

BIODINAMICA

ORDINE BIOLOGICO ed ENERGIA



Biodinamica

Premessa.

Le cellule non possono sottrarsi alle leggi della fisica e della chimica; le regole della meccanica, così come quelle che governano la conversione di un'energia in un'altra, valgono per esse non meno che per la macchina a vapore.

È esperienza comune che qualunque cosa, lasciata a sé, finisce con il disordinarsi: gli edifici crollano, gli organismi morti vanno in putrefazione, e così via; questa tendenza universale si esprime nel secondo principio della termodinamica, il quale afferma che nell'ambito di un sistema isolato il grado di disordine può solamente aumentare.

L'enigma sta nell'ordine elevatissimo che presentano gli organismi viventi a tutti i livelli; un ordine che si impone all'evidenza nelle grandi strutture, come l'ala di una farfalla o l'occhio di un polipo, nelle strutture subcellulari come i mitocondri e le ciglia, nella forma e nella disposizione delle molecole donde tali strutture traggono corpo.

Ai fini termodinamici possiamo considerare la cellula e l'ambiente immediatamente circostante come un contenitore ermeticamente chiuso immerso in un mare uniforme di materia che rappresenta il resto dell'universo; per crescere e sostentarsi la cellula deve costantemente creare ordine dentro questo contenitore.

Anche se fra il contenitore e il mare che lo avvolge non è possibile scambiare molecole è però possibile scambiare calore e fra calore e ordine sussiste una relazione quantitativa; il calore è energia sotto forma di moto caotico delle molecole, e perciò rappresenta l'espressione più disordinata dell'energia medesima.

Nel corso delle reazioni chimiche l'energia non si può creare né distruggere, e ciò vuol dire che alla perdita continua di calore che, nella cellula, pilota la produzione dell'ordine biologico, deve corrispondere l'assunzione, altrettanto continua, di energia dall'esterno.

Tale energia deve avere forma diversa da quella termica; per le piante l'energia deriva originariamente dalla radiazione elettromagnetica del sole, per gli animali da quella chimica accumulata nei legami covalenti delle molecole organiche che costituiscono il loro nutrimento; siccome queste stesse sostanze nutritive sono state prodotte da organismi fotosintetici, è il sole la sorgente primaria di energia per entrambi i sistemi.

Si può ammettere che le cellule animali ricavano l'energia dagli elementi in tre tempi:

1°) proteine, polisaccaridi e grassi vengono demoliti da radiazioni extracellulari in molecole di piccola dimensione.

2°) queste ultime subiscono all'interno delle cellule la degradazione ad Acetil-CoA e una limitata quantità di ATP e di NADH.

In assenza di ossigeno sono queste le sole reazioni capaci di liberare energia;

3°) le molecole di Acetil-CoA subiscono all'interno dei mitocondri la degradazione a CO₂ e ad atomi di idrogeno, i quali ultimi si legano a molecole vetrici come il NADH.

Gli elettroni provenienti dagli atomi di idrogeno passano attraverso una complessa catena di vettori che si conclude con la riduzione dell'ossigeno molecolare e la formazione di acqua; sotto l'impulso di energia liberata in queste fasi successive di trasferimento degli elettroni, gli ioni idrogeno (H⁺) fuoriescono per trasporto dai mitocondri.

Il gradiente elettrochimico protonico che ne risulta entro la membrana mitocondriale interna viene imbrigliato a sua volta per pilotare la sintesi della maggior parte dell'ATP cellulare.

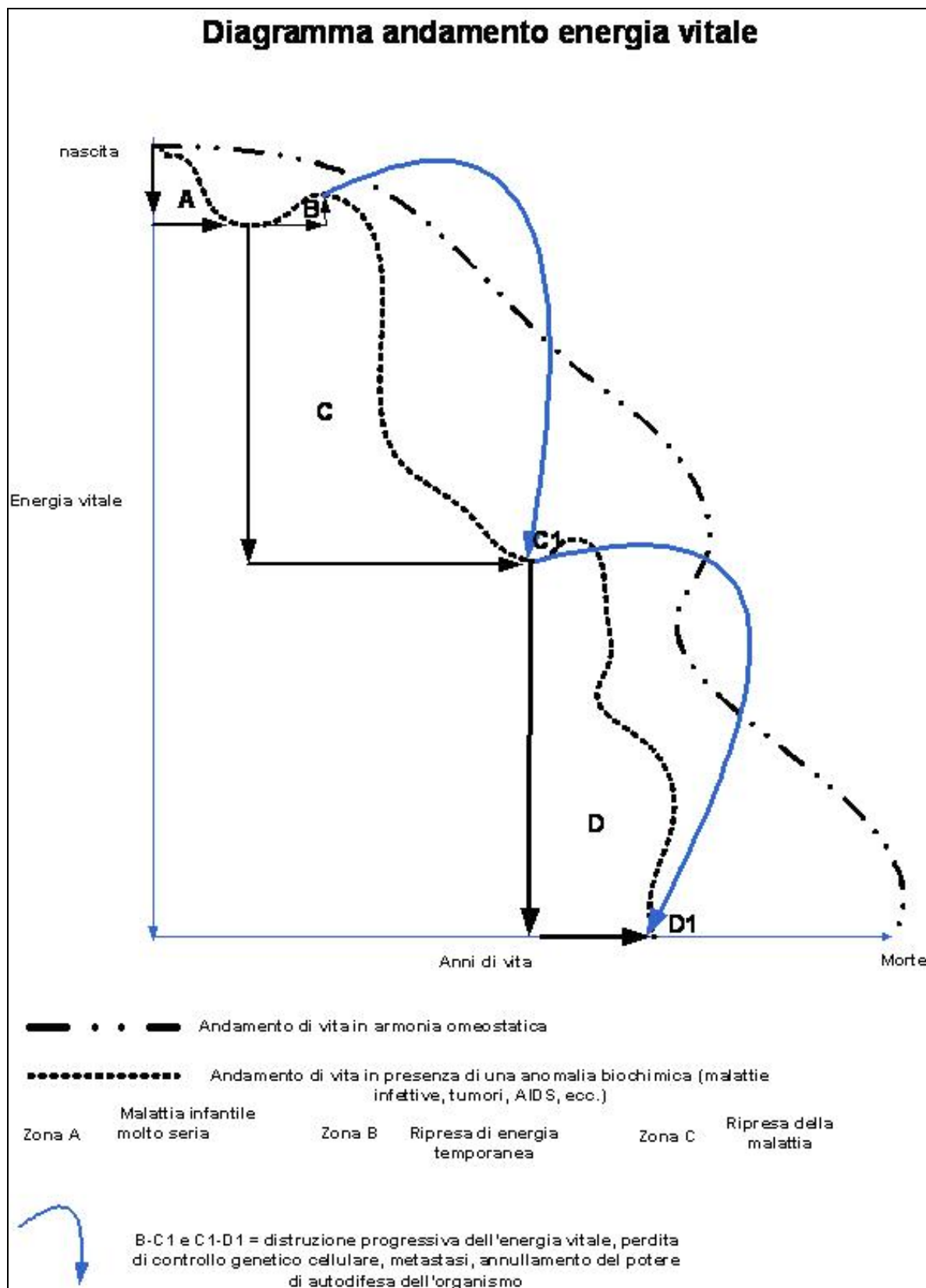
L'idrolisi di ATP si accoppia alle reazioni energeticamente sfavorite, quali la biosintesi delle macromolecole, generalmente tramite la formazione di intermedi fosforati; altre molecole reattive, che fungono da vetrici e si dicono coenzimi, trasferiscono nel corso della biosintesi alcuni gruppi chimici: ad es. il NADPH trasferisce idrogeno sotto forma di protone più due elettroni (ione idruro), mentre l'Acetil-CoA trasferisce gruppi acetile.

Molecole polimere come le proteine e gli acidi nucleici vengono edificate, a partire da piccoli precursori attivati, mediante reiterate disidratazioni.



Diagramma dell'energia vitale.

In questo diagramma si vede molto chiaramente come danni ai metabolismi omeostatici determinano un calo dell'energia vitale al di sotto delle necessità minime per la regolazione stessa. Se il livello di energia del sistema non viene ripristinato e stimolato rapidamente, si tende a una situazione cronica che riduce sempre più l'energia del sistema stesso fino a ridurre in modo significativo le aspettative di vita.





Organizzazione molecolare della cellula.

Le tipiche cellule eucariotiche sono molto più grandi delle cellule procariotiche; la caratteristica distintiva degli eucarioti è il nucleo circondato da una doppia membrana, con la sua tipica complessità interna, un'altra differenza sostanziale fra procarioti e eucarioti è dovuta alla presenza di organelli circondati da membrane negli eucarioti.

Membrane plasmatiche.

La membrana plasmatica di tutte le cellule contiene una grande varietà di trasportatori, proteine che attraversano la membrana trasportando sostanze nutrienti all'interno e prodotti di scarto all'esterno della cellula, come più sopra specificato.

Il traffico attraverso la membrana plasmatica è regolato da: endocitosi, un meccanismo che serve a trasportare nel citoplasma i componenti presenti nell'ambiente che circonda la cellula; durante questo processo, una regione della membrana plasmatica si invagina, racchiudendo nel suo interno un piccolo volume di fluido esterno.

L'invaginazione si richiude poi su se stessa, formando una vescicola rivolta verso l'interno della cellula; questa vescicola (l'endosoma) può muoversi dentro la cellula trasportando il suo contenuto ad un altro organello circondato da membrana, mediante fusione delle due membrane.

La fagocitosi, è un caso speciale di endocitosi, in cui il materiale trasportato nella cellula (all'interno di un fagosoma) è particolato, come un frammento della cellula o addirittura un'altra cellula più piccola; l'inverso dell'endocitosi è l'esocitosi.

Reticolo endoplasmatico.

È un intreccio involuto e tridimensionale di spazi delimitati da una membrana che si estende attraverso il citoplasma e genera un compartimento subcellulare ben definito e separato dal citoplasma (il lume del reticolo endoplasmatico); questo compartimento ha molte ramificazioni appiattite (le cisterne) continue tra loro ed in contatto con la sacca nucleare.

Il legame di migliaia di ribosomi (di solito nella regione delle grandi cisterne) conferisce alla superficie del reticolo un aspetto granuloso da cui deriva il nome di reticolo endoplasmatico ruvido; in altre regioni della cellula il reticolo è privo di ribosomi, questa forma che prende il nome di reticolo endoplasmatico liscio, è continua con il reticolo ruvido, ma è la sede della biosintesi dei lipidi e di una varietà di altri processi importanti, compreso il metabolismo di alcuni farmaci e di composti tossici.

Complesso del Golgi.

Tutte le cellule eucariotiche possiedono caratteristici gruppi di vescicole membranose chiamate **dittiosomi**; diversi dittiosomi collegati fra loro costituiscono il complesso (o apparato) del Golgi.

Il complesso del Golgi è strutturalmente e funzionalmente asimmetrico; il lato cis guarda verso il reticolo endoplasmatico ed il lato trans verso la membrana plasmatica: tra questi vi sono gli elementi mediali.

Le proteine vengono inserite all'interno del lume delle cisterne del reticolo endoplasmatico ruvido, mentre vengono sintetizzate dai ribosomi legati alla superficie esterna; si formano quindi piccole vescicole contenenti le proteine di nuova sintesi che si staccano dal reticolo endoplasmatico e fondono con il lato cis dell'apparato del Golgi.

