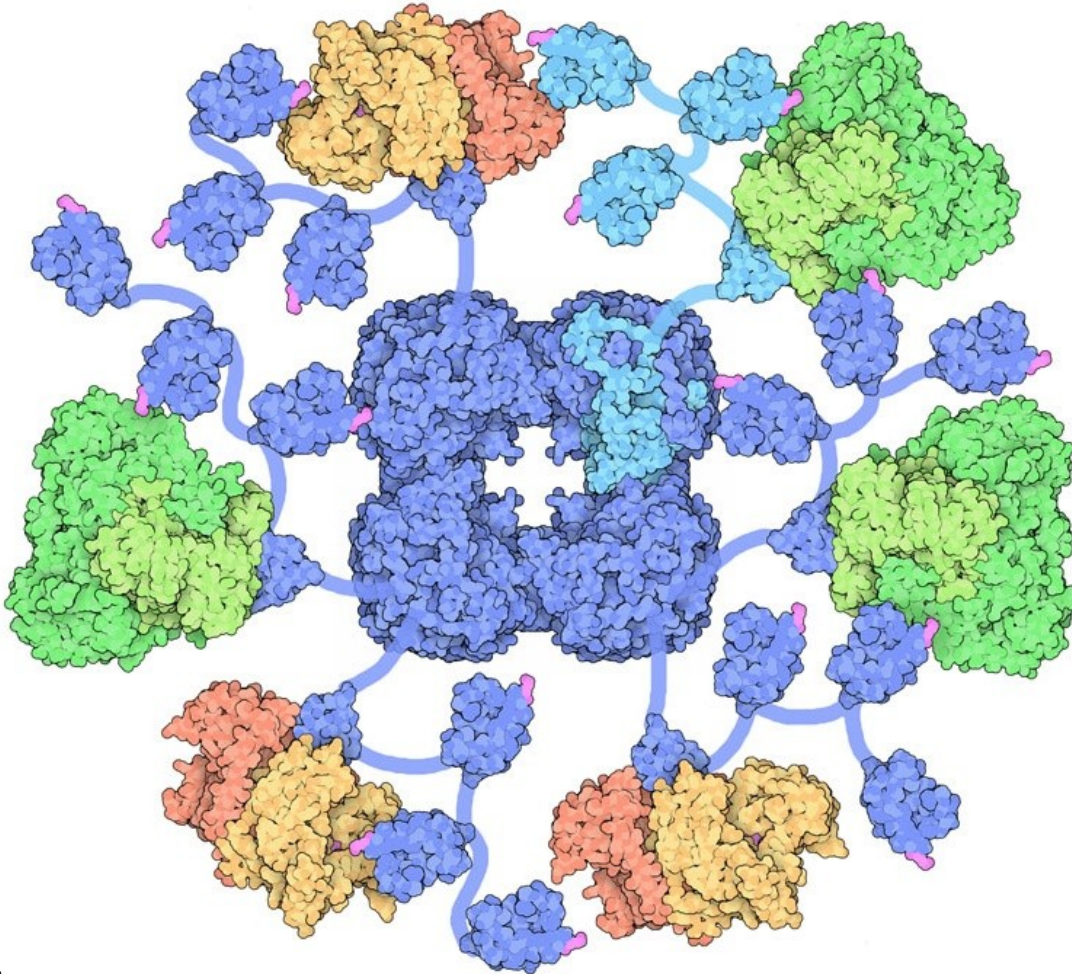


Mauro Tonellato

Respirazione cellulare



Indice:

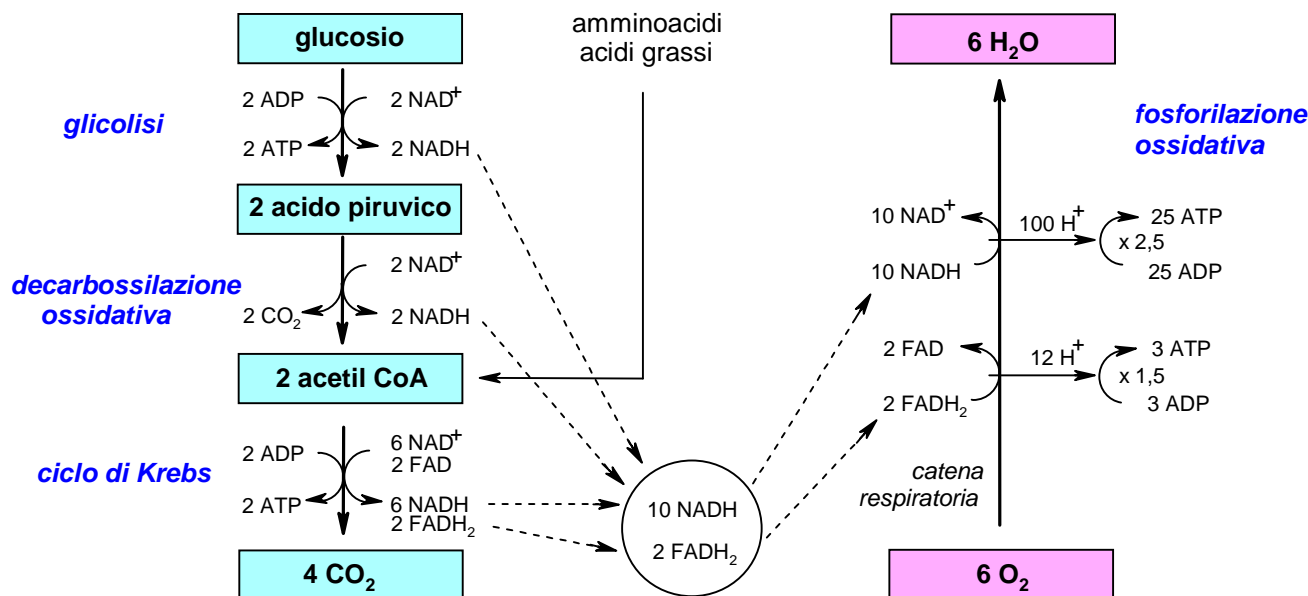
- | | |
|---|--|
| 2 - Respirazione cellulare | 17 - Fosforilazione ossidativa |
| 3 - Glicolisi | 18 - Catena respiratoria |
| 3 - Fase preparatoria | 19 - NAD, nicotinammide adenina dinucleotide |
| 4 - Fase del guadagno energetico | 19 - Complesso 1 |
| 4 - Le reazioni 6 e 7 producono i primi due ATP | 20 - FMN, flavin mononucleotide |
| 5 - Le reazioni 8, 9 e 10 producono altri due ATP | 20 - Fe-S, centri ferro-zolfo |
| 5 - Meccanismo delle reazioni 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 | 21 - Q, coenzima Q |
| 9 - Respirazione e fermentazione | 22 - Complesso 2 |
| 10 - Meccanismo della fermentazione lattica | 22 - Complesso 3 |
| 11 - Decarbossilazione ossidativa | 23 - Citocromi |
| 13 - Meccanismo della fermentazione alcolica | 24 - Complesso 4 |
| 14 - Ciclo di Krebs | 25 - ATP sintasi |
| 15 - Tappa n° 1: citrato sintasi | 27 - Accoppiamento della fosforilazione ossidativa |
| 16 - Tappa n° 3: isocitrato deidrogenasi | 27 - Considerazioni finali |

Respirazione cellulare

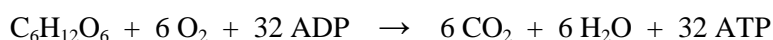
Con il termine **respirazione** solitamente si intende il processo fisiologico macroscopico che consiste nella assunzione di O_2 e nel rilascio di CO_2 da parte di organismi multicellulari. In biochimica si usa il termine respirazione in senso microscopico per riferirsi ai processi molecolari che avvengono nella cellula con consumo di O_2 e formazione di CO_2 che hanno lo scopo di produrre energia sotto forma di ATP. La molecola principale che viene degradata nella respirazione cellulare è il glucosio che viene ossidato a CO_2 e H_2O in quattro stadi:

glicolisi, decarbossilazione ossidativa, ciclo di Krebs, fosforilazione ossidativa.

Vengono degradate anche altre molecole come amminoacidi e acidi grassi che condividono col glucosio la parte finale del percorso metabolico.



- 1) La **glicolisi** è costituita da dieci reazioni che avvengono nel citoplasma in assenza di ossigeno e spezzano la catena di sei atomi di carbonio del **glucosio** in due frammenti di tre atomi di carbonio che alla fine diventano due molecole di **acido piruvico**. Per questo è necessaria l'azione ossidante di $2 NAD^+$ che si riducono a **2 NADH**, mentre 2 ADP vengono trasformati in **2 ATP**.
- 2) La **decarbossilazione ossidativa**, che avviene nei mitocondri, decarbossila e poi ossida due molecole di **acido piruvico** formando due molecole di **acetil-CoA**, mentre riduce $2 NAD^+$ a **2 NADH**.
- 3) Il **ciclo di Krebs**, anche questo nei mitocondri, ossida due molecole di **acetil-CoA** formando **4 CO_2** attraverso una serie di otto reazioni nelle quali $6 NAD^+$ e 2 FAD vengono ridotti a **6 NADH** e **2 $FADH_2$** , mentre si formano 2 GTP che poi si trasformano in **2 ATP**.
- 4) La **fosforilazione ossidativa**, nei mitocondri, usa l'energia ricavata dall'ossidazione con O_2 dei 10 NADH e dei 2 $FADH_2$, che si sono formati nei primi tre stadi, per fosforilare **28 ATP** attraverso l'enzima ATP sintasi. NADH e $FADH_2$ non reagiscono direttamente con O_2 , ma cedono i loro elettroni alla **catena respiratoria**, una serie di molecole trasportatrici di elettroni, da cui giungono all'ossigeno molecolare O_2 che si riduce ad H_2O . Questo flusso di elettroni aziona 3 pompe protoniche che spostano H^+ da un lato all'altro della membrana interna dei mitocondri generando una differenza di pH. Questa, a sua volta, mette in funzione l'enzima ATP sintasi. La **reazione complessiva** che avviene nella respirazione cellulare è la completa ossidazione del glucosio ad opera di O_2 per formare CO_2 , H_2O ed energia come in una normale combustione. Qui, però, l'energia non viene liberata tutta come calore, ma, in gran parte, viene trasformata in energia chimica sotto forma di ATP. In totale, per ogni molecola di glucosio ossidata, si ottengono 32 ATP (2 + 2 + 28).

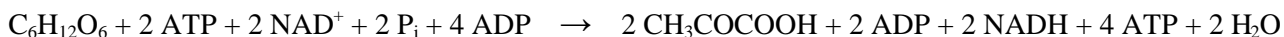


Dato che il $\Delta G'^{\circ}$ dell'idrolisi di ATP è $-7,3$ kcal/mol, questa reazione, producendo 32 ATP, ottiene un guadagno energetico $\Delta G'^{\circ} = -7,3 \cdot 32 = -234$ kcal/mol. Confrontando questo valore con quello della combustione del glucosio ($\Delta G^{\circ} = -686$ kcal/mol), l'efficienza della respirazione cellulare appare del 34% (il 34% di 686 è 234). Si è calcolato però che, nella cellula, l'efficienza reale sia circa del 70%, tenendo conto che le concentrazioni vere sono molto inferiori alle concentrazioni standard 1 M a cui è riferito il $\Delta G'^{\circ}$. ($\Delta G'^{\circ}$ è il ΔG° ricalcolato a pH 7).

Glicolisi

Il termine **glicolisi** (si pronuncia glicòlisi) deriva da due parole greche che significano **dolce** 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 microorganismi. La sua universalità e il fatto di essere **anaerobica** fanno pensare che questa via metabolica si sia sviluppata agli inizi della vita sulla Terra in organismi **procarioti anaerobi** che vivevano quando l'atmosfera era ancora priva di O₂. La glicolisi è rimasta poi inalterata durante tutta la storia evolutiva grazie alla sua semplicità ed efficienza. Gli organismi che hanno provato a cambiarla non sono sopravvissuti.

La glicolisi è costituita da una sequenza di **10 reazioni** enzimatiche anaerobiche che avvengono nel citoplasma e **degradano il glucosio in due molecole di acido piruvico**. Produce, inoltre, 4 ATP dopo averne, però, consumati due, e riduce **2 NAD⁺** a **2 NADH**.



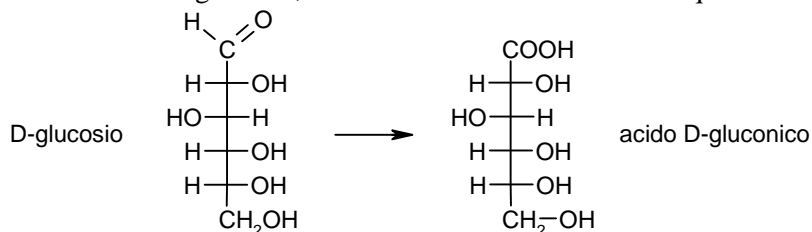
La glicolisi ha un $\Delta G'^{\circ}$ favorevole di $-20,3$ kcal/mol e si svolge in **due fasi**, ciascuna composta di 5 reazioni: la prima è detta fase preparatoria e la seconda fase del guadagno energetico.

Nella **fase preparatoria** il glucosio viene **spezzato in due frammenti** identici di 3 atomi di carbonio: due molecole di **gliceraldeide-3-fosfato**. Per realizzare questo obiettivo si consumano, però, 2 ATP.

Nella fase di **guadagno energetico** si ottengono 4 ATP, ma, dato che nella prima fase se ne erano consumati 2, il guadagno netto è di 2 ATP. I primi 2 ATP si ottengono sfruttando l'energia liberata dall'ossidazione con NAD⁺ della gliceraldeide-3-fosfato, gli altri 2 ATP si ottengono sommando le energie di due reazioni dell'acido fosfoenolpiruvico: la tautomeria cheto-enolica e l'idrolisi di un estere fosforico.

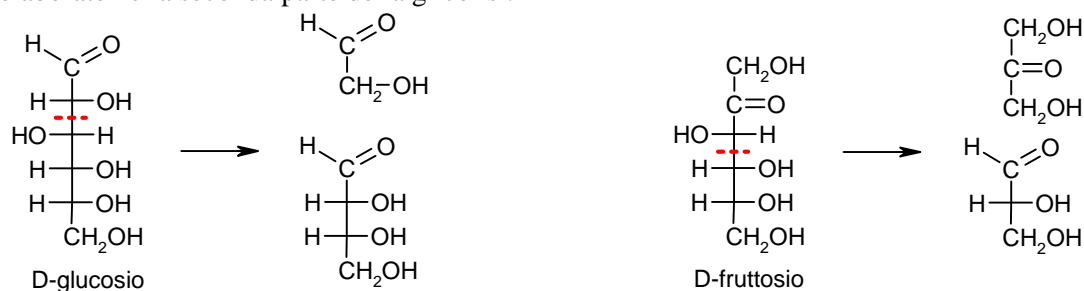
Fase preparatoria

La glicolisi è un insieme geniale di reazioni che hanno in sé una potente logica chimica che ora proviamo a scoprire insieme. L'ossidazione di un'aldeide con NAD⁺ ha un $\Delta G'^{\circ}$ molto favorevole. Se la cellula ricavasse energia dalla semplice ossidazione del glucosio, ossiderebbe **una sola aldeide** e quindi otterrebbe **un solo ATP**.



Per rendere più efficiente il processo, si potrebbe tagliare a metà la catena di 6 atomi di carbonio del glucosio producendo **due aldeidi più piccole** dalla cui ossidazione, nella seconda fase, si potrebbero ricavare **due ATP**.

