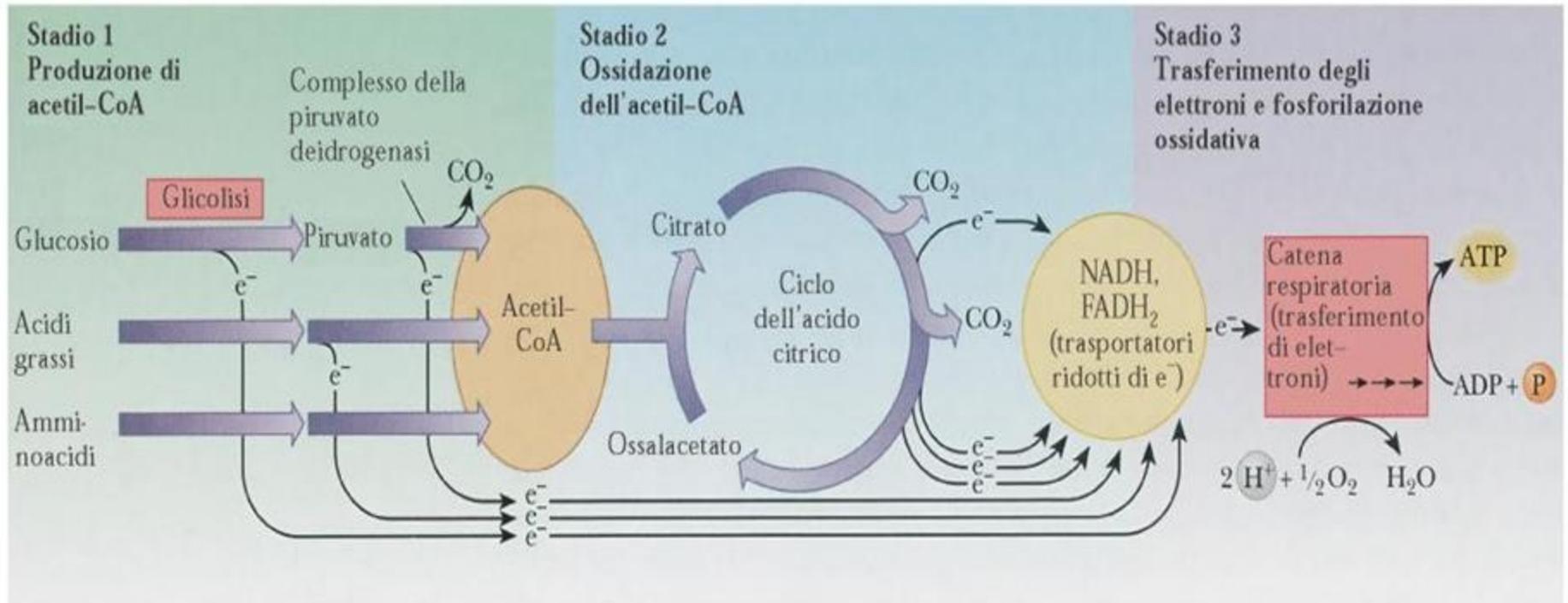




Respirazione cellulare
e
fosforilazione ossidativa

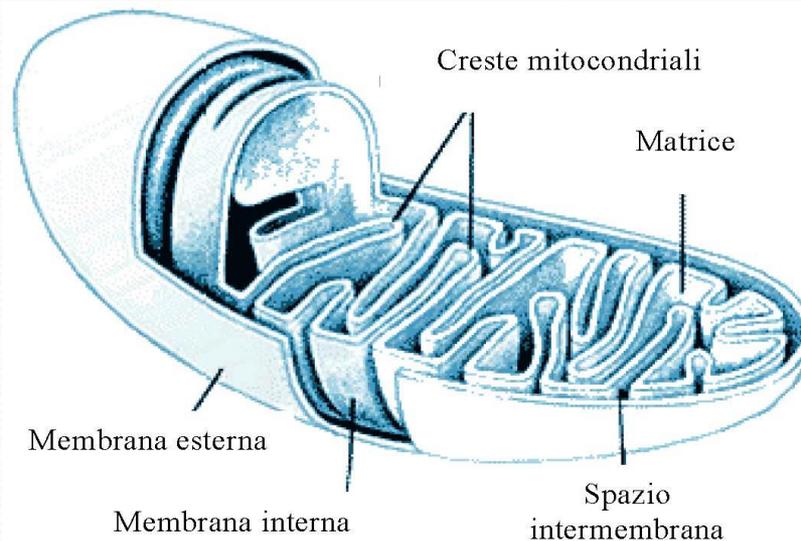
La respirazione cellulare



Il ciclo dell'acido citrico ha un ruolo centrale nel catabolismo. Gli aminoacidi, gli acidi grassi e gli zuccheri come il glucosio possono produrre tutti acetil-CoA nel primo stadio del catabolismo (stadio 1). Nel secondo stadio (stadio 2) l'acetil CoA entra nel ciclo dell'acido citrico. Entrambi gli stadi catabolici producono trasportatori di elettroni ridotti che nel terzo stadio (stadio 3) entrano nella catena di trasporto cedendo questi elettroni all'ossigeno molecolare e allo stesso tempo generare ATP

Trasportatori di elettroni e mitocondrio

I trasportatori di elettroni sono localizzati sulla membrana mitocondriale interna. La velocità del processo varia con l'area della superficie della membrana. Per questo l'area della membrana interna è notevolmente aumentata grazie ad una serie di invaginazioni o creste



La fosforilazione ossidativa

Si svolge nei mitocondri, a livello della membrana interna, e comprende i seguenti eventi:

- 1) Il NADH e il FADH₂ prodotti durante il ciclo dell'acido citrico e le altre vie metaboliche ossidative (glicolisi, ossidazione del piruvato, degradazione degli acidi grassi ecc) vengono riossidati attraverso la catena di trasporto degli elettroni presente nella membrana mitocondriale interna
- 2) Il trasferimento degli elettroni passa attraverso più di 10 centri redox per poi arrivare all'ossigeno molecolare che così viene ridotto ad acqua
- 3) Durante il trasferimento degli elettroni viene generato un gradiente di protoni tra l'interno del mitocondrio (matrice) e lo spazio tra la membrana esterna e quella interna (spazio intermembrana). L'energia associata a questo gradiente viene poi utilizzata per la produzione di ATP (processi accoppiati)

La catena respiratoria

Alcune reazioni della sequenza della catena respiratoria comportano il trasferimento di un solo elettrone, mentre in altre vi è il trasferimento contemporaneo di due elettroni

Oltre a NAD e Flavoproteine (proteine contenenti FAD o FMN) nella catena respiratoria operano altri tre gruppi di trasportatori di elettroni:

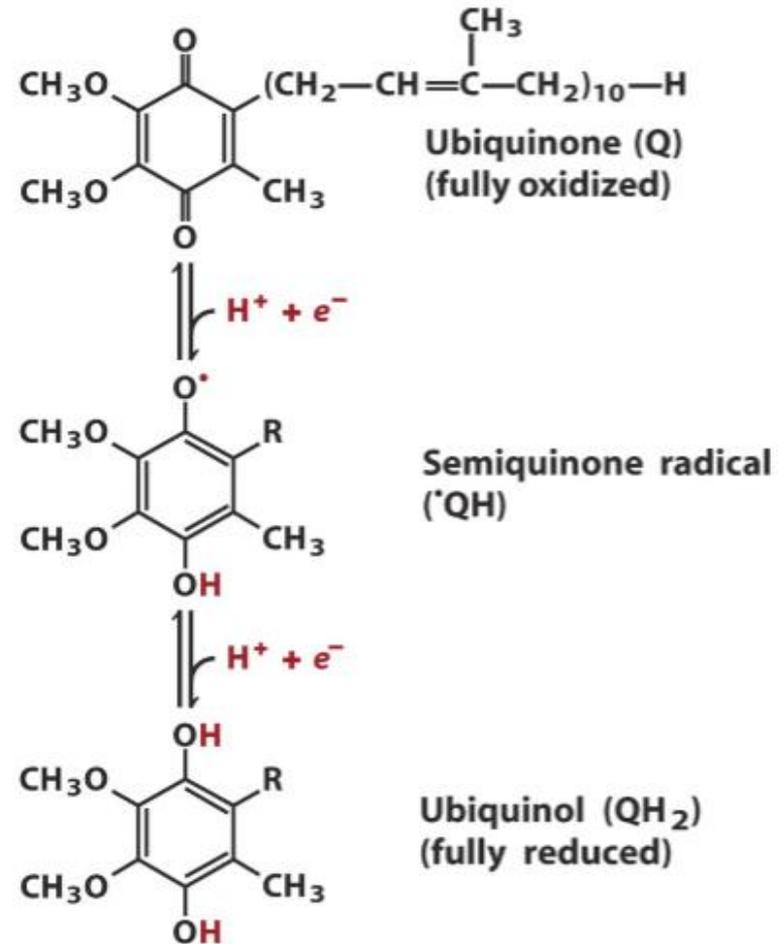
- un benzochinone idrofobico (ubichinone)
- citocromi (contenenti eme)
- proteine ferro-zolfo

Ubichinone (coenzima Q)

L'ubichinone o coenzima Q è un benzochinone con catena laterale isoprenoide. Può accettare un solo elettrone, trasformandosi in un radicale semichinonico, oppure può accettare due elettroni trasformandosi nella forma completamente ridotta (Ubichinolo).

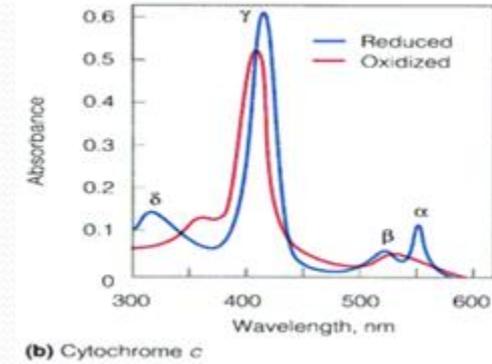
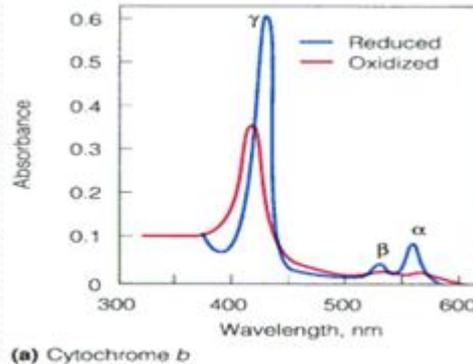
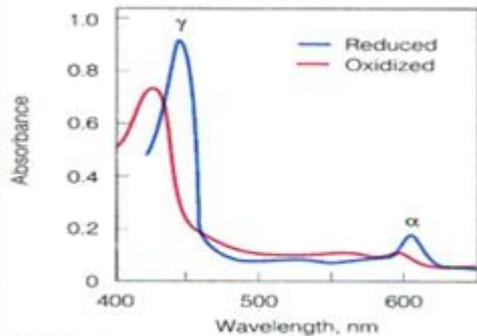
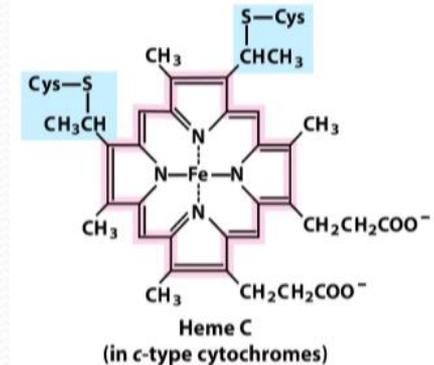
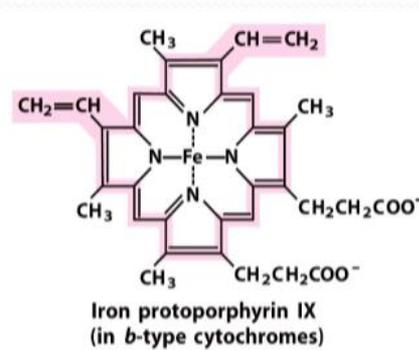
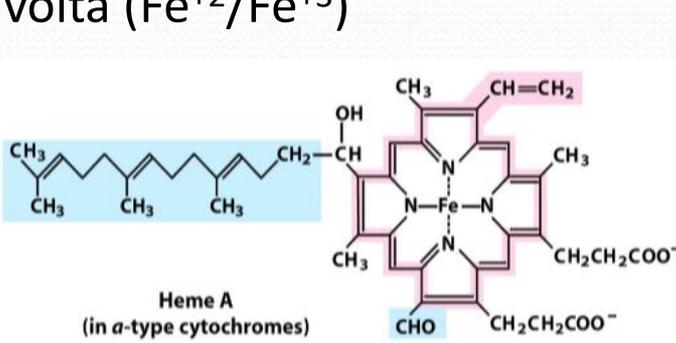
Come le flavoproteine, può mettere in relazione processi a due elettroni con altri ad un elettrone. E' di piccole dimensioni ed idrofobico e quindi può diffondere liberamente nella membrana mitocondriale interna e può agire da ponte tra trasportatori di elettroni meno mobili. Trasporta sia elettroni che protoni (importante ruolo nel processo di accoppiamento tra flusso elettronico e movimento protonico).

Il coenzima Q è associato alla membrana mitocondriale grazie ad una coda isoprenoide (generalmente 10 unità) e quindi il coenzima è detto anche Q10.



Citocromi

I citocromi sono proteine con una elevata capacità di assorbire la luce visibile dovuta alla presenza di un gruppo prostetico (l'EME) contenente Fe. Esistono tre classi di citocromi (a, b e c) distinguibili in base allo spettro di assorbimento. Il gruppo eme dei citocromi a e b è saldamente legato alla proteina ma senza legami covalenti. Il gruppo eme dei citocromi c è invece legato covalentemente a residui di cisteina della proteina. Il potenziale standard di riduzione del ferro all'interno dell'eme dipende dalle sue interazioni con le catene laterali della proteina, quindi è diverso in ogni tipo di citocromo. Sono in grado di trasportare un solo elettrone alla volta (Fe^{+2}/Fe^{+3})



Proteine Ferro-Zolfo (FeS)

In queste proteine gli atomi di ferro sono associati ad atomi di zolfo inorganico o ad atomi di zolfo di residui di Cys della proteina.

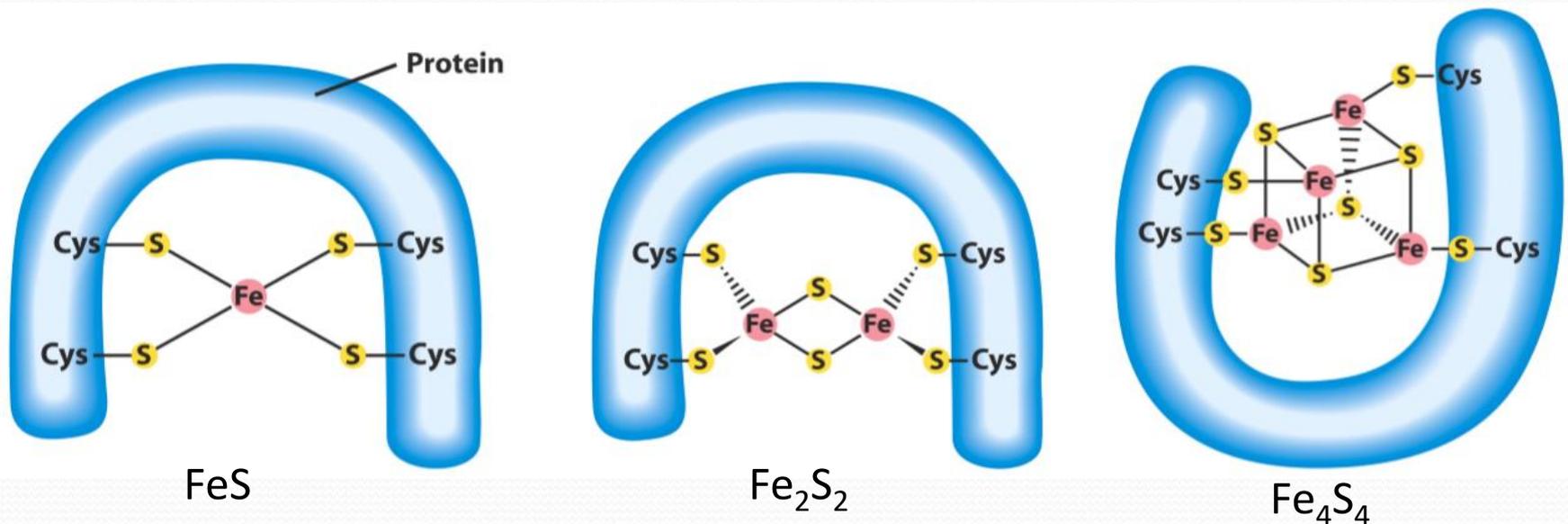
Si possono osservare diversi tipi di centri FeS nelle proteine di questa classe

Centri FeS

Centri Fe_2S_2

Centri Fe_4S_4 (a strutture cubica)

Le proteine FeS partecipano a reazioni redox in cui viene trasferito un elettrone alla volta utilizzando la modificazione dello stato di ossidazione degli atomi di ferro



Sequenza della catena di trasporto

L'ordine in cui si trovano i diversi componenti della catena respiratoria è stato determinato in diversi modi.

Mediante determinazione sperimentale dei potenziali standard di riduzione dei singoli trasportatori.

I trasportatori sono disposti in ordine di potenziale crescente

I componenti della catena respiratoria possono essere ridotti sperimentalmente in assenza di O_2 . L'aggiunta dell'accettore finale della catena permette di stabilire l'ordine progressivo in cui i diversi trasportatori si ossidano.

