

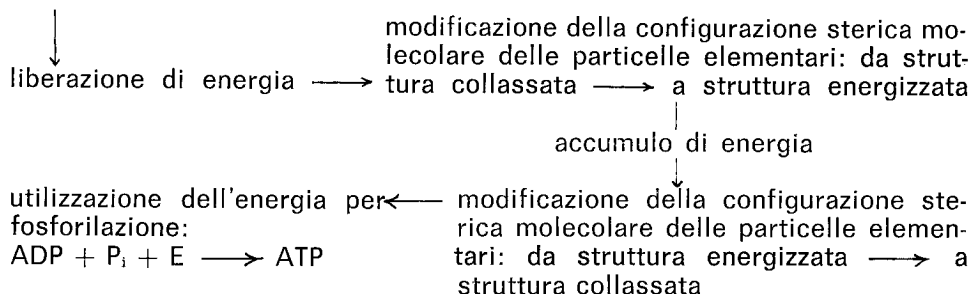
4) L'ACCOPIAMENTO DEL TRASPORTO ELETTRONICO CON LA FOSFORILAZIONE

L'energia necessaria per lo svolgimento della maggior parte della attività cellulare è fornita dall'ATP, o da sostanze affini quali il GTP (guanositri-fosfato) o la fosfocreatina, la cui sintesi è mediata dall'ATP; ai mitocondri è affidato il compito di originare la maggior parte dell'ATP prodotto in tutte le cellule aerobiche; per cui il mitocondrio è definito come la centrale energetica della cellula. Nell'intima realtà dei fatti, il trasporto elettronico è legato solo indirettamente alla sintesi di ATP da ADP e P_i , mentre è direttamente legato all'induzione di uno stato di attivazione energetica per mezzo del quale l'ATP è successivamente sintetizzato attraverso una serie di reazioni che richiedono ADP e P_i . E' pertanto utile la valutazione delle modificazioni che il trasporto degli elettroni induce a livello della membrana interna e che portano all'accumulo della energia per il processo fosforilativo. I dati, relativi alle variazioni della configurazione molecolare, che legano il trasporto di elettroni al processo di induzione di uno stato di attivazione energetica, verranno esposti tenendo presenti i concetti di base elaborati da Green e collaboratori.

Le due trasduzioni fondamentali attuantesi sul mitocondrio sono: (1) la trasformazione reversibile dell'energia libera (resa disponibile dalla catena di reazioni ossido-riduttive del Sistema 1) in energia conformazionale; in tal modo le particelle elementari (vedi Capitolo 3.2) subiscono una variazione nella loro struttura molecolare, accumulando energia: tali particelle elementari passano così dallo stato di inattività a quello di attivazione energetica; (2) la conversione dell'energia conformazionale in energia di legame dell'ATP; in tal modo, le particelle elementari si scaricano della energia riportando la loro configurazione da quella dello stato di attivazione energetica a quello di inattività.

Il processo quindi è il seguente:

flusso di elettroni attraverso il Sistema 1



4.1) Analisi dei complessi della catena del trasporto elettronico

L'energia libera resa disponibile nei processi di ossido-riduzione durante il flusso di elettroni attraverso il Sistema 1 è conservata sotto forma di cambiamenti conformazionali delle particelle elementari; tale conservazione richiede un meccanismo intermedio di trasporto diretto dell'energia dal sistema sottoposto all'ossidazione al sistema sottoposto ai cambiamenti conformazionali.

I complessi della catena del trasporto elettronico contengono ambedue i sistemi; cioè, l'intero apparato che accoppia il flusso di elettroni alla induzione di uno stato di attivazione energetica è contenuto all'interno di ciascuno dei Complessi: un danno del Complesso può, di conseguenza, compromettere o modificare la capacità di accoppiamento dei due processi. Il Complesso integro è invece l'unità operativa completa capace di accoppiare il flusso degli elettroni all'attivazione energetica conformazionale delle particelle elementari.

Ogni Complesso della catena respiratoria (Sistema 1) catalizza una sequenza completa di trasporto degli elettroni derivati dal Sistema 2. Tuttavia la caduta di potenziale che si accompagna ad ogni tappa ossido-riduttiva è insufficiente a generare uno stato di attivazione energetica.

Si è a lungo pensato che il processo di trasporto elettronico attraverso i Complessi della catena implicasse un meccanismo classico di collisione; da ciò consegue che i componenti individuali di ciascuna delle ossido-riduzioni avrebbero una capacità funzionale indipendente: in realtà, se così fosse, l'energia in gioco dovrebbe andare persa poiché non ci sarebbe modo, in ciascuna tappa ossido-riduttiva, di « accumulare » energia libera ad un livello sufficiente per attuare una reazione esoergonica. Vi è quindi una confluenza di tappe ossido-riduttive in Complessi la cui configurazione molecolare è adattata alla conservazione dell'energia utilizzabile. Solo i Complessi della catena di trasporto elettronico hanno tale capacità di adattamento molecolare: infatti l'adattamento dipende dalla interrelazione spaziale di un « sistema » di proteine in grado di attuare le ossido-riduzioni, e non da un singolo paio di proteine ossido-riduttrici all'interno del Complesso.

Nel capitolo 2.2.1) è stato detto che il passaggio di elettroni attraverso il Complesso II non porta alla formazione di ATP poiché la caduta totale di potenziale tra il primo donatore di elettroni per il Complesso (succinato) e l'accettore terminale di elettroni (coenzima Q) è insufficiente a generare uno stato di attivazione energetica. Il Complesso II è un complesso « impotente », ma con questo non si può dire che esso non abbia capacità di manifestare lo stato energetico qualora si trovi in altre situazioni termodinamiche: infatti, ad es., l'ATP può generare uno stato di attivazione energetica nel Complesso II. In altri termini, la capacità è latente e, sebbene non si manifesti durante il flusso di elettroni dal succinato al coenzima Q, può essere indotta dall'ATP. Tutte le parti basali della membrana interna, che facciano o no parte della catena di trasporto degli elettroni, sono destinate a manifestare uno stato di attivazione energetica. Ora lo stato di attivazione energetica può essere trasmesso da una porzione basale della membrana ad un'altra e, data tale trasmissione all'interno della membrana, il concetto di Complessi perennemente impotenti non è sostenibile.

Lo studio del flusso di elettroni attraverso il Complesso III fornisce un esempio caratteristico per la spiegazione del meccanismo della conservazione dell'energia; il Complesso III, che opera il trasporto elettronico dal coenzima Q ridotto al citocromo c, è così costituito: una proteina non catalitica (proteina fondamentale), 2 molecole di citocromo b, una molecola di citocromo c_1 , una molecola di ferroproteina (contenente 2 atomi di ferro), ed una molecola proteica contenente un sito sensibile all'azione dell'antimicina.

