

Aula de **Bioquímica II**

Tema:

Fosforilação Oxidativa

Síntese de ATP

Prof. Dr. Júlio César Borges

Depto. de Química e Física Molecular – DQFM

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Universidade de São Paulo – USP

E-mail: borgesjc@iqsc.usp.br

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

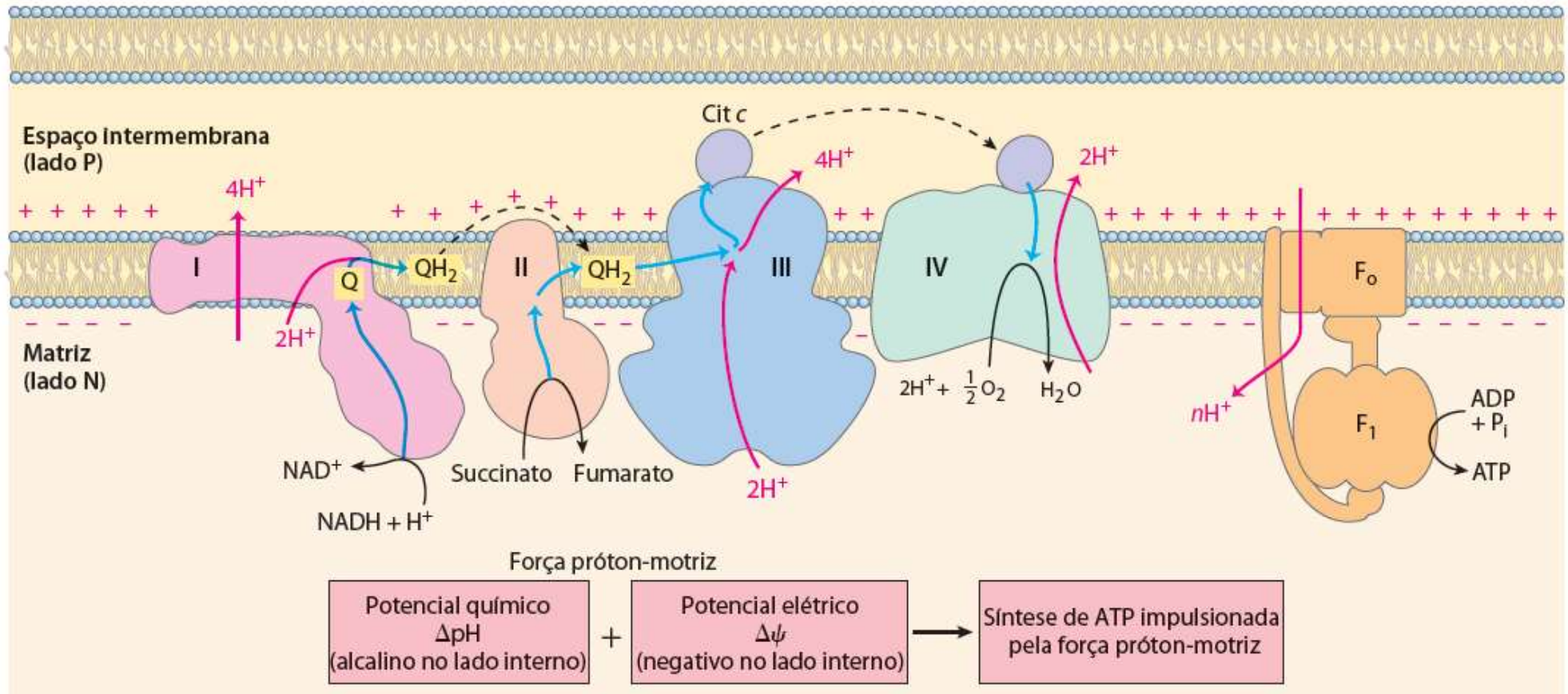


MODELO QUIMIOSMÓTICO

- Fluxo de elétrons por carreadores criam um gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial interna $\rightarrow \Delta G = \sim 190 \text{ kJ/mol}$ de par de e'

\rightarrow Força Próton-Motriz

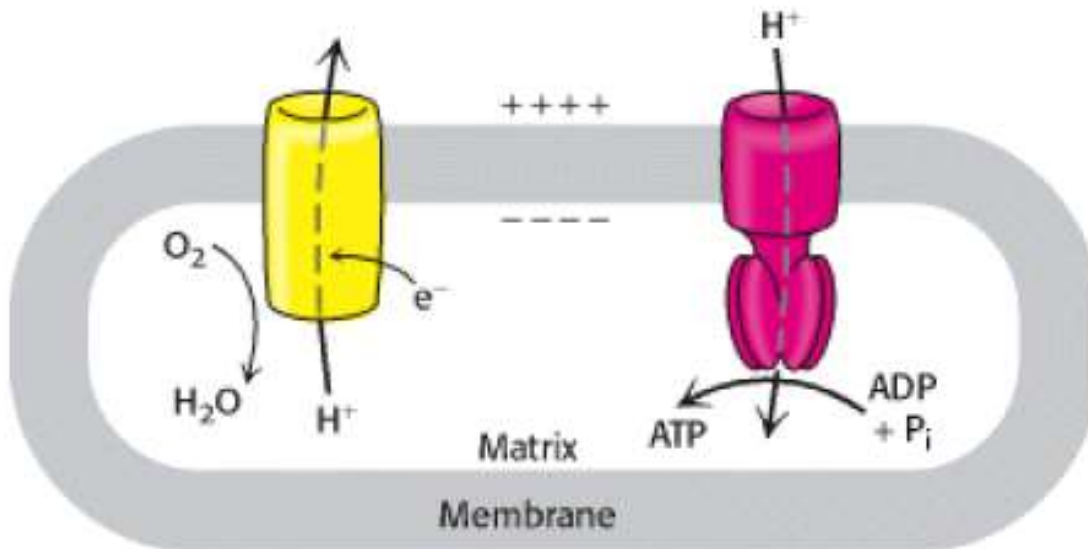
- A quebra deste gradiente está acoplada com a síntese de ATP $\rightarrow \Delta G = \sim 50 \text{ kJ/mol}$ de ATP



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP



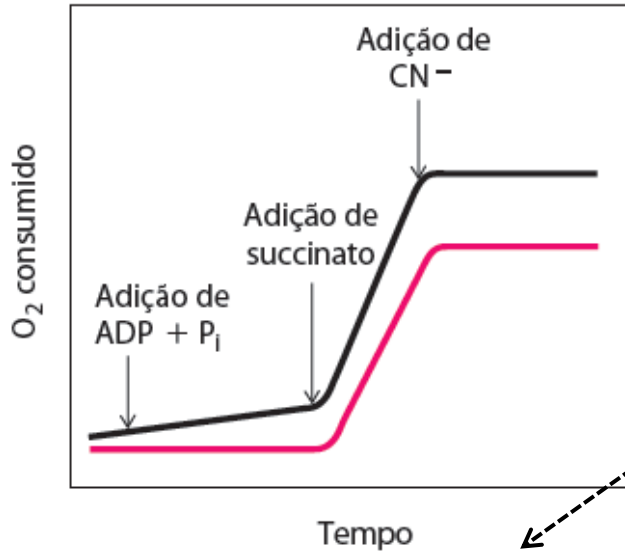
- ✓ É a síntese de ATP pela enzima ATP sintase
- ✓ É o ponto final do processo aeróbico de geração de energia
- ✓ Difere da síntese de ATP por fosforilação ao nível de substrato, pois é dirigida pelo transporte de elétrons.
- ✓ **ACOPLAMENTO QUIMIOSMÓTICO: Conexão obrigatória da síntese de ATP a CTE**



