

LA CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE

Key Concepts

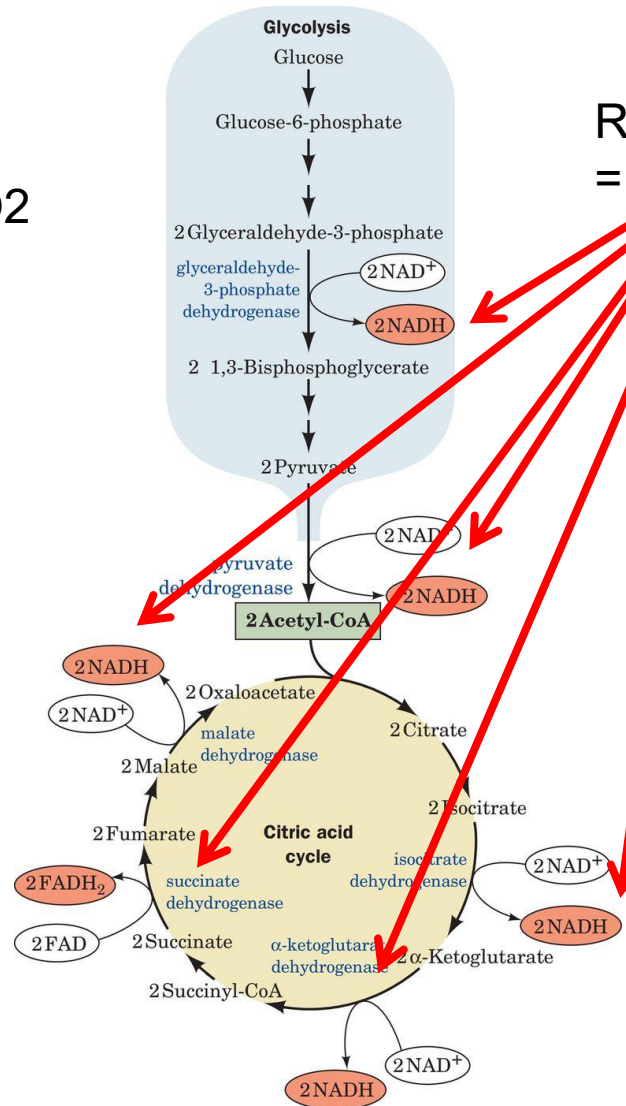
- The free energy of electron transport from NADH to O₂ can drive the synthesis of approximately 2.5 ATP.
- Electron carriers are arranged in the mitochondrial membrane so that electrons travel from Complexes I and II via coenzyme Q to Complex III, and from there via cytochrome c to Complex IV.

Overview: Oxidative Fuel Metabolism

Durante l'ossidazione dei metaboliti gli organismi AEROBI consumano OSSIGENO e producono CO₂



Ma gli elettroni non sono trasferiti direttamente all'OSSIGENO



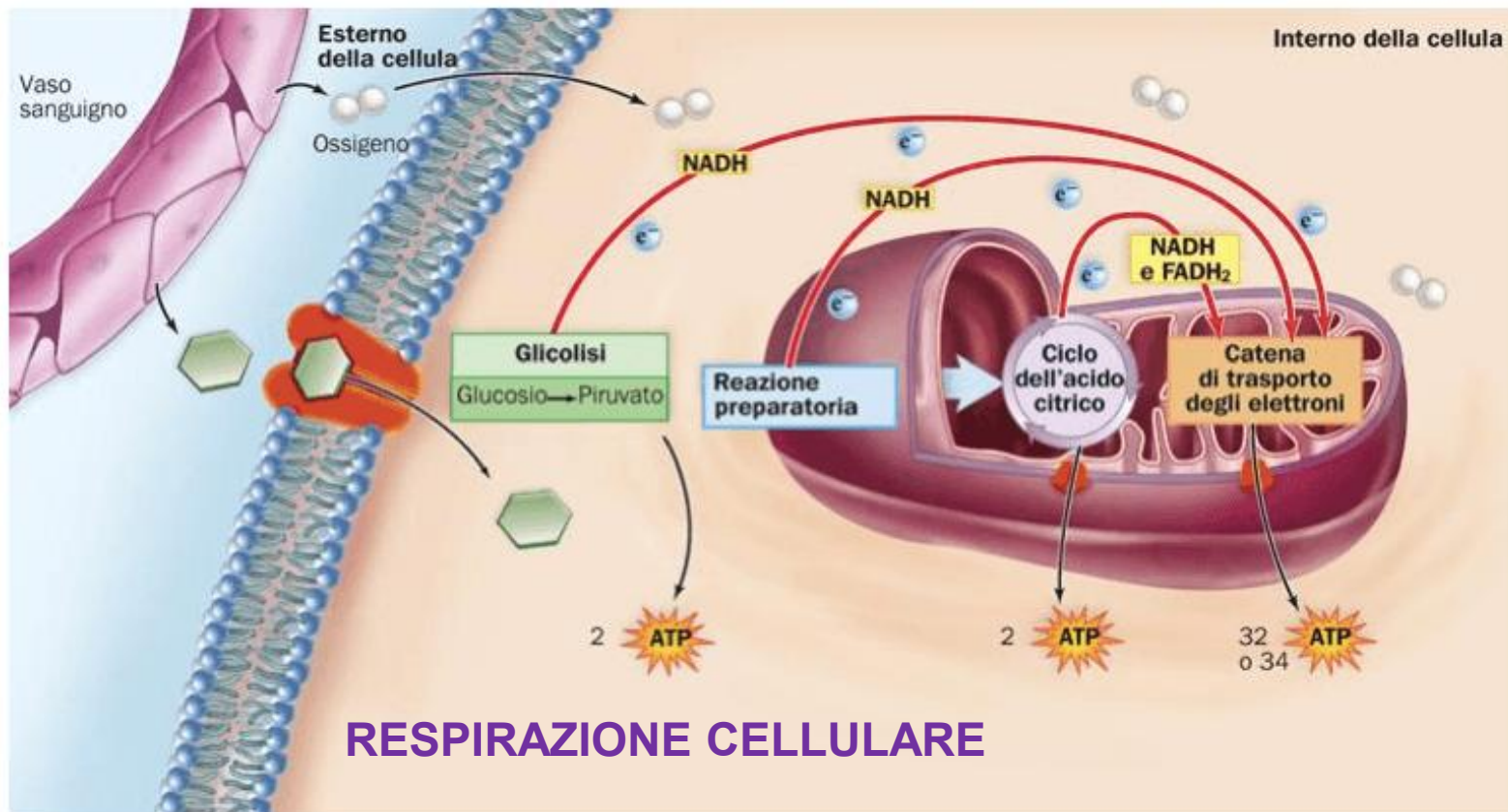
Reazioni OSSIDOREDUTTIVE
= DEIDROGENAZIONI

Gli elettroni delle reazioni di ossidoriduzione vengono incanalati verso gli accettori universali:

Deidrogenasi NADH dipendenti
Flavoproteine (FADH₂)

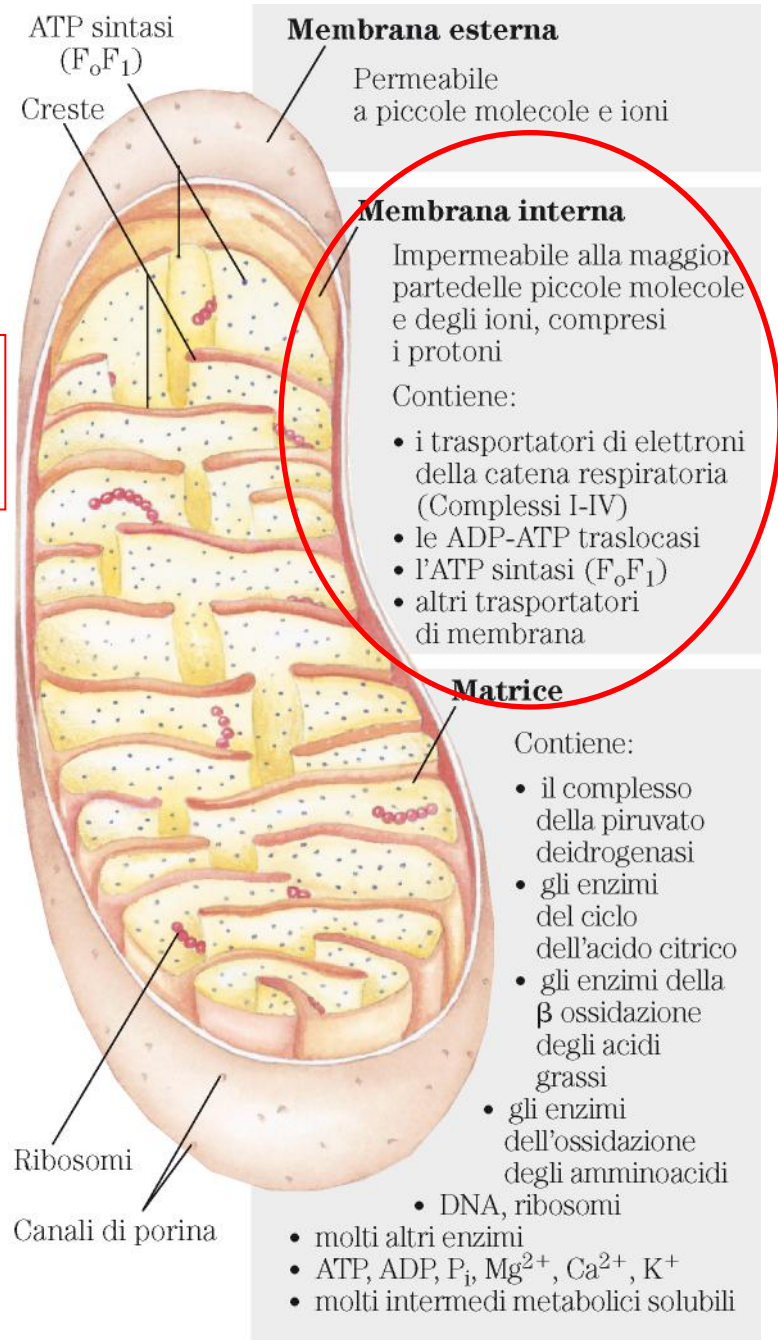
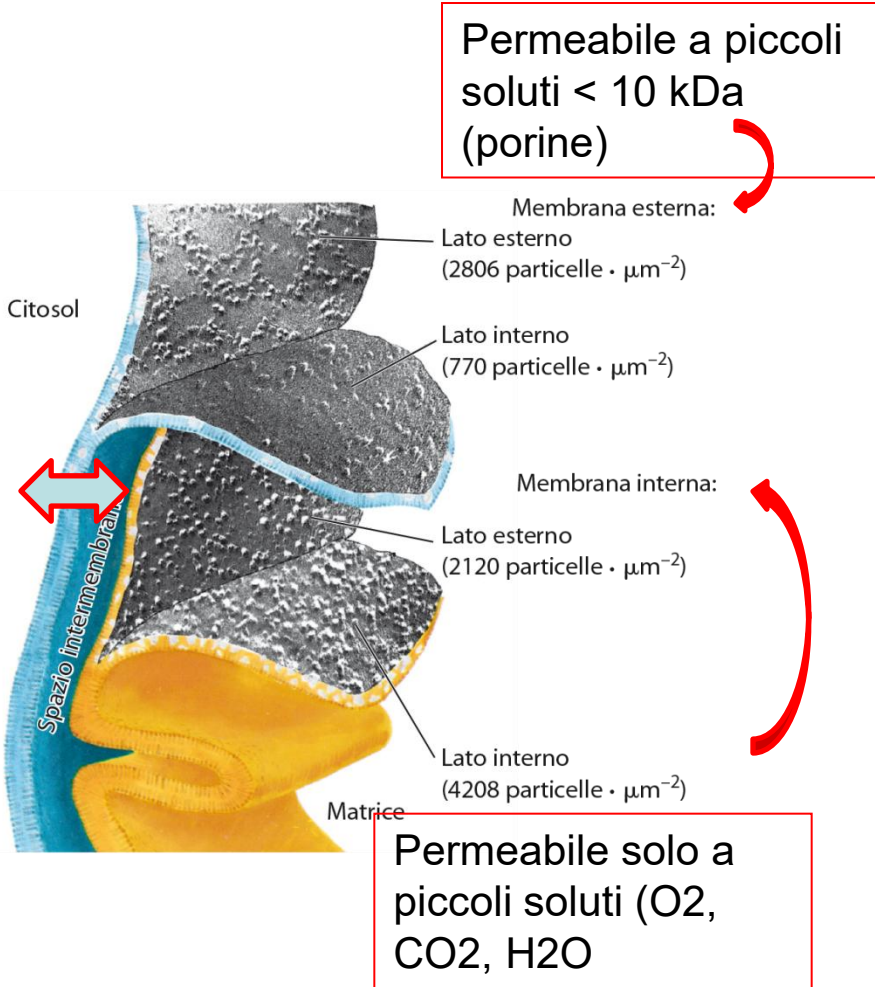
Gli elettroni passano attraverso una serie di trasportatori legati alla membrana (catena mitocondriale)

- 1) Trasferimento diretto degli elettroni ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$)
- 2) Trasferimento di un atomo di idrogeno ($1\text{H}^+ + 1\text{e}^-$)
- 3) Trasferimento di uno ione idruro

