

Decuplanții fosforilării oxidative

La fosforilarea oxidativă contribuie:

a) integritatea membranei interne a mitocondriilor – orice leziune conduce la pierderea capacității de fosforilare oxidativă, în timp ce transferul electronilor poate continua. Fără integritatea membranei interne, gradientul de H^+ n-ar putea exista;

b) impermeabilitatea membranei interne pentru ionii H^+ , OH^- , K^+ , Cl^- . Dacă ar fi permeabilă, procesele de fosforilare oxidativă nu ar avea loc.

Procesele fosforilării oxidative pot fi decuplate cu ajutorul unor substanțe chimice ce inhibă fosforilarea ADP, neafectând transferul electronilor – agenți decuplanți. Energia nu se acumulează în ATP, ci doar trece în căldură. Decuplanții măresc permeabilitatea la H^+ (*protonofori*). Ca substanțe lipofile, ei leagă ionii de o parte a membranei și-i transferă pe cealaltă, unde concentrația lor e mai mică (fig.3.15).

Mulți agenți decuplează procesul fosforilării oxidative - decuplantul clasic e 2,4-dinitrofenol (decuplează oxidarea de fosforilare). La fel, drept decuplanți pot servi unele hidrazone, izotiocianați etc.

Acest fenomen are drept scop și menținerea homeostazei termice – energia neutilizată ce se disipează sub formă de căldură. Procesele respective decurg intensiv în țesuturile adipoase brune, saturate în mitocondrii, cu un conținut mare de citocromi. Asemenea țesuturi caracterizează animalele care hibernează; de altfel, le posedă și nou-născuții. În calitate de decuplanți servesc acizii grași, eliminarea cărora e reglată de adrenalina.

Altă grupă de substanțe sunt *ionoforele* care leagă și transferă ionii prin membrană – Valinomicina (K^+), Gramicidina (Na , K , și alți ioni monovalenți).

S-a constatat că sub acțiunea noradrenalinei eliberată la nivelul terminațiilor nervoase simpatice, se sintetizează o proteină decuplantă – *termogenina*. Efectul ei are loc în țesutul adipos brun, dezvoltat la nou-născut, cât și la mamiferele care hibernează. Frigul sau o alimentare abundentă eliberează termogenină, care decuplează fosforilarea oxidativă, cu producerea de căldură. Efectul calorigen e caracteristic și hormonilor tiroidieni, care în final modifică permeabilitatea membranei mitocondriale pentru protoni, împiedicând generarea gradientului electrochimic.

Dar multe nuanțe ale mecanismelor fosforilării oxidative nu sunt elucidate. De exemplu, nu se știe:

1. Care anume este mecanismul ce facilitează lanțul de transfer al electronilor – pomparea H^+ din matrice în exterior?

2. De unde se iau acești protoni? Fie că sunt cei care participă direct la reacțiile chimice catalizate de enzime, reprezentând o cale nemijlocită de la NADH, alta – din soluție sau, indirect, la interacțiunea conformațională între centrele catalitice și de fixare în diferite porțiuni ale complexului enzimatic.

În 1988, M.Hartmut a expus argumente incontestabile în favoarea teoriei lui Mitchell, în urma studierii cristalelor proteinei membranare din complexul clorofil – proteină a unor bacterii. Cu ajutorul analizei roentgenostructurale, a demonstrat că sub acțiunea luminii electronii se desprind de la substrat și se deplasează de la un complex la altul. Golul rămas în proteina dată este compensat de transferul următorului electron de

la proteina precedentă (fig.3.16).

La scindarea ATP în citozol, se formează ADP^{3-} și P^{2-} . *Care este mecanismul de transfer al ADP în mitocondrii și cum ATP sintetizat va părăsi mitocondriile?*

Se știe că membrana mitocondrială e impermeabilă pentru substanțe ionizate. Membrana internă conține două sisteme specifice de transport: adeninnucleotid translocaza, cu funcția de transfer al ADP^{3-} din citozol în mitocondrii, în schimb de ATP^{4-} , în direcție inversă (1:1).

Transferul are loc datorită modificărilor conformaționale ale moleculei AN-translocazei, ce reprezintă o proteină foarte specifică. Se cunoaște un inhibitor al ei – *antractilozidul*, secretat de o plantă (ciulin sau scaiete). Al doilea sistem specific e fosfatranslocaza, cu funcția de transportator al fosfatului în mitocondrii, însoțit de deplasarea ionilor de hidrogen.

