

2) LE ATTIVITA' MITOCONDRIALI

2.1) Generalità sugli enzimi

Gli enzimi si possono definire come dei catalizzatori organici, dotati di alta specificità e prodotti dalle cellule viventi; sono di natura proteica e possiedono pertanto le proprietà caratteristiche di queste sostanze: ad esempio, la perdita di attività enzimatica è parallela alla denaturazione delle proteine causata dal calore o da altri agenti.

Alcuni enzimi sono sostanze omogenee semplici, costituite cioè dalla sola componente proteica, mentre altri enzimi sono proteine complesse, dette « coniugate », contenenti anche un gruppo prostetico di natura non proteica, così saldamente legato alla parte proteica stessa che i procedimenti per l'estrazione e la purificazione dell'enzima non ne provocano la dissociazione nei singoli costituenti; la parte proteica dell'enzima è denominata apoenzima. Molti enzimi per poter funzionare richiedono la presenza di alcuni cofattori, o coenzimi, sostanze organiche di struttura piuttosto complessa, spesso derivati di vitamine, che si legano alla parte enzimatica, ma assai labilmente. Molto semplicemente la distinzione tra coenzimi e gruppi prostetici è la seguente: si definisce gruppo prostetico la parte non proteica dell'enzima che resta costantemente unita alla proteina durante lo svolgimento di tutto il processo biologico, mentre i coenzimi agiscono da trasportatori; partecipano cioè in vario modo alla formazione del complesso intermedio (enzima-substrato-coenzima), da cui però si distaccano insieme al prodotto della reazione enzimatica. Tanto l'enzima che il coenzima agiscono quindi cataliticamente e risultano rigenerati e liberi al termine del processo chimico al quale hanno partecipato; quindi piccole quantità di questi composti possono attivare la trasformazione di grandi quantità di substrato, ossia delle sostanze sulle quali l'enzima è in grado di agire. Molti enzimi sono attivi solo in presenza di ioni metallici, abitualmente denominati « attivatori ».

Mentre alcuni enzimi sono praticamente ubiquitari, altri sono caratteristici solo del mondo vegetale o del mondo animale, con grandi diversità nei singoli organismi a seconda della specie e, nell'ambito della stessa specie, con sensibili variazioni nella concentrazione nei diversi tessuti ed organi. Gli enzimi non sono distribuiti uniformemente nella cellula, ma risultano localizzati in ben definite strutture subcellulari; così i nuclei possiedono una elevata concentrazione degli enzimi del metabolismo nucleosidico (DNA, RNA, ecc.); così nei mitocondri si sono riscontrati gli enzimi deputati alla β -ossidazione degli acidi grassi, alla fosforilazione ossidativa, all'ossidazione del succinato; così nel citoplasma vi sono gli enzimi interessati nelle sequenze delle reazioni di glicolisi, ecc.

La formazione degli enzimi nella cellula si identifica con la biogenesi delle proteine cellulari ed è condizionata dalla concentrazione di sostanze sulle quali l'enzima può agire (substrato). La produzione di un enzima è controllata da un « gene regolatore » mentre la struttura dell'enzima è determinata da un gene differente, il « gene strutturale ». L'adattamento enzimatico alle diverse esigenze biofunzionali organismiche non implica un mutamento genetico della cellula, ma solamente un aumento della produzione di un enzima che la cellula è geneticamente già in grado di produrre; tale aumento è determinato dall'incremento del suo substrato, a sua volta determinato, ad esempio, dalle incrementate esigenze funzionali.

Una delle principali caratteristiche degli enzimi è la loro elevata specificità, cioè la proprietà per cui un enzima agisce su una sola sostanza o su poche sostanze chimicamente molto simili fra loro. Per questa caratteristica ciascun enzima può agire soltanto su uno dei passaggi di una catena metabolica di reazioni; di conseguenza una determinata via metabolica richiede la presenza di un sistema coordinato di parecchi enzimi che agi-

scono successivamente e in ordine definito sulle molecole del substrato in fase di trasformazione. Inoltre, nelle particelle mitocondriali, molti enzimi non sono liberi di muoversi, ma risultano fissati su strutture insolubili, in posizioni definite, per cui l'organizzazione topografica modula la successione delle reazioni, dato che l'intimo contatto delle molecole dell'enzima con quelle del substrato è essenziale per lo svolgimento della reazione.

Gli enzimi, a seconda del tipo di reazione che catalizzano, sono stati suddivisi in sei grandi classi: Ossidoreduttasi, Transferasi, Idrolasi, Liasi, Isomerasi e Ligasi. Queste a loro volta in sottoclassi, che sono nuovamente distinte con ulteriori suddivisioni per specificare sempre più dettagliatamente la natura chimica dei partecipanti ed il livello a cui avviene la reazione. La classe delle Transferasi, ad esempio, comprende tutti quegli enzimi che catalizzano il trasferimento di radicali (glucidici, metilici, fosforici, ecc.) ossia le glicosil-transferasi, le metil-transferasi, le fosfotransferasi dette chinasi, ecc... Queste ultime poi, a seconda dell'accettore che riceve il gruppo fosforico, comprendono: l'adenilato-chinasi (che catalizza la reazione di trasferimento di un radicale fosforico dallo ATP all'AMP con formazione di due ADP: $ATP + AMP \rightleftharpoons ADP + ADP$), la creatina-chinasi ($ATP + creatina \rightleftharpoons ADP + \text{fosfocreatina}$), ecc. che consentono la formazione di legami altamente energetici e mediante questi il trasferimento di energia da un sistema all'altro.

Da un punto di vista generale si può dire che la caratteristica comune degli enzimi (E) è quella di interreagire con il substrato specifico (S) per trasformarlo nel prodotto finale (P).



Come si vede, in un primo tempo si ha la formazione del complesso enzima-substrato (ES) e successivamente la trasformazione di S in P, con liberazione dell'enzima E. Nella maggior parte delle reazioni enzimatiche sono interessati substrati la cui molecola è molto più piccola rispetto alla lunga catena proteica dell'enzima. Di conseguenza S entrerà in rapporto diretto solo con porzioni limitate di E: queste porzioni, unitamente a quei gruppi funzionali che intervengono indirettamente nella catalisi, costituiscono il « sito attivo » dell'enzima. Il resto della catena enzimatica può anche non prendere parte attiva nella reazione catalitica, benché una sua alterazione agisca comunque sulla funzionalità dell'enzima; il suo solo ruolo è quello di supporto strutturale, cioè di mantenere debitamente orientati i siti attivi perché sia possibile la formazione del complesso enzima-substrato.

Per quanto concerne la conformazione del sito attivo e la specificità delle reazioni enzimatiche, sono state avanzate due teorie fondamentali: la prima è quella della « chiave-serratura », secondo la quale l'enzima è disposto in una struttura rigida destinata ad accogliere solo il suo substrato specifico, (come appunto una data serratura può ingranare solo con la sua propria chiave) mentre respinge stericamente le altre molecole. Questa teoria non è però accettabile in senso assoluto perché la molecola enzimatica non è mai così rigida e subisce variazioni in funzione del substrato.

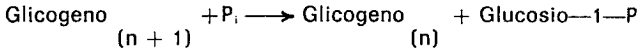
Più probabile è l'ipotesi della « variazione indotta » secondo la quale l'enzima, in presenza del substrato specifico e per influenza di questo, modifica la sua struttura per meglio legarsi ad esso e svolgere la sua azione catalitica.

Nell'organismo non esistono reazioni, anche se termodinamicamente possibili, che non siano catalizzate da enzimi, i quali hanno anche il compito di accelerarle: i meccanismi non intervengono singolarmente, ma ne possono coesistere diversi contemporaneamente.

Alcuni enzimi particolari, oltre al ruolo solito di riconoscere un substrato specifico e di catalizzarne la trasformazione in prodotti, hanno la proprietà di riconoscere anche altre molecole le quali si associano all'enzima comportandosi da attivatori o da inibitori, cioè rispettivamente attivandolo od inattivandolo nei confronti del substrato. Sono questi gli « enzimi allosterici », così chiamati perché vengono a svolgere un compito di regolazione mediante centri diversi dal sito attivo, ma con questo funzionalmente correlati. L'inibitore, legandosi all'enzima, viene presumibilmente a creare un ingombro sterico che agisce con azione repulsiva sul substrato, impedendo che a sua volta questo prenda rapporto col sito attivo. La maggior parte degli enzimi allosterici sono delle proteine costituite da più subunità: l'interazione con l'inibitore può portare ad una nuova conformazione di quelle subunità.