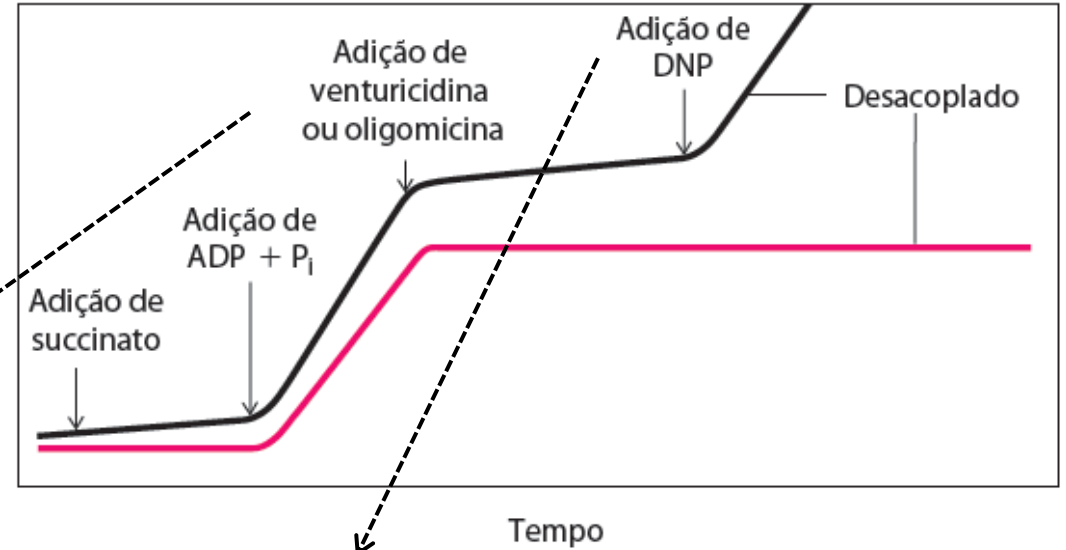
**Nobel Prize
Winner, 1978,
Chemistry**

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

ACOPLAMENTO DA CTE E SÍNTESE DE ATP



ATP sintetizado



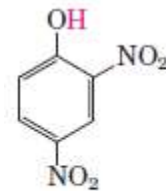
ATP sintetizado

Inibidores da ATP-sintase

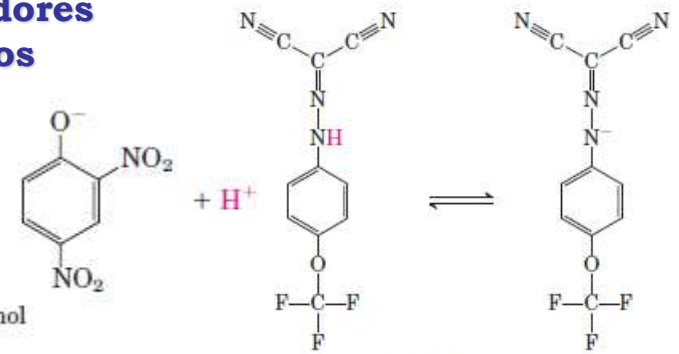
→ A inibição da ATP-sintase emperra CTE.

→ A extrusão de H^+ pela CTE funcionará até acumular um gradiente de prótons equivalente ao custo da liberação de ΔG pela transferência de e^- do NADH para o O_2 .

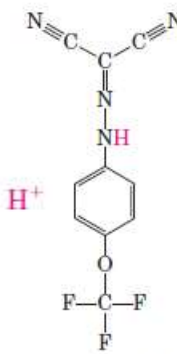
Desacopladores Químicos



2,4-Dinitrophenol (DNP)



$+ H^+$



Carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)

$+ H^+$

→ Neste ponto, a CTE deve parar pois a ΔG do fluxo de e^- acoplado ao bombeamento de H^+ torna-se ZERO → Equilíbrio

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

Síntese artificial de ATP

→ Em mitocôndrias isoladas

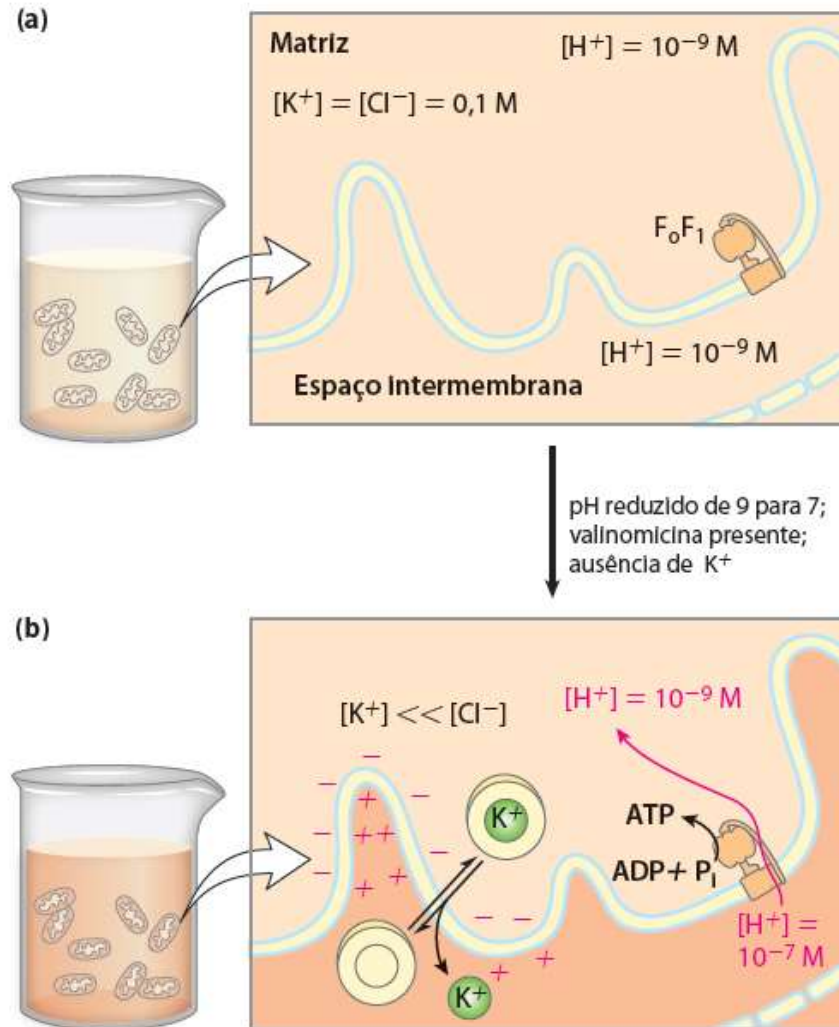
→ Sem compostos para fornecer e' para a CTE

→ 1° → meio isotônico, KCl e pH 9 até o equilíbrio entre matriz e espaço intermembrana

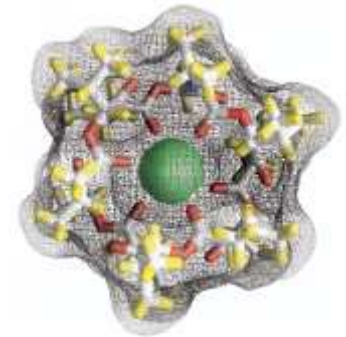
→ 2° → redução do pH externo para 7, presença de valinomicina, sem K⁺

