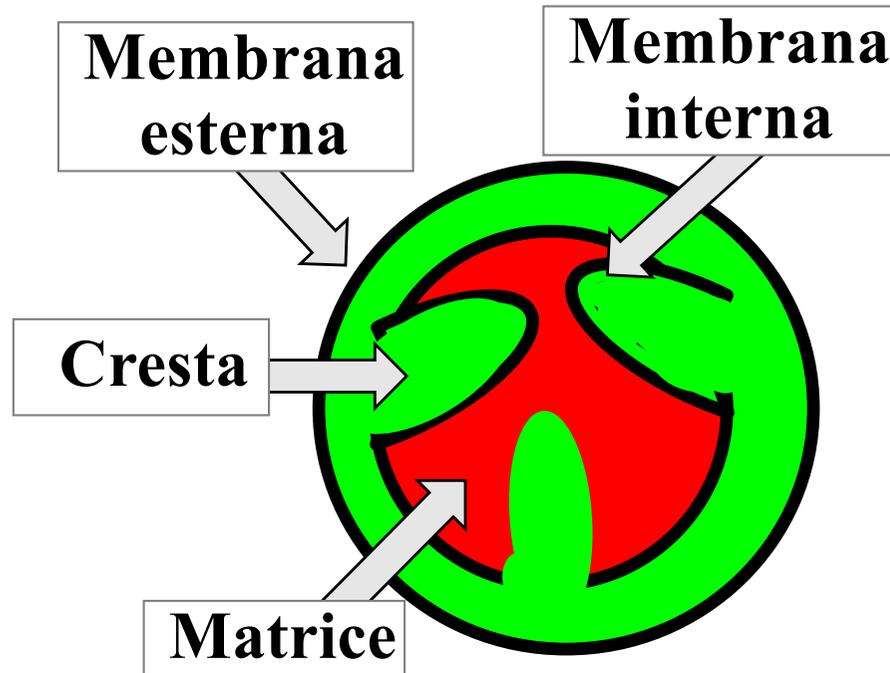


Catena di trasporto degli elettroni e Fosforilazione ossidativa

Trasferimento degli equivalenti riducenti dal NADH e dal FADH₂ all'ossigeno molecolare mediante una serie di trasportatori di elettroni, topologicamente associati sulla membrana mitocondriale interna (cellule eucariotiche) o plasmatica (cellule procariotiche).

Il mitocondrio

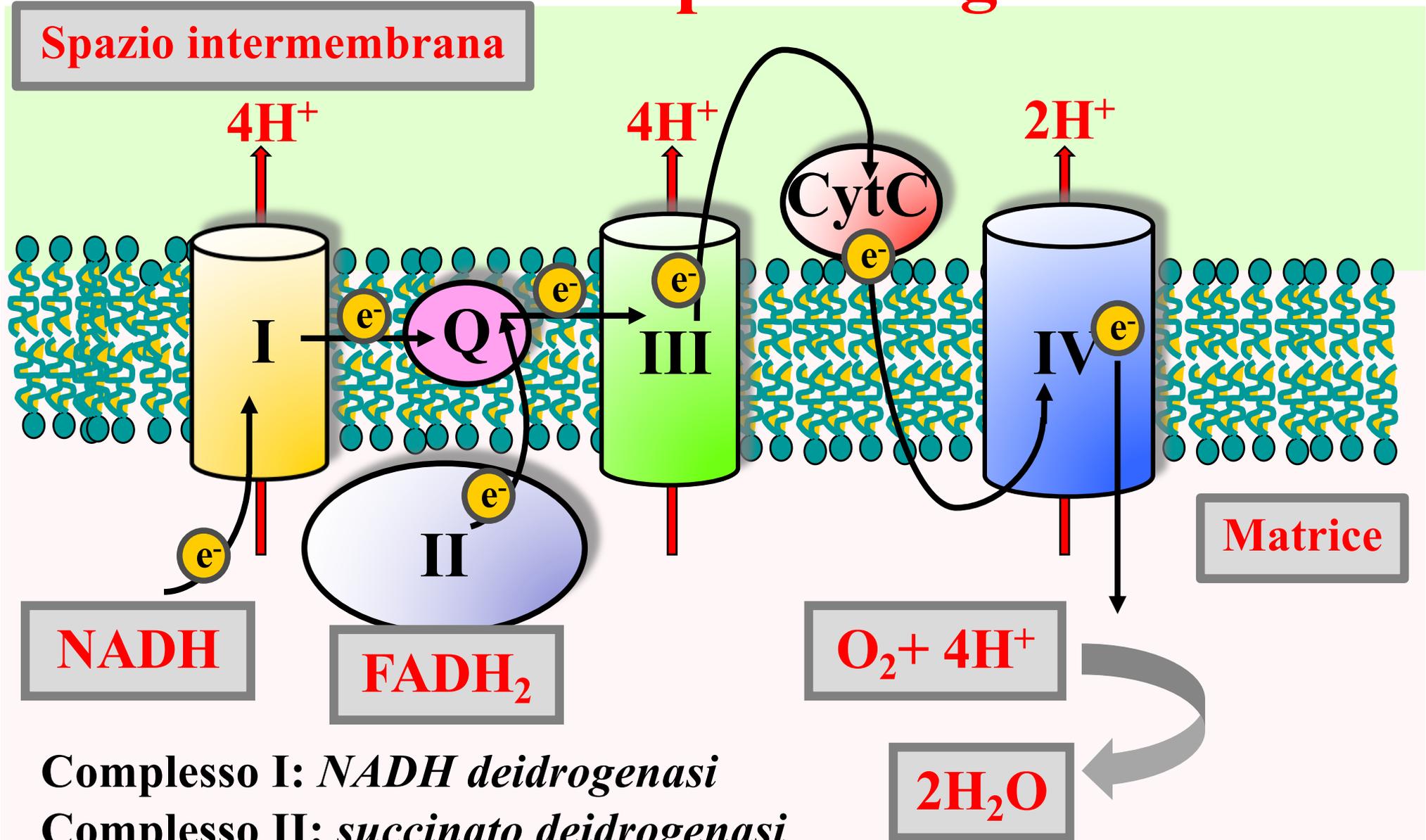


La membrana esterna:
permeabile a molecole fino a ≈ 10 kDa, per cui la composizione dello spazio intermembrana è simile a quella del citosol.

La membrana interna:

- permeabile solo a O_2 , CO_2 e H_2O ;
- costituita per circa il 75% del suo peso da proteine, impegnate sia nel trasporto attivo dei metaboliti attraverso la matrice che nel trasporto degli elettroni
- separa separa fisicamente il contenuto della matrice da quello del citoplasma, compartimentalizzando le funzioni metaboliche associate.

