

* Lezione 16

*Trasporto degli elettroni e
Fosforilazione ossidativa*

IL TRASPORTO DI LETTRONI, LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA E IL METABOLISMO DELL'OSSIGENO

Un uomo adulto produce in media abbastanza energia da sintetizzare ogni giorno una quantità di ATP pari al suo peso.

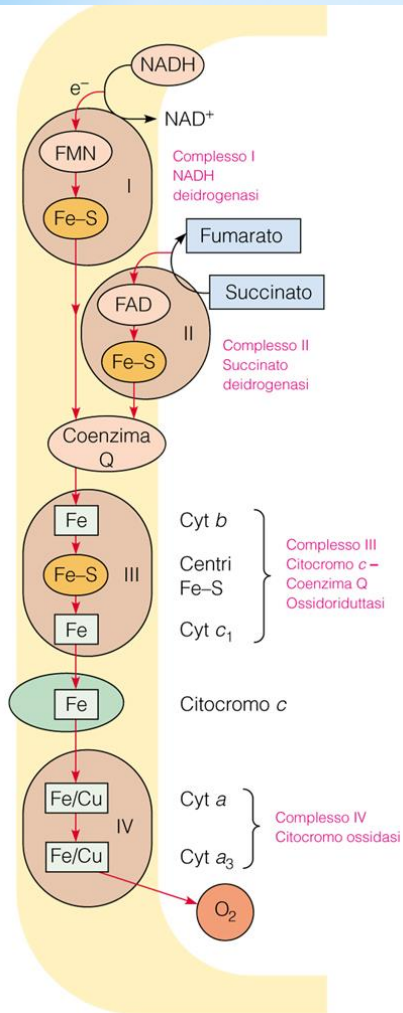
COME VIENE METABOLIZZATA QUESTA MASSICCIA QUANTITA' DI ENERGIA?

Glicolisi + ciclo di Krebs



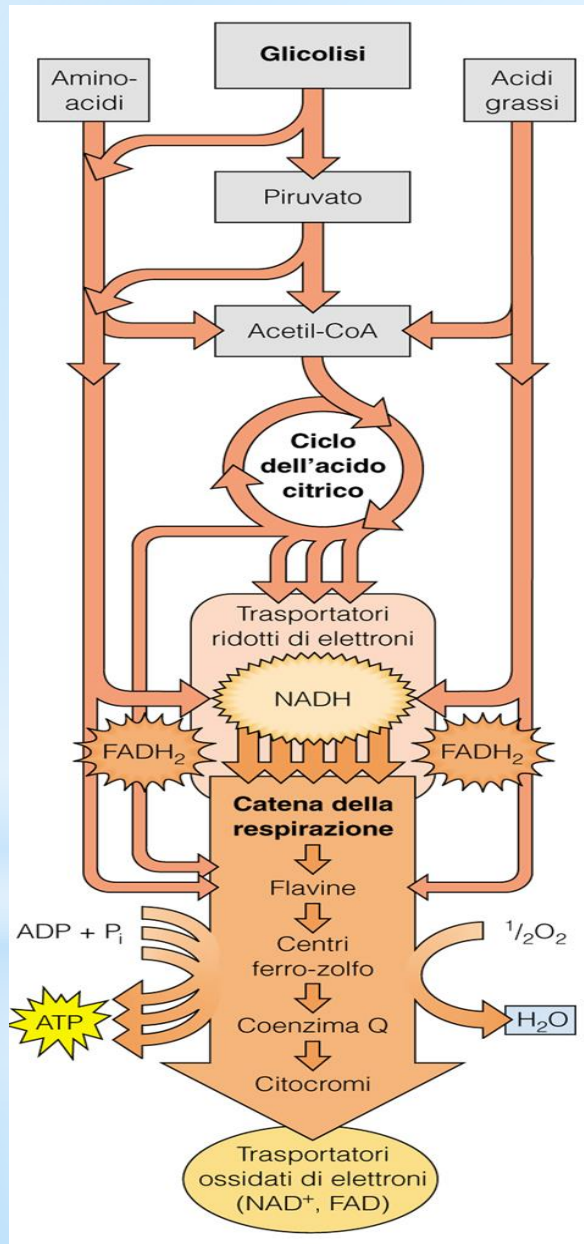
10 moli NADH + 2 moli FADH₂

Per mole di glucosio ossidato



Legenda:

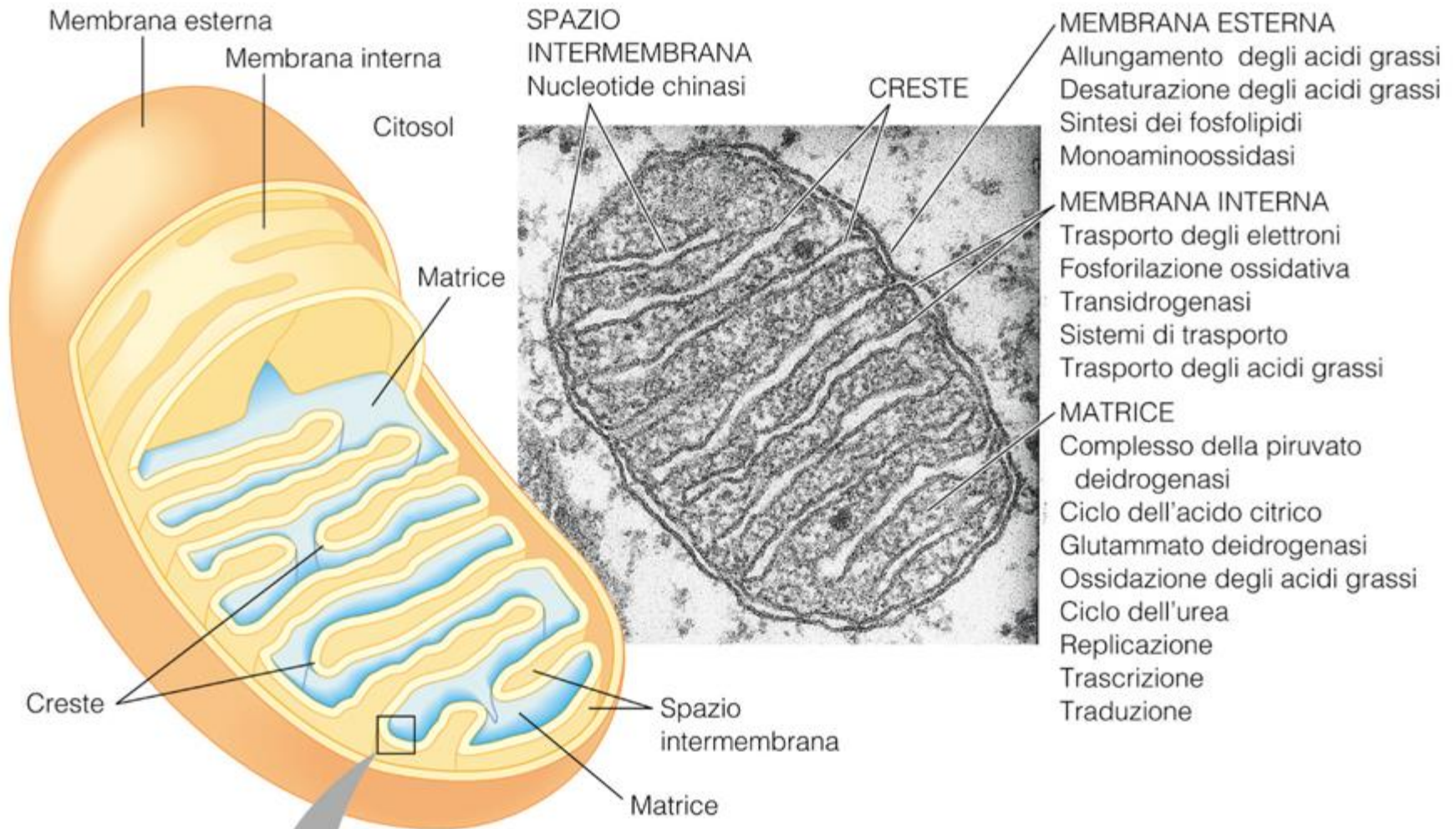
- Complessi enzimatici
- Coenzimi organici e gruppi prostetici
- Centri Fe-S
- Citocromi
- (ferro emínico)



La ri-ossidazione dei trasportatori di e⁻ prodotti produce la maggior parte di energia necessaria per la sintesi dell'ATP

*Tutte le tappe enzimatiche della **degradazione ossidativa dei carboidrati, dei grassi e aminoacidi** nelle cellule aerobiche convergono sulla tappa finale della respirazione cellulare*

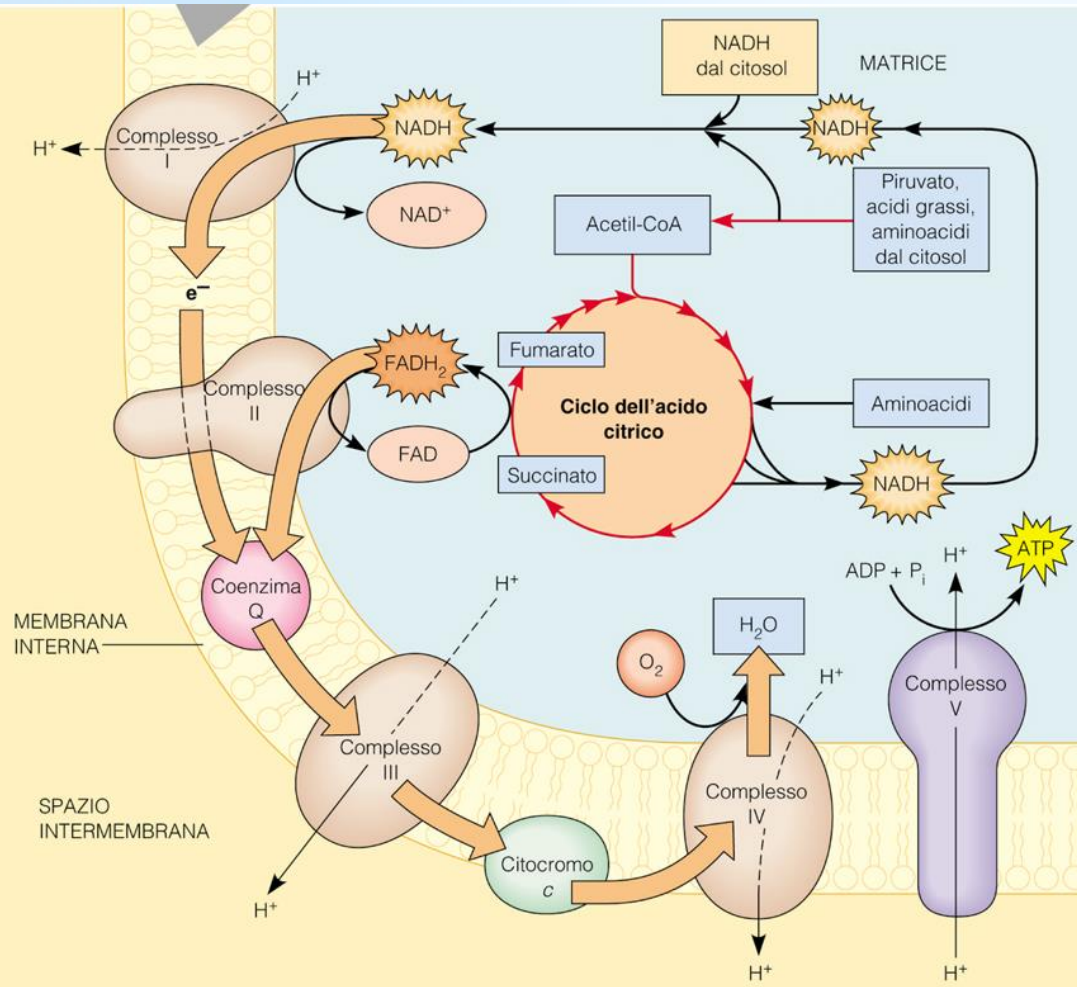
LOCALIZZAZIONE MITOCONDRIALE





Reazione altamente **ESOERGONICA**

$$\Delta G_0' = -n F \Delta E_0' = -2 (96,5) [0,82 - (- 0,32)] = \underline{- 220 \text{ kJ/ mole}}$$



Gli elettroni dal NADH vengono trasferiti all'ossigeno attraverso una catena composta di 4 complessi proteici

Il flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria causa la fuoriuscita di protoni dalla matrice mitocondriale. Si crea una forza

motrice generata dai protoni formata da un gradiente di pH e da un potenziale elettrico transmembrana.

