

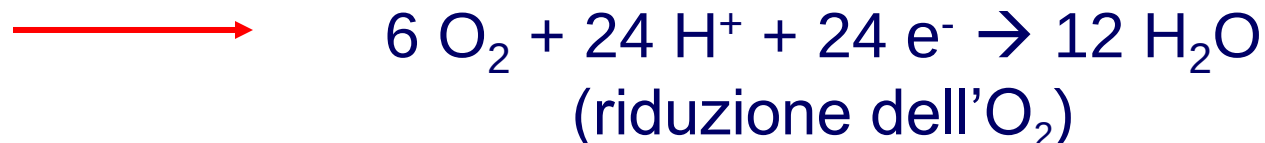
L'ossidazione completa del glucosio da parte dell'O₂



può essere suddivisa in due semi-reazioni



e



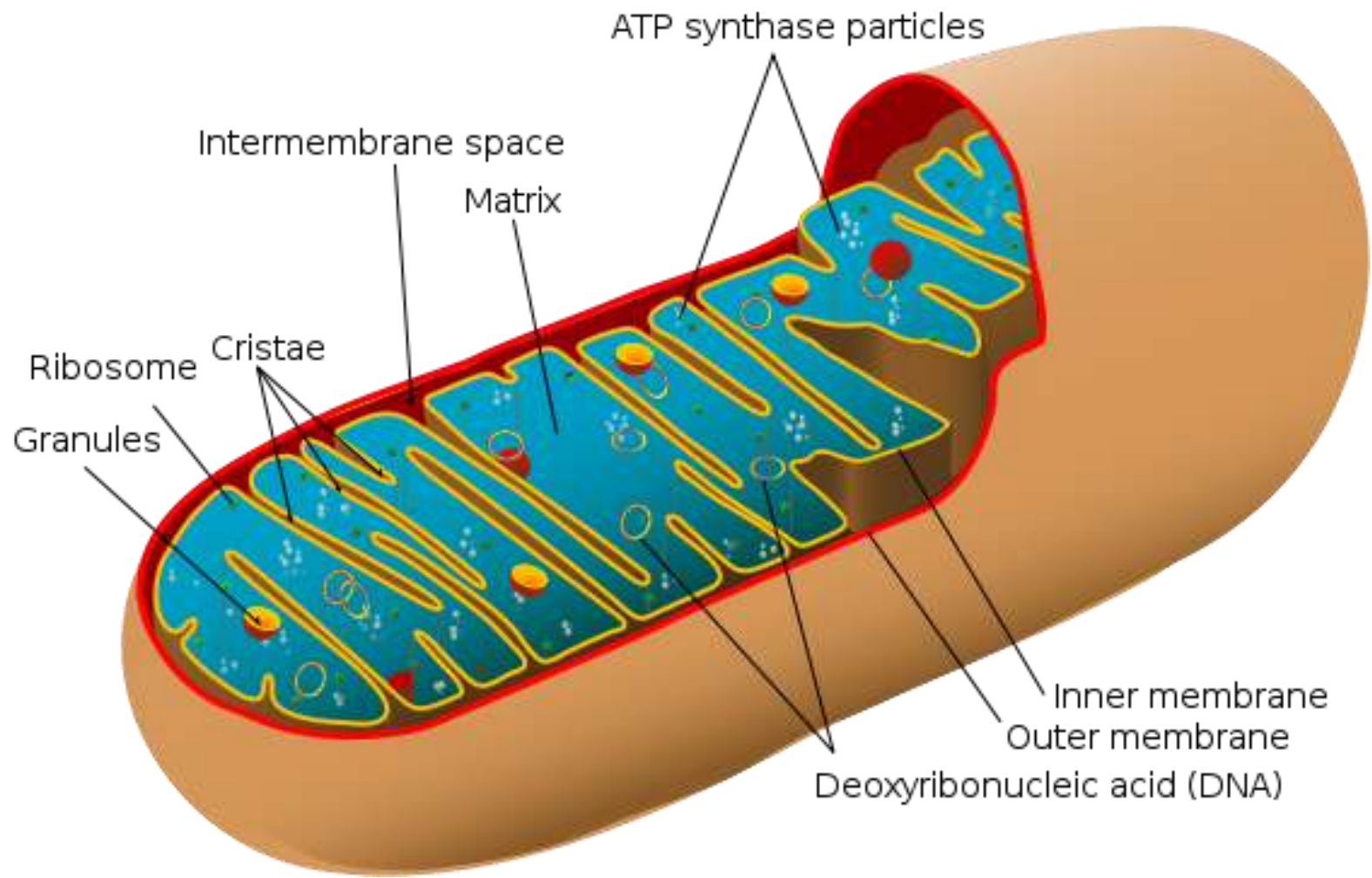
NON **diretta**, ma **mediata** dai coenzimi NAD⁺ e FAD

La **conservazione dell'energia** durante l'ossidazione di substrati può avvenire anche **mediante trasporto di elettroni** scambiati in reazioni di ossido-riduzione accoppiate.

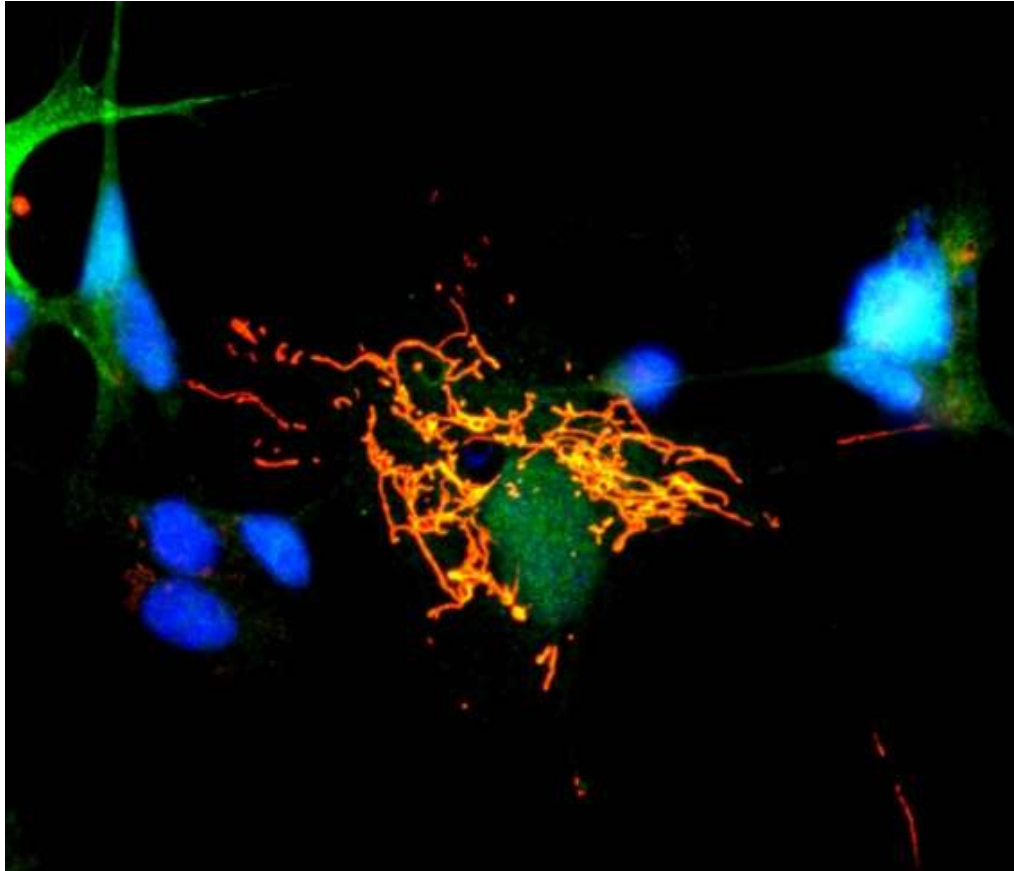
Nella **fosforilazione ossidativa** il trasporto di elettroni e la formazione di un gradiente di protoni transmembrana promuove la **formazione di ATP**.

MITOCONDRIO = CENTRALE ENERGETICA

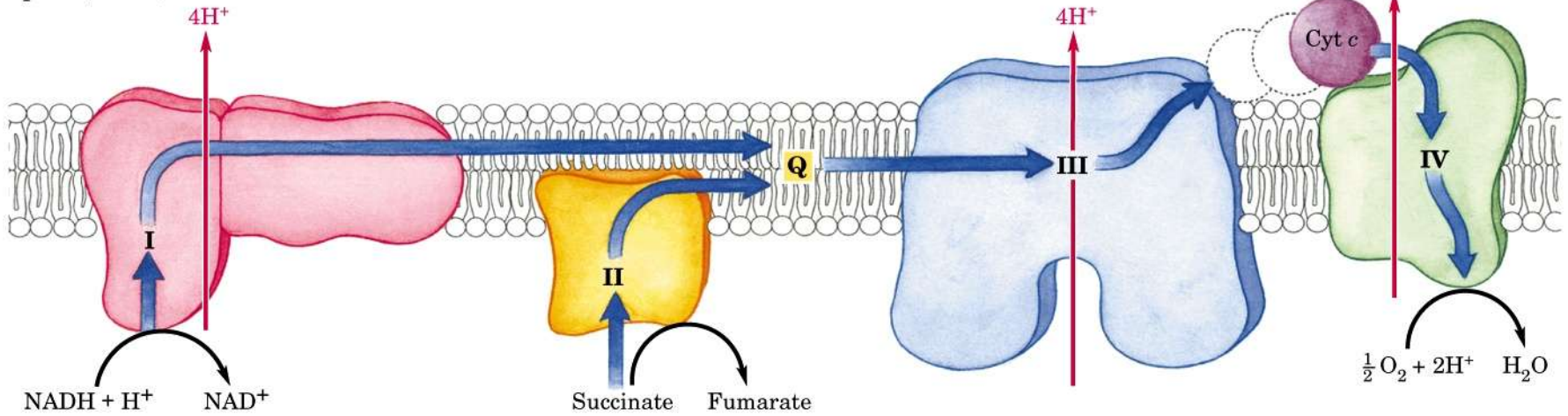
- Trasformazione del piruvato ad acetil Coa;
 - Ciclo degli acidi tricarbossilici;
 - **Fosforilazione ossidativa**;
 - Catabolismo acidi grassi;
 - Ciclo dell'urea (in parte);
 - Serbatoio di Ca^{2+}



Mitochondrial network



Intermembrane
space (P side)



Matrix (N side)

Gli elettroni vengono trasportati da centri redox

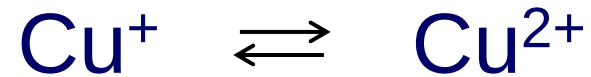
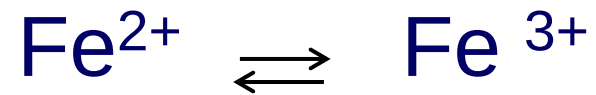


table 19–3

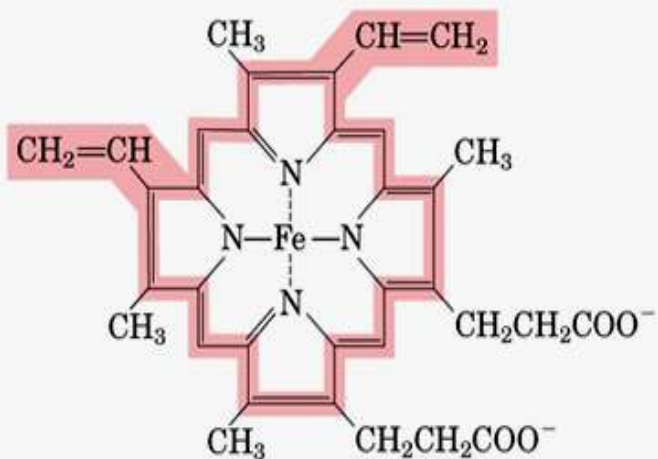
Protein Components of the Mitochondrial Electron-Transfer Chain

Enzyme complex	Mass (kDa)	Number of subunits*	Prosthetic group(s)
I NADH dehydrogenase	850	42 (14)	FMN, Fe-S
II Succinate dehydrogenase	140	5	FAD, Fe-S
III Ubiquinone: cytochrome <i>c</i> oxidoreductase	250	11	Hemes, Fe-S
Cytochrome <i>c</i> [†]	13	1	Heme
IV Cytochrome oxidase	160	13 (3–4)	Hemes; Cu _A , Cu _B

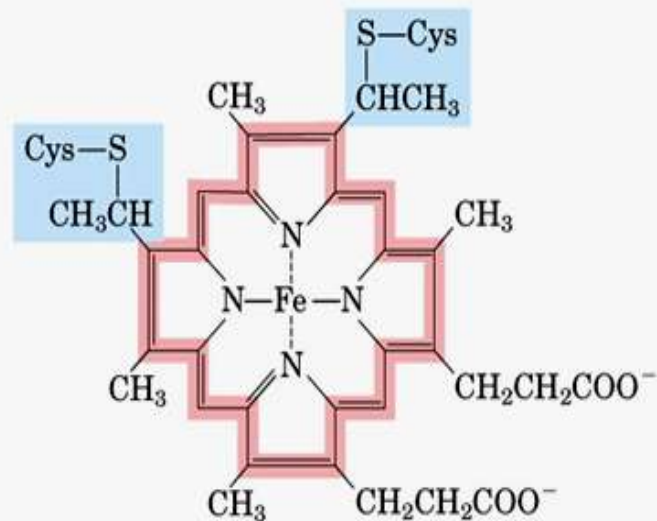
*Numbers of subunits in the bacterial equivalents in parentheses.

[†]Cytochrome *c* is not part of an enzyme complex; it moves between Complexes III and IV as a freely soluble protein.

