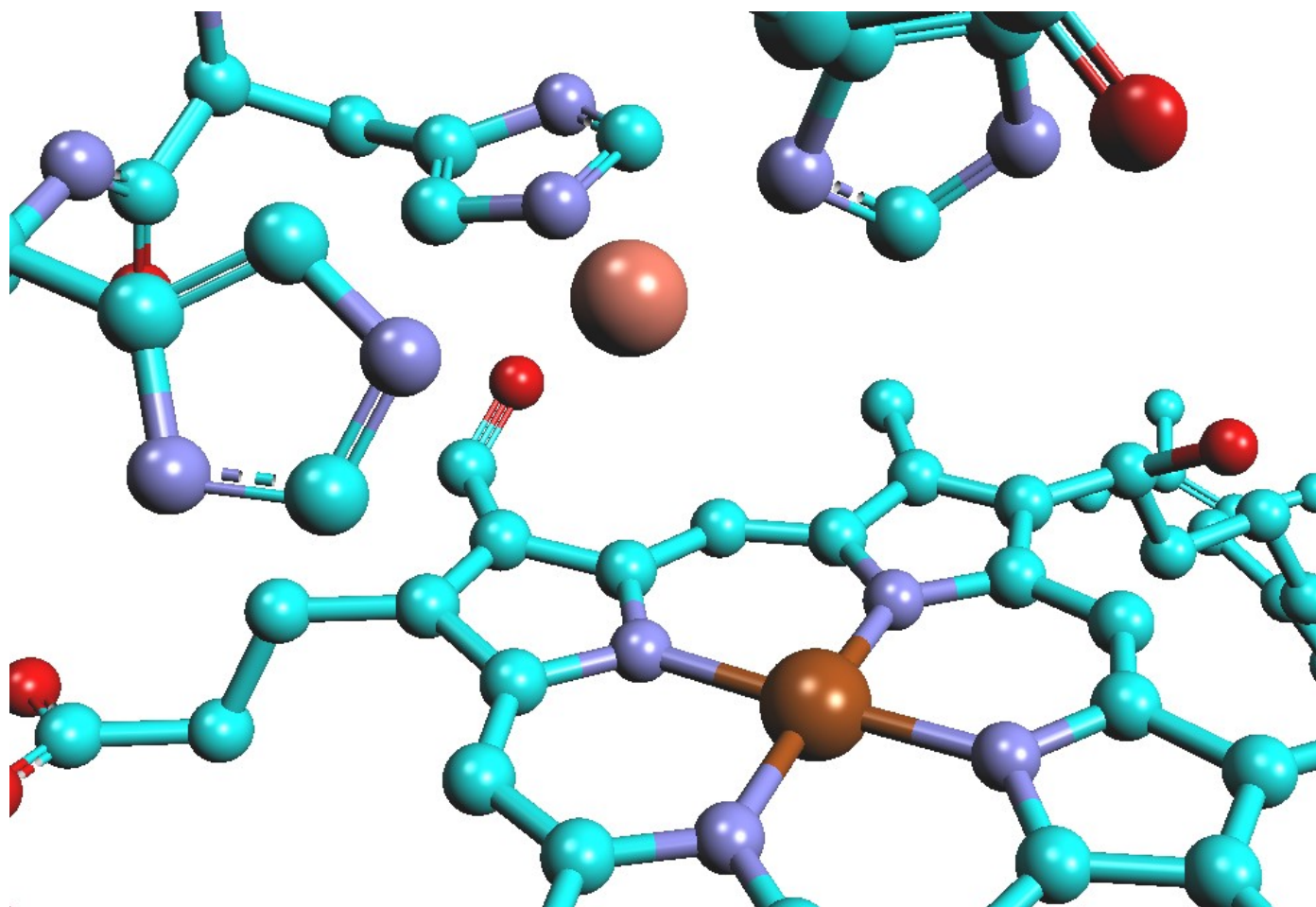


RESPIRAZIONE CELLULARE



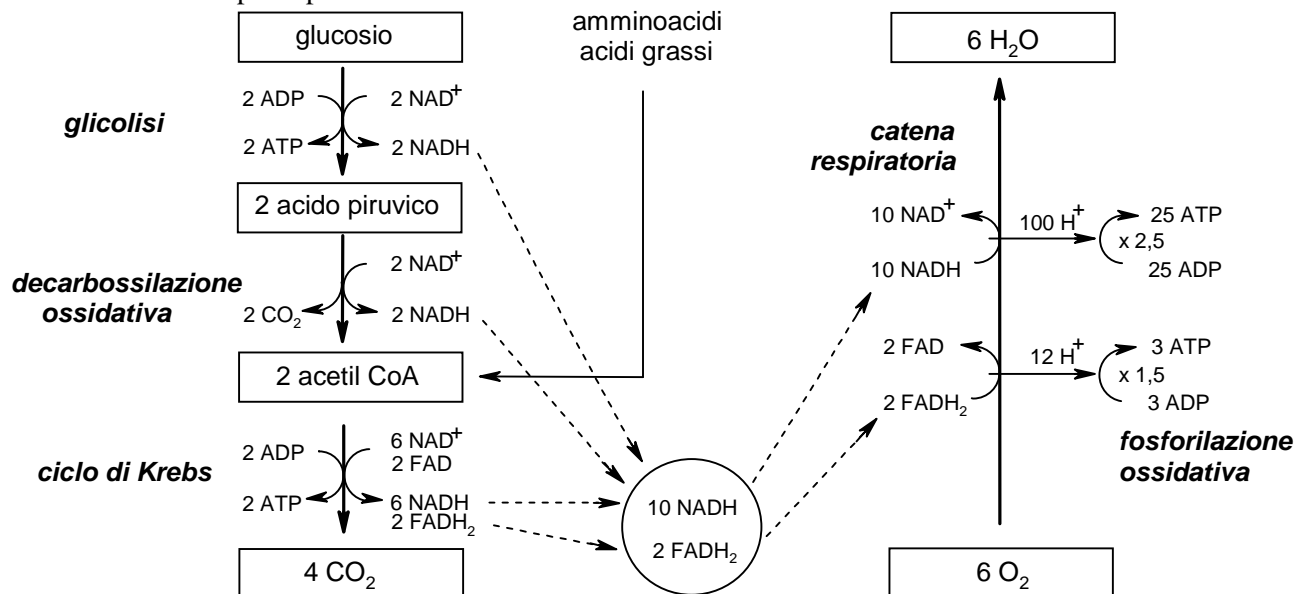
Indice:

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, nicotinamide adenina dinucleotide
FMN, flavin mononucleotide
Fe-S, centri ferro-zolfo
Q, coenzima Q
Complesso 2
Complesso 3
Citocromi
Complesso 4
Fosforilazione ossidativa
Accoppiamento della fosforilazione ossidativa
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 . La respirazione cellulare può essere schematizzata come in figura ed avviene in tre stadi principali.

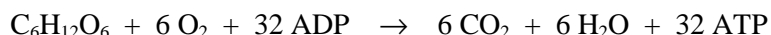


1) Nel primo stadio le molecole organiche combustibili (glucosio, acidi grassi, alcuni aminoacidi) vengono trasformate in **acetil-CoA** (acetil-coenzima A), un tioestere dell'acido acetico. La degradazione del glucosio fino ad acetil-CoA avviene attraverso la **glicolisi** e la **decarbossilazione ossidativa**. La glicolisi è costituita da 10 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 vengono ossidati ad **acido piruvico**. L'acido piruvico, poi, entra nei mitocondri, organelli specializzati a gestire le reazioni in presenza di ossigeno, dove subisce la reazione di decarbossilazione ossidativa e forma **acetil-CoA**.

2) Nel secondo stadio l'**acetil-CoA** viene ossidato a CO_2 attraverso il **ciclo di Krebs**, una serie di otto reazioni enzimatiche che avvengono nei mitocondri e che liberano equivalenti riducenti sotto forma di ioni idruro legati ai coenzimi ridotti **NADH e FADH₂**.

3) Nel terzo stadio, l'**ossigeno O₂**, l'**ossidante finale** della respirazione cellulare, ossida i coenzimi ridotti che si sono formati nei primi due stadi, 10 NADH e 2 FADH₂. Si generano così 10 NAD⁺ e 2 FAD che possono continuare le reazioni di ossidazione nella glicolisi, nella decarbossilazione ossidativa e nel ciclo di Krebs. NADH e FADH₂ non reagiscono direttamente con O₂, ma cedono i loro elettroni ad una catena di molecole trasportatrici di elettroni organizzate in quattro complessi proteici, la **catena respiratoria**, che li portano all'ossigeno molecolare O₂ che si riduce ad H₂O. Questo flusso di elettroni mette in funzione tre pompe protoniche, nei complessi 1, 3, 4, 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 che produce **ATP** (da ADP) in un processo chiamato **fosforilazione ossidativa**. E' proprio la produzione di ATP lo scopo fondamentale della respirazione cellulare.

La **reazione complessiva** che è avvenuta è la completa ossidazione del glucosio ad opera di O₂ per formare CO₂, H₂O ed energia come in una normale combustione. 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.



Dato che l'idrolisi di ATP ha $\Delta G^\circ = -7,3 \text{ kcal/mol}$, producendo 32 ATP abbiamo ottenuto:

$\Delta G^\circ = -7,3 \cdot 32 = -234 \text{ kcal/mol}$. Confrontando questo valore con quello della reazione di combustione del glucosio ($\Delta G^\circ = -686 \text{ kcal/mol}$), 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.

Primo stadio della respirazione cellulare

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 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 priva 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** enzimatiche anaerobiche che avvengono nel citoplasma e **degradano il glucosio a due molecole di acido piruvico** producendo anche **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 producendo **due aldeidi più piccole** dalla cui ossidazione, nella seconda fase, si possano ricavare **due ATP**.

E' indispensabile, però, che le **due aldeidi** siano **identiche** se vogliamo che sia unica la via metabolica della seconda fase della glicolisi, quindi devono essere di **3 atomi di carbonio ciascuna**. Dato però che la reazione che rompe la catena è una **condensazione aldolica inversa**, spezzando il glucosio, si otterrebbero due frammenti di 2 e 4 atomi di carbonio rispettivamente, Prima di spezzare la catena, quindi, è indispensabile **convertire il glucosio in fruttosio** che, avendo il carbonile sul C-2, può essere tagliato in due frammenti di 3 atomi di carbonio ciascuno.

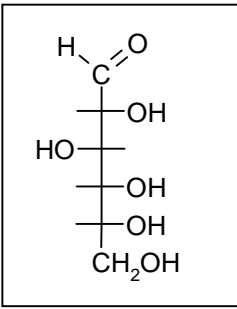
Inoltre, per rendere massima l'efficienza della glicolisi, **ogni frammento deve essere fosforilato** perché così è più facilmente riconoscibile dagli enzimi ed inoltre non può sfuggire dalla cellula. Le molecole fosforilate, infatti, non possono attraversare la membrana cellulare costituita da un doppio strato di fosfolipidi. Questa doppia fosforilazione, però, comporta il consumo di due molecole di ATP e obbliga, nella seconda fase della glicolisi, non solo a ricavare due ATP dall'ossidazione di un'aldeide ad acido, ma anche a recuperare i due ATP spesi nella prima parte.

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

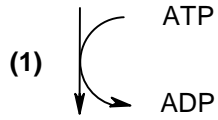
- glucosio →
- (1) glucosio-6-fosfato
 - (2) fruttosio-6-fosfato
 - (3) fruttosio-1,6-difosfato
 - (4) gliceraldeide-3-fosfato + diidrossiacetone-fosfato
 - (5) 2 molecole di gliceraldeide-3-fosfato

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, entrambi fosforilati: **gliceraldeide-3-fosfato** e **diidrossiacetone-fosfato** (4). Queste due molecole sono isomeri di struttura e vengono interconvertiti uno nell'altro nella reazione n° 5. All'equilibrio è presente solo 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.

