

Mitocondri

Biotechnologie

<http://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/files/2012/03/Mitochondrial-Network-of-Endothelial-Cell-in-Green.jpg>

- 🚩 I **cianobatteri fotosintetici** produttori di **ossigeno** sono comparsi circa 2,7 miliardi di anni fa.
- 🚩 Il successivo incremento di ossigeno nell'atmosfera nel successivo miliardo di anni ha aperto la strada perchè **gli organismi sviluppassero una via estremamente efficiente di ossidazione aerobica**, che a sua volta ha permesso l'evoluzione (specialmente nel Cambriano) di forme corporee di grandi dimensioni ed elevata complessità e associate attività metaboliche.
- 🚩 Nelle cellule eucariotiche **l'ossidazione aerobica** viene svolta nei **mitocondri**.

http://www.teachmean science.net/images/microbes_photosyn_bac_ige.png
 Testo da Lodish et al., 7° ed.

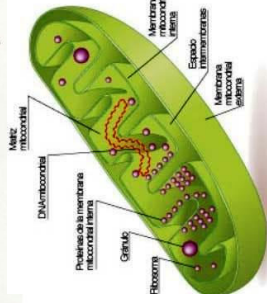
Mitocondri

1° PARTE

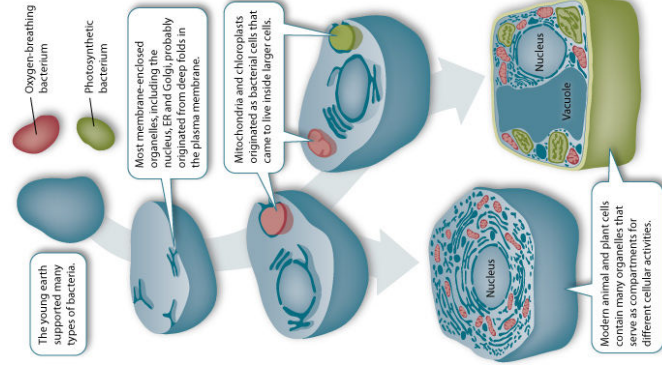
- L'ultrastuttura dei mitocondri riflette le funzioni che svolge: nella **matrice** si trovano gli enzimi responsabili dell'ossidazione degli acidi grassi, degli aminoacidi e dell'acido piruvico (derivato dalla glicolisi) nel ciclo di Krebs.
- Nella **membrana interna** stanno i sistemi dedicati al **trasporto degli elettroni** che vengono liberati nelle ossidazioni suddette e un insieme di proteine (corpuscoli respiratori) incaricate di accoppiare l'energia rilasciata al trasporto degli elettroni alla sintesi dell'ATP; queste proteine conferiscono un aspetto granuloso alla faccia interna della membrana mitocondriale interna.
- Nella membrana interna si trovano inoltre diversi sistemi di trasporto per i precursori e prodotti delle reazioni che si svolgono nella matrice o nella membrana interna.

- Nella **matrice** si trovano inoltre una o varie copie della stessa molecola di **DNA circolare** e piccoli ribosomi o poliribosomi implicati nella sintesi di un piccolo numero di proteine mitocondriali.

- ▶ ▶ Una caratteristica peculiare dei **mitocondri** è che sono di **origine materna**, giacché **solo l'ovulo** apporta i **mitocondri allo zigote**. Dato che i mitocondri possiedono DNA si presume che questa informazione passa alle generazioni successive esclusivamente attraverso le donne.



<http://fffaif.org.au/?p=5249>



Teoria endosimbiontica

<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/organelles/>

Ipotesi endosimbiontica

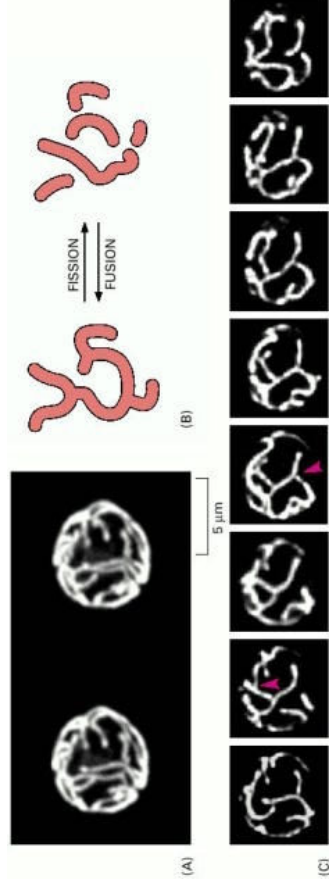
E' da molto che i biologi si sono resi conto delle somiglianze fra diversi organelli delimitati da membrane e certi batteri. In particolare, una delle somiglianze più note è quella tra i cloroplasti e i cianobatteri carichi di clorofila. Allo stesso modo è stata notata la somiglianza fra i mitocondri e altri tipi di batteri. Il fatto che i cloroplasti e i mitocondri possiedono il loro proprio DNA e possano dividersi in modo indipendente dal resto della cellula appoggia l'ipotesi che questi ed altri organelli una volta fossero batteri indipendenti che invasero le cellule primitive e giunsero a stabilire una rapporto indipendente con esse. Si pensa che gli invasori furono **simbionti** che beneficiavano dell'ambiente protetto all'interno della cellula che a loro volta apportavano all'ospite capacità e talenti che ad esso mancavano.

Dinamica dei mitocondri

- ▶ I **mitocondri** sono **strutture altamente dinamiche**: subiscono frequenti processi di **fissione** e **fusione** che generano **reti tubulari spesso ramificate**, che potrebbero spiegare la grande diversità di morfologie dei mitocondri osservate in diversi tipi cellulari.
- ▶ Quando i singoli mitocondri si fondono ciascuna delle due membrane si fonde (interna con interna, esterna con esterna) e ciascuno dei due compartimenti si ricongiungono (matrice con matrice, spazio intermembrana con spazio intermembrana).
- ▶ La **fusione** e la **fissione** apparentemente giocano un **ruolo funzionale** dato che alterazione geniche in diversi geni della superfamiglia delle **GTPasi** (coinvolte nei processi di fusione o scissione di membrane) può alterare la funzione mitocondriale e portare a patologie:

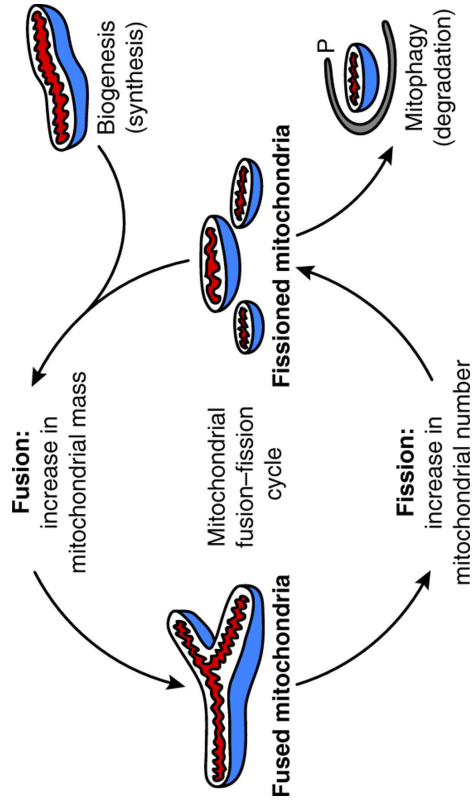
▶ Es.: Patologia neuromuscolare ereditaria di Charcot-Marie-Tooth sottotipo 2

Reticolo mitocondriale dinamico



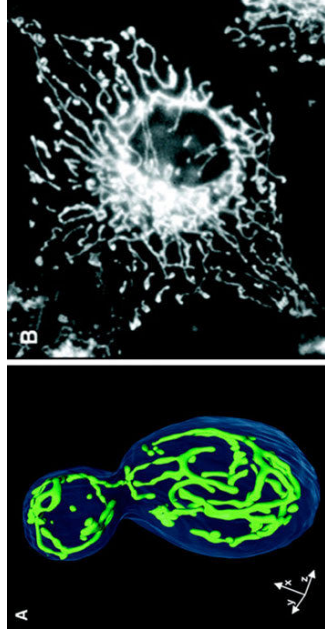
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26924/figure/A2605/>

Possibile correlazione tra la fusione, fissione, biogenesi e degradazione dei mitocondri,



Seo A Y et al. J Cell Sci 2010; 123:2533-2542

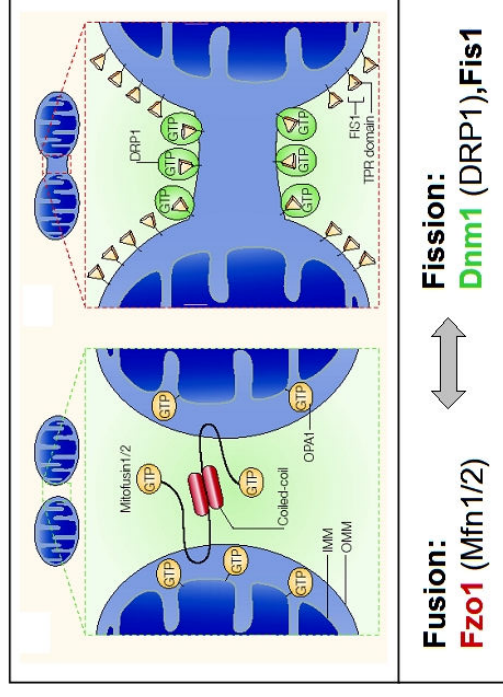
Nelle cellule i mitocondri sono in un costante stato di fusione e divisione



(A) Ricostruzione tridimensionale di una rete mitocondriale (verde) in una cellula del lievito *Saccharomyces cerevisiae* con mitocondri evidenziati con fluorocromo cell e visualizzati al microscopio confocale.

