

Premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia 2019



Gregg L. Semenza (Johns Hopkins University, Baltimore)

William G. Kaelin (Howard Hughes Medical Institute, Maryland)

Sir Peter J. Radcliffe (Francis Crick Institute, Londra)

“for their discovery of how cells sense and adapt to oxygen availability”

I tre studiosi hanno identificato il meccanismo molecolare che regola l'attività dei geni che rispondono ai cambiamenti di concentrazione dell'ossigeno nei tessuti

Lavori fondamentali

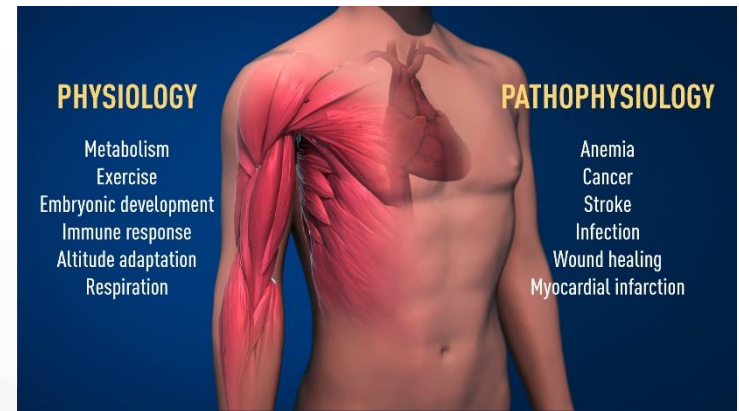
Semenza G.L, Nejfelt M.K., Chi S.M. & Antonarakis S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 5680-5684.

Mircea I., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S. & Kaelin Jr. W.G. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science*, 292, 464-468.

Jakkola P., Mole D.R., Tian Y.-M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Heberstreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W. & Ratcliffe P.J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 468-472.

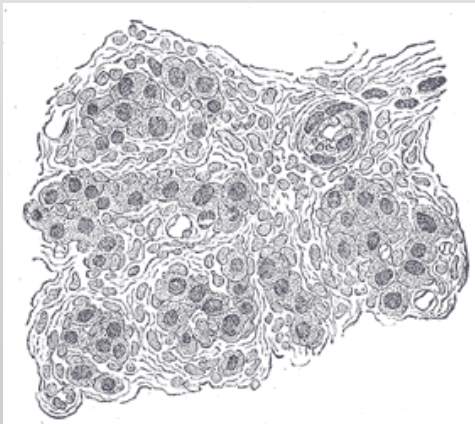
L'ossigeno è essenziale per la produzione aerobia di energia sotto forma di ATP, che avviene nei mitocondri tramite la fosforilazione ossidativa

L'adattamento delle cellule alla carenza di ossigeno è fondamentale per la vita in ambito sia fisiologico (attività fisica normale) sia patologico (traumi, infarti, ictus, tumori)



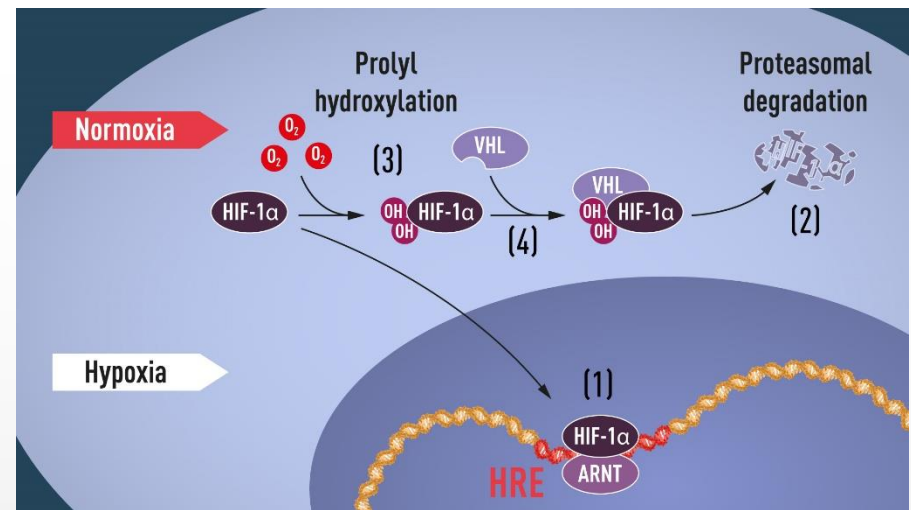
Le cellule tumorali in crescita incontrollata necessitano di elevate quantità di ossigeno: diminuendone la disponibilità è spesso possibile rallentare o bloccare la crescita

Il controllo dei livelli di ossigeno nelle cellule è fondamentale non solo nella terapia dei tumori e delle anemie, ma anche nel normale allenamento sportivo e nell'adattamento del corpo umano alle alte quote



Le pressioni parziali dell'ossigeno e dell'anidride carbonica nel sangue sono percepite da un piccolo gruppo di cellule chemorecetttrici situate presso la biforcazione dell'arteria carotidea (**“corpo” o “glomus” carotideo**), scoperto nel 1929 da Corneille Heymans (Premio Nobel 1938 per la Medicina e la Fisiologia)

Le cellule del glomo carotideo inviano le informazioni direttamente al cervello, regolando il ritmo respiratorio e numerose altre attività dell'organismo



Ossigeno, EPO, HIF e sindrome VHL

Semenza e Radcliffe hanno studiato l'ormone renale eritropoietina (**EPO**), che intensifica la **produzione di globuli rossi in carenza di ossigeno (ipossia)**, scoprendo che il gene EPO è regolato dal livello di ossigeno non solo nel rene ma in quasi tutti i tessuti tramite un complesso di proteine (**hypoxia-inducible factor, HIF**) che agisce come fattore di trascrizione sul DNA

A livelli normali di ossigeno, HIF è marcato con ubiquitina e degradato nel proteasoma, ma quando l'ossigeno scarseggia l'ubiquitina non si lega più ad HIF, la degradazione non avviene e HIF induce la produzione di EPO: non si comprendeva però come l'ossigeno (un gas) potesse influenzare il processo

Studiando una rara sindrome ereditaria, la malattia di von Hippel-Lindau (**VHL**), che aumenta il rischio di tumori in famiglie con la mutazione, Kaelin ha scoperto che il gene mutato era coinvolto nel controllo della risposta all'ipossia perché **il suo prodotto regolava la marcatura con ubiquitina e quindi la degradazione normale di HIF nel proteasoma**

In questo modo è stato identificato con chiarezza **l'intero processo tramite il quale l'ossigeno regola a livello molecolare la risposta di cellule e tessuti all'ipossia**

Il mitocondrio: centrale energetica degli Eucarioti

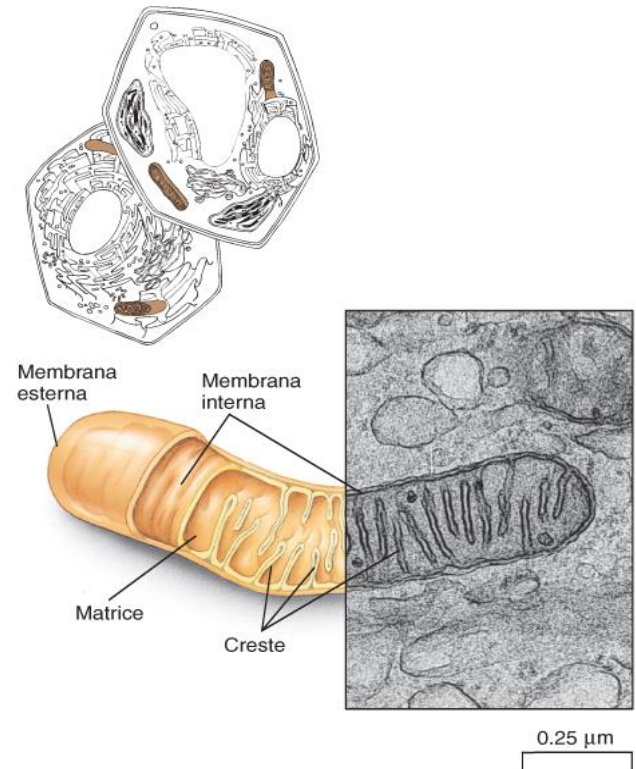
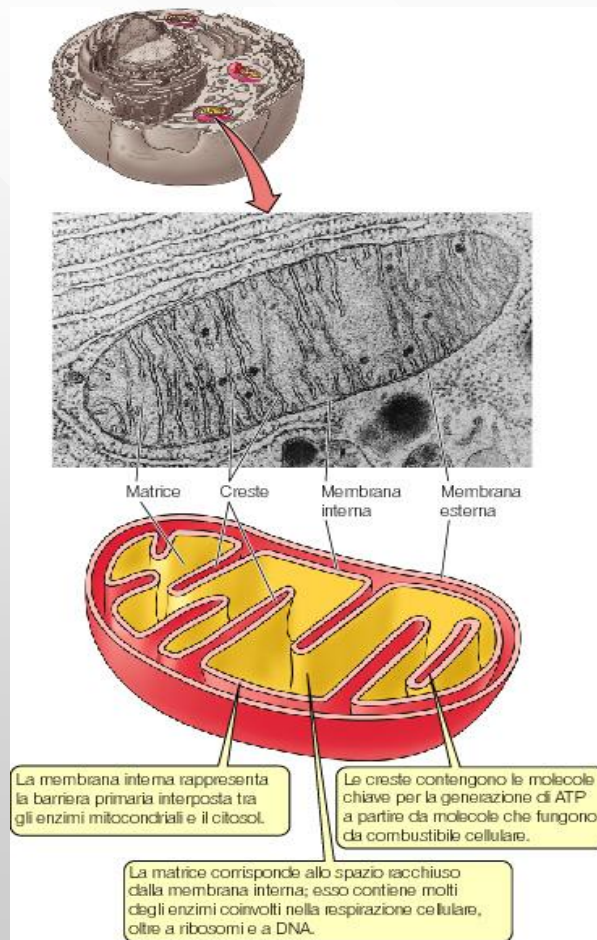
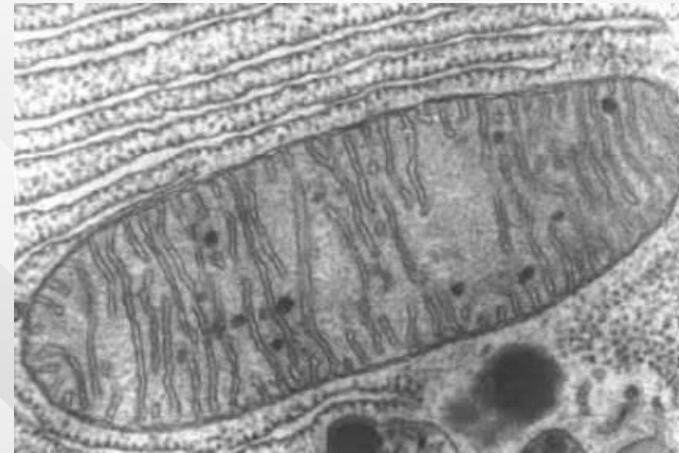
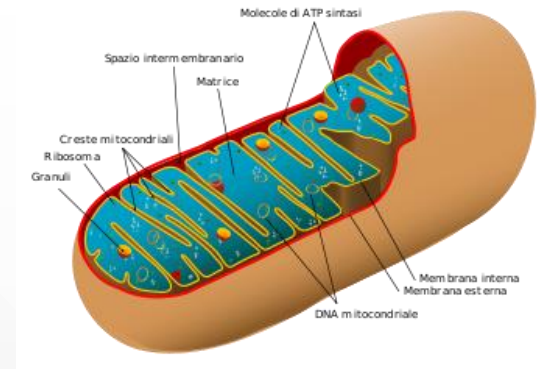
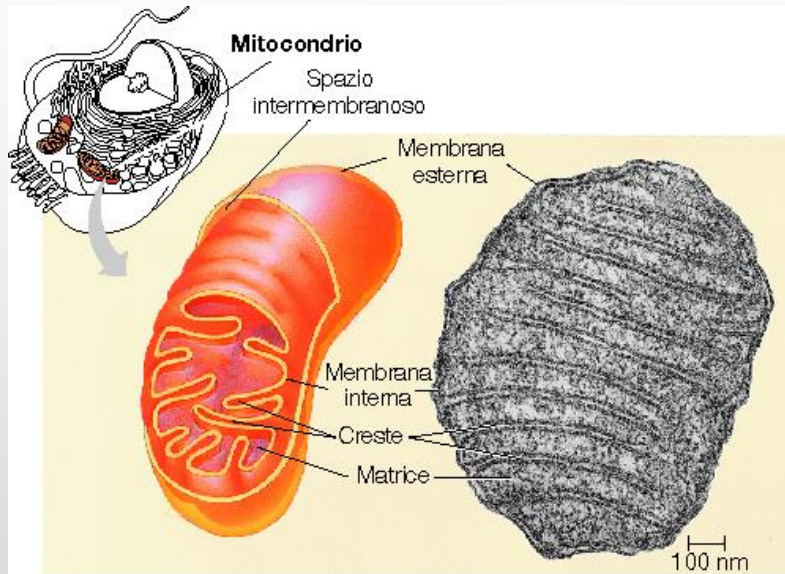


FIGURA 4-18 Mitocondri.

La respirazione aerobica avviene all'interno del mitocondrio. Nella fotografia al microscopio elettronico a trasmissione, così come nel disegno, sono ben evidenti le creste; il disegno evidenzia le relazioni tra membrana interna ed esterna.

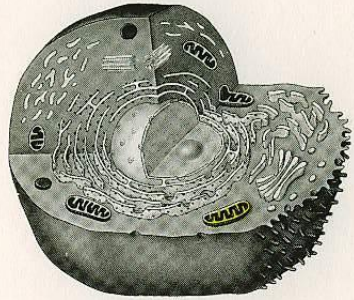
Struttura del mitocondrio



Il **mitocondrio** è un organello **presente in tutte le cellule eucariotiche animali e vegetali** (con qualche eccezione...)

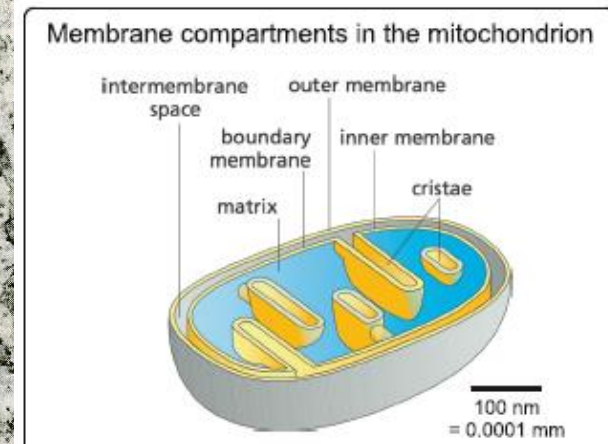
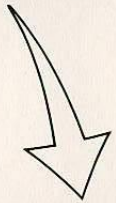
Si è originato per **endosimbiosi secondaria di Procarioti non fotosintetici** all'interno di cellule eucariotiche primitive

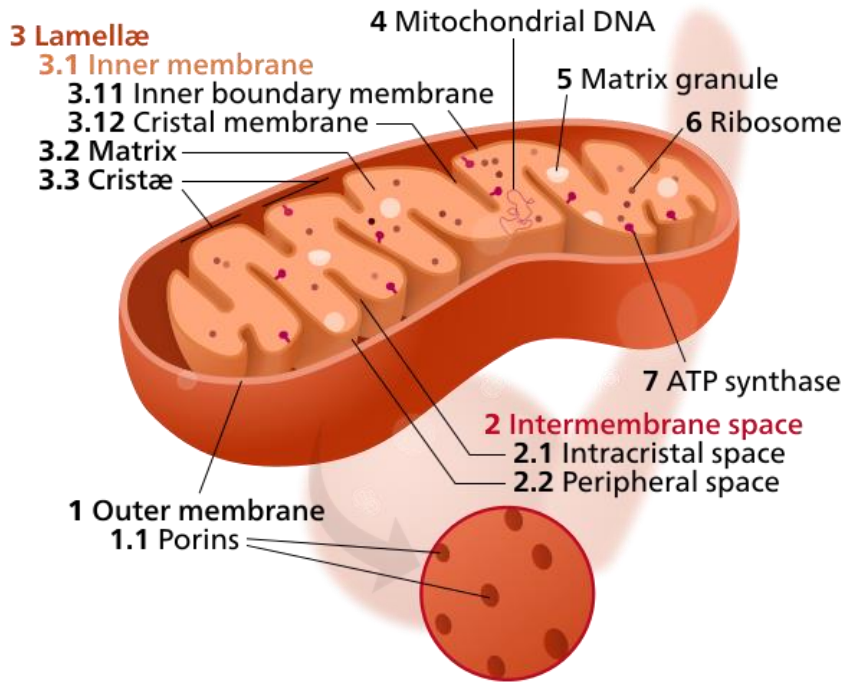
Il mitocondrio è costituito da due membrane, una **esterna (liscia)** ed una **interna (ripiegata in creste)**



Le creste delimitano uno spazio detto “**matrice mitocondriale**”

Lo spazio tra le due membrane è detto “**spazio intermembrana**”





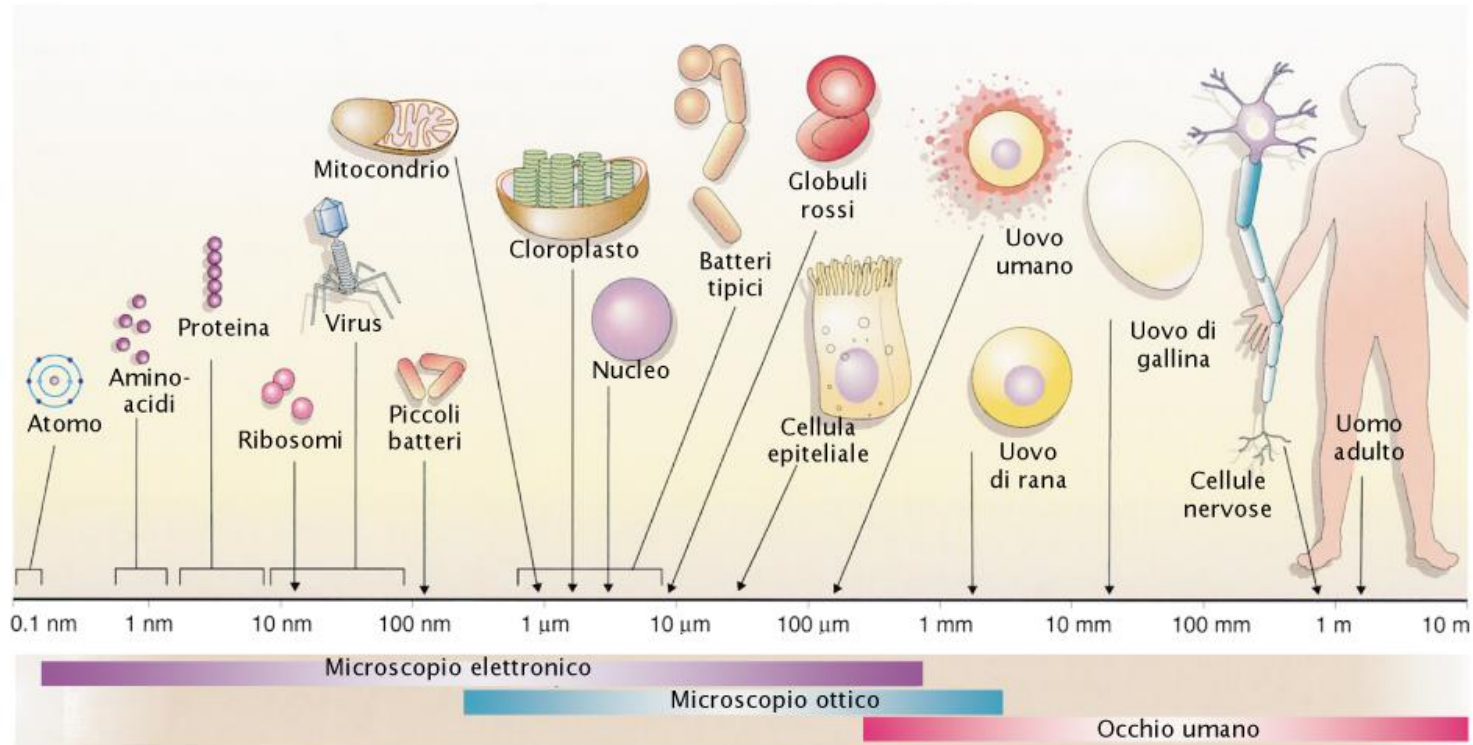
Porina con struttura “ β -barrel”

L’origine procariotica del mitocondrio è testimoniata dalla presenza al suo interno di **DNA e ribosomi di tipo procariotico**, e dalle **differenze strutturali tra la membrana interna e quella esterna**

La **membrana esterna** ha un **rapporto proteine-fosfolipidi 1:1**, simile a quello degli **Eucarioti**, e proteine transmembrana dette “**porine**”, con struttura “ **β -barrel**” (polare al suo interno) per importare nel mitocondrio molecole di medie dimensioni (Hohr et al., 2018)

La **membrana interna** ha invece un **elevato rapporto proteine-fosfolipidi (3:1)**, è **impermeabile** a molecole e ioni, e contiene **traslocasi** per il trasporto delle proteine

Le dimensioni del mitocondrio sono generalmente comprese tra 0.5 e 1.0 μm (paragonabili a quelle dei proteobatteri)

