

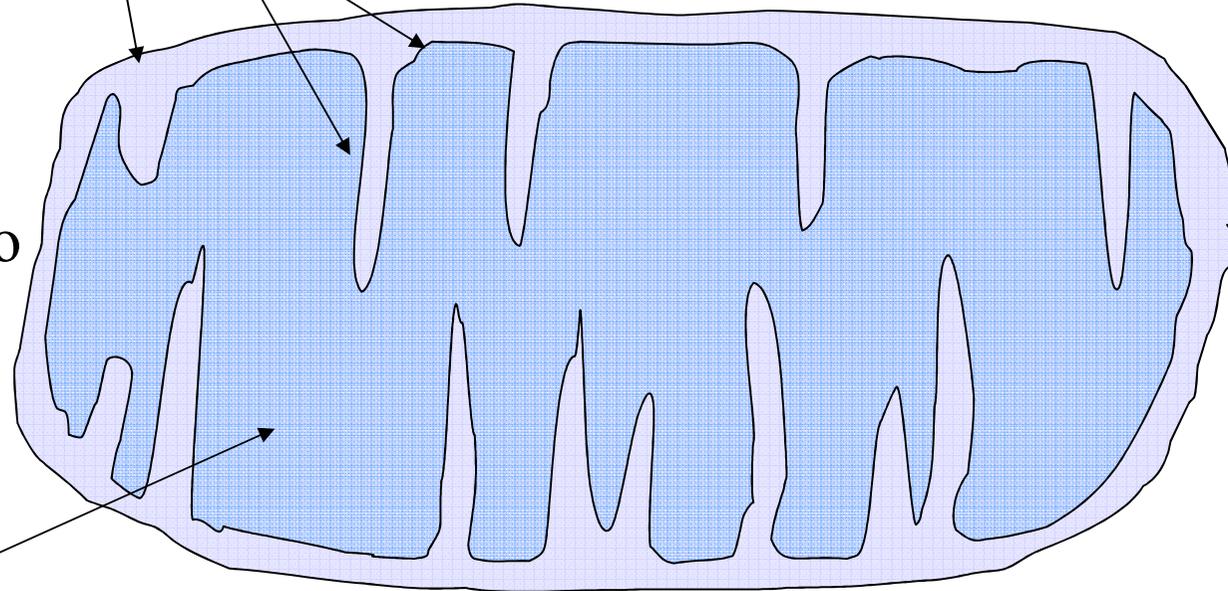
Membrana esterna:
poco selettiva:
permeabile a molti
metaboliti

Membrana interna:

sede del processo della **fosforilazione
ossidativa.**

Membrana selettiva, **impermeabile ai protoni**;
ATP sintasi, succinato deidrogenasi; ATP/ADP
antiporto, molti altri antiporti; catena di
trasporto degli elettroni

Mitocondrio



Matrice: enzimi del ciclo di Krebs, piruvato deidrogenasi, enzimi della
beta ossidazione, ATP, ADP, Pi, glutammato deidrogenasi, glutaminasi, Mg^{2+}

Fosforilazione ossidativa

1. Gli elettroni raccolti sul NADH e il FADH₂ durante il ciclo di Krebs e la beta-ossidazione passano ad una serie di trasportatori posti sulla **membrana mitocondriale interna**, detta **catena respiratoria** o **catena di trasporto degli elettroni**
2. I trasportatori sono **mobili** entro la membrana od organizzati in **complessi** multiproteici:
si tratta di 4 complessi e 2 trasportatori mobili

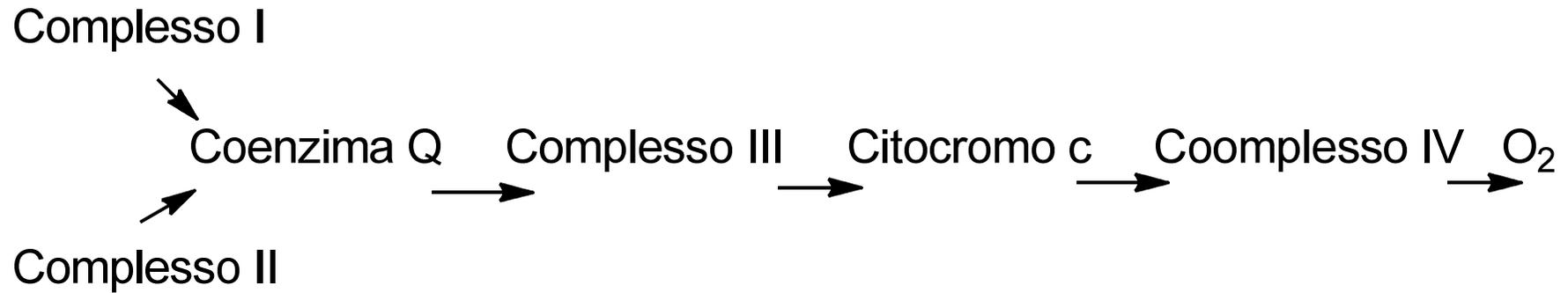
Fosforilazione ossidativa

3. Gli elettroni passano da un trasportatore all'altro secondo gradiente di potenziale elettrochimico ($\Delta G < 0$)
4. I complessi sono **pompe protoniche.**

Fosforilazione ossidativa

5. L'energia liberata dal processo di trasferimento degli elettroni è conservata sotto forma di **gradiente protonico**.
6. Questa energia è utilizzata per la **biosintesi di ATP**.
7. La sintesi di ATP è controllata dalla disponibilità di **ADP**

Flusso di elettroni tra i complessi



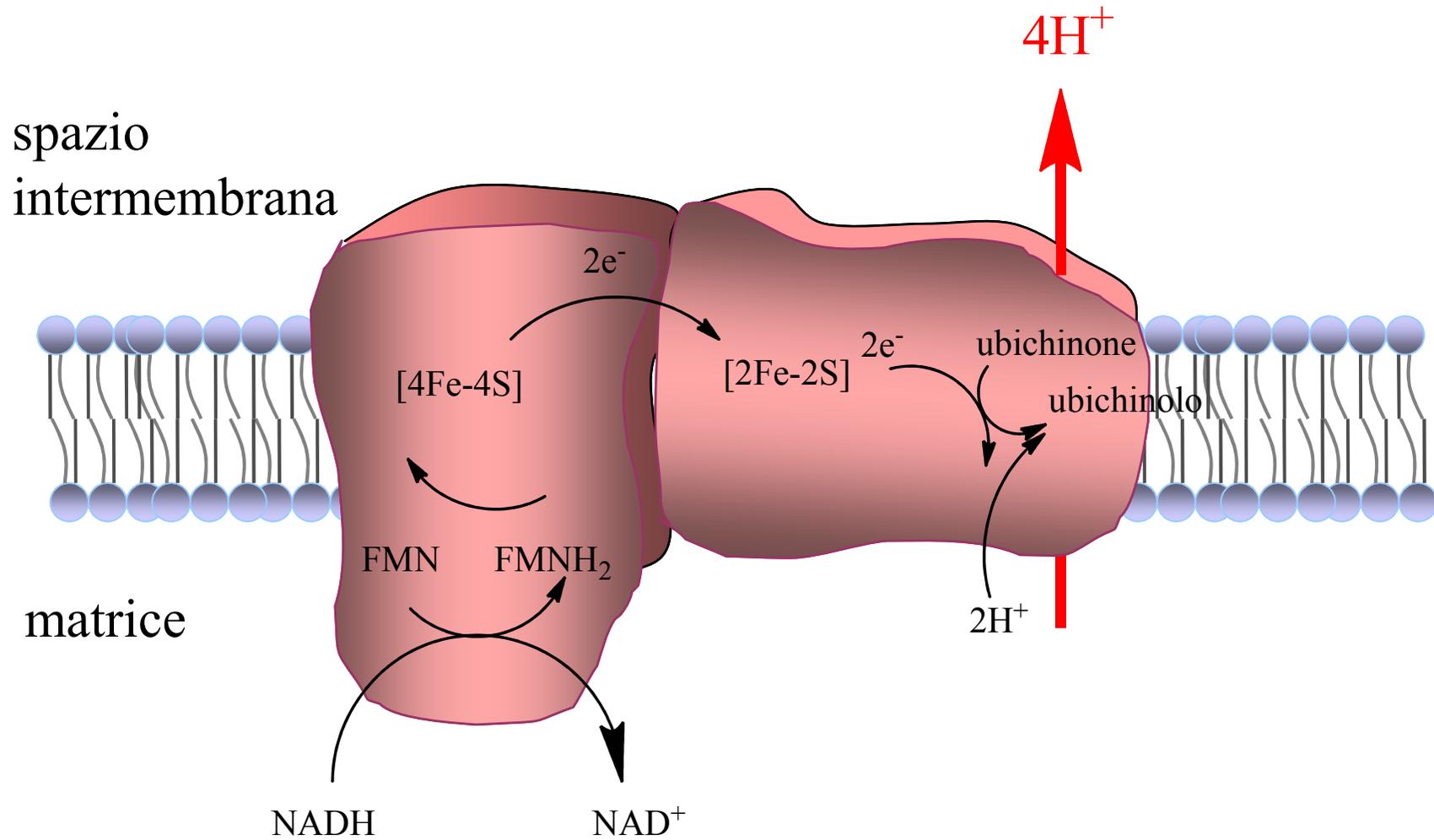
I trasportatori di elettroni

coppia redox	$E^{\circ'} (V)$
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{NADH}$	- 0.32
$\text{NADH deidrogenasi (FMN)} + \text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ $\text{NADH deidrogenasi (FMNH}_2\text{)}$ (complesso I)	- 0.30
$\text{Fumarato} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{succinato}$ (complesso II)	0.031
$\text{Ubichinone} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{ubichinolo}$	0.045
$\text{Citocromo } b (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citocromo } b (Fe^{2+})$	0.077
$\text{Citocromo } c_1 (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citocromo } c_1 (Fe^{2+})$ (complesso III)	0.22
$\text{Citocromo } c (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citocromo } c (Fe^{2+})$	0.254
$\text{Citocromo } a (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citocromo } a (Fe^{2+})$	0.29
$\text{Citocromo } a_3 (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow \text{Citocromo } a_3 (Fe^{2+})$ (complesso IV)	0.35
$\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	0.82

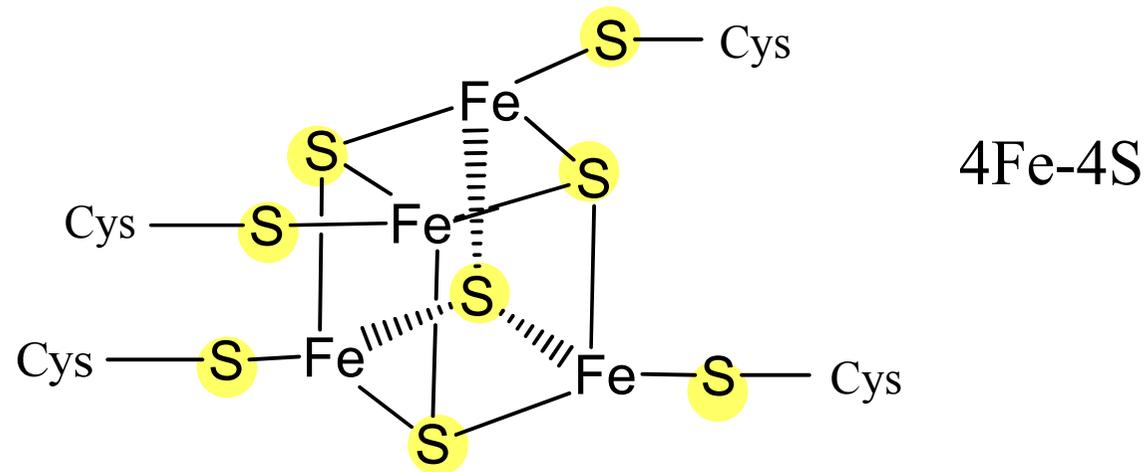
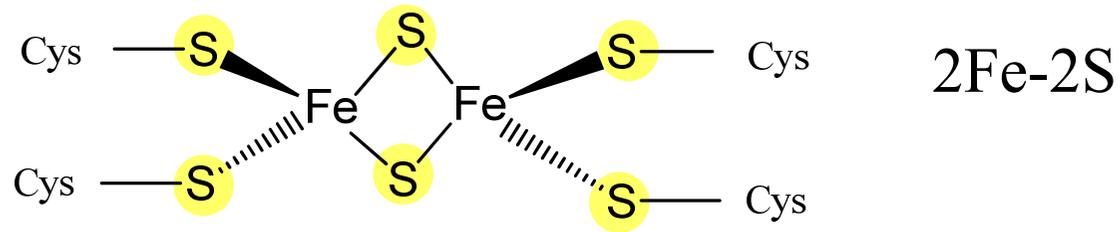
Composizione dei complessi della catena respiratoria

Complesso	Name	No. di Proteine	Gruppi prostetici
Complesso I	NADH Deidrogenasi	46	FMN, 7 centri Fe-S
Complesso II	Succinato-CoQ Reduttasi	5	FAD, cyt b₅₆₀, 3 centri Fe-S
Complesso III	CoQ-citocromo c Reduttasi	11	cyt b_H, cyt b_L, cyt c₁, Fe-S_{Rieske}
Complesso IV	Citocromo Ossidasi	13	cyt a, cyt a₃, Cu_A, Cu_B

Il complesso I o NADH deidrogenasi



I centri Ferro-Zolfo

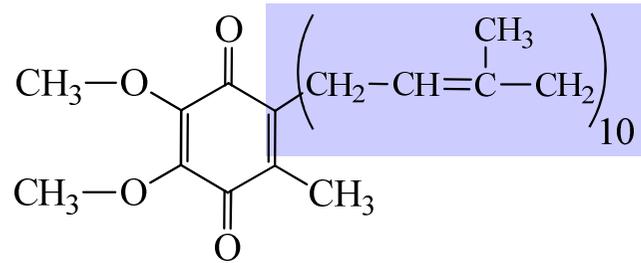


Accettano un solo elettrone per la stretta vicinanza degli atomi di ferro

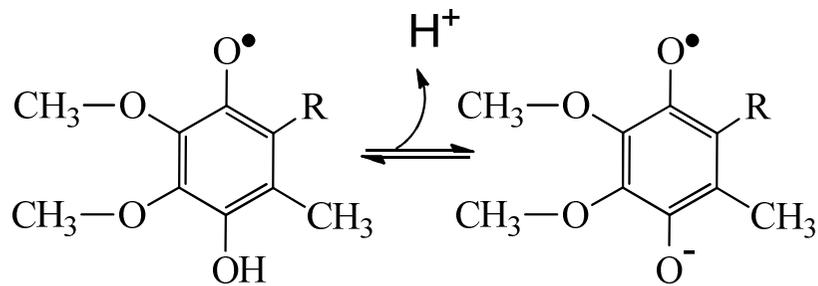
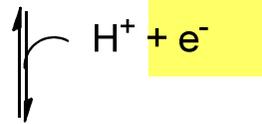
ad es., un centro 4-Fe può ciclare tra i seguenti stati redox:



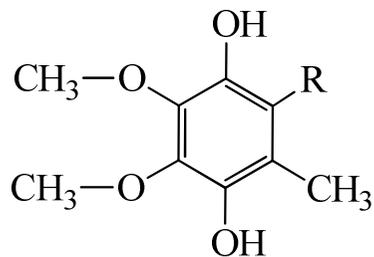
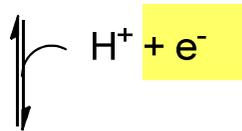
Ubichinone o coenzima Q (anche Q₁₀ o Q o CoQ)



Q chinone con una lunga catena isoprenica lipofila (90% con 10 unità nella maggior parte dei mammiferi, uomo incluso)

