

CAPITOLUL III. BIOENERGETICA

ASPECTE GENERALE

Întreaga biosferă desfășoară o luptă continuă pentru menținerea structurii proprii și a funcțiilor inerente acestora. Pentru a exista și a supraviețui, organismele vii se află într-un schimb permanent de energie cu mediul înconjurător.

Energia chimică a substanțelor nutritive, după transformarea ei într-o formă convenabilă, este utilizată pentru efectuarea de travalii specifice vieții - creștere, reparații tisulare, activitate contractivă, osmotică. Organismele vii posedă dispozitive de transformare a energiei, deosebit de subtile și eficiente.

Care sunt legile fundamentale ce guvernează procesele însoțite de schimbări energetice? *Știința care studiază transformările și utilizarea energiei se numește bioenergetică.* Obiectul ei de studiu sunt sistemele termodinamice care constituie porțiuni din Univers, separate real sau imaginar. Ceea ce nu face parte din sistemul considerat (restul Universului), constituie mediul înconjurător. Între un sistem și mediul înconjurător se efectuează schimburi de energie. Ca sisteme termodinamice pot fi cercetate (în cadrul schimbului de energie) atât indivizii unei specii, celulele izolate, cât și reacțiile biochimice. Organismele vii sunt sisteme deschise, traversate de un flux de energie și materie, adică o dată cu mediul înconjurător se schimbă atât substanța, cât și energia.

Termodinamica clasică studiază sisteme închise (nu pierd și nu câștigă nimic în cazul transformărilor ce le suferă). *Legile termodinamicii* (TD) sunt deduse din două principii fundamentale:

1. *Principiul conservării energiei* constă în faptul că energia Universului este constantă. Energia nu poate fi creată și nici distrusă, e posibilă doar transformarea ei dintr-o formă în alta în cantități echivalente, energia nu se pierde.

2. *Principiul evoluției* stabilește posibilitatea și sensul transformărilor însoțite de schimburi de energie. Procesele asociate de transfer de energie se desfășoară de la sine numai într-o direcție și numai pînă la o anumită limită (de exemplu, căderea unui corp; revenirea la inițial a unui arc întins etc).

Care este factorul ce determină spontaneitatea unei transformări, de ce la o anumită limită procesul încetează?

Putem prevedea sensul și limita desfășurării libere a unui proces cu ajutorul *entropiei* (S), definită ca grad de dezordine a unui sistem. Ea reprezintă mișcarea dezordonată, haotică a particulelor, atomilor care alcătuiesc acest sistem. Cu cât libertatea de mișcare a acestor particule este mai mare, au o distribuție mai dezordonată, cu atât entropia sistemului este mai mare. Moleculele organice complexe, proteinele, acizii nucleici sunt compuși cu entropii mici. Celulele vii, organismele pluricelulare sunt de asemenea sisteme naturale cu entropii dintre cele mai mici.

Principiul al doilea al termodinamicii atestă că entropia Universului crește. Ordinea se poate transforma spontan în dezordine. Însă procesul invers — diminuarea dezordinii — nu poate avea loc decît dacă sistemul absoarbe energie din mediu și diminuează entropia. Ultima (S) poate fi măsurată (în calorii /grad/ mol.). Modificările

entropiei sunt greu de evaluat, de apreciat, în foarte multe cazuri. S-a definit o altă funcție termodinamică legată de entropie, care servește drept criteriu de manifestare liberă a proceselor — *energia liberă*.

Totalitatea factorilor (nucleul, electronii, rotația, translația, legăturile) determină energia internă (E) a sistemului. Energia internă a substanțelor simple nu se supune calculelor sau măsurărilor. Termodinamica operează cu valori ale modificărilor în cursul unor transformări pe care le suportă sistemul.

Având în vedere că reacțiile biochimice au loc în soluții apoase, în care variațiile de volum, presiune, T^0 sunt neglijate în cursul transformărilor, în bioenergie pot fi efectuate diferite simplificări ale modului de evaluare a schimbărilor energetice și sensului în care transformarea poate decurge liber, spontan. În reacțiile biochimice efectuate în condițiile sus-numite, modificările energetice sunt datorate exclusiv unor transformări intrinseci ale sistemului: formare sau desfacere de legături covalente, transfer de electroni, schimb de protoni, interacțiuni hidrofobe, formare de asociații intermoleculare etc.

Dacă în starea inițială sistemul a avut o valoare energetică egală cu E_1 și în final cu E_2 , apoi diferența $E_2 - E_1 = \Delta E$ indică variația energiei interne a sistemului, modificările energetice totale ce însoțesc acest proces. Dacă ΔE este negativă, sistemul are energie internă, în final, mai mică. Dacă ΔE are valoare pozitivă, sistemul captează energie din mediu, în decursul transformărilor.

O porțiune din energia internă depinde de entropie și atestă produsul ei (S) și temperatura absolută (ST), aceasta fiind componenta energetică ce nu poate fi transformată în travaliu, în lucru util (la T constantă). Un anumit lucru înseamnă o mișcare ordonată, iar factorul TS este o energie de calitate inferioară, o energie degradată a sistemului. *Componenta energiei sistemului, convertibilă în lucrul util (la T^0 constantă) poartă denumirea de energie liberă (G).* $E = G + TS$. Rezultă că variația energiei interne (ΔE) într-o reacție este determinată de variațiile energiei sale libere (ΔG) și de variațiile entropiei (ΔS):

$$\Delta E = \Delta G + T\Delta S.$$

Reacțiile au loc spontan, când entropia sistemului în stare finală este mai mare, respectiv energia sa liberă scade. Orice reacție chimică sau proces are loc în sensul în care energia liberă a sistemului diminuează capacitatea sa de a efectua travaliul. Forța motrice a reacțiilor este tendința sistemului atât de a-și spori gradul de dezordine, cât și de a-și reduce conținutul de energie liberă, ordonată.

Energia liberă a unui compus depinde de cantitatea de substanță, ceea ce constituie o valoare extensivă. Energia a 2 molecule este de 2 ori mai mare decât a unei singure molecule. Energia liberă este o mărime aditivă: $G_s = G_a + G_b + G_c$.

Variația energiei libere într-o reacție în care un mol reactant s-a transformat într-un mol rezultat — fiecare în stare standard — poartă denumirea de energie liberă de reacția standard și se notează cu ΔG^0 . Ea se calculează conform formulei:

$$(1) \quad \Delta G^0 = -2,303 \times R \times T \times \lg K; = -1,36 \times \lg K$$

(R - constanta gazului = 1,987 cal/mol, $T = 298^\circ K$).

Dacă: 1) $K_{eq} = 1$, atunci $\Delta G^0 = 0$;

2) $K_{eq} > 1$, ΔG^0 este negativ;

3) $K_{eq} < 1$, ΔG este o valoare pozitivă.

$K_{eq} = 10^{-1}$, $\Delta G^0 = 1,36$; $K_{eq} = 10$, $\Delta G^0 = -1,36$.

Spre exemplu: în amestecul echilibrat G-1-P \rightleftharpoons G-6-P concentrațiile sunt egale respectiv, cu $K_{eq_1} = 0,001$ (1mM) și $K_{eq_2} = 0,019$ (19 mM).

$$K_{eq} = \frac{0,019}{0,001} = 19; \quad \lg 19 = 1,28.$$

$$\Delta G^0 = -1,36 \times 1,28 = -1,74 \text{ kcal/mol.}$$

În concluzie, transformările G-1-P în G-6-P la concentrații inițiale de 1,0 mol decurg cu pierderea energiei libere.

Formula precedentă (1) ne permite să determinăm constanta reacțiilor în condiții standard (2):

$\lg K_{eq} = 10^{-\Delta G^0 / (2,303 RT)} = 10^{-\Delta G^0 / 1,36}$. Dacă $\Delta G^0 = -1,36$ kcal/mol, apoi $K_{eq} = 10$.

Așadar, energia liberă standard și constanta de echilibru a reacției sunt legate printr-o formulă simplă. Corelațiile dintre constanta de echilibru și valorile modificărilor energiei libere standard ale reacțiilor chimice la $T = 25^\circ\text{C}$ sunt redată în tabelul de mai jos:

K_{eq}	ΔG^0 , kcal/mol	K'_{eq}	ΔG^0 , kcal/mol
10^{-5}	6,82	10	-1,36
10^{-4}	5,46	10^2	-2,73
10^{-3}	4,09	10^3	-4,09
10^{-2}	2,73	10^4	-5,46
10^{-1}	1,36	10^5	-6,82
1	0		

Valorile modificărilor energiei libere standard caracteristice unor reacții chimice sunt următoarele:

ATP + H ₂ O	→	ADP + Fosfat	$\Delta G^0 = -7,3$ kcal/mol
Glucozo-6-fosfat + H ₂ O	→	Glucoză + Fosfat	$\Delta G^0 = -3,3$ kcal/mol
Maltoza + H ₂ O	→	2Glucoză	$\Delta G^0 = -3,7$ kcal/mol
Lactoza + H ₂ O	→	Glucoză + Galactoză	$\Delta G^0 = -3,8$ kcal/mol
Glucozo-1-fosfat	→	Glucozo-6-fosfat	$\Delta G^0 = -1,74$ kcal/mol
Fructozo-6-fosfat	→	Glucozo-6-fosfat	$\Delta G^0 = -0,40$ kcal/mol
Malat	→	Fumarat + H ₂ O	$\Delta G^0 = +0,75$ kcal/mol
Glucoză + 6O ₂	→	6CO ₂ + 6H ₂ O	$\Delta G^0 = -686$ kcal/mol
Acid palmitic + 23O ₂	→	16CO ₂ + 16 H ₂ O	$\Delta G^0 = -2338$ kcal/mol

Studiind biochimia, ar trebui să rezolvăm două probleme principale: 1) În ce mod celula recepționează energia și capacitatea reductoare din mediul ambiant și 2) Cum celulele sintetizează blocurile de construcție — baza macromoleculilor?

În general, aceste procese au loc datorită prezenței unor sisteme superintegrate de reacții chimice denumite *metabolism*.

METABOLISMUL

Metabolismul este o activitate celulară concordată, determinată de participarea multor sisteme multienzimatice strâns legate între ele.

Care sunt funcțiile metabolismului?

1. Aprovizionarea cu energie chimică, care se formează la scindarea substanțelor nutritive bogate în energie sau ca urmare a transformării energiei radiației solare.
2. Transformarea moleculelor substanțelor nutritive în blocuri de construcție necesare pentru sinteza macromoleculelor.
3. Asamblarea proteinelor, acizilor nucleici, polizaharidelor, lipidelor și a altor componenți celulari din aceste blocuri.
4. Sinteza și catabolismul biomoleculelor necesare pentru activitatea specifică a diferitelor celule.

Un organism simplu ca *E.coli* produce cel puțin o mie de reacții chimice diferite. Sistematizarea lor la prima vedere pare imposibilă, dar la o analiză mai profundă se dovedește a fi mult mai simplă — metabolismul reprezintă un sistem coordonat cu motivații comune. Numărul de reacții în metabolism e mare, dar numărul de tipuri de reacții e relativ mic.

Rolul primordial în toate formele vieții îi aparține unui grup de molecule, numărul total al cărora nu depășește 100. De remarcat că există mecanisme comune ale reacțiilor căilor metabolice. Cu alte cuvinte, căile metabolice centrale sunt reduse și identice aproape la toate viețuitoarele.

În procesul metabolismului o parte din energia captată se pierde, iar cantitatea energiei neutilizate crește. Căldura și alte forme de energie se emană în mediul exterior, trec într-o formă nesistematizată și inutilă pentru organismele vii. Torentul de energie în biosferă e un proces direcționat, neciclic, cheltuindu-se o energie anumită pentru activitatea în căile metabolice, deoarece energia utilizabilă nu poate fi regenerată din cea inaccesibilă, disipată. Și dacă elementele C, O₂ au rotațiile lor, sunt antrenate în cicluri noi, atunci energia utilă degradează încontinuu, se transformă în una inutilă.

Fiecare tip de celule se caracterizează printr-o solicitare specifică de sursele O₂, N, C, cât și de surse corespunzătoare de energie. Metabolismul celular e un sistem de modificări fermentative ale substanțelor și energiei provenite din produsele inițiale și pînă la biosinteza materiei vii. *Produsele intermediare a căilor metabolice sunt numite metaboliți.*

La diferite etape au loc modificări chimice neesențiale — adiția, deleția, transferul atomilor, moleculelor, grupelor funcționale. În urma acestor modificări reglementate pe etape, molecula inițială se transformă în metabolitul rezultat. Unele căi metabolice se expun liniar, altele ciclic.

De obicei, căile metabolice au diferite ramificații, de unde circulă produsele reacțiilor. Într-un sens mai îngust, prin metabolism se subînțeleg transformările substanțelor în celulă de la momentul inițial pînă la formarea produselor finale. Evidențiem două faze ale metabolismului — *catabolism și anabolism*.

Catabolismul constituie faza degradării compușilor preluați din exterior, a propriilor constituenți ca rezerve — la compuși simpli. Procesele catabolice sunt însoțite de degajarea energiei libere, încadrată în structura complexă a substanțelor organice. La o anumită etapă a procesului energia liberă se acumulează pe durată scurtă grație reacțiilor fermentative cuplate în formă macroergică — ATP. Poate fi acumulată și în intermediari (o parte) bogați în energie — atomii de hidrogen ai coenzimei NADP în stare redusă NADPH.

Anabolismul sau biosinteza este faza procesului de sinteză a diverșilor compuși organici (proteine, acizi nucleici și alte blocuri macromoleculare) constituiți din mici blocuri de construcție. Procesul necesită utilizarea energiei libere. Drept sursă servește scindarea ATP. Biosinteza solicită și atomi de H, donatori fiind NADPH.

Catabolismul și anabolismul decurg simultan în celule, însă viteza lor se reglează independent. Hans Krebs a descris trei etape de generare a energiei la oxidarea substanțelor nutritive. Aceste căi catabolice jonctonează, converg, dând naștere unui număr redus de metaboliți.

Etapetele catabolismului aerob sunt următoarele:

a) Macromoleculele alimentelor se scindează în componente mici: proteinele în 20 aminoacizi, polizaharidele — în hexoze și pentoze, lipidele — în acizi grași și glicerină. La această etapă nu are loc eliminarea energiei biologice utile.

b) În faza a doua, din moleculele primei faze (numeroase) se formează câteva componente simple, ce joacă un rol primordial în structura metabolismului, și anume piruvatul — un compus intermediar, ce se transformă în component acil al acetil-coenzimei A, ultimul încheind etapa a doua.

c) În etapa a treia, grație ciclului acizilor tricarbonici și fosforilării oxidative, ce finalizează căile de oxidare a moleculelor nutritive, se formează H_2O , CO_2 , NH_3 (sau alte substanțe azotoase). Generarea energiei are loc, mai cu seamă, la această etapă. Căile catabolice, în fine, fuzionează fenomenul de convergență.

Anabolismul decurge la fel în trei etape, începând cu moleculele mici de precursori. Spre deosebire de catabolism, căile metabolice la anabolism se ramifică (fenomen de divergență). Dintr-un număr mic de precursori se formează, în final, un complex de macromolecule de structură vastă.

Căile centrale conțin multe ramificații, facilitând astfel sintetizarea a sute de componente, reacțiile biochimice fiind catalizate de sisteme multienzimatice. Succesiunea modificărilor chimice în aceste căi este în principiu identică la toate organismele vii. De exemplu, scindarea glucozei decurge în același mod la toate organismele.

Coincide oare direcția căilor catabolice și celor anabolice?

Datele confirmă că ea nu este identică. Or, acest factor e favorabil celulei?

Există cauze serioase ce determină necoincidența căilor metabolice:

1. Calea de scindare a biomoleculei poate fi incompatibilă cu cea de biosinteză din considerente energetice (e clar, dacă procedăm în analogie cu căderea unei pietre de pe munte și intenția de a o urca în vârful lui). Calea de biosinteză necesită energie suplimentară, cheltuieli enorme.

