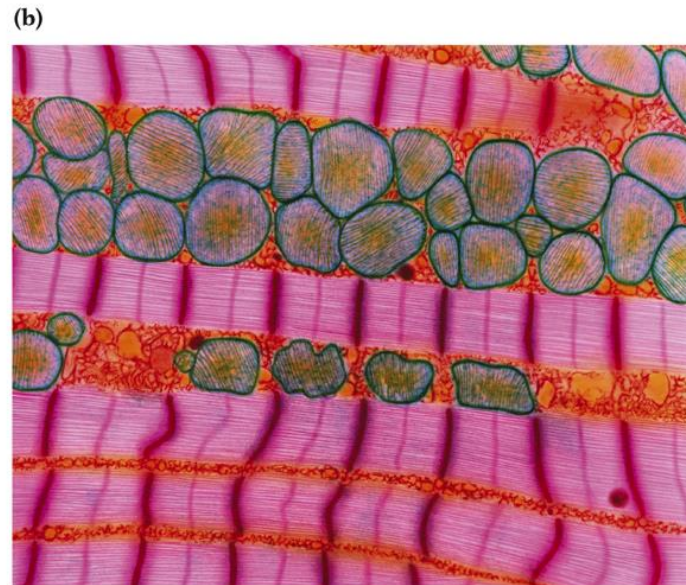
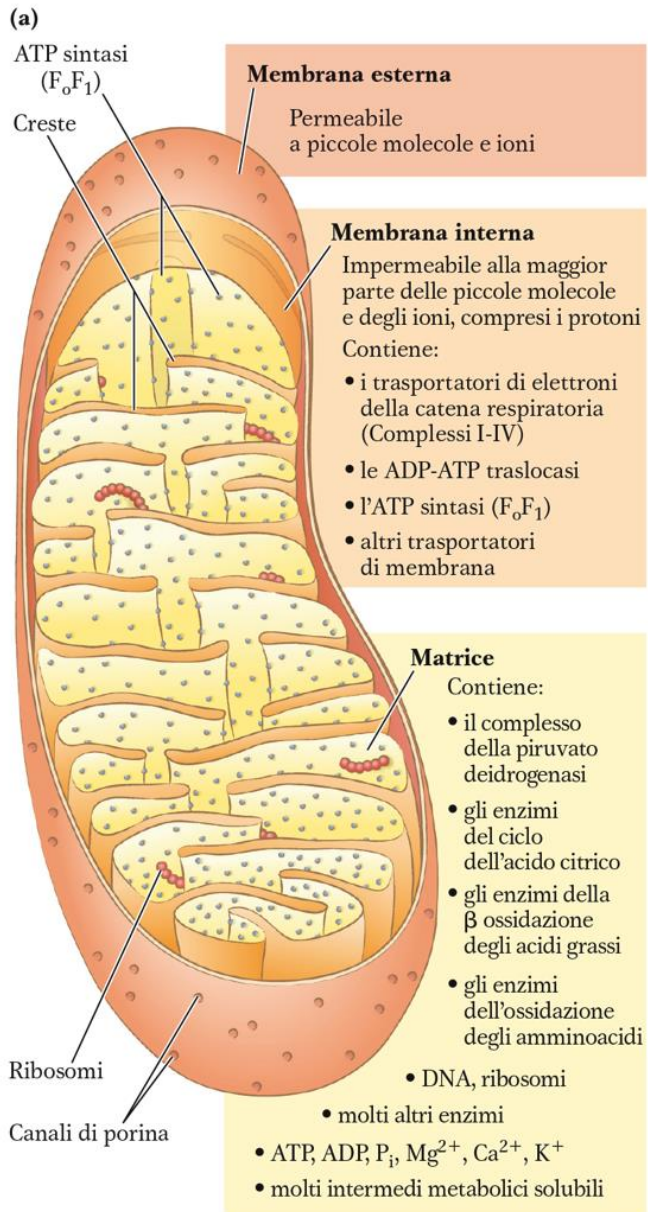
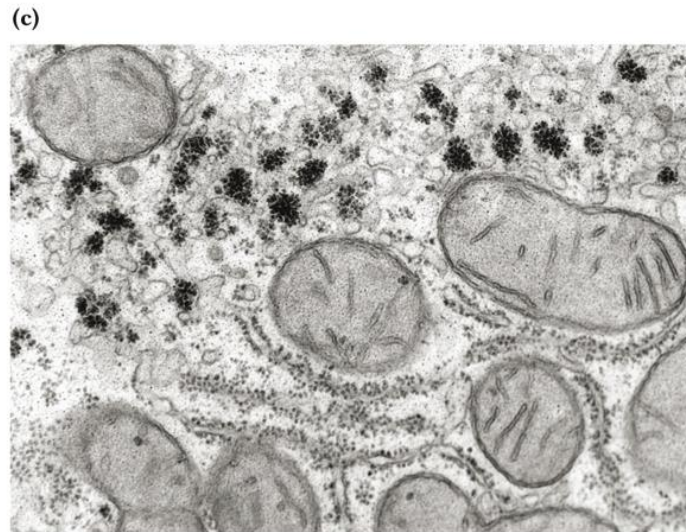


