



The diagram illustrates a protein complex embedded in a lipid bilayer. It features a central grey subunit labeled γ (rotor) and two purple subunits labeled β (stator). On the top surface, there are two light grey subunits labeled α (stator) and a small green subunit. The text "Fosforilazione ossidativa" is overlaid in the center.

Fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa rappresenta il culmine del metabolismo energetico negli organismi aerobi

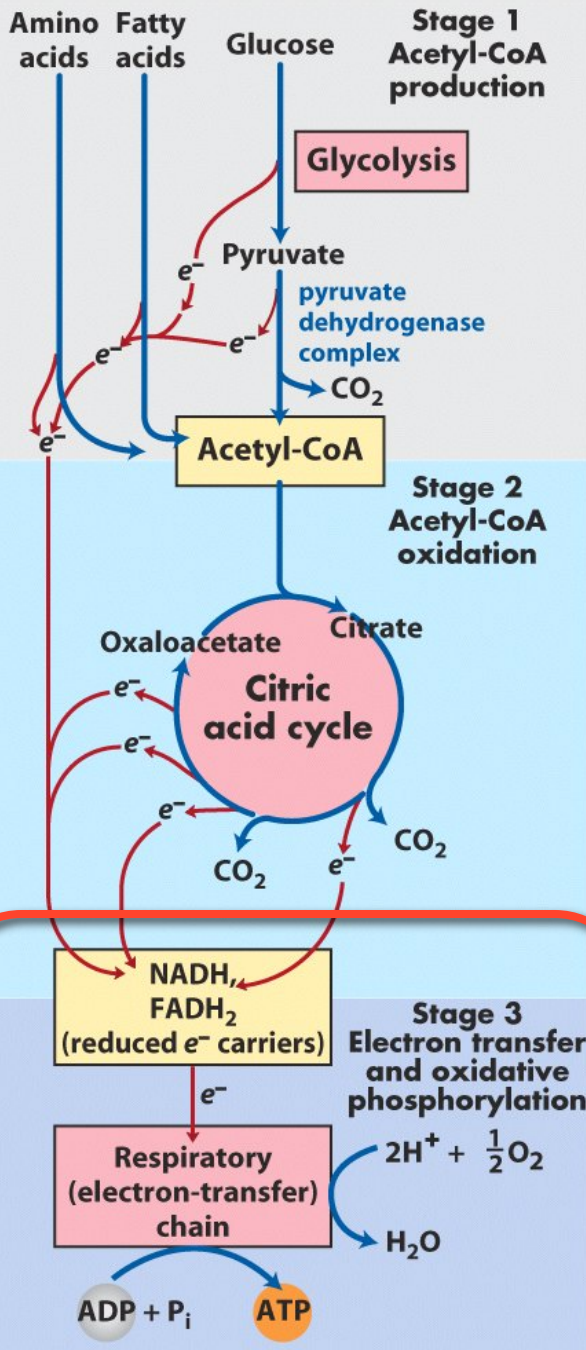
E' costituita da due fenomeni strettamente accoppiati:

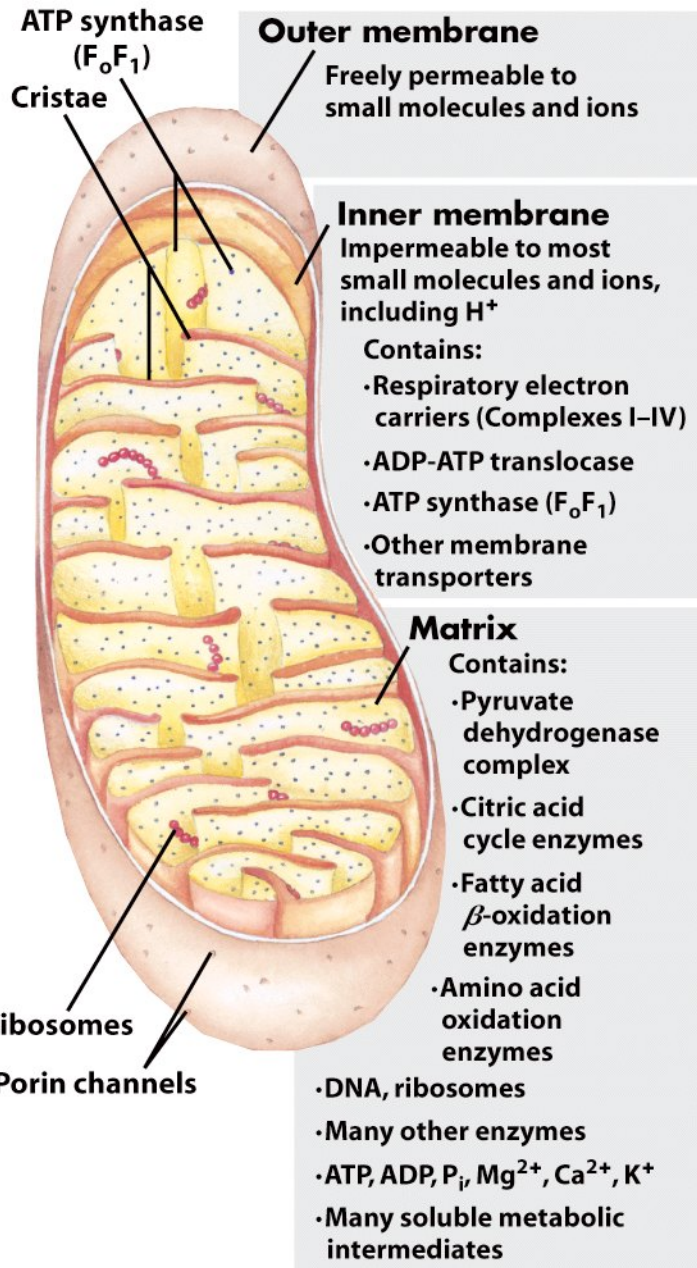
1. I coenzimi ridotti prodotti durante le reazioni ossidative vengono ossidati nella **catena di trasporto degli elettroni**, lungo la quale gli elettroni vengono trasferiti all'ossigeno molecolare

La catena respiratoria di trasporto degli elettroni è un sistema di complessi proteici localizzati nella membrana mitocondriale interna (membrana plasmatica delle cellule procariotiche)

Tre di questi complessi sono **ossidoreduttasi che pompano protoni**, cioè generano un gradiente di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna

2. Il gradiente di protoni è una **fonte di energia libera** che viene dissipata quando i protoni passano nuovamente attraverso la membrana mitocondriale interna tramite il complesso ATP sintasi
In questo processo si forma **ATP**





E.Kennedy, A.Lehninger (1948): nelle cellule eucariotiche la fosforilazione avviene nei mitocondri. Questa scoperta rappresenta storicamente l'inizio degli studi sulla trasduzione energetica nei sistemi biologici



Albert L. Lehninger
1917-1986

I mitocondri derivano probabilmente da batteri aerobici, contenenti già la fosforilazione ossidativa, entrati in rapporto simbiotico con cellule anaerobiche primitive di eucarioti
Come i batteri gram-negativi, i mitocondri hanno due membrane

Ricordiamo:

Gli elettroni che entrano nella catena respiratoria sono frutto dell'azione di deidrogenasi che utilizzano trasportatori di elettroni

NAD e NADP sono trasportatori di elettroni solubili in acqua che **si associano reversibilmente alle deidrogenasi**.

NADH si comporta come un **composto diffusibile** che trasporta gli elettroni dalle reazioni cataboliche al complesso della NADH-deidrogenasi, primo punto di ingresso degli elettroni nella catena respiratoria

Anche NADPH è un trasportatore diffusibile, ma fornisce di elettroni le reazioni anaboliche

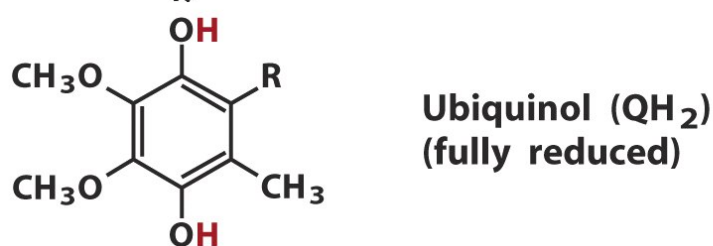
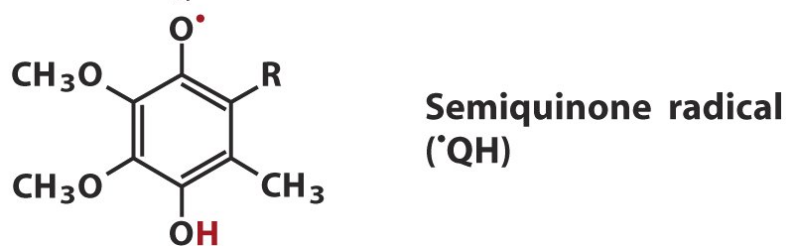
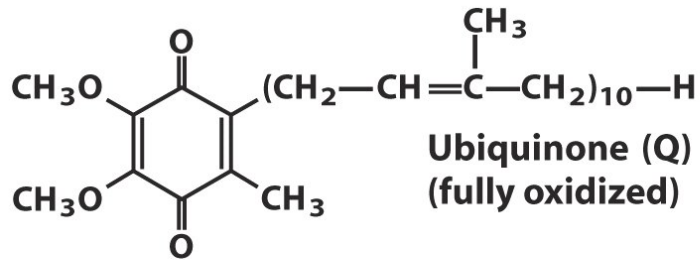
FAD e FMN sono il cofattore delle flavoproteine **legato saldamente, in qualche caso covalentemente, all'enzima**. Questi coenzimi possono essere considerati parte integrale del sito attivo dell'enzima e non reagenti o prodotti di una reazione di ossido-riduzione

Alcune reazioni della sequenza della catena respiratoria comportano il trasferimento di un solo elettrone, mentre in altre vi è il trasferimento contemporaneo di due elettroni

Oltre a NAD e Flavoproteine nella catena respiratoria operano altri tre gruppi di trasportatori di elettroni:

- un benzochinone idrofobico (ubichinone)
- citocromi
- proteine ferro-zolfo

Ubichinone (Coenzima Q)



Benzochinone con catena laterale isoprenoide

Può accettare un solo elettrone, trasformandosi in un radicale semichinonico, oppure può accettare due elettroni trasformandosi nella forma completamente ridotta (Ubichinolo)

Come le flavoproteine, può mettere in relazione processi a due elettroni con altri ad un elettrone

E' di piccole dimensioni ed idrofobico; può quindi diffondere liberamente nella membrana mitocondriale interna e può agire da ponte tra trasportatori di elettroni meno mobili

Trasporta sia elettroni che protoni (importante ruolo nel processo di accoppiamento tra flusso elettronico e movimento protonico)