2. Neidentitatea constă și în faptul că succesiunea reacțiilor trebuie reglată separat. Dacă ar exista aceeași cale, ar avea loc o simplă inversare a succesiunilor de reacții. Inhibarea catabolismului ar conduce și la inhibarea proceselor anabolice. Pentru ca sinteza și scindarea unei molecule să fie reglate independent, aceste căi trebuie să fie diferite. Dacă, însă, posedă faze fermentative comune, apoi viteza procesului este reglată de acele enzime care în cadrul succesiunii reacțiilor căilor contrare nu participă.

3. Este exclusă identitatea și din motivul că diferă (cele antidirecționale) și după localizare (catabolismul acizilor grași are loc în mitocondrii — biosinteza lor în citozol. În aceste structuri este situat un complet de enzime specifice).

Nefiind identice, căile menționate sunt legate prin etapa a III-a ce include ciclul acizilor tricarboxilici și fosforilarea oxidativă. Această etapă e numită *faza amfibolică* a metabolismului, îndeplinind un rol bifuncțional. Catabolismul finalizează cu scindarea și formarea moleculelor relativ mici; anabolismul furnizează molecule mici — precursorii biosintezei.

Ciclul ATP. Reacțiile metabolice sunt indispensabile, constituind o rețea de reacții fermentative corelate necesităților urgente ale celulei; decurg foarte econom, cu minimum consum energetic. În procesul de oxidare se elimină o cantitate enormă de energie nevalorificată, utilizată ulterior pentru îndeplinirea unui lucru la T și P constante. Ea se fixează și se conservează. Energia termică e necesară pentru menținerea T constante a corpului. Sistemul universal de transfer al energiei în toate celulele vii este ATP - ADP și P_i . O mare parte a energiei libere se păstrează în baza sintezei cuplate a ATP din ADP și P_i .

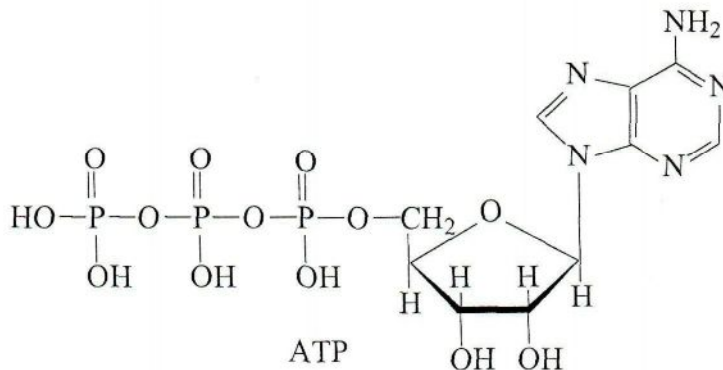
Energia chimică încorporată în ATP este utilizată drept:

1. Sursă de energie în mișcare, contracție și transfer de ingredientii prin membrane contra gradientului de concentrație etc.

2. Sursă de energie în biosinteză. Sub acțiunea enzimelor respective fosforul (P) terminal este transferat moleculelor mici, activându-le și folosindu-le ulterior la asamblarea macromoleculelor.

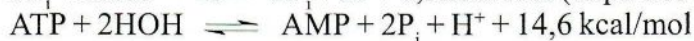
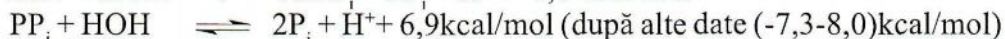
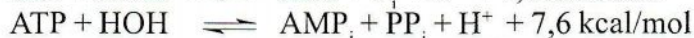
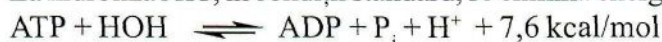
3. Mobilizator al mecanismelor fine ce determină transmiterea informației genetice.

În reacțiile cuplate cu utilizarea energiei celulare ADP se încarcă. ATP joacă rolul de expeditor al energiei și cuplează procesele active, cu eliminarea și utilizarea energiei.



Fiind depistată ATP în extractul din mușchii scheletali, în 1929, de către K.Lohmann (Germania) și C.Fiske, și J.Subbarow (SUA), abia în 1941, Fritz Lipmann a înaintat conceptul care prevedea existența în celulă a ATP - ciclului, în care ATP joacă principalul și universalul rol de remițător al energiei chimice. Prezența ATP, ADP, AMP este determinată la toate vietățile și îndeplinesc aceleași funcții. Se conțin în toate compartimentele celulei, cota ATP fiind 80% din conținutul total.

La hidroliza ATP, în condiții standard, se elimină energie:



Energia liberă constituie diferența dintre energia liberă a substanțelor inițiale și cea a produselor rezultante în condiții standard ($T = 298^\circ\text{K}$, $P = 1 \text{ atm.}$, concentrație = $1,0 \text{ mol}$, $\text{pH} = 7,0$). Se notează prin ΔG° — în cal/mol sau J (joule); $1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$ și se calculează conform ecuației descrise mai sus.

ATP este principalul donator al energiei libere în sistemele biologice, ceea ce nu egalează cu forma de rezervă a energiei. În celulă molecula de ATP se utilizează timp de un minut după sinteza sa. Omul în repaus utilizează în 24 ore circa 40 kg de ATP; la exerciții intensive viteza utilizării de ATP ajunge la 0,5 kg/min. Turația ATP e foarte mare.

Unele reacții biosintetice sunt inițiate de către alte nucleotide, în care GTP, UTP, CTP servesc drept furnizori de energie.

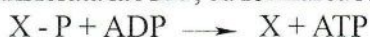
La hidroliza unor compuși fosforilați se elimină mai multă energie liberă decât la scindarea în condiții standard a ATPului:



ATP, ADP ocupă o poziție intermediară, care are o importanță primordială pentru funcțiile lor biologice - 7,6 kcal/mol.



Ocupînd acest loc în scara termodinamică, ATP servește la remiterea grupelor fosfat de la *substanțele supermacroergice* la acceptorii de fosfat, compușii cărora se caracterizează prin valori mici de ΔG° la hidroliză. În procesele de catabolism se formează substanțe supermacroergice ($X - P$). Cu ajutorul enzimelor specifice din grupa kinazelor grupa fosfat este transferată la ADP, cu formarea ATP.



La etapa a doua, o altă kinază specifică transferă P terminal din ATP pe molecula acceptorului de fosfat (Y), măbind energia lui.

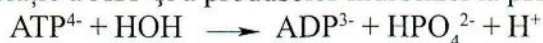


ATP îndeplinește funcția de remițător al energiei chimice, deoarece celula nu conține kinaze specifice, ce ar transfera grupa fosfat de la substanțele supermacroergice la acceptori.

Ce particularități determină molecula de ATP, la hidroliza fosfatului terminal, să elimine energie?

Efectul e determinat de trei factori structurali:

1) gradul de disociație a ATP și a produselor hidrolizei la pH = 7,0



— ionii de hidrogen deplasează reacția de hidroliză spre dreapta;

2) repulsia electrostatică: cele 4 sarcini negative sunt situate foarte aproape în spațiu — la hidroliza ATP tensiunea intramoleculară scade, produsele reacției posedă sarcină negativă, se resping reciproc și nu pot forma molecula de ATP;

3) gradul de stabilitate, cu rezonanța mai mare a ADP + P_i decât pentru ATP; primele au forme structurale mult mai stabile. Stabilitatea e determinată de faptul că o parte din electroni sunt dispuși în configurații cu energie mult mai mică decât în configurațiile caracteristice pentru ATP. Cu alte cuvinte, electronii în ADP și P_i se situează la niveluri energetice mai joase și conduc la micșorarea rezervei de energie liberă;

4) prezența ionilor de Mg⁺⁺ — afinitatea ADP de Mg²⁺, este de 6 ori mai mare decât a ATP, reacția de hidroliză este “împinsă” spre formarea ADP și P_i.

Energia nu se află în legătură macroergică și contrar se utilizează pentru scindarea ei. La hidroliza esterilor acidului fosforic energia este condiționată nu de ruperea legăturii, dar de reducerea energiei din produsele inițiale. Sistemul de generare a ATP în celulă menține raportul ATP/ADP x P_i la nivel înalt — circa 500. Hidroliza unei molecule de ATP deplasează raportul concentrației produselor la concentrația substanțelor inițiale în reacțiile cuplate = 10⁸ ori. Succesiunea de reacții imposibile, din punct de vedere termodinamic, devine posibilă, se realizează prin cuplarea hidrolizei unui număr mare de molecule de ATP.

De exemplu: ΔG° transformării substanței A în B este egală cu 4 kcal/mol.

Astfel de transformare devine imposibilă fără surplus de energie. Fiind Keq = 10^{-ΔG/1,36}, obținem K egală cu 1,15 x 10⁻³, adică, dacă relația molară e egală sau mai mare decât 1,15 x 10⁻³, substanța A nu poate fi spontan transformată în B.

Acest lucru va fi posibil numai dacă reacția se va cupla cu hidroliza ATP.



$$\Delta G = -7,3 + 4 = -3,3 \text{ kcal}$$

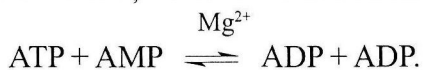
$$K_{eq} = 10^{-3,3/1,36} = 2,67 \times 10^{-2}$$

$$K_{eq} = \frac{[\text{B}] [\text{ADP}] [\text{P}_i]}{[\text{A}] [\text{ATP}]} = 2,67 \times 10^{-2}$$

$$\frac{[B]}{[A]} = K_{eq} \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} = (2,67 \times 10^{-2}) \times 500 = 1,34 \times 10^5.$$

Aceasta înseamnă că hidroliza ATP asigură posibilitatea transformării $A \rightarrow B$ atîta timp, cît raportul B/A va atinge valoarea $1,34 \times 10^5$. Fără ATP, valoarea e egală cu $1,15 \times 10^{-3}$; hidroliza ATP modifică raportul B/A aproximativ de 10^8 ori.

La utilizarea a două grupe fosfat se formează AMP, care se reîntoarce în ciclu sub acțiunea unei enzime prezente în toate țesuturile - *adenilatkinaza*.



Enzima are și funcția de a menține ATP în celule, cînd reacția catalizată va decurge în direcție inversă.

Metabolismul celular e bazat pe o economie maximă. Viteza metabolismului e determinată de necesitățile în ATP și NADPH. Celula utilizează la moment acea cantitate de substanțe nutritive, care-i permite satisfacerea necesităților energetice, precum și viteza de sinteză a blocurilor de construcție și macromoleculelor celulare. Substanțele din multe organisme și plante nutritive trec în rezervă și servesc drept surse de energie și de carbon (glucidele, lipidele), cu excepția proteinelor și acizilor nucleici.

Procesele catabolice sunt foarte sensibile și reacționează fin la modificările și necesitățile energetice ale celulei. La musca domestică, bunăoară, utilizarea O_2 și a surselor celulare în timpul zborului în decurs de 1 sec. crește de 100 ori.

MECANISMELE DE REGLARE ALE METABOLISMULUI

Mecanismul cardinal este indispensabil de efectul enzimelor alosterice. În calitate de inhibitor servește ATP, iar de modulator pozitiv — ADP și AMP. Pot participa și alte rezultante finale sau intermediare ale altor căi metabolice.

Multe reacții sunt reglate de starea energetică a celulei. Indicatorul ei *e sarcina energetică* care se determină: (ATP — conține două legături anhidrice, ADP — una):

$$Se = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Valoarea oscilează de la 0 (în sistem numai AMP) la 1 (numai ATP). Daniel Atkinson a demonstrat că toate căile metabolice, responsabile de sinteza ATP, sunt inhibitate de sarcina energetică înaltă, pe când căile de utilizare ale ATP sunt simultan stimulate (fig.3.1). Reglarea menține sarcina energetică ca și pH-ul celulei în oscilații limitate (0,80-0,95).

Un indice reglator al metabolismului celular e *potențialul fosforilării — PF*. El e dependent de fosforul compartimental și e direct dependent de energia liberă degajată la scindarea ATP:

$$PF = \frac{[ATP]}{[ADP] \times [P_i]} = 500.$$

Mecanismele ce reglează metabolismul sunt dependente de hormonii care accelerează activitatea enzimelor (adaptare imediată) sau de viteza sintezei enzimelor (adaptare de lungă durată), respectiv, adrenalina și steroizii.

Sunt mecanisme legate de modificările concentrației enzimelor în celulă, determinată de relațiile sinteză-scindare. Inducția enzimatică condiționată de concentrația substanțelor participă activ la reglarea metabolică (vezi cap. I).

Distingem și *metabolism secundar*, care își are funcția sa aparte la formarea substanțelor specifice necesare celulei în cantități mult mai mici — coenzime, hormoni. Sute de biomolecule absolut specifice se produc în aceste căi metabolice, studiate insuficient pînă în prezent.

Toate animalele și celulele plantelor, în condiții normale, sunt aerobe și combustibilul lor organic și-l oxidează complet pînă la CO_2 și H_2O . *Energia biologică liberă accesibilă* este eliminată din substanțe organice numai în cazul în care toți atomii de hidrogen, legați de atomii de carbon din moleculă, vor fi substituiți de oxigen, formînd CO_2 . Cantitatea de energie liberă, ce se elimină la arderea totală a oricărei substanțe organice, e aproximativ proporțională cu raportul dintre numărul de atomi de hidrogen legați de carbon și numărul total al atomilor de carbon: CH_4 (4); CH_3OH (3); $CHOH$ (1); CH_2O (2); CO_2 (0).

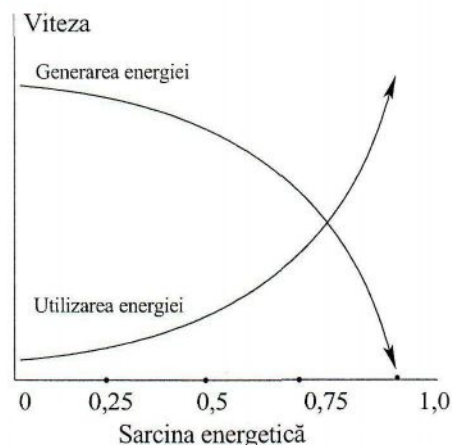


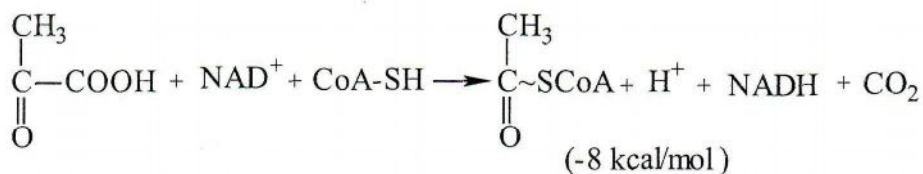
Figura 3.1. Reglarea metabolismului

DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A PIRUVATULUI

Procesul de respirație studiat în biochimie se referă la mecanismele moleculare de utilizare a O_2 și formarea CO_2 în celule. Unul din produsele principale ale procesului de catabolism este piruvatul (la scindarea glucozei, în primul rând). După transformarea sa în acetyl-CoA, va fi utilizat în ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs sau ciclul acidului citric) — etapă finală de oxidare a moleculelor substanțelor nutritive.

În ce constă procesul de oxidare a piruvatului în acetyl-CoA?