→ Geração de um gradiente de H⁺ e eletroquímico

→ Síntese de ATP



Valinomicina



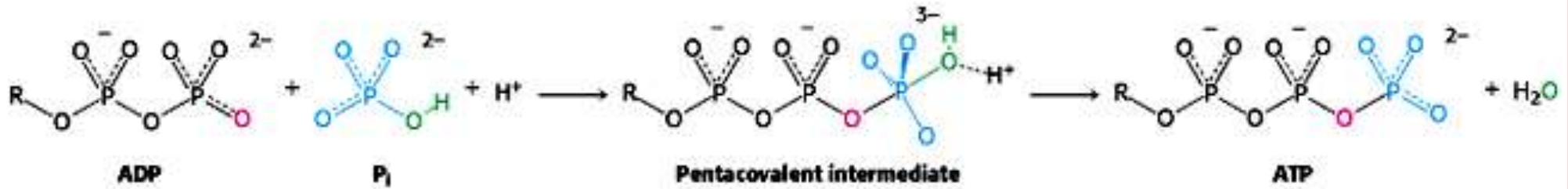
→ Antibiótico ionófero

→ Carreador de K⁺ → rompe o gradiente de K⁺

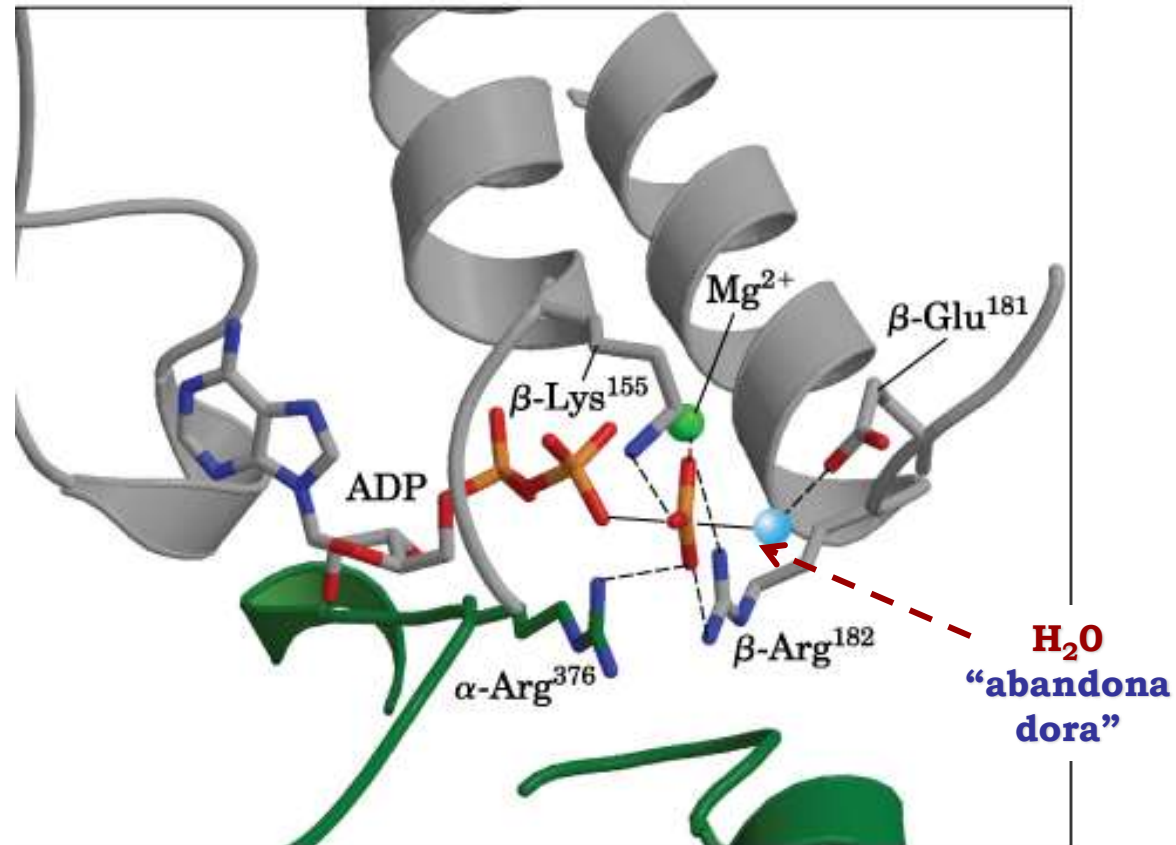
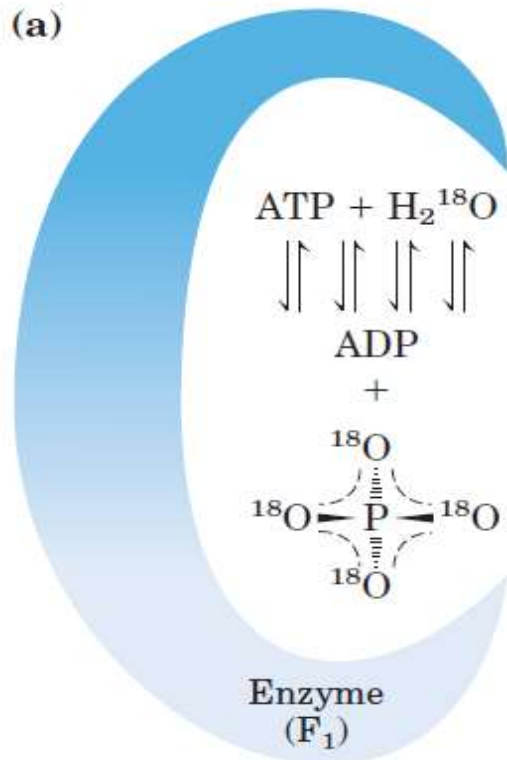
→ No experimento → Cria um potencial eletroquímico na membrana mitocondrial onde a matriz fica negativa

Fosforilação oxidativa: A síntese de ATP

A ATP-Sintase catalisa a quebra e formação da ligação fosfoéster repetidamente



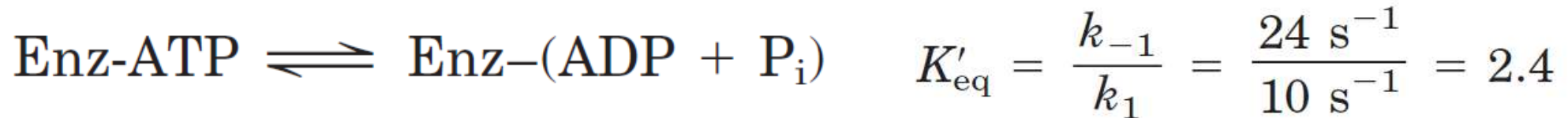
(a)



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

A Estabilização do ATP pela ATP-Sintase

Medidas cinéticas confirmam a proximidade do equilíbrio para a reação em condições padrão



- A reação da ATP-sintase ocorre com $\Delta G^{0'} \sim 0$

- A reação de hidrólise de ATP livre ocorre com $\Delta G^{0'} = -30,5 \text{ kJ/mol}$

A ATP-sintase liga ATP com K_D de 10^{-12} mol/L e ADP com K_D de 10^{-5} mol/L

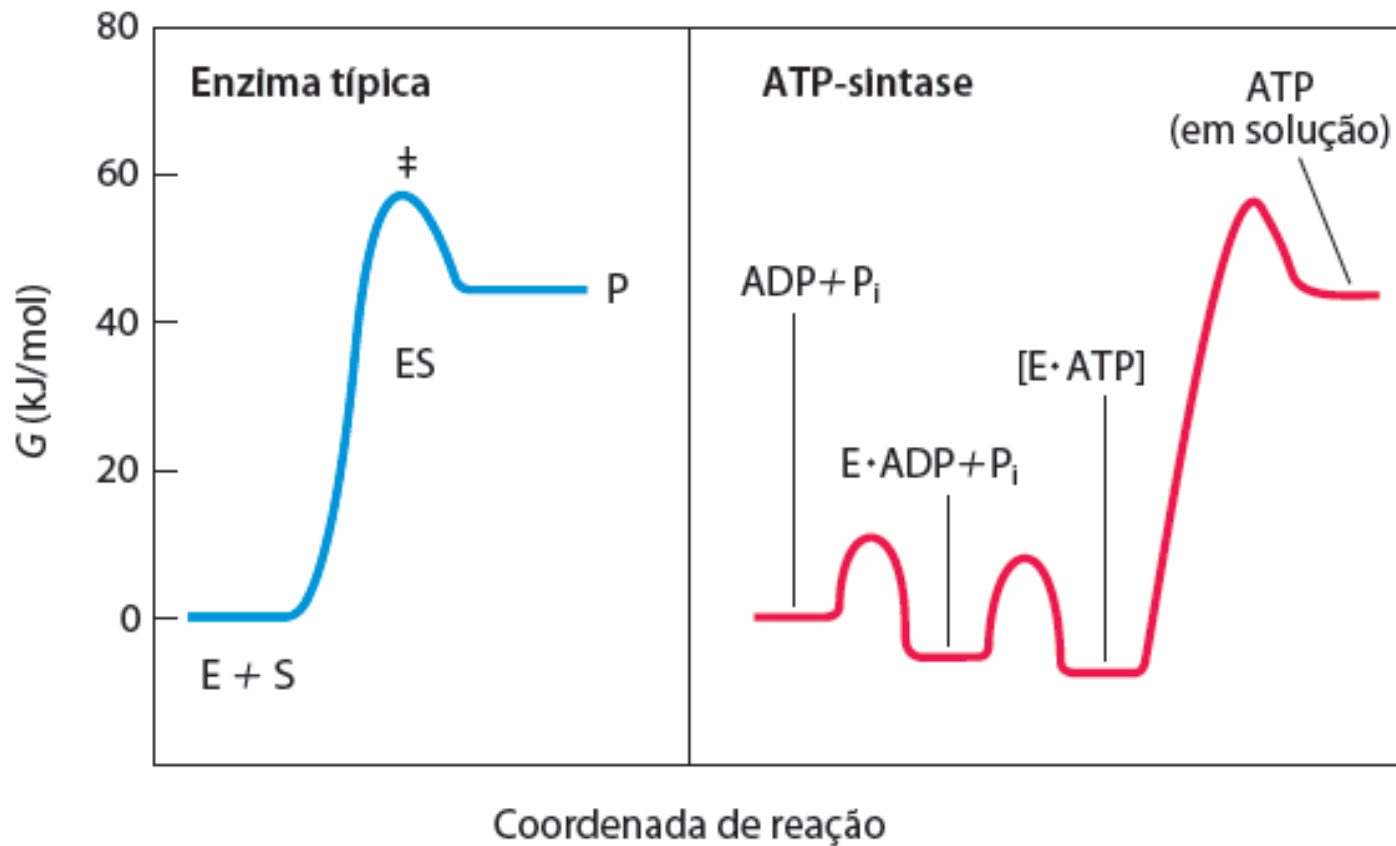
$\Delta G \rightarrow 40 \text{ kJ/mol}$

