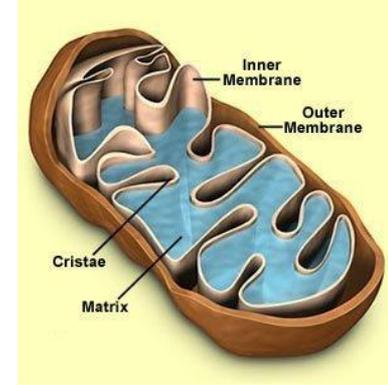


La respirazione

- Gli animali sono organismi aerobi e non possono vivere in assenza di ossigeno.
- L'ossigeno inspirato a livello polmonare (respirazione polmonare) è trasportato ai tessuti mediante l'emoglobina ed è utilizzato a livello cellulare per ossidare i nutrienti in grado di donare energia (respirazione cellulare)
- Le molecole ricche di energia (carboidrati, acidi grassi, amminoacidi) sono metabolizzate a livello cellulare in una serie di reazioni di ossidazione che portano alla formazione di CO_2 e di H_2O .
- Nei mitocondri avvengono molte reazioni ossidoriduttive, nelle quali i substrati si ossidano cedendo elettroni a specifici coenzimi, come il NADAH e il FADH_2 , che si riducono.

I Mitocondri



Membrana esterna

- liberamente permeabile alla maggioranza degli ioni e delle piccole molecole.

Membrana interna

- insolitamente *ricca di proteine* (inclusi i complessi ATP sintetasi che protrudono nella matrice mitocondriale)
- *impermeabile* alla maggior parte degli ioni (compresi H^+ , Na^+ , K^+), ad ATP, ADP, piruvato ed altri metaboliti importanti per la funzione mitocondriale.
- Il trasporto di molecole può avvenire grazie a trasportatori specializzati.

Matrice

- simile ad un gel, è composta per il 50% da proteine
- contiene NAD^+ e FAD, ADP e fosfato, mtDNA, mtRNA, enzimi (per l'ossidazione di piruvato, amminoacidi ed acidi grassi, ciclo di Krebs e per parte della sintesi dell'urea e dell'eme).

La fosforilazione ossidativa e la Catena Respiratoria

- Nei mitocondri avvengono diverse reazioni ossidoriduttive (decarbossilazione ossidativa del piruvato, ciclo di Krebs, β -ossidazione degli acidi grassi etc.) nelle quali i substrati si ossidano cedendo elettroni a specifici coenzimi, come il NAD^+ e il FAD, che si riducono a NADH e FADH_2 .
- A livello della membrana mitocondriale interna è collocata la **catena di trasporto degli elettroni** attraverso la quale, mediante un sistema di reazioni ossidoriduttive consecutive, gli elettroni dal NADH e FADH_2 vengono trasferiti all' O_2 .
- Questo complesso di reazioni prende il nome di *CATENA* poiché gli elettroni vengono ceduti all' O_2 attraverso passaggi intermedi; si aggiunge l'aggettivo *RESPIRATORIA* poiché si consuma ossigeno.

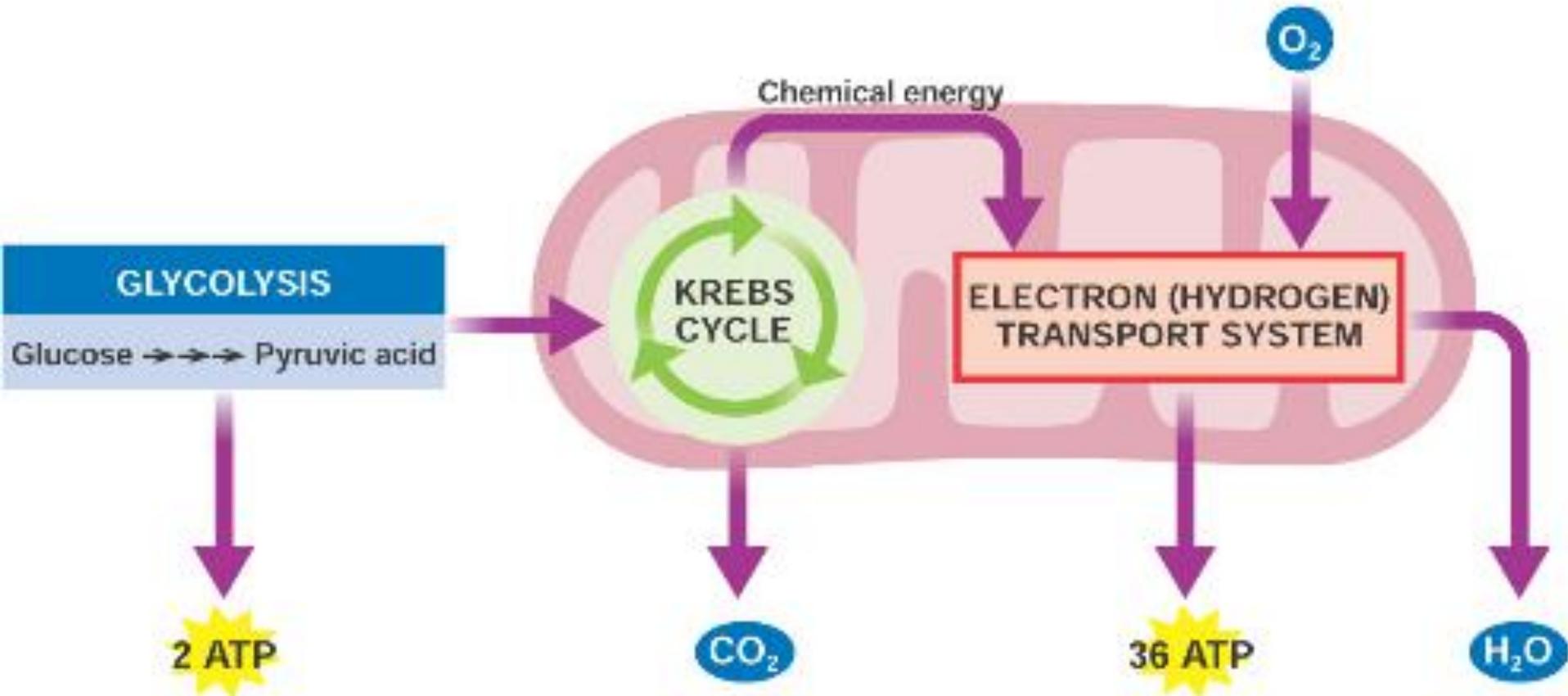


Albert L. Lehninger 1917–1986.

Fosforilazione ossidativa

- Rappresenta il culmine del metabolismo energetico negli organismi aerobi
- La **conservazione dell'energia** durante l'ossidazione di substrati può avvenire anche **mediante trasporto di elettroni** scambiati in reazioni di ossido-riduzione.
- Nella fosforilazione ossidativa il trasporto di elettroni e la formazione di un gradiente di protoni (H^+) trans-membrana promuove la formazione di ATP.
- I più comuni trasportatori di elettroni sono i coenzimi nucleotidici (nicotinamide adenina dinucleotide, **NAD⁺**, e la flavina adenina dinucleotide, **FAD**).

