

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Biochimica  
Ciclo XXI

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/10**

Meccanismo di trasferimento elettronico nel Complesso I  
mitocondriale

**Presentata da: Dott.ssa Leoni Serena**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Giorgio Lenaz**

**Relatore**

**Prof. Giorgio Lenaz**

**Esame finale anno 2009**

# Indice degli argomenti

<b>Introduzione</b> .....	3
1- Struttura e morfologia mitocondriale.....	3
2- Organizzazione e distribuzione .....	6
3- Funzione dei mitocondri .....	7
4- La fosforilazione ossidativa .....	8
4.1- Complesso I.....	10
4.1.1- Dominio idrofilico .....	14
4.1.2- Dominio idrofobico.....	16
4.1.3- Meccanismi di trasporto protonico.....	19
4.1.4- Inibitori del Complesso I .....	23
4.1.5 Meccanismi di inibizione .....	26
4.3- Complesso II.....	28
4.3- Coenzima Q.....	29
4.4- Complesso III.....	31
4.4.1- Inibitori del Complesso III .....	33
4.5- Citocromo c .....	35
4.6- Complesso IV .....	35
4.6.1- Inibitori del complesso IV.....	37
4.7- ATP sintasi .....	38
4.7.1- Inibitori del Complesso V.....	40
5- Le Specie Reattive dell'Ossideno (ROS).....	41
5.1- La catena respiratoria mitocondriale come fonte di ROS .....	44
5.1.1- Il Complesso I come fonte di ROS .....	45
5.1.2- Complesso III come produttore di ROS.....	47
5.1.3- Altre fonti di ROS.....	48
<b>Scopo della tesi</b> .....	50
<b>Materiali e Metodi</b> .....	52
1- Preparazione di mitocondri di cuore bovino (BHM) .....	52
2- Preparazione di particelle submitocondriali di cuore bovino (SMP) .....	52
3- Determinazione della concentrazione proteica.....	53
4- Dosaggi fluorimetrici .....	54

4.1- Misura della produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS).....	54
5- Saggi enzimatici .....	55
5.1- Attività NADH-CoQ reduttasica .....	55
5.2- Attività NADH-DCIP reduttasica .....	55
6- Saggi di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR).....	56
6.1- Preparazione dei campioni .....	56
6.2- Misure EPR .....	56
<b>Risultati e discussione</b> .....	<b>57</b>
1- Utilizzo delle sonde fluorescenti per studiare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in particelle submitocondriali (SMP) .....	57
2- Produzione di ROS da parte del Complesso I in presenza di substrati riducenti e ossidanti.....	61
3- Effetto degli inibitori del Complesso I sulla produzione di ROS.....	66
4- Analisi dell'attività NADH-DCIP reduttasica del Complesso I in presenza di inibitori76	
5- Indagine del Complesso I attraverso la Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) .....	79
5.1- Introduzione alla tecnica di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) .....	79
5.2- Dati EPR preliminari: analisi del semichinone .....	82
5.3- Analisi dei centri Fe-S del Complesso I.....	86
5.4- Analisi dell'effetto di analoghi a corta catena .....	89
5.5- Analisi del centro N1b e del semichinone.....	94
<b>Conclusioni</b> .....	<b>97</b>
<b>Abbreviazioni</b> .....	<b>104</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>105</b>

# Introduzione

## 1- Struttura e morfologia mitocondriale

La conoscenza della struttura dei mitocondri si è sviluppata in parallelo con il progredire delle tecniche di preparazione dei campioni biologici per la microscopia elettronica e con gli studi biochimici sulla funzionalità mitocondriale.

Sjostrand e Palade hanno condotto lavori pioneristici di microscopia elettronica applicata allo studio dei mitocondri. Entrambi constatarono che questi organelli intracellulari erano delimitati da un sistema di doppie membrane, ciascuna costituita da un doppio strato lipidico: la membrana mitocondriale esterna e la membrana mitocondriale interna. La loro interpretazione delle immagini ottenute in microscopia aveva però portato alla formulazione di due modelli diversi. Il modello di Sjostrand spiegava la compartimentazione osservata all'interno del mitocondrio con dei setti connessi alla membrana interna, che delimitavano degli spazi [1].