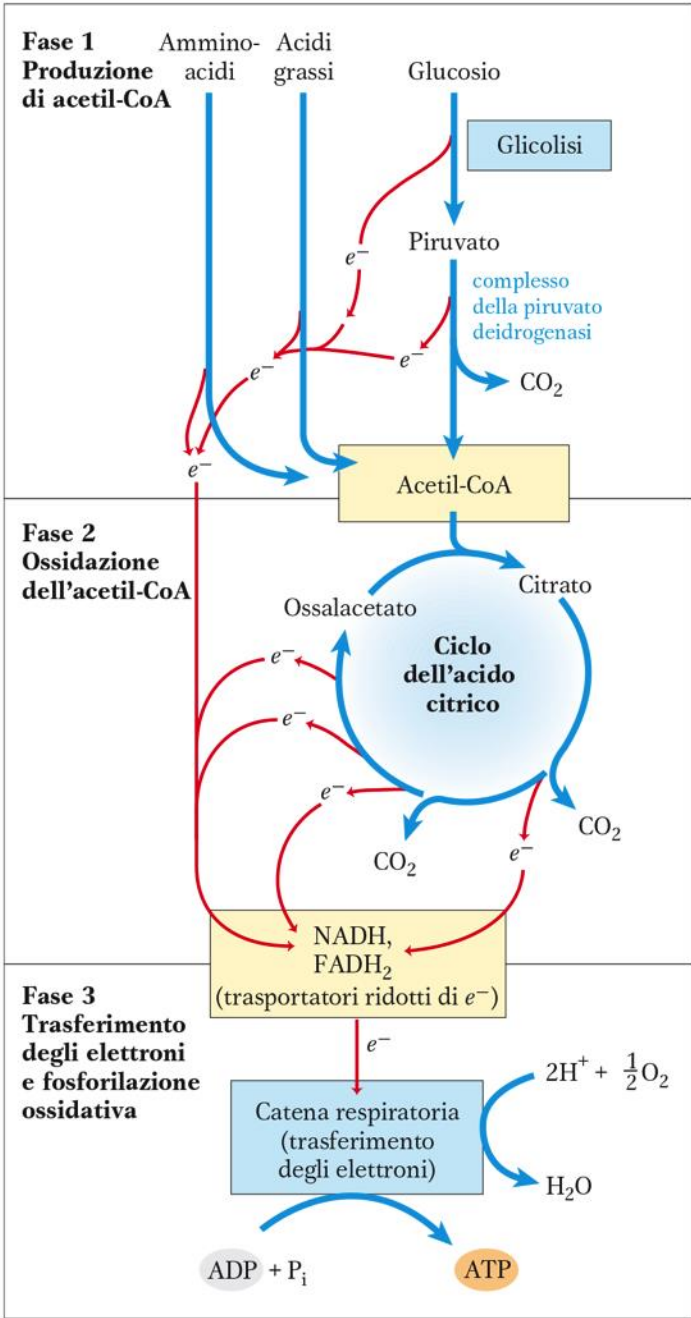
**CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI
E
FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA**



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:** perché 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.

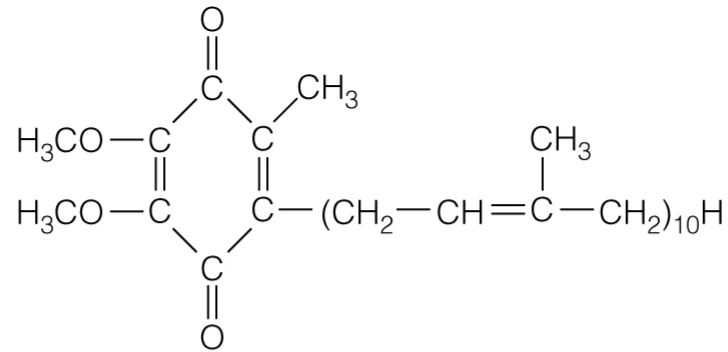
COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

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.

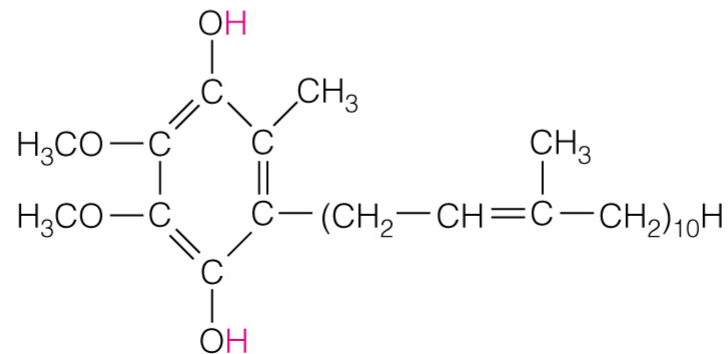
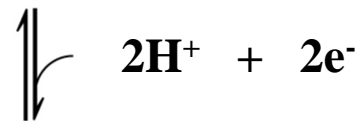
1. Flavoproteine: contengono un cofattore flavinico, FAD o FMN
2. Citocromi: hanno come cofattore l'eme. L'atomo di Fe dell'eme trasporta e-.

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 UQH₂ ubichinolo)
5. citocromo c



Coenzima Q₁₀ ossidato (CoQ)



Coenzima Q₁₀ ridotto (CoQH₂)

COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

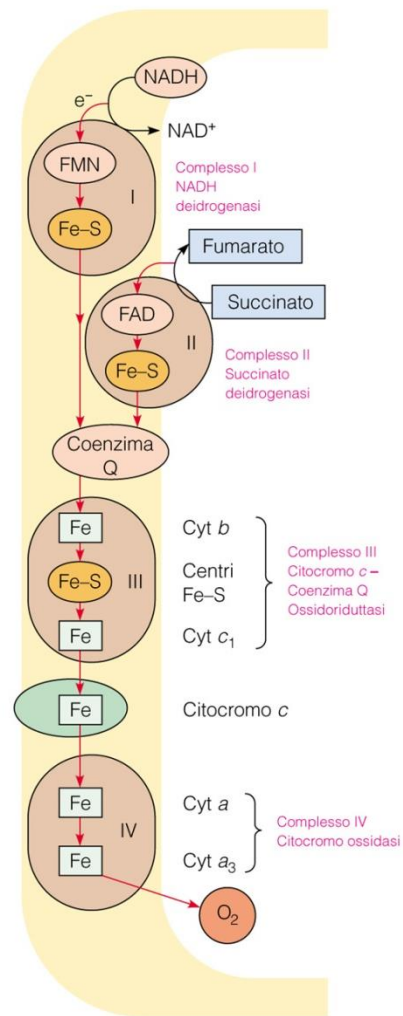
Sono organizzati in 4 complessi multiproteici:

- **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⁻: Complesso I e II


I Complessi III e IV sono situati in sequenza sulla base della loro affinità progressivamente crescente per e⁻.

Ogni complesso riduce l'accettore di e⁻ che lo segue. L'ultimo complesso si chiama ossidasi perchè O₂ funziona da ossidante.




