

PRODUZIONE DI ENERGIA

Gli organismi e le cellule autotrofi immagazzinano l'energia prelevata dell'ambiente trasformando i composti che si trovano allo stato ossidato in composti organici allo stato ridotto (contenuto energetico più elevato). Tutti gli organismi e le cellule ossidando i composti organici estraggono l'energia necessaria utilizzandola per compiere diversi tipi di lavoro e producono composti organici ossidati che ritornano all'ambiente. L'energia che si recupera dalla rottura di questi composti organici è sotto forma di ATP. L'ATP è un composto fortemente polare che quindi non riesce ad attraversare le membrane biologiche. Nelle cellule non esistono sistemi per trasportarlo, di conseguenza ogni cellula deve provvedere a sintetizzare ATP che è necessario ed esso rimane confinato al suo interno. Quando si parla di sintesi di ATP si intende l'attacco dal terzo fosfato all'ADP (fosforilazione). L'ATP trasferisce l'energia dai processi esoergonici ai processi endoergonici all'interno delle cellule. Il metabolismo rappresenta l'insieme delle reazioni biochimiche attraverso cui le cellule trasformano l'energia. Le vie metaboliche sono una serie di reazioni in cui ognuna è catalizzata da un enzima specifico ed il prodotto di una reazione rappresenta il substrato della reazione successiva. Le vie metaboliche possono essere:

- **Vie anaboliche**, sintetizzano composti complessi da materiali di partenza più semplici;
- **Vie cataboliche**, degradazione di molecole complesse in costituenti elementari.

Nelle vie cataboliche l'energia liberata viene immagazzinata sotto forma di **ATP e trasportatori di elettroni**. Le vie cataboliche e anaboliche prevedono reazioni in cui si ha il trasferimento di elettroni quindi esse sono reazioni redox. Quando un atomo perde elettroni si dice ossidato. Quando un atomo accetta elettroni si dice ridotto. L'ossidazione di un reagente deve essere accompagnata alla contemporanea riduzione di un altro reagente e viceversa. La molecola che in una reazione viene ossidata e quindi perde elettroni è detta riducente, quella che viene ridotta e quindi guadagna elettroni è detta ossidante.

Il grado di riduzione di un composto è la misura della capacità di svolgere lavoro chimico in una cellula. Più atomi di idrogeno possono essere strappati dalle molecole di combustibile maggiore è la quantità di ATP che alla fine può essere formato. I carboidrati sono ricchi di energia chimica perché contengono ripetizioni di unità H-C-OH. Gli acidi grassi contengono una maggiore quantità di energia per unità di peso perché contengono ripetizioni di unità H-C-H.

Tutte le macromolecole possono essere utilizzate come fonte di energia. La loro demolizione avviene attraverso vie cataboliche che convergono verso la formazione di un numero relativamente piccolo di composti. Il più importante è l'**Acetil-Coenzima A**, la molecola chiave che permette alle cellule in condizione di aerobiosi, di produrre energia.

Il glucosio è l'unità costitutiva sia dell'amido che del glicogeno. Rappresenta la molecola chiave del metabolismo energetico sia delle piante che degli animali. L'ossidazione completa di una molecola di glucosio a CO₂ e H₂O libera energia sufficiente a generare un gran numero di molecole di ATP.

Il glucosio viene prodotto dalle piante attraverso la reazione della fotosintesi.

Il catabolismo del glucosio è costituito da due stadi identici in tutti gli organismi aerobi:

- **Glicolisi**, avviene in assenza di ossigeno nel caso della fermentazione, come nelle cellule muscolari
- **Ciclo di Krebs** o Ciclo dell'acido citrico

L'energia chimica del glucosio viene accumulata sotto forma di elettroni ad alta energia che viene utilizzata per produrre ATP.

COENZIMI DINUCLEOTIDICI: NAD⁺ E FAD

NAD⁺ e **FAD** sono i coenzimi delle deidrogenasi, la classe di enzimi che catalizza le reazioni di ossido-riduzione. Entrambi sono dinucleotidi contenenti AMP. I due mononucleotidi sono uniti da un legame fosfoanidridico. Il NAD è il coenzima nelle reazioni di ossidazione dei gruppi alcolici a aldeidici e dei gruppi aldeidici a carbossilici, nella Glicolisi e nel Ciclo di Krebs. Il NADH trasporta 2 elettroni e 1H⁺. Il secondo H⁺ liberato dall'ossidazione del substrato è libero nel mezzo.