Citocromi

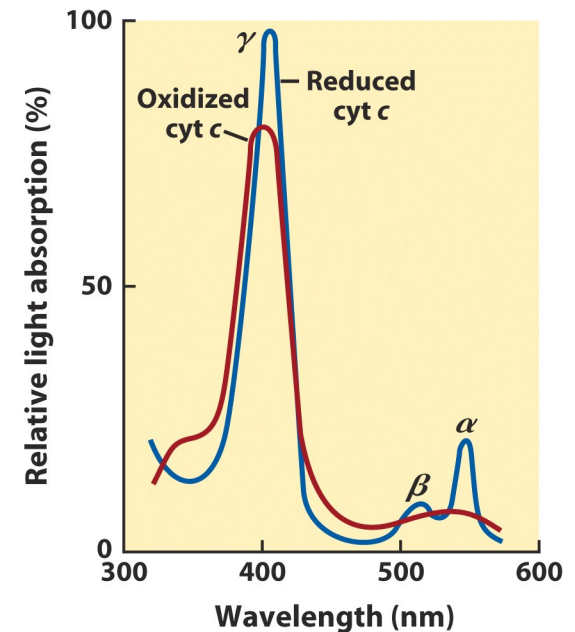
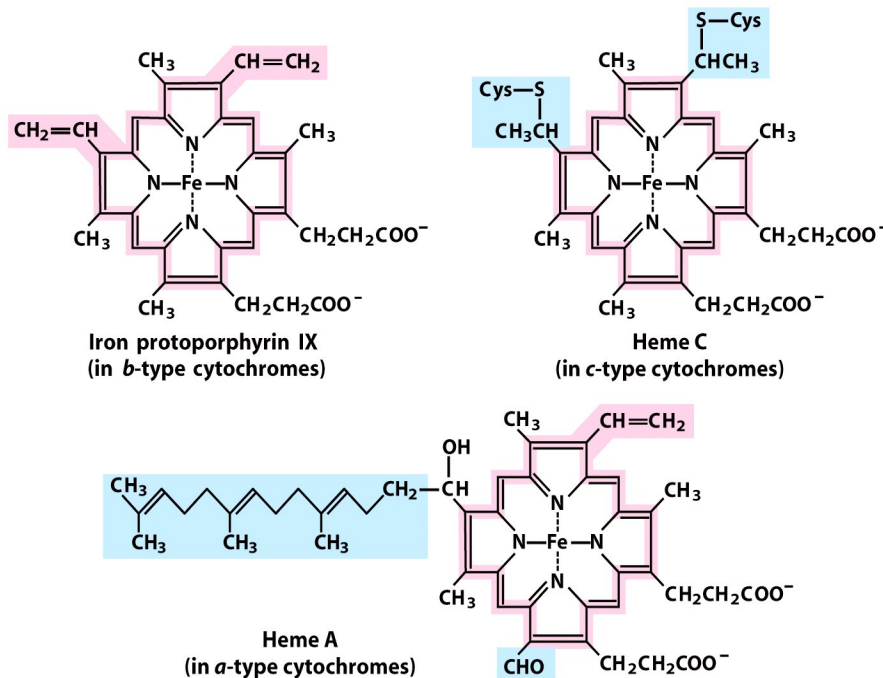
Proteine con una elevata capacità di assorbire la luce visibile dovuta alla presenza di un gruppo prostetico EME contenente FERRO

Tre classi di citocromi (a, b e c) distinguibili in base allo spettro di assorbimento

Il gruppo eme dei citocromi a e b è saldamente legato alla proteina ma senza legami covalenti

Il gruppo eme dei citocromi c è legato covalentemente a residui di cisteina della proteina

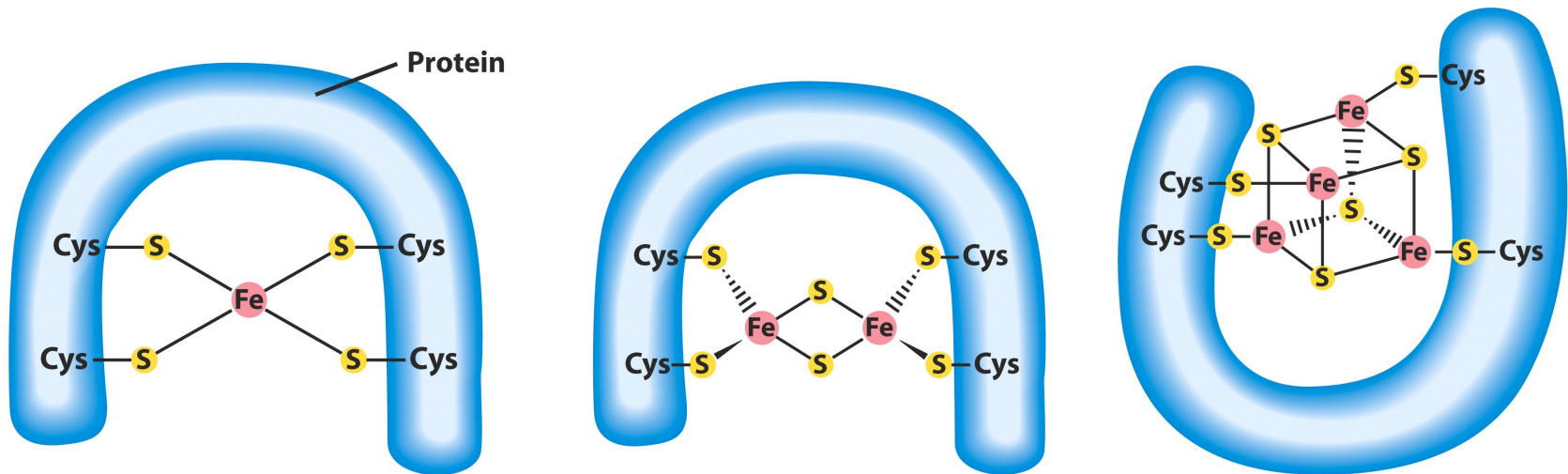
Il potenziale standard di riduzione del ferro all'interno dell'eme dipende dalle sue interazioni con le catene laterali della proteina, quindi è diverso in ogni tipo di citocromo



Proteine ferro-zolfo

Il ferro è associato ad atomi di zolfo inorganico o ad atomi di zolfo di residui di Cys della proteina

Partecipano a reazioni redox in cui viene trasferito un elettrone alla volta utilizzando la modificazione dello stato di ossidazione degli atomi di ferro

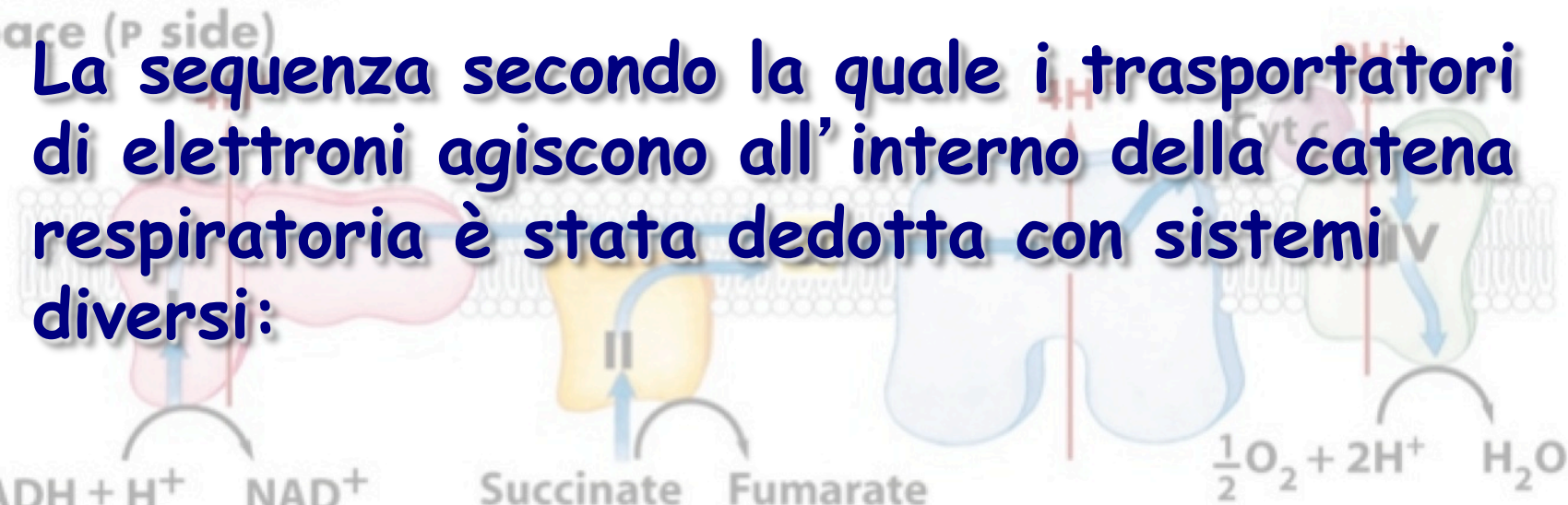


Intermembrane
space (P side)

La sequenza secondo la quale i trasportatori di elettroni agiscono all'interno della catena respiratoria è stata dedotta con sistemi diversi:



Matrix (N side)



1. Determinazione sperimentale dei potenziali standard di riduzione

(basso potenziale standard: buoni donatori di elettroni

alto potenziale standard: buoni accettori di elettroni):

ci si aspetta che i trasportatori siano disposti in ordine di potenziale di riduzione crescente, dato che gli elettroni tendono a fluire spontaneamente da trasportatori con $E' \circ$ basso verso quelli con $E' \circ$ alto

TABLE 19-2 Standard Reduction Potentials of Respiratory Chain and Related Electron Carriers

<i>Redox reaction (half-reaction)</i>	<i>E'° (V)</i>
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{H}_2$	-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
$\text{NADH dehydrogenase (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{NADH dehydrogenase (FMNH}_2)$	-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
$\text{Cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \longrightarrow \text{cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{2+})$	0.35
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.8166

L'ordine di trasportatori dedotto con questo sistema è:



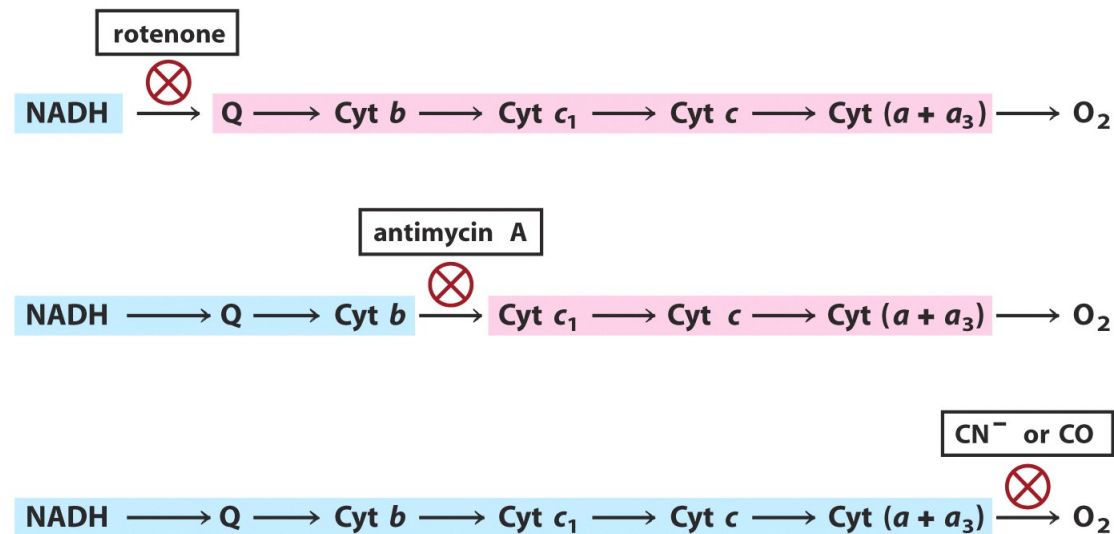
Da considerare che l'ordine reale all'interno della cellula dipende anche dalle concentrazioni relative delle forme ossidate e ridotte