La catena di trasporto degli elettroni



Complesso I: *NADH deidrogenasi*

Complesso II: *succinato deidrogenasi*

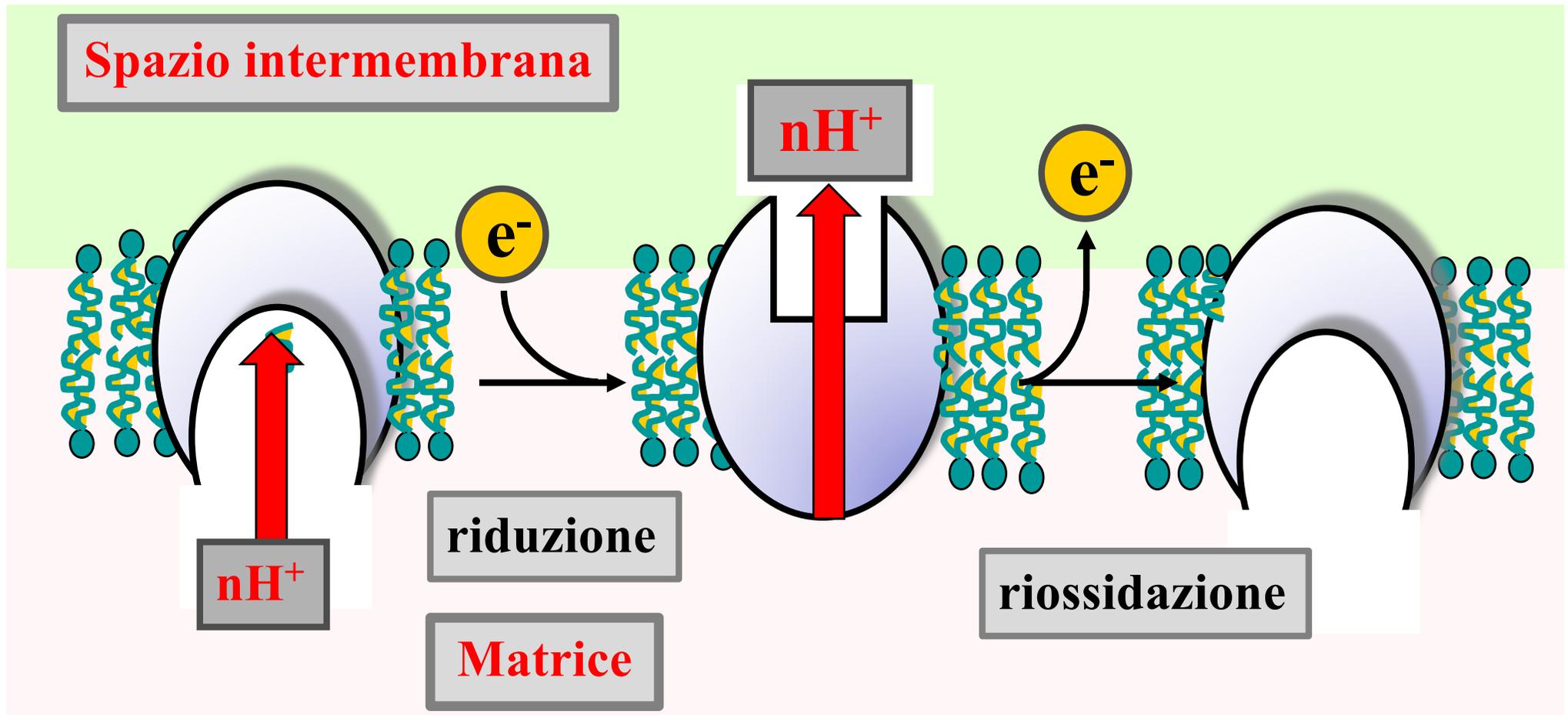
Complesso III: *coenzima Q -citocromo c ossido-reduttasi*

Complesso IV: *citocromo c ossidasi*

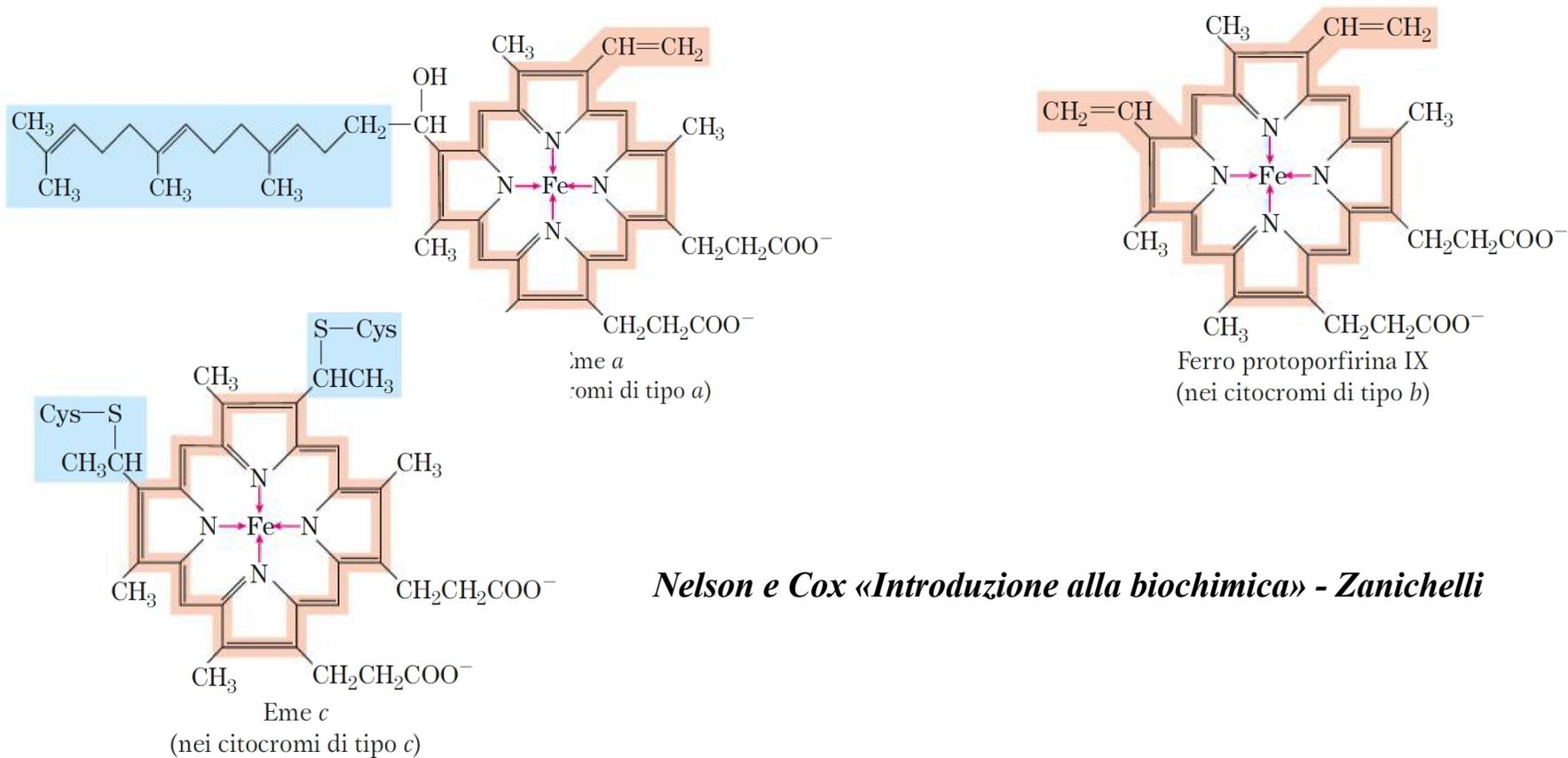
Le pompe protoniche

Associate al passaggio degli elettroni, le pompe protoniche (complessi I, III e IV) trasferiscono protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana.

Si verifica una doppia modifica conformazionale a carico del sito del complesso che accetta gli elettroni.



I citocromi



Nelson e Cox «Introduzione alla biochimica» - Zanichelli

I citocromi sono ferro-proteine contenenti gruppi eme, derivati della protoporfirina IX. A differenza della mioglobina e della emoglobina, i gruppi eme dei citocromi possono essere legati covalentemente mediante legami tioetere tra i loro residui vinilici e due residui di cisteina. Nei mitocondri ci sono 3 classi di citocromi.

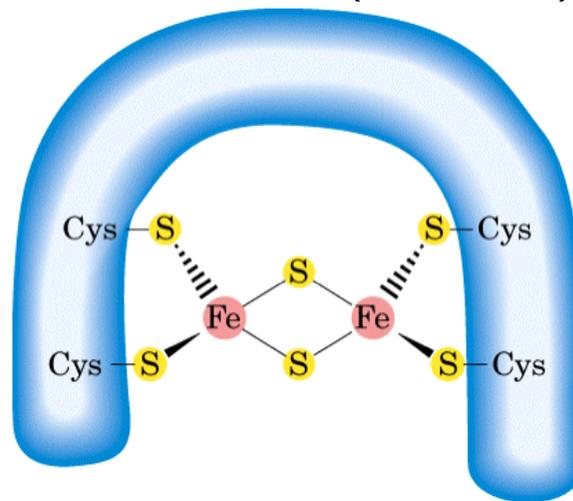
Il complesso I della catena di trasporto degli elettroni: NADH - coenzima Q ossidoreduttasi (1)

Il complesso I della catena di trasporto degli elettroni, catalizza il trasferimento degli elettroni dal NADH al coenzima Q.