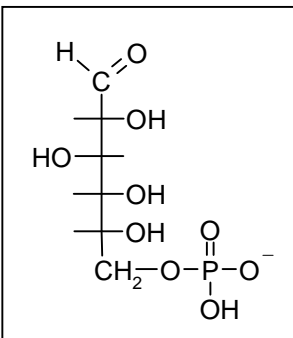
Prima fase della glicolisi



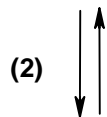
D-glucosio



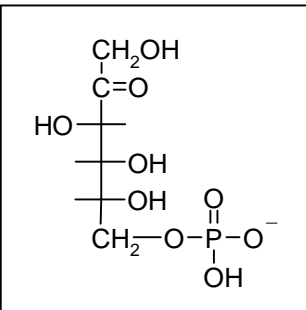
chinasi



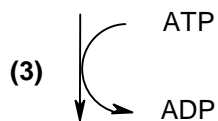
D-glucosio-6-fosfato



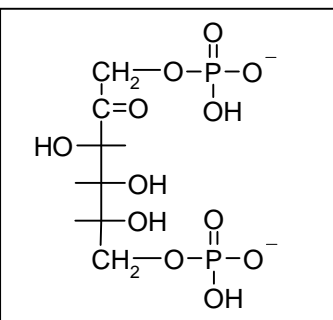
isomerasi



D-fruttosio-6-fosfato



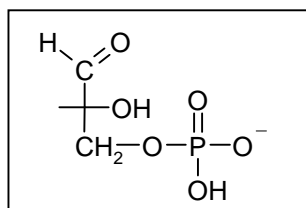
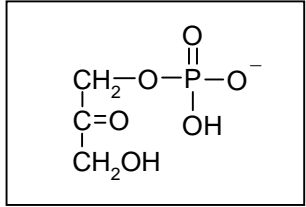
chinasi



D-fruttosio-1,6-difosfato

aldolasi (4)

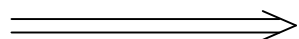
diidrossiacetone-fosfato



D-gliceraldeide-3-fosfato

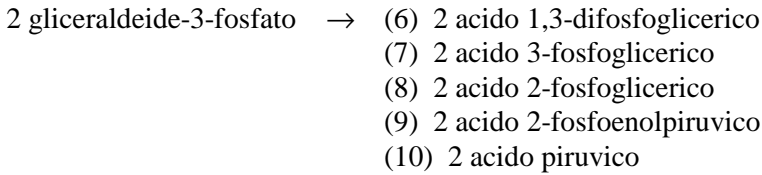
isomerasi (5)

alla seconda fase



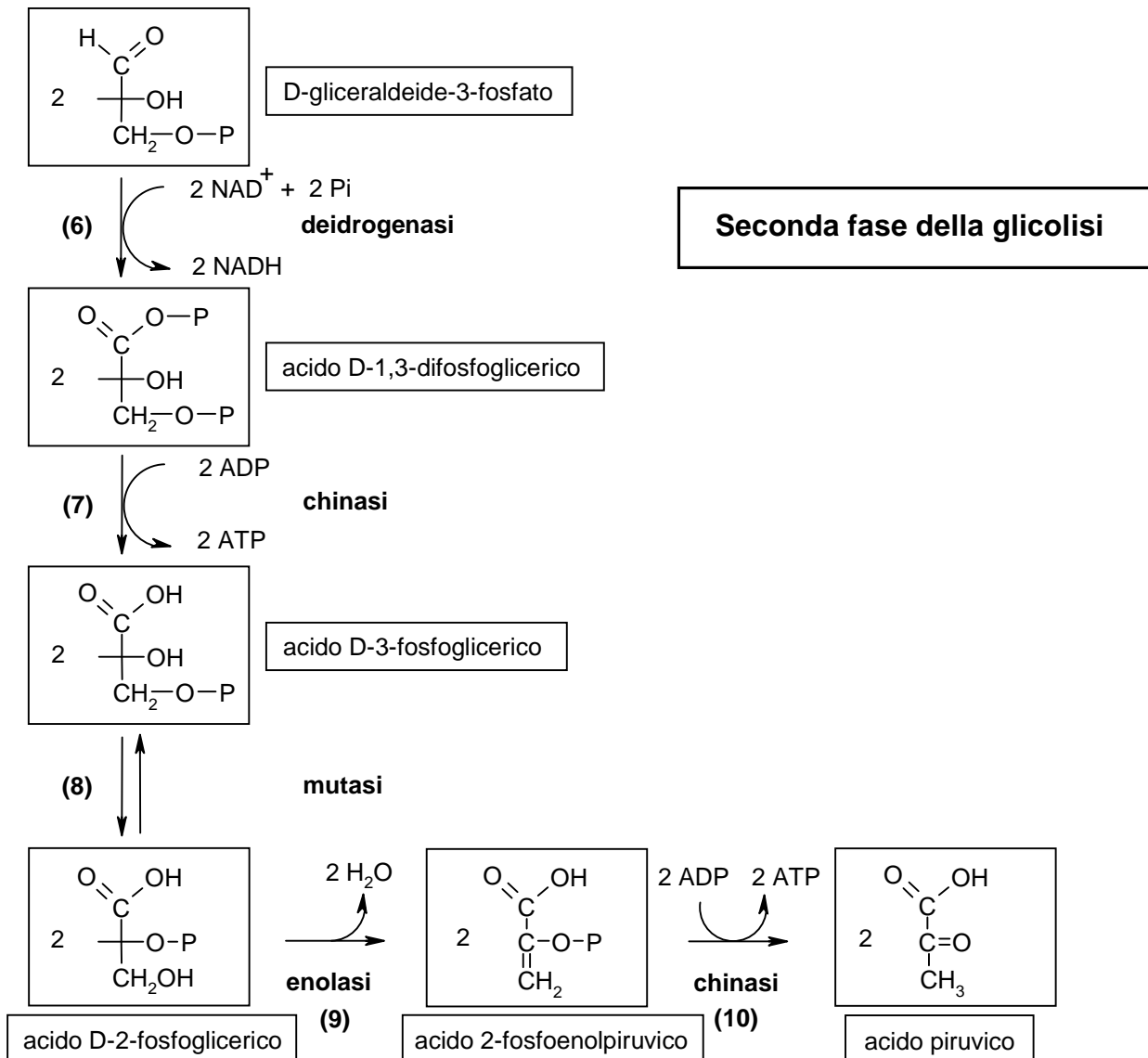
La seconda fase della glicolisi

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 . . .**):



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 le reazioni 6 e 7. Se la glicolisi usasse il NAD^+ per ossidare la gliceraldeide-3-fosfato si otterrebbe il corrispondente acido glicerico-3-fosfato e l'eccesso di energia sarebbe sprecato come calore. Per trasformare questo eccesso di energia in energia chimica, la glicolisi usa un metodo ingegnoso. Lega l'aldeide ad un gruppo SH dell'enzima formando un tiosemiacetale. Ora serve tutta la capacità ossidante del NAD^+ per ossidare il tiosemiacetale a tioestere, perchè questo è molto reattivo, infatti, reagendo con un fosfato inorganico, produce un'anidride: l'**acido 1,3-difosfoglicerico** (6). Anche questo è reattivo e trasferisce il fosfato all'ADP per formare ATP e **acido 3-fosfoglicerico** (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 -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** non ha però l'OH libero in posizione β , ma lo può facilmente liberare spostando il fosfato dalla posizione β a quella α , cioè dal C-3 al C-2, formando l'**acido 2-fosfoglicerico (8)**. Questo è un β -idrossiacido e si può disidratare formando l'**acido 2-fosfoenolpiruvico (9)**, una molecola ancora instabile perchè è un enolo. La tautomeria cheto-enolica a cui andrà incontro la molecola dà la spinta per la produzione di ATP e forma **acido piruvico (10)**.

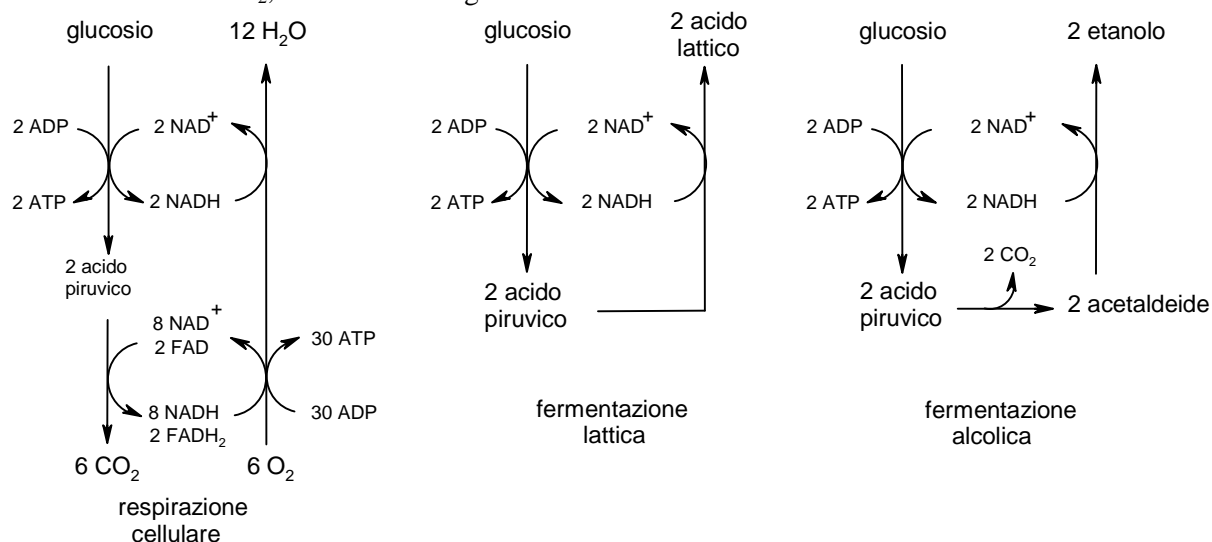
Oltre al bilancio di ATP è importante considerare il **bilancio di NADH**. L'ossidazione compiuta nella tappa (6) comporta il consumo di 2 NAD^+ che vengono ridotti a 2 NADH . Questo ha come conseguenza che la glicolisi ha bisogno di un costante apporto di NAD^+ che però è presente in minima quantità 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'acidimento 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.

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 grazie all'intervento di O_2 , e della sua energica azione ossidante.



Si parla di **respirazione** se la molecola che fa da ossidante finale 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^- che si riduce a S^{2-} , H^+ che si riduce a H_2 . Si parla invece di **fermentazione** se la molecola che fa da ossidante finale è una **molecola organica** come l'acido piruvico che si riduce ad acido lattico nella fermentazione lattica, l'acetaldeide che si riduce ad etanolo nella fermentazione alcolica, la CO_2 che si riduce a CH_4 nella fermentazione delle biomasse.

Reazioni enzimatiche

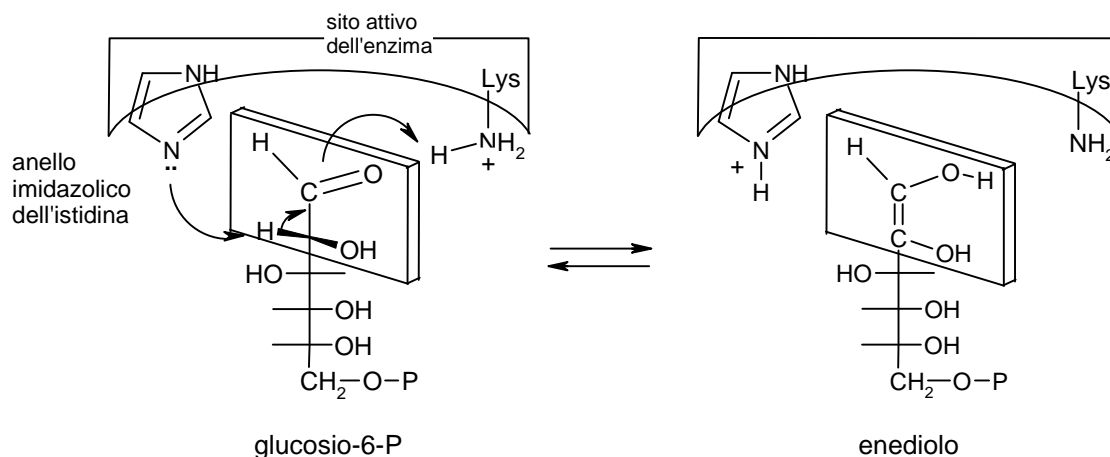
Le dieci reazioni della glicolisi, costituiscono per il chimico un'occasione ideale per comprendere che le reazioni enzimatiche non sono da accettare "a scatola chiusa", ma sono delle normali reazioni di chimica organica che vengono realizzate in modo estremamente sofisticato all'interno del sito attivo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

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

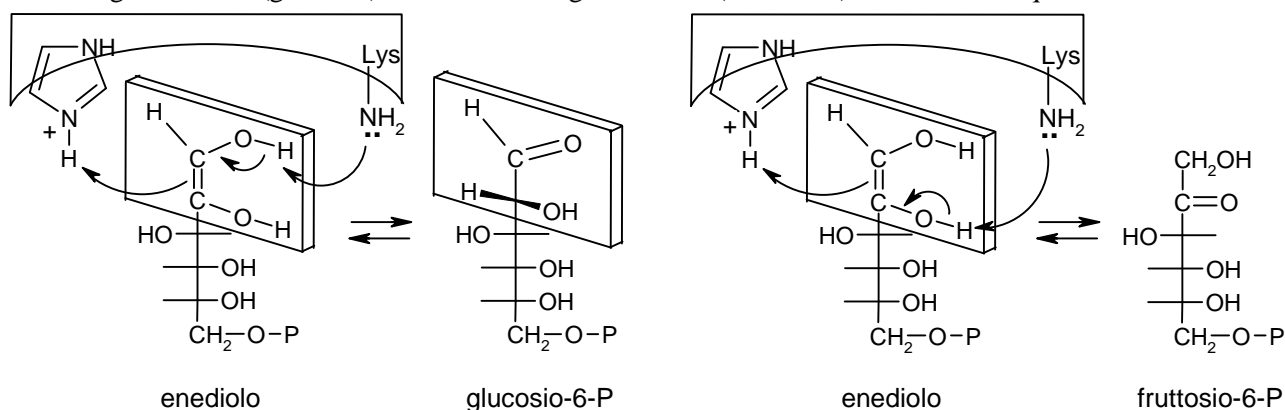
Se la reazione avviene **in soluzione**, richiede condizioni più drastiche di pH e temperatura ed è affidata alla casualità degli urti tra le molecole. Una reazione **enzimatica**, invece, non è lasciata al caso, ma avviene all'interno di una perfetta macchina chimica, il sito attivo dell'enzima. Qui il substrato è 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, in una reazione 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:



Nell'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: se la lisina strappa l' H^+ sull'OH del C-1, l'enzima permette l'**ingresso dell' H^+ sul C-2 solo da sopra** il piano molecolare, dove è presente l'azoto protonato dell'anello imidazolico dell'istidina e così si può formare **solo glucosio**. Quando, invece, la reazione avviene in soluzione, l' 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 una configurazione R (glucosio) e mai una configurazione S (mannosio), come si vede qui sotto a sinistra.



