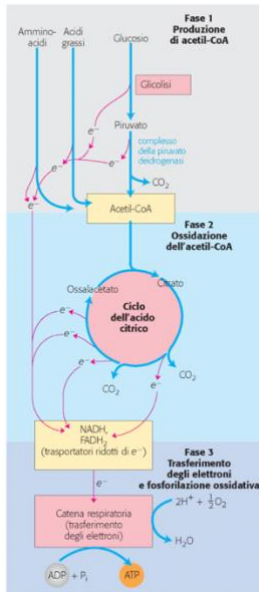


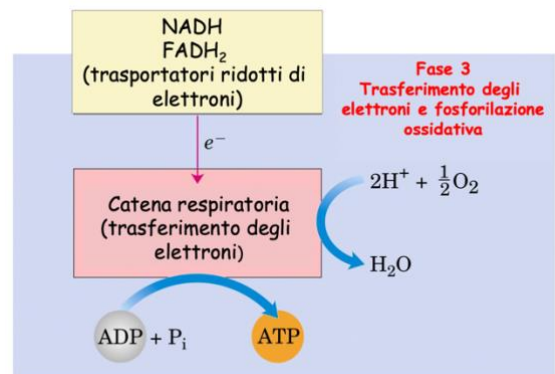
Lezione 14 – Biochimica

Sbobbinatori: Borello Natalia e Antonio Mainente

La fosforilazione ossidativa



Dopo i vari catabolismi, la produzione di AcetilCoA porta al Ciclo di Krebs che produce NADH e FADH₂ che devono essere riossidati nella così detta Terza Fase che è quella, per l'appunto, di trasferimento degli elettroni e fosforilazione ossidativa dove si avrà la sintesi dell'ATP. Ora, per poter avere la sintesi di quest'ultimo, in quei complessi multiproteici che sono presenti sulla membrana mitocondriale interna e che prendono vari nomi, avviene un trasferimento di elettroni che determina la riossidazione dei coenzimi ridotti e, secondariamente, i vari complessi della catena di trasporto degli elettroni si riossideranno passando gli elettroni fino all'Ossigeno per dare acqua e permettere la sintesi di ATP.



Quindi, nella fosforilazione ossidativa vi è un trasferimento di elettroni. Esistono 3 modalità per trasferire.

- 1) Trasferimento diretto: avviene partendo da Fe^{3+} a Fe^{2+}
- 2) Trasferimento di un atomo di H (un protone più un elettrone)
- 3) Trasferimento di ione Idruro (un atomo di idrogeno che presenta un elettrone in più)

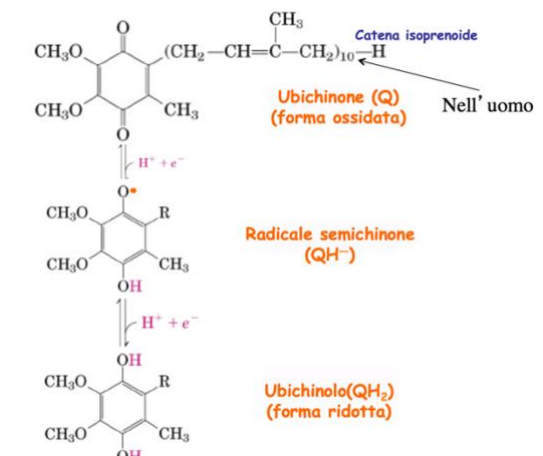
In generale, per indicare il trasferimento degli elettroni, si usa il **termine equivalente riducente (o di riduzione)** e ciò si dice anche dei coenzimi (si parla di trasportatori di equivalenti di riduzione). In particolare, quando si considera il trasferimento degli elettroni, bisogna considerare il trasferimento di due elettroni e due protoni.

Esistono vari trasportatori di equivalenti riducenti:

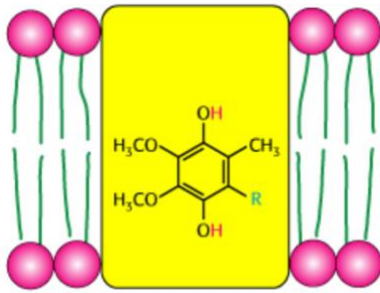
- NAD che si è caricato dello ione idruro
- Flavoproteine (abbiamo già visto la produzione di FADH₂ ma anche di FMN da cui il FAD deriva)
- Ubichinone
- Citocromi
- Proteine ferro-zolfo

Ubichinone:

È costituito da un anello di benzochinone a cui viene legata una catena isoprenoide che viene ripetuta più volte. In particolare, nell'uomo è ripetuta 10 volte. L'ubichinone si abbrevia con la lettera Q. Esso passa attraverso due stati di riduzione. Il primo stato dipende dall'acquisizione di un elettrone e di un protone e porta alla formazione di un radical semichinonico che ha, quindi, un elettrone spaiato. Acquisendo un altro



elettrone e un altro protone abbiamo l'ubichinolo che è la forma completamente ridotta della molecola.