Cum se scindează alte molecule pînă la formarea acetyl-CoA se va studia în alte teme. Piruvatul se oxidează pînă la acetyl-CoA și CO_2 , cu participarea mai multor enzime unite structural în *complexul piruvat-dehidrogenazic*. Sistemul multienzimatic în cadrul eucariotelor se află în mitocondrii, al procariotelor — în citozol, catalizînd următoarea reacție sumară:



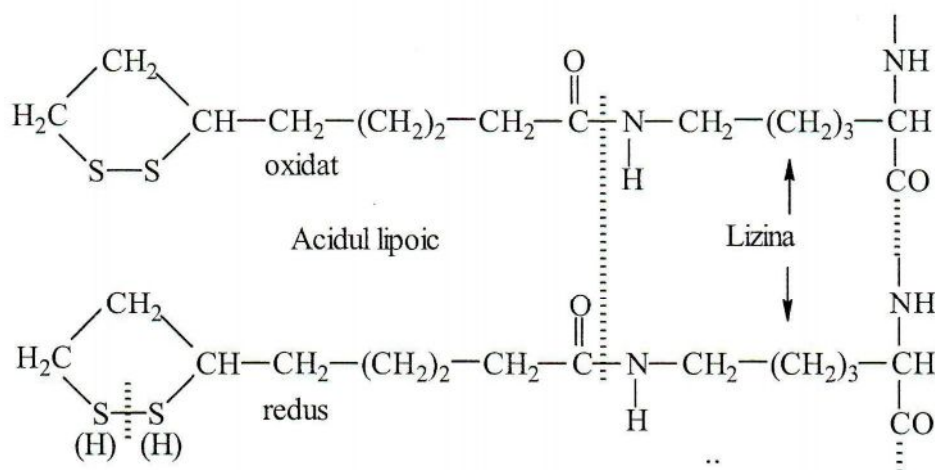
În procesul comun de dehidrogenare și decarboxilare a piruvatului se includ diferite enzime: E_1 -piruvat-dehidrogenază, E_2 -dihidrolipoil-transacetilaza și E_3 -dihidrolipoil-dehidrogenaza, K- E_1 kinaza specifică, F-fosfo- E_1 fosfataza, X-proteina ligand în E_3 .

Participă, de altfel, și 5 coenzime — TPP - tiaminpirofosfatul (E_1), FAD, NAD^+ , CoA-SH (E_3), acidul lipoic (E_2). Cu alte cuvinte, pentru funcționarea acestui sistem multienzimatic sunt necesare 4 vitamine — B_1 , B_2 , PP, acidul pantotenic și acidul lipoic.

Lister Rid, savant de la Universitatea din Texas, a cercetat minuțios acest complex la *E. coli*, stabilind că e compus din 48 de lanțuri polipeptidice, neesențial depășind mărimea unui ribozom. Nucleul îl ocupă E_2 (transacetilaza), E_1 și E_3 se leagă în exterior de nucleu. Lanțurile polipeptidice sunt consolidate de forțe necovalente. La pH alcalin sau neutru, în prezența ureei, complexul disociază în componentele sale. Complexul nativ enzimatic se formează prin autoasamblare.

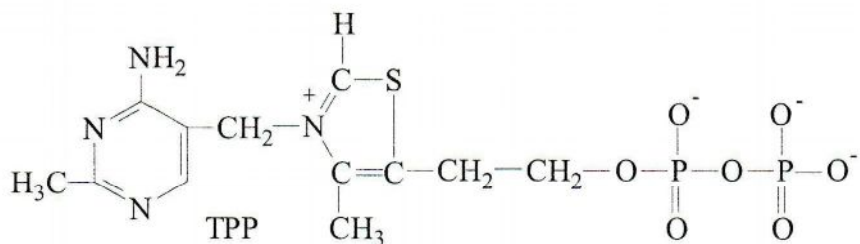
Fiind un complex multienzimatic, actualmente se confirmă că în centru (nucleu) se află componenta E_2 alcătuită din α_1 — monomeri aranjați la suprafața lui; în anumite proporții E_1 ($\alpha_2\beta_2$ - tetramer), E_3 (α_2 - homodimer), K ($\alpha_2\beta_2$ - heterodimer) și F ($\alpha\beta$ - heterodimer). Proteina X (α -monomer) are o aranjare nestabilă la moment — posibil ocupă o poziție integrală în autoasamblarea complexului sau se atașează periferic după asamblare. De altfel, recent s-a constatat, că la un complex structural stabil revin 60 componente E_2 , 20-30 molecule E_1 , 6 molecule E_3 , 12 molecule proteina X, 3-15 molecule K și mai mult de 3 molecule de fosfatază (F). Proteina X e un component lipoil auxiliar, ce participă la transferul electronilor.

Complexul determină o cataliză coordonată, în care produsele intermediare sunt fixate rigid de el, iar formarea produselor auxiliare fiind redusă la minim. Ea accelerează viteza reacției, exclude hazardul coleziunii substanțelor cu enzimele respective potențial existente în stare liberă. Produsele intermediare se permută de pe un centru activ (CA) pe altul - de grupe prostetice E_2 (grupa lipoamidică). Acidul lipoic se atașează de grupa aminică a restului de lizină din E_2 . În fiecare lanț polipeptidic, la 2 resturi de acid lipoic se atașează 2 resturi de lizină, ce realizează un braț flexibil de aproximativ 14 Å. Acest braț efectuează o mișcare tur-retur între grupele prostetice ale sistemului multienzimatic.

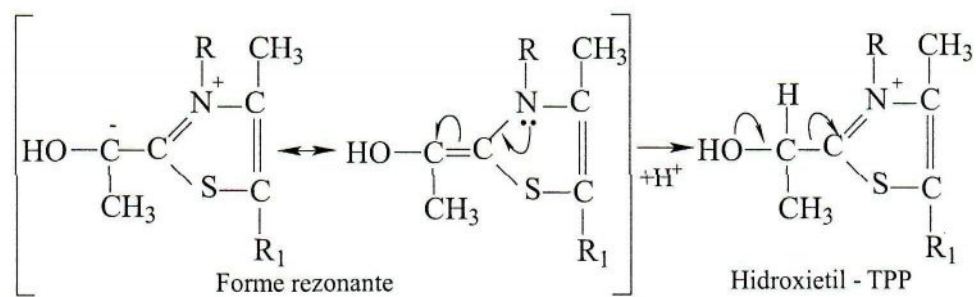
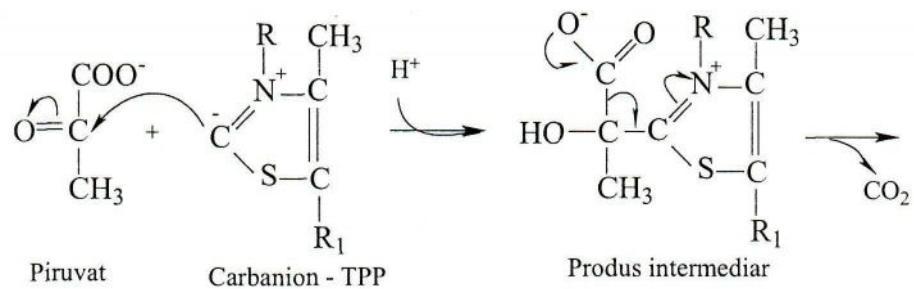


Compoziții lipoamidici interacționează. Sarcina lor în procesul de modificări în ciclu se schimbă de la 0-1 până la 2, la o ionizare completă a grupelor sulfhidrilice. Anume modificările de sarcină reprezintă forța motrice a mișcării coordonate a grupei lipoice.

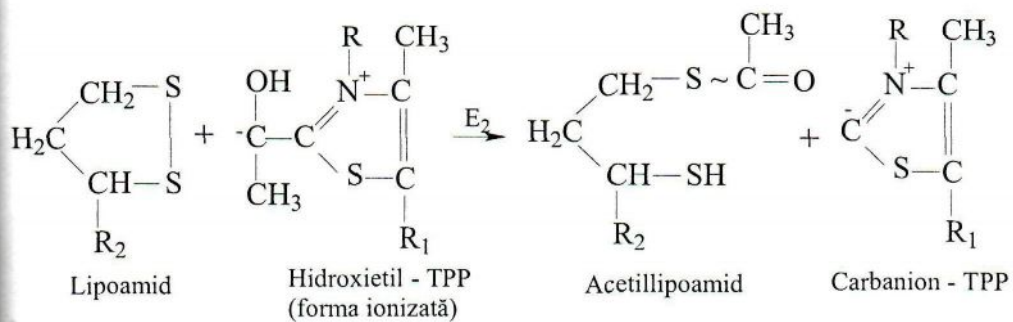
Procesul decurge pe etape. În etapa I piruvatul adăunează la TPP, după care are loc decarboxilarea lui. Este catalizată reacția de E_1 , rolul hotărîtor revenind particularităților TPP — exponentul acid al atomului C aranjat, ionizează între atomii N și S ai inelului tiazolic, el formînd un carbanion, ușor adăunînd la grupa carbonil a piruvatului.



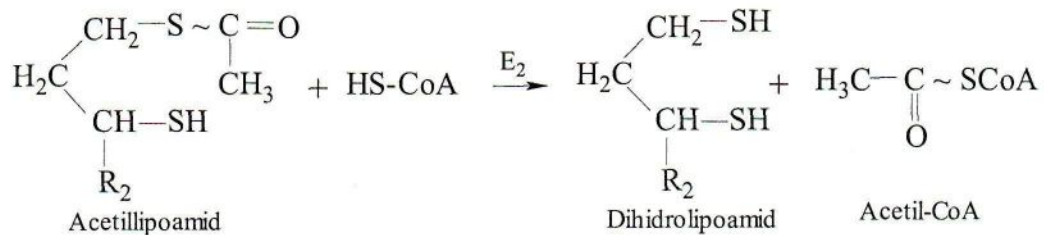
Azotul cu sarcina pozitivă (+) adăunează electroni, stabilizînd constituirea sarcinii negative necesară decarboxilării. Protonarea formează hidroxietiltiamino pirofosfatul.



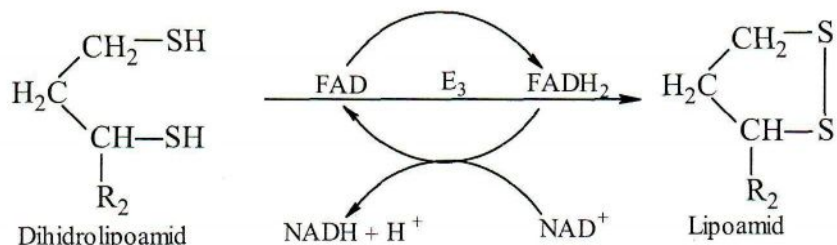
În etapa următoare grupa hidroxietică legată de TPP se oxidează o dată cu formarea acetil radical și simultan se permută pe lipoamid. Ca oxidant servește grupa disulfidică, care se transformă în sulfhidrică. Reacția e catalizată de E_2 (dihidrolipoil transacetilază) cu formarea acetillipoamidei.



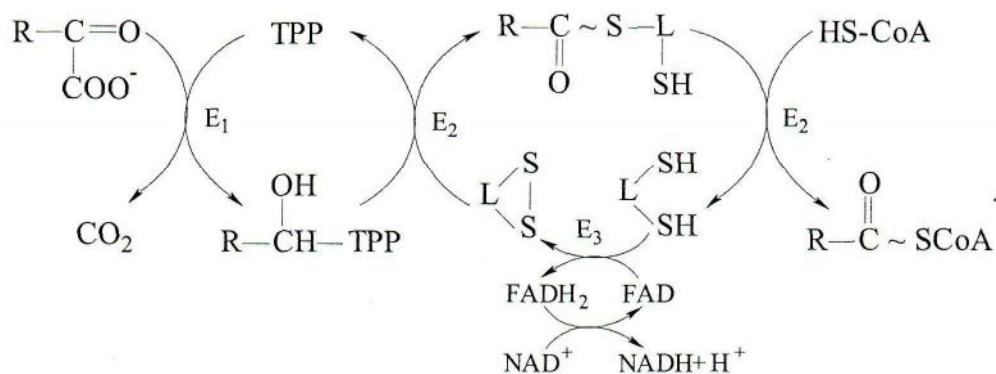
La etapa a III-a grupa acetil se translochează pe CoA, formînd acetil-CoA. Procesul e catalizat similar de E_2 , translocarea fiind însoțită de menținerea legăturii macroergice tioesterice.



În etapa a IV-a are loc regenerarea formei oxidate a lipoamidei. Reacția e catalizată de E₃. Oxidantul e NAD⁺, și rolul prostetic îi revine FAD.



Procesul e ireversibil, avînd $\Delta G^0 = -8$ kcal/mol. Etapa descrisă este cheia ireversibilă a metabolismului. Animalele nu sunt capabile să transforme acetil-CoA în glucoză. Acetil-CoA se încadrează în ciclul Krebs sau în sinteza lipidelor. Reacțiile pot fi reproduse schematic în felul următor:



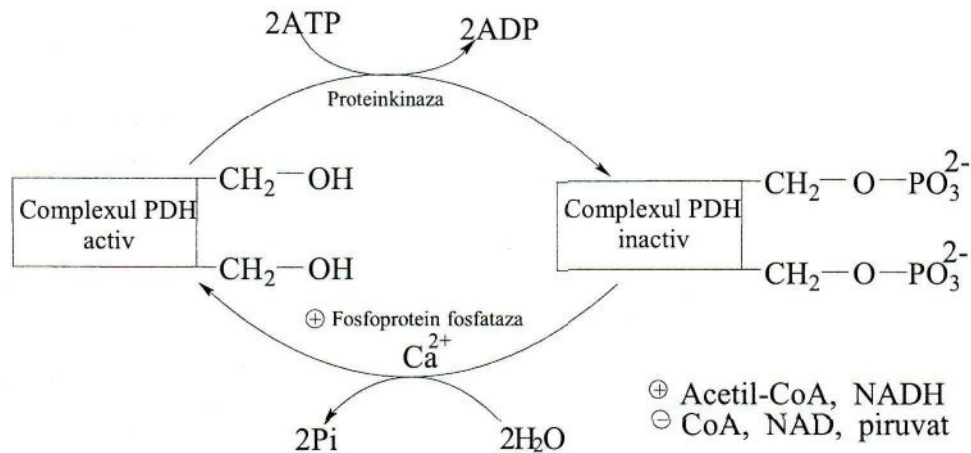
Complexul fermentativ descris mai sus se reglează prin:

1. Inhibarea prin rezultatele reacției (retroinhibiție) de acetil-CoA, NADH—primul compus inhibînd E₂, NADH-E₃. Efectul este reversibil la acțiunea NAD⁺ și HSCoA. Inhibiția alosterică este amplificată de acizii grași macromoleculari.

2. Reglarea nucleotidică, prin sarcina energetică. Este inhibat complexul de GTP și activat de AMP. Activitatea complexului se reduce atunci cînd celula conține energie accesibilă și se amplifică, în caz contrar.

3. Complexul piruvat dehidrogenazic (CPDH) își pierde din activism la fosforilarea serinei de ATP (modulator pozitiv pentru *kinaza piruvat dehidrogenazei*) o dată cu

formarea fosfopiruvat dehidrogenazei (*reglarea covalentă*). Dacă ATP se micșorează, are loc scindarea hidrolitică a fosfatului de CPDH. Reacția este catalizată de *fosfataza piruvat dehidrogenazei*. Atît kinaza, cît și fosfataza persistă în complexul piruvat dehidrogenazic.

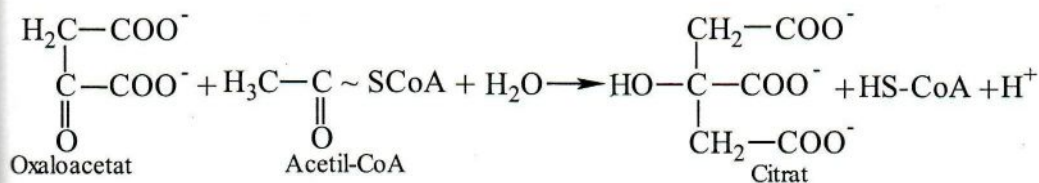


Reglarea covalentă a complexului piruvat dehidrogenazic

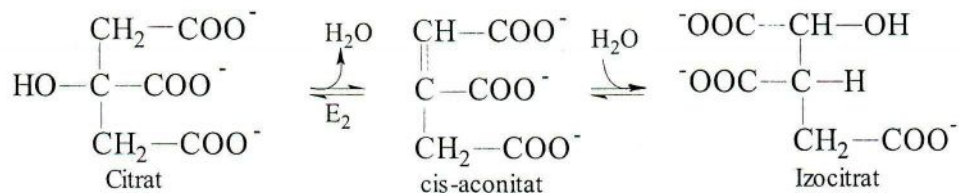
Fosforilarea se amplifică la raportul înalt de ATP/ADP; acetil-SCoA/HSCoA; NADH/NAD⁺, iar defosforilarea — la concentrații înalte de piruvat și ioni de Ca²⁺.

