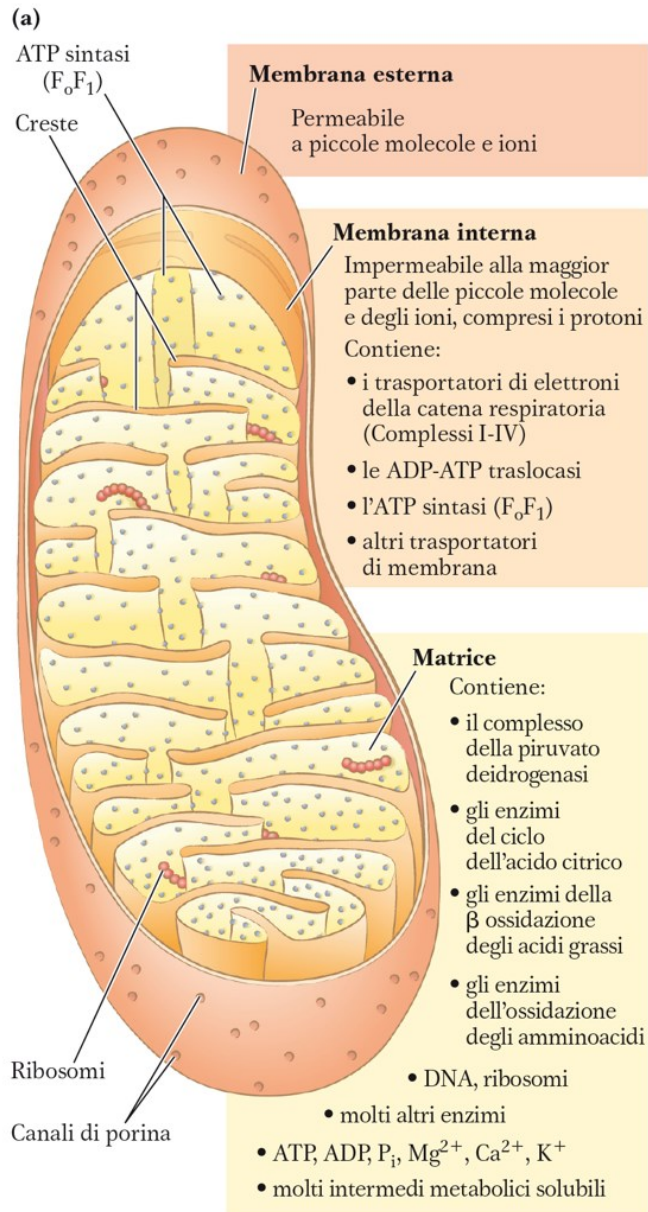


PRODUZIONE DI ENERGIA NEI MITOCONDRI

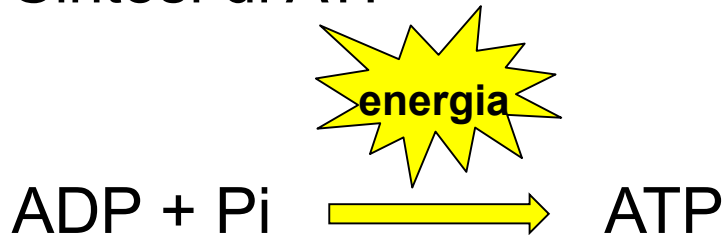


Mitocondri del muscolo cardiaco (più creste)



Mitocondri del fegato

Sintesi di ATP



Energia deriva da reazioni REDOX

Catena di trasporto mitocondriale: reazioni redox,
accettore finale O_2

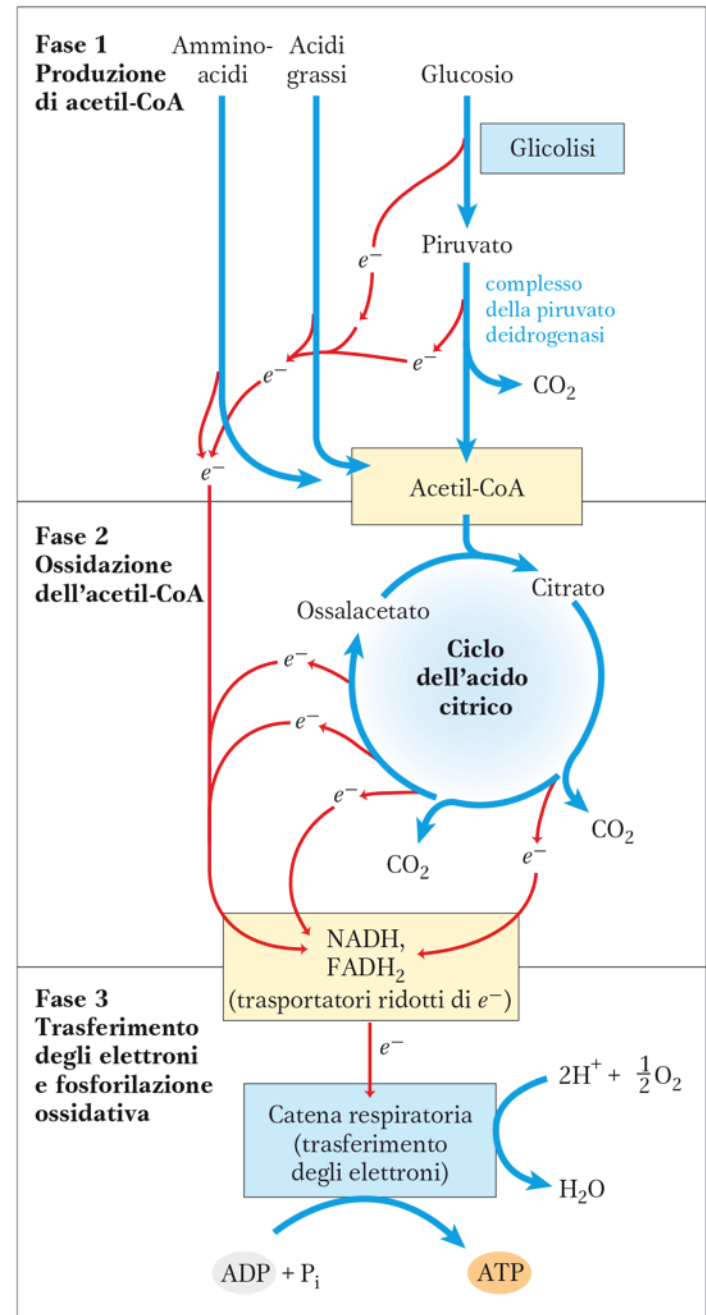
Fosforilazione ossidativa: sintesi di ATP accoppiata alla
catena di trasporto mitocondriale

Respirazione cellulare

comprende tutti i processi molecolari in cui sono coinvolti il consumo di O_2 e la produzione di CO_2 da parte delle cellule.

Scopo: degradare l'acetil-SCoA (intermedio comune del catabolismo) a due CO_2 ; produrre coenzimi ridotti che serviranno per ottenere energia.

I coenzimi ridotti daranno gli elettroni (H) all'ossigeno attraverso la catena di trasporto mitocondriale formando H_2O e **ATP**



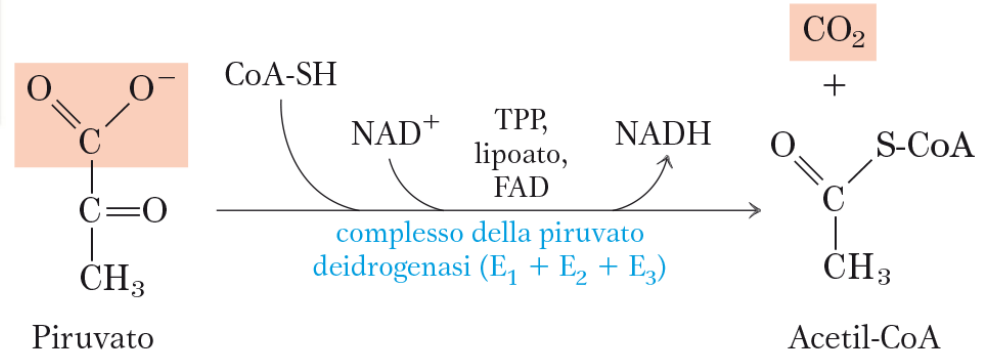
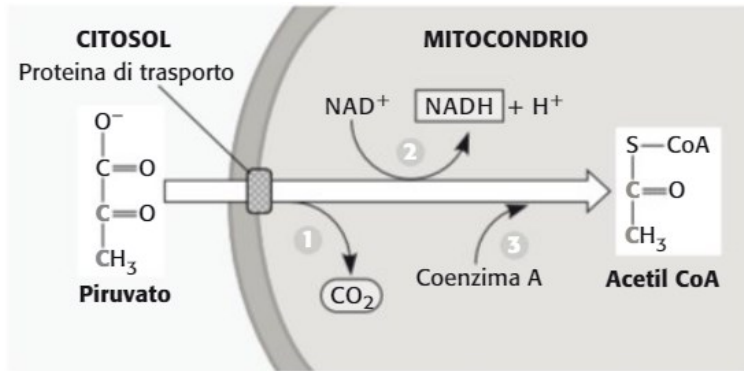
Acetil CoA

prodotto terminale della degradazione di:

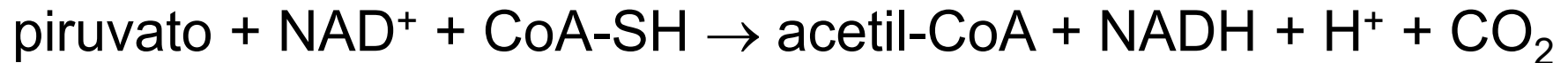
- acidi grassi
- molti amminoacidi
- carboidrati

acido piruvico viene per la maggior parte convertito in acetil CoA nei mitocondri per opera del complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi

COMPLESSO DELLA PIRUVATO DEIDROGENASI



$$\Delta G'^{\circ} = -33,4 \text{ kJ/mole}$$



Reazione irreversibile nella cellula.

Decarbossilazione dell'acido piruvico ad Acetil CoA:
reazione irreversibile nella cellula

possibile trasformare i carboidrati in acetil CoA e quindi in
acidi grassi e lipidi;

impossibile utilizzare acidi grassi per sintetizzare glucosio.