Mentre le proteine attraversano il complesso, enzimi localizzati in questo organello modificano le strutture proteiche aggiungendo ad essi gruppi solforici, carboidrati e unità lipidiche, alla catena laterale di alcuni amminoacidi; queste modificazioni hanno anche la funzione di indirizzare le proteine di nuova sintesi verso la loro corretta destinazione.

Lisosomi.

Sono presenti nel citoplasma delle cellule animali e sono vescicole di forma quasi sferica circondate da una singola membrana; hanno un diametro di circa 1µm, pressoché le stesse dimensioni di un batterio.

I lisosomi contengono enzimi in grado di digerire le proteine, i polisaccaridi, gli acidi nucleici ed i lipidi, operano come centro di riciclaggio cellulare delle molecole complesse portate all'interno della cellula mediante endocitosi, di frammenti di altre cellule entrati per fagocitosi, di organelli ormai esauriti del citoplasma della cellula stessa.

Questi materiali entrano selettivamente nei lisosomi per fusione della membrana del lisosoma con quella dell'endosoma, del fagosoma o dell'organello difettoso e vengono degradati nei loro componenti semplici (amminoacidi, monosaccaridi, acidi grassi, ecc.) che sono poi rilasciati nel citosol e riciclati in nuovi componenti cellulari oppure catabolizzate ulteriormente.

Gli enzimi digestivi all'interno dei lisosomi sarebbero dannosi se non fossero racchiusi all'interno della membrana lisosomiale; essi sarebbero liberi di agire su tutti i componenti cellulari senza distinzione.

Il compartimento lisosomiale è più acido (pH ≤ 5) del citoplasma (pH circa 7); la maggiore acidità è dovuta all'azione di una pompa protonica alimentata dall'ATP presente nella membrana lisosomiale; gli enzimi li-



sosomiali sono molto meno attivi a pH 7 che a pH ≤ 5 , questo fatto rappresenta una seconda linea di difesa contro la distruzione di macromolecole citosoliche nel caso che questi enzimi sfuggano nel citosol.

Vedi figura sotto riportata.

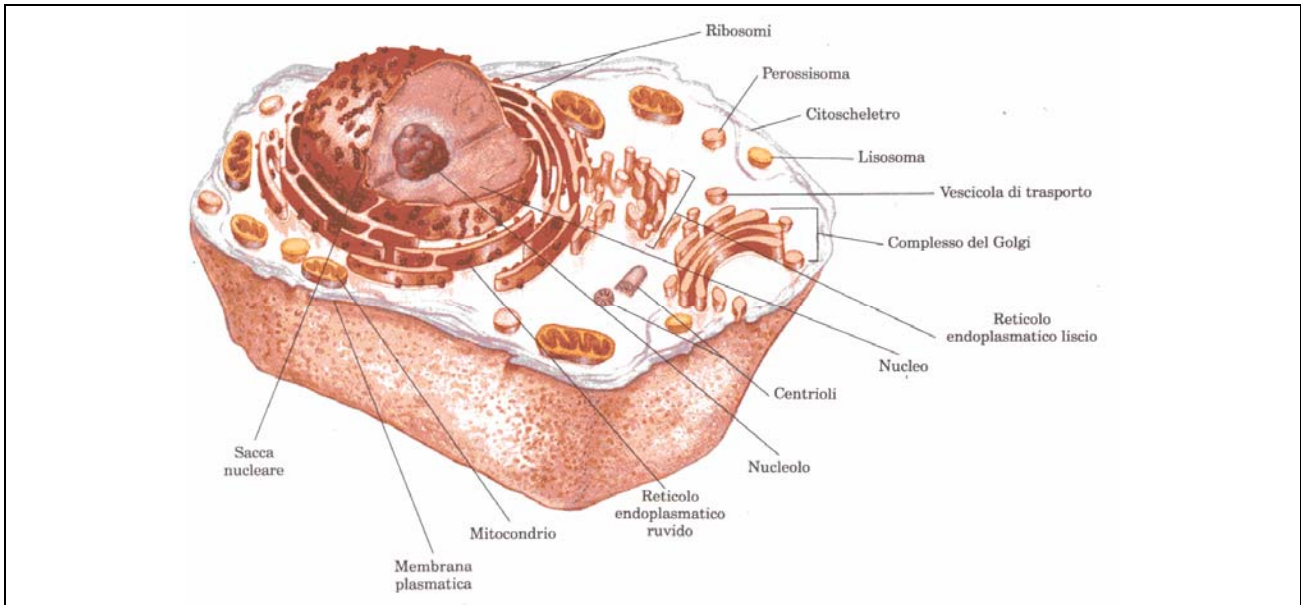
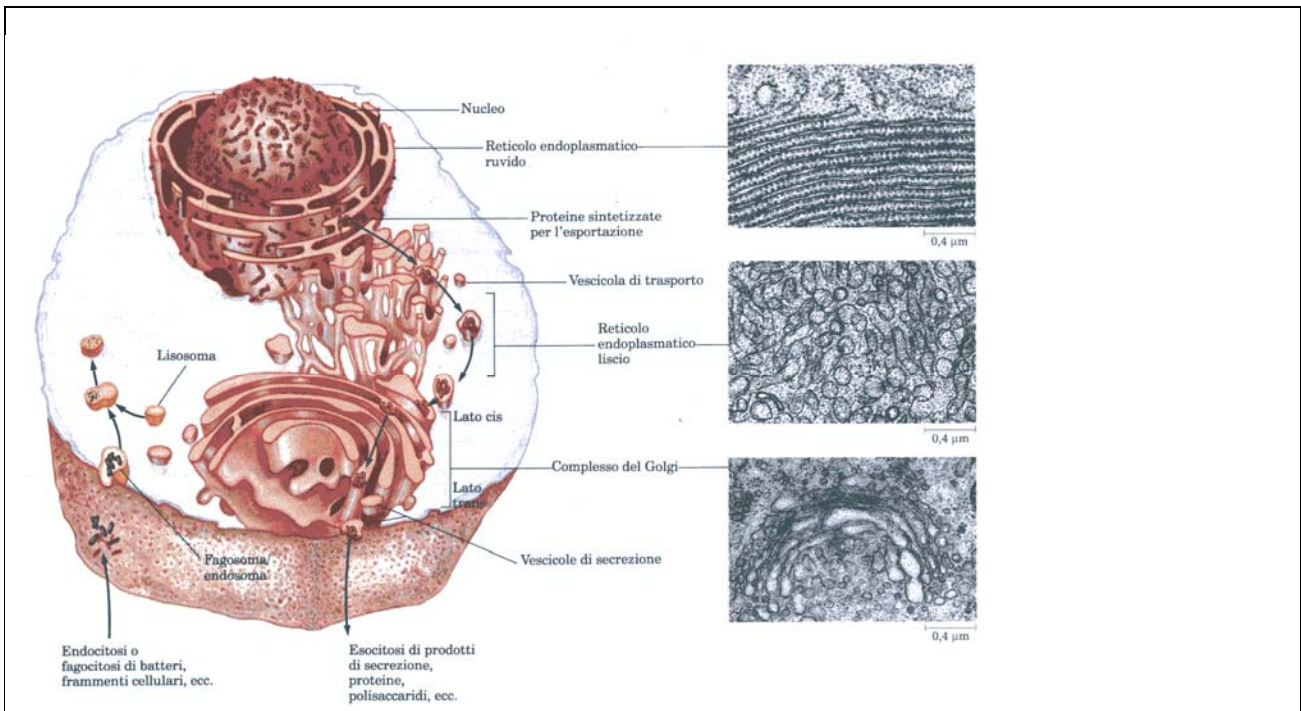


Illustrazione schematica di una cellula animale.



Il sistema endomembranoso comprende la sacca nucleare, il reticolo endoplasmatico, il complesso del Golgi ed altri tipi di piccole vescicole; questo sistema delimita un compartimento (il lume) distinto fisicamente dal citosol.

Il contenuto del lume si muove da una regione all'altra del sistema membranoso sotto forma di piccole vescicole che si generano su un componente e fondono con un altro.

Le fotografie al microscopio elettronico di sezioni di una cellula mostrano il reticolo endoplasmatico ruvido ricoperto di ribosomi, il reticolo endoplasmatico liscio e il complesso del Golgi; il sistema endomembranoso è dinamico, le proteine di nuova sintesi si spostano dal lume del reticolo endoplasmatico ruvido a quello del reticolo endoplasmatico liscio e poi al complesso del Golgi mediante vescicole di trasporto.

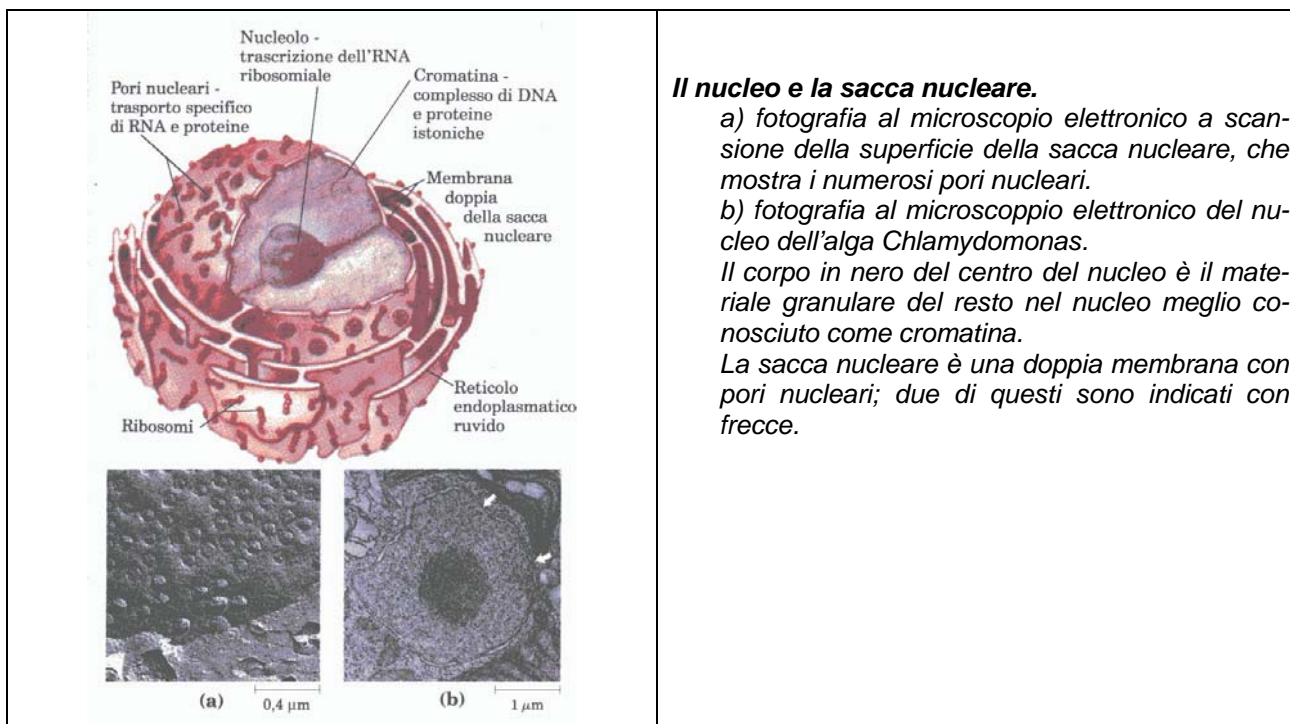
Nel complesso del Golgi viene scritto sulla molecola delle proteine l'indirizzo della loro destinazione finale, in modo da inviare senza errori alla superficie della cellula, ai lisosomi oppure alle vescicole di secrezione; il contenuto delle vescicole di secrezione viene rilasciato all'esterno della cellula per esocitosi, l'endocitosi e la fagocitosi portano materiale all'interno della cellula.