(B) Rete mitocondriale marcata con fluorocromo di un fibroblasto di scimmia africana (microscopio in fluorescenza)

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/mitochondrial-fusion-and-division-14264007>



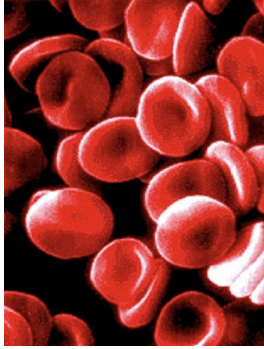
Youle and Karbowski (2005) Nature Reviews Molecular Cellular Biology 6:657-63

Gli **organismi anaerobici** vivono in ambienti senza ossigeno, e tutti essi mancano di mitocondri.

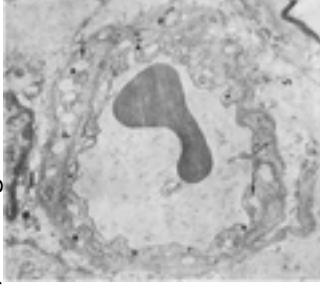
ECCEZIONE IMPORTANTE

I **globuli rossi (eritrociti)** vivono nel sangue* e sono privi anche essi di mitocondri!!!

* l'ambiente in assoluto più ossigenato, se sangue arterioso



<http://humanphysiology.wikispaces.com/05-Hematology>



http://thejns.org/na01/home/literatum/publisher/jns/journals/content/jns/1971/jns.1971.35.issue-3/jns.1971.35.3.0263/production/images/small/jns_1971_35_3_0263.tig007.gif

Conversione di energia (2)

- La membrana che viene utilizzata per produrre ATP nei **procarioti** è la **membrana plasmatica**.
- Negli **eucarioti**, la membrana plasmatica è riservata ad altri processi di trasporto.
- Vice-versa, delle **membrane specializzate all'interno di organelli** in grado di convertire energia, sono utilizzate per produrre ATP:
 - ▶ **Mitocondri**, presenti nelle cellule di praticamente tutti gli organismi eucarioti (funghi, animali, piante)
 - ▶ **Plastidi**, soprattutto cloroplasti, che si trovano nelle piante.
- Nelle foto al microscopio elettronico, l'aspetto morfologico più appariscente dei mitocondri e cloroplasti è la grande **quantità di membrane interne** che essi contengono.
- Le **membrane interne** forniscono l'**impalcatura** per un elaborato insieme di processi di **trasporto di elettroni** che produce la maggior parte dell'ATP delle cellule.

Conversione di energia (1)

- Mediante una serie di reazioni che si svolgono nel **citosol (GLICOLISI)**, l'energia derivata dalla **parziale ossidazione delle molecole di carboidrati**, ricche di energia, è utilizzata per formare ATP, la moneta energetica delle cellule.
- Un **modo molto più efficace** di generazione di energia è comparso molto precocemente nell'evoluzione. E' basato sulle **membrane**, e permette alle cellule di acquisire energia da una gran varietà di sorgenti. Es:
 - ▶ **Conversione di energia luminosa in energia chimica nella fotosintesi**
 - ▶ **Respirazione aerobica** che permette di **utilizzare l'ossigeno per produrre grandi quantità di ATP** a partire dalle molecole di cibo.

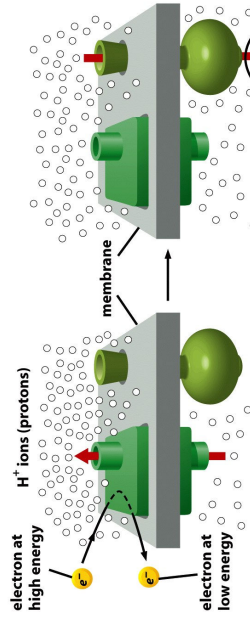
Accoppiamento chemiosmotico (1)

- Meccanismo comune usato dai mitocondri, cloroplasti e procarioti per ricavare energia.
- Il termine riflette un collegamento funzionale tra le **reazioni per formare legami chimici** che generano l'ATP ("chemi") e i **trasporti di membrana** ("osmotico").

Accoppiamento chemiosmotico (2)

Il processo di accoppiamento ha luogo in due passi collegati, che si svolgono entrambi mediante **complessi proteici inseriti in una membrana**.

Passo 1: Elettroni ad elevata energia (derivati dall'ossidazione di molecole di cibo, dall'azione della radiazione solare o da altre sorgenti e trasportati temporaneamente da coenzimi ridotti) sono **trasferiti lungo una serie di trasportatori di elettroni inseriti nella membrana**. Questi trasferimenti di elettroni **rilascia energia** che è utilizzata per **pompate protoni** (H^+ , ubiquitari nelle cellule) **attraverso le membrane** e quindi per generare un **gradiente protonico elettrochimico**. [Un gradiente ionico attraverso una membrana è una forma di energia immagazzinata, che può essere utilizzata per svolgere lavoro utile quando gli ioni hanno la possibilità di rifluire attraverso la membrana lungo il loro gradiente elettrochimico.



STAGE 1: ELECTRON TRANSPORT DRIVES PUMP THAT PUMPS PROTONS ACROSS MEMBRANE (A)

STAGE 2: PROTON GRADIENT IS HARNESSSED BY ATP SYNTHASE TO MAKE ATP (B)



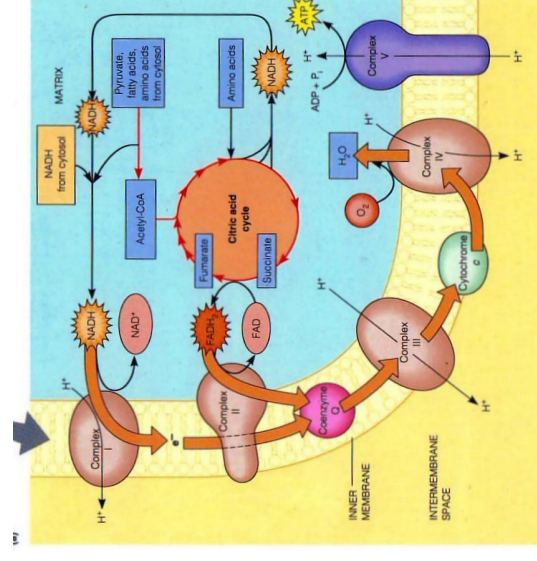
imbrigliare



Accoppiamento chemiosmotico (3)

- Passo 2:** I protoni H^+ fluiscono in dietro lungo il loro gradiente elettrochimico attraverso un dispositivo proteico chiamato **ATP sintasi**, che catalizza la **sintesi, energia-dipendente, dell'ATP a partire dall'ADP e fosfato inorganico** (P_i). Questo enzima ubiquitario può essere paragonato ad una turbina, permettendo che il gradiente protonico sia sfruttato per portare alla produzione di ATP.

Produzione di energia nei mitocondri



Membrane mitocondriali

- I mitocondri sono circondati da due membrane, la **membrana mitocondriale esterna** e la **membrana mitocondriale interna**.
- La **membrana mitocondriale esterna** racchiude completamente il mitocondrio e rappresenta il confine con il citosol.
- La **membrana mitocondriale interna** contiene due domini interconnessi:
 - **Membrana delimitante interna**: sotto la membrana mitocondriale esterna. Particolarmente ricca di proteine coinvolte nell'importo di proteine mitocondriali.
 - **Creste mitocondriali**: si estendono verso l'interno dell'organello.
- La membrana delimitante interna e le creste sono collegate da sottili connessioni – **giunzioni delle creste**.

Adattato da
Karp G.: Biologia Cellulare e Molecolare: Concetti ed Esperimenti, Edises, IV ed., 2010; Smith & Wood, Cell Biology, 2nd ed., Stanley Thornes, 1995.

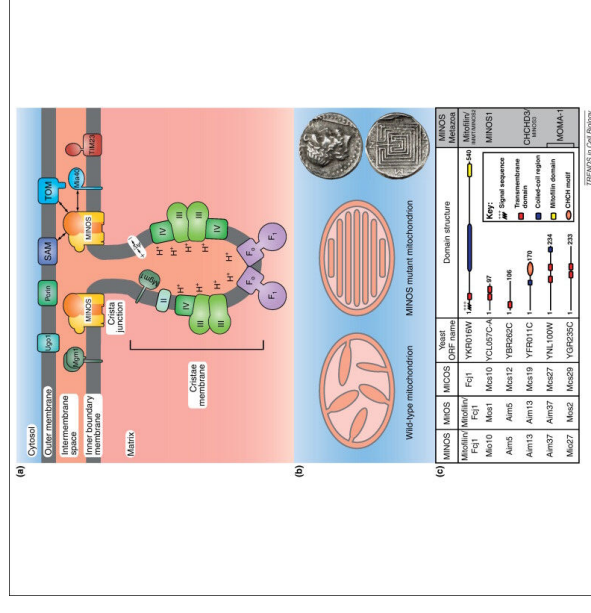
Membrana mitocondriale esterna (2)

- Contiene diversi enzimi quali la NADH/citocromo *b5* ossidoreduttasi, la monoammina ossidasi e enzimi coinvolti nell'ossidazione dell'adrenalina, nella degradazione del triptofano e nell'allungamento degli acidi grassi (sintesi degli acidi grassi).
- Contiene inoltre il principale portale di entrata di proteine nei mitocondri, la «translocase of the outer membrane, TOM» nonché il macchinario per lo “sorting and assembly machinery, SAM” (macchinario per lo smistamento e assemblaggio) e molecole fondamentali per la fusione e fissione dei mitocondri.

[Bohnert et al., Role of mitochondrial inner membrane organizing system in protein biogenesis of the mitochondrial outer membrane. Mol Biol Cell. 2012 Oct;23:3948-3956. 2012].