GLICOLISI

Nella glicolisi una molecola di glucosio viene degradata mediante una serie di 10 reazioni catalizzate da altrettanti enzimi che portano alla formazione di due molecole di un composto a 3 atomi di carbonio, il piruvato. Durante queste reazioni, una parte dell'energia proveniente dall'ossidazione del glucosio viene immagazzinata sotto forma di ATP (Adenosina Trifosfato) e di NADH (Nicotinammide Adenina Dinucleotide, in forma ridotta, cioè che ha accettato gli elettroni che il glucosio ha perso ossidandosi). Quindi, il NAD si riduce in NADH e il glucosio si ossida in piruvato. Possiamo dividere le 10 reazioni della glicolisi in due sottogruppi da 5, in quanto nelle prime 5 detta FASE PREPARATORIA, viene consumato ATP mentre nelle 5 seguenti viene ricavato ATP. La glicolisi è divisa in due tappe:

- **FASE ENDOERGONICA**, in cui viene consumata ATP
- **FASE ESOERGONICA** in cui viene prodotta ATP

PRIME 5 REAZIONI: FASE ENDOERGONICA

1. Il glucosio viene convertito in GLUCOSIO-6-FOSFATO dalla esochinasi, enzima che fosforila un esoso attraverso il consumo di ATP, producendo ADP e G6P
2. Il G6P viene isomerizzato in F6P (Fruttosio-6-Fosfato) dalla fosfoesoisomerasi, che isomerizza un esoso già fosforilato in posizione 6.
3. Il F6P viene ulteriormente fosforilato (cioè un enzima trasferisce un altro gruppo fosforico dall'ATP sul fruttosio) dalla fosfofruttochinasi ottenendo il FRUTTOSIO-1,6-BISFOSFATO.
4. Un'aldolasi scinde in 2 parti questo composto a 6 atomi di carbonio e con due gruppi fosforici in 2 molecole a 3 atomi di carbonio monofosforilati: GLICERALDEIDE-3-FOSFATO e DIIDROSSIACETONE-FOSFATO.
5. Il diidrossiacetonefosfato viene convertito in GLICERALDEIDE-3-FOSFATO dalla triosio-fosfato-isomerasi.

SECONDE 5 REAZIONI: FASE ESOERGONICA

Queste reazioni sono di recupero energetico e ogni molecola di Gliceraldeide-3-Fosfato viene ossidata e fosforilata dal fosfato inorganico, NON DALL'ATP, ma da gruppi fosfato (PO₄)₃ liberi.

1. Si ha la prima ossidazione con formazione di NADH a partire da NAD e aggiunta di gruppo fosfato. La GLICERALDEIDE-3-FOSFATO viene ossidata e fosforilata ad 1,3-BISFOSFOGLICERATO dall'enzima GLICERALDEIDE-3-FOSFATO DEIDROGENASI. La molecola oltre a ricevere un gruppo fosfato in posizione 1, viene ossidata, cioè perde 2 elettroni e vengono dati al NAD, che si trova nel sito attivo dell'enzima che catalizza la sesta reazione della glicolisi: GLICERALDEIDE-3-FOSFATO DEIDROGENASI.
2. In questa tappa ognuna delle due molecole di 1,3-BISFOSFATO che ha ottenuto, trasferisce il fosfato in posizione 1 all'ADP con produzione di ATP e di 3-FOSFOGLICERATO. Ne ha prodotte 2 e l'enzima che catalizza questa reazione si chiama FOSFOGLICERATO CHINASI.
3. In questa ottava tappa, il gruppo fosfato viene spostato nell'ambito della stessa molecola di 3FOSFOGLICERATO OTTENENDO 2FOSFOGLICERATO attraverso l'enzima MUTASI.
4. Nella nona tappa una ENOLASI catalizza l'eliminazione una molecola d'acqua dal 2FOSFOGLICERATO ottenendo il FOSFOENOLPIRUVATO (PEP).
5. Il PEP viene privato del gruppo fosforico ad opera dell'enzima PIRUVATO CHINASI che lo trasferisce all'ADP ottenendo il PIRUVATO C₃H₄O₃ a partire da una molecola a 6 atomi di carbonio, il glucosio C₆H₁₂O₆.

Ogni 2 molecole di Glucosio si formano 4NADH. Durante la fase di rendimento della glicolisi sono prodotte complessivamente 4 molecole di ATP, 2 per ogni molecola di piruvato, a partire da ADP.