L'uso di inibitori del trasporto di elettroni accoppiato a misure del grado di ossidazione di ogni elemento della catena ha permesso di stabilire l'ordine dei trasportatori di elettroni.

Sequenza della catena di trasporto

In base alla determinazione sperimentale dei potenziali standard di riduzione

- basso potenziale standard: buoni donatori di elettroni

- alto potenziale standard: buoni accettori di elettroni

ci si aspetta che i trasportatori siano disposti in ordine di potenziale di riduzione crescente, dato che gli elettroni tendono a fluire spontaneamente da trasportatori con E'° basso verso quelli con E'° alto

Standard Reduction Potentials of Respiratory Chain and Related Electron Carriers

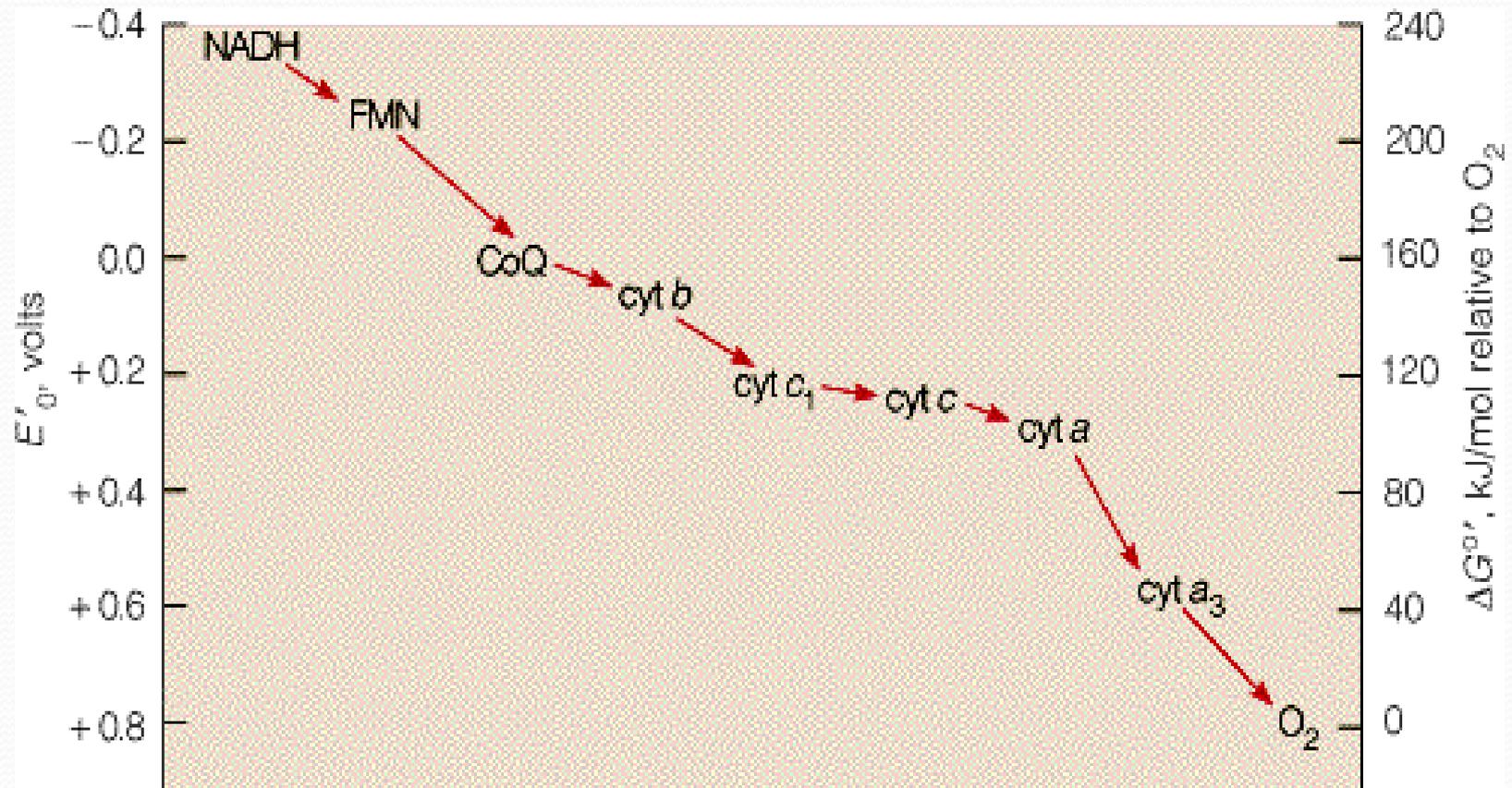
| Redox reaction (half-reaction) | E'° (V) |
|--|------------------|
| $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ | -0.414 |
| $\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH}$ | -0.320 |
| $\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADPH}$ | -0.324 |
| $\text{NADH dehydrogenase (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH dehydrogenase (FMNH}_2\text{)}$ | -0.30 |
| $\text{Ubiquinone} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{ubiquinol}$ | 0.045 |
| $\text{Cytochrome } b (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } b (\text{Fe}^{2+})$ | 0.077 |
| $\text{Cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{2+})$ | 0.22 |
| $\text{Cytochrome } c (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } c (\text{Fe}^{2+})$ | 0.254 |
| $\text{Cytochrome } a (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } a (\text{Fe}^{2+})$ | 0.29 |
| $\text{Cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{2+})$ | 0.55 |
| $\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$ | 0.816 |

In base ai potenziali standard l'ordine di trasportatori è:

$\text{NADH} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{citocromo } b \rightarrow \text{citocromo } c_1 \rightarrow \text{citocromo } c \rightarrow \text{citocromo } a \rightarrow \text{citocromo } a_3 \rightarrow \text{O}_2$

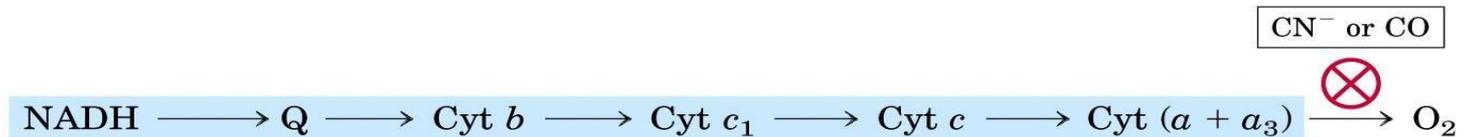
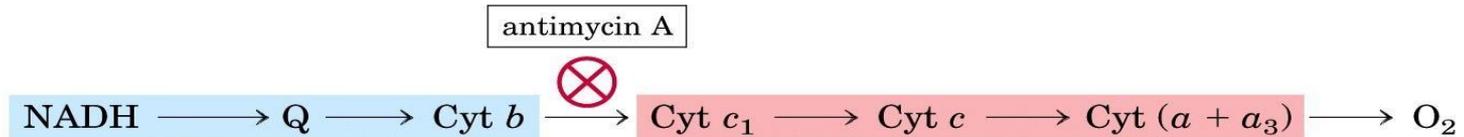
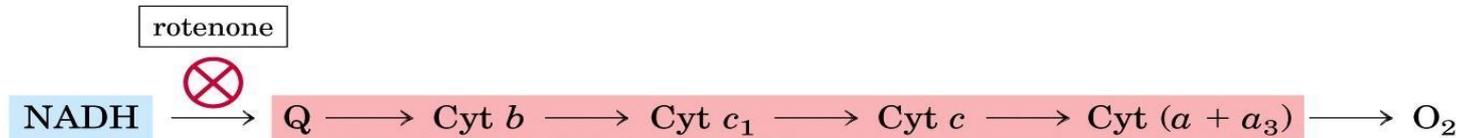
Da considerare che l'ordine reale all'interno della cellula dipende anche dalle concentrazioni relative delle forme ossidate e ridotte

Sequenza della catena di trasporto



Sequenza della catena di trasporto

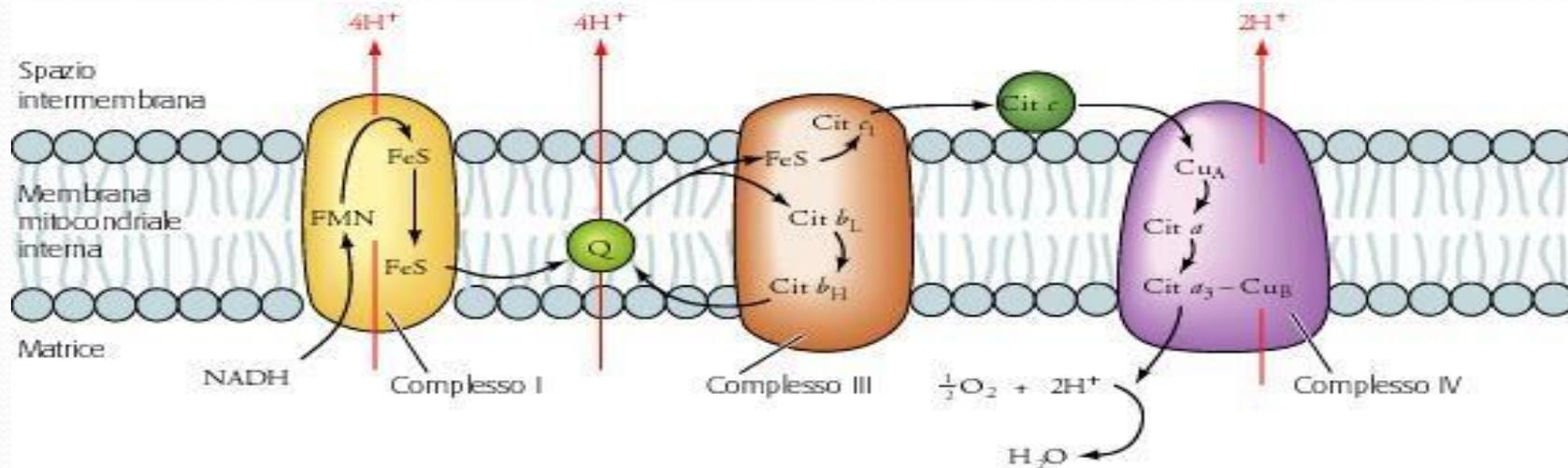
La sequenza può anche essere sperimentalmente determinata in base agli effetti di inibitori del trasferimento degli elettroni. In presenza di un donatore di elettroni e di O_2 ogni inibitore modifica in modo caratteristico lo stato di ossidoriduzione dei trasportatori di elettroni: quelli prima del blocco si riducono mentre quelli dopo il blocco restano ossidati



Organizzazione degli elementi della catena di trasporto

I trasportatori di elettroni della catena respiratoria sono organizzati in complessi multienzimatici intramembrana separabili.

Ogni complesso rappresenta una frazione della catena respiratoria



Complesso I
NADH
DEIDROGENASI
trasferisce
elettroni dal
NADH al
Coenzima Q

Complesso II
SUCCINATO
DEIDROGENASI
trasferisce
elettroni dal
FADH₂ al
Coenzima Q

Complesso III
UBICHINONE
CITOCROMO C
REDUTTASI
trasferisce
elettroni dal
Coenzima Q
al citocromo c

Complesso IV
CITOCROMO
OSSIDASI
trasferisce
elettroni dal
citocromo c
all'O₂

La catena respiratoria

Protein Components of the Mitochondrial Electron-Transfer Chain

| Enzyme complex | Mass (kDa) | Number of subunits* | Prosthetic group(s) |
|--|------------|---------------------|--|
| I NADH dehydrogenase | 850 | 42 (14) | FMN, Fe-S |
| II Succinate dehydrogenase | 140 | 5 | FAD, Fe-S |
| III Ubiquinone: cytochrome <i>c</i> oxidoreductase | 250 | 11 | Hemes, Fe-S |
| Cytochrome <i>c</i> [†] | 13 | 1 | Heme |
| IV Cytochrome oxidase | 160 | 13 (3–4) | Hemes; Cu _A , Cu _B |

*Numbers of subunits in the bacterial equivalents in parentheses.

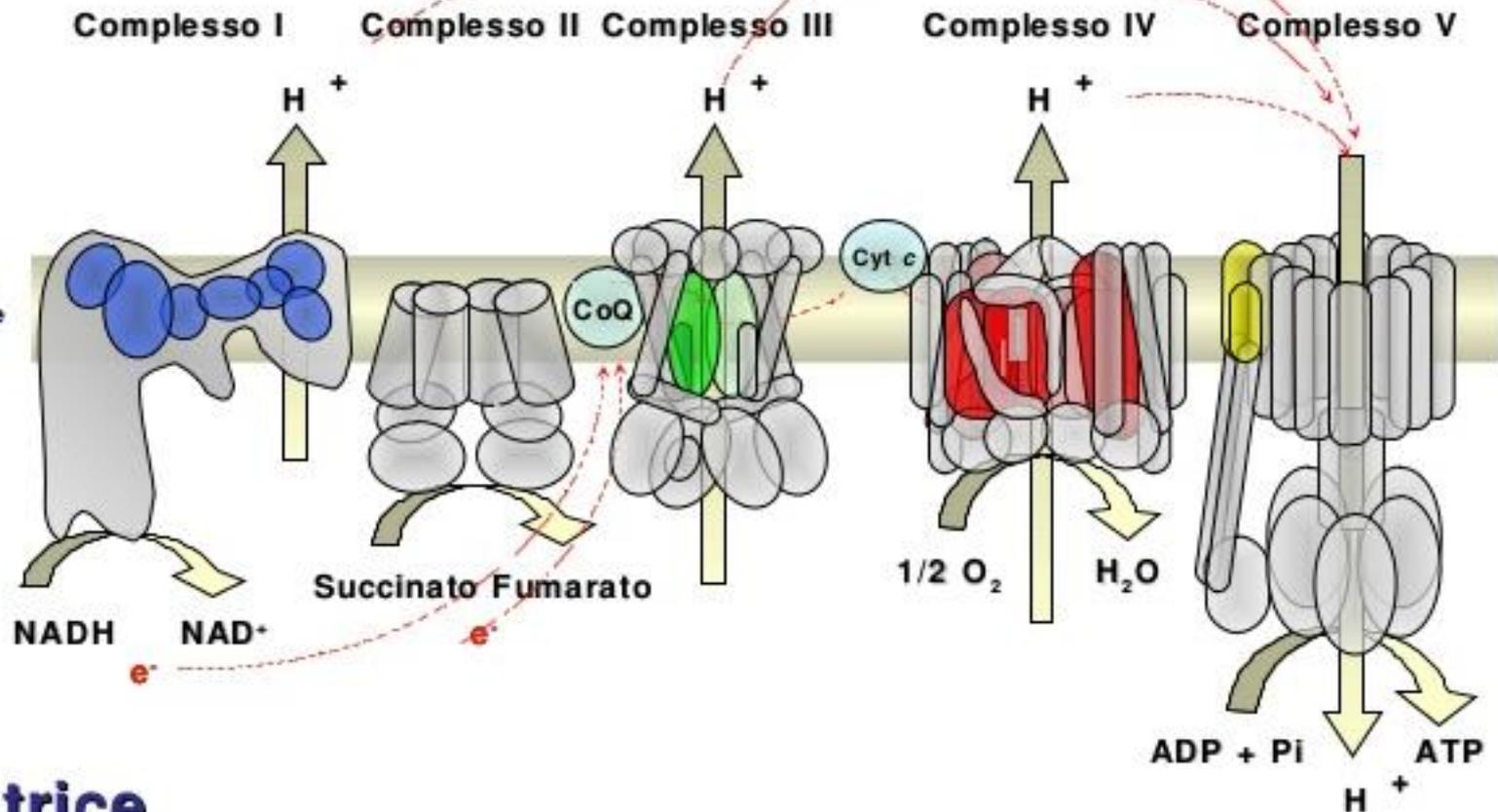
[†]Cytochrome *c* is not part of an enzyme complex; it moves between Complexes III and IV as a freely soluble protein.

La catena respiratoria

Citoplasma

Membrana Mitochondriale esterna

Membrana Mitochondriale Interna



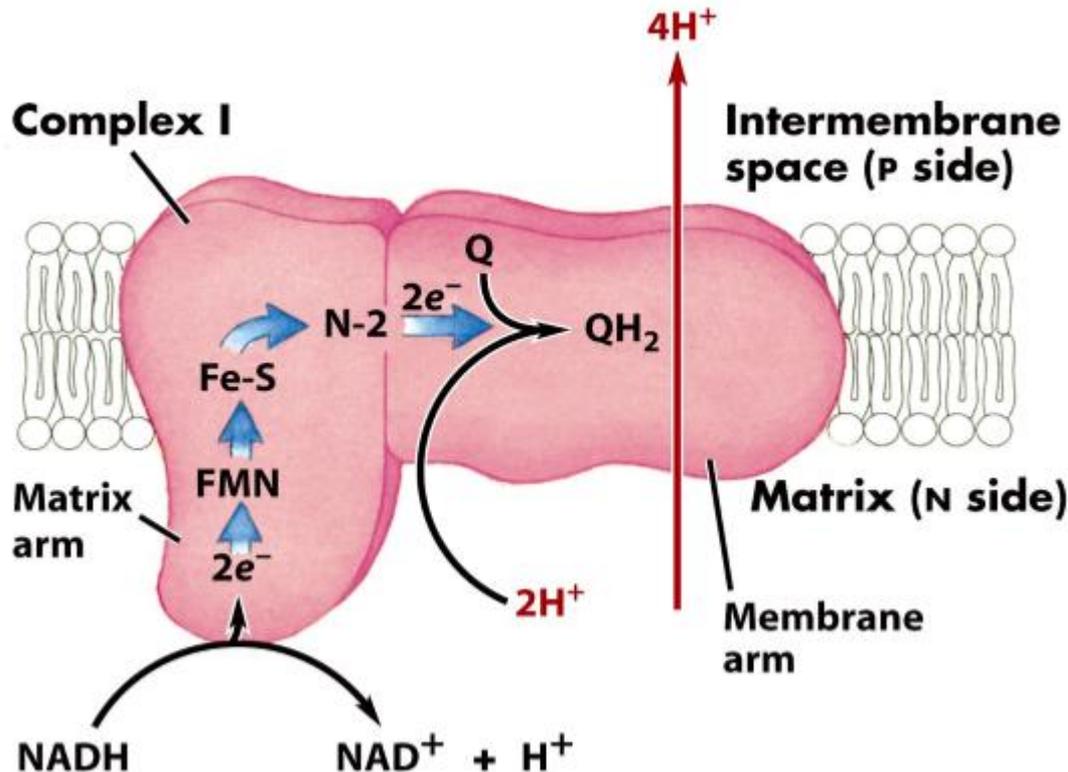
Matrice

Complesso I: NADH deidrogenasi

Il complesso I catalizza il trasferimento degli elettroni dal NADH all'ubichinone. Per questo il complesso prende anche il nome di NADH:ubichinone ossidoreduttasi o NADH deidrogenasi o NADH-Q reduttasi

Il complesso I comprende una molecola di FMN e 6-7 centri Fe-S

Il trasferimento degli elettroni nel complesso avviene a tappe secondo l'ordine del potenziale di ossidoriduzione



Trasferimento di uno ione idruro da NADH a FMN.

