

## **FOSFORILIAZIONE OSSIDATIVA**

La fosforilazione ossidativa è il livello più elevato del metabolismo energetico negli organismi aerobici e rappresenta il mezzo con cui gli organismi fotosintetici catturano l'energia dalla luce solare e la trasformano in ATP; infatti tutte le tappe enzimatiche della degradazione dei carboidrati, acidi grassi e amminoacidi nella cellula aerobica convergono nella tappa finale della respirazione cellulare in cui l'energia prodotta dalla ossidazione viene utilizzata per la sintesi dell'ATP

La fosforilazione ossidativa, negli eucarioti, avviene nei MITOCONDRI, compartimenti cellulari che svolgono il ruolo fondamentale per la funzione delle cellule e degli organismi tanto che difetti nelle sue funzioni possono provocare situazioni serie per la salute degli individui

I mitocondri, dal punto di vista funzionale sono importanti per le: funzioni neuronali, muscolari, regolazione del metabolismo energetico dell'intero organismo e del peso corporeo, ma oltre alla produzione di ATP, partecipano anche a

- termogenesi
- sintesi steroidi
- apoptosi (morte programmata)

Dal punto di vista strutturale hanno due membrane:

- Membrana mitocondriale Esterna: facilmente permeabile a piccole molecole e a ioni che si muovono liberamente attraverso canali transmembrana formati da porine (proteine integrali di membrana), ma non permettono il passaggio delle proteine
- Membrana mitocondriale Interna: impermeabile a piccole molecole e a quasi tutti gli ioni, compresi i protoni (H<sup>+</sup>), fanno eccezione le specie chimiche che hanno sulla membrana sessa un trasportatore specifico

Troviamo inoltre:

→ i trasportatori degli elettroni della catena respiratoria (complessi I-IV)

→ complesso enzimatico ATP sintasi che sintetizza l'ATP

→ ADP-ATP traslocasi

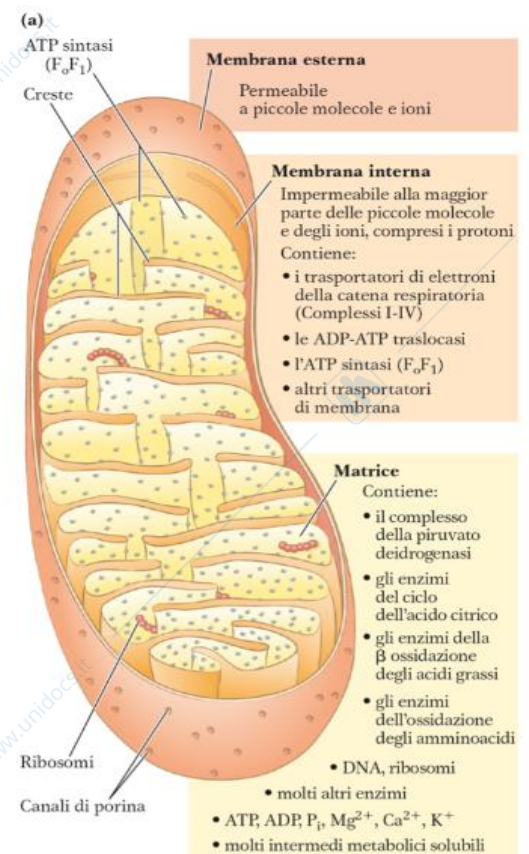
La membrana interna presenta delle creste, involuzioni che aumentano l'area della loro superficie (es: mitocondri del muscolo cardiaco hanno più creste e dunque una maggiore area superficiale che implica un maggior numero di trasportatori di elettroni, rispetto, ai mitocondri del fegato)

Matrice mitocondriale: è lo spazio più interno del mitocondrio delimitato dalla membrana interna e contiene tutti gli enzimi/ complessi enzimatici di tutte le vie di ossidazione delle sostanze nutrienti come: piruvato deidrogenasi, enzimi degli acidi grassi, enzimi delle vie di ossidazione degli amminoacidi, eccetto la glicolisi che avviene nel citosol

Essendo la Matrice mitocondriale il centro di tutte le vie di ossidazione ed essendo la Membrana Interna impermeabile o meglio selettivamente permeabile, il piruvato, gli amminoacidi e gli acidi grassi usati nelle diverse vie, possono passare dalla Membrana Interna alla Matrice mitocondriale gli specifici trasportatori precedentemente citati

I mitocondri possono avere grande varietà di forme e dimensioni e sono principalmente presenti nei tessuti in cui vi è un elevato metabolismo aerobico come: cervello, muscolo scheletrico e cardiaco e l'occhio, con un numero maggiore di creste più densamente compatte

Durante la crescita e la divisione cellulare, i mitocondri si dividono per scissione (come i batteri) e in alcune circostanze, i singoli mitocondri possono fondersi tra loro formando strutture



più grandi e più estese

La fosforilazione ossidativa ha inizio con l'ingresso degli elettroni nella catena dei trasportatori degli elettroni chiamata catena respiratoria, dove alcuni di questi trasportatori di elettroni sono proteine integrali di membrana contenenti gruppi prostetici in grado di donare o accettare uno o più elettroni

Esistono 3 tipi di trasferimento degli elettroni:

- 1) Trasferimento diretto di elettroni, come nella riduzione di  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$
- 2) Trasferimento di un atomo di idrogeno ( $\text{H}^+$ ) e un elettrone
- 3) Trasferimento di uno ione idruro ( $\text{H}^-$ ) e due elettroni

La maggior parte di questi elettroni derivano dall'azione delle Deidrogenasi, che li hanno raccolti nei processi catabolici e li hanno incanalati verso accettori universali di elettroni (trasportatori di elettroni):

- nucleotidi nicotinamidici ( $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADPH}$ ), il  $\text{NADH}$  e  $\text{NADPH}$  sono trasportatori di elettroni solubili in acqua e si associano reversibilmente alle deidrogenasi  $\text{NAD}$ -dipendenti, le quali rimuovono due atomi di idrogeno dai loro substrati, uno viene trasferito sotto forma di ione idruro ( $\text{H}^-$ ) al  $\text{NAD}^+$ , l'altro viene rilasciato nell'ambiente circostante sotto forma di ione  $\text{H}^+$

→ il  $\text{NADH}$  trasporta gli elettroni dalle reazioni cataboliche al complesso della  $\text{NADH}$  deidrogenasi che costituisce il primo punto di ingresso di elettroni nella catena respiratoria;

→ il  $\text{NADPH}$ , rifornisce di elettroni le reazioni anaboliche

Queste due molecole con differenti potenziali redox sono tenute separate e né il  $\text{NADH}$  né il  $\text{NADPH}$  possono attraversare la membrana mitocondriale interna mediante trasportatori mentre gli elettroni possono passare

- nucleotidi flavinici ( $\text{FMN}$  o  $\text{FAD}$ ) che sono i cofattori flavinici delle Flavoproteine

Questi due nucleotidi nella forma ossidata possono accettare sia un elettrone che due elettroni, per questa caratteristica, possono servire come intermedi tra le reazioni a due elettroni (es deidrogenazioni  $\text{NAD}$ -dipendenti) e quelle in cui viene accettato un solo elettrone per volta (riduzione chinone a semichinone)

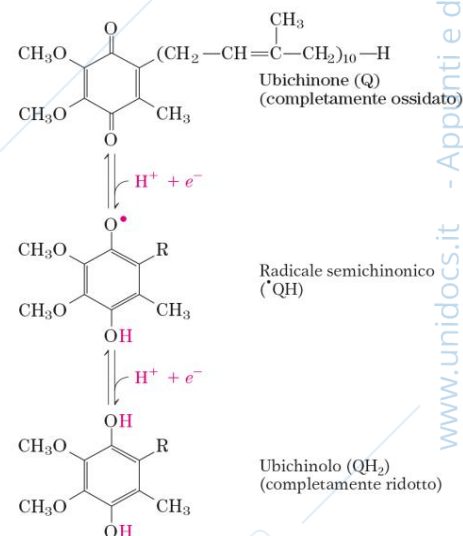
Il potenziale di riduzione standard del coenzima flavinico dipende dalle proteine a cui è associato (a differenza di quello del  $\text{NAD}$  o  $\text{NADP}$ )

- Ubichinone detto anche Coenzima Q, trasportano elettroni all'interno di una catena di trasferimento di elettroni associata alla membrana

L'ubiquitina (forma ossidata Q) può accettare un solo elettrone trasformandosi nella forma semi-ridotta chiamata radicale semichinonico ( $^*\text{QH}$ ) oppure può accettare due elettroni, trasformandosi nella forma completamente ridotta di ubiquinolo ( $\text{QH}$ )

Insieme agli elettroni possono accettare e dunque trasportare anche protoni, (per tale caratteristica rivestono un ruolo importante nel processo di accoppiamenti tra flusso elettronico e movimento protonico.) Infatti la riduzione completa dell'ubiquitina richiede due elettroni e due protoni avvenendo in due tappe

Questi accettori / trasportatori di elettroni hanno piccole dimensioni e sono idrofobi, possono dunque liberamente diffondersi nel doppio strato lipidico della membrana mitocondriale interna e possono agire da ponte tra trasportatori di elettroni meno mobili presenti nella membrana stessa



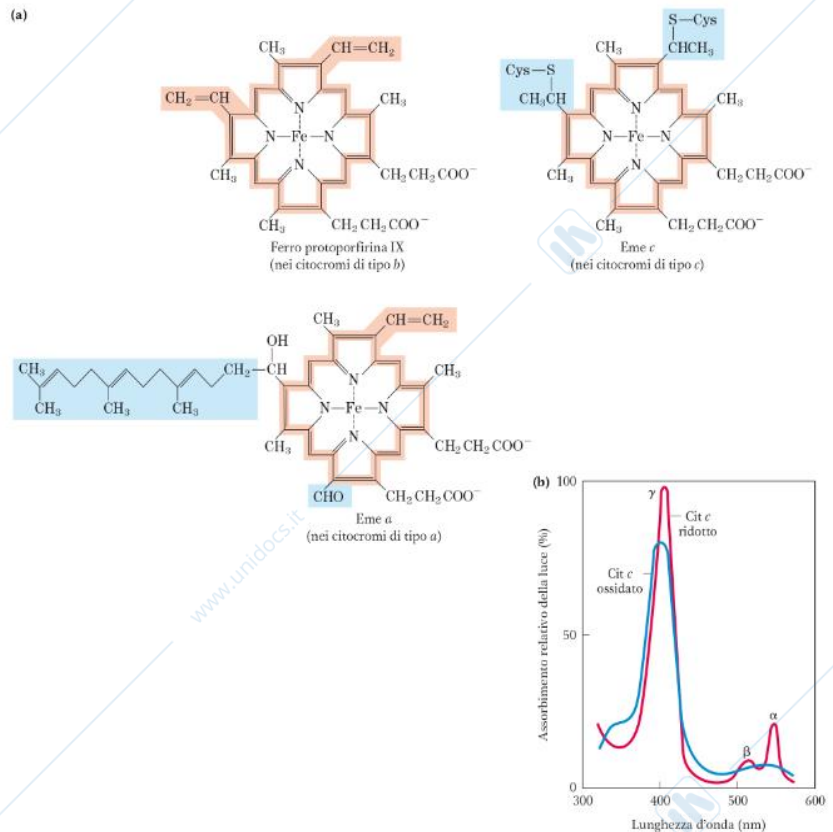
- Citocromi sono proteine capaci di assorbire la luce visibile, grazie alla presenza del gruppo prostetico eme contenente Ferro