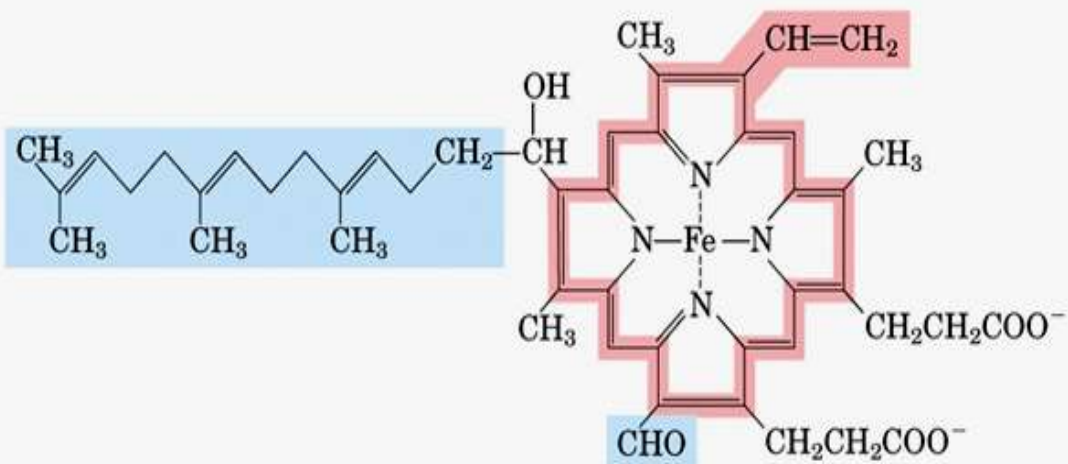
CITOCROMI: David Keilin, 1925



Iron protoporphyrin IX
(in *b*-type cytochromes)



Heme C
(in *c*-type cytochromes)



Heme A
(in α -type cytochromes)

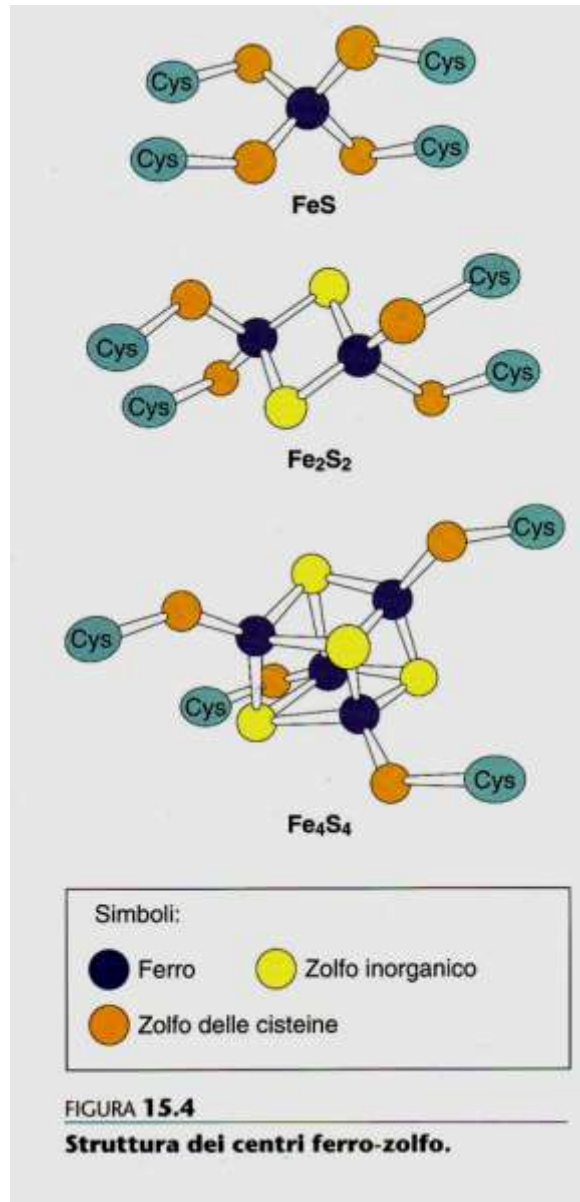


CENTRI FERRO-ZOLFO: ferro non eme

[2Fe-2S]



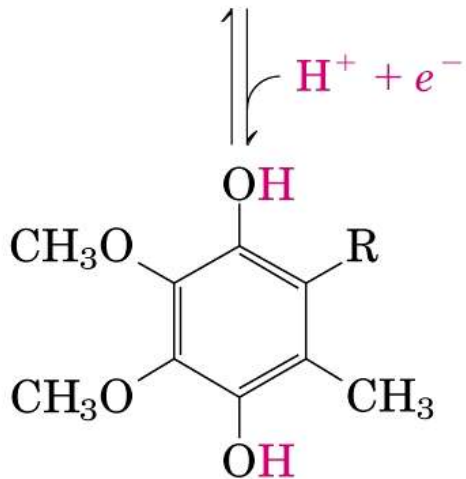
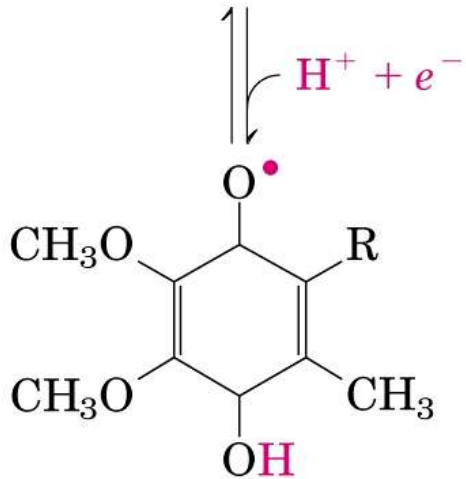
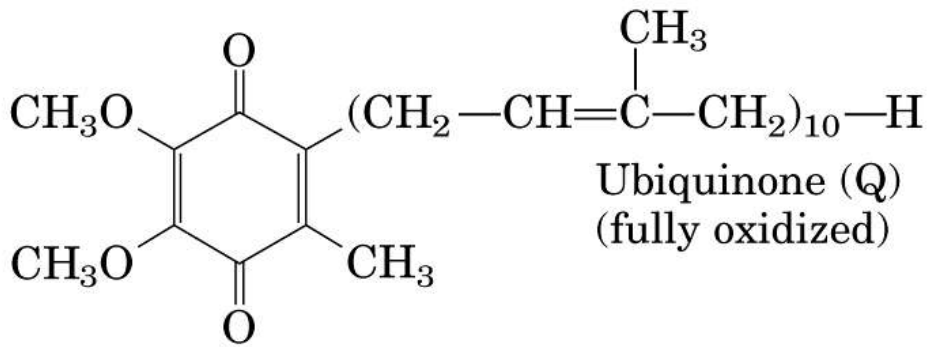
[4Fe-4S]



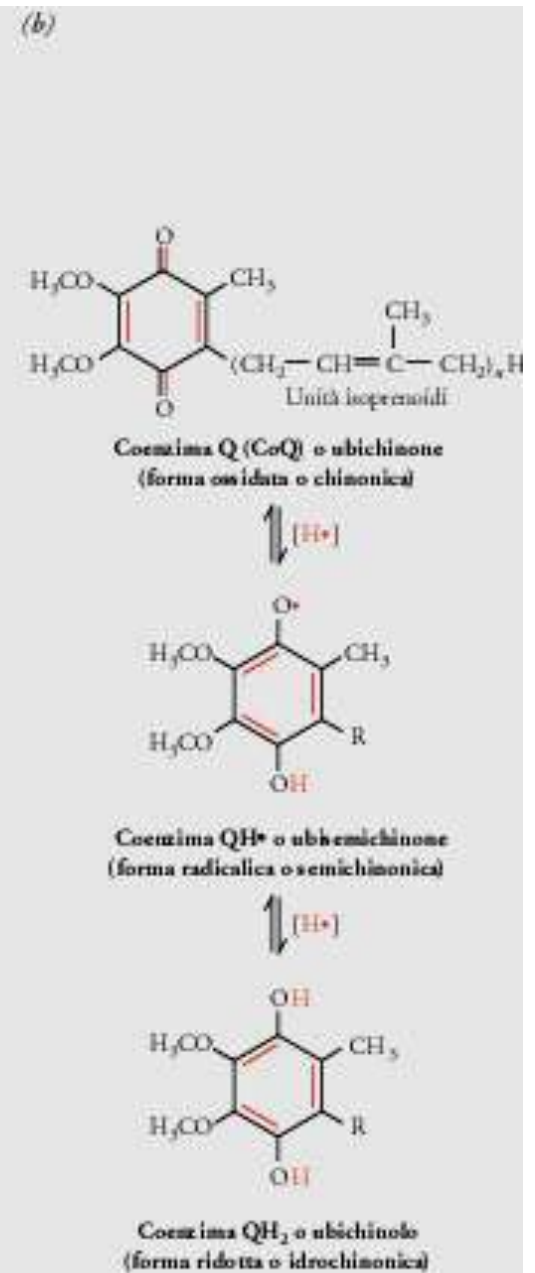
Fe e S sono uniti a Cys con legami di coordinazione con simmetria tetraedrica

Possono subire reazioni redox ($\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$)

CoenzimaQ



Hanno 3 stati di ossidazione possibili perché possono accettare o donare o uno o due elettroni

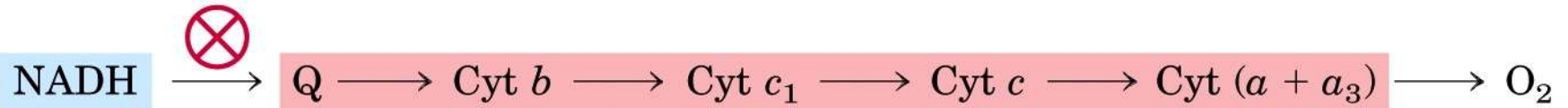


Potenziali di riduzione standard di alcuni componenti della catena di trasporto degli elettroni

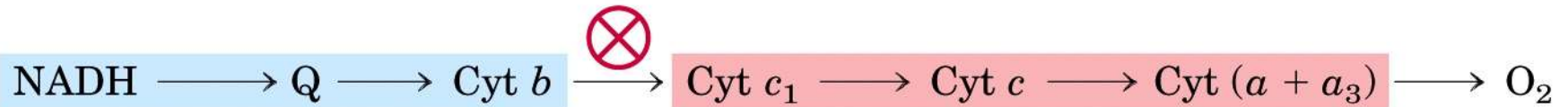
Redox reaction (half-reaction)	E'° (V)
$2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{H}_2$	-0.414
$\text{NAD}^{+} + \text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADP}^{+} + \text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{NADPH}$	-0.324
$\text{NADH dehydrogenase (FMN)} + 2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{NADH dehydrogenase (FMNH}_2\text{)}$	-0.30
$\text{Ubiquinone} + 2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{ubiquinol}$	0.045
$\text{Cytochrome } b (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } b (\text{Fe}^{2+})$	0.077
$\text{Cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{2+})$	0.22
$\text{Cytochrome } c (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } c (\text{Fe}^{2+})$	0.254
$\text{Cytochrome } a (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } a (\text{Fe}^{2+})$	0.29
$\text{Cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{2+})$	0.55
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.816



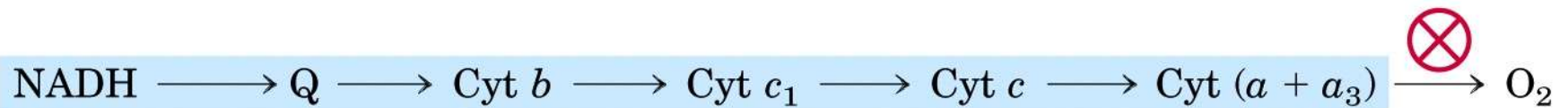
rotenone



antimycin A



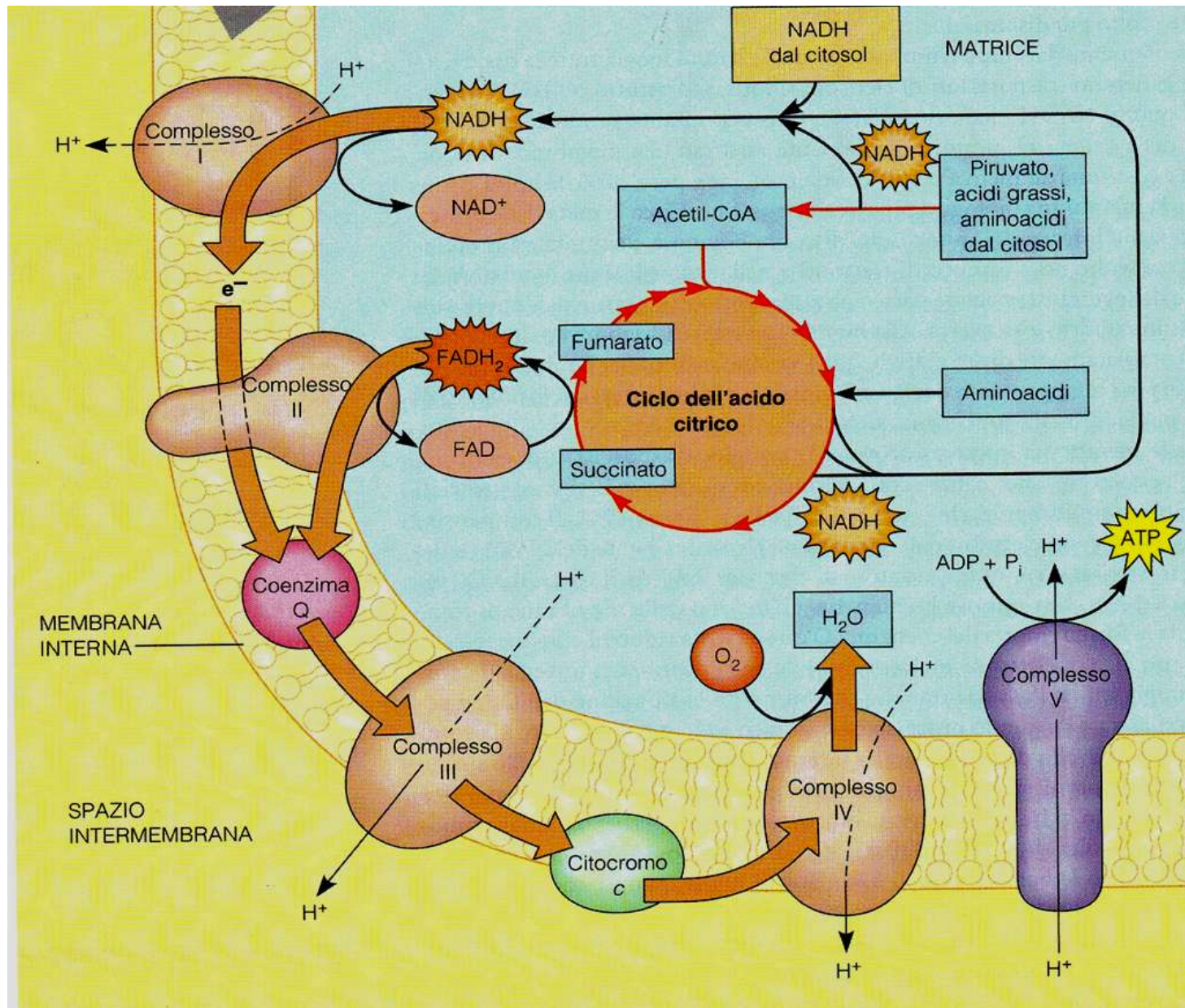
CN⁻ or CO



CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

Gli elettroni trasportati dai 10 NADH e 2 FADH₂ prodotti da Glicolisi e ciclo di Krebs passano nella catena di trasporto di elettroni in cui:
4 complessi enzimatici contenenti circa **10 centri redox** assemblati sulla **membrana interna** del mitocondrio;

1. NADH e FADH₂ vengono **riossidati** a NAD⁺ e FAD;
2. Gli **elettroni vengono trasferiti** secondo una sequenza dettata dal potenziale ossidoriduttivo dei trasportatori (verso potenziali redox via via crescenti), fino ad arrivare all'ossigeno;
3. Durante il trasferimento (che è un processo **ESOERGONICO**) vengono **espulsi protoni** nello spazio intermembrana;
4. L'energia conservata in questo gradiente protonico permette la sintesi di ATP (**FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA**), nel momento in cui i protoni tornano nella matrice.