Con la fusione degli endosomi con i lisosomi, organelli pieni di enzimi digestivi, inizia la degradazione del materiale cellulare.

Il nucleo degli eucarioti.

Contiene quasi tutto il DNA della cellula; una piccola quantità di DNA si trova nei mitocondri (*DNA mitocondriale*), il nucleo è circondato da una sacca nucleare composta da due membrane separate da uno spazio sottile e in diretta comunicazione con il reticolo endoplasmatico; ad intervalli le due membrane si uniscono generando aperture note con il nome di pori nucleari, con un diametro di circa 90 nm.

All'interno del nucleo vi è il nucleolo che appare nelle fotografie al microscopio elettronico come un corpo denso per il suo elevato contenuto in RNA; il nucleolo è una regione specifica del nucleo, in cui il DNA contiene molte copie dei geni che codificano per l'RNA ribosomiale. *Vedi figura.*



Il nucleo e la sacca nucleare.

a) fotografia al microscopio elettronico a scansione della superficie della sacca nucleare, che mostra i numerosi pori nucleari.

b) fotografia al microscopio elettronico del nucleo dell'alga *Chlamydomonas*.

Il corpo in nero del centro del nucleo è il materiale granulare del resto nel nucleo meglio conosciuto come cromatina.

La sacca nucleare è una doppia membrana con pori nucleari; due di questi sono indicati con frecce.

Enzimi.

Gli enzimi sono una delle chiavi per comprendere come le cellule sopravvivono e proliferano; agendo in sequenze coordinate, essi catalizzano le centinaia di reazioni consecutive delle vie metaboliche attraverso cui le molecole delle sostanze nutritive vengono degradate, l'energia chimica viene conservata e trasformata e le macromolecole vengono sintetizzate da precursori semplici. Gli enzimi hanno anche un'immensa importanza pratica, specialmente nelle malattie genetiche ereditarie come descritto nella tabella sotto riportata.

Tabella 1. Esempi di malattie genetiche dovute alla mancanza di un singolo enzima o proteina

Malattia	Effetti fisiologici	Enzima o proteina colpita
Fibrosi cistica	Anormale secrezione nei polmoni, pancreas, ghiandole sudoripare; malattie polmonari croniche che in genere portano alla morte bambini e adulti giovani	Canali per il cloro
Malattia di Lesch-Nyhan	Deficienze neurologiche, automutilazioni, ritardo mentale	Ipxantina-guanina fosforibosil transferasi
Malattia da immunodeficienza	Mancanza di risposta immunitaria. Mancanza di risposta immunitaria (i bambini devono vivere in ambienti sterili)	Purina nucleoside fosforilasi Adenosina deaminasi
Malattia di Gaucher	Erosione delle ossa e delle anche; in qualche caso danni cerebrali	Glucocerebrosidasi
Gotta, primaria	Sovraproduzione di acido urico che porta ad attacchi ricorrenti di artrite acuta	Fosforibosil pirofosfato sintetasi
Rachitismo, Vitamina D-dipendente	Statura limitata, convulsioni	25-Idrossicolecalciferolo-1-idrossilasi
Ipercolesterolemia familiare	Aterosclerosi da elevati livelli di colesterolo nel sangue; in qualche caso morte prematura per attacco cardiaco	Recettore delle lipoproteine a bassa densità
Malattia di Tay-Sachs	Debolezza motoria, deterioramento mentale, morte a circa 3 anni	Esosaminidasi A
Anemia a cellule falciformi	Dolore, edemi alle mani e ai piedi, può portare improvvisi dolori alle ossa e alle giunture e alla morte	Emoglobina



Gli enzimi, come tutte le proteine, hanno masse molecolari che variano da 12.000 u a oltre un milione (con u si indica l'unità di massa atomica: UMA o Dalton); alcuni enzimi non hanno bisogno per la loro attività di altri gruppi chimici se non quelli dei loro residui aminoacidici, altri invece hanno bisogno di componenti chimiche addizionali chiamati cofattori.

Il cofattore può essere sia uno che più ioni inorganici, oppure complesse molecole organiche o metallorganiche chiamate coenzimi. Vedi tabelle sotto riportate.

Enzimi che contengono come cofattori elementi inorganici	
Fe ²⁺ o Fe ³⁺	Citocromo ossidasi, catalasi, perossidasi
Cu ²⁺	Citocromo ossidasi
Zn ²⁺	Anidrasi carbonica, alcool deidrogenasi
Mg ²⁺	Esochinasi, glucosio-6-fosfatasi, piruvato chinasi
Mn ²⁺	Arginasi, ribonucleotide riduttasi
K ⁺	Piruvato chinasi
Ni ²⁺	Ureasi
Mo	Dinitrogenasi
Se	Glutadione perossidasi

Enzimi che contengono molecole organiche o metallorganiche		
Coenzima	Esempi di gruppi chimici trasferiti	Precursore della dieta dei mammiferi
Tiamina pirofosfato	aldeidi	Tiamina (vitamina B ₁)
Flavin adenin dinucleotide	elettroni	Riboflavina (vitamina B ₂)
Nicotinamide adenina dinucleotide	ione idruro (:H ⁻)	Acido nicotinico (niacina)
Coenzima A	Gruppi acilici	Acido pantotenico
Piridossal fosfato	Gruppi aminici	Piridossina (vitamina B ₆)
5'-deossadenosil cobalamina	Atomi di H e gruppi alchilici	Vitamina B ₁₂
biocitina	CO ₂	Biotina
tetraidrofolato	Gruppi a un atomo di carbonio	Folato
Acido lipoico	Elettroni e gruppi acilici	Non necessario nella dieta

Apporto di biomolecole conformazionate da catalizzatori enzimatici.

In questa relazione si vogliono evidenziare le caratteristiche più importanti dei prodotti Citozeatec, sottolineando che l'alterazione di una molecola genetica all'interno del nucleo cellulare porta modificazione del codice di memorie alle proteine di trasporto e di conseguenza a tutto il sistema dell'organismo.

Quello che deve essere evidenziato è che tutti i cicli (Krebs, Acidi grassi e Urea) sono guidati da una serie di memorie biochimiche ripetitive e se solo una di queste memorie perde la sua capacità, si possono verificare danni anche molto gravi; la risoluzione di questi danni non può passare attraverso il concetto di cura delle conseguenze, come normalmente accade con la farmacologia e l'oncologia, per migliorare il sistema dell'organismo vanno affrontate migliaia e migliaia di reazioni biochimiche a cui il farmaco deve far fronte (*farmaco ancora da scoprire*).

Lo spirito della Citozeatec è di produrre molecole biodinamiche mediante biotecnologia a conversione enzimatica o molecole Citogenetiche (per biodinamica intendiamo la lavorazione continua del substrato con enzimi specifici, in una catena di reattori posti in un impianto industriale imprimendo le memorie degli enzimi nel prodotto finale, così da dotare le molecole con un proprio codice di riconoscimento verso il proprio sistema). Molecole quindi in grado di disattivare enzimi anomali e fornire potenza agli enzimi della propria specie, lisozimi compresi.

Ruolo generale a livello biochimico

I prodotti Citozeatec, oggetto della presente relazione, sono preparati con prodotti agricoli assolutamente non transgenici, coltivati su terreni a perfetta sanità biochimica.

La rigidità, con cui si preparano le materie prime agricole, nasce dal fatto che non sono minimamente ammissibili i prodotti transgenici in quanto gli stessi contengono enzimi non accettabili dal metabolismo animale e umano.

Riveste notevole importanza, nella coltivazione, l'assenza di diserbanti, pesticidi, fitofarmaci e altri prodotti di sintesi in quanto questi prodotti rilasciano veleni di difficile eliminazione e in netto contrasto con le proteine che si devono produrre.

I prodotti Citozeatec, sono derivati da una coordinata attività di processi biochimici su materie prime vegetali rigorosamente biologiche, ottenendo una serie di substrati perfettamente coniugati secondo i principi della biochimica umana.

Sono pertanto una felice combinazione di pacchetti energetici in grado di interagire in forma diretta nei processi duplicativi delle cellule, possiedono una elevata memoria biochimica in grado di mo-



dulare la sintesi delle proteine promosse sia nella replicazione del DNA che nelle eventuali fasi di correzione degli errori di trascrizione.

Essendo la produzione di questi prodotti effettuata secondo i canoni della biochimica relativa ai vari cicli vitali, si arriva alla costruzione dei codoni di amminoacidi e di tutti i componenti energetici necessari ad implementare tali cicli.

Accanto alle proteine di base e amminoacidi, questi preparati vengono facilmente utilizzati da enzimi, coenzimi, tRNA, assemblando la sequenza proteica nelle strutture ribosomiali, favorendo e potenziando le attività di controllo genomico del DNA cellulare.

Fosforilazione ossidativa.

La fosforilazione ossidativa rappresenta il culmine del metabolismo energetico negli organismi aerobici; tutte le tappe enzimatiche della degradazione ossidativa dei carboidrati, acidi grassi e amminoacidi nelle cellule aerobiche convergono sulla tappa finale della respirazione cellulare, in cui gli elettroni passano dagli intermedi catabolici all'ossigeno, generando l'energia necessaria alla sintesi di ATP da ADP e P_i .

Le nostre conoscenze sulla sintesi di ATP nei mitocondri e nei cloroplasti sono essenzialmente basate sull'ipotesi, proposta da Peter Mitchell nel 1961, in cui la trasduzione energetica avviene mediante la creazione di gradienti protonici transmembrana, conosciuta come teoria chemiosmotica e universalmente accettata.

Il processo della fosforilazione ossidativa ha origine nella catena di trasporto degli elettroni situata nei mitocondri; questi sono organelli delle cellule eucariotiche, la membrana mitocondriale esterna è facilmente permeabile a piccole molecole e a ioni; molti canali costituiti dalla proteina porina consentono di attraversare la membrana alla maggior parte delle molecole con una massa molecolare fino a 5.000 u.

