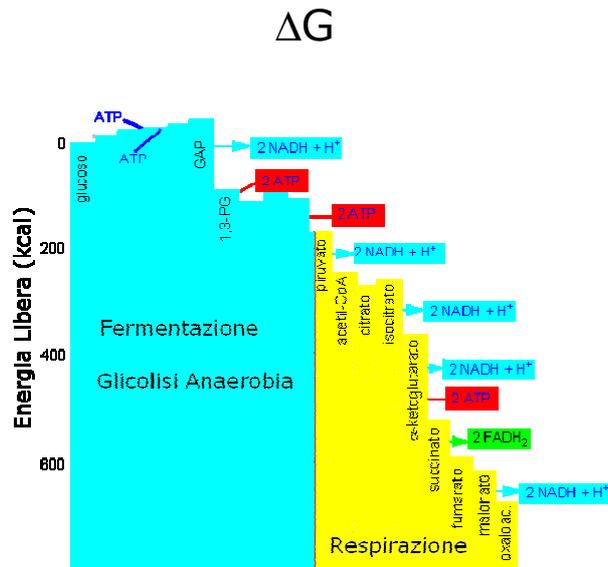


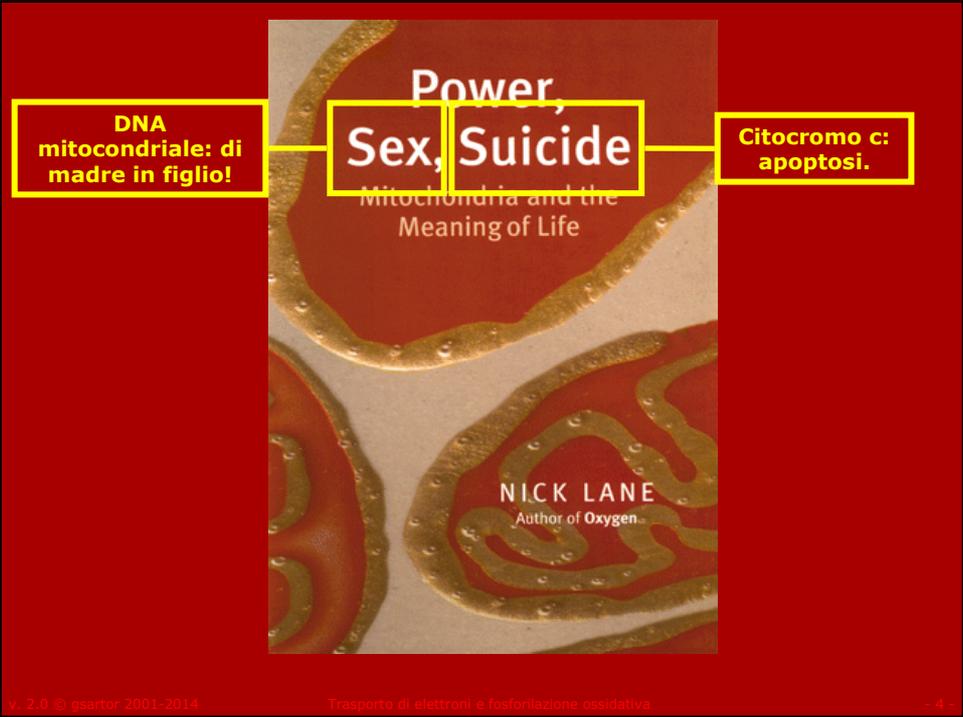
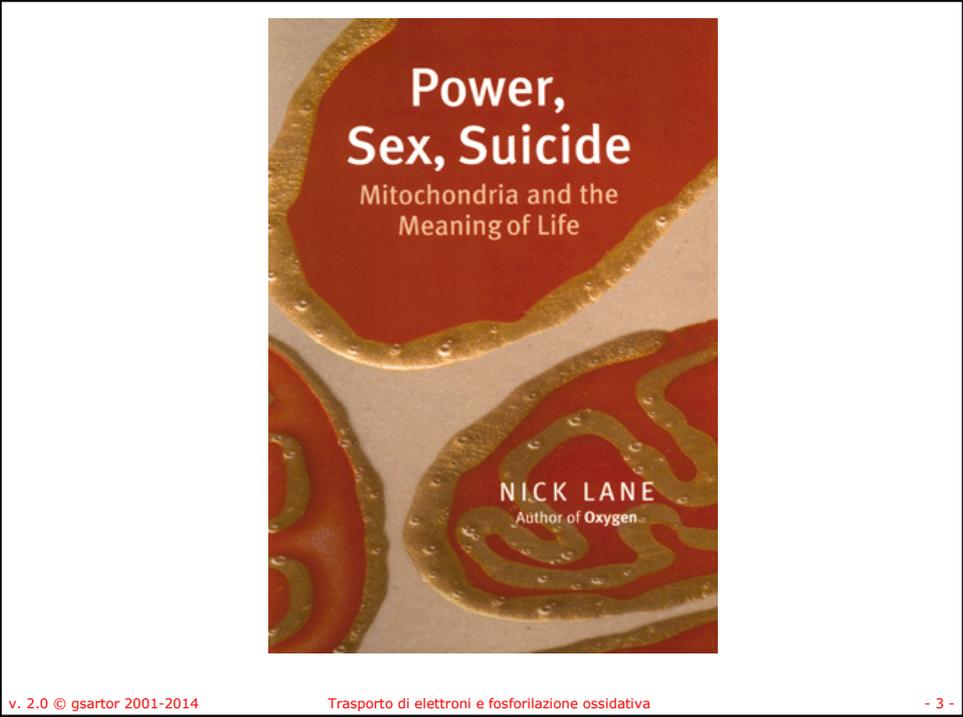
Prof. Giorgio Sartor

# Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa

Copyright © 2001-2014 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

B10 - v. 2.0 - 25/03/2014





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

NICK LANE  
Author of *Oxygen*

Respirazione cellulare e produzione di ATP.

v. 2.0 © gsartor 2001-2014      Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa      - 5 -

## Simbiosi!

nature      Vol 446 | March 2007 | doi:10.1038/nature05572

LETTERS

**Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum***

Heather J. Painter<sup>1</sup>, Joanne M. Morrissey<sup>1</sup>, Michael W. Mather<sup>1</sup> & Akhil B. Vaidya<sup>1</sup>

↓

The origin of all mitochondria can be traced to the symbiotic arrangement that resulted in the emergence of eukaryotes in a world that was exclusively populated by prokaryotes<sup>1-3</sup>.

hypothesis

**The hydrogen hypothesis for the first eukaryote**

William Martin<sup>\*</sup> & Miklós Müller<sup>†</sup>

<sup>\*</sup> Institut für Genetik, Technische Universität Braunschweig, Spielmannstrasse 7, D-38023 Braunschweig, Germany  
<sup>†</sup> The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, New York 10021, USA

A new hypothesis for the origin of eukaryotic cells is proposed, based on the comparative biochemistry of energy metabolism. Eukaryotes are suggested to have arisen through symbiotic association of an anaerobic, strictly hydrogen-dependent, strictly autotrophic archaeobacterium (the host) with a eubacterium (the symbiont) that was able to respire, but generated molecular hydrogen as a waste product of anaerobic heterotrophic metabolism. The host's dependence upon molecular hydrogen produced by the symbiont is put forward as the selective principle that forged the common ancestor of eukaryotic cells.

v. 2.0 © gsartor 2001-2014      Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa      - 6 -

# Simbiosi?

Vol 440|30 March 2006|doi:10.1038/nature04546

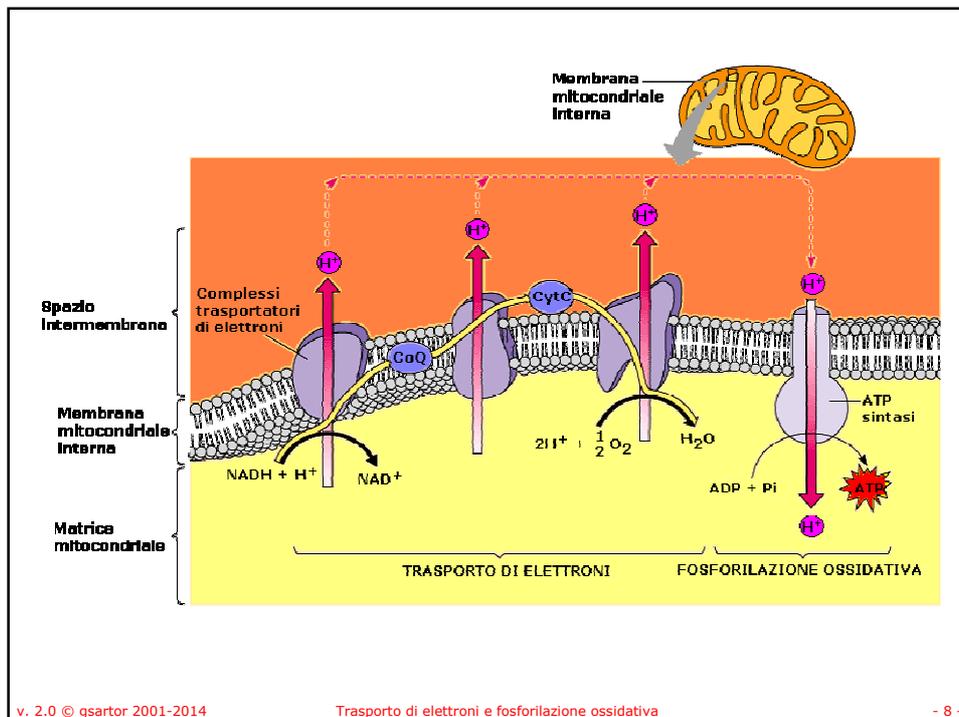
nature

## REVIEWS

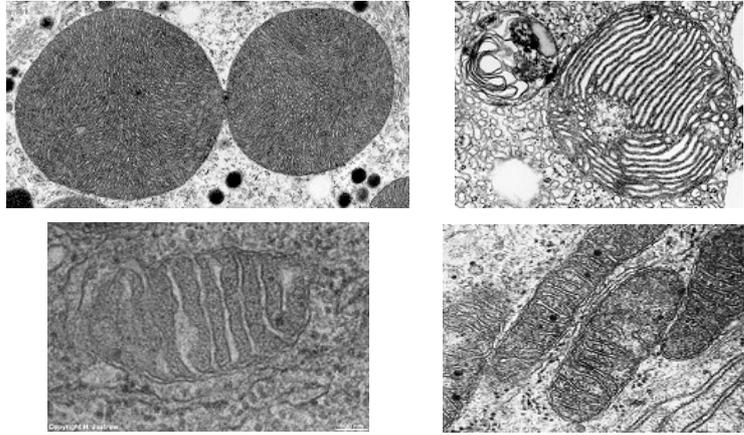
### Eukaryotic evolution, changes and challenges

T. Martin Embley<sup>1</sup> & William Martin<sup>2</sup>

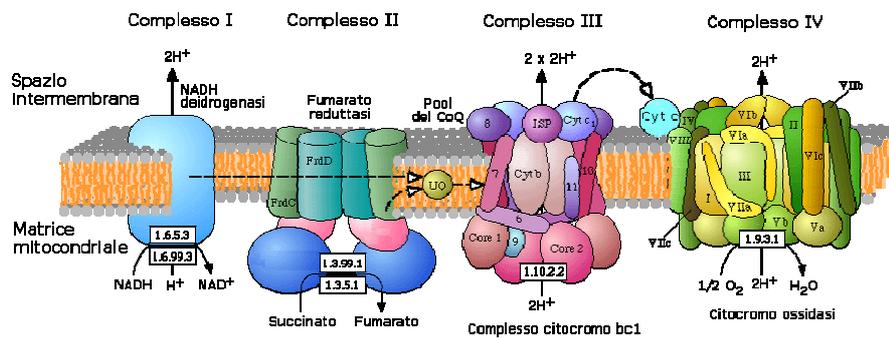
The idea that some eukaryotes primitively lacked mitochondria and were true intermediates in the prokaryote-to-eukaryote transition was an exciting prospect. It spawned major advances in understanding anaerobic and parasitic eukaryotes and those with previously overlooked mitochondria. But the evolutionary gap between prokaryotes and eukaryotes is now deeper, and the nature of the host that acquired the mitochondrion more obscure, than ever before



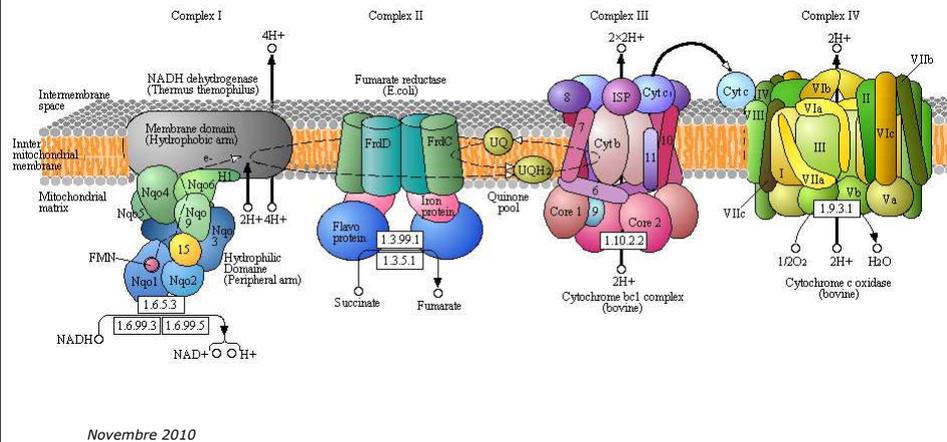
# I mitocondri



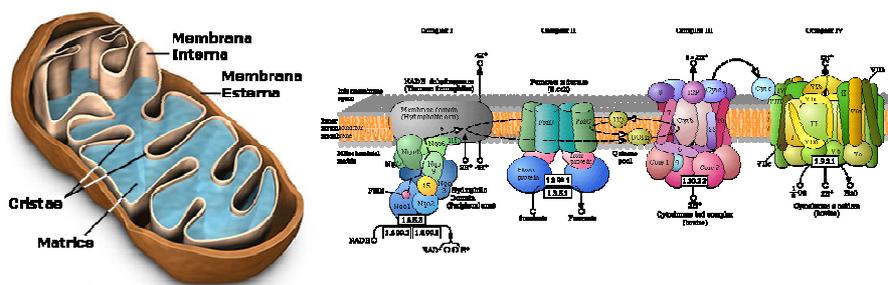
# La catena respiratoria



## La catena respiratoria



## 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.



The diagram illustrates the electron transport chain in the mitochondrial membrane. It shows four complexes: Complex I (NADH dehydrogenase), Complex II (Fumarate reductase), Complex III (Cytochrome bc1 complex), and Complex IV (Cytochrome c oxidase). Electrons from NADH enter at Complex I, pass through FMN, iron-sulfur clusters, and heme b groups, then to ubiquinone (Q) and ubiquinol (QH2). From there, they move to Complex II, then to ubiquinone (Q), then to cytochrome c (Cyt c), and finally to Complex III. From Complex III, electrons go to ubiquinol (QH2) and then to Complex IV. Protons (H+) are pumped from the matrix to the intermembrane space at each complex. The diagram also shows the membrane structure with intermembrane space, inner mitochondrial membrane, and matrix.

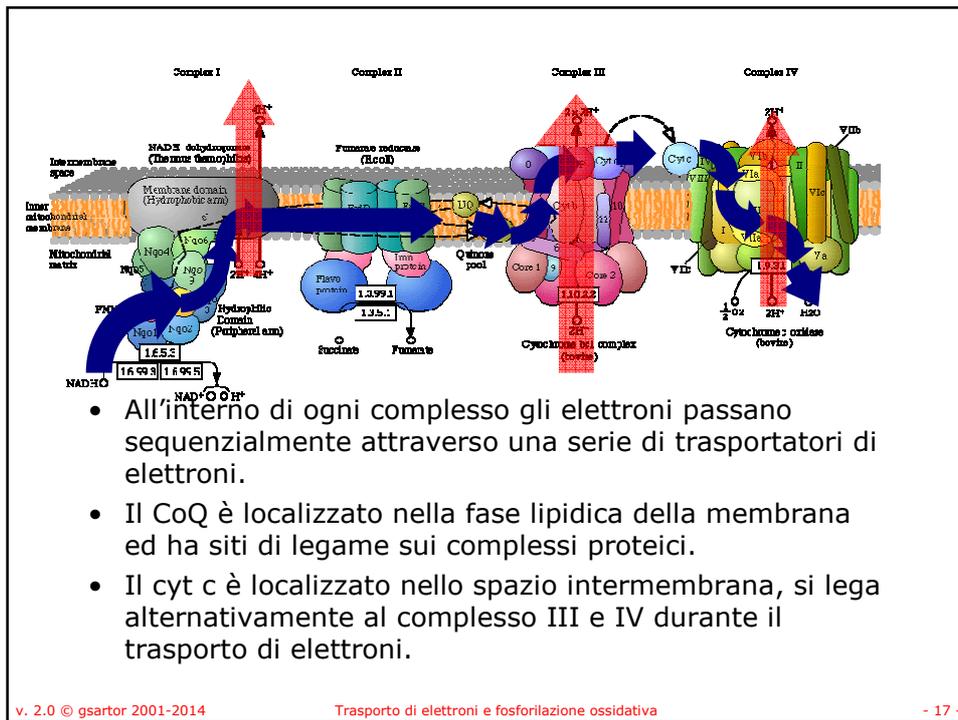
- All'interno di ogni complesso gli elettroni passano sequenzialmente attraverso una serie di trasportatori di elettroni.
- Il CoQ è localizzato nella fase lipidica della membrana ed ha siti di legame sui complessi proteici.
- Il cyt c è localizzato nello spazio intermembrana, si lega alternativamente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

v. 2.0 © gsartor 2001-2014 Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa - 15 -

This diagram is identical to the one above, but with blue arrows highlighting the path of electron flow. The arrows start at NADH, go through Complex I, then to ubiquinone (Q), then to Complex II, then to cytochrome c (Cyt c), then to Complex III, then to ubiquinol (QH2), and finally to Complex IV. The arrows also show the pumping of protons (H+) across the membrane at each complex.

- 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.

v. 2.0 © gsartor 2001-2014 Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa - 16 -

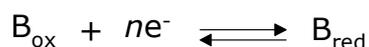


## Trasporto di elettroni

- In una reazione di ossidoriduzione

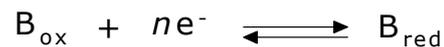
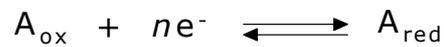


- $A_{\text{ox}}$  è la forma ossidata di A (ossidante)
- $B_{\text{red}}$  è la forma ridotta di B (riducente).
- Per questo trasferimento di elettroni si possono considerare le reazioni di semicella:



## Trasporto di elettroni

- Per ogni semireazione vale



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

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

## Trasporto di elettroni

- Per un trasferimento di elettroni:

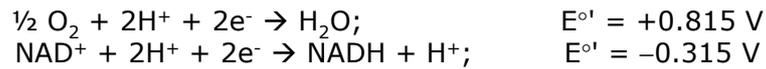
$$\Delta E^\circ = E^\circ_{(\text{ossidante})} - E^\circ_{(\text{riducente})} = E^\circ_{(\text{accettore})} - E^\circ_{(\text{donatore})}$$

$$\Delta G^\circ = -nF \Delta E^\circ$$

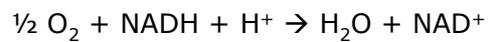
- Un trasferimento di elettroni è spontaneo ( $\Delta G$  negativo) se il potenziale ( $E^\circ$ ) del donatore è più negativo del potenziale ( $E^\circ$ ) dell'accettore.
- Se  $\Delta E^\circ$  è positivo la reazione è spontanea.

## Trasporto di elettroni

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



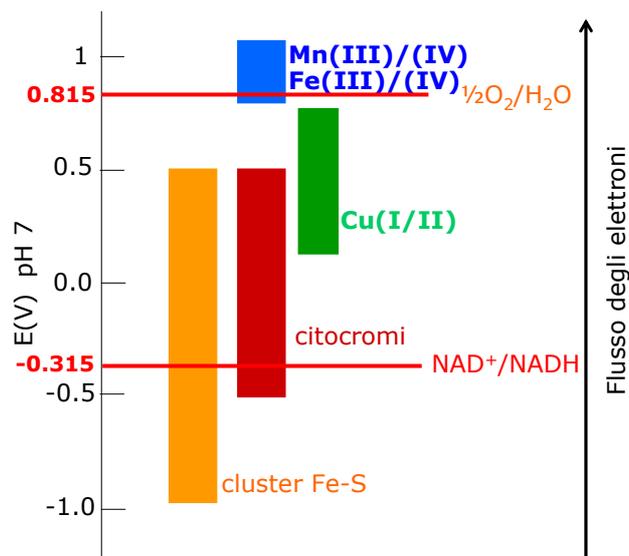
- Sottraendo la seconda dalla prima:



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

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

## Potenziale



## Personaggi ed interpreti

- I trasportatori di elettroni:
  - Nucleotidi:
    - NAD<sup>+</sup>/NADH,
    - FAD/FADH<sup>+</sup>/FADH<sub>2</sub>,
    - FMN/FMNH<sup>+</sup>/FMNH<sub>2</sub>
  - Trasportatori mobili:
    - Coenzima Q,
    - Citocromo c
  - Composti ionici:
    - Fe<sup>+++</sup>/Fe<sup>++</sup> nei:
      - citocromi a, b, c e
      - nei centri ferro-zolfo

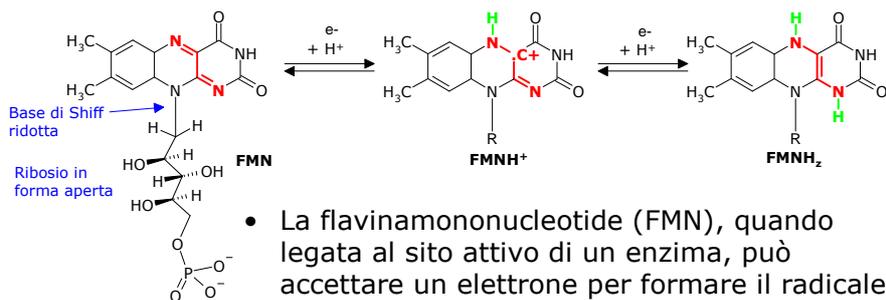
## Personaggi:

- 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

## Trasportatori di elettroni

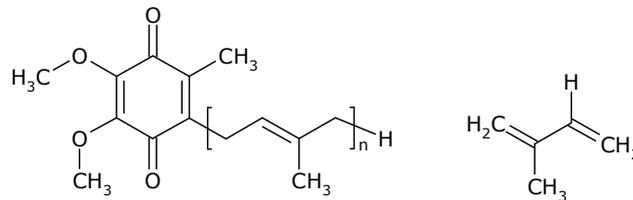
- Delle coppie  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  abbiamo già visto.
- FMN (Flavin MonoNucleotide) è il gruppo prostetico di alcune flavo proteine.
- La struttura è simile al FAD, ma manca la parte adeninucleotidica.
- In soluzione il FMN (come il FAD) può accettare due elettroni e due  $\text{H}^+$  per formare  $\text{FMNH}_2$ .