Legenda:

 Complessi enzimatici

 Coenzimi organici e gruppi prostetici

 Centri Fe-S

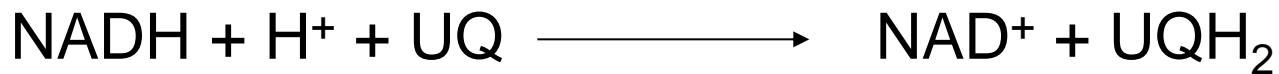
 Citocromi (ferro eminico)

Potenziali di riduzione standard di alcuni componenti della catena respiratoria mitocondriale

Redox reaction (half-reaction)	E'° (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.

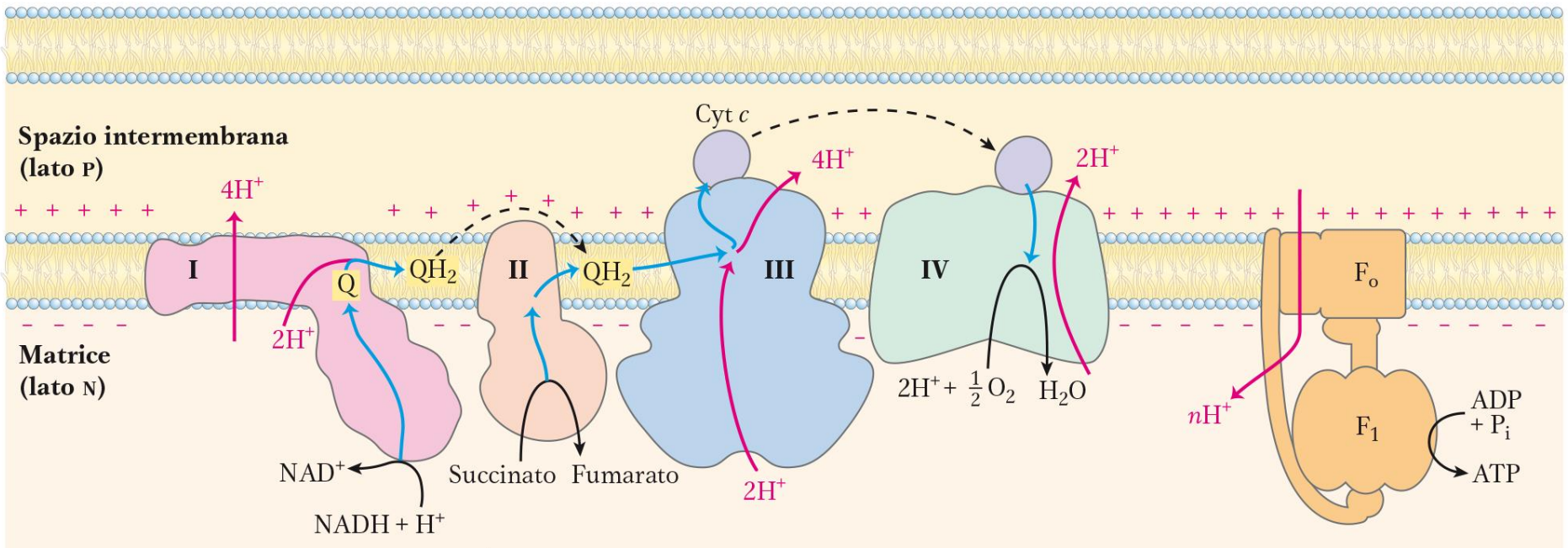


Percorso e⁻:



Il flusso di e⁻ è accompagnato dallo spostamento di 4 H⁺ dalla matrice allo spazio intermembrana.

CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



COMPLESSO II: SUCCINATO-UBICHINONE REDUTTASI

legato a membrana mitocondriale interna.

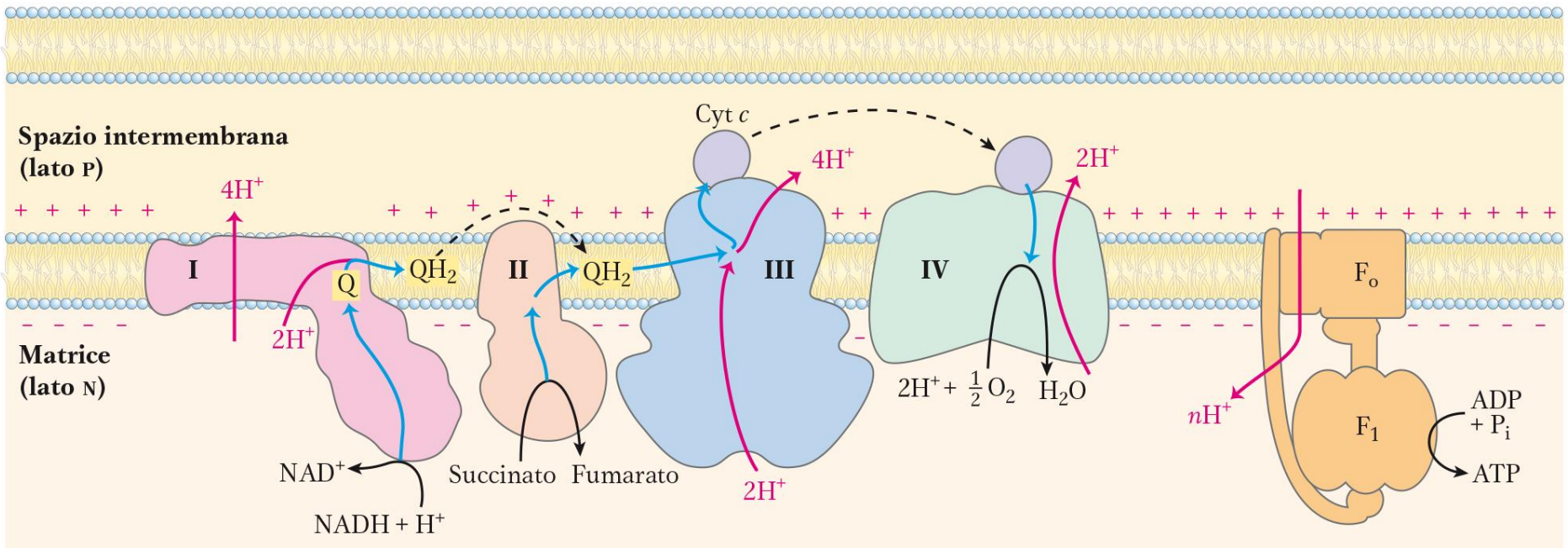
contiene FAD, centri Fe-S, sito di legame per succinato
percorso e-:

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

Riossida il 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.

CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



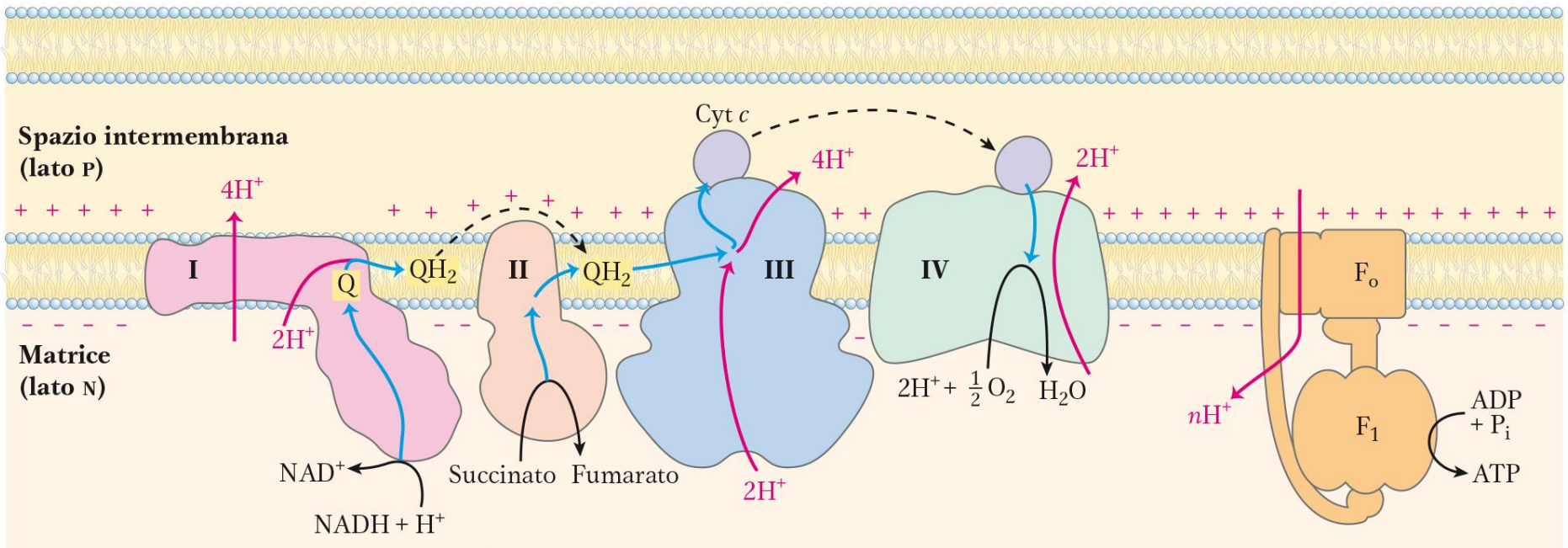
**UQH₂ DIFFONDE DAL COMPLESSO I E DAL
COMPLESSO II AL COMPLESSO III**

COMPLESSO III: UBICHINOLO-CITOCROMO C REDUTTASI

Punto di confluenza degli e⁻ che vi arrivano tramite UQH₂, 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⁻ al citocromo c solubile. Funziona come pompa di H⁺ che sono rilasciati nello spazio intermembrana, contribuendo alla generazione del gradiente protonico

CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



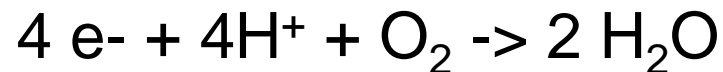
COMPLESSO IV: CITOCROMO C OSSIDASI

Contiene i citocromi a e a₃ e due centri rame.

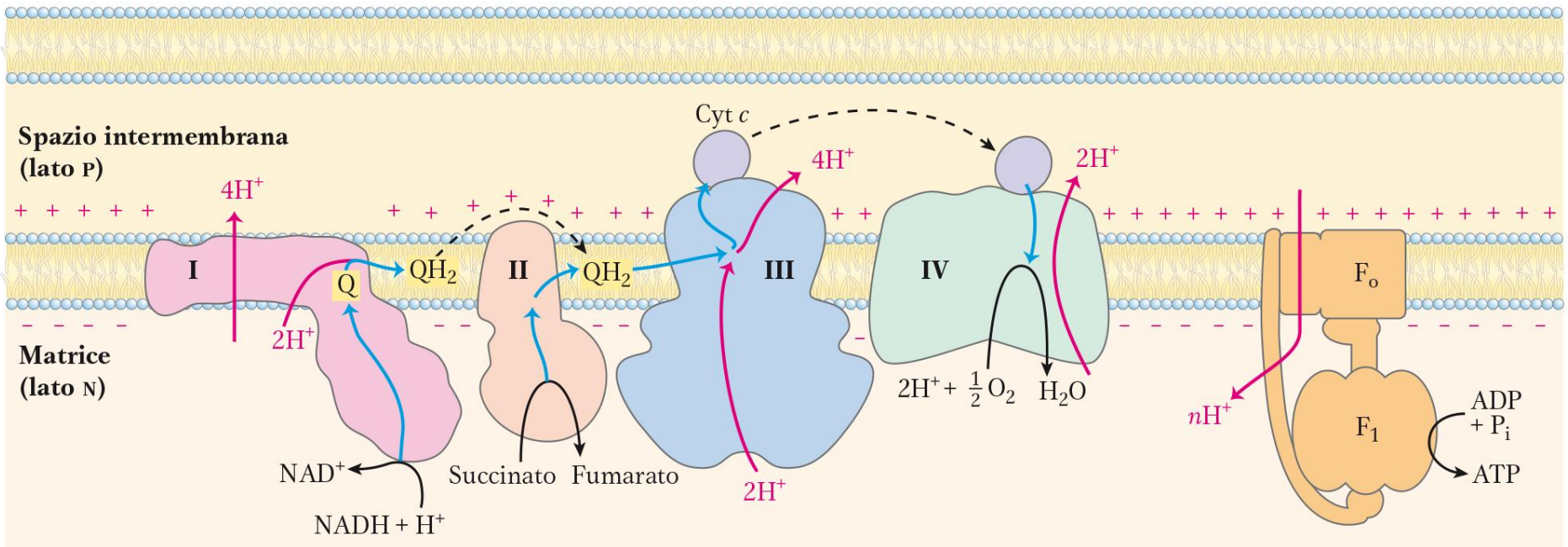
Catalizza il trasferimento di e⁻ dal citocromo c a O₂.