Nel modello di Palade, chiamato "Baffle Model", la compartimentazione originava da invaginazioni della membrana interna proiettate verso la matrice, le creste mitocondriali [2]. Secondo questo modello, correntemente rappresentato nei libri di testo, la membrana mitocondriale interna è una superficie continua con una complessa morfologia e le creste che si formano sono aperte allo spazio intermembrana da un lato e protrudono verso la matrice nel lato opposto.



*Figura 1:* Immagine di mitocondrio da cellule di pancreas (x 190000).

*Figura 2:* Rappresentazione schematica di un mitocondrio che mostra la membrana esterna, la membrana interna e le cristae mitocondriali (disegno di Fawcett D.).

Studi condotti da Hackenbrock dimostrarono in seguito che i mitocondri isolati sono soggetti a cambiamenti conformazionali in funzione dello stato metabolico e della condizione osmotica a cui sono sottoposti. La matrice si contrae producendo una conformazione “condensata” in cui la membrana interna si allontana da quella esterna eccetto in alcuni punti chiamati “punti di contatto” e ci sono più connessioni tra le creste e tra queste e la membrana interna [3]. Al contrario i mitocondri osservati *in situ* si trovano per lo più nella conformazione “ortodossa”, caratterizzata da un ampio volume della matrice, la membrana interna molto vicina a quella esterna e poche connessioni tra le creste mitocondriali.

La frequenza con cui le creste sono connesse alla membrana interna può quindi variare in funzione dello stato del mitocondrio, a differenza di quanto proposto nel modello di Palade.

Attraverso lo studio dei mitocondri tramite sottili sezioni in serie, Daeme e Wisse osservarono che le creste erano connesse alla membrana interna attraverso strutture tubulari del diametro di circa 30 nm che chiamarono “pediculi cristae” [4].

La tomografia elettronica (TEM) e la microscopia elettronica a trasmissione ad elevata risoluzione (HRSEM) hanno confermato questi ultimi risultati ed hanno fornito nuove evidenze sulla compartimentazione mitocondriale. Attualmente la tomografia elettronica è la tecnica che fornisce la più alta risoluzione tridimensionale della struttura interna di un mitocondrio. A differenza delle tecniche che usano sottili sezioni di tessuto in serie (50- 80 nm), la tomografia utilizza sezioni abbastanza spesse (0,25- 1,0  $\mu\text{m}$ ) da contenere una porzione rappresentativa del volume mitocondriale.

Le nuove immagini ottenute e i risultati di questi studi condotti su mitocondri isolati da fegato di ratto [5, 6] mostravano chiaramente che le creste hanno un'estesa natura tubulare e sono strutturalmente indipendenti dalla membrana interna. I segmenti tubulari delle creste sono sottili (30- 40 nm di diametro) e lunghi qualche centinaio di nanometri. Le creste mitocondriali sono connesse tra loro e allo spazio intermembrana mediante strette giunzioni tubulari (crista junctions) di circa 28 nm di diametro [7]. La maggior parte delle creste ha più giunzioni che possono essere disposte sullo stesso lato o su lati opposti del perimetro mitocondriale quando la cresta si estende completamente attraverso la matrice.

