

Figura 19.1 Il meccanismo chemiosmotico per la sintesi dell'ATP nei mitocondri. Gli elettroni si muovono spontaneamente lungo una catena di trasportatori legati alla membrana (la catena respiratoria), spinti dall'elevato potenziale di riduzione dell'ossigeno e dai potenziali di riduzione relativamente bassi dei vari substrati ridotti (combustibili metabolici) ossidati all'interno del mitocondrio. Il flusso degli elettroni genera un potenziale elettrochimico per effetto del trasferimento transmembrana di protoni e delle loro cariche positive. Questo potenziale elettrochimico favorisce la sintesi di ATP catalizzata da un enzima legato alla membrana, l'ATP sintasi; questo enzima è fondamentale nei mitocondri, nei cloroplasti, ma anche nei batteri e negli archaea.

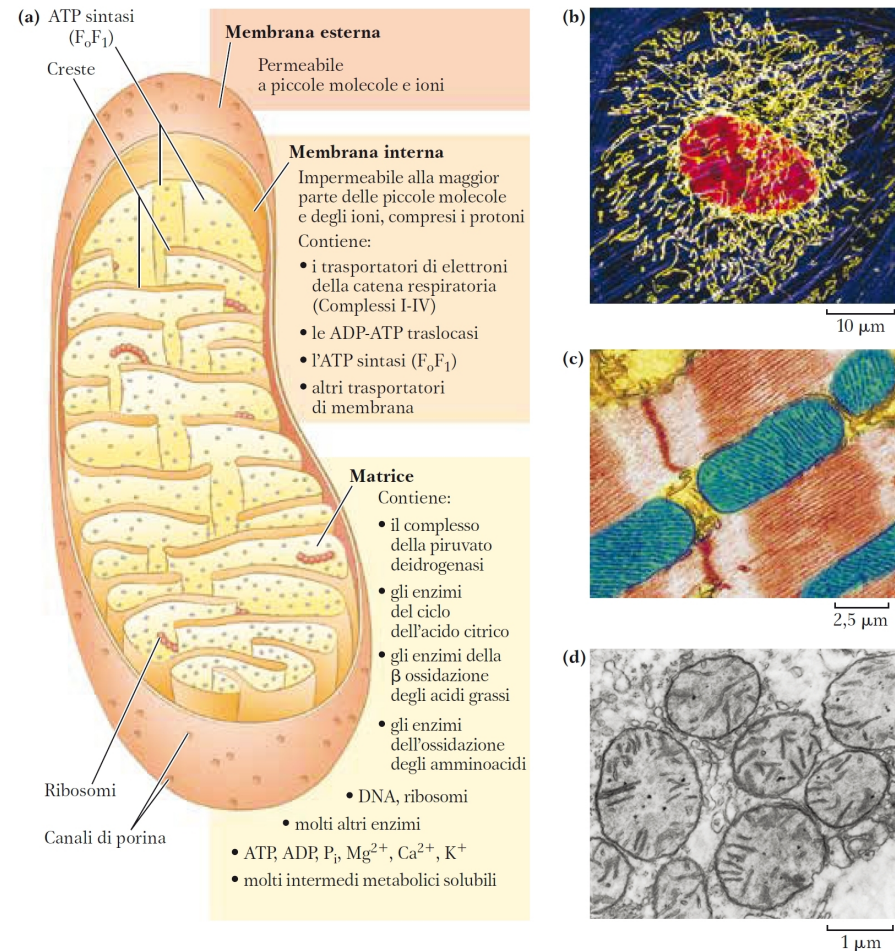


Figura 19.2 Anatomia biochimica di un mitocondrio. (a) La membrana esterna ha dei pori che la rendono permeabile alle piccole molecole e agli ioni, ma non alle proteine. Le involuzioni (creste) aumentano considerevolmente l'area della superficie della membrana interna. La membrana interna di un singolo mitocondrio di fegato può avere anche più di 10 000 gruppi di trasportatori di elettroni (le catene respiratorie) e di complessi di ATP sintasi, distribuiti su tutta la superficie della membrana. (b) Una tipica cellula animale ha centinaia o migliaia di mitocondri. Questa cellula endoteliale ottenuta da un'arteria polmonare di bovino è stata marcata con sonde fluorescenti per l'actina (blu), per il DNA (rosso) e per i mitocondri (giallo). Si noti la variabilità nella lunghezza

dei mitocondri. (c) I mitocondri del muscolo cardiaco (blu in questa micrografia elettronica) hanno più creste e quindi una superficie della membrana interna più ampia, con una quantità tre volte maggiore di trasportatori di elettroni rispetto (d) ai mitocondri di fegato. I mitocondri di muscolo e di fegato hanno all'incirca le dimensioni di un batterio, da 1 a 10 μm di lunghezza. I mitocondri delle piante, degli invertebrati e degli eucarioti microbici sono simili a quello mostrato nella figura, anche se possono presentare differenze relative a dimensione, forma e grado di ripiegamento della membrana interna. [Fonti: (b) Talley Lambert/Science Source. (c) Thomas Deerinck, NCMIR/Science Source. (d) Biophoto Associates/ Science Source.]

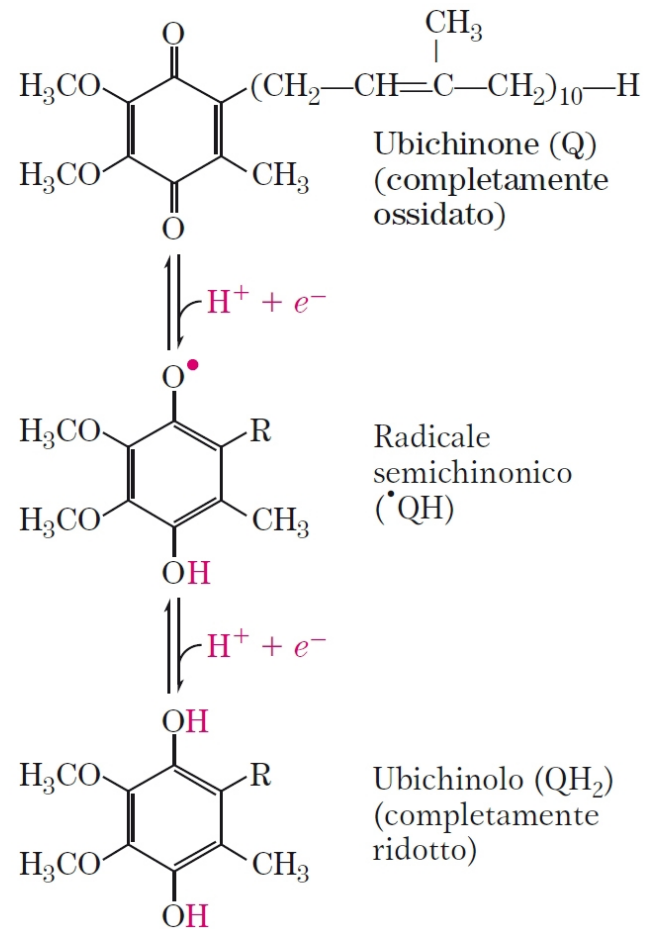


Figura 19.3 L'ubichinone (Q o coenzima Q). La riduzione completa dell'ubichinone richiede due elettroni e due protoni, e può avvenire in due tappe mediante la formazione di un radicale intermedio semichinonico.