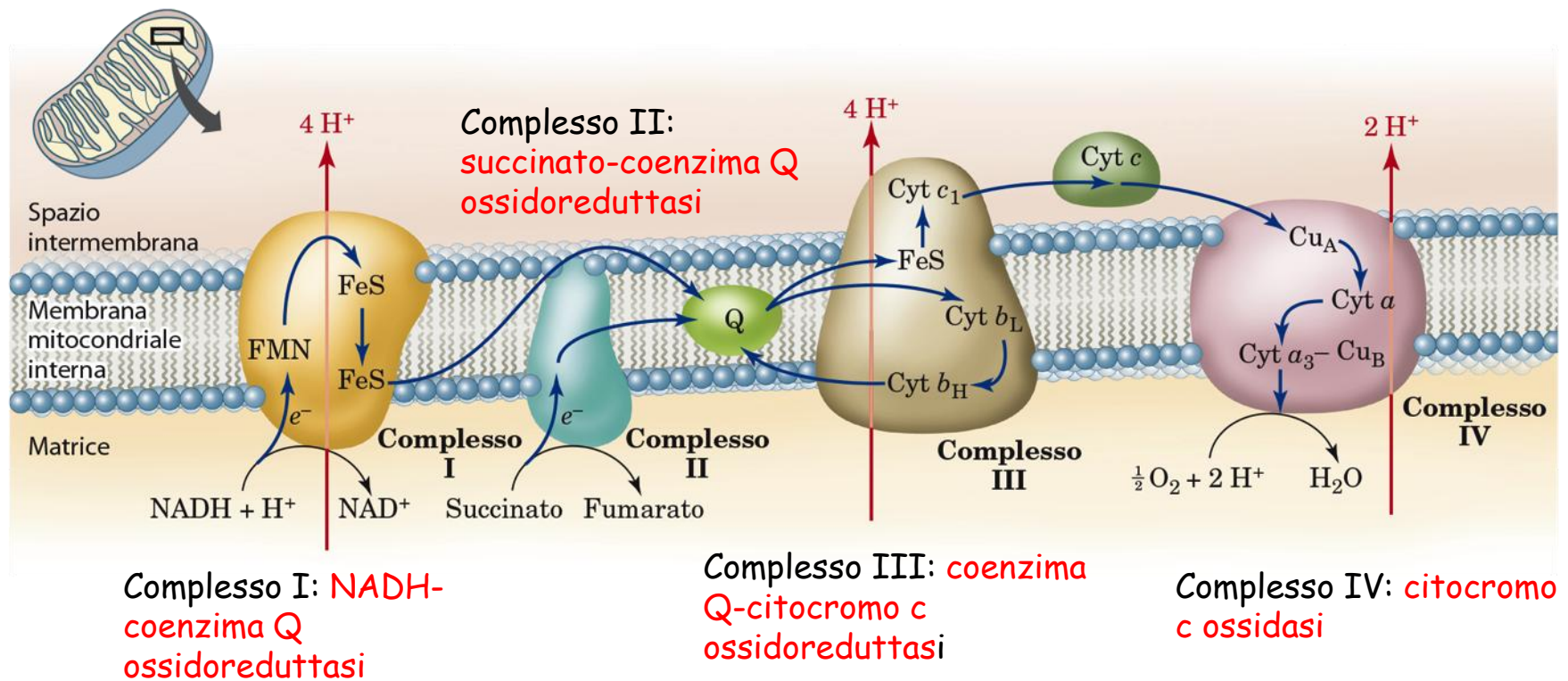


Il metabolismo ossidativo avviene nel Mitocondrio:

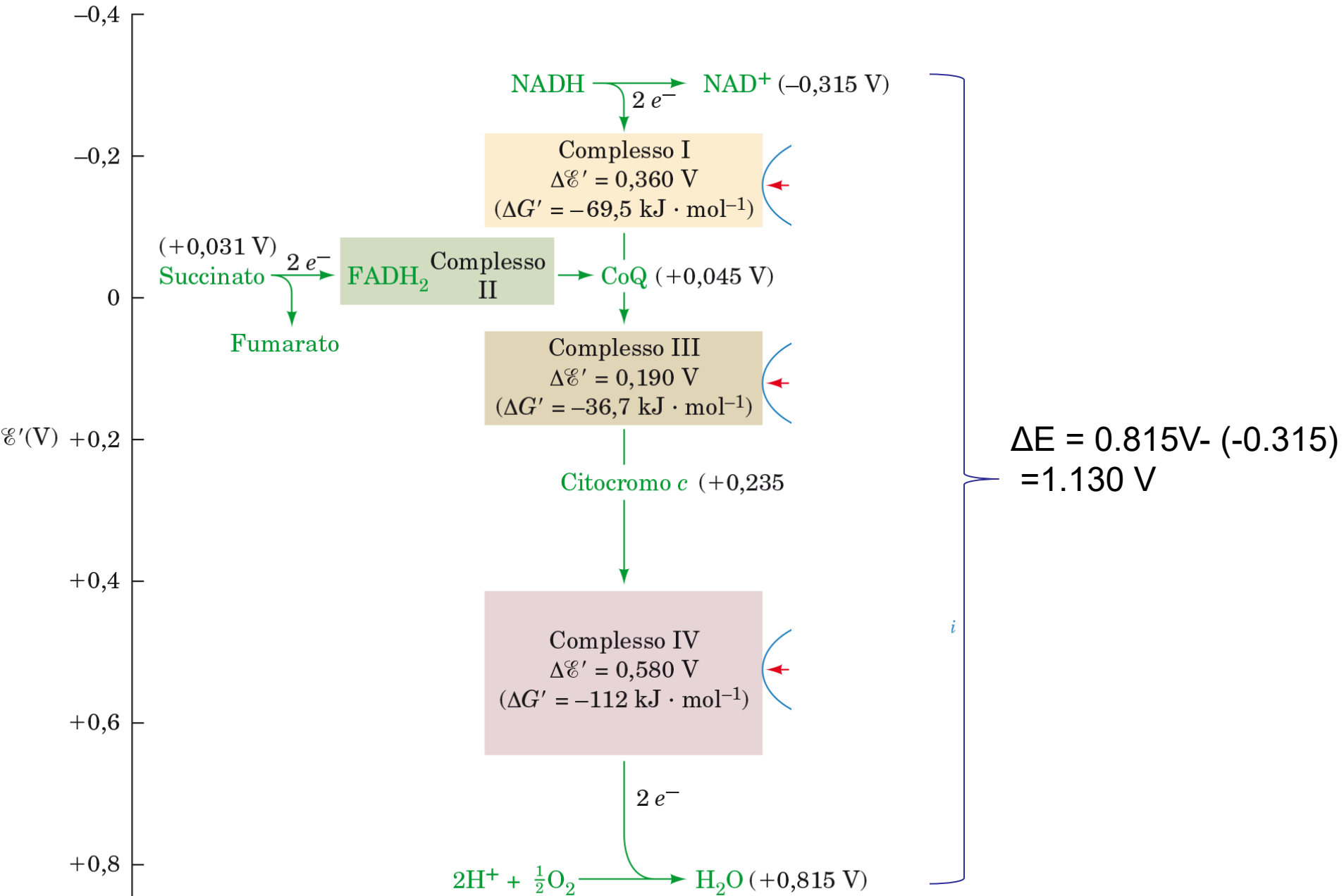
- dimensioni di un batterio
- 800-2000 mitocondri /cell



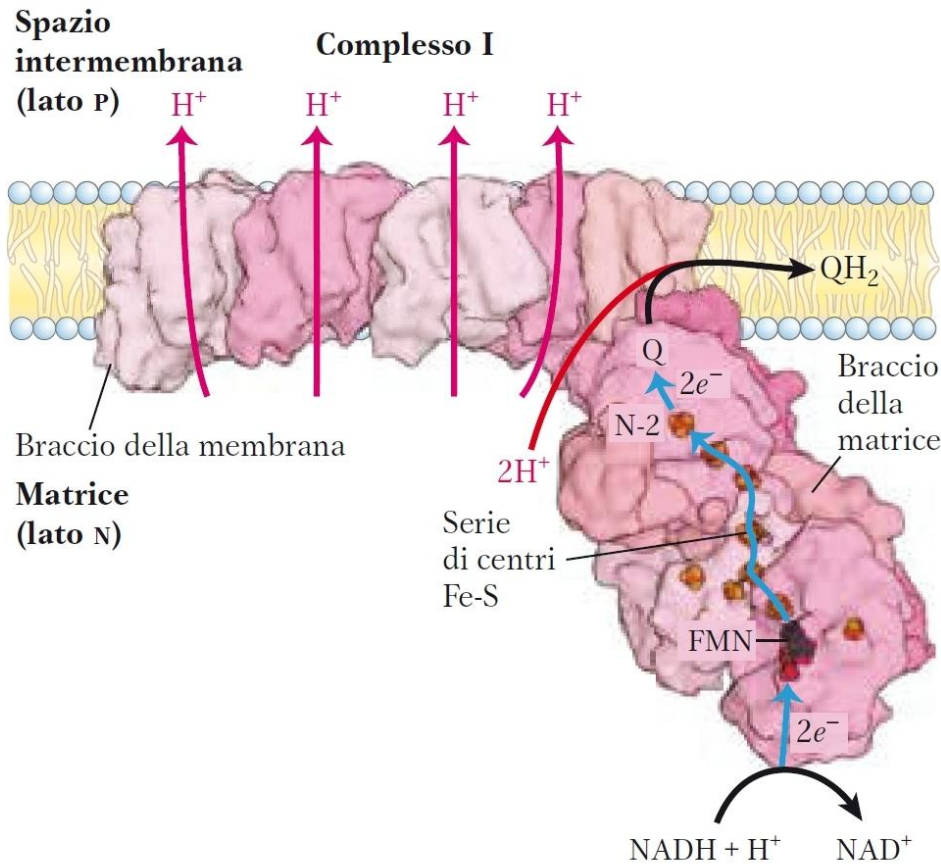
La catena di trasporto degli elettroni è formata da 4 complessi multiproteici contenuti centri redox a potenziale crescente



Il trasporto degli elettroni è un processo esoergonico



Complesso I: NADH-coenzima Q ossidoreduttasi



Catalizza il trasferimento di uno ione idruro dal NADH al coenzima Q

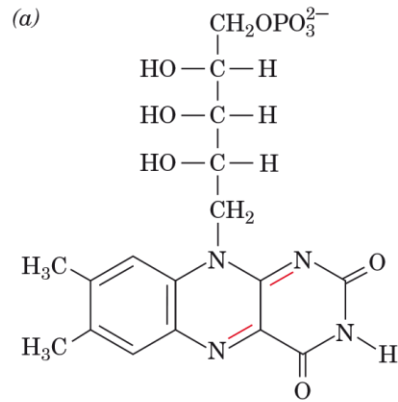
- 45 catene polipeptidiche
- FMN
- 7 centri [4Fe-4S]
- 2 centri [2Fe-2S]

TABLE 18-1 Reduction Potentials of Electron-Transport Chain Components in Resting Mitochondria

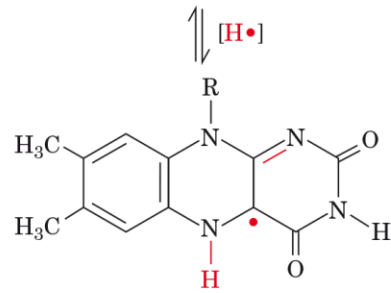
Component	\mathcal{E}° (V)
NADH	-0.315
Complex I (NADH-CoQ oxidoreductase; ~1000 kD monomer, 44 unique subunits):	
FMN	-0.380
[2Fe-2S]N1a	-0.370
[2Fe-2S]N1b	-0.250
[4Fe-4S]N3, 4, 5, 6a, 6b, 7	-0.250
[4Fe-4S]N2	-0.150

Il trasferimento è esoergonico perché avviene secondo gradiente di potenziale di riduzione standard

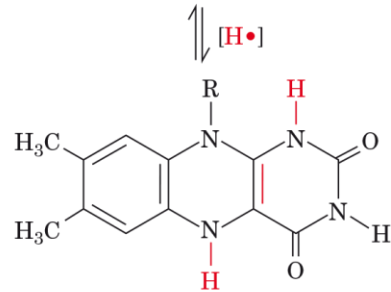
Saldamente unito alle proteine come gruppo prostetico



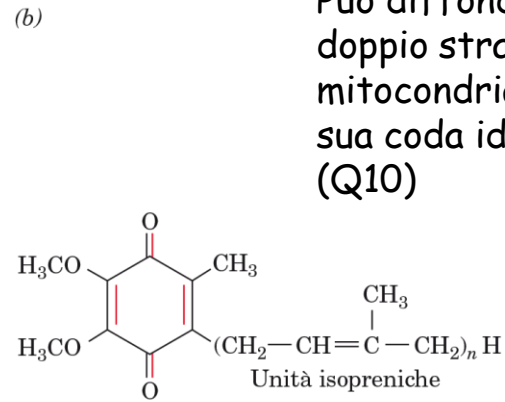
Flavina mononucleotide (FMN)
(forma ossidata, o forma chinonica)



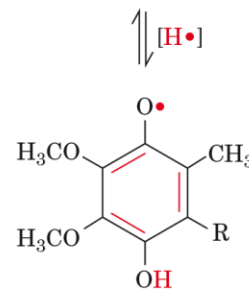
FMNH• (forma radicalica, o forma semichinonica)



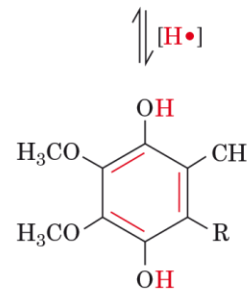
FMNH₂ (forma ridotta, o forma idrochinonica)



Coenzima Q (CoQ) o ubiquinone
(forma ossidata, o forma chinonica)



Coenzima QH• o semiubichinone
(forma radicalica, o forma semichinonica)

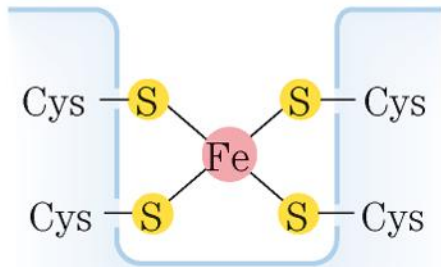


Coenzima QH₂ o ubichinolo
(forma ridotta o idrochinonica)

Può diffondere liberamente nel doppio strato della membrana mitocondriale interna grazie alla sua coda idrofobica isoprenoide (Q10)

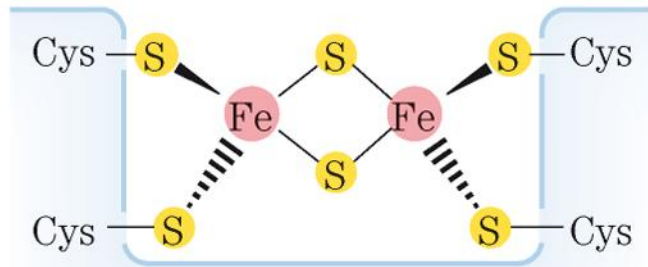
Centri ferro-zolfo: gruppi prostetici di proteine Fe-S -possono acquistare o cedere solo un elettrone per volta!

