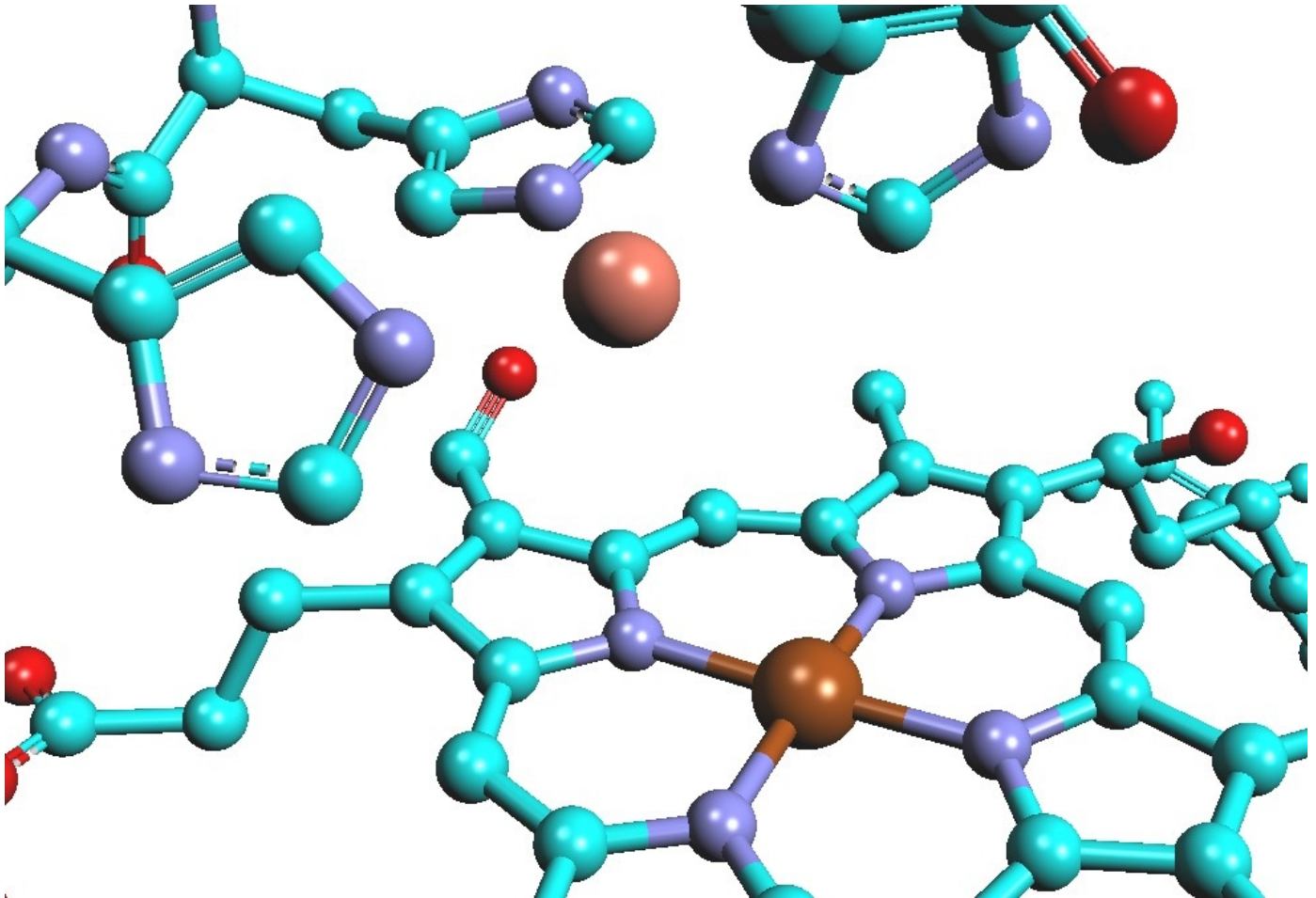


RESPIRAZIONE CELLULARE



Complesso eme a_3 - Cu_B

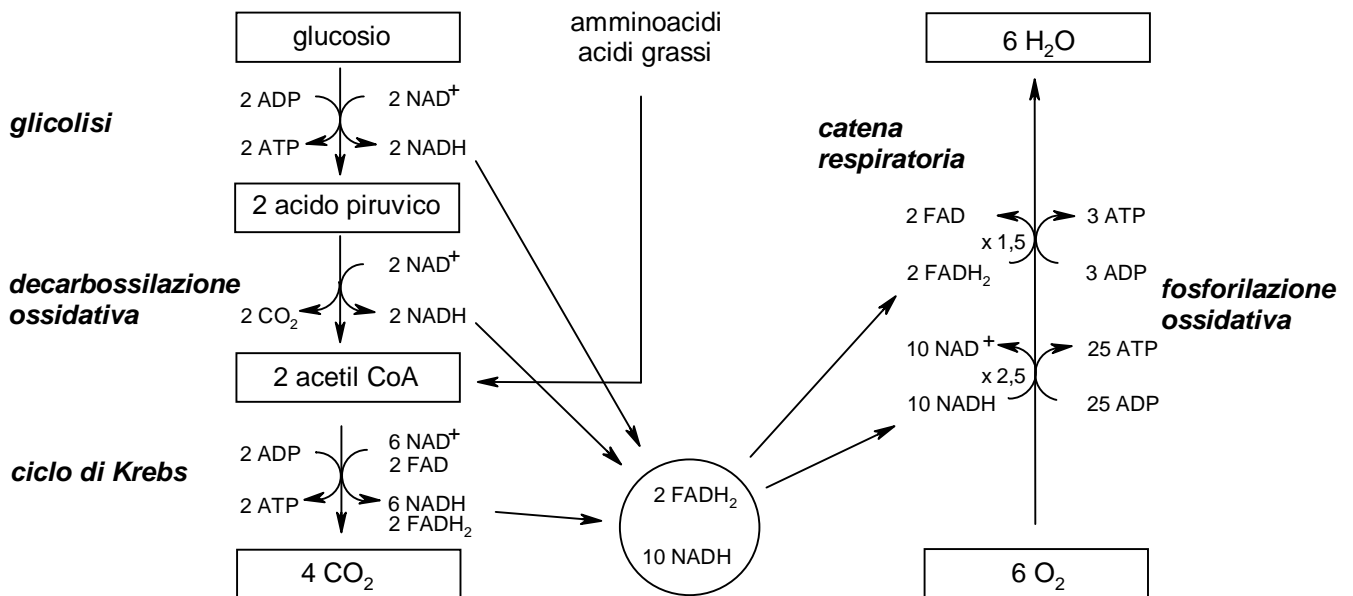
Indice:

Respirazione cellulare
Primo stadio della respirazione cellulare
Glicolisi
La prima fase della glicolisi
La seconda fase della glicolisi
Reazioni enzimatiche
Meccanismo delle reazioni 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10
Decarbossilazione ossidativa
Secondo stadio della respirazione cellulare
Ciclo di Krebs
Tappa n° 1: citrato sintasi
Tappa n° 3: isocitrato deidrogenasi
Terzo stadio della respirazione cellulare
Fosforilazione ossidativa

Catena respiratoria
Complesso 1
NAD, nicotinammide adenina dinucleotide
FMN, flavin mononucleotide
Fe-S, centri ferro-zolfo
Q, coenzima Q
Complesso 2
Complesso 3
Citocromi
Complesso 4
Fosforilazione ossidativa
Accoppiamento e disaccoppiamento della
fosforilazione ossidativa
Considerazioni finali

Respirazione cellulare

Con il termine **respirazione** solitamente si intende il processo fisiologico macroscopico che consiste nella assunzione di O₂ e nel rilascio di CO₂ da parte di organismi multicellulari. In biochimica si usa il termine respirazione in senso microscopico per riferirsi ai processi molecolari che implicano consumo di O₂ e formazione di CO₂ da parte della cellula. La respirazione cellulare può essere schematizzata come in figura ed avviene in tre stadi principali.



1) Nel primo stadio le molecole organiche combustibili (glucosio, acidi grassi, alcuni amminoacidi) vengono trasformate in **acetil-coenzima A** (acetil-CoA). In pratica queste molecole vengono spezzate in frammenti di due atomi di carbonio e ossidate per formare molecole di acido acetico che troviamo legate come tioesteri nell'acetil-CoA. La degradazione del glucosio fino ad acetil-CoA avviene attraverso la **glicolisi** e la **decarbossilazione ossidativa**. La glicolisi è una catena di reazioni che avvengono nel citoplasma dove il **glucosio** è degradato ed ossidato ad **acido piruvico**. L'acido piruvico, poi, entra nei mitocondri dove subisce una decarbossilazione ossidativa formando **acetil-CoA**.

2) Nel secondo stadio l'**acetil-CoA** viene ossidato a CO₂ attraverso il **ciclo di Krebs**, una serie di reazioni che avvengono nei mitocondri e che liberano equivalenti riducenti sotto forma di ioni idruro legati ai coenzimi ridotti **NADH e FADH₂**. L'ossidazione del glucosio fino a CO₂ è compiuta.

3) Nel terzo stadio entra in azione l'**ossidante finale**, l'**ossigeno molecolare O₂** che ossida tutti i coenzimi ridotti formati nei primi due stadi: 10 NADH e 2 FADH₂. Questi vengono ossidati a NAD⁺ e FAD che possono così continuare a sostenere le reazioni di ossidazione del glucosio fino a CO₂ nei primi due stadi. NADH e FADH₂ cedono i loro elettroni, attraverso una catena di molecole trasportatrici di elettroni, la **catena respiratoria**, all'ossigeno molecolare O₂ che viene ridotto ad H₂O. Durante questo processo si genera un flusso di elettroni e una parte dell'energia liberata viene recuperata come energia chimica sotto forma di **ATP** in un processo chiamato **fosforilazione ossidativa**. E' proprio la produzione di ATP lo scopo fondamentale della respirazione cellulare.

La **reazione globale** è una ossidazione completa del glucosio ad opera di O₂ che forma CO₂, H₂O ed energia come una normale combustione. Solo una parte dell'energia liberata viene trasformata in energia chimica sotto forma di ATP. In totale si ottengono 32 ATP per ogni molecola di glucosio.



Si ottengono $32 \cdot 7,3 = 234$ kcal/mol. Questo rappresenta un'efficienza del 34 %, infatti la variazione di energia libera per questa reazione è $\Delta G^\circ = -686$ kcal/mol (il 34% di 686 è 234). Si è calcolato però che nella cellula l'efficienza reale è circa del 70 %, tenendo conto che le concentrazioni vere sono molto inferiori alle concentrazioni standard 1 M.

Primo stadio della respirazione cellulare

Glicolisi

Il termine **glicolisi** (si pronuncia glicòlisi) deriva da due parole greche che significano **zucchero** e **scissione**. La glicolisi è una via metabolica pressoché universale dato che è presente non solo negli animali e nelle piante, ma anche nella maggior parte dei microrganismi. La sua universalità e il fatto di essere anaerobica fanno pensare che sia una via metabolica che si è sviluppata agli inizi della vita sulla Terra in organismi **procarioti anaerobi** che vivevano quando l'atmosfera era ancora povera di O₂. La glicolisi è rimasta poi inalterata durante tutta la storia evolutiva grazie alla sua semplicità ed efficienza. Tutti gli organismi che hanno provato a cambiarla non sono sopravvissuti.

La glicolisi è costituita da una sequenza di **10 reazioni** che avvengono nel citoplasma e **degradano il glucosio ad acido piruvico** in assenza di ossigeno e producono **2 ATP** e **2 NADH**.

Nella glicolisi si possono individuare **due fasi**, ciascuna composta di 5 reazioni.

Nelle prime 5 reazioni il glucosio viene **spezzato in due frammenti** identici di 3 atomi di carbonio: due molecole di **gliceraldeide-3-fosfato**. Per realizzare questo obiettivo si devono però consumare 2 ATP.

Nelle 5 reazioni successive si realizza un **guadagno energetico** di 2 ATP e inoltre si recuperano i 2 ATP utilizzati nella prima fase. Questo si ottiene sfruttando dapprima l'energia liberata dall'ossidazione della gliceraldeide-3-fosfato, poi l'energia cumulata di due reazioni che avvengono contemporaneamente sull'acido fosfoenolpiruvico: la tautomeria cheto-enolica e l'idrolisi di un estere fosforico.

La prima fase della glicolisi

Ossidare il glucosio tal quale porterebbe all'ossidazione di **una sola aldeide** e si otterrebbe un solo ATP. Per rendere più efficiente il processo, nella prima parte della glicolisi la catena di 6 atomi di carbonio del glucosio viene rotta in due frammenti in modo che poi, nella seconda fase, si possano ricavare due ATP dalla ossidazione ad acido delle **due aldeidi** ottenute.

E' indispensabile che i **due frammenti** siano **identici** e quindi devono essere di **3 atomi di carbonio ciascuno** se vogliamo che sia unica la via metabolica della seconda fase della glicolisi. Quindi non si può spezzare il glucosio in due frammenti perché questi sarebbero di 2 e 4 atomi di carbonio rispettivamente, dato che la reazione che può rompere la catena è una condensazione aldolica inversa. La strategia obbligata è quindi **trasformare il glucosio in fruttosio** che, avendo il carbonile sul C-2, può essere spezzato in due frammenti di 3 atomi di carbonio ciascuno.

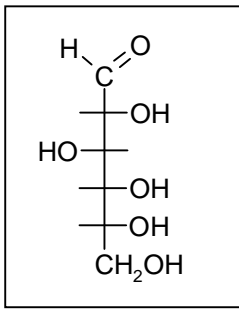
Inoltre **ogni frammento deve essere fosforilato** perché così è vincolato a restare all'interno della cellula fino alla fine della glicolisi. Le molecole fosforilate non possono attraversare la membrana cellulare costituita da un doppio strato di fosfolipidi che la rende negativa in superficie e apolare al suo interno. Questa doppia fosforilazione implica un consumo di due molecole di ATP nella prima parte e obbliga, nella seconda parte, non solo a ricavare due ATP dall'ossidazione di un'aldeide ad acido, ma anche a recuperare i due ATP spesi nella prima parte, al fine di realizzare un vero guadagno energetico.

La prima fase della glicolisi è costituita quindi dalle seguenti 5 reazioni che, partendo da glucosio, formano nell'ordine:

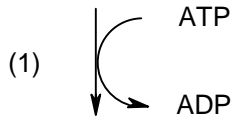
- 1) Glucosio-6-fosfato
- 2) Fruttosio-6-fosfato
- 3) Fruttosio-1,6-difosfato
- 4) Gliceraldeide-3-fosfato + Diidrossiacetone-fosfato
- 5) 2 molecole di Gliceraldeide-3-fosfato

Nelle prime 3 reazioni il glucosio viene fosforilato sul C-6 per formare **glucosio-6-fosfato** (1), poi questo viene isomerizzato a **fruttosio-6-fosfato** (2), infine quest'ultimo viene fosforilato sul C-1 per ottenere **fruttosio-1,6-difosfato** (3). Questa molecola è pronta per essere tagliata, nella reazione n° 4, in due frammenti di tre atomi di carbonio, ambedue fosforilati: **gliceraldeide-3-fosfato** e **diidrossiacetone-fosfato** (4). Queste due molecole sono isomeri di struttura che vengono interconvertiti uno nell'altro nella reazione n° 5. All'equilibrio è presente il 4 % di gliceraldeide-3-fosfato e il 96 % di diidrossiacetone-fosfato, ma quest'ultimo viene progressivamente trasformato in **gliceraldeide-3-fosfato** (5) a mano a mano che questa viene ossidata nella reazione successiva della glicolisi. In questo modo, per ogni molecola di glucosio degradata, due molecole di gliceraldeide-3-fosfato entrano nella seconda fase della glicolisi.

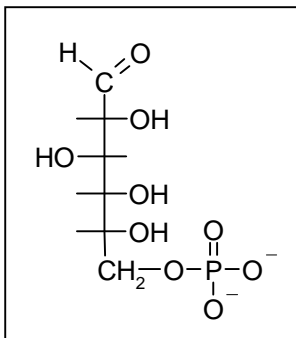
Prima fase della glicolisi



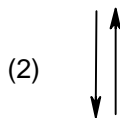
D-glucosio



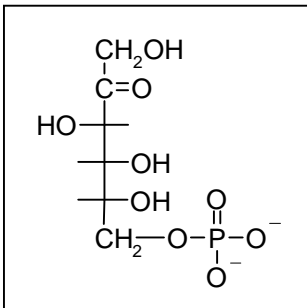
chinasi



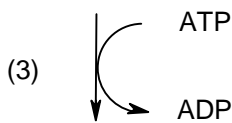
D-glucosio-6-fosfato



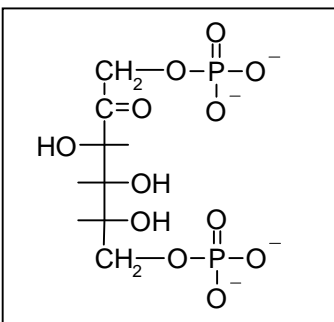
isomerasi



D-fruttosio-6-fosfato



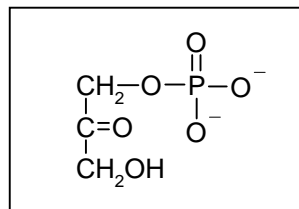
chinasi



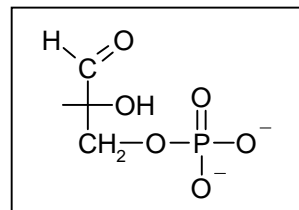
D-fruttosio-1,6-difosfato

aldolasi

(4)



diidrossiacetone-fosfato



D-gliceraldeide-3-fosfato

isomerasi

(5)

alla seconda fase

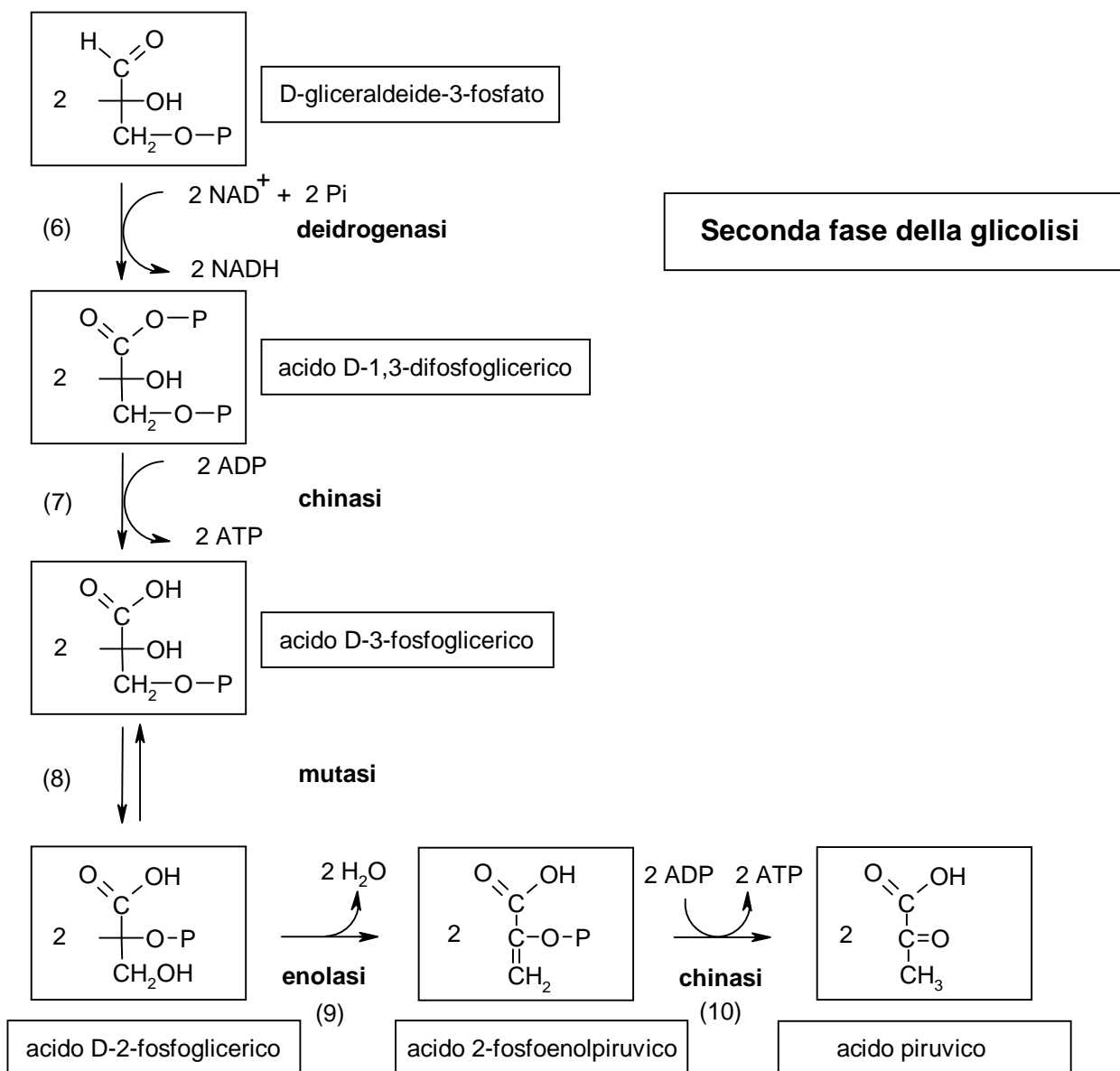
La seconda fase della glicolisi

La seconda fase della glicolisi è costituita dalle 5 reazioni finali, dalla 6 alla 10, che, partendo da due molecole di gliceraldeide-3-fosfato, formano nell'ordine (il 2 davanti al nome indica **2 molecole di . . .**):