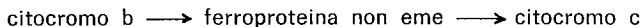
Gli elettroni provenienti dall'esterno, dopo aver ridotto il coenzima Q vengono direttamente trasferiti al citocromo b; quindi vengono trasferiti dal citocromo b ridotto al citocromo c_1 ; ed alla fine sono trasferiti dal citocromo c_1 ridotto al citocromo c esterno. Poiché ci sono 2 molecole di citocromo b e solo una di citocromo c_1 , il trasferimento dovrebbe essere graduale (un elettrone alla volta) o globale (due elettroni

alla volta); in quest'ultimo caso necessitano altre molecole, oltre al citocromo c_1 , capaci di fungere da accettori di elettroni. Ed infatti il Complesso III contiene una ferroproteina (non facente parte di un gruppo eme) che può essere ben utilizzato a tale scopo: questa proteina subisce una ossido-riduzione durante il trasferimento nel Complesso III e costituisce un canale di trasferimento aggiuntivo tra il citocromo b ridotto ed il citocromo c.

Così, uno degli elettroni è trasferito secondo la sequenza:



mentre l'altro è trasferito secondo la sequenza



L'antimicina impedisce il passaggio di elettroni dal citocromo b al citocromo c_1 ; quando il Complesso è inibito dall'antimicina è impossibile quindi separare il citocromo b dal citocromo c_1 (per mezzo, ad esempio, di agenti chimici quali taurocolato più ammonio solfato): in assenza di antimicina, questa rottura avviene invece facilmente. Analogamente la riduzione del Complesso con ditionina ha lo stesso effetto terminale dell'antimicina; il Complesso ridotto con ditionina non è più scindibile nei citocromi b e c_1 (per mezzo del taurocolato e dell'ammonio solfato).

Ci sono quindi due stati del Complesso: uno stato « aperto » che si può facilmente rompere, ed uno stato « chiuso » che non si può rompere: l'antimicina e la ditionina bloccano il Complesso nello stato « chiuso ». In condizioni di normalità, lo stato aperto può essere considerato come la forma ossidata del Complesso, lo stato chiuso come la forma ridotta; perché avvenga un trasferimento di elettroni dal citocromo b al citocromo c è necessario un passaggio dalla forma aperta alla forma chiusa. L'antimicina blocca il Complesso ossidato nella forma chiusa, ma non con un processo riduttivo, bensì con un riarrangiamento molecolare che porta ad uno stato paragonabile, ma non identico, allo stato chiuso che è ottenuto con la riduzione del Complesso da parte della ditionina.

E' stato prima osservato che le particelle elementari della membrana interna (capitolo 3.2) hanno una conformazione ciclica modificantesi durante le reazioni di accoppiamento; come mostrato in Fig. 4.1, la particella elementare è collassata nella conformazione non energizzata, mentre si distende nello stato di attivazione energetica o in forma clavata (attivazione da ATP) o in forma a spirale (attivazione da substrati più fosfato inorganico): in tal modo la particella elementare è sottoposta ad una specie di movimento a vite durante il ciclo di variazione conformazionale:

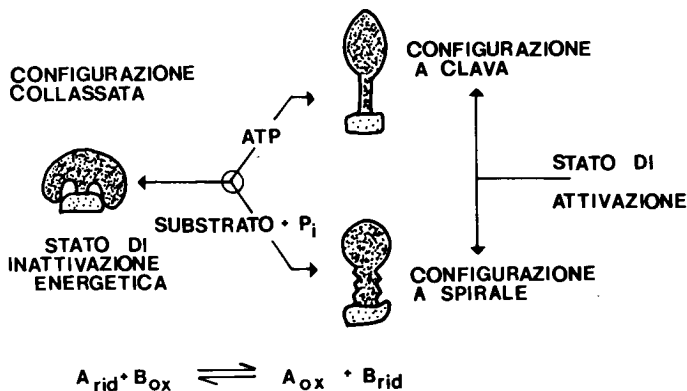


FIGURA 4.1

ossia il trasferimento di elettroni è accompagnato da un cambiamento conformazionale che porta alla separazione della testa dalla base della particella elementare. Solamente dopo la scarica dello stato di attivazione energetica la particella elementare ritorna al suo originale stato collasato. Possiamo paragonare la forma aperta del Complesso III alla conformazione dello stato non energizzato della particella elementare, e la forma chiusa del Complesso III alla conformazione energizzata della particella elementare; il processo del trasferimento di elettroni non può aver luogo quando la particella elementare si trova nella conformazione di attivazione energetica. Il blocco indotto dal cambiamento conformazionale può essere spiegato considerando che la forma ossidata del citocromo b, nello stato di attivazione energetica del Complesso III, non è riducibile dal coenzima Q ridotto: ossia il potenziale del citocromo b diventa troppo negativo per consentire la riduzione a mezzo del coenzima Q ridotto. Così non può avvenire un ulteriore trasferimento di elettroni finché il Complesso si scarica dell'energia: quando cioè nel Complesso III « scaricato » il citocromo b diventa riducibile dal coenzima Q.

Gli eventi sopra descritti per il Complesso III sembrano verificarsi in ugual modo negli altri Complessi implicati in reazioni di accoppiamento, ossia i Complessi I e IV. Le ossido-riduzioni che avvengono nel Complesso portano a cambiamenti conformazionali. Le interazioni tra la « molecola mobile » ridotta od ossidata (vedi Capitolo 2) ed i Complessi sono legate alla rigenerazione di un vero stato ossido-riduttivo del Complesso e non ai cambiamenti conformazionali implicati nella conservazione dell'energia. Infatti (vedi Fig. 4.1) sintetizzando con A e B i vari componenti il trasporto elettronico in ciascuno dei Complessi (I, III e IV), nello stato di inattivazione energetica, A si trova in forma ridotta, in grado di cedere cioè elettroni a B che è originariamente ossidato e quindi in grado di accettare elettroni riducendosi; nello stato di attivazione energetica un ulteriore trasferimento elettronico da A a B non è possibile perché A è ossidato, quindi privo di elettroni da cedere a B che, essendo già ridotto, non è in grado di accoglierli. I cambiamenti conformazionali delle particelle elementari che si accompagnano al trasferimento di elettroni nei Complessi I, III e IV devono essere di entità tale da portare alla sintesi dell'ATP; l'energia utilizzabile liberata dai processi di ossido-riduzione è trasformata ed immagazzinata come energia conformazionale ed elettrostatica. Il cambiamento conformazionale del ciclo completo rappresenta una quota di energia libera pari alla somma dei due termini: [energia libera resa disponibile da un elettrone che passa dal coenzima Q ridotto al citocromo c₁] + [energia libera resa disponibile dal secondo elettrone che passa dal coenzima Q ridotto alla ferroproteina]. Questa somma si avvicina alla massima energia libera resa disponibile dalla completa reazione di ossidazione del Complesso III: ossidazione del coenzima Q ridotto per mezzo del citocromo c. La formazione finale di ATP è possibile con questo meccanismo solo se la conversione: « energia liberata dell'ossidazione → energia conformazionale », e la successiva conversione: « energia conformazionale → energia di legame dell'ATP » sono entrambe altamente efficienti.