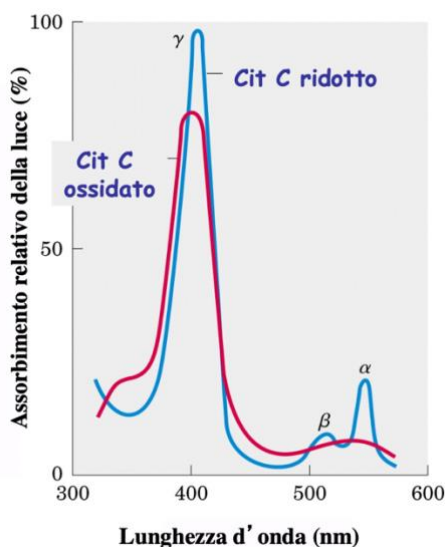
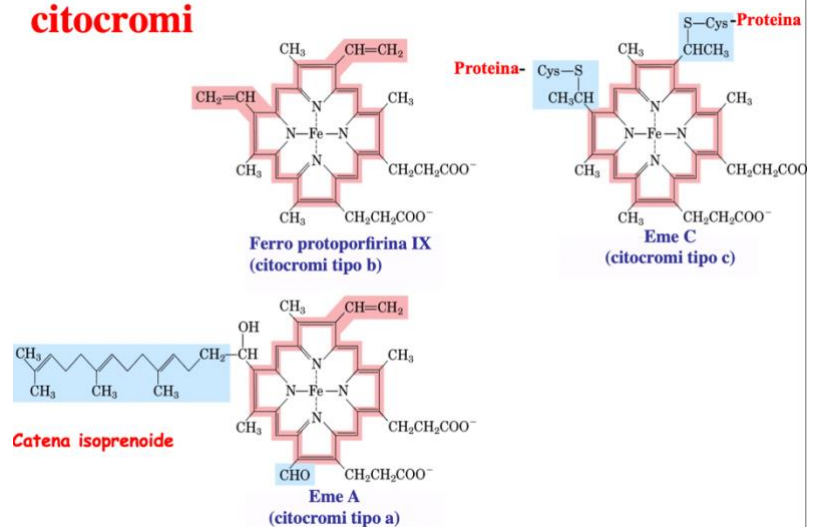


L'ubichinone è parte integrante della catena di trasporto degli elettroni ed ha una caratteristica particolare perché è una molecola lipofila, quindi può essere "immersa" nel doppio strato fosfolipidico e poi è un componente mobile della catena di trasporto.

Citocromi:

Tutti i citocromi sono caratterizzati dalla presenza di un anello protoporfirinico, lo stesso che abbiamo visto nell'emoglobina. La differenza sta nel ferro che qui è legato sotto forma di Fe^{3+} . Inoltre, si distinguono tre diverse classi di citocromi: A, B, C. Queste classi si distinguono sia in base ai sostituenti che l'anello protoporfirinico ha sulla sua struttura e al tipo di legame che effettuano con le proteine. In quelli di tipo B e C (come abbiamo visto nell'emoglobina), il ferro attua altri due legami di coordinazione con due residui di istidine. In quello di tipo A, il ferro attua due legami di coordinazione con 1 residuo di istidina ed 1 con cisteina. Nell'eme a3, in corrispondenza di una cisteina si posiziona O_2 .

citocromi



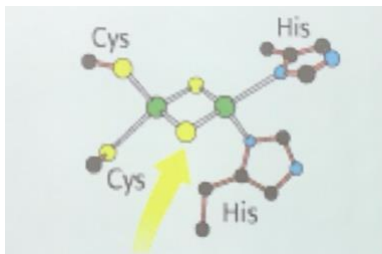
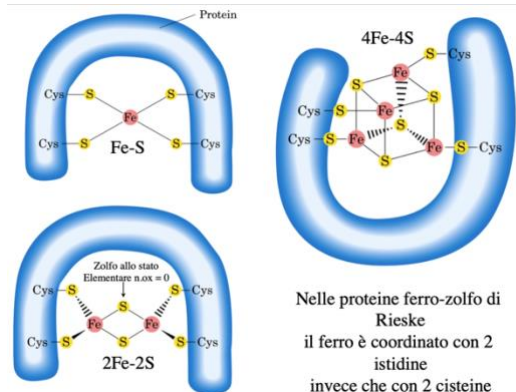
Inoltre, i citocromi hanno tutti la caratteristica di assorbire luce ma, in base alla classe a cui appartengono, assorbono a diversa lunghezza d'onda.

In particolare, qui, è mostrato lo spettro di assorbimento del citocromo c. Caratteristica dei tre citocromi è che, passando dallo stato ossidato allo stato ridotto cambia lo spettro di assorbimento (così come abbiamo visto per il NAD). Quindi, è possibile seguire la reazione di ossidoriduzione dei citocromi verificando la presenza dei picchi di assorbimento a diverse lunghezze d'onda.

Proteine ferro-zolfo:

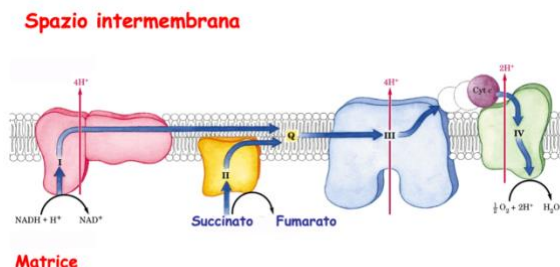
Anche in questo caso abbiamo vari tipi di proteine:

- 1) Fe-S: dove un atomo di ferro è legato a 4 atomi di zolfo. Questi atomi di zolfo sono derivati da 4 residui di Cisteina. In tutte le classi di proteine Ferro-Zolfo, il ferro ha 4 legami di coordinazione con lo Zolfo. Cambia solo il tipo di legame di coordinazione. In questo caso, abbiamo detto che ci sono 4 legami con i residui di cisteina.
- 2) 2Fe-2S: il ferro ha sempre 4 legami con lo zolfo ma, questa volta, 2 di questi legano due residui di cisteina e 2 legano zolfo di tipo elementare.
- 3) 4Fe-4S: questa volta solo un atomo di ferro lega un atomo di zolfo che deriva dalla cisteina, gli altri tre legano Zolfo elementare.



Un'ultima classe di particolari proteine Ferro-Zolfo è quella delle proteine di Rieske. In questo caso il ferro è coordinato con due cisteine e con due istidine.