2. Determinazione degli effetti di inibitori del trasferimento degli elettroni

In presenza di un donatore di elettroni e di O_2 ogni inibitore modifica in modo caratteristico lo stato di ossidoriduzione dei trasportatori di elettroni:

quelli prima del blocco si riducono

quelli dopo il blocco sono ossidati



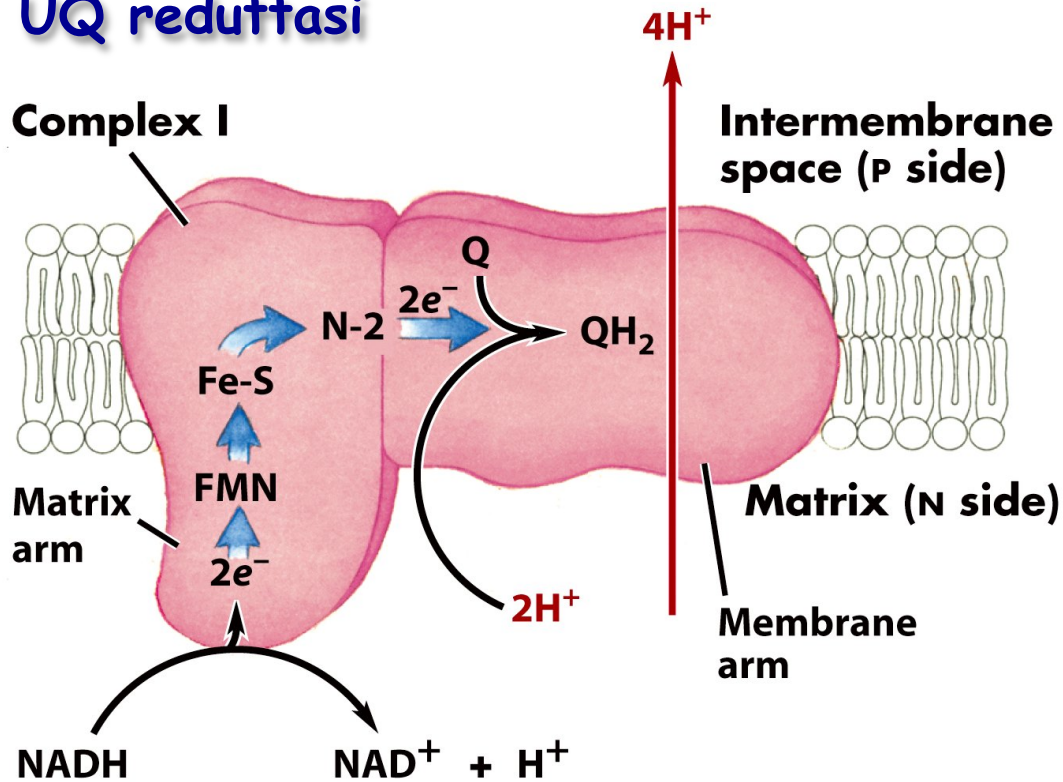
I trasportatori di elettroni della catena respiratoria sono organizzati in complessi multienzimatici intramembrana separabili

Ogni complesso rappresenta una frazione della catena respiratoria

	Complesso	Massa (kD)	Subunità	Gruppo prostetico	Sito di legame per:
I	NADH-UQ reduttasi	980	≥45	FMN Fe-S	NADH (lato matrice) UQ (nucleo lipidico)
II	Succinato-UQ reduttasi	140	4	FAD Fe-S	Succinato (lato matrice) UQ (nucleo lipidico)
III	UQ-Cit <i>c</i> reduttasi	250	9-10	Eme <i>b_L</i> Eme <i>b_H</i> Eme <i>c₁</i> Fe-S	Cit <i>c</i> (lato dello spazio intermembrana)
	Citocromo <i>c</i>	13	1	Eme <i>c</i>	Cit <i>c₁</i> Cit <i>a</i>
IV	Citocromo <i>c</i> ossidasi	162	13	Eme <i>a</i> Eme <i>a₃</i> Cu _A Cu _B	Cit <i>c</i> (lato dello spazio intermembrana)

Complesso I: da NADH a ubiquinone

NADH:ubichinone ossidoreduttasi o NADH deidrogenasi o NADH-UQ reduttasi



Trasferimento di uno ione idruro da NADH a FMN

I due elettroni passano attraverso una serie di centri ferro-zolfo fino all'ubichinone che si riduce

QH₂ diffonde all'interno del doppio strato lipidico

Il trasferimento di elettroni porta anche all'espulsione dalla matrice di protoni

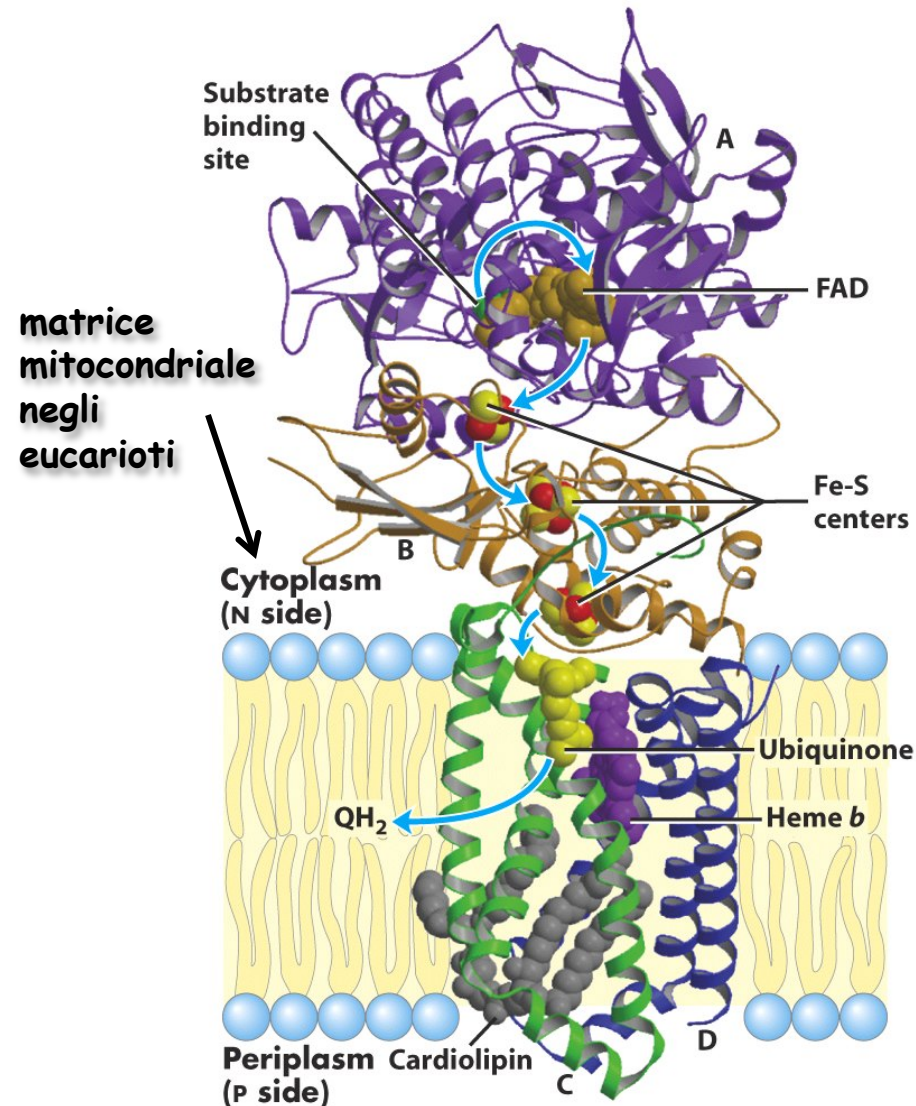
(4H⁺ per ogni coppia di e⁻)

con un meccanismo non ancora noto

Il flusso protonico (pompa protonica) produce un potenziale elettrochimico tra i due lati della membrana che conserva parte dell'energia rilasciata dalle reazioni esoergoniche di trasferimento degli elettroni

Complesso II: da succinato a ubiquinone

Succinato deidrogenasi o succinato-UQ reduttasi



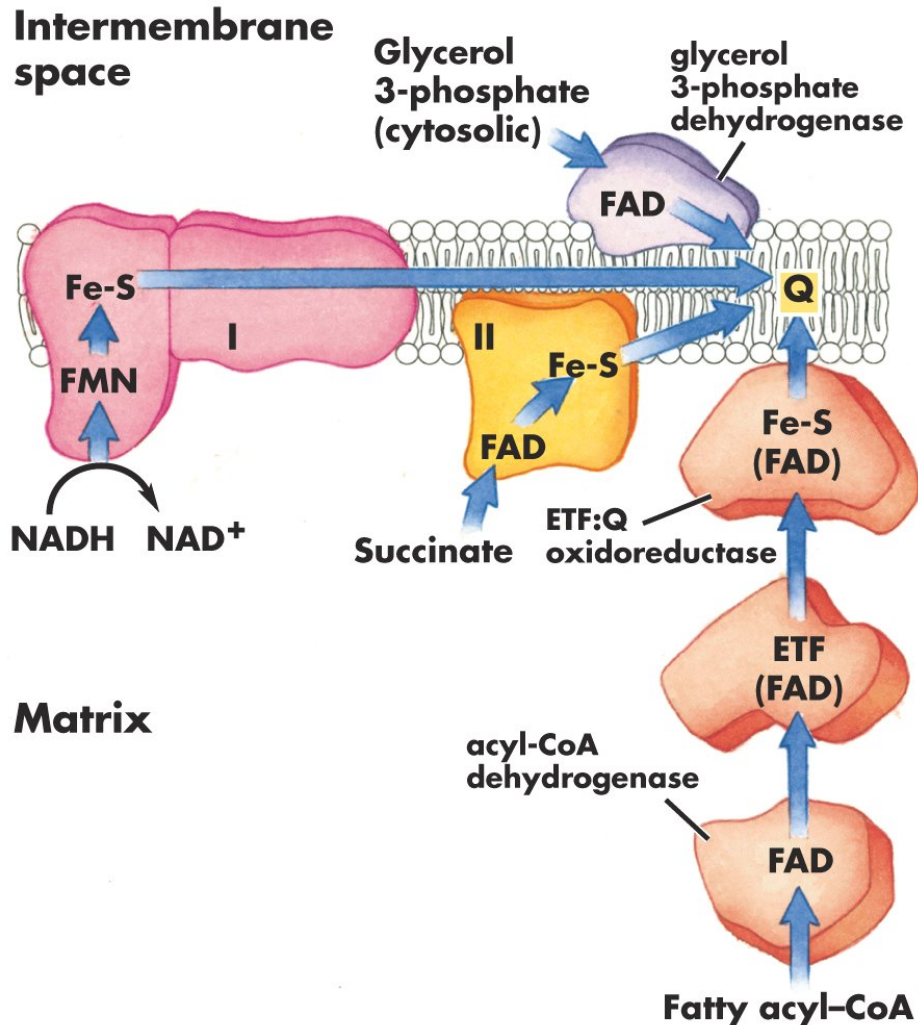
Gli elettroni si muovono dal succinato a FAD, quindi attraversano tre centri Fe-S fino all'ubichinone