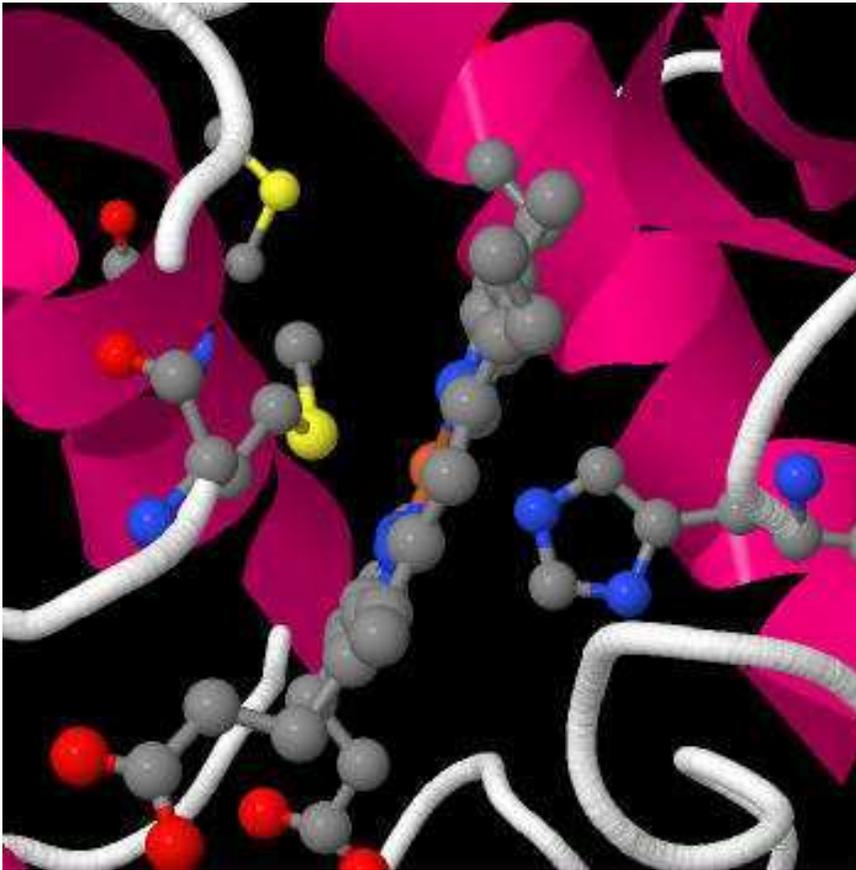


Q^{•-} semichinone, stabile



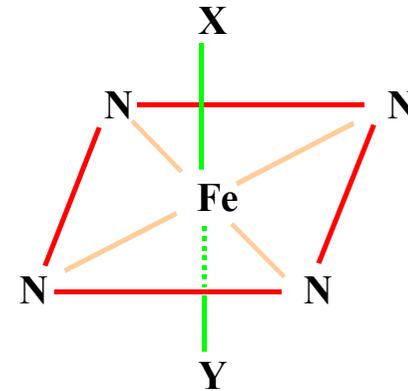
QH₂

I citocromi contengono un gruppo eme

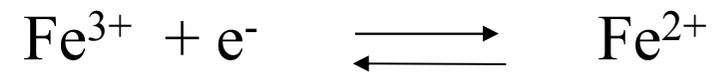


Metionina

Istidina



I ligandi assiali sono S o N;
Ogni ferro eme trasporta un e^-



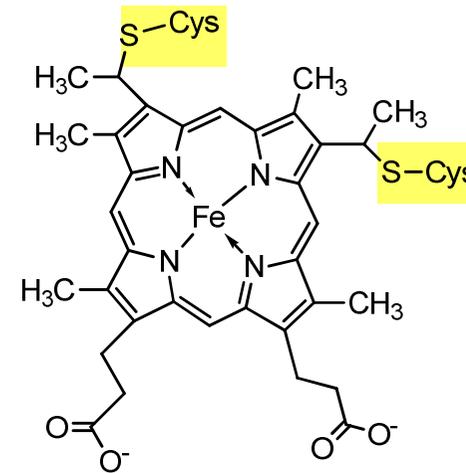
Citocromo

tipo *b*

protoporfirina IX (come mioglobina)

tipo *c*

i gruppi vinilici sono legati con ponti tioetere alla proteina

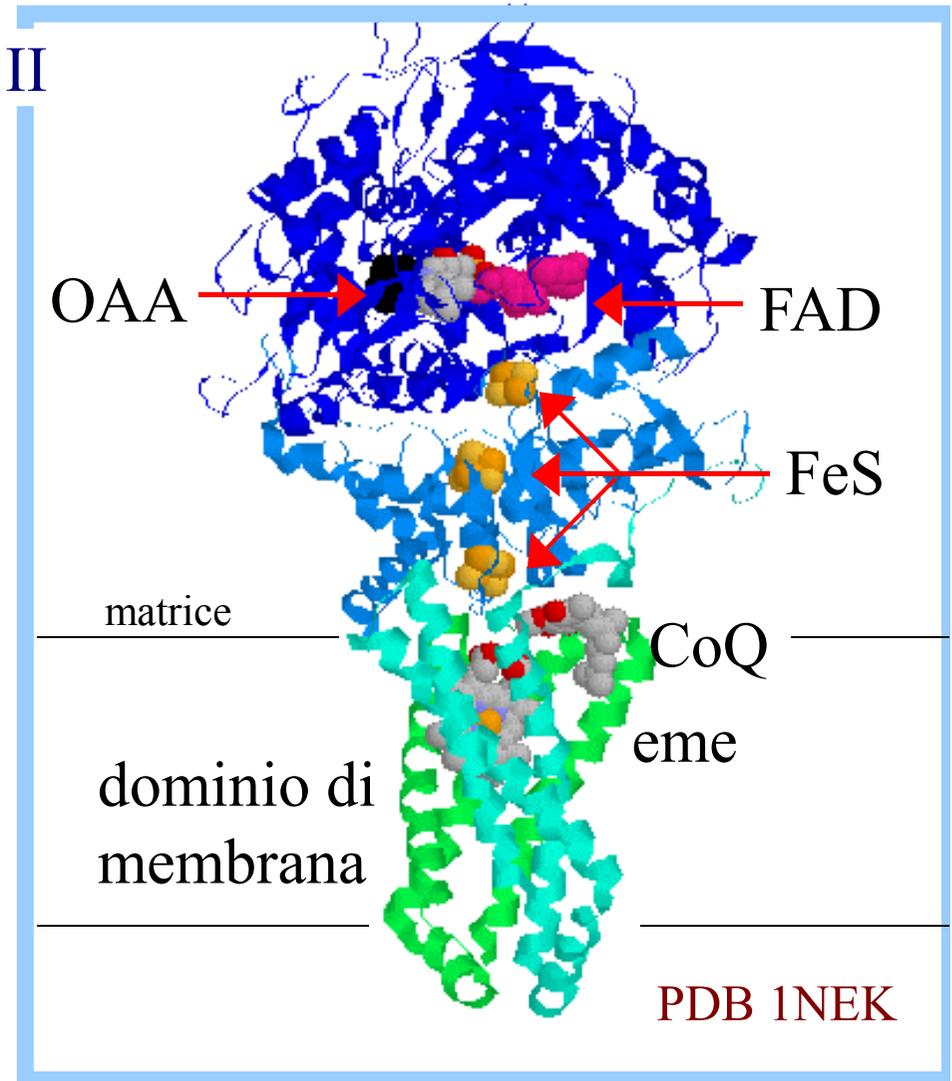


tipo *a*

è presente una lunga catena isoprenoide legata all'eme

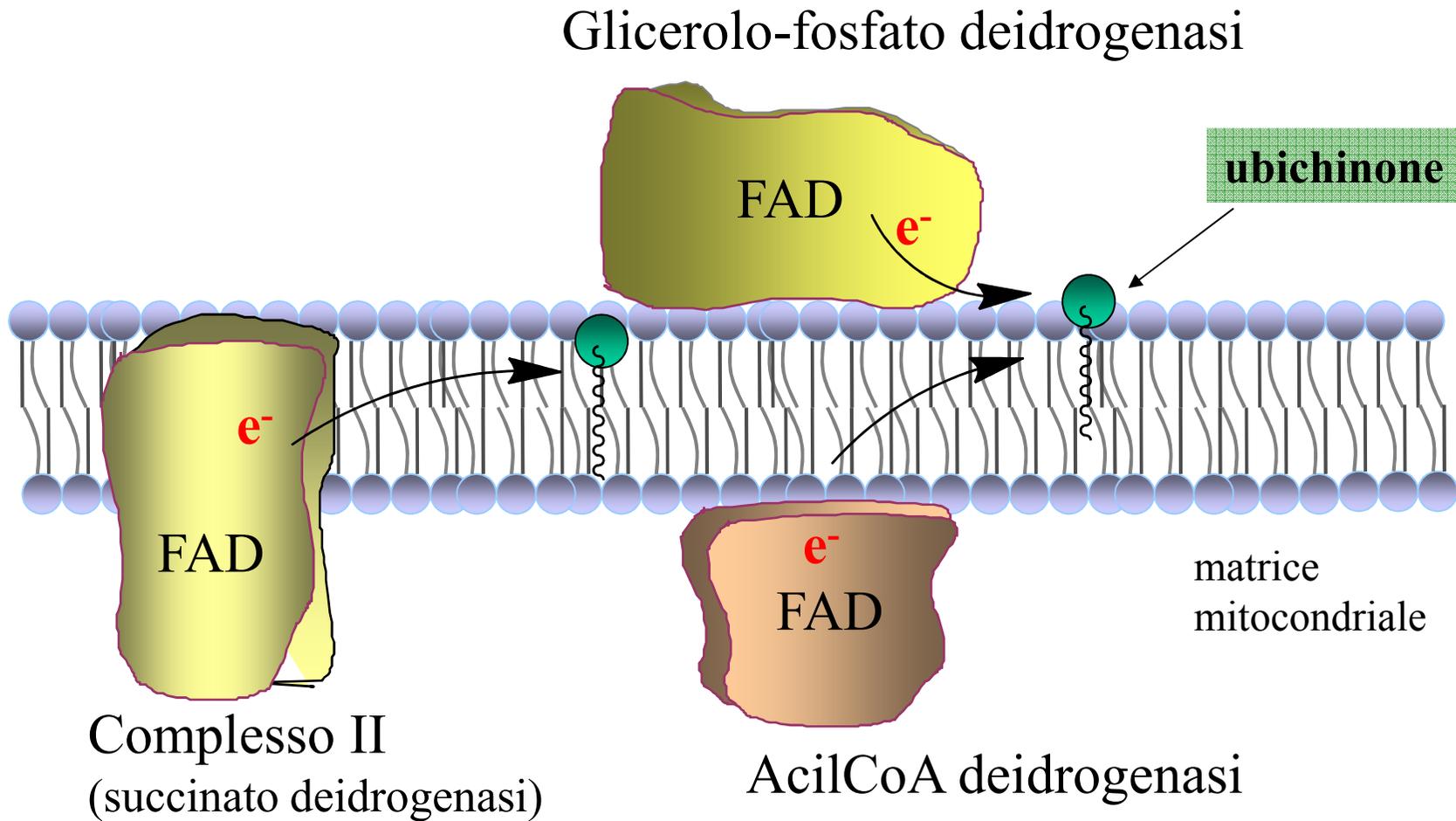
Complesso II

L'analisi strutturale del complesso II di *E. coli* indica una disposizione **lineare** dei trasportatori di elettroni entro il complesso, coerente con la sequenza di trasporto presupposta:

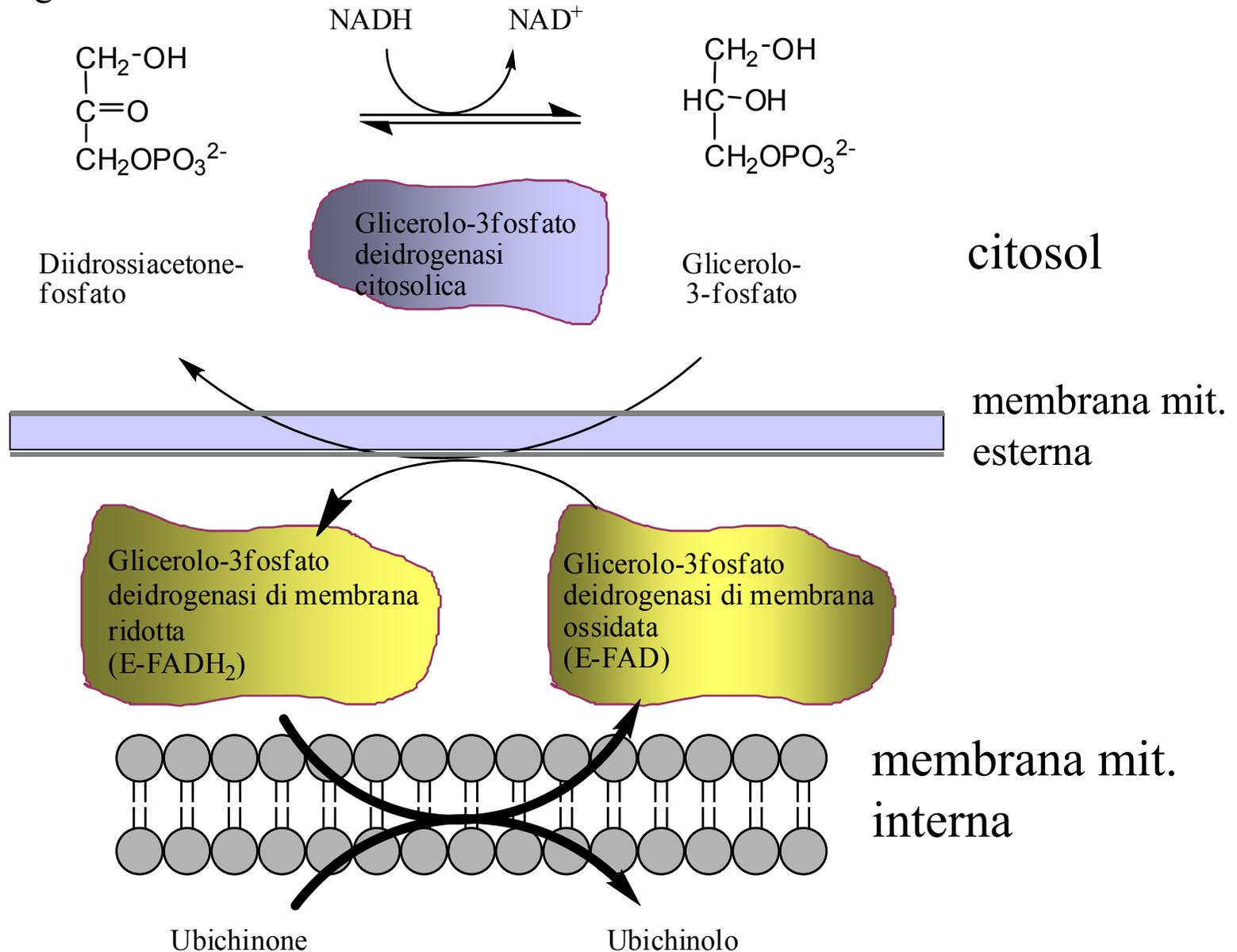


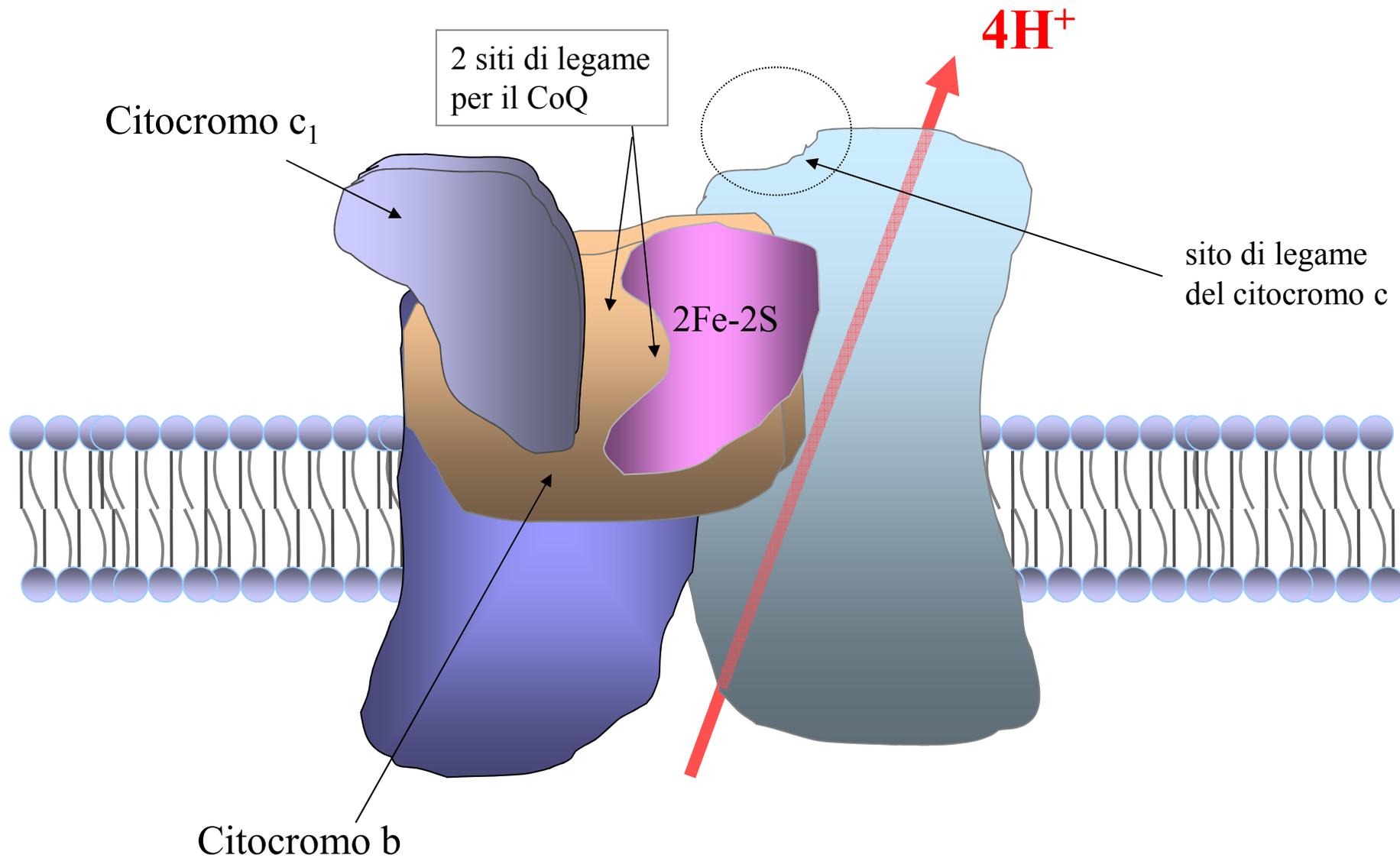
In questa struttura l'ossalacetato (OAA) si trova legato al posto del succinato.