→ A ligação de ADP + Pi direciona para a formação de ATP

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

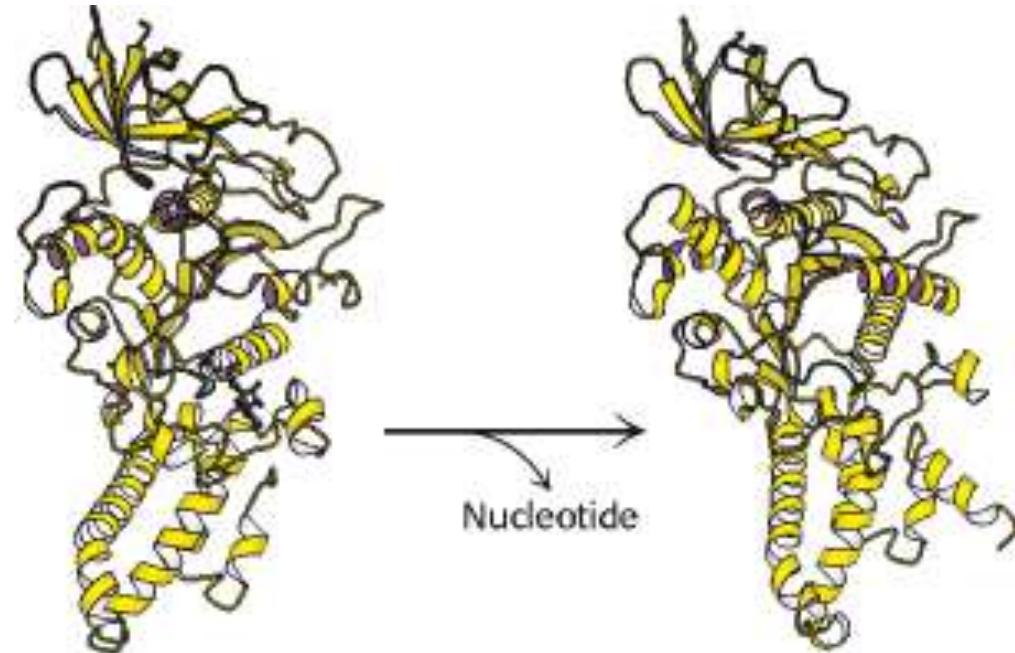
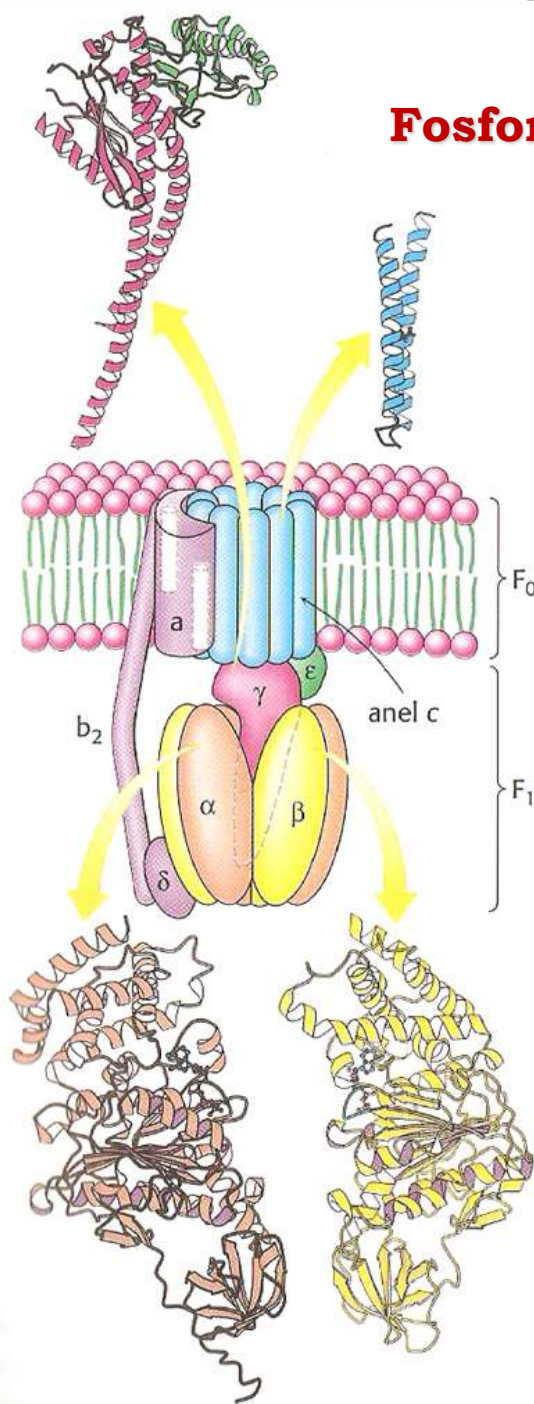
A liberação de ATP pela ATP-Sintase é o passo limitante do processo

O gradiente de prótons impulsiona a liberação do ATP para a solução



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

→ A Estrutura da ATP-Sintase
Complexo proteico da MMI



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

→ A Estrutura da ATP-Sintase

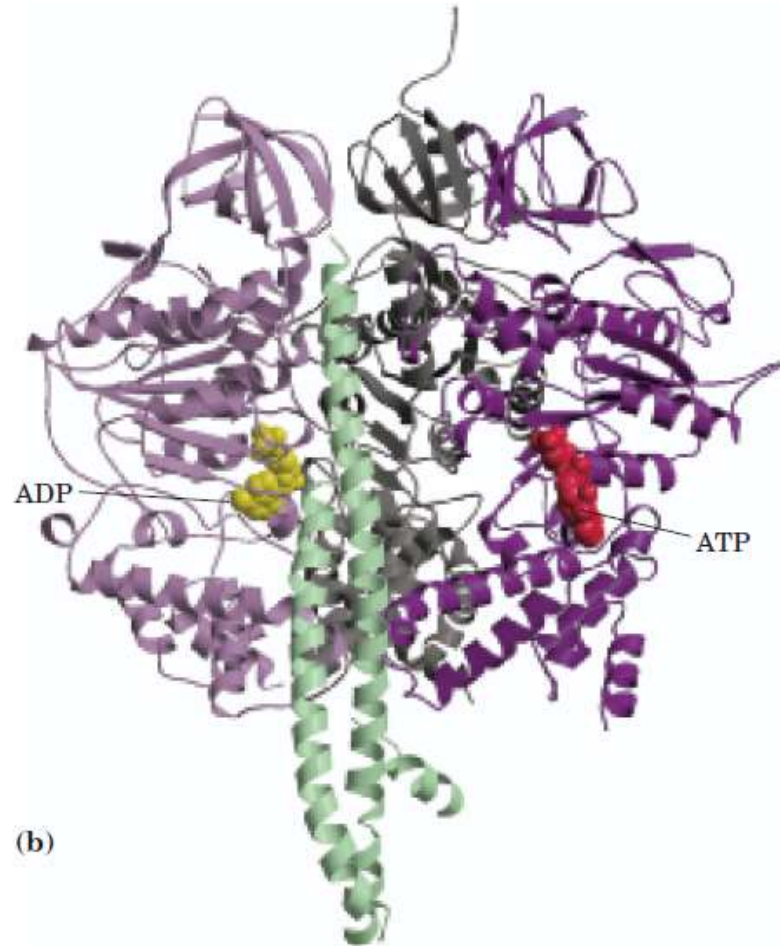
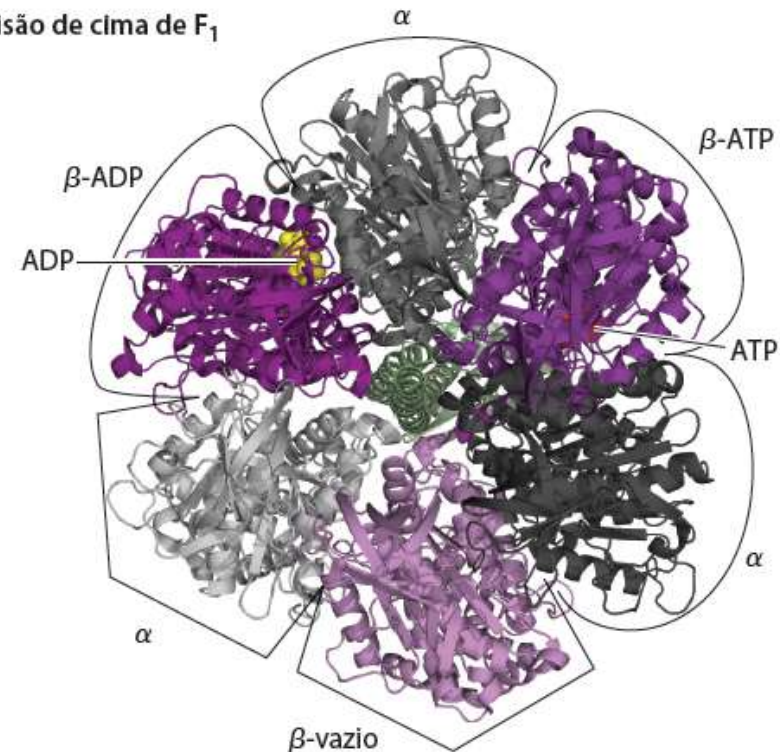
- Estrutura de periferia da superfície interna da MMI