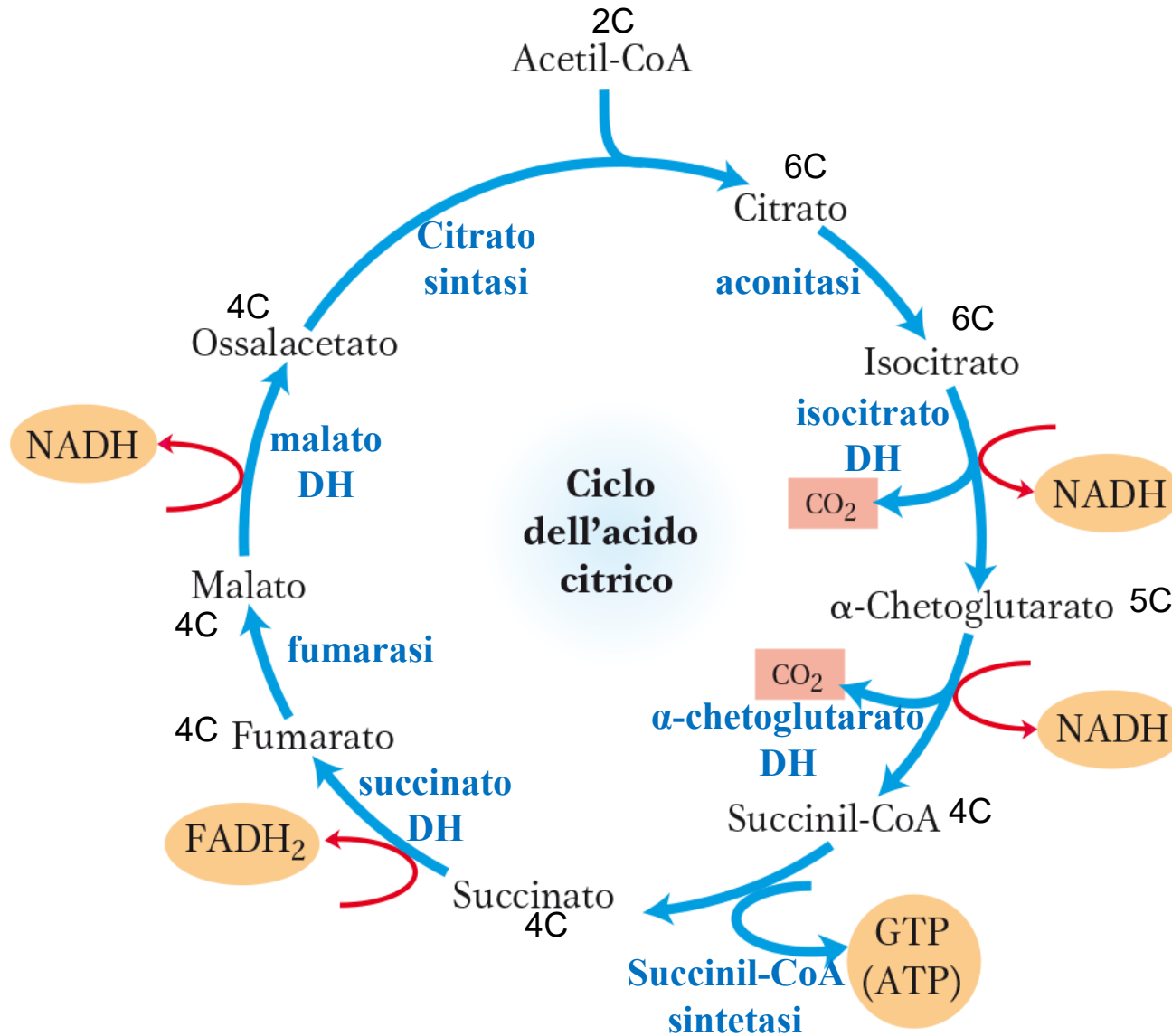
Ruolo chiave degli amminoacidi come precursori dei
carboidrati nei periodi di digiuno per il mantenimento dei
corretti valori di glicemia e l'importanza, in queste
condizioni, della produzione dei corpi chetonici che,
essendo utilizzati dal cervello, permettono un risparmio di
glucosio e quindi di amminoacidi e di proteine

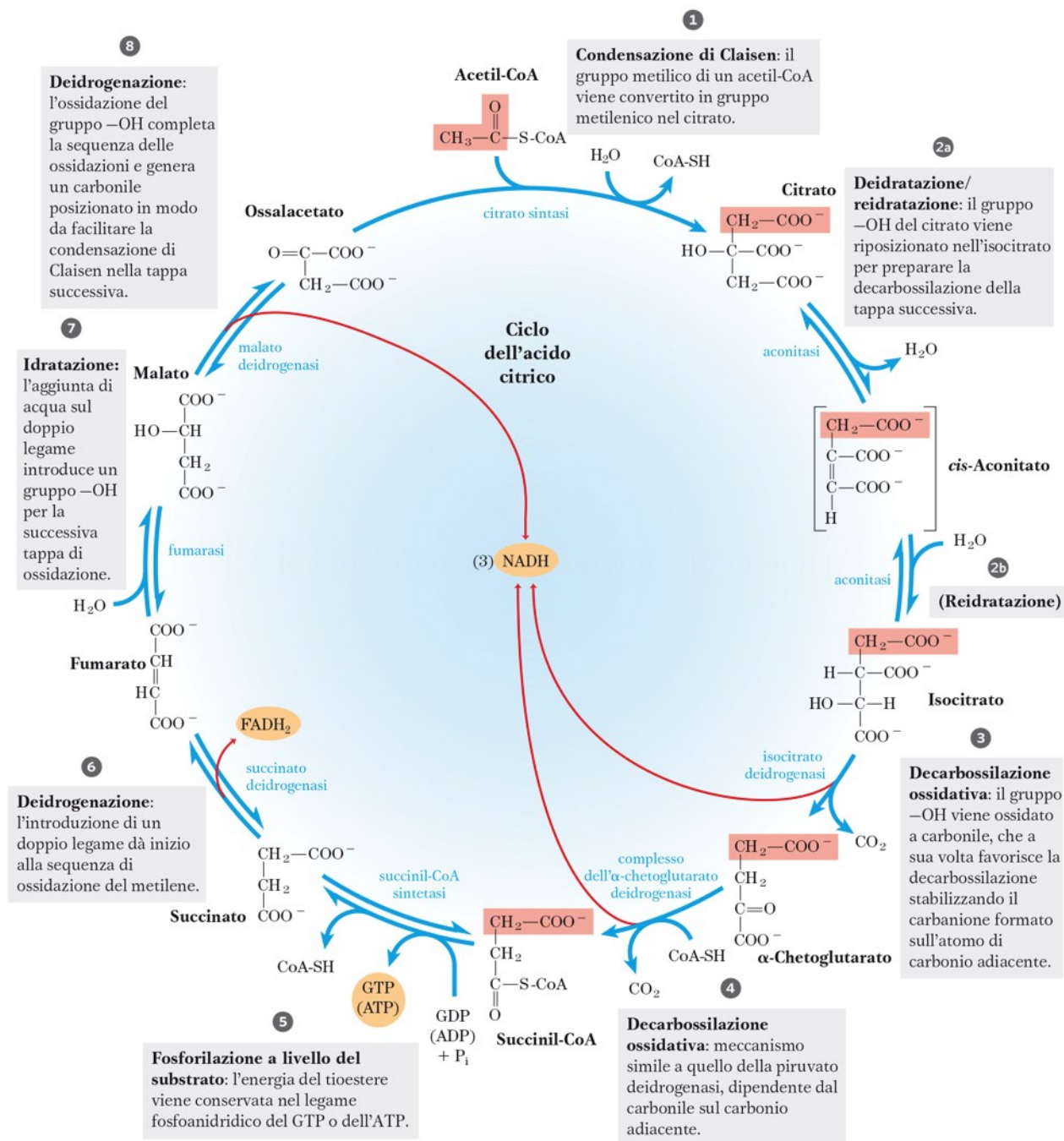
Digiuno

nelle cellule epatiche la decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico non avviene, perché l'acido piruvico disponibile viene utilizzato prevalentemente per la gluconeogenesi.

una proteina chinasi sotto controllo ormonale fosforila il complesso della piruvato deidrogenasi e ne blocca l'attività

IL CICLO DI KREBS





RIASSUNTO

1 $\text{CH}_3\text{CO-SCoA}$ entra nel ciclo

2 atomi di C escono come CO_2

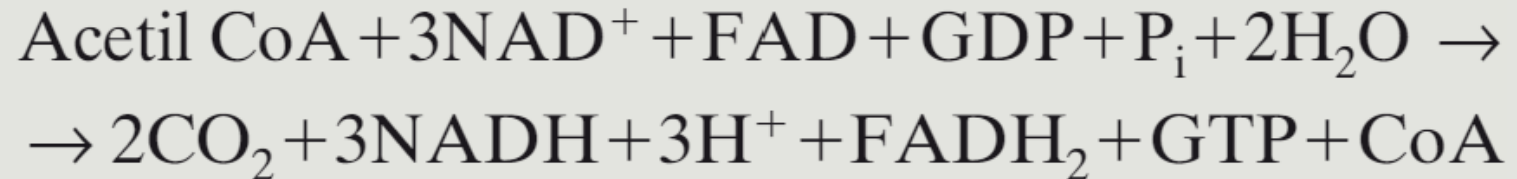
4 paia di H sono rimossi ($3 \text{ NADH} + \text{H}^+$ e 1FADH_2)

prodotti:

- 1 GTP o 1 ATP (dipende dal tipo cellulare)
- flusso di elettroni ricchi di energia che passano alla catena respiratoria fino ad O_2 per formare H_2O
- **O_2 necessario:** accettore finale delle REDOX.

La riossidazione di 1 molecola di $\text{NADH} + \text{H}^+$ fornisce energia sufficiente per la sintesi di 2,5 molecole di ATP, e la riossidazione di 1 molecola di FADH_2 fornisce energia sufficiente per la sintesi di 1,5 molecole di ATP.