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

Meccanismo della reazione 4

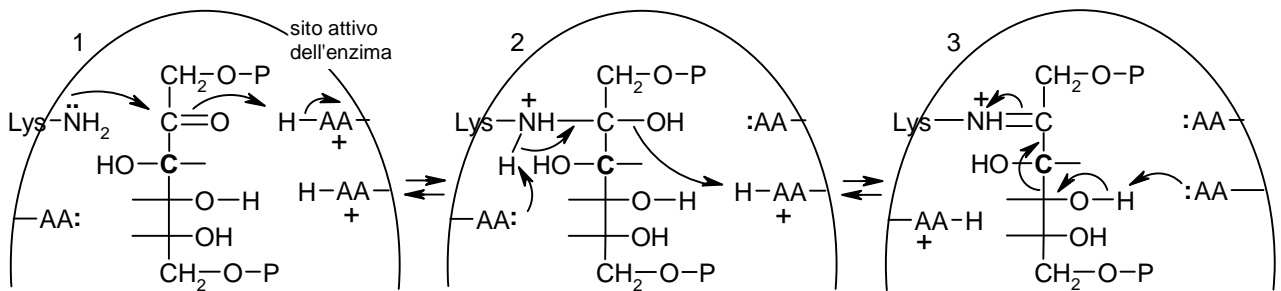
L'enzima della reazione 4 è un'aldolasi e catalizza un'**addizione aldolica inversa** per spezzare il fruttosio-1,6-di-P in due frammenti di 3 atomi di carbonio, diidrossiacetone-P e gliceraldeide-3-P. L'addizione aldolica è una reazione che permette di fondere tra loro due aldeidi ottenendo una β -idrossialdeide, ma, essendo reversibile, consente anche di spezzare una β -idrossialdeide o un β -idrossichetone in due frammenti.

Nel fruttosio, si 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 C- α è il C-3, in neretto nella figura, e può staccarsi dal C-4 se questo forma un nuovo carbonile (fig.3 qui sotto). 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 nel C-2 formando l'intermedio **enediolo** (fig.4). La molecola, quindi, si taglia tra C-3 e C-4.

Il fruttosio, quando entra nel sito attivo dell'enzima (fig.1), 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) meglio dell'ossigeno, infatti l'azoto è più stabile nella forma enolica, 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).

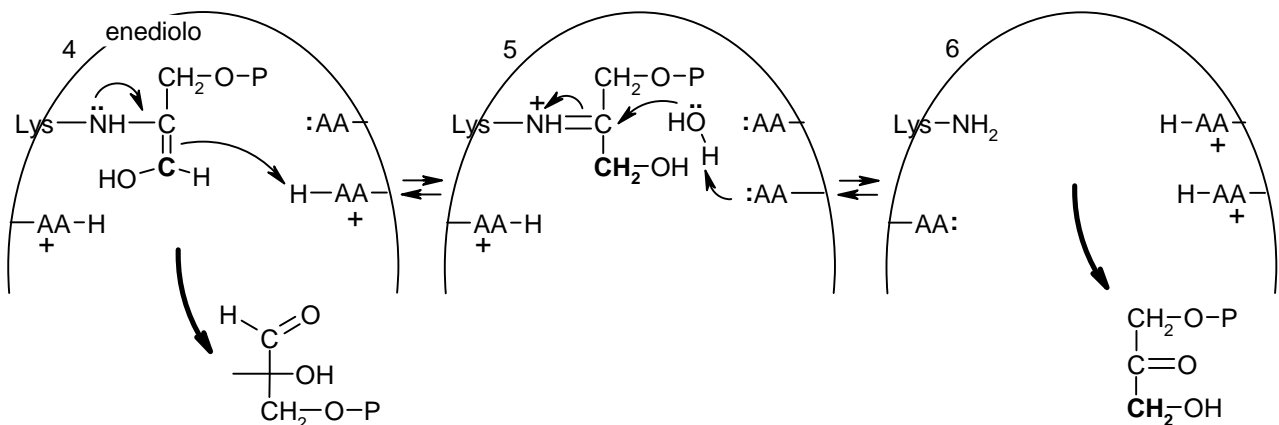
La reazione è reversibile e viene usata sia per rompere il fruttosio in due nella glicolisi, sia per sintetizzare fruttosio nella gluconeogenesi, la configurazione RS sul C-3 e sul C-4 dei due carboni che perdono reversibilmente l'attività ottica durante la reazione deve quindi essere preservata dall'enzima.

Si noti **che vi è contemporaneamente catalisi basica da un lato 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 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 l'addizione aldolica inversa



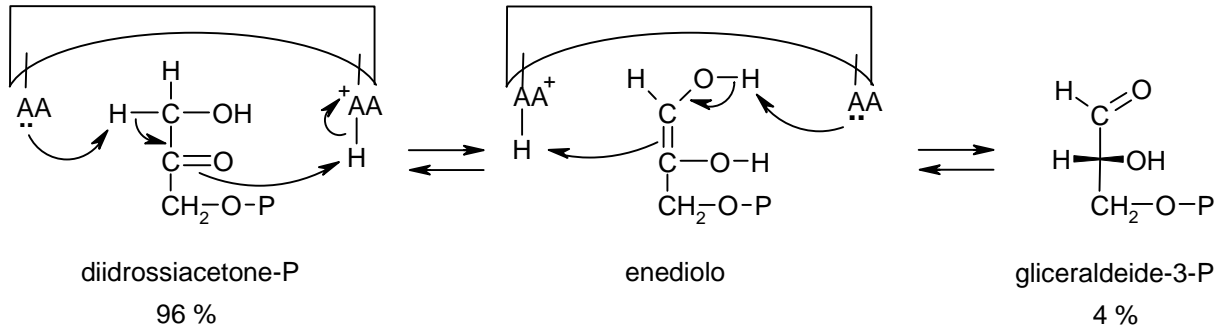
Dopo la rottura del legame C3-C4 la gliceraldeide-3-P lascia l'enzima

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

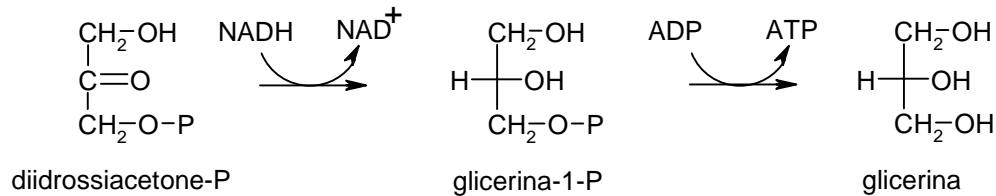
Meccanismo della reazione 5

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.



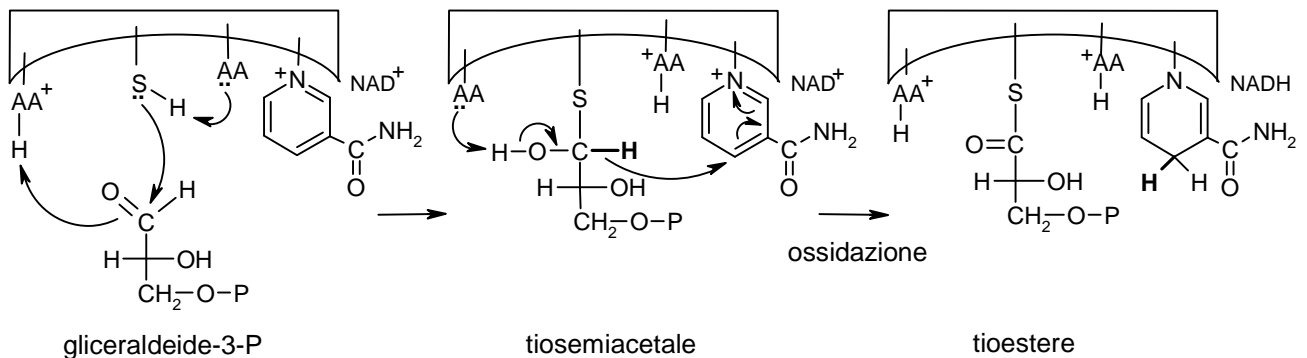
In realtà una piccola percentuale di diidrossiacetone-P sfugge alla glicolisi grazie ad una deidrogenasi che lo riduce a glicerina-1-fosfato, molecola necessaria per la sintesi dei fosfolipidi e dei trigliceridi.



Meccanismo della reazione 6

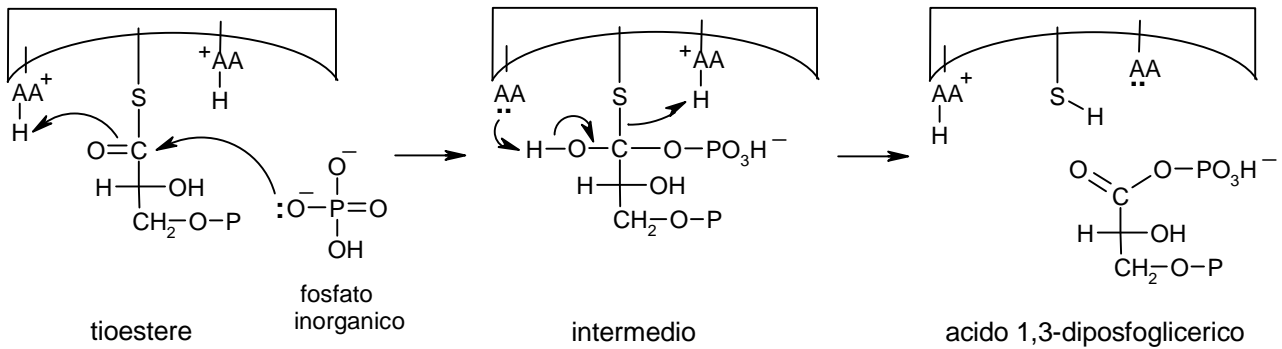
In questa reazione la gliceraldeide-3-P viene ossidata ad acido 1,3-di-P-glicerico per mezzo di un enzima deidrogenasi. La tappa 6 è importante per due motivi:

- 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.



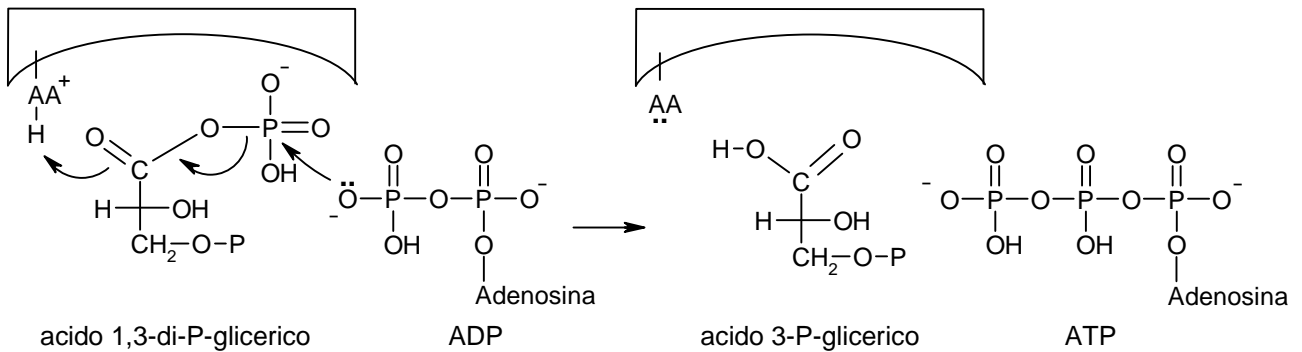
Il meccanismo con cui procede la reazione è complesso. La gliceraldeide-3-P si lega covalentemente al **gruppo tiolico SH di una cisteina** nel sito attivo dell'enzima. Si forma così un tio-semiacetale che è più difficile da ossidare di un'aldeide e quindi **serve tutta la capacità ossidante del NAD^+ 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 **tiostere** formato è **una molecola molto reattiva** in quanto il legame tiostereo è ad alta energia e può facilmente reagire con una molecola di fosfato inorganico per formare acido 1,3-di-P-glicerico, un'anidride mista carbossilica-fosforica nella quale viene conservata l'energia di ossidazione della gliceraldeide-3-P.



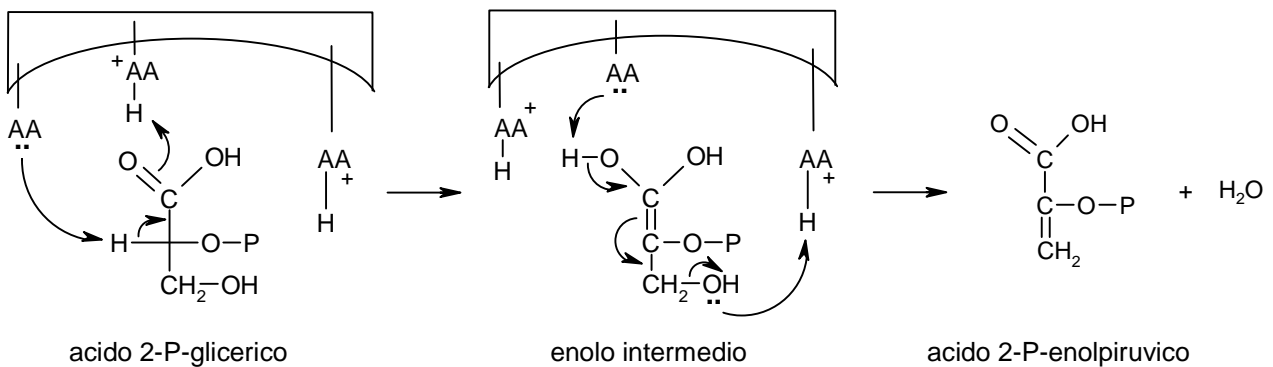
Meccanismo della reazione 7

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**.