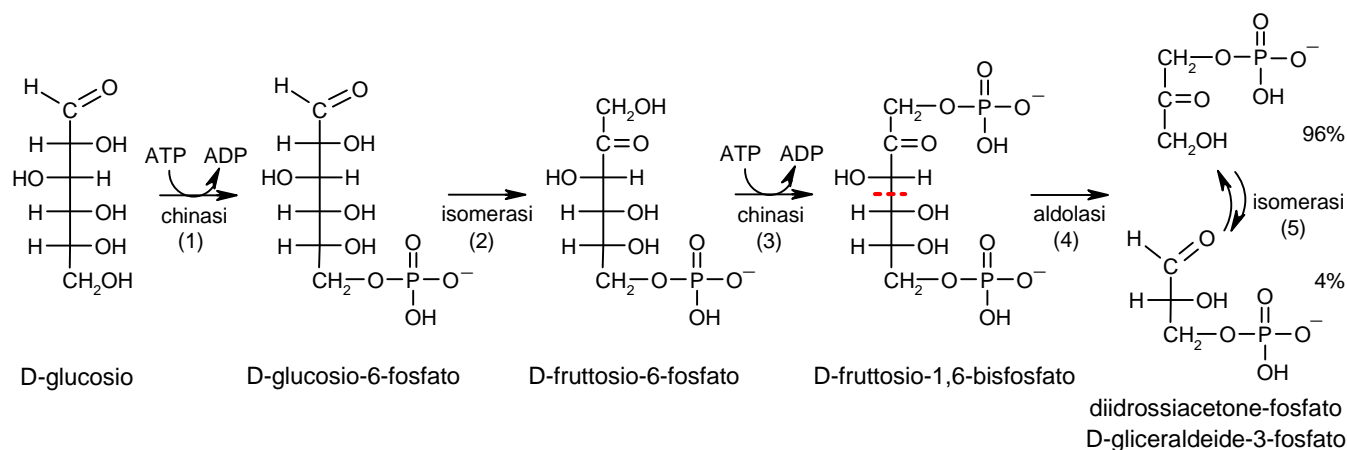
Tagliando la catena del glucosio (carbonile sul C-1) con una **addizione aldolica inversa**, però, si otterrebbero due aldeidi diverse, di 2 e 4 atomi di carbonio rispettivamente, che richiederebbero due vie metaboliche diverse per essere elaborate nella seconda parte della glicolisi.



Per avere, nella seconda fase della glicolisi, un'unica via metabolica, le due aldeidi devono essere **identiche tra loro** cioè devono avere **3 atomi di carbonio ciascuna**, quindi la catena di sei carboni deve essere tagliata tra C-3 e C-4. Per questo è necessario **convertire il glucosio in fruttosio** che, avendo il carbonile sul C-2, può essere tagliato tra C-3 e C-4 in due frammenti di 3 atomi di carbonio ciascuno.

Infine, **ogni frammento deve essere fosforilato** perché così è più facilmente riconoscibile dagli enzimi della glicolisi ed inoltre non può sfuggire della cellula perché non può attraversare il doppio strato di fosfolipidi. Questo, però, comporta il consumo di due ATP e obbliga, nella seconda fase della glicolisi, non solo a ricavare due ATP dall'ossidazione delle due aldeidi, ma anche a recuperare i due ATP spesi nella prima parte.

La fase preparatoria della glicolisi, quindi, è costituita dalle seguenti 5 reazioni:



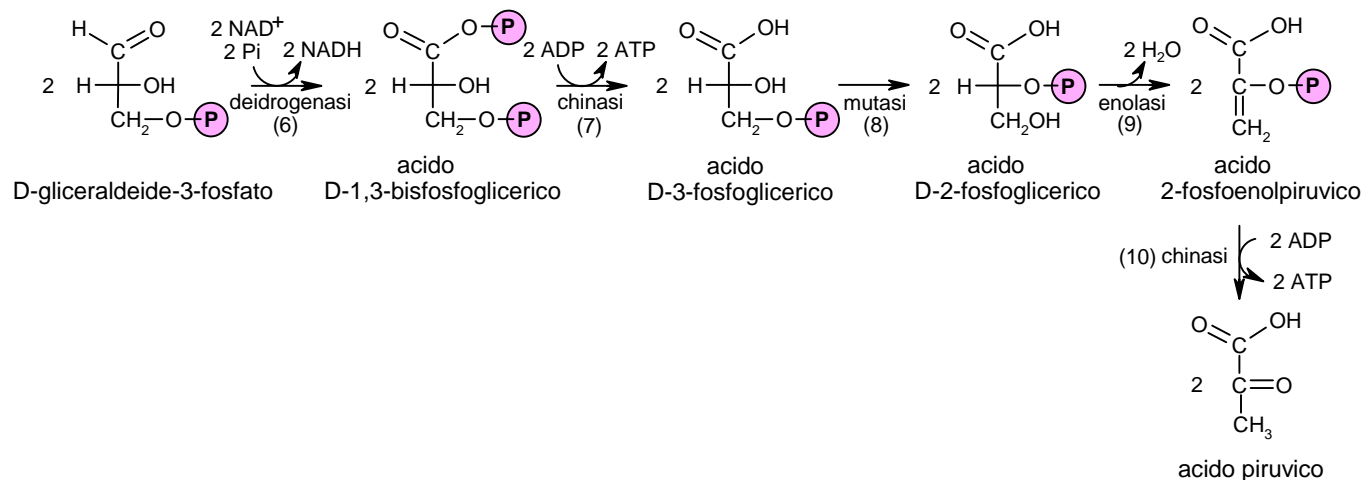
Nella prima reazione il glucosio viene fosforilato sul C-6, consumando la prima molecola di ATP, per formare **glucosio-6-fosfato**, poi questo viene isomerizzato a **fruttosio-6-fosfato**, infine quest'ultimo viene fosforilato anche sul C-1, consumando una seconda molecola di ATP, per dare **fruttosio-1,6-bisfosfato**. Questa molecola è pronta per essere tagliata, nella reazione n° 4, in due frammenti di tre atomi di carbonio, entrambi fosforilati: **diidrossiacetone-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato**. Queste due molecole sembrano diverse, ma sono isomeri di struttura e vengono rapidamente interconvertite una nell'altra nella reazione n° 5.

Dato che il chetone è più stabile dell'aldeide, all'equilibrio è presente solo il 4 % di gliceraldeide-3-fosfato mentre il 96 % è diidrossiacetone-fosfato, ma quest'ultimo viene progressivamente trasformato in **gliceraldeide-3-fosfato** (5) mano a mano che questa viene ossidata nella reazione n° 6 della glicolisi. In questo modo, per ogni molecola di glucosio degradata, **due molecole** di gliceraldeide-3-fosfato entrano nella seconda fase della glicolisi.

Fase del guadagno energetico

In questa fase si realizza il **guadagno energetico** che rappresenta lo scopo della glicolisi. Si formano 4 ATP, ma, 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 (qui sotto il fosfato è rappresentato in modo condensato con una **P**).

La fase di guadagno energetico è costituita dalle seguenti cinque reazioni che partono dalle 2 molecole di gliceraldeide-3-fosfato uscite dalla prima fase e alla fine producono due molecole di acido piruvico.



Le reazioni 6 e 7 producono i primi due ATP

Nella reazione n° 6 si devono ossidare **due molecole** di **gliceraldeide-3-fosfato**. Dato che per ossidare un'aldeide ad acido carbossilico basta un ossidante molto blando, usando un ossidante più energetico come NAD^+ , l'eccesso di energia sarebbe sprecato come calore. Per trasformare questo eccesso di energia in nuova energia chimica, la glicolisi usa un metodo ingegnoso. Lega l'aldeide della **gliceraldeide-3-fosfato** al gruppo SH di una cisteina (nell'enzima) formando un tiosemiacetale. Ora serve tutta la capacità ossidante del NAD^+ per ossidare il tiosemiacetale a tioestere, perchè questo è molto reattivo (ha la reattività di una anidride), infatti reagisce subito con un fosfato inorganico e produce un'anidride, **acido 1,3-bisfosfoglicerico**. Anche questo composto è reattivo e, nella reazione n° 7, trasferisce il fosfato sul carbossile all'ADP per formare **ATP e acido 3-fosfoglicerico**.

Le reazioni 8, 9 e 10 producono altri due ATP

Queste ultime tre reazioni devono recuperare i due ATP consumati nella prima fase per fosforilare i carboni 1 e 6 della catena. Questo può essere fatto perchè i β -idrossiacidi sono instabili e tendono a disidratarsi formando acidi α - β insaturi (un comportamento già osservato con le β -idrossialdeidi nella condensazione aldolica).

L'**acido 3-fosfoglicerico**, però, non ha l'OH libero in posizione β , ma lo può facilmente liberare spostando il fosfato dalla posizione β alla α , cioè dal C-3 al C-2, formando l'**acido 2-fosfoglicerico**.

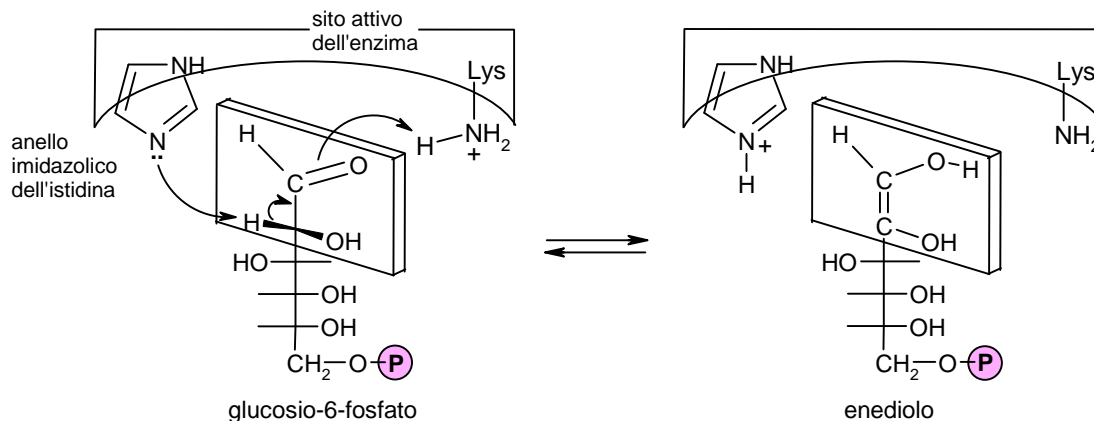
Questo è un β -idrossiacido e si può disidratare formando l'**acido 2-fosfoenolpiruvico**, una molecola ancora instabile perchè è un enolo. La tautomeria cheto-enolica a cui va incontro la molecola trasformandosi in **acido piruvico** dà la spinta per la produzione di ATP.

Meccanismo della reazione 2

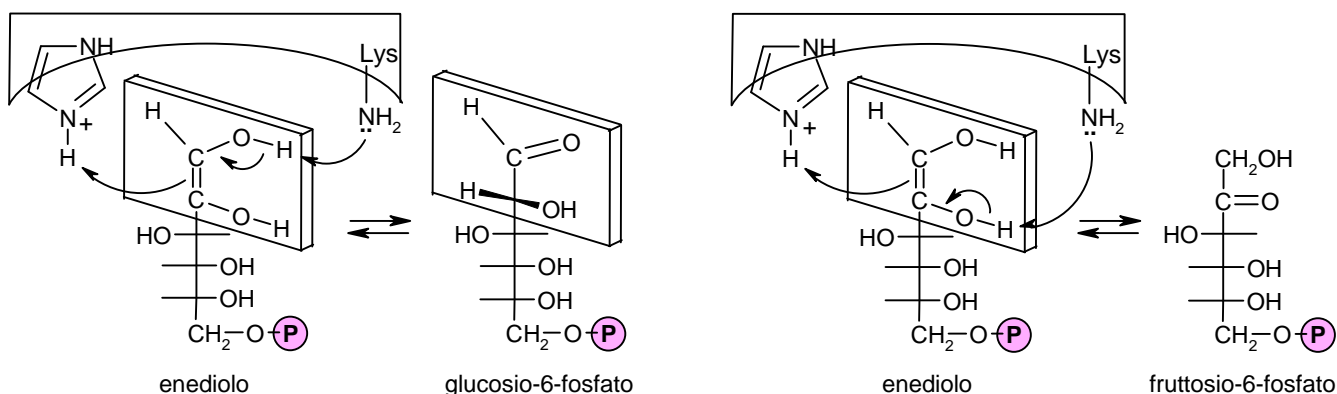
Le reazioni della glicolisi, per un chimico, sono un'occasione ideale per comprendere che le reazioni enzimatiche non sono da accettare "a scatola chiusa", ma sono delle normali reazioni di chimica organica realizzate in modo raffinato all'interno del sito attivo degli enzimi.

Una reazione organica **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 di uno specifico enzima, dove può entrare solo la molecola che deve reagire perchè ha una forma e una polarità che calzano perfettamente. Quando la molecola è nel sito attivo, è circondata con precisione dai gruppi funzionali degli amminoacidi che la fanno reagire in modo stereospecifico.

Un esempio tipico è la reazione 2 della glicolisi nella quale 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, con una reazione nota come **isomerizzazione alcalina**. Sia la reazione enzimatica che quella in soluzione procedono attraverso lo stesso intermedio **enediolo**. Nell'enzima, però, il glucosio-6-fosfato si trova vicino alle catene laterali di una istidina e di una lisina. Il meccanismo di formazione dell'enediolo è il seguente:



Nell'isomerizzazione alcalina in soluzione, il glucosio dà luogo ad 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**, mentre il mannosio non si forma.



Quando la reazione avviene in soluzione, invece, **questo H^+ può entrare sul C-2 sia da sopra che da sotto** il piano molecolare dell'enediolo formando indifferentemente **glucosio e mannosio**. Questa è la ragione per cui l'enzima è in grado di condurre la reazione in modo **stereoselettivo** producendo sul C-2 solo la configurazione R (glucosio) e mai la configurazione S (mannosio).

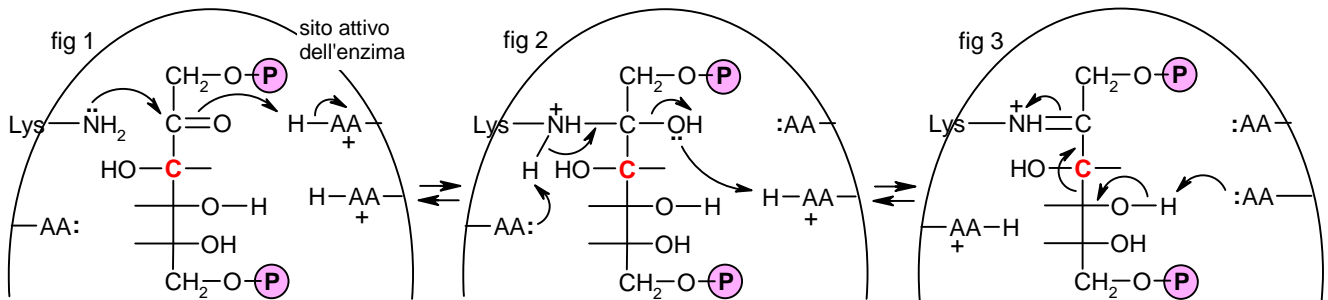
Se, invece, la lisina strappa l' H^+ sull'OH del C-2, si forma **fruttosio-6-fosfato**, come si vede qui sopra a destra.

Meccanismo della reazione 4

La reazione 4, catalizzata dall'enzima aldolasi, è un'**addizione aldolica inversa** e taglia il fruttosio-1,6-bisfosfato in due frammenti di tre atomi di carbonio, diidrossiacetone-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato. L'addizione aldolica è una reazione che unisce tra loro due aldeidi per formare una β -idrossialdeide (aldolo), ma, essendo reversibile, può anche spezzare una β -idrossialdeide o un β -idrossichetone in due frammenti.