(a)



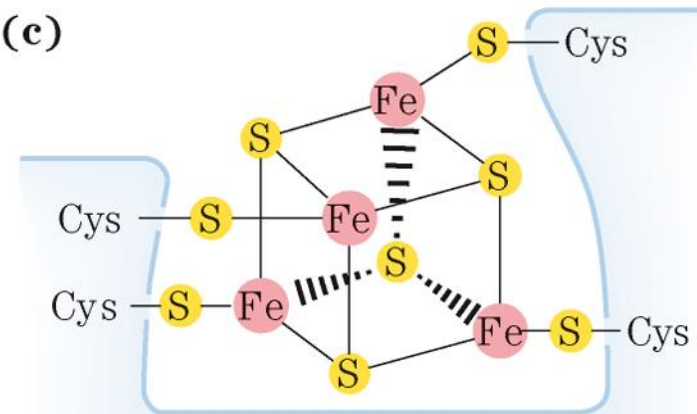
Proteina

(b)

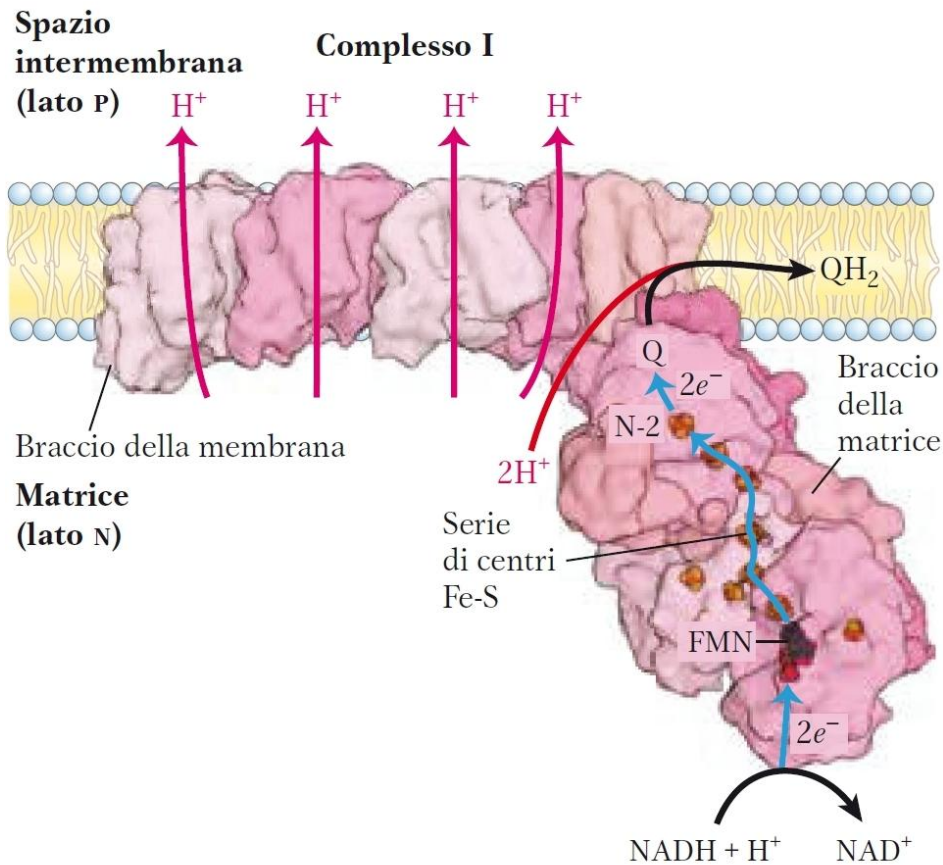


centri [2Fe-2S]

(c)



centri [4Fe-4S]



L'FMN, con la sua forma semichinonica, funge da ponte tra un trasportatore a due elettroni (NADH) e un trasportatore ad un elettrone (centri Fe-S)

il trasferimento esoergonico degli elettroni attraverso i trasportatori a diverso potenziale di riduzione rende possibile il trasferimento endoergonico di PROTONI dalla matrice allo spazio intermembrana

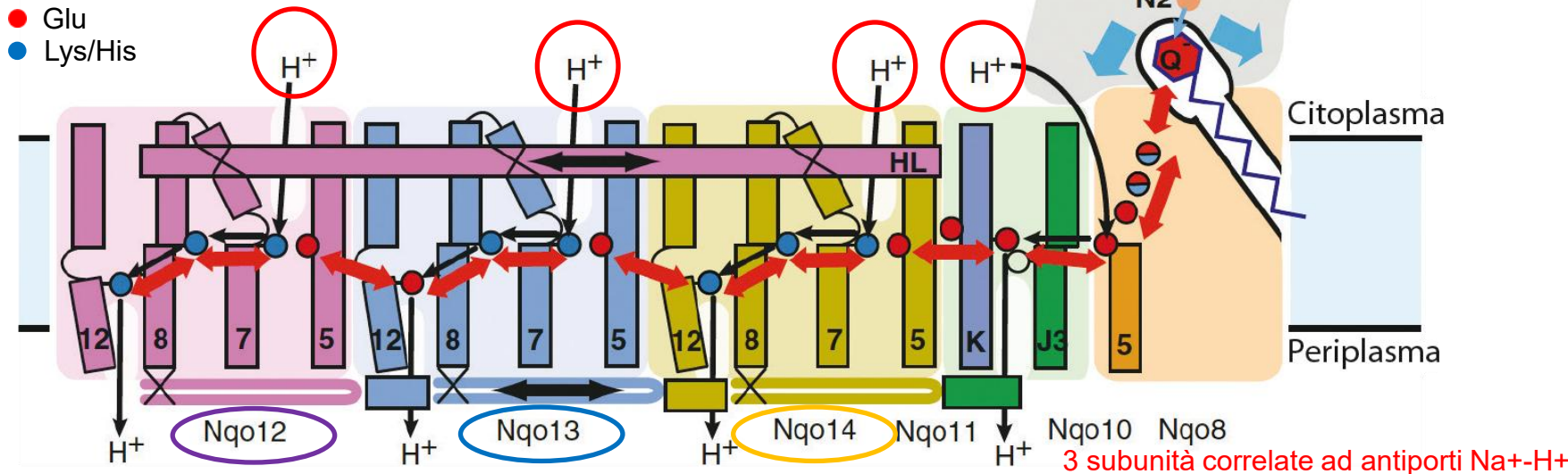
Complesso I: NADH-coenzima Q ossidoreduttasi è una POMPA PROTONICA

-trasloca in maniera **VETTORIALE** 4 protoni dalla **matrice** allo **spazio intermembrana**

Modificazioni conformazionali delle 3 subunità, indotte dalla variazione del loro stato di ossidoriduzione, cambiano il pK delle catene laterali ionizzabili in modo che i protoni siano rilasciati mentre gli elettroni son trasferiti.

I gruppi ionizzabili legati tra loro da legami H formano »**FILA DI PROTONI**«

200 volte /sec!!
Turnover del complesso I



Complesso II: succinato-coenzima Q ossidoreduttasi

Omotrimero:

Accoppia l'ossidazione del succinato alla riduzione di Q

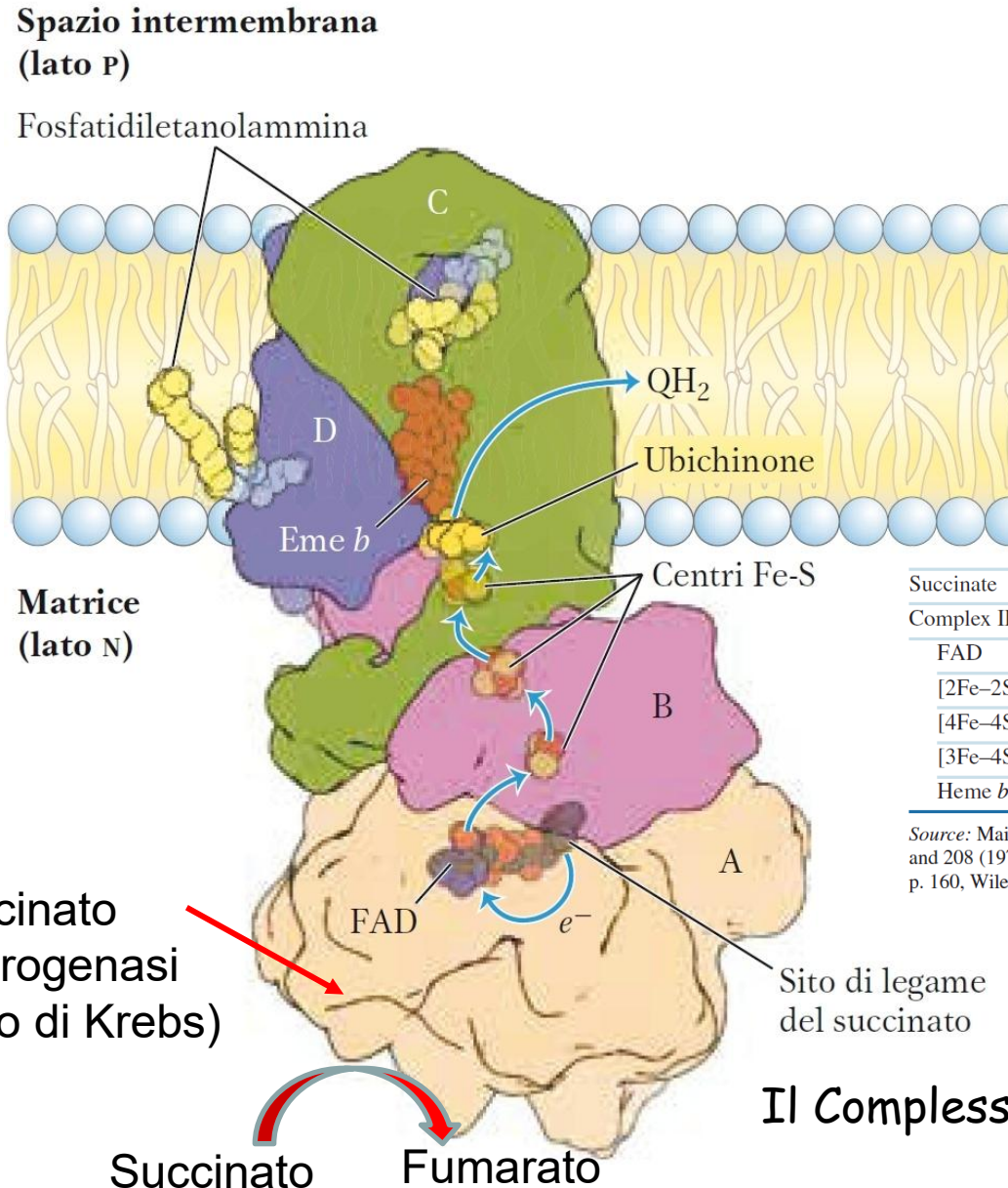
-FAD

-1 centro [4Fe-4S]

-1 centro [3Fe-3S]

-1 centro [2Fe-2S]

-1 citocromo b560 (scavenger ROS)



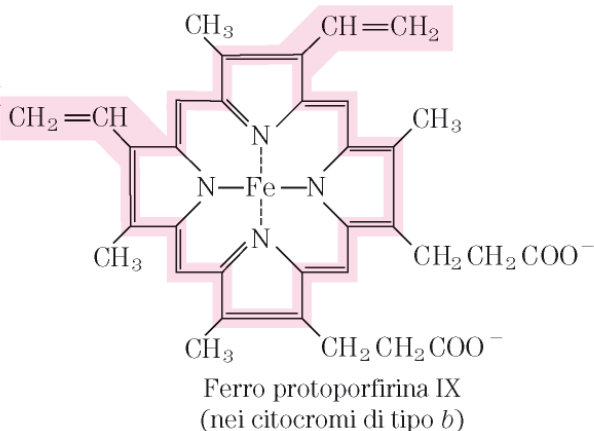
Succinate	0.031
Complex II (succinate-CoQ oxidoreductase; ~420 kD trimer, 4 unique subunits):	
FAD	-0.040
[2Fe-2S]	-0.030
[4Fe-4S]	-0.245
[3Fe-4S]	-0.060
Heme b_{560}	-0.080

Source: Mainly Wilson, D.F., Erecinska, M., and Dutton, P.L., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 205 and 208 (1974); and Wilson, D.F., in Bittar, E.E. (Ed.), *Membrane Structure and Function*, Vol. 1, p. 160, Wiley (1980).

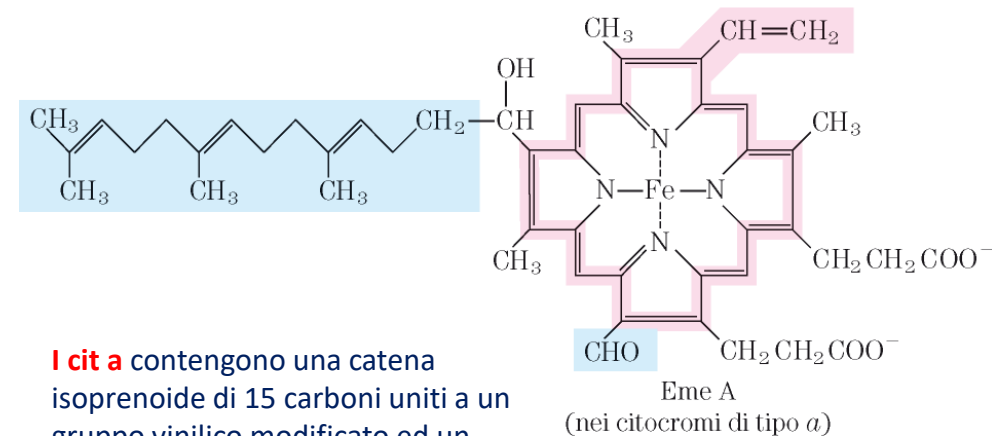
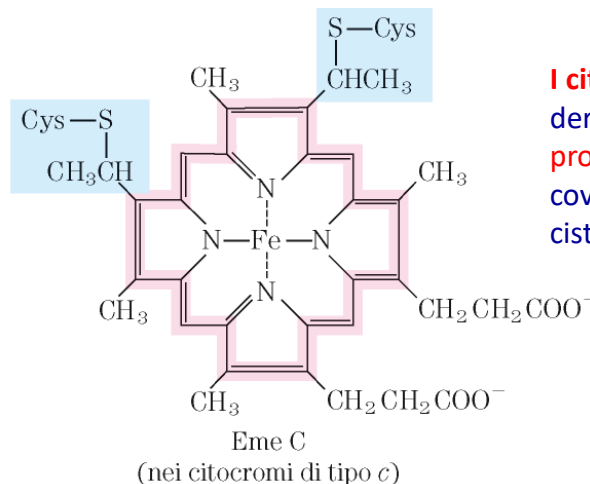
Il Complesso II NON è una pompa protonica

Gruppo eme dei citocromi mitocondriali

I cit b contengono la ferro-protoporfirina IX lo stesso eme che si trova nell'emoglobina e nella mioglobina

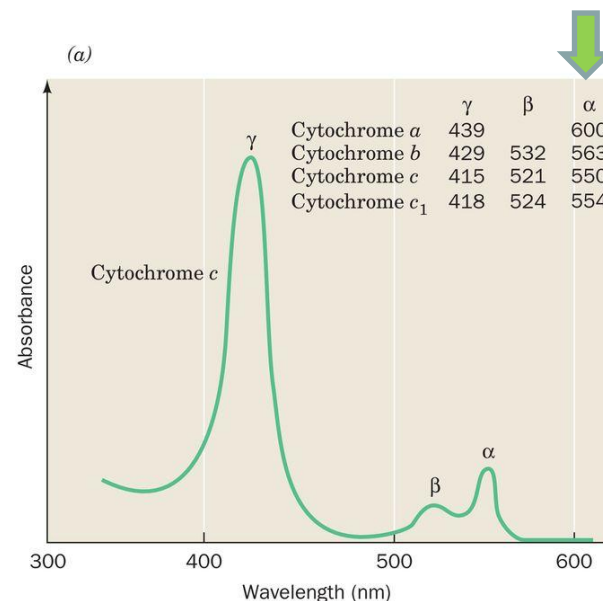


I cit c contengono l'eme c, derivato dalla ferro-protoporfirina IX ma legata covalentemente a residui di cisteina della apoproteina.



