

Prof. Giorgio Sartor

Dalla chimica alla contrazione muscolare

...

e

viceversa!

Copyright © 2001-2011 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 0.2 - may 2011

Prima di iniziare ...

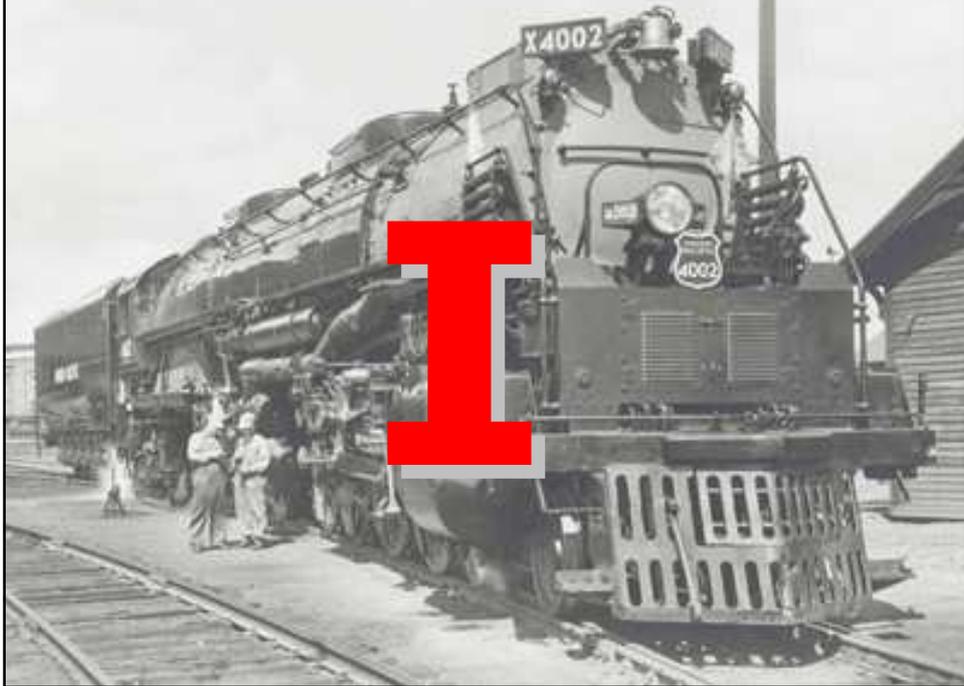
Alcuni concetti da conoscere

- Cellula
- Proteine
- Enzimi
- ATP
- Metabolismo
- Leva

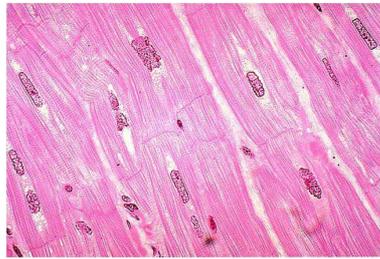
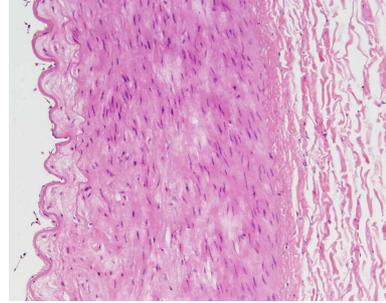
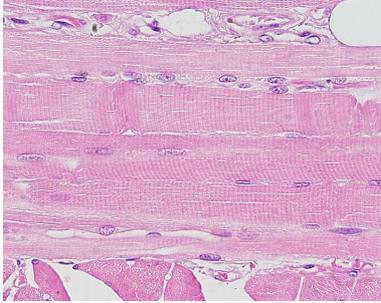
Argomenti

1. Contrazione muscolare
 - Sistema actina-miosina
2. Come si produce l'energia
 - Metabolismo degli zuccheri
 - Destino del piruvato:
 - **ciclo di Krebs** e **fermentazione**
(ossigeno **sì** o ossigeno **no**)

Union Pacific Railroad's t 4000 class 4-8-8-4 Mallet articulated steam locomotives 1941- 1944



I muscoli

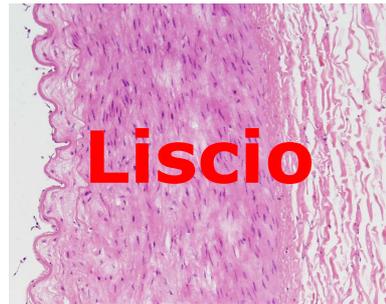


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 7 -

I muscoli

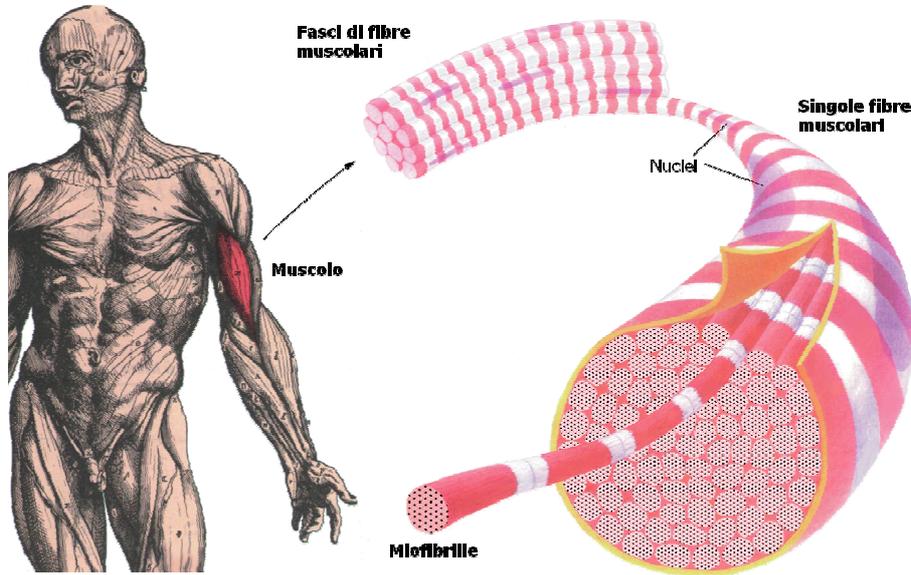


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 8 -

Dal grande al piccolo ...

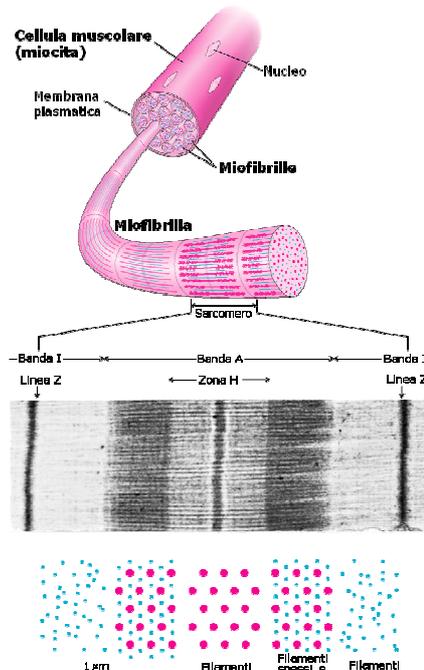


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 9 -

... dal piccolo al piccolissimo ...



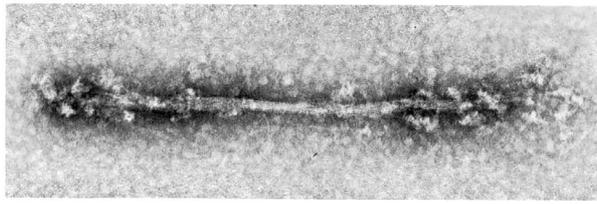
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

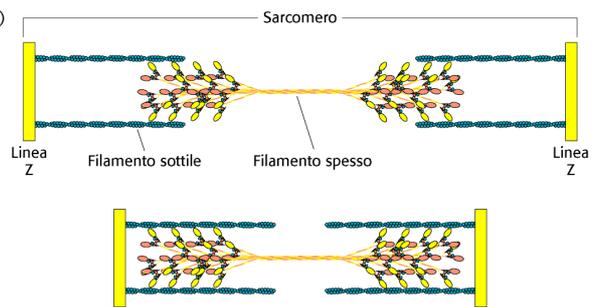
- 10 -

... dal piccolissimo al
microscopico ...

(A)



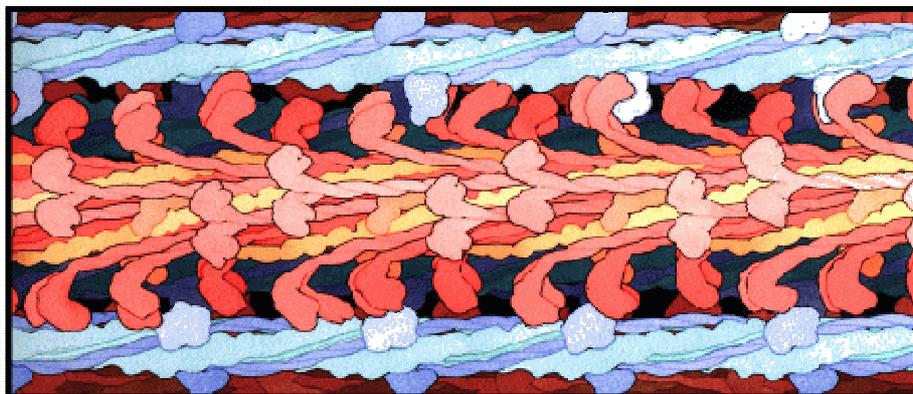
(B)



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 11 -



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

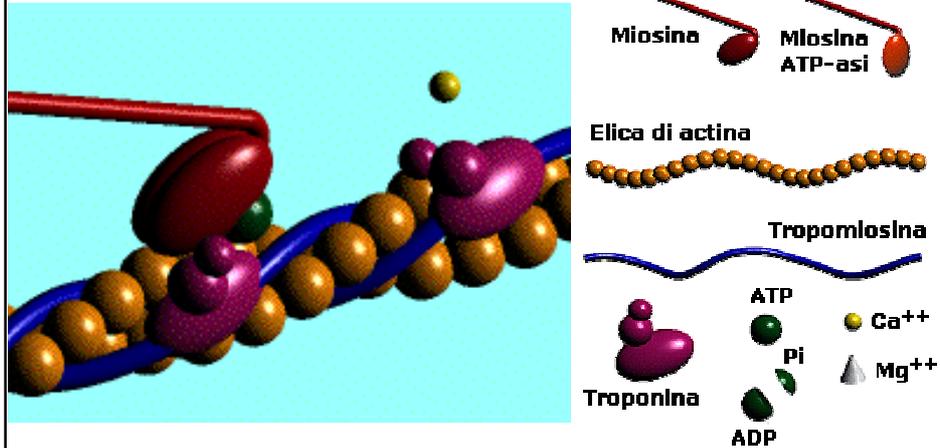
- 12 -

Disco Z

25 maggio 2011 Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani - 13 -



Contrazione muscolare



25 maggio 2011

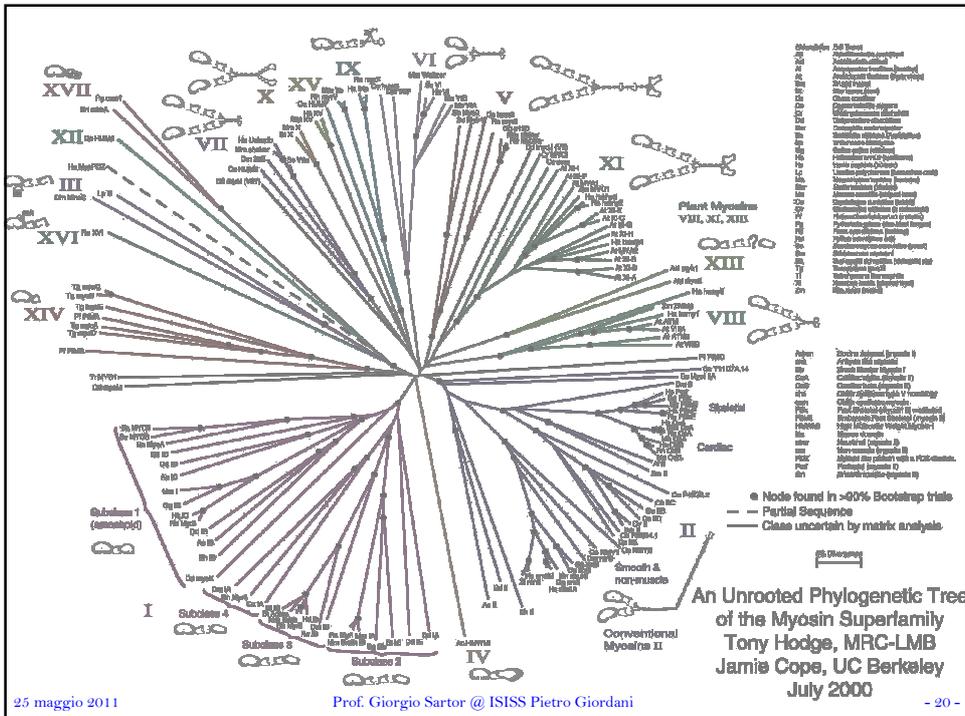
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

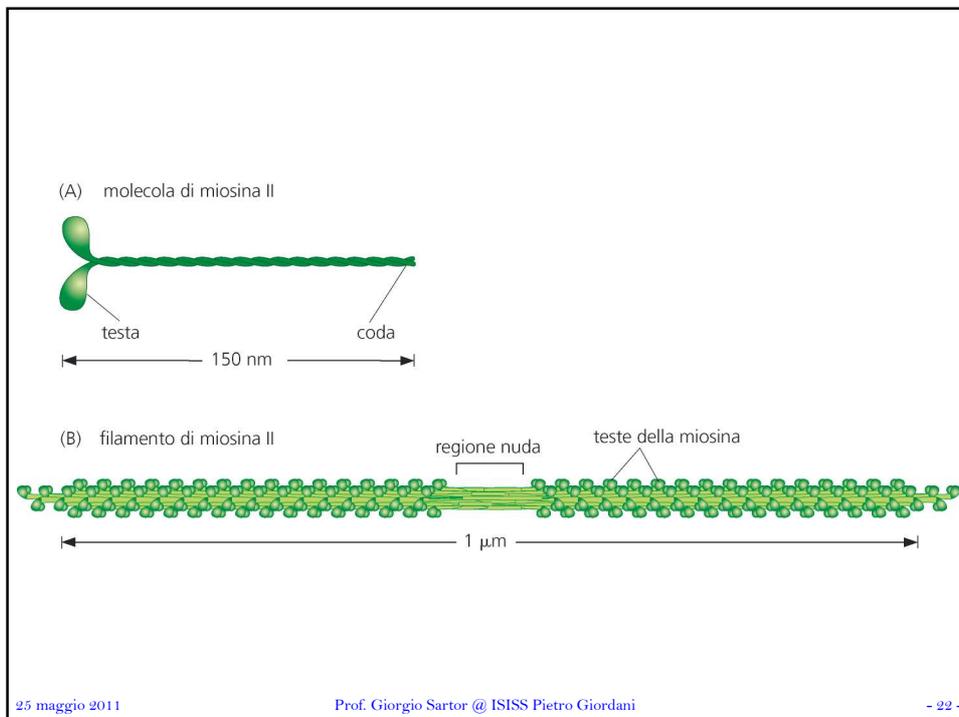
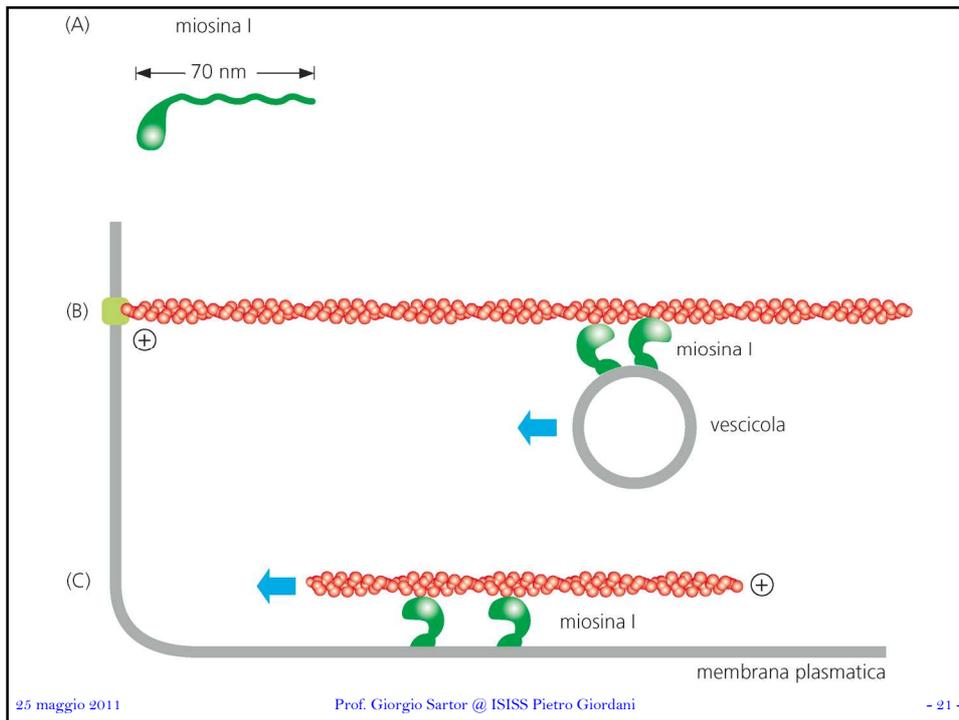
- 15 -

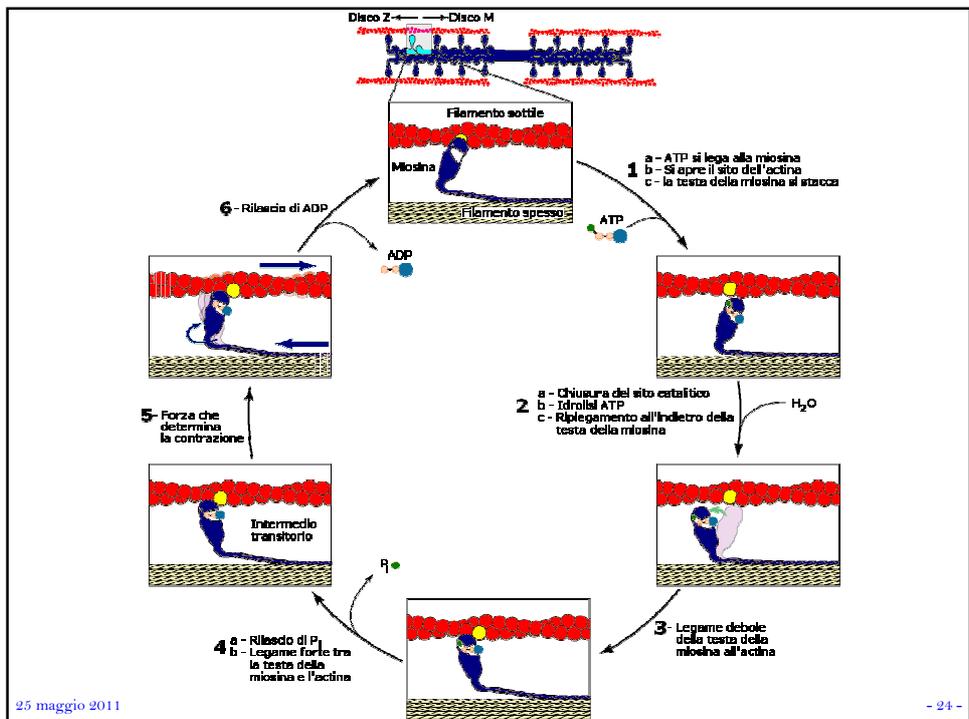
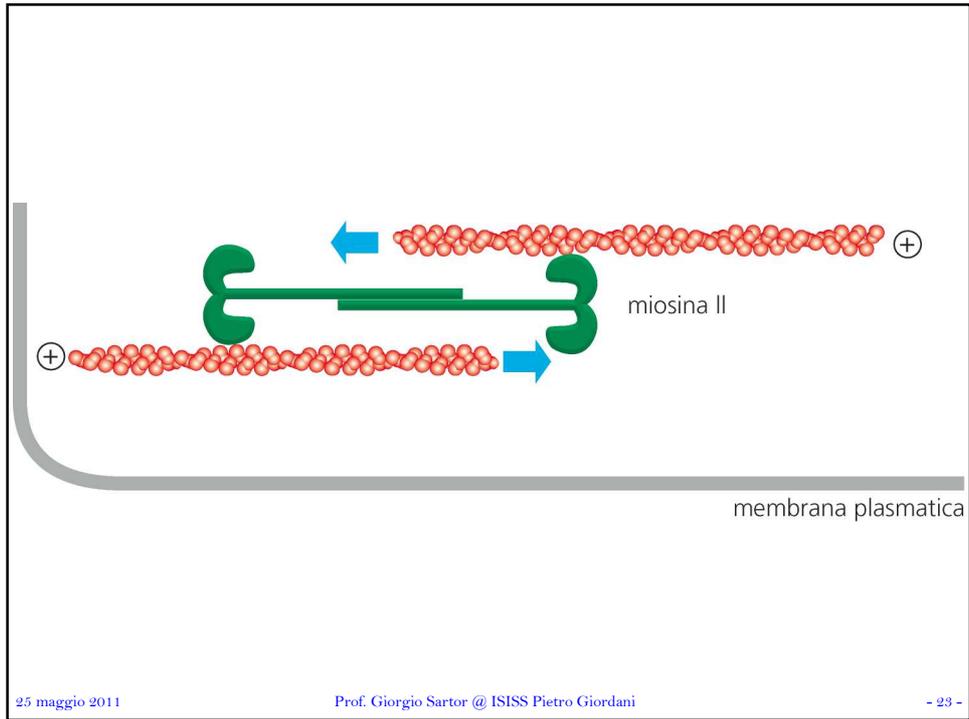
Qualche domanda?

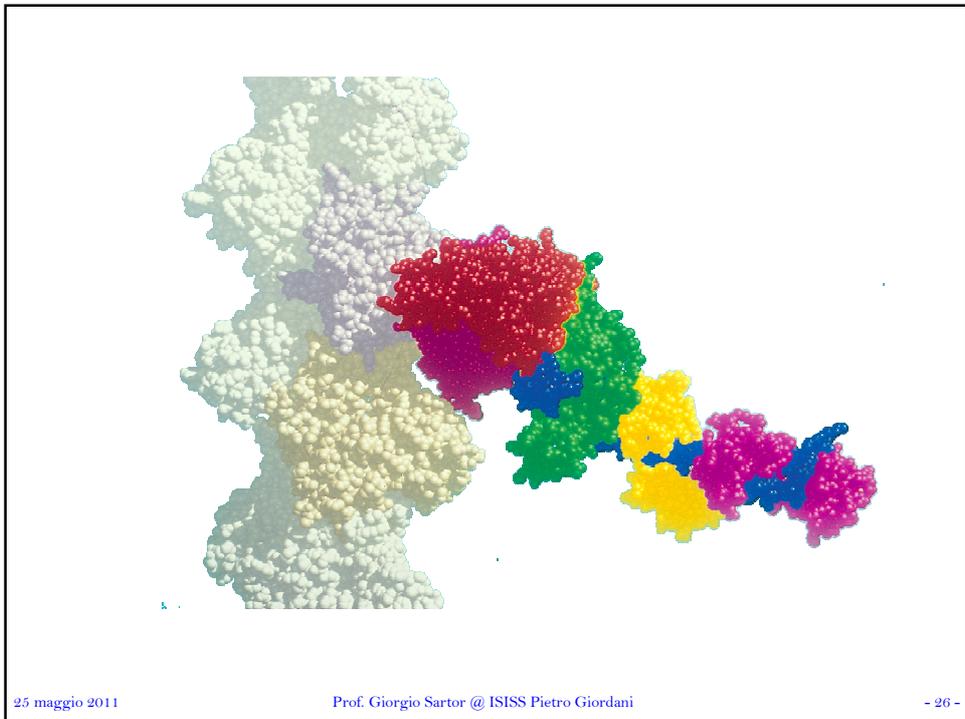
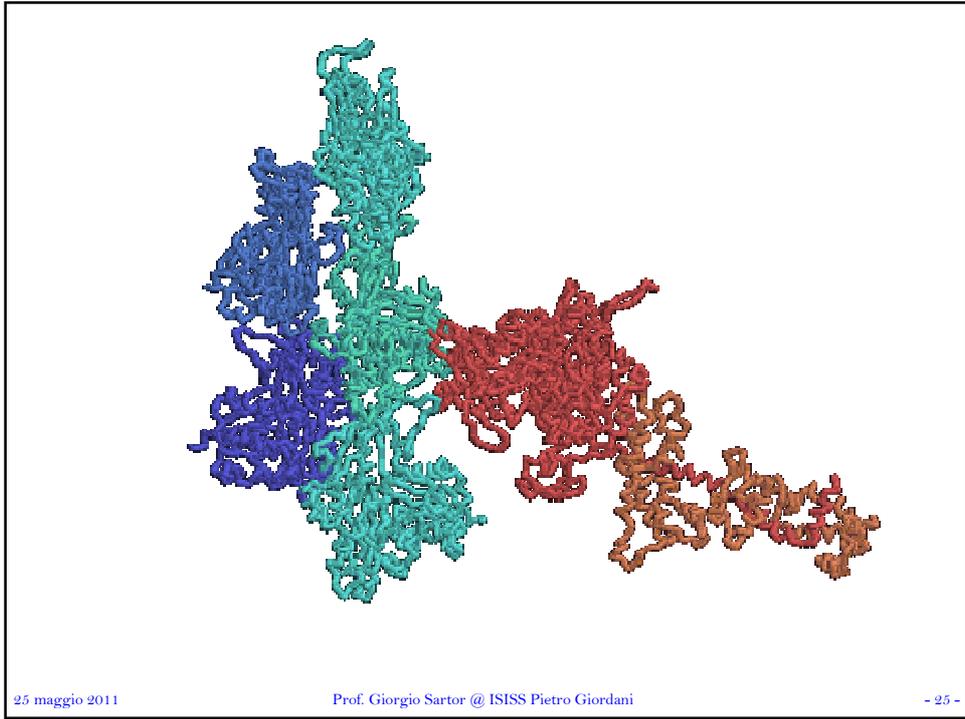
Non esistono domande stupide o intelligenti, solo le risposte lo sono!

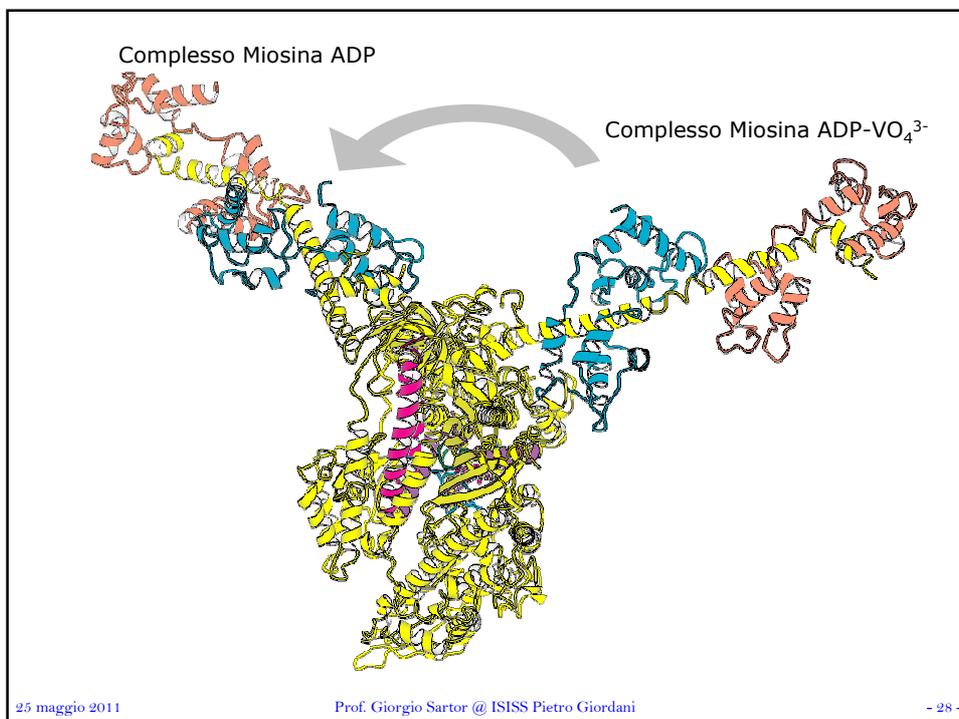
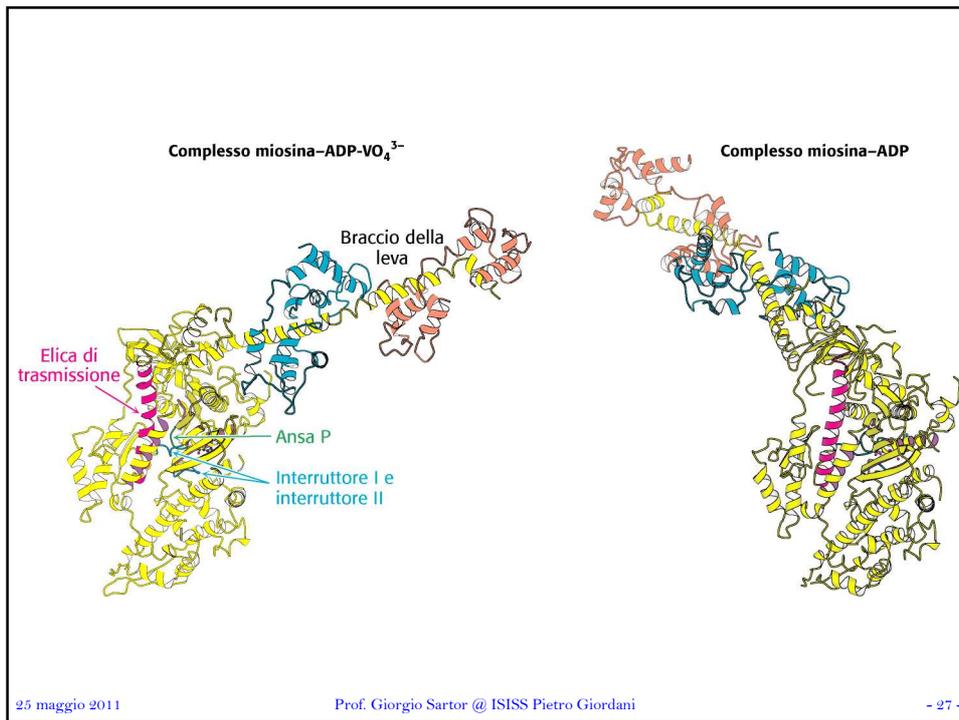


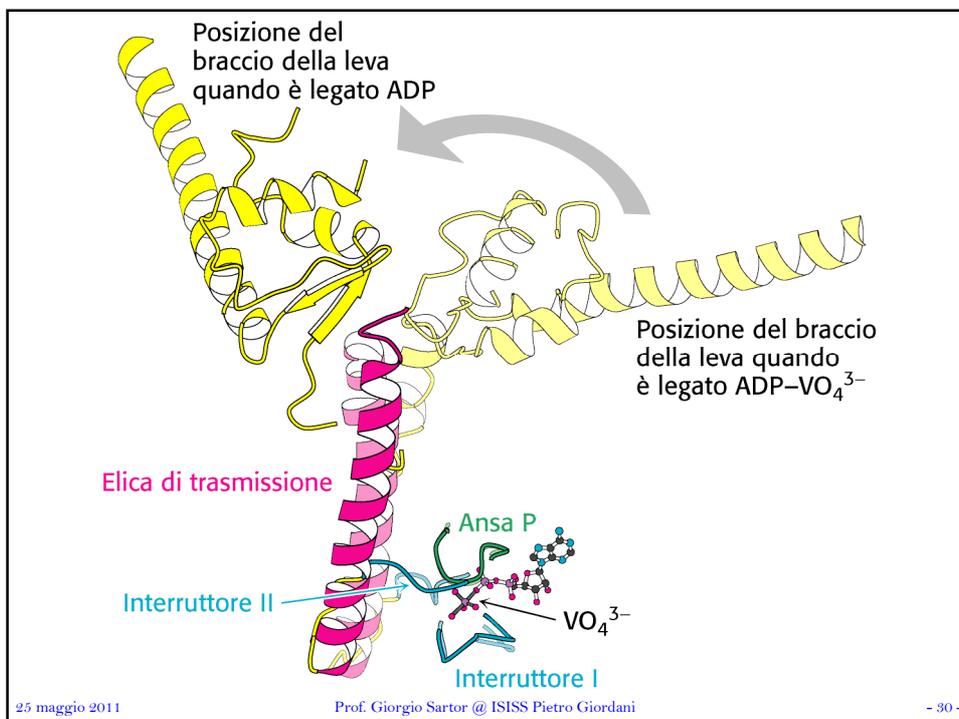
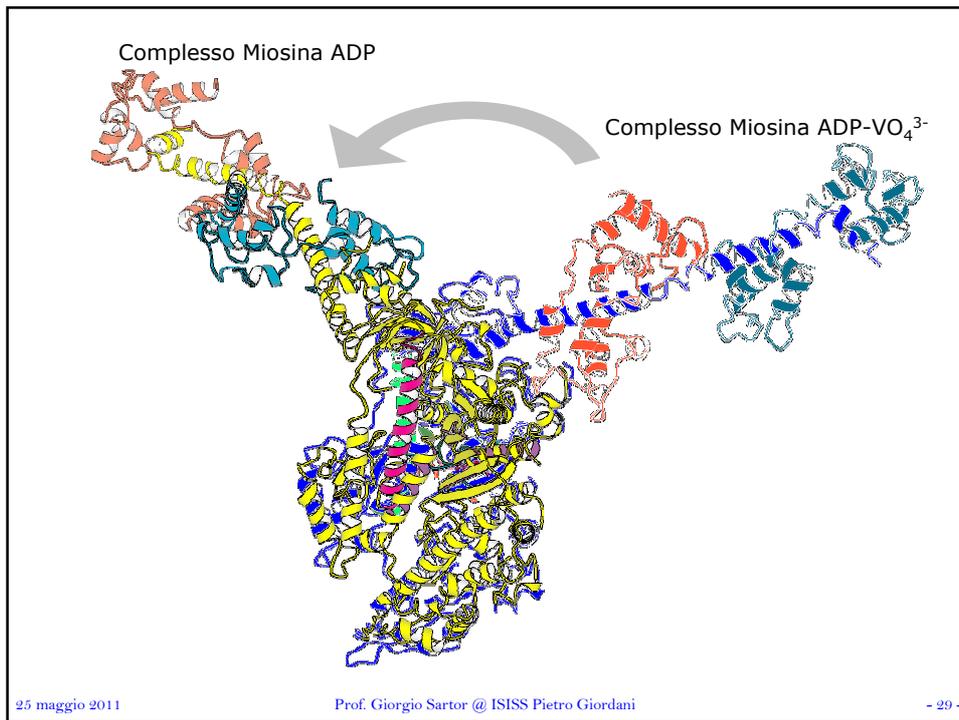


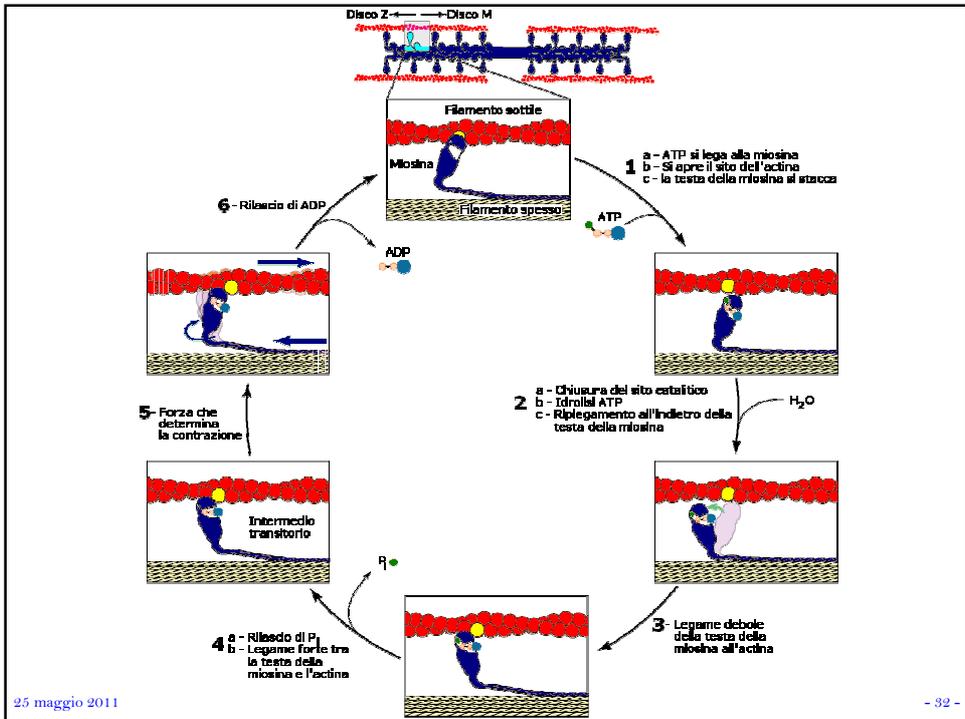
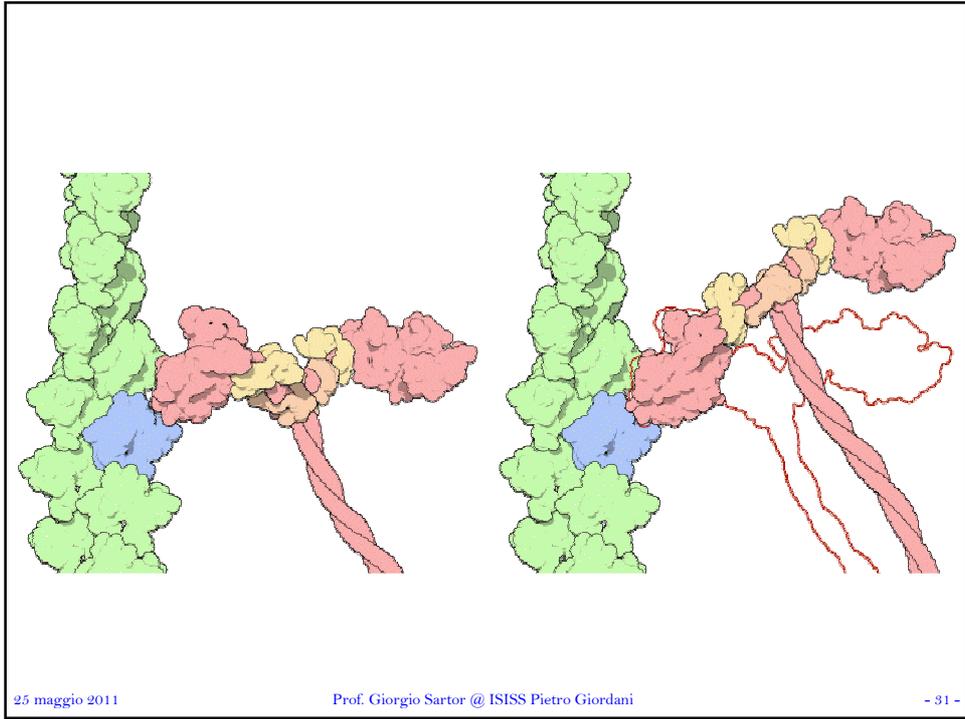


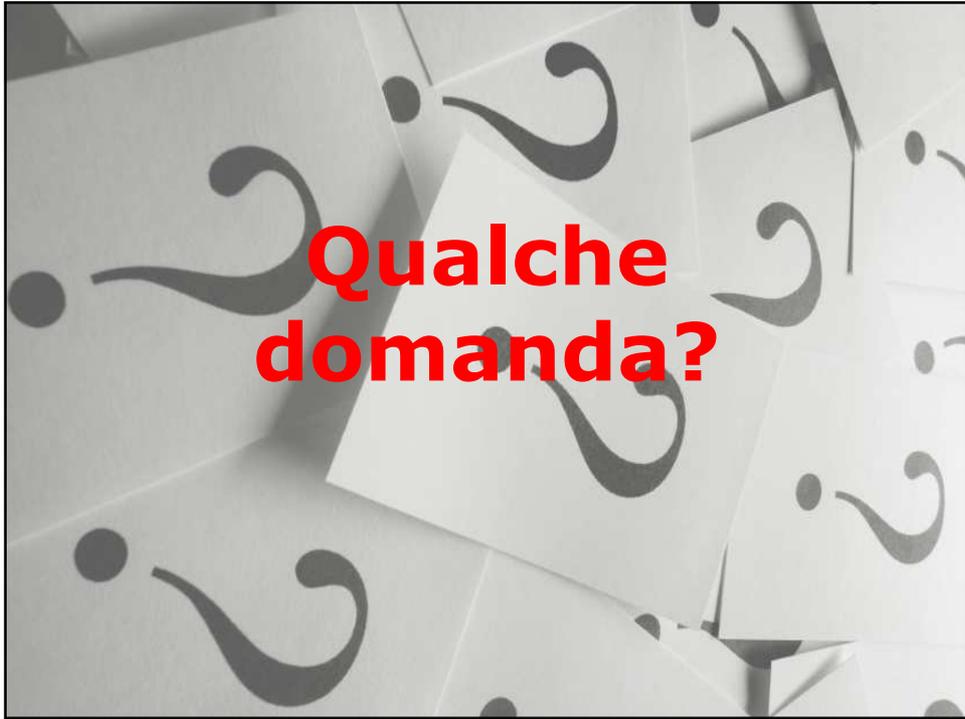














Actina

- Proteina globulare di 43 kDa, diametro di circa 7 nm,
- Abbondante nelle cellule eucariote (5-10% di tutte le proteine), nel tessuto muscolare è la più abbondante (circa 20% delle proteine totali)
- La singola subunità di actina (Actina G) si può legare ad altre due subunità, formando così un polimero lineare.
- Due polimeri lineari avvolti tra di loro danno origine ad un filamento (Actina F) che va a formare il citoscheletro..