L'ATP viene sintetizzato quando i protoni rientrano nella matrice mitocondriale attraverso il complesso V.

table 14-7

Standard Reduction Potentials of Some Biologically Important Half-Reactions, at 25 °C and pH 7

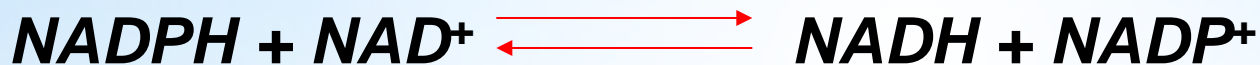
Half-reaction	E° (V)
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.816
$\text{Fe}^{3+} + e^- \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$	0.771
$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	0.421
Cytochrome <i>f</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>f</i> (Fe^{2+})	0.365
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (ferricyanide) + $e^- \longrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	0.36
Cytochrome <i>a</i> ₃ (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>a</i> ₃ (Fe^{2+})	0.35
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0.295
Cytochrome <i>a</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>a</i> (Fe^{2+})	0.29
Cytochrome <i>c</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>c</i> (Fe^{2+})	0.254
Cytochrome <i>c</i> ₁ (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>c</i> ₁ (Fe^{2+})	0.22
Cytochrome <i>b</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>b</i> (Fe^{2+})	0.077
Ubiquinone + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol + H_2	0.045
Fumarate ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ succinate ²⁻	0.031
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ (at standard conditions, pH 0)	0.000
Crotonyl-CoA + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ butyryl-CoA	-0.015
Oxaloacetate ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ malate ²⁻	-0.166
Pyruvate ⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ lactate ⁻	-0.185
Acetaldehyde + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ ethanol	-0.197
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{FADH}_2$	-0.219*
Glutathione + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ 2 reduced glutathione	-0.23
$\text{S} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$	-0.243
Lipoic acid + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ dihydrolipoic acid	-0.29
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADPH}$	-0.324
Acetoacetate + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \beta$ -hydroxybutyrate	-0.346
α -Ketoglutarate + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ isocitrate	-0.38
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ (at pH 7)	-0.414
Ferredoxin (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ ferredoxin (Fe^{2+})	-0.432

Data mostly from Loach, P.A. (1976) In *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman, G.D., ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, pp. 122-130, CRC Press, Boca Raton, FL.

*This is the value for free FAD; FAD bound to a specific flavoprotein (for example succinate dehydrogenase) has a different E° .

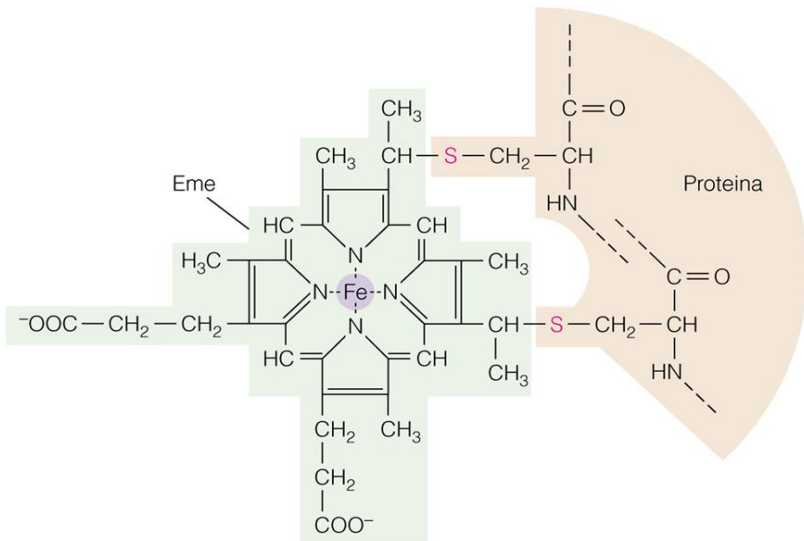
Le deidrogenasi NAD⁺ dipendenti rimuovono 2 e⁻ sottoforma di ione idruro (:H⁻), uno va al NAD⁺ mentre l'altro viene rilasciato nell'ambiente sottoforma di protone H⁺.

Il NAD⁺ può ricevere elettroni dalle deidrogenasi NADP⁺ dipendenti : piridinanucleotide transidrogenasi

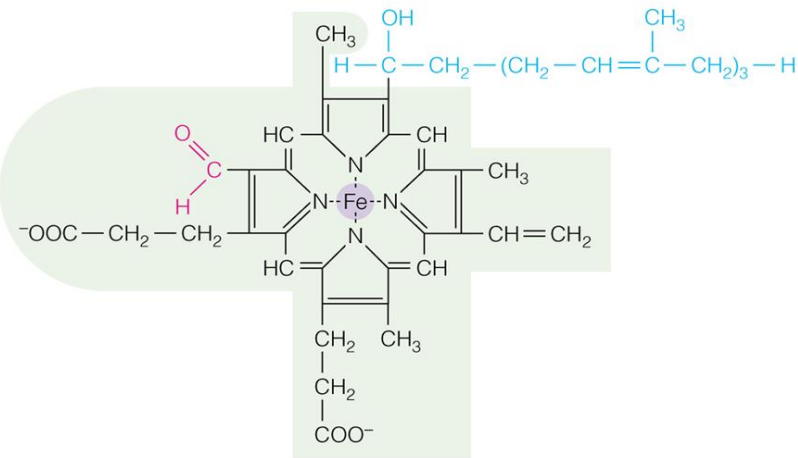


Né il NADH né il NADPH possono attraversare la membrana mitocondriale interna, ma gli elettroni lo possono fare mediante trasportatori

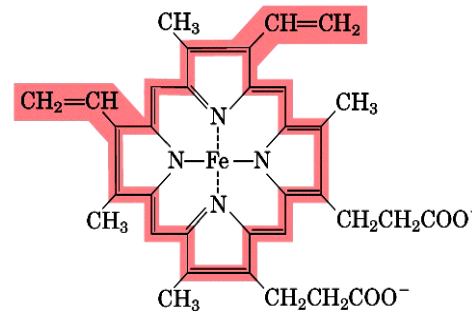
I citocromi (a, b, e c)



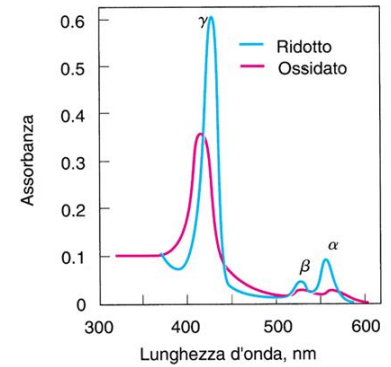
(a) Struttura generale dei citocromi c e c_1



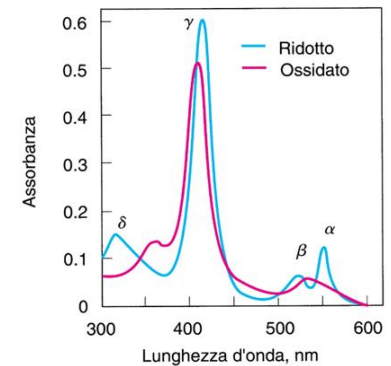
(b) Eme A nei citocromi a e a_3



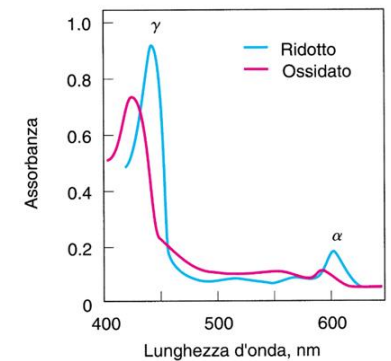
Iron protoporphyrin IX
(in b-type cytochromes)