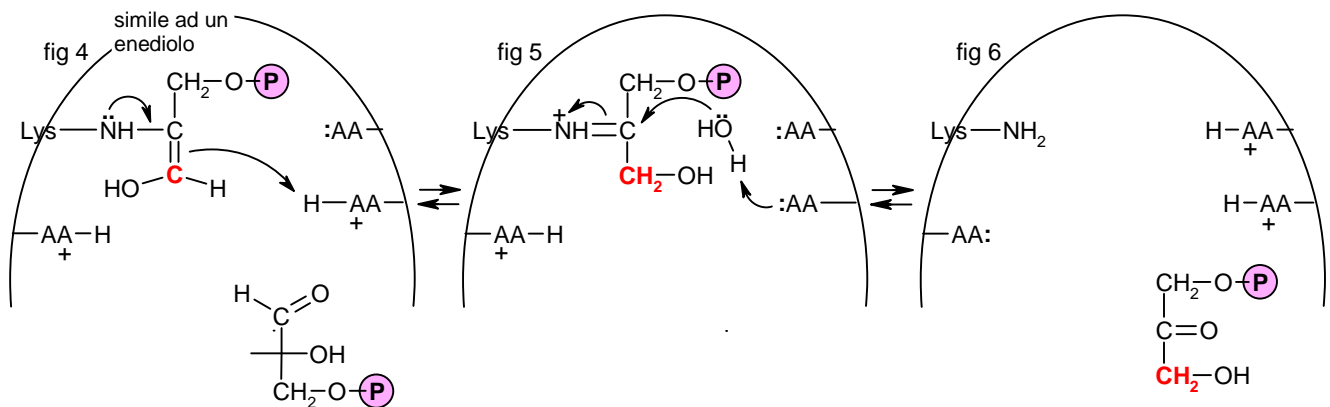
Quando entra nel sito attivo dell'enzima (fig 1 qui sotto), il fruttosio si lega al gruppo amminico di una lisina formando un'**immina** (fig 3). Questa rende più facile la reazione perchè stabilizza l'**intermedio enediolo** (fig 4) dato che l'azoto è meno elettronegativo dell'ossigeno.

L'addizione aldolica inversa sfrutta la particolare stabilità di una **carica negativa sul carbonio in posizione alfa** rispetto al carbonile. Dato che il carbonile è sul C-2, il **carbonio alfa** è il C-3 (in neretto) e può staccarsi dal C-4 se questo forma un nuovo carbonile (fig 3). La reazione è un'eliminazione e la metà superiore della molecola si stacca (**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, quindi, si taglia tra C-3 e C-4 liberando il frammento inferiore di gliceraldeide-3-fosfato. Alla fine della reazione, per liberare il frammento superiore di diidrossiacetone-fosfato, una molecola di acqua idrolizza l'immina (fig 5) e l'enzima torna allo stato iniziale (fig 6).



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

l'immina del fruttosio-1,6-bisfosfato subisce l'addizione aldolica inversa



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

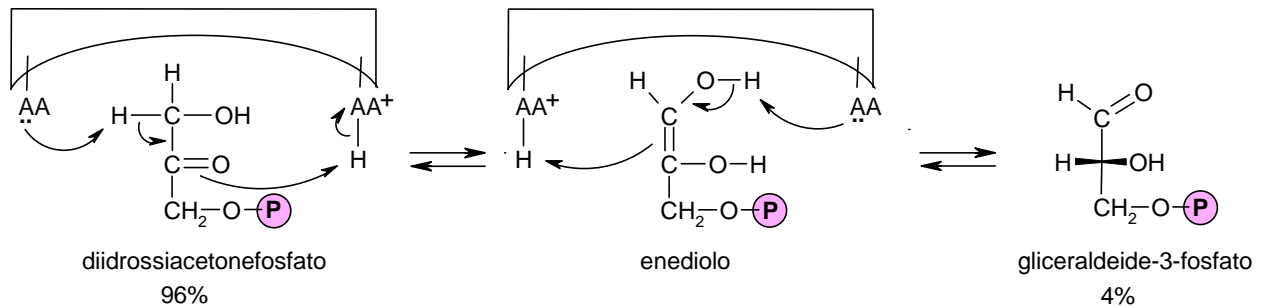
l'idrolisi dell'immina rilascia diidrossiacetone-fosfato (meccanismo semplificato)

La reazione è reversibile e viene usata sia nella glicolisi per rompere il fruttosio in due frammenti, sia nella gluconeogenesi per sintetizzare fruttosio, la configurazione RS sul C-3 e sul C-4 dei due carboni che perdono reversibilmente l'attività ottica durante la reazione, quindi, deve essere preservata dall'enzima.

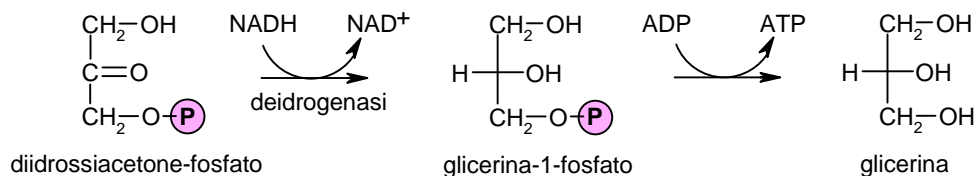
Si noti che vi è **contemporaneamente catalisi basica** da un lato della molecola e **catalisi acida** dall'altro. In soluzione questo non sarebbe mai possibile perchè il pH è uniforme, mentre nel sito attivo di un enzima possono esserci amminoacidi con caratteristiche acido-base opposte in punti diversi del sito attivo.

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-fosfato in fruttosio-6-fosfato già esaminata prima. Naturalmente l'equilibrio è spostato a favore della molecola più stabile, il diidrossiacetone-fosfato che rappresenta il 96% del totale, mentre la gliceraldeide-3-fosfato è il 4%. Dato però che quest'ultima è consumata dalle tappe successive della glicolisi, per la legge dell'equilibrio mobile il diidrossiacetone-fosfato viene progressivamente trasformato in gliceraldeide-3-fosfato e come tale è anch'esso degradato nella glicolisi. In questo modo entrambi i trioso-fosfati producono acido piruvico e quindi si ottengono due molecole di acido piruvico per ogni molecola di glucosio degradata.



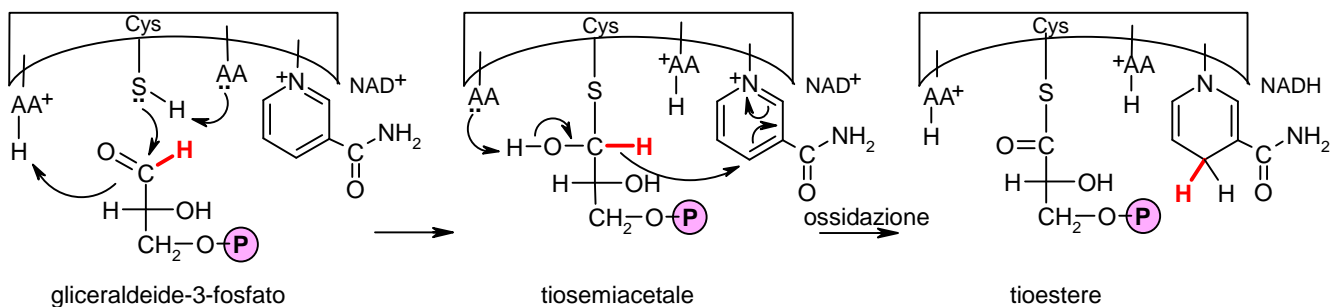
In realtà una piccola percentuale di diidrossiacetone-fosfato sfugge alla glicolisi grazie ad una deidrogenasi che lo riduce a glicerina-1-fosfato, molecola necessaria per la sintesi dei fosfolipidi e dei trigliceridi.



Meccanismo della reazione 6

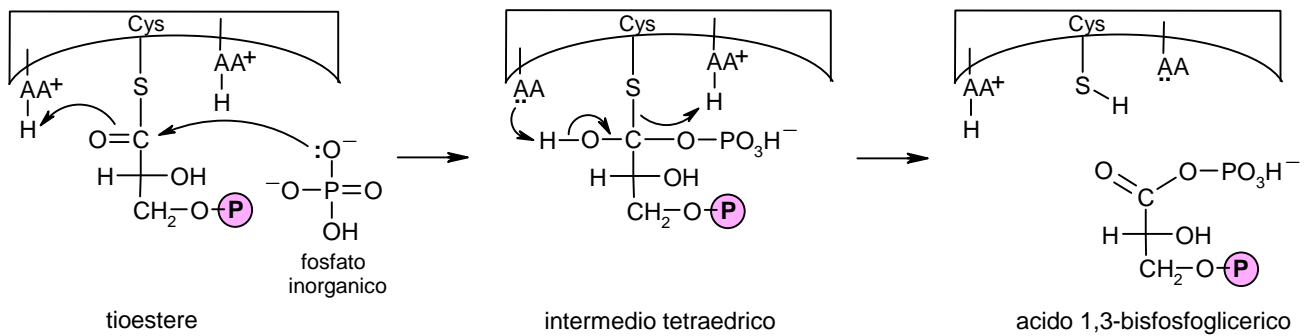
In questa reazione la gliceraldeide-3-fosfato viene ossidata ad acido 1,3-bisfosfoglicerico dal NAD⁺ per mezzo di un enzima deidrogenasi. La tappa 6 è importante per due motivi:

- 1) Riesce a conservare l'energia liberata dall'ossidazione del gruppo aldeidico producendo un legame ad alta energia, l'anidride mista carbossilica-fosforica dell'acido 1,3-bisfosfoglicerico. 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 usa NAD⁺ trasformandolo in NADH, quindi è indispensabile rigenerare il NAD⁺ consumato se si vuole che la glicolisi continui a degradare glucosio e a produrre energia.



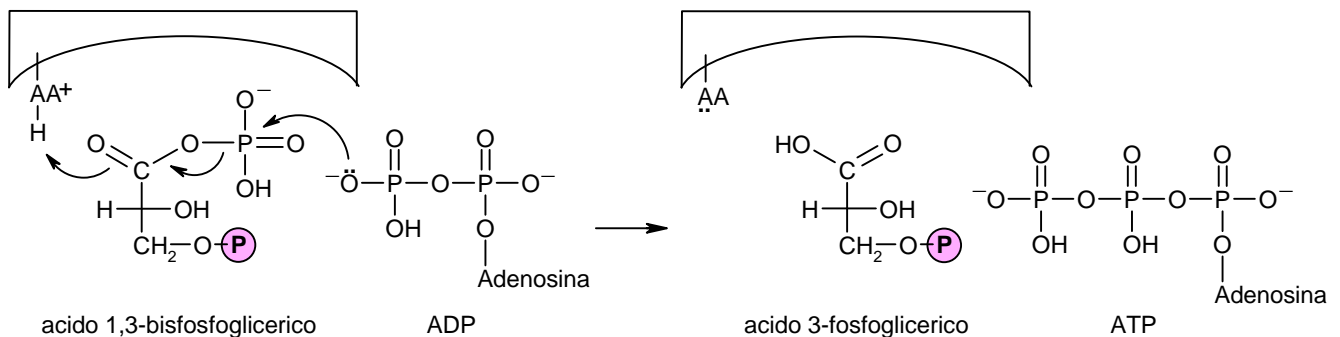
Se, in questa reazione, si facesse l'ossidazione diretta dell'aldeide con NAD⁺, il ΔG° sarebbe molto favorevole, ma l'energia liberata andrebbe sprecata come calore. Per ricavare energia chimica, la reazione utilizza un metodo molto ingegnoso. La gliceraldeide-3-fosfato si lega covalentemente al **gruppo 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 nel sito attivo dell'enzima vicino al tiosemiacetale. Nella figura è mostrata la parte attiva della molecola di NAD⁺, la nicotinammide, che accetta uno ione idruro (mostrato in rosso) in posizione 4.

Il **tioestere** formato dall'ossidazione è **una molecola molto reattiva** (al pari di un'anidride) e può facilmente reagire con una molecola di fosfato inorganico per formare acido 1,3-bisfosfoglicerico, un'anidride mista carbosilica-fosforica nella quale viene conservata l'energia in eccesso dell'ossidazione della gliceraldeide-3-P.



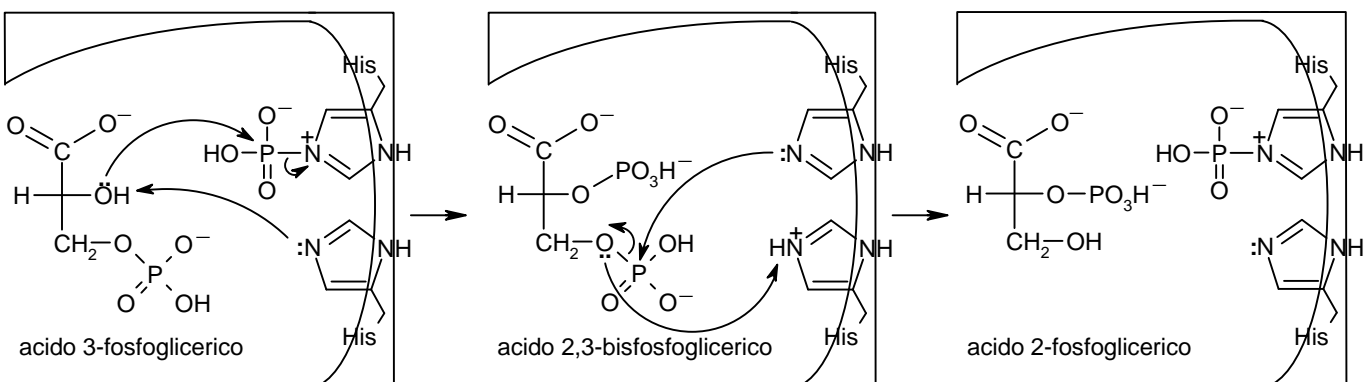
Meccanismo della reazione 7

Il legame anidridico carbossilico-fosforico dell'acido 1,3-bisfosfoglicerico viene idrolizzato da un enzima chinasi che trasferisce il gruppo fosforico ad una molecola di ADP per formare ATP. Questo costituisce il **guadagno energetico della glicolisi**.



Meccanismo della reazione 8

L'enzima mutasi, con l'aiuto di uno ione magnesio, catalizza lo spostamento reversibile del gruppo fosfato dalla posizione 3 alla posizione 2 dell'acido 3-fosfoglicerico. La reazione procede in due fasi. Nella prima un'istidina fosforilata cede il suo gruppo fosfato all'OH sul C-2 dell'acido 3-fosfoglicerico trasformandolo in acido 1,3-bisfosfoglicerico. Un'altra istidina aiuta l'OH nell'attacco nucleofilo strappandogli un H⁺, cioè con una catalisi basica. Nella seconda fase il fosfato in posizione 3 viene trasferito alla stessa istidina che prima lo aveva ceduto, ripristinando la forma iniziale dell'enzima e liberando acido 2-fosfoglicerico.

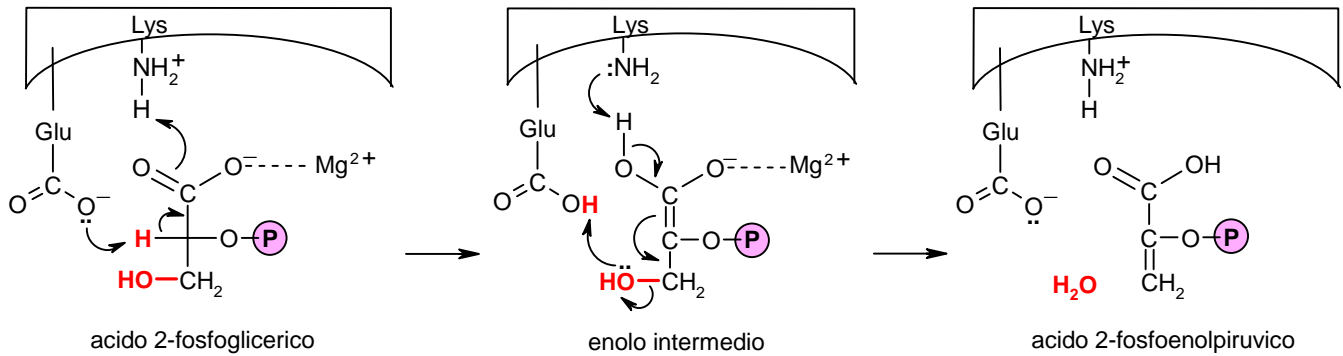


L'enzima è attivo solo se ha la prima istidina fosforilata. Per attivarlo è necessaria una minima quantità di acido 2,3-bisfosfoglicerico che, entrando nel sito attivo, fosforila l'istidina. L'enzima attivato può compiere centinaia di cicli catalitici prima di perdere ancora il fosfato e a quel punto deve essere attivato nuovamente.