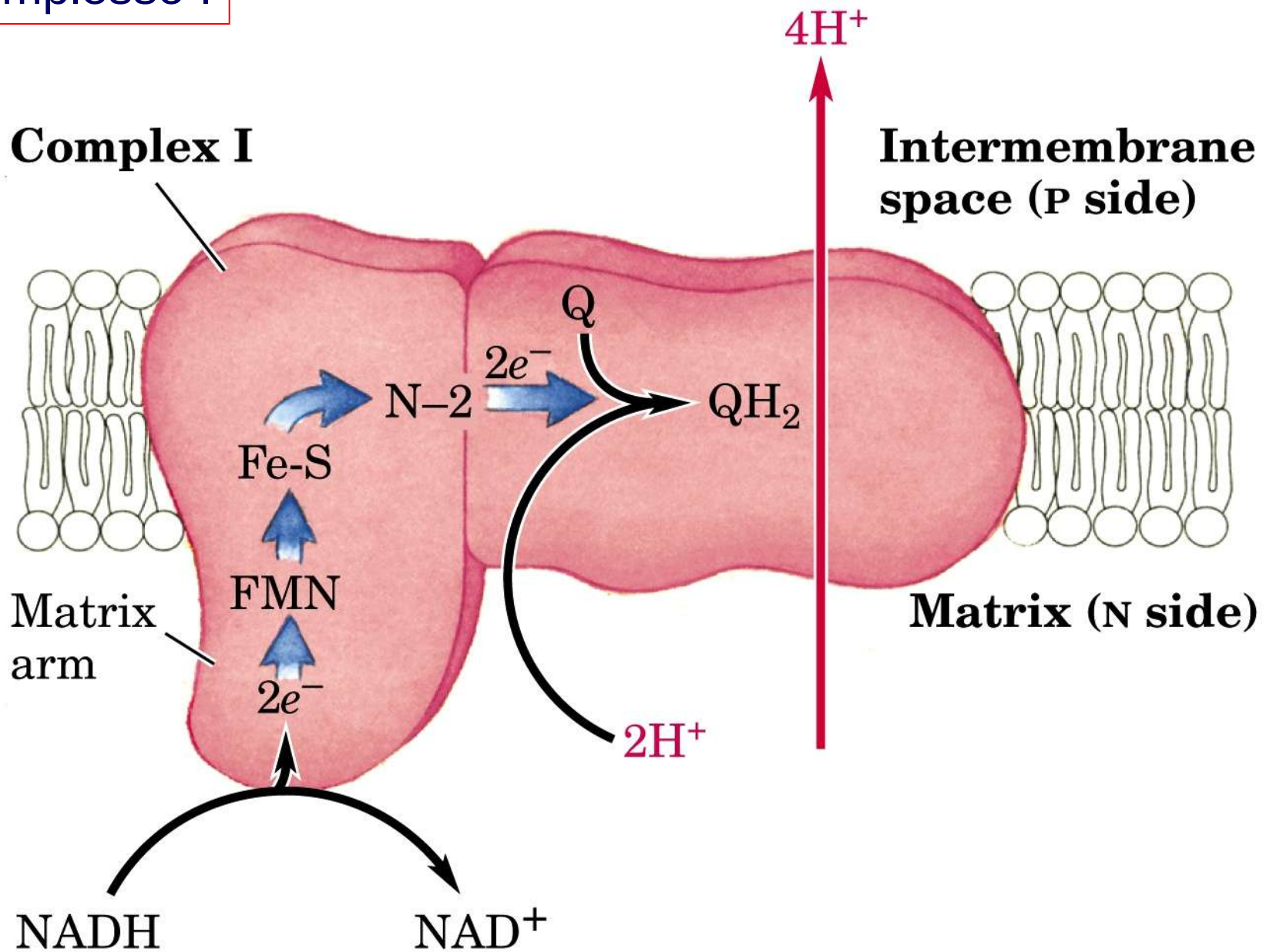


Complesso I

- 43 catene polipeptidiche
- 850 kD
- 1 FMN (= FAD-AMP) che partecipa alle reazioni redox
- 6 o 7 centri ferro-zolfo che partecipano al trasporto di e^-

Durante il trasporto di e^- , 4 protoni vengono trasferiti fuori dalla matrice nello spazio intra-membrana

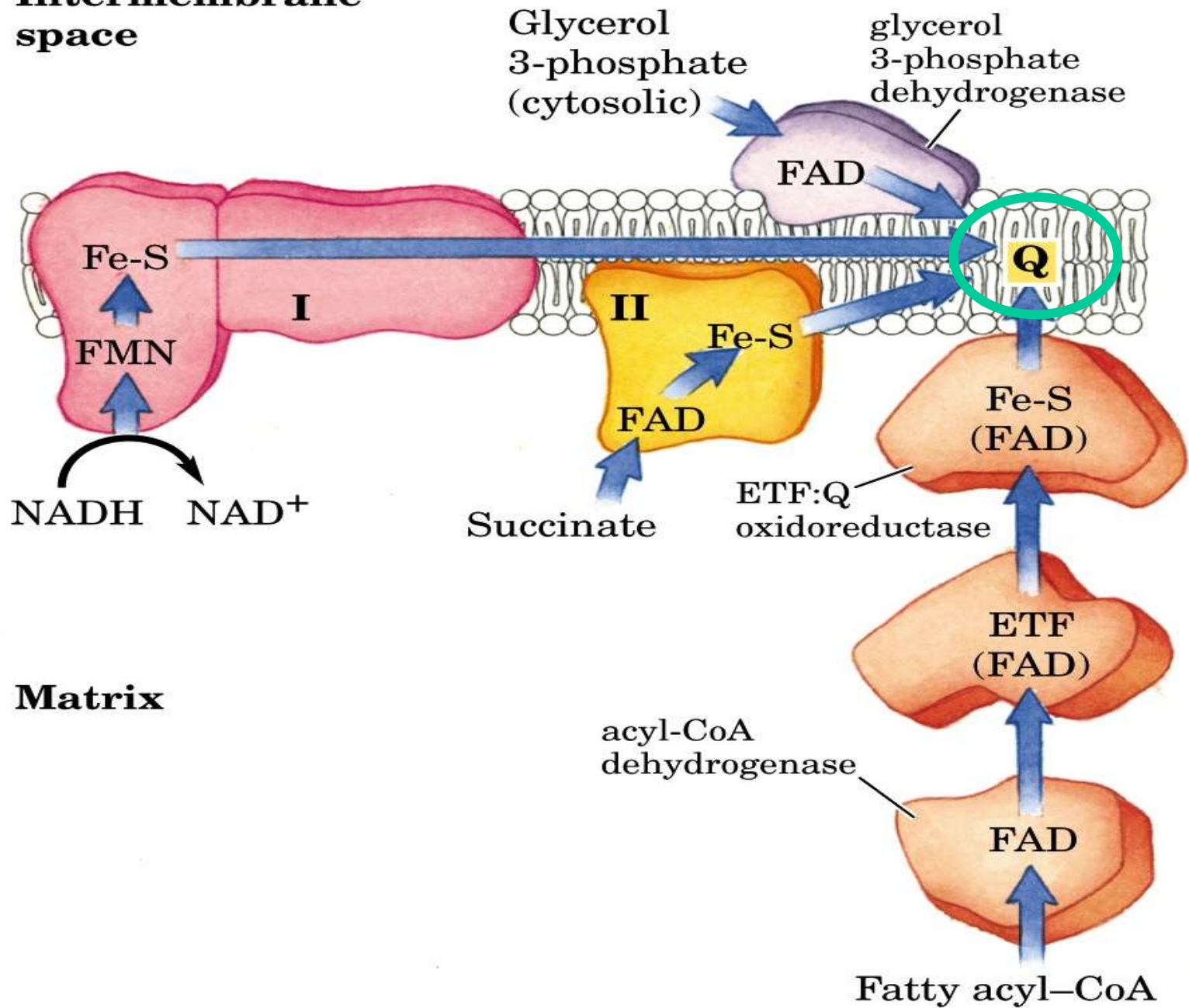
Complesso I



Complesso II

1. Contiene la succinato deidrogenasi (ciclo di Krebs) che contiene FAD
2. Passa gli elettroni dal succinato al CoQ
3. Contiene centri Fe-S
4. Contiene citocromo b_{560}
5. NON opera dopo il Complesso I, ma fornisce un altro ingresso alla catena

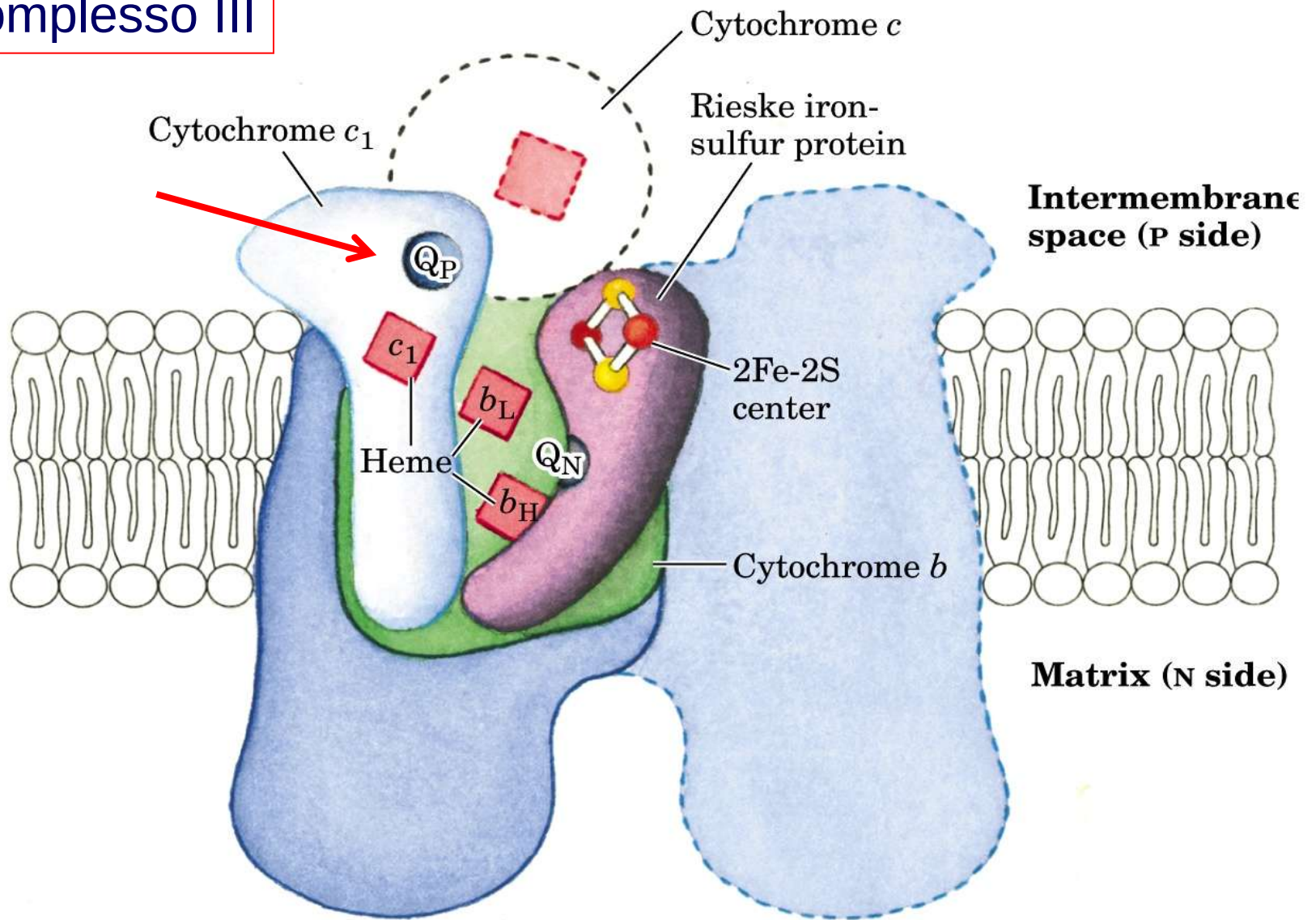
**Intermembrane
space**



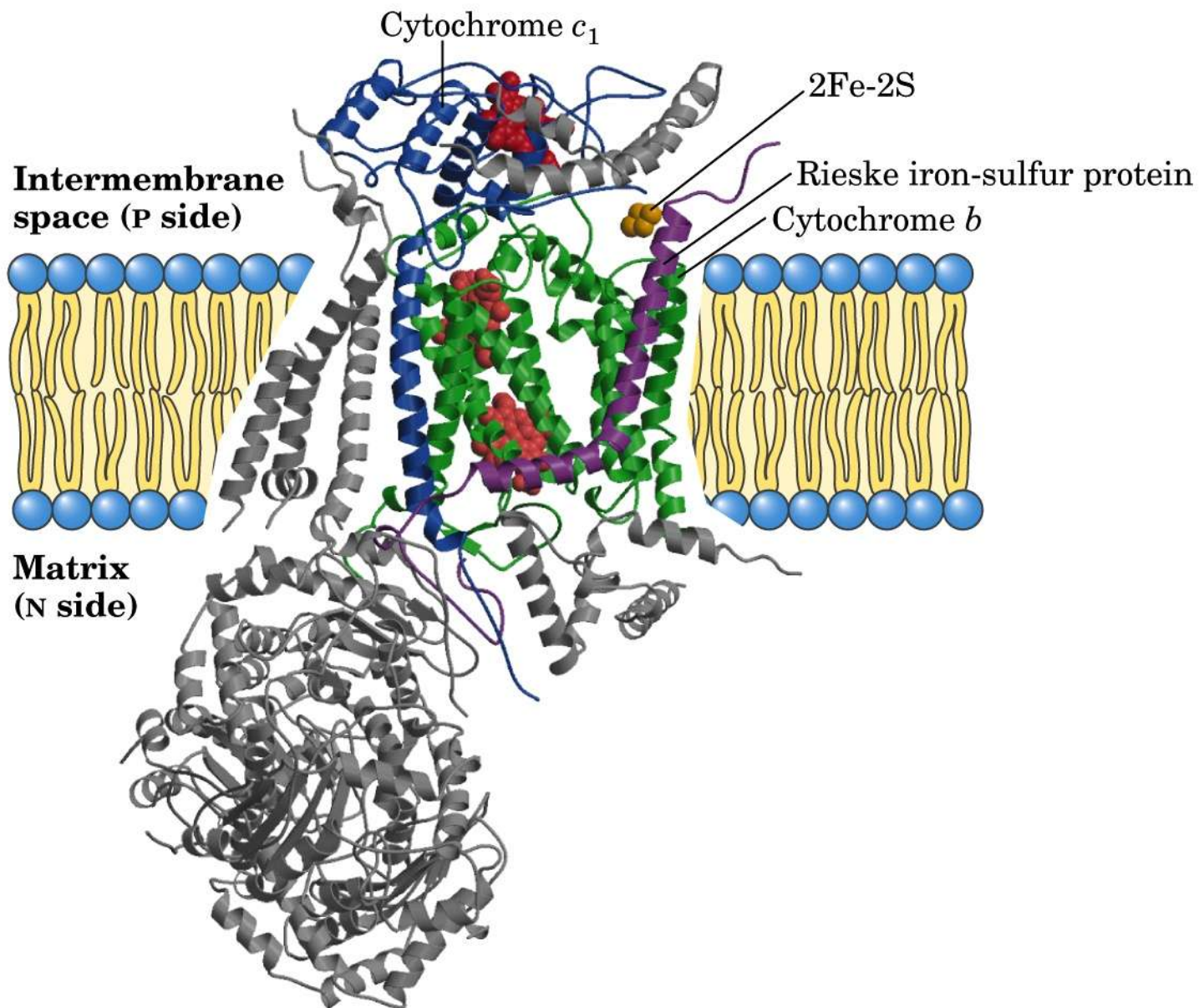
Complesso III

1. Contiene 2 x 11 subunità (PM : 2 x 248 kD)
2. Contiene 2 citocromi b, 1 citocromo c_1 , 1 centro [2Fe-2S]
3. Consente al trasportatore a 2 e^- (CoQH₂) di ridurre due molecole di citocromo c (trasportatore a un e^-) mediante il **Ciclo Q**