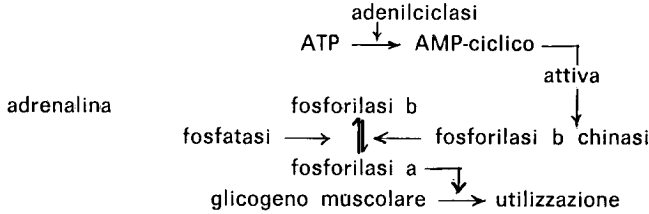
Un esempio di questo controllo allosterico è quello presentato dall'enzima « glicogeno-fosforilasi muscolare » che ha il compito di attingere alle riserve di glicogeno per staccare molecole di glucosio e, fosforilandole, rendere possibile la loro utilizzazione metabolica.

La reazione si svolge secondo lo schema:



dove n rappresenta il numero delle molecole di glucosio costituenti il glicogeno.

Questo enzima è presente nel muscolo in due forme fra loro interconvertibili: « fosforilasi b », inattiva, costituita da due subunità (quindi è un dimero), e « fosforilasi a », attiva, che è fosforilata e costituita da quattro subunità (quindi è un tetramero). L'interconversione è sotto il controllo dell'adrenalina che stimola un altro enzima, l'adenilciclasi, a formare AMP-ciclico; l'AMP-ciclico ne attiva dal canto suo un altro: la fosforilasi b-chinasi, che agisce sul dimero inattivo, ossia sulla fosforilasi b, trasformandolo in fosforilasi a, tetramero attivo. Questo a sua volta viene convertito nella forma b da una specifica fosfatasi che stacca il radicale fosforico e riporta l'enzima alla forma dimerica.



La fosfatasi è inibita dall'AMP, che attiva invece la fosforilasi: se infatti nell'organismo sono alti i valori di AMP, vuol dire che saranno bassi o assenti quelli di ADP e ATP, ossia dei radicali fosforici altamente energetici. E' quindi necessario attingere alle riserve di glicogeno, per staccare glucosio-1-P che entrando nel ciclo metabolico della glicolisi e specialmente in quello di Krebs, potrà fornire l'energia necessaria alla sintesi di ATP. E per fare questo è necessaria l'attivazione della fosforilasi. Il caso opposto si verifica quando sono presenti alte quote di ATP che si comporterà da inibitore nei confronti della fosforilasi a e da attivatore per la fosfatasi che con processo inverso indirizzerà il glucosio alla glicogeno-sintesi.

2.2) Gli enzimi mitocondriali

Si è precedentemente rilevato che i sistemi mitocondriali connessi con la trasduzione di energia (Fig. 1.2) sono essenzialmente tre, e cioè: un sistema a catena per il trasporto di elettroni (Sistema 1 o della catena respiratoria), un sistema capace di generare elettroni per la catena (Sistema 2 o del ciclo di Krebs) ed un sistema idoneo a sintetizzare ATP dall'unione di ADP e fosfato inorganico (Sistema 3 o della fosforilazione).

L'essenza della funzione mitocondriale consiste nella trasformazione dell'energia libera, prodotta dall'ossidazione di alcune molecole, in energia di un nuovo legame formato tra due molecole (ADP-fosfato; AMP-fosfato), energia detta impropriamente « di legame ». Il mitocondrio attua la produzione di ATP associando una sintesi chimica (quella tra ADP e fosfato inorganico) ad una reazione di ossido-riduzione. Per semplicità, si considereranno i tre sistemi come eventi attuantesi separatamente nel tempo e nello spazio, anche se, come indicato nella Figura 2.1, essi sono legati intimamente l'uno all'altro da un meccanismo di trasduzione energetica insito nella catena di trasporto degli elettroni.

Nella trattazione che segue si farà costantemente riferimento ai potenziali ossido-riduttivi: per le delucidazioni di base su questo argomento si rimanda all'appendice A.1: « Elementi di bioenergetica ».

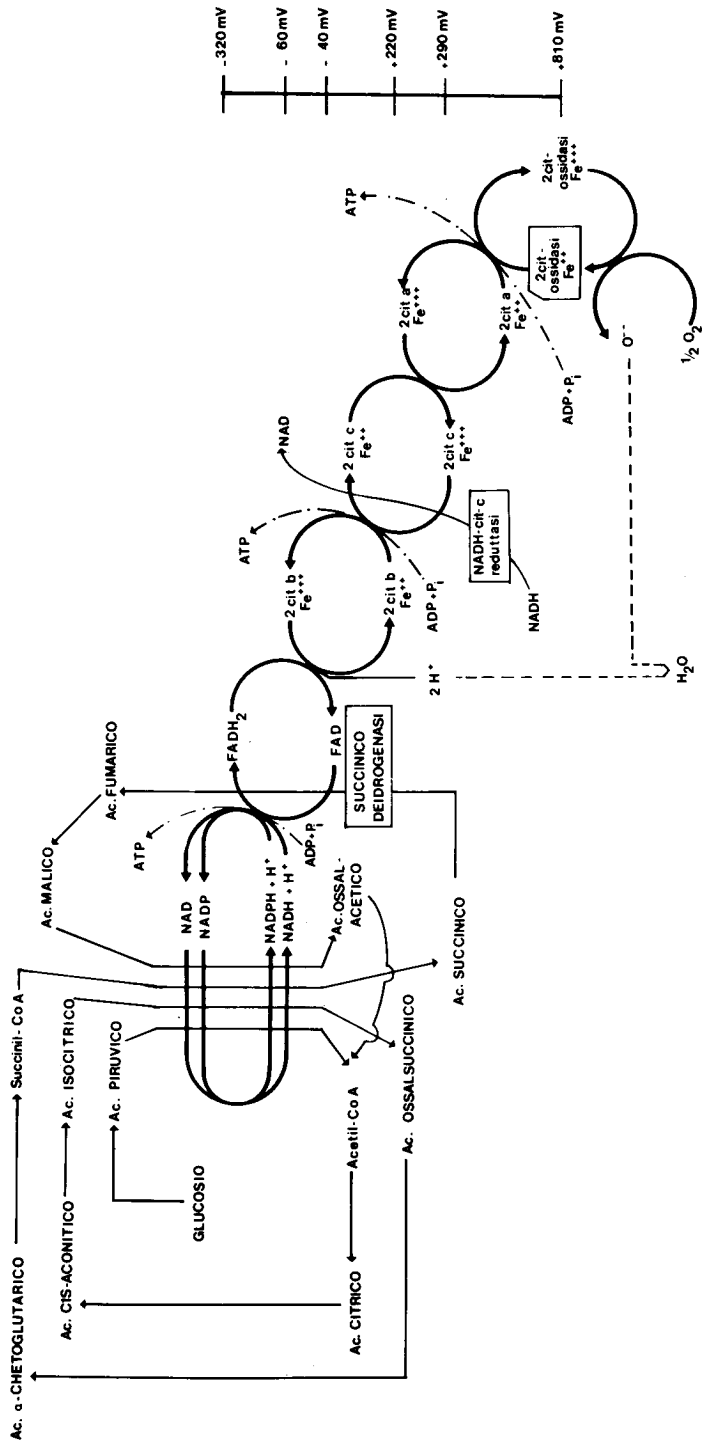


FIGURA 2.1

2.2.1.) La catena di trasporto degli elettroni (Sistema 1)