I cit a contengono una catena isoprenoide di 15 carboni uniti a un gruppo vinilico modificato ed un gruppo formile al posto di uno dei metili.

-possono acquistare o cedere solo un elettrone per volta!

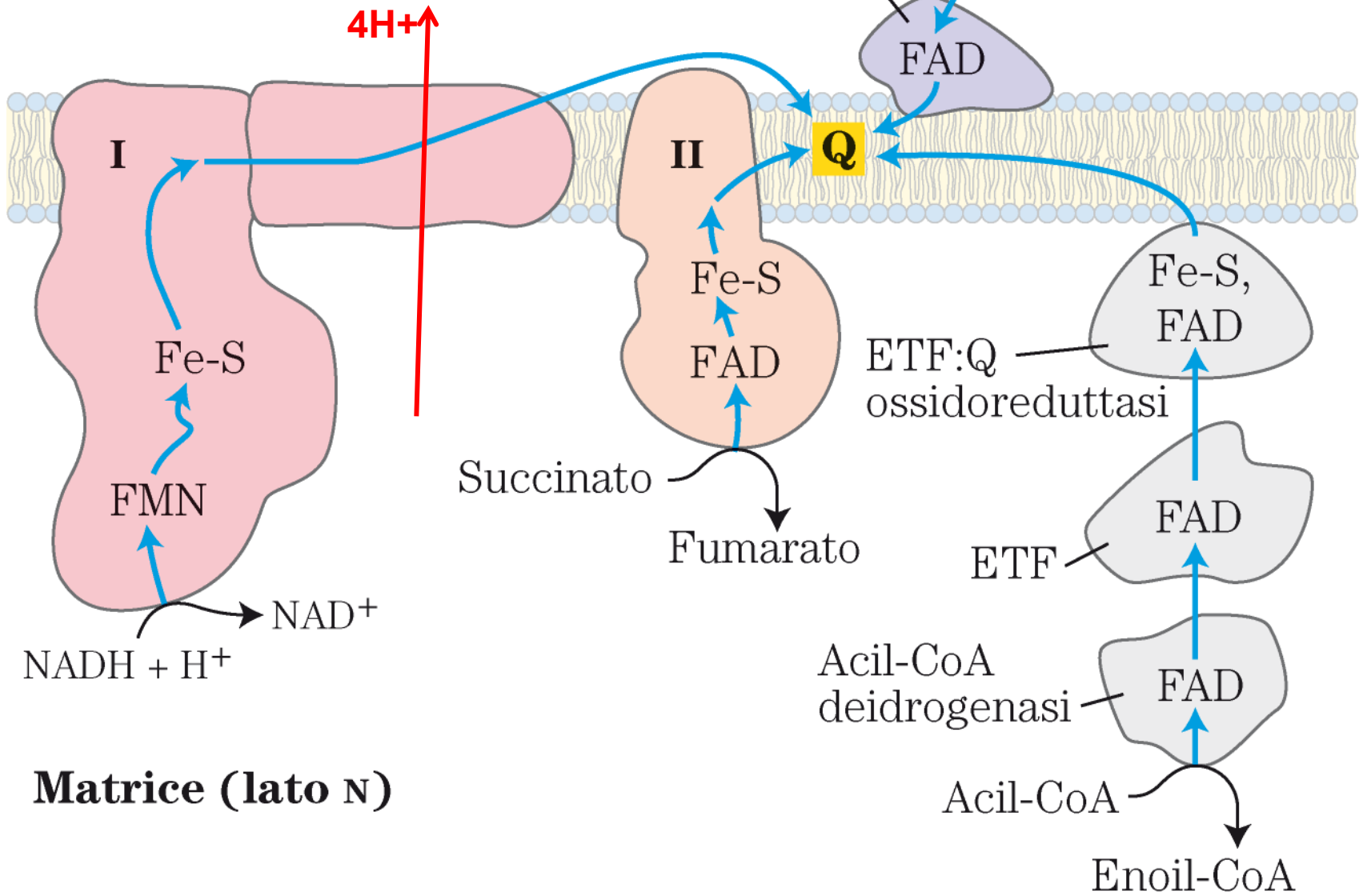


Cit ridotti

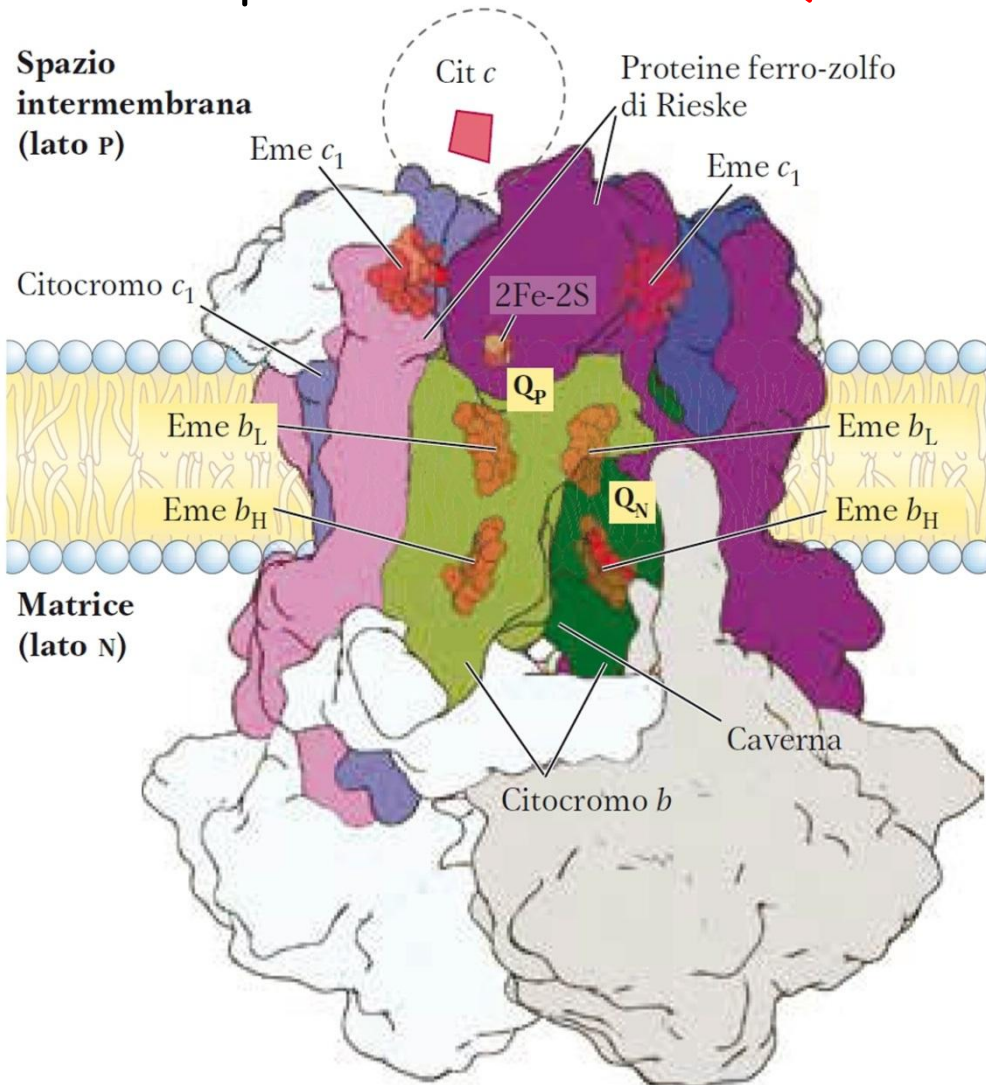
Spazio intermembrana (lato P)

Glicerolo 3-fosfato deidrogenasi

Glicerolo 3-fosfato (citosolico)



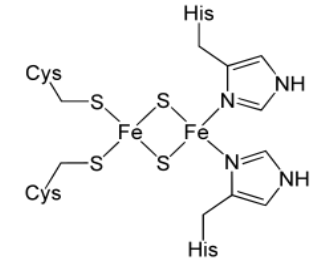
Complesso III: coenzima Q-citocromo c ossidoreduttasi (cit bc1)



Trasferisce 2 elettroni dal QH2 a due molecole di Citocromo c.

Omodimero:

-1 proteina ISP con 1 centro [2Fe-2S] detto di Rieske (coord. a 2 His e 2 Cys)



-2 citocromi b (eme bH e eme bL)

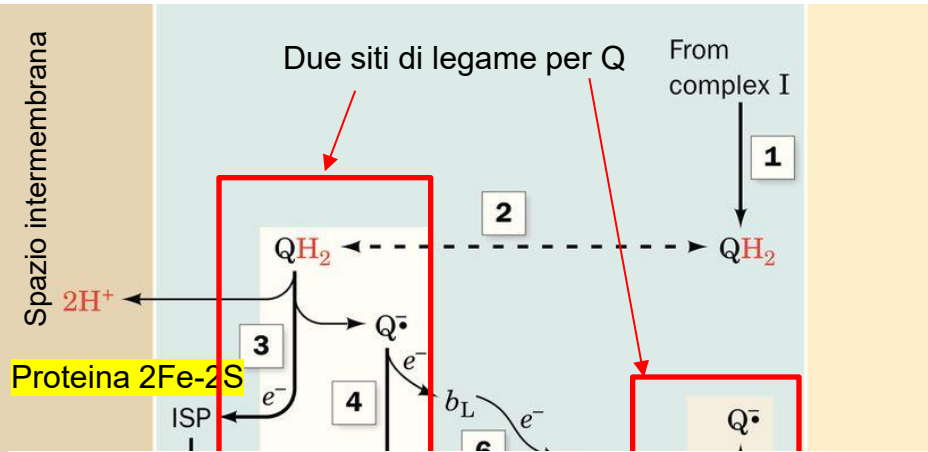
-1 citocromo c1

TABLE 18-1 Reduction Potentials of Electron-Transport Chain Components in Resting Mitochondria

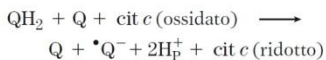
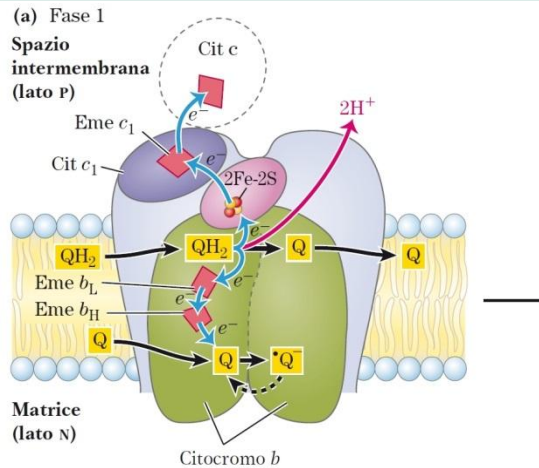
Component	\mathcal{E}° (V)
Complex III (CoQ-cytochrome <i>c</i> oxidoreductase; ~450 kD dimer, 9–11 unique subunits):	
Heme b_H (b_{562})	0.030
Heme b_L (b_{566})	-0.030
[2Fe-2S]	0.280
Heme c_1	0.215
Cytochrome <i>c</i>	0.235

Il QH2 subisce **due cicli** di ossidazione in cui il semichinone è l'intermedio stabile
CICLO Q

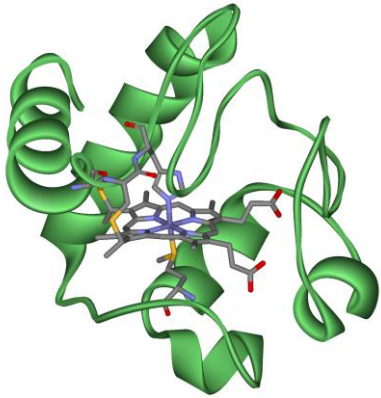
The Q Cycle: per ogni 2 molecole di QH2 si rigenera 1 QH2



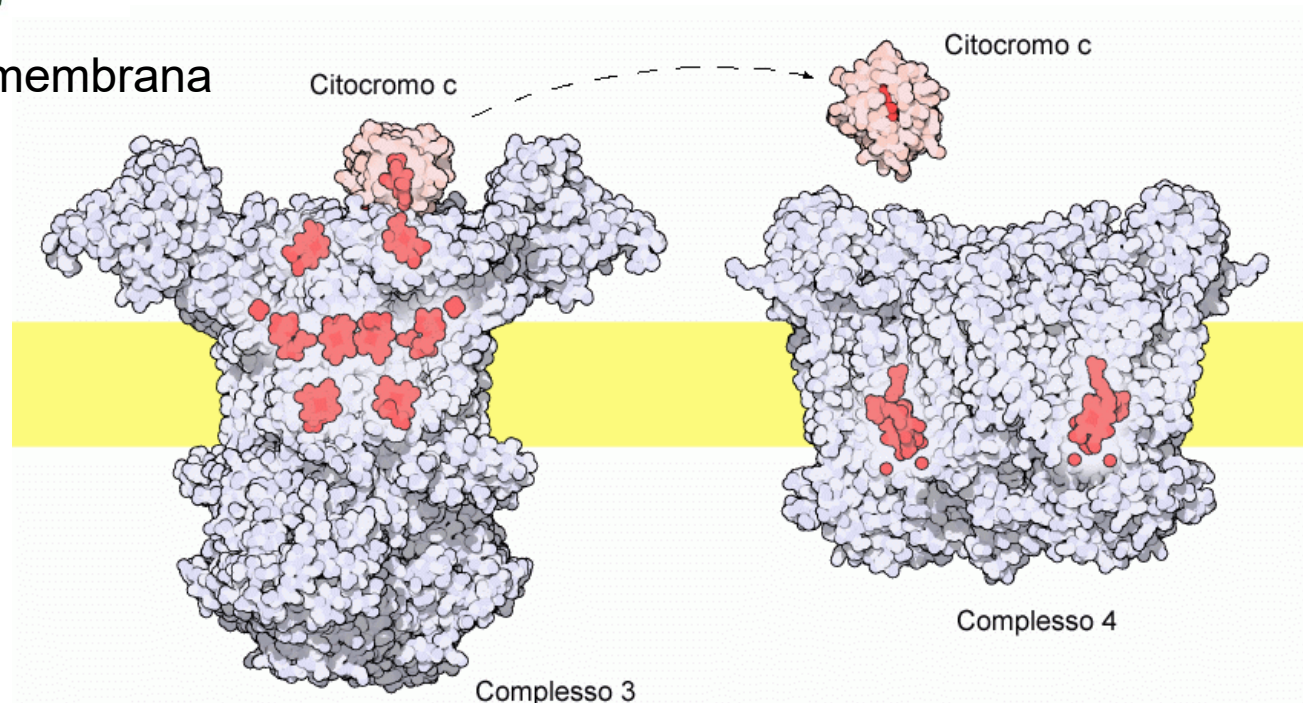
IL COMPLESSO III E' UNA POMPA PROTONICA



Gli elettroni che arrivano al citocromo c1 vengono trasferiti al **citocromo c** che è una proteina periferica di membrana che trasporta gli elettroni dal complesso III al complesso IV sulla superficie esterna (lato p) della membrana mitocondriale interna

