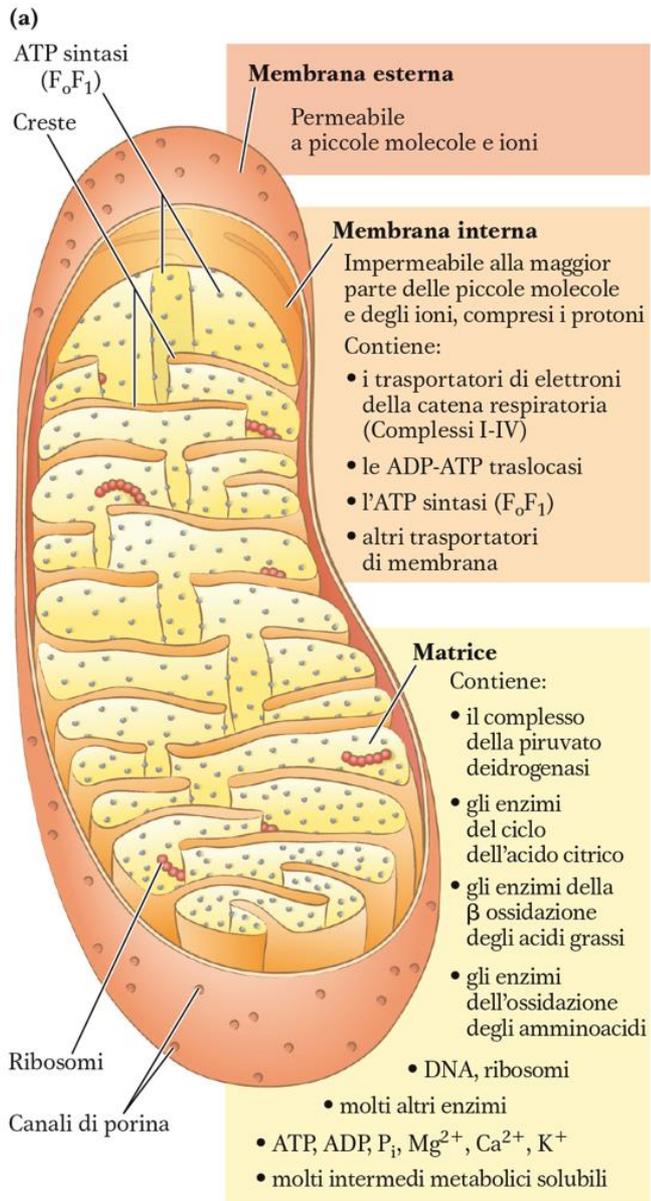


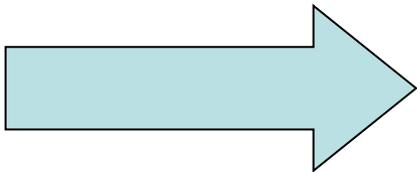
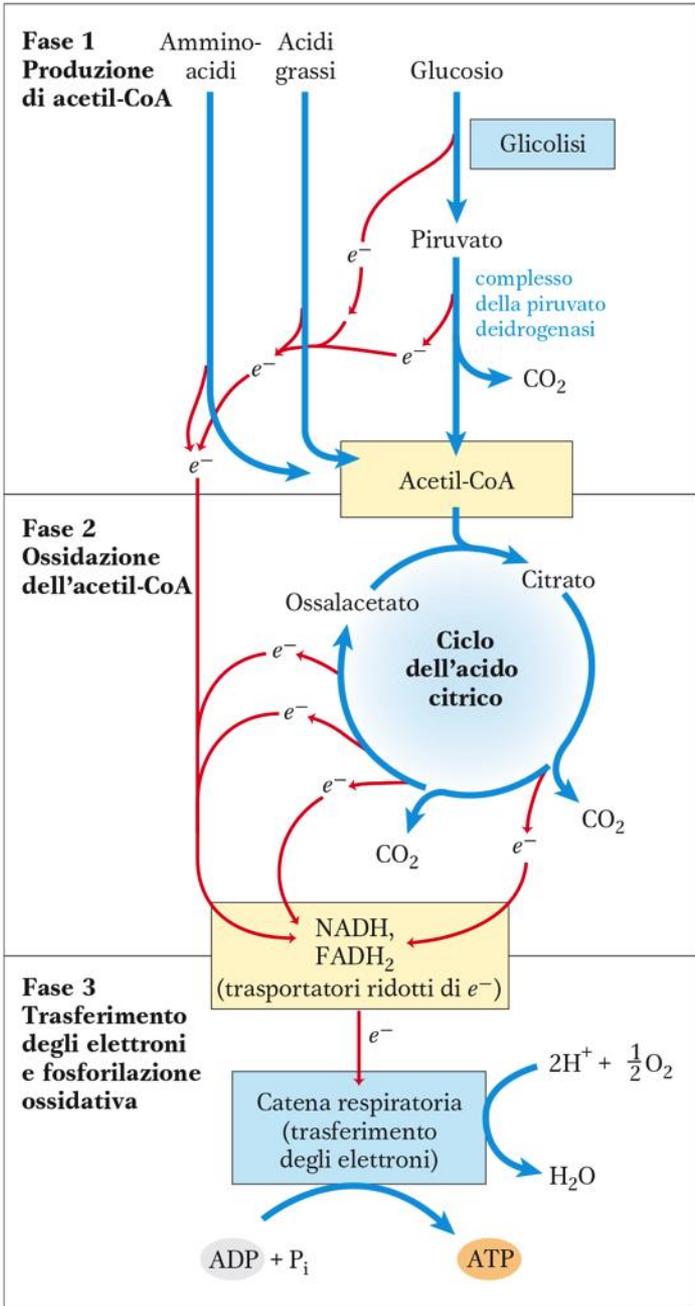
**CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI  
E  
FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA**



Mitocondri del muscolo cardiaco (più creste)



Mitocondri del fegato



Le vie cataboliche intermedie (glicolisi, ciclo di Krebs, beta-ossidazione degli acidi grassi) sono state denominate "aerobiche", ma  $O_2$  non è mai stato coinvolto.

## PERCHE'?

Le reazioni di ossidazione hanno portato alla riduzione di cofattori (FAD e  $NAD^+$  sono stati ridotti a  $FADH_2$  e  $NADH+H^+$ ) che a loro volta andranno a ridurre  $O_2$  riossidandosi.