Sorge ora il problema di individuare quale o quali strutture del Complesso sono interessate dalla modificazione molecolare che porta alla attivazione del Complesso

stesso. E' noto che i Complessi possono essere scomposti in una frazione contenente le proteine catalitiche, ossia i sistemi ossido-riduttivi, ed in un'altra frazione contenente proteine costitutive. Una separazione di questo tipo farebbe pensare che nel Complesso originario le proteine catalitiche formino un gruppo funzionale operativo che ha come supporto un gruppo di proteine costitutive, non partecipanti quindi attivamente ai processi di attivazione energetica. Ciò non è vero, in quanto un cambiamento conformazionale nel Complesso non può essere localizzato esclusivamente nelle proteine catalitiche o nelle proteine costitutive, poiché si tratta di un sistema integrato in cui la proteina costitutiva è parte integrante della catena del trasporto elettronico. La proteina costitutiva, durante la fase di attivazione energetica, è capace di numerosi cambiamenti conformazionali, e ciò è molto importante per la conservazione dell'energia da rendere poi disponibile per attuare il processo di accoppiamento; perciò, la dizione « proteina costitutiva » non deve essere presa letteralmente.

4.2) Il meccanismo del trasferimento energetico

Per spiegare le modalità con le quali il trasporto elettronico rende possibile la sintesi di ATP da ADP e fosfato, sono state avanzate varie prospettive: la prima è quella dell'accoppiamento chimico, secondo cui il processo di trasporto degli elettroni è legato alla sintesi di una serie di intermedi altamente energetici (che non siano ATP) che, con successivi passaggi, si trasformano in ATP, come indicato in 2.2.6. Secondo questa veduta vi è una diretta conversione dell'energia liberata nelle reazioni di ossidoriduzione in energia di legame di alcuni intermedi aspecifici ad alto contenuto energetico.

Tuttavia manca la dimostrazione della validità sperimentale di tale « accoppiamento chimico » in quanto non è stato possibile isolare effettivamente questi intermedi. In alternativa, Mitchell ha proposto la tesi chemio-osmotica secondo la quale il trasporto degli elettroni (e^-) pompa i protoni (H^+) attraverso le membrane mitocondriali nel senso che, passando gli e^- dal Sistema 2 all'ossigeno molecolare, si ha un parallelo flusso reversibile di protoni (H^+) dall'interno del mitocondrio verso l'esterno: questa forza protonica, così generata, rappresenterebbe il meccanismo per la conservazione dell'energia liberata dalle reazioni ossido-riduttive del Sistema 1: il gradiente di concentrazione fra protoni (H^+) extra ed intramitocondriali risulterebbe la forza di immediato prelievo per la sintesi dell'ATP, allorché tali protoni rientrano all'interno del mitocondrio. Anche questa modalità chemio-osmotica non ha avuto una chiara dimostrazione laboratoristica, ma al contrario, le esperienze hanno portato ad una certa limitazione di tale veduta.

Secondo Green è invece importante la prospettiva della variazione conformazionale, esposta in 4.1, secondo cui la trasduzione mitocondriale di energia durante il trasporto elettronico consiste nella conversione dell'energia libera in energia conformazionale od elettrostatica. La sintesi dell'ATP richiede poi una seconda trasduzione, e cioè la conversione dell'energia elettrostatica conformazionale nell'energia di legame pirofosforico dell'ATP.

Questa interpretazione si basa soprattutto sul fatto sperimentale che, in concomitanza con il processo di accoppiamento « trasporto elettronico \rightleftharpoons sintesi di ATP », la membrana interna subisce profondi mutamenti nella forma e nella struttura; tali riarrangiamenti si possono ricollegare al ciclo conformazionale delle particelle elemen-

tari e si riflettono sulla conformazione dei Complessi, i quali non sono altro che una serie di proteine ossido-riduttive collegate con le particelle elementari, ossia con proteine enzimatiche. Si potrebbe pensare perciò che i cambiamenti conformazionali siano eventi di secondaria importanza nel processo di accoppiamento e quindi, non rilevanti per la trasduzione di energia. Secondo Green però, si possono fare cinque considerazioni di base che si oppongono ad una dissociazione dei cambiamenti conformazionali dalla fosforilazione ossidativa: 1) indipendentemente dai grossi cambiamenti nella conformazione di membrana, sussiste il fatto incontrovertibile che il flusso di elettroni è accompagnato da cambiamenti negli stati conformazionali dei Complessi; 2) se gli altrettanto incontrovertibili notevoli cambiamenti della membrana interna fossero indipendenti dai processi di trasduzione energetica, l'efficienza della trasduzione sarebbe molto bassa a livello mitocondriale dal momento che questi grossi cambiamenti rappresenterebbero una forte dissipazione di energia libera. Al contrario è noto che l'efficienza del processo di accoppiamento del mitocondrio è fra i più alti nel quadro del metabolismo energetico; una efficienza così alta è incompatibile con il concetto che l'accoppiamento implichi una gran quantità di cambiamenti conformazionali inutili; 3) la presenza in natura di altri cambiamenti conformazionali simili a quelli osservati nei mitocondri; ossia vi è una certa universalità nella correlazione fra trasduzione di energia e cambiamenti conformazionali nelle membrane; 4) i mitocondri possono essere parzialmente limitati nei cambiamenti conformazionali; in tal caso essi non possono più svolgere nessuna funzione legata alla trasduzione dell'energia; 5) la velocità dei cambiamenti conformazionali è dello stesso ordine di grandezza della velocità delle reazioni dei componenti della catena del trasporto elettronico.

A livello della particella fondamentale, il cambiamento più evidente è la scomparsa del peduncolo nello stato conformazionale non energizzato e la sua distensione nelle due conformazioni energizzate: il peduncolo quindi o si trova completamente disteso sulla base o, in alternativa, si collassa con la testa della particella. Il peduncolo però non si muove come un pistone, ma si espande nella conformazione di inattivazione energetica. Una simile trasformazione è spiegabile se si pensa che il cambiamento conformazionale nella base della particella elementare, attuantesi durante il trasporto elettronico, faccia in modo che le molecole si dispongono ad elica portando così ad una distensione dell'unità pedunculata. La disposizione ad elica delle molecole rende il peduncolo rigido e porta al passaggio dalla forma collassata alla forma distesa: tale disposizione si estende anche alla testa, per cui il peduncolo agisce da trasmettitore dello stato di attivazione energetica dalla porzione basale alla porzione apicale; la perturbazione conformazionale è così trasferita dalla base alla testa. Probabilmente però, la ridistribuzione molecolare nella testa, durante il passaggio dalla forma collassata alla forma distesa a clava od a spirale, è più di un semplice innalzamento della testa sulla base: la distensione del peduncolo conduce infatti ad un riassetto molecolare della proteina della parte apicale: quando l'ATP viene sintetizzato nella testa, una sufficiente energia conformazionale deve essere disponibile nella testa perché la sintesi possa avvenire.