Complesso III

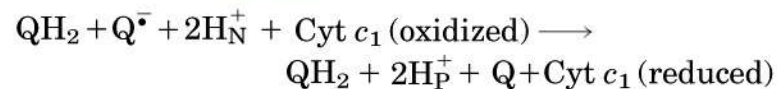
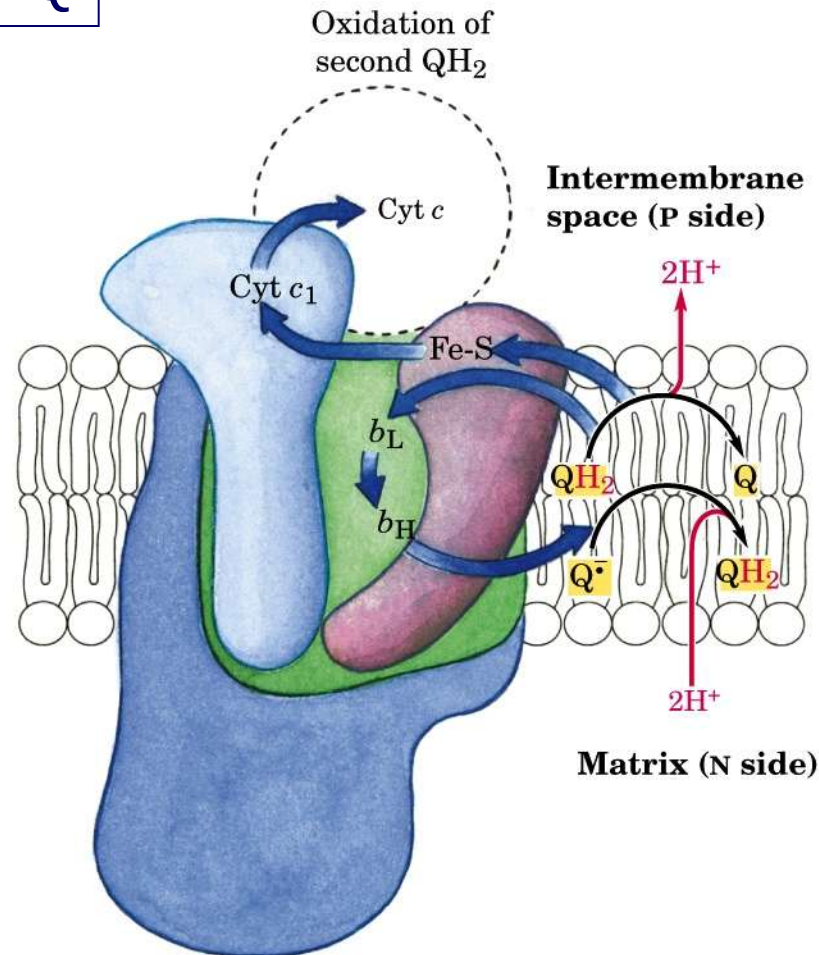
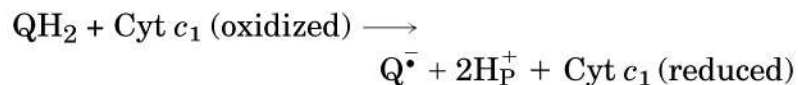
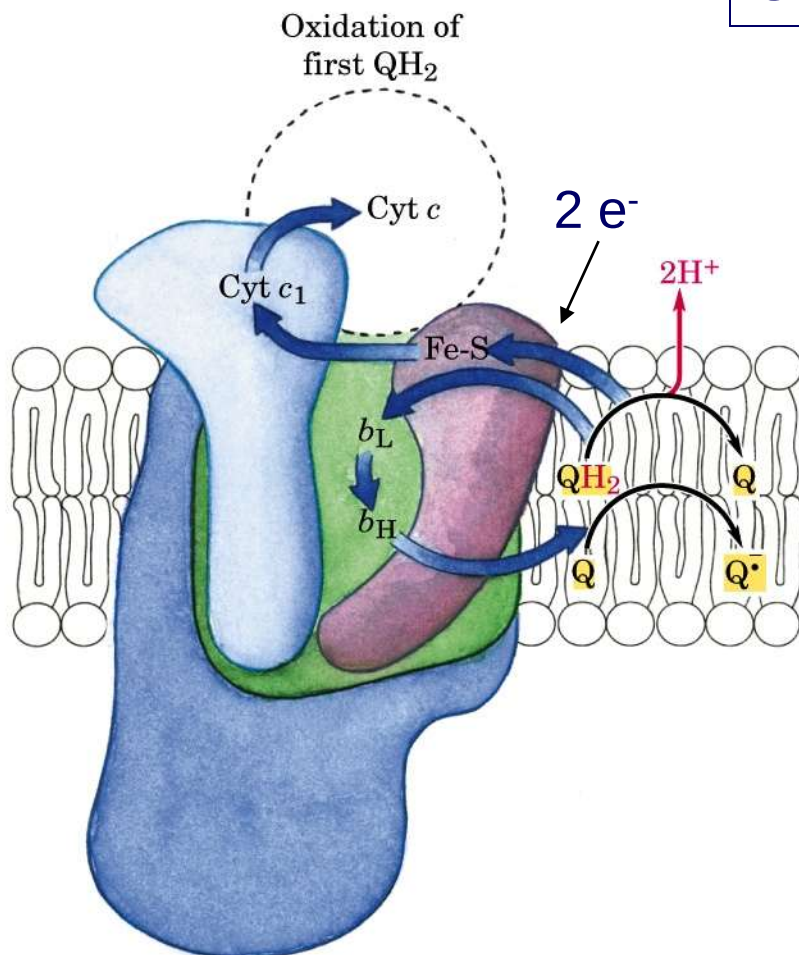


(b)



(a)

CICLO Q

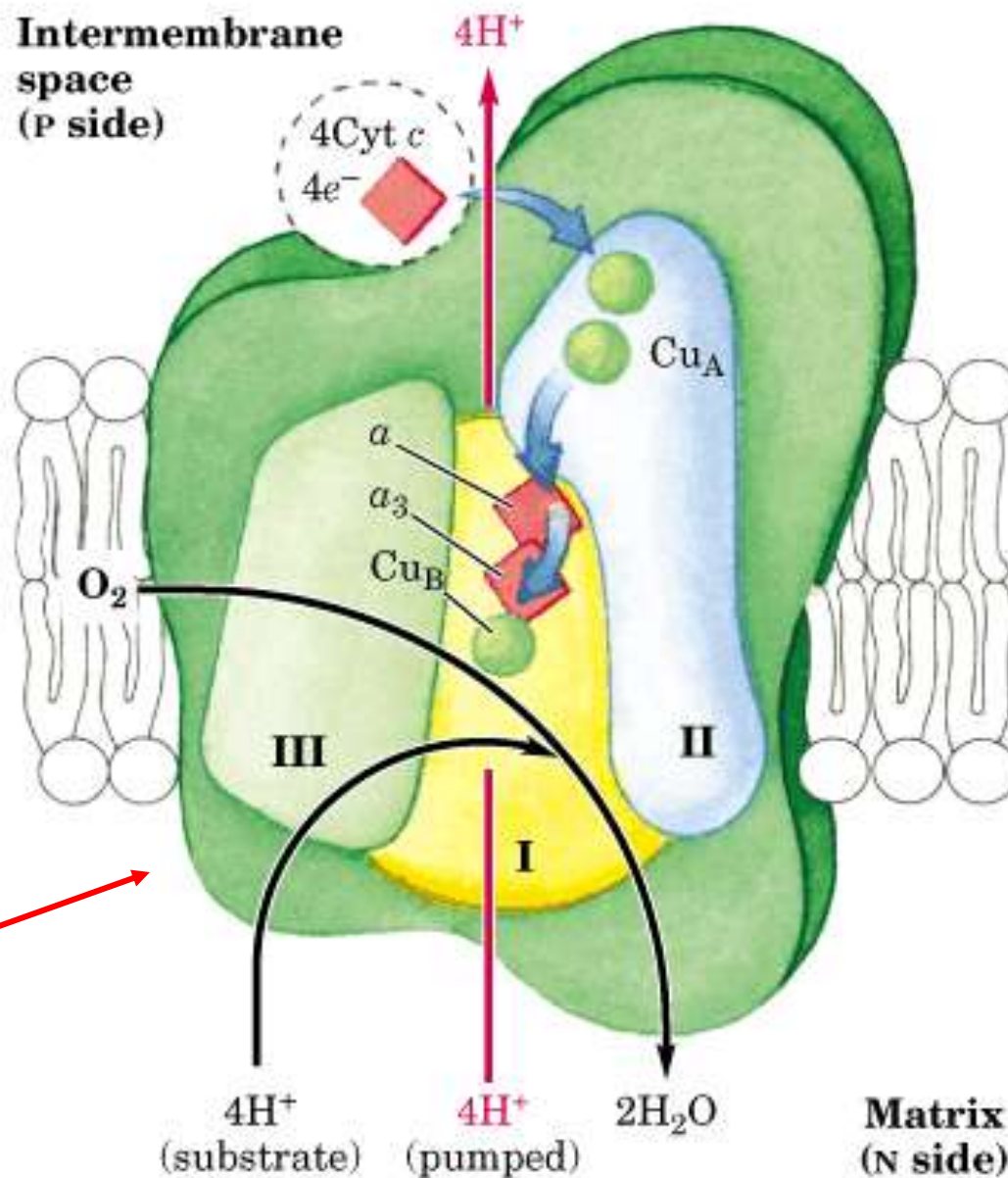


Net equation:



Citocromo c

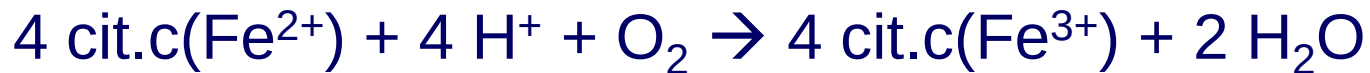
E' un trasportatore di e^- solubile



Complesso IV

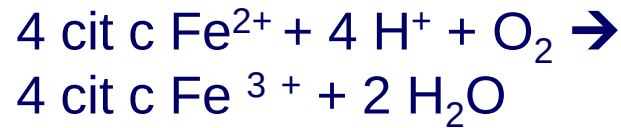
Complesso IV (citocromo ossidasi)

Catalizza le ossidazioni (con acquisto di 1 e⁻) di **4 molecole consecutive** di citocromo c ridotto e la contemporanea **riduzione di una molecola di O₂**

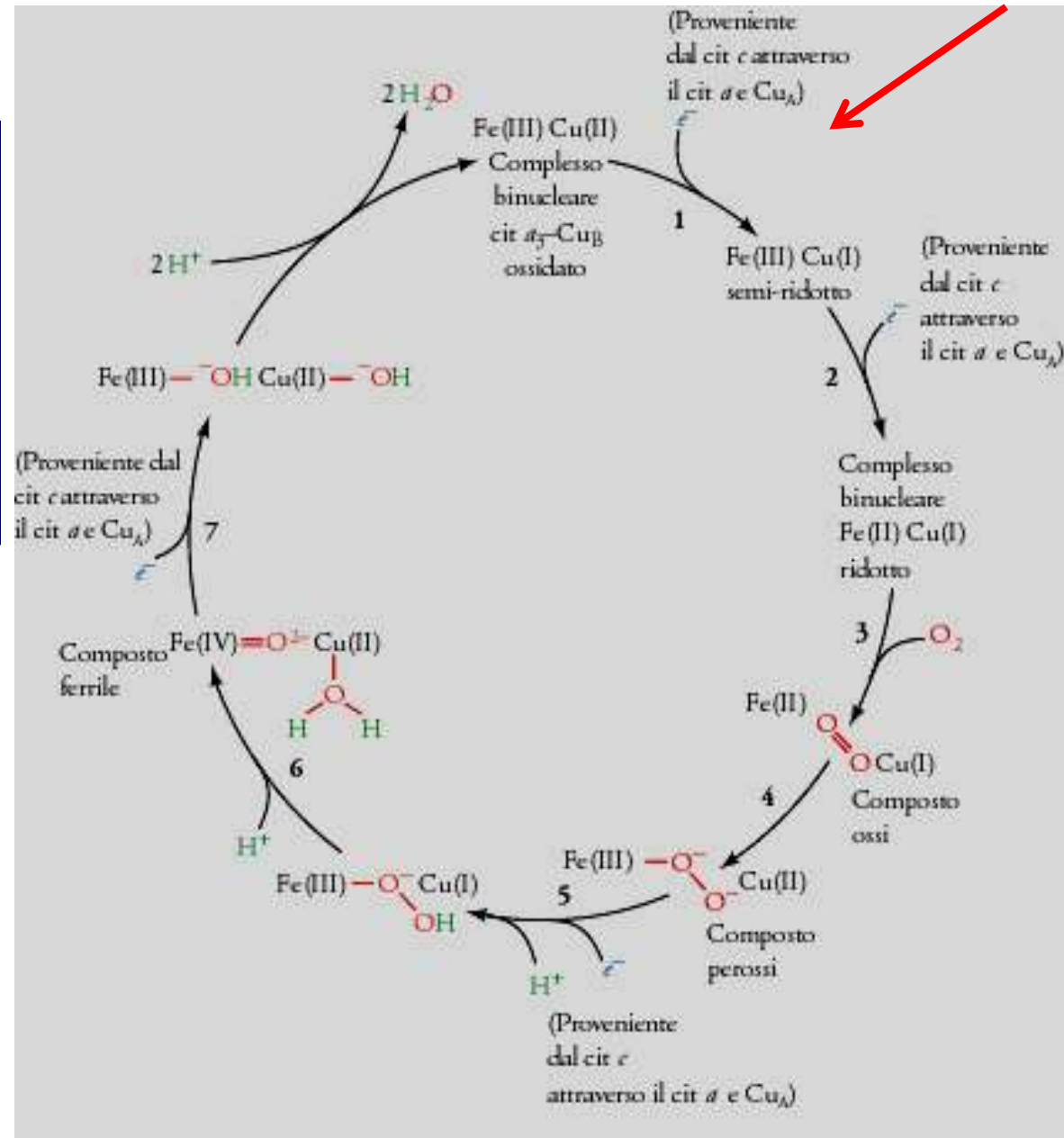


- E' un dimero 2 x 200 kD, 2 x 13 subunità
- Lega 4 centri redox :
 1. cit.a
 2. cit a₃
 3. 1 x Cu_B
 4. centro 2 x Cu_A

