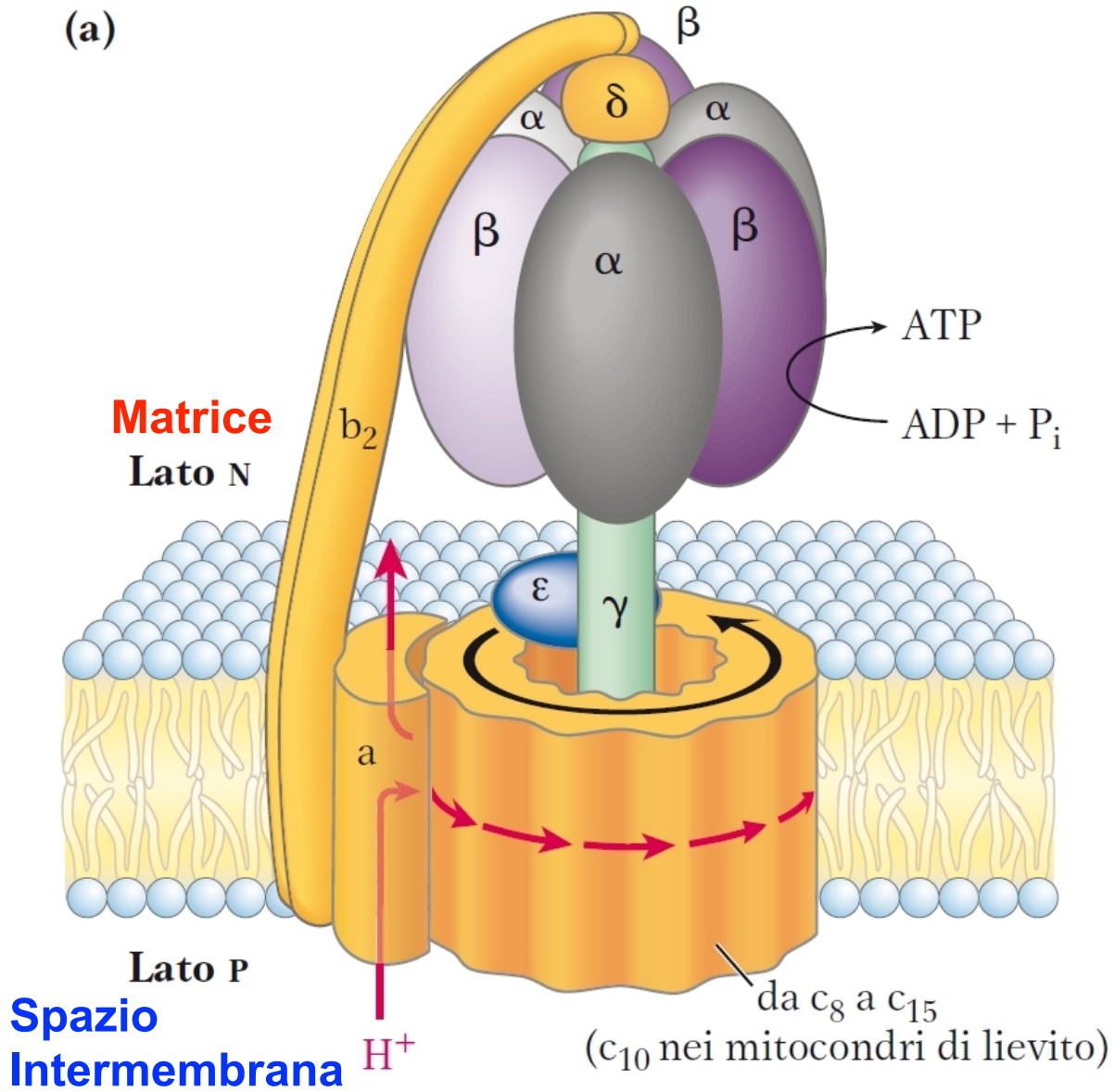


ATP sintasi può assumere una conformazione dove ha un'affinità di legame molto più alta per l'ATP rispetto all'ADP, che in questo modo viene stabilizzato, ma se ATP è fortemente legato all'ATP sintasi, come può procedere la formazione di ATP?



