

3) RAPPORTI FRA STRUTTURA ED ATTIVITA' MITOCONDRIALE

Prima di valutare i rapporti fra la struttura mitocondriale e le attività enzimatiche che portano alla liberazione aerobica di energia, è necessario effettuare una distinzione più generale che separi questo meccanismo aerobico dalla liberazione anaerobica di energia a livello del citoplasma fondamentale dove sono inclusi i mitocondri. Ricordiamo che, per ragioni di semplicità, verrà qui usata la dizione di « citoplasma » per indicare il mezzo cellulare in cui sono immersi i mitocondri, anche se, più correttamente, sarebbe da usarsi la dizione di « ialoplasma » o di « citoplasma fondamentale ».

Un concetto biologico generale indica che esistono degli organismi che sono strettamente anaerobici, ossia possono vivere in totale assenza di O_2 . Questi organismi sono in numero molto limitato, giacché la più parte dei soggetti viventi è capace di liberare energia sia in assenza che in presenza di O_2 : organismi facoltativi. In assenza di O_2 , essi sono in grado di liberare energia (E) da processi di fermentazione (glucosio \rightarrow 2 lattato + E), mentre in presenza di O_2 preferiscono ricorrere alla ossidazione (glucosio + $O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + E$). Filogeneticamente la fermentazione è stata probabilmente la prima fonte di energia degli organismi viventi, mentre solo più tardi è comparsa la capacità ad usare l' O_2 come ossidante; negli organismi facoltativi, la primitiva capacità fermentativa è rimasta, ma con un grado di flessibilità piuttosto scarso. In molti organismi, quale l'organismo umano, le tappe fermentative ed ossidative si susseguono l'una all'altra, svolgendosi la prima nel citoplasma fondamentale e la seconda nei mitocondri, come esemplificato nella Fig. 3.1 (dove le dimensioni dei costituenti sono ovviamente del tutto arbitrarie).

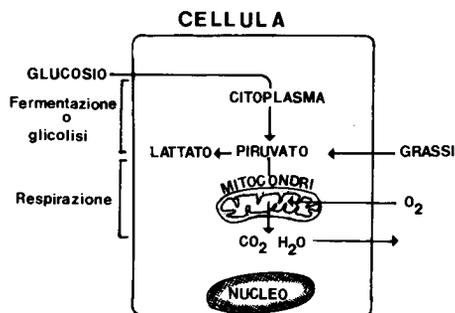


FIGURA 3.1

Quindi, anche se la prestazione si svolge in presenza di ossigeno, « una parte » del processo degradativo del glucosio avviene sempre in anaerobiosi (glucosio \longrightarrow 2 piruvato); se la prestazione si svolge in anaerobiosi, il processo degradativo avviene « solamente » mediante la glicolisi (glucosio \longrightarrow 2 lattato); in ogni caso questa seconda condizione può sussistere da sola unicamente come processo transitorio e di breve durata.

La capacità degli organismi inferiori di trarre energia dal glucosio solamente attraverso una completa via anaerobica si attua con vie diverse, e quindi con prodotti terminali diversi: glucosio \longrightarrow lattato; glucosio \longrightarrow alcool etilico; glucosio \longrightarrow acetone; glucosio \longrightarrow butanolo; glucosio \longrightarrow ac. acetico + alcool etilico, ecc.

In ogni caso, la glicolisi consiste in una sequenza di trasformazioni chimiche di varie molecole, ognuna delle quali è ossidata da un'altra: si tratta quindi di una sequenza ossido-riduttiva, durante la quale una parte dell'energia liberata è immagazzinata nel pool dei fosfati labili.

Non va poi dimenticata l'altra fonte energetica di primaria importanza per la prestazione, ossia i grassi (trigliceridi) i quali, come si vedrà, si inseriscono primariamente sia nel metabolismo glucidico (come glicerolo) che nelle attività mitocondriali (come acidi grassi).

La presente trattazione riguarda sostanzialmente la liberazione di energia a livello mitocondriale: verranno tuttavia esposte delle brevi note di bioenergetica delle attività citoplasmatiche che, come sopra detto, costituiscono la premessa biochimica della respirazione dei mitocondri. Per alcune terminologie usate nei capitoli seguenti, può essere utile consultare l'appendice A.1 « Elementi di bioenergetica »: ricordiamo comunque alcuni brevi concetti generali.

Un processo chimico trasformativo può essere scritto genericamente:



che indica che una sostanza A (detta « reagente ») dà origine a una sostanza B (detta « prodotto »), con una variazione di energia libera (ΔG) in più o in meno: questo processo procede fino ad un certo punto, per poi arrestarsi. Il punto di arresto è quello in cui la velocità di conversione di A in B può essere esattamente controbilanciata dalla conversione di B in A:



Vi è una costante che esprime questa condizione di equilibrio: K; la costante di equilibrio K è data dal rapporto $[B] / [A]$, dove le parentesi rappresentano le concentrazioni dei partecipanti A e B che sussistono al punto di equilibrio nel quale, ovviamente, la variazione di energia libera è nulla ($\Delta G = 0$). La $K = [B] / [A]$ è una costante fissa a specifiche condizioni di temperatura e pressione, senza che abbiano alcuna importanza le concentrazioni iniziali di ciascun partecipante. Queste considerazioni valgono anche quando

i partecipanti sono più di due: ad es. per $A + B \xrightleftharpoons{+ \Delta G} AB$ (dove $K = \frac{[AB]}{[A][B]}$) oppure

per $AB + CD \xrightleftharpoons{\pm \Delta G} AC + BD$ (dove $K = \frac{[AC][BD]}{[AB][CD]}$) ecc.

Per caratterizzare il ΔG , si usa convenientemente la sua valutazione in condizioni standard, ossia quando i partecipanti sono in concentrazione unitaria molare (ad es., quando una mole del reagente A è convertita in una mole di prodotto B): questa variazione standard di energia libera, che si indica con ΔG° , è largamente influenzata dalle condizioni in cui si svolge il processo, quali temperatura e pH. Per poter effettuare delle valutazioni comparative, si calcola in pratica il ΔG° , ossia la variazione standard di

energia libera a 25°C ed a pH = 7. È importante notare che la reazione $A \rightleftharpoons B$ può avvenire in presenza di un enzima che catalizza la reazione stessa; tuttavia ai fini del calcolo del ΔG° , ciò non ha alcuna importanza, giacché l'enzima può accelerare la velocità di raggiungimento dell'equilibrio, ma non modifica le concentrazioni [A] e [B] per cui l'equilibrio stesso sussiste. Altra caratteristica importante è che il valore del ΔG° non è influenzato dalla via seguita da A per trasformarsi in B: quello che conta ai fini del calcolo è lo stato iniziale e finale del sistema.

Si è visto precedentemente che la reazione $A \rightarrow B$, tranne che nello stato di equilibrio, prevede una variazione di energia libera (ΔG): orbene se si ha $-\Delta G$ la reazione non richiede energia, ma al contrario la libera (reazione esoergonica); se si ha $+\Delta G$, la reazione richiede energia per attuarsi (reazione endoergonica).

Va notato inoltre che se la reazione $A \rightarrow B$ avviene con una caduta di energia libera, ossia se si ha $-\Delta G$, la reazione procede « spontaneamente »; ciò non vuol dire che avvenga necessariamente anche « rapidamente » e « di per sé », giacché sono proprio gli enzimi i responsabili di queste azioni catalitiche.

La variazione standard di energia libera è funzione della costante di equilibrio, ed i rapporti sono sintetizzati nella relazione

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K'$$

dove: R = costante dei gas (1,987 cal/mole/grado di temperatura)

T = temperatura assoluta, espressa cioè secondo la scala Kelvin, a partire da -273°C ; quindi T è legata alla temperatura centigrada (t) dalla semplice relazione:
 $T = 273 + t$

In K' = logaritmo naturale della costante di equilibrio, a 25°C (ossia per $T = 273 + 25 = 298$ gradi) e pH = 7.

Nella Tabella 3.1 sono indicate le reazioni numeriche tra la costante di equilibrio K' e la variazione standard di energia libera ΔG° . La costante K' può essere maggiore di 1: ciò significa che la reazione $A \rightarrow B$ tende ad andare naturalmente verso il compimento, come indicato dalla freccia; ossia vi è una caduta di energia libera, che condiziona

un ΔG negativo ($A \rightarrow B$). La costante K può essere minore di 1: ciò significa che la reazione $A \rightarrow B$ non tende ad andare naturalmente verso il compimento; ossia bisogna immettere energia nel sistema per trasformare A in B: quindi il ΔG è positivo ($A \rightarrow B$).

Tabella 3.1 - Relazioni numeriche tra la costante di equilibrio K' e la variazione di energia libera ΔG° a 25°C ed a pH = 7.

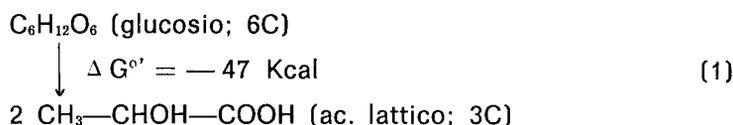
K'		ΔG° (Kcal/mole)
1×10^{-3}	endoergoniche	+ 4,09
1×10^{-2}		+ 2,73
1×10^{-1}		+ 1,36
1	reazioni	0
1×10^1		- 1,36
1×10^2		- 2,73
1×10^3	esoergoniche	- 4,09

3.1) Bioenergetica dell'attività del citoplasma fondamentale

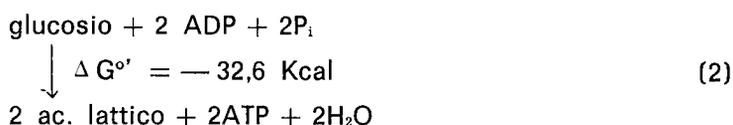
Per motivi pratici, considereremo separatamente il metabolismo energetico dei glucidi da quello dei lipidi, rilevando nella trattazione le evidenti interconnessioni.

3.1.1.) Bioenergetica citoplasmatica dei glucidi

La glicolisi è un processo citoplasmatico mediante il quale una molecola a sei atomi di carbonio (6 C) viene spezzata in due molecole a 3 atomi di carbonio:



In questa reazione, che è tipicamente laboratoristica, si nota che: (a) non è richiesto O_2 ; (b) il rapporto « carbonio : idrogeno : ossigeno » non varia, rimanendo 1 : 2 : 1; (c) vi è un ΔG largamente negativo, e quindi avviene spontaneamente. Tuttavia, se si considera la realtà dei fatti nel vivente, la reazione (1) è accoppiata alla sintesi di ATP, e pertanto l'equazione reale è la seguente:



Questa reazione (2) si chiama « accoppiata » in quanto la formazione di ATP non può avvenire senza la scissione del glucosio, che, a sua volta, non può avvenire senza formazione di ATP.

Si può notare che nella (2) si ha una variazione standard di energia libera (ΔG°) che è di 14,4 Kcal inferiore a quella della (1). Ora dalla termodinamica elementare si sa che sono richieste circa 7,2 Kcal per generare una mole di ATP da una mole di ADP e P_i : si può quindi concludere che nelle cellule viventi, in cui si attua appunto la reazione (2), una parte significativa della variazione standard di energia libera (ΔG°), che si attua durante la glicolisi, è conservata in forma di ATP: questa quota è circa $(14,4/47) \times 100$, ossia circa il 30%.