H⁺ vengono spostati dalla matrice allo spazio intermembrana.

Parte dei H⁺ vengono usati per la sintesi di H₂O.



CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

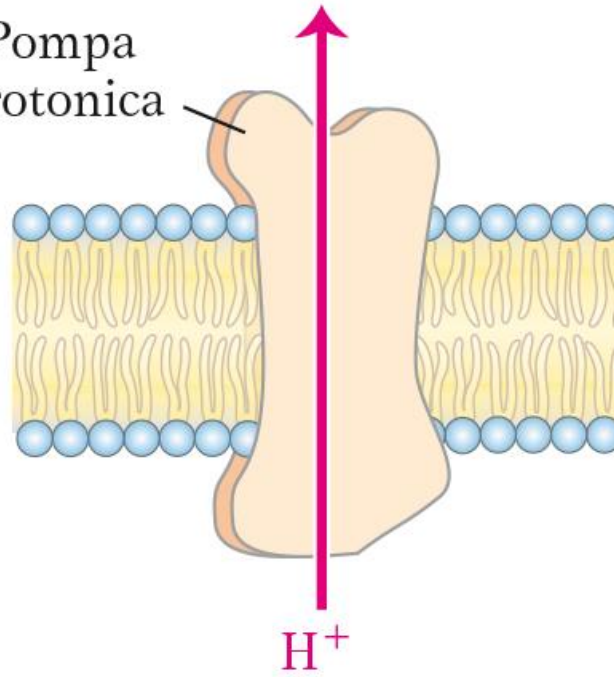


Lato P

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



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 e rilasciare ATP.

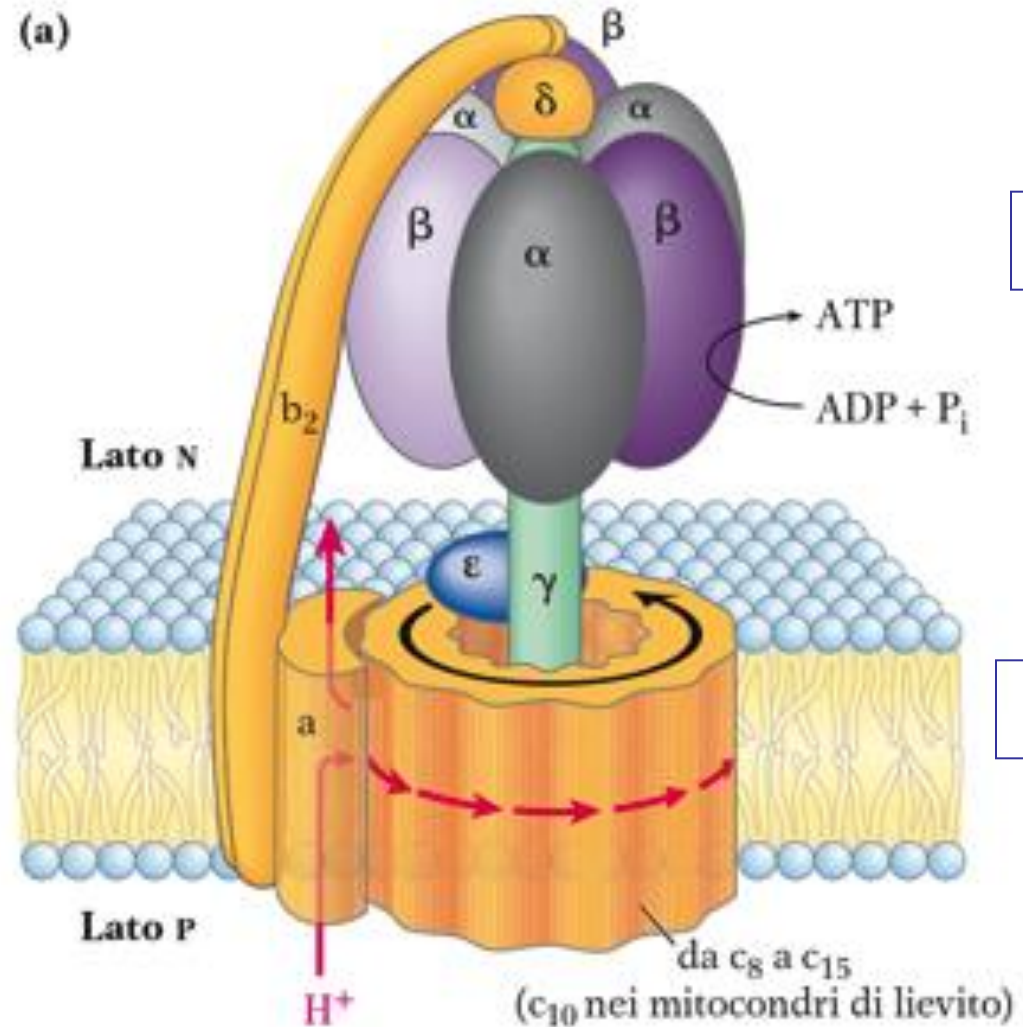
Avviene nel complesso multiproteico ATP sintasi (complesso FoF1 o complesso V)

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 γ con una sola delle subunità β alla volta. Sulla base dell'interazione γ - β si hanno 3 diverse conformazioni e 3 diverse situazioni:

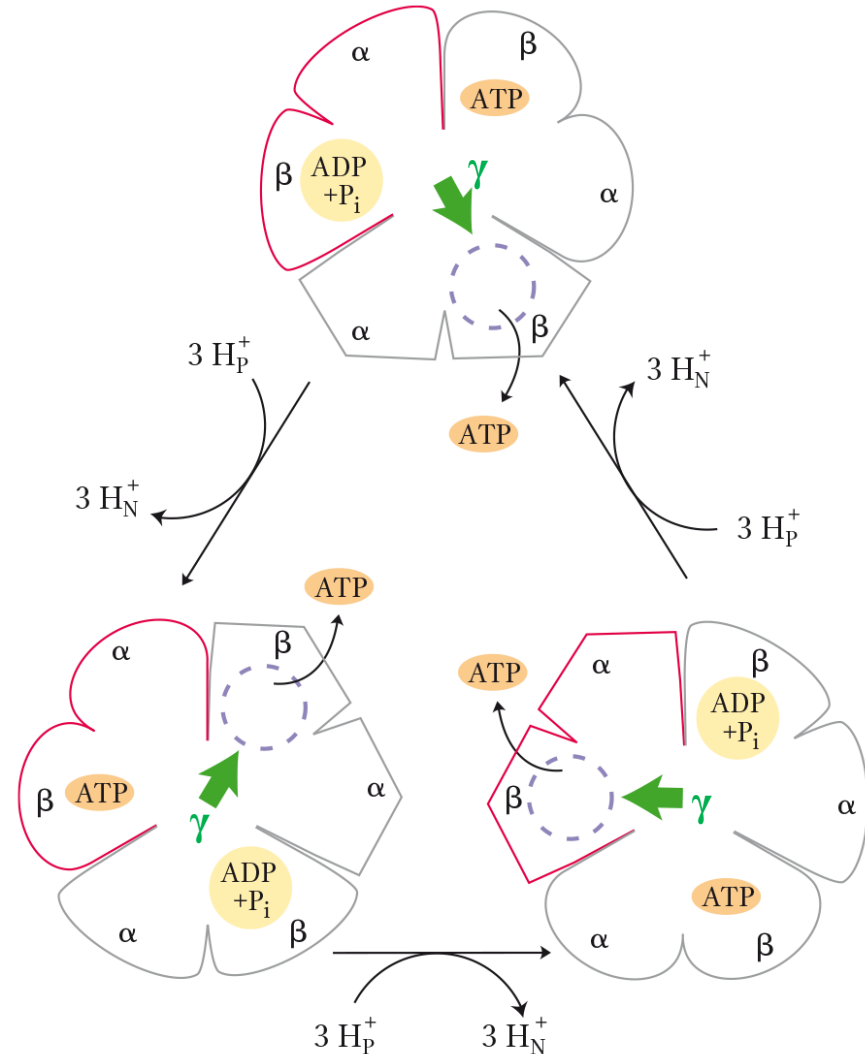
1. β -ADP (lega ADP e P_i)
2. β -ATP (viene sintetizzato ATP)
3. β -vuota (o aperta, viene rilasciato ATP)

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

La forza motrice protonica causa la rotazione di 120° di γ , che viene a contatto con una delle subunità $\alpha\beta$. Questo causa una modificazione conformazionale per cui

- **il sito β -ATP assume la conformazione vuota e dissocia l'ATP**
- **il sito β -ADP assume la conformazione β -ATP che promuove la sintesi di ATP da ADP + Pi e forma ATP**
- **il sito β -vuoto assume la conformazione β -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_0 causa la rotazione del cilindro costituito dalle subunità c e di conseguenza ruota anche la proteina γ . La struttura $3\alpha3\beta$ è tenuta fissa rispetto al cilindro c ed all'asse γ dalle subunità b e δ . Perciò ogni rotazione di 120° mette in contatto γ con una diversa subunità β . Questo contatto induce la conformazione β -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.



Valore di x = rapporto P/O

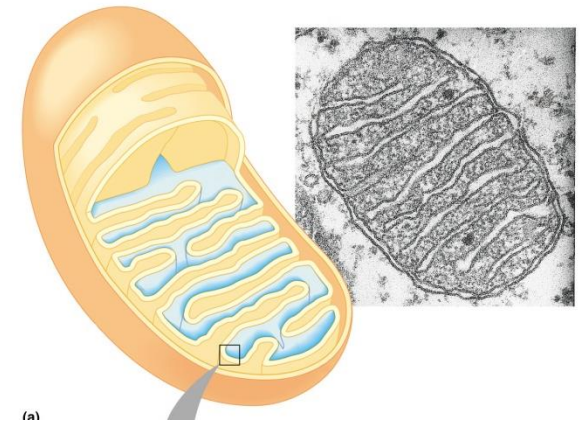
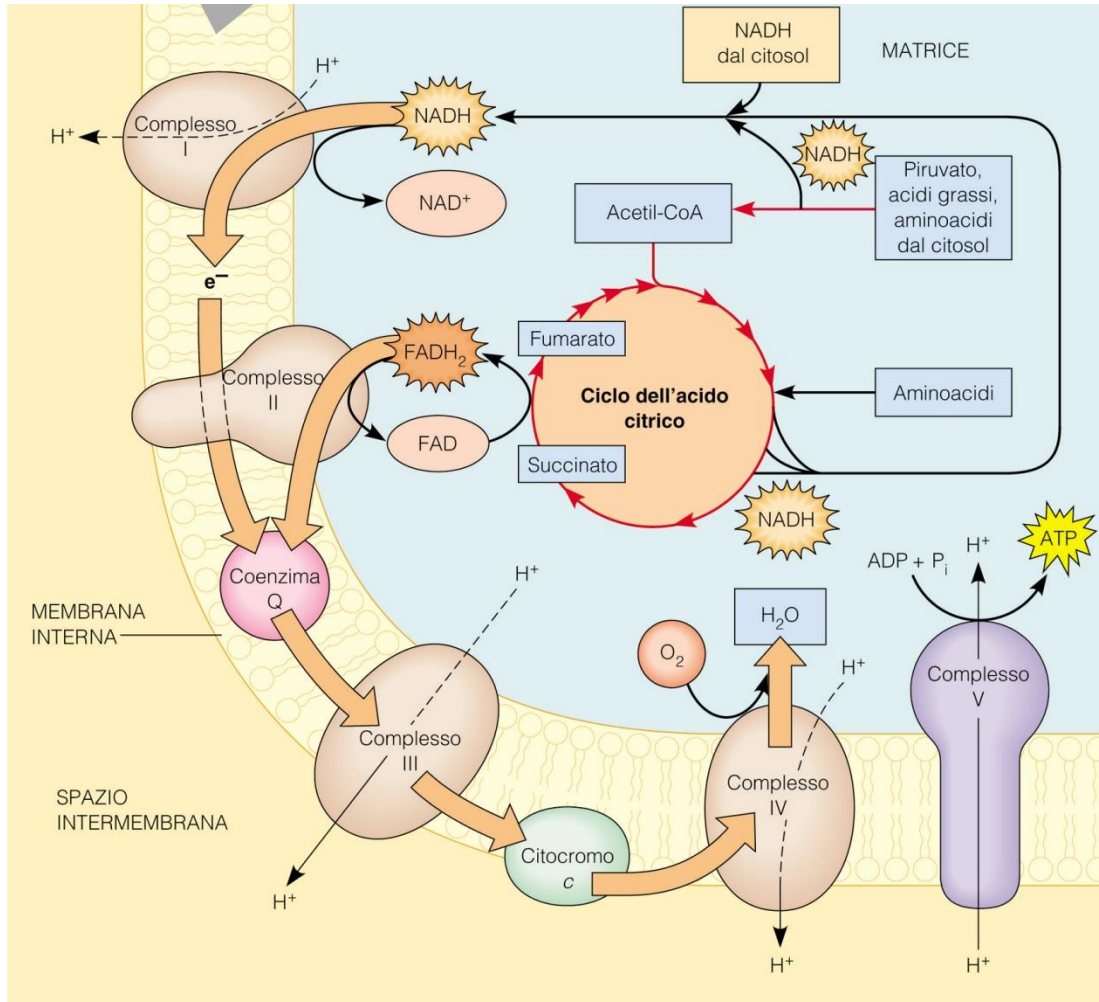
Stabilito che:

- 10 H^+ sono pompate fuori dal mitocondrio per 1 $\text{NADH} + \text{H}^+$ e 6 per FADH_2
- Servono 4 H^+ per la sintesi di 1 ATP (di cui 1 serve per trasportare Pi , ADP e ATP attraverso la membrana mitocondriale)

si è arrivati a concludere che il rapporto P/O è pari a 2,5 (10/4) per il NADH e 1,5 (6/4) per FADH_2 .

RILEVANZA DEL PROCESSO

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



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

6) Sistemi di trasporto di $NADH + H^+$

REGOLAZIONE

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

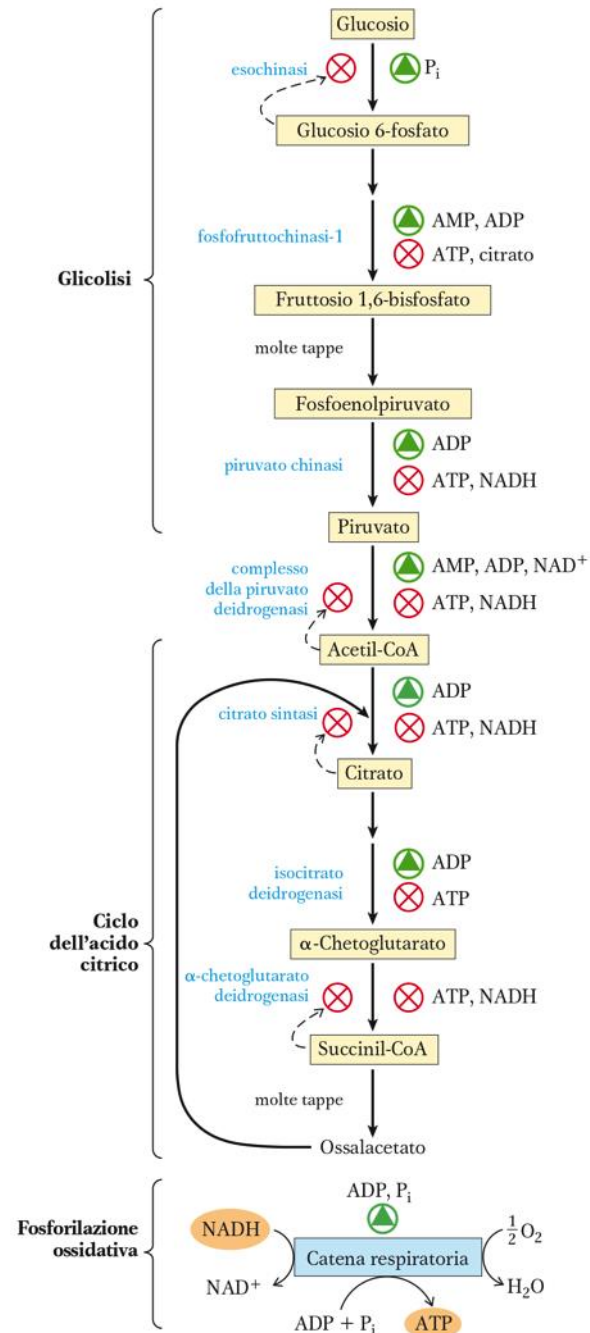
se $[ATP] / [ADP] [Pi] \gg$ la velocità non è massima
se $[ATP] / [ADP] [Pi] \ll$ aumenta la velocità della
fosforilazione ossidativa.

Normalmente la velocità viene regolata in modo preciso allo
scopo di far variare poco il rapporto $[ATP]/ [ADP] [Pi]$, 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 $[FAD]$)).



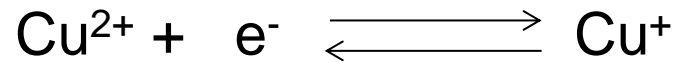
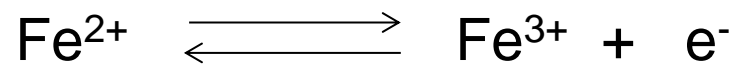
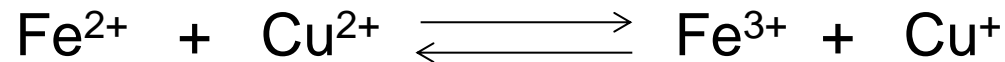
DIAPOSITIVE DI SUPPORTO

Le reazioni che trasferiscono e⁻ sono redox

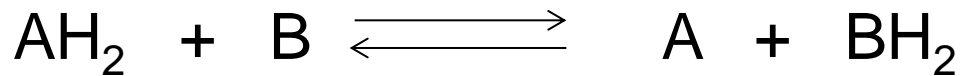
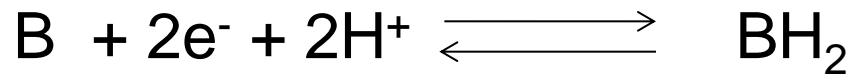
donatore di elettroni $\xrightleftharpoons{\hspace{1cm}}$ e⁻ + accettore di elettroni
coppia redox coniugata

gli e⁻ vengono trasferiti.