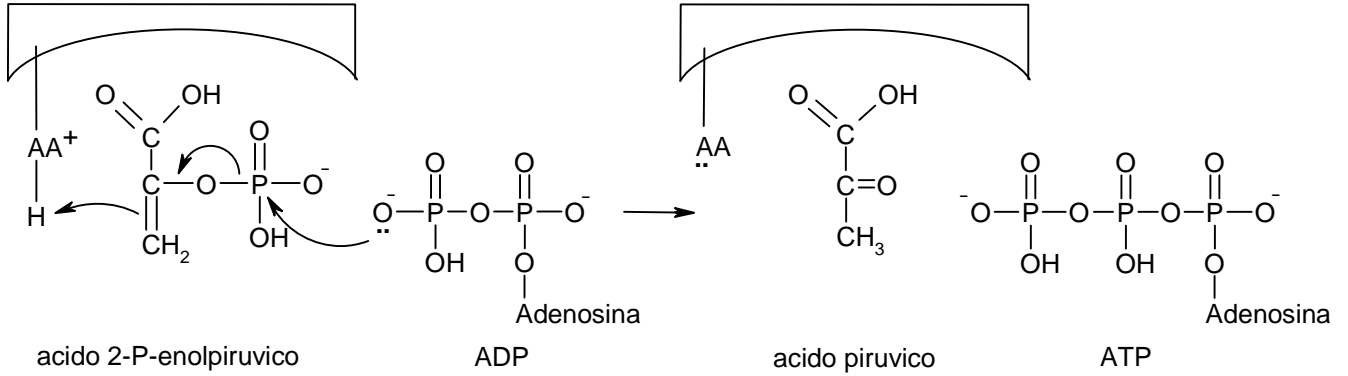
Meccanismo della reazione 9

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 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.



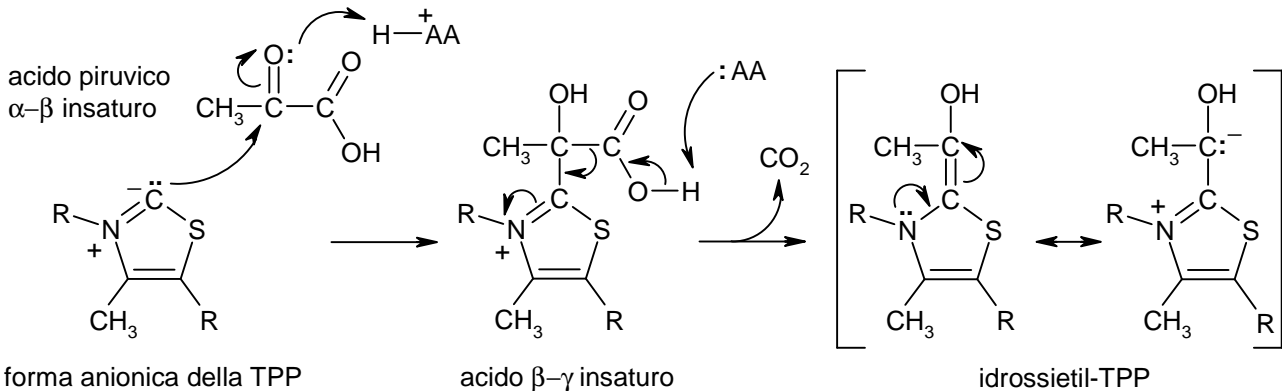
Meccanismo della reazione 10

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.

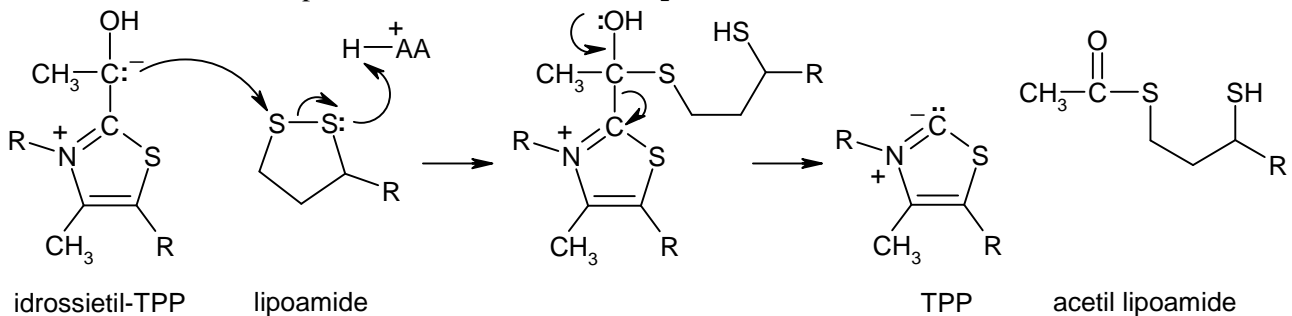


Il punto reattivo della vitamina B1 è l'anello tiazolico aromatico a cinque atomi. A causa della carica positiva sull'azoto, l'atomo di carbonio compreso tra azoto e zolfo è leggermente acido e può perdere l' H^+ . La forma anionica della TPP è nucleofila e può reagire attaccando il carbonile sul C-2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

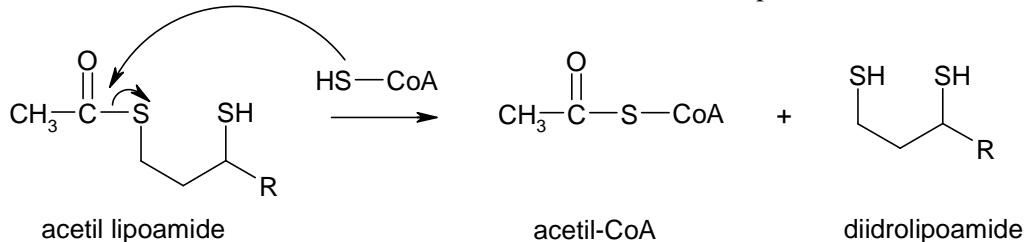
Il nuovo acido che si ottiene è ancora insaturo, ma ha il doppio legame spostato più indietro di un posto, è diventato quindi **β - γ insaturo** (due legami singoli tra carbossile e doppio legame). Questa è la **situazione ideale per la decarbossilazione** che permette agli elettroni, lasciati sulla molecola dalla CO_2 che si stacca, di essere stabilizzati 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 ha queste caratteristiche, ma naturalmente è troppo tossico.



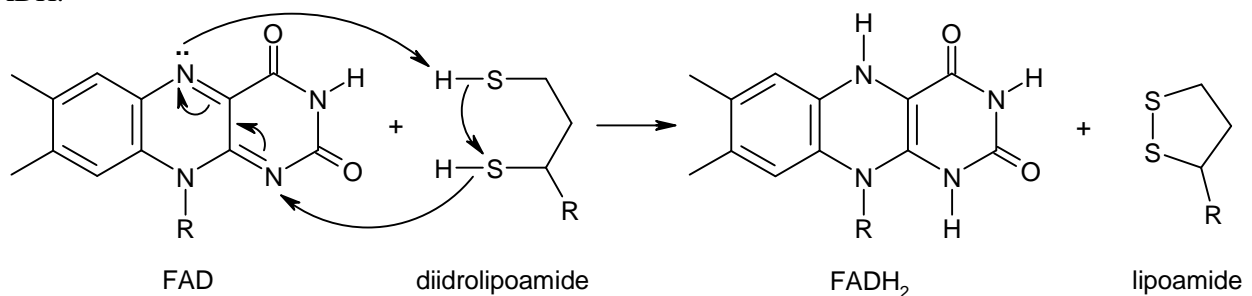
Si è formata **idrossietil-TPP** che è descritta dalle due forme limite di risonanza mostrate qui sopra a destra. Questa molecola deve essere ossidata per produrre **acido acetico**, ma non si può usare NAD^+ o FAD perchè non ci sono atomi di H sul carbonio che deve essere ossidato. L'enzima piruvato deidrogenasi utilizza quindi un altro sistema redox, il ponte disolfuro $-S-S-$ della **lipoamide** che viene ridotto alla forma tiolica SH.



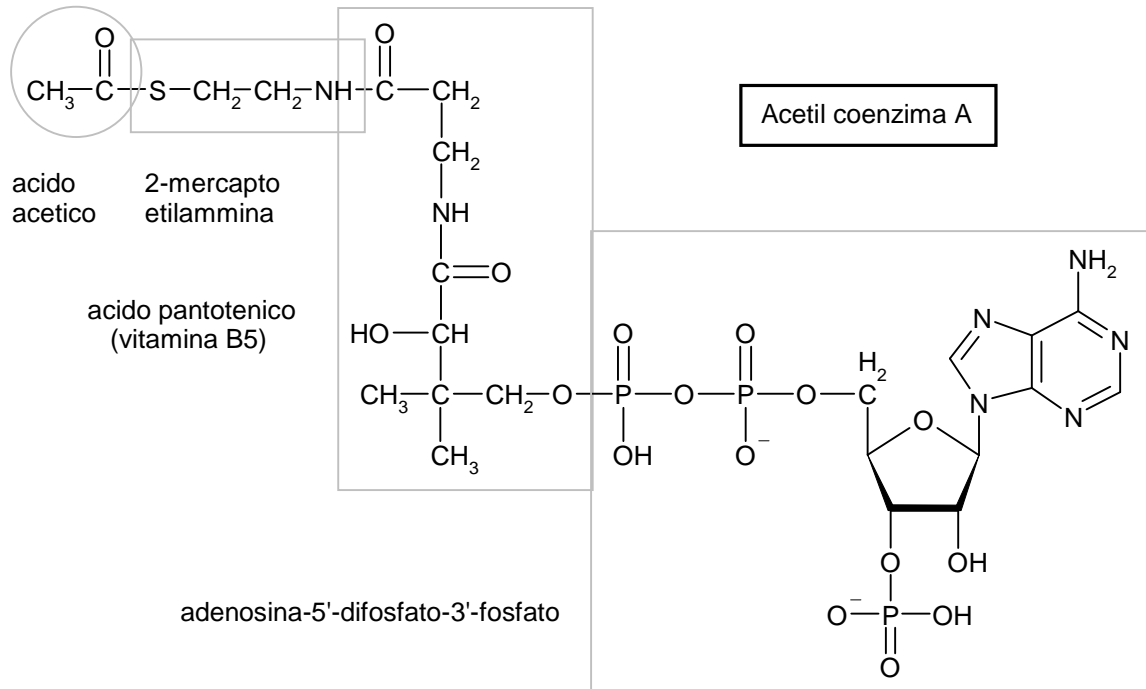
Il tioestere intermedio **acetil-lipoamide** subisce una reazione di transesterificazione reagendo col tiolo del **coenzima A** (CoA-SH). Si forma il tioestere **acetil-CoA** e il ditio diidrolipoamide.



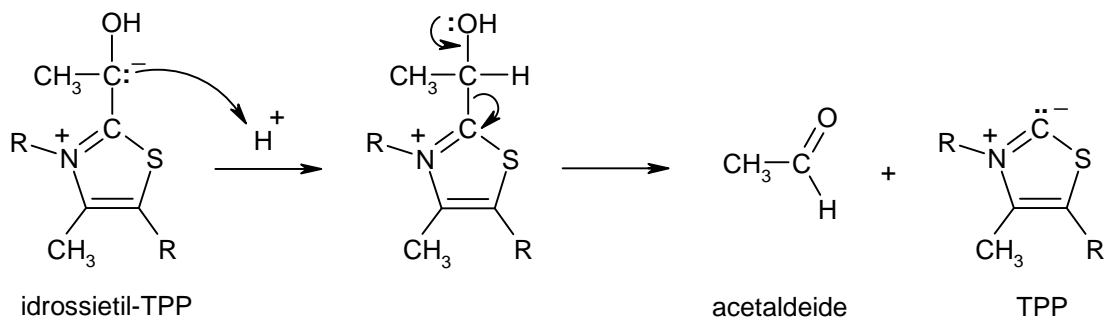
A differenza della idrossietil-TPP, la diidrolipoamide possiede, sui gruppi SH, gli atomi di idrogeno necessari per ridurre il FAD . Il $FADH_2$ così prodotto viene subito dopo riossidato dal NAD^+ che si riduce a $NADH$.



