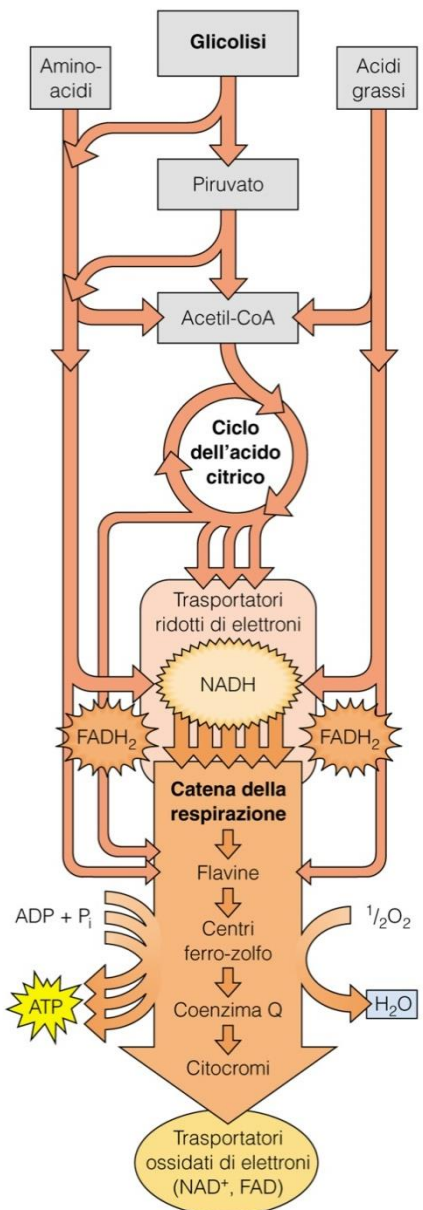
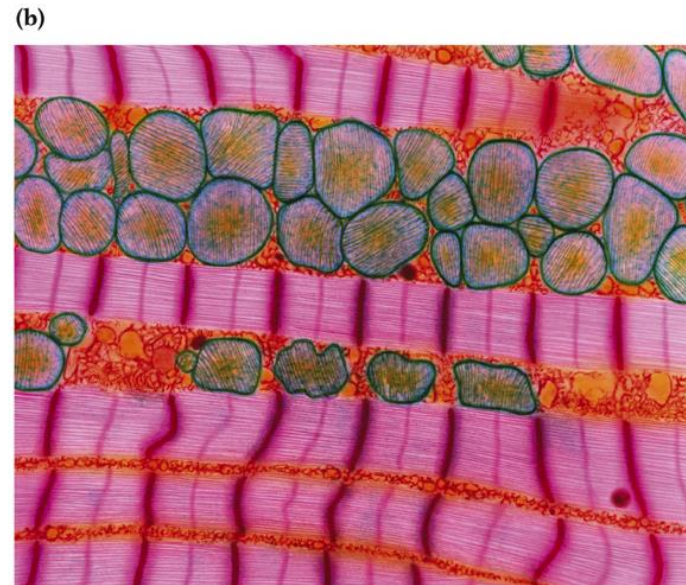
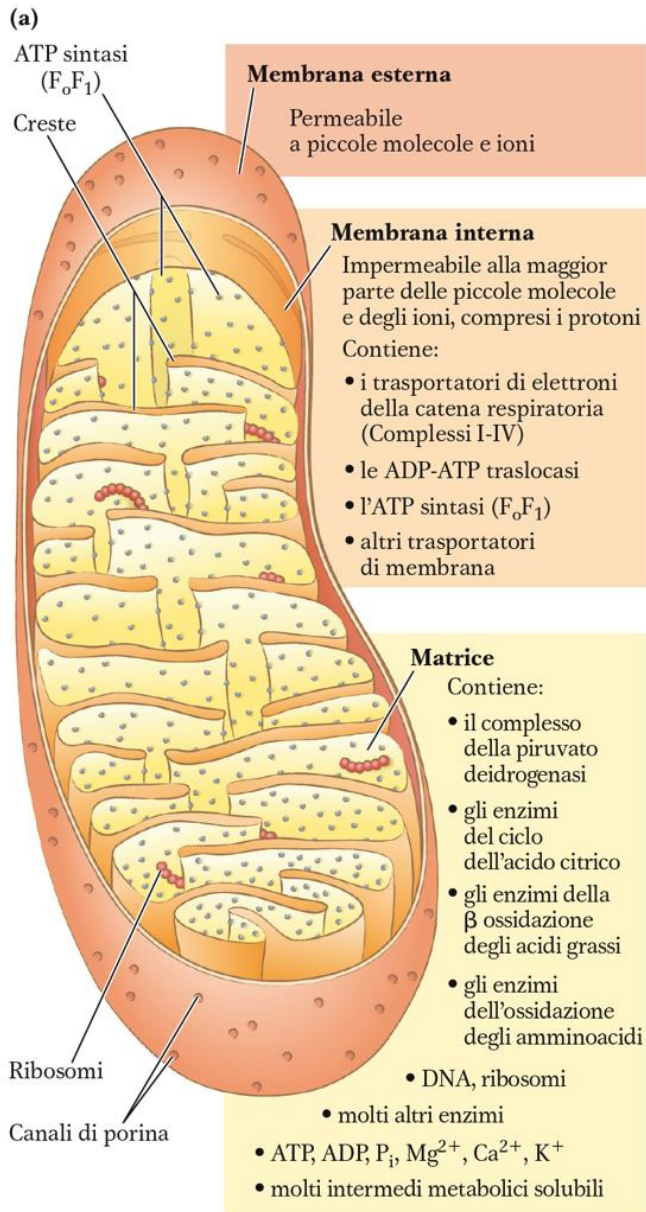
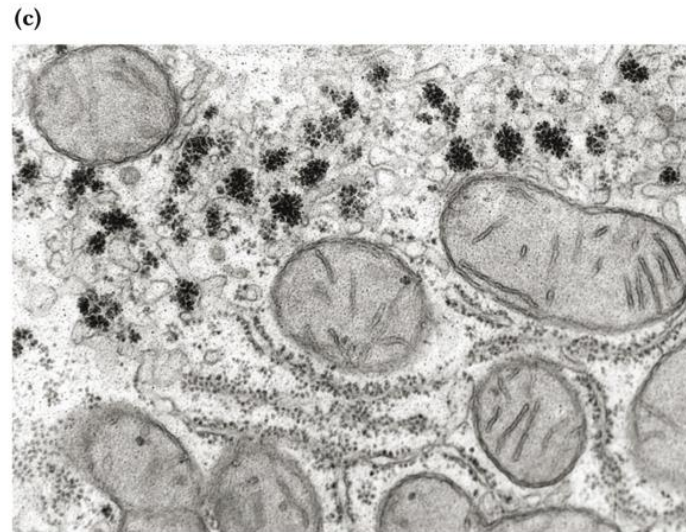


FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA





Mitocondri del muscolo cardiaco (più creste)



Mitocondri del fegato

FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

sintesi di ATP guidata dal trasferimento di e⁻ a O₂

Tutte le tappe enzimatiche della degradazione ossidativa di carboidrati, acidi grassi e amminoacidi convergono in questa tappa.

Avviene nei mitocondri (eucarioti)

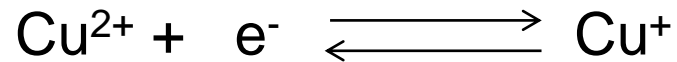
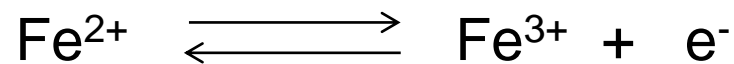
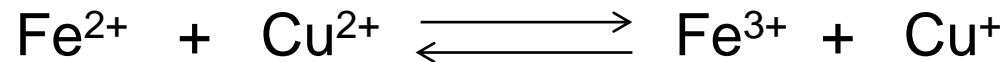
- 1) NADH e FADH₂ donano e⁻ a trasportatori
- 2) Ultimo accettore di e⁻: O₂ ridotto ad H₂O
- 3) H⁺ vengono pompati nello spazio intermembrana
- 4) energia → ATP

Le reazioni che trasferiscono e⁻ sono redox

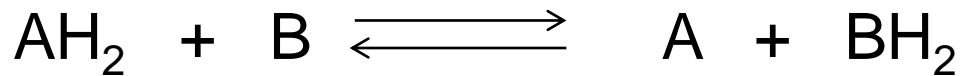
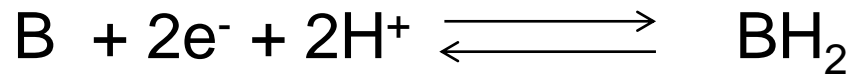
donatore di elettroni \rightleftharpoons e⁻ + accettore di elettroni
coppia redox coniugata

gli e⁻ vengono trasferiti.

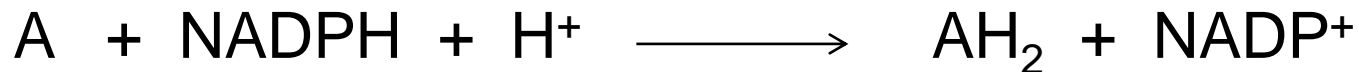
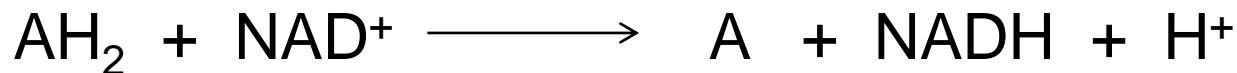
1) come e⁻



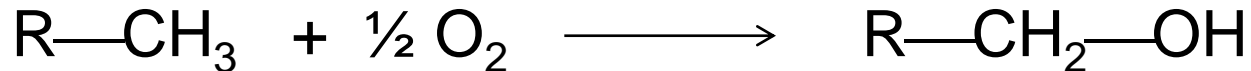
2) come atomi H



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.