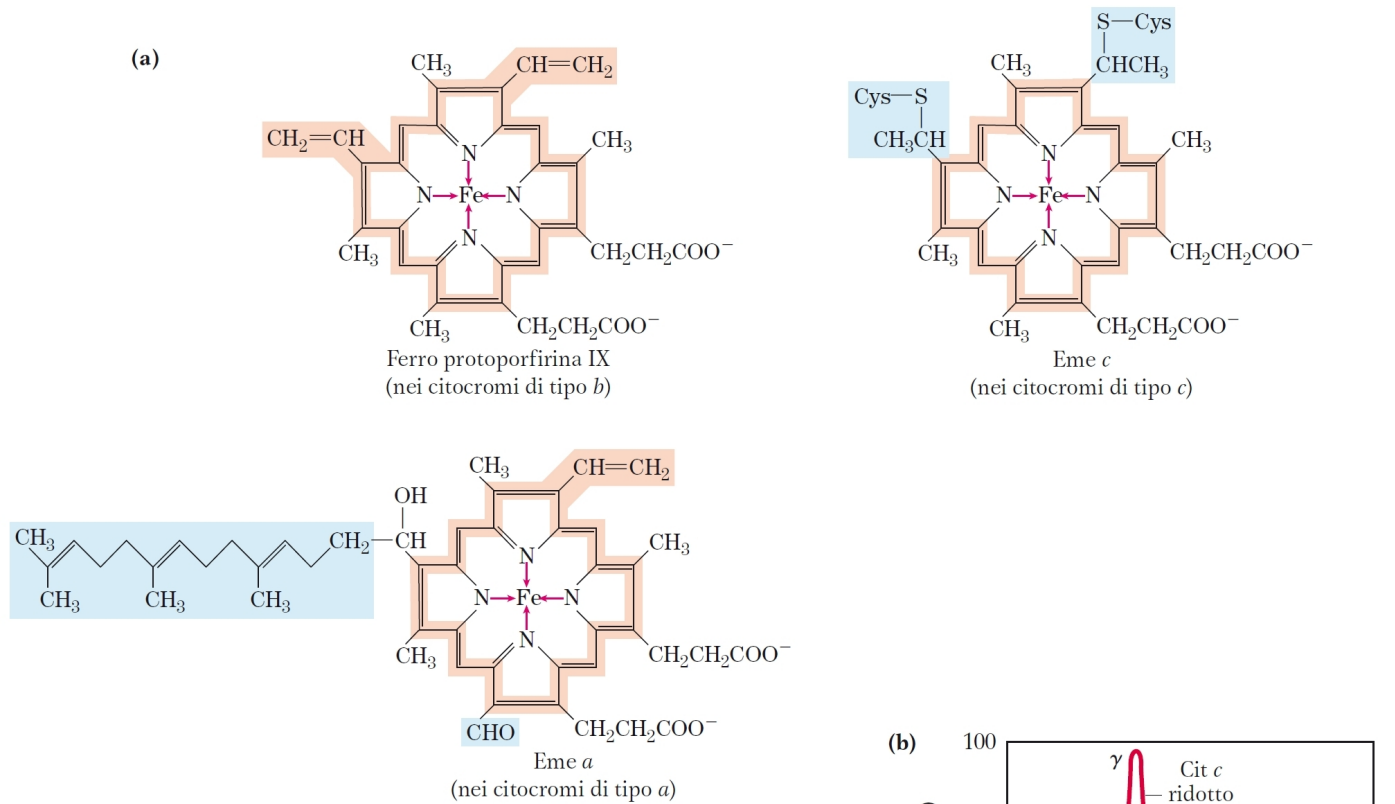
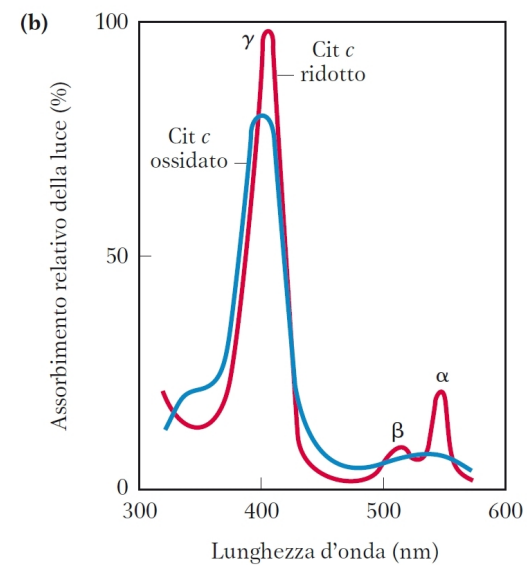


Figura 19.4 I gruppi prostetici dei citocromi. (a) Ogni eme possiede quattro anelli a cinque membri contenenti azoto che costituiscono una struttura ciclica detta porfirina. I quattro atomi di azoto sono coordinati con uno ione centrale di Fe, che può assumere gli stati di ossidazione Fe^{2+} o Fe^{3+} . La ferro protoporfirina IX si trova nei citocromi di tipo *b*, nella mioglobina e nell'emoglobina (vedi la Figura 4.17). L'eme *c* è legato covalentemente alla proteina del citocromo *c* mediante ponti tioeteri con due residui di Cys. L'eme *a*, presente nei citocromi di tipo *a*, ha una lunga coda isoprenoide legata a uno degli anelli a cinque membri. I legami doppi coniugati (ombreggiati in rosa) dell'anello della porfirina hanno elettroni π delocalizzati che sono facilmente eccitabili dai fotoni con lunghezze d'onda nell'ambito del visibile. Essi sono responsabili dell'assorbimento della luce nella regione dello spettro del visibile da parte di queste strutture (e dei composti a esse correlati). (b) Spettri di assorbimento del citocromo *c* (cit *c*) nella forma ossidata (in blu) e nella forma ridotta (in rosso). Sono indicate le bande di assorbimento α , β e γ , caratteristiche della forma ridotta.



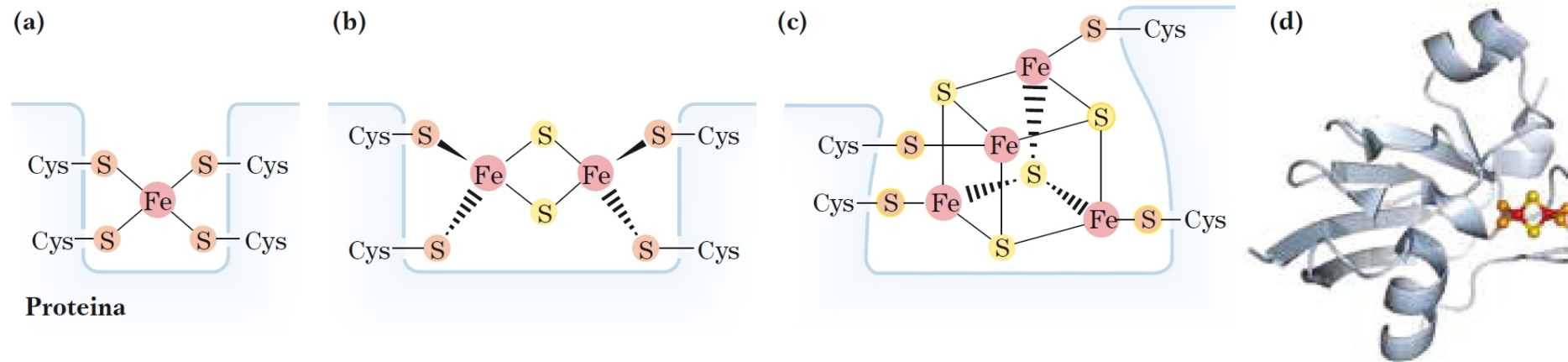


Figura 19.5 I centri ferro-zolfo. I centri Fe-S delle proteine ferro-zolfo possono avere strutture semplici come quella in (a), con un solo ione ferro circondato dagli atomi di S appartenenti a quattro residui di cisteina; il ferro è in rosa, lo zolfo inorganico in giallo e lo zolfo della cisteina in arancione. Altri centri hanno, oltre allo zolfo cisteinico, anche atomi di zolfo inorganico, come in (b) 2Fe-2S o in (c) 4Fe-4S. (d) La ferredossina del cianobatterio *Anabaena* 7120 ha un centro 2Fe-2S. Si noti