Ci preme far presente che se la prestazione si svolge con sufficiente ossigeno nel distretto muscolare, la (2) si ferma alla tappa di ac. piruvico, che viene poi trasferito nei mitocondri.

Una interessante osservazione riguarda le sequenze relative al comportamento degli atomi di carbonio del glucosio (Fig. 3.2); questo, dopo una serie di tappe fosforilative (glucosio $\xrightarrow{\text{esocinasi}}$ glucosio-6-fosfato $\xrightarrow{\text{fosfoesoisomerasi}}$ fruttosio-6-fosfato $\xrightarrow{\text{fosfofruttosochinasi}}$ fruttosio-1,6-difosfato), si trasforma in due molecole fosforilate a tre atomi di C, interconvertibili fra di loro: 3-fosfoglicero-aldeide (per il 5%) e diidrossiacetone-fosfato (per il 95%): quest'ultimo, tuttavia si converte in 3-fosfogliceraldeide. Ciascuna di queste due molecole a 3 atomi di C si trasforma in una molecola di ac. lattico, che è appunto un composto a 3 atomi di C. Gli atomi 3 e 4 della originaria molecola di glucosio sono quelli che si

trasformeranno nei gruppi carbossilici (—COOH) dell'ac. lattico, mentre gli atomi 1 e 6 sono quelli che si trasformeranno nei gruppi metilici (—CH_3) dell'ac. lattico (vedi Fig. 3.2).

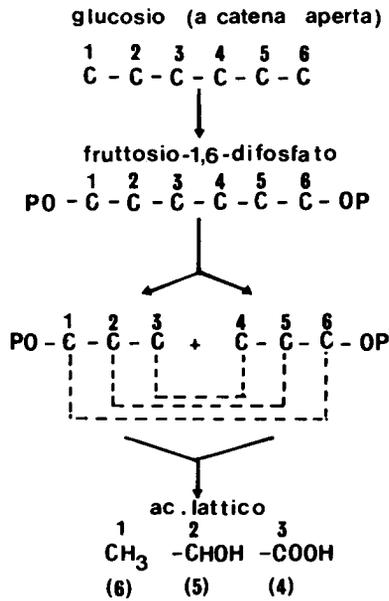
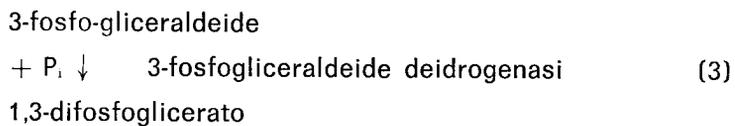


FIGURA 3.2

3.1.2) Formazione di ATP a livello del citoplasma fondamentale mediante la glicolisi

Una importante questione riguarda la possibilità che, nella glicolisi, intervengano fenomeni di trasporto elettronico. Va tenuto presente che una molecola di glucosio origina una molecola di 3-fosfogliceraldeide ed una molecola di diidrossiacetonfosfato che si trasforma successivamente in 3-fosfo-gliceraldeide; pertanto di quest'ultima se ne formano due molecole per ogni molecola di glucosio degradata. Possiamo quindi seguire ulteriormente la glicolisi:



Se si asserisce che questa è una ossidazione per sottrazione di idrogeno, non si specifica la natura dell'ossidante, ma si indica genericamente che due ioni idrogeno (H^+) ed i relativi elettroni (e^-) sono rimossi dalla

gliceraldeide, attraverso l'intervento di un enzima deidrogenasico. Analizzando meglio il fenomeno si nota che accettore degli elettroni rimossi dalla gliceraldeide può essere: (a) in aerobiosi il Sistema 1 mitocondriale; (b) in anaerobiosi il piruvato (Fig. 3.3) che si riduce a lattato. Sia per (a) che per (b), ciò è reso possibile mediante l'intervento di un sistema

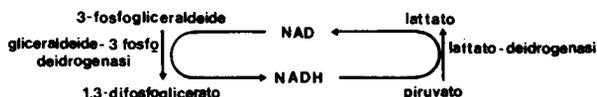


FIGURA 3.3

trasportatore di elettroni: quello del NAD o Nicotinamide-Adenina-Dinucleotide o difosfopiridin-nucleotide. Il NAD è un sistema di trasporto elettronico in quanto esiste nella forma ossidata (NAD), che assume gli elettroni (ad es. dalla 3-fosfogliceraldeide) trasformandosi nella forma ridotta (NADH), la quale a sua volta cede gli elettroni ad altro accettore (ad es. la catena respiratoria mitocondriale, il piruvato, ecc.). Il NAD può svolgere questo ruolo di trasportatore di elettroni, ossia di sistema ossido-riduttivo, perché nella sua complessa struttura è presente una molecola di nicotinamide (Fig. 3.4) che è in grado di assumere i due H^+

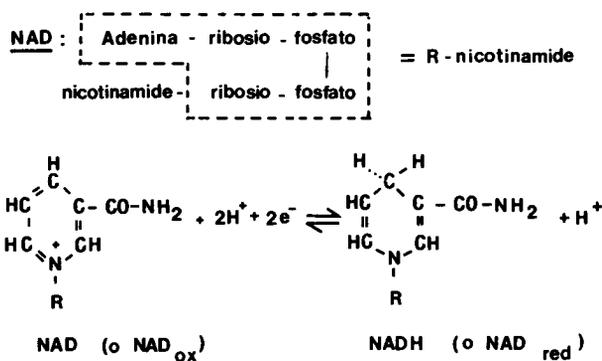
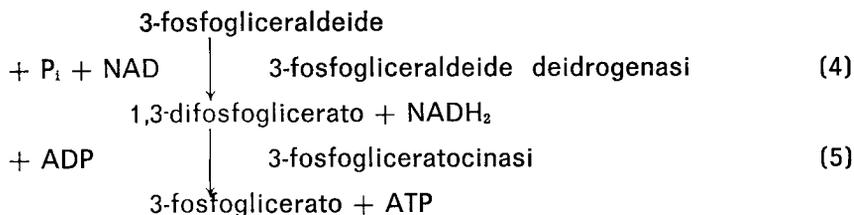


FIGURA 3.4

ed i relativi e^- , e quindi di ridursi. Il NAD è ridotto (NADH) quando accoglie una coppia di elettroni e la coppia degli idrogenioni di supporto, per cui viene indicato anche come: « NADH₂ » per sottolineare questa sua caratteristica, o, più correttamente, come « NADH + H⁺ »: in ogni caso le grafie sono da considerarsi intercambiabili.

La reazione (3) procede con assunzione di fosfato inorganico: il prodotto ad alta energia formato, l'1,3-difosfoglicerato, si scinde donando un gruppo fosforico all'ADP che si trasforma in ATP.



Queste due reazioni mostrano che l'ossidazione è accompagnata dalla formazione di un derivato ossidato ad alta energia, con un gruppo fosforico energetico che può essere donato all'ADP per formare ATP. Nelle due reazioni (4) e (5), il comune intermedio è il prodotto ad alta energia, l'1,3-difosfoglicerato, che ha un ΔG° di idrolisi di $-11,8$ Kcal. La molecola infatti contiene, in una giustapposizione abbastanza stretta (Fig. 3.5),

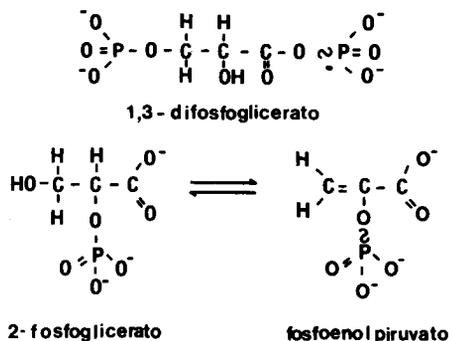
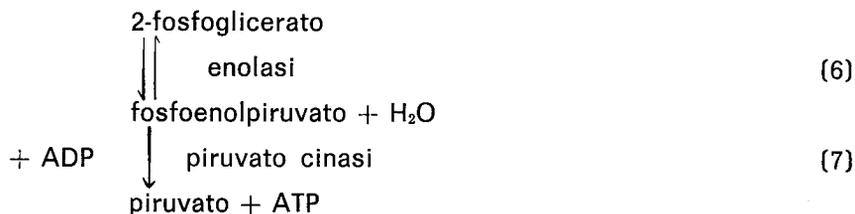


FIGURA 3.5

due gruppi fosfati portanti una doppia carica negativa, cosicché vi è una insolitamente alta densità elettronica nel legame tra il gruppo carbossilico ed il gruppo fosfato: ciò porta ad una configurazione instabile per questi elettroni, i quali tendono naturalmente a stare lontani gli uni dagli altri. Ciò condiziona da una parte la labilità del legame e dall'altra l'impossibilità di ricomposizione dei due frammenti molecolari, dopo l'idrolisi della molecola. A causa dell'alto potenziale di trasferimento, il fosfato organico legato al radicale carbossilico dell'1,3-fosfoglicerato è donato all'ADP con una notevole spinta termodinamica dovuta alla differenza fra il ΔG° idrolitico dell'1,3-difosfoglicerato ($-11,8$ Kcal) ed il ΔG° idrolitico dell'ATP ($-7,2$ Kcal); differenza che è quindi di circa $-4,6$ Kcal.

Una volta formato il 3-fosfoglicerato, questo si trasforma in 2-fosfoglicerato, a mezzo della fosfogliceromutase; a questo punto interviene una

successiva trasformazione che richiede qualche commento; infatti si è precedentemente asserito che in generale le reazioni ossido-riduttive sono le responsabili della formazione di composti portatori di legami fosforici ad alto livello energetico. Tuttavia, analizzando il secondo sito di formazione di ATP nelle sequenze della glicolisi, si nota che questo coincide con la sequenza:



A differenza della (4), la reazione in (6) non sembra una ossido-riduzione, ma una semplice scissione, con eliminazione di acqua. Nonostante le apparenze, la (6) avviene per uno spostamento di elettroni: ossia è una reazione ossido-riduttiva intramolecolare. Infatti passando al fosfoenolpiruvato (Fig. 3.5) gli elettroni risultano più concentrati intorno al carbonio 2, dato che qui si instaura un doppio legame (che coinvolge due coppie di elettroni) e che qui si attuano delle costrizioni nelle distanze di legame e negli angoli relativi alla conformazione spaziale molecolare. Ciò porta alla situazione di repulsione fra il gruppo fosforico, carico negativamente, ed il gruppo carbossilico: questa situazione porta ad uno slittamento nell'energia interna molecolare tale che il fosfoenolpiruvato diviene un composto ad alta energia (ΔG° idrolitico = $-14,8$ Kcal). Dato che il ΔG° idrolitico dell'ATP è di $-7,2$ Kcal, il fosfato del fosfoenolpiruvato è donato all'ADP con una notevole spinta termodinamica.

Risulta quindi evidente che si può formare ATP al di fuori dei mitocondri; e questo avviene proprio nei processi glicolitici, nelle due tappe citoplasmatiche prima indicate: 1) da 3-fosfogliceraldeide a 3-fosfoglicerato; 2) da 2-fosfoglicerato ad ac. piruvico.

Queste due tappe costituiscono gli eventi ossido-riduttivi del processo glicolitico, mentre le altre reazioni sono costituite da trasformazioni varie; è quindi solamente in concomitanza delle tappe ossido-riduttive che si attuano eventi termodinamici atti a condurre alla formazione di derivati ossidati ad alta energia.