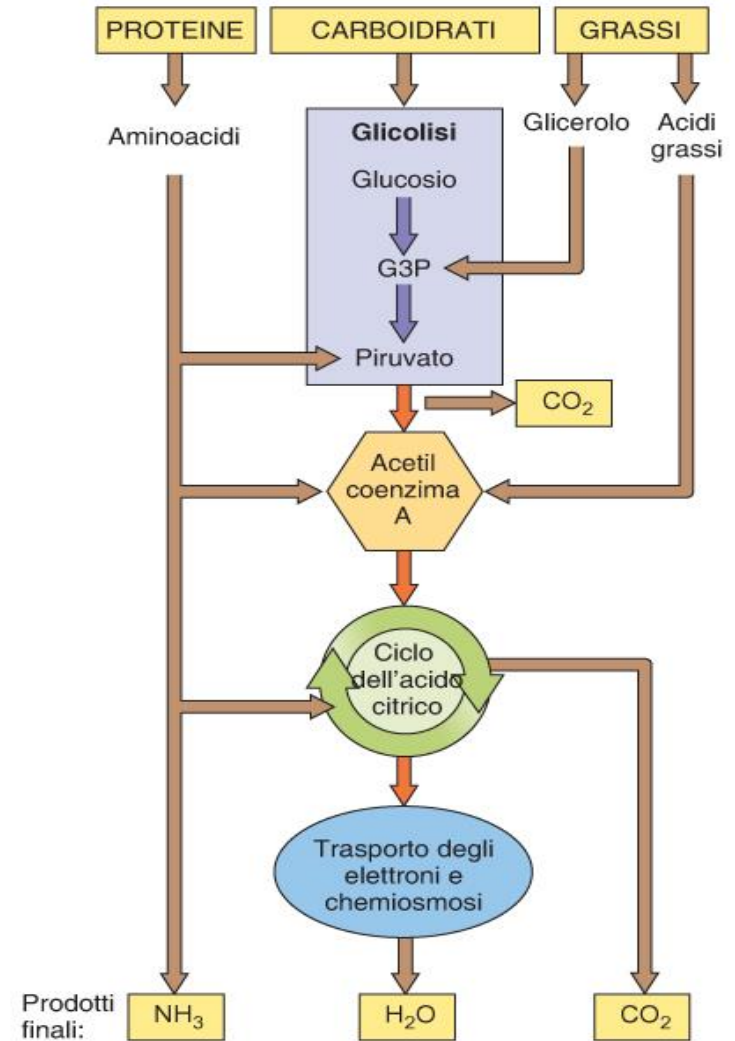
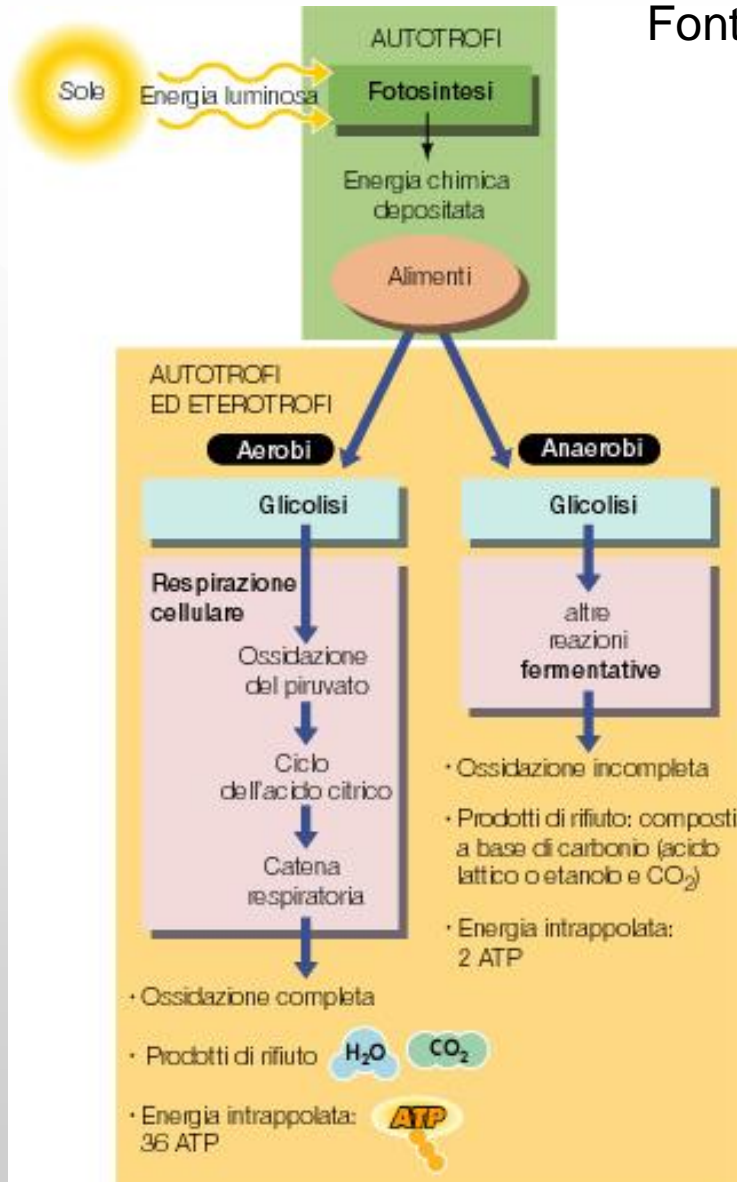


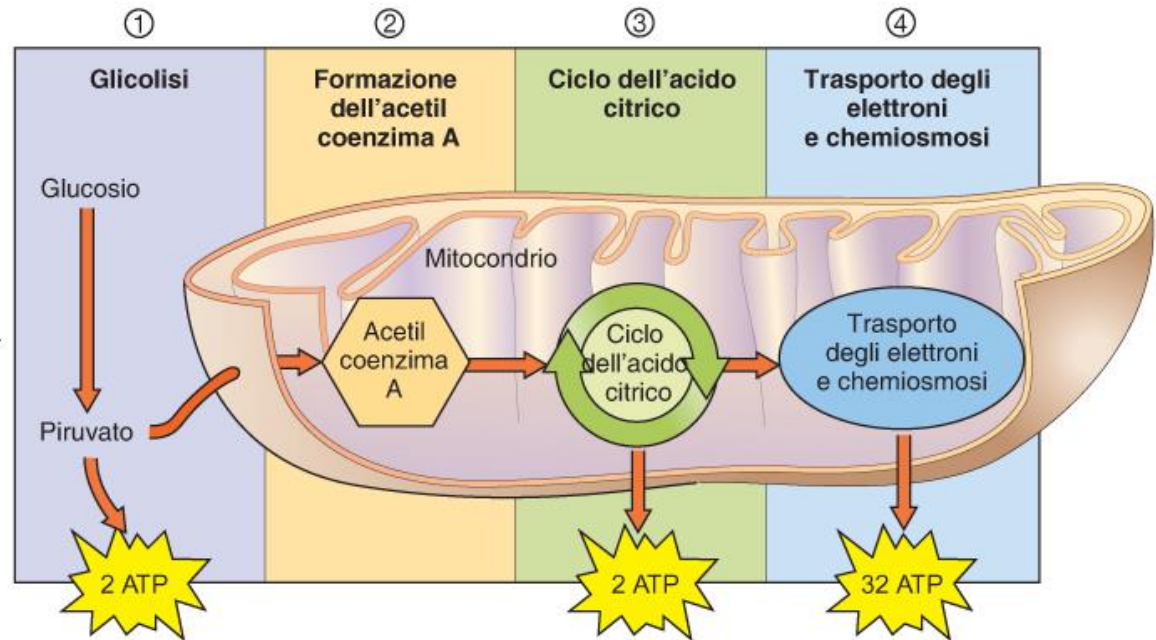
Misure

- 1 metro = 1000 millimetri (mm)
- 1 millimetro = 1000 micrometri (μm)
- 1 micrometro = 1000 nanometri (nm)

Fonte: Solomon et al., 2014

Fonti di energia per le cellule





“Mappa di navigazione”
 nella respirazione aerobia e nella
 fosforilazione ossidativa

FIGURA 7-2

Le quattro fasi della respirazione aerobica.

① Il primo stadio, la glicolisi, avviene nel citosol. ② Il piruvato, prodotto nella glicolisi, entra nei mitocondri dove la respirazione cellulare prosegue con la formazione dell'acetil coenzima A, ③ il ciclo dell'acido citrico, ④ il sistema di trasporto degli elettroni e la chemiosmosi. La maggior parte dell'ATP è sintetizzata mediante la chemiosmosi.

Punti fondamentali della fosforilazione ossidativa

Glicolisi

una molecola di **glucosio** ($C_6H_{12}O_6$) (a **6 atomi di carbonio**) è scissa da un complesso di enzimi situati **nel citoplasma**, con “investimento” di 2 ATP, per produrre due molecole di **piruvato** (a **3 atomi di carbonio**); il “ricavo” finale è 4 ATP, quindi il “**guadagno**” è di **2 ATP**

Decarbossilazione ossidativa del piruvato

nel mitocondrio, il **piruvato** è **decarbossilato** (perde CO_2) e il restante frammento a 2 atomi di carbonio è legato al Coenzima A (**acetil-CoA**)

Ciclo di Krebs (o ciclo dell'acido citrico)

l'**acetil-CoA** entra nel ciclo di Krebs ed è completamente demolito a CO_2 , producendo **NADH** e **FADH₂**

Catena di trasporto degli elettroni

NADH e **FADH₂** trasferiscono idrogeno ed elettroni ai **complessi della catena di trasporto**, situati nella membrana mitocondriale interna; i complessi separano i protoni dagli elettroni e “**confinano**” i **protoni nello spazio intermembrana**, trasportando contemporaneamente elettroni fino all'ultimo accettore, l'**ossigeno** (O_2)

Sintesi di ATP “guidata” dal movimento dei protoni (chemiosmosi)

il **movimento dei protoni** dallo spazio intermembrana alla matrice, passando attraverso l'**ATP-sintetasi**, induce **cambiamenti conformazionali nella “testa” della molecola**, determinando la **sintesi di ATP** (in totale 36 ATP)

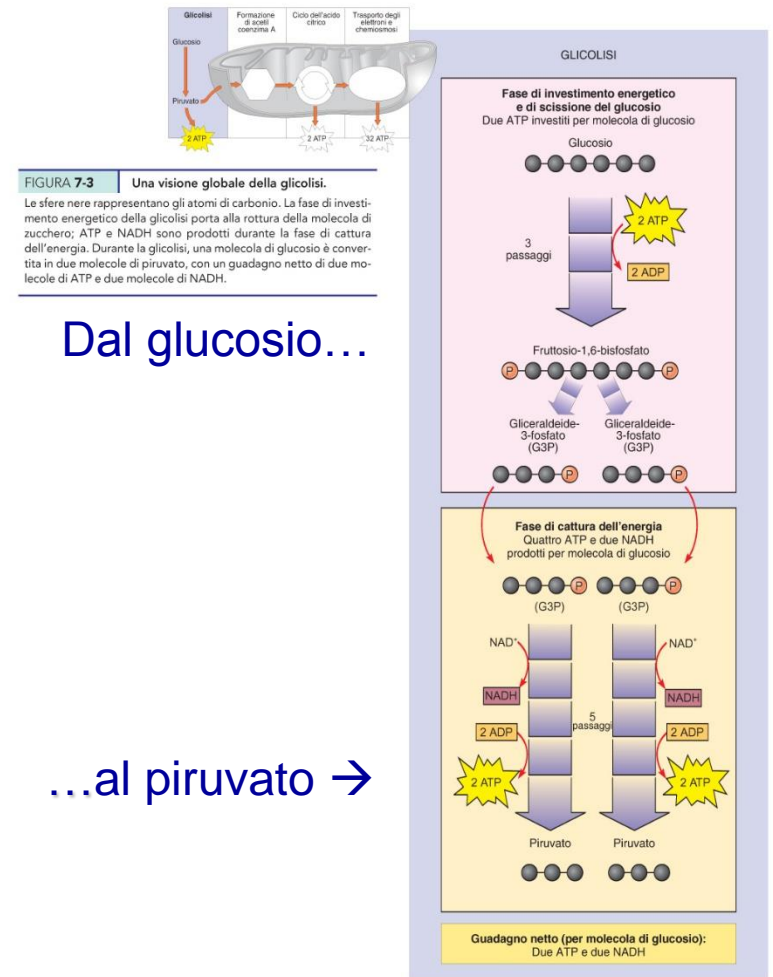
La **glicolisi**, prima tappa di demolizione del glucosio, avviene nel citoplasma

Da **una molecola di glucosio a 6 atomi di carbonio**, attraverso una serie progressiva di reazioni enzimatiche

si ottengono alla fine

- **due molecole di un composto a 3 atomi di carbonio** (acido piruvico, o **piruvato**)
- **due molecole di ATP**

La glicolisi è detta anche “via di Embden-Meyerhof-Parnas” (EMP) dai nomi degli scienziati che ne scoprirono le reazioni (Gustav Embden, Otto Meyerhof e Jakub Karol Parnas) nel 1940



Dal glucosio...

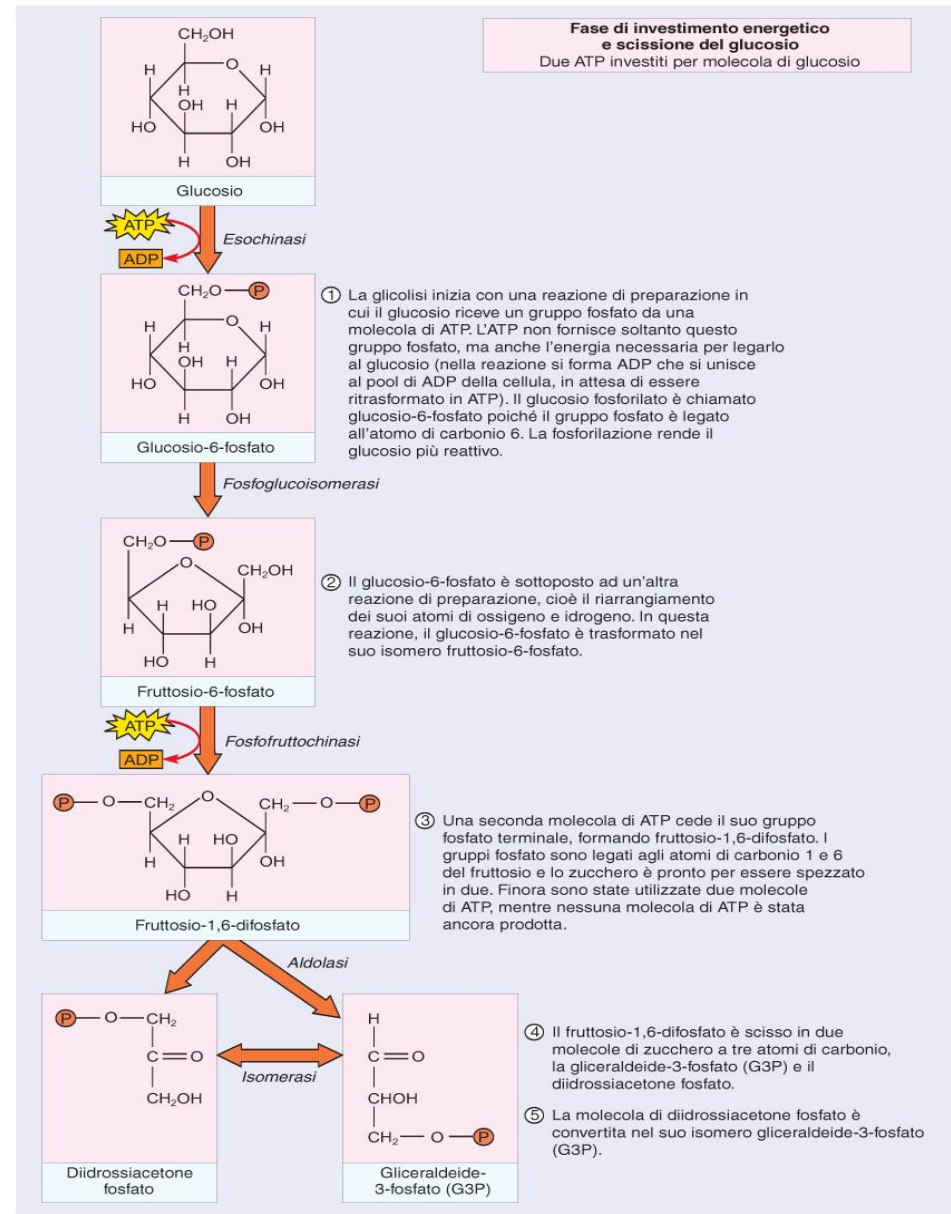
...al piruvato →

La serie di reazioni della glicolisi...

Glycolysis

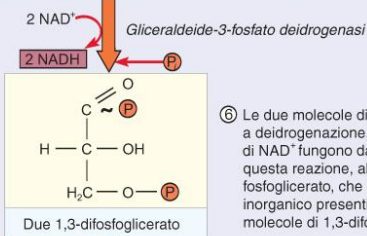
Glycolysis is the partial breakdown of one molecule of glucose into two molecules of pyruvic acid, two net molecules of ATP, two molecules of NADH, and $2H^+$.

Fonti: Sadava et al., 2014, 2019; <http://faculty.ccbcmd.edu>

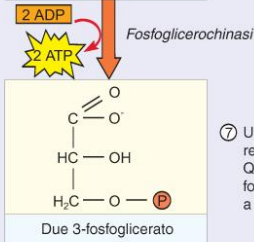


Due gliceraldeide-3-fosfato (G3P) dalla pagina precedente

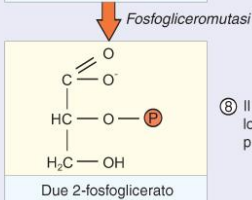
Fase di cattura dell'energia
Quattro ATP e due NADH prodotti per molecola di glucosio



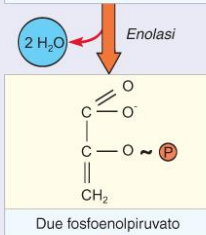
⑥ Le due molecole di gliceraldeide-3-fosfato (G3P) sono sottoposte a deidrogenazione, in una reazione nella quale due molecole di NAD⁺ fungono da accettori di atomi di idrogeno. I prodotti di questa reazione, altamente esoergonica, sono due molecole di fosfoglicerato, che reagiscono con due molecole di fosfato inorganico presenti nel citoplasma per trasformarsi in due molecole di 1,3-difosfoglicerato.



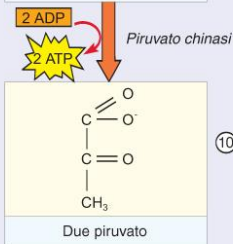
⑦ Uno dei gruppi fosfato di ciascuna molecola di 1,3-difosfoglicerato reagisce direttamente con una molecola di ADP per formare ATP. Questo trasferimento di un gruppo fosfato da un composto fosforilato all'ADP con produzione di ATP è detto fosforilazione a livello del substrato.



⑧ Il 3-fosfoglicerato è riarrangiato a 2-fosfoglicerato attraverso lo spostamento del gruppo fosfato. Questa reazione è solo preparativa.



⑨ Una molecola d'acqua è rimossa, con formazione di un doppio legame nella molecola residua, il fosfoenolpiruvato (PEP). Tale doppio legame rende instabile il legame del gruppo fosfato al carbonio 2 (linea ondulata).



⑩ Ciascuna delle due molecole di PEP trasferisce il suo gruppo fosfato all'ADP per formare ATP e piruvato. Quest'ultima reazione è una fosforilazione a livello del substrato.

GLYCOLYSIS

FIGURA 7-4

Una visione dettagliata della glicolisi.

Ciascuna reazione è catalizzata da un enzima specifico. Notare che si ha un guadagno netto di due molecole di ATP e di due molecole di NADH. (Le linee nere ondulate indicano legami instabili. Questi legami permettono il trasferimento di fosfati ad altre molecole, in questo caso l'ADP).