La catena di trasporto degli elettroni è un insieme ben strutturato di proteine contenenti gruppi ossido-riducenti che rendono possibile il trasporto graduale (ma non continuo) di una coppia di elettroni da donatori di elettroni, come il NADH (difosfo-piridin-nucleotide ridotto) ed il succinato, all'ossigeno molecolare. Il NADH ed il succinato sono prodotti dal Sistema 2 (o ciclo di Krebs) e da essi prende l'avvio una serie di ossido-riduzioni che trasporta gli elettroni all'ossigeno che la funzione cardiocircolatoria pone a disposizione della cellula in generale, e di quella muscolare in particolare. Tra NADH ed ossigeno avvengono 12 ossido-riduzioni; anche tra il succinato e l'ossigeno avviene lo stesso numero di ossido-riduzioni, ma la natura delle prime tre è diversa. Il complesso organizzato di proteine che opera il trasporto elettronico è suddiviso in quattro unità che insieme formano la catena di trasporto degli elettroni. Questi complessi di vari componenti (che possono essere considerati come delle singole catene di trasporto di elettroni, ma di lunghezza limitata) vengono chiamati Complesso I, II, III e IV, come indicato nella Tabella 2.1. I Complessi I, III e IV sono nell'ordine implicati nell'ossidazione

Natura delle componenti ossido-riduttive dei quattro complessi della catena e probabile sequenza del flusso elettronico

COMPLESSO	COMPONENTI DELLE OSSIDO-RIDUZIONI	SEQUENZA
I	Flavin mononucleotide (FMN) Ferro (Fe)	NADH → FMN → Fe → CoQ
II	Flavin adenin dinucleotide (FAD) Ferro (Fe)	Succinato → FAD → Fe → CoQ
III	Citocromo b (b) Citocromo c (c) Ferro (Fe)	CoQH ₂ → b → c → Fe → c
IV	Rame (Cu) Citocromo a (a) Rame (Cu) Citocromo a (a)	c ridotto → Cu → a → Cu → a → O ₂

TABELLA 2.1

del NADH, mentre i Complessi II, III e IV sono nell'ordine implicati nell'ossidazione del succinato. Ciascuno dei quattro Complessi è una struttura integrata contenente una serie di tre o più proteine con gruppi ossido-riduttori disposti in una ben precisa successione. Nei Complessi non ci sono solo proteine con funzioni ossido-riduttrici, ma anche proteine aventi ruoli diversi e sostanze non proteiche. Ogni Complesso catalizza il trasferimento di elettroni tra due molecole « mobili »; così, come rappresentato

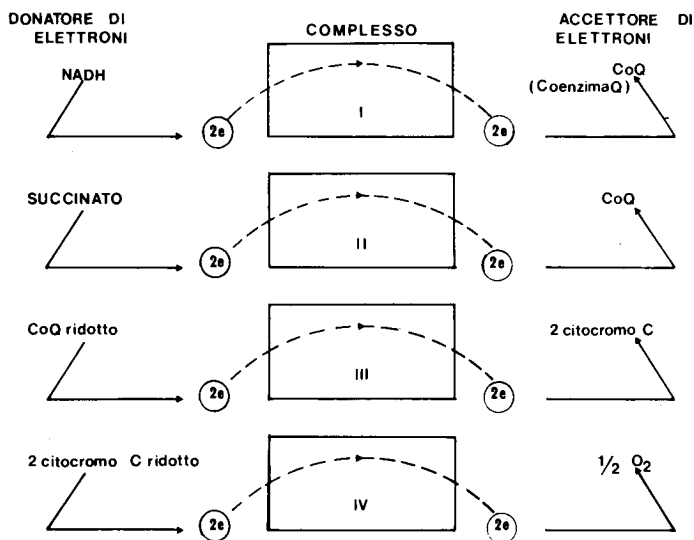


FIGURA 2.2

nella Figura 2.2, il Complesso I catalizza l'ossidazione del NAD ridotto (o NADH) per mezzo del coenzima Q; il Complesso II, l'ossidazione del succinato per mezzo del coenzima Q; il Complesso III, l'ossidazione del coenzima Q ridotto per mezzo del citocromo c; il Complesso IV, l'ossidazione del citocromo c ridotto per mezzo dell'ossigeno molecolare.

MOLECOLE MOBILI DELLA CATENA DI TRASPORTO ELETTRONICO

- 1) Molecole mobili intermedie nella catena :
 - 1.a) Coenzima Q
 - 1.b) Citocromo C
- 2) Molecole mobili ai due estremi della catena:
 - 2.a) all'estremo in contatto con le strutture extramitochondriali
-Ossigeno
 - 2.b) all'estremo in contatto con il sistema 2, generatore di elettroni
-NADH
-Succinato

TABELLA 2.2

Come indicato anche nella Tabella 2.2 e nella Figura 2.3, il coenzima Q è l'anello mobile sia tra i Complessi I e III che tra i Complessi II e III; il citocromo c è invece l'anello mobile tra il Complesso III e IV; ciascuno di questi anelli mobili è ridotto da un complesso e ossidato da un altro. Di contro, il NADH ed il succinato costituiscono una differente categoria di molecole mobili, in quanto essi operano tra la catena ed un sistema esterno alla catena; infatti, essi sono gli anelli mobili di congiunzione tra il sistema che genera gli elettroni (ciclo di Krebs) da un estremo e la catena di trasporto degli elettroni: l'ossigeno passa all'interno dei mitocondri dall'ambiente circostante prima di accettare gli elettroni che hanno attraversato la catena di trasporto.

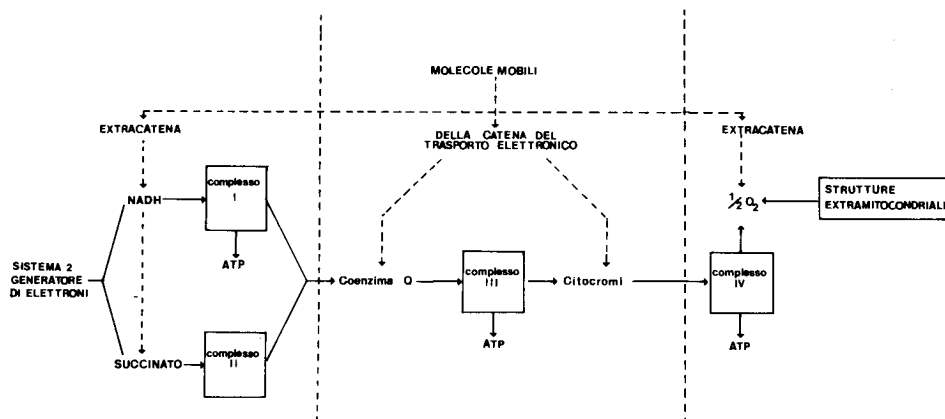


FIGURA 2.3

Come risultato del passaggio di elettroni attraverso i Complessi I, III, o IV, si ha l'attivazione di uno stato energetico del Complesso in cui l'energia liberata dalle ossido-riduzioni viene conservata come energia conformazionale. Così, ciascuno dei tre Complessi è sia una catena per il trasporto elettronico sia un trasformatore che lega il flusso di elettroni all'energia conformazionale. La natura della reazione del trasporto elettronico è differente in ogni Complesso, ma la finalità della trasduzione è praticamente la stessa, vale a dire, la trasformazione dell'energia di ossido-riduzione in energia conformazionale. L'energia libera ottenuta da questa trasformazione è sufficiente per operare la sintesi dell'ATP dall'ADP e fosfato inorganico.

Quindi, la caduta di potenziale tra NADH e coenzima Q nel Complesso I, tra il coenzima Q ridotto ed il citocromo c nel Complesso III, e tra il citocromo c ridotto e l'ossigeno molecolare nel Complesso IV, è più che sufficiente per liberare una quantità di energia atta a rendere possibile la sintesi: $ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$. Al contrario ciò non si verifica relativamente alla differenza di potenziale tra il succinato ed il coenzima Q, per cui la sintesi di ATP a mezzo del flusso di elettroni attraverso il Complesso II è energeticamente impossibile. Così

solo il Complesso I, III e IV intervengono nella fosforilazione ossidativa; il Complesso II è invece un Complesso « impotente » per questa funzione, anche se è in grado di innescare il trasporto elettronico che sarà produttivo a livello dei Complessi III e IV.