I dati, esposti per la glicolisi, evidenziano un fenomeno generale valido anche per la respirazione mitocondriale: esistono cioè, relativamente all'ATP, dei composti fosforati capaci di una maggiore o minore variazione standard di energia libera idrolitica (ΔG°). Orbene, come indicato nella Fig. 3.6, l'ATP è ben lontano dall'aver il maggior valore negativo di ΔG° fra i vari esteri, ma ha un valore intermedio. Si possono quindi disporre i vari composti fosforilati secondo una scala termodinamica che abbia come unità di misura la variazione standard di energia libera durante idrolisi (ΔG°). Naturalmente i composti a più alto valore negativo di ΔG° tendono a cedere con maggiore facilità i loro gruppi fosforici.

Vi è da chiedersi, a questo punto, perché l'ATP sia così importante come mediatore di energia visto che esistono altri e numerosi composti fosforilati, in alcuni casi anche più efficienti dell'ATP stesso.

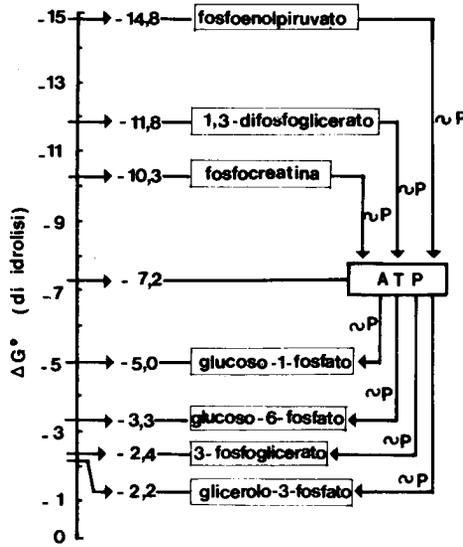


FIGURA 3.6

Ciò dipende da vari motivi. In primo luogo l'ATP occupa una posizione intermedia nella scala termodinamica per cui l'ADP può fungere da accettore dei gruppi fosforici dai composti fosforati a più alto potenziale, mentre l'ATP così formato può enzimaticamente cedere il radicale fosforico ad alcune molecole accettrici (quali glucosio o glicerolo) che vengono trasfor-

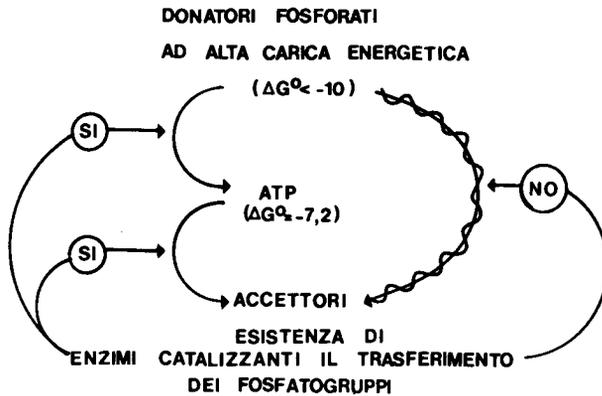
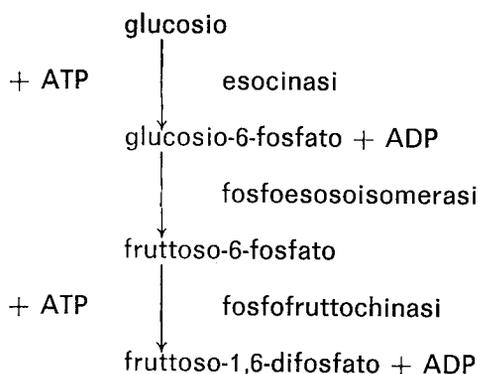


FIGURA 3.7

mate nei rispettivi derivati energetici (quali glucosio-6-fosfato, glicerolo-3-fosfato, ecc.). In secondo luogo, l'ATP, l'ADP e l'AMP sono i reagenti d'obbligo praticamente in tutte le reazioni biologiche di trasferimento enzimatico dei radicali fosforici energetici: ci sono infatti degli enzimi che catalizzano il trasferimento dei fosfato-gruppi dai composti ad alto potenziale energetico all'ADP, così come una seconda serie di enzimi catalizza il trasferimento dei fosfato-gruppi dall'ATP agli accettori a basso potenziale energetico. In ogni caso, non vi sono enzimi capaci di trasferire direttamente i gruppi fosforici dai donatori ad alto potenziale energetico agli accettori a basso potenziale energetico (vedi Fig. 3.7). Il pool degli adenilati (AMP, ADP ed ATP) rappresenta quindi un sistema mediatore di energia a funzionamento obbligato.

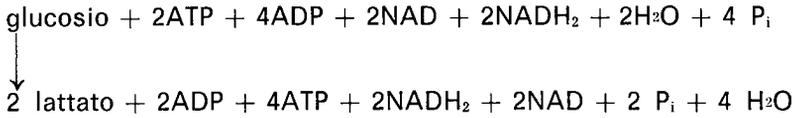
3.1.3) Bilancio energetico delle attività glicolitiche del citoplasma fondamentale

Ragionando in termini di ATP formato ed ATP utilizzato, vi è da rilevare che le prime tappe della glicolisi richiedono ATP:

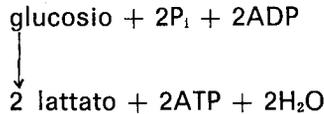


Quindi due molecole di ATP preformato sono necessarie per « innescare » la reazione glicolitica. Al contrario, si è visto che nelle reazioni (5) e (7) si ha la formazione di due molecole di ATP: considerato che, come visto in precedenza, da una molecola a 6 atomi di carbonio, quale è il glucosio, ad un certo punto della scissione prendono origine due molecole a 3 atomi di carbonio che vanno incontro alle reazioni (5) e (7), risultano 4 le molecole di ADP che in tali reazioni vengono trasformate in ATP, per ogni molecola di glucosio metabolizzata. Inoltre, nella reazione indicata nella Fig. 3.3, una molecola di NAD è convertita in NADH₂ ed una di NADH₂ in NAD: per quanto sopra detto, la reazione si verifica due volte per ogni molecola di glucosio degradata e quindi le molecole di NAD e

di NADH_2 implicate sono due. Si può quindi indicare il bilancio chimico della glicolisi in questo modo:



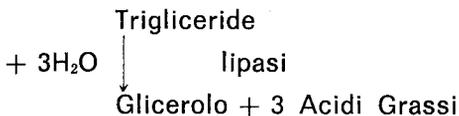
da cui, eliminando i membri comuni:



L'equazione « glucosio \longrightarrow 2 lattato » espressa in (1) ha un ΔG° di -47 Kcal per mole di glucosio utilizzata. Si paragoni ora questa disponibilità energetica anaerobica con quella della reazione glucosio + $\text{O}_2 \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, che ha un ΔG° di -686 Kcal/mole di glucosio. E' evidente che la (1) fornisce solamente il 7% dell'energia liberabile in presenza di O_2 . Quello anaerobico lattacido rappresenta quindi un meccanismo energetico largamente meno redditizio di quello aerobico.

3.1.4) Bioenergetica dei lipidi a livello del citoplasma fondamentale

Ai fini energetici, i grassi, che interessano particolarmente la prestazione, sono sostanzialmente i grassi neutri o trigliceridi; essi vengono così chiamati perché sono gli esteri di un alcool trivalente, il glicerolo, con acidi grassi diversi. In caso di utilizzazione energetica, si ha la reazione inversa che consiste nella idrolisi enzimatica dei trigliceridi nei rispettivi componenti

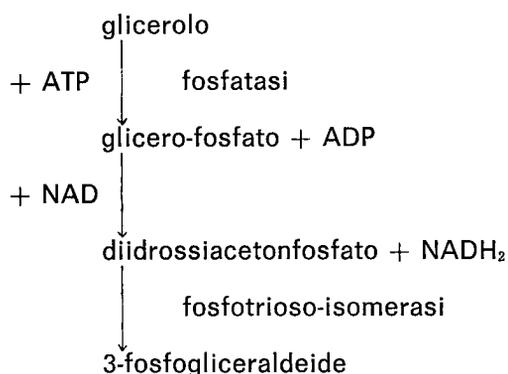


Le lipasi, che catalizzano questa scissione, sono quindi delle idrolasi e si trovano soprattutto nel succo pancreatico ed intestinale.

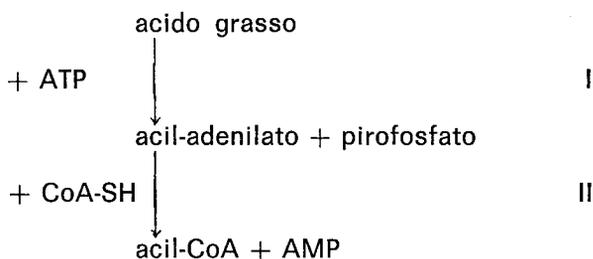
E' chiaro quindi che l'utilizzazione dei grassi neutri a scopo energetico coincide con l'utilizzazione dei suoi due costituenti così liberati, ossia il glicerolo e gli acidi grassi.

Per quanto riguarda il glicerolo, il problema è intimamente connesso

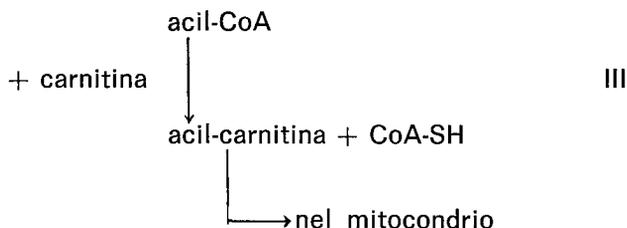
con quanto prima esposto per la glicolisi dato che esso si trasforma in fosfo-gliceraldeide e come tale entra nelle sequenze glicolitiche.



Più complessi si presentano invece i problemi relativi all'utilizzazione degli acidi grassi: questi infatti subiscono una prima serie di modificazioni che li trasformano nel corrispettivo acil-coenzima A, ossia in un composto ricco di energia in cui un acile (R-COOH) è legato al coenzima A (CoA-SH) nella forma $R\text{-CO} \sim S - \text{CoA}$.



L'acil-CoA come tale non può penetrare nei mitocondri ove sono localizzati gli enzimi che possono ossidarlo: interviene allora la carnitina che, esterificandosi con l'acido grasso, forma una acil-carnitina, la quale può passare attraverso le membrane mitocondriali



Si vedrà più avanti come l'acil-carnitina subisca nel mitocondrio un processo inverso che libera la carnitina che, ripassando nel citoplasma, è disponibile per un nuovo ciclo di trasferimento degli acili.

3.2) Organizzazione mitocondriale e respirazione

La distribuzione dei mitocondri è generalmente omogenea nel citoplasma, benché in alcuni casi essi tendano ad accumularsi, specie in condizioni patologiche, attorno al nucleo od alla periferia del corpo cellulare. Alcune di queste modificazioni possono essere considerate come il risultato di un sovraccarico di inclusi, quali glicogeno e grasso, che spostano i mitocondri stessi. In alcune cellule i mitocondri hanno una vasta possibilità di movimento per trasportare l'ATP laddove è necessario: in altre cellule, quali quelle muscolari, i mitocondri hanno invece una posizione costante nella zona ove è necessaria una più alta quantità di energia; ad es. la disposizione ad anelli dei mitocondri intorno alla stria I della miofibrilla.