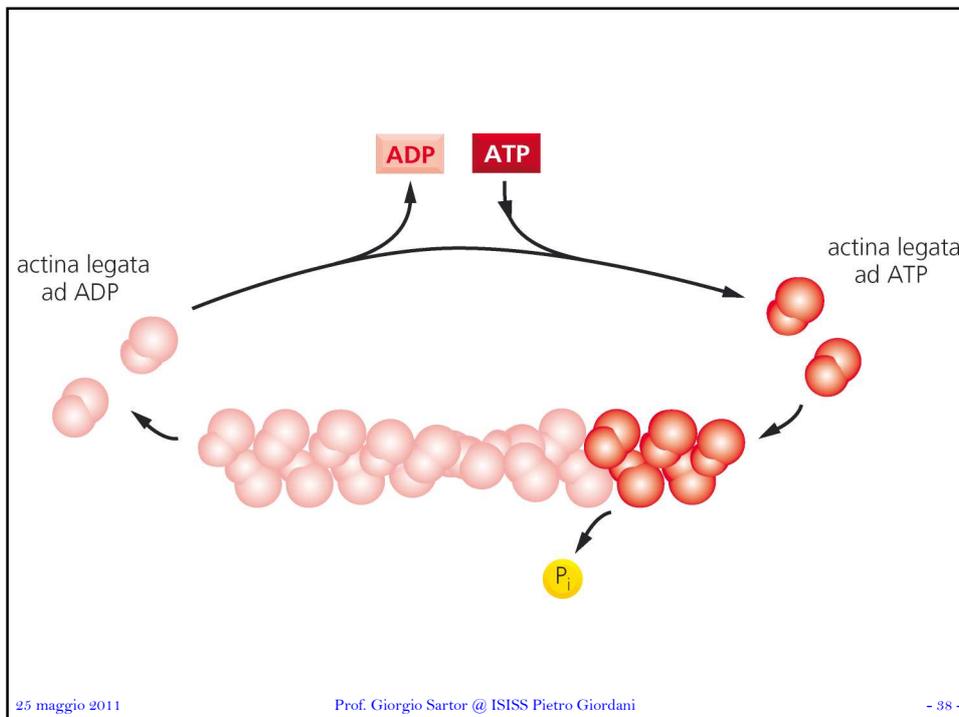
Filamenti di actina

- Continuamente assemblata e disassemblata;
- Controllati da ATP/ADP:
 - Con ATP aggrega in filamenti (estremità in crescita)
 - Con ADP dissocia dai filamenti (estremità in dissoluzione)
- Ioni
- Falloidina

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

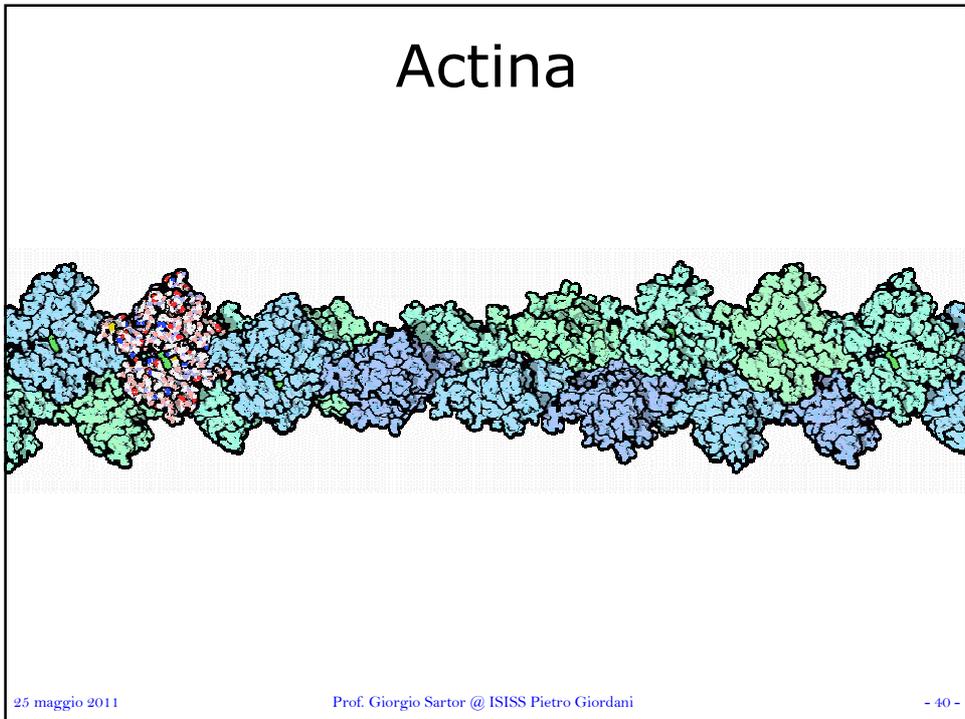
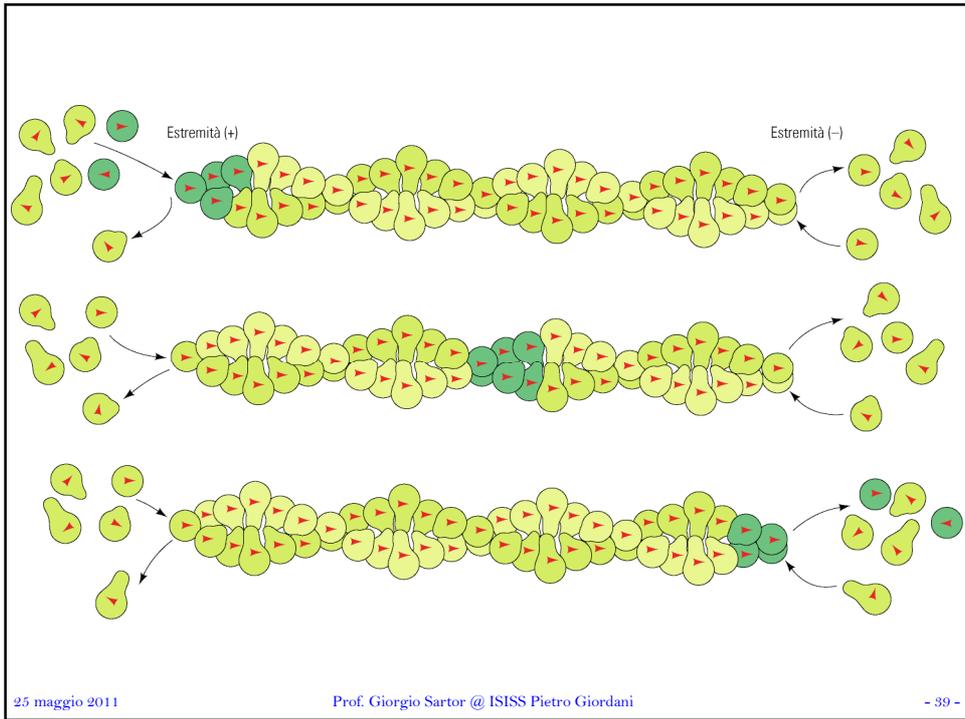
- 37 -



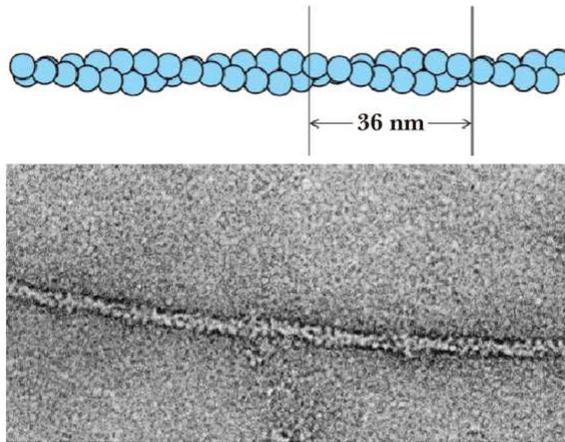
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 38 -



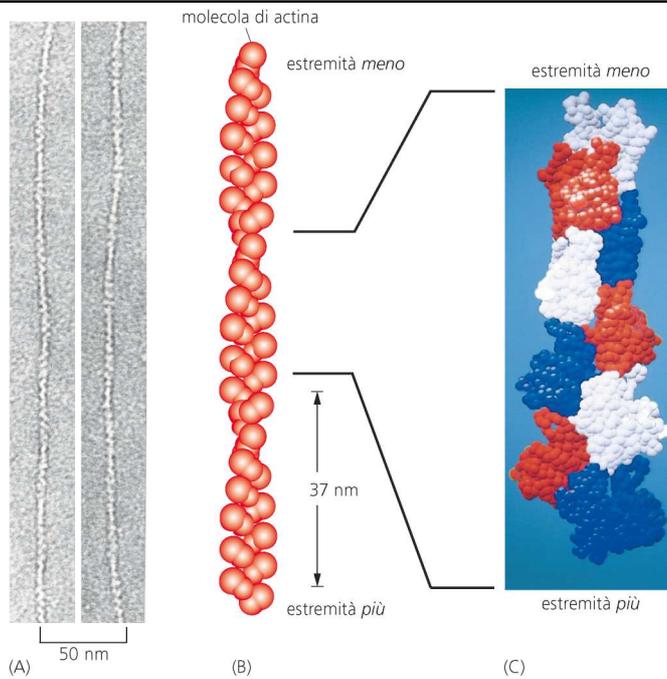
Filamenti di actina



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

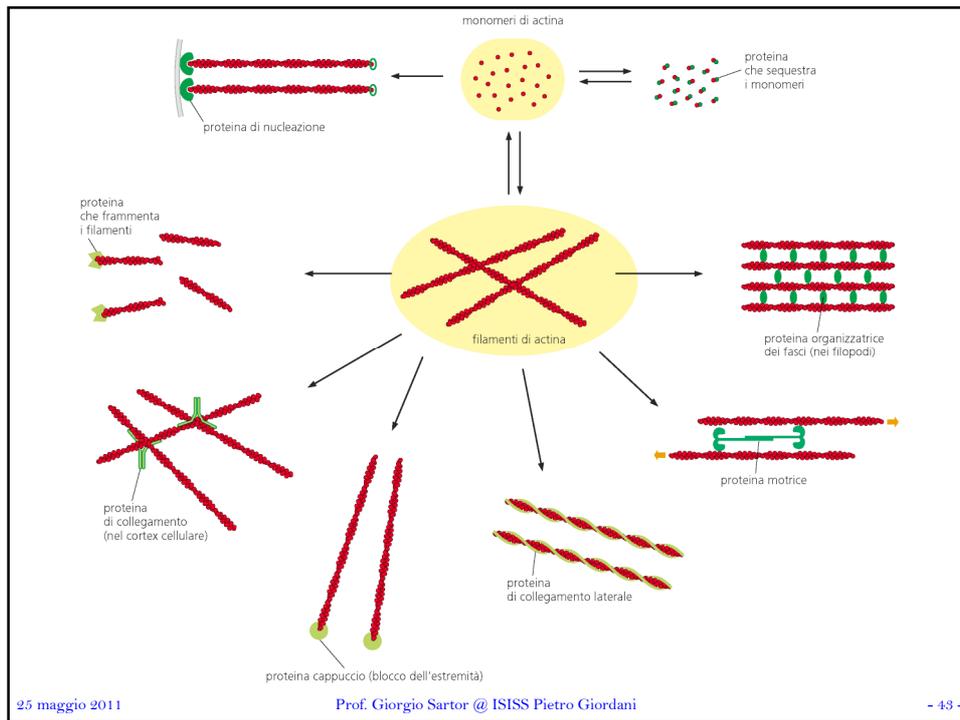
- 41 -



25 maggio 2011

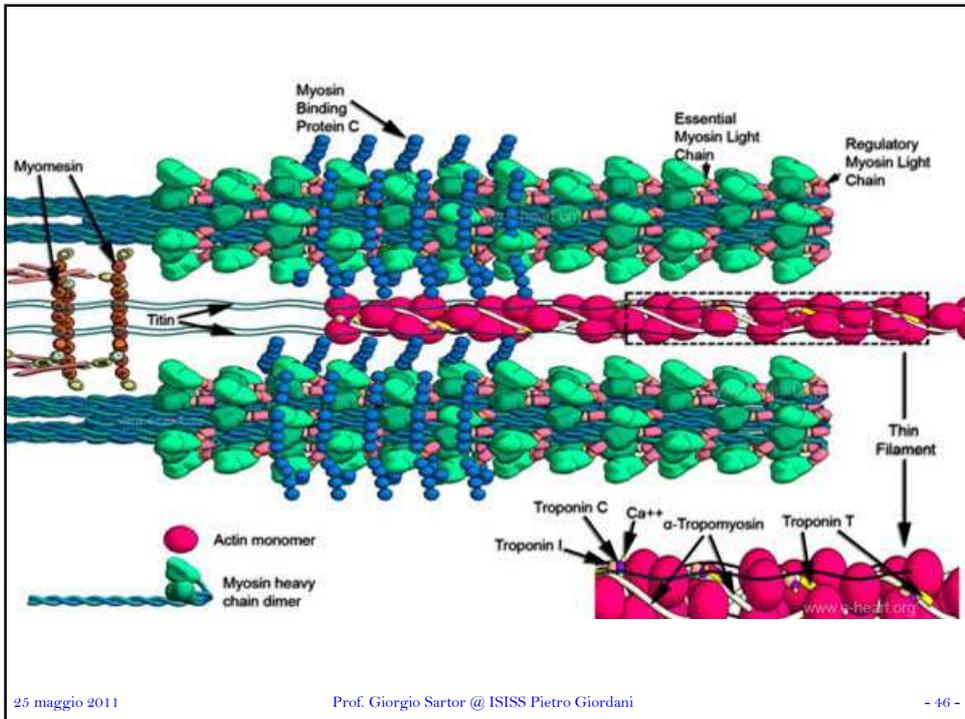
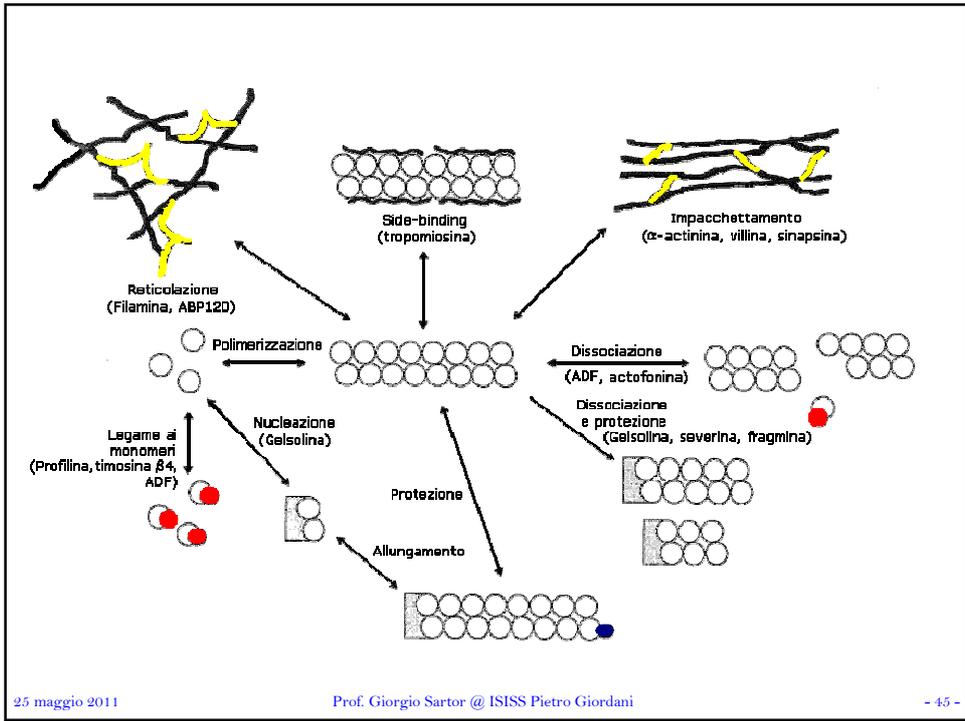
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

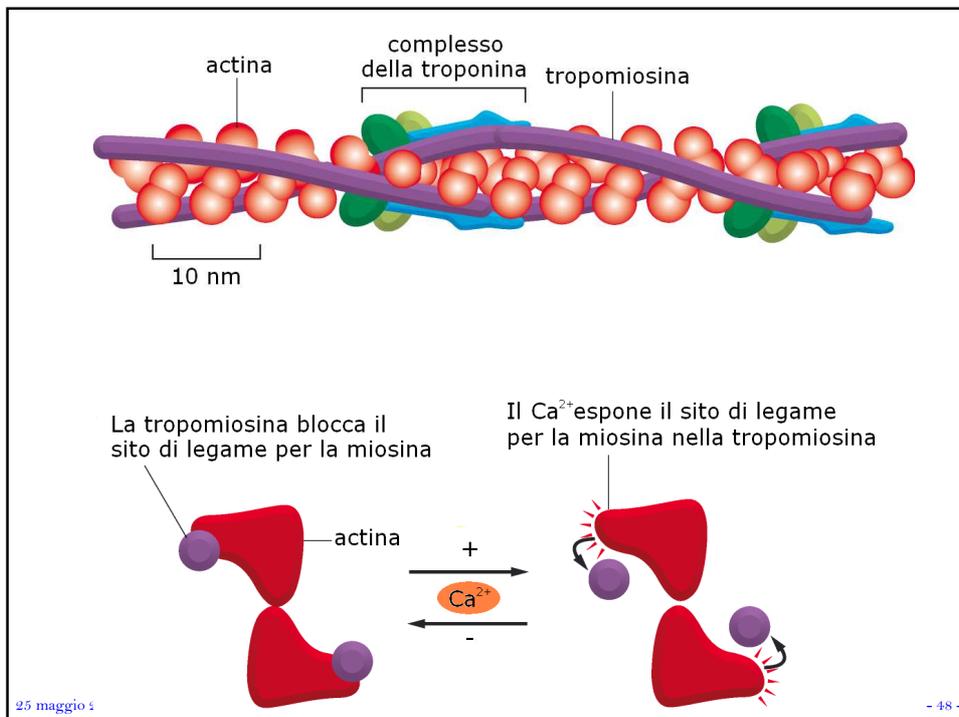
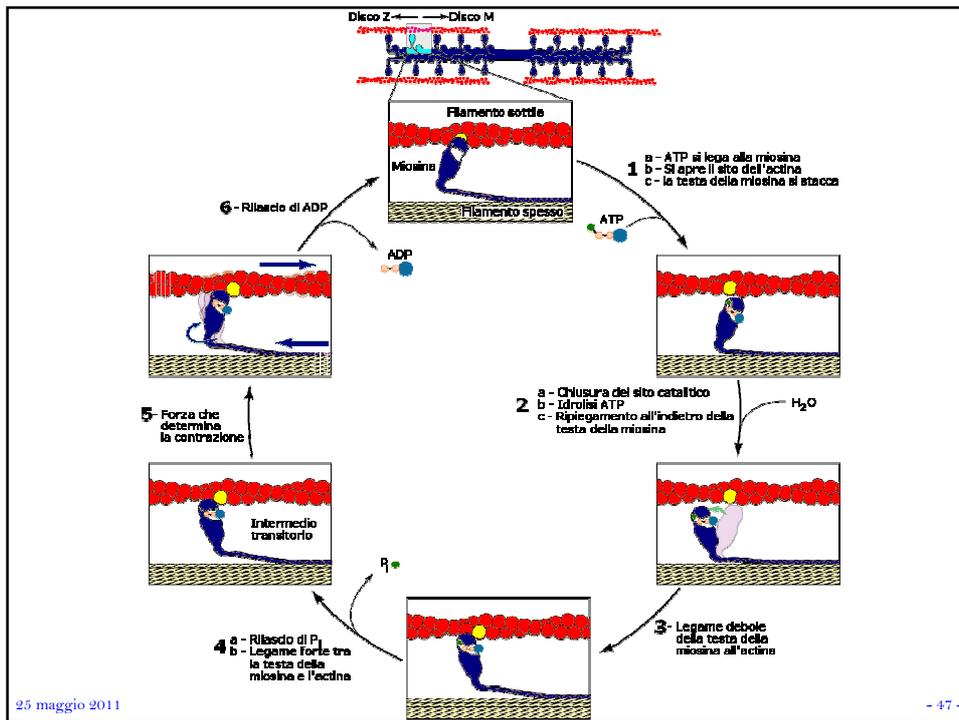
- 42 -



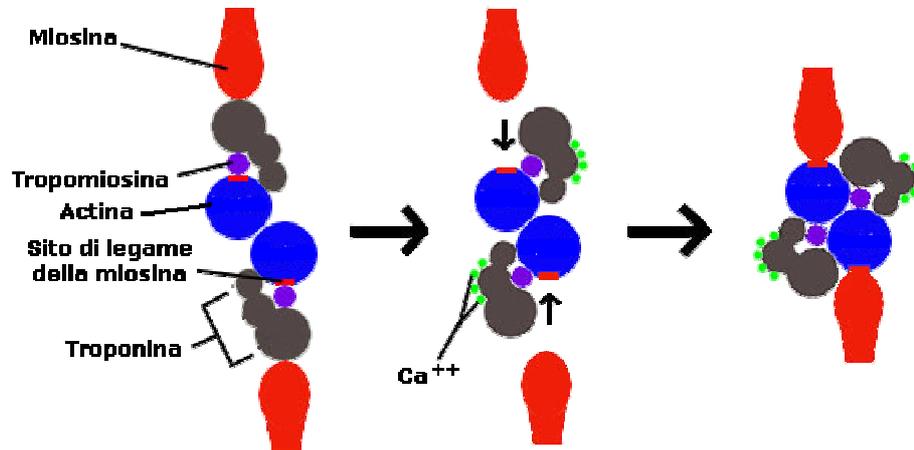
ABP, Actine Bindig Proteins

- **Profilina:** si lega ai singoli monomeri di actina. Favorisce la formazione dei filamenti.
- **Severina e Timosina:** si legano anch'esse ai singoli monomeri di actina. Ostacolano la formazione dei filamenti
- **Gelsolina:** taglia il filamento e si lega all'estremità "più" appena formata;
- **Fimbrina, α -actinina, Tropomiosina, Fodrina, Villina:** organizzano i microfilamenti in fasci paralleli
- **Filamina:** organizza i microfilamenti in reticoli
- **Spettrina, Distrofina, Vinculina, Talina, Tensina:** collegano i microfilamenti alla membrana plasmatica
- **Miosina/e:** si muove sui microfilamenti.





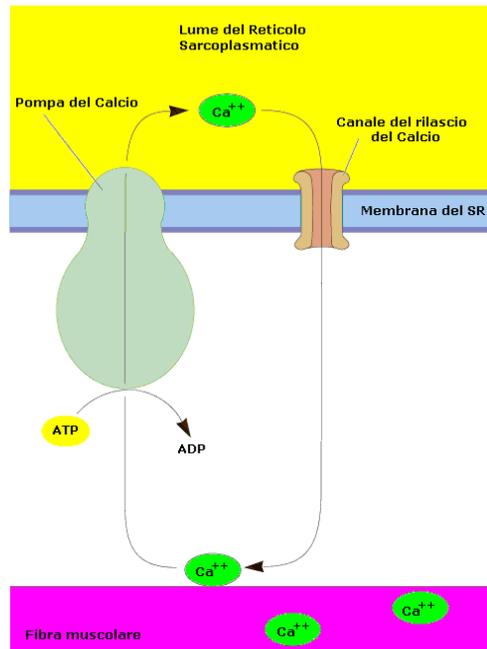
Altro punto di vista



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

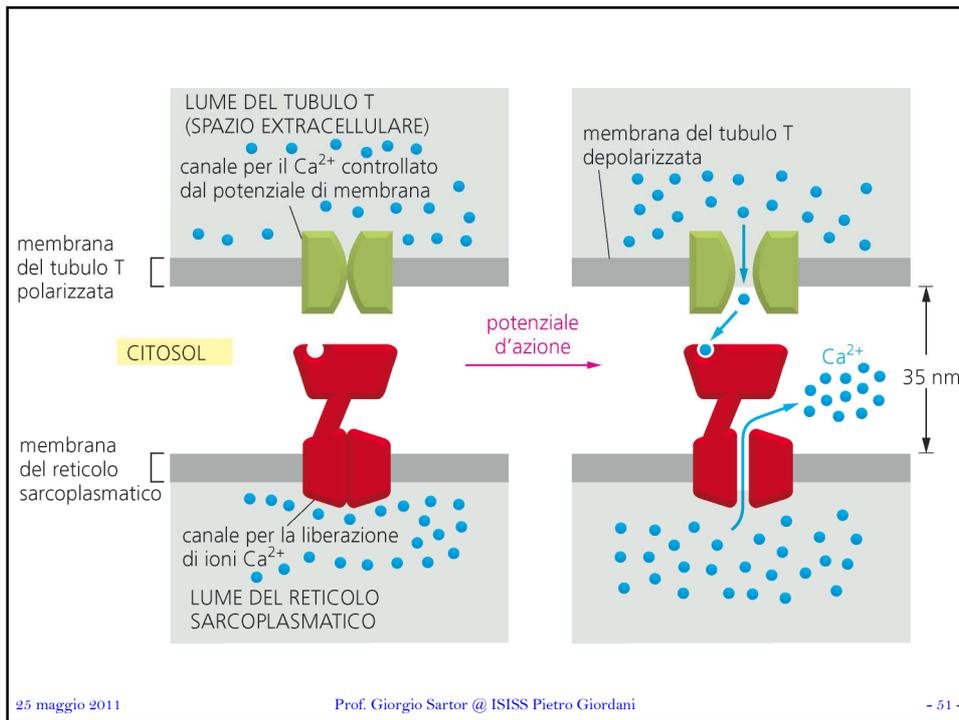
- 49 -



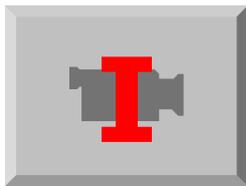
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 50 -



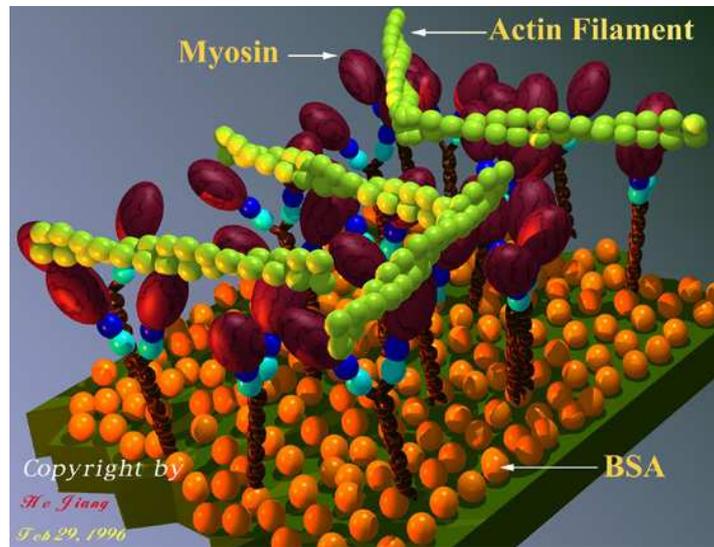
Animazioni



<http://www.youtube.com/watch?v=gJ309LfHQ3M>



<http://www.youtube.com/watch?v=VQ4OMSi6qAg&feature=related>



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 53 -

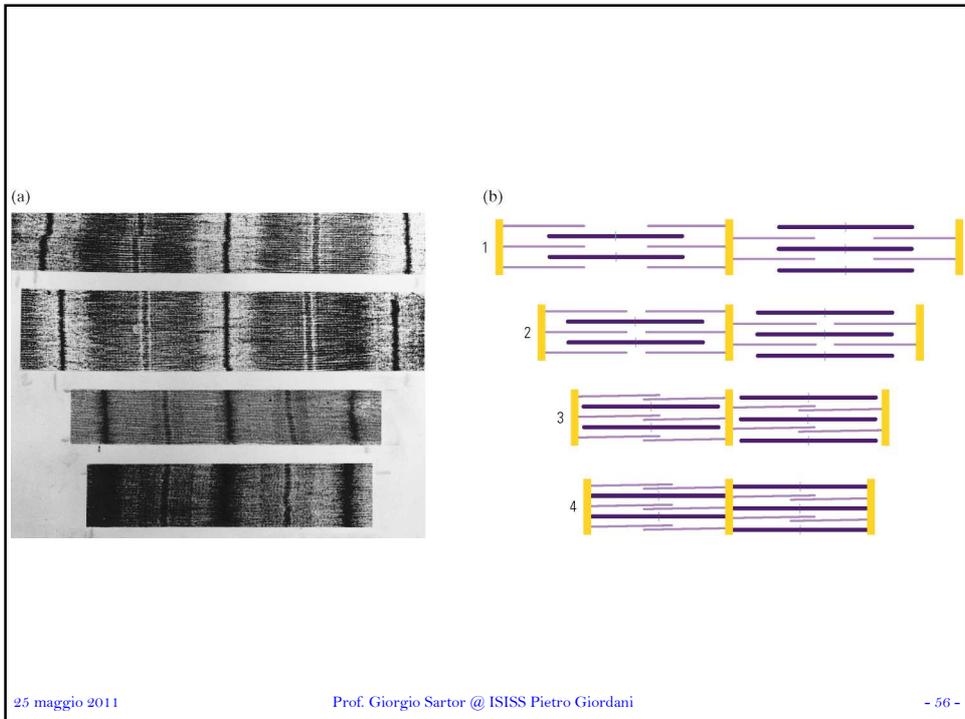
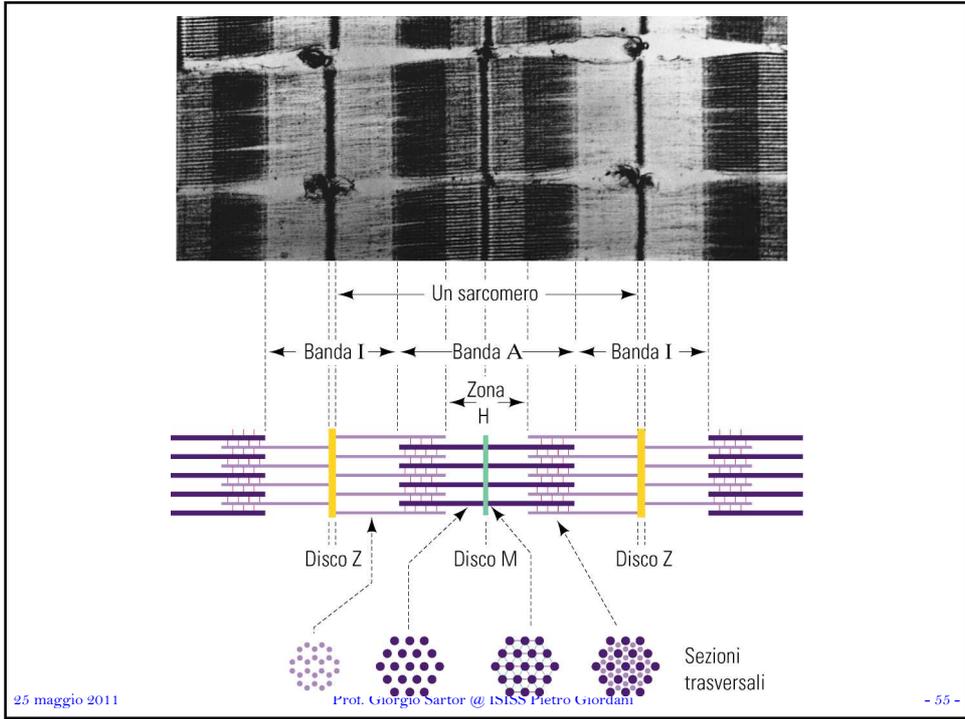
Movimento di actina su vetrino coperto di miosina

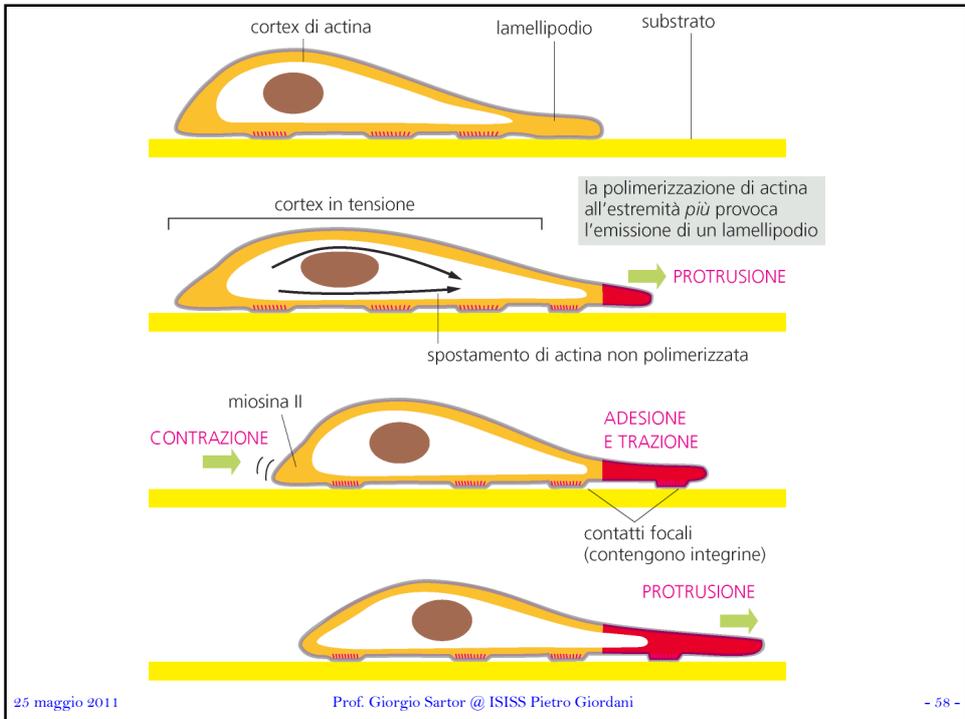
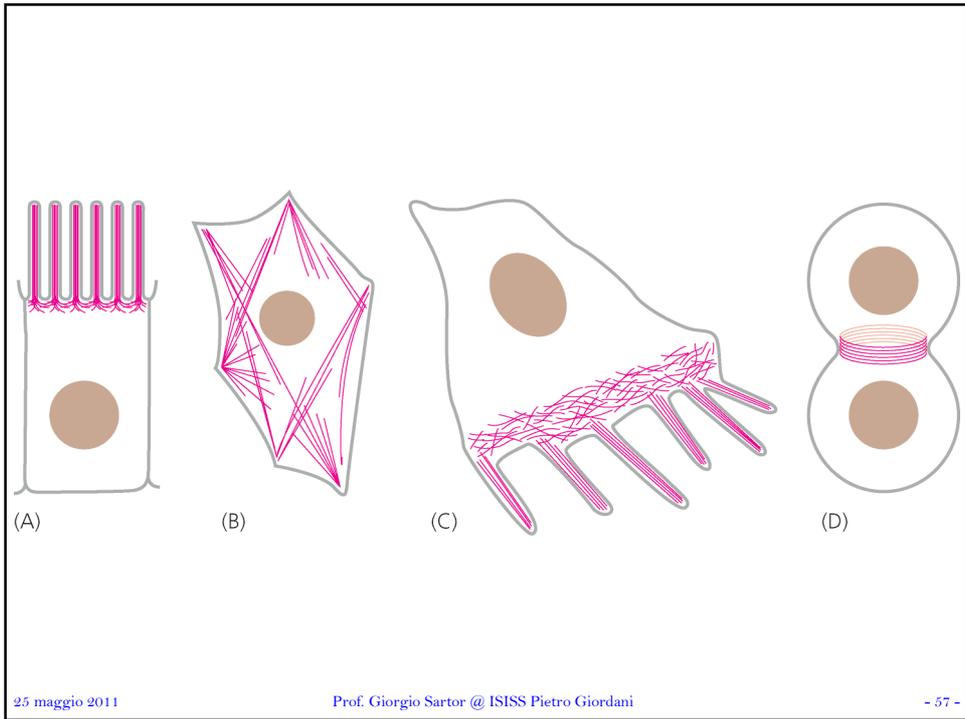


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 54 -







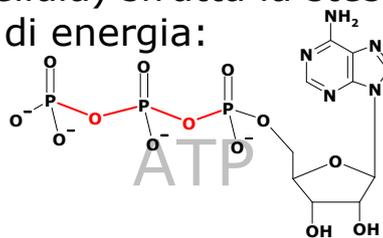
Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:

ATP

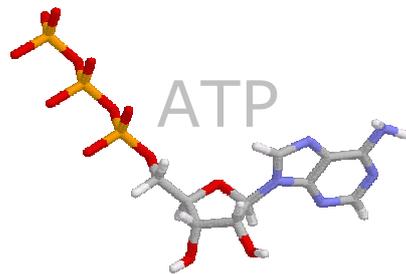
Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:



Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:



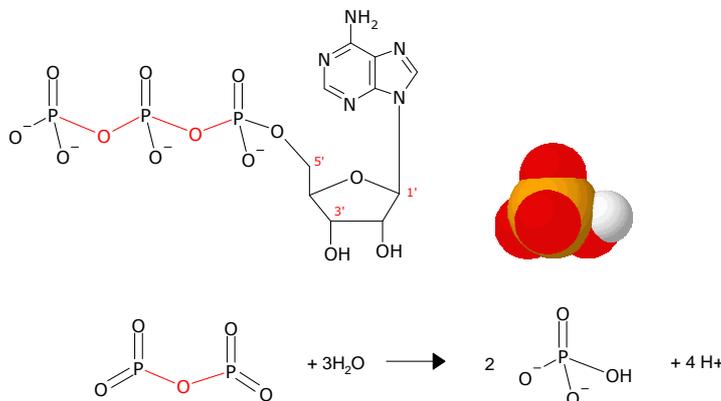
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 63 -

Nucleotidi liberi

- I legami che tengono insieme i residui di fosfato sono legami di tipo **anidridico**.