**LA CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI o CATENA RESPIRATORIA** è localizzata nella membrana interna dei mitocondri. E' il processo che riossida i trasportatori di H e li rende di nuovo disponibili per le diverse vie metaboliche.  $O_2$  è l'accettore finale di atomi di H e viene trasformato in  $H_2O$ . **CATENA:** gli elettroni NON sono trasferiti direttamente a  $O_2$ , MA attraverso una serie di trasportatori intermedi. **RESPIRATORIA:** perchè c'è consumo di  $O_2$ .  
**RESPIRAZIONE CELLULARE**

**LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA** è il processo che sintetizza ATP mitocondriale. Avviene a livello della membrana mitocondriale interna. Dipende dalle reazioni redox della **CATENA RESPIRATORIA**

**I DUE PROCESSI SONO ACCOPPIATI.** In questo modo l'energia prodotta nelle reazioni redox viene convertita in ATP.

# COME AVVIENE L'ACCOPIAMENTO FRA I DUE PROCESSI?

Atomo di H = 1 protone e 1 elettrone ( $e^-$ )

In alcuni punti della catena le due particelle prendono vie diverse:

- $e^-$  viaggia lungo la catena di trasporto degli elettroni fino a  $O_2$ ;
- Il protone attraversa la membrana mitocondriale interna e va nello spazio intermembrana.

Il flusso di  $e^-$  procede secondo la scala di potenziale redox: da una coppia redox che ha maggior tendenza a cedere  $e^-$  verso la coppia redox con maggior tendenza a ricevere  $e^-$ . Dalla coppia  $NAD^+/NADH+H^+$  a  $O_2/H_2O$ .

L'energia prodotta da questo flusso di  $e^-$  serve a trasportare protoni contro gradiente dalla matrice allo spazio intermembrana.

Questo gradiente di carica produce ATP quando i protoni ritornano dallo spazio intermembrana nella matrice.

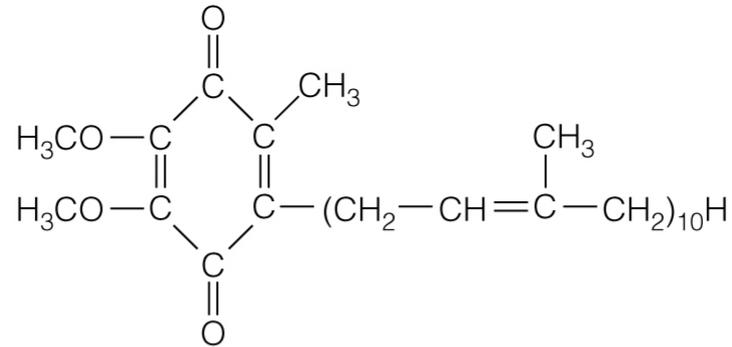
# COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

Sono tutte proteine integrali di membrana ad esclusione dell'*ubichinone* e del *citocromo c* (proteina periferica solubile). Ogni componente può accettare e- dal trasportatore che lo precede e trasferirli a quello che lo segue.

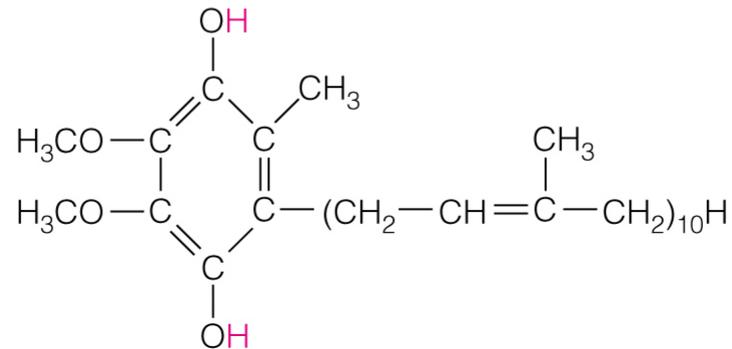
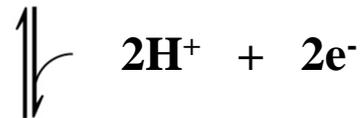
1. Flavoproteine: contengono un cofattore flavinico, FAD o FMN
2. Citocromi: hanno come cofattore l'eme. L'atomo di Fe dell'eme trasporta e-.

# COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

3. Proteine ferro-zolfo (Fe-S): Ferro è associato ad atomi di zolfo inorganico o di residui di cisteina. Questi centri Fe-S partecipano a reazioni redox in cui viene trasferito un e- per volta utilizzando cambi dello stato di ossidazione del ferro.
4. Ubichinone (coenzima Q, CoQ o UQ): piccolo e idrofobico, libero di diffondere nel doppio strato della membrana mitocondriale interna. (Forma ridotta UQH<sub>2</sub> ubichinolo)
5. citocromo c



**Coenzima Q<sub>10</sub> ossidato (CoQ)**



**Coenzima Q<sub>10</sub> ridotto (CoQH<sub>2</sub>)**

# COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

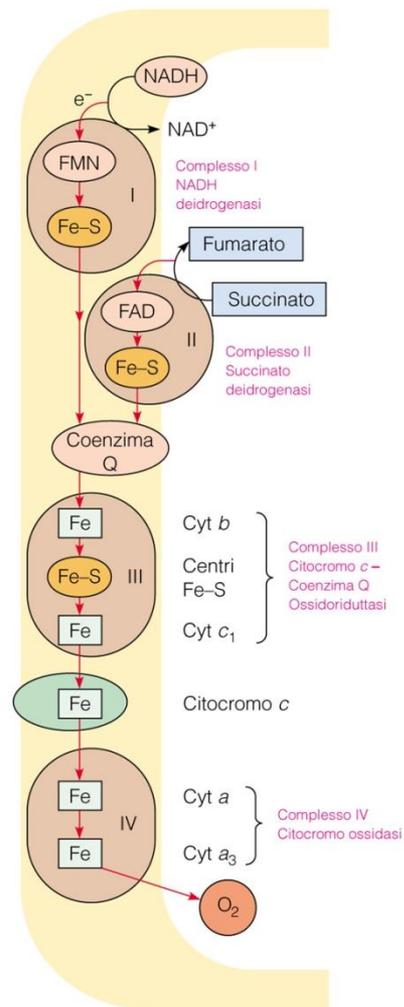
Sono organizzati in 4 complessi multiproteici:

- **NADH-ubichinone reduttasi (Complesso I)**
- **Succinato-ubichinone reduttasi (Complesso II)**
- **Ubichinolo-citocromo c reduttasi (Complesso III)**
- **Citocromo c ossidasi (Complesso IV)**

Due punti di ingresso degli e<sup>-</sup>: Complesso I e II

Complessi III e IV sono situati in sequenza sulla base della loro affinità progressivamente crescente per e<sup>-</sup>.