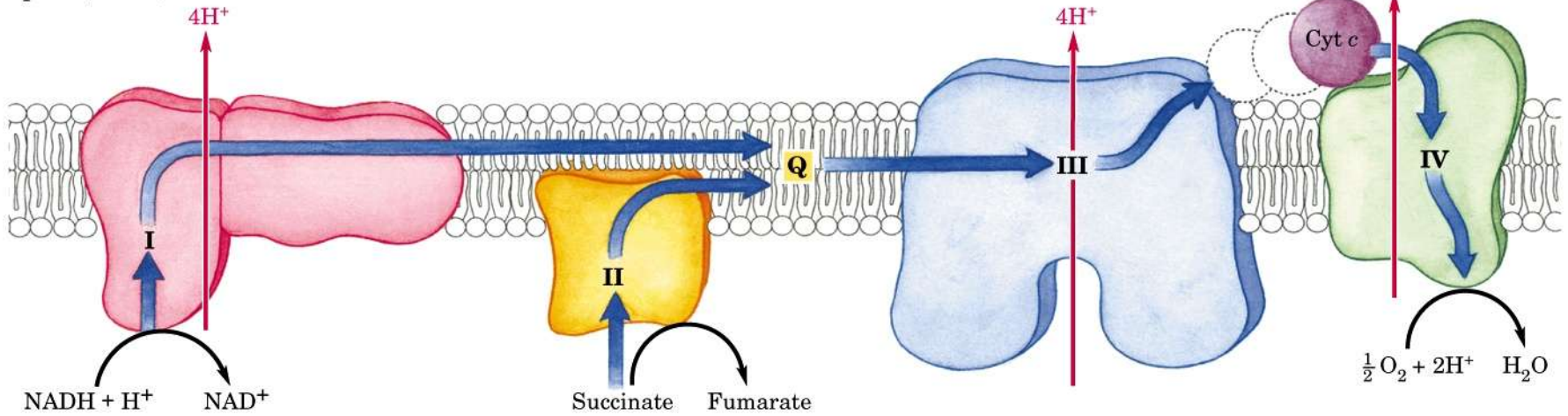
MECCANISMO DI REAZIONE DELLA CITOCROMO C OSSIDASI



Oltre ai 4 H⁺ utilizzati per ridurre l'O₂, 4 H⁺ vengono traslocati nello spazio intermembrane.



Intermembrane
space (P side)



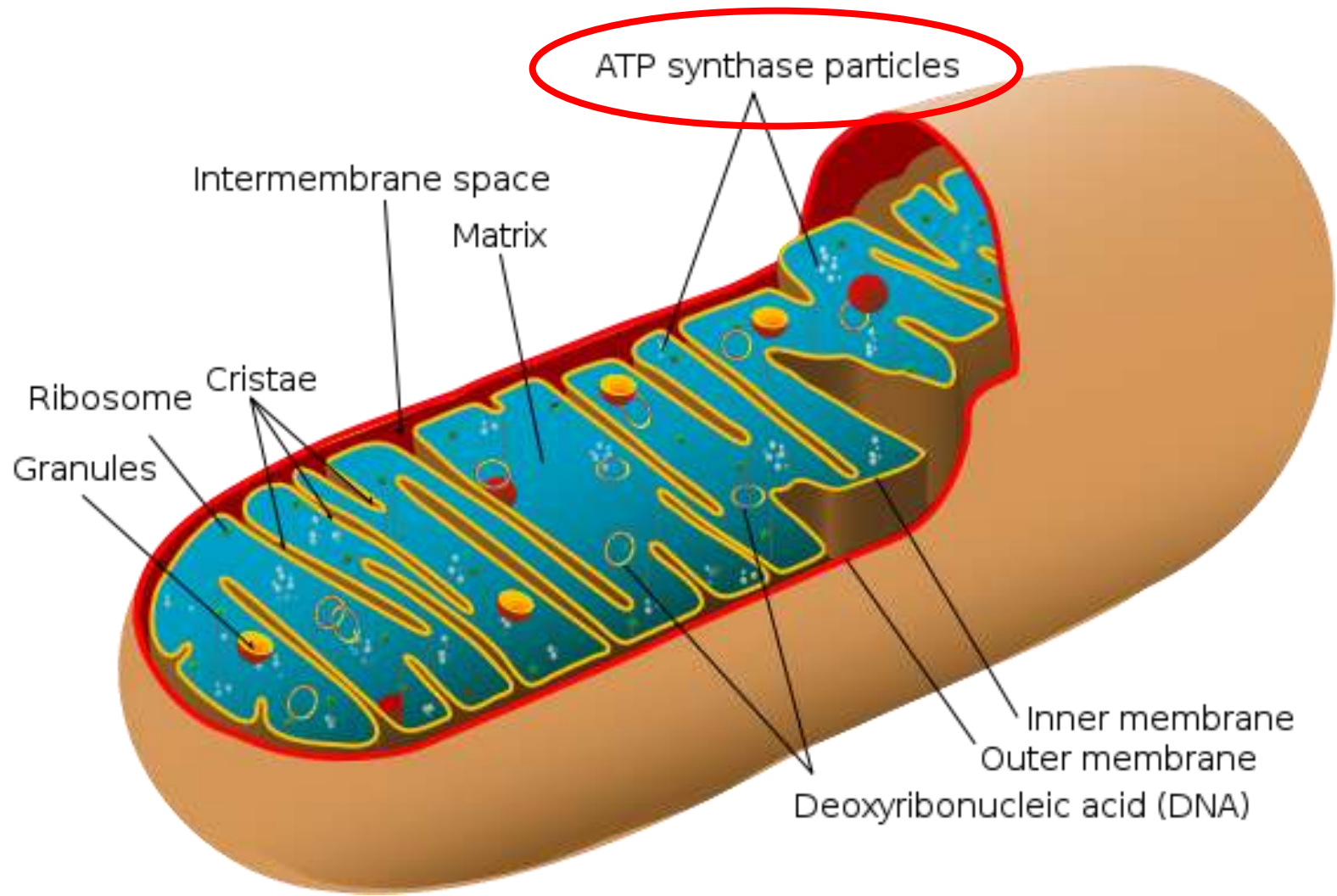
Matrix (N side)

table 19-4

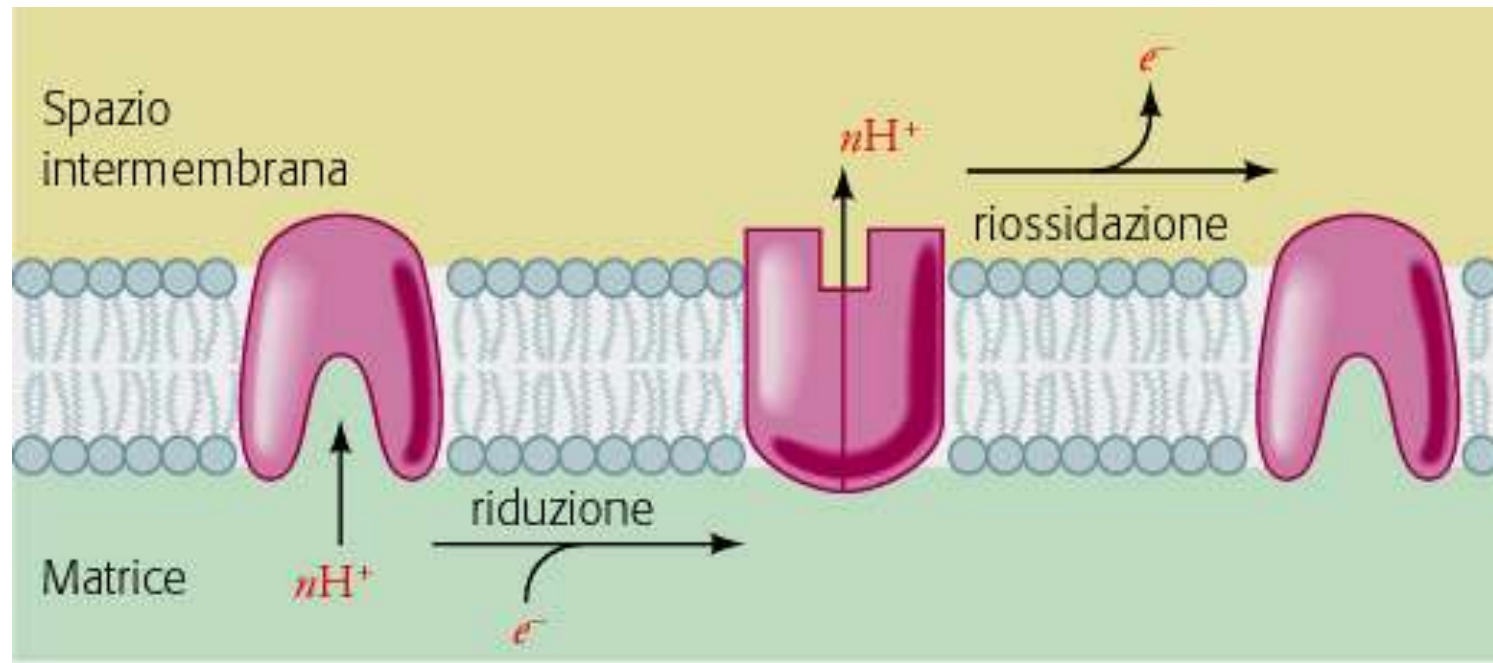
Some Agents That Interfere with Oxidative Phosphorylation or Photophosphorylation

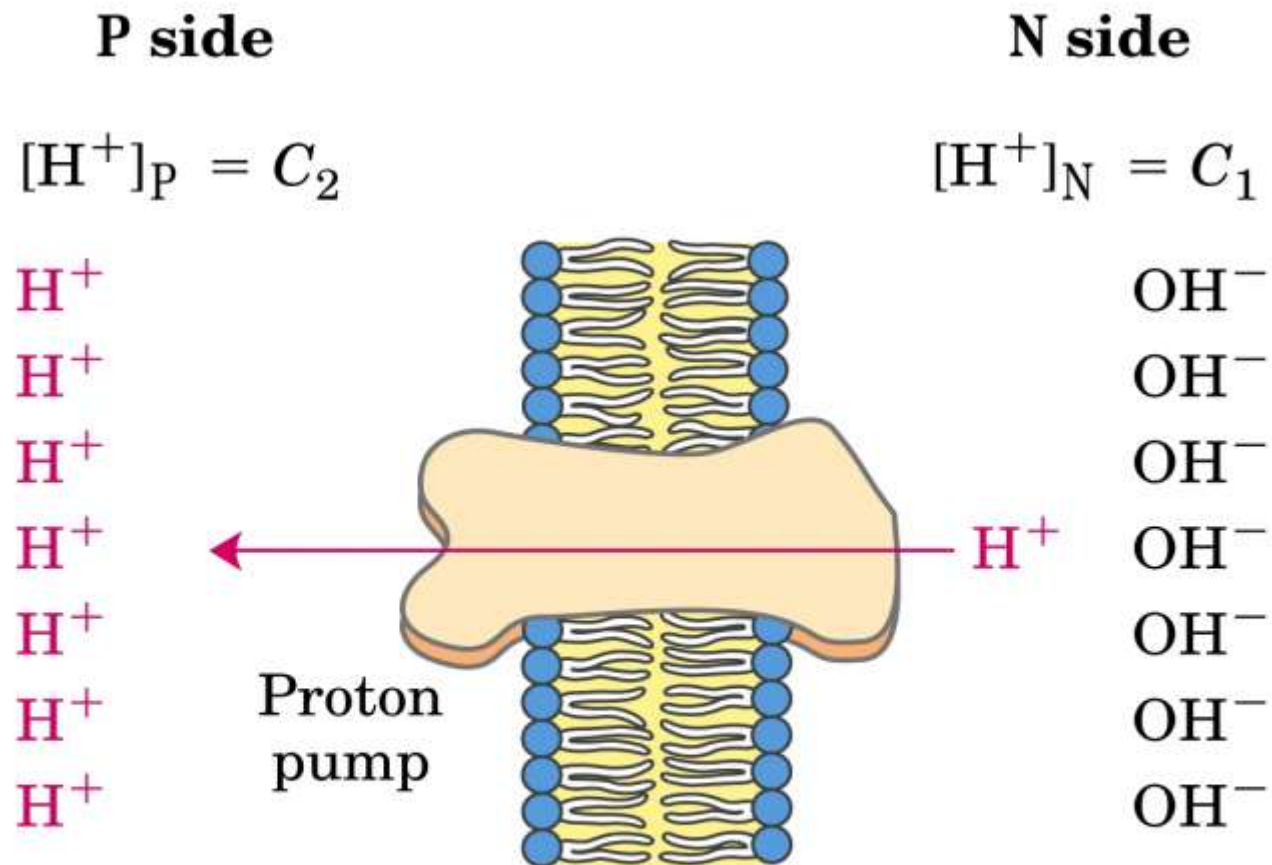
Type of interference	Compound*	Target/mode of action
Inhibition of electron transfer	Cyanide	Inhibit cytochrome oxidase
	Carbon monoxide	
	Antimycin A	Blocks electron transfer from cytochrome <i>b</i> to cytochrome <i>c</i> ₁
	Myxothiazol	
	Rotenone	Prevent electron transfer from Fe-S center to ubiquinone
	Amytal	
	Piericidin A	
Inhibition of ATP synthase	DCMU	Competes with Q _B for binding site in PSII
	Aurovertin	Inhibits F ₁
	Oligomycin	Inhibit F ₀ and CF ₀
	Venturicidin	
Uncoupling of phosphorylation from electron transfer	DCCD	Blocks proton flow through F ₀ and CF ₀
	FCCP	Hydrophobic proton carriers
	DNP	
	Valinomycin	K ⁺ ionophore
	Thermogenin	Forms proton-conducting pores in inner membrane of brown fat mitochondria
Inhibition of ATP-ADP exchange	Atractyloside	Inhibits adenine nucleotide translocase

*DCMU is 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; FCCP, cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; DNP, 2,4-dinitrophenol.