AEROBIC RESPIRATION -- SUMMARY



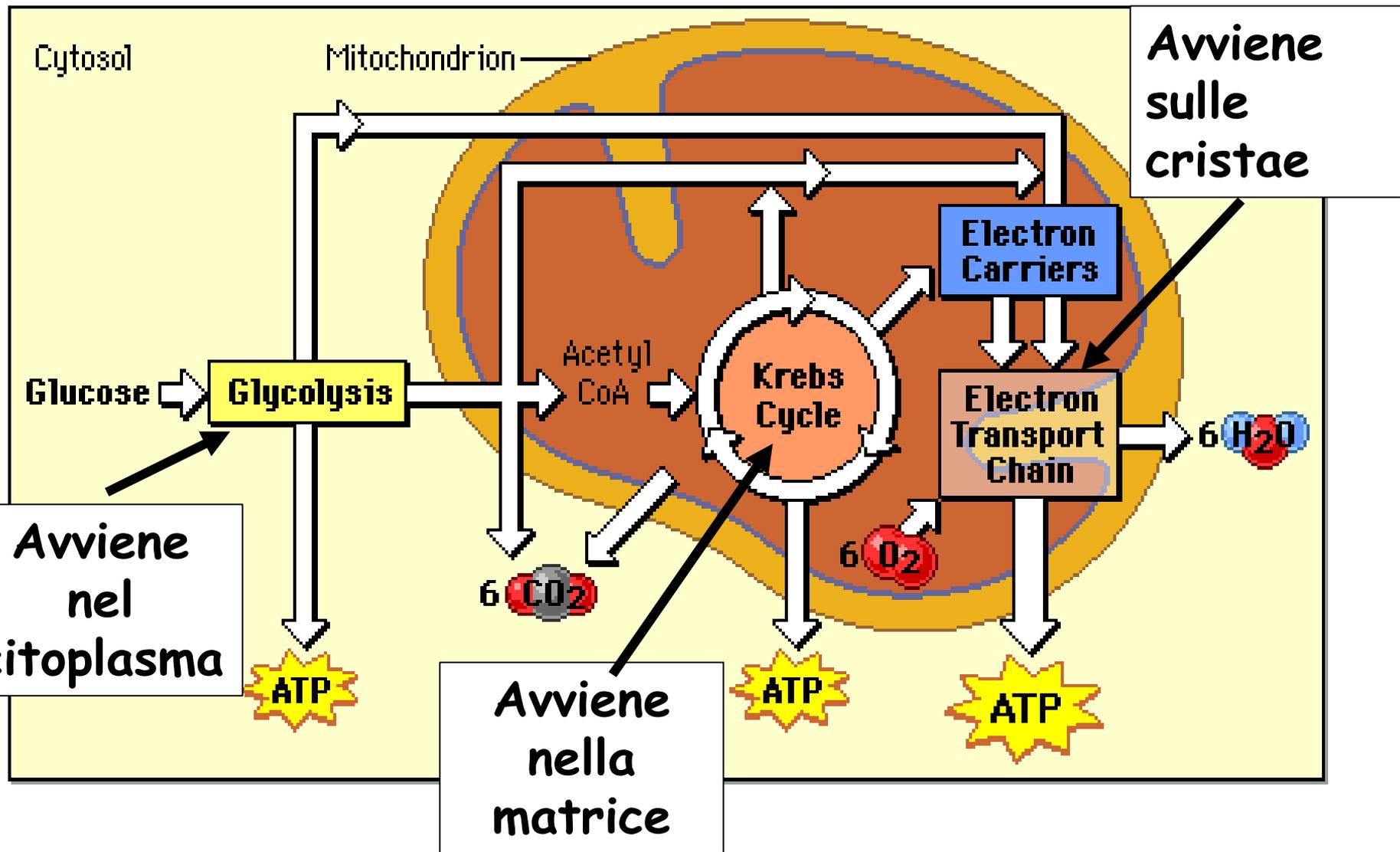
$$\Delta G^{\circ} = -2850 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1} = -682 \text{ kcal mole}^{-1}$$

Resa energetica

Glicolisi = 2 ATP + 2 NADH + 2 acido piruvico

2 x sintesi Acetil-CoA da piruvato = 2 x 1 NADH

2 x Ciclo di KREBS = 2 x (1 GTP + 3 NADH + 1 FADH₂)



La Catena Respiratoria

- Dalla membrana mitocondriale interna si possono separare 5 distinti complessi enzimatici (*Complesso I, II, III, IV e V*).
- I *Complessi I-IV* fanno parte della catena di trasporto degli elettroni.
- Ciascun Complesso accetta o dona elettroni a trasportatori di elettroni intermedi (Coenzima Q e Citocromo c), dotati di una certa libertà di movimento.
- Gli elettroni infine si combinano con l'O₂ e con i protoni (H⁺ in acqua), formando molecole di H₂O.
- Il *Complesso V* (ATP sintetasi) catalizza la sintesi dell'ATP.

Le reazioni della catena di trasporto degli elettroni

La formazione del NADH.

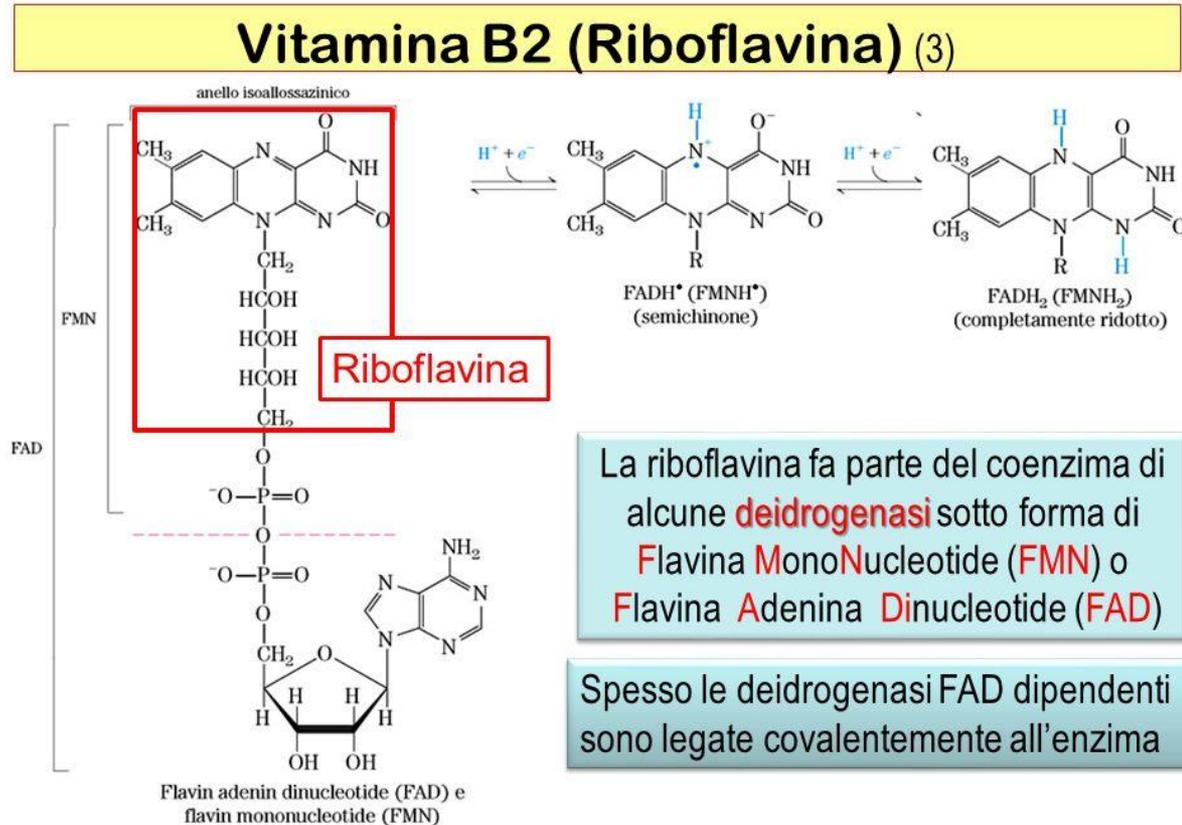
- Il $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ ad opera di deidrogenasi che rimuovono 2 atomi di H dal loro substrato.
- Entrambi gli e^- , ma un solo H^+ , si trasferiscono al NAD^+ (nell'insieme uno *ione idruro*, H^-). Si formano così il NADH e un H^+ libero.