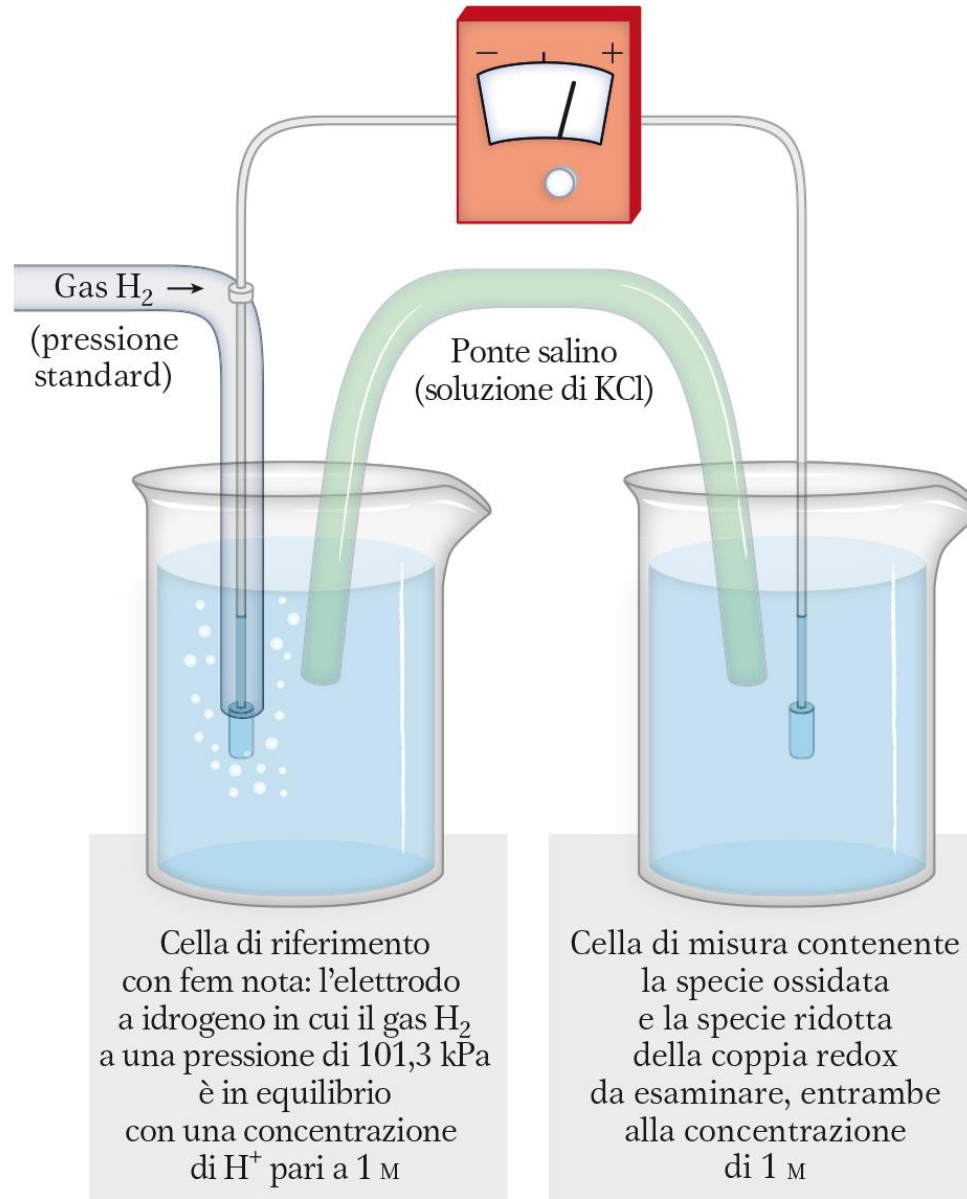
In biochimica si usa E'^0 , quando le condizioni standard sono considerate a pH=7.

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

$$\Delta E^0 = E^0 \text{ accettore elettroni} - E^0 \text{ donatore elettroni.}$$

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⁻ 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.

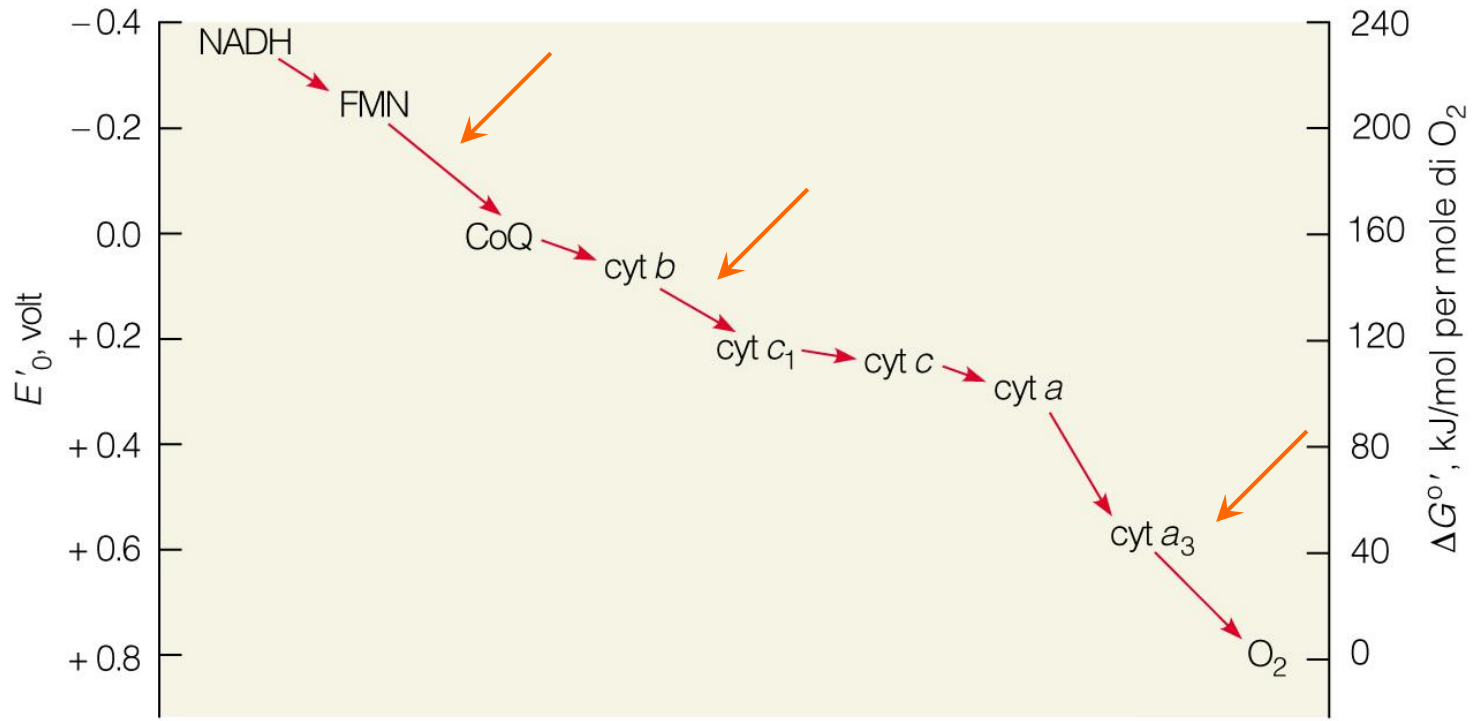
Questo flusso spontaneo di elettroni fornisce energia libera che può essere usata per produrre lavoro. Gli e⁻ tendono sempre a muoversi in una direzione decrescente di energia libera

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

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.

TABELLA 19.2 Potenziali di riduzione standard della catena respiratoria e dei suoi trasportatori di elettroni

Reazione redox (semireazione)	E'° (V)
$2 \text{H}^+ + 2 e^- \longrightarrow \text{H}_2$	-0,414
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2 e^- \longrightarrow \text{NADH}$	-0,320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2 e^- \longrightarrow \text{NADPH}$	-0,324
$\text{NADH deidrogenasi (FMN)} + 2 \text{H}^+ + 2 e^- \longrightarrow \text{NADH deidrogenasi (FMNH}_2)$	-0,30
$\text{Ubichinone} + 2 \text{H}^+ + 2 e^- \longrightarrow \text{ubichinolo}$	0,045
$\text{Citocromo } b (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{citocromo } b (\text{Fe}^{2+})$	0,077
$\text{Citocromo } c_1 (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{citocromo } c_1 (\text{Fe}^{2+})$	0,22
$\text{Citocromo } c (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{citocromo } c (\text{Fe}^{2+})$	0,254
$\text{Citocromo } a (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{citocromo } a (\text{Fe}^{2+})$	0,29
$\text{Citocromo } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{citocromo } a_3 (\text{Fe}^{2+})$	0,35
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0,817



LE DH UTILIZZANO NAD⁺ E NADP⁺ COME ACCETTORI DI e⁻

NAD e NADP presenti nel citosol sono separati da quelli del mitocondrio dalla membrana mitocondriale interna (impermeabile).

NADH è la forma molecolare comune di raccolta di e⁻



NADH e NADPH trasportatori di elettroni solubili in acqua; si associano reversibilmente alle deidrogenasi.

NADH trasporta e⁻ dalle reazioni cataboliche alla catena respiratoria

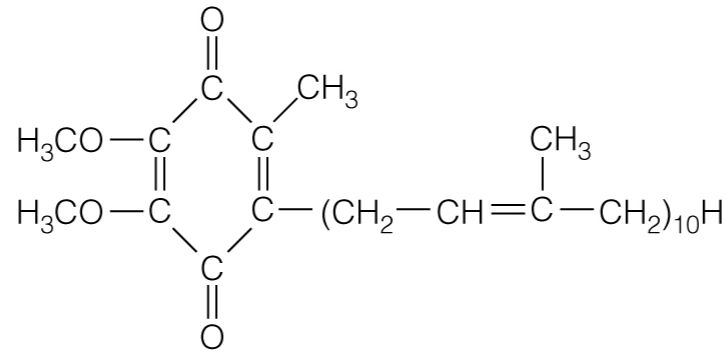
TRASPORTATORI DI ELETTRONI

La maggior parte sono proteine integrali di membrana. Ogni componente può accettare e- dal trasportatore che lo precede e trasferirli a quello che lo segue.

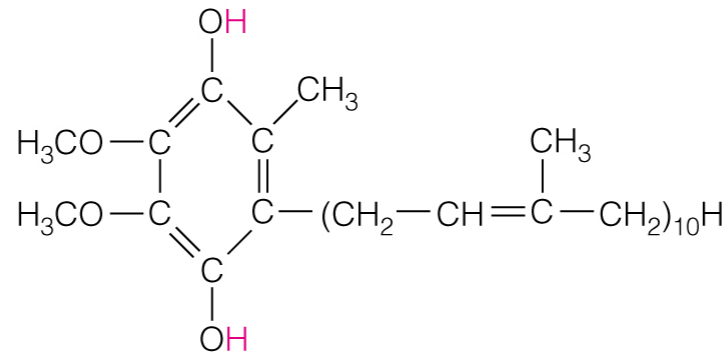
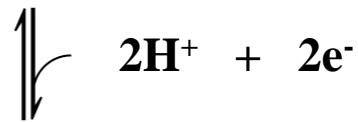
1) NADH

2) Flavoproteine: contengono un cofattore flavinico, FAD o FMN

3) ubiquinone (coenzima Q o UQ)
piccolo e idrofobico, libero di diffondere nel doppio strato della membrana mitocondriale interna. Può accettare 1 e- (radicale semichinonico) o 2 e- (UQH₂ ubiquinolo)



Coenzima Q₁₀ ossidato (CoQ)



Coenzima Q₁₀ ridotto (CoQH₂)

TRASPORTATORI DI ELETTRONI

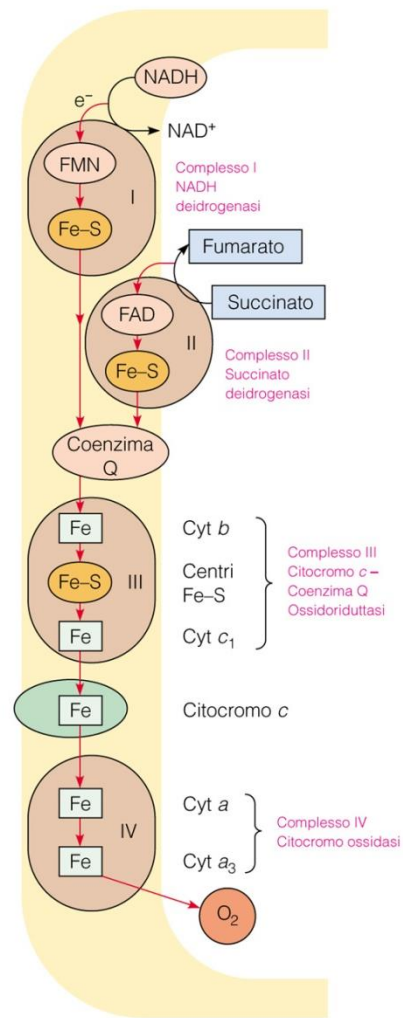
4) citocromi

proteine contenenti ferro. Contengono un gruppo eme.