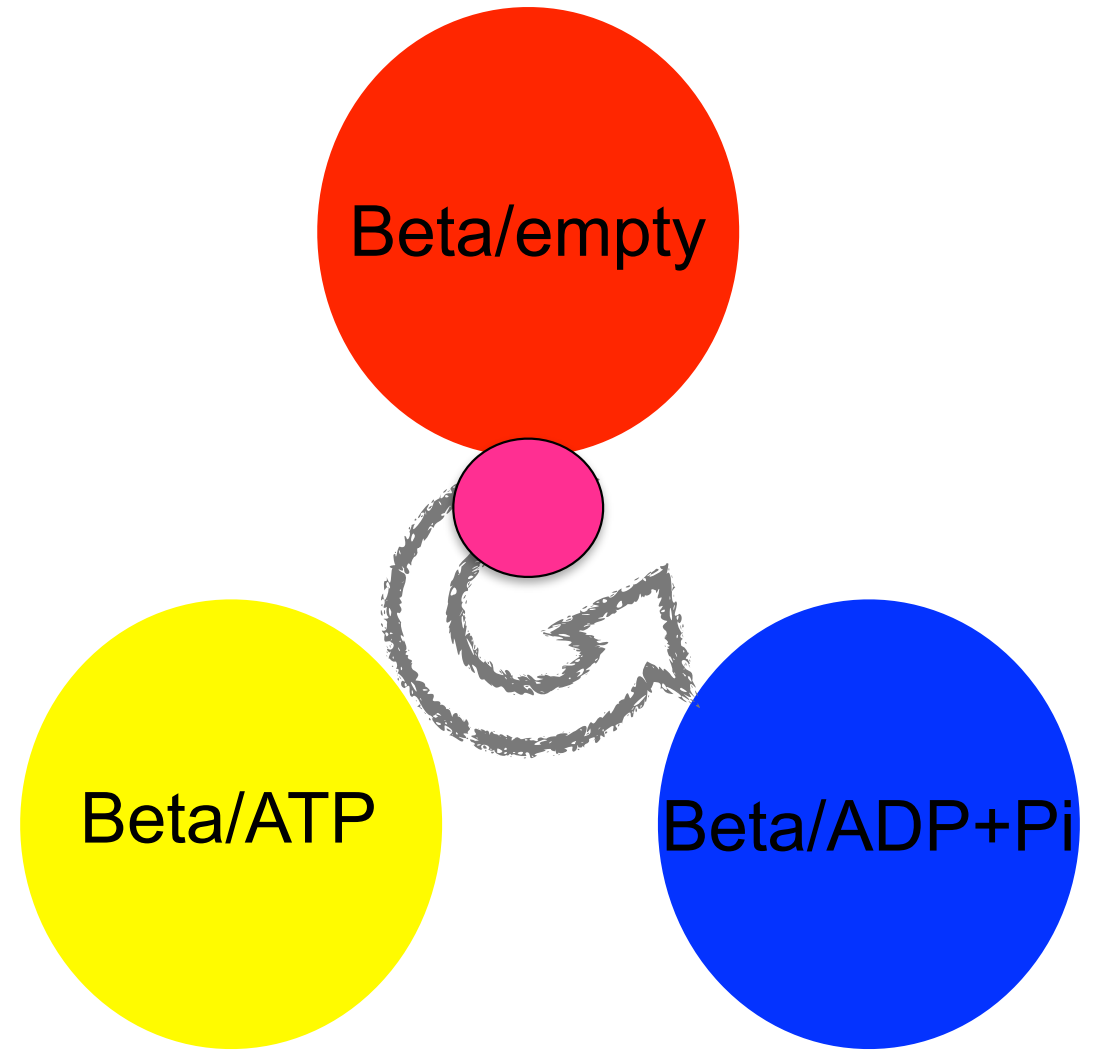
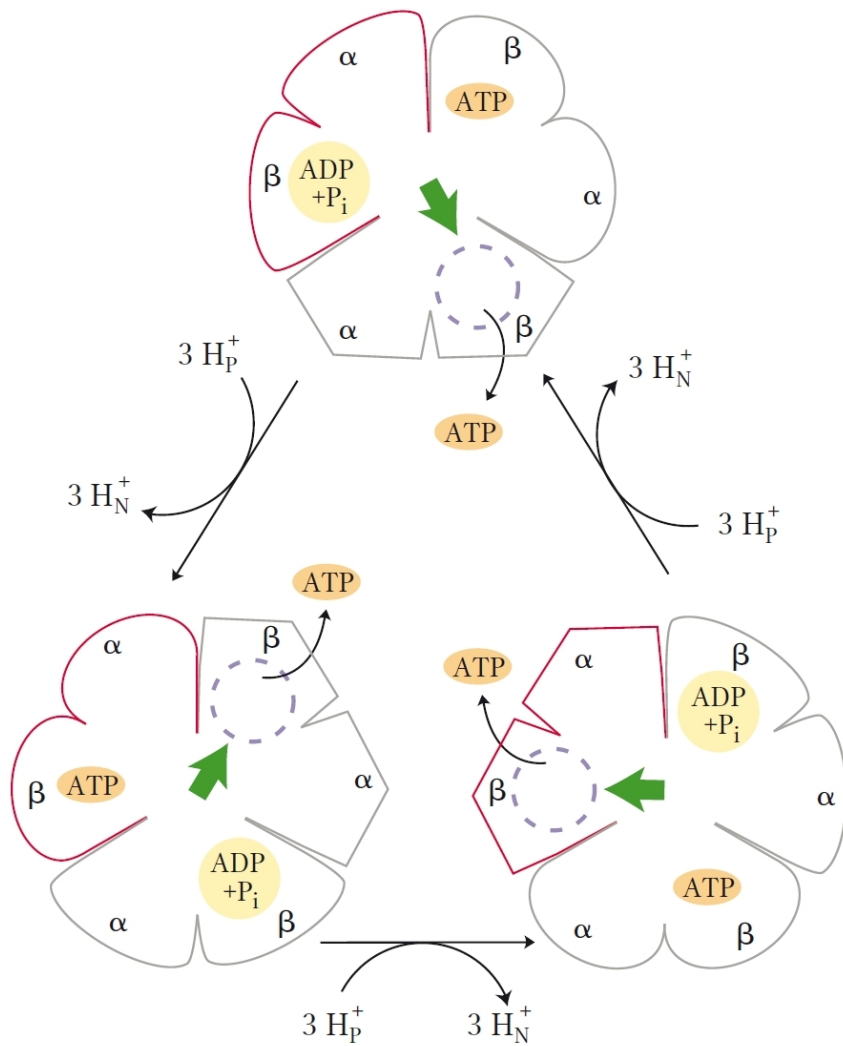
Lo step con forte differenza di energia libera è il rilascio dell'ATP
=> forza motrice del gradiente protonico (tre fasi distinte)