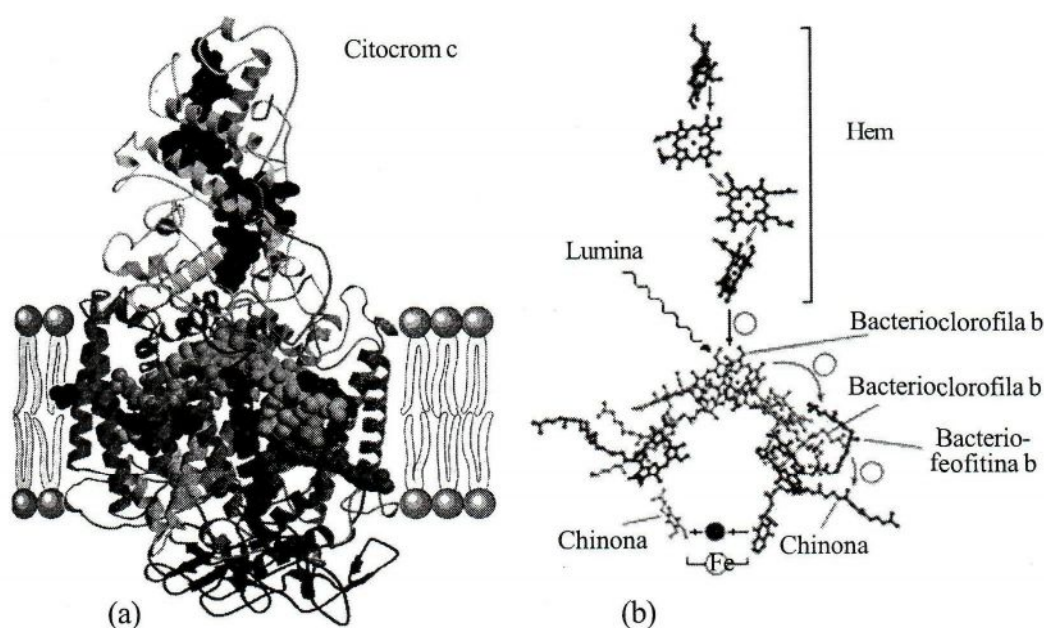


Figura 3.16. Modelul tridimensional (a) și aranjarea spațială a cofactorilor în interiorul modelului pentru proteinele centrului fotoreactant în bacteriile *Rhodospirillum rubrum* (b)

Bolile mitocondriale

Mutațiile genelor care codifică proteinele sau moleculele de RNA mitocondrial cauzează bolile mitocondriale mult mai semnificative în patologia generală, pe măsura evoluției cunoștințelor actuale despre funcționarea normală a mitocondriilor. Proteinele mitocondriale pot fi codificate de gene nucleare (fiind importate în mitocondrii după ce au fost sintetizate în citoplasmă) sau de gene din DNA mitocondrial. Bolile mitocondriale pot fi cauzate de anomalii ale unuia din complexe din membrana internă (antrenând un deficit energetic important), de anomalii ale ribozomilor și ale biosintezei intramitocondriale

a proteinelor, de anomalii ale transporturilor din membranele mitocondriale etc.

Cele mai importante particularități ale acestor afecțiuni sunt:

- a) transmiterea mendeliană, dacă mutația afectează o genă nucleară;
- b) transmiterea matriliniară (exclusiv pe linie maternă), dacă mutația afectează o genă a DNA mitocondrial, deoarece DNA mitocondrial este transmis pe linie maternă;
- c) segregarea replicativă, care constă în repartiția aleatorie a mitocondriilor afectate și ale celor normale în urma diviziunii celulare, ceea ce antrenează un mozaicism tisular (exprimarea diferențiată a simptomatologiei în funcție de țesut sau chiar în cadrul aceluiași țesut);
- d) acumularea progresivă a mutațiilor în DNA mitocondrial ca urmare a atacului radicalilor liberi produși prin funcționarea lanțului respirator. După atingerea unui anumit nivel al anomaliilor induse de radicalii liberi, apare expresia clinică a afecțiunii, în primul rând în organele dependente de un aport constant de energie (miocardul, mușchiul scheletic, sistemul nervos).