Meccanismo della reazione 9

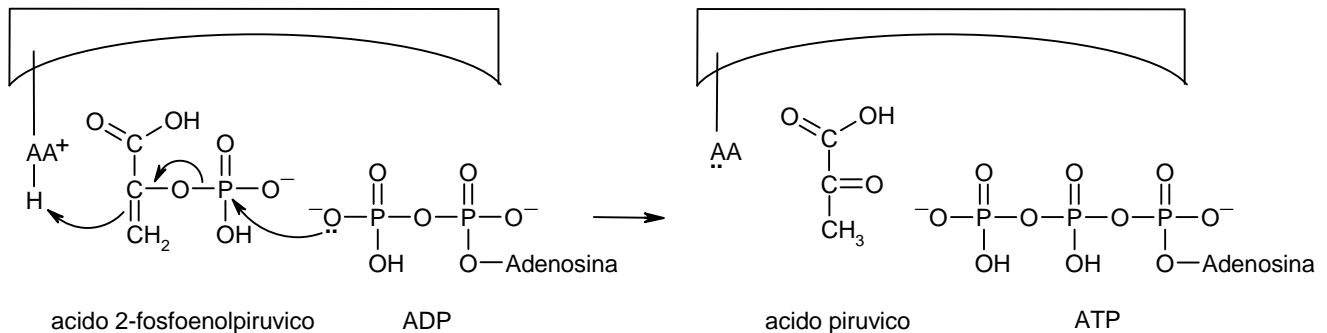
L'enzima enolasi catalizza reversibilmente questa reazione di eliminazione in cui si ha la disidratazione del carbonio 3 dell'acido 2-fosfoglicerico per dare l'acido 2-fosfoenolpiruvico. La **disidratazione di un gruppo OH in posizione β rispetto al carbossile** è facilitata da due fattori: perchè può procedere **via enolo**, e perchè forma un **acido α - β insaturo** che quindi è coniugato col doppio legame. E' importante osservare che, mentre il legame estereo col fosfato nell'acido 2-fosfoglicerico è relativamente stabile, nell'acido fosfoenolpiruvico questo legame diventa instabile ed è in grado di trasferire il fosfato sull'ADP per la sintesi di ATP nella tappa successiva (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.

I due amminoacidi che eseguono la catalisi nel sito attivo sono rispettivamente un acido glutammico e una lisina, sono presenti anche due ioni Mg^{2+} che servono a facilitare la formazione dell'enolo intermedio.



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. Queste due reazioni, in realtà, liberano un'energia doppia rispetto a quella necessaria per la sintesi di ATP, l'eccesso di energia spinge con forza la reazione a completezza.



Respirazione e fermentazione

Oltre al bilancio di ATP, nella glicolisi è importante considerare il **bilancio di NADH**. L'ossidazione compiuta nella tappa (6) della glicolisi 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 deve 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.

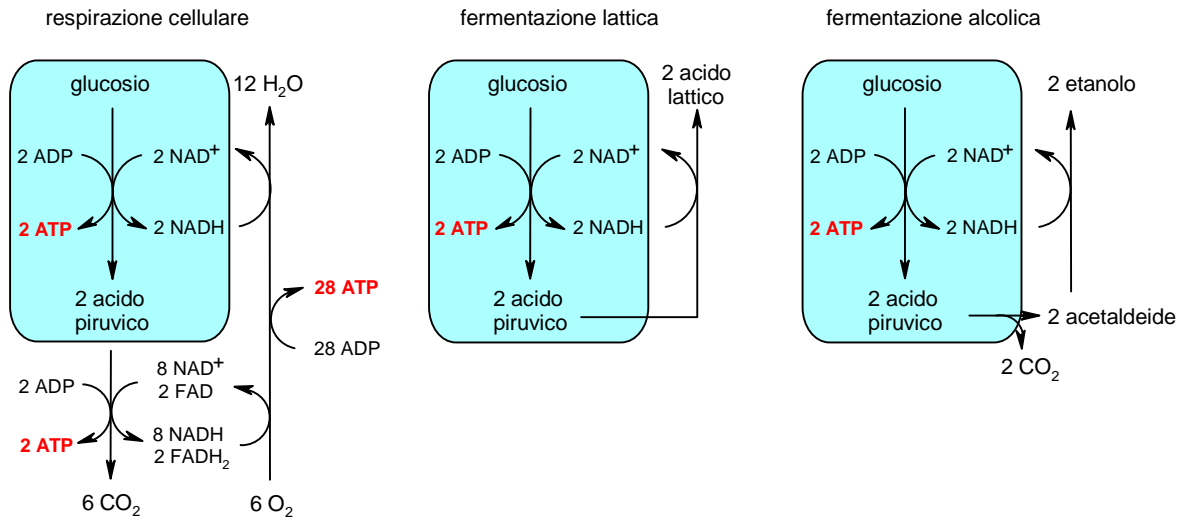
I tre più importanti sono: la **respirazione cellulare**, la **fermentazione lattica** e la **fermentazione alcolica**.

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 però 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, qualche altra molecola deve fungere da **ossidante finale**. Questo ruolo può essere svolto dallo stesso **acido piruvico** che viene **ridotto ad acido lattico** per consentire l'ossidazione del NADH a NAD⁺. Questa via metabolica si realizza nel **muscolo scheletrico** che si contrae violentemente e viene detta fermentazione **omolattica**. Anche alcuni batteri anaerobi trasformano il glucosio in acido piruvico e poi questo in acido lattico, come nella fermentazione **lattica** che trasforma il latte in **yogurt**.

3) Fermentazione alcolica. Alcuni microrganismi anaerobi, come il lievito di birra, decarbossilano l'**acido piruvico** formando **acetaldeide** e poi riducono quest'ultima ad **etanolo**. In questo modo ossidano il NADH a NAD⁺ e possono continuare a ricavare energia dalla glicolisi.

Qui sotto sono riassunte queste tre vie metaboliche. Mentre nelle due fermentazioni l'energia ricavata per ogni molecola di glucosio è di 2 ATP (prodotti dalla glicolisi), nella respirazione cellulare si ricavano 32 ATP (2 dalla glicolisi, 2 dal ciclo di Krebs, 28 dalla fosforilazione ossidativa) grazie all'intervento di O₂, e della sua energica azione ossidante.



Si parla di **respirazione** se la molecola che fa da ossidante finale è una **molecola inorganica**, in particolare, con O₂, si parla di respirazione aerobica. In altri tipi di respirazione troviamo altre molecole inorganiche che fanno da ossidanti, per esempio NO₃⁻ che si riduce ad N₂, SO₄²⁻ che si riduce a S²⁻, H⁺ che si riduce ad H₂.

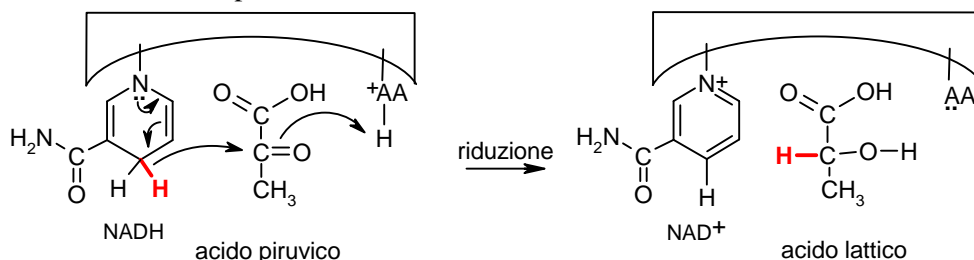
Si parla invece di **fermentazione** se la molecola che fa da ossidante finale è una **molecola organica**, uno dei prodotti di scarto dalle reazioni considerate. Questa può essere l'acido piruvico che si riduce ad acido lattico nella fermentazione lattica, l'acetaldeide che si riduce ad etanolo nella fermentazione alcolica, la CO₂ che si riduce a CH₄ nella fermentazione delle biomasse.

Dato che non c'è l'intervento di molecole estranee come l'ossigeno, nelle fermentazioni, lo stato redox complessivo delle molecole resta costante.

Meccanismo della fermentazione lattica

La fermentazione lattica è realizzata dall'enzima lattato deidrogenasi che lega nel sito attivo sia il NADH che l'acido piruvico. La reazione di riduzione dell'acido piruvico comporta il trasferimento di uno ione idruro dalla posizione 4 dell'anello della nicotinammide ridotta del NADH al carbonile sul C-2 dell'acido piruvico.

Al termine della reazione sia il NAD⁺ che l'acido lattico devono lasciare l'enzima per essere sostituiti da due nuove molecole di NADH e acido piruvico.



Il meccanismo della fermentazione alcolica è più complesso e verrà discusso alla fine del prossimo paragrafo sulla decarbossilazione ossidativa.

Decarbossilazione ossidativa

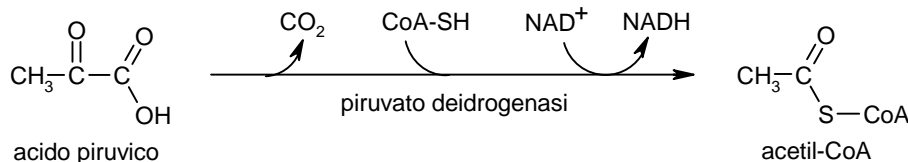
L'acido piruvico, il prodotto finale della glicolisi, può essere degradato secondo tre vie diverse come illustrato a pagina 9: respirazione cellulare, fermentazione lattica, fermentazione alcolica.

Nella fermentazione lattica, l'acido piruvico viene ridotto ad acido lattico.

Nella fermentazione alcolica l'acido piruvico viene decarbossilato ad acetaldeide che poi è ridotta ad etanolo.

Nella respirazione cellulare l'acido piruvico subisce una **decarbossilazione ossidativa** che lo trasforma in **acetil-CoA** che poi viene ossidato fino a CO₂ nel ciclo di Krebs.

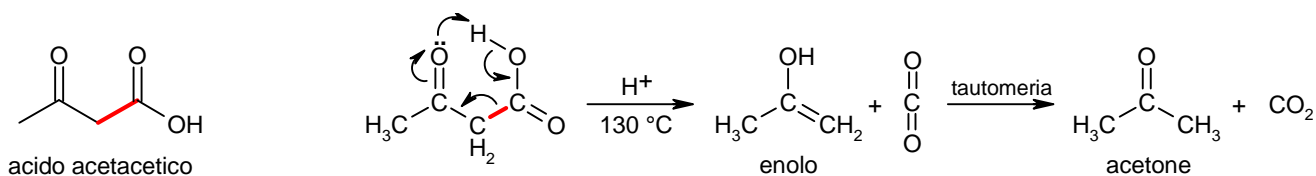
La decarbossilazione ossidativa è una reazione che avviene nei mitocondri e trasforma l'acido piruvico in acetil-CoA, un tioestere dell'acido acetico legato al coenzima A (la struttura dell'acetil-CoA è mostrata a pag 13).



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

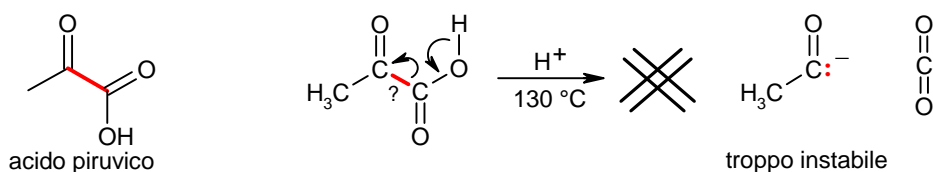
La decarbossilazione è una reazione ben nota in chimica organica che può avvenire in condizioni blande solo con gli **acidi β-γ insaturi** o con i **β-chetoacidi** che hanno due legami singoli tra carbossile e legame insaturo.

Per esempio, l'**acido acetacetico** è un **β-chetoacido** e può decarbossilare facilmente, infatti perde CO₂ per semplice riscaldamento a 130 °C grazie al seguente meccanismo ciclico a 6 atomi:



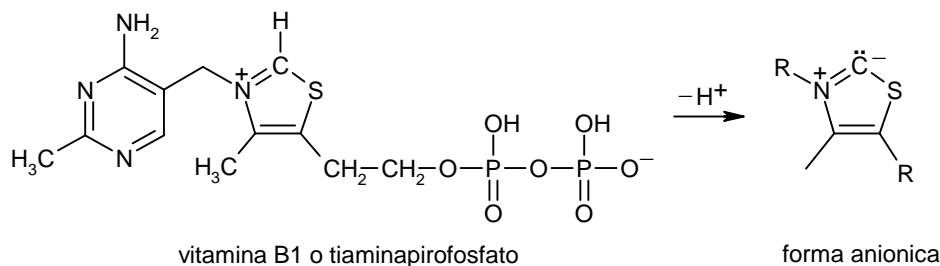
Il carbossile COOH è legato al carbonio in alfa rispetto al carbonile, così, quando il gruppo COOH se ne va come CO₂, la coppia di elettroni che lascia sulla molecola (mostrata qui sopra in rosso) è sul **carbonio in alfa** e, quindi, è stabilizzata per risonanza dato che può giungere fino all'atomo di ossigeno del carbonile.

L'**acido piruvico**, invece, è un **α-chetoacido**, e non può decarbossilare facilmente, infatti, se la CO₂ si staccasse, dovrebbe lasciare una coppia di elettroni (mostrata qui sotto in rosso) direttamente sul **carbonio del carbonile**, in un punto dove non può essere delocalizzata per risonanza.



Come può decarbossilare, quindi, l'acido piruvico senza contraddire le leggi della chimica?

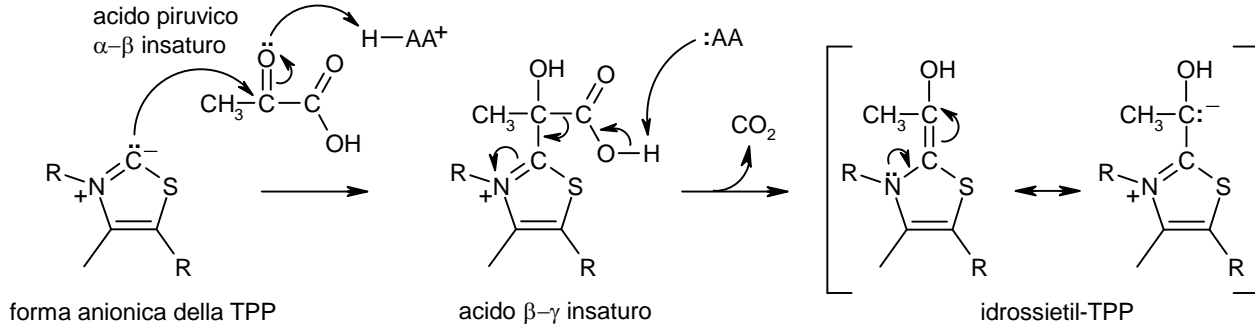
La reazione è possibile grazie all'intervento della **tiaminapirofosfato** (TPP) o **vitamina B1** una molecola in grado di promuovere la decarbossilazione degli α-chetoacidi.



Il punto reattivo della vitamina B1 è l'anello tiazolico aromatico 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⁺ producendo la forma anionica della TPP mostrata qui in forma semplificata.