Il gruppo eme B presente nel complesso non si trova nel percorso diretto degli elettroni

Può servire a proteggere dalla formazione di ROS catturando elettroni che "escono" dal sistema muovendosi dal succinato a O₂

Struttura del complesso II di E.coli

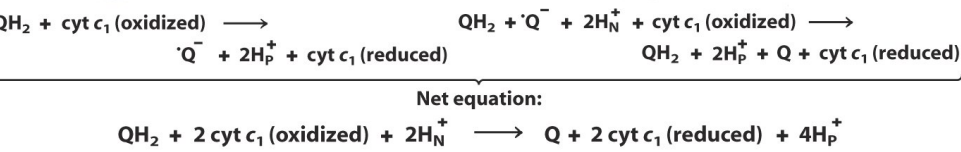
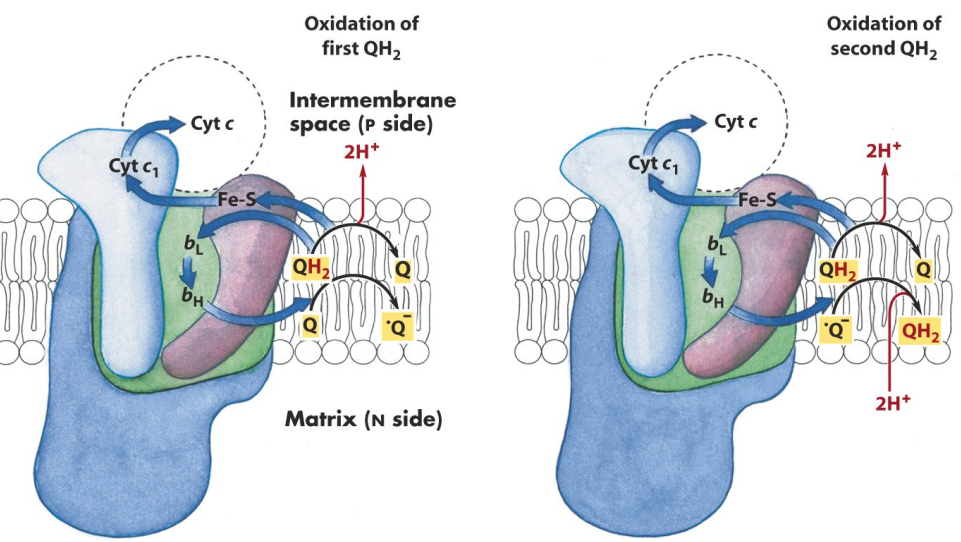
Altri substrati di deidrogenasi mitocondriali passano i loro elettroni alla catena respiratoria a livello dell'ubichinone senza passare dai complessi I o II



acil-CoA deidrogenasi (prima tappa della β -ossidazione degli acidi grassi): trasferimento degli elettroni a FAD, ETF (proteina che trasferisce elettroni), ETF:ubichinone ossidoreduttasi, ubichinone

glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale flavoproteina localizzata sulla faccia esterna della membrana mitocondriale interna incanala gli elettroni nella catena respiratoria riducendo direttamente Q.

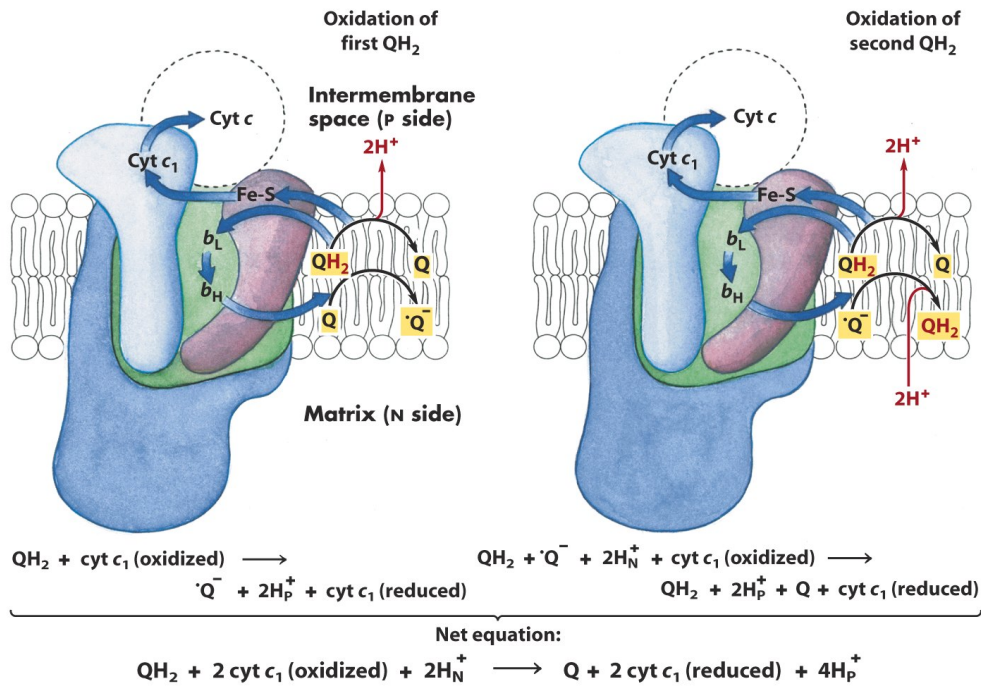
Complesso III: da ubiquinone a citocromo c
Complesso del citocromo bc₁ o ubiquinone: citocromo c ossidoreduttasi o ubiquinone-citocromo c reduttasi
 contiene due siti di legame per Q: Q_P e Q_N



seconda pompa protonica
(4 H⁺ per ogni coppia di e⁻)

CICLO DELL' UBICHINONE (CICLO Q) :

- una prima molecola di QH₂ legata a Q_P cede separatamente un e⁻ al citocromo c e l'altro ad una molecola di Q legato a Q_N: si forma una molecola di citocromo c ridotto e una molecola di radicale anionico semichinonico. Q neofornato abbandona il complesso.
- una seconda molecola di QH₂ cede un e⁻ al citocromo c e l'altro al radicale: si forma citocromo c e QH₂. il secondo trasferimento di e⁻ comporta la captazione di due protoni dalla matrice. Q neofornato abbandona il complesso.

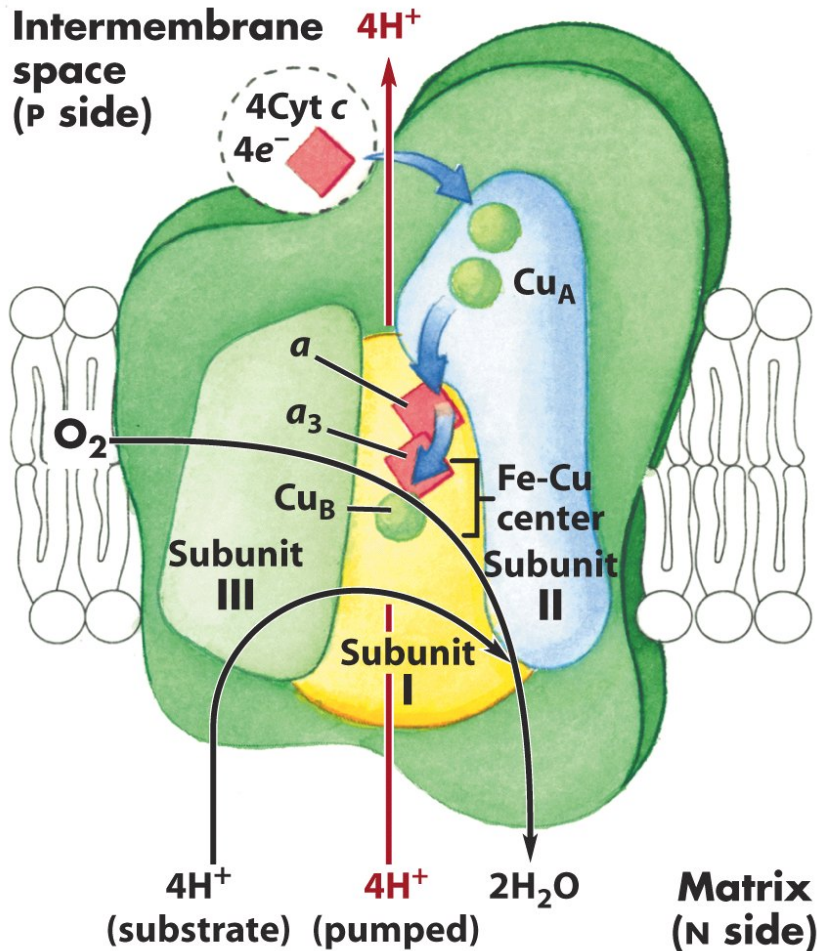


Il ciclo Q incanala gli e⁻ da un trasportatore a due e⁻ ad un trasportatore a un e⁻.

Il citocromo c è una proteina solubile dello spazio intermembrana
 Il citocromo c ridotto a livello del complesso III si sposta verso il complesso IV per cedere l' e⁻.