I trasportatori di elettroni funzionano come complessi multi-enzimatici. Abbiamo già visto la catena di trasporto degli elettroni. Essa costituita da 4 diversi complessi enzimatici:



- 1) Complesso della NADH deidrogenasi (NADH ubiquinone ossido-reduttasi)
- 2) Succinato deidrogenasi
- 3) Citocromo C - Coenzima Q ossidoreduttasi
- 4) Citocromo ossidasi

Fra le caratteristiche che definiscono la catena di trasporto degli elettroni, bisogna annoverare che il complesso 1, 3 e 4 attraversano completamente

la membrana mitocondriale interna, invece, il complesso 2 è presente nella matrice mitocondriale e pende contatti con la membrana interna.

Altra caratteristica è che i complessi 1, 3 e 4 sono pompe protoniche, cioè portano protoni nello spazio inter-membrana. Questi sono complessi fissi nella membrana mitocondriale interna, ma appartengono alla catena di trasporto anche altri due elementi: l'ubichinone e il citocromo c che sono i due elementi mobili.

Componenti proteici della catena di trasporto degli elettroni			
Complesso enzimatico	Massa (kDa)	Numero di subunità	Gruppo prostetico
I NADH deidrogenasi	850	42 (14)	FMN, Fe-S
II Succinato deidrogenasi	140	5	FAD, Fe-S
III Ubichinone-citocromo c ossidoreduttasi	250	11	Eme, Fe-S
Citocromo c	13	1	Eme,
IV Citocromo ossidasi	160	13 (3-4)	Eme, Cu ₂ , Cu ₂

I vari complessi della catena di trasporto degli elettroni sono formati da numerose proteine che hanno una massa molecolare piuttosto importante. Quello composto dal maggior numero di subunità è il complesso 1 (costituito da NADH deidrogenasi). Ciascuno dei complessi ha tutta una serie di equivalenti di riduzione perché gli elettroni vengono passati ad

esempio, dal primo complesso a proteine FMN, ferro-zolfo e solo in seguito all'ubichinone. Altra caratteristica è che il complesso 1 ed il complesso 2 vanno, in maniera indipendente, a ridurre l'ubichinone. Questo, poi, andrà a ridurre il complesso 3.

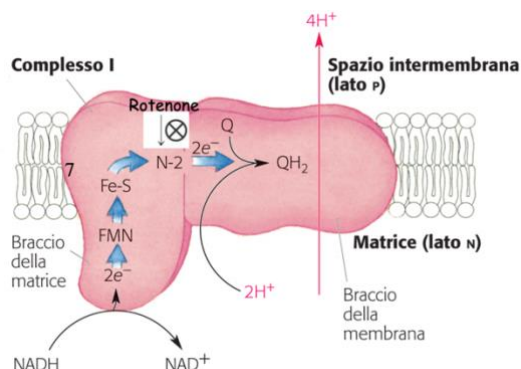
Quindi, il complesso 1 è quello nel quale verranno riossimate tutte le molecole di NADH che sono presenti nella matrice mitocondriale. Come abbiamo già detto, è un grosso complesso multimerico formato da almeno 42 polipeptidi diversi. Contiene una serie di proteine di riduzione, quindi, flavoproteine di tipo FMN, alcuni centri Fe-S e va a ridurre il coenzima Q. I centri Ferro-Zolfo sono proteine di tipo non-eme.

Il complesso 1 catalizza due processi diversi tra loro accoppiati:

- 1) Trasferimento esoergonico all'ubichinone di uno ione idruro e di un protone preso dalla matrice mitocondriale. Teniamo presente che il NADH, sulla sua struttura, ha acquisito uno ione idruro che è costituito da un protone e due elettroni, quindi è necessario un secondo protone per ridurre completamente l'ubichinone.
- 2) Trasferimento endoergonico di 4 protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana.



Complesso 1:

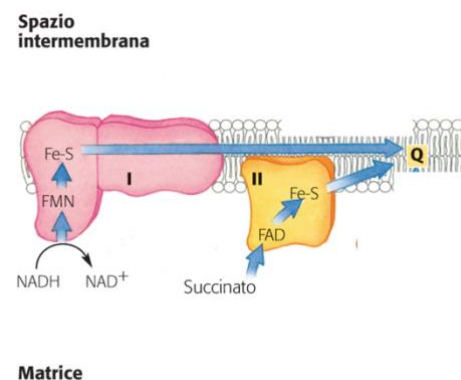


Quindi, per poter riossidare il NADH che proviene dalla matrice mitocondriale, il NADH va a ridurre inizialmente l'FMN, successivamente le varie proteine Fe-S che poi, a loro volta, vanno a ridurre l'ubichinone. Nel frattempo il NADH viene riossidato in NAD+ e contemporaneamente si ha un pompaggio di protoni nello spazio intermembrana.

Complesso 2:

Il complesso della succinato-deidrogenasi è anche un enzima del ciclo di Krebs, l'unico che è legato alla matrice mitocondriale. Questo complesso contiene un FAD e 3 centri Fe-S ed è deputato a riossidare il FADH2 che si è formato nel ciclo di Krebs andando a ridurre il coenzima Q.

Questo complesso è anche importante perché riesce, sia pur parzialmente, a ridurre la produzione dei radicali dell'ossigeno (ROS). Ciò perché, all'interno di questo complesso, c'è un gruppo eme che è in grado di raccogliere elettroni che in questo trasporto possono sfuggire alla catena di trasporto e formare le specie reattive dell'ossigeno fra le quali, ricordiamo, si formano il

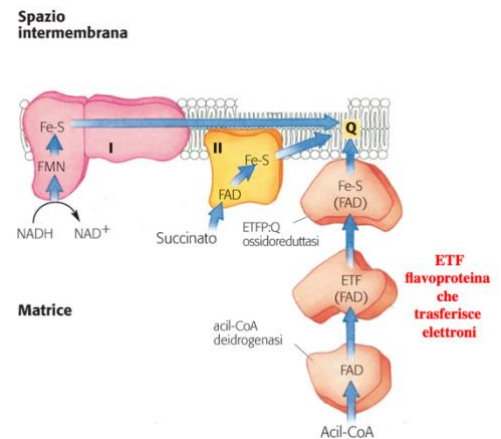


Peroossido di Ossigeno ed il radicale superossido che, in qualche modo, l'organismo deve inattivare. Di fatti questi sono composti che poi vanno a produrre tutta una serie di danni cellulari.