Il ciclo conformazionale è destinato ad interessare profondamente anche le forze repulsive ed attrattive legate agli ioni: infatti quando la particella fondamentale è collassata sulla base, vi è una notevole protezione o neutralizzazione delle cariche delle estremità polari delle molecole di fosfolipidi che ricoprono la superficie della base; quando la particella fondamentale si distende, un notevole numero di gruppi fosfolipidici elettricamente carichi resta scoperto e quindi disponibili per legami elettrostatici: i cationi possono così iniziare ad avere o, al contrario, a smettere di avere una neutralità elettrica; in tal modo si ha un movimento ionico

transmembrana per cui cationi e proteine possono partecipare al riassetto di carica. Il cambiamento conformazionale, portando ad un cambiamento nell'equilibrio delle cariche, inevitabilmente porta a movimenti di proteine e cationi; pertanto si avranno cambiamenti di pH esattamente paralleli al passaggio dalla conformazione non energizzata a quella dello stato di attivazione energetica.

Il problema fondamentale che rimane da risolvere è quello di stabilire come l'energia conformazionale può essere trasdotta in energia di legame di un pirofosfato nell'ATP. Il cambiamento conformazionale porta alla formazione di una sorgente elettrostatica nella testa della particella fondamentale in cui vi è un insieme di 5 gruppi caricati positivamente: quando l' ADP^{3-} ed il P_i^{2-} si imbattono in questa sorgente elettrostatica (e si legano agli appositi siti attivi) tutte le barriere elettrostatiche ed entropiche, che si oppongono alla loro unione in ATP, vengono eliminate; la combinazione dell'ADP e del P_i in queste speciali condizioni dovrebbe quindi essere un processo reversibile che richiede una piccola variazione di energia libera. Infatti è come se un enzima inattivo passasse alla sua forma attiva per mezzo di un preliminare cambiamento conformazionale endoergonico; una volta che si trova così attivato, l'enzima può catalizzare la combinazione reversibile dell'ADP e del P_i ; in questa similitudine, la spesa energetica è quindi relativa soprattutto alla attivazione dell'enzima, mentre la sintesi dell'ATP da ADP e P_i non rappresenta che una parte modesta dell'energia in gioco. L'energia conformazionale è quindi usata per portare ad uno speciale stato elettrico e geometrico le strutture della particella fondamentale per cui può avvenire una combinazione isoergonica di ADP e P_i .

Va inoltre osservato che la struttura ad incastro delle creste è una condizione essenziale per l'accoppiamento del trasporto elettronico alla fosforilazione ossidativa. Questa struttura ad incastro, che porta alla conformazione energizzata delle particelle fondamentali, implica un'interazione tra la testa e la base di creste opposte. Se a questo sistema in equilibrio elettrostatico si aggiungono P_i ed ADP, si ha che: (1) il fosfato inorganico rompe il legame fra la testa e la base delle opposte creste; forma così un legame covalente con la testa, e ciò porta ad una conformazione energetica a spirale; (2) l'ADP può indurre poi un riarrangiamento conformazionale del sistema, che potrebbe far scattare il passaggio da un gruppo fosforico a contenuto scarsamente energetico ad uno ad alto contenuto energetico. Anche in questo caso la spesa energetica di gran lunga maggiore è legata alla induzione della modificazione conformazionale delle particelle elementari di creste opposte: la sintesi dell'ATP rappresenta un momento successivo in cui, per l'immissione di ADP e P_i , si rompe l'equilibrio elettrostatico fra due fronti opposti di creste; l'energia liberata da tale rottura dell'equilibrio è immagazzinata nei legami energetici dell'ATP.

4.3) Scarica e trasmissione dello stato di attivazione energetica

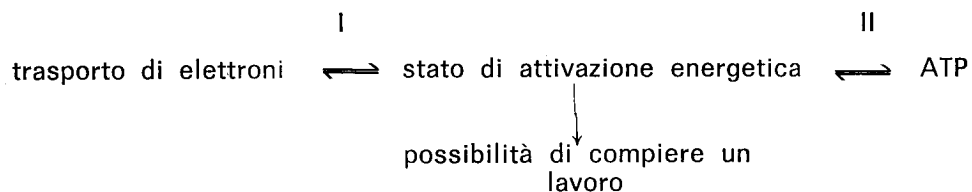
Lo stato di attivazione energetica a clava (da ATP) o lo stato di attivazione energetica a spirale (da substrato e P_i) possono scaricarsi in vari

modi; così l'interazione dello stato energetico a spirale con l'ADP porta alla sintesi di ATP ed alla scarica dello stato energetico; così l'interazione della configurazione energetica a spirale con Ca^{2+} porta al deposito di $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ed alla scarica dello stato di attivazione energetica; così l'interazione dello stato energetico a spirale con cationi monovalenti porta alla traslocazione di sali monovalenti e alla scarica dello stato di attivazione energetica. Lo stato di attivazione energetica a clava è accoppiato alla transidrogenazione; il sistema, ridotto dal NADH, è attivato dall'ATP e scaricato dal NADP^+ . Tutte queste prestazioni di lavoro implicano l'intervento dello stesso sistema di accoppiamento di base: la presenza o l'assenza di fattori in grado di operare la scarica dello stato energetico determina quale delle prestazioni di lavoro avrà luogo. Se è presente Ca^{2+} , avrà luogo la traslocazione del Ca^{2+} ; se è presente l'ADP, avrà luogo la sintesi dell'ATP; se sono presenti sia il Ca^{2+} che l'ADP, prevarrà il reagente che presenta la maggior affinità per il sito di liberazione dell'energia.

Va poi rilevato che lo stato di attivazione energetica generato in un punto della membrana interna può diffondere attraverso la membrana stessa con una specie di reazione di scambio; ciò implica che vi può essere il trasferimento di uno stato di attivazione energetica da un Complesso al suo vicino. Il Complesso donatore non resta più in uno stato di attivazione dopo il trasferimento dell'energia, mentre il Complesso accettore passa in uno stato di attivazione energetica.