Si è già precedentemente detto che nel mitocondrio vi è una membrana esterna (di circa 60 Å) ed una membrana interna (pure di circa 60 Å) che si estroflette entro la cavità formando le creste. Le due membrane circoscrivono la camera esterna, mentre la membrana interna (Fig. 1.1) circoscrive la camera interna in cui vi è la matrice. Le due membrane esterna ed interna, con relative creste, possono essere considerate quali pellicole solide dotate di una struttura molecolare stratificata e compatta, mentre la matrice è simile ad una gelatina contenente proteine solubili e molecole di limitate proporzioni. I mitocondri hanno quindi una struttura solido-liquida che consente di spiegare alcune caratteristiche meccaniche dei mitocondri, quali le deformazioni ed i rigonfiamenti rilevabili sia in condizioni fisiologiche che sperimentali.

Nelle membrane mitocondriali hanno una notevole importanza i lipidi, che sono disposti in doppia fila; la loro stabilità è determinata dalla natura e dal rapporto degli elementi costitutivi, dalla loro carica elettrica e dalla loro capacità permeativa. La doppia fila di lipidi è largamente stabilizzata da deboli forze elettrostatiche (tipo Van der Waals) instauratesi fra i gruppi alchilici e le catene idrocarboniose; sebbene queste forze siano unitariamente deboli, data la loro diffusione, finiscono per costituire nel complesso una stabile struttura tridimensionale (ad es. strato L della Fig. 3.8).

Fra le due membrane sussistono notevoli differenze nella capacità di permeazione; infatti, mentre la esterna è liberamente permeabile a ioni (H^+ , OH^- , Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , ecc.) e saccarosio, quella interna è di norma impermeabile a questi. Le membrane sono inoltre capaci di operare uno specifico trasferimento del piruvato (di origine citoplasmatica) verso la matrice, dove entra nel ciclo di Krebs; analogo trasporto avviene per i radicali fosforici altamente energetici e per il fosfato inorganico.

La membrana interna e le creste appaiono ricoperti di particelle steroidali di 80-100 Å le quali sono collegate a mezzo di un peduncolo con la membrana. Queste particelle, dette « particelle elementari » o « particelle F1 » sono quindi costituite da tre porzioni: una base, un peduncolo ed una testa; esse si trovano regolarmente distribuite ad intervalli di 100 Å sulla membrana interna e contengono l'ATP-sintetasi, che interviene nei processi correlati alla fosforilazione. E' possibile che le particelle elementari nel vivente siano incluse entro la membrana interna mitocondriale (Fig. 3.8) e che si estroflettano a causa del trattamento ipotonico e di colorazione

con acido fosfotungstico che viene attuato in laboratorio per rendere visibili i mitocondri al microscopio elettronico.

Queste formazioni elementari, in relazione allo stato funzionale della membrana interna, possono sussistere in due conformazioni estreme: (1) come struttura distesa, in cui il peduncolo è completamente allungato e la porzione basale ed apicale sono massimalmente separate; (2) come struttura collassata in cui il peduncolo è contratto e le tre porzioni costitutive la particella elementare non sono più differenziabili. La configurazione distesa può sussistere in due forme diverse: (1.a) quella a clava, quando lo stato di attivazione energetica è indotto dall'ATP; (1.b) quella a tortiglione o a spirale, quando lo stato energetico è indotto dal substrato più fosfato inorganico.

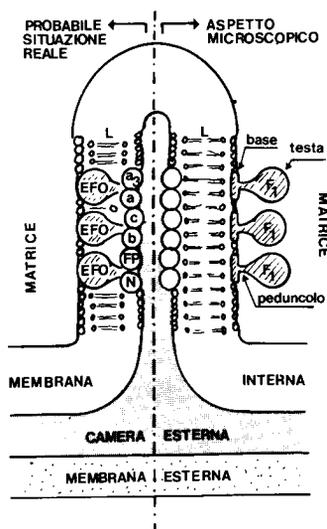


FIGURA 3.8

Come si osserva dalla Fig. 3.8, nelle creste, a livello della porzione esterna della membrana interna sono presenti in serie ordinata gli elementi della catena respiratoria: N = nucleotidi adenilici (ad es. NAD), FP = flavoproteine (ad es. FAD, FMN); b, c, a = citocromi; a_3 = autocitocromo ossidasi. Nella porzione interna della membrana interna sono presenti invece le molecole degli enzimi sintetizzanti ATP, ed indicati con EFO (Enzimi del processo fosforilativo). Il complesso di queste varie formazioni costituisce una « unità respiratoria » mitocondriale, idonea a trasportare elettroni in accoppiamento con la fosforilazione dell'ADP. Per dare una idea del numero di queste unità respiratorie, basti pensare che un mitocondrio epatico (che ha una modesta attività respiratoria) ne contiene circa 15.000, mentre un mitocondrio muscolare (che ha un'alta attività respiratoria) ne contiene 100.000. Particolare importanza riveste l'enzima

che è posto nelle particelle elementari e che catalizza l'accoppiamento del processo della fosforilazione con il trasporto elettronico, con produzione di ATP: questo enzima è una particolare ATPasi, chiamata ATP-sintetasi, o fattore di copulazione di Racker, avente peso molecolare di 284.000. Se le particelle elementari vengono rimosse dalla membrana interna con particolari artifici, il trasporto elettronico avviene regolarmente, ma manca la formazione di ATP.

La possibilità di effettuare una separazione dei vari costituenti il mitocondrio è attuabile mediante la tecnica della centrifugazione in gradiente di densità, per cui dal mitocondrio intatto, per azione anche della digitonina, si ottengono separatamente: a) la membrana esterna; b) la membrana interna più la matrice; c) il contenuto della camera esterna, posta fra le due membrane.

Gli elementi legati alla digitonina ed indicati in b), costituiscono il « mitoplasto » che, per ultracentrifugazione e trattamento con un detergente (ad es., lubrol WX), si separa nei due componenti: la membrana interna (nel sedimento) e la matrice (nel soprannatante).

La separazione dei vari costituenti morfologici mitocondriali ha consentito di tracciare una mappa dei vari enzimi presenti in base alla loro disposizione; tale mappa è riassunta nella Tabella 3.2. E' interessante notare come nella membrana interna siano localizzati tutti gli elementi della catena respiratoria compresi coenzimi e citocromi, mentre nella matrice si ritrovano per lo più gli enzimi del ciclo di Krebs e dell'ossidazione degli acidi grassi.

Tabella 3.2 - Distribuzione di alcuni enzimi nelle varie strutture mitocondriali.

Sede	Enzima
Membrana esterna	Monoamino ossidasi NADH - citocromo c reduttasi (rotenone resistente) acil-coenzima A ligasi
Camera esterna	Adenilato chinasi nucleoside - difosfochinasi
Membrana interna	Enzimi della catena respiratoria ATP - sintetasi succinico-deidrogenasi acil-transferasi della carnitina
Camera interna (matrice)	Enzimi del ciclo di Krebs enzimi della β -ossidazione degli ac. grassi α -chetoacido deidrogenasi

3.3) Bioenergetica delle attività svolgentisi nella matrice mitocondriale

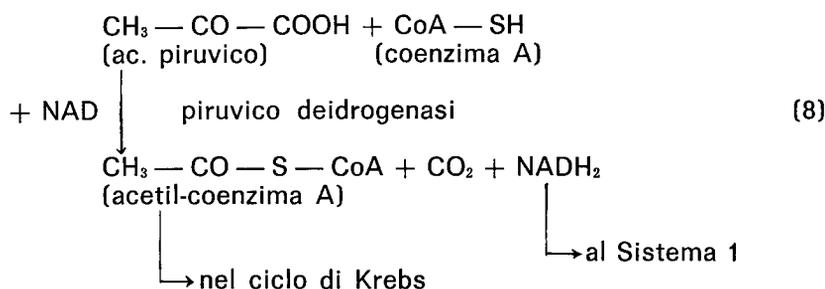
Nella matrice si svolge sostanzialmente il ciclo di Krebs o Sistema 2 o sistema generatore di elettroni: il ciclo accetta per la sua funzione solo molecole che, indipendentemente dal fatto di derivare dai glucidi, o dai lipidi, siano dei composti attivati dell'acido acetico, a 2 atomi di carbonio.

E' necessario quindi un lavoro preliminare per trasformare gli intermedi del metabolismo glucidico e lipidico nella molecola idonea ad entrare nel ciclo di Krebs; tale molecola è l'acetil-coenzima A (acetil-CoA).

3.3.1) Formazione di acetil-CoA dal metabolismo glucidico

Il metabolismo glucidico anaerobico citoplasmatico (vedi Capitolo 3.1) porta alla formazione di acido piruvico che, dopo essere stato trasportato nei mitocondri, viene preparato per il Sistema 2 mediante una ossidazione enzimatica che lo trasforma in un derivato dell'acido acetico (che ha formula $\text{CH}_3\text{-COOH}$): in questa reazione, l'acido piruvico, che ha 3 atomi di carbonio, ne perde uno (quello del gruppo carbossilico -COOH) che viene eliminato come anidride carbonica (CO_2).

L'acido piruvico viene ossidato, ossia perde elettroni che vengono captati dal NAD che passa così alla sua forma ridotta NADH : quest'ultimo è così a disposizione del Complesso I del Sistema 1 (vedi il Capitolo 2.1.1)



Come si vede, nella reazione (8) l'acido acetico non si produce in forma libera, ma nella forma « attivata » di acetil-coenzima A, ossia di un derivato di quel nucleotide complesso che è il coenzima A (Fig. 3.9). Il Coenzima A (CoA) è un trasportatore di gruppi acetilici, così come l'ATP è un trasportatore di fosfatogruppi ed il NAD è un trasportatore di elettroni; d'altra parte il CoA ricorda nella sua struttura il NAD, essendo pure esso costituito da adenina, ribosio e gruppi fosforici. Il CoA ha di caratteristico l'acido pantotenico, che è una vitamina del complesso B: il gruppo tiolico (—SH) serve a legare in maniera covalente (ossia con una partecipazione di elettroni) l'acido acetico a mezzo di un legame tioestere (—S—CO—), il quale è un legame ad alta energia. Infatti, come indicato nella Fig. 3.9, la variazione di energia libera di idrolisi della reazione:

acetil-CoA \rightarrow ac. acetico + CoA, è di $-7,5$ Kcal (ossia superiore, anche se di poco, alla variazione standard di energia libera dall'idrolisi dell'ATP: $\Delta G^\circ = -7,2$ Kcal); quindi il gruppo acetilico trasportato dal CoA si trova in uno stato di attivazione energetica e può essere enzimaticamente trasferito ai vari accettori metabolici, ed in particolare a quelli del ciclo di Krebs.