3 classi: a, b, c distinguibili in base agli spettri di assorbimento. Eme è saldamente legato, ma solo nel citocromo c con legami covalenti. Il potenziale di riduzione standard del ferro dipende dalle sue interazioni con la proteina e quindi è diverso per ogni citocromo. La maggior parte sono proteine integrali di membrana.

5) proteine ferro-zolfo

Ferro è associato ad atomi di zolfo inorganico o di residui di cisteina, o entrambi. Questi centri Fe-S partecipano a reazioni redox in cui viene trasferito un e⁻ per volta utilizzando cambi dello stato di ossidazione del ferro.

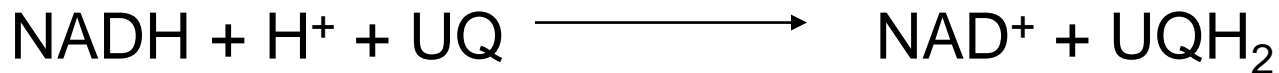


Legenda:

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

COMPLESSO I o della NADH DH DALL'NADH ALL'UBICHINONE

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.

COMPLESSO II o della succinato DH DAL SUCCINATO ALL'UBICHINONE

legato a membrana mitocondriale interna.

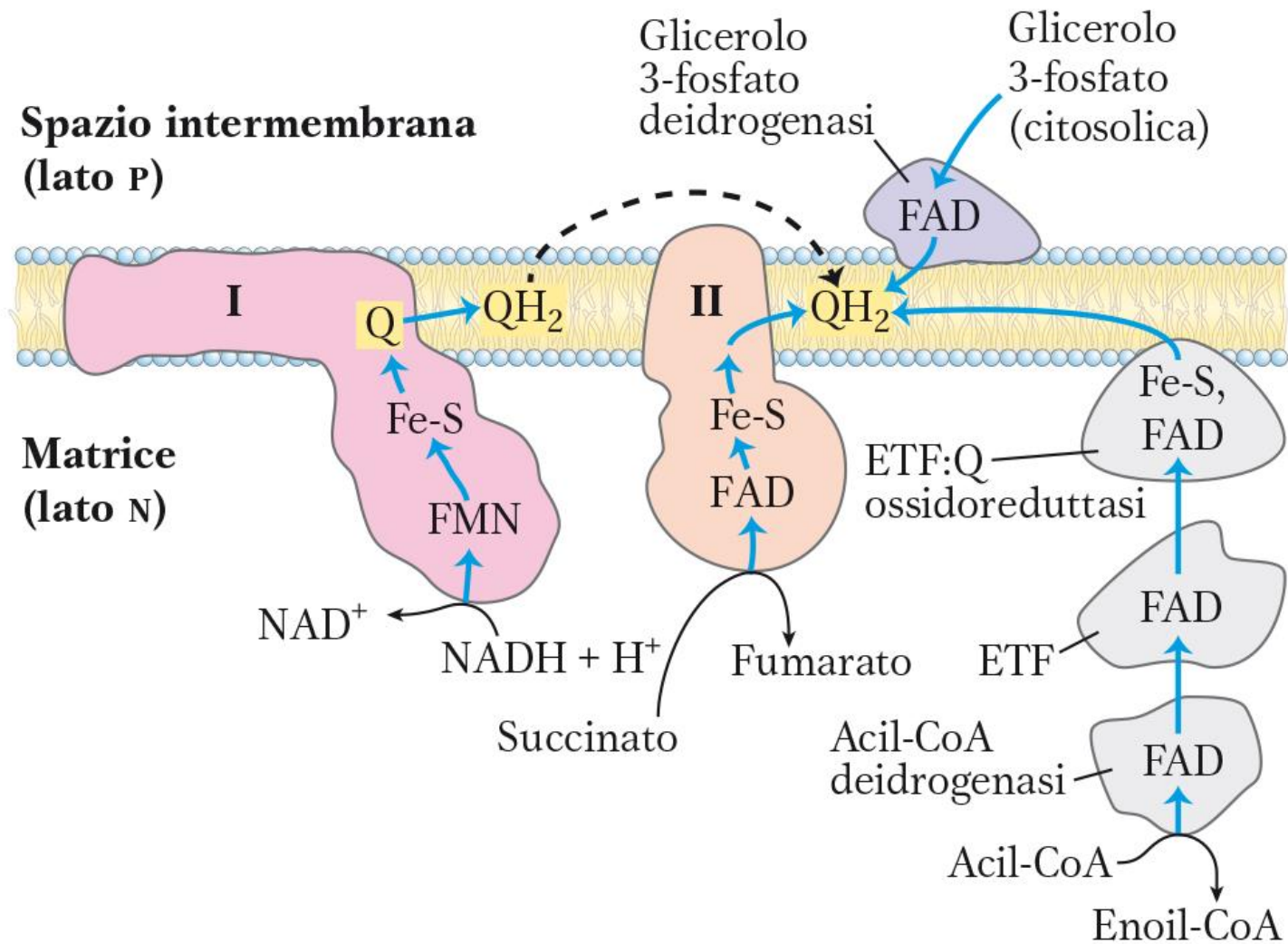
contiene FAD, centri Fe-S, sito di legame per succinato

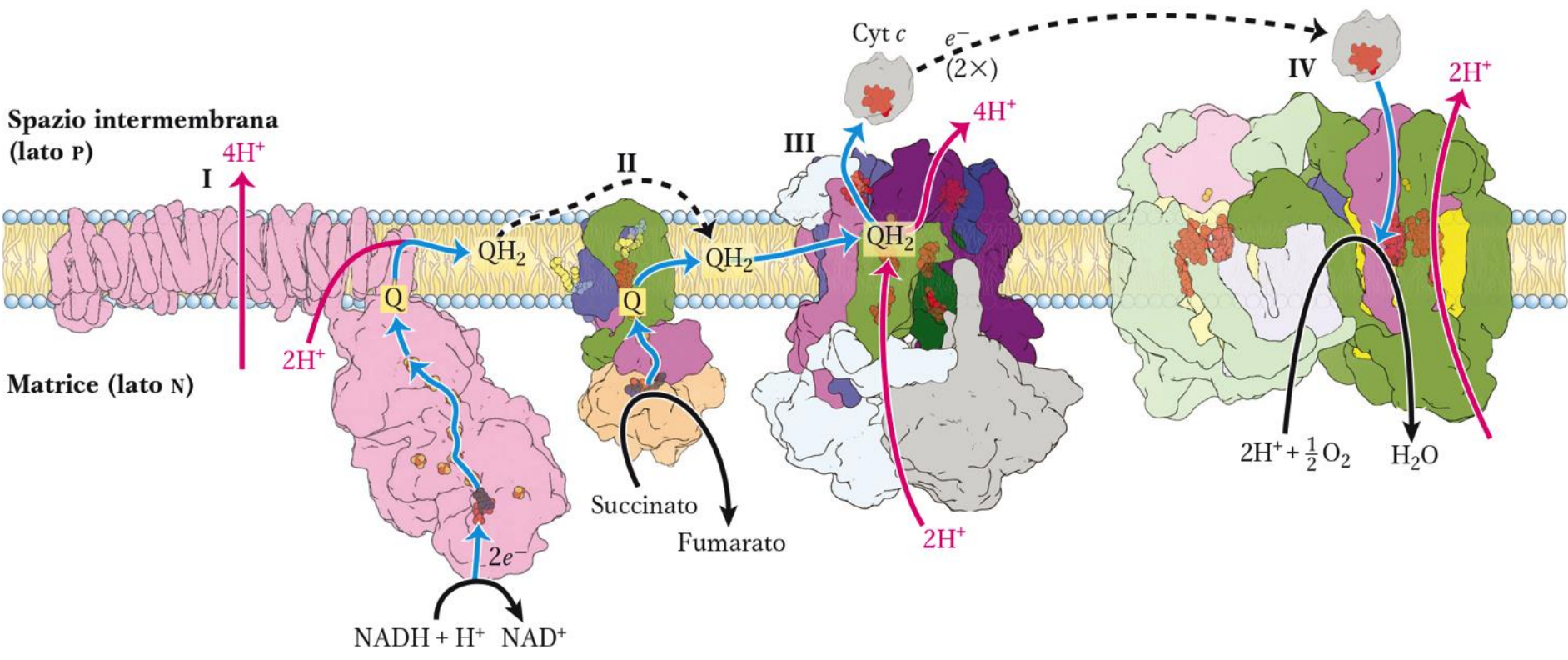
percorso e-:

succinato → FAD → Fe-S → UQ

Non è una pompa protonica

Ci sono anche altri substrati, ac. grassi e glicerolo 3P, che passano e- alla catena respiratoria a livello di UQ. Anche in questo caso i protoni NON vengono pompati all'esterno del mitocondrio.





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

COMPLESSO III DALL'UBICHINOLO AL CITOCROMO C

Complesso del citocromo bc1 o ubiquinone: citocromo c ossidoreduttasi.

Contiene 2 citocromi b, il citocromo c1, una proteina ferro-zolfo ed almeno altre sei subunità proteiche. Funziona come pompa di H⁺. 4 H⁺ sono rilasciati nello spazio intermembrana, generando un gradiente protonico

CITOCROMO C

Proteina solubile dello spazio intermembrana. Viene ridotto dal Complesso III e a sua volta riduce il Complesso IV.