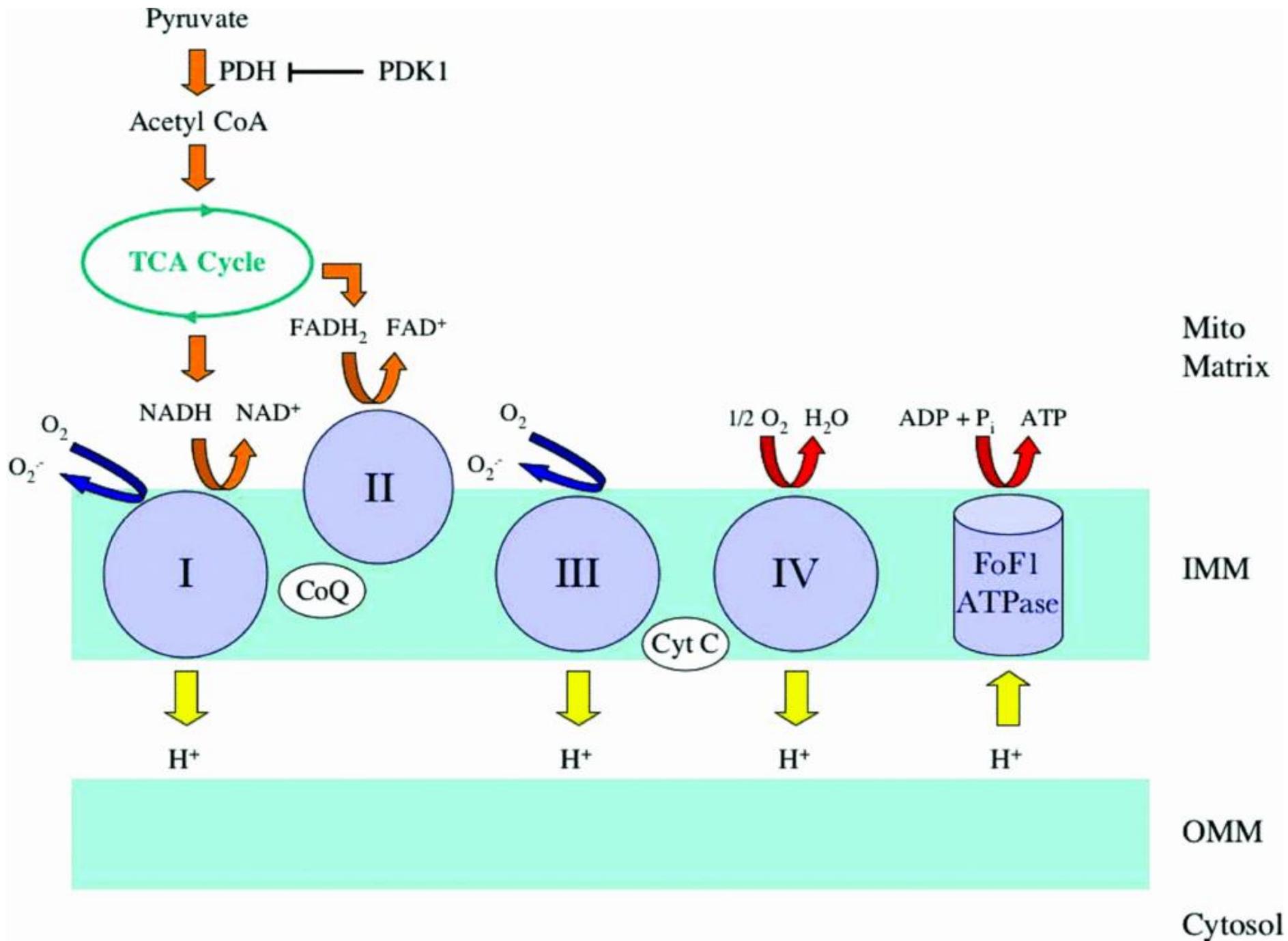
Ad esempio

- Lattico deidrogenasi
- Malico deidrogenasi
- Alcol deidrogenasi

Le reazioni della catena di trasporto degli elettroni

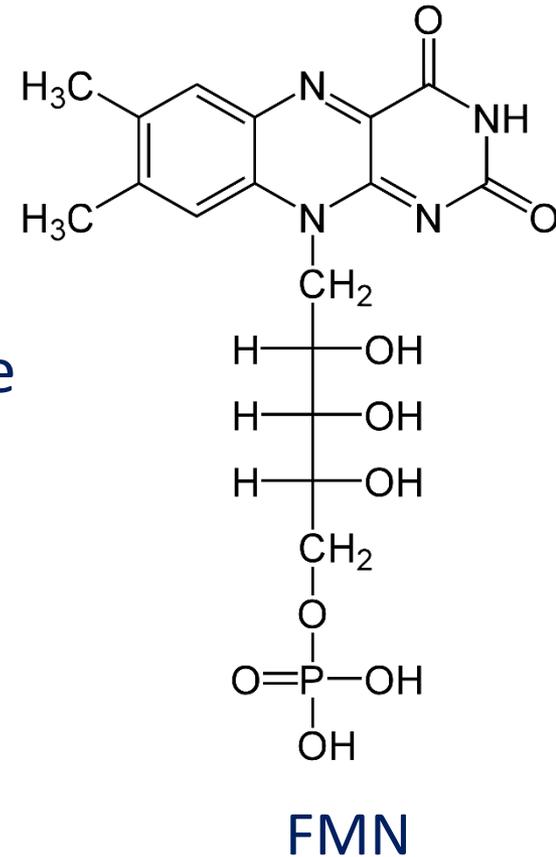
- Il flavina adenina dinucleotide (**FAD**), partecipa a innumerevoli reazioni che comportano il trasferimento di 1 o 2 elettroni. Riducendosi con due elettroni dà luogo al **FADH₂**





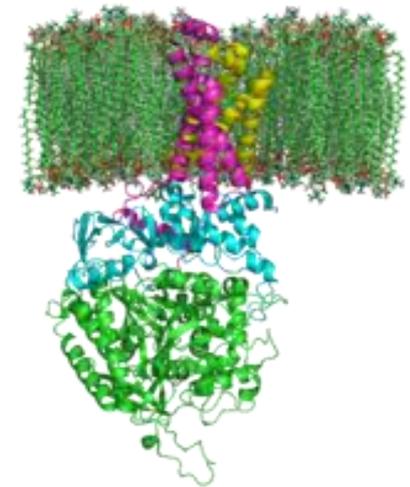
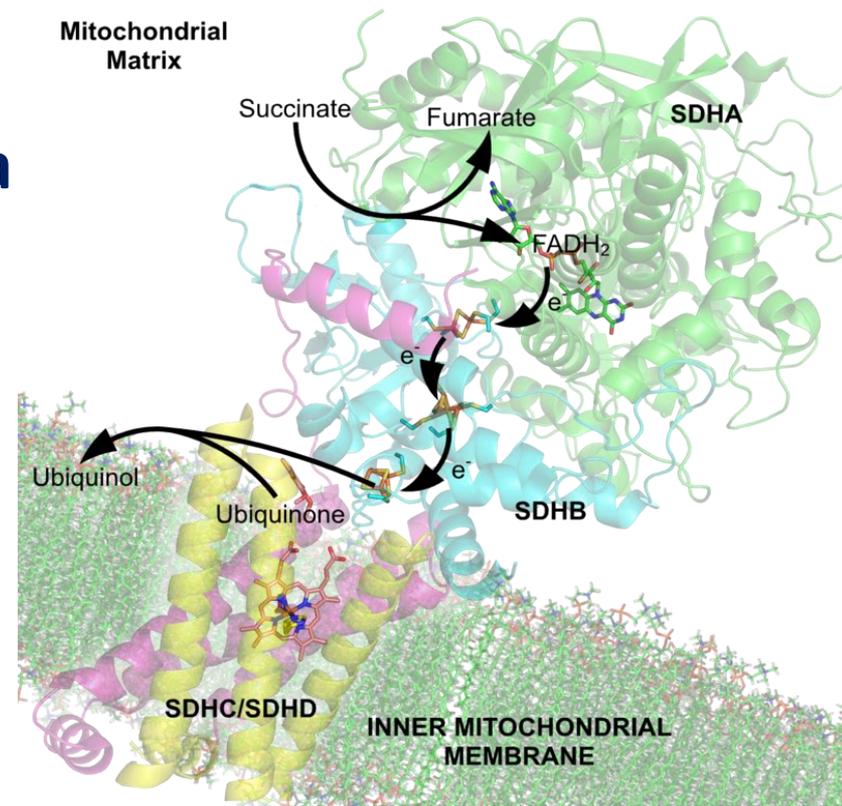
Complesso I, *NADH deidrogenasi*.

- Uno ione H^+ libero e lo ione idruro (H^-) trasportato dal NADH si trasferiscono al Complesso I (*NADH deidrogenasi*).
- Al Complesso I è saldamente legata una molecola di Flavin mono-nucleotide (FMN) che accetta i 2 e^- e i 2 H^+ , trasformandosi in $FMNH_2$.
- La *NADH deidrogenasi* contiene vari atomi di Fe coordinati ad atomi di S (centri ferro-zolfo), che permettono di trasferire gli e^- al componente successivo della catena (Coenzima Q) grazie al passaggio del ferro da Fe^{+++} a Fe^{++} .
- Questa pompa protonica porta 4 protoni fuori dalla matrice del mitocondrio e un flusso di 2 elettroni per ogni NADH.