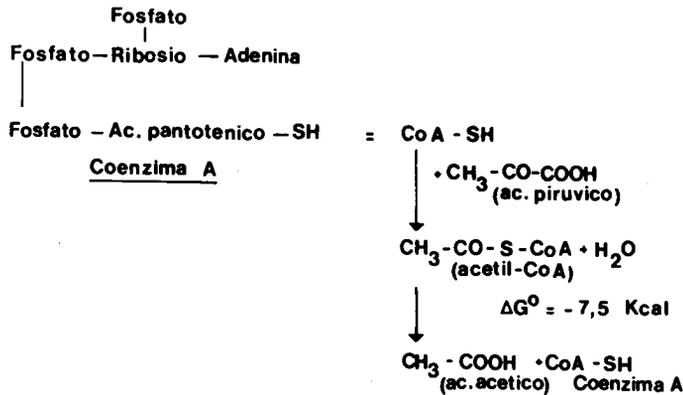


FIGURA 3.9

3.3.2) Formazione di acetil-CoA dal metabolismo lipidico

Anche gli acidi grassi formano acetil-CoA e quindi possono inserirsi nel Sistema 2: le sequenze sono illustrate nella Fig. 3.10, in cui si vede

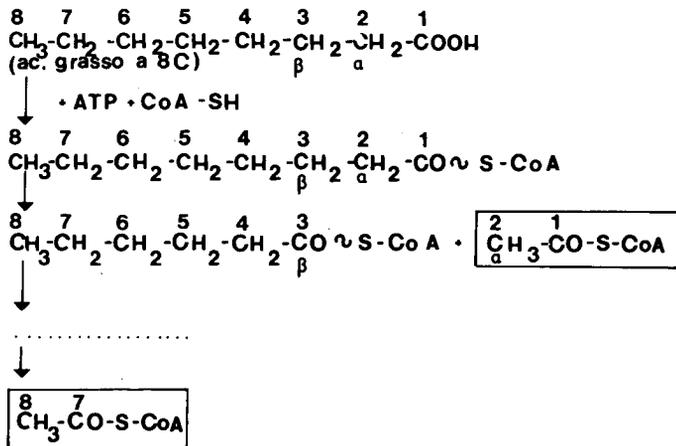
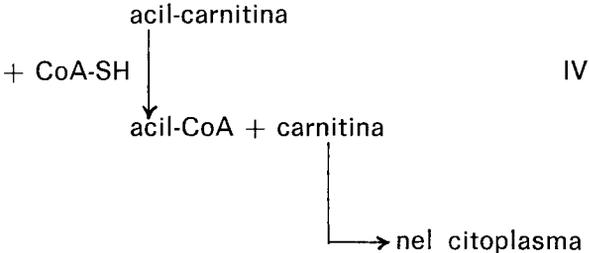
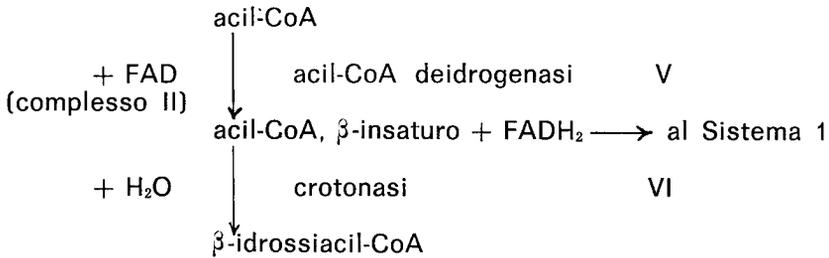


FIGURA 3.10

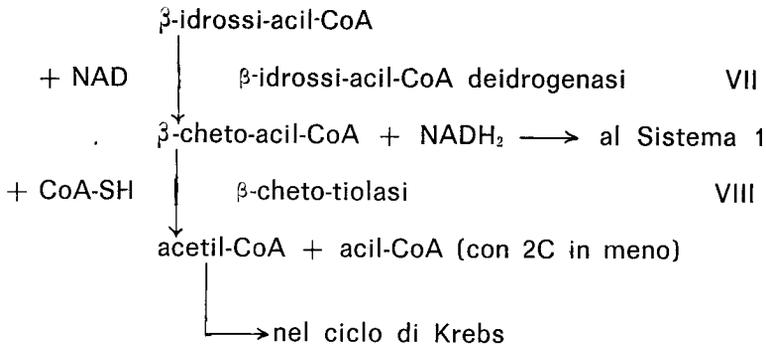
come le varie unità molecolari costituite da una coppia di atomi di carbonio (unità bicarboniose) si scindono gradualmente dall'acido grasso sotto forma di acetil-CoA. Infatti, si è visto in precedenza che dal citoplasma veniva trasferito l'acido grasso sotto forma di acil-carnitina: questa, in presenza di CoA-SH, ricostituisce l'acil-CoA così come era formato nel citoplasma.



Nell'acil-CoA, la parte caratteristica è rappresentata dall'acile derivato dall'ac. grasso corrispondente (vedi Fig. 3.10) il quale è costituito per lo più da un numero pari di atomi di C. Indichiamo con $R' - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$ l'acido grasso che prendiamo in esame; a livello mitocondriale esso si trova sotto forma di acil-CoA ($R' - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CO \sim S - CoA$) e viene reso insaturo in α e β dando origine ad acil-CoA insaturo ($R' - CH_2 - CH = CH - CO \sim S - CoA$) e quindi viene idratato in β trasformandosi in β -idrossi-acil-CoA ($R' - CH_2 - CHOH - CH_2 - CO \sim S - CoA$), con la partecipazione di vari enzimi.



Il β -idrossi-acil-CoA viene deidrogenato a β -cheto-acil-CoA ($R' - CH_2 - CO - CH_2 - CO \sim S - CoA$) che viene quindi scisso in α , β in due acil-CoA (in quanto interviene ancora coenzima A) e di cui: a) un acil-CoA è proprio acetil-CoA ($CH_3 - CO \sim CoA$), e b) l'altro acile e l'acil-CoA con 2C in meno dell'acil-CoA di partenza.



Come si vede, dall'acil-CoA originario si stacca una « unità bicarboniosa », mentre il residuo si trova sotto forma acilata ed entra quindi nella reazione (V); questo processo continua sino a che tutto l'acido grasso è ridotto ad acetil-CoA, forma molecolare accettata dal ciclo di Krebs (vedi Figura 3.10).

Il processo che abbiamo descritto si chiama « β -ossidazione » perché avviene sempre per ossidazione del carbonio posto in posizione β .

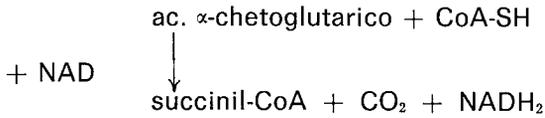
Prendiamo in considerazione, ad es., un acido grasso molto comune: ossia l'acido palmitico che ha 16 atomi di carbonio. Esso sarà sottoposto a sette successive β -ossidazioni e darà origine a 8 acetil-CoA: ossia gli acidi grassi ad n atomi di C subiranno $[(n/2) - 1]$ ossidazioni e daranno origine ad $n/2$ acetil-CoA da immettere nel ciclo di Krebs o Sistema 2 a livello della reazione (9). Qualora si avessero acidi grassi a numero dispari di atomi di C, la β -ossidazione porterà ovviamente anche alla formazione di un prodotto a 3 atomi di C (il propionil-CoA) che, dopo una serie di successive reazioni si trasforma in succinil-CoA, e come tale entra nel ciclo di Krebs a livello della reazione (11 bis).

3.3.3) Il ciclo di Krebs

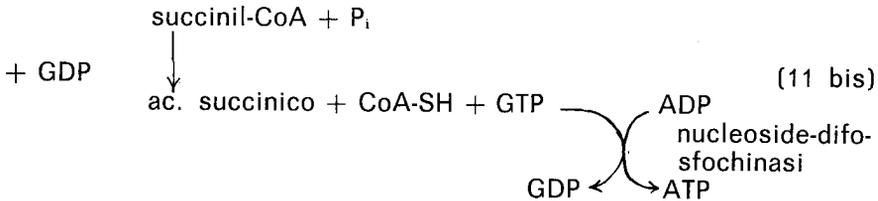
Una volta ottenuto dai glucidi o dai lipidi, l'acetil-CoA è disponibile per il Sistema 2, di cui verranno descritte le tappe principali. Ricordiamo che ai fini pratici, nelle sequenze metaboliche, si indica indifferentemente l'acido (ad es.: ac. ossalacetico) o la sua forma ionizzata (ad es.: ossalacetato), dato che nella realtà fisiologica quest'ultima forma è quella con cui effettivamente si presenta l'acido organico.

Tappa 1 - L'acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs con una reazione di coniugazione mediante la quale il gruppo acetilico (a 2C) è enzimaticamente trasferito ad un composto dicarbossilico a 4C (l'acido ossalacetico) per formare un composto tricarbossilico a 6C (l'acido citrico), che è poi trasformato in ac. isocitrico.

zima A (succinil-CoA); infatti la (11), si svolge analogamente alla (8), in una maniera quindi più complessa, e cioè:

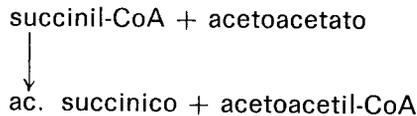


Questa fase di transizione è molto importante perché il succinil-CoA si trasforma in ac. succinico operando la trasformazione parallela di un composto fosforato, il guanosin-difosfato (GDP) nel corrispondente composto trifosfato (GTP)

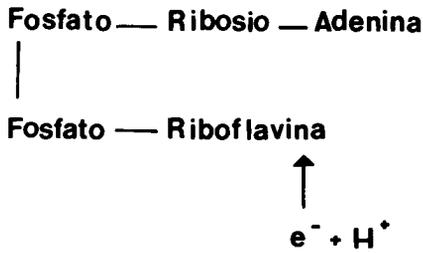


Come risulta chiaro dalla (11 bis), l'evento più importante è costituito dal trasferimento del radicale energetico fosforico dal guanosin-trifosfato all'ADP, con formazione di una molecola di ATP.

Ricordiamo che, in alternativa, il CoA del succinil-CoA può essere trasferito all'aceto-acetato secondo la reazione

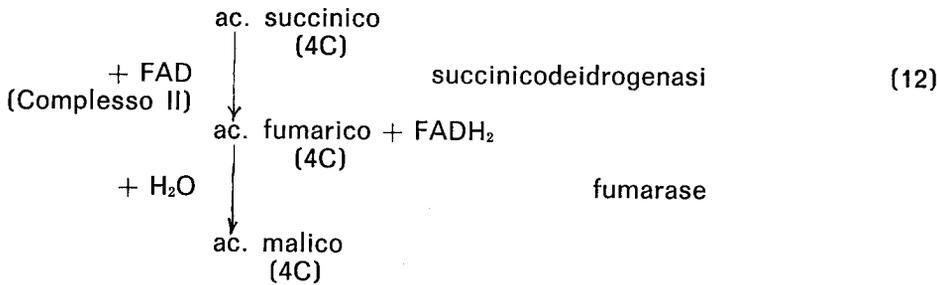


Tappa 4 - E' una tappa a mezzo della quale si passa da acido succinico ad ac. malico: nella attuazione di questa tappa viene coinvolto uno dei Complessi del Sistema 1, e precisamente il Complesso II (vedi Capitolo 2.2.1), di cui il FAD (o flavin-adenin-dinucleotide) è un elemento essenziale. A rigor di logica, quindi, del FAD sarebbe opportuno parlare a proposito della catena respiratoria: tuttavia ne diamo qui informazione per rendere più agevole la trattazione. Nella presente tappa 4, l'acido succinico si trasforma in acido fumarico in quanto perde una coppia di elettroni che vengono accettati dal gruppo attivo della succinico deidrogenasi, gruppo che è una delle varie flavoproteine. Queste sono notoriamente una classe di deidrogenasi (ossia dei sottrattori di H^+ ed e^-) contenenti come accettore di elettroni un flavinnucleotide; la succinicodeidrogenasi contiene il Flavin-Adenin-Dinucleotide (FAD) che è un trasportatore di elettroni simile al NAD e come questo può trasformarsi nella forma ridotta: FADH. Nello schema della Fig. 3.11, si riassume la struttura generale del FAD che ha come elemento costitutivo caratteristico la riboflavina o vitamina B_2 , la quale è la struttura responsabile della captazione dell'idrogeno ($\text{H}^+ + \text{e}^-$).