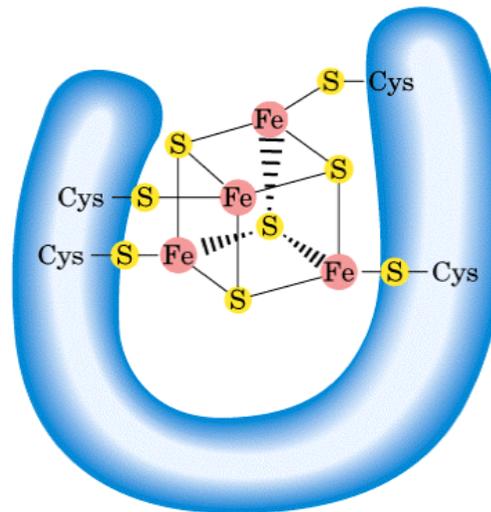
E' costituito da 43 catene polipeptidiche e contiene una molecola di FMN e diversi (da sei a sette) centri ferro-zolfo come cofattori.

Le proteine ferro-zolfo sono di due tipi, ma entrambe contengono quattro residui di cisteina che coordinano i complessi ferro-zolfo costituiti da ioni ferro (+3 o +2) e ioni solfuro.

Centro
[2Fe - 2S]



Centro
[4Fe - 4S]

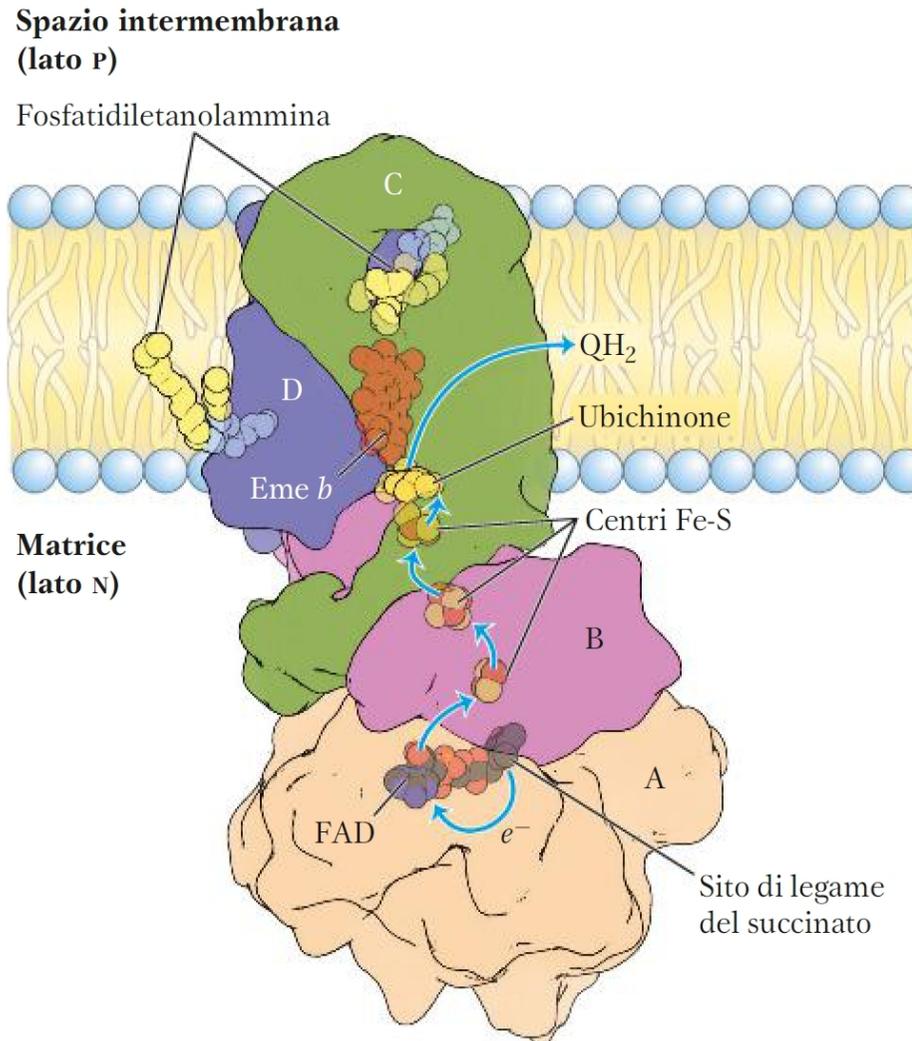


Nelson e Cox «Introduzione alla biochimica» - Zanichelli

La variazione dello stato di ossidazione dello ione ferro permette il trasferimento di un elettrone grazie al sistema coniugato dei legami di coordinazione. Lo ione ferro può assumere uno stato di ossidazione intermedio tra Fe^{2+} e Fe^{3+} .

Il complesso II: la succinato - coenzima Q ossido- reduttasi

Il complesso II trasferisce gli elettroni dal FADH_2 al coenzima Q o ubiquinone.



E' un complesso multiproteico costituito dalla succinato deidrogenasi, un enzima del ciclo di Krebs, con tre centri ferro-zolfo (un [4Fe-4S] e due [2Fe-2S]) e un citocromo (citocromo_{b560}).

Il complesso III: il Coenzima Q-citocromo c ossido-reduttasi

Questo complesso multiproteico contiene un centro ferro-zolfo ([2Fe - 2S]) e tre citocromi (due citocromi_b e un citocromo_{c1}).

Trasferisce gli elettroni dall'ubichinolo al citocromo c. Gli elettroni passano dal complesso III al complesso IV sulla superficie della membrana mitocondriale interna.

Il complesso IV: la citocromo c ossidasi

Trasferimento di e^- dal citocromo *c* all' O_2 molecolare, che viene ridotto a H_2O .

E' un complesso multiproteico contenente quattro centri redox: due citocromi (citocromo_a e citocromo_{a3}) e due ioni rame.