ATP sintasi



ATP sintasi - 3 conformazioni

Beta/ADP+Pi - Beta/ATP - Beta/empty



● Subunità gamma di F1

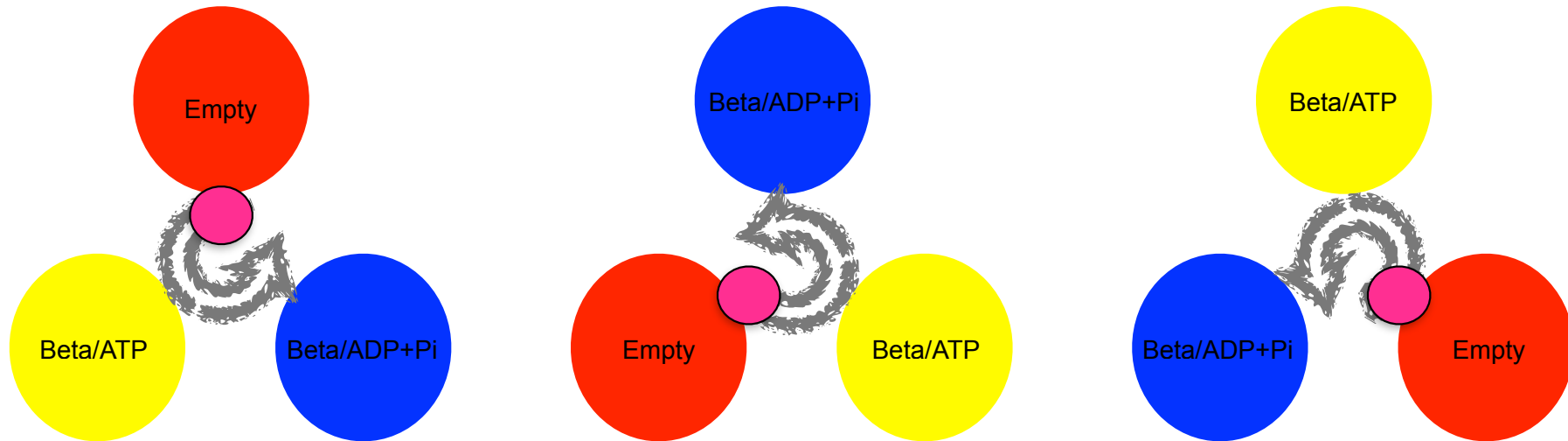
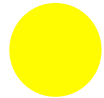
ATP sintasi - 3 conformazioni



Tre conformazioni diverse delle subunità beta di F1:



Quando è in contatto con la subunità gamma cambia conformazione (empty, a bassa affinità per ATP), quella a cui era legata prima diventa ad alta affinità per ADP e quella dopo ad alta affinità per ATP. In questo modo, dopo che si è stabilizzato l'ATP, questo, a seguito di un cambiamento conformazionale viene rilasciato dal complesso F1.