Ogni complesso riduce l'accettore di e<sup>-</sup> che lo segue. L'ultimo complesso si chiama ossidasi perchè O<sub>2</sub> funziona da ossidante.



Legenda:

 Complessi enzimatici

 Coenzimi organici e gruppi prostetici

 Centri Fe-S

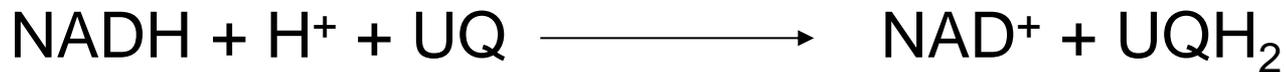
 Citocromi (ferro eminico)

## Potenziali di riduzione standard di alcuni componenti della catena respiratoria mitocondriale

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

## COMPLESSO I: NADH-UBICHINONE REDUTTASI

Contiene: molte catene peptidiche, una flavoproteina complessa con gruppo prostetico FMN, almeno sei centri Fe-S. Si trova nella membrana mitocondriale interna con il sito che lega NADH verso la matrice.



Percorso e<sup>-</sup>:



Il flusso di e<sup>-</sup> è accompagnato dallo spostamento di 4 H<sup>+</sup> dalla matrice allo spazio intermembrana.

## COMPLESSO II: SUCCINATO-UBICHINONE REDUTTASI

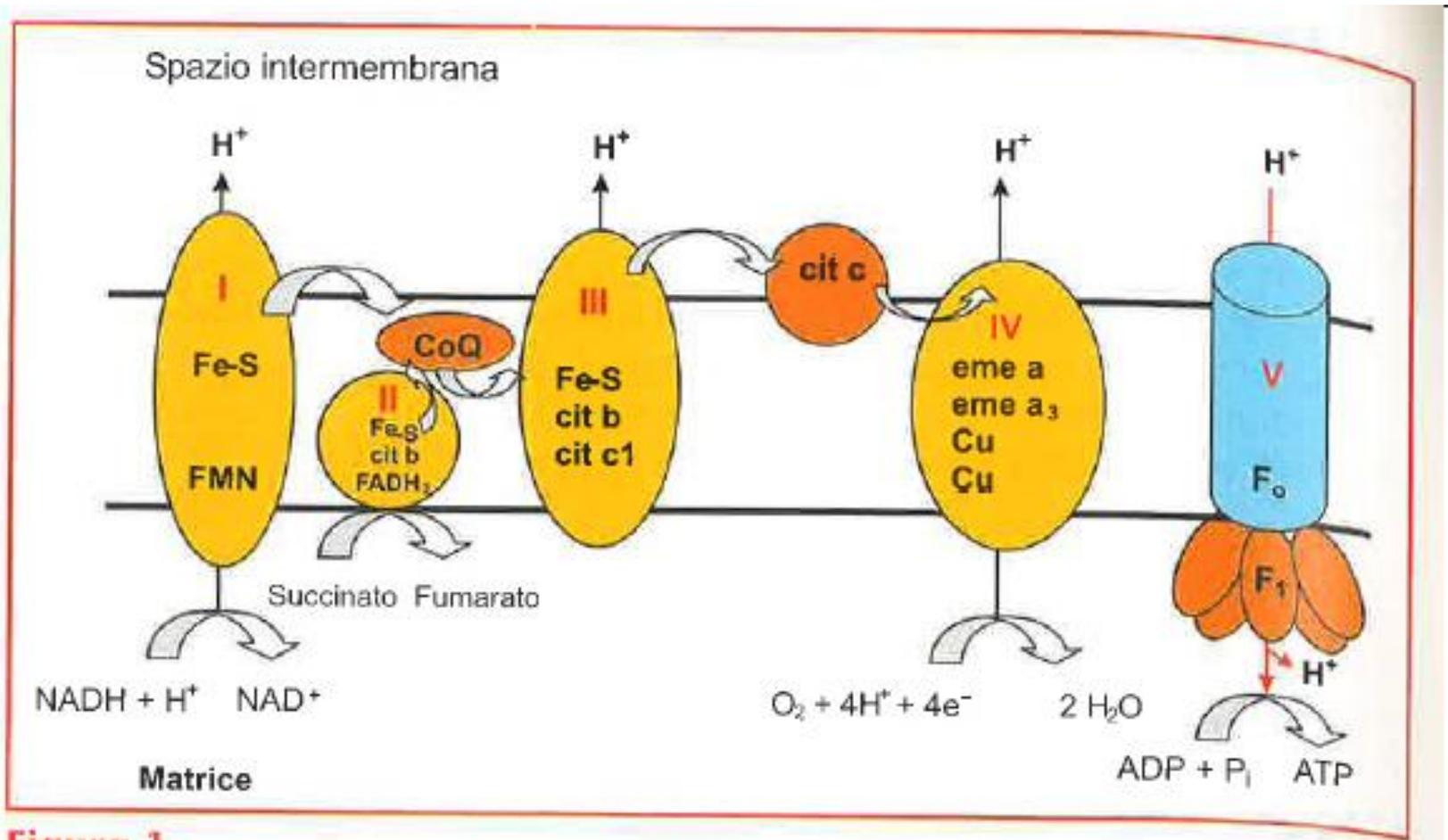
legato a membrana mitocondriale interna.

contiene FAD, centri Fe-S, sito di legame per succinato  
percorso e-:

succinato  $\rightarrow$  FAD  $\rightarrow$  Fe-S  $\rightarrow$  UQ

Riossida il  $\text{FADH}_2$ , cofattore dell'enzima succinato DH (ciclo di Krebs)

Non è una pompa protonica perché la reazione non fornisce sufficiente energia per spostare protoni.



**Figura 1**  
Schema della catena respiratoria e della fosforilazione ossidativa.

**UQH<sub>2</sub> DIFFONDE DAL COMPLESSO I E DAL  
COMPLESSO II AL COMPLESSO III**

## COMPLESSO III: UBICHINOLO-CITOCROMO C REDUTTASI

Punto di confluenza degli e<sup>-</sup> che vi arrivano tramite UQH<sub>2</sub>, che è un trasportatore mobile di elettroni.