I trasportatori di ioni idrogeno ed elettroni:
nicotinammide adenindinucleotide (NAD)
 e **nicotinammide adenindinucleotide fosfato (NADP)**

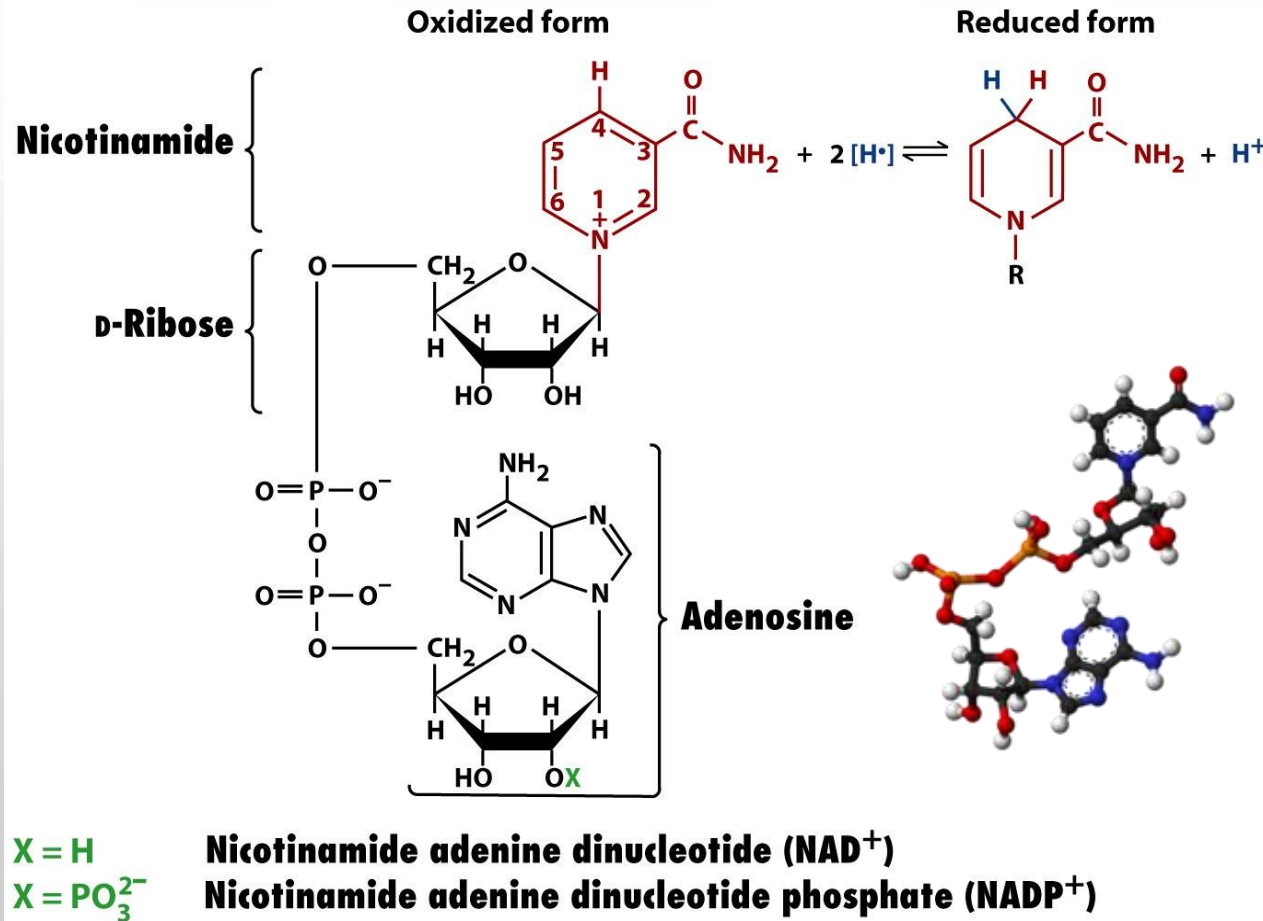
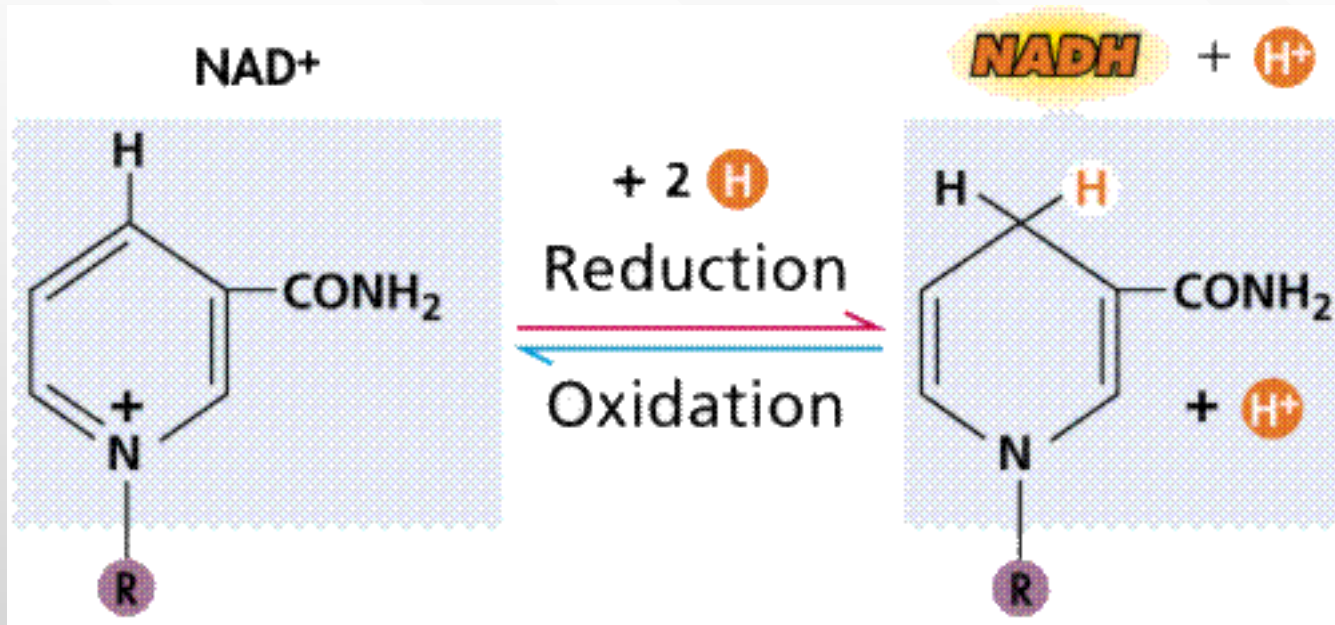
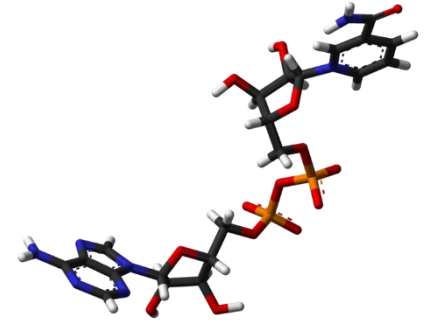


Figure 11-3 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
 © 2006 John Wiley & Sons

Il NAD acquista H^+ ed elettroni
(**si riduce**)



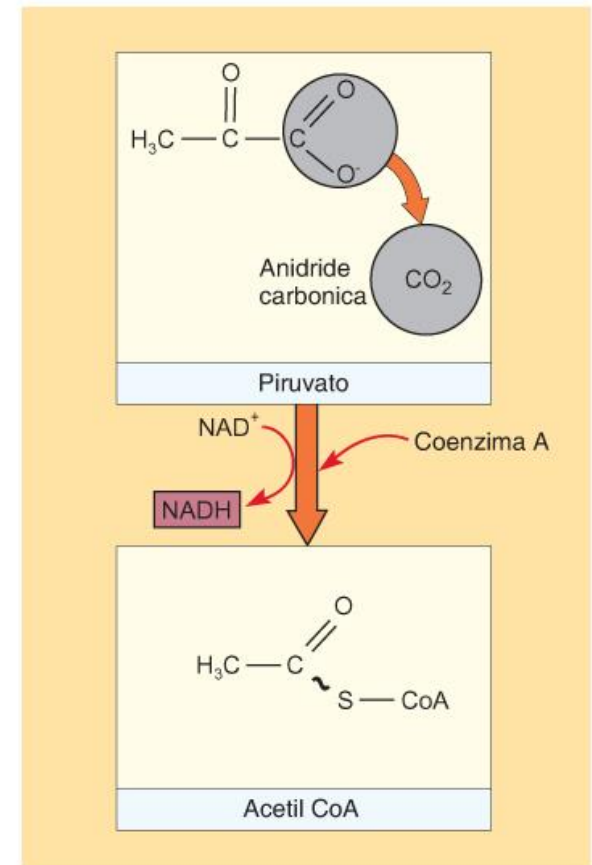
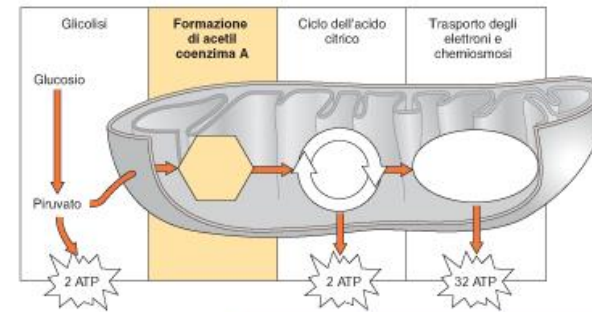
oppure **cede H^+ ed elettroni**
(**si ossida**)

Ossidazione = perdita di elettroni
(o acquisto di protoni)

Il piruvato entra nei mitocondri ed è decarbossilato ad acetil-coenzima A (**acetil-CoA**)

L'acetil-CoA contiene **due** atomi di carbonio del piruvato originario
(2 molecole di acetil-CoA per ogni molecola di glucosio)

Fonti: Sadava et al., 2014, 2019; Solomon et al., 2012



Acetil-coenzima A (acetyl-CoA)

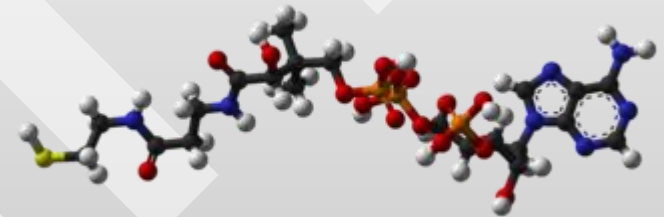
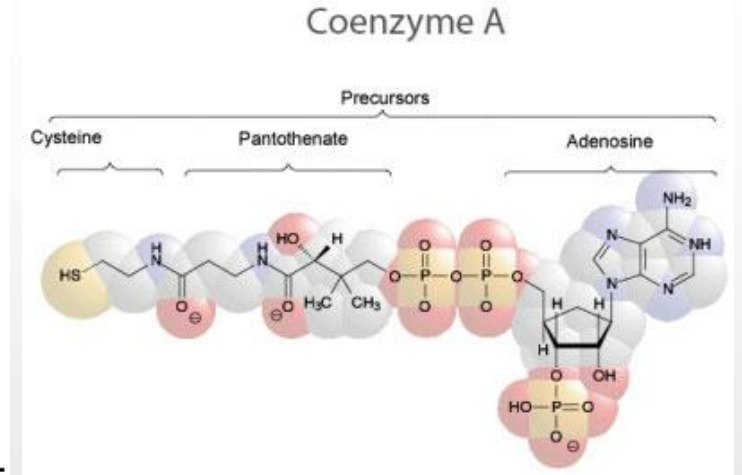
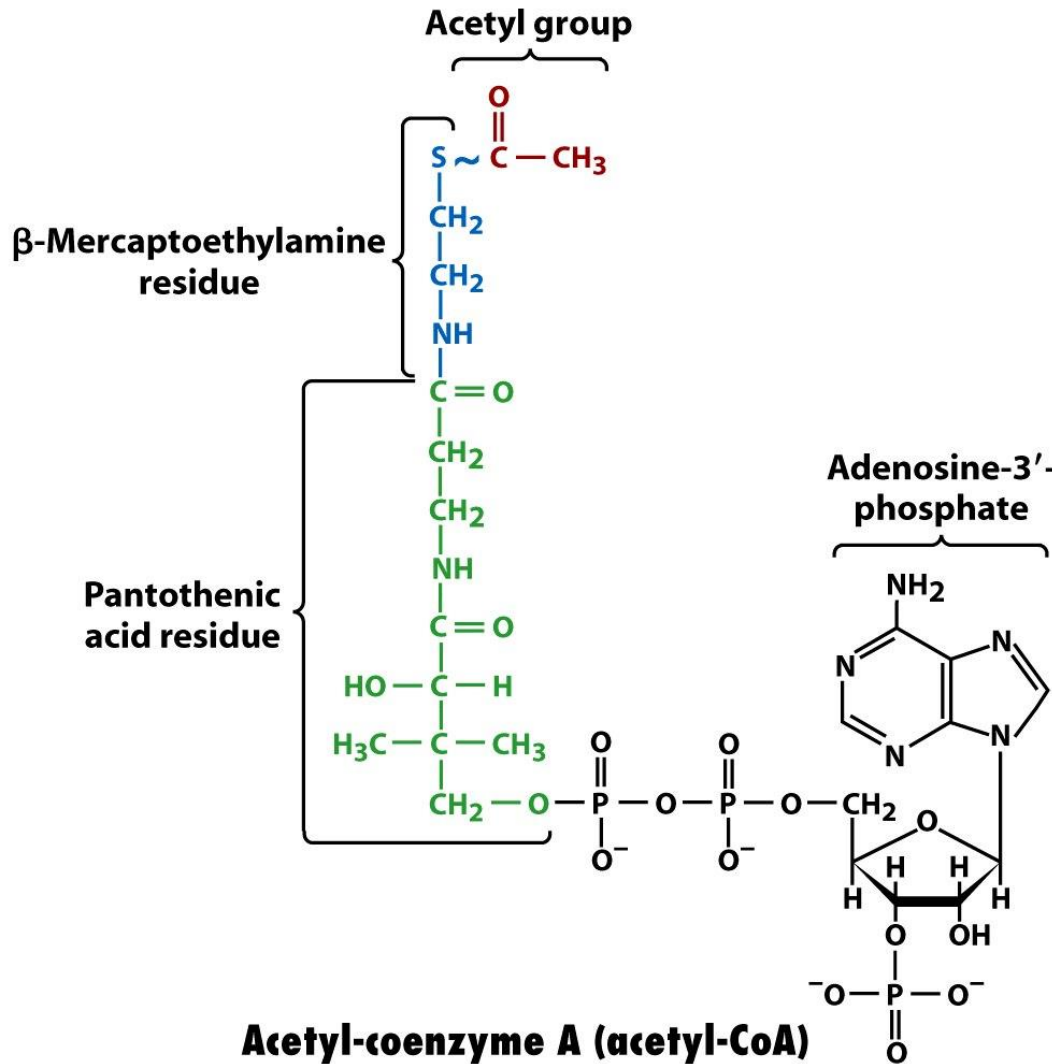


Figure 13-9 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

Fonte: Voet et al., 2006

La decarbossilazione ossidativa del piruvato ad **acetil-CoA** apre la via al ciclo di Krebs (così chiamato in onore di Hans Krebs, biochimico, Premio Nobel 1953 per la Medicina e la Fisiologia)

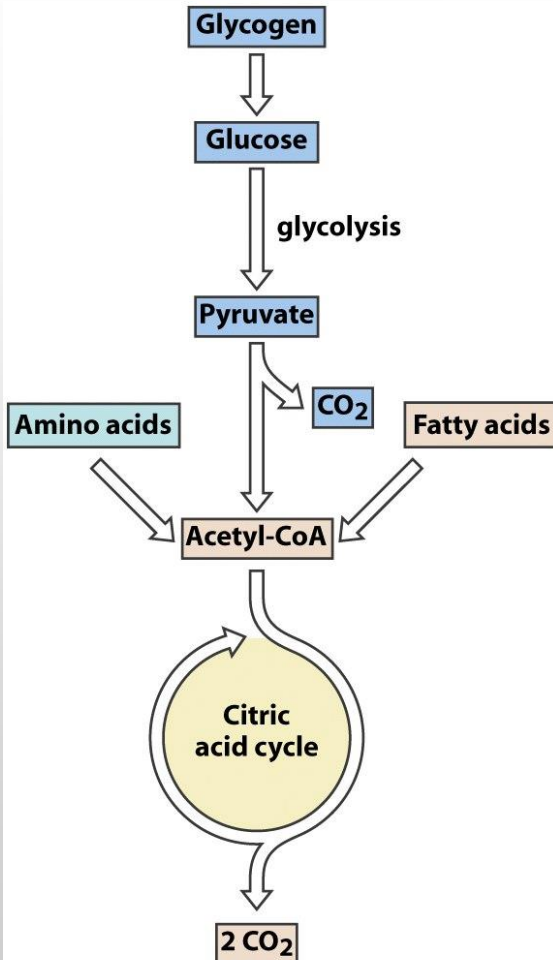


Figure 16-1 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

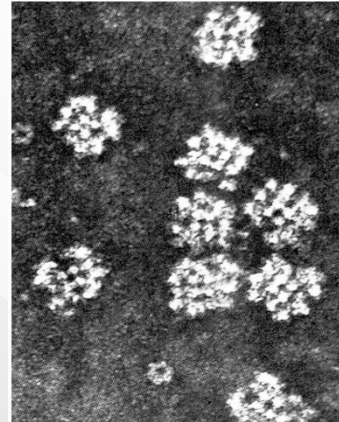


Figure 16-3a Fundamentals of Biochemistry, 2/e

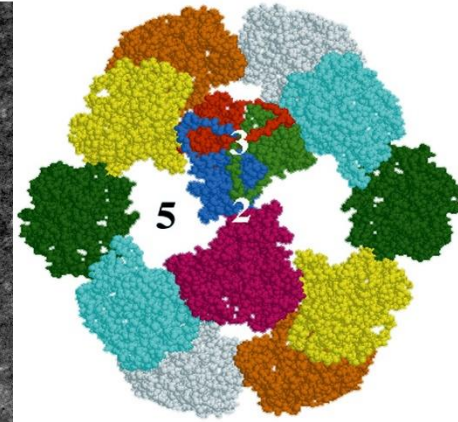
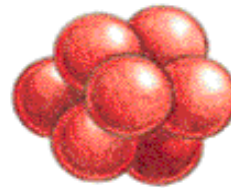


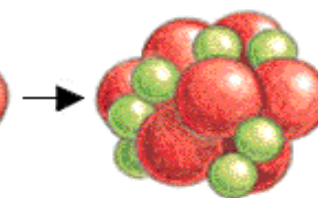
Figure 16-5b Fundamentals of Biochemistry, 2/e

Il gigantesco complesso multienzimatico della **piruvato decarbossilasi** (10 000 kD, 96 subunità)

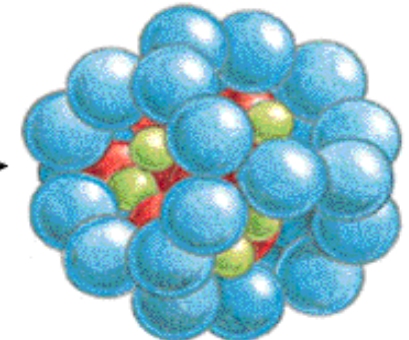
8 trimers of lipoamide reductase-transacetylase

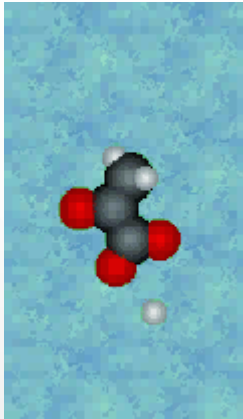


+6 dimers of dihydrolipoyl dehydrogenase



+12 dimers of pyruvate decarboxylase





Le reazioni della piruvato decarbossilasi... ...questo è solo un riassunto...

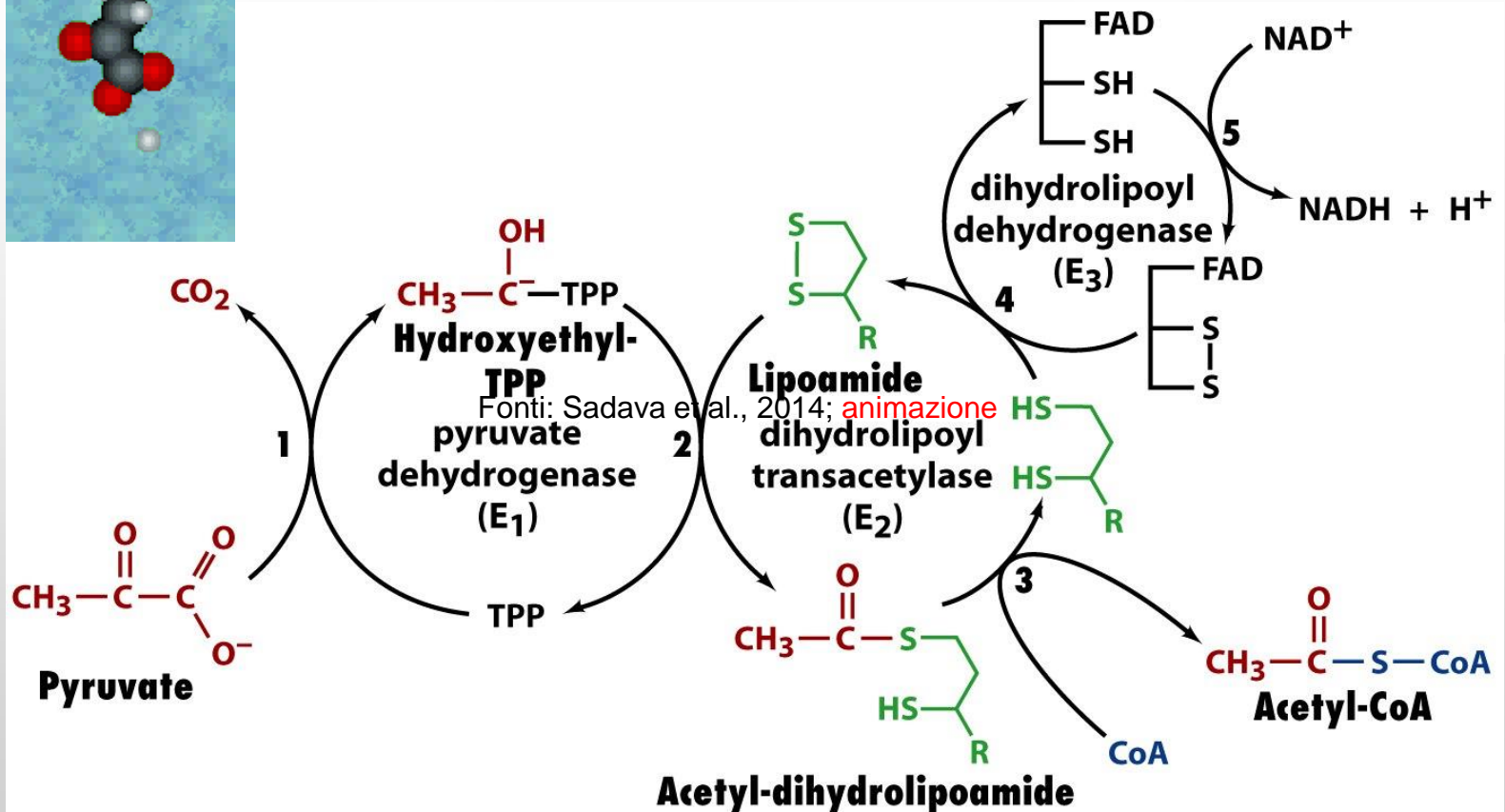
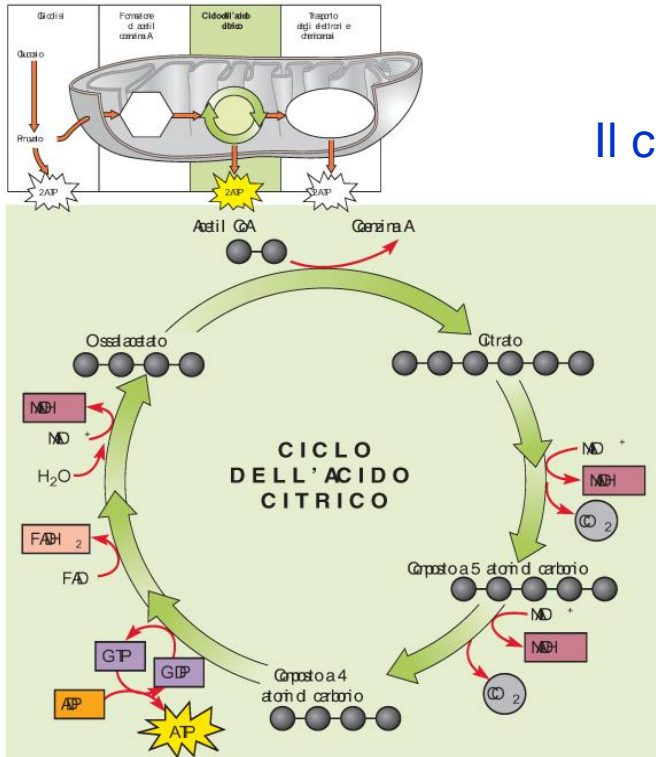


Figure 16-6 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

L'**arsenico** è un potente **veleno della piruvato decarbossilasi**, perché ha una elevata affinità con i gruppi -SH dell'acido lipoico (cofattore della diidrolipoil transacetilasi)

L'acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs (ciclo dell'acido citrico, o ciclo degli acidi tricarbossilici)



Il ciclo di Krebs avviene nella matrice mitocondriale

FIGURA 7-6 Una visione globale del ciclo dell'acido citrico.
Due gruppi acetile entrano nel ciclo dell'acido citrico per ciascun glucosio iniziale. Ciascun gruppo acetile, molecola a due atomi di carbonio, si combina con l'ossalacetato, composto a quattro atomi di carbonio, per formare il citrato, molecola a sei atomi di carbonio. Due molecole di CO₂ sono rimosse, l'energia è catturata in forma di un ATP, tre NADH ed un FADH₂ per ciascun gruppo acetile (ovvero due ATP, sei NADH e due FADH₂ per ogni molecola di glucosio).