COMPLESSO IV DAL CITOCROMO C ALL'O₂

citocromo ossidasi

contiene i citocromi a e a₃ e due ioni rame

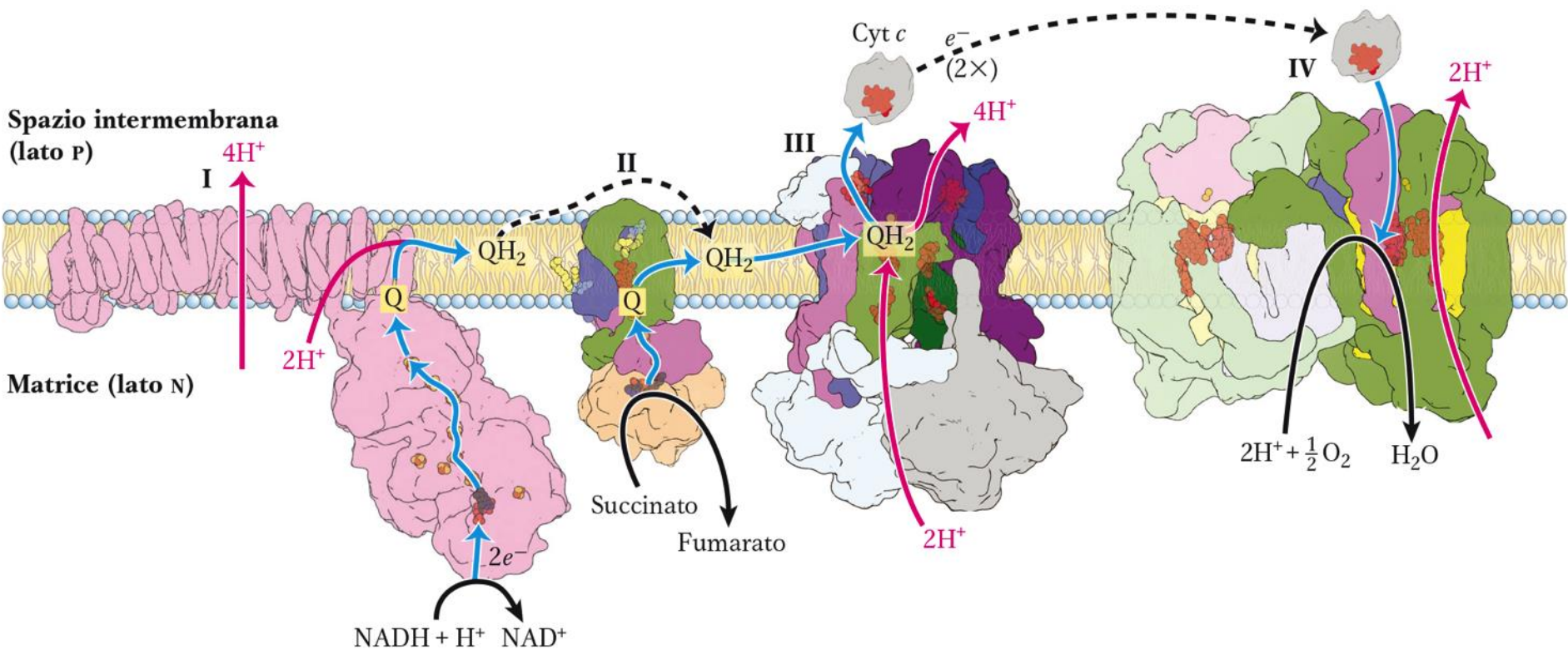
catalizza il trasferimento di 4 e⁻ a O₂. 2 H⁺ vengono spostati allo spazio intermembrana.

SEQUENZA SPECIFICA

1) E'⁰ gradualmente positivi verso O₂. e⁻ fluiscono da sistemi elettronegativi a quelli elettropositivi.

2) ogni componente della catena è specifico per un particolare donatore e per un particolare accettore di e⁻

3) isolamento dei complessi



RIASSUNTO

COMPLESSO I



$$E'^0 \text{ NAD}^+/\text{NADH} \quad -0.32 \text{ V}$$

$$E'^0 \text{ O}_2/\text{H}_2\text{O} \quad 0.816 \text{ V}$$

$$\Delta E'^0 = 1.14 \text{ V}$$

$$\Delta G'^0 = -nF\Delta E'^0$$

$$\Delta G'^0 = -220 \text{ kJ/mol}$$

COMPLESSO II

stesso calcolo

$$\Delta G'^0 = -152 \text{ kJ/mol}$$

energia rilasciata è sufficiente alla sintesi di ATP.

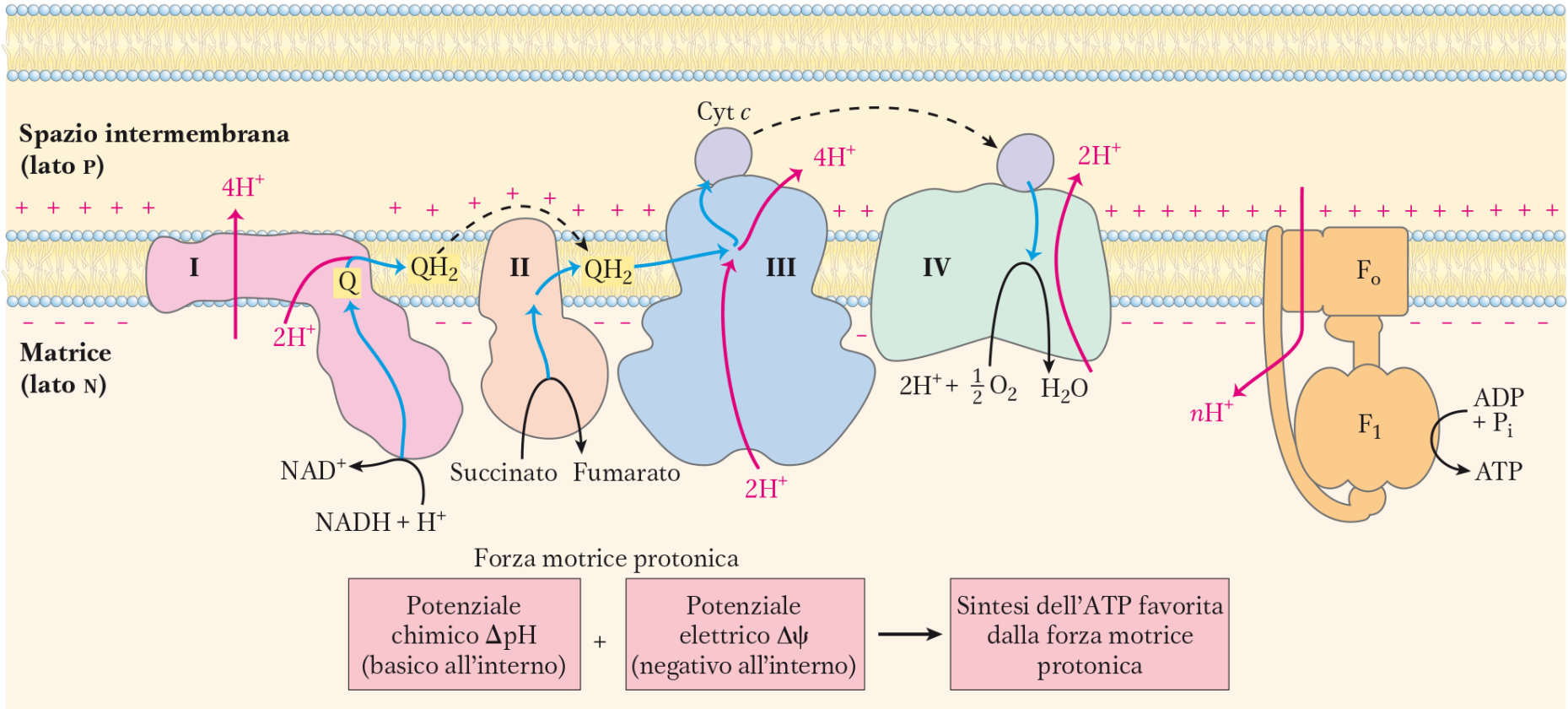
MA COME AVVIENE?

TEORIA CHEMIOOSMOTICA

Il gradiente protonico fornisce all'ATP sintasi (complesso FoF1 o complesso V) l'energia necessaria alla sintesi di ATP da ADP e Pi. (P. Mitchell)

trasformazioni “chemiosmotiche”: comportano simultaneamente una reazione chimica e un processo di trasferimento

MODELLO CHEMIOSMOTICO

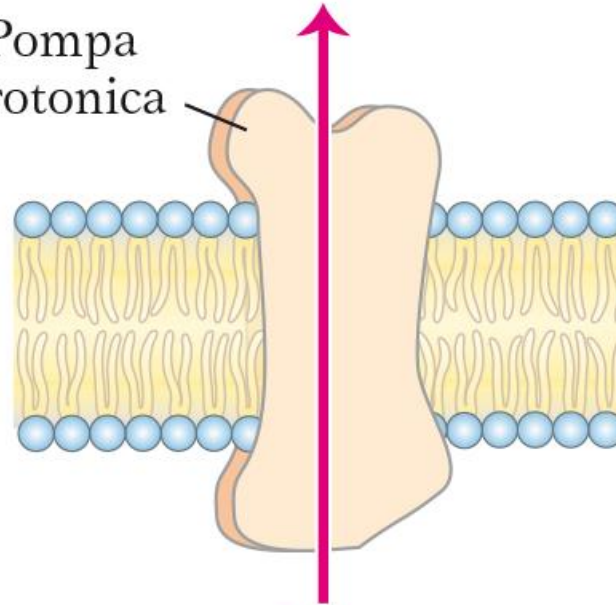


Lato P

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



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.

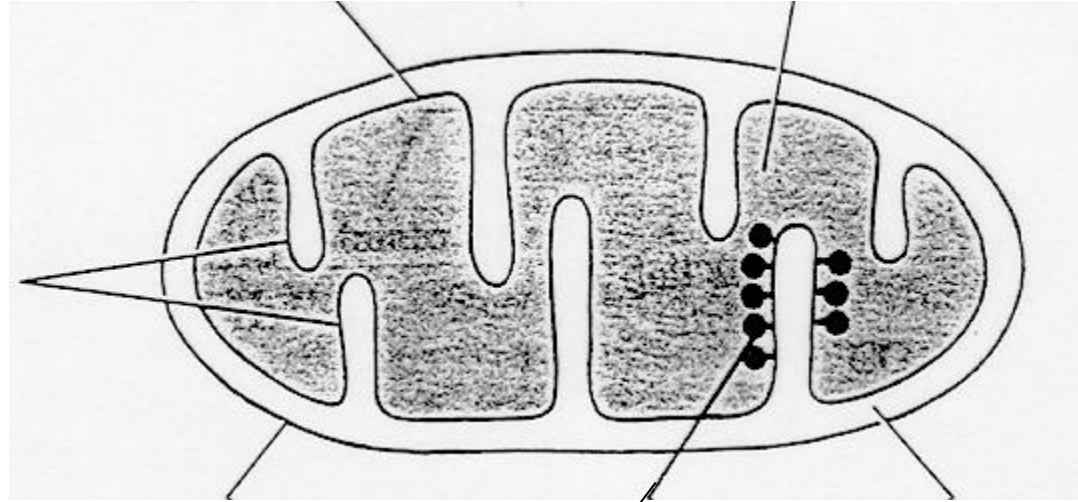
Energia elettrochimica dovuta al gradiente di concentrazione e alla separazione di cariche. Si chiama anche **forza motrice protonica** ed è formata da due componenti: 1) energia potenziale chimica (differenza di concentrazione dei protoni); 2) energia del potenziale elettrico.