Contiene 2 citocromi b, il citocromo c1, una proteina ferro-zolfo ed almeno altre sei subunità proteiche. Trasferiscono e<sup>-</sup> al citocromo c solubile. Funziona come pompa di H<sup>+</sup> che sono rilasciati nello spazio intermembrana, contribuendo alla generazione del gradiente protonico

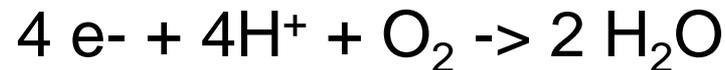
## COMPLESSO IV: CITOCROMO C OSSIDASI

Contiene i citocromi a e a<sub>3</sub> e due centri rame.

Catalizza il trasferimento di e<sup>-</sup> dal citocromo c a O<sub>2</sub>.

H<sup>+</sup> vengono spostati dalla matrice allo spazio intermembrana.

Parte dei H<sup>+</sup> vengono usati per la sintesi di H<sub>2</sub>O.

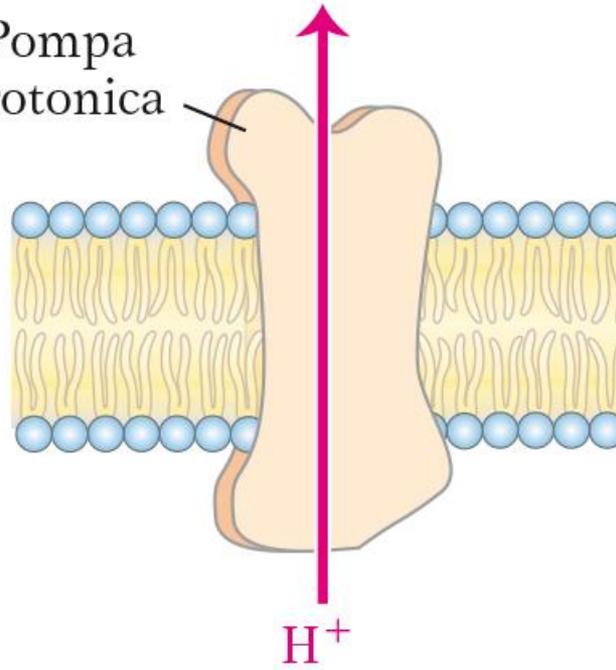


**Lato P**

$$[H^+]_P = C_2$$



Pompa  
protonica



**Lato N**

$$[H^+]_N = C_1$$



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

$$= 2,3RT \Delta\text{pH} + \mathcal{F}\Delta\psi$$

Gran parte di questa energia viene usata per pompare protoni fuori dalla matrice mitocondriale.

Energia elettrochimica dovuta al gradiente di concentrazione e alla separazione di cariche. Si chiama anche **forza motrice protonica** ed è formata da due componenti: 1) energia potenziale chimica (differenza di concentrazione dei protoni); 2) energia del potenziale elettrico.

Quando i protoni fluiscono spontaneamente secondo il loro gradiente elettrochimico, questa energia viene resa disponibile per produrre lavoro.

# FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

Sintesi mitocondriale di ATP a partire da ADP e Pi.

I protoni accumulati nello spazio intermembrana fluiscono verso la matrice spinti dal gradiente elettrochimico (differenza di carica e differenza di pH transmembrana).

Questo flusso fornisce l'energia per formare il legame fosfoanidridico fra ADP e Pi.

Avviene nel complesso multiproteico ATP sintasi (complesso FoF1 o complesso V)

E' stato calcolato che la riossidazione di una molecola di NADH + H<sup>+</sup> porta alla produzione media di 2,5 molecole di ATP. La riossidazione di una molecola di FADH<sub>2</sub> porta alla produzione media di 1,5 molecole di ATP.



x = rapporto P/O

Il meccanismo è molto efficiente perché consente di immagazzinare come energia chimica circa il 35% dell'energia potenzialmente utilizzabile. La parte di energia non utilizzata per la sintesi di ATP è dispersa sotto forma di calore.

## **RILEVANZA DEL PROCESSO**

Una persona fa uso giornaliero di 40 Kg di ATP per la normale attività.

# QUOZIENTE RESPIRATORIO

Rapporto fra  $\text{CO}_2$  prodotta e  $\text{O}_2$  consumato

Per il glucosio = 1

Per i lipidi = 0.7

Per gli amminoacidi = 0.84

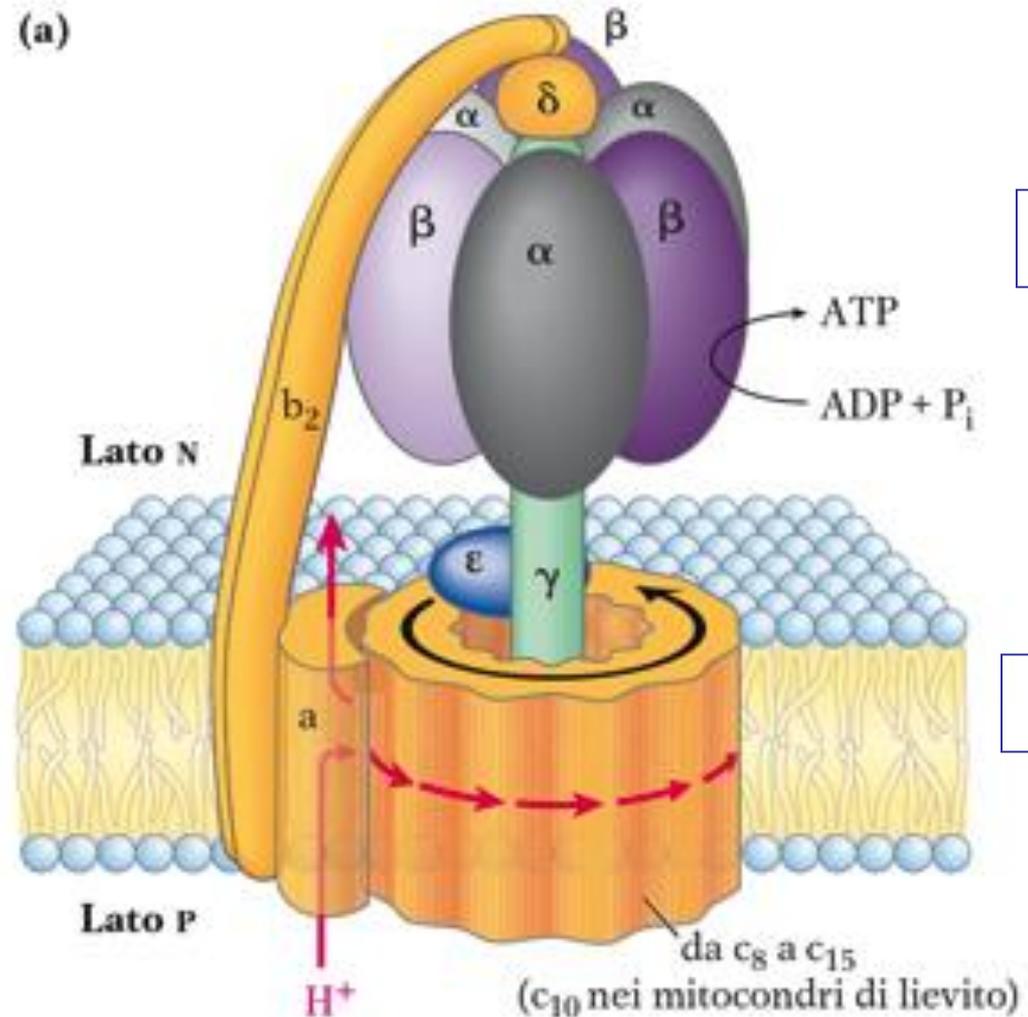
Esso misura la proporzione di grassi e carboidrati che vengono impiegati ai fini energetici. Poiché i grassi e i carboidrati hanno QR diversi, bassi valori indicano un maggiore impiego di grassi, mentre alti valori indicano un maggiore impiego di carboidrati (glucosio)