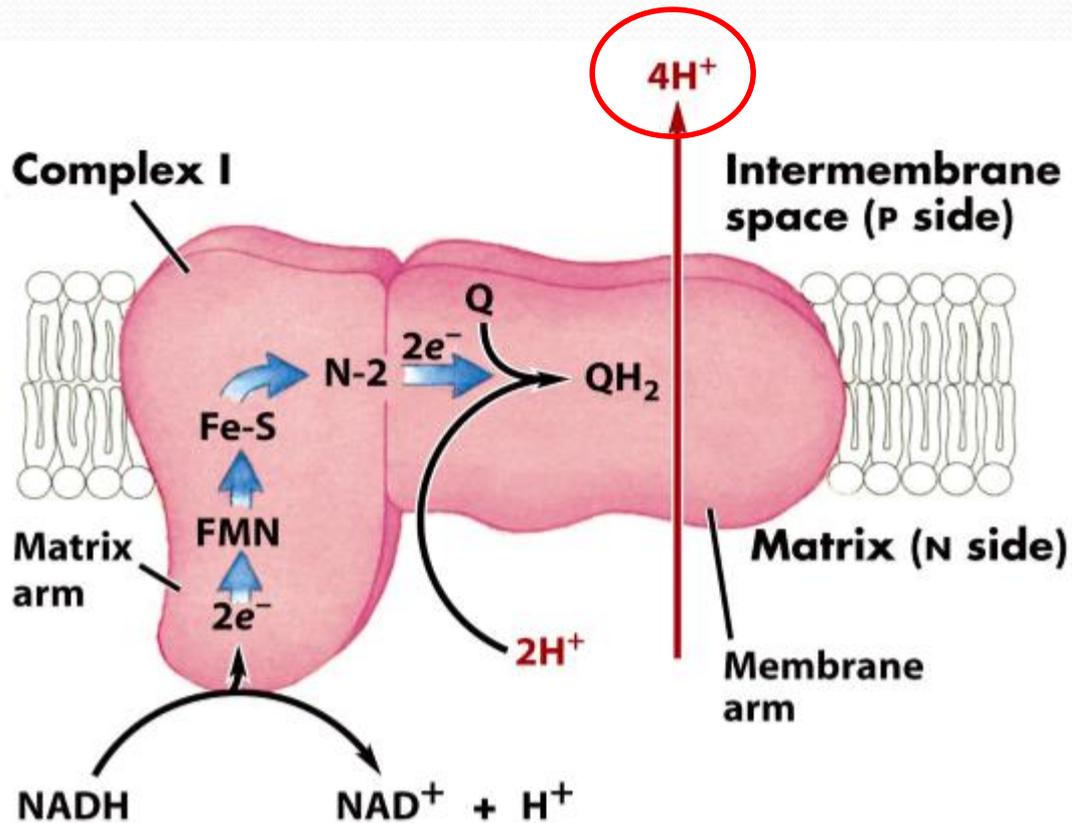
I due elettroni passano quindi attraverso una serie di centri ferro-zolfo fino ad arrivare all'ubichinone che si riduce a QH₂. Il QH₂ può quindi diffondere all'interno del doppio strato lipidico.

Il trasferimento di elettroni è accoppiato al trasferimento endoergonico (pompaggio attivo) di quattro protoni dalla matrice allo spazio intermembrana.

Complesso I: NADH deidrogenasi

Il complesso I è una pompa protonica che esegue un trasporto vettoriale: la zona della matrice prossima alla membrana si carica negativamente, mentre quella rivolta sullo spazio intermembrana diviene positiva. Per ogni coppia di elettroni trasportata vengono traslocati quattro protoni.

Il flusso protonico produce un potenziale elettrochimico tra i due lati della membrana che conserva parte dell'energia rilasciata dalle reazioni esoergoniche di trasferimento degli elettroni.



Complesso II: succinato deidrogenasi

Il complesso II è di fatto l'enzima che partecipa al ciclo dell'acido citrico ed è l'unico che è associato alla membrana (proteina integrale)

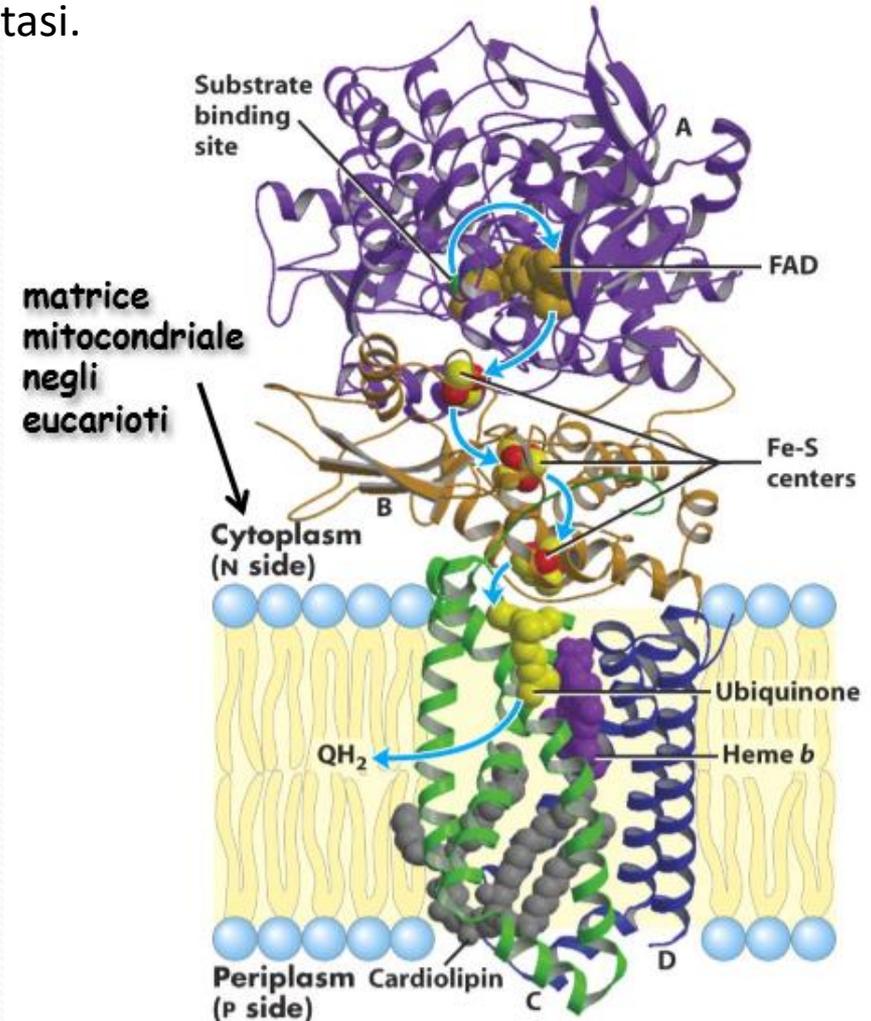
Il complesso catalizza il trasferimento degli elettroni dal succinato al coenzima Q e per questo è anche detto succinato-CoQ ossidoreduttasi.

Il complesso II comprende:

- il FAD legato in modo covalente alla succinato deidrogenasi
- un centro Fe_4S_4
- due centri Fe_2S_2
- un citocromo b560

Gli elettroni si muovono dal succinato al FAD e quindi attraversano i tre centri FeS per arrivare fino all'ubichinone.

Il gruppo eme B presente nel complesso non si trova sul percorso diretto degli elettroni. Si è ipotizzato che possa proteggere la cellula dalla formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) catturando gli elettroni che dovessero uscire dal percorso muovendosi dal succinato all' O_2

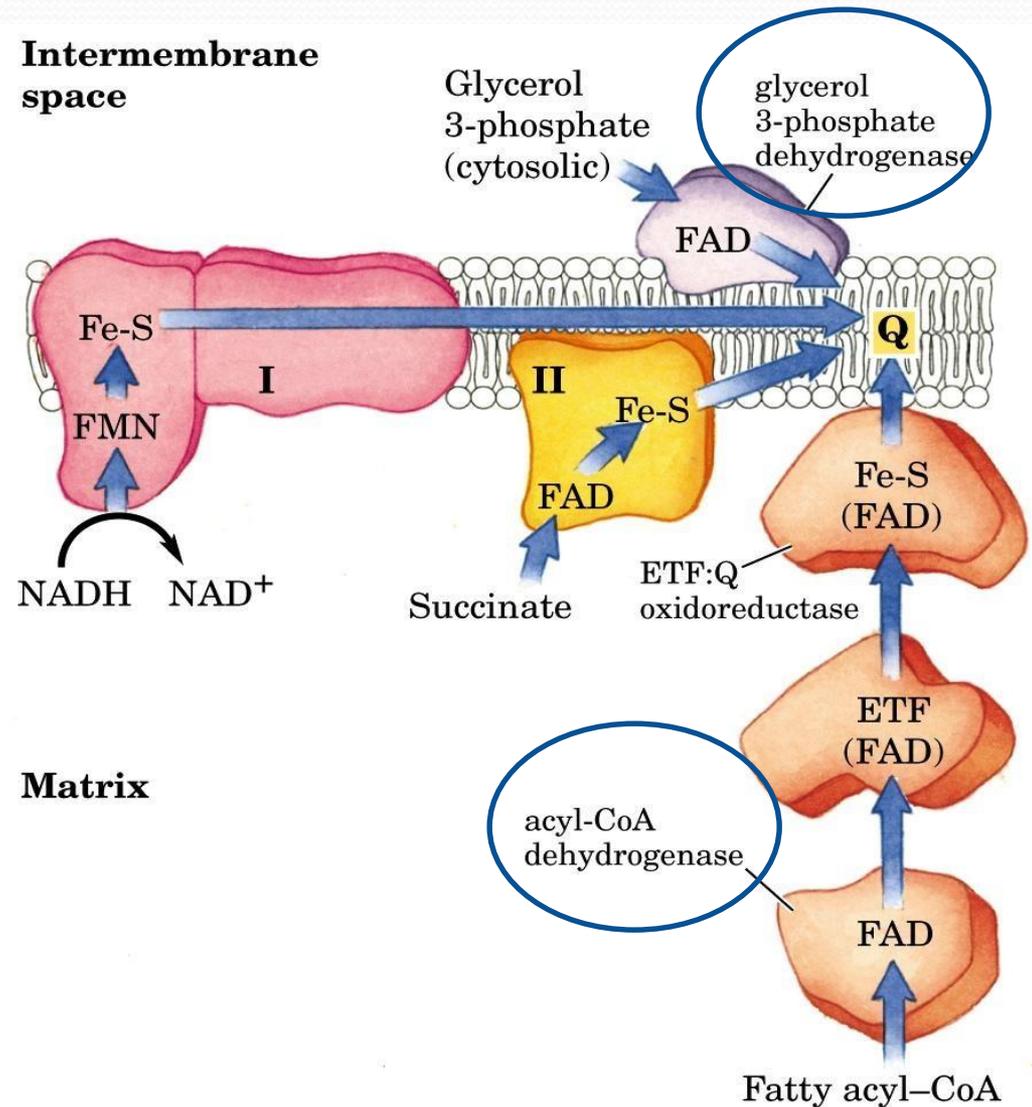


Complesso II: succinato deidrogenasi

Altri substrati di enzimi mitocondriali ad attività deidrogenasica cedono i loro elettroni alla catena respiratoria a livello dell'ubichinone senza passare dai complessi I o II

Acil-CoA deidrogenasi (enzima che catalizza la prima tappa della β -ossidazione degli acidi grassi). Gli elettroni passano dal FADH_2 legato all'enzima ad una flavoproteina (ETF, electron transfer flavoprotein) che poi li trasferisce ad un'altra proteina che contiene oltre al FAD anche un centro FeS (ETF:ubichinone ossidoreduttasi). Quest'ultima è in grado di trasferire gli elettroni all'ubichinone riducendolo a QH_2 .

Anche la glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale è una flavoproteina localizzata sulla faccia esterna della membrana mitocondriale interna che incanala gli elettroni nella catena respiratoria riducendo direttamente il coenzima Q.



Complesso III: citocromo c reduttasi

Il complesso comprende 10 subunità tra cui:

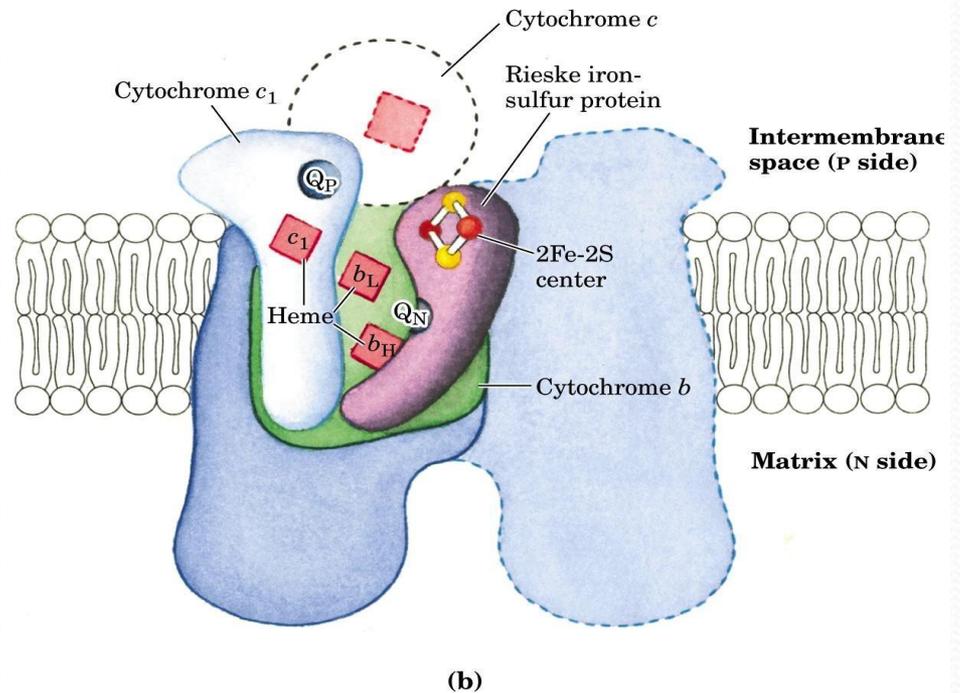
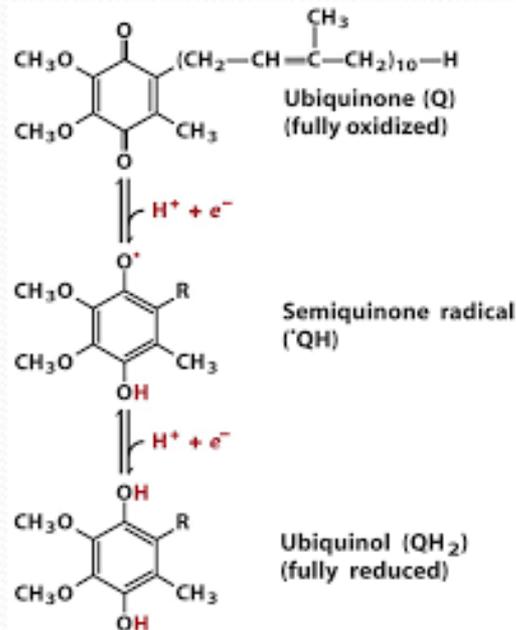
un citocromo c_1

una proteina Fe_2S_2 (proteina Riesk)

un citocromo b che possiede due gruppi eme (b_L e b_H o b_{562} e b_{566}) legati ad un'unica catena proteica

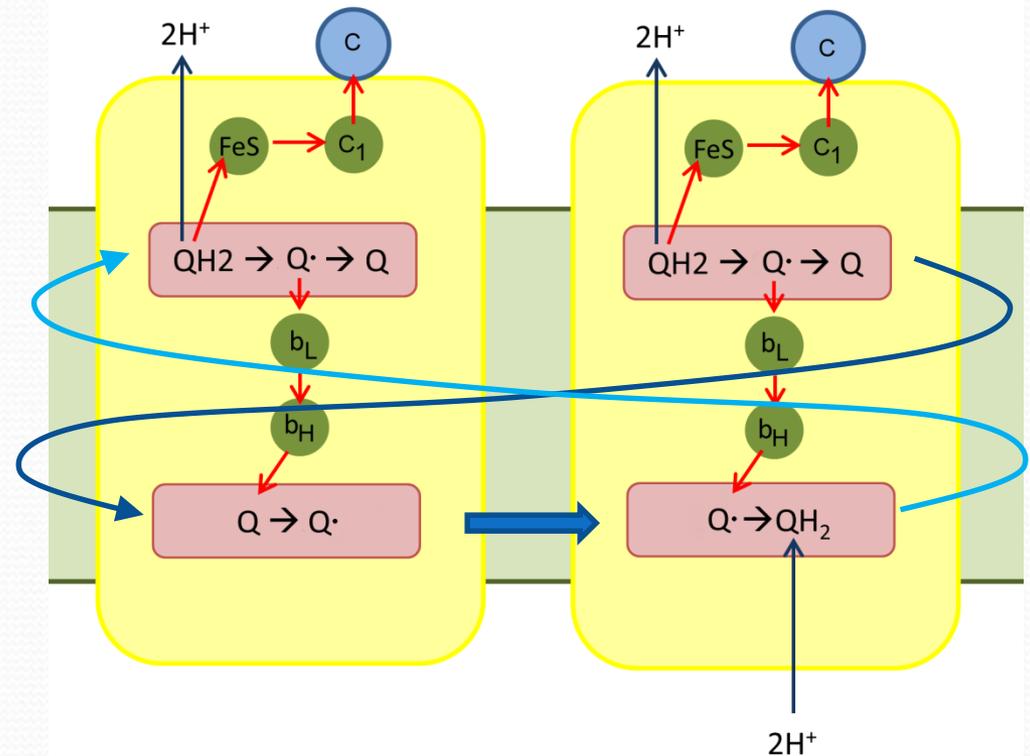
Il complesso ha il compito di trasferire gli elettroni dal coenzima Q o ubiquinone al citocromo c da cui anche il nome ubiquinone:citocromo c reduttasi.