Modello del trasporto di elettroni legato alla pompa protonica





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

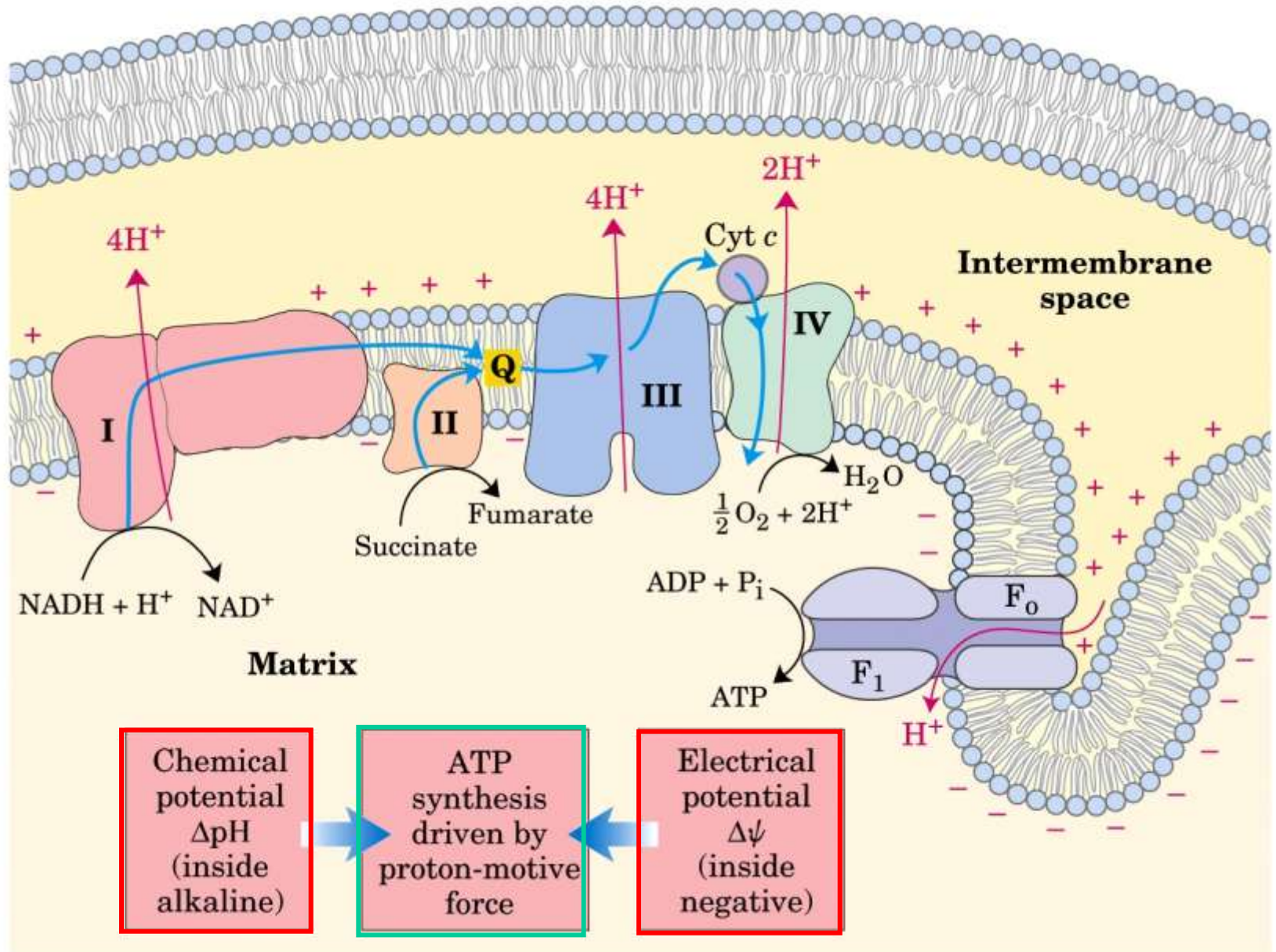
$$= 2.3RT \Delta \text{pH} + \mathcal{F} \Delta \psi$$

Z = carica del protone

$\mathcal{F}$ = costante di Faraday = quantità di carica elettrica di una mole di elettroni = 96.485,3399 C/mol

TEORIA CHEMIOSMOTICA: Peter Mitchell, 1961 (Nobel nel 1978)

Gradiente elettrochimico di H^+



La variazione di energia libera che serve a traslocare un protone verso lo spazio intermembrana è formata da **due componenti**:

$$\Delta G = 2,3 RT \underbrace{[\text{pH dentro} - \text{pH fuori}]}_{[1]} + Z\mathcal{F} \underbrace{\Delta\Psi}_{[2]}$$

Poiché il pH fuori è minore del pH dentro la matrice, [1] è positivo. Poiché $\Delta\Psi$ è positivo quando un protone viene trasportato da un potenziale negativo ad uno positivo, anche [2] è positivo $\rightarrow \Delta G$ è positivo

L'intero processo di formazione del gradiente protonico è un processo **endoergonico**

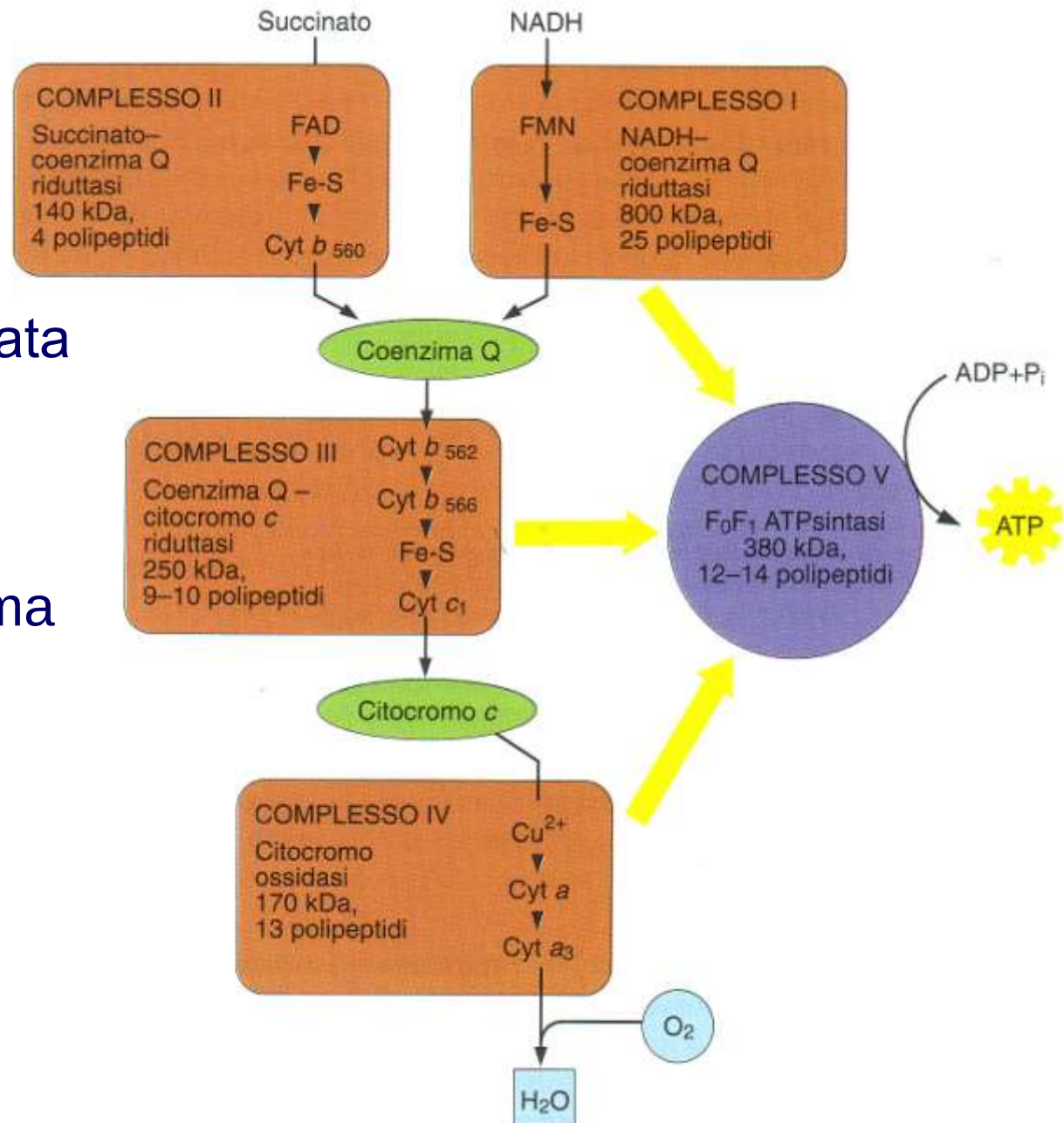
Quindi

Lo scaricamento del gradiente protonico è un processo **esoergonico accoppiato** a sintesi di ATP

PROVE SPERIMENTALI DELLA TEORIA CHEMIOSMOTICA DELLA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

1. è necessaria una membrana interna intatta
2. le proteine del trasporto sono proteine transmembrana
3. uso di agenti che dissipano il gradiente:
disaccoppianti (2, 4 dinitrofenolo)
ionofori (valinomicina)
4. inibitori della pompa protonica (oligomicina B)

L'energia libera rilasciata dal passaggio di e^- attraverso i complessi I-IV deve essere conservata in una forma utilizzabile dall'ATP sintasi (complesso V)



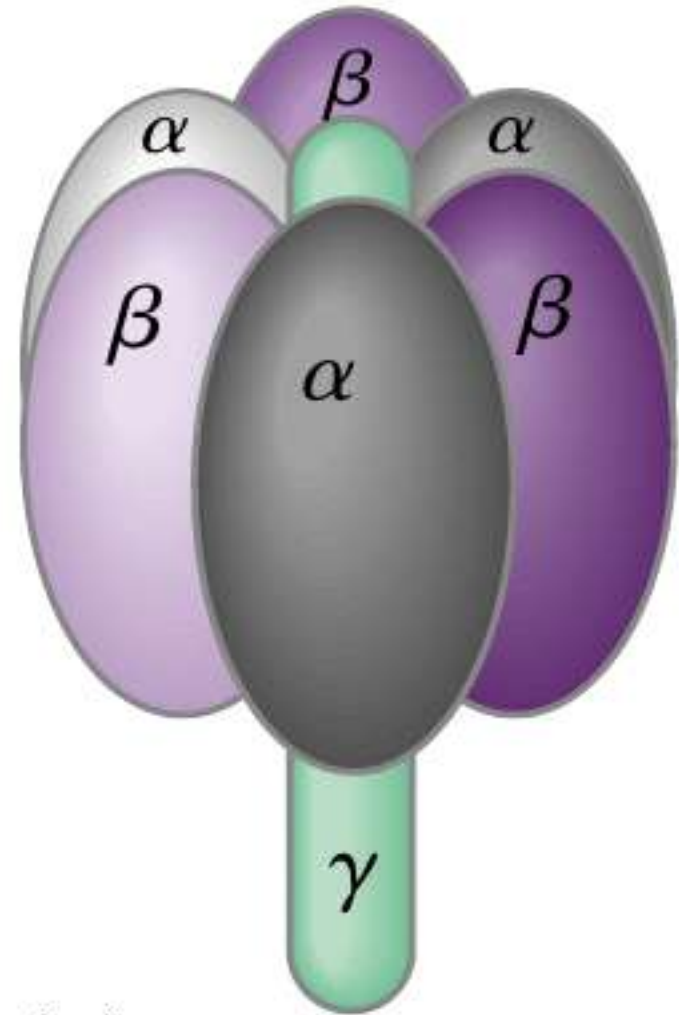
F0 – F1 ATPasi (complesso V)

F1

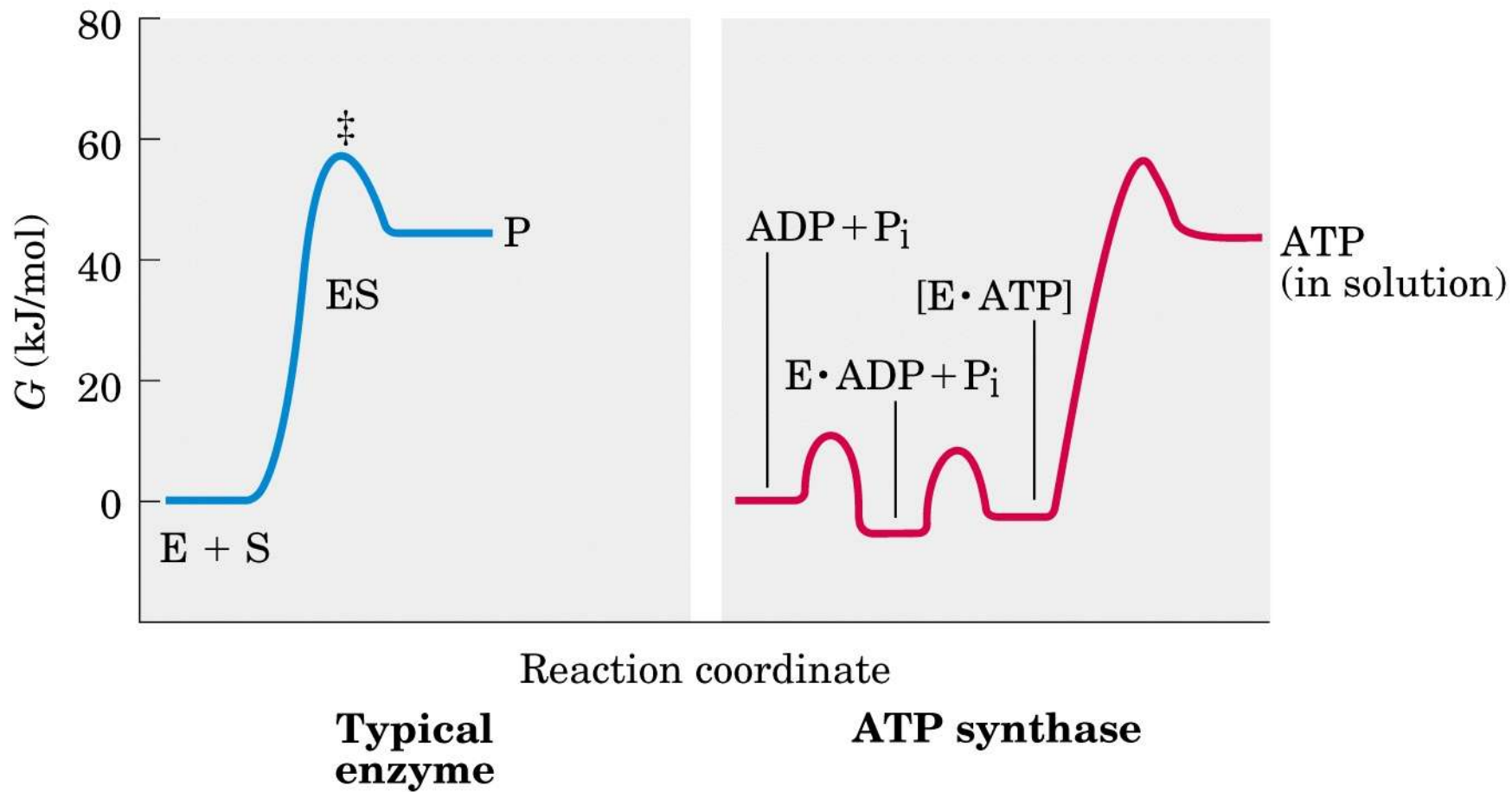
$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$