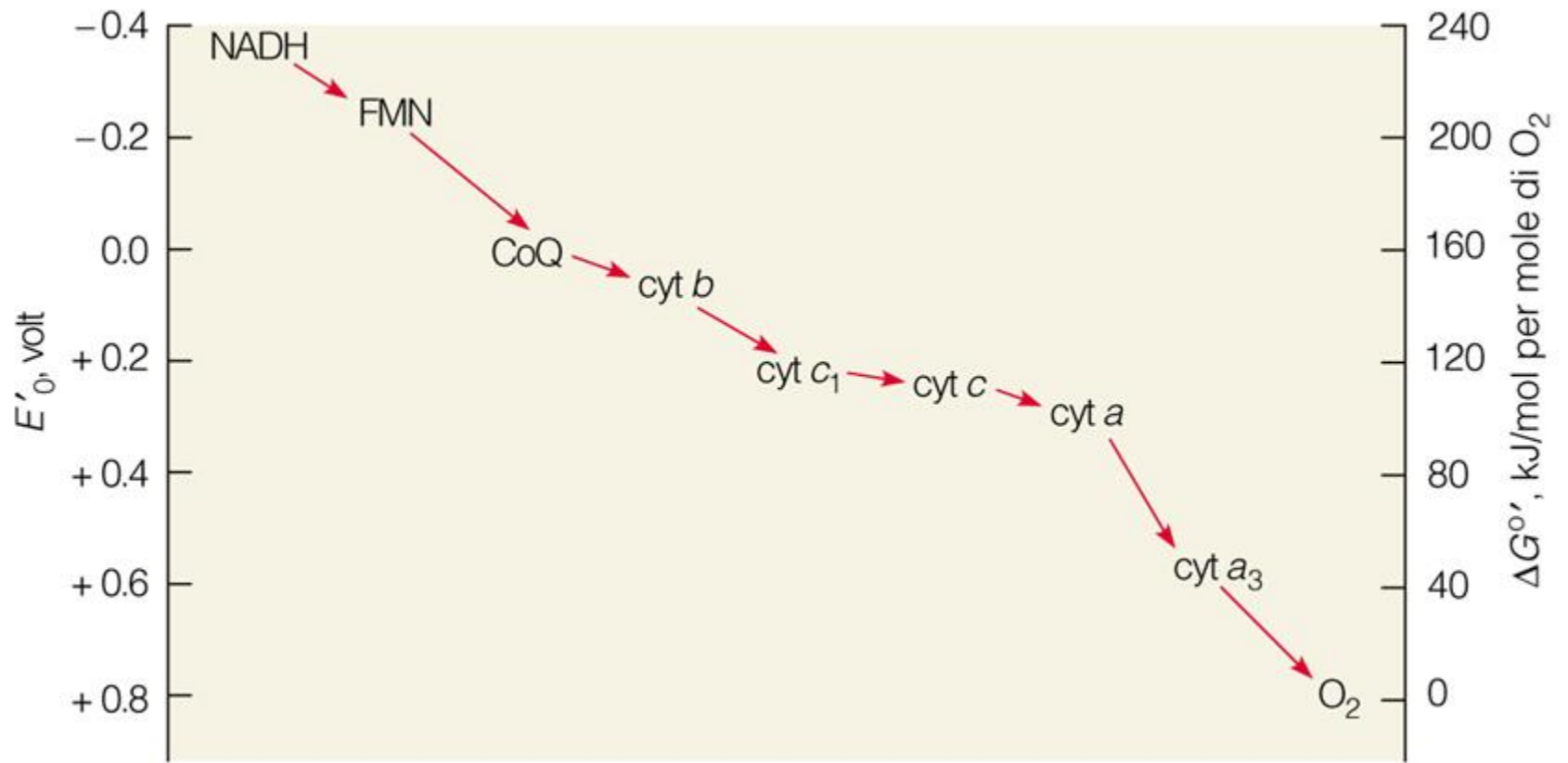
(a) Citocromo b

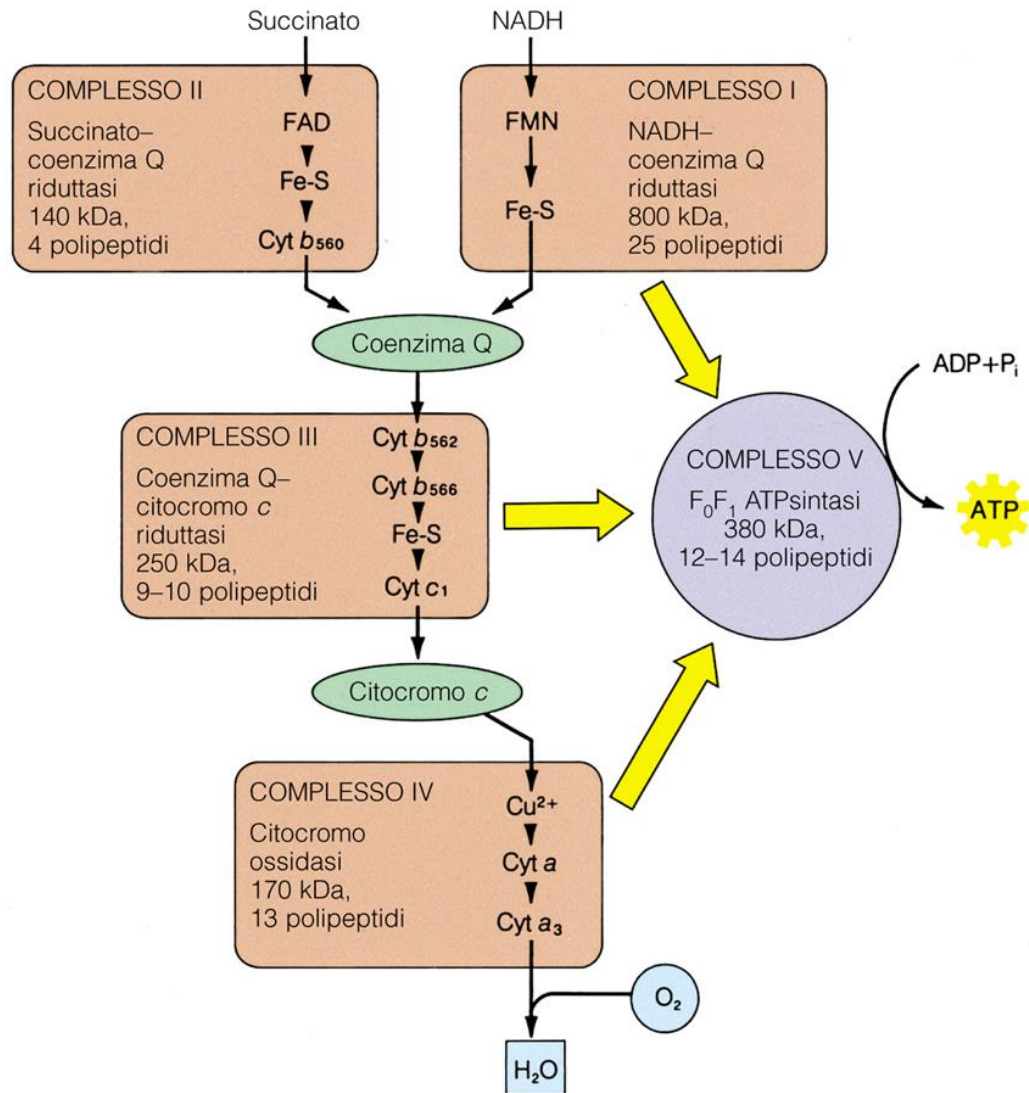


(b) Citocromo c



(c) Citocromi a e a_3





IL TRASPORTO DI LETTRONI NELLA CATENA RESPIRATORIA

Gli e⁻ vengono trasferiti all'O₂ attraverso una catena composta di 4 complessi proteici chiamati:

NADH deidrogenasi

(complesso mitocondriale I)

Succinato deidrogenasi

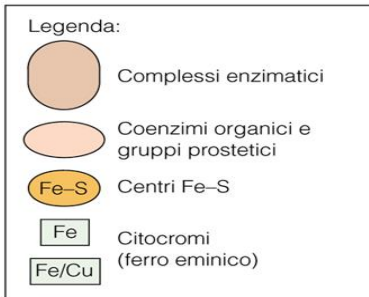
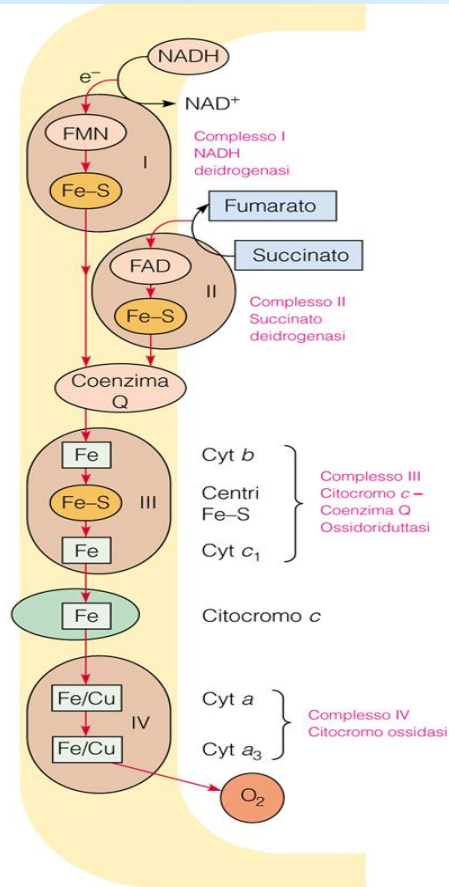
(complesso mitocondriale II)

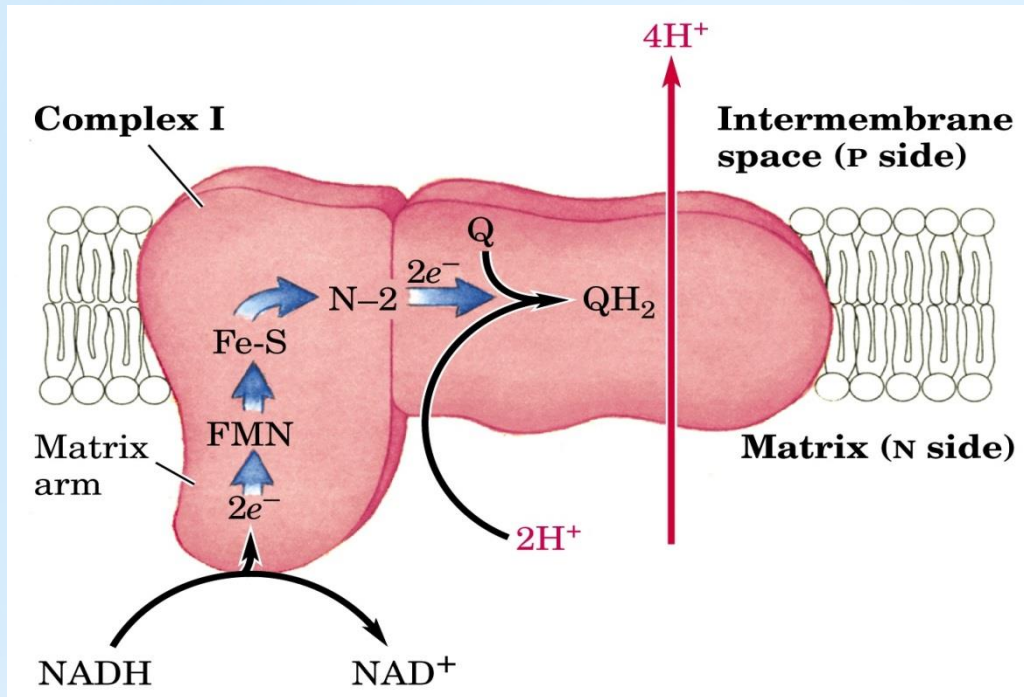
Citocromo c ossidoreduttasi

(complesso mitocondriale III)

Citocromo ossidasi

(complesso mitocondriale IV)

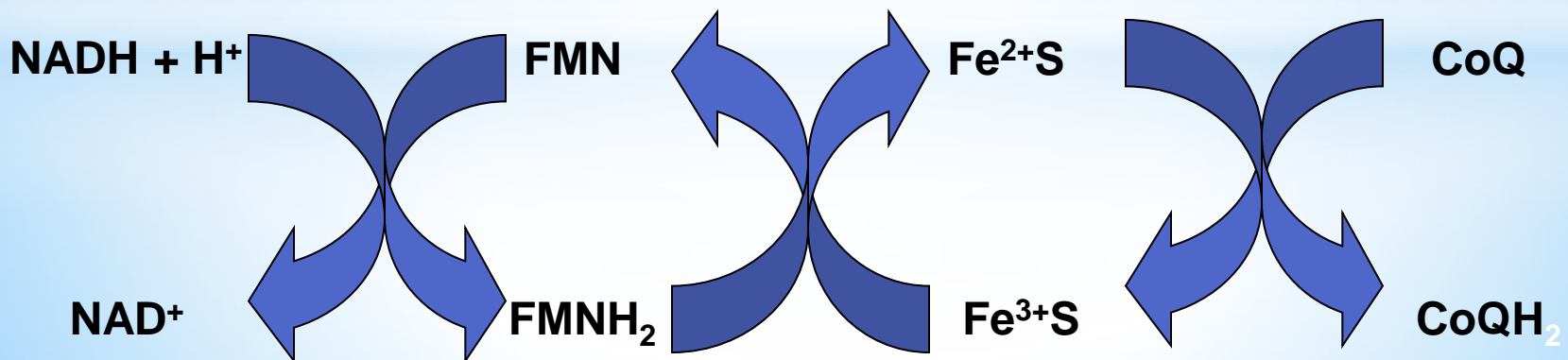


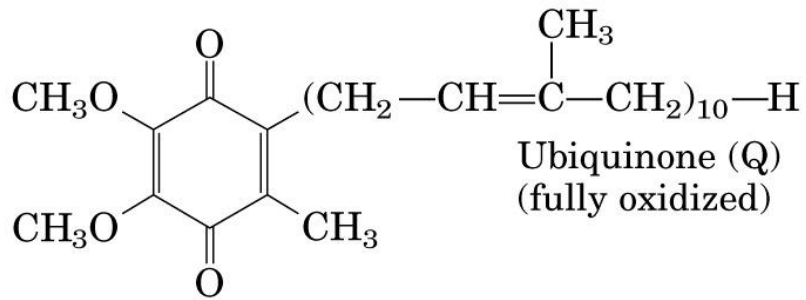


Gli elettroni sono poi trasferiti al Coenzima Q UBICHINONE
 Derivato chinonico con una lunga coda isoprenoide
 Per cui la NADH-deidrogenasi è detta anche NADH-CoenzimaQ-riduttasi

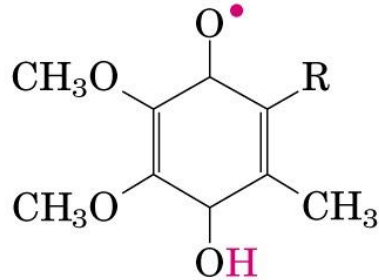
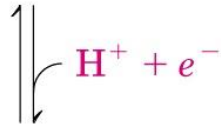
PRIMA POMPA
PROTONICA

Il flusso di elettroni dalla NADH-CoQ reduttasi all'ubichinone causa il TRASPORTO di $4H^+$ dalla MATRICE allo spazio intermembrana.

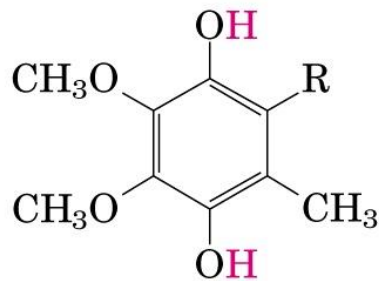
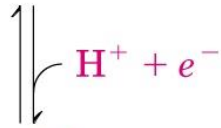




Ubiquinone (Q)
(fully oxidized)