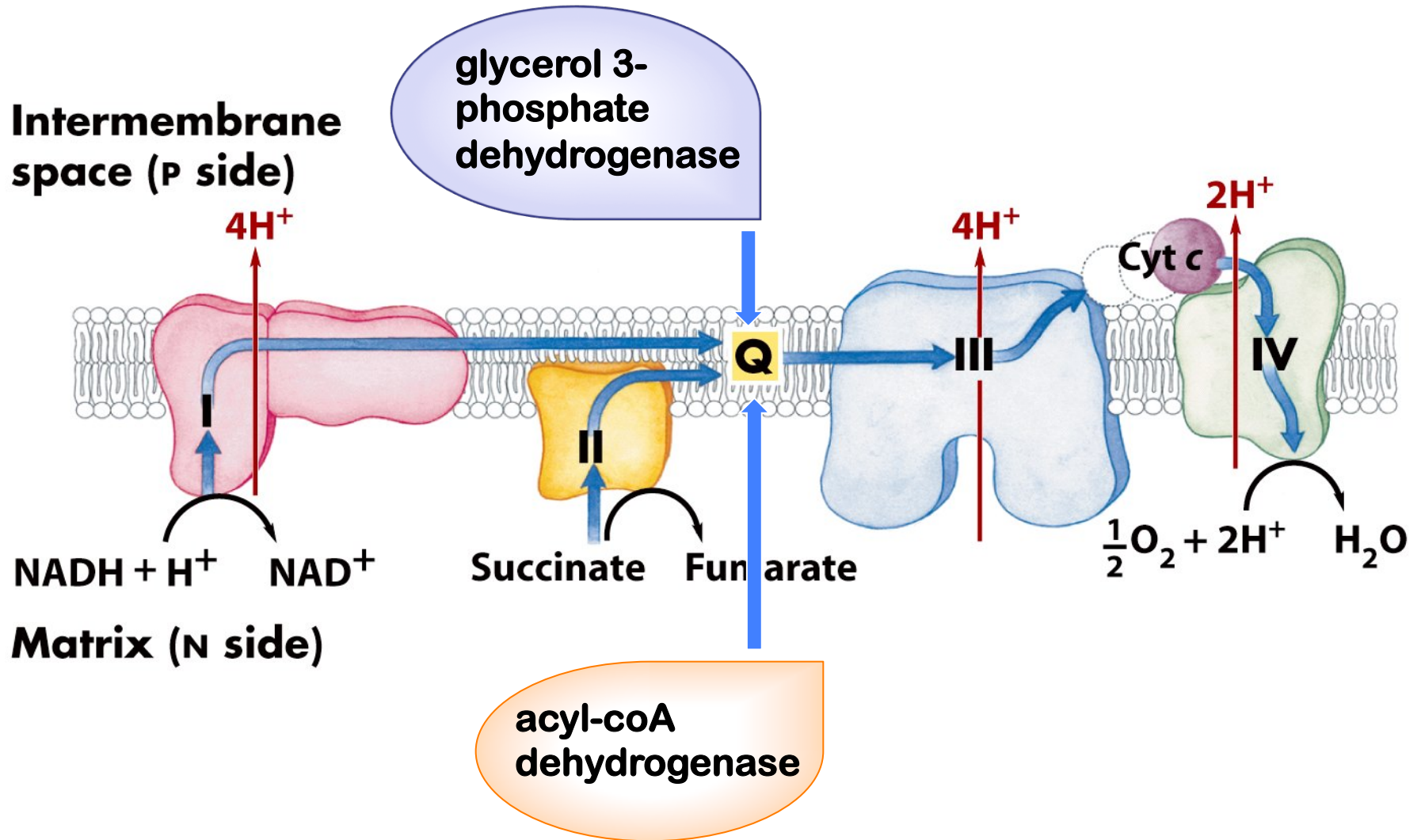
Complesso IV: da citocromo c a O_2

Citocromo c ossidasi



Complesso di grandi dimensioni
le tre proteine importanti per il
trasferimento elettronico sono la I, II
e III
trasferimento di e^- dal citocromo c
ridotto a O_2
attraverso: centro Cu_A , gruppo eme
 a , centro a_3 - Cu_B
i protoni necessari per formare H_2O
vengono prelevati dalla matrice
il flusso degli elettroni attraverso il
complesso determina lo spostamento di
protoni dalla matrice allo spazio
intermembrana (terza pompa protonica
- 2H^+ per ogni coppia di e^-)

Il flusso di elettroni e protoni attraverso i quattro complessi della catena respiratoria

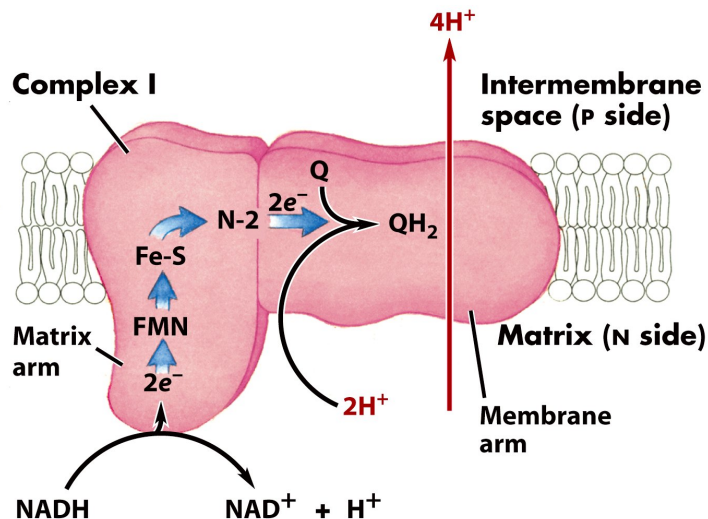


Sistemi navetta specifici (shuttle) trasferiscono gli equivalenti riducenti di NADH citosolico nei mitocondri

NADH è prodotto nel citosol

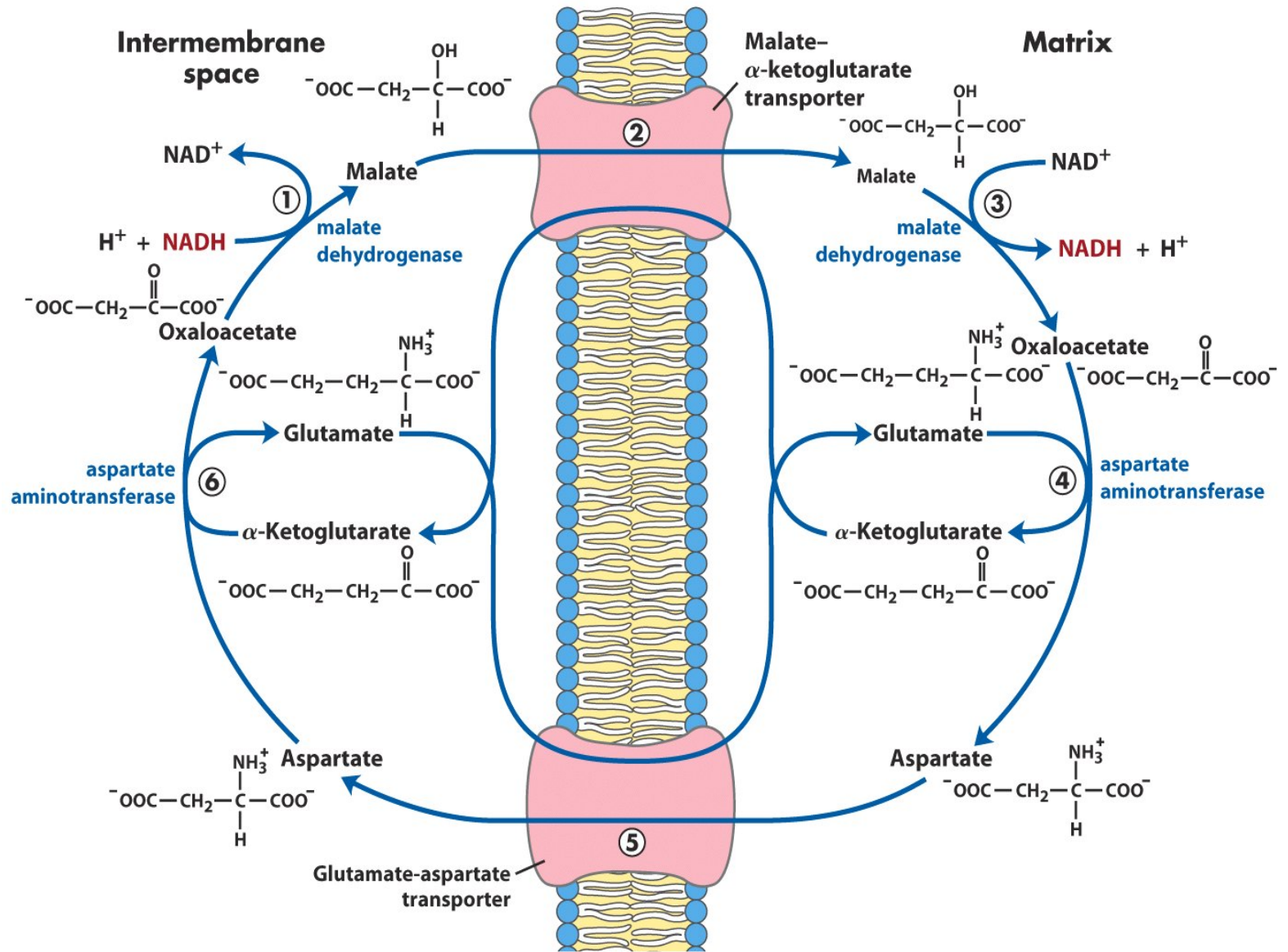
La membrana mitocondriale interna non è permeabile a NADH citosolico che può arrivare fino allo spazio intermembrana

NADH deidrogenasi del Complesso I accetta elettroni da NADH presente nella matrice (l'interazione avviene sul lato interno della membrana mitocondriale interna)

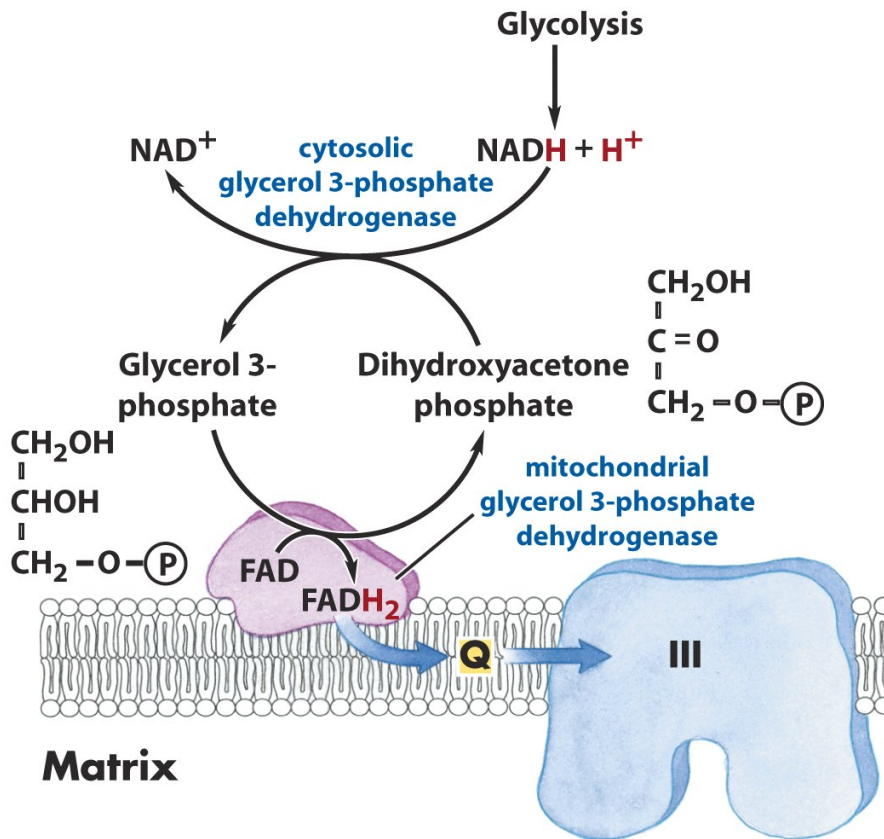


Quindi, per l'ossidazione di NADH citosolico nei mitocondri sono necessari sistemi navetta