Il trasferimento di elettroni all'interno del complesso III è un processo ciclico in cui il coenzima Q va incontro a reazioni di ossidoriduzione cicliche in cui può assumere diversi stati (ridotto o QH_2 , semi-ridotto o Q^\bullet e ossidato o Q)



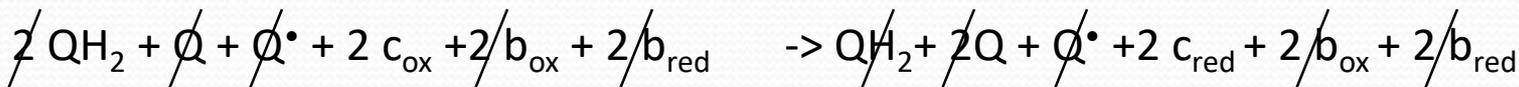
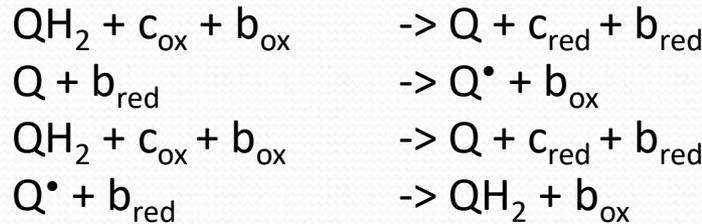
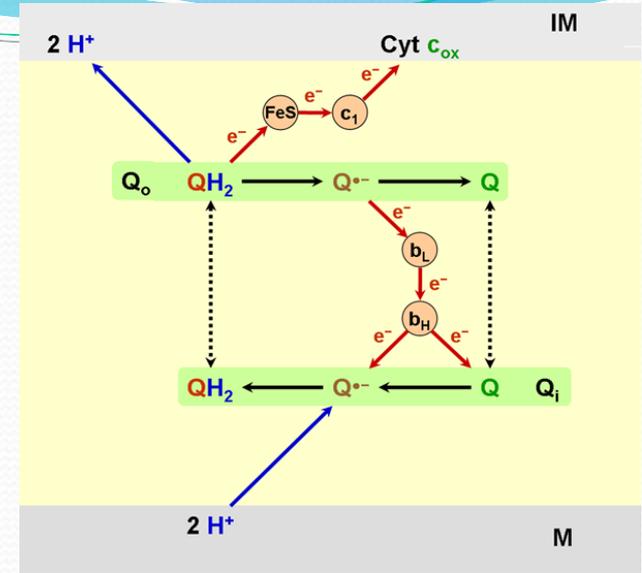
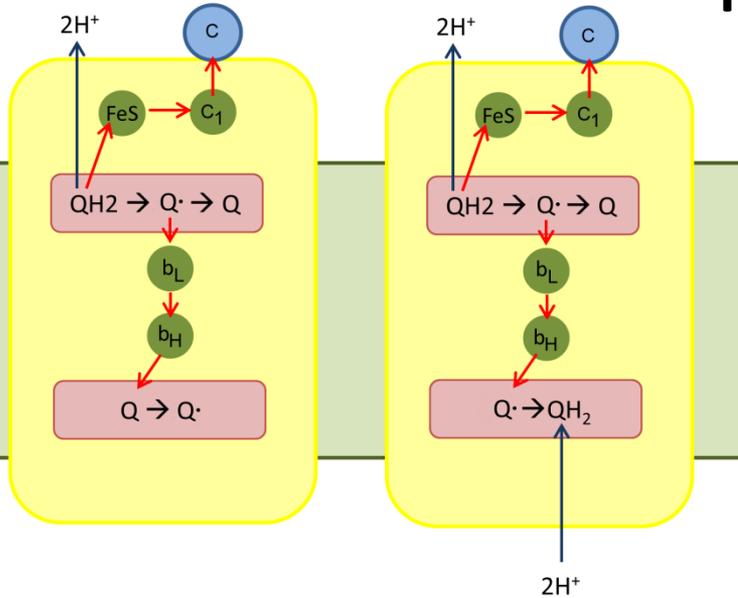
Ciclo dell'ubichinone (o ciclo Q)

Il ciclo Q serve per incanalare gli elettroni da un trasportatore bi-elettronico (NADH, FADH₂ e Q) ad uno mono-elettronico (citocromi). Il citocromo c è l'unica proteina della catena non integrale (è associata alla membrana attraverso interazioni con il citocromo c₁ del complesso III (citocromo c riduttasi) e il complesso IV (citocromo c ossidasi)



Una prima molecola di QH₂ cede separatamente un e⁻ al citocromo c (tramite un centro FeS e il citocromo c₁) e l'altro e⁻ al citocromo b (con i due eme b_L e b_H o b₅₆₂ e b₅₆₆). In questo modo il citocromo c viene ridotto e il secondo e⁻ è "parcheeggiato" sul citocromo b. Questo elettrone viene poi trasferito ad una molecola di Q per generare la forma semichinonica Q•. Una seconda molecola di QH₂ cede separatamente un e⁻ al citocromo c (tramite un centro FeS e il citocromo c₁) e l'altro e⁻ al citocromo b che a questo punto lo cederà alla forma semichinonica Q• rigenerando QH₂.

Il ciclo Q

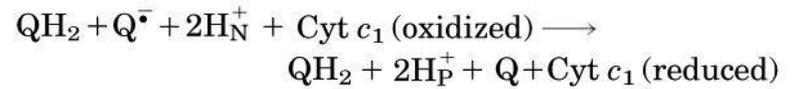
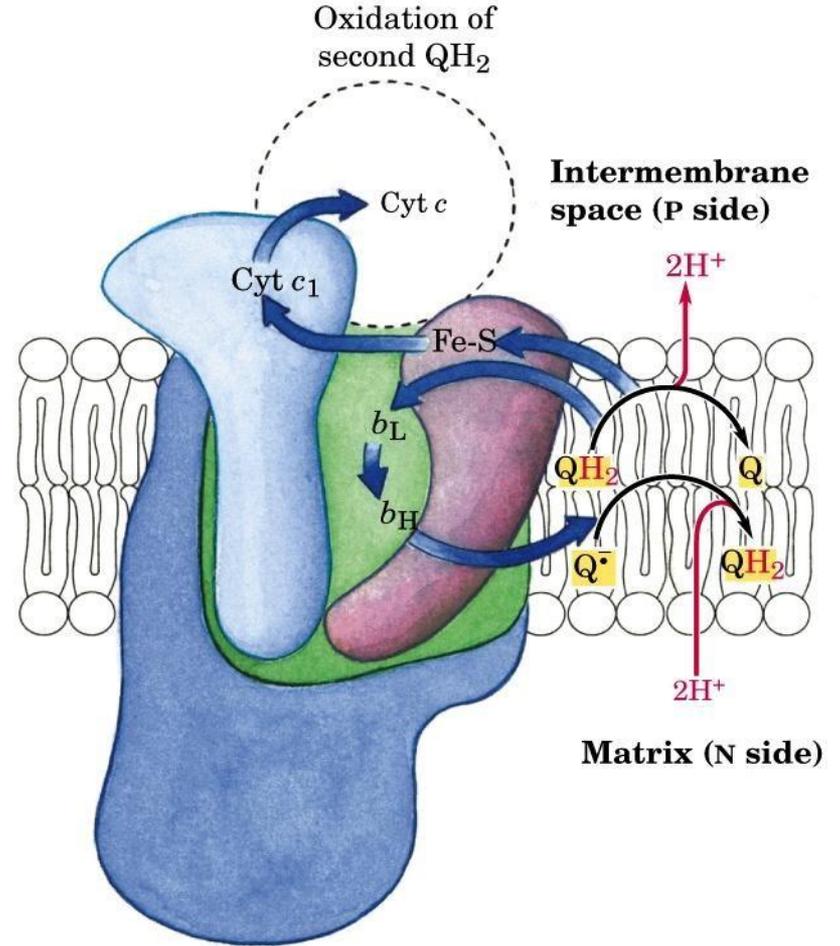
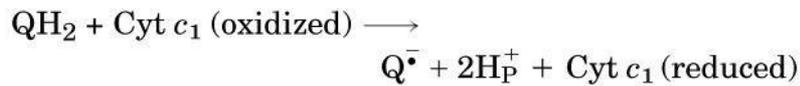
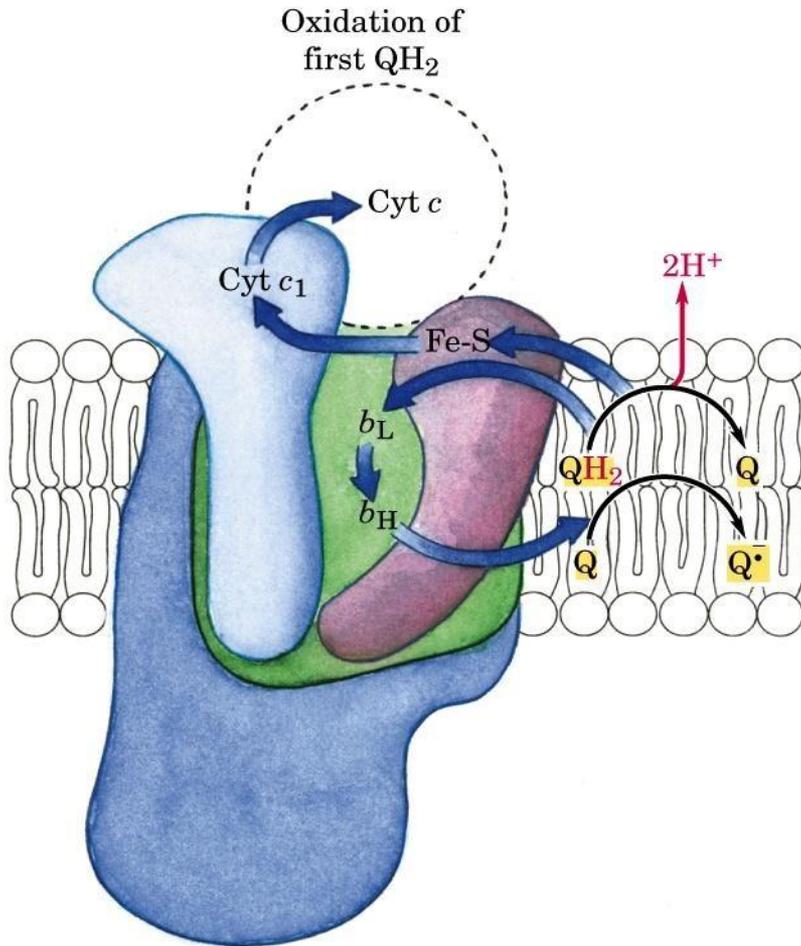


totale

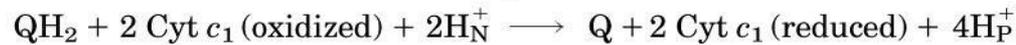
semplificando

In questo modo una molecola di QH_2 riesce a trasferire i due elettroni al citocromo c uno alla volta. Assieme ai 2 elettroni vengono trasferiti dall'interno allo spazio intermembrana 4 H^+

Il ciclo Q



Net equation:



Il complesso IV: citocromo c ossidasi

Il complesso comprende 13 subunità proteiche tra cui:

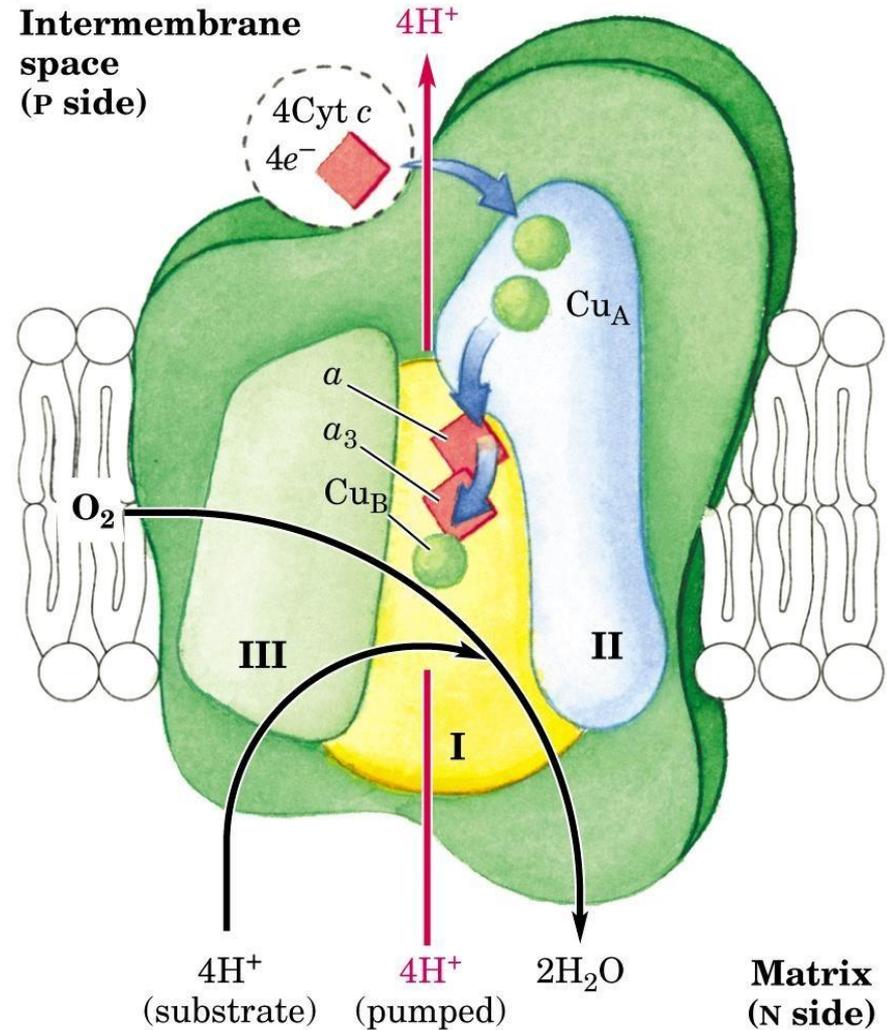
- un citocromo a
- un citocromo a_3
- un atomo di rame Cu_B
- Un atomo di rame Cu_A

I due ioni rame sono legati a due atomi di zolfo di due residui di cisteina

E' un complesso di grandi dimensioni e le tre proteine importanti per il trasferimento elettronico sono la I, la II e la III. Gli elettroni sono trasferiti dal citocromo c all' O_2 che così viene ridotto. Gli elettroni passano attraverso il centro Cu_A , il gruppo eme a e quindi il centro costituito da eme a_3 e Cu_B . Sono necessari 4 elettroni per ridurre correttamente una molecola di O_2 .