- Complexo F_1 isolada da MMI tem atividade de hidrólise de ATP → “ F_1 -ATPase”

→ Complexo F_1
Heteroheptâmero

- $\alpha_3\beta_3\gamma$
- Hexâmero $\alpha_3\beta_3$
- Trímero de dímeros $\alpha\beta$
- Cada dímero $\alpha\beta$ assume um estado na presença de ATP, ADP + Pi e vazio

(b) Visão de cima de F_1



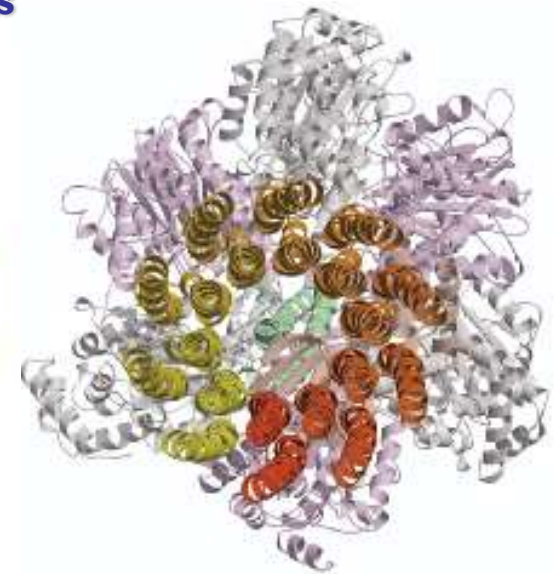
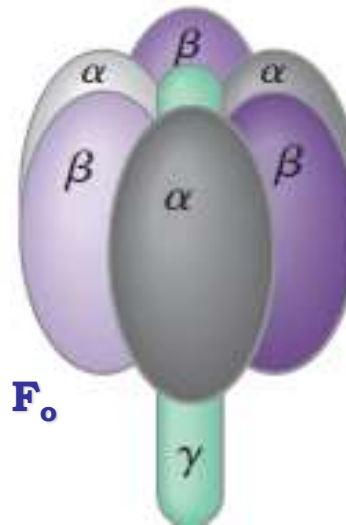
→ Reflete diferentes estados conformacionais com diferentes afinidades por ATP

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

A Estrutura da ATP-Sintase

→ Complexo F₁

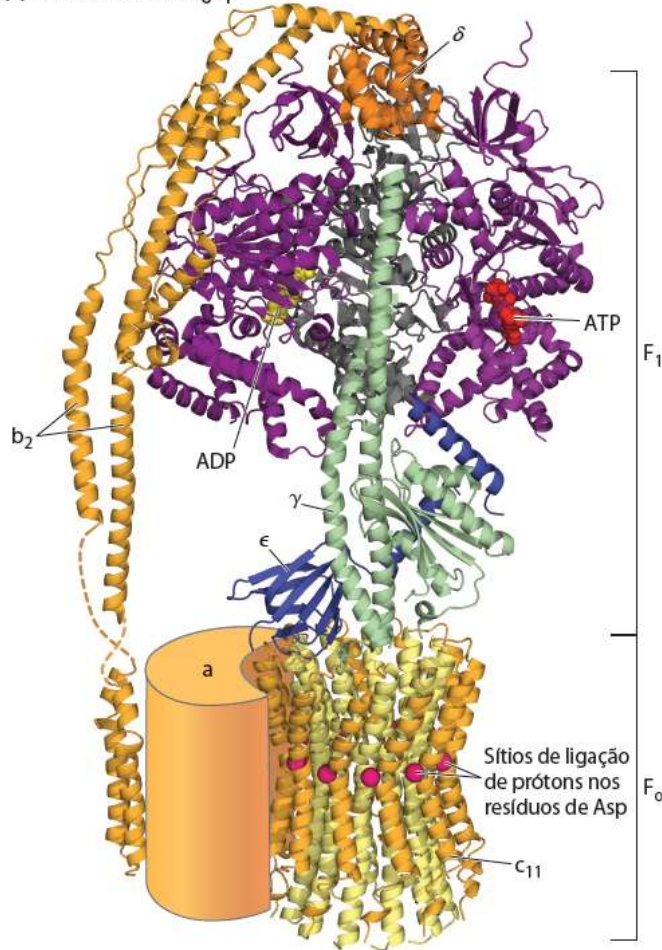
- 9 proteínas de 5 tipos diferentes
- $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$
- A cadeia γ interage principalmente com a cadeia β vazia
- As cadeias $\delta\epsilon$ interagem com a F₀



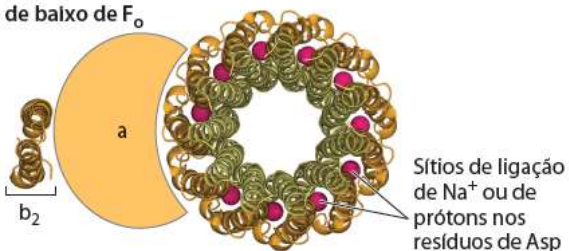
→ Complexo F₀

- Integral de membrana → subunidades ab_2c_{10-12}
- Canal de H₊
- Vesículas “Mitocondriais” desprovidas da F₁ carregam e’ mas não criam o gradiente de H⁺
- Adição da F₁ a estas vesículas permite a síntese de ATP