## Trasportatori di elettroni: FMN



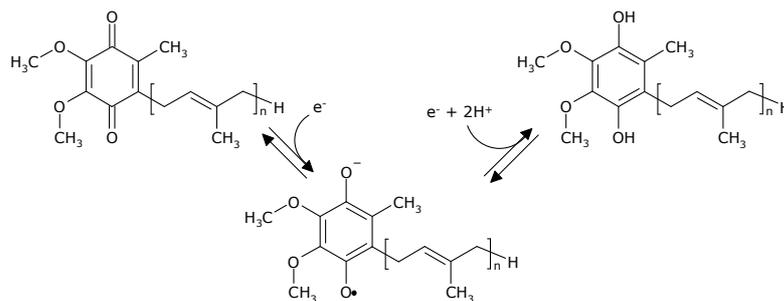
- La flavinamnonucleotide (FMN), quando legata al sito attivo di un enzima, può accettare un elettrone per formare il radicale semichinonico. Il semichinone può accettare un secondo elettrone per formare  $\text{FMNH}_2$ .
- Poiché può accettare o donare uno o due elettroni, FMN ha un ruolo importante per trasferire elettroni tra trasportatori che portano due elettroni ( $\text{NADH}$ ) e quelli che ne possono accettare uno solo ( $\text{Fe}^{+++}$ ).

## 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.

## Trasportatori di elettroni: Coenzima Q



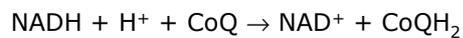
- Quando è legato al proprio sito il CoQ può accettare un  $e^-$  per formare un radicale semichinone ( $Q^{\cdot-}$ ).
- Quindi il CoQ, come FMN, può trasferire uno o due  $e^-$  fra donatori e accettori.
- Il CoQ funziona come un trasportatore mobile di  $e^-$  all'interno della membrana interna mitocondriale.

## I complessi

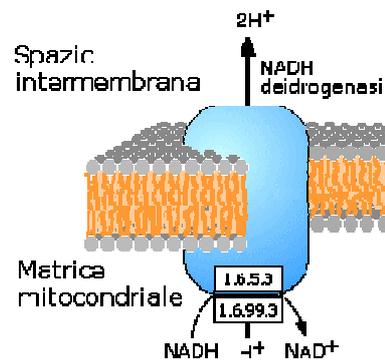
Complesso	Nome	Numero di subunità	Gruppi prostetici
<b>I</b> (EC 1.6.5.3)	<b>NADH deidrogenasi</b> o <b>NADH-CoQ ossidoreduttasi</b>	<b>46</b>	<b>FMN,</b> <b>7 Fe-S</b>
II (EC 1.3.5.1)	Succinato-CoQ reduttasi	5	FAD, cyt b <sub>560</sub> , 3 Fe-S
III (EC 1.10.2.2)	CoQ-cyt c ossidoreduttasi	11	cyt b <sub>H</sub> , cyt b <sub>L</sub> , cyt c1, Fe-S <sub>Rieske</sub>
IV (EC 1.9.3.1)	Citocromo ossidasi	13	cyt a, cyt a <sub>3</sub> , Cu <sub>A</sub> , Cu <sub>B</sub>

## Complesso I

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

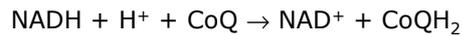


- La struttura ad alta risoluzione non è ancora disponibile, si ha una struttura al microscopio elettronico.
- Il complesso ha forma di L.

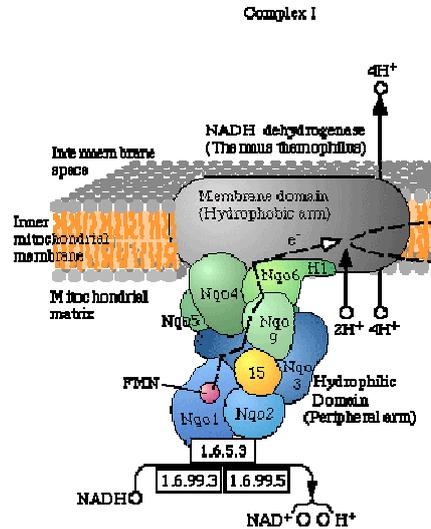


## Complesso I

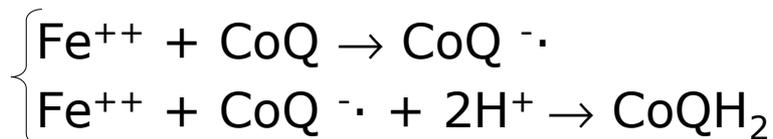
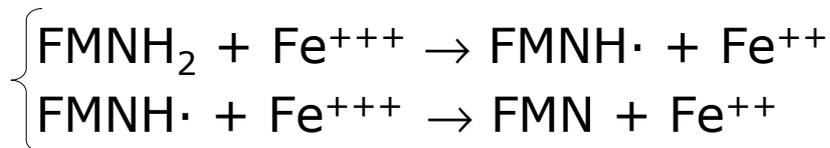
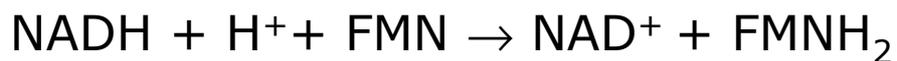
- Il Complesso I catalizza l'ossidazione del NADH con riduzione del CoQ:



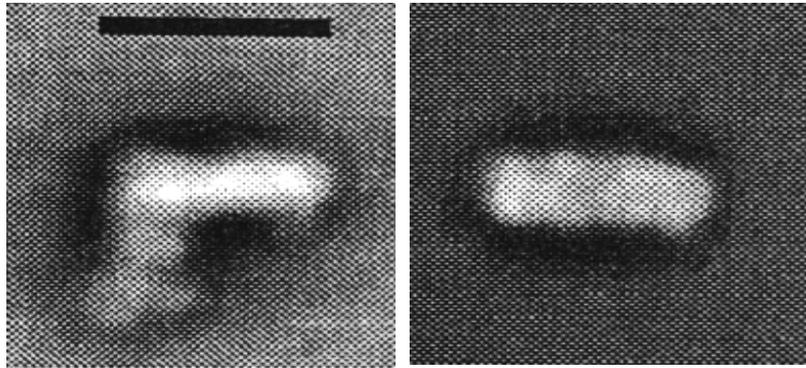
- La struttura ad alta risoluzione non è ancora disponibile, si ha una struttura al microscopio elettronico.
- Il complesso ha forma di L.



## Complesso I

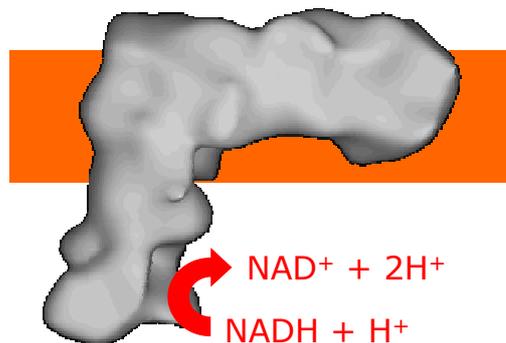


## Complesso I

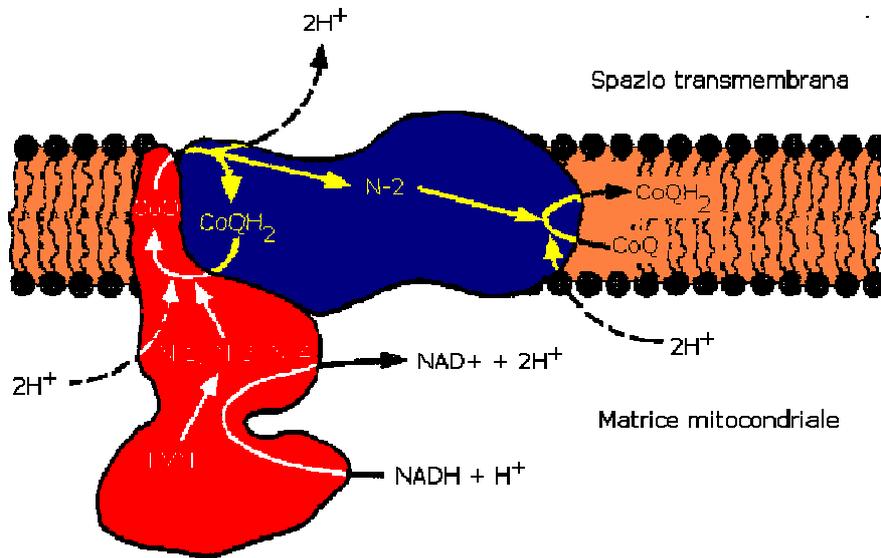


## Complesso I

- 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.



## Complesso I



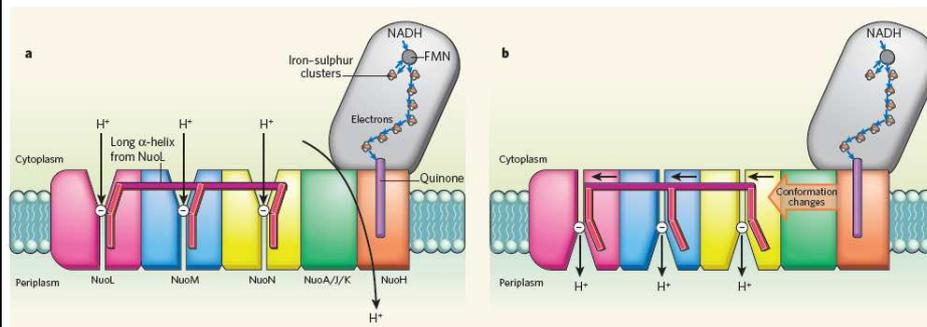
v. 2.0 © gsartor 2001-2014

Trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa

- 35 -

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 structures<sup>1</sup> of bacterial complex I reveal that the transmembrane Nuol subunit of the enzyme projects a long  $\alpha$ -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 subunits push the long  $\alpha$ -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).

## The architecture of respiratory complex I

Rouslan G. Efremov\*, Rozbeh Baradaran\* & Leonid A. Sazanov

- 36 -

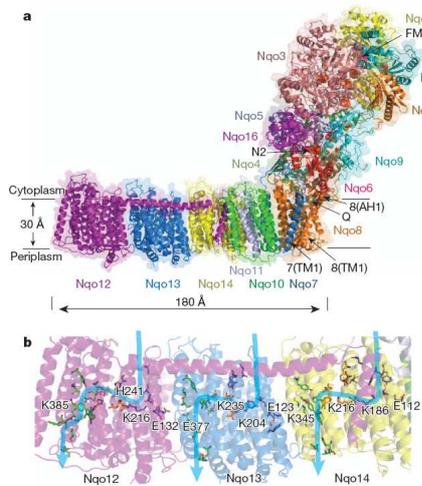


Figure 1 | Structure of the entire complex I from *T. thermophilus*.

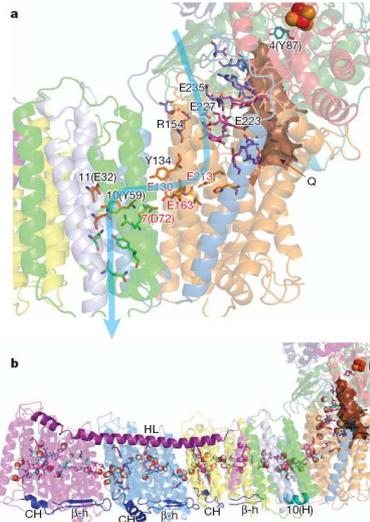


Figure 3 | E-channel and central hydrophilic axis.

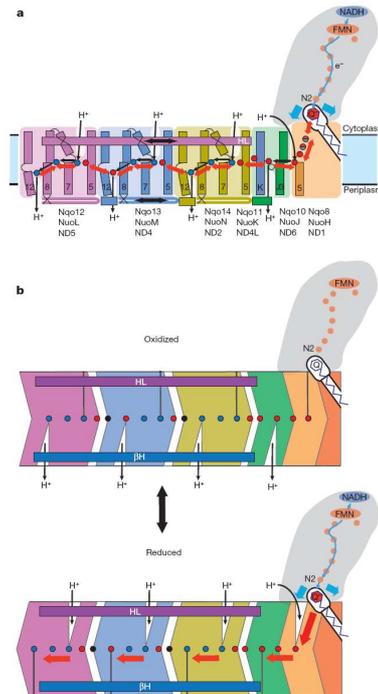
# Crystal structure of the entire respiratory complex I

Rozbeh Baradaran<sup>1</sup>, John M. Berrisford<sup>1,†</sup>, Gurdeep S. Minhas<sup>1</sup> & Leonid A. Sazanov<sup>1</sup>  
 444 | NATURE | VOL 494 | 28 FEBRUARY 2013

v. 2.0 © gsartor 2001-2014

Trasporto di elettroni e tossificazione ossidativa

- 37 -



v. 2.0 © gsartor 2001-2014

- 38 -

## Complesso I

- Ossidazione del NADH

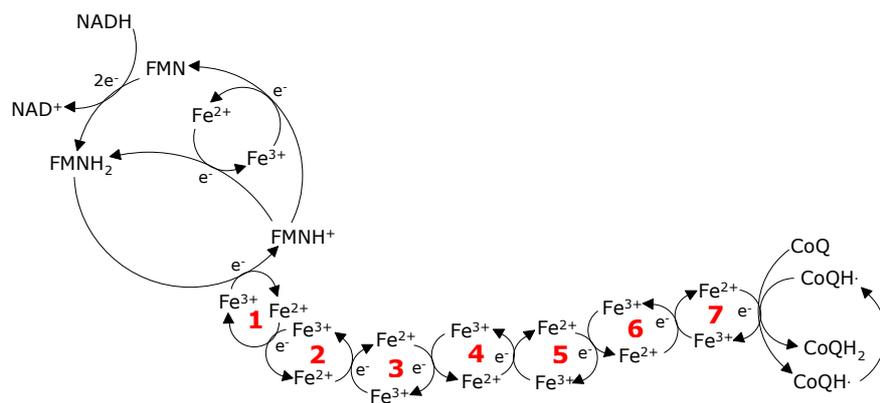


- Dopo che il centro Fe-S è riossidato per trasferimento di un elettrone al successivo, può accettare il secondo elettrone dal FMNH·

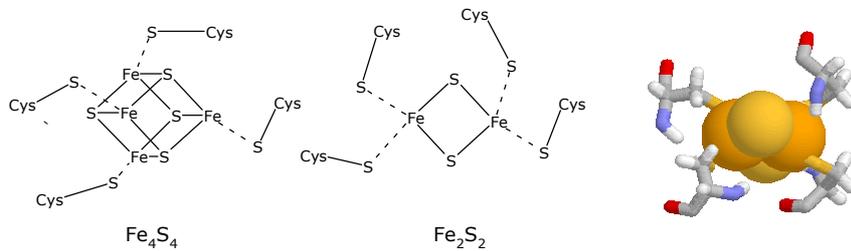


- Gli elettroni passano da una serie di sette centri Fe-S fino al CoQ
- Il CoQ accetta 2 e<sup>-</sup>, uno alla volta, e preleva 2 H<sup>+</sup> per formare il CoQH<sub>2</sub> completamente ridotto.

## Complesso I – ossidazione del NADH

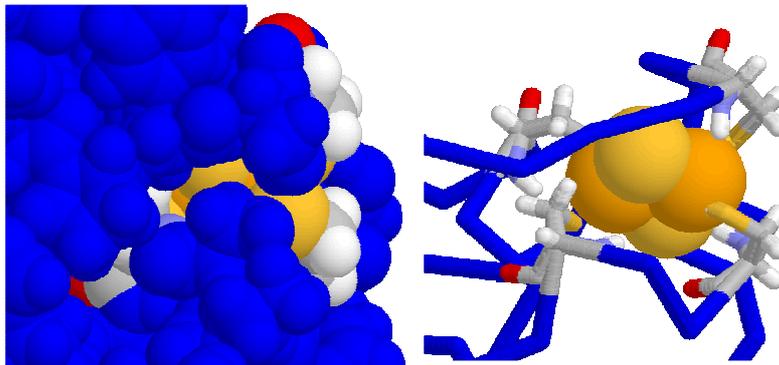


## Trasportatori di elettroni: i centri Fe-S



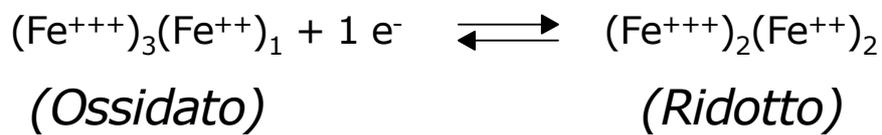
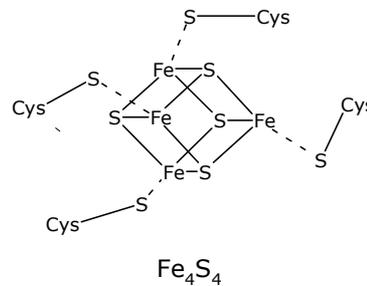
- I centri ferro-zolfo (Fe-S) sono gruppi prostetici che contengono ione Fe (da uno a quattro) complessati con atomi di zolfo elementare o di Cys.
- Le proteine trasportatrici di elettroni possono contenere più centri Fe-S.

## Trasportatori di elettroni: i centri Fe-S

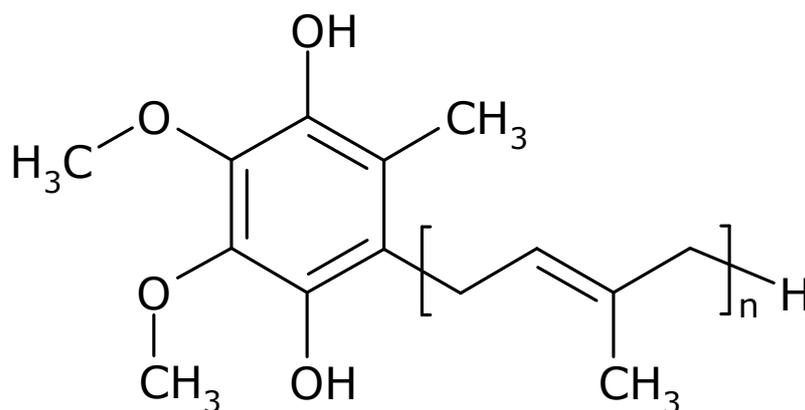


## Trasportatori di elettroni: i centri Fe-S

- 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.



## CoQH<sub>2</sub>

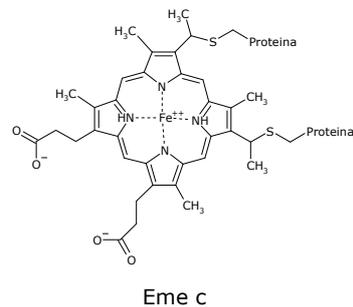


## I complessi

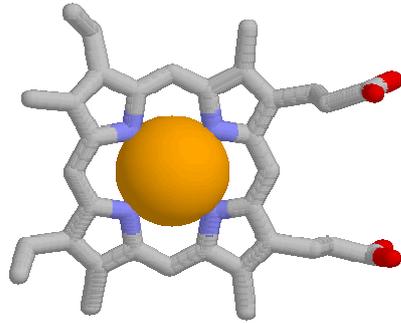
Complesso	Nome	Numero di subunità	Gruppi prostetici
I (EC 1.6.5.3)	NADH deidrogenasi o NADH-CoQ ossidoreduttasi	46	FMN, 7 Fe-S
<b>II (EC 1.3.5.1)</b>	<b>Succinato-CoQ reduttasi</b>	<b>5</b>	<b>FAD, cyt b<sub>560</sub>, 3 Fe-S</b>
III (EC 1.10.2.2)	CoQ-cyt c ossidoreduttasi	11	cyt b <sub>H</sub> , cyt b <sub>L</sub> , cyt c1, Fe-S <sub>Rieske</sub>
IV (EC 1.9.3.1)	Citocromo ossidasi	13	cyt a, cyt a <sub>3</sub> , Cu <sub>A</sub> , Cu <sub>B</sub>

## 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.



## Trasportatori di elettroni: gruppo Eme

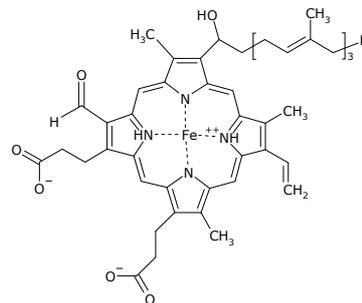


- Lo ione Ferro nel gruppo eme può subire reazioni di ossidoriduzioni con un elettrone tra lo stato ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ) e ferrico ( $\text{Fe}^{+++}$ ):



## Trasportatori di elettroni: Gruppo Eme a

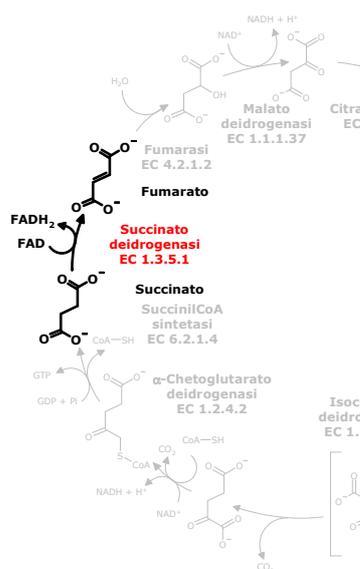
- Il gruppo eme a possiede una catena farnesilica (tre unità isoprenoidi) che ne conferiscono una certa idrofobicità.