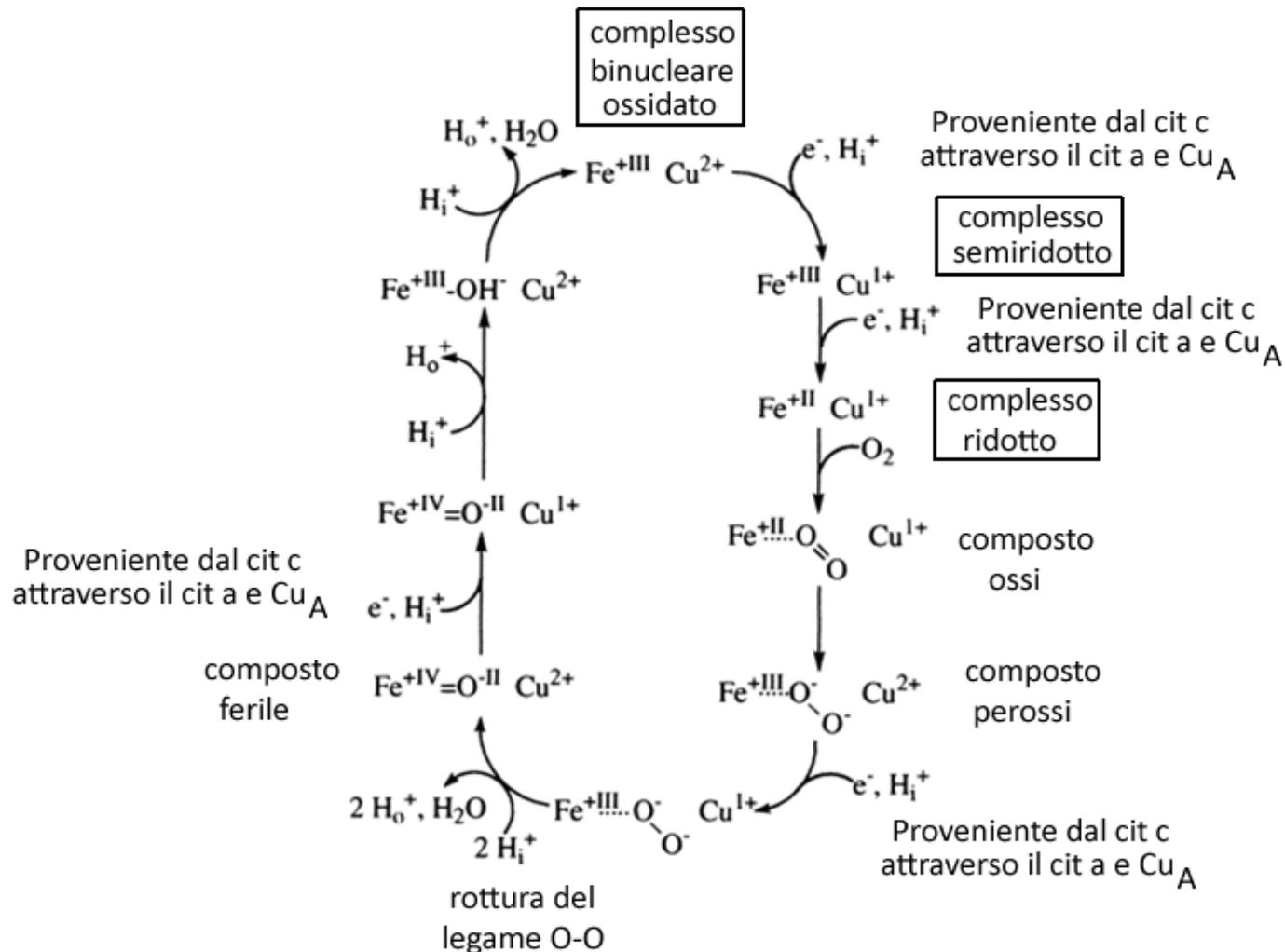


I protoni necessari per formare H_2O vengono prelevati dalla matrice. Il flusso degli elettroni attraverso il complesso determina anche lo spostamento di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana (terza pompa protonica). In totale vengono espulsi $2H^+$ per ogni coppia di e-



Riduzione dell'ossigeno

La riduzione dell'O₂ è effettuata dal complesso cyt a₃-Cu_B (complesso binucleare) attraverso trasferimento, per 4 volte consecutive, di un elettrone proveniente dal citocromo c



In questo processo vengono consumati 4 protoni provenienti dalla matrice per essere trasformati in due molecole di H₂O. In più altri 4 protoni vengono pompati fuori dalla matrice

La fosforilazione ossidativa

L'**accoppiamento energetico** consiste nel fatto che l'energia libera rilasciata dal passaggio degli elettroni attraverso i vari complessi deve essere conservata e resa utilizzabile per la sintesi di ATP

Diverse ipotesi sono state formulate in passato su come si realizza l'accoppiamento energetico:

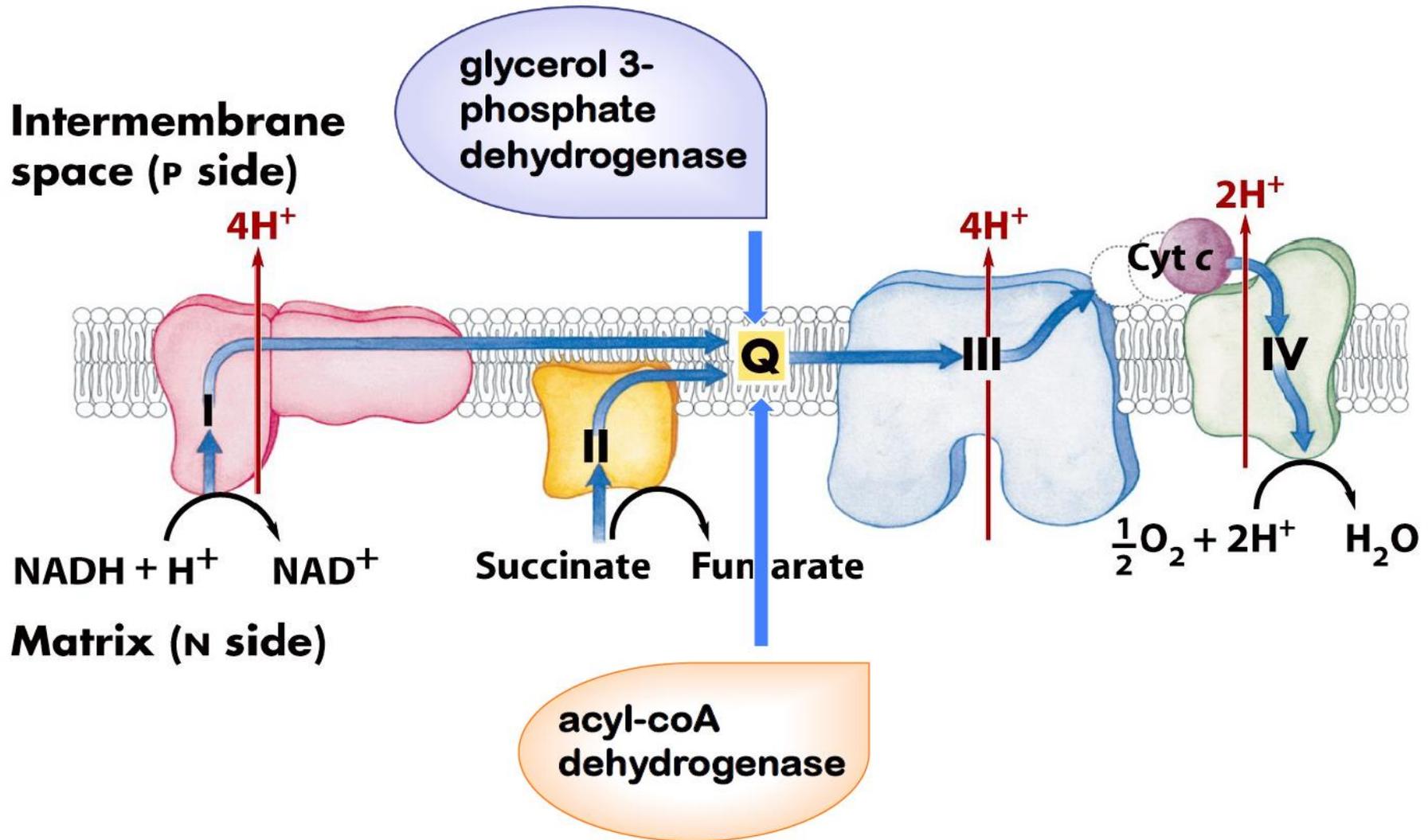
Un **intermedio** ad alta energia

Uno **stato conformazionale** da alta energia

Il **modello chemiosmotico** formulato inizialmente da Peter Mitchell

La catena respiratoria

flusso di elettroni e protoni



Flusso di elettroni e protoni attraverso i quattro complessi della catena respiratoria

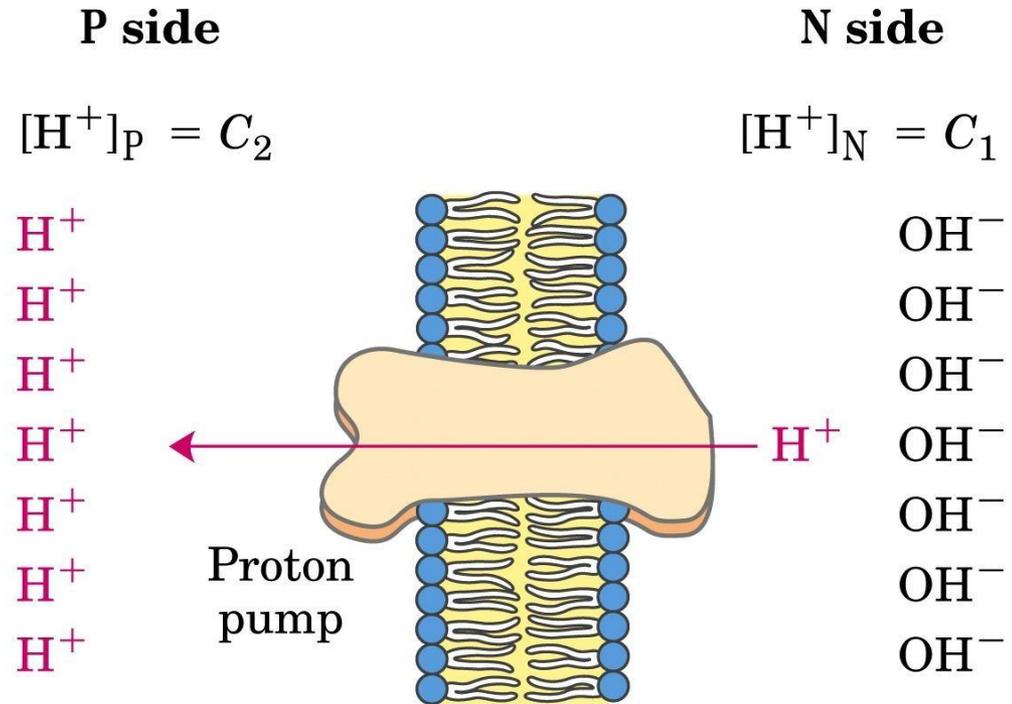
Gradiente protonico

La membrana mitocondriale interna separa due compartimenti a diversa concentrazione di H^+ .

Questo comporta differenze

- nella concentrazione di H^+ (ΔpH)
- nella distribuzione delle cariche ($\Delta\Psi$)

che generano la forza motrice protonica (ΔG)

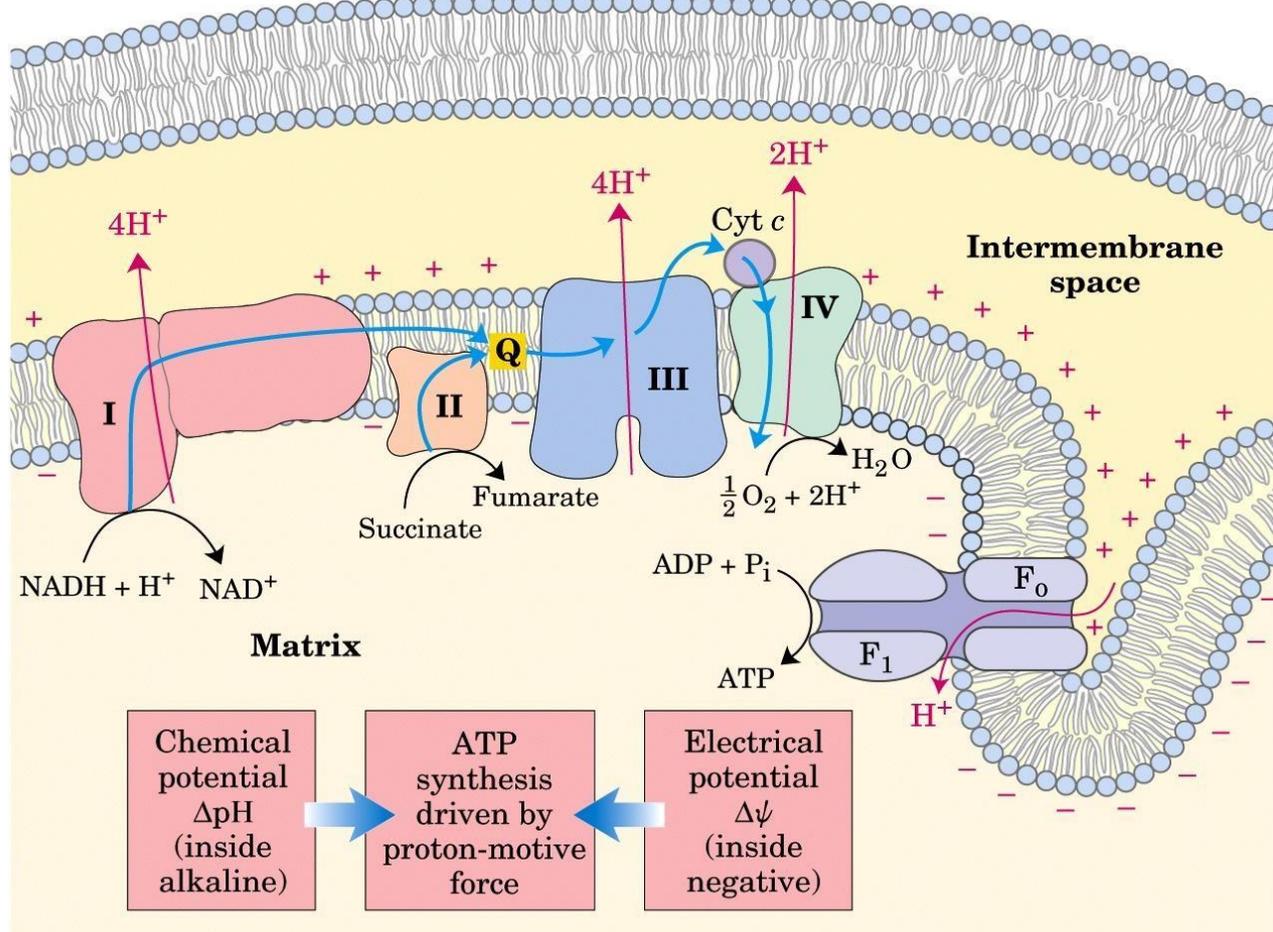


$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi$$

$$= 2.3RT \Delta pH + F\Delta\psi$$

La sintesi di ATP

Il modello chemiosmotico



Gli elettroni passano attraverso una catena di trasportatori disposti in maniera asimmetrica nella membrana interna. Il flusso degli elettroni è accompagnato dalla traslocazione di protoni attraverso la membrana che produce un gradiente chimico ed elettrico.

La membrana mitocondriale interna è impermeabile ai protoni, che per rientrare devono attraversare dei canali proteici specifici (complesso F₀).

La forza motrice protonica che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia per la sintesi di ATP, catalizzata dal complesso F₁ associato ad F₀ (ATP sintasi).

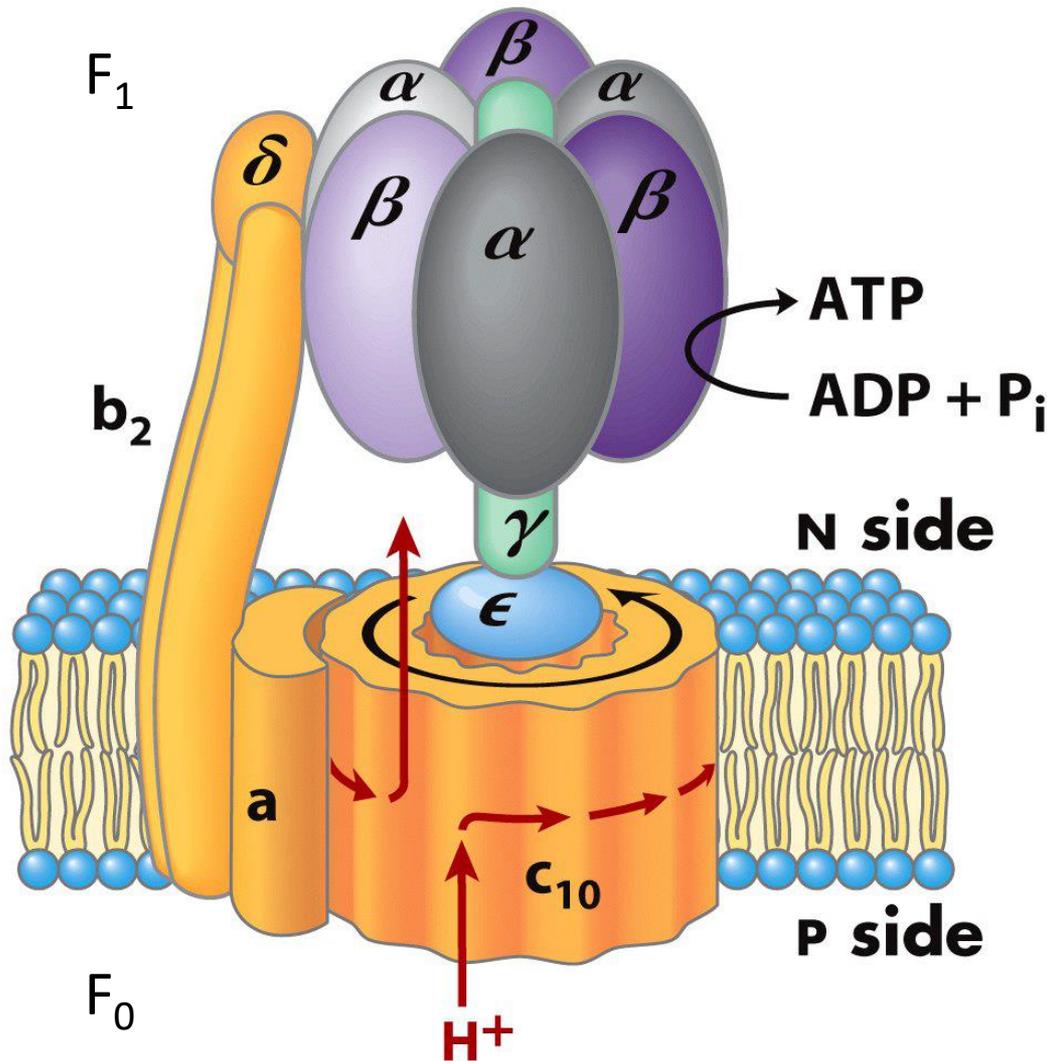
Il modello chemiosmotico

Secondo il modello chemiosmotico, l'energia libera generata dal trasporto di elettroni viene conservata sotto forma di un gradiente elettrochimico di ioni H^+ , che si crea a cavallo della membrana mitocondriale interna a seguito della traslocazione dei protoni associata al flusso di elettroni.