β catalizza la formazione di ATP
 α lega ATP

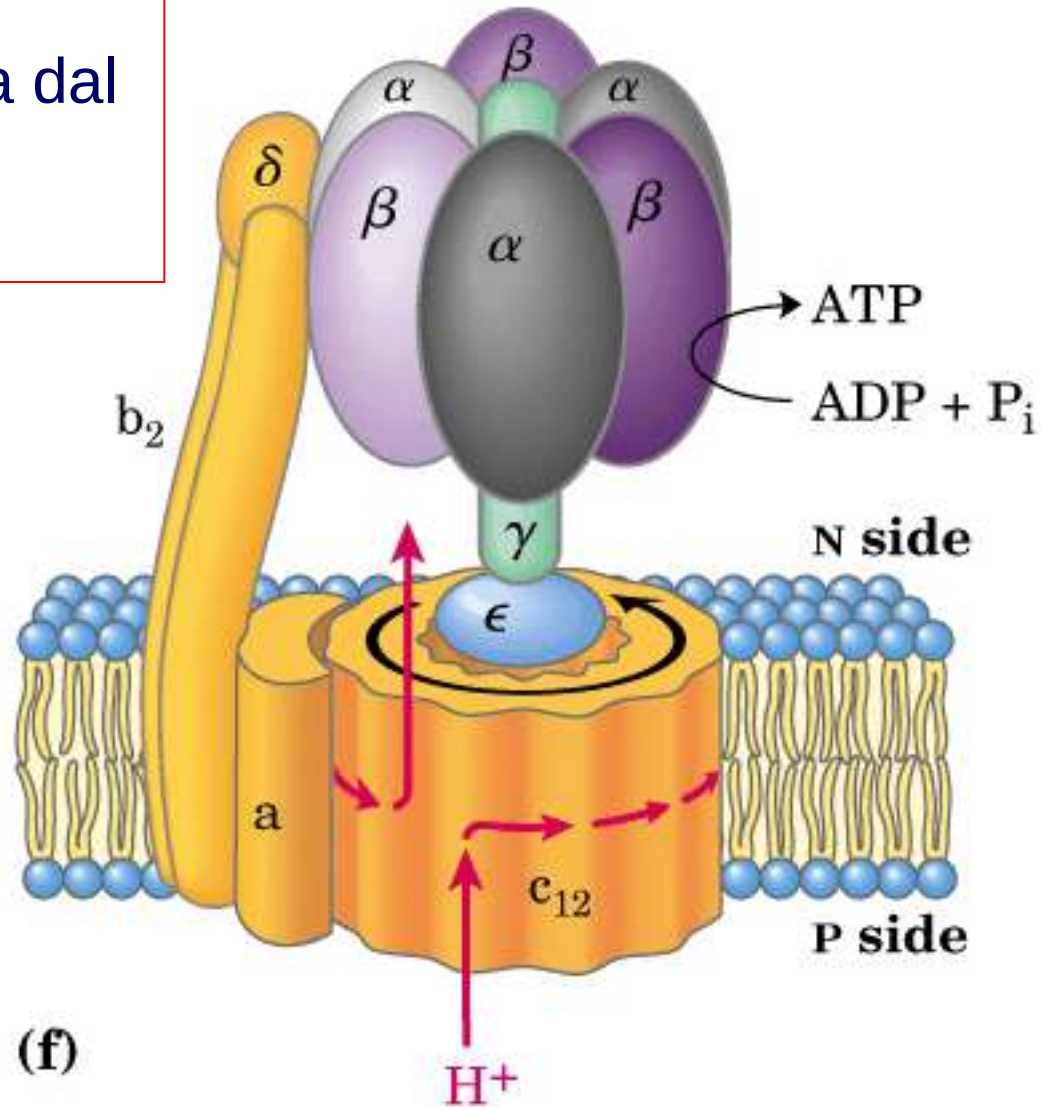
Boyer e Walker, Nobel 1997

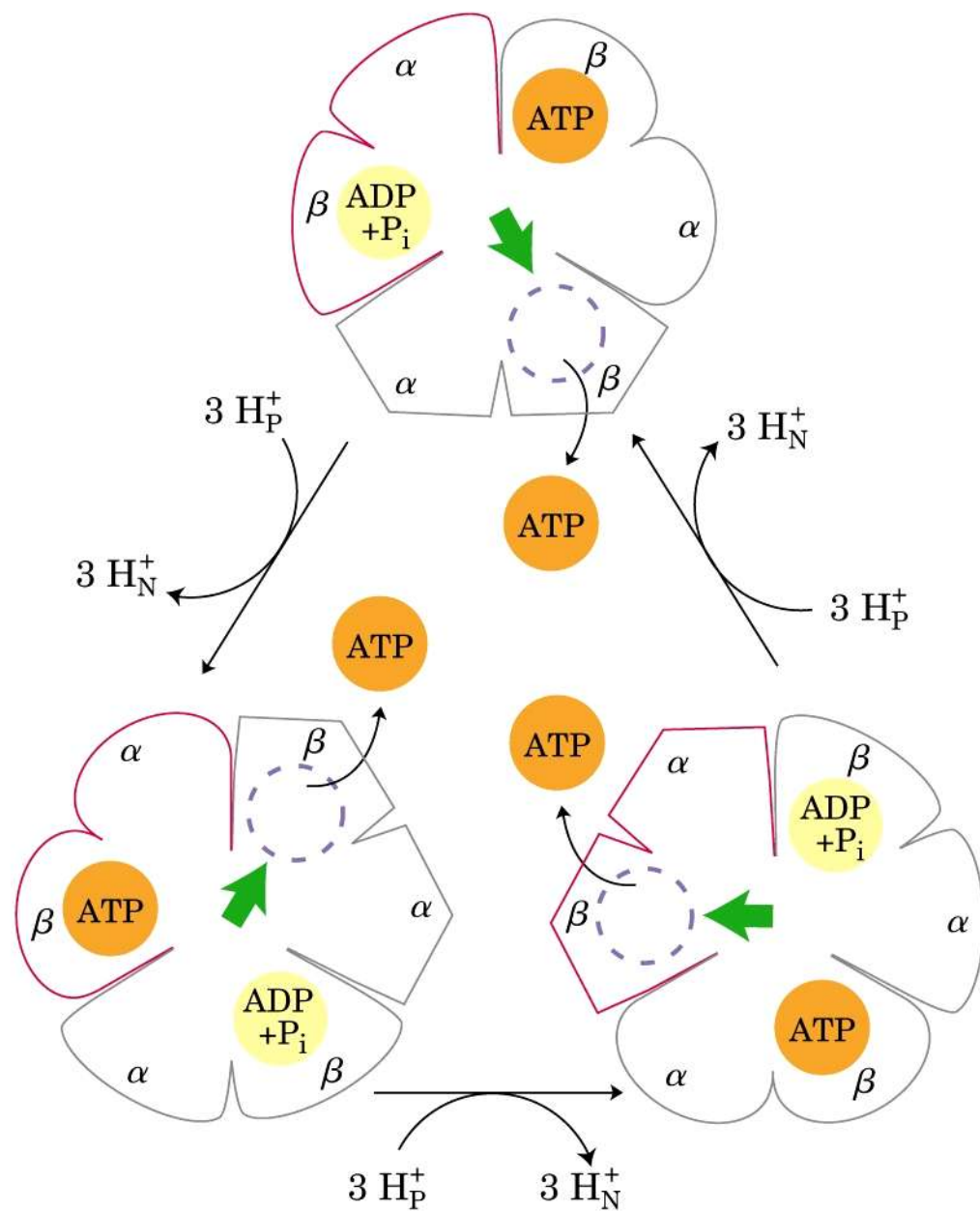


(a)



La rotazione della parte catalitica $\alpha_3\beta_3$ viene indotta dal trasferimento di protoni e consente la sintesi di ATP





RAPPORTO FOSFORO / OSSIGENO

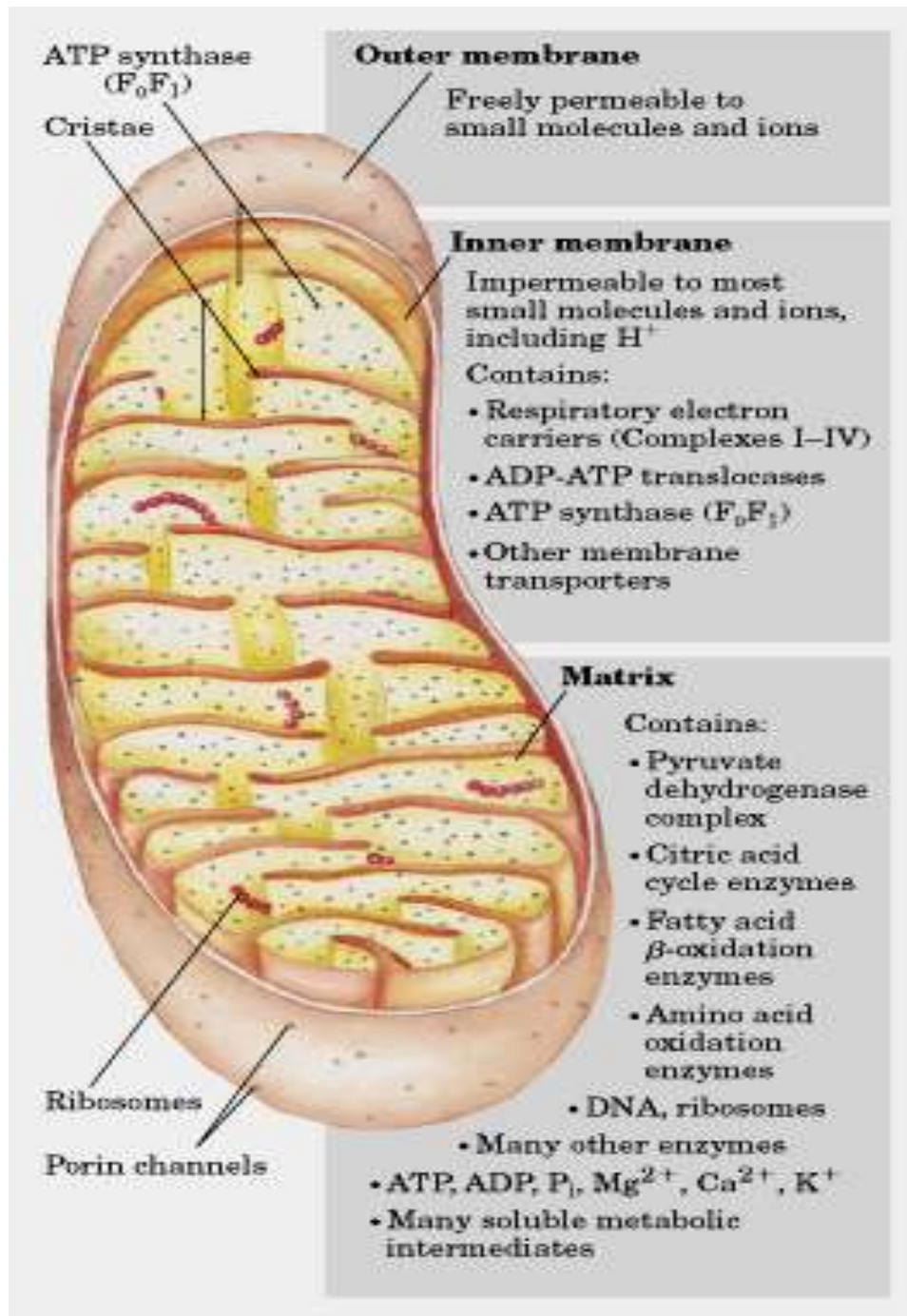
(quantità di ATP sintetizzato / O_2 ridotto)

Il passaggio di *circa* un H^+ a livello della subunità F_0 produce un solo cambiamento conformazionale (rotazione di 120°).

Quindi **per sintetizzare 1 ATP occorrono *circa* 3 H^+**

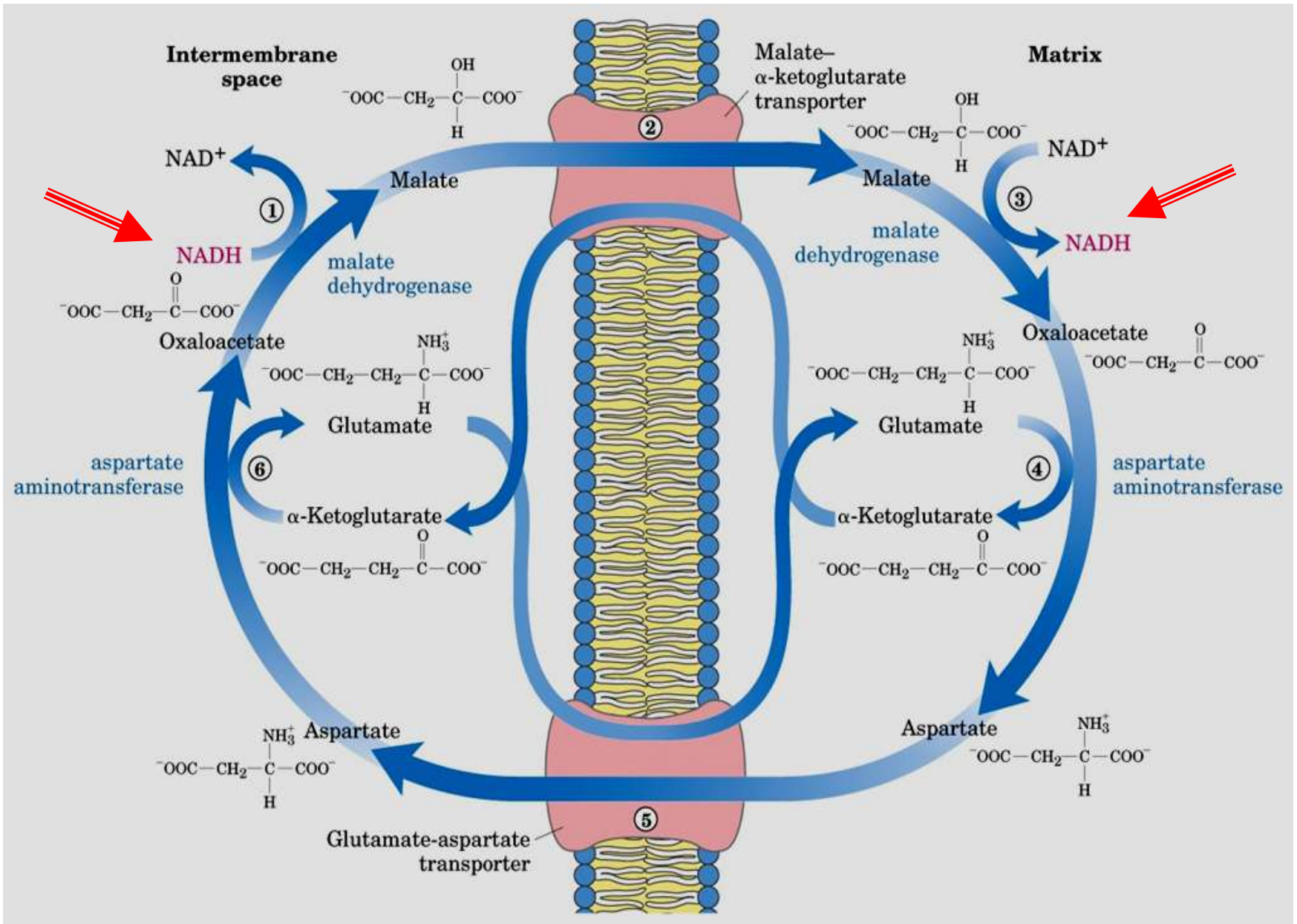
Il flusso di 2 elettroni nella catena respiratoria induce il passaggio di 10 H^+