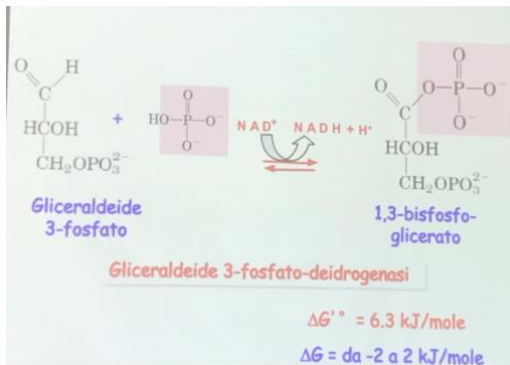
Quindi, sostanzialmente, il NADH presente nella matrice mitocondriale ha spostato i suoi elettroni sull'ubichinone e ciò viene svolto anche dalla succinato deidrogenasi. L'ubichinone è, di fatto, una molecola che possiamo considerare come il collettore di tutti gli elettroni che derivano da tutti i catabolismi che abbiamo visto.

Domanda: A livello della matrice mitocondriale, quali sono i catabolismi che producono FADH₂ e NADH?

Risposta: Beta-ossidazione. Vengono prodotti equivalenti di riduzione sotto forma ridotta. Il NADH che è stato prodotto finirà sul complesso 1. Il FADH₂, invece, non passa per la succinato-deidrogenasi ma va a ridurre l'ubichinone in una via alternativa. Quindi, l'AcilCoA deidrogenasi, che è l'enzima della beta-ossidazione, che ha prodotto il FADH₂ scarica i suoi elettroni sulla proteina ETF (Flavoproteina che trasferisce elettroni). A sua volta, questa proteina, scarica i suoi elettroni sulla proteina ETFP-ubichinone-ossidoreuttasi che, a questo punto, va a ridurre in maniera diretta l'ubichinone.

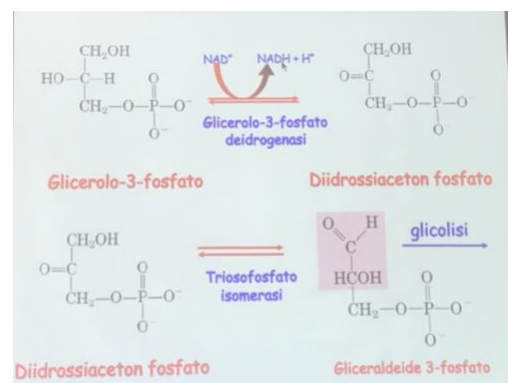


Ricapitolando: la prima tappa dell'ossidazione degli acidi grassi è catalizzata dall'AcilCoA transferasi che trasferisce due elettroni al FAD producendo il FADH₂. Questo viene riossidato trasferendo i suoi elettroni alla ETF la quale, a sua volta, viene riossidata, trasferendo i suoi elettroni alla proteina ETFP-ubichinone-ossidoreuttasi che può ridurre l'ubichinone.



Ma noi abbiamo visto, in tutti i catabolismi, che una produzione di NADH ridotto avviene anche a livello citoplasmatico a livello della glicolisi e che, quel NADH citoplasmatico deve necessariamente essere riossidato perché altrimenti la glicolisi non può essere mandata avanti. La riossidazione è preferibile in presenza di ossigeno per permettere una maggiore produzione di ATP. In assenza di ossigeno, solo il muscolo riesce a riossidare il NADH citosolico mediante il processo della fermentazione lattica.

Inoltre, altro NADH citosolico, è stato prodotto dalla reazione della Glicerolo3P-deidrogenasi che è la reazione che avviene durante la degradazione dei 3Acil-gliceroli e che produceva deidrossi-acetone-fosfato che poteva essere mandato anch'esso in glicolisi. Queste molecole di NADH citosolico devono essere necessariamente riossimate.



MUSCOLO - CERVELLO

The diagram illustrates the metabolic pathway of glycolysis and the entry of pyruvate into the mitochondria. At the top, 'GLICOLISI' (Glycolysis) is shown as the initial step, converting 'GLICERICO 3-FOSFATO' (Glyceric 3-phosphate) into 'DIDROSSIACETONE FOSFATO' (Dihydroxyacetone phosphate). This step is coupled with the reduction of NAD^+ to $\text{NADH} + \text{H}^+$. The chemical structure of Glyceric 3-phosphate is shown as $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHO}-\text{O}-\text{P}$. The pathway then leads to 'GLICERICO 3-FOSFATO DEIDROGENASI MITOCONDRIALE' (Mitochondrial glyceric 3-phosphate dehydrogenase), which is represented by a pink oval enzyme embedded in a membrane. This enzyme converts 'GLICERICO 3-FOSFATO' into 'GLICERICO 3-FOSFATO DEIDROGENASI MITOCONDRIALE' (Mitochondrial glyceric 3-phosphate dehydrogenase), which then enters the mitochondrion (labeled 'III'). The chemical structure of Glyceric 3-phosphate is also shown as $\text{CH}_2\text{OH}-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{P}$. The diagram is labeled 'MUSCOLO - CERVELLO' (Muscle - Brain) at the top.

dipendente, quindi trasforma il diidrossiacetonfosfato in glicerolo3P, riossidando il NAD. L'altra reazione è FADH2 dipendente e svolge la reazione inversa: ri ossida il glicerolo3P a dididrossiacetonfosfato riducendo il FADH2. Questo va a ridurre direttamente l'ubichinone. Questo sistema shuttle è presente nello spazio intermembrana.