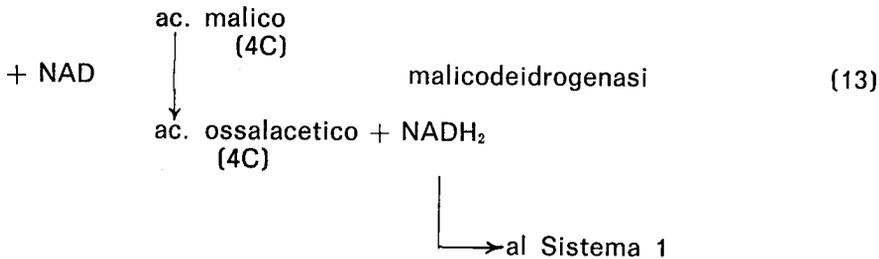


Flavoproteina

FIGURA 3.11



Tappa 5 - E' la tappa che porta alla rigenerazione dell'acido ossalacetico, a mezzo del quale il ciclo di Krebs può continuare se vi è a disposizione acetil-CoA. In questa tappa si ha la sottrazione di una coppia di elettroni che vengono captati dal NAD, e resi quindi disponibili per il Sistema 1.



Pertanto nell'intero ciclo era stata introdotta una molecola a 2C, l'acido acetico (anche se nella forma attivata di acetil-CoA) unitamente ad una molecola a 4C, l'acido ossalacetico. Come finale si ha la rigenerazione del composto a 4C, l'acido ossalacetico, dato che due atomi di C sono stati persi come CO₂ (vedi reazione 10 ed 11). Una sola molecola di ac. ossalacetico può quindi partecipare alla ossidazione di un numero infinito di molecole di ac. acetico, dato che è rigenerata alla fine di ogni ciclo.

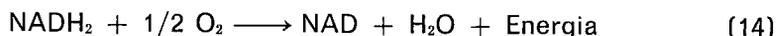
3.4) Bionergetica delle attività svolgentesi nella membrana interna

Bisogna a questo proposito distinguere il processo del trasporto elettronico, che ha sede nella porzione esterna della membrana interna, dal processo correlato alla fosforilazione, che ha sede nelle particelle elementari site nella porzione interna della membrana interna (vedi Fig. 3.8)

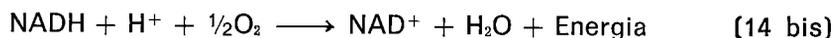
3.4.1) Attività situate nella porzione esterna della membrana interna

Da quanto descritto nel Capitolo 3.3), le attività svolgentesi nella matrice portano alla cessione di cinque coppie di elettroni: di queste, come indicato nella Fig. 2.4, quattro coppie sono conservate nel NADH₂, mentre una coppia è conservata nel Complesso II come FADH₂. La catena del trasporto elettronico, o Sistema 1, è la via comune a mezzo della quale tutte le coppie di elettroni vengono portate al loro naturale accettore, ossia l'ossigeno molecolare: le caratteristiche di base sono già state indicate nel Capitolo 2.2.1).

Per quanto riguarda il problema del bilancio energetico, va ricordato che mentre il NAD e le flavoproteine (FMN e FAD) trasportano due elettroni alla volta, i citocromi ne possono portare solo uno per volta, per cui nel trasporto elettronico sono implicate coppie di molecole di citocromi. Il complesso delle reazioni di ossido-riduzione che conducono alla ossidazione del NADH₂ ad opera dell'O₂ (ossia che conducono alla sottrazione di una coppia di elettroni al NADH₂ ed all'accettazione degli stessi da parte dell'ossigeno), può essere così riassunto:



oppure, più correttamente:



anche se per ragioni di semplicità useremo sempre la (14) che è meno esatta, ma più facile da utilizzare.

Pertanto per ogni paio di elettroni prodotti nella matrice dal Sistema 2 (e portati, con i relativi H⁺, alla membrana interna) alla fine del trasporto elettronico si ha la riduzione di un atomo di ossigeno e la formazione di una molecola di acqua. Come indicato nel Capitolo 2.2.1) il trasporto elettronico avviene in quanto il potenziale ossidoriduttivo (E'₀) degli elementi della catena è posto nella serie ordinata: NAD → flavoproteine → coenzima Q → citocromi b, c, a → O₂: in questa serie, gli elettroni passano dall'E'₀ più negativo, ossia quello del NAD (E'₀ = - 0,32 V) al più positivo, ossia a quello dell'ossigeno (E'₀ = + 0,82 V), secondo quanto delucidato in dettaglio nel capitolo « Elementi di bioenergetica », posto nell'appendice A.1. La caduta di energia libera che si attua ad ogni trasferimento elettronico è direttamente correlata con la grandezza del decremento nel potenziale ossido-riduttivo standard E'₀: pertanto la variazione standard di energia libera ΔG^{o'} equivale a

$$\Delta G^{o'} = - n F \Delta E'_0 \quad (15)$$

dove: n = numero degli elettroni trasferiti

F = costante di Faraday, esprime la carica di un equivalente di elettroni = 96.487 coulombs = 23.061 calorie/volt

$\Delta E'_0$ = variazione nei potenziali standard dei trasportatori implicati.

Per ogni sequenza della reazione (14), possiamo calcolare la variazione di energia libera dato che: $n = 2$ elettroni;

$$\Delta E'_0 = 0,82 \text{ V} - (-0,32 \text{ V}) = 1,14 \text{ V}$$

$$\Delta G^{o'} = - (2) (23.061) (1,14) \approx - 52.600 \text{ cal/mole di NADH}_2 \quad (16)$$

La reazione (14) quindi procede spontaneamente con una larga variazione di energia libera ($\Delta G^{o'} = - 52,6 \text{ Kcal}$) per ogni coppia di elettroni trasportati. Vediamo ora di fare un bilancio delle attività mitocondriali liberanti energia: per ogni molecola di piruvato che giunge nella matrice e viene inserita nel ciclo di Krebs, si formano:

— molecole di $\text{NADH}_2 = 1 + 3 = 4$

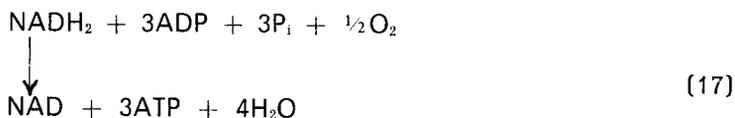
— molecole di $\text{FADH}_2 = 1$

Quindi l'attività mitocondriale rende disponibili, per il trasporto elettronico della porzione esterna della membrana interna, ben 5 coppie di elettroni; tuttavia (come indicato in 3.1) nel citoplasma, per ogni molecola di glucosio vengono elaborate due molecole di ac. piruvico, per cui, per ogni molecola di glucosio degradata ossidativamente, sono disponibili $5 \times 2 = 10$ coppie di elettroni. Va poi ricordato che, a livello citoplasmatico, vengono formate 2 molecole di NADH_2 per ogni molecola di glucosio degradata ad ac. piruvico: il passaggio è indicato nella reazione (4). Le molecole di NADH_2 sono due, dato che sono due le molecole di 3-fosfogliceraldeide formate dalla degradazione di una molecola di glucosio.

Nel complesso quindi le coppie di elettroni disponibili sono: 10 mitocondriali + 2 citoplasmatiche = 12; dato che per ogni coppia di elettroni si ha $\Delta G^{o'} = - 52,6 \text{ Kcal}$, il processo del trasporto elettronico dal NADH_2 all' O_2 comporta una variazione di energia libera $\Delta G^{o'}$ di oltre $- 630 \text{ Kcal}$. Considerato che l'equazione: $\text{glucosio} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ ha un $\Delta G^{o'} = - 686 \text{ Kcal}$, si può ben comprendere l'importanza dei processi che si svolgono a livello della porzione esterna della membrana interna mitocondriale al fine della liberazione di energia per la prestazione.

3.4.2) Attività situate nella porzione interna della membrana interna

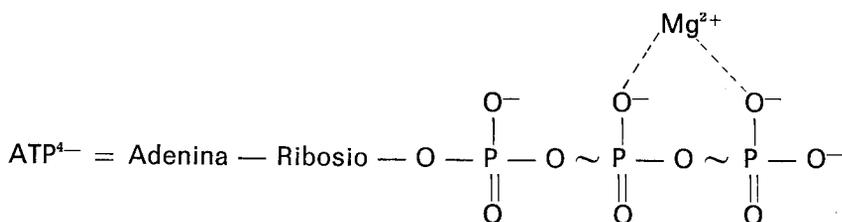
Sono sostanzialmente costituite dal processo fosforilativo che si svolge nelle particelle elementari: il processo consiste essenzialmente nella conversione di ADP in ATP, mediante l'intervento dell'energia liberata dalla reazione (14); considerato che per ogni paio di elettroni che passano dal NADH_2 all' O_2 si formano tre molecole di ATP, detta reazione (14) va così scritta:



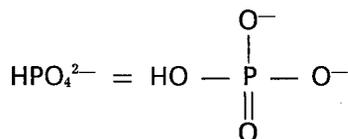
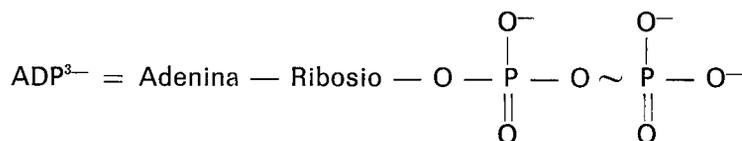
dato che: $\text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$, con necessità di disporre di almeno 7,2 Kcal.

La (14) ha un ΔG° di $-52,6$ Kcal, mentre le tre molecole di ATP conservano almeno: $3 \times 7,2 \text{ Kcal} \simeq 22 \text{ Kcal}$; ossia nelle tre molecole di ATP viene immagazzinato circa il 40% della energia totale liberata dal flusso di una coppia di elettroni dal NADH_2 all' O_2 .

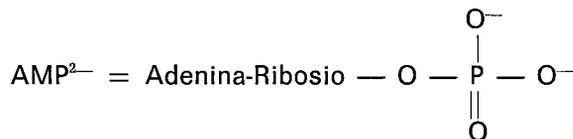
La molecola di ATP si può trovare, in base al pH, in stato di ionizzazione quasi completa, ossia con ben quattro cariche negative concentrate attorno alla struttura lineare dei fosfatogruppi; quindi la molecola è in grado di formare dei complessi con alcuni ioni bivalenti, quali il magnesio (Mg^{2+}).



Le quattro cariche negative sono molto vicine fra di loro, e questo condiziona una notevole repulsione reciproca: allorché avviene l'idrolisi del legame fosforico terminale, le cariche sono distribuite come ADP^{3-} e HPO_4^{2-} .

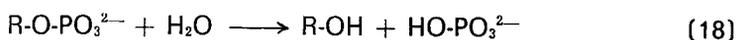


Le due porzioni ADP^{3-} ed HPO_4^{2-} hanno scarsa tendenza ad un riavvicinamento a causa delle loro cariche elettriche che le respingono reciprocamente; analoghe osservazioni valgono per le due porzioni in cui si scinde l' ADP^{3-} : ossia AMP^{2-} e HPO_4^{2-} .