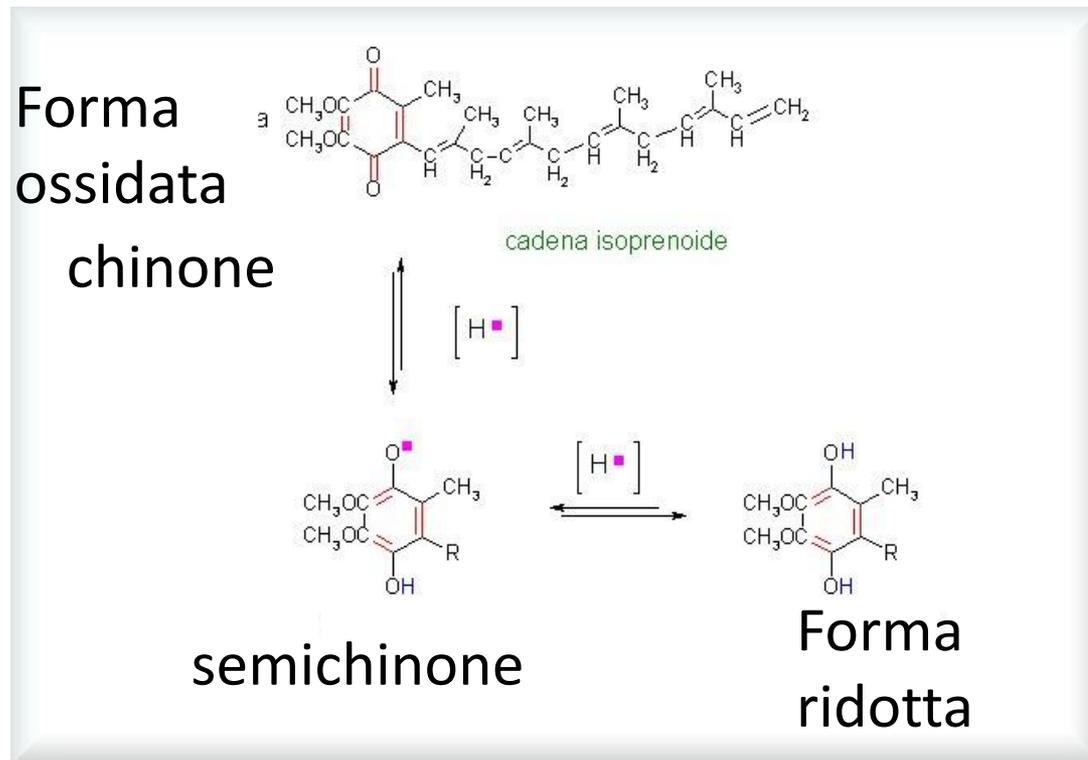
Complesso II, succinato deidrogenasi (succinato-coenzima Q riduttasi)

- Fa parte del ciclo di Krebs.
- Catalizza la riduzione del FAD a FADH_2 con concomitante ossidazione del succinato a fumarato (tappa 6 del ciclo di Krebs) e porta alla formazione di FADH_2 che viene ossidato dal centro Fe-S (che si riduce da Fe^{3+} a Fe^{2+}).
- La successiva ossidazione del Fe riduce Q a QH_2 .
- In questo caso non avviene il trasporto di protoni



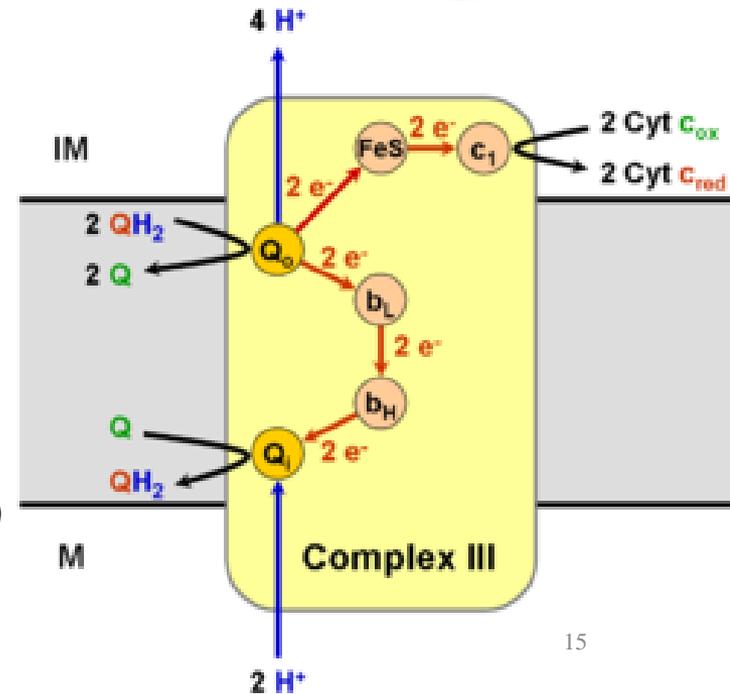
Coenzima Q (CoQ) o Ubichinone.

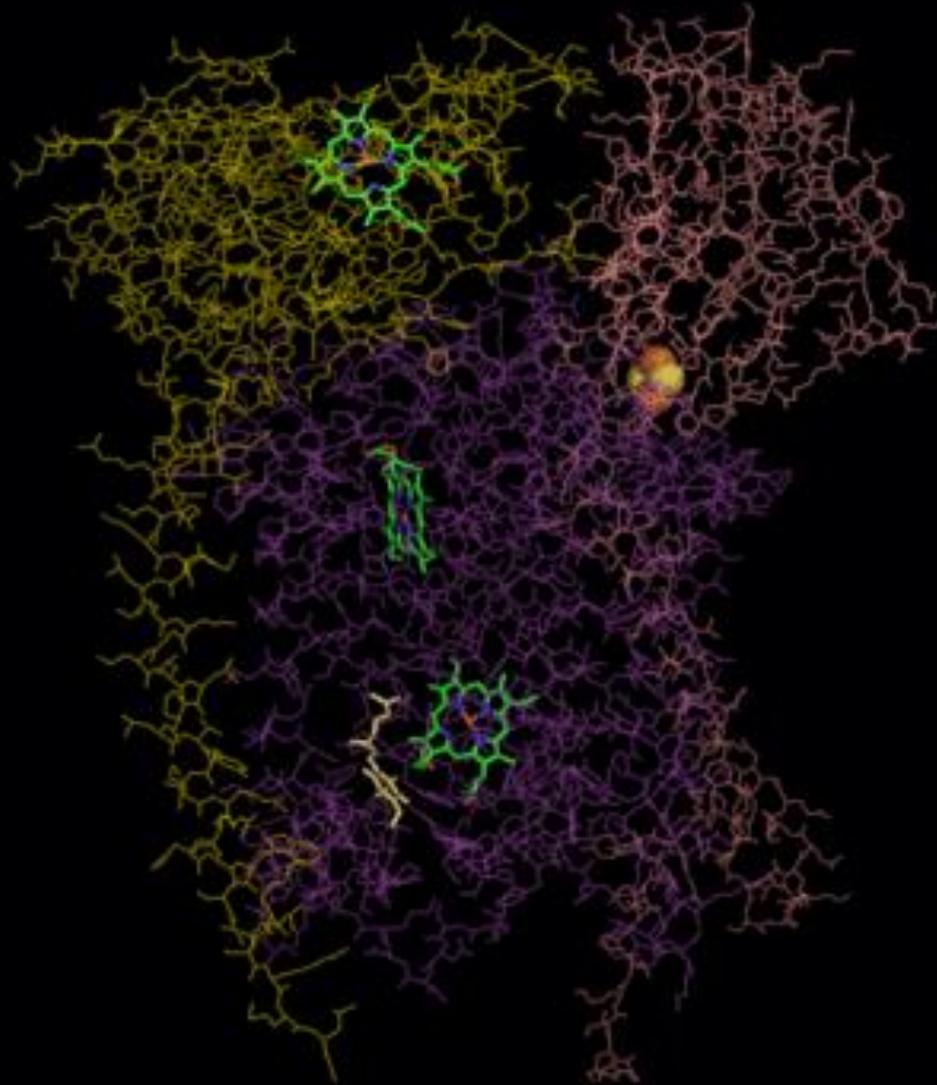
- Il coenzima Q può accettare atomi di H sia dal FMNH_2 (prodotto nella *NADH deidrogenasi*) sia dal FADH_2 prodotto dalla *succinato deidrogenasi* (Complesso II).
- Il CoQ può accettare uno o due elettroni, trasformandosi nella forma semichinonica o in quella completamente ridotta.