Sir Hans Krebs (1900-1981)

Medico e biochimico tedesco di origine ebrea, dal 1933 cittadino inglese

Premio Nobel per la Medicina nel 1953



Albert Szent-Györgyi de Nagyrápolt

(1893-1986)

Fisiologo ungherese, naturalizzato americano

Premio Nobel per la Medicina nel 1937

Fonti: Solomon et al., 2012, 2014

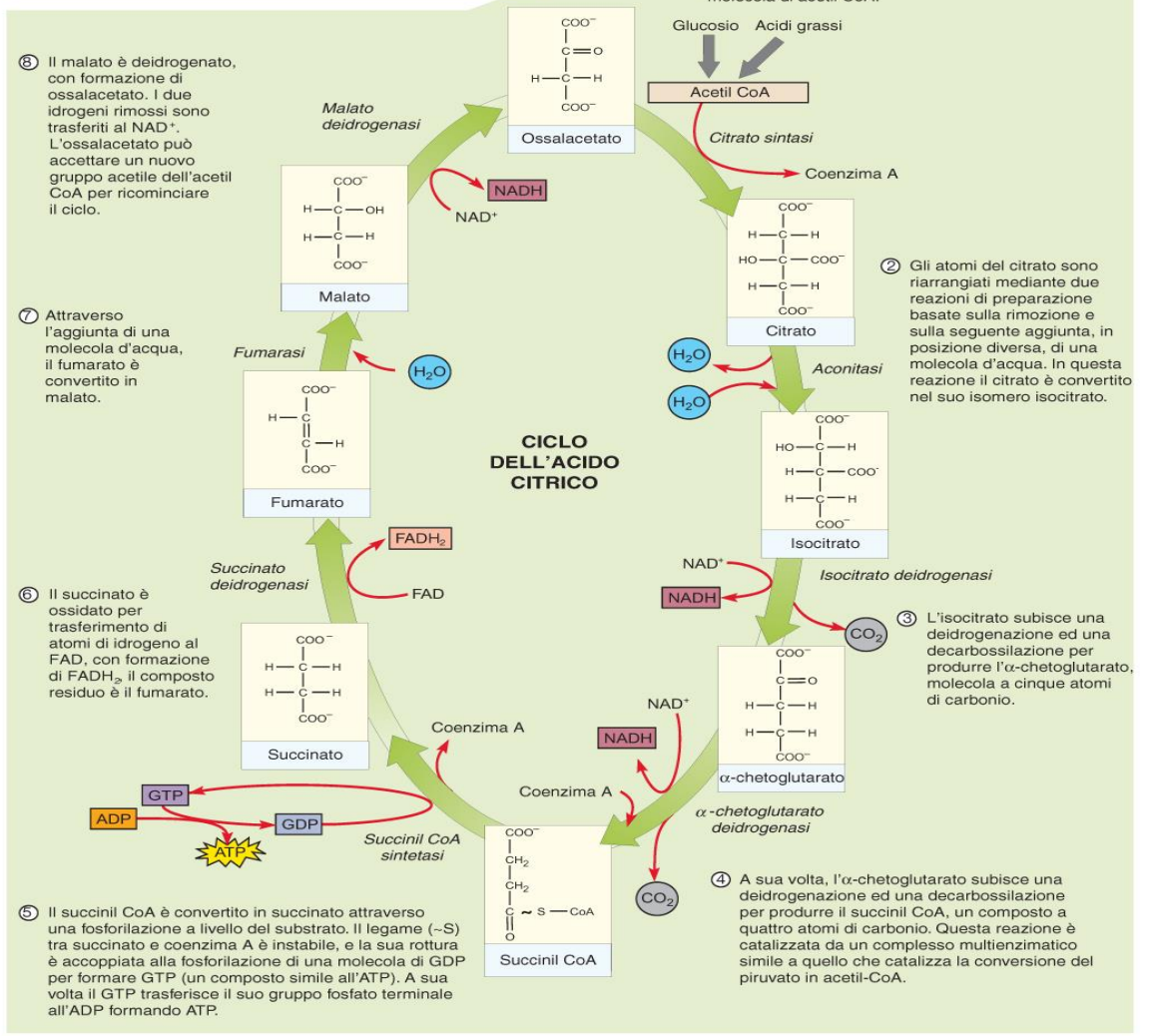
Il frammento a due atomi di carbonio contenuto nell'acetil-CoA è completamente demolito nel ciclo di Krebs

I prodotti del ciclo di Krebs sono **CO₂**, **NADH** e **FADH₂**

Fonti: Sadava et al., 2014, 2019

FIGURA 7-7 Una visione dettagliata del ciclo dell'acido citrico.

Bisogna iniziare dalla parte alta a destra, dove l'acetil CoA si attacca all'ossalacetato. Durante il ciclo dell'acido citrico, l'entrata di un gruppo acetile, a due atomi di carbonio, è bilanciata dal rilascio di due molecole di anidride carbonica. Gli elettroni sono trasferiti al NAD⁺ e al FAD, con produzione, rispettivamente, di NADH e FADH₂. ATP è formato per fosforilazione a livello del substrato.



Un altro trasportatore di H⁺ ed elettroni:
flavina adenindinucleotide (**FAD**)

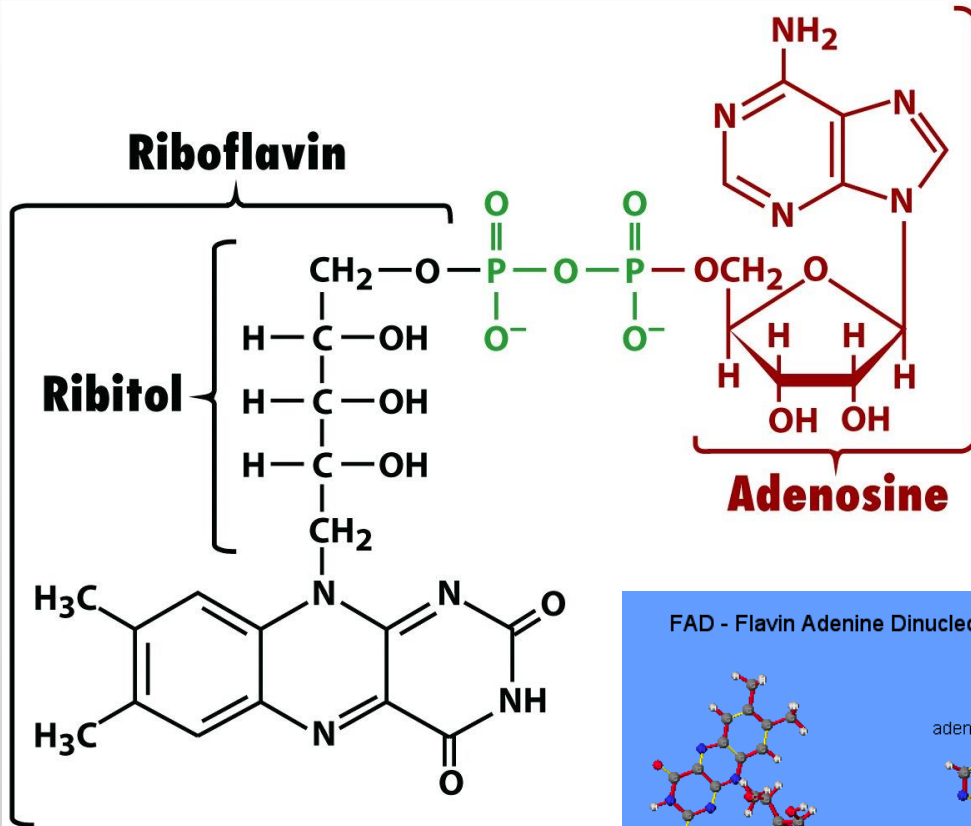
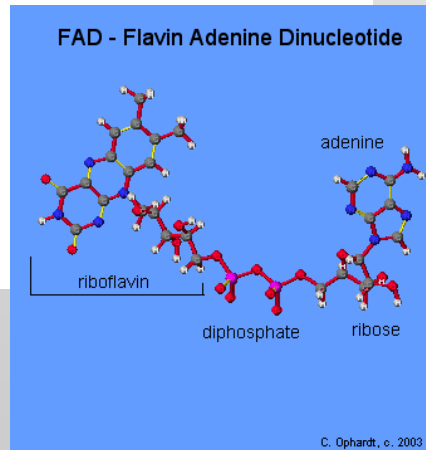
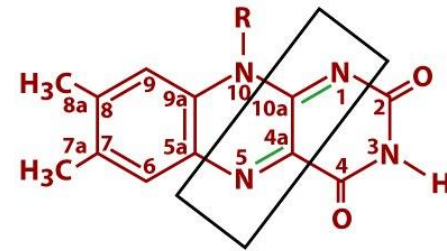


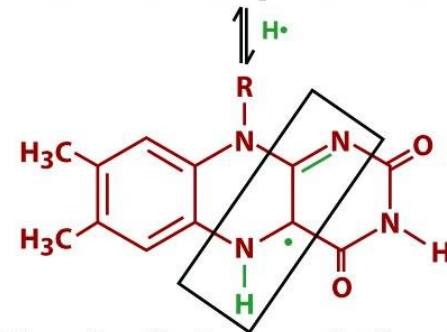
Figure 13-11 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons



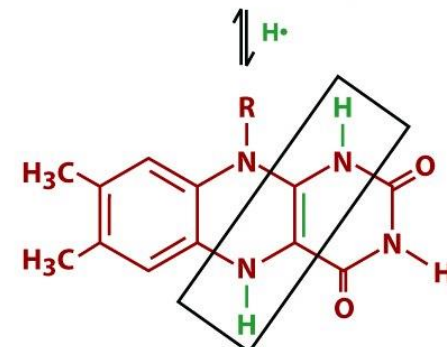
C. Ophardt, c. 2003



Flavin adenine dinucleotide (FAD)
(oxidized or quinone form)



FADH · (radical or semiquinone form)

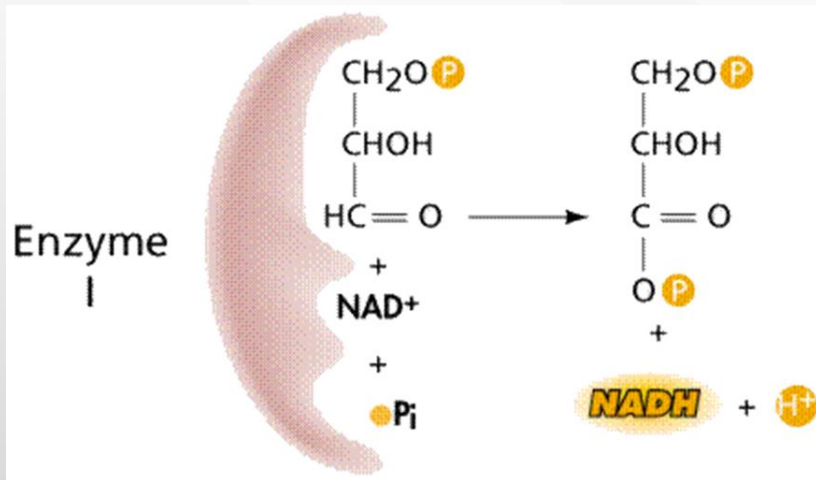


FADH₂ (reduced or hydroquinone form)

Figure 13-12 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

A che cosa servono tutti questi
coenzimi piridinici ridotti?

Servono ad ottenere “**potere riducente**”
(H^+) per produrre ATP



NAD e FAD possono infatti acquistare H^+ ed
elettroni (si riducono) e la riduzione serve per
produrre ATP

Ma in quale modo è prodotto ATP?

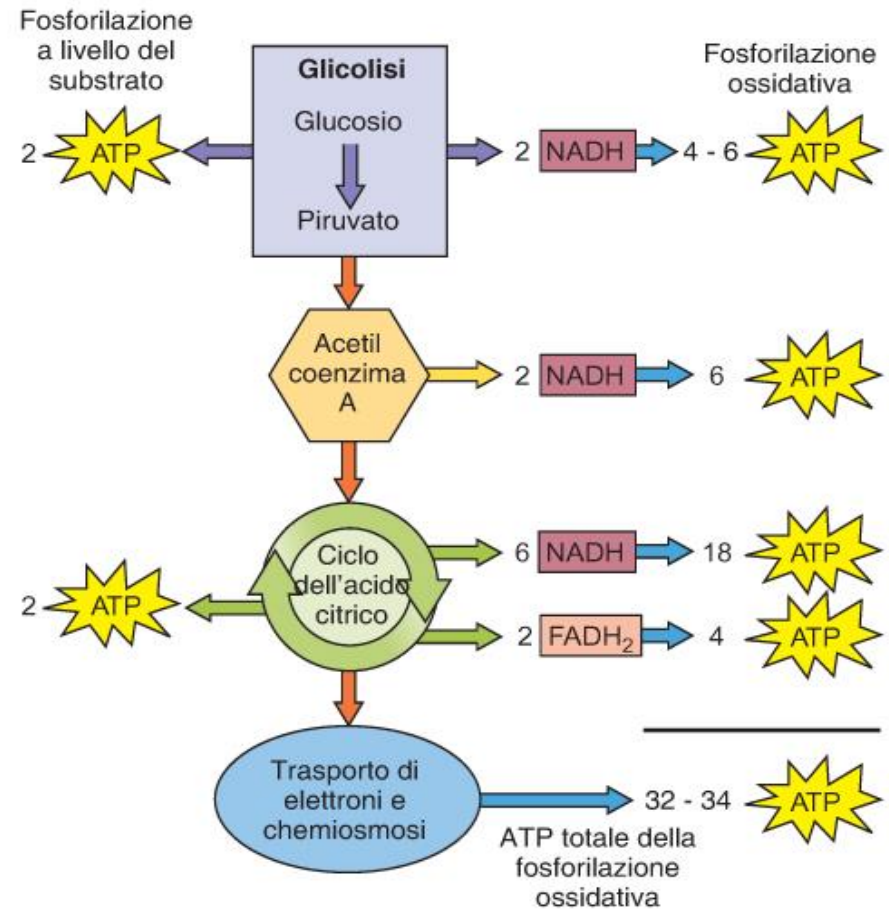


FIGURA 7-11

Resa energetica della ossidazione completa del glucosio con la respirazione aerobica.

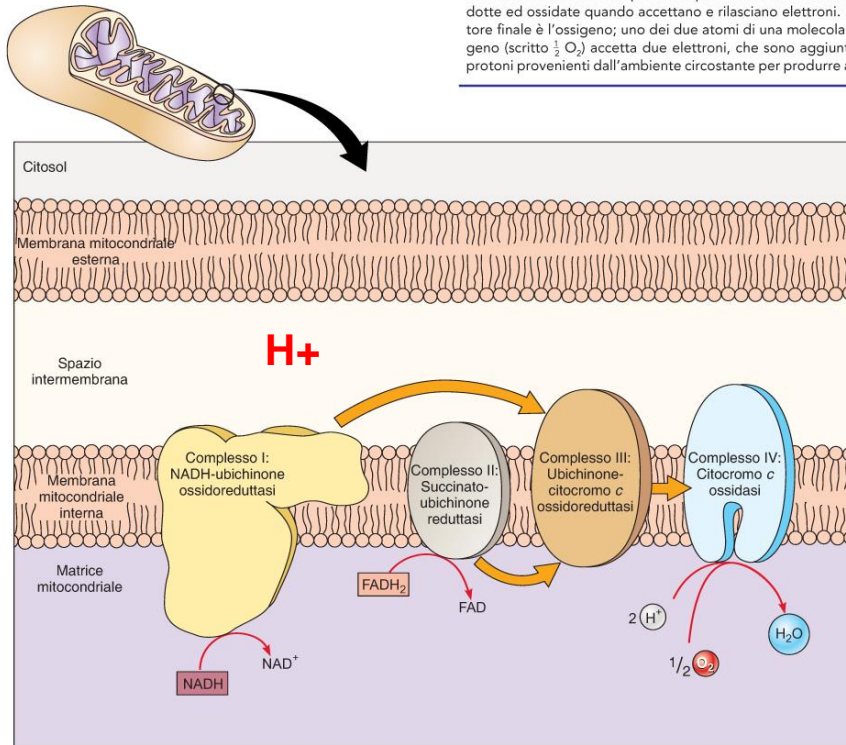
Per molecola di glucosio, si producono un massimo di 36-38 molecole di ATP. Di queste molecole, quattro sono prodotte per fosforilazione a livello del substrato e le rimanenti per fosforilazione ossidativa (trasporto di elettroni e chemiosmosi).

Per produrre ATP è necessario separare i protoni (H^+) dagli elettroni:

gli elettroni sono trasportati lungo la catena di trasporto degli elettroni, nella membrana interna del mitocondrio...

FIGURA 7-8 Una visione globale della catena di trasporto degli elettroni.

Gli elettroni cadono in livelli energetici progressivamente più bassi, durante il loro passaggio attraverso i quattro complessi della catena di trasporto, che si trovano nella membrana mitocondriale interna (le frecce arancioni indicano la direzione del trasferimento). Le molecole carrier all'interno di questi complessi sono alternativamente ridotte ed ossidate quando accettano e rilasciano elettroni. L'accettore finale è l'ossigeno; uno dei due atomi di una molecola di ossigeno (scritto $\frac{1}{2} O_2$) accetta due elettroni, che sono aggiunti a due protoni provenienti dall'ambiente circostante per produrre acqua.