Citopatiile mitocondriale

Anomaliile sau deficitul total al proteinelor din lanțul respirator sunt denumite genetic *citopatii mitocondriale*. Acestea sunt cauzate de deficitul ereditar al unuia dintre complexe enzimatice respiratorii. Simptomatologia debutează precoce, încă în perioada neonatală în cazul deficiențelor grave sau, ulterior, în cazul în care activitatea enzimatică reziduală permite sinteza unui număr mic de molecule de ATP. Tabloul clinic depinde de gradul de afectare a mitocondriilor din diferite țesuturi, deoarece nu toate celulele aerobe sunt în egală măsură purtătoare ale anomaliilor mitocondriale. Țesuturile cele mai afectate sunt cele cu necesități energetice maximale, în primul rând sistemul nervos, miocardul și mușchiul scheletic. Frecvent, pacienții prezintă semne de encefalopatie metabolică, cardiomiopatii, hipotonie severă, steatoză hepatică, insuficiență renală, etc. Pe plan bioumoral predomină acidoză lactică consecutivă inhibării retroactive a ciclului Krebs și conversiei piruvatului în lactat. O altă modificare caracteristică este accentuarea cetogenezei cauzată de creșterea nivelului cetonemiei și a raportului β -hidroxibutirat/ acetoacetat (deoarece β -hidroxibutirat dehidrogenaza este activată la creșterea raportului NADH/NAD^+).

Cele mai frecvente afecțiuni cauzate de disfuncții ale proteinelor sau ale RNA mitocondrial sunt:

- a) sindromul OXPHOS care reunește afecțiunile cauzate de disfuncția unuia dintre complexe lanțului respirator;
- b) sindromul MERRF, afecțiune neurodegenerativă produsă de prezența unei mutații în gena mitocondrială care codifică tRNA-Lys, ceea ce condiționează perturbarea biosintezei tuturor proteinelor mitocondriale;
- c) sindromul MELAS, afecțiune neurodegenerativă fatală, produsă de prezența unei mutații în gena mitocondrială pentru un alt tip de RNA de transfer (tRNA^{leu}-UUR).

Anomaliile mitocondriale secundare

Anomaliile mitocondriale secundare sunt cauzate de diminuarea aportului tisular de oxigen (anoxie sau hipoxie în insuficiențele respiratorii ori cardiocirculatorii severe) sau de intoxicațiile cu agenți care blochează complexe mitocondriale. Drept exemplu ar

servi monooxidul de carbon sau cianurile care blochează ireversibil complexul IV, prin stabilizarea formei fierice a ionului de fier.

Sistemele - navetă de transport al echivalenților de reducere

Este evident că $\text{NADH} + \text{H}^+$ care se produce la nivelul mitocondriilor, se reoxidează prin pătrunderea în lanțul respirator. Dar care este soarta celui ce generează în citoplasmă, doar mitocondriile intacte sunt impermeabile pentru NAD(P) ? Reoxidarea va decurge pe căi indirecte denumite sisteme "navete", fiind indispensabile de funcționarea căilor metabolice citozolice. Prin membrană vor fi transferați nu NADH , dar numai electronii lor. Primul mecanism e naveta "glicerol-fosfat", ce operează în ansamblu astfel: NADH și H^+ rezultat din diverse reacții de reducere din citoplasmă se asociază cu apoenzima specifică, formînd glicerol-3-P-dehidrogenaza (fig.3.17). Drept acceptor servește DHAP (dihidroxiacetonfosfatul - intermediar glicolitic). Membrana externă mitocondrială este permeabilă pentru glicerol-3-fosfat care difuzează cu ușurință în spațiu intermembranar. Pe suprafața externă a membranei interne mitocondriale este localizată G-3-P-DH mitocondrială, care-l reoxidează (glicerolfosfatul) în DHAP, iar cei doi atomi de H sunt preluați de coenzima acestei enzime de tip flavinic (FP). Hidrogenii sunt preluați la această enzimă prin intermediul CoQ în lanțul respirator. DHAP revine în citoplasmă și suita de reacții se reia. Mecanismul menține în citoplasmă o concentrație necesară de NAD^+ .