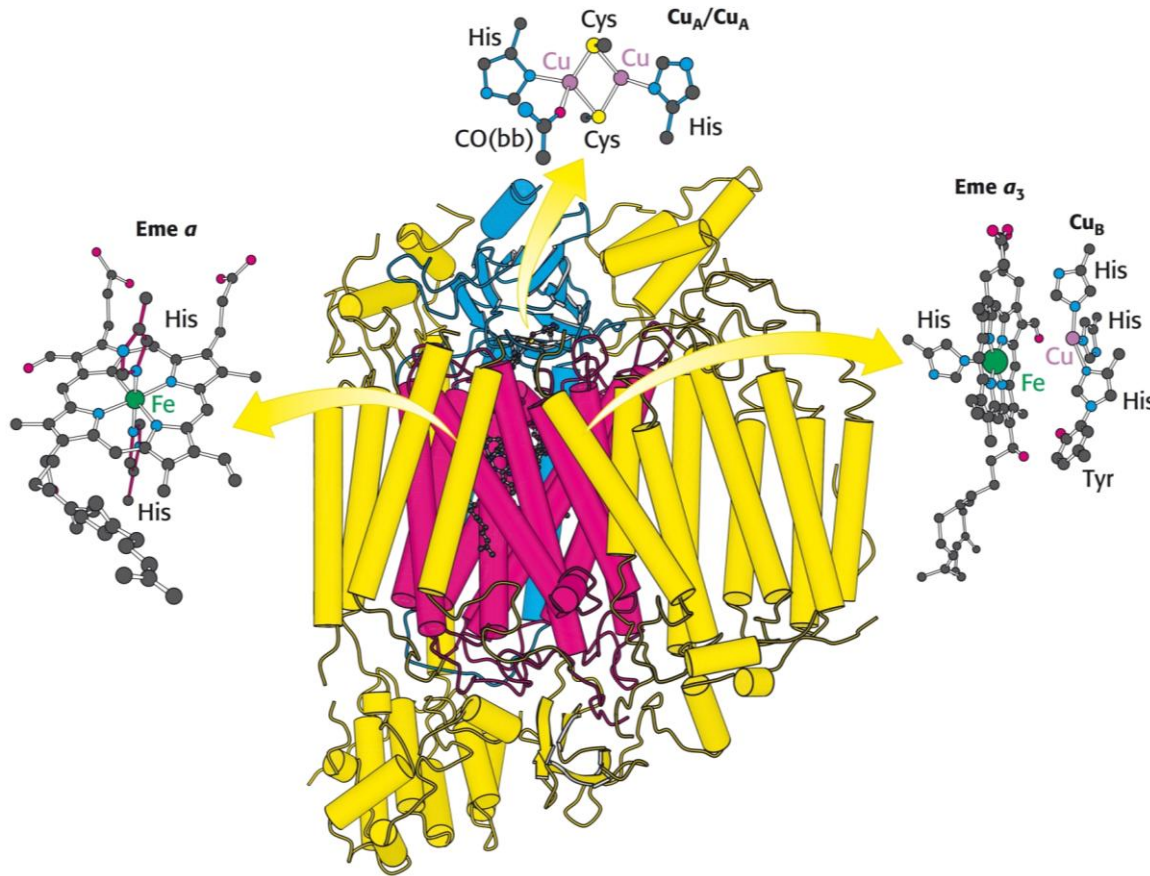


Spazio intermembrana



Matrice

Complesso IV: citocromo c ossidasi



Catalizza la reazione di ossidazione ad un solo elettrone di 4 molecole di cit. c ridotto, con la contemporanea riduzione di una molecola di ossigeno (acqua)

-1 omodimero (13 subunità)

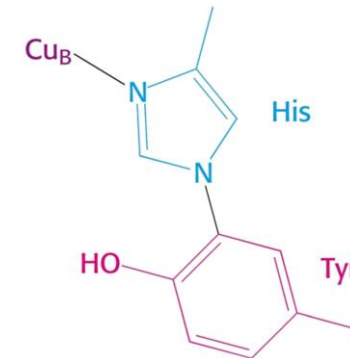
-1 citocromo a

-1 citocromo a₃

-1 atomo di rame Cu-B

-1 centro binucleare rame CuA/CuA

Centro binucleare a₃-CuB

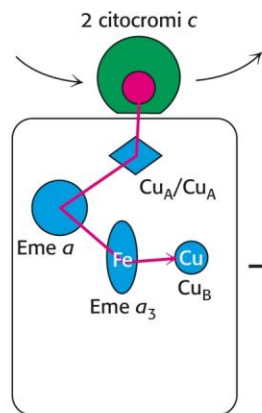


Istidina legata covalentemente alla tirosina

Figura 18.13 Struttura della citocromo c ossidasi

L'enzima è costituito da 13 catene polipeptidiche. La maggior parte del complesso, come pure i due principali gruppi prostetici (l'eme a e l'eme a₃-Cu_B), è immersa nella membrana (le α-eliche sono rappresentate dai cilindri verticali). L'eme a₃-Cu_B è il sito di riduzione dell'ossigeno ad acqua. Il gruppo prostetico Cu_A/Cu_A è localizzato vicino allo spazio intermembrana, per meglio accettare gli elettroni dal citocromo c. CO(bb) è un gruppo carbonilico dello scheletro polipeptidico. [Fonte: 2OCC.pdb.]

1. Due molecole di citocromo *c* trasferiscono sequenzialmente gli elettroni, per ridurre il Cu_B e l'eme α_3 .



2. Il Cu_B ridotto e il Fe dell'eme α_3 si legano all'ossigeno, che forma un ponte perossido.

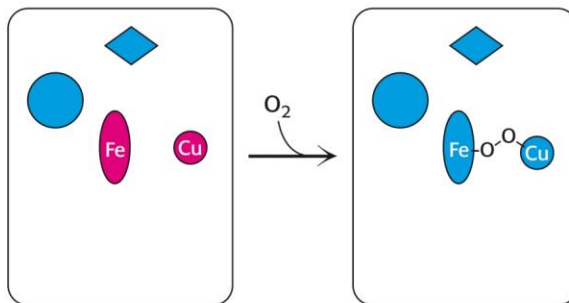
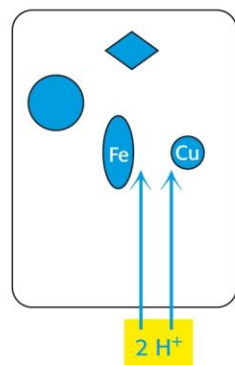
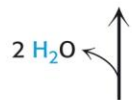
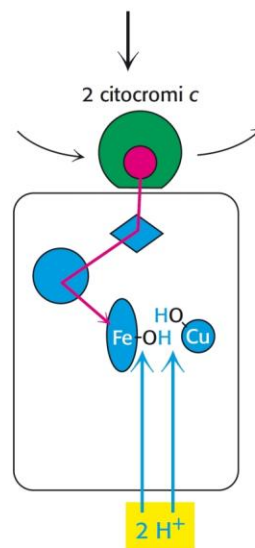


Figura 18.15 Ponte perossido
L'ossigeno legato all'eme α_3 viene ridotto a perossido per la presenza di Cu_B .



4. L'aggiunta di altri due protoni porta al rilascio di acqua.

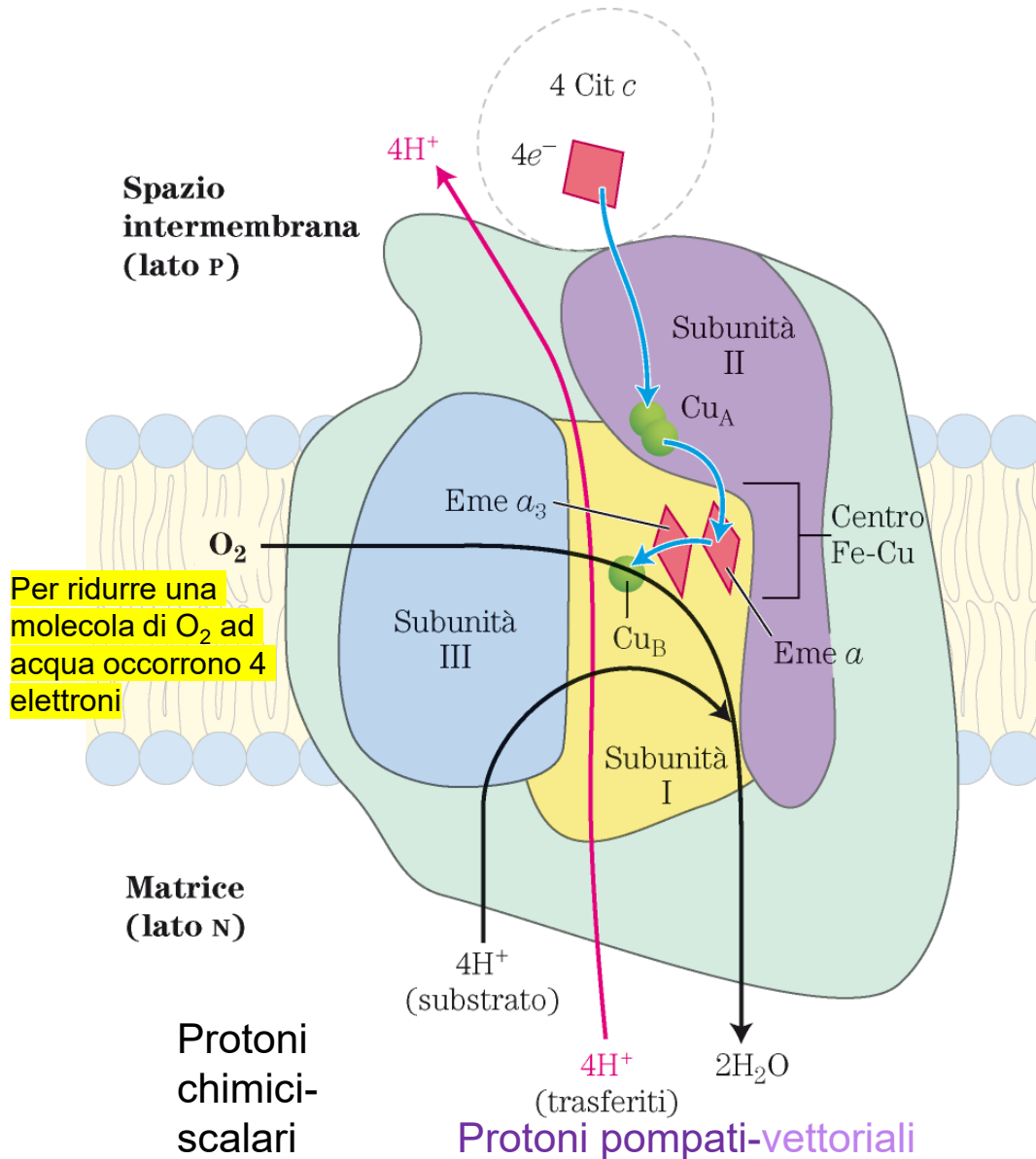


3. L'aggiunta di altri due elettroni e di altri due protoni provoca la scissione del ponte perossido.

Figura 18.14 Meccanismo della citocromo *c* ossidasi

Il ciclo comincia e termina con tutti i gruppi prostetici nella loro forma ossidata (mostrata in blu). Le forme ridotte sono in rosso. Quattro molecole di citocromo *c* donano quattro elettroni, che da una parte permettono il legame e la scissione di una molecola di O_2 , dall'altra rendono possibile il recupero dalla matrice di quattro H^+ per formare due molecole di H_2O , che sono rilasciate dall'enzima allo scopo di ripristinare lo stato iniziale.

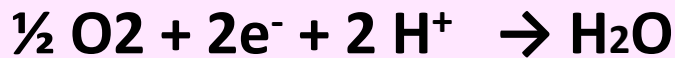
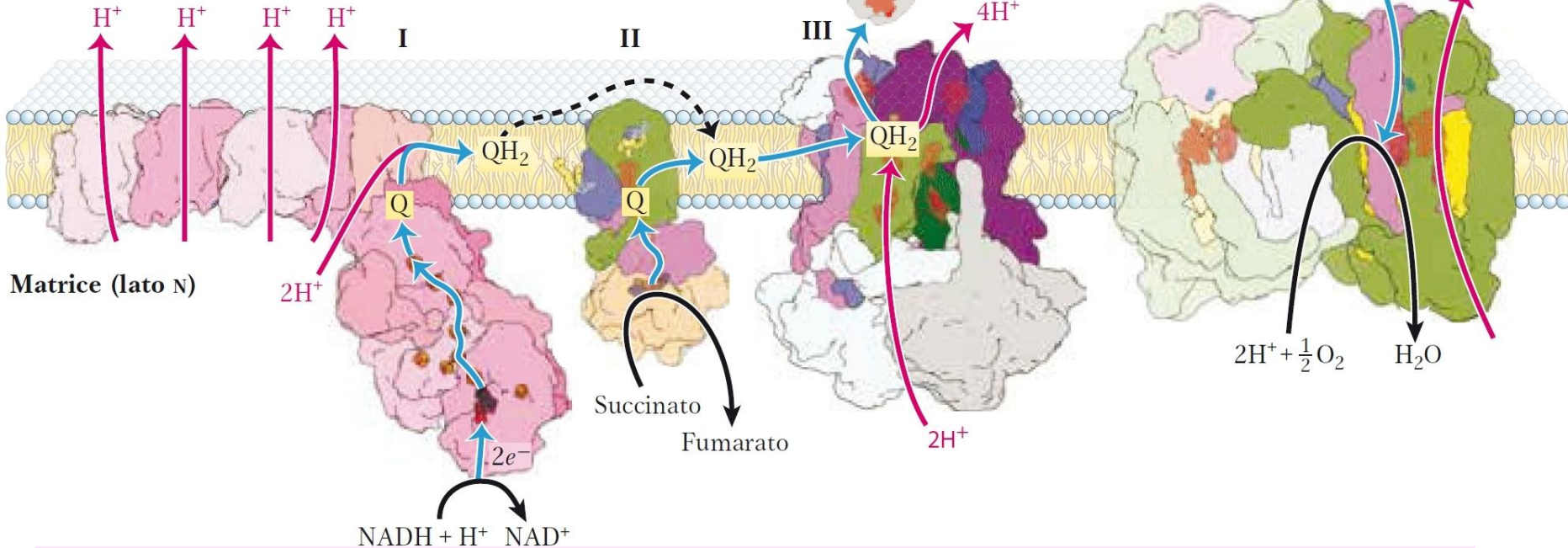
Complesso IV: citocromo c ossidasi