che in queste sigle viene considerato solo lo zolfo inorganico. Per esempio, nel centro 2Fe-2S in (b), ogni ione Fe è in realtà in contatto con quattro atomi di S. Il potenziale di riduzione standard del ferro nei centri ferro-zolfo dipende dal tipo di centro e dalle sue specifiche interazioni con la proteina con cui è associato. [Fonte: (d) PDB ID 1FRD, B.L. Jacobson et al., *Biochemistry* 32:6788, 1993.]

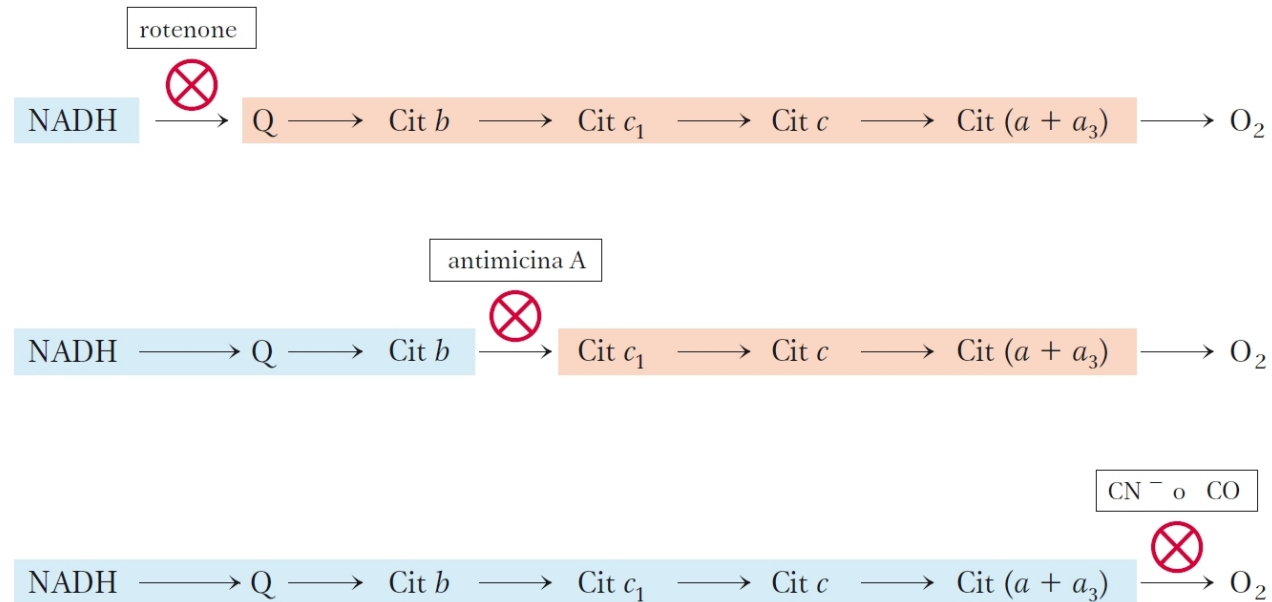


Figura 19.6 Metodo per la determinazione della sequenza dei trasportatori di elettroni. Questo metodo misura gli effetti degli inibitori del trasferimento degli elettroni sullo stato di ossidazione di ogni trasportatore. In presenza di un donatore

di elettroni e di ossigeno, ogni inibitore modifica in modo caratteristico lo stato di ossidoriduzione dei trasportatori di elettroni: quelli prima del blocco diventano ridotti (in celeste) e quelli dopo il blocco vengono ossidati (in rosa).

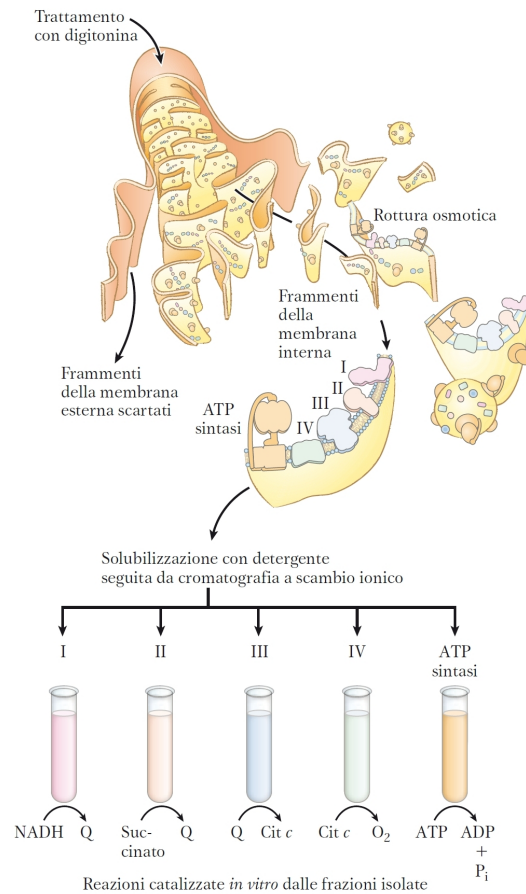


Figura 19.7 Separazione dei complessi funzionali della catena respiratoria. Viene prima rimossa la membrana mitocondriale esterna mediante trattamento con il detergente digitonina. Per effetto della rottura osmotica dei mitocondri si ottengono frammenti della membrana interna, che vengono disciolti in condizioni blande in un secondo detergente. La miscela di proteine della membrana mitocondriale interna presente nella soluzione viene poi sottoposta a una cromatografia a scambio ionico, che separa i vari complessi (dal Complesso I al IV) della catena respiratoria, ognuno con la sua tipica composizione proteica (vedi la Tabella 19.3); in questo modo si isola anche l'ATP sintasi (talvolta chiamata Complesso V). I Complessi isolati dall'I al IV catalizzano anche *in vitro* trasferimenti di elettroni da donatori (NADH o succinato) all'ossigeno, mediante alcuni trasportatori intermedi (Q e citocromo c). L'ATP sintasi possiede *in vitro* solo un'attività ATP-asi, come mostrato, mentre l'attività ATP-sintetasi è assente.