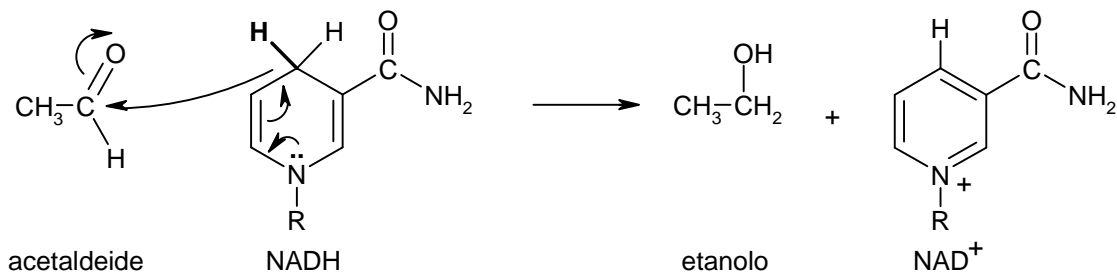
La struttura dell'**acetil-coenzima A** è illustrata qui sotto. Nel Co-A ci sono tre componenti legati tra loro in modo covalente: 2-mercaptoetilammina, acido pantotenico (vitamina B5), adenosina-3'-fosfato-5'- difosfato. Il legame tioestereo tra l'acido acetico e il coenzima A è ad alta energia dato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

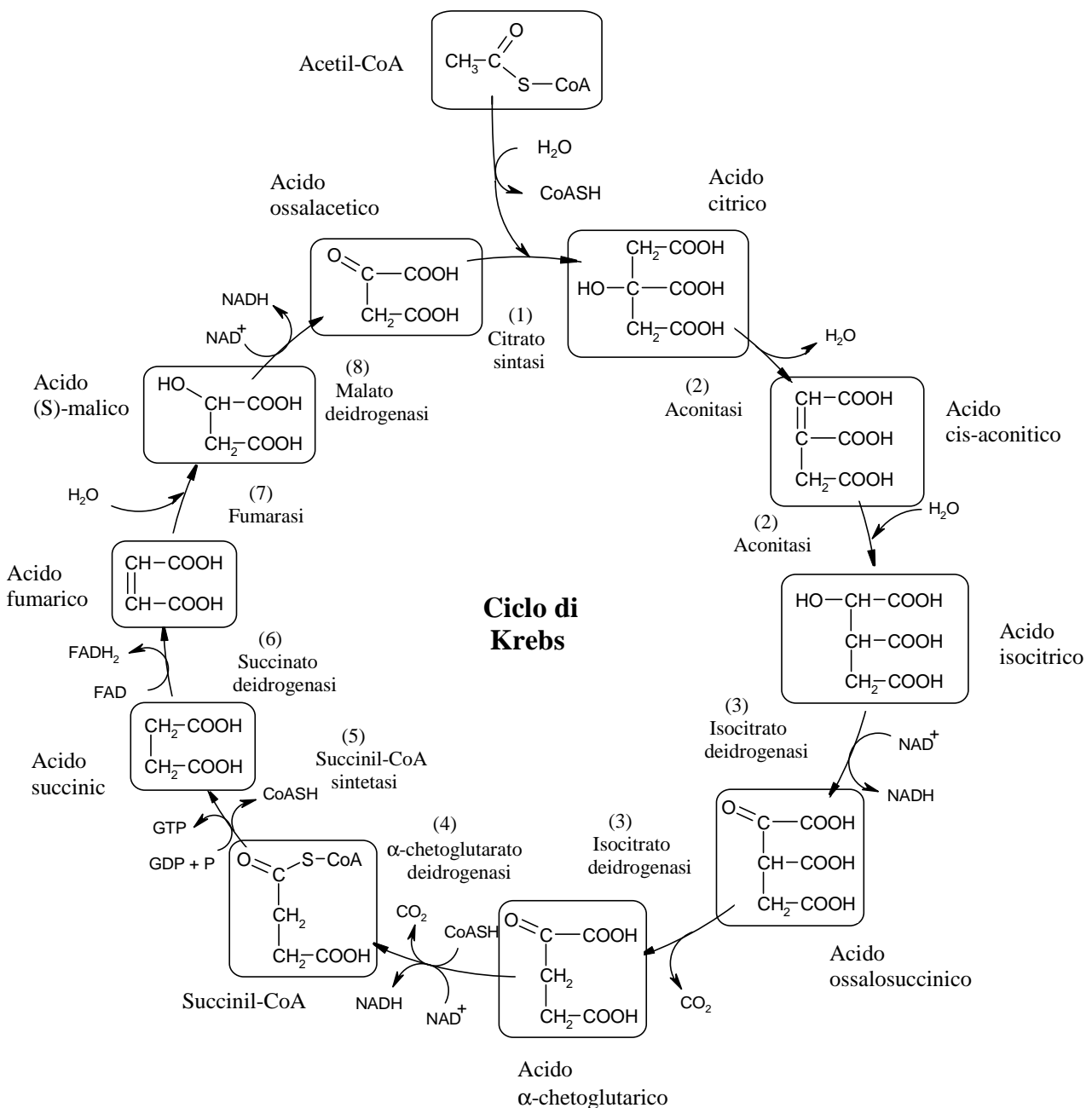


Secondo stadio della respirazione cellulare

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 CO_2 in modo però da conservare l'energia libera per la produzione di ATP.

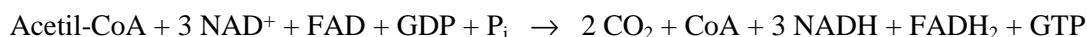
Il problema chimico affrontato dal ciclo di Krebs è la **decarbossilazione dell'acido acetico**, che risulta ancora più complessa di quella dell'acido piruvico. Il problema è stato risolto in modo elegante unendo l'acido acetico ad una molecola ausiliaria, l'acido ossalacetico, in modo da ottenere, dopo alcuni passaggi, l'acido ossalosuccinico un β -chetoacido che può decarbossilare facilmente perchè possiede un doppio legame in posizione β - γ . La molecola che si ottiene è l'acido α -chetoglutarico, un α -chetoacido, che può decarbossilare facilmente con l'intervento della tiaminapirofosfato, la vitamina B1, ed un enzima quasi identico a quello della decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico.



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. Se l'acido citrico avesse un carbonile in posizione β potrebbe decarbossilare. Però non è possibile ossidare il suo gruppo OH a carbonile perché è terziario. Nelle prossime tappe del ciclo è necessario quindi spostare l'OH 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 ossidrilico 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'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 ossidrilico dell'acido isocitrico formando l'acido ossalosuccinico, un β -chetoadido (β - γ insaturo) 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 una decarbossilazione ossidativa dell'acido α -chetoglutarico (che è un α -chetoadido 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 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 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 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.

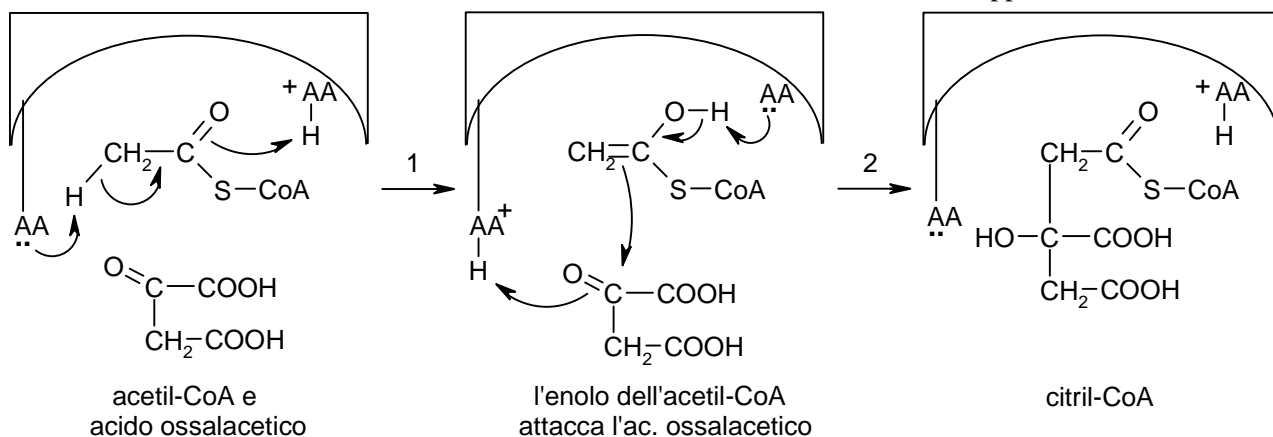
La reazione globale riferita ad una molecola di acetil-CoA è la seguente:

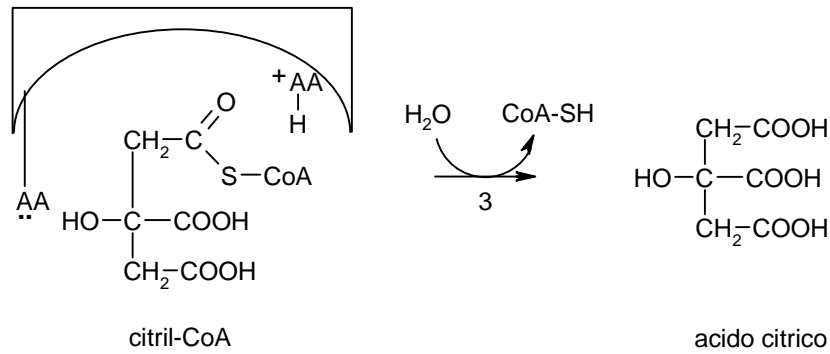


Per brevità esamineremo in dettaglio il meccanismo di due sole reazioni enzimatiche, quello della citrato sintasi, la tappa n° 1, e quello della isocitrato deidrogenasi, la tappa n° 3.

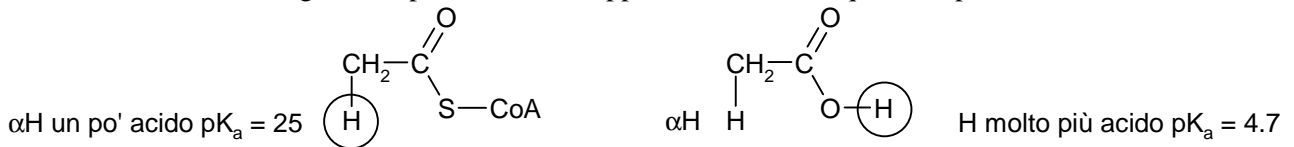
Tappa n° 1: citrato sintasi

La reazione catalizzata dall'enzima citrato sintasi è una condensazione di Claisen mista tra un estere, l'acetil-CoA e 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 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'enolo. Se l'acido acetico avesse il carbossile libero, qui avrebbe avuto 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.

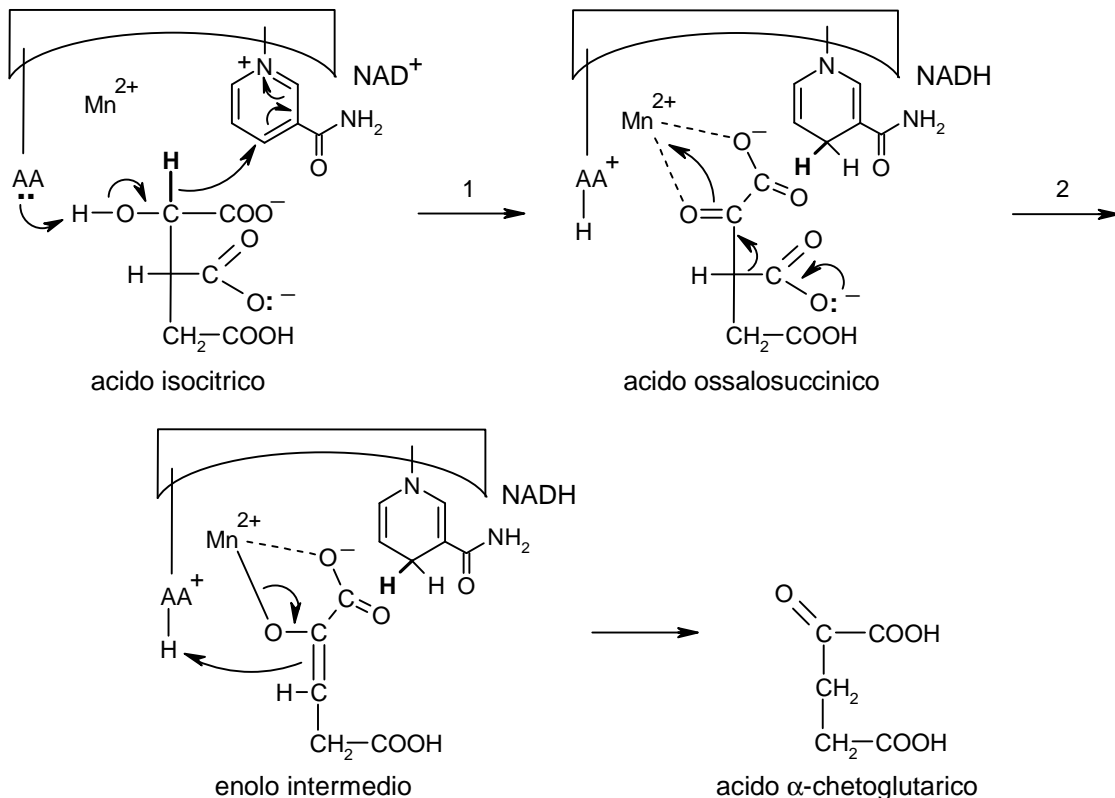


2) L'enolo dell'acetil-CoA porta un attacco nucleofilo al carbonile dell'acido ossalacetico. Il prodotto della reazione è il citril-CoA che resta legato all'enzima.