Complesso IV è una **POMPA PROTONICA** (esistono due canali K (per i protoni chimici) e D (per i protoni vettoriali) che sfruttano il meccanismo a "fila di protoni")
-trasloca 4 protoni dalla **matrice** allo **spazio intermembrana**

respirosoma

Spazio intermembrana
(lato P)



$$\begin{aligned} \Delta E^{0'} &= E^{0'} (O_2/H_2O) - E^{0'} (NAD^+/NADH) \\ &= 0.816 - (-0.320) \\ &= +1.14 V \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta G^{0'} &= -n F \Delta E^{0'} \\ &= -2 \times (96.5 \text{ Kj/V} \cdot \text{mole}) \times (+1.14 V) \\ &= -210 \text{ Kj/mole di NADH} \end{aligned}$$

$$E^{0'} = 0.816 V$$

$$E^{0'} = -0.320$$

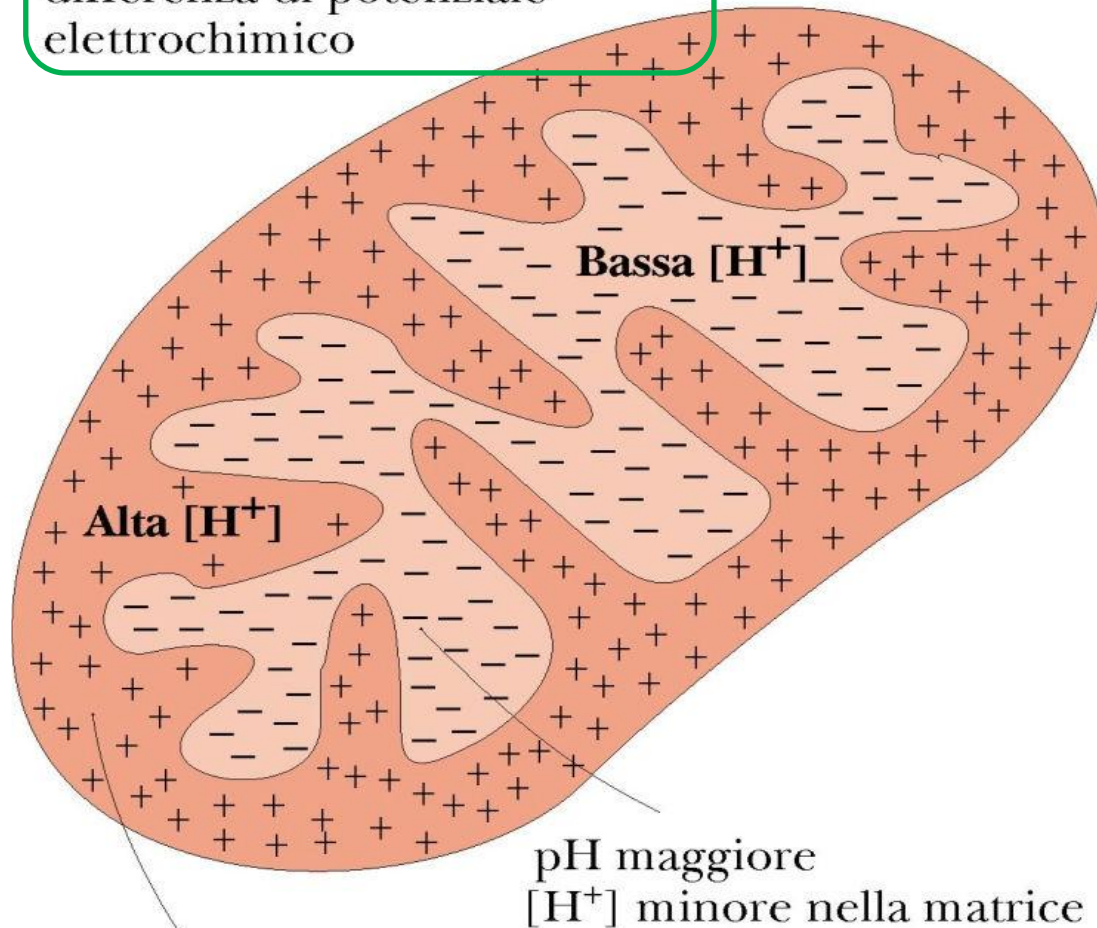
Energia usata per
pompare, contro
gradiente di
concentrazione i
protoni nello spazio
intermembrana

LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

Il trasporto di elettroni induce l'uscita di H^+ e crea una differenza di potenziale elettrochimico

GRADIENTE ELETTRICO:
cariche negative nella matrice e cariche positive nello spazio intermembrana

GRADIENTE CHIMICO: $[H^+]$
bassa nella matrice e $[H^+]$
alta nello spazio intermembrana

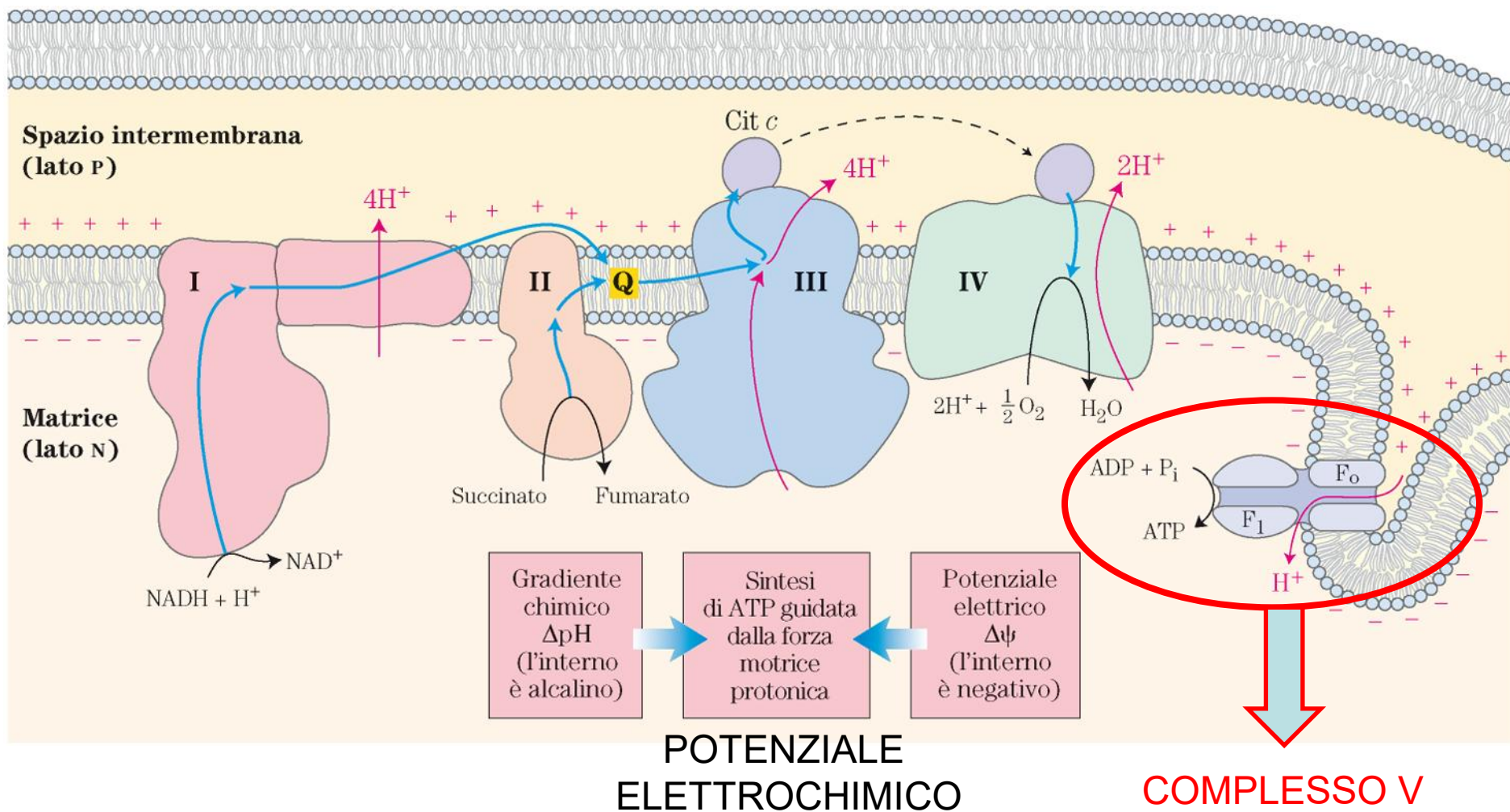


pH minore,
 $[H^+]$ maggiore
nello spazio intermembrana

pH maggiore
 $[H^+]$ minore nella matrice

Modello chemiosmotico: l'energia elettrochimica contenuta nella differenza di concentrazione protonica porta alla sintesi di ATP

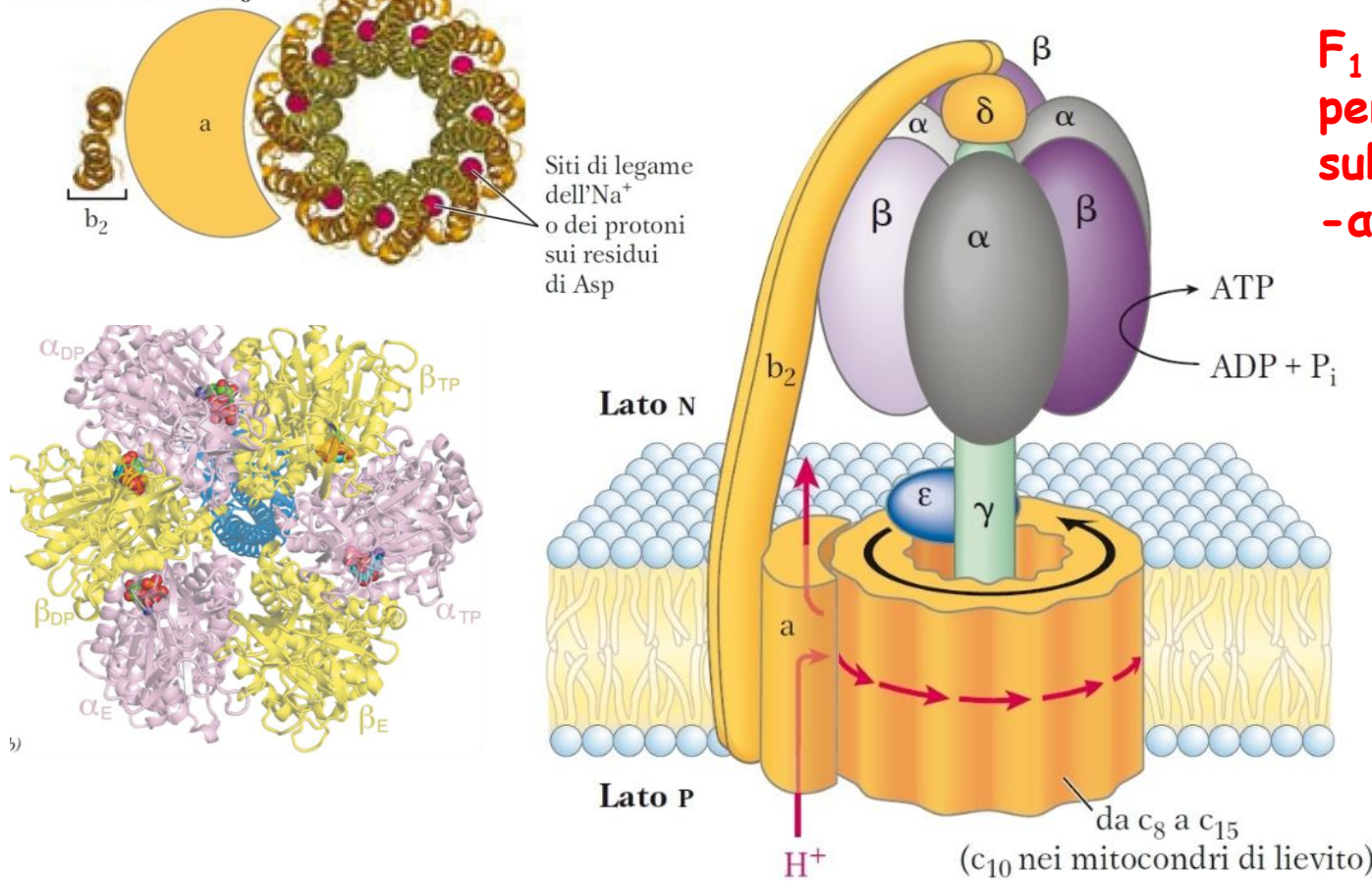
»»» ACCOPPIAMENTO ENERGETICO (Mitchell)



<https://www.youtube.com/watch?v=LQmTKxl4Wn4>

F₁ F₀ ATP sintasi mitocondriale (F₁F₀ ATPasi), complesso V: 2 unità funzionali
 > è una POMPA PROTONICA

(d) Vista dal basso di F₀



F₁: proteina periferica con 9 subunità
-α₃β₃γδε

F₀: canale protonico transmembrana
-ab₂c_n (negli eucarioti 9 subunità)

Figura 19.25 Il complesso dell'ATP sintasi mitocondriale.

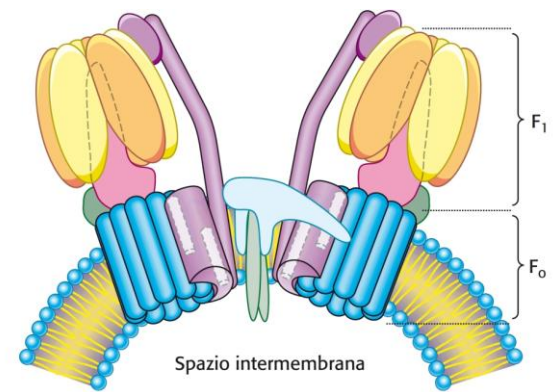


Figura 18.26 Un dimerico dell'ATP sintasi mitocondriale
 Rappresentazione schematica di un dimerico di ATP sintasi mitocondriale immerso nella membrana mitocondriale interna. Il dimerico, collegato da una serie di proteine, contribuisce al ripiegamento della membrana mitocondriale interna. La struttura del dimerico è stata determinata per mezzo della criomicroscopia elettronica.