2.2.2) Il sistema deputato alla produzione di elettroni (Sistema 2)

Alla catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri è legato un sistema di enzimi che genera NADH e succinato, i due donatori di elettroni per la catena. Questo sistema di enzimi catalizza la sequenza metabolica conosciuta come ciclo dell'acido citrico di Krebs (o ciclo degli acidi tricarbossilici), il cui schema è riportato in Figura 2.4. Il piruvato deriva

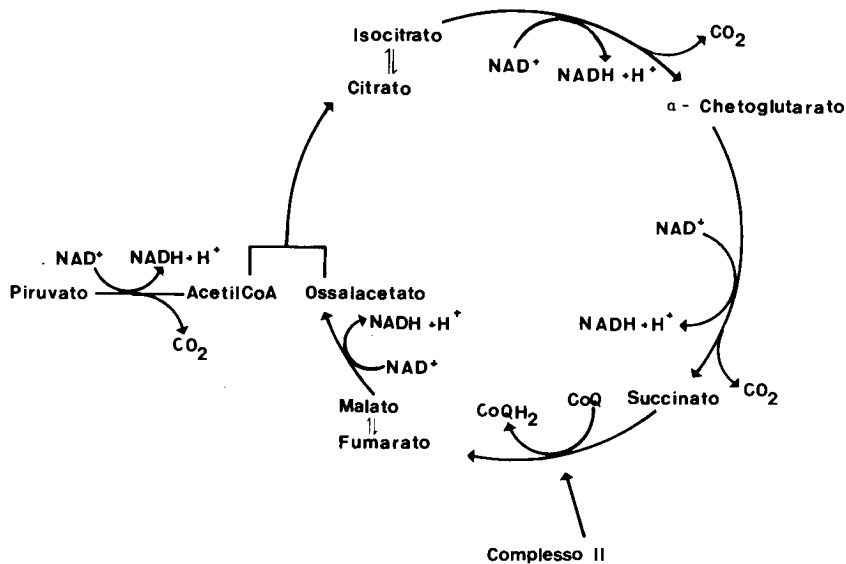


FIGURA 2.4

fondamentalmente dal glucosio attraverso la glicolisi che si svolge nel citoplasma; esso è quindi ossidato in cinque successivi passaggi: (1) da piruvato ad acetil-CoA (con riduzione del NAD^+); (2) da isocitrato ad α -chetoglutarato (con riduzione di NAD^+ o NADP^+); (3) da α -chetoglutarato a succinato (con riduzione di NAD^+); (4) da succinato a fumarato (con l'intervento del Complesso II); (5) da malato a ossalacetato (con riduzione di NAD^+). In aggiunta a queste cinque ossido-riduzioni avvengono una idratazione (fumarato \rightarrow malato), un'isomerizzazione (citrato \rightarrow isocitrato) ed una condensazione (ossalacetato + acetil-CoA \rightarrow citrato). Alla fine di ogni ciclo, una molecola di piruvato viene completamente ossidata, ed una molecola di ossalacetato viene rigenerata, pronta per un nuovo ciclo che inizia dalla condensazione di ossalacetato con acetil-CoA. Va notato che, dei due gruppi di molecole mobili operanti ad un estremo

della catena, il NADH (o NADPH) è prodotto in quattro delle cinque ossidazioni del ciclo dell'acido citrico, mentre il succinato è generato in uno solo dei cinque passaggi ossidativi (ossidazione dell' α -chetoglutarato). Va anche notato che una sola fase ossidativa del ciclo (succinato \rightarrow fumarato) coinvolge direttamente una ossidazione catalizzata dalla catena di trasporto degli elettroni (Complesso II), mentre le altre generano solamente dei substrati (NADH e succinato) per la catena.

Ogni molecola che può dare origine ad un intermedio del ciclo dell'acido citrico può pure servire a produrre succinato e NADH. Acidi grassi ed aminoacidi, in molti mitocondri, vengono usati proprio per questa capacità; questo significa che qualsiasi prodotto intermedio, derivante dal metabolismo proteico o lipidico, può inserirsi attivamente in una delle tappe del ciclo di Krebs e dare quindi origine a succinato e NADH. Così le unità bicarboniose derivanti dalle catene degli acidi grassi possono dare origine a molecole di acetil-CoA, e analogamente alcuni aminoacidi, mediante processi di desaminazione ossidativa o di transaminazione, possono essere convertiti in intermedi del ciclo di Krebs, come indicato nella Figura 2.5. Va inoltre considerato che, se gli intermedi del ciclo vengono

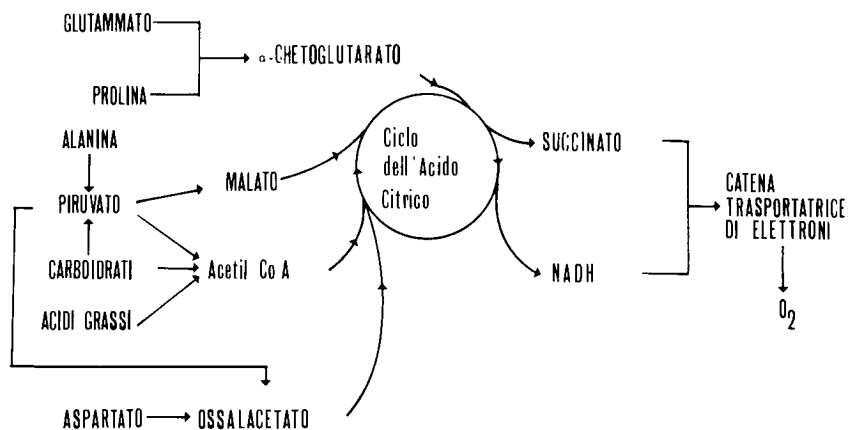


FIGURA 2.5

convogliati verso altre vie, viene meno l'efficacia con la quale il ciclo può captare unità di acetil-CoA derivate sia dal piruvato che dalla ossidazione degli acidi grassi. Un'importante fonte di intermedi per ricaricare il ciclo, e ristabilire così la sua efficienza, è il piruvato; infatti il piruvato può dare origine all'intermedio malato mediante una carbossilazione riduttiva (reazione con CO_2 ed NADPH in presenza dell'enzima malico); inoltre può anche essere direttamente carbossilato (con la piruvico carbossilasi) ad ossalacetato, reazione attivata dall'ATP e probabilmente più importante di quella catalizzata dall'enzima malico (o malato-deidrogenasi) per il mantenimento del ciclo.

2.2.3) Sintesi dell'ATP (Sistema 3)

L'energia liberata dal trasferimento di elettroni nei Complessi è usata per rendere possibile la sintesi di ATP dall'unione di ADP e ortofosfato: perché questo sia possibile è necessario che la liberazione di energia per mezzo del trasporto elettronico e la sintesi dell'ATP siano sincronizzati. Per quanto detto in 2.2.1), il trasporto degli elettroni dal NADH, attraverso i Complessi I, III e IV, darà origine a 3 molecole di ATP; il trasporto elettronico dal succinato attraverso i Complessi II, III e IV, darà origine a 2 molecole di ATP. Su questo argomento si ritornerà più avanti. La sintesi dell'ATP avviene a spese dell'energia conformazionale ed elettrostatica; questa seconda trasduzione implica l'esistenza di un sistema aggiunto, ma intimamente associato, ai Complessi della catena di trasporto degli elettroni. Allorché l'ATP è stato sintetizzato all'interno dei mitocondri, sussiste la possibilità che un gruppo fosforico altamente energetico sia trasferito ad una molecola di ADP posta all'esterno dei mitocondri, dando così origine alla formazione di ATP extra-mitocondriale: questo ATP extra-mitocondriale deve essere considerato come una parte del Sistema 3, per quanto riguarda la disponibilità di ATP ai fini dell'immagazzinamento di energia. Ossia, mentre il trasporto elettronico e la sintesi dell'ATP sono processi prevalentemente mitocondriali, il deposito di energia nel pool dei composti portatori di fosfati labili ha sede mitocondriale ed extramitocondriale. I meccanismi generali qui accennati, verranno ampiamente discussi nel Capitolo 4.