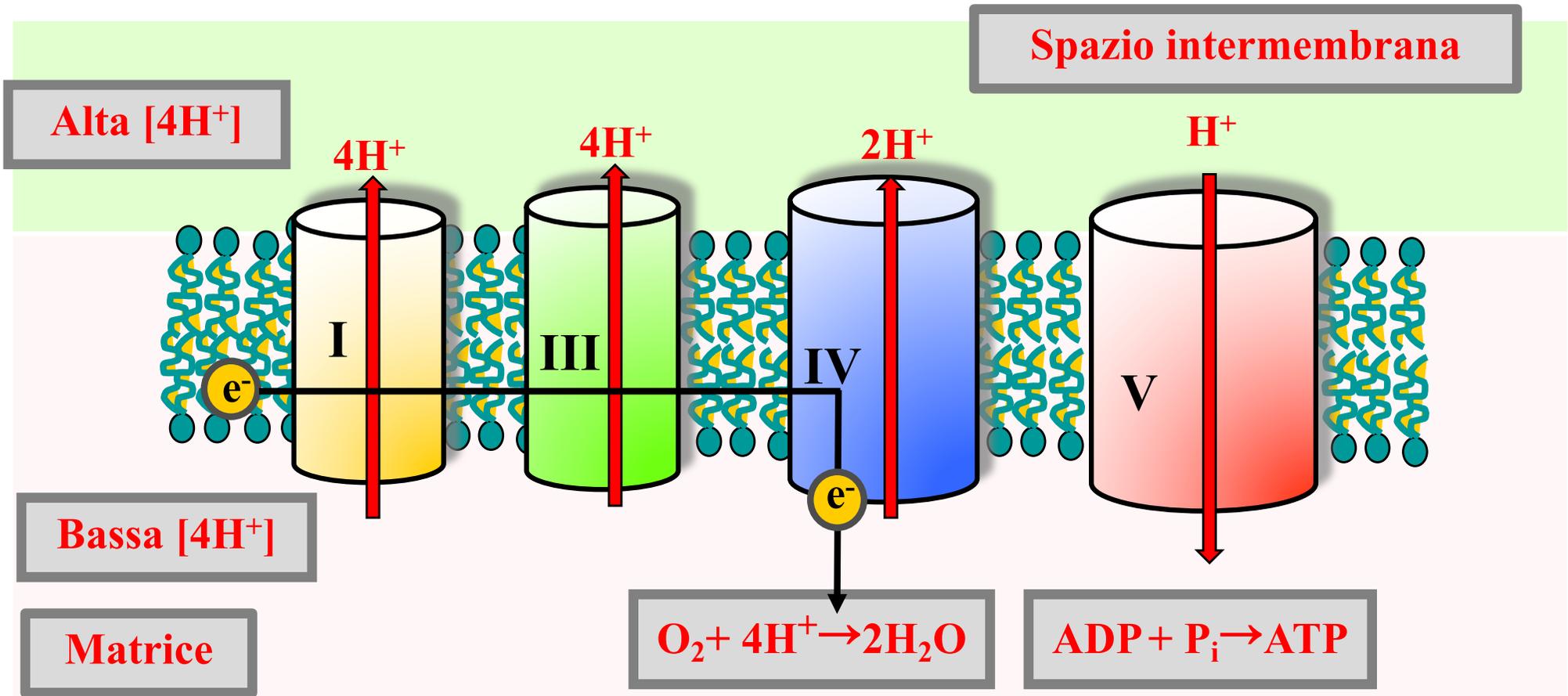
Catalizza il trasferimento di quattro e^- provenienti da quattro molecole di citocromo *c* diverse secondo la reazione:



La riduzione dell' O_2 con 4 e^- avviene mediante centri redox che trasportano un solo e^- per volta e deve avvenire senza la formazione di intermedi ridotti incompleti come il perossido d'H (H_2O_2) e radicali liberi ossidrilici ($\cdot\text{OH}$) specie molto reattive (ROS).

La teoria chemio-osmotica

I complessi I, III e IV generano un gradiente elettrochimico tra l'interno e l'esterno della membrana mitocondriale interna con un pH maggiore all'interno del mitocondrio.



Il gradiente elettrochimico (forza motrice protonica) alimenta la sintesi di ATP mediante il reingresso dei protoni nella matrice attraverso l'ATP sintasi (complesso V).

Fosforilazione ossidativa

Si produce un eccesso di ioni H^+ che sono rilasciati attraverso la membrana dalle pompe protoniche.

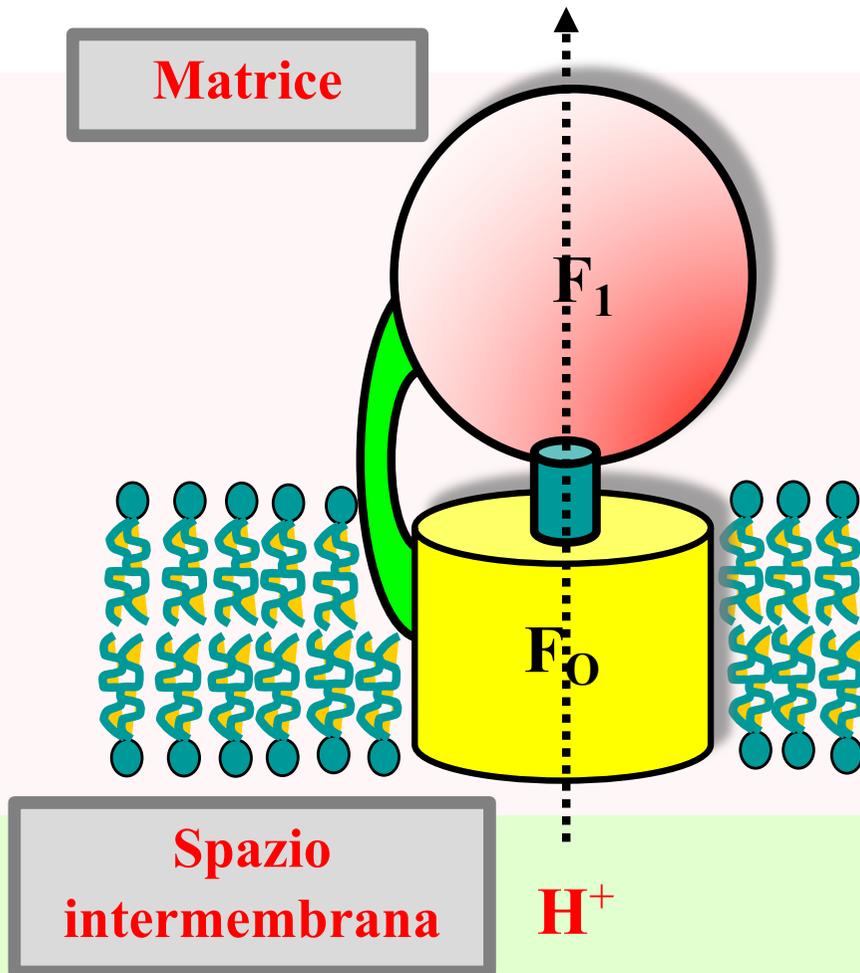
Si genera un gradiente di pH e quindi elettrochimico (ΔE) associabile ad una variazione di energia libera.

$$\Delta G = -n \cdot F \cdot \Delta E$$

L'energia libera ottenuta viene accoppiata alla sintesi di ATP

ATP sintasi o F_1-F_0 ATPasi

L'ATP sintasi catalizza la sintesi dell'ATP. E' costituita da due componenti: F_1 e F_0 . Questo enzima viene anche definito F_1-F_0 ATPasi. F_1 e F_0 sono due unità funzionali separabili.



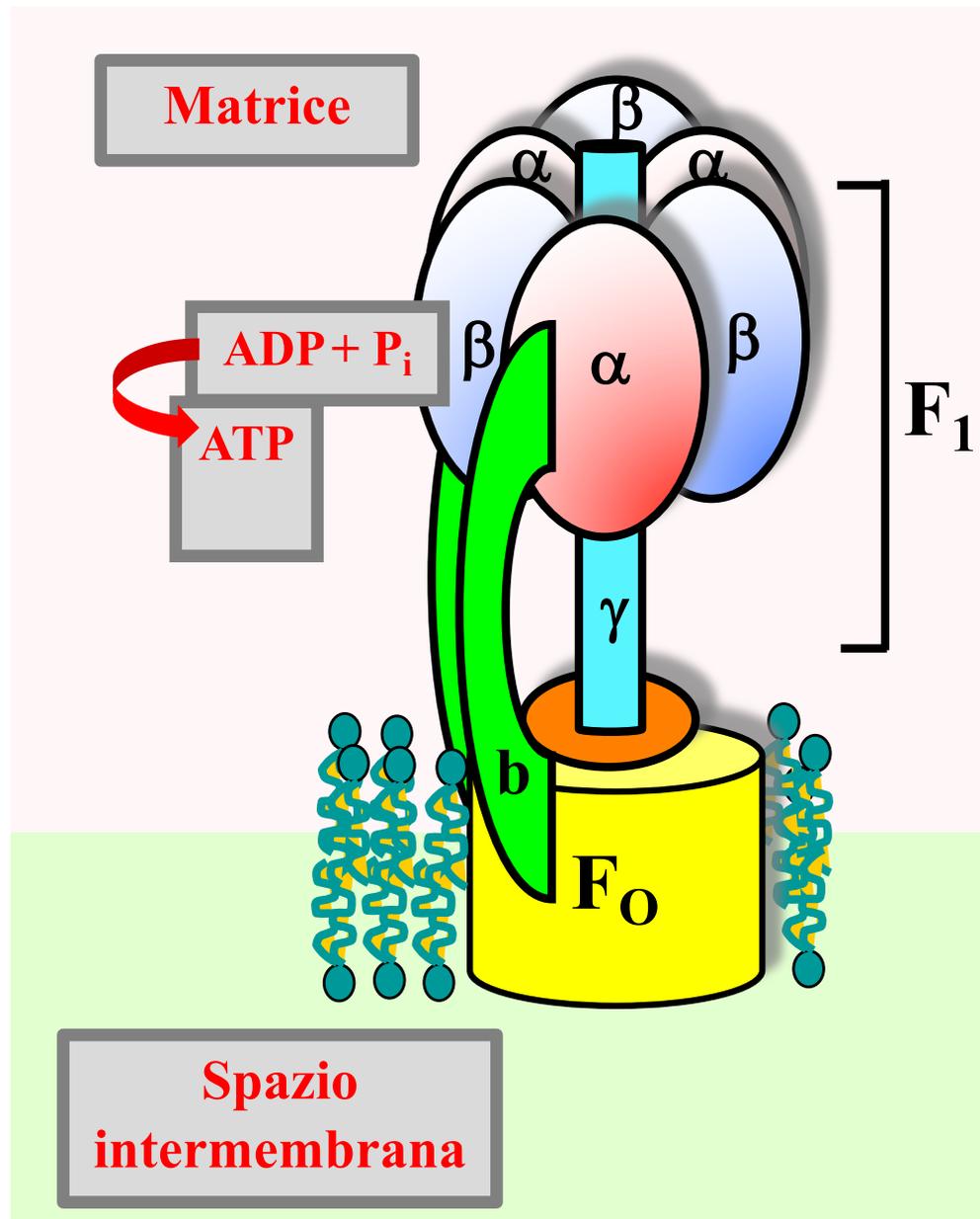
F_1 è una **proteina estrinseca** di membrana rivolta verso la matrice mitocondriale dissociabile da F_0 ; F_1 è solubile in acqua. F_1 isolata perde la capacità di sintetizzare ATP ed acquista la capacità di idrolizzarlo ad ADP e P_i .