4.4) Utilizzazione dell'energia conformazionale

Le trasformazioni energetiche dei mitocondri si possono riassumere con questo semplice schema:



I due apparati funzionalmente differenti in grado di produrre lo stato di attivazione energetica delle particelle elementari sulla membrana interna sono: I = i Complessi della catena del trasporto elettronico; II = il Complesso ATP-asico. L'apparato I è correlato con la base delle particelle elementari, mentre l'apparato II si trova nella testa e nel peduncolo della particella stessa. Lo stato di attivazione energetica è lo stesso, sia che venga generato dall'apparato I che dall'apparato II: il processo del trasporto elettronico nella base, o l'idrolisi accoppiata dell'ATP nella testa, danno il via alla generazione dello stato di attivazione energetica: topograficamente, l'apparato I e l'apparato II sono disposti ad angolo retto l'uno rispetto all'altro (Fig. 3.8).

Il processo del trasporto elettronico avviene sulla porzione esterna della membrana interna, mentre l'idrolisi accoppiata dell'ATP avviene in direzione perpendicolare rispetto alla membrana. Il peduncolo che è perpendicolare alla base della particella fondamentale (Fig. 3.8) è l'elemento di connessione funzionale tra i cambiamenti conformazionali molecolari che avvengono nella testa e quelli che avvengono nella base.

L'induzione dello stato di attivazione energetica, sia da parte del trasporto elettronico che dell'idrolisi dell'ATP, è un processo reversibile, come indicato dalle reazioni I e II; al contrario, l'utilizzazione dello stato di attivazione energetica per compiere un lavoro risulta irreversibile. Sono state descritte varie possibilità di compiere un lavoro sia per mezzo dello stato di attivazione energetica « a clava » delle particelle elementari, che per mezzo della conformazione « a spirale » delle stesse. La membrana interna può assumere in totale tre configurazioni diverse e cioè: (1) la configurazione di « inattivazione » (nonenergized configuration), che corrisponde alla configurazione collassata delle particelle elementari (vedi Fig. 4.1); (2) la configurazione di « attivazione energetica » (energized configuration), che corrisponde alla configurazione a clava delle particelle elementari (vedi Fig. 4.1); (3) la configurazione di « attivazione energetica a zig-zag o spiralata » (energized-twisted configuration), che corrisponde alla configurazione a spirale delle particelle elementari (vedi Fig. 4.1). Pertanto, useremo sempre le tre dizioni di « inattivazione », « attivazione » ed « attivazione spiralata od a zig-zag » per indicare le corrispondenti configurazioni della membrana interna o delle particelle elementari costituenti. E' noto, dalla microscopia elettronica, che le creste dei mitocondri sono delle sacche a forma di bottiglia, allineate in file parallele perpendicolari alle membrane limitanti; la loro estremità aperta si fonde con il complesso delle membrane limitanti (Fig. 1.1).

Nello stato di inattivazione, le sacche sono appiattite in modo tale che le pareti membranose opposte di ogni sacca sono parallele; il lume all'interno della sacca è in continuazione con la camera circoscritta dalle membrane limitanti. Quando le particelle fondamentali della membrana interna si trovano nello stato di attivazione energetica, risultante dal trasporto di elettroni, la sacca collassata della cresta si gonfia (come una bottiglia piena d'acqua calda) e in sezione trasversale appare vescicolata. L'altra configurazione che la membrana può assumere quando le particelle elementari sono in stato di attivazione energetica (in presenza di fosfato inorganico) porta ad un assestamento delle creste a zig-zag, nelle sezioni trasversali. Il passaggio da ognuno di questi tre stati conformazionali della membrana ad un altro è reversibile e molto veloce: la configurazione della membrana è quindi l'espressione dello stato delle particelle elementari ed in particolare delle loro basi. Quando queste ultime sono cilindriche o cuboidali, le facce contigue sono parallele e così la membrana non ha curvatura, come avviene nello stato non energetico, dove si ha una disposizione parallela e simmetrica delle pareti opposte di ogni cresta. Quando le particelle elementari si trovano in stato di attivazione energetica (a causa dell'ossidazione del substrato o a causa dell'idrolisi dell'ATP) le basi diventano più asimmetriche nella forma in quanto le facce contigue non sono parallele: le creste assumono allora una più netta configurazione sferica in accordo con i cambiamenti nella forma delle particelle elementari.

Infine, quando queste si trovano in stato di attivazione energetica in presenza di fosfato inorganico, le basi assumono una geometria più contorta a causa dell'attrazione fra le teste: questa torsione nelle particelle elementari comporta una configurazione a zig-zag delle creste.

Non si è mai vista una singola cresta in una configurazione mista: probabilmente ci saranno delle configurazioni intermedie, ma i cambiamenti conformazionali sono così rapidi che la probabilità di fissare una cresta in una configurazione di passaggio è estremamente piccola.

I tre stati conformazionali della membrana interna si possono facilmente osservare anche nei mitocondri « in situ »: l'allineamento parallelo regolare delle creste che si ottiene « in situ » rende possibile la visualizzazione dei settori ordinati delle creste: settori in cui le creste sono nella stessa configurazione. Quando i mitocondri vengono isolati con metodi standard, si perde la regolarità della disposizione delle creste; la disposizione « in situ » delle creste può, tuttavia, essere ottenuta in condizioni sperimentali appropriate. Infatti è facile che si abbia, nell'allestimento dei preparati per lo studio dei mitocondri, una disorganizzazione delle creste nei mitocondri isolati stessi: le creste hanno infatti tendenza ad aggregarsi e questo avvicinamento di una cresta alla sua vicina complica enormemente la visualizzazione al microscopio elettronico e l'interpretazione dei cambiamenti conformazionali che avvengono nelle creste dei mitocondri isolati; un'ulteriore complicazione è dovuta alla tendenza delle creste giustapposte a ridursi. Se tuttavia si tiene presente il fatto che nelle particelle elementari avvengono gli stessi cambiamenti di base sia nel mitocondrio « in situ » che isolato, il quadro diventa più chiaro. La differenza tra le varie situazioni morfologiche, comunque, non sta nei cambiamenti fondamentali della geometria delle particelle elementari che passano dallo stato non attivato allo stato di attivazione energetica, quanto piuttosto nel differente modo in cui la membrana si adatta a questi cambiamenti conformazionali delle particelle stesse.

Come già detto, lo stato di « attivazione energetica » può essere prodotto sia dal processo di trasporto degli elettroni, che dall'idrolisi dell'ATP. Pertanto gli inibitori del processo del trasporto elettronico, come l'antimicina, possono impedire la induzione dello stato energetico dovuta al trasporto elettronico, ma non la induzione dello stato energetico dovuto all'idrolisi dell'ATP. Viceversa, gli inibitori dell'idrolisi dell'ATP, come la rutamicina, possono impedire la generazione dello stato di attivazione energetica derivante dall'idrolisi dell'ATP, ma non quello derivante dal trasporto elettronico.