Complesso III – Complesso del Citocromo c reduttasi

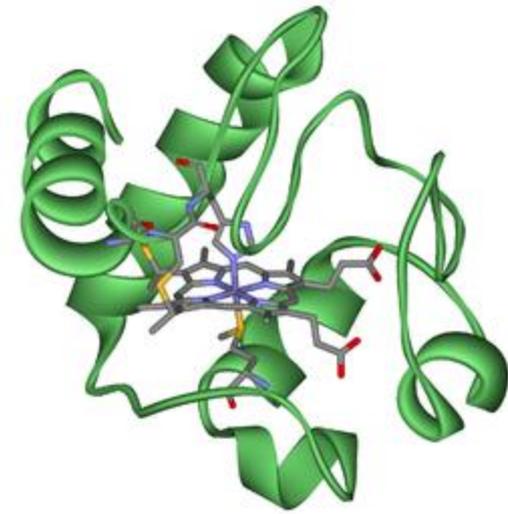
- Riceve elettroni dal Coenzima Q e li cede al citocromo c.
- Contestualmente, l'enzima trasferisce altri 4 H⁺ nello spazio intermembrana.
- L'enzima contiene anche il citocromo b, che possiede due gruppi eme (b562 e b566) legati ad un'unica catena proteica, un centro ferro-zolfo *ed il citocromo c1*.



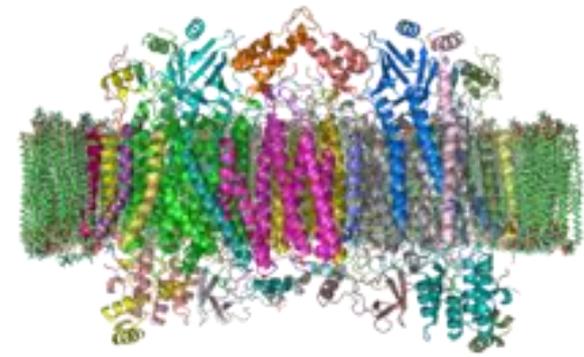


Il citocromo C

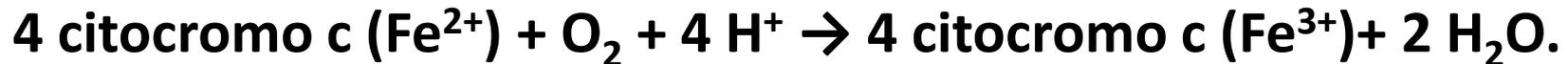
- Anche il citocromo c è una parte essenziale della catena di trasporto degli elettroni. È una proteina periferica di membrana, solubile e debolmente associata alla membrana mitocondriale interna (sul versante che affaccia sullo spazio intermembrana) e trasferisce elettroni tra i complessi III e IV.
- il citocromo c è dotato, come tutti i citocromi, di un gruppo prostetico chiamato gruppo EME che coordina un atomo di ferro. Il Citocromo c permette il passaggio degli elettroni tramite l'oscillazione del ferro dalla forma ferrica Fe^{3+} (ossidata) alla forma ferrosa Fe^{2+} (ridotta).
- Le forme ridotte non possono essere riossimate dall' O_2 ma soltanto da un altro citocromo.



Complesso IV – Citocromo c ossidasi



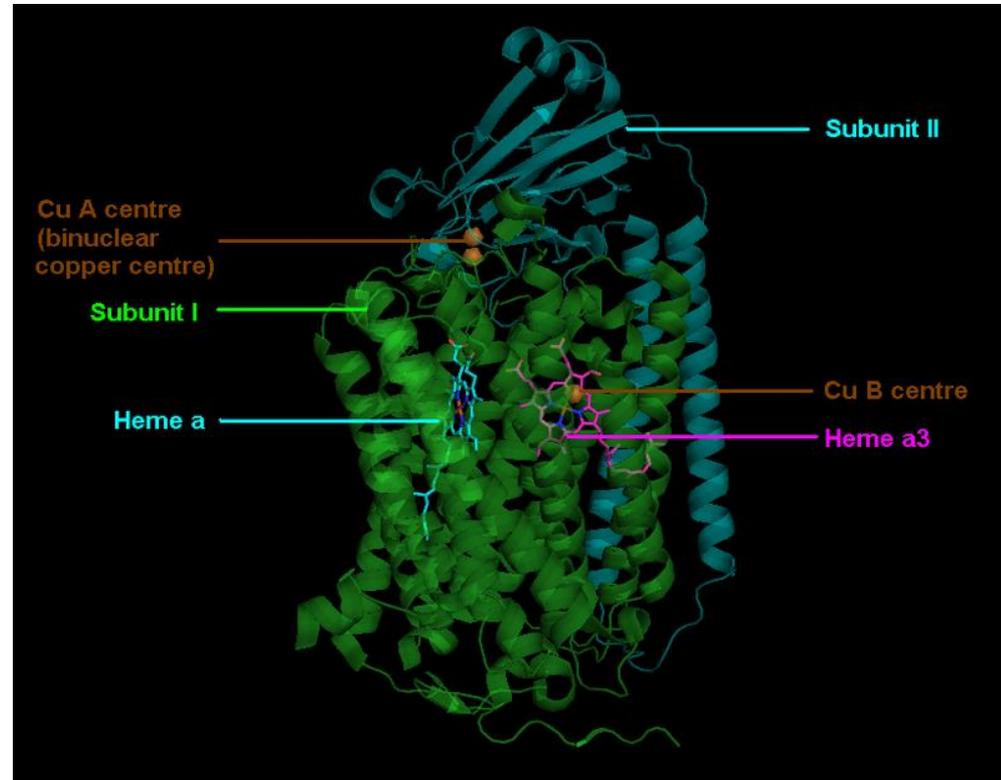
- È l'ultimo complesso, quello che trasferisce gli elettroni direttamente all'ossigeno trasformandolo, insieme agli ioni H^+ , in H_2O . Anche questo trasporta 4 protoni nello spazio intermembrana.