Reazione somma del Ciclo di Krebs



Produzione di ATP da una molecola di glucosio

1 glucosio	→ 2 piruvato +	2 NADH	+ 2 ATP	
2 piruvato	→	2 NADH	+ 2 acetil CoA	+ 2 CO ₂
2 acetil CoA	→	6 NADH + 2 FADH ₂	+ 2 GTP(ATP)	+ 4 CO ₂
1 glucosio	→	10 NADH + 2 FADH ₂	+ 4 ATP	+ 6 CO ₂
1 glucosio	→	25 ATP + 3 ATP	+ 4 ATP = 32 ATP	

Ossidazione del glucosio a CO₂ e H₂O

condizioni anaerobie

glucosio $\rightarrow$ 2 lattato + 2H⁺

$\Delta G'^{\circ} = -197.0$ kJ/mol

condizioni aerobie

glucosio + 6O₂ $\rightarrow$ 6CO₂ + 6H₂O

$\Delta G'^{\circ} = -2870$ kJ/mol

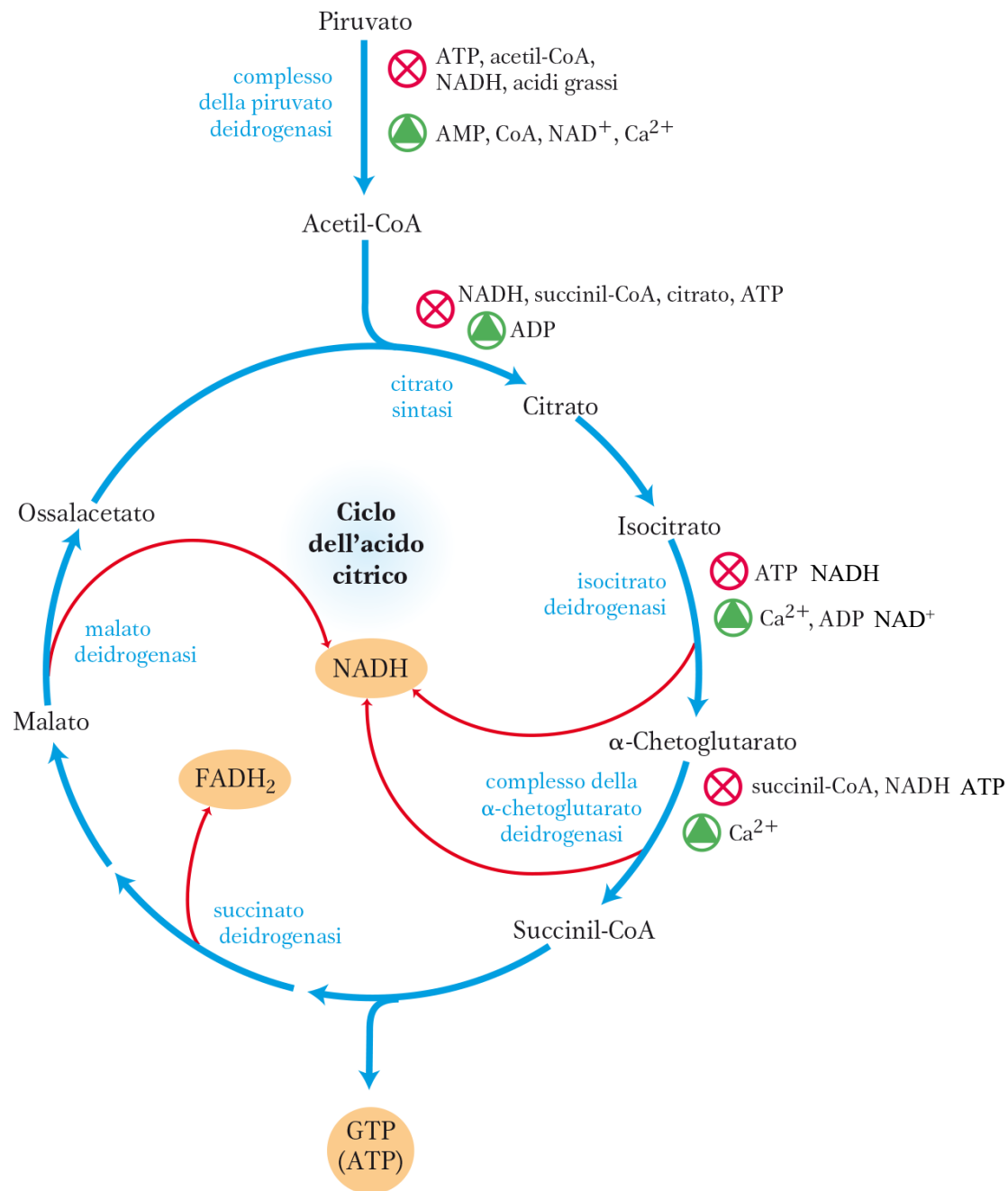
Regolazione del ciclo di Krebs

necessità di ATP da parte della cellula

principale enzima regolatore: citrato sintasi, che catalizza la prima reazione. Inibito allostericamente da ATP

Altri enzimi controllati dai livelli sia di ATP sia di ADP o dei prodotti delle reazioni catalizzate

- piruvato DH (prima del ciclo di Krebs)
- isocitrato DH
- α -chetoglutarato DH



UN'ALTRA FUNZIONE DEL CICLO DI KREBS

importante fonte di intermedi per numerose reazioni biosintetiche.

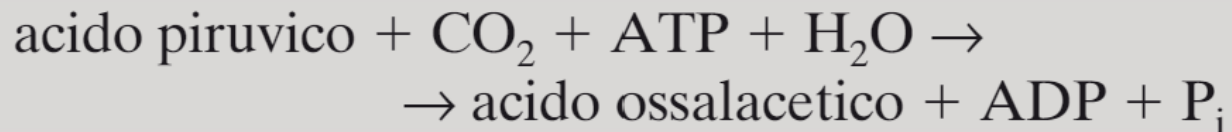
Citrato: può essere trasferito nel citosol e utilizzato per la biosintesi di acidi grassi e colesterolo o nella gluconeogenesi.

Succinil CoA: biosintesi dell'anello porfirinico dell'eme e biosintesi amminoacidi

α -chetoglutarato: biosintesi amminoacidi

Rifornimento di ossalacetato!!!!

piruvato carbossilasi, enzima mitocondriale attivato da acetil CoA



esempio di reazione anaplerotica

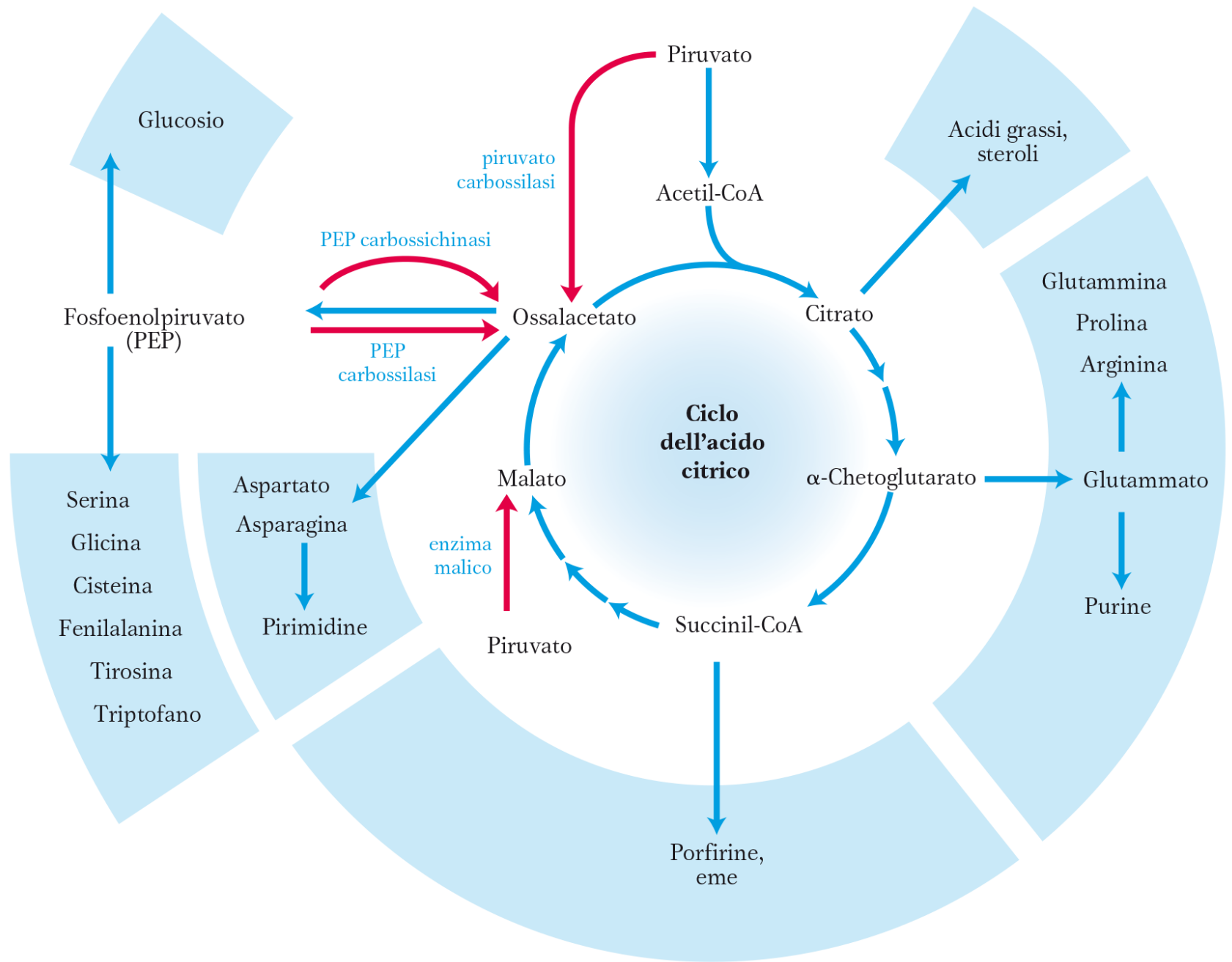
Reazioni anaplerotiche

Reazioni metaboliche che riforniscono una via di un intermedio particolarmente importante quando questo viene utilizzato in altre vie.