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

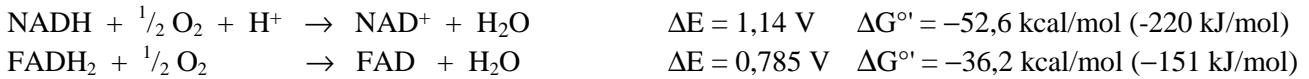
L'enzima isocitrato deidrogenasi catalizza prima l'ossidazione e poi la decarbossilazione dell'acido isocitrico per formare acido α -chetoglutarico. Si produce la prima molecola di CO_2 del ciclo e la prima molecola di NADH. La reazione procede in due stadi. Nel primo il NAD^+ ossida l'acido isocitrico ad acido ossalosuccinico che resta legato all'enzima. Nel secondo stadio l'acido ossalosuccinico, un β -chetoacido, viene decarbossilato in presenza di Mn^{2+} come cofattore.



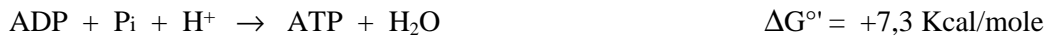
Terzo stadio della respirazione cellulare

Fosforilazione ossidativa

Nel terzo stadio della respirazione cellulare l'ossigeno molecolare O_2 **ossida** i 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:



(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 provoca una reazione di **fosforilazione** che genera ATP da ADP e fosfato inorganico.



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

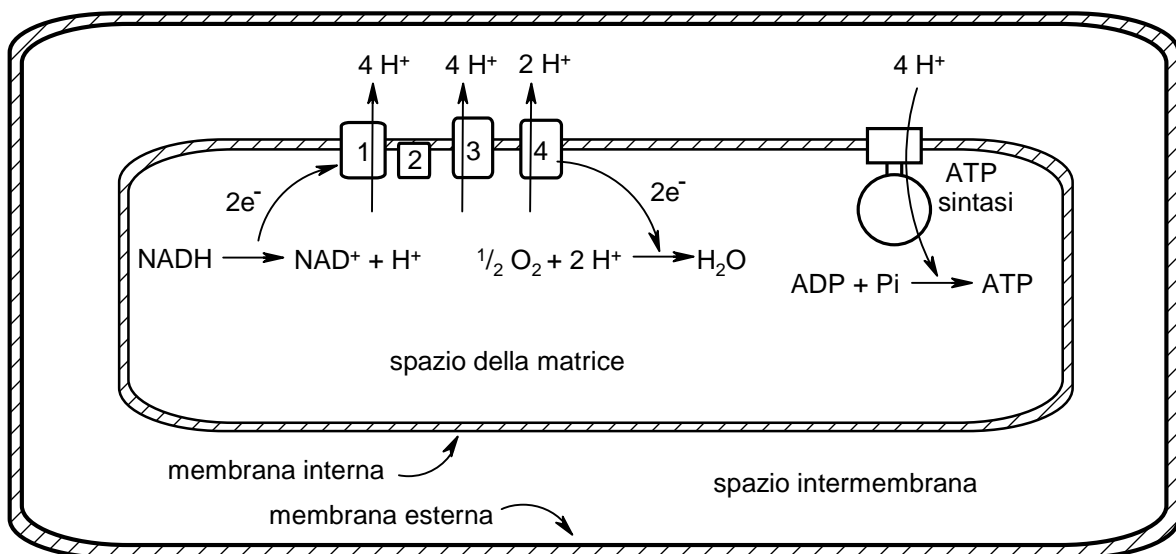
Gli elettroni che vengono ceduti dal NADH e dal $FADH_2$ giungono all'ossigeno attraverso una serie di **molecole trasportatrici di elettroni** chiamate nel loro insieme **catena respiratoria** e organizzate in quattro complessi proteici chiamati complesso 1, 2, 3 e 4. Sia la catena respiratoria che la fosforilazione ossidativa 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 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 chiamati **pompe protoniche** (il complesso, invece, 2 è inattivo). 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 **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 .

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.

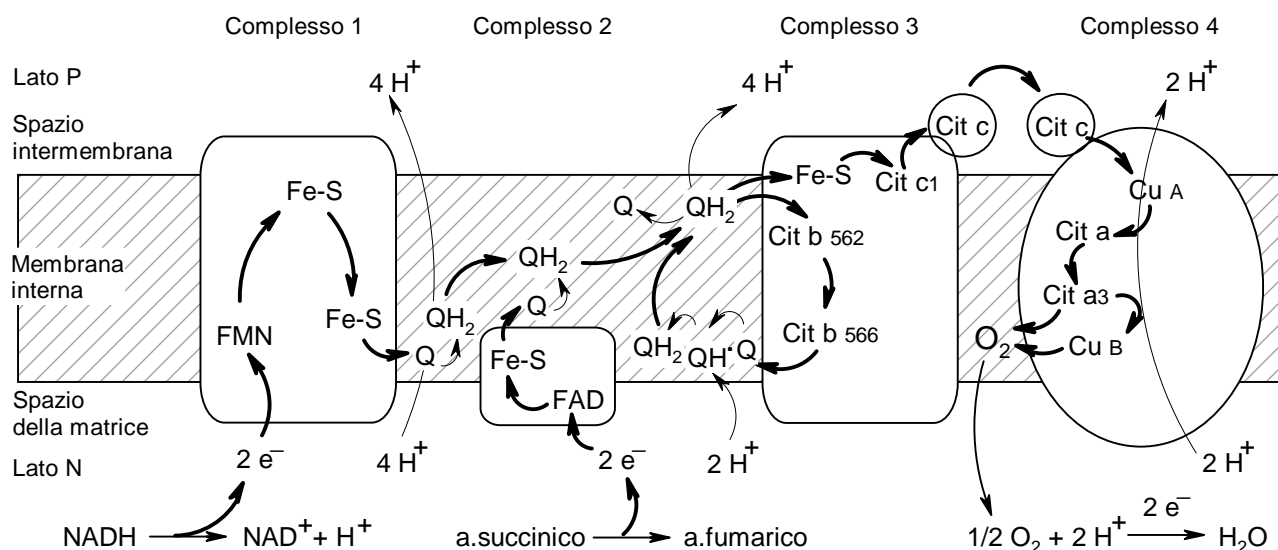
Per realizzare una pila si fanno avvenire le due semireazioni di ossidazione e di riduzione in due recipienti diversi uniti da un ponte salino e nei quali sono immersi due elettrodi collegati da un filo elettrico attraverso il quale gli elettroni vengono trasferiti dalla semireazione di ossidazione a 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 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**.

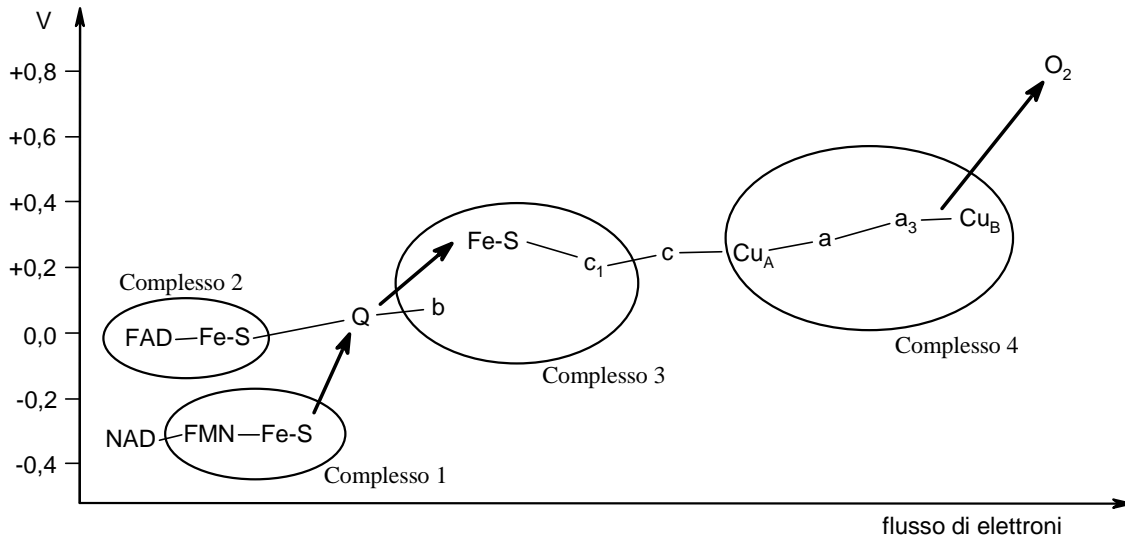
Gli elettroni vengono trasferiti dai **complessi 1 e 2** fino al **complesso 3** per mezzo del **coenzima Q** (che si muove liberamente all'interno della membrana), e sono trasferiti dal **complesso 3** fino al **complesso 4** per mezzo del **citocromo c** (una piccola proteina esterna alla membrana).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



I potenziali redox E^o 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 che 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

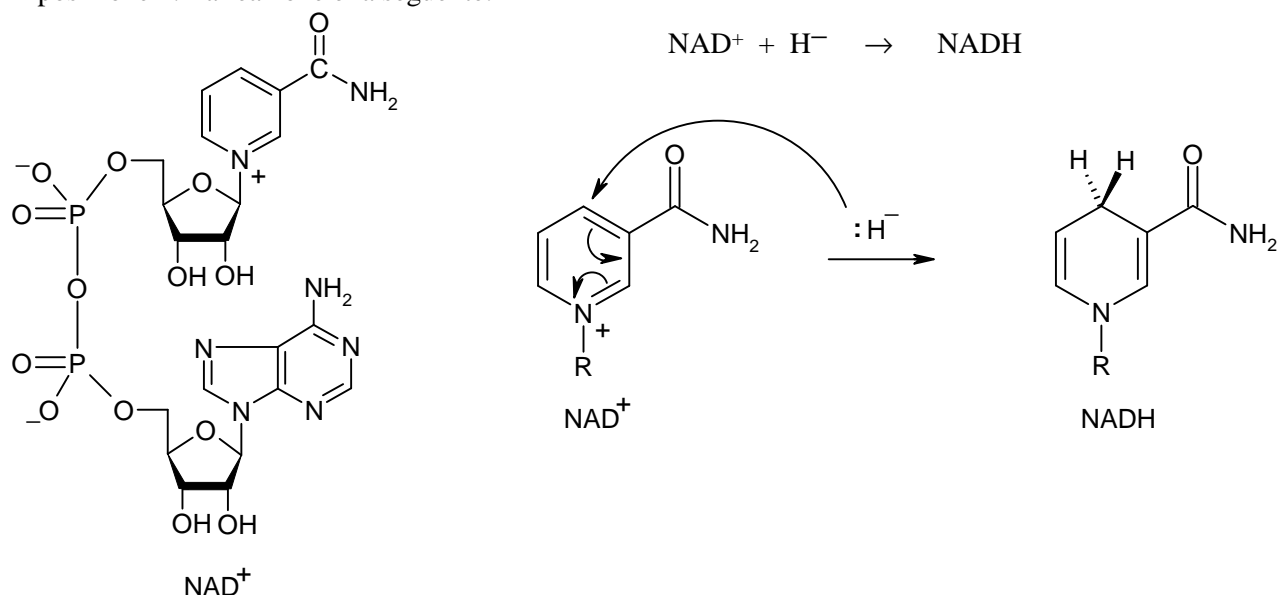
Il complesso 1 umano, chiamato **NADH-CoQ ossidoreduttasi**, è uno dei più grandi complessi proteici di membrana conosciuti, infatti è composto di 46 catene e contiene due tipi di sistemi redox: una molecola di **FMN, flavin mononucleotide**, e sette **centri ferro-zolfo**, cioè proteine che contengono atomi di ferro non-eme complessati con atomi di zolfo. Inoltre il complesso 1 è anche una **pompa protonica** e contiene 4 canali trasportatori di H^+ . I due processi che questo complesso promuove sono quindi:

- 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).

Descriveremo in questo paragrafo anche il **NADH** e il **Coenzima Q**, i gruppi redox che interagiscono a monte e a valle col complesso 1.