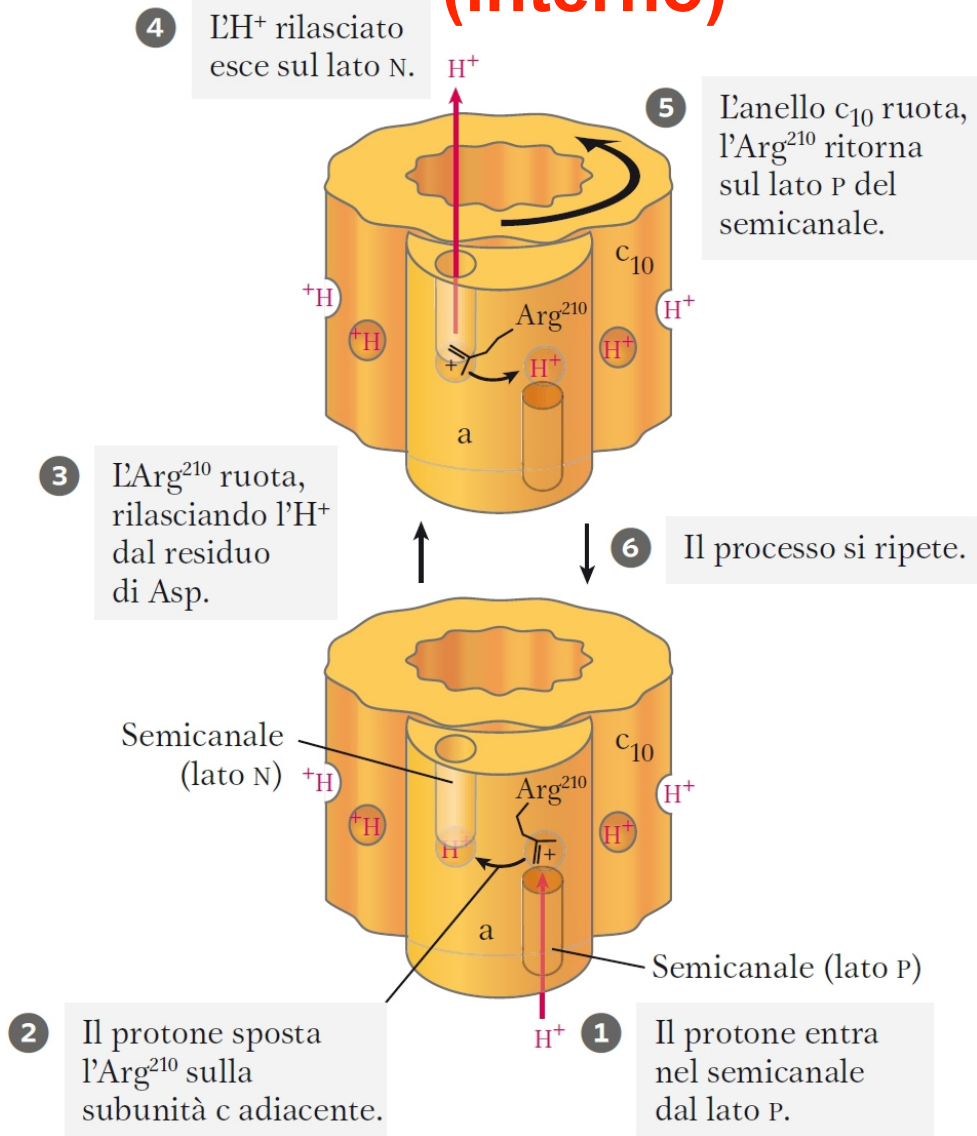
 Subunità gamma di F1

Rotazione perchè agganciata a complesso F_o (ab_2c_{8-15}) che ruota (solo le subunità c) grazie al flusso attraverso di essa dei protoni.

ADP+Pi => ATP => EMPTY

Accoppiamento flusso protonico / rotazione

Matrice (interno)



Spazio intermembrana (esterno)

Arg: subunità a (ancora delle subunità c)
Asp/Glu: subunità c.

In **a** 2 semicanali: esterno / intramembrana e intramembrana / interno.

Arg lega Asp/Glu quando è dissociata (interazione elettrostatica: +/-).

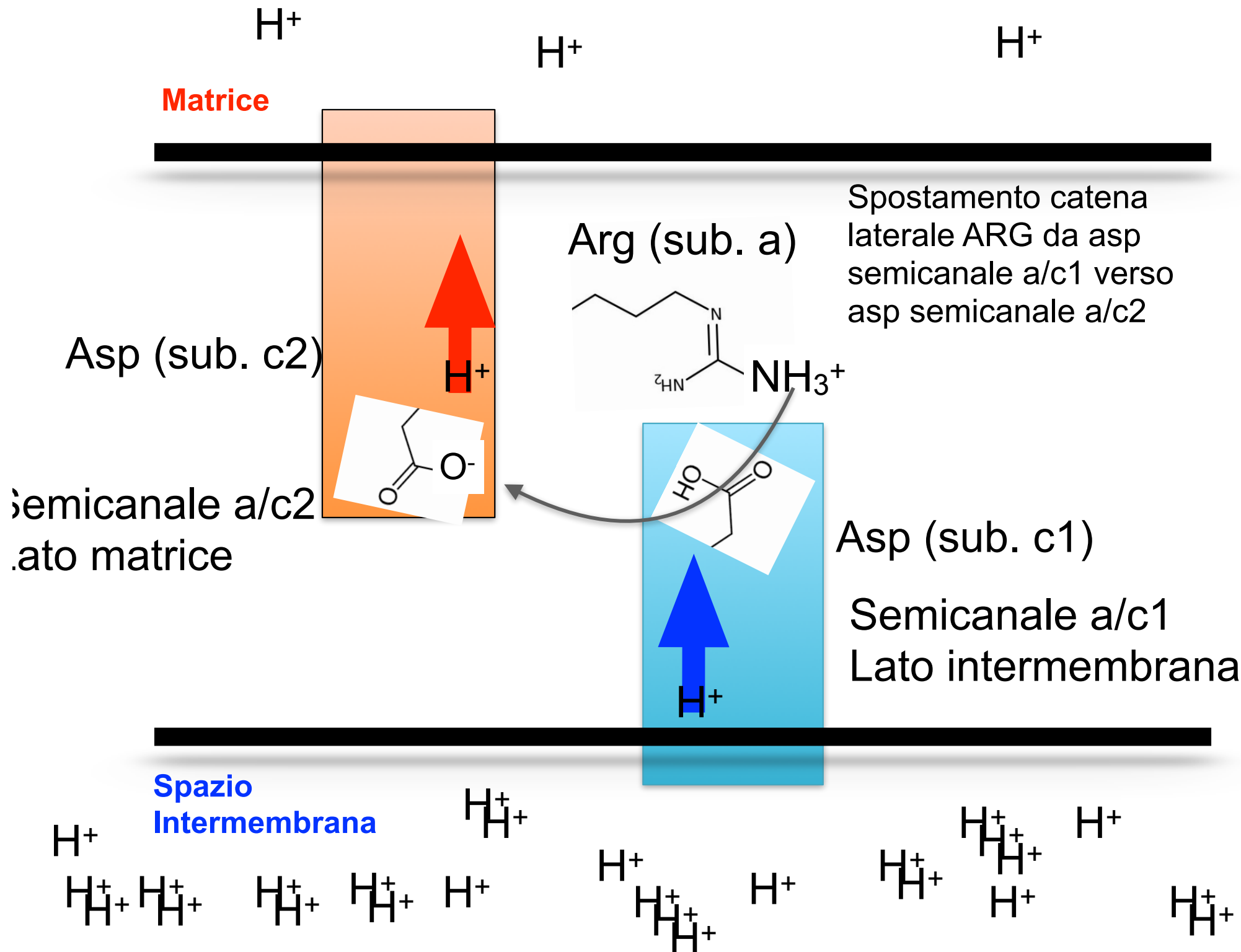
L'elevata concentrazione di protoni all'esterno fa sì che il protone possa diffondere nel semicanale est/intra e protonare residuo di Asp/Glu.