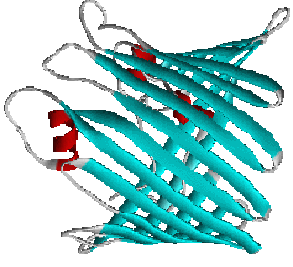
Membrana mitocondriale esterna (1)

- E' formata per il circa 50% di lipidi (lipidi simili a quelli della maggior parte delle altre membrane delle cellule eucariotiche).
- Contiene solo il circa 5% della massa totale di proteine dei mitocondri.
- Le proteine più abbondanti sono le **porine**, **proteine integrali che formano ampi canali (2-3 nm) circondati da una palizzata di foglietti β** (similmente alla membrana esterna che fa parte della parete cellulare dei batteri Gram negativi).
- Le **porine** sono strutture dinamiche in grado di **chiudersi reversibilmente** a seconda delle condizioni della cellula.
- Quando i canali delle porine sono aperti, la membrana esterna è permeabile a molecole con peso molecolare fino a 5000 Da, in particolare anche all'**ATP**, al **NAD⁺** e al **coenzima A**, che giocano un ruolo chiave nel metabolismo energetico.

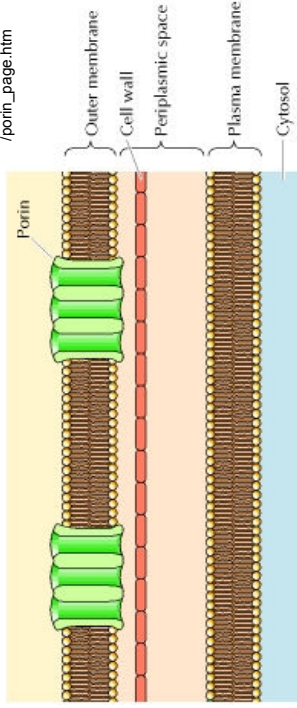


Porine

Presenti sia nella membrana esterna dei batteri Gram⁻ che nella membrana esterna dei mitocondri



http://www.tulane.edu/~biochem/faculty/facfigs/porin_page.htm

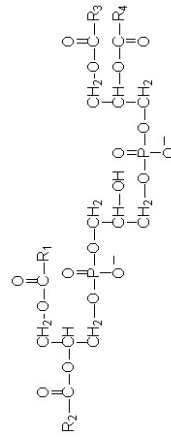


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/figure/A1977/>

Cardiolipina (1)

La cardiolipina (difosfatidilglicerolo) è un lipide molto concentrato della membrana mitocondriale interna, ma anche nella membrana plasmatica dei batteri, ossia in membrane coinvolte nella trasduzione di energia.

La cardiolipina è un **“doppio” fosfolipide inusuale**, che contiene **quattro catene di acidi grassi** e che si trova principalmente nella membrana mitocondriale interna.

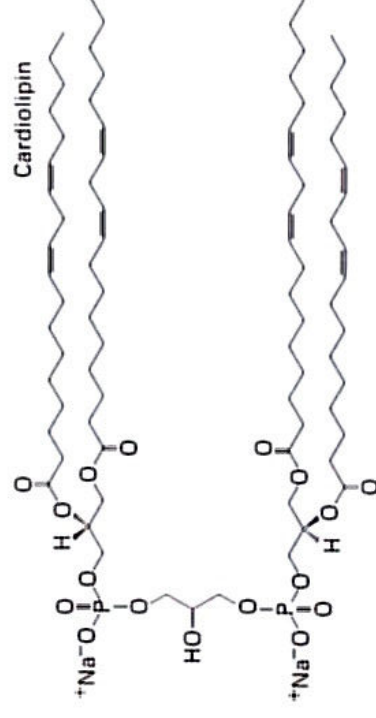


<http://themedicalbiochemistypage.org/lipid-synthesis.php>

Membrana mitocondriale interna (1)

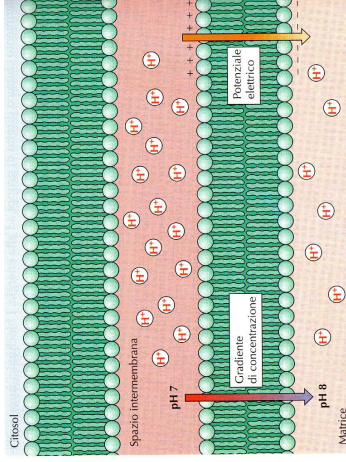
- Praticamente **priva di colesterolo**, ha un **elevato rapporto lipidi insaturi/lipidi saturi**
- Ricca di un lipide inusuale il difosfatidil-glicerolo, detto anche **cardiolipina**.
- La **cardiolipina**, che ha una bassa concentrazione nella membrana mitocondriale esterna, conta per circa il 20% del contenuto totale di lipidi della membrana interna.
- La sua **elevata fluidità** permette una **mobilità laterale elevata dei complessi proteici coinvolti nella trasporto degli elettroni**.
- La membrana interna contiene più di 100 diversi tipi di polipeptidi.
- Contiene un alto rapporto proteine/lipidi (> 3:1 in peso; circa il 20% del contenuto totale di proteine dei mitocondri).

Cardiolipina (2) (difosfatidilglicerolo)



Cardiolipina (3)

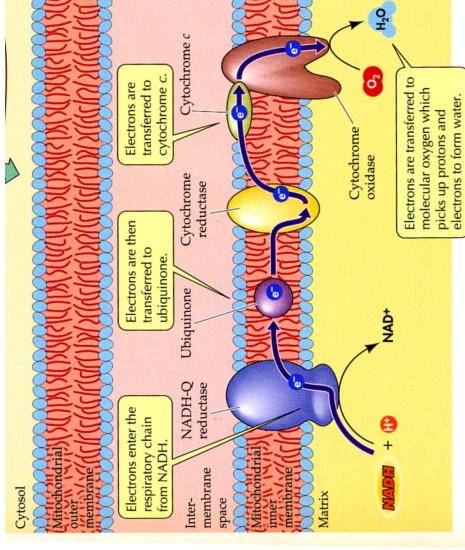
- La **cardiolipina** è importante per **ridurre la permeabilità ai protoni** dando così origine al gradiente elettrochimico di protoni fra lo spazio intermembranario e la matrice dei mitocondri.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/figure/A1647?report=objectonly>

Cardiolipina (4)

- I fosfolipidi mitocondriali svolgono diversi ruoli nella regolazione dei vari processi mitocondriali che includono l'**apoptosi**, il **trasporto degli elettroni** e l'**importazione verso i mitocondri di proteine e lipidi**.



(Hatch GM. Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. Biochem Cell Biol. 82: 99-112, 2004).

Membrana mitocondriale interna (2)

- E' la **membrana specializzata per la trasduzione di energia** ed è **impermeabile a quasi tutti i piccoli ioni**.
- Vi si trovano tre tipi principali di complessi proteici:
 - Componenti della **catena di trasporto di elettroni** (catena respiratoria): complessi I, II, III e IV.
 - L'**ATP sintasi**
 - Proteine di trasporto specifiche** che mediano il trasporto di metaboliti verso e al di fuori della matrice mitocondriale.
- L'architettura e la **grande fluidità della membrana mitocondriale interna facilitano le interazioni tra i componenti richiesta per la produzione di ATP e in particolare la diffusione laterale di piccole proteine coinvolte nel trasporto di elettroni** della catena di trasporto degli elettroni.

Le membrane mitocondriali dividono i mitocondri in due compartimenti pieni di fluido

- Matrice:**
 - Consistenza di gel, dovuta ad elevata concentrazione di proteine idrosolubili (< 500 mg/ml).
 - Contiene diversi **enzimi**, in particolare tutti tranne uno* di quelli che **catalizzano i vari passi del ciclo degli acidi tricarbossilici** (ciclo di Krebs, ciclo dell'acido citrico)
 - Contiene **ribosomi** e parecchie molecole di **DNA a doppio filamento, di solito circolari**.
 - Il **DNA mitocondriale** codifica per un piccolo n° di proteine (circa 13 nell'uomo) coinvolte nel trasporto degli elettroni nelle creste mitocondriali, per due RNA ribosomiali e per una ventina di tRNA.

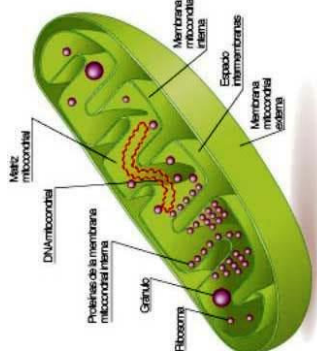
***Succinato deidrogenasi**, presente sul versante della membrana mitocondriale interna rivolto verso la matrice

Spazio intermembrane

- ⚡ Proteine coinvolte nella morte cellulare programmata (apoptosi).

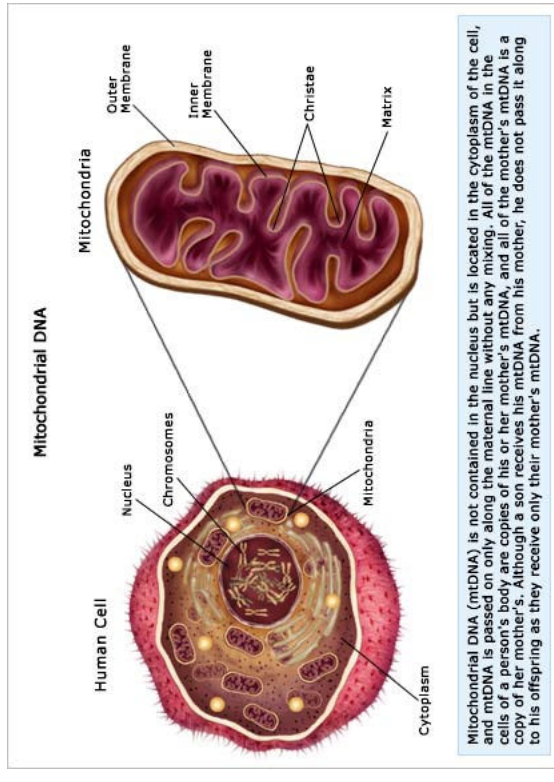
MATRICE & MEMBRANA MITOCONDRIALE INTERNA

- ⚡ Reazioni che catalizzano l'ossidazione del piruvato e degli acidi grassi a CO_2 e H_2O .
- ⚡ Sintesi ad esse accoppiata di ATP a partire da $\text{ADP} + \text{P}_i$.

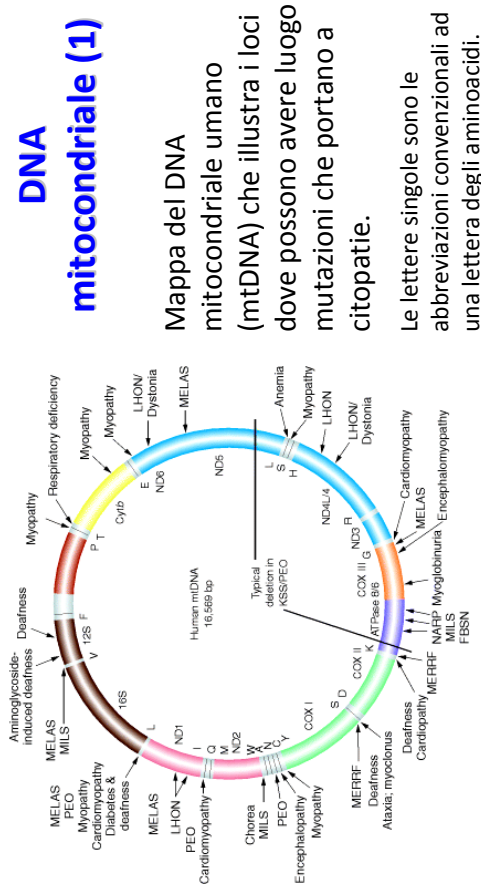


Mitocondri

DNA MITOCONDRIALE



DNA mitocondriale (1)



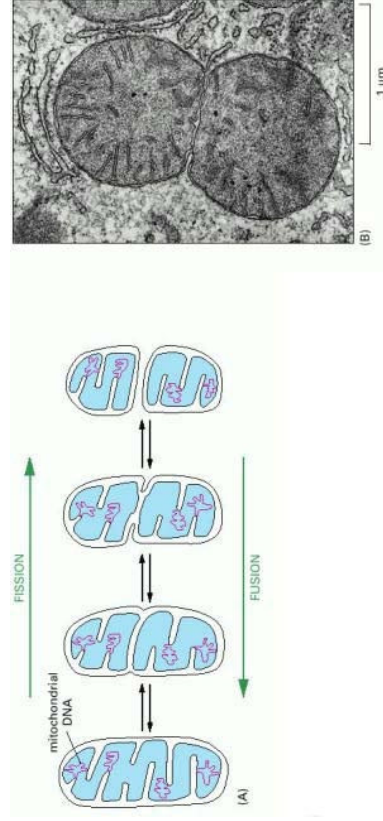
Mapa del DNA mitocondriale umano (mtDNA) che illustra i loci dove possono avere luogo mutazioni che portano a citopatie.

Le lettere singole sono le abbreviazioni convenzionali ad una lettera degli aminoacidi.

ND: NADH deidrogenasi
CO: citocromo ossidasi
12S e 16S: RNAs ribosomali

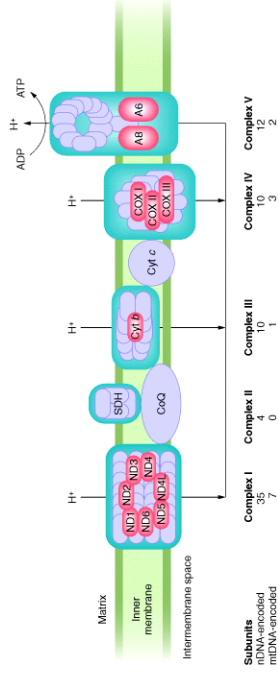
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21778/figure/A3442/?report=objectonly>

Fissione e fusione dei mitocondri



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26924/figure/A2606/?report=objectonly>

DNA mitocondriale (2)



La **catena respiratoria mitocondriale**. Le subunità codificate dal DNA nucleare sono in rosso, mentre le subunità codificate dal mtDNA sono in porpora. I protoni (H⁺) sono pompati dalla matrice verso lo spazio intermembranoso attraverso i complessi I, III e IV. Essi ritornano verso la matrice attraverso il complesso V (ATP sintasi) con la concomitante produzione di ATP. Il citocromo c (Cyt c) è una proteina di trasferimento di elettroni codificata dal DNA nucleare.

ND: NADH deidrogenasi
SDH: succinato deidrogenasi
COX: citocromo ossidasi
A6 e A8: subunità del complesso V dell'ATP sintasi

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22005/figure/A3436/>

Tre gruppi di reazioni in regioni distinte dei mitocondri (1)

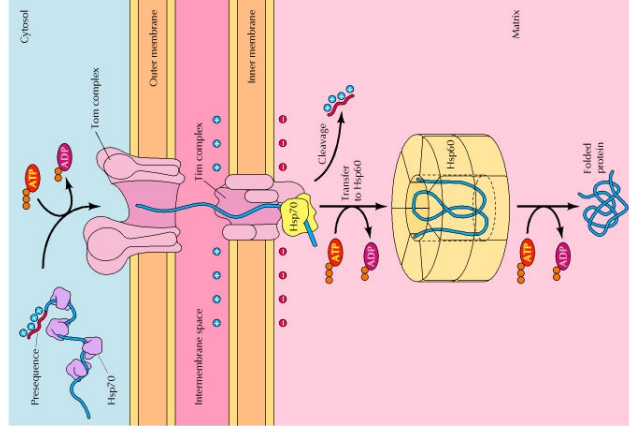
MATRICE (insieme a proteine della membrana mitocondriale interna rivolte verso la matrice):

- Ossidazione del piruvato e degli acidi grassi a CO₂
- Riduzione dei coenzimi NAD⁺ e FAD a NADH e FADH₂

Tre gruppi di reazioni in regioni distinte dei mitocondri (2)

MEMBRANA MITOCONDRIALE INTERNA:

- Trasporto di elettroni dal NADH e dal FADH₂ all'O₂
- Accoppiato alla creazione di **FORZA PROTON-MOTRICE** (gradiente protonico) attraverso la membrana mitocondriale interna.
- **COMPLESSO F₀F₁ SULLA MEMBRANA INTERNA:**
- Utilizzazione dell'energia accumulata nel gradiente protonico per la sintesi dell'ATP.



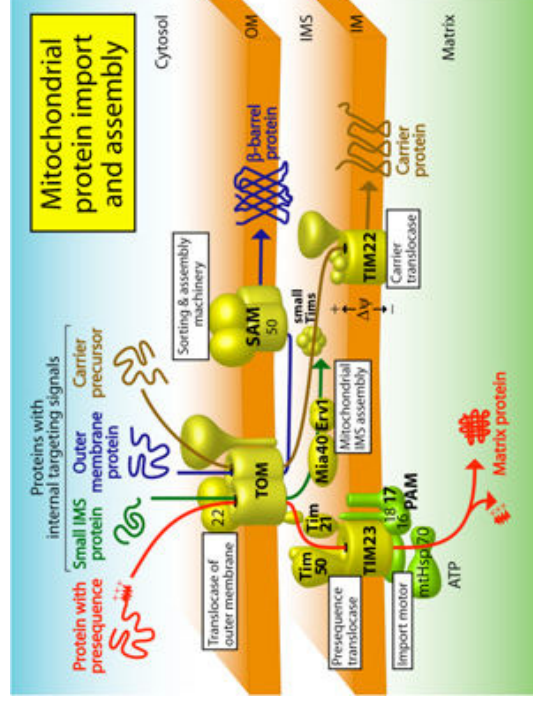
Importazione di proteine nei mitocondri

Le proteine sono indirizzate ai mitocondri mediante una presequenza N-terminale che contiene aminoacidi carichi positivamente. Le proteine sono mantenute in uno stato parzialmente non ripiegato mediante associazione con una Hsp 70 citosolica e sono riconosciute da un recettore sulla superficie dei mitocondri. Le catene polipeptidiche non ripiegate sono allora trasportate attraverso un complesso Tom nella membrana mitocondriale esterna ("outer mitochondrial membrane") e trasferite al complesso Tim nella membrana interna ("inner membrane"). La componente di voltaggio del gradiente elettrochimico è necessaria per il traslocamento attraverso la membrana mitocondriale interna. La presequenza viene scissa da una proteasi della matrice, e una Hsp 70 mitocondriale si lega alla catena polipeptidica man mano essa attraversa la membrana mitocondriale interna, provocando un'ulteriore traslocazione. A questo punto una Hsp 60 mitocondriale facilita il ripiegamento del polipeptide importato all'interno della matrice.

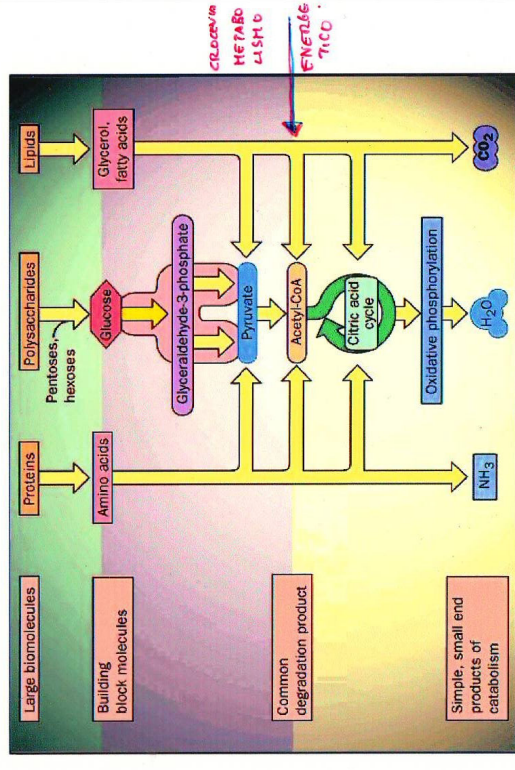
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK89896/figure/A1633/>

Mitocondri

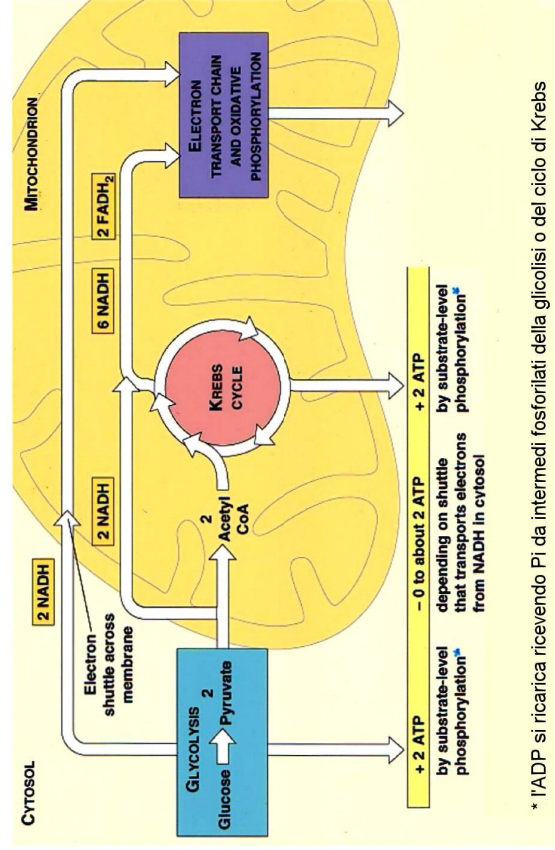
IMPORTAZIONE DELLE PROTEINE NELLA MATRICE



http://www.cnrs-gif.fr/cgm/dujardin/images/bg_import.jpg



Mitocondri METABOLISMO



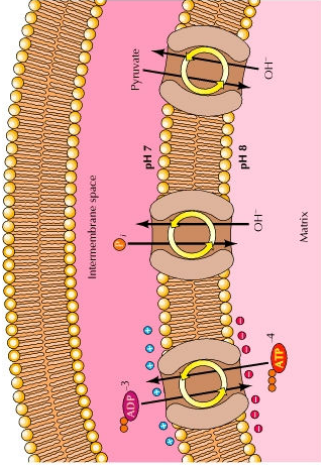
* l'ADP si ricarica ricevendo Pi da intermedii fosforilati della glicolisi o del ciclo di Krebs

Metabolismo nei mitocondri

(1) ENTRATA DEL PIRUVATO NELLA MATRICE E DECARBOSSILAZIONE

MOVIMENTO DEL PIRUVATO DAL CITOSOL VERSO LA MATRICE MITOCONDRIALE (1)

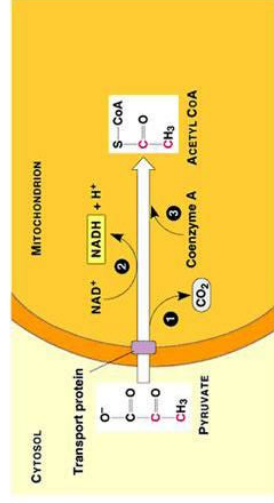
- Il **piruvato** formato nel citosol attraversa la **membrana** mitocondriale **esterna** attraverso le **porine** e la **membrana** mitocondriale **interna** mediante **simporto con un protone** [Becker, Alberts] (**antiporto con un gruppo idrossile**; Cooper) (?) e raggiunge la matrice.



Co-transporto del piruvato o carrier specifico?

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/figure/A11650/>

MOVIMENTO DEL PIRUVATO DAL CITOSOL VERSO LA MATRICE MITOCONDRIALE (2)



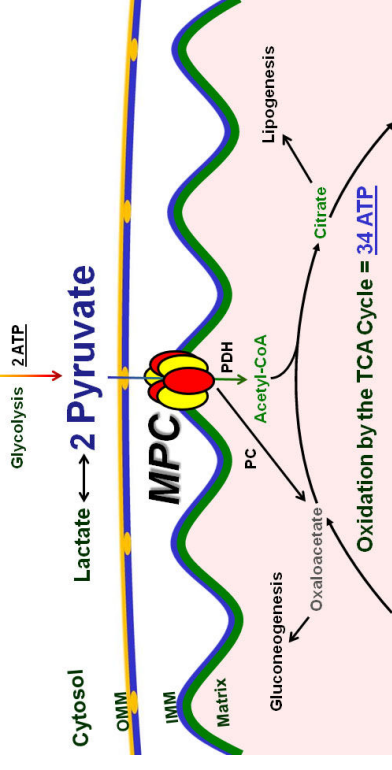
Decarbossilazione ---- ossidativa → Gruppo acetilico trasferito al CoA

Rilascio di CO₂

Elettroni trasferiti al NAD⁺

Reazione con ΔG° molto negativo (-32.5 kJ mol⁻¹)
↓ IRREVERSIBILE

Glucose

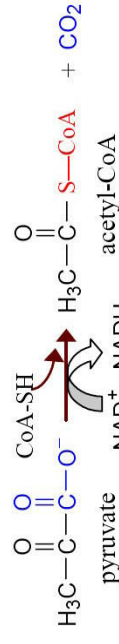


Il piruvato diffonde passivamente attraverso i pori nella membrana mitocondriale esterna (OMM) ma richiede il transito attraverso il «mitochondrial pyruvate carrier» (MPC) per attraversare la membrana mitocondriale interna e raggiungere la matrice mitocondriale.

<http://www.medicine.uiowa.edu/biochem/fabs/taylor/>

Il complesso della piruvato deidrogenasi

Pyruvate Dehydrogenase



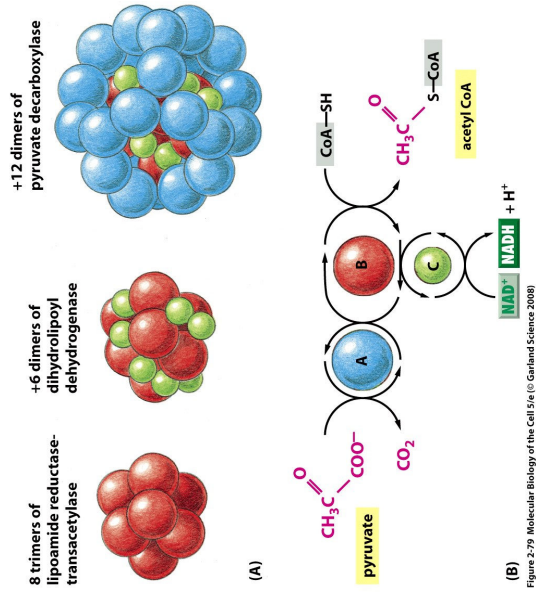
3 atomi di carbonio

2 atomi di carbonio

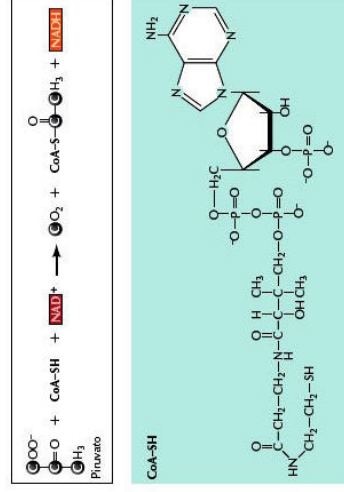
1 atomo di carbonio

- Le molecole di **piruvato** prodotte nella glicolisi sono **trasportate** attraverso la membrana mitocondriale interna **verso la matrice**, dove vengono **decarbossilate** per formare **gruppi acetile**, con **2 atomi di carbonio** (-CH₃COO₂).
- Il gruppo acetile forma in seguito un complesso con il coenzima A per formare **acetyl-CoA**:
Piruvato + HS-CoA + NAD⁺ → acetyl CoA + CO₂ + NADH + H⁺
- La decarbossilazione del piruvato ed il trasferimento del gruppo acetile al CoA sono catalizzati dal complesso multienzimatico gigante della **piruvato deidrogenasi** nella matrice mitocondriale.

Ossidazione del piruvato ad acetilcoenzima A e CO₂ (matrice mitocondriale)

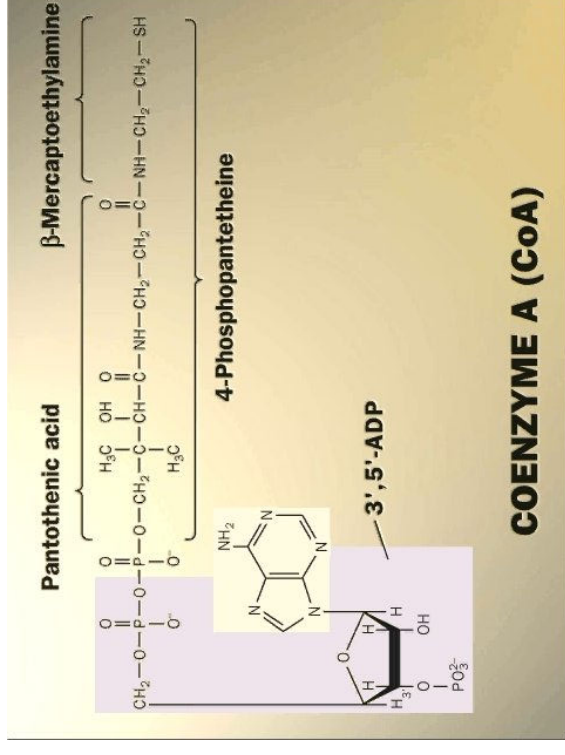


Decarbossilazione ossidativa del piruvato (matrice mitocondriale)

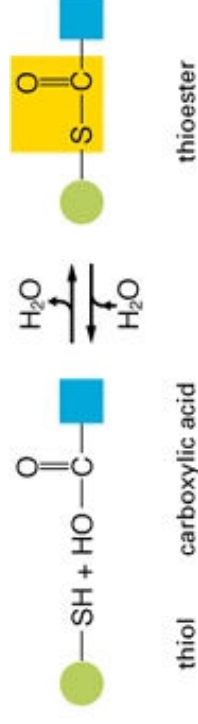


Il **piruvato** viene convertito in **CO₂** (decarbossilato) e in **acetilCoA**, in un processo che produce anche una molecola di **NADH**.

Il **coenzima A (CoA-SH)** è un **trasportatore generale di gruppi acilici attivati** in una grande varietà di reazioni.



Legame tioesterico ad alta energia



L'idrolisi di un legame tioesterico rilascia molto più energia dell'idrolisi di un legame esterico.

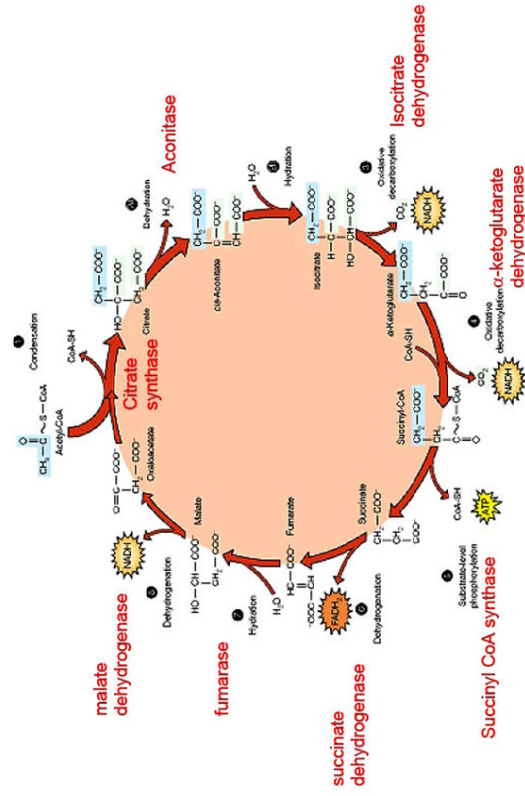
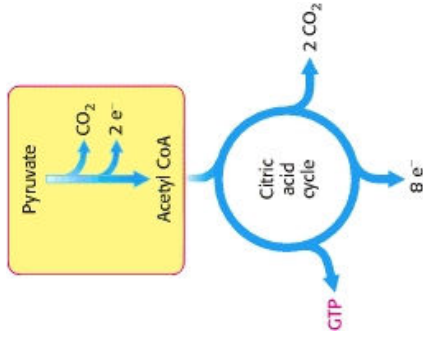
Ad esempio, il ΔG° per l'idrolisi del succinil CoA (ciclo di Krebs) è di circa -8 kcal mol^{-1} ($-33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$), paragonabile a quello dell'ATP ($-7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, o $-30.5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Decarbossilazione del piruvato: collegamento tra la glicolisi e il ciclo di Krebs

- Nella decarbossilazione irreversibile del piruvato viene rilasciato CO_2 e sono catturati dal NAD elettroni ad alto potenziale di trasferimento.

- La reazione della piruvato deidrogenasi ha molti aspetti in comune con il ciclo di Krebs stesso.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

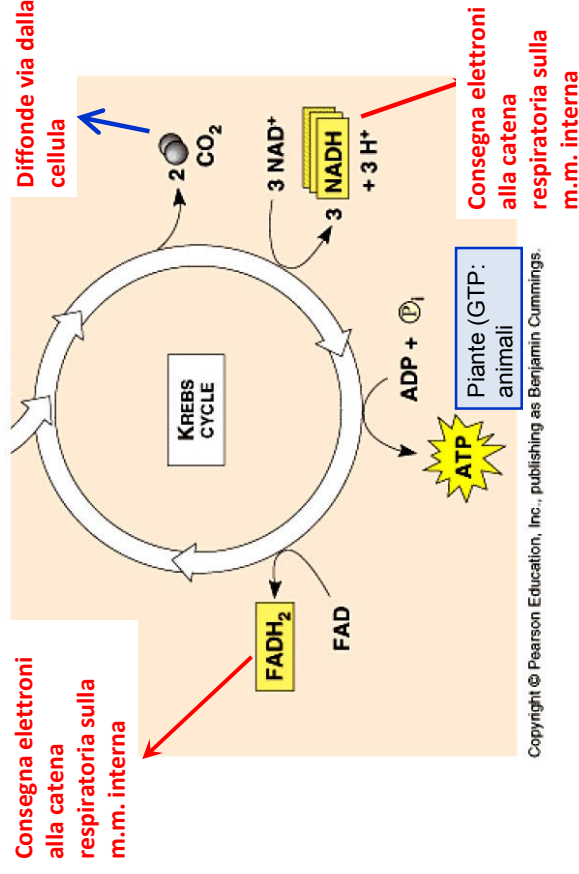


Ciclo di Krebs, degli acidi tricarbossilici o dell'acido citrico

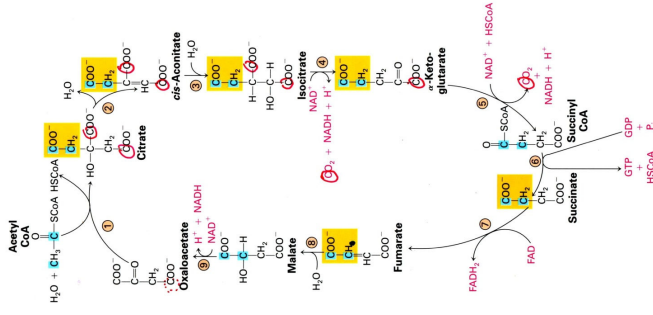
Funzioni del ciclo di Krebs

- Permette alla cellula di ossidare i prodotti del catabolismo degli zuccheri (GLICOLISI), dei lipidi e delle proteine.
- I prodotti sono CO_2 , trasportatori temporanei di elettroni ridotti e fosfato ad alta energia (in GTP o ATP).
- Diverse reazioni di questo ciclo sono inoltre utilizzate in processi quale la gluconeogenesi (sintesi del glucosio) e in processi anabolici coinvolti nel metabolismo dell'azoto.

I prodotti significativi del ciclo di Krebs

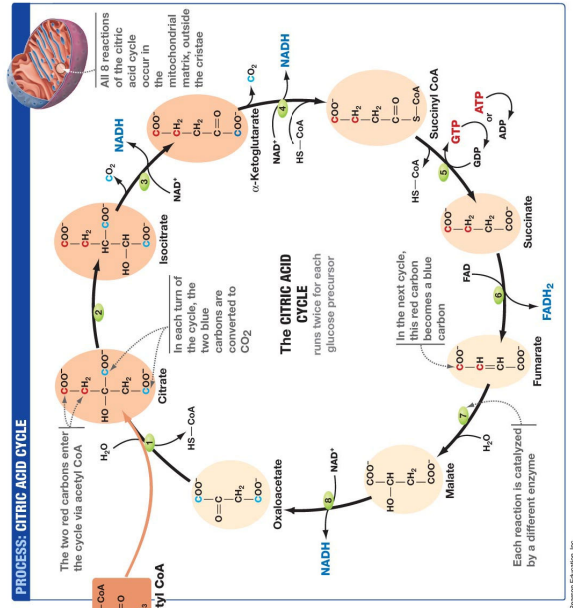


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



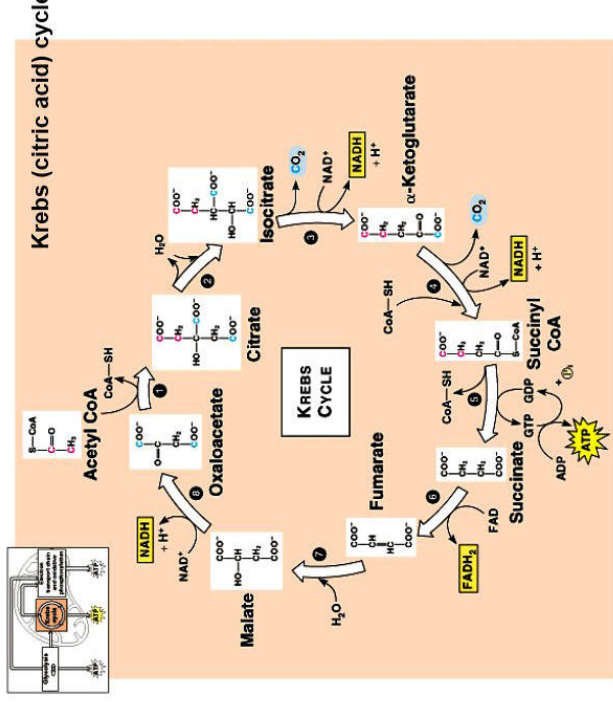
Il ciclo dell'acido citrico in cui gruppi acetilici trasferiti dal acetyl CoA sono ossidati a CO₂

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21624/figure/A4356/>
6/7?report=objectonly



© 2011 Pearson Education, Inc.

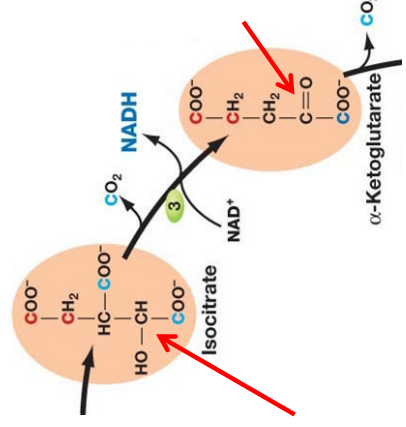
http://www.uic.edu/classes/bios100/lectures/09_15_citric_acid_cycle-L.jpg



Perchè nelle ossidazioni si formano due tipi di coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)? - 1

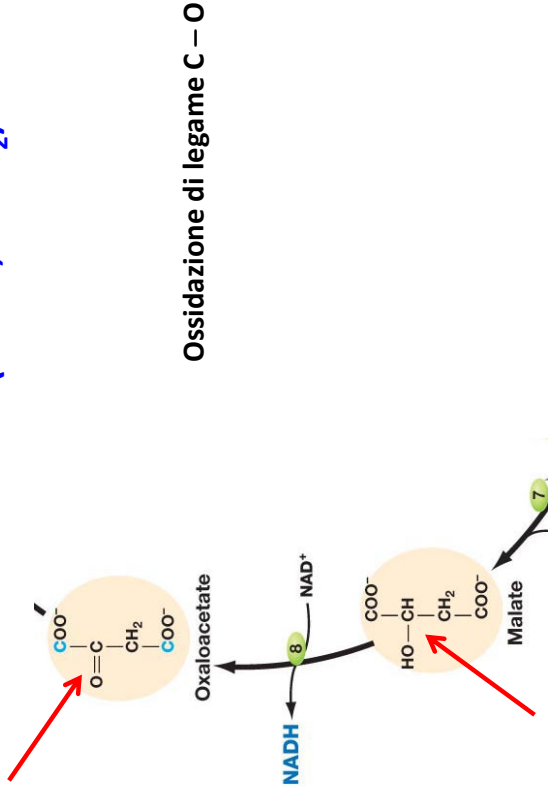
Ossidazione di legame C - O

Quando la rimozione di elettroni viene fatta da un legame fra Carbonio e Ossigeno sulla stessa molecola, o da un legame fra un atomo di Carbonio e un atomo di Zolfo tra due molecole collegate, viene liberata una quantità di energia sufficiente per trasferire gli elettroni al NAD⁺ in modo esergonico. Si forma un gruppo C = O.



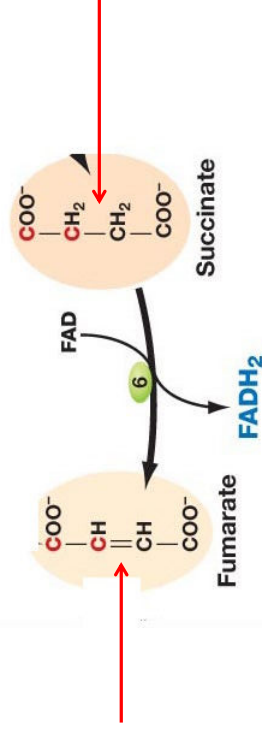
Becker, 2014

Perchè nelle ossidazioni si formano due tipi di coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)? - 2



Perchè nelle ossidazioni si formano due tipi di coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)? - 4

➡ Esempio di reazione di deidrogenazione che porta alla formazione di FADH₂.



Perchè nelle ossidazioni si formano due tipi di coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)? - 3

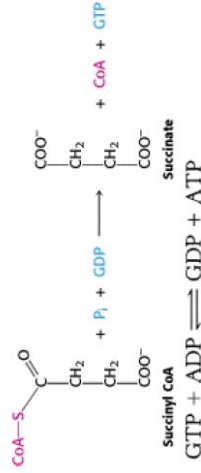
- ➡ Quando i due elettroni derivano da due atomi di Carbonio adiacenti, con formazione di un doppio legame C = C, l'ossidazione libera meno energia dell'ossidazione di un legame Carbonio – Ossigeno che non è in grado di ridurre il NAD⁺ in modo esergonico. Invece l'accettore ed elettroni in questa deidrogenazione è un coenzima a minore energia, il Flavin adenin dinucleotide (FAD).
- ➡ Il FAD accetta due elettroni e due protoni: forma ridotta FADH₂.

Come è possibile la formazione di GTP(ATP) nel ciclo di Krebs? - 1

- ➡ Il succinil CoA genera un **composto ad elevato potenziale di trasferimento di gruppi fosfato**.
- 🌱 Il succinil CoA è un composto tioesterico ricco di energia: Il ΔG° necessario per la sua idrolisi è di circa -8 kcal mol⁻¹ (-33.5 kJ mol⁻¹), paragonabile a quella dell'idrolisi dell'ATP (-7.3 kcal mol⁻¹, o -30.5 kJ mol⁻¹).
- 🌱 Nella reazione catalizzata dalla citrato sintasi, la **scissione del legame tioesterico** dell'acetil CoA fornisce l'energia per la sintesi del citrato con sei atomi di carbonio a partire dall'ossalacetato che ha quattro atomi di carbonio e dal frammento a due atomi di carbonio legato al CoA.

Come è possibile la formazione di GTP(ATP) nel ciclo di Krebs? - 2

- La scissione del legame tioesterico del succinil CoA è invece accoppiata alla fosforilazione di una purina nucleoside difosfato, di solito GDP.
- Questa reazione è catalizzata dalla succinil CoA sintetasi (succinato tiocinasasi).
- Questo meccanismo è un chiaro esempio di trasformazione di energia: l'energia inerente alla molecola di tioestere viene trasformata in un potenziale di trasferimento di gruppo fosfato.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

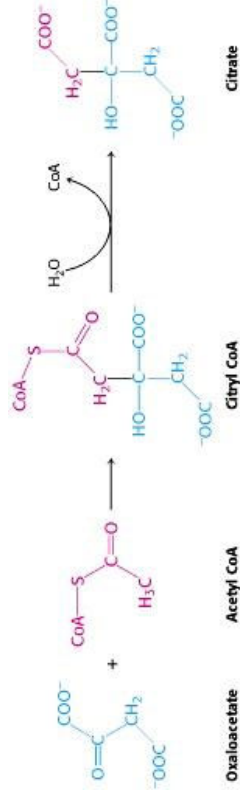
Seminario

Ciclo di Krebs

1. La citrato sintasi forma citrato a partire dell'ossalacetato e acetilcoenzima A

- Il ciclo dell'acido citrico inizia con la reazione di condensazione di un'unità con 4 atomi di carbonio, l'ossalacetato, con un'unità con 2 atomi di carbonio, l'acetil-Co A e H₂O per dare **citrato (6C)** e rilasciare il CoA.

- La scissione del **legame tioestere** fornisce l'energia per la formazione del citrato (6C) a partire dall'ossalacetato (4C) e il frammento a due atomi di carbonio.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

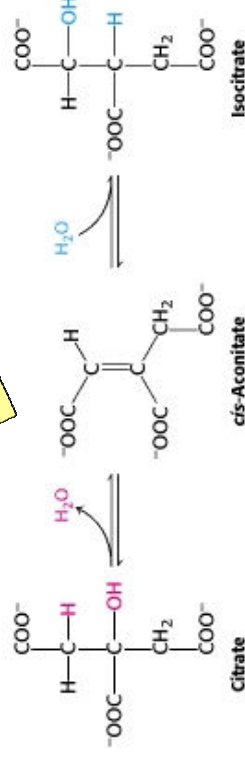
SEMINARIO

I PASSI DEL CICLO DI KREBS

Ciclo di Krebs

2. Il citrato viene isomerizzato in isocitrato

- Il gruppo -OH legato ad un carbonio in posizione terziaria del citrato non è localizzato in modo adeguato per le ossidazioni decarbossilative che si svolgono dopo. L'isomerizzazione del citrato è svolta mediante un passo di disidratazione seguito da un'idratazione. Ciò provoca un interscambio fra un atomo di idrogeno e un gruppo idrossile. L'enzima si chiama **aconitasi** perchè il cis-aconitato è un intermedio della reazione.



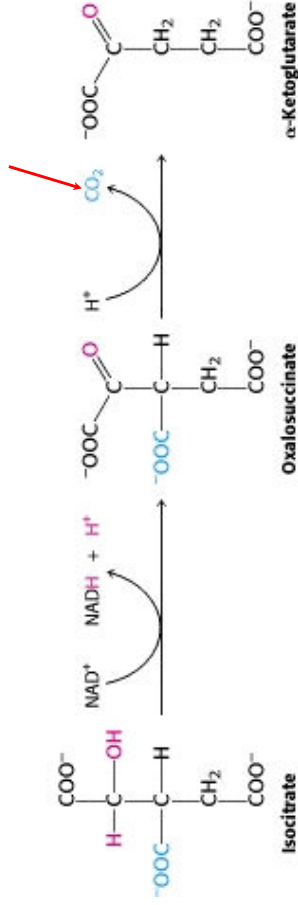
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Seminario

Ciclo di Krebs

3. L'isocitrato è ossidato e decarbossilato in α -chetoglutarato

- Prima delle quattro reazioni di ossidazione-riduzione del ciclo, catalizzata dalla isocitrato deidrogenasi.
- L'ossidazione genera il 1° trasportatore di elettroni ad elevato potenziale di trasferimento, **NADH**, del ciclo.



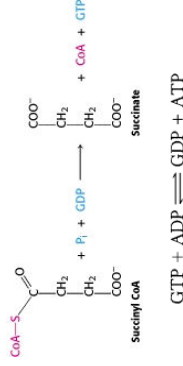
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Seminario

Ciclo di Krebs

5. Un composto ad elevato potenziale di trasferimento del gruppo fosfato viene generato dal Succinil Coenzima A - [1]

- Il succinil CoA è un composto **tiostere ricco di energia**.
- La scissione del **legame tiostere del succinilCoA** è accoppiata alla **fosforilazione di un purina nucleoside difosfato**, di solito GDP, catalizzata dalla succinil CoA sintasi.
- Questo è l'unico passo del ciclo dell'acido citrico che fornisce un **composto ad elevato potenziale di trasferimento di gruppi fosfato** mediante **fosforilazione a livello di substrato**.
- Alcune succinil CoA dei mammiferi sono specifiche per il GDP e altre per il ADP. Il **gruppo fosfato del GTP può essere rapidamente trasferito all'ADP** per formare **ATP** in una reazione catalizzata dalla nucleoside difosfochinasi.

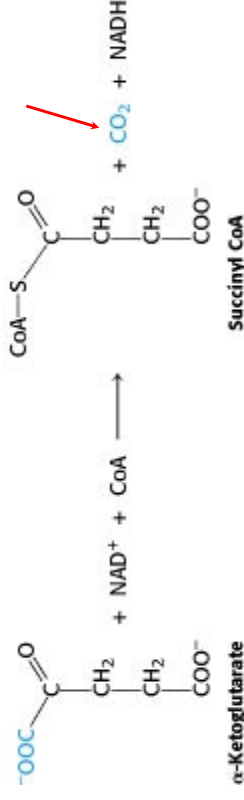


Seminario

Ciclo di Krebs

4. L' α -chetoglutarato viene decarbossilato ossidativamente a succinil coenzima A

- 2ª reazione di **ossidazione decarbossilativa**, che **somiglia strettamente alla decarbossilazione ossidativa del piruvato**, anche esso un α -chetoadido.
- Entrambe le reazioni includono la decarbossilazione di un α -chetoadido e la formazione successiva di un **legame tiostere ad elevato potenziale di trasferimento con il CoA**.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Seminario

Ciclo di Krebs

5. Un composto ad elevato potenziale di trasferimento del gruppo fosfato viene generato dal Succinil Coenzima A - [2]

- Il **succinil CoA ha un'elevata energia potenziale** che verrà utilizzata per **portare alla sintesi di GTP**.
 - Il meccanismo catalitico coinvolge un **intermediato enzimatico succinilfosfato**:
- Succinil CoA + P_i + Enz \rightleftharpoons Enz-succinilfosfato + CoASH
- Enz-succinilfosfato + succinato \rightleftharpoons Enz-fosfato + succinilfosfato + GDP \rightleftharpoons Enz + GTP

- L'enzima viene fosforilato nella posizione 3 di un residuo di istidina

- Quindi, viene conservato un legame ad alta energia sotto forma di GTP

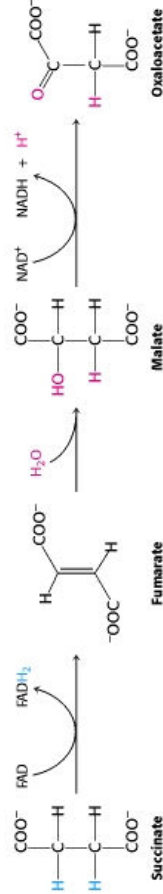
Devlin, Textbook Biochemistry, 4ª ed.

Seminario

Ciclo di Krebs

6. L'ossalacetato è rigenerato mediante l'ossidazione del succinato

- Le reazioni di composti a 4C costituiscono lo stadio finale del ciclo: la **rigenerazione dell'ossalacetato**.
- Un gruppo metilenico (CH₂) è convertito in un gruppo carbonilico (C=O) in tre passi: un'ossidazione, una idratazione e una seconda reazione di ossidazione.
- Si rigenera l'ossalacetato e si estrae altra **energia** sotto forma di **FADH₂** e **NADH**.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Appunti sull'ossidazione del succinato

- Il succinato è ossidato a fumarato dalla succinato deidrogenasi.
- L'accettore di idrogeno è il **FAD** invece che il **NAD⁺** che viene usato nelle altre tre reazioni di ossido-riduzione del ciclo.
- Nella succinato deidrogenasi l'anello isoalloxazinicco del FAD è legato covalentemente alla catena laterale di un'istidina dell'enzima (E-FAD)



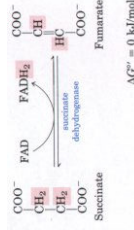
- Il FAD è l'accettore dell'idrogeno in questa reazione in quanto le modificazioni di energia libera sono insufficienti per ridurre il NAD⁺.
- Il FAD è quasi sempre l'accettore di elettroni nelle ossidazioni che rimuovono due atomi di idrogeno da un substrato.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Seminario

Ossidazione del succinato a fumarato

- Ossidazione articolare perchè i due elettroni derivano non da un legame singolo Carbono-Ossigeno (che porta alla formazione di un gruppo C = O), ma da due atomi di carbonio adiacenti, portando alla formazione di un legame doppio (C = C).
- L'ossidazione di un legame C – C libera meno energia dell'ossidazione di un legame C – O, non abbastanza da permettere il trasferimento di elettroni al NAD⁺ in modo esergonico.
- Perciò, l'accettore di elettroni di questa deidrogenazione non è il NAD⁺, ma un coenzima a minore energia, il Flavina Adenina Dinucleotide (FAD).
- Il FAD accetta due elettroni e due protoni per cui la forma ridotta è FADH₂.



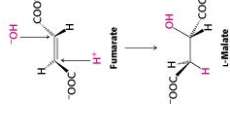
Succinato deidrogenasi

- E' una proteina che contiene **tre** differenti tipi di **centri ferro-zolfo** (Fe-S).
- Diversamente dagli altri enzimi del ciclo dell'acido citrico che sono proteine solubili nella matrice la SDH è **inserita nella membrana mitocondriale interna**.
- Di fatto, è **associata direttamente alla catena di trasporto degli elettroni, il collegamento tra il ciclo dell'acido citrico e la formazione di ATP**.
- IL FADH₂ formato dall'ossidazione del succinato non si dissocia dall'enzima, al contrario del NADH prodotto in altre reazioni di ossido-riduzione.
- Invece, due elettroni sono trasferito dal FADH₂ direttamente ai centri Fe-S dell'enzima.
- L'accettore finale di questi elettroni sarà l'ossigeno molecolare**.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Appunti sull'idratazione del fumarato a L-malato

Il passo seguente è l'idratazione del fumarato per formare L-malato.

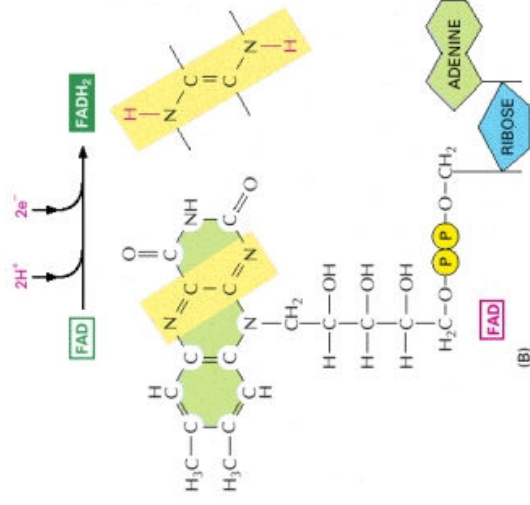
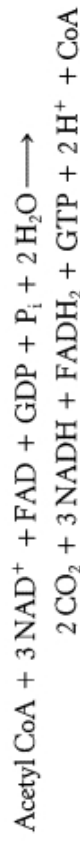


In seguito il malato è ossidato a ossaloacetato. La reazione è catalizzata dalla malato deidrogenasi, e il NAD^+ è di nuovo l'accettore di idrogeno



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Stechiometria del ciclo dell'acido citrico



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26882/figure/A306/?report=objectonly>

Riassunto delle reazioni (1)

1. **Due atomi di carbonio entrano** nel ciclo nel processo di condensazione di un'unità acetile (dall'acetil CoA) con l'ossaloacetato. **Due atomi di carbonio escono** dal ciclo sotto forma di CO_2 nelle decarbossilazioni successive, catalizzate dalla isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi.

- Dati con marcatura isotopica rivelano che **gli atomi di carbonio che entrano in ogni ciclo non sono quelli che lo abbandonano**.

Riassunto delle reazioni (2)

2. Quattro paia di atomi di idrogeno lasciano il ciclo in quattro reazioni di ossidazione. Due molecole di NAD^+ sono ridotte nella decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato e del α -chetoglutarato, una molecola di FAD è ridotta nell'ossidazione del succinato e una molecola di NAD^+ è ridotta nell'ossidazione del malato.
3. Un composto ad elevato potenziale di trasferimento del fosfato, di solito il GTP, viene generato nella scissione di un legame tioestere del succinil CoA.

Riassunto delle reazioni (3)

4. Sono consumate due molecole di acqua: una nella sintesi del citrato mediante l'idrolisi dell'acil CoA e l'altra nell'idratazione del fumarato.
- ✚ L'efficacia del ciclo dell'acido citrico può essere aumentata dalla **disposizione degli enzimi costituenti**. Ci sono sempre più prove sperimentali che **gli enzimi siano associati fisicamente uno all'altro per facilitare l'incanalamento del substrato fra i siti attivi**.
 - ✚ E' stato suggerito il nome di METABOLONE per definire tali complessi multienzimatici.

Ruolo dell'ossigeno nel ciclo dell'acido citrico

- ✚ L'ossigeno molecolare **non** partecipa direttamente al ciclo dell'acido citrico.
- ✚ Tuttavia, il ciclo opera soltanto in condizioni aerobiche perchè il **NAD^+** e il **FAD** possono venire **rigenerati nei mitocondri soltanto mediante il trasferimento di elettroni all'ossigeno molecolare**.
- ✚ Mentre la glicolisi si può svolgere sia in modo aerobico che anaerobico, **il ciclo dell'acido citrico è strettamente aerobico**.

Il ciclo dell'acido citrico genera elettroni ad alta energia

- ✚ Il ciclo dell'acido citrico converte gli atomi di carbonio dell'acetil CoA in **CO_2** che la cellula **elimina come prodotto di scarto**.
- ✚ Il punto molto importante è che tale **ossidazione genera elettroni ad alta energia, trasportati dalle molecole «carrier» attivate, NADH e FADH_2** .
- ✚ Questi **elettroni ad alta energia sono in seguito trasferiti alla membrana mitocondriale interna dove incontrano la catena di trasporto degli elettroni**.
- ✚ La perdita degli elettroni del NADH e del FADH_2 **rigenera il NAD^+** e il **FAD**, necessari per che il metabolismo ossidativo prossegua.