- 6) 2 Acido 1,3-difosfoglicerico
- 7) 2 Acido 3-fosfoglicerico
- 8) 2 Acido 2-fosfoglicerico
- 9) 2 Acido 2-fosfoenolpiruvico
- 10) 2 Acido piruvico

Nella seconda fase si realizza il **guadagno energetico** che rappresenta il vero scopo della glicolisi. Si formano 4 ATP e, dato che ne erano stati consumati 2 nella prima fase, il guadagno netto è di 2 ATP per ogni molecola di glucosio degradata ad acido piruvico.

Due ATP vengono prodotti con la reazione 7 sfruttando il sovrappiù di energia che deriva dall'ossidazione di due molecole di gliceraldeide-3-fosfato con NAD^+ nella reazione 6. Questa energia viene accumulata come legame anidridico con un fosfato inorganico sul C-1 dell'**acido 1,3-difosfoglicerico** (6). Il trasferimento del fosfato all'ADP porta alla sintesi di ATP e di **acido 3-fosfo-glicerico** (7).



Gli altri **due ATP vengono prodotti attraverso le reazioni 8, 9 e 10**. Si tratta di restituire i due ATP consumati nella prima fase per fosforilare i carboni 1 e 6 della catena. Questo può essere realizzato osservando che i β -idrossi-acidi sono instabili e tendono a disidratarsi formando acidi α - β insaturi (accade

anche con le β -idrossialdeidi della condensazione aldolica). L'acido 3-fosfoglicerico non ha però l'OH in posizione β libero, ma lo può facilmente liberare spostando il fosfato sull'OH in α . Dopo la disidratazione, la molecola è ancora instabile perchè si tratta in realtà di un enolo. La forza della tautomeria cheto-enolica a cui andrà incontro la molecola può dare la spinta per la produzione di ATP.

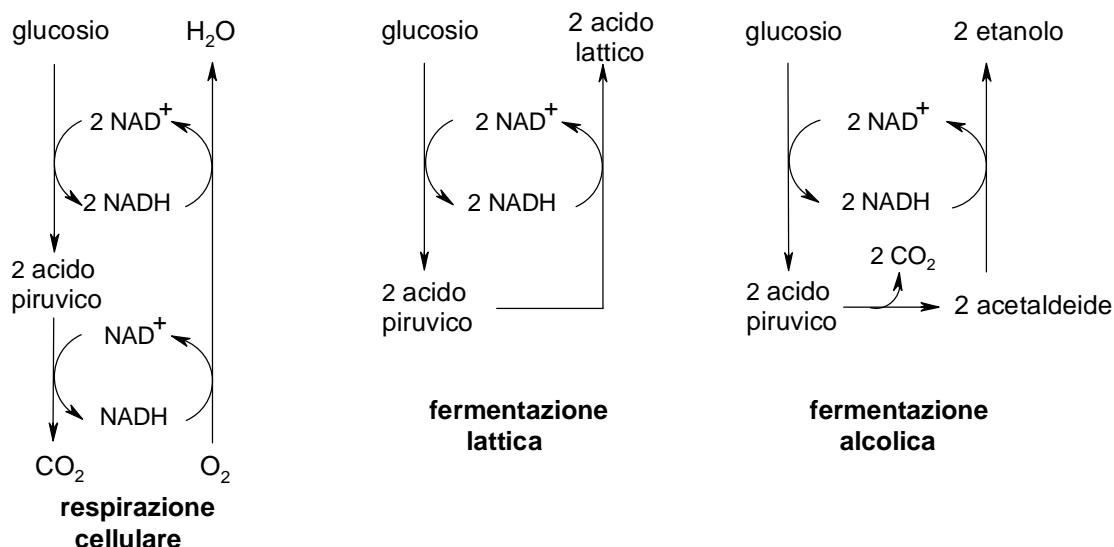
Nella reazione (8), quindi, il fosfato viene spostato dal C-3 al C-2, trasformando l'acido 3-fosfo-glicerico in **acido 2-fosfoglicerico**. Questo viene disidratato formando una specie instabile, l'**acido 2-fosfoenolpiruvico** (9) che finalmente attraverso due reazioni combinate di tautomeria cheto-enolica e idrolisi dell'estere fosforico produce ATP e **acido piruvico** (10).

Oltre al bilancio di ATP è importante considerare il **bilancio di NADH**. L'ossidazione compiuta nella tappa (6) comporta il consumo di 2 NAD^+ che vengono ridotti a 2 NADH. Questo ha come conseguenza che la glicolisi ha bisogno di un costante apporto di NAD^+ che però è presente in minima quantità nella cellula. Per funzionare, quindi, **la glicolisi ha bisogno di essere accoppiata con una reazione che ossidi il NADH a NAD^+** . Questo può avvenire in modi diversi che rappresentano diversi destini metabolici dell'acido piruvico: i tre più importanti sono: la **respirazione cellulare**, la **fermentazione lattica** e la **fermentazione alcolica**.

1) **Respirazione cellulare**. Negli organismi aerobi la glicolisi costituisce solo il primo passo della respirazione cellulare cioè dell'ossidazione completa del glucosio a CO_2 ad opera di O_2 . L'acido piruvico prodotto dalla glicolisi viene ossidato fino a CO_2 nei mitocondri attraverso la decarbossilazione ossidativa e il ciclo di Krebs. Queste reazioni producono grandi quantità di NADH che deve essere subito ossidato per rigenerare NAD^+ . Questa **ossidazione finale** è compiuta dall'**ossigeno molecolare O_2** che **si riduce ad H_2O** nella catena respiratoria.

2) **Fermentazione lattica**. In condizioni anaerobiche, cioè in assenza di ossigeno, bisogna che qualche altra molecola funga da **ossidante finale**. Questo ruolo può essere svolto dall'**acido piruvico** che viene **ridotto ad acido lattico** per consentire l'ossidazione del NADH a NAD^+ . Questa via metabolica si realizza per esempio nel muscolo scheletrico che si contrae violentemente, in questo caso si parla di fermentazione omolattica. Anche alcuni batteri anaerobi trasformano il glucosio in acido piruvico e poi questo in acido lattico, questa viene chiamata fermentazione lattica ed è responsabile dell'inacidimento del latte nello yogurt.

3) **Fermentazione alcolica**. In condizioni anaerobiche l'acido piruvico, il prodotto finale della glicolisi, può essere ridotto con una diversa via metabolica. Alcuni microrganismi anaerobi, come il lievito di birra, decarbossilano l'**acido piruvico** ad **acetaldeide** e poi riducono quest'ultima ad **etanolo**. In questo modo ossidano il NADH a NAD^+ e possono continuare a ricavare energia dalla glicolisi.



Si parla di **respirazione** se la molecola che fa da ossidante ultimo è una **molecola inorganica** come O_2 che si riduce ad H_2O nella respirazione cellulare. In altri tipi di respirazione troviamo altre molecole inorganiche che fanno da ossidante, per esempio NO_3^- che si riduce ad N_2 , SO_4^{2-} che si riduce a S^{2-} , H^+ che si riduce a H_2 , ecc. Si parla invece di **fermentazione** se la molecola che fa da ossidante ultimo è una **molecola organica** come l'acido piruvico che si riduce ad acido lattico nella fermentazione lattica, acetaldeide che si riduce ad etanolo nella fermentazione alcolica, CO_2 che si riduce a CH_4 nella fermentazione delle biomasse.

Reazioni enzimatiche

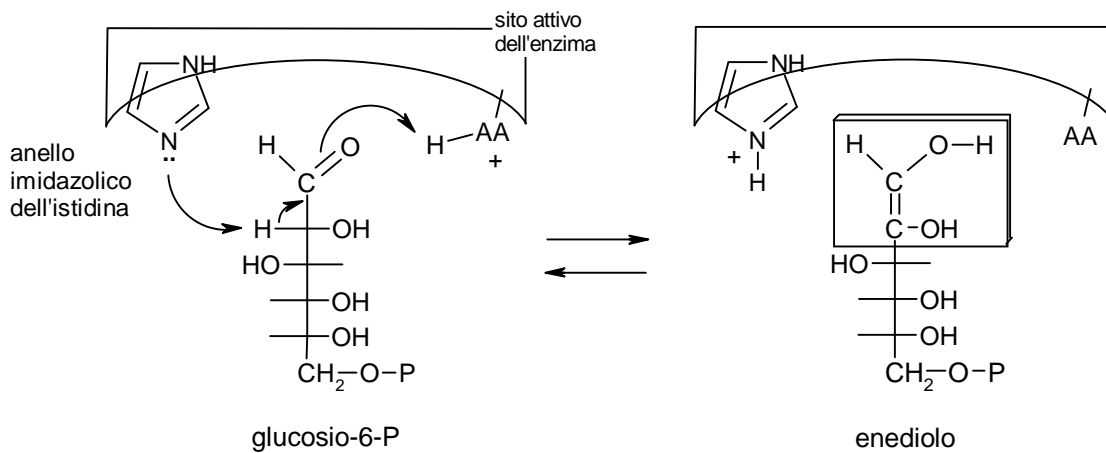
Le dieci reazioni della glicolisi, costituiscono per il chimico un'occasione ideale per comprendere che le reazioni enzimatiche non sono da accettare "a scatola chiusa", ma sono delle normali reazioni di chimica organica che vengono realizzate in modo estremamente sofisticato all'interno del sito attivo degli enzimi.

Spesso può essere interessante paragonare una reazione enzimatica con la corrispondente reazione in soluzione come verrebbe realizzata in un classico laboratorio di chimica organica.

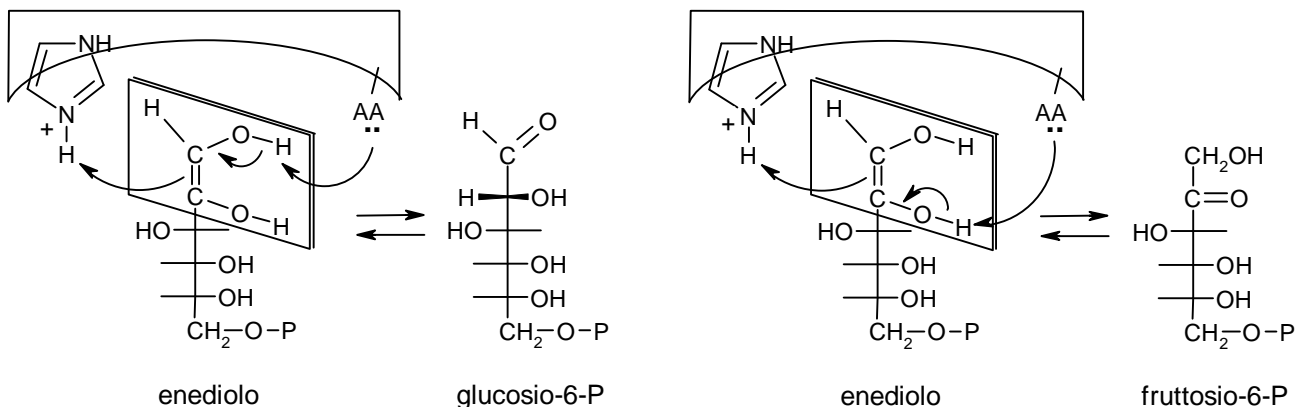
Se la reazione avviene **in soluzione**, richiede condizioni più drastiche di pH e temperatura ed è affidata alla casualità degli urti tra le molecole. Una reazione **enzimatica**, invece, non è lasciata al caso, ma avviene all'interno di una perfetta macchina chimica, il sito attivo dell'enzima. Qui il substrato viene legato in modo selettivo e i gruppi funzionali degli amminoacidi si avvicinano con precisione alla molecola e la fanno reagire in modo stereospecifico. Esamineremo ora i meccanismi delle reazioni più interessanti.

Meccanismo della reazione 2

In questa reazione l'enzima isomerasi catalizza l'isomerizzazione del glucosio-6-fosfato in fruttosio-6-fosfato. Il glucosio può essere isomerizzato anche in soluzione se trattato in ambiente basico, questa reazione è nota come isomerizzazione alcalina. Sia la reazione enzimatica che quella in soluzione procedono attraverso lo stesso intermedio **enediolo**. Nel sito attivo dell'enzima il glucosio-6-P si trova vicino ad un residuo di istidina e ad uno di lisina. Il meccanismo di formazione dell'enediolo è il seguente:



Nella isomerizzazione alcalina in soluzione il glucosio dà luogo a una miscela di equilibrio nella quale sono presenti tre esosi: **glucosio, fruttosio e mannosio**. Qui invece, grazie all'enzima, sono in equilibrio **solo glucosio e fruttosio**, senza formazione di mannosio. Il passaggio chiave è la formazione di glucosio dall'enediolo: l'enzima permette l'ingresso dell' H^+ solo da sopra il piano molecolare dove è presente l'azoto protonato dell'anello imidazolico di una istidina. Quando invece la reazione avviene in soluzione, l' H^+ può entrare sia da sopra sia da sotto il piano molecolare dell'enediolo portando indifferentemente a glucosio e a mannosio. In pratica osserviamo che l'enzima è in grado di condurre questa reazione in modo **stereoselettivo** producendo sul C-2 solo una configurazione R (glucosio) e mai una configurazione S (mannosio).



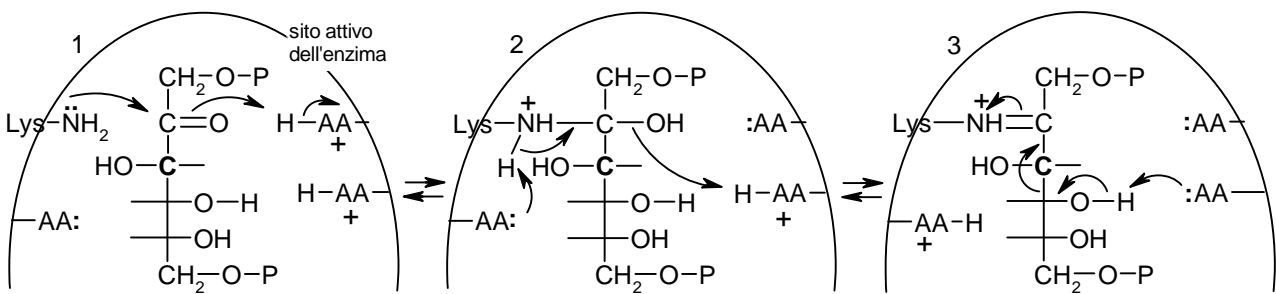
Meccanismo della reazione 4

L'enzima della reazione 4 è un'aldolasi e catalizza una **condensazione aldolica inversa** per spezzare il fruttosio-1,6-di-P in due frammenti di 3 atomi di carbonio ciascuno, diidrossiacetone-P e gliceraldeide-3-P.

La condensazione aldolica è una reazione che permette di condensare tra loro due aldeidi, ma, essendo reversibile, consente anche di spezzare in due frammenti una β-idrossi aldeide o un β-idrossi chetone.