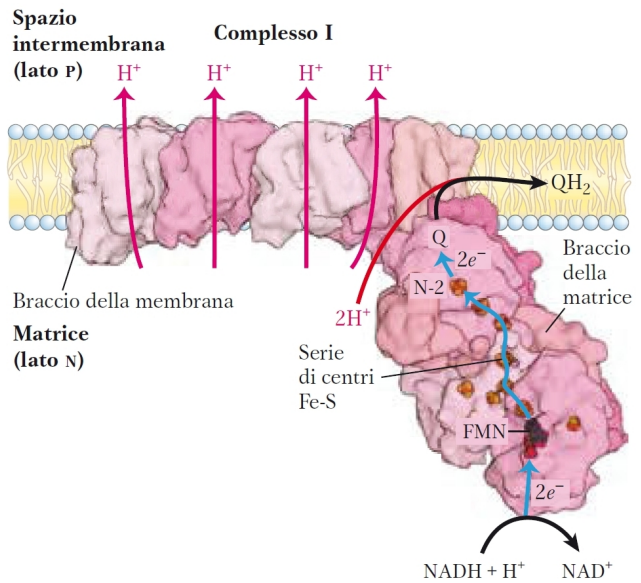


Figura 19.8 Struttura del Complesso I (NADH:ubichinone ossidoreduktasi). Il Complesso I (qui è mostrata la struttura cristallina della proteina estratta dal batterio *Thermus thermophilus*) catalizza il trasferimento di uno ione idruro dal NADH all'FMN, e dall'FMN due elettroni passano attraverso una serie di centri Fe-S fino al centro Fe-S N-2 nel braccio del complesso che sporge nella matrice. Il trasferimento di elettroni da N-2 all'ubichinone sul braccio del complesso che sta nella membrana forma QH₂, che diffonde nel doppio strato lipidico. Questo trasferimento di elettroni guida anche l'espulsione di quattro protoni dalla matrice per ogni coppia di elettroni. Il flusso di protoni genera un potenziale elettrochimico attraverso la membrana mitocondriale interna (lato N negativo, lato P positivo). Non è ancora noto il meccanismo dettagliato che accoppia il trasferimento di elettroni e di protoni nel Complesso I, ma tre delle subunità di membrana sono correlate strutturalmente a un noto antiporto Na⁺-H⁺, e il percorso del movimento dei protoni può essere simile nei due casi. Il quarto ipotetico passaggio di protoni avviene attraverso una subunità integrale più vicina al sito di legame Q. Una lunga elica (non visibile in questa figura) che si trova lungo la superficie del braccio della membrana può coordinare l'azione delle quattro pompe protoniche quando Q è in forma ridotta. [Fonte: PDB ID 4HEA, R. Baradaran et al., *Nature* 494:443. 2013.]

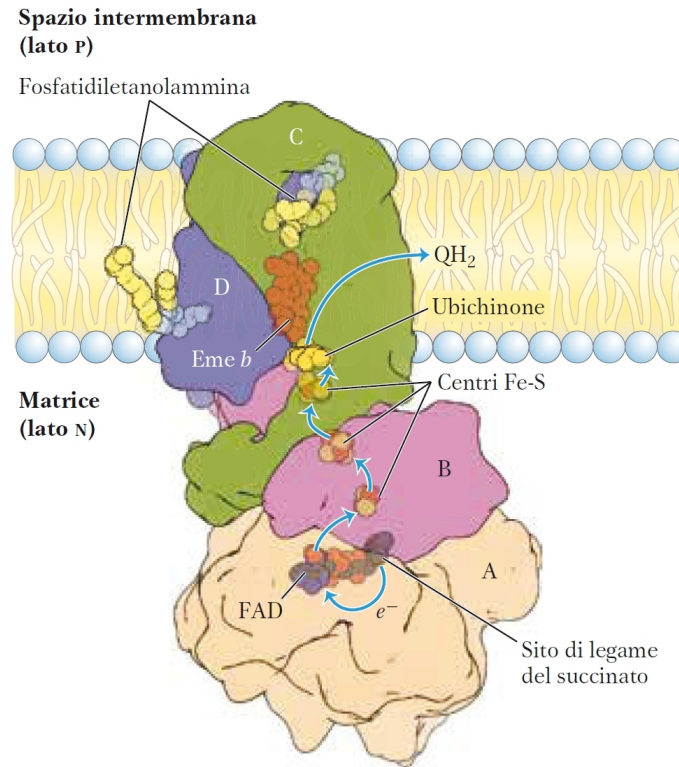


Figura 19.9 Struttura del Complesso II (succinato deidrogenasi). Questo complesso (porcino) ha due subunità transmembrana, C e D; le subunità A e B si estendono nella matrice. Nella subunità A, subito dietro il FAD, si trova il sito di legame del succinato. La subunità B possiede tre centri Fe-S; l'ubichinone si lega alla subunità B, e l'eme *b* si trova tra la subunità C e la D. Due molecole di fosfatidiletanolamina sono saldamente legate alla subunità D e sono facilmente identificabili nella struttura cristallina del complesso. Gli elettroni (freccie blu) si muovono dal succinato al FAD, poi raggiungono l'ubichinone attraverso i tre centri Fe-S. L'eme *b* non partecipa a questa via di trasporto degli elettroni, tuttavia è un fattore di protezione contro la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di elettroni che possono rendersi liberi. [Fonte: PDB ID 1ZOY, F. Sun et al., *Cell* 121:1043, 2005.]