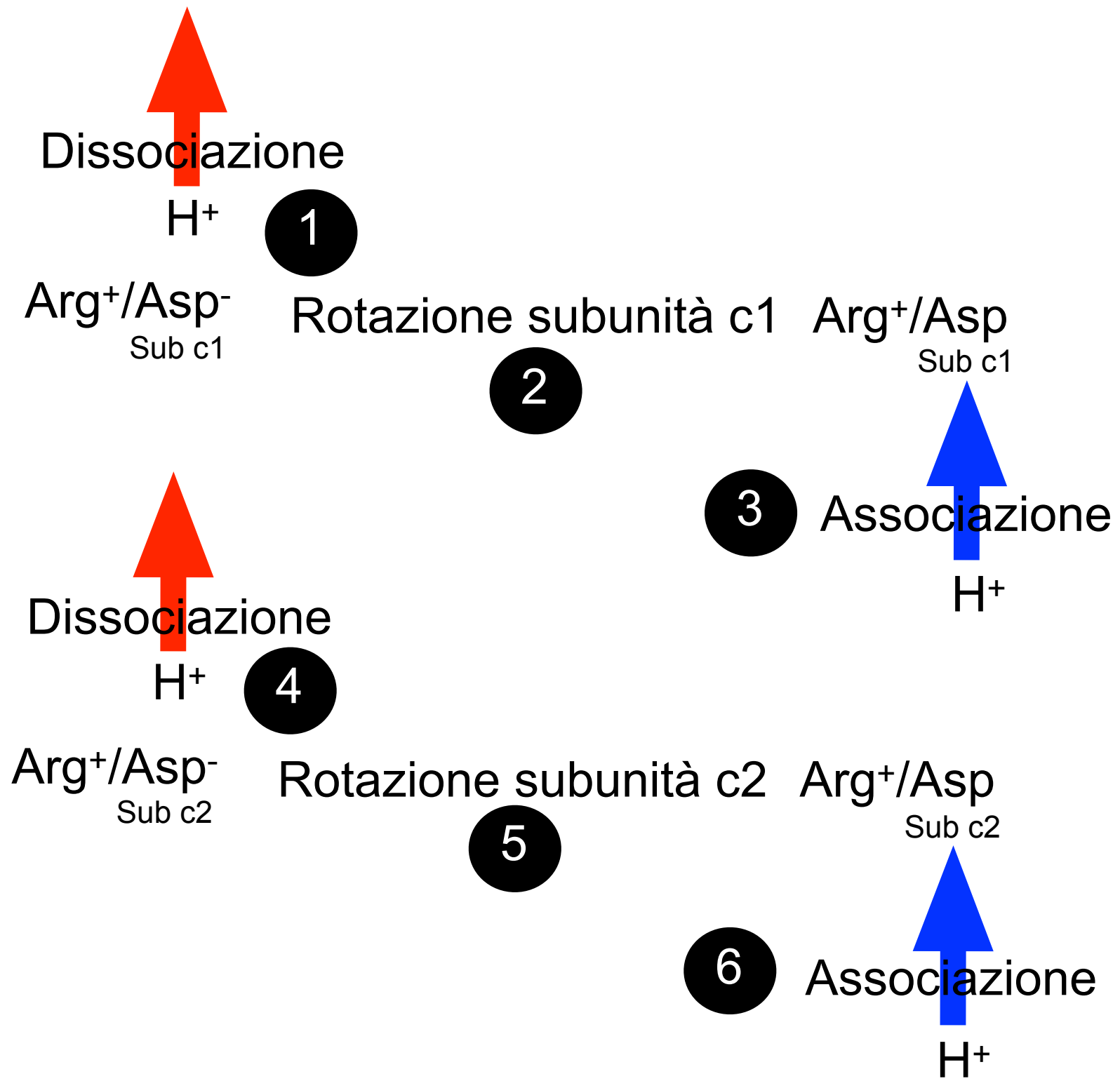
L'Arg a questo punto ricerca un legame con un Asp/Glu di una subunità c adiacente, e lo fa solo muovendosi in una direzione (verso sx).