Esistono 3 classi: citocromo a,b, il quale loro gruppo eme è saldamente legato alle proteine ad esso associato senza legami covalenti e il citocromo c, il quale gruppo eme è saldamente legato attraverso legami covalenti con i residui di Cisteina delle proteine ad esso associate

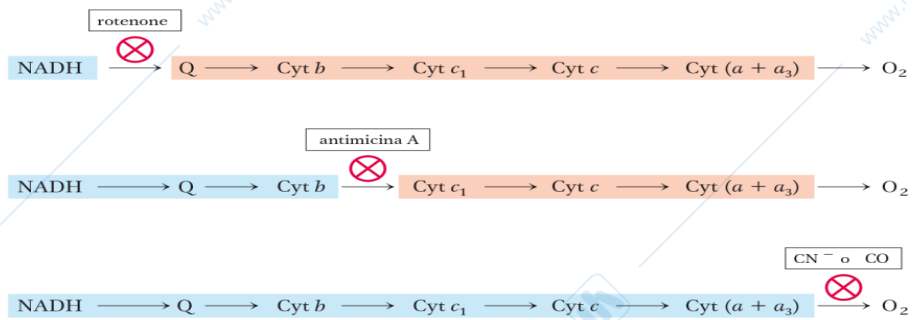
Ognuno di loro presenta e bande di assorbimento della luce visibile: 600 nm (a), 560nm (b), 550nm(c)  
 Il potenziale di riduzione standard dell'atomo di ferro all'interno del gruppo eme dipende dalle sue interazioni con le catene laterali dei residui della proteina e dunque è diverso in ogni tipo di citocromo (come nelle Flavoproteine)

- Proteine ferro-zolfo: dove il Ferro non è presente all'interno del gruppo eme ma è associato ad atomi di zolfo inorganico e ad atomi di zolfo di residui di Cisteina della proteina  
 I centri Ferro-zolfo (Fe-S) possono avere strutture semplici (contenenti 1 atomo di Fe) oppure complesse (contenenti 4 atomi di Fe)  
 Una variante delle proteine ferro-zolfo, sono le Proteine ferro-zolfo di Rieske, che hanno l'atomo di Fe coordinato a 2 residui: Cisteina e Istidina  
 Partecipano a reazioni redox in cui viene trasferito un elettrone alla volta utilizzando modificazioni dello stato di ossidazione del Ferro

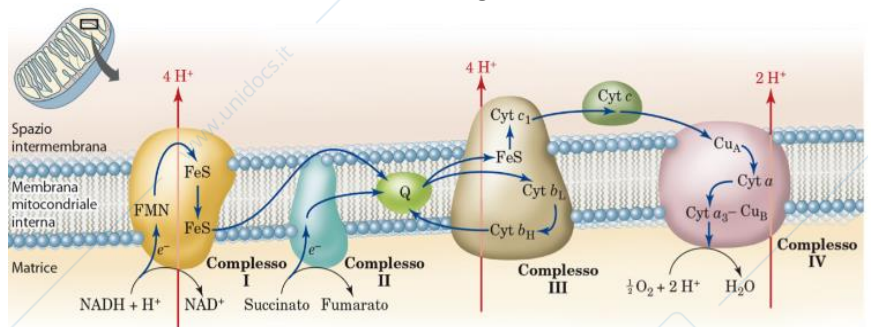
Nella reazione complessiva catalizzata nei mitocondri, gli elettroni passano dal donatore primario alla flavoproteina, ubiquinone, proteine ferro-zolfo, citocromi per arrivare infine all'ossigeno  
 Determinare la sequenza di passaggio dei trasportatori di elettroni nella catena respiratoria è importante: inizialmente si ipotizzò un modello in cui venivano misurati i potenziali standard di ogni singolo trasportatore, aspettandosi che questi si disponessero in ordine di potenziale di riduzione crescente, dato che gli elettroni tendono a fluire spontaneamente da un potenziale di azione più basso a un potenziale di azione più alto, ma nel pratico si osservò che l'ordine dei potenziali di riduzione non riflette necessariamente quello reale che si riscontra nella cellula e che dipende dalla concentrazione delle forme ossidate e ridotte  
 Successivamente si sviluppò un secondo modello per determinare la sequenza dei trasportatori di elettroni che consiste nella riduzione dell'intera catena di trasportatori fornendo una fonte di elettroni ma non un accettore, dove una volta introdotto l'ossigeno nella catena, la velocità con cui i trasportatori vengono riossidati evidenzierà l'ordine con cui entrano in azione i vari trasportatori nella catena: il trasportatore più vicino all'ossigeno donerà i suoi elettroni per primo (ossidato), mentre il secondo a essere ossidato sarà il penultimo e così via  
 Per aver maggior conferma, sono stati introdotti degli agenti in grado di inibire con specifica diversità il



flusso di elettroni nella catena in modo di misurare gli effetti inibitori del trasferimento degli elettroni sullo stato di ossidazione di ogni trasportatore: in presenza di ossigeno e di un donatore di elettroni, ogni inibitore modifica in maniera specifica lo stato di ossidoriduzione dei trasportatori: il trasportatore che si trova prima dalla tappa inibita (blocco) diventano completamente ridotto, mentre il trasportatore che si trova a dopo della tappa inibita (blocco) viene completamente ossidato



I trasportatori sono organizzati in **COMPLESSI MULTIENZIMATICI intermembrana** che possono essere **isolati** e **separati** attraverso trattamento della membrana mitocondriale interna con detergenti. Ogni complesso è in grado di trasportare elettroni ed è considerato come una parte della catena respiratoria, distinguiamo:



→ **Complesso I**, chiamato anche **NADH deidrogenasi** che catalizza il trasferimento dal donatore **NADH** accettore **Ubichinone**

Tale complesso presenta:

- 6 centri Fe-S
- flavoproteina contenente il cofattore FMN

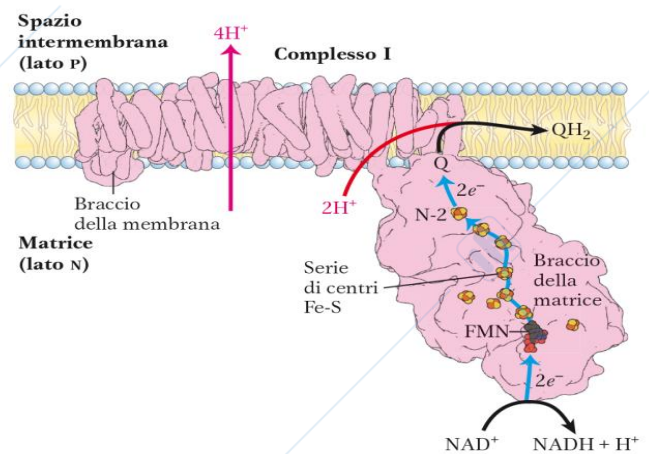
E funziona da vera pompa protonica guidata dall'energia che derivata dal trasferimento di elettroni, ha una forma ad L con un braccio immerso nella membrana mitocondriale interna e l'altro orientato verso la matrice

Il complesso I catalizza due processi accoppiati e simultanei:

- 1) il trasferimento esoergonico di uno ione idruro dal **NADH** e di un protone dal solvente acquoso della matrice all'ubichinone:  $NADH + H^+ + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2$
- e contemporaneamente 2) il trasferimento endoergonico di 4 protoni (per ogni coppia di elettroni trasferita dal complesso) dalla matrice allo spazio intermembrana

NB: PRATICAMENTE: il **Complesso I** riceve due elettroni dal **NADH** (che viene ossidato liberando due elettroni) che li cede alla flavoproteina **FMN** (primo trasportatore, riducendola a **FMNH2**)

Quest'ultima riossidandosi trasferisce due elettroni al gruppo prostetico (costituito da centri **Fe-S**) al complesso I centri **Fe-S** trasferiscono gli elettroni all'**Ubichinone (Q)**: secondo trasportatore) riducendone a **QH2** passando da **Fe2+** a **Fe3+**



La reazione complessiva è **vettoriale**, infatti essa **muove i protoni** in una specifica direzione **da una zona** (matrice mitocondriale che si carica - per allontanamento dei protoni) **a un'altra** (spazio intermembrana che si carica + per arrivo protoni) generando un **potenziale elettrochimico** tra le due facce della membrana mitocondriale interna (N e P)

Questo accoppiamento di trasferimento sia di elettroni che di protoni fa pensare che sia coinvolto un ciclo dell'ubichinone simile a quello che avviene nel Complesso III

Questo flusso elettronico dai centri Fe-S all'ubichinone può essere inibito da alcuni farmaci come: barbiturico, rotenone (insetticida) e antibiotico piericidina A, bloccando conseguenzialmente il processo della fosforilazione ossidativa

→ Complesso II, chiamato anche Succinato deidrogenasi, catalizza il trasferimento di elettroni dal donatore Succinato all'accettore Ubichinone

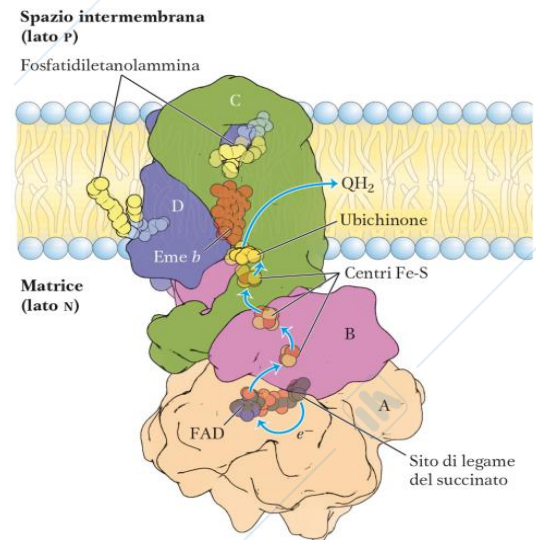
Questo è l'unico enzima del ciclo di Krebs legato alla membrana mitocondriale interna e contiene 5 gruppi prostetici di due tipi diversi e 4 subunità:

→ Subunità C e D sono proteine di membrana integrali che contengono:

- un sito di legame per l'ubichinone, accettore finale degli elettroni nella reazione catalizzata dal Complesso I
- un gruppo eme b che non partecipa al trasporto degli elettroni ma è un fattore di protezione contro la formazione di specie reattive all'ossigeno (ROS), perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e il radicale superossido (\*O<sub>2</sub><sup>-</sup>) da parte di elettroni che possono "uscire" dal sistema, dunque liberi

→ Subunità A e B si estendono all'interno della matrice e contengono:

- 3 centri Fe-S (si trovano nella subunità B)
- una flavoproteina contenente il cofattore FAD legato covalentemente
- sito di legame per il Succinato, donatore di elettroni (si trova dietro il FAD)



NB: PROCESSO: Gli elettroni si muovono dal Succinato alla

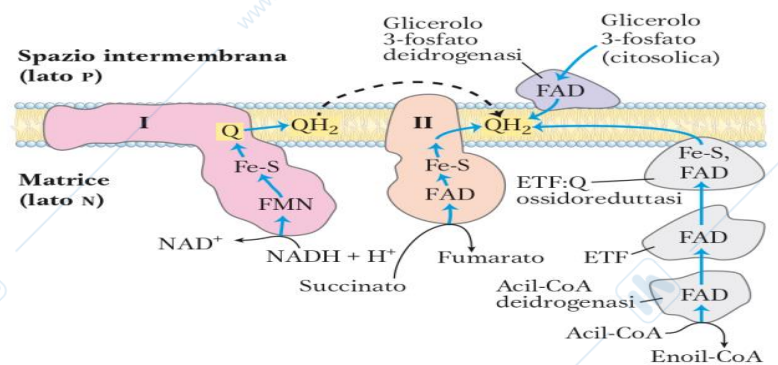
flavoproteina contenente il cofattore FAD, poi attraverso i 3 centri Fe-S raggiungono l'Ubichinone, riducendolo

Contemporaneamente altre deidrogenasi mitocondriali passano i loro elettroni alla catena respiratoria con obiettivo di formare una grande quantità di Ubichinone ridotto (QH<sub>2</sub>) che verrà riossidato nel Complesso III

Queste sono:

→ La flavoproteina Glicerolo-3-fosfato deidrogenasi, che riceve gli elettroni dal glicerolo 3-fosfato, trasferendoli poi all'Ubichinone (Q), riducendolo (QH<sub>2</sub>)

→ La flavoproteina ETF che riceve gli elettroni dall' acil-CoA deidrogenasi (primo enzima della beta-ox degli acidi grassi) che poi li trasferisce alla ETF ubichinone ossidoreduttasi che li cede all' Ubichinone (Q) riducendolo (QH<sub>2</sub>)



→ Complesso III, chiamato anche il complesso del citocromo bc1, che catalizza il trasferimento di elettroni dall'Ubichinone ridotto al citocromo c

accoppiato al trasporto vettoriale di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana

Il complesso III è un dimero formato da monomeri identici con 11 subunità diverse, il cui centro funzionale è costituito da 3 subunità:

- il citocromo b con i suoi due gruppi eme: bH e bL
- la proteina ferro-zolfo di Rieske con i suoi centri 2Fe-2S



NB: PROCESSO:

Sono le subunità I, II e III ad avere un ruolo fondamentale per il flusso degli elettroni attraverso il Complesso IV, che inizia nel citocromo c che procede donando due elettroni (ciascuno x ogni citocromo c), quindi al centro binucleare Cua ( subunità II ), dove da qui gli elettroni passano nel gruppo eme a e vanno al centro binucleare Fe-Cu (subunità I)

A questo punto l'O<sub>2</sub> si lega al gruppo eme a<sub>3</sub>, accettando i due elettroni e riducendosi a perossido. Successivamente arrivano altri due elettroni dal citocromo c, con un totale di 4 elettroni che convertono il perossido in due molecole di H<sub>2</sub>O

Ogni volta che 4 elettroni attraversano questo complesso, l'enzima preleva 4 protoni "substrato" (ioni H<sup>+</sup>) dalla matrice (lato N) per convertire l'O<sub>2</sub> in 2 molecole di H<sub>2</sub>O

Contemporaneamente ad uno ad uno i protoni vengono pompati nello spazio intermembrana (lato P) per ogni elettrone che attraversa il Complesso IV, aumentando ulteriormente il potenziale elettrochimico prodotto dal trasporto protonico attraverso i Complessi I e III

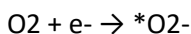
La reazione catalizzata dal Complesso IV di riduzione dell'ossigeno con 4 elettroni, coinvolge centri redox che trasportano un solo elettrone alla volta senza formazione di intermedi ridotti incompleti, come il perossido di idrogeno o i radicali liberi ossidrilici, che sono specie molto reattive che potrebbero danneggiare la struttura cellulare

Infatti gli intermedi rimangono strettamente legati al complesso finché non vengono completamente convertiti in acqua

\*Però, può capitare che nella fosforilazione ossidativa queste specie reattive dell'ossigeno si vengono a formare, precisamente si forma l'intermedio radicale \*Q<sup>-</sup>, durante il trasferimento degli elettroni:

- dal QH<sub>2</sub> al Complesso III
- dal Complesso I al QH<sub>2</sub>

Il radicale \*Q<sup>-</sup> (ubichinone parzialmente ridotto) può a sua volta passare un elettrone all'O<sub>2</sub> formando il radicale libero superossido al livello del Complesso I e III:

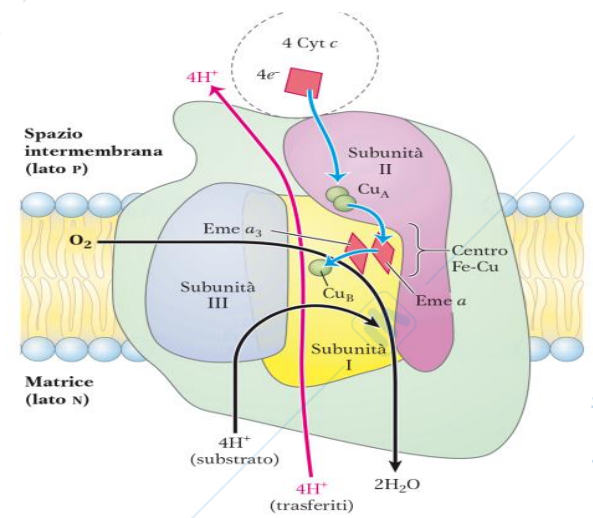
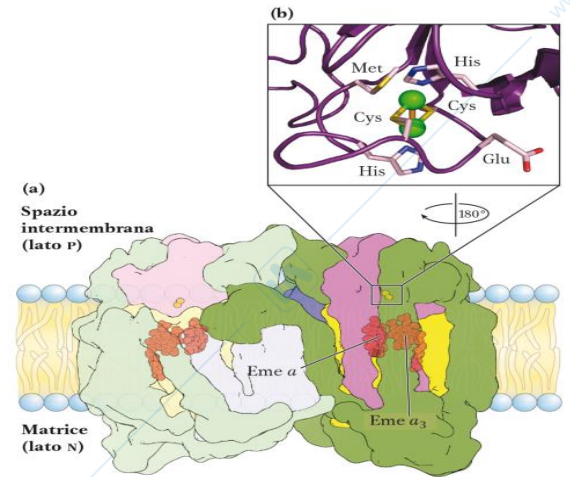


La cui formazione porta a sua volta alla produzione di un altro radicale libero, ancora più reattivo, il radicale libero ossidrilico \*OH (in quanto il superossido induce il rilascio di Fe<sup>2+</sup> sulla proteina aconitasi, e la presenza di questo Fe<sup>2+</sup> induce una reazione Fenton che porta alla formazione del radicale libero ossidrilico \*OH<sup>-</sup>)

La formazione di queste specie reattive dell'ossigeno (ROS) è favorita quando si verificano due condizioni:

- 1) Quando i mitocondri non stanno producendo ATP, per mancanza di ADP o O<sub>2</sub>, dunque hanno una grande forza motrice protonica e un elevato rapporto QH<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>
- 2) Quando nella matrice il rapporto NADH/NAD<sup>+</sup> è molto elevato

In queste condizioni il mitocondrio è in forte stress ossidativo, ovvero quando la velocità di ingresso degli elettroni nella catena respiratoria e la velocità di trasferimento degli stessi nella catena respiratoria, NON SONO UGUALI (più elettroni in attesa di entrare nella catena respiratoria rispetto a quelli trasferiti nell'ossigeno)



MENTRE, quando il rifornimento di donatori di elettroni (NADH) è confrontabile con gli accettori di elettroni, allora lo stress ossidativo diminuisce e la produzione di ROS è ridotta  
 Sebbene alti livelli di ROS sono nocivi, bassi livelli di ROS invece fungono per la cellula come segnale in casi di ipossia (insufficiente apporto di ossigeno) permettendo alla cellula di innescare aggiustamenti metabolici

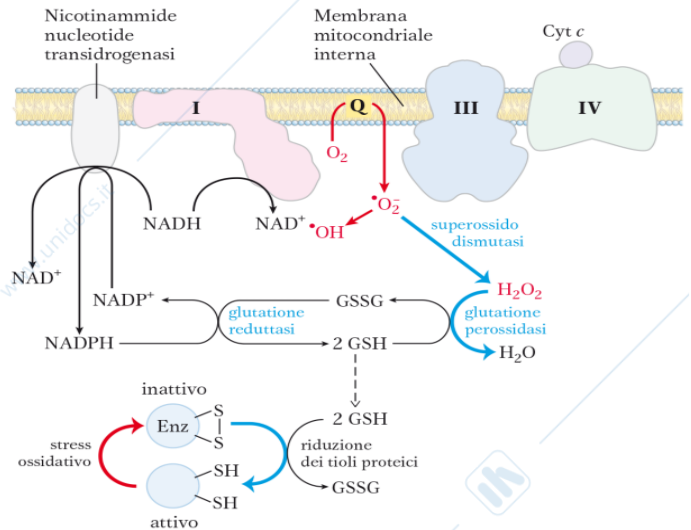
Per IMPEDIRE, gli effetti dannosi del superossido ( $\text{O}_2^-$ ) le cellule dispongono di diverse forme dell'enzima superossido dismutasi, che permette la reazione del superossido con due protoni, formando perossido di idrogeno e ossigeno:  $2 \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