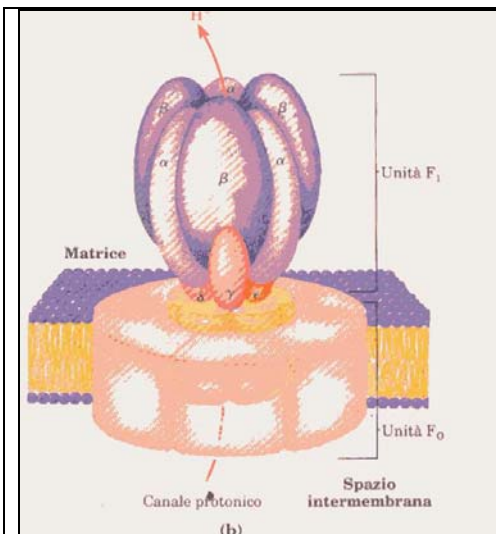
La membrana mitocondriale interna è impermeabile a quasi tutti gli ioni e piccole molecole, compreso i protoni H^+ ; le sole specie chimiche che possono attraversare la membrana sono quelle che possiedono uno specifico trasportatore inserito nella membrana stessa; in questa struttura sono localizzati anche i componenti della catena respiratoria e il complesso enzimatico che sintetizza ATP.

La maggior parte degli elettroni che entrano nella catena respiratoria mitocondriale sono il frutto dell'azione di deidrogenasi che partecipano a reazioni come l'ossidazione del piruvato, il ciclo dell'acido citrico, la β -ossidazione degli acidi grassi e le tappe ossidative del catabolismo degli amminoacidi.

La catena respiratoria mitocondriale è costituita da una serie di trasportatori di elettroni, la maggior parte dei quali sono proteine integrali di membrana, contenenti gruppi prostetici in grado di accettare e di donare uno o due elettroni.

Alcune delle reazioni della sequenza della catena respiratoria comportano il trasferimento di un solo elettrone, mentre in altre vie vi è il trasferimento contemporaneo di due elettroni; oltre al NAD e alle flavoproteine, nella catena respiratoria operano altri tre gruppi di trasportatori di elettroni: un benzochinone idrofobico (ubichinone) e due tipi diversi di proteine contenenti ferro (i citocromi e le proteine ferro-zolfo).

ATP sintasi.



Il complesso enzimatico che sintetizza l'ATP nella membrana interna dei mitocondri, è formato da due componenti principali chiamati F_0 e F_1 .

F_1 , che in tutti gli organismi aerobici è costituito da sei subunità proteiche, contiene diversi siti di legame per l'ATP e ADP, compreso il sito catalitico in cui avviene la sintesi di ATP.

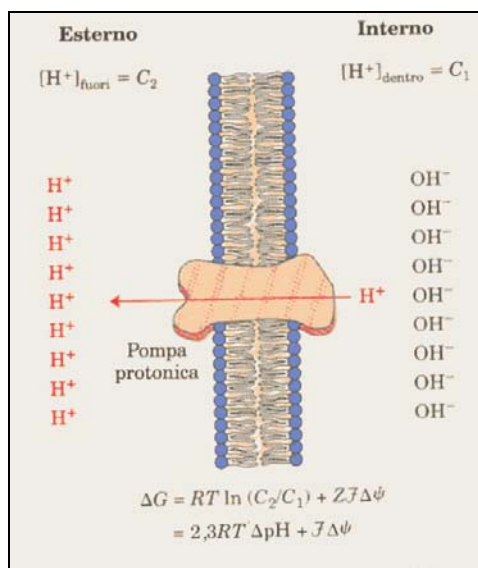
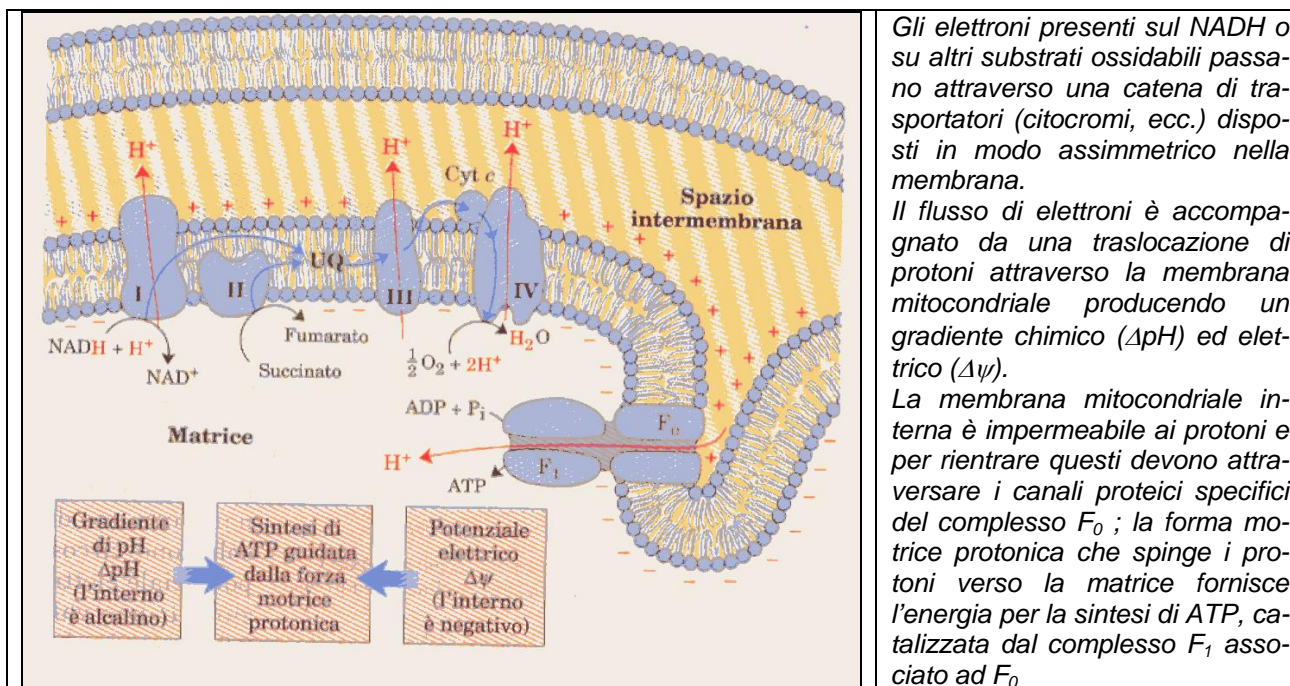
F_0 è un complesso proteico periferico integrale di membrana, composto da quattro polipeptidi diversi che formano un canale transmembrana attraverso il quale possono passare i protoni; fotografie al microscopio elettronico ad alta risoluzione del complesso F_0F_1 hanno mostrato che la struttura ha la forma di un pomello dove F_1 è la testa globulare e F_0 è la base, normalmente inserita nella membrana. (Vedi figura a lato)

Teoria chemiosmotica.

Il trasferimento degli elettroni lungo la catena respiratoria è accompagnato da un pompaggio di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, che porta alla formazione di una differenza di concentrazione in protoni e quindi di pH; la faccia che guarda verso la matrice della membrana diventa alcalina rispetto al lato citosolico della membrana stessa.



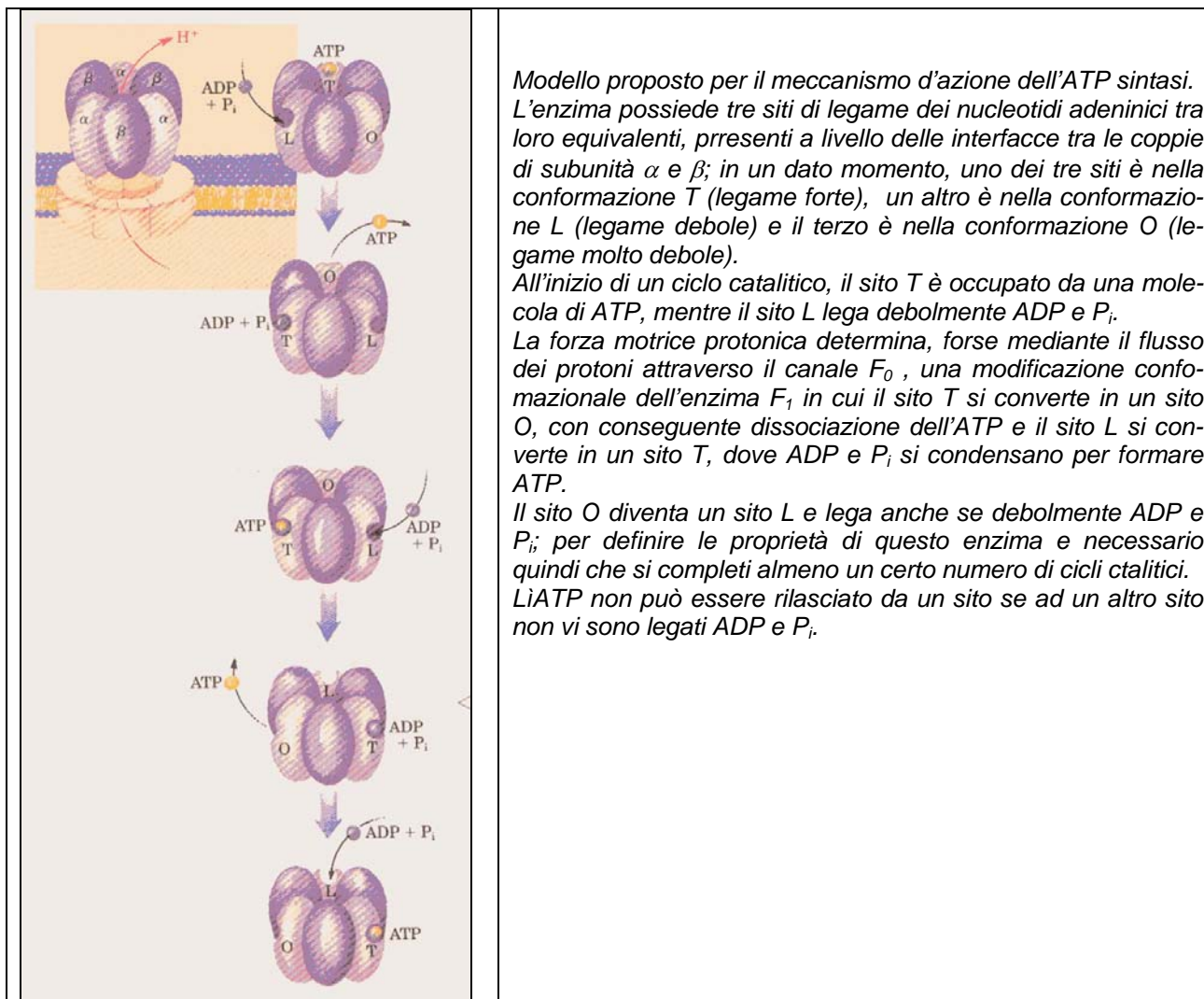
In linea generale l'energia elettrochimica di un gradiente transmembrana di una qualsiasi specie carica può essere considerata alla stregua di un legame chimico; l'energia conservata in questo gradiente è formata da due componenti: uno è l'energia potenziale chimica dovuta alla differenza di concentrazione della specie chimica nelle due regioni separate da una membrana; l'altro è l'energia del potenziale elettrico che si genera dalla separazione delle cariche prodotta da uno ione che attraversa la membrana, senza che vi sia un flusso contrario di pari carica. *Vedi figura sotto riportata.*