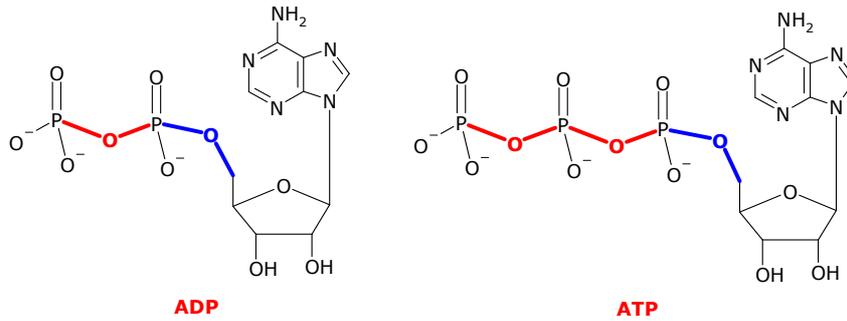
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 64 -

ADP e ATP

- Legami di tipo **anidridico**
- Legami di tipo **fosfoestereo**

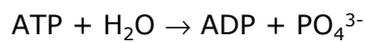


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

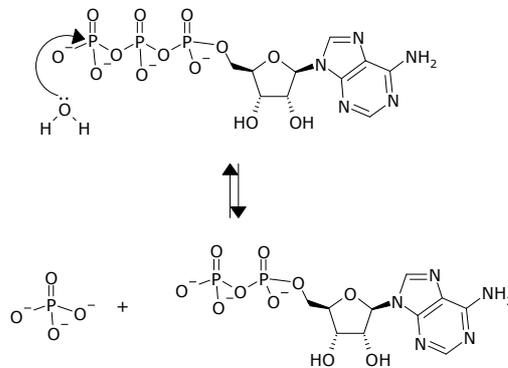
- 65 -

Trasporto di energia



$\Delta G^{\circ} = -7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1} (-30.6 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1})$ a pH 7

$\Delta G^{\circ} = -10 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1} (-42 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1})$ a pH 9



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 66 -

ΔG

- Il valore di ΔG dipende da:
 - Forza ionica
 - Concentrazione di Mg^{++}
 - Concentrazione di Ca^{++}
- Nelle normali condizioni cellulari vale circa:
 $-12 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$
- I nucleotidi sono contemporaneamente:
 - Stabili
 - Solubili
 - Carichi
 - Reattivi

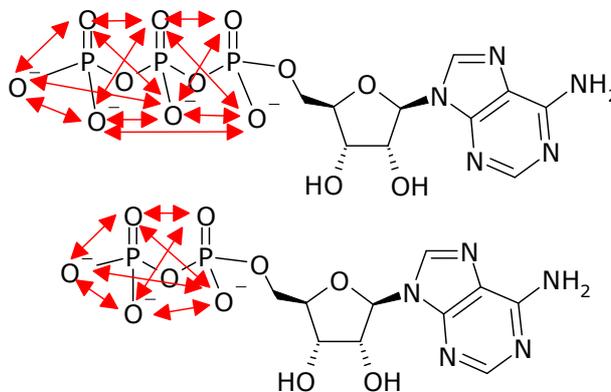
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 67 -

Perché il $\Delta G^{\circ'}$ dell'ATP vale $-30.6 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$?

- **Repulsione tra cariche**
 - Maggiore in ATP che in ADP



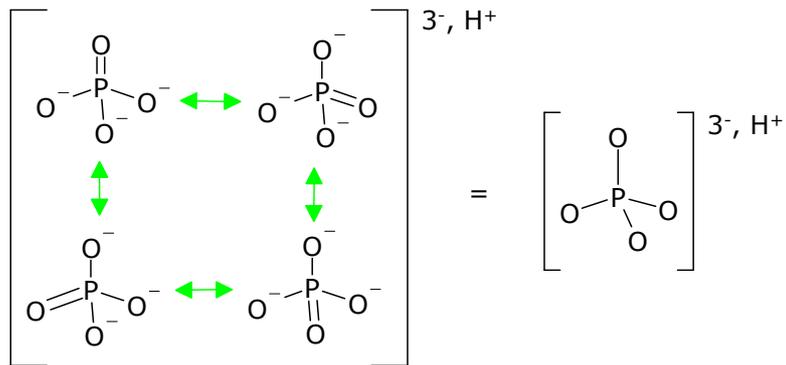
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 68 -

Perché il $\Delta G^{\circ'}$ dell'ATP vale $-7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$?

- Stabilizzazione per risonanza
 - Del fosfato

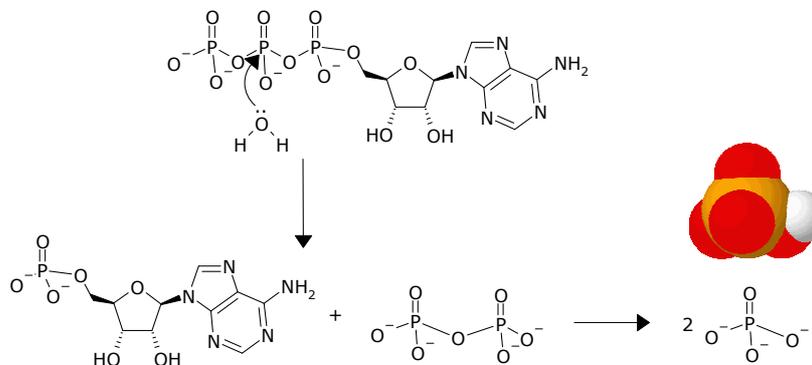


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 69 -

Trasporto di energia



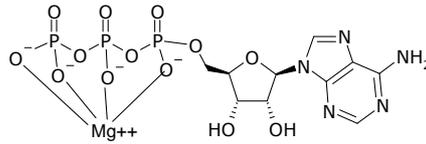
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 70 -

ATP e Mg⁺⁺

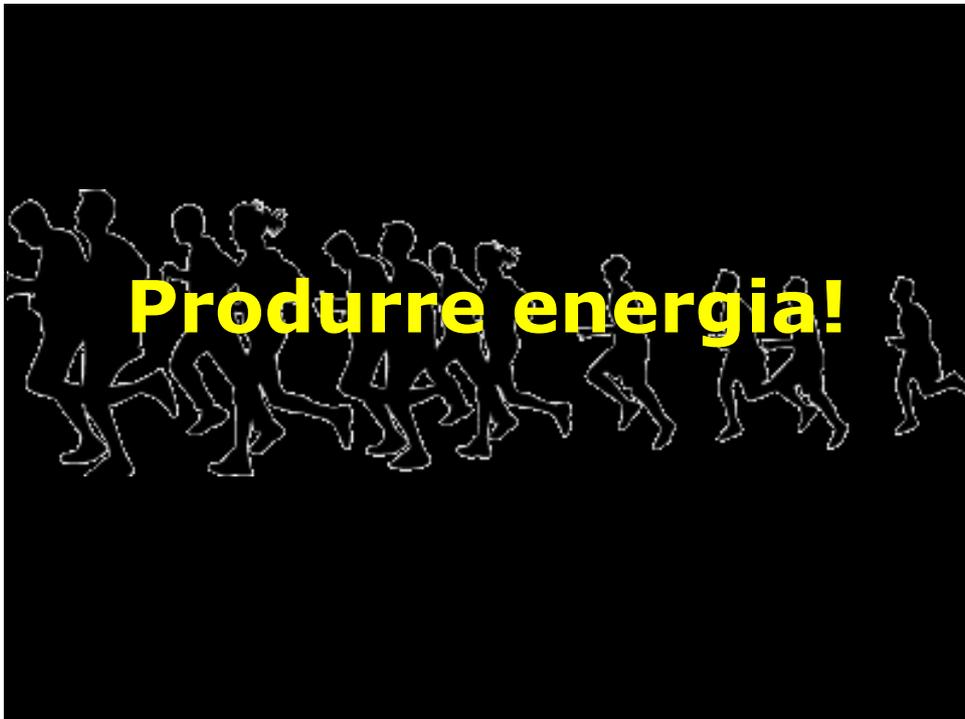
- Nella cellula l'ATP è spesso complessato con lo ione Mg⁺⁺



- Per formare uno ione complesso.

Qualche domanda?





Metabolismo

È il processo che permette di ricavare energia da legami chimici (sottoforma di nucleotidi trifosfati, equivalenti riducenti, ecc.) e di utilizzarla (per produrre legami chimici, energia, calore, ecc.)

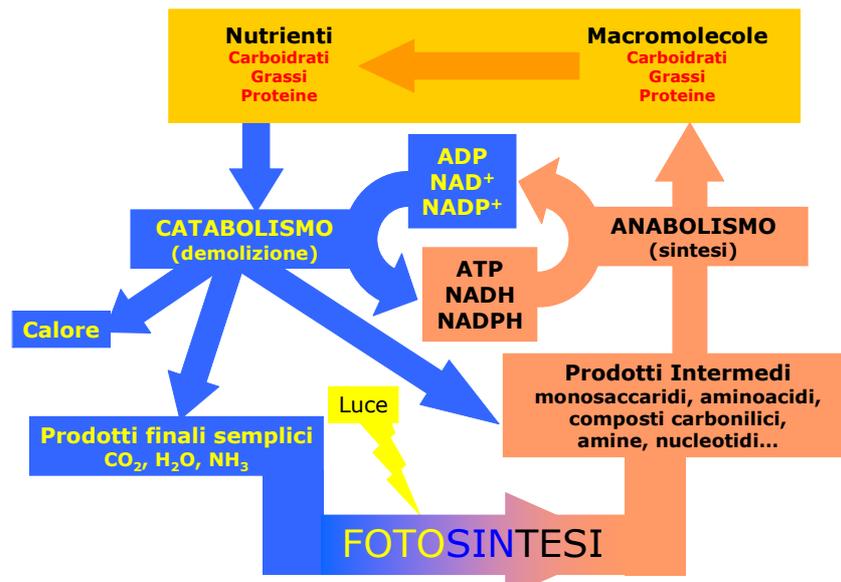
Tutta la chimica dei viventi!

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 75 -

Metabolismo

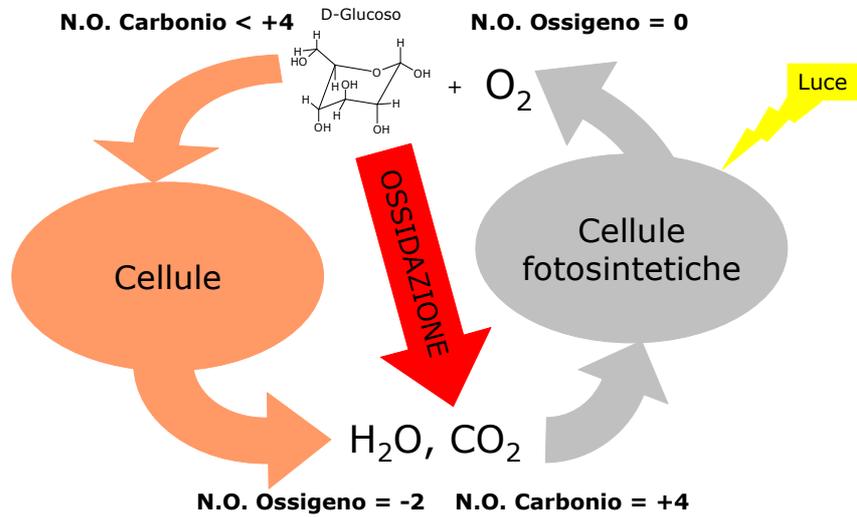


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 76 -

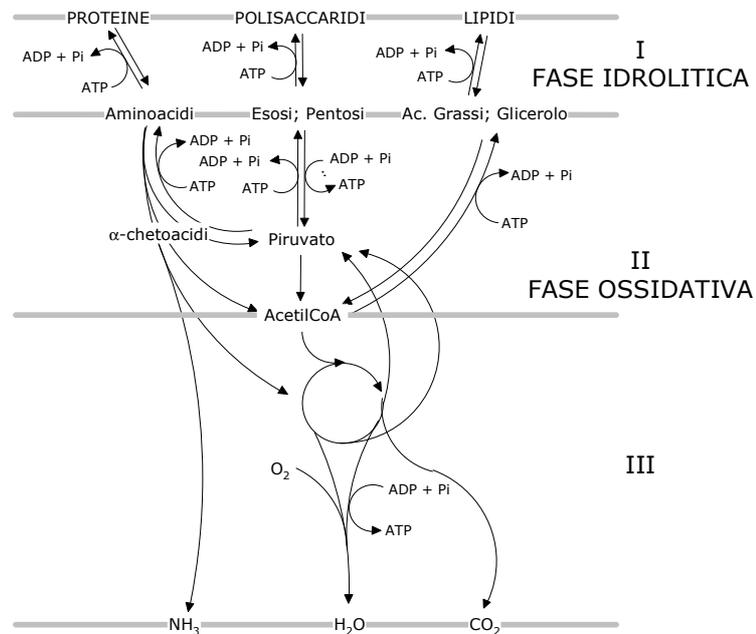
Metabolismo del carbonio



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

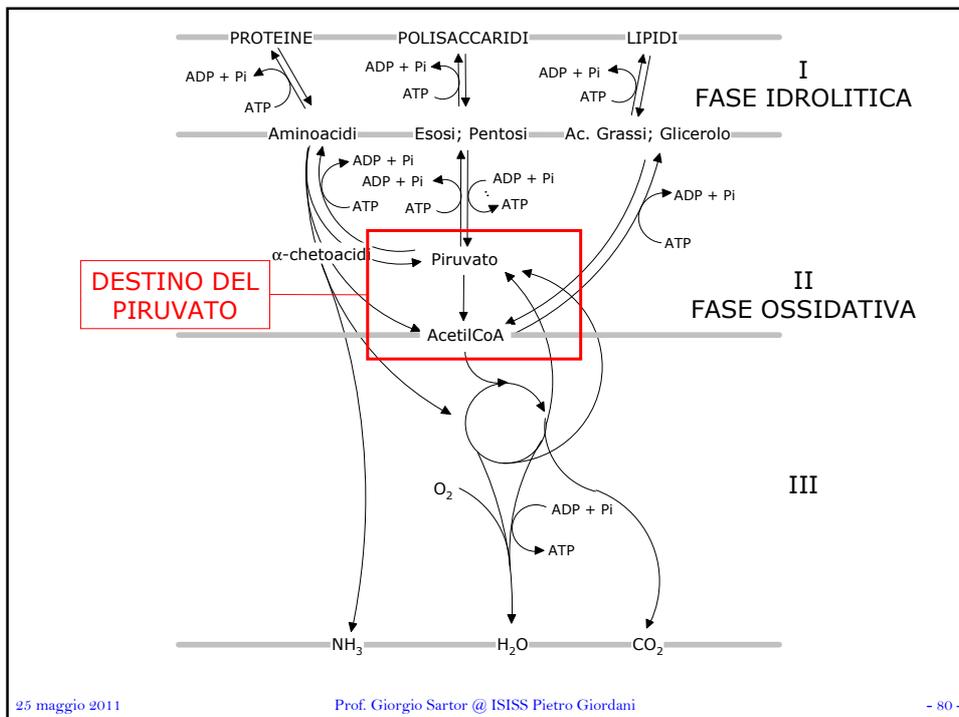
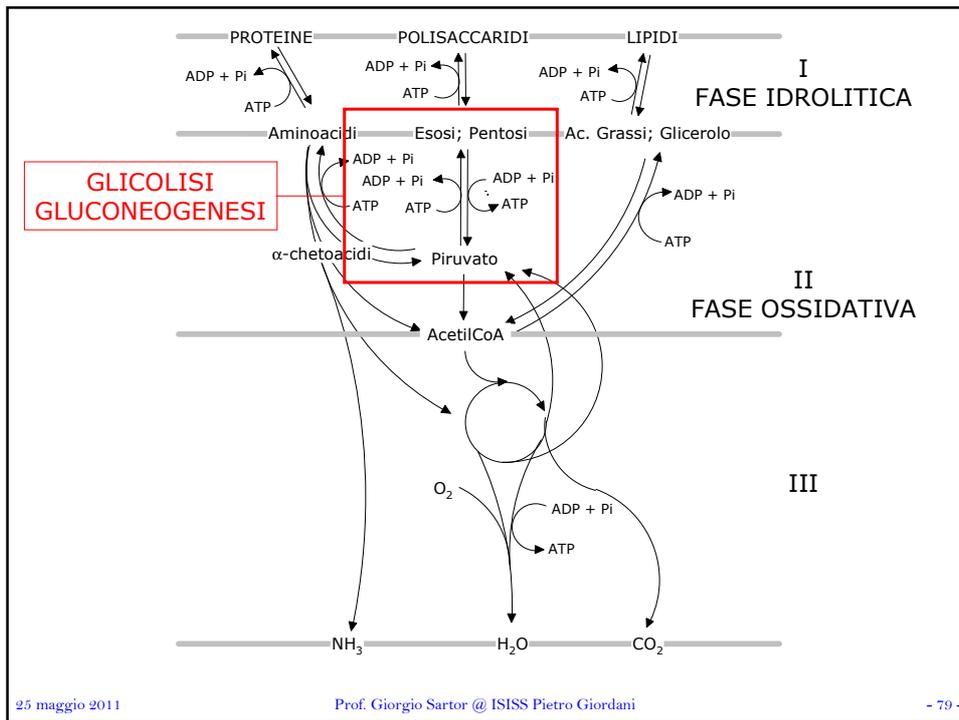
- 77 -

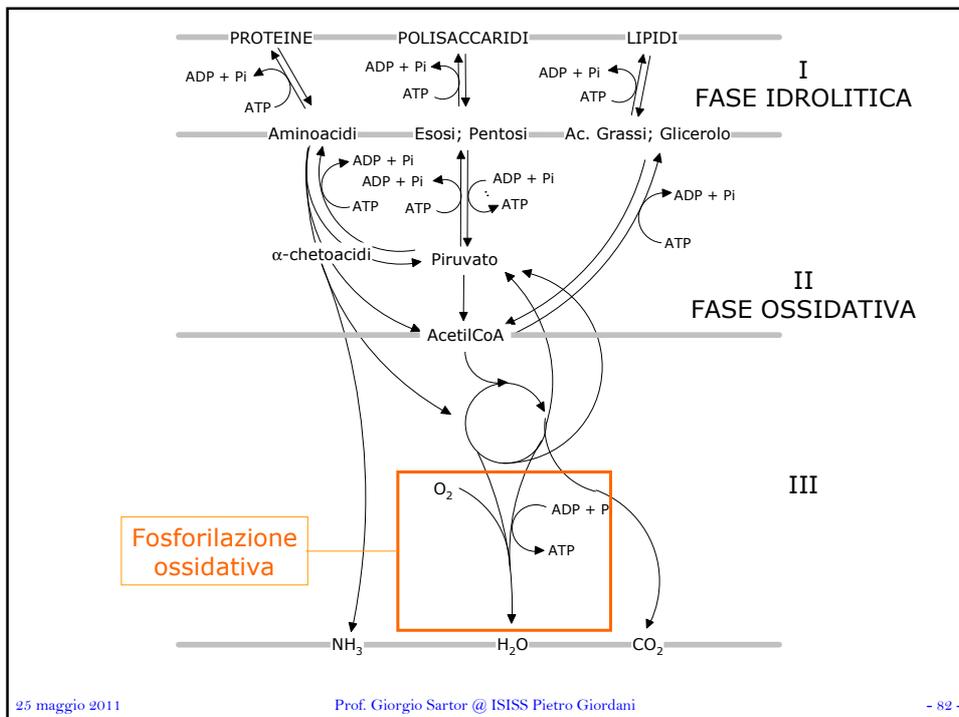
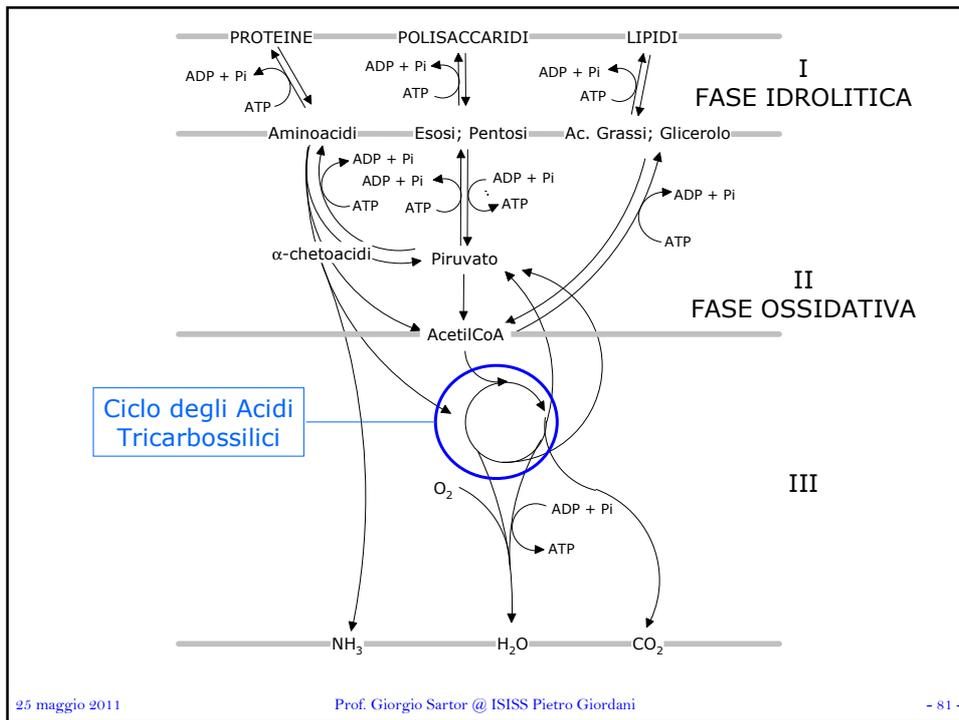


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 78 -





Glicolisi

- In tutte le cellule avviene la glicolisi
- Dieci reazioni, le stesse in tutte le cellule, ma con diversa cinetica
- Tre fasi:
 - La prima fase converte il glucosio in fruttosio-1,6-difosfato,
 - La seconda fase scinde il fruttosio-1,6-difosfato in due triosi,
 - La terza fase produce due molecole di piruvato.
- I prodotti sono: piruvato, ATP e NADH.
- Esistono tre diversi destini possibili del piruvato.

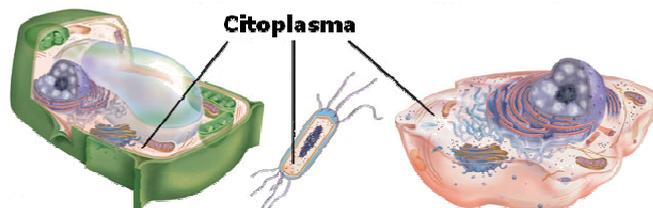
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 83 -

Glicolisi

- Gli enzimi sono confinati nel citoplasma della cellula.
- Gli intermedi sono tutti fosforilati.
 - Non passano attraverso le membrane.
 - Vengono riconosciuti dagli enzimi.
 - Sono convertiti in intermedi ad alto potenziale di trasferimento del fosfato che sono in grado di fosforilare l'ADP ad ATP.



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 84 -

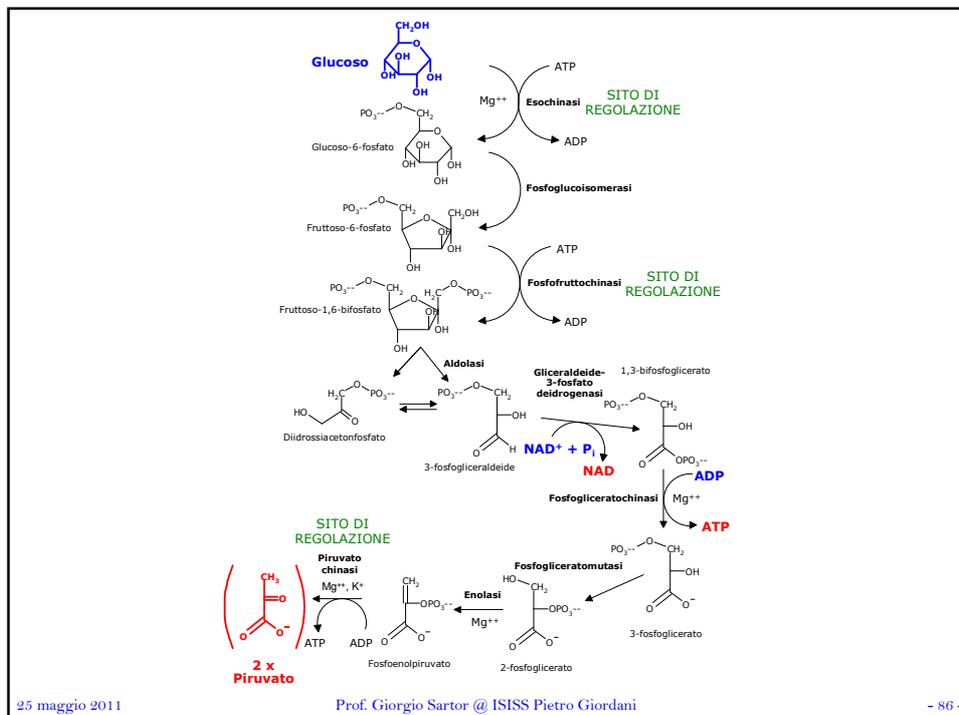
Fasi della glicolisi

1. Fosforilazione del substrato ed attivazione,
2. Scissione dello zucchero a sei atomi di carbonio,
3. Recupero dell'energia nella fosforilazione dell'ADP.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

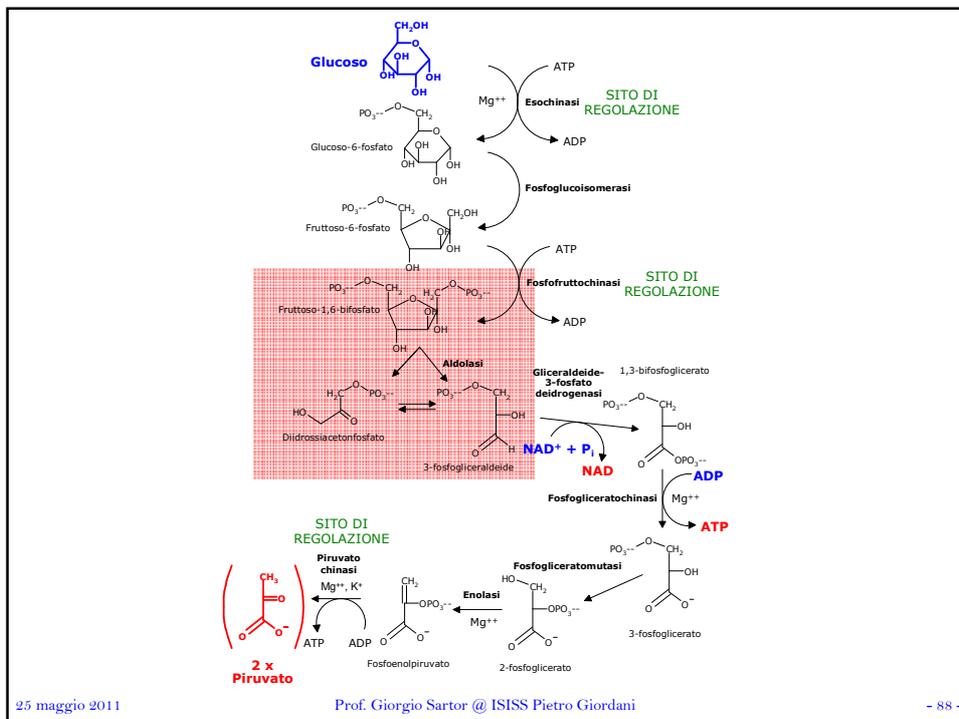
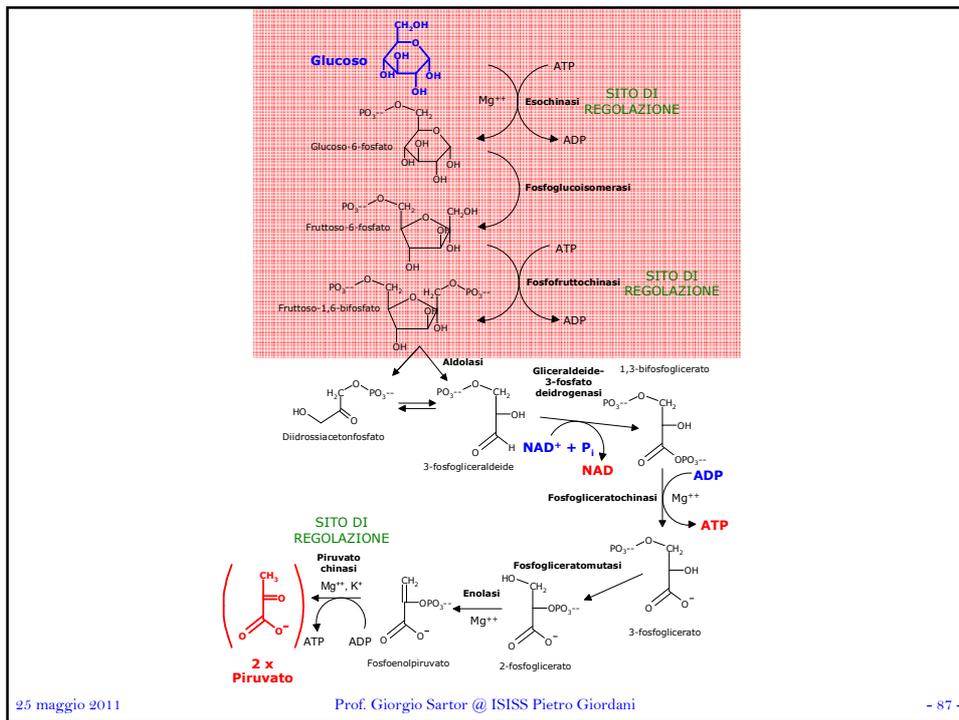
- 85 -

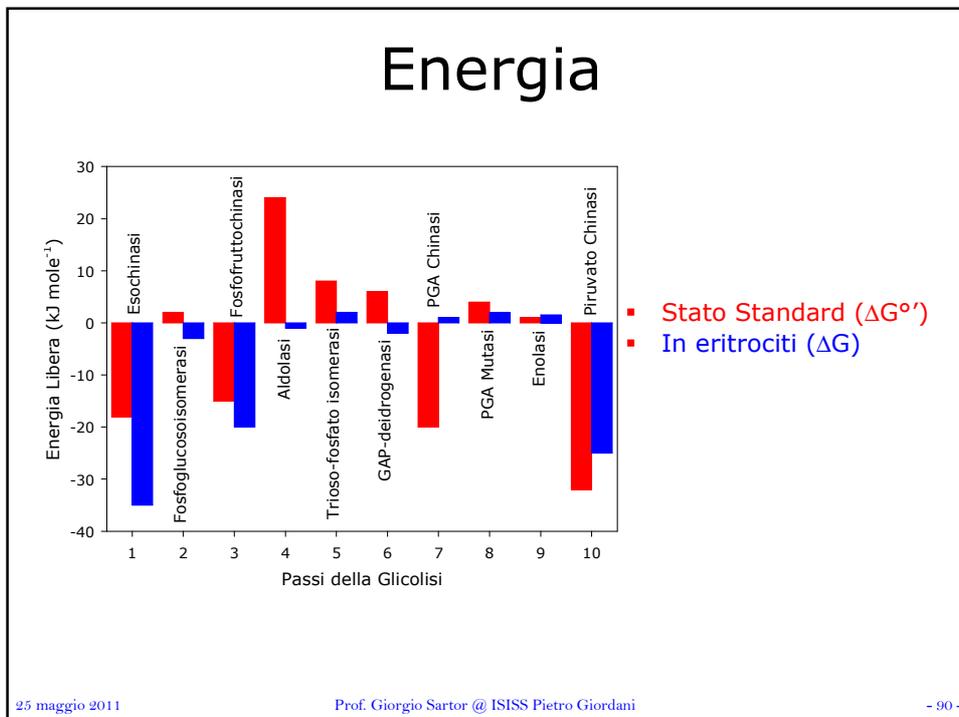
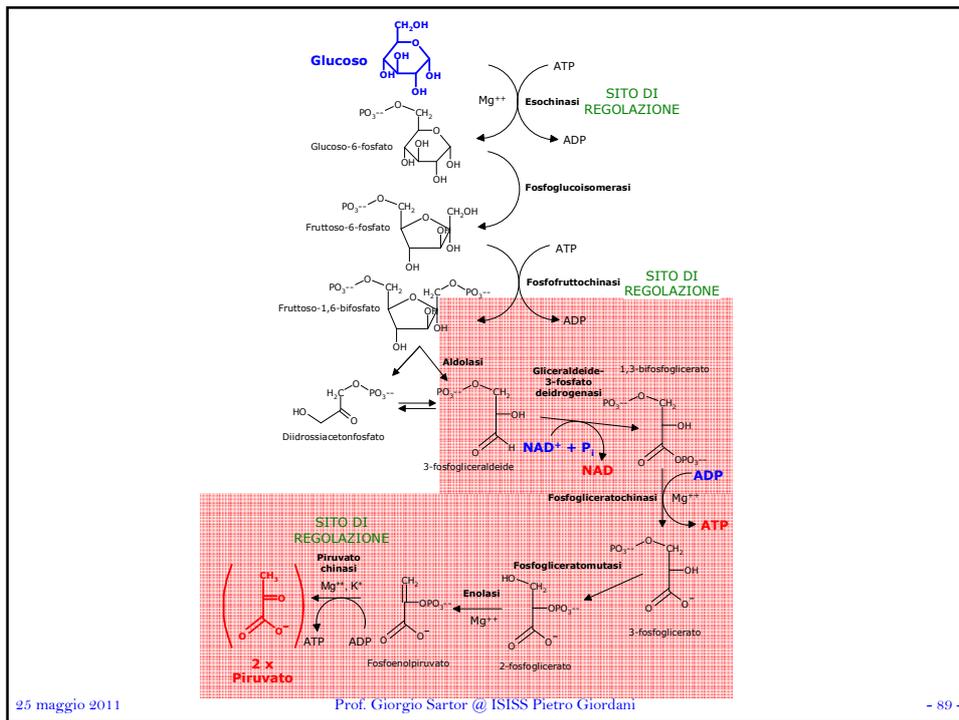


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 86 -





Destino del piruvato

- In assenza di ossigeno

- Riduzione a lattato
- Prima riduzione a lattato poi decarbossilazione ad acetato
- Prima decarbossilazione ad aldeide poi riduzione ad etanolo