Il piruvato è il PEP privato di gruppo fosfato. 7 reazioni sono reversibili cioè gli enzimi che le catalizzano sono capaci di lavorare in entrambe le direzioni delle reazioni ottenendo i reagenti dai prodotti. Questo è importante nella Gluconeogenesi (la formazione del glucosio a partire da alcuni intermedi della glicolisi, il piruvato o il lattato, percorrendo all'indietro la serie delle reazioni verso il glucosio. Le reazioni irreversibili della glicolisi sono la 1,3 e 10.



DECARBOSSILAZIONE OSSIDATIVA

La decarbossilazione ossidativa del piruvato è un processo metabolico che converte il piruvato prodotto dalla glicolisi in Acetil-CoA, substrato del Ciclo di Krebs. Per questo motivo, tale processo è a tutti gli effetti la via di collegamento fra queste due vie metaboliche e di conseguenza, una parte fondamentale del catabolismo dei carboidrati. La reazione ha luogo a livello del mitocondrio, all'interno del quale il piruvato viene trasportato attivamente nella matrice mitocondriale mediante trasporto attivo secondario sfruttando il gradiente protonico instauratosi a cavallo della membrana interna del mitocondrio. È catalizzata dal complesso enzimatico della piruvato deidrogenasi. Si forma CO₂, AcetilCoA e NADH.

Il Piruvato si ossida e il NADH si riduce. Il NADH è prodotto sia nel citoplasma che nel mitocondrio mentre il FADH₂ solo nel mitocondrio. Il NADH che si è formato nella Glicolisi passa nel mitocondrio dove andrà a legarsi ai complessi della respirazione sulla membrana mitocondriale. Questi sono 4 + 5 (ATP Sintasi).

Il NAD⁺ quando si ossida, un substrato si riduce, ottenendo dal substrato ossidato 2 elettroni e 2 protoni con uno di questi che viene rilasciato e un secondo che viene legato da NAD che quindi si riduce.

Il NADH prodotto dalla Glicolisi deve passare e utilizza delle vie diverse in una delle quali per esempio è coinvolto il Glicerolo 3 Fosfato che proviene dal DHAP con formazione di NAD (riduzione) passa il G3P in mitocondrio attraverso trasportatori e poi, venendo riconvertito in DHAP si ripristina un altro enzima. Una volta entrato nel mitocondrio, legandosi ai complessi I, II, III e IV, determina la traslocazione di protoni nello spazio intermembrana determinando il gradiente protonico necessario all'ATP Sintasi.

Il NAD quando ossida un substrato, si riduce, aumentando il numero di protoni quindi NADH.

CICLO DI KREBS

Con Ciclo di Krebs si indica una serie di 8 reazioni catalizzate da enzimi che conducono alla completa ossidazione di una molecola di Acido Piruvico proveniente dal Glucosio dopo la Glicolisi, ottenendo CO₂ e H₂O. Gli stessi prodotti di una reazione di combustione. La combustione è l'ossidazione di un composto organico. Il carbonio nella CO₂ assume un numero di ossidazione +4, il massimo possibile.

Quindi durante il Ciclo di Krebs, il carbonio raggiunge il massimo della sua ossidazione così che ne ricavi tutta l'energia possibile. Durante le reazioni enzimatiche di ossidazione che si verificano durante il ciclo, l'energia (intesa sotto forma di potenziale riducente, cioè elettroni in movimento) si conserva nelle molecole di NAD e FAD che riducendosi quando un composto si ossida, acquistano elettroni. Elettroni che serviranno durante la catena di trasporto.

- I. L'enzima citrato sintasi catalizza la formazione del citrato a partire dall'Acetil-CoA e dall'Ossalacetato, composto a 4C. La reazione è irreversibile e libera il CoA che può tornare a legarsi al sito attivo della Piruvato Deidrogenasi, pronto per accoppiarsi da un'altra molecola ad un'altra molecola di Acetile così da generare un altro substrato per il Ciclo di Krebs.
- II. L'enzima Aconitasi catalizza la trasformazione del citrato appena ottenuto in Isocitrato. Dapprima il citrato si lega all'enzima e l'intermedio che si forma prende il nome di Cis-Aconitato. A questo punto l'aconitasi può aggiungere una molecola d'acqua sull'intermedio. Sono due i possibili risultati che derivano da questa idratazione:
 - La formazione dell'isocitrato
 - La riformazione del citrato da cui il cisaconitato deriva
- III. L'isocitrato deidrogenasi catalizza una reazione di decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato attenendo un composto detto α Chetoglutarato riducendo una molecola di NAD a NADH.
- IV. α Chetoglutarato deidrogenasi catalizza una seconda decarbossilazione ossidativa, che porta alla formazione del Succinil-CoA e alla riduzione di una seconda molecola di NAD a NADH.
- V. Succinil-CoA sintetasi porta alla separazione del CoA dal Succinil-CoA ottenendo il Succinato e liberando il CoA. Questa reazione è caratteristica perché durante la catalisi enzimatica viene ad assemblarsi una molecola di GTP a partire da GDP e Pi.
- VI. La Succinato deidrogenasi porta alla formazione del Fumarato, ossidando il Succinato e riducendo il FAD a FADH₂.
- VII. L'enzima fumarasi agisce sul Fumarato idratandolo per ottenere il Malato, più precisamente L-Malato.
- VIII. La Malato deidrogenasi catalizza l'ultima reazione del ciclo. Il malato viene ossidato e il NAD si riduce a NADH producendo Ossalacetato togliendo 2 protoni e 2 elettroni dal Malato.