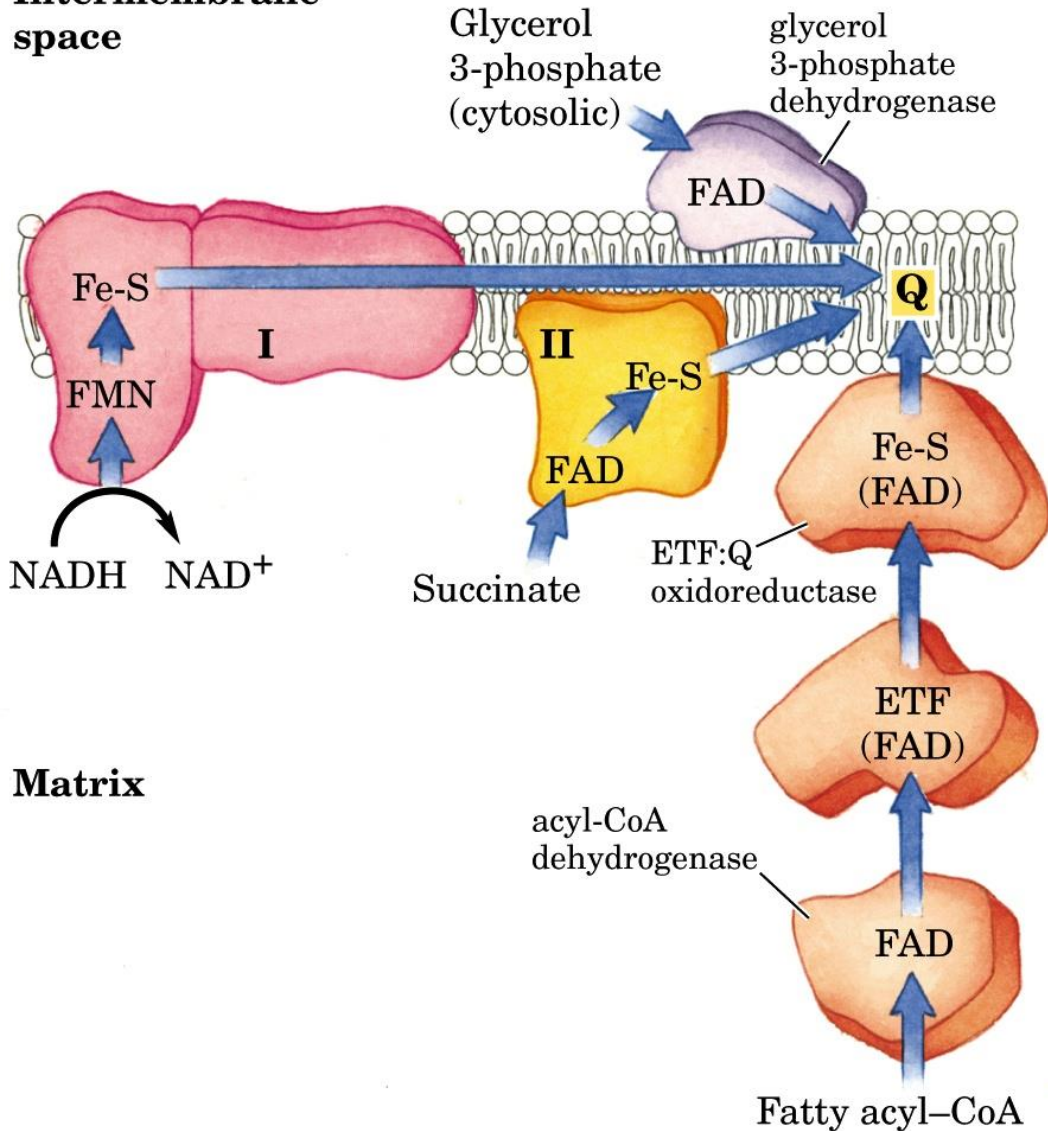
Semiquinone radical
(QH[•])



Ubiquinol (QH₂)
(fully reduced)

Poiché la riossidazione dell'ubichinone procede un elettrone alla volta, attraverso un semichinone intermedio, il CoQ rappresenta un'interfaccia adatta tra i trasportatori bieletronici e i citocromi che trasportano un singolo elettrone.

Intermembrane space



Complesso II *Succinato deidrogenasi*

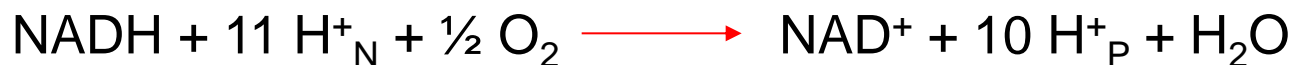
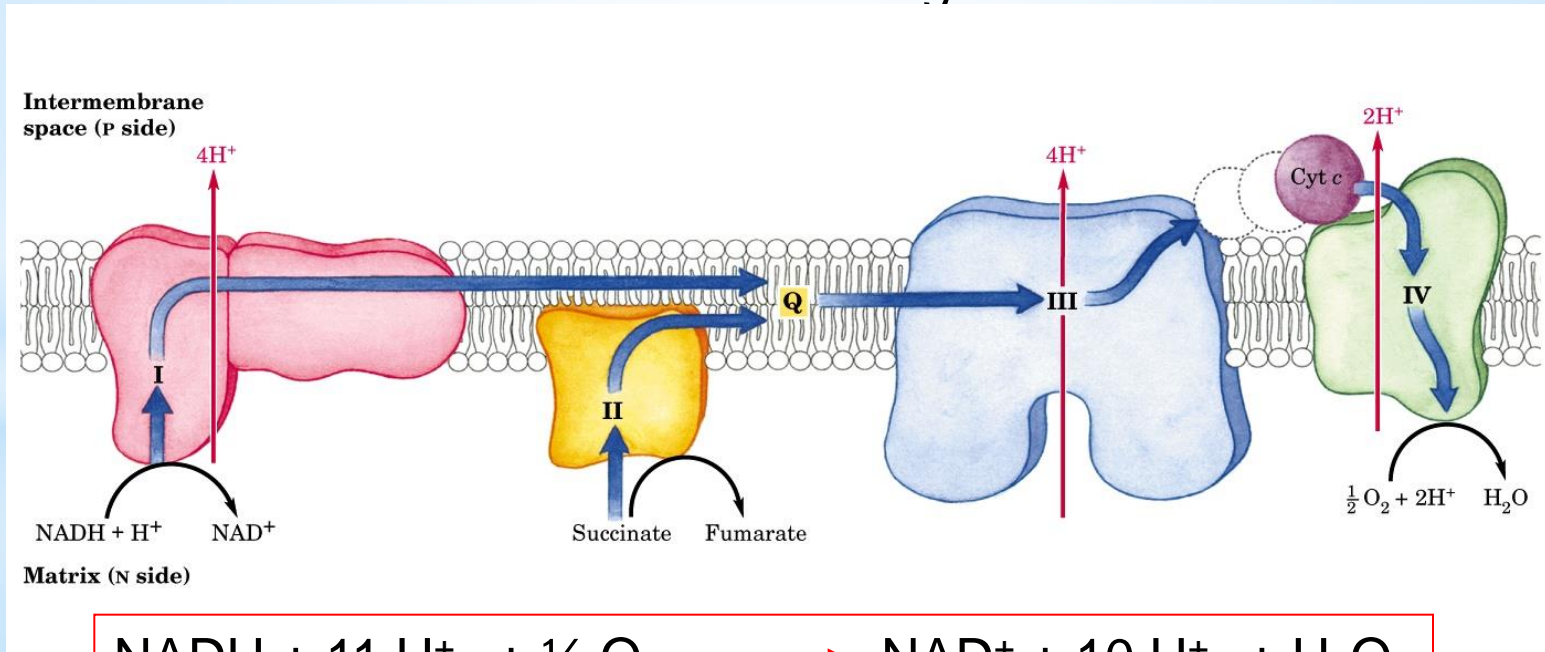
- *L'UBICHINONE è anche il punto di ingresso degli elettroni trasportati dal FADH₂*
- *Il FADH₂ non si dissocia dall'enzima ma passa prima i suoi elettroni ad un centro Fe-S e quindi al CoQ*

TEORIA CHEMIOSMOTICA

L'energia libera prodotta durante il trasferimento di elettroni viene efficientemente conservata in un GRADIENTE PROTONICO

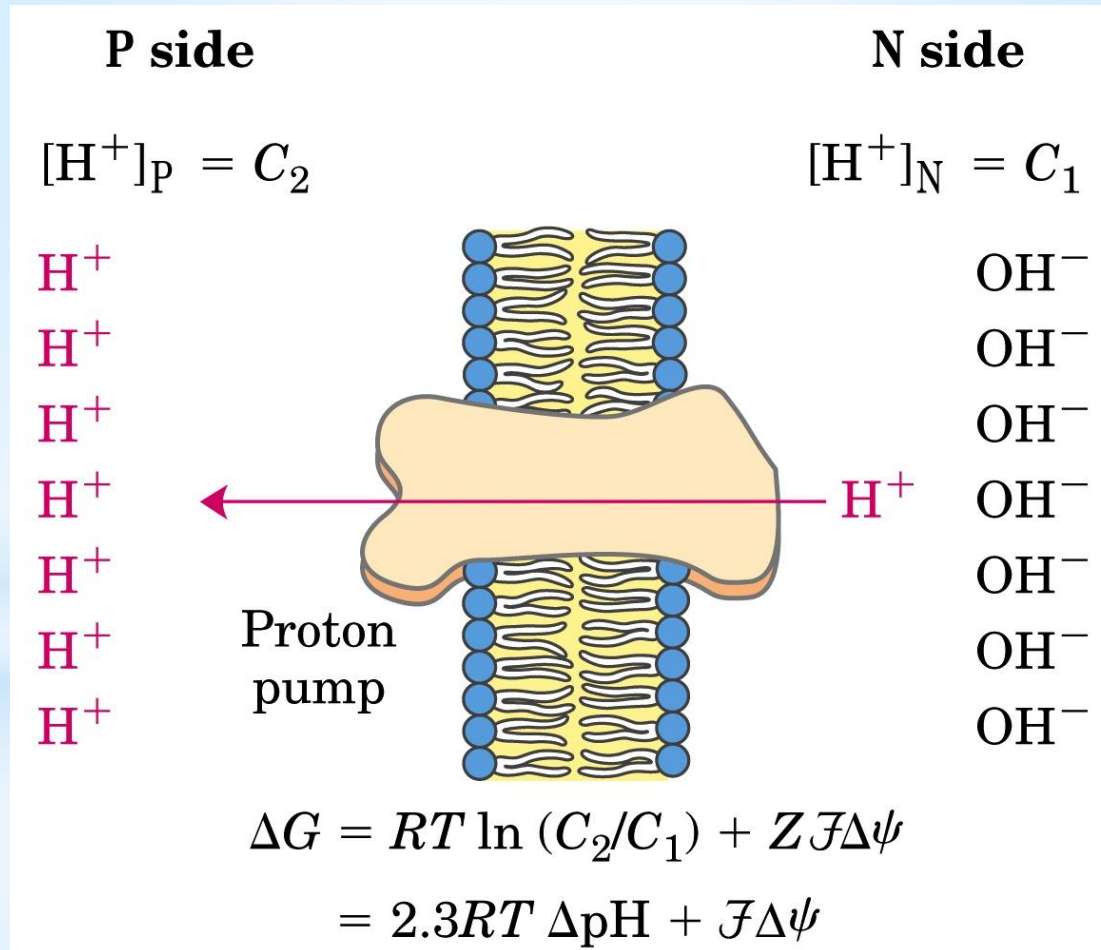


Gran parte di questa energia viene usata per pompare protoni attraverso la membrana interna mitocondriale creando un gradiente elettrochimico di H^+ .



LA FORZA MOTTRICE PROTONICA

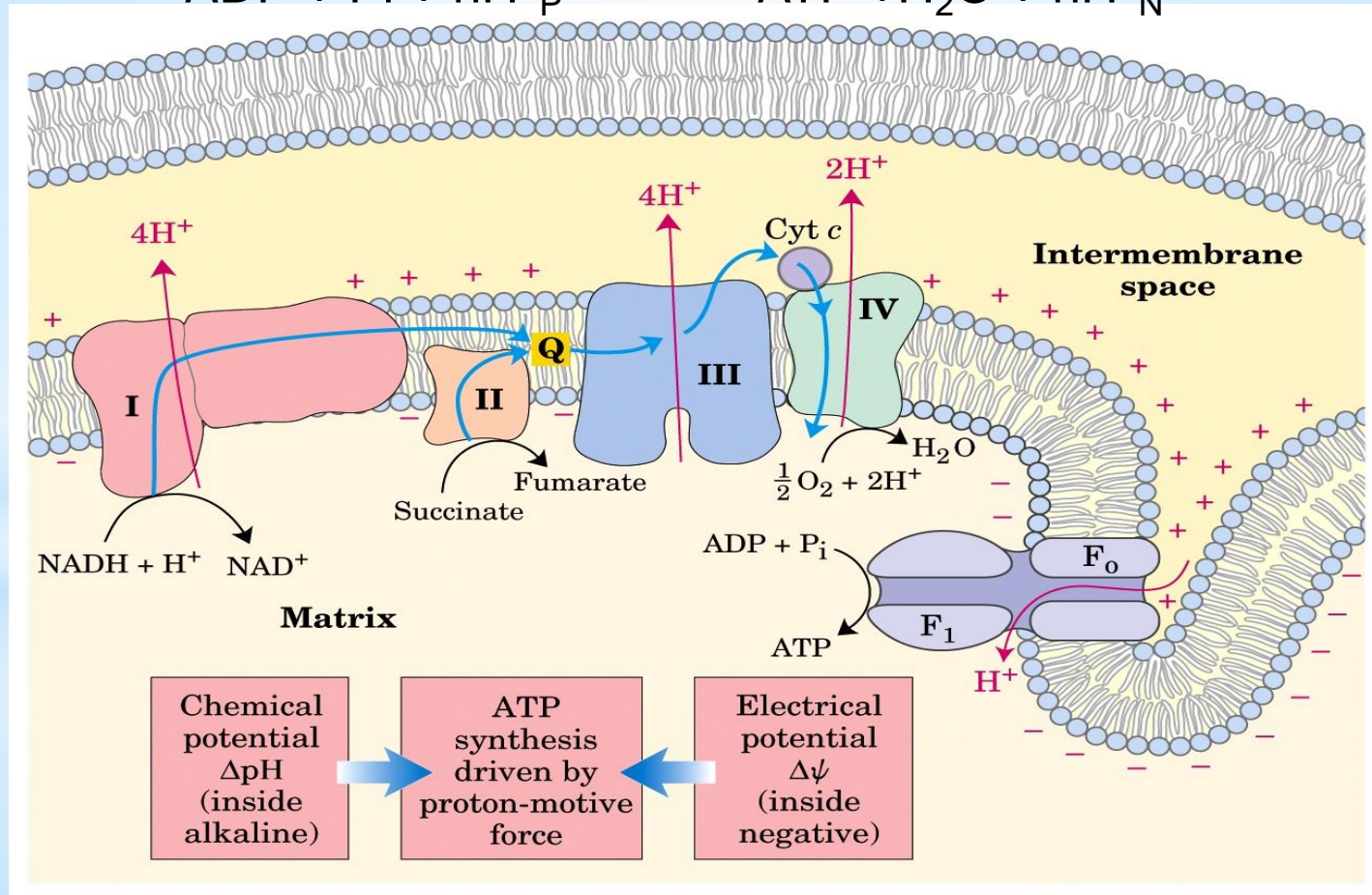
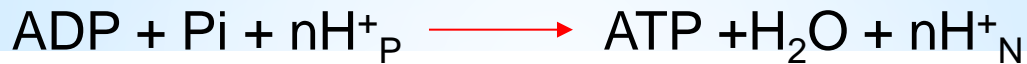
Energia potenziale chimica e energia del potenziale elettrico transmembrana.