CICLUL KREBS

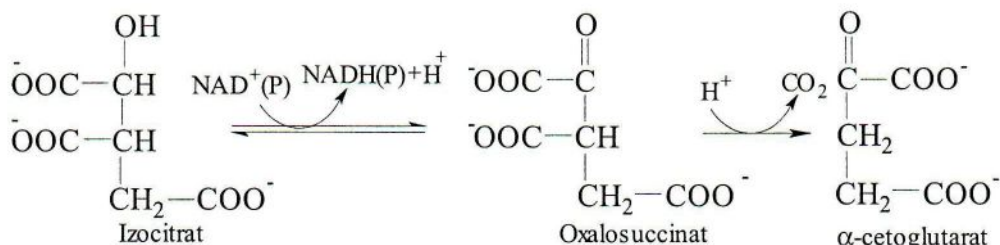
Reprezintă un ciclu primordial pentru funcționarea sistemelor vii. Sistemul enzimatic acționează cu o finețe deosebită. Ciclul începe cu retrocedarea de către acetil-CoA — oxaloacetatului grupei acetil, cu formarea compusului de 6 atomi de carbon - citrat. Prima reacție este catalizată de *citrat sintază* — ferment reglator. Produsul intermediar îl constituie citril-CoA. Reacția sumară deviază spre dreapta ($\Delta G^{\circ} = -7,7$ kcal/mol), rezultantă a hidrolizei.



Enzima, *aconitaza*, catalizează transformarea reversibilă a citratului în izocitrat prin formarea produsului intermediar cis-aconitat, ce nu deviază de la centrul activ al enzimei. Izomerizarea se realizează prin dehidratare, succedată de hidratare. Conținutul izocitratului e mai mic de 10%, reacția evoluează de la stînga spre dreapta, și produsul ei se încadrează rapid, succesiv, în celelalte stadii ale ciclului. Aconitaza reprezintă o enzimă compusă, ce conține fier și sulf acidolabil, formînd centre fiero-sulf.

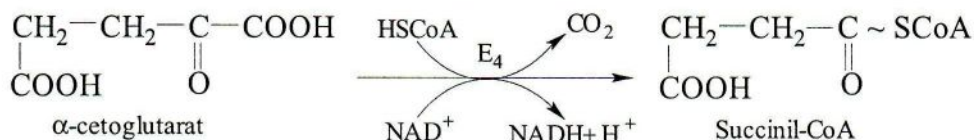


Decarboxilarea oxidativă a izocitratului, catalizată de *izocitrat dehidrogenază* (ICDH), este prima reacție de oxido-reducere din ciclu, cu formarea ulterioară a α -cetoglutaratului.

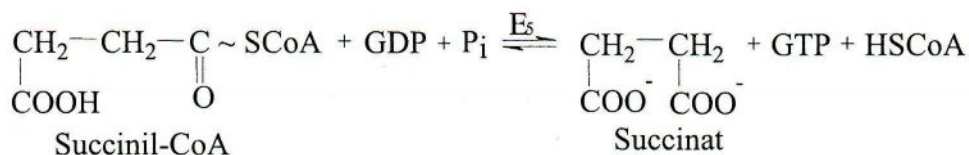


ICDH este o enzimă de două tipuri — NAD^+ și NADP^+ dependentă: NAD^+ d — localizată în mitocondrii; NADP^+ d — localizată atât în mitocondrii, cât și în citozol. Modulator pozitiv al reacției este ADP, enzima practic nu funcționează fără ADP; reacția necesită ioni de Mg^{2+} sau Mn^{2+} .

A doua reacție de oxido-reducere (a patra în ciclu) este decarboxilarea oxidativă a α -cetoglutaratului, catalizată de *complexul α -cetoglutarat dehidrogenazic* cu formarea succinil-CoA și a CO_2 , $\text{NADH}+\text{H}^+$. Mecanismul acestei reacții e asemănător cu transformarea piruvatului în acetil-CoA. Sunt utilizați aceiași cofactori ai trei enzime: *α -cetoglutarat dehidrogenaza*, (A'), *transsuccinilaza* (B') și (C') *dihidrolipoil dehidrogenaza*. Miezul complexului e subunitatea B', iar subunitatea C' este identică pentru ambele complexe. Aceste două complexe reprezintă asociații omoloage de enzime.



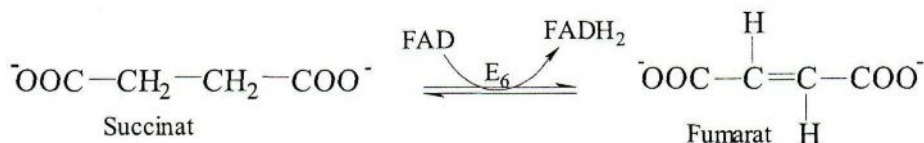
Hidroliza succinil-CoA dă aproximativ 8 kcal/mol. Scindarea e cuplată cu fosforilarea GDP, catalizată de *succinil-CoA sintetaza* și formarea GTP.



Enzima *nucleozidfosfo kinaza* transferă grupa fosfat de la GTP la ADP cu formarea ATP. Ea este unica reacție a ciclului, fiind însoțită de formarea directă a compușilor macroergici fosfați. E o *fosforilare la nivel de substrat* — drept izvor de energie servește oxidarea unei substanțe organice.



Succinatul este dehidrogenat, cu formarea fumaratului — reacție catalizată de *succinat dehidrogenaza* (SDH), avînd ca acceptor $\text{H}_2\text{-FAD}$. În molecula de SDH inelul izoaloxazinic a FAD-ului e legat covalent de partea proteică cu restul histidinei din centrul activ (CA) al enzimei. Molecula conține 4 atomi de fier și 4 atomi de sulf, formînd proteine fiero-sulf.

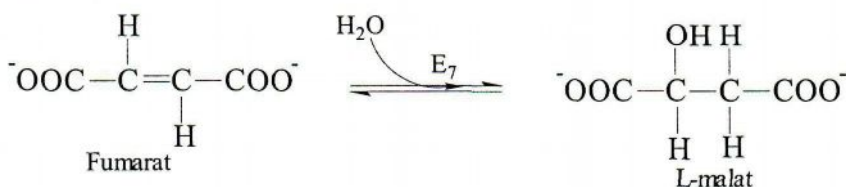


SDH conține două componente:

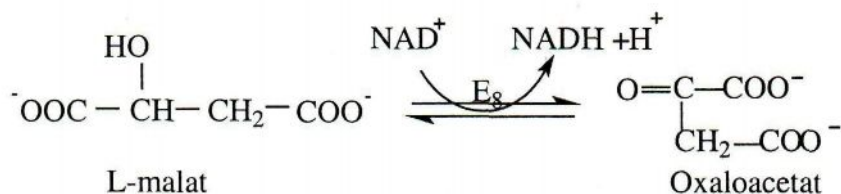
1. 70 kDa și două clustere de FSP (proteine fiero-sulf);
2. 27 kDa — cluster proteic.

Enzima SDH este o proteină integrală a membranei interne din mitocondrii, iar inhibitor concurent al SDH este malonatul. FADH_2 format nu se desprinde de enzimă, electronii sunt direct transferați pe Fe^{3+} al enzimei. Acceptori finali pot servi O_2 molecular.

Următoarea reacție constă în hidratarea fumaratului cu formarea L-malatului catalizată de enzima stereospecifică *fumaraza* (are loc o transadiționare de H și OH). Enzima e compusă din 4 subunități identice (4LPP).



L-malat dehidrogenaza, componenta matricei mitocondriale, catalizează dehidrogenarea L-malatului (NAD^+), cu formarea oxaloacetatului (OA). Echilibrul e deplasat (la pH = 7,0, concentrație -1,0 M) spre stînga, însă în celulele intacte — spre dreapta, oxaloacetatul se asimilează rapid și concentrația reală e foarte mică în celule (10^{-6} mol).



În urma acestui ciclu de reacții are loc: 1) regenerarea oxaloacetatului, care interacționează cu o nouă moleculă de acetyl-CoA; 2) gruparea acetică se asimilează în două molecule de CO₂; 3) sunt captați ionii de hidrogen, bogați în energie.

Stoichiometria ciclului:



Reacția descrisă confirmă că O₂ molecular la ciclul Krebs (CK) nu participă nemijlocit, ciclul funcționând numai în condiții aerobe, deoarece NAD⁺ și FAD în mitocondrii pot fi regenerate numai după transferul electronilor pe O₂ molecular. Ciclul manifestă caracter aerob, spre deosebire de glicoliză, ce decurge atât în condiții aerobe, cât și anaerobe. Cauza constă în faptul că la transformarea piruvatului în lactat în cadrul glicolizei are loc regenerarea de NAD⁺.

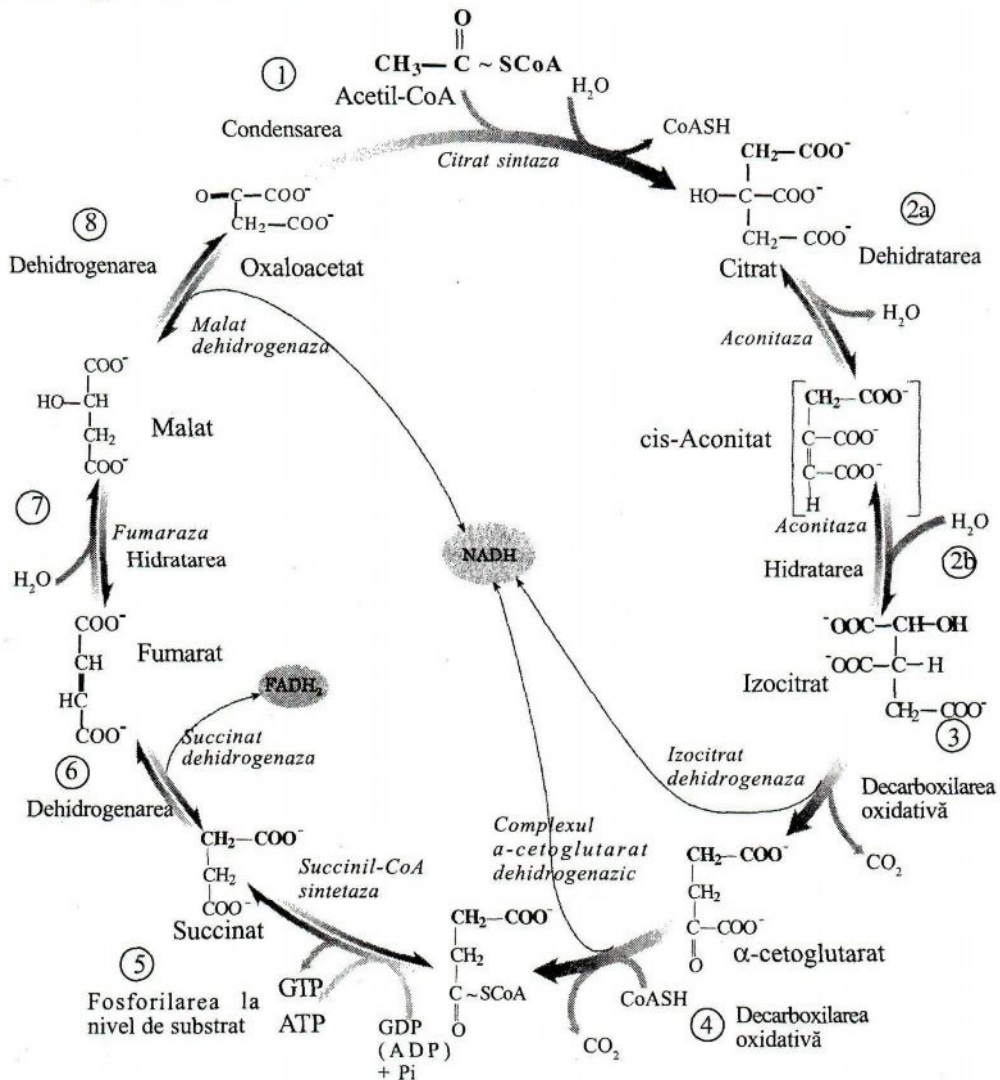


Figura 3.2. Ciclul acizilor tricarboxilici (Ciclul Krebs)

Care-i esența biologică a prezenței ciclului acizilor tricarboxilici? Care-i cauza că oxidarea grupei acetilice solicită un ciclu atât de complex?

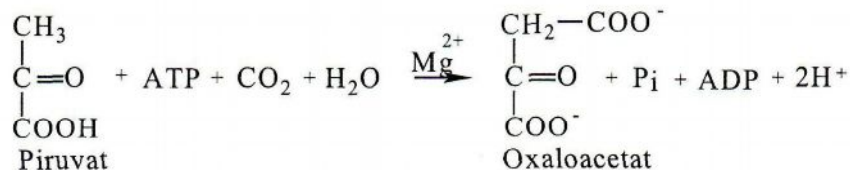
Molecula acidului acetic, cu dimensiuni mici și o structură relativ simplă, are o particularitate deosebită: grupa sa metilică e foarte rezistentă la oxidarea chimică. Pentru o oxidare directă pînă la CO₂, sunt necesare condiții rigide, incomparabile cu cele din celulă. În timpul evoluției celulele se conformă căilor din cele mai adaptabile, ce nu comportă energie mare de activare. Celulele atașează acetatul la OA, cu formarea citratului care se dehidrogenează și se decarboxilează cu mult mai ușor decît acetatul. La aparență, unele reacții sunt foarte complicate, dar studierea principiilor ce stau la baza acestor mecanisme ale reacțiilor organice atestă descoperirea celei mai rezonabile căi chimice ce asigură atare transformare.

Ciclul acizilor tricarbonici (CAT) e calea principală de scindare comună a glucidelor, proteinelor, lipidelor ce asigură generarea ATP.

Reacții anaplerotice

Ciclul Krebs îndeplinește și alt rol — furnizează produse intermediare pentru procesele de biosinteză. Utilizarea lor pentru biosinteză trebuie să fie însoțită obligatoriu de compensarea lor, în caz contrar funcția ciclului se va sista. Reacțiile fermentative, ce asigură completarea produselor intermediare ale ciclului, se numesc *reacții anaplerotice* sau reacții de completare.

Reacția de carboxilare a piruvatului cu CO₂ și formarea oxaloacetatului are o însemnătate primordială. Ea este catalizată de *piruvat carboxilază* și decurge intensiv în ficat, rinichi. Ca modulator pozitiv servește CH₃—CO~SCoA



Enzima catalizatoare de reacție este complexă, conține 4 grupe prostetice (4 biotine). Vitamina H este covalent legată de aminogrupa restului de lizină din centrul activ al enzimei. Reacția decurge în două etape:

1. Oxidul de carbon în primul rînd se fixează de atomul azot din biotină, se activează cu utilizarea ATP (covalent).

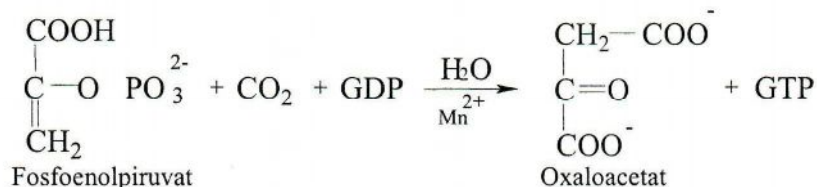


2. Apoi are loc transferul de piruvat pe enzimă cu formarea oxaloacetatului.



Piruvat carboxilaza reprezintă o enzimă reglatoare. CH₃—COSCoA asigură, cînd e în surplus, cu combustibil ciclul Krebs (CK), stimulînd și reacția piruvat carboxilică. În final, se formează surplus de oxaloacetat, deci rezultă că și ciclul în ansamblu va utiliza mai mult acetyl-CoA în reacția de sinteză a citratului. Diminuarea de viteză la formarea oxaloacetatului e cauzată de mica convertire a acetyl-CoA în ciclurile respective.