Ripristino di NAD⁺ per continuare la glicolisi → ATP

- In presenza di ossigeno

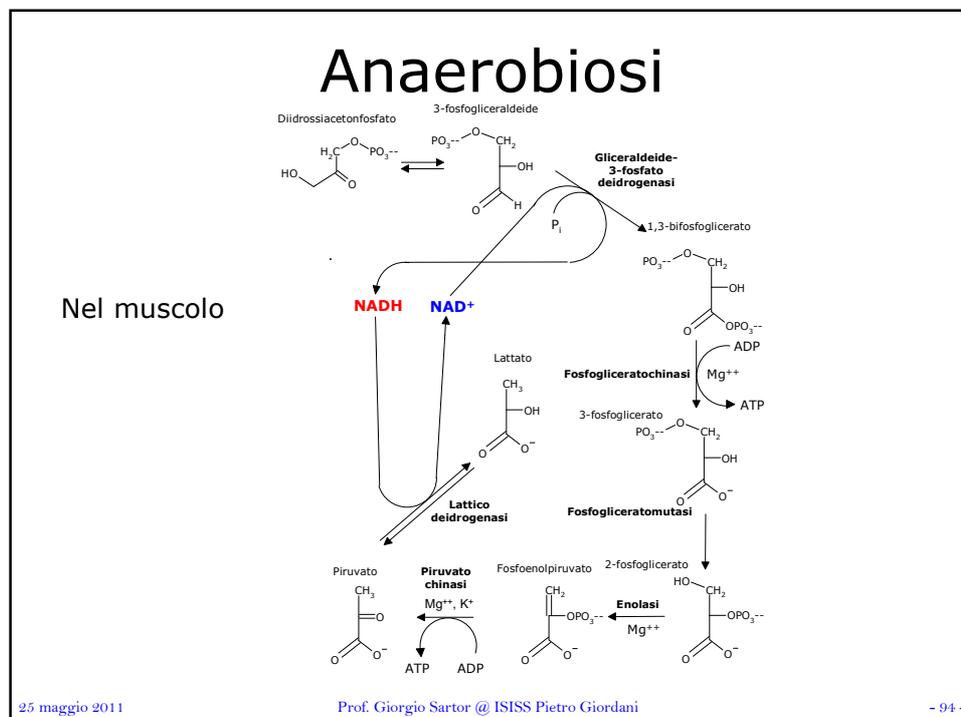
- Decarbossilazione,
- Ciclo di Krebs,
- Respirazione cellulare

ATP

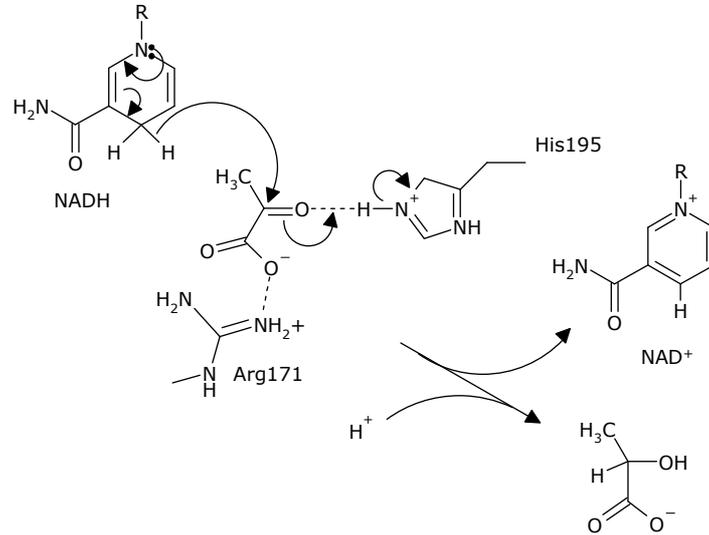
Qualche domanda 

No O₂

ANAEROBIOSI



Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27

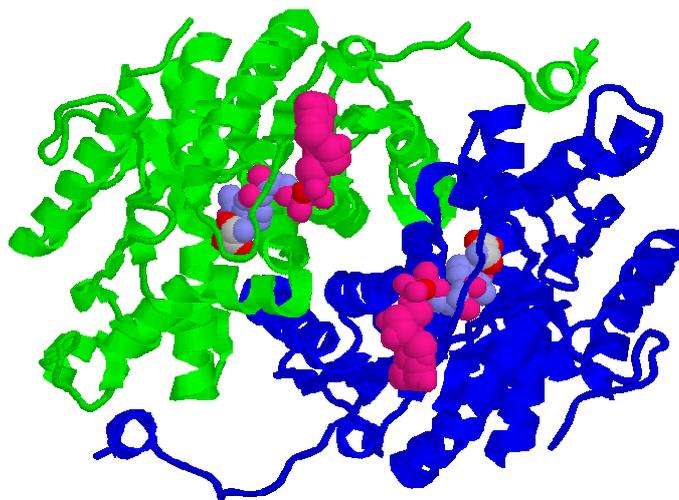


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 95 -

Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27

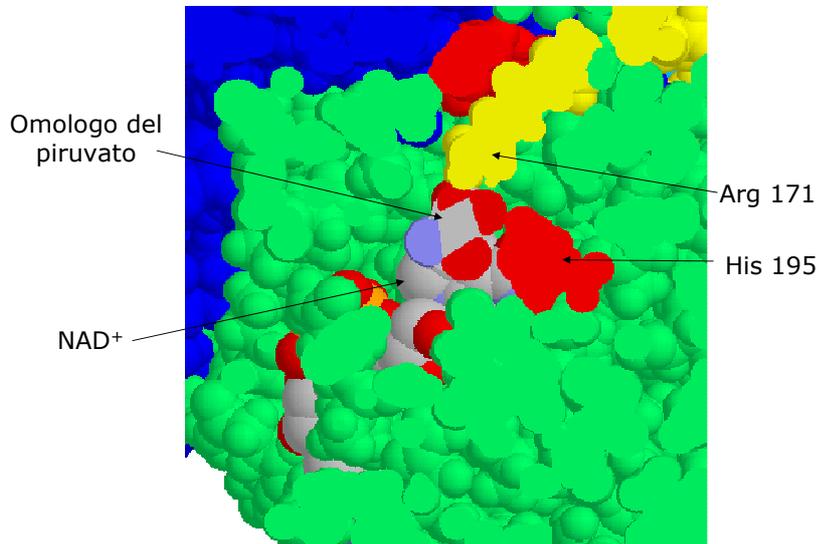


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 96 -

Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27

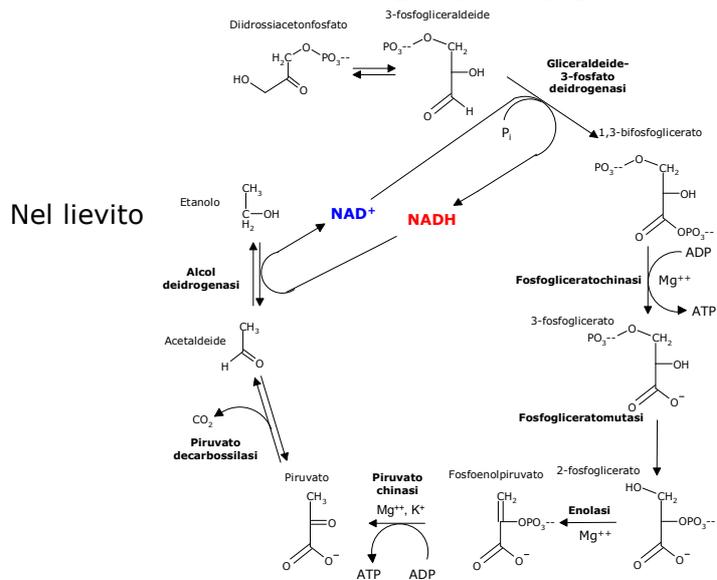


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 97 -

Anaerobiosi



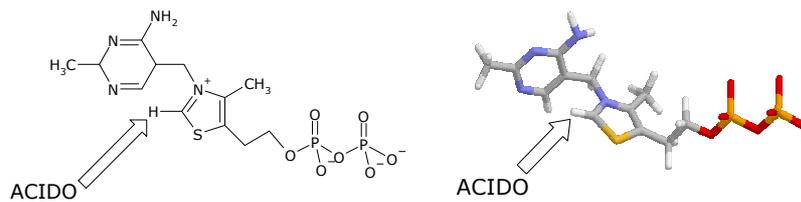
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 98 -

Piruvato decarbossilasi EC 4.1.1.1

- Catalizza la decarbossilazione del piruvato.
- Usa la tiamina pirofosfato come coenzima

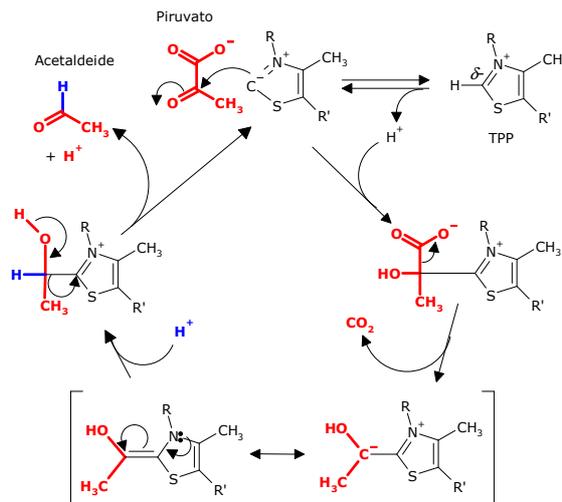


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 99 -

Piruvato decarbossilasi EC 4.1.1.1

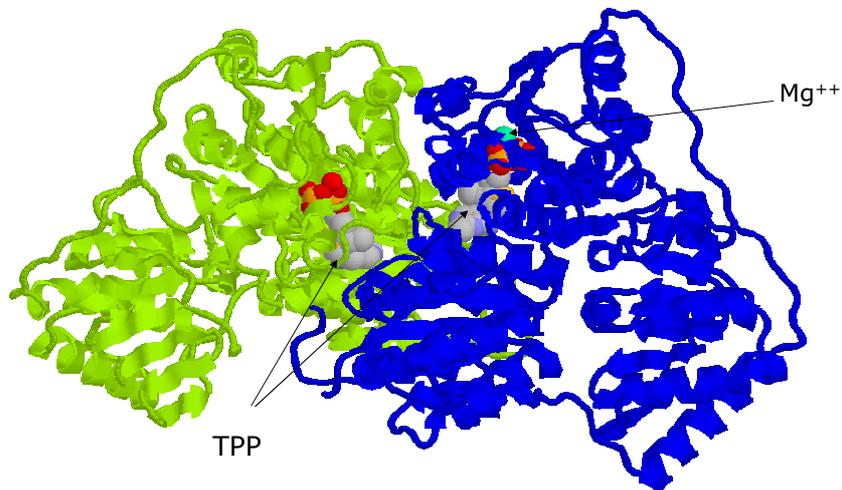


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 100 -

Piruvato decarbossilasi EC 4.1.1.1



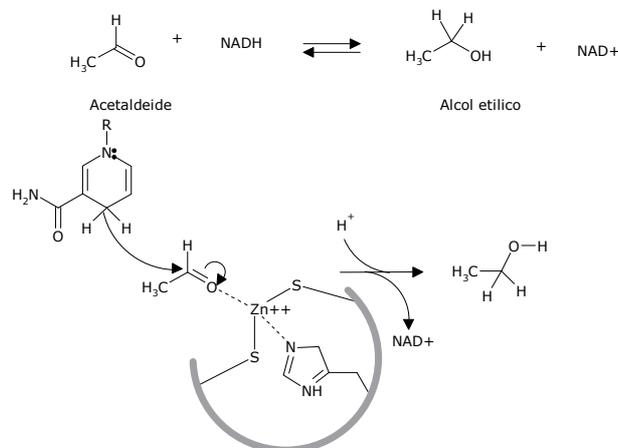
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 101 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1

- Catalizza la reazione di ossidoriduzione:

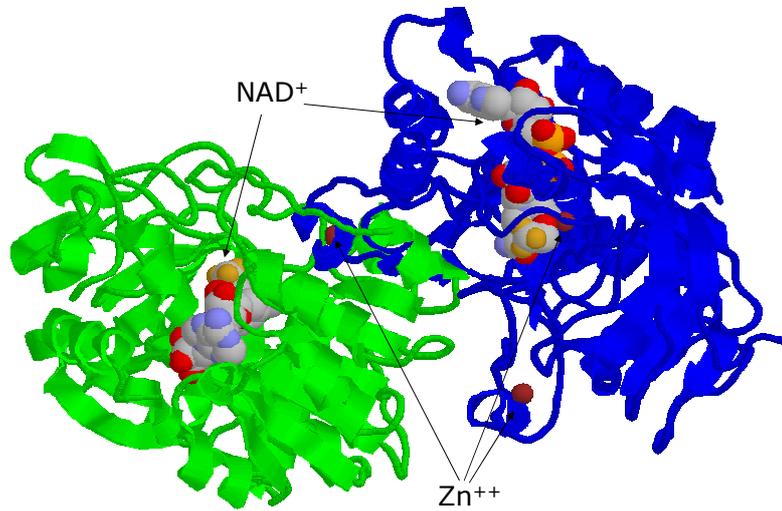


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 102 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1

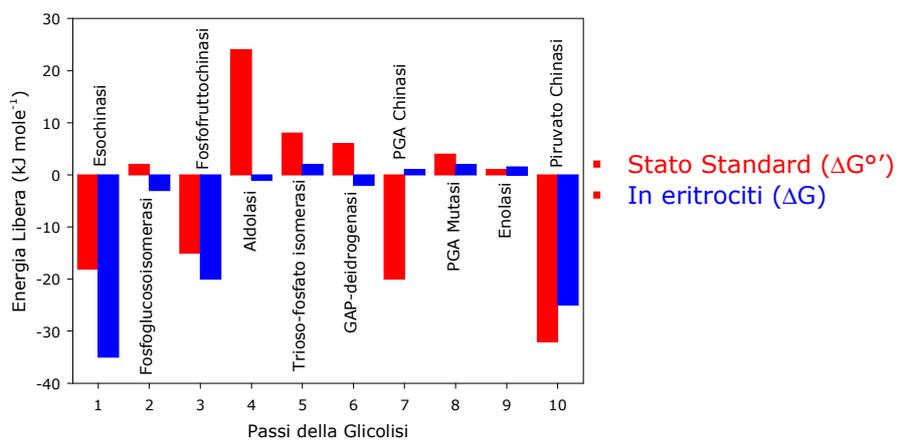


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 103 -

Energia

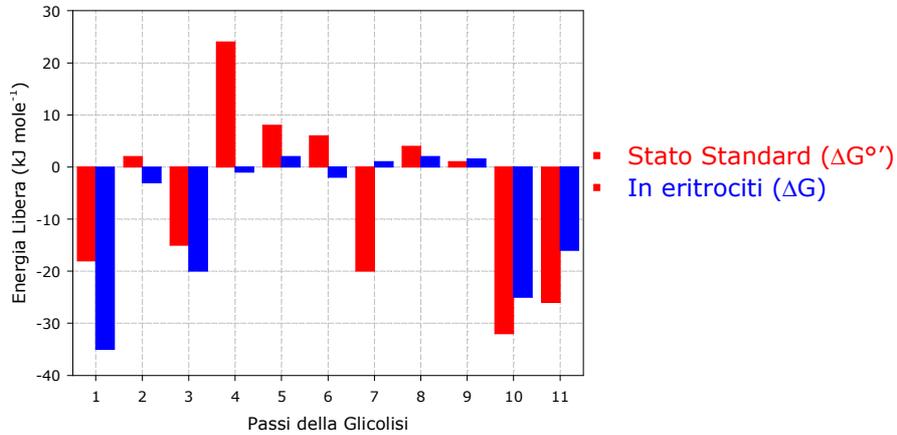


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 104 -

Energia



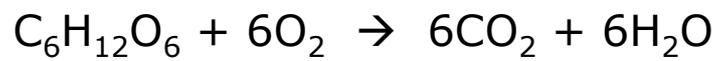
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 105 -

Energia dalla glicolisi

$$\Delta G = -43.4 \text{ kJ mol}^{-1}$$



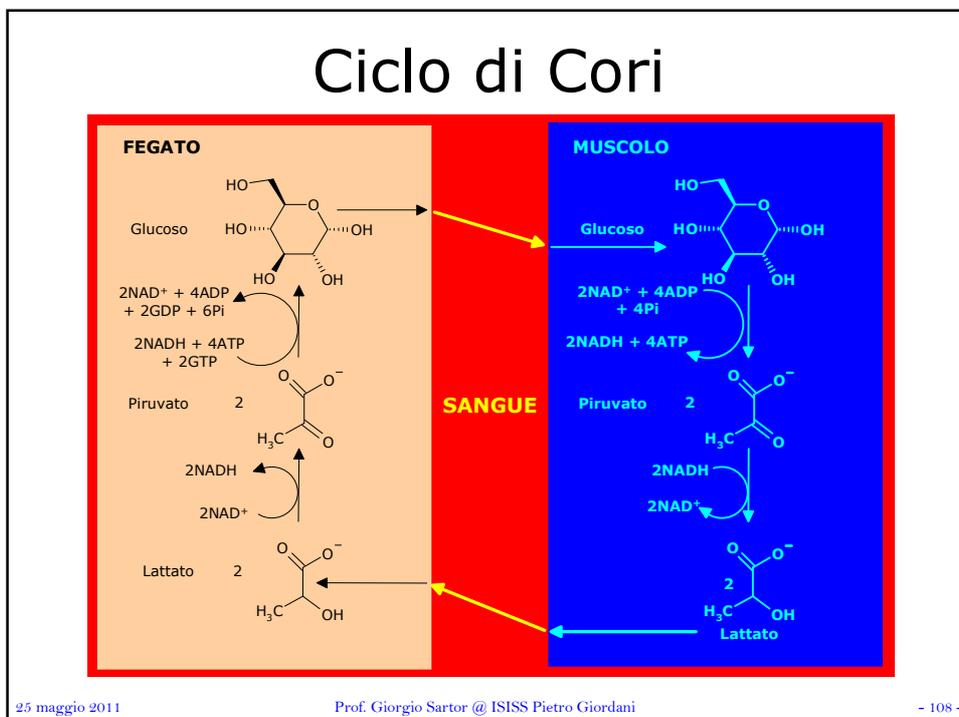
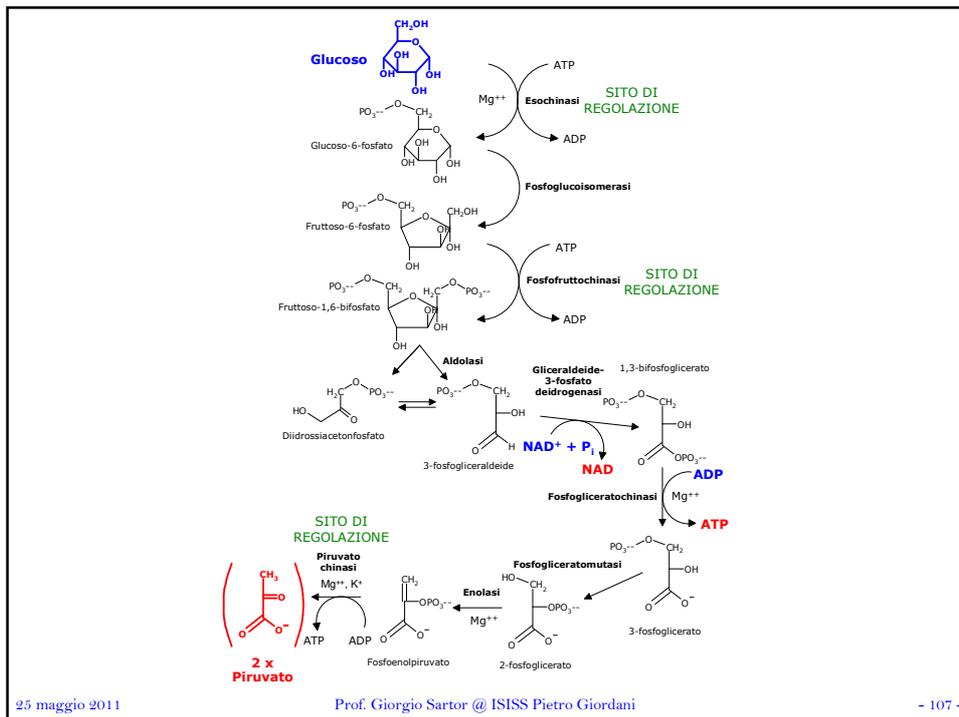
$$\Delta G = -2850 \text{ kJ mol}^{-1}$$

- La scissione di glucosio a piruvato utilizza solo il 1.7% del contenuto energetico del glucosio.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

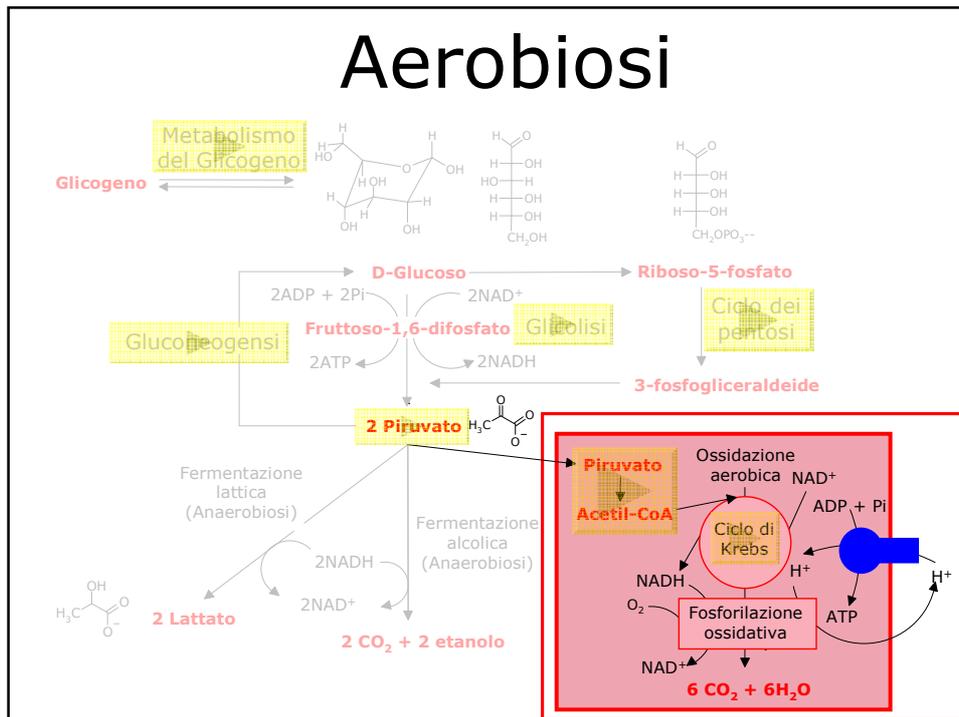
- 106 -





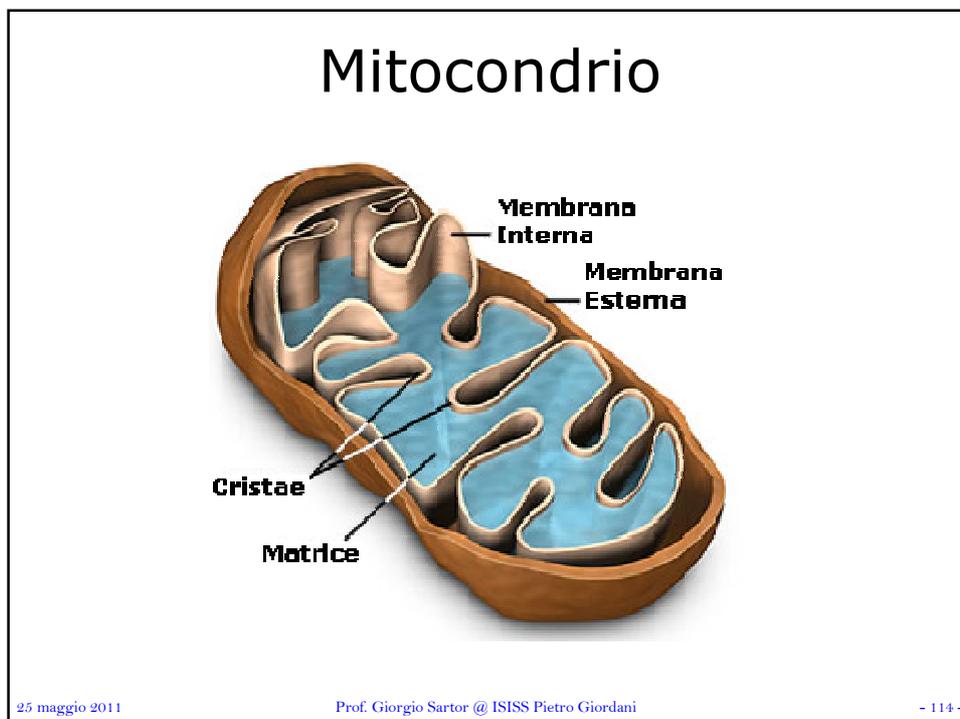
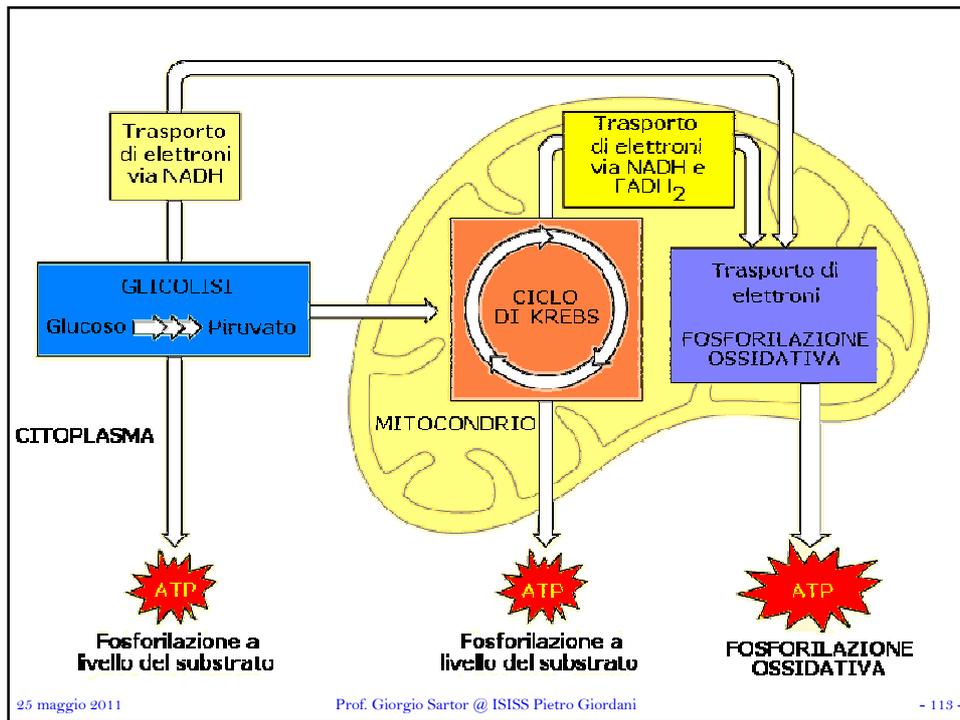
O₂
AEROBIOSI

Aerobiosi



Aerobiosi

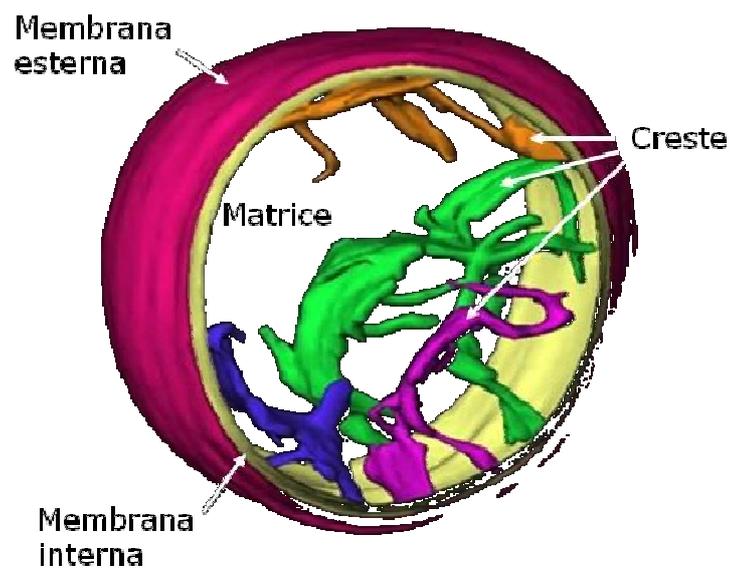
- In condizioni aerobiche il piruvato prodotto dalla glicolisi e dalla degradazione degli aminoacidi è ossidato a H₂O e CO₂ nella respirazione cellulare.
- Ciò avviene in tre stadi
 - Produzione di acetil-CoA (decarbossilazione del piruvato)
 - Ossidazione dell'acetil-CoA a CO₂ (Ciclo di Krebs)
 - Trasferimento di elettroni e fosforilazione ossidativa (produzione di H₂O e ATP con consumo di O₂).



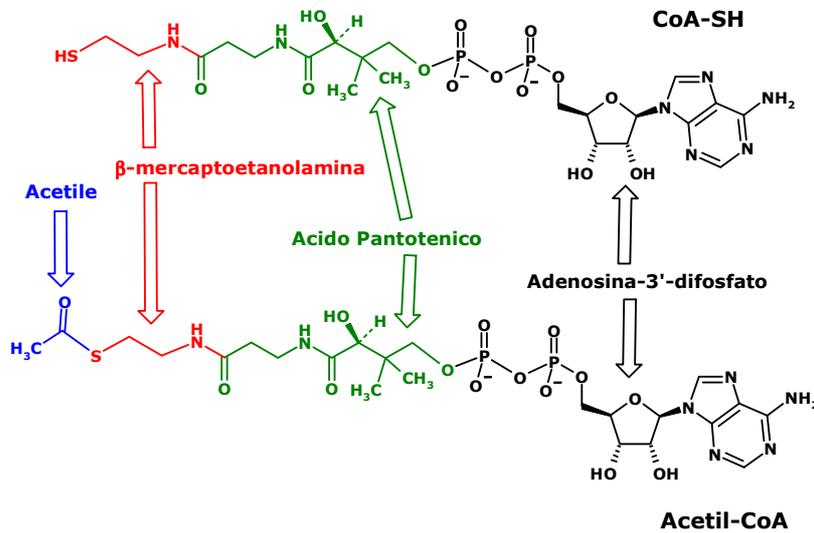
Piruvato deidrogenasi

Produzione di acetil-CoA
(decarbossilazione del piruvato)

Mitocondrio



Acetil-CoA



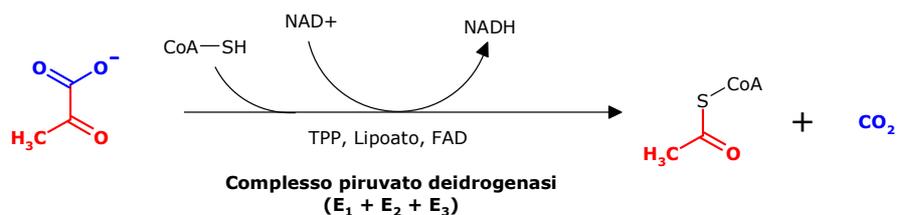
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 117 -

Complesso piruvato deidrogenasi

- Il complesso piruvato deidrogenasi è un gruppo di enzimi associati non covalentemente che catalizzano la decarbossilazione del piruvato e formazione di Acetil-CoA.
- La reazione forma contemporaneamente NADH trasferendo uno ione H⁻ al NAD⁺.
- Il NADH passa gli elettroni alla catena respiratoria
- La reazione ha un $\Delta G^{o'} = -33.4 \text{ kJ/mol}$ (essenzialmente irreversibile).

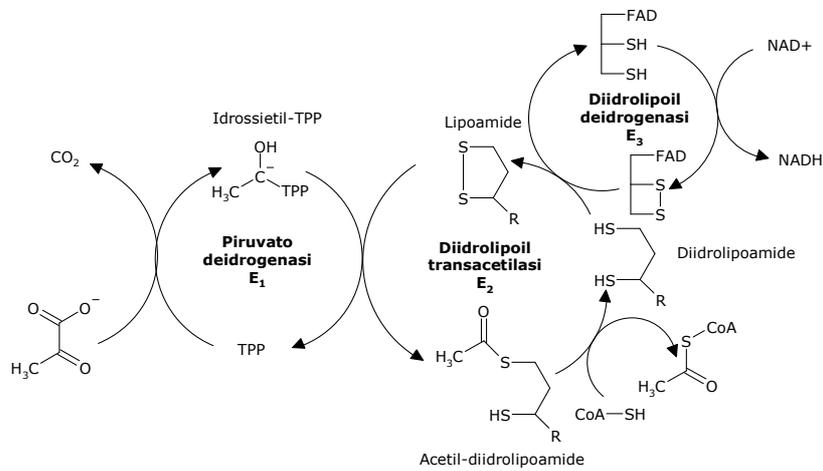


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 118 -

Complesso Piruvato deidrogenasi



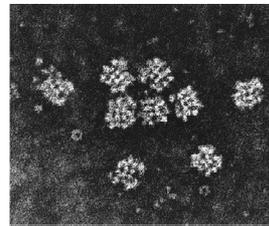
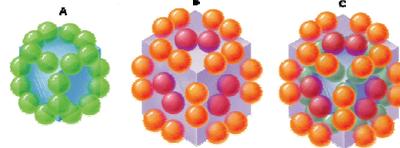
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 119 -

I tre enzimi

- Il complesso piruvato deidrogenasi PDC consiste in tre enzimi:
 - piruvato deidrogenasi EC 1.2.4.1
 - (E_1 , arancio) (B),
 - diidrolipoil transacetilasi EC 2.3.1.12
 - (E_2 , verde) (A),
 - diidrolipoil deidrogenasi EC 1.8.1.4
 - (E_3 , violetto) (B).
- In *E. coli* il complesso consiste in 24 coppie di E_1 , 24 coppie di E_2 e di 12 coppie di E_3 .
- E_2 funziona come “core” del complesso (C).



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 120 -

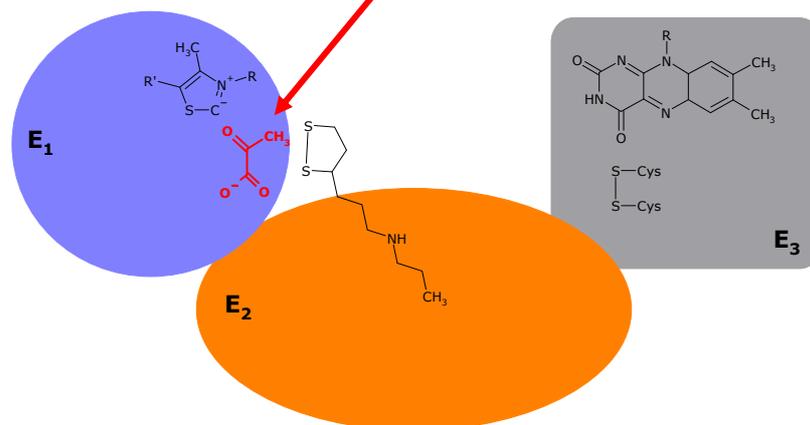
- La diidrolipoil transacetilasi (E_2) è centrale in questo meccanismo.
- Il braccio flessibile del lipoato:
 - lega il gruppo acetile e lo trasferisce al CoA e
 - accetta due elettroni dalla piruvato deidrogenasi (E_1) e li trasferisce al diidrolipoil deidrogenasi (E_3).