# ATP SINTASI

ATP sintasi è formata da due componenti:

- Fo (porzione integrale di membrana)
- F1 (porzione periferica di membrana).

Fo possiede un canale per i protoni.



## STRUTTURA DEL COMPLESSO FoF1

# ATP SINTASI: UN MOTORE MOLECOLARE

I tre dimeri  $\alpha\beta$  hanno la stessa struttura ma conformazioni differenti come conseguenza dell'interazione con la subunità  $\gamma$  con una sola delle subunità  $\beta$  alla volta. Sulla base dell'interazione  $\gamma$ - $\beta$  si hanno 3 diverse conformazioni e 3 diverse situazioni:

1.  $\beta$ -ADP (lega ADP e  $P_i$ )
2.  $\beta$ -ATP (viene sintetizzato ATP)
3.  $\beta$ -vuota (o aperta, viene rilasciato ATP)

Ciascun dimero  $\alpha\beta$  passa per queste 3 conformazioni in modo ciclico. I 3 dimeri hanno sempre conformazione diversa tra loro.

La forza motrice protonica causa la rotazione di  $120^\circ$  C di  $\gamma$ , che viene a contatto con una delle subunità  $\alpha\beta$ .

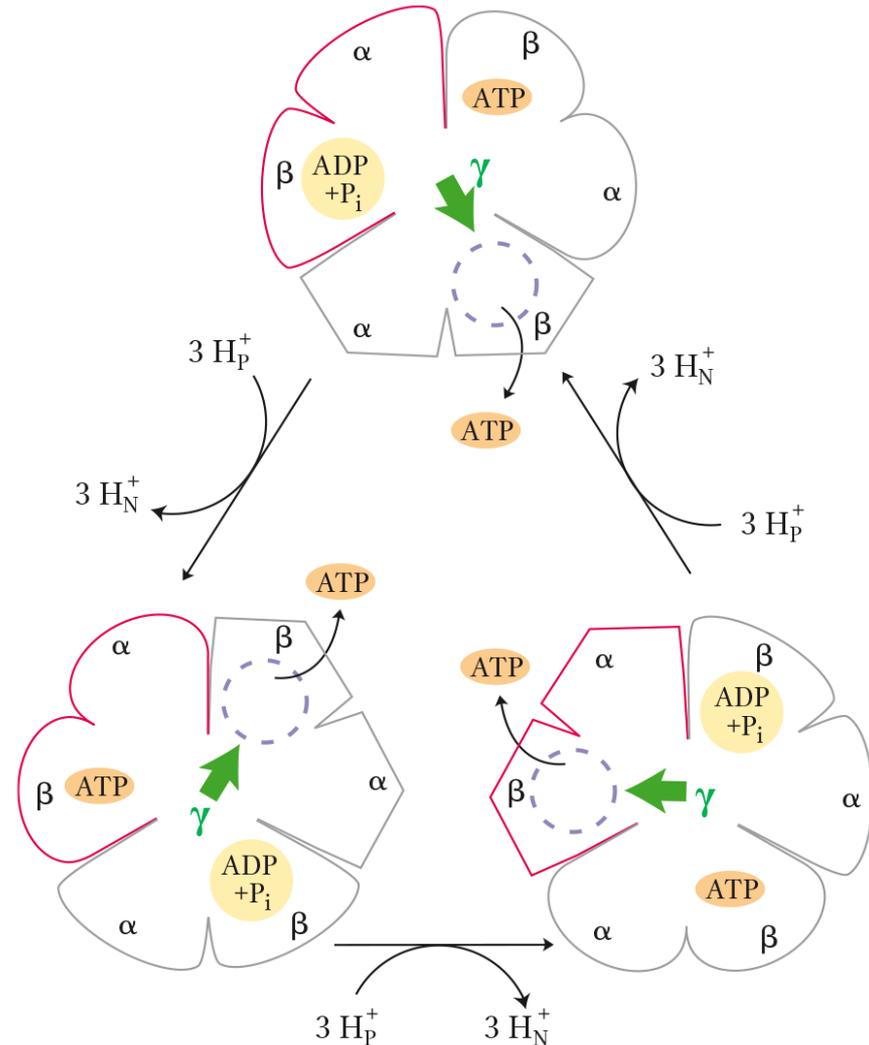
Questo causa una modificazione conformazionale per cui

- il sito  $\beta$ -ATP assume la conformazione vuota e dissocia l'ATP

- il sito  $\beta$ -ADP assume la conformazione  $\beta$ -ATP che promuove la sintesi di ATP da ADP + Pi e forma ATP

