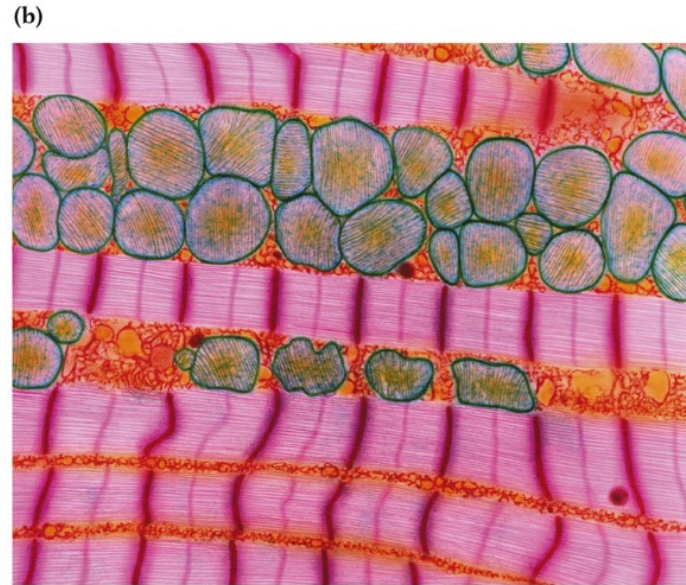
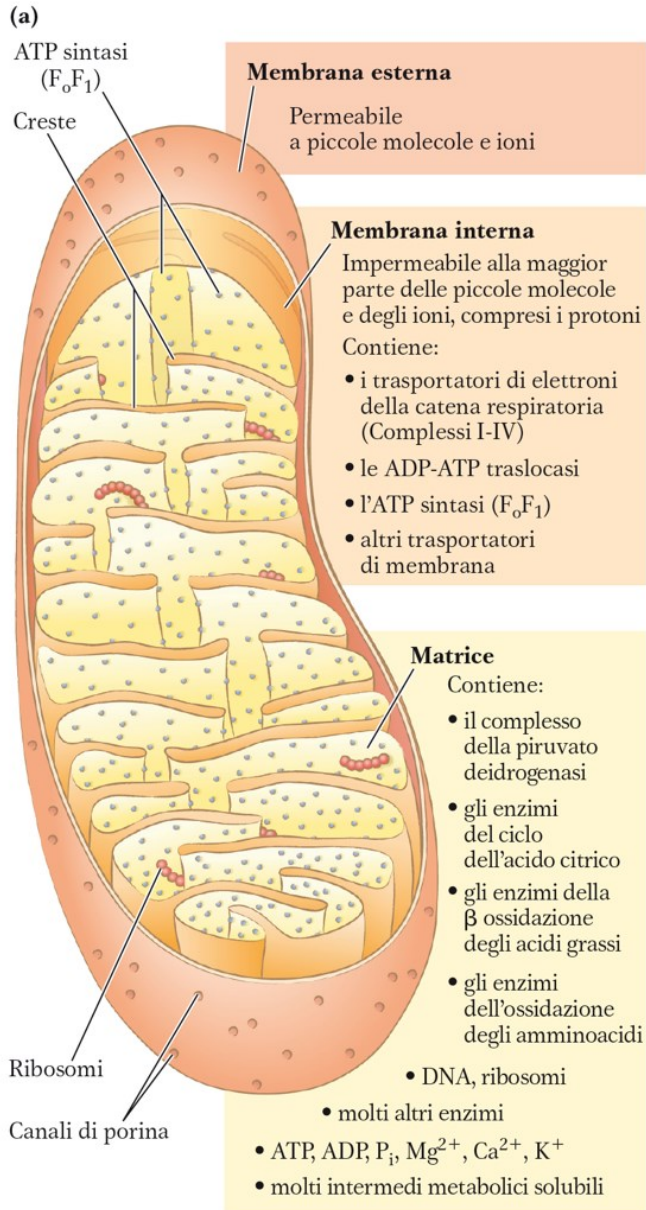
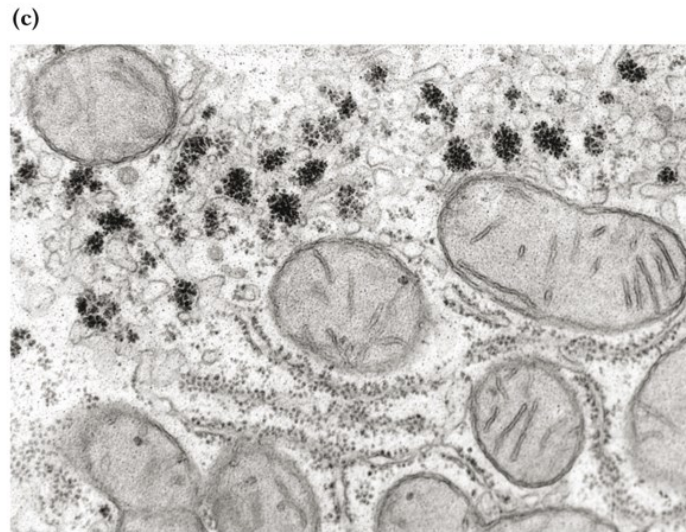