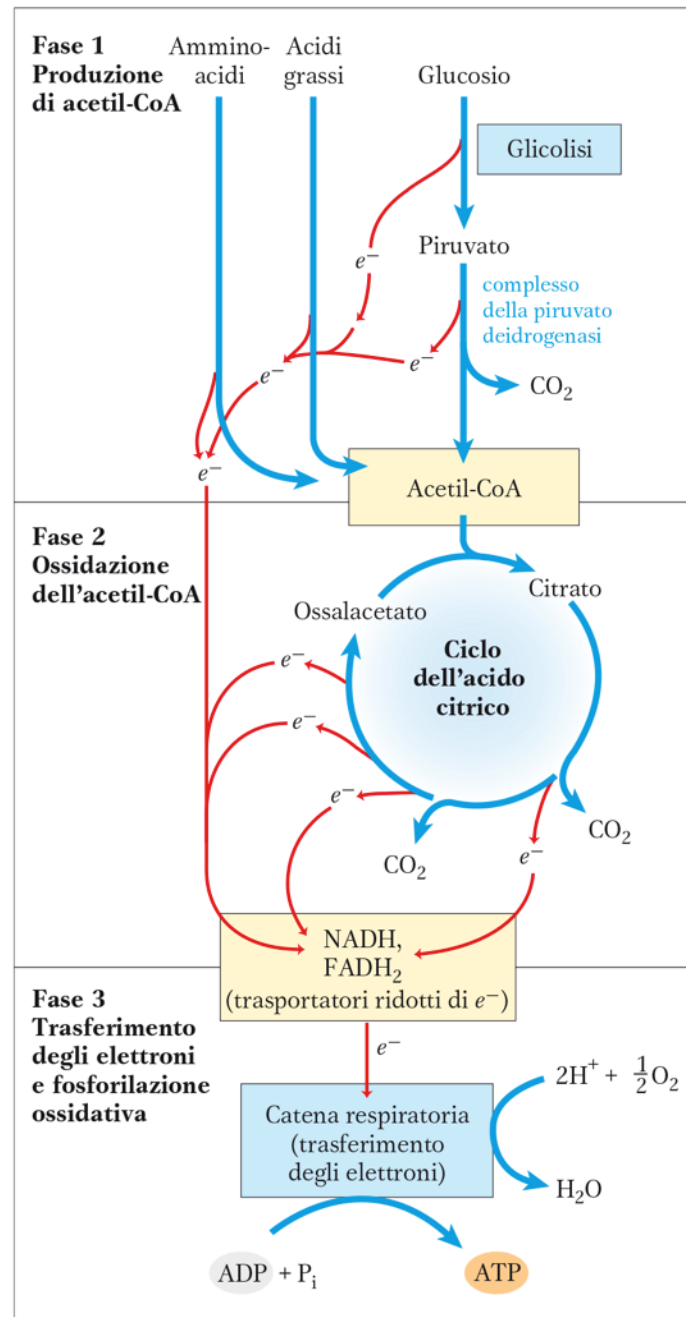
Reazione catalizzata dalla piruvato carbossilasi

garantisce livelli mitocondriali di ossalacetato adatti al corretto funzionamento del ciclo dell'acido citrico anche quando esso viene utilizzato nella gluconeogenesi o per la biosintesi degli acidi grassi e del colesterolo.

Ciclo di Krebs: via anfibolica



CATENA RESPIRATORIA MITOCONDRIALE
GLI ELETTRONI PASSANO DAI COENZIMI
RIDOTTI ALL'OSSIGENO ATTRAVERSO
ACCETTORI INTERMEDI



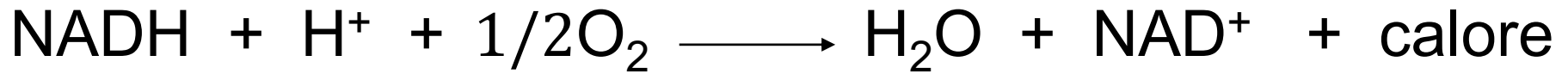
CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

Le vie cataboliche intermedie (glicolisi, ciclo di Krebs, beta-ossidazione degli acidi grassi) sono state denominate "aerobiche", ma O_2 non è mai stato coinvolto.

PERCHE'?

Le reazioni di ossidazione hanno portato alla riduzione di cofattori (FAD e NAD^+ sono stati ridotti a $FADH_2$ e $NADH+H^+$) che a loro volta andranno a ridurre O_2 riossidandosi.

REDOX



Se questa energia venisse liberata tutta assieme sarebbe dispersa in gran parte come calore.

Trasferimento a step degli atomi di idrogeno (e^-) su O_2 .

La riduzione di O_2 avviene mediante una serie di reazioni redox attraverso cui gli atomi di idrogeno (e^-) passano su accettori con un potenziale redox via via maggiore.

Quasi il 40% dell'energia redox viene trasformata in energia chimica.

In alcuni step l'energia liberata genera un gradiente elettrochimico che rappresenta la forza trainante della reazione di fosforilazione dell'ADP.

LA CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI o CATENA RESPIRATORIA è localizzata nella membrana interna dei mitocondri. È il processo che riossida i trasportatori di elettroni e li rende di nuovo disponibili per le diverse vie metaboliche. **O₂ è l'accettore finale di atomi di H e viene trasformato in H₂O.**

CATENA: gli elettroni NON sono trasferiti direttamente a O₂, MA attraverso una serie di trasportatori intermedi. **RESPIRATORIA:** perché c'è consumo di O₂. **RESPIRAZIONE CELLULARE**

LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA è il processo che sintetizza ATP mitocondriale. Avviene a livello della membrana mitocondriale interna. Dipende dalle reazioni redox della **CATENA RESPIRATORIA**

I DUE PROCESSI SONO ACCOPPIATI. In questo modo l'energia prodotta nelle reazioni redox viene convertita in ATP.

COME AVVIENE L'ACCOPPIAMENTO FRA I DUE PROCESSI?

Atomo di H = 1 protone e 1 elettrone (e^-)

In alcuni punti della catena le due particelle prendono vie diverse:

- e^- viaggia lungo la catena di trasporto degli elettroni fino a O_2 ;
- Il protone attraversa la membrana mitocondriale interna e va nello spazio intermembrana.

Il flusso di e^- procede secondo la scala di potenziale redox: da una coppia redox che ha maggior tendenza a cedere e^- verso la coppia redox con maggior tendenza a ricevere e^- . **Dalla coppia $NAD^+/NADH+H^+$ a O_2/H_2O .**

L'energia prodotta da questo flusso di e^- serve a trasportare protoni contro gradiente dalla matrice allo spazio intermembrana.

Questo gradiente di elettrochimico produce ATP quando i protoni ritornano dallo spazio intermembrana nella matrice.

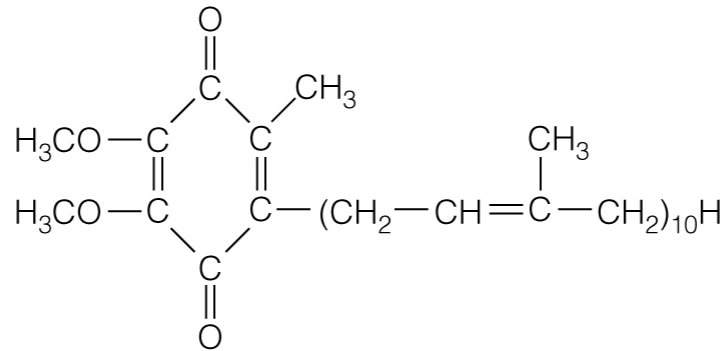
COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

Sono tutte proteine integrali di membrana ad esclusione dell'*ubichinone* e del *citocromo c* (proteina periferica solubile). Ogni componente può accettare e^- dal trasportatore che lo precede e trasferirli a quello che lo segue.

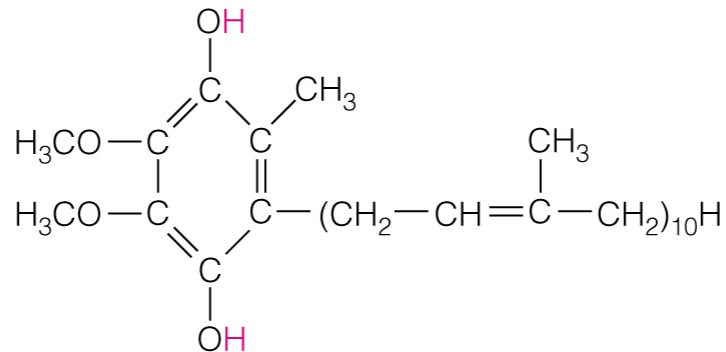
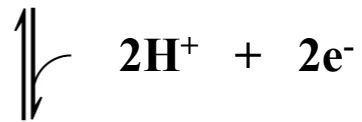
1. Flavoproteine: contengono un cofattore flavinico, FAD o FMN
2. Citocromi: hanno come cofattore l'eme. L'atomo di Fe dell'eme trasporta e^- .

COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

3. Proteine ferro-zolfo (Fe-S): Ferro è associato ad atomi di zolfo inorganico o di residui di cisteina. Questi centri Fe-S partecipano a reazioni redox in cui viene trasferito un e- per volta utilizzando cambi dello stato di ossidazione del ferro.
4. Ubichinone (coenzima Q, CoQ o UQ): piccolo e idrofobico, libero di diffondere nel doppio strato della membrana mitocondriale interna. (Forma ridotta UQH₂ ubiquinolo)
5. citocromo c



Coenzima Q₁₀ ossidato (CoQ)



Coenzima Q₁₀ ridotto (CoQH₂)

I COMPLESSI DELLA CATENA RESPIRATORIA

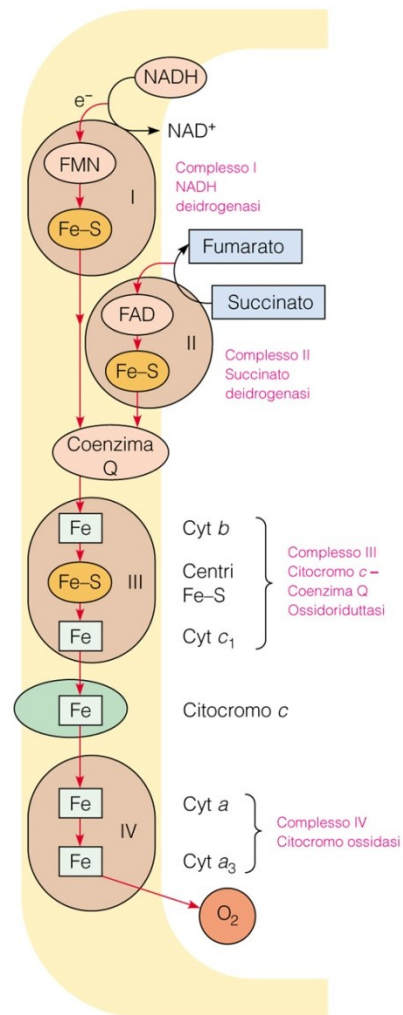
4 complessi multiproteici:

- **NADH-ubichinone reduttasi (Complesso I)**
- **Succinato-ubichinone reduttasi (Complesso II)**
- **Ubichinolo-citocromo c reduttasi (Complesso III)**
- **Citocromo c ossidasi (Complesso IV)**

Due punti di ingresso degli e⁻: Complesso I e II

I Complessi III e IV sono situati in sequenza sulla base della loro affinità progressivamente crescente per e⁻.