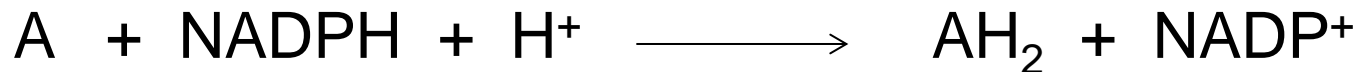
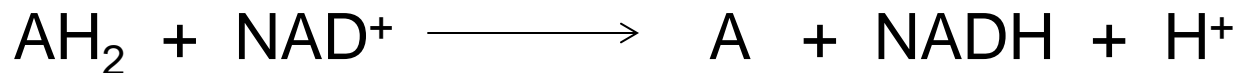
1) come e⁻



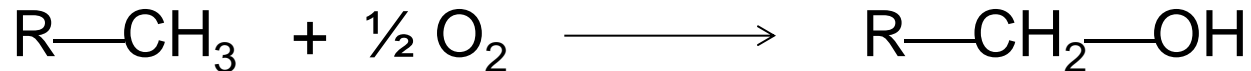
2) come atomi H



3) come ione idruro (:H⁻)



4) combinazione diretta di un riducente organico con l'O₂



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.

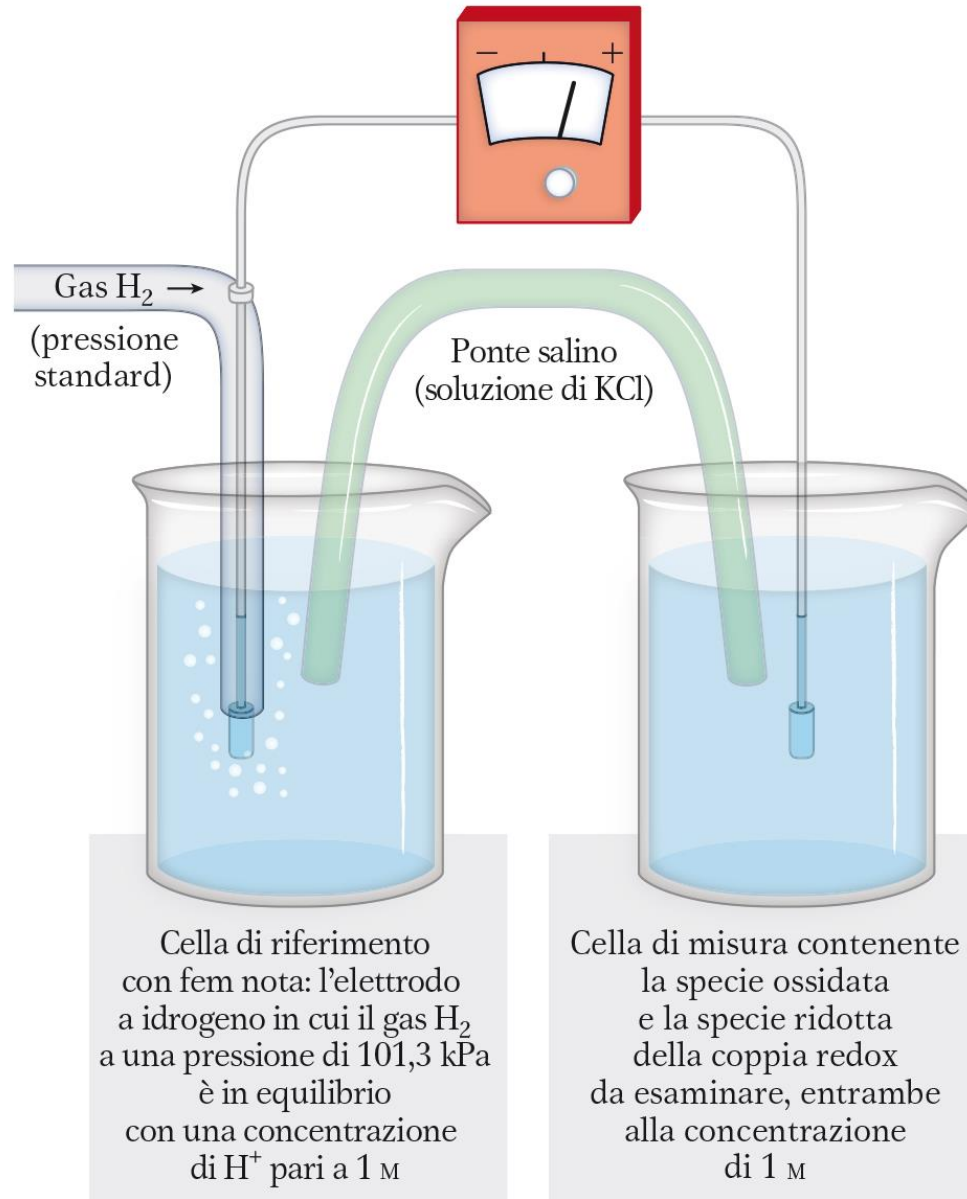
In biochimica si usa E'^0 , quando le condizioni standard sono considerate a pH=7.

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 ΔE^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 $T=298 \text{ K}$

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

E potenziale di riduzione

E^0 potenziale di riduzione standard

E'^0 potenziale di riduzione standard a $\text{pH}=7$

I TRASFERIMENTI DI ELETTRONI SONO ACCOMPAGNATI DA VARIAZIONI DI ENERGIA LIBERA

In generale, gli e⁻ tendono a fluire verso la semi-cella che ha un valore di E⁰ più positivo da quella con E⁰ più negativo.

Nei sistemi biologici gli e⁻ 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⁻ 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⁻; F = costante di Faraday; $\Delta E'^{\circ}$ è la differenza fra il potenziale standard del sistema accettore di elettroni e quello del sistema donatore.