Le flavoproteine ridotte scaricano gli elettroni sull'ubichinone



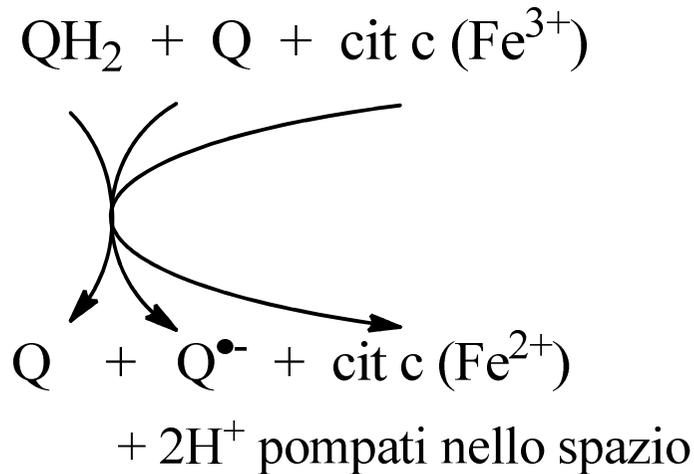
Sistema navetta per la riossidazione del NADH citosolico: avviene quando il piruvato entra nei mitocondri e quindi non può essere ridotto dal NADH tramite la lattato deidrogenasi



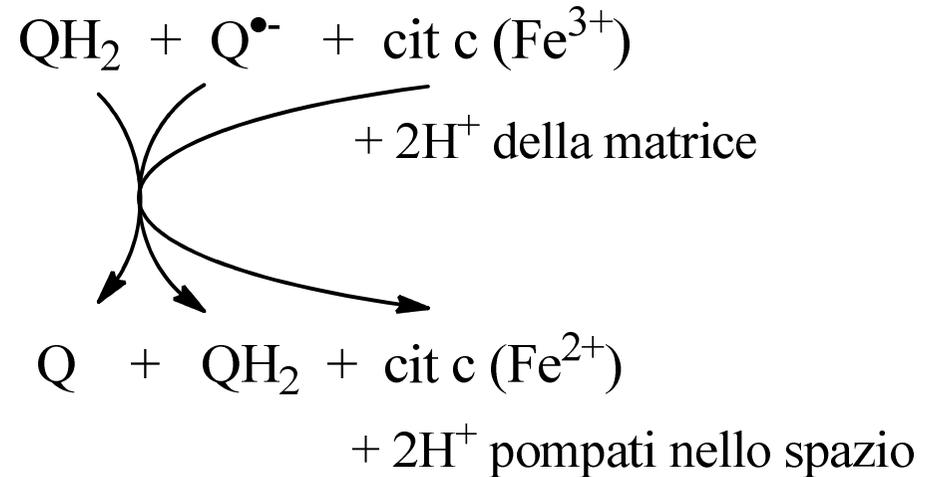


Il complesso III

Trasferimento di elettroni dal CoQ al citocromo c via complesso III

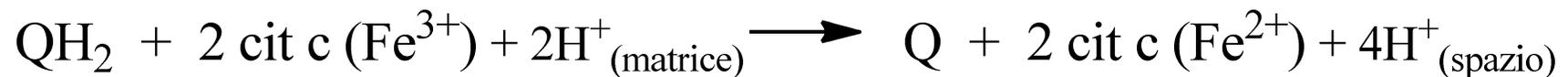


dei 2 elettroni presenti sull'ubichinolo
 1 va su una molecola di ubichinone che
 diventa semichinone, 1 va su un
 citocromo c

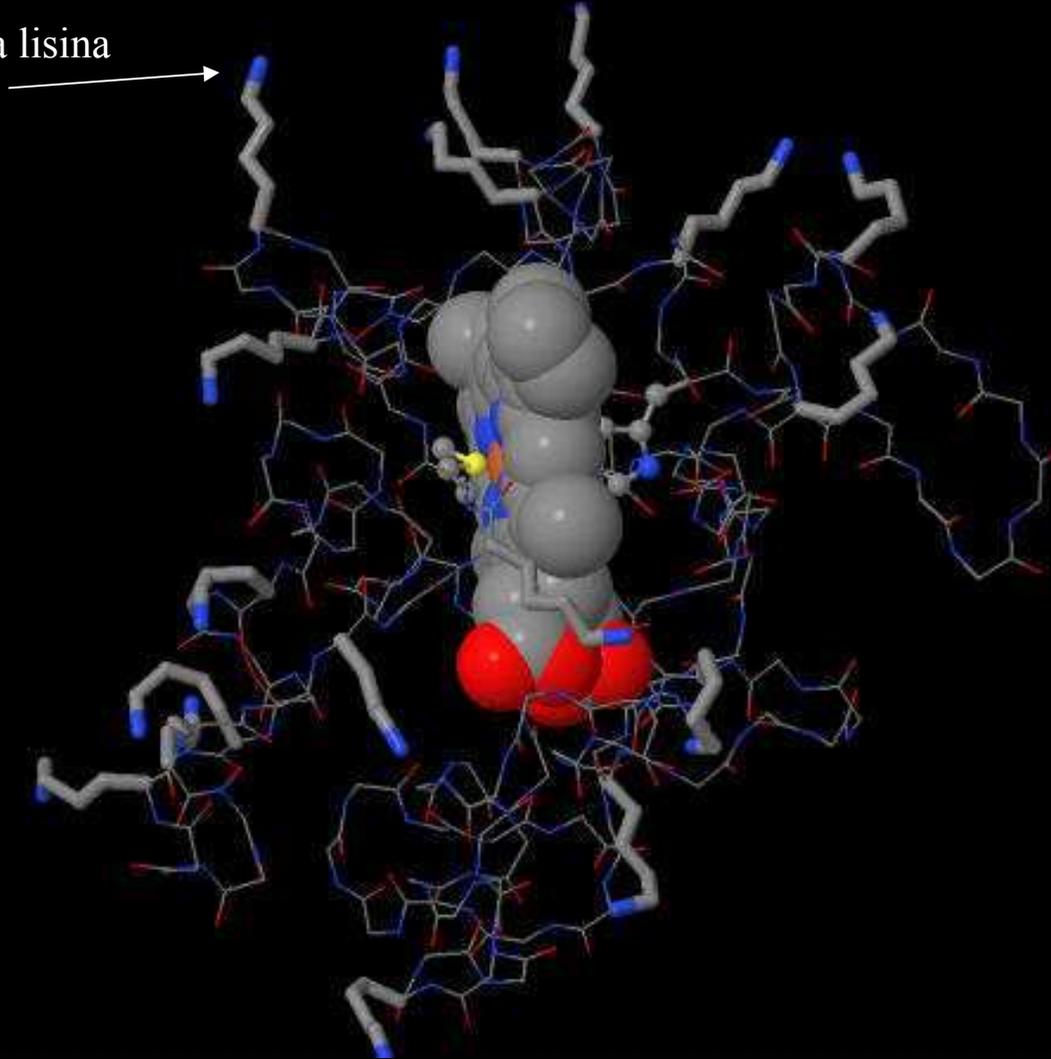


dei 2 elettroni presenti su una seconda
 molecola di ubichinolo, 1 va su una
 molecola di semichinone che
 diventa ubichinolo, 1 va su una seconda
 molecola di citocromo c

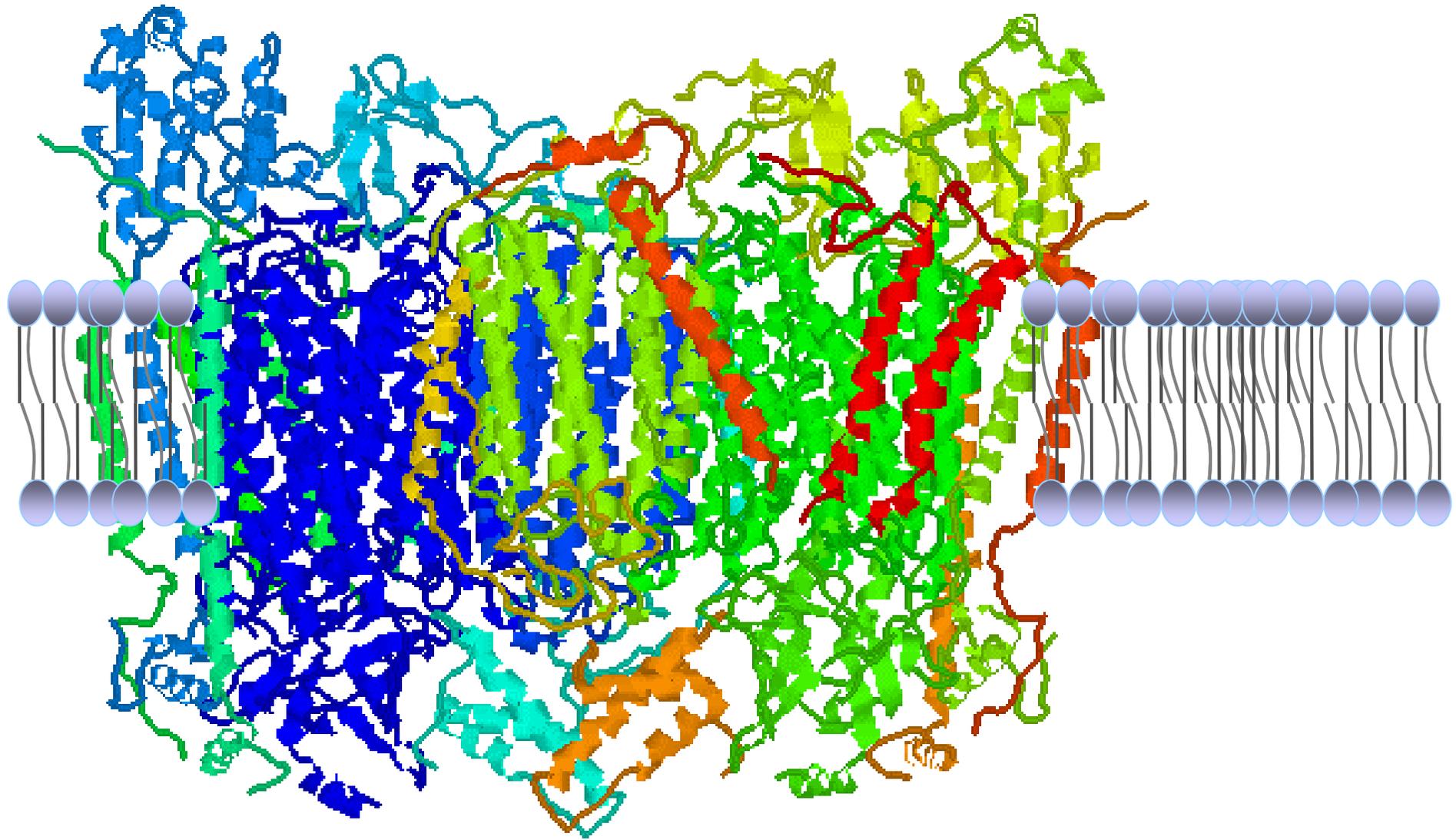
equazione netta



NH₂ della lisina

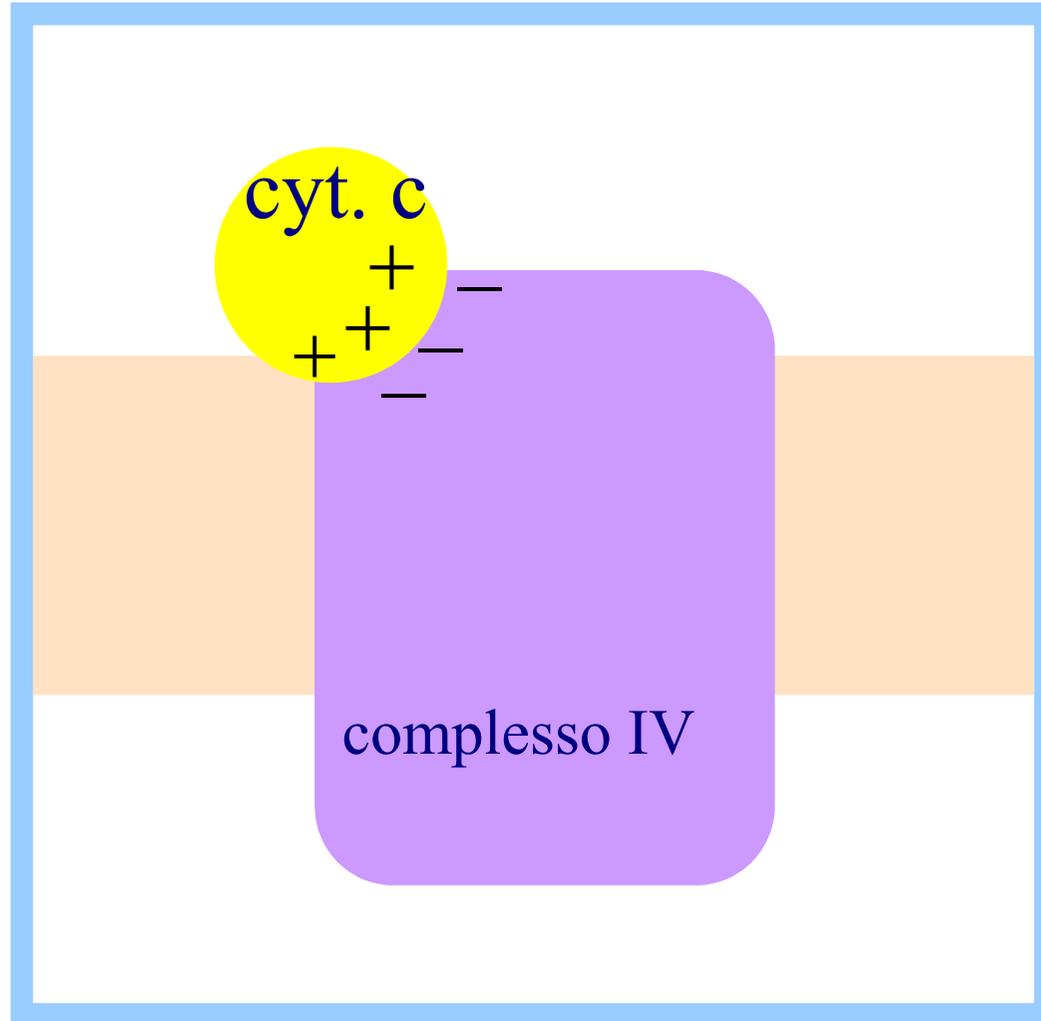


Il citocromo c, piccola proteina estrinseca di 104 aminoacidi.
La superficie del citocromo c espone numerosi residui basici di lisina per interagire con il sito di legame presente sul complesso IV