În miocard și mușchii scheletali reacția anaplerotică principală e catalizată de fosfoenolpiruvatcarboxi kinază. Are loc scindarea fosfoenol piruvatului — produs macroergic format în procesul de glicoliză. Energia eliberată se utilizează pentru carboxilare cu formarea oxaloacetatului, restul de energie se depozitează în GTP.



Produsele unui tur al ciclului citric sunt reprezentate în fig.3.3.

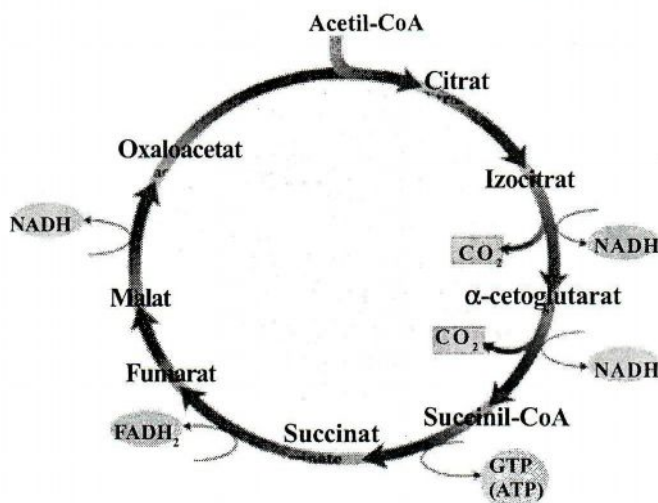


Figura 3.3. Produsele unui tur al ciclului citric

Reglarea ciclului Krebs

Procesul e coordonat perfect cu necesitățile de ATP în celulă. Următoarele reacții sunt reglate:

1. Sinteza citratului:

a) e dependentă de concentrația de substraturi — oxaloacetat și acetil-CoA, ce servesc ca modulatori pozitivi;

b) e dependentă de activitatea citrat sintazei, ce e inhibată de succinil-CoA; acizii grași; NADH; citrat — ultimele 2 substanțe au efect numai în unele celule.

2. Reacția catalizată de izocitrat dehidrogenază:

a) este activată de ADP — se confirmă efectul cooperativ între legarea izocitratului cu Mg²⁺ și ADP;

b) este inhibată de NADH și NADPH.

3. Reacția catalizată de complexul α -cetoglutarat dehidrogenazic. Complexul enzimatic este inhibat de succinil-CoA și NADH, produsele reacției. De altfel, este inhibat și de sarcina energetică mare.

Patologiile medicale

Deficitul enzimelor implicate în ciclul Krebs (fumaraza, α -cetoglutarat dehidrogenaza) este frecvent pe parcursul unor afecțiuni ereditare, caracterizate prin:

- a) acidoză lactică, produsă în urma acumulării piruvatului rezultat din glicoliză, care nu poate fi metabolizat prin conversia în acetil-CoA și este transformat în acid lactic;
- b) deficit energetic marcat, cu repercusiuni asupra dezvoltării neuromotorii, manifestat prin retard mental, hipotonie și apariția encefalopatiilor severe;
- c) amplificarea excesivă a cetogenezei, pe baza moleculelor de acetil-CoA, care nu pot fi degradate prin ciclul Krebs.

Formele cele mai severe se manifestă încă în perioada perinatală, prin leziuni neurologice și musculare. Aceste afecțiuni sunt rare, deoarece funcționarea normală a enzimelor din ciclul Krebs este esențială pentru dezvoltarea organismului și desfășurarea normală a activităților celulare. Deficitul energetic marcat conduce la degenerarea și moartea rapidă a celulelor afectate.

Deficitul *piruvat carboxilazei* sau al uneia din subunitățile piruvat dehidrogenazei se manifestă prin reducerea semnificativă a funcționării ciclului Krebs, ca urmare a imposibilității formării substanțelor sale principale. Consecințele pe plan clinic sunt datorate deficitului energetic și acumulării de acid lactic, piruvat, α -cetoglutarat (în cazul deficitului dihidrolipoil dehidrogenazei din structura CPDH, subunitate comună tuturor α -cetoacid dehidrogenazelor). Alanina și acizii ramificați prezintă niveluri plasmatiche înalte, ca urmare a blocării catabolismului lor în condițiile reducerii fluxului intermediatorilor în ciclul Krebs.

Situațiile caracterizate prin scăderea marcată a oxigenării tisulare (hipoxie sau anoxie) intervin în cazul insuficienței cardiorespiratorii acute, al stărilor de șoc ș.a. Aportul insuficient de oxigen cauzează încetinirea fluxului metabolic la nivelul lanțului respirator mitocondrial și, implicit, inactivarea ciclului Krebs. Rezultă un deficit energetic important, deoarece ATP nu poate fi regenerat decât în baza glicolizei anaerobe, a cărei randament energetic este scăzut (2ATP). Acumularea piruvatului rezultat din glicoliză conduce la apariția acidozei lactice.

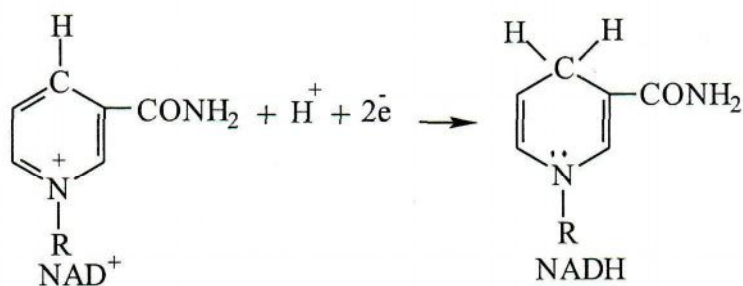


Hans Krebs 1900 -1981

OXIDAREA BIOLOGICĂ - RESPIRAȚIA TISULARĂ

Oxidarea biologică reprezintă totalitatea proceselor de oxido-reducere ce decurg în celule și țesuturi. Cum se oxidează moleculele cu rol de combustibil? Oxidarea are loc prin dehidrogenare, adică prin donarea atomilor de hidrogen. Ei sunt transferați în formă de protoni (H^+) și electroni (e^-), cu ajutorul coenzimelor specifice, dar nu direct la O_2 . Forma redusă transmite pe lanțul respirator în membrana internă a mitocondriilor electroni cu un mare potențial energetic. Acest transfer este însoțit de formarea ATP din ADP și P_i . Procesul e numit *fosforilare oxidativă* — sursa de bază a ATP la organismele aerobe. De altfel, electronii cu înalt potențial energetic pot fi utilizați și în procesul de biosinteză, ce necesită ATP și echivalente reduse.

Acceptorul principal de electroni este NAD^+ . Inelul nicotinamidic activează adiționează ionul de hidrogen și doi electroni, constituind echivalentul hidridionului.



NAD^+ servește ca acceptor în reacții de tipul:

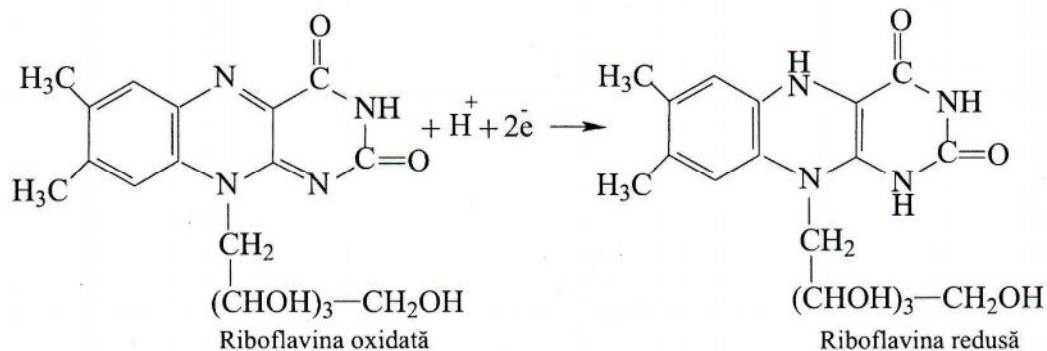


Al doilea H^+ rămâne în soluție.

Alt acceptor principal este FAD și participă în reacții de tipul:



Porțiunea activă e inelul izoaloxazinic, unde se adăunează protonii și electronii.



Compușii ce joacă rol de precursori în biosinteză sunt oxidați mai puternic decât produsele reacției. De aceea, pentru realizarea procesului sunt necesare, în afară de ATP, și echivalente reducătoare. Rolul de donator îl are forma redusă a $\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$. Diferă de NAD^+ prin prezența fosfatului conjugat cu legătura esterică prin 2'-OH a adenozei, utilizându-se numai în procesele de biosinteză, pe când NADH — preponderent la generarea ATP.

Culminarea respirației tisulare o reprezintă transportul de electroni și fosforilarea oxidativă. Omul cu o greutate medie de 70 kg utilizează pe zi circa 2800 kcal. Pentru a recepționa această energie din ATP în condiții standard e nevoie de $2800 : 7,3 = 384$ mol ATP sau 190 kg de ATP. Organismul uman conține 50g de ATP. Pentru satisfacerea necesităților de ATP, ea trebuie să fie scindată și sintetizată de mii de ori. În limite foarte mari se modifică viteza sintezei ATP în organism: minimum — somnul și maximum — la eforturi intensive, ceea ce denotă că fosforilarea oxidativă (FO) este nu numai un proces primordial și încontinuu, dar și un autoreglator foarte fin.

Lanțul respirator

Este un ansamblu de proteine aranjate într-o anumită succesiune cu grupe prostetice fixate rigid, care posedă capacitatea de a adăuna și a dona electroni și protoni saturați de energie. Electronii, transferându-se de la o proteină la alta, își pierd energia liberă. O parte considerabilă a ei se acumulează în ATP, prin intermediul mecanismelor moleculare.

Fiecărei perechi de electroni, transferați de la NADH la O_2 pe lanțul respirator, i se sintetizează 3 molecule de ATP. Locurile, unde energia se elimină în cadrul proceselor de oxido-reducere, cu formarea de ATP, se numesc **puncte de fosforilare**. La o rotație a ciclului Krebs dehidrogenazele specifice scindează de la substraturi 4 perechi de atomi de H, care într-un locus anumit își donează electronii lanțului respirator și se transformă în H^+ , cu deplasarea în mediul apos. Electronii parcurg pe lanțul respirator până la O_2 — acceptorul final al electronilor la organismele aerobe.

Fosforilarea oxidativă e localizată în mitocondrii (fig.3.4). Aceste organite ovale conțin enzime ale ciclului Krebs și enzime

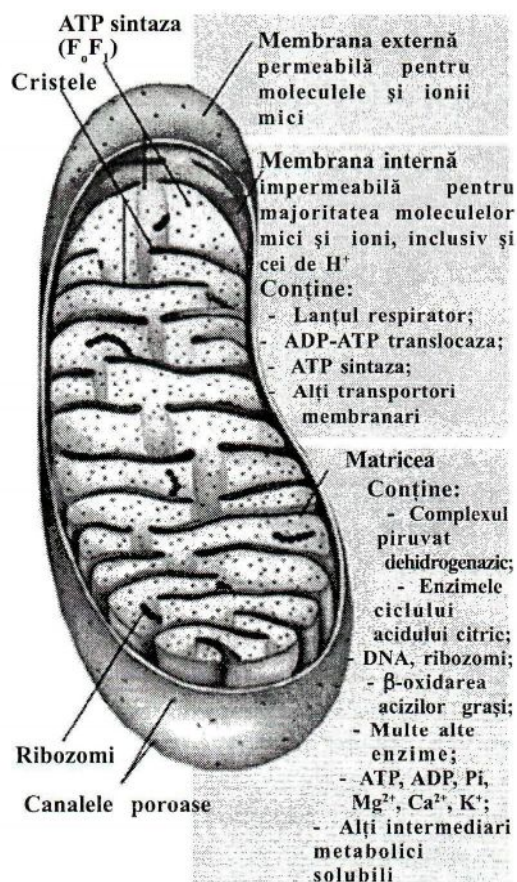


Figura 3.4. Structura mitocondrii

ale oxidării acizilor grași. Mitocondriile posedă două sisteme de membrane: externă și internă, ultima are o suprafață foarte mare și formează cristele. O parte indispensabilă a membranei interne reprezintă ansambluri respiratorii și enzime ce catalizează sinteza ATP.

Membrana internă are o structură complexă și-i impermeabilă pentru majoritatea ionilor. Membrana externă, dimpotrivă, are o permeabilitate majoră pentru ionii și moleculele mici. Ea conține *monoaminoxidaza*. În spațiul intermembranar se află enzima adenilatkinaza, în matrice (compartiment determinat de membrana internă) sunt localizate dehidrogenazele specifice ciclului Krebs, precum și enzimele oxidării acizilor grași.

În ce constă esența reacțiilor de transfer al electronilor?

Acestea sunt reacții de oxido-reducere. În calitate de donatori servesc reducătorii, drept acceptor — oxidanții. În comun funcționează ca redox-pereche.



Fe^{2+} și Fe^{3+} → sunt redox-pereche.

Distingem 4 modele de transfer al e^- de la o moleculă la alta:

1) Transfer direct al electronilor:

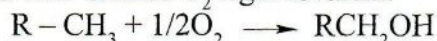


2) Transferul în componența atomului de H (H^+ și e^-):



3) În formă de hidrid ion ($:H^-$) în cazul transferului de NAD dehidrogenaze.

4) Transferul la interacțiunea directă a reducătorului organic cu O_2 , ce conduce la formarea unui produs care include O_2 legat covalent:



Toate modelele de transfer al electronilor sunt proprii celulelor vii. Capacitatea de a dona reversibil electroni se exprimă cantitativ prin *potențialul redox-standard*. E_0 - mărime egală cu forța electromotoare exprimată în volți, ce apare în semiconductor, în care donatorul de electroni și acceptorul cuplat cu el acționează în concentrații de 1,0 mol la $T = 25^\circ C$ și $pH = 7,0$, formînd un echilibru cu electrodul ce adăunează e^- de la donator și-i transferă la acceptor. În calitate de semielement standard se ia electrodul de hidrogen. Forța electromotoare la concentrația ionilor de H^+ 1,0 mol ($pH = 0$) și $T = 25^\circ C$ e egală cu zero. Pentru $pH = 7,0$ potențialul standard e egal cu 0,41V. E acceptată formula *potențial de reducere*. Dacă potențialul sistemului e negativ, rezultă o capacitate mai mare de a elibera electroni. Cu cît valoarea lui e mai pozitivă, cu atît e mai mare capacitatea de a adăuna electroni. Știind mărimea E_0 a diferitor redox-perechi, se poate pronostica direcția torentului de electroni de la o pereche la alta.

Torentul de electroni e orientat în direcția micșorării energiei libere a sistemului. (fig.3.5.) Cu cît mai mare e diferența potențialului dintre două redox-perechi, cu atît mai mare e diminuarea energiei libere la transferul electronilor. Trecînd prin lanțul respirator de la NADH (-0,32V) la O_2 (0,82V), electronii pierd o cantitate suficientă de *energie liberă*. ΔG° poate fi calculată după formula:

$\Delta G = -n \times F \Delta E_o$, unde **n** este numărul de electroni;

F - indicele Faraday egal cu $23062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$;

ΔE_o - diferența de potențial.

$\Delta G^\circ = -2 \times 23062 [0,82 - (-0,32)] = -52,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} = -220 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Energia respectivă este efectiv suficientă pentru sinteza a 3 mol de ATP ($3 \times (-7,3) = -21,9 \text{ kcal}$).

În lanțul respirator se pot identifica ușor trei segmente, în care transferul electronilor e însoțit de scăderea bruscă a energiei libere: locusuri de sintetizare ATP. Forța motrice a fosforilării oxidative reprezintă potențialul de transfer al electronilor inerenți NADH sau FADH_2 .