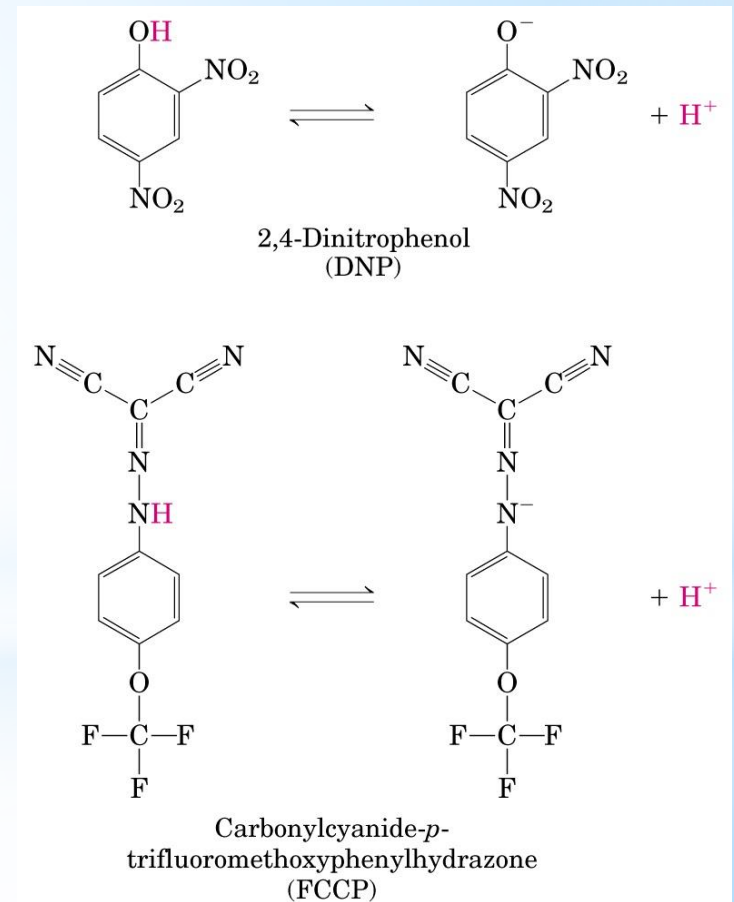
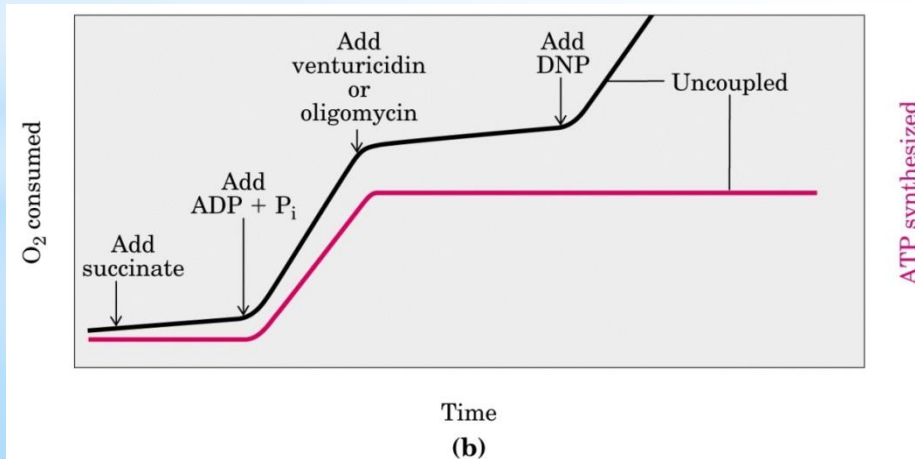
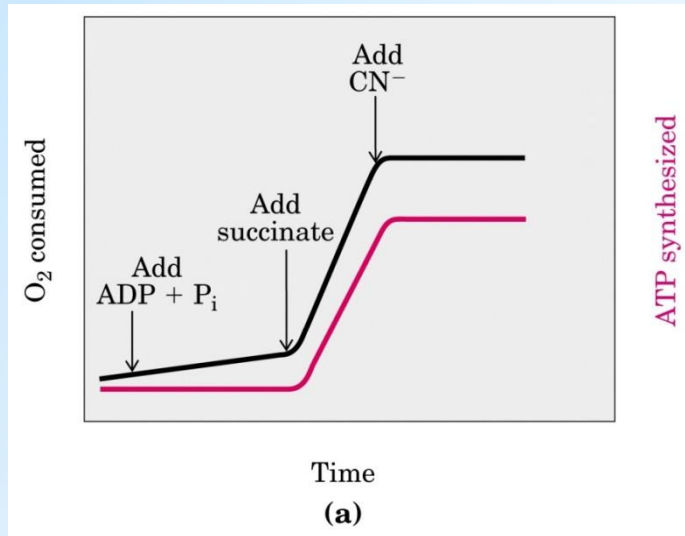
LA FORZA MOTTRICE PROTONICA

MODELLO CHEMIOSMOTICO (Peter Mitchell): meccanismo chimico che accoppia il flusso protonico con la fosforilazione.

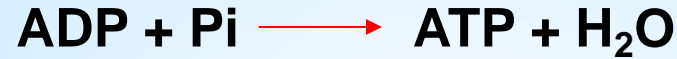
L'energia contenuta nel gradiente elettrochimico porta alla sintesi di ATP quando il flusso protonico inverte la sua direzione



ACCOPPIAMENTO DEL TRASFERIMENTO ELETTRONICO CON LA SINTESI DI ATP

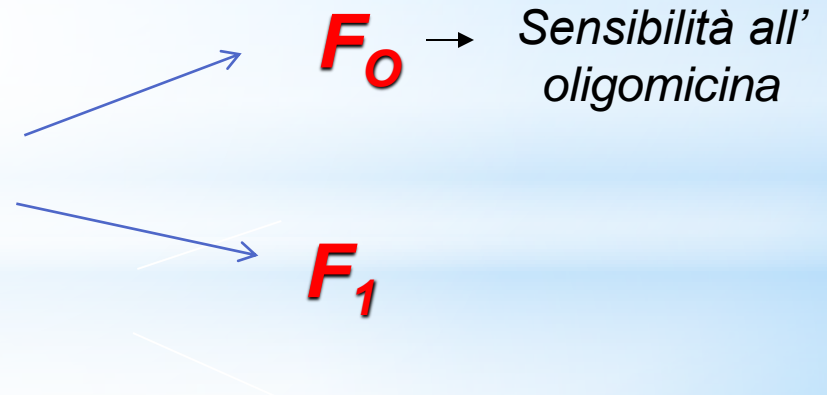


ATP-SINTASI (Efraim Racker 1960)



Questo grande complesso enzimatico catalizza la formazione di ATP a partire da ADP e P_i accompagnato dal flusso di protoni dal lato P al lato N della membrana mitocondriale interna.

L'ATPsintasi o COMPLESSO V è
formato da due **DOMINI**
FUNZIONALI



F₁ proteina periferica catalizza l'idrolisi di ATP (**F₁ ATPasi**)

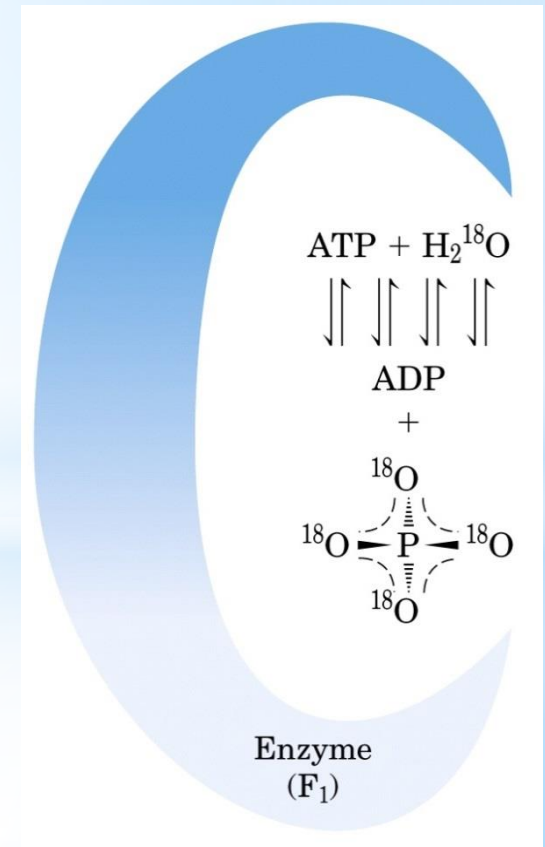
F₀ proteina integrale di membrana ha un canale per i protoni

Quando l'ATP è sulla superficie di F₁ è stabile quanto l'ADP

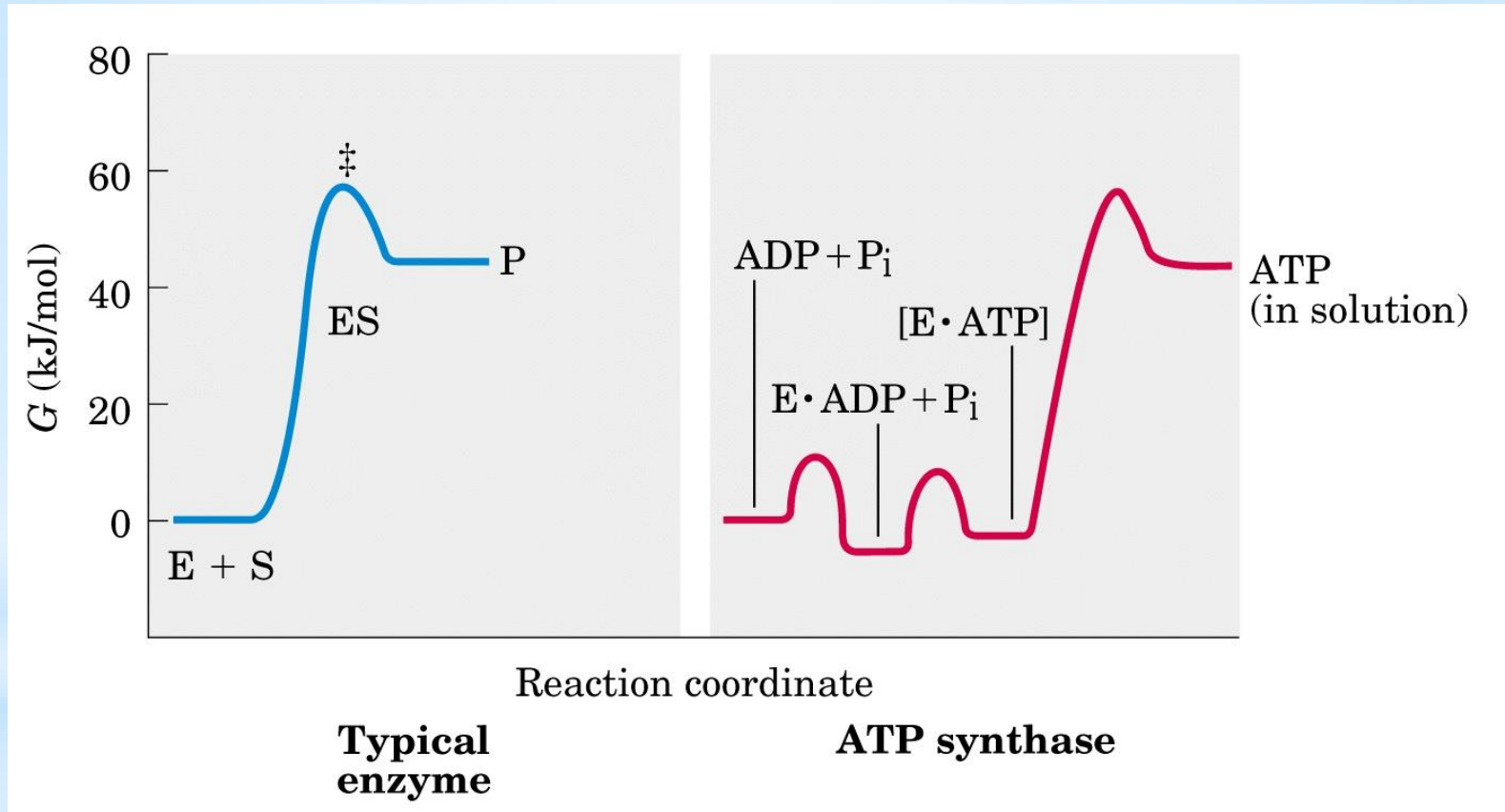


L'ATP sintasi rende l'ATP stabile quanto i suoi prodotti di idrolisi tenendolo saldamente legato e fornendo in questo modo l'energia necessaria per controbilanciare quella richiesta dalla sintesi.