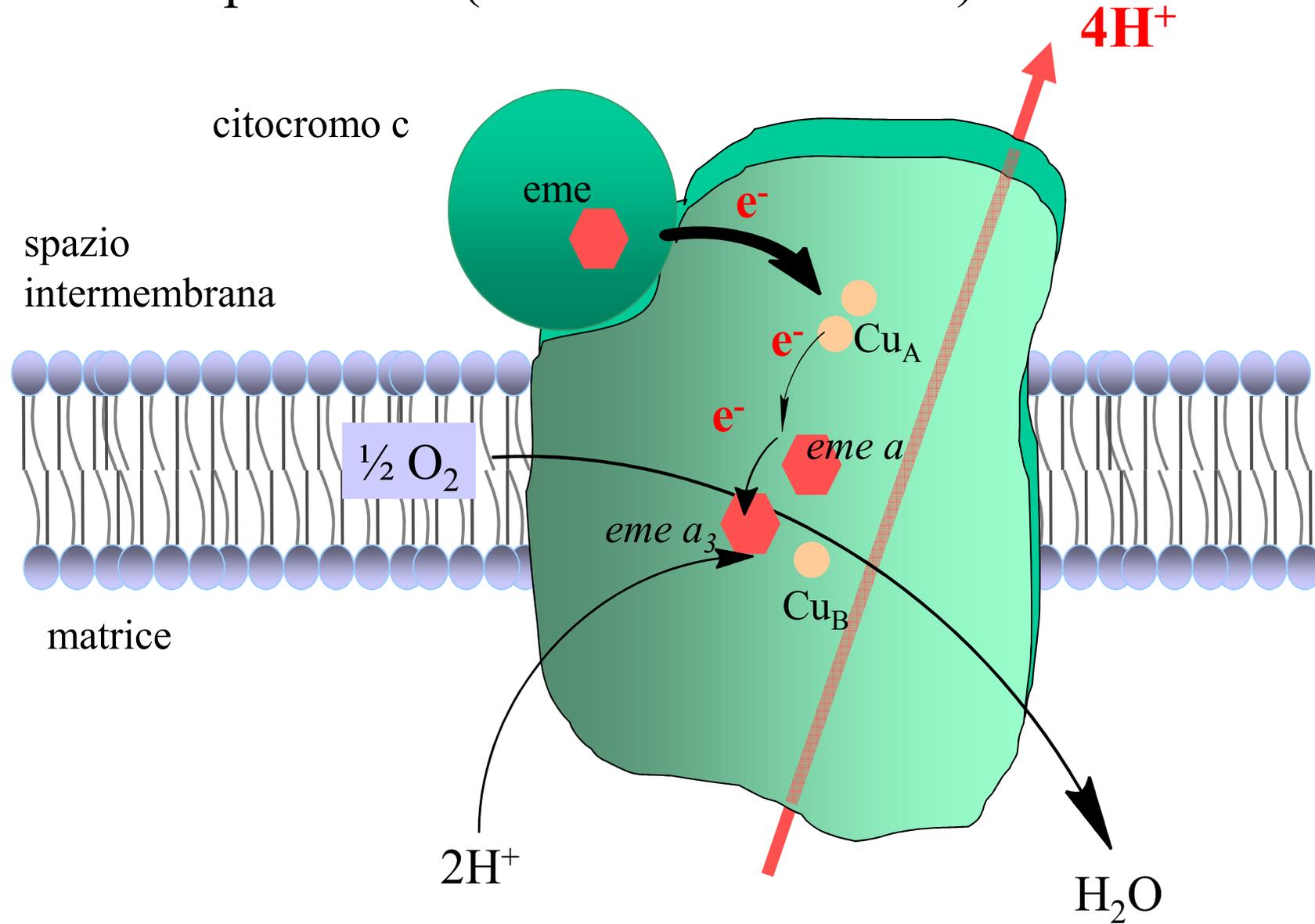


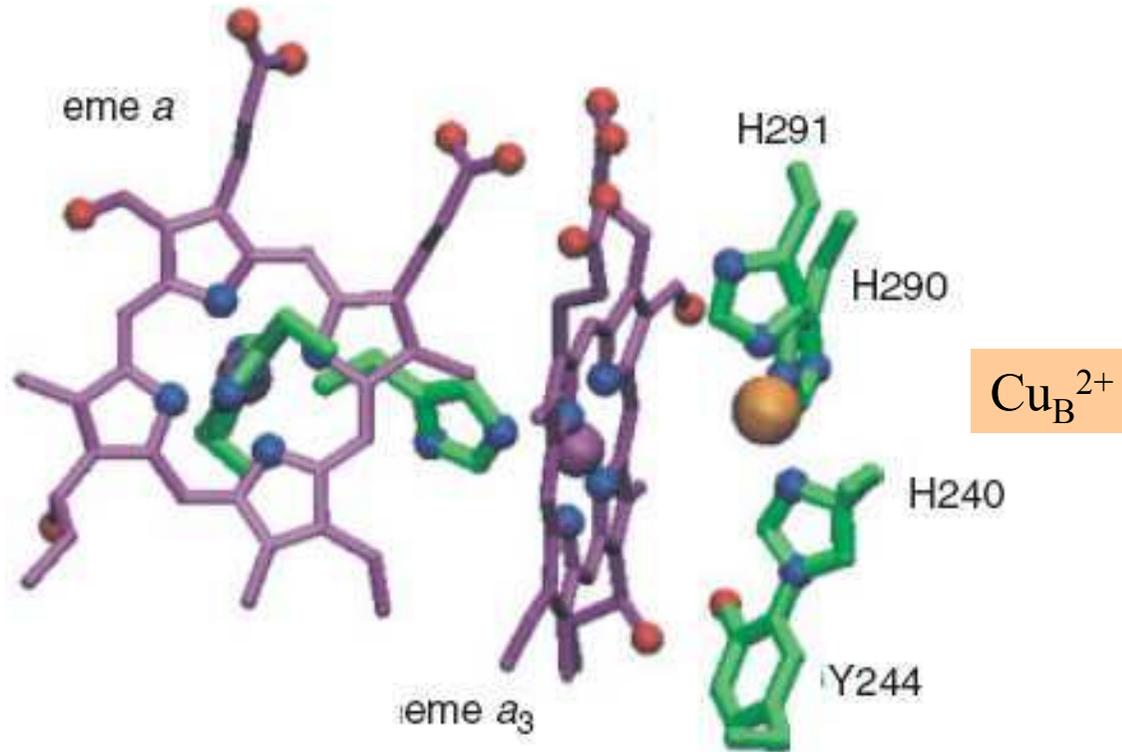
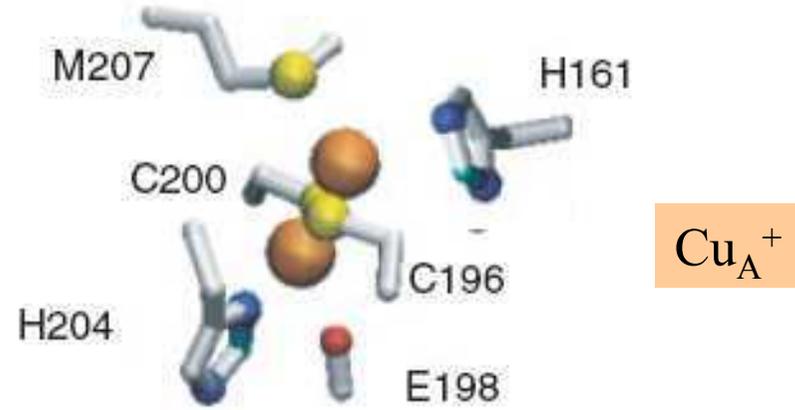
Complesso IV citocromo ossidasi, costituito principalmente da
alfa-eliche di transmembrana

(PDB file 1OCC)

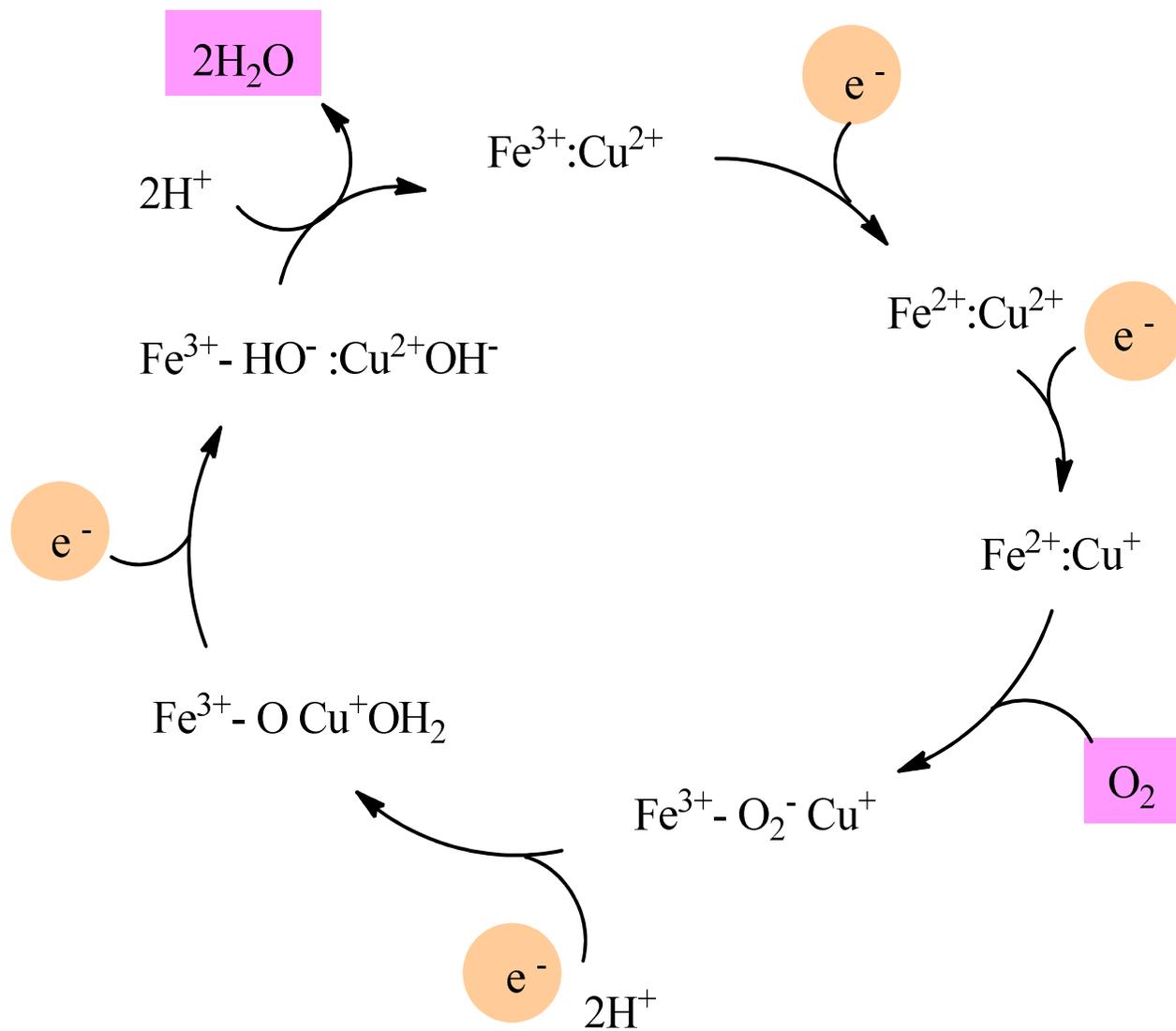


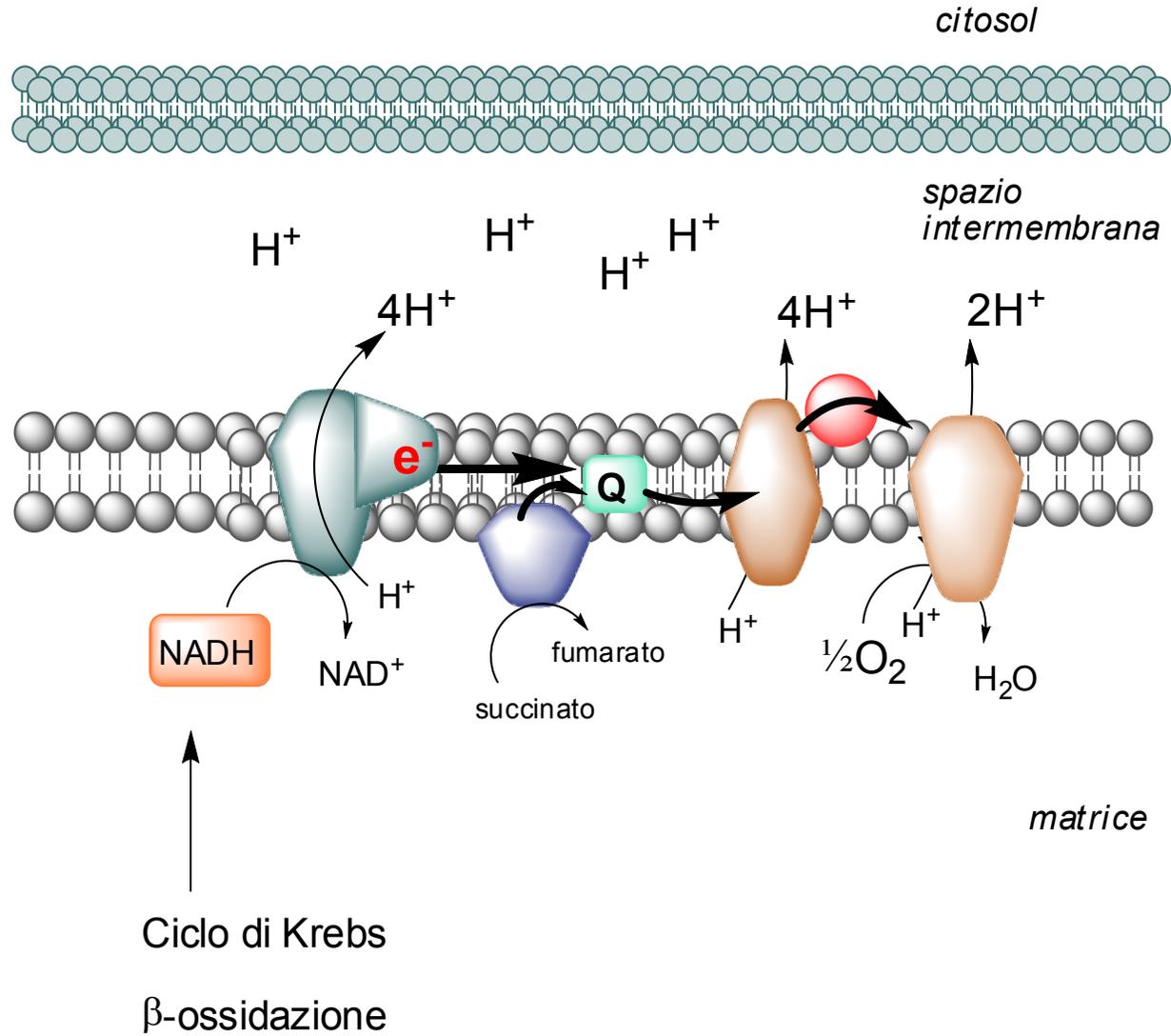
Il complesso IV (citocromo c ossidasi)





Ciclo di ossidoriduzioni a livello del ferro eme a_3 e Cu_B

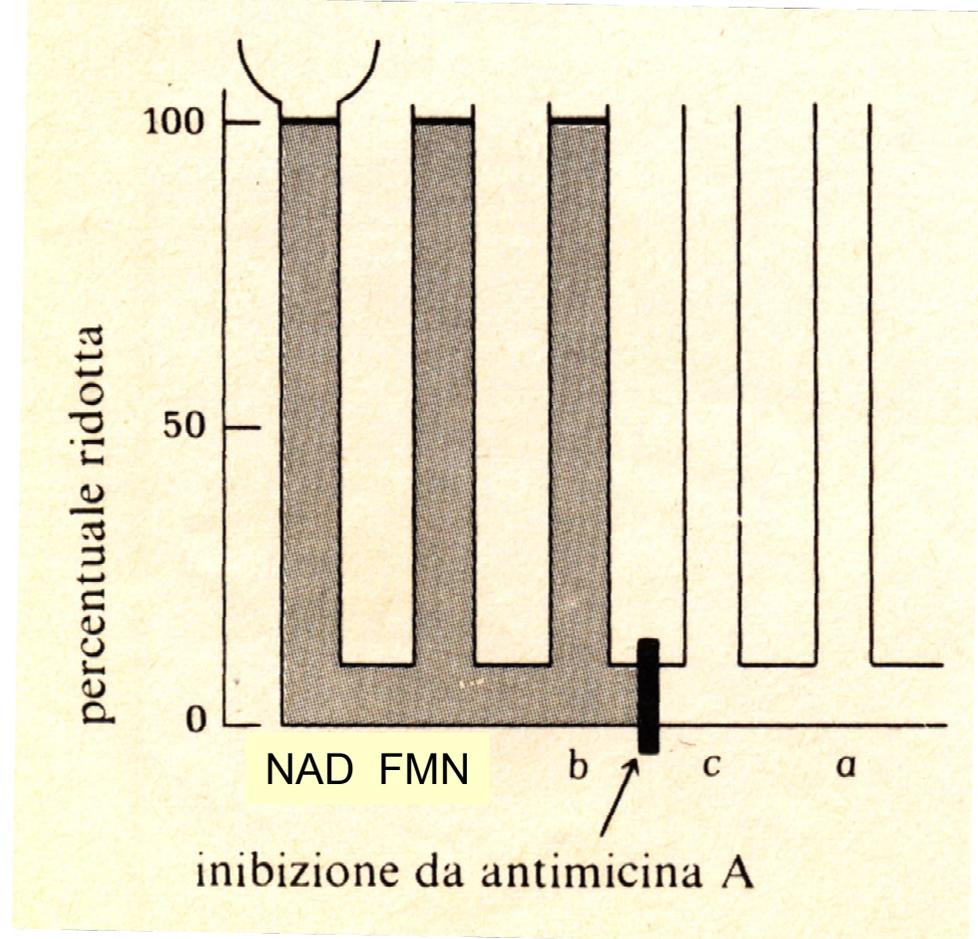
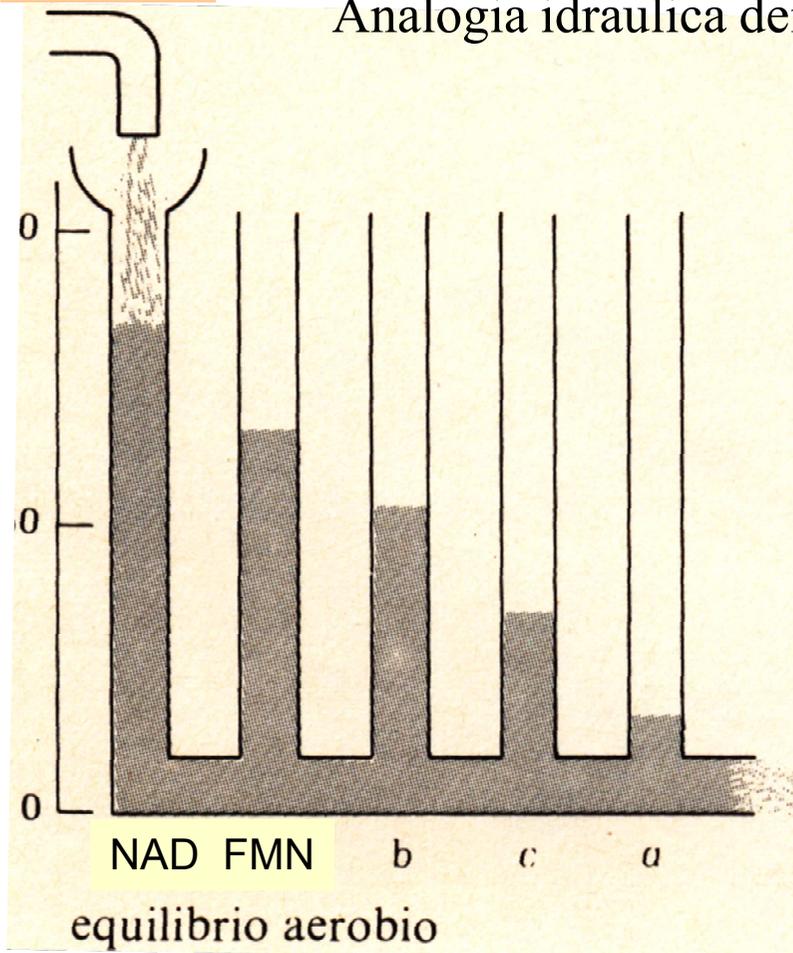