Il Ciclo di Krebs ha come risultato il suo primo substrato, l'ossalacetato. Attraverso questo ciclo si ottiene il potere riducente sotto forma di molecole ridotte come il NADH e FADH₂. Il ciclo ne produce 3 e 1 ogni volta che avviene e dato che l'ossidazione di una molecola di glucosio a CO₂ avviene 2 volte, il guadagno è tanto. Durante le tappe di decarbossilazione viene liberata CO₂. Le molecole ridotte ottenute, il NADH e il FADH₂ saranno i substrati della Catena di trasporto degli elettroni per produrre energia sotto forma di ATP durante la fosforilazione ossidativa nel mitocondrio. Le vie metaboliche nella cellule avvengono nel citosol e nella matrice mitocondriale (TCA).

Si formano nel ciclo di Krebs 2ATP per ogni glucosio entrato in ossidazione. Si formano 2CO₂ ogni AcetilCoA entrato nel ciclo.

Per ogni molecola di AcetilCoA, un ciclo, si forma 1 molecola di FADH₂. Si formano 2ATP per ogni Glucosio entrato in ossidazione.

Bilancio energetico per ogni AcetilCoA:

3NADH + 1FADH₂ + 2CO₂ + 1CoA + 1GTP

Per ogni molecola di glucosio:

10NADH 2FADH₂ 6CO₂

NADH: 2 GLICOLISI + 6TCA + 2 DECARBOSSICAZIONE OSSIDATIVA

CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

La catena di trasporto degli elettroni rappresenta la prima fase della fosforilazione ossidativa. In questa fase gli elettroni dei coenzimi ridotti NADH e FADH₂, provenienti dall'ossidazione dei composti organici, vengono ceduti alla catena di trasporto degli elettroni per creare un gradiente protonico (ioni H⁺) nello spazio intermembrana del mitocondrio. La catena di trasporto degli elettroni è un sistema proteico legato alla membrana mitocondriale interna, la quale separa la matrice dallo spazio intermembrana. È formata da 4 complessi proteici transmembrana e da 2 trasportatori solubili. Il suo compito è quello di accettare gli elettroni ad alta energia provenienti dai coenzimi ridotti NADH e FADH₂ e di trasferirli attraverso la catena tramite reazioni redox a potenziale crescente. Ad ogni reazione redox parte dell'energia degli elettroni viene ceduta al sistema permettendo di attivare il pompaggio dei protoni nello spazio intermembrana contro il loro gradiente.

L'accettare finale degli elettroni è l'ossigeno che, catturando 2 elettroni 2 protoni, viene ridotto ad acqua.

NADH – COMPLESSO I – COMPLESSO II – SUCCINATO – COENZIMA Q – COMPLESSO III – CITOCROMO – COMPLESSO IV – O₂

La catena di trasporto degli elettroni consta di 4 complessi + ATP sintasi.

Il processo prevede l'ossidazione di NADH e FADH₂ a NAD⁺ e FAD con cessione di elettroni ai complessi a pompaggio di protoni nello spazio intermembrana.

COMPLESSO I

NADH Ubichinone Ossidoreduttasi, proteina di membrana che catalizza il trasferimento di 2 elettroni dal coenzima ridotto NADH al trasportatore solubile Ubichinone (Coenzima Q). La reazione avviene attraverso diversi passaggi. Inizialmente il NADH viene ossidato a NAD⁺ riducendo il Flavin Mononucleotide a FMNH₂ con il trasferimento simultaneo dei due elettroni. Ciascun elettrone viene trasferito singolarmente passando per diversi centri ferro-zolfo e successivamente viene donato all'Ubichinone che al primo ciclo forma un radicale semichinonico e al secondo ciclo viene completamente ridotto a Ubichinolo (QH₂). Durante il processo vengono trasferiti 4 protoni nello spazio transmembrana.