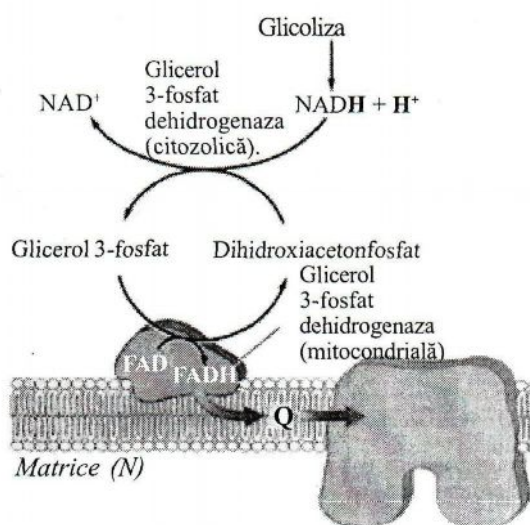


Figura 3.17 Mecanismul-navetă glicerol 3-fosfat

Procesul e deosebit de activ în mușchii scheletali și creier.

E mai complicat mecanismul de transfer al H^+ la naveta "malat- aspartat" (fig.3.18).

În schema respectivă, 2,5 indică sisteme de transfer al aminoacizilor, dicarboxilaților. Acest mecanism funcționează intens în inimă, ficat, rinichi. Astfel, se asigură reoxidarea NADH citozolic și reglarea cuplurilor NADH/NAD^+ extra și intra mitocondriale. Naveta dată cedează electroni în lanțul respirator, formînd 3ATP.

Naveta malat-aspartat include următoarele sisteme enzimatice și de transport:

- malat dehidrogenaza (MDH) cu izoformele sale – citozolică și mitocondrială;
- aspartatamino transferaza (AST), de asemenea citozolică și mitocondrială;
- transportătorii, care funcționează ca sisteme antiport – malat-cetoglutarat și aspartat - glutamat.

Echivalenții reducători ($\text{NADH} + \text{H}^+$) citozolici sunt preluați de MDH și utilizați pentru reducerea oxaloacetatului în malat. Ultimul este transportat în mitocondrii și retransformat în oxaloacetat grație acțiunii MDH mitocondriale. $\text{NADH} + \text{H}^+$ mitocondrial este preluat