-
- Il diagramma illustra la catena di trasporto degli elettroni (CTE) mitocondriale. La matrice mitocondriale è l'area inferiore, mentre lo spazio intermembrana è l'area superiore. La catena è composta da diversi complessi e trasportatori di elettroni:
- Complesso I (NADH deidrogenasi):** Riceve elettroni da NADH (che si ossida a NAD⁺) e li trasferisce a FMN, Fe-S e un gruppo Fe-S. I protoni (H⁺) vengono pompati dallo spazio intermembrana nella matrice.
 - Complesso II (Succinato deidrogenasi):** Riceve elettroni da Succinato (che si ossida a Succinato ossidato) e li trasferisce a FAD, Fe-S e un gruppo Fe-S.
 - Trasportatore Q (Ubichinone):** Riceve elettroni dal gruppo Fe-S del complesso II e li trasferisce al gruppo Fe-S del complesso III.
 - Complesso III (Cyt b₆/f):** Riceve elettroni dal gruppo Fe-S del complesso III e li trasferisce a Cyt b₆ e Cyt f. I protoni (H⁺) vengono pompati dallo spazio intermembrana nella matrice.
 - Trasportatore Cyt c₁:** Riceve elettroni da Cyt b₆/f e li trasferisce a Cyt c.
 - Trasportatore Cyt c:** Riceve elettroni da Cyt c₁ e li trasferisce al complesso IV.
 - Complesso IV (Cyt aa₃):** Riceve elettroni da Cyt c e li trasferisce a Cyt aa₃. I protoni (H⁺) vengono pompati dallo spazio intermembrana nella matrice.
 - Trasportatore Cyt aa₃:** Riceve elettroni da Cyt aa₃ e li trasferisce a Cyt aa₃.
 - Trasportatore Cyt aa₃:** Riceve elettroni da Cyt aa₃ e li trasferisce a Cyt aa₃.
- I substrati che entrano nella matrice sono NADH, Succinato e Acil-CoA. I substrati che entrano nello spazio intermembrana sono Glicerolo 3-fosfato (citosolico) e Glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale.

FEATO, RENE, CUORE - Shuttle (navetta) Malato/aspartato

Spazio intermembrana

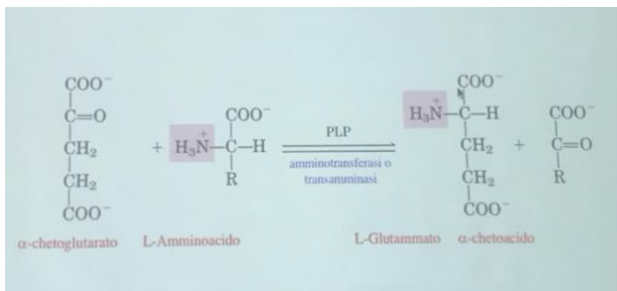
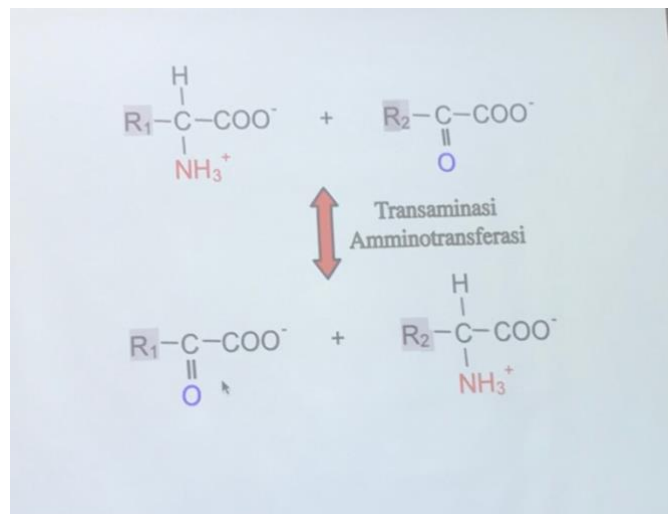
Matrice

The diagram illustrates the malate-aspartate shuttle across the mitochondrial membrane. A central vertical lipid bilayer represents the membrane. Two oval carriers are embedded in the membrane. The top carrier is labeled 'Carrier α-chetoglutarato-malato' and facilitates the exchange of Malato (malate) and α-chetoglutarato. The bottom carrier is labeled 'Carrier Aspartato - glutammato' and facilitates the exchange of Aspartato (aspartate) and Glutammato (glutamate). On the left side (Spazio intermembrana), arrows show the conversion of Malato to Ossalacetato by the enzyme 'malato deidrogenasi', which uses NAD⁺ and produces NADH + H⁺. Similarly, Aspartato is converted to Glutammato by 'aspartato aminotransferasi'. On the right side (Matrice), the reverse reactions occur: Glutammato is converted back to Aspartato by 'aspartato aminotransferasi', and Ossalacetato is converted back to Malato by 'malato deidrogenasi', which uses NADH + H⁺ and produces NAD⁺. The cycle completes the shuttle of reducing equivalents from the matrix to the intermembrane space.

NADH. Gli equivalenti di riduzione, quindi, sono all'interno della matrice mitocondriale, sempre sul NADH. Questa molecola di NADH può essere riossidata a livello del complesso 1. A questo punto, tutto il resto del meccanismo, serve per riportare l'ossalacetato, che ora si trova nella matrice, presso lo spazio intermembrana. L'ossalacetato, quindi, reagisce con

una molecola di glutammato in una reazione di transamminazione che produce alfa-chetoglutarato e aspartato. L'aspartato prodotto passa nello spazio intermembrana utilizzando il carrier per l'aspartato-glutammato. L'alfa-chetoglutarato va dalla matrice mitocondriale verso lo spazio intermembrana utilizzando la proteina di trasporto che prende il nome di carrier dell'alfachetogluatarato-malato perché scambia il malato con l'alfa-chetoglutarato. Quando questi giungono nello spazio intermembrana, danno luogo alla reazione inversa che abbiamo appena visto, ovvero una reazione di transamminazione che produce ossalacetato e glutammato. Questo deve essere riportato nella matrice mitocondriale utilizzando il carrier dell'aspartato-glutammato che trasporta aspartato verso lo spazio intermembrana in scambio di glutammato.