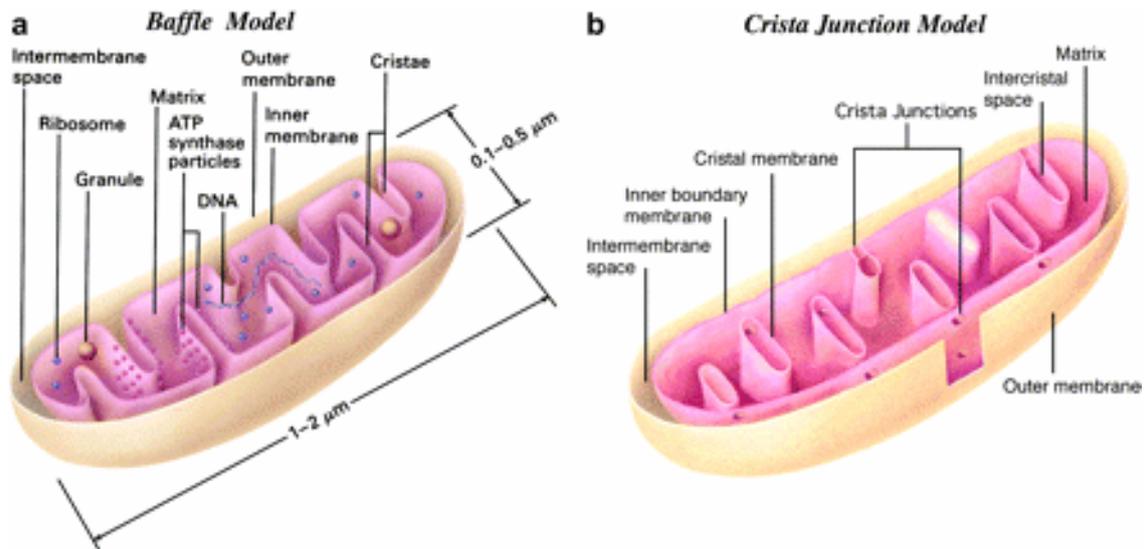


Figura 3: Modelli che rappresentano la struttura delle membrane mitocondriali.

a) Modello “ad invaginazioni”, elaborato da Palade nel 1950.

b) Modello “crista junction”. [Logan DC. (2006) ristampa da Perkins e Frey (2000)].

L’area di superficie topologicamente continua della membrana interna viene quindi divisa in due domini distinti le cui superfici sono contigue [7, 8].

Un dominio, lo spazio periferico della membrana interna o membrana interna di confine (“inner boundary membrane”) è posto molto vicino alla membrana esterna, e con essa stabilisce stretti contatti (“regioni puntate”) in numerose posizioni. Il secondo dominio origina dal primo e forma le creste mitocondriali per lo più tubulari che delimitano uno spazio (“intercristal space”).

All’interno di un mitocondrio è possibile distinguere quattro compartimenti fondamentali: membrana mitocondriale esterna ed interna, spazio intermembrana e matrice.

Le due membrane mitocondriali hanno differenti proprietà, a causa della loro diversa composizione.

La **membrana esterna** è composta per il 40-50% di lipidi e per la restante parte di proteine, tra cui alcuni enzimi che svolgono attività quali l’ossidazione dell’adrenalina, l’allungamento degli acidi grassi e la degradazione del triptofano. La membrana esterna è permeabile alla maggior parte delle piccole molecole e degli ioni perché contiene molte copie di porina, una proteina di 30-35 kDa che forma canali transmembrana non selettivi, nota anche come VDAC (Canale Anionico Voltaggio Dipendente). Il VDAC forma una struttura aperta a barile  $\beta$  simile alle porine batteriche. La **membrana interna** ha un rapporto proteine/lipidi di 3:1. L’assenza di porine e la presenza di molecole di cardiolipina (difosfatidil-glicerolo) determina la scarsa

permeabilità ad anioni, cationi e protoni permettendo la formazione del gradiente transmembrana, utile per la funzionalità mitocondriale. Nella membrana interna sono compresi gli enzimi della catena di trasporto degli elettroni, l'ATP sintasi e alcune proteine di trasporto per le molecole metabolizzate nella matrice mitocondriale.

Lo spazio intermembrana è caratterizzato dalla presenza dell'enzima miochinasi, che catalizza la fosforilazione dell'adenosina 5'-monofosfato (AMP) ad adenosina 5'-difosfato (ADP). In questo spazio sono presenti inoltre le proteine proapoptotiche.

La **matrice** è una fase omogenea o finemente granulare, simile ad un gel a causa della concentrazione elevata di proteine idrosolubili (circa il 50%). Si ritiene che i granuli della matrice siano deputati al legame di cationi bivalenti come  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ; è noto infatti che i mitocondri rappresentano un importante deposito di calcio all'interno della cellula.

Nella matrice sono contenuti gli enzimi del Ciclo di Krebs, della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e del metabolismo degli amminoacidi, i ribosomi e molecole di DNA circolare a doppio filamento.