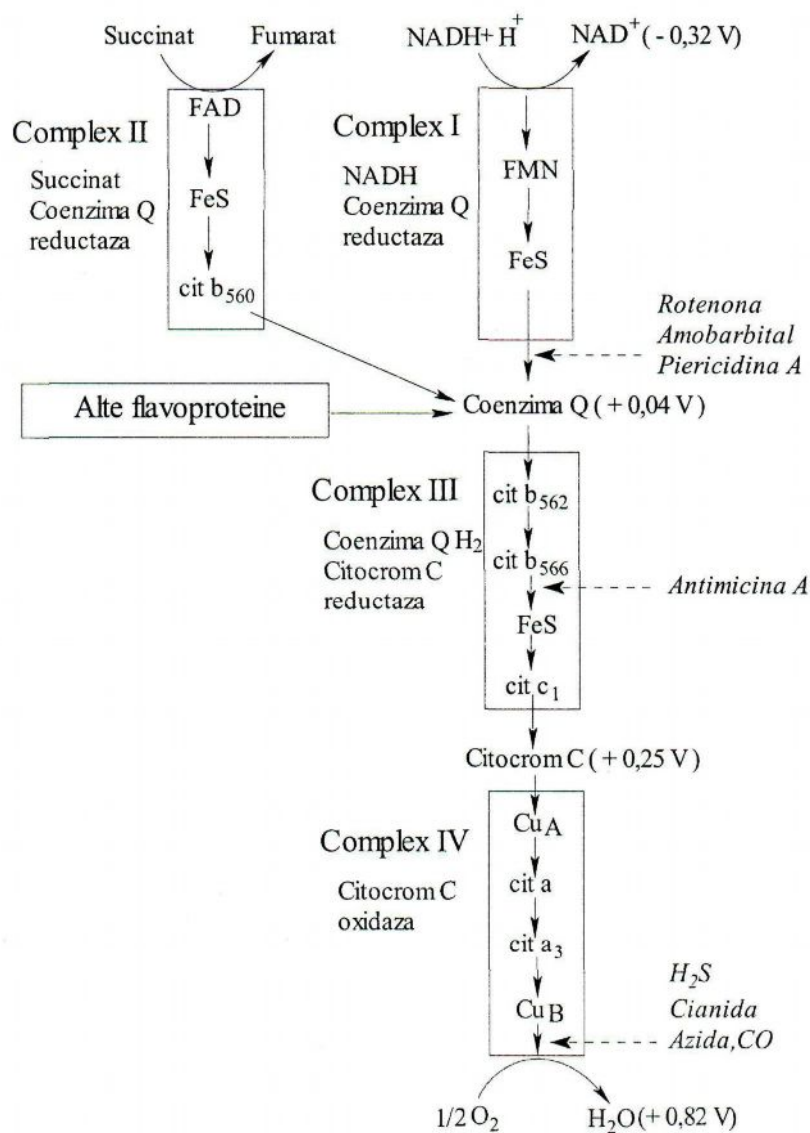


Figura 3.5. Lanțul respirator mitocondrial

Caracteristica complexelor lanțului respirator

Complexul I. NADH-Q-oxidoreductaza.

Torentul de electroni din lanțul respirator în mare măsură este determinat de activitatea dehidrogenazelor NAD^+ sau NADP^+ dependente și doar foarte puține dintre ele semnificativ (GDH) pot să interacționeze cu ambele coenzime.(fig.3.6).

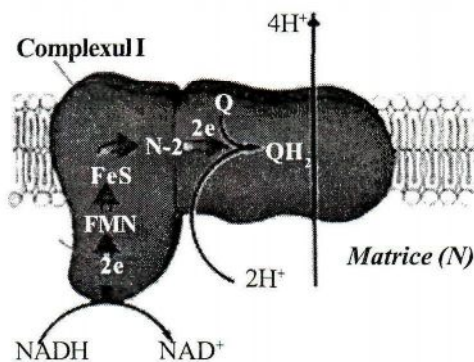


Figura 3.6. NADH: ubiquinon oxidoreductaza (Complex I)

Ulterior perechea de echivalenți reduși e transferată pe flavinproteide (FMN dependente), iar electronii sunt preluați de complexele fiero-sulf cu rol de grupe prostetice. Flavinmononucleotidul formează cu acești compuși un complex enzimatic NADH-Q-reductază. Fierul nu e de natură hemică și rezultă că proteinele poartă denumirea fiero-proteine nehemice sau centre fiero-sulf. Se atestă trei tipuri de centre FeS:

1. Atomul de Fe e tetraedric coordonat cu SH grupe a patru resturi de cisteină proteică, FeS_4 (fig.3.8. (a)).

2. $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ conține 2 atomi de Fe și doi disulfizi neorganici adiționali la 4 resturi de cisteină (fig.3.8. (b)).

3. $\text{Fe}_4\text{-S}_4$ - 4 atomi de Fe și 4 disulfizi neorganici adiționali la 4 resturi de cisteină (fig.3.8. (c)).

S-a confirmat că NADH-Q-reductaza conține două centre: $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ și $\text{Fe}_4\text{-S}_4$.

De la Fe-S al enzimei electronii și H^+ sunt transferați la coenzima Q.

Reducerea de potențial constituie $0,42\text{V}$, $\Delta G = -19,4 \text{ kcal/mol}$ și e suficient pentru sinteza a 2 mol de ATP, dar se sintetizează un singur mol de ATP, restul energiei risipindu-se sub formă de căldură. Enzima NADH-Q-reductaza e compusă din 16 subunități polipeptidice.

Unele dehidrogenaze sunt localizate în mitocondrii, altele în citozol, dar semnificativ e că dehidrogenazele din citozol cât și cele din mitocondrii interacționează cu NAD^+ , respectiv. Membrana mitocondrială e impermeabilă pentru aceste coenzime. Coenzima NAD^+ are funcția de colector, adunând H_2 de la diferite substraturi (NADPH, izocitrat, α -ceto-glutarat, piruvat, lactat, malat, β -oxibutirat, β -hidroxiacil-CoA) (fig.3.7.).

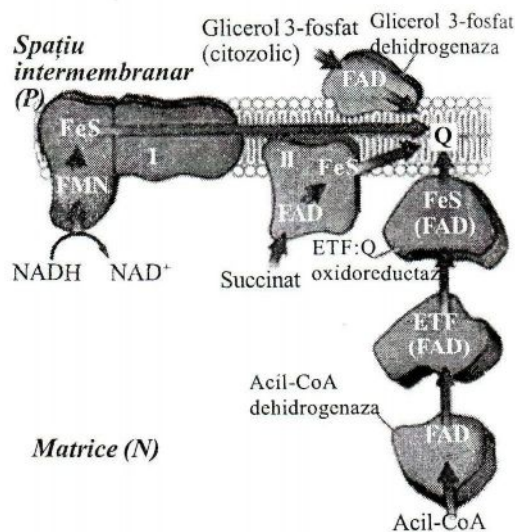


Figura 3.7. Transferul electronilor de la NADH, succinat, acil-CoA și glicerol-3-fosfat pe ubiquinonă

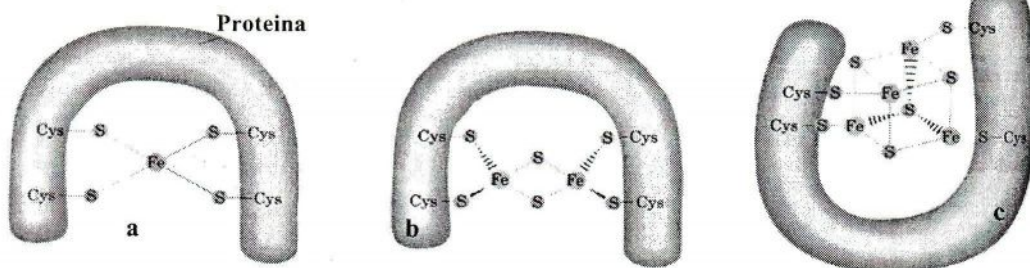
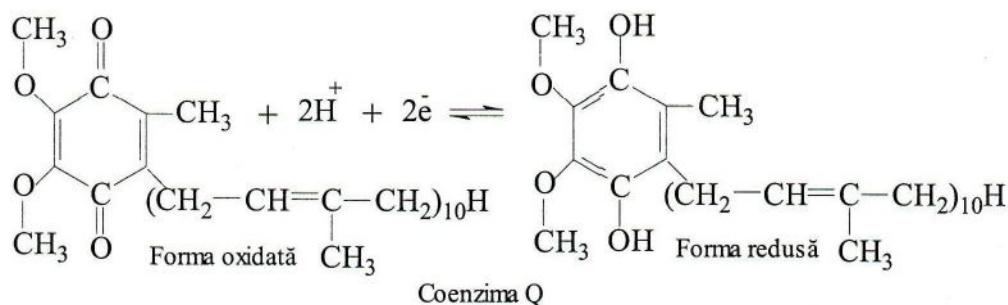


Figura 3.8. Centrele fiero-sulf

Coenzima Q sau ubichinona are o răspîndire vastă în sistemele biologice. Coada izoprenică determină capacitățile hidrofobe ale Q, ce permit o difuzie rapidă în membrana internă a mitocondriilor.



Coenzima Q, unicul translator al electronilor fixat nerigid de proteină, nu adăunează covalent la ea. Ea îndeplinește funcția de collector, adăunînd echivalentele reduse de la NADH și de la *complexul succinat-Q-reductază* (dependentă de FAD), electronii fiind transferați spre proteinele Fe-S, apoi spre Q. Complexul enzimatic (II) e component integral al membranei interne a mitocondriilor.

Transferul electronilor de la QH₂ mai departe e realizat de proteinele Fe-S și de citocromi (1925, David Keilin). Citocromii sunt proteine ce transferă electroni, molecule lor conținînd hemul ca grupă prostetică. În procesul de transfer al electronilor atomul de Fe se află fie în stare redusă (Fe²⁺), fie oxidată (Fe³⁺).

Grupa hemului, asemănătoare cu Fe-S centre, transferă numai un electron. Așadar, molecula de QH₂ transmite 2 electroni ai săi saturați de energie la 2 molecule de citocrom *b*. Citocromii *b_L*, *b_H*, *c₁* și proteina Fe-S reprezintă *complexul QH₂ – citocrom C reductaza (III)* (fig.3.9.). Valoarea de potențial în cadrul acestui transfer este de 0,21V ($\Delta G^\circ = -7,75 \text{ kcal}$), ceea ce asigură sinteza unui mol de ATP.

Citocromul *c* transferă electronii de la acest complex la *complexul citocrom C oxidazic (IV)*, ce conține citocromii *a* și *a₃*. Citocromul C joacă același rol ca și coenzima Q, adică asigură transferul electronilor din diferite complexe ale lanțului respirator (fig.3.10).

Citocromii diferă după structură și proprietăți. Grupa prostetică a citocromului *b*, citocromului *c_L*, citocromului *c* este protoporfirina IX, hemul constituind aceeași grupă

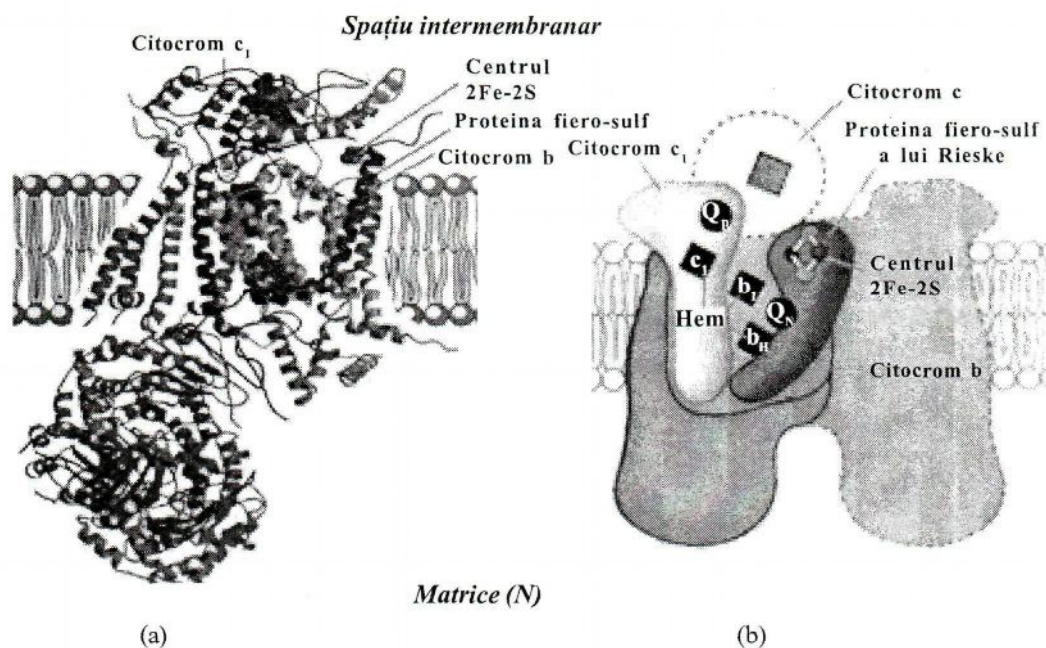
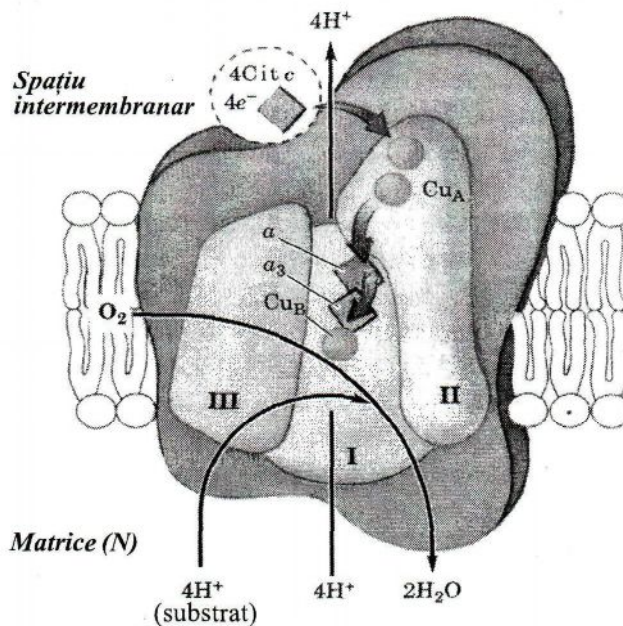


Figura 3.9. Complexul QH_2 —citocrom C reductaza (III). Complexul este un dimer compus din monomeri identici, fiecare cu 11 unități diferite. Structura unui monomer (a). Unitatea funcțională este dimerică (b). Citocromul c, și proteina fiero-sulf a lui Rieske proiectată pe suprafața P poate interacționa cu citocromul c în spațiul membranelor. Complexul are două situsuri distincte pentru fixarea ubiquinonei, Q_N și Q_P , ce corespund situsurilor de inhibiție a două substanțe ce blochează fosforilarea oxidativă. Antimicina A blochează fluxul de electroni de la hemul b_H la Q_N , se leagă la Q_N , aproape de hemul b_H în locusul N(matrice) al membranei. Myxothiazolul previne fluxul electronilor de la QH_2 la proteina fiero-sulf a lui Rieske, se leagă la Q_P , lângă centrul 2Fe-2S și hemul b_L pe partea P a membranei. Structura dimerică este esențială pentru funcția complexului III

Figura 3.10. Calea electronilor prin complexul IV. Cele trei proteine implicate în transferul electronilor sunt I, II și III. Transferul de electroni prin complexul IV începe când două molecule de citocrom c redus donează fiecare câte un electron centrului binuclear Cu_A . De aici electronii trec prin hemul a către centrul Fe-Cu (citocromul a_3 și Cu_B). Oxigenul legat la hemul a_3 este redus la derivatul lui peroxid (O_2^{2-}) de doi electroni de la centrul Fe-Cu. Primirea a încă doi electroni de la citocromul c convertește O_2^{2-} în două molecule de apă, consumând patru «substrat» — protoni din matrice. În același timp, încă patru protoni sunt pompați de la matrice printr-un mecanism încă puțin elucidat



prostetică ca și la mioglobină și hemoglobină. În citocrom *b* hemul nu e legat covalent de proteină, în citocromii *c* și *c*₁ — covalent cu legături tioesterice (grupele sulfhidrilice a 2 resturi de cisteină la grupele vinil ale hemului).