Ogni substrato della catena del trasporto elettronico può indurre lo stato di attivazione energetica: NADH, succinato, citocromo c ridotto, coenzima Q ridotto. Naturalmente esistono dei livelli diversi di azione degli inibitori, in base al loro punto di attacco; così si ha una inibizione del trasporto elettronico:

- nel Complesso I, da parte del rotenone;
- nel Complesso III, da parte dell'antimicina A;
- nel Complesso IV, da parte del cianuro.

Quindi il rotenone inibirà lo stato di attivazione energetica da NADH, legato al Complesso I, ma non quello da succinato, legato al Complesso II.

Lo stato di attivazione energetica include sia la configurazione « attivata » che quella « a spirale »: in assenza di fosfato inorganico, si forma lo stato di attivazione energetica; in presenza di fosfato, si forma lo stato di attivazione energetica della configurazione a spirale. Inibitori del tra-

sporto elettronico o dell'idrolisi dell'ATP impediscono la formazione di entrambi gli stati di attivazione energetica nelle condizioni sopra descritte.

Non solo il fosfato, ma anche l'arseniato possono indurre la trasformazione dello stato di « attivazione energetica » allo stato di « attivazione con la configurazione a spirale », ma la concentrazione di arseniato inorganico richiesto è circa 10 volte quella del fosfato inorganico. Anioni monovalenti, come l'acetato ed il propionato, possono indurre la trasformazione dallo stato di attivazione energetica allo stato attivato della configurazione a spirale, ma anche in questo caso le concentrazioni richieste sono più alte di quella del fosfato inorganico.

Una volta ottenuto lo stato di attivazione energetica, si conoscono 4 modalità per cui lo stato di attivazione energetica stessa si può scaricare: (1) per mezzo dei disaccoppianti, come il dinitrofenolo; (2) per mezzo dell'ADP, in presenza di fosfato; (3) per mezzo di ioni di metalli bivalenti, come il Ca^{2+} , in presenza di fosfato; (4) per mezzo di sali monovalenti, come l'acetato d'ammonio. I risultati di questa scarica dello stato di attivazione sono differenti nelle quattro differenti modalità, e cioè:

- 1) i disaccoppianti non producono alcun lavoro e si ha una perdita energetica sotto forma di calore;
- 2) l'ADP, attraverso la fosforilazione, porta alla sintesi di ATP;
- 3) il Ca^{2+} più fosfato porta al trasporto transmembrana dello stesso;
- 4) i sali monovalenti portano al rigonfiamento energetico (energized swelling) delle particelle elementari.

Più avanti si discuterà la possibilità che questi eventi possano avvenire, oltre che singolarmente, anche contemporaneamente.

Si deve sottolineare che i fattori che possono scaricare lo stato di attivazione energetica sono proprio quelli che determinano le varie possibilità di utilizzazione dello stato di attivazione energetica. Così, l'ADP può servire da accettore di un radicale fosforico nel processo fosforilativo; il Ca^{2+} può servire da partner per lo ione fosfato nella formazione di $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; e i sali monovalenti possono essere determinanti nel rigonfiamento energetico.

Esiste cioè prima un ciclo di generazione dello stato energetico e poi un ciclo di scarica che si avvale di comuni partecipanti. Così, nella fase che porta al processo fosforilativo, lo stato attivato della configurazione a spirale (indotto in presenza di fosfato) porta alla formazione di un gruppo fosfato legato conformazionalmente al potenziale chimico di un gruppo fosforico; nella fase di scarica del ciclo, questo gruppo fosfato è trasferito all'ADP con sintesi di ATP. Nel trasferimento di ioni di metalli bivalenti, il gruppo fosfato è trasferito al Ca^{2+} , o a qualche altro ione metallico bivalente. Nel rigonfiamento energetico, l'anione (probabilmente nella forma di acido indissociato) induce lo stato attivato della conformazione a spirale; alternativamente questo stato è scaricato dal catione con trasferimento sia dell'anione che del catione nello spazio più interno della membrana interna: questo trasferimento precede il riarrangiamento della membrana interna che porta al rigonfiamento.

Un problema di notevole importanza riguarda la velocità dei cambiamenti conformazionali che, come espressione delle modificazioni della configurazione della membrana delle creste, sono gli eventi fondamentali nei processi accoppiati di attivazione energetica: questi cambiamenti devono quindi essere rapidi come il ciclo delle reazioni dei componenti la catena del trasporto elettronico.

La velocità può essere determinata sia per mezzo del microscopio elettronico su campioni rapidamente fissati, sia per mezzo dei cambiamenti che provocano nei raggi luminosi i fenomeni fisici che accompagnano i cambiamenti conformazionali; da tali

osservazioni si è constatato che i cambiamenti della configurazione sono sufficientemente rapidi per essere dello stesso ordine di grandezza della velocità dei cambiamenti dei componenti catalitici della catena del trasporto elettronico.

Un altro problema di rilievo è poi quello della permeabilizzazione dei mitocondri da parte di molecole di substrato, come il malato, l'ossalacetato, il succinato, ecc. Il cambiamento conformazionale della membrana interna è la causa determinante del cambiamento nella permeabilità della membrana mitocondriale esterna: infatti il riasssemblaggio della membrana mitocondriale interna durante il processo di attivazione energetica ha indubbiamente una profonda influenza sulle proprietà della membrana esterna e, in particolare, modifica la permeabilità della membrana esterna agli acidi bicarbossilici, quali quelli prima indicati.

Rimane infine da valutare la possibilità di compiere contemporaneamente, a livello mitocondriale, più di un lavoro per volta. In condizioni che esaltano al massimo il trasporto di Ca^{2+} e fosfato inorganico, il processo fosforilativo non si può verificare: il Ca^{2+} è quindi di gran lunga più efficiente dell'ADP nell'operare la scarica dello stato attivato della configurazione a spirale, indotta dal fosfato inorganico: pertanto il trasporto di Ca^{2+} più fosfato inorganico non è compatibile con la fosforilazione.

Il trasferimento di Mg^{2+} , più lo ione fosfato, è invece notevolmente più lento di quello del Ca^{2+} più lo ione fosfato; l'ADP può competere favorevolmente con Mg^{2+} nella scarica dello stato attivato della conformazione energizzata. Quindi, sia la fosforilazione che il trasferimento di Mg^{2+} possono avvenire contemporaneamente: questa è una opzione possibile poiché entrambi i processi hanno in comune lo stesso stato di attivazione energetica (stato attivato della conformazione a spirale, indotto dal fosfato).