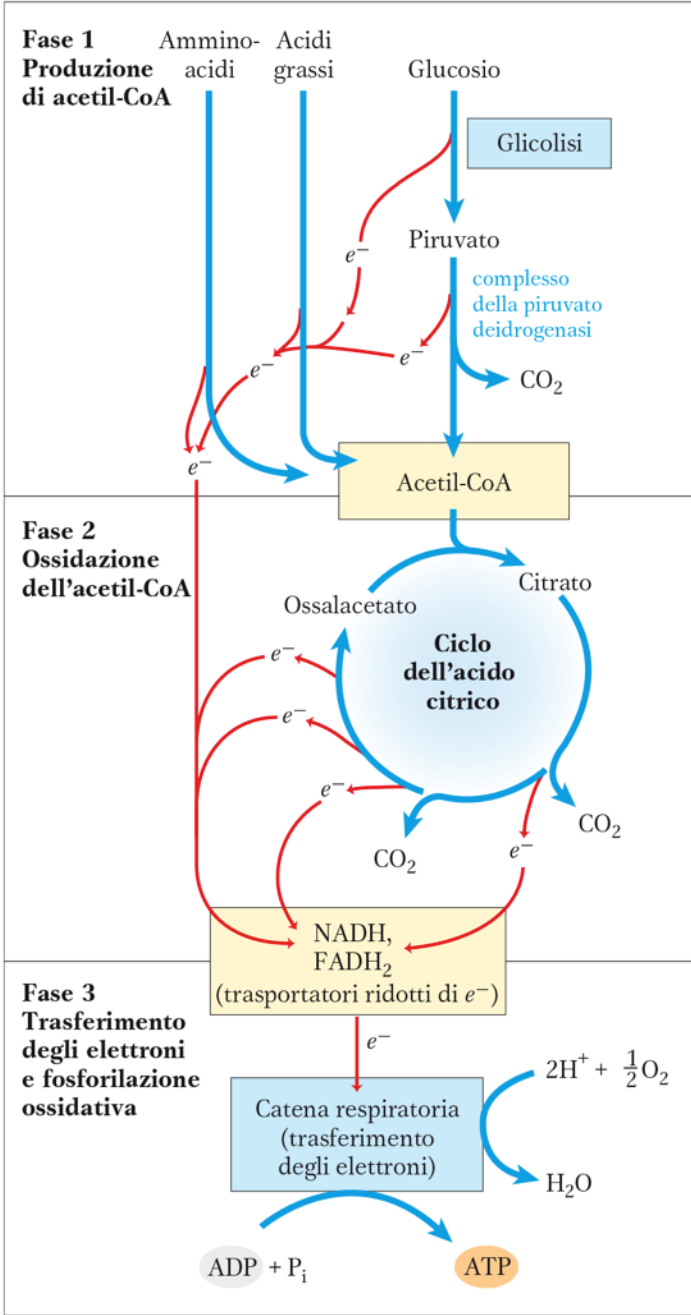
**CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI  
E  
FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA**



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. È il processo che riossida i trasportatori di elettroni e li rende di nuovo disponibili per le diverse vie metaboliche. **O<sub>2</sub> è l'accettore finale di atomi di H e viene trasformato in H<sub>2</sub>O.**

**CATENA:** gli elettroni NON sono trasferiti direttamente a O<sub>2</sub>, MA attraverso una serie di trasportatori intermedi. **RESPIRATORIA:** perché c'è consumo di O<sub>2</sub>. **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'ACCOPPIAMENTO 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

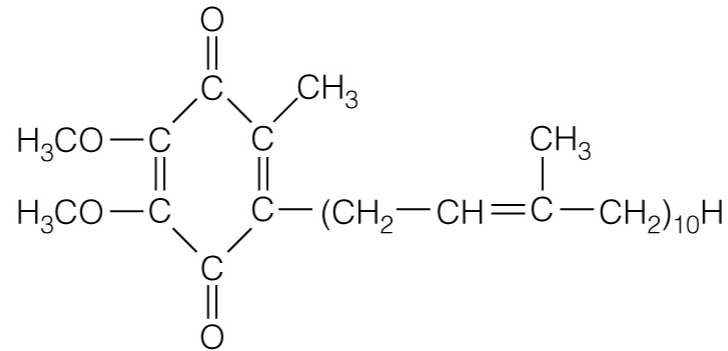
Sono tutte proteine integrali di membrana ad esclusione dell'*ubichinone* e del *citocromo c* (proteina periferica solubile). Ogni componente può accettare e- dal trasportatore che lo precede e trasferirli a quello che lo segue.

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

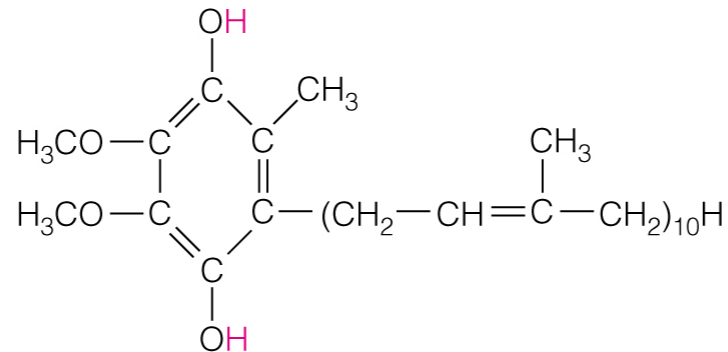
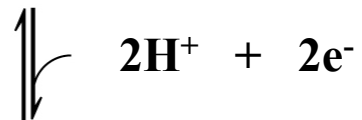


# COMPONENTI DELLA CATENA RESPIRATORIA

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

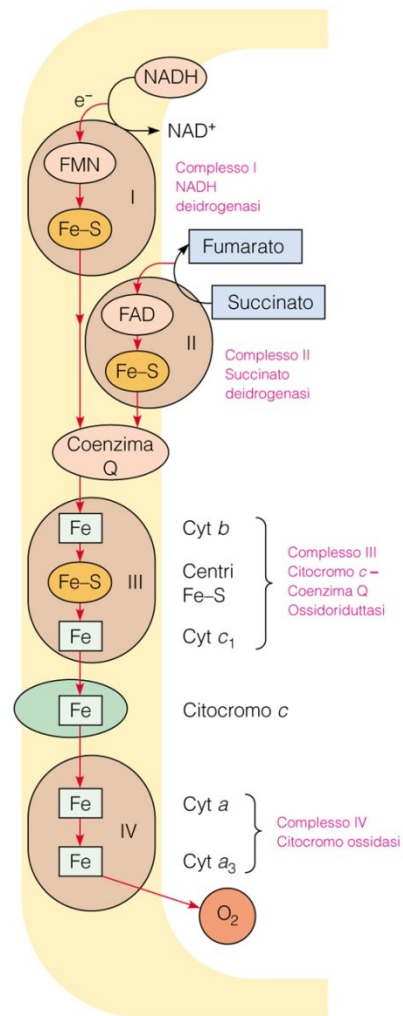
Sono organizzati in 4 complessi multiproteici:

- **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

I 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:

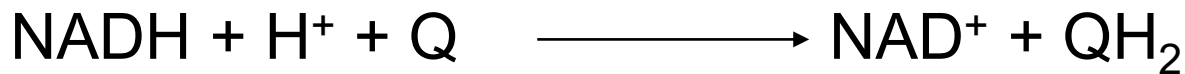
-  Complessi enzimatici
-  Coenzimi organici e gruppi prostetici
-  Centri Fe-S
-  Citocromi (ferro emnico)

# 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.

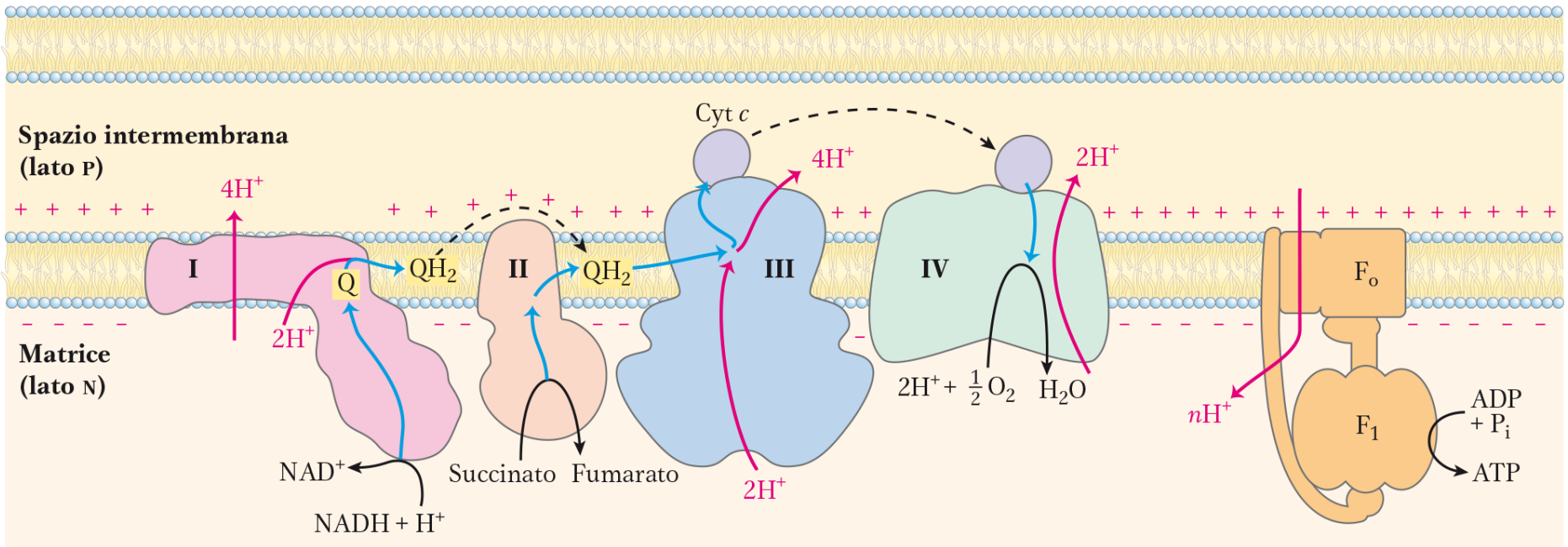


Percorso e<sup>-</sup>:



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

# 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-:

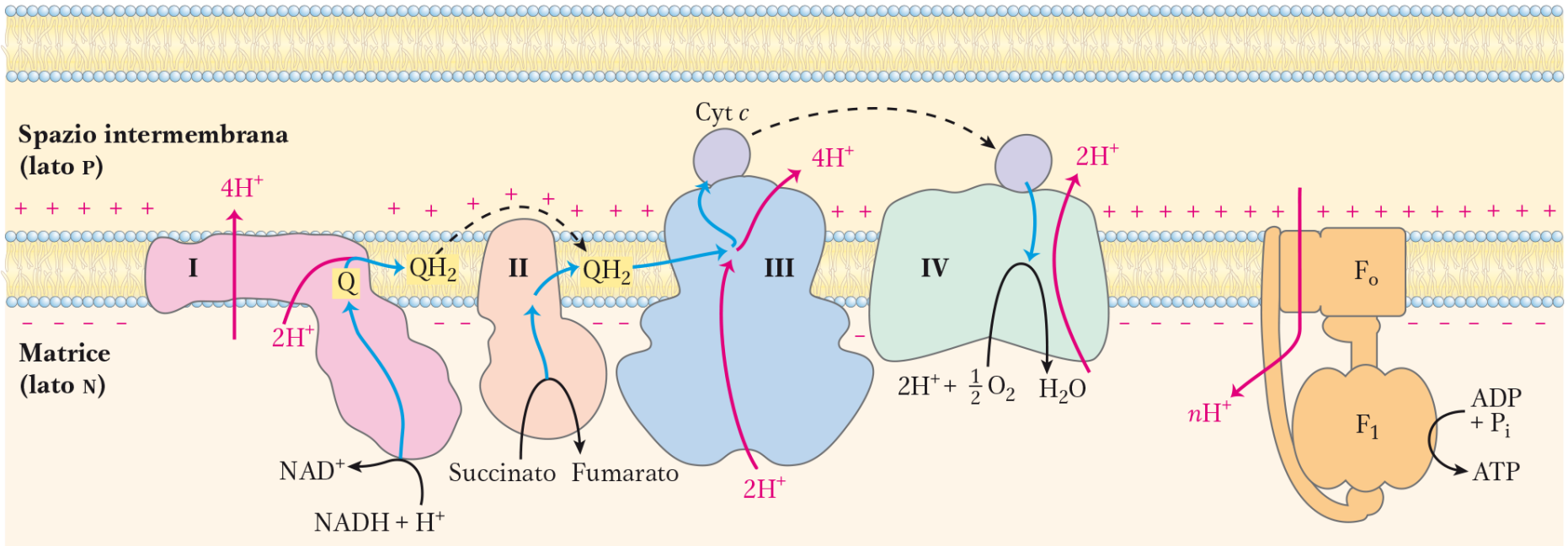
succinato  $\rightarrow$  FAD  $\rightarrow$  Fe-S  $\rightarrow$  Q