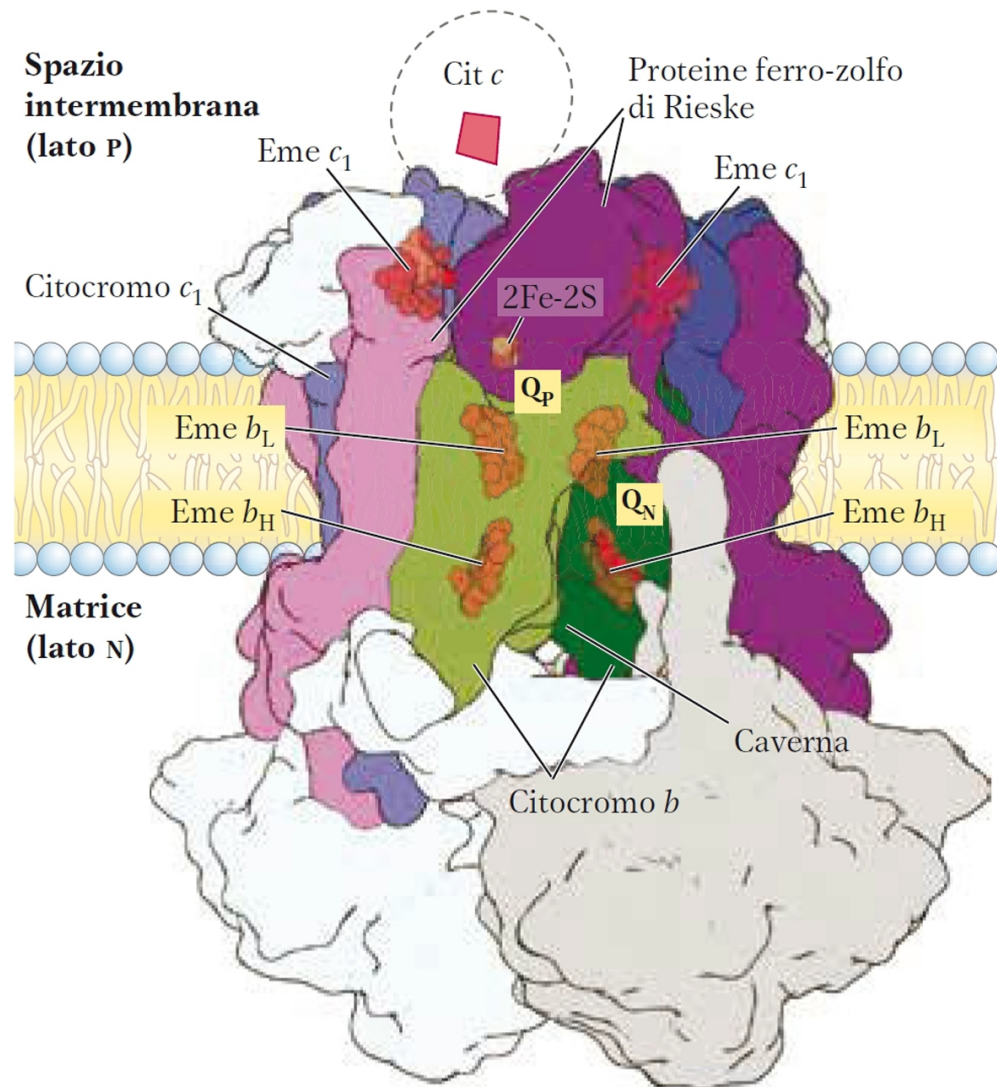


Figura 19.10 Struttura del Complesso III (complesso del citocromo bc_1). Il complesso (bovino) è un dimero formato da monomeri identici, ciascuno con 11 subunità diverse. Il centro funzionale di ogni monomero è costituito da tre subunità: il citocromo b (in verde), con i suoi due gruppi eme (b_H e b_L); la proteina ferro-zolfo di Rieske (in viola), con i suoi centri $2Fe-2S$; il citocromo c_1 (in blu), con il suo gruppo eme. Questa rappresentazione schematica mostra come il citocromo c_1 e la proteina ferro-zolfo di Rieske sporgano verso la superficie P e possano interagire col citocromo c (qui mostrato, ma non fa parte del complesso) nello spazio intermembrana. Il complesso ha due distinti siti di legame per l'ubichinone, Q_N e Q_P , che corrispondono ai siti di inibizione da parte di due farmaci che bloccano la fosforilazione ossidativa. L'antimicina A, che blocca il flusso elettronico dal citocromo b al citocromo c_1 , in modo specifico dall'eme b_H al Q , si lega a Q_N , vicino all'eme b_H , sul lato N (matrice) della membrana. Il mixotiazolo, che impedisce il trasferimento elettronico da QH_2 alla proteina ferro-zolfo di Rieske, si lega a Q_P vicino al centro $2Fe-2S$ e all'eme b_L sul lato P . La struttura dimerica è essenziale per la funzionalità del Complesso III. L'interfaccia tra i monomeri forma due "caverne": una contiene il sito Q_P derivante da un monomero e l'altra un sito Q_N derivante dall'altro. Il movimento degli intermedi dell'ubichinone avviene all'interno di queste caverne protette. Il Complesso III cristallizza in due distinte conformazioni (non mostrate in questa figura). In una conformazione il centro $Fe-S$ di Rieske è vicino al suo accettore di elettroni, il gruppo eme del citocromo c_1 , ma è relativamente distante dal citocromo b e dal sito a cui è legato QH_2 , a livello del quale il centro $Fe-S$ di Rieske riceve gli elettroni. Nell'altra conformazione il centro $Fe-S$ si è allontanato dal citocromo c_1 in direzione del citocromo b . È probabile che la proteina di Rieske oscilli tra queste due conformazioni perché la prima viene ridotta e poi ossidata. [Fonte: PDB ID 1BGY, S. Iwata et al., *Science* 281:64, 1998.]

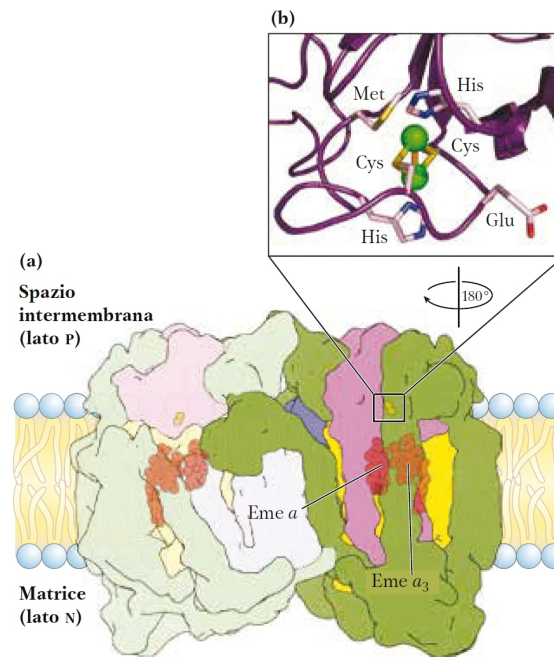


Figura 19.12 Struttura del Complesso IV (citocromo ossidasi).

(a) Questo complesso (bovino) ha 13 subunità in ogni monomero identico della sua struttura dimerica. La subunità I (in giallo) ha due gruppi eme a e a_3 , vicini a un singolo ione di rame, Cu_B (non visibile in questa figura). L'eme a_3 e il Cu_B costituiscono un centro binucleare Fe-Cu. La subunità II (in viola) contiene due ioni rame complessati con i gruppi $-\text{SH}$ di due residui di cisteina, che formano un centro binucleare, Cu_A , simile ai centri 2Fe-2S delle proteine ferro-zolfo. Questo centro binucleare e il sito di legame del citocromo c sono localizzati in un dominio della subunità II che sporge dal lato P della membrana interna (nello spazio intermembrana). La subunità III (in blu) è essenziale per il rapido movimento dei protoni attraverso la subunità II. Nei mammiferi i ruoli delle altre 10 subunità del Complesso IV (in verde) non sono ancora del tutto noti, ma sembrano avere alcune funzioni nell'assemblaggio e nella stabilizzazione del complesso. (b) Il centro binucleare Cu_A . Gli ioni rame (sfere azzurre) condividono equamente gli elettroni. Quando il centro si trova nella sua forma ridotta, gli ioni hanno carica formale $\text{Cu}^{1+}\text{Cu}^{1+}$; quando si trova nella sua forma ossidata, gli ioni hanno carica formale $\text{Cu}^{1.5+}\text{Cu}^{1.5+}$. Sei residui amminoacidici fungono da ligandi intorno agli ioni Cu: un Glu, una Met, due His e due Cys. [Fonte: PDB ID 1OCC, T. Tsukihara et al., *Science* 272:1136, 1996.]