Quindi il trasporto elettronico è un processo chimico di ossido-riduzione; si è visto in precedenza che nel Sistema 2 (ciclo di Krebs) si ha la liberazione di coppie di ioni H^+ e delle corrispondenti coppie di elettroni (e^-): questi atomi di idrogeno vengono rimossi a mezzo di deidrogenasi piridiniche ed avviati alla catena enzimatica trasportatrice di elettroni (Sistema 1). Al momento del trasferimento di una coppia di atomi di H sui coenzimi, gli atomi stessi sono ad un livello energetico simile a quello del substrato: quindi l'energia libera di ossidazione del substrato non diviene utilizzabile. Essa si libera quando le forme ridotte dei nucleotidi piridinici (NADH) attraverso altri coenzimi sono riossimate mediante un trasferimento di elettroni: in tal caso alla variazione di energia libera corrisponde una liberazione di energia elettrica (per trasferimento di elettroni) che si trasforma in lavoro (conversione di ADP in ATP). In termini semplici il processo avviene, ad es., così: il substrato, che possedeva gli atomi di idrogeno, li libera (vedi ciclo di Krebs) e questi passano al difosfo-piridin-nucleotide (NAD), che viene quindi ridotto.

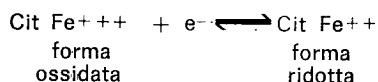


A sua volta il NAD - ridotto cede gli idrogeni ad un altro coenzima: l'FMN (flavin-adeninmononucleotide) che si riduce, mentre il NAD - ridotto si ossida.



L'FMN - ridotto cede gli idrogeni ad un altro coenzima, e così via. Nel processo ossido-riduttivo si è detto aversi un trasferimento di elettroni; a titolo puramente esplicativo indichiamo: $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$. Ora l'FMN ridotto viene riossidato mediante l'intervento dei citocromi: dapprima il citocromo b, poi il c_1 , il c, l'a ed infine l' a_3 (che è una citocromo-ossidasi capace di autoossidarsi a basse tensioni di O_2). I citocromi

oscillano dalla forma ridotta (con Fe^{++}) alla forma ossidata (con Fe^{+++}) per assunzione o perdita di un elettrone



I citocromi sono dei trasportatori di elettroni, disposti uno dopo l'altro secondo i valori dei potenziali di ossido-riduzione. L'ultimo è la citocromo ossidasi che è auto-ossidabile e che può trasferire l'elettrone al suo naturale accettore, ossia l'ossigeno molecolare ($\text{O}-\text{O}$).

2.2.4) Utilizzazione dell'energia

Un concetto non completamente corretto è che l'energia liberata dal trasporto elettronico a livello mitocondriale sia utilizzata, nei muscoli, solo per svolgere un lavoro statico o dinamico.

Molti sono i modi con cui i mitocondri possono utilizzare l'energia liberata dal trasporto elettronico; questa può essere utilizzata per la sintesi di ATP, ma può anche rendere possibile il trasporto di ioni, cambiamenti in volume (rigonfiamenti ioni-dipendenti), flusso di elettroni controcorrente, ed una transidrogenazione tra NADH ed NADP^+ . L'energia è conservata nella sintesi di ATP, ma è spesa nei processi di cambiamento di volume, nella traslocazione di ioni di metalli bivalenti e nella transidrogenazione, come indicato nella Fig. 2.6.

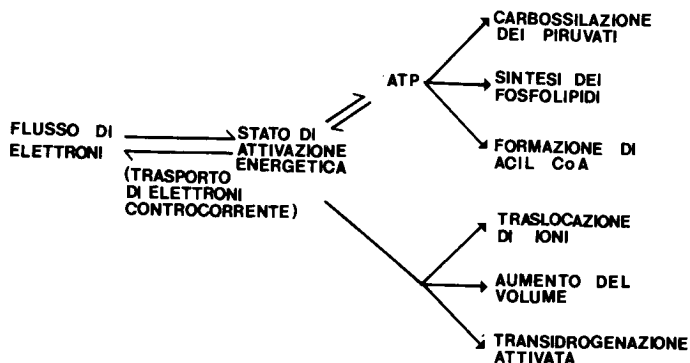


FIGURA 2.6

Il trasporto di elettroni attraverso la catena può essere accoppiato alla sintesi di ATP, che è un processo reversibile; pertanto l'ATP può essere usato per invertire la direzione del flusso degli elettroni; la scissione di ATP in ADP e P_i può essere accoppiata alla generazione di uno stato di attivazione energetica, e la scarica di questo stato può essere utilizzata per portare il flusso degli elettroni nella direzione opposta a quella spontanea. La massima conservazione di energia richiede che le reazioni accoppiate possano avvenire in condizioni reversibili. Uno dei Complessi

mitocondriali catalizza il trasferimento di un idrogenione, come rappresentato dall'equazione:



I potenziali dei sistemi $\text{NADH} - \text{NAD}^+$ e $\text{NADPH} - \text{NADP}^+$ sono più o meno identici: E'_0 a pH 7,0 è $-0,321 \text{ V}$ e $-0,324 \text{ V}$, rispettivamente. Non ci si deve meravigliare, perciò, se la costante di equilibrio per questa reazione è circa 1,0 come richiesto dai principi elementari della termodinamica. Quello che è sorprendente nella reazione (1) è che l'avvicinamento all'equilibrio da sinistra a destra, come ad esempio con NADPH come donatore di idrogenioni, è molto più rapido della reazione inversa, cioè l'idrogenazione del NADP^+ per mezzo di NADH . Quando i mitocondri sono portati ad uno stato di attivazione energetica, tuttavia, solo l'ultima reazione può avvenire; inoltre l'equilibrio è spostato molto a sinistra.

2.2.5) Interdipendenza dei sistemi

Gli anelli di congiungimento tra la catena di trasporto degli elettroni e gli enzimi del ciclo dell'acido citrico sono il succinato ed il NADH , come evidenziato in Figura 2.3. Gli enzimi ossidanti gli acidi grassi e gli aminoacidi possono essere considerati come sistemi supplementari che forniscono gli intermedi che alimentano il ciclo dell'acido citrico, l'unico donatore di elettroni per la catena. Il passaggio di una coppia di elettroni dal NADH attraverso la catena implica la formazione finale di tre molecole di ATP . Ognuno dei tre Complessi lega il flusso di elettroni alla formazione di uno stato energetico; nell'ossidazione del succinato, lo stato di attivazione energetica (e quindi l' ATP) si forma solo in due Complessi durante il trasferimento di elettroni all'ossigeno molecolare (Fig. 2.3), mentre il Complesso II è incapace di generare una attivazione energetica durante il flusso di elettroni.

D'altra parte esistono delle interrelazioni tra il ciclo di Krebs, il trasporto elettronico e la sintesi degli acidi grassi, sintesi che si attua mediante l'allungamento della loro catena costitutiva. Infatti sia l'allungamento degli acidi grassi che la sintesi dei fosfolipidi, richiedono ATP ; tale necessità correla la funzionalità della catena di trasporto degli elettroni a questi due sistemi di sintesi. Esiste quindi un legame fra il ciclo di Krebs e l'allungamento degli acidi grassi, in quanto l'acetil-CoA, il NADH ed il NADPH formati nel ciclo di Krebs sono utilizzati per le sequenze energetiche che portano all'allungamento della catena degli acidi grassi, come indicato nella Figura 2.7. C'è pure una relazione tra la sintesi accoppiata di ATP e l'innesco dell'ossidazione degli acidi grassi; infatti gli acidi grassi devono essere convertiti ai rispettivi esteri con l'acetil-CoA. Pertanto è importante puntualizzare che, sebbene l'ossidazione degli acidi grassi generi ATP , il suo inizio è condizionato dalla conversione degli acidi grassi ai rispettivi esteri con l'acil-CoA, reazione ATP -dipendente. L' ATP gioca un ruolo analogo per il mantenimento dell'intero ciclo di Krebs: infatti è usato di volta in volta per la formazione di ossalacetato dal piruvato; quote catalitiche di ossalacetato, una volta disponibili, permettono l'ossidazione di grandi quote di piruvato e formazione di molto ATP .

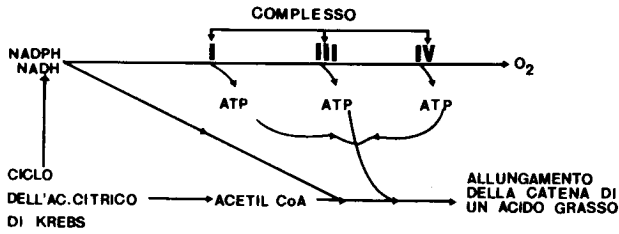
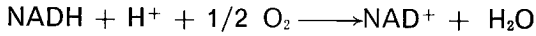


FIGURA 2.7

2.2.6) Correlazioni tra la catena respiratoria e la fosforilazione a livello del trasporto degli elettroni all'ossigeno

Come premessa di questo paragrafo può essere utile consultare l'appendice A.2) « Cenni di fisica ».