Per legarsi Arg ha bisogno che Asp/Glu sia dissociato, e questo è favorito dalla bassa concentrazione di H interna al mitocondrio e dalla possibilità che il protone diffonda fuori dal semicanale intra/interno.

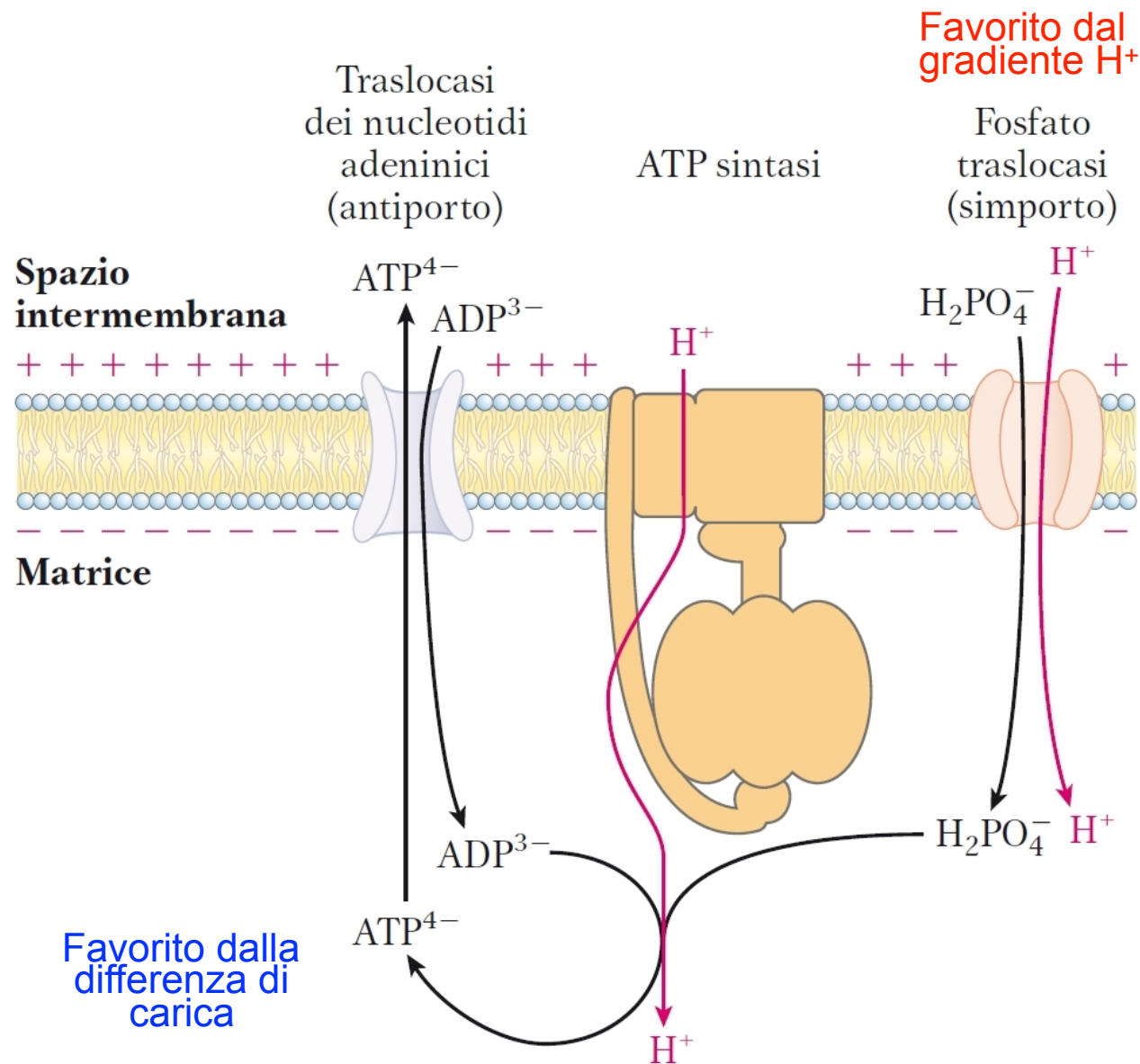
Arg si lega ad Asp/Glu ed in questo modo vincola il movimento del barile formato dalle subunità c.