I mitocondri sono caratterizzati da un proprio genoma che contiene 16569 coppie di basi e possiede 37 geni, codificanti per due RNA ribosomiali (rRNA), 22 RNA di trasporto (tRNA) e 13 proteine che fanno parte dei complessi enzimatici deputati alla fosforilazione ossidativa. Il resto delle proteine presenti nel mitocondrio deriva da geni nucleari i cui prodotti vengono appositamente trasportati. Le proteine destinate al mitocondrio generalmente vengono riconosciute grazie ad una sequenza *leader* presente sulla loro parte N-terminale.

In ogni mitocondrio si trovano da due a dieci copie del genoma.

La presenza della catena di trasporto degli elettroni con la sua capacità di produrre radicali liberi, la mancanza di istoni ed i limitati sistemi di riparo, rendono il DNA mitocondriale facilmente danneggiabile: il suo tasso di mutazione è circa dieci volte maggiore di quello nucleare. Ciò fa sì che si possano avere sequenze mitocondriali diverse anche all'interno di uno stesso individuo.

## **2- Organizzazione e distribuzione**

I mitocondri si trovano in tutti gli organismi eucariotici. Il numero e la dimensione di questi organelli variano a seconda del tipo cellulare e dello stato metabolico della cellula, da poche centinaia ad alcune migliaia. Un numero abbastanza elevato di mitocondri si trova per esempio negli epatociti: 1000-2000 mitocondri per cellula, che corrispondono ad un quinto del volume totale.

Il numero di mitocondri non è il parametro più rilevante da considerare per valutare l'attività energetica di una cellula; è molto più significativo considerare il volume mitocondriale come frazione del volume cellulare totale o la superficie totale delle creste mitocondriali per cellula.

I mitocondri spesso formano una rete tridimensionale in associazione con il citoscheletro e questo può modificare la forma del mitocondrio così come la sua funzionalità.

### **3- Funzione dei mitocondri**

I mitocondri sono considerati il centro energetico della cellula perché attraverso la fosforilazione ossidativa producono la maggior parte dell'ATP cellulare.

Il ciclo degli acidi tricarbossilici (Ciclo di Krebs), il complesso piruvato deidrogenasi, la  $\beta$  ossidazione degli acidi grassi e parte del ciclo dell'urea sono localizzati nella matrice; la catena respiratoria, il processo di sintesi dell'ATP e gli enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme sono associati alla membrana interna. La stessa membrana interna mitocondriale svolge un ruolo centrale nella fosforilazione ossidativa grazie alla sua impermeabilità ai protoni. Questo permette la generazione di un gradiente protonico in seguito al pompaggio di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana da parte della catena respiratoria. Il gradiente protonico viene quindi utilizzato dall'ATP sintasi per produrre ATP, a partire da ADP e fosfato inorganico ( $P_i$ ).

La concentrazione di calcio libero nelle cellule può regolare varie reazioni ed è importante per la trasduzione del segnale. I mitocondri possono funzionare come depositi temporanei di calcio contribuendo all'omeostasi generale di questo ione, grazie alla loro capacità di immagazzinarlo rapidamente. Il calcio viene importato nella matrice attraverso un uniporto guidato dal potenziale di membrana sulla membrana interna e rilasciato attraverso proteine di scambio  $Na^+ / Ca^{2+}$  o una via di rilascio indotta dal calcio stesso.

I mitocondri funzionano quindi come riserva intracellulare di calcio insieme al reticolo endoplasmatico, con il quale c'è stretta comunicazione.

Per la funzione energetica che svolgono e per le molteplici vie metaboliche al loro interno i mitocondri sono fondamentali nella regolazione del metabolismo cellulare. Tra le molte funzioni che ricoprono non ultime sono la regolazione della proliferazione cellulare e la partecipazione al processo di morte cellulare programmata (apoptosi).

## 4- La fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa è il processo attraverso il quale si forma ATP in seguito al trasferimento di elettroni dal NADH o dal FADH<sub>2</sub> all'ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>), mediante una serie di trasportatori di elettroni che costituiscono la catena respiratoria, localizzati nella membrana mitocondriale interna. Questo processo è la principale fonte di ATP degli organismi aerobi.