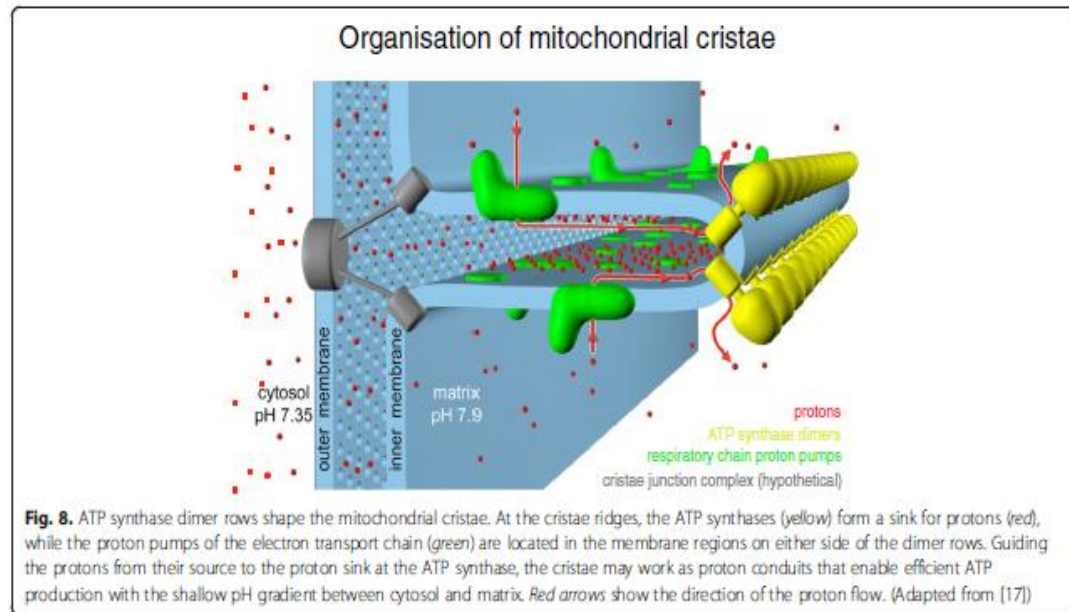
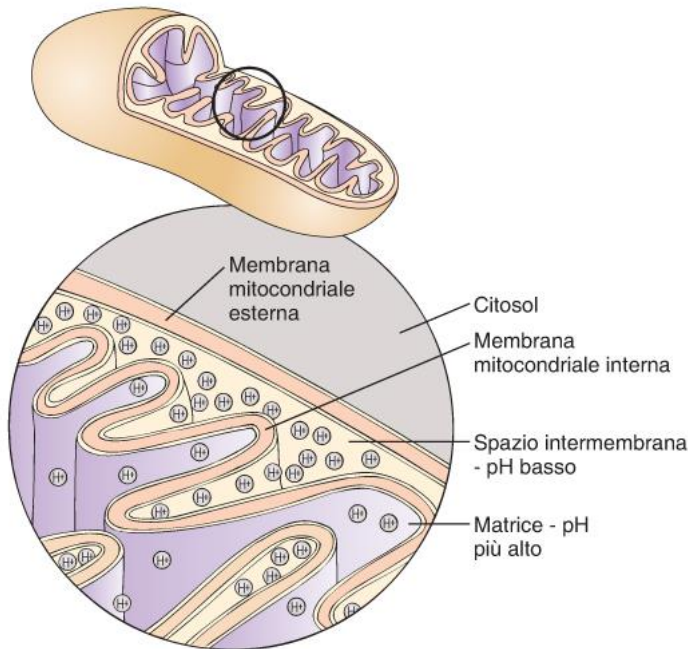
...ma i protoni sono
“confinati” nello
spazio intermembrana



La membrana interna del mitocondrio
è carica positivamente e respinge i
protoni

Lo **spazio intermembrana** del mitocondrio diventa una sorta di “**campo di concentrazione**” per protoni (H^+)

L'accumulo di protoni nello spazio intermembrana determina la sintesi di ATP



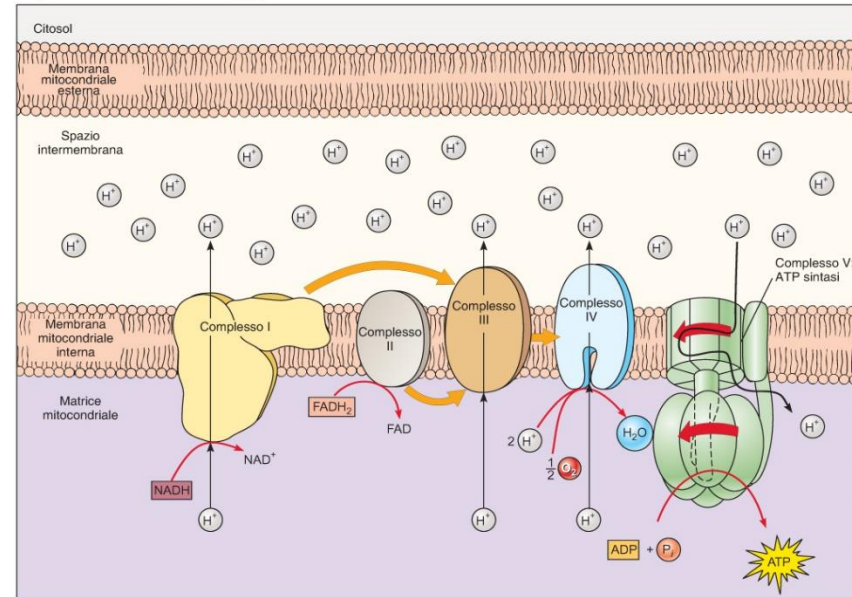
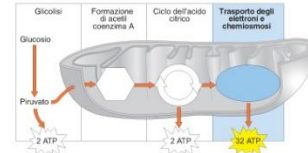
Un lavoro pubblicato nel 2015 ha stabilito che **i protoni si accumulano principalmente nella regione apicale interna delle creste**, in corrispondenza dei complessi transmembrana che eseguono la sintesi di ATP (Kuhlbrandt, 2015)

Riepilogando fino a questo punto...

Il NADH e il FADH₂
trasportano protoni ed elettroni

cedendoli alla catena di trasporto degli elettroni, situata nella membrana interna del mitocondrio e costituita da 4 grandi complessi transmembrana

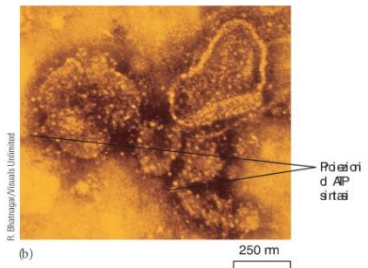
I complessi della catena di trasporto muovono gli elettroni lungo la catena e contemporaneamente riversano i protoni nello spazio intermembrana, dove restano "confinati"



(a)

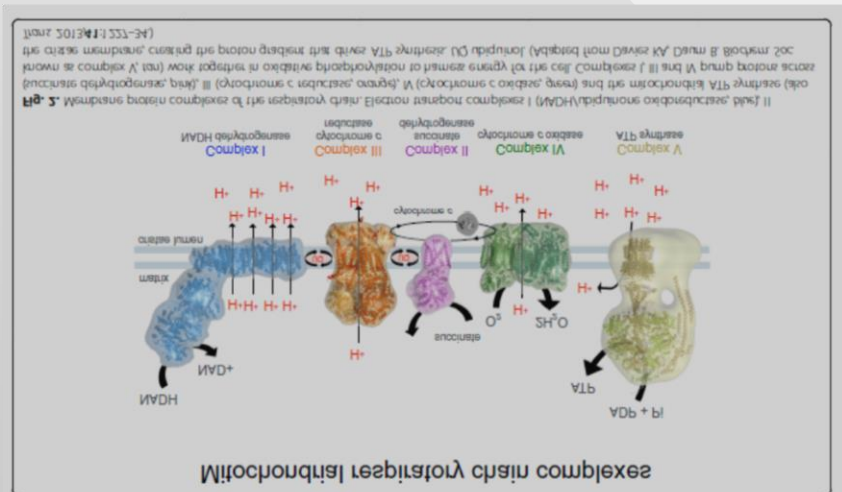
FIGURA 7-10 Una visione dettagliata del trasporto degli elettroni e della chemiosmosi.

(a) La catena di trasporto degli elettroni nella membrana mitocondriale interna comprende tre pompe protoniche localizzate in tre dei quattro complessi di trasporto. (Le frecce arancie indicano il flusso degli elettroni e quelle nere il flusso dei protoni). L'energia rilasciata durante il trasporto elettronico è utilizzata per trasportare protoni (H⁺) dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana, dove si accumula una elevata concentrazione di protoni, i quali non possono diffondere attraverso la membrana mitocondriale interna nella matrice, se non attraverso i canali dell'ATP sintasi. Il flusso di protoni attraverso l'ATP sintasi fornisce l'energia per produrre ATP da ADP e P_i. In questo processo, la parte interna della ATP sintasi ruota (freccia rossa spessa) come un motore. (b) Questa fotografia al microscopio elettronico mostra centinaia di complessi di ATP sintasi che si proiettano dalla superficie della membrana mitocondriale interna.



R. Baumeister/Visuals Unlimited

(b)



Mitochondrial respiratory chain complexes

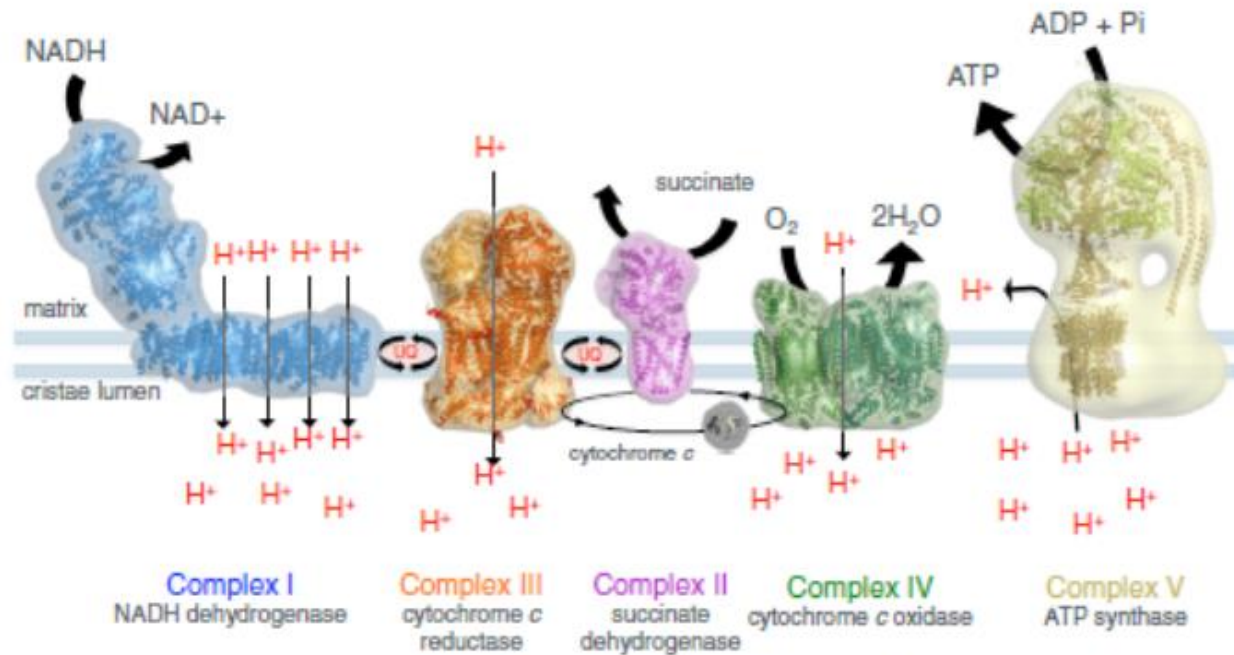
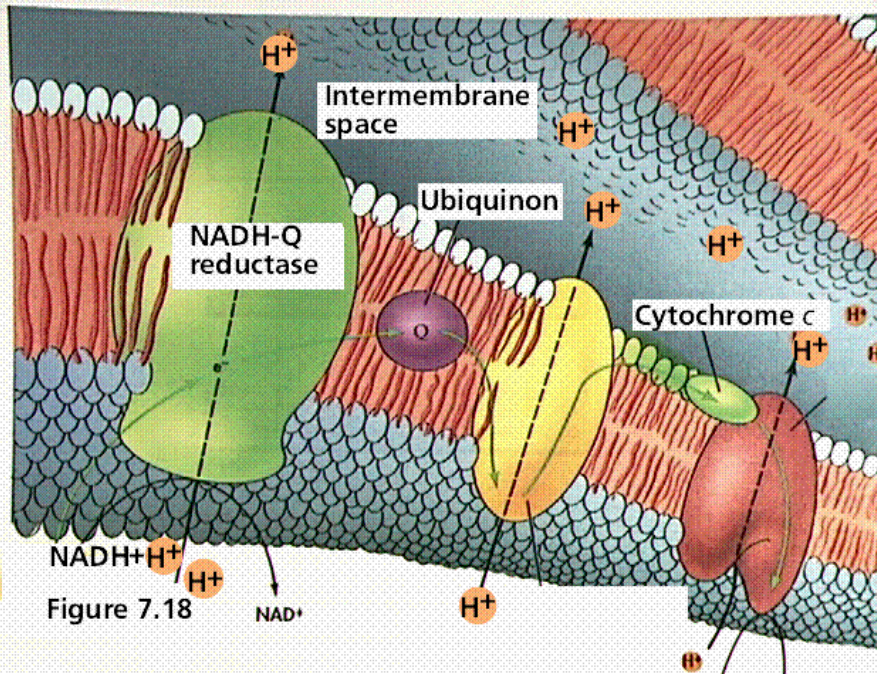


Fig. 2. Membrane protein complexes of the respiratory chain. Electron transport complexes I (NADH/ubiquinone oxidoreductase, blue), II (succinate dehydrogenase, pink), III (cytochrome c reductase, orange), IV (cytochrome c oxidase, green) and the mitochondrial ATP synthase (also known as complex V, tan) work together in oxidative phosphorylation to harness energy for the cell. Complexes I, III and IV pump protons across the cristae membrane, creating the proton gradient that drives ATP synthesis. UQ ubiquinol. (Adapted from Davies KA, Daum B. *Biochem. Soc. Trans.* 2013;41:1227-34.)

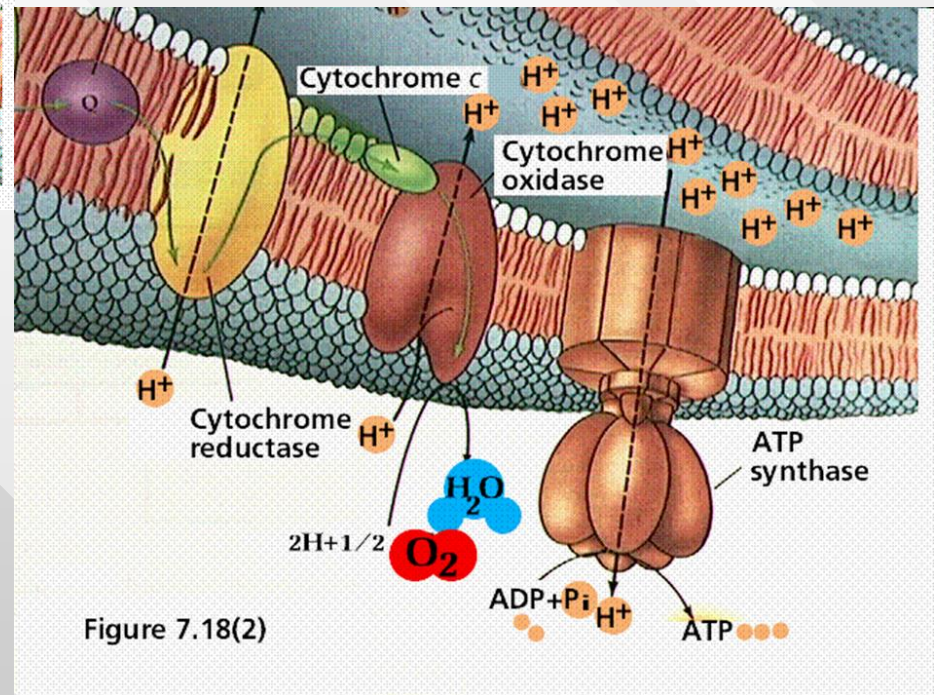
Struttura dei complessi della catena respiratoria mitocondriale ('**respiroma**')
esaminati tramite **microscopia crioelettronica (Cryo-EM)** (2015)



I complessi della membrana interna mitocondriale confinano i protoni nello spazio intermembrana e trasferiscono gli elettroni lungo la catena...

... fino a quando gli **elettroni**, tramite il complesso IV, **finiscono sull'ossigeno** (ecco perché gli organismi aerobi devono respirarlo per sopravvivere)

L' **ossigeno** è l' **accettore finale degli elettroni** trasportati lungo la catena di trasporto della membrana interna del mitocondrio



La citocromo ossidasi, il complesso IV della catena di trasporto degli elettroni, compie un ciclo catalitico **trasferendo** prima **gli elettroni** (uno alla volta) sull'**ossigeno** e poi **aggiungendo protoni** fino a **produrre acqua**

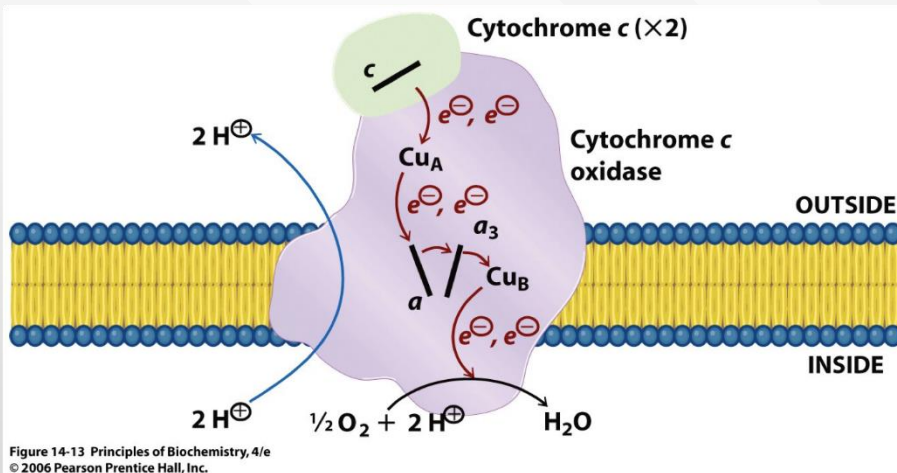
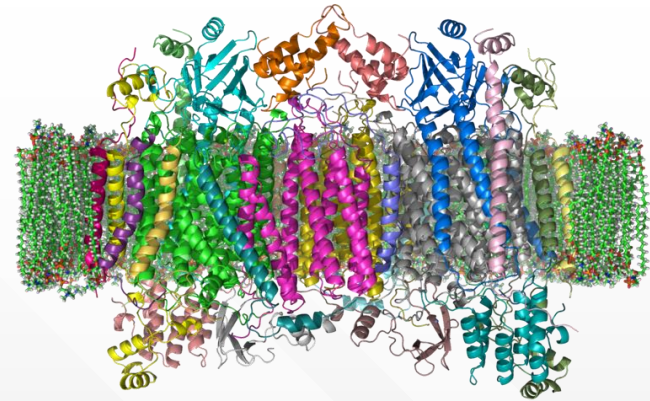


Figure 14-13 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

$2 H^+ + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$
(Necessary for ATP generation)

Cyanide

H-C≡N

Ferric ion (Fe³⁺)

Cytochrome oxidase a₃

Mitochondrion

Anaerobic metabolism

Lactic acidosis

Toxicology

A Review of Acute Cyanide Poisoning With a Treatment Update

Jillian Hamel, MS, ACNP-BC, CCNS, CCRN

Cyanide causes intracellular hypoxia by reversibly binding to mitochondrial cytochrome oxidase a₃. Signs and symptoms of cyanide poisoning usually occur less than 1 minute after inhalation and within a few minutes after ingestion. Early manifestations include anxiety, headache, dizziness, inability to focus the eyes, and mydriasis, as hypoxia progresses, progressively lower levels of consciousness, seizures, and coma can occur. Skin may look normal or slightly ashen, and arterial oxygen saturation may be normal. Early respiratory signs include tachycardia and deep respirations. As poisoning progresses, hypotension, status may become unstable. The key treatment is early administration of 1 of the 2 antidotes currently available in the United States: the well-known cyanide antidote kit and hydroxocobalamin. Hydroxocobalamin detoxifies cyanide by binding with it to form the readily excreted, nontoxic cyanocobalamin. Because it binds with cyanide without forming methemoglobin, hydroxocobalamin can be used to treat patients without compromising the oxygen-carrying capacity of hemoglobin. (Critical Care Nurse. 2011;31(11):72-82)

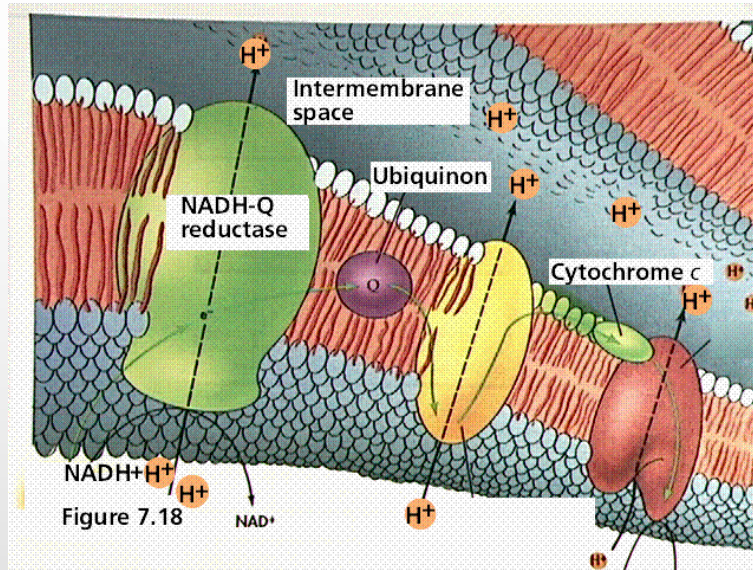
Knowledge of the pathophysiology of acute cyanide poisoning and its antidotes in combination with the ability to tailor management of a patient's care to this unique situation will be critical to the patient's recovery. In this article, I discuss the pathophysiology of acute cyanide poisoning and detail the benefits and challenges of the antidotes currently available.