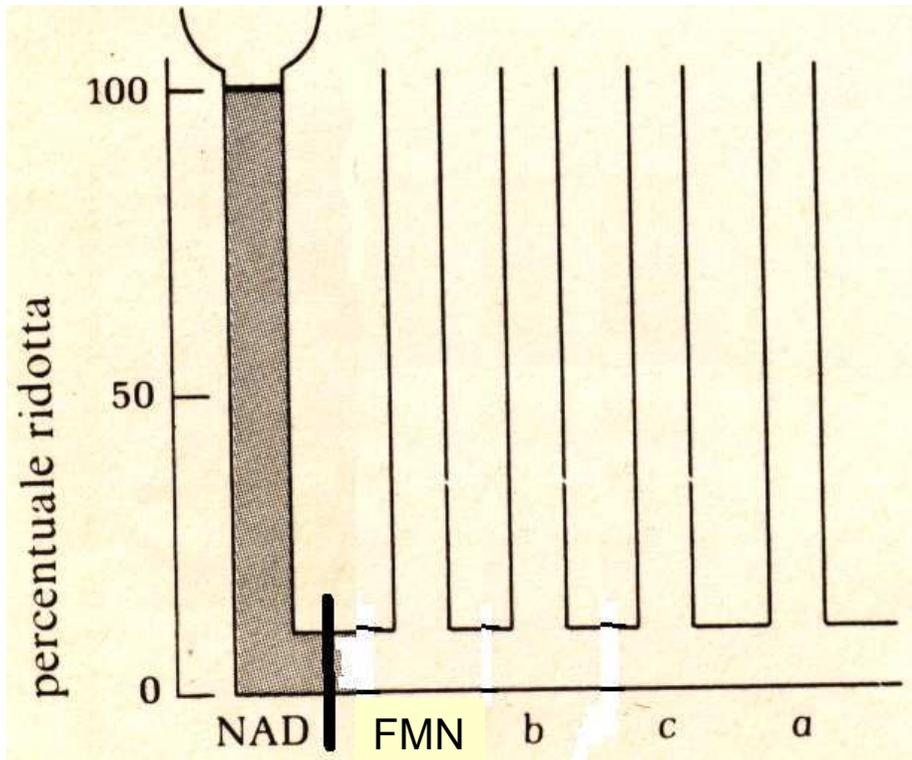


elettroni

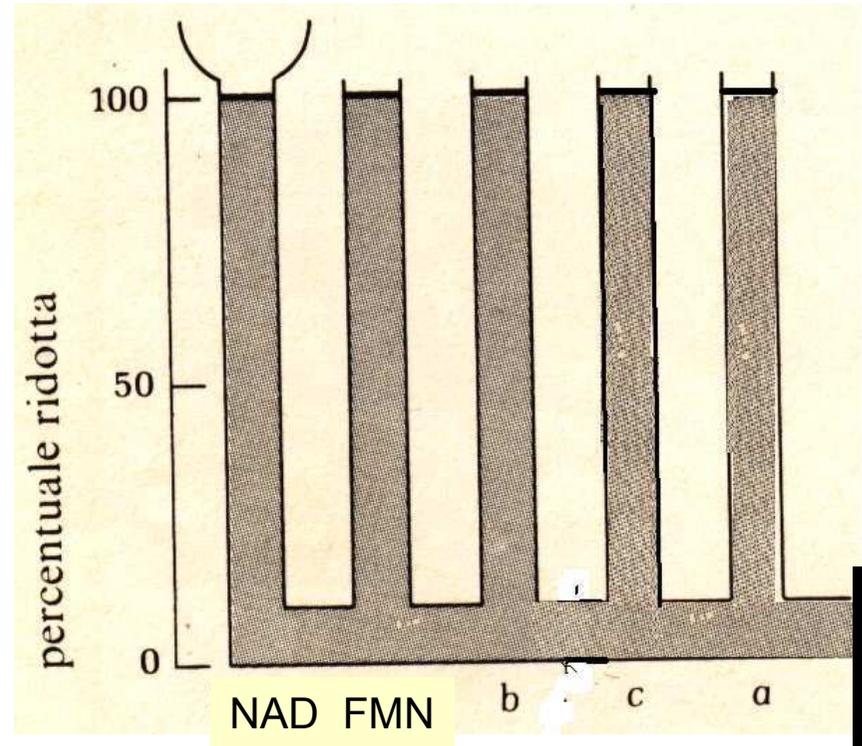
Dimostrazione che la sequenza dei trasportatori è quella stabilita dai potenziali redox: studi con inibitori.

Analogia idraulica dei risultati ottenuti





inibizione da
rotenone

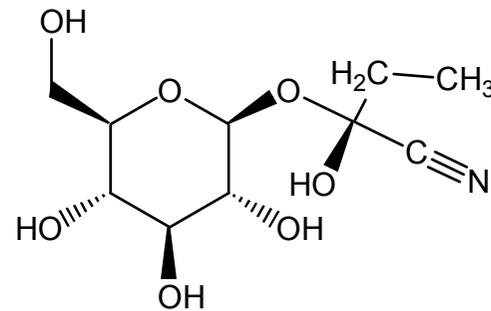


inibizione da
cianuro

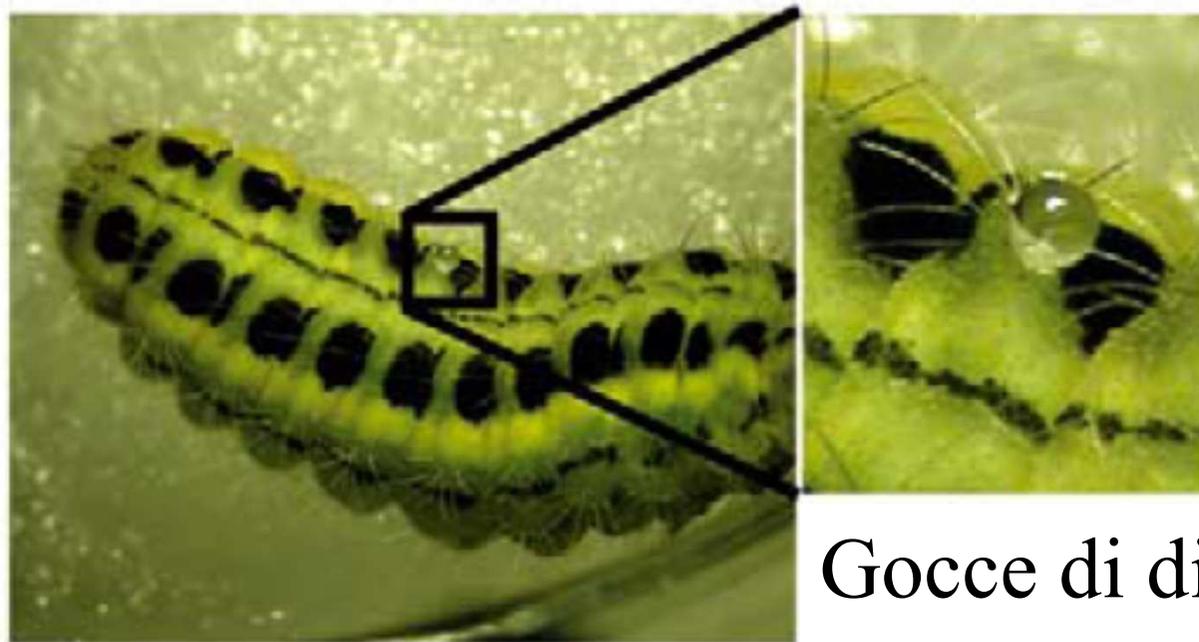
Il cianuro e i glicosidi cianogenici



Le zigene accumulano e/o producono sostanze cianogeniche

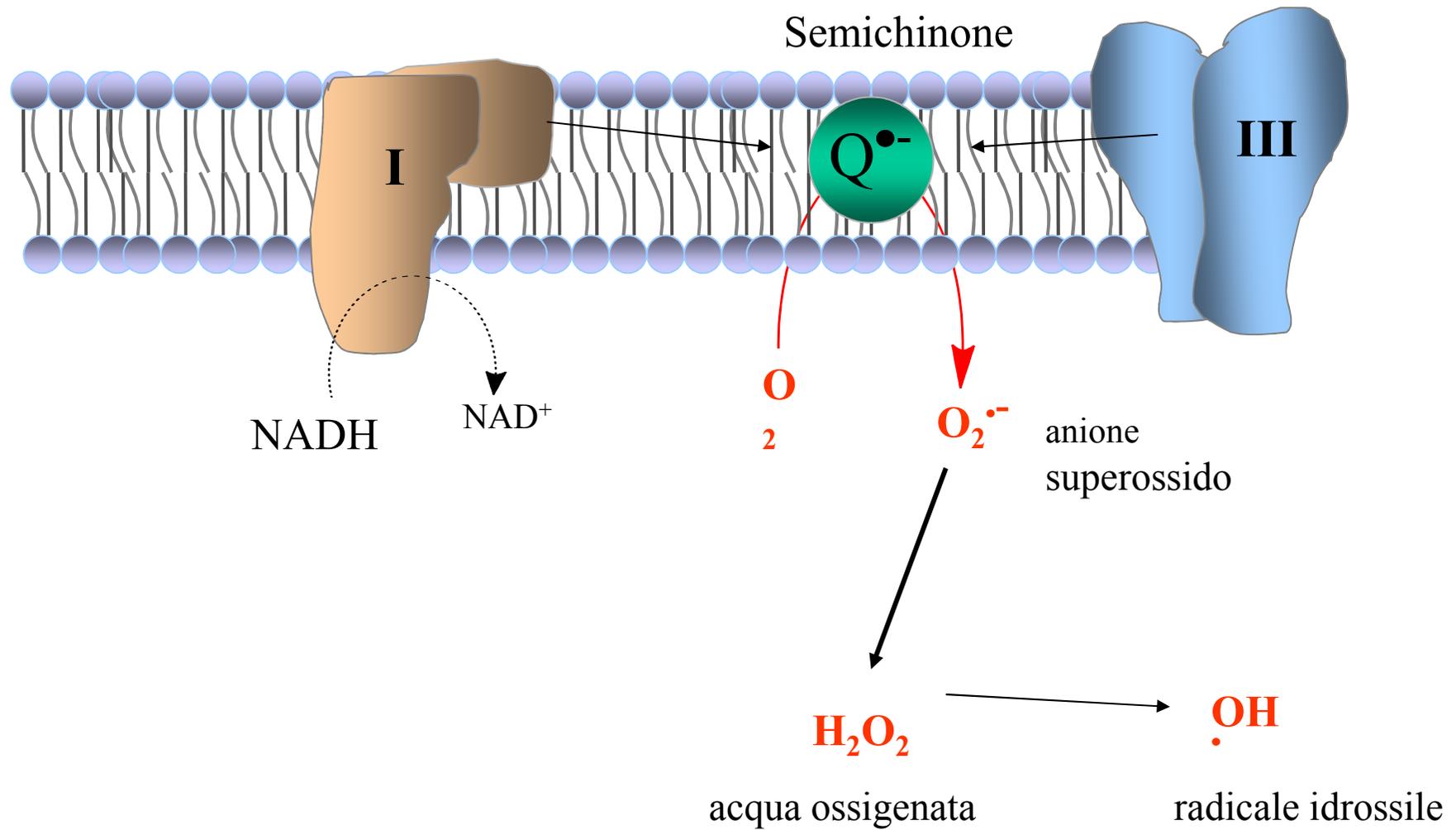


Iotaustralina

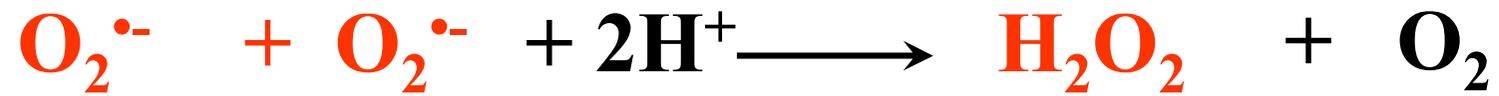


Gocce di difesa

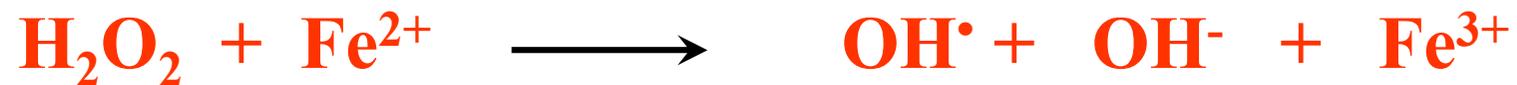
La catena di trasporto può perdere elettroni ed essere fonte di **stress ossidativo**



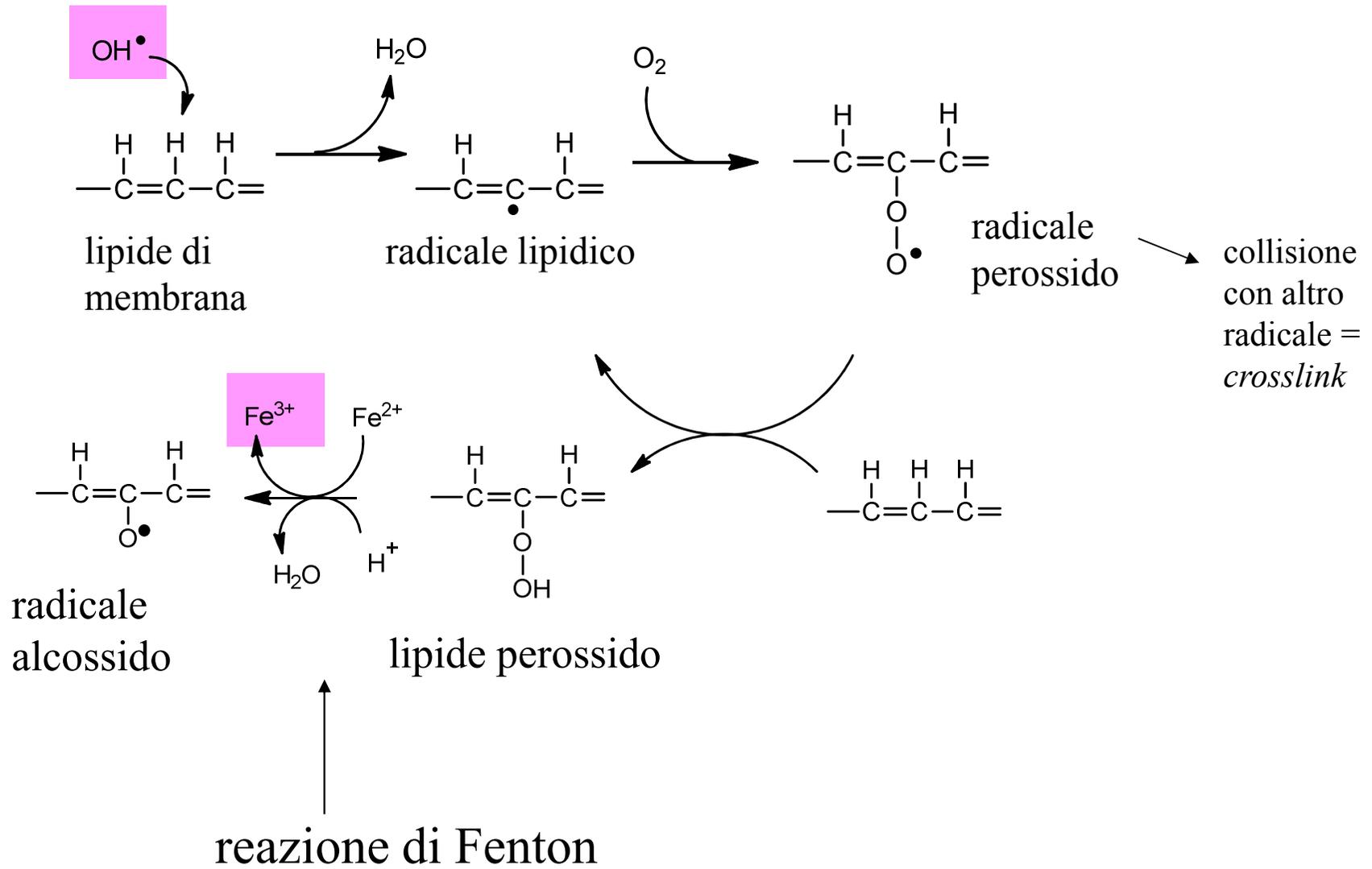
Superossido dismutasi

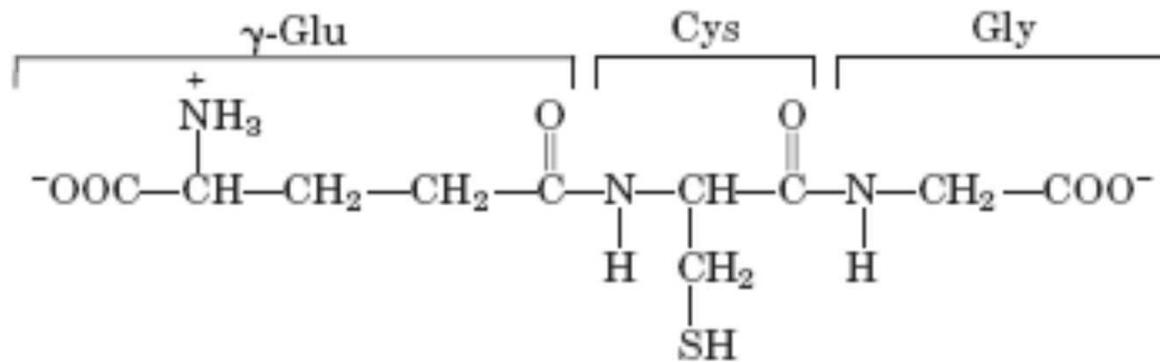


Reazione di Fenton

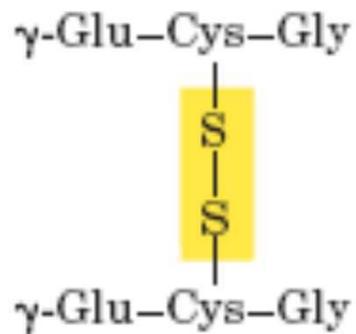


radicale
ossidrile !



