

Microscopia in fluorescenza

Mitocondri: fluorocromo **verde**.

Actina: Falloidina (veleno che si lega ed impedisce la depolimerizzazione dei microfilamenti di actina) collegata a **fluorocromo rosso**.

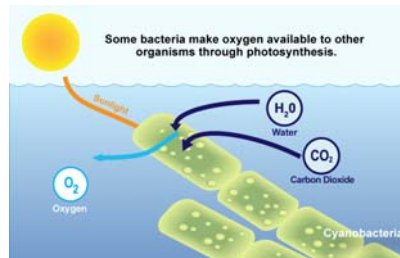
DNA: fluorocromo **azzurro**.

Mitocondri

Biotechnologie

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

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/images/fluorescencefigure6.jpg>



Alcuni batteri rendono disponibile l'ossigeno agli altri organismi tramite la fotosintesi

- ✦ I **cianobatteri fotosintetici** produttori **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 le associate attività metaboliche.
- ✦ Nelle cellule eucariotiche **l'ossidazione aerobica** viene svolta nei **mitocondri**.

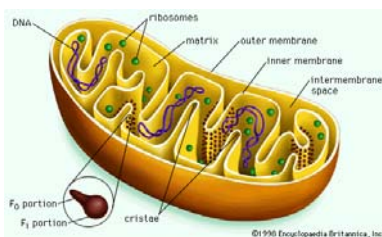
http://www.teachoceanscience.net/images/microbes_photosyn_bac_lge.png

Testo da Lodish et al., 7° ed.

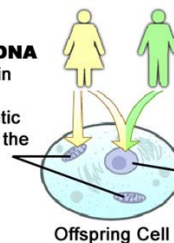
- L'ultrastuttura dei mitocondri riflette le funzioni che svolge: nella **matrice** si trovano gli **enzimi** responsabili dell'**ossidazione** degli **acidi grassi**, degli **aminoacidi** e dell'**acido piruvico** (derivato dalla glicolisi) nel ciclo di Krebs.
- Nella **membrana interna** stanno i sistemi 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** é 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.



Mitochondrial DNA (mtDNA) is found in cell mitochondria and contains genetic material only from the **mother**.



Nuclear DNA (nuDNA) is found in the cell nucleus and contains genetic material from **both parents**.

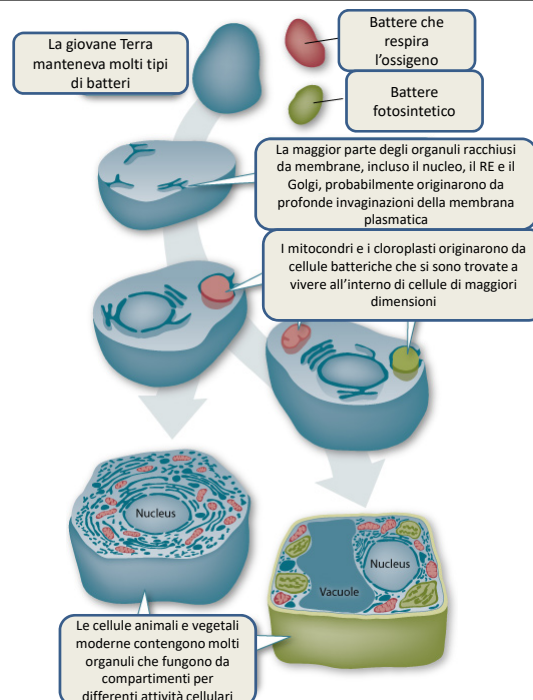
<https://media1.britannica.com/eb-media/89/22489-004-EE9DC4F5.jpg>
<https://naturalishistoria.files.wordpress.com/2013/02/nuclear-mtdna-diagram.jpg>

Ipotesi endosimbiontica

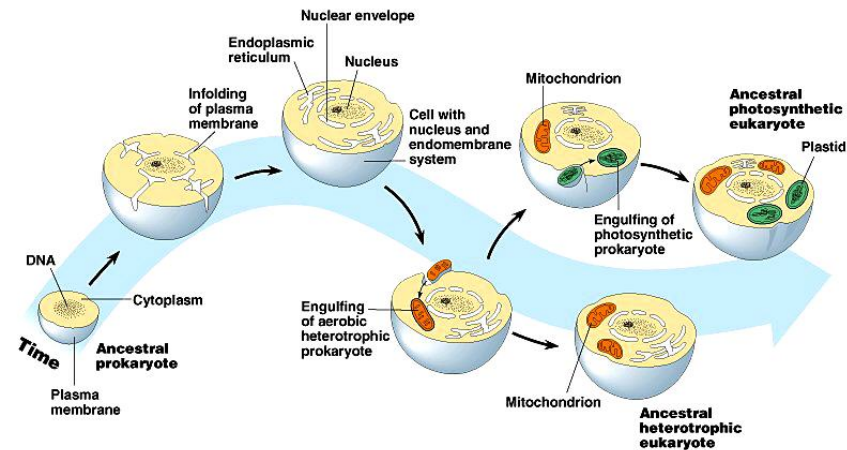
E' da molto che i biologi si sono resi conto delle somiglianze fra diversi organelli delimitati da membrane e certi batteri. In particolare, una delle somiglianze più note è quella tra i cloroplasti e i cianobatteri carichi di clorofila. Allo stesso modo è stata notata la somiglianza fra i mitocondri 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 un 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.

Teoria endosimbiontica

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



Teoria endosimbiontica

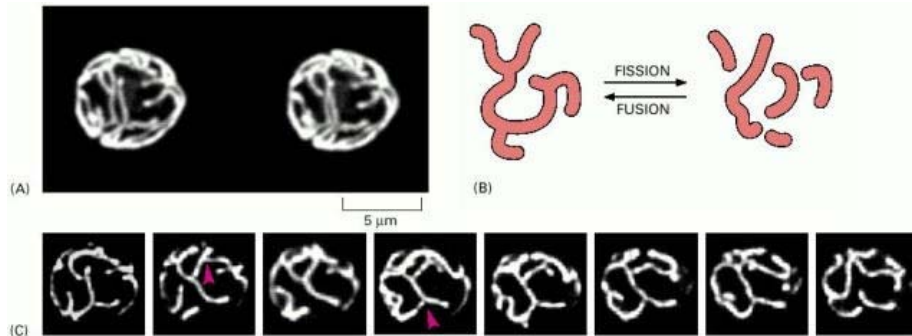


<http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/28.4.gif>

Dinamica dei mitocondri

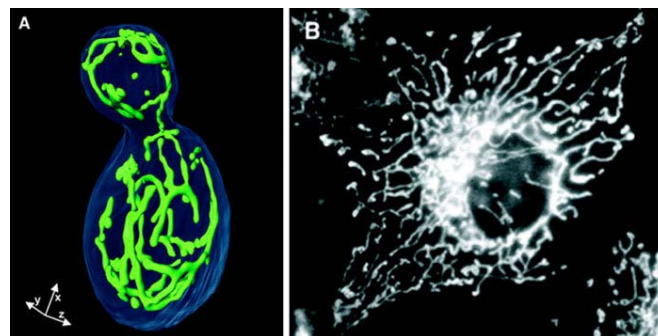
- ✚ I **mitocondri** sono **strutture altamente dinamiche**: subiscono frequenti processi di **fissione** e **fusione** che generano **reti tubulari spesso ramificate**, che potrebbero spiegare la grande diversità di morfologie dei mitocondri osservate in diversi tipi cellulari.
- ✚ Quando i singoli mitocondri si fondono ciascuna delle due membrane si fonde (interna con interna, esterna con esterna) e ciascuno dei due compartimenti interni si connettono (matrice con matrice, spazio intermembrana con spazio intermembrana).
- ✚ La **fusione** e la **fissione** appaiono giocare 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/>

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 e visualizzati al microscopio confocale.
- (B) Rete mitocondriale di un fibroblasto di scimmia africana marcata con fluorocromo (microscopio in fluorescenza)

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

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

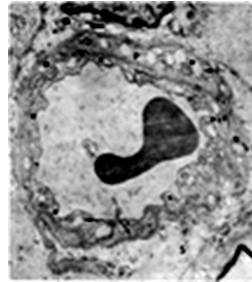
ECCEZIONE IMPORTANTE

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

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

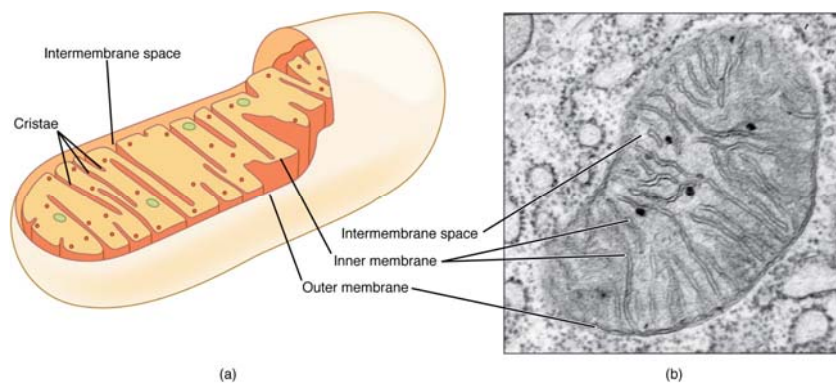


<http://humanphysiology.wikispaces.com/05-Hematology>



http://thejns.org/na101/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.fig007.gif

Membrane mitocondriali



http://oerpub.github.io/epubjs-demo-book/resources/0315_Mitochondrion_new.jpg

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** in regioni strettamente affiancate delle due membrane.
 - **Creste mitocondriali**: si estendono verso l'interno dell'organello; contengono in particolare le proteine della catena respiratoria e l'ATP sintasi.
- ✚ La membrana delimitante interna e le creste sono collegate da sottili connessioni – **giunzioni delle creste**.

Adattata da: Karp G.: *Biologia Cellulare e Molecolare: Concetti ed Esperimenti*, EdiSES, IV ed., 2010; Smith & Wood, *Cell Biology*, 2nd ed., Stanley Thornes, 1999.

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 soltanto 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 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.

Seminario

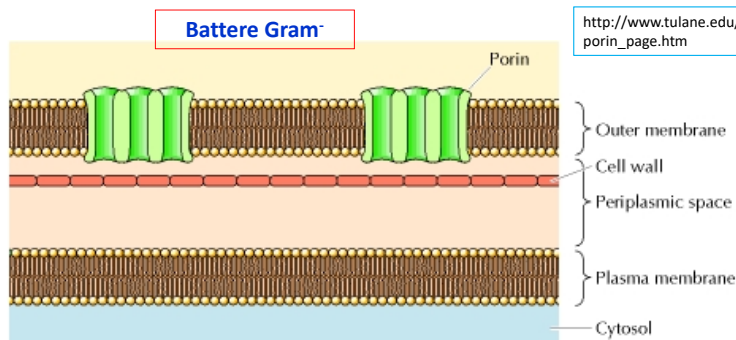
Membrana mitocondriale esterna – [2]

- Contiene diversi enzimi quali la NADH/citocromo *b5* ossidoreduttasi, la monoamina 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 la «**Sorting and Assembly Machinery; SAM**» (macchinario per lo smistamento e l'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].

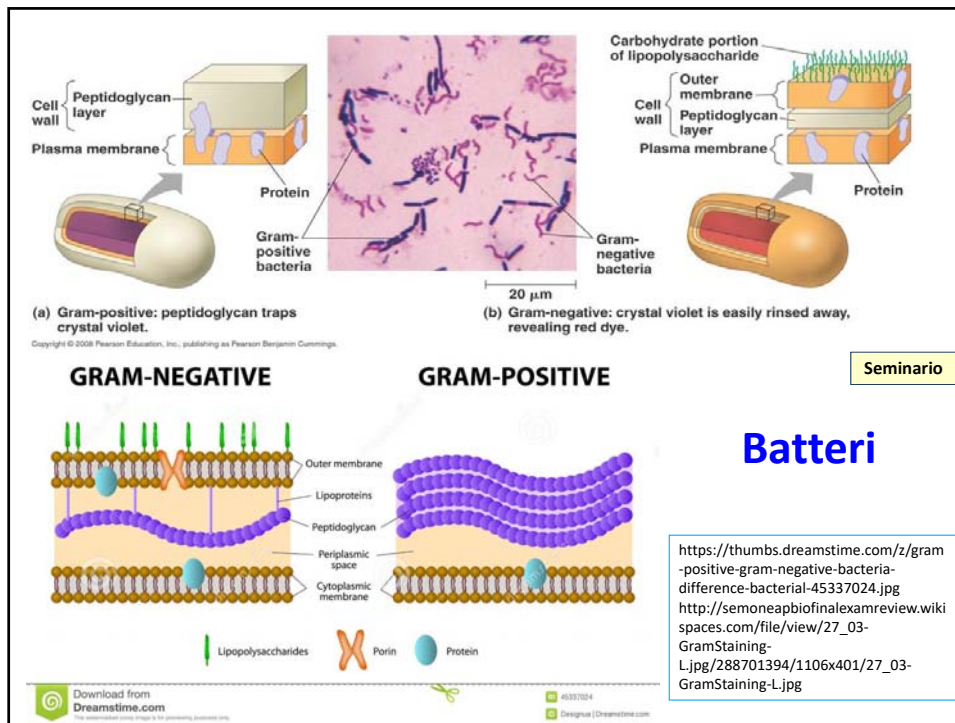
Porine

Presenti sia nella membrana esterna dei batteri Gram negativi 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/>



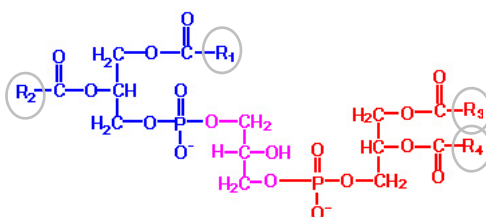
Membrana mitocondriale interna – [1]

- ✦ Praticamente **priva di colesterolo**, ha un **elevato rapporto lipidi insaturi/lipidi saturi (elevata fluidità)**
- ✦ Ricca di un lipide inusuale, il difosfatidilglicerolo, detto anche **cardiolipina**.
 - La **cardiolipina**, che ha una bassa concentrazione nella membrana mitocondriale esterna, costituisce circa il 20% del contenuto totale di lipidi della membrana interna.
- ✦ La sua **elevata fluidità** permette una **mobilità laterale elevata dei complessi proteici coinvolti nel 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 – [1]



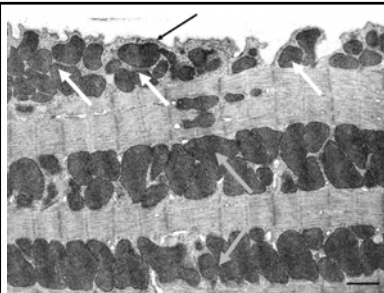
- La **cardiolipina** (difosfatidilglicerolo) è un lipide particolare, molto concentrato sia nella **membrana mitocondriale interna**, che nella membrana plasmatica dei batteri, ossia in **membrane coinvolte nella trasduzione di energia**.



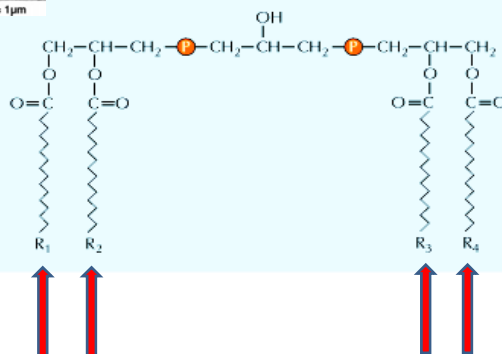
La cardiolipina è un **“doppio” fosfolipide inusuale**, che contiene **quattro catene di acidi grassi**

http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/phospholipids.htm
<https://avantlipids.com/images/3dc/710335.gif>

Cardiolipina – [2] (difosfatidilglicerolo)



Muscolo cardiaco,
ricco di mitocondri

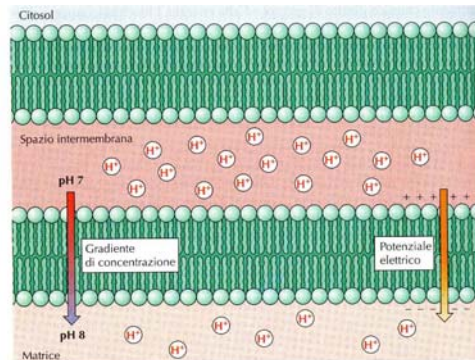


Seminario

<https://d2npw7jqx38emt.cloudfront.net/content/cardiovascres/88/1/40/F1.large.jpg>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/figure/A1636/>

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>
<https://avantilipids.com/images/3dc/710335.gif>

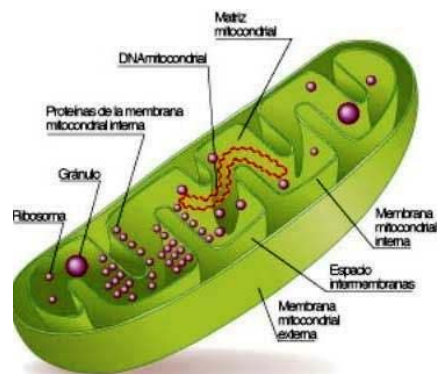
Membrana mitocondriale interna - [2]

- 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 (complesso V)**
 - 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 richiesti 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

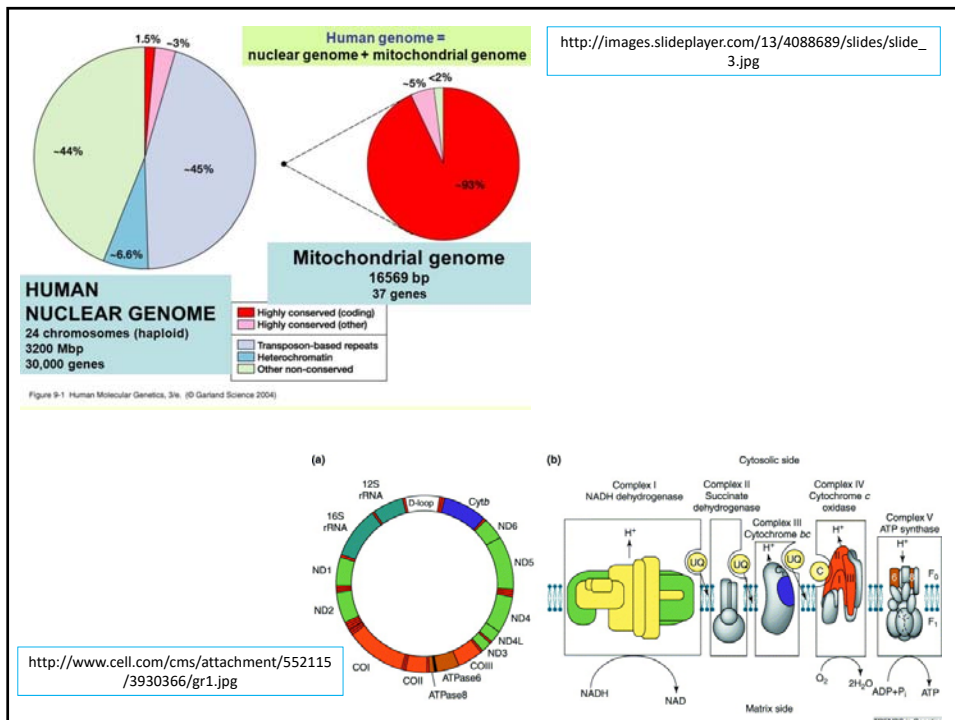
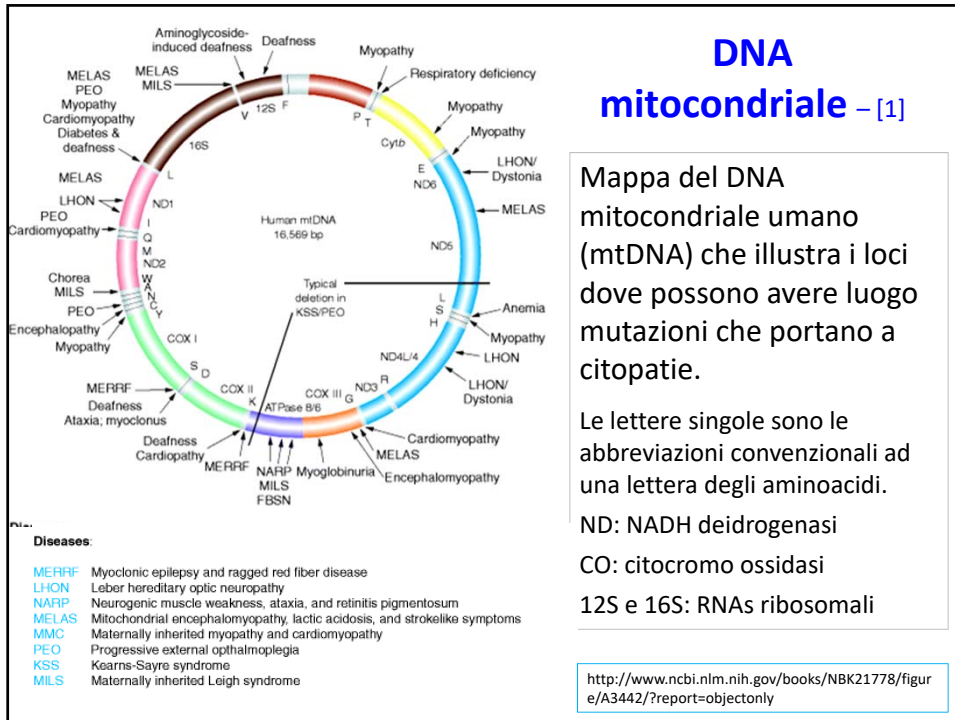
✚ Matrice:

- Consistenza di gel, dovuta all'elevata concentrazione di proteine idrosolubili (< 500 mg/ml).
- Contiene diversi **enzimi**, in particolare tutti quelli che **catalizzano i vari passi del ciclo degli acidi tricarbossilici** (ciclo di Krebs, ciclo dell'acido citrico) (tranne uno, la Succinato deidrogenasi, SDH, che è presente sul versante della membrana mitocondriale interna rivolto verso la matrice)
- 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.



Mitocondri

DNA MITOCONDRIALE



DNA mitocondriale – [2]

Subunit
nDNA-encoded
mtDNA-encoded

Complex	nDNA-encoded	mtDNA-encoded
Complex I	4	7
Complex II	4	0
Complex III	10	1
Complex IV	10	3
Complex V	12	2

La **catena respiratoria mitocondriale**. Le subunità codificate dal **DNA-nucleare** sono in viola, mentre le subunità codificate dal **mtDNA** sono in fucsia. 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 codificate 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/>

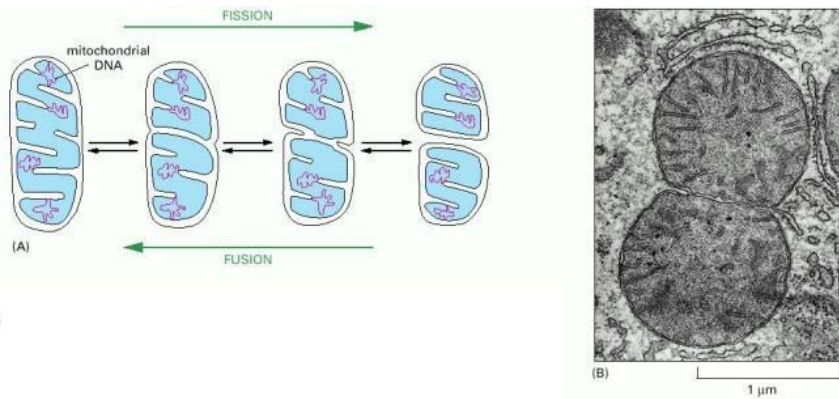
26 MAY 2016 | VOL 533 | NATURE | 499

Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs

Mary T. Couvillion¹, Iliana C. Soto¹, Gergana Shipkovenska¹ & L. Stirling Churchman¹

Oxidative phosphorylation (OXPHOS) is a vital process for energy generation, and is carried out by complexes within the mitochondria. OXPHOS complexes pose a unique challenge for cells because their subunits are encoded on both the nuclear and the mitochondrial genomes. Genomic approaches designed to study nuclear/cytosolic and bacterial gene expression have not been broadly applied to mitochondria, so the co-regulation of OXPHOS genes remains largely unexplored. Here we monitor mitochondrial and nuclear gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during mitochondrial biogenesis, when OXPHOS complexes are synthesized. We show that nuclear- and mitochondrial- encoded OXPHOS transcript levels do not increase concordantly. Instead, mitochondrial and cytosolic translation are rapidly, dynamically and synchronously regulated. Furthermore, cytosolic translation processes control mitochondrial translation unidirectionally. Thus, **the nuclear genome coordinates mitochondrial and cytosolic translation to orchestrate the timely synthesis of OXPHOS complexes**, representing an unappreciated regulatory layer shaping the mitochondrial proteome. Our whole-cell genomic profiling approach establishes a foundation for studies of global gene regulation in mitochondria.

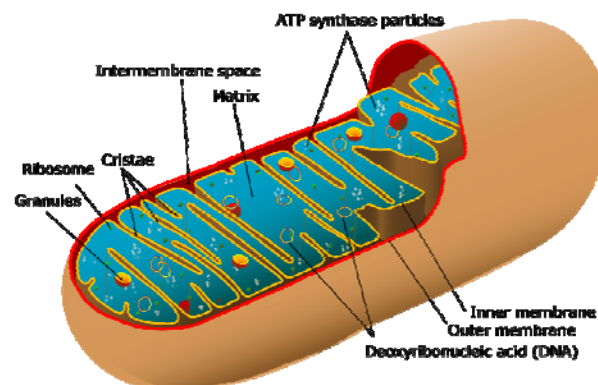
Fissione e fusione dei mitocondri



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

Spazio intermembrane

- Contiene proteine coinvolte nella morte cellulare programmata (apoptosi).



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0c/Animal_mitochondrion_diagram_en_%28edit%29.svg/2000px-Animal_mitochondrion_diagram_en_%28edit%29.svg.png

Tre gruppi di reazioni in regioni distinte dei mitocondri – [1]

✚ **MATRICE** (*+ complesso succinico deidrogenasi, SDH, che si trova nella membrana mitocondriale interna, rivolto verso la matrice):

- Ossidazione del piruvato e degli acidi grassi a CO_2
- Riduzione dei coenzimi NAD^+ a NADH e di FAD a FADH_2 (*, nella SDH)

Tre gruppi di reazioni in regioni distinte dei mitocondri – [2]

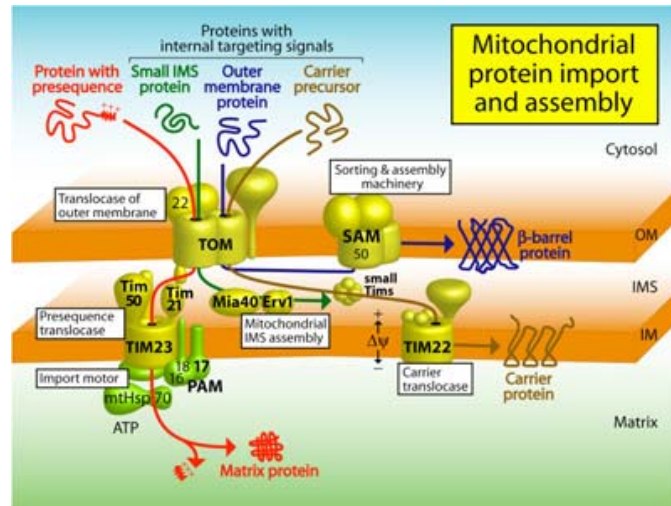
✚ **MEMBRANA MITOCONDRIALE INTERNA:**

- Trasporto di elettroni dal NADH e dal FADH_2 all' O_2
- Accoppiato alla creazione di **FORZA PROTON-MOTRICE** (gradiente protonico) attraverso la membrana mitocondriale interna.

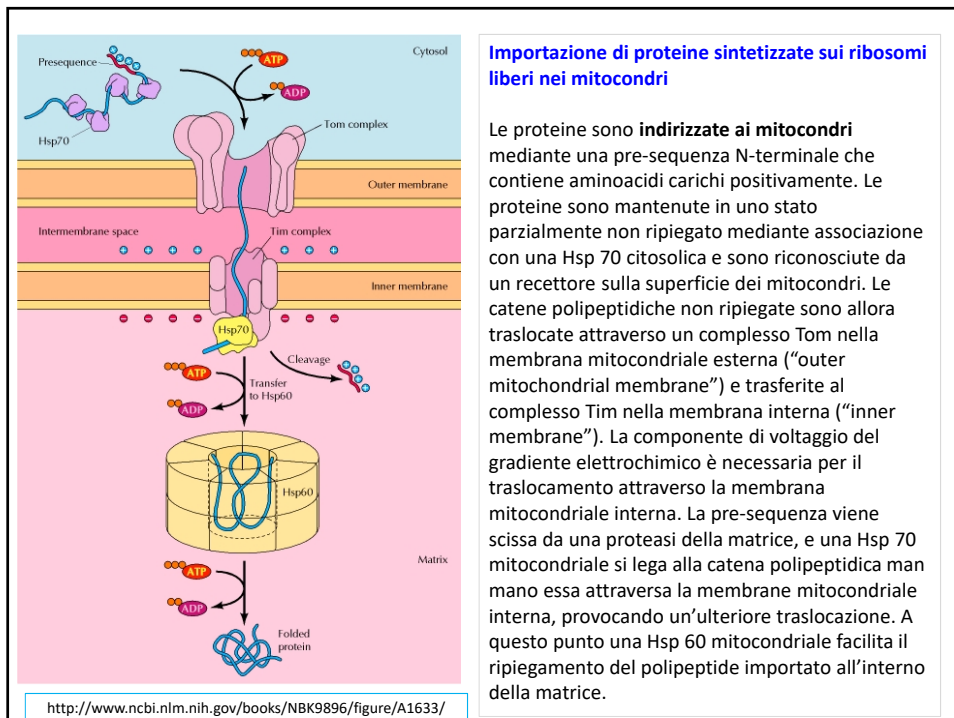
✚ **COMPLESSO F_0F_1 SULLA MEMBRANA INTERNA:**

- Utilizzazione dell'energia accumulata nel gradiente protonico per la sintesi dell'ATP.

Importazione delle proteine codificate dal genoma nucleare e tradotte in ribosomi liberi nel citosol, nei mitocondri



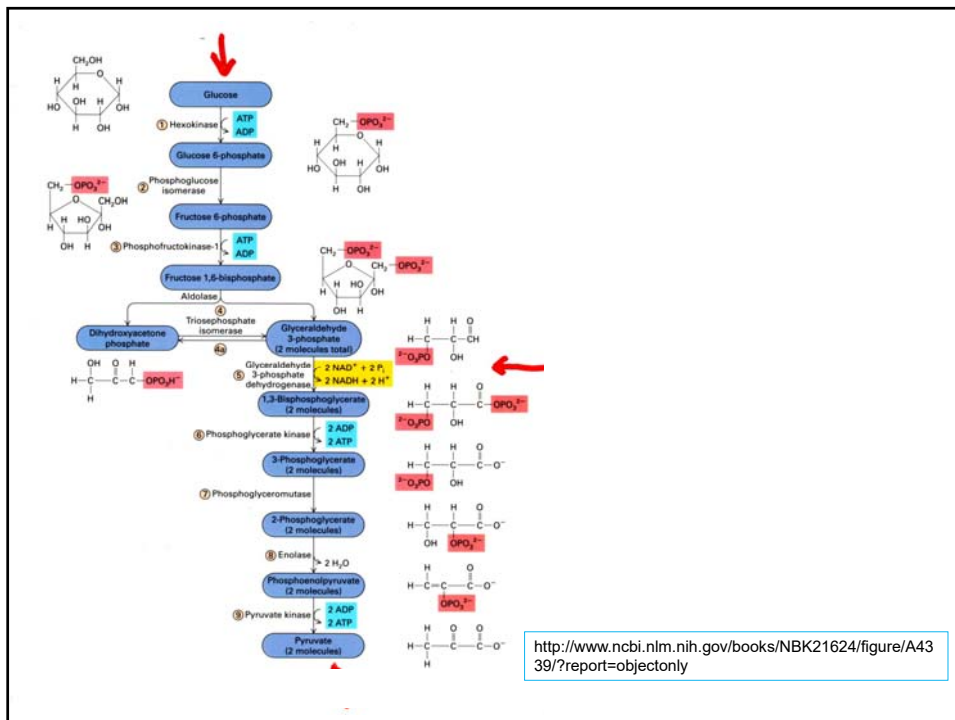
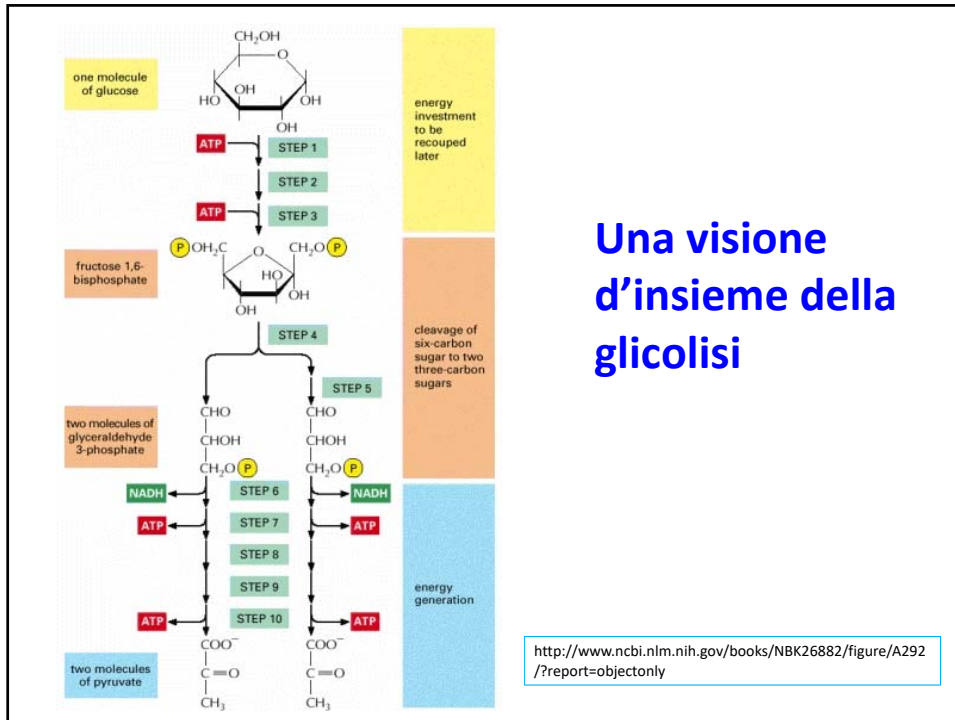
http://www.cnrs-gif.fr/cgm/dujardin/images/bg_import.jpg

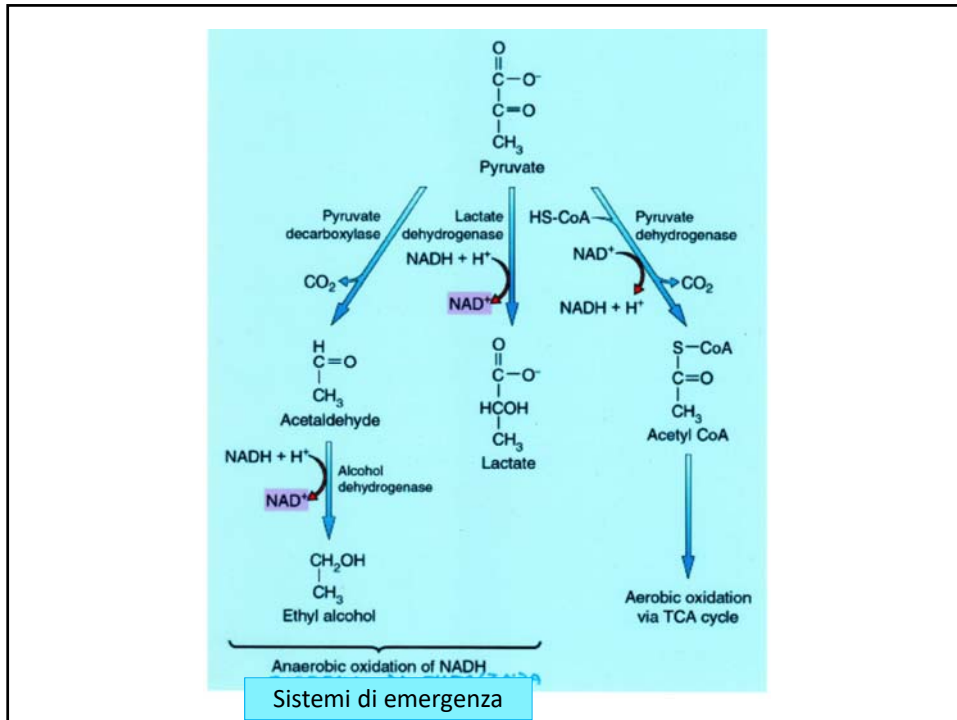


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/figure/A1633/>

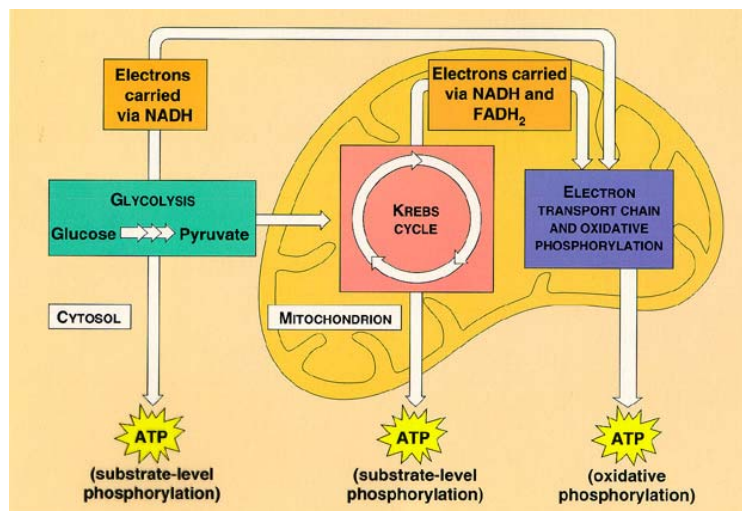
Importazione di proteine sintetizzate sui ribosomi liberi nei mitocondri

Le proteine sono **indirizzate ai mitocondri** mediante una pre-sequenza 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 traslocate 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 pre-sequenza 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.

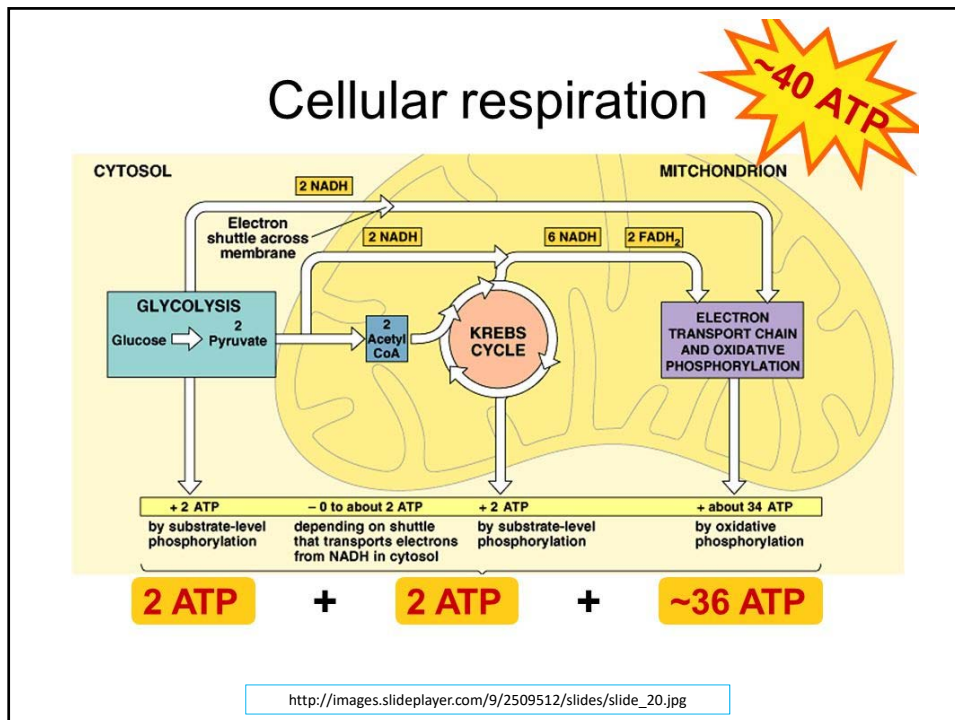




Processi metabolici nei mitocondri



<http://site.lps.org/sputnam/Biology/U4Metabolism/krebs.jpg>



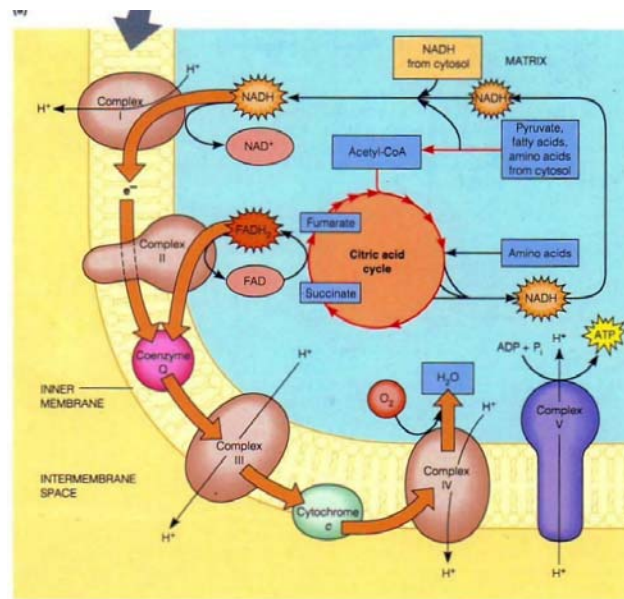
Conversione di energia – [1]

- ✦ Mediante una serie di reazioni che si svolgono nel **citioso** (**GLICOLISI**), l'energia derivata dalla **parziale ossidazione delle molecole di carboidrati** a piruvato 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 delle molecole di cibo.

Conversione di energia – [2]

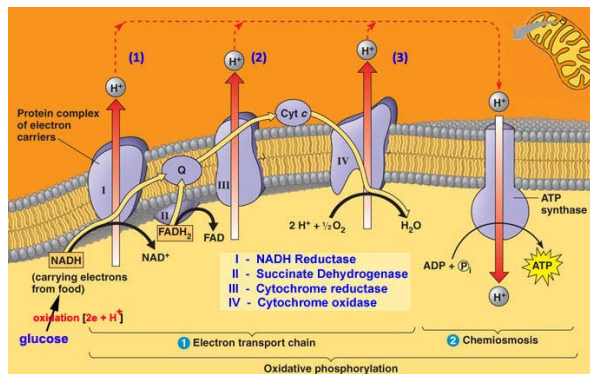
- ✚ Nei **procarioti** la **membrana che viene utilizzata per produrre ATP** è la **membrana plasmatica**.
- ✚ Negli **eucarioti**, la membrana plasmatica è riservata ad altri processi di trasporto.
- ✚ Vice-versa, **membrane specializzate all'interno di organelli** in grado di convertire energia, sono 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 dei 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.

Produzione di energia nei mitocondri



Accoppiamento chemiosmotico – [1]

- ✚ Meccanismo comune usato dai mitocondri, cloroplasti e procarioti per ricavare energia.
- ✚ Collegamento funzionale tra le **reazioni per formare legami chimici** che generano l'ATP ("chemio") e i **trasporti di membrana** ("osmotico").

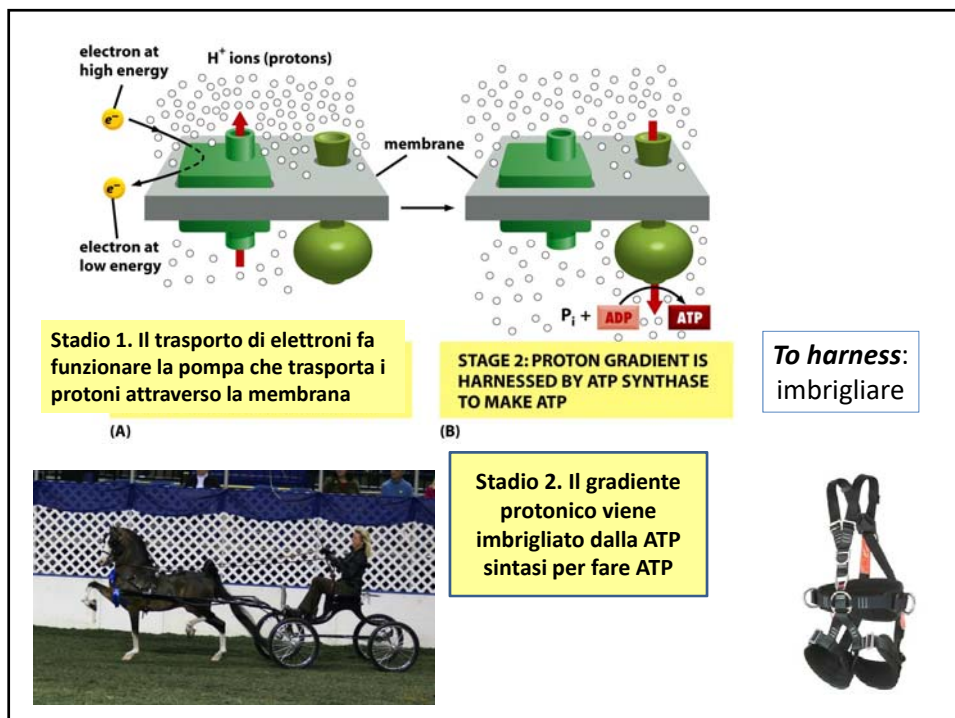


Accoppiamento chemiosmotico – [2]

- ✚ 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**. Questo trasferimento 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 refluire attraverso la membrana lungo il loro gradiente elettrochimico**].

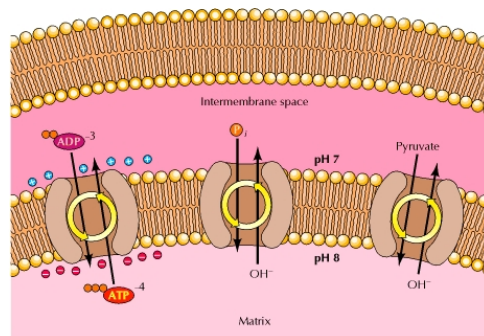
Accoppiamento chemiosmotico – [3]

- **Passo 2: I protoni H^+ ritornano 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)**. L'ATP sintasi, enzima ubiquitario, può essere paragonata ad una turbina, in cui l'energia associata al gradiente protonico è sfruttata per portare alla produzione di ATP.



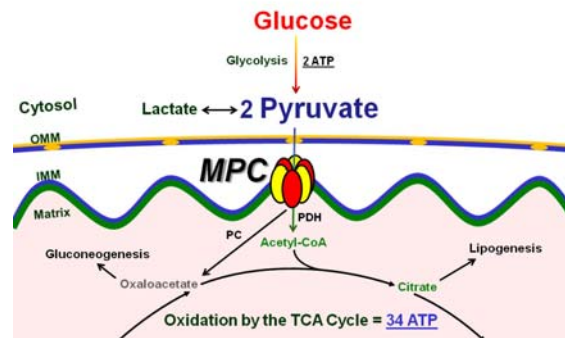
MOVIMENTO DEL PIRUVATO DAL CITOSOL VERSO LA MATRICE MITOCONDRIALE – [1]

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



Co-trasporto del piruvato o trasportatore specifico?

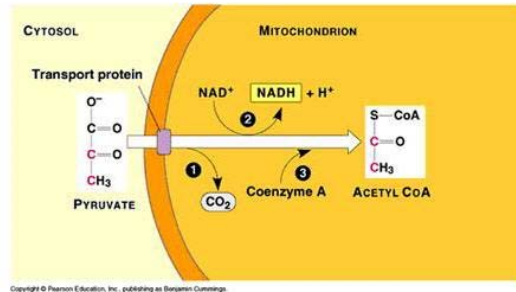
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/figure/A1650/>



Nel citosol, una singola molecola di **glucosio** è ossidata mediante glicolisi a due molecole di **piruvato**. Il piruvato diffonde passivamente attraverso i pori della membrana mitocondriale esterna («outer mitochondrial membrane», OMM) ma necessita di transitare attraverso il **trasportatore mitocondriale per il piruvato** («mitochondrial pyruvate carrier», **MPC**) per attraversare la membrana mitocondriale interna («inner mitochondrial membrane», IMM) e raggiungere la matrice mitocondriale. Una volta raggiunta la matrice, il piruvato può essere ossidato a CO_2 dal ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) producendo ATP ed estraendo la maggior parte dell'energia disponibile nella molecola di glucosio originaria. Il piruvato mitocondriale è inoltre il principale substrato che per i processi anabolici della gluconeogenesi e della lipogenesi.

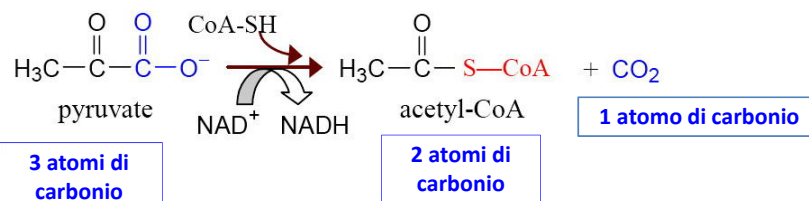
<https://www.medicine.uiowa.edu/biochem/labs/taylor/>

MOVIMENTO DEL PIRUVATO DAL CITOSOL VERSO LA MATRICE MITOCONDRIALE - [2]



Il complesso della piruvato deidrogenasi

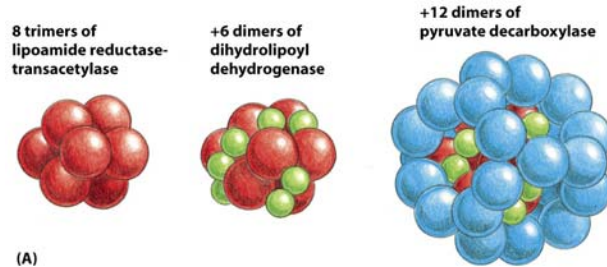
Pyruvate Dehydrogenase



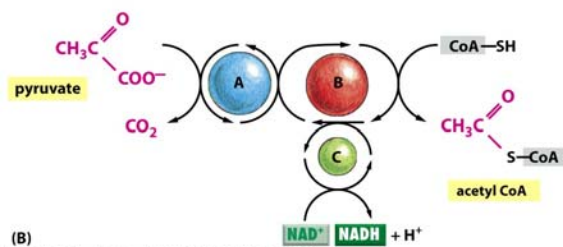
- Le molecole di **piruvato** prodotte nella glicolisi sono **trasportate** attraverso la membrana mitocondriale interna **verso la matrice**, dove vengono **decarbossilate** per formare un **gruppi acetile**, con **2 atomi di carbonio** (-CH₃COO₂).
- Il gruppo acetile in seguito forma un complesso con il coenzima A per formare **acetil-CoA**:

$$\text{Piruvato} + \text{HS-CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetil CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$
- La decarbossilazione del piruvato e 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 a CO₂ (matrice mitocondriale)



(A)

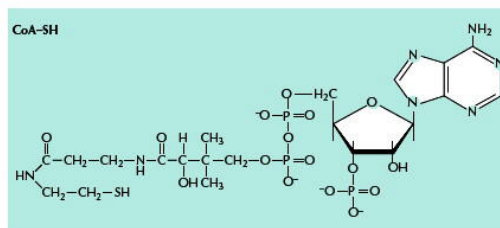
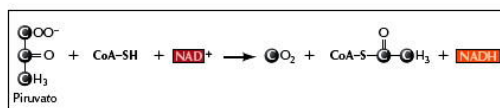


(B)

Figure 2-79 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

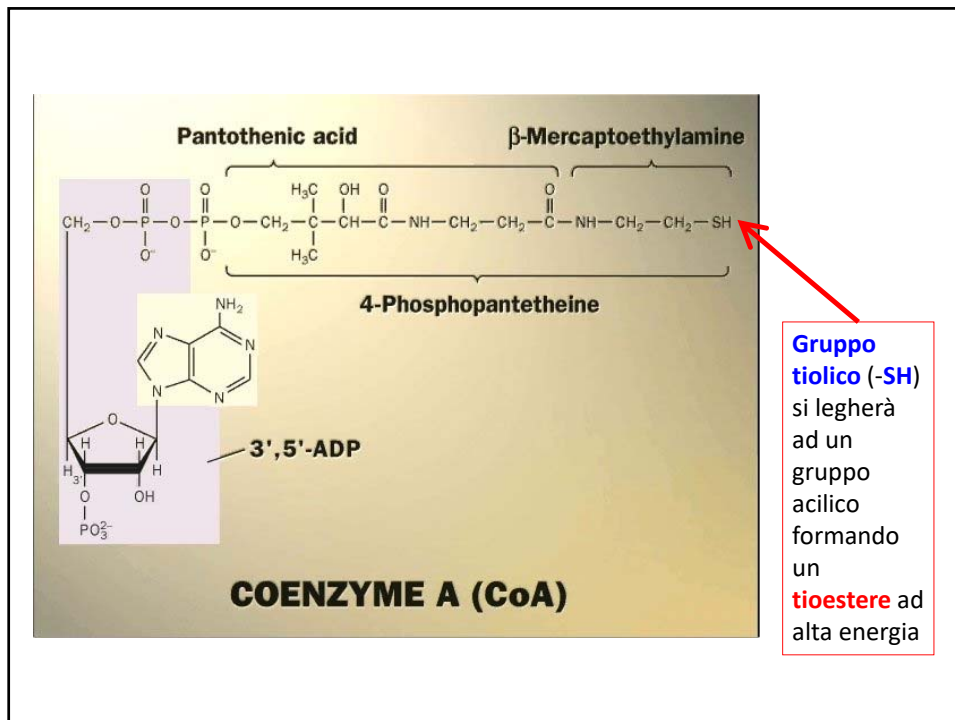
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26882/figure/A301/?report=objectonly>

Decarbossilazione ossidativa del piruvato (matrice mitocondriale)

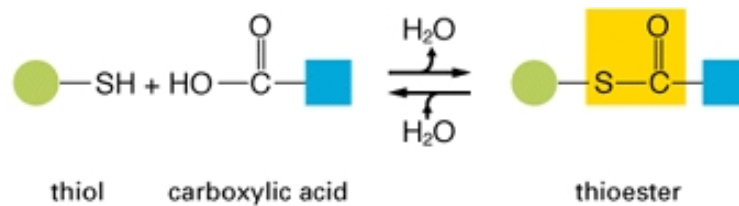


✚ Il **piruvato** viene convertito in **CO₂** (decarbossilato) e in **acetilCoA**, in un processo che produce anche una molecola di **NADH**.

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



Legame tioesterico ad alta energia



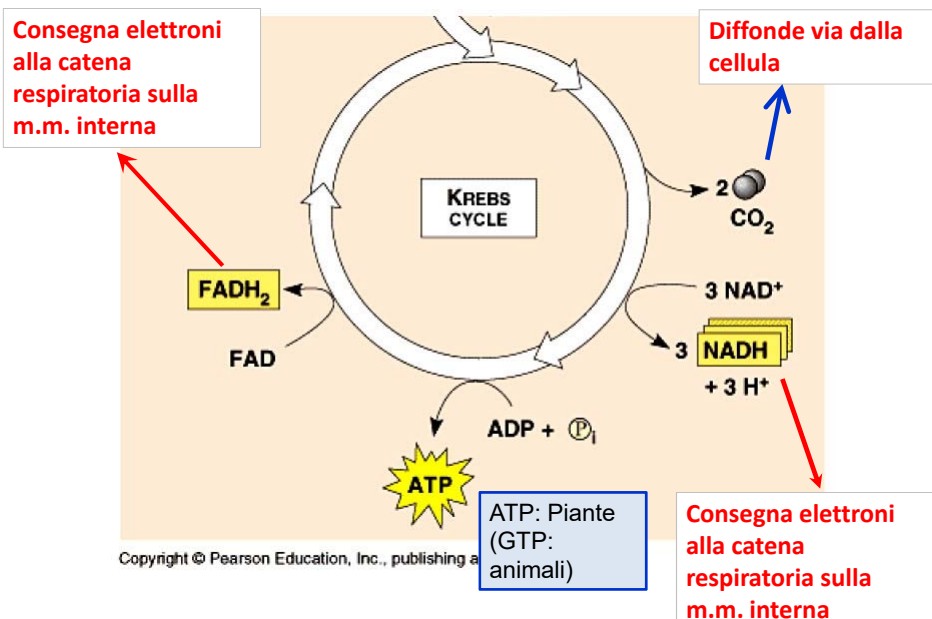
- ⚡ L'idrolisi di un legame **tioesterico** rilascia molto più energia dell'idrolisi di un legame esterico.
- ⚡ Ad esempio, il ΔG° per l'idrolisi del succinil CoA (ciclo di Krebs) è di circa -8 kcal mol^{-1} ($-33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$), **paragonabile a quello dell'idrolisi dell' ATP** ($-7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, o $-30.5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

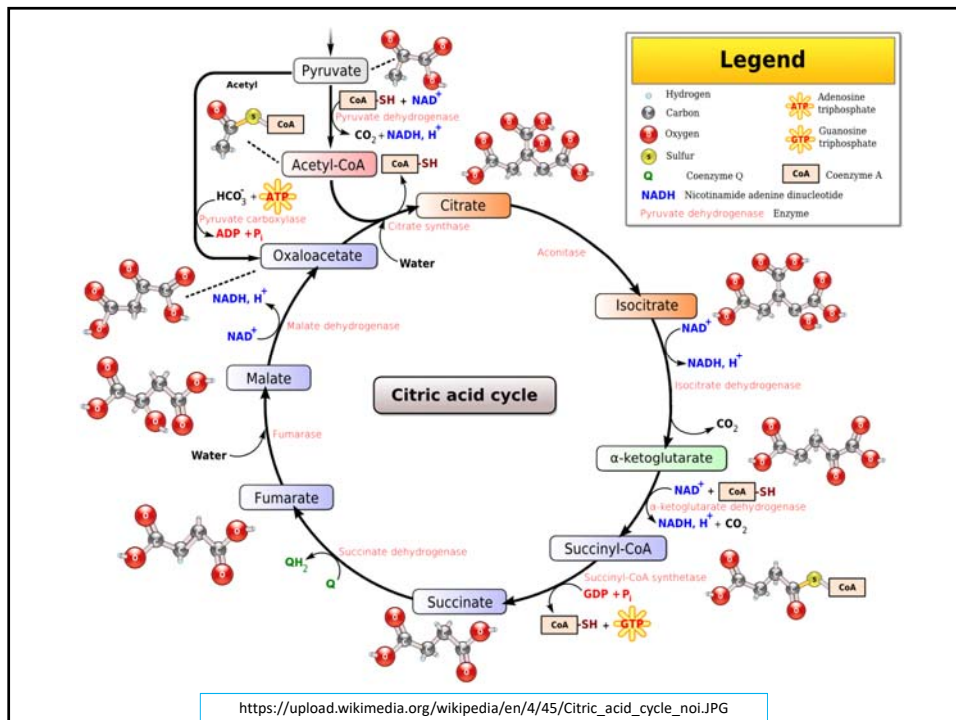
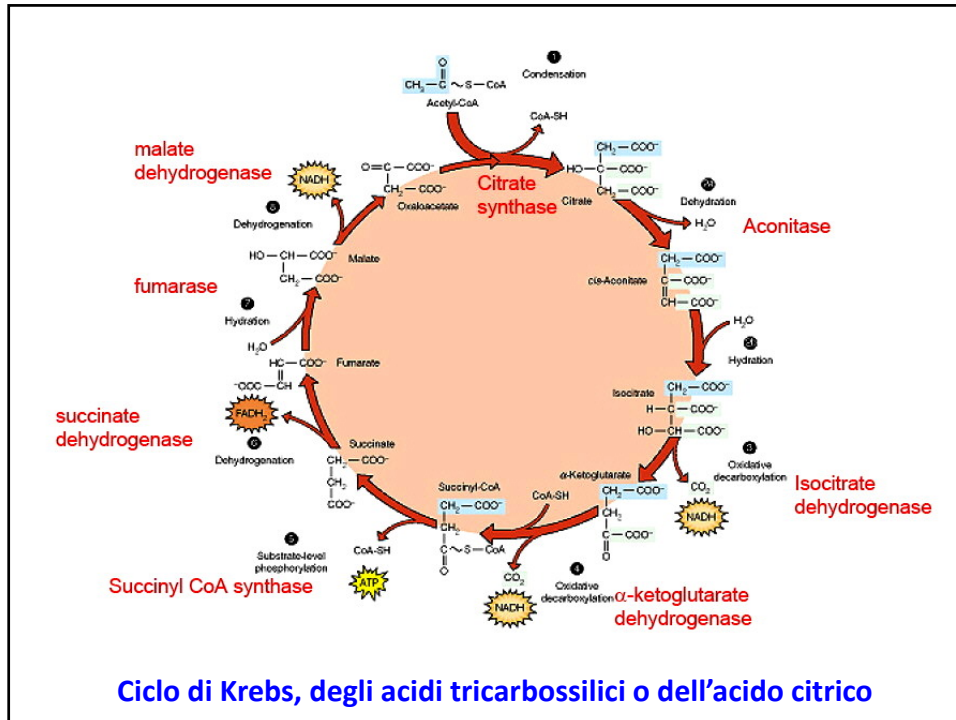
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28340/figure/A32/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Funzioni del ciclo di Krebs

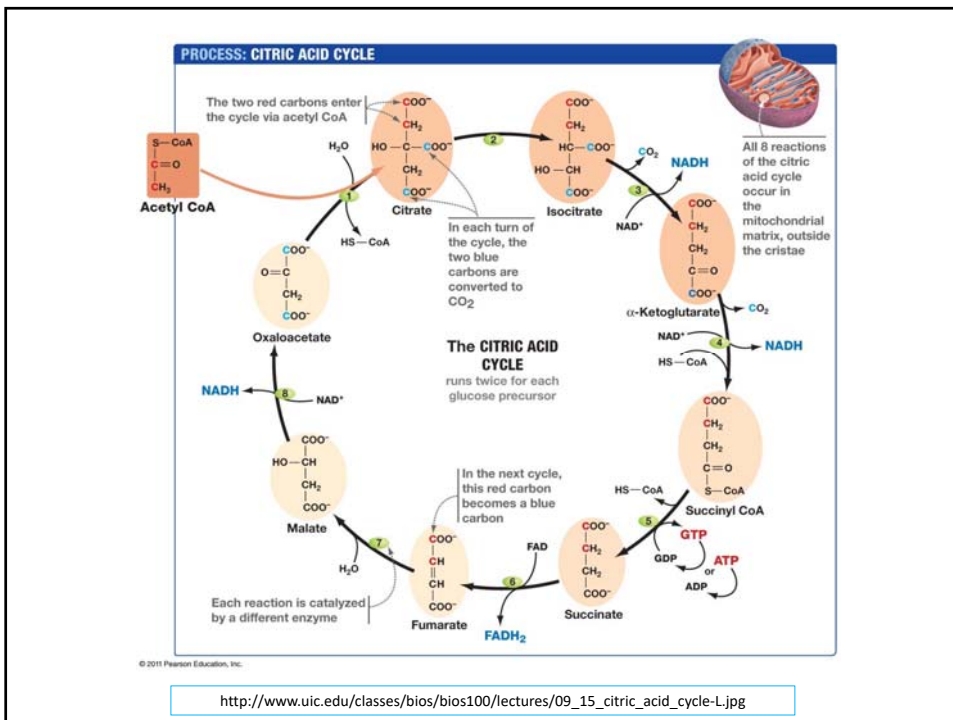
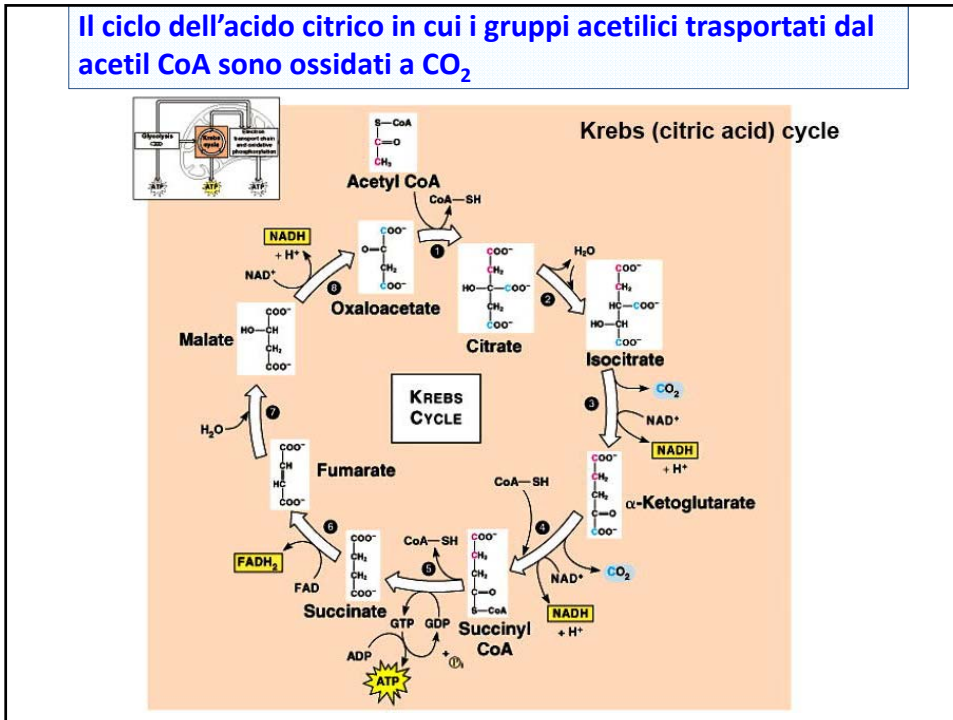
- ✚ Permette alla cellula di ossidare i prodotti del **catabolismo** degli **zuccheri** (**GLICOLISI**), dei **lipidi** e delle **proteine**.
- ✚ I prodotti sono **CO₂**, **trasportatori temporanei di elettroni ridotti** (**NADH**, **FADH₂**) e **fosfato ad alta energia** (in GTP o ATP).
- ✚ Diverse reazioni di questo ciclo sono inoltre utilizzate in processi **anabolici** quale la **gluconeogenesi** (sintesi del glucosio) e in **processi coinvolti nel metabolismo dell'azoto**.

I prodotti significativi del ciclo di Krebs





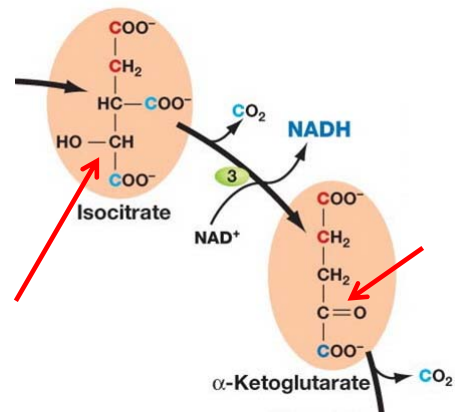
Il ciclo dell'acido citrico in cui i gruppi acetilici trasportati dal acetil CoA sono ossidati a CO₂



Perchè nelle ossidazioni si formano due tipi diversi di coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)? – [1]

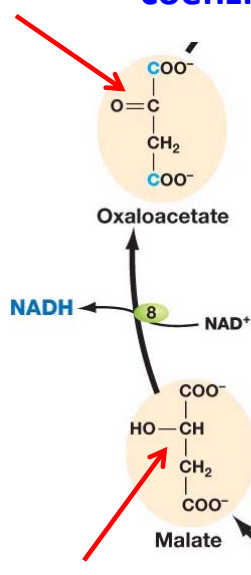
Quando la rimozione di elettroni viene fatta da un **legame fra Carbonio e Ossigeno** sulla stessa molecola, o da un legame fra un atomo di Carbonio e un atomo di Zolfo tra due molecole collegate, viene **rilasciata una quantità di energia sufficiente per trasferire gli elettroni al NAD⁺ in modo esergonico**.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

Ossidazione di legame C – O



Becker, 2014

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



Ossidazione di legame C – O

Becker, 2014

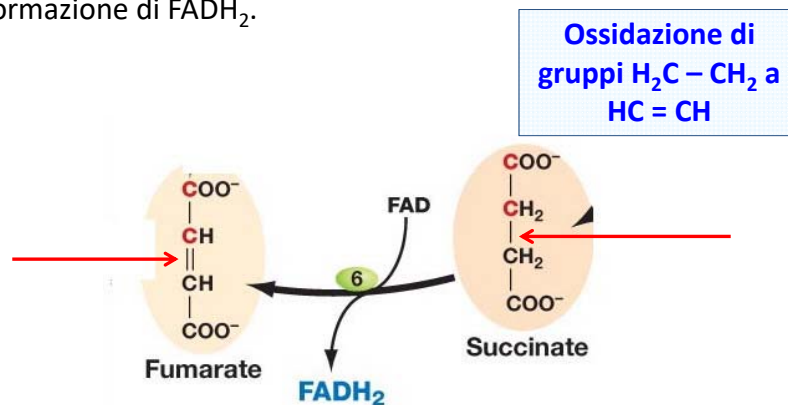
Perchè nelle ossidazioni si formano due tipi di coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)? – [3]

- ✚ Quando invece 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, energia che non è sufficiente per ridurre il NAD⁺ in modo esergonico. Invece l'accettore di elettroni in questa deidrogenazione è un **coenzima a minore energia**, il Flavina Adenina Dinucleotide (FAD).
- ✚ Il FAD accetta due elettroni e due protoni: forma ridotta FADH₂.

Becker, 2014

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

- ✚ Esempio di reazione di deidrogenazione che porta alla formazione di FADH₂.



Becker, 2014

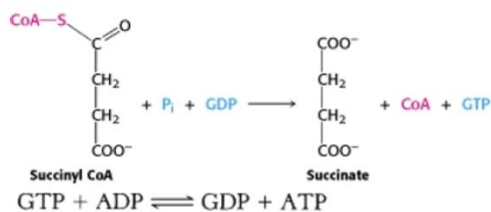
Come è possibile la formazione di GTP (ATP) nel ciclo di Krebs? – [1]

- ✚ 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} ($-33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$), paragonabile a quella dell'idrolisi dell'ATP ($-7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, o $-30.5 \text{ kJ mol}^{-1}$).
 - ☀ 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 (quattro atomi di carbonio) e dal frammento a due atomi di carbonio legato al CoA.

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

Come è possibile la formazione di GTP(ATP) nel ciclo di Krebs? – [2]

- ☀ **Invece, la scissione del legame tioesterico del succinil CoA fornisce energia per la fosforilazione di una purina nucleoside difosfato**, di solito GDP.
- ☀ Questa reazione è catalizzata dalla succinil CoA sintetasi (succinato tiochinasi).
- ☀ 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/>

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'ossalacetato. **Due atomi di carbonio escono** dal ciclo sotto forma di CO₂ 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** in quello stesso ciclo.

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'citril CoA e l'altra nell'idratazione del fumarato.
- ✚ L'efficacia del ciclo dell'acido citrico può essere aumentata dalla **disposizione spaziale degli enzimi costituenti**. Ci sono sempre più prove sperimentali che **gli enzimi sono 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 anerobico, **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 **CO₂** che la cellula **elimina come prodotto di scarto**.
- ✚ Il punto molto importante è che tale **l'ossidazione genera elettroni ad alta energia, trasportati dalle molecole «carrier» attivate, NADH e FADH₂**.
- ✚ 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 FADH₂ **rigenera il NAD⁺** e il **FAD**, necessari per che il metabolismo ossidativo prossegua.