F_0 è un **canale protonico** transmembrana collegato da uno stelo alla componente F_1 . La componente F_0 è insolubile in acqua.

ATP sintasi

Quale è il meccanismo molecolare che associa al flusso di protoni attraverso la componente F_0 l'energia sufficiente per la sintesi di ATP ?

L'ATP sintasi

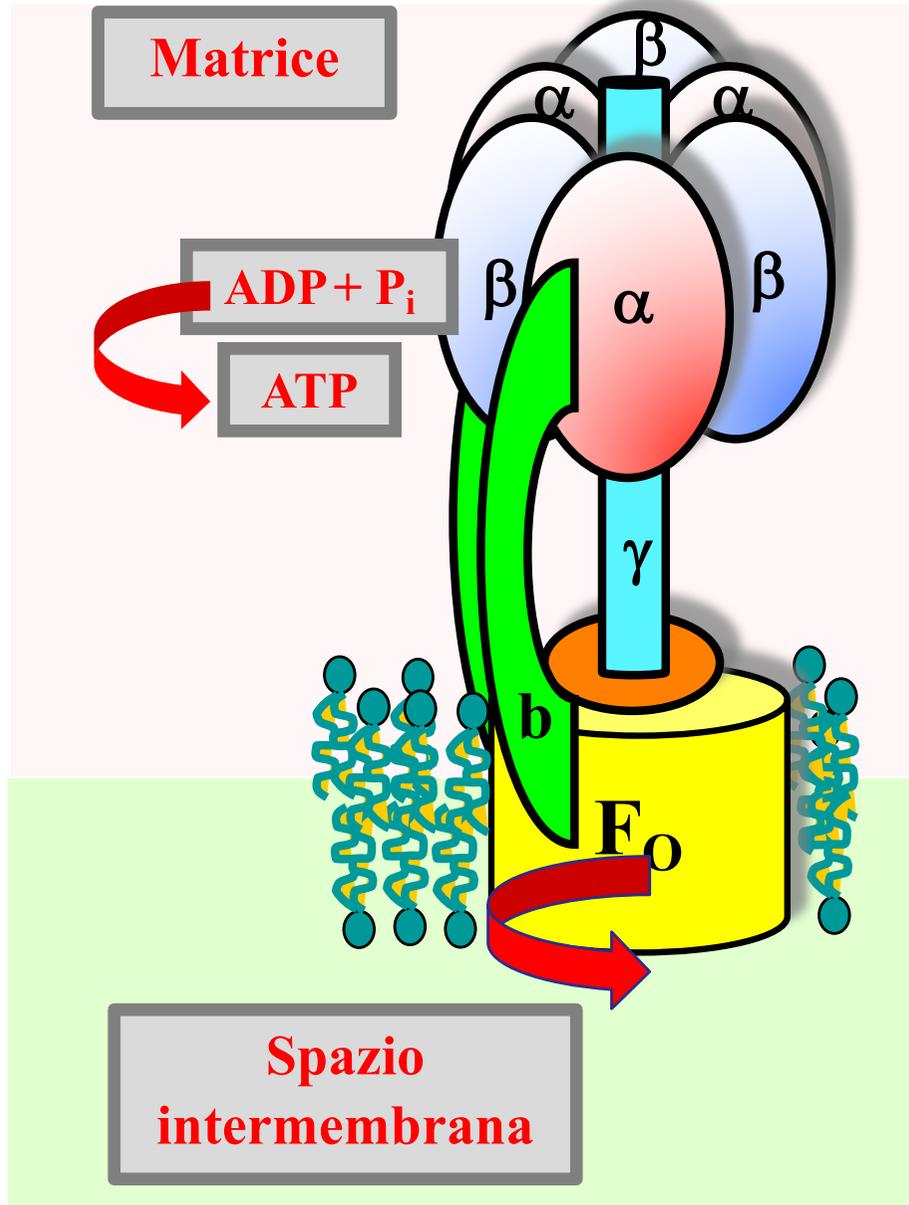


F₁, la parte catalitica, è costituita da tre protomeri identici contenenti due subunità ciascuno (α e β). Ciascuna subunità β ha un sito catalitico per la sintesi di ATP.

La subunità γ , in contatto con una subunità β vuota, è un asse centrale che attraversa tutto il complesso F_0 .

Le 2 subunità b di F_0 si associano alle subunità α e β di F_1 mantenendole fisse rispetto alla membrana.

ATP sintasi: la catalisi rotazionale



La sintesi dell'ATP è accoppiata al flusso di H^+ attraverso F_0 .