Ogni complesso riduce l'accettore di e⁻ che lo segue. L'ultimo complesso si chiama ossidasi perchè O₂ funziona da ossidante.



Legenda:

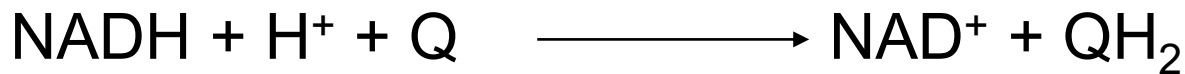
-  Complessi enzimatici
-  Coenzimi organici e gruppi prostetici
-  Centri Fe-S
-  Citocromi (ferro emnico)

Potenziali di riduzione standard di alcuni componenti della catena respiratoria mitocondriale

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

COMPLESSO I: NADH-UBICHINONE REDUTTASI

Contiene: molte catene peptidiche, una flavoproteina complessa con gruppo prostetico FMN, almeno sei centri Fe-S. Si trova nella membrana mitocondriale interna con il sito che lega NADH verso la matrice.

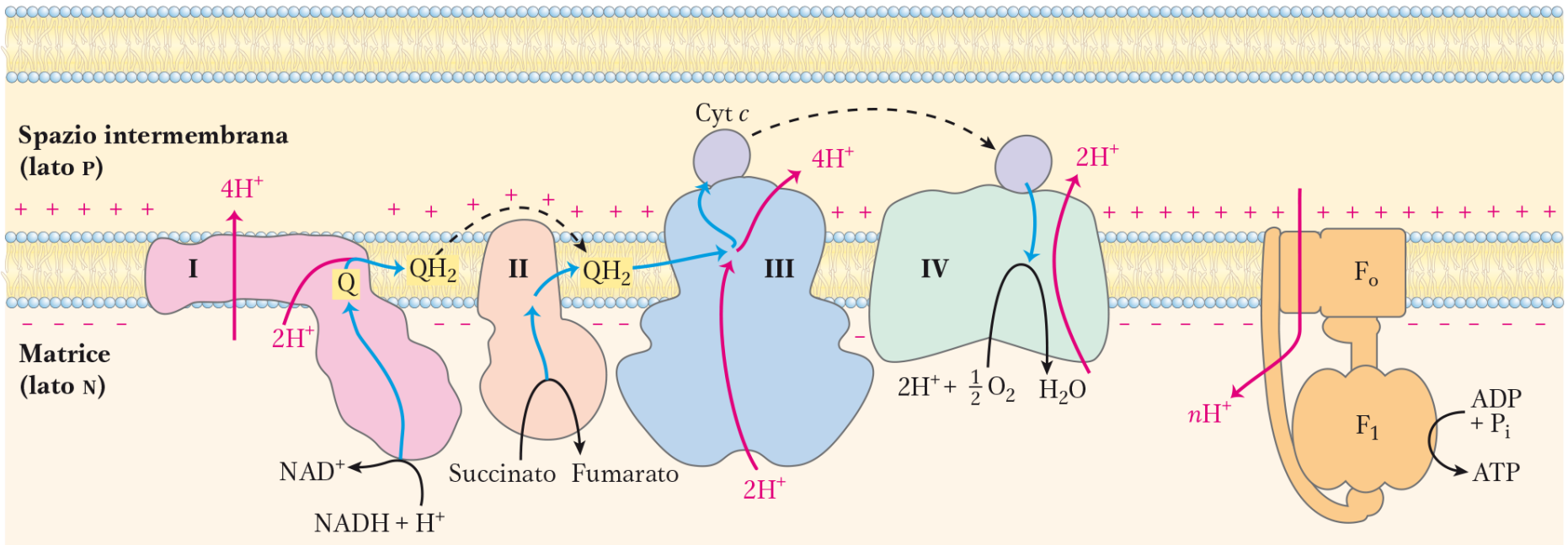


Percorso e⁻:



Il flusso di e⁻ è accompagnato dallo spostamento di 4 H⁺ dalla matrice allo spazio intermembrana.

CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



COMPLESSO II: SUCCINATO-UBICHINONE REDUTTASI

legato a membrana mitocondriale interna.

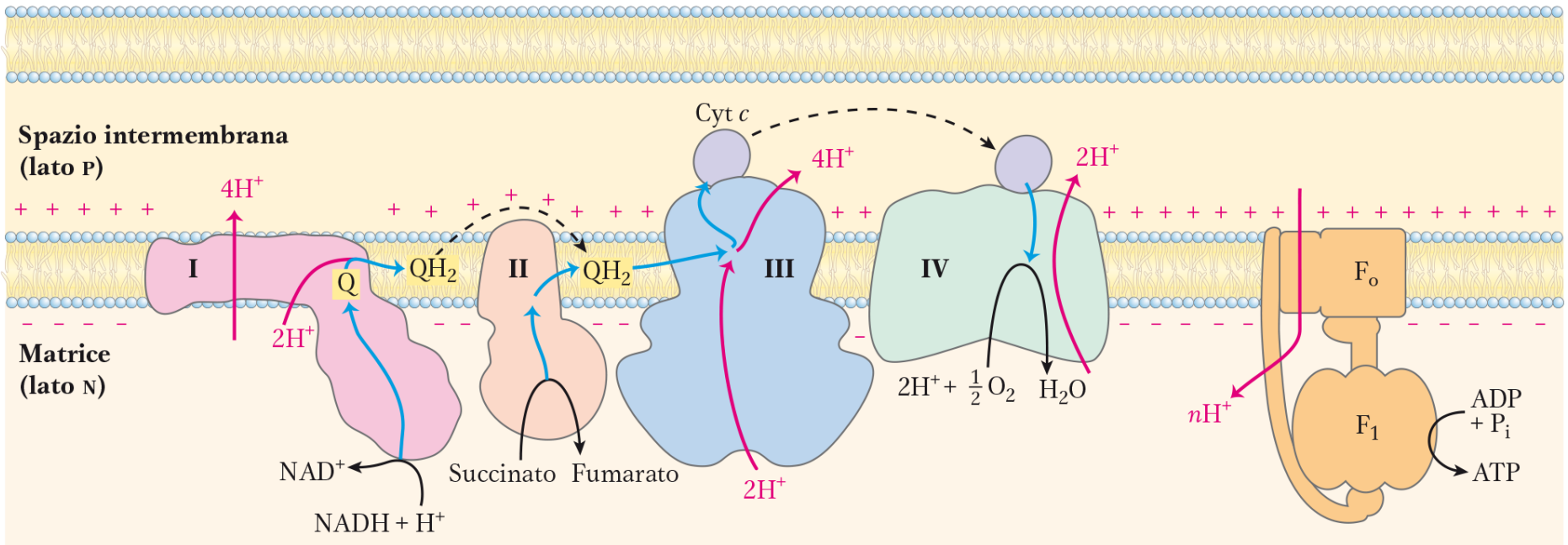
contiene FAD, centri Fe-S, sito di legame per succinato
percorso e-:

succinato $\rightarrow$ FAD $\rightarrow$ Fe-S $\rightarrow$ Q

Riossida il FADH_2 , cofattore dell'enzima succinato DH (ciclo di Krebs)

Non è una pompa protonica perché la reazione non fornisce sufficiente energia per spostare protoni.

CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



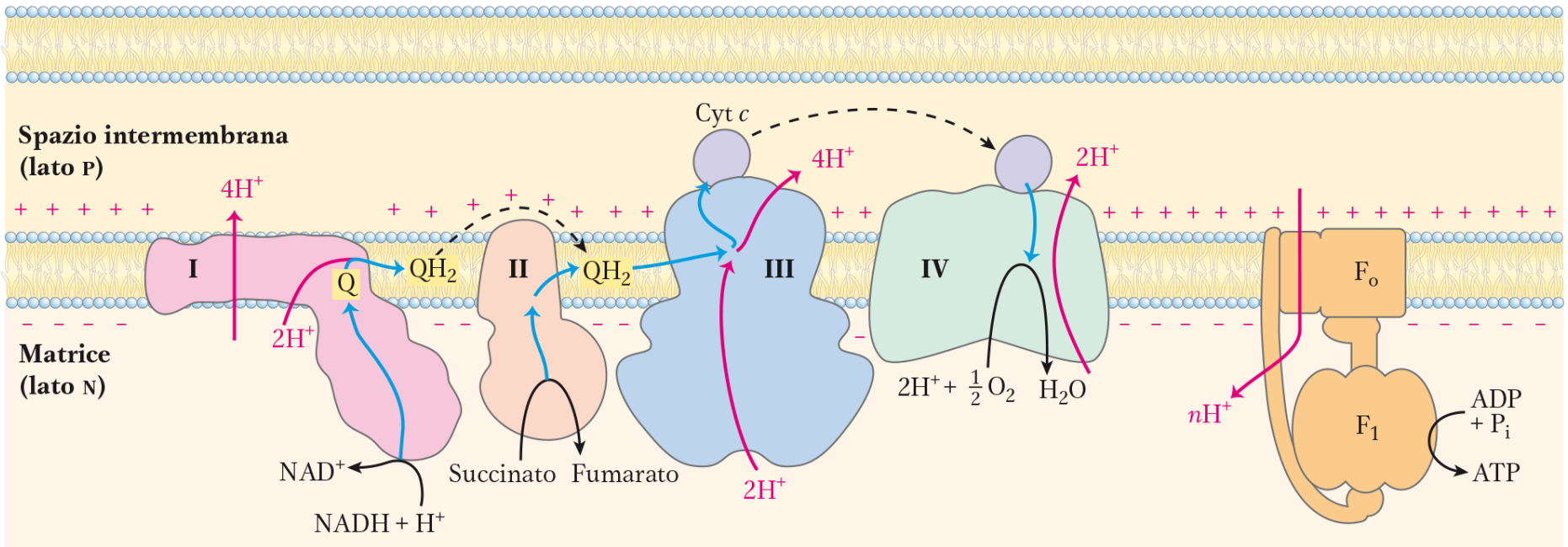
**QH₂ DIFFONDE DAL COMPLESSO I E DAL
COMPLESSO II AL COMPLESSO III**

COMPLESSO III: UBICHINOLO-CITOCROMO C REDUTTASI

Punto di confluenza degli e^- che vi arrivano tramite QH_2 , che è un trasportatore mobile di elettroni.