- il sito  $\beta$ -vuoto assume la conformazione  $\beta$ -ADP e lega ADP e Pi

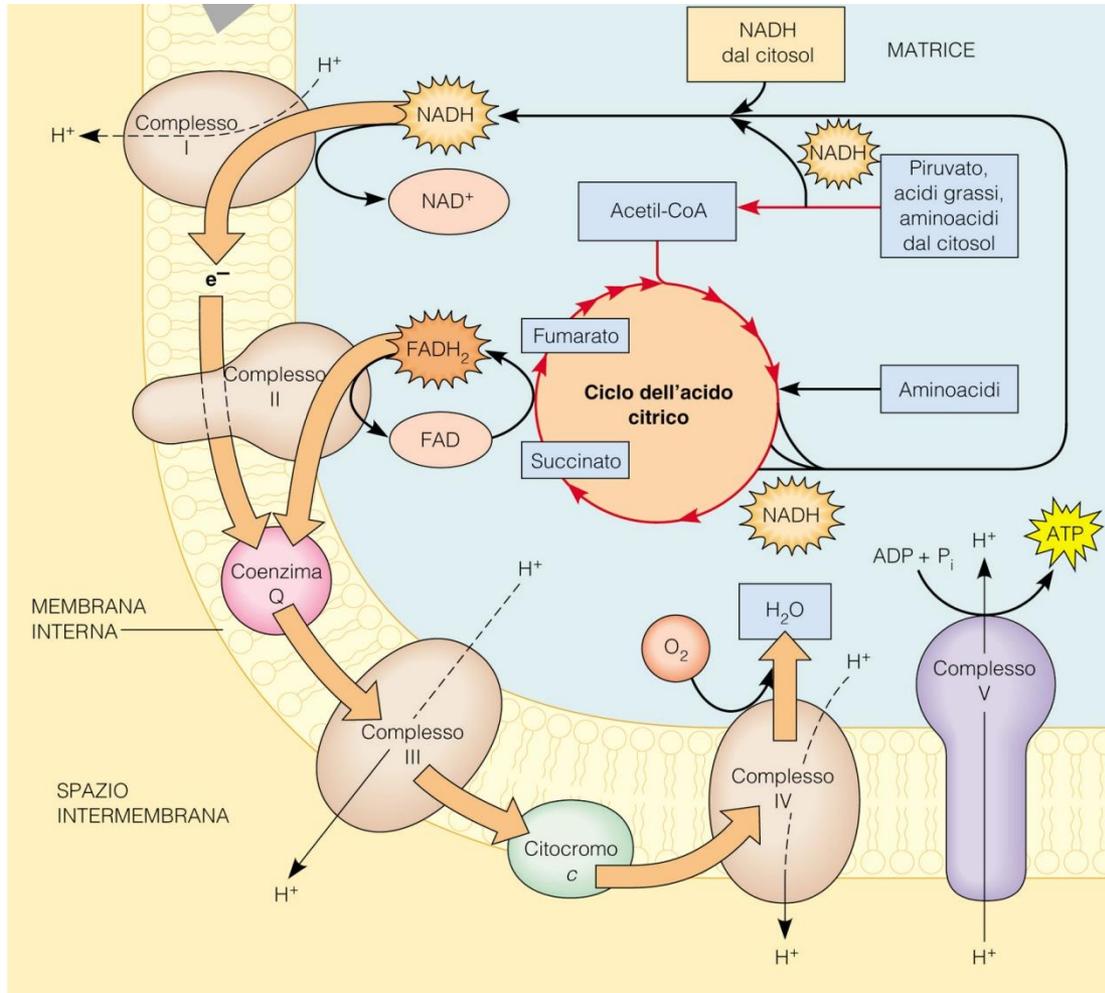
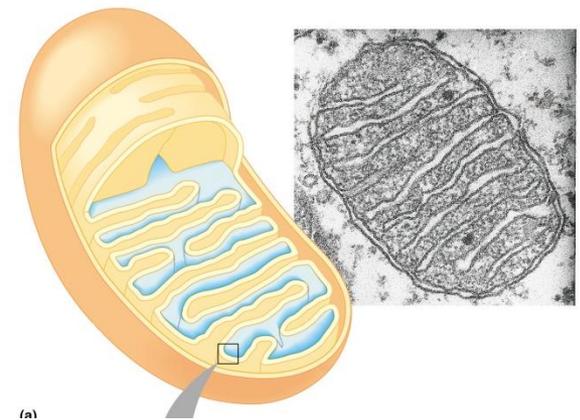
La funzione della forza motrice protonica è quella di liberare ATP, perché la sintesi di ATP da parte di questo enzima richiede poca energia.



Modello della modificazione di legame dell'ATP sintasi

## ATP SINTASI: COME FUNZIONA?

Il passaggio di protoni attraverso il cilindro  $F_o$  causa la rotazione del cilindro costituito dalle subunità  $c$  e di conseguenza ruota anche la proteina  $\gamma$ . La struttura  $3\alpha3\beta$  è tenuta fissa rispetto al cilindro  $c$  ed all'asse  $\gamma$  dalle subunità  $b$  e  $\delta$ . Perciò ogni rotazione di  $120^\circ$  mette in contatto  $\gamma$  con una diversa subunità  $\beta$ . Questo contatto induce la conformazione  $\beta$ -vuota e il rilascio di ATP. I tre dimeri  $\alpha\beta$  funzionano in contemporanea, e si trovano in ogni momento ciascuno in una delle 3 conformazioni.



## SISTEMI DI TRASPORTO SPECIFICI

membrana mitocondriale interna impermeabile a:  
 $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $K^+$  e molti soluti ionici.

1) adenina nucleotide translocasi. Trasporta  $ADP^{3-}$  verso interno e  $ATP^{4-}$  verso esterno

2) trasportatore di fosfato o translocasi  
 $H_2PO_4^- + H^+$  da esterno alla matrice

3) sistemi di trasporto per piruvato

4) sistemi di trasporto per dicarbossilati

5) sistemi di trasporto per tricarbossilati

# REGOLAZIONE

La velocità della respirazione è limitata da  $[ADP]$   
 $[ATP]/ [ADP] [P_i]$  esprime la situazione energetica cellulare.  
Normalmente ha un valore elevato.