Durante la fosforilazione ossidativa il NADH o il FADH<sub>2</sub> generati dall'ossidazione degli acidi grassi e dal ciclo di Krebs, vengono utilizzati come donatori di elettroni e l'ossigeno molecolare come accettore finale. Il NADH è un forte agente riducente con un potenziale di riduzione negativo di -0,32 V, mentre l'ossigeno è un forte ossidante in grado di accettare elettroni, con un potenziale di riduzione positivo di 0,82 V.

Il flusso di elettroni dal NADH o dal FADH<sub>2</sub> attraverso i complessi enzimatici è quindi un processo esoergonico la cui variazione di energia libera (-52,6 kcal mol<sup>-1</sup>) è sfruttata per il pompaggio di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana. La concentrazione di H<sup>+</sup> più bassa nella matrice genera un gradiente di pH ( $\Delta\text{pH}$ ) e un gradiente di potenziale elettrico transmembrana ( $\Delta\psi$ ) che in condizioni fisiologiche assume valori tra -150 mV e -200 mV. Questi sono i due elementi che compongono la forza motrice protonica ( $\Delta\mu\text{H}$ ) secondo la relazione:  $\Delta\mu\text{H} = \Delta\psi - 2,303 RT \Delta\text{pH}$ ; con R = costante dei gas = 8,31 JK<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> e T = 298°K (25°C).

Secondo l'ipotesi chemiosmotica di Mitchell, questa forza motrice protonica è utilizzata dall'ATP sintasi, che catalizza la produzione di ATP a partire da ADP e P<sub>i</sub>, processo endoergonico con una variazione di energia libera standard pari a 7,3 kcal mol<sup>-1</sup>.

Gli equivalenti riducenti come il NADH o il FADH<sub>2</sub> entrano nella catena respiratoria a livello del Complesso I e del Complesso II. Gli elettroni poi vengono trasferiti attraverso i vari complessi transmembrana della catena, seguendo i potenziali di ossidoriduzione di ciascuna specie redox (*figura 4*).

Nel caso dell'ossidazione del NADH la reazione complessiva catalizzata dall'intera catena è la seguente:



Con una variazione corrispondente di energia libera standard:

$$\Delta G^{\circ} = - n \cdot F \cdot \Delta E^{\circ} = - 220 \text{ kJ/mol}$$

Per l'ossidazione dei substrati flavinici come il FADH<sub>2</sub>, la differenza di potenziale redox è di 0,72 V, che corrisponde ad un  $\Delta G^{\circ} = -139 \text{ kJ/mol}$  [9].

Due elettroni per ogni NADH ossidato dal Complesso I sono trasferiti al trasportatore mobile di elettroni ubiquinone (coenzima Q), che viene ridotto a chinolo. Analogamente al Complesso I anche il Complesso II, catalizzando l'ossidazione del succinato a

fumarato, ed altri enzimi come l'alfa- glicerofosfato deidrogenasi, sono in grado di ridurre l'ubichinone a ubichinolo.

Il Complesso III catalizza l'ossidazione del chinolo a chinone, trasferendo gli elettroni al citocromo c, il secondo trasportatore mobile di elettroni della catena respiratoria. Il citocromo c ridotto viene ossidato a livello del Complesso IV, che trasferisce gli elettroni all'ossigeno molecolare riducendolo ad acqua.