## Complesso II

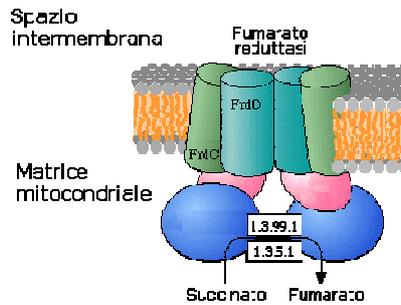
- L'intruso

## Complesso II



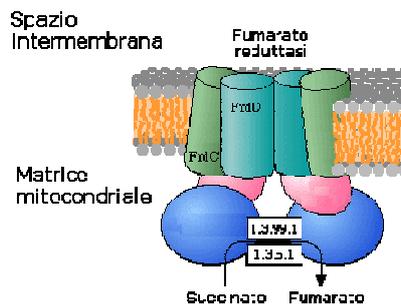
- La succinato deidrogenasi del ciclo di Krebs è anche chiamata complesso II o succinato-CoQ reduttasi.
- Il FAD è il recettore iniziale degli elettroni,
- è ridotto a FADH<sub>2</sub> durante l'ossidazione del succinato a fumarato.
- Il FADH<sub>2</sub> è quindi riossidato per trasferimento di elettroni ad una serie di centri Fe-S fino al CoQ per produrre CoQH<sub>2</sub>.

## Complesso II

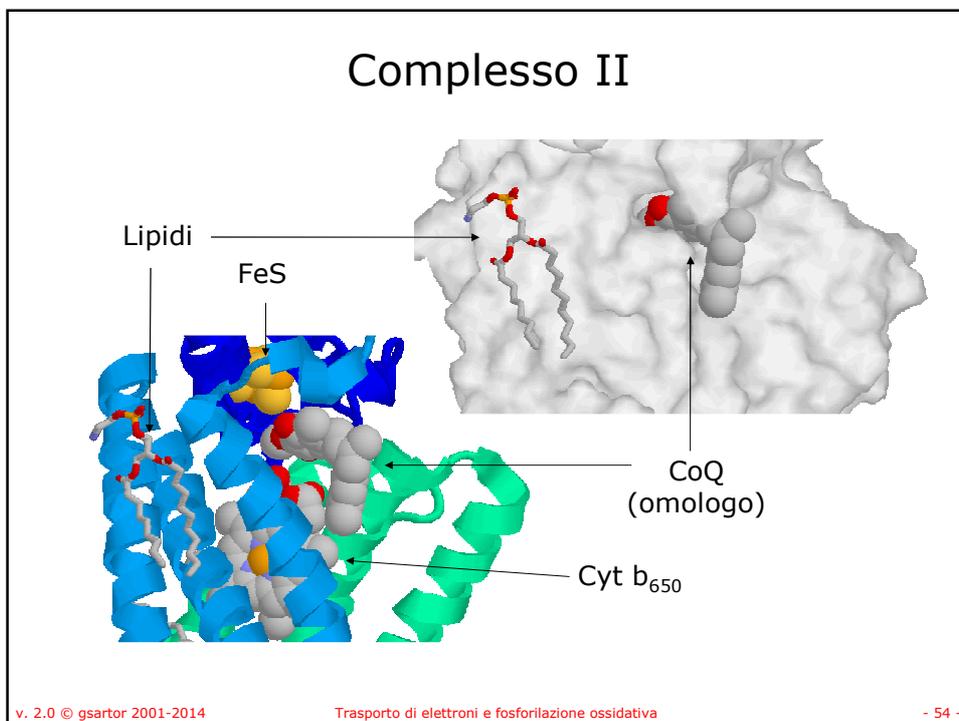
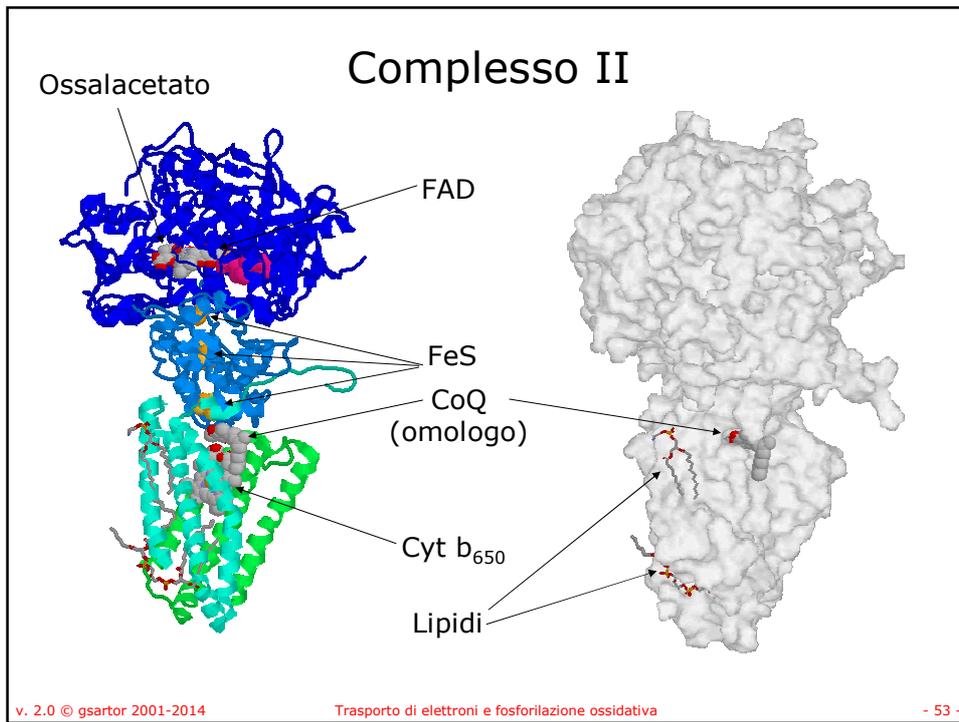


- La succinato deidrogenasi (fumarato reduttasi) del ciclo di Krebs è anche chiamata complesso II o succinato-CoQ reduttasi.
- Il FAD è l'accettore iniziale degli elettroni,
- è ridotto a  $\text{FADH}_2$  durante l'ossidazione del succinato a fumarato.

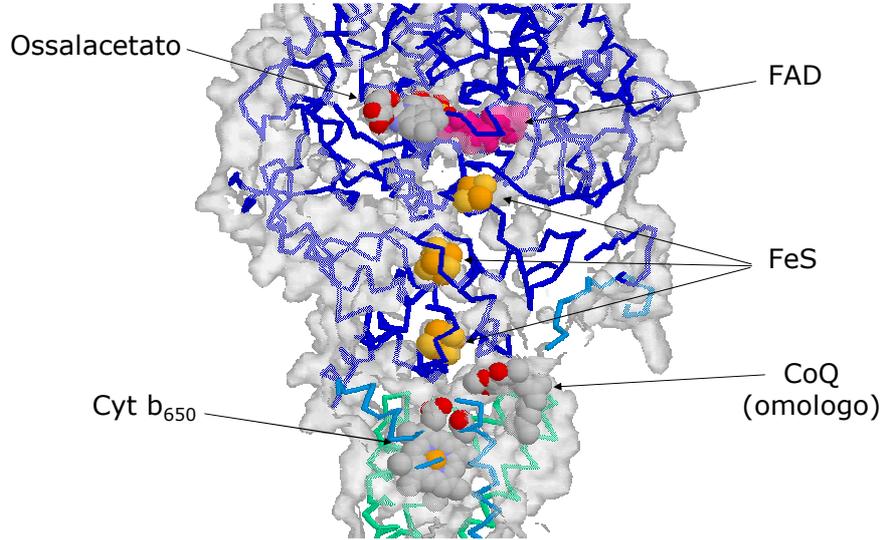
## Complesso II



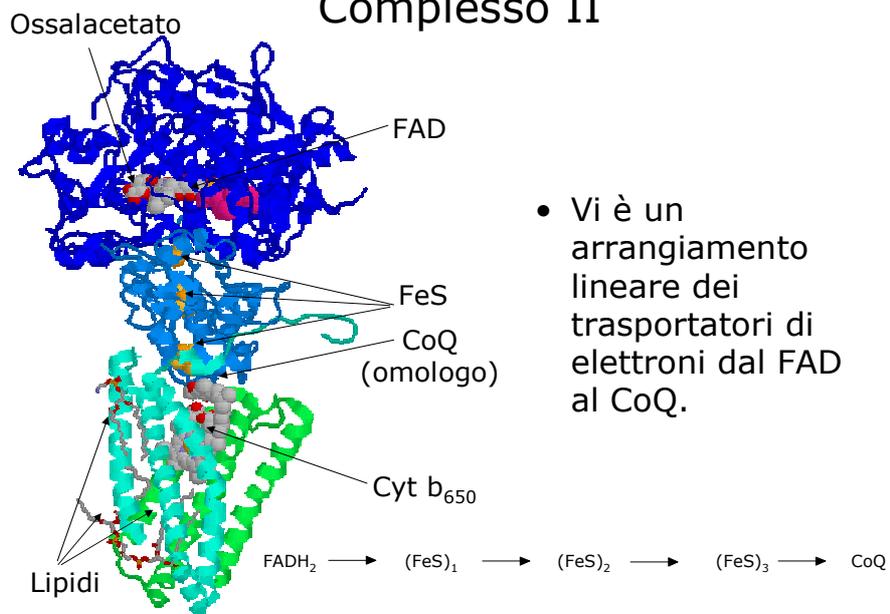
- Il  $\text{FADH}_2$  è quindi riossidato per trasferimento di elettroni ad una serie di centri Fe-S fino al CoQ per produrre  $\text{CoQH}_2$ .
- Contrariamente agli altri tre complessi della catena respiratoria il complesso II NON trasporta  $\text{H}^+$  tra la matrice e lo spazio intermembrana.



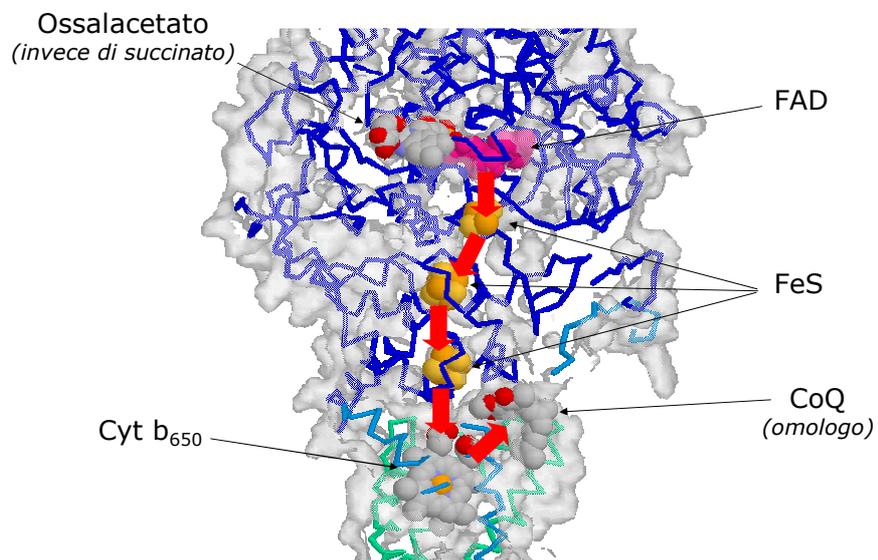
## Complesso II



## Complesso II



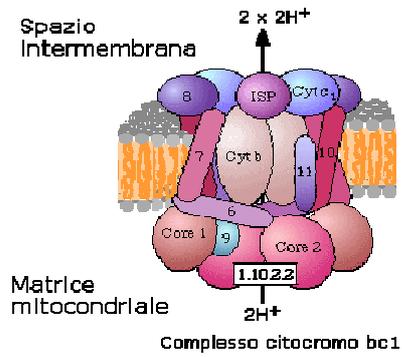
## Complesso II



## I complessi

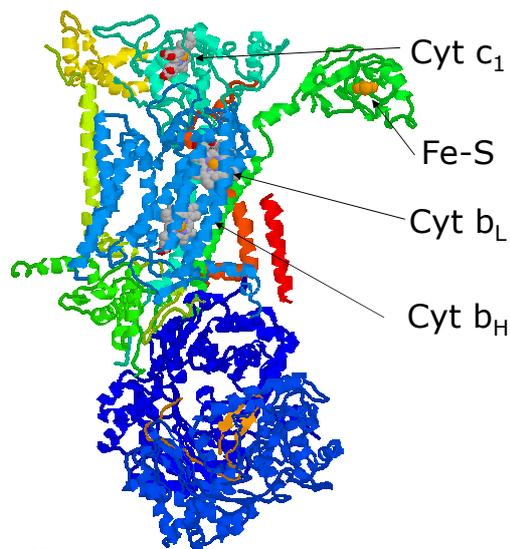
Complesso	Nome	Numero di subunità	Gruppi prostetici
I (EC 1.6.5.3)	NADH deidrogenasi o NADH-CoQ ossidoreduttasi	46	FMN, 7 Fe-S
II (EC 1.3.5.1)	Succinato-CoQ reduttasi	5	FAD, cyt b <sub>560r</sub> , 3 Fe-S
<b>III</b> (EC 1.10.2.2)	<b>CoQ-cyt c ossidoreduttasi</b>	<b>11</b>	<b>cyt b<sub>Hr</sub>, cyt b<sub>Lr</sub>, cyt c1, Fe-S<sub>Rieske</sub></b>
IV (EC 1.9.3.1)	Citocromo ossidasi	13	cyt a, cyt a <sub>3</sub> , Cu <sub>A</sub> , Cu <sub>B</sub>

## Complesso III



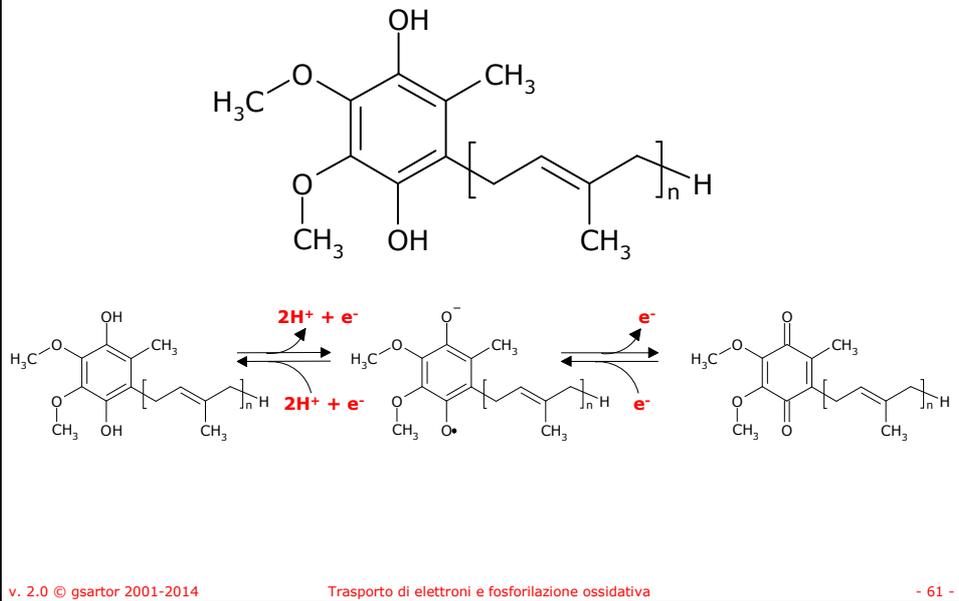
- Complesso citocromo  $bc_1$
- Il complesso III accetta elettroni dal  $CoQH_2$  generato a livello dei complessi I e II.
- Il trasporto dei  $H^+$  nel complesso III coinvolge il CoQ.

## Complesso III

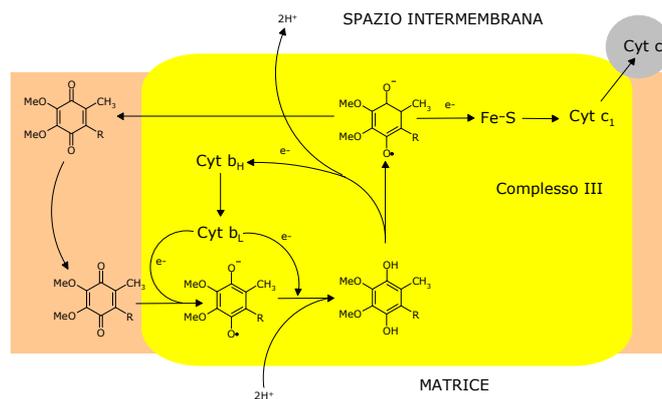


- Ha:
  - un sito di legame del  $CoQH_2$
  - un sito di legame del CoQ
- Gruppi prostetici:
  - Una coppia di citocromi b (cit  $b_H$  e cit  $b_L$ )
  - Un citocromo c (cit  $c_1$ )
  - Un centro Ferro Zolfo ( $Fe_2S_2$ )

1BCC



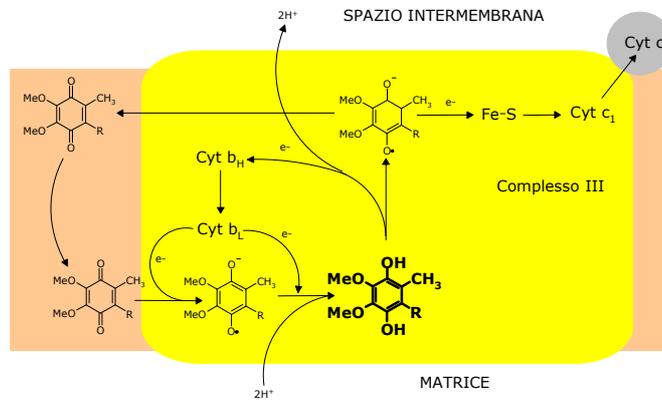
## Q cycle



- Il "Q cycle" è il meccanismo con il quale avviene la ossidoriduzione del CoQ e dipende da:
  - La mobilità del CoQ nella membrana
  - L'esistenza di un sito di legame che stabilizza il radicale semichinonico CoQ<sup>•-</sup>.

## Q cycle

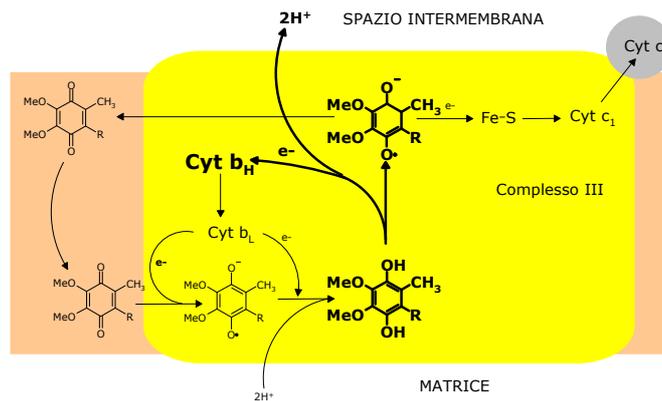
1



- Il CoQH<sub>2</sub> è legato al proprio sito nella proteina.

## Q cycle

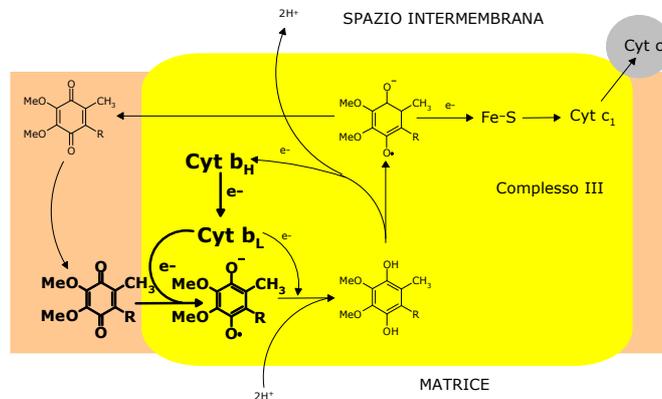
2



- Il CoQH<sub>2</sub> cede un e<sup>-</sup> al Fe<sup>+++</sup> dell'eme b<sub>L</sub>
- Si forma il semichinone carico negativamente
- 2 H<sup>+</sup> sono rilasciati nello spazio intermembrana.