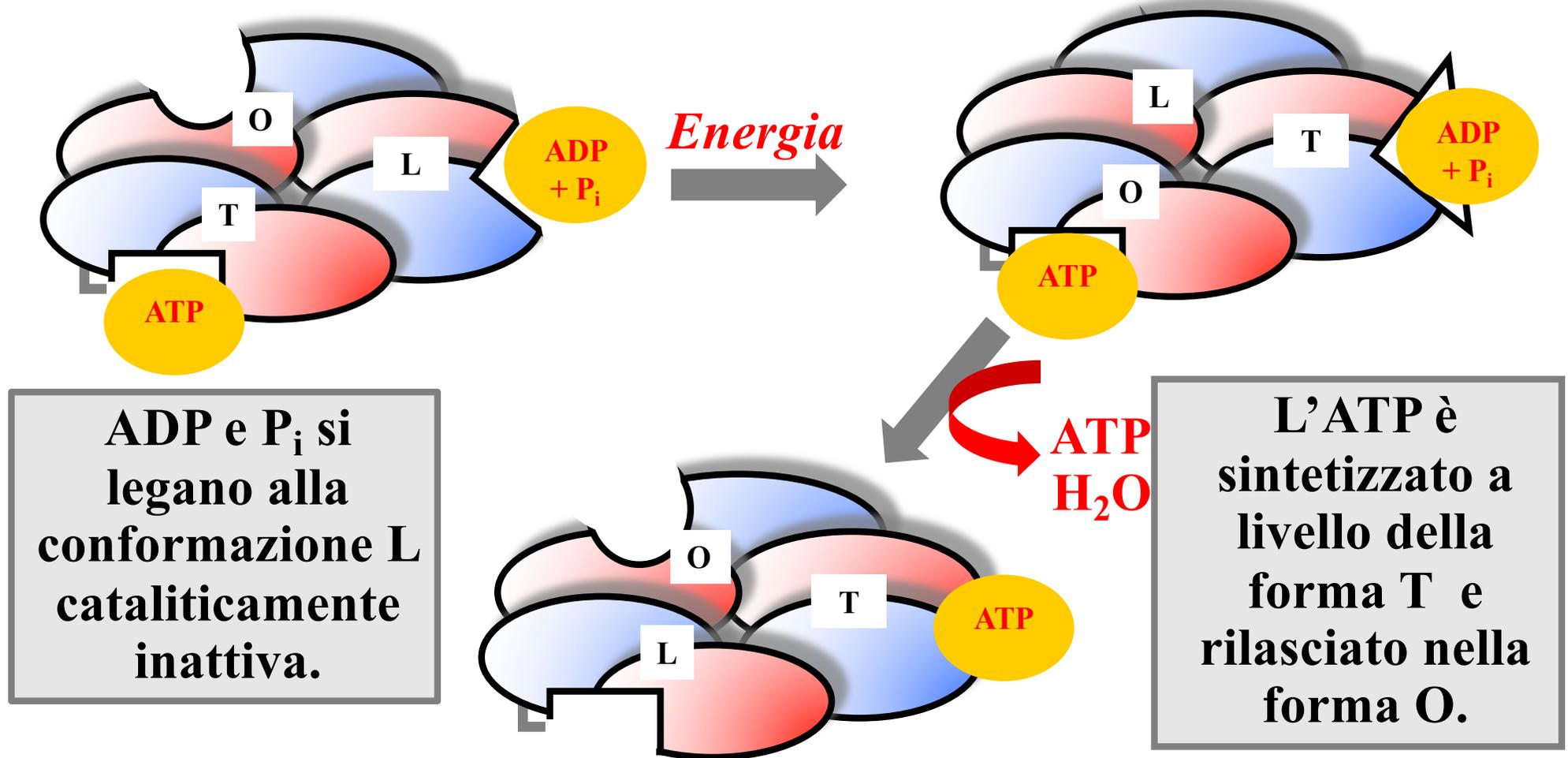
Il flusso di H^+ attraverso F_0 provoca la rotazione di F_0 , inducendo un cambio conformazionale a livello dei siti catalitici delle subunità β .

I tre protomeri identici (subunità α e β) esistono **tre stati conformazionali**:

- stato **O (aperta)**, con affinità molto bassa per i ligandi e cataliticamente inattiva.
- stato **L (rilassata)**, più chiusa, lega debolmente i ligandi e cataliticamente inattiva.
- stato **T (compatta)**, chiusa con alta affinità per i ligandi cataliticamente attiva.

La sintesi dell'ATP avviene in tre tappe ¹⁷

Tre cambi conformazionali, che richiedono energia, trasformano un dimerico dalla forma L alla forma T, un altro dimerico dalla forma T alla forma O e l'ultimo dimerico dalla forma O a quella L.



Meccanismo della modificazione del legame dell'ATP

L'energia fornita dal passaggio di protoni attraverso la componente F_0 , provoca la rotazione dello stelo centrale (subunità γ) che è in contatto con ciascun dimerio $\alpha\beta$, generando cambi nella conformazione dei siti catalitici.

La rotazione non è continua ma avviene in 3 tappe distinte, ognuna di 120° .

Ad ogni rotazione di 120° corrisponde il rilascio di una molecola di ATP; il legame di ADP e P_i ; la sintesi di ATP.

Bilancio energetico dell'ossidazione del glucosio

Nella catena respiratoria, la riossidazione del NADH* produce 2,5 ATP e la riossidazione del FADH₂ produce 1,5 ATP.

Glicolisi *	2 NADH	$1,5 * 2 = 3 \text{ ATP}$
Piruvato deidrogenasi (2 Piruvato)	2 NADH	$2,5 * 2 = 5 \text{ ATP}$
Ciclo di Krebs (2 AcetilCoA)	6 NADH	$2,5 * 6 = 15 \text{ ATP}$
	2 FADH ₂	$1,5 * 2 = 3 \text{ ATP}$
		26 ATP

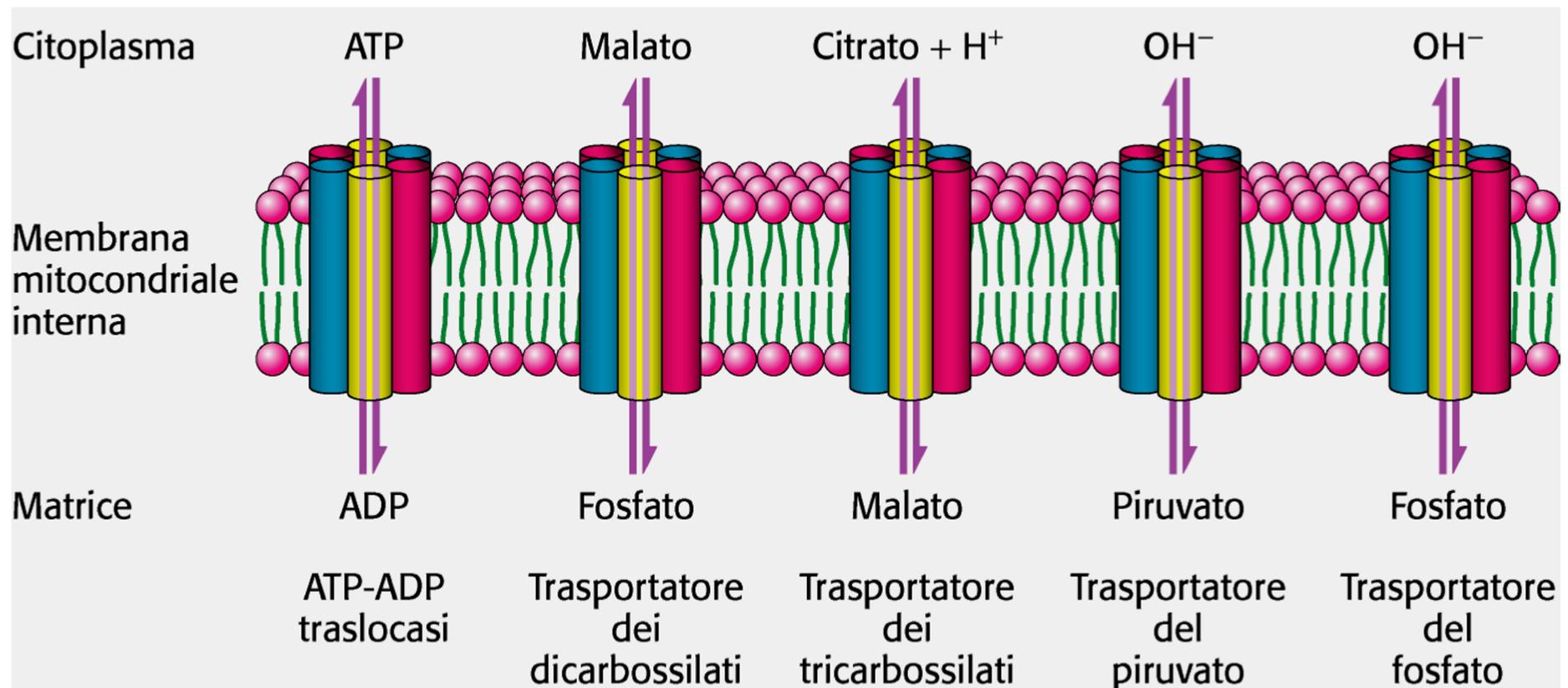
Sintesi di ATP mediante fosforilazione a livello del substrato
(2 ATP nella glicolisi, 2 GTP da 2 cicli di Krebs) **4 ATP**

Il bilancio energetico totale: 30 ATP

**La riossidazione del NADH della glicolisi produce 1,5 ATP (navetta del glicerofosfato)*

I sistemi di trasporto attraverso la membrana mitocondriale

A causa della permeabilità controllata della membrana mitocondriale interna, l'entrata nella matrice mitocondriale o l'uscita da essa dei metaboliti viene mediata da sistemi di trasporto.