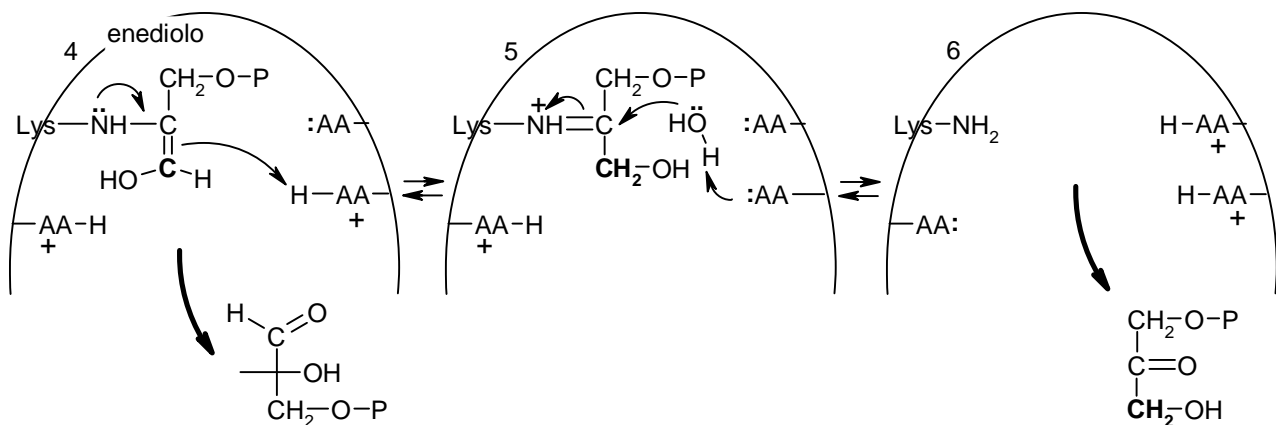
Nel fruttosio si sfrutta la particolare stabilità di una **carica negativa sul carbonio in posizione alfa** cioè quello vicino al carbonile (il carbonile è il C-2, quindi il C-3 è il **C-α**, in neretto nella figura). Quando sul C-4 si forma il nuovo carbonile della gliceraldeide (fig.3), la metà superiore della molecola del fruttosio può staccarsi perchè è un buon **gruppo uscente** dato che può stabilizzare la carica negativa per risonanza sul carbonile del C-2 formando l'intermedio **enediolo** (fig.4). La molecola si taglia tra C-3 e C-4, cioè dopo il C-α. Il fruttosio, quando entra nel sito attivo dell'enzima (fig.1), si lega con il gruppo amminico di una lisina formando una **immina** (fig.3). Questa rende più facile la reazione perchè stabilizza meglio l'**enediolo intermedio** (fig.4), infatti l'azoto è più stabile nella forma enolica piuttosto che in quella chetonica, mentre l'ossigeno è più stabile nella forma chetonica. Alla fine della reazione, per liberare la molecola di diidrossiacetone-P, una molecola di acqua idrolizza l'immina (fig.5) e l'enzima torna allo stato iniziale (fig.6). La reazione è reversibile e viene usata sia per rompere il fruttosio in due nella glicolisi, sia per sintetizzare fruttosio nella gluconeogenesi, la configurazione sul C-3 e sul C-4 dei due carboni che perdono reversibilmente l'attività ottica durante la reazione deve quindi essere preservata dall'enzima.

Si noti la **doppia catalisi che è contemporaneamente basica e acida**. In soluzione questo non sarebbe mai possibile perchè il pH è uniforme, mentre nel sito attivo di un enzima possono esserci amminoacidi dal comportamento acido-base opposto in punti diversi del sito attivo.



il fruttosio-1,6-di-P reagisce con una lisina per dare una immina (base di Schiff)

il fruttosio-1,6-di-P legato come immina subisce la condensazione aldolica inversa



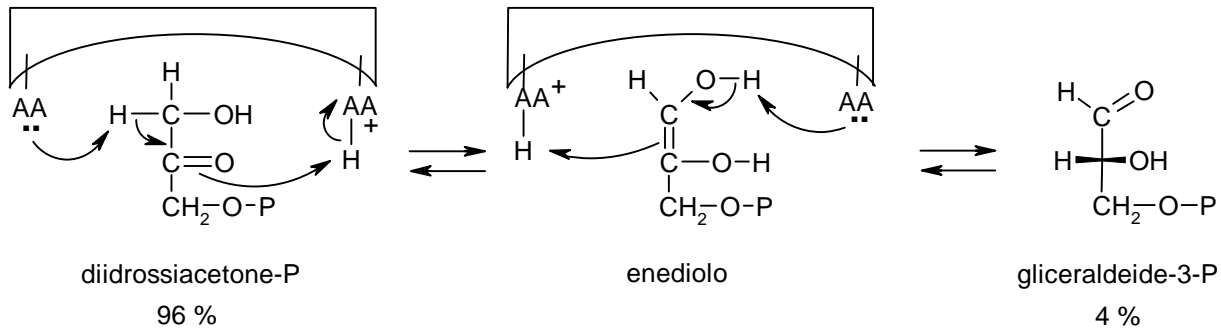
Dopo la rottura del legame C3-C4 la gliceraldeide-3-P lascia l'enzima

l'idrolisi dell'immina rilascia diidrossiacetone-P (l'ultimo passaggio è tralasciato)

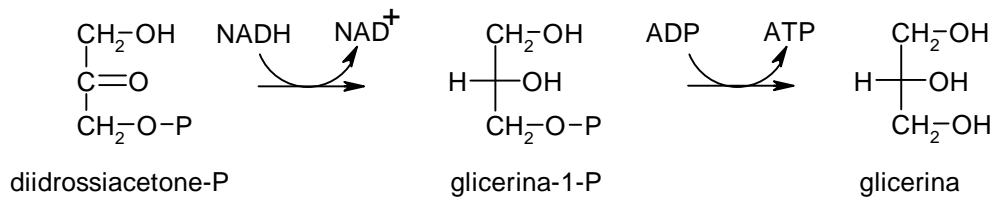
Meccanismo della reazione 5

I due trioso-fosfati prodotti dalla reazione 4, gliceraldeide-3-fosfato e diidrossiacetone-fosfato, sono in equilibrio tra loro via **enediolo** per mezzo di un enzima **isomerasi**. La reazione 5 è analoga a quella di isomerizzazione del glucosio-6-P in fruttosio-6-P già esaminata prima.

All'equilibrio è presente il 96 % di diidrossiacetone-P, dato però che solo la gliceraldeide-3-P viene consumata nelle tappe successive della glicolisi, per la legge dell'equilibrio mobile tutto il diidrossiacetone-P viene trasformato in gliceraldeide-3-P e come tale degradato nella glicolisi. In questo modo entrambi i trioso-fosfati vengono trasformati in acido piruvico, si ottengono quindi due molecole di acido piruvico per ogni molecola di glucosio degradata.



In realtà una piccola percentuale di diidrossiacetone-P sfugge alla glicolisi grazie ad una deidrogenasi che lo riduce a glicerina-1-fosfato, molecola necessaria per la sintesi dei fosfolipidi e dei trigliceridi.

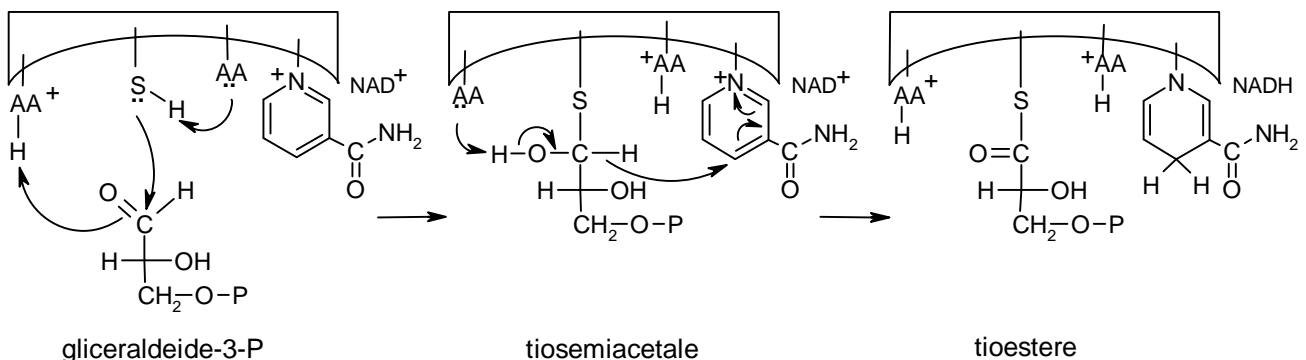


Meccanismo della reazione 6

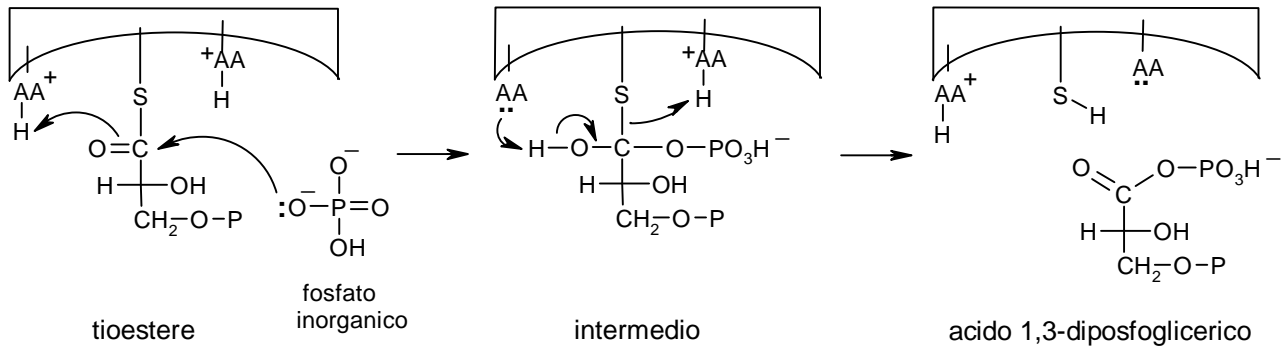
In questa reazione la gliceraldeide-3-P viene ossidata ad acido 1,3-di-P-glicerico per mezzo di un enzima deidrogenasi. La tappa 6 è importante per due motivi:

- 1) Riesce a conservare l'energia liberata dall'ossidazione del gruppo aldeidico producendo un legame ad alta energia, l'anidride mista acil-fosforica dell'acido 1,3-di-P-glicerico. Questo fosfato costituisce il vero guadagno energetico della glicolisi dato che produce una molecola di ATP nella tappa successiva, la n° 7.
- 2) L'ossidazione consuma NAD⁺ trasformandolo in NADH, quindi è indispensabile rigenerare il NAD⁺ se si vuole che la glicolisi continui a degradare glucosio e a produrre energia.

Il meccanismo con cui procede la reazione è complesso. La gliceraldeide-3-P si lega covalentemente al **gruppo tiolico SH di una cisteina** nel sito attivo dell'enzima. Si forma così un tio-semiacetale che è più difficile da ossidare di un'aldeide e quindi **serve tutta la capacità ossidante del NAD⁺ per ossidare il tio-semiacetale a tio-estere**. Il NAD⁺ si trova legato nel sito attivo dell'enzima. Nella figura è mostrata solo la parte attiva della molecola di NAD⁺, la nicotinammide, che accetta uno ione idruro in posizione 4.

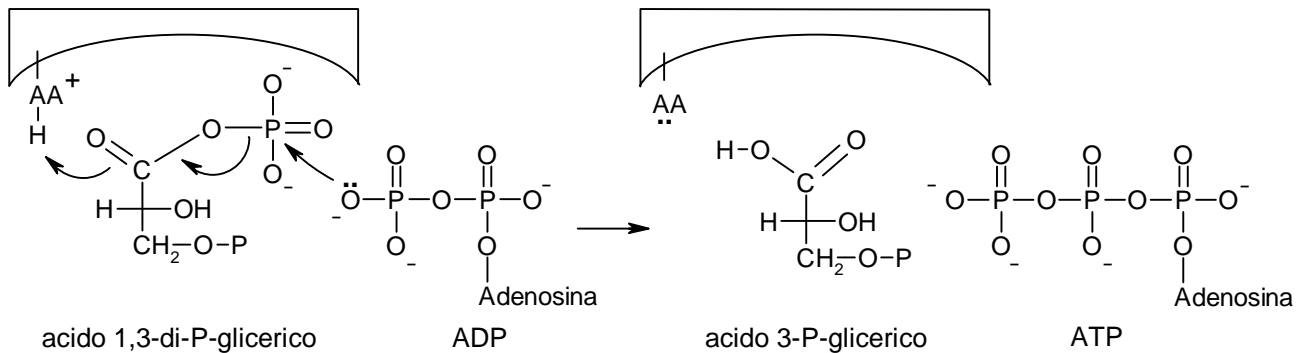


Il **tioestere** formato è **una molecola molto reattiva** in quanto il legame tioestereo è ad alta energia e può facilmente reagire con una molecola di fosfato inorganico per formare acido 1,3-di-P-glicerico, una anidride mista acil-fosforica nella quale viene conservata l'energia di ossidazione della gliceraldeide-3-P.



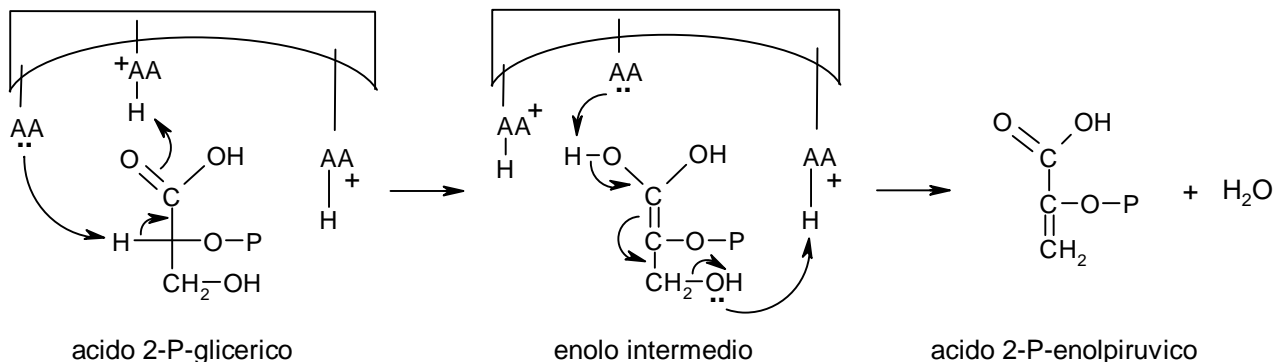
Meccanismo della reazione 7

Il legame anidridico acil-fosforico dell'acido 1,3-di-P-glicerico viene ora idrolizzato per mezzo di un enzima chinasi che trasferisce il gruppo fosforico ad una molecola di ADP. L'ATP ottenuto costituisce il **guadagno energetico della glicolisi**.



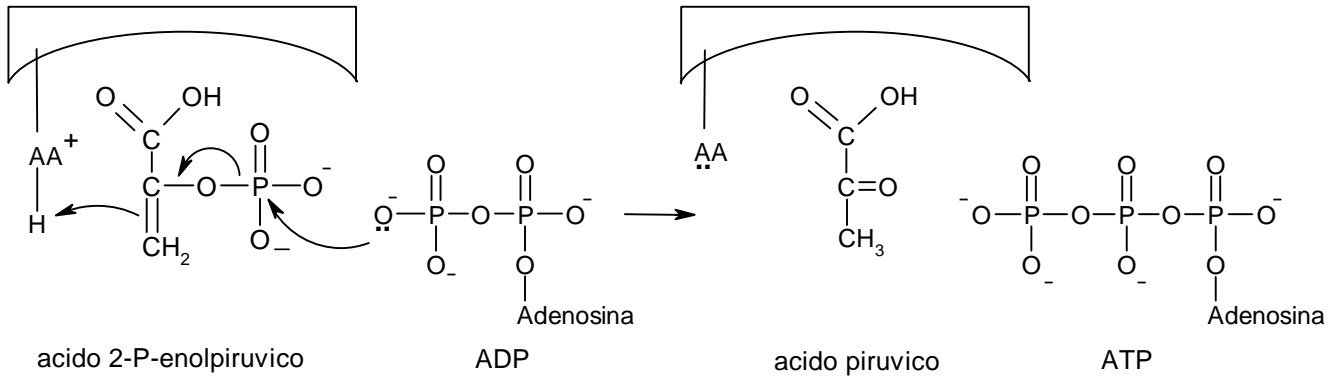
Meccanismo della reazione 9

L'enzima enolasi catalizza reversibilmente questa reazione di eliminazione in cui si ha la disidratazione del carbonio 3 dell'acido 2-P-glicerico per dare l'acido fosfoenolpiruvico. La **disidratazione di un gruppo OH in posizione b rispetto al carbonile** è particolarmente facile sia perchè può procedere **via enolo**, sia perchè dà luogo ad un doppio legame coniugato formando un **acido a-b insaturo**. E' importante poi osservare che, mentre il legame estereo col fosfato nell'acido 2-P-glicerico è relativamente stabile, nell'acido fosfoenolpiruvico questo legame diventa instabile in grado di trasferire il fosfato sull'ADP per la sintesi di ATP nella tappa successiva, la n° 10. Quello che rende così reattiva la molecola dell'acido fosfoenolpiruvico è la presenza del gruppo enolico che tende spontaneamente a trasformarsi nel corrispondente chetone attraverso la tautomeria cheto-enolica.



Meccanismo della reazione 10

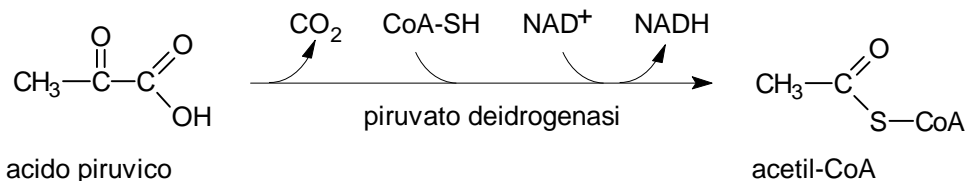
Un enzima chinasi catalizza l'ultima reazione della glicolisi nella quale l'acido fosfoenolpiruvico viene trasformato in acido piruvico dopo aver ceduto il fosfato ad una molecola di ADP per formare ATP. L'energia necessaria per la sintesi dell'ATP viene dalla somma di due reazioni combinate: **l'idrolisi del legame estereo** col fosfato sul C-2 e la **tautomeria cheto-enolica** che trasforma l'enolo (instabile) nel chetone (stabile) dell'acido piruvico.



Decarbossilazione ossidativa

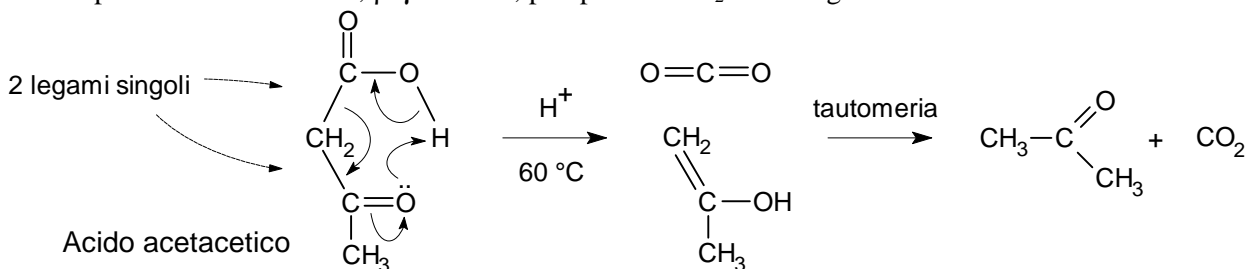
L'acido piruvico, il prodotto finale della glicolisi, può essere degradato secondo tre vie diverse come illustrato a pagina 6.

- 1 - Nella fermentazione lattica, l'acido piruvico viene ridotto ad acido lattico.
- 2 - Nella fermentazione alcolica viene prima decarbossilato ad acetaldeide e poi ridotto ad etanolo.
- 3 - Qui, nella respirazione cellulare, l'acido piruvico subisce una **decarbossilazione ossidativa** che lo trasforma in acido acetico sotto forma di tioestere del coenzima A, **acetil-CoA**.