## Q cycle

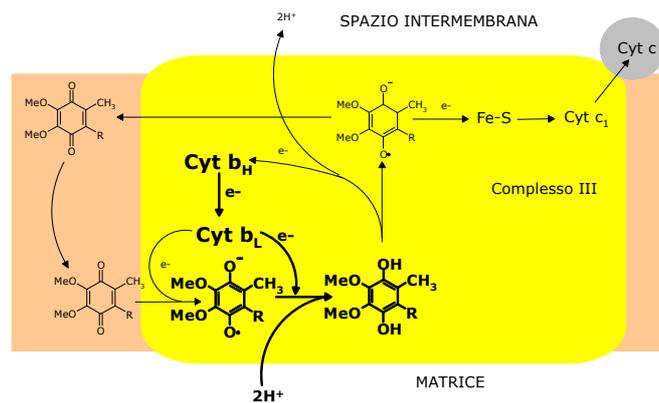
3a



- Un  $e^-$  passa dal  $Fe^{++}$  del gruppo eme  $b_H$  al  $Fe^{+++}$  del gruppo eme  $b_L$ .
- L'  $e^-$  va quindi a ridurre un CoQ ossidato (proveniente dal pool dei chinoni) a semichinone

## Q cycle

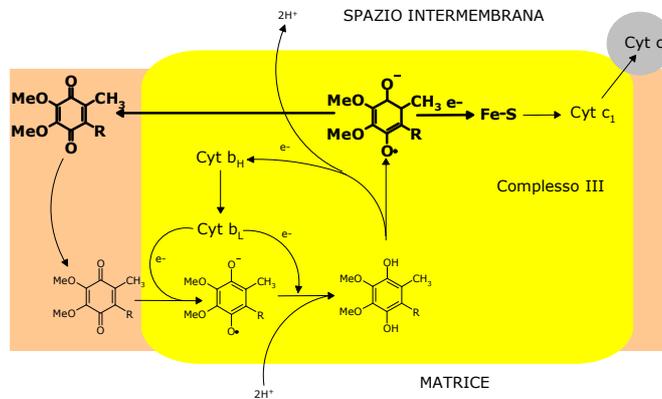
3b



- Un  $e^-$  passa dal  $Fe^{++}$  del gruppo eme  $b_H$  al  $Fe^{+++}$  del gruppo eme  $b_L$ .
- In alternativa (secondo le necessità) l'  $e^-$  va quindi a ridurre un  $CoQ^-$  per riformare il  $CoQH_2$  con due  $H^+$  provenienti dalla matrice.

## Q cycle

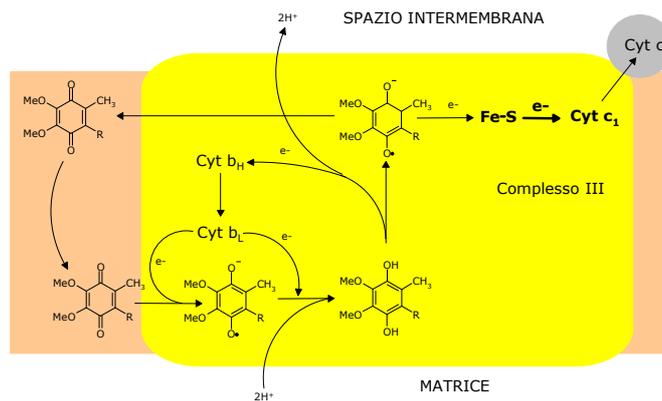
4



- Il  $\text{CoQ}^{\cdot-}$ , formato per semiossidazione al passo 2, cede un  $e^-$  al  $\text{Fe}^{+++}$  del complesso Fe-S.
- Si forma il  $\text{CoQ}$  ossidato che va a confluire nel pool.

## Q cycle

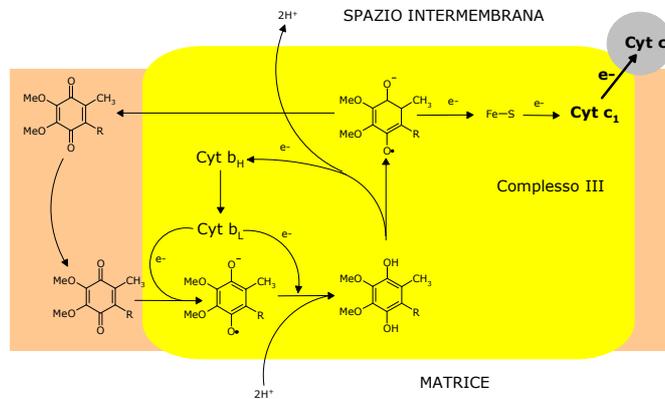
5



- Il  $\text{Fe}^{++}$  del complesso Fe-S cede un  $e^-$  al  $\text{Fe}^{+++}$  del  $\text{Cyt } c_1$  legato alla proteina.

## Q cycle

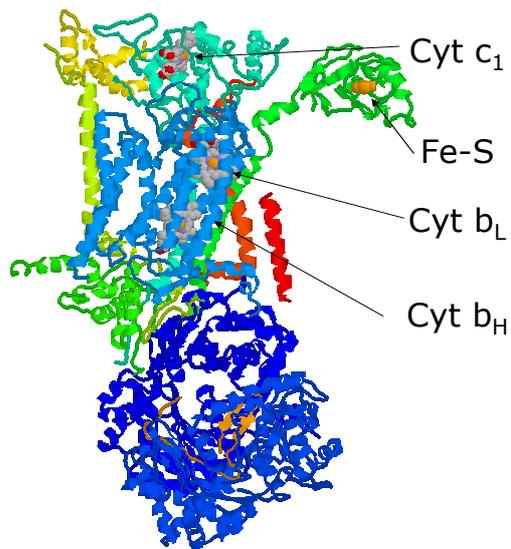
6



- Il Fe<sup>++</sup> del cit c<sub>1</sub> legato alla proteina cede un e<sup>-</sup> al Fe<sup>+++</sup> del cit c mobile.

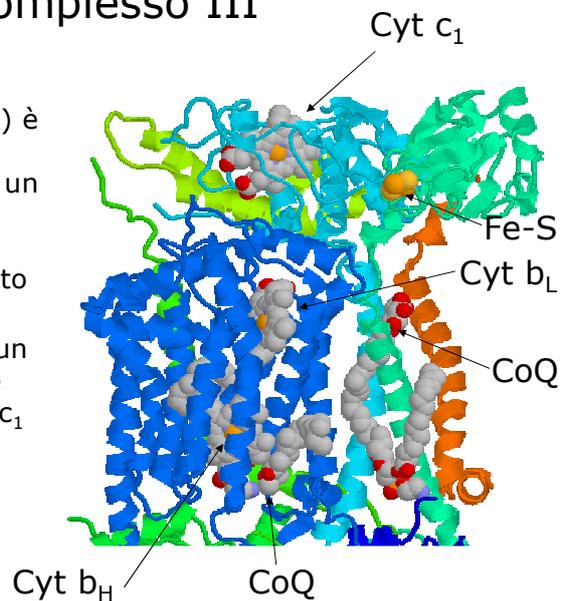
## Complesso III

- 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<sup>-</sup> dal CoQ<sup>•-</sup>, si muove vicino al gruppo eme c<sub>1</sub> al quale trasferisce l'elettrone.



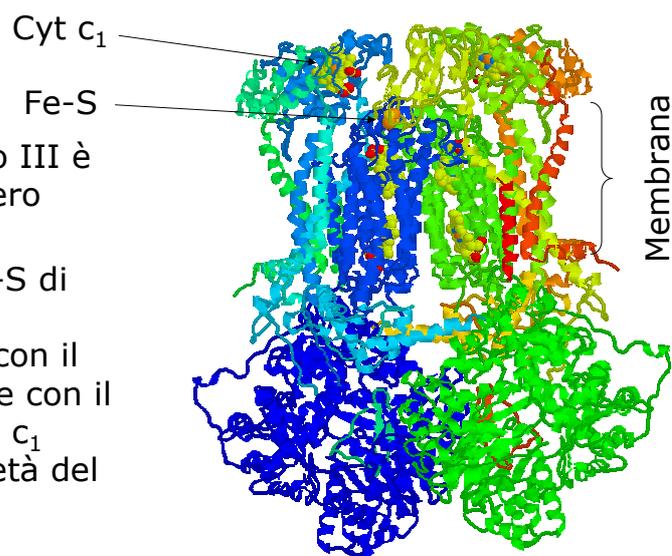
## Complesso III

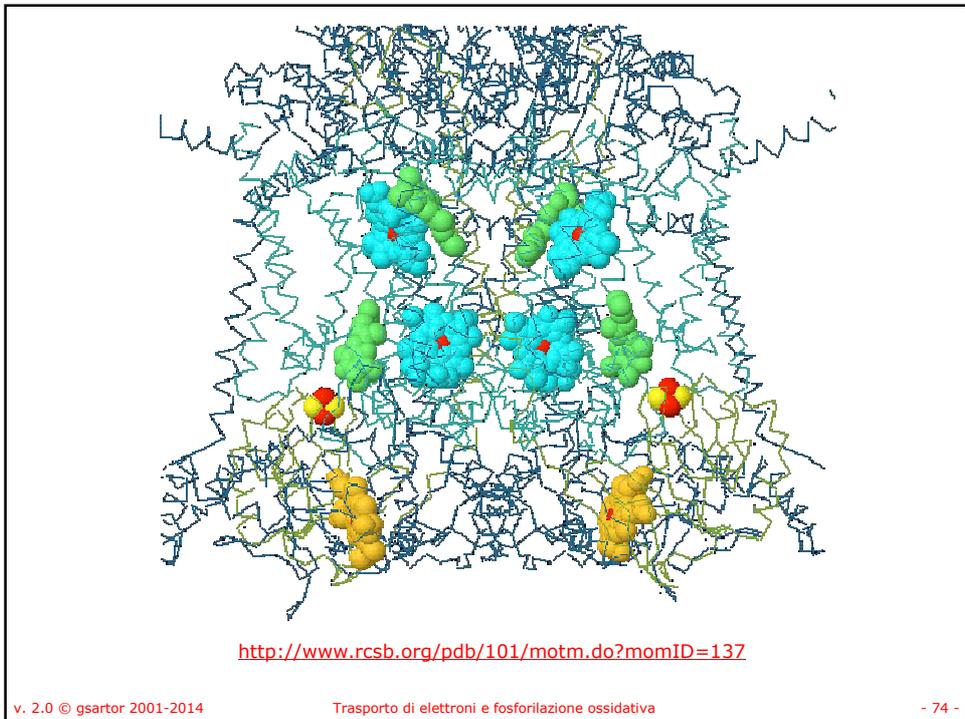
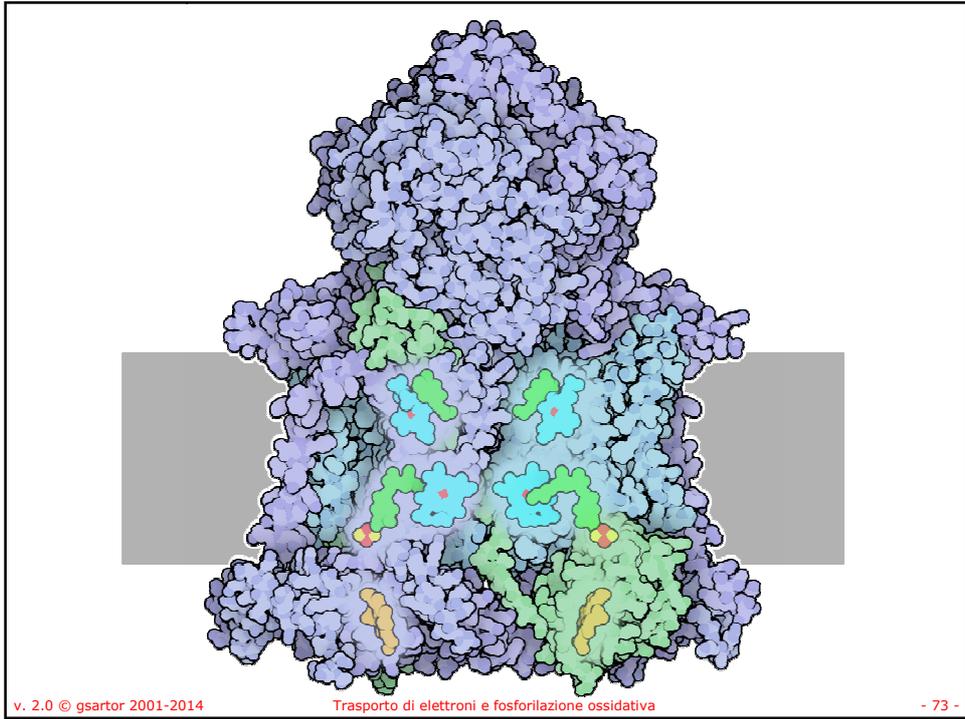
- Il centro Fe-S (Rieske) è legato al resto del complesso attraverso un braccio flessibile che cambia di posizione durante il trasferimento di elettroni.
- Il centro Fe-S estrae un  $e^-$  dal  $\text{CoQ}^{\cdot-}$ , si muove vicino al gruppo eme  $c_1$  al quale trasferisce l'elettrone.



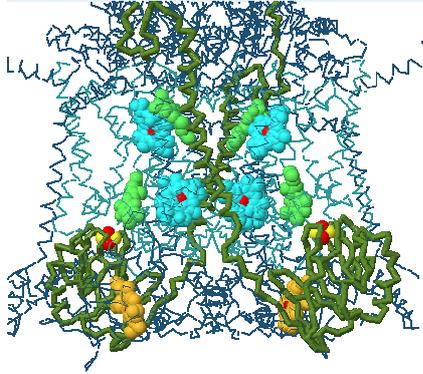
## Complesso III

- 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.



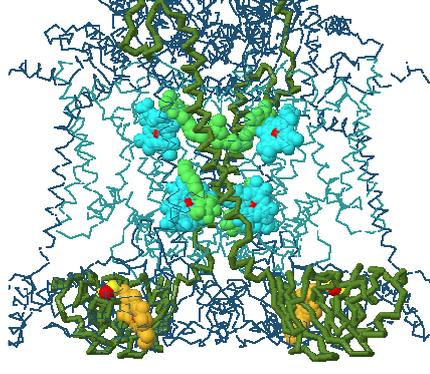


1



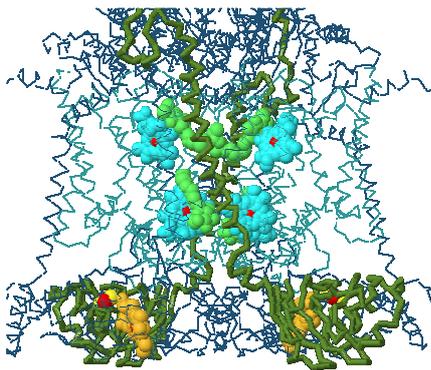
Complesso bc<sub>1</sub> bovino  
(ubichinolo legato)  
(1NTZ)

2



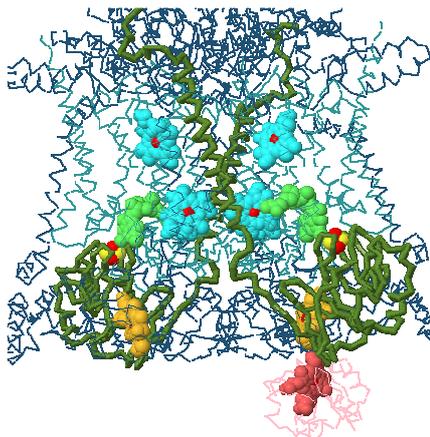
Complesso bc<sub>1</sub> pollo  
(dominio Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> spostato)  
(1KY0)

2



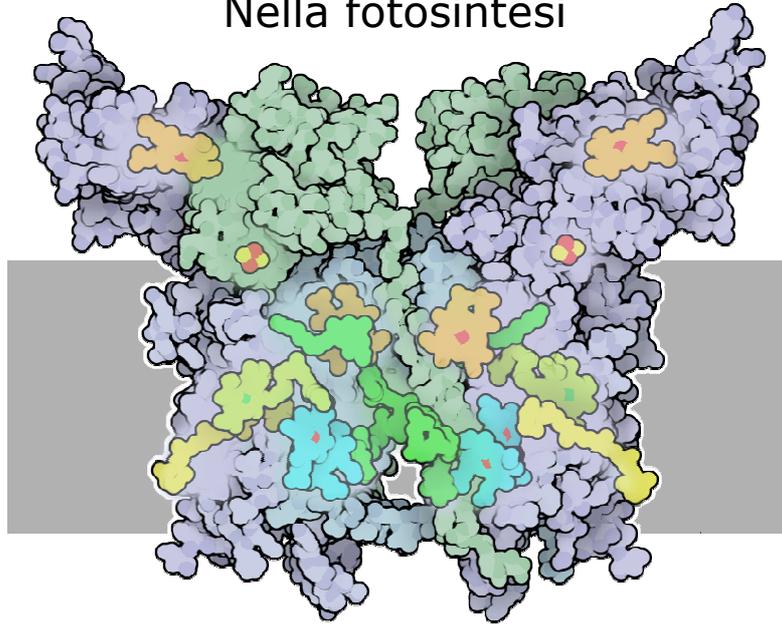
Complesso bc<sub>1</sub> pollo  
(dominio Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> spostato)  
(1KY0)

3

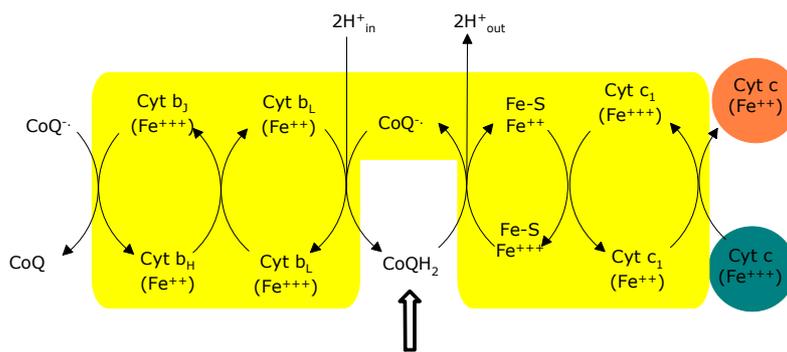


Complesso bc<sub>1</sub> di lievito  
(CitC legato)  
(1BCC)

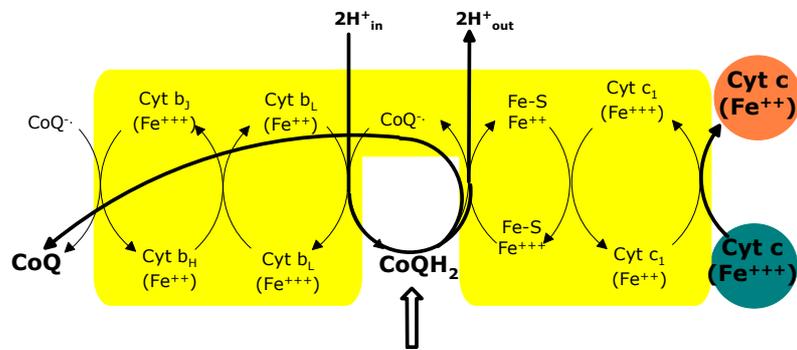
## Nella fotosintesi



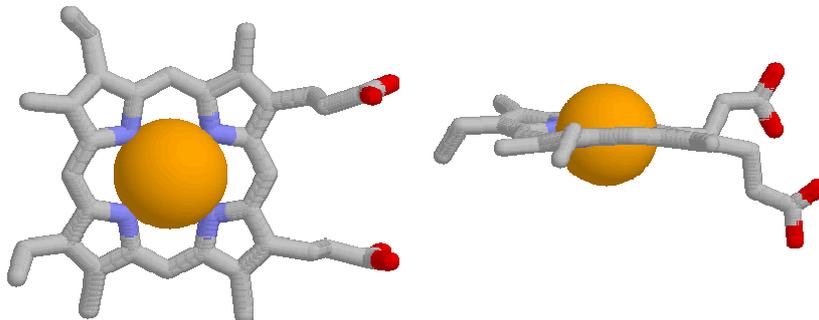
## Complesso III



## Complesso III

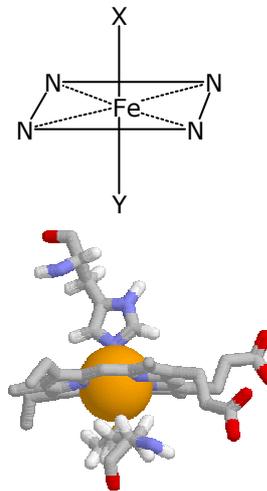


## Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c



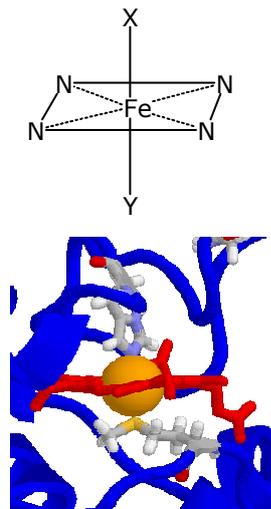
## Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- 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'O<sub>2</sub>.



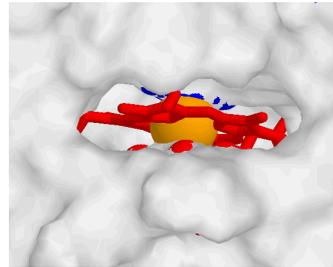
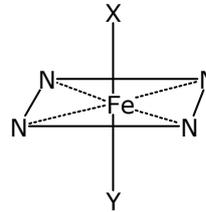
## Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- 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'O<sub>2</sub>.