Life-threatening cyanide poisoning is treatable when quickly recognizing

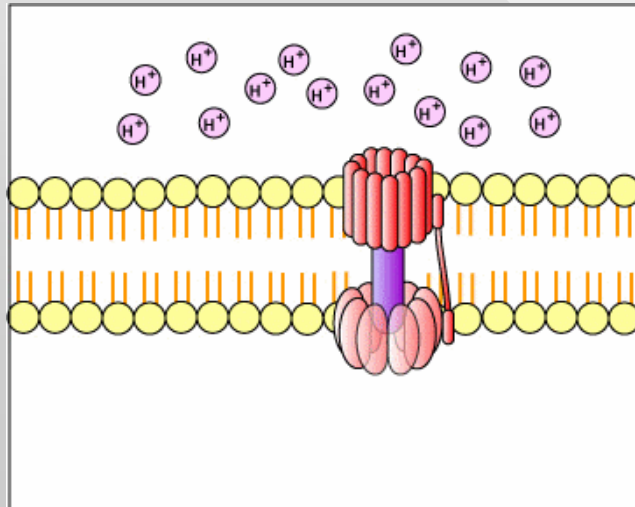
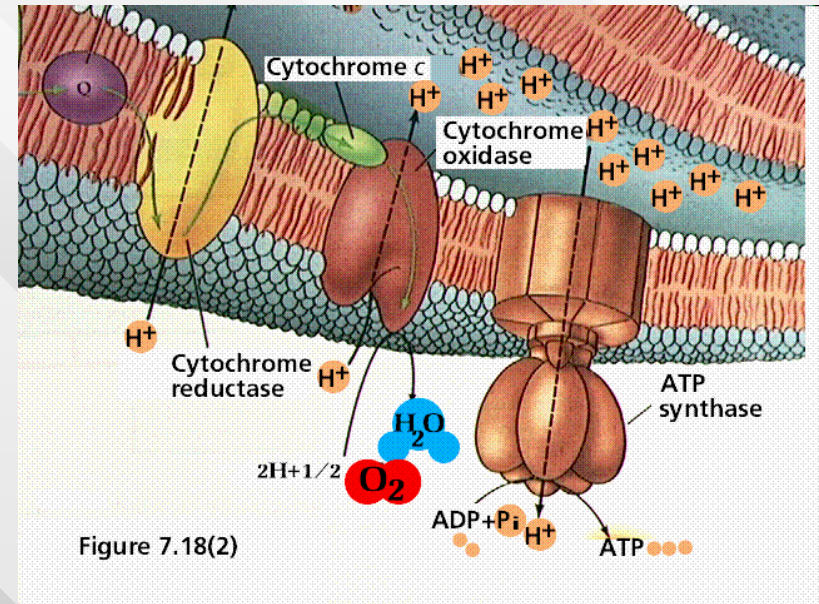
Il **cianuro** si lega in modo reversibile alla citocromo ossidasi, causando **ipossia e asfissia**

L'avvelenamento da cianuro si può curare con la somministrazione di **idrossicobalamina**, che forma un complesso innocuo con il cianuro e ne consente l'eliminazione per escrezione (Hamel et al., 2011)

I **protoni confinati** nello spazio intermembrana e costretti a rientrare nella matrice lungo una via obbligata, azionano l'**ATP-sintetasi**...

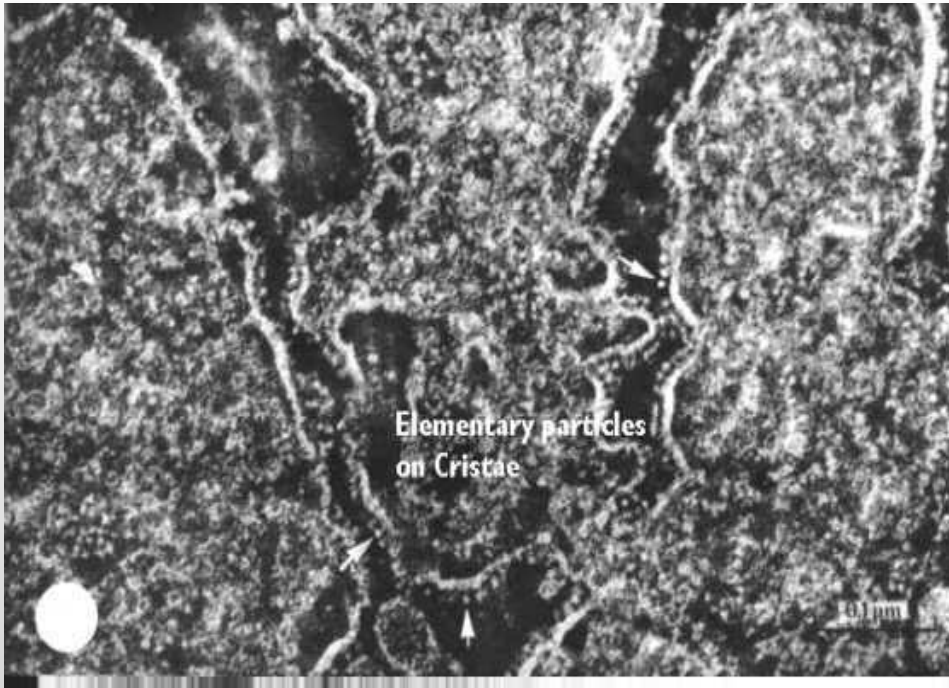


...il grande complesso multienzimatico che **fabbrica ATP**



Filmato

Teoria chemiosmotica della produzione di ATP (Peter Mitchell, 1961)



Peter Dennis Mitchell (1920-1992)
Premio Nobel per la Chimica 1978

Quando propose per la prima volta la sua ipotesi (oggi **teoria**) **chemiosmotica**, Peter Mitchell incontrò **forti ostilità** da parte di molti biochimici perché **si riteneva impossibile che la produzione di ATP dipendesse dal trasporto di elettroni e protoni**

Fotografia dell'ATP-sintetasi al microscopio AFM e modelli interpretativi



Figure 17-21b Fundamentals of Biochemistry, 2/e

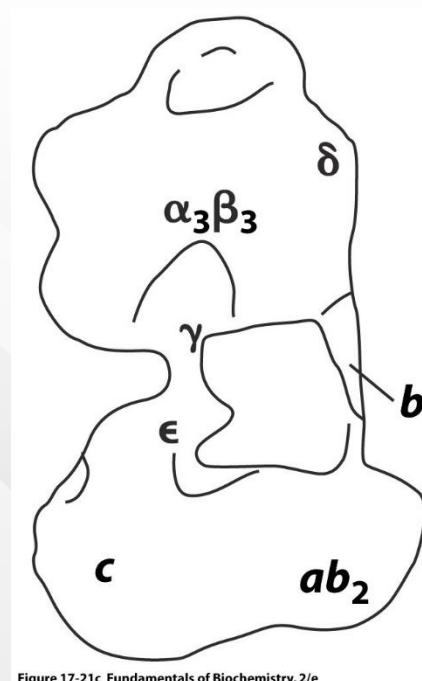
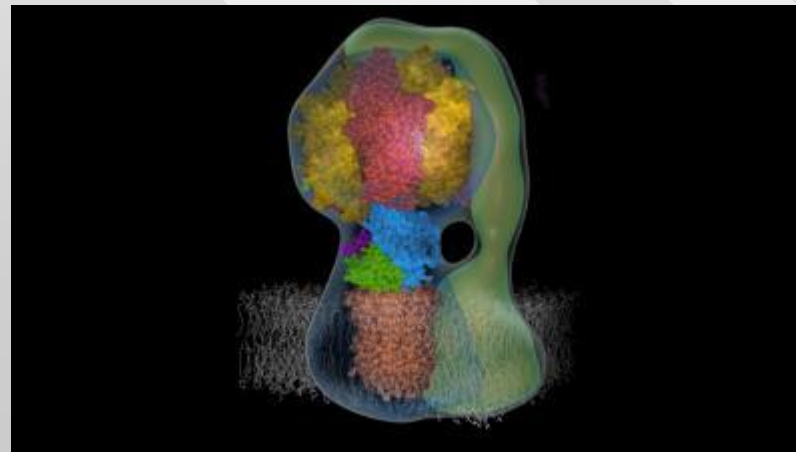
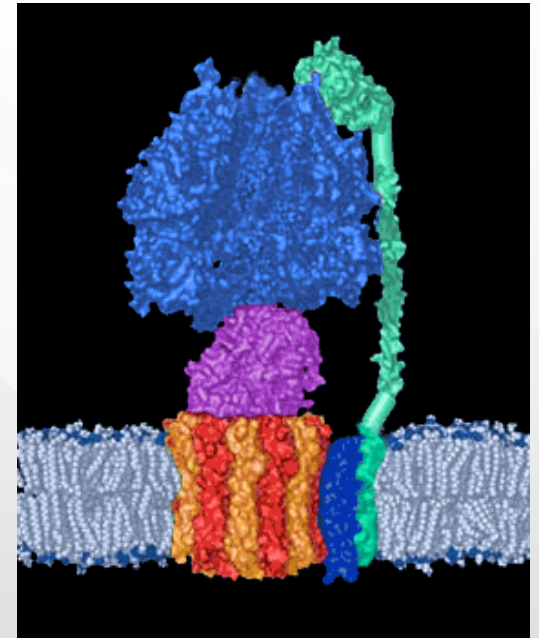


Figure 17-21c Fundamentals of Biochemistry, 2/e



Fonte: Voet et al., 2006

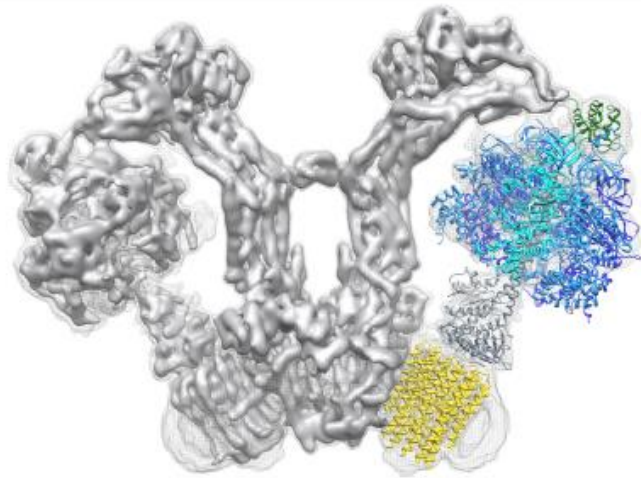


Fig. 5. Structure of the mitochondrial ATP synthase dimer from *Palytomella* sp. Side view of the two mitochondrial ATP synthase in the V-shaped dimer. One protomer is fitted with atomic models PDB 2WSS [63] (α -subunits, cyan; β -subunits, blue; γ subunits, grey; OSCP, green) and PDB 3UZ7 [64] (yellow, c_{10} -ring). Density threshold levels are 1σ (mesh) or 7σ (solid surface). (Adapted from [40])

Studi recenti hanno stabilito che il complesso dell'ATP-sintasi funziona come **dimero**, posizionato in lunghe file **all'apice della cresta mitocondriale**, in corrispondenza del punto di accumulo interno dei protoni (Kuhlbrandt, 2015)

Organisation of mitochondrial cristae

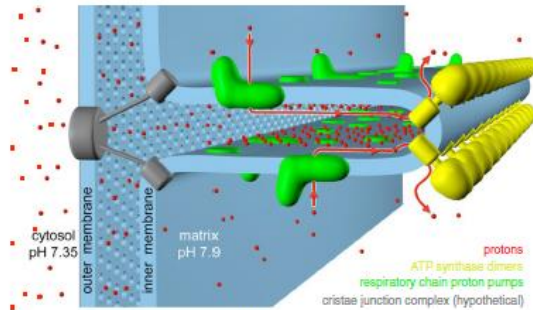


Fig. 8. ATP synthase dimer rows shape the mitochondrial cristae. At the cristae ridges, the ATP synthases (yellow) form a sink for protons (red), while the proton pumps of the electron transport chain (green) are located in the membrane regions on either side of the dimer rows. Guiding the protons from their source to the proton sink at the ATP synthase, the cristae may work as proton conduits that enable efficient ATP production with the shallow pH gradient between cytosol and matrix. Red arrows show the direction of the proton flow. (Adapted from [17])

Dimer rows of the mitochondrial ATP synthase in different organisms

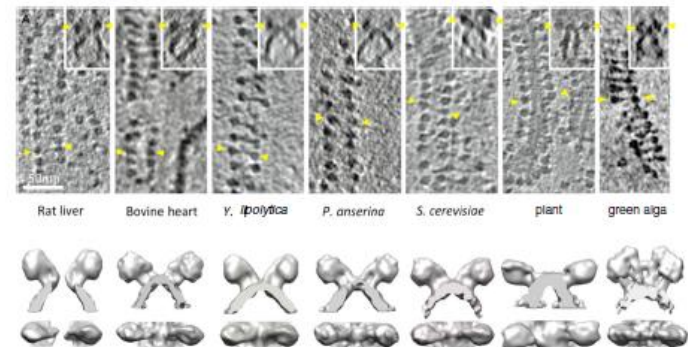
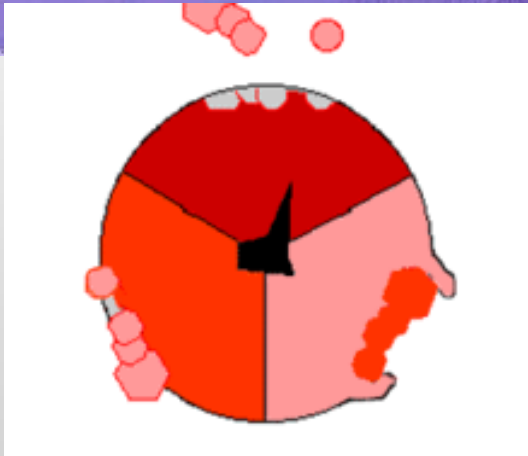
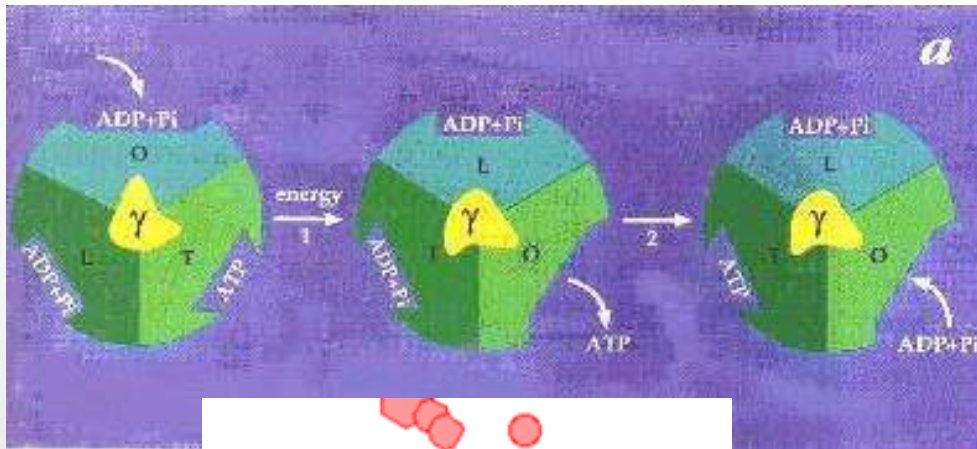


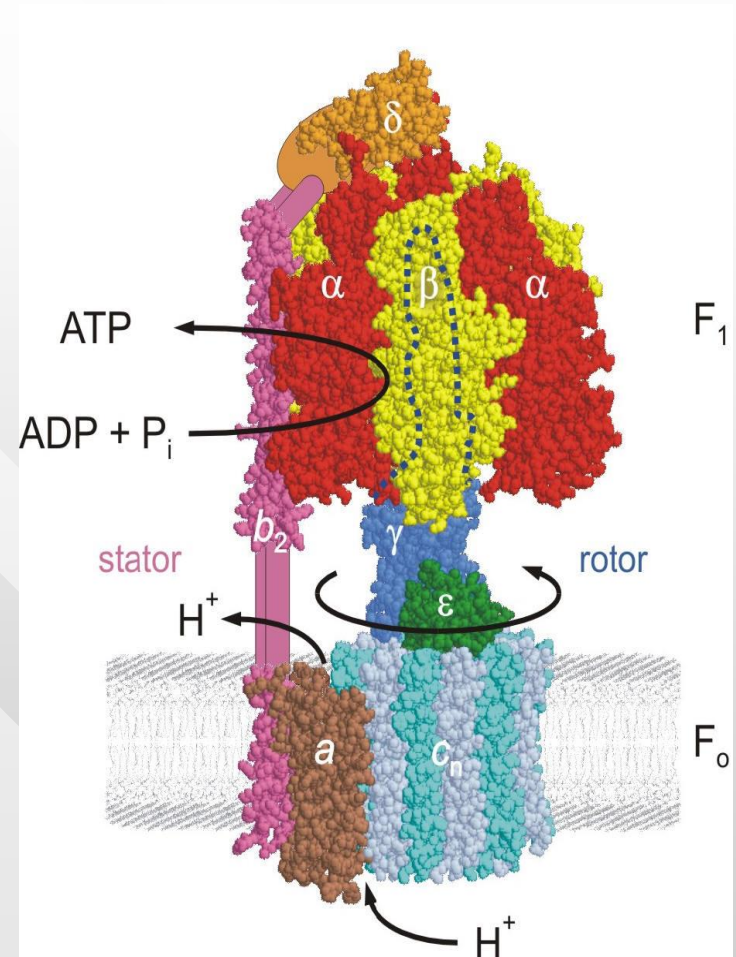
Fig. 4. Double rows of ATP synthase in seven different species. Top row: slices of 3D volumes obtained by cryo-ET with rows of ATP synthase dimers. Insets show side views of the dimers in the membrane. Yellow arrowheads indicate F_1 heads of one dimer. Scale bar = 50 nm. Bottom row: surface representations of subtomogram averages. (Adapted from [17])

Le file di dimeri di ATP-sintasi sono state identificate in numerosi organismi modello

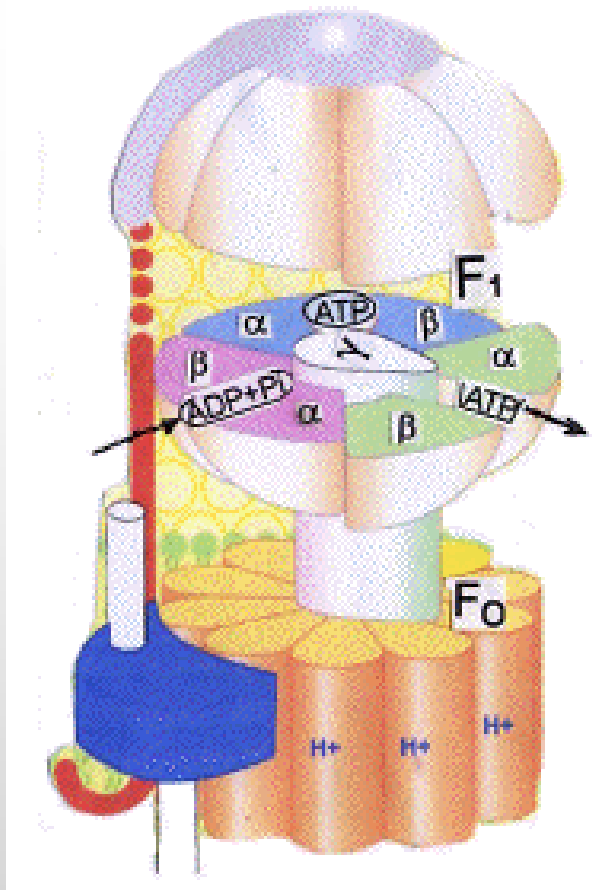
Funzionamento dell'ATP-sintetasi



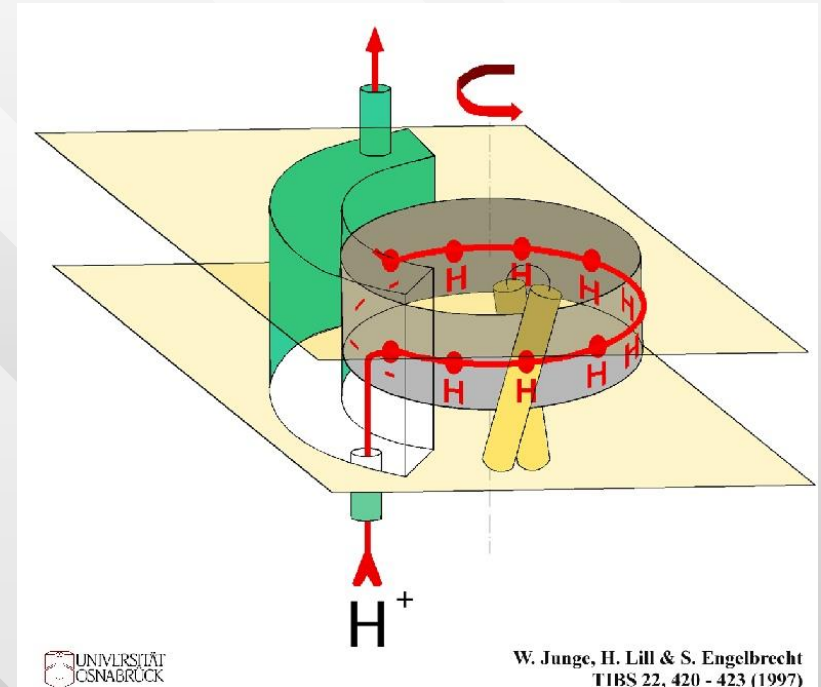
Il movimento di protoni (**forza protonmotrice**) produce cambiamenti conformazionali nelle subunità che formano la “**testa**” dell'ATP-sintetasi, **determinando la sintesi di ATP**



Fonte: Voet et al., 2006



Il movimento dei protoni lungo l'ATP-sintetasi
costringe il complesso a cambiare forma e a
sintetizzare ATP da ADP e P_i