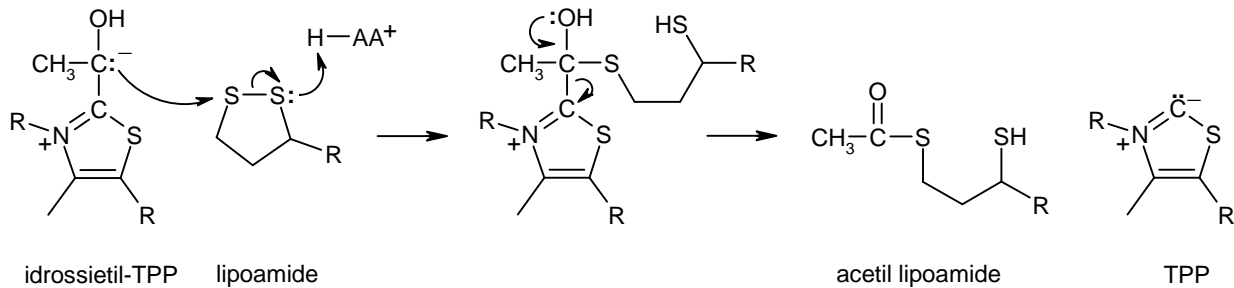
La forma anionica della TPP è nucleofila e può reagire attaccando il carbonile sul C-2 dell'acido piruvico.

Il **nuovo acido** che si ottiene è ancora insaturo, ma ha il doppio legame spostato più indietro di una posizione, è diventato quindi **β - γ 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 per risonanza giungendo fino all'atomo di azoto positivo. Non sono molte le molecole che possiedono, come la TPP, una carica negativa stabile sul carbonio di un legame multiplo. Lo ione cianuro avrebbe queste caratteristiche, ma è decisamente troppo tossico.

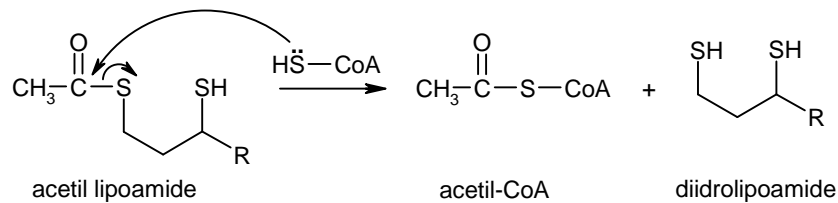


Si è formata **idrossietil-TPP** che è descritta dalle due forme limite di risonanza mostrate qui sopra a destra.

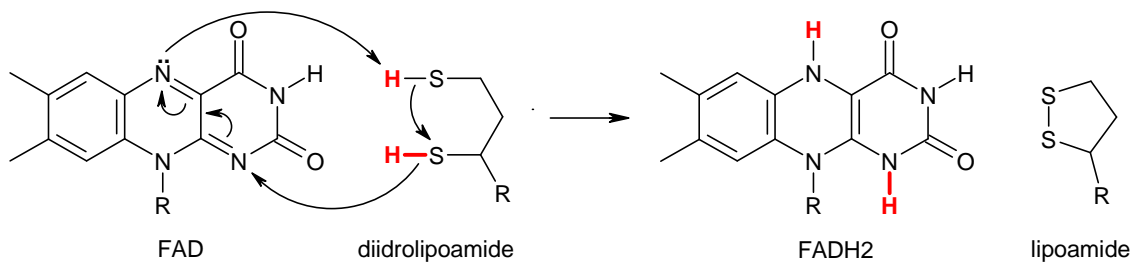
Questa molecola deve essere ossidata per produrre **acido acetico**, ma non si può usare NAD⁺ o FAD perchè non ci sono atomi di H sul carbonio che deve essere ossidato. L'enzima piruvato deidrogenasi utilizza quindi un altro ossidante, il ponte disolfuro -S-S- della **lipoammide** che viene ridotto alla forma tiolica SH.



L'intermedio di questa reazione è **acetil-lipoammide**, un tioestere che poi subisce una reazione di transesterificazione reagendo col gruppo SH del **coenzima A (CoA-SH)**. Si forma così un altro tioestere, **acetil-CoA** e il ditiole diidrolipoammide.

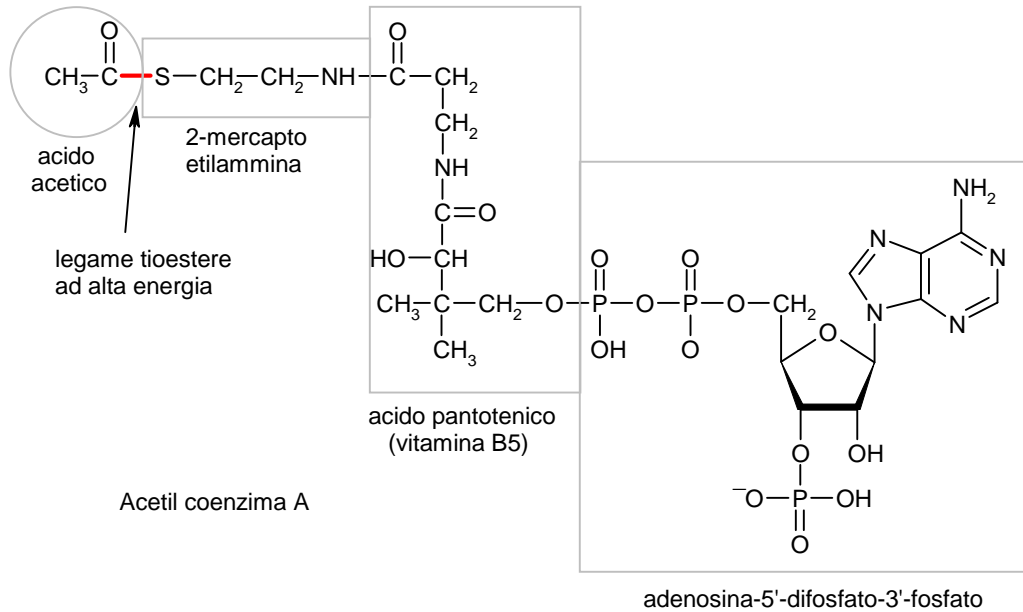


A differenza della idrossietil-TPP, la diidrolipoammide possiede, sui gruppi SH, gli atomi di idrogeno che le consentono di essere ossidata dal FAD. Il FADH₂ così prodotto viene subito dopo riossidato dal NAD⁺ che si riduce a NADH.



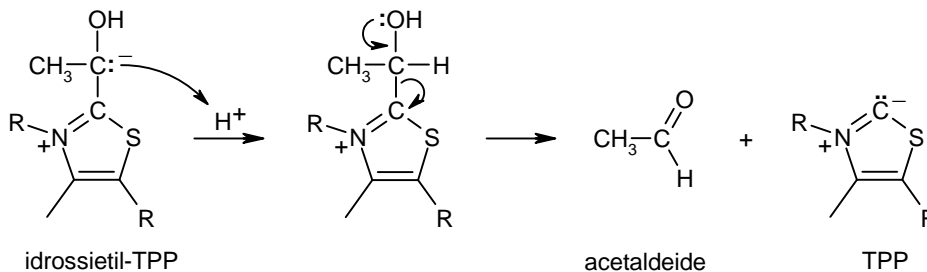
La struttura dell'**acetil-coenzima A** è illustrata qui sotto. Nel Co-A ci sono tre componenti legati tra loro in modo covalente: 2-mercaptoetilammina, acido pantotenico (vitamina B5), adenosina-3'-fosfato-5'- difosfato.

Il legame tioestere tra l'acido acetico e il coenzima A è ad alta energia dato che il suo ΔG° di dissociazione è di $-7,5$ kcal/mole, simile a quello dell'ATP che è di $-7,3$ kcal/mole.

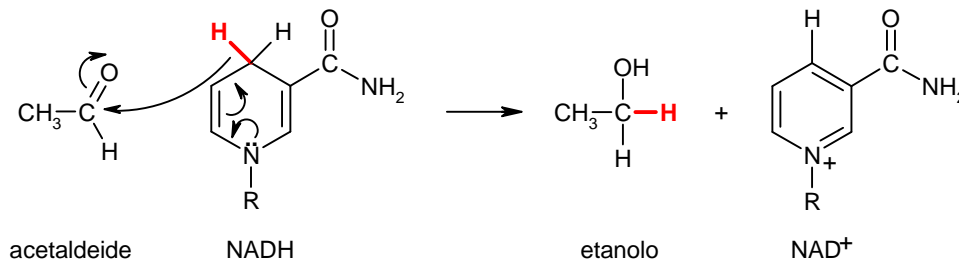


Meccanismo della fermentazione alcolica

Nella fermentazione alcolica l'acido piruvico viene decarbossilato attraverso una serie di reazioni che ricalcano quelle appena viste per la decarbossilazione ossidativa fino alla formazione della idrossietil-TPP. A questo punto la idrossietil-TPP, invece di subire un'ossidazione con la lipoammide, 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.



L'acetaldeide viene infine ridotta col NADH formando etanolo e NAD^+ che consente di continuare la glicolisi.

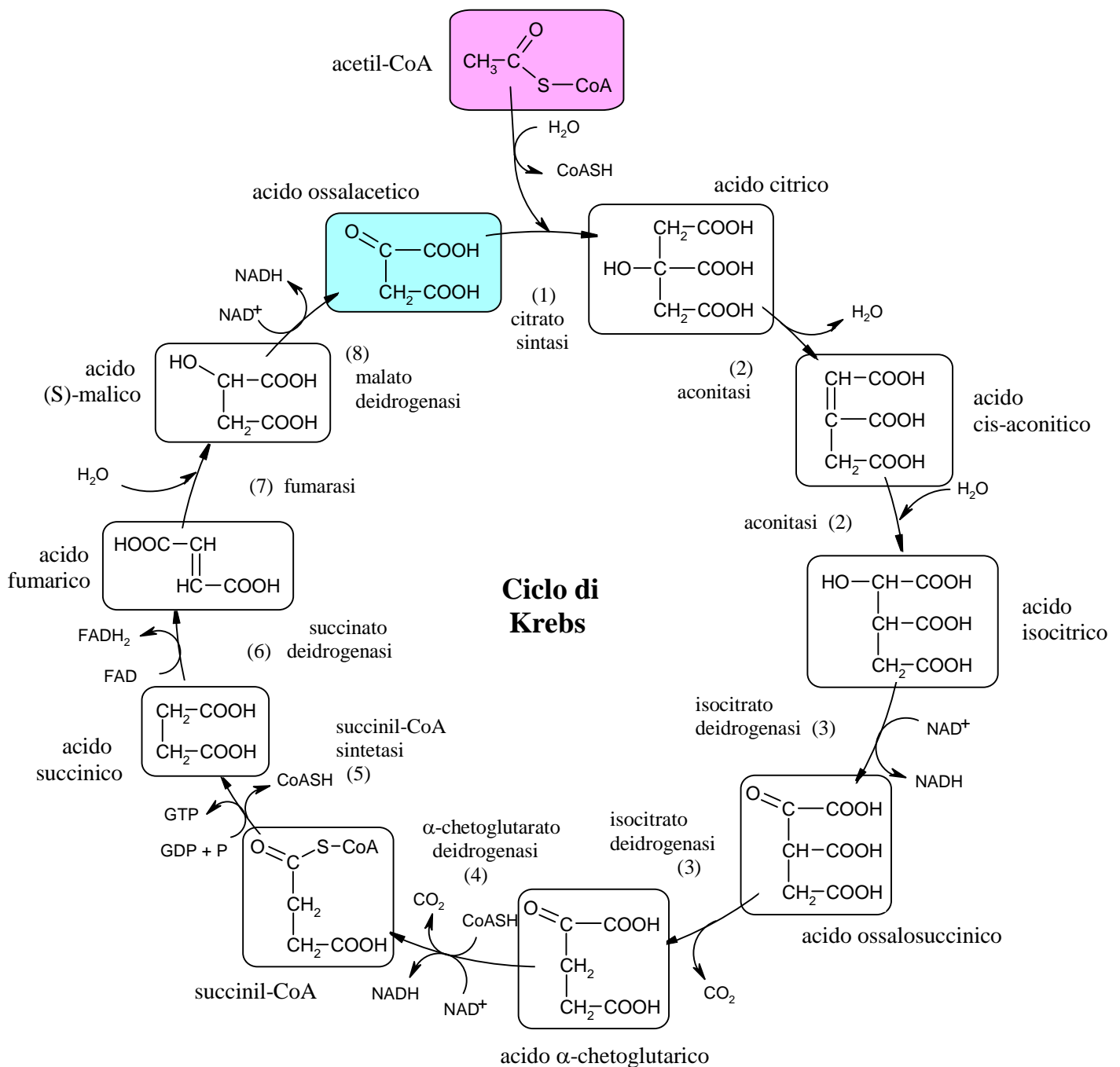


Ciclo di Krebs

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 in **otto tappe** enzimatiche e hanno lo scopo di ossidare completamente i due carboni del gruppo acetilico dell'acetil-CoA formando due molecole di CO_2 in modo però da conservare una parte dell'energia libera di reazione 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 perchè alle spalle del CH_3 dell'acido acetico non vi sono altri atomi che consentano di aiutare la decarbossilazione.

Il problema è stato risolto in modo elegante unendo l'acido acetico dell'acetil-CoA ad una molecola ausiliaria, l'acido ossalacetico, in modo da ottenere una molecola più grande, l'acido citrico, che, dopo alcuni passaggi, può essere trasformato in un β -chetoacido, l'acido ossalosuccinico, che finalmente può decarbossilare con facilità perchè possiede un carbonile in posizione beta. La molecola che si ottiene dopo la decarbossilazione è l'acido α -chetoglutarico, un alfa chetoacido (come l'acido piruvico) che la cellula sa decarbossilare facilmente con l'intervento della TPP, la vitamina B1, usando un enzima quasi identico a quello della decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico. La parte finale del ciclo ha lo scopo di convertire l'acido succinico formato fin qui nella molecola iniziale, l'acido ossalacetico.



A differenza di quanto accade nella glicolisi, nel ciclo di Krebs le reazioni hanno un andamento ciclico: l'acido ossalacetico, che viene consumato all'inizio per condensazione con l'acetil-CoA, è solo una molecola ausiliaria e deve essere rigenerato alla fine del ciclo per 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). Se l'acido citrico avesse un carbonile in posizione β potrebbe decarbossilare. Però non è possibile ossidare a carbonile il suo gruppo alcolico perché è terziario. Le prossime tappe del ciclo, quindi, devono spostare l'OH alcolico dell'acido citrico sul carbonio adiacente (secondario), ossidarlo a carbonile, e infine decarbossilare la molecola.

2) L'enzima **aconitasi** converte l'acido citrico in acido isocitrico nel quale il gruppo OH alcolico si trova sul carbonio secondario. L'acido citrico viene prima disidratato, formando l'acido insaturo cis-aconitico, questo viene poi reidratato in modo che l'ossidrilico 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 ossidrilico dell'acido isocitrico formando l'acido ossalosuccinico, un β -chetoacido rispetto al COOH centrale che viene subito decarbossilato ad acido α -chetoglutarico. Questa è la prima delle due tappe in cui si ha liberazione di CO_2 .

4) Il complesso multienzimatico **α -chetoglutarato deidrogenasi** esegue la decarbossilazione ossidativa dell'acido α -chetoglutarico (un α -chetoacido 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^+ . La sua struttura è quasi identica a quella mostrata in copertina della piruvato deidrogenasi.

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.

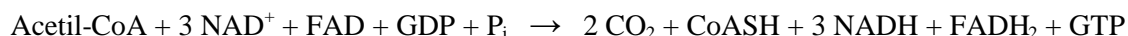
A questo punto del ciclo sono state prodotte due molecole di CO_2 e quindi è stata completata l'ossidazione del gruppo acetile. La parte restante del ciclo ha lo scopo trasformare l'acido succinico in acido ossalacetico che può ricominciare il ciclo di reazioni. La somiglianza tra le due molecole ci suggerisce la strategia di sintesi: si tratta di creare un doppio legame C=C, di idratarlo formando un 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 il FAD a FADH_2 .