Le reazioni di transamminazione sono reazioni reversibili che avvengono comunemente nel nostro organismo e che hanno questa caratteristica di base: Dobbiamo partire da un amminoacido e da un alfa-chetoacido che devono reagire. Il gruppo amminico che è presente sull'amminoacido viene trasportato sull'alfa-chetoacido. Questo fa sì che l'amminoacido che ha ceduto il suo gruppo amminico si trasformi nel corrispondente alfa-chetoacido, mentre l'alfa-chetoacido che ha ricevuto il gruppo amminico, si trasforma nel suo equivalente amminoacido.

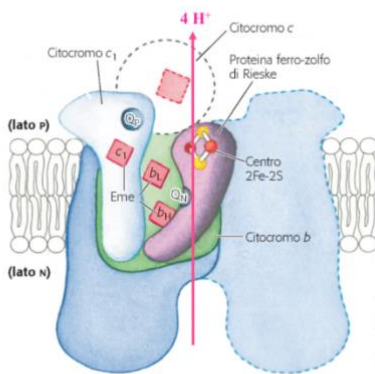


Uno degli amminoacidi più comunemente usati nelle reazioni di transamminazione è il glutammato. Questo reagisce con l'alfa-chetoacido e quindi, trasformando il glutammato in alfa-chetoacido, otteniamo alfa-chetogluatarato. L'alfa-chetogluatarato, ricevendo un amminoacido, si trasforma nel suo corrispondente amminoacido. Ora, nel caso della

reazione di transamminazione che avviene nello shuttle del malato-aspartato, l'alfa-chetoacido è l'ossalacetato, il quale è un acido dicarbossilico alfa-chetoacido che reagisce con il glutammato, che è un amminoacido. Il glutammato trasferisce il suo gruppo amminico sull'ossalacetato e il corrispondente dell'ossalacetato, sottoforma di amminoacido, restituisce aspartato, mentre il corrispondente alfa-chetoacido del glutammato è l'alfachetogluatarato. Chiaramente, la reazione inversa, porta a formazione di glutammato e ossalacetato.

A questo punto, tutti gli equivalenti di riduzione sono stati trasportati sull'ubichinone che è stato ridotto e va riossidato.

Complesso III: complesso bc_1 Ubichinone: citocromo c ossidoreduttasi



Dimero: ogni monomero 11 subunità (b)

L'**Ubichinone** per poter essere ossidato deve trasportare i suoi equivalenti di riduzione al complesso seguente, ovvero al **complesso 3**. Il ciclo di riossidazione dell'Ubichinone è un ciclo particolare perché per essere completamente ridotto, questo, deve acquisire 2 elettroni e 2 protoni; nel complesso 3 non sono presenti accettori di due elettroni e due protoni, bensì vi sono i **citocromi** (i citocromi sono enzimi che contengono come coenzima il gruppo prostetico eme, grazie al quale legano l'ossigeno permettendone l'utilizzo nel processo della respirazione cellulare), i quali hanno la capacità di acquisire un solo elettrone per volta, quindi l'attuazione dell'ossidazione avviene per mezzo del **ciclo dell'ubichinone**, che consiste nel seguente meccanismo:

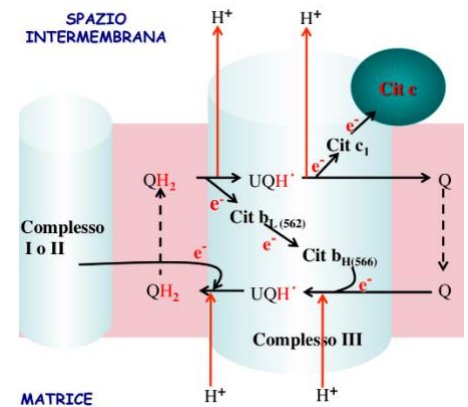
l'ubichinone ridotto, inizialmente

cede un elettrone al **citocromo di tipo B** e pompa un protone nello spazio inter-membrana trasformandosi nel suo radicale semi-chinonico, successivamente tale radicale cederà un elettrone al **citocromo C1** e pomperà un secondo protone nello spazio inter-membrana. Il citocromo C1 cede il suo elettrone al **citocromo C**, il quale sarà in grado di raggiungere il complesso 4, mentre il citocromo B è parte integrante del complesso 3.

Di fatto è come se avessimo trasferito un solo elettrone al citocromo C e quindi il ciclo si ripete per trasferire un secondo elettrone dal citocromo B al citocromo C1 che infine giunge al citocromo C, per far sì che ciò avvenga il citocromo B a bassa lunghezza d'onda (assorbe a 562), trasferisce il suo elettrone ad un citocromo B ad alta lunghezza d'onda, trasformando una molecola di ubichinone ossidato in un radicale semi-chinonico assorbendo anche un protone dalla matrice mitocondriale; questo radicale semi-chinonico viene poi ridotto nuovamente in ubichinolo (**NB. Ubichinolo= Forma ridotta dell'ubichinone**). Quindi se noi ripercorriamo questo ciclo abbiamo il pompaggio di 4 protoni nello spazio intermembrana e 2 elettroni tramite i due citocromi di tipo C; il citocromo C è l'elemento mobile della catena di trasporto e quindi può portare i suoi elettroni al **complesso 4** dove li scarica. Questo complesso contiene, oltre alle proteine ferro-zolfo, proteine ferro-rame e in particolare scarica i suoi elettroni sull'**Emme A**, ovvero il citocromo di tipo A in contatto con l'ossigeno, che acquisendo elettroni va a ridurre l'ossigeno ad acqua; per far ciò abbiamo bisogno di 4 protoni e 2 elettroni, ma visto che il citocromo C ne trasporta solo uno questo processo viene ripetuto due volte (ciò accade perché altrimenti $\frac{1}{2}$ molecola di O_2 dovrebbe esser ridotta ad acqua, quindi il processo va attuato due volte).

