



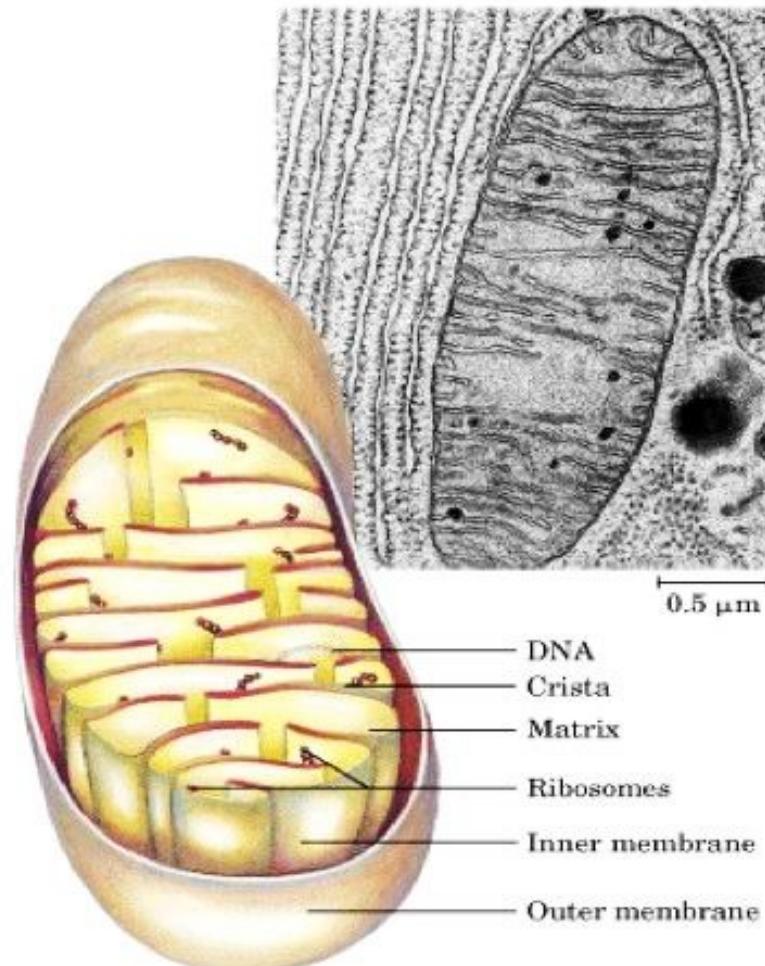
Trasporto degli  
elettroni e  
fosforilazione  
ossidativa

## Perché la struttura mitocondriale è importante nella produzione di ATP?

La produzione di ATP nei mitocondri è il risultato della fosforilazione ossidativa, in cui l'ADP è fosforilato ad ATP e genera la maggior parte di ATP associato all'ossidazione completa di glucosio.

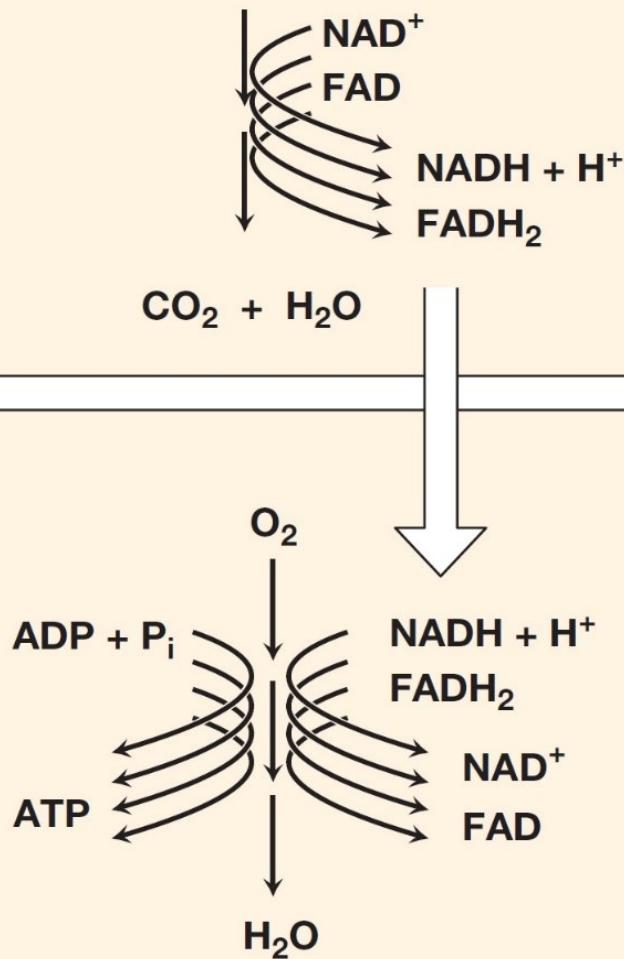
La produzione di ATP nel corso della fosforilazione ossidativa (processo endoergonico) è distinta dal trasporto degli elettronni all'ossigeno (processo esoergonico).

Le reazioni della catena di trasporto degli elettronni sono fortemente legate le une alle altre e sono strettamente accoppiate alla sintesi di ATP.



# Metabolismo

Carboidrati  
Acidi grassi  
Amminoacidi



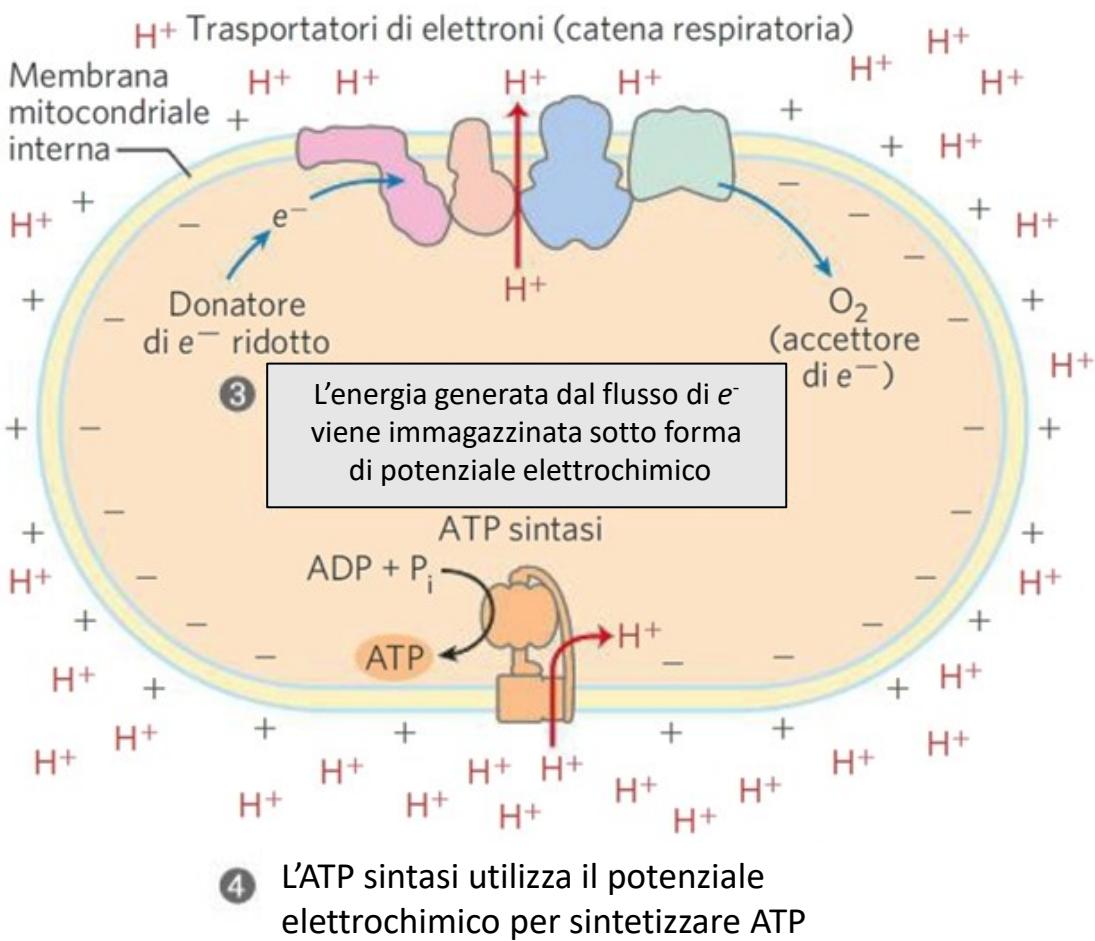
## Fosforilazione ossidativa

- Le molecole ricche di energia sono metabolizzate in una serie di reazioni di ossidazione che portano alla formazione netta di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.
- Gli intermedi metabolici di queste reazioni donano elettroni a specifici coenzimi, quali il NAD<sup>+</sup> o FAD per generare le corrispondenti forme ridotte, ricche di energia, il NADH e il FADH<sub>2</sub>, essi possono donare una coppia di elettroni alla catena di trasporto degli elettroni.

# Meccanismo chemiosmotico per la sintesi di ATP nei mitocondri

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

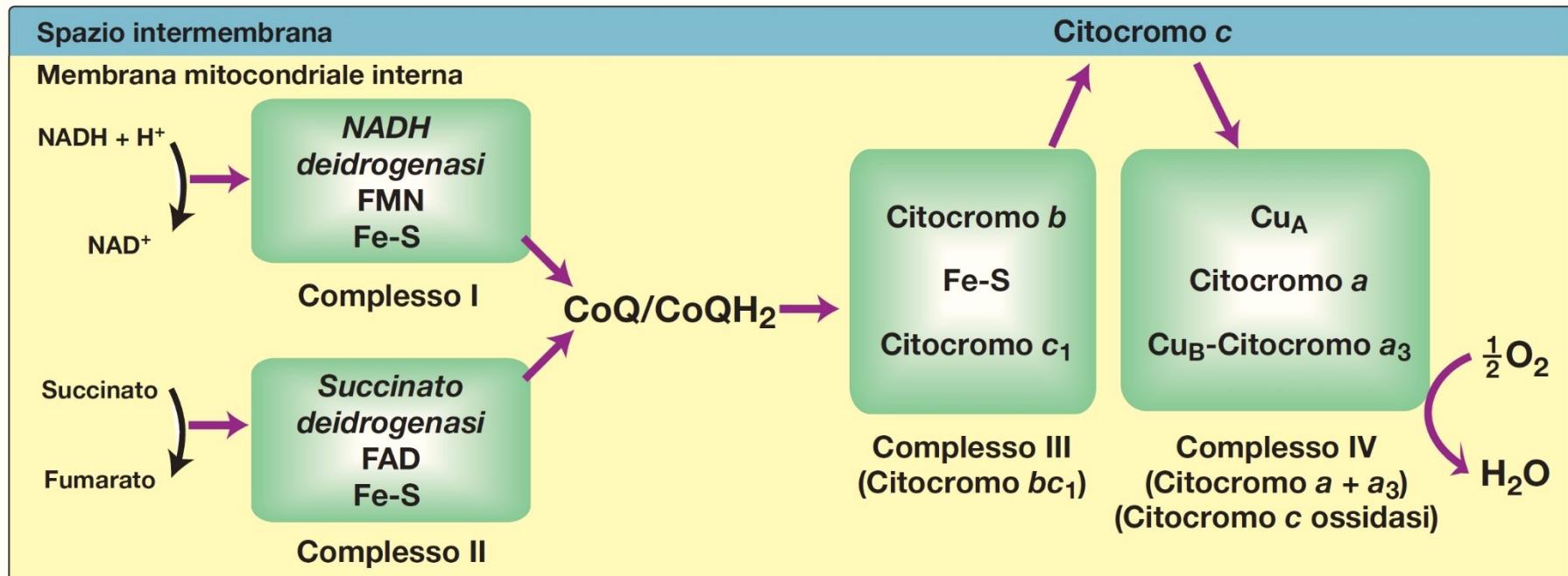
- ② I trasportatori di  $e^-$  pompano all'esterno gli  $H^+$  quando gli  $e^-$  fluiscano verso l' $O_2$