I sistemi di trasporto attraverso la membrana mitocondriale

Principali molecole che vengono trasportate attraverso la membrana

- piruvato
- ossalacetato
- ADP/ATP
- malato
- fosfato
- aspartato
- NADH (solo gli equivalenti riducenti)

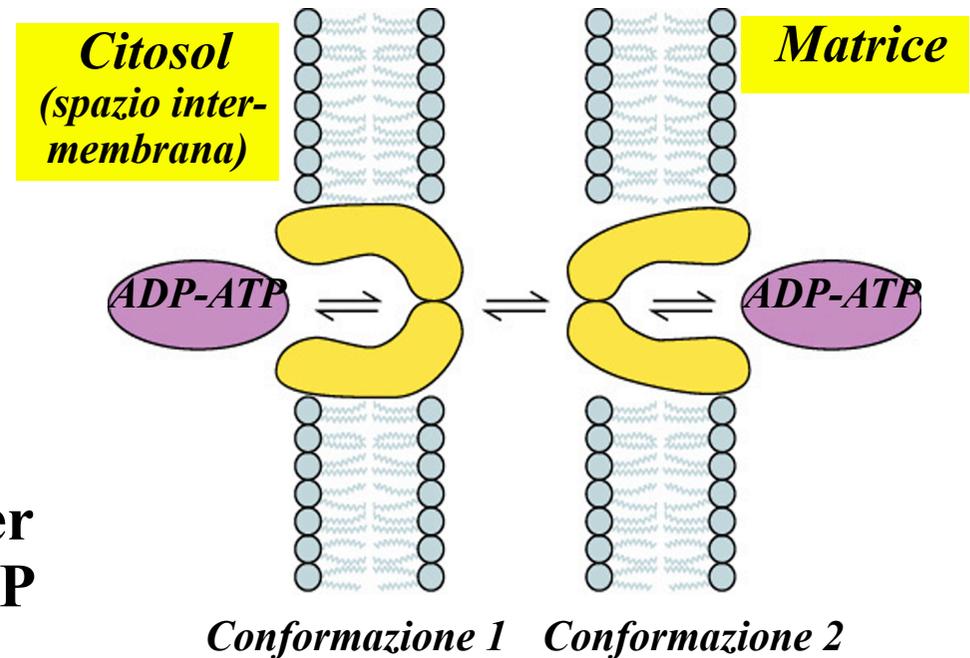
ATP e ADP vengono trasportati contestualmente da una proteina di membrana (traslocatore ADP/ATP).

Gli equivalenti riducenti del NADH (impermeabile alla membrana) vengono trasferiti mediante i sistemi navetta del glicerofosfato o del malato-aspartato.

Il traslocatore ADP-ATP

E' una proteina di membrana omodimerica. Il sito di legame è unico per ADP o ATP ed esiste in due stati conformazionali, in cui il sito di legame è rivolto alternativamente verso l'interno o l'esterno della matrice mitocondriale.

Nella conformazione 1, l'affinità per l'ATP è bassa mentre quella per l'ADP alta; viceversa per la conformazione 2.

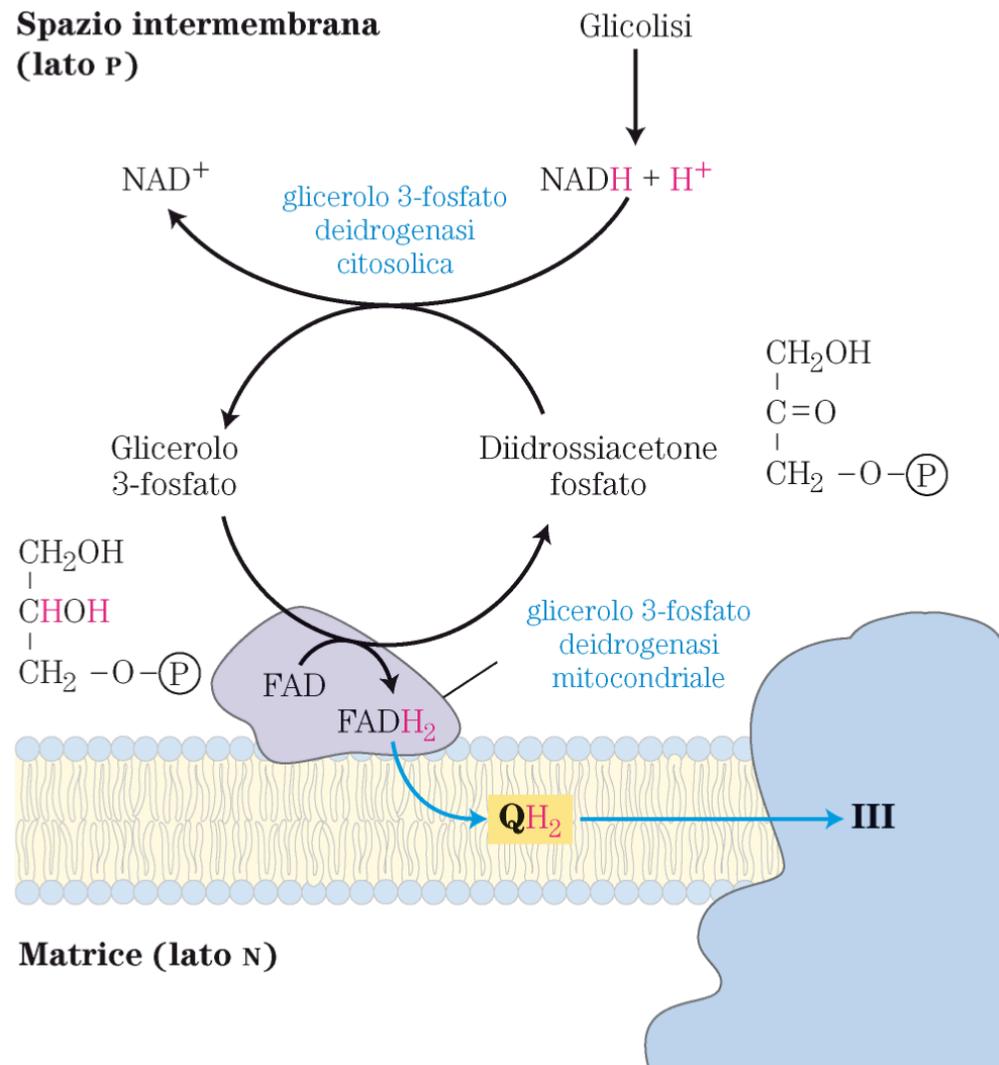


Questo trasporto genera uno squilibrio di cariche negative tra l'interno e l'esterno della matrice mitocondriale; tale squilibrio viene bilanciato dal gradiente protonico generato dalla fosforilazione ossidativa.

Lo ione fosfato necessario alla sintesi di ATP viene importato nella matrice da un altro trasportatore che trasferisce questo ione insieme ad uno ione H^+ (sistema di simporto).

Un altro sistema di simporto viene utilizzato per il trasporto del piruvato.