Sintesi di ATP: filmato

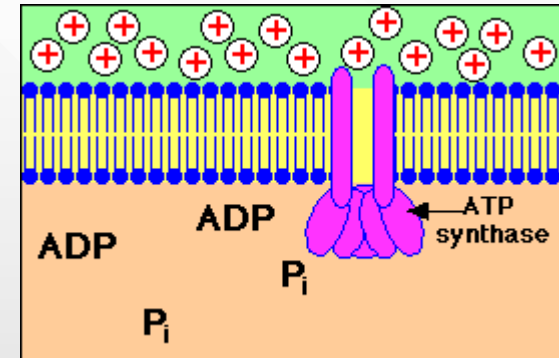
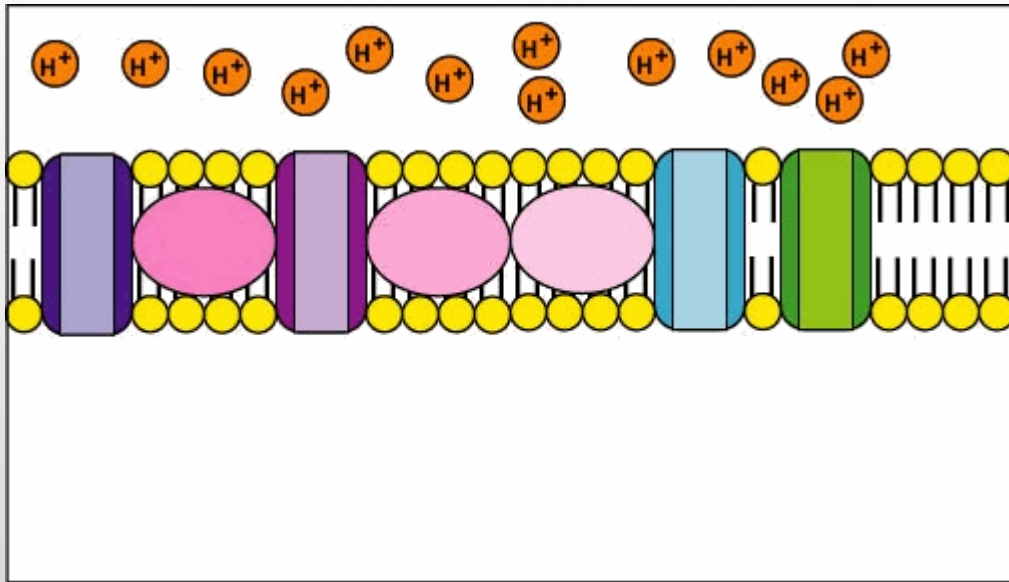
Fonte: Junge et al., Trends in Biochemical Sciences 22: 420-423, 1997

UNIVERSITÄT
 CSNABRÜCK

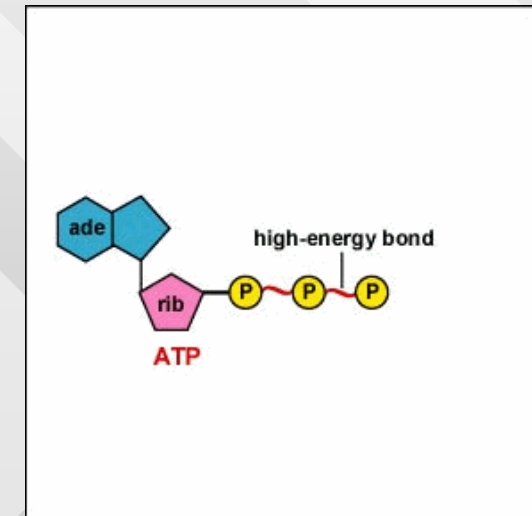
W. Junge, H. Lill & S. Engelbrecht
 TIBS 22, 420 - 423 (1997)

La sintesi di ATP a partire da ADP e P_i (“**fosforilazione**”) che utilizza il flusso dei protoni attraverso l’ATP-sintetasi e **richiede ossigeno come accettore finale di elettroni** è detta

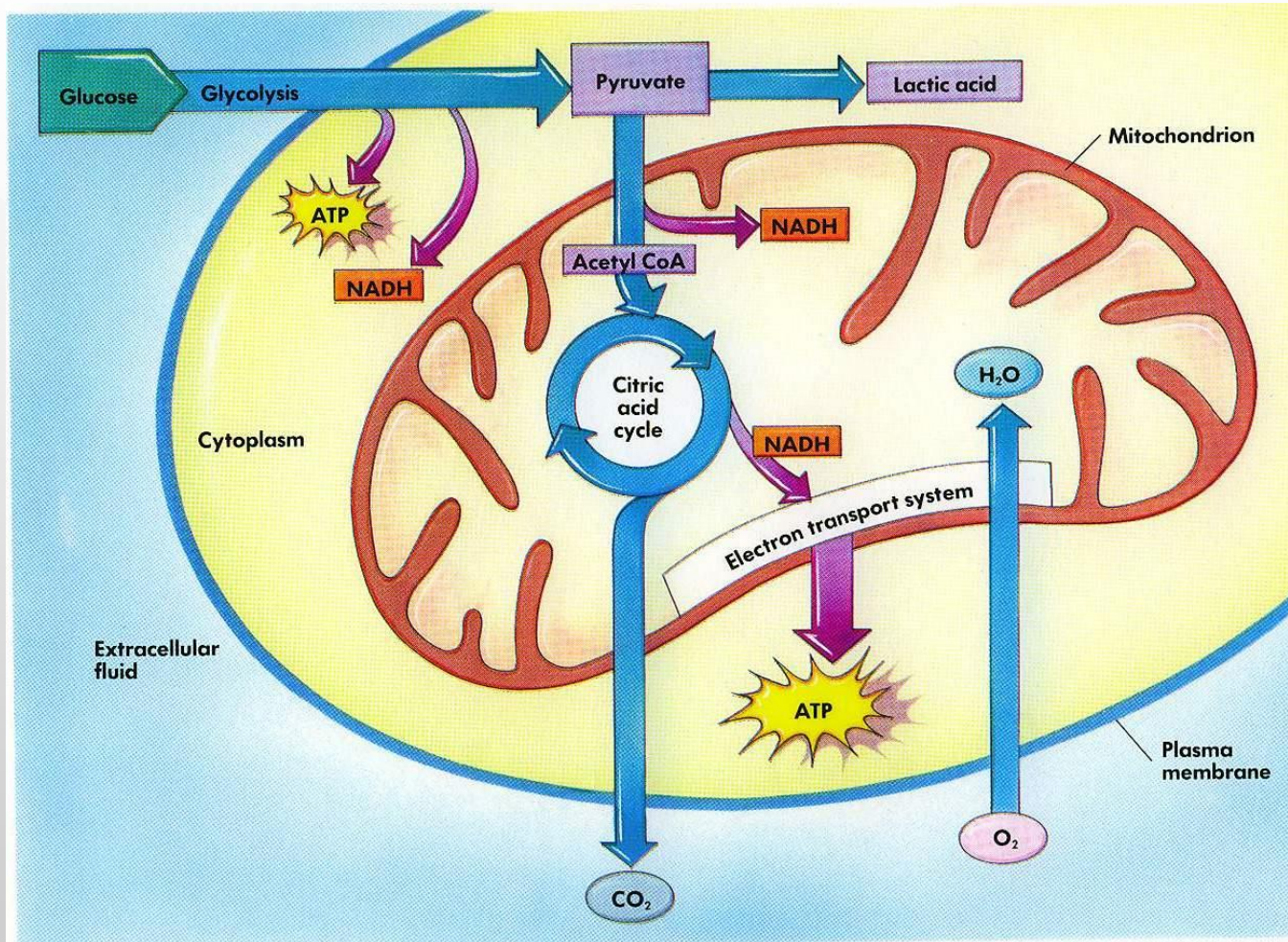
FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



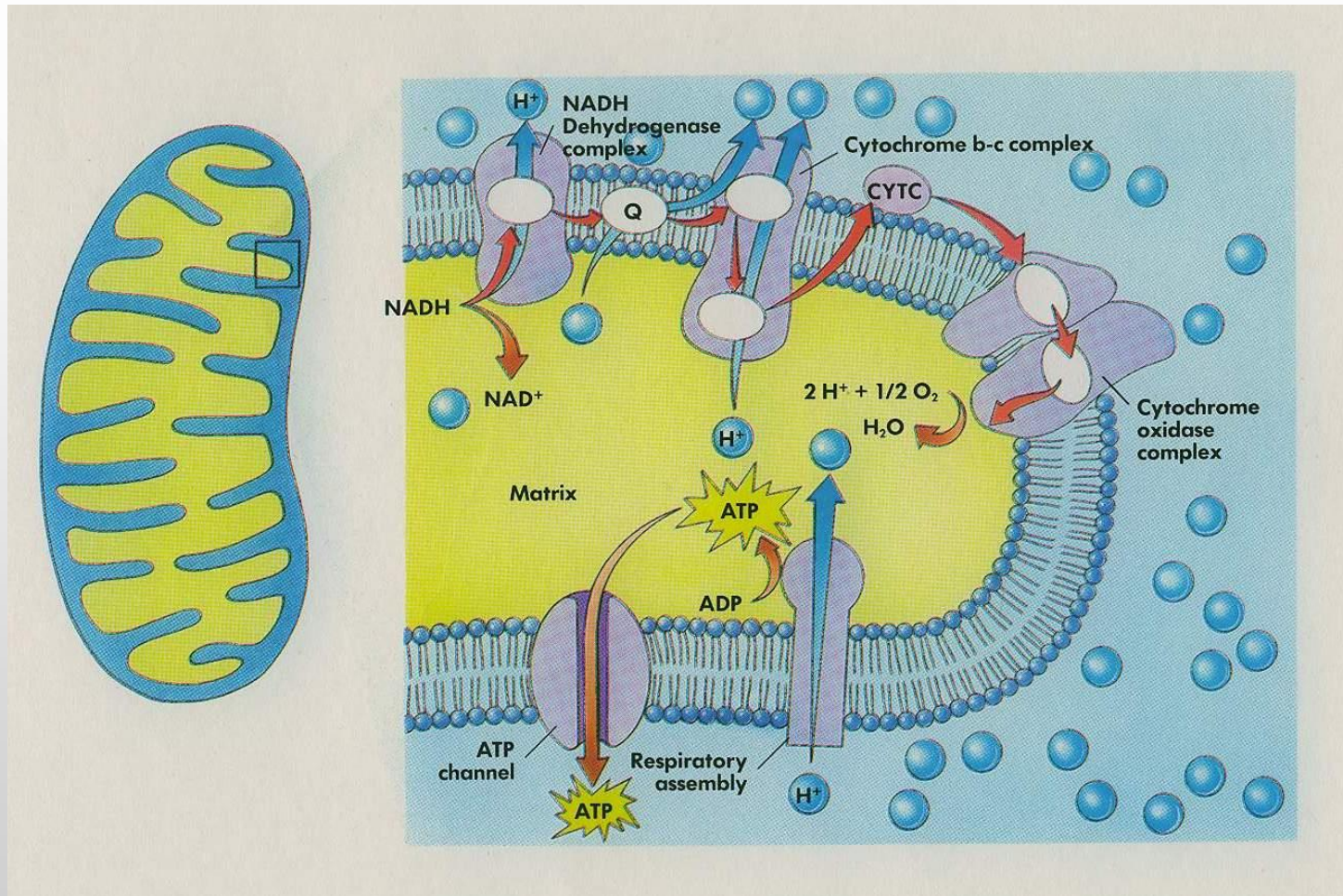
La fosforilazione ossidativa avviene **nei mitocondri nelle cellule eucariotiche sia animali sia vegetali**, ed anche (in forma semplificata) nella membrana plasmatica di alcuni procarioti



Riassunto della **produzione di energia sotto forma di ATP** in condizioni aerobiche nei mitocondri delle cellule eucariotiche, a partire dal glucosio



Riassunto degli eventi della **fosforilazione ossidativa** che avvengono nella membrana interna, nello spazio intermembrana e nella matrice mitocondriale



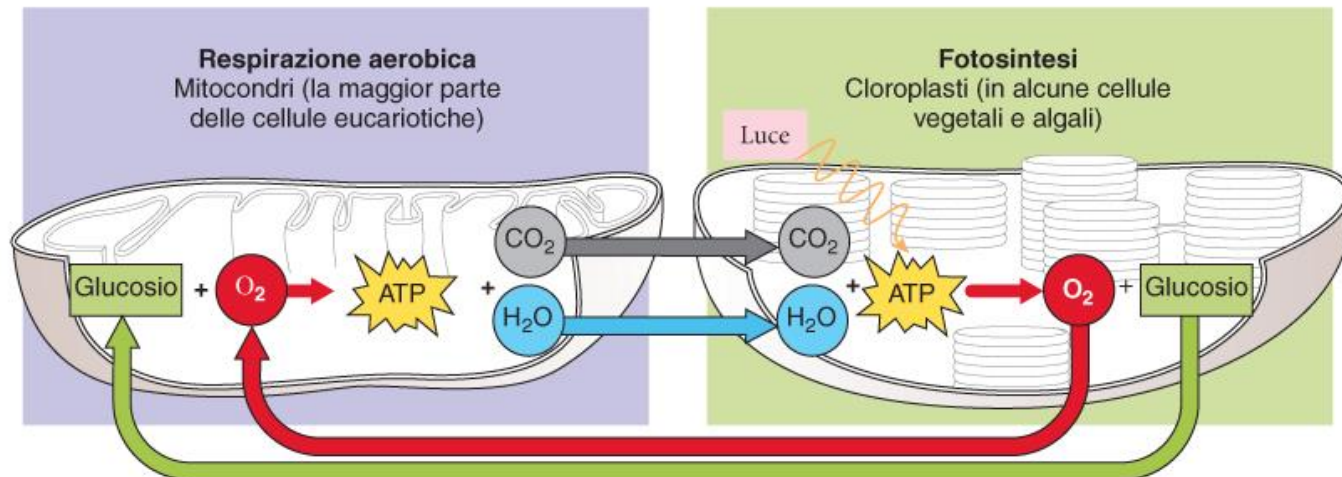
Fonte: Reece et al., 2006

Fosforilazione ossidativa e fotosintesi: le piante producono carboidrati ed energia tramite la fotosintesi, ma...

FIGURA 4-17 Respirazione cellulare e fotosintesi.

Nella respirazione cellulare, che avviene nei mitocondri di quasi tutte le cellule eucariotiche, l'energia chimica del glucosio viene trasformata in energia chimica sotto forma di ATP. La fotosintesi, che avviene nei cloroplasti delle cellule vegetali ed algali, converte l'energia luminosa in ATP ed altre forme di energia chimica. Questa energia viene utilizzata per sintetizzare glucosio a partire da anidride carbonica e acqua.

Anche le piante usano la fosforilazione ossidativa per ottenere ATP



Fermentazione: la vita “ferma” alla glicolisi

In condizioni anaerobiche, in molti procarioti e anche negli Eucarioti è possibile produrre una piccola quantità di ATP anche in assenza di ossigeno, tramite la **fermentazione**

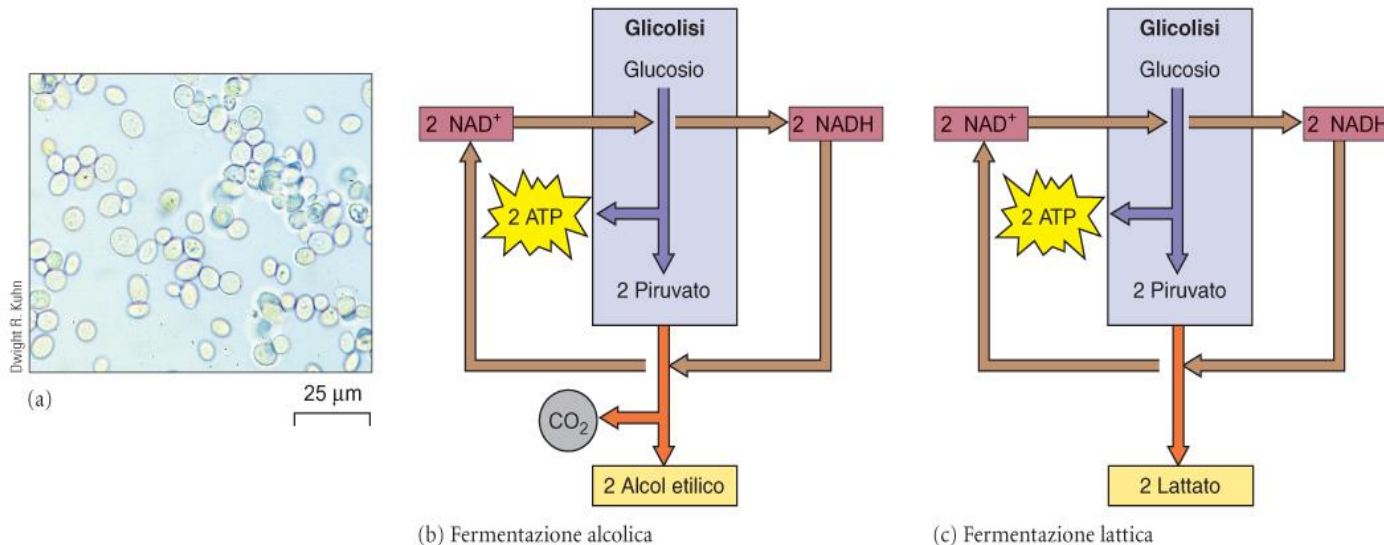
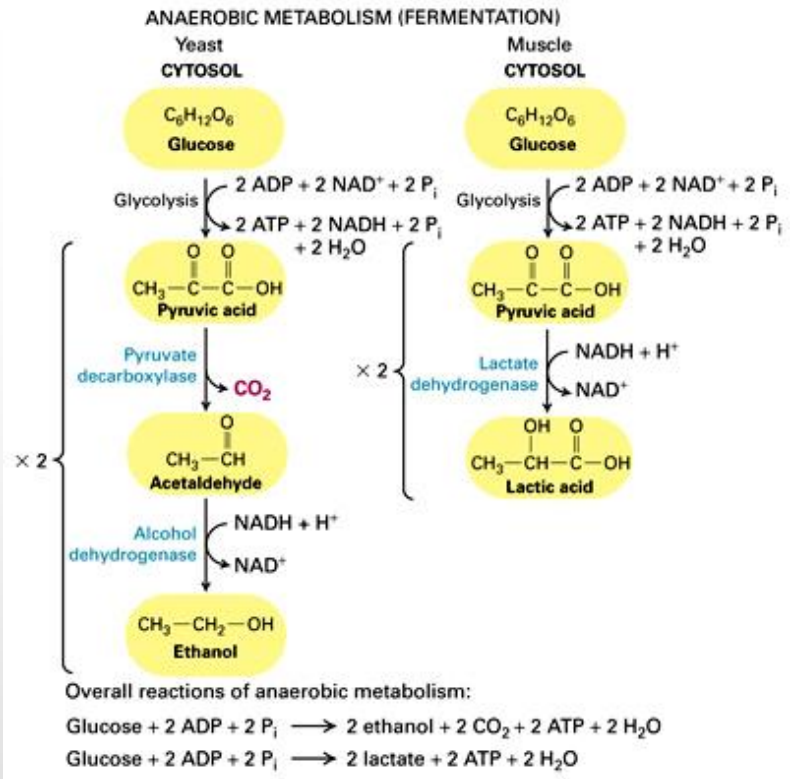


FIGURA 7-13 La fermentazione.

(a) Cellule di lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*) al microscopio ottico. I lieviti possiedono mitocondri e svolgono la respirazione aerobica quando è disponibile ossigeno molecolare. In assenza di ossigeno, invece, essi svolgono la fermentazione alcolica. (b, c) La prima parte della fermentazione è rappresentata dalla glicolisi. (b) Nella fermentazione alcolica, viene eliminata anidride carbonica ed il prodotto finale è l'alcol etilico, molecola a due atomi di carbonio. (c)

Nella fermentazione lattica, il prodotto finale è il lattato, molecola a tre atomi di carbonio. Sia nella fermentazione alcolica che in quella lattica vi è una resa energetica pari a solo due molecole di ATP per molecola di glucosio. Da notare che il NAD^+ utilizzato durante la glicolisi è rigenerato sia nella fermentazione alcolica, sia in quella lattica.