Il fatto che Arg possa solo spostarsi verso sx e che ci sia un gradiente di H^+ vincola la direzione della rotazione.





ATP sintasoma: ATP sintasi + 2 traslocasi



Problema:

Durante la sintesi di ATP da parte della ATP sintasi viene consumato ADP e Pi e prodotto ATP.

Se non vi fosse un sistema per esportare ATP e importare ADP e Pi il sistema andrebbe in arresto a causa della mancanza di substrati e dell'accumulo di prodotti

Soluzione:

2 traslocasi

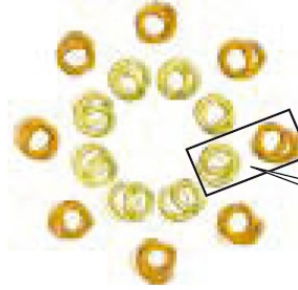
- 1) Pi / H⁺ (simporto)
- 2) ATP/ADP (antiporto)

=>

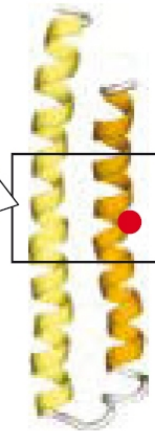
gradiente protonico speso anche per importare nella matrice mitocondriale Pi!

Accoppiamento flusso protonico / rotazione => 1 giro completo 3 ATP sintetizzate

(a) Vista dall'alto



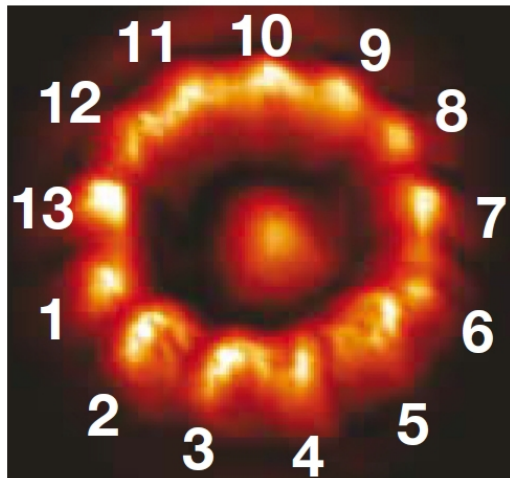
Vista laterale



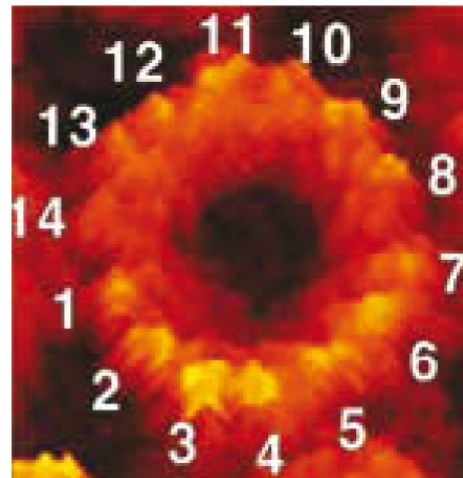
(b)



(c)



(d)



5 nm

Ma attenzione...

Non tutte le specie hanno lo stesso numero di subunità c. Un giro => 3 ATP

Ma se ci sono 8 subunità servono 8 H⁺, se ce ne sono 10 servono 10 H⁺ e così via...

Considerando che è stato stabilito che l'ossidazione di:

NADH => 10 H⁺

Succinato => 6 H⁺

E H⁺ non è solo utilizzato per far "muovere" l'ATP sintasi ma anche per l'importo nella matrice mitocondriale di Pi...

Qualche calcolo (rapporto ATP/NADH)

...quante molecole di ATP si formano a seguito dell'ossidazione di una molecola di NADH?

NADH \Rightarrow 10 H⁺ pompati all'esterno

Un giro ATP sintasi \Rightarrow 3 molecole di ATP

Giro completo ATP sintasi (tanti H⁺ quante sono le subunità c)