Di fatto l'ultimo complesso della catena di trasporto degli elettroni pompa 2 protoni e non 4, ciò a causa della riduzione dell' O_2 in H_2O ; questo trasferimento di elettroni può essere bloccato da vari composti: Venturidicina, oligomicina e DNP (quelli citati).

Una volta pompati gli elettroni e riossidati i vari enzimi, a cavallo della membrana mitocondriale interna si crea la forza protono-motrice (dato che dalla matrice mitocondriale sono stati pompati dei protoni verso lo spazio intermembrana si crea un gradiente protonico); se noi consideriamo la specie chimica "protone" (l'idrogeno), questa è data da una certa quantità di protoni e da una carica elettrica, si ha quindi anche una separazione di carica: la faccia dello spazio intermembrana è carica positivamente rispetto alla matrice mitocondriale. Se trasferiamo uno ione da una parte all'altra della membrana dobbiamo fare i conti con la variazione di energia libera (forza protonomotrice) che permette la sintesi dell'ATP, l'abbattimento di questo gradiente avviene per mezzo del **Atp-sintasi** che (ricordiamo: grazie all'energia sprigionata per mezzo dei protoni trasportati) usa le subunità FO



e F1 per sintetizzare ATP. Questo gradiente protonico è dato da una concentrazione di protoni che hanno però una carica e quindi la variazione di energia libera è data: (formula foto a Dx)

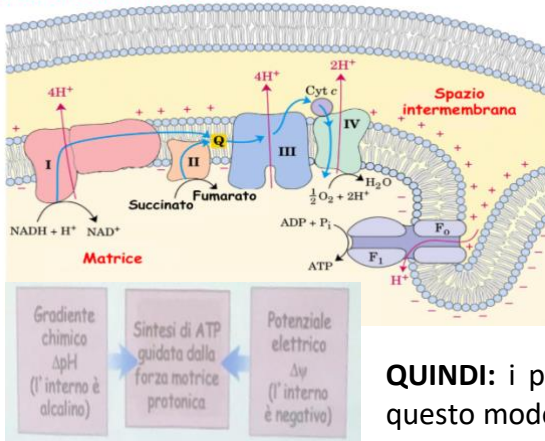
Poiché questa specie chimica, i protoni, determinano il pH di una sostanza si ha anche una variazione di pH tra lo spazio intermembrana e la matrice mitocondriale, si ha quindi: un'energia chimica data dalla variazione di concentrazione dei protoni e un potenziale di membrana dato dalla carica positiva presente sui protoni.

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{C_2}{C_1} \right) + ZF\Delta\psi$$

$$= 2.3RT \Delta pH + F\Delta\psi$$

Energia chimica Energia del potenziale elettrico

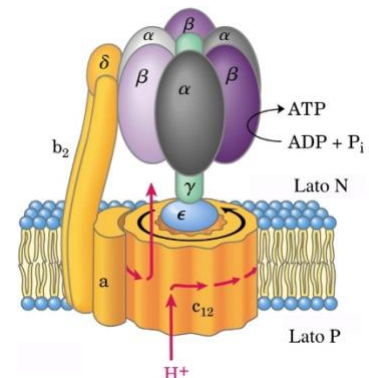
Modello chemiosmotico



Quest'energia libera, costituitasi per mezzo del pompaggio dei protoni attraverso i tre complessi, può essere usata per sintetizzare ATP poiché i protoni possono fluire attraverso l'ultima proteina che costituisce la catena di trasporto degli elettroni ovvero: l'atp-sintasi; questa è una proteina costituita da due grandi complessi: il primo che è identificato con la sigla FO, calato all'interno della membrana mitocondriale interna che è una specie di canale per il trasporto dei protoni; il secondo, chiamato F1, sul quale avviene la sintesi dell'ATP.

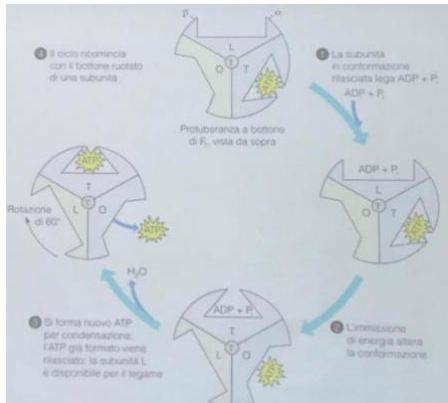
QUINDI: i protoni fluendo attraverso l'atp-sintasi vanno a produrre Atp, questo modello prende il nome di **modello chemiosmotico di Mitchell**, in cui si ha un accoppiamento tra una reazione chimica (sintesi dell'Atp) e un