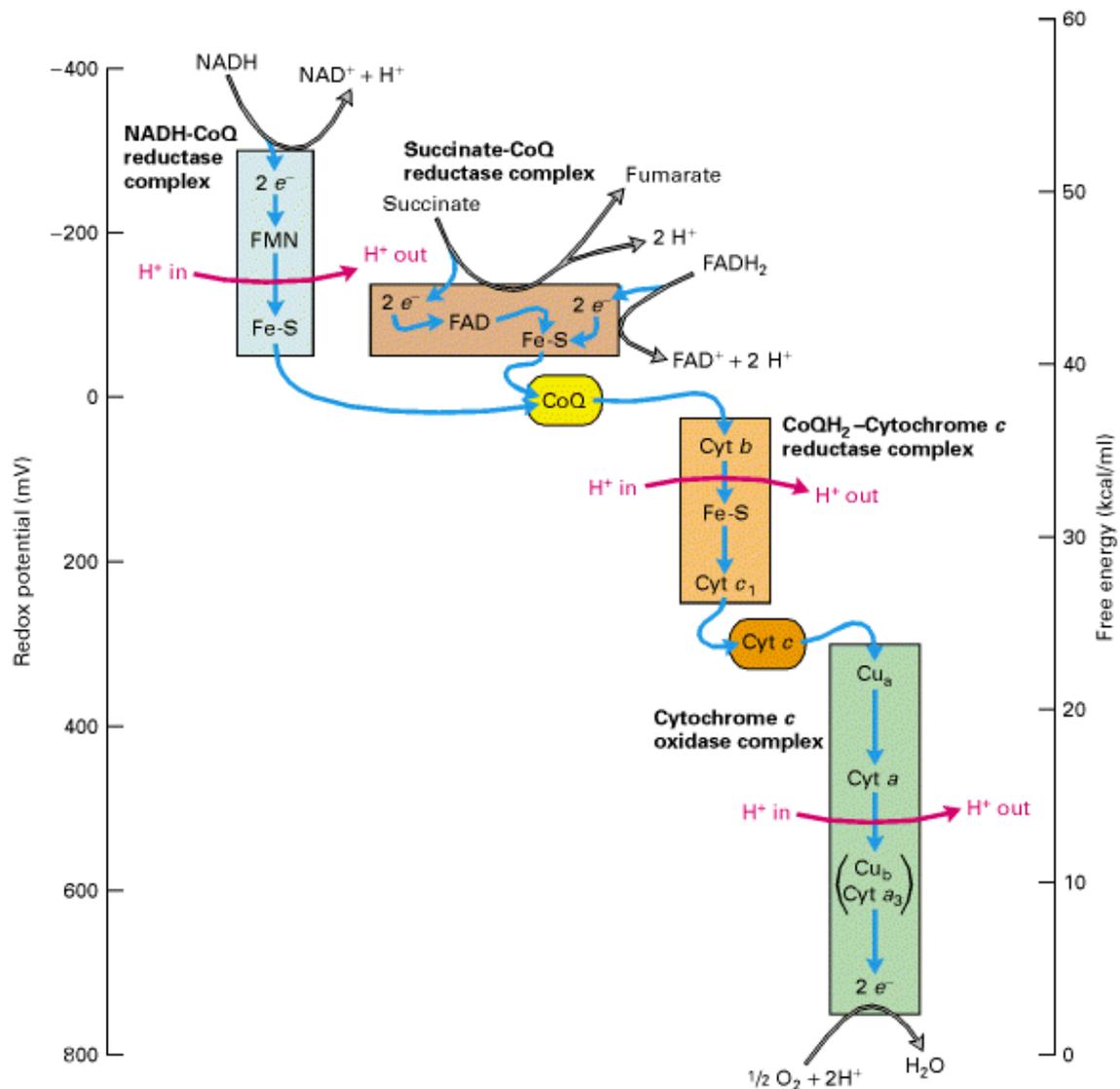


Figura 4: Valori di potenziale di riduzione standard dei componenti della catena respiratoria mitocondriale e corrispondente variazione di energia libera.

L'energia libera resa disponibile dal flusso di elettroni all'interno dei complessi enzimatici della catena respiratoria è accoppiata al trasporto endoergonico di protoni nello spazio intermembrana da parte dei Complessi I, III e IV, attraverso la membrana mitocondriale interna.

Tale trasporto genera la forza elettromotrice protonica che spinge i protoni dallo spazio intermembrana verso la matrice. Poichè la membrana interna è impermeabile ai protoni, questi per rientrare devono attraversare il canale transmembrana specifico del settore F<sub>0</sub> dell'ATP sintasi (Complesso V). La forza motrice che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia necessaria alla sintesi di ATP, catalizzata dal settore F<sub>1</sub> dell'ATP sintasi.