Questa detossificazione del perossido di idrogeno viene effettuata dalla Glutazione perossidasi (GSSG) enzima selenio-dipendente che utilizza come substrato il Glutazione ridotto GSH, antiossidante prodotto dal nostro organismo per proteggere la cellula dai radicali liberi svolgendo un ruolo importante di nucleofilo "sacrificale" nella detossificazione per evitare l'ossidazione di preziosi componenti cellulari

Quest'ultimo viene poi rigenerato dalla conseguente forma ossidata (GSSG) per azione dell'enzima glutazione-reduttasi, il quale sfrutta il potere riducente associato al NADPH prodotto nelle vie metaboliche di degradazione degli zuccheri

Il NADPH viene formato:

- per azione della nicotinamide nucleotide trans-idrogenasi nei mitocondri,
- attraverso la via del pentosio fosfato nel citoplasma



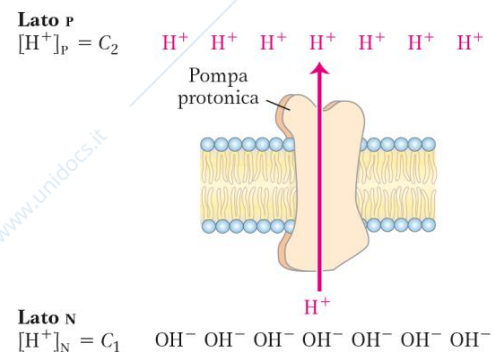
→ FORZA MOTTRICE PROTONICA

E' la differenza di pH (concentrazione chimica) e di potenziale (distribuzione di carica) che si genera tra lo spazio intermembrana mitocondriale e la matrice mitocondriale stessa, sfruttata per ottenere l'energia necessaria per generare ATP a partire da Pi e ADP

Dunque è formata da due componenti:

- l'energia potenziale chimica dovuta dalla differenza di concentrazione dei protoni ( $\text{H}^+$ ) nelle due regioni separate da membrana
- l'energia del potenziale elettrico, che si genera nella separazione delle cariche

Separazione che avviene quando un protone si sposta attraverso la membrana senza che vi sia un flusso contrario di pari carica



$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi$$

$$= 2,3RT \Delta\text{pH} + F\Delta\psi$$

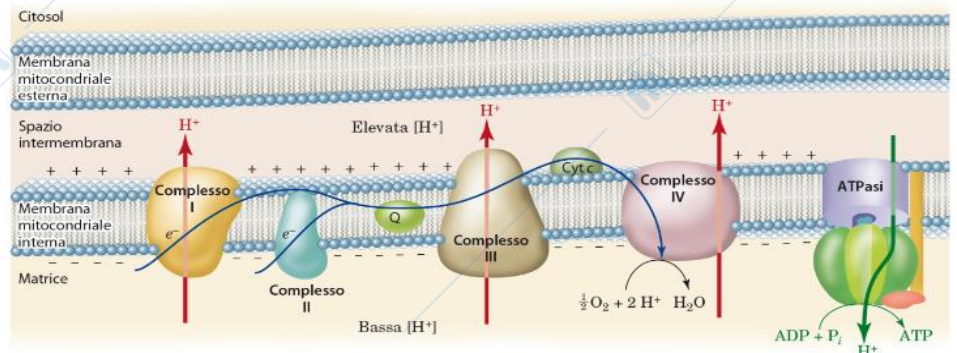
Questa forza motrice protonica non è altro che la parte di energia liberata dal trasferimento elettronico che viene conservata, da ricordare che questa energia liberata è ottenuta dal trasferimento delle coppie di elettroni dal NADH all'ossigeno seguita, per ogni coppia di elettroni, dal trasferimento, dalla matrice allo spazio intermembrana di:

- 4 protoni attraverso il Complesso I
- 4 protoni attraverso il Complesso III
- 2 protoni attraverso il Complesso IV

Reazione vettoriale:  $\text{NADH} + 11\text{H}^+ + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + 10\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$

Cosa avviene nello specifico? Quando gli equivalenti riducenti (NADH) trasportano gli elettroni alla catena mitocondriale di trasporto degli elettroni, i protoni vengono pompati nello spazio intermembrana, generando una differenza di pH e di potenziale tra i due lati della membrana, per cui i protoni che si trovano nello spazio intermembrana tendono a rientrare nella matrice secondo il proprio gradiente chemiosmotico e lo fanno attraverso il canale protonico (della porzione F<sub>0</sub> dell'ATP sintasi)

Ogni qualvolta entra un protone nel canale della F<sub>0</sub>, si genera una variazione conformazionale per cui la subunità gamma della porzione F<sub>1</sub> della ATP sintasi ruota di 120°, mettendosi in contatto con una subunità beta della F<sub>1</sub>, la quale lega ADP e P<sub>i</sub>, formando ATP



Il Complesso I riceve due elettroni dal NADH (che viene ossidato liberando due elettroni) che li cede alla flavoproteina FMN (primo trasportatore, riducendola a FMNH<sub>2</sub>)

Quest'ultima riossidandosi trasferisce due elettroni al gruppo prostetico (costituito da centri Fe-S) al complesso

I centri Fe-S trasferiscono gli elettroni all'Ubichinone (Q: secondo trasportatore) riducendolo a QH<sub>2</sub> passando da Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>

A livello del Complesso II, gli elettroni si muovono dal Succinato alla flavoproteina contenente il cofattore FAD, poi attraverso i 3 centri Fe-S raggiungono l'Ubichinone riducendolo

Contemporaneamente altre deidrogenasi mitocondriali passano i loro elettroni alla catena respiratoria con l'obiettivo di formare una grande quantità di Ubichinone ridotto (QH<sub>2</sub>) che verrà riossidato nel Complesso III

Queste sono:

→ La flavoproteina Glicerolo-3-fosfato deidrogenasi, che riceve gli elettroni dal glicerolo 3-fosfato, trasferendoli poi all' Ubichinone (Q), riducendolo (QH<sub>2</sub>)

→ La flavoproteina ETF che riceve gli elettroni dall' acil-CoA deidrogenasi (primo enzima della beta-ox degli acidi grassi) che poi li trasferisce alla ETF ubichinone ossidoreduttasi che li cede all' Ubichinone (Q) riducendolo (QH<sub>2</sub>)

Il Complesso III, catalizza il trasferimento degli elettroni e protoni dal complesso al citocromo c, attraverso il Ciclo dell'Ubichinone (Ciclo Q): dove il trasporto elettronico va da un trasportatore a due elettroni: l'ubichinolo (QH<sub>2</sub> forma ridotta ubiquinone) a trasportatori a un solo elettrone: i gruppi eme bH e bL, e i gruppi eme dei citocromi c1 e c (il citocromo c è un proteina solubile dello spazio intermembrana, non fa parte del complesso) questo trasferimento è accompagnato per ogni coppia di elettroni che attraversa il Complesso III e viene trasferito al citocromo c:

→ dall'acquisto di 2 protoni sul lato N (matrice)

→ dalla perdita di 4 protoni sul lato P (spazio intermembrana) di cui 2 protoni sono elettrogenici e due neutri, bilanciati dai due elettroni trasferite al citocromo c sul lato P

Quando il gruppo eme del Citocromo c accetta un elettrone dal Complesso III, il citocromo C si sposta verso il Complesso IV per donare l'elettrone a un centro rameico binucleare di questo enzima

Il trasferimento elettronico nel Complesso IV che inizia nel citocromo c che procede donando due elettroni (ciascuno x ogni citocromo c) al centro binucleare Cua (subunità II), dove da qui gli elettroni passano nel gruppo eme a e vanno al centro binucleare Fe-Cu (subunità I)

A questo punto l'O<sub>2</sub> si lega al gruppo eme a<sub>3</sub>, accettando i due elettroni e riducendosi a perossido

Successivamente arrivano altri due elettroni dal citocromo c, con un totale di 4 elettroni che convertono il perossido due molecole di H<sub>2</sub>O

\*Ogni volta che 4 elettroni attraversano questo complesso, l'enzima preleva 4 protoni "substrato" (ioni H<sup>+</sup>) dalla matrice (lato N) per convertire l'O<sub>2</sub> in 2 molecole di H<sub>2</sub>O

Contemporaneamente ad uno ad uno i protoni vengono pompati nello spazio intermembrana (lato P) per ogni elettrone che attraversa il Complesso IV, aumentando ulteriormente il potenziale elettrochimico prodotto dal trasporto protonico attraverso i Complessi I e III

La reazione catalizzata dal Complesso IV di riduzione dell'ossigeno con 4 elettroni, coinvolge centri redox che trasportano un solo elettrone alla volta senza formazione di intermedi ridotti incompleti, come il perossido di idrogeno o i radicali liberi ossidrilici, che sono specie molto reattive che potrebbero danneggiare la struttura cellulare

Infatti gli intermedi rimangono strettamente legati al complesso finché non vengono completamente convertiti in acqua

### LA SINTESI DELL'ATP

La sintesi dell'ATP avviene attraverso un modello chemiosmotico che si basa sul meccanismo chimico di accoppiamento del flusso protonico con la fosforilazione ossidativa, tanto che tale modello è definito anche accoppiamento chemiosmotico dove:

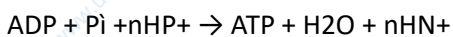
→ "chemiosmotico" sta ad indicare quelle trasformazioni che comprendono simultaneamente una reazione chimica e un processo di trasferimento

→ "accoppiamento" si riferisce all'assoluta dipendenza della sintesi dell'ATP nei mitocondri al flusso degli elettroni attraverso la catena respiratoria, infatti nessuno dei due processi può avvenire in assenza dell'altro

Secondo tale modello, l'energia elettrochimica contenuta nella Forza Motrice Protonica (ovvero la differenza di concentrazione protonica (gradiente protonico) e nella differenza di separazione delle cariche (gradiente elettrico) verso la membrana mitocondriale), porta alla sintesi dell'ATP quando il flusso protonico inverte la sua direzione e i protoni ritornano nella matrice attraverso un canale protonico associato all'ATP sintasi (canale F<sub>o</sub>)

La forza motrice protonica che spinge questi protoni nella matrice genera l'energia necessaria per la sintesi dell'ATP, catalizzata dal complesso F<sub>1</sub> associato a F<sub>o</sub>

L'equazione della sintesi dell'ATP può essere indicata come:

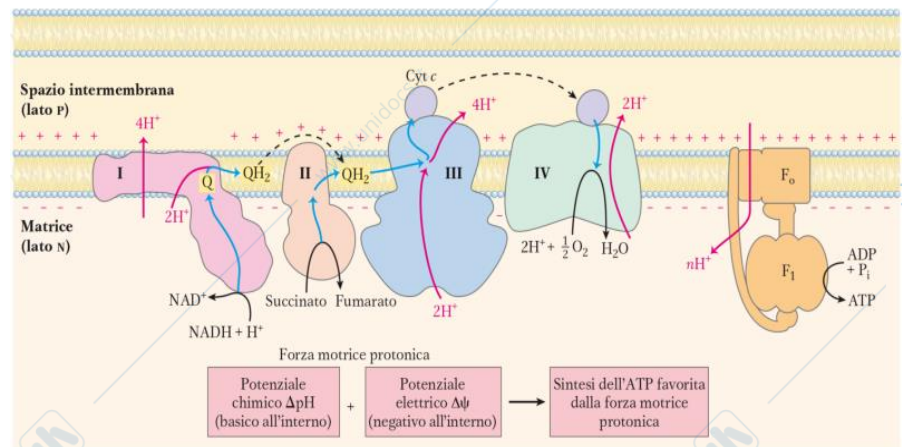


Quando i mitocondri isolati sono sospesi in una soluzione tamponata contenente ADP, P<sub>i</sub> e un substrato ossidabile (es: Succinato), avvengono 3 processi:

- 1) il substrato viene ossidato (Succinato a Fumarato)
- 2) l'ossigeno viene consumato
- 3) l'ATP viene sintetizzato

Dunque il consumo di Ossigeno e a sintesi di ATP dipendono dal substrato ossidabile dall' ADP e dal P<sub>i</sub>

Dato che l'energia rilasciata dall'ossidazione del substrato favorisce la sintesi dell'ATP il processo contrario, ovvero l'inibizione (per opera di ione cianuro o monossido di carbonio) del flusso di elettroni verso l'ossigeno blocca la sintesi



Il blocco della sintesi dell'ATP e anche del trasferimento degli elettroni all'ossigeno della catena respiratoria, può avvenire in diversi modi:

→ Se ai mitocondri isolati viene fornito solo ossigeno e substrati ossidabili ma non ADP, in queste condizioni non vi è:

- né sintesi di ATP
- né trasferimento degli elettroni

→ Se ai mitocondri isolati viene fornito solo ADP e Pi vi è:

- scarso aumento della sintesi di ATP
- scarso aumento della respirazione

se invece aggiungiamo il substrato ossidabile (come succinato) la respirazione e la sintesi di ATP hanno subito inizio

→ Se vengono aggiunti antibiotici tossici, come oligomicina e venturicidina, inibitori dell'ATP sintasi, avviene:

- blocco della sintesi dell'ATP
- blocco della respirazione

In questo caso accade che viene bloccato il ritorno dei protoni nella matrice, attraverso il canale Fo dell'ATP sintasi, di conseguenza non esistendo altra via, vi è una continua estrusione di questi protoni, da parte dell'attività della catena respiratoria che provoca un aumento del gradiente protonico si ha accumulo della forza motrice protonica, fino a che l'energia libera (necessaria per il pompaggio protonico contro gradiente fuori dalla matrice) non eguaglia o addirittura supera, l'energia rilasciata dal trasferimento elettronico dal NADH all'ossigeno, a questo punto il flusso elettronico deve arrestarsi, così facendo l'energia libera dell'intero processo (flusso elettronico + pompaggio protonico) è uguale a zero e raggiunge l'equilibrio

#### → Disaccoppiamento ossidazione dalla fosforilazione:

Vi sono alcune condizioni o alcuni reagenti che disaccoppiano l'ossidazione dalla fosforilazione: ad esempio, quando i mitocondri (intatti) vengono ridotti attraverso un trattamento con uso di detergenti o sistemi meccanici, i frammenti di membrana ottenuti, sono ancora in grado di trasferire gli elettroni dal NADH all'Ossigeno MA la sintesi di ATP non è più accoppiata alla respirazione

Altro esempio di disaccoppiamento è provocato da alcuni composti chimici che però non provocano la distruzione della struttura mitocondriale, questi sono:

- DNP (2,4-dinitrofenolo)
- FCCP

Sono acidi deboli con proprietà idrofobiche, che permette loro di potersi diffondere attraverso la membrana mitocondriale

Una volta entrati nella *matrice*, sotto forma protonata rilasciano il protone, dissipando il gradiente protonico

#### → ATP SINTASI:

L'ATP sintasi mitocondriale definita anche Complesso V enzimatico simile all'ATPasi di tipo F, posto nella membrana interna mitocondriale che catalizza la formazione dell'ATP partendo dall'ADP e Pi accompagnata dal flusso protonico dal lato P al lato N della membrana stessa

Formata da due domini funzionali:

- F1: una proteina periferica della membrana
- Fo: proteina integrale della membrana, dove il pedice "o" sta ad indicare che questa è la porzione che conferisce la sensibilità all'oligomicina (antibiotico tossico), al complesso

Il dominio F1 è composto da 9 subunità: alfa3, beta3, gamma, delta, epsilon:

→ Ciascuna delle 3 subunità beta ha un sito di legame per nucleotidi, essenziale per la sua attività catalitica

→ La subunità gamma forma una specie di stelo centrale che si associa alle 3 subunità alfa e le tre subunità beta forzando quest'ultima a modificare la propria conformazione e affinità per i nucleotidi. Infatti, quando l'enzima viene cristallizzato:

- la prima subunità beta ha legato nel suo sito l'ADP: beta-ADP
- la seconda subunità beta ha legato nel suo sito l'ATP: beta-ATP
- la terza subunità beta è vuota

Questa differenza di legare nucleotidi è fondamentale per il meccanismo d'azione dell'intero complesso

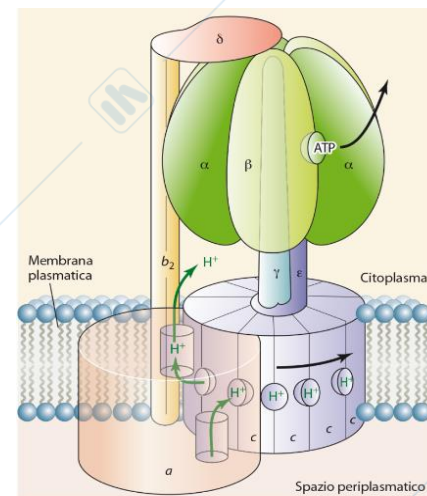
→ La subunità delta conferisce la sensibilità all'oligomicina (antibiotico tossico)

→ la subunità epsilon serve in alcune circostanze ad inibire l'attività ATPasica

Il dominio Fo è costituito da:

- una subunità a e due subunità b che ancorano il complesso FoF1 alla membrana e agiscono da statore, mantenendo le subunità a e b nel posto corretto
- anello c composto da un certo numero di subunità c (da 8 a 15) che sono delle piccole proteine identiche ed idrofobiche

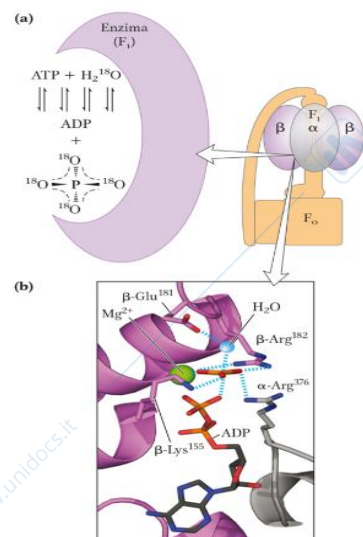
L'anello c e la subunità a interagiscono formando una via transmembrana ai protoni dove ciascuna subunità c (nell'anello c) ha vicino al centro della membrana un residuo di Asparagina che può legare o rilasciare un protone innescando dunque una protonazione/ deprotonazione



La sintesi dell'ATP accompagnato degli elettroni avviene in delle vescicole formatesi nella membrana mitocondriale interna, le quali, per mezzo di un trattamento blando, allontanano da loro la parte F1 mentre mantengono intatta la catena respiratoria e la parte Fo dell'ATP sintasi, questo allontanamento della parte F1, fa sì che le vescicole possano permettere il trasferimento degli elettroni dal NADH all'ossigeno, MA non possono produrre un gradiente protonico e di conseguenza non possono produrre ATP

La parte F1 isolata, chiamata in questo caso F1 ATPasi, catalizza l'idrolisi dell'ATP (reazione inversa alla sintesi)

Una volta purificata, viene di nuovo aggiunta alle vescicole, F1 si riassocia a Fo chiudendo il suo canale protonico e restituendo alla membrana la capacità di accoppiare il trasferimento protonico alla sintesi



Per quanto riguarda il meccanismo di azione dell'enzima, si è scoperto che la reazione che avviene sulla superficie dell'enzima  $ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O$  è facilmente reversibile e che la variazione di energia libera per la sintesi dell'ATP è vicina allo zero

Ciò è stato dimostrato attraverso un esperimento in cui l'ATP viene idrolizzato utilizzando F1 incubato con ATP e solubilizzato con acqua marcata con O18 (nella matrice mitocondriale interna) che porta alla formazione ovvero rilascio di una molecola di  $P_i$ , contenente un atomo di O18

Successivamente, con vari intervalli, viene prelevato un altro campione di questa soluzione per essere analizzata in modo di determinare nuovamente l'incorporazione dell'O18 nella molecola  $P_i$  e si osserva che la molecola di  $P_i$  non contiene più un solo atomo di O18 ma 3 o 4 atomi, il che indica che durante l'incubazione sono avvenute sia l'idrolisi che la sintesi dell'ATP

Questa reazione di scambio avviene solo in complessi FoF1 privi di energia oppure con F1 isolato, in quanto lo scambio non richiede energia

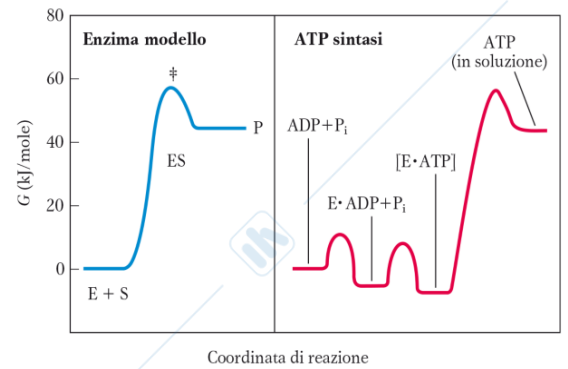
Una volta sintetizzato l'ATP, questo lascia l'enzima solo in presenza e grazie di un gradiente protonico. Mettendo a confronto un enzima modello con l'ATP sintasi che catalizzano una reazione endoergonica, possiamo notare che:

in una reazione catalizzata dall'enzima modello, la principale barriera energetica da superare è il raggiungimento dello stato di transizione tra substrato e prodotto