Sistema navetta del malato-aspartato



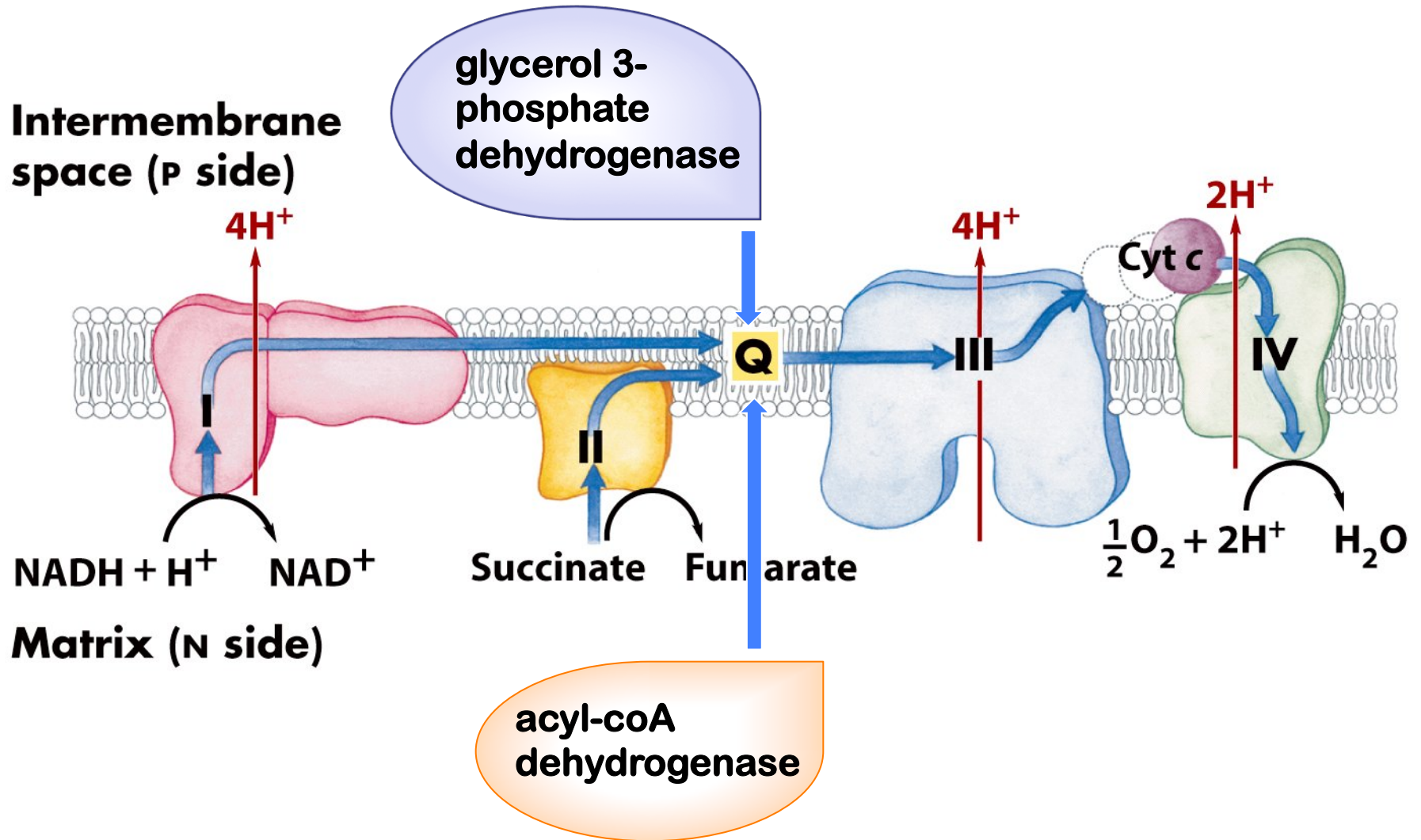
Sistema navetta del glicerolo-3-fosfato



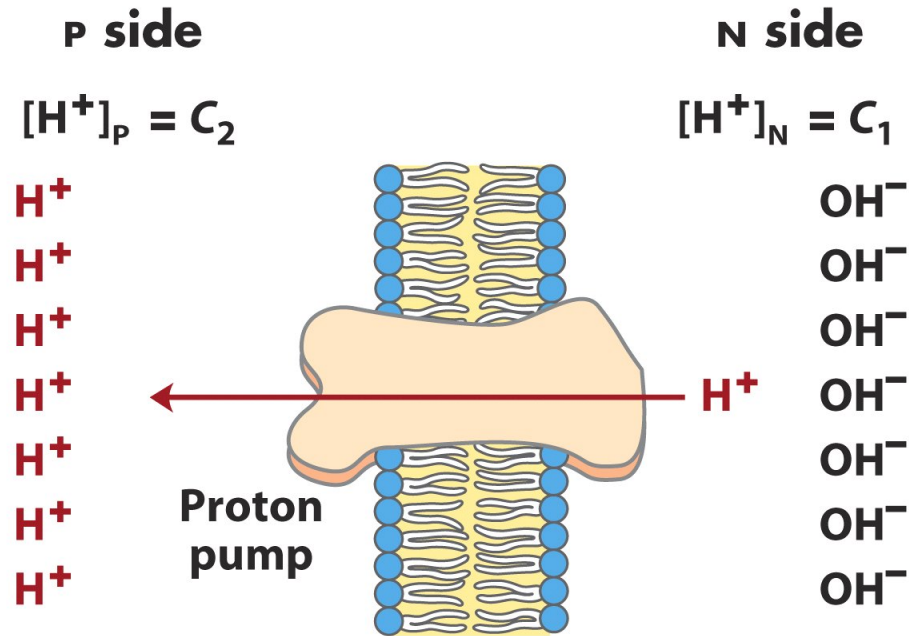
Sistema attivo solo nel muscolo scheletrico e nel cervello

Gli equivalenti riducenti sono passati direttamente al **Complesso III**

Il flusso di elettroni e protoni attraverso i quattro complessi della catena respiratoria



La forza motrice protonica



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

La membrana mitocondriale interna separa due compartimenti a diversa concentrazione di H^+ .

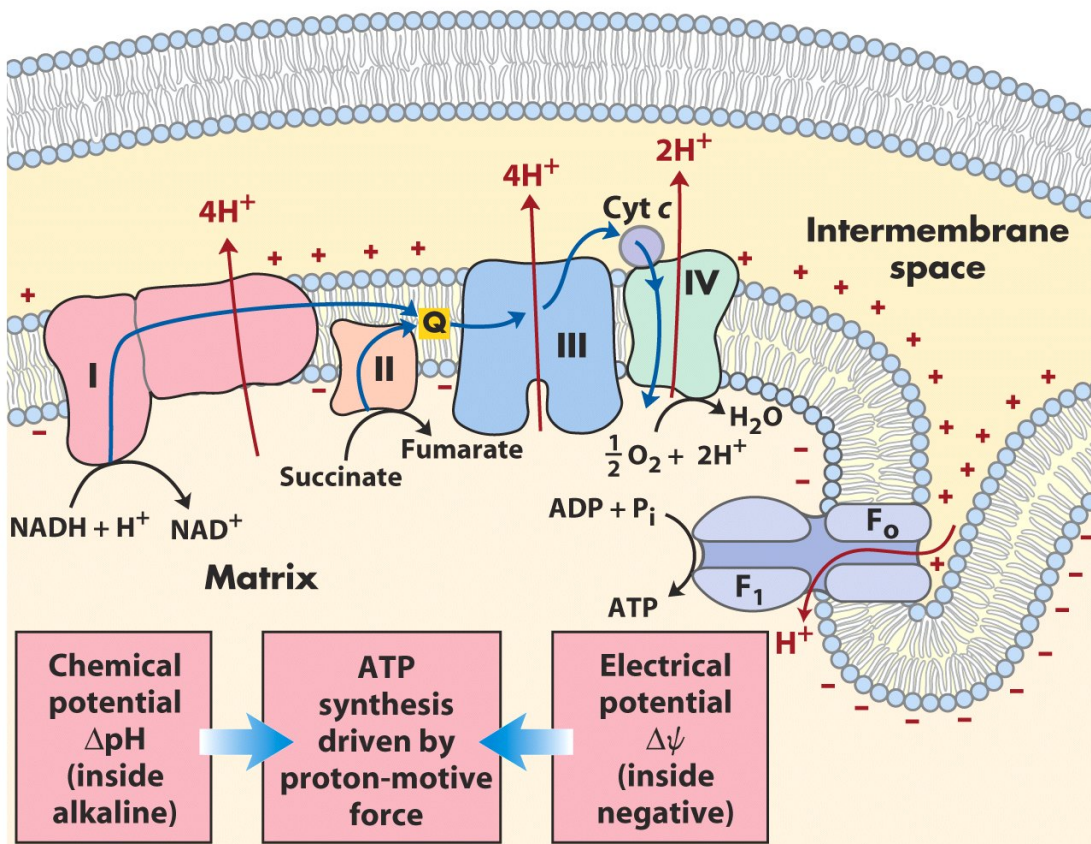
Questo comporta differenze

nella concentrazione di H^+ (ΔpH)

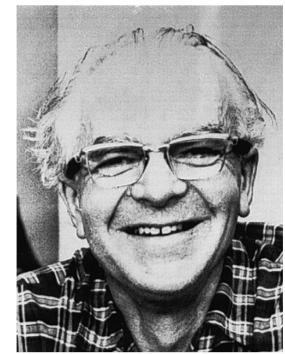
nella distribuzione delle cariche ($\Delta \Psi$)

che generano la forza motrice protonica (ΔG)

La sintesi di ATP



Modello chemiosmotico (P. Mitchell):



Peter Mitchell, 1920–1992

Unnumbered 19 p723
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Gli elettroni passano attraverso una catena di trasportatori disposti in maniera asimmetrica nella membrana interna.