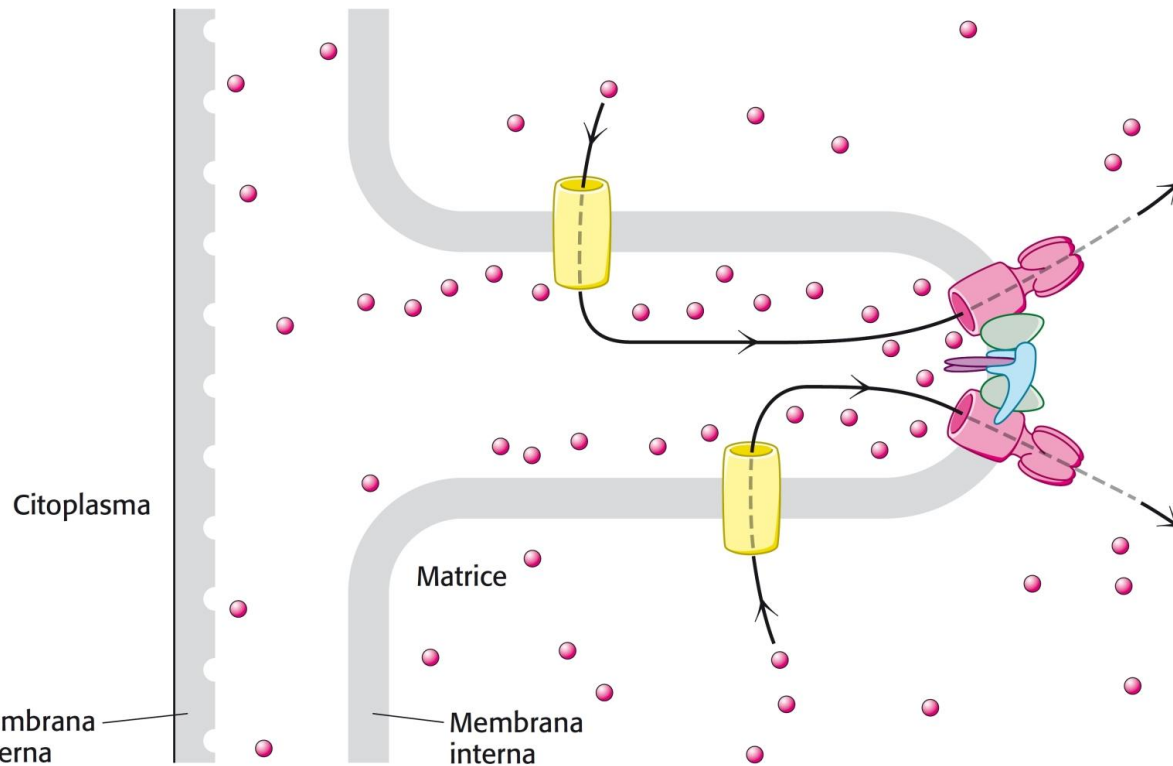
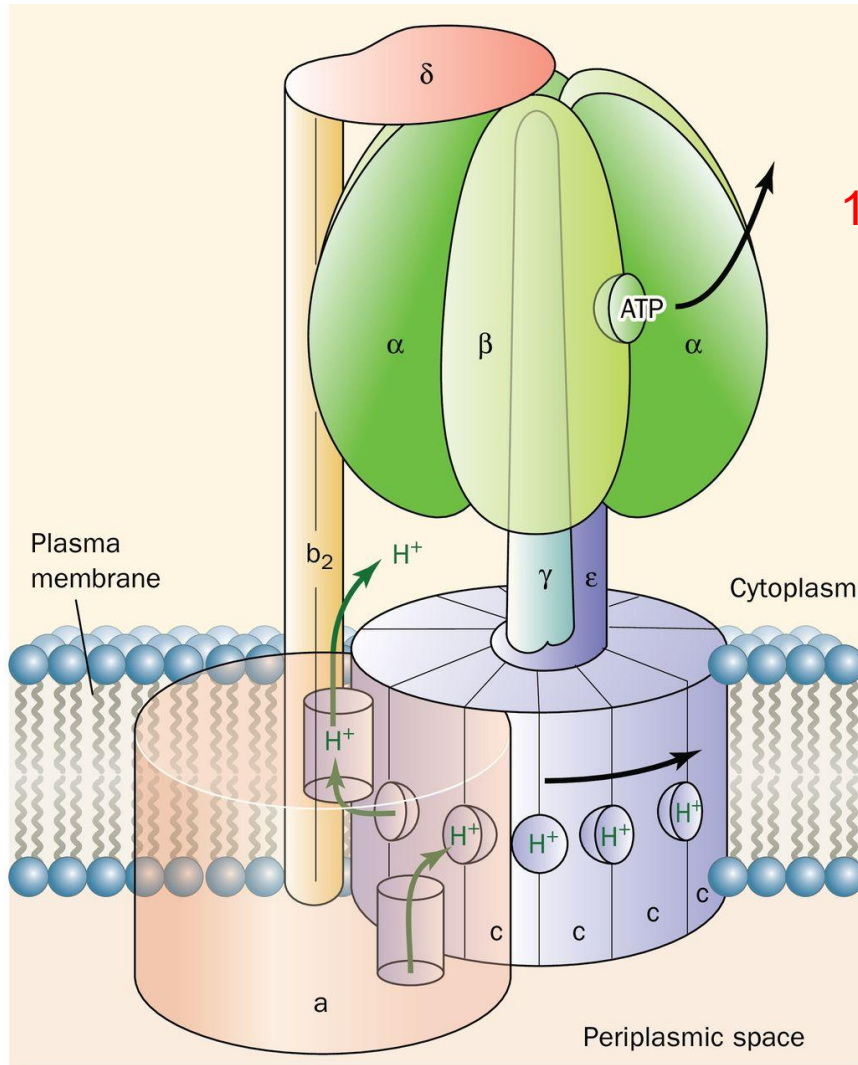


Figura 18.27 L'ATP sintasi contribuisce alla formazione delle creste mitocondriali
 Oligomeri di dimeri di ATP sintasi favoriscono la formazione delle creste, creando un'area in cui il protoni (le sferette rosse) sono concentrati e hanno facile accesso alla porzione F_0 dell'ATP sintasi. La catena di trasporto degli elettroni è simboleggiata dai cilindri gialli immersi nella membrana mitocondriale interna. [Fonte: Davies, K.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14121-14126 (2011).]

Model of F_1F_0 -ATPase



After a drawing by Richard Cross, State University of New York, Syracuse, New York.

Flusso unidirezionale, perché spontaneo, di protoni secondo gradiente di concentrazione

100 rotazioni al secondo!!!

STATORE:

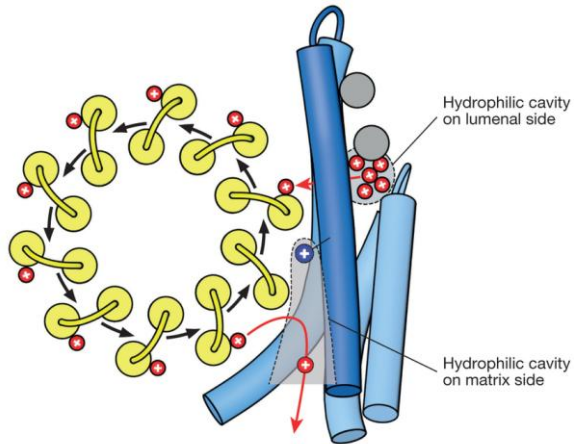
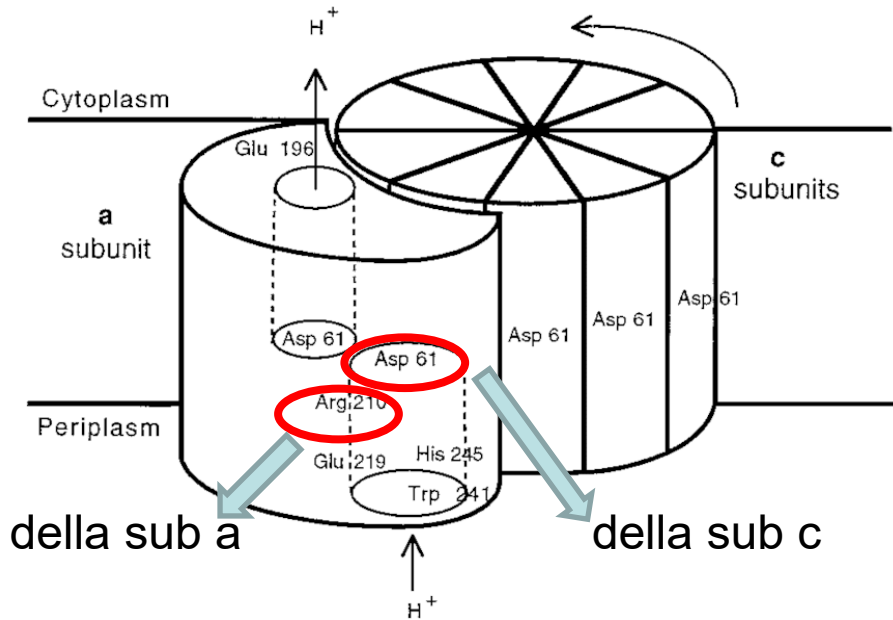
$ab_2\alpha_3\beta_3\delta$

ROTORE:

$\gamma\epsilon$ -cilindro c

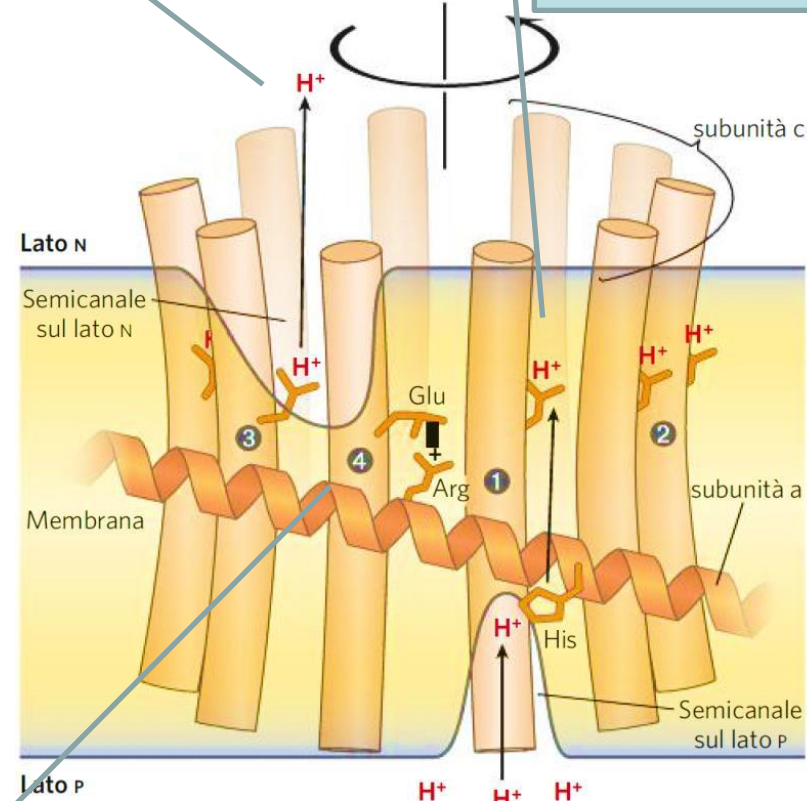


Model of F₁F₀-ATPase



2. La protonazione induce una variazione conformazionale del Glu che consente la rotazione della sub c

3. Il Glu cede il protone del canale di uscita di a (lato N) e riacquista la sua carica negativa

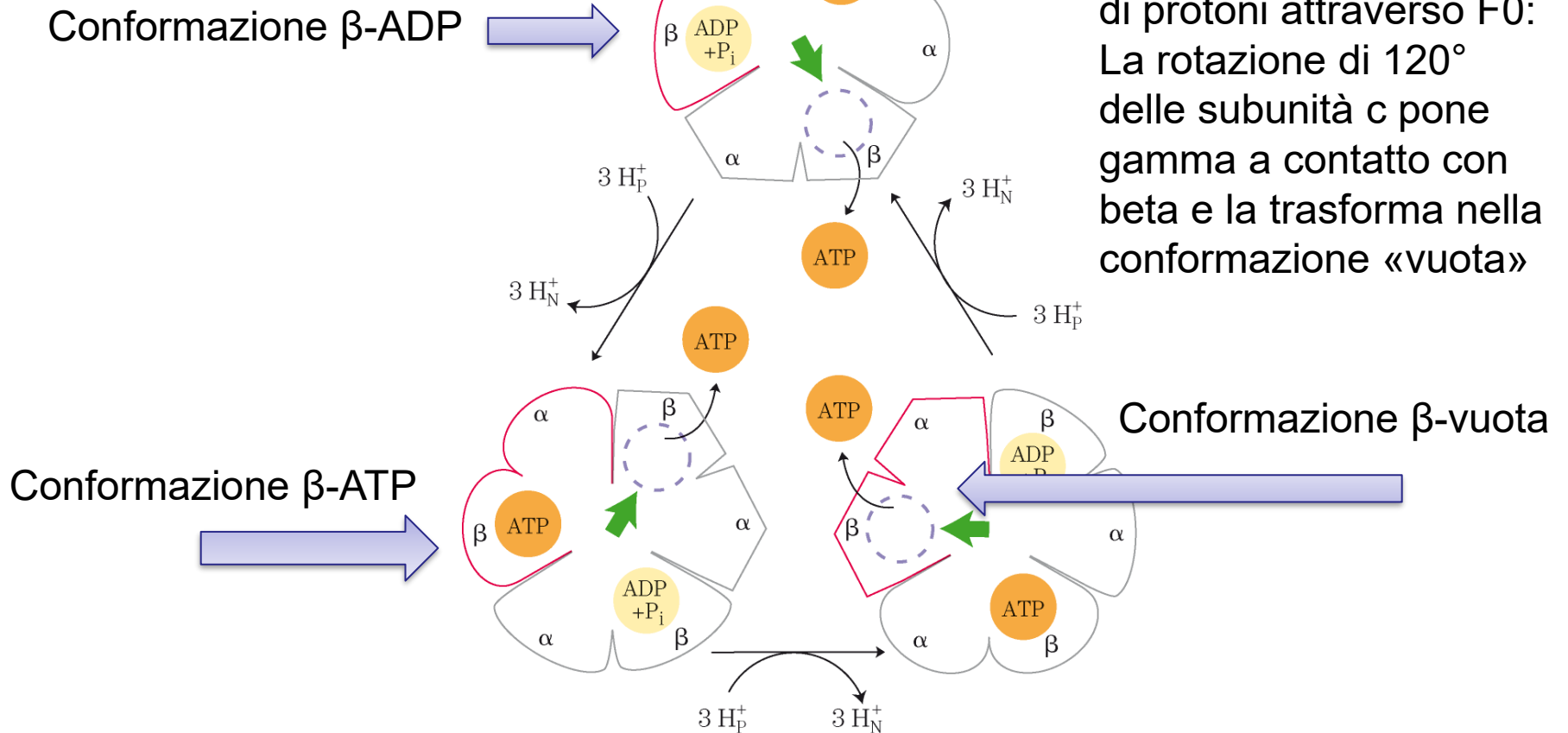


1b. Il Glu grazie alla sua carica negativa stabilisce un ponte salino con una Arg. L'interazione viene persa quando il Glu riprende il protone dall'His