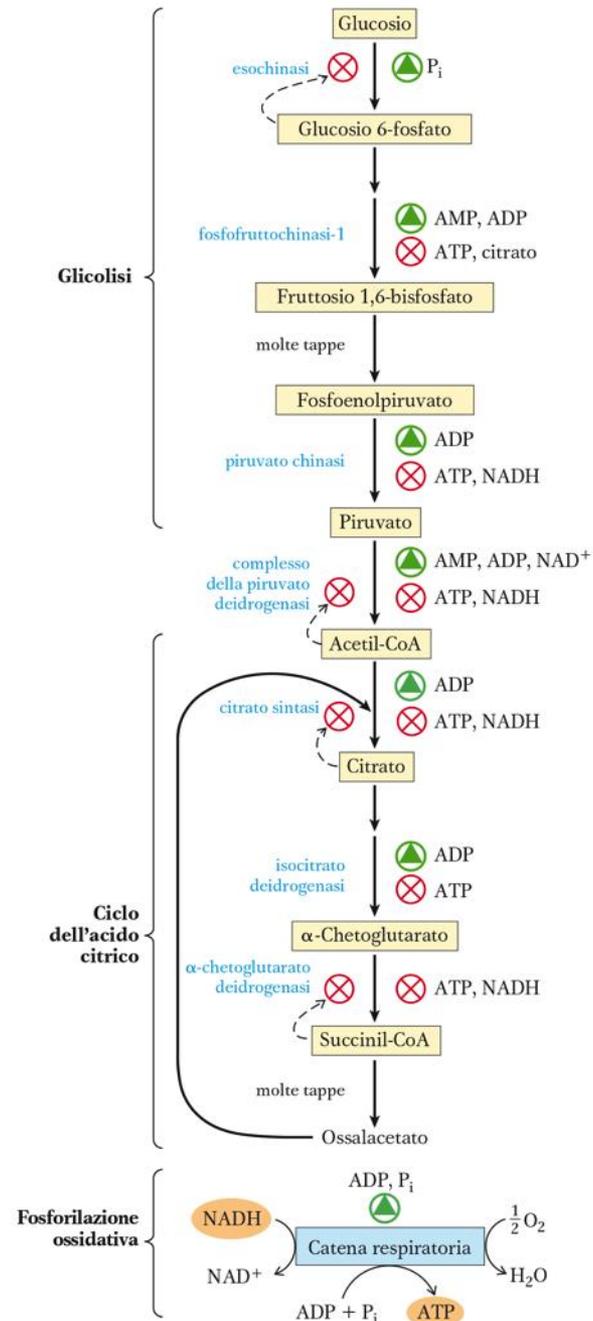
se  $[ATP] / [ADP] [P_i] \gg$  la velocità non è massima  
se  $[ATP] / [ADP] [P_i] \ll$  aumenta la velocità della  
fosforilazione ossidativa.

Normalmente la velocità viene regolata in modo preciso allo  
scopo di far variare poco il rapporto, anche durante  
variazioni delle richieste di energia.

La regolazione della velocità della fosforilazione ossidativa  
da parte di  $[ADP]$  si chiama controllo respiratorio o controllo  
da accettore.

[ADP] influenza anche la velocità del ciclo di Krebs. Quando  $[ADP] \ll$ , NADH e  $FADH_2$  NON sono ossidati nella catena di trasporto degli e-. La V del ciclo rallenta ( $[NAD^+]$  e  $[FAD]$  basse).

Quando  $[ADP] \gg$  la V della fosforilazione ossidativa aumenta, e la V del ciclo di Krebs aumenta (disponibilità di ( $[NAD^+]$  e  $[FAD]$ )).



Questo è l'indirizzo del sito in cui si trova l'animazione della fosforilazione ossidativa presentata a lezione

[http://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/electron\\_transport/electron\\_transport.htm](http://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/electron_transport/electron_transport.htm)

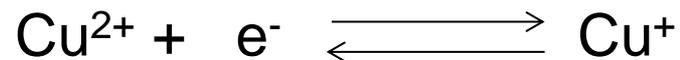
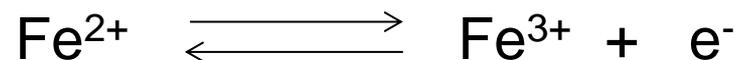
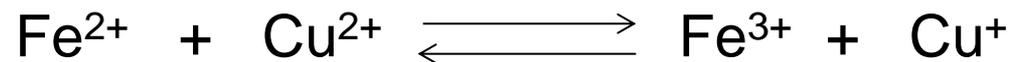
**Il rapporto P/O riportato non è stato aggiornato e neanche il numero di H<sup>+</sup> pompato fuori dal mitocondrio.**

## Le reazioni che trasferiscono e<sup>-</sup> sono redox

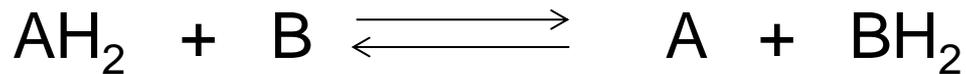
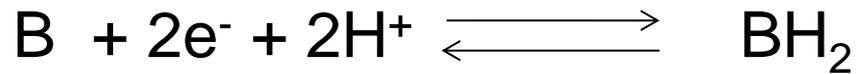
donatore di elettroni  $\xrightleftharpoons{\hspace{1cm}}$  e<sup>-</sup> + accettore di elettroni  
coppia redox coniugata

gli e<sup>-</sup> vengono trasferiti.

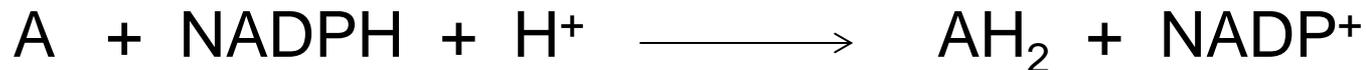
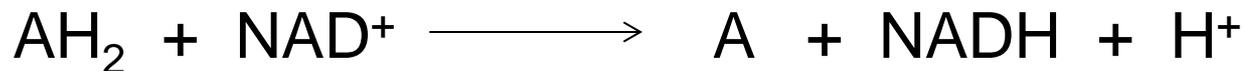
1) come e<sup>-</sup>



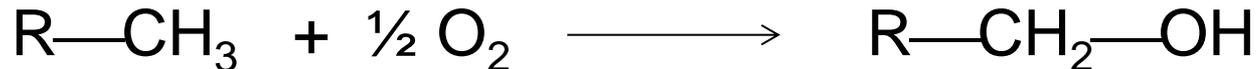
2) come atomi H



3) come ione idruro (:H<sup>-</sup>)



4) combinazione diretta di un riducente organico con l'O<sub>2</sub>



Analogia con coppia acido-base coniugata:

La tendenza di una coppia acido base coniugata a perdere un protone è definita dalla costante di dissociazione  $K'$ .

La tendenza di una coppia coniugata redox a perdere un elettrone è definita da una costante, il **potenziale standard di ossido riduzione**,  $E^0$ . Questa costante è la **forza elettromotrice (fem)** espressa in Volt data da un elettrodo appropriato posto in una soluzione contenente il donatore e l'accettore di elettroni alla concentrazione 1 M, a 25°C.