(c) Visão lateral de F₀F₁



(d) Visão de baixo de F₀



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

Esquema do complexo estrutural da ATP-Sintase

→ **Complexo F₁**

- 9 proteínas de 5 tipos diferentes

- $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$

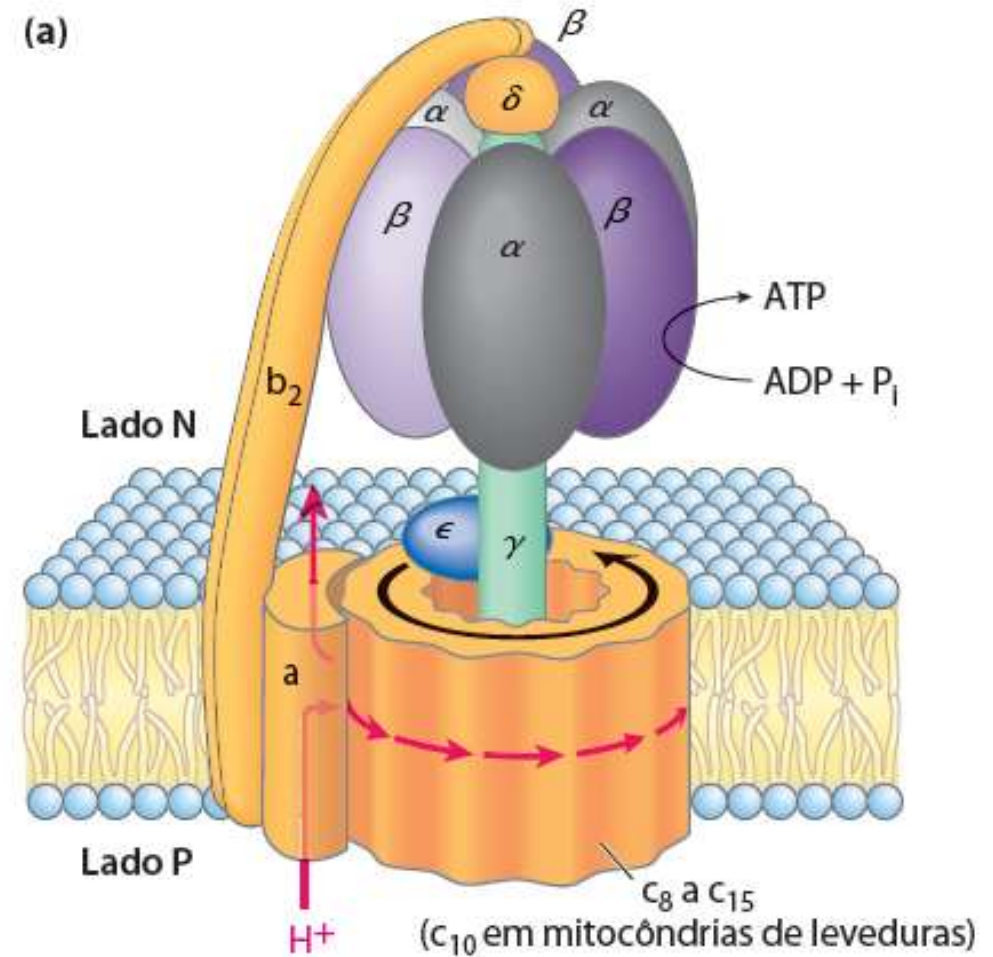
→ **Complexo F_o**

→ **Proteína Integral de membrana**

→ subunidades ab_2c_{10-12}

→ subunidade b_2 funciona como uma alavanca interagindo com a subunidade $\alpha\delta$ da F₁

→ Ponto de fixação da F₁



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

A catálise rotacional direcionada pelo fluxo de H^+ é o mecanismo da ATP-Sintase

→ 3 sítios catalíticos na subunidade β se revezam na síntese de ATP

1° → β -ADP-Pi

- Mudança conformacional para a conformação em alta afinidade por ATP → síntese de ATP

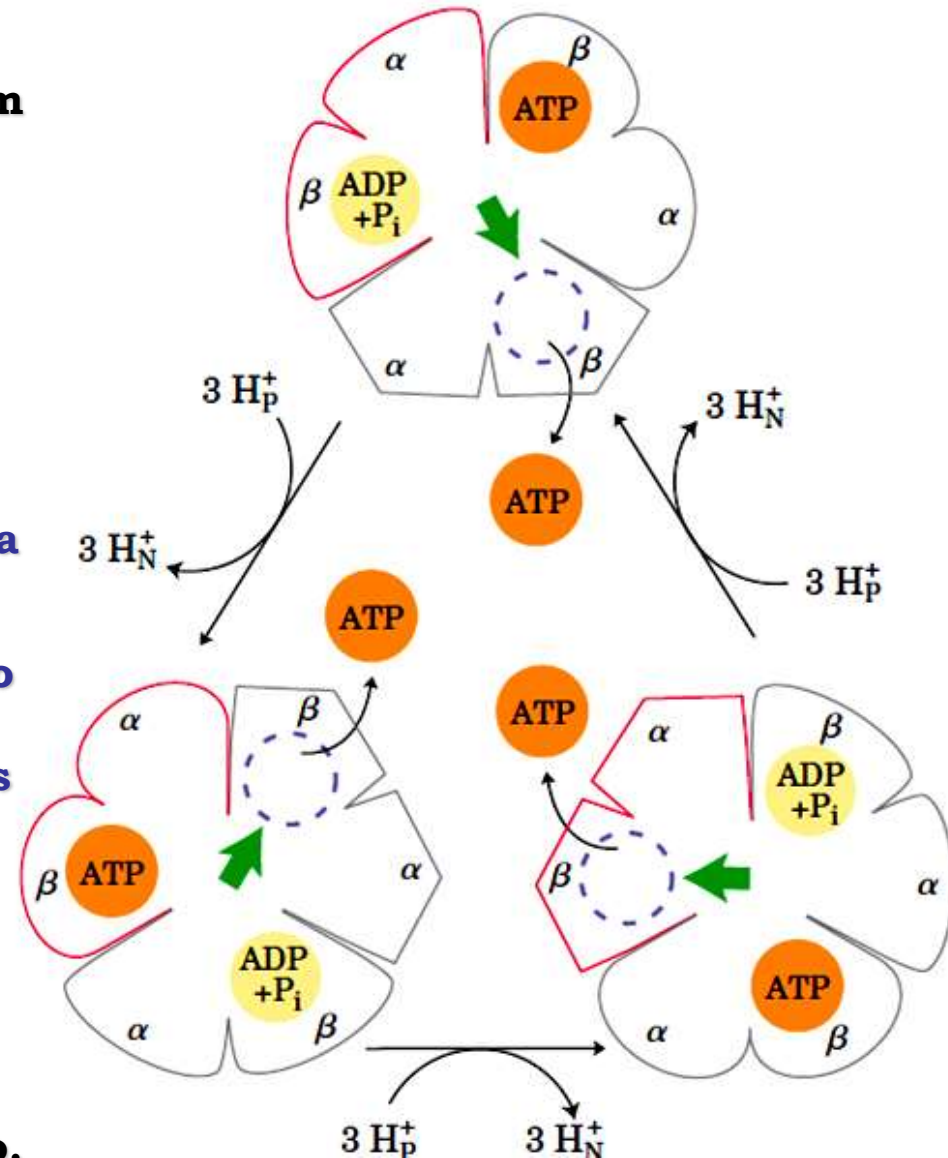
2° → β -ATP

- Mudança conformacional para o estado de baixa afinidade e saída de ATP

- A cadeia γ estabiliza a cadeia β na conformação “vazia” reduzindo a afinidade por ATP e induzindo mudanças conformacionais adicionais nas cadeias vizinhas

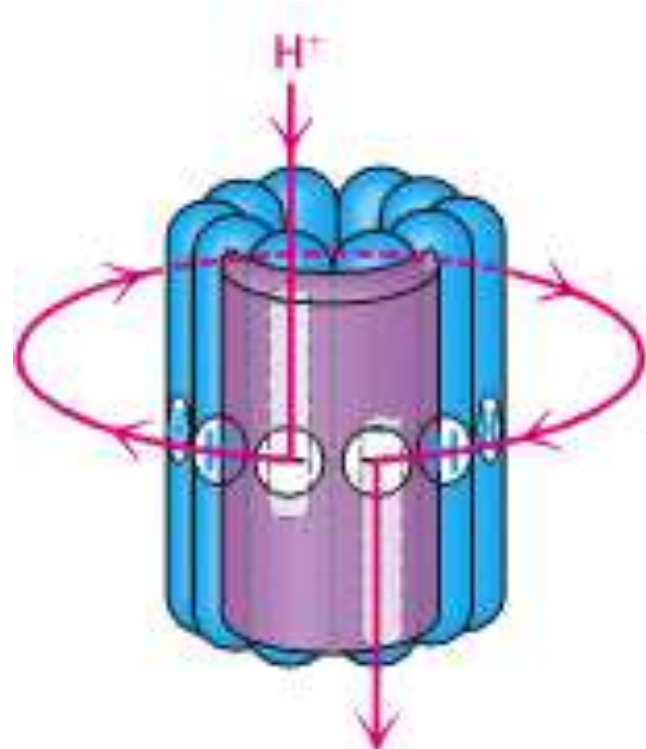
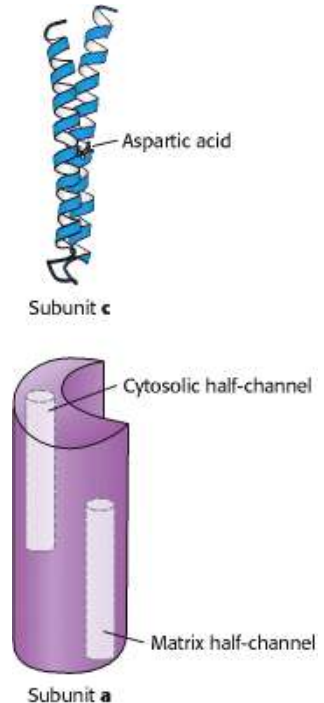
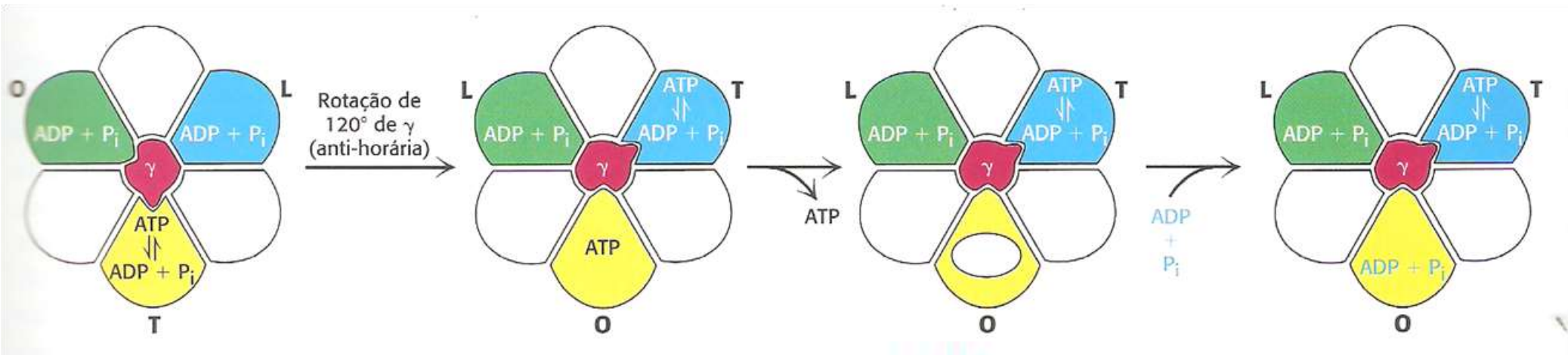
3° → β -vazio