7) L'enzima **fumarasi** idrata il 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.

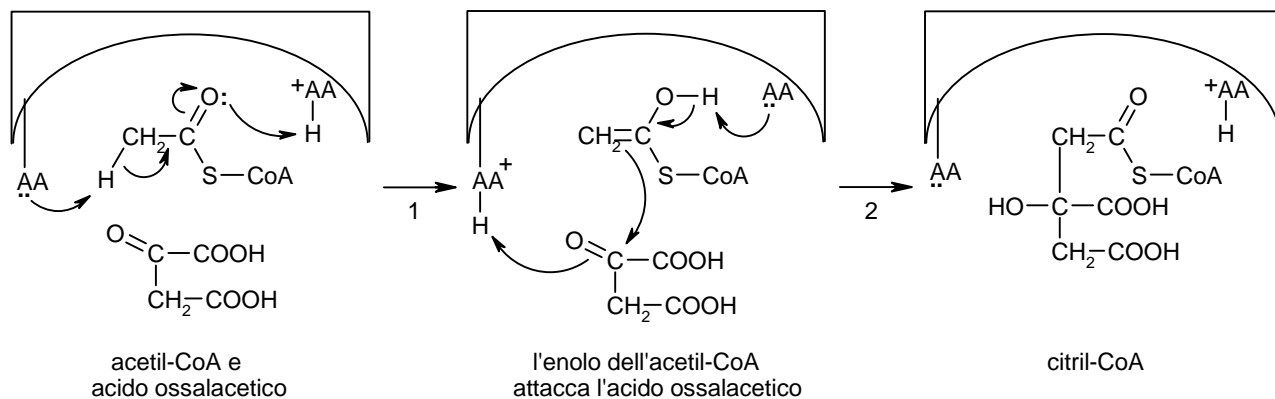
La reazione globale riferita ad una molecola di acetil-CoA è la seguente:

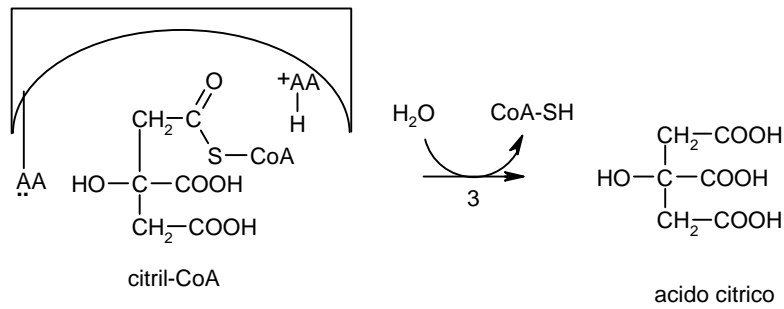


Per brevità esamineremo in dettaglio il meccanismo di due sole reazioni enzimatiche, quello della citrato sintasi, la tappa n° 1, e quello della isocitrato deidrogenasi, la tappa n° 3.

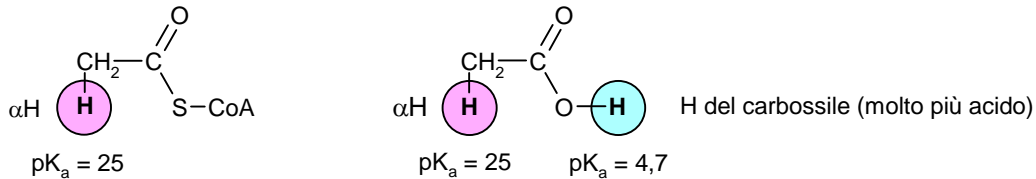
Tappa n° 1: citrato sintasi

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





1) L'acetil-CoA viene convertito per tautomeria nell'eno attraverso una catalisi acida da un lato della molecola e basica dall'altro. L'acido acetico si presenta come tioestere (acetil-CoA) perchè così può formare più facilmente l'eno. Se l'acido acetico avesse il carbossile libero, su questo avrebbe un idrogeno molto più acido di quello in alfa (pK_a 4,7 contro pK_a 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'eno dell'acetil-CoA porta un attacco nucleofilo al carbonile dell'acido ossalacetico. Il prodotto della reazione è il citritil-CoA che resta legato all'enzima.

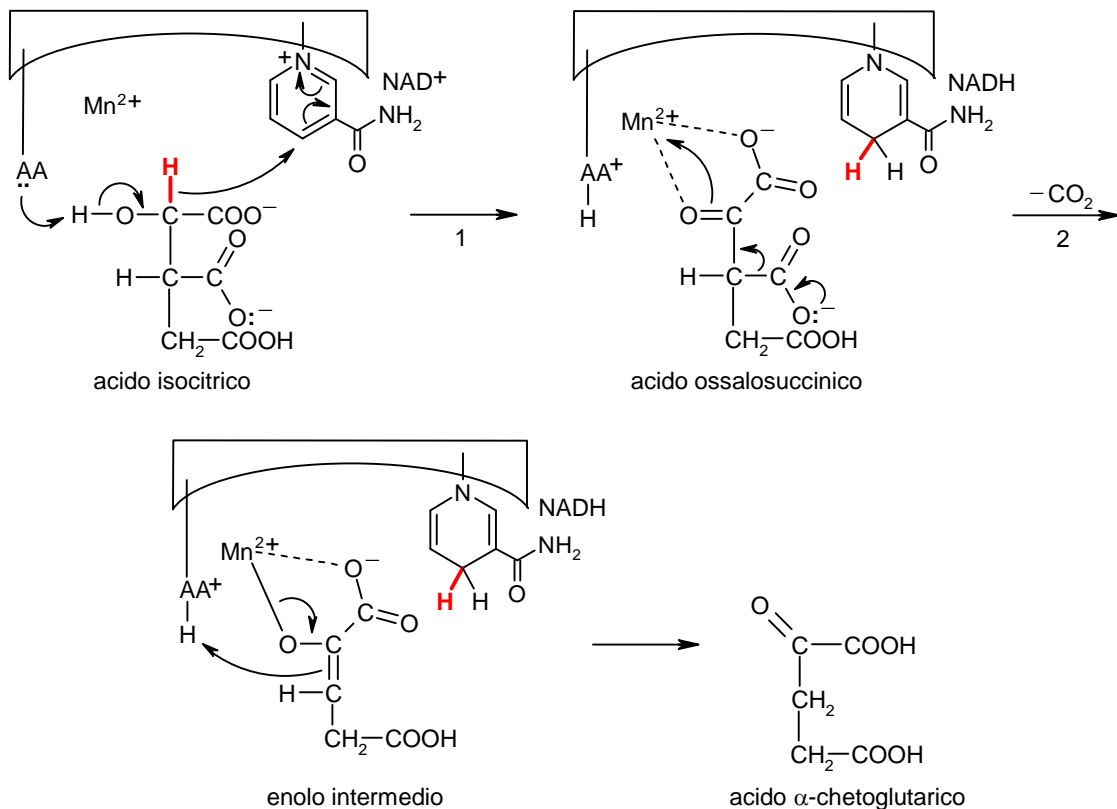
3) Il citritil-CoA viene idrolizzato ad acido citrico e CoA-SH. Questa idrolisi è fortemente spostata a destra dato che il tioestere è un estere attivo, ha un $\Delta G^\circ = -7,5$ kcal/mole, e spinge a destra tutta la reazione.

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 CO_2 del ciclo e la prima molecola di NADH. La reazione procede in due stadi.

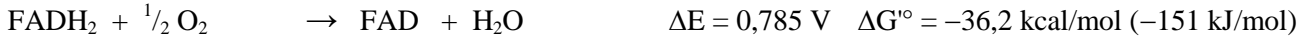
Nel primo stadio il NAD^+ ossida l'acido isocitrico ad acido ossalosuccinico che resta legato all'enzima.

Nel secondo stadio l'acido ossalosuccinico, un β -chetoadido rispetto al carbossile centrale, viene decarbossilato in presenza di Mn^{2+} come cofattore.



Fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa è costituita da un insieme di reazioni che avvengono nei mitocondri e hanno lo scopo di produrre ATP (fosforilazione) sfruttando la reazione di ossidazione con O_2 (ossidativa) dei coenzimi ridotti NADH e $FADH_2$ che sono stati generati dalla glicolisi, dalla decarbossilazione ossidativa e dal ciclo di Krebs. Le reazioni di **ossidazione** sono le seguenti:



(ΔG° 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 ΔG° 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 mette in azione l'enzima ATP sintasi che opera la reazione di **fosforilazione** che genera ATP da ADP e fosfato inorganico.



Gli elettroni che vengono ceduti dal NADH e dal $FADH_2$ non giungono direttamente all'ossigeno, ma passano attraverso una serie di **molecole trasportatrici di elettroni** chiamate nel loro insieme **catena respiratoria** che sono organizzate in quattro complessi proteici chiamati 1, 2, 3 e 4. Come si vede nel disegno qui sotto, la catena respiratoria è localizzata nella **membrana interna dei mitocondri** che circonda la zona più interna dei mitocondri chiamata **spazio della matrice** nella quale avvengono le reazioni che producono la maggior parte del NADH e del $FADH_2$: la decarbossilazione ossidativa, il ciclo di Krebs e la beta ossidazione degli acidi grassi.

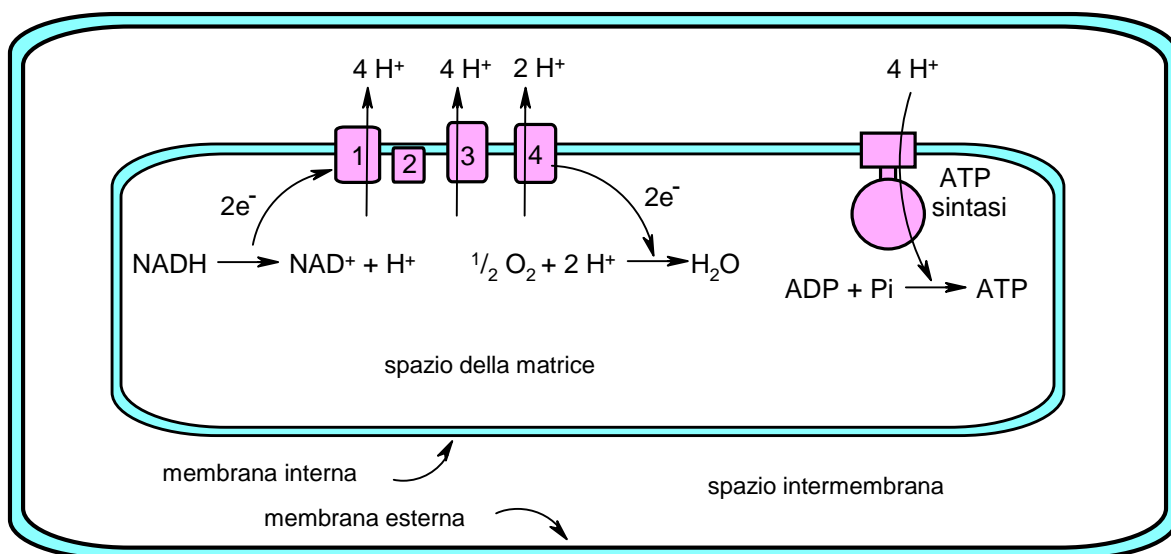
Il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria provoca uno **spostamento di ioni H^+ dalla matrice verso lo spazio intermembrana** in corrispondenza dei complessi 1, 3 e 4 che, per questo, sono anche chiamati **pompe protoniche**, mentre il complesso 2 non sposta H^+ . Si genera così una **differenza 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 più **acido**, nella matrice un ambiente più **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^+ ad attraversare la membrana per reagire con gli ioni OH^- e formare H_2O .

L'ossidazione di una molecola di NADH fa scorrere 2 elettroni nella catena respiratoria attraverso i complessi 1, 3 e 4 e quindi spinge 10 H^+ (4+4+2) nello spazio intermembrana e produce 2,5 molecole di ATP.

L'ossidazione di un $FADH_2$, invece, fa scorrere 2 elettroni nella catena respiratoria attraverso i complessi 2, 3 e 4 e quindi spinge solo 6 H^+ (4+2) nello spazio intermembrana e produce 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 un 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 per produrre un flusso di elettroni che a sua volta produce un lavoro, lo spostamento di ioni H⁺ dalla matrice allo spazio intermembrana.

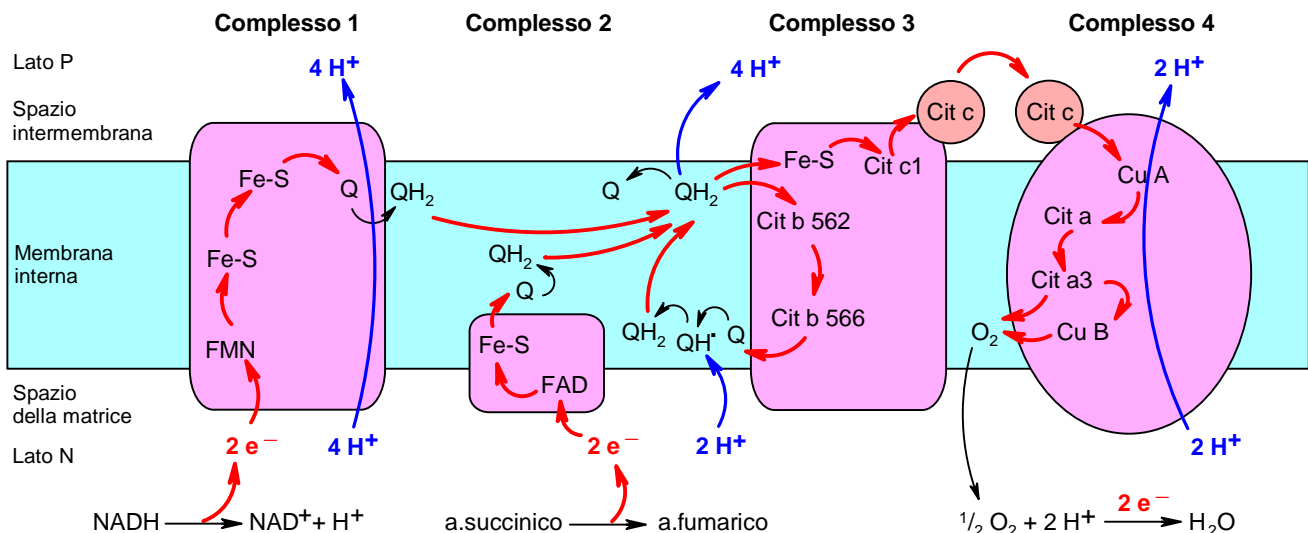
Per realizzare una pila si fanno avvenire le due semireazioni di ossidazione e di riduzione in due recipienti diversi, uniti da un ponte salino, nei quali sono immersi due elettrodi collegati da un filo elettrico attraverso il quale gli elettroni vengono trasferiti dalla semireazione di ossidazione a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

Nei mitocondri si realizza qualcosa di simile: NADH e O₂ non reagiscono direttamente tra loro, ma le due semireazioni avvengono in posti diversi (nel complesso 1 e nel complesso 4) 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 (i complessi 1, 3 e 4) 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 perchè questi operano a 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**.