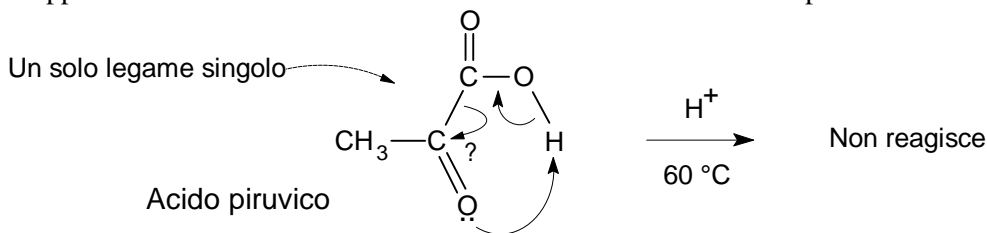
Il meccanismo della decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico è complesso e coinvolge una serie di quattro reazioni che devono avvenire in sequenza senza che siano rilasciati prodotti intermedi, per questo i tre enzimi che le conducono sono associati tra loro in un unico **complesso multienzimatico** chiamato **piruvato deidrogenasi**. Prima di esaminare nel dettaglio le reazioni della decarbossilazione ossidativa, vale la pena di fare alcune considerazioni di carattere generale.

Può sembrare strano che l'acido piruvico venga decarbossilato dato che è un acido α - β insaturo, infatti sappiamo dalla chimica organica che solo gli **acidi β - γ insaturi** possono decarbossilare in condizioni blande. Per esempio l'**acido acetacetico**, β - γ insaturo, può perdere CO_2 con il seguente meccanismo ciclico a 6 atomi:

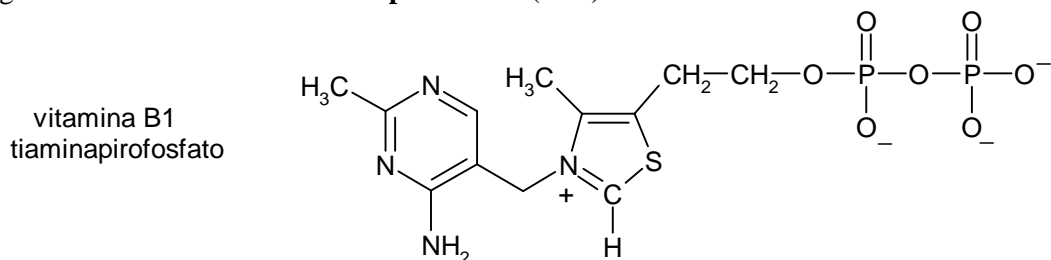


Grazie ai due legami singoli che separano il carbossile COOH dal doppio legame $\text{C}=\text{O}$, la CO_2 che si stacca lascia una coppia di elettroni sul carbonio in posizione α rispetto al carbonile $\text{C}=\text{O}$ dove possono essere stabilizzati per risonanza giungendo fino all'atomo di ossigeno.

L'**acido piruvico**, α - β insaturo, non può decarbossilare facilmente perché la CO_2 dovrebbe lasciare sulla molecola una coppia di elettroni direttamente sul carbonio del carbonile dove non può essere delocalizzata.

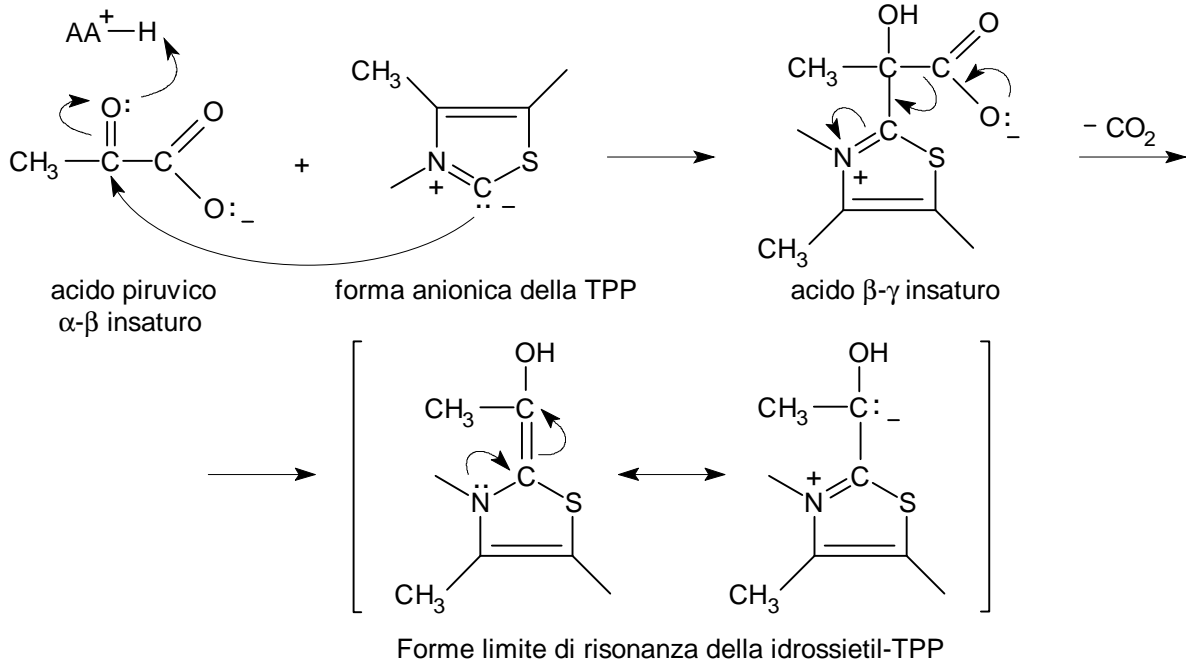


Come può allora l'acido piruvico decarbossilare senza contraddire le leggi della chimica? La reazione è possibile grazie all'intervento della **tiaminapiruvato (TPP)** o **vitamina B1**

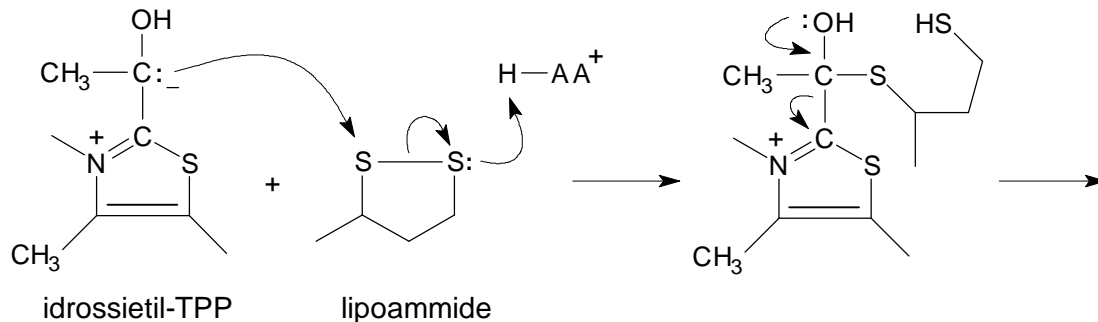


Il punto reattivo della vitamina B1 è l'anello tiazolico a cinque atomi. A causa della carica positiva sull'azoto, l'atomo di carbonio compreso tra azoto e zolfo è leggermente acido e può perdere l' H^+ . La forma anionica della TPP è nucleofila e può reagire attaccando il carbonile sul C-2 dell'acido piruvico.

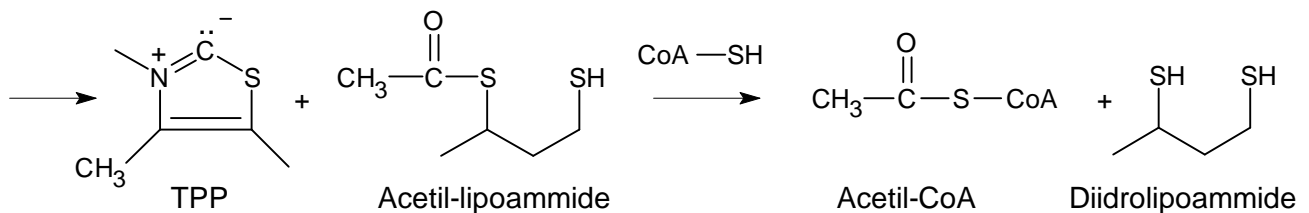
Il nuovo acido che si ottiene è ancora insaturo, ma ha il doppio legame spostato più indietro di un posto, è diventato quindi **b-g insaturo** (due legami singoli tra carbossile e doppio legame). Questa è la **situazione ideale per la decarbossilazione** che permette agli elettroni, lasciati sulla molecola dalla CO₂ che si stacca, di essere stabilizzati giungendo fino all'atomo di azoto positivo. Una molecola alternativa capace di aiutare la decarbossilazione degli α-chetoacidi è lo ione **cianuro** CN⁻ (esercizio: scrivete il meccanismo di decarbossilazione dell'acido piruvico con il cianuro). La vitamina B1, naturalmente, è di gran lunga preferibile perchè, a differenza del cianuro, non è tossica.



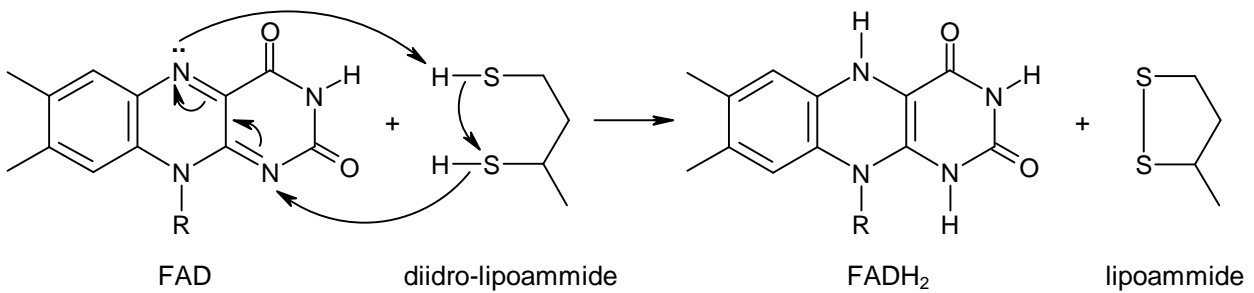
Si è formata **idrossietil-TPP** che al prossimo passaggio deve essere ossidata dato che questa reazione produce **acido acetico** e non acetaldeide, come la fermentazione alcolica. L'ossidazione non può essere realizzata dal FAD o dal NAD⁺ poichè sulla idrossietil-TPP non ci sono atomi di H da espellere. La cellula utilizza quindi un altro sistema redox, il ponte disolfuro -S-S- della **lipoammide** che viene ridotto alla forma tiolica SH.



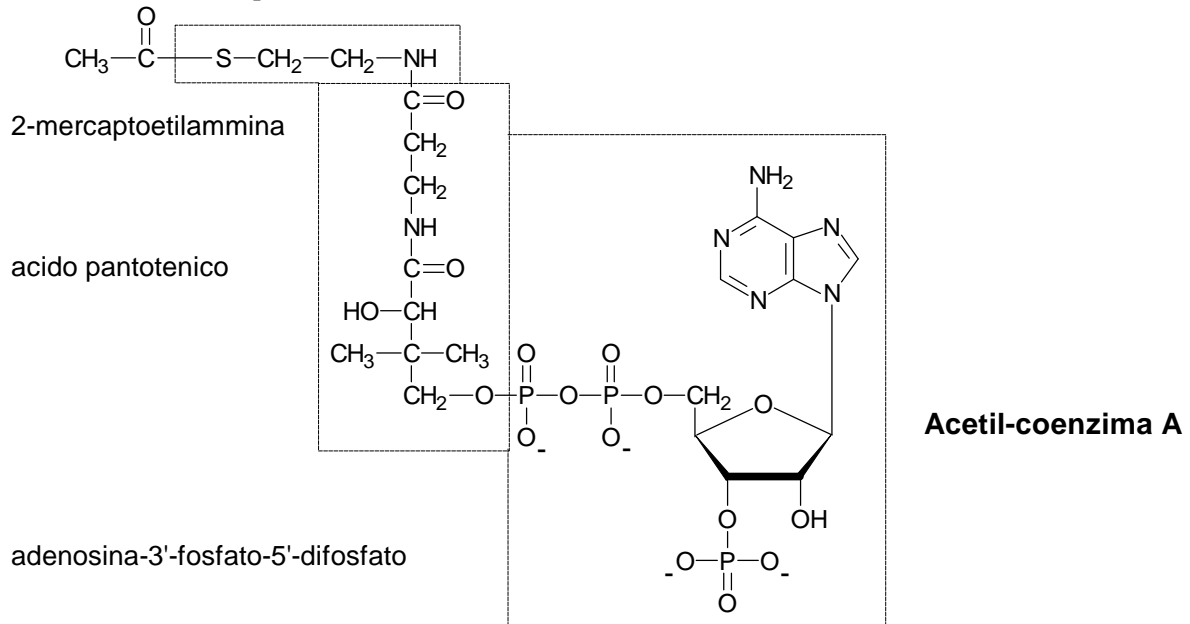
Il tioestere intermedio **acetil-lipoammide** subisce una reazione di transesterificazione reagendo col tiolo del **coenzima A** (CoA-SH). Si forma il tioestere **acetil-CoA** e il ditio diidrolipoammide.



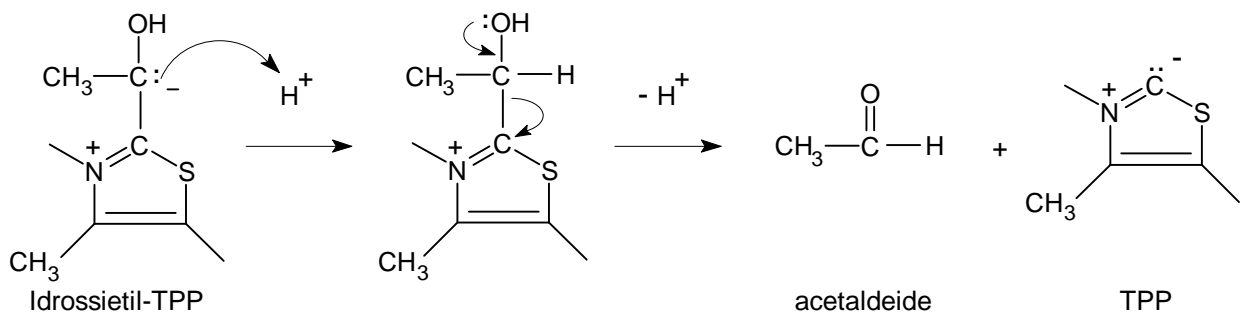
A differenza della idrossietil-TPP, la diidrolipoammide possiede, sui gruppi SH, gli atomi di idrogeno necessari per ridurre il FAD a FADH₂. Subito dopo interviene una molecola di NAD⁺ che, riducendosi a NADH, rigenera il FAD nell'enzima.



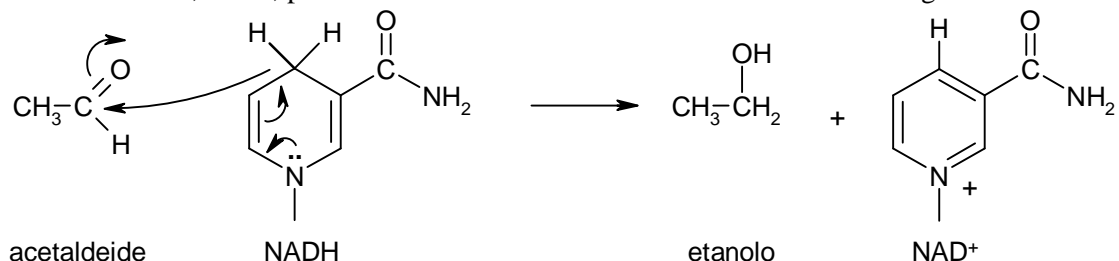
La struttura dell'**acetil-coenzima A** è illustrata qui sotto. Nel Co-A ci sono tre componenti legati tra loro in modo covalente: 2-mercaptoetilammina, acido pantotenico (vitamina B5), adenosina-3'-fosfato-5'- difosfato. Il legame tioestereo tra l'acido acetico e il coenzima A è ad alta energia dato che il ΔG° di dissociazione è di -7,5 Kcal/mole, simile a quello dell'ATP che è di -7,3 Kcal/mole.



Nella **fermentazione alcolica** l'acido piruvico viene decarbossilato attraverso una serie di reazioni che ricalcano lo stesso schema appena visto per la decarbossilazione ossidativa fino alla formazione della idrossietil-TPP. A questo punto la idrossietil-TPP, invece di subire un'ossidazione con la lipoammide, prima si protona sul carbonio che aveva subito la decarbossilazione, poi si scinde liberando **acetaldeide** e TPP che è un buon gruppo uscente dato che può uscire come carbanione stabile.



La reazione col NADH, infine, produce etanolo e NAD⁺ che consente di continuare la glicolisi.

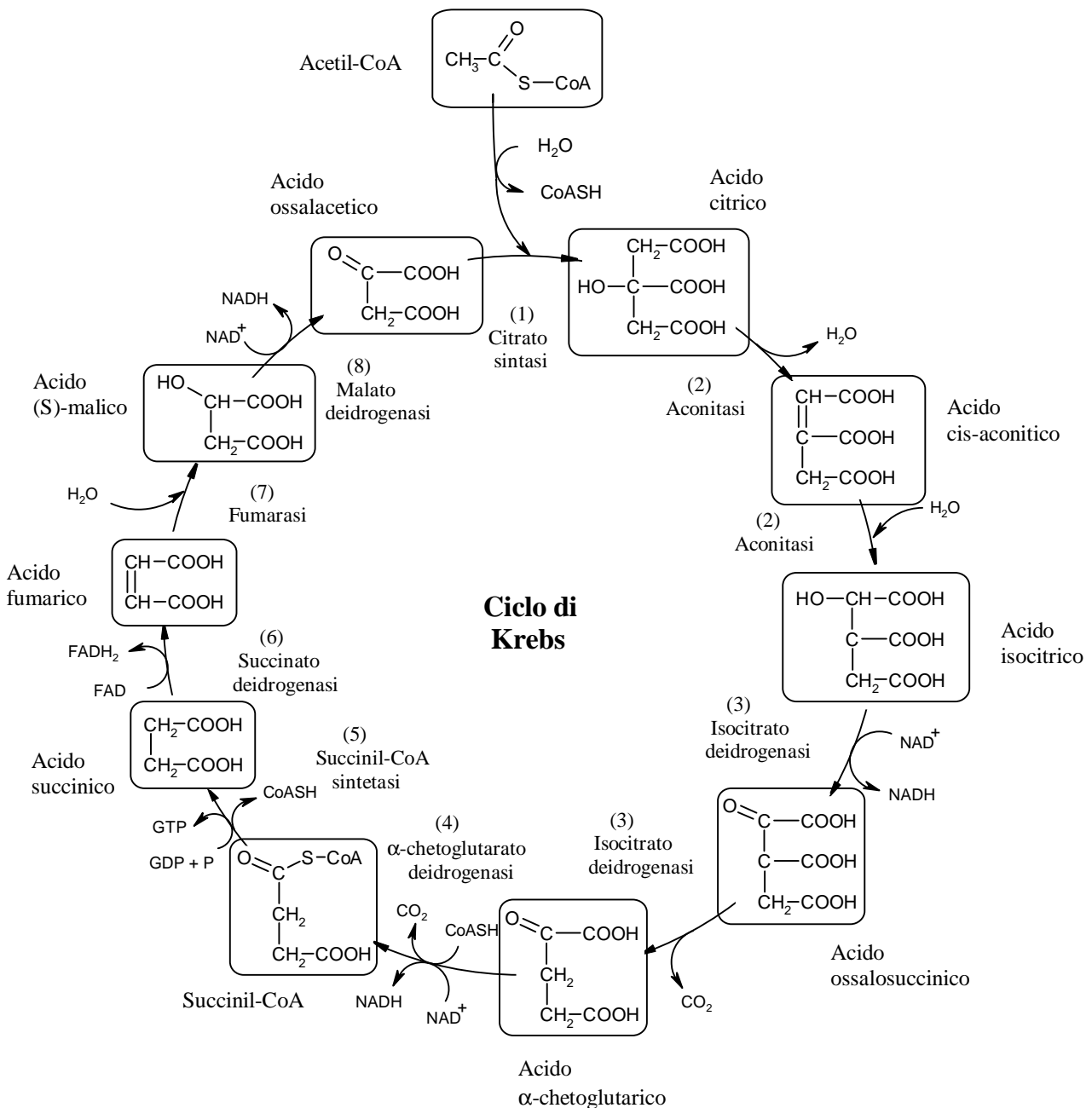


Secondo stadio della respirazione cellulare

Ciclo di Krebs

Il ciclo di Krebs, o ciclo dell'acido citrico, consiste in una serie di reazioni che avvengono all'interno dei mitocondri, nello **spazio della matrice**. Queste reazioni sono realizzate attraverso **otto tappe** enzimatiche e hanno lo scopo di ossidare completamente i due carboni del gruppo acetilico dell'acetil-CoA formando due molecole di CO₂ in modo però da conservare l'energia libera per la produzione di ATP.