- 1) una serie di trasportatori attraverso cui gli elettroni fluiscano fino all'ossigeno.
- 2) produzione di gradiente di protoni mediante un trasporto endoergonico.
- 3) un complesso proteico capace di utilizzare il gradiente protonico per formare ATP (ATP sintasi)

L'attività della catena porta a pompare protoni (ioni  $H^+$ ) attraverso la membrana mitocondriale interna, creando un gradiente di pH chiamato gradiente protonico che rappresenta l'energia potenziale immagazzinata e fornisce le basi del meccanismo di accoppiamento (accoppiamento chemiosmotico)

## Catena di trasporto degli elettronni con i 4 complessi della catena respiratoria.



Gli elettroni sono trasferiti dal coenzima Q ad una serie di proteine chiamate citocromi fino ad arrivare all'ossigeno.

Nella fosforilazione ossidativa vi sono tre tipi di trasferimento degli elettroni:

- 1) trasferimento diretto degli elettroni come nella riduzione di Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>
- 2) trasferimento di un atomo di idrogeno (H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>)
- 3) trasferimento di uno ione idruro (:H<sup>-</sup>), che porta con sé due elettroni.

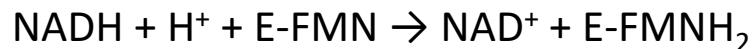
Nei citocromi ridotti il ferro è nello stato di ossidazione Fe<sup>2+</sup>, nei citocromi ossidati il ferro è nello stato di ossidazione Fe<sup>3+</sup>

# Il complesso I: dal NADH all'ubichinone ossidoreduttasi

Reazioni catalizzate dal **complesso I**,  
NADH:ubichinone ossidoreduttasi

Catalizza due processi accoppiati e simultanei:

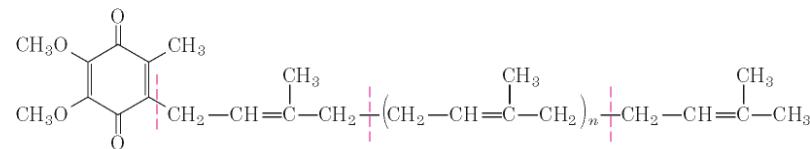
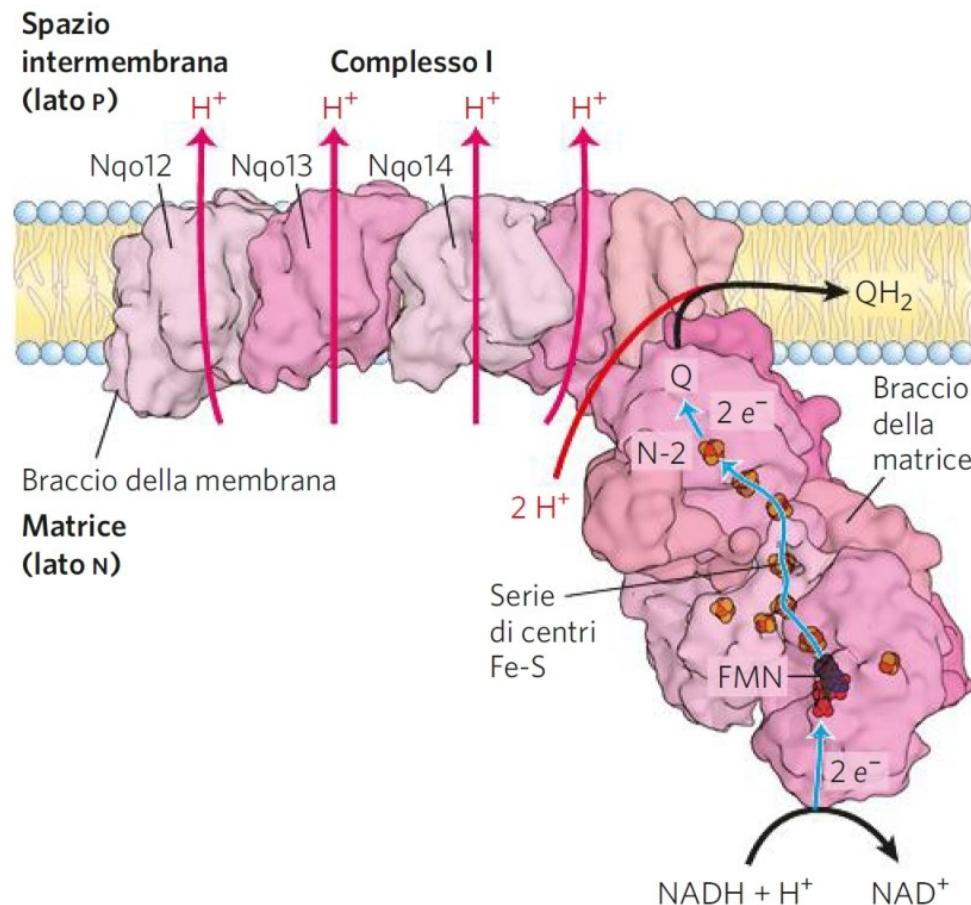
1) il trasferimento esoergonomico di uno ione idruro dal NADH all'FMN:



Dal FMN 2 e<sup>-</sup> passano attraverso una serie di centri Fe-S che dona i suoi e al coenzima Q che si riduce a CoQH<sub>2</sub> che diffonde nel doppio strato lipidico.

2) il trasferimento endoergonomico di 4 protoni dalla matrice allo spazio intermembrana:

il trasferimento del CoQH<sub>2</sub> nello strato lipidico guida l'espulsione di 4 protoni dalla matrice per ogni coppia di e<sup>-</sup>.



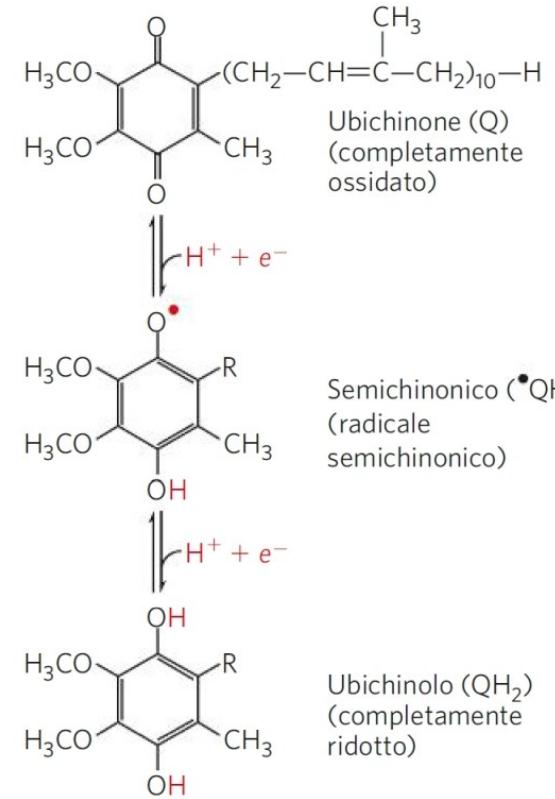
CoQ<sub>10</sub> is an essential component of the electron transport chain within the mitochondria.

## Il Coenzima Q

Il CoQ mitocondriale si trova inserito nel doppio strato lipidico della membrana interna dove diffonde liberamente tra i complessi respiratori.

La molecola presenta tre diversi stati di ossidazione:

- completamente ossidato, Q (ubichinone)
- parzialmente ridotto, il radicale semichinonico  $\text{QH}^\bullet$
- completamente ridotto,  $\text{QH}_2$  (ubichinolo)

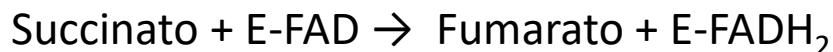


L'Ubichinone (Q) viene ridotto a radicale libero semichinonico ( $\text{QH}^\bullet$ ) quando riceve un solo elettrone e la riduzione di quest'ultimo con un secondo elettrone porta alla formazione dell'ubichinolo (idrochinone,  $\text{QH}_2$ ).

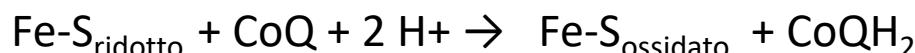
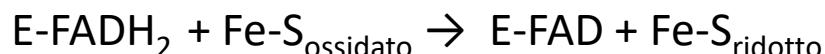
Il CoQ rappresenta un punto di raccolta per gli elettroni provenienti da diversi complessi deidrogenasici (non solo i Complessi I e II, ma anche la glicerolo 3- fosfato deidrogenasi), che poi trasferisce al Complesso III.