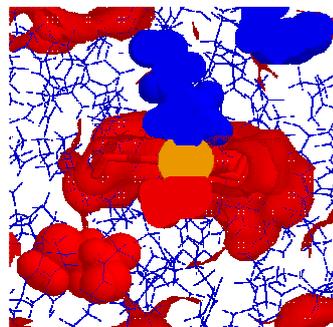
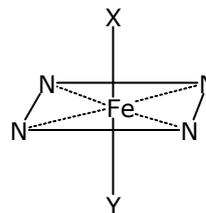
## Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

- 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'O<sub>2</sub>.



## Trasportatori di elettroni: Eme nel citocromo c

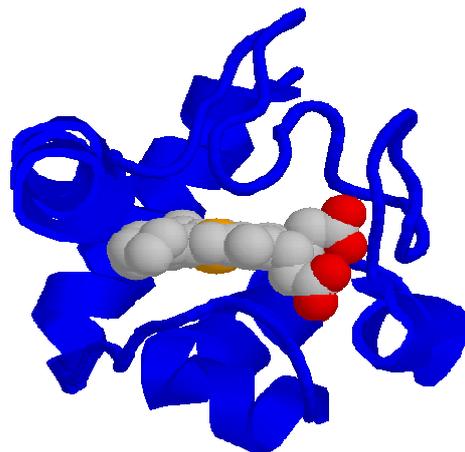
- L'anello porfirinico è planare.
- Il Fe nel gruppo eme è anche coordinato con due ligandi assiali al di sopra e al di sotto del piano (X,Y).
- I ligandi possono essere atomi di zolfo o azoto di catene laterali di aminoacidi.
- Nel citocromo c sono lo zolfo di una Met (sotto) e l'azoto di una His (sopra).
- I gruppi eme che legano ossigeno (emoglobina, mioglobina, ecc.) hanno una posizione libera per l'O<sub>2</sub>.



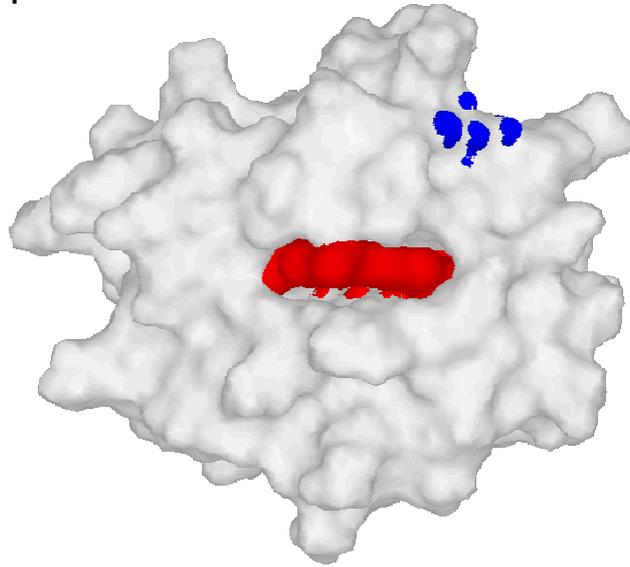
## Trasportatori di elettroni: i citocromi

- I **citocromi** sono proteine che hanno un gruppo eme come gruppo prostetico e assorbono luce a lunghezze d'onda caratteristiche.
- Il loro assorbimento varia se il ferro è ossidato e ridotto, ciò permette di seguirne lo stato redox.
- Alcuni citocromi sono parte di proteine integrali di membrana che possiedono anche altri sistemi di trasporto degli elettroni.
- Il **citocromo c** è, invece, una piccola proteina solubile in acqua con singolo gruppo eme.

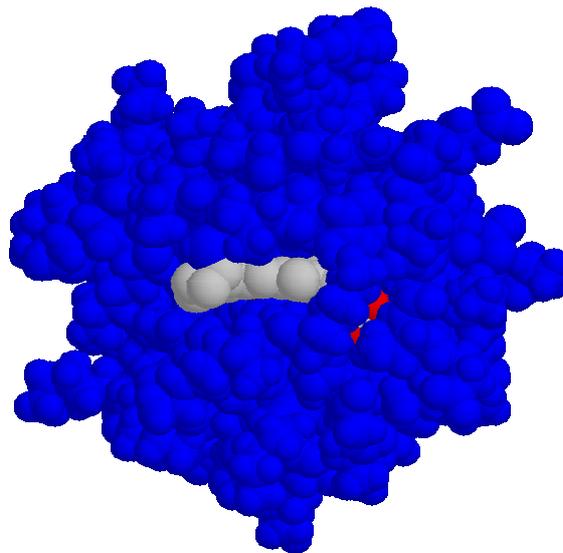
## Trasportatori di elettroni: Citocromo c



## Trasportatori di elettroni: Citocromo c

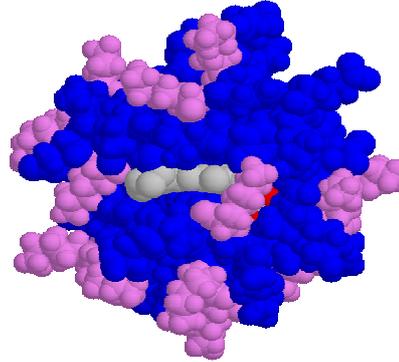


## Trasportatori di elettroni: Citocromo c



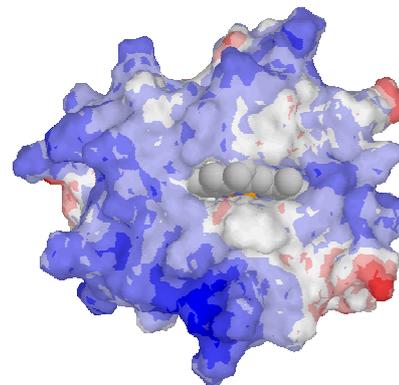
## Trasportatori di elettroni: Citocromo c

- 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).

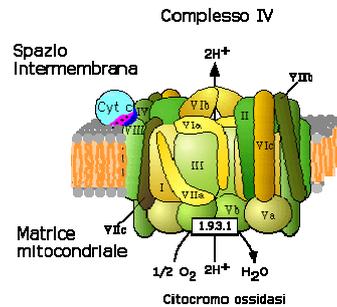
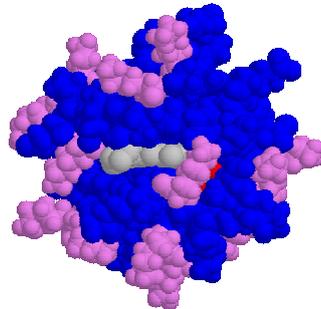


## Trasportatori di elettroni: Citocromo c

- 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).

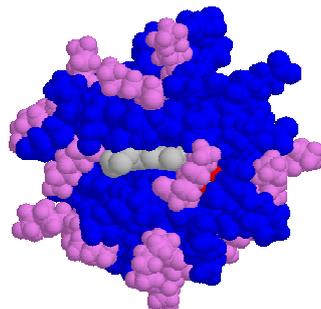


## Trasportatori di elettroni: Citocromo c

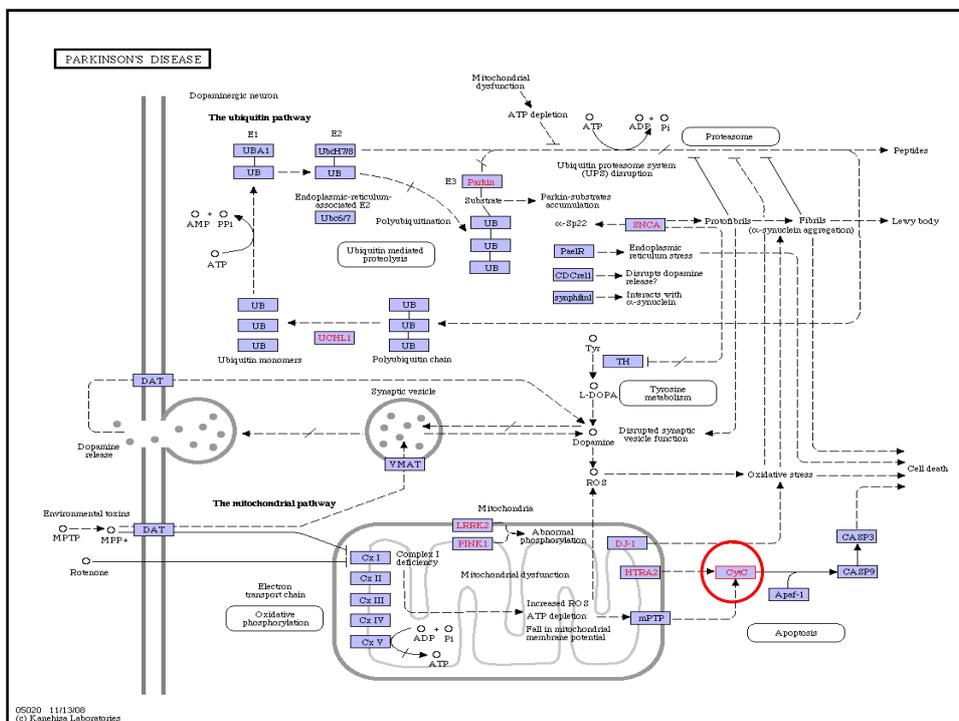
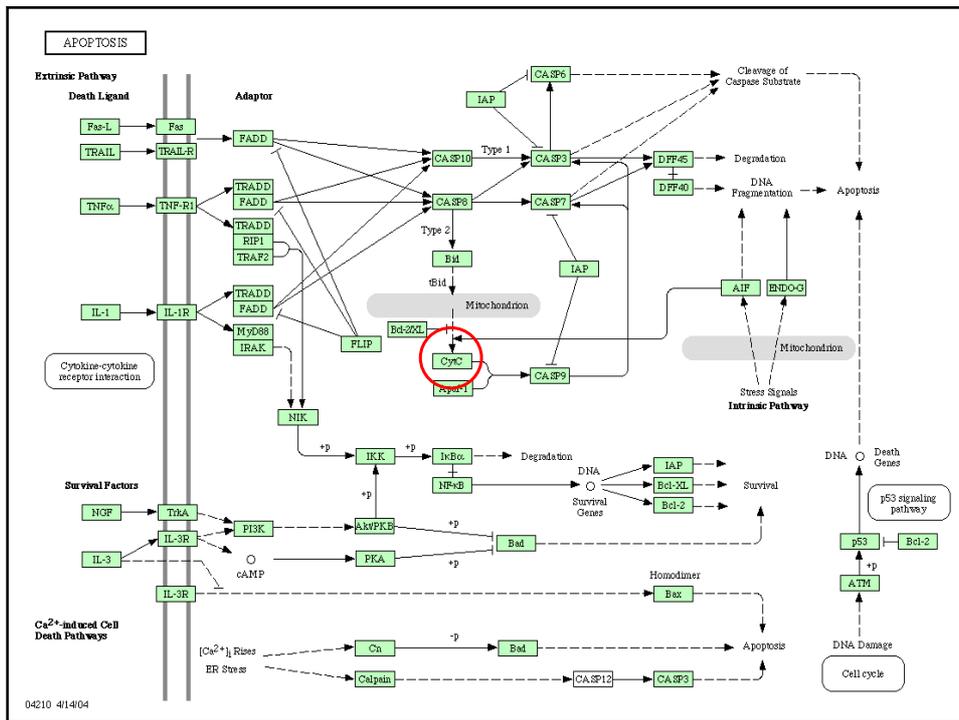


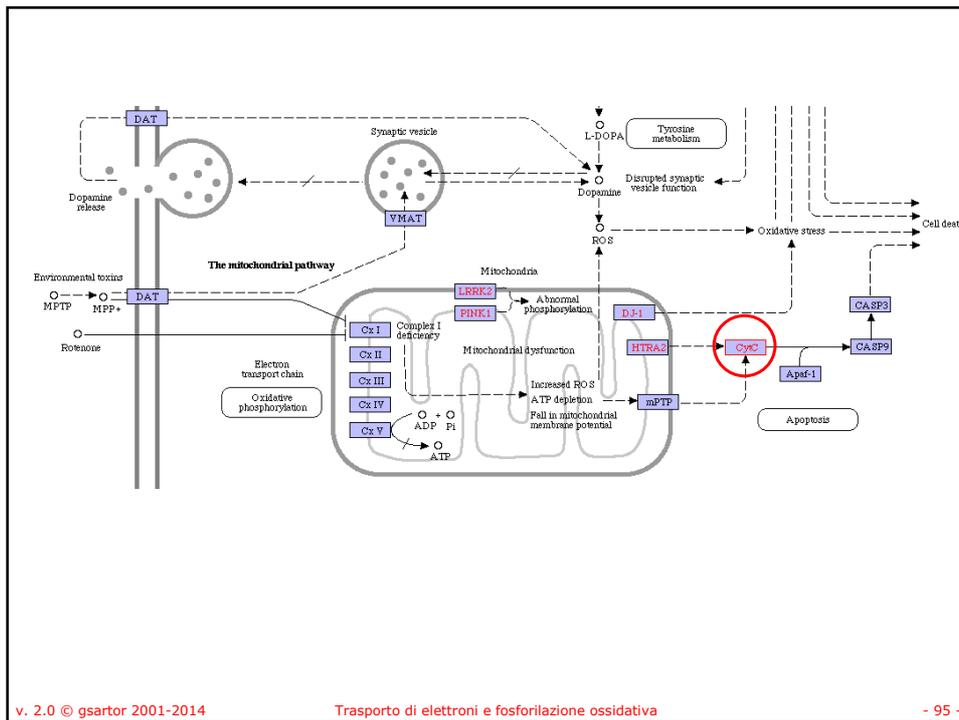
- I residui di Lys interagiscono con la superficie carica negativamente del complesso III che lega il Cyt c e dal quale riceve un elettrone.

## 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.



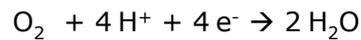


## I complessi

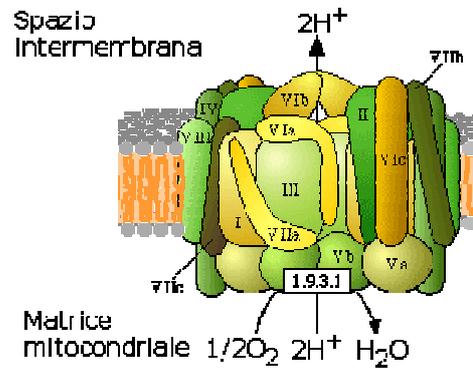
Complesso	Nome	Numero di subunità	Gruppi prostetici
I (EC 1.6.5.3)	NADH deidrogenasi o NADH-CoQ ossidoreduttasi	46	FMN, 7 Fe-S
II (EC 1.3.5.1)	Succinato-CoQ reduttasi	5	FAD, cyt b <sub>560r</sub> , 3 Fe-S
III (EC 1.10.2.2)	CoQ-cyt c ossidoreduttasi	11	cyt b <sub>H</sub> , cyt b <sub>L</sub> , cyt c1, Fe-S <sub>Rieske</sub>
<b>IV (EC 1.9.3.1)</b>	<b>Citocromo ossidasi</b>	<b>13</b>	<b>cyt a, cyt a<sub>3</sub>, Cu<sub>A</sub>, Cu<sub>B</sub></b>

## Complesso IV

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

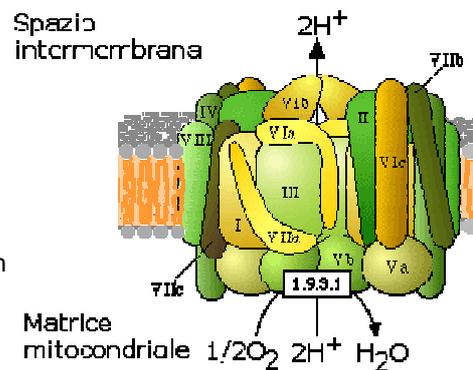


- Quattro elettroni sono trasferiti, uno alla volta, al complesso IV dal Cyt c.

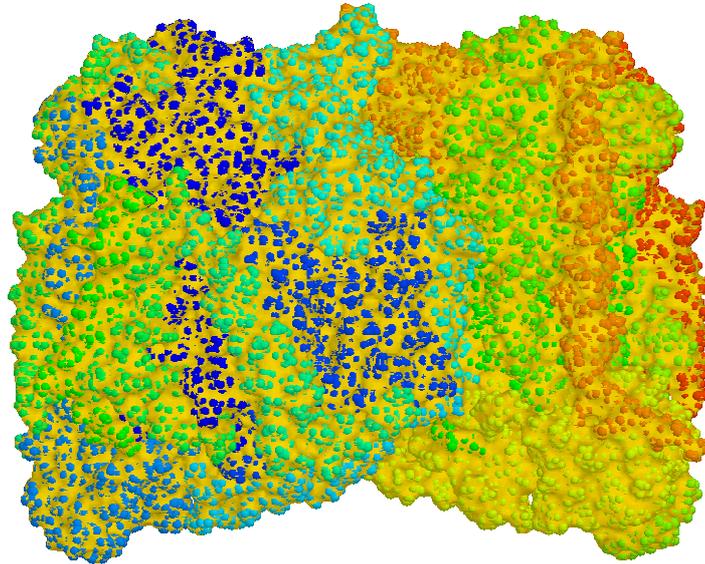


## Complesso IV

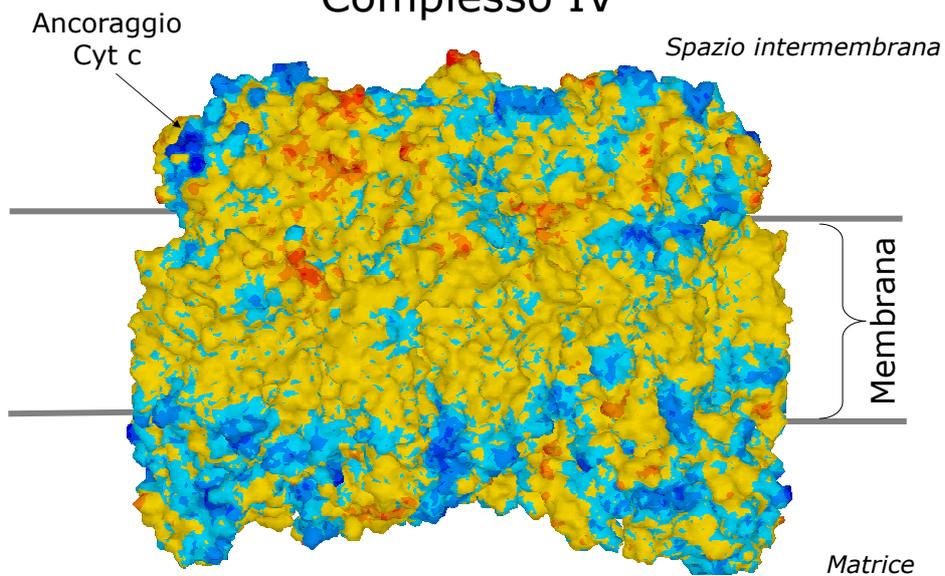
- È costituita da otto subunità, le più grandi I, II e III sono codificate dal DNA mitocondriale, le altre cinque dal DNA nucleare.
- Ogni complesso contiene due gruppi eme e due centri con ioni rame
- I due gruppi eme sono uguali ma differiscono leggermente in potenziale a causa della loro posizione,
- Il gruppo rame a è fatto da due ioni rame vicini.