Citocromii *a* și *a*₃ au altă grupă prostetică (fieroporfirinică), ce se deosebește de citocromii *c* și *c*₁, avînd grupa formil (în loc de metil) și un lanț hidrocarbonat (în loc de vinil). Complexul final mai este denumit și citocrom-oxidaza.

Citocrom C oxidaza prezintă dimer proteic asimetric, în care fiecare monomer e compus din 13 subunități diferite. Ca componenți ai subunităților I sunt 2 heme A, trei atomi, cu raportul Fe/Cu 2:3, un atom de Mg și Zn și cîteva molecule de fosfolipide.

Se observă că partea internă a scheletului de α -atomi de carbon a structurii cristalice e compusă dintr-o cantitate vădită de α spirale, ce sunt aranjate în 2 suprafețe paralele, la depărtarea de 50 Å. Acest sector α spiralat prezintă partea proteică transmembranară situată în membrana internă mitocondrială.

E stabilit că primele trei subunități codificate de genele mitocondriale formează nucleul monomerului, celelalte 10 subunități codate de gene nucleare formează spațiul perinuclear (fig.3.11). Funcțiile subunităților I și II constau în formarea centrelor metalice de oxido-reducere și a terminațiilor de transfer al protonilor, funcțiile celorlalte subunități sunt discutabile. E confirmat că protonii antrenanți în formarea gradientului transmembranar

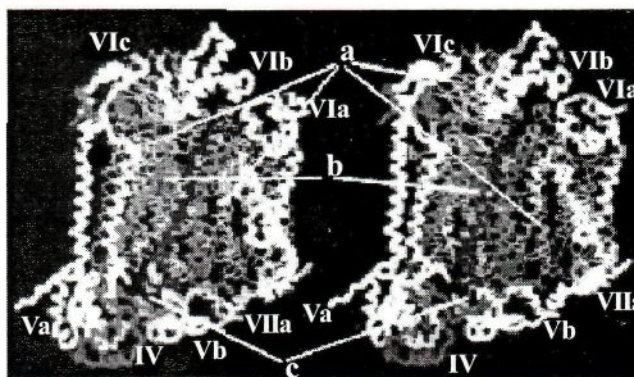


Figura 3.11. Organizarea tridimensională în monomer a subunităților codificate de genele nucleare din structura citocromului C oxidazic. Subunitățile codate de genele (a) mitocondriale, b — hemul a și a₃, c — în fiecare monomer atomii de Cu⁺⁺

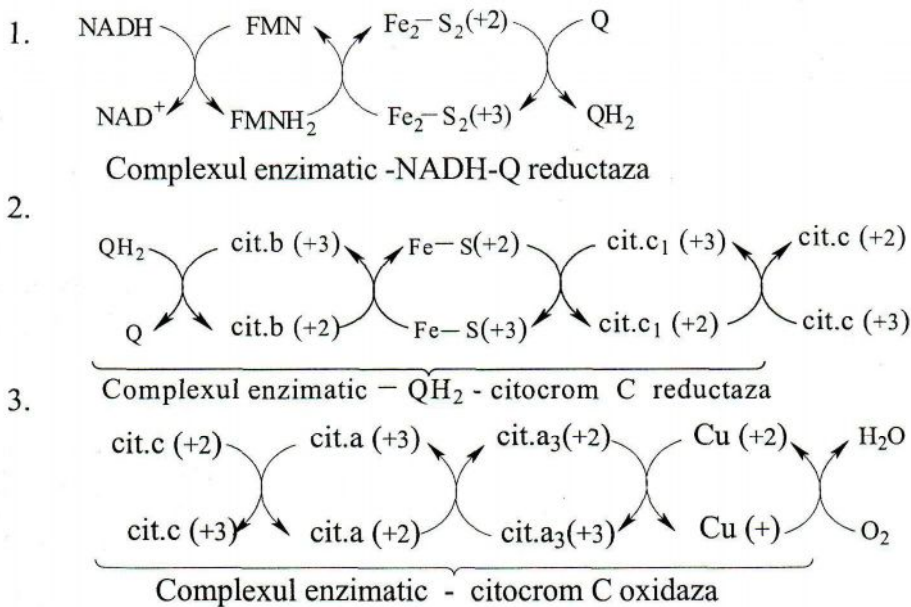
și în sinteza apei sunt transportați pe căi diferite. Căile efective de transport al H⁺ sunt determinate de cavități, în care sunt fixați aminoacizii capabili de formarea legăturii de hidrogen. Alte cavități, orientate haotic, pot conține molecule de apă mișcătoare. Cavitățile pot să-și îndeplinească rolul la modificările conformaționale ale resturilor de aminoacizi, la inducția lor sub influența proceselor de oxido-reducere sau a modificărilor fixării legăturilor în centrele metalofixatoare.

Controlul riguros la viteza de intrare a oxigenului joacă rolul decisiv la funcționarea enzimei, dacă torentul de e⁻ e suficient, apoi surplusul de oxigen în centrul de reducere al său favorizează formarea particulelor de oxigen activ. Sunt depistate 2 canale pentru oxigen în subunitatea III și în hemul A₃. Molecula de oxigen nu poate trece liber prin cavitata canalelor, ceea ce confirmă controlul riguros al difuziei de oxigen prin ele.

Expulzarea moleculelor de apă sintetizată în centrul de reducere a oxigenului în partea citoplasmică e, de altfel, strict controlată. Sunt depistați aminoacizii hidrofilii, aranjați liniar în jurul hemului A₃, și pînă la atingerea cu subunitățile I și II se formează o cale hidrofilă — canal posibil pentru apă. Aminoacizii sunt compact aranjați,

așa încât torentul invers al apei e practic imposibil. Analiza RS confirmă lipsa unor alte structuri, ce ar îndeplini această funcție. Modificările conformaționale ale acestor canale sunt induse de modulatorii stărilor de oxido-reducere și ligandofixatoare ale centrului de reducere a oxigenului.

Transferul schematic al electronilor în lanțul respirator este prezentat în felul următor:



Revenind la lanțul respirator, ne-am referi la unele probe ce confirmă faptul că proteinele acestuia funcționează în secvența descrisă mai sus.

a) Valoarea potențialului redox devine pozitiv la deplasarea spre oxigen.

b) Fiecare proteină din acest lanț e specifică numai pentru un anumit donator și un anumit acceptor de hidrogen.

c) Din membrana mitocondrială s-au extras complexe structurale izolate funcțional legate între ele prin transferul de electroni (4 complexe și doi componenți de legătură).

Inhibitorii lanțului respirator. Studiul transferului de electroni s-a facilitat datorită utilizării metodei de inhibiție specifică, ce blochează etapa concretă a procesului (fig.3.5).

1. Complexul I este inhibat de rotenonă (insecticid de origine vegetală folosit de indienii americani ca otravă pentru pești), Na amital - (barbiturat), pericidină (antibiotic), care blochează transferul electronilor pe segmentul NADH⁺ la coenzima Q.

2. Antimicina A (antibiotic foarte toxic) comportă acțiune de blocaj transportului de electroni între QH₂ și citocromul c.

3. Cianida blochează funcția citocromului aa₃ (aa₃ este blocat și de CO).

4. Complexul II este inhibat de către malonat, care acționează ca inhibitor competitiv. Coenzima Q este inhibată de doxorubicina, preparat din clasa antraciclinelor.

5. ATP sintetaza este blocată și de compușii arsenicului, care în forma ionilor de arseniat substituie ionii fosfați, blocând formarea ATP.

6. Componentele lanțului respirator pot fi inactivate în deficit de fier, deficit al vit.

B₂, hipoxie sau prin atacul radicalilor liberi asupra coenzimei Q.

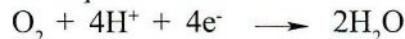
S-a constatat că pînă la fiecare blocaj proteinele sunt mai reduse, iar după blocaj — mai oxidate. Cînd echivalenții de reducere intră în lanțul respirator prin complexul I, se consideră că lanțul funcționează prin “ramura lungă”, intrarea prin complexul II se asigură prin “ramura scurtă” (fig.3.5).

Fluxul de electroni de la NADH la O₂ e un proces exergonic și poate fi exprimat prin:



Trei moli de ATP conțin numai 21,9 kcal/mol. Rezultă că randamentul utilizării energiei libere va fi de 42%. Procesul de transfer al electronilor e cuplat de fosforilarea ADP și sinteza ATP. Potențialul redox în punctele de fosforilare trebuie să fie mai mare decît 0,224V necesar pentru sinteza de ATP. Lanțul respirator e o cascadă, datorită căreia celula acumulează energia liberă eliminată de combustibilul celular într-o formă accesibilă.

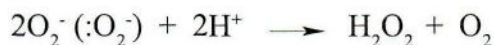
Generarea radicalilor liberi. Procesul de transferare a patru electroni finalizează cu formarea apei, însă se știe că hemul transferă numai un electron. Modul în care jonctionează patru electroni pentru reducerea moleculei de oxigen nu este distinct:



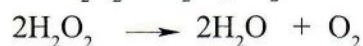
La reducerea incompletă, cu adîția a 2e⁻, se formează apă oxigenată (H₂O₂). La adîția unui electron se formează radicalul superoxid (:O₂⁻). Ultimele două substanțe sunt toxice și, interacționînd cu restul acizilor grași din lipidele membranare, lezează membranele celulare.

Celulele aerobe se protejează grație acțiunii enzimelor:

1) *Superoxiddismutaza* — enzimă-metal ce transformă superoxidul în H₂O₂:



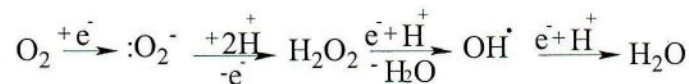
2) *Catalaza* transformă H₂O₂ în H₂O și O₂:



3) *Peroxidaza*:

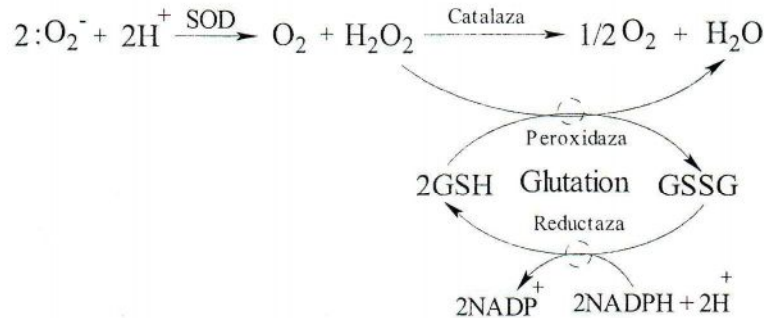


Interacțiunea oxigenului poate evolua în felul următor:



Arsenalul mecanismelor de protejare nu dispune de enzime ce ar neutraliza OH[·], dar benefice sunt sistemele de neutralizare a : O₂⁻ și H₂O₂, sistînd formarea OH[·]. Deosebit de expuse efectelor nocive ale radicalilor liberi sunt mitocondriile — compartimentul celular unde se efectuează reacțiile de oxido-reducere în prezența oxigenului molecular. Sunt afectate primordial fagocitele și eritrocitele. Deficitul unuia dintre sistemele de protecție celulară are consecințe severe și imposibilitatea de neutralizare a radicalilor liberi este implicată în patogenia diferitelor afecțiuni, ca: ateroscleroza, bolile mitocondriale, bronșitele

cronice, emfizemul pulmonar, cancerul, diabetul zaharat, distrofiile musculare, insuficiența renală, maladiile degenerative neurologice, accidentele cerebrovasculare.



Mecanismele fosforilării oxidative (cuplarea oxidării cu fosforilarea)

Se postulează mai multe ipoteze:

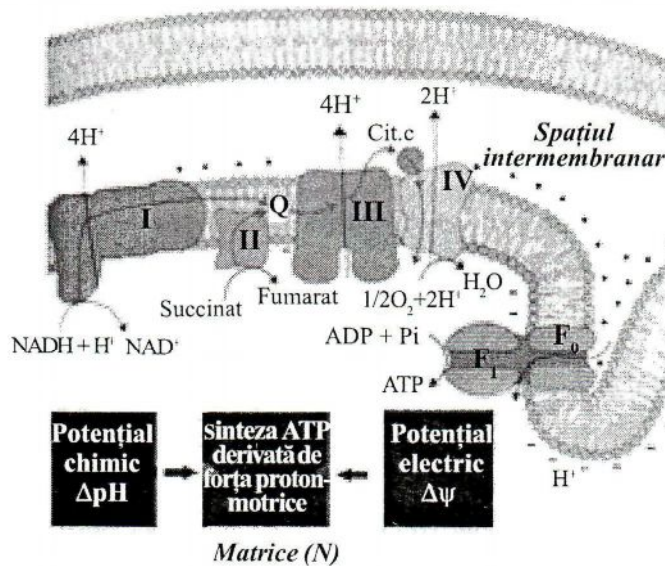
a) Una din ipoteze este că în cadrul procesului de transfer al electronilor are loc formarea unui produs intermediar covalent, macroergic, precursor al ATP (în analogie cu procesele similare).

b) O altă ipoteză presupune că energia oxidării este preluată de o proteină ce se găsește într-o conformație activă, care ulterior stimulează sinteza ATP. Investigațiile n-au confirmat atare ipoteză.

c) Piter Mitchell postulează, în 1961, mecanismul hemiosmotic.

Savantul a presupus că anume cuplarea transferului de electroni și sinteza ATP se datorează gradientului de protoni, ce se stabilește între partea interioară și cea exterioară a membranei interne mitocondriale. Anume transferul electronilor (energia eliberată la transferul lor) pompează H^+ din interior spre exterior, sporind concentrația ionilor H^+ în exterior - regenerează potențialul membranar cu semnul (+).

Figura 3.12. Modelul hemiosmotic. În această simplă prezentare a teoriei hemiosmotice aplicată mitocondrii, electronii din $NADH$ și alt substrat oxidabil trec printr-un lanț de proteine aranjate simetric în membrana internă. Fluxul electronilor este cuplat de transferul de protoni de-a lungul membranei, producând atât un gradient chimic (ΔpH), cât și un gradient electric ($\Delta \psi$). Membrana internă mitocondrială este impermeabilă pentru protoni; protonii pot reintra în matrice doar prin canalele proton-specifice (F_0). Forța motrice ce conduce protonii înapoi în matrice asigură energia pentru sinteza ATP, catalizată de complexul F_1 asociat cu F_0 .



Energia electronilor se stochează, deci, inițial în gradientul protonilor, apoi apare o forță proton-motrice ce condiționează sinteza ATP în complexul enzimatic ATP-azic (fig.3.12.).

Esența generală a mecanismului constă în faptul că actul primar de stocare a energiei îl constituie transferul protonilor prin membrana internă, cu formarea gradientului proton.

Numeroasele date experimentale confirmă conceptul lui Mitchell:

1) S-a confirmat generarea gradientului în cele trei puncte ale lanțului respirator. Gradientul protonic generat în ele se utilizează la sinteza moleculelor de ATP.

2) S-a demonstrat că pH matricei mitocondriale crește, iar a mediului extern al mitocondriilor scade, mediul fiind mai acid.

3) A fost argumentată teza că transferul H^+ din mitocondrii în timpul transferului electronilor și revenirii lor prin moleculele de ATP-sintaza sunt comparabile cu viteza lor din cadrul proceselor de fosforilare oxidativă în mitocondriile intacte.

Teoria hemiosmotică postulează că ionii de H^+ translocați în exterior datorită energiei de transfer a electronilor revin în mitocondrii prin canale speciale, ionice, localizate în complexul ATP-azic. Acest flux de protoni este forța motrice care determină sinteza cuplată a ATP din ADP și P_i .

Complexul enzimatic, denumit ATP-sintaza sau F_0F_1 -ATP-aza, se compune din factorii F_0 și F_1 . Ultimul se află în matricea mitocondrială. Savantul Efraim Racker l-a izolat și în această stare izolată de F_0 scindează ATP (F_1 -ATPaza). Masa moleculară e de 380 kDa și conține nouă subunități incluse în cinci tipuri diferite, fiind jonctionate și conținând câteva locusuri de fixare pentru ADP și ATP. F_1 e fixată de F_0 , aceasta fiind parte componentă a membranei interne, o traversează complet. Zero (nu e decît o literă) înseamnă că această parte a complexului leagă un antibiotic toxic — oligomicina ce simultan inhibă fosforilarea oxidativă.