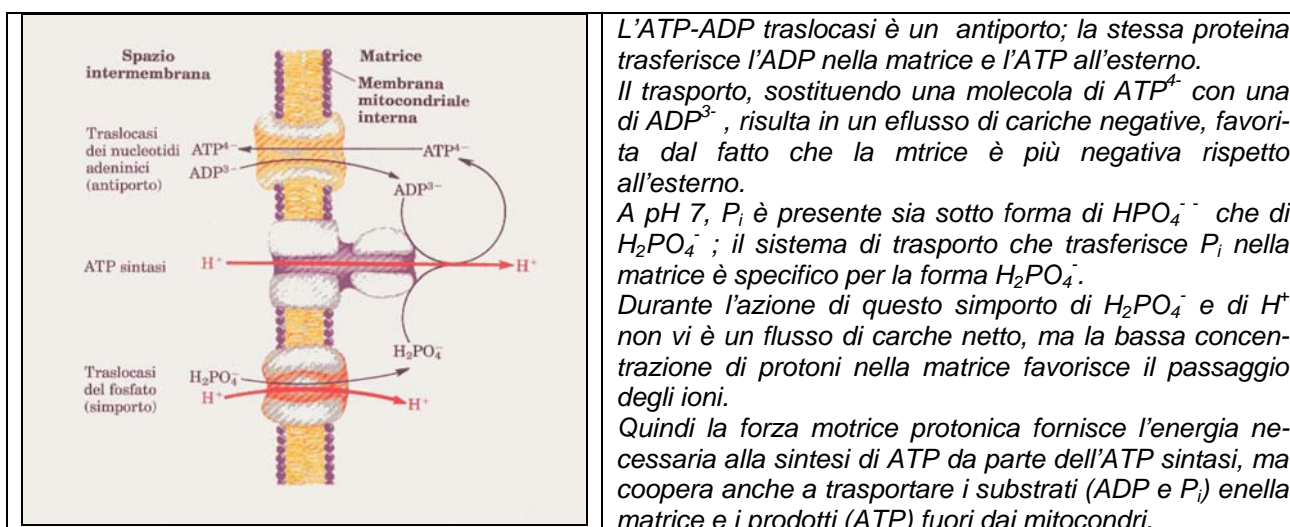
La membrana mitocondriale interna separa due compartimenti a pH diversi, con differenze quindi sia nella concentrazione di H^+ (ΔpH) sia nella distribuzione delle cariche che genera un potenziale elettrico ($\Delta \psi$). Queste differenze generano la forza motrice protonica (ΔG) che può essere calcolata come è mostrato nella figura riportata a fianco.

Meccanismi molecolari della formazione di ATP.

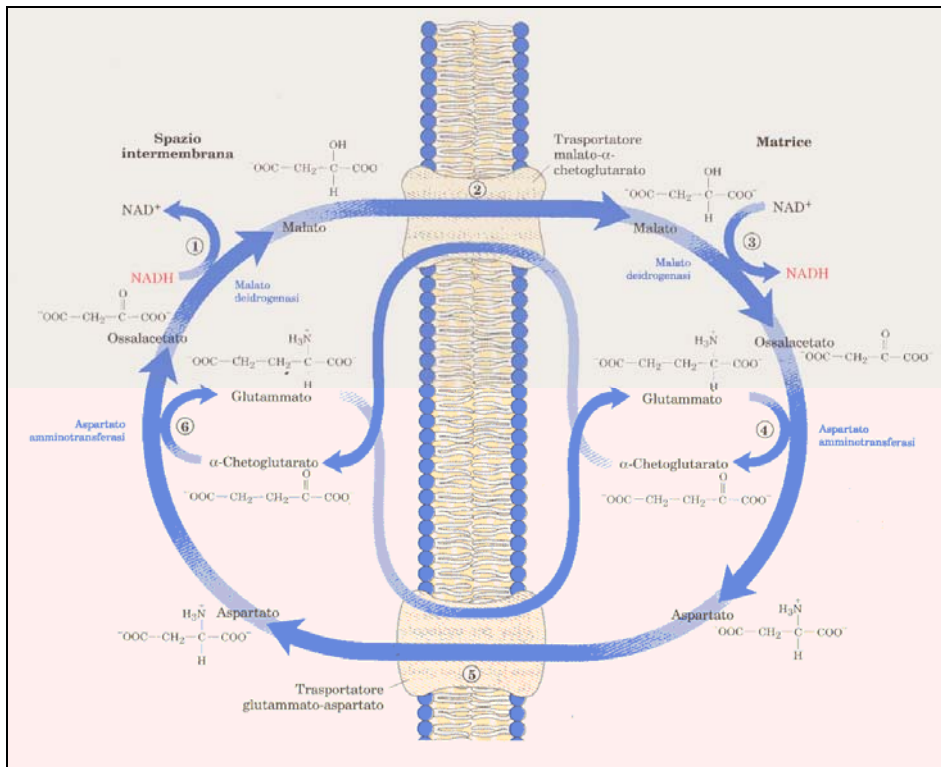
Anche se è ormai chiaro che il gradiente transmembrana di protoni fornisce l'energia per la sintesi di ATP, non è stato ancora identificato come questa energia viene trasmessa all'ATP sintasi. Ogni complesso F_1 ha una composizione in subunità del tipo $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$; il sito che lega saldamente l'ATP, apparentemente identico al sito catalitico, si trova sulla subunità β o forse nell'interfaccia tra le subunità β e α . Ogni complesso F_1 ha tre siti che possono sintetizzare ATP, che interagiscono con F_0 mediante le singole coppie delle subunità γ, δ, ϵ ; in base ai dati cinetici dettagliati e a studi di legame delle reazioni catalizzate dal complesso F_0F_1 , Paul Boyer suggerì un meccanismo come quello riportato nella figura successiva.



La funzione principale di trasferimento degli elettroni nei mitocondri è quello di fornire energia per la sintesi di ATP durante la fosforilazione ossidativa, am questa energia può servire anche a favorire diversi processi di trasporto che sono essenziali per la fosforilazione ossidativa. I sistemi di trasporto nella membrana mitocondriale interna sono descritti nella figura sotto riportata.



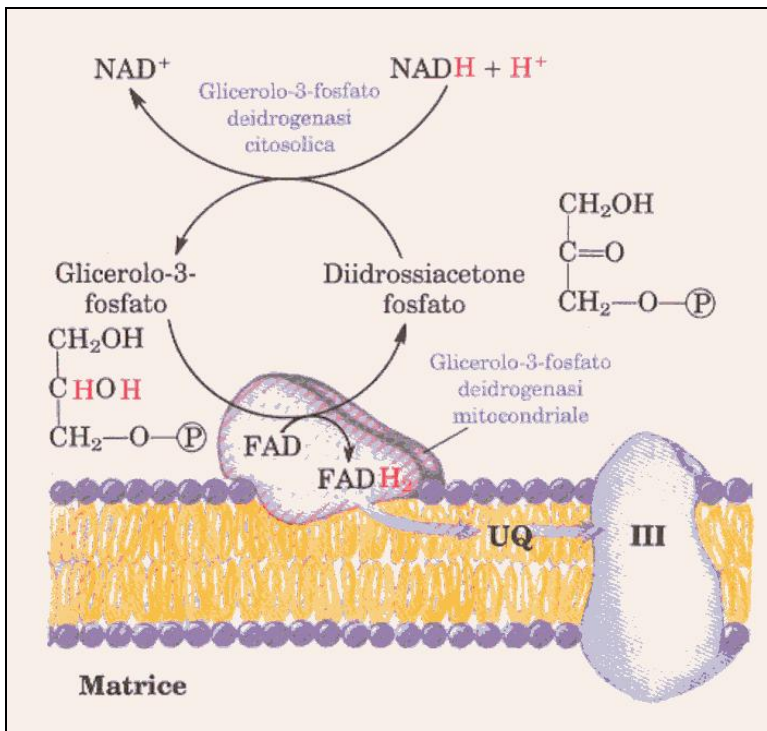
La NADH-deidrogenasi della membrana mitocondriale interna delle cellule animali accetta elettroni solo da NADH presente nella matrice; dato che la membrana interna non è permeabile al NADH citosolico, speciali sistemi navetta (shuttle) trasportano gli equivalenti riducenti dal NADH citosolico all'interno dei mitocondri mediante una via indiretta, come illustrato nella figura sotto riportata.



Spiegazione della figura sopra riportata.

- 1): il NADH citosolico (spazio intermembrana) passa i suoi equivalenti riducenti all'ossalacetato, formando malato.
- 2): il malato viene trasportato all'interno attraverso la membrana del trasportatore malato- α -chetoglutarato.
- 3): nella matrice il malato trasferisce i suoi equivalenti riducenti al NAD^+ ; il NADH così generato viene poi riossidato dalla catena respiratoria mitocondriale; l'ossalacetato, il prodotto di ossidazione del malato, non può ritornare direttamente nel citosol e quindi viene prima tansaminato ad aspartato.
- 4): che può uscire dai mitocondri attraverso il trasportatore glutammato-aspartato.
- 5): ossalacetato viene rigenerato nel sitosol.
- 6): il ciclo è così completato.

Nel muscolo scheletrico e nel cervello opera un altro tipo di sistema navetta, chiamato shuttle del glicerolo-3-fosfato, come illustrato nella figura sotto riportata.



Il diossiacetone fosfato nel citosol accetta due equivalenti riducenti dal NADH citosolico in una reazione catalizzata dalla glicerolo-3-fosfato deidrogenasi, anche essa citosolica. Un'isozima della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi legato alla faccia esterna della membrana mitocondriale interna trasferisce poi due equivalenti riducenti del glicerolo-3-fosfato presenti nello spazio intermembrana, all'ubichinone. Da notare che questo shuttle non coinvolge sistemi di trasporto attraverso la membrana.



Regolazione della produzione di ATP.

Le principali vie cataboliche (glicolisi, ciclo dell'acido citrico, ossidazione degli acidi grassi e degli amminoacidi e fosforilazione ossidativa) sono interconnesse e concertate da meccanismi di regolazione che consentono loro di funzionare insieme in maniera economica e autoregolata per produrre ATP e precursori biosintetici.