Caso 8 subunità c

Necessario importare nel mitocondrio 3 P_i \Rightarrow 3 H⁺

3 ATP: 8 H⁺ + 3 H⁺

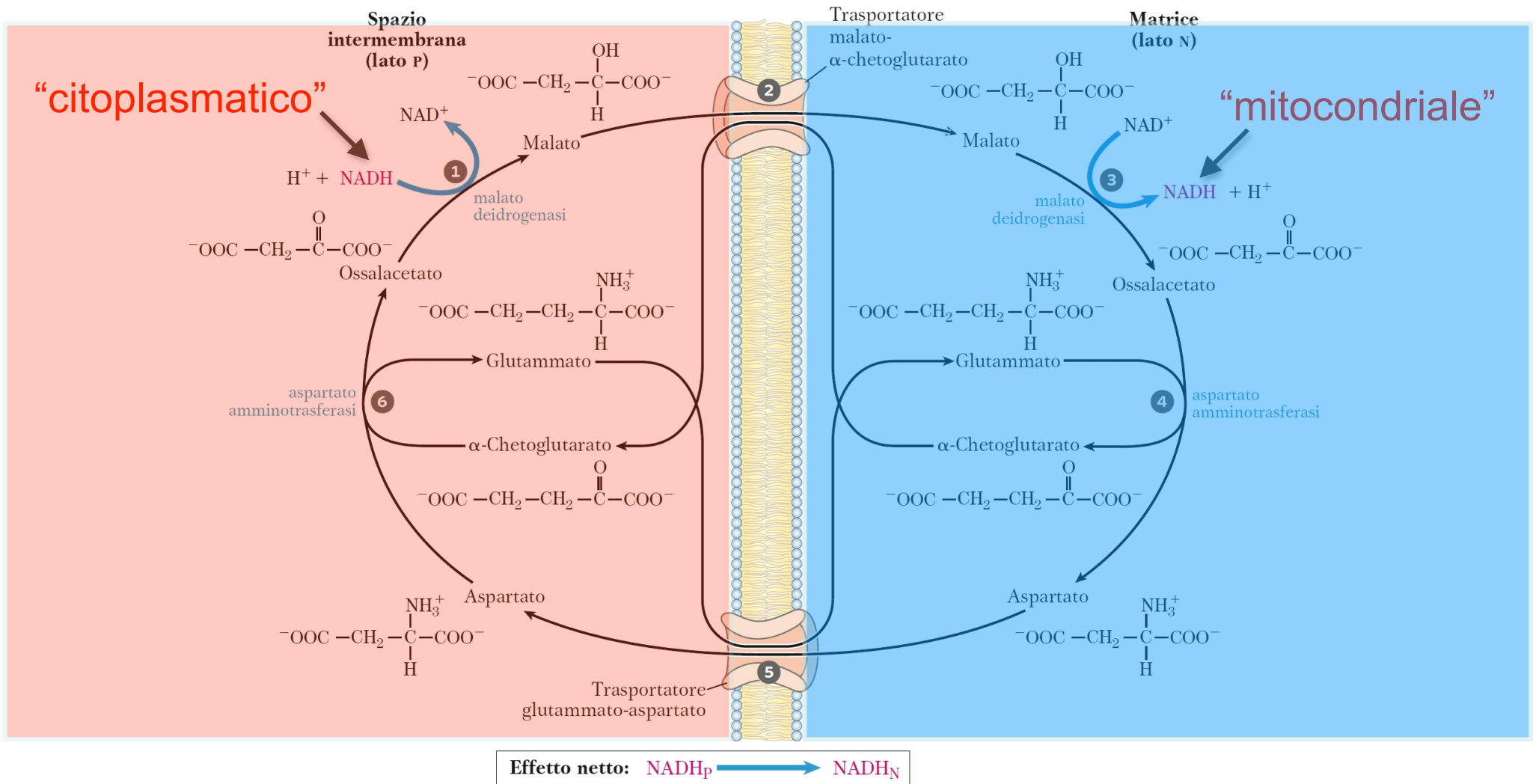
11 H⁺ / 3 ATP = 3,6 H⁺/ATP

\Rightarrow

10 H⁺/NADH / 3,6 H⁺/ATP = **2,8 ATP/NADH**

NB: questo numero dipende dal numero di subunità c!
(Più subunità c ci sono meno efficiente è il sistema...)

NADH citoplasmatico deve essere veicolato all'interno del mitocondrio:
 Sistema indiretto - equivalenti riducenti trasportati da sistemi navetta
 (**fegato, reni, cuore**)



Shuttle: **Malato / alfa-chetoglutarato**
Aspartato / Glutammato

Malato / ossalacetato
 (trasporto di equivalenti riducenti)

NADH citoplasmatico deve essere veicolato all'interno del mitocondrio: Sistema indiretto - equivalenti riducenti trasportati da sistemi navetta (**muscolo scheletrico / cervello**)

Spazio intermembrana
(lato P)

Glicolisi

NAD⁺

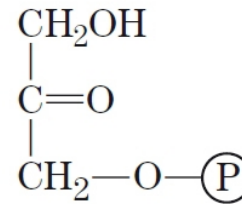
glicerolo 3-fosfato
deidrogenasi
citosolica

NADH + H⁺

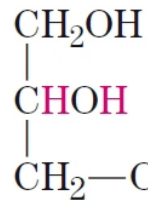
Affinchè la glicolisi
continui NADH deve
essere consumato

Glicerolo
3-fosfato

Diidrossiacetone
fosfato



Prodotto intermedio
della glicolisi



FAD

FADH₂

glicerolo 3-fosfato
deidrogenasi
mitocondriale



Complesso
III

Matrice (lato N)

Shuttle: **Glicerolo 3 fosfato**

Metodo diretto e veloce per rigenerare NAD⁺ e consentire alla glicolisi di procedere, ma questo al costo di una perdita di efficienza (si salta il complesso 1 della catena di trasporto degli elettroni con relativa perdita di gradiente protonico).