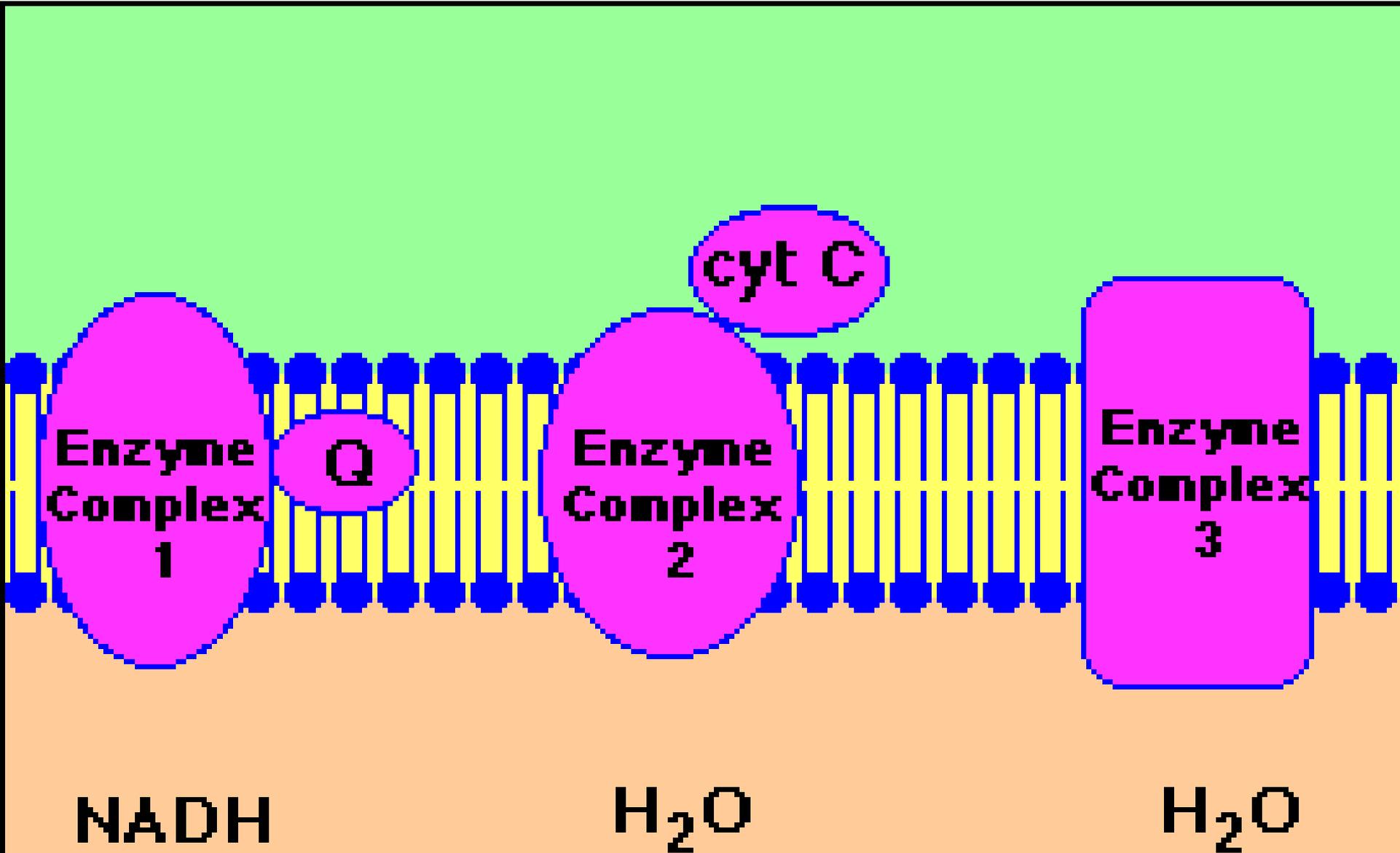
- La riduzione dell'ossigeno è accompagnata dall'estrusione di quattro protoni dal compartimento intramitocondriale. Il consumo di quattro ioni idrogeno per molecola di ossigeno e la traslocazione di quattro ulteriori ioni idrogeno attraverso la membrana mitocondriale interna sono responsabili del mantenimento di un gradiente di pH sui due lati di tale membrana, gradiente da cui dipendono la fosforilazione di ADP ad ATP e la produzione di energia della cellula.

Le reazioni della catena di trasporto degli elettroni

- Il Complesso IV (*citocromo ossidasi*) è l'unico trasportatore di e^- nel quale il Fe dell'EME può reagire direttamente con l' O_2 .
- Contiene il *citocromo a*, *a₃* e rame.
- E' inibito dagli ioni CN^- .
- Il Complesso IV è costruito in modo da non lasciar sfuggire derivati dell'ossigeno parzialmente ridotti (ROS).



Le reazioni della catena di trasporto degli elettroni



La Fosforilazione Ossidativa

- Nel percorrere la catena di trasporto, gli elettroni perdono gran parte della loro *energia libera*.
- Parte di questa energia è trattenuta mediante la *produzione di ATP* a partire da ADP e fosfato inorganico (Pi)
- La quota di energia libera che non è trattenuta sotto forma di ATP viene dissipata come *calore*.
- Il trasferimento di elettroni lungo la catena respiratoria è favorito sul piano energetico (il NADH è un potente donatore di elettroni e l'O₂ è un avido accettore di elettroni).
- Tuttavia il flusso di elettroni dal NADH verso l'O₂ non ha come esito diretto la formazione di ATP.

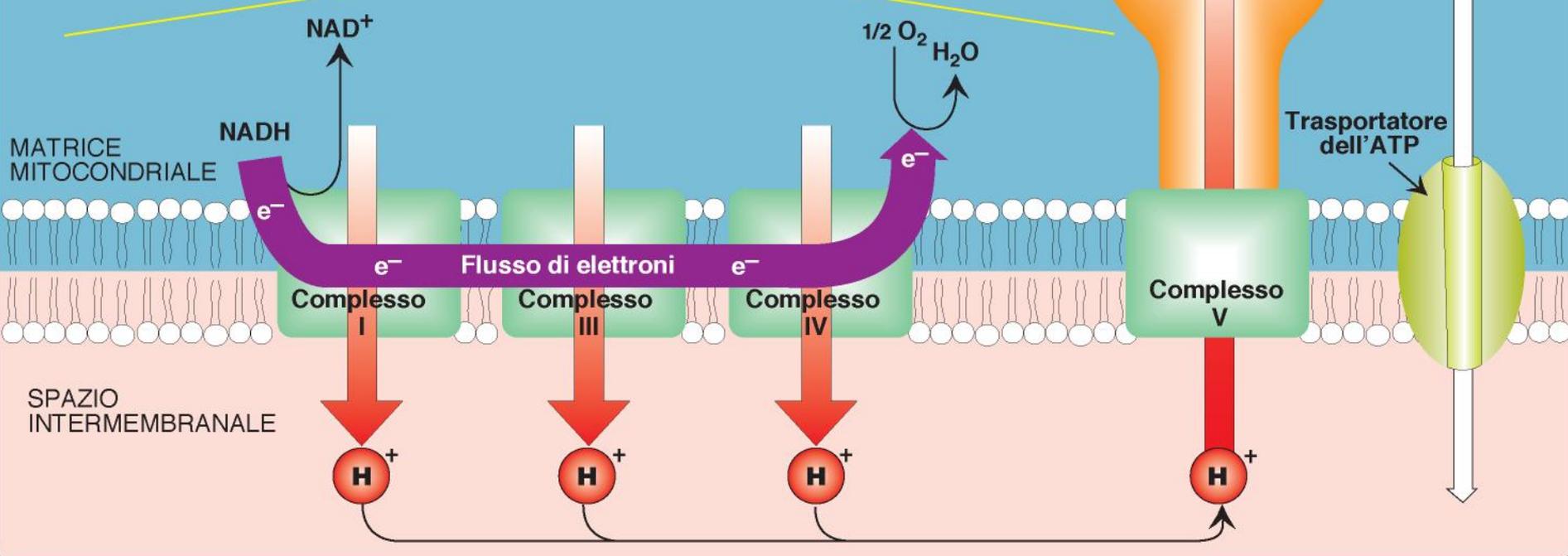
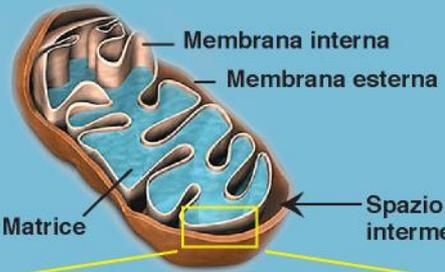
Ipotesi chemio-osmotica di Mitchell

- Spiega in che modo l'energia libera generata dalla catena respiratoria possa essere utilizzata per formare ATP.

Pompa protonica.

- Durante il trasporto di elettroni, attraverso la membrana mitocondriale interna avviene anche un trasporto di protoni (H^+), dalla matrice allo spazio intermembranale .
- Questo processo crea un gradiente elettrico (con una quantità di cariche positive maggiore all'esterno della membrana) ed un gradiente di pH (all'esterno della membrana il pH è più basso rispetto all'interno).
- L'energia generata da tale gradiente protonico è utilizzata per la sintesi di ATP: Il gradiente protonico è quindi l'intermedio che accoppia l'ossidazione alla fosforilazione.