Contiene 2 citocromi b, il citocromo c1, una proteina ferro-zolfo ed almeno altre sei subunità proteiche. Trasferisce e^- al citocromo c solubile. Funziona come pompa di H^+ che sono rilasciati nello spazio intermembrana, contribuendo alla generazione del gradiente protonico

CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



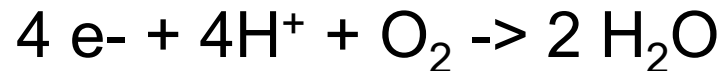
COMPLESSO IV: CITOCROMO C OSSIDASI

Contiene i citocromi a e a₃ e due centri rame.

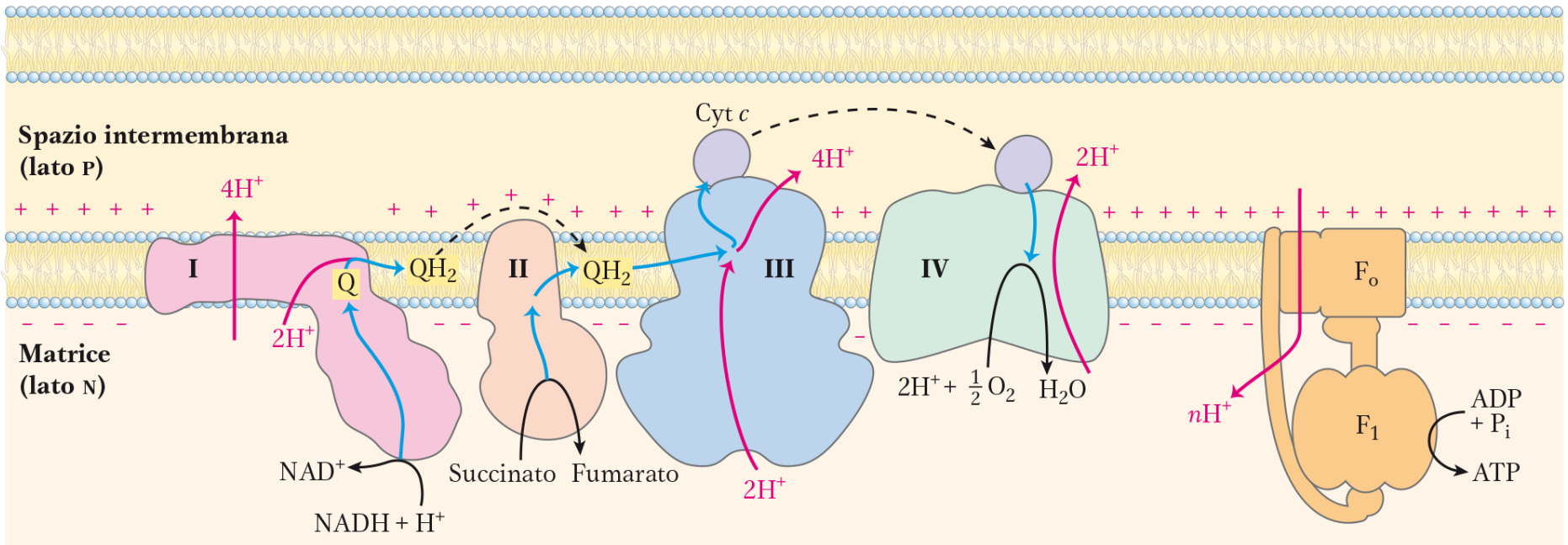
Catalizza il trasferimento di e⁻ dal citocromo c a O₂.

H⁺ vengono spostati dalla matrice allo spazio intermembrana.

Parte dei H⁺ vengono usati per la sintesi di H₂O.



CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



Gran parte di questa energia viene usata per pompare protoni fuori dalla matrice mitocondriale.

Energia elettrochimica dovuta al gradiente di concentrazione e alla separazione di cariche. Si chiama anche **forza motrice protonica** ed è formata da due componenti: 1) energia potenziale chimica (differenza di concentrazione dei protoni); 2) energia del potenziale elettrico.

Quando i protoni fluiscono spontaneamente secondo il loro gradiente elettrochimico, questa energia viene resa disponibile per produrre lavoro.

FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

Sintesi mitocondriale di ATP a partire da ADP e P_i .

I protoni accumulati nello spazio intermembrana fluiscono verso la matrice spinti dal gradiente elettrochimico (differenza di carica e differenza di pH transmembrana).

Questo flusso fornisce l'energia per formare e rilasciare ATP.

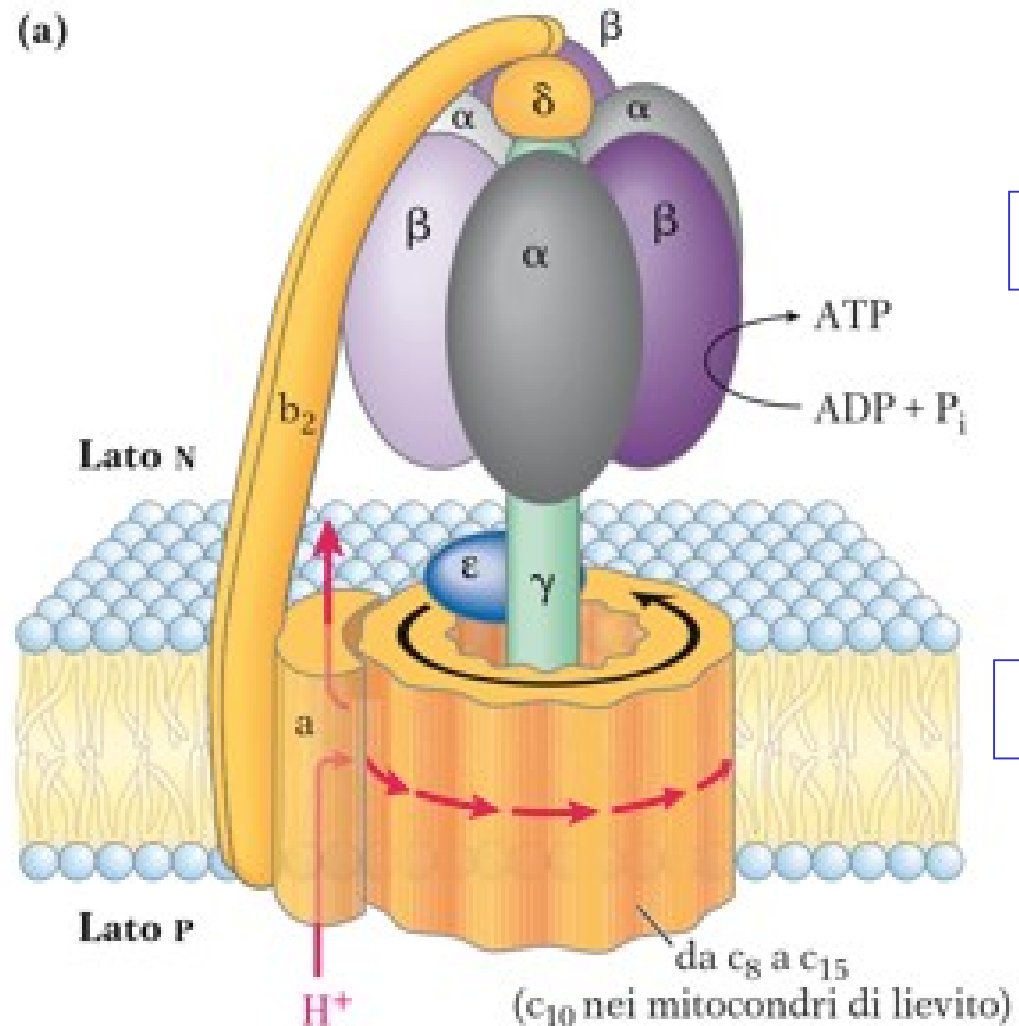
Avviene nel complesso multiproteico ATP sintasi (complesso FoF1 o complesso V)

ATP SINTASI

ATP sintasi è formata da due componenti:

- Fo (porzione integrale di membrana)
- F1 (porzione periferica di membrana).

Fo possiede un canale per i protoni.



STRUTTURA DEL COMPLESSO FoF1

ATP SINTASI: UN MOTORE MOLECOLARE

I tre dimeri $\alpha\beta$ hanno la stessa struttura ma conformazioni differenti come conseguenza dell'interazione con la subunità γ con una sola delle subunità β alla volta.

Sulla base dell'interazione γ - β si hanno 3 diverse conformazioni e 3 diverse situazioni:

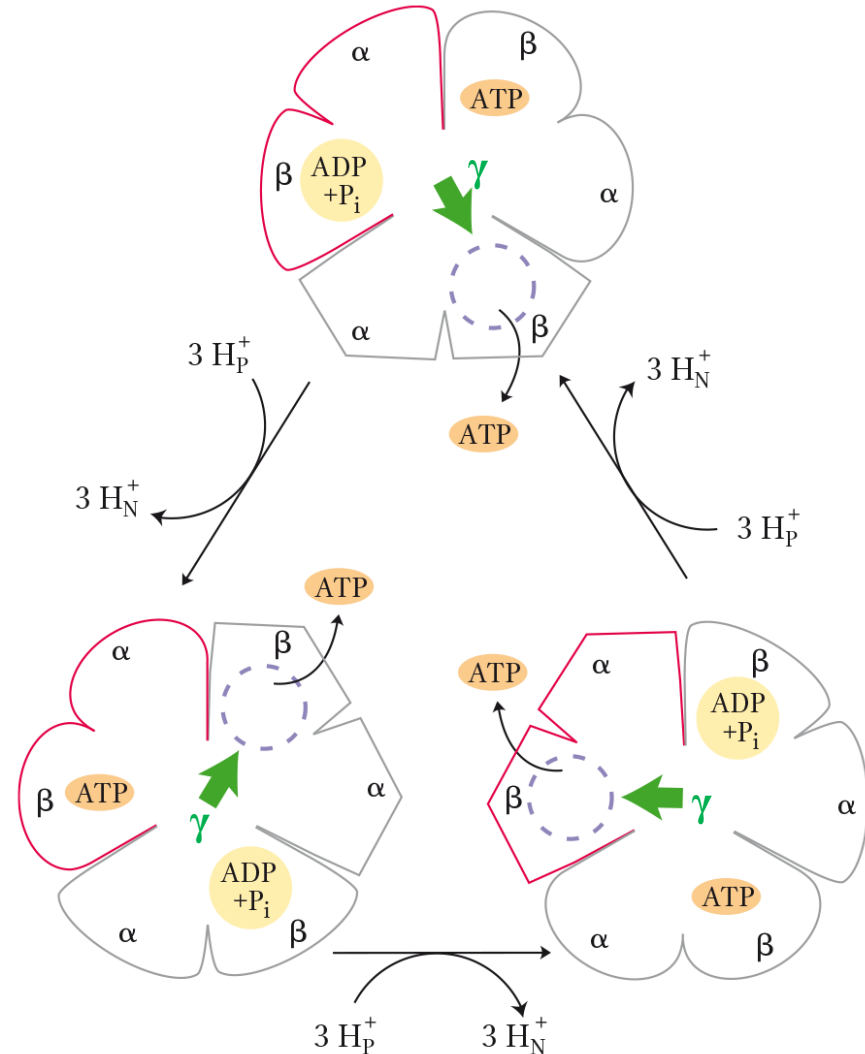
1. β -ADP (lega ADP e P_i)
2. β -ATP (viene sintetizzato ATP)
3. β -vuota (o aperta, viene rilasciato ATP)

Ciascun dimero $\alpha\beta$ assume una di queste 3 conformazioni in modo ciclico. I 3 dimeri hanno sempre conformazione diversa tra loro.