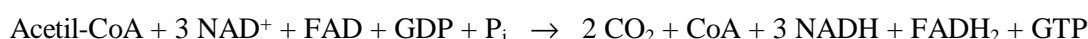
Il problema chimico affrontato dal ciclo di Krebs è la **decarbossilazione** dell'acido acetico, che risulta ancora più complessa di quella dell'acido piruvico. Il problema è stato risolto in modo elegante unendo l'acido acetico ad una molecola ausiliaria, l'acido ossalacetico, in modo da ottenere, dopo alcuni passaggi, l'acido ossalosuccinico un β-chetoacido che può decarbossilare facilmente perchè possiede un doppio legame in posizione β-γ. La seconda decarbossilazione viene realizzata facendo ricorso alla tiaminapirifosfato, la vitamina B1, come nella decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico, dato che si tratta di decarbossilare un α-cheto acido, l'acido α-chetoglutarico.



A differenza di quanto accade nella glicolisi, qui le reazioni hanno un andamento ciclico: l'acido ossalacetico, che viene consumato inizialmente per condensazione con l'acetil-CoA, viene rigenerato alla fine del ciclo e può ricominciare la sequenza di reazioni. In questo modo una singola molecola di acido ossalacetico può degradare teoricamente un numero infinito di molecole di acetil-CoA. Le 8 tappe enzimatiche possono essere così riassunte:

- 1) L'enzima **citrato sintasi** catalizza la condensazione dell'acetil-CoA con l'acido ossalacetico per formare acido citrico, che dà il nome al ciclo. L'acido citrico possiede un gruppo alcolico OH che però non può essere ossidato a carbonile C=O perchè è terziario. Nelle prossime tappe è necessario spostare l'OH sul carbonio adiacente secondario per poi creare il carbonile C=O che consentirà di decarbossilare la molecola.
 - 2) L'enzima **aconitasi** converte l'acido citrico, che possiede un gruppo alcolico terziario, in acido isocitrico nel quale il gruppo ossidrile si trova sul carbonio adiacente, in posizione secondaria. L'acido citrico viene prima disidratato formando l'acido insaturo cis-aconitico, questo viene poi reidratato in modo che l'ossidrile si leghi al carbonio adiacente. Durante queste operazioni la molecola resta legata nel sito attivo dell'enzima.
 - 3) L'enzima **isocitrato deidrogenasi** ossida, per mezzo del NAD⁺, il gruppo ossidrile dell'acido isocitrico formando l'acido ossalosuccinico, un β-chetoacido (β-γ insaturo) che viene subito decarbossilato generando l'acido α-chetoglutarico. Questa è la prima delle due tappe in cui si ha liberazione di CO₂.
 - 4) Il complesso multienzimatico **α-chetoglutarato deidrogenasi** esegue una decarbossilazione ossidativa dell'acido α-chetoglutarico (un alfa cheto acido come l'acido piruvico) formando succinil-CoA. Il meccanismo d'azione di questo enzima è del tutto simile a quello della piruvato deidrogenasi e coinvolge la vitamina B1, la lipoamide, il Coenzima A e il NAD⁺.
 - 5) L'enzima **succinil-CoA sintetasi** trasforma il succinil-CoA in acido succinico recuperando l'energia libera dell'idrolisi del tioestere per formare GTP che viene poi convertito in ATP.
- A questo punto del ciclo sono state prodotte due molecole di CO₂ e quindi è stata completata l'ossidazione del gruppo acetile. La parte restante del ciclo ha lo scopo trasformare l'acido succinico in acido ossalacetico che può ricominciare il ciclo di reazioni. La somiglianza tra le due molecole ci suggerisce la strategia di sintesi: si tratta di creare un doppio legame C=C, di idratarlo fino ad alcol e infine di ossidare l'alcol a carbonile C=O.
- 6) L'enzima **succinato deidrogenasi** trasforma il legame centrale dell'acido succinico nel doppio legame trans dell'acido fumarico, cioè ossida un alcano ad alchene riducendo FAD a FADH₂.
 - 7) L'enzima **fumarasi** catalizza l'idratazione del doppio legame dell'acido fumarico producendo acido malico.
 - 8) Infine l'enzima **malato deidrogenasi** ossida il gruppo alcolico a chetone e forma acido ossalacetico riducendo la terza molecola di NAD⁺ a NADH.

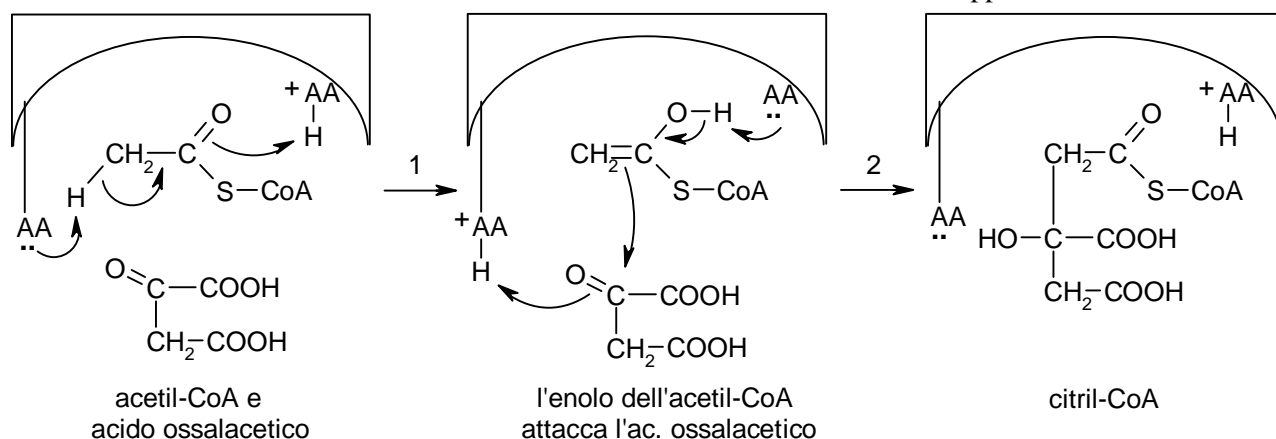
La reazione globale riferita ad una molecola di acetil-CoA è la seguente:

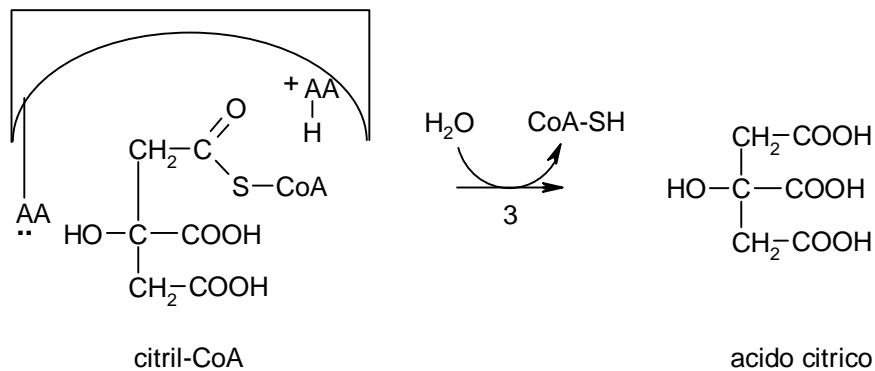


Per brevità esamineremo in dettaglio il meccanismo di due sole reazioni enzimatiche, quello della citrato sintasi, la tappa n° 1, e quello della isocitrato deidrogenasi, la tappa n° 3.

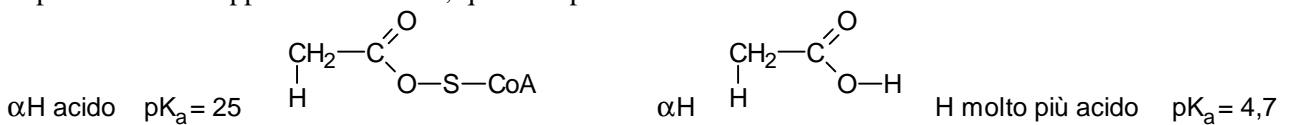
Tappa n° 1: citrato sintasi

La reazione catalizzata dall'enzima citrato sintasi è una condensazione di Claisen mista tra un estere, l'acetil-CoA e un chetone, l'acido ossalacetico. Il meccanismo della reazione avviene in 3 tappe.





1) L'acetil-CoA viene convertito per tautomeria nell'enolo attraverso una catalisi concertata acida e basica. L'acido acetico si presenta come tiostere del coenzima A (acetil-CoA) perchè così può formare più facilmente l'enolo. Se l'acido acetico avesse il carbossile libero, questo sarebbe molto più acido dell'idrogeno in alfa (pKa 4,7 contro pKa 25) quindi a pH fisiologico il carbossile sarebbe presente come carbossilato e la carica negativa impedirebbe lo strappo dell'H⁺ in alfa, quindi impedirebbe la tautomeria.

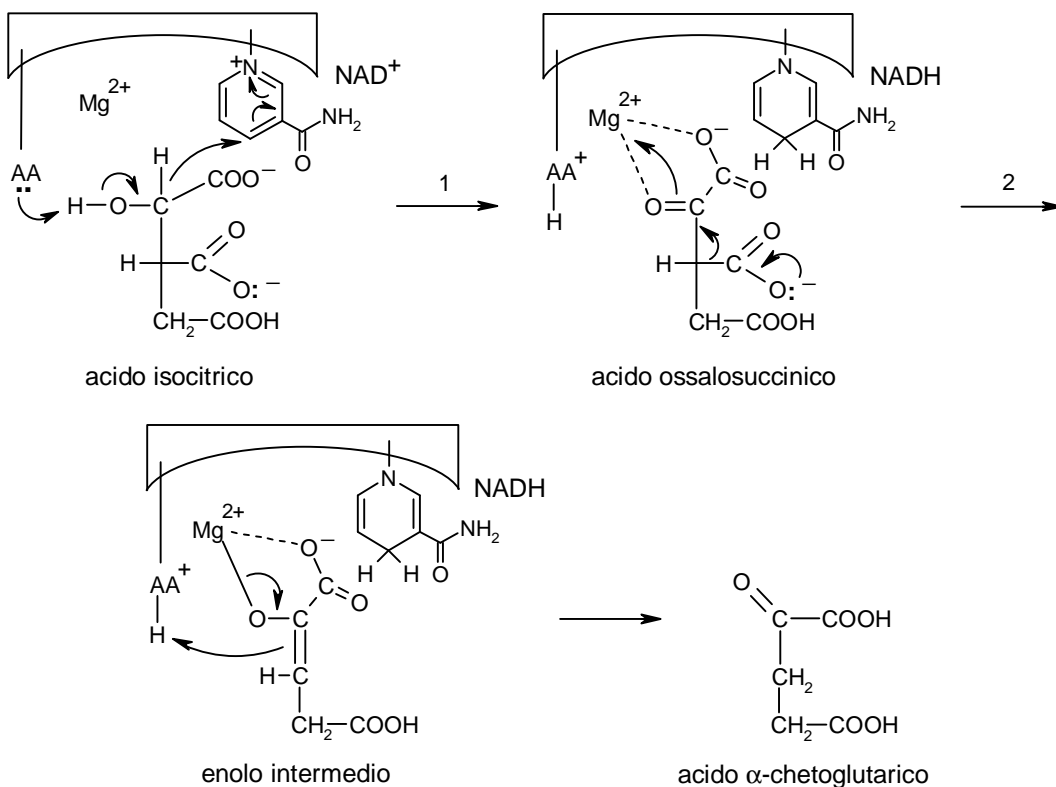


2) L'enolo dell'acetil-CoA porta un attacco nucleofilo al carbonile dell'acido ossalacetico. Il prodotto della reazione, il citril-CoA, resta legato all'enzima.

3) Il citril-CoA viene idrolizzato ad acido citrico e CoA-SH. Questa idrolisi è fortemente spostata a destra, $\Delta G^\circ = -7,5$ Kcal/mole, e fornisce la spinta termodinamica a tutta la reazione.

Tappa n° 3: isocitrato deidrogenasi

L'enzima isocitrato deidrogenasi catalizza prima l'ossidazione e poi la decarbossilazione dell'acido isocitrico per formare acido α -chetoglutarico. Si produce la prima molecola di CO₂ del ciclo e la prima molecola di NADH. La reazione procede in due stadi. Nel primo il NAD⁺ ossida l'acido isocitrico ad acido ossalosuccinico che resta legato all'enzima. Nel secondo stadio l'acido ossalosuccinico, un β -chetoacido, viene decarbossilato in presenza di Mn²⁺ come cofattore.



Terzo stadio della respirazione cellulare

Fosforilazione ossidativa

Nel terzo stadio della respirazione cellulare l'ossigeno molecolare O_2 provoca l'**ossidazione** dei coenzimi ridotti NADH e $FADH_2$ che sono stati generati dalla glicolisi, dalla decarbossilazione ossidativa e dal ciclo di Krebs. Le reazioni sono le seguenti:



($\Delta G^{\circ'}$ indica la variazione di energia libera per concentrazioni 1 M a pH 7, mentre ΔG° è riferito a pH 0). Queste reazioni sono fortemente esoergoniche. L'energia libera $\Delta G^{\circ'}$ non viene dispersa come calore, ma è utilizzata per produrre una differenza di pH tra la matrice e lo spazio intermembrana, che a sua volta provoca una reazione di **fosforilazione** che genera ATP da ADP e fosfato inorganico.



La reazione complessiva è quindi chiamata **fosforilazione ossidativa**.

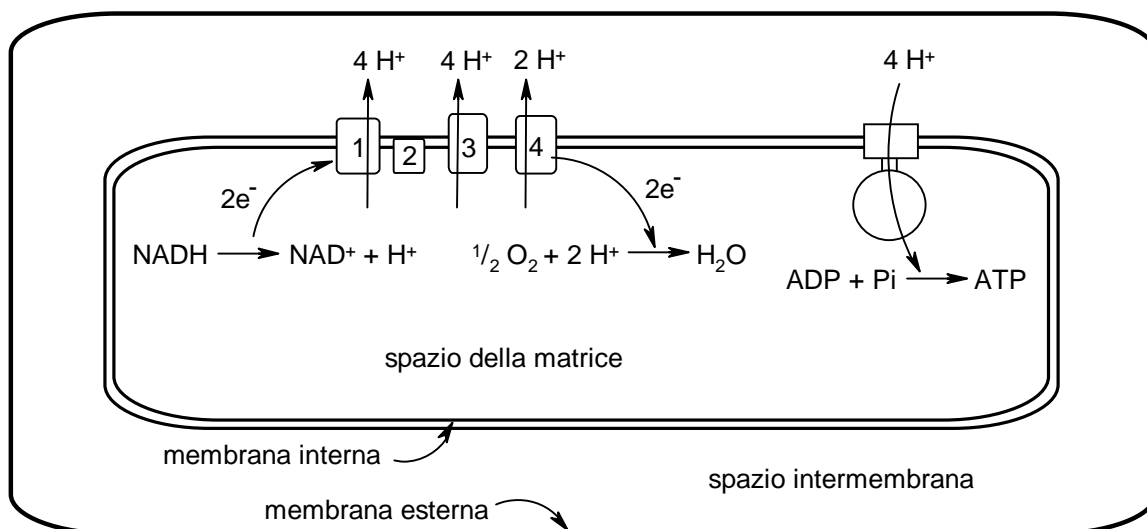
Gli elettroni che vengono ceduti dal NADH e dal $FADH_2$ giungono all'ossigeno attraverso una serie di **molecole trasportatrici di elettroni** chiamate nel loro insieme **catena respiratoria** e organizzate in quattro complessi proteici. Sia la catena respiratoria che la fosforilazione sono localizzate nella **membrana interna dei mitocondri**. La decarbossilazione ossidativa, il ciclo di Krebs e la beta ossidazione degli acidi grassi, che producono la maggior parte del NADH e del $FADH_2$, sono localizzate nella matrice mitocondriale a ridosso della catena respiratoria.

Il trasferimento degli elettroni dal NADH e dal $FADH_2$ verso l'ossigeno molecolare O_2 lungo la catena respiratoria provoca uno **spostamento di ioni H^+ dalla matrice verso lo spazio intermembrana**. Si genera in questo modo una **differenza di pH** di circa 0,75 unità tra i due lati della membrana interna dei mitocondri. Nello spazio intermembrana si viene a creare un ambiente **acido**, nella matrice un ambiente **basico**. A questo punto entra in azione il complesso enzimatico **ATP sintasi** che produce ATP a partire da ADP e fosfato inorganico sfruttando la tendenza degli ioni H^+ a reagire con gli ioni OH^- per formare H_2O .

In definitiva, l'ossidazione di una molecola di NADH fa scorrere 2 elettroni nella catena respiratoria e spinge 10 H^+ (4+4+2) nello spazio intermembrana e produce 2,5 molecole di ATP.

Anche l'ossidazione di una molecola di $FADH_2$ fa scorrere 2 elettroni nella catena respiratoria, ma spinge solo 6 H^+ (4+2) nello spazio intermembrana e produce quindi solo 1,5 molecole di ATP.

Per concludere, l'ossidazione e la fosforilazione sono **processi accoppiati** per mezzo di una differenza di concentrazione di ioni H^+ creata a cavallo della membrana interna mitocondriale.