La catena respiratoria può essere schematizzata nella Figura 2.8, dove sotto ciascun componente è riportato il potenziale ossido-riduttivo. E' evidente che nell'ossidazione del NADH:



gli elettroni si muovono da un potenziale di ossido-riduzione di $-0,32$ Volts ad un potenziale di ossido-riduzione di $+0,82$ Volts, con un salto di potenziale di $1,14$ Volts. Durante l'ossidazione del NADH, due elettroni si muovono quindi in un campo elettrico fra due punti a potenziale diverso e possono quindi compiere un lavoro. Detto lavoro può essere calcolato dalla relazione generale:

$$L = q \times (v_a - v_r)$$

dove L = lavoro compiuto; q = carica; $(v_a - v_r)$ = differenza di potenziale. Nel nostro caso L sarà uguale a due volte la carica dell'elettrone moltiplicato per $1,14$ Volts.

Ricordiamo che la carica di un equivalente di elettroni, detto anche numero di Faraday, è uguale a 96.487 coulombs e quindi la nostra relazione diventa:

$$L = (2 \times 96.487) \times 1,14 \text{ joules}$$

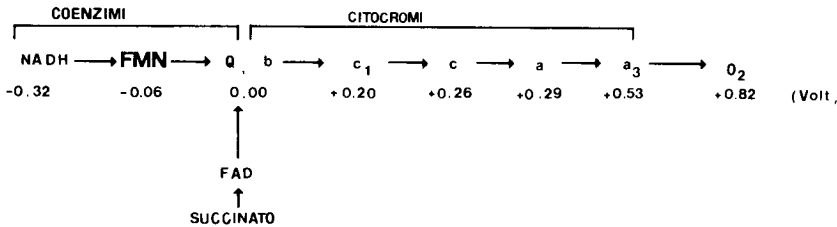
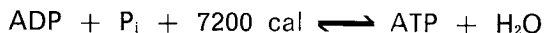


FIGURA 2.8

Il lavoro così calcolato è quindi espresso in joules; però trattandosi di una variazione di energia libera è più appropriato esprimerlo in calorie; per ottenere questo sarà sufficiente dividere il lavoro L calcolato, per l'equivalente meccanico della caloria, pari a 4,18 joules/calorie. La nostra espressione diventa quindi:

$$L = \frac{(2 \times 96.487) \times 1,14}{4,18} = 52.636 \text{ calorie/mole di NADH ossidato}$$

Questo valore rappresenta la quantità teorica di energia che può essere utilizzata nella sintesi dei legami fosforici energetici dell'ATP, secondo la seguente equazione:



dove 7200 calorie corrispondono alla variazione di energia libera per la scissione idrolitica dell'ATP.

Un problema che ci si può porre è il seguente: quante molecole di ATP si possono formare per ogni mole di NADH ossidata? A prima vista sembrerebbe logico che fosse possibile ricavare il numero di molecole di ATP, che si possono formare nell'ossidazione di una mole di NADH, semplicemente dividendo 52636 calorie per 7200: in questo caso si otterrebbe un valore vicino a 7 moli di ATP per mole di NADH. Tuttavia l'energia di ossidazione del NADH non viene liberata gradualmente ed in modo continuo dal potenziale di $-0,32$ Volts al potenziale di $+0,82$ Volts, ma in modo discontinuo per successivi salti di potenziale. Si può calcolare allora, viceversa, quale è la variazione di potenziale necessaria per ottenere la sintesi di una mole di ATP, sempre facendo riferimento alla formula generale $L = q \times (v_a - v_r)$. Applicando questa formula infatti avremo:

$$7200 \text{ calorie} = \frac{2 \times 96487 \text{ coulombs}}{4,18} \times (v_a - v_r)$$

da cui si ricava che $(v_a - v_r)$ è uguale a $0,15$ Volts. Perché si possa formare una molecola di ATP è necessario quindi che esista tra due trasportatori di elettroni una differenza di potenziale di ossido-riduzione $\geq 0,15$ Volts. Osserviamo che tale valore si riscontra nella Figura 2.8 fra:

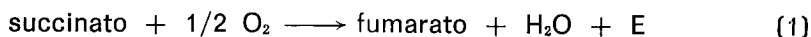
- NADH e FMN
- citocromi b e c
- citocromo a e O_2

quest'ultima differenza di potenziale è anzi molto più grande di $0,15$ Volts.

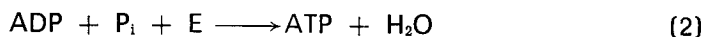
E' prevedibile quindi, in base a queste considerazioni energetiche, che non più di tre moli di ATP si formino per mole di NADH ossidato. D'altra parte è anche prevedibile che, se si ossida succinato, anziché NADH, la resa energetica del sistema sia inferiore, corrispondente a due moli di ATP per mole di succinato. Questi dati sono tutti ricavati in via puramente teorica; in pratica ci si può chiedere come immaginare un esperimento che consenta di calcolare la resa energetica del sistema. Questo tipo di esperimento si basa sull'impiego di preparazioni fresche

di mitocondri isolati per centrifugazione differenziale. I mitocondri isolati sono in grado di ossidare succinato ed altri metaboliti, con contemporanea assunzione di ossigeno. Se i mitocondri vengono messi in contatto con un substrato da una parte e con l'ossigeno dall'altra, essi possono catalizzare l'ossidazione del substrato a spese dell'ossigeno presente nel sistema.

Nel caso del succinato, ad esempio, essi catalizzano la seguente reazione liberando energia (E):



Se l'energia viene utilizzata per la sintesi di ATP in presenza di ADP + P_i, dovremmo avere:



Si assiste quindi da una parte alla scomparsa di ossigeno utilizzato nella reazione (1), e dall'altra alla scomparsa di P_i utilizzato nella reazione (2) per la sintesi dell'ATP. Dato che per ogni atomo di ossigeno (1/2 O₂) consumato corrisponde una mole di succinato o, in generale, di un qualsiasi substrato utilizzato, e dato che per ogni mole di P_i scomparsa corrisponde una mole di ATP sintetizzata, dal rapporto:

$$\frac{\text{moli di fosfato scomparse}}{\text{atomi di ossigeno consumati}} = \frac{\text{P}}{\text{O}} \quad (3)$$

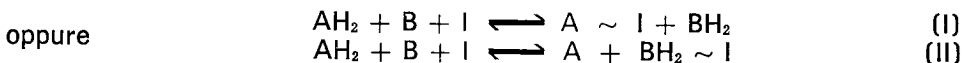
si può calcolare la resa del sistema, espressa in molecole di ATP sintetizzate per molecola di substrato ossidato. Si è potuto constatare che, utilizzando dei substrati che conducano alla formazione di NADH, il rapporto sperimentale P/O ha un valore di circa 3. Nel caso di succinato, come previsto dalle precedenti considerazioni teoriche, il rapporto sperimentale P/O assume il valore di 2.

Esistono quindi tre punti a livello della catena respiratoria in cui è termodinamicamente possibile la sintesi di una molecola di ATP: tra

- NADH e CoQ
- CoQ e citocromo c
- citocromo c ed O₂

Per ciascuno di questi punti si può verificare sperimentalmente che, per ogni coppia di elettroni, si ha la sintesi di una molecola di ATP.