Mentre, nella reazione catalizzata dall'ATP sintasi, la principale barriera energetica da superare è il rilascio di ATP dall'enzima e non la sua formazione: questo perchè anche se la variazione di energia libera per la formazione di ATP da ADP e Pi in H<sub>2</sub>O è ampia e di segno positivo

il legame molto saldo dell'ATP all'enzima, fornisce una quantità di energia di legame che abbassa l'energia libera dell'ATP legato all'enzima a valori simili a quelli dell'ADP-Pi legato all'enzima, favorendo il suo distacco e rilascio

La reazione dunque è facilmente reversibile e la sua  $K_e$  è vicino a 1



Abbiamo detto che l'alternanza di legame delle subunità b nei nucleotidi è fondamentale per la sintesi dell'ATP, dove alla base c'è una vera e propria catalisi rotazionale: che viene innescata dalla Forza motrice protonica (passaggio dei protoni attraverso porzione Fo dell'ATP sintasi) che provoca la rotazione dello stelo centrale della subunità  $\gamma$ , la quale entra a contatto in successione con ciascuna subunità  $\alpha\beta$

Il contatto genera una modificazione conformazionale cooperativa delle subunità b:

La prima subunità b, in forma Beta-ADP, lega ADP e Pi, presi dall'ambiente circostante, cambia la conformazione in Beta-ATP, dove lega saldamente e stabilizza l'ATP generando un equilibrio tra i ADP+ Pi e ATP sulla superficie dell'enzima

Infine, la subunità modifica ulteriormente la sua conformazione passando a quella Beta-vuota che ha pochissima affinità per l'ATP, il quale, appena sintetizzato, lascia la superficie dell'enzima

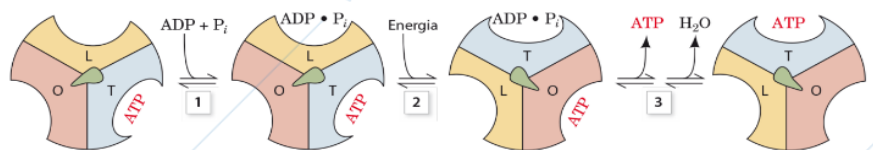
Nel momento in cui la subunità B-vuota riassume la forma B-ADP inizia un altro ciclo dell'enzima

Contemporaneamente, alle modificazioni conformazionali della prima subunità b avvengono anche le modificazioni delle altre due subunità:

→ la seconda subunità b, in forma B-ATP cambia conformazione in B-vuota, che ha poca affinità con l'ATP, il quale si dissocia e lascia la superficie dell'enzima

→ la terza subunità b, in forma B-vuota, cambia la sua conformazione in B-ADP, legando ADP e Pi dall'ambiente esterno (solvente)

Cosa importante è che l'ATP non può essere rilasciato da un sito se contemporaneamente in un altro sito non sono ancora legati ADP e Pi



Questa alterazione del legame, non è altro che una rotazione in una direzione della subunità  $\gamma$  quando il complesso FoF1 dell'ATP sintasi sta sintetizzando l'ATP; e di un'altra rotazione nella direzione opposta quando invece il complesso sta idrolizzando l'ATP

Facciamo qualche esempio sperimentale che hanno portato a questa conclusione:

- **Esperimento 1:** Dimostrazione della rotazione della subunità  $\gamma$ : durante l'idrolisi dell'ATP, la rotazione della subunità  $\gamma$  di una singola molecola di F1, è stata determinata attaccando alla subunità  $\gamma$  un lungo e sottile polimero di actina fluorescente e osservando i suoi movimenti rotazionali rispetto alle subunità  $\alpha_3\beta_3$  immobilizzante su un vetrino

Ma attraverso questo esperimento non si poté osservare la rotazione della subunità  $\gamma$  in senso inverso (sintesi ATP)

• **Esperimento2: Dimostrazione della rotazione dell'intero anello della subunità c insieme alla y:**  
 Si prese in esame l'intero complesso FoF1 dove la parte F1 viene modificata geneticamente inserendo un residuo di Istidina, e immobilizzata su un vetrino ricoperto da un complesso Ni (Nichel)  
 Contemporaneamente, alla subunità c viene associata la biotina mediante legame covalente con una proteina avidina che a sua volta formando il complesso biotina-avidina, al quale si associa ad un lungo filamento di actina fluorescente (precisamente alla biotina, ma che poi con al formazione del complesso si lega anche alla subunità c)

Aggiunto ATP, per stimolare l'attività ATPasica di F1, il filamento fluorescente ruota continuamente in una sola direzione e contemporaneamente ruota anche il cilindro Fo della subunità c

### In che modo il flusso protonico attraverso il complesso Fo produce movimento rotatorio?

La rotazione dell'anello avviene attraverso un moto termico e a tappe, dove il gradiente protonico determina la direzione del flusso dei protoni e rende la rotazione dell'anello C unidirezionale

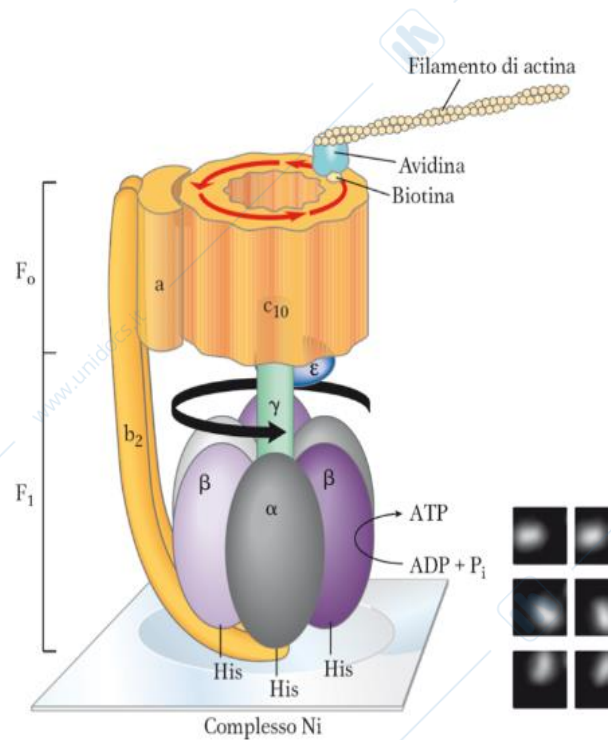
Abbiamo la subunità a del complesso Fo dell'ATP sintesi che ha due semicanali idrofilici per i protoni:

- uno che porta al lato P al centro della membrana
- uno che porta dal centro della membrana al lato N

E presenta inoltre una catena laterale di Arginina carica positivamente

Ciascuna subunità c, invece, ha un residuo di Asparagina essenziale a circa metà della membrana, che può donare o accettare un protone H<sup>+</sup>

Questo residuo di Asparagina interagisce elettrostaticamente (con il suo carbossilato carico -) con l'Arginina carica positivamente posta sulla catena laterale della subunità adiacente ad essa

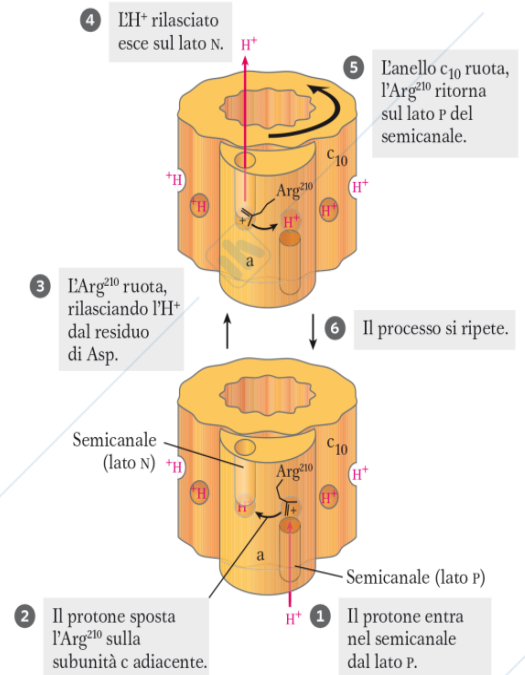


Quando il protone entra nel semicanale nel lato P, la subunità c'è posizionata in modo tale che il protone possa incontrare e legarsi al residuo di Asparagina, indebolendo la sua interazione con il residuo di Arginina

Di conseguenza, la catena laterale dell'Arginina ruota verso il residuo di Asparagina protonato e rimuove il protone carbossilico nel momento in cui si forma una nuova interazione tra i residui di Arginina e Asparagina

Il protone rilasciato si muove attraverso il secondo semicanale della subunità a e passa sul lato N, contemporaneamente la subunità c, con il residuo di asparagina deprotonato, si muove in modo che la sua coppia Arginina-Asparagina si affacci sul semicanale dal lato P, iniziando un secondo ciclo:

- ingresso del protone
- protonazione dell'asparagina
- movimento dell'arginina
- uscita del protone



### TRASPORTO ATTIVO PER LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

La membrana mitocondriale interna è in genere impermeabile alle specie cariche, ma la forza motrice protonica fornisce energia, oltre che per la sintesi di ATP, anche per favorire processi di trasporto essenziale nella fosforilazione ossidativa

Esistono infatti due sistemi specifici presenti nella membrana interna mitocondriale che trasportano ADP e Pi nella matrice e ATP nel citosol

→ La traslocasi dei nucleotidi adeninici, proteina integrale di membrana che innesca un antiporto:

- ADP<sup>3-</sup> dallo spazio intermembrana alla matrice
- ATP<sup>4-</sup> dalla matrice allo spazio intermembrana

Questo antiporto trasporta praticamente, 4 cariche negative all'esterno e 3 cariche negative all'interno, grazie al gradiente elettrochimico transmembrana, (ovvero favorito dal fatto che la matrice è più negativa dell'esterno)

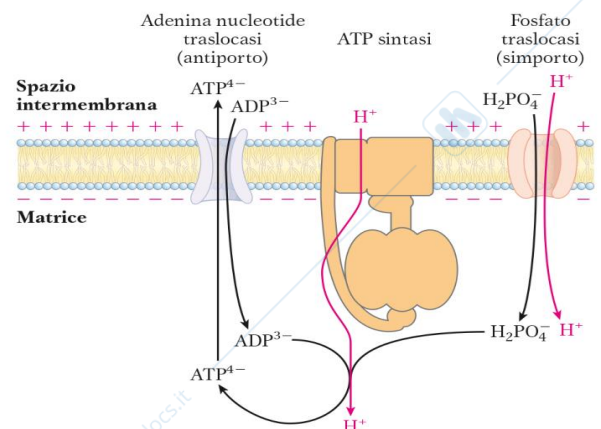
In questo trasporto, la forza motrice protonica favorisce lo scambio tra ADP e ATP