Structura complexului F_0F_1 , dedusă prin studii biochimice și cristalografice de John E. Walker, este redată în fig 3.13a. În F_1 trei subunități α și 3 β sunt aranjate precum feliile alternate ale unei portocale. În centru se află subunitatea γ . Cele două subunități β ale F_0 se asociază ferm cu subunitățile α și β ale F_1 , menținându-le strîns lîngă membrană. În F_0 cilindrul membranal al subunităților c este atașat la subunitățile γ_2 și ϵ ale lui F_1 . În timp ce protonii «curg» prin membrană din direcția P spre N - via F_0 , complexul cilindric se rotește și subunitățile β F_1 își schimbă conformația; subunitatea γ se asociază cu fiecare în parte.

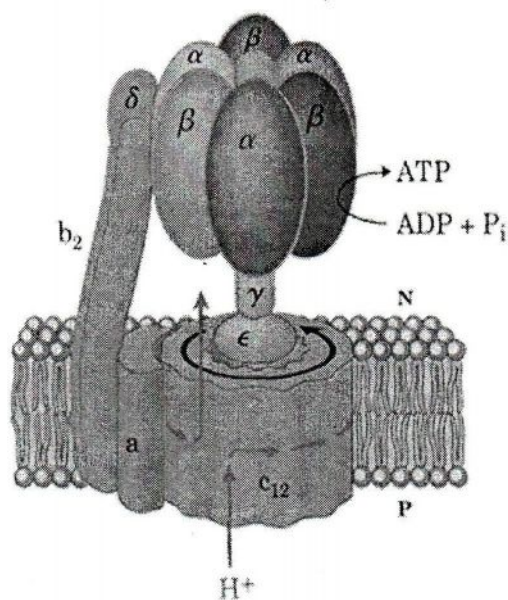


Figura 3.13a. Complexul mitocondrial ATP-sintaza

În fig. 3.13b este redată conformația lui F_1 , văzută din direcția N membranară, cu cele trei subunități β și 3 α la periferie și subunitatea γ în centru. Pe fiecare subunitate

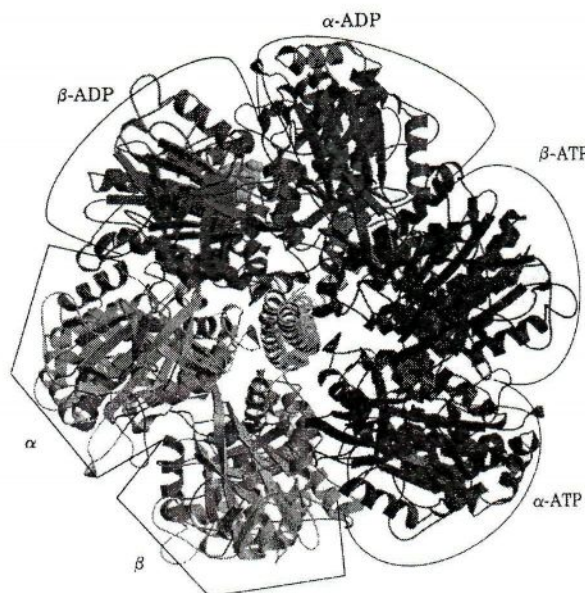


Figura 3.13b. Conformația complexului F_1 , văzută din direcția N membranară

Pe fiecare subunitate β , la interfața ei cu α , este prezent un site de legare nucleotidic. Subunitatea γ se asociază primar cu una din cele trei perechi $\alpha\beta$, forțând trecerea lor în diferite conformații cu generare de ATP.

În cursul evoluției, s-au dezvoltat câteva tipuri de transportatori activi ATP-dependenți, diferențiindu-se în structură, mecanism, localizarea în țesuturi specifice și compartimente intracelulare (vezi tab.3.1)

ATP-azele de tip P sunt transportatori ai ATP-ului ce conduc cationii fosforilați reversibil de către ATP, ca parte a ciclului de transport. Toate

ATP-azele de transport de tip P au asemănări în secvența aminoacidică, mai ales în apropierea rezidului Asp ce suferă fosforilare, și toate sunt sensibile la inhibiție de către analogul fosfat – *vanadatul*. Fiecare este o proteină integrală cu multiple regiuni de „deschideri” membranare într-un singur polipeptid, unii avînd și o a doua subunitate (fig.3.14a).

Transportatorii de tip P sunt larg răspîndiți. În țesuturile animale, Na^+ , K^+ -ATP-aza, un anticondutor pentru Na^+ , K^+ ; Ca^{2+} -ATP-aza, un unicondutor pentru Ca^{2+} . Tipul P al ATP-azei menține dezechilibrul în compoziția ionică dintre citozol și mediul extracelular. Celulele parietale ale stomacului mamiferelor au o ATP-ază de tip P ce pompează H^+ și K^+ de-a lungul membranei plasmactice, deci acidifică și conținutul stomacal. La plantele superioare, ATP-aza de tip P pompează protonii afară din celulă, stabilind o diferență de 2 unități pH și 250mV de-a lungul membranei plasmactice.

O ATP-ază de tip P similară din mucegaiul pînii, *Neurospora*, pompează protonii din celulă pentru a stabili un potențial negativ pe partea internă a membranei, utilizat pentru a conduce aportul de substraturi și ionii din mediul înconjurător prin transport activ secundar. Bacteria folosește ATP-aza de tip P pentru a pompa în afară ionii metalelor grele, precum și Cd^{2+} , Cu^{2+} .

Tabelul 3.1. Localizarea, tipul de membrană și rolul celor patru tipuri de transportatori ATP-azici

	Organism sau țesut	Tip de membrană	Rolul
ATP-azele de tip P			
Na ⁺ K ⁺	Țesuturi animale	Plasmă	Menține scăzut Na ⁺ , ridicând K ⁺ în interiorul celulei, crează potențial transmembrantar electrolic
H ⁺ K ⁺	Celule acid-secretorii (parietale) ale mamiferelor	Plasmă	Acidificază conținutul stomacal
H ⁺	Fungi (Neurospora)	Plasmă	Crează gradientul FT pentru a dirija transportul secundar extracelular în interiorul celulei
H ⁺	Plante superioare	Plasmă	
Ca ²⁺	Țesuturi animale	Plasmă	Menține Ca ²⁺ scăzut în citozol
Ca ²⁺	Miocite animale	Reticulul endoplasmatic	Sechestrează Ca ²⁺ intracelular, menținând Ca ²⁺ scăzut în citozol
Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺	Bacterii	Plasmă	Pompează ionii metalelor grele din celule
ATP-azele de tip V			
H ⁺	Animale	Vezicule secretorii, lizozomale, endozomale	Crează un pH mic în compartiment, activând proteazele și alte enzime hidrolitice
H ⁺	Plante superioare	Vacuolar	
H ⁺	Fungi	Vacuolar	
ATP-azele de tip F			
H ⁺	Eucariote	Partea internă a mitocondriei	Catalizează formarea de ATP din ADP + Pi.
H ⁺	Plante superioare	Tilacoid	
H ⁺	Procariote	Plasmă	
Transportatori multimedicațioși			
	Celule animale tumorale	Plasmă	Îndepărtează o mare varietate de produse naturale hidrofobe și droguri sintetice din citozol, inclusiv vinblastina, doxorubicina, actinomicina D, mitomicina, taxolul, colchicina, puromicina

O clasă diferită de ATP-aze responsabile de transportul ionilor este corelată cu acidifierea compartimentelor intracelulare la multe organisme. Vacuolele fungilor și ale unor plante superioare mențin un pH între 3 și 6, cu mult sub cel ce înconjoară citozolul (pH=7,5), prin activitatea ATP-azei de tip V – pompă de protoni. *ATP-azele de tip V* (V de la vacuole) sunt responsabile și de acidifierea lizozomilor, endozomilor, complexului Golgi și veziculelor secretorii din celulele animale.

Structural, nu sunt înrudite cu ATP-azele de tip P, nu suferă fosforilarea ciclică și defosforilarea, și nici nu sunt inhibitate de vanadat. Toate ATP-azele de tip V au o structură complexă similară, cu un domeniu integral (transmembrantar) (V_0) ce servește drept canal protonic, și un domeniu periferic (V_1) ce conține site-ul ATP de legare și activitatea ATP-azică (fig.3.14.b). Mecanismul prin care ATP-aza de tip V cuplează ATP – hidrolizarea pînă la transportul protonic, nu este încă pedepplin cunoscut. Pompele protonice de tip V sunt asemănătoare structural și, probabil, ca mecanism, cu o a treia familie de pompe protonice, ATP-azele de tip F.

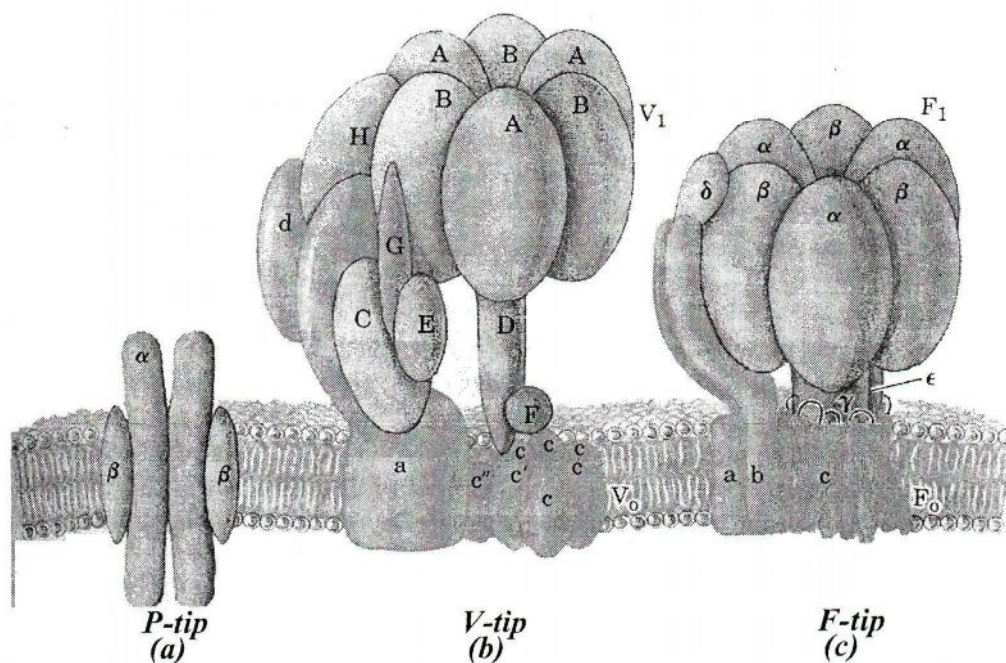


Figura.3.14. Structura subunitară a trei tipuri de ATP-aze transportatoare.

- a) ATP-azele de tip P au, în general, două tipuri de subunități proteice integrale. Subunitatea a care este esențială, are un reziduu Asp fosforilat în timpul transportului medicamentelor.
- b) ATP-azele de tip V au un domeniu periferic V_1 , compus din 7 tipuri diferite de subunități, incluzînd trei A și trei B, și un domeniu integral V_0 , cu trei tipuri de subunități ce includ multiple copii ale lui c.
- c) ATP-azele de tip F au un domeniu periferic F_1 , omolog cu V_1 al ATP-azelor de tip V. Porțiunea integrală a ATP-azelor de tip F, F_0 , de asemenea are trei tipuri de subunități cu multiple copii ale lui c. Pompele de tipul P, cum ar fi Na^+ , K^+ , ATP-aza mișcă doi ioni în direcții opuse. Pompele de tip V și F mișcă protonii într-o direcție.

ATP-azele de tip F joacă un rol central în reacția de conservare a energiei la bacterii, mitocondrii și cloroplasti. Ele catalizează trecerea transmembrantară a protonilor, condusă

prin hidrolizarea ATP, ca și reacția inversă în care fluxul de protoni determină sinteza ATP (fig.3.14c). În al doilea caz, ATP-azele de tip F sunt denumite ATPsintaze. Gradientul protonic în fosforilarea oxidativă și fotosfosforilare este stabilit de o altă categorie de pompe protonice ce au ca sursă substratul oxidativ sau lumina solară. ATP-azele de tip F/ATP-sintazele sunt complexe multisubunitare ce asigură pori transmembranari (proteina integrală F_0) pentru protoni și molecule (proteina periferică F_1), ce folosesc energia eliberată din protoni (F_0) pentru a forma punți fosfoanhidridice de ATP. Sinteza ATP și activitatea ATP-azică se află în proteina F_1 (fig.3.14c).

La mijlocul anilor 1980 a devenit evident că unele tumori sunt rezistente la un număr de compuși antitumorali. Investigațiile au arătat că membranele plasmatiche ale acestor tumori conțin un transportator – ATP-dependent ce poate exporta mulți compuși medicamentoși diferiți, prevenind acumularea lor în celulele tumorale și efectele lor de inhibiție tumorală. Medicamentele transportate diferă chimic, dar sunt hidrofobe. Transportatorii de medicamente prezintă o proteină integrală, cu masa moleculară de 170 kDa, 12 segmente membranare și două site-uri de legare a ATP-ului. Ele sunt responsabile de eliminarea medicamentelor din citozolul celulei tumorale. Exportul de medicamente are loc prin hidrolizarea ATP-ului. Transportatorii de medicamente sunt, de asemenea, și canale ionice, care favorizează în mod specific trecerea Cl^- la diminuarea gradientului de concentrație independent de ATP. În boala genetică fibroză cistică defectul determinant este în gena care decodează o proteină transportatoare de Cl^- (reglator transmembranar CFTR), ce poate fi înrudită cu transportatorul de medicamente în celulele tumorale.

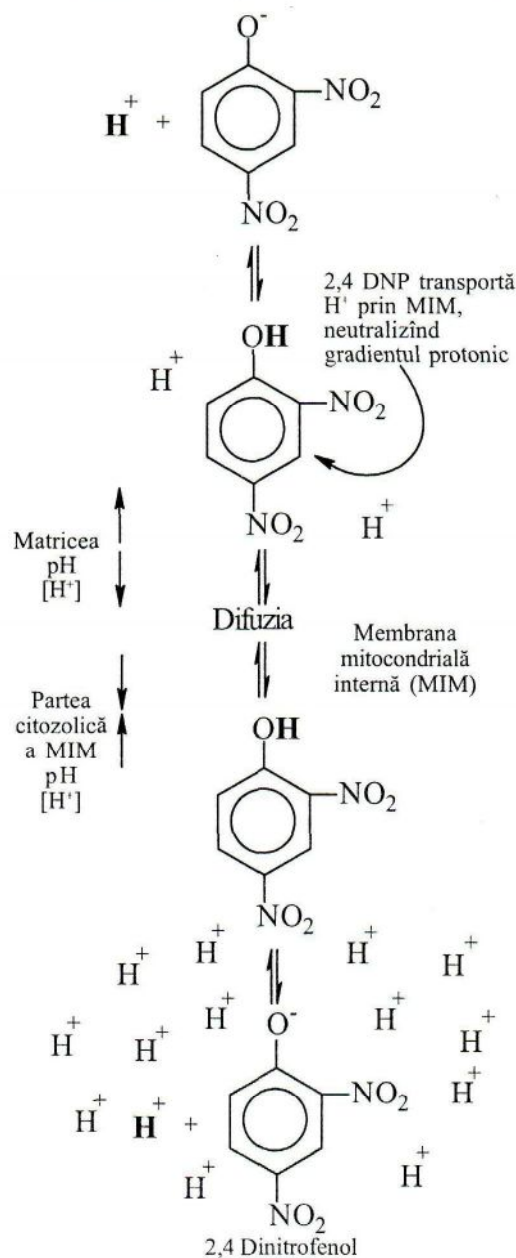


Figura 3.15. Influența DNP la transportul de H^+ în mitocondrii