Riossida il FADH<sub>2</sub>, 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



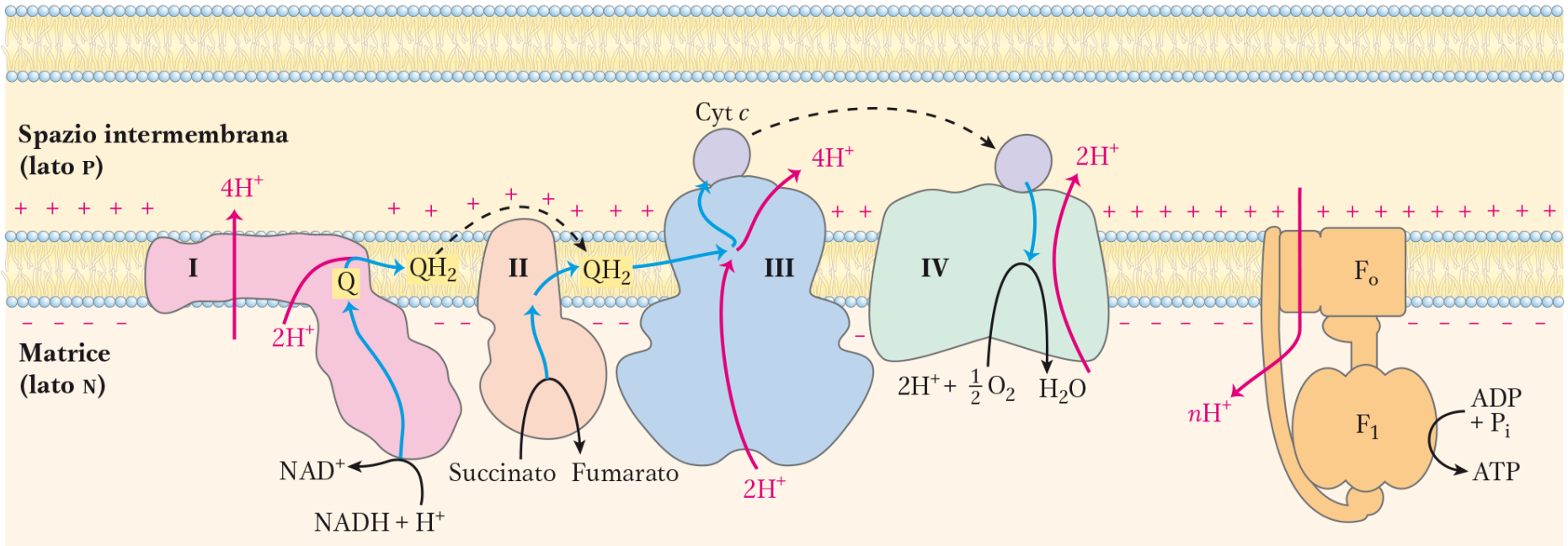
**QH<sub>2</sub> DIFFONDE DAL COMPLESSO I E DAL  
COMPLESSO II AL COMPLESSO III**

## COMPLESSO III: UBICHINOLO-CITOCROMO C REDUTTASI

Punto di confluenza degli e<sup>-</sup> che vi arrivano tramite QH<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

# CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



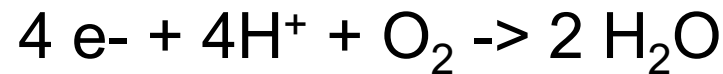
## COMPLESSO IV: CITOCROMO C OSSIDASI

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

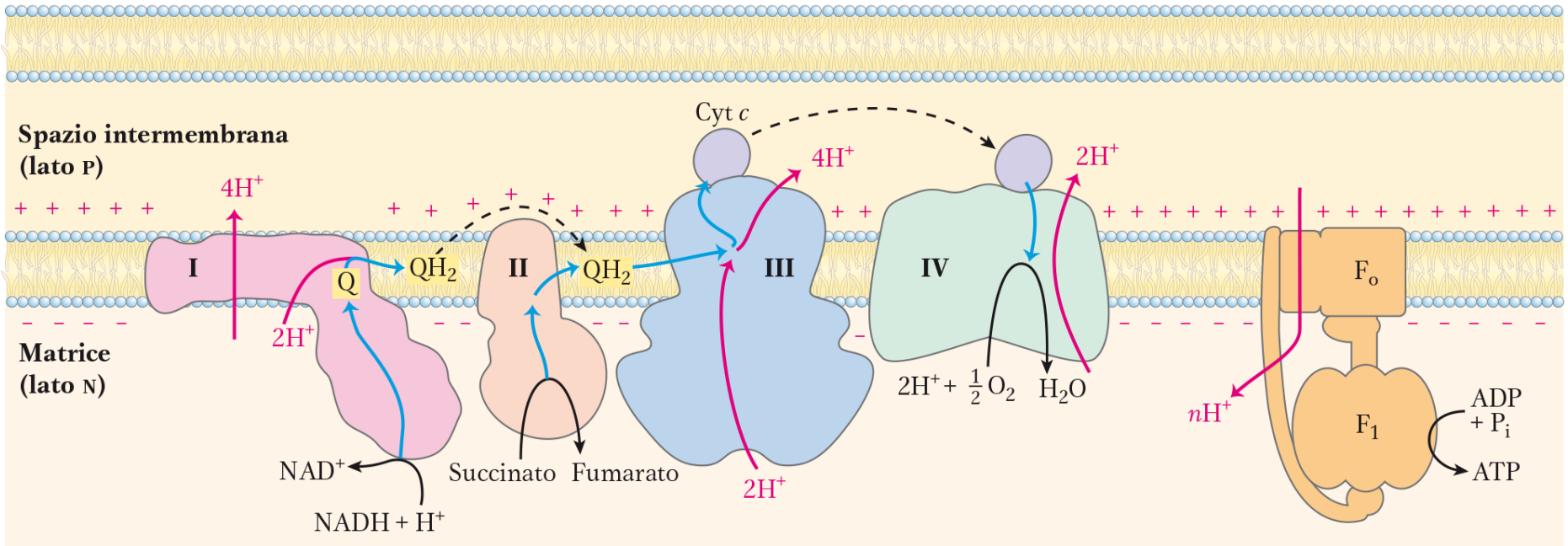
Catalizza il trasferimento di e<sup>-</sup> dal citocromo c a O<sub>2</sub>.