L'enzima lega l'ATP con affinità maggiore che per l'ADP



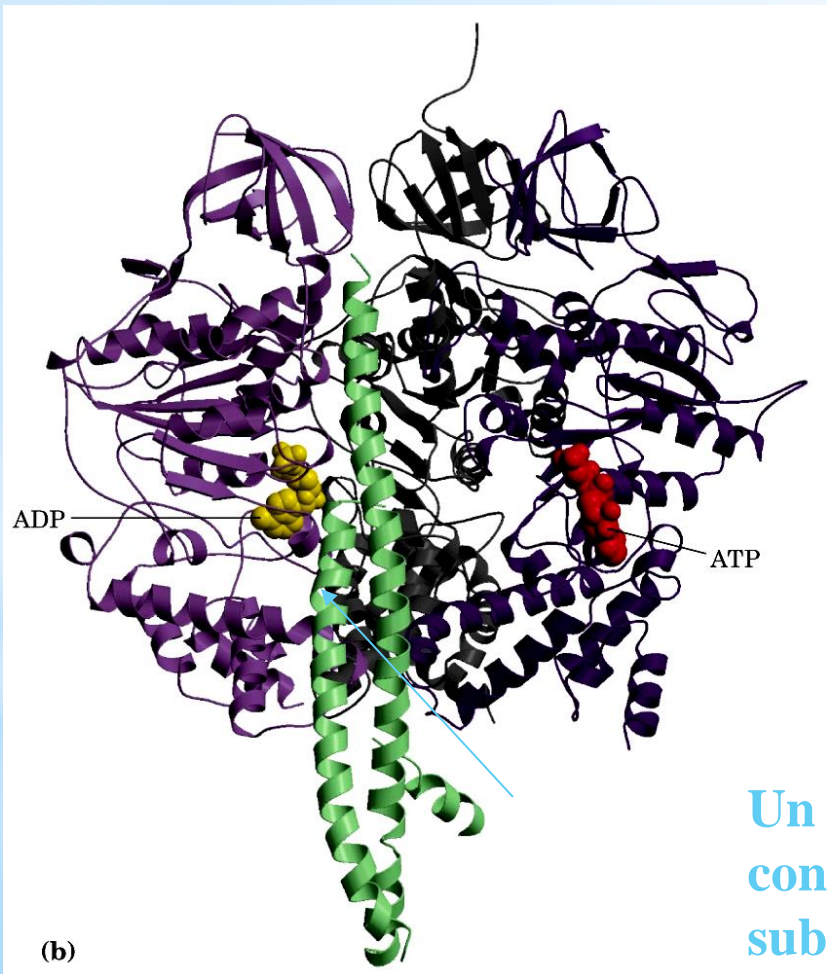
La maggior barriera energetica è determinata dal rilascio di ATP e non dalla sua formazione



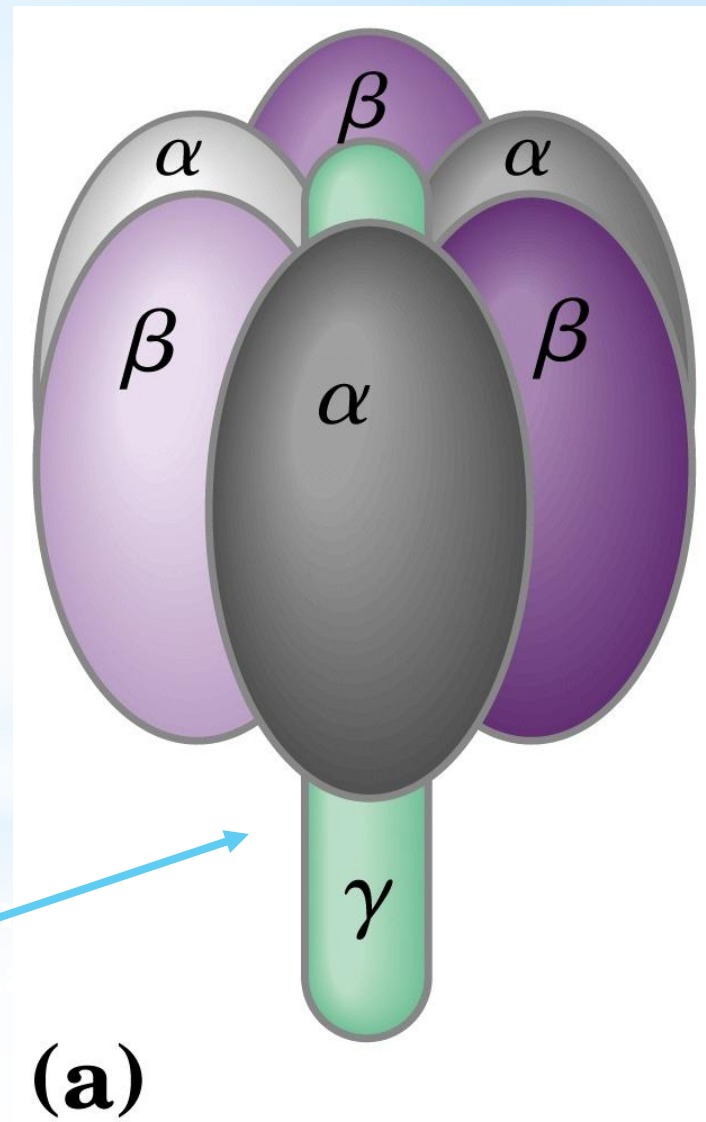
L'energia richiesta per il rilascio dell'ATP è fornita dalla forza motrice protonica

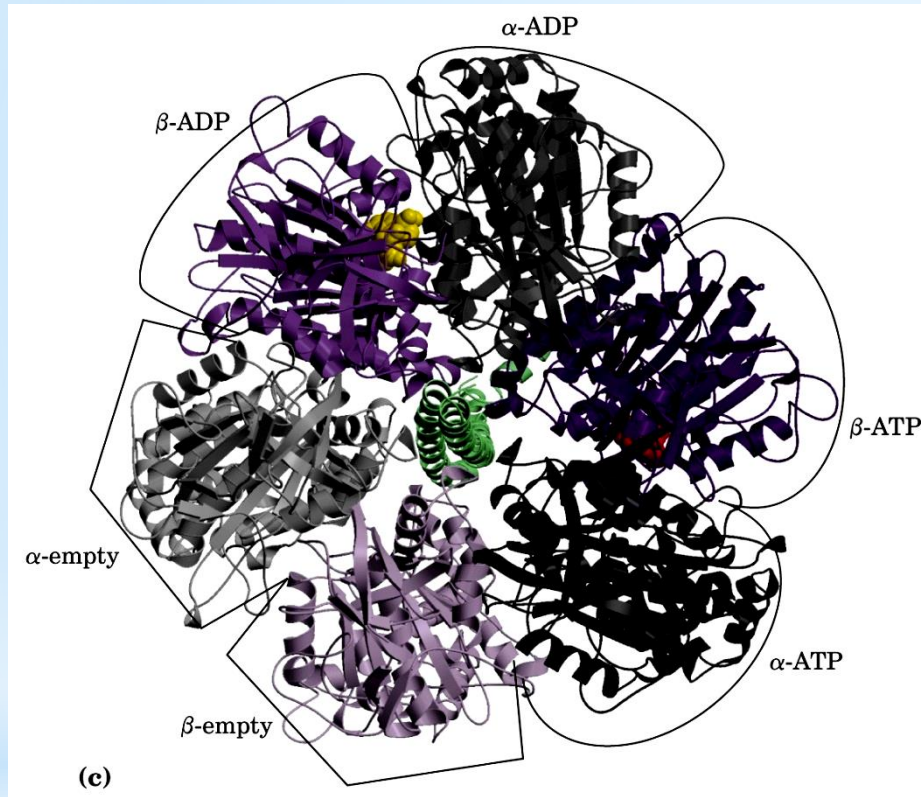
Struttura del complesso F_1

9 subunità: $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$



Un dominio è in
contatto con un
sub. β vuota





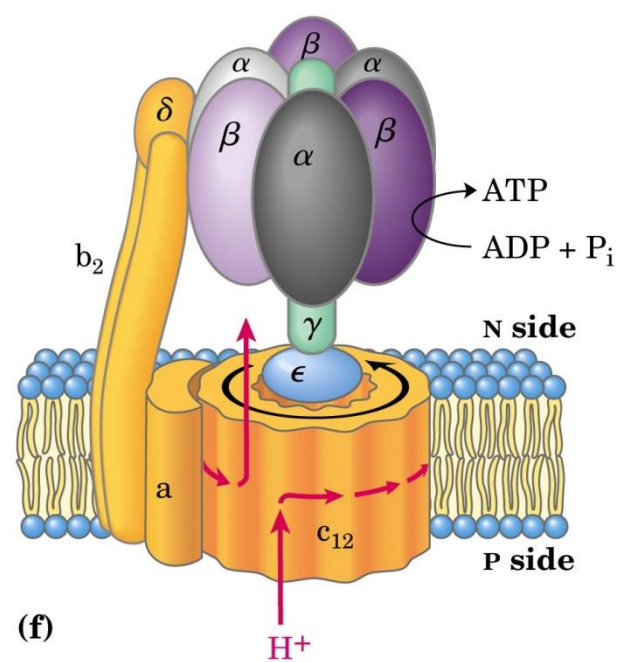
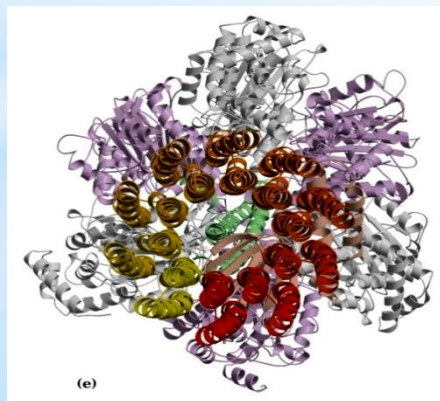
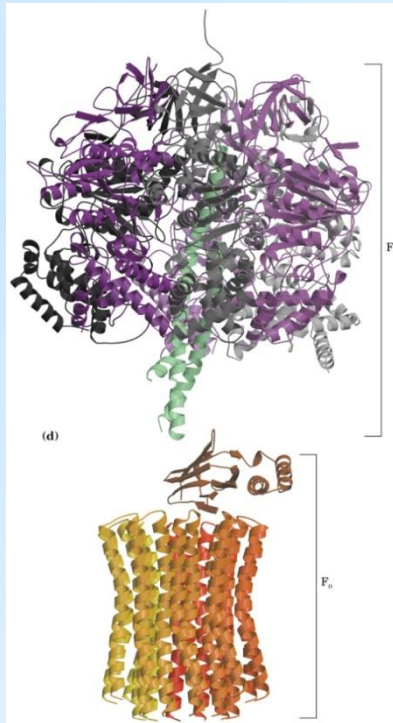
- Le sequenze aa delle sub. β sono uguali ma le conformazioni differiscono a causa dell'associazione con sub. γ .
- Le differenze si estendono ai loro siti di legame per l'ATP e ADP

β -ATP
 β -ADP
 β -vuota associata a un dominio della sub. γ

Questa differenza è di cruciale importanza per il meccanismo d'azione dell'intero complesso