Ci si può chiedere ora quale sia l'intimo meccanismo, a livello molecolare, attraverso il quale la respirazione (trasporto di elettroni all'ossigeno) sia connessa alla fosforilazione dell'ADP. Nella sintesi dell'ATP accoppiata al trasporto degli elettroni nella catena respiratoria esistono molti intermedi. Detta sintesi si attuerebbe secondo il seguente schema di reazioni:



dove: A e B = due trasportatori di elettroni consecutivi nella sequenza; I = un composto di natura sconosciuta che si lega con legame altamente energetico al trasportatore di elettroni allo stato ossidato oppure ridotto. Infatti, da AH₂ a B, il trasporto elettronico procede in quanto AH₂ + B → A + BH₂; avvenuto il trasporto elettronico, il composto I

non ha altre alternative che di legarsi con A (trasportatore ossidato) o con BH₂ (trasportatore ridotto). Poiché non esistono sufficienti dati per ritenere più probabile la prima o la seconda ipotesi, si indicherà con C ~ I il composto ad alta energia non fosforilato che si forma tra un trasportatore di elettroni (A oppure BH₂) ed I: ossia C ~ I vale tanto per A ~ I che per BH₂ ~ I. Dato che nella catena respiratoria vi sono tre punti in cui è termodinamicamente possibile la sintesi di una molecola di ATP, esistono tre livelli energetici in grado di operare la formazione di C ~ I, si avrà: C₁ ~ I, C₂ ~ I e C₃ ~ I. Il composto (C ~ I) reagisce successivamente con un altro intermedio ipotetico (X), secondo il seguente schema:



A sua volta l'intermedio non fosforilato (I ~ X) reagirebbe con il fosfato inorganico, per dare un composto ad alta energia fosforilato:



A sua volta il composto fosforilato (X ~ P) reagirebbe con ADP per dare ATP:



Schematizzando si potrebbe quindi rappresentare la sequenza di reazioni che conducono alla sintesi di ATP nella Figura 2.9, da cui è evidente che se il fosfato inorganico (P_i) o l'ADP vengono a mancare, nel sistema si devono accumulare gli intermedi a monte rispettivamente di X ~ P o di ATP, il che, in ultima analisi, si riflette nell'accumulo di quell'intermedio che comprende nella sua struttura un trasportatore di elettroni (C₁, C₂, C₃): di conseguenza il flusso degli elettroni tende a fermarsi. Questo fenomeno prende il nome di « controllo respiratorio » e si riscontra nelle preparazioni sperimentali fresche di mitocondri e va progressivamente scomparendo man mano che questi invecchiano (la spiegazione di questa scomparsa sta nel fatto che l'intermedio X ~ I viene idrolizzato molto lentamente

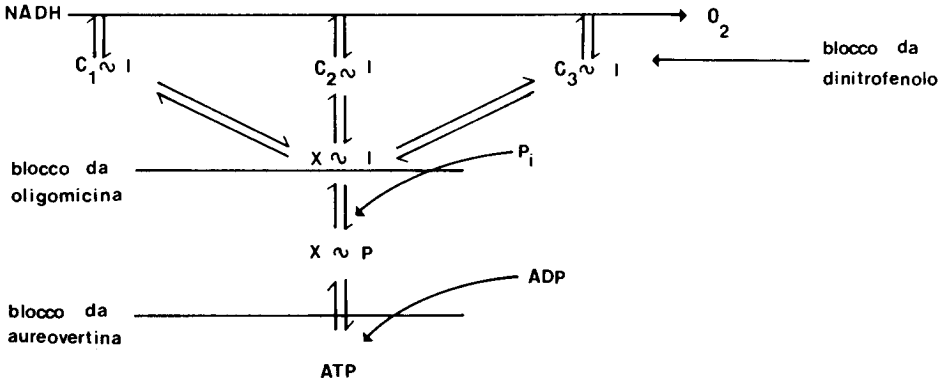


FIGURA 2.9

nelle preparazioni fresche e più rapidamente nelle preparazioni invecchiate). Il controllo respiratorio è espressione di una stretta interrelazione fra trasporto di elettroni (Sistema 1) ed il processo fosforilativo (Sistema 3): questa interrelazione è abolita totalmente da alcune sostanze (quali il 2,4-dinitrofenolo, il pentaclorofenolo ed il dicumarolo) che prendono il nome di « disaccoppianti ». In presenza di questi composti il consumo di O_2 risulta anche più elevato che di norma, ma la sintesi di ATP cade a zero. L'azione di questi composti è stata identificata nell'incremento dell'idrolisi di $C \sim I$:



Accanto ai disaccoppianti sono noti anche farmaci che inibiscono sia la fosforilazione dell'ADP che il trasporto degli elettroni: questi composti non sono quindi disaccoppianti, ma agiscono inibendo una o più delle reazioni che conducono alla sintesi di ATP. Ricordiamo: (a) l'oligomicina, un antibiotico che blocca la sintesi $X \sim P$ e favorisce quindi l'accumulo di $X \sim I$ e di $C \sim I$, provocando quindi di riflesso un arresto del trasporto degli elettroni con meccanismo identico a quello del controllo respiratorio; (b) l'aureovertina, un antibiotico che impedisce la sintesi di ATP favorendo l'accumulo di $X \sim P$, $X \sim I$, $C \sim I$.

Sebbene la sequenza di reazioni, indicata nella Figura 2.9, comprenda ben sette composti chimici sconosciuti ($C_1 \sim I$, $C_2 \sim I$, $C_3 \sim I$, $X \sim I$, $X \sim P$, X ed I) esiste tutta una massa di dati sperimentali che fanno questo schema come probabile. Lo schema prevede inoltre che, essendo tutte le reazioni indicate liberamente reversibili, si possano far procedere a ritroso gli elettroni nella catena respiratoria derivando l'energia per questa inversione di flusso sia dalle ossidazioni della catena respiratoria stessa sia anche dall'ATP. Ci si può chiedere ora perché sia stato postulato il composto $X \sim I$, ossia un intermedio non fosforilato e non contenente un trasportatore di elettroni. È stato sperimentalmente possibile dimostrare che l'energia prodotta in corrispondenza del terzo punto di fosforilazione (fra citocromo c e ossigeno) ottenuta ossidando ascorbato (che riduce chimicamente il citocromo c) può essere utilizzata per ridurre NAD a partire dal succinato. In questo esperimento si ha che $C_1 \sim I$ si forma da $C_3 \sim I$ e ciò deve avvenire per mezzo di un intermedio comune. Poiché il fosfato non è necessario per verificare questo effetto si deve ammettere che esista un intermedio $X \sim I$ non fosforilato e non contenente un trasportatore di elettroni. L'effetto descritto è stato abolito dai disaccoppianti e stimolato da oligomicina, ed entrambi questi fenomeni sono prevedibili in base allo schema. La posizione dell'inibizione da oligomicina è stata determinata in base al fatto che questo inibitore agisce anche in assenza di fosfato: il punto di blocco dell'inibitore deve quindi giacere prima dell'ingresso del fosfato inorganico nella sequenza di reazioni.

Ci si può chiedere ora se il fenomeno del disaccoppiamento, che abbiamo visto verificarsi per aggiunta di un disaccoppiante, possa in realtà avere il significato di un meccanismo fisiologico di controllo. Supponiamo che i mitocondri di un tessuto siano disaccoppiati: in questo caso le ossidazioni devono procedere a velocità più elevata della norma e, inoltre, l'energia di ossidazione non può essere conservata sotto forma di legami altamente energetici dell'ATP, ma deve essere necessariamente dissipata sotto forma di calore. È possibile quindi che per il mantenimento dell'omeostasi termica, in condizioni particolari, la produzione di calore sia affidata ai mitocondri in parte o totalmente disaccoppiati. È noto che questo si verifica in due condizioni: (1) nel grasso bruno, tessuto presente negli animali ibernati o nei neonati di ogni specie, in cui il rapporto assai elevato « superficie corporea/volume » favorisce una rapida dispersione del calore; da questo tessuto, che appare bruno per l'elevato contenuto di mitocondri nelle cellule, non è mai stato possibile isolare mitocondri capaci di fosforilazione e si è quindi concluso che questi mitocondri sono fisiologicamente disaccoppiati; va notato inoltre che la noradrenalina stimola fortemente il consumo di ossigeno da parte di questi mitocondri e favorisce quindi la produzione di calore; (2) negli stati di ipertiroidismo; è noto infatti che l'ormone tiroideo, in vitro, determina un rigonfiamento dei mitocondri cui si accompagna un parziale disaccoppiamento delle ossidazioni dalla fosforilazione.

Questo fenomeno spiegherebbe l'ipertermia e l'aumento del consumo di ossigeno nei pazienti affetti da ipertiroidismo ed indurrebbe a ritenere che la tiroxina o la triiodotironina esplicano un'azione regolatrice a livello mitocondriale.