Il modello chemiosmotico spiega alcune osservazioni:

1. Perché si abbia la sintesi di ATP la membrana mitocondriale deve essere intatta
2. La membrana mitocondriale è impermeabile agli H^+
3. Attraverso la membrana si crea un gradiente elettrochimico misurabile
4. I disaccoppianti (agenti che distruggono il gradiente di pH come alcuni ionofori) inibiscono la fosforilazione ossidativa ma non il trasporto di elettroni

Il complesso della ATP sintasi

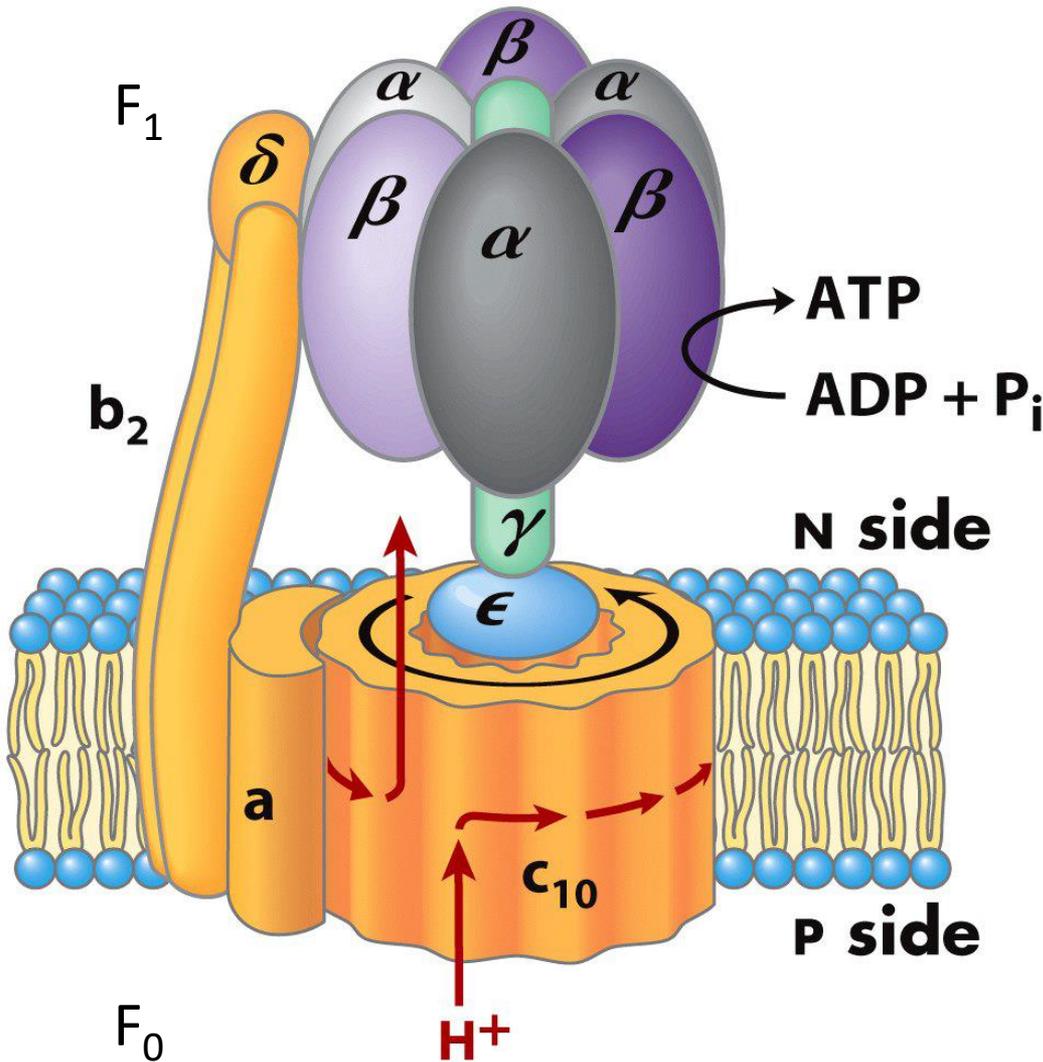


È una proteina di membrana costituita da due complessi funzionali:

F₁ - proteina periferica di membrana costituita da 5 tipi di subunità ($\alpha\beta_3\gamma\delta\epsilon$) che possiede attività ATPasica. Ciascuna subunità β ha un sito catalitico per la sintesi di ATP. La subunità γ possiede un dominio che costituisce l'asse centrale del complesso e un dominio che si associa a una delle subunità β .

F₀ - canale protonico costituito da diverse subunità (ab_2c_{10-12}). Le due subunità b si fissano alle subunità α e β del complesso F₁ mantenendolo legato alla membrana.

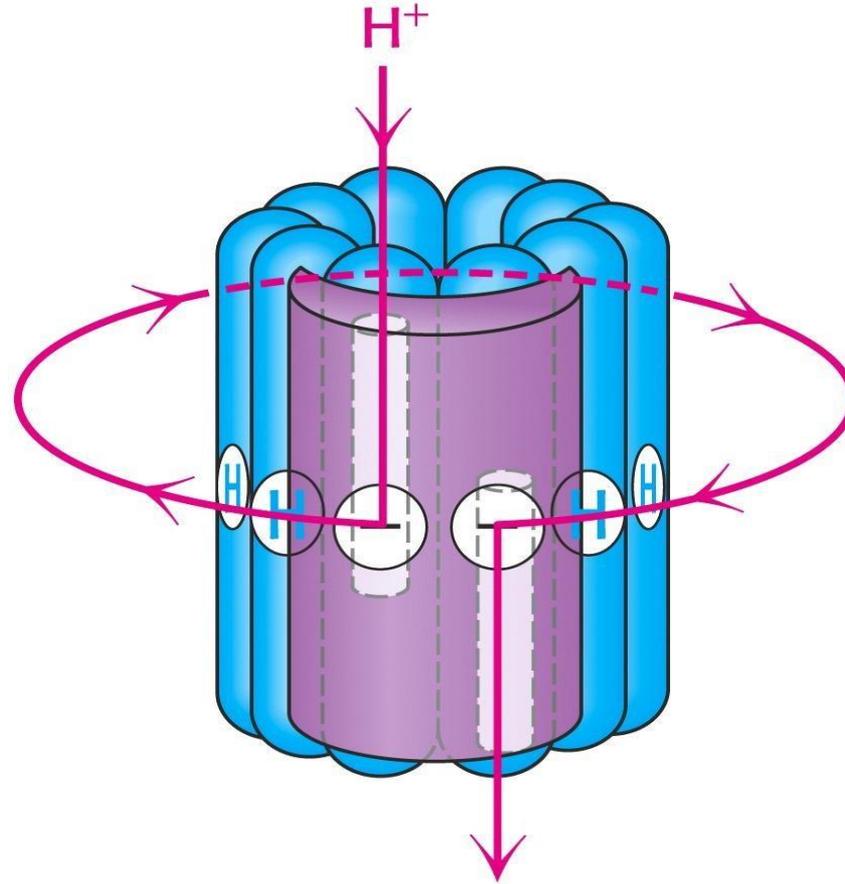
Il complesso della ATP sintasi



Il cilindro delle subunità c è immerso nel doppio strato lipidico e interagisce con F_1 grazie alle subunità γ e ϵ di questa ultima (si parla anche di gamba e piede, rispettivamente, di F_1).

Quando i protoni passano secondo gradiente di concentrazione favorevole dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale attraverso F_0 , il cilindro e l'asse ruotano e le subunità β di F_1 cambiano di conformazione. In tal modo la subunità γ si associa a turno a ciascuna delle subunità β .

Meccanismo di azione di ATP sintasi: modello della catalisi rotazionale

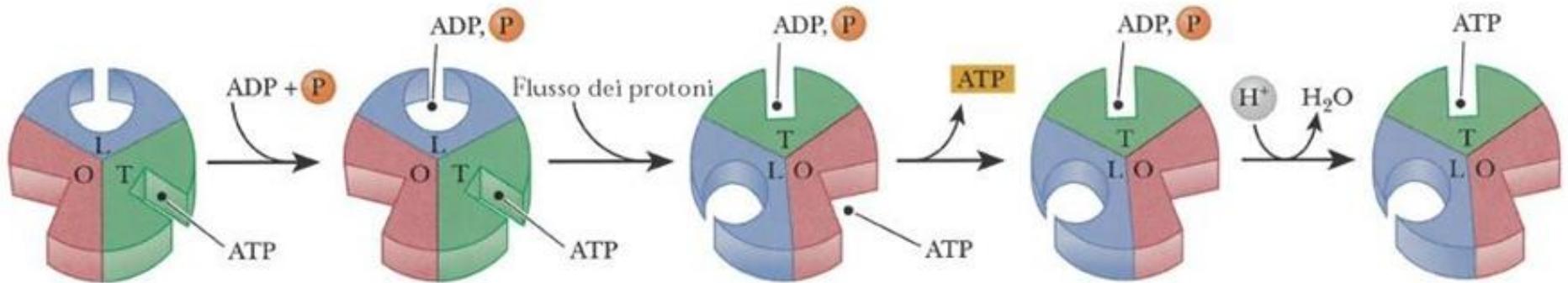


Il flusso di protoni attraverso il complesso F_0 porta alla rotazione delle subunità c che trasmettono questa rotazione alla subunità γ centrale del complesso F_1

Sintesi di ATP

Avviene in 3 passaggi:

1. Traslocazione dei protoni (F_0)
2. Formazione del legame fosfoanidridico (F_1)
3. Accoppiamento della dissipazione del gradiente protonico con la sintesi di ATP (F_0+F_1): la subunità γ ruota rispetto al complesso $\alpha_3\beta_3$, inducendo modificazioni conformazionali a livello dei siti catalitici della subunità β

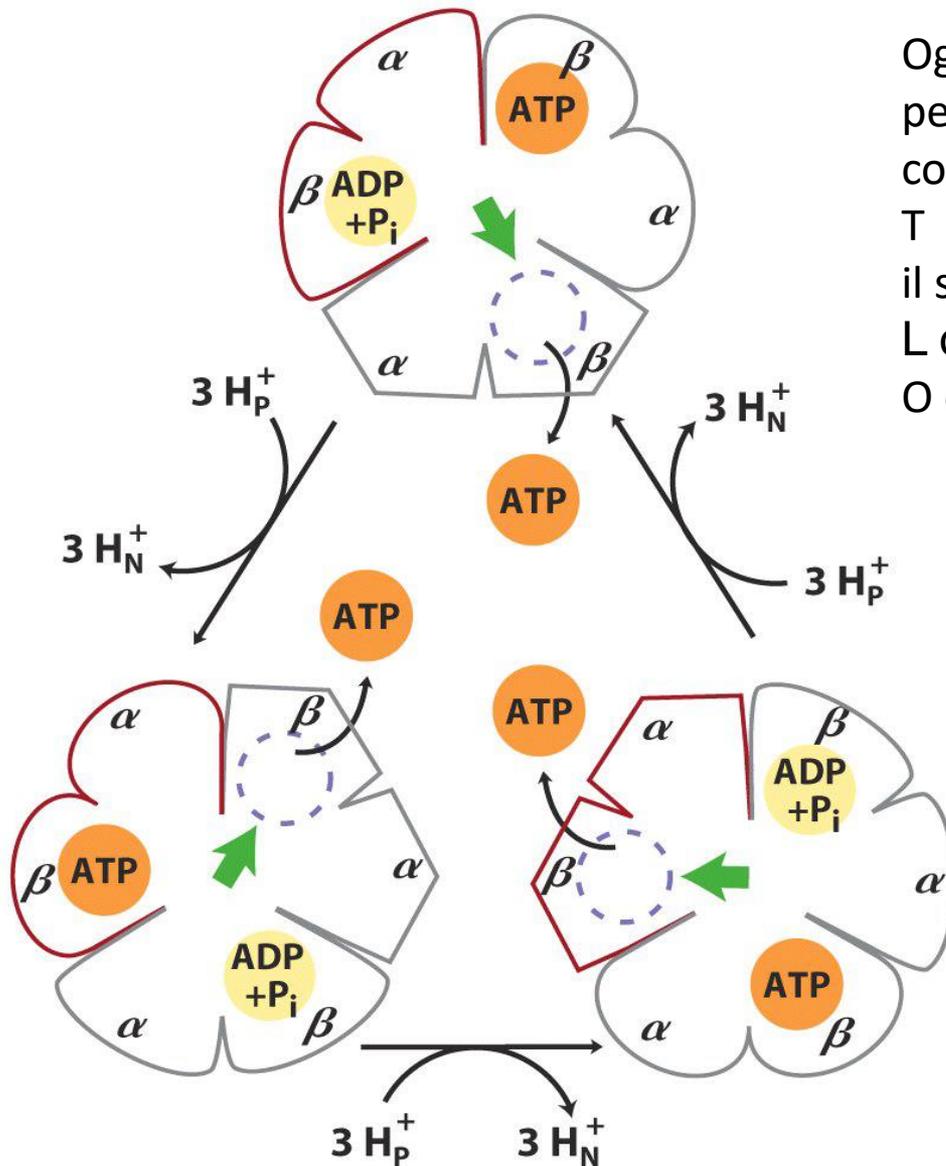


Secondo il meccanismo del cambiamento di legame, i 3 protomeri ($\alpha\beta$) catalitici di F_1 possono trovarsi in 3 stati conformazionali diversi:

1. Stato L in cui substrati e prodotti si legano debolmente
2. Stato T in cui si legano saldamente (avviene la formazione di ATP)
3. Stato O in cui non si legano

Ad ogni momento, uno di questi si trova nella conformazione T, un altro nello stato L e un terzo che si trova nella conformazione O.

Sintesi di ATP



Ogni coppia $\alpha\beta$ possiede un sito di legame per ATP che può oscillare fra tre diverse conformazioni:

T o β -ATP (lega saldamente ATP)

il secondo si trova nella conformazione

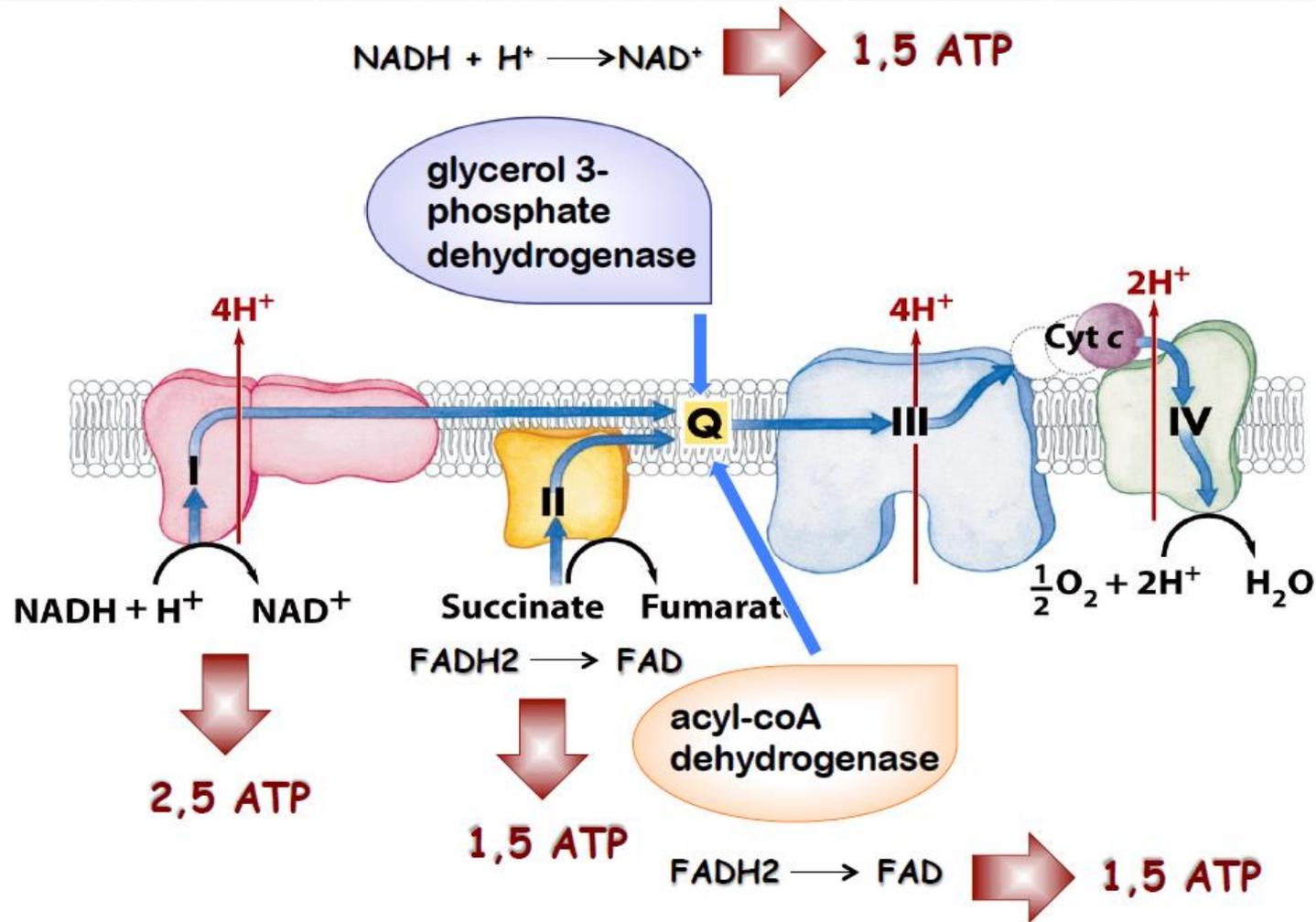
L o β -ADP (lega debolmente ATP)

O o β -vuota (lega molto debolmente ATP)

La forza motrice provoca la rotazione della subunità γ centrale che entra in contatto in successione con ciascuna coppia $\alpha\beta$. La conformazione di legame con γ è β -vuota.