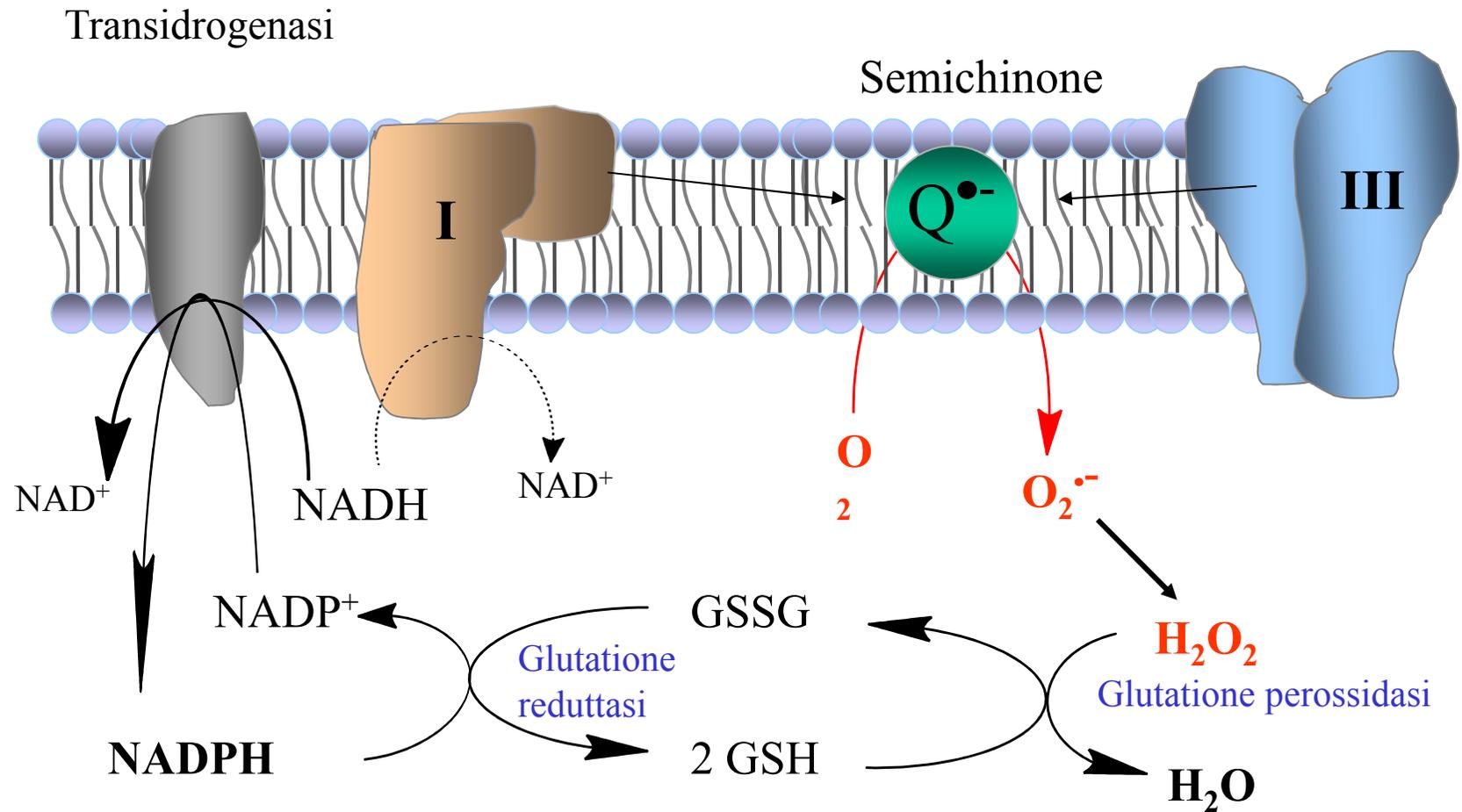


Glutathione ridotto
(GSH)

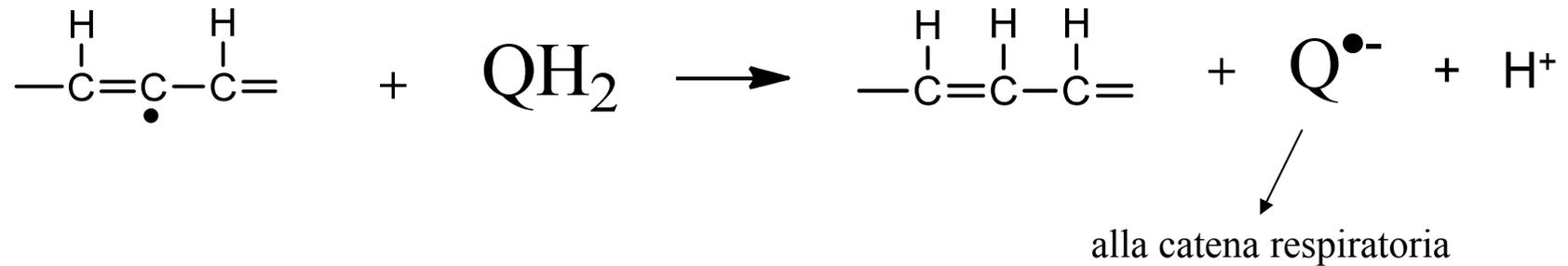


Glutathione ossidato
(GSSG)

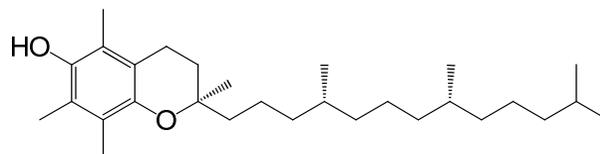
La catena di trasporto può perdere elettroni ed essere fonte di **stress ossidativo**



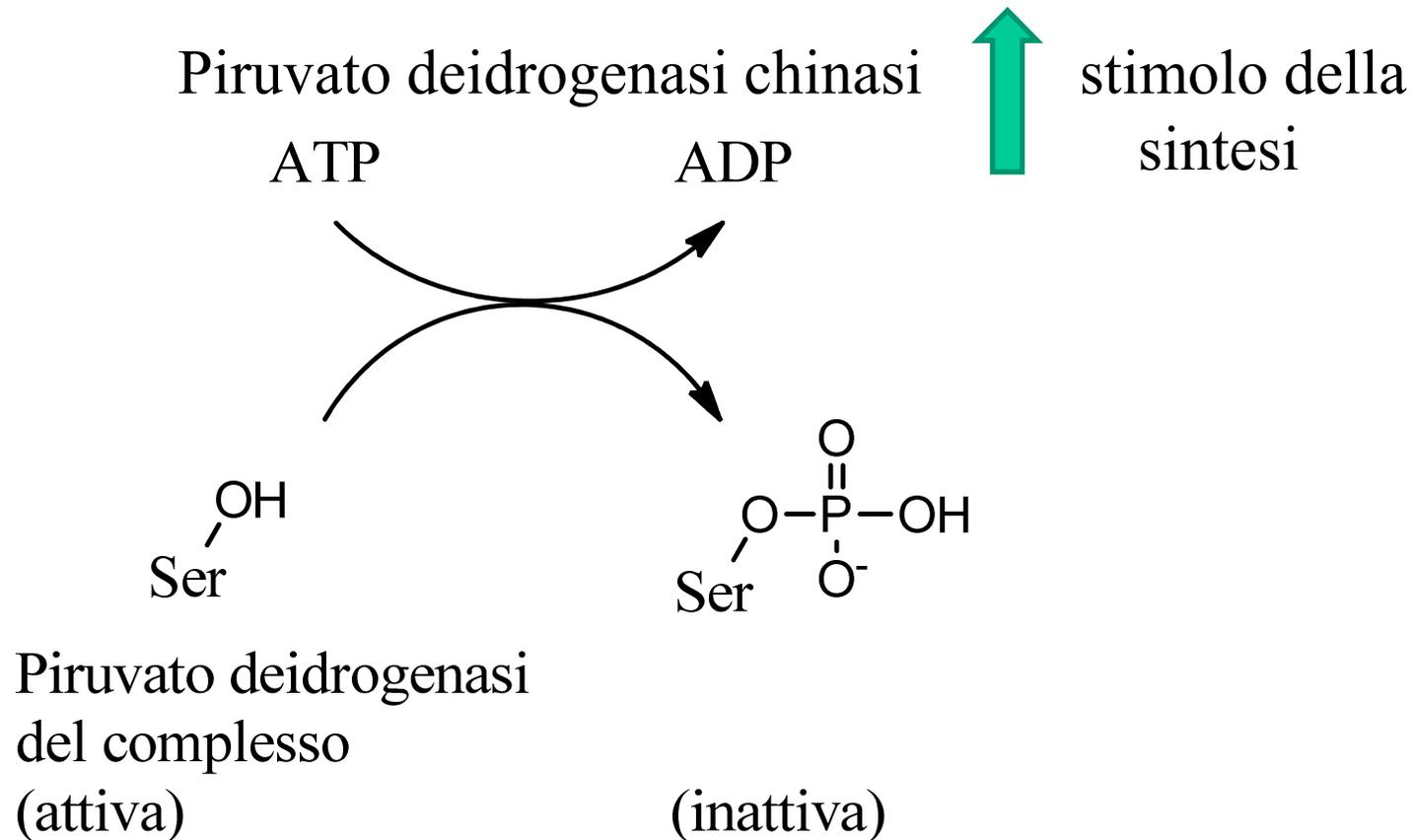
Scavenger (spazzini) di radicali liberi



- L'80% del CoQ (Q) si trova nei mitocondri, il resto su apparato di Golgi, reticolo e lisosomi
- un terzo del CoQ è legato alle proteine (per servire come antiossidante)
- i mammiferi che vivono di più hanno una maggior quota di CoQ associata ai mitocondri
- il cuore l'organo che ne contiene di più (110 µg/g), i polmoni il minore (7 µg/g)
- altri agenti efficaci sono la vitamina E (tocoferolo) e la vitamina K

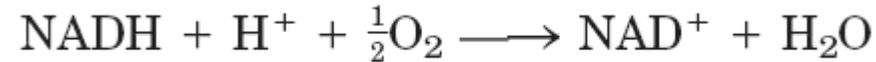


Regolazione da parte dell'HIF in ipossia



Effetto: rallentamento del ciclo di Krebs con minor produzione di coenzimi ridotti e quindi minor carico di elettroni sulla catena

Trasporto di elettroni: energetica



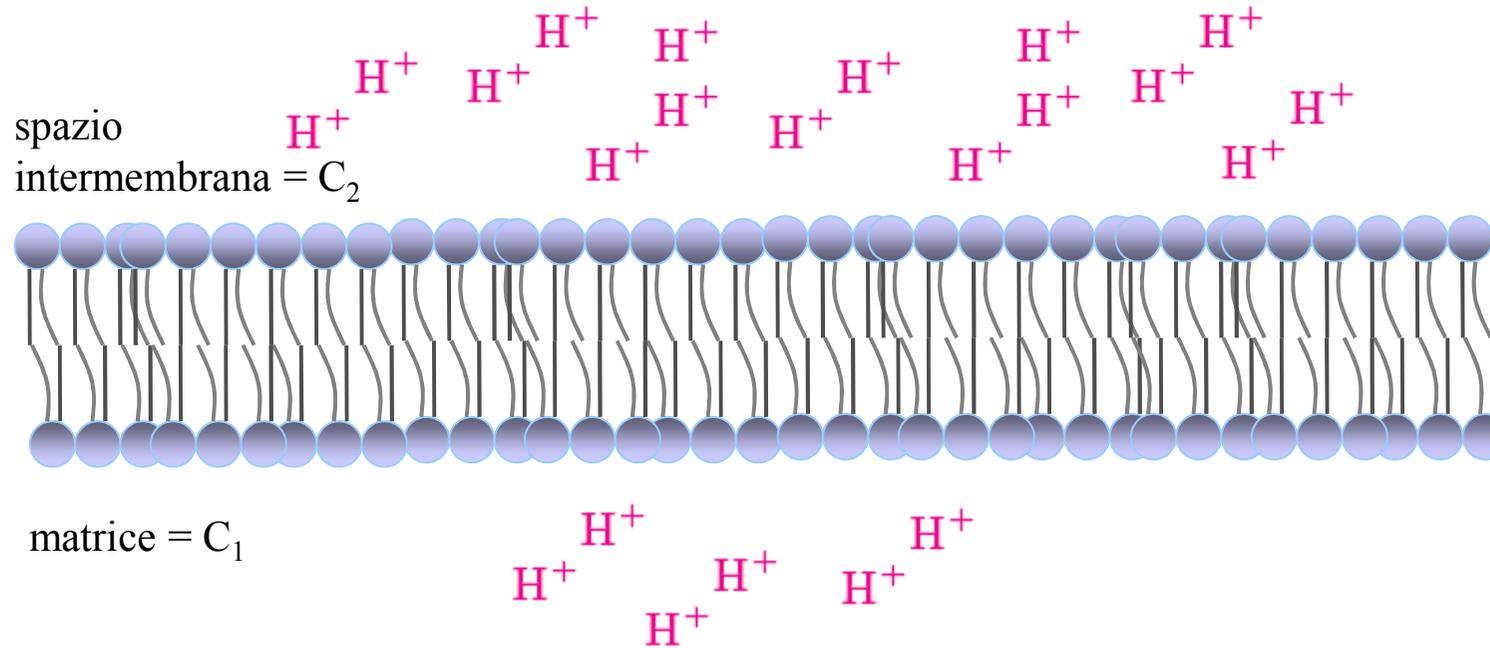
Il potenziale $E^{\circ'}$ della coppia $\text{NAD}^+/\text{NADH} = -0.32\text{V}$

Il potenziale $E^{\circ'}$ della coppia $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = 0.82\text{V}$

Il $\Delta E^{\circ'} = 0.82 - (-0.32) = 1.14\text{V}$

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -nF\Delta E^{\circ'} \\ &= -2(96.5 \text{ kJ/V} \cdot \text{mol})(1.14 \text{ V}) \\ &= -220 \text{ kJ/mol (of NADH)}\end{aligned}$$