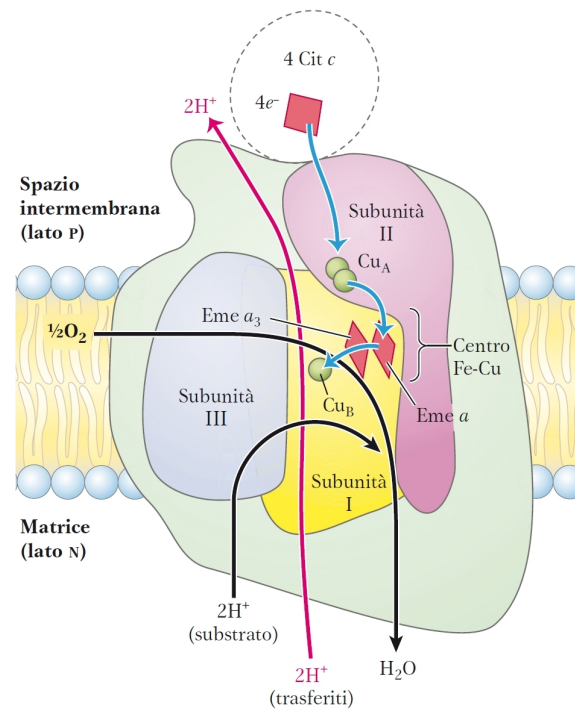


Figura 19.13 Percorso degli elettroni attraverso il Complesso IV. Per semplicità, è mostrato solo un monomero del Complesso IV dimerico bovino. Tre proteine hanno un ruolo fondamentale per il flusso degli elettroni: la subunità I, la subunità II e la subunità III. L'ampia struttura mostrata in verde comprende le altre 10 proteine in ogni monomero del complesso dimerico. Il trasferimento elettronico attraverso il Complesso IV inizia dal citocromo c (in alto). Due molecole di citocromo c ridotto donano ciascuna un elettrone al centro binucleare Cu_A . Da qui gli elettroni passano attraverso l'eme a al centro Fe-Cu (eme a_3 e Cu_B). A questo punto l' O_2 si lega all'eme a_3 e viene ridotto a perossido (O_2^{2-} , non mostrato nella figura) da due elettroni provenienti dal centro Fe-Cu. L'arrivo di altri due elettroni provenienti dal citocromo c (in alto), per un totale di quattro elettroni, converte l' O_2^{2-} in due molecole d'acqua, con consumo di quattro protoni "substrato" provenienti dalla matrice. Contemporaneamente, due protoni vengono pompati dalla matrice per ogni coppia di elettroni che passa attraverso il Complesso IV, mediante un meccanismo ancora non del tutto noto. Si noti che la riduzione di O_2 a $2 \text{H}_2\text{O}$ richiede quattro elettroni, o due coppie di elettroni.

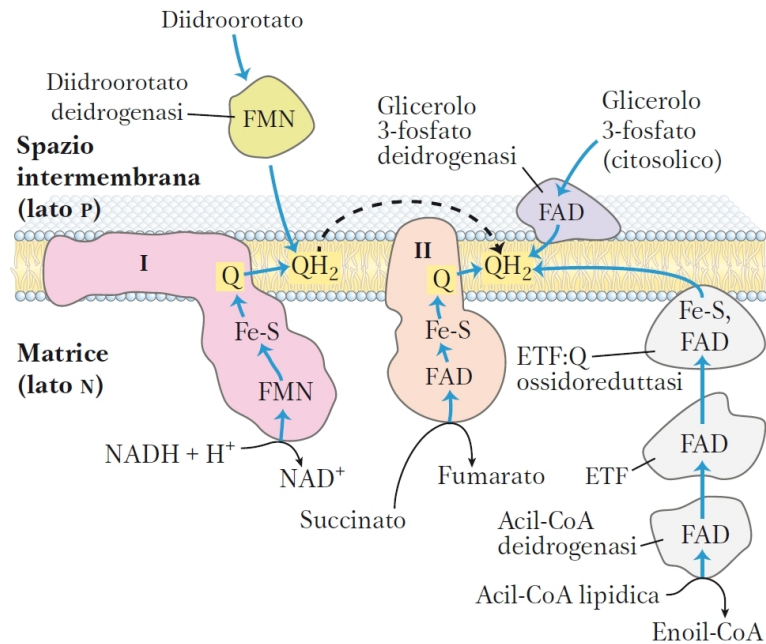


Figura 19.15 La via di trasferimento degli elettroni all'ubichinone nella catena respiratoria. Gli elettroni dal NADH nella matrice passano attraverso l'FMN di una flavoproteina (NADH deidrogenasi) a una serie di centri Fe-S (nel Complesso I) e poi a Q. Gli elettroni che derivano dall'ossidazione del succinato nel ciclo dell'acido citrico passano attraverso una flavoproteina con diversi centri Fe-S (Complesso II) per arrivare a Q. L'acil-CoA deidrogenasi, il primo enzima della β -ossidazione degli acidi grassi, trasferisce gli elettroni a una flavoproteina di trasferimento di elettroni (ETF), da cui essi passano a Q attraverso la ETF:ubichinone ossidoreduttasi. Il diidroorotato, un intermedio della via di biosintesi dei nucleotidi pirimidinici (vedi la Figura 22.38), dona due elettroni a Q tramite una flavoproteina (diidroorotato deidrogenasi). Il glicerolo 3-fosfato, un intermedio della glicolisi presente nel citosol, dona elettroni a una flavoproteina (la glicerolo 3-fosfato deidrogenasi) sul lato esterno della membrana mitocondriale interna, da cui essi passano a Q.

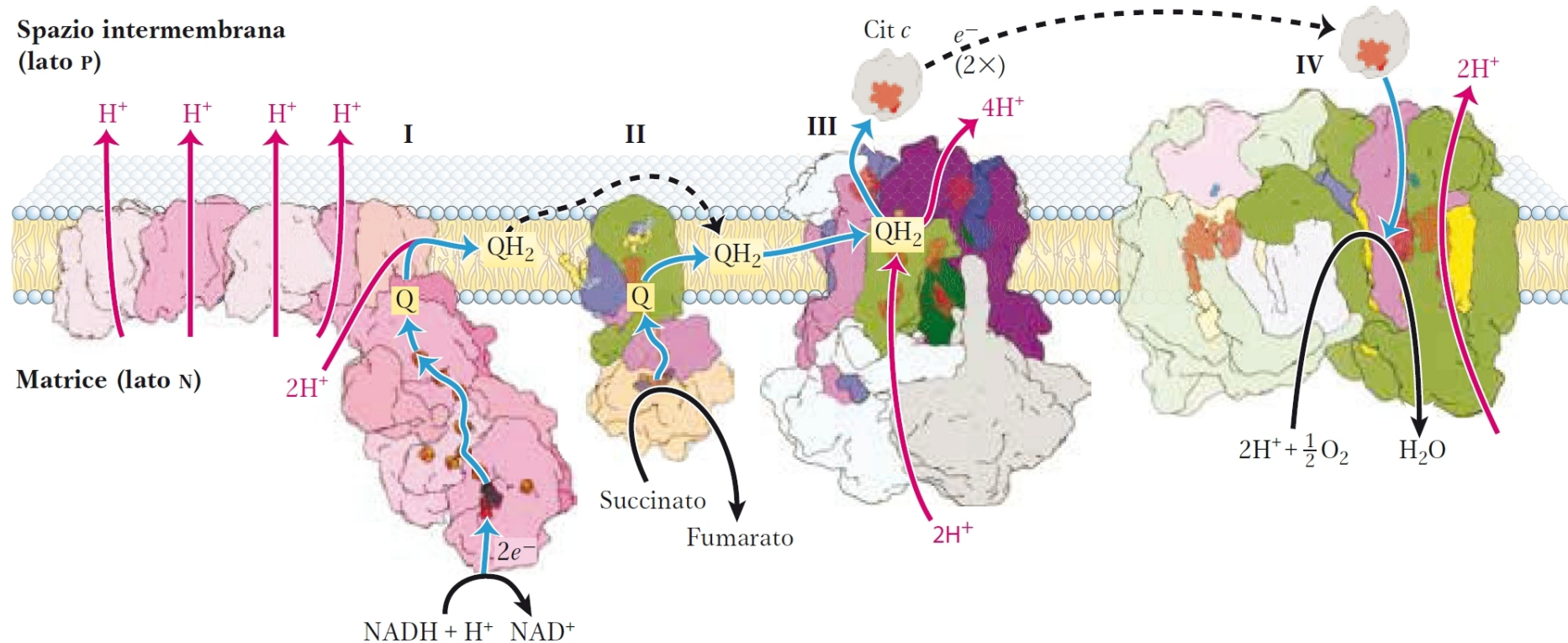


Figura 19.16 Rappresentazione schematica del flusso degli elettroni e dei protoni attraverso i quattro complessi della catena respiratoria. Gli elettroni raggiungono Q attraverso i Complessi I e II (attraverso le altre vie mostrate nella Figura 19.15). QH₂ (Q ridotto) è un trasportatore mobile di elettroni e di protoni: trasferisce elettroni al Complesso III, che li passa a un altro trasportatore mobile, il citocromo c. Il Complesso IV trasferisce gli elettroni dal citocromo c all'O₂. Il flusso di elettroni attraverso i Complessi I, III e IV è accompagnato da una traslocazione di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana.