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

Membrana interna

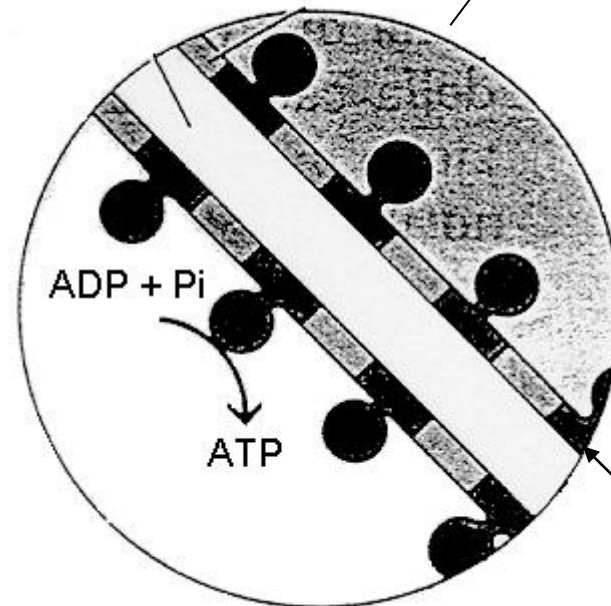
Matrice

criste



Membrana esterna

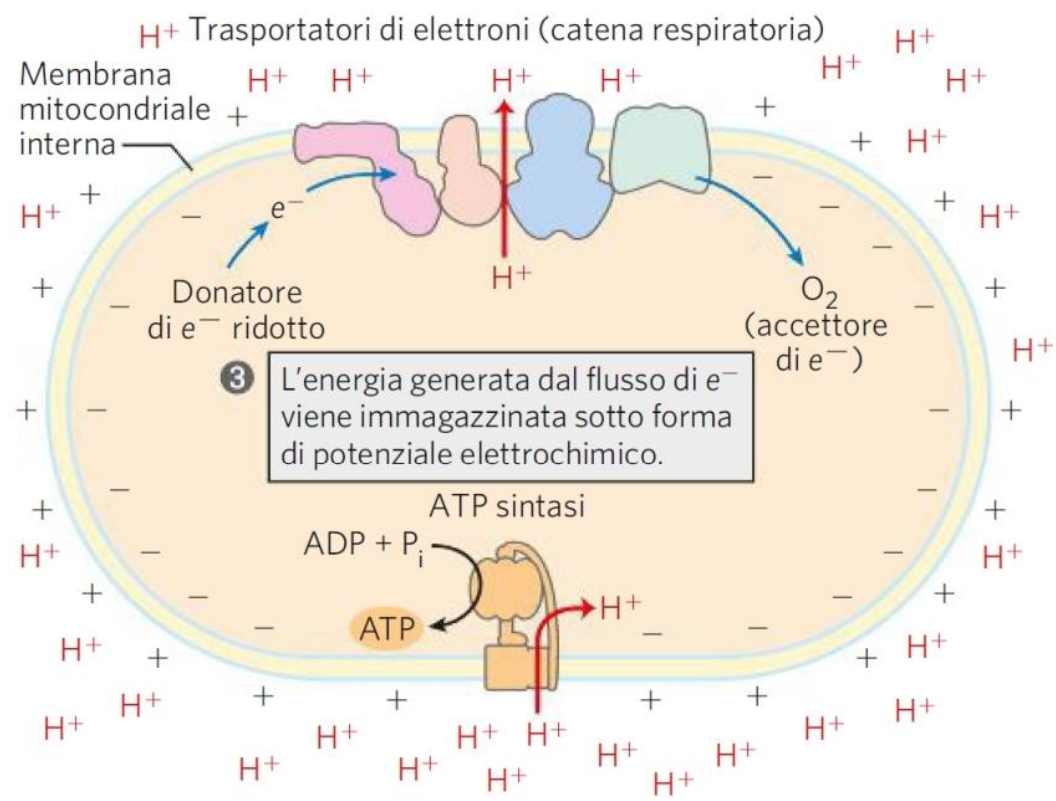
Spazio fra le membrane



Membrana interna

1 Il substrato ridotto (combustibile metabolico) dona e^- .

2 I trasportatori di elettroni pompano all'esterno gli H^+ quando gli elettroni fluiscono verso l' O_2 .



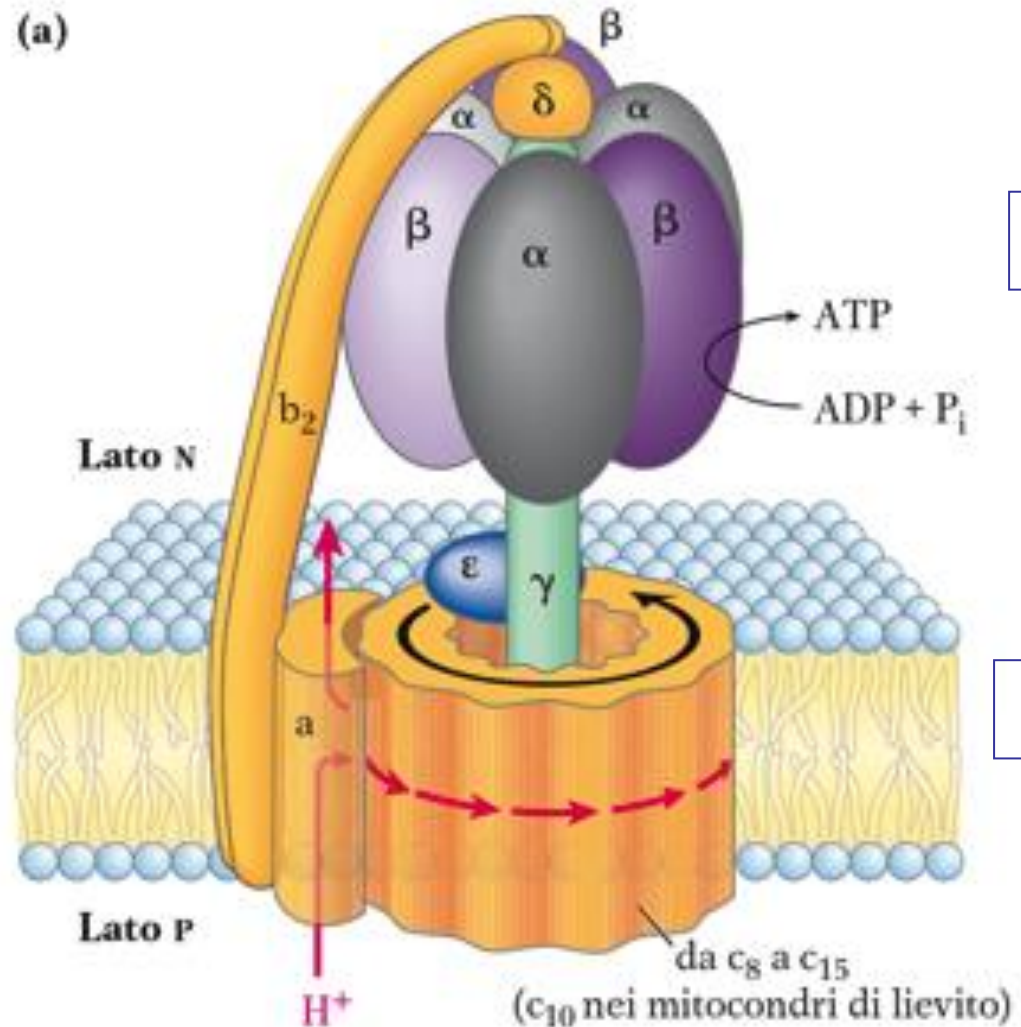
3 L'energia generata dal flusso di e^- viene immagazzinata sotto forma di potenziale elettrochimico.

4 L'ATP sintasi utilizza il potenziale elettrochimico per sintetizzare ATP.

ATP sintasi è formata da due componenti:

- F_o (proteina integrale di membrana)
- F₁ (proteina periferica di membrana).

F_o possiede un canale per i protoni.



F₁

F_o

STRUTTURA DEL COMPLESSO FoF1

CATALISI ROTAZIONALE

I protoni fluiscono attraverso F_o e provocano la rotazione del cilindro (subunità c e γ). La subunità γ attraversa il centro di F_1 ($\alpha_3\beta_3$). Ogni rotazione di 120° pone in contatto γ con una diversa subunità β .

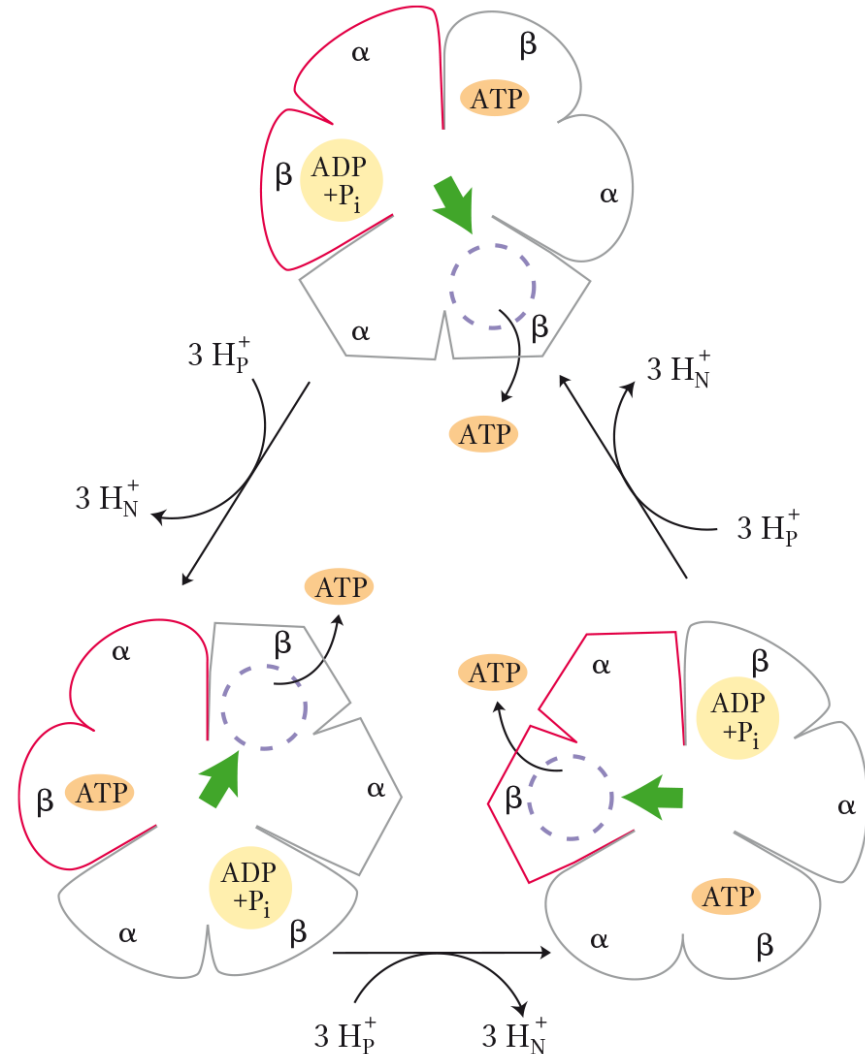
Le subunità β hanno 3 conformazioni:

- β -ATP
- β -ADP (lega ADP e P_i)
- β -vuota

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

Un modello che spiega la rotazione dell'anello c indotta dai protoni

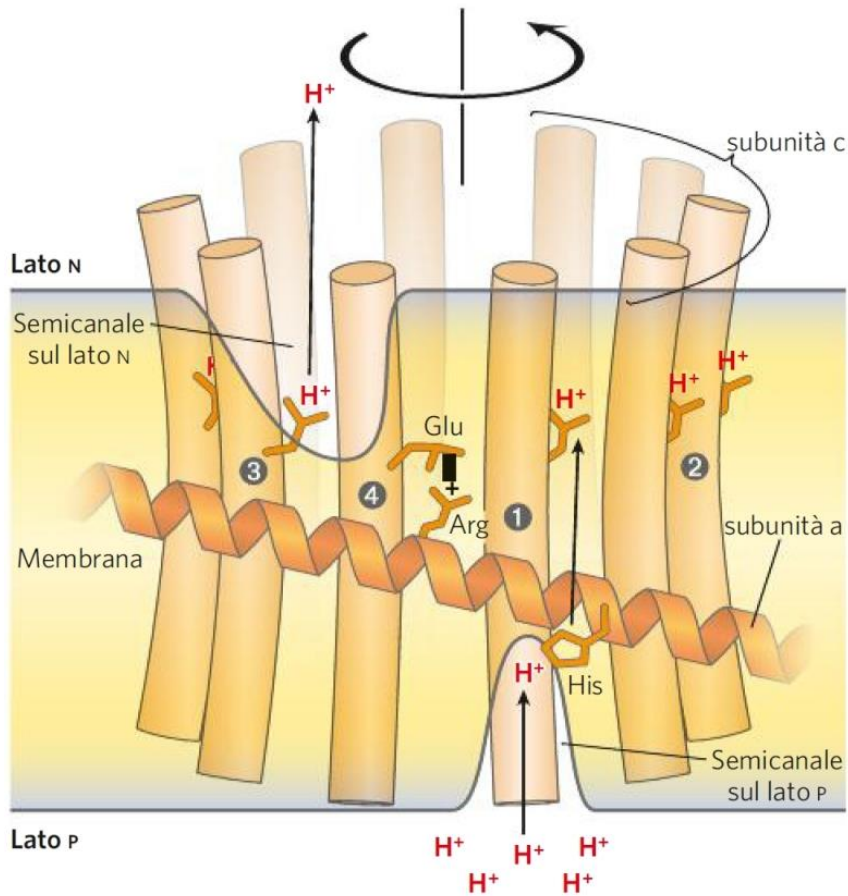
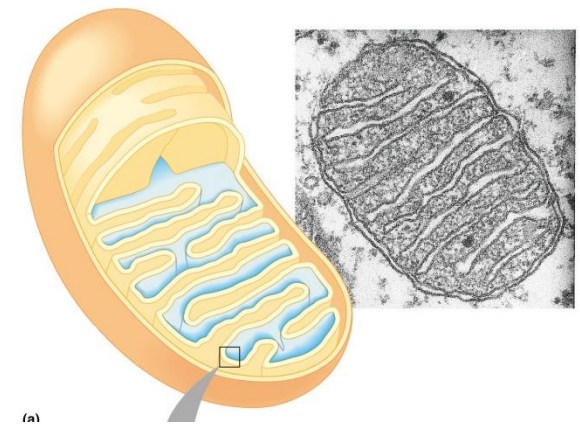
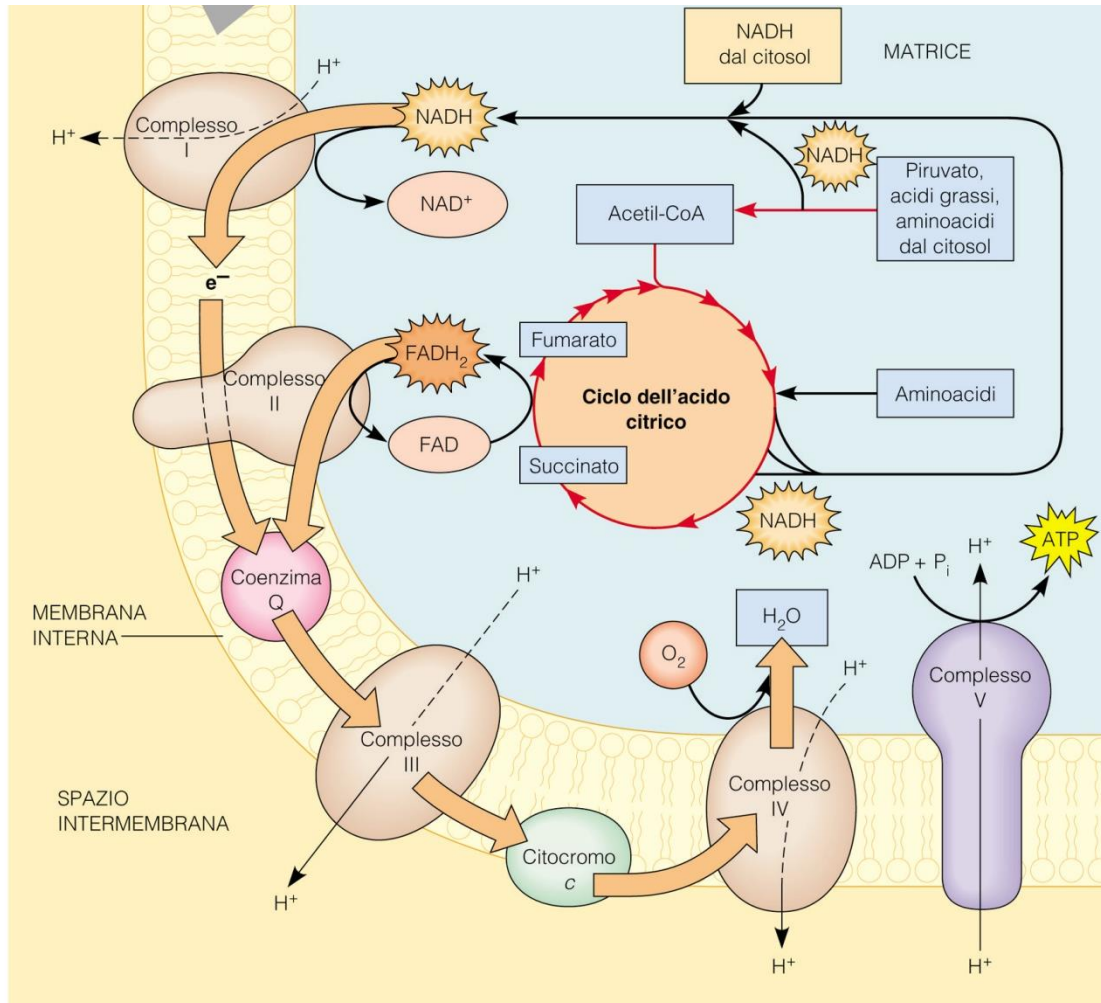


Figura 19.28 Un modello che spiega la rotazione dell'anello c indotta dai protoni. La subunità a del complesso F₀ dell'ATP sintasi (vedi Figura 19.25a) ha due semicanali idrofili per i protoni, uno che porta dal lato P al centro della membrana e l'altro che porta dal centro della membrana al lato N (matrice). Le singole subunità c presenti in F₀ (il numero totale varia da 8 a 17 nelle diverse specie) sono disposte in cerchio intorno a un nucleo centrale. Ciascuna subunità c ha un residuo di Glu essenziale (Asp in alcune specie) all'incirca a metà della membrana, con un valore di pK_a tale da poter donare o accettare un protone (gli H⁺ sono mostrati in rosso) a valori di pH vicini alla neutralità. Viene illustrato il ciclo seguito dalle subunità c. Una subunità c ① è inizialmente posizionata in modo che un protone che entra nel semicanale dal lato P (dove la concentrazione protonica è relativamente elevata) incontri e si leghi a un residuo di His conservato nella subunità a, trasferendolo poi al residuo di Glu nella subunità c. Ciò induce nella subunità c protonata un cambiamento conformazionale che promuove la rotazione, quando il residuo di Glu perde la sua carica negativa. Il residuo di Glu, ora divenuto neutro, viene sequestrato nello strato idrofobo della membrana mentre ruota, in quanto parte dell'anello c ②. Quando l'anello c ruota, la subunità c che stiamo seguendo in questa figura prende infine contatto con il semicanale sul lato N della membrana, in cui l'ambiente è relativamente basico, e il protone viene rilasciato ③. Quando il residuo di Glu riacquista la sua carica negativa, si verifica un altro cambiamento conformazionale che promuove la rotazione, in modo che il Glu interagisca in modo transitorio con un residuo conservato di Arg nella subunità a immobile ④. L'interazione con l'Arg viene interrotta quando il Glu è nuovamente protonato dal residuo di His, in movimenti che ancora una volta facilitano la rotazione. Le subunità c posizionate vicino ai semicanali forniscono la forza che induce la rotazione in qualsiasi momento, dato che sono le uniche a subire cambiamenti conformazionali associati alla protonazione e alla deprotonazione. L'orientamento del gradiente protonico detta la direzione del flusso dei protoni e rende la rotazione dell'anello c sostanzialmente unidirezionale. [Fonte: Kühlbrandt, W. e Davies, K.M., *Trends Biochem. Sci.* **41**, 106 (2016).]