Reazione catalizzata dal **complesso II**,  
succinato-CoQ ossidoreduttasi  
(Succinato deidrogenasi)

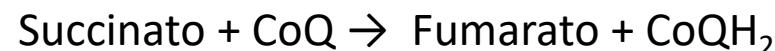
### Prima tappa



### Seconda e terza tappa

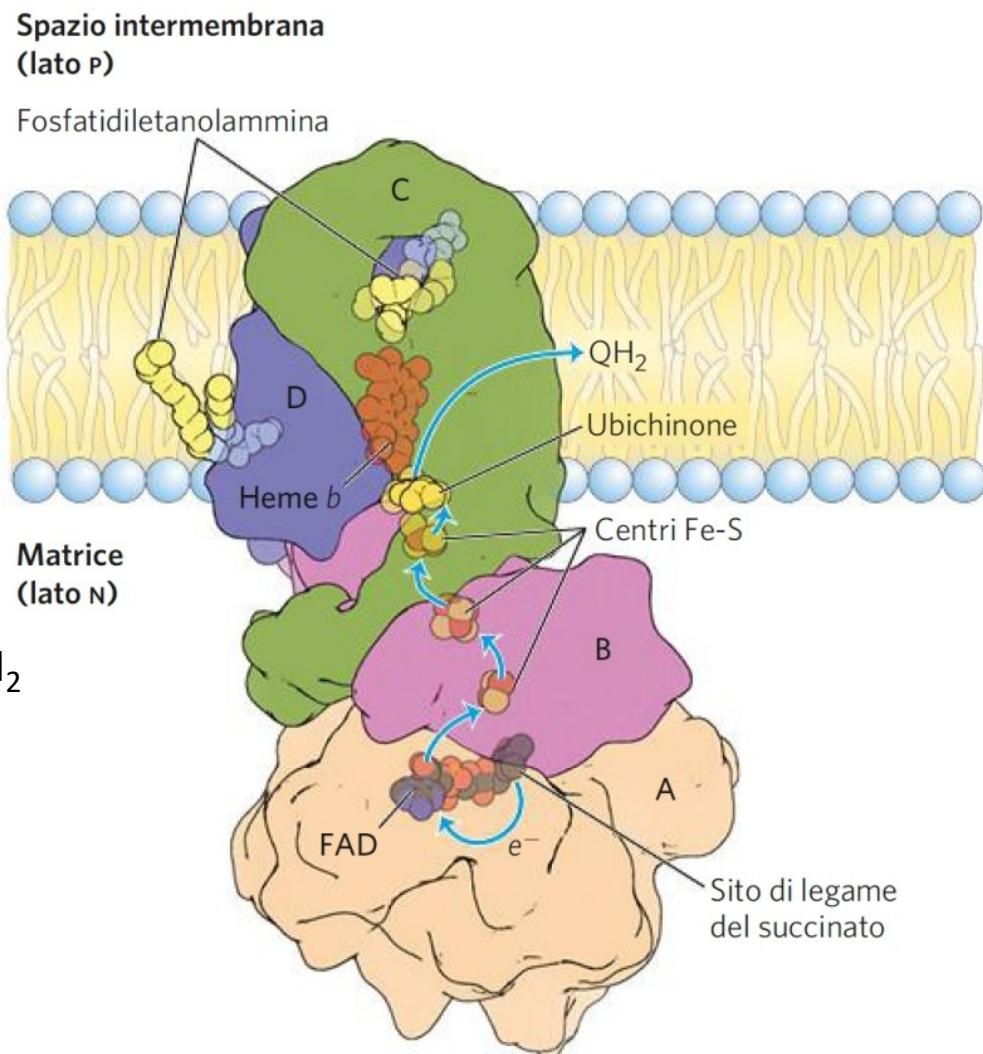


### La reazione globale:



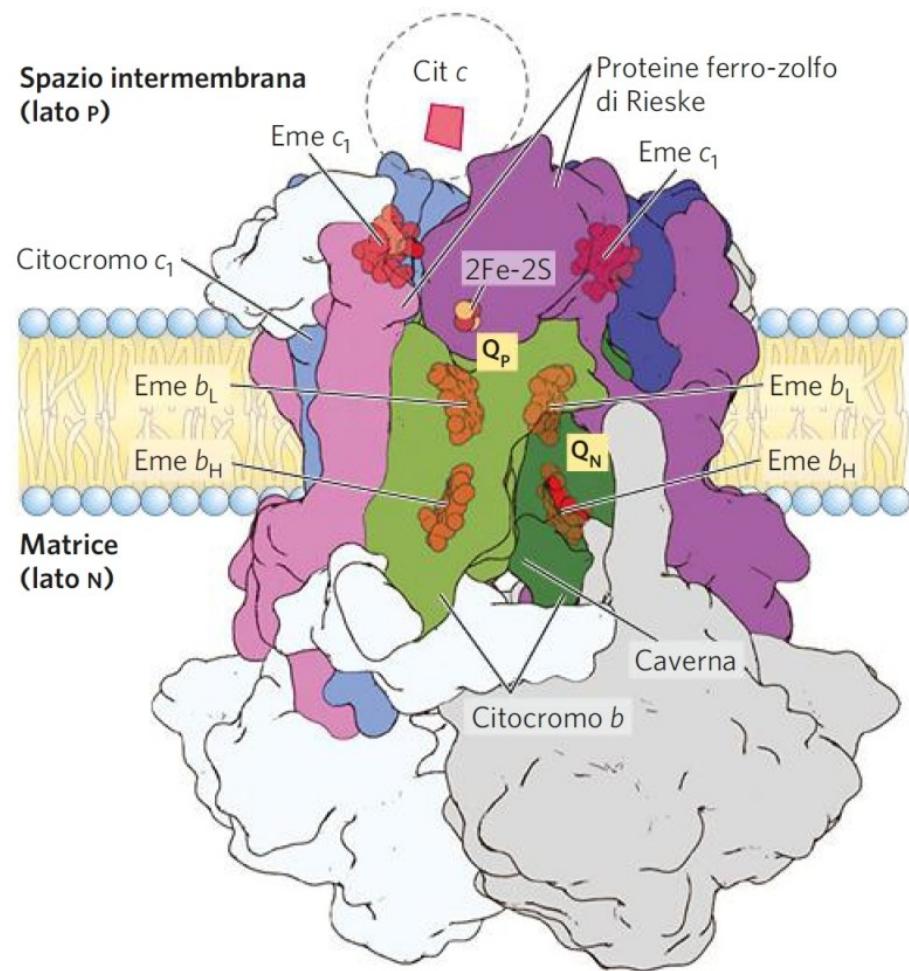
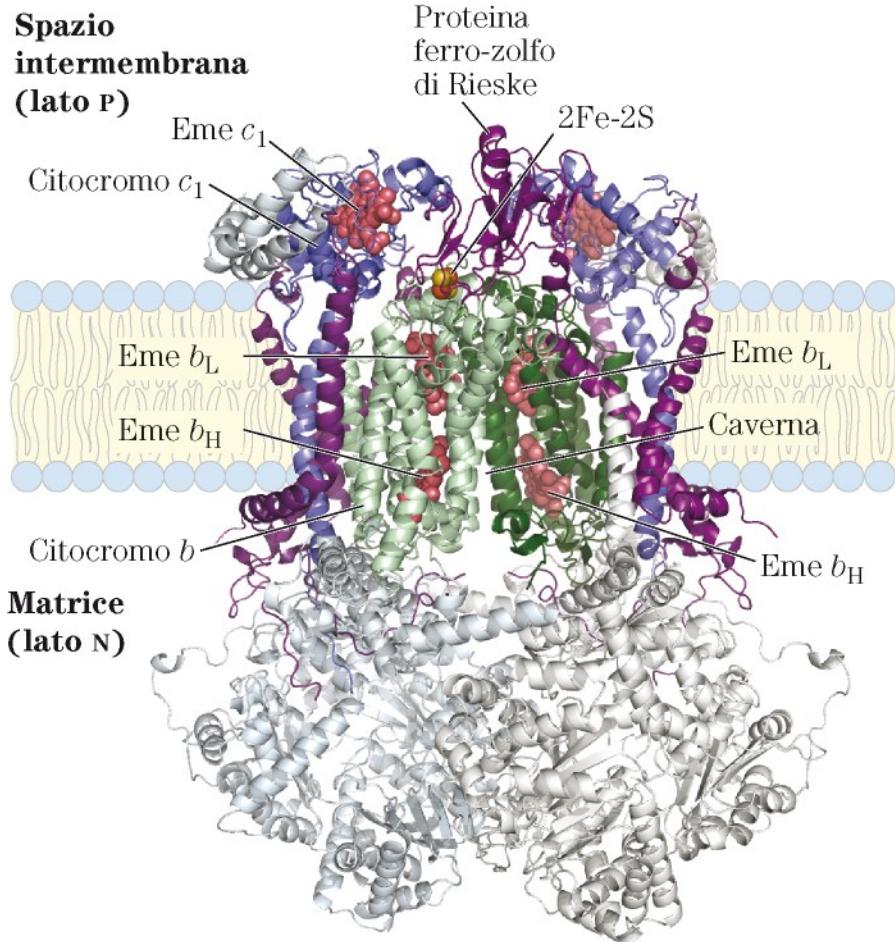
$$\Delta G^\circ = -13,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

## Il complesso II: dal succinato all'ubichinone



Il complesso II non è accompagnato da un pompaggio  
di protoni attraverso la membrana interna.

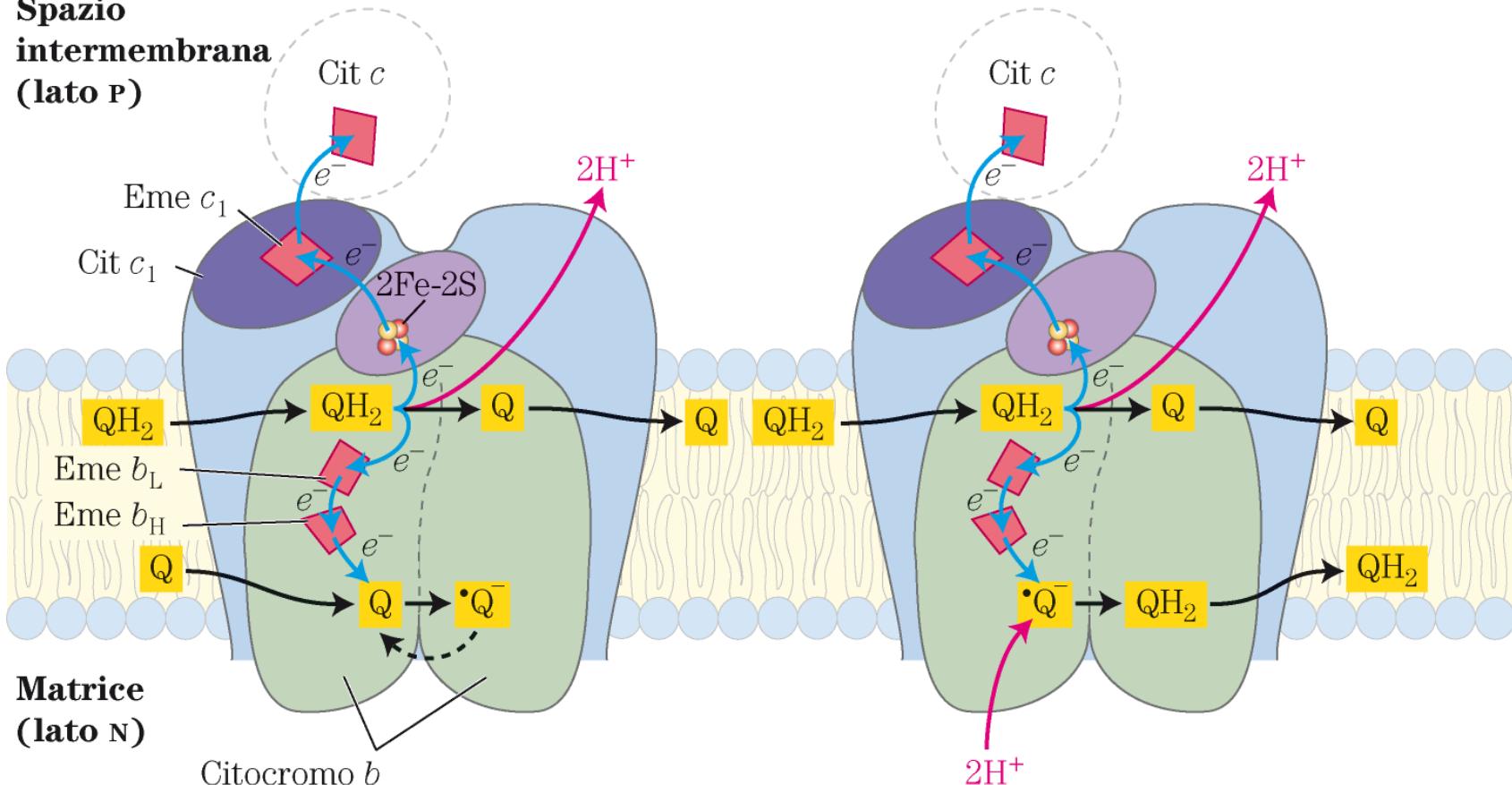
# Il complesso del citocromo $bc_1$ (Complesso III) o ubichinone:citocromo c ossidoreduttasi