Sistema navetta del glicerolo 3-fosfato: muscolo scheletrico e cervello

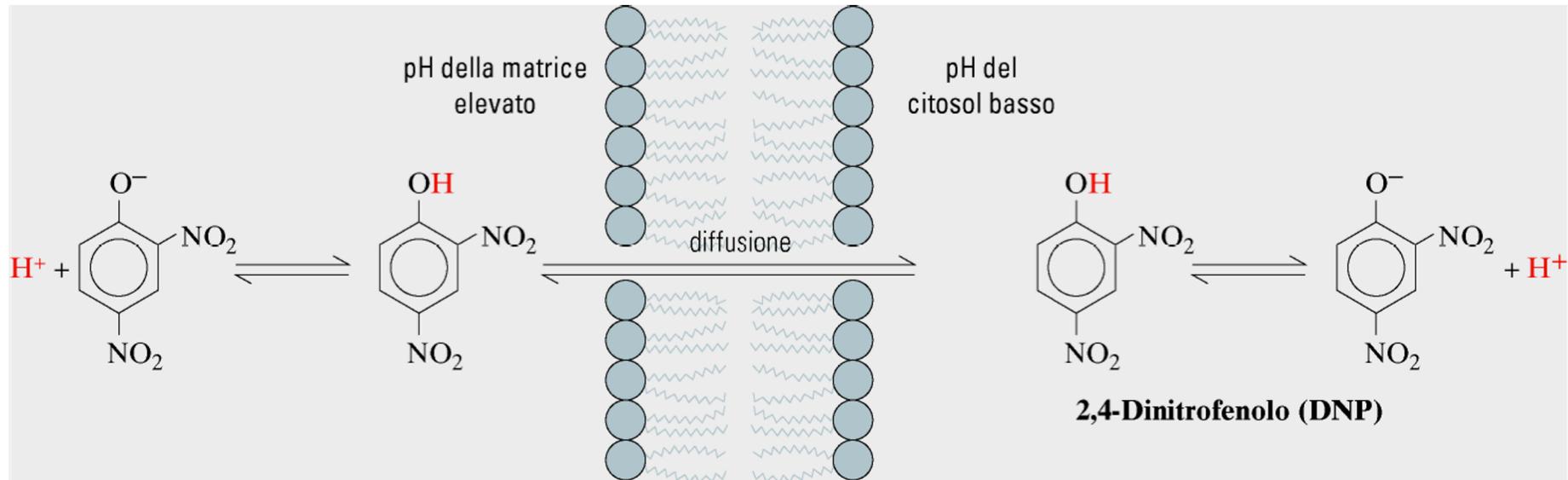


Gli equivalenti riducenti passano dal NADH citosolico al diidrossiacetonefosfato con produzione di glicerolo 3-fosfato;

un **isoenzima della glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale** (legato al lato esterno della membrana mitocondriale interna, trasferisce due equivalenti riducenti dal glicerolo 3-fosfato all'ubichinone.

In questo caso, gli equivalenti riducenti del NADH non passano per il complesso I.

Il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa: gli agenti disaccoppianti (1)



Il 2,4-dinitrofenolo (DNP) è un acido debole lipofilo, che nel suo stato neutro attraversa facilmente le membrane.

In un gradiente di pH, il DNP lega i protoni sulla parte più acida della membrana, diffonde attraverso di essa rilasciando i protoni sul lato alcalino,

Il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa: gli agenti disaccoppianti (2)

Il DNP si comporta come uno ionoforo, dissipando il gradiente protonico.

L'accoppiamento tra il trasporto degli elettroni all'O₂ e la fosforilazione ossidativa dipende dalla impermeabilità della membrana mitocondriale interna al libero passaggio di H⁺.

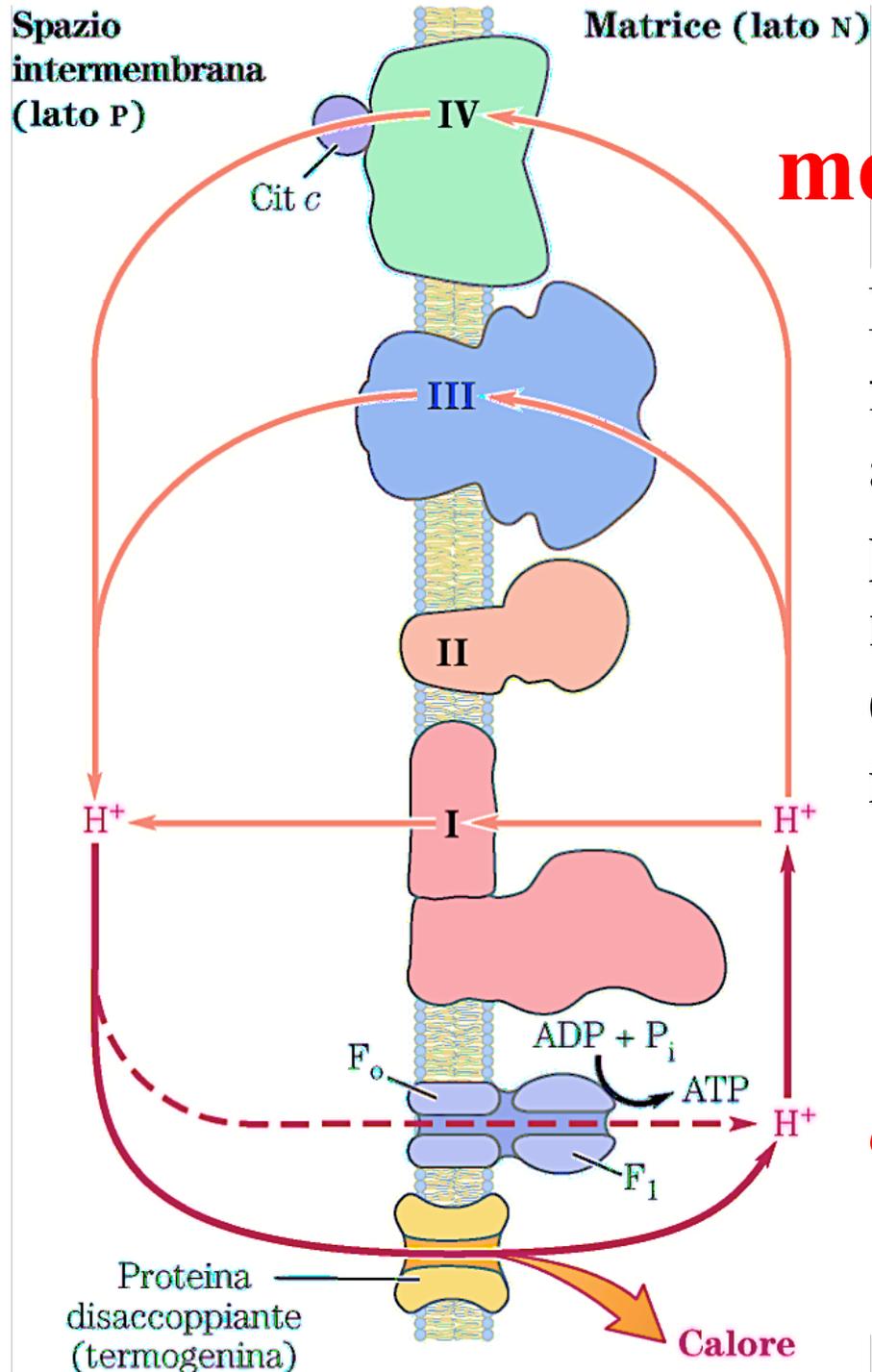
Il DNP disaccoppia il trasporto degli e⁻ e la sintesi di ATP.

Il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa: gli agenti disaccoppianti (3)

Nel 1920 il DNP fu usato come pillola dietetica che aveva la capacità di indurre la perdita di peso ma causava effetti collaterali mortali.

Uno ionoforo che si comporta come il DNP è detto agente disaccoppiante: disaccoppia la fosforilazione ossidativa dal trasporto di elettroni, ossia dissipa il gradiente elettrochimico protonico.

In condizioni fisiologiche, la dissipazione di un gradiente elettrochimico di protoni genera calore.



Generazione di calore mediante disaccoppiamento

La produzione di calore è la funzione fisiologica del tessuto adiposo bruno, presente nel collo e parte superiore del dorso nei mammiferi privi di pelliccia (neonati) e in quelli che vanno in ibernazione.

La proteina disaccoppiante (UCP1) o termogenina costituisce un canale protonico nei mitocondri del grasso bruno.