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

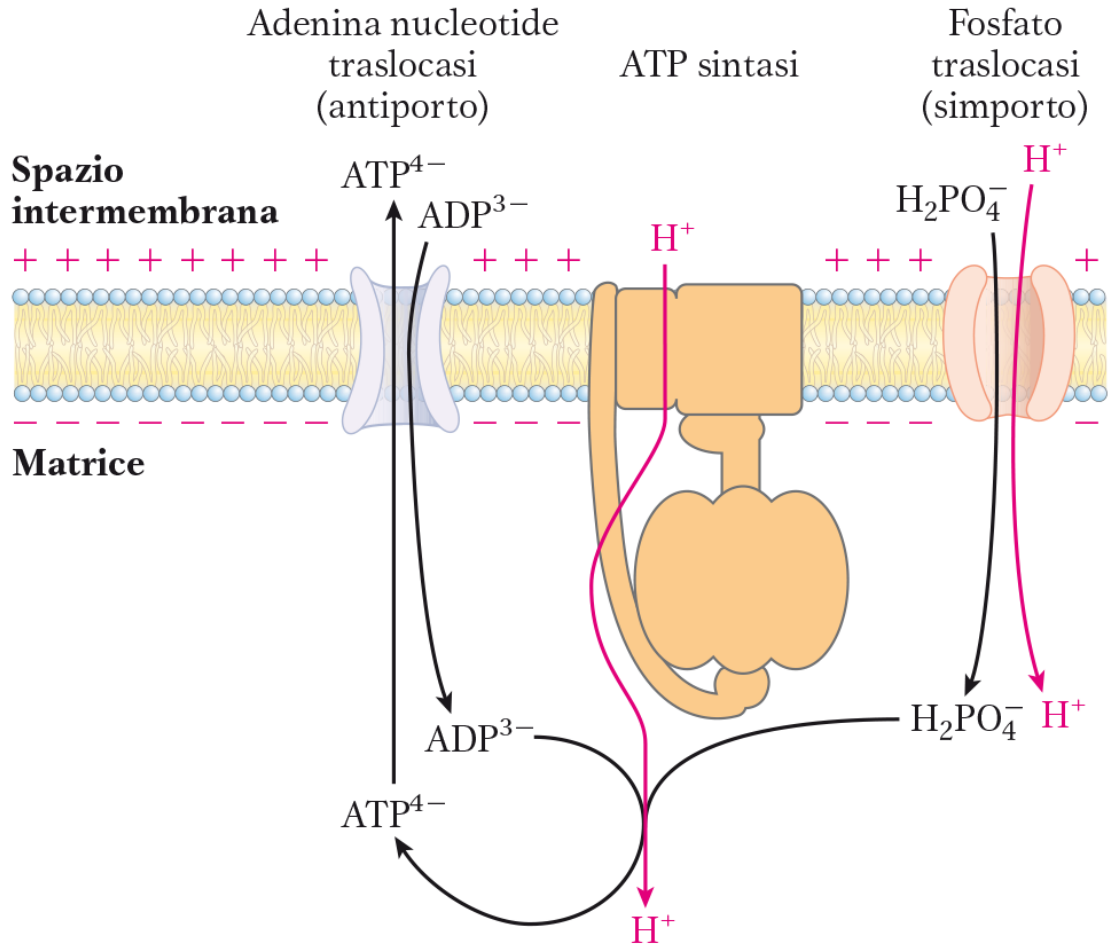
2) trasportatore di fosfato o translocasi
 $H_2PO_4^- + H^+$ da esterno alla matrice

3) sistemi di trasporto per piruvato

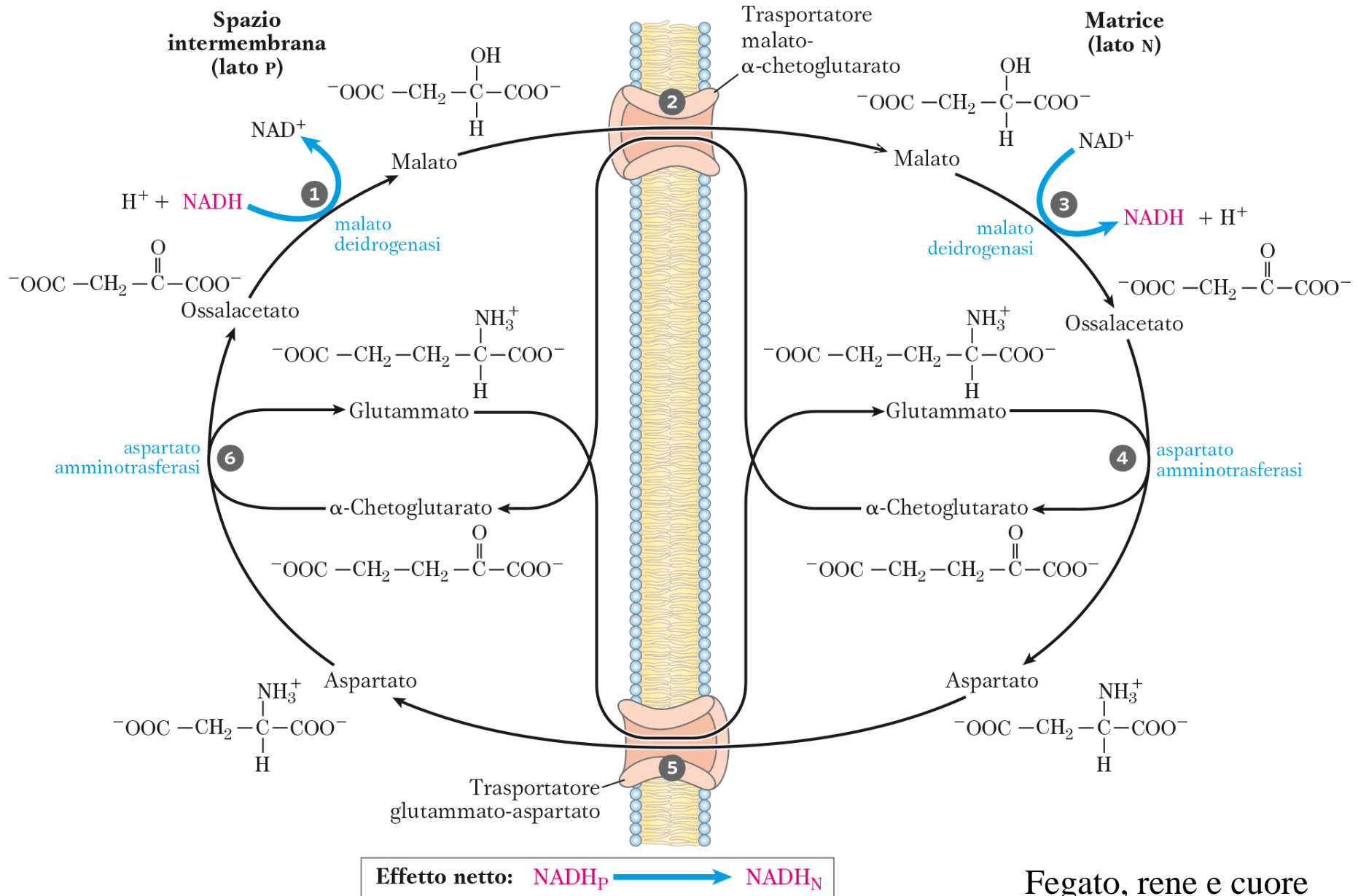
4) sistemi di trasporto per dicarbossilati

5) sistemi di trasporto per tricarbossilati

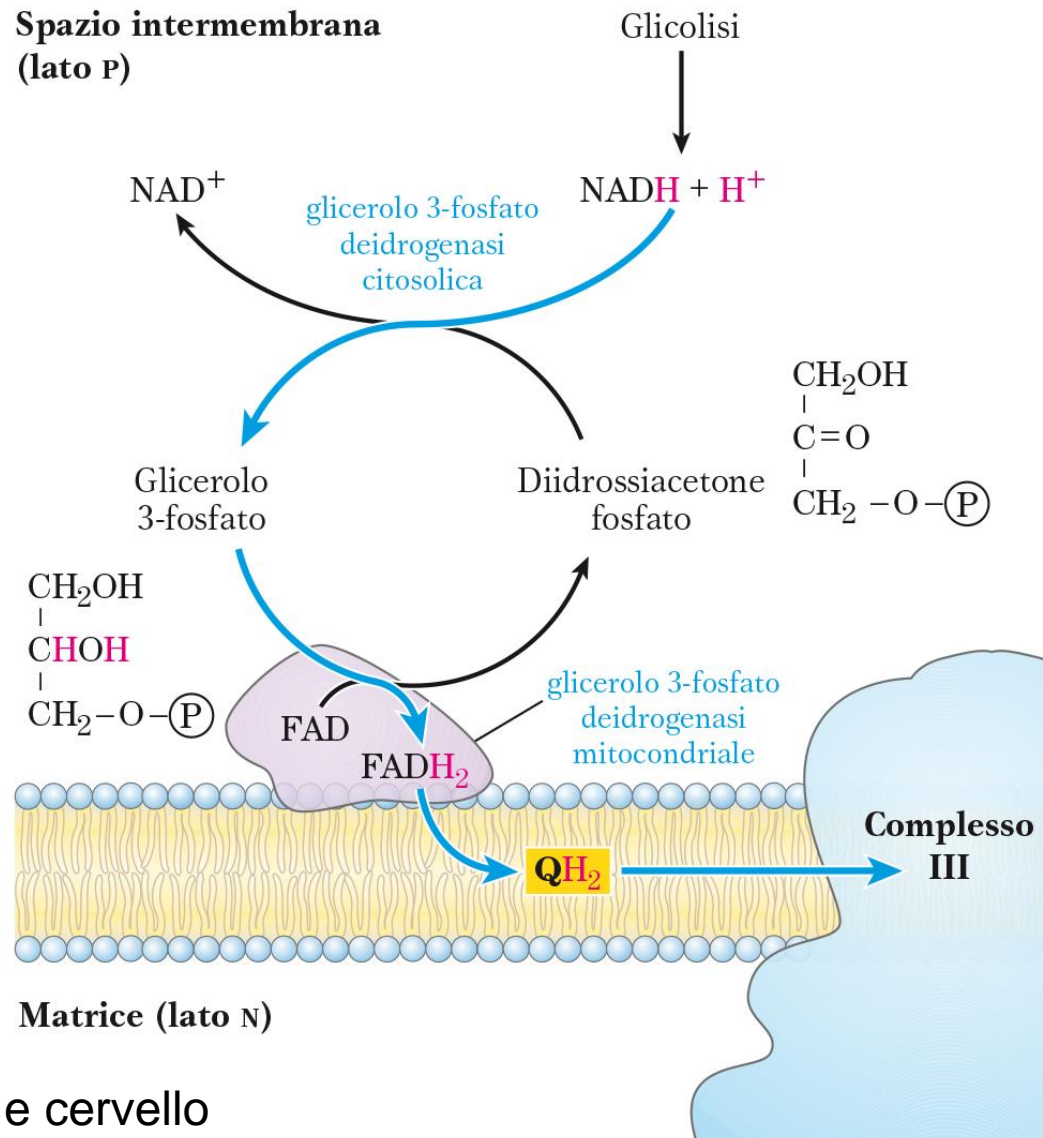
Dai mitocondri può essere isolato un complesso, l'**ATP sintasoma**, contenente l'ATP sintasi e le due traslocasi, suggerendo che le funzioni delle tre proteine siano strettamente integrate



SHUTTLE DEL MALATO-ASPARTATO



SHUTTLE DEL GLICEROLO 3 P



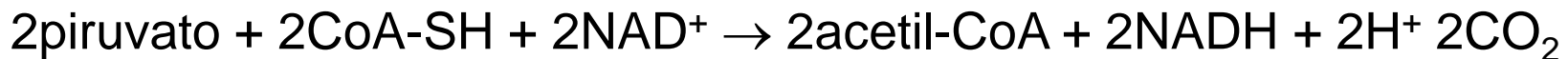
Muscolo scheletrico e cervello

OSSIDAZIONE COMPLETA DEL GLUCOSIO

GLICOLISI AEROBIA



PIRUVATO DH



CICLO DI KREBS





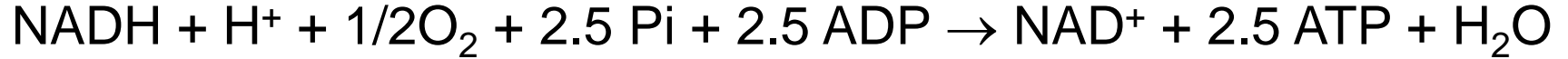
x = rapporto P/O

Misurare P/O è complicato

È stato stabilito che 10 protoni sono trasportati fuori per coppia di e⁻ per il NADH e 6 protoni per il succinato

Per la sintesi di 1 molecola di ATP sono richiesti 4 protoni (di cui uno è usato per trasportare Pi attraverso la membrana mitocondriale).