Parte dell'ATP generata attraverso la fosforilazione ossidativa è utilizzata dal mitocondrio stesso, la maggior parte è trasportata fuori dall'organello mediante il traslocatore adenin-nucleotidico (ANT) e utilizzata per le diverse funzioni cellulari.

Nonostante esistano molte informazioni sulla struttura dei singoli complessi proteici transmembrana che fanno parte della catena respiratoria, ci sono ancora poche conoscenze sull'organizzazione sopramolecolare di questi complessi.

A tal proposito sono stati proposti alcuni modelli per spiegare la struttura generale della catena respiratoria.

L'iniziale modello "Solid-state" in cui il trasferimento degli elettroni avveniva attraverso una serie di complessi ordinati all'interno della catena respiratoria, venne sostituito gradualmente in seguito alle osservazioni che i singoli complessi erano in grado di funzionare anche individualmente [10]. Questo modello venne quindi sostituito con il "Random collision model", secondo il quale i complessi che fanno parte della catena respiratoria sono distribuiti in modo casuale nel doppio strato lipidico e il trasferimento elettronico avviene attraverso casuali collisioni tra le piccole molecole diffusibili, il coenzima Q e il citocromo c, e i complessi enzimatici distribuiti nella membrana mitocondriale interna [11].

Nonostante quest'ultimo modello si sia diffuso notevolmente, il concetto dell'organizzazione secondo il modello "Solid state" non è stato abbandonato, soprattutto grazie alle osservazioni della preferenziale associazione tra specifici complessi e l'isolamento di supercomplessi stabili tra il Complessi I e III.

In base a queste ultime osservazioni è stato elaborato il modello del "Respirosoma": i complessi non sono totalmente indipendenti l'uno dall'altro, ma formano supercomplessi, cioè aggregati stabili che comprendono i Complessi I, III e IV in diversi rapporti stechiometrici [12, 13].

## **4.1- Complesso I**

Il Complesso I, NADH-CoQ ossidoreduttasi o NADH deidrogenasi, è l'enzima di entrata degli elettroni nella catena respiratoria mitocondriale. Catalizza il trasferimento di due elettroni dal NADH all'ubichinone (CoQ), reazione accoppiata alla traslocazione di

quattro protoni attraverso la membrana, che contribuisce alla generazione del gradiente protonico transmembrana.

Ad eccezione di *S. cerevisiae*, tutti i mitocondri degli organismi eucariotici possiedono il Complesso I. Negli eubatteri è presente una NADH deidrogenasi di tipo 1 (NDH-1), in alcuni procarioti è presente una NADH-ubichinone ossidoreduttasi chiamata NOR, che funziona come pompa per il sodio. I mitocondri delle cellule vegetali, di alcuni funghi e di alcuni batteri contengono alcune NADH deidrogenasi alternative: questi semplici flavoenzimi catalizzano la stessa reazione catalizzata dal Complesso I, ma non accoppiano la reazione di riduzione dell'ubichinolo alla traslocazione di protoni.

Nonostante il Complesso I sia stato purificato circa 50 anni fa da mitocondri di cuore di bue, la sua struttura molecolare e il meccanismo di trasferimento degli elettroni all'interno dell'enzima non sono ancora completamente noti.