La traslocasi può essere inibita selettivamente dall'atrattiloside, glucoside vegetale tossico che blocca il trasporto di ADP (all'interno) e ATP (all'esterno) causando l'impossibilità di rigenerare ATP dall'ADP citosolico: tossicità

→ La fosfato traslocasi, innesca un simporto che trasferisce alla matrice: uno ione H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, uno ione H<sup>+</sup>; processo favorito anche qui dal gradiente protonico transmembrana

Per questo trasporto è richiesto il passaggio di un protone dal lato P al lato N della membrana interna, con il consumo di parte dell'energia prodotta dal trasferimento degli elettroni

I tre sistemi di trasporto (ATPasi e le due traslocasi) possono essere isolati, solubilizzando il mitocondrio con detergenti, come un singolo complesso legato alla membrana, chiamato ATP sintasoma



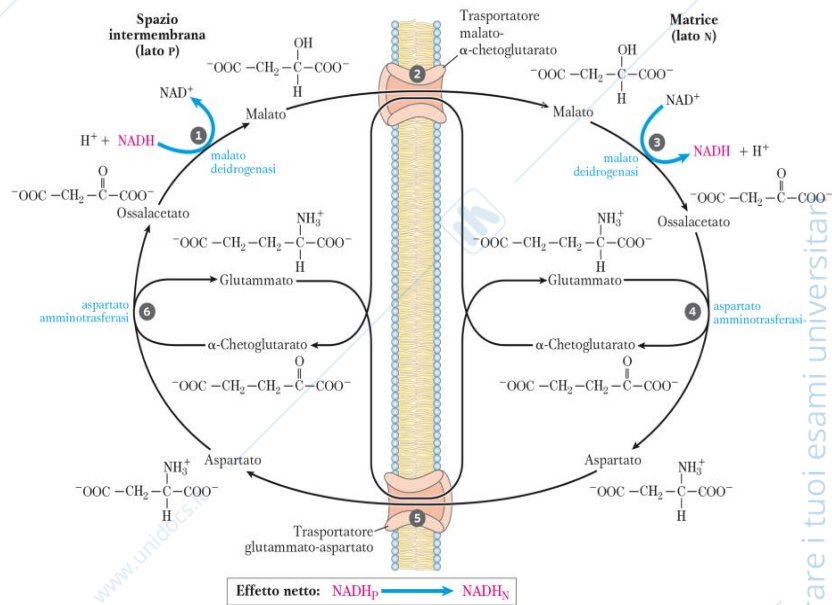
→ Sistema navetta (Shuttle)

Il sistema navetta, è una via indiretta che permette il trasporto degli equivalenti riducenti, NADH, dal citosol nei mitocondri, in quanto da soli non possono entrare nella matrice mitocondriale e dunque attraversare la membrana mitocondriale interna, in quanto quest'ultima è impermeabile al NADH citosolico

Il sistema navetta più attivo che funziona nel fegato, reni e cuore è lo Shuttle del malato-aspartato: il quale trasferisce i NADH citosolici all'ossalacetato citosolico producendo il Malato attraverso l'azione della malato-deidrogenasi citosolica

Il Malato poi, grazie al trasportatore malato-alfa-chetoglutarato attraversa la membrana mit. Interna e viene portato nella matrice, dove trasferisce i suoi due equivalenti riducenti al NAD<sup>+</sup> formando NADH

Il NADH, ora può trasferire i suoi elettroni (riossidandosi a NAD<sup>+</sup>) alla catena respiratoria sulla membrana mitocondriale interna: per ogni elettrone che arriva all'Ossigeno sono prodotte 2,5 molecole di ATP



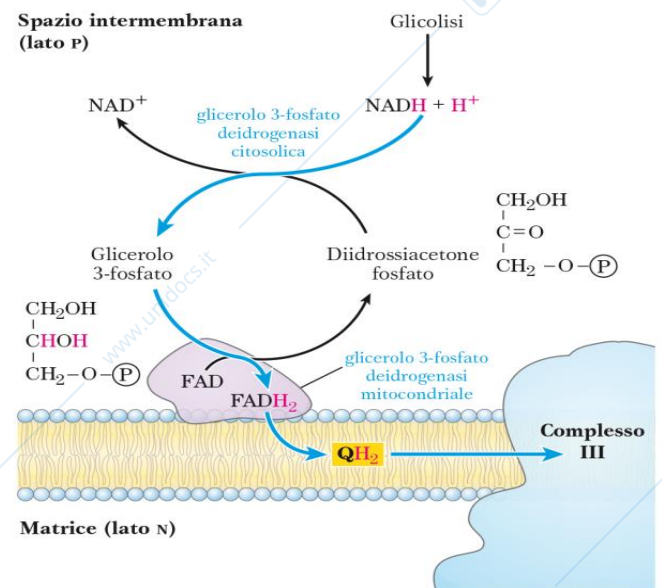
L'ossalacetato citosolico, prodotto dall'ossidazione del malato, non può però ritornare direttamente nel citosol e quindi viene prima transaminato ad aspartato, che può uscire dal mitocondrio attraverso il trasportatore glutammato-aspartato, andare nel citosol, rigenerare l'ossalacetato in modo da riniziare il ciclo del sistema navetta

Il sistema navetta presente nel cervello e nel muscolo scheletrico è lo Shuttle del glicerolo-3-fosfato che differisce da quello del malato-aspartato in quanto trasporta equivalenti riducenti dal NADH → al Complesso III (via ubiquinone) e non al Complesso I, fornendo una quantità di energia sufficiente solo alla formazione di 1,5 molecole di ATP per coppia di elettroni

A livello del citosol, NADH citosolico, dona due equivalenti riducenti al di-idrossi-acetone fosfato, attraverso una reazione catalizzata dalla glicerolo-3-fosfato-deidrogenasi

Successivamente un isoenzima della glicerolo-3-fosfato-deidrogenasi legato alla faccia esterna della membrana mitocondriale interna trasferisce due equivalenti riducenti dal glicerolo-3-fosfato (presente nello spazio intermembrana) all'ubichinone

NB. Questo sistema non coinvolge trasporti attraverso la membrana



## REGOLAZIONE FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

La fosforilazione ossidativa è regolata:

- 1) dal fabbisogno energetico della cellula.
- 2) Proteina IF1 inibitrice dell'ATP sintasi in casi di Ipossia
- 3) Piruvato deidrogenasi (PDH) e la COX4-1/COX4-2 in caso di formazione della ROS causata da Ipossia
- 4) Regolazione coordinata delle vie di produzione dell'ATP

**1) Regolazione da parte del fabbisogno energetico della cellula**

Le misure dello stato energetico della cellula sono:

- **controllo da accettore (ADP)** della **respirazione**: dove la **concentrazione intercellulare di ADP**, che è una **misura dello stato energetico** della cellula, **limita** la **velocità di consumo dell'O<sub>2</sub>** (*velocità della respirazione*), la quale ne è dipendente

Perciò è importante definire il **rapporto di controllo di accettore**, nonchè, il **rapporto** tra la **velocità massima di consumo di O<sub>2</sub>** in **presenza di concentrazioni ottimali di ADP** e la **velocità basale di consumo di O<sub>2</sub>**, in **assenza di concentrazioni di ADP** (in alcuni tessuti animali, il rapporto ha un valore almeno di 10)

- **rapporto di azione di massa del sistema ATP-ADP**:  $ATP / (ADP) \times (P_i)$ : è un altro metodo per valutare lo stato energetico della cellula

Questo rapporto è solitamente molto **elevato** quindi il **sistema ATP-ADP** è quasi **completamente fosforilato**, e questa condizione si manifesta quando:

→ viene **richiesta energia dall'interno della cellula**, ad esempio nel corso di un processo come la sintesi proteica

→ nella **demolizione dell'ATP a ADP e P<sub>i</sub>**, il che **abbassa il valore del rapporto di azione di massa**.

Avendo a disposizione **grandi concentrazioni di ATP**, la **velocità di consumo di O<sub>2</sub>** (velocità della respirazione) **aumenta**, innescando una **continua sintesi di ATP** fino a che il **rapporto di azione di massa** non raggiunge il suo **valore massimo**, a questo punto la **respirazione** tende a **rallentare**

In conclusione, per le **attività cellulari che richiedono energia** **l'ATP viene formato solo alla velocità con cui viene consumato**

**2) Inibitore IF1 dell'ATP sintasi (IPOSSIA)**

La proteina inibitrice IF1 (proteina intrinsecamente disordinata), determina l'inibizione dell'attività ATPasica dell'ATP sintasi bloccando una idrolisi dannosa dell'ATP, condizione che si manifesta in casi Ipossia, dove il trasferimento degli elettroni all'ossigeno e il pompaggio di protoni si interrompono con immediato collasso della forza motrice protonica

In queste condizioni, l'ATP sintasi (che può agire anche come pompa protonica guidata dall'ATP catalizzando la reazione inversa della sintesi dell'ATP: idrolisi) potrebbe agire in modo opposto, idrolizzando l'ATP per pompare i protoni nella direzione inversa causando una disastrosa riduzione dei livelli di ATP

L'inibitore IF1 è attivo solo nella sua forma dimerica che si determina a pH inferiori di 6-5 nel citosol e nella matrice, ambiente creato dall'acido lattico e acido piruvico

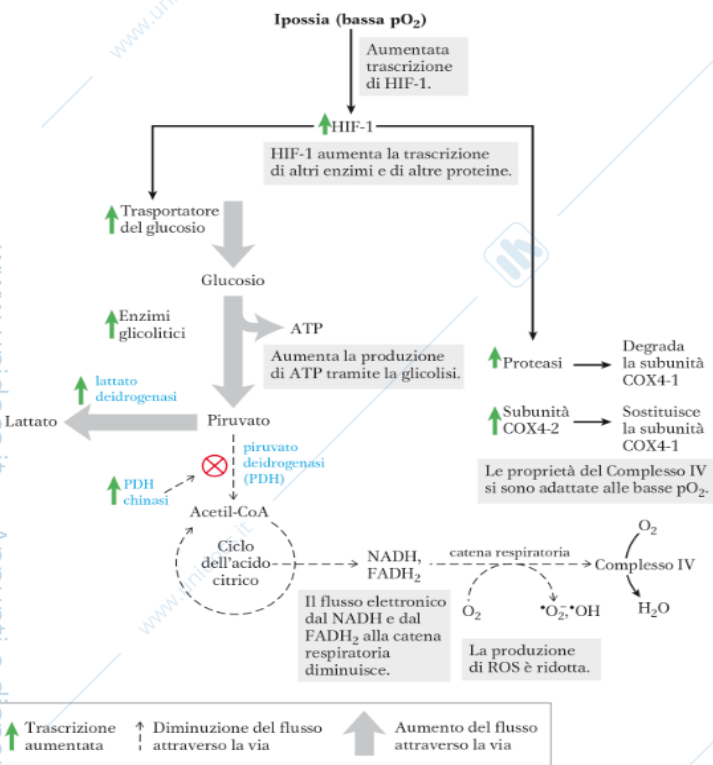
Generato nelle cellule anaerobiche dove l'unica fonte di ATP è la glicolisi

Quando viene ripristinato il metabolismo aerobico, la produzione di acido piruvico rallenta, il pH nel citosol sale, il dimero IF1 si destabilizza e l'inibizione sull'ATP sintasi viene rimossa

**4) Piruvato deidrogenasi (PDH) e COX4-1/ COX4-2**

L'**ipossia** provoca la produzione delle ROS, le cellule, per far fronte a tali problematiche, oltre al sistema della glutarato perossidasi, hanno anche con altri **due sistemi di difesa**:

- Regolazione della piruvato deidrogenasi (PDH), enzima che rifornisce di acetil-CoA, il ciclo di Krebs, dove la PDH chinasi *fosforila* la PDH mitocondriale **inattivandola**, diminuendo così il rifornimento di FADH<sub>2</sub> e di NADH **dal ciclo di Krebs alla catena respiratoria**
  - Regolazione dalla COX4-1 e COX4-2 è un sistema costituito dalla sostituzione del Complesso IV, il quale:
    - quando è legato alla COX4-1 ha un'ottima attività catalitica e concentrazioni di ossigeno normali
    - quando è legato alla COX4-2, funziona meglio in condizioni ipossiche
- L'attività del PDH e della COX4-2 nel Complesso IV sono entrambe regolate e indotte a sintesi dal fattore inducibile dell'ipossia HIF-1 proteina intrinsecamente disordinata, che stimola la *sintesi* anche di una proteasi che degraderà la COX-4-1

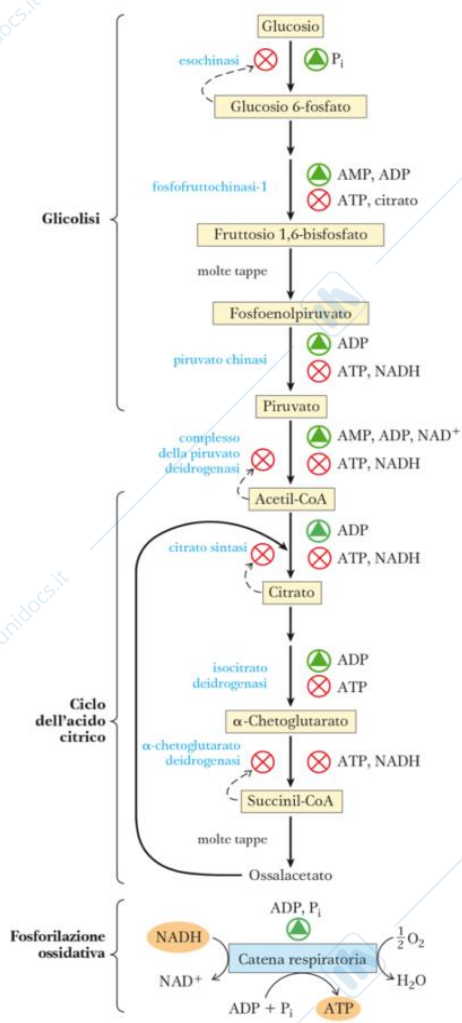


Le risposte adattative all'ipossia mediate dall'HIF-1 *rallentano* dunque il trasferimento degli elettroni nella catena respiratoria e *modificano* il Complesso IV, rendendolo più adatto a funzionare in condizioni a basse concentrazioni di ossigeno

### 5)Regolazione coordinata

E' un sistema di meccanismi interconnessi che regolano le vie cataboliche principali (fosforilazione ossidativa, trasferimento elettronico, glicolisi, ciclo di krebs e ossidazione piruvato) in modo che possano funzionare insieme in maniera economica e autoregolata per produrre ATP e i loro precursori Tali meccanismi regolatori dipendono dalle concentrazioni relative di: TP, ADP, AMP e NADH:

→ Concentrazioni elevate di ADP (e dunque aumento consumo ATP) porta ad un aumento della velocità di trasferimento elettronico e della fosforilazione ossidativa, seguita da un aumento della velocità di utilizzazione del piruvato nel ciclo di Krebs e di conseguenza aumento del flusso degli elettroni nella catena respiratoria, fino a poter generare anche un aumento della glicolisi e quindi più produzione del piruvato



→ Concentrazioni elevate di ATP (e dunque basse di ADP e AMP) producono un rallentamento della glicolisi, dell'ossidazione del piruvato, dell'ossidazione dell'acetato attraverso il ciclo di Krebs e della diminuzione del trasporto elettronico e fosforilazione ossidativa

La glicolisi e il ciclo di Krebs, diminuiscono perchè l'ATP è inibitore allosterico della Piruvato deidrogenasi e della Fosfofruttochinasi-1 inibita anche dall' aiuto del Citrato (primo intermedio del ciclo di Krebs)

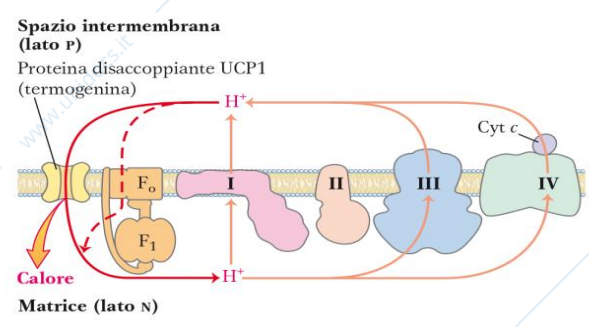
→ Concentrazioni elevate di NADH e di acetil-CoA portano all'inibizione dell'ossidazione del piruvato a acetil-CoA e un rapporto molto elevato di NADH/NAD+ inibisce le reazioni della deidrogenasi del ciclo di Krebs

**TERMOGENESI**

I mitocondri, nel tessuto adiposo, svolgono la funzione di Termogenesi, ovvero produzione di calore, per proteggere gli organi vitali da eventuali basse temperature ambientali, attraverso l'ossidazione di sostanze nutrienti, la quale energia ottenuta non viene usata (conservata) per produrre ATP, ma dissipata come calore contribuendo così a mantenere a temperatura ambiente il corpo dell'organismo

Questa azione avviene principalmente nel tessuto adiposo bruno (o grasso bruno BAT) presente nei neonati, la quale colorazione bruna è dovuta alla numerevole presenza di mitocondri e perciò citocromi i cui gruppi eme assorbono la luce visibile

I mitocondri presenti hanno una differenza peculiare rispetto agli altri mitocondri delle cellule mammifere, presentano una proteina speciale localizzata nella loro membrana interna chiamata termogenina (il prodotto del gene UCP1) che costituisce una via di ritorno alla matrice per i protoni, senza che questi passino attraverso il complesso FoF1

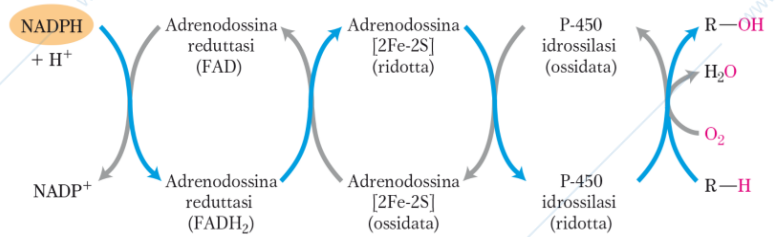


**SINTESI ORMONI STERODEI**

I mitocondri svolgono anche una funzione di sintesi degli ormoni steroide al livello delle ghiandole surrenali e nelle gonadi, prodotti a partire dal colesterolo o da steroli in esso correlati, attraverso una reazione catalizzata dal Citocromo P450 che prevede una ossidazione dove un atomo della molecola di O2 viene incorporato nel substrato (R-H) mentre il secondo atomo viene convertito in H2O:  $R-H + O_2 + NADPH + H^+$

→ R-OH + H<sub>2</sub>O + NADP<sup>+</sup>

Il flusso di elettroni in questa reazione catalizzata dal Citocromo P450, coinvolge una Flavoproteina contenente FAD che riceve 2 elettroni dal NADPH per poi trasportarli, uno per volta, ad un'altra proteina, la proteina Ferro-Zolfo ( 2Fe-2S chiamata anche adrenodossina) solubile, di piccole dimensioni, che a sua volta trasferisce gli elettroni al Citocromo P-450-idrossilasi, dove il suo gruppo eme interagisce direttamente con l'O<sub>2</sub> e con un sito del substrato ( R-H) per formare i seguenti prodotti : R-OH e H<sub>2</sub>O



Esistono molti enzimi citocromo P-450 sia nella membrana mit. interna che anche nel reticolo endoplasmatico degli epatociti, in questi ultimi sono presenti una grande famiglia di Citocromo P-450 che usano come substrati:

- composti idrofobici molti dei quali sono Xenobiotici (composti di sintesi industriale), i quali vengono ossidrilati diventando solubili in H<sub>2</sub>O, in questo modo possono attraversare facilmente il filtro renale ed essere escreti con le urine
- farmaci, ai quali viene limitato il tempo di emivita nel torrente circolatorio e dunque il loro effetto terapeutico

### APOPTOSI

Altra funzione dei mitocondri è quella di iniziare l'Apoptosi, morte programmata delle cellule per il benessere dell'organismo, il quale però ne conserva i componenti cellulari come amminoacidi, nucleotidi ecc.

Inizia da un segnale esterno che agisce su un recettore di membrana oppure da un evento intracellulare come un danno al DNA, infezione virale oppure stress ossidativo indotto da accumulo di ROS

Quando uno di questi eventi innesca il processo apoptotico, si ha un immediato aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna, (dovuto dall'apertura del complesso del poro di transizione della permeabilità ( PTPC ) ) che permette al citocromo c di uscire dallo spazio intermembrana al citosol, dove qui il citocromo c interagisce con i monomeri dell' Apaf-1 ( fattore-1 di attivazione della proteasi dell'apoptosi) causando la formazione di un apoptosoma composto da 7 molecole di Apaf-1 e 7 citocromi c, il quale funge da supporto sul quale la proteasi procaspasi-9 viene attivata → a capsasi-9 coinvolta nell'apoptosi. Queste capsasi hanno un residuo di Cisteina nel sito attivo e vanno ad idrolizzare le proteine rompendo i legami peptidici dal lato carbossilico di un residuo di Aspartato (da cui il nome caspasi) iniziando una cascata di attivazione proteolitica che porta alla morte cellulare