E' interessante notare che si può indurre un rigonfiamento con stato di attivazione energetica nella configurazione a spirale mediante la presenza combinata di un sale monovalente (ad es. l'acetato d'ammonio, il cui anione non è fosfato inorganico), di substrato e di un agente facilitante adatto (come la valinomicina); orbene tale stato di attivazione non può essere scaricato dall'ADP: ciò perché lo stato attivato della configurazione a spirale, indotto dalla serie di circostanze sopra elencate, è diverso dall'analogo stato indotto dalla presenza combinata di fosfato inorganico e substrato. Non ci può essere nessuna competizione fra il rigonfiamento attivato ed il processo fosforilativo poiché questi due processi coinvolgono differenti forme dello stato di attivazione energetica. Solo allorché si è stabilizzato lo stato di rigonfiamento attivato nella forma indotta da sali monovalenti non ci sarà più la possibilità che avvenga il processo fosforilativo. Similmente, una volta che si è stabilizzato lo stato attivato nella forma indotta dal fosfato inorganico, la scarica per mezzo dell'ADP (che porta alla fosforilazione) ha il sopravvento sulla scarica per mezzo di cationi monovalenti (che portano al rigonfiamento attivato).

L'induzione dello stato di rigonfiamento attivato, a mezzo dei sali monovalenti, è indipendente dal trasporto elettronico o dall'idrolisi dell'ATP; ora la configurazione della membrana interna nei mitocondri così attivati corrisponde strettamente allo stato attivato della configurazione a spirale. Ma nonostante la somiglianza formale nella grossolana apparenza ultrastrutturale, esiste una proprietà che è fundamentalmente differente: i disaccoppianti scaricano lo stato attivato della configurazione a spirale indotto dal fosfato ma non scaricano l'equivalente stato conformazionale indotto dal sale monovalente. Pertanto esistono tre varianti dello stato

attivato della configurazione a spirale (indotto da fosfato inorganico e substrato): (1) scaricabile dall'ADP, da cationi bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ecc.) o da disaccoppianti (dinitrofenolo, ecc.); (2) scaricabile da ioni monovalenti (acetato di ammonio, ecc.); (3) non scaricabile dall'ADP, dai sali o da disaccoppianti.

4.5) Gli enzimi dell'accoppiamento del trasporto elettronico alla fosforilazione

Il complesso enzimatico che lega reversibilmente l'idrolisi dell'ATP alla generazione dello stato energetico è definito come « complesso ATP-asico » che contiene: (a) la serie di proteine enzimatiche della testa delle particelle elementari e che idrolizzano l'ATP; (b) la serie dei componenti il peduncolo, implicati sia nell'accoppiamento di tale idrolisi al cambiamento conformazionale, che nella trasmissione del cambiamento conformazionale dalla testa alla base delle particelle elementari. L'attività ATP-asica del settore testa-peduncolo è sensibile alla rutamicina. Né la testa isolata, né il settore testa-peduncolo isolato, rivelano l'evidenza di un cambiamento conformazionale associato all'idrolisi dell'ATP: l'accoppiamento dell'idrolisi dell'ATP ai cambiamenti conformazionali richiede il legame del settore testa-peduncolo alla base.

Quando il settore testa-peduncolo è isolato e privato dei fosfolipidi costitutivi, non si rileva nessuna attività ATP-asica: se poi l'unità testa-peduncolo è lasciata interreagire con i fosfolipidi, l'attività ATP-asica si ricostituisce rapidamente: questo dimostra che i fosfolipidi sono essenziali per l'attività ATP-asica. Il complesso ATP-asico (settore testa-peduncolo) è correlato al sistema di trasporto degli elettroni in modo tale che il cambiamento conformazionale indotto dall'idrolisi dell'ATP può essere convertito nello stato conformazionale indotto dal trasporto di elettroni nella base.

Va ora tenuto presente che esistono delle sostanze, chiamate « disaccoppianti » (uncouplers), le quali non solo possono dissociare il flusso di elettroni, o l'idrolisi dell'ATP, dall'induzione dello stato di attivazione energetica, ma sono in grado anche di determinare la scarica di uno stato energetico già formato. Tra i disaccoppianti più noti ricordiamo i derivati del carbonilcianuro di fenilidrazone, il 2,4-dinitrofenolo ed il dicumarolo.

L'evento fondamentale, nell'azione dei disaccoppianti, è il trasferimento dello stato di variazione energetica da base a base delle particelle elementari, per mezzo di una reazione di scambio; pertanto, disaccoppianti molto efficaci possono dissociare completamente la fosforilazione ossidativa anche quando le loro concentrazioni, riferite alle particelle elementari, sono di gran lunga al di sotto di quelle richieste per un rapporto molecolare 1 : 1; meno di una molecola di disaccoppiante per 50 o più particelle elementari.

Se il disaccoppiante si combina stechiometricamente con una particella elementare, inducendo una rapida scarica dello stato di attivazione energetica, la particella elementare in questione innesca la scarica dello

stato energetico delle particelle viciniori e ciò può portare alla scarica dello stato di attivazione energetica di una cresta o, addirittura, dell'intera membrana.

L'attivazione della membrana mitocondriale interna obbedisce alla legge « del tutto o del nulla » e quindi o si trova nello stato di attivazione energetica, o in uno stato non attivato; non è mai stata trovata in uno stato intermedio.

Va ora rilevato che i mitocondri autoregolano il loro stato di attivazione energetica: così, in presenza di substrato e fosfato inorganico, i mitocondri respirano ad una quota ridotta finché non si aggiunge dell'ADP esterno; così la respirazione raggiunge il massimo grado non appena lo stato di attivazione energetica viene scaricato con formazione di ATP. Il fenomeno del controllo respiratorio è espressione della stabilità del mitocondrio nello stato di attivazione: se la stabilità di questo stato fosse però infinita, non potrebbe esserci nessuna respirazione. Ma la stabilità è solo parziale: infatti l'indice del controllo respiratorio (ossia il rapporto: entità della respirazione in presenza di ADP / entità della respirazione in assenza di ADP) è al massimo 10-12, e generalmente molto meno.

Quando i mitocondri vengono (in laboratorio) divisi in particelle submitocondriali, il controllo respiratorio scende paurosamente; lo stato di attivazione energetica è di gran lunga più instabile nelle particelle submitocondriali che nei mitocondri intatti; quando le particelle submitocondriali sono vescicolari, il controllo respiratorio è praticamente uguale a zero, mentre è stata riscontrata una notevole quota di controllo respiratorio nelle particelle submitocondriali che mantengono il carattere tubulare della cresta: ciò sottolinea l'importanza della geometria della membrana nella stabilizzazione dello stato di attivazione energetica.

4.6) Il trasferimento dei radicali fosforici dall'ATP, prodotto all'interno del mitocondrio, all'ADP esterno

Uno dei problemi più importanti, a livello mitocondriale, è quello del trasferimento dell'ATP, prodotto nella membrana interna, al sistema esterno al mitocondrio. Infatti si deve ricordare il principio fondamentale che la membrana interna è assolutamente impermeabile ai nucleotidi adenilici: pertanto è assolutamente impossibile liberare ATP come tale, cioè sotto forma di molecola intera. Dallo studio dell'effetto dell'atractiloside (uno steroide glicosidico vegetale) sulla fosforilazione ossidativa in mitocondri integri, è risultato chiaro che il trasferimento si attua trasferendo i gruppi fosforici e non i nucleotidi adenilici.