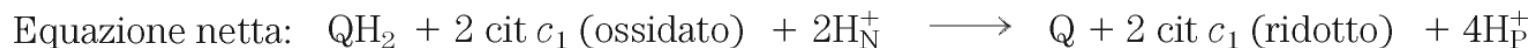
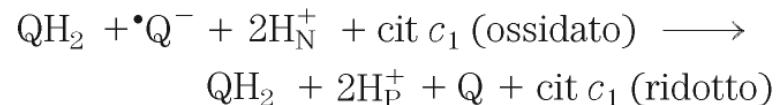
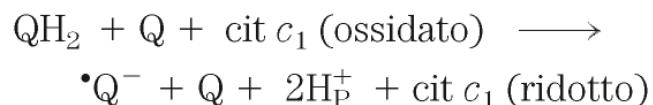
Il complesso III è un dimero, ogni monomero è composto da tre proteine fondamentali per l'azione del complesso: il citocromo  $b$ , il citocromo  $c_1$  e la proteina Fe-S di Rieske.

## Il ciclo Q, mostrato in due fasi

**Spazio intermembrana (lato P)**



**Matrice (lato N)**

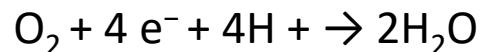


## il Complesso IV: dal citocromo c all'O<sub>2</sub>

Reazione catalizzata dal complesso IV,  
Citocromo c ossidasi

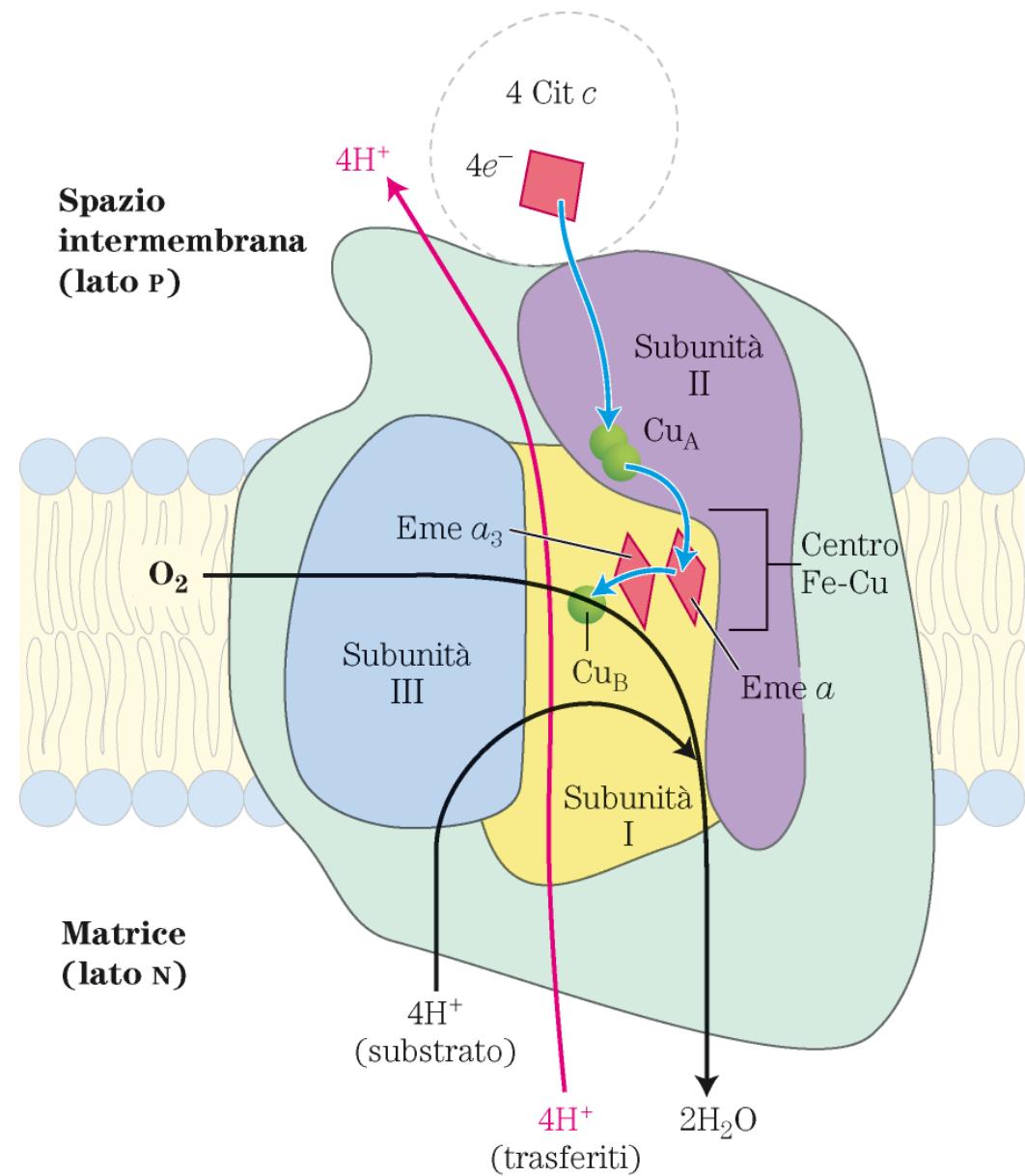
L'O<sub>2</sub> si lega al Fe del citocromo a<sub>3</sub> e al rame Cu<sub>B</sub> all'interno del complesso IV.

Il complesso IV riceve 4 elettroni in totale (dal citocromi c), e insieme a 4 protoni della matrice riduce l'O<sub>2</sub> a 2 molecole di H<sub>2</sub>O:

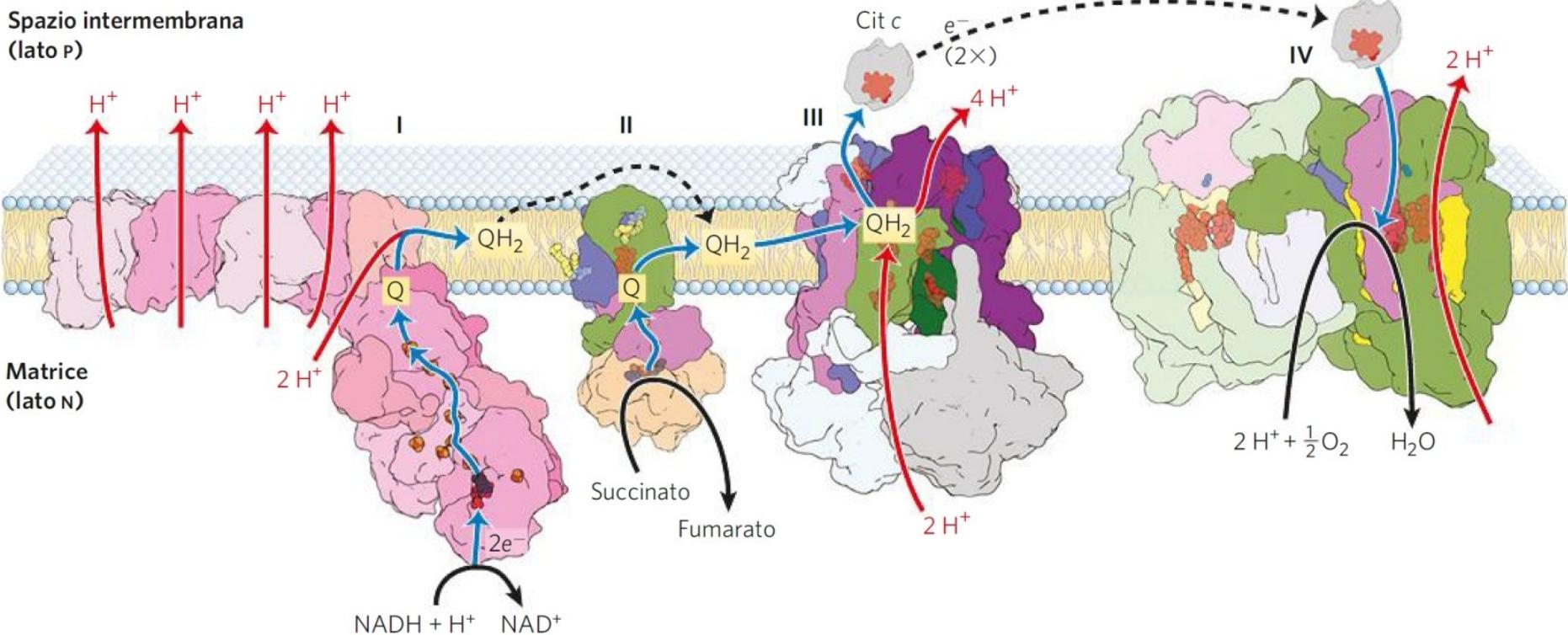


Il citocromo c è mobile e solubile nello spazio intermembrana, quindi non fa parte di un complesso fisso. La sua mobilità permette flessibilità e velocità del flusso elettronico.

Il complesso IV pompa 4 protoni nello spazio intermembrana per ogni O<sub>2</sub> ridotta (2 protoni per ½ di O<sub>2</sub> ridotta ad H<sub>2</sub>O).



# Flusso degli elettroni e dei protoni attraverso i quattro complessi della catena respiratoria



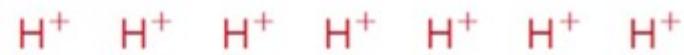
Per ogni coppia di e<sup>-</sup> trasferiti all'O<sub>2</sub> vengono trasferiti dalla matrice allo spazio di intermembrana, 4 protoni dal complesso I, 4 dal complesso III e 2 dal complesso IV. L'energia conservata in questo gradiente, detta forza motrice protonica è formata da due componenti:

- 1) l'energia potenziale chimica (differenza di concentrazione di H<sup>+</sup>)
- 2) l'energia del potenziale elettrico che si genera nella separazione delle cariche.