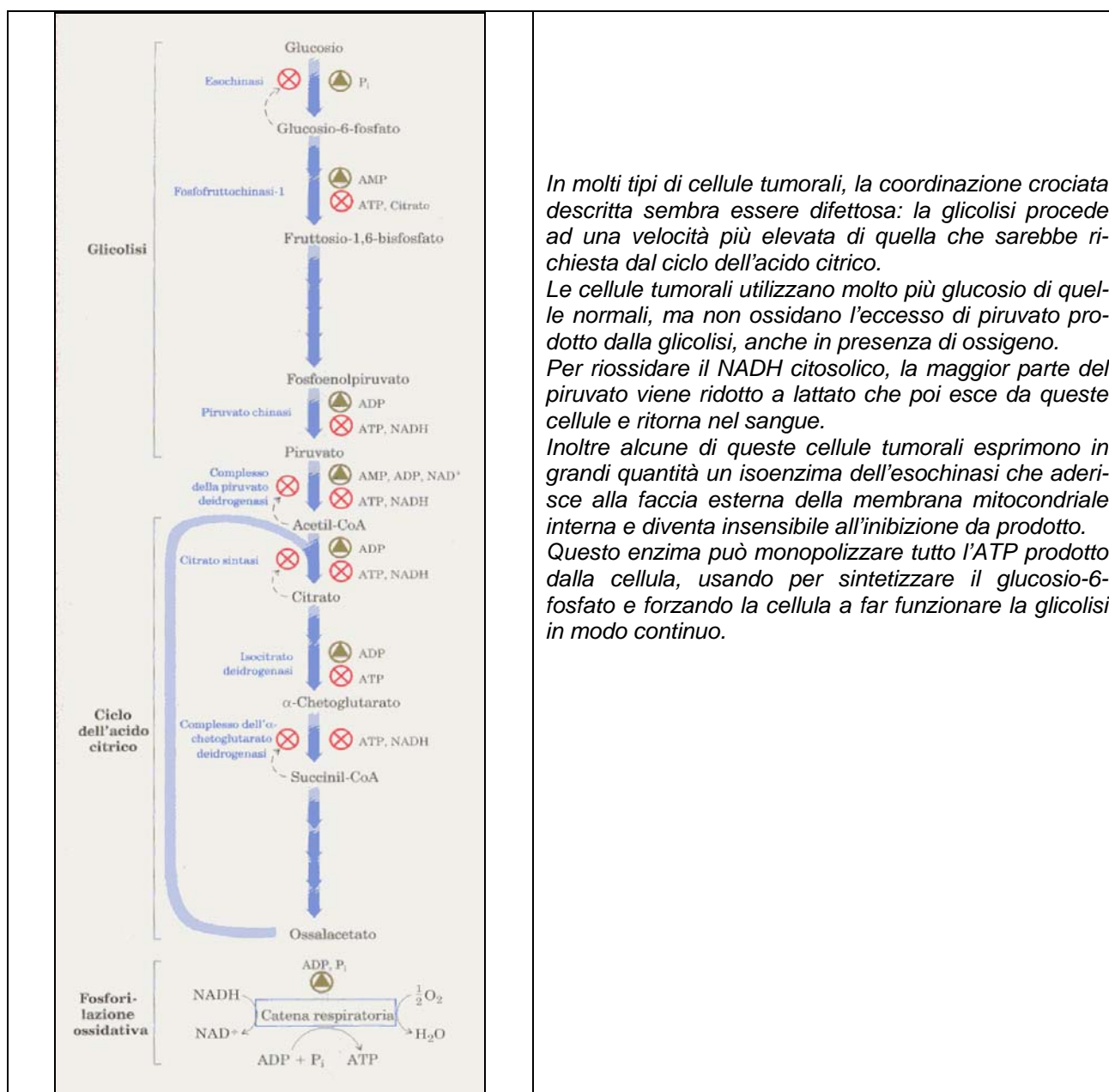
Concentrazioni elevate di ATP (oppure basse di ADP e AMP) producono un rallentamento nella glicolisi, nell'ossidazione del piruvato e dell'ossidazione dell'acetato attraverso il ciclo dell'acido citrico e la fosforilazione ossidativa.

Le quattro vie tendono ad accelerare la loro velocità quando vi è un aumento dell'utilizzazione di ATP e quindi delle concentrazioni di ADP, AMP, P_i ; l'azione del citrato, nell'inibire la glicolisi, si coordina con quella dei nucleotidi adeninici.

Inoltre un aumento dei livelli di NADH e di acetil-CoA porta all'inibizione dell'ossidazione del piruvato ad acetil-CoA e un rapporto $NADH/(NAD^+)$ molto elevato è un segnale negativo per le deidrogenasi del ciclo dell'acido citrico.

Vi è una eccezione alla regola generale che dice: la respirazione rallenta quando il rifornimento di ATP nella cellula è sufficiente; nella maggior parte degli animali, compreso l'uomo, i neonati hanno un tipo di tessuto adiposo chiamato grasso bruno, in cui l'ossidazione delle sostanze nutrienti non viene utilizzata per produrre ATP, ma per generare calore che serve a mantenere il corpo ad una temperatura costante.

Nella figura riportata nella pagina successiva sono illustrati i meccanismi della glicolisi, dell'ossidazione del piruvato, del ciclo dell'acido citrico e della fosforilazione ossidativa innescati dalle concentrazioni di ATP, ADP, AMP e NADH.



In molti tipi di cellule tumorali, la coordinazione crociata descritta sembra essere difettosa: la glicolisi procede ad una velocità più elevata di quella che sarebbe richiesta dal ciclo dell'acido citrico.

Le cellule tumorali utilizzano molto più glucosio di quelle normali, ma non ossidano l'eccesso di piruvato prodotto dalla glicolisi, anche in presenza di ossigeno.

Per riossidare il NADH citosolico, la maggior parte del piruvato viene ridotto a lattato che poi esce da queste cellule e ritorna nel sangue.

Inoltre alcune di queste cellule tumorali esprimono in grandi quantità un isoenzima dell'esocinasi che aderisce alla faccia esterna della membrana mitocondriale interna e diventa insensibile all'inibizione da prodotto.

Questo enzima può monopolizzare tutto l'ATP prodotto dalla cellula, usando per sintetizzare il glucosio-6-fosfato e forzando la cellula a far funzionare la glicolisi in modo continuo.



Mutazione nei geni e causa di malattie.

Sono molte le mutazioni nel DNA mitocondriale che causano una malattia genetica.

Prendiamo ad esempio una malattia nota come neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON).

Questa rara malattia genetica colpisce il sistema nervoso centrale compresi i nervi ottici, determina la perdita della visione bilaterale ed ha esito molto rapido nei giovani.

La sostituzione di una singola base nel gene mitocondriale ND4 porta all'incorporazione, nella proteina del complesso IU, di un residuo di His al posto del residuo di Arg; i mitocondri colpiti da questa mutazione sono in parte incapaci di trasferire elettroni dal NADH al coenzima Q.

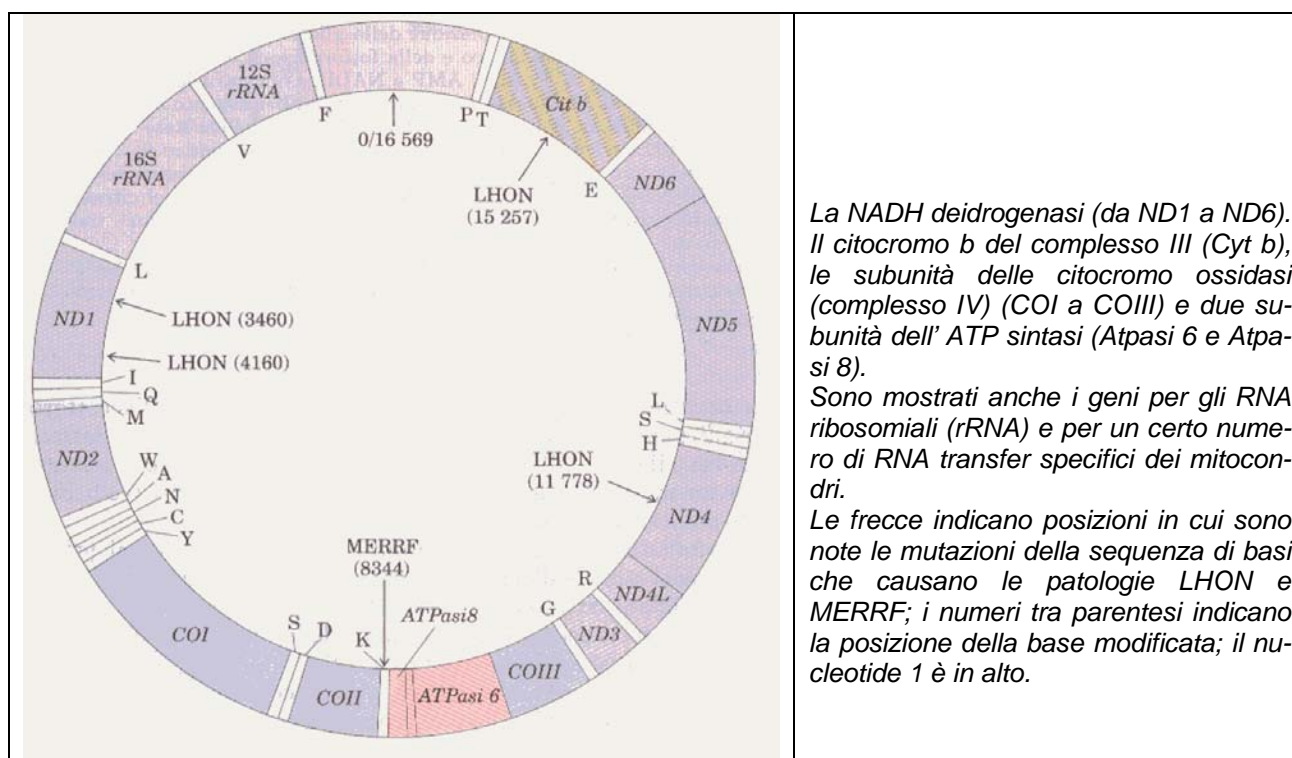
Anche se questi mitocondri sono capaci di produrre ATP trasferendo elettroni all'ossigeno, non sembrano sufficientemente efficaci nel rifornire opportunamente il metabolismo molto rapido dei neuroni, il risultato di questa carenza è il danno del nervo ottico che porta alla cecità.

Un'altra malattia genetica umana, l'epilessia mioclonica e malattie delle fibre rosse logore (MERRF) è causata da una mutazione del gene mitocondriale che codifica per un RNA transfer.

Questa malattia causata da scatti muscolari non controllabili è apparentemente il risultato della produzione difettosa di alcune proteine sintetizzate con l'aiuto di RNA transfer mitocondriali.

Le fibre del muscolo scheletrico dei pazienti effetti da MERRF hanno mitocondri di forma anormale che in qualche caso contengono strutture paracrystalline.

Si rimette la mappa del DNA dei mitocondri umani che mostra i geni che codificano per le proteine del complesso I.



Biosintesi dei carboidrati.

Il catabolismo e l'anabolismo procedono contemporaneamente in uno stato stazionario dinamico, in cui le degradazioni di componenti cellulari che producono energia sono controbilanciati dai processi biosintetici, che creano e mantengono un elevato grado di ordine nelle cellule.

I principi generali che regolano la biosintesi sono:

1. la via seguita dalla biosintesi di una biomolecola è di norma diversa da quella della sua degradazione; anche se le due vie sono con direzione opposta possono condividere molte reazioni reversibili, almeno una tappa enzimatica deve essere specifica e caratteristica di ogni via. Se le reazioni del catabolismo e dell'anabolismo sono catalizzate dallo stesso gruppo di enzimi che agiscono in modo reversibile, il flusso di carbonio attraverso queste vie sarà dettato esclusivamente dall'azione di massa dei precursori di macromolecole, non dalle necessità di energia della cellula.
2. le vie cataboliche e anaboliche corrispondenti sono controllate da enzimi regolatori diversi; queste vie con direzione opposta sono regolate in modo coordinato e reciproco per far sì che la stimolazione, per esempio, della via biosintetica sia sempre accompagnata da una inibizione della via degradativa.
3. i processi biosintetici che richiedono energia sono accoppiati alla demolizione esoergonica di ATP, in modo tale che il processo nel suo complesso risulti, in vivo, irreversibile.



Le sinapsi

Una sinapsi è la giunzione tra due elementi cellulari eccitabili che consente il passaggio di informazione sotto forma di segnali elettrici.