Quindi dal NADH si possono produrre *circa* 3 ATP,
dal $FADH_2$ *circa* 2 ATP



Gli **equivalenti riducenti** vengono trasportati all'interno dei mitocondri attraverso dei sistemi navetta (Shuttle)

Shuttle del malato-aspartato



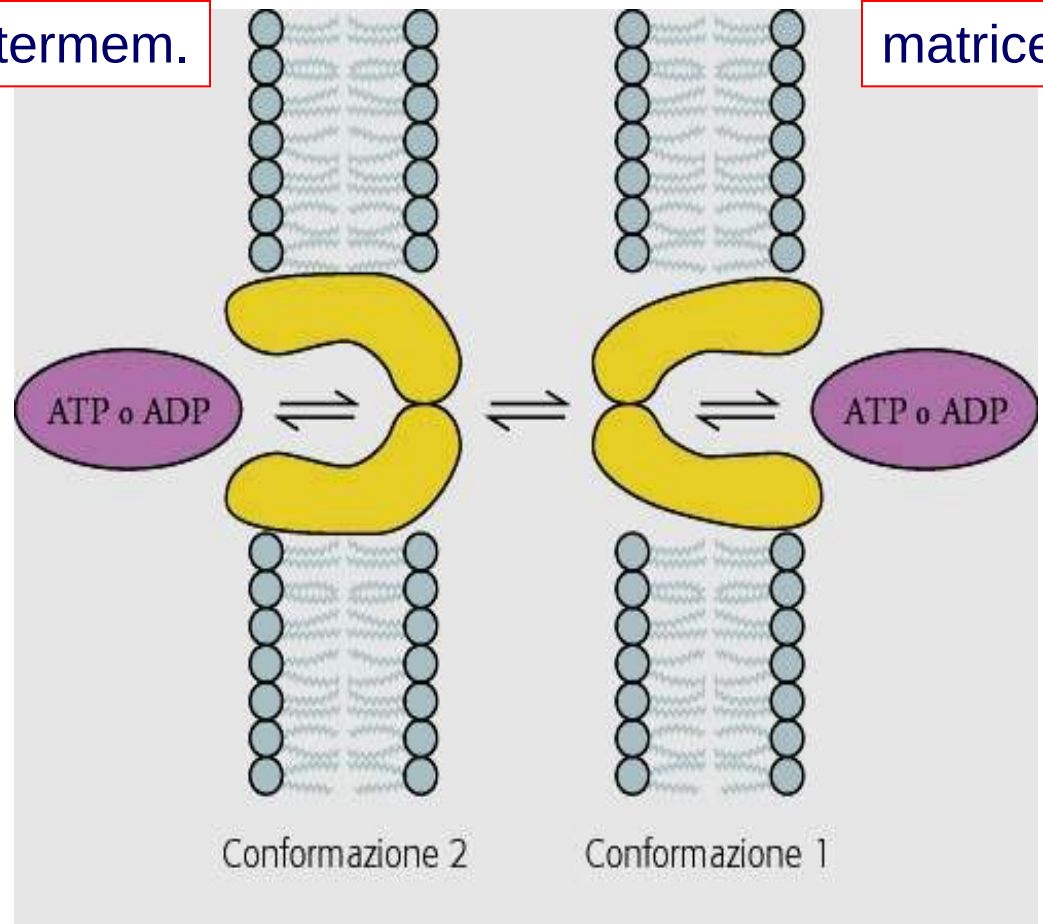
Traslocatore ADP/ATP

Sp. intermem.

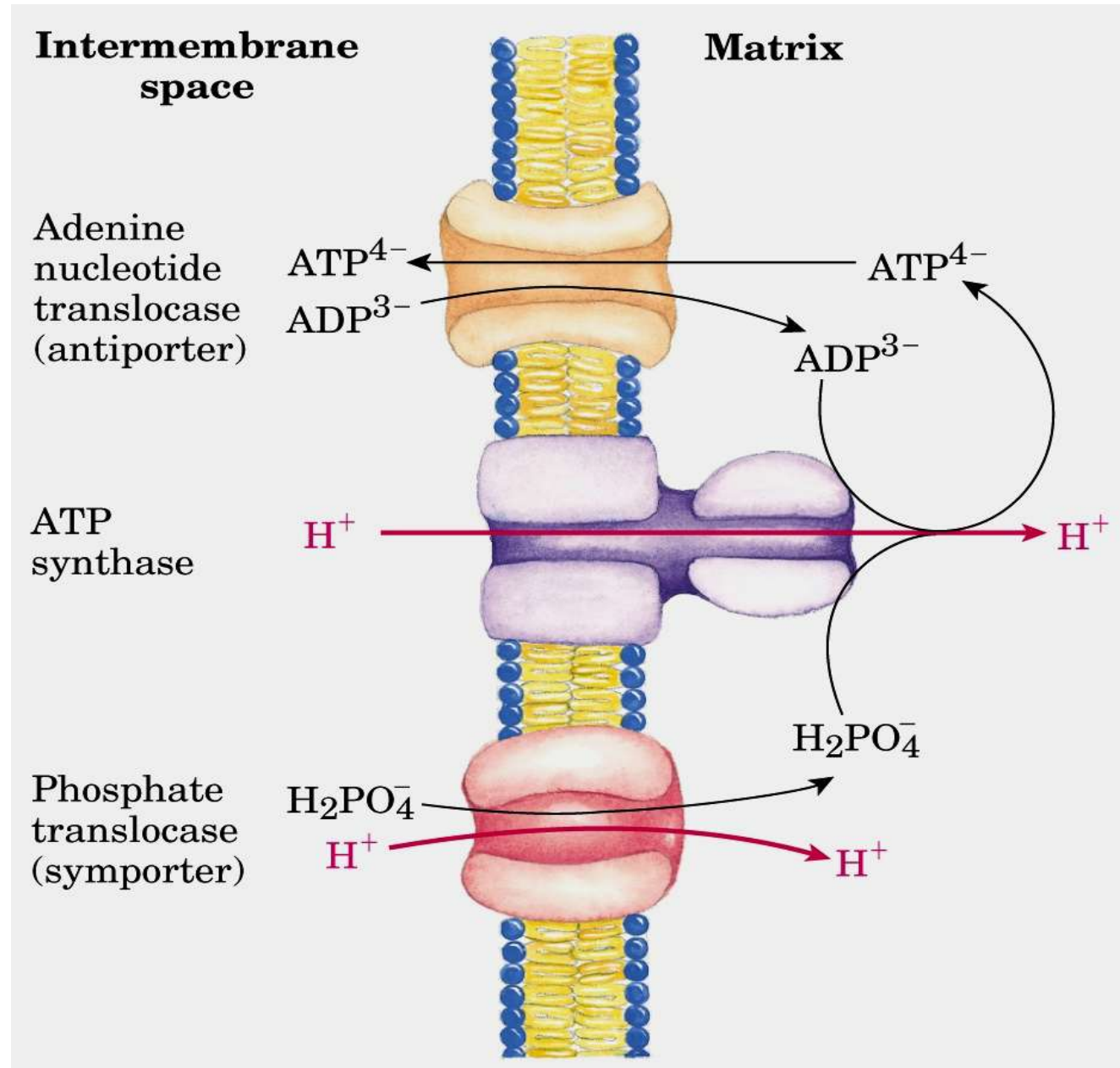
matrice

Cambia conformazione solo se legato.

Ad ogni esportazione di ATP (-4) ed importazione di ADP (-3) corrisponde il trasferimento di una carica, che è guidato dalla differenza di potenziale $\Delta\Psi$ attraverso la membrana mitocondriale interna (+ all'esterno), che guida anche l'entrata di Ca^{2+}



Traslocatore ADP/ATP



Assumendo che $1 \text{ NADH} \rightarrow 2,5 \text{ ATP}$
e $1 \text{ FADH}_2 \rightarrow 1,5 \text{ ATP}$

ATP Yield from Complete Oxidation of Glucose

Process	Direct product	Final ATP
Glycolysis	2 NADH (cytosolic)	3 or 5*
	2 ATP	2
Pyruvate oxidation (two per glucose)	2 NADH (mitochondrial matrix)	5
Acetyl-CoA oxidation in citric acid cycle (two per glucose)	6 NADH (mitochondrial matrix)	15
	2 FADH ₂	3
	2 ATP or 2 GTP	2
Total yield per glucose		30 or 32

*The number depends on which shuttle system transfers reducing equivalents into mitochondria.

RESA ENERGETICA DAL METABOLISMO AEROBIO DEL GLUCOSIO

GLICOLISI

Glucosio $\rightarrow$ 2 NADH + 2 ATP + 2 Piruvato
 $2 \times 3 \text{ ATP} + 2 \text{ ATP} = 8 \text{ ATP}$

PIRUVATO DEIDROGENASI

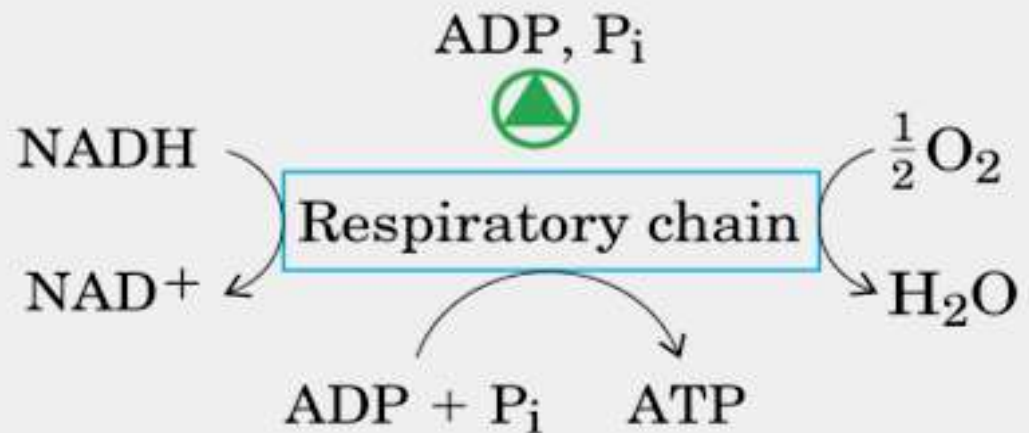
2 Piruvato $\rightarrow$ 2 NADH + 2 Acetil CoA
 $2 \times 3 \text{ ATP} = 6 \text{ ATP}$

CICLO DI KREBS

2 Acetil CoA $\rightarrow$ 4 CO₂ + 2 ATP + 6 NADH + 2 FADH₂
 $2 \text{ ATP} + 6 \times 3 \text{ ATP} + 2 \times 2 \text{ ATP} = 24 \text{ ATP}$

TOTALE 38 ATP (CIRCA)

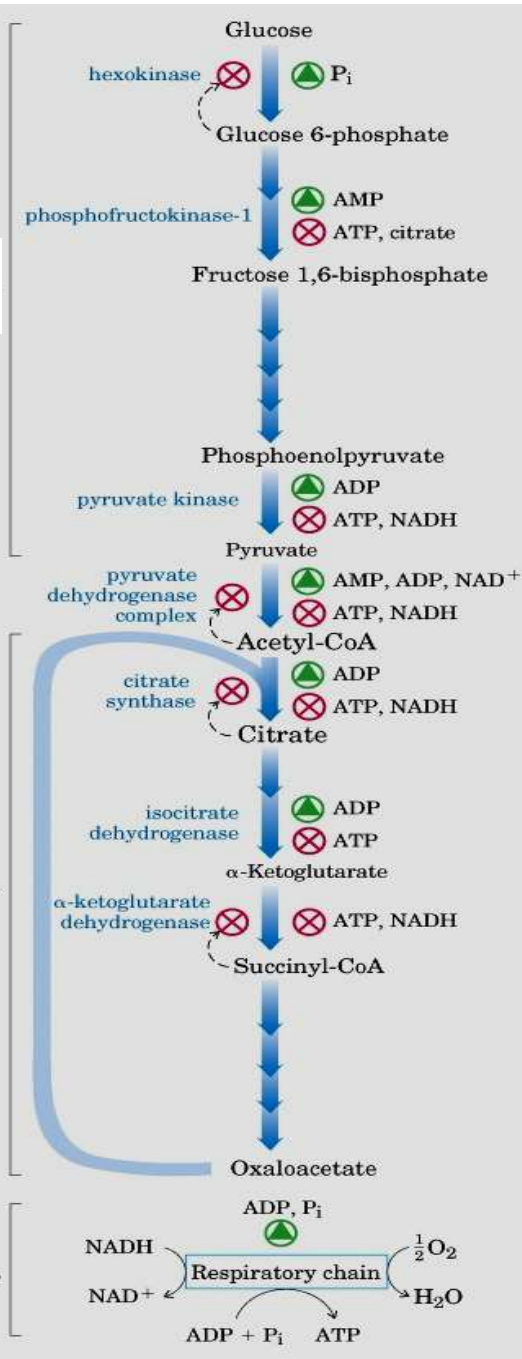
Oxidative phosphorylation



Glicolisi

Ciclo di Krebs

Fosforil. Ox.



Nel tessuto adiposo bruno (nei neonati e negli animali in letargo), anche in presenza di alte concentrazioni di ATP la respirazione continua, ma l'energia prodotta viene utilizzata per produrre calore anziché ATP attraverso la termogenina, una proteina disaccoppiante.