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 121 -

Legame del piruvato

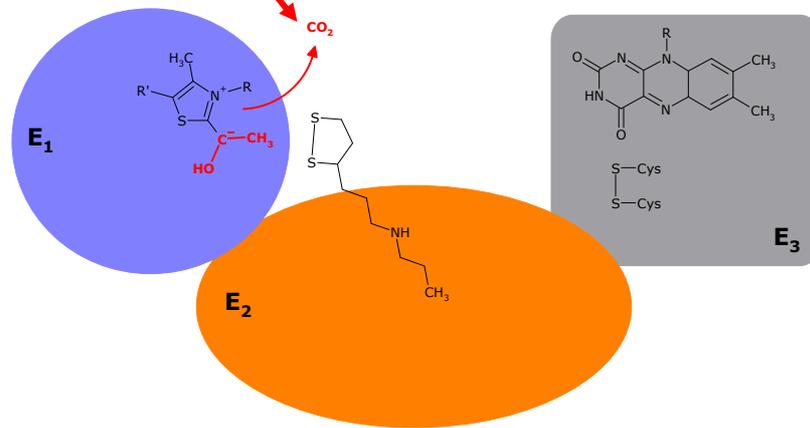


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 122 -

Decarbossilazione del piruvato

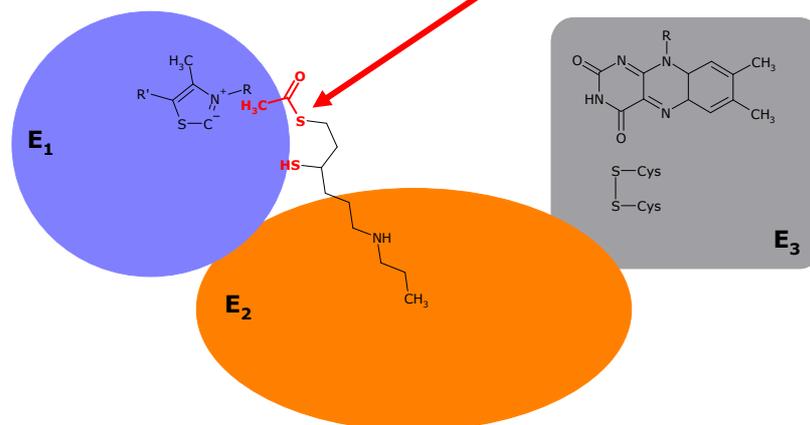


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 123 -

Formazione di diidroacetillipoamide

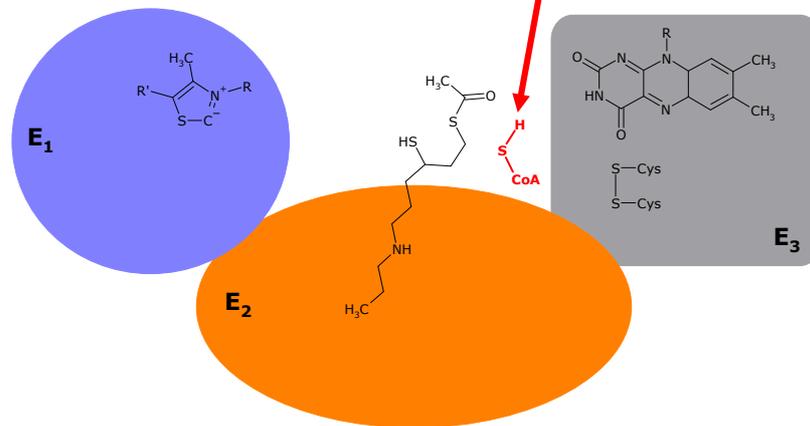


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 124 -

Legame del Coenzima A

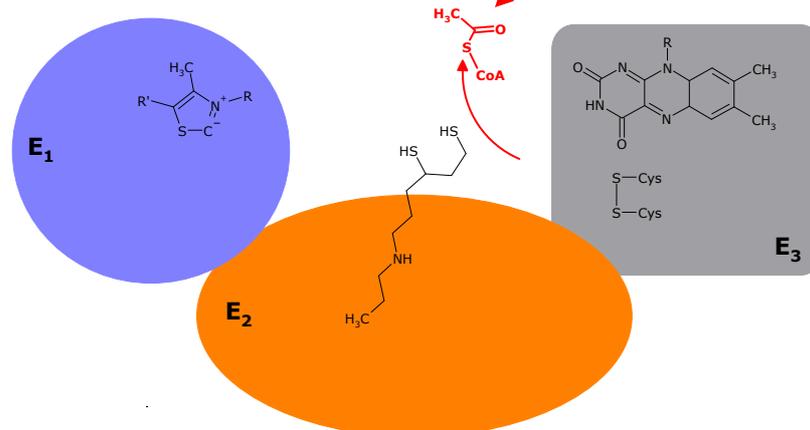


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 125 -

Formazione di Acetil-CoA

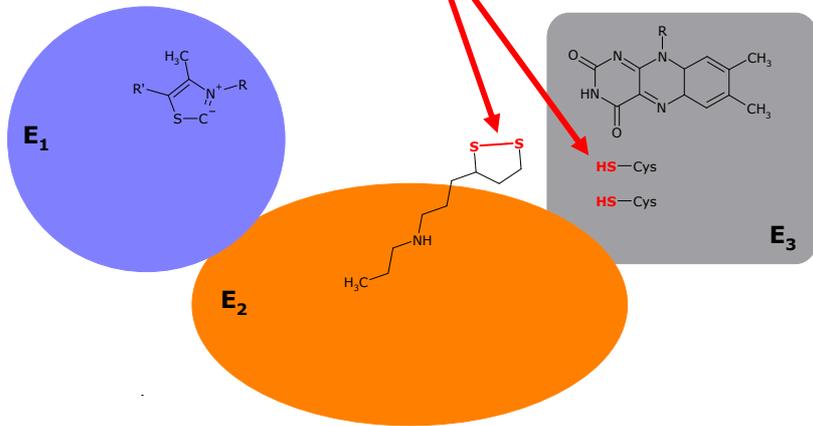


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 126 -

Ossidazione della diidrolipoamide

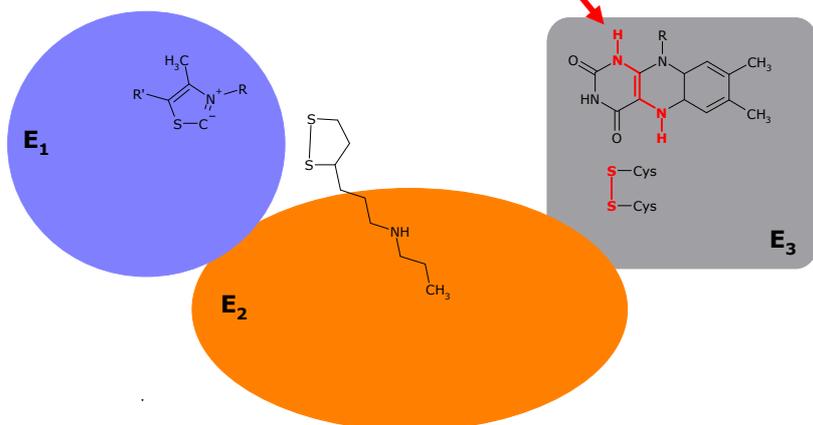


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 127 -

Riduzione del FAD

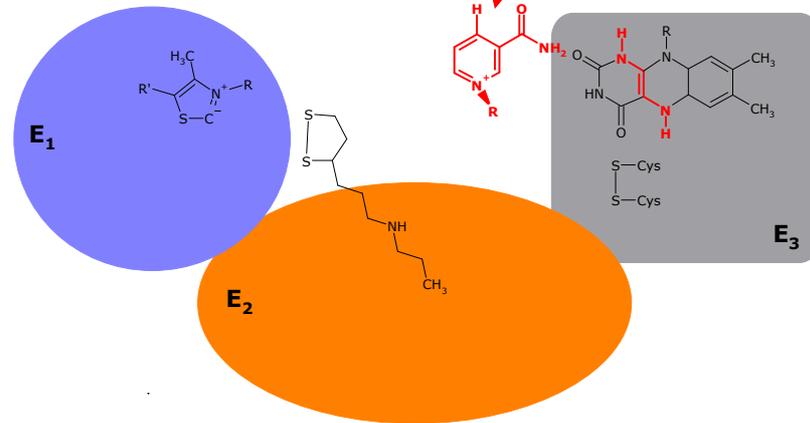


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 128 -

Legame del NAD⁺

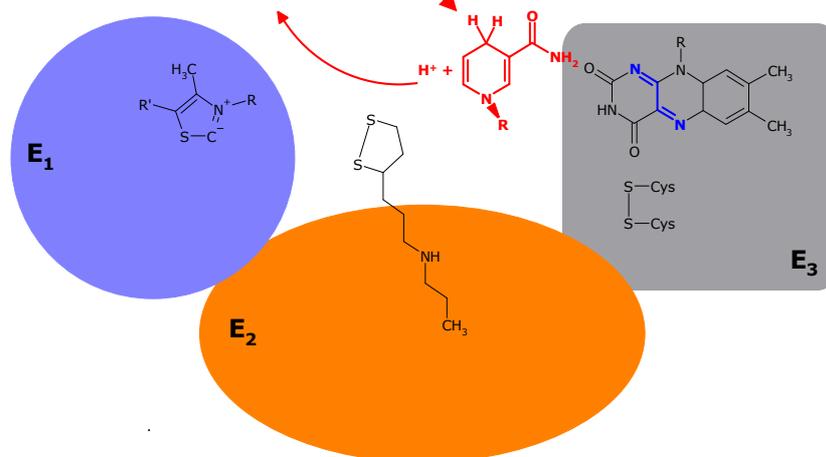


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 129 -

Riduzione del NAD⁺

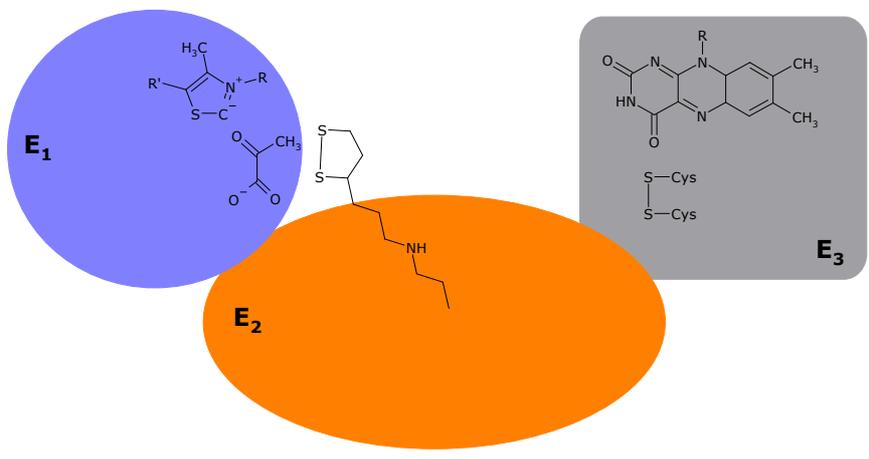


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 130 -

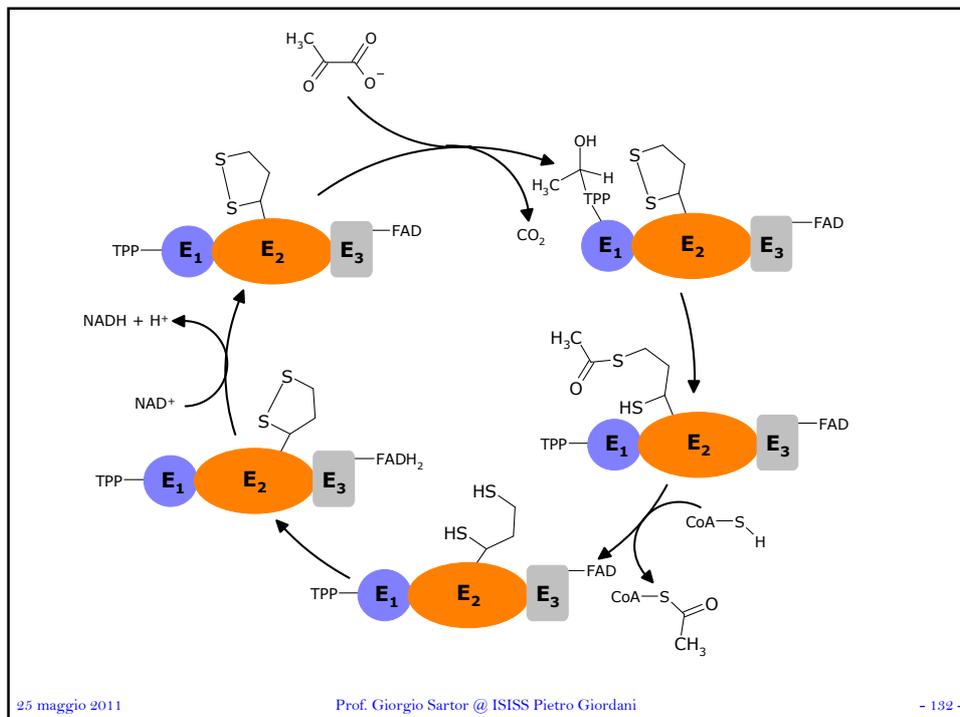
Ritorno al punto di partenza



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 131 -



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 132 -

Ciclo di Krebs

Ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)
Ciclo dell'acido citrico

Ossidazione dell'acetil-CoA a CO₂

Krebs e Lipmann

Premio Nobel per la Medicina 1953

"for his discovery of the citric acid cycle"

"for his discovery of co-enzyme A and its importance for intermediary metabolism"



Hans Adolf Krebs



Fritz Albert Lipmann

Ciclo di Krebs

- Il ciclo di Krebs è al centro del metabolismo.
- Le vie degradative (catabolismo) lo alimentano, le vie sintetiche (anabolismo) ne usano i componenti.
- È una via “**ANFIBOLICA**”, opera infatti sia nel catabolismo che nell’anabolismo cellulare.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 135 -

Ciclo di Krebs

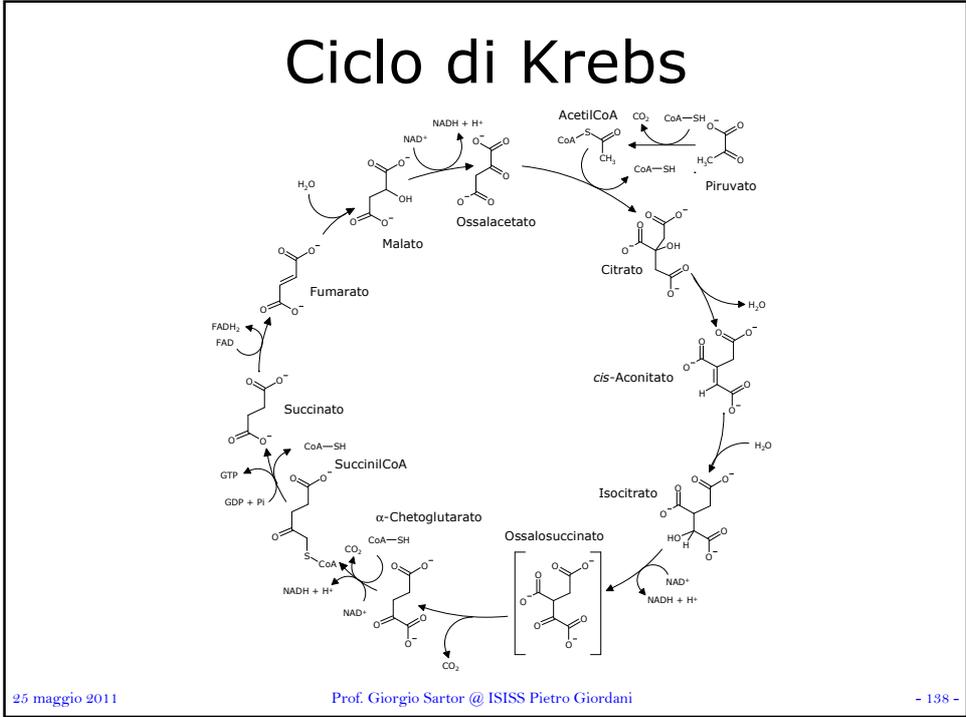
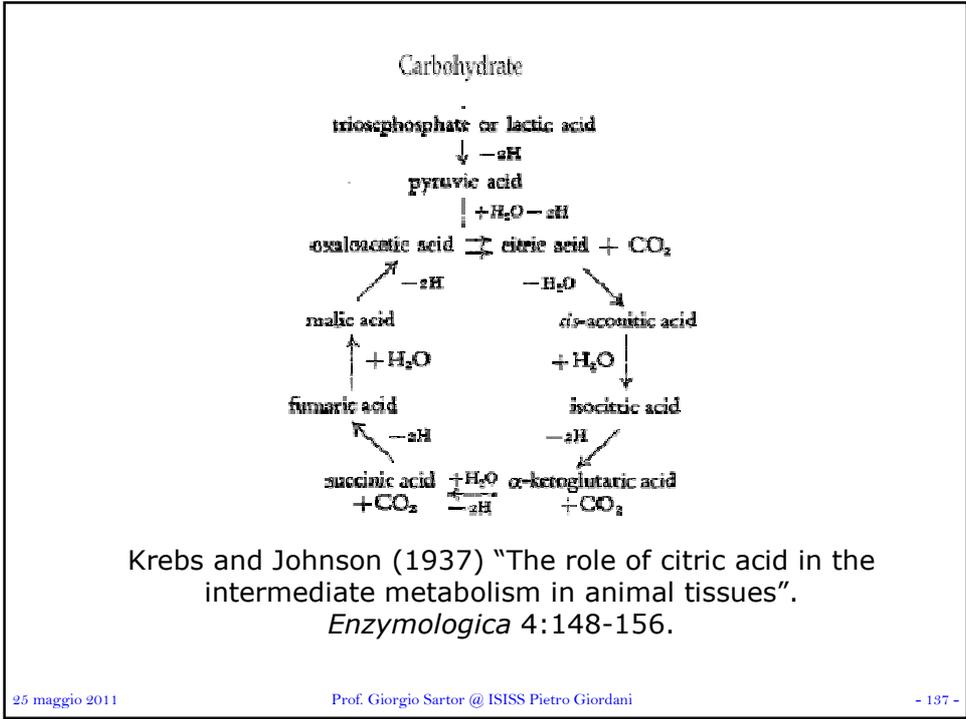
- Tutte le reazioni avvengono nella matrice mitocondriale.
- Nei mitocondri vi sono anche gli enzimi della fosforilazione ossidativa e quelli della ossidazione degli acidi grassi e degli aminoacidi.



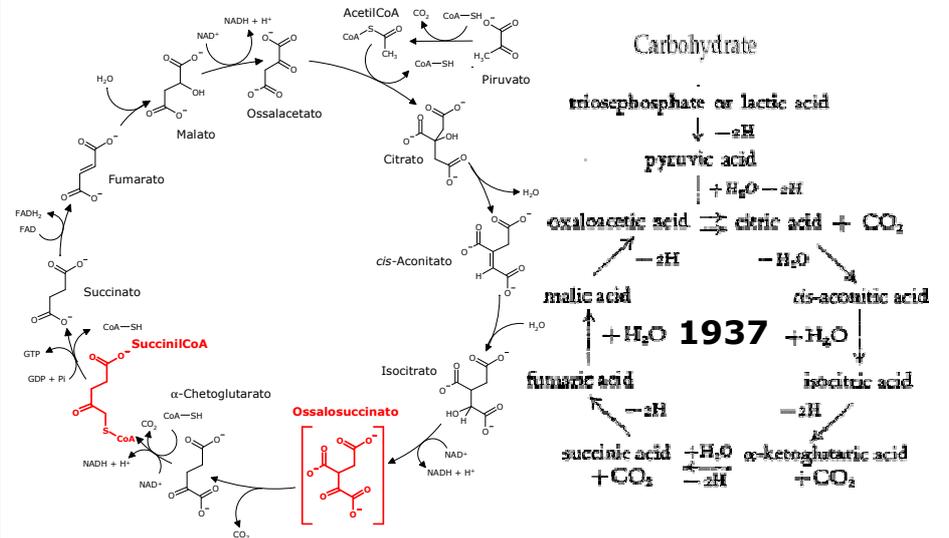
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 136 -



Ciclo di Krebs

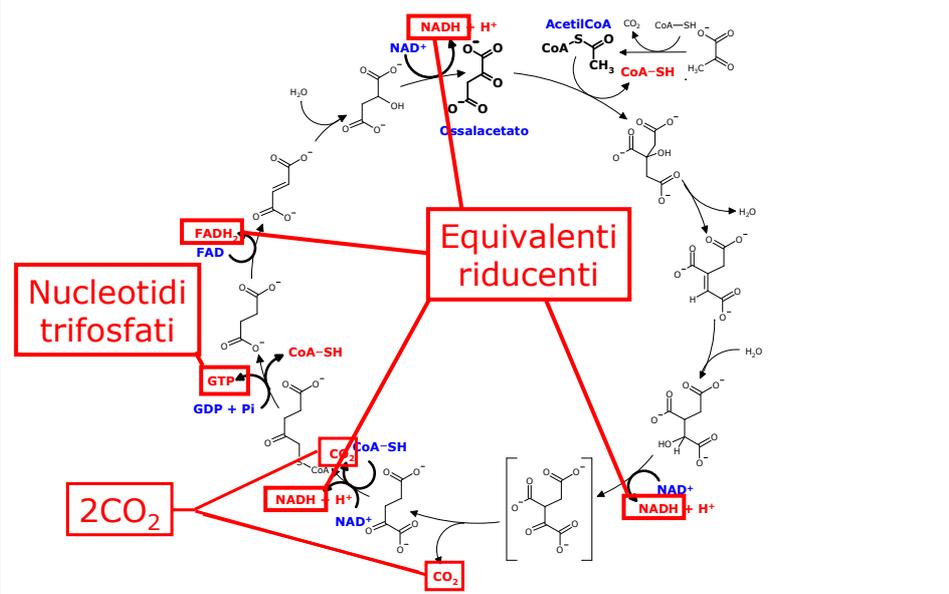


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 139 -

Ciclo di Krebs

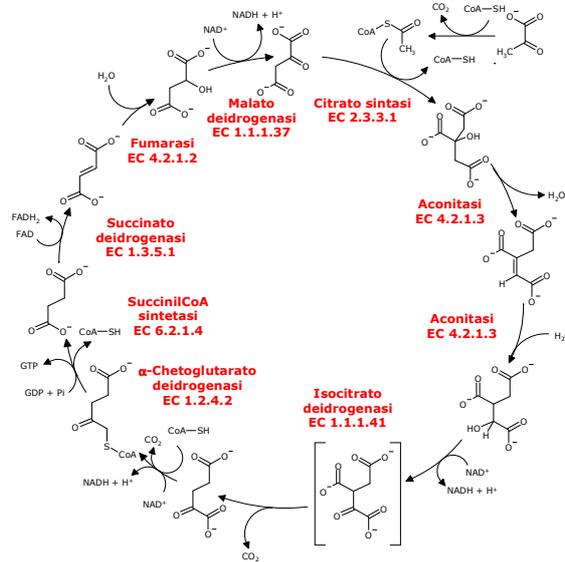


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 140 -

Ciclo di Krebs

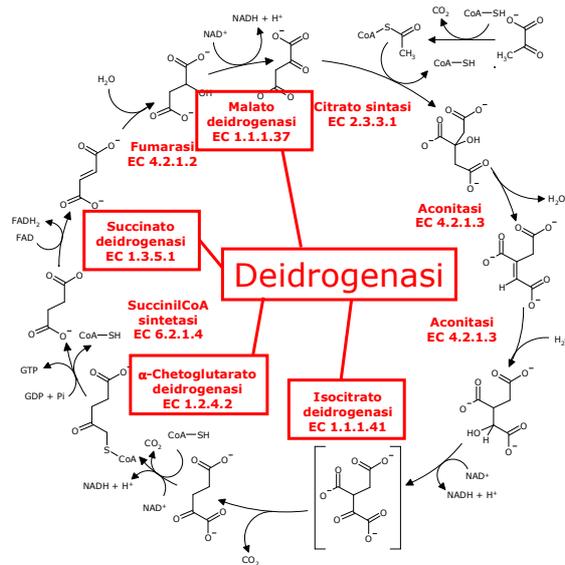


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 141 -

Ciclo di Krebs

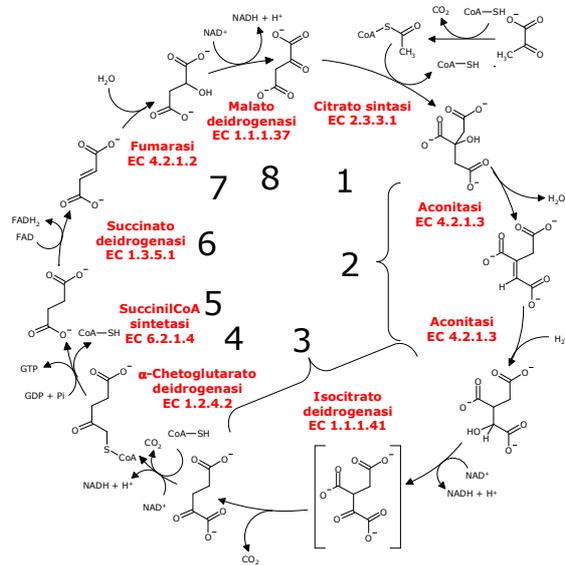


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 142 -

Ciclo di Krebs

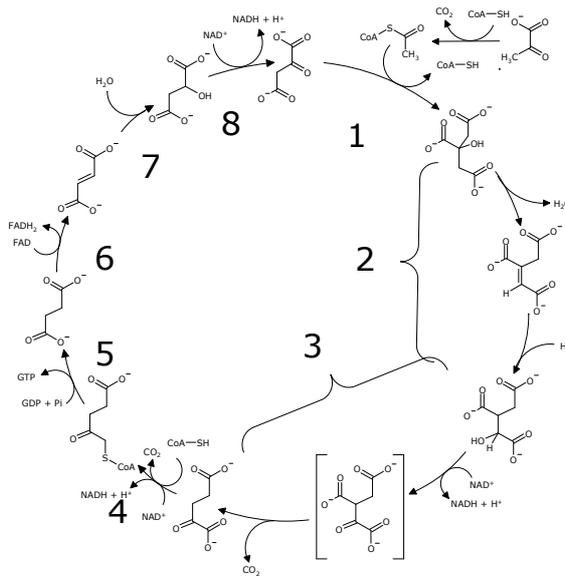


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 143 -

Ciclo di Krebs

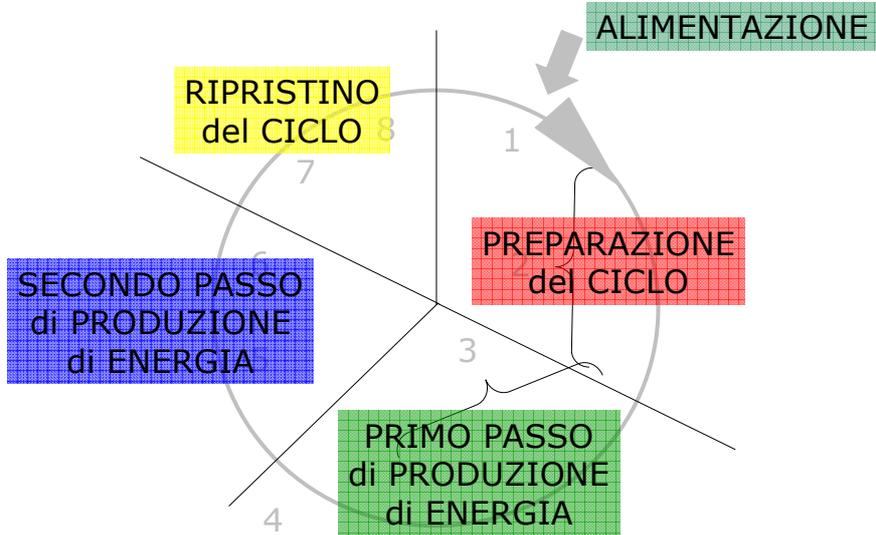


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 144 -

Ciclo di Krebs

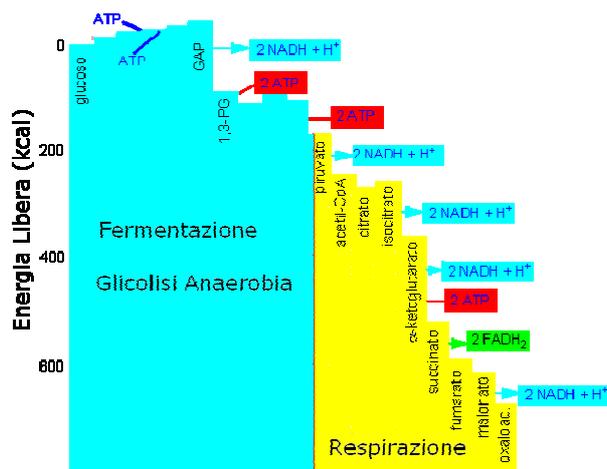


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 145 -

ΔG



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 146 -

Qualche domanda

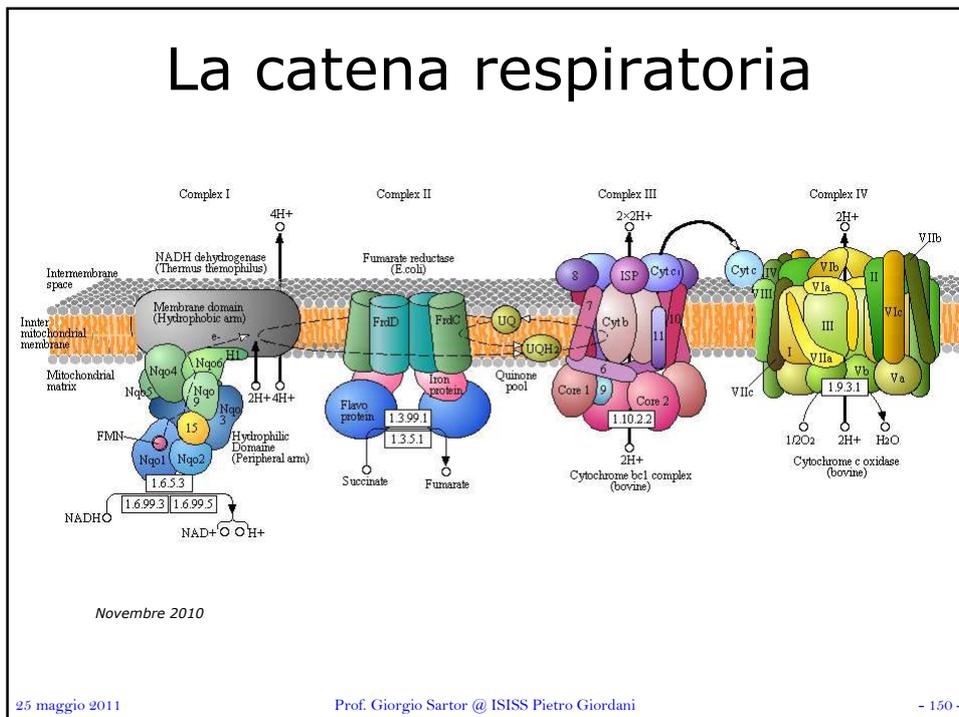
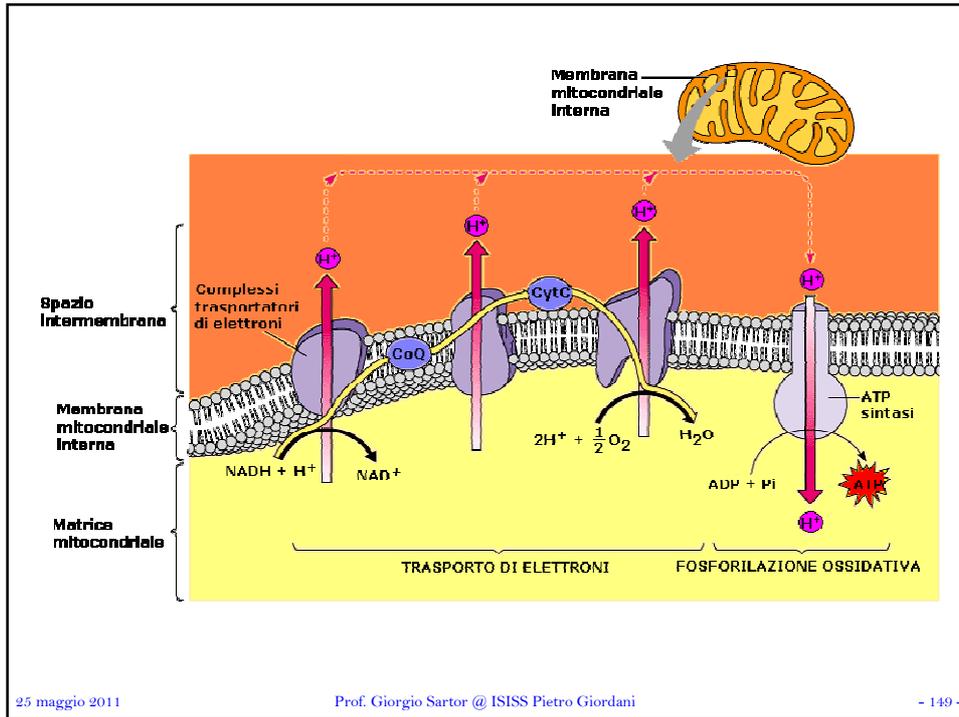


**Power,
Sex, Suicide**
Mitochondria and the
Meaning of Life

NICK LANE
Author of *Oxygen*

© 2011 Houghton Mifflin Harcourt

ISBN 978-0-14-281492-9



Trasporto di elettroni

- In una reazione di ossidoriduzione



- A_{ox} è la forma ossidata di A (ossidante)
- B_{red} è la forma ridotta di B (riducente).
- Per questo trasferimento di elettroni si possono considerare le reazioni di semicella:



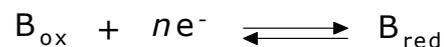
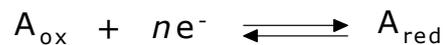
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 151 -

Trasporto di elettroni

- Per ogni semireazione vale



- quando $[A_{\text{red}}] = [A_{\text{ox}}]$, $E = E^{\circ}$
- E° è il potenziale redox di semireazione, è il potenziale quando la concentrazione delle specie ossidate e ridotte sono uguali.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Specie ridotta}]}{[\text{Specie ossidata}]}$$

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 152 -

Trasporto di elettroni

- Per un trasferimento di elettroni:

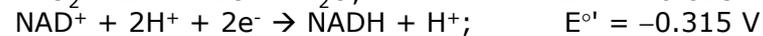
$$\Delta E^{\circ'} = E^{\circ'}_{\text{(ossidante)}} - E^{\circ'}_{\text{(riducente)}} = E^{\circ'}_{\text{(accettore)}} - E^{\circ'}_{\text{(donatore)}}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -nF \Delta E^{\circ'}$$

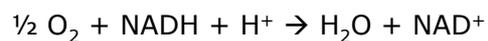
- Un trasferimento di elettroni è spontaneo (ΔG negativo) se il potenziale ($E^{\circ'}$) del donatore è più negativo del potenziale ($E^{\circ'}$) dell'accettore.
- Se $\Delta E^{\circ'}$ è positivo la reazione è spontanea.

Trasporto di elettroni

- Consideriamo il trasferimento di due elettroni dal NADH all'ossigeno:



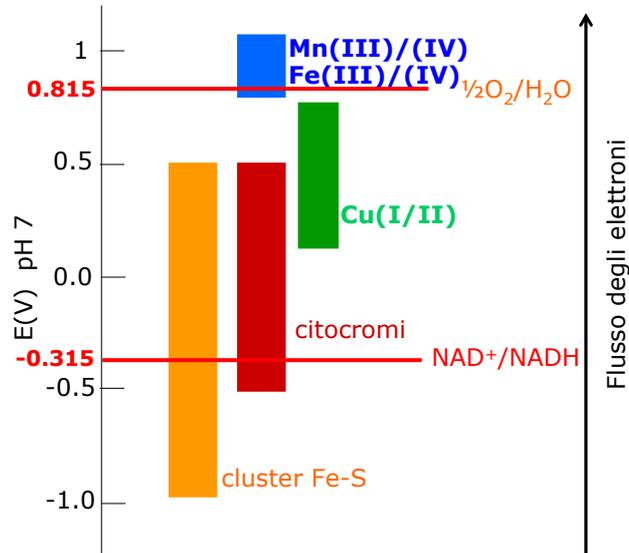
- Sottraendo la seconda dalla prima:



$$\Delta E^{\circ'} = +1.13 \text{ V}$$

$$\Delta G = -nF\Delta E^{\circ'} = -2(96494)(1.13) = -218 \text{ kJ/mol}$$

Potenziale



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 155 -

Il cast

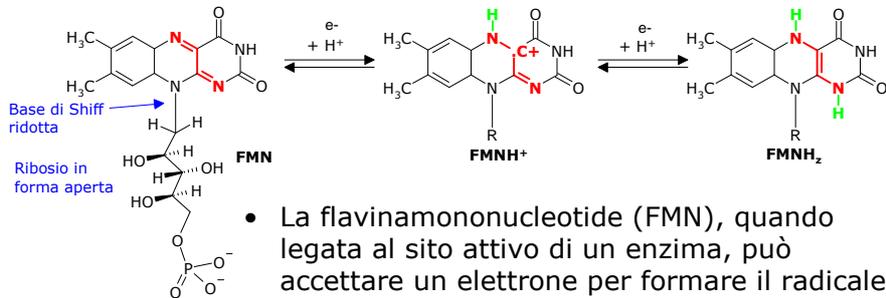
- I trasportatori di elettroni:
 - Nucleotidi:
 - NAD⁺/NADH,
 - FAD/FADH⁺/FADH₂,
 - FMN/FMNH⁺/FMNH₂
 - Trasportatori mobili:
 - Coenzima Q,
 - Citocromo c
 - Composti ionici:
 - Fe⁺⁺⁺/Fe⁺⁺ nei:
 - citocromi a, b, c e
 - nei centri ferro-zolfo
- Complessi enzimatici:
 - Complesso I:
 - NADH-CoenzimaQ ossidoreduttasi (EC 1.6.5.3)
 - Complesso II:
 - Succinato-CoQ reduttasi ossidoreduttasi (EC 1.3.5.1)
 - Complesso III:
 - CoQ-cyt c reduttasi ossidoreduttasi (EC EC 1.10.2.2)
 - Complesso IV:
 - Citocromo ossidasi (EC 1.9.3.1)
 - Complesso V: ATP sintasi

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 156 -

Trasportatori di elettroni: FMN



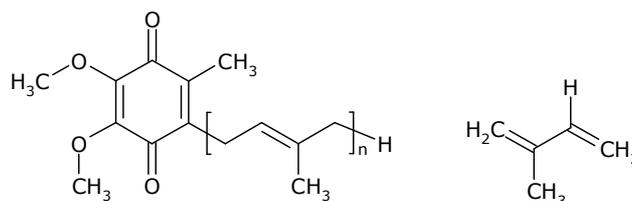
- La flavinammonucleotide (FMN), quando legata al sito attivo di un enzima, può accettare un elettrone per formare il radicale semichinonico. Il semichinone può accettare un secondo elettrone per formare FMNH₂.
- Poiché può accettare o donare uno o due elettroni, FMN ha un ruolo importante per trasferire elettroni tra trasportatori che portano due elettroni (NADH) e quelli che ne possono accettare uno solo (Fe⁺⁺⁺).

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 157 -

Trasportatori di elettroni: Coenzima Q



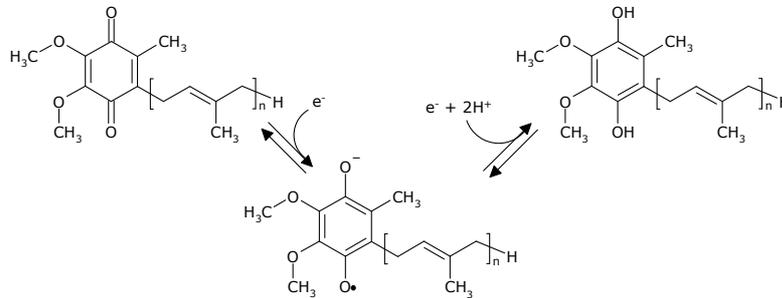
- Il Coenzima Q (CoQ, Q, ubiquinone) è un trasportatore di elettroni idrofobico.
- È immerso nella membrana
- La struttura del CoQ comprende una lunga coda isoprenoide (n = 10) che è responsabile dell'idrofobicità.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 158 -

Trasportatori di elettroni: Coenzima Q



- Quando è legato al proprio sito il CoQ può accettare un e^- per formare un radicale semichinone ($Q\cdot^-$).
- Quindi il CoQ, come FMN, può trasferire uno o due e^- fra donatori e accettori.
- Il CoQ funziona come un trasportatore mobile di e^- all'interno della membrana interna mitocondriale.