Quindi quando il donatore di e⁻ è NADH, P/O=2.5, mentre quando il donatore è il succinato vengono pompati fuori 6 protoni e quindi P/O=1.5



TOTALE

2 ATP

10 NADH → 25 ATP

2 FADH₂ → 3 ATP

2 GTP → 2 ATP

L'ossidazione completa di una molecola di glucosio porta alla formazione di **32 molecole di ATP** (30 nel caso venga utilizzato lo shuttle glicerolo fosfato).

ATTENZIONE

In queste lezioni ho usato un rapporto di P/O per NADH pari a 2.5 e P/O per FADH₂ pari a 1.5, come stabilito dalle ultime scoperte in questo campo.

Dipendentemente dal testo che utilizzate, potrete trovare anche rapporti P/O = 3 per NADH e P/O = 2 per FADH₂

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 in quanto accettore di P_i).

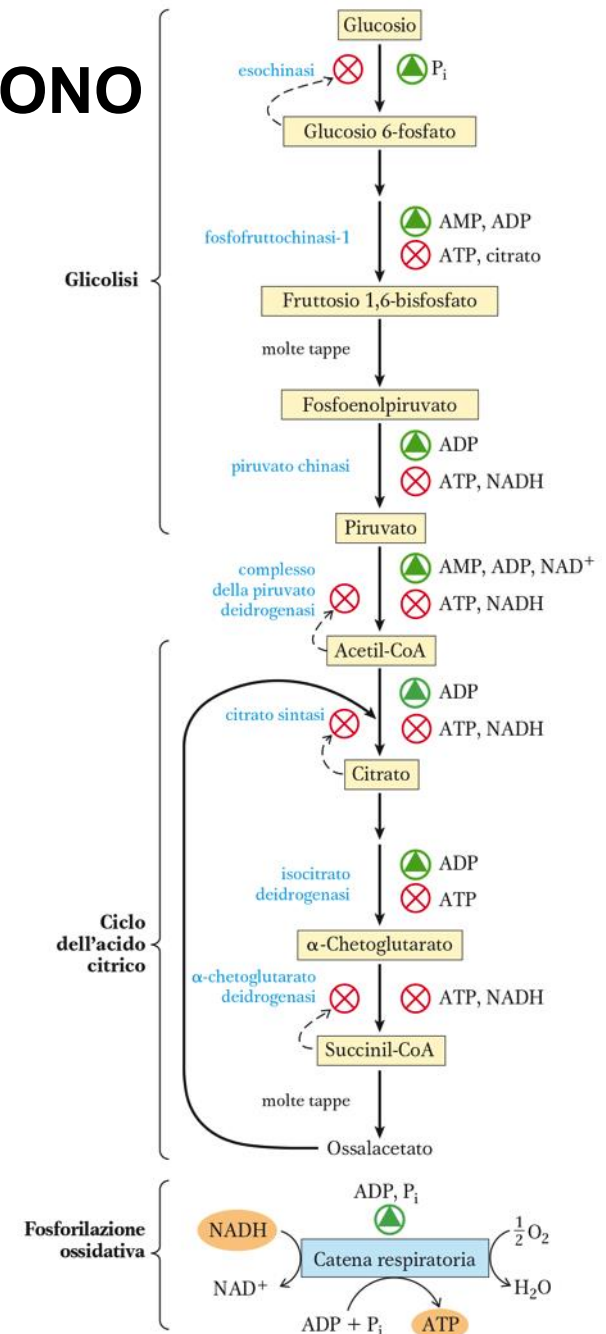
La velocità di ossidazione delle sostanze nutrienti è regolata con una sensibilità e una precisione così elevate che il rapporto $[ATP]/[ADP][P_i]$ si modifica solo di poco nella maggior parte dei tessuti, anche se la domanda energetica della cellula varia considerevolmente.

In sostanza, l'ATP viene formato solo alla velocità con cui viene consumato per le attività cellulari che richiedono energia.

LE VIE DI PRODUZIONE DELL'ATP SONO REGOLATE IN MODO COORDINATO

[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 $[FAD]$).



USO DELL'ENERGIA PRODOTTA DAL TRASPORTO ELETTRONICO

- 1) produzione di ATP
- 2) **produzione di calore**

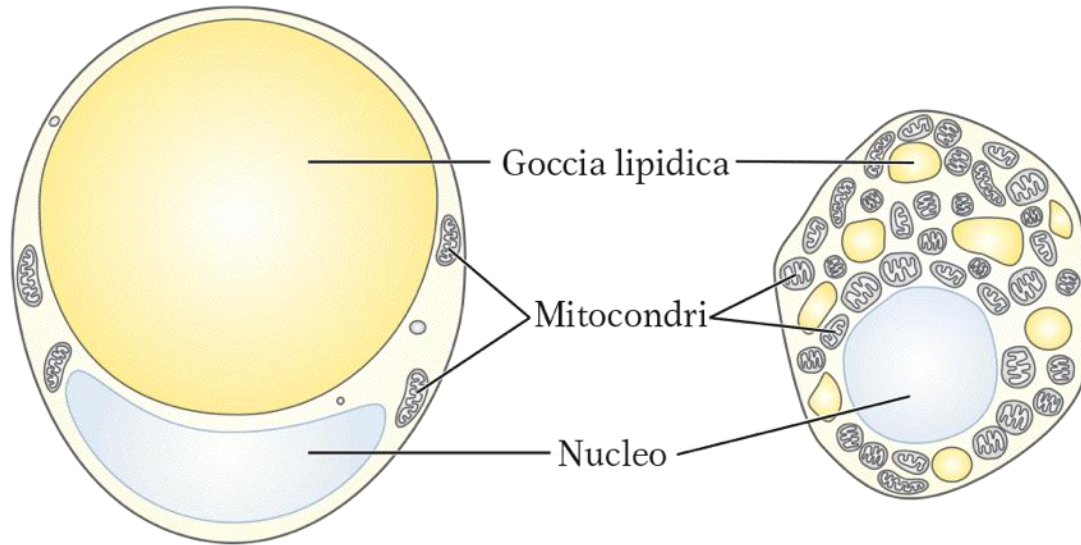
grasso bruno (nel collo e nella parte superiore del dorso dei neonati)

bruno = molti mitocondri

Funzione: generare calore dall'ossidazione dei grassi

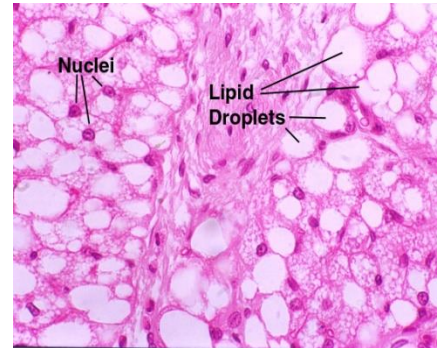
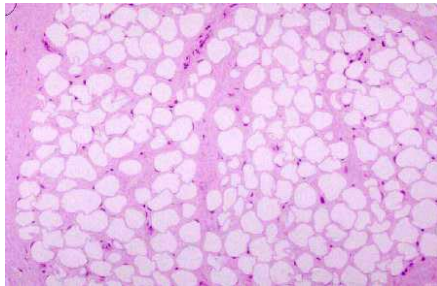
I mitocondri del grasso bruno hanno pori speciali che permettono rientro di H^+ senza passare per la FoF1ATPasi e quindi senza sintesi di ATP.

Generazione di calore



(a) Adipociti bianchi

(b) Adipociti bruni



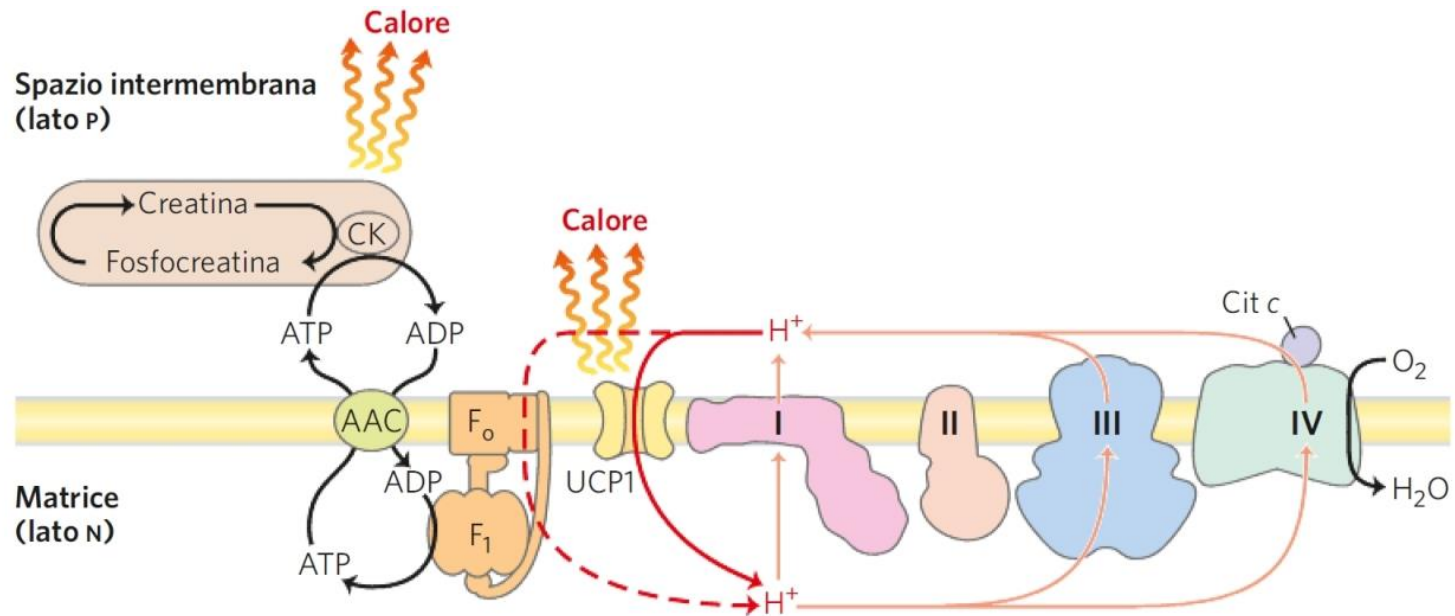


Figura 19.36 I due meccanismi di termogenesi nei mitocondri. La proteina disaccoppiante (UCP1) nei mitocondri del tessuto adiposo bruno fa sì che l'energia conservata grazie ai protoni pompato sia dissipata sotto forma di calore, fornendo un per-

corso alternativo per il rientro dei protoni nella matrice mitocondriale. Il calore viene generato anche da un ciclo futile, in cui la creatina è fosforilata dalla creatina chinasi (CK) utilizzando ATP e producendo ADP trasportati dal trasportatore ATP-ADP (AAC).