Il complesso **F_o** costituisce il **CANALE PROTONICO** ed è composto da tre subunità **ab₂c₁₀₋₁₂**

*Eliche trans-membrana
perpendicolari al piano della
membrana disposte in cerchi
concentrici*

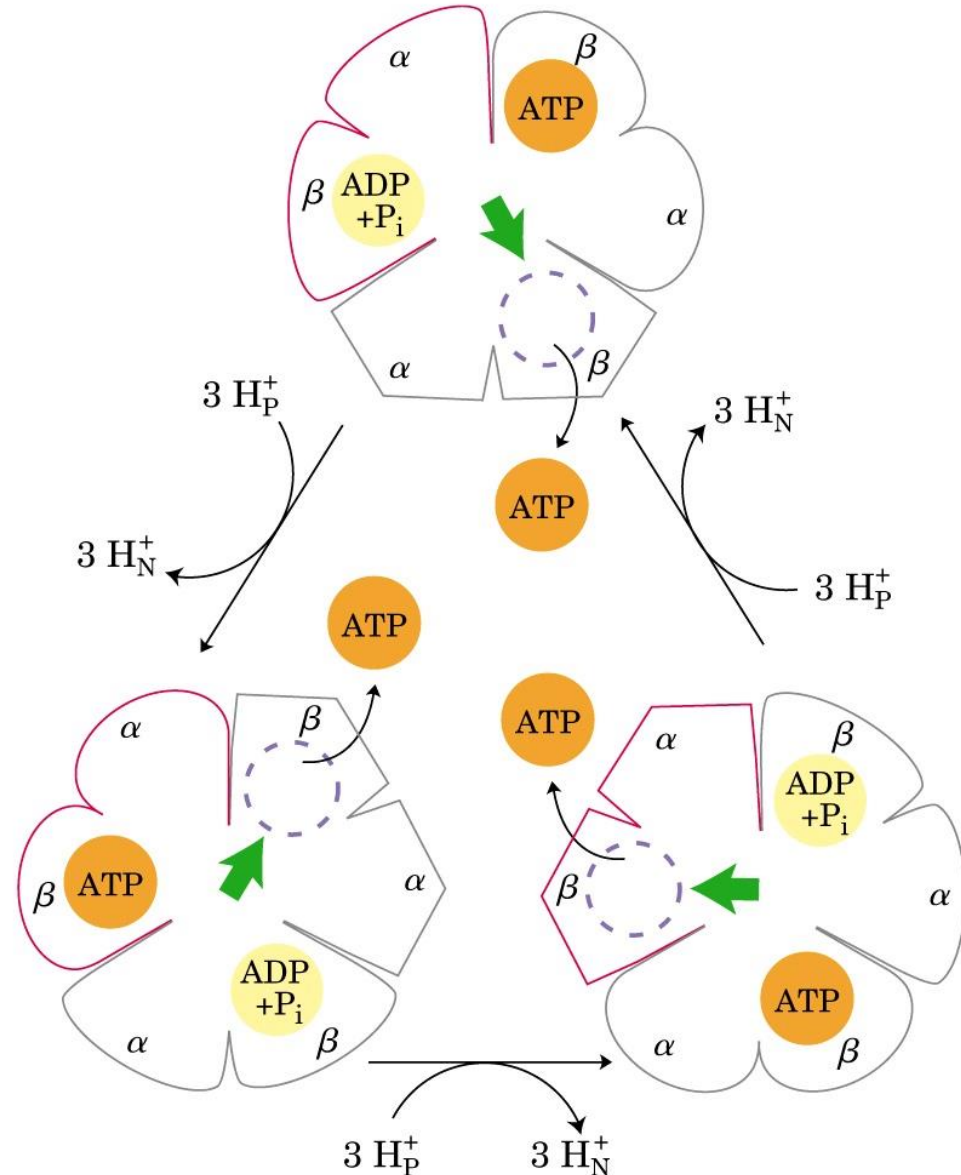


La catalisi rotazionale sta alla base del meccanismo di variazione di legame per la sintesi di ATP

(Paul Boyer)

I 3 siti attivi di F_1 catalizzano a turno la sintesi di ATP

La subunità γ passa al centro dello sferoide $\alpha_3\beta_3$. Ogni rotazione di 120° pone in contatto γ con una diversa subunità β e questo contatto costringe questa ad assumere la conformazione β -vuota. Le tre subunità β interagiscono tra loro in modo tale che quando una assume la conformazione β -vuota, la subunità vicina da un lato deve assumere la forma β -ADP e quella dall'altro lato la forma β -ATP.

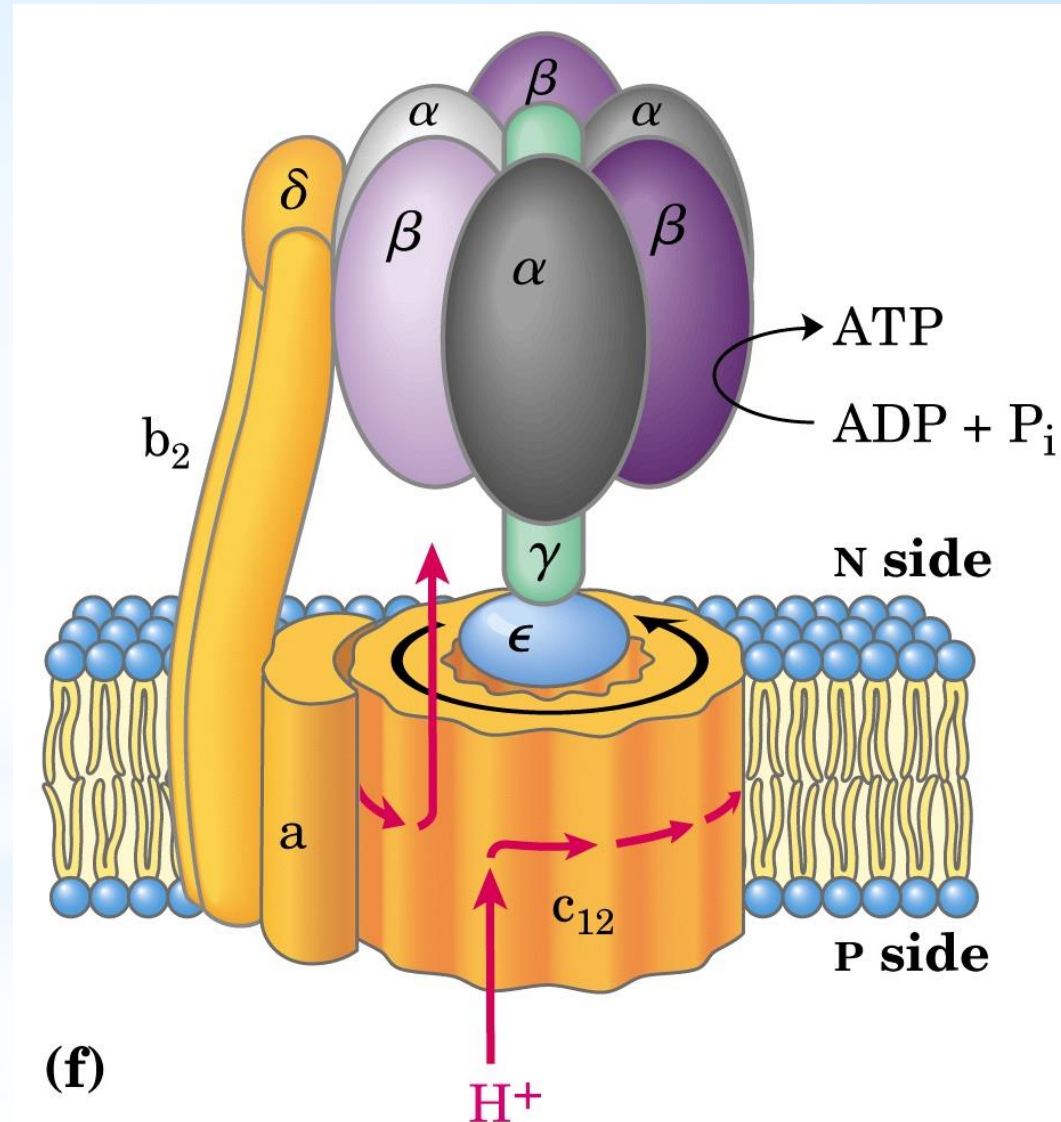


Modificazioni conformazionali

Dovute al passaggio di protoni attraverso la porzione Fo dell' ATPsintasi

Il passaggio di protoni provoca la rotazione del cilindro delle sub. c e della γ ad esso attaccata.

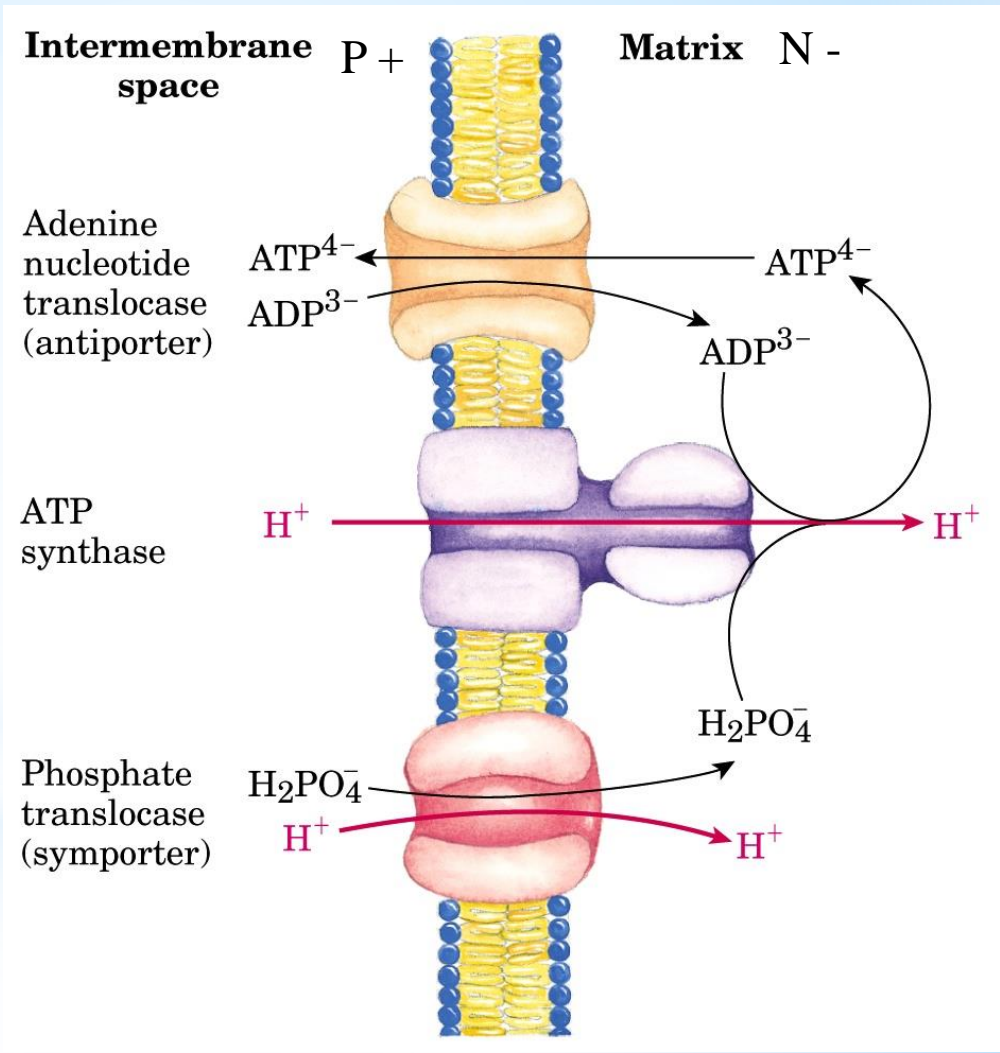
Ogni rotazione di 120° pone a contatto la sub. γ con una nuova sub. β costringendola ad assumere la conformazione β -vuota