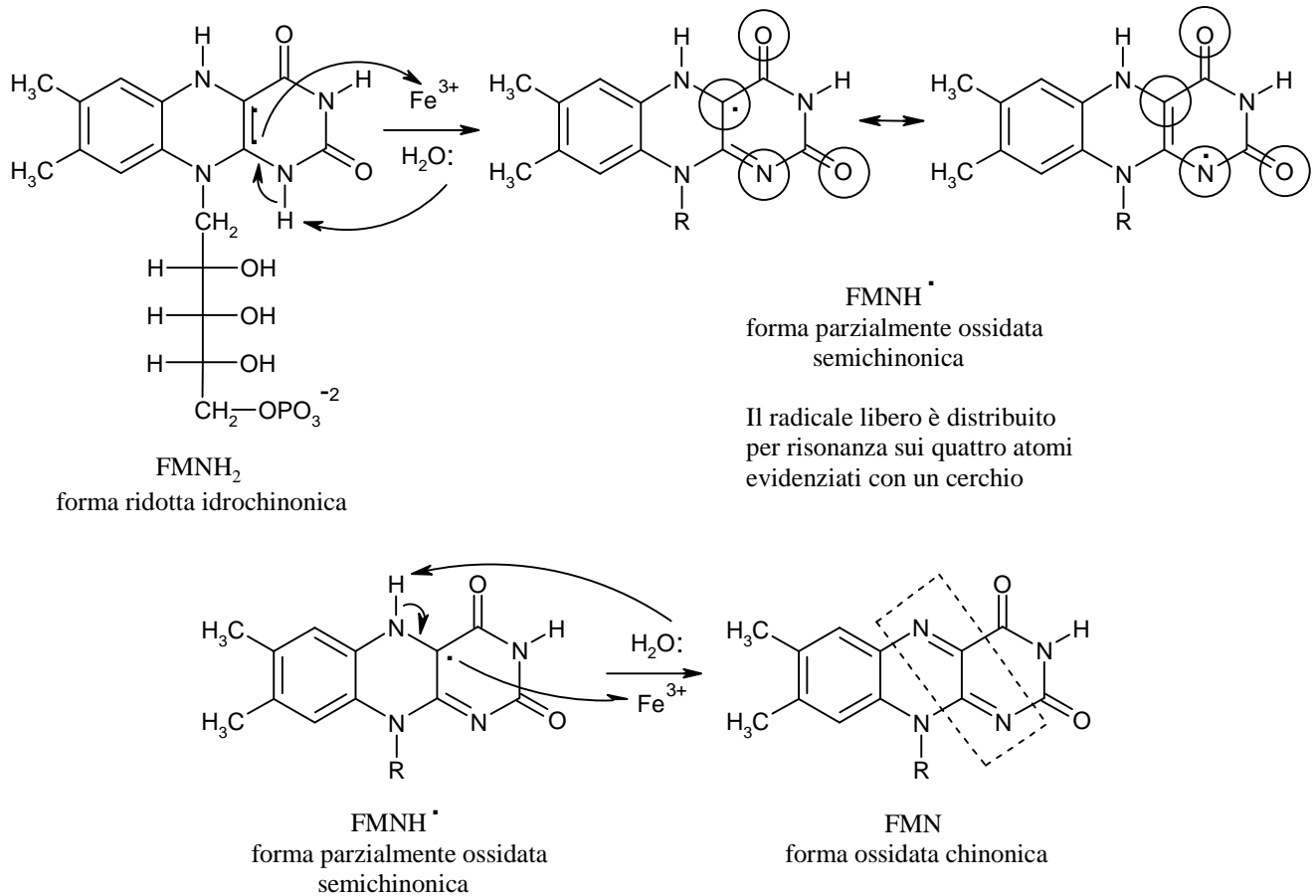
NAD, nicotinamide adenina dinucleotide

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 **nicotinamide** (vitamina PP o **vitamina B3**, mostrata qui sotto a destra), che può accettare uno **ione idruro** in posizione 4. La reazione è la seguente:



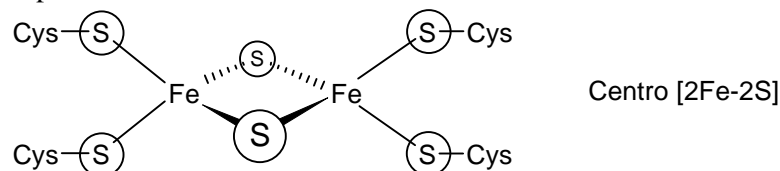
FMN, flavin mononucleotide

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.



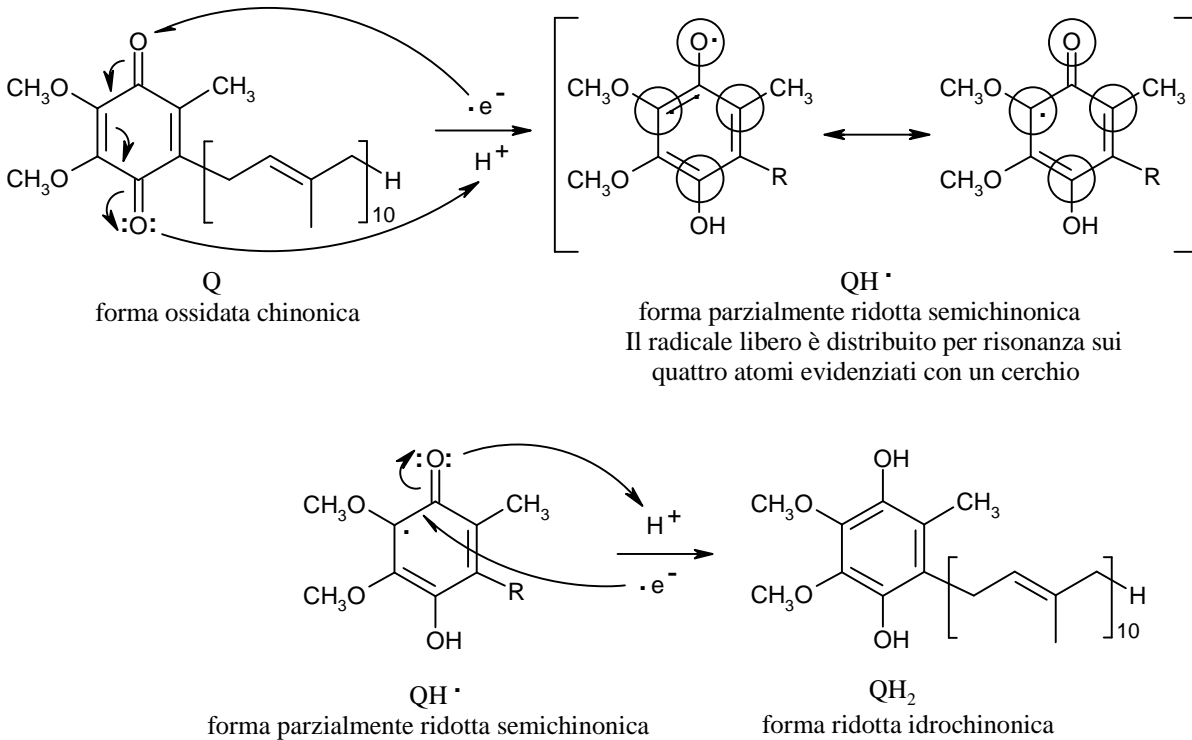
Durante il passaggio degli elettroni nella catena respiratoria, gli atomi di ferro dei centri ferro-zolfo passano ciclicamente dallo stato di ossidazione +3 a +2 e viceversa. Anche se sono presenti più atomi di ferro, i centri ferro-zolfo possono scambiare **un solo elettrone per volta**.

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

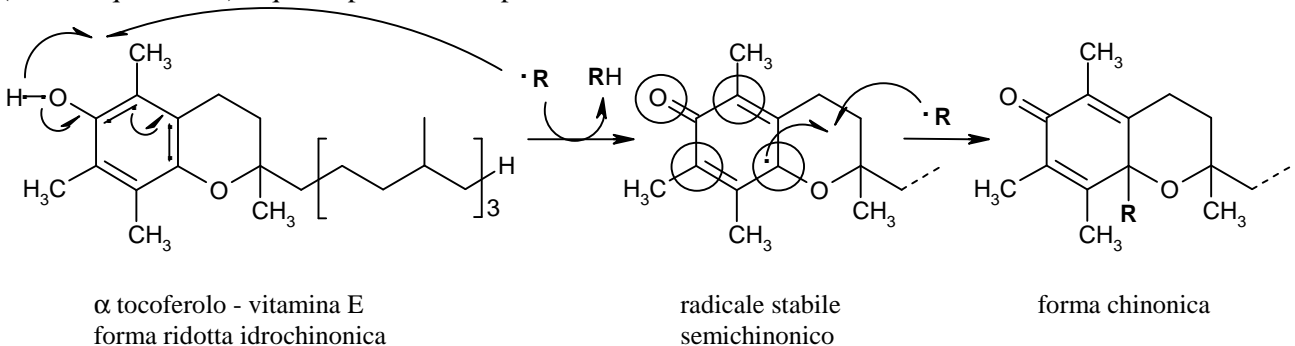
che gli conferisce la catena terpenica, può diffondere rapidamente all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana interna dei mitocondri. Raccoglie elettroni dai centri ferro-zolfo dei complessi 1 e 2 e quindi migra fino ad entrare in contatto con il complesso 3 dove cede i propri due elettroni 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 gruppi 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 QH₂ 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** ha una struttura di tipo idrochinonico, è una molecola antiossidante che forma radicali molto stabili e 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.

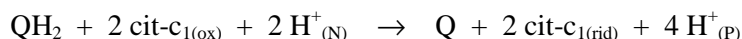
Il complesso 2 **non è una pompa protonica**, cioè non è in grado di trasferire protoni dalla matrice allo spazio intermembrana a causa della troppa piccola energia libera generata dal trasferimento di elettroni dal FADH₂ al CoQ. Gli elettroni immessi dal FADH₂ nel complesso 2 attraversano **solo due pompe protoniche** nei complessi 3 e 4 quindi spostano solo 4 H⁺ e 2 H⁺ e portano alla formazione di sole 1,5 molecole di ATP.

Anche il 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:

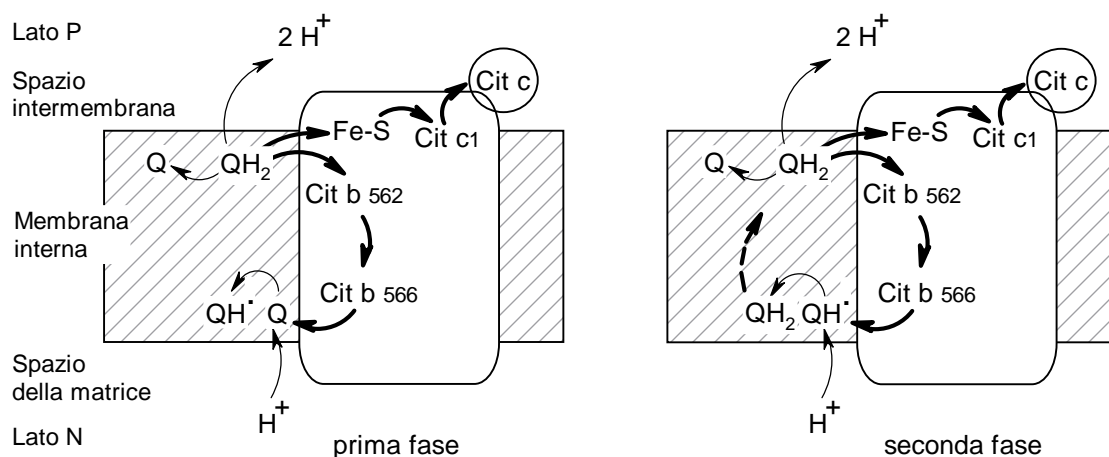


Questo si realizza attraverso un processo chiamato **ciclo Q** che consiste in un doppio flusso di elettroni e coinvolge due molecole di coenzima Q con un meccanismo in due fasi.

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.

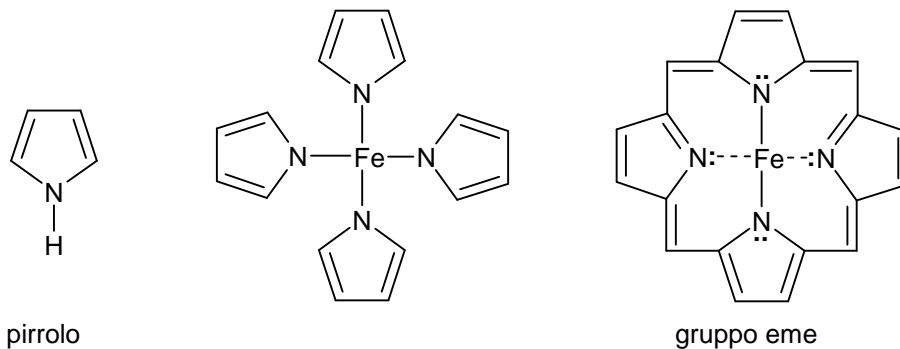
Ciclo Q nel Complesso 3



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.

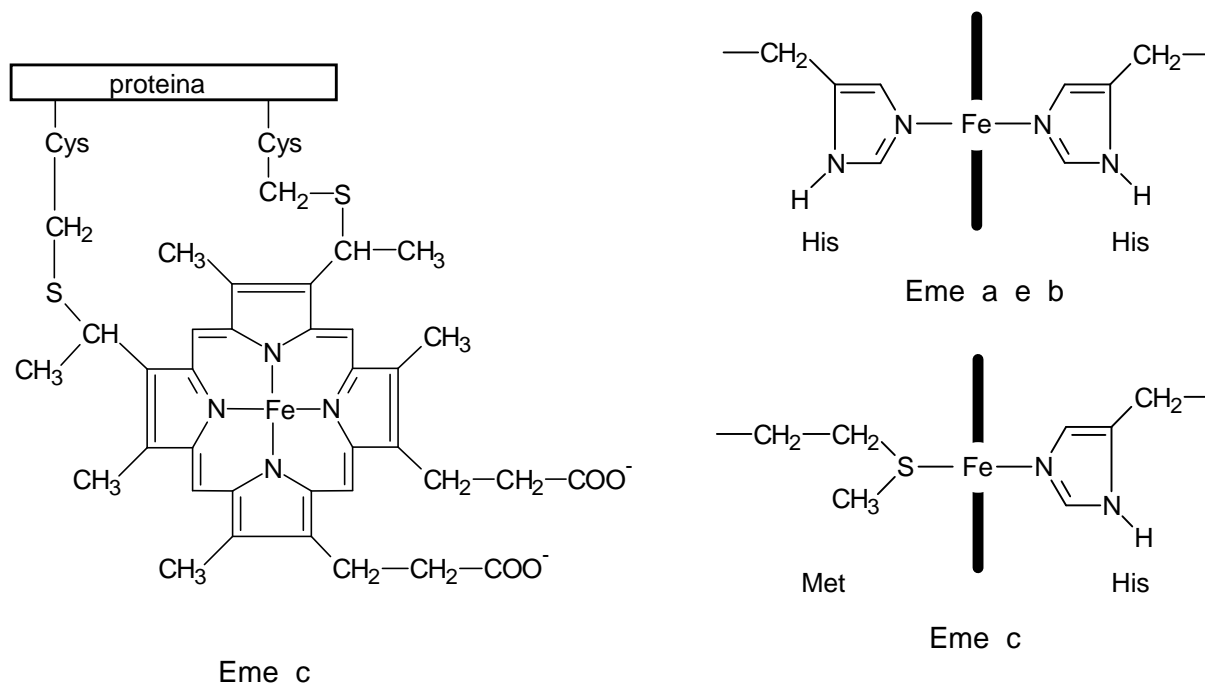


L'anello porfirinico è presente non solo nei **citocromi**, ma anche nell'**emoglobina** dove lega un atomo di Fe^{2+} per trasportare ossigeno molecolare nel sangue. E' presente nella **mioglobina**, proteina simile all'emoglobina specializzata nel trasporto di O_2 nelle cellule del tessuto muscolare. 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.