La forza motrice protonica causa la rotazione di 120° di γ , che viene a contatto con una delle subunità $\alpha\beta$. Questo causa una modificazione conformazionale per cui

- **il sito β -ATP assume la conformazione vuota e dissocia l'ATP**
- **il sito β -ADP assume la conformazione β -ATP che promuove la sintesi di ATP da ADP + P_i e forma ATP**
- **il sito β -vuoto assume la conformazione β -ADP e lega ADP e P_i**

La funzione della forza motrice protonica è quella di liberare ATP, perché la sintesi di ATP da parte di questo enzima richiede poca energia.



Modello della modificazione di legame dell'ATP sintasi

ATP SINTASI: COME FUNZIONA?

Il passaggio di protoni attraverso il cilindro F_o causa la rotazione del cilindro costituito dalle subunità c e di conseguenza ruota anche la proteina γ . La struttura $3\alpha 3\beta$ è tenuta fissa rispetto al cilindro c ed all'asse γ dalle subunità b e δ . Perciò ogni rotazione di 120° mette in contatto γ con una diversa subunità β . Questo contatto induce la conformazione β -vuota e il rilascio di ATP. I tre dimeri $\alpha\beta$ funzionano in contemporanea, e si trovano in ogni momento ciascuno in una delle 3 conformazioni.



Valore di x = rapporto P/O

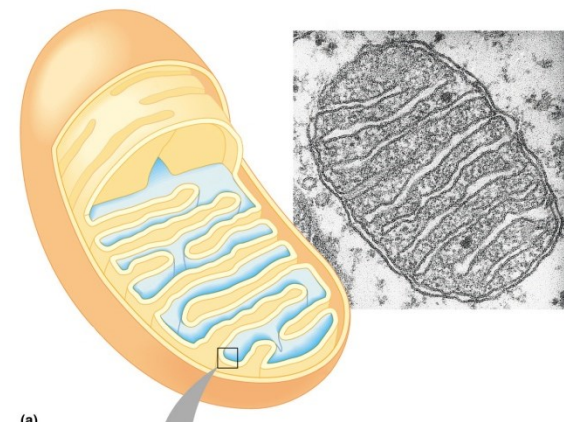
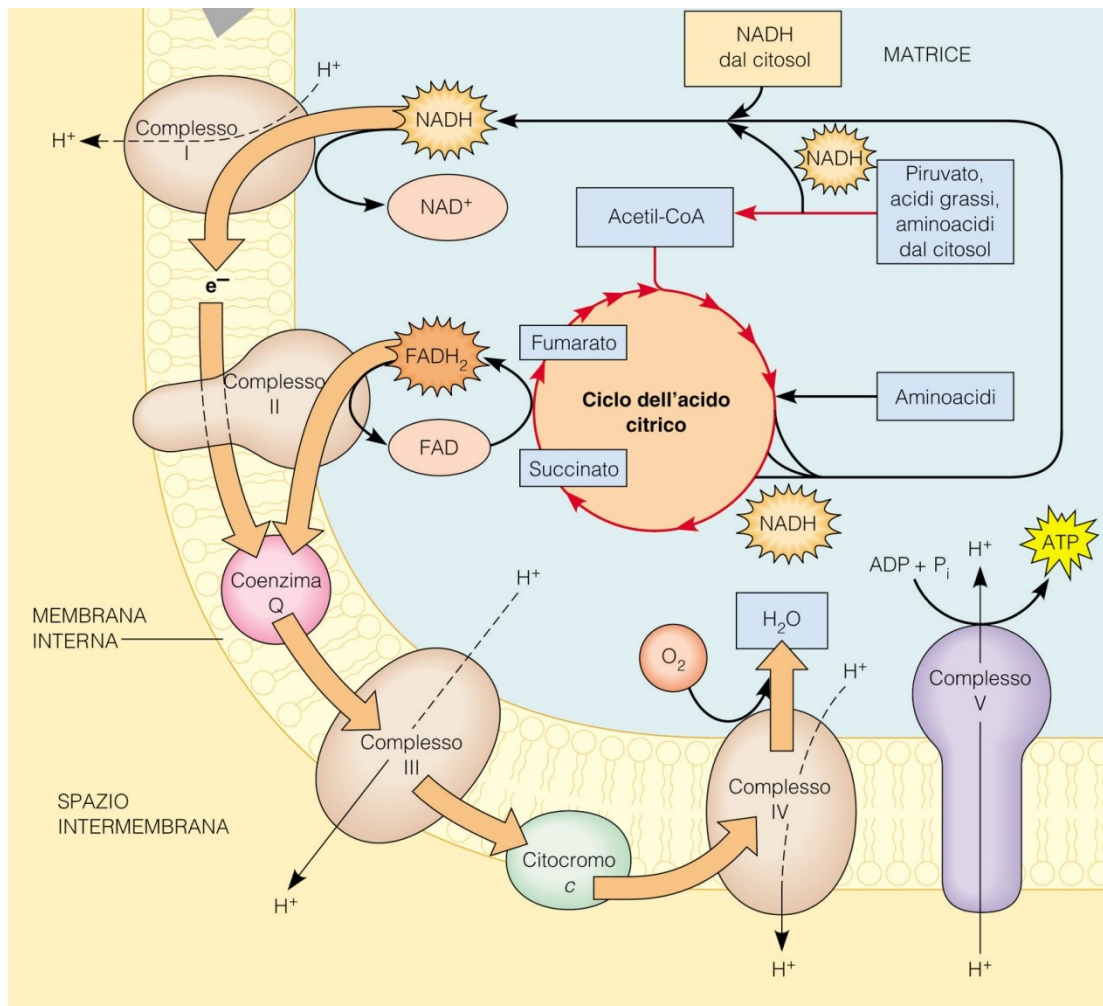
Stabilito che:

- 10 H^+ sono pompate fuori dal mitocondrio per 1 NADH e 6 per FADH_2
- Servono 4 H^+ per la sintesi di 1 ATP (di cui 1 serve per trasportare Pi , ADP e ATP attraverso la membrana mitocondriale)

si è arrivati a concludere che il rapporto P/O è pari a 2,5 (10/4) per il NADH e 1,5 (6/4) per FADH_2 .

RILEVANZA DEL PROCESSO

Una persona fa uso giornaliero di 40 Kg di ATP per la normale attività.



REGOLAZIONE

La velocità della respirazione è limitata da $[ADP]$
 $[ATP]/[ADP][P_i]$ esprime la situazione energetica cellulare.
Normalmente ha un valore elevato.

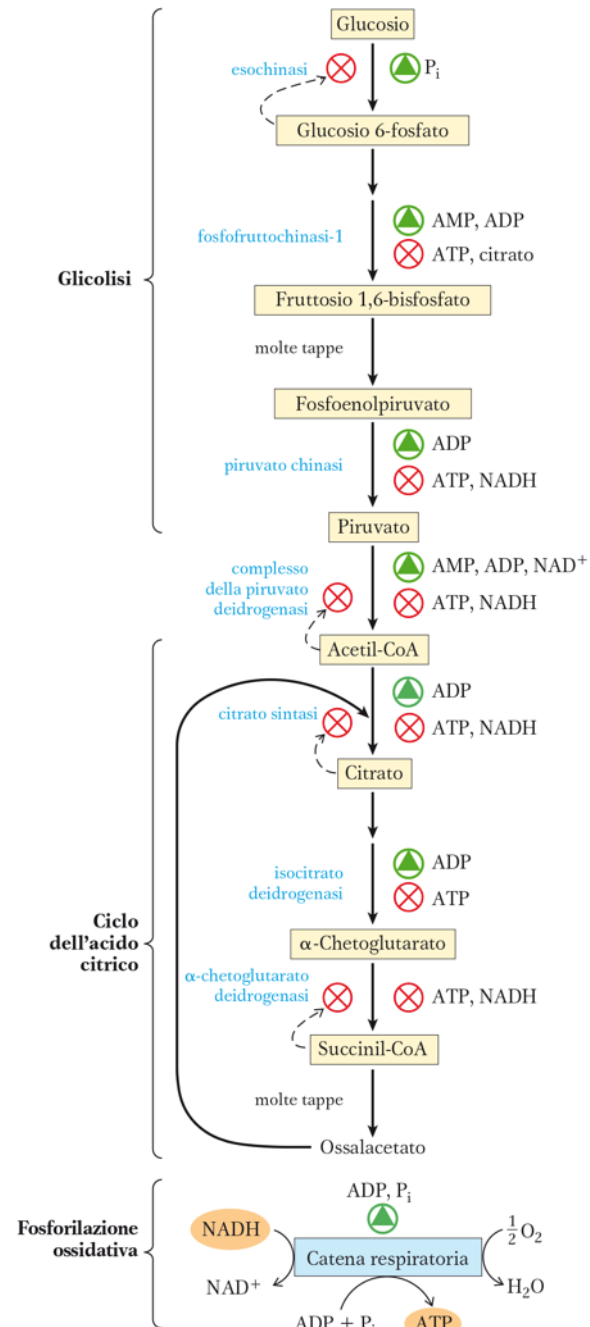
se $[ATP]/[ADP][P_i] \gg$ la velocità non è massima
se $[ATP]/[ADP][P_i] \ll$ aumenta la velocità della
fosforilazione ossidativa.