Struttura schematizzata di mitocondrio

Catena respiratoria

La catena respiratoria ricorda da vicino una pila, infatti utilizza l'energia liberata dall'ossidazione di NADH e FADH₂ ad opera di O₂ che si riduce ad H₂O per produrre un flusso di elettroni che a sua volta produce un lavoro, lo spostamento di ioni H⁺ dalla matrice allo spazio intermembrana.

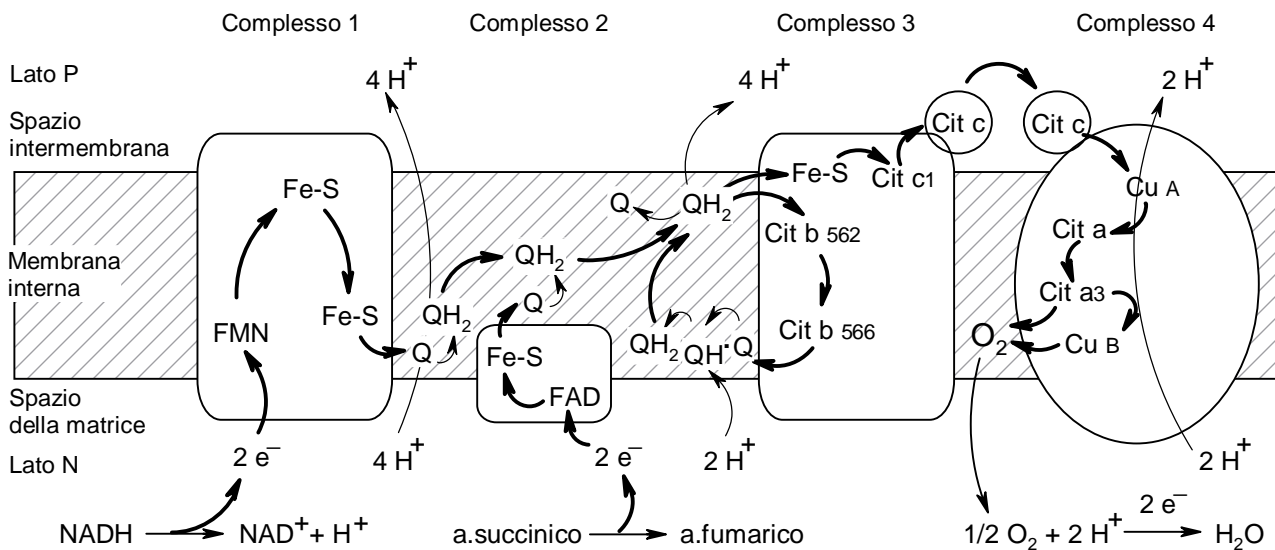
Per realizzare una pila si fanno avvenire le due semireazioni di ossidazione e di riduzione in due recipienti diversi uniti da un ponte salino e collegati da un filo elettrico attraverso il quale si trasferiscono gli elettroni dalla semireazione dove avviene l'ossidazione all'altra, quella di riduzione. In questo modo l'energia libera della reazione viene trasformata in energia elettrica che può essere utilizzata per azionare un motore elettrico.

Nei mitocondri si realizza qualcosa di simile: NADH e O₂ non reagiscono direttamente tra loro, ma le due semireazioni avvengono in posti diversi e gli elettroni vengono trasferiti dalla semireazione di ossidazione del NADH a quella di riduzione di O₂ attraverso una serie di molecole trasportatrici di elettroni, la **catena respiratoria**, che si comporta come un filo elettrico. Il flusso di elettroni compie un lavoro chimico inducendo alcuni complessi proteici di membrana a trasferire ioni H⁺ da un lato all'altro della membrana interna dei mitocondri.

La catena respiratoria è costituita da **quattro complessi proteici** che contengono dei coenzimi redox saldamente legati. Gli elettroni vengono trasferiti da un gruppo redox al successivo attraverso potenziali progressivamente crescenti compresi tra -0,32 V della coppia NAD⁺/NADH e +0,82 V della coppia O₂/H₂O.

Solo i **complessi 1, 3 e 4** sono in grado spostare gli ioni H⁺ e per questo sono chiamati **pompe protoniche**.

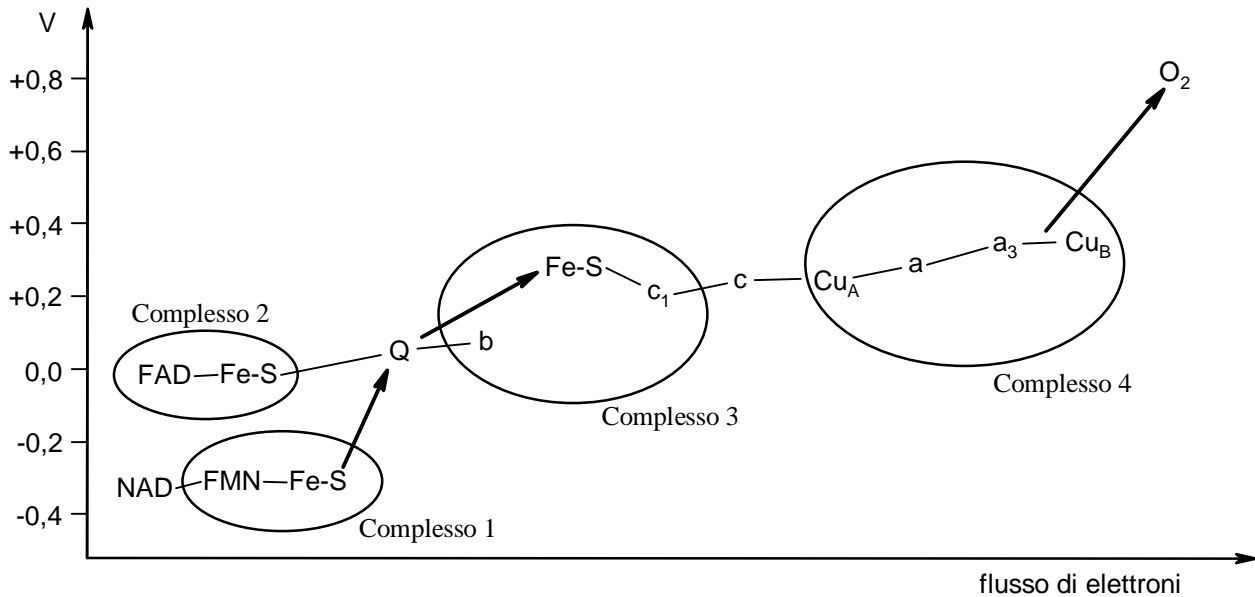
Gli elettroni vengono trasferiti dai **complessi 1 e 2** fino al **complesso 3** per mezzo del **coenzima Q** (che si muove all'interno della membrana), e sono trasferiti dal **complesso 3** fino al **complesso 4** per mezzo del **citocromo c** (una piccola proteina esterna alla membrana). Il seguente schema può chiarire il processo (il percorso compiuto dagli elettroni è mostrato con frecce in grassetto).



I potenziali redox E° dei componenti della catena respiratoria sono i seguenti:

	O ₂	+0,82 V	
Complesso 4	CuB	+0,34 V	
	Cit a ₃	+0,35 V	
	Cit a	+0,29 V	
	CuA	+0,25 V	
	Cit c	+0,25 V	
Complesso 3	Cit c ₁	+0,21 V	
	Fe-S	+0,28 V	
	Cit b	+0,077 V	
	CoQ	+0,045 V	
Complesso 1	Fe-S	-0,30 V	
	FMN	-0,30 V	
	NAD	-0,32 V	
Complesso 2	Fe-S	-0,03 V	
	FAD	-0,04 V	

Riportando in grafico questi valori si osserva che ci sono solo tre passaggi lungo la catena respiratoria che presentano sufficiente differenza di potenziale da permettere sia di trasferire elettroni sia di spostare ioni H^+ contro gradiente di concentrazione per promuovere la sintesi di ATP. Questi salti di potenziale sono in corrispondenza dei tre complessi 1, 3 e 4 e sono evidenziati con tre frecce nella figura.



Complesso 1

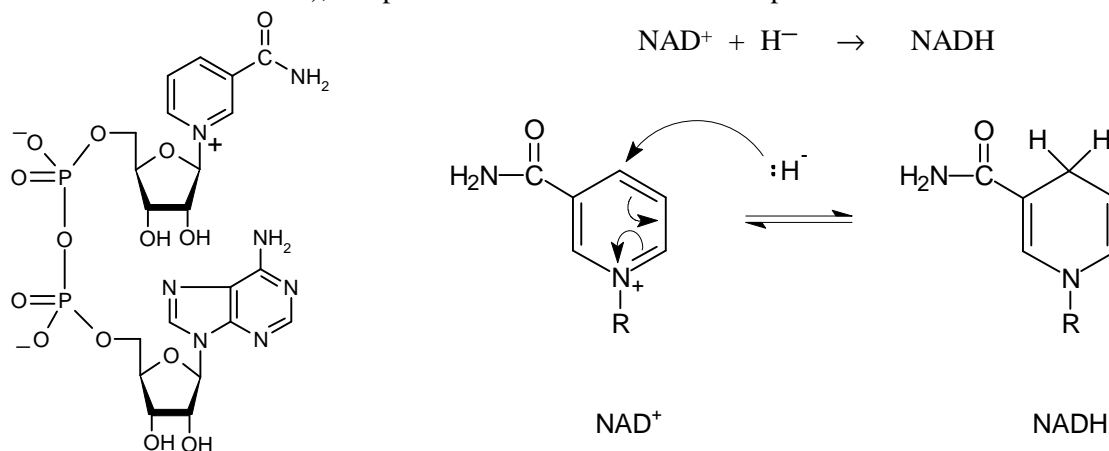
Il complesso 1, chiamato **NADH-CoQ ossidoreduttasi**, catalizza due processi accoppiati:

- 1) il trasferimento esoergonico di $2 e^-$ e $2 H^+$ dal NADH al coenzima Q: $NADH + H^+ + Q \Rightarrow NAD^+ + QH_2$.
- 2) il trasferimento endoergonico di $4 H^+$ dalla matrice (lato N, negativo) allo spazio intermembrana (lato P, positivo).

Il complesso 1 è quindi una **pompa protonica**. E' composto di 42 catene proteiche e contiene due tipi di sistemi redox: una molecola di **FMN, flavin mononucleotide**, e sei **centri ferro-zolfo**, cioè proteine che contengono atomi di ferro non-eme complessati con atomi di zolfo. Descriveremo in questo paragrafo anche il **NADH** e il **Coenzima Q**, i gruppi redox che interagiscono a monte e a valle col complesso 1.

NAD, nicotinammide adenina dinucleotide

Il NAD è il coenzima di ossidoriduzione che, assieme al FAD, ha la funzione di raccogliere tutti gli equivalenti riducenti prodotti dall'ossidazione dei substrati organici. Il centro redox del NAD è la **nicotinammide (vitamina PP o vitamina B3)**, che può accettare uno **ione idruro** in posizione 4. La reazione è la seguente:

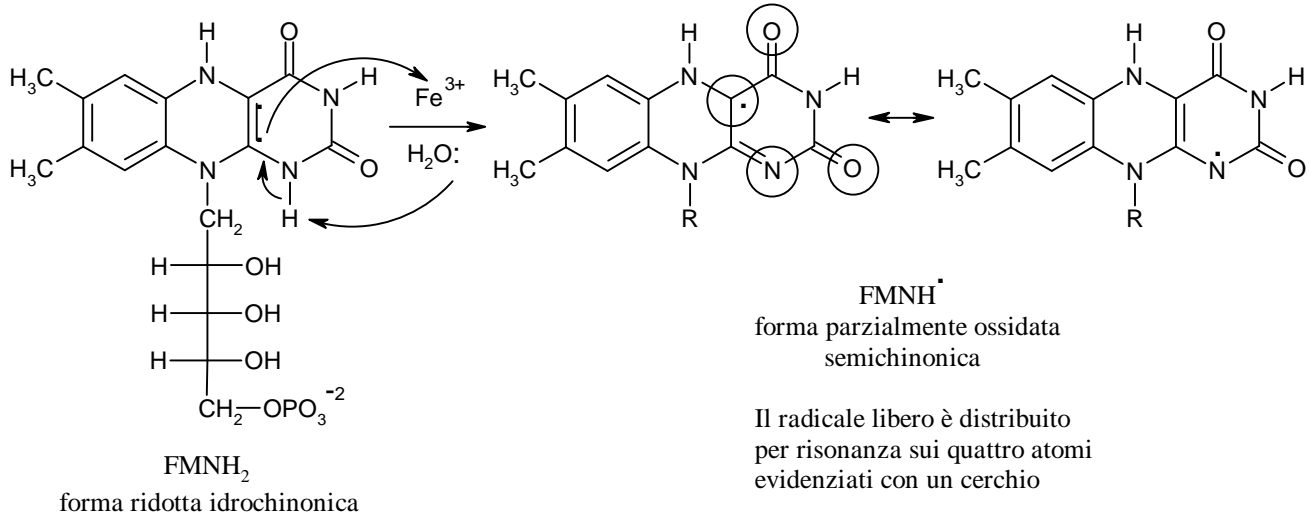


Nicotinammide Adenina Dinucleotide

FMN, flavin mononucleotide

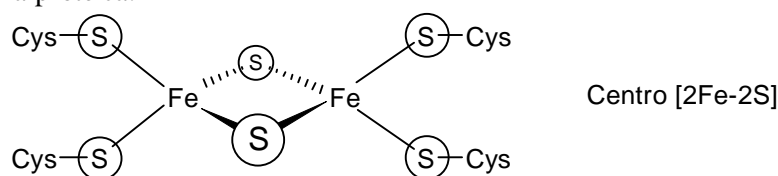
Il FMN è un coenzima simile al FAD, ma privo di AMP adenosina monofosfato. Il precursore del FMN e del FAD è la **riboflavina** o **vitamina B2** che differisce dal FMN solo per la mancanza del gruppo fosfato legato al ribitolo. Come il coenzima Q, mostrato più avanti, anche il FMN può scambiare sia uno che due elettroni per volta, questo è possibile perché oltre ad una forma ossidata e ad una forma ridotta, possiede anche uno **stato di ossidazione intermedio** di tipo **semichinonico** che è un **radicale libero stabilizzato per risonanza**.

Il FMN può così fare da ponte, nella catena respiratoria, tra un donatore a due elettroni, il NADH, e un accettore ad un solo elettrone, il Fe^{3+} del gruppo ferro zolfo che scambia un solo elettrone per volta.



Fe-S, centri ferro-zolfo

I centri Fe-S sono i gruppi prostetici delle **proteine ferro-zolfo**, proteine che contengono atomi di ferro non inseriti in un gruppo eme, ma complessati con atomi di zolfo. I più comuni sono i **centri [2Fe-2S]** e **[4Fe-4S]**, sono costituiti da un numero uguale di atomi di ferro e di zolfo coordinati dai quattro gruppi tiolici di quattro cisteine appartenenti alla catena proteica.



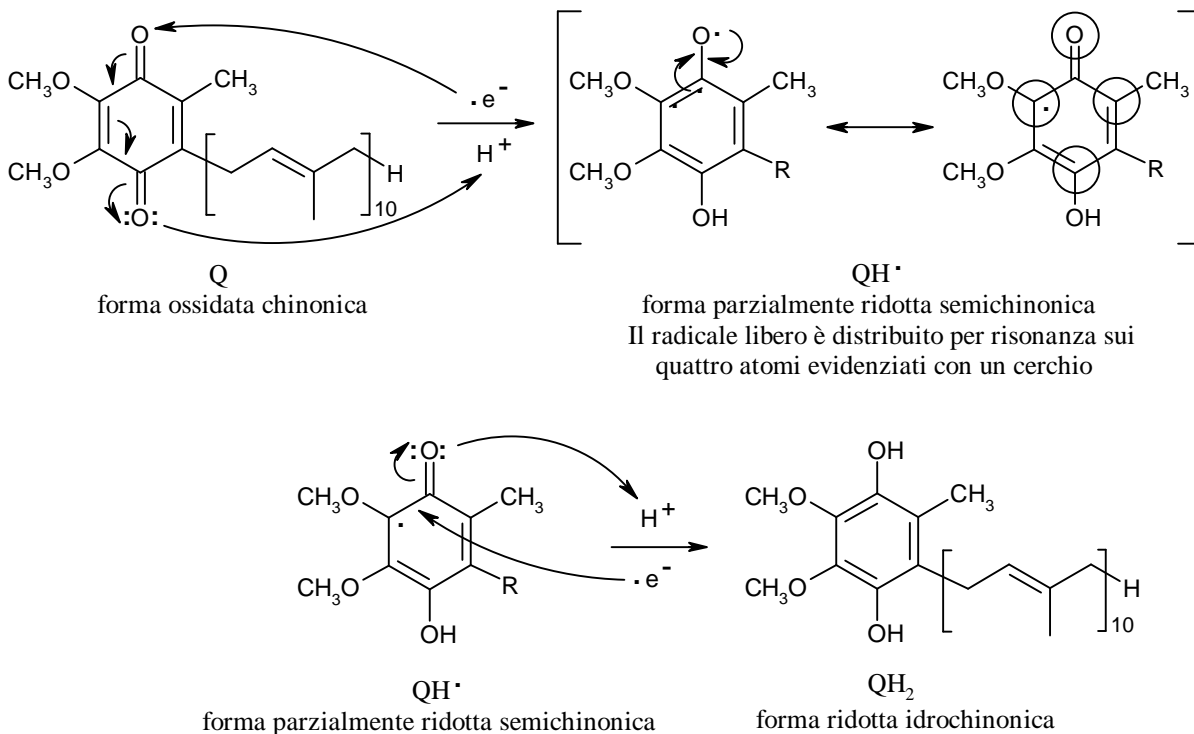
Durante il passaggio degli elettroni nella catena respiratoria, gli atomi di ferro dei centri ferro-zolfo passano ciclicamente dallo stato di ossidazione +3 a +2 e viceversa. Anche se sono presenti più atomi di ferro, i centri ferro-zolfo possono scambiare **un solo elettrone per volta**.