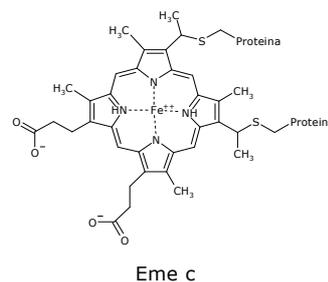
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 159 -

Trasportatori di elettroni: gruppo Eme

- Il gruppo eme è il gruppo prostetico dei citocromi.
- Contiene uno ione Ferro coordinato con quattro atomi di azoto di un anello porfirinico.
- Nelle tre classi di citocromi (a, b, c) il gruppo eme si differenzia leggermente per i sostituenti dell'anello porfirinico
- Sono comuni le due catene di propionato
- Solo il gruppo eme c è legato covalentemente alla proteina attraverso legami tioestere con residui Cys.

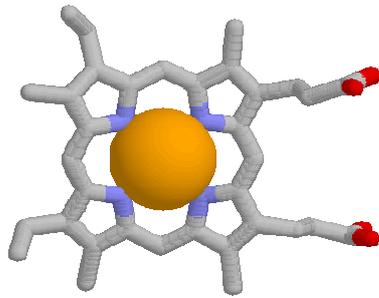


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 160 -

Trasportatori di elettroni: gruppo Eme



- Lo ione Ferro nel gruppo eme può subire reazioni di ossidoriduzioni con un elettrone tra lo stato ferroso (Fe^{++}) e ferrico (Fe^{+++}):



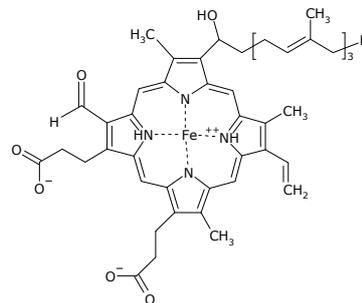
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 161 -

Trasportatori di elettroni: Gruppo Eme a

- Il gruppo eme a possiede una catena farnesilica (tre unità isoprenoidi) che ne conferiscono una certa idrofobicità.

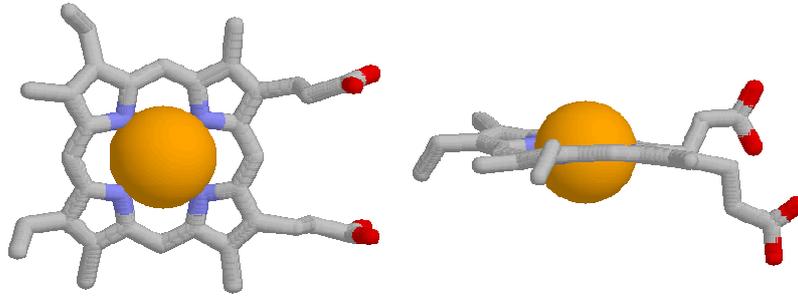


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 162 -

Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c



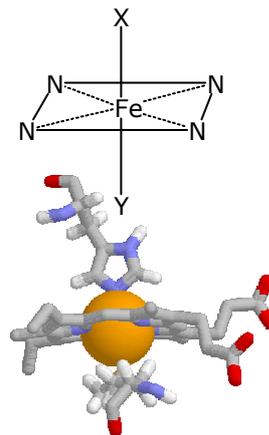
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 163 -

Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- L'anello porfirinico è planare.
- Il Fe nel gruppo eme è anche coordinato con due ligandi assiali al di sopra e al di sotto del piano (X,Y).
- I ligandi possono essere atomi di zolfo o azoto di catene laterali di aminoacidi.
- Nel citocromo c sono lo zolfo di una Met (sotto) e l'azoto di una His (sopra).
- I gruppi eme che legano ossigeno (emoglobina, mioglobina, ecc.) hanno una posizione libera per l'O₂.



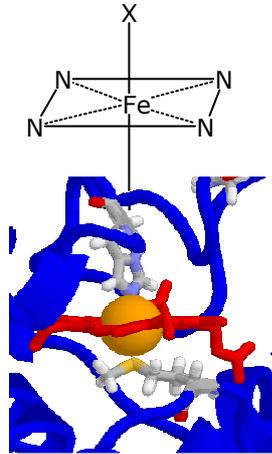
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 164 -

Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- L'anello porfirinico è planare.
- Il Fe nel gruppo eme è anche coordinato con due ligandi assiali al di sopra e al di sotto del piano (X,Y).
- I ligandi possono essere atomi di zolfo o azoto di catene laterali di aminoacidi.
- Nel citocromo c sono lo zolfo di una Met (sotto) e l'azoto di una His (sopra).
- I gruppi eme che legano ossigeno (emoglobina, mioglobina, ecc.) hanno una posizione libera per l'O₂.



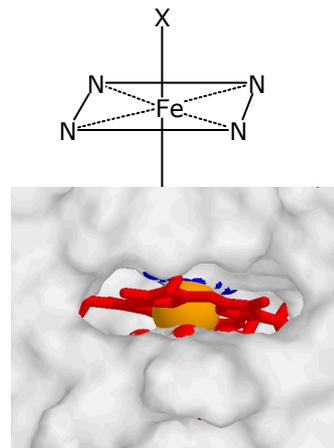
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 165 -

Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- L'anello porfirinico è planare.
- Il Fe nel gruppo eme è anche coordinato con due ligandi assiali al di sopra e al di sotto del piano (X,Y).
- I ligandi possono essere atomi di zolfo o azoto di catene laterali di aminoacidi.
- Nel citocromo c sono lo zolfo di una Met (sotto) e l'azoto di una His (sopra).
- I gruppi eme che legano ossigeno (emoglobina, mioglobina, ecc.) hanno una posizione libera per l'O₂.



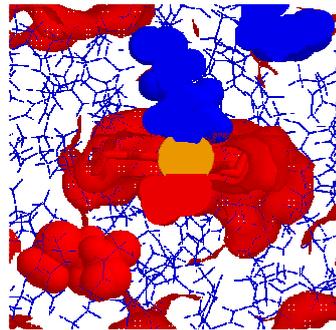
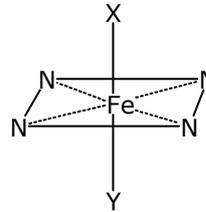
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 166 -

Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- L'anello porfirinico è planare.
- Il Fe nel gruppo eme è anche coordinato con due ligandi assiali al di sopra e al di sotto del piano (X,Y).
- I ligandi possono essere atomi di zolfo o azoto di catene laterali di aminoacidi.
- Nel citocromo c sono lo zolfo di una Met (sotto) e l'azoto di una His (sopra).
- I gruppi eme che legano ossigeno (emoglobina, mioglobina, ecc.) hanno una posizione libera per l'O₂.

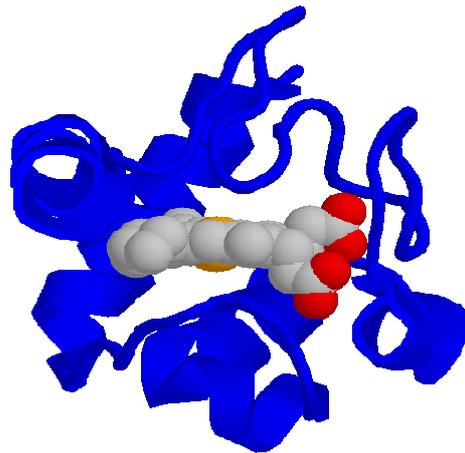


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 167 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c

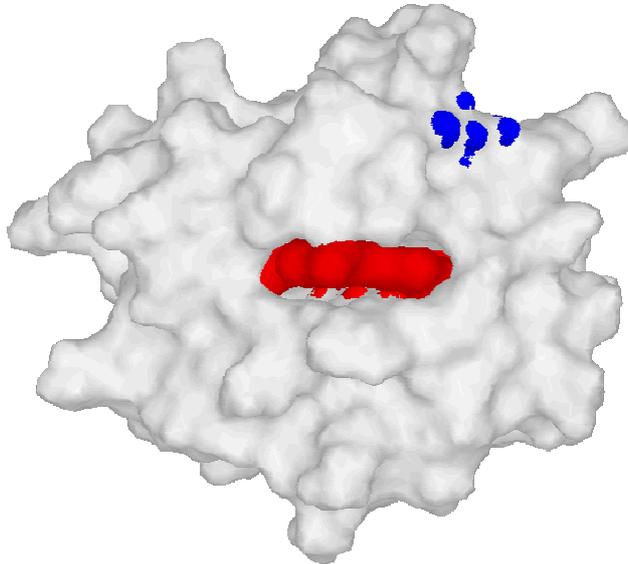


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 168 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c

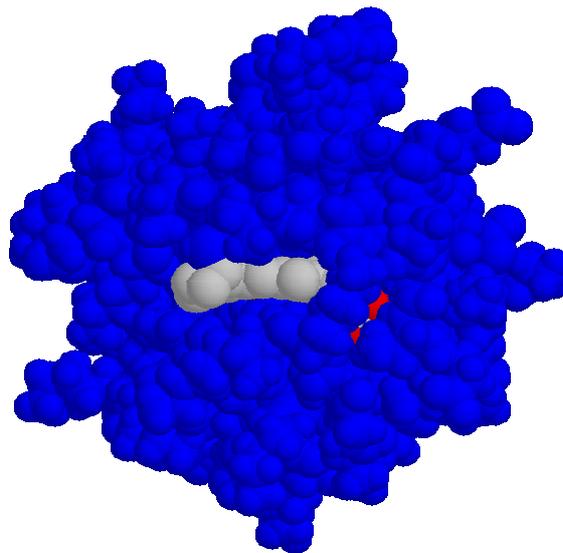


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 169 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c



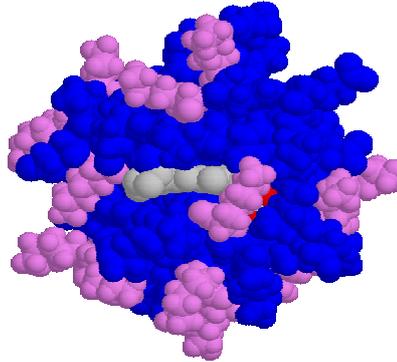
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 170 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c

- I residui di Lys (in magenta), sono superficiali e carichi positivamente
- Circondano la tasca dove alloggia il gruppo eme.
- Interagiscono con le catene di propionato del gruppo eme (cariche negativamente).



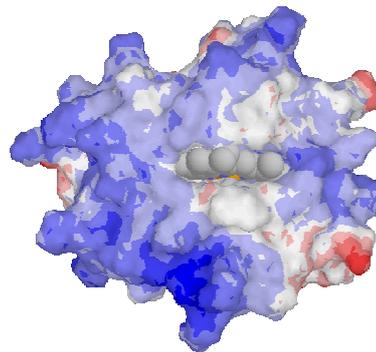
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 171 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c

- I residui di Lys (in magenta), sono superficiali e carichi positivamente
- Circondano la tasca dove alloggia il gruppo eme.
- Interagiscono con le catene di propionato del gruppo eme (cariche negativamente).

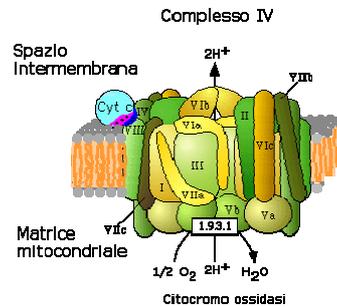
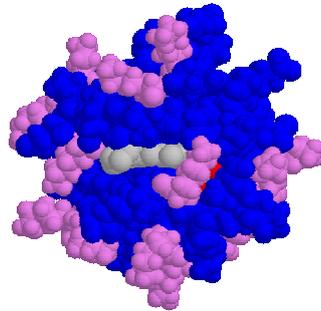


25 maggio 2011

Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 172 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c



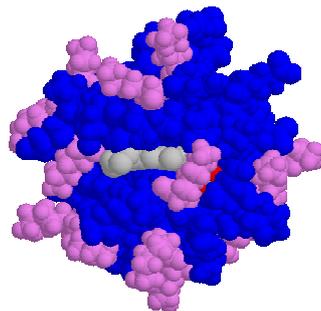
- I residui di Lys interagiscono con la superficie carica negativamente del complesso III che lega il Cyt c e dal quale riceve un elettrone.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 173 -

Trasportatori di elettroni: Citocromo c



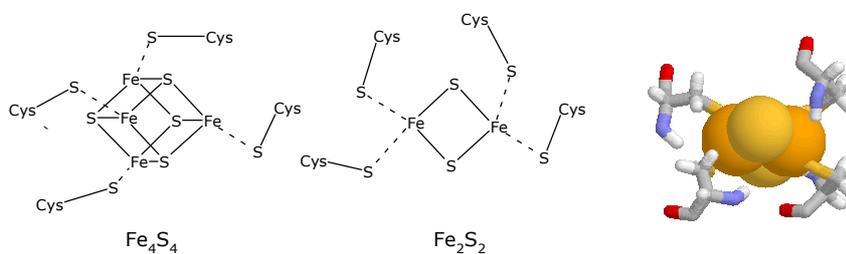
- I residui di Lys interagiscono con la superficie carica negativamente del complesso III che lega il Cyt c e dal quale riceve un elettrone.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 174 -

Trasportatori di elettroni: i centri Fe-S



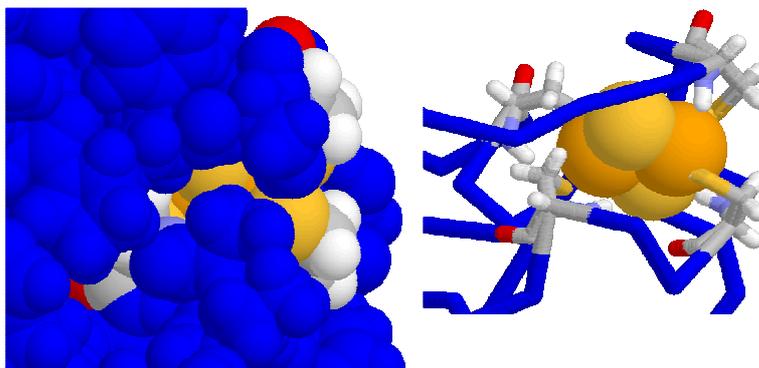
- I centri ferro-zolfo (Fe-S) sono gruppi prostetici che contengono ione Fe (da uno a quattro) complessati con atomi di zolfo elementare o di Cys.
- Le proteine trasportatrici di elettroni possono contenere più centri Fe-S.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISISS Pietro Giordani

- 175 -

Trasportatori di elettroni: i centri Fe-S



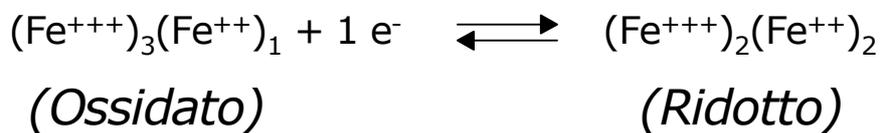
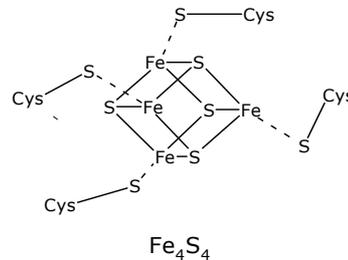
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISISS Pietro Giordani

- 176 -

Trasportatori di elettroni: i centri Fe-S

- I centri Fe-S trasferiscono un solo elettrone per volta tra gli ioni Fe a causa della vicinanza degli ioni.
- Il numero di ossidazione del ferro varia da +3 a +2.

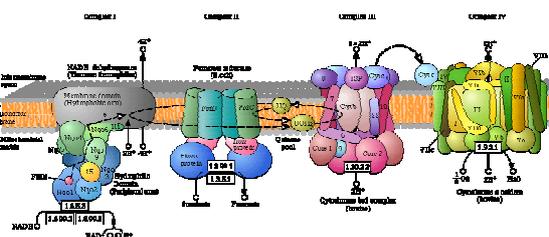
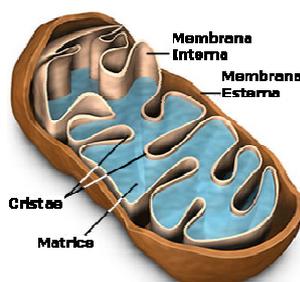


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 177 -

La catena respiratoria



- Molti componenti della catena respiratoria sono localizzati nella membrana interna mitocondriale (o nella membrana citoplasmatica dei batteri aerobi).
- La membrana interna mitocondriale è ripiegata a formare delle creste che aumentano la superficie.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 178 -

Complex I: NADH dehydrogenase (The size 500kDa)

Complex II: Fumarate reductase (FcrR)

Complex III: Cytochrome bc1 complex (bovine)

Complex IV: Cytochrome c oxidase (bovine)

- All'interno di ogni complesso gli elettroni passano sequenzialmente attraverso una serie di trasportatori di elettroni.
- Il CoQ è localizzato nella fase lipidica della membrana ed ha siti di legame sui complessi proteici.
- Il cyt c è localizzato nello spazio intermembrana, si lega alternativamente al complesso III e IV durante il trasporto di elettroni.

25 maggio 2011 Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani - 183 -

Complex I: NADH dehydrogenase (The size 500kDa)

Complex II: Fumarate reductase (FcrR)

Complex III: Cytochrome bc1 complex (bovine)

Complex IV: Cytochrome c oxidase (bovine)

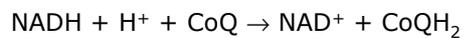
- All'interno di ogni complesso gli elettroni passano sequenzialmente attraverso una serie di trasportatori di elettroni.
- Il CoQ è localizzato nella fase lipidica della membrana ed ha siti di legame sui complessi proteici.
- Il cyt c è localizzato nello spazio intermembrana, si lega alternativamente al complesso III e IV durante il trasporto di elettroni.

25 maggio 2011 Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani - 184 -

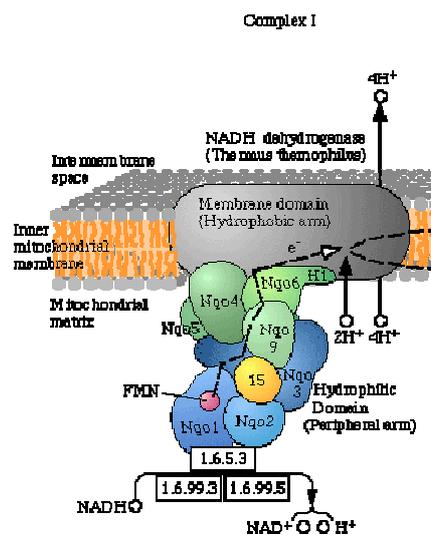
Qualche domanda ?

Complesso I

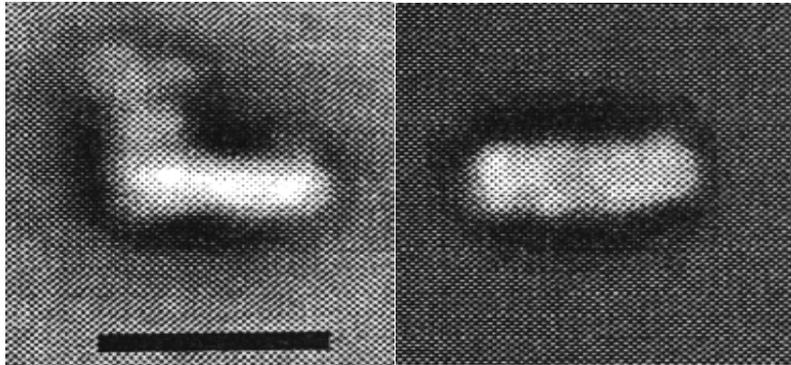
- Il Complesso I catalizza l'ossidazione del NADH con riduzione del CoQ:



- La struttura ad alta risoluzione non è ancora disponibile, si ha una struttura al microscopio elettronico.
- Il complesso ha forma di L.



Complesso I



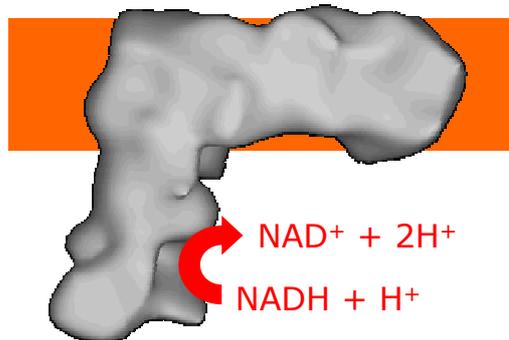
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 187 -

Complesso I

- Il dominio dove si lega il NADH protrude nella matrice mitocondriale.
- Il CoQ si lega nel dominio di membrana.
- I centri Fe-S sono localizzati nel dominio che lega il NADH e nel dominio che lo connette alla membrana.

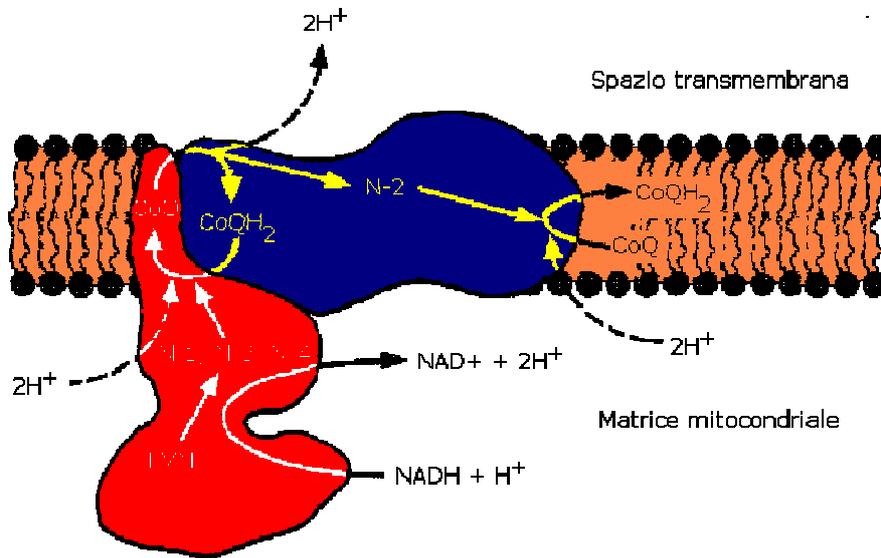


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 188 -

Complesso I



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 189 -

NATURE | Vol 465 | 27 May 2010

NEWS & VIEWS

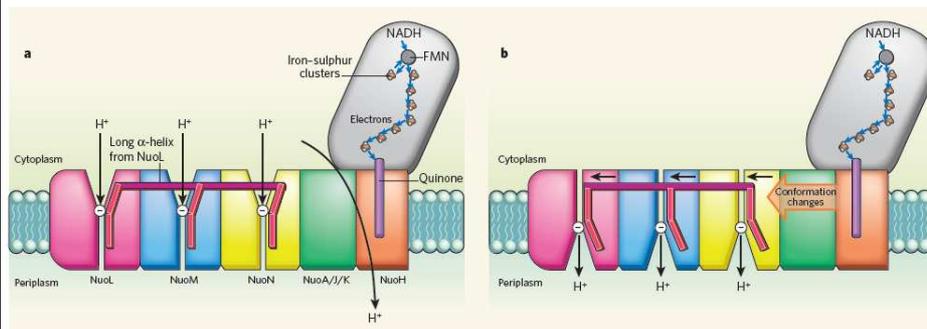


Figure 1 | Indirect coupling of electron transfer to proton pumping in complex I. Complex I, an enzyme found in mitochondrial and bacterial membranes, converts energy by coupling electron transfer to proton pumping. Sazanov and colleagues' crystal structures¹ of bacterial complex I reveal that the transmembrane NuoL subunit of the enzyme projects a long α -helix through the adjacent NuoM and NuoN subunits. They suggest the following mechanism to explain how electron transfer drives proton pumping. **a**, Pairs of electrons from the metabolic intermediate NADH are transferred to a cofactor (flavin mononucleotide, FMN) and then passed along a chain of iron-sulphur clusters in the extramembrane region of complex I, eventually reaching a quinone cofactor; blue arrows indicate

the electron-transfer pathway. This allows a proton (H^+) to pass through complex I at the interface of the extra- and intramembrane regions. Protons can also enter channels in NuoL, NuoM and NuoN from the cytoplasm, but cannot pass through. White circles with minus signs represent negatively charged amino acids, which are key to proton transport. **b**, Conformational changes in the NuoA/J/K/H subunits push the long α -helix towards the other transmembrane subunits. This tilts three other helices in NuoL, NuoM and NuoN, causing the reorientation of certain residues in the subunits' channels. These local conformational changes allow protons in the channels to pass through the channels and enter the periplasm (the space between the inner and outer bacterial membranes).

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSIS Pietro Giordani

- 190 -

Complesso I

- I trasferimenti di elettroni dal NADH sono:



- Dopo che il centro Fe-S è riossidato per trasferimento di un elettrone al successivo, può accettare il secondo elettrone dal FMNH \cdot :



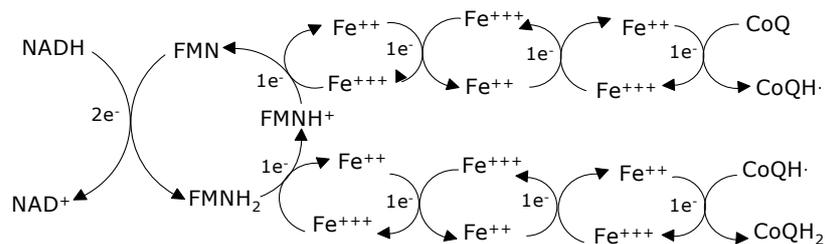
- Gli elettroni passano da una serie di centri Fe-S fino al CoQ.
- Il CoQ accetta 2 e $^-$ e preleva 2 H $^+$ per formare il CoQH $_2$ completamente ridotto.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 191 -

Complesso I

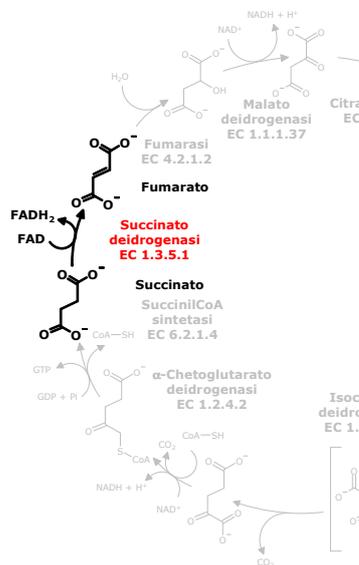


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 192 -

Complesso II



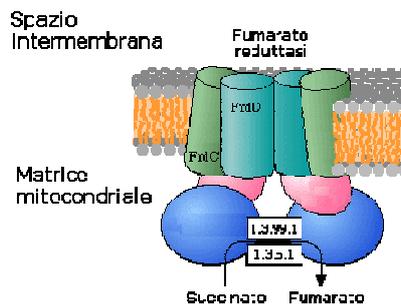
- La succinato deidrogenasi del ciclo di Krebs è anche chiamata complesso II o succinato-CoQ reduttasi.
- Il FAD è il recettore iniziale degli elettroni,
- è ridotto a FADH₂ durante l'ossidazione del succinato a fumarato.
- Il FADH₂ è quindi riossidato per trasferimento di elettroni ad una serie di centri Fe-S fino al CoQ per produrre CoQH₂.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 193 -

Complesso II



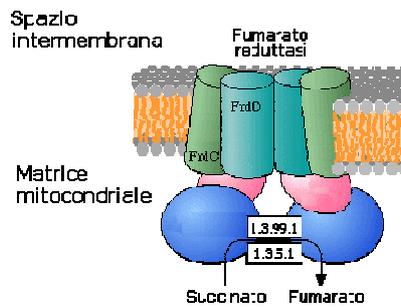
- La succinato deidrogenasi (fumarato reduttasi) del ciclo di Krebs è anche chiamata complesso II o succinato-CoQ reduttasi.
- Il FAD è l'accettore iniziale degli elettroni,
- è ridotto a FADH₂ durante l'ossidazione del succinato a fumarato.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 194 -

Complesso II



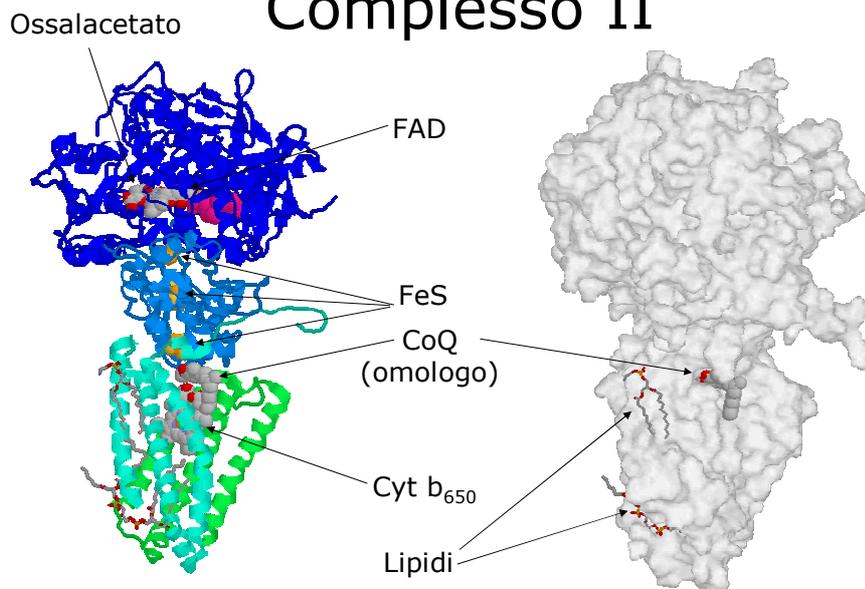
- Il FADH_2 è quindi riossidato per trasferimento di elettroni ad una serie di centri Fe-S fino al CoQ per produrre CoQH_2 .
- Contrariamente agli altri tre complessi della catena respiratoria il complesso II NON trasporta H^+ tra la matrice e lo spazio intermembrana.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 195 -

Complesso II

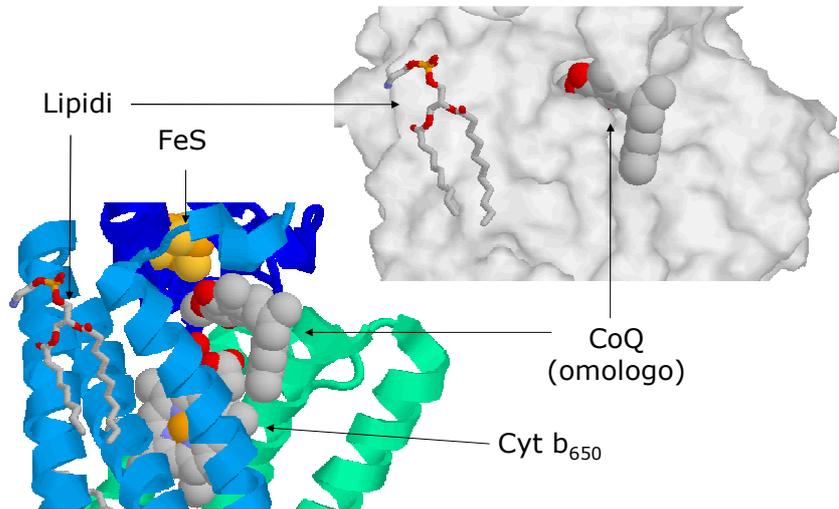


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 196 -

Complesso II

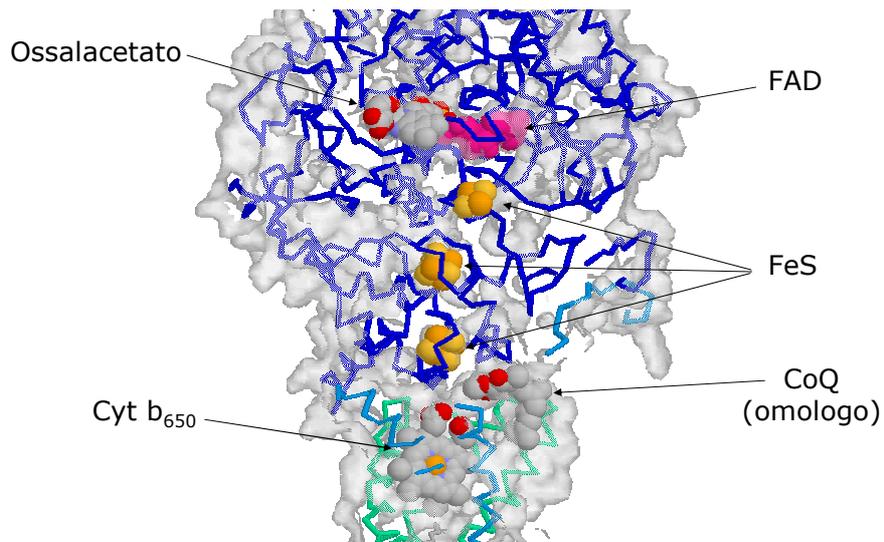


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 197 -

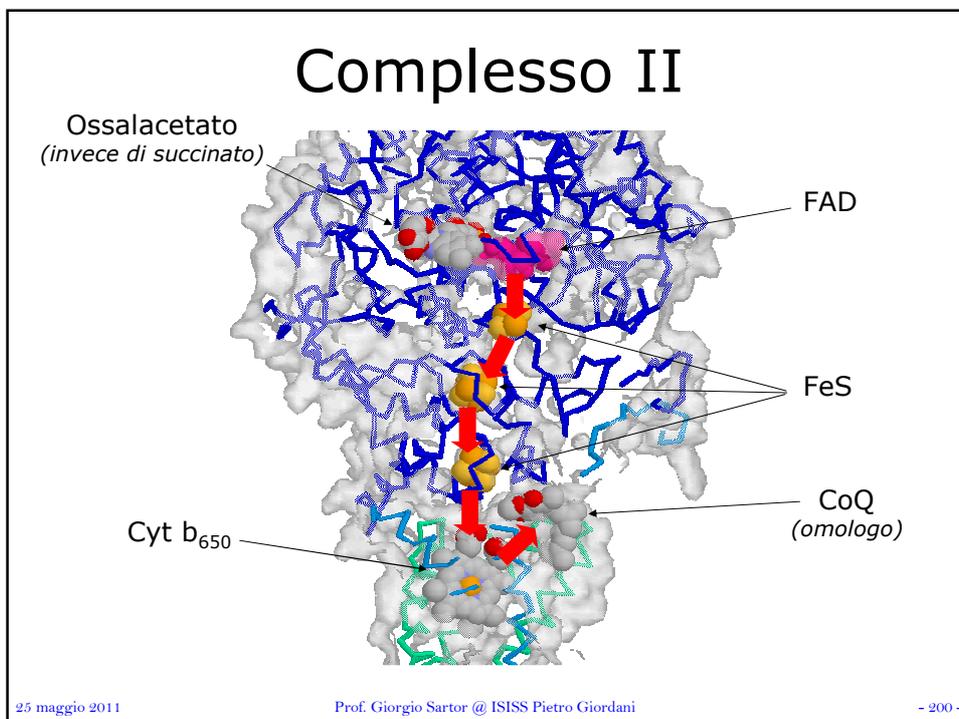
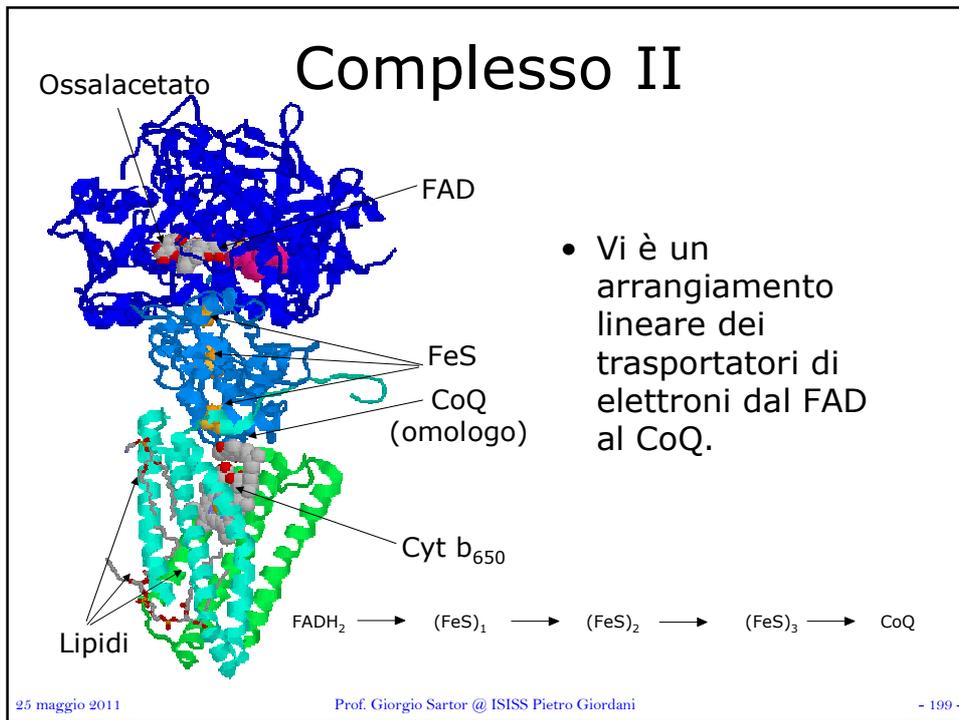
Complesso II



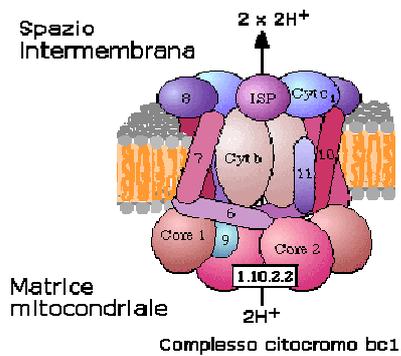
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 198 -



Complesso III



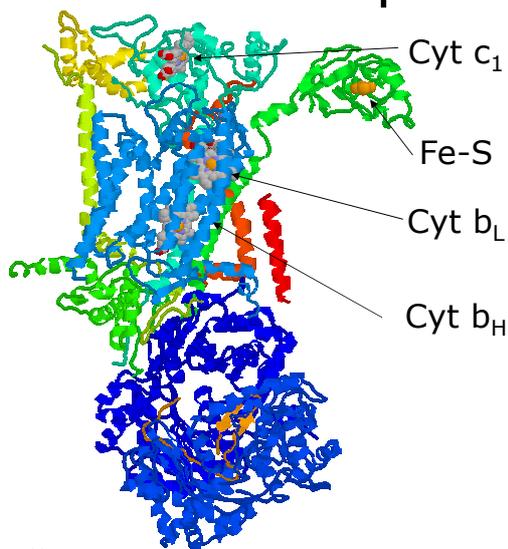
- Complesso citocromo bc_1
- Il complesso III accetta elettroni dal $CoQH_2$ generato a livello dei complessi I e II.
- Il trasporto dei H^+ nel complesso III coinvolge il CoQ.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 201 -

Complesso III



- Ha:
 - un sito di legame del $CoQH_2$
 - un sito di legame del CoQ
- Gruppi prostetici:
 - Una coppia di citocromi b (cit b_H e cit b_L)
 - Un citocromo c (cit c_1)
 - Un centro Ferro Zolfo (Fe_2S_2)

1BCC

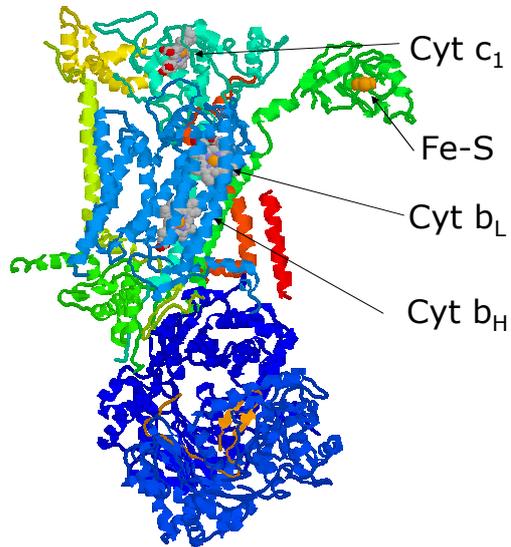
25 maggio 2011

Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 202 -
- 202 -

Complesso III

- Il centro Fe-S (Rieske) è legato al resto del complesso attraverso un braccio flessibile che cambia di posizione durante il trasferimento di elettroni.
- Il centro Fe-S estrae un e^- dal $\text{CoQ}^{\cdot-}$, si muove vicino al gruppo eme c_1 al quale trasferisce l'elettrone.