Normalmente la velocità viene regolata in modo preciso allo scopo di far variare poco il rapporto $[ATP]/[ADP][P_i]$, anche durante variazioni delle richieste di energia.

La regolazione della velocità della fosforilazione ossidativa da parte di $[ADP]$ si chiama controllo respiratorio o controllo da accettore.

[ADP] influenza anche la velocità del ciclo di Krebs. Quando $[ADP] \ll$, NADH e $FADH_2$ NON sono ossidati nella catena di trasporto degli e⁻. La V del ciclo di Krebs rallenta ($[NAD^+]$ e $[FAD]$ basse).

Quando $[ADP] \gg$ la V della fosforilazione ossidativa aumenta, e la V del ciclo di Krebs aumenta (disponibilità di ($[NAD^+]$ e $[FAD]$)).



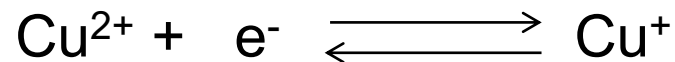
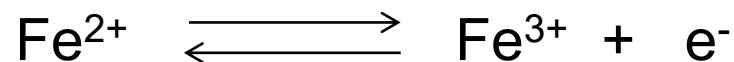
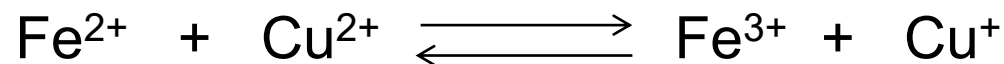
DIAPOSITIVE DI SUPPORTO

Le reazioni che trasferiscono e- sono redox

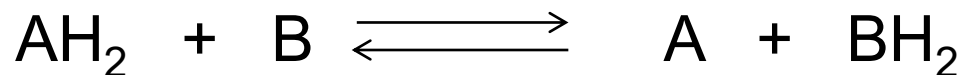
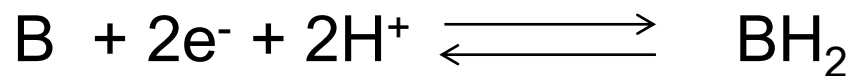
donatore di elettroni $\rightleftharpoons$ e⁻ + accettore di elettroni
coppia redox coniugata

gli e⁻ vengono trasferiti.

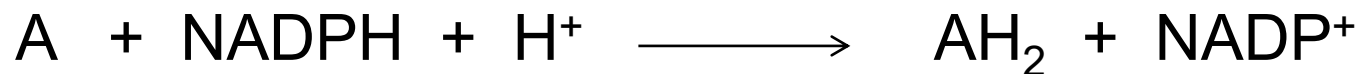
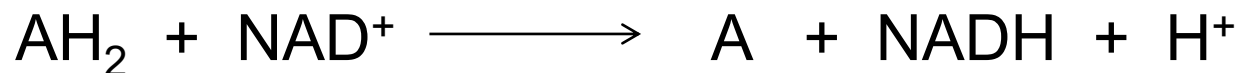
1) come e⁻



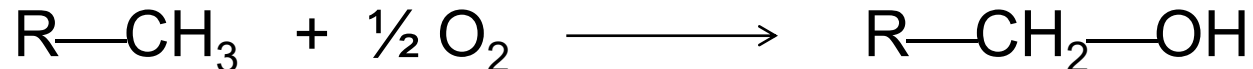
2) come atomi H



3) come ione idruro (:H⁻)



4) combinazione diretta di un riducente organico con l'O₂



Analogia con coppia acido-base coniugata:

La tendenza di una coppia acido base coniugata a perdere un protone è definita dalla costante di dissociazione K' .

La tendenza di una coppia coniugata redox a perdere un elettrone è definita da una costante, il **potenziale standard di ossido riduzione**, E^0 . Questa costante è la **forza elettromotrice (fem)** espressa in Volt data da un elettrodo appropriato posto in una soluzione contenente il donatore e l'accettore di elettroni alla concentrazione 1 M, a 25°C.

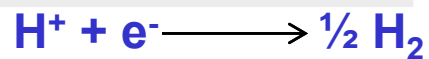
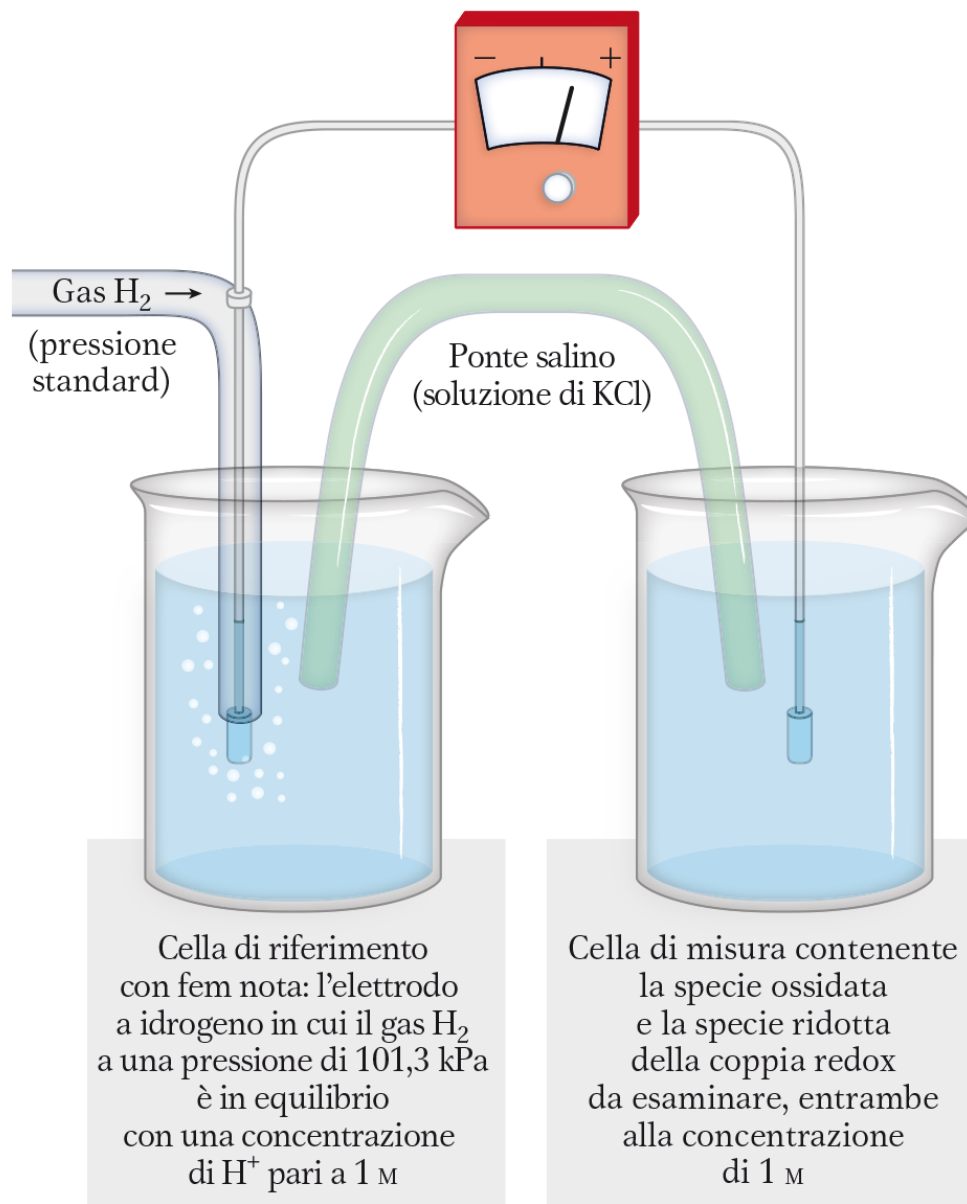
In biochimica si usa E'^0 , quando le condizioni standard sono considerate a pH=7.

Come si calcola E^0 per una coppia redox coniugata?

- 1) Semi-cella di riferimento (è l'elettrodo a idrogeno, vedi figura successiva) a cui viene assegnato $E^0 = 0 \text{ V}$
- 2) Semi-cella della coppia redox coniugata di cui si vuole determinare la E^0 .
- 3) Connessione delle due semi-celle con un ponte salino (contiene KCl, permette la continuità elettrica). Gli elettrodi di ciascuna semi-cella sono collegati ad un misuratore di corrente.
- 4) Il misuratore di corrente rivela in che verso si muovono gli elettroni e il valore della fem.

NOTA: una semi-cella è costituita da una soluzione contenente una coppia redox coniugata e un elettrodo.

Strumento
di misura della fem



In biochimica si utilizza il potenziale di riduzione standard che assegna valori maggiormente negativi a sistemi che hanno una maggiore tendenza a perdere gli elettroni e valori progressivamente positivi ai sistemi che tendono ad accettare elettroni.

Per convenzione ΔE^0 di ogni reazione redox è la differenza fra l' E^0 dell'accettore di elettroni e l' E^0 del donatore di elettroni.

L'equazione di Nernst: mette in relazione il potenziale di riduzione standard con il potenziale redox a qualsiasi concentrazione di specie ossidata e ridotta.

I valori di E^0 delle coppie redox permettono di predire la direzione del flusso di elettroni da una coppia redox ad un'altra quando entrambe si trovano in condizioni standard.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

Sostituendo i valori delle
costanti e per $T=298\text{ K}$

$$E = E^{\circ} + \frac{0.026\text{ V}}{n} \ln \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

E	potenziale di riduzione
E^0	potenziale di riduzione standard
E'^0	potenziale di riduzione standard a pH=7

I TRASFERIMENTI DI ELETTRONI SONO ACCOMPAGNATI DA VARIAZIONI DI ENERGIA LIBERA

In generale, gli e⁻ tendono a fluire verso la semi-cella che ha un valore di E⁰ più positivo da quella con E⁰ più negativo.

Nei sistemi biologici gli e⁻ passano da una coppia redox a un'altra in presenza di enzimi che catalizzano la reazione.

Questo flusso spontaneo di elettroni fornisce energia libera che può essere usata per produrre lavoro. Gli e⁻ tendono sempre a muoversi in una direzione decrescente di energia libera

$$\Delta G = -nF\Delta E \qquad \Delta G'^{\circ} = -nF\Delta E'^{\circ} \text{ (in condizioni standard e pH=7)}$$

dove n = numero di e⁻; F = costante di Faraday; $\Delta E'^{\circ}$ è la differenza fra il potenziale standard del sistema accettore di elettroni e quello del sistema donatore.