Q, coenzima Q

Il coenzima Q è un chinone liposolubile con una lunga catena laterale terpenica costituita, nei mammiferi, da 10 unità isopreniche che contengono 5 atomi di carbonio ciascuna. E' anche conosciuto come **ubichinone** o chinone ubiquitario perché è presente nella maggior parte dei sistemi biologici. E' il solo trasportatore di elettroni della catena respiratoria che non è legato ad una proteina e quindi, grazie alle caratteristiche apolari

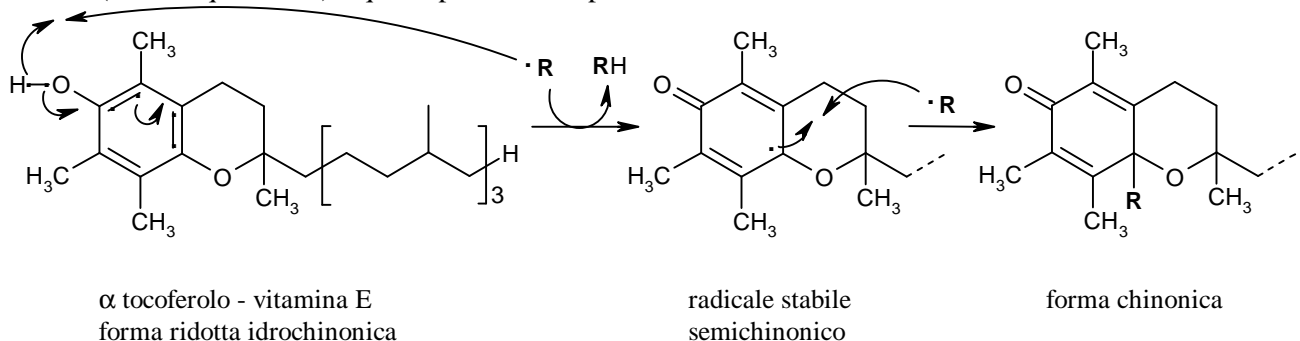
che gli conferisce la catena terpenica, può diffondere rapidamente all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana interna dei mitocondri. Raccoglie elettroni dai centri ferro-zolfo dei complessi 1 o 2 e quindi migra fino ad entrare in contatto con il complesso 3 dove cede i propri due elettroni ad un gruppo ferro-zolfo e al citocromo b.

Il coenzima Q, oltre alla forma ossidata (chinonica) e a quella ridotta (idrochinonica), possiede anche uno stato di ossidazione intermedio **semichinonico** che è un **radicale libero stabilizzato per risonanza**. Questa caratteristica diventa indispensabile quando Q deve accettare un solo elettrone per volta dai gruppi ferro-zolfo del complesso 1 o del complesso 2.



Dato che il **coenzima Q** trasporta sia protoni che elettroni, è anche responsabile del funzionamento della **pompa protonica del complesso 1**. Il meccanismo dettagliato non è ancora ben chiarito, ma sembra molto simile a quello che agisce nel complesso 3, basato sul **ciclo Q** un ciclo di ossidoriduzioni nel quale il coenzima Q partecipa due volte per ogni coppia di elettroni.

Un'altra struttura di tipo idrochinonico si trova nella **vitamina E**, una molecola antiossidante che forma radicali molto stabili e che ha il compito di preservare dall'ossidazione radicalica le catene insature dei fosfolipidi della membrana cellulare. Il **radicale semichinonico** della vitamina E è più stabile dei **radicali allilici** che si formano durante l'ossidazione degli acidi grassi. Una molecola di vitamina E reagisce con due radicali (indicati qui con **·R**) e quindi può interrompere due catene di ossidazione.



Complesso 2

Il complesso 2 è chiamato **succinato-CoQ reduttasi** perché gli elettroni che giungono al CoQ dal FADH₂ provengono dalla ossidazione dell'acido succinico. Il complesso 2 è un punto di contatto tra ciclo di Krebs e catena respiratoria, infatti contiene l'enzima della tappa n°6 del ciclo di Krebs, che ossida l'acido succinico ad

acido fumarico riducendo il FAD a FADH₂. Il FADH₂ non lascia mai il complesso e trasferisce i suoi elettroni a 3 centri Fe-S che a loro volta riducono il CoQ. La distanza massima tra questi centri redox è di 11 Å e questo garantisce un trasferimento veloce di elettroni. Nel complesso 2, proprio dietro il sito di legame per il CoQ, è presente anche un citocromo b che non partecipa al flusso di elettroni, ma serve a catturare gli elettroni che escono dal percorso per limitare la formazione di molecole radicaliche e di composti reattivi dell'ossigeno (ROS) come acqua ossigenata e ioni superossido. Alcune mutazioni genetiche a carico di questo punto del complesso 2 portano ad un eccesso di ROS e a una maggior incidenza di tumori.

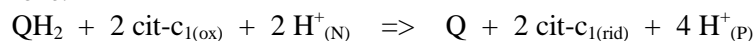
Il complesso 2 non è una pompa protonica, cioè non è in grado di trasferire protoni dalla matrice allo spazio intermembrana a causa della troppa piccola variazione di energia libera generata dal trasferimento di elettroni dal FADH₂ al CoQ. Per questo gli elettroni immessi dal FADH₂ nella catena respiratoria portano alla formazione di sole 1,5 molecole di ATP contro le 2,5 generate quando gli elettroni provengono dall'ossidazione del NADH e quindi arrivano al CoQ attraverso il complesso 1.

Anche FADH₂ prodotto dalla β-ossidazione degli acidi grassi e da altre vie porta i suoi elettroni fino al coenzima Q, ma lo fa attraverso complessi enzimatici diversi e non attraverso il complesso 2.

Complesso 3

Il complesso 3, chiamato **CoQ-citocromo c ossidoreduttasi**, è la seconda delle tre pompe protoniche della catena respiratoria. Contiene il **citocromo b** che possiede due gruppi eme, b₅₆₂ e b₅₆₆ (lunghezza d'onda più lunga della luce assorbita), legati ad un'unica catena proteica, un **centro Fe-S** e il **citocromo c₁**.

Nel complesso 3 si realizza il trasferimento dal coenzima QH₂ al citocromo c₁ di due elettroni con il contemporaneo prelievo di 2 H⁺ dalla matrice (lato N) e il trasferimento di 4 H⁺ nello spazio intermembrana (lato P) secondo la reazione:

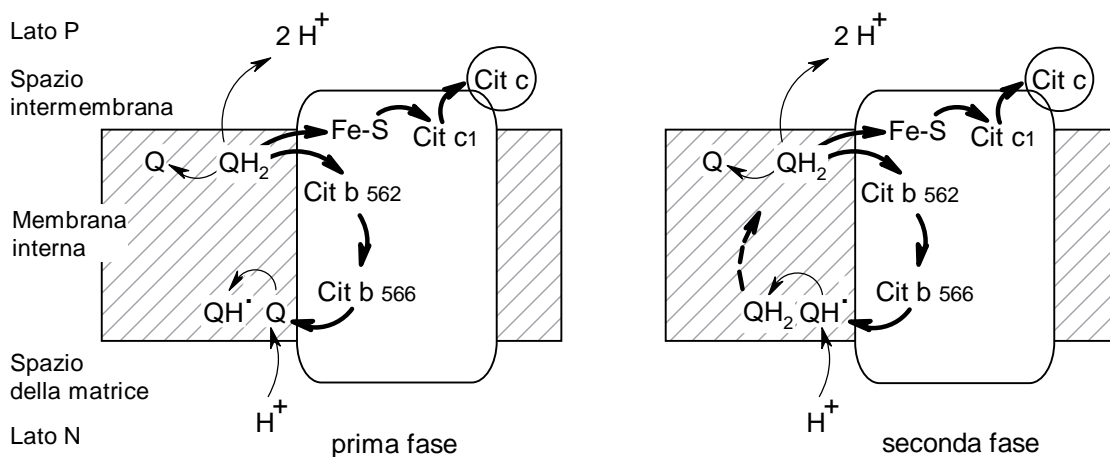


Questo si realizza attraverso un processo chiamato **ciclo Q** che consiste in un doppio flusso di elettroni e coinvolge due molecole di coenzima Q con un meccanismo in due fasi.

Nella prima fase una molecola di QH₂ cede due elettroni, uno va al centro ferro zolfo e da questo prosegue fino al citocromo c₁. L'altro elettrone viene ceduto da QH₂ al citocromo b nel quale si muove attraverso i due gruppi eme b₅₆₂ e b₅₆₆ fino ad un'altra molecola di Q che viene ridotto alla forma semichinonica QH•.

Nella seconda fase una seconda molecola di QH₂ immette altri due elettroni che seguono la stessa strada dei primi due, e giungono da un lato al citocromo c₁, dall'altro giungono al semichinone QH• che viene ridotto a QH₂.

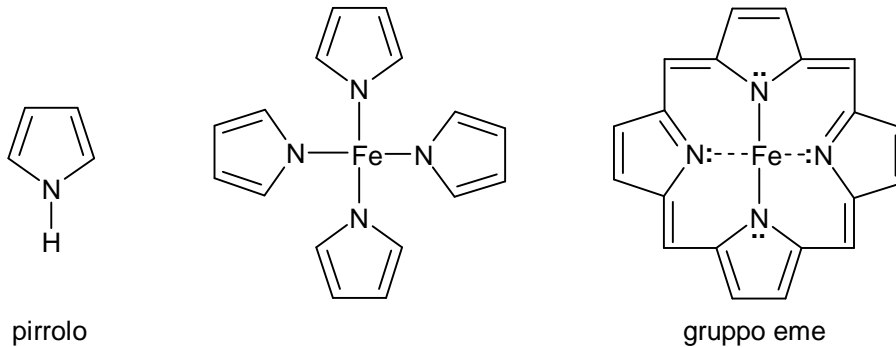
Ciclo Q nel Complesso 3



Il ciclo Q rende conto di come funziona la pompa protonica accoppiata al flusso di elettroni nella catena respiratoria. La molecola di coenzima QH₂ che si ossida si trova nel lato alto della membrana interna e cede 2 H⁺ verso lo spazio intermembrana. La molecola di coenzima Q che si riduce si trova nel lato basso della membrana interna e prende H⁺ dalla matrice. Questo è reso possibile grazie allo sdoppiamento del flusso di elettroni che in parte proseguono diritti fino al citocromo c₁, in parte vengono convogliati in basso verso il lato matrice della membrana dove riducono un'altra molecola di coenzima Q. Per ogni coppia di elettroni che giungono al citocromo c₁ vengono ossidate due molecole QH₂ e vengono quindi immessi 4 H⁺ nello spazio intermembrana.

Citocromi

I citocromi sono proteine colorate che partecipano a reazioni di ossidoriduzione e sono presenti in quasi tutti gli organismi tranne in alcuni batteri anaerobi obbligati come i metanobatteri. Il sistema redox dei citocromi è il **gruppo eme** formato da un **atomo di ferro**, che può passare dallo stato di ossidazione +3 a +2 e viceversa, legato al centro di un **anello porfirinico**. Questo è costituito da 4 anelli pirrolici uniti da ponti CH.

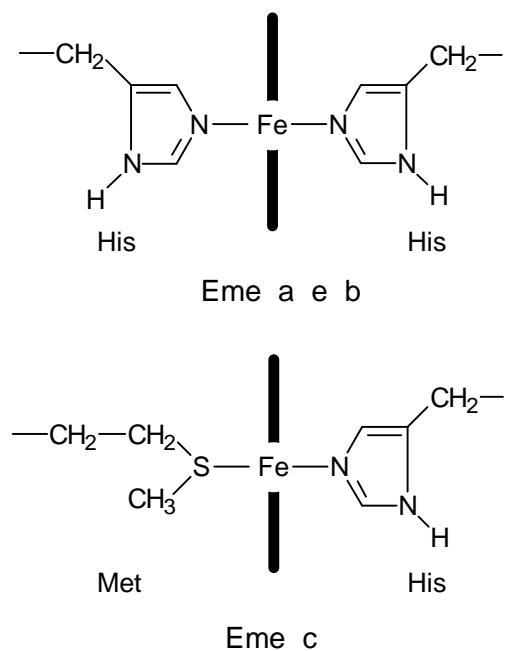
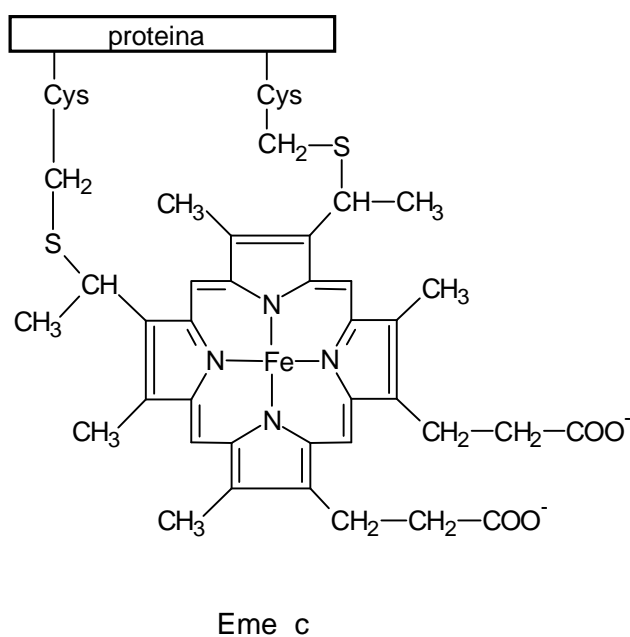


L'anello porfirinico è presente non solo nei **citocromi**, ma anche nell'**emoglobina** dove lega un atomo di Fe^{2+} per trasportare ossigeno molecolare nel sangue. E' presente nella **mioglobina**, proteina simile all'emoglobina specializzata nel trasporto di O_2 nelle cellule del tessuto muscolare. Infine l'anello porfirinico si trova nel più importante pigmento fotosintetico presente in tutti gli organismi vegetali, la **clorofilla**, dove però l'atomo legato al centro dell'anello è il Mg^{2+} .

I citocromi presenti nei mitocondri sono di tre tipi **a, b, c** in base al picco assorbito di lunghezza d'onda maggiore (a: 600 nm, b: 560 nm, c: 550 nm). Il citocromo b del complesso 3, per esempio, possiede due gruppi eme che hanno l'ultimo picco di assorbimento a 562 e 566 nm e quindi sono chiamati b_{562} e b_{566} .

I tre tipi di citocromi differiscono per i sostituenti che sono legati all'anello porfirinico. Nei gruppi **eme di tipo a** è presente una lunga catena idrofobica di unità isopreniche, gli **eme di tipo b** sono identici all'eme dell'emoglobina, gli **eme di tipo c** sono legati covalentemente alla proteina formando due legami tioetere con i gruppi tiolici di due residui di cisteina. Nella figura seguente è mostrato un gruppo eme di tipo c, a fianco sono mostrati gli eme a, b e c visti in sezione per mettere in evidenza i due **legandi assiali del ferro** dell'eme che variano con il tipo di citocromo. Nei citocromi a e b entrambi i legandi sono residui di istidina come accade anche nell'emoglobina. Nel citocromo c i legandi sono istidina e metionina.

Il **citocromo c**, a differenza degli altri citocromi, non è immerso nella membrana interna, ma si trova sul lato esterno della membrana e si lega alternativamente al complesso 3 e al complesso 4 e quindi funge da **sistema navetta** per gli elettroni tra questi due complessi ossidoriduttivi.

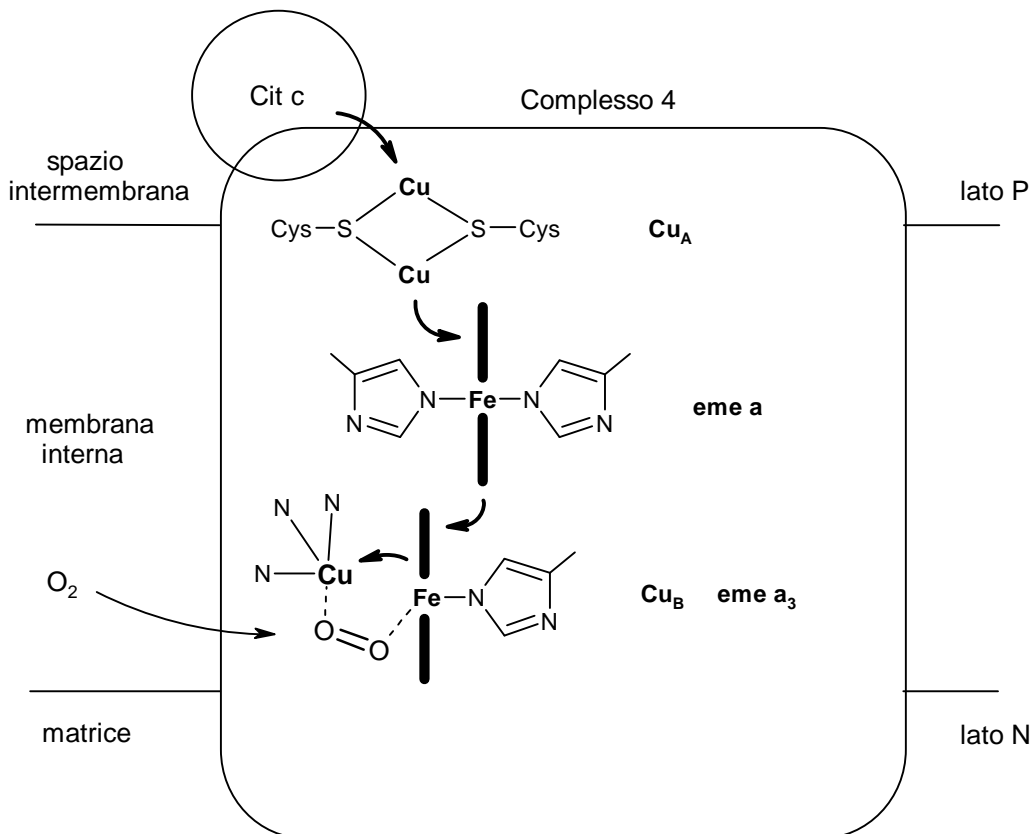


Complesso 4

Il complesso 4, chiamato **citocromo c ossidasi**, è composto di 13 subunità ed è la terza ed ultima pompa di protoni della catena respiratoria. Il complesso catalizza l'ossidazione sequenziale ad un elettrone di quattro molecole di citocromo c (Fe^{2+}) e la contemporanea riduzione a quattro elettroni di una molecola di O_2 .

La subunità 2 contiene due atomi di rame chiamati centro Cu_A legati con gli atomi di zolfo di due cisteine in un complesso simile ai centri $2\text{Fe}-2\text{S}$. Nella subunità 1 sono presenti due gruppi **eme** chiamati **a** e **a₃** ed un atomo di rame chiamato Cu_B . L'eme a₃ e il Cu_B sono associati a formare un centro binucleare Fe-Cu al quale si lega l'ossigeno O_2 per essere ridotto ad acqua (vedi foto di copertina a pag 1 ricavata dalla struttura dell'enzima **PDB 1occ**).

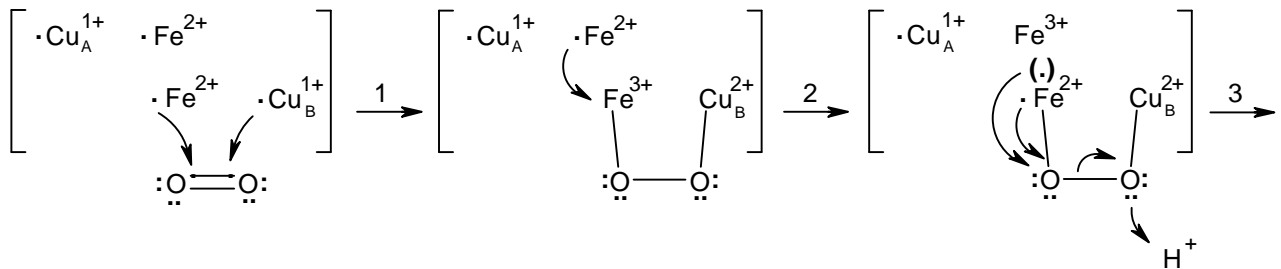
Il flusso di elettroni nel complesso 4 è quindi dal citocromo c al centro Cu_A , all'eme a, al centro eme a₃ - Cu_B e da questo all'ossigeno O_2 .