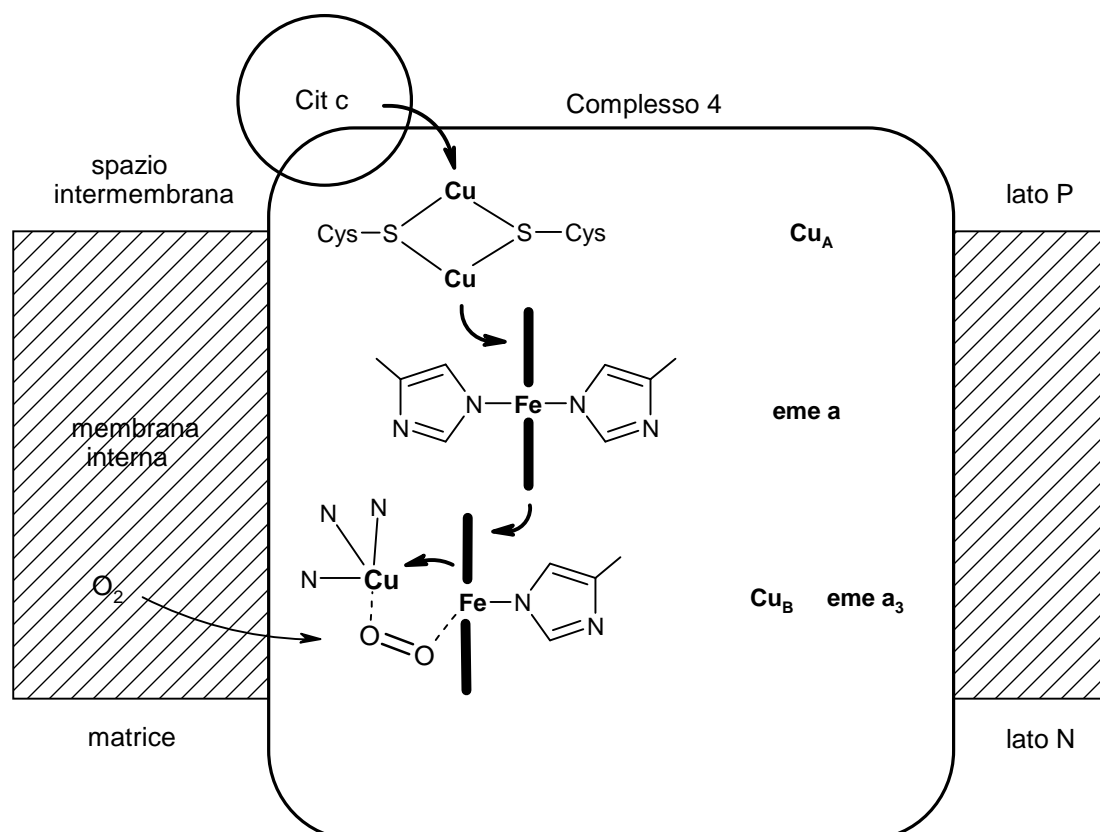


Complesso 4

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 di quattro molecole di citocromo c ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) e la contemporanea riduzione (con 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 2Fe-2S. 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**).

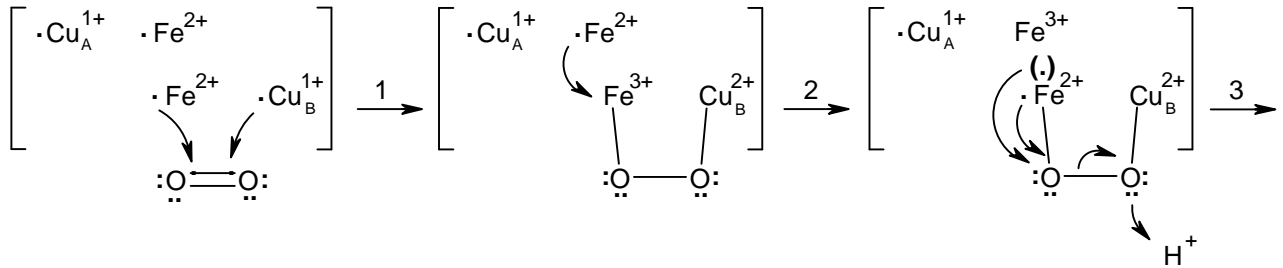
Il flusso di elettroni nel complesso 4 è quindi dal citocromo c al centro Cu_A , all'eme a, al centro eme a₃ - Cu_B e da questo all'ossigeno O_2 .



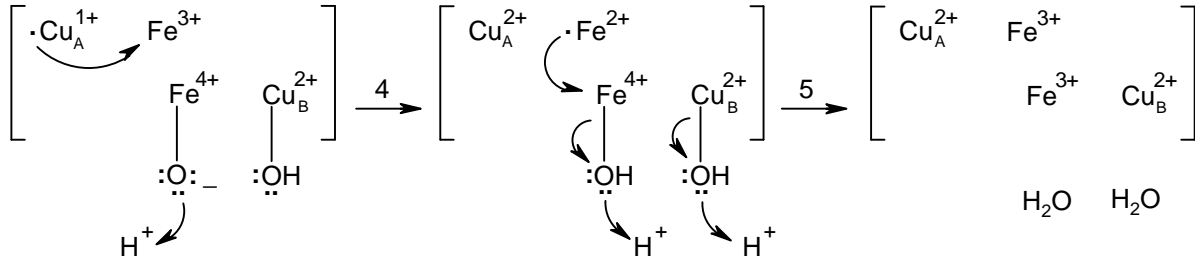
La riduzione dell'ossigeno ad H_2O è conveniente da un punto di vista energetico perché fornisce l'energia necessaria per la fosforilazione, ma nasconde alcune insidie dal punto di vista chimico, infatti i prodotti di riduzione parziale dell'ossigeno, come lo **ione superossido** O_2^- e l'**acqua ossigenata** 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 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 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).



O₂ si lega al complesso 4 ridotto Con i primi 2 e⁻ si è formato O₂²⁻ Servono altri 2 e⁻ per formare 2 H₂O

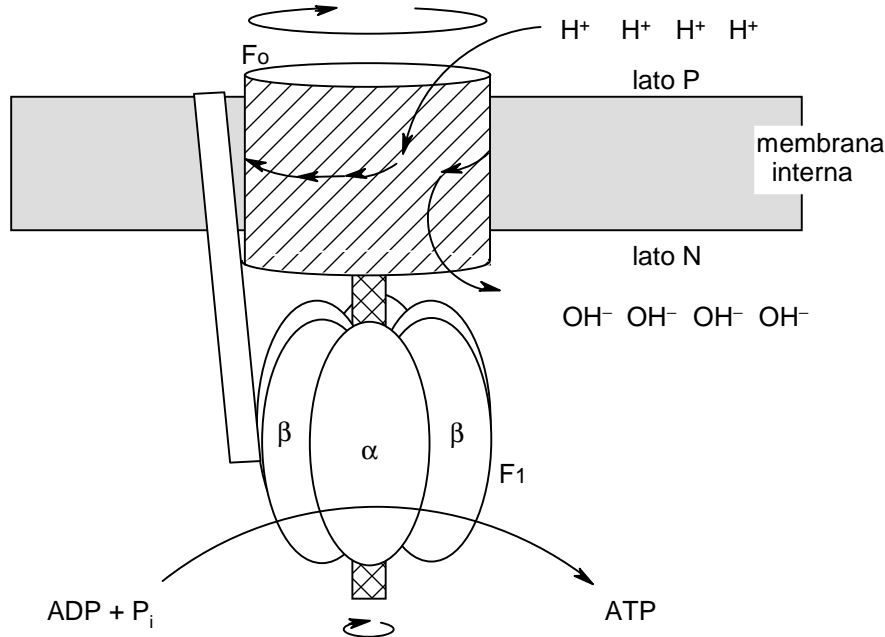


Si è formato Fe⁴⁺ Arriva l'ultimo elettrone, viene liberata H₂O Complesso 4 ossidato

Meccanismo della riduzione di O₂ nel complesso 4

Fosforilazione ossidativa

L'energia liberata dalla reazione di ossidazione di NADH e FADH₂ con l'ossigeno molecolare O₂, 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, 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 dal 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).

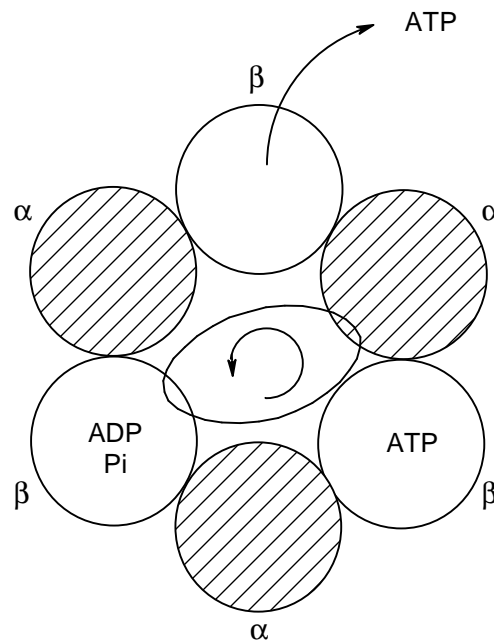


L'enzima è composto da due subunità F_o ("o" sta per sensibile alla oligomicina) e F₁. La subunità F_o ha la forma di un cilindro ed è immersa nella membrana interna. F₁ ha forma sferica, è formata da tre catene α e da tre catene β ed è tenuta ferma a ridosso di F_o nello spazio della matrice. Le due subunità sono collegate da un asse solidale con F_o e che penetra all'interno di F₁.

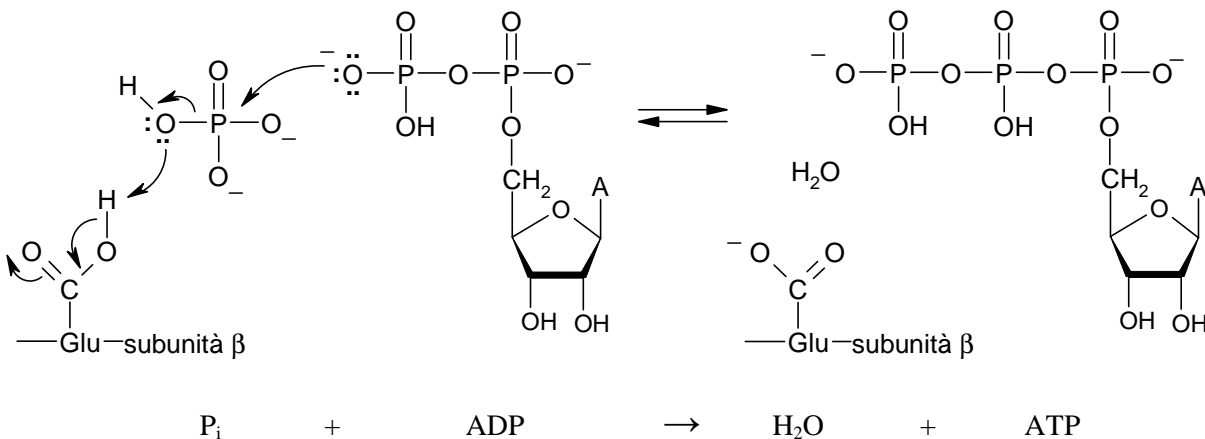
Gli ioni H^+ possono fluire dallo spazio intermembrana (lato P, positivo) alla matrice (lato N, negativo) e questo flusso obbliga la subunità F_0 a ruotare come una trottola. Questo fa ruotare anche l'asse e lo fa strisciare all'interno di F_1 che invece è tenuta ferma da un braccio esterno.

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 $ADP + P \rightarrow ATP$ 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 .



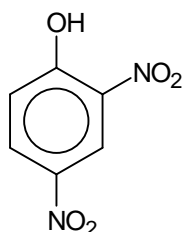
L'ATP non può essere rilasciato dalla terza catena β fino a quando ADP non si è legato alla prima. Il movimento dell'asse centrale non avviene in modo fluido, ma a scatti di 120° .



Studi con H_2O contenente l'isotopo ^{18}O 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 ^{18}O .

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