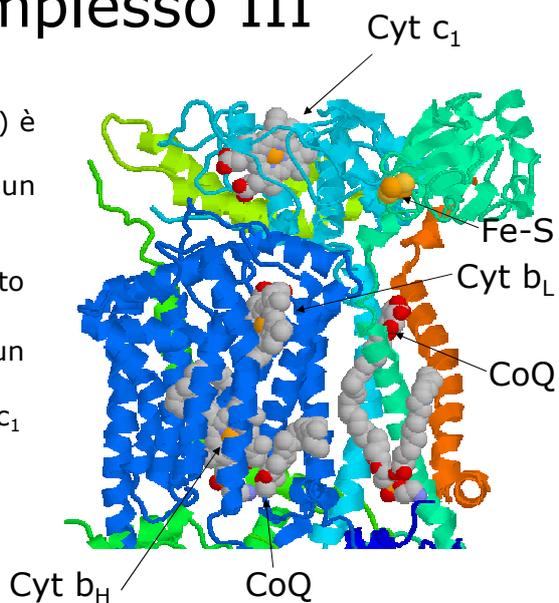
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 203 -

Complesso III

- Il centro Fe-S (Rieske) è legato al resto del complesso attraverso un braccio flessibile che cambia di posizione durante il trasferimento di elettroni.
- Il centro Fe-S estrae un e^- dal $\text{CoQ}^{\cdot-}$, si muove vicino al gruppo eme c_1 al quale trasferisce l'elettrone.



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

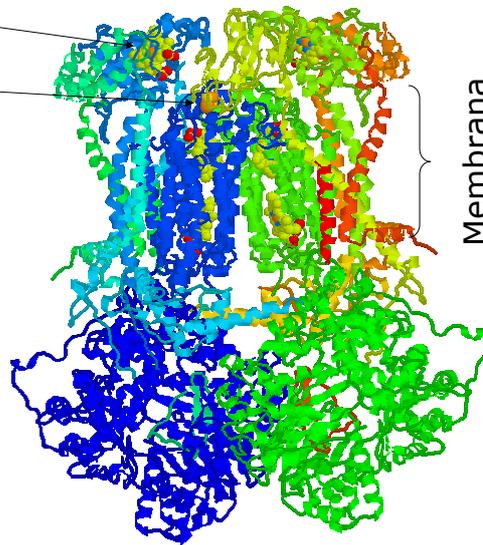
- 204 -

Complesso III

Cyt c_1

Fe-S

- Il complesso III è un omodimero obbligato.
- Il centro Fe-S di una metà interagisce con il CoQ legato e con il gruppo eme c_1 nell'altra metà del dimero.

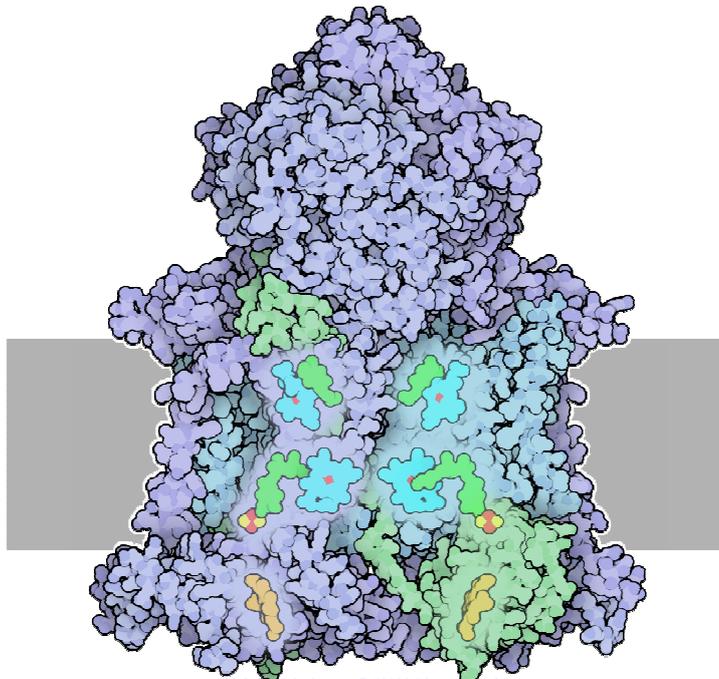


Membrana

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

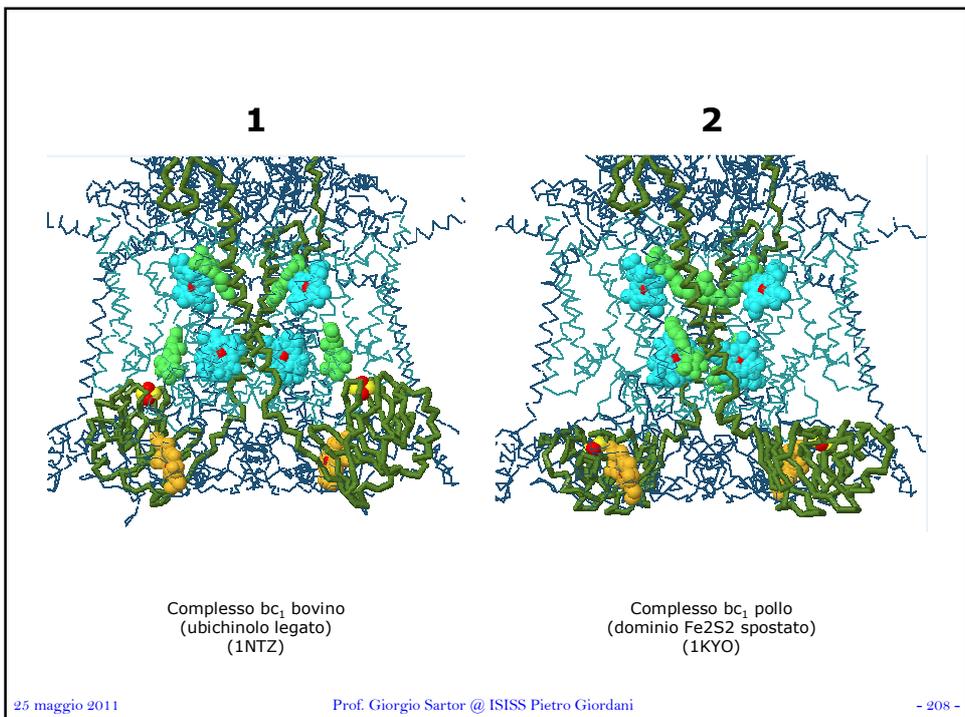
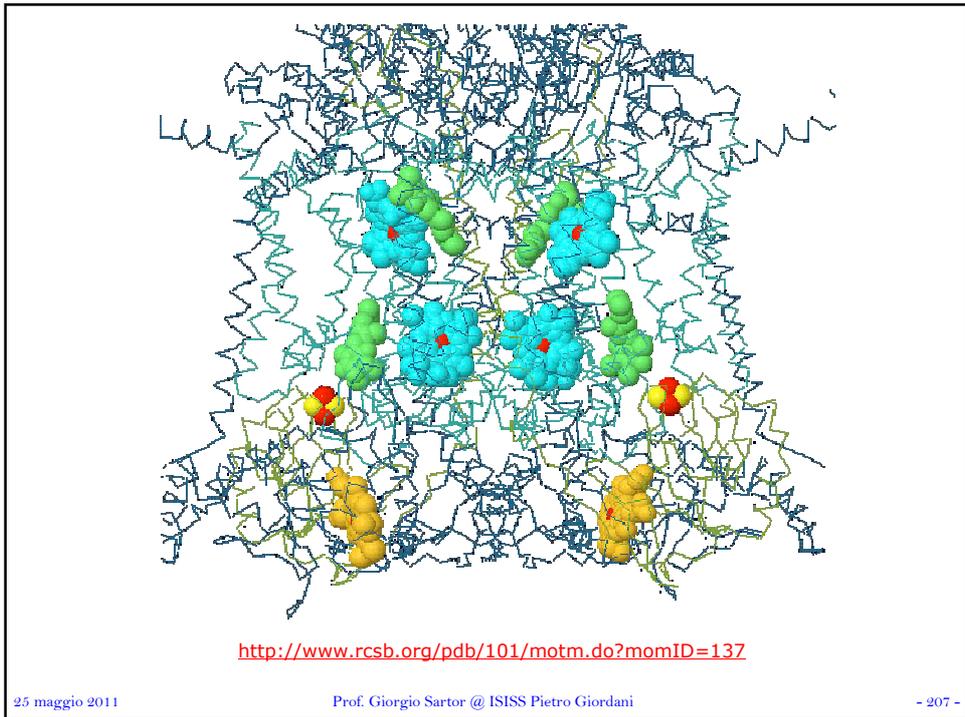
- 205 -

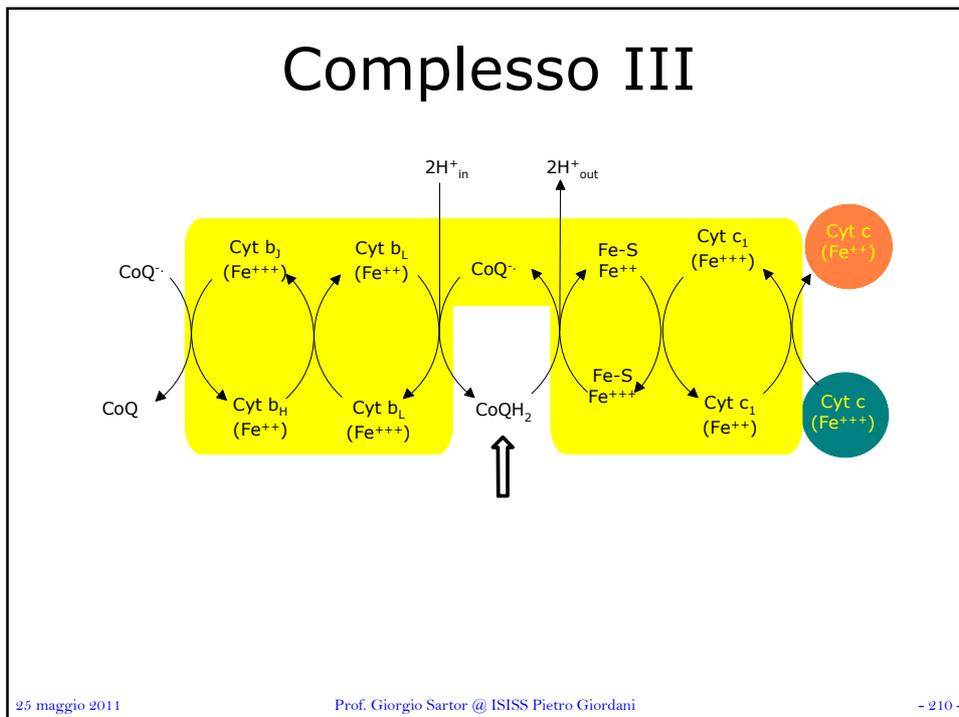
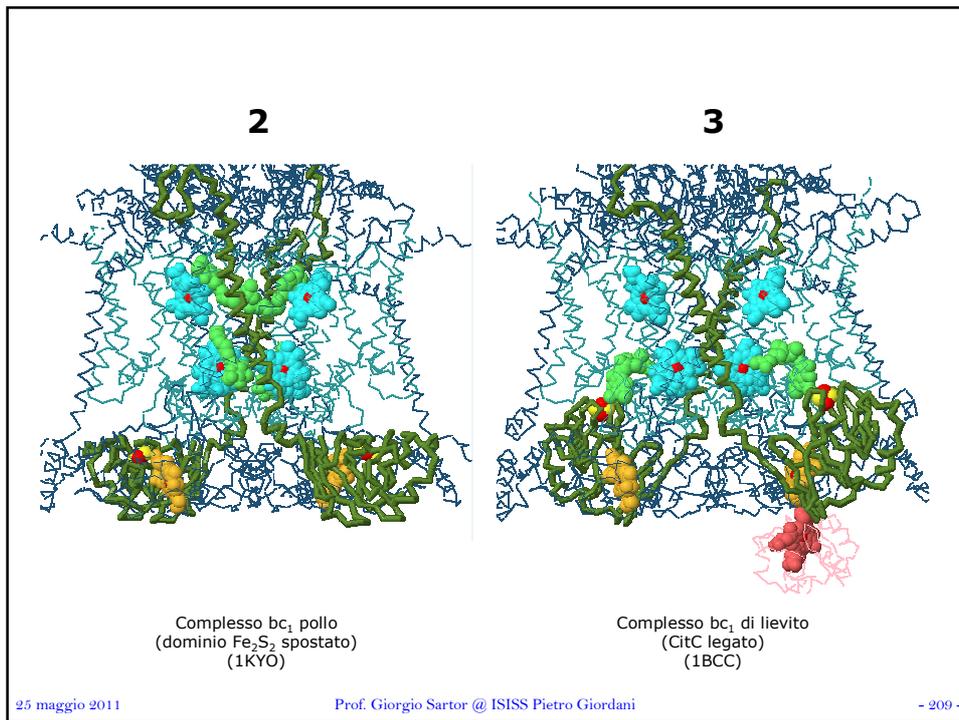


25 maggio 2011

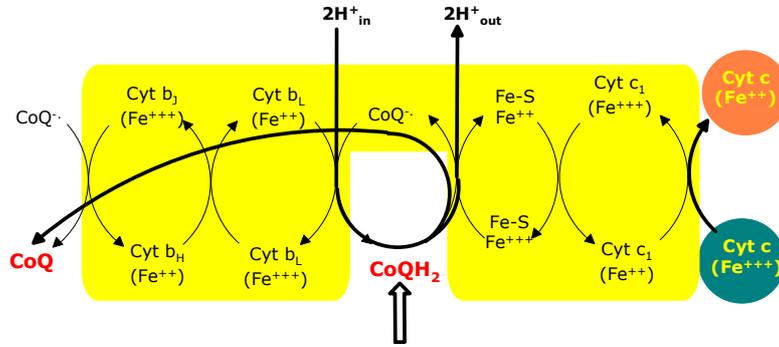
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 206 -





Complesso III



25 maggio 2011

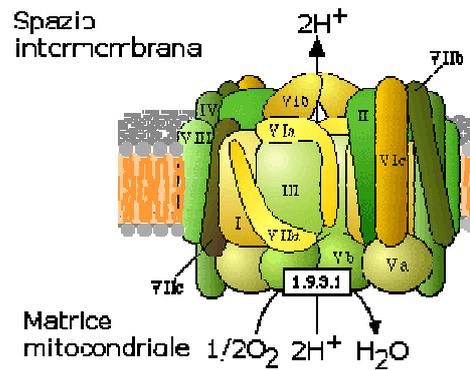
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 211 -

Complesso IV

- La Citocromo ossidasi (Complesso IV) catalizza la reazione irreversibile:

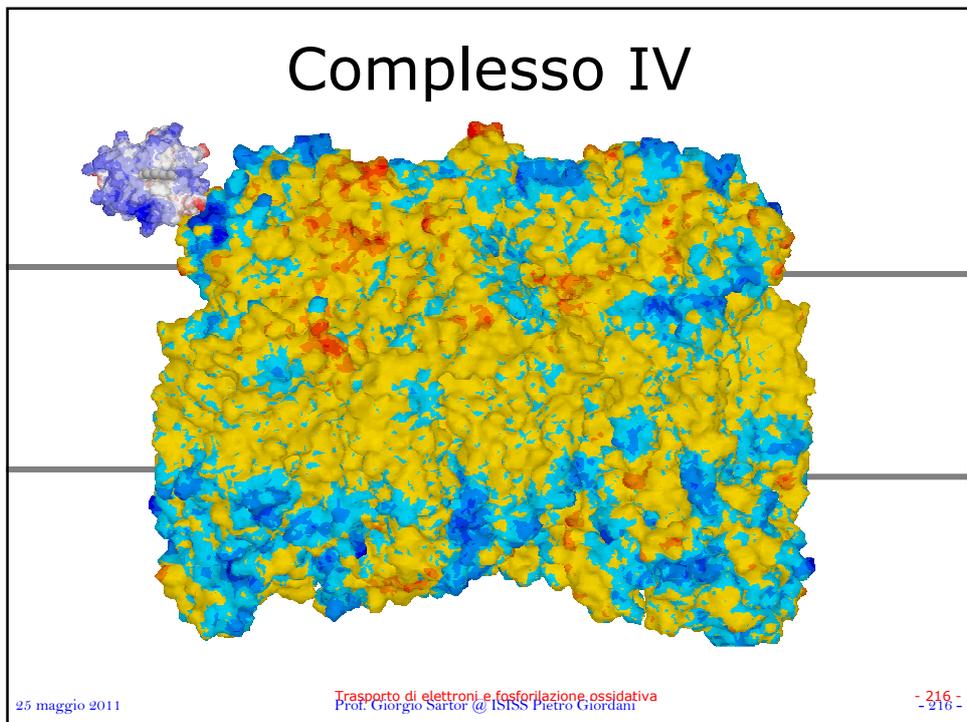
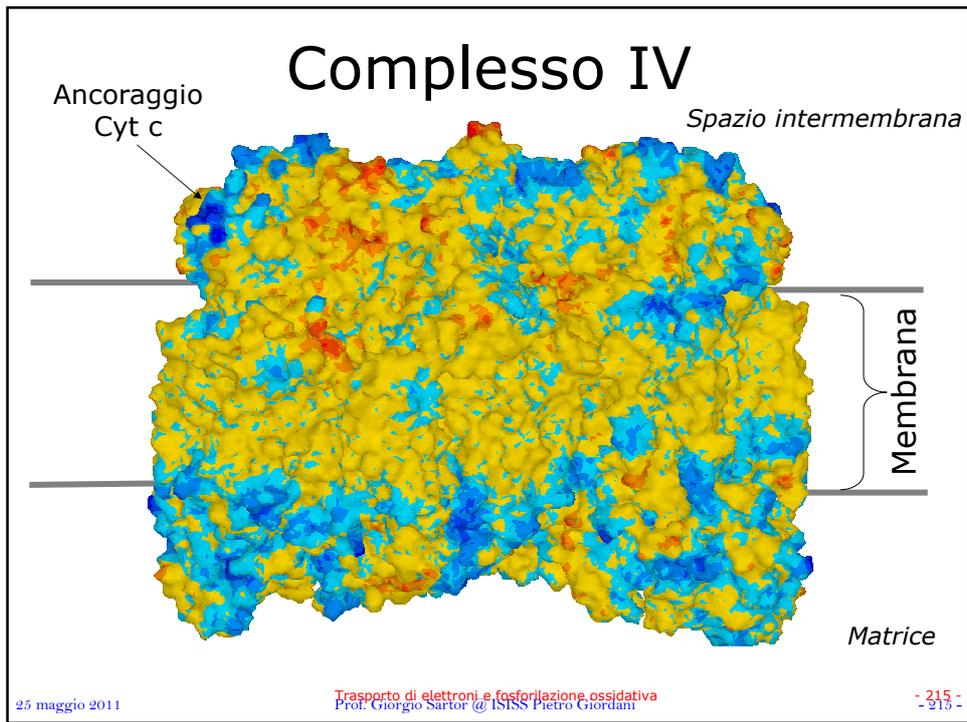
$$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$$
- Quattro elettroni sono trasferiti, uno alla volta, al complesso IV dal Cyt c.

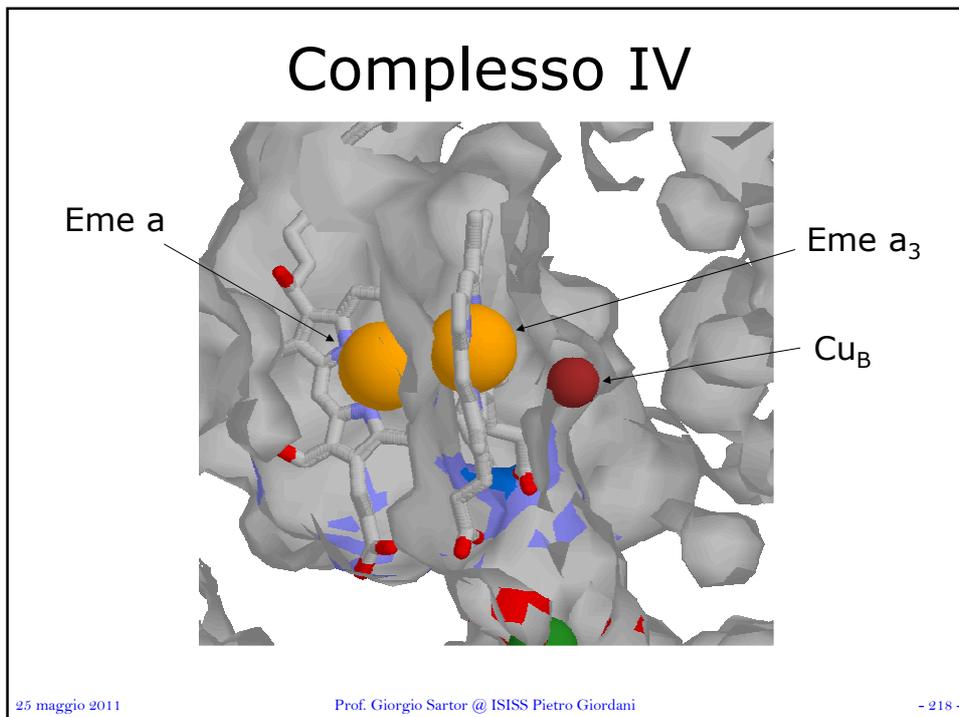
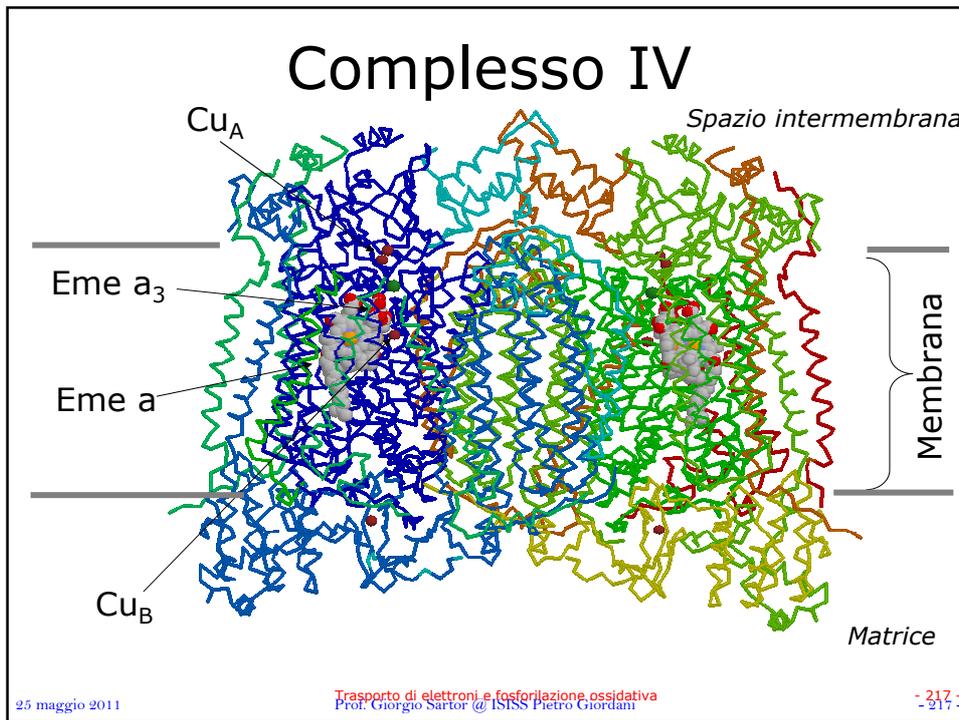


25 maggio 2011

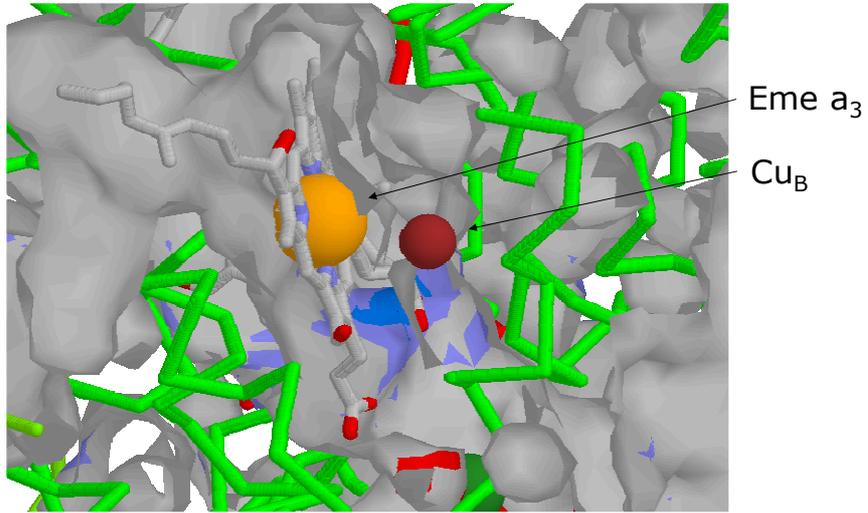
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 212 -





Complesso IV

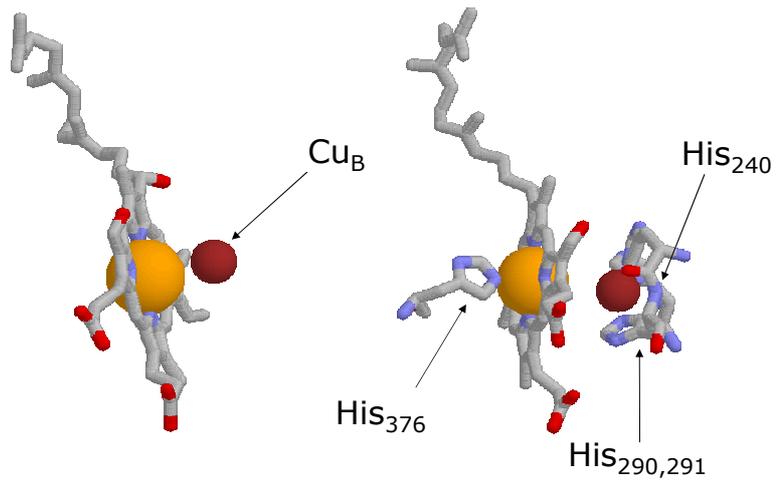


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 219 -

Complesso IV



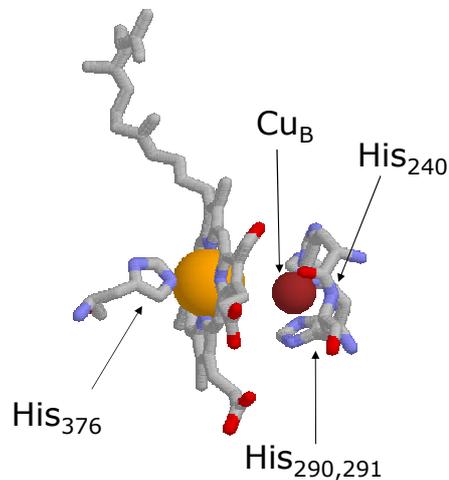
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 220 -

Complesso IV

- Il gruppo eme a_3 , adiacente al Cu_B , ha un solo ligando assiale.
- Lo ione Cu è coordinato con atomi di azoto di residui di His, il Cu_A è anche coordinato con atomi di zolfo di Cys e Met S e con un atomo di ossigeno del backbone di un Glu.
- Gli elettroni vengono trasferiti dal cyt c al complesso IV attraverso Cu_A e eme a.
- Passano quindi al centro binucleare eme $a_3 - Cu_B$ dove si lega O_2 .



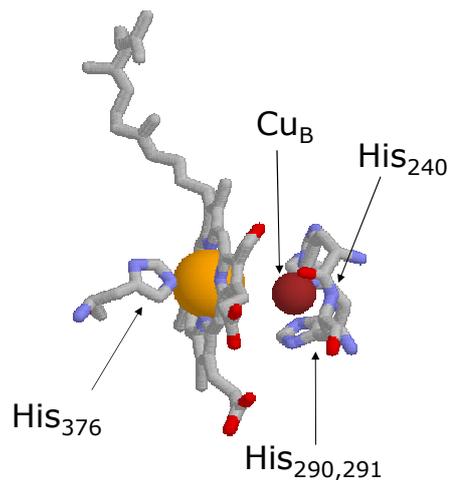
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 221 -

Complesso IV

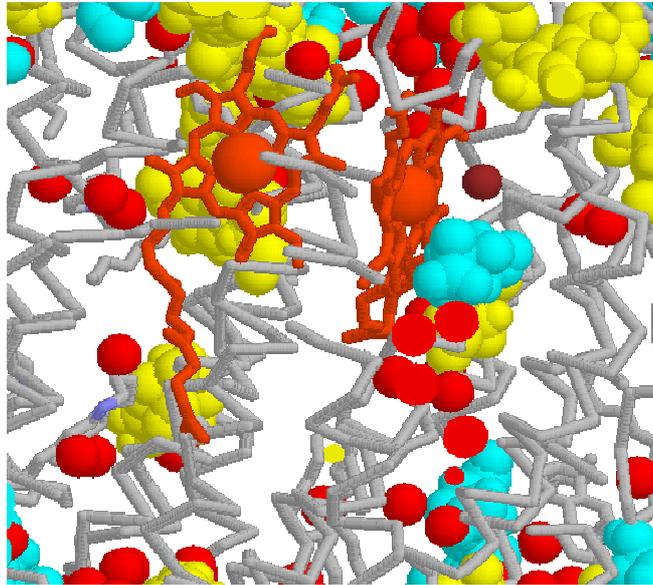
- Il legame della molecola di ossigeno sfrutta anche la presenza di una coppia His Tyr, il che permette la scissione del legame O-O.
- Il sito per O_2 è anche disponibile per il legame di CN^- , CO, H_2S , o del radicale $\cdot NO$.
- CN^- , CO, H_2S inibiscono l'attività della citocromo ossidasi (avvelenamento).
- Si ritiene che il radicale $\cdot NO$ abbia funzioni di regolazione.



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

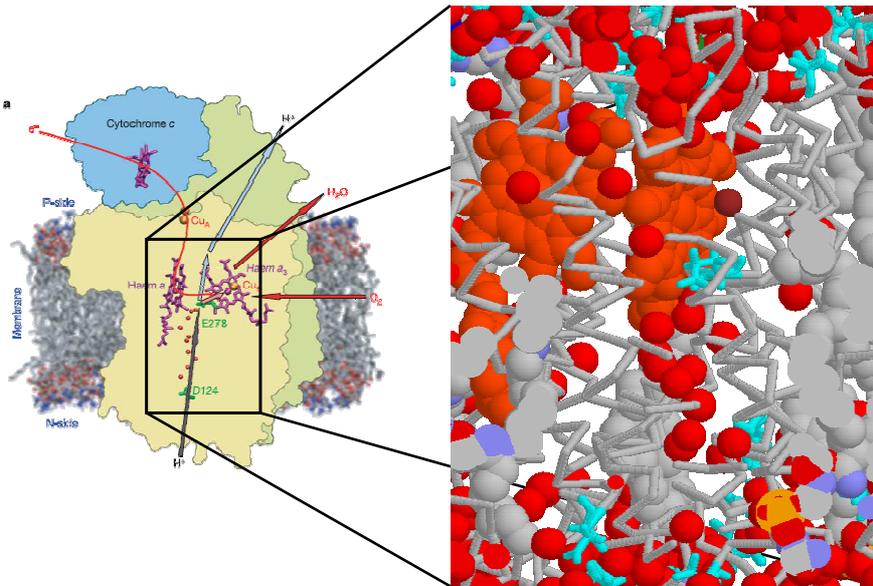
- 222 -



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

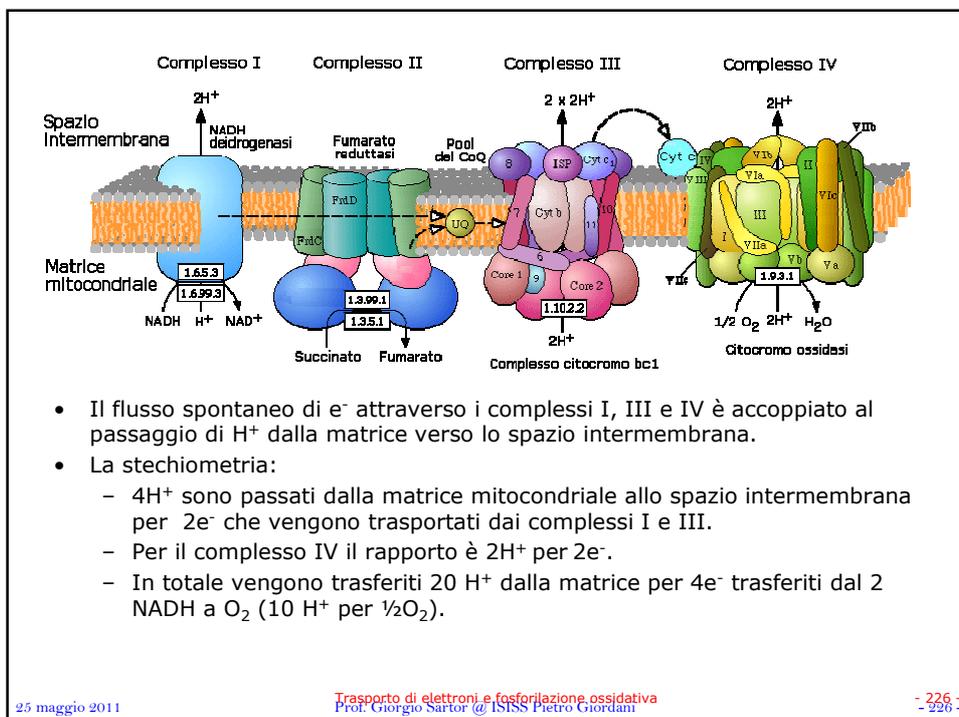
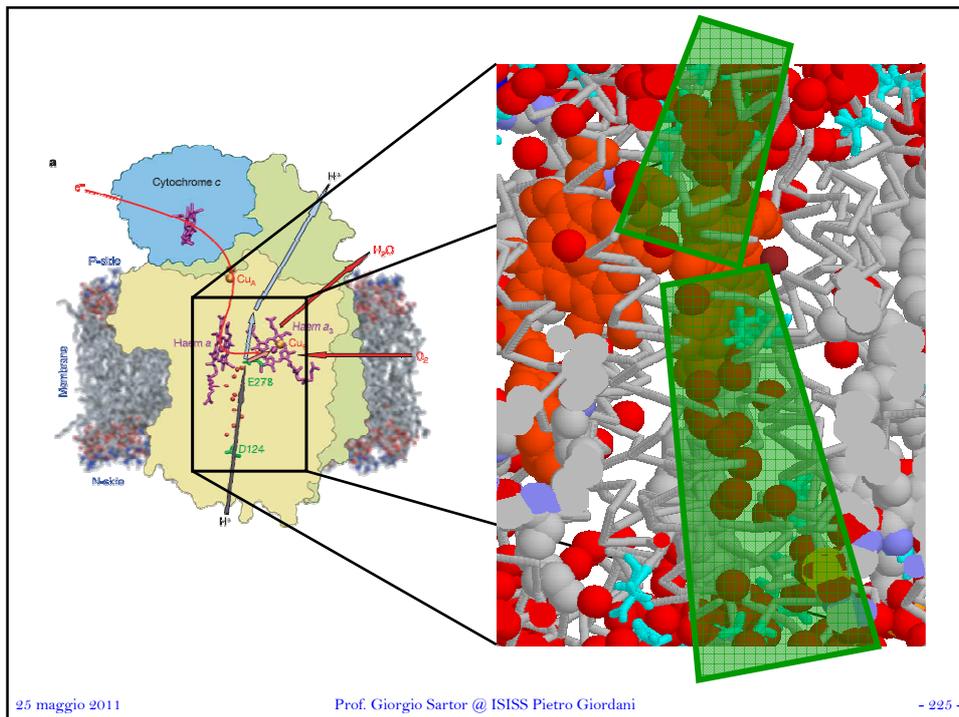
- 223 -



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

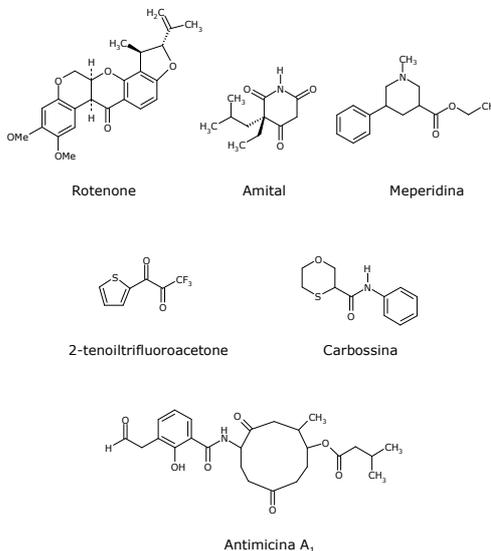
- 224 -



- Il flusso spontaneo di e^- attraverso i complessi I, III e IV è accoppiato al passaggio di H^+ dalla matrice verso lo spazio intermembrana.
- La stechiometria:
 - $4H^+$ sono passati dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana per $2e^-$ che vengono trasportati dai complessi I e III.
 - Per il complesso IV il rapporto è $2H^+$ per $2e^-$.
 - In totale vengono trasferiti $20 H^+$ dalla matrice per $4e^-$ trasferiti dal 2 NADH a O_2 ($10 H^+$ per $\frac{1}{2}O_2$).