2.2.7) Influenze esogene sulle attività mitocondriali

Dal Capitolo precedente è risultato che esistono delle sostanze le quali, addizionate al mezzo in cui i mitocondri sono stati isolati, possono modificare la funzionalità mitocondriale. Questi agenti possono determinare opposte risposte e pertanto sono suddivisibili in « inibitori » e « stimolanti ».

2.2.7.1) Agenti inibitori

Si tratta di farmaci vari che, pur differendo nella struttura chimica, hanno proprietà comuni sulla funzionalità mitocondriale; essi comprendono:

a) gli inibitori del trasporto elettronico, i quali agiscono per lo più combinandosi con i trasportatori di elettroni, piuttosto che con gli enzimi connessi con l'accoppiamento energetico; questo gruppo comprende: l'amital, il dimercaptopropanolo (BAL), l'antimicina A, il rotenone, il 2-eptil-4-idrossichinolina-N-ossido, l'acido cianidrico, ecc.;

b) gli inibitori del processo fosforilativo, i quali si combinano stechiometricamente con alcuni intermedi nelle sequenze di accoppiamento, impedendo la ciclica e concatenata serie di sequenze del trasporto degli elettroni e del trasporto dei fosfato-gruppi; questa serie di inibitori comprende: l'oligomicina, la valinomicina, l'aureovertina, la guanidina ed i suoi derivati, l'atractiloside, ecc.;

c) i disaccoppianti il trasporto elettronico dal processo fosforilativo, i quali inibiscono la fosforilazione dell'ADP senza modificare il trasporto elettronico; i disaccoppianti sono rappresentati da queste sostanze: il 2,4-dinitrofenolo, il dicumarolo, la gramicidina D, la tirotricina, gli acidi grassi a catena lunga, alcuni complessi nitrilici gli arseniati, ecc. I veri disaccoppianti agiscono inducendo una scarica od una caduta nella concentrazione di alcuni intermedi ad alta energia, per cui, pur avvenendo un normale trasporto elettronico ed un normale od incrementato consumo mitocondriale di O_2 , la formazione di ATP è inibita in misura varia o totale.

Un fatto di grande rilievo è che i disaccoppianti agiscono sulle cosiddette « reazioni parziali » del processo fosforilativo, incrementando alcune e decrementando altre; le « reazioni parziali » sono quelle che interessano il fosfato inorganico e/o l'ATP e che hanno la caratteristica di base di potersi attuare anche in assenza di un efficiente trasporto elettronico mitocondriale. Le più interessanti reazioni parziali sono le seguenti:

1) l'attività ATPasica, che è tipicamente stimolata dai disaccoppianti sia nei mitocondri intatti che nei frammenti fosforilanti submitocondriali. La reazione ATPasica è determinata dalla reversione delle reazioni correlate con la formazione di ATP, in concomitanza con una anormale caduta, probabilmente idrolitica, nella concentrazione di alcuni intermedi ad alta energia implicati nel meccanismo di accoppiamento del trasporto elettronico al processo fosforilativo. Va infatti notato che l'attività ATPasica (catalizzante: $ATP \longrightarrow ADP + P_i$) è normalmente latente nei mitocondri, i quali appaiono invece una evidente attività ATPsintetasi (catalizzante: $ADP + P_i \longrightarrow ATP$). Si devono poi rilevare questi due eventi: (A) l'attività ATPasica stimolata dai disaccoppianti (ad es. la ATPase-dinitrofenolo-dipendente) è inibita dagli agenti indicati in b), ossia dagli inibitori della fosforilazione ossidativa (oligomicina, atractiloside, ecc.); (B) i disaccoppianti (ad es. il dinitrofenolo) antagonizzano l'azione degli inibitori del processo fosforilativo; tutto ciò indica che i disaccoppianti agiscono in un punto posto fra il trasporto elettronico ($NADH \longrightarrow O_2$) e la tappa bloccata dagli inibitori della fosforilazione ($X \sim I + P_i$). In base alla dipendenza dell'azione dal pH, sono state evidenziate differenti attività enzimatiche ATPasiche mitocondriali, corrispondenti ai tre punti di accoppiamento della catena del trasporto elettronico, punti che differiscono essi pure nella sensibilità al pH.

2) l'attività ATPfosfatasi, che catalizza le reazioni di scambio fra ATP e fosfato inorganico, il quale può essere così incorporato nel fosfato-gruppo terminale dell'ATP anche in assenza di un evidente trasporto elettronico. Dato che la reazione è completamente inibita sia dal dinitrofenolo che dall'oligomicina, si deve concludere che l'attività si svolga tra il punto di captazione del fosfato e la formazione di ATP. La reazione di scambio ATP-fosfato è dipendente dalla concentrazione molare di ATP, ADP e P_i , e

viene completamente a cessare allorché tutti i costituenti della catena respiratoria si trovano nello stato di totale riduzione; si è prospettato che questa reazione avvenga solo a livello di un sito della catena respiratoria, ed in particolare a livello delle flavoproteine.

3) reazione di scambio dell'O₂ fra H₂O-P_i e H₂O-ATP; infatti gli atomi di O₂ dell'acqua circostante scambiano rapidamente con quelli del fosfato inorganico o del fosfato terminale dell'ATP se i mitocondri sono capaci di attuare la fosforilazione ossidativa; la velocità di queste reazioni di scambio (che sono inibite sia dai disaccoppianti che dagli inibitori del processo fosforilativo) può essere anche 20 o 30 volte più grande della velocità massima della efficiente fosforilazione ossidativa stessa. L'ATPase della miosina e la pirofosfatase inorganica sono i soli altri enzimi fosfato-trasferitori, oltre a quelli mitocondriali, capaci di catalizzare le suindicate reazioni di scambio dell'ossigeno.

4) reazione di scambio ATP-ADP, per cui l'ADP è incorporato nell'ATP anche in assenza di un attivo trasporto elettronico; tale reazione è bloccata dai disaccoppianti e dagli inibitori del processo fosforilativo. Va ricordato che i mitocondri sono capaci di almeno un'altra reazione di scambio ATP-ADP, che è Mg⁺⁺-dipendente, non è bloccata dalle sostanze sopracitate, e non è particolarmente rilevante ai fini della fosforilazione ossidativa. L'azione catalitica della reazione ATP-ADP è dovuta all'enzima adenilato chinase, anche se non in maniera esclusiva; in ogni caso, questa reazione è del tutto inibita se la catena respiratoria è completamente ridotta.

Nel complesso si osserva che i disaccoppianti hanno un'azione attivante solo nei confronti dell'attività ATPasica, mentre sono inibitori delle altre « reazioni parziali ».

2.2.7.2) Agenti stimolanti

Sono dei sistemi enzimatici ottenuti dal frazionamento mitocondriale, capaci di attivare il trasporto elettronico e la fosforilazione ossidativa, oppure in grado di ripristinare questi processi allorché siano stati in precedenza inibiti da varie situazioni sperimentali. In ogni caso lo studio di questi sistemi « accoppianti » il trasporto elettronico e la fosforilazione è di notevole importanza in quanto costituisce uno sforzo per ricostruire l'intimo meccanismo della fosforilazione ossidativa stessa.

Alcuni di questi agenti accoppianti sono:

a) ATPase solubile e fattori F di Racker; questa ATPase solubile, stimolata dai disaccoppianti, è capace di ripristinare la fosforilazione dell'ADP, convertendolo in ATP: è quindi una ATP-sintetasi. Essa non contiene trasportatori elettronici, nè catalizza reazioni di scambio ATP-ADP o ATP-P_i, ma le incrementa se i mitocondri non possedevano più capacità respiratoria. Oltre a questa ATPase (detta fattore F₁) esistono altri fattori (F₂, F₃, F₄), che sono richiesti per il ripristino della fosforilazione ossidativa.

b) fattori di Green, i quali sono delle proteine atte a ripristinare la fosforilazione ossidativa specificatamente in ciascuno dei tre punti di fosforilazione.

c) enzimi delle reazioni di scambio ATP-ADP; questi enzimi non sono di per sé sensibili ai disaccoppianti o agli inibitori della fosforilazione; tuttavia se vengono ricombinati con i frammenti di membrana mitocondriale, viene ripristinata la sensibilità al dinitrofenolo, che è caratteristica di queste reazioni di scambio a livello mitocondriale.