L'energia del gradiente protonico

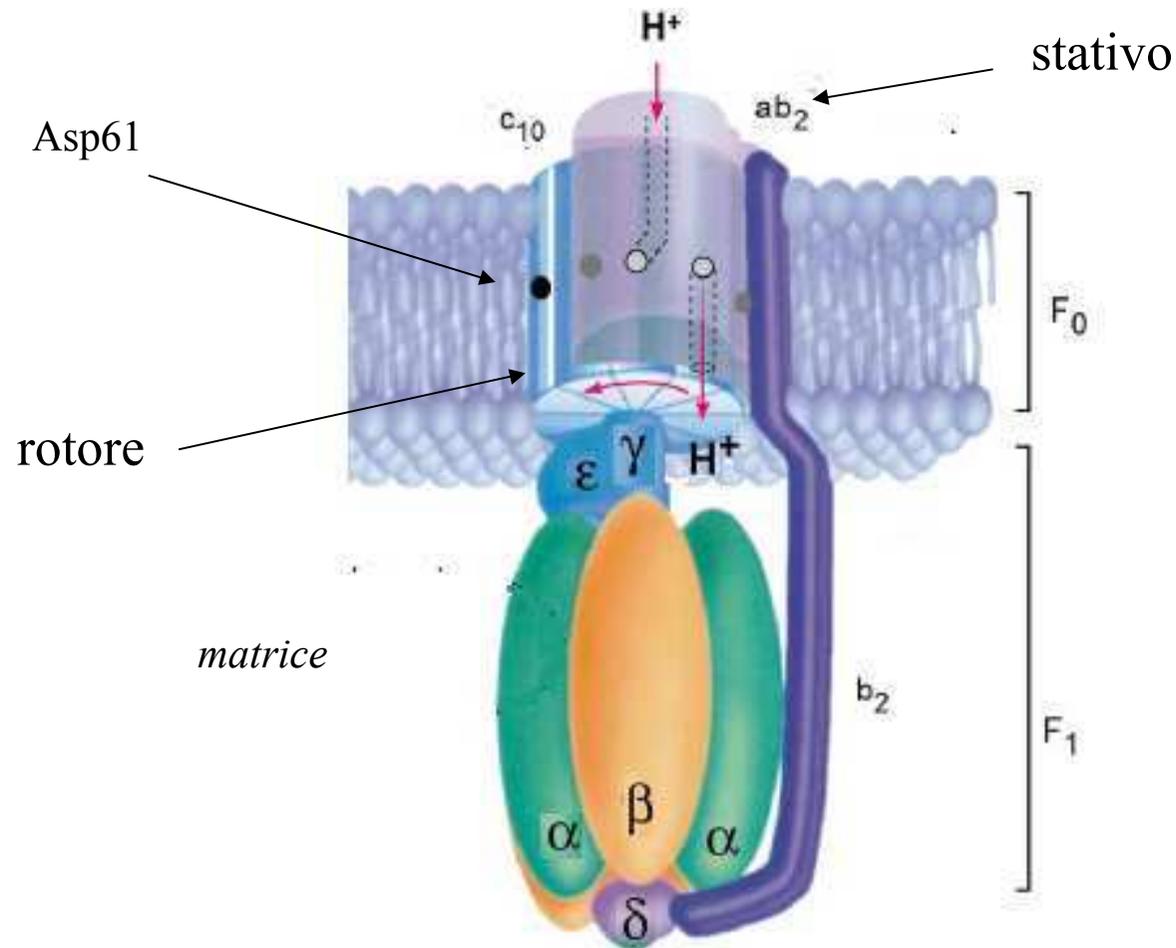


$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F} \Delta\psi = 2.3RT \Delta\text{pH} + \mathcal{F} \Delta\psi$$

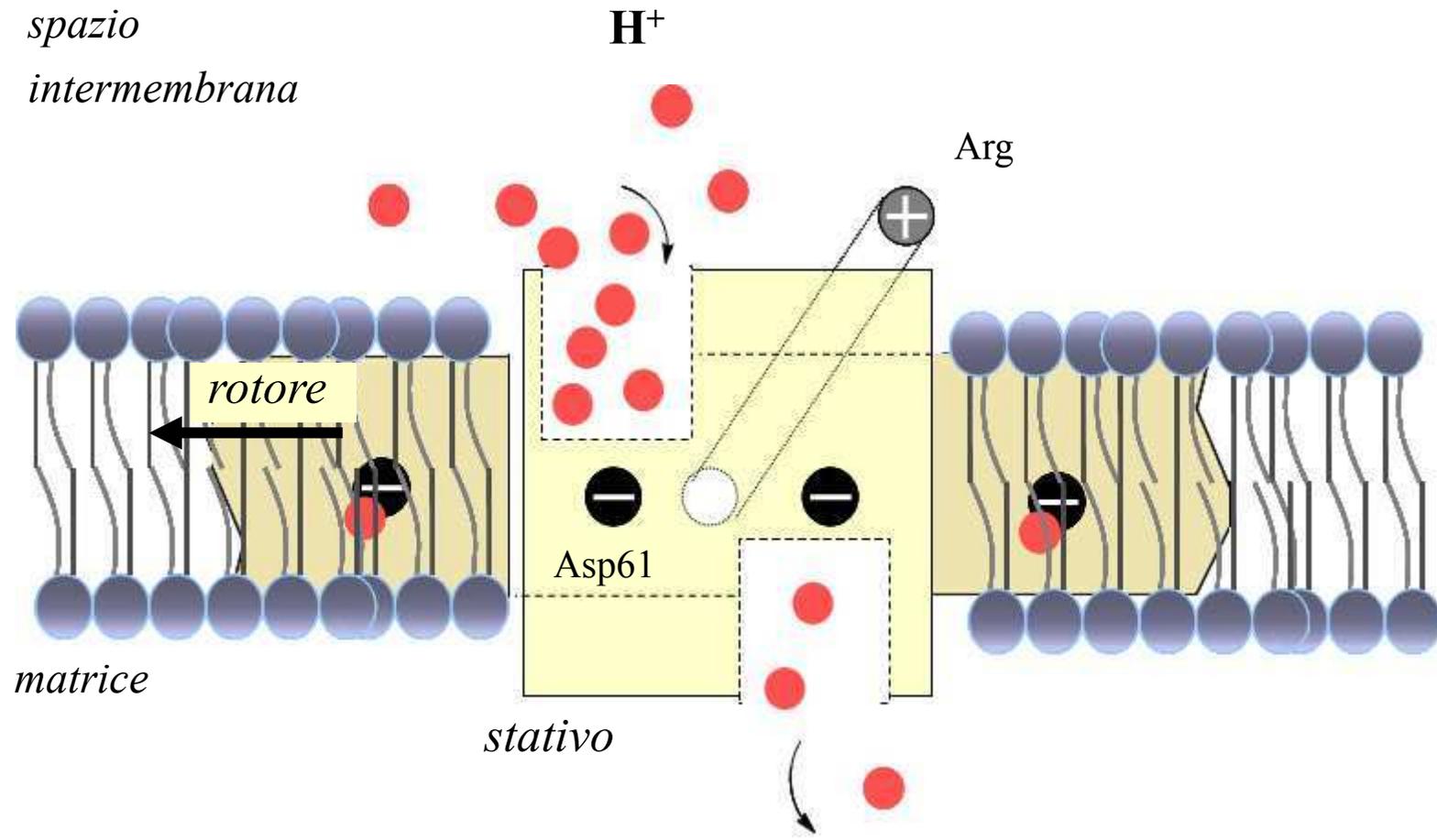
In mitocondri attivi $\Delta\text{pH} = 0.75$; $\Delta\psi = 0.17$ V, pertanto $\Delta G \cong 20$ kJ/mol H^+

Se vengono pompate 10 H^+ si conservano 200 kJ

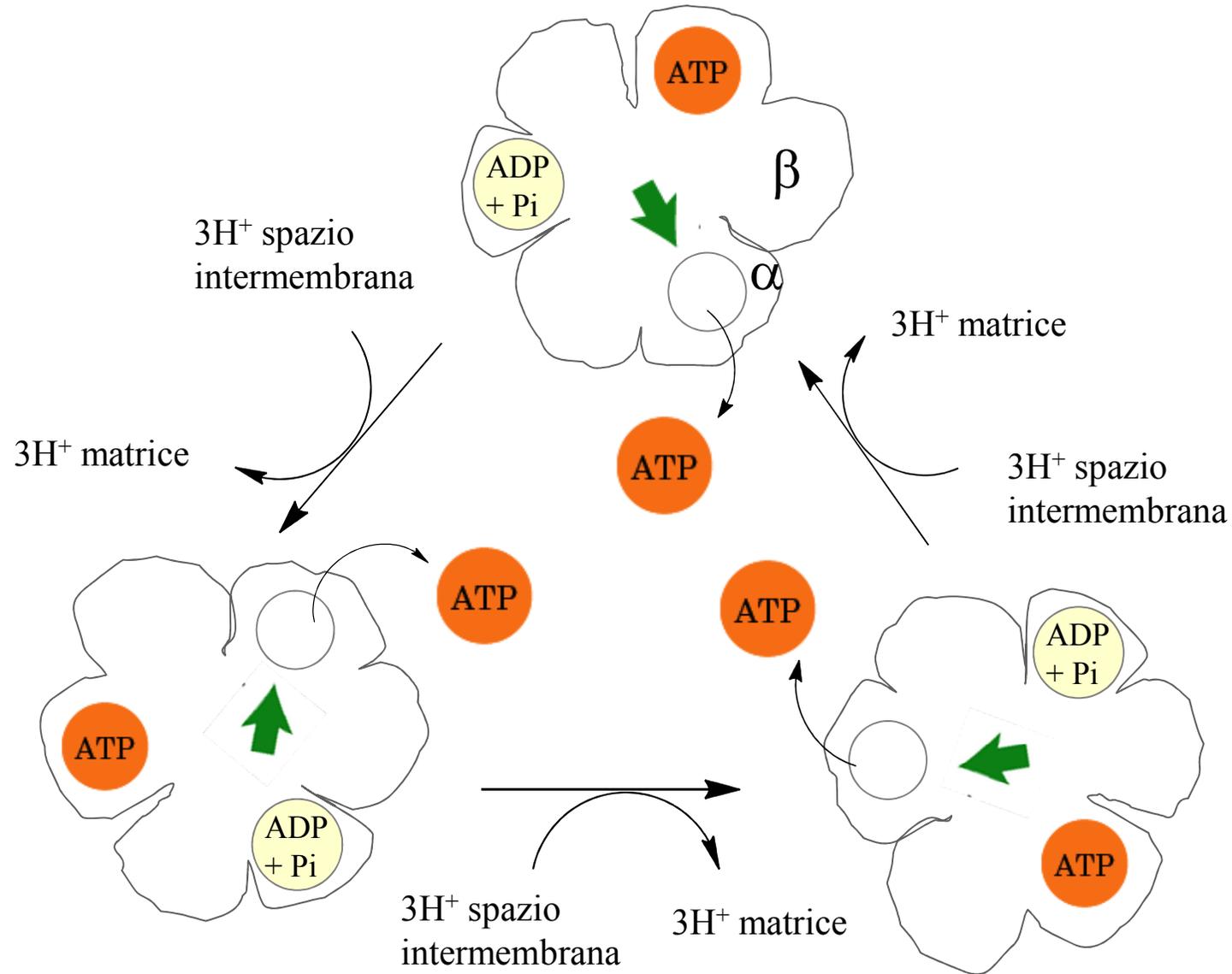
L'ATPasi- F_0F_1 sfrutta il gradiente protonico per sintetizzare ATP



L' H^+ entra nella subunità a dello stativo e va a protonare Asp61 della catena $1c$, il rotore ruota di 36° portando la catena $10c$ sul sito di protonazione mentre la catena $9c$ entra nel sito di deprotonazione verso la matrice



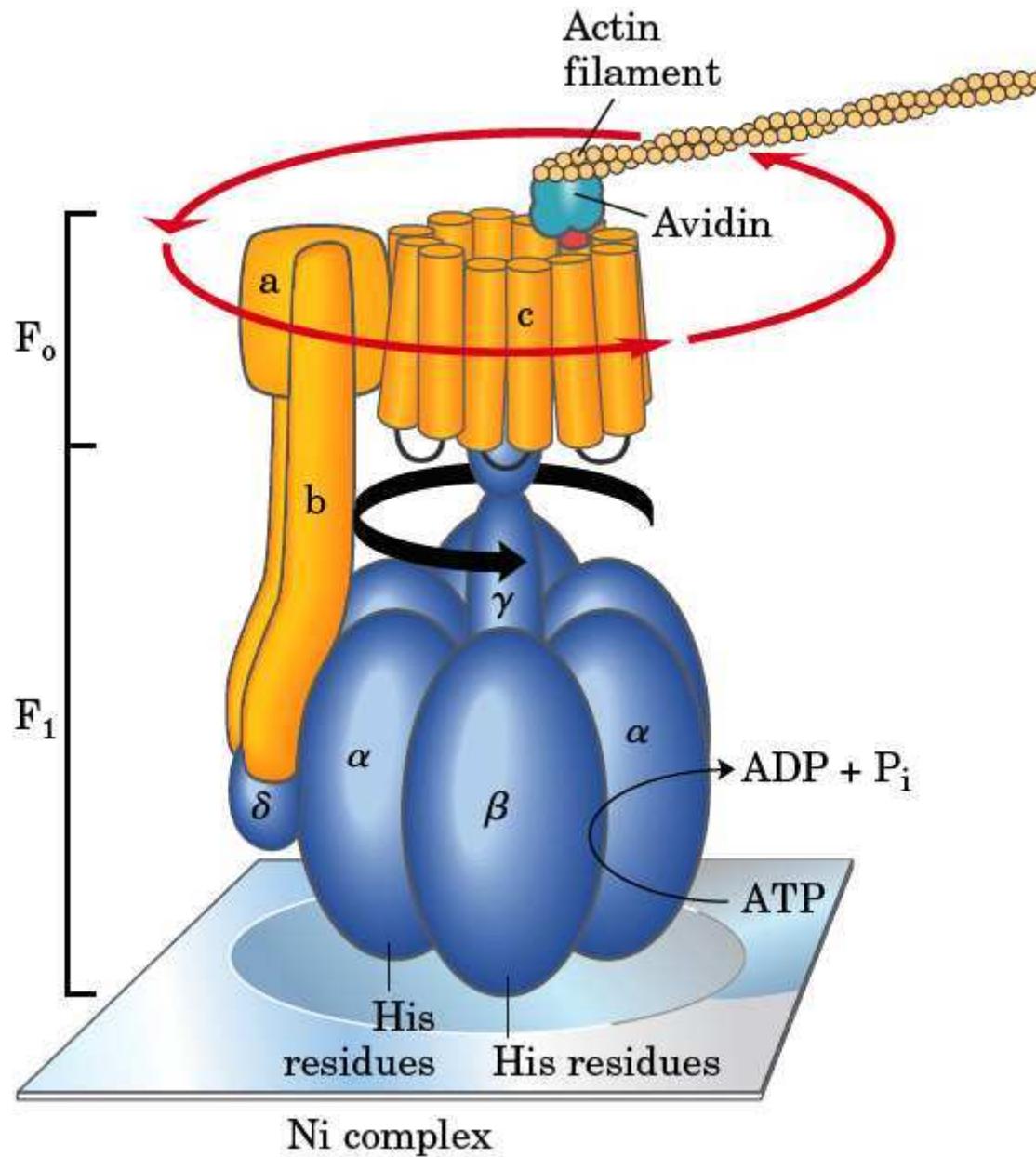
Catalisi rotazionale: la rotazione del rotore è solidale con la subunità γ (freccia verde) che fa un terzo di giro ogni 3 protoni che passano



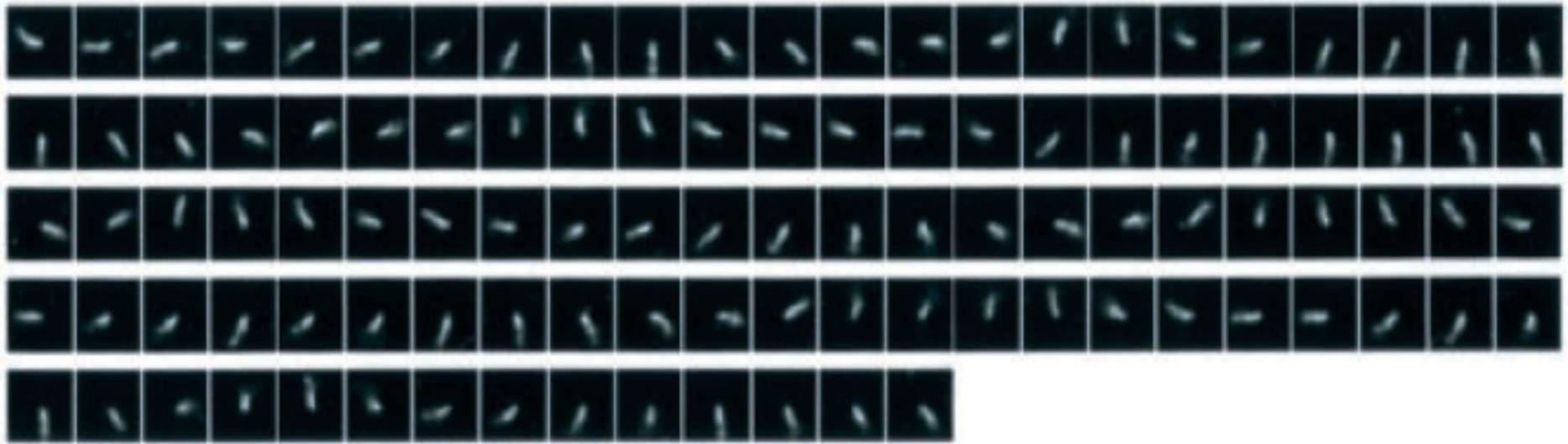
Il complesso V: l'ATPasi-F₀F₁ o ATP sintasi