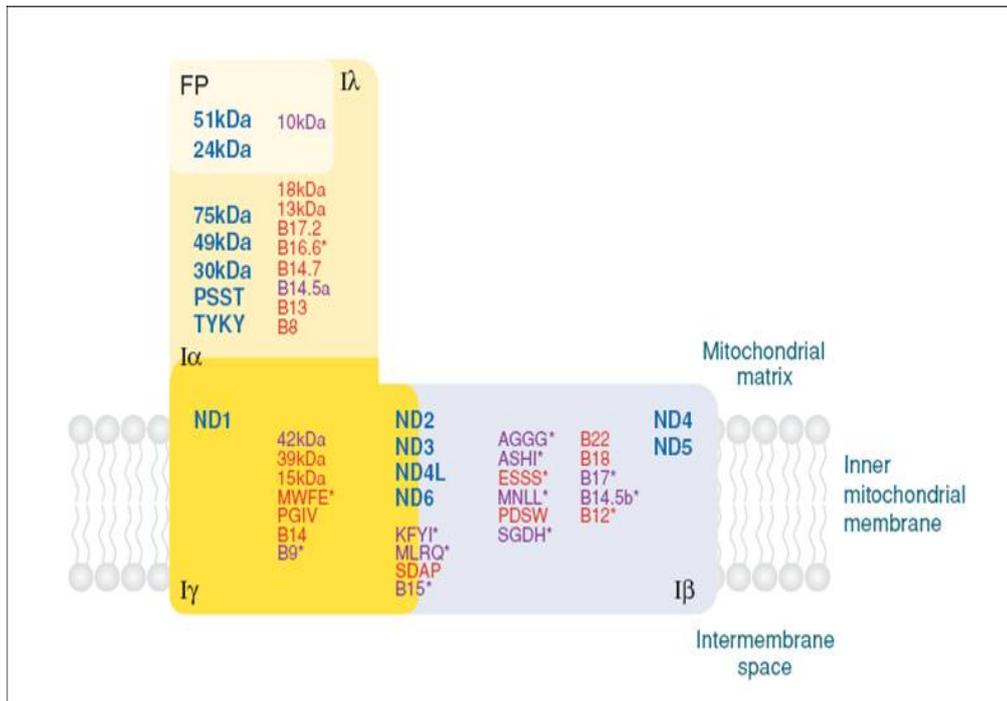
Diverse ragioni limitano le possibilità di studio di questa proteina. E' difficoltoso purificare un complesso enzimatico di così grandi dimensioni come il Complesso I che pesa circa 1000 kDa, mantenendone le caratteristiche native in membrana [14]. E' altrettanto complicato da investigare il trasporto elettronico all'interno di questo enzima, perchè coinvolge una flavina mononucleotide (FMN) e diversi centri Ferro- Zolfo. Infine l'accettore fisiologico di elettroni dell'enzima, il coenzima Q<sub>10</sub>, presenta caratteristiche idrofobiche tali da non poter essere utilizzato nei comuni saggi enzimatici, obbligando all'utilizzo di accettori di elettroni esogeni a più corta catena.

Nonostante le difficoltà tecniche, le informazioni riguardo al Complesso I sono aumentate negli ultimi anni. L'interesse verso questo enzima è cresciuto anche in seguito alla scoperta che numerose patologie mitocondriali, come la neuropatia ottica di Leber (LHON) e il morbo di Parkinson, mostrano anomalie strutturali e funzionali a carico del Complesso I. Inoltre questo enzima è uno dei maggiori produttori di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello mitocondriale, fenomeno legato all'insorgenza di patologie e all'invecchiamento.

Il Complesso I è costituito da 45 subunità ed è uno dei più grandi complessi proteici di membrana. L'enzima procariotico, come nel caso di altri complessi della catena respiratoria, rappresenta la forma minima dell'enzima: comprende 14 subunità con una massa molecolare di circa 550 kDa, che contengono tutti i centri redox. Queste subunità "centrali" sono sufficienti per svolgere le funzioni bioenergetiche dell'enzima [15, 16, 17].

In aggiunta il Complesso I mitocondriale eucariotico ha 31 subunità "accessorie", per una massa molecolare totale di 1000 kDa [18]. Le subunità accessorie hanno la funzione di organizzare l'assemblaggio dell'enzima, costituito da proteine codificate sia dal genoma mitocondriale (mtDNA) che da quello nucleare (nDNA) [19].

L'identificazione delle subunità e la loro assegnazione alle differenti parti dell'enzima è stata raggiunta principalmente attraverso l'uso di blandi detergenti (N,Ndimetildodecilammina N-ossido) che hanno permesso di dissociare l'enzima purificato in vari subcomplessi ( $I\alpha$ ,  $I\beta$ ,  $I\gamma$ ) [20] ed analizzare le subunità utilizzando tecniche di elettroforesi su gel (*figura 5*).