Una sinapsi rappresenta sempre un punto di discontinuità della struttura perché le membrane dei due elementi che prendono contatto possono essere più o meno ravvicinate, ma restano però sempre distinte o separate da una interruzione, nota come fessura sinaptica che, nella maggioranza delle sinapsi, ha una larghezza considerevole (circa 200 Å); questa discontinuità costituisce un ostacolo al passaggio dei segnali elettrici, per cui solo in alcuni casi essi possono essere trasmessi con il semplice meccanismo con cui avviene la conduzione nelle fibre nervose, sulla base del meccanismo con cui avviene la trasmissione dei segnali la sinapsi si distingue in: sinapsi elettrica e chimica.

Sinapsi elettrica.

In queste sinapsi le membrane dei due elementi cellulari che formano il contatto sono intimamente ravvicinate, per cui manca la fessura sinaptica; ciò facilita la diffusione dell'elemento post sinaptico delle correnti elettrotoniche generate dall'arrivo di un segnale elettrico all'elemento pre sinaptico (ad es. nelle giunzioni comunicanti: **gap**)

La trasmissione in una sinapsi elettrica, essendo affidata al flusso delle correnti elettrotoniche attraverso la membrana della giunzione, richiede che la giunzione offra una bassa resistenza elettrica, il che richiede, oltre ad una più stretta unione delle membrane, anche una elevata velocità di trasmissione, il basso consumo di energia ed una relativa inaffaticabilità; mancano invece di ogni capacità di elaborare il segnale che viene trasmesso.

I vantaggi della mielinizzazione delle fibre nervose non sono però rappresentati solamente dall'elevata velocità di conduzione in relazione al diametro, ma hanno anche importanti riflessi di ordine metabolico; infatti in una fibra nervosa mielinica il dispendio di energia alla conduzione di potenziali d'azione è molto inferiore a quello di una fibra amielinica di pari diametro.

Le sinapsi chimiche.

Le sinapsi chimiche sono facilmente riconoscibili agli esami ultrastrutturali perché l'elemento pre-sinaptico presenta al suo interno numerose vescicole sinaptiche che contengono il neurotrasmettitore; inoltre le due membrane che si affacciano nel contatto sinaptico (la membrana pre-sinaptica e post-sinaptica) si presentano inspessite, al microscopio elettronico, perché riccamente dotate di proteine membranali.

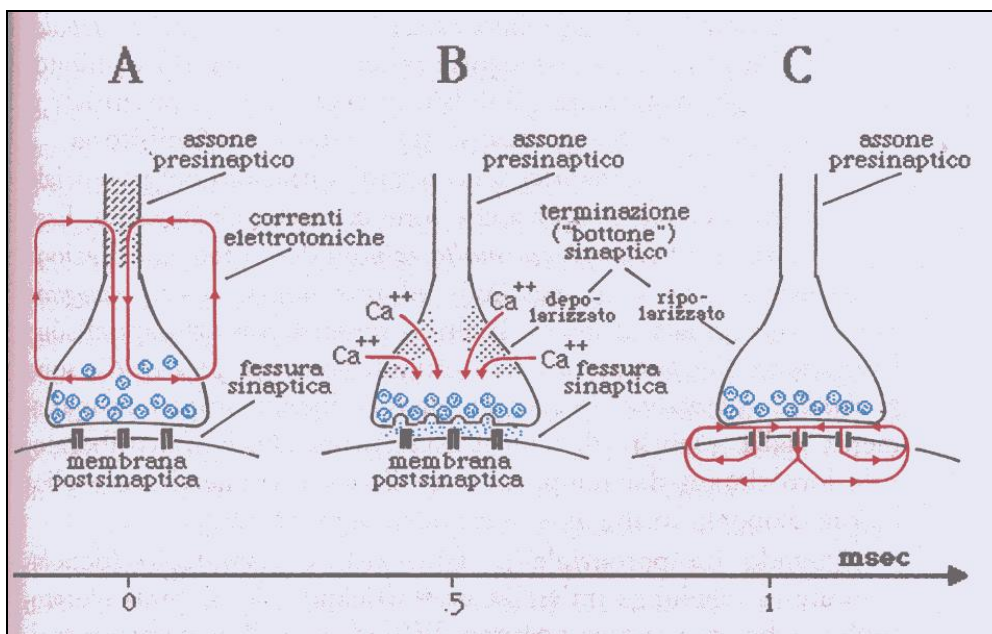
In una sinapsi chimica un messaggio elettrico viene convertito in un messaggio chimico atto a scavalcare la fessura sinaptica, per poi essere riconvertito in un segnale elettrico; i vantaggi di questo meccanismo si possono così riassumere:

1. La capacità di amplificazione; derivante dalla elevatissima attività del neurotrasmettitore che, anche in piccola quantità, può attivare estesamente l'elemento post-sinaptico.
2. La capacità di sommazione; (temporale e spaziale), per cui segnali pervenuti in tempi ravvicinati dallo stesso elemento pre-sinaptico o da elementi pre-sinaptici diversi (ad es. potenziali d'azione) possono sommarsi in un unico segnale chimico di diversa intensità che viene trasmesso all'elemento post-sinaptico.
3. La capacità di invertire di segno; ciò avviene in un particolare tipo di sinapsi (dette inibitorie), nelle quali l'arrivo dell'elemento pre-sinaptico di un segnale eccitatorio (depolarizzante) genera, per la peculiare azione del neurotrasmettitore sull'elemento post-sinaptico, un segnale di segno opposto, cioè inibitorio (iperpolarizzante).

Accanto a questi vantaggi, la trasmissione sinaptica chimica presenta anche degli svantaggi, legati essenzialmente al rinnovo del neurotrasmettitore, che comporta dispendio energetico e supporto metabolico.

Un'altra conseguenza dell'elevato metabolismo di una sinapsi chimica è la sua particolare sensibilità alla carenza di O₂ ed alla azione di veleni metabolici o di sostanze farmacologiche, che invece agiscono scarsamente sulle fibre nervose e sulle sinapsi elettriche.

Le fasi che si susseguono nella trasmissione in una sinapsi chimica sono riportate nella figura della pagina successiva.



A: depolarizzazione della terminazione assonica ad opera delle correnti elettrotoniche generate dal potenziale d'azione;
 B: attivazione dei canali voltaggio dipendenti per il Ca^{++} , esocitosi del neurotrasmettitore e sua diffusione nella fessura sinaptica.

C: attivazione di canali ionici chemio dipendenti presenti nella membrana post-sinaptica; nella figura si immagina che le correnti ioniche che attraversano i canali aperti abbiano una direzione entrante e siano quindi depolarizzanti (sinapsi eccitatoria), non è presentato nessun processo che preveda l'allontanamento del neurotrasmettitore dalla fessura sinaptica o alla sua demolizione.

Sorte del neurotrasmettitore.

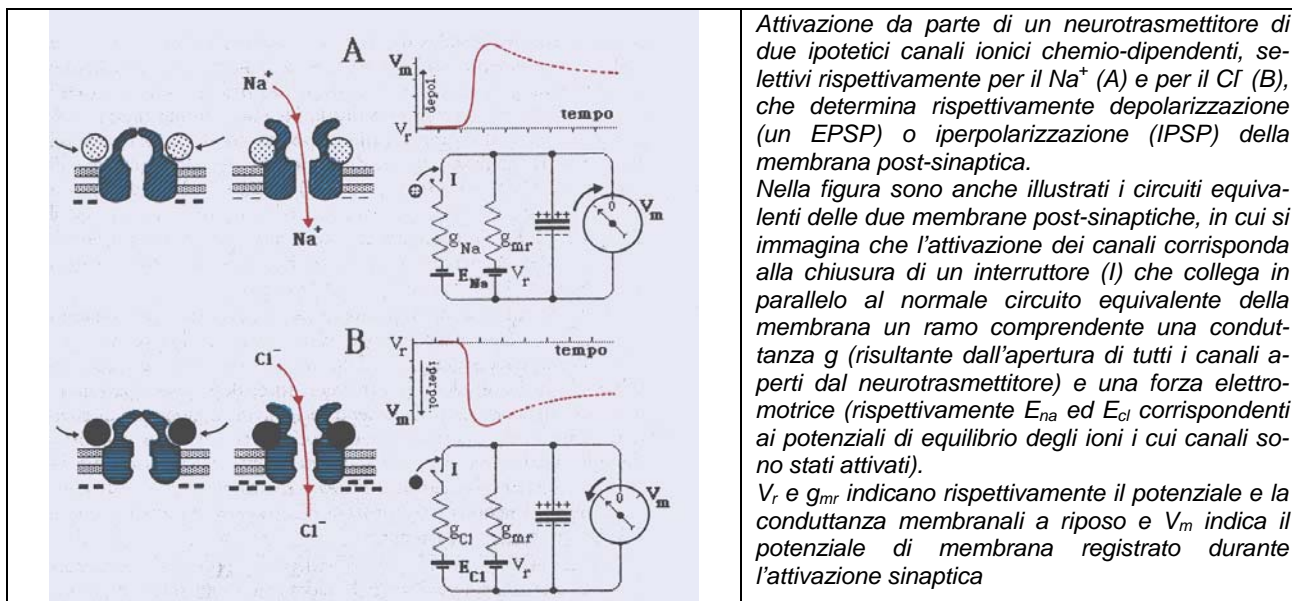
L'azione del neurotrasmettitore si estingue abbastanza presto ad opera di tre meccanismi che hanno rilevanza diversa nelle varie sinapsi:

1. La diffusione del neurotrasmettitore al di fuori della fessura sinaptica, che ne riduce rapidamente la concentrazione a livello della membrana post-sinaptica.
2. La scissione enzimatica del neurotrasmettitore ad opera di un adatto enzima idrolitico che ne distrugge l'attività; ciò avviene tipicamente per uno dei più noti neurotrasmettitori: l'acetilcolina, che viene scissa dall'enzima specifico acetilcolin-esterasi.
3. Il riassorbimento del neurotrasmettitore nella terminazione pre-sinaptica; questo processo di recupero (re-uptake), da un lato allontana il neurotrasmettitore dalla membrana post-sinaptica, dall'altro permette il suo riutilizzo, ciò avviene tipicamente per le catecolamine, neurotrasmettitori di numerose sinapsi del sistema nervoso vegetativo e somatico.

È evidente che una sinapsi chimica, pur essendo finalizzata alla trasmissione di segnali elettrici, è tuttavia sede di un processo nel quale si ritrova l'intera sequenza di eventi che caratterizzano la comunicazione chimica tra le cellule, pertanto:

- Elaborazione e liberazione di un messaggero chimico (il neurotrasmettitore).
- La migrazione del messaggero per via extra cellulare fino alla cellula bersaglio (l'elemento post-sinaptico).
- La combinazione delle molecole del messaggero con recettori chimici specifici della cellula bersaglio che porta al riconoscimento del messaggio (attivatorio o inibitorio).
- L'inattivazione o l'allontanamento delle molecole del messaggero che pongono fine alla sua azione.

Per quanto riguarda le sinapsi inibitorie il meccanismo ionico che determina l'iperpolarizzazione della membrana post-sinaptica, cioè il potenziale post-sinaptico inibitorio (IPSP), è conosciuto abbastanza bene solo per alcune sinapsi e il caso meglio studiato è quello delle sinapsi in cui opera come neurotrasmettitore l'acido γ -aminobutirrico (GABA), che porta all'apertura dei canali ionici selettivi per il Cl^- , generando nella membrana post-sinaptica un flusso anionico entrante che iperpolarizza la membrana, generando un potenziale post-sinaptico inibitorio; vedi schema sotto riportato.