Nel cuore bovino il rapporto fra i Complessi I, II, III e IV è approssimativamente: 1,1:1,3:3,0:6,7. Le linee tratteggiate indicano la diffusione di Q nel piano della membrana interna, e quella del citocromo c nello spazio intermembrana. [Fonti: Complesso I: PDB ID 4HEA, R. Baradaran et al., *Nature* 494:443, 2013. Complesso II: PDB ID 1ZOY, F. Sun et al., *Cell* 121:1043, 2005. Complesso III: PDB ID 1BGY, S. Iwata et al., *Science* 281:64, 1998. Citocromo c: PDB ID 1HRC, G.W. Bushnell et al., *J. Mol. Biol.* 214:585, 1990. Complesso IV: PDB ID 1OCC, T. Tsukihara et al., *Science* 272:1136, 1996.]

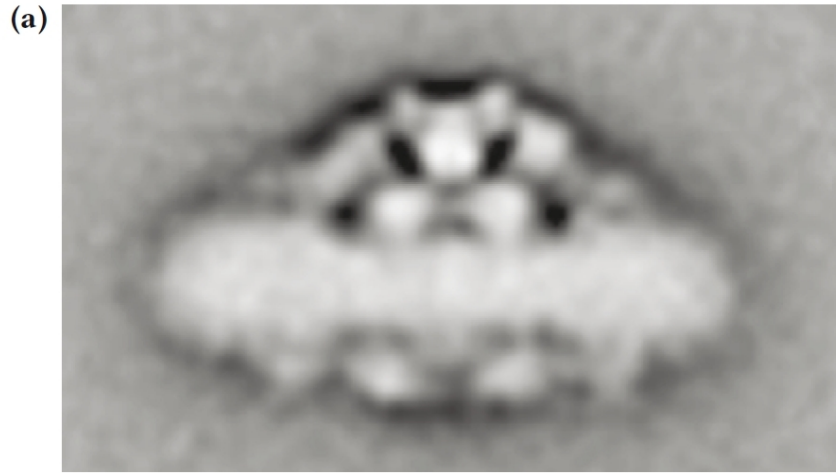
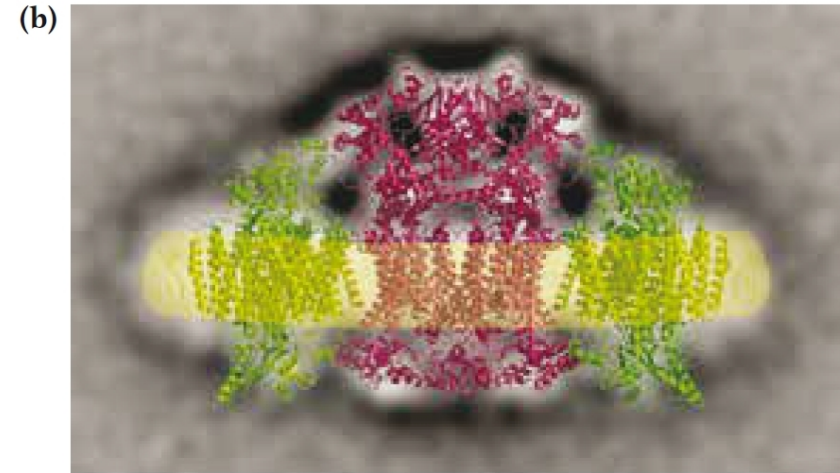


Figura 19.14 Un respirasoma composto dai Complessi III e IV. (a) La figura mostra l'immagine al microscopio elettronico di un supercomplesso purificato di lievito, contenente i Complessi III e IV, dopo raffreddamento rapido. L'immagine è stata ottenuta sovrapponendo le immagini di centinaia di densità elettroniche (vedi il Box 19.1). (b) Le strutture ai raggi X di



una molecola del Complesso III di lievito (in rosso) e di due molecole del Complesso IV di cuore bovino (in verde) possono essere sovrapposte alla mappa di densità elettronica, facendo supporre un probabile modo di interazione dei due complessi nel respirasoma. Il doppio strato lipidico della membrana è mostrato in giallo. [Fonte: per gentile concessione di Egbert Boekema.]