Quando i protoni fluiscano spontaneamente secondo il loro gradiente elettrochimico, questa energia viene resa disponibile per produrre ATP

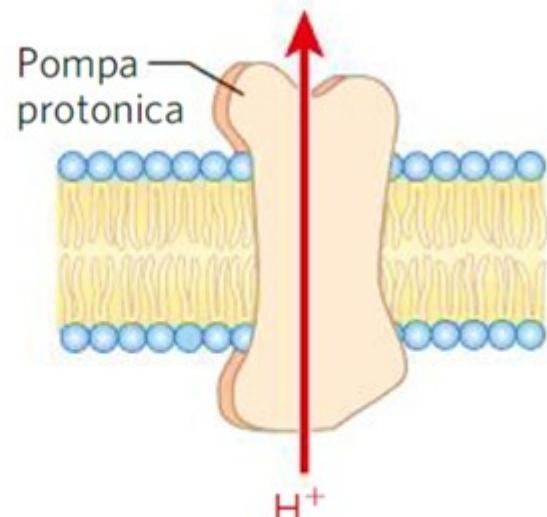
**Lato P**

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



La forza motrice protonica:

La membrana mitocondriale interna separa due compartimenti a diversa concentrazione di  $H^+$ , con differenze sia nella concentrazione chimica di  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) sia nella distribuzione delle cariche attraverso la membrana ( $\Delta\psi$ ). L'effetto netto è la forza motrice protonica ( $\Delta G$ ).



**Lato N**

$$[H^+]_N = C_1$$



$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi$$

$$= 2,3RT \Delta pH + F\Delta\psi$$

Come può un gradiente di concentrazione di protoni dare origine alla formazione di ATP?

Qual è il fattore di accoppiamento nella fosforilazione ossidativa?

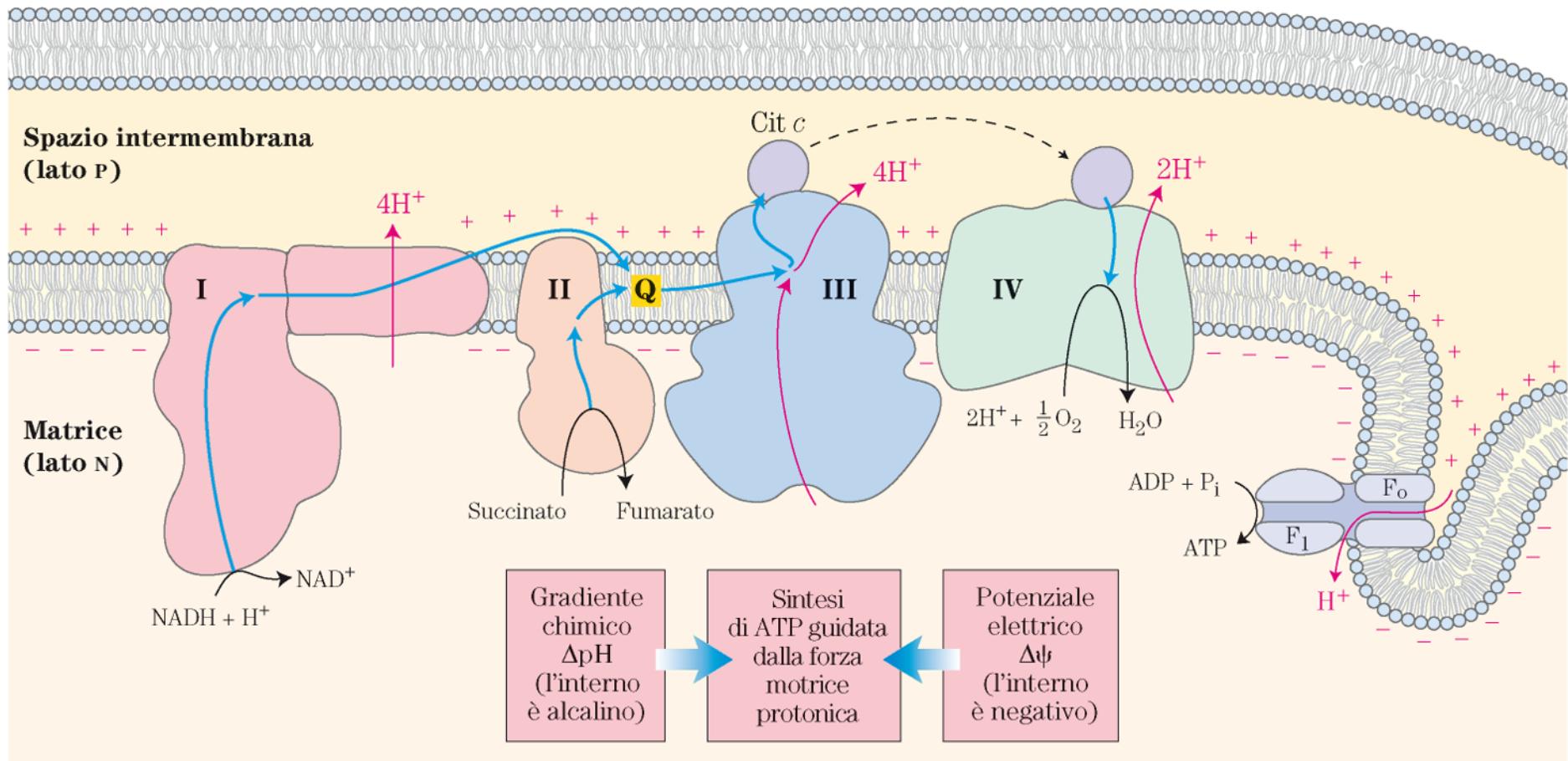
Questa funzione è svolta da una proteina oligomerica complessa distinta dal trasporto degli elettoni.

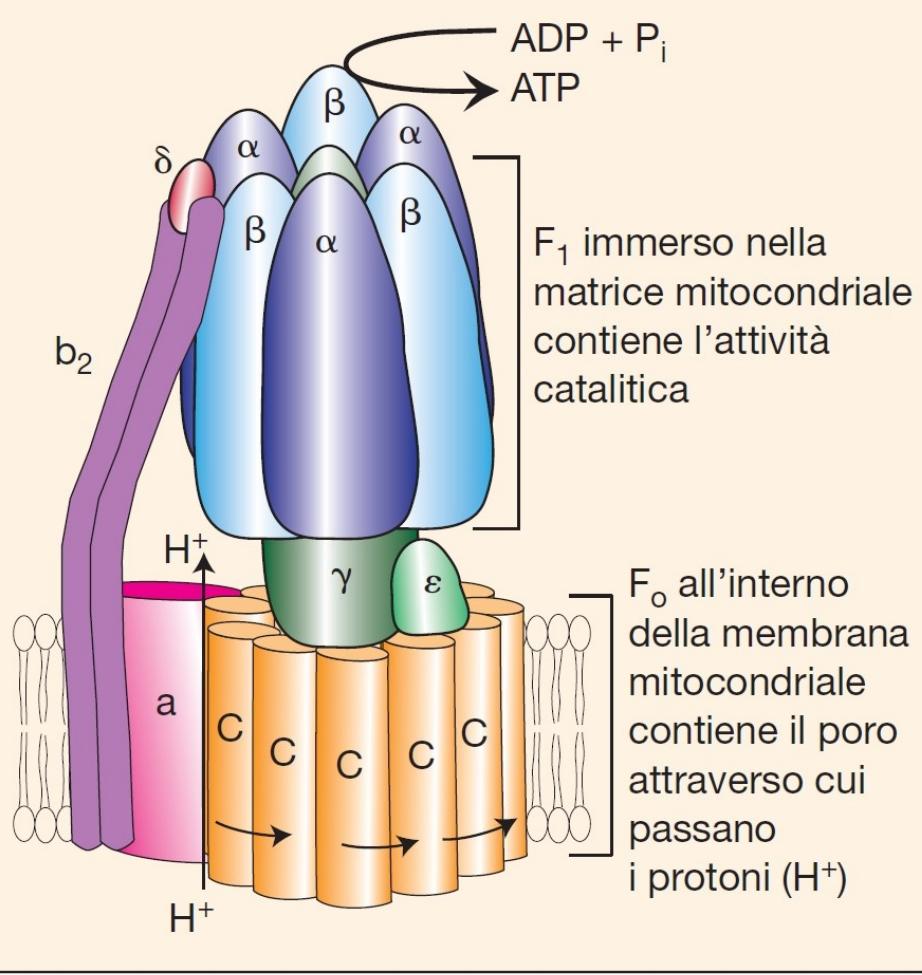
La proteina completa attraversa la membrana mitocondriale interna per tutto il suo spessore e protrude anche nella matrice.



fotografia al microscopio elettronico delle protrusioni nella matrice di un mitocondrio

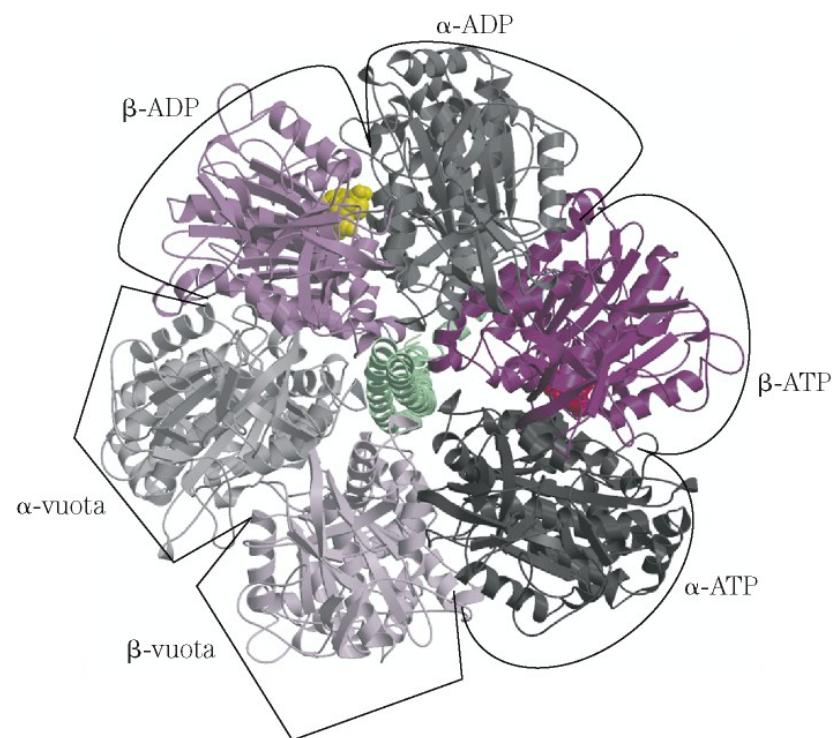
# Sintesi di ATP: modello chemiosmotico





Il flusso di protoni attraverso il poro  $F_0$  provoca la rotazione del cilindro costituito dalle subunità  $c$  e  $\gamma$ . Ogni rotazione è di circa  $120^\circ$  e pone  $\gamma$  in contatto con una diversa subunità  $\beta$  e questo contatto costringe la subunità  $\beta$  ad assumere la conformazione  $\beta$  vuota. Una rotazione completa dell'anello  $c$  produce tre molecole di ATP.