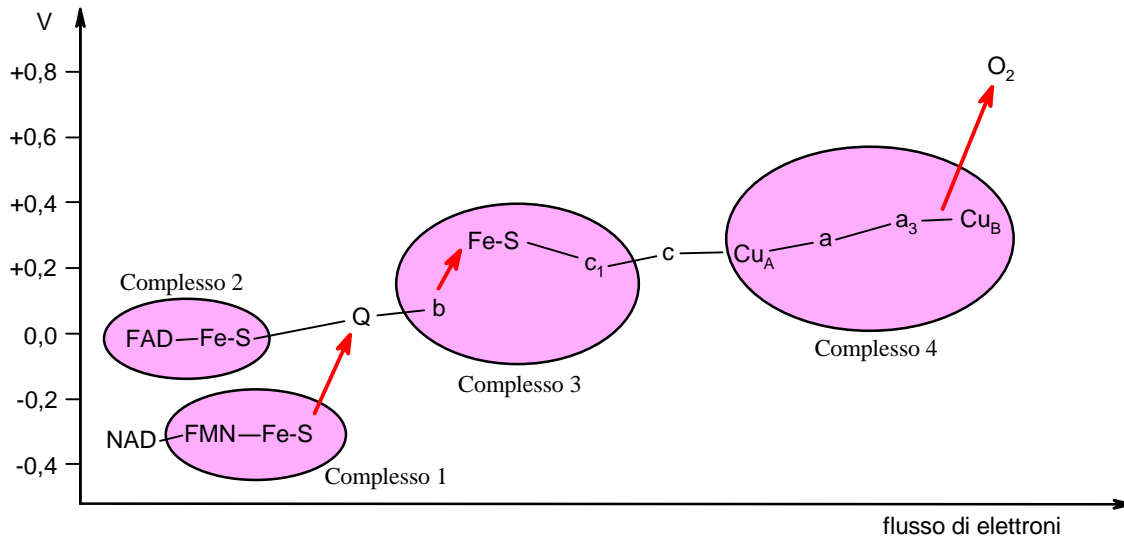
Gli elettroni vengono trasferiti dai **complessi 1 e 2** fino al **complesso 3** per mezzo del **coenzima Q** (una molecola liposolubile che si muove liberamente all'interno della membrana), e sono trasferiti dal **complesso 3** fino al **complesso 4** per mezzo del **citocromo c** (una piccola proteina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



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

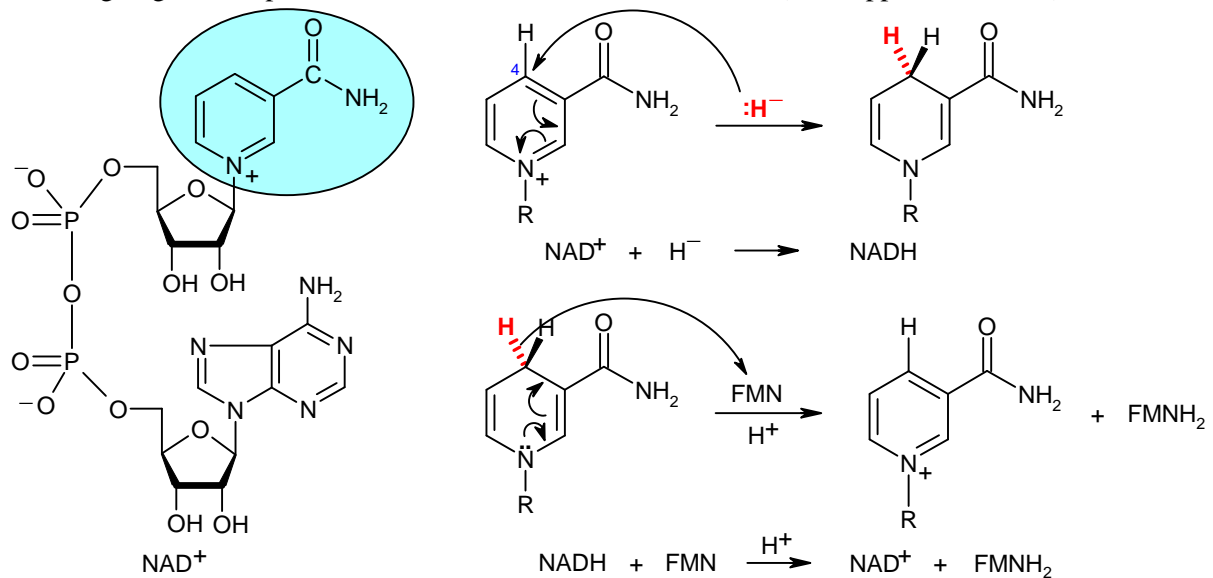
	O ₂	+0,82 V	
Complesso 4	CuB	+0,34 V	
	Cit a ₃	+0,35 V	
	Cit a	+0,29 V	
	CuA	+0,25 V	
	Cit c	+0,25 V	
Complesso 3	Cit c ₁	+0,21 V	
	Fe-S	+0,28 V	
	Cit b	+0,077 V	
	CoQ	+0,045 V	
Complesso 1	Fe-S	-0,30 V	
	FMN	-0,30 V	
	NAD	-0,32 V	
Complesso 2	Fe-S	-0,03 V	
	FAD	-0,04 V	

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^+ verso lo spazio intermembrana contro gradiente di concentrazione. Questi salti di potenziale sono in corrispondenza dei tre complessi 1, 3 e 4 e sono evidenziati da tre frecce nella figura qui sotto.



NAD, nicotinamide adenina dinucleotide

Il NAD è il principale coenzima di ossidoriduzione e può esistere in forma ossidata NAD^+ o ridotta $NADH$. 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 **nicotinamide** chiamata anche **vitamina B3** o PP (pellagra preventing) (evidenziata nella figura qui sotto). Il NAD^+ (che disegneremo d'ora in poi in forma semplificata) è un ossidante che può accettare uno **ione idruro** nella posizione 4 dell'anello della nicotinamide riducendosi a $NADH$. Il $NADH$ che giunge al complesso 1, si ossida cedendo uno ione idruro (una coppia di elettroni) al **FMN**.



Complesso 1

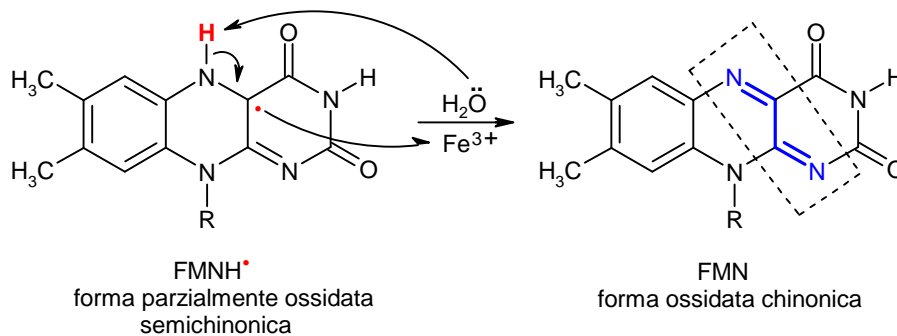
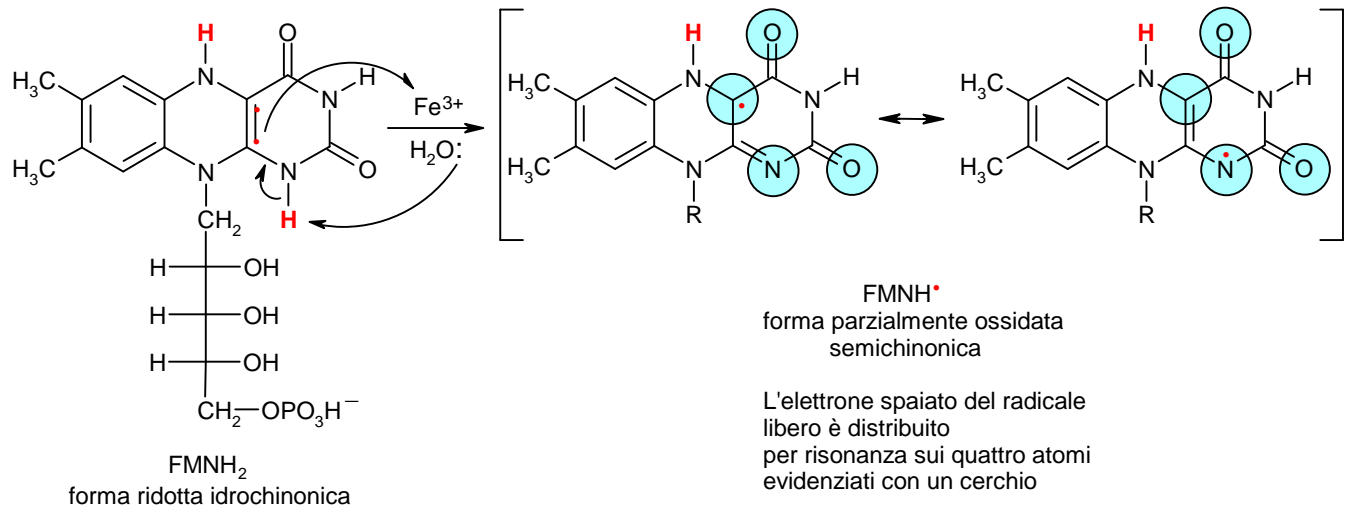
Nel complesso 1 avvengono due processi:

- 1) il trasferimento esoergonico di $2 e^-$ 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, pos.).
- Il complesso 1 umano, chiamato **NADH-CoQ ossidoreduttasi**, è uno dei più grandi complessi proteici di membrana, infatti è composto di 46 catene e contiene due tipi di sistemi redox: una molecola di **FMN**, **flavin mononucleotide**, e sette **centri ferro-zolfo**, cioè atomi di ferro non-eme complessati con atomi di zolfo e trattenuti all'interno di proteine (descritti più avanti). Inoltre il complesso 1 è anche una **pompa protonica**, infatti contiene, in uscita, 4 canali trasportatori di H^+ che si attivano al passaggio del coenzima QH_2 ridotto che si allontana dopo aver preso due elettroni dai gruppi ferro-zolfo.

FMN, flavin mononucleotide

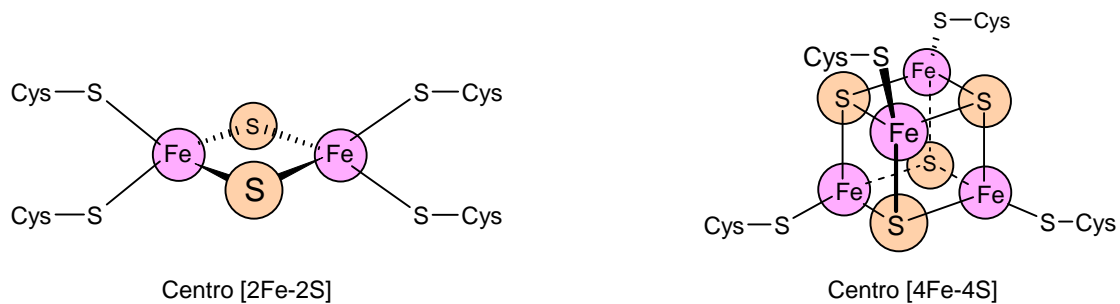
Il FMN è un coenzima simile al FAD, ma privo di AMP adenosina monofosfato. Il precursore del FMN e del FAD è la **riboflavina** o **vitamina B2** che differisce dal FMN solo per la mancanza del gruppo fosfato legato al ribitolo. Come il coenzima Q, mostrato più avanti, anche il FMN può scambiare sia 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.

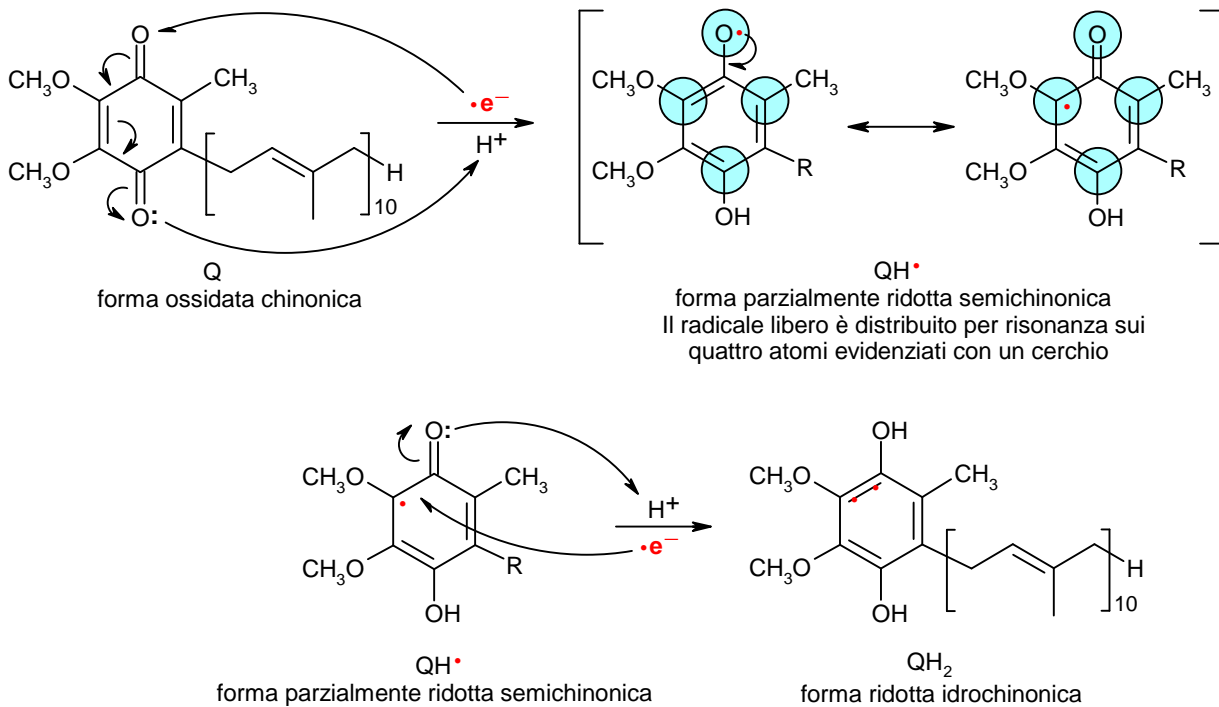


Durante il passaggio degli elettroni nella catena respiratoria, gli atomi di ferro dei centri ferro-zolfo passano ciclicamente dallo stato di ossidazione +3 a +2 e viceversa. Anche se sono presenti più atomi di ferro, i centri ferro-zolfo possono scambiare **un solo elettrone per volta**.

Q, coenzima Q

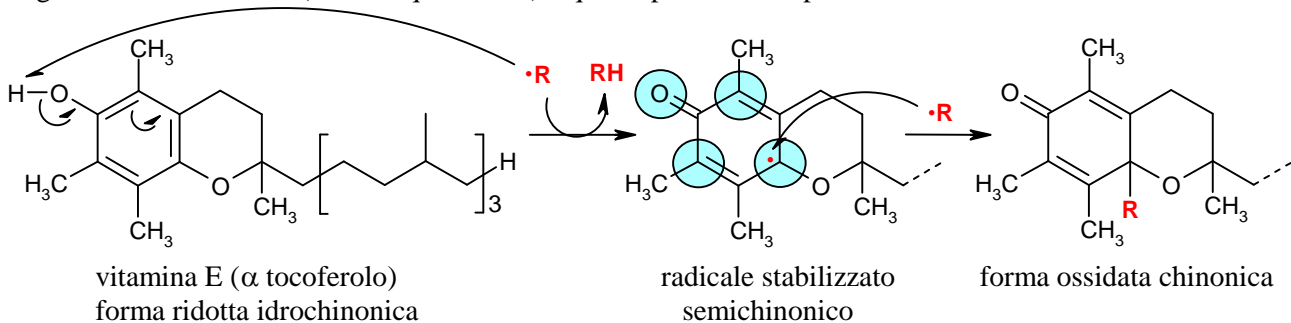
Il coenzima Q è un chinone liposolubile con una lunga catena laterale terpenica costituita, nei mammiferi, da 10 unità isopreniche che contengono 5 atomi di carbonio ciascuna. E' anche conosciuto come **ubichinone** (chinone ubiquitario) perché è presente nella maggior parte dei sistemi biologici. E' 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 e 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 centri ferro-zolfo del complesso 1 e del complesso 2.