Questo comportamento non deve essere generalizzato per tutti gli esteri organici: ad es. i fosfato-esteri degli alcoli non danno origine a

prodotti idrolitici con forze di repulsione reciproca, dal momento che uno dei prodotti (ossia l'alcool) non ha carica elettrica:



Va ora ricordato che la configurazione elettronica di una molecola può variare fra due o più strutture limiti, qualora gli stati energetici di ciascuna di queste strutture siano uguali, o quasi, fra di loro: questo fenomeno detto di « risonanza », permette un equilibrio dinamico fra le varie strutture, come esemplificato per il CO_2 :



In questo esempio, nel caso dei doppi legami ($\text{O} = \text{C}$), la distanza fra C ed O è di 1,28 Å, mentre nelle strutture mesomeriche con $\text{C} = \text{O}$, il triplo legame è reso possibile dalla riduzione della distanza fra C ed O a soli 1,15 Å. Quando una molecola si trova in forma di due o più strutture di risonanza, non è possibile assegnare alla molecola, nello stato normale, l'una o l'altra di queste strutture, dato che sono tutte presenti ed in trasformazione dinamica l'una nell'altra. Nella realtà esiste quindi un « ibrido di risonanza » di queste diverse strutture che ha un minor livello di energia e quindi è più stabile delle varie strutture individuali singolarmente considerate: il valore di questa minor energia è detto « energia di risonanza ».

L'ADP ed il fosfato, prodotti dell'idrolisi dell'ATP, sono ampiamente stabilizzati, come ibridi di risonanza, non appena sono formati: infatti gli elettroni circondanti gli atomi di fosforo e di ossigeno, sia dell'ATP che dei suoi prodotti di scissione idrolitica (ADP e fosfato), tendono ad acquisire una disposizione spaziale che comporti la maggior stabilità e quindi la più bassa energia possibile. Allorché ADP e fosfato sono separati reciprocamente, essi possiedono molta meno energia di quanto non ne possedessero allorché essi erano uniti, nell'ATP, dal legame covalente; ciò perché la rottura del legame del fosfato terminale dell'ATP rende possibile una nuova disposizione degli elettroni che comporta maggior stabilità e quindi, un minor contenuto energetico. Si può comprendere pertanto il fenomeno, rilevando che quando ADP e fosfato si uniscono per formare ATP, vi è una riduzione delle forme di risonanza, il che comporta una immissione di energia che viene conservata nell'ATP. Quando questo si idrolizza, per i due prodotti di scissione, ADP e fosfato, si formano al contrario molti ibridi di risonanza stabilizzati quindi ad un livello energetico molto più basso. La stabilizzazione elettronica a livelli energetici minori è una delle ragioni più importanti per le quali si ha un ΔG° di idrolisi dell'ATP così largamente negativo. Questa evenienza pratica ha fatto assegnare il termine di « legami fosforici altamente energetici » ai legami terminali dell'ATP e dell'ADP. Tale dizione, tuttavia, non è molto felice in quanto induce a sottintendere che l'energia sia « nel » legame e che quando questi si rompe, l'energia sia liberata. In effetti, usando rigorosamente i termini, per « energia di legame » si definisce l'energia richiesta per rompere un legame fra due atomi; ed occorre una enorme carica energetica per rompere dei legami chimici. Il termine (ormai largamente invalso nell'uso) di « legame altamente energetico » non indica quindi effettivamente l'energia del legame covalente, esistente nell'ATP o nell'ADP, fra un atomo di fosforo ed un atomo di ossigeno; in verità esso evidenzia che esiste una differenza di contenuto in energia fra la struttura molecolare dell'ATP e la struttura molecolare dell'ADP, oppure fra quella dell'ADP

e quella dell'AMP. L'energia del legame fosforico non è quindi localizzata nel legame chimico come tale, ma riflette la variazione di energia fra reagenti (ad es. ATP) e prodotti (ad es. ADP): ed infatti per valutare in pratica l'energia, non si attuano misurazioni assolute, ma si esprime un ΔG , ossia una « variazione » di energia che si esplica passando dallo stato di « ATP » a quello di « ADP + fosfato ».

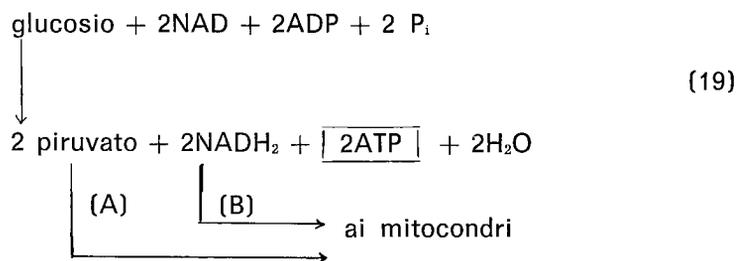
3.5) Bilancio dell'ATP da metabolismo glucidico

Per quanto riguarda questo bilancio, va ricordato che la glicolisi citoplasmatica, durante la prestazione aerobica, porta il glucosio a piruvato, e non a lattato, come indicato in 3.1).

Nel complesso quindi in presenza di O_2 , abbiamo due fasi energetiche ben distinte, ma sequenziali: la prima si svolge in anaerobiosi nel citoplasma (glicolisi: glucosio \longrightarrow 2 piruvato + energia); la seconda si svolge in aerobiosi nei mitocondri (piruvato + $O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O +$ energia).

3.5.1) Bilancio della fase citoplasmatica glicolitica

Per quanto riguarda la fase citoplasmatica, o glicolisi, possiamo scrivere



Nella Tabella 3.3 si riassume il bilancio della fosforilazione dell'ADP per via glicolitica citoplasmatica (vedi Capitolo 3.1).

Tabella 3.3 - Fosforilazione dell'ADP nel citoplasma fondamentale per ogni molecola di glucosio degradata a due molecole di ac. piruvico.

Tappa	Molecole di ATP formate od utilizzate (—)
glucosio \longrightarrow glucosio-6-fosfato	$1 \times -1 = -1$
fruttosio-6-fosfato \longrightarrow fruttosio-1,6-difosfato	$1 \times -1 = -1$
2 fosfogliceraldeide \longrightarrow 2 fosfoglicerato	$2 \times 1 = 2$
2 fosfopiruvato \longrightarrow 2 piruvato	$2 \times 1 = 2$
Totale	2

Teniamo ora presente che, per ogni molecola di NADH_2 ossidata ad opera dell' O_2 , si ha il trasporto elettronico di una coppia di elettroni con fosforilazione di tre molecole di ADP: nel caso (B) della reazione (19), ossia del NADH_2 formato durante la glicolisi, va ricordato però che il NADH_2 stesso sta « fuori » dai mitocondri e che la membrana dei mitocondri non è permeabile al NADH_2 . E' chiaro quindi che la coppia di elettroni legata al NADH -citoplasmatico rimarrebbe energeticamente inutilizzata se non si potesse trasferirla al NADH -mitocondriale. Ciò avviene mediante l'intervento di un intermedio metabolico, per lo più il diidrossiacetonfosfato, che ha queste caratteristiche: 1) permea liberamente la membrana mitocondriale; 2) può captare gli elettroni del NADH_2 e ridursi a glicerofosfato; 3) come glicerofosfato può riossidarsi a diidrossiacetonfosfato e cedere gli elettroni al NAD mitocondriale che, accogliendoli, si riduce a NADH_2 mitocondriale, pronto ad entrare in funzione nella catena respiratoria (Fig. 3.12). Va tut-

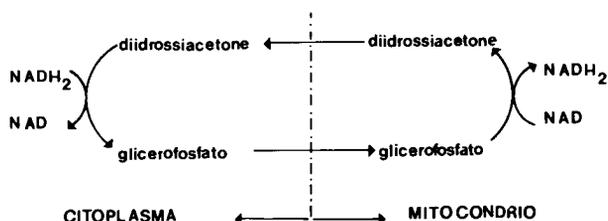
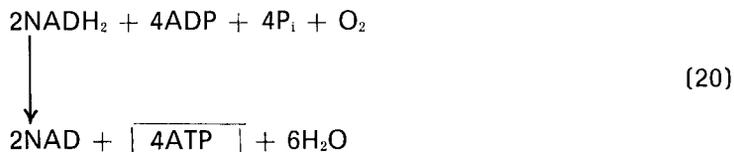


FIGURA 3.12

tavia notato che il trasporto della coppia di elettroni attraverso le membrane mitocondriali è tale che successivamente si formano solamente due molecole di ATP per ciascuna coppia di elettroni trasportati; pertanto nel caso del NADH citoplasmatico, la (17) diventa:



Per ogni molecola di glucosio che si trasforma in piruvato, sono formate 2 molecole di NADH_2 ; la risultante sarà quindi, secondo la (20) la formazione di 4 molecole di ATP.

Il bilancio di ATP formato nella fase anaerobia citoplasmatica deriva dalla somma della (19) e della (20), per cui si hanno: $2 + 4 = 6$ molecole di ATP formato per molecola di glucosio degradata ad ac. piruvico. Tuttavia la (20) si realizza nei mitocondri, per cui è più corretto considerare solo 2 le molecole di ATP formate durante la glicolisi citoplasmatica.

3.5.2) Bilancio della fase mitocondriale

Per quanto riguarda il processo (A) della reazione (19), si ha che le due molecole di piruvato sono trasportate dal citoplasma nell'interno del mitocondrio e danno origine: 1) secondo la (8) = 2 molecole di NADH₂; 2) secondo la (10), la (11) e la (13) = 6 molecole di NADH₂; 3) secondo la (12) = 2 molecole di succinato con intervento del Complesso II (FAD).

Quindi si ha: (a) un trasporto elettronico di 6 + 2 = 8 coppie di elettroni legati al NADH₂, che li immette nel Complesso I; e (b) un trasporto elettronico di 2 coppie di elettroni legati al succinato che li immette nel Complesso II.

Ora abbiamo già evidenziato che il trasporto di una coppia di elettroni del NADH, attraverso i Complessi I, III e IV dà origine a 3 molecole di ATP; il trasporto di una coppia di elettroni del succinato, attraverso i Complessi II, III e IV dà origine solo a 2 molecole di ATP.

Per ogni molecola di glucosio degradata (e quindi per ogni coppia di molecole di piruvato che entra nei mitocondri) a livello mitocondriale si formano: $(8 \times 3) + (2 \times 2) = 24 + 4 = 28$ molecole di ATP; a queste vanno aggiunte le due molecole di ATP che si formano nella (11 bis) ad opera del guanosintrifosfato (GTP).

Nella Tabella 3.4 è riassunto il bilancio della fosforilazione dell'ADP a livello mitocondriale, con formazione di 30 molecole di ATP.

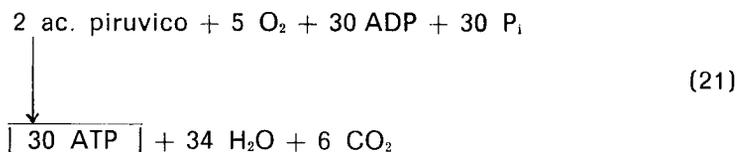


Tabella 3.4 - Fosforilazione dell'ADP a livello mitocondriale per ogni coppia di molecole di ac. piruvico immesse nel mitocondrio e derivanti dalla degradazione di una molecola di glucosio.