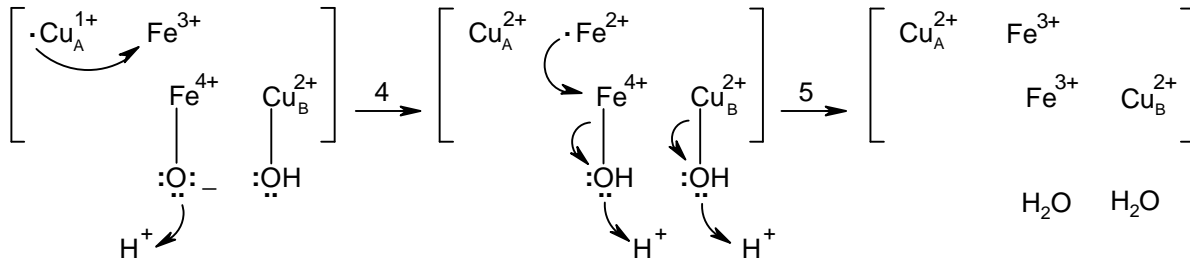
La riduzione dell'ossigeno ad H_2O è conveniente da un punto di vista energetico perché fornisce l'energia necessaria per la fosforilazione, ma nasconde alcune insidie dal punto di vista chimico, infatti i prodotti di riduzione parziale dell'ossigeno, come lo **ione superossido** O_2^- e l'**acqua ossigenata** H_2O_2 , sono **tossici per la cellula**. E' quindi indispensabile che l'ossigeno resti legato al centro eme a₃ - Cu_B per tutto il tempo necessario a completare la **riduzione a quattro elettroni** fino a produrre H_2O , senza che siano rilasciati prodotti parzialmente ridotti.

Il complesso 4 ridotto contiene tutti e quattro gli elettroni necessari per la riduzione, uno per ogni centro redox: Cu_A , eme a, eme a₃, Cu_B .

Il meccanismo della riduzione è illustrato di seguito. I primi due elettroni giungono subito all'ossigeno appena questo si lega al centro eme a₃ - Cu_B (stadio 1). L'ossigeno ora si trova allo stato di ossidazione 1- tipico dell'acqua ossigenata H_2O_2 . Il terzo e il quarto elettrone che servono per completare la riduzione fino ad acqua si trovano sull'eme a e sul Cu_A e da qui devono giungere all'eme a₃. La riduzione fino ad H_2O , però, viene completata in anticipo, quando arriva il terzo elettrone dall'eme a (stadio 2) senza attendere che giunga anche l'ultimo elettrone dal Cu_A . L'elettrone mancante viene donato dal **ferro dell'eme a₃** che dona due elettroni all'ossigeno (stadio 3) e assume temporaneamente lo stato di ossidazione Fe^{4+} , chiamato **ferrile**, e permette in questo modo che si formi acqua. Quando alla fine arriva l'ultimo elettrone attraverso la sequenza Cu_A , eme a, eme a₃, il ferro 4+ dell'eme a₃ può tornare allo stato di ossidazione più stabile 3+ (stadio 5).



O_2 si lega al complesso 4 ridotto Con i primi 2 e^- si è formato O_2^{2-} Servono altri 2 e^- per formare 2 H_2O

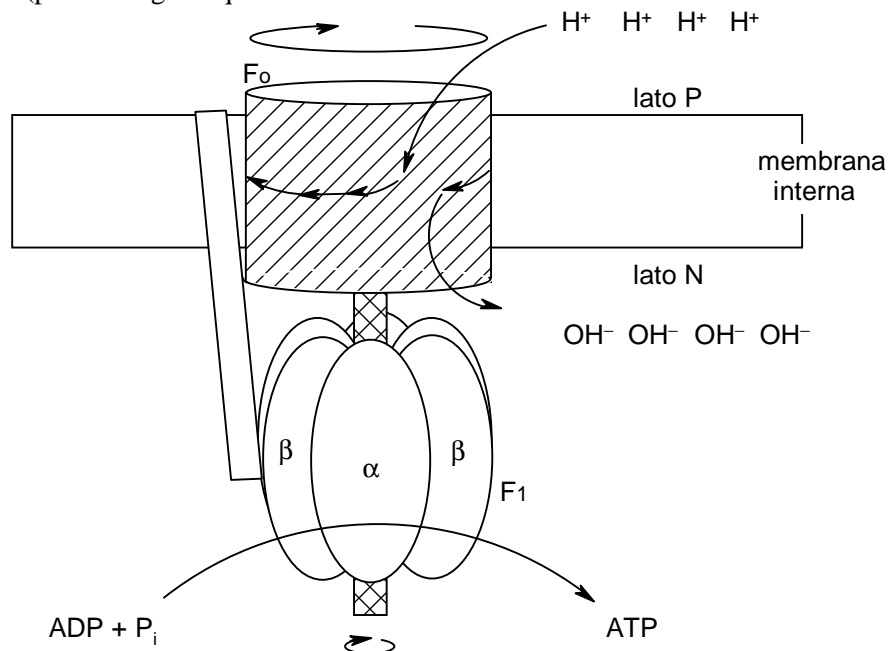


Si è formato Fe^{4+} Arriva l'ultimo elettrone, viene liberata H_2O Complesso 4 ossidato

Meccanismo della riduzione di O_2 nel complesso 4

Fosforilazione ossidativa

L'energia liberata dalla reazione di ossidazione del NADH e del $FADH_2$ con l'ossigeno molecolare O_2 , è stata convertita dai complessi della catena respiratoria in una **differenza di pH** a cavallo della membrana interna dei mitocondri. Gli ioni H^+ in eccesso che si sono accumulati nello spazio intermembrana non possono tornare liberamente nella matrice perchè la membrana interna è impermeabile a questi ioni. Gli H^+ possono tornare nella matrice solo passando attraverso l'enzima **ATP sintasi** mostrato qui sotto. Questo è un complesso enzimatico situato nella membrana interna dei mitocondri, ed è in grado di sintetizzare ATP da ADP e fosfato inorganico sfruttando il flusso di ioni H^+ che lo attraversano. ATP sintasi è una vera e propria **macchina molecolare** con parti in movimento azionate da questo flusso di ioni H^+ proprio come un mulino è azionato da un flusso di acqua (per i dettagli di questo movimento vedi Molecola del Mese 12/2005 su PianetaChimica.it).

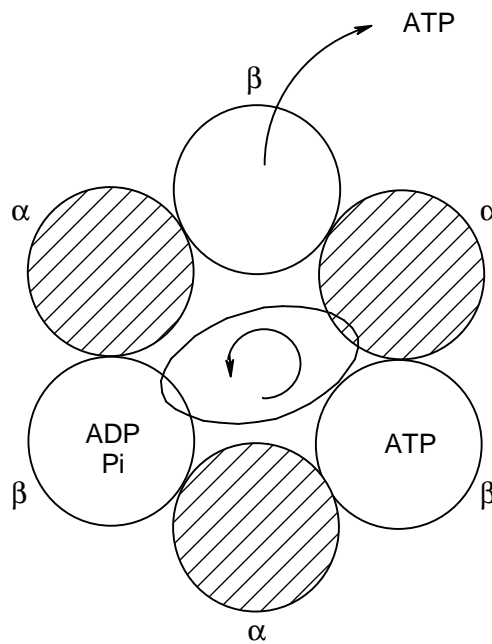


L'enzima è composto da due subunità F_0 ("o" sta per sensibile alla oligomicina) e F_1 . La subunità F_0 ha la forma di un cilindro ed è immersa nella membrana interna. F_1 ha forma sferica, è formata da tre catene α e da tre catene β ed è tenuta ferma a ridosso di F_0 nello spazio della matrice. Le due subunità sono collegate da un asse solidale con F_0 e che penetra all'interno di F_1 .

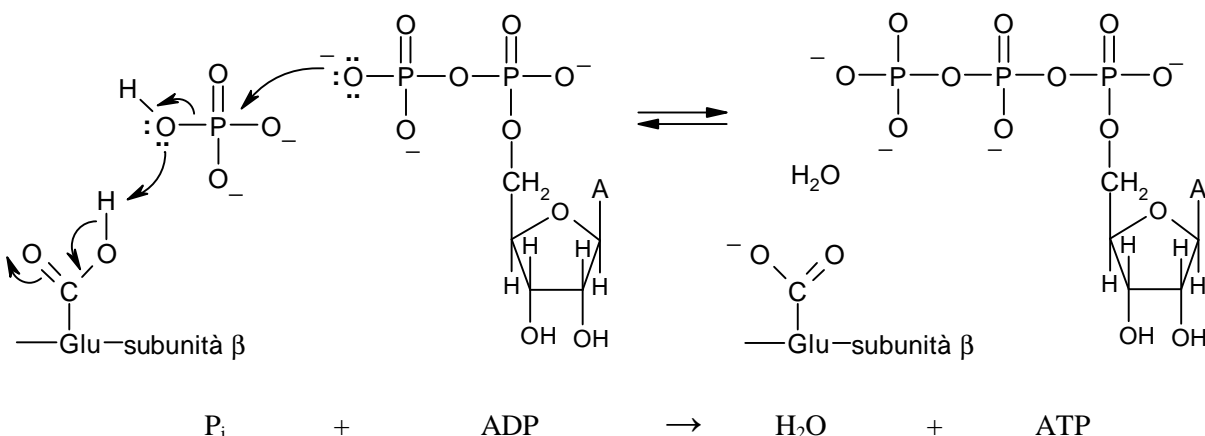
Gli ioni H^+ possono fluire dallo spazio intermembrana (lato P, positivo) alla matrice (lato N, negativo) e questo flusso obbliga la subunità F_0 a ruotare come una trottola. Questo fa ruotare anche l'asse e lo fa strisciare all'interno di F_1 che invece è tenuta ferma da un braccio esterno.

Il movimento dell'asse all'interno di F_1 provoca una deformazione ciclica delle tre subunità β che assumono a turno tre diverse conformazioni. Una subunità β è inizialmente affine per ADP, poi dopo una rotazione di 120° diventa affine per ATP al punto che la sintesi di ATP diventa favorevole, infine dopo una rotazione di 240° perde l'affinità per ATP così lo può rilasciare. Il passaggio difficile della reazione, non è la sintesi di ATP che si forma anche in assenza del flusso di H^+ infatti questa reazione avviene con ΔG uguale a zero perchè ATP è stabilizzato dai legami col sito attivo dell'enzima. **Il passaggio difficile è il rilascio di ATP** che può avvenire solo dopo che la subunità F_0 ha ruotato deformando la catena β di F_1 , inducendola a rilasciare ATP.

In ogni istante le tre catene β si trovano una legata ad ADP, la seconda legata ad ATP appena sintetizzato, la terza infine è vuota, come si può vedere nella seguente figura che mostra in sezione la subunità F_1 .



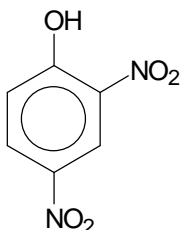
L'ATP non può essere rilasciato dalla terza catena β fino a quando ADP non si è legato alla prima. Il movimento dell'asse centrale non avviene in modo fluido, ma a scatti di 120° .



Studi con H_2O contenente l'isotopo 18 dell'ossigeno hanno dimostrato che la sintesi di ATP avviene per attacco di ADP su una molecola di fosfato inorganico con espulsione di una molecola d'acqua. In pochi minuti, infatti, visto che la reazione è all'equilibrio, il fosfato incorpora ossigeno 18.

Accoppiamento e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa

In condizioni normali la fosforilazione ossidativa è **strettamente accoppiata** al trasporto di elettroni nella catena respiratoria, cioè il NADH e il FADH₂ vengono ossidati solo se contemporaneamente l'ADP viene fosforilato ad ATP. Nello stato di riposo, infatti, quando il consumo di ATP è minimo, diventa minima la fosforilazione e quindi la differenza di pH a cavallo della membrana interna dei mitocondri raggiunge il valore massimo. In queste condizioni diventa troppo alta la richiesta energetica per spostare H⁺ dal lato N al lato P e quindi sono impediti ulteriori spostamenti di H⁺ verso lo spazio intermembrana e questo inibisce anche il trasporto di elettroni. La membrana mitocondriale interna, infatti, è impermeabile agli ioni H⁺ e questi possono tornare nella matrice solo attraverso l'enzima ATP sintasi.



2,4-dinitrofenolo

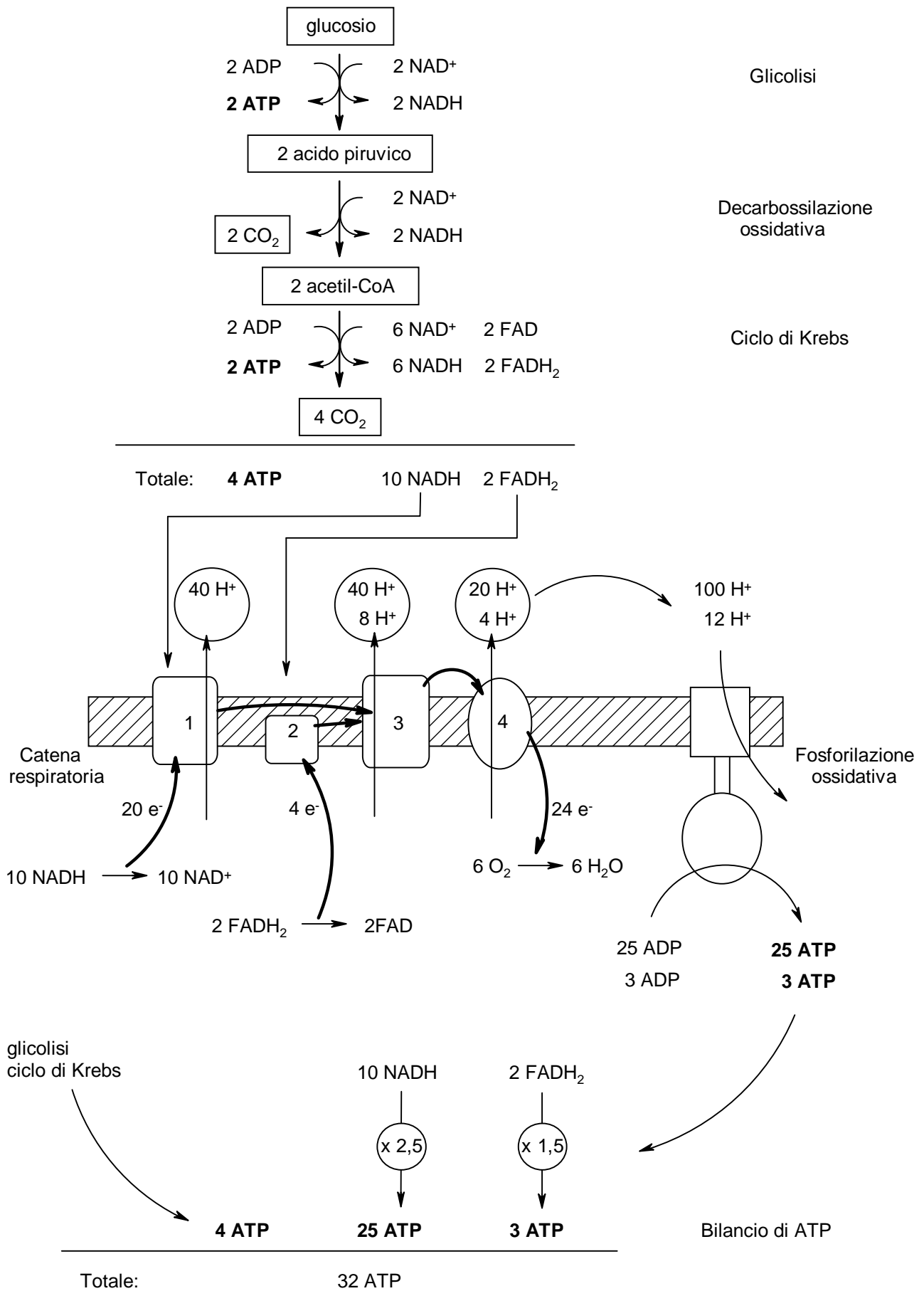
La fosforilazione ossidativa e la catena respiratoria **possono essere disaccoppiate** da alcune molecole aromatiche debolmente acide, come il 2,4-dinitrofenolo, che sono in grado di trasportare protoni attraverso la membrana interna e quindi forniscono un'altra via agli ioni H⁺ per tornare nella matrice. In questo modo il mitocondrio può **ossidare NADH senza produrre ATP**. La cellula degrada allora grandi quantità di glucosio e di acidi grassi, **l'energia liberata** nel processo di ossidazione viene dissipata **sotto forma di calore** nella reazione di formazione di H₂O da H⁺ e OH⁻. Il 2,4-dinitrofenolo è stato usato come prodigiosa pillola per dimagrire all'inizio del '900, ma è stato subito abbandonato per la sua pericolosità.

I neonati dei mammiferi e gli animali che vanno in letargo possiedono un tipo di tessuto adiposo chiamato **grasso bruno** in cui l'ossidazione degli acidi grassi non viene utilizzata per produrre ATP, ma per **generare calore** che serve a mantenere costante la temperatura corporea. Questo tessuto è costituito da trigliceridi come il tessuto adiposo bianco, ma contiene una grande quantità di mitocondri i cui citocromi determinano il colore scuro. I mitocondri del grasso bruno contengono una **proteina disaccoppiante** chiamata **termogenina** immersa nella membrana interna che, in seguito ad un opportuno segnale, forma un canale che consente il passaggio dei protoni che così possono tornare liberamente nella matrice per produrre acqua e calore. In questo modo gli orsi quando si svegliano dal letargo invernale possono aumentare rapidamente la loro temperatura corporea da pochi gradi sopra lo zero fino a 40 °C e così diventano attivi in pochi minuti.

Considerazioni finali

Con l'ossidazione completa di una molecola di glucosio per formare CO₂ e H₂O, la respirazione cellulare produce ben **32 molecole di ATP** (oppure **30 ATP** nelle cellule dove è meno efficiente il sistema di trasporto dal citoplasma ai mitocondri dei due NADH prodotti dalla glicolisi). Lo schema della pagina seguente riassume le reazioni coinvolte.

La glicolisi anaerobica, o fermentazione omolattica, produce solo **2 molecole di ATP** per ogni molecola di glucosio degradata e quindi è circa 16 volte meno efficiente della respirazione cellulare, ma è circa 200 volte più veloce, essendo un processo molto più semplice. La glicolisi anaerobica, quindi, produce una quantità circa 13 volte maggiore di ATP nell'unità di tempo. Per questo il muscolo scheletrico sotto sforzo intenso lavora in condizioni anaerobiche, in questo modo sviluppa più potenza, ma al prezzo di **consumare più glucosio** e soprattutto di **accumulare acido lattico**. Dopo uno sforzo violento il muscolo deve riposare per eliminare l'acido lattico prodotto. Questo, col flusso sanguigno, va nel fegato per essere trasformato ancora in glucosio.



Schema riassuntivo della respirazione cellulare