Ciò produce una modificazione conformazionale cooperativa nelle tre subunità che consente il legame alternativo ad ADP + P_i , ATP, o rilascio di ATP

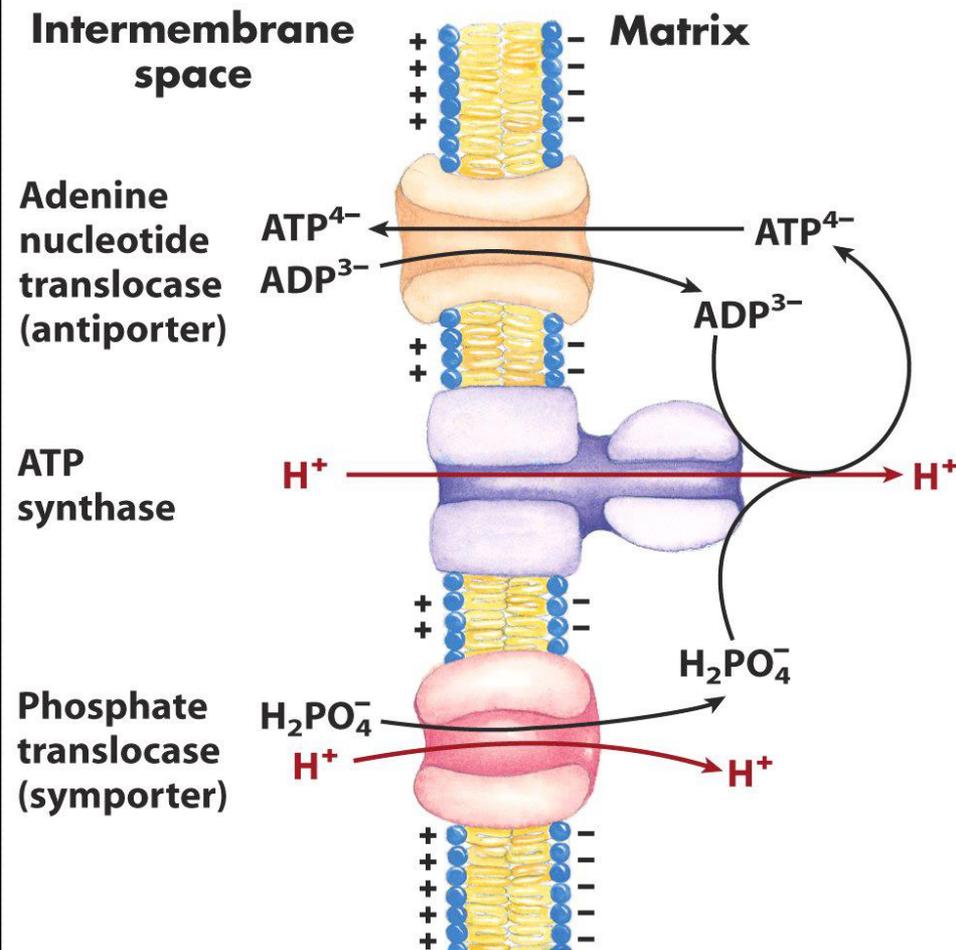
Sintesi di ATP



Resa approssimativa di ATP associata al trasporto nella catena degli elettroni provenienti dai diversi coenzimi di trasporto (NADH , FADH_2)

Il gradiente protonico consente il trasporto attivo

La funzione principale del trasferimento degli e- nei mitocondri è quella di fornire energia per la sintesi di ATP. L'energia associata al gradiente protonico può però anche servire a favorire dei sistemi di trasporto essenziali per la fosforilazione ossidativa.



La membrana mitocondriale interna è praticamente impermeabile alla maggior parte delle molecole cariche.

Quindi sono necessari dei trasportatori specifici per entrare o uscire dal mitocondrio

In particolare sono presenti due sistemi di trasporto che portano ADP e Pi nella matrice e consentono all'ATP sintetizzato di uscire nel citosol:

Adenina nucleotide traslocasi (antiporto)

Fosfato traslocasi (simporto)

Entrambi usano il gradiente protonico (ΔpH) o di carica ($\Delta\Psi$)

Controllo della respirazione cellulare

La via che porta dal NADH al cyt c funziona in condizioni di equilibrio mentre la reazione catalizzata dalla citocromo c ossidasi è irreversibile ed è un punto di controllo. La disponibilità di citocromo c ridotto controlla l'attività della citocromo c ossidasi.

La velocità della respirazione mitocondriale è limitata dalla disponibilità di ADP quale substrato per la fosforilazione (accettore del gruppo fosforico).

La dipendenza della velocità di consumo di ossigeno dalla concentrazione di ADP è detta controllo dell'accettore della respirazione e indica l'accoppiamento dell'ossidazione con la fosforilazione.

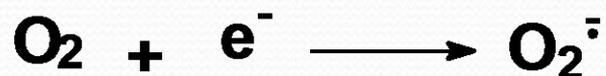
Lo stato energetico della cellula dipende dalla concentrazione intracellulare di ADP in rapporto con quella di ATP:

$$[ATP]/[ADP][P_i]$$

In condizioni ottimali tale rapporto è molto elevato e quindi il sistema ATP-ADP è quasi completamente fosforilato. Quando è richiesta energia si ha un incremento della demolizione di ATP ed una diminuzione del rapporto. L'aumento dei livelli di ADP disponibile per la fosforilazione ossidativa determina l'aumento della respirazione e la rigenerazione di ATP.

Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La riduzione incompleta della molecola di ossigeno porta alla formazione di specie radicaliche (O_2^- e H_2O_2). Queste specie possono provocare danni a tutte le macromolecole biologiche.



anione superossido



**perossido
di idrogeno**



Per questo motivo all'interno del mitocondrio sono presenti degli enzimi in grado di eliminare i ROS. Sono reazioni di dismutazione (la stessa specie molecolare viene ossidata e ridotta, senza la necessità di altri reagenti o energia).

Interferenti della fosforilazione ossidativa

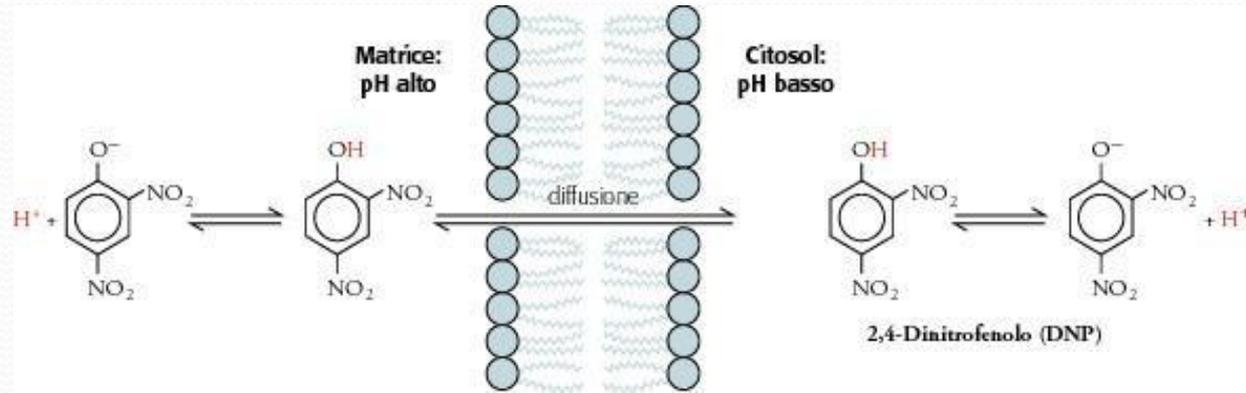
Some Agents That Interfere with Oxidative Phosphorylation or Photophosphorylation

| Type of interference | Compound* | Target/mode of action |
|---------------------------------|--|---|
| Inhibition of electron transfer | Cyanide | Inhibit cytochrome oxidase |
| | Carbon monoxide | |
| | Antimycin A | Blocks electron transfer from cytochrome <i>b</i> to cytochrome <i>c</i> ₁ |
| | Myxothiazol | |
| | Rotenone | Prevent electron transfer from Fe-S center to ubiquinone |
| | Amytal | |
| | Piericidin A | |
| Inhibition of ATP synthase | DCMU | Competes with Q _B for binding site in PSII |
| | Aurovertin | Inhibits F ₁ |
| | Oligomycin | Inhibit F _o and CF _o |
| | Venturicidin | |
| | Uncoupling of phosphorylation from electron transfer | DCCD |
| FCCP | | Hydrophobic proton carriers |
| DNP | | |
| Valinomycin | | K ⁺ ionophore |
| Thermogenin | | Forms proton-conducting pores in inner membrane of brown fat mitochondria |
| Inhibition of ATP-ADP exchange | Atractyloside | Inhibits adenine nucleotide translocase |

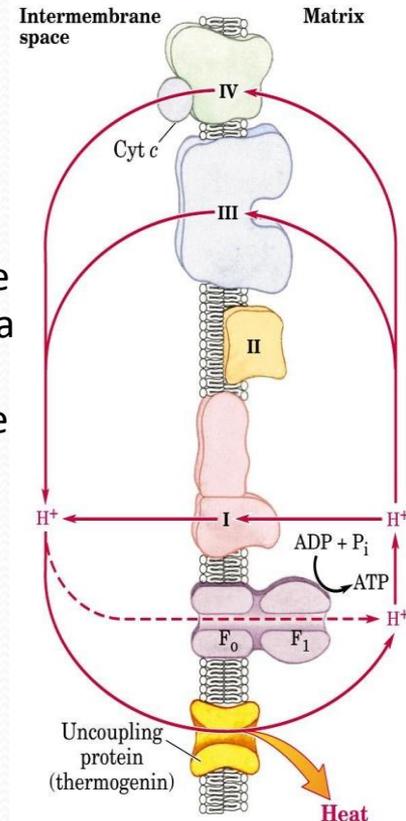
*DCMU is 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; FCCP, cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; DNP, 2,4-dinitrophenol.

Disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa

I disaccoppianti (DNP, FCCP) sono molecole lipofile che aumentano la permeabilità della membrana mitocondriale interna ai protoni.

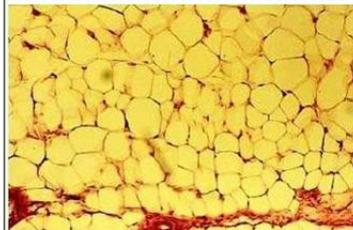


La dissipazione del gradiente elettrochimico disaccoppiato dalla sintesi di ATP produce calore (esempio grasso bruno)

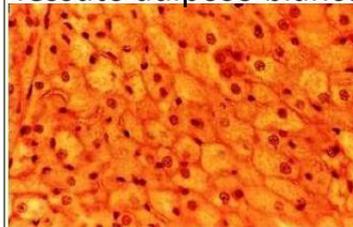


Il tessuto adiposo bruno ricco in mitocondri produce la termogenina, una proteina disaccoppiante, che consente di trasformare in calore, invece che ATP, l'energia prodotta dalla degradazione degli acidi grassi

Tessuto adiposo



Tessuto adiposo bianco



Tessuto adiposo bruno

TESSUTO ADIPOSITO BIANCO

- Bianco-giallognolo (*carotenoidi*).
- Cellule grandi.
- Adipociti **uniloculari**.
- **Organuli periferia cellulare.**
- Membrana basale.
- Suddivisione in lobi
- **Innervazione:** gli assoni entrano in contatto solo con i vasi sanguigni.
- **Sede:** sottocutanea e viscerale (omento, mesentieri, regione retroperitoneale)
- **Funzione:** 1) **essenzialmente di riserva energetica**, 2) mantenimento T corporea, 3) protezione traumi, 4) **endocrina**

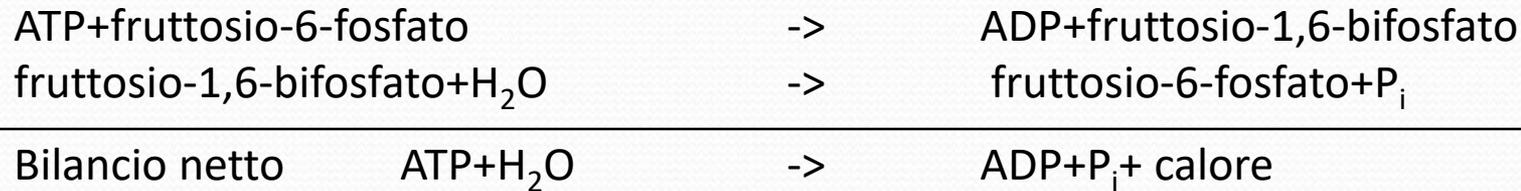
TESSUTO ADIPOSITO BRUNO

- Rosso-bruno (*ricca vascol. e citocromi*).
- Cellule più piccole.
- Adipociti **multiloculari**.
- **Organuli non periferici, abbondanti mitocondri.**
- Membrana basale.
- Suddivisione in lobi
- **Innervazione:** gli assoni entrano spesso in contatto con gli adipociti
- **Sede:** nuca, ascelle, regione interscapolare, periferica e periinguinale.
- **Funzione:** produzione di calore.

Cicli futili

Nella cellula sono possibili cicli futili, ovvero reazioni che portano alla idrolisi di ATP senza un utilizzo netto dell'energia associata a questa idrolisi

Un esempio di ciclo futile è rappresentato dalle reazioni catalizzate dalla fosfo-fruttochinasi e dalla fruttosio 1,6 bisfosfato fosfatasi, impiegate rispettivamente nella glicolitica e nella gluconeogenesi.



Se non venissero opportunamente regolate le due reazioni potrebbero portare all'idrolisi netta di ATP e la conseguente dissipazione dell'energia liberata sotto forma di calore (ciclo futile). Queste reazioni cicliche possono permettere alla cellula di mantenere le condizioni di omotermia attraverso la generazione di calore associato alla idrolisi di ATP.

In condizioni normali, i cicli futili non sono operanti, ma in certi casi possono diventare importanti per produrre calore. Ad esempio il futile sopra descritto serve ai bombi durante la stagione fredda per mantenere la temperatura delle ali a 30°C dato che non possono volare se la temperatura alare non raggiunge i 30°C.