Il **coenzima Q** è anche responsabile del funzionamento della **pompa protonica del complesso 1**. Dopo aver preso i due elettroni dall'ultimo dei sette gruppi FeS del complesso 1, il coenzima QH_2 passa attraverso la porzione del complesso immersa nella membrana, formata da **quattro canali proteici trasportatori di H^+** e li attiva uno dopo l'altro in sequenza.

Anche la **vitamina E** (α -tocoferolo) ha una struttura di tipo idrochinonico. E' una molecola con funzione antiossidante che forma radicali molto stabili e ha il compito di preservare dall'ossidazione radicalica le catene insature dei fosfolipidi della membrana cellulare, lo può fare perchè il **radicale semichinonico** della vitamina E è più stabile del **radicale alilico** che si forma durante l'ossidazione degli acidi grassi. Una molecola di vitamina E reagisce con due radicali (indicati qui con $\cdot\text{R}$) e quindi può interrompere due reazioni a catena di ossidazione.



Complesso 2

Il complesso 2 è chiamato **succinato-CoQ reduttasi** perché gli elettroni che giungono al CoQ dal FADH_2 provengono dall'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 FADH_2 . Il FADH_2 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 come acqua ossigenata e ione superossido. Alcune mutazioni genetiche a carico di questo punto del complesso 2 portano ad un eccesso di radicali liberi pericolosi e a una maggior incidenza di tumori.

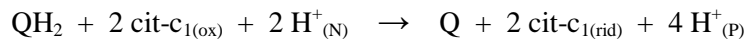
Il complesso 2 **non è una pompa protonica**, cioè non è in grado di trasferire protoni dalla matrice allo spazio intermembrana a causa della troppo piccola energia libera generata dal trasferimento di elettroni dal FADH_2 al CoQ. Gli elettroni immessi dal FADH_2 nel complesso 2 attraversano **solo due pompe protoniche** nei complessi 3 e 4 quindi spostano solo $4 + 2 = 6 \text{ H}^+$ e portano alla formazione di sole 1,5 molecole di ATP.

Anche il FADH_2 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 reduttasi**, è la seconda delle tre pompe protoniche della catena respiratoria. Contiene il **citocromo b** che possiede due gruppi eme, b_{562} e b_{566} (lunghezza d'onda più lunga della luce assorbita), legati ad un'unica catena proteica, un **centro Fe-S** e il **citocromo c_1** .

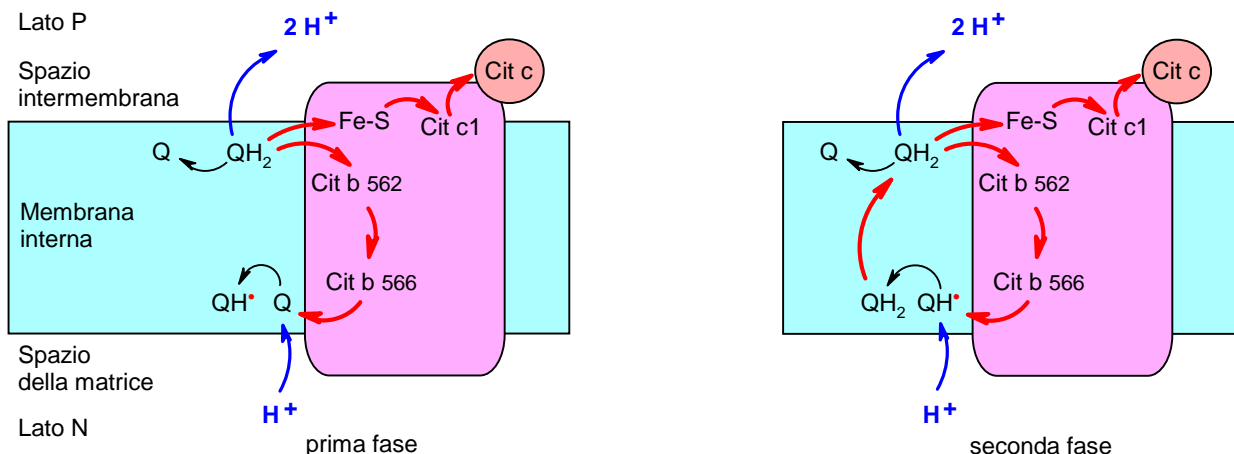
Nel complesso 3 si realizza il trasferimento dal coenzima QH_2 al citocromo c_1 di due elettroni con il contemporaneo prelievo di 2 H^+ dalla matrice (lato N, negativo) e il trasferimento di 4 H^+ nello spazio intermembrana (lato P, positivo) secondo la reazione:



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 QH_2 cede due elettroni, uno va al centro ferro zolfo e da questo prosegue fino al citocromo c_1 . L'altro elettrone viene ceduto da QH_2 al citocromo b nel quale si muove attraverso i due gruppi eme b_{562} e b_{566} fino ad un'altra molecola di Q che viene ridotto alla forma semichinonica QH^\bullet .

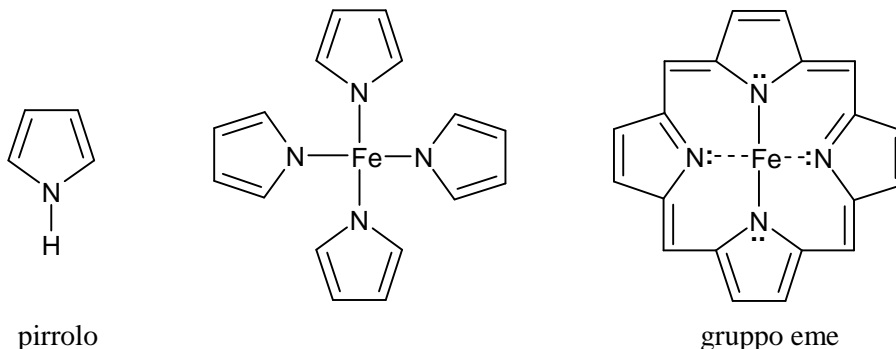
Nella seconda fase una seconda molecola di QH_2 immette altri due elettroni che seguono la stessa strada dei primi due, e giungono da un lato al citocromo c_1 , dall'altro giungono al semichinone QH^\bullet che viene ridotto a QH_2 .



Il ciclo Q permette di capire come funziona la pompa protonica accoppiata al flusso di elettroni nel complesso 3 della catena respiratoria. La molecola di coenzima QH_2 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 c_1 , 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 c_1 vengono ossidate due molecole QH_2 e vengono quindi immessi 4 H^+ nello spazio intermembrana.

Citocromi

I citocromi sono proteine colorate (grazie al ferro) 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.

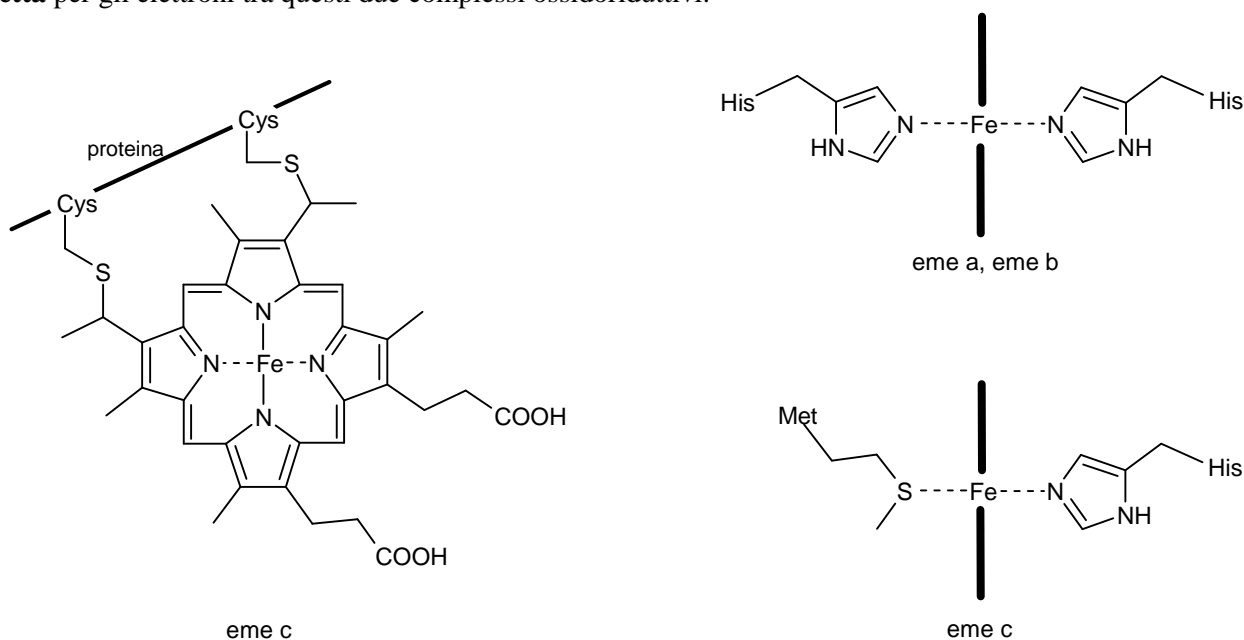


L'anello porfirinico legato a $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ è presente non solo nei **citocromi**, ma anche nelle **cicloossigenasi** (COX), enzimi che ciclizzano e poi ossidano l'acido arachidonico per sintetizzare le prostaglandine, molecole che mediano l'infiammazione e il dolore. L'anello porfirinico legato al Fe^{2+} è presente nell'**emoglobina** e nella **mioglobina**, dove trasporta ossigeno molecolare nel sangue o nei tessuti. Infine l'anello porfirinico legato al Mg^{2+} si trova nella **clorofilla**, il più importante pigmento fotosintetico presente in tutti gli organismi vegetali.

I citocromi presenti nei mitocondri sono classificati in 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 cisteine. Nella figura seguente è mostrato un eme di tipo c legato alla proteina, 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 istidine 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.



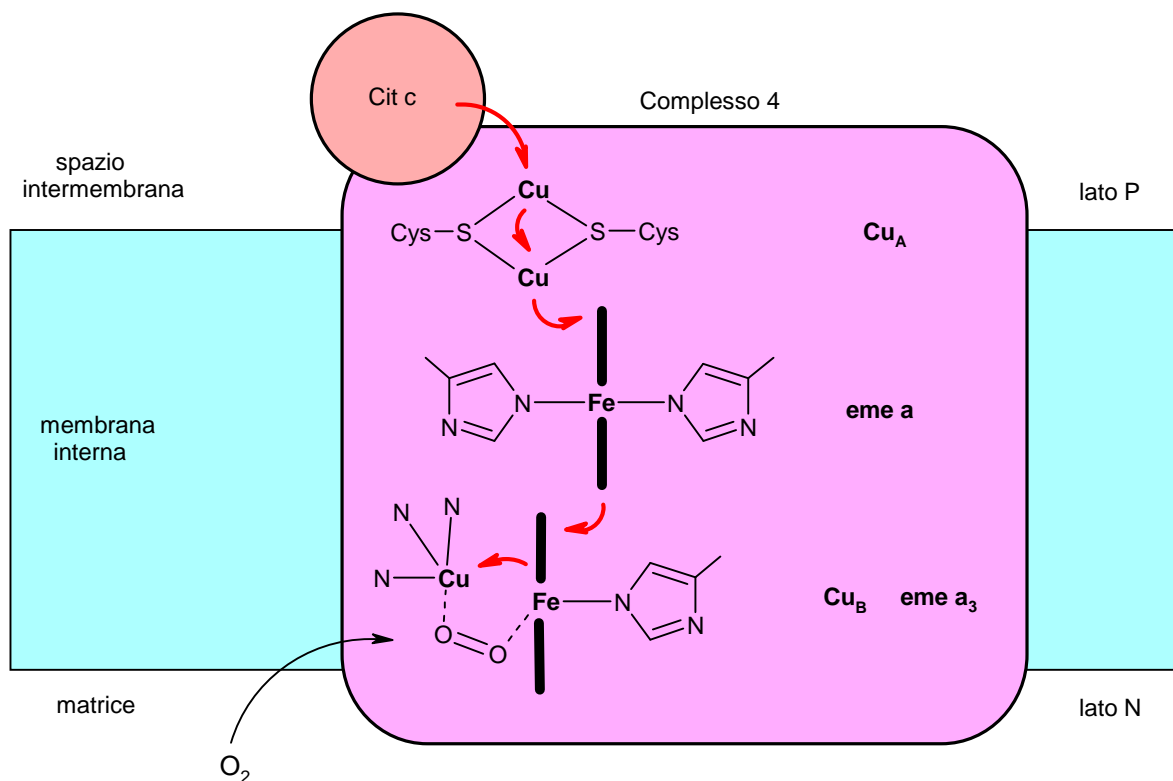
Complesso 4

Il complesso 4, **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 di quattro molecole di citocromo c (nelle quali avviene la reazione $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$) e la successiva riduzione (coi 4 e^- ottenuti) di una molecola di O_2 .

La subunità 2 contiene il centro **Cu_A** formato da due atomi di rame legati agli atomi di zolfo di due cisteine in un complesso simile ai centri ferro-zolfo 2Fe-2S.

La subunità 1 contiene due gruppi eme chiamati **eme a** e **eme a₃** ed un atomo di rame chiamato **Cu_B**. L'eme a₃ e il Cu_B sono associati tra loro e formano un centro binucleare Fe-Cu al quale si lega l'ossigeno O_2 per essere ridotto ad acqua.

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 e infatti fornisce l'energia necessaria per la fosforilazione, ma nasconde alcune insidie dal punto di vista chimico. 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 è 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 i 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 nello 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 **Fe⁴⁺**, 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).

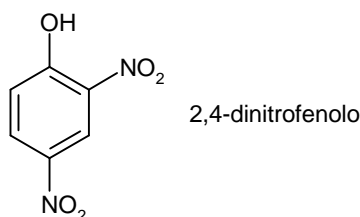
Accoppiamento e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa

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 da parte di ATP sintasi 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 questo inibisce anche il trasporto di elettroni.

Se l'attività dell'ATP sintasi si ferma, gli H⁺ si accumulano nello spazio intermembrana perchè la membrana mitocondriale interna è impermeabile agli H⁺.

In condizioni particolari, però, la fosforilazione ossidativa e la catena respiratoria **possono essere disaccoppiate**. 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. Il grasso bruno è costituito da trigliceridi, come il normale tessuto adiposo bianco, ma contiene una grande quantità di mitocondri i cui citocromi determinano il colore scuro. I mitocondri del grasso bruno producono una **proteina disaccoppiante (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.

Anche alcune molecole aromatiche liposolubili e debolmente acide sono in grado di trasportare protoni attraverso la membrana interna e quindi forniscono un'altra via agli ioni H⁺ per tornare verso gli OH⁻ della matrice. Tra queste la più nota è il **2,4-dinitrofenolo**.



Molecole di questo tipo permettono al mitocondrio di **ossidare NADH senza produrre ATP**. La cellula degrada allora grandi quantità di glucosio e di acidi grassi, e **l'energia liberata** nel processo di ossidazione non produce ATP, ma viene dissipata **sotto forma di calore** nella reazione di formazione di H₂O da H⁺ e OH⁻.

Il 2,4-dinitrofenolo è stato usato in una prodigiosa pillola per dimagrire all'inizio del '900, ma è stato subito messo al bando per la sua pericolosità dopo che un numero rilevante di pazienti erano deceduti. È stato usato anche di recente soprattutto dai culturisti che volevano eliminare ogni traccia di grasso per consentire ai muscoli di apparire più definiti, ma anche se usato sotto controllo medico si è rivelato pericoloso non solo per il grande aumento di temperatura corporea che provoca, ma anche per altri gravi effetti collaterali.

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).

Nella pagina seguente è riportato lo schema complessivo della respirazione cellulare.

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, dato che è 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