La forza motrice protonica fornisce energia al trasporto attivo

FAVORITA DAL GRADIENTE ELETTROCHIMICO TRANS-MEMBRANA

FAVORITA DAL GRADIENTE PROTONICO TRANS-MEMBRANA



LA FOSFORILAZIONE PRODUCE LA MAGGIOR PARTE DI ATP NELLE CELLULE AEROBICHE

table 19–5

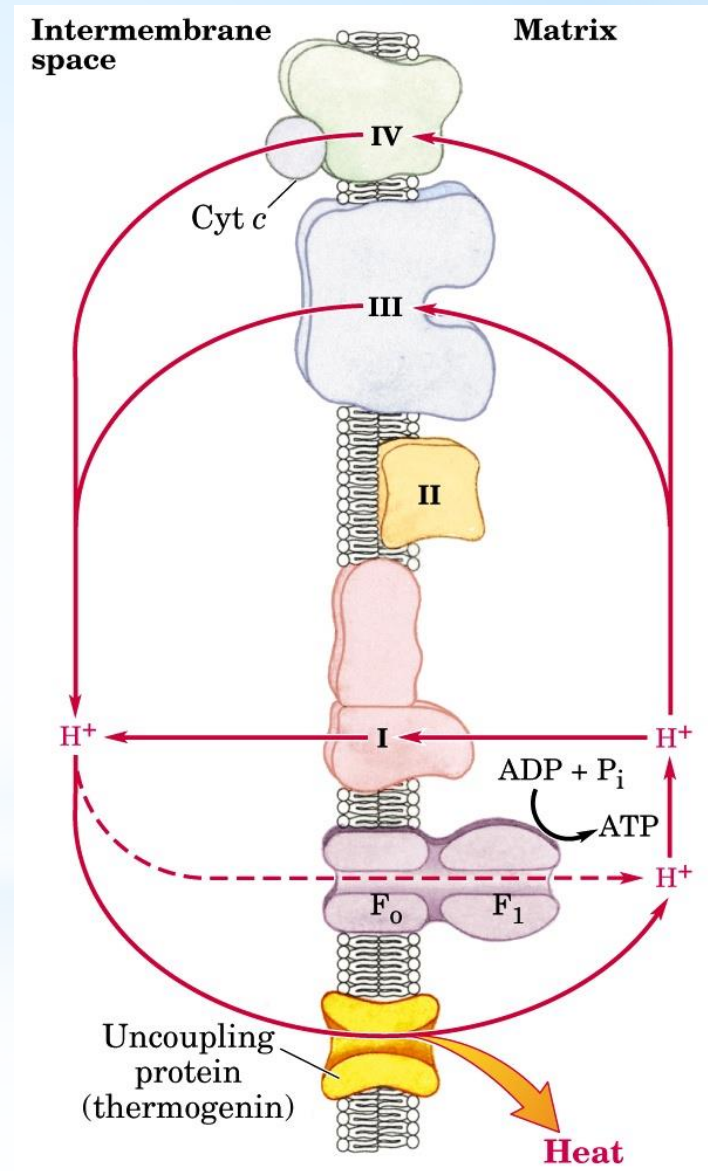
ATP Yield from Complete Oxidation of Glucose

Process	Direct product	Final ATP
Glycolysis	2 NADH (cytosolic)	3 or 5*
	2 ATP	2
Pyruvate oxidation (two per glucose)	2 NADH (mitochondrial matrix)	5
Acetyl-CoA oxidation in citric acid cycle (two per glucose)	6 NADH (mitochondrial matrix)	15
	2 FADH ₂	3
	2 ATP or 2 GTP	2
Total yield per glucose		30 or 32

*The number depends on which shuttle system transfers reducing equivalents into mitochondria.

MITOCONDRI DISACCOPPIANTI

TESSUTO BRUNO
ADIPOSO



REGOLAZIONE DELLA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

*Produzione di ATP adeguata alle necessità energetiche
cellulari*

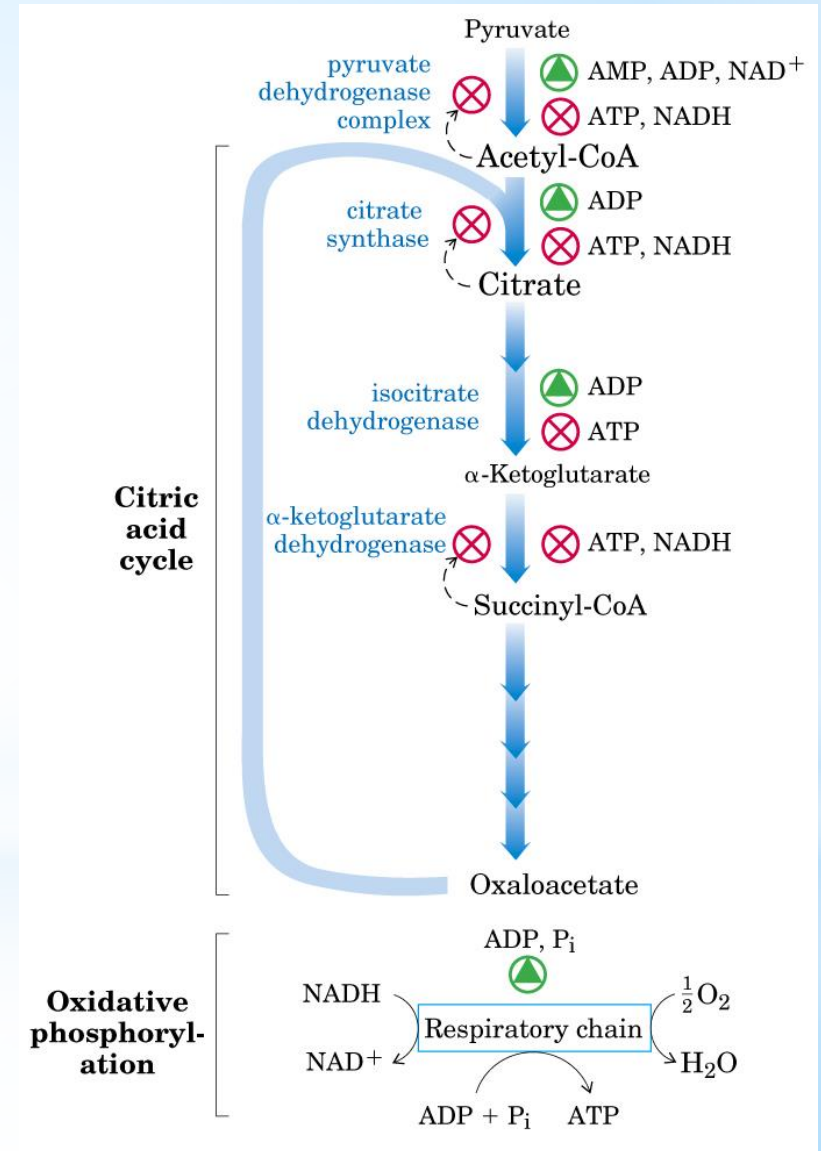
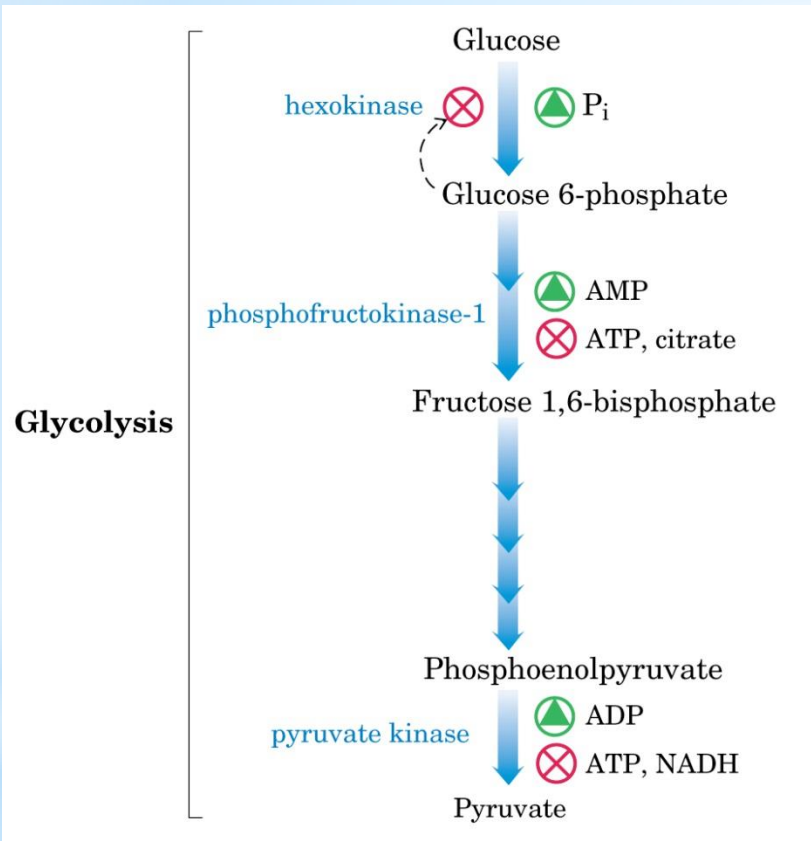
Velocità limitata dalla disponibilità del substrato (ADP)

La velocità di ossidazione delle sostanze nutrienti è regolata con una sensibilità ed una precisione così elevate, che il rapporto di azione di massa si modifica solo di poco nella maggior parte dei tessuti, anche se la richiesta energetica varia sensibilmente.

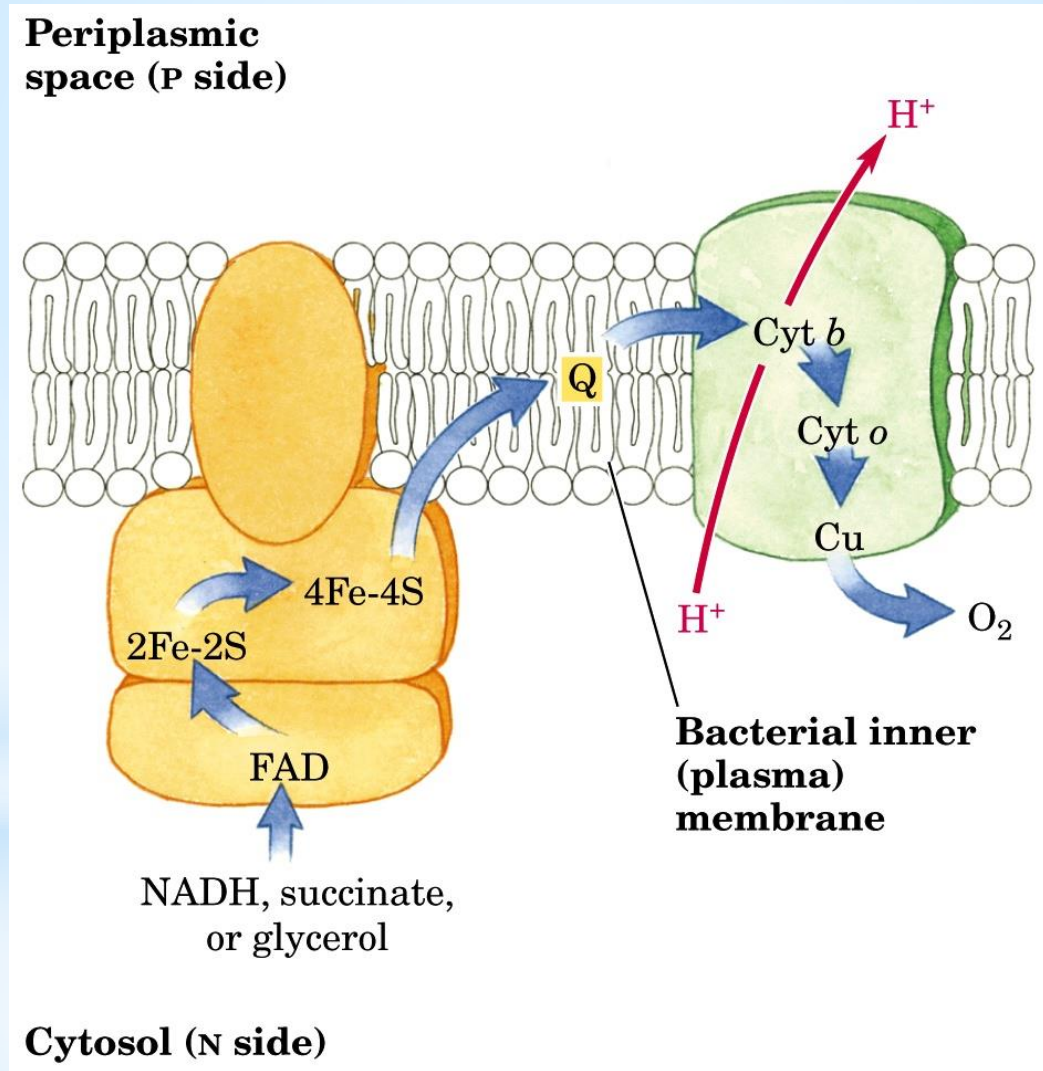
Rapporto di azione di massa

[ATP]/[ADP] [Pi]

Le vie cataboliche sono tutte regolate dall'ATP e dall'ADP



La catena respiratoria batterica



La rotazione dei flagelli batterici è favorita dalla forza motrice protonica