## Componenti $F_1$ e $F_0$ dell'ATP sintasi



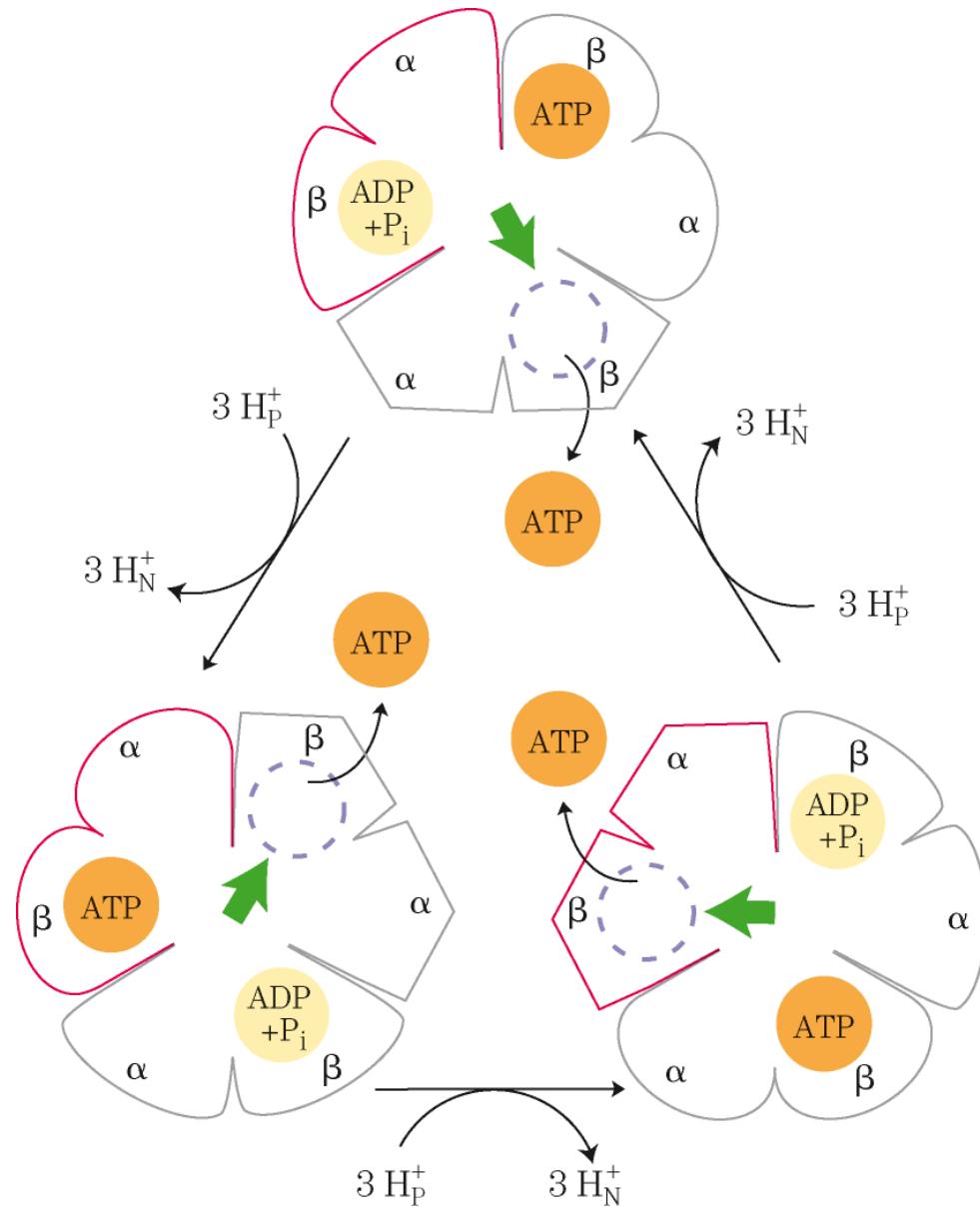
Le subunità  $a$ ,  $b$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  costituiscono lo statore del motore e le subunità  $c$ ,  $\gamma$  ed  $\epsilon$  formano il rotore. Il flusso dei protoni attraverso la struttura fa girare il rotore e determina il ciclo di cambiamenti conformazionali in  $\alpha$  e  $\beta$  che sintetizzano l'ATP.

## Modello di “alterazione di legame” dell’ATP sintasi

Il complesso F1 ha 3 siti non equivalenti per il legame dell’ADP, uno per ciascuna coppia di subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . In ogni momento uno di questi siti si trova nella conformazione  $\beta$ -ATP (affinità per l’ATP), il secondo si trova nella conformazione  $\beta$ -ADP (lega debolmente l’ATP), mentre il terzo è nella conformazione vuota (lega molto debolmente).

La forza motrice protonica provoca la rotazione dello stelo centrale (subunità  $\gamma$  indicata con la freccia verde) che viene a contatto con ciascuna subunità  $\alpha\beta$ .

Il contatto genera una modificazione conformazionale cooperativa in cui il sito  $\beta$ -ATP assume conformazione vuota e l’ATP si dissocia; il sito  $\beta$ -ADP assume la conformazione  $\beta$ -ATP che promuove la sintesi di ATP; il sito  $\beta$ -vuoto assume conformazione  $\beta$ -ADP e lega ADP +  $P_i$  provenienti dal solvente.



## Modello che spiega la rotazione dell'anello c indotta dai protoni.

La subunità a è stazionaria mentre anello c ruota.

Le singole subunità presenti nell'anello c sono disposte in cerchio e in ogni istante solo alcune di esse si trovano a contatto con la subunità a.

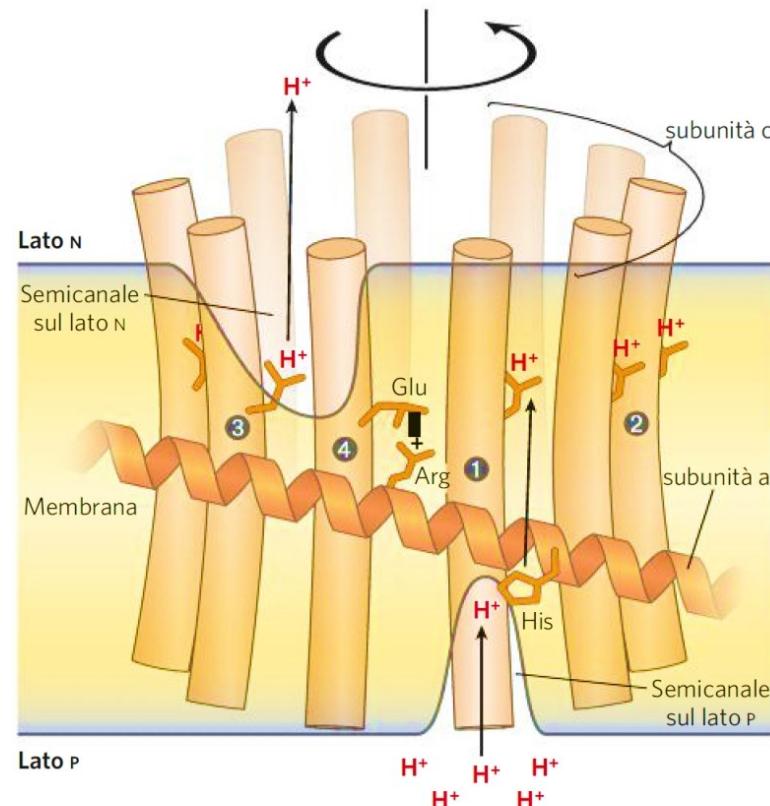
I protoni diffondono attraverso la membrana lungo una via costituita dalle subunità a e c.

La protonazione transitoria di un residuo di Glu in ciascuna subunità c induce dei cambiamenti conformazionali che provocano la rotazione e trasferiscono i protoni tra i semicanali idrofili posizionati su ciascun lato della membrana.

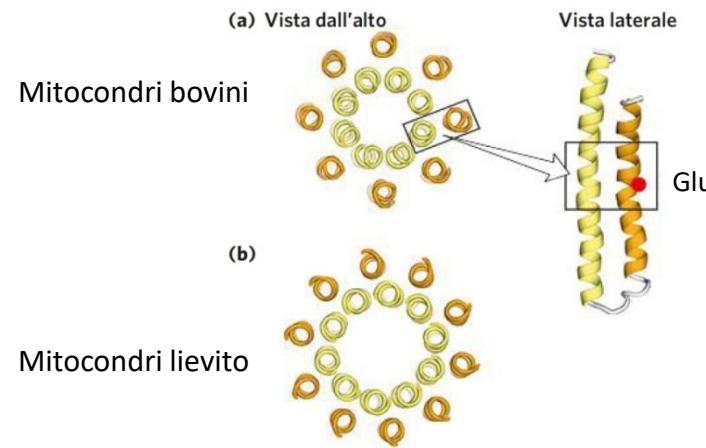
Il movimento rotatorio antiorario del anello c è reso unidirezionale dalla grande differenza nella concentrazione protonica attraverso la membrana.

Il numero di protoni che deve essere trasferito per produrre una rotazione completa dell'anello c è uguale al numero delle subunità c presenti nell'anello, (nel lievito è formato da 10 subunità). Nel lievito per fare una rotazione completa di 360° del rotore servono 10 protoni (uno per ciascuna subunità c).

Si stima che la velocità di rotazione nei mitocondri intatti sia di circa 6000 giri al minuto, l'equivalente di 100 rotazioni al secondo.



Un modello che spiega la rotazione dell'anello c



Un protone entra dal canale periplasmico della subunità a (fissa) e si legano a specifici residui amminoacidici (acido glutammico o aspartico) presenti su ciascuna subunità c dell'anello.

Il legame neutralizza la carica negativa, il residuo diventa neutro (non più carico negativamente).

Ciò consente alla subunità c di muoversi all'interno della membrana lipidica senza repulsioni elettrostatiche, il protone viene rilasciato perché il gradiente di concentrazione lo favorisce.

Il rilascio ristabilisce la carica negativa sul residuo e la subunità non può più ruotare liberamente finché non riceve un altro protone.