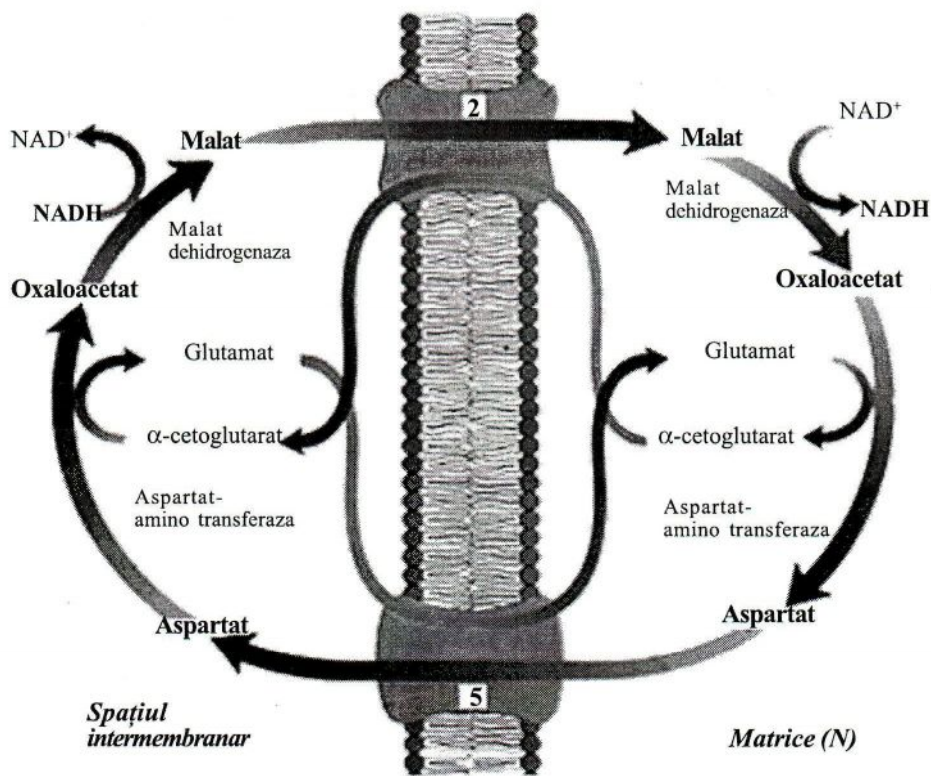


Figura 3.18 Mecanismul-navetă malat-aspartat

ca substrat al complexului I. Oxaloacetatul este transaminat sub acțiunea AST, generînd acidul aspartic, care ulterior este transportat în citozol prin intermediul transportatorului comun aspartat-glutamat. AST citozolică regenerează oxaloacetatul prin transaminarea aspartatului. Ciclul glutamat-aspartat furnizează oxaloacetatul necesar funcționării navei în cauză.

Reglarea fosforilării oxidative

Intensitatea fosforilării oxidative este riguros controlată. Un anumit control se poate exercita prin compuși și factori direct implicați în proces. Rolul major îi revine lui ADP ce se cuplează cu P, formînd ATP. Controlul se exercită:

a) Prin *acceptor fosfat* exprimat prin mărimea P/O (denumit și cît de fosforilare). El reprezintă numărul de molecule de fosfor neorganic, transformat în formă organică, cu referire la atomul de *oxigen* utilizat, (respectiv, pentru cele trei puncte de fosforilare e egal cu 3 : 2 : 1).

b) Electronii se deplasează prin lanțul respirator, cu condiția fosforilării simultane a ADP în ATP. Conținutul de ADP determină viteza de fosforilare oxidativă. La sporirea ei, viteza maximă de utilizarea O₂ durează atîta timp, cît ADP se transformă în ATP, apoi revine la valoarea inițială. Reglarea fosforilării oxidative prin ADP se numește *control respirator*, care depinde direct de necesitățile energetice ale celulei.

c) Fosforilarea oxidativă e reglată și de *sarcina energetică* celulară (vezi mai sus).

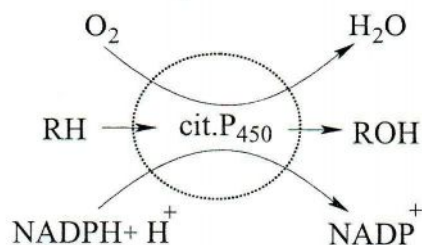
Oxigenazele. Citocromul P₄₅₀ și reacțiile de oxido-reducere. Aproape 90% din O₂ este redus de complexul citocromoxidazic aa₃. Unele țesuturi conțin enzime ce catalizează reacții de oxido-reducere în care atomii de oxigen se includ nemijlocit în molecule și formează grupa OH sau carboxilică –COOH. Enzimele ce catalizează tipul dat de reacții se numesc *oxigenaze*.

Dioxigenazele sunt enzime ce catalizează reacții care includ în molecula substratului organic ambii atomi de O₂, exp: pirocatehaza. *Monooxigenazele* reprezintă enzime ce catalizează reacții de includere a unui atom de O₂, celălalt fiind redus la H₂O. Aceste enzime necesită două substraturi – unul adăunează un atom, iar al doilea – cosubstratul este donator de H pentru reducerea atomului de O₂ la H₂O:



Primul substrat se hidroxilează, de aceea enzimele sunt denumite și hidroxilaze; monooxigenazele se divizează în subclase în dependență de natura cosubstratului (FMN, FAD, NAD, NADP, α-cetoglutarat).

Numeroase și complexe sunt reacțiile de oxido-reducere, cu participarea citocromului P₄₅₀ (prezent în reticulul endoplasmatic). Acest citocrom poate interacționa cu O₂ și cu CO, formînd cu ultimul un complex ce absoarbe lumina la 450 nm.



Citocromul P₄₅₀ catalizează reacțiile de hidroxilare a substratului (RH → ROH), iar celălalt se reduce la H₂O, adăunînd echivalenți reduși ai NADH, NADPH sau proteine fiero-sulf.

Participă la: **1)** hidroxilarea steroizilor; **2)** inactivarea substanțelor străine, mai ales puțin solubile în apă; **3)** hidroxilarea medicamentelor – hidroxilare ce amplifică solubilitatea lor, favorizînd procesele de dezintoxicare și eliminare din organism.



P.Mitchell



J. E. Walker