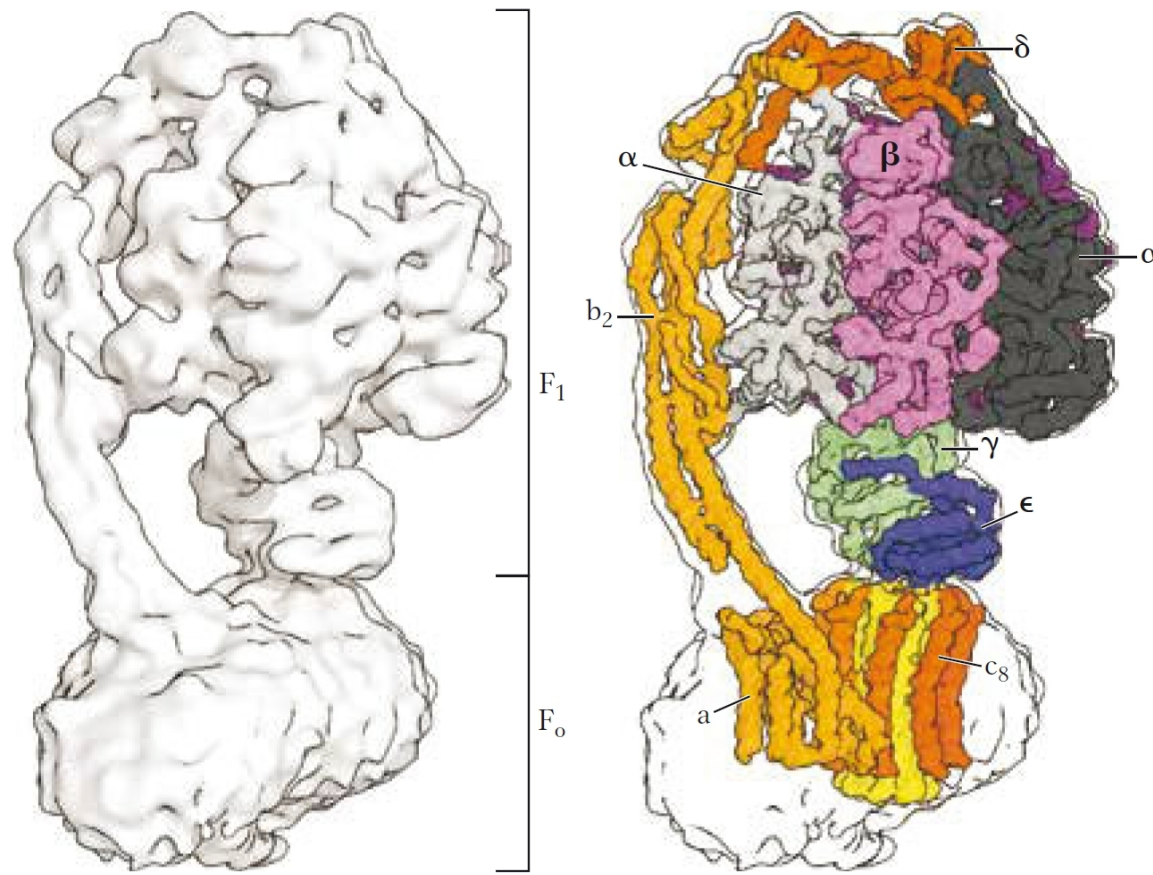


Figura 2 (a) Struttura tridimensionale dell'ATP sintasi bovina ottenuta mediante microscopia crioelettronica a singola particella. Il metodo ha rivelato più di una struttura delle subunità a e b nella porzione del complesso inserita nella membrana che era disponibile dalla cristallografia a raggi X. La struttura in basso a sinistra include la subunità a e un'estensione della subunità b, come anche diverse altre

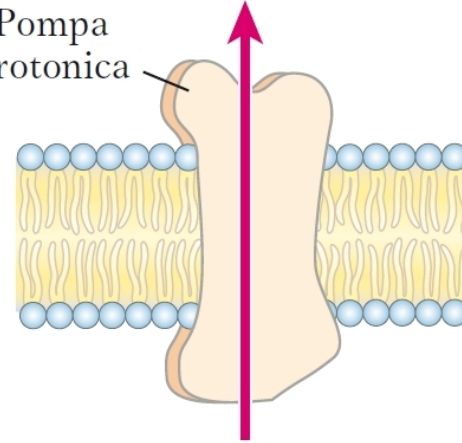
piccole proteine associate alla struttura F_o ma non visibili nelle strutture cristallografiche. (b) Un modello atomico coerente con le strutture cristalline a raggi X può essere inserito nell'involucro ottenuto dalla crio-EM, fornendo un'immagine nettamente migliore dell'intera struttura della ATP sintasi. [Fonti: (a) EMD-3164 e (b) PDB ID 5ARA, A. Zhou et al., *eLife* 4:e10180, 2015.]

Lato P

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



Pompa
protonica



Lato N

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



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

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

Figura 19.17 La forza motrice protonica. La membrana mitocondriale interna separa due compartimenti a diversa concentrazione di H^+ , con differenze quindi sia nella concentrazione chimica di H^+ (ΔpH) sia nella distribuzione delle cariche attraverso la membrana ($\Delta\psi$). Queste differenze generano la forza motrice protonica (ΔG), che può essere calcolata nel modo mostrato nella figura. Maggiori spiegazioni sono contenute nel testo.

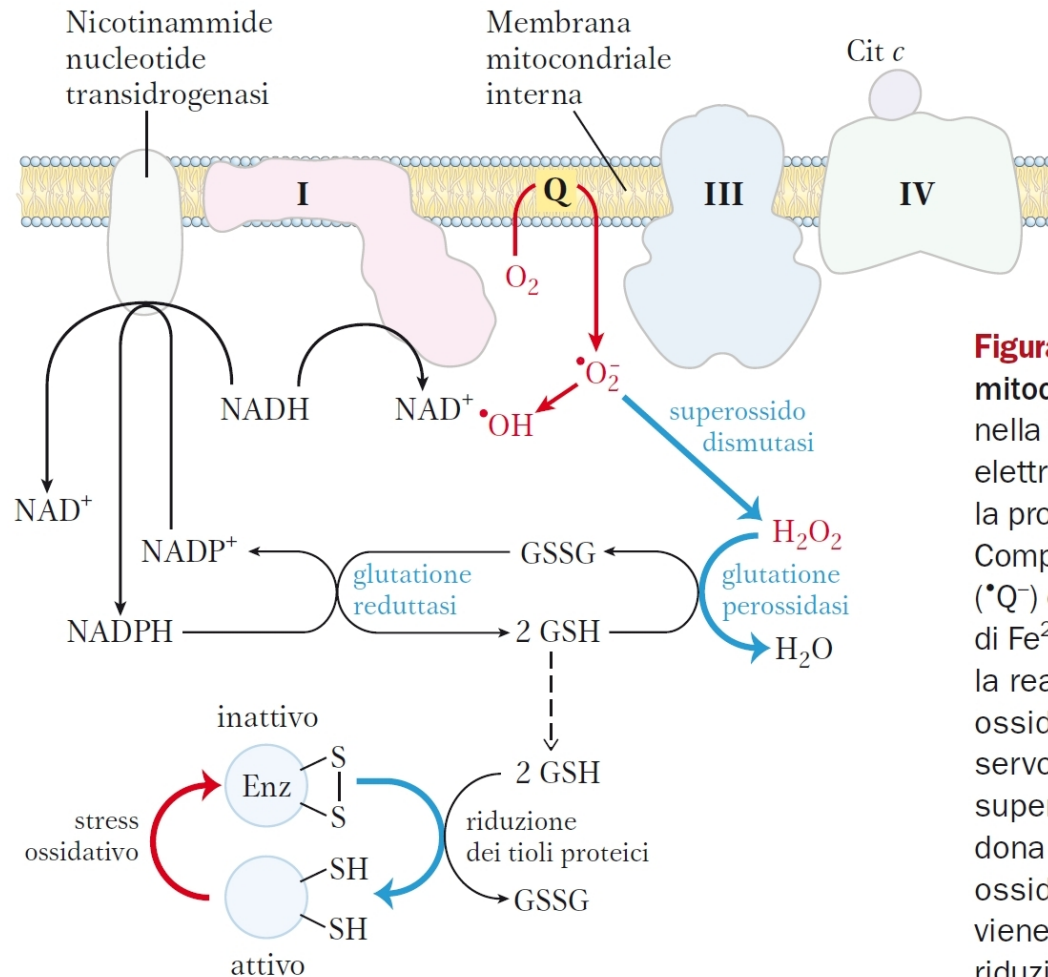


Figura 19.18 Formazione di ROS nei mitocondri e difese mitocondriali. Quando la velocità di ingresso degli elettroni nella catena respiratoria e la velocità di trasferimento degli elettroni lungo la catena respiratoria non sono uguali, aumenta la produzione del radicale superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) a livello dei Complessi I e III, in quanto l'ubichinone parzialmente ridotto ($\cdot\text{Q}^-$) dona un elettrone all' O_2 . Il superossido induce il rilascio di Fe^{2+} sull'aconitasi, una proteina 4Fe-4S. In presenza di Fe^{2+} , la reazione di Fenton porta alla formazione del radicale libero ossidrilico $\cdot\text{OH}$ altamente reattivo. Le reazioni indicate in blu servono a difendere la cellula contro gli effetti dannosi del superossido. Il glutathione ridotto (GSH; vedi la Figura 22.29) dona gli elettroni per la riduzione dell' H_2O_2 e dei residui di Cys ossidati ($-\text{S}-\text{S}-$) degli enzimi e di altre proteine; il GSH viene rigenerato dalla sua forma ossidata (GSSG) mediante riduzione da parte del NADPH.