MITOCONDRIO



ATP sintetasi

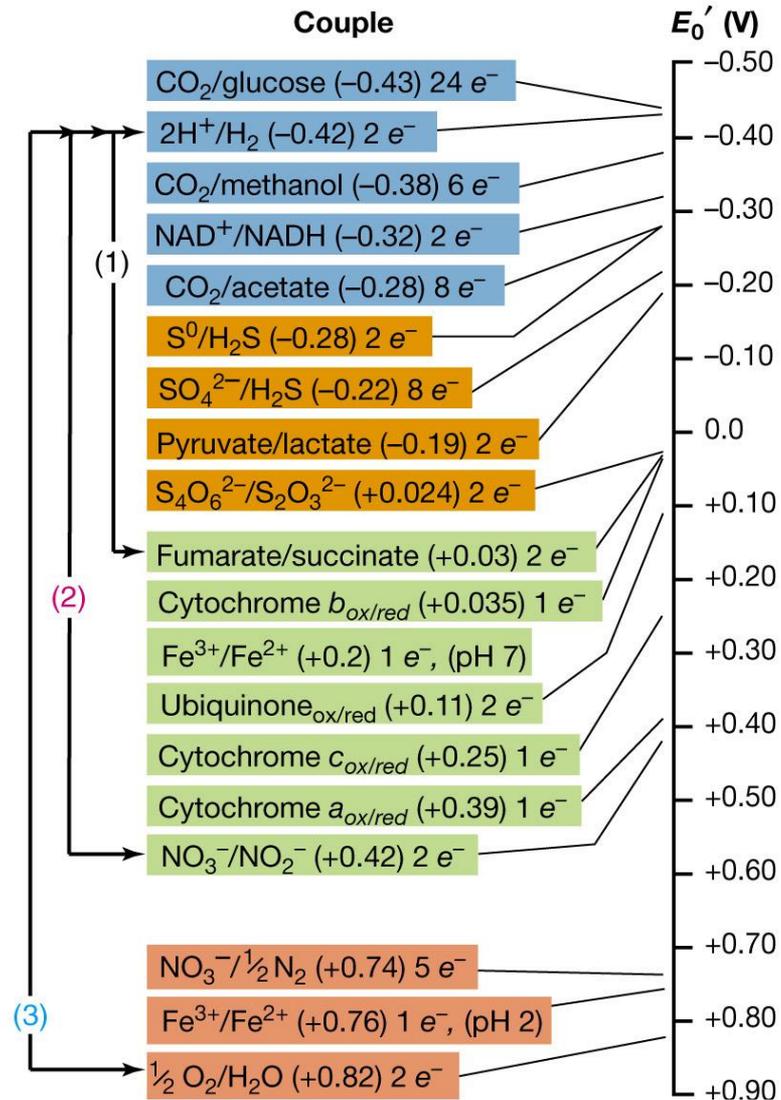
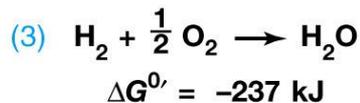
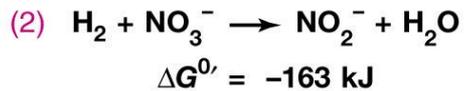
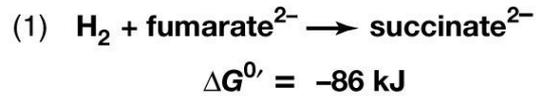
- Il complesso enzimatico della *ATP sintetasi* (Complesso V) produce l'ATP, utilizzando l'energia del gradiente protonico.
- I protoni, dopo essere stati trasferiti sul versante citosolico della membrana mitocondriale interna, rientrano nella matrice mitocondriale attraverso un canale all'interno del complesso dell'ATP sintasi. (N.B. *La membrana mitocondriale interna è impermeabile ai H^+*)
- Durante il flusso di protoni, all'interno del complesso dell'ATP sintetasi avviene la sintesi di ATP a partire da ADP e P_i mentre il gradiente elettrochimico viene dissipato.

Accoppiamento

- Il trasporto degli elettroni (*catena respiratoria*) e la sintesi di ATP (*fosforilazione ossidativa*) avvengono in modo continuo in tutti i tessuti che contengono mitocondri.
- La catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa sono *strettamente accoppiate*: l'una può avvenire solo se avviene anche l'altra:
 - *se il gradiente protonico non è consumato*, la catena respiratoria cessa perché diventa impossibile termodinamicamente aumentare il gradiente di protoni;
 - *se la catena respiratoria cessa*, la fosforilazione consuma il gradiente protonico fino a che questo non è più sufficiente per la sintesi di ATP.