→ O fluxo de H^+ pelo complexo dirige as mudanças conformacionais em um único sentido.



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

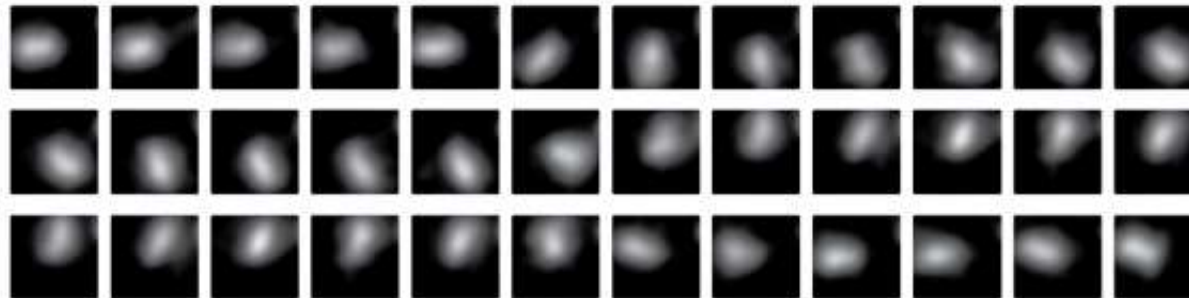
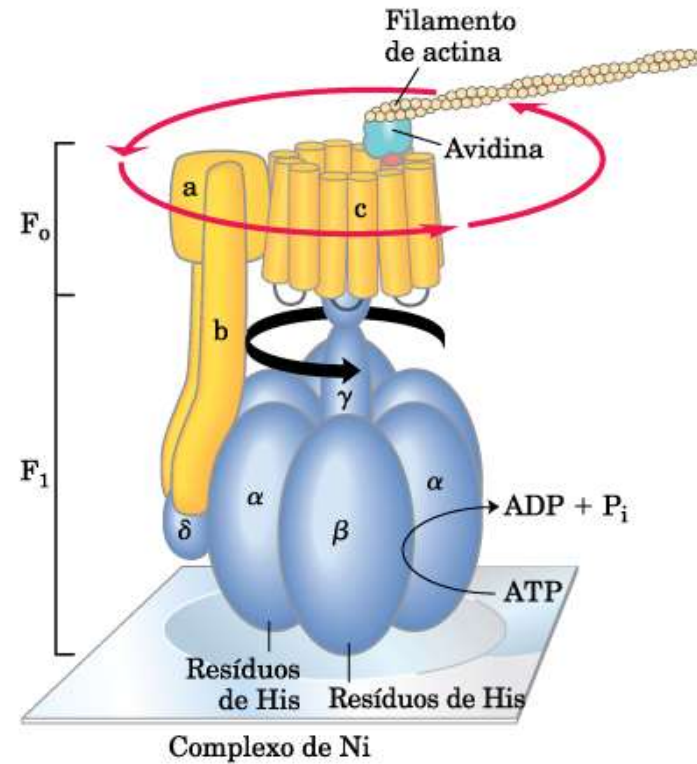
A catálise rotacional direcionada pelo fluxo de H^+ depende de catálise ácido-base



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

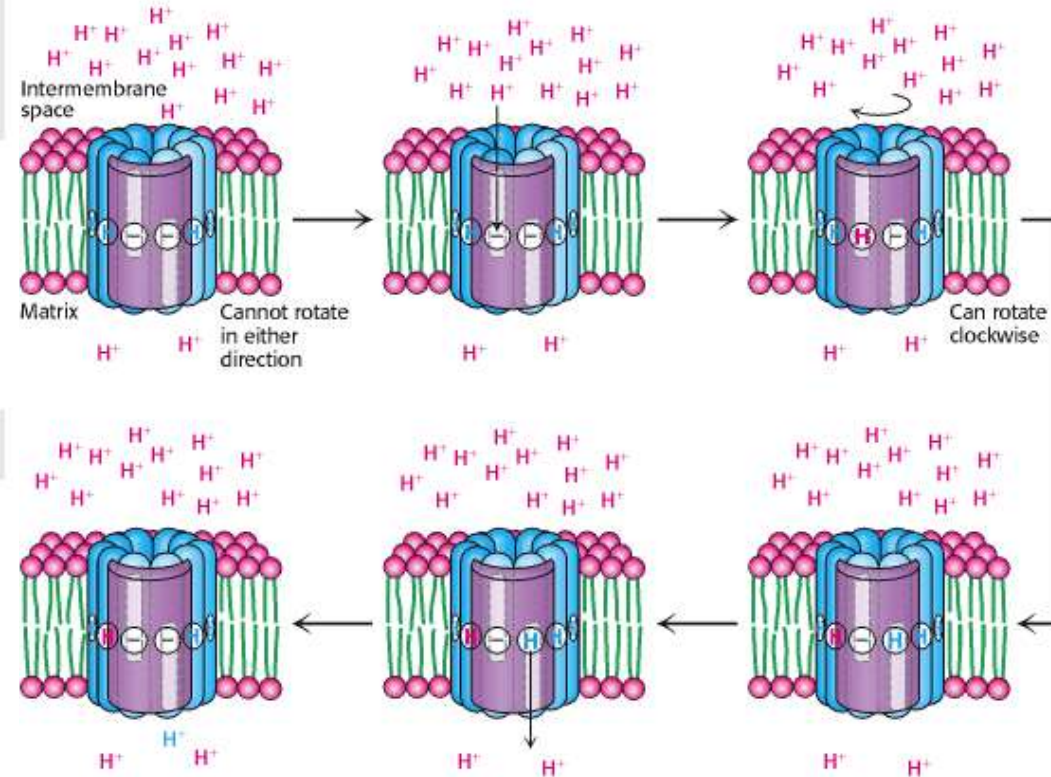
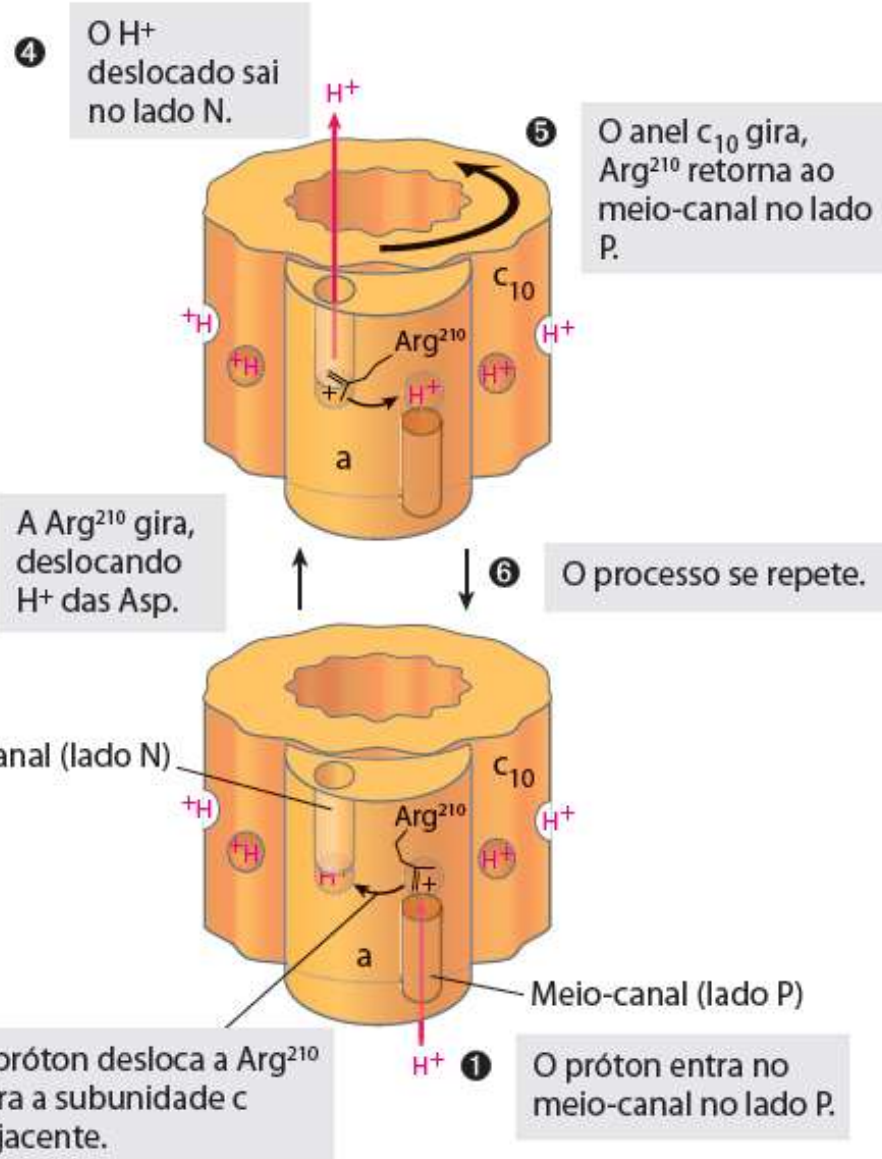
Demonstração experimental da rotação da F_0 em função da F_1