1a. Il residuo di His della subunità a (lato P) lega un protone acquistando una carica positiva

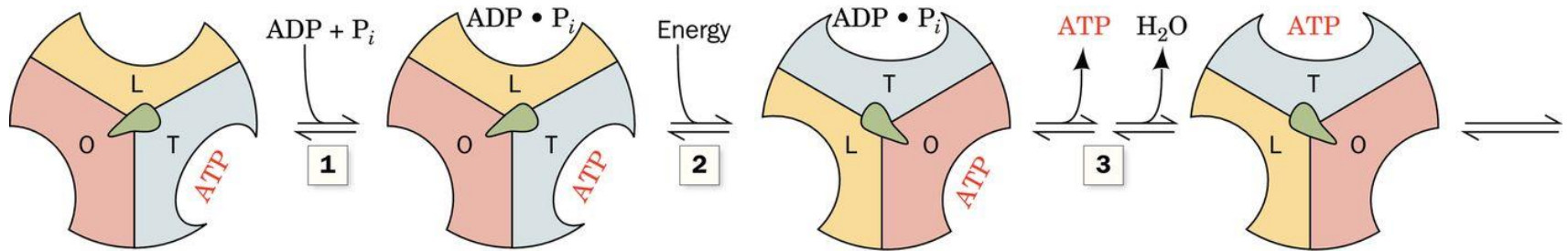
Catalisi rotazionale

La rotazione è resa possibile dal passaggio di protoni attraverso F₀: La rotazione di 120° delle subunità c pone gamma a contatto con beta e la trasforma nella conformazione «vuota»



Conformazione β-ATP

Conformazione β-vuota

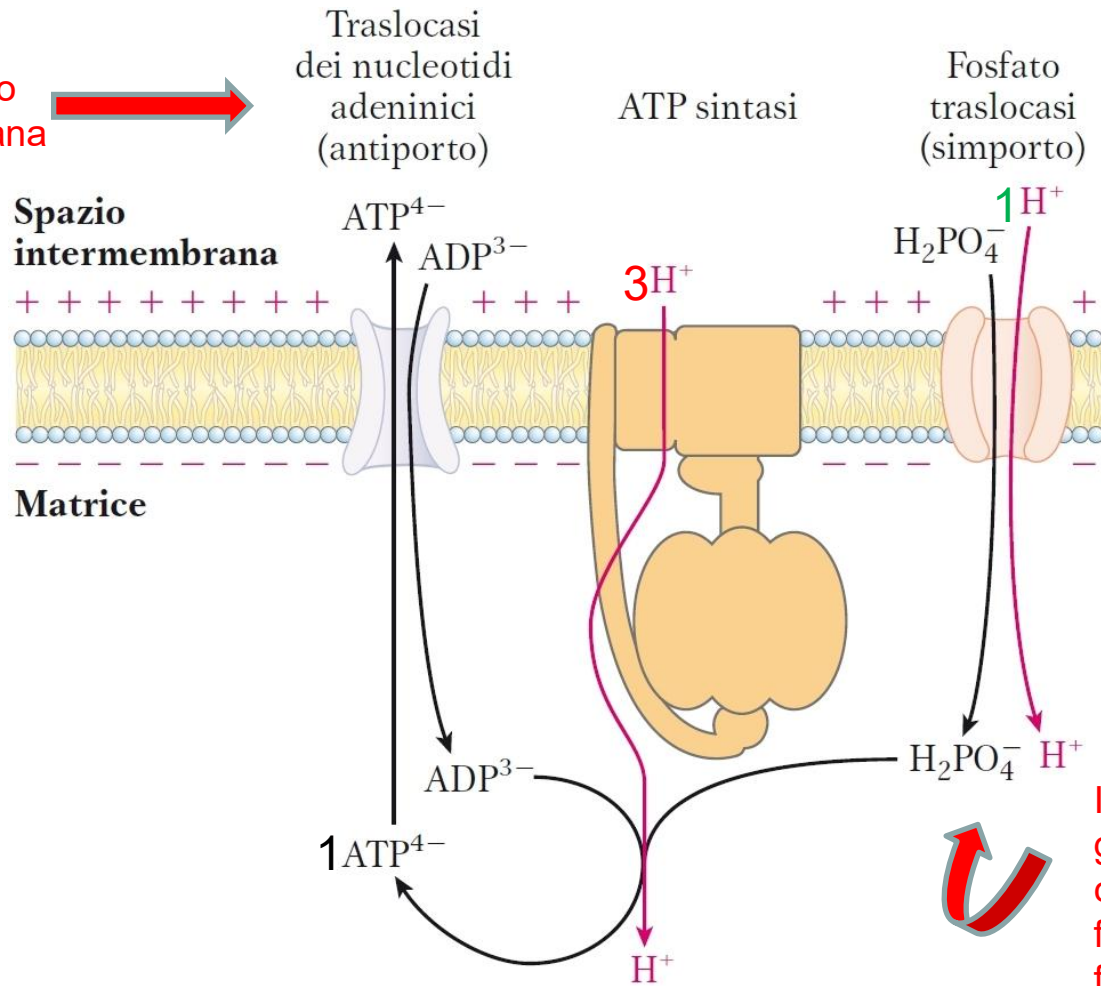


After Cross, R.L., *Annu. Rev. Biochem.* 50, 687 (1980).

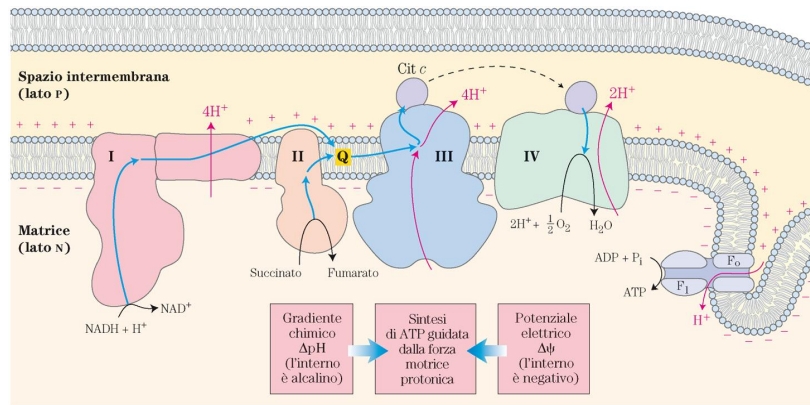
<https://www.youtube.com/watch?v=kXpzp4RDGJI>

1 molecola di ATP viene utilizzata per il trasporto dei nucleotidi attraverso la membrana mitocondriale interna > **TRASLOCASI**

Favorito dal
gradiente
elettrochimico
transmembrana



Il trasferimento secondo gradiente di concentrazione di protoni facilita il passaggio del fosfato anche se il bilancio netto di cariche rimane invariato



Per ogni molecola di **NADH** ossidata (2 elettroni trasferiti) vengono pompati **10 protoni** nello spazio intermembrana

Per ogni molecola di **FADH₂** ossidata (2 elettroni trasferiti) vengono pompati **6 protoni** nello spazio intermembrana

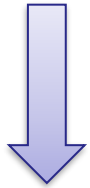
Per la sintesi di **una molecola di ATP** vengono usati 4 protoni (**3 protoni per la rotazione di F₀** e **1 protone per trasportare P_i attraverso la membrana mitocondriale**)

Quindi il rapporto P/O (ATP prodotta / Ossigeno ridotto) sarà:
 una molecola di NADH produce **2.5** molecole di ATP (10/4)
 una molecola di FADH₂ produce **1.5** molecole di ATP (6/4)

L'ossidazione completa di una molecola di **glucosio** ad CO_2 produce **32 molecole di ATP**

L'ossidazione completa **del palmitato (16:0)** produce **108 molecole di ATP**

Il **complesso I** lega solo il NADH presente nella matrice, la quale è impermeabile a molte sostanze, NADH compreso



Come viene ossidato il NADH prodotto nel citosol ?

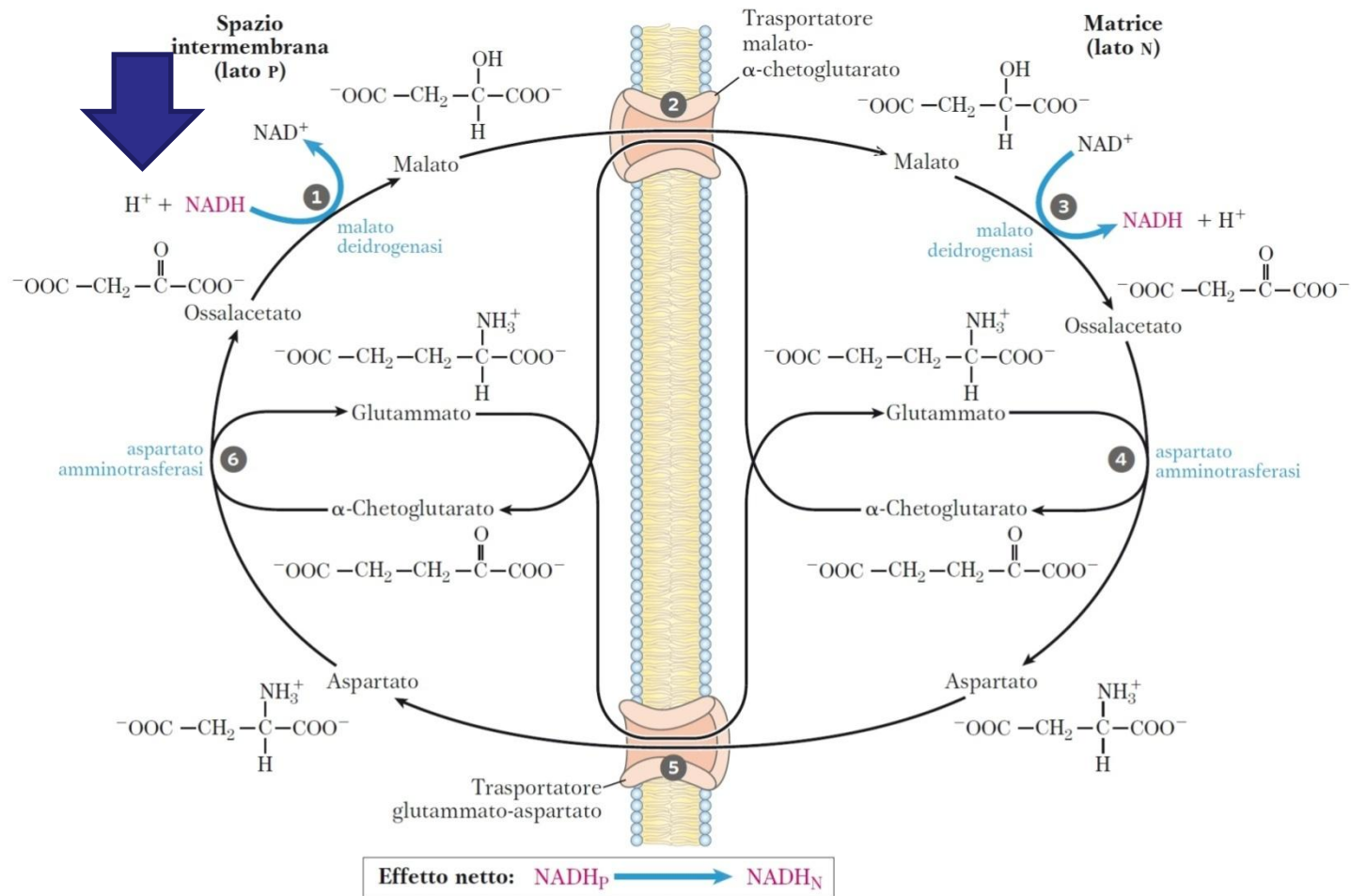


Figura 19.31 Sistema navetta (shuttle) del malato-aspartato. Questo sistema navetta per il trasporto degli equivalenti riducenti dal NADH citosolico alla matrice mitocondriale è attivo nel fegato, nei reni e nel cuore. ❶ Il NADH citosolico entra nello spazio intermembrana attraverso delle aperture nella membrana esterna (porine), poi passa i suoi due equivalenti riducenti all'ossalacetato per produrre malato. ❷ Il malato viene trasportato attraverso la membrana interna dal trasportatore malato- α -chetoglutarato. ❸ Nella matrice il malato trasferisce i suoi due equivalenti riducenti

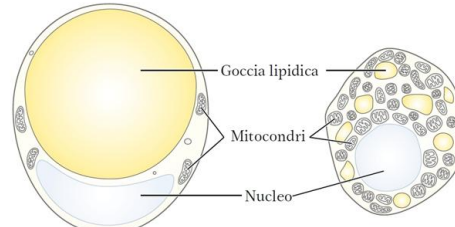
al NAD^+ ; il NADH così generato viene poi riossidato dalla catena respiratoria mitocondriale. L'ossalacetato, il prodotto di ossidazione del malato, non può ritornare direttamente nel citosol e quindi viene prima transaminato ad aspartato ❹, che può uscire dai mitocondri attraverso il trasportatore glutammato-aspartato ❺. L'ossalacetato viene rigenerato nel citosol e ❻ il ciclo è così completato; il glutammato prodotto nella stessa reazione entra nella matrice tramite il trasportatore glutammato-aspartato.

Nel tessuto adiposo i mitocondri producono calore per difendersi dalle basse temperature:

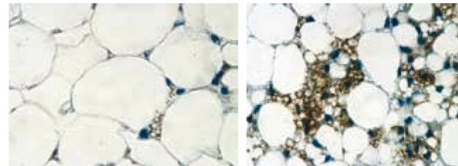
- tessuto adiposo bruno (BAT)
- dei neonati
- Degli animali in letargo



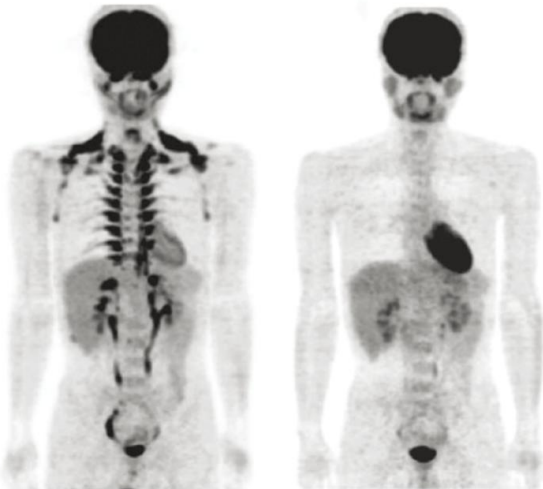
(a)



(a) Adipociti bianchi (b) Adipociti bruni



(c) (d)



Dopo esposizione al freddo

Controllo a temperatura ambiente

PROTEINA DISACCOPIANTE (TERMOGENINA)