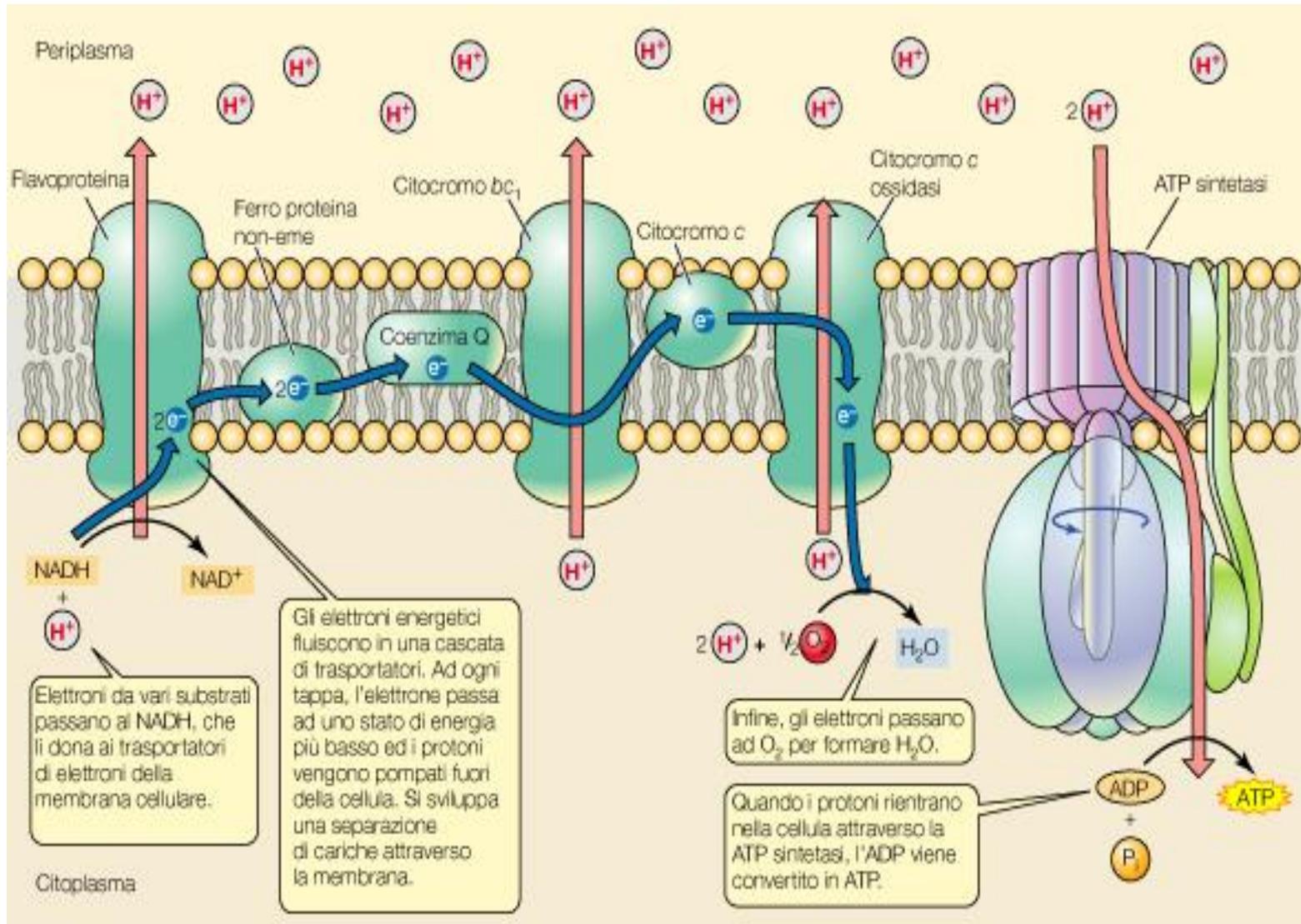
Potenziale di ossido-riduzione

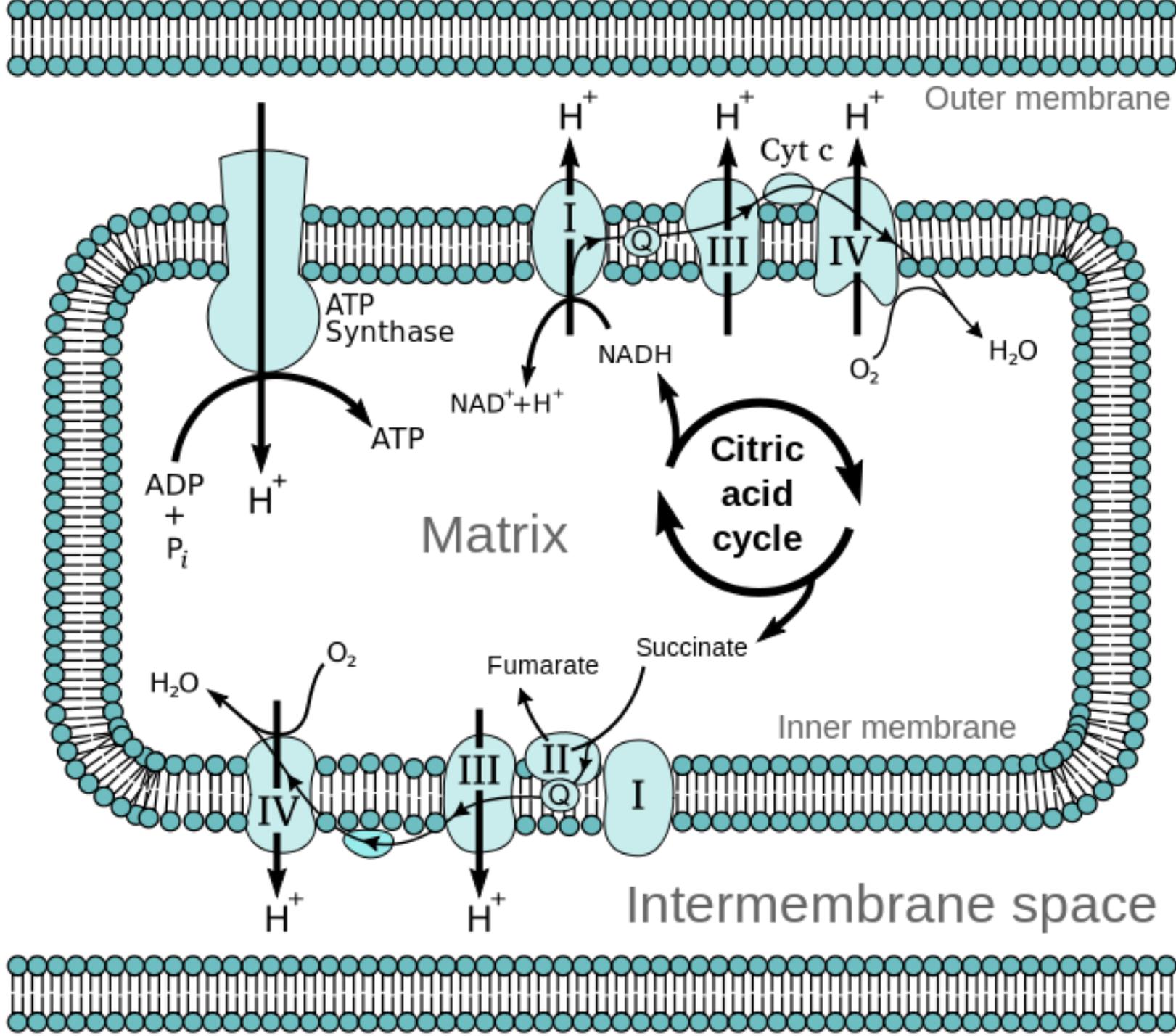
Examples of reactions
with H₂ as e⁻ donor



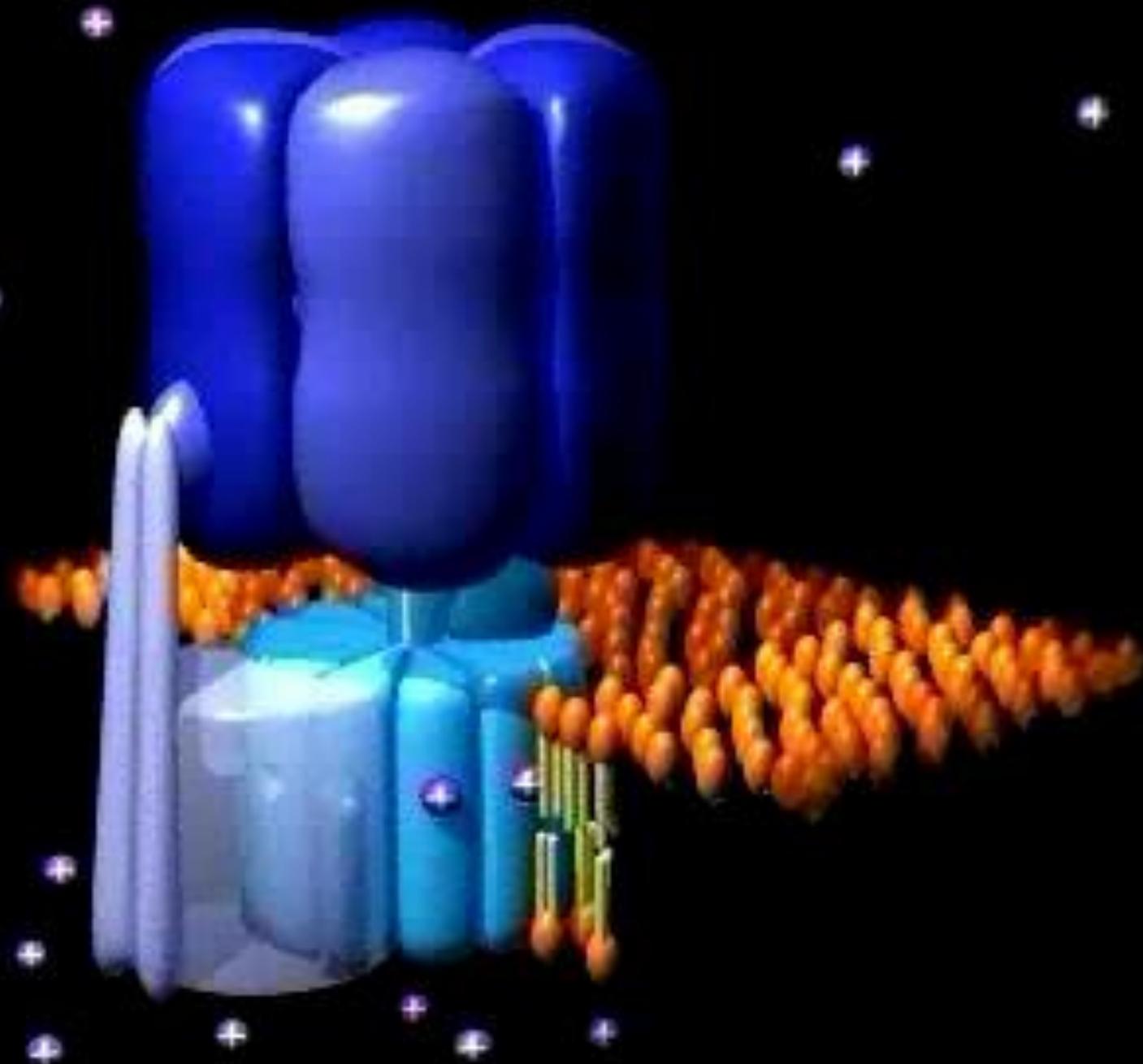
Il potenziale redox è una misura (Volt) dell'affinità di una sostanza per gli elettroni

FORZA PROTONO-MOTRICE





W. Junge, Bereiter-Hahn & IWF (1999)



La resa dell'ossidazione completa del glucosio

L'ossidazione del glucosio sviluppa:

$$\Delta G^{\circ'} = -2850 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1} = -682 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$$

Dall'ossidazione completa si ottengono 38 moli di ATP per mole di glucosio

$$\Delta G^{\circ'} = 38 \times 30.5 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1} = 1160 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1} = 277 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$$

La resa energetica è:

$$resa = \frac{1160 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}}{2850 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}} \times 100 = 40.7 \%$$

Le alternative metaboliche

ACCETTORE DI ELETTRONI	Prodotto finale	NOME DEL PROCESSO
O_2	H_2O	RESPIRAZIONE AEROBIA
NO_3	NO_2 , NH_3 or N_2	Respirazione anaerobia: denitrificazione (<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i>)
SO_4	S or H_2S	Respirazione anaerobia : riduzione solfati (<i>Desulfovibrio</i>)
fumarato	succinato	respirazione anaerobia : con accettore organico di e- (<i>E.coli</i>)
CO_2	CH_4	METANOGENESI (Archea)