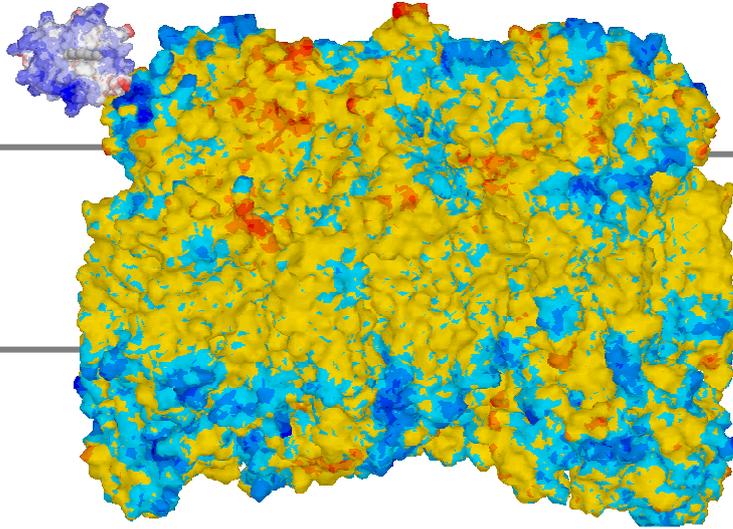
## Complesso IV



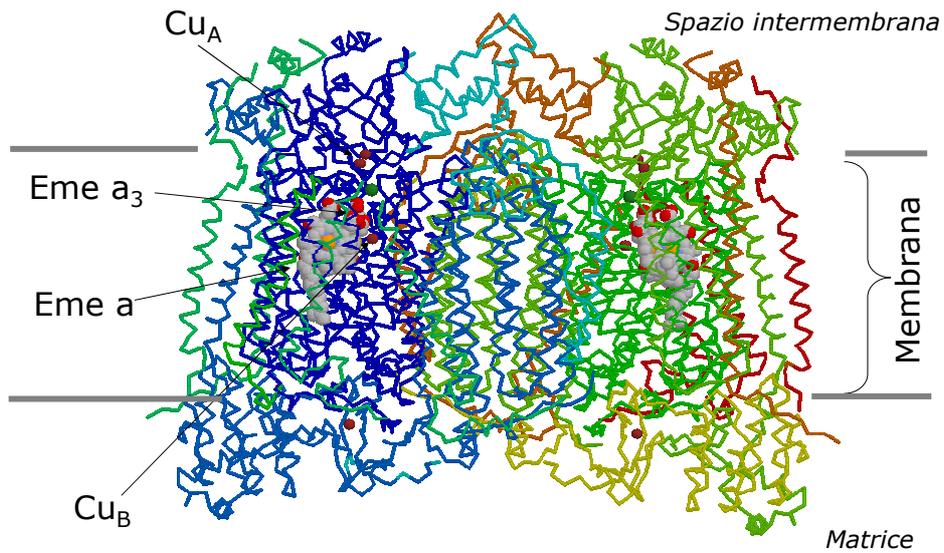
## Complesso IV



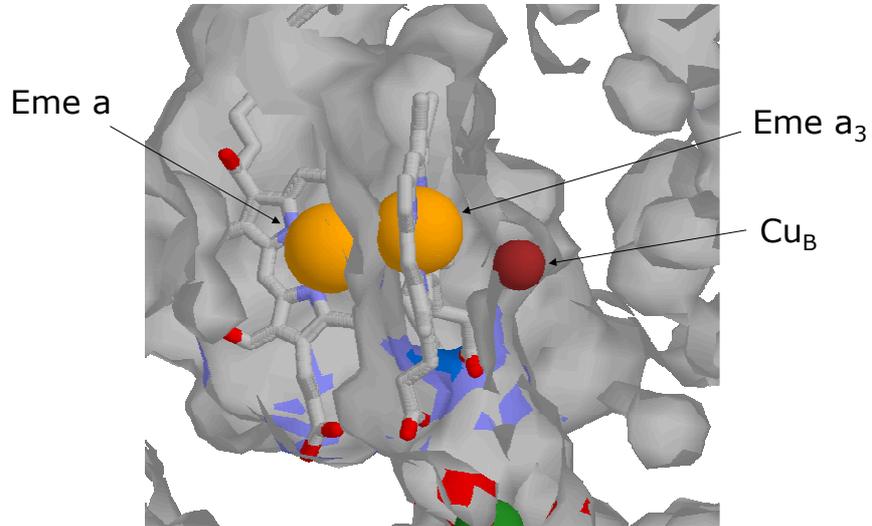
# Complesso IV



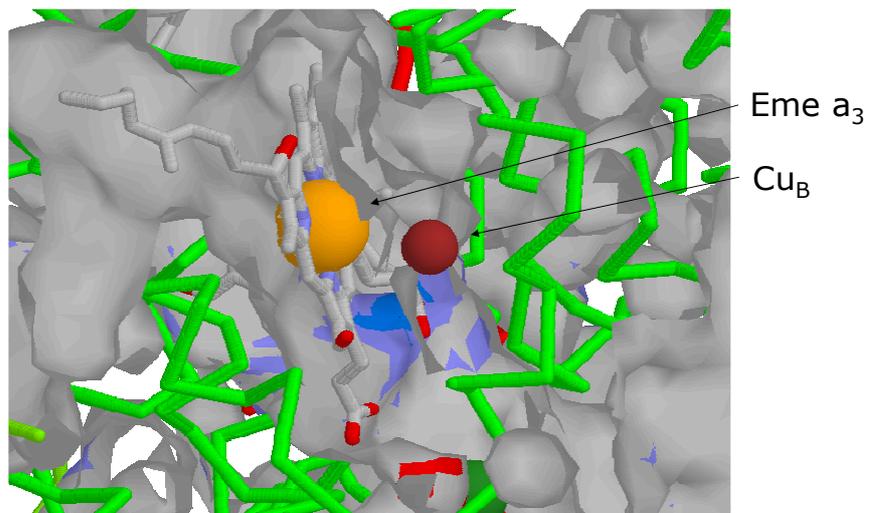
# Complesso IV



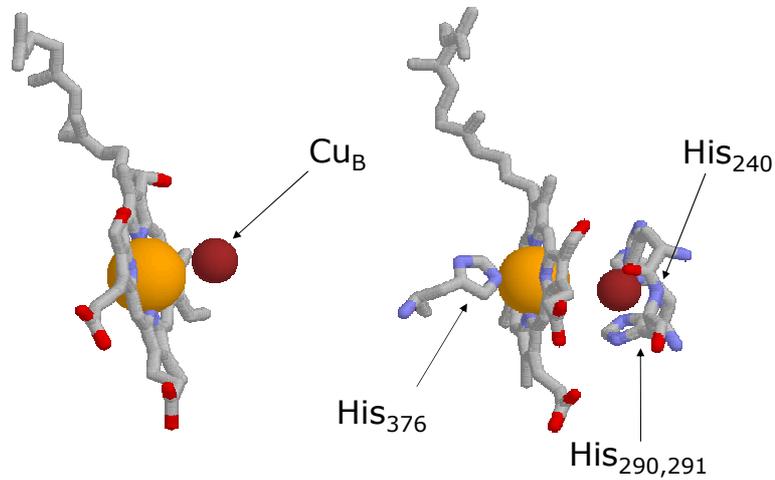
## Complesso IV



## Complesso IV

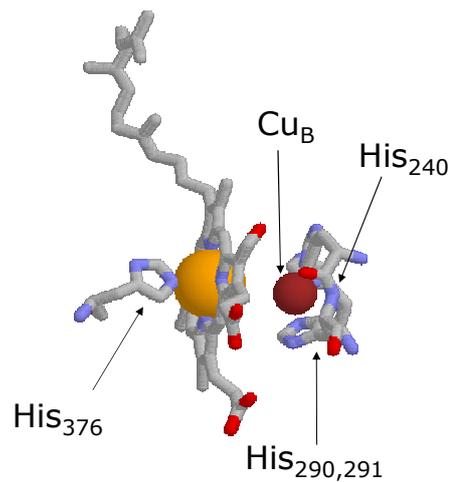


## Complesso IV

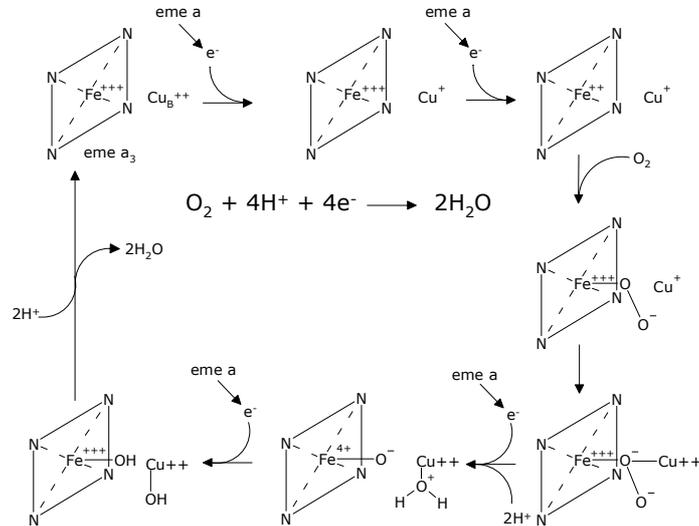


## Complesso IV

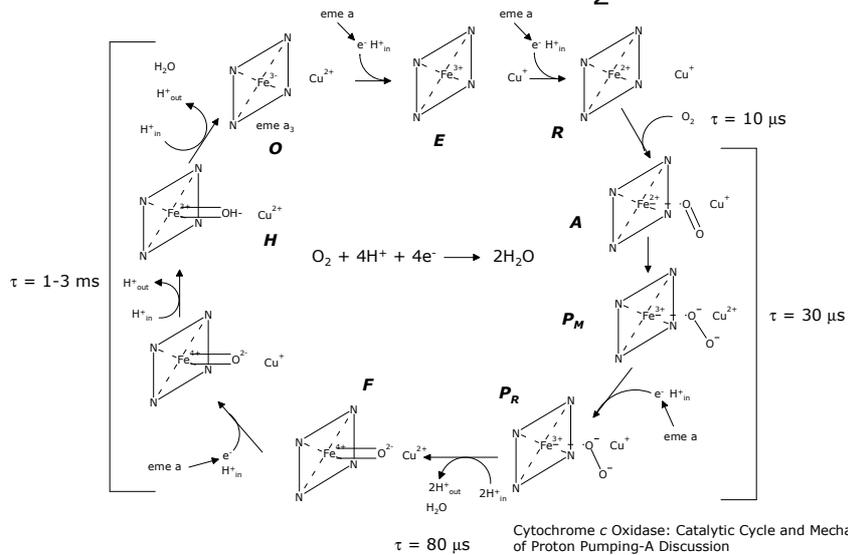
- Il gruppo eme  $a_3$ , adiacente al  $Cu_B$ , ha un solo ligando assiale.
- Lo ione Cu è coordinato con atomi di azoto di residui di His, il  $Cu_A$  è anche coordinato con atomi di zolfo di Cys e Met S e con un atomo di ossigeno del backbone di un Glu.
- Gli elettroni vengono trasferiti dal cyt c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



## Formazione di H<sub>2</sub>O



## Formazione di H<sub>2</sub>O



Cytochrome c Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping-A Discussion  
Hartmut Michel *Biochemistry* 1999, 38, 15129-15140

# 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<sub>2</sub> è anche disponibile per il legame di CN<sup>-</sup>, CO, H<sub>2</sub>S, o del radicale ·NO.
- CN<sup>-</sup>, CO, H<sub>2</sub>S inibiscono l'attività della citocromo ossidasi (avvelenamento).
- Si ritiene che il radicale ·NO abbia funzioni di regolazione.

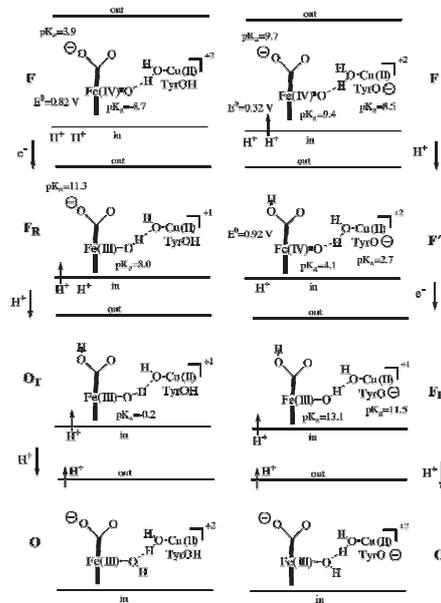
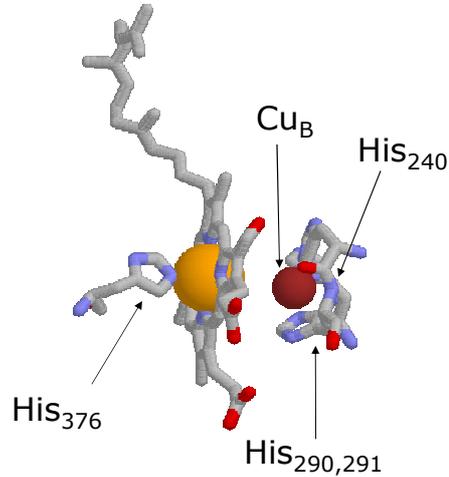


Fig. 4. Proton-pump electron-flow in the F to O transition for two different models. Note that the reduction potentials are calculated in vivo a value of 0.4 V for  $\mu_{\text{H}^+}$ .

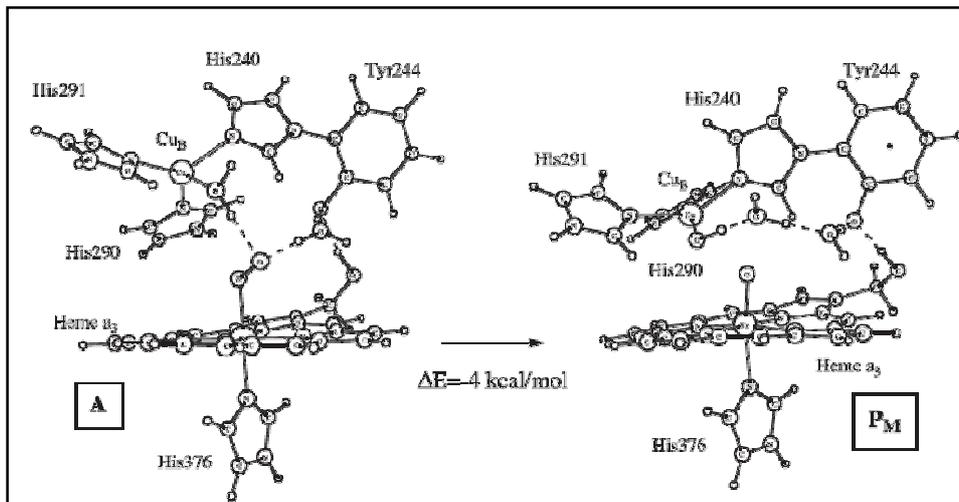
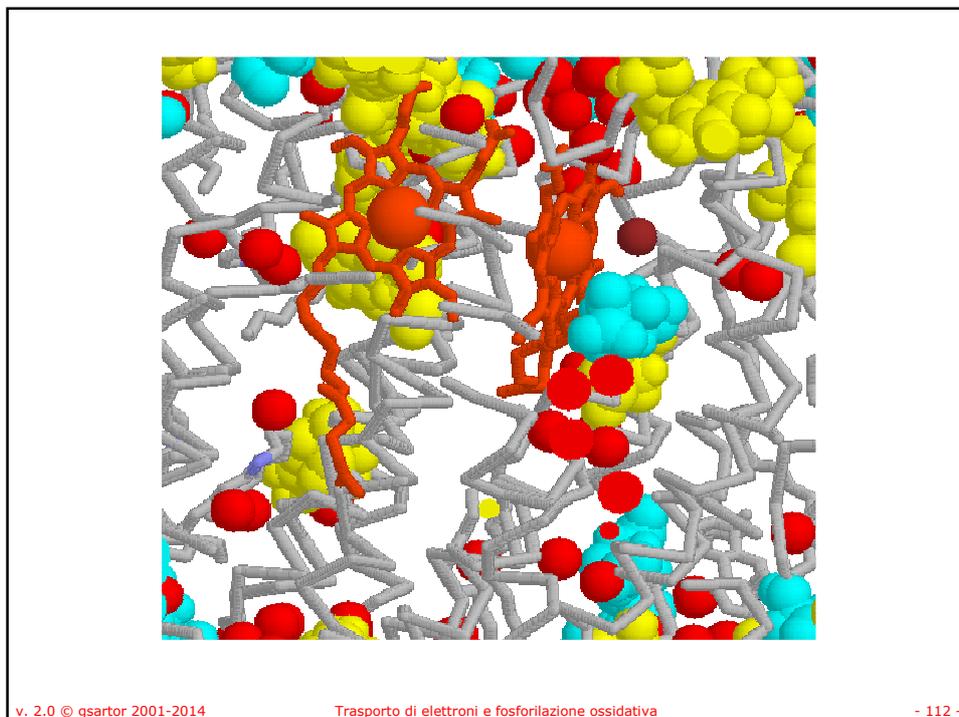
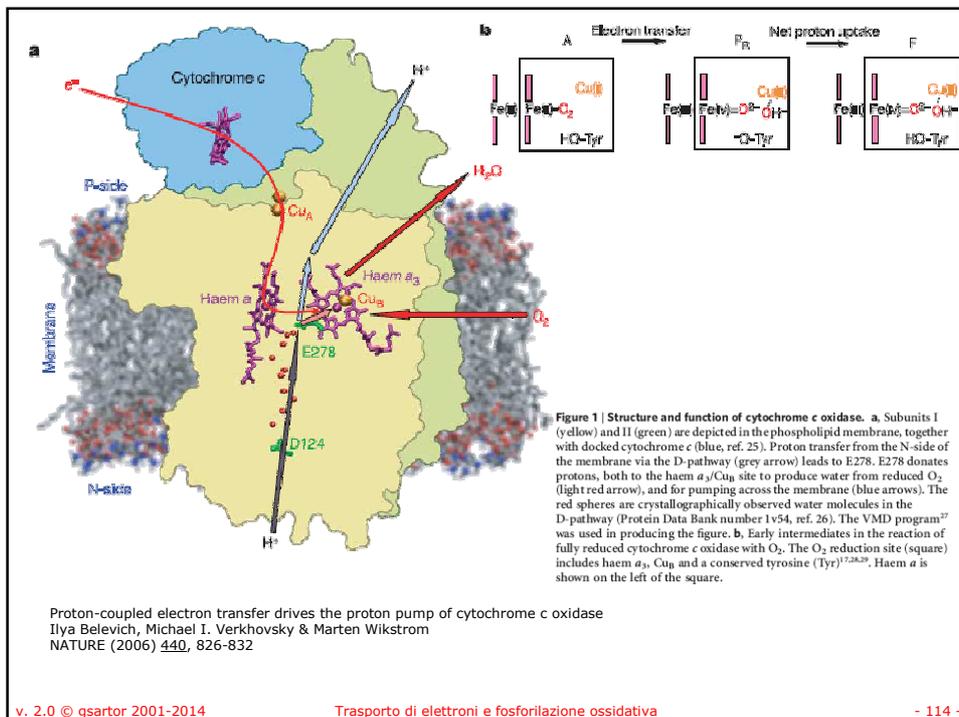
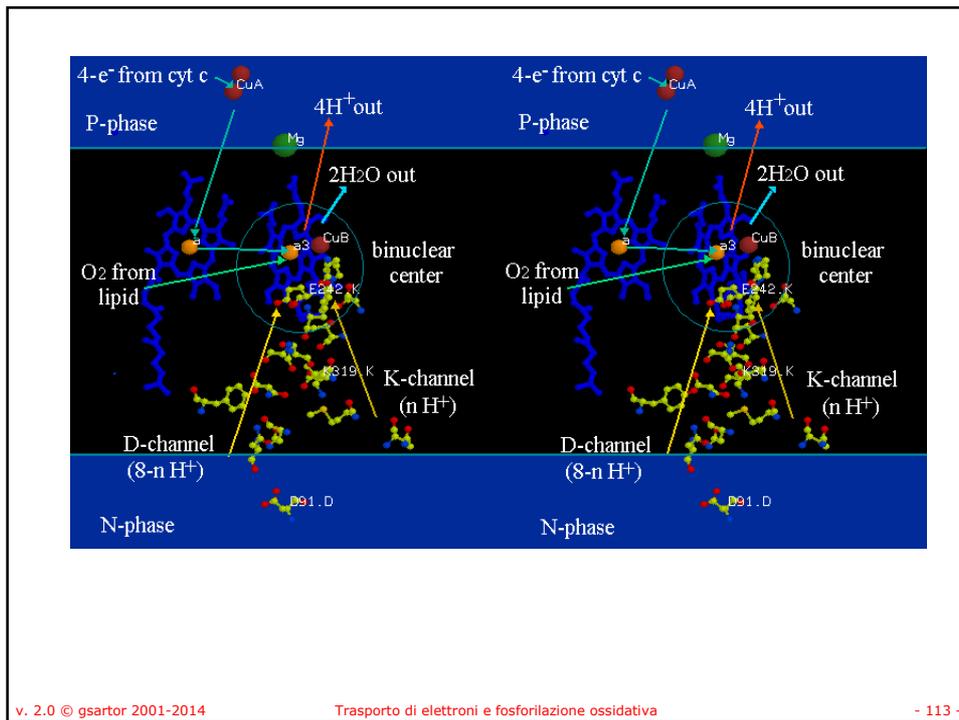
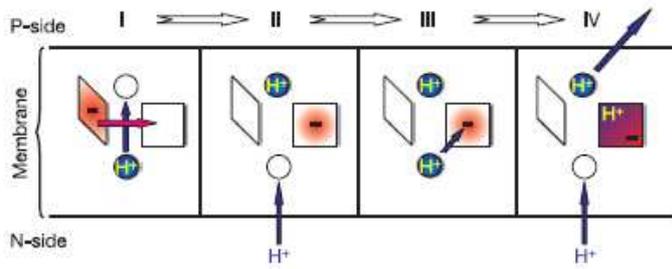


Fig. 3. Reactants and products for O—O bond cleavage in cytochrome oxidase.

Important roles of tyrosines in Photosystem II and cytochrome oxidase  
 Per E.M. Siegbahn, Margareta R.A. Blomberg\* *Biochimica et Biophysica Acta* 1655 (2004) 45– 50

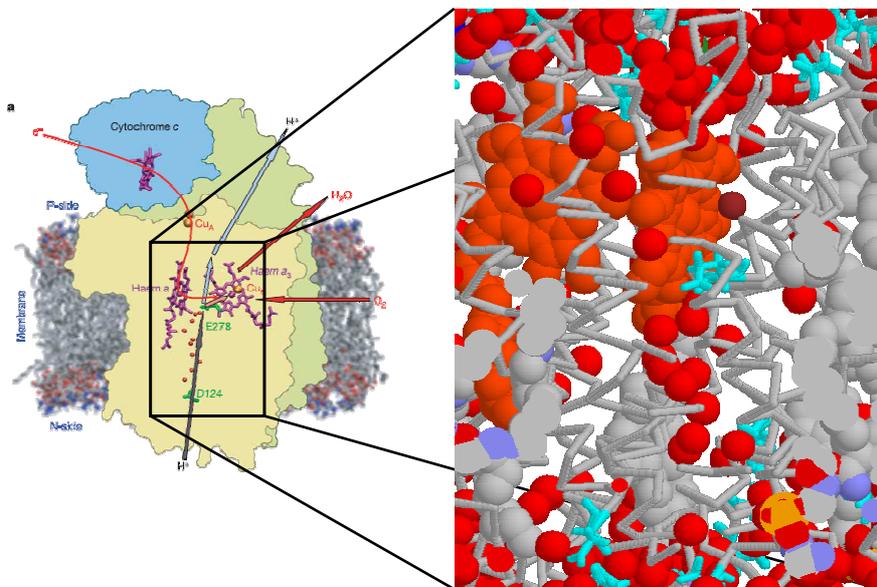






**Figure 3 | Scheme of the proposed proton pump mechanism.** Four states are shown (I–IV), each comprising haem *a* (rhombus) and the haem *a*<sub>3</sub>/Cu<sub>B</sub> site (square). The lower and upper circles denote the carboxylic residue E278 at the end of the D-pathway (Fig. 1a) and an unidentified protonatable site above the haems, respectively. In I → II electron transfer from haem *a* to the binuclear site is coupled to transfer of a proton from E278 to the protonatable site. In II → III, E278 is re-protonated from the N-side via the D-pathway. In III → IV, a substrate proton is transferred from E278 to the binuclear site. After IV, E278 is again re-protonated and the proton above the haems is ejected towards the P-side.