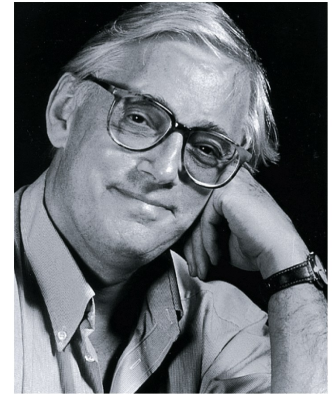
Il flusso degli elettroni è accompagnato da traslocazione di protoni attraverso la membrana che produce un gradiente chimico ed elettrico.

La membrana mitocondriale interna è impermeabile ai protoni, che per rientrare devono attraversare i canali proteici del complesso F₀.

La forza motrice protonica che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia per la sintesi di ATP, catalizzata dal complesso F₁ associato ad F₀ (ATP sintasi).

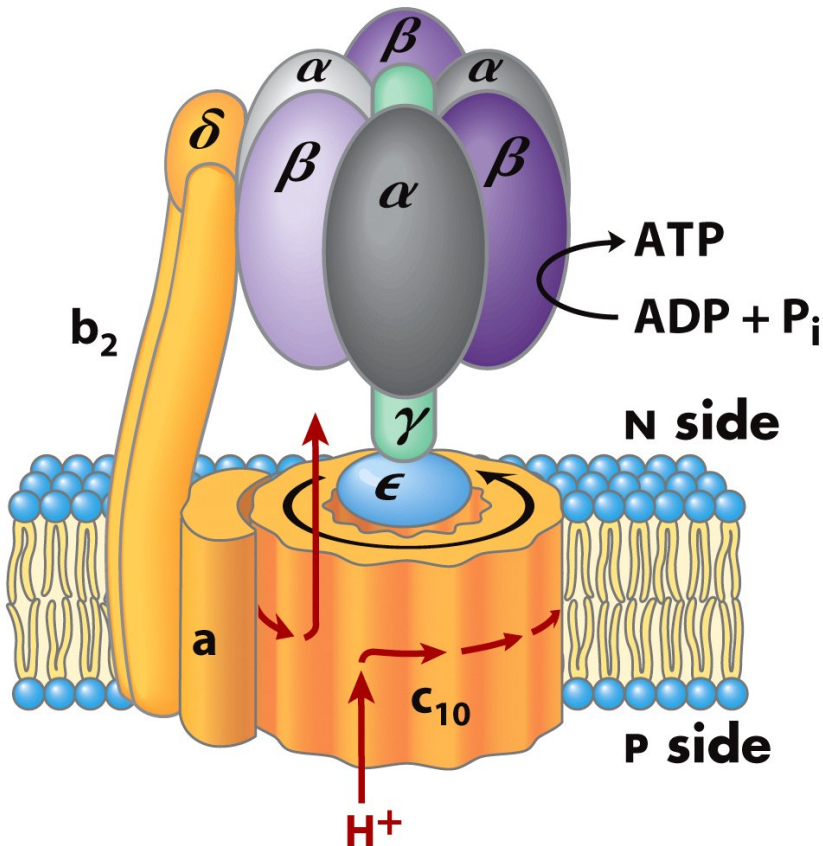
Il complesso ATP sintasi

Gli studi cristallografici di Walker hanno fornito dati strutturali utili per comprendere il meccanismo catalitico dell'enzima



John E. Walker

Unnumbered 19 p727a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



F₁: 9 subunità $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$

Ciascuna subunità β ha un sito catalitico per la sintesi di ATP

La subunità γ possiede un dominio che costituisce l'asse centrale del complesso e un dominio che si associa a una delle β

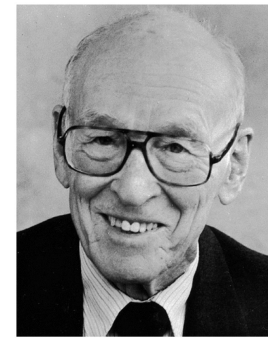
La conformazione delle subunità β cambia se associata a γ

F₀: tre subunità ab_2c_{10-12}

Le due subunità b si fissano ad α e β di F₁ mantenendolo legato alla membrana

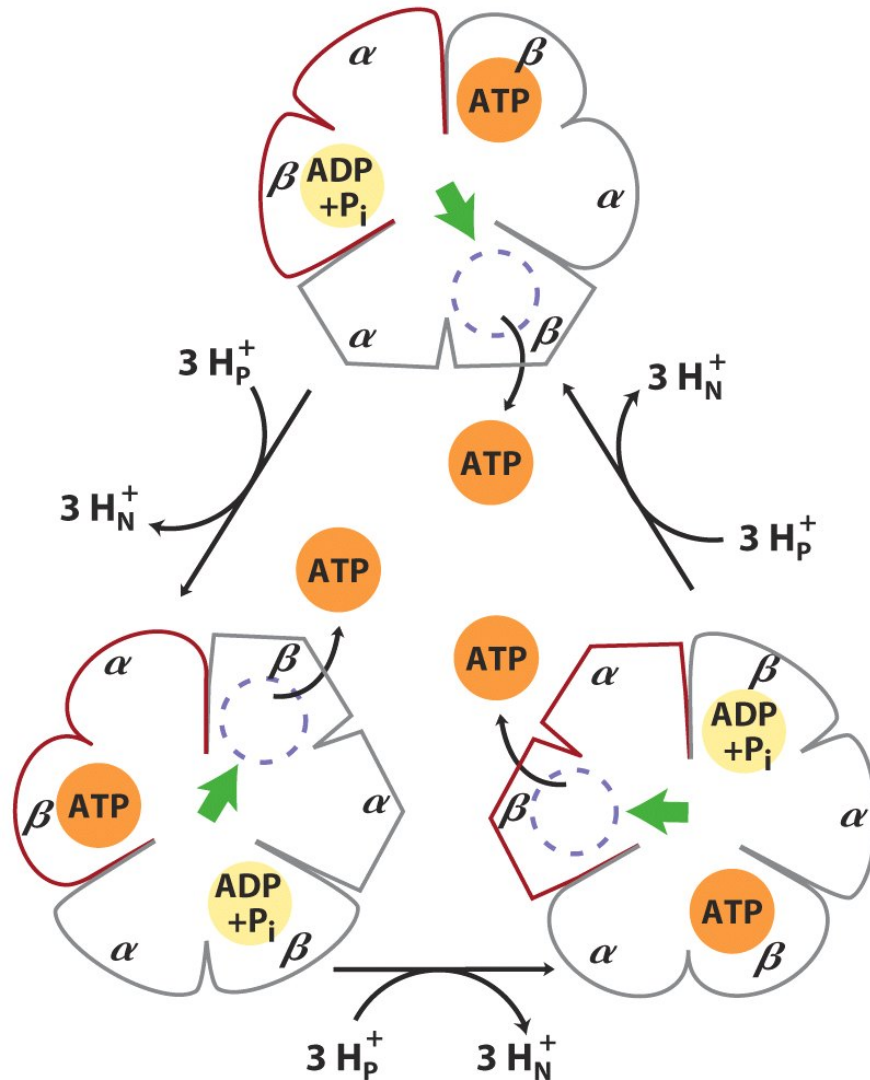
Quando i protoni fluiscono attraverso F₀, il cilindro e l'asse ruotano e le subunità β di F₁ cambiano conformazione; in questo modo γ si associa a turno con ciascuna di esse

Meccanismo di azione di ATP sintasi: modello della catalisi rotazionale (Paul Boyer)



Paul Boyer

Unnumbered 19 p729
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



Ogni coppia $\alpha\beta$ possiede un sito di legame per ATP che può oscillare fra tre diverse conformazioni:

quando uno dei tre siti si trova nella conformazione

β -ATP (lega saldamente ATP)

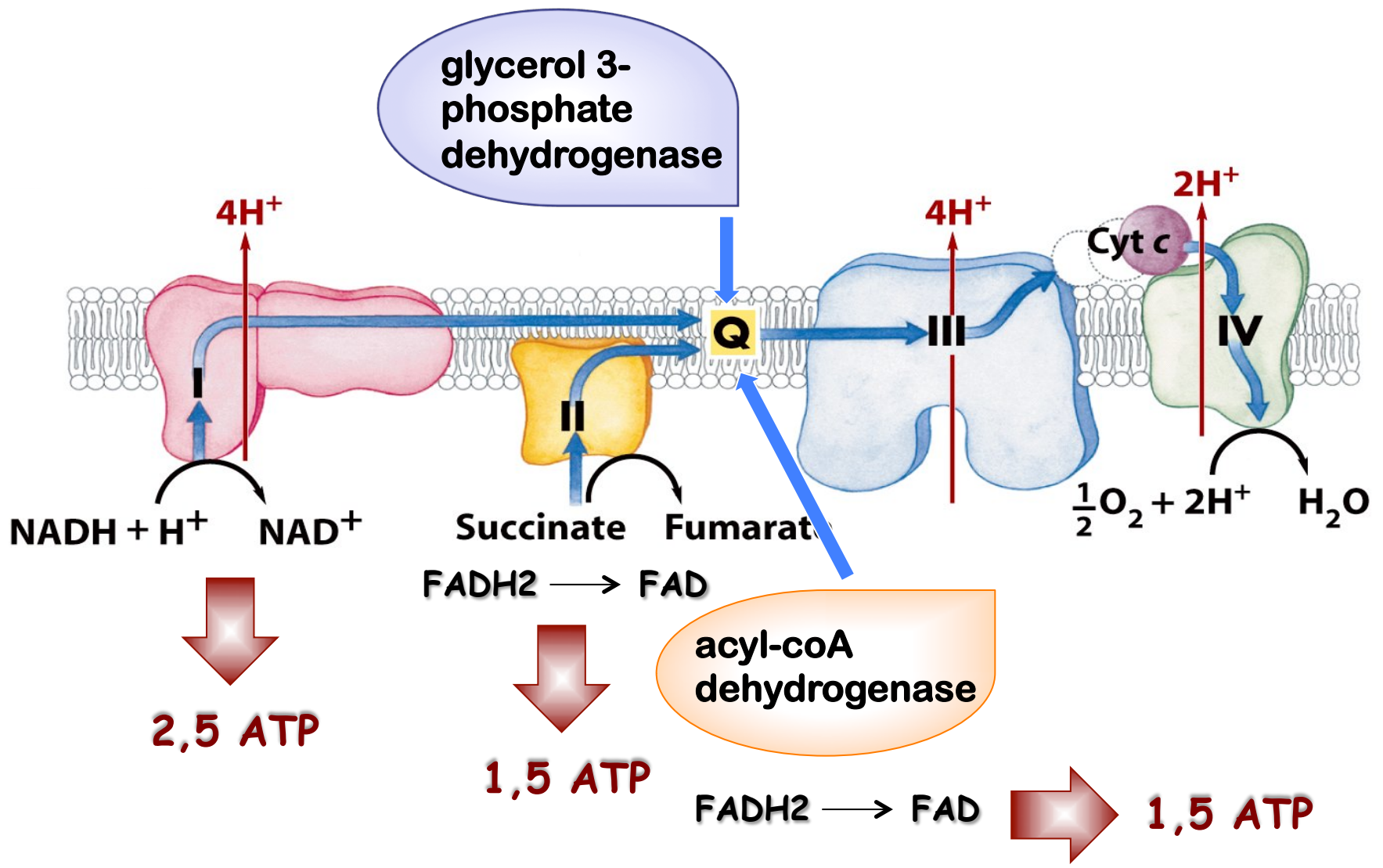
il secondo si trova nella conformazione

α -ADP (lega debolmente ATP)

e il terzo si trova nella conformazione β -vuota (lega molto debolmente ATP)

La forza motrice provoca la rotazione della subunità γ centrale che entra in contatto in successione con ciascuna coppia $\alpha\beta$. La conformazione di legame con γ è β -vuota.