La via principale per mezzo della quale un gruppo fosforico dell'ATP, prodotto nella testa della particella elementare della membrana interna, si trasferisce all'esterno, può essere separatamente descritta come segue: (a) dalla membrana delle creste alla camera esterna (sistema intermembrana); (b) dalla camera esterna alla membrana limitante esterna; (c) dalla membrana limitante esterna all'ADP esterno. Non può esserci quindi un trasferimento di molecole adeniliche portanti i gruppi fosforici come tali tra le varie membrane; si verificano invece tre tappe nel trasferimento di ogni singolo gruppo fosforico: (1) dall'ATP della membrana delle creste ad un accettore fosforico nella camera esterna; (2) dal sistema intermembrana della camera esterna ad un accettore di tale gruppo nella membrana limitante esterna; (3) dalla membrana limitante esterna all'ADP esterno.

Il trasferimento di un gruppo fosforico si può attuare dall'ATP all'ADP, dall'ATP all'AMP, dall'ATP al GMP (Guanosin-Mono-Fosfato), dal GTP (Gua-

nosin-Tri-Fosfato) all'AMP, ecc. L'enzima è il fattore determinante sia per il donatore che per l'accettore del gruppo fosforico. Così, ad es., la presenza dell'adenilato-chinasi nella camera esterna, permette che vi sia lo scambio di radicali fosforici tra l'ATP della membrana interna e l'AMP della camera esterna, dato che l'enzima è proprio quello che presiede allo svolgimento della reazione: $ATP + AMP \rightleftharpoons 2 ADP$.

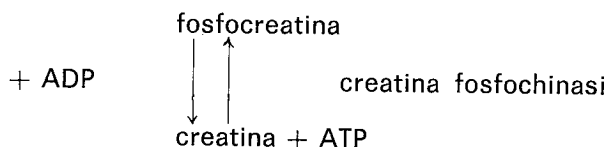
Gli enzimi che catalizzano i trasferimenti di radicali fosforici dalla membrana delle creste alla camera esterna, e dalla camera esterna alla membrana limitante esterna, devono essere orientati vettorialmente, rispetto a questi tre sistemi, per permettere i trasferimenti stessi. Pertanto, il trasferimento di un gruppo fosforico avviene all'interno di guide molecolari costituite da catene di enzimi di trasferimento: non c'è quindi un movimento generalizzato di gruppi fosforici, ma piuttosto un trasferimento guidato dall'enzima su molecole intermedie accettrici e donatrici di fosfato-gruppi.

4.7) I sistemi di riserva energetica

E' evidente che il disporre (mediante, ad es., l'allenamento) di una maggior funzionalità di unità mitocondriali per grammo di tessuto muscolare, oppure di disporre di un maggior numero di unità mitocondriali per grammo di tessuto muscolare, non conferisce soltanto la caratteristica di rendere disponibile una maggiore quota energetica aerobica, ma consente di attuare un trasferimento di radicali fosforici dall'ATP mitocondriale alle molecole accettrici citoplasmatiche (ADP, AMP, GMP, ecc.). In tal caso quindi, i livelli di tali molecole diminuiranno a favore di quelle dei rispettivi composti a maggior stato di fosforilazione (ATP, GTP, ecc.), realizzandosi quindi una situazione extramitocondriale di « riserva energetica » del citoplasma fondamentale che potrà, in caso di richiesta (ad es. per minor disponibilità prestativa di O_2), essere utilizzata prima di dover far ricorso al solo meccanismo citoplasmatico anaerobico, che è energeticamente poco conveniente. Ora questa riserva energetica citoplasmatica può avere un peso di notevole rilievo nei meccanismi anaerobici di liberazione dell'energia. Infatti, considerando la singola fibra muscolare, la capacità del meccanismo anaerobico alattacido è legata alla quantità di radicali fosforici altamente energetici di immediata disponibilità; analogamente, in caso di carenza di O_2 , l'entrata in funzione del meccanismo anaerobico lattacido sarà tanto più dilazionata quanto maggiore sarà la riserva energetica iniziale. In ogni caso, la « via mitocondriale » per costituire questa riserva risulta energeticamente largamente più economica della « via citoplasmatica ». I mitocondri, in ultima analisi, rappresentano le macchine biologiche più efficienti non solo per liberare energia, ma anche per indurre una riserva della stessa.

Si è più volte evidenziato che la presenza di O_2 non è indispensabile ai fini della contrazione muscolare, giacché in condizioni anaerobiche la glicolisi, attuantesi nel citoplasma fondamentale, può vicariare la funzionalità mitocondriale, anche se con una resa energetica estremamente bassa. Tuttavia si è sperimentalmente dimostrato che in anaerobiosi è possibile

compiere lavoro muscolare anche quando è bloccata la glicolisi, ad es. a mezzo di un inibitore della 3-fosfogliceroaldeide deidrogenasi, quale è lo iodoacetato ($I-CH_2-COO^-$), che inibisce la conversione: 3-fosfogliceraldeide \longrightarrow 1,3-difosfoglicerato. Ciò evidenzia l'entrata in funzione di quel notissimo sistema di riserva energetica quale è la fosfocreatina che, nei muscoli, è contenuta a livelli di oltre cinque volte superiori a quelli dell'ATP. La fosfocreatina può scindersi nel fosfato-gruppo e nella creatina, in una reazione accoppiata con la conversione di ADP in ATP:



Questa reazione è reversibile; tuttavia il suo punto di equilibrio tende ad essere spostato verso la formazione di ATP; ciò è prevedibile anche in base al fatto che la fosfocreatina ha una variazione standard di energia idrolitica (ΔG°) di $-10,3$ Kcal/mole, decisamente più elevato di quello dell'ATP ($\Delta G^\circ = -7,2$ Kcal/mole). Pertanto esiste una spinta termodinamica alla trasformazione « fosfocreatina \longrightarrow ATP » decisamente superiore a quella della trasformazione « ATP \longrightarrow fosfocreatina »: quest'ultima trasformazione è tuttavia indispensabile per la ricostituzione della riserva di creatinfosfato.

Va inoltre notato che è possibile inibire la creatin-fosfochinasi muscolare: in queste condizioni durante il lavoro muscolare, la fosfocreatina rimane immutata, mentre avvengono normalmente sia la reazione: ATP \longrightarrow ADP, che quella inversa di fosforilazione ADP \longrightarrow ATP. Quindi la fosfocreatina ha la funzione di terzo meccanismo fosforilante che si affianca a quello aerobico dei mitocondri ed a quello anaerobico del citoplasma fondamentale; in ogni caso il pool della fosfocreatina rappresenta un sistema di riserva di fosfato-gruppi ad alta potenza ma a bassissima capacità.