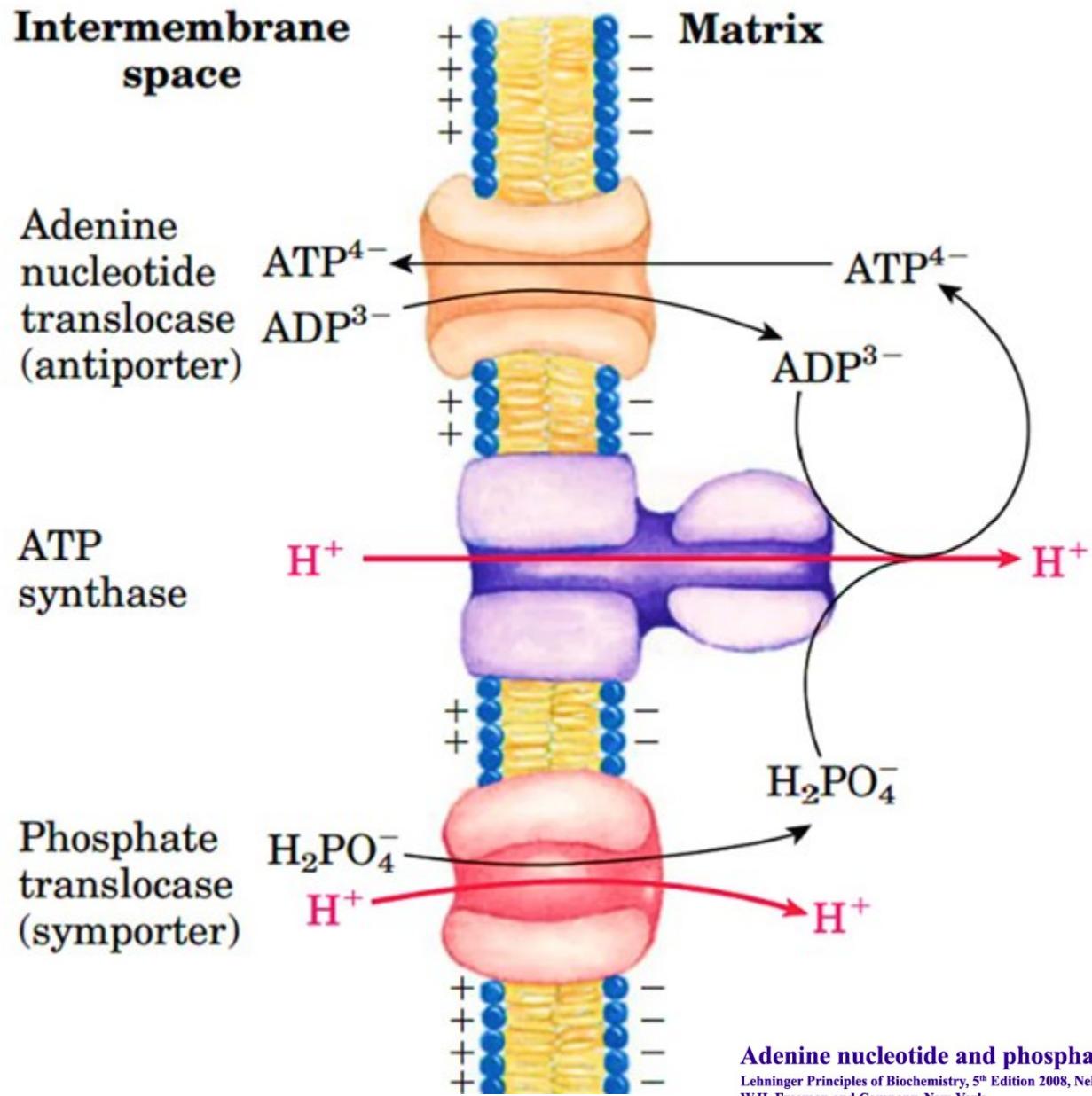
Ogni passaggio di  $H^+$  genera una rotazione dell'anello, che a sua volta fa girare la subunità  $\gamma$  nel dominio  $F_1$ .

Questa rotazione provoca cambi conformazionali ciclici nelle subunità  $\beta$ :

- $\beta_1$  lega ADP +  $P_i$
- $\beta_2$  sintetizza ATP
- $\beta_3$  rilascia ATP

Quindi l'energia del gradiente protonico si converte in energia meccanica (rotazione) e poi in energia chimica (ATP).

# Adenine nucleotide e fosfato traslocase



Adenine nucleotide and phosphate translocases

Lehninger Principles of Biochemistry, 5<sup>th</sup> Edition 2008, Nelson and Cox  
W.H. Freeman and Company, New-York

## L'accoppiamento chemiosmotico permette stequiometrie espresse da numeri non interi tra il consumo di ossigeno e la sintesi di ATP

In cui il valore di x o rapporto P/O\* è sempre un numero intero:



Il rapporto P/O era uguale a 3 quando il donatore di elettroni era il NADH ed erano 2 quando il donatore era il succinato. Grazie alla teoria chemiosmotica si può ipotizzare che il rapporto P/O non sia necessariamente un numero intero.

Il numero di protoni pompatis fuori per coppia di elettroni trasportati è pari a 10 per il NADH e a 6 per il FADH<sub>2</sub>.

Il numero di protoni necessari per la sintesi di ATP è pari a 4: uno di essi è usato per trasportare P<sub>i</sub>, ATP e ADP attraverso la membrana mitocondriale.

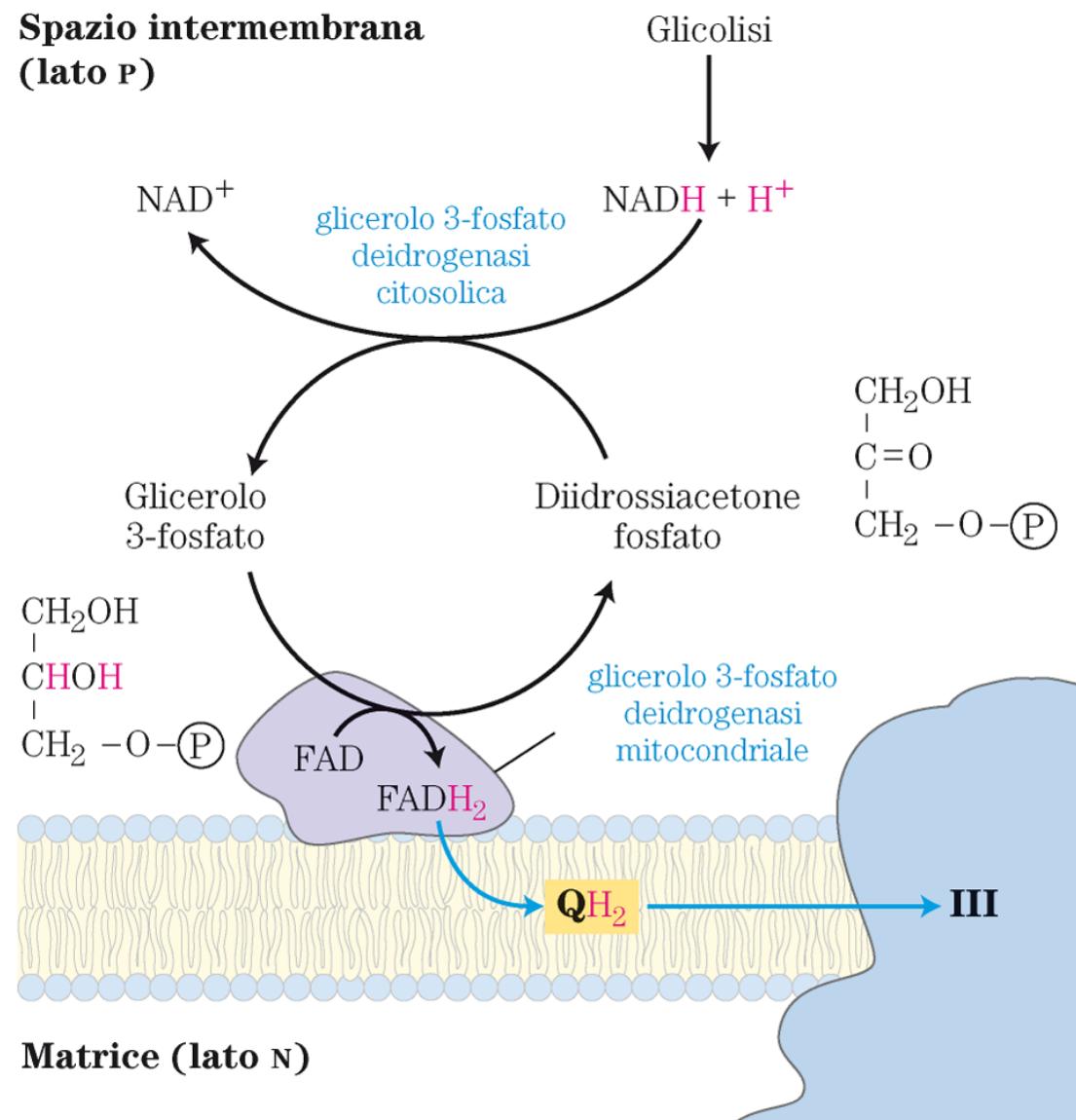
Se vengono pompatis fuori 10 protoni per ogni molecola di NADH e ne rifiuiscono 4 all'interno per sintetizzare una molecola di ATP il rapporto basato sui protoni P/O è 2,5 quando il donatore è il NADH e 1,5 quando il donatore è il FADH<sub>2</sub>

\* Rapporto P/O rappresenta quante moli di ATP sono sintetizzate dall'ATP sintasi per mole di coppia di elettroni trasportate dal trasportatore (NADH o FADH<sub>2</sub>)

## Il sistema navetta (shuttle) del glicerolo 3-fosfato

I diidrossiacetone fosfato nel citosol accetta due equivalenti riducenti dal NADH citosolico in una reazione catalizzata dalla glicerolo 3-fosfato deidrogenasi citosolica. La glicerolo 3-fosfato deidrogenasi trasferisce due equivalenti riducenti dal glicerolo 3-fosfato presente nello spazio intermembrana all'ubichinone ( $\text{QH}_2$ ).

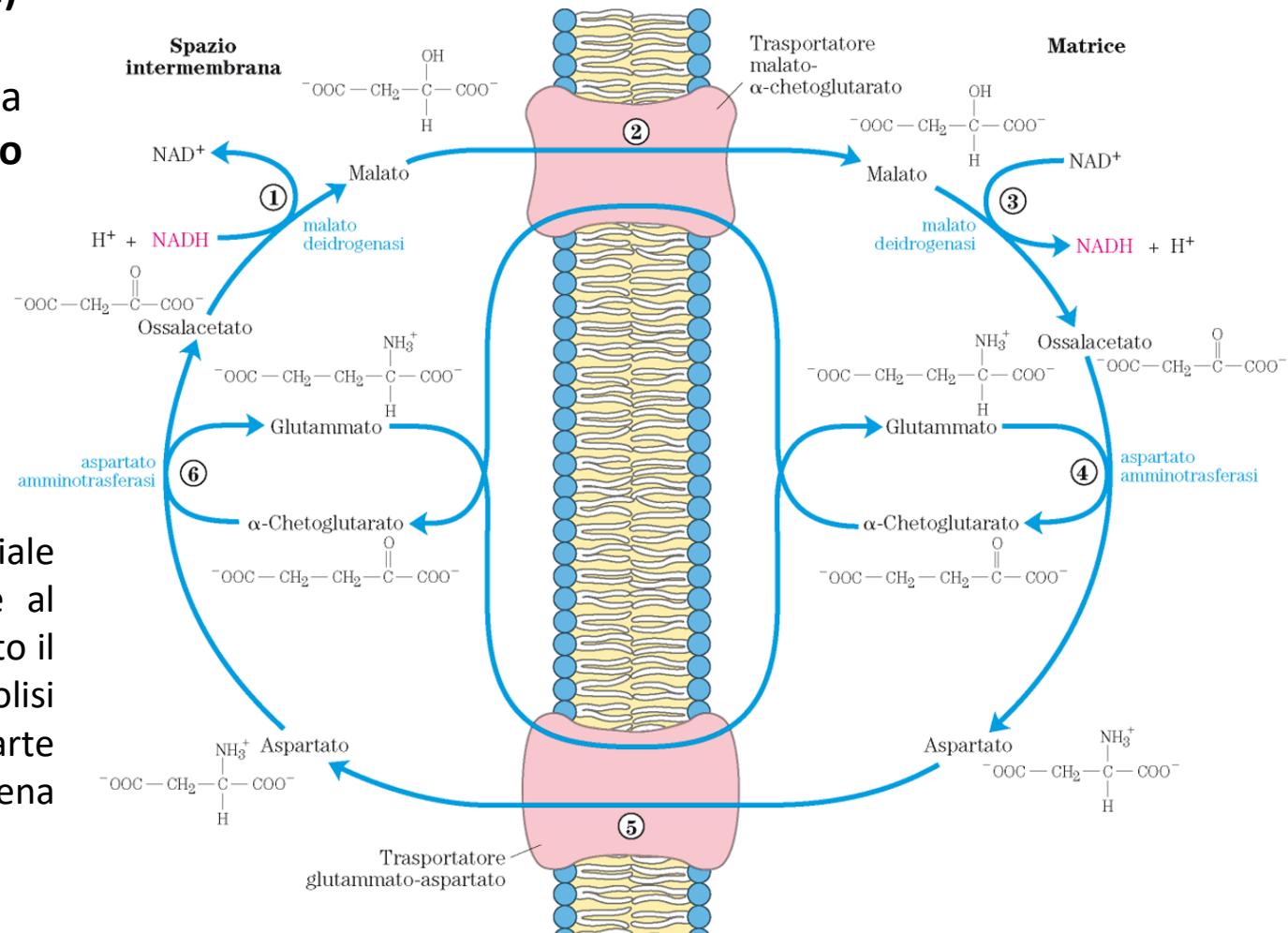
L'agente ossidante è il FAD e il prodotto è il  $\text{FADH}_2$  che fa passare gli elettronni attraverso la catena di trasporto degli elettronni portando alla produzione di 1,5 moli di ATP per ogni mole di NADH del citosol.