COMPLESSO II

Succinato-CoQ-Reduttasi. La reazione del complesso è una via alternativa del complesso I e catalizza il trasferimento di elettroni al Coenzima Q. Il complesso II è l'enzima che coalizza la sesta reazione del Ciclo di Krebs trasformando il Succinato in Fumarato, ed è l'unico enzima del ciclo di Krebs che si trova legato ad una membrana. Durante la reazione viene ridotta una molecola di FADH₂ la quale cede gli elettroni ai centri ferro-zolfo del complesso II ed infine all'Ubichinone. Diversamente dal complesso I in questo processo non vengono trasferiti protoni.

COMPLESSO III

CoQH₂-CitocromoC-Ossidoreduttasi. L'ossidazione dell'ubichinolo da parte del complesso III avviene in modo ciclico in un processo chiamato Ciclo Q. I due elettroni trasportati dal Coenzima Q vengono strappati uno alla volta generando un intermedio semichinonico e trasferiti sui centri ferro-zolfo presenti sul complesso III, dove vengono pompati 4 protoni nello spazio intermembrana cioè sui protoni per ogni ciclo di un elettrone. Infine ogni elettrone viene trasferito su una molecola del trasportatore solubile *Citocromo C*.

COMPLESSO IV

Citocromo C-ossidasi. 4 molecole di Citocromo C vengono ossidate dal complesso IV passando per dei centri contenenti atomi di rame. Gli elettroni vengono donati all'ossigeno molecolare che funge da accettore finale. I due atomi di ossigeno che compongono la molecola vengono scissi e ridotti dai 4 elettroni e, combinandosi con 4 protoni prelevati dalla matrice mitocondriale, si trasformano in 2 molecole di acqua. Durante il processo vengono pompati 4 protoni nello spazio intermembrana.

SINTESI DELL'ATP

La sintesi dell'ATP rappresenta la seconda fase della fosforilazione ossidativa. In essa, il gradiente protonico ottenuto nella catena di trasporto degli elettroni viene sfruttato per azionare l'enzima transmembrana ATP-sintasi in grado di sintetizzare molecole di ATP a partire da ADP+Pi.

In questa fase del processo l'energia degli elettroni è stata trasformata in un gradiente protonico, il quale viene sfruttato per immagazzinare energia in un legame chimico dall'enzima ATP-sintasi tramite la sintesi di ATP a partire da ADP+Pi. L'enzima ATP sintasi, chiamato anche complesso V è una pompa protonica che funziona al contrario. In condizioni di assenza di un gradiente di ioni H⁺, questo enzima funzionerebbe come una pompa protonica, idrolizzando ATP e trasferendo protoni da un lato all'altro della membrana. La condizione necessaria al suo funzionamento è strettamente legata alla presenza del gradiente protonico, il quale sposta l'equilibrio della reazione verso i prodotti (cioè la formazione dell'ATP).

L'ATP sintasi è un grosso complesso proteico che attraversa la membrana mitocondriale interna. La porzione che attraversa la membrana è denominata porzione F₀ mentre la porzione che sporge verso la matrice mitocondriale è detta F₁. Grazie al gradiente protonico gli ioni idrogeno attraversano spontaneamente l'anello proteico o detto anche rotore che costituisce la porzione F₀ provocando la sua rotazione. Il movimento rotatorio viene trasferito tramite l'asse gamma alla porzione F₁. Sono presenti 3 siti catalitici, ciascuno formato da un eterodimero alfa-beta dove avviene la sintesi dell'ATP in un processo conosciuto come catalisi rotazionale. Il movimento rotatorio dell'asse gamma provoca dei cambiamenti di conformazione dei siti catalitici (che non ruotano ma restano nella loro posizione), i quali si trovano a turno in 3 stati conformazionali differenti. Nella prima conformazione il sito catalitico lega una molecola di ADP e un gruppo fosfato (P). La seconda conformazione provoca la condensazione tra le due molecole in una molecola di ATP. Nel terzo stato la molecola neosintetizzata viene liberata dal sito catalitico, che è pronto per un nuovo ciclo. Ad ogni rotazione completa del rotore F₀ vengono quindi sintetizzate 3 molecole di ATP (1 per ogni sito catalitico) e la forza motrice viene generata dal passaggio di 9 protoni che, a favore del gradiente, attraversano l'enzima per raggiungere la matrice mitocondriale.