processo di trasferimento (trasferimento dei protoni), tale processo è chiamato **accoppiamento chemiosmotico** e si riferisce alla dipendenza della sintesi dell'Atp al flusso di elettroni che abbiamo durante la catena di trasporto. Se blocchiamo con uno degli inibitori il trasporto degli elettroni, blocchiamo la sintesi dell'Atp; ciò è dimostrabile attraverso un semplice esperimento: isoliamo i mitocondri e aggiungiamo a questi i substrati che servono per sintetizzare l'Atp (Adp + Pi + un substrato respiratorio che manda avanti il ciclo di Krebs **es. succinato**), in questo modo si può misurare il consumo di ossigeno, dato che la catena di trasporto presuppone consumo di ossigeno (per questo tale processo è detto in condizione di aerobiosi), contemporaneamente alla produzione di Atp. A questo punto se aggiungiamo un inibitore osserviamo come avvenga un blocco sia del consumo di ossigeno che della sintesi di Atp, in particolare la sintesi dell'Atp viene effettuata mediante questo complesso proteico che costituisce l'Atp-sintasi: formato da una regione (in violetto nella foto sopra) che attraversa completamente la membrana mitocondriale interna e prende il nome di regione FO e da questa regione che sporge nella matrice mitocondriale e prende il nome di regione F1. Queste due regioni sono collegate tra loro da una serie di proteine accessorie, in pratica per avere la sintesi di Atp: attraverso la regione FO passano i protoni, tale passaggio di protoni imprime alla regione F1 un movimento rotatorio che fa sì che le subunità di F1 cambino conformazione e così facendo si ha la sintesi di Atp, questo passaggio di elettroni che imprime il movimento rotatorio è permesso dal legame per mezzo di proteine che legano FO a F1. La regione F1 è quella sulla quale avviene veramente la sintesi dell'Atp ed è formata da due tipi di subunità: **α** e **β**; nello specifico abbiamo 3 subunità **α** e 3 subunità **β** che, legandosi a due a due, costituiscono dei dimeri alpha-beta. Questi tre dimeri man mano che la regione F1 gira cambiano conformazione e, cambiando conformazione, cambiano affinità per: l'Adp, fosfato e Atp (ovvero i substrati necessari

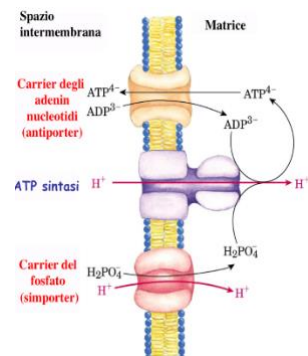


per la sintesi); i tre dimeri contemporaneamente presenti nella regione F1 sono presenti **in tre diverse conformazioni**: **(1)** una conformazione di tipo L (sigla per lose, rilasciato), che è in grado di legare l'Adp e il fosfato; **(2)** una conformazione di tipo T che permette il legame tra Atp e Pi e lega strettamente l'atp; **(3)** una conformazione di tipo O (open), che permette il rilascio dell'Atp. Per la sintesi dell'Atp è necessario il passaggio per tutte e tre i tipi di conformazioni facendo sì che le loro funzioni vengano svolte (1 aggancio di Adp e Pi; 2 favorire il legame tra i due reagenti e formazione di Atp; 3 rilascio Atp).

Per avere la sintesi dell'Atp a livello della matrice mitocondriale abbiamo bisogno di



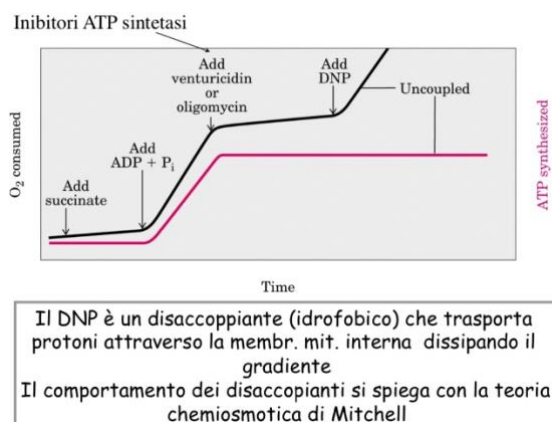
ADP e Pi che vengono **trasportati all'interno della matrice mitocondriale da 2 proteine di trasporto**, che trasportano i substrati per diffusione facilitata: in particolare esiste **(1)** una proteina detta **carrier degli Adenin nucleotidi** trasporta l'Adp della matrice mitocondriale in scambio con l'Atp, che viene portata nello spazio intermembrana; **(2)** una proteina di trasporto che prende il nome di **Carrier Fosfato**



che trasporta il fosfato nella matrice mitocondriale. Quindi il complesso dell'Atp-sintasi è in relazione a queste due proteine

di trasporto in modo da sintetizzare l'Atp e spostare l'Atp sintetizzato verso lo spazio intermembrana.

Perché per ogni Ndh si formano 2,5 e per ogni Fadh2 1,5 molecole di Atp? Poiché un Atp viene prodotto dal pompaggio di 4 protoni e rispettivamente il Ndh ne trasporta 10, mentre il fadh2 6.



Ultimo meccanismo che può avvenire quando abbiamo il trasporto di elettroni durante la riduzione del Fad e la sintesi dell'Atp, è il **processo di disaccoppiamento**. Abbiamo visto che avendo substrati in grado di mandare avanti il ciclo di Krebs e sintetizzare Atp possiamo misurare il consumo di O_2 e la produzione di Atp, inoltre sappiamo che quando aggiungiamo un inibitore non misuriamo più né il consumo di ossigeno, né la sintesi di Atp, ma se dopo che abbiamo misurato questo blocco nel consumo e nella sintesi diamo ai mitocondri un substrato (*chiamato da lei:*

disaccoppiante) in grado di prendere i protoni dallo spazio intermembrana e riportarli nella matrice mitocondriale (quindi in grado di abbattere il gradiente protonico), osserviamo che ricomincia il consumo di ossigeno ma non c'è sintesi di Atp poiché questi protoni non passano attraverso la proteina che sintetizza Atp, ma attraverso la membrana mitocondriale interna (quindi vi è un disaccoppiamento dei processi di consumo di ossigeno e sintesi di Atp). Questo fenomeno di disaccoppiamento è un processo fisiologico che avviene all'interno del nostro organismo e che ha una sua funzione: **la termogenina** (proteina presente all'interno del tessuto adiposo bruno) determina il disaccoppiamento tra il consumo di ossigeno e la sintesi di Atp, è quindi una proteina disaccoppiante in grado di produrre calore (poiché l'energia non può "esprimersi" trasformandosi in Atp, deve comunque essere convertita in un altro tipo di energia, quindi in questo caso: in calore).

NB: la prof ha esplicitamente detto che il termine FO per indicare la subunità FO dell'Atp-sintasi è errato.