Nel *S. cerevisiae* il sistema **navetta del glicerolo-3-fosfato** è predominante

# Sistema navetta (shuttle) del malato-aspartato

Nel *S. cerevisiae* il sistema navetta malato-aspartato è meno efficiente.



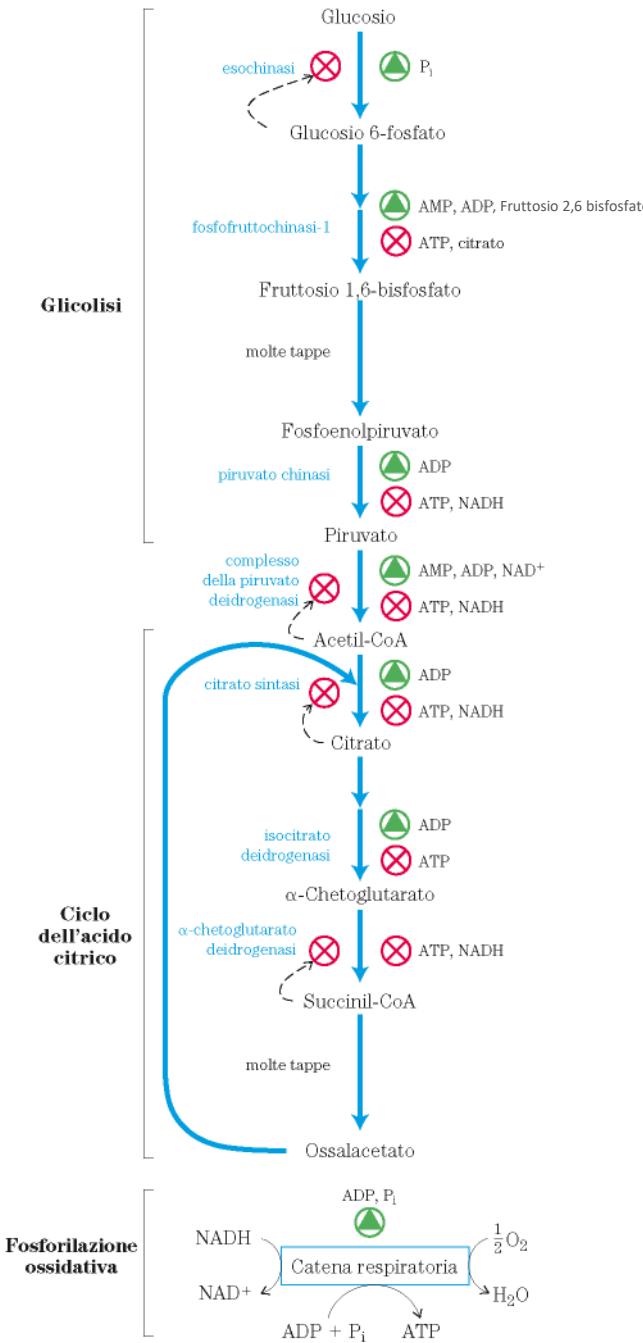
La membrana mitocondriale interna non è permeabile al NADH, come viene riossidato il NADH prodotto dalla glicolisi nel citosol a NAD<sup>+</sup> da parte dell'O<sub>2</sub> attraverso la catena respiratoria?

- 1) NADH citosolico entra nello spazio intermembrana attraverso le porine e passa i suoi equivalenti riducenti all'ossalacetato per produrre malato. 2) il malato viene trasportato attraverso la membrana interna del trasportatore malato α-chetoglutarato.

## Resa di ATP dall'ossidazione completa del glucosio: produzione di ATP dall'ossidazione del glucosio

<b>Processo</b>	<b>Prodotto formato nella via</b>	<b>Molecole di ATP prodotte</b>
Glicolisi	2 NADH (citosolico)	3 o 5
	2 ATP	2
Ossidazione del piruvato (2 per molecola di glucosio)	2 NADH (matrice mitocondriale)	5
Ossidazione dell'aceti-CoA nel ciclo dell'acido citrico (2 per glucosio)	6 NADH (matrice mitocondriale) 2 FADH <sub>2</sub> 2 ATP o 2 GTP	15 3 2
Resa totale per molecola di glucosio		30 o 32

La fosforilazione ossidativa produce la maggior parte dell'ATP generato nelle cellule aerobiche, la completa ossidazione di una molecola di glucosio a CO<sub>2</sub> rende da 30 a 32 molecole di ATP. La glicolisi in condizioni anaerobiche (fermentazione) rende solo 2 molecole di ATP per molecola di glucosio. Le vie ossidative aerobiche che trasferiscono elettroni all'O<sub>2</sub> producono una grande quantità di ATP durante il catabolismo.



## Meccanismi di regolazione delle vie che producono ATP

I meccanismi interconnessi di regolazione della glicolisi, dell'ossidazione del piruvato, del ciclo dell'acido citrico e della fosforilazione ossidativa, dipendenti dalle concentrazioni relative di ATP, ADP, AMP e NADH.

Concentrazione elevate di ATP producono un rallentamento della glicolisi, dell'ossidazione del piruvato, dell'ossidazione del acetato attraverso il ciclo dell'acido citrico e della fosforilazione ossidativa. Tutte e quattro le vie vengono accelerate quando aumenta il consumo di ATP e la formazione di ADP, AMP e P<sub>i</sub>.

La capacità del citrato di inibire la glicolisi e il ciclo dell'acido citrico rinforza l'azione del sistema. Un aumento dei livelli di NADH e di Acetil CoA porta all'inibizione dell'ossidazione del piruvato ad Acetil-CoA e un rapporto [NADH]/[NAD<sup>+</sup>] molto elevato inibisce rapidamente le reazione della piruvato deidrogenasi del ciclo dell'acido citrico.

**CONTROLLO DA ADP:** questo è il meccanismo principale di controllo respiratorio. La velocità della catena respiratoria dipende direttamente dalla disponibilità di ADP.

**Quando l'ADP è basso:**

- l'ATP sintasi rallenta o si ferma perché manca ADP come substrato,
- il flusso di protoni attraverso  $F_0$  si riduce,
- il gradiente protonico ( $\Delta p$ ) aumenta perché diventa difficile pompare ulteriori protoni contro il gradiente elevato,
- i complessi respiratori si fermano (perché pompare altri  $H^+$  diventa sfavorevole).

**Come conclusione la respirazione rallenta.**

**Quando l'ADP è alto:**

- l'ATP sintasi è attiva,
- i protoni fluiscano dalla membrana alla matrice (rientrano),
- il gradiente  $\Delta p$  diminuisce perché i protoni rientrano nella matrice,
- la catena respiratoria accelera per ristabilire il gradiente.

**Come conclusione si ha aumento del consumo di ossigeno e della produzione di ATP.**

Questo è un meccanismo di feedback negativo dove la velocità della respirazione mitocondriale è auto-regolata dalla richiesta di ATP.

**CONTROLLO REDOX (NADH/NAD<sup>+</sup>):** la velocità del flusso di elettroni nella catena respiratoria dipende anche dal rapporto redox mitocondriale:

Quando c'è molto NADH (derivante da glicolisi o ciclo di Krebs attivi), la catena respiratoria accelera per ossidarlo.

Quando il NADH scarseggia, la catena rallenta per mancanza di elettroni da trasferire.

Questo collega strettamente la fosforilazione ossidativa al metabolismo centrale (ciclo di Krebs, β-ossalidazione, ecc.).

**CONTROLLO DA GRADIENTE PROTONICO ( $\Delta p = \Delta\Psi + \Delta pH$ ):**

La forza proton-motrice ha due componenti:

$\Delta\Psi$  = potenziale elettrico di membrana

$\Delta pH$  = gradiente di concentrazione protonica

Quando la catena respiratoria pompa protoni più rapidamente di quanto l'ATP sintasi ne consenta il ritorno nella matrice, il gradiente protonico ( $\Delta p$ ) aumenta. Questo rende più difficile, dal punto di vista energetico, pompare ulteriori protoni, provocando un rallentamento reversibile della catena respiratoria, fenomeno noto come inibizione da accumulo del gradiente protonico.

Il gradiente agisce come un freno energetico perché previene lo spreco di riducenti.

**CONTROLLO DA OSSIGENO:** l'ossigeno è l'accettore finale degli elettroni (complesso IV, citocromo c ossidasi).

In assenza di O<sub>2</sub> la catena si blocca e il NADH non viene ossidato e il metabolismo diventa fermentativo.

In presenza di ossigeno, se la concentrazione di glucosio è alta, il lievito preferisce la fermentazione.

Nel *Saccharomyces cerevisiae* la regolazione è influenzata dalla disponibilità di glucosio:

Il glucosio alto inibisce la respirazione mitocondriale (effetto Crabtree) e segue la via della fermentazione. Il glucosio basso stimola l'attività respiratoria e sarà più attiva la fosforilazione ossidativa.

Il Livello di NADH/NAD<sup>+</sup> citosolico e mitocondriale controlla il flusso di elettroni.

L'ADP e P<sub>i</sub> mitocondriali controllano l'attività dell'ATP sintasi e il consumo di ossigeno.