La comunicazione fra cellule

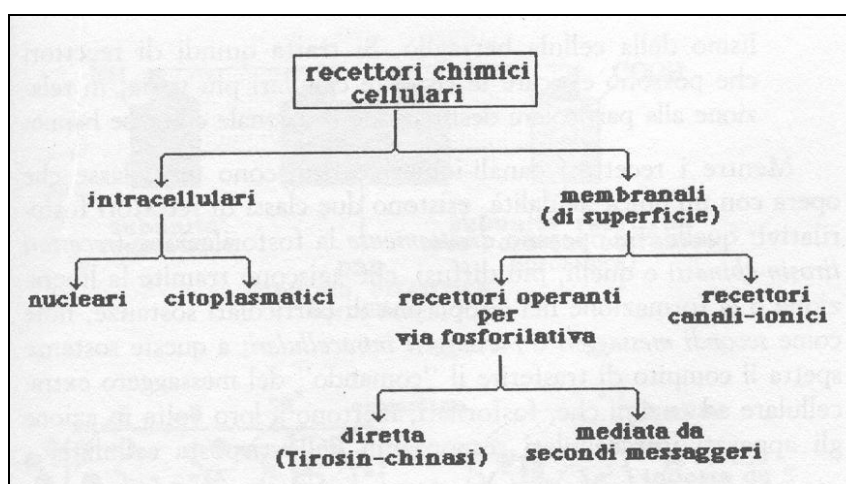
Ogni cellula, almeno potenzialmente, ha la capacità di elaborare e liberare sostanze che possono fungere da messaggi chimici, trasmissibili alle cellule circostanti o anche a cellule di tessuti ed apparati lontani, queste sostanze sono chiamate messaggeri extracellulari e sono composte da molecole particolarmente reattive perché debbono esplicare la loro azione alle bassissime concentrazioni in cui di solito giungono alle cellule destinarie.

Queste sono genericamente definite cellule bersaglio del messaggero extracellulare; al fitto interscambio di messaggi chimici tra le cellule è largamente affidata la promozione e la regolazione per via umorale di quasi tutte le funzioni organiche, da quelle basilari quali la crescita, il metabolismo e la moltiplicazione, fino a quelle specializzate dei vari apparati.

Nelle cellule bersaglio, l'informazione contenute in una molecola messaggera viene raccolta da particolari molecole dette recettori chimici, che sono molecole proteiche capaci di legare con affinità altissima quelle messaggere; si tratta di un legame che in genere è labile (ponti di idrogeno, legami idrofobici, forze di Wandaer Waals), quindi facilmente reversibile.

Alla molteplicità dei messaggi chimici che continuamente giungono alle cellule di un organismo ed alla varietà delle risposte che essi evocano, fa riscontro un altrettanto estesa molteplicità nell'organizzazione e nel modo di operare dei recettori specifici.

Si rimette una classificazione sintetica dei recettori chimici delle cellule.



Secondo lo schema riportato i recettori possono essere distinti, in base alla loro ubicazione, in:

1. Recettori intracellulari, che possono essere nucleici o citoplasmatici; la loro attivazione evoca risposte cellulari che consistono in una variabile produzione di proteine (strutturali o enzimatiche) capaci di modificare profondamente le funzioni cellulari in tutti i loro aspetti.
2. Recettori membranali (o di superficie); essi sono riservati ai messaggeri extracellulari idrosolubili, che non possono superare la membrana cellulare per la sola diffusione; si distinguono in:
 - ✓ Recettori canali-ionici; questi recettori quando sono attivati, divengono essi stessi un tramite transmembranario che consente il passaggio degli ioni. Essi così modificano direttamente la conduttan-



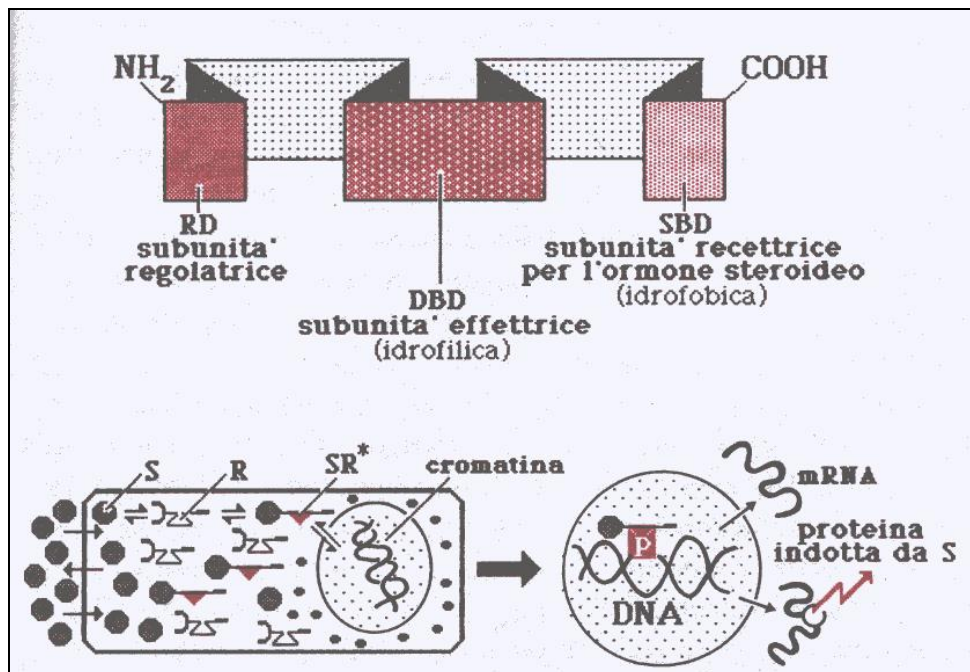
za ionica della membrana della cellula bersaglio, determinando perciò una pronta variazione del potenziale di membrana.

- ✓ Recettori operanti per via fosforilativa: questi recettori, quando sono attivati dal legame con il messaggero, agiscono in modo preminente sull'intensità e l'orientamento del biochimismo cellulare. La loro azione attivatrice si esplica per fosforilazione di svariate proteine enzimatiche implicate nel metabolismo della cellula bersaglio; si tratta quindi di recettori che possono evocare le risposte cellulari più varie, in relazione alla particolare destinazione funzionale che essi hanno.

Sia che si trovino nel citoplasma o nel nucleo, questi recettori specifici per i messaggeri liposolubili devono accedere al DNA nucleare per espletare su di essi la loro azione; si tratta di molecole capaci di consentire alla molecola messaggera idrofobica di intervenire in reazioni che si svolgono tutte in ambiente idrico intracellulare: ogni molecola recettoriale deve perciò possedere necessariamente almeno due regioni (o domini), una idrofobica (di legame) e una idrofila (effettrice), che la rendono in un certo senso anfipatica.

Un attendibile modello molecolare di recettore citoplasmatico è quello proposto per i recettori degli ormoni steroidei (corticosteroidi e sessuali); secondo questo modello la molecola del recettore è composta da tre porzioni: una subunità recettrice, detta SDB (steroid-binding domain); una subunità effettrice, idrofila, denominata DBD (DNA-binding domain), destinata ad operare sulla trascrizione genetica; una subunità regolatrice detta RD (regulatory domain), tramite la quale l'affinità del recettore per il messaggero può essere modificata da fattori regolatori specifici.

Si rimette un modello di molecola recettrice per un ormone steroideo.



In alto: modello di una molecola recettrice per un ormone steroideo SDB (steroid binding domain): subunità recettrice DBD (DNA binding domain): subunità effettrice RD (regulatory domain): sub unità regolatrice.

In basso S – steroide, R – recettore, il complesso recettore ligando attivato (SR*) penetra nel nucleo, dove attiva particolari siti promotori (P) del DNA:

come viene mostrato nella figura sopra descritta, una volta che sia avvenuto il legame tra la subunità recettrice e la molecola steroidea, viene attivata la subunità effettrice e l'intero complesso recettore-ormone migra nel nucleo dove si combina, tramite un adatto sito, con regioni specifiche del DNA, dette SRE (steroid responsive elements), portandole in attività.

Funzione tipica dei recettori canale è quella di mediare la trasmissione nelle sinapsi chimiche, esse sono perciò attivati da messaggeri che appartengono alla estesa classe dei neurotrasmettitori.

Questo selettivo indirizzo viene ottenuto tramite una catena di attivazioni che interessano in sequenza:

- ✓ La proteina recettrice.
- ✓ Una proteina di accoppiamento (proteina G).
- ✓ Una proteina effettrice enzimatica.
- ✓ Un secondo messaggero.
- ✓ Le proteine cui è affidata la risposta cellulare.

1. Quando il messaggero extracellulare giunge a contatto della superficie esterna della membrana cellulare, esso si combina con il sito di legame del recettore per esso specifico; a questo legame consegue una modificazione allosterica dell'intera molecola recettrice che la rende attiva, cioè capace di agire sulla seconda proteina membranale: una proteina G, che viene a sua volta attivata con analogo meccanismo.



2. La proteina G attivata reagisce con la terza proteina membranale: la proteina effettrice (o enzima effettrice) la cui molecola è in contatto con l'ambiente intracellulare; questa di solito è una ciclasi oppure una fosfatasi; con l'attivazione dell'enzima effettrice termina la sequenza dei processi membranali che hanno permesso di trasferire fino all'ambiente intracellulare l'informazione contenuta nel messaggero extracellulare.
3. L'enzima effettrice, reagendo con il substrato specifico, produce il secondo messaggero: un composto libero, capace di diffondere nel mezzo intracellulare. Nel più comune dei casi l'effettore è l'adenilato-ciclasi, ed il secondo messaggero che viene prodotto è l'adenosin-monofosfato ciclico (AMPc); quando invece l'enzima effettrice è una fosfolipase, di solito vengono prodotti due secondi messaggeri: l'inositolo-trifosfato (IP3) e il diacilglicerolo (DAG).
4. Il secondo messaggero non è direttamente capace, come regola, di rendere attive le proteine cui è affidata la risposta della cellula bersaglio, ma è però un potente attivatore di particolari enzimi intermedi: le protein-chinasi, capaci di attivare per fosforilazione i gruppi di enzimi metabolici direttamente implicati nella risposta cellulare.
5. Una volta attivata la cascata fosforilativa che caratterizza la via dei secondi messaggeri tende a procedere finché è disponibile substrato; anche se poco conosciuti i meccanismi di arresto delle attivazioni, comuni a tutte le cellule è il sistema delle fosfatasi endocellulari (o fosfoprotein-fosfatasi), che sono potenti enzimi de-fosforilanti delle proteine, quindi ad azione opposta a quella delle proteine-chinasi e delle fosforilasi-chinasi.

Si vuole ricordare con questa breve relazione che prima di procedere con trattamenti chimici o molecole non ben riconosciute dal sistema naturale è conveniente bonificare tutto il sistema con prodotti biodinamici così da elevare la risposta enzimologica naturale.

Relazione a cura di Pasquale Ferorelli, *Responsabile R&D in Biotecnologie Industriali della Citozeatec.*