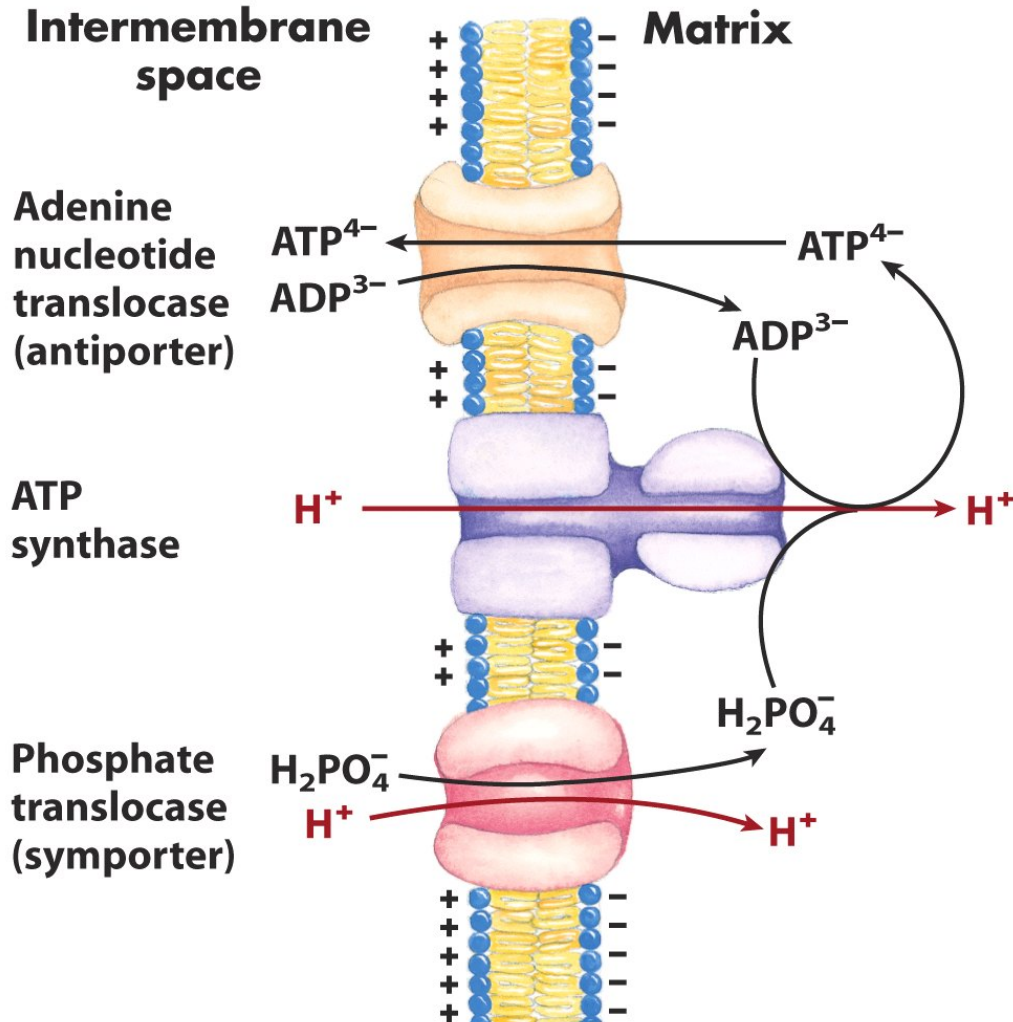
Ciò produce una modificazione conformazionale cooperativa nelle tre subunità che consente il legame alternativo ad $\text{ADP} + \text{P}_i$, ATP, o rilascio di ATP



La forza motrice protonica fornisce energia al trasporto attivo

La funzione principale del trasferimento degli e^- nei mitocondri è quella di fornire energia per la sintesi di ATP.

La stessa energia può servire anche a favorire sistemi di trasporto essenziali per la fosforilazione ossidativa.



Poiché la membrana mitocondriale interna è impermeabile alle specie cariche, sono presenti due sistemi di trasporto che portano ADP e P_i nella matrice e consentono ad ATP appena sintetizzato di uscire nel citosol

La fosforilazione ossidativa è regolata sulle necessità energetiche della cellula

La velocità della respirazione mitocondriale è limitata dalla disponibilità di ADP quale substrato per la fosforilazione (**accettore del gruppo fosforico**).

La dipendenza della velocità di consumo di ossigeno dalla concentrazione di ADP è detta **controllo dell'accettore della respirazione**. Indica l'accoppiamento dell'ossidazione con la fosforilazione.

Lo stato energetico della cellula si può valutare tramite
la concentrazione intracellulare di ADP
il rapporto di azione di massa del sistema ATP-ADP:

$$\frac{[ATP]}{[ADP][P_i]}$$

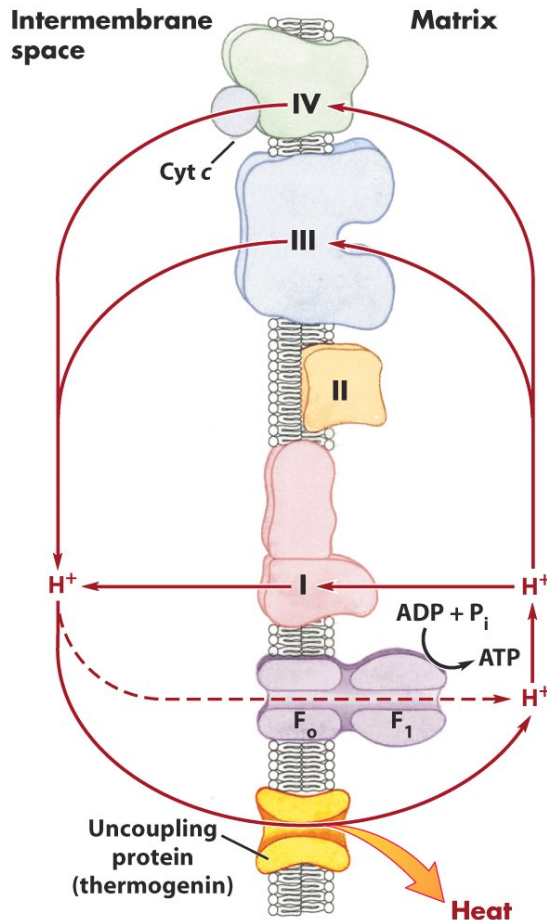
tale rapporto è normalmente molto elevato, quindi il sistema ATP-ADP è quasi completamente fosforilato

Quando è richiesta energia si ha un incremento della demolizione di ATP ed una diminuzione del rapporto di azione di massa

L'aumento dei livelli di ADP disponibile per la fosforilazione ossidativa determina l'aumento della respirazione e la rigenerazione di ATP

Quando il rifornimento di ATP nella cellula è sufficiente la respirazione rallenta, **con una eccezione:**

i neonati della maggior parte degli animali e i mammiferi che vanno in letargo 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 a temperatura costante



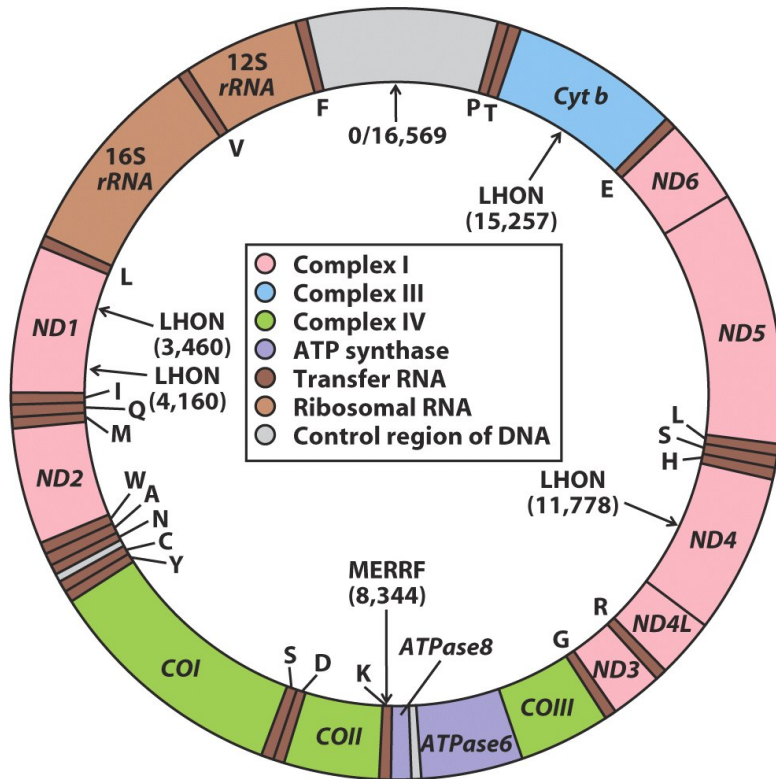
Esempio di generazione di calore mediante disaccoppiamento mitocondriale
La **termogenina** dei mitocondri del grasso bruno genera una nuova via per il rientro dei protoni nella matrice mitocondriale determinando la **dissipazione sotto forma di calore** dell'energia conservata sotto forma di **gradiente protonico**

TABLE 19-4 Agents That Interfere with Oxidative Phosphorylation or Photophosphorylation

<i>Type of interference</i>	<i>Compound*</i>	<i>Target/mode of action</i>
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	
	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	In brown fat, forms proton-conducting pores in inner mitochondrial membrane
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.

I geni mitocondriali



I mitocondri contengono un loro genoma, costituito da una molecola di DNA circolare a doppia elica
 Ciascun mitocondrio presente in una cellula possiede circa cinque copie di questo genoma

Nel cromosoma mitocondriale umano vi sono 37 geni (16569 bp) di cui 13 codificano proteine della catena respiratoria

Circa 900 altre proteine mitocondriali sono codificate da geni nucleari, sintetizzate dai ribosomi e successivamente importate nei mitocondri

TABLE 19–6 Respiratory Proteins Encoded by Mitochondrial Genes in Humans

Complex	Number of subunits	Number of subunits encoded by mitochondrial DNA
I NADH dehydrogenase	>43	7
II Succinate dehydrogenase	4	0
III Ubiquinone:cytochrome c oxidoreductase	11	1
IV Cytochrome oxidase	13	3
V ATP synthase	8	2