Inibitori dei complessi

- Inibitori del complesso I:
Rotenone, Amital, Meperidina
- Inibitori del complesso II:
2-tenoiltrifluoroacetone, carbossina.
- Inibitori del complesso III:
Antimicina A.
- Inibitori del complesso IV:
Ligandi al gruppo eme a_3 :
 CN^- , CO , H_2S , NaN_3 .



25 maggio 2011

Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa
Prof. Giorgio Sartor @ ISISS Pietro Giordani

- 227 -

- 227 -

Ipotesi chemiosmotica

"for his contribution to the understanding of biological energy transfer through the formulation of the chemiosmotic theory"



Peter D. Mitchell

- **The Nobel Prize in Chemistry 1978**
- La teoria chemiosmotica della fosforilazione ossidativa (premio Nobel a Peter Mitchell), definisce che l'accoppiamento della sintesi di ATP alla respirazione è dipendente dal gradiente elettrochimico di H^+ .

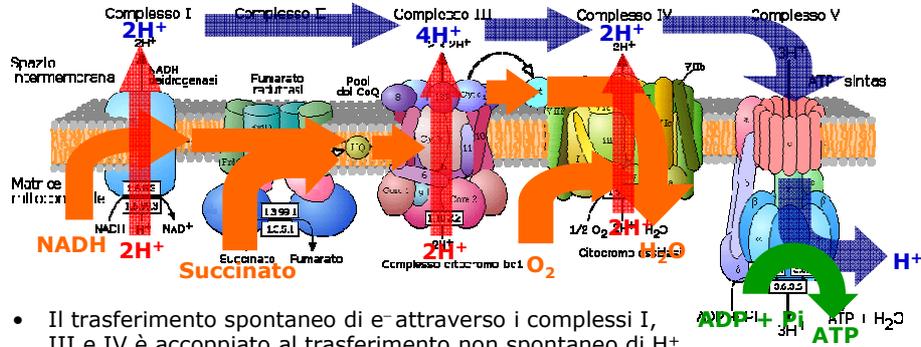
25 maggio 2011

Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa
Prof. Giorgio Sartor @ ISISS Pietro Giordani

- 228 -

- 228 -

Respirazione cellulare e ipotesi chemiosmotica

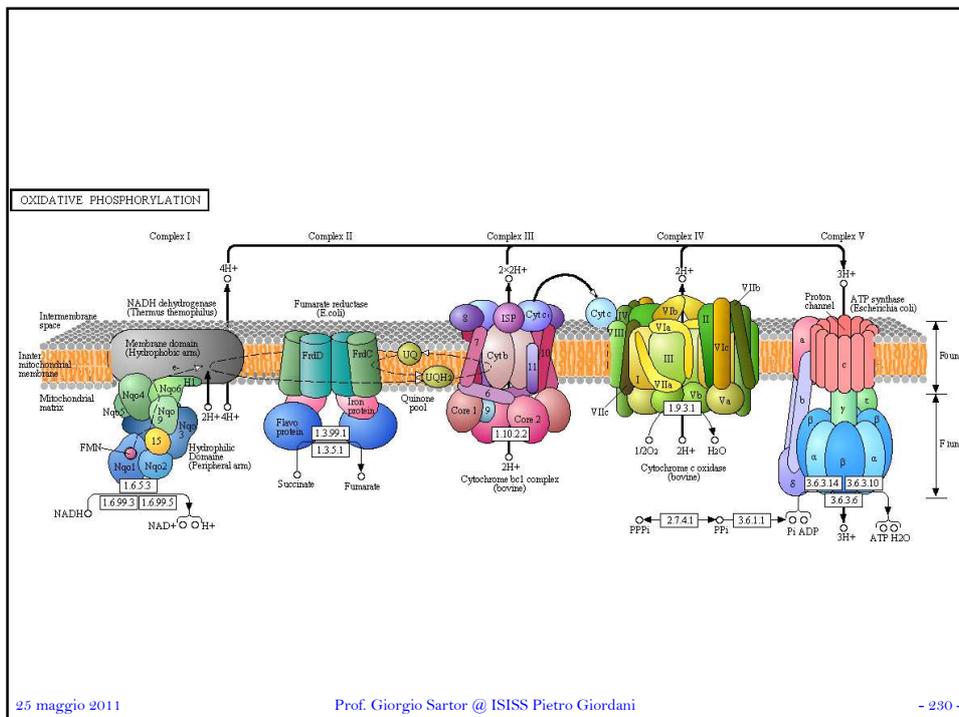


- Il trasferimento spontaneo di e⁻ attraverso i complessi I, III e IV è accoppiato al trasferimento non spontaneo di H⁺ dalla matrice allo spazio intermembrana.
- Il trasporto di H⁺ genera un potenziale di membrana ($\Delta\Psi$, negativo nella matrice) e un gradiente di pH (ΔpH , la matrice diventa alcalina).
- Gli H⁺ ritornano nella matrice attraverso la ATP-sintasi (F₀) che sfrutta questo potenziale per generare ATP nella subunità F₁.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSI Pietro Giordani

- 229 -



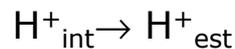
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSI Pietro Giordani

- 230 -

Ipotesi chemiosmotica

- Viene generato un gradiente protonico:



- Che crea una polarizzazione della membrana:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{[\text{H}^+]_{\text{citosol}}}{[\text{H}^+]_{\text{matrice}}} \right) + F\Delta\Psi$$

$$\Delta\Psi = 0.18 \text{ V}$$

$$\Delta\text{pH} = 1$$

$$\Delta G = 2.3 RT + F 0.18 = 23.3 \text{ kJ}$$

- Quindi per trasportare un H^+ verso l'interno:

$$\Delta G = -23.3 \text{ kJ}$$

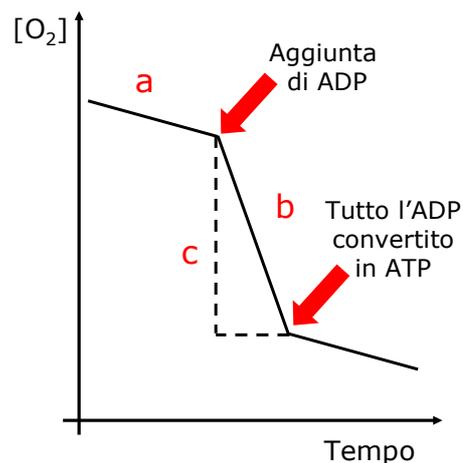
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 231 -

Controllo respiratorio

- La velocità di respirazione, dipendente dalla disponibilità di ADP per la ATP sintasi, è chiamata **controllo respiratorio**.
- Il grafico rappresenta il consumo di O_2 registrato usando un elettrodo ad ossigeno in una sospensione di mitocondri in presenza di P_i e di un donatore di e^- (succinato o un altro generatore di NADH).
- Il controllo respiratorio è il rapporto tra le pendenze della curva dopo e prima dell'aggiunta di ADP (b/a).
- Il rapporto P/O è dato dalle moli di ADP diviso per le moli di O_2 consumate (c) nella fosforilazione di ADP.



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 232 -

Controllo respiratorio

- Il trasporto di elettroni è accoppiato alla estrusione di H⁺ dalla matrice.
- Il fatto che questa reazione accoppiata sia spontanea dipende dai gradienti elettrico ($\Delta\Psi$) di pH.

Reazione	ΔG
Trasferimento e ⁻	Negativo $\Delta G^{o'} = -nF\Delta E^{o'} = -218 \text{ kJ/mol per } 2 \text{ e}^- \text{ NADH} \rightarrow \text{O}_2$
Estrusione H ⁺ dalla matrice	Positivo (dipende dal gradiente protonico) Per estrarre un H ⁺ dalla matrice $\Delta G = RT \ln ([\text{H}^+]_{\text{cit}}/[\text{H}^+]_{\text{mat}}) + F\Delta\Psi$ $\Delta G = 2.3 RT (\text{pH}_{\text{mat}} - \text{pH}_{\text{cit}}) + F\Delta\Psi$
Reazione accoppiata	Somma algebrica

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 233 -

Controllo respiratorio

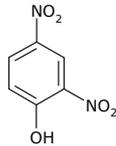
- In assenza di ADP, i H⁺ non possono fluire attraverso F_o. ΔpH e $\Delta\Psi$ sono massimi. Il valore assoluto del ΔG per l'estrusione H⁺ aumenta avvicinandosi a quello del trasporto di e⁻.
- Quando la reazione accoppiata non è più spontanea ($\Delta G > 0$) la respirazione si ferma.
- Quindi in assenza di ADP la velocità di respirazione è fermata (o bassa a causa del leak di H⁺).
- Quando si aggiunge ADP riprende la sintesi di ATP, gli H⁺ entrano nella matrice via F_o. Si riducono ΔpH e $\Delta\Psi$.
- Il ΔG dell'estrusione di H⁺ diminuisce.
- La reazione accoppiata ridiventa spontanea ($\Delta G < 0$).
- La respirazione riprende (è stimolata).

25 maggio 2011

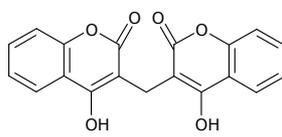
Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 234 -

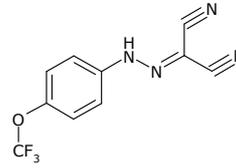
Disaccoppianti



Dinitrofenolo



Dicumarolo



Carbonil cianuro-*p*-trifluoro metossifenilidrazone (FCCP)

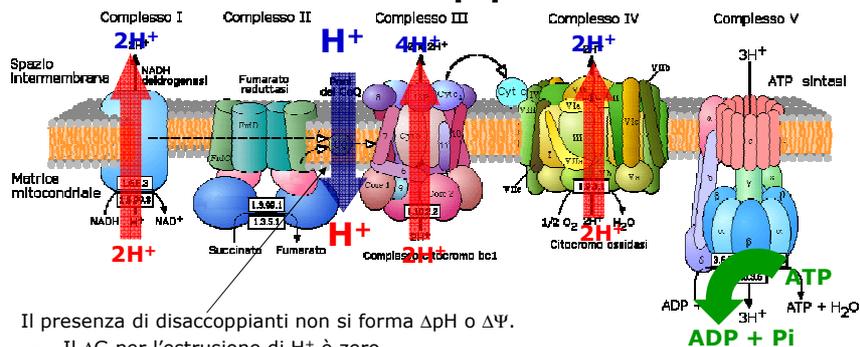
- I disaccoppianti bloccano la fosforilazione ossidativa dissipando il gradiente protonico convertendolo in calore
- Sono in genere degli acidi deboli solubili nella fase lipidica.
- I protoni pompati fuori rientrano nella matrice, non si genera il gradiente ΔpH o $\Delta \Psi$.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 235 -

Disaccoppianti



- Il presenza di disaccoppianti non si forma ΔpH o $\Delta \Psi$.
 - Il ΔG per l'estrusione di H^+ è zero
 - Il ΔG per il trasporto di e^- accoppiato all'estrusione di H^+ è massima.
- La respirazione procede in presenza di disaccoppianti sia che l'ADP sia presente o no.
 - Il ΔG per il flusso H^+ è zero in assenza di gradiente protonico.
 - L'idrolisi di ATP è spontanea.
- In presenza di disaccoppianti l'ATP sintasi funziona al contrario.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 236 -

Proteine disaccoppianti

- Il disaccoppiamento può essere usato per produrre calore.
- Nel tessuto adiposo bruno (bruno perché ricco di mitocondri) di neonati dei mammiferi e nei mammiferi che vanno in letargo, è presente una proteina disaccoppiante, la termogenina.
- La termogenina funziona come un trasportatore di H^+ nella membrana interna mitocondriale.
- La proteina blocca lo sviluppo del gradiente protonico contemporaneamente stimola la respirazione dissipando il ΔG come calore.
- Questo tipo di riscaldamento costa in termini di energia respiratoria (non convertita in ATP) ma aiuta l'organismo a rispondere al raffreddamento.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISISS Pietro Giordani

- 237 -

Qualche domanda?



F₁F₀ ATP Sintasi

Meccanismo della sintesi di ATP

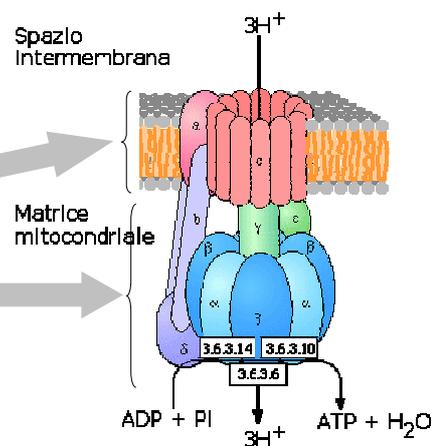
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 239 -

Complesso V – ATP sintasi

- La ATP sintasi, presente nella membrana interna mitocondriale.
- È composta di sue principali unità catalitiche:
 - F₀: proteina di membrana che gestisce il trasporto di protoni.
 - F₁: costituita da cinque polipeptidi con stechiometria $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$.

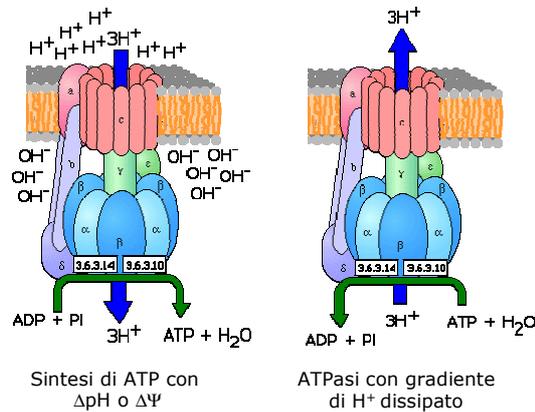


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 240 -

F₁F₀ ATP Sintasi di mitocondri, cloroplasti, batteri



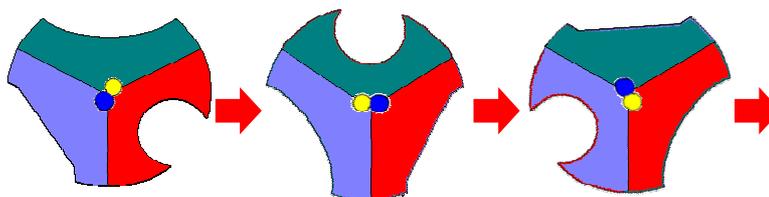
- Quando il ΔpH o il $\Delta\Psi$ sono favorevoli, F₁F₀ accoppia la sintesi di ATP al flusso spontaneo di H⁺ verso la parte della membrana dove si protrude F₁ (matrice mitocondriale).
- Se non c'è ΔpH o $\Delta\Psi$ per pilotare la reazione accoppiata viene favorita l'idrolisi dell'ATP (ATPasi).

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 241 -

Meccanismo di sintesi



- Il meccanismo di legame e di sintesi accoppiata è stata proposta da Boyer e Walker (Nobel).
- Per semplicità sono riportate solo le subunità catalitiche β .
 - È stato proposto che una struttura proteica di forma irregolare (γ) sia legata a F₀ e ruoti relativamente alle tre subunità catalitiche β .
 - La rotazione di γ è pilotata dal flusso protonico attraverso F₀.

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 242 -

Meccanismo di sintesi

The Nobel Prize in Chemistry 1997

"for their elucidation of the enzymatic mechanism underlying the synthesis of adenosina triphosphate (ATP)"

"for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na⁺, K⁺-ATPase"



Paul D. Boyer



John E. Walker



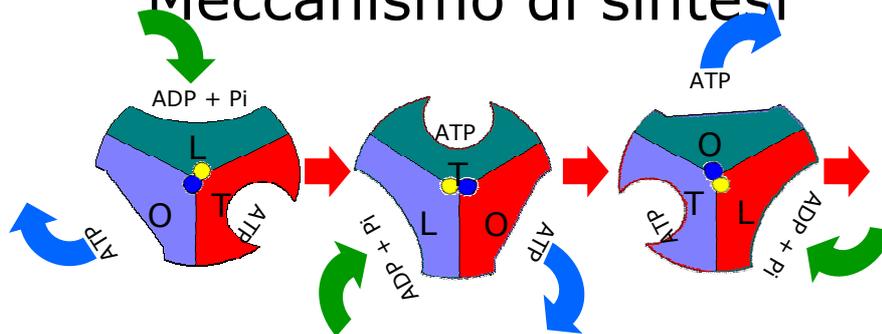
Jens C. Skou

25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 243 -

Meccanismo di sintesi



- La conformazione di ogni subunità catalitica β cambia sequenzialmente a seguito dell'interazione con la subunità γ che ruota (al centro).
- Ogni subunità catalitica β ha una conformazione diversa per ogni passo del ciclo catalitico
- Per esempio la subunità verde è sequenzialmente:
 - In conformazione L (loose) nella quale il sito attivo lega debolmente ADP + Pi
 - In conformazione T (tight) nella quale il substrato è legato fortemente e si forma ATP.
 - In conformazione O (open) nella quale viene rilasciato l'ATP.

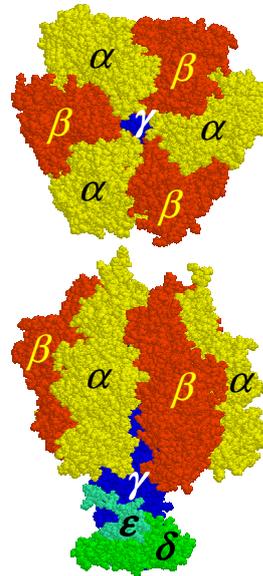
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 244 -

Struttura di F₁

- Nei mammiferi F₁ consiste di cinque polipeptidi con stechiometria α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ (in ordine decrescente di peso molecolare).
- Le subunità α e β sono omologhe.



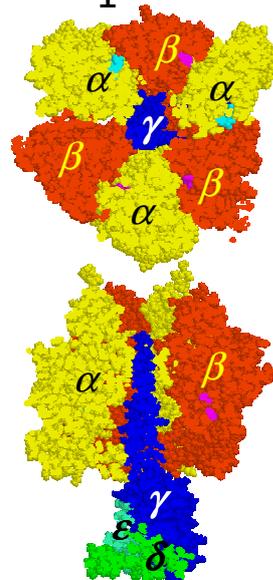
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 245 -

Struttura di F₁

- Nei mammiferi F₁ consiste di cinque polipeptidi con stechiometria α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ (in ordine decrescente di peso molecolare).
- Le subunità α e β sono omologhe.



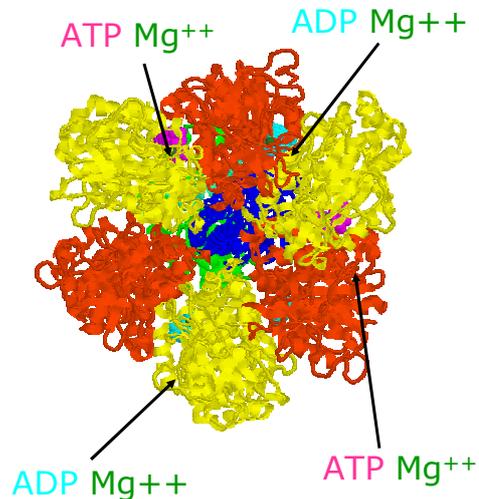
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 246 -

Struttura di F₁

- Ci sono tre siti catalitici.
- Sono localizzati alle interfacce $\alpha\beta$ con predominanza nella subunità β .
- Ognuna delle tre subunità α contiene un ATP legato alla proteina ed inattivo nella catalisi.
- I nucleotidi adenilici si legano alle subunità α e β complessati con Mg^{++} .



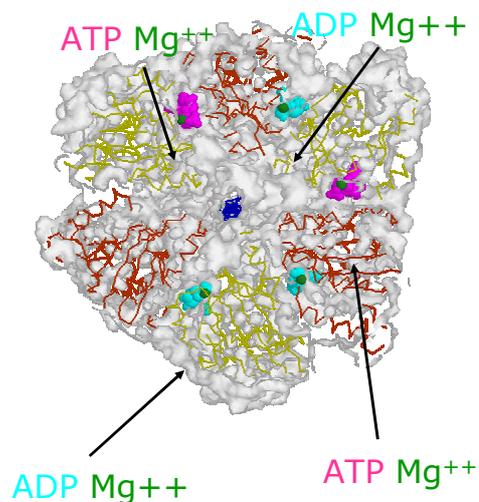
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 247 -

Struttura di F₁

- Ci sono tre siti catalitici.
- Sono localizzati alle interfacce $\alpha\beta$ con predominanza nella subunità β .
- Ognuna delle tre subunità α contiene un ATP legato alla proteina ed inattivo nella catalisi.
- I nucleotidi adenilici si legano alle subunità α e β complessati con Mg^{++} .



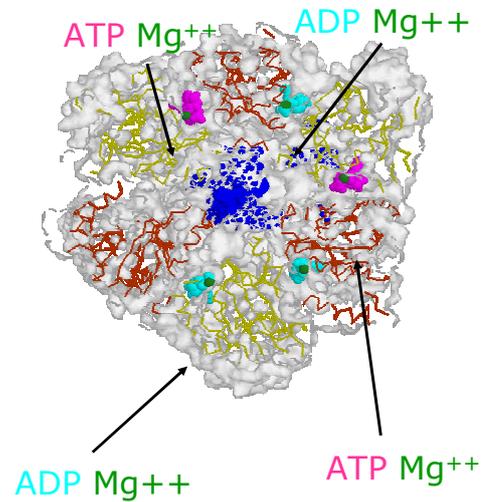
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 248 -

Struttura di F₁

- Ci sono tre siti catalitici.
- Sono localizzati alle interfacce $\alpha\beta$ con predominanza nella subunità β .
- Ognuna delle tre subunità α contiene un ATP legato alla proteina ed inattivo nella catalisi.
- I nucleotidi adenilici si legano alle subunità α e β complessati con Mg^{++} .



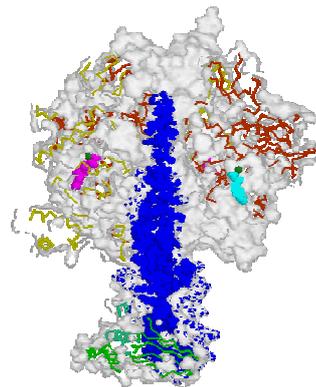
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 249 -

Struttura di F₁

- La subunità γ include un ripiegamento dell'elica che costituisce una "camma" incastrata tra le subunità α e β .



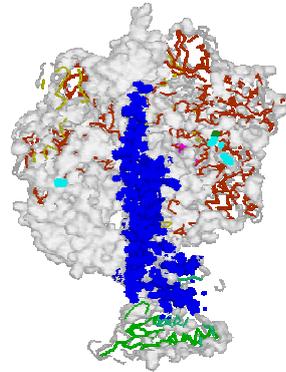
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 250 -

Struttura di F₁

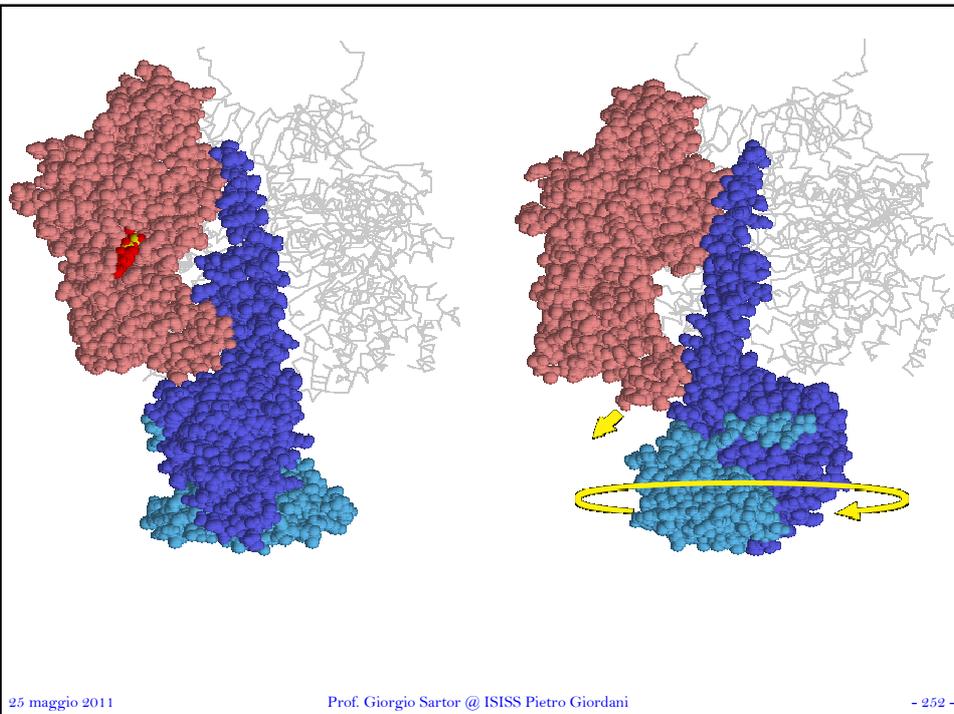
- La subunità γ include un ripiegamento dell'elica che costituisce una "camma" incastrata tra le subunità α e β .



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 251 -



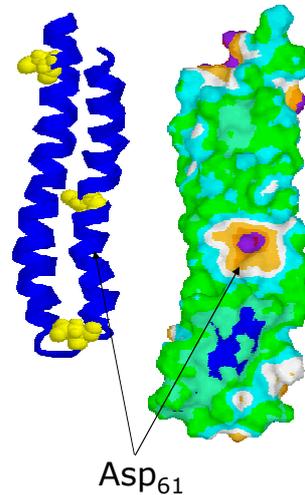
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 252 -

Subunità F_o

- La subunità c di F_o ha una struttura ripiegata (hairpin) con due α -eliche transmembrana connesse da un corto loop.
- È un peptide molto idrofobico.
- Una delle due α -eliche ha un residuo acido (Asp o Glu) che è il sito di reazione del DCCD.
- Tale residuo è essenziale per il trasporto dei H⁺ attraverso F_o.



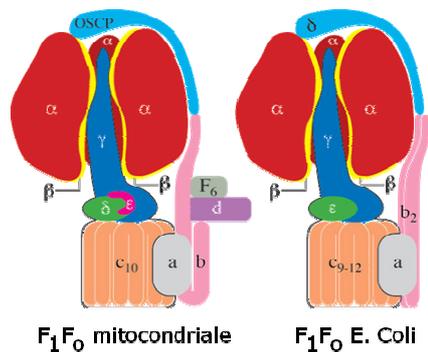
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 253 -

Struttura F_oF₁

- F_o è un complesso di proteine integrali di membrana.
 - La stechiometria in *E. Coli* è a, b_2, c_{10} .
- Nei mammiferi F₁F_o è un poco più complessa che nei batteri.
- Nei diversi organismi le subunità hanno nomi diversi.
 - La subunità δ nei mammiferi è omologa alla subunità ϵ in *E. Coli*.
 - La subunità "OSCP" nei mammiferi è omologa alla subunità δ in *E. Coli*.
 - La subunità ϵ nei mammiferi è unica.



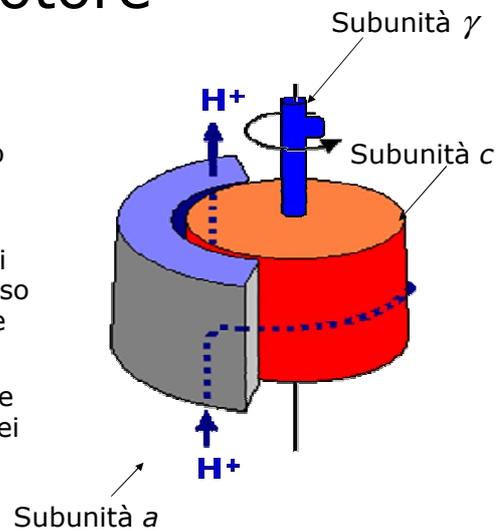
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 254 -

Il rotore

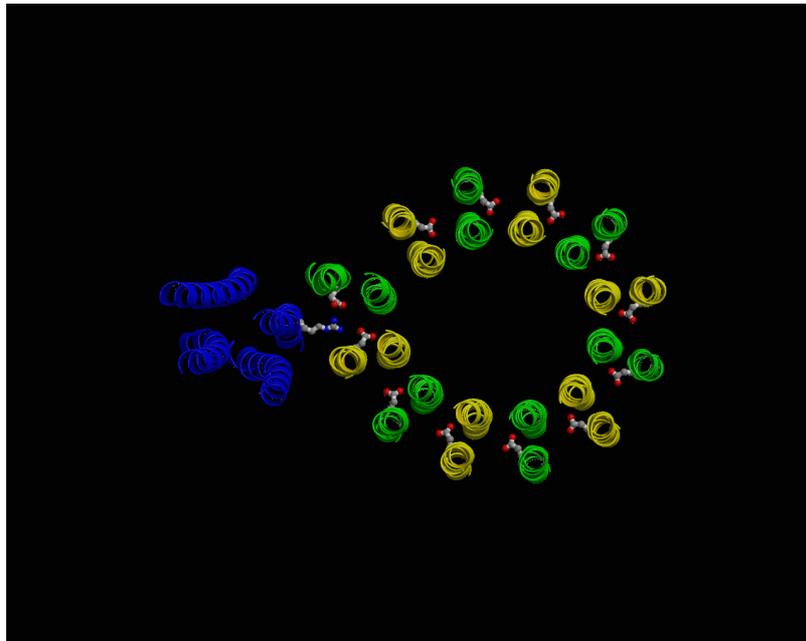
- È stato proposto che la subunità a di F_0 formi due mezzi canali per il trasporto dei protoni.
- Il trasporto avverrebbe attraverso la ionizzazione di gruppi ionizzabili o attraverso molecole d'acqua contenute nei canali.
- La variazione di ionizzazione (Asp61 in c) al passaggio dei protoni indurrebbe il movimento rotatorio del rotore trasmesso poi, attraverso γ a F_1 .



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 255 -



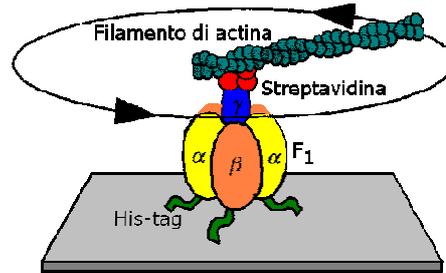
25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 256 -

Motori molecolari

- Che la rotazione di una parte della proteina avvenga in seguito all'idrolisi di ATP è stato dimostrato sperimentalmente:
 - Le subunità β di F_1 sono state "saldate" ad una superficie.
 - Un filamento di actina opportunamente marcato con colorante fluorescente è stato legato alla porzione di γ che protrude dalla F_1 .
 - Fornendo ATP nella soluzione si ha la rotazione (visibile) del braccio di actina in senso antiorario.

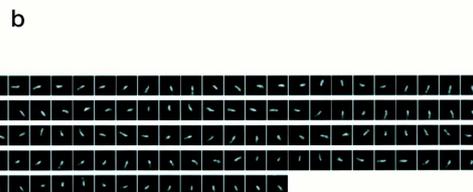
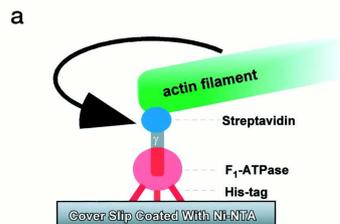


25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 257 -

The direct observation of the γ rotation in the F_1 motor.



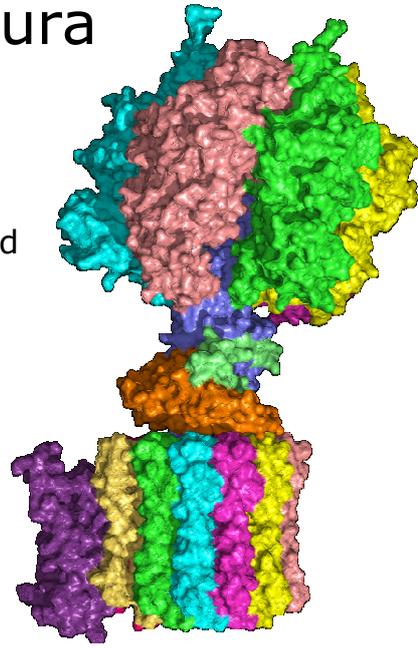
Noji H, Yoshida M J. Biol. Chem. 2001;276:1665-1668

©2001 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

jbc - 258 -

Struttura

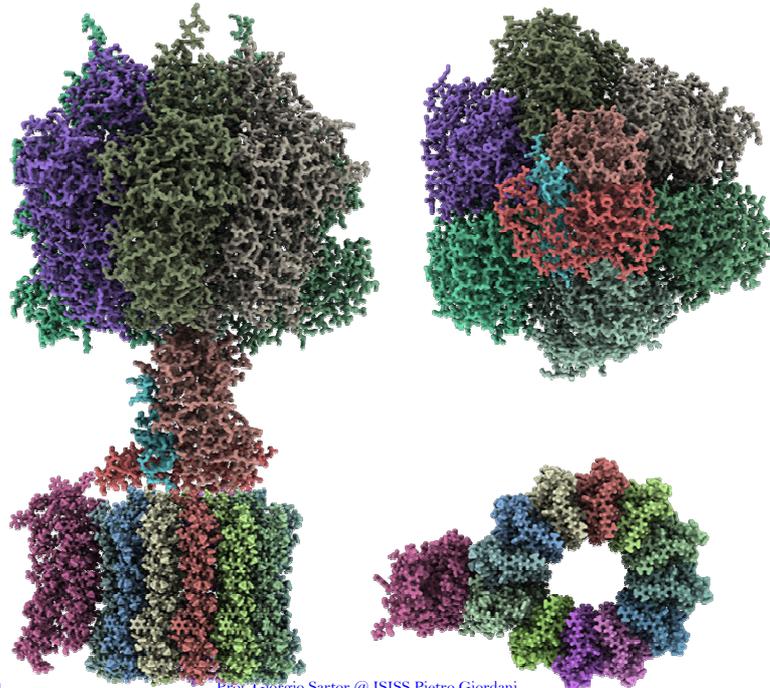
- Questo è il massimo di risoluzione ottenuta fino ad ora della definizione della intera struttura dell'ATP sintasi.



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

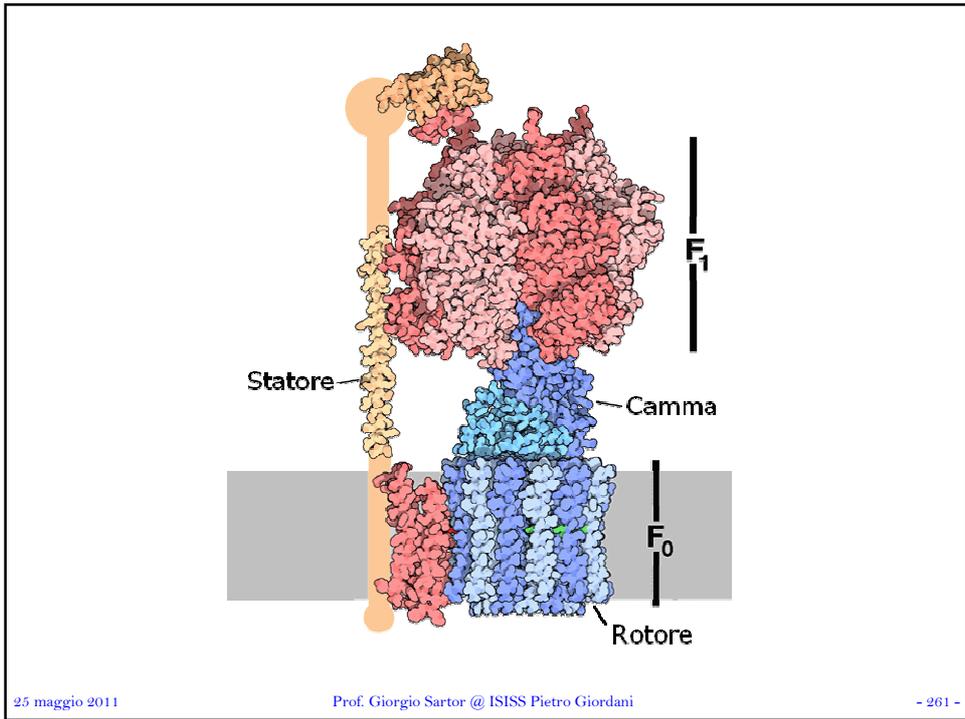
- 259 -



25 maggio 2011

Prof. Giorgio Sartor @ ISSS Pietro Giordani

- 260 -





Prof, è ora di andare?