Tappa	Trasportatore	Molecole di ATP formate
2 piruvato → 2 acetil-CoA	NADH	2 × 3 = 6
2 isocitrato → 2 α-chetoglutarato	NADH	2 × 3 = 6
2 α-chetoglutarato → 2 succinil-CoA	NADH	2 × 3 = 6
2 succinil-CoA → 2 succinato	GTP	2 × 1 = 2
2 succinato → 2 fumarato	Complesso II	2 × 2 = 4
2 malato → 2 ossalacetato	NADH	2 × 3 = 6
	Totale	30

Il bilancio totale nella prestazione aerobica per ogni molecola di glucosio degradata, è quindi il seguente:

- 1) Fase citoplasmatica glicolitica
glucosio → 2 piruvato (reazione 19) : 2 ATP

2) Fase mitocondriale		
ossidazione del NADH citoplasmatico (reazione 20)	:	4 ATP
ciclo di Krebs (reazione 21)	:	30 ATP
		<hr/>
		36 ATP

Quindi per ogni molecola di glucosio degradata, si ha la formazione di 36 molecole di ATP, di cui 34 sono formate nei mitocondri, i quali forniscono quindi il 94% dell'ATP impiegabile nella prestazione.

3.6) Bilancio dell'ATP da metabolismo degli acidi grassi

Anche in questo caso tratteremo un quadro globale della fase citoplasmatica e di quella mitocondriale.

3.6.1) Bilancio della fase svolgentesi nel citoplasma fondamentale

E' relativamente semplice in quanto nella reazione (I) si ha l'utilizzazione di una molecola di ATP, e quindi il bilancio è negativo di una unità.

3.6.2) Bilancio della fase mitocondriale

Il bilancio è dipendente naturalmente dagli n atomi di C costituenti l'acido grasso che subisce $[(n/2) - 1]$ β -ossidazioni le quali daranno origine ad: (a) numero $n/2$ molecole di acetyl-CoA che si inseriranno nel ciclo di Krebs. Ciascuna di esse darà origine ad: (a.1) secondo la (10), la (11) e la (13) = 3 molecole di NADH; (a.2) secondo la (12) = 1 molecola di succinato; (a.3) secondo la (11 bis) una molecola di GTP. In totale avremo: per la (a.1) = $(n/2) \times 3 \times 3 = 4,5 n$ molecole di ATP; per la (a.2) = $(n/2) \times 1 \times 2 = n$ molecole di ATP; per la (a.3) = $(n/2) \times 1 \times 1 = 0,5 n$ molecole di ATP; sommando (a.1) + (a.2) + (a.3) avremo: $4,5 n + n + 0,5 n = 6 n$ molecole di ATP; (b) per la (V) = $[(n/2) - 1]$ molecole del Complesso II (rappresentato dal FAD) ciascuna delle quali forma 2 molecole di ATP; quindi in totale si avranno $2 [(n/2) - 1] = (n - 2)$ molecole di ATP; (c) per la (VII) = $[(n/2) - 1]$ molecole di NADH, ciascuna delle quali fornisce 3 molecole di ATP; quindi in totale si avranno: $3 [(n/2) - 1] = 3 (n/2) - 3 = (1,5 n - 3)$ molecole di ATP.

Sommando (a) + (b) + (c) avremo: $6 n + (n - 2) + (1,5 n - 3) = 6 n + n - 2 + 1,5 n - 3 = [8,5 n - 5]$ molecole di ATP formato.

Il bilancio totale della ossidazione di un acido grasso ad n atomi di C è quindi il seguente:

1) Fase svolgentesi nel citoplasma fondamentale ac. grasso \longrightarrow acil-adenilato (reazione I)	:	— 1 ATP
2) Fase svolgentesi nei mitocondri acil-CoA \longrightarrow acil-CoA - α, β -insaturo (reazione V)	:	(n — 2) ATP
β -idrossi-acil-CoA \longrightarrow β - cheto-acil-CoA (reazione VII)	:	(1,5 n — 3) ATP
β -cheto-acil-CoA \longrightarrow acetil-CoA (reazione VIII)	:	6 n ATP
		<hr/>
		[8,5 n — 6] ATP

Ad es. l'acido palmitico, che ha 16 atomi di C, darà origine a $(8,5 \times 16) - 6 = 136 - 6 = 130$ molecole di ATP. Questo spiega la elevata quantità di energia che si ricava dalla ossidazione degli acidi grassi: è abbastanza evidente che il processo è « solamente » mitocondriale, giacché a livello citoplasmatico si ha solo una perdita di ATP: ed il processo mitocondriale è solamente aerobico.

3.7) Autoregolazione metabolica

Abbiamo visto come la finalità dell'attività mitocondriale sia quella di far passare gli elementi costitutivi del pool degli adenilati (ATP, ADP, AMP) dalle forme a minor carica energetica a quelle a maggior carica energetica. Orbene, il bilancio dinamico fra detti costituenti condiziona non solamente la carica energetica compartimentale, ma modula efficacemente il metabolismo energetico, sia nella fase del citoplasma fondamentale che in quella dei mitocondri stessi. Ossia esiste un meccanismo di autoregolazione biochimica, per cui le concentrazioni reciproche di ATP, ADP ed AMP inibiscono o favoriscono alcune specifiche reazioni metaboliche dette « reazioni di modulazione » o « pacemaker » che fanno parte della « controregolazione » o « feed-back ». Nella Fig. 3.13, sono indicate alcune delle più importanti reazioni di modulazione, operate dal pool degli adenilati. La prima (« fruttosio-6-fosfato \longrightarrow fruttosio-1,6-difosfato ») avviene a livello del citoplasma fondamentale ed è catalizzata dalla fosfofruttochinase, mentre la seconda (isocitrato \longrightarrow α -chetoglutarato) avviene a livello mitocondriale ed è catalizzata dalla isocitricodeidrogenasi. L'ATP ha una azione depressiva sulla attività sia della fosfofruttochinase che della isocitricodeidrogenasi, mentre l'ADP e l'AMP hanno una azione attivante sugli stessi enzimi. Ne consegue che, allorché si abbia una notevole richiesta energetica compartimentale, con conseguente diminuzione di ATP ed incremento di ADP ed AMP, le reazioni di modulazione provvedono ad incrementare automaticamente e proporzionalmente le funzionalità del citoplasma fondamentale (glicolisi) e dei mitocondri.

La carica energetica potenziale (CEP), determinata dal bilancio dei costituenti il pool degli adenilati

$$CEP = \frac{[ATP] + 0,5 [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

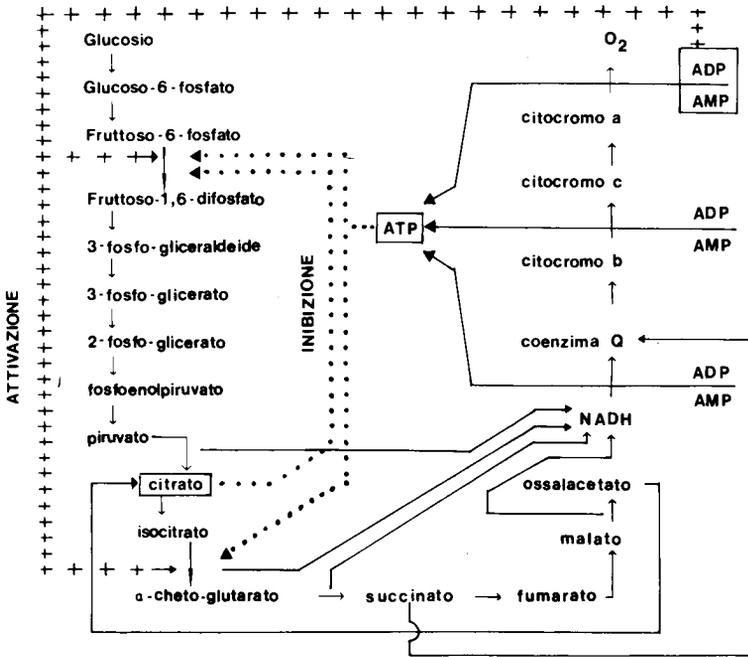


FIGURA 3.13

ha poi un ruolo notevole nella regolazione della respirazione, ossia del trasporto elettronico. Come indicato nella Fig. 3.14, più alta è la CEP (ossia più prevalgono le forme ad alto contenuto energetico) più la velocità di formazione di ATP tende a diminuire, e viceversa.

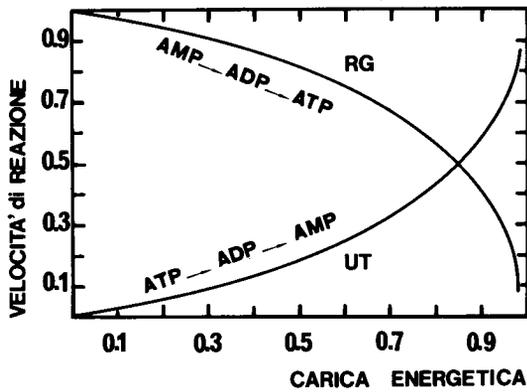


FIGURA 3.14

Possiamo quindi asserire che i fosfati labili autoregolano i processi energetici sia a livello della glicolisi citoplasmatica che, nei mitocondri, a livello dei Sistemi 1 e 2.

Va inoltre rilevato che esiste un altro importante intermediario di modulazione: l'ac. citrico, il quale ha un effetto depressivo sulla reazione di modulazione correlata alla fase svolgentsi nel citoplasma fondamentale: allorché si ha un eccesso di produzione di citrato, la velocità della trasformazione « fruttosio-6-fosfato \longrightarrow fruttosio-1,6-difosfato » viene depressa: l'inverso avviene nel caso di un incremento nell'impiego del citrato, con diminuzione della sua concentrazione compartimentale.

Un altro importante regolatore della velocità di reazione è lo stesso O_2 : infatti nel muscolo il consumo di glucosio è 6-8 volte maggiore in anaerobiosi che in aerobiosi: se si introduce O_2 in tali condizioni di lavoro anaerobico, la velocità di degradazione citoplasmatica del glucosio diminuisce vistosamente, mentre vengono notevolmente incrementate le attività mitocondriali.

L'effetto inibitorio dell' O_2 sulle attività glicolitiche citoplasmatiche si chiama « effetto Pasteur » ed è dovuto principalmente al fatto che, nel lavoro anaerobico, la reazione « glucosio \longrightarrow ac. lattico » libera circa il 7% dell'energia resa disponibile dalla reazione « glucosio \longrightarrow $H_2O + CO_2$ »; subentrando il meccanismo aerobico, non vi è bisogno di immettere nel sistema altro glucosio, giacché l'ac. lattico accumulato viene riconvertito ad ac. piruvico che entra nei mitocondri dove libera la gran massa di energia non espressa in anaerobiosi. Una parte di questa energia, se non viene utilizzata ai fini della prestazione, può venir impiegata per risintetizzare il glucosio o il glicogeno a partire dall'ac. lattico o dall'ac. piruvico residui. Va infatti tenuto nella massima evidenza che le reazioni di scissione glicolitica sono reversibili, ossia si può avere l'inversione di tali reazioni (ac. lattico \longrightarrow ac. piruvico \longrightarrow glucosio \longrightarrow glicogeno), anche se ciò avviene in entità modesta ed unicamente nei tessuti epatico e renale.