Paul Boyer (1918-) Nobel per la Chimica nel 1997 insieme a John Walker e Jens Skou definì l'ATP sintasi una “meravigliosa macchina molecolare”



Fotogrammi della rotazione dell'ATPsintasi



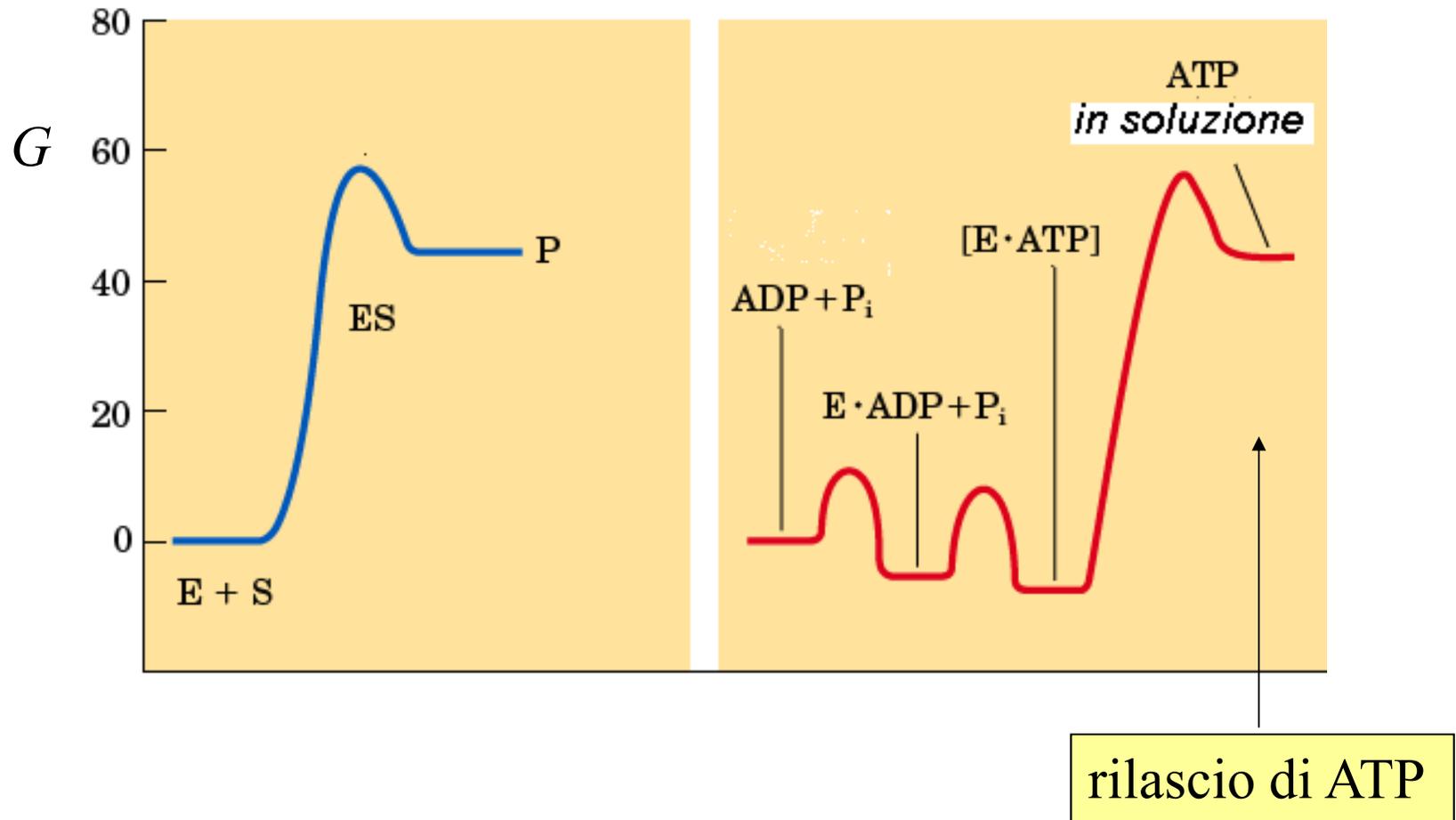


$$K'_{\text{eq}} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{24 \text{ s}^{-1}}{10 \text{ s}^{-1}} = 2.4$$

Il valore della costante di equilibrio è molto diverso da quello dell'idrolisi dell'ATP in soluzione ($K_{\text{eq}}=10^5$; $\Delta G^{\circ'} = -30 \text{ kJ/mol}$)

tipico enzima

ATP sintasi



Resa in ATP dell'ossidazione del glucosio e di palmitato

$$1 \text{ NADH} = 3 \text{ ATP}$$

$$1 \text{ FADH}_2 = 2 \text{ ATP}$$

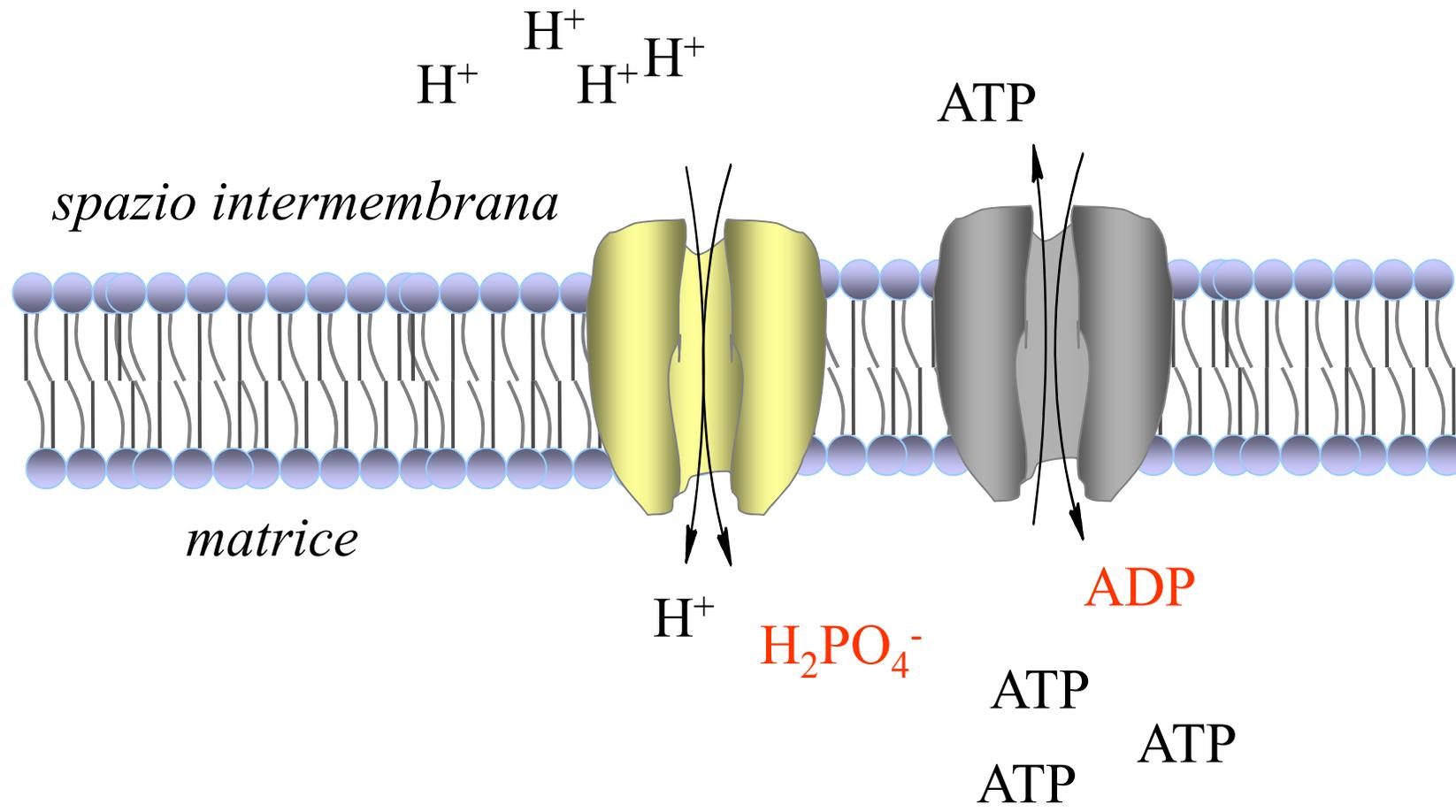
$$\begin{aligned} 1 \text{ glucosio} &= 2\text{ATP} + 2+8 \text{ NADH} + 2\text{GTP} + 2\text{FADH}_2 \\ &= 38 \text{ ATP} \end{aligned}$$

$$\text{ATP/Carbonio} = 38/6 = 6.3$$

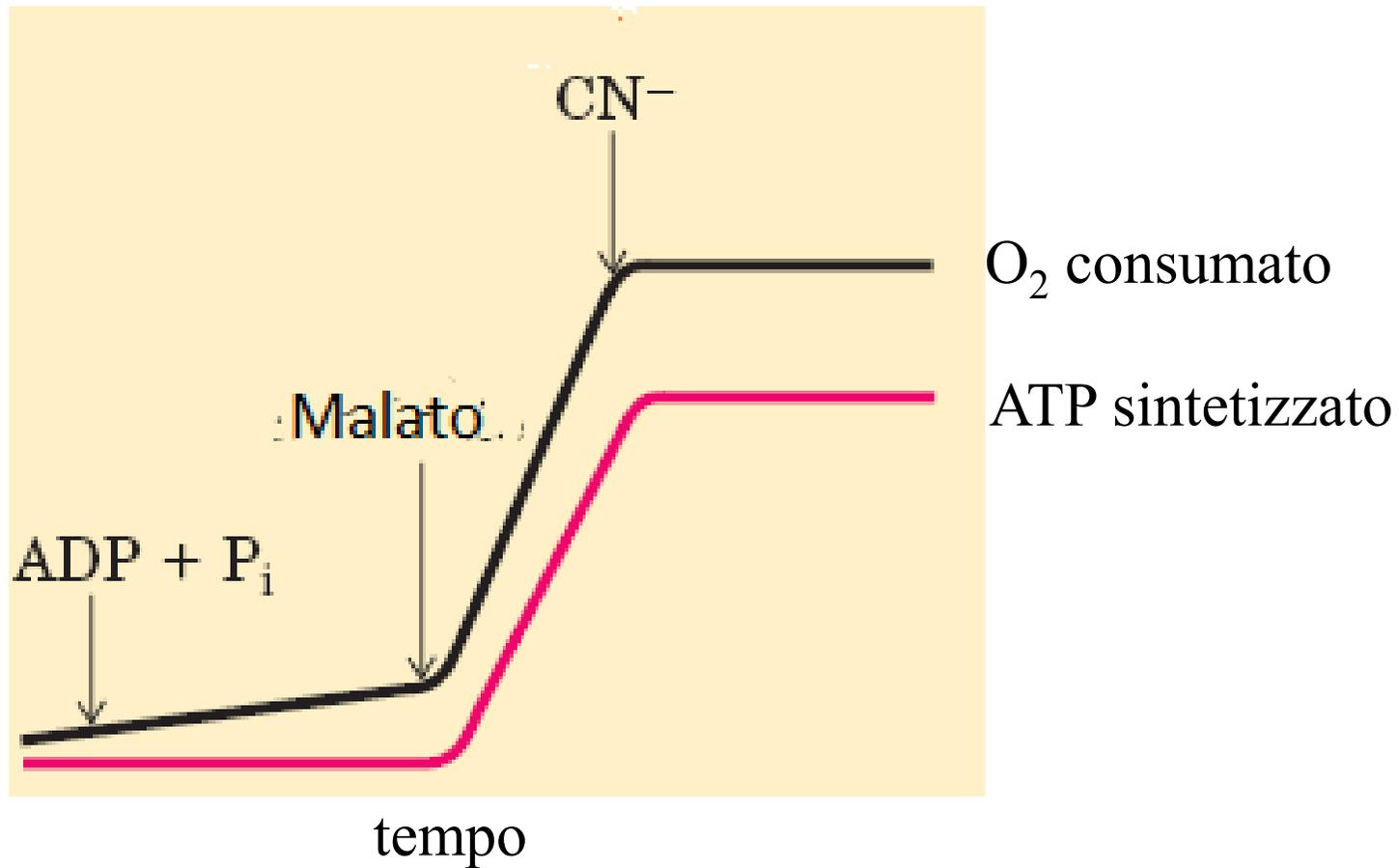
$$\begin{aligned} 1 \text{ palmitato} &= 7+3 \times 8 \text{ NADH} + 8\text{GTP} + 7+1 \times 8\text{FADH}_2 \\ &= 93 + 8 + 30 = 131 \text{ ATP (-2ATP attivazione)} \end{aligned}$$

$$\text{ATP/Carbonio} = 129/16 = 8.1 \text{ (+27\%)}$$

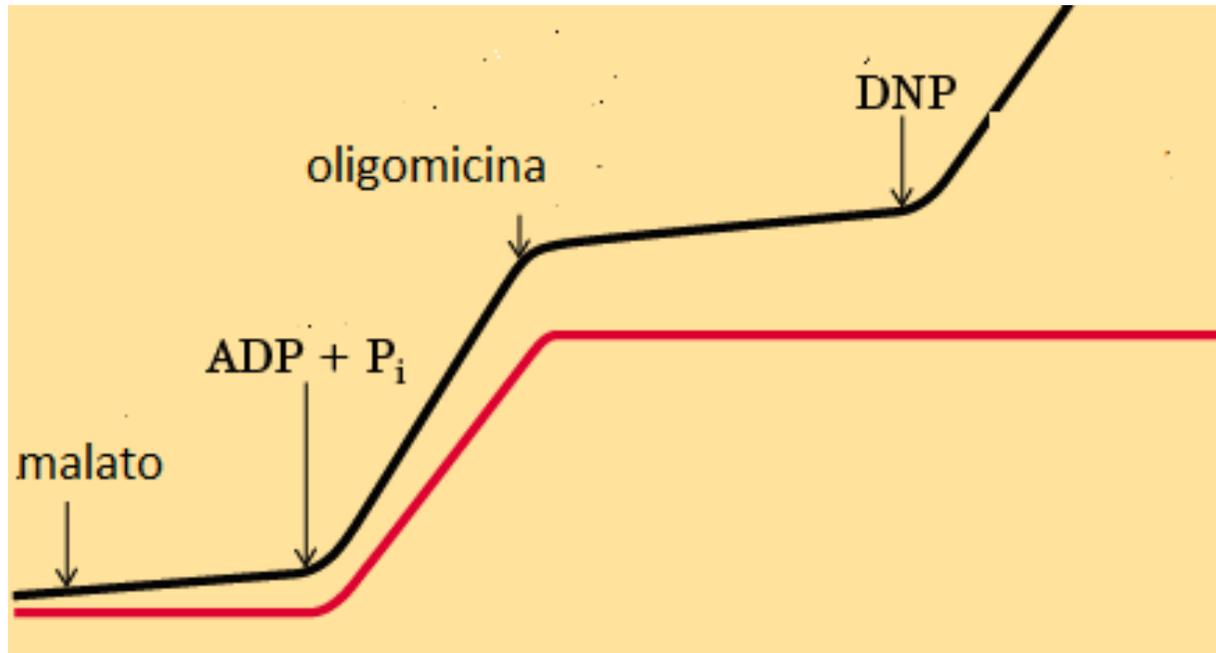
Le traslocasi necessarie all'ATPsintasi



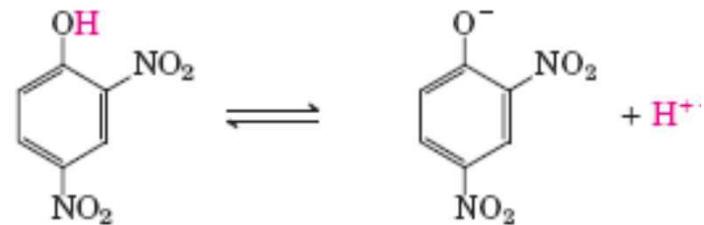
Accoppiamento fosforilazione/consumo d'ossigeno



Disaccoppiamento fosforilazione/consumo d'ossigeno con dinitrofenolo



DNP = 2,4 dinitrofenolo



Disaccoppiamenti fisiologici:

grasso bruno: letargo

fiori: dispersione di sostanze odorose *oppure*
produzione di calore per emergere dal manto
nevoso

Inibitori della fosforilazione ossidativa

Inibitori della catena di trasporto degli e⁻

Rotenone Fenazaquin	Complesso I	Ittiocida, Insetticida Acaricida, Insetticida
Acequinocyl	Complesso III	Acaricida, Insetticida
Cianuro	Complesso IV	Velenoso per tutti gli animali

Disaccoppianti (non inibiscono il trasporto degli e⁻)

2,4-dinitrofenolo		Biocida Usato come "pillola dietetica" negli USA anni '20
Clorfenapir		Acaricida, Insetticida

Inibitori dell'ATP sintasi

Diafentiuron		Acaricida, Insetticida
Oligomicina		