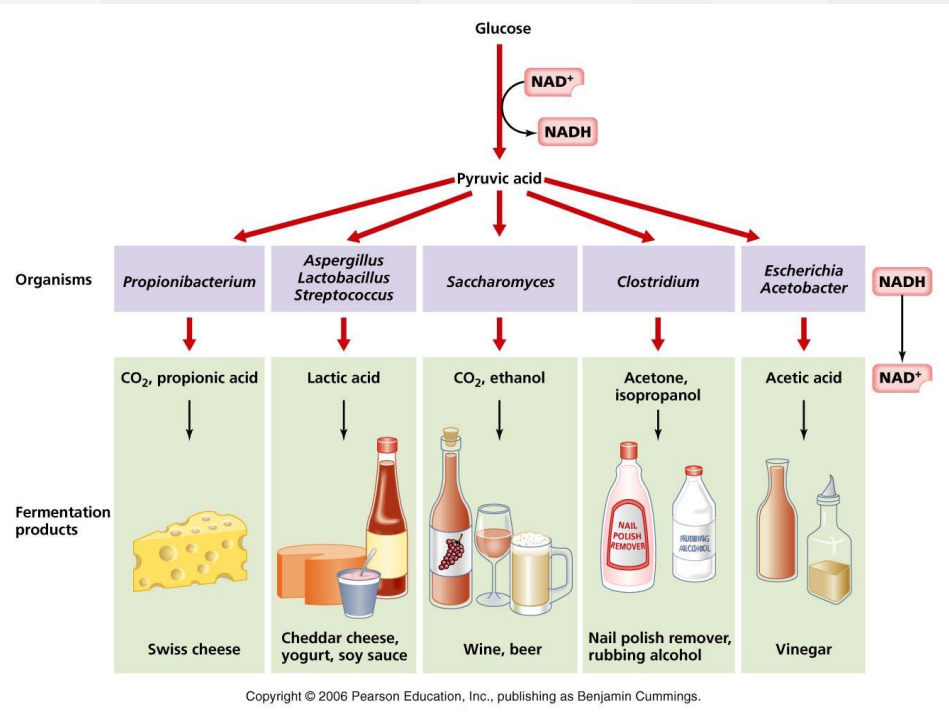


A termine della glicolisi, la **fermentazione alcolica** produce **alcool etilico** e CO_2 , **rigenerando il NAD ridotto (NADH⁺)** e permettendo alla glicolisi di continuare

Nella **fermentazione lattica**, al termine della glicolisi i protoni e gli elettroni sono scaricati sul **piruvato**, che forma quindi **acido lattico**

Gli umani **hanno imparato molto presto** a **sfruttare le fermentazioni** operate dai **microorganismi** (batteri e lieviti) per produrre **bevande inebrianti** ed **alimenti di grande appetibilità** e qualità

Si ritiene infatti che il **primo organismo** "addomesticato" dall'uomo sia stato **Saccharomyces cerevisiae** (Fungi Ascomycetes), **produttore di alcool**



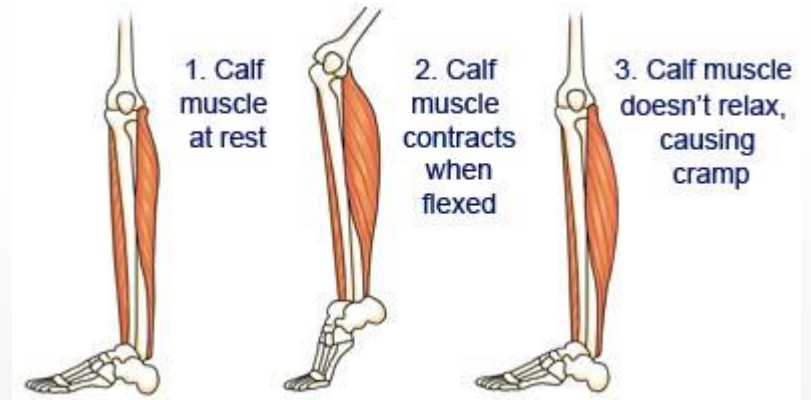
Acido lattico e dolori muscolari

Contrariamente a quanto si ritiene, l'acido lattico prodotto durante un intenso esercizio fisico non è la causa diretta dei crampi o dei dolori muscolari che si presentano il giorno (o i giorni) successivi all'allenamento

Le cause dei dolori muscolari e dei crampi sono complesse: logoramento reversibile dei tessuti, infiammazione locale, acidificazione, recettori neurali ipereccitati e "sbilanciati"

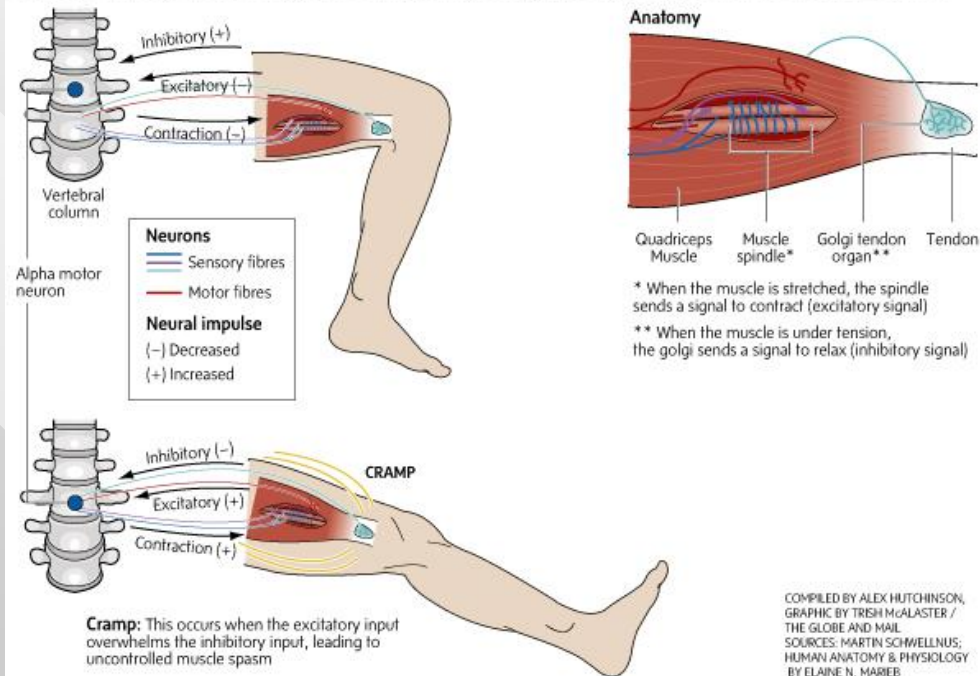
La produzione e il consumo ("turnover") di acido lattico e lattato sono fondamentali per un corretto metabolismo, particolarmente negli sport che richiedono resistenza e lunga durata del lavoro muscolare

Fonte:
Schwellnus M., British J. Sports Med 43: 401-403, 2009



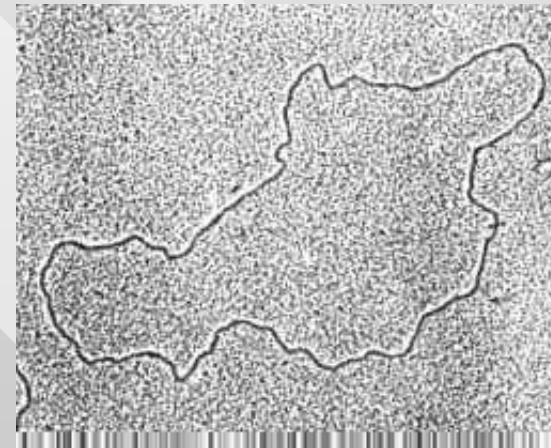
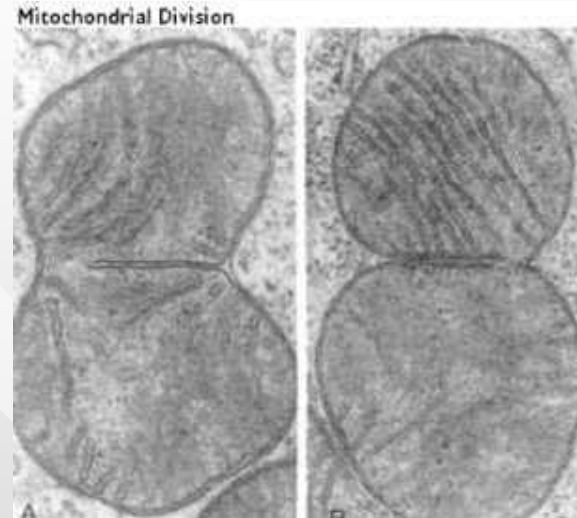
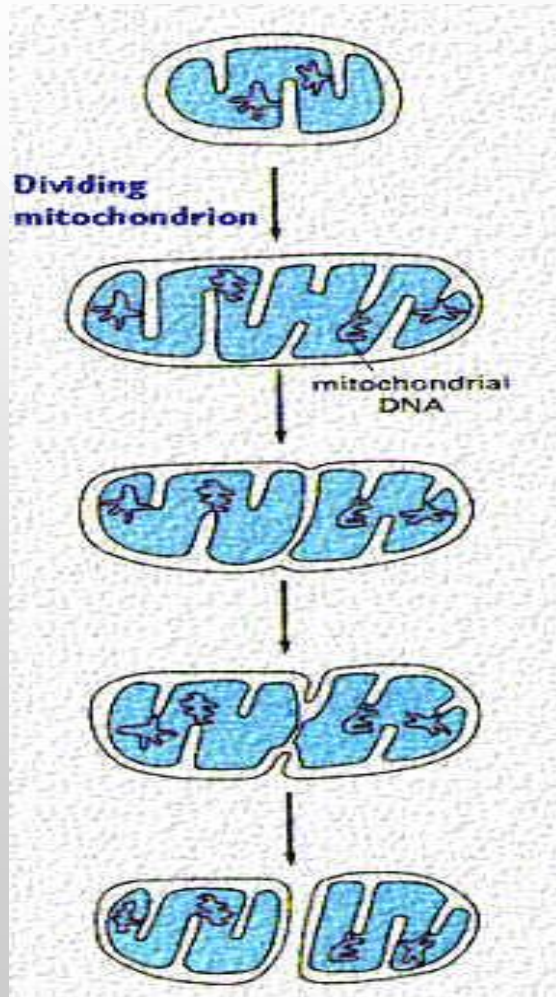
The neuromuscular theory of muscle cramps

New evidence suggests that cramps result when the balance between excitatory and inhibitory input to motor neurons in the spine is disrupted. Muscle fatigue and damage, family history and even pickle juice can affect this delicate balance.



Autonomia riproduttiva dei mitocondri, “ex-procarioti”

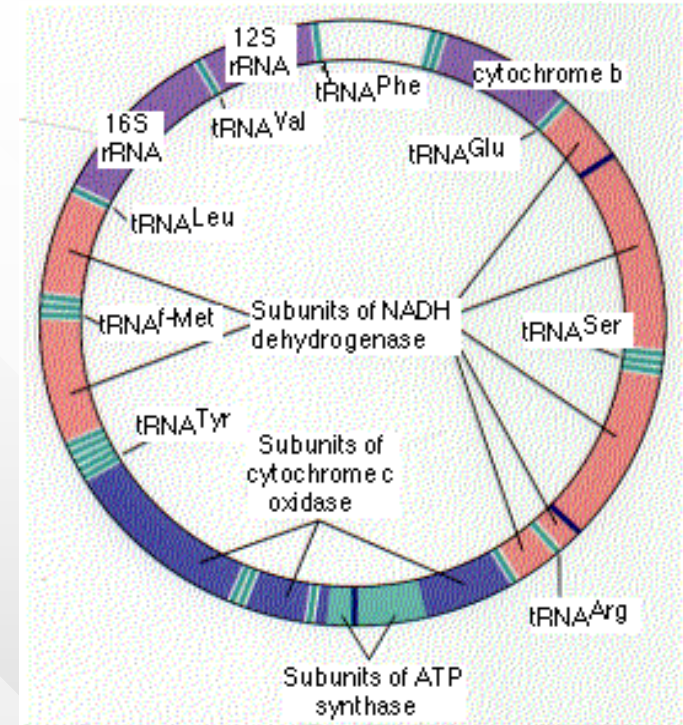
I mitocondri **replicano il proprio DNA di tipo batterico (mtDNA)**, si dividono in modo **autonomo** tramite **scissione binaria**, contengono **ribosomi di tipo procariotico** ed effettuano la loro (**molto limitata**) **sintesi proteica**



Il genoma mitocondriale umano

Genoma di tipo procariotico, di forma circolare, contenente **16569 coppie di basi di DNA** che codificano per:

- 2 molecole di RNA ribosomiale (rRNA)
- 22 molecole di RNA transfer (tRNA)
- 13 proteine che formano alcuni complessi della membrana mitocondriale interna
- 7 subunità della NADH deidrogenasi mitocondriale
- 3 subunità della citocromo c ossidasi
- **2 subunità dell'ATP sintetasi**
- **il citocromo b**



Tutti i prodotti del genoma mitocondriale **sono usati all'interno dell'organello**

...**ma il mitocondrio richiede altre proteine codificate dal genoma nucleare**
(ad esempio il citocromo c e le RNA e DNA polimerasi usate per la sintesi proteica mitocondriale sono costruite nel citoplasma e poi "importate" nel mitocondrio)

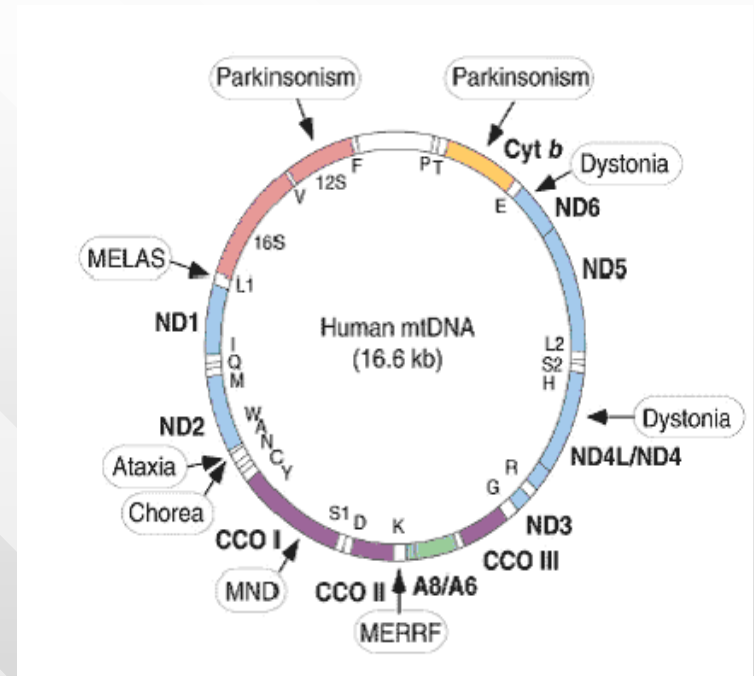
→ **L'organello non è quindi più in grado di "sopravvivere da solo"**

I mitocondri (ed il loro genoma) sono ereditati **esclusivamente per via femminile**, tramite il citoplasma della cellula uovo

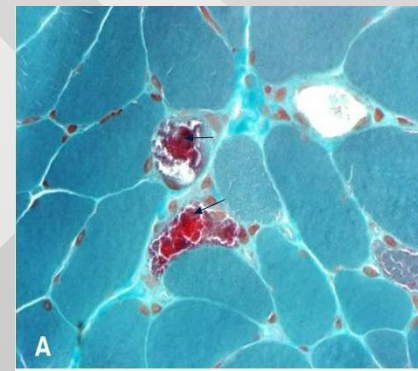
Sono note alcune **gravi malattie genetiche causate da alterazioni del genoma mitocondriale**:

- Neuropatia ottica ereditaria di Leber (**LHON**)
- **Atassia** di Friedrich
- Epilessia mioclonica a fibre muscolari “ragged” (**MERRF**)
- Encefalomiopatia mitocondriale (**MELAS**)

I **sintomi principali** di queste malattie sono **disfunzioni del metabolismo energetico**, con lesioni ai muscoli, al sistema nervoso e agli organi di senso



“Ragged Red Fibers” nella MERRF



Neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)

Mutazione puntiforme mitocondriale 11778/ND4

La mutazione trasforma **una guanina in adenina** nella posizione **11778 del genoma mitocondriale**, modificando un amminoacido (**da arginina a istidina**) nella **posizione critica 340 della subunità 4 della NADH deidrogenasi**

La mutazione è 6 volte più frequente nei maschi rispetto alle femmine, ma **non tutte le persone che hanno la mutazione sviluppano la malattia**

La LHON causa cecità irreversibile ed è una **malattia complessa**, dovuta sia a **cause genetiche** sia a **fattori ambientali** ancora non del tutto chiariti

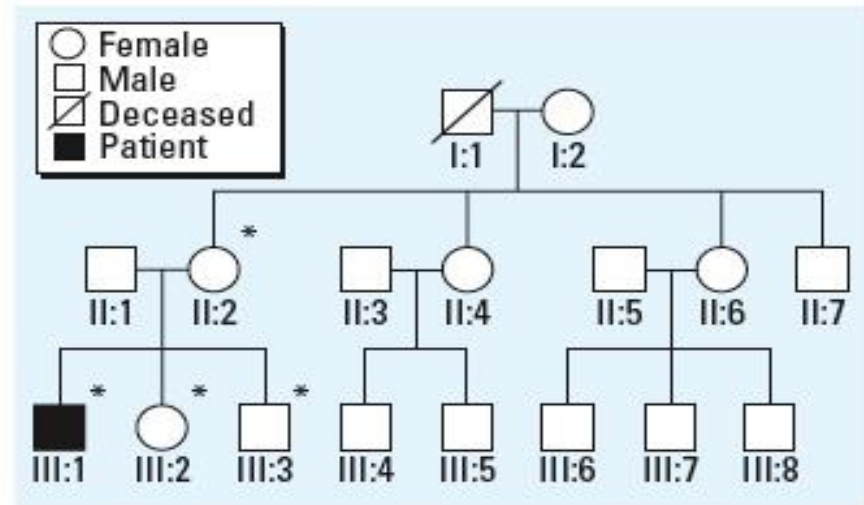
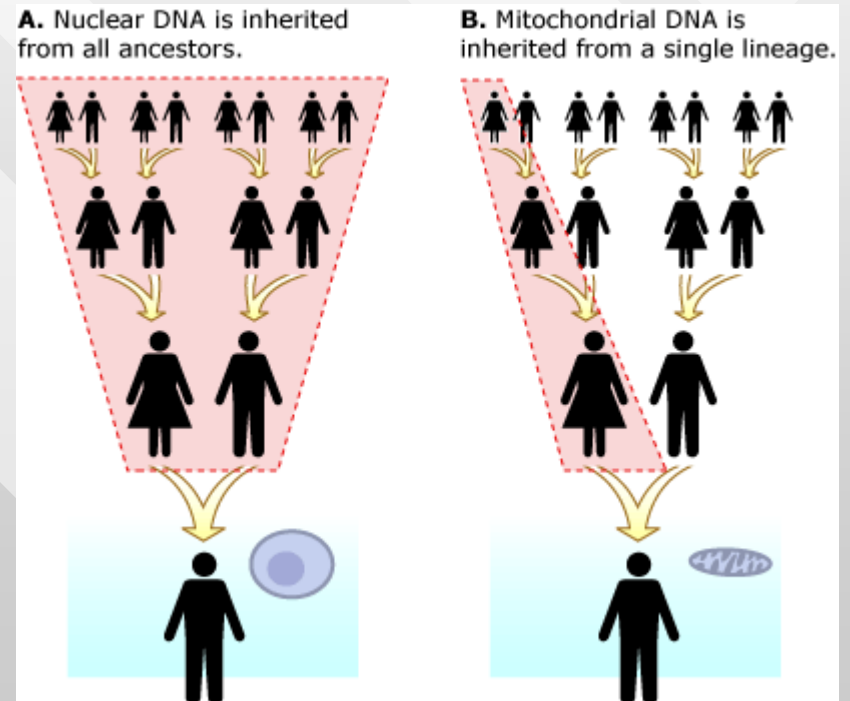
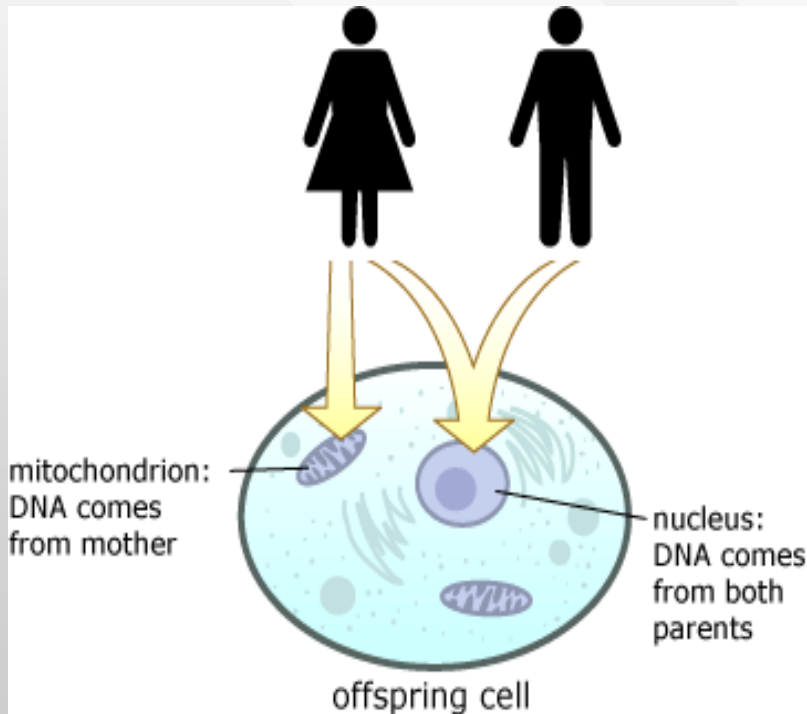
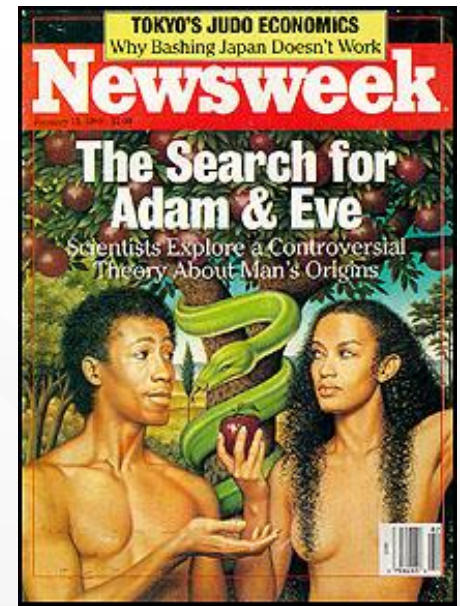


Figure 2. Three-generation reconstruction of the patient's maternal line. mtDNA analysis of the patient and his mother and siblings (asterisks) revealed the homoplasmic 11778/ND4 LHON mutation in all four of them; however, the patient was the only family member affected.

“Eva” mitocondriale

Poiché il genoma mitocondriale è ereditato esclusivamente per via femminile, **lo studio dei geni mitocondriali permette di ricostruire l’eredità matrilineare fino alle prime (una o più) antenate africane di tutta l’umanità**, vissute circa 150.000 anni fa



“Out of Africa”

La ricostruzione delle migrazioni umane tramite l'analisi dei geni mitocondriali (ereditati per via femminile) dimostra **chiaramente ed inequivocabilmente** l'origine africana dell'umanità