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.



# CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

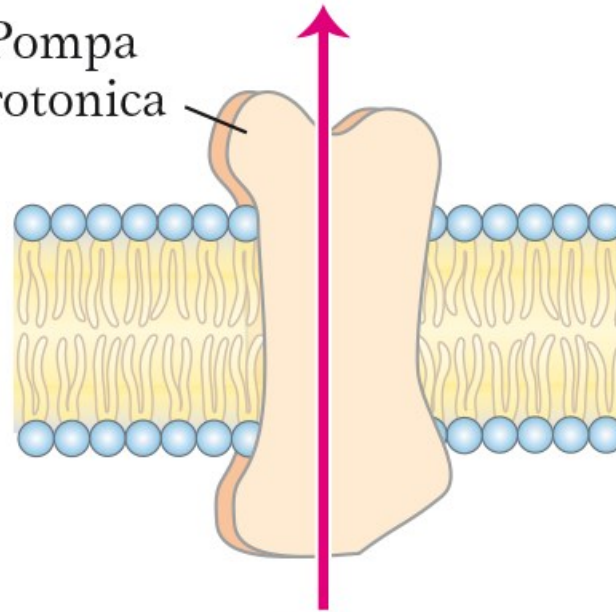


**Lato P**

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



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.

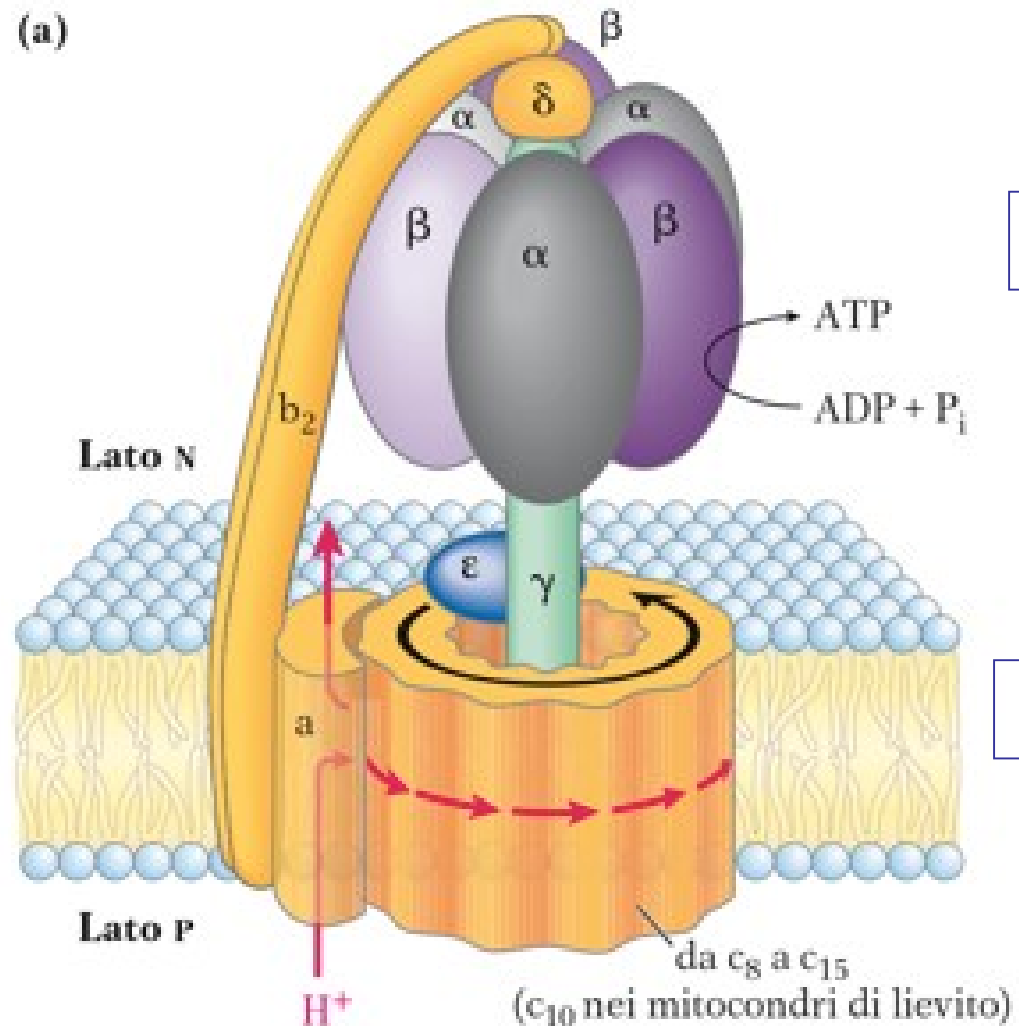
Avviene nel complesso multiproteico ATP sintasi (complesso FoF1 o complesso V)

# 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  $\gamma$  con una sola delle subunità  $\beta$  alla volta. Sulla base dell'interazione  $\gamma$ - $\beta$  si hanno 3 diverse conformazioni e 3 diverse situazioni:

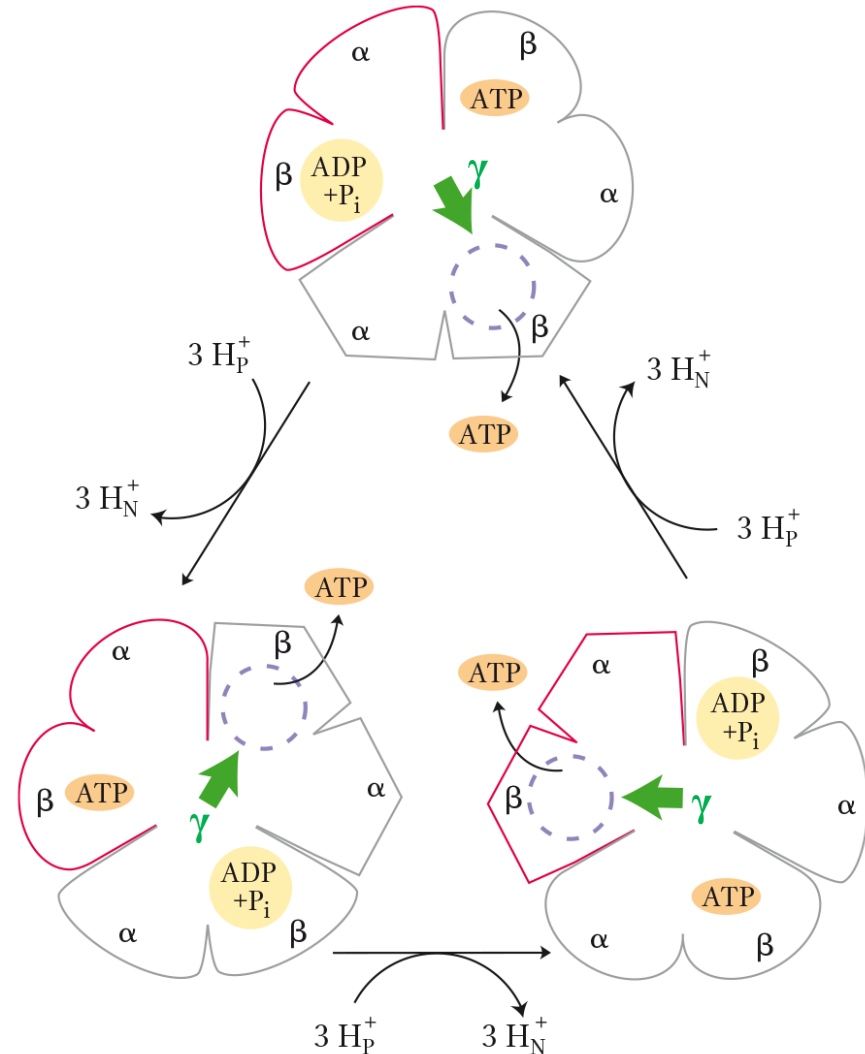
1.  $\beta$ -ADP (lega ADP e  $P_i$ )
2.  $\beta$ -ATP (viene sintetizzato ATP)
3.  $\beta$ -vuota (o aperta, viene rilasciato ATP)

Ciascun dimero  $\alpha\beta$  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  $120^\circ$  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.



Valore di  $x$  = rapporto P/O

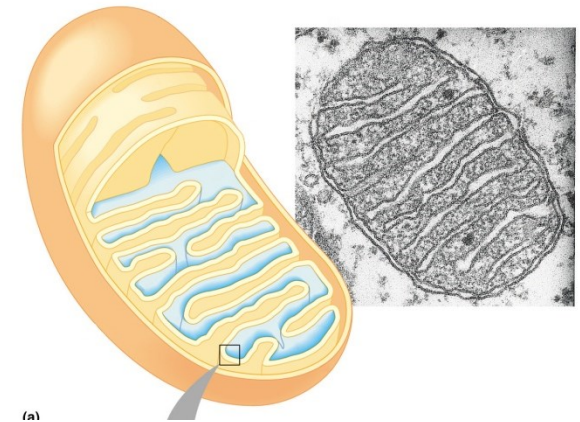
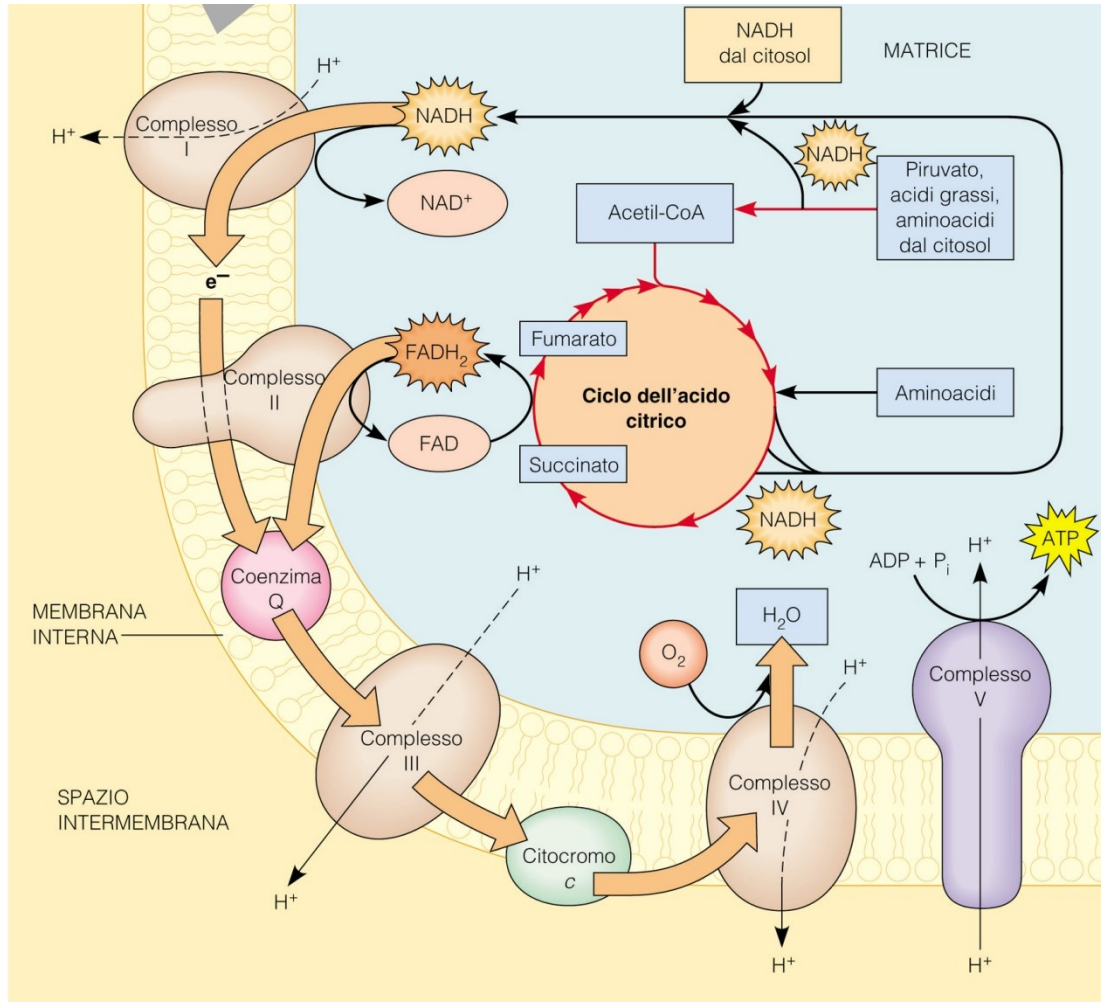
Stabilito che:

- 10  $\text{H}^+$  sono pompate fuori dal mitocondrio per 1 NADH e 6 per  $\text{FADH}_2$
- Servono 4  $\text{H}^+$  per la sintesi di 1 ATP (di cui 1 serve per trasportare  $\text{Pi}$ , 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  $\text{FADH}_2$ .

## **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  $[ADP]$   
 $[ATP]/ [ADP] [P_i]$  esprime la situazione energetica cellulare.  
Normalmente ha un valore elevato.

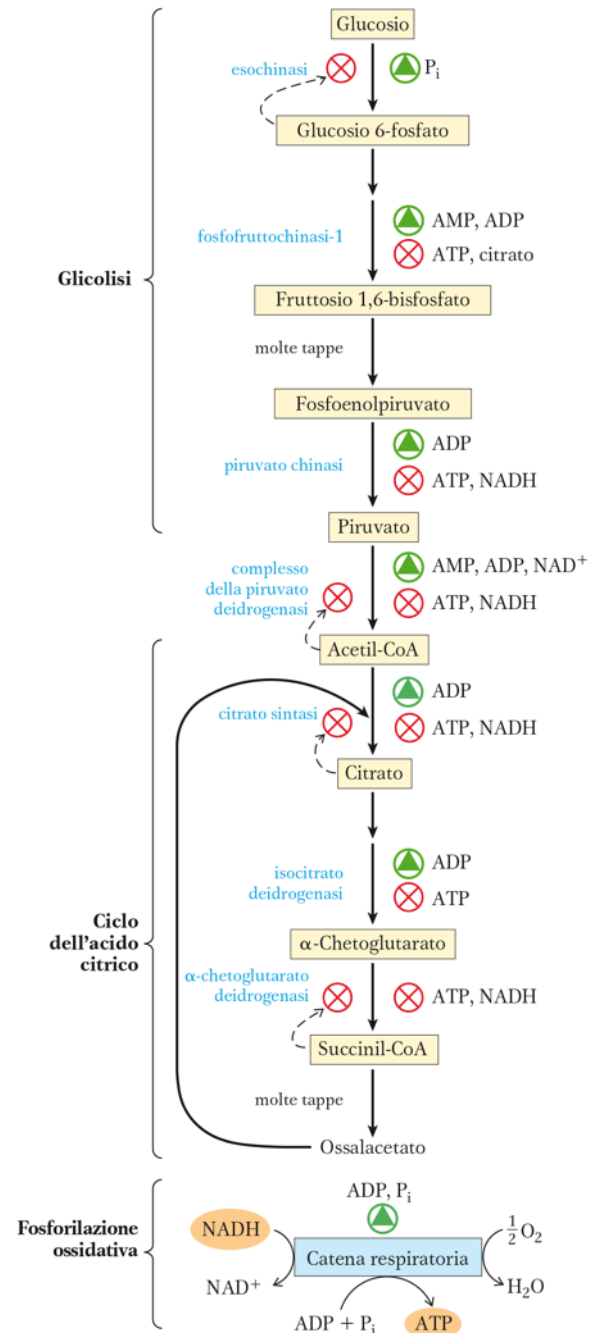
se  $[ATP] / [ADP] [P_i] \gg$  la velocità non è massima  
se  $[ATP] / [ADP] [P_i] \ll$  aumenta la velocità della  
fosforilazione ossidativa.

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



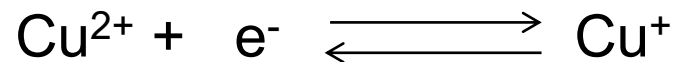
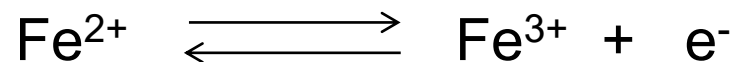
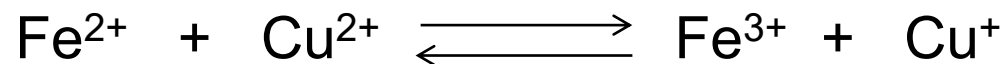
# DIAPOSITIVE DI SUPPORTO

## Le reazioni che trasferiscono e- sono redox

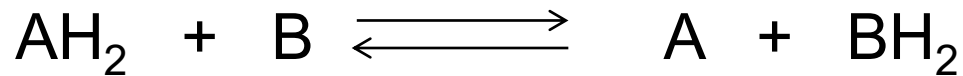
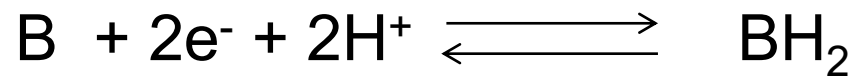
donatore di elettroni  $\rightleftharpoons$  e<sup>-</sup> + accettore di elettroni  
coppia redox coniugata

gli e- vengono trasferiti.