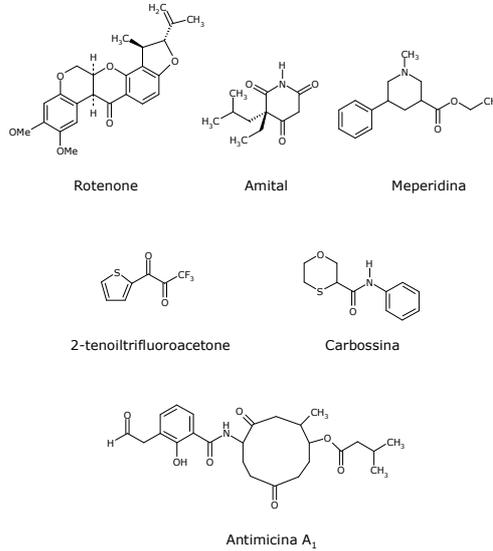
Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase  
 Ilya Belevich, Michael I. Verkhovsky & Marten Wikstrom  
 NATURE (2006) 440, 826–832





## 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  $a_3$ :  
 $\text{CN}^-$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NaN}_3$ .



## Ipotesi chemiosmotica

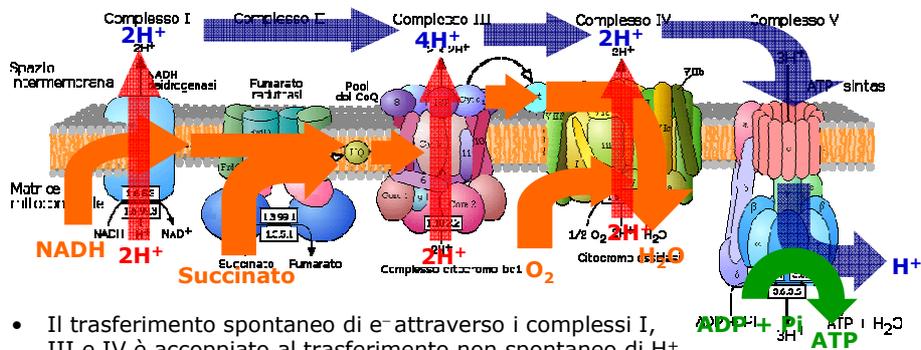
"for his contribution to the understanding of biological energy transfer through the formulation of the chemiosmotic theory"



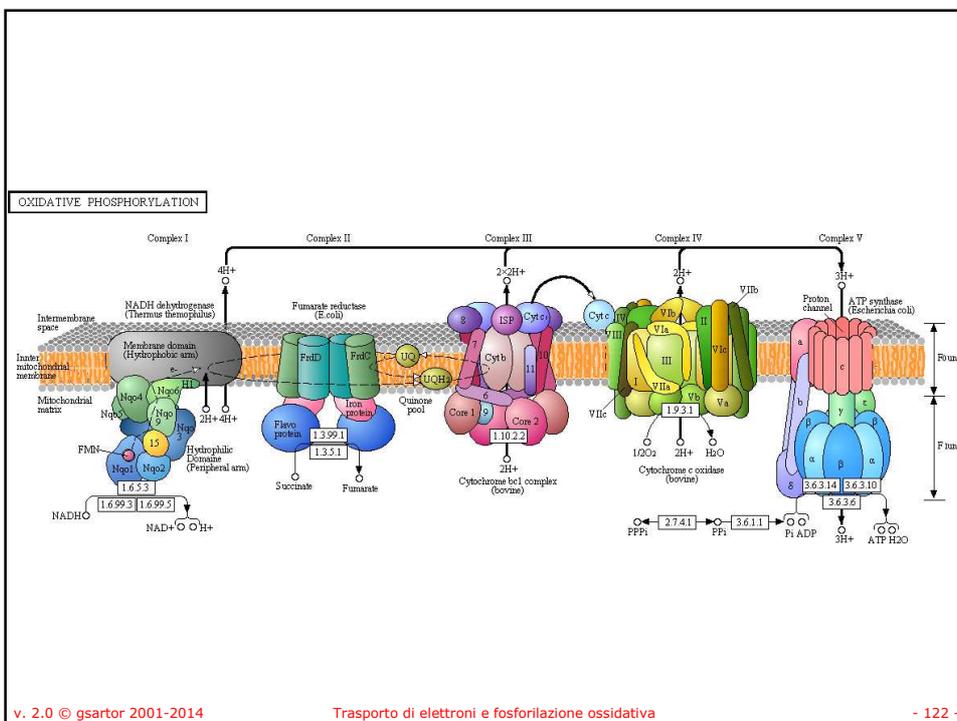
**Peter D. Mitchell**

- **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  $\text{H}^+$ .

### Respirazione cellulare e ipotesi chemiosmotica

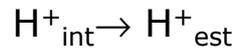


- Il trasferimento spontaneo di e<sup>-</sup> attraverso i complessi I, III e IV è accoppiato al trasferimento non spontaneo di H<sup>+</sup> dalla matrice allo spazio intermembrana.
- Il trasporto di H<sup>+</sup> genera un potenziale di membrana (ΔΨ, negativo nella matrice) e un gradiente di pH (ΔpH, la matrice diventa alcalina).
- Gli H<sup>+</sup> ritornano nella matrice attraverso la ATP-sintasi (F<sub>0</sub>) che sfrutta questo potenziale per generare ATP nella subunita F<sub>1</sub>.



## Ipotesi chemiosmotica

- Viene generato un gradiente protonico:



- Che crea una polarizzazione della membrana:

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

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

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

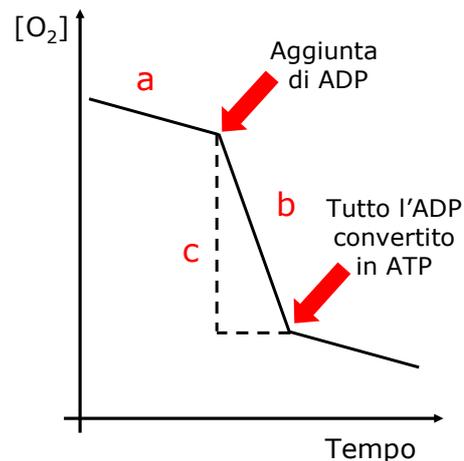
$$\Delta G = 2.3 RT + F 0.18 = 23.3 \text{ kJ}$$

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

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

## 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.



## Controllo respiratorio

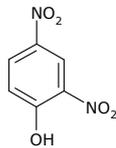
- Il trasporto di elettroni è accoppiato alla estrusione di H<sup>+</sup> dalla matrice.
- Il fatto che questa reazione accoppiata sia spontanea dipende dai gradienti elettrico ( $\Delta\Psi$ ) di pH.

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

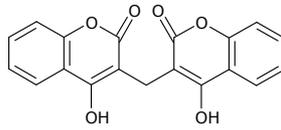
## Controllo respiratorio

- In assenza di ADP, i H<sup>+</sup> non possono fluire attraverso F<sub>o</sub>.  $\Delta\text{pH}$  e  $\Delta\Psi$  sono massimi. Il valore assoluto del  $\Delta G$  per l'estrusione H<sup>+</sup> aumenta avvicinandosi a quello del trasporto di e<sup>-</sup>.
- 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<sup>+</sup>).
- Quando si aggiunge ADP riprende la sintesi di ATP, gli H<sup>+</sup> entrano nella matrice via F<sub>o</sub>. Si riducono  $\Delta\text{pH}$  e  $\Delta\Psi$ .
- Il  $\Delta G$  dell'estrusione di H<sup>+</sup> diminuisce.
- La reazione accoppiata ridiventa spontanea ( $\Delta G < 0$ ).
- La respirazione riprende (è stimolata).

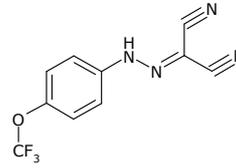
## Disaccoppianti



Dinitrofenolo



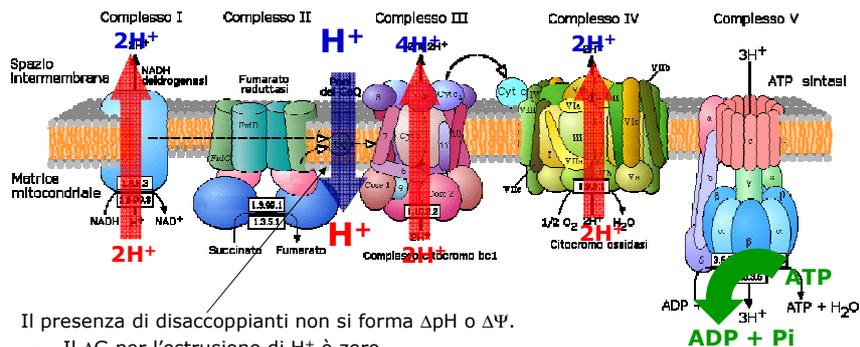
Dicumarolo



Carbonil cianuro-*p*-trifluoro metossifenilidrazona (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  $\Delta pH$  o  $\Delta \Psi$ .

## Disaccoppianti



- Il presenza di disaccoppianti non si forma  $\Delta pH$  o  $\Delta \Psi$ .
  - Il  $\Delta G$  per l'estrusione di  $H^+$  è zero
  - Il  $\Delta G$  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  $\Delta G$  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.

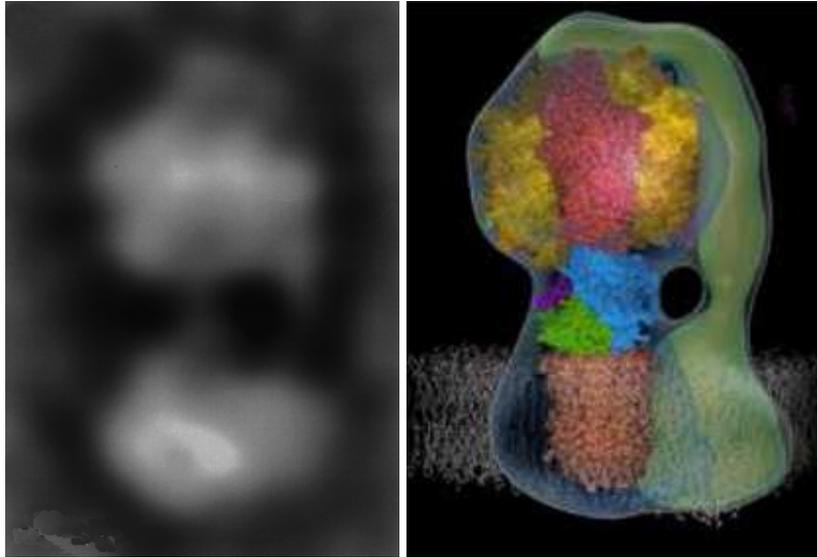
## Proteine disaccoppianti

- 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<sup>+</sup> nella membrana interna mitocondriale.
- La proteina blocca lo sviluppo del gradiente protonico contemporaneamente stimola la respirazione dissipando il  $\Delta G$  come calore.
- Questo tipo di riscaldamento costa in termini di energia respiratoria (non convertita in ATP) ma aiuta l'organismo a rispondere al raffreddamento.

## F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP Sintasi

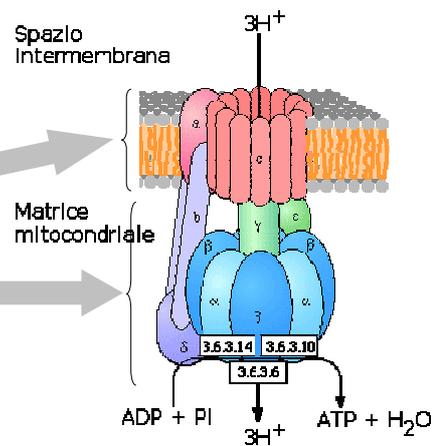
### Meccanismo della sintesi di ATP





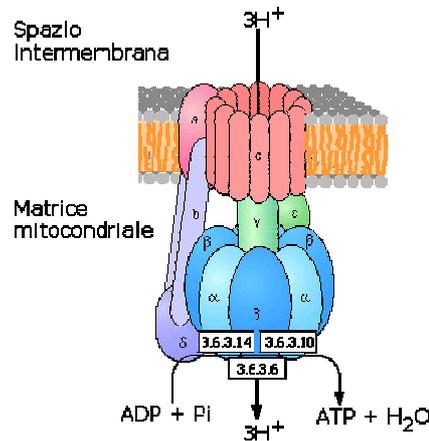
## Complesso V – ATP sintasi

- La ATP sintasi, presente nella membrana interna mitocondriale.
- È composta di sue principali unità catalitiche:
  - $F_0$ : proteina di membrana che gestisce il trasporto di protoni.
  - $F_1$ : costituita da cinque polipeptidi con stechiometria  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ .



## Complesso V – ATP sintasi

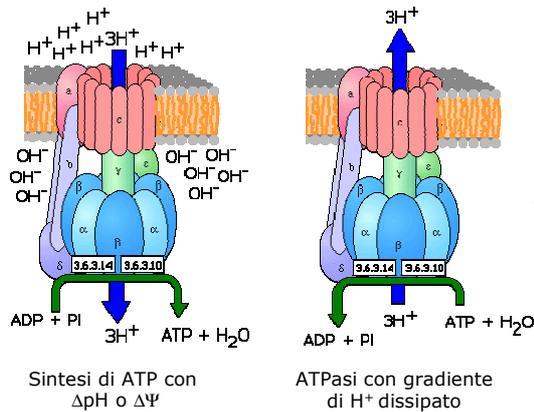
- Le due unità  $F_1F_0$  accoppiano la sintesi di ATP con il trasporto di  $H^+$  dallo spazio intermembrana alla matrice.
- Per convertire una mole di ADP in ATP è richiesto il trasporto di tre moli di  $H^+$ .
- Il numero di tre moli di  $H^+$  viene dedotto da:
  - Il  $\Delta G$  per la sintesi di ATP in condizioni cellulari.
  - Il  $\Delta G$  per trasferire ogni  $H^+$  nella matrice dato il gradiente elettrochimico (energia disponibile per  $H^+$ ).



## Controllo respiratorio

- In assenza di ADP, i  $H^+$  non possono fluire attraverso  $F_0$ .  $\Delta pH$  e  $\Delta \Psi$  sono massimi. Il valore assoluto del  $\Delta G$  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  $F_0$ . Si riducono  $\Delta pH$  e  $\Delta \Psi$ .
- Il  $\Delta G$  dell'estrusione di  $H^+$  diminuisce.
- La reazione accoppiata ridiventa spontanea ( $\Delta G < 0$ ).
- La respirazione riprende (è stimolata).

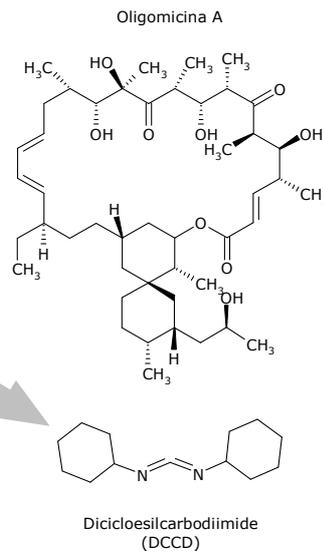
## F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP Sintasi di mitocondri, cloroplasti, batteri



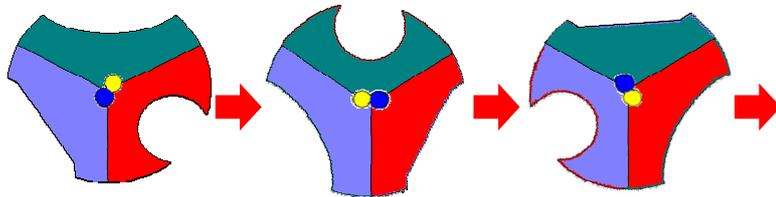
- Quando il  $\Delta pH$  o il  $\Delta \Psi$  sono favorevoli, F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> accoppia la sintesi di ATP al flusso spontaneo di H<sup>+</sup> verso la parte della membrana dove si protrude F<sub>1</sub> (matrice mitocondriale).
- Se non c'è  $\Delta pH$  o  $\Delta \Psi$  per pilotare la reazione accoppiata viene favorita l'idrolisi dell'ATP (ATPasi).

## Inibitori ATP sintasi

- Bloccano il trasporto di H<sup>+</sup> accoppiato alla sintesi o all'idrolisi di ATP.
  - Oligomicina A, un antibiotico.
  - Diciolesilcarbodiimide (DCCD) è un reagente dei gruppi carbonilici in ambiente idrofobico per formare un addotto covalente.
- Entrambi bloccano il flusso di H<sup>+</sup> nella membrana inibendo la sintesi di ATP attraverso l'interazione con F<sub>0</sub>.



## 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  $\beta$ .
  - È stato proposto che una struttura proteica di forma irregolare ( $\gamma$ ) sia legata a  $F_o$  e ruoti relativamente alle tre subunità catalitiche  $\beta$ .
  - La rotazione di  $\gamma$  è pilotata dal flusso protonico attraverso  $F_o$ .

## Meccanismo di sintesi

### The Nobel Prize in Chemistry 1997

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

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



**Paul D. Boyer**

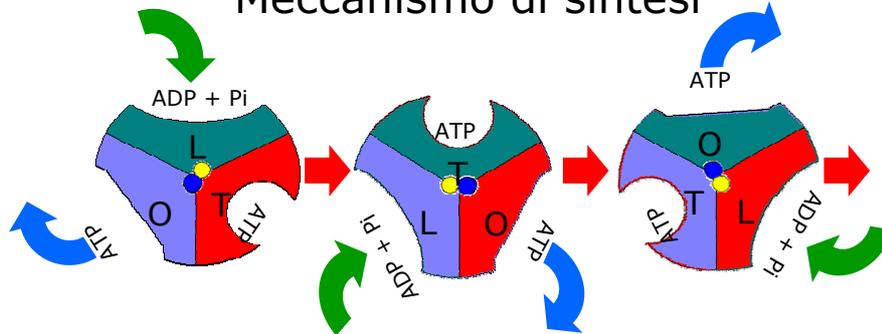


**John E. Walker**



**Jens C. Skou**

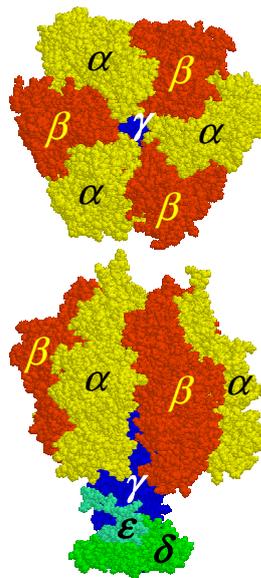
## Meccanismo di sintesi



- La conformazione di ogni subunità catalitica  $\beta$  cambia sequenzialmente a seguito dell'interazione con la subunità  $\gamma$  che ruota (al centro).
- Ogni subunità catalitica  $\beta$  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.

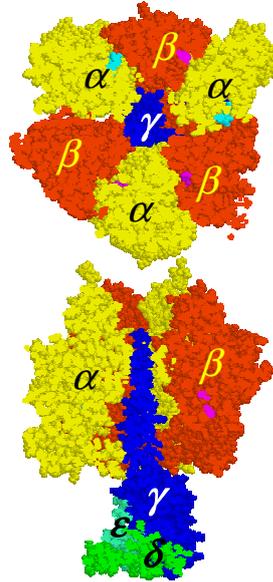
## Struttura di $F_1$

- Nei mammiferi  $F_1$  consiste di cinque polipeptidi con stechiometria  $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$  (in ordine decrescente di peso molecolare).
- Le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  sono omologhe.



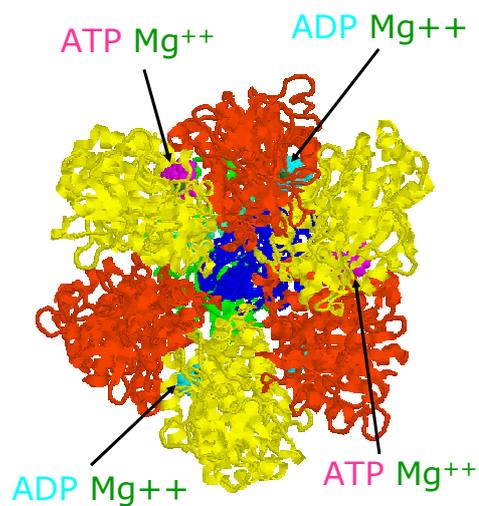
## Struttura di F<sub>1</sub>

- Nei mammiferi F<sub>1</sub> consiste di cinque polipeptidi con stechiometria  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (in ordine decrescente di peso molecolare).
- Le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  sono omologhe.