- Rotação reversa em ângulos de 120°
- Sistemas em hidrólise de ATP
- Filamento de actina marcada com um marcador de fluorescência



Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

A catálise rotacional direcionada pelo fluxo de H⁺ depende de catálise ácido-base



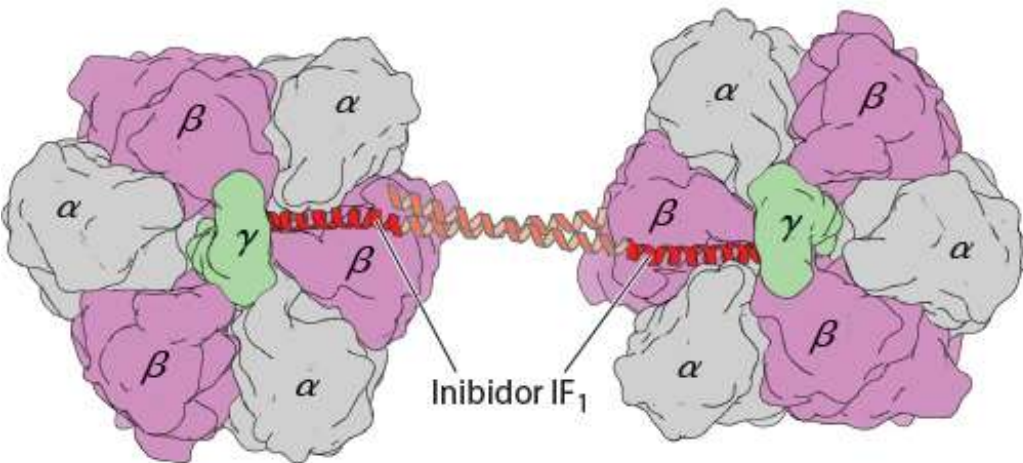
Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

REGULAÇÃO: Inibição devido a hipóxia

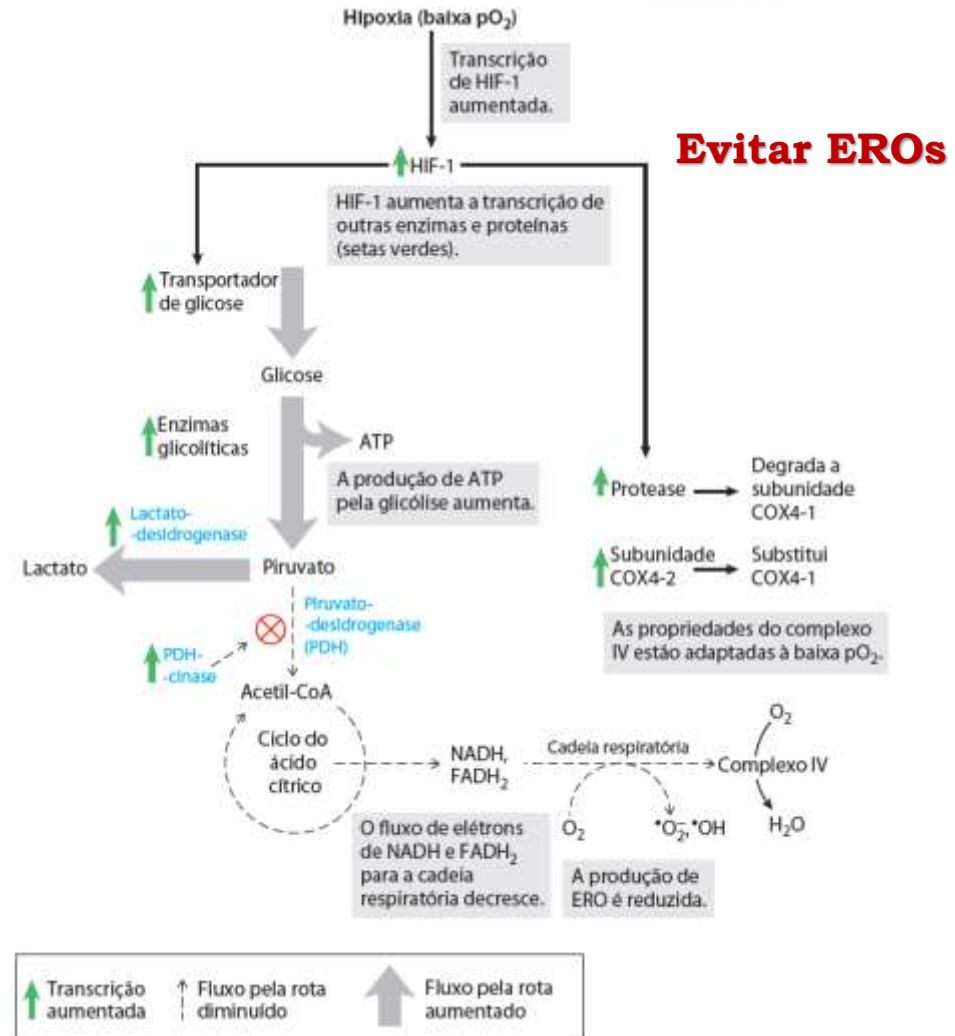
→ Ausência de Oxigênio → queda do gradiente de H⁺

→ ATP sintase poderia atuar hidrolisando o ATP existente transportando H⁺ para o espaço intermembranas

- Proteínas Inibitória da F₁ = IF₁



Efeito conjunto de várias vias metabólicas devido a proteína HIF-1



Evitar EROs

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

REGULAÇÃO: Depende da concentração do Aceptor de Pi → ADP

Depende do Status energético

Situação 1) Alta [ATP] → Inibida → alto teor energético

- ATP sintase para → Acumula H⁺ no espaço intermembranas
- Para a CTE devido ao alto gradiente eletroquímico → acoplamento
- Acúmulo de ATP, NADH e FADH₂ → para o ciclo de Krebs

Situação 2) Alta [ADP] → Ativada → baixo teor energético

- ATP sintase ativa → consumo de H⁺ no espaço intermembranas
- CTE Ativa devido ao baixo gradiente eletroquímico → acoplamento
- Acúmulo de AMP/ADP, NAD⁺ e FAD → Ativa o ciclo de Krebs

→ Um ser humano típico (70 kg) tem aproximadamente 100 g de ATP

→ ATP tem um alto número de renovação – *turnover number*

- Em repouso: 40 kg de ATP em 24 horas → 28 g/min

- Em exercício vigoroso → 500 g/min

- Para corrida de 2 horas → 60 kg de ATP

→ O Organismo está constantemente oxidando combustíveis para formar ATP

Fosforilação oxidativa: Síntese de ATP

REGULAÇÃO: Ação coordenada das vias produtoras de ATP

- Controle interconectado com a via glicolítica e ciclo de Krebs