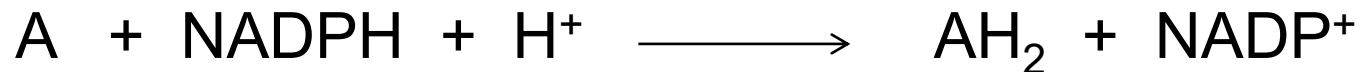
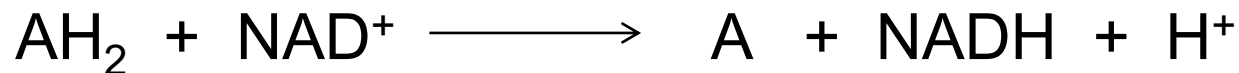
1) come e<sup>-</sup>



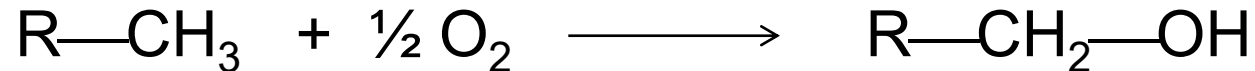
2) come atomi H



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.

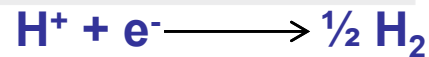
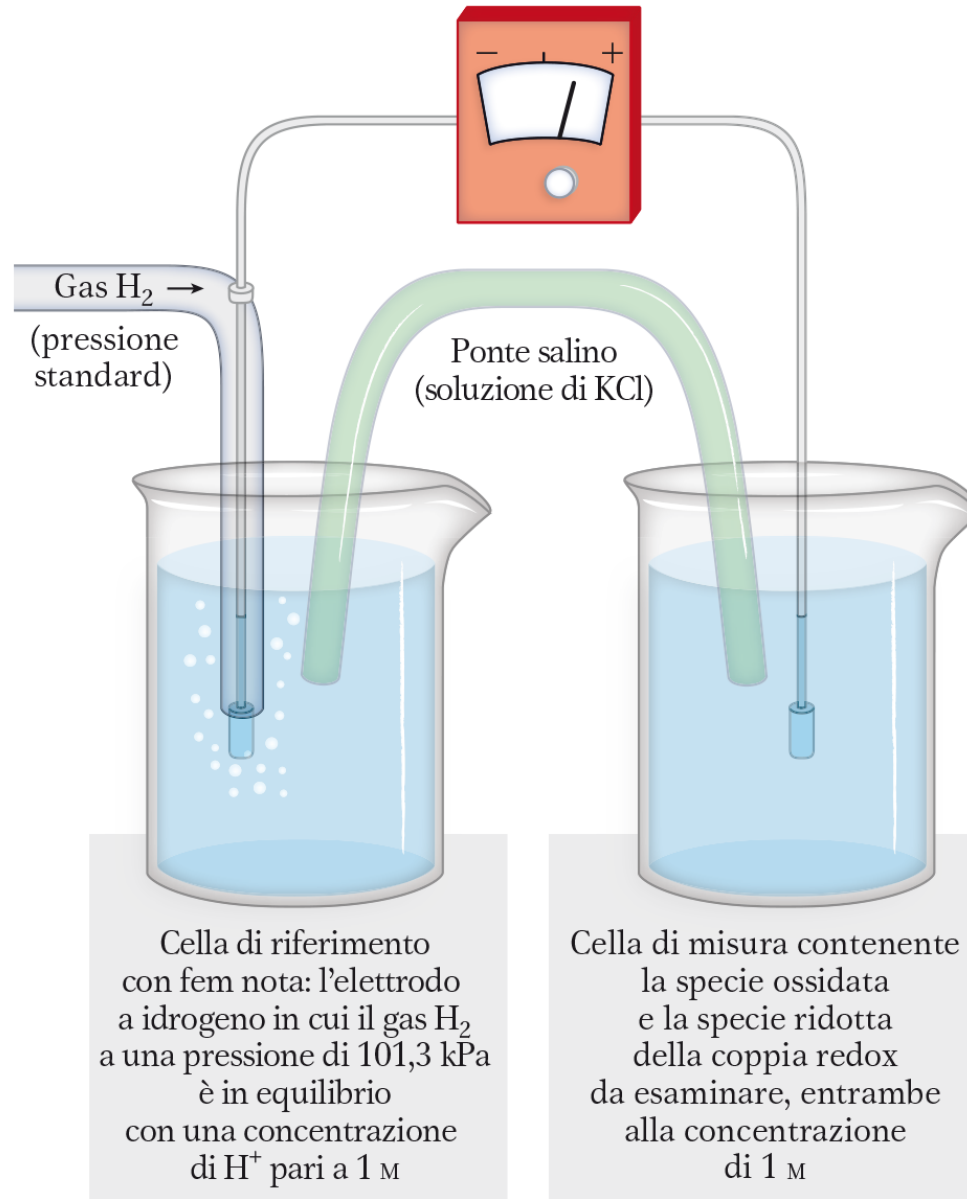
In biochimica si usa  $E'^0$ , quando le condizioni standard sono considerate a pH=7.

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  $T=298 \text{ K}$

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

|        |   |
|--------|---|
| $E$    | potenziale di riduzione                 |
| $E^0$  | potenziale di riduzione standard        |
| $E'^0$ | potenziale di riduzione standard a 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.