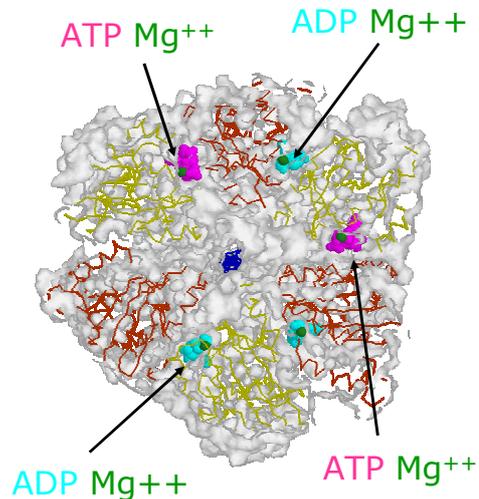
## Struttura di F<sub>1</sub>

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



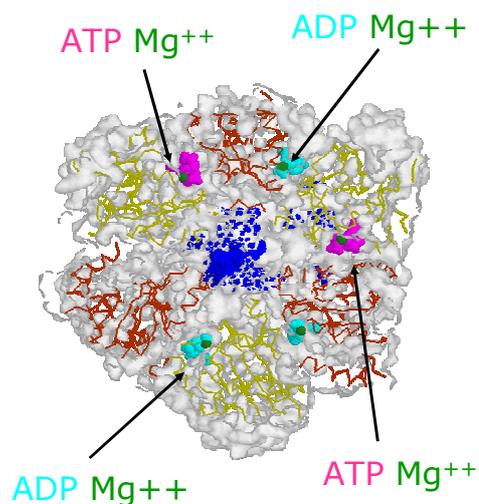
## Struttura di F<sub>1</sub>

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



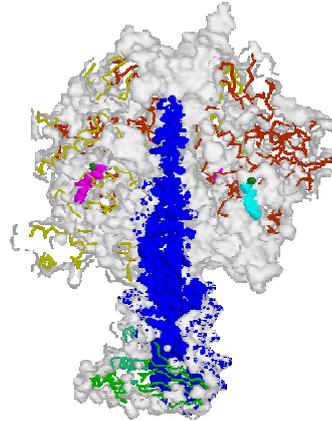
## Struttura di F<sub>1</sub>

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



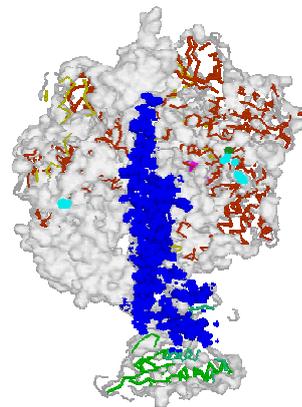
## Struttura di F<sub>1</sub>

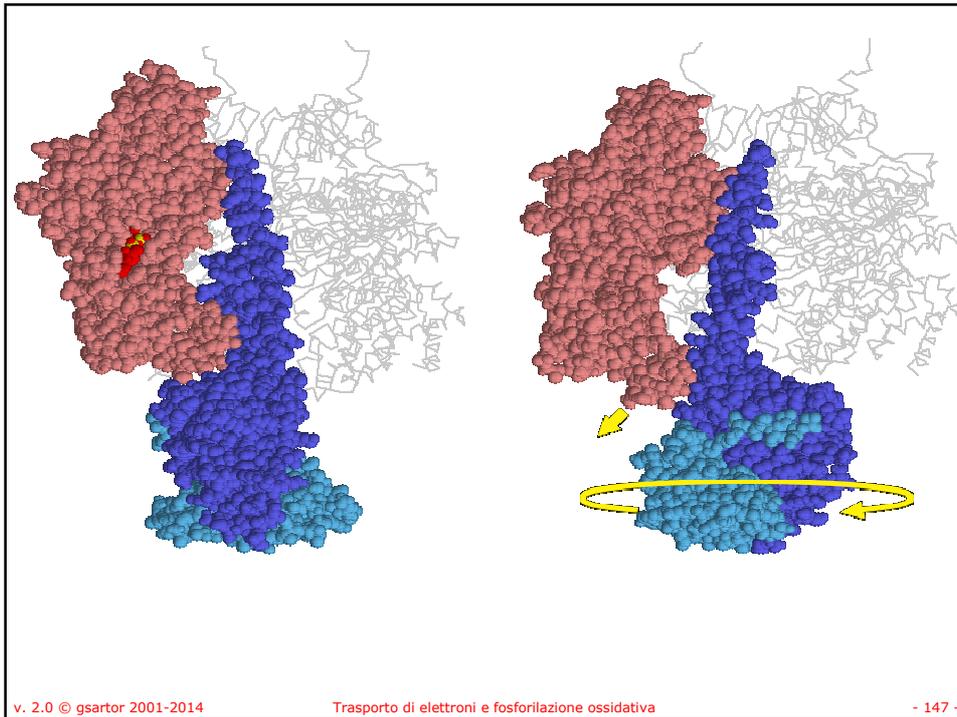
- La subunità  $\gamma$  include un ripiegamento dell'elica che costituisce una "camma" incastrata tra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ .



## Struttura di F<sub>1</sub>

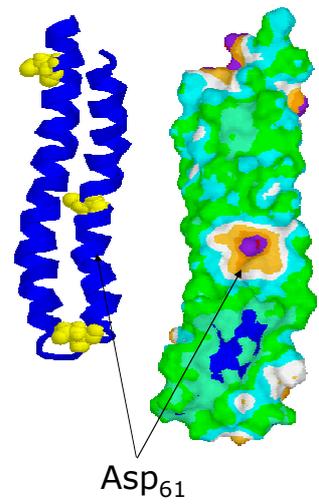
- La subunità  $\gamma$  include un ripiegamento dell'elica che costituisce una "camma" incastrata tra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ .





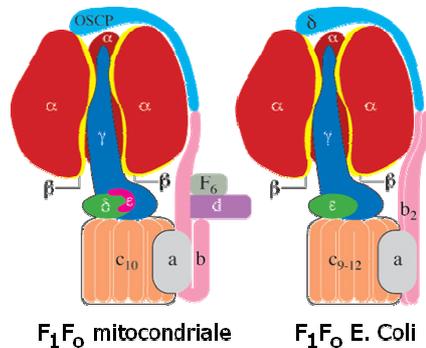
## Subunità F<sub>o</sub>

- La subunità c di F<sub>o</sub> ha una struttura ripiegata (hairpin) con due  $\alpha$ -eliche transmembrana connesse da un corto loop.
- È un peptide molto idrofobico.
- Una delle due  $\alpha$ -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<sup>+</sup> attraverso F<sub>o</sub>.



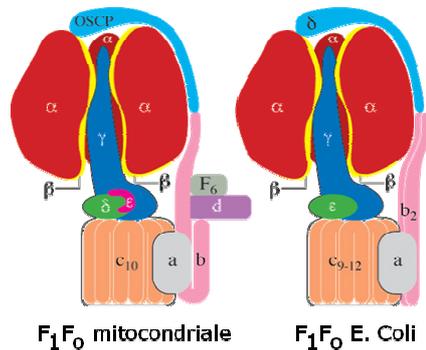
## Struttura $F_0F_1$

- $F_0$  è un complesso di proteine integrali di membrana.
  - La stechiometria in *E. Coli* è  $a, b_2, c_{10}$ .
- Nei mammiferi  $F_1F_0$  è un poco più complessa che nei batteri.
- Nei diversi organismi le subunità hanno nomi diversi.
  - La subunità  $\delta$  nei mammiferi è omologa alla subunità  $\varepsilon$  in *E. Coli*.
  - La subunità "OSCP" nei mammiferi è omologa alla subunità  $\delta$  in *E. Coli*.
  - La subunità  $\varepsilon$  nei mammiferi è unica.



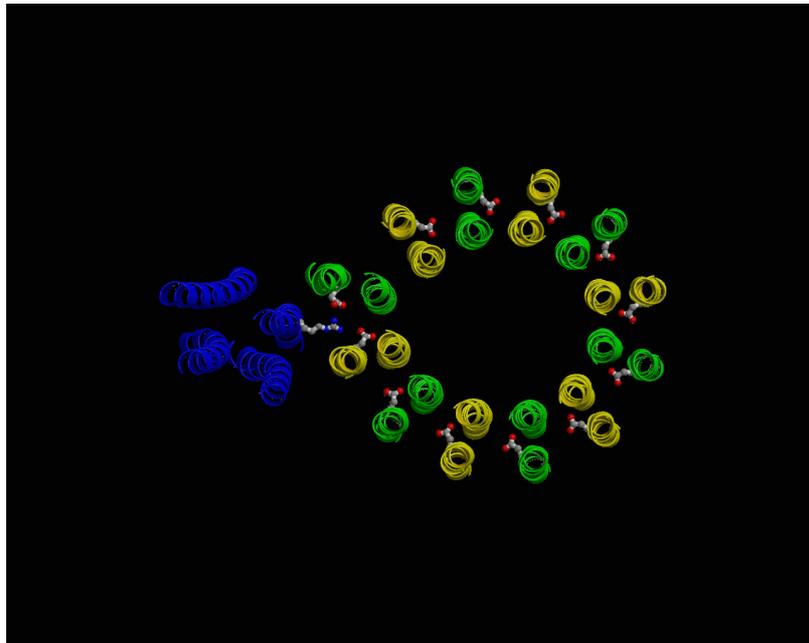
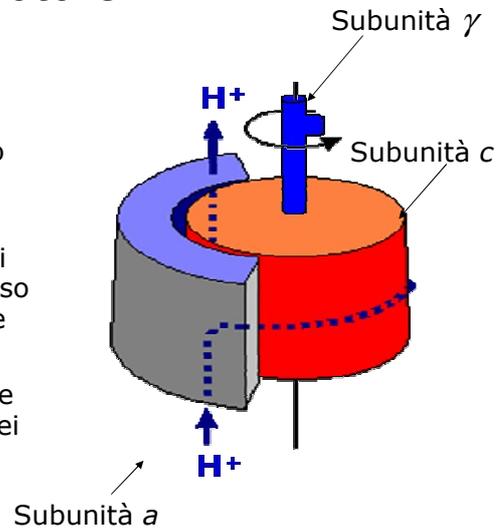
## Struttura $F_0F_1$

- Si ritiene che le subunità  $b$  di  $F_0$  includano una  $\alpha$ -elica transmembrana e un dominio  $\alpha$ -elica molto polare che si estenda al di fuori della membrana.
- Lo "statore" del motore molecolare consiste quindi in un anello di tre subunità  $\alpha\beta$  di  $F_1$ , la subunità  $a$  di  $F_0$  e le varie subunità che le legano insieme ( $b, d, F_6$  e  $OSCP$  nel  $F_1F_0$  mitocondriale o due  $b$  e  $\delta$  in *E. coli*).
- Il "rotore" consisterebbe in un anello di dieci subunità  $c$ , la "camma" nella parte interna di  $F_1$  ( $\gamma, \delta, \varepsilon$  nei mitocondri;  $\gamma$  e  $\varepsilon$  in *E. coli*).



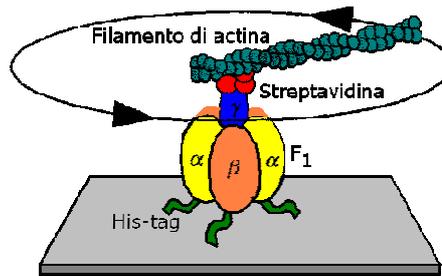
## Il rotore

- 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  $\gamma$  a  $F_1$ .

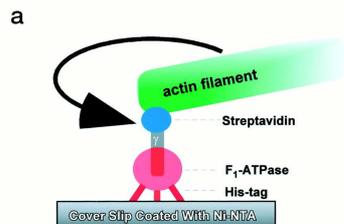


## Motori molecolari

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



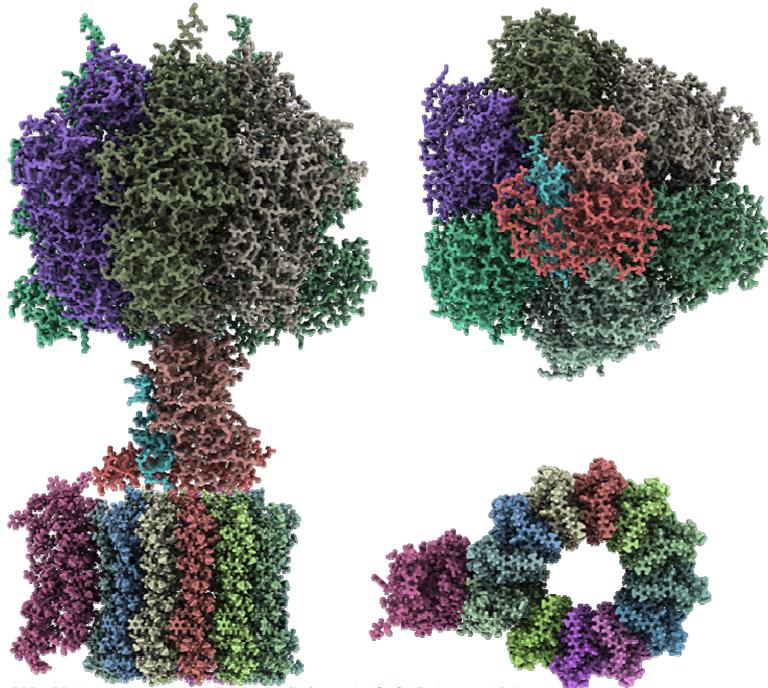
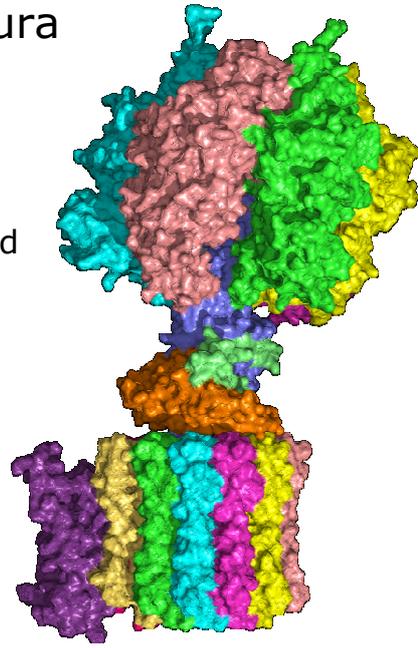
### The direct observation of the $\gamma$ rotation in the $F_1$ motor.

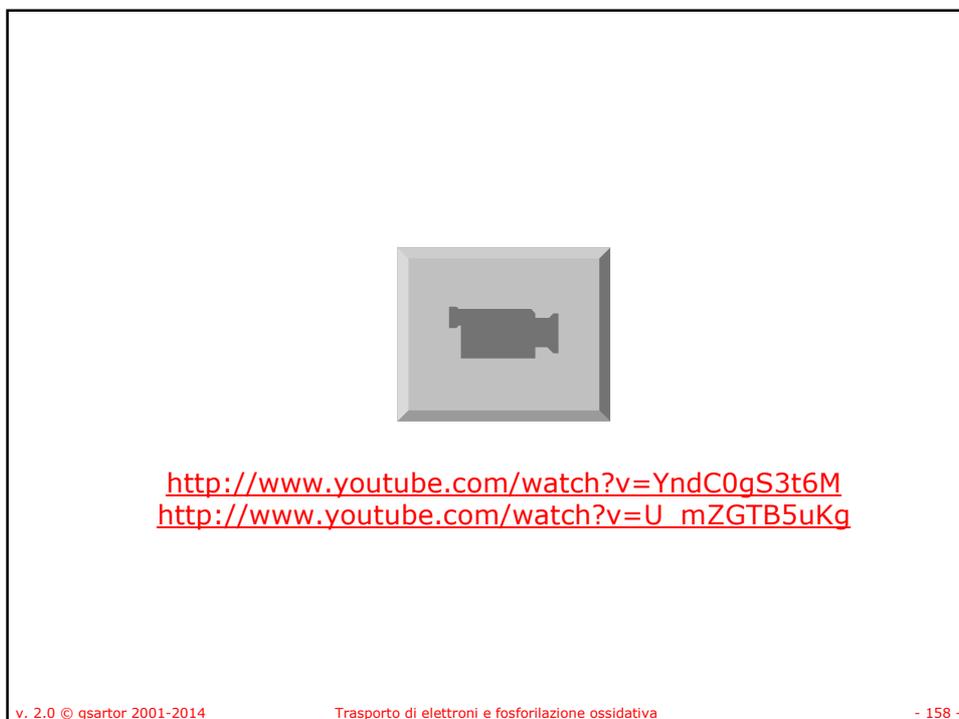
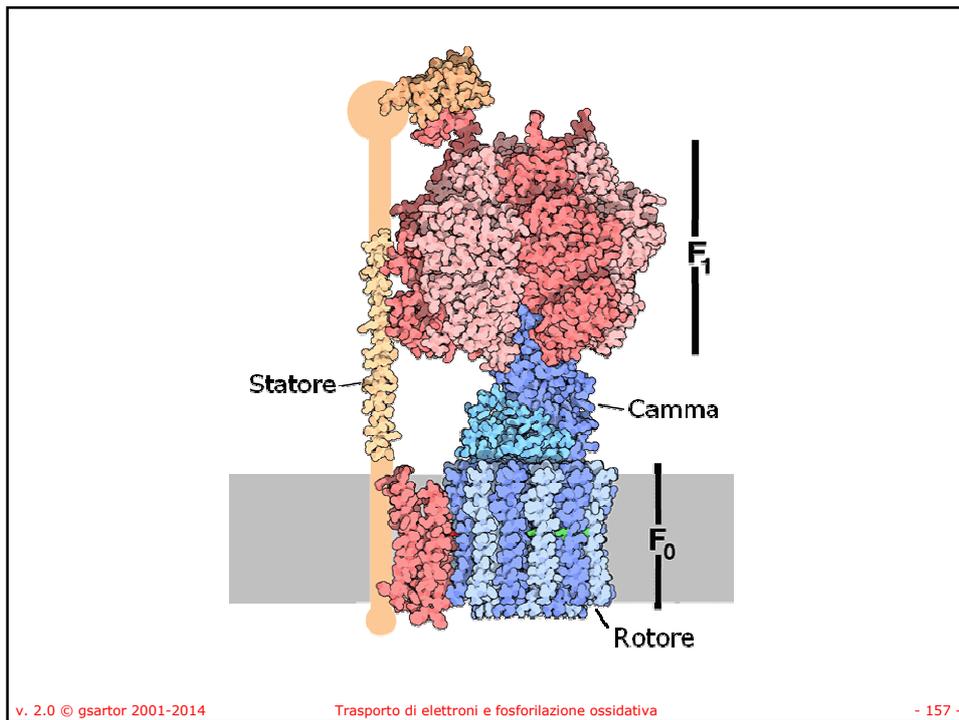


Noji H, Yoshida M J. Biol. Chem. 2001;276:1665-1668

## Struttura

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





# Trasporto ATP, ADP e Pi

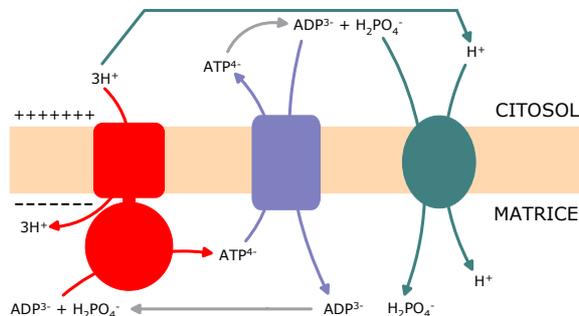
Come rendere disponibile l'energia (ATP).



## Trasporto ATP, ADP e P<sub>i</sub>

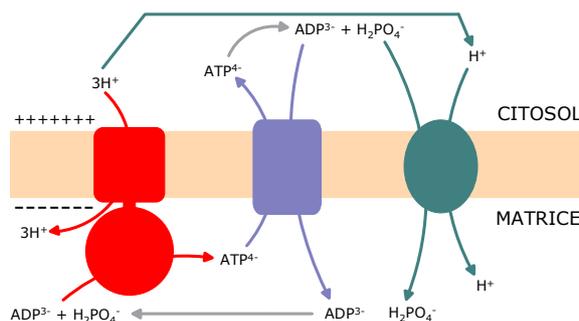
- L'ATP prodotto nelle matrice mitocondriale deve uscire per essere usato nel citosol come fonte di energia.
- L'ADP e il P<sub>i</sub> provenienti dall'idrolisi dell'ATP nel citosol devono entrare nella matrice mitocondriale per essere convertito in ATP.
- La membrana esterna mitocondriale non è una barriera impermeabile, canali anionici a voltaggio dipendente (VDAC) permettono il passaggio di ADP e P<sub>i</sub>.
- La membrana interna è invece impermeabile e sono richiesti due trasportatori per l'ADP e ATP.

## Trasporto ATP, ADP e P<sub>i</sub>



- Una traslocasi (trasportatore ADP/ATP) è un antiporter che catalizza lo scambio di ADP per ATP attraverso la membrana mitocondriale interna.
  - Al pH cellulare (7.2) l'ATP ha quattro cariche negative (ATP<sup>4-</sup>), l'ADP ne ha tre (ADP<sup>3-</sup>).
  - Lo scambio ADP<sup>3-</sup>/ATP<sup>4-</sup> è pilotato, e usa, il potenziale di membrana (una carica per molecola di ATP).

## Trasporto ATP, ADP e P<sub>i</sub>



- Il fosfato rientra nella matrice attraverso un simporto elettroneutro con H<sup>+</sup>,
- L'entrata di P<sub>i</sub> è pilotata, e usa, il gradiente di pH (una mole H<sup>+</sup> per mole di ATP).
- Quindi l'equivalente di una mole di H<sup>+</sup> entra nella matrice per lo scambio ADP/ATP e l'entrata di P<sub>i</sub>.
- Assumendo 3H<sup>+</sup> trasportati da F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>, 4H<sup>+</sup> entrano nella matrice per ATP sintetizzato.

## Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
  - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] – Zanichelli
  - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
  - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
  - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
  - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
  - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
  - Rensselaer Polytechnic Institute:  
<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:

<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>, oppure da <http://www.qsartor.org/>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

**Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**  
Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - [giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)