Sistemi di trasporto mitocondriale

La membrana mitocondriale interna è permeabile solo a O_2 , CO_2 e H_2O . Per tutte le altre molecole che devono attraversare la membrana mitocondriale interna esistono specifici trasportatori che possono utilizzare il gradiente protonico generato attraverso la catena di trasporto degli elettroni oppure altri sistemi di traslocazione (di tipo simporto che antiporto)

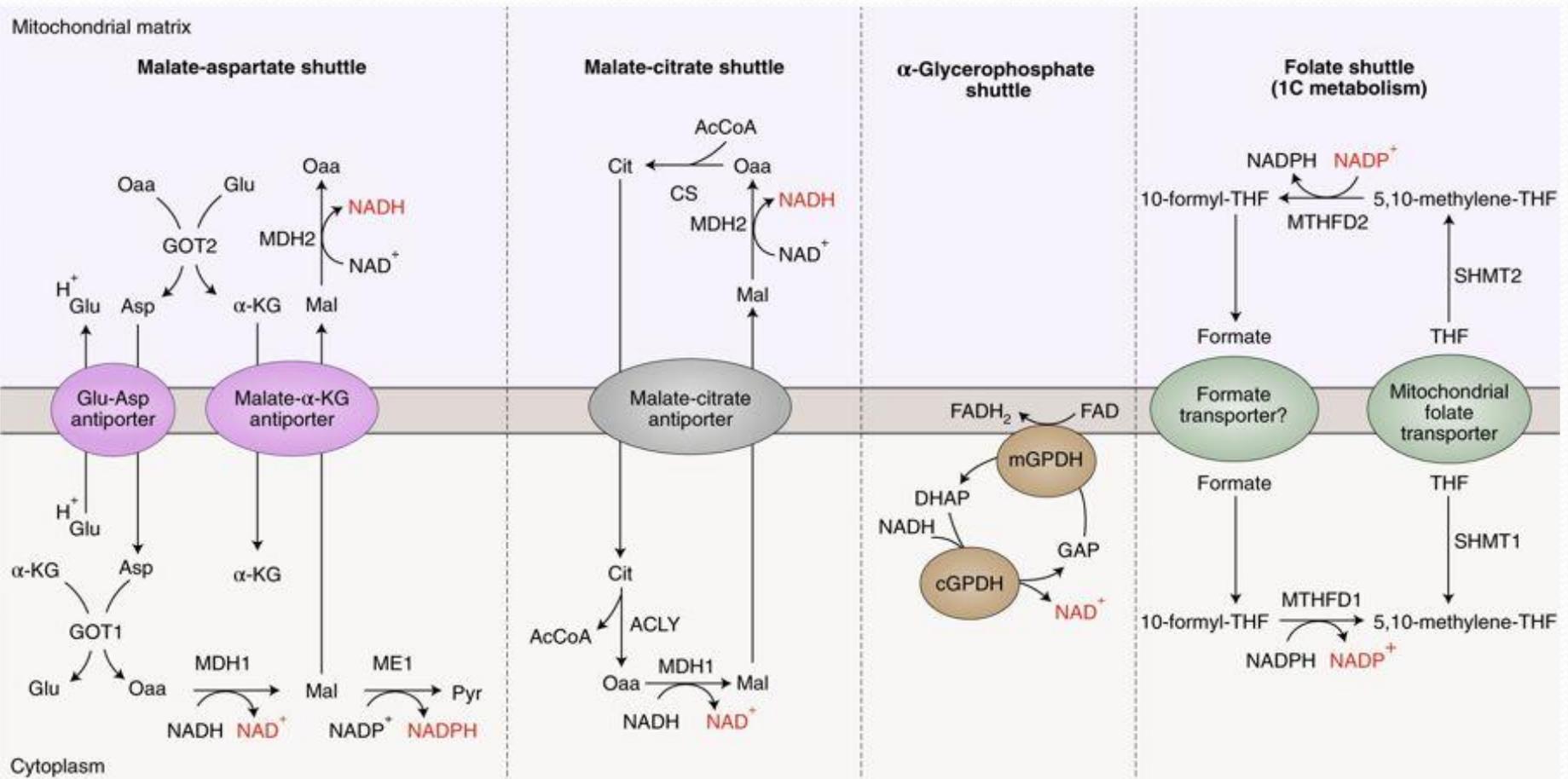
Esistono proteine di trasporto per ATP, ADP, piruvato, Ca^{++} e fosfato che utilizzano il gradiente protonico o il potenziale di membrana

- Il **traslocatore ADP-ATP** trasporta ATP fuori dalla matrice con un trasporto elettrogenico, guidato dal gradiente protonico.
- Il **piruvato** viene trasportato nella matrice con un sistema di simporto H^+ /piruvato
- Il **P_i** viene trasportato nella matrice con un sistema di simporto H^+ / P_i
- Il **Ca^{++}** esce dalla matrice solo in scambio con gli ioni Na^+ ed entra grazie al potenziale di membrana. I mitocondri agiscono da tamponi per gli ioni Ca^{++}

Esistono poi sistemi navetta (o shuttle) per lo scambio di metaboliti

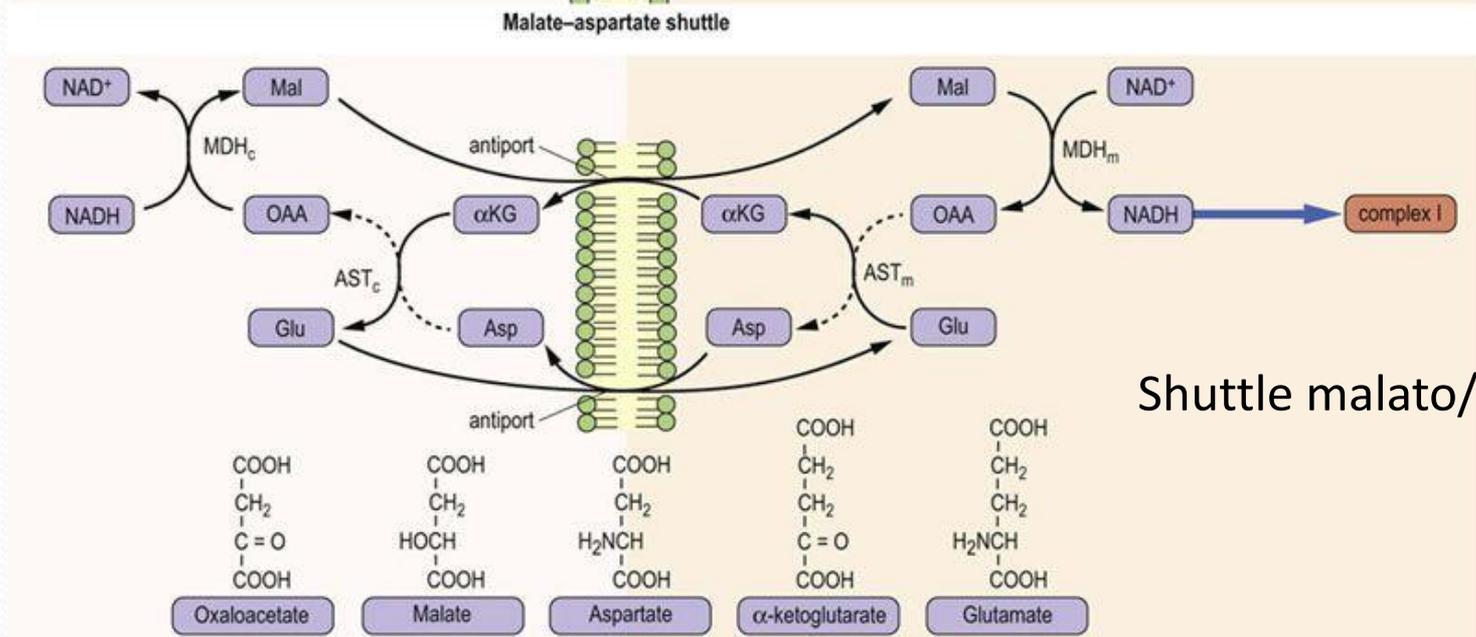
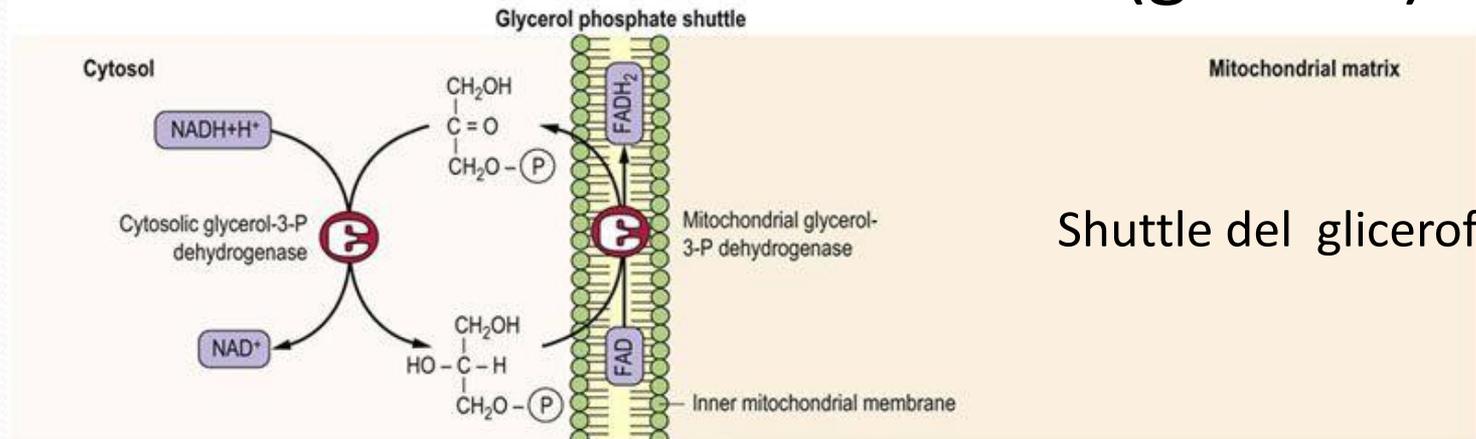
As esempio il **NAD^+ / $NADH$** viene trasportato indirettamente attraverso due sistemi navetta: quello del **malato/aspartato** e quello del **glicerofosfato**

Principali shuttle mitocondriali



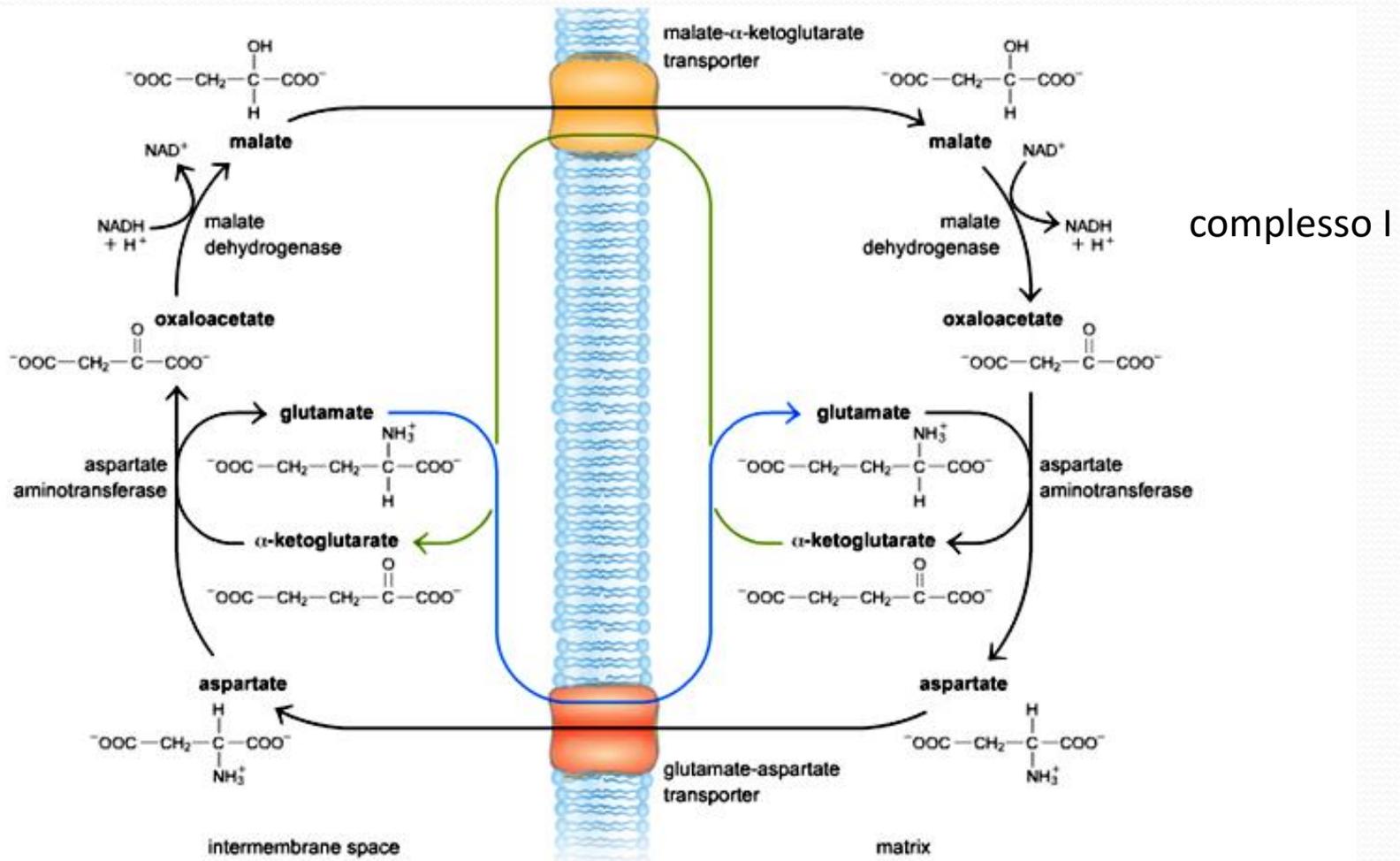
Sistemi di trasporto che consentono lo scambio di metaboliti tra l'interno del mitocondrio (matrice mitocondriale) e lo spazio intermembrana (in contatto con il citoplasma)

Ossidazione del NADH citosolico (glicolisi)



Il NADH generato durante la glicolisi (citosolico) deve entrare nel mitocondrio per essere ossidato e trasferire i suoi elettroni al complesso I. Esistono due sistemi navetta (shuttle) per consentire l'ingresso del NADH nel mitocondrio

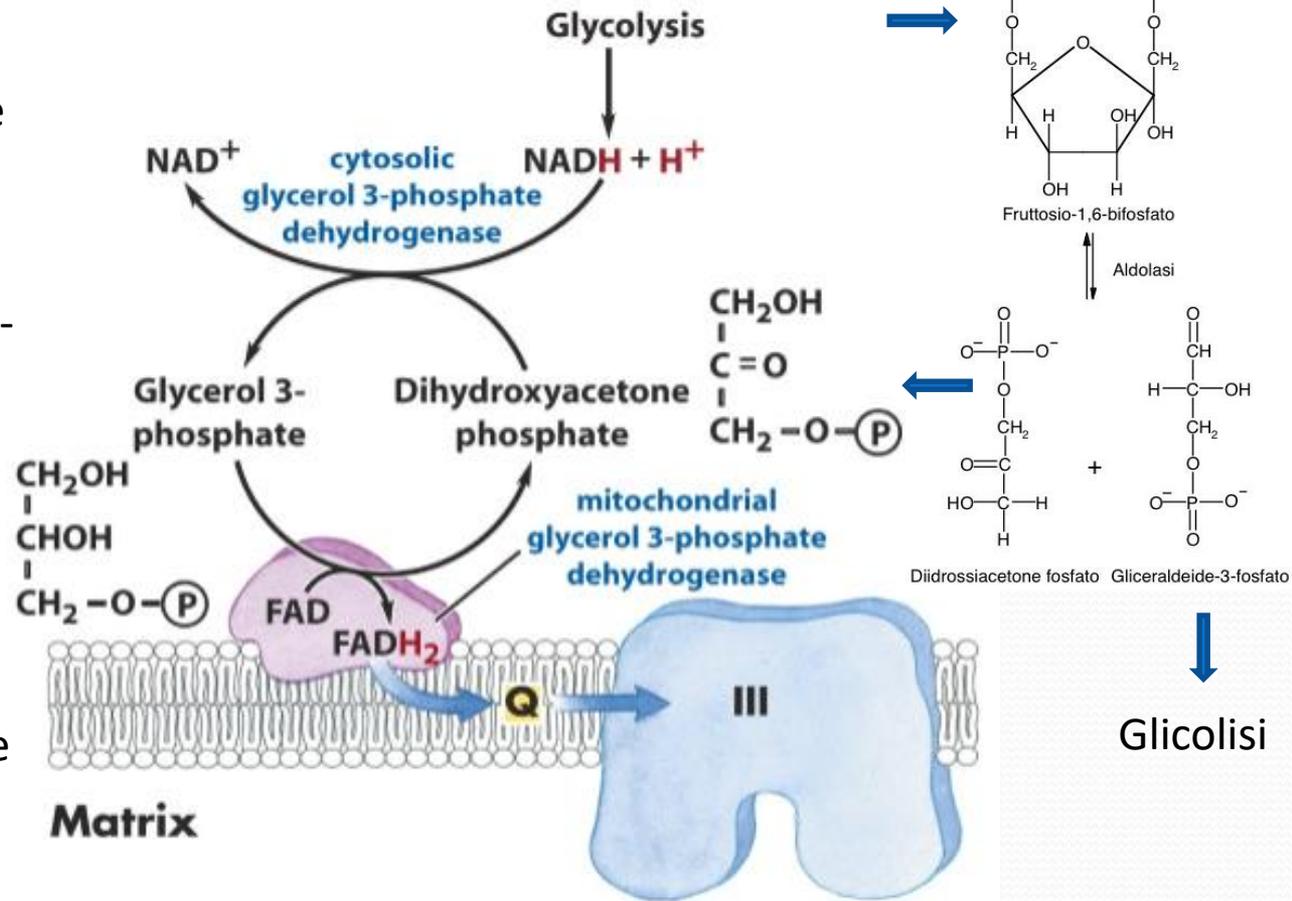
Shuttle malato/aspartato



Il sistema comprende due trasportatori antiporto, uno specifico per due acidi dicarbossilici (malato/ α -chetoglutarato) e l'altro per due aminoacidi (aspartato/glutamato). Il sistema consente di indirizzare gli elettroni del NADH citosolico al complesso I della catena (ottenendo così il rendimento massimo)

Shuttle del glicerofosfato

Il diidrossiacetone fosfato che proviene dalla via glicolitica viene utilizzato come trasportatore di elettroni tramite riduzione a glicerolo 3-fosfato catalizzata dalla glicerolo-3-fosfato deidrogenasi citosolica. Il glicerolo 3-fosfato viene poi riossidato a diidrossiacetone fosfato dalla glicerolo-3-fosfato deidrogenasi presente sulla membrana mitocondriale e gli elettroni trasferiti al coenzima Q.



Il sistema è attivo solo nel muscolo scheletrico e nel cervello che richiedono una immediata riossidazione degli equivalenti di NADH citosolico. Gli elettroni vengono però trasferiti al complesso III tramite l'ubichinone. Questo sistema sebbene più veloce comporta una resa energetica inferiore a quella dello shuttle malato/aspartato che invece consente il trasferimento degli equivalenti di elettroni direttamente al complesso I.