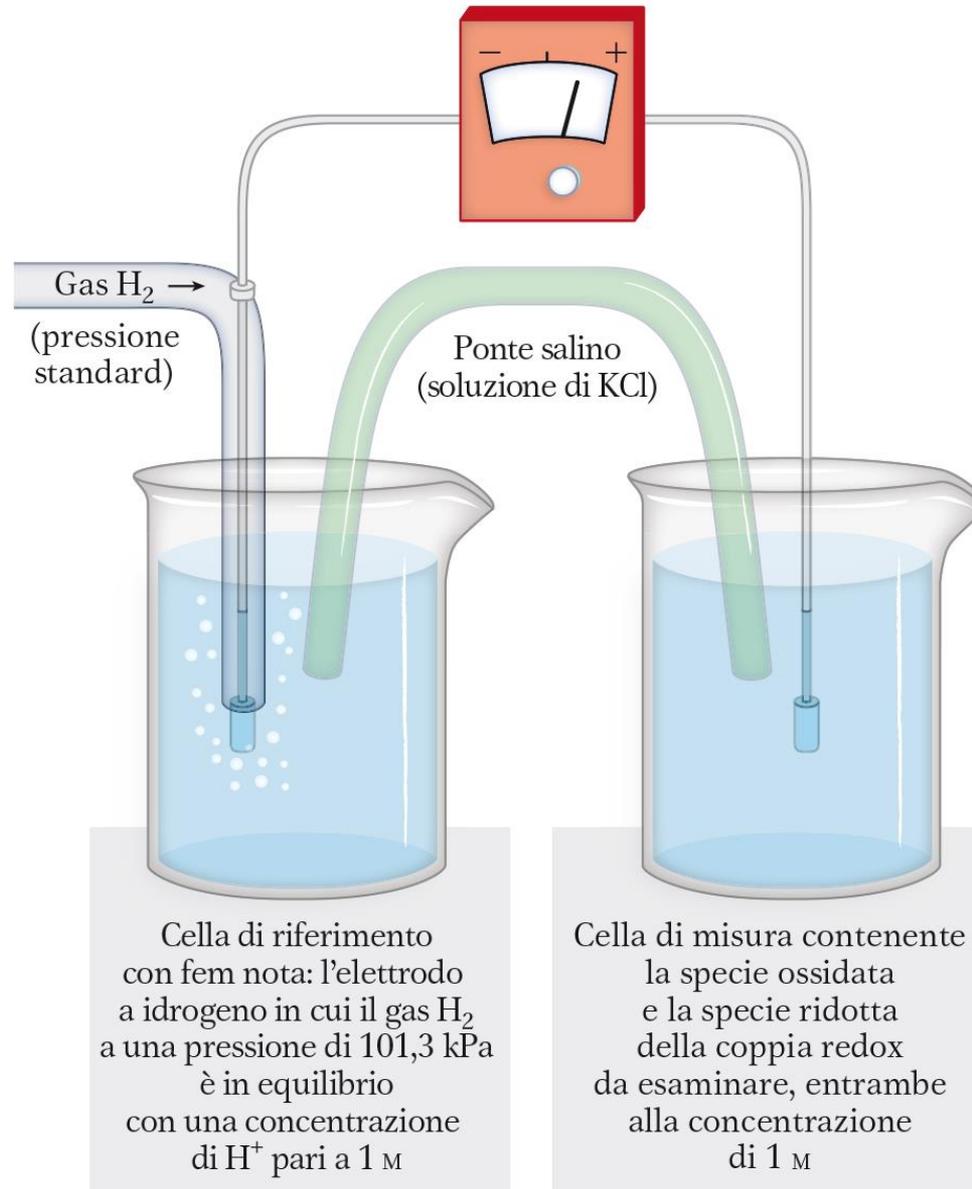
In biochimica si usa  $E'^0$ , quando le condizioni standard sono considerate a pH=7.

Come si calcola  $E^0$  per una coppia redox coniugata?

- 1) Semi-cella di riferimento (è l'elettrodo a idrogeno, vedi figura successiva) a cui viene assegnato  $E^0 = 0 \text{ V}$
- 2) Semi-cella della coppia redox coniugata di cui si vuole determinare la  $E^0$ .
- 3) Connessione delle due semi-celle con un ponte salino (contiene KCl, permette la continuità elettrica). Gli elettrodi di ciascuna semi-cella sono collegati ad un misuratore di corrente.
- 4) Il misuratore di corrente rivela in che verso si muovono gli elettroni e il valore della fem.

NOTA: una semi-cella è costituita da una soluzione contenente una coppia redox coniugata e un elettrodo.

Strumento  
di misura della fem



In biochimica si utilizza il potenziale di riduzione standard che assegna valori maggiormente negativi a sistemi che hanno una maggiore tendenza a perdere gli elettroni e valori progressivamente positivi ai sistemi che tendono ad accettare elettroni.

Per convenzione  $\Delta E^0$  di ogni reazione redox è la differenza fra l' $E^0$  dell'accettore di elettroni e l' $E^0$  del donatore di elettroni.

L'equazione di Nernst: mette in relazione il potenziale di riduzione standard con il potenziale redox a qualsiasi concentrazione di specie ossidata e ridotta.

I valori di  $E^0$  delle coppie redox permettono di predire la direzione del flusso di elettroni da una coppia redox ad un'altra quando entrambe si trovano in condizioni standard.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{n \cdot F} \ln \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

Sostituendo i valori delle costanti e per  $T=298$  K

$$E = E^{\circ} + \frac{0.026 \text{ V}}{n} \ln \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

$E$	potenziale di riduzione
$E^0$	potenziale di riduzione standard
$E'^0$	potenziale di riduzione standard a pH=7

# I TRASFERIMENTI DI ELETTRONI SONO ACCOMPAGNATI DA VARIAZIONI DI ENERGIA LIBERA

In generale, gli e<sup>-</sup> tendono a fluire verso la semi-cella che ha un valore di E<sup>0</sup> più positivo da quella con E<sup>0</sup> più negativo.

Nei sistemi biologici gli e<sup>-</sup> passano da una coppia redox a un'altra in presenza di enzimi che catalizzano la reazione.

Questo flusso spontaneo di elettroni fornisce energia libera che può essere usata per produrre lavoro. Gli e<sup>-</sup> tendono sempre a muoversi in una direzione decrescente di energia libera

$$\Delta G = -nF\Delta E \qquad \Delta G'^{\circ} = -nF\Delta E'^{\circ} \text{ (in condizioni standard e pH=7)}$$

dove n = numero di e<sup>-</sup>; F = costante di Faraday;  $\Delta E'^{\circ}$  è la differenza fra il potenziale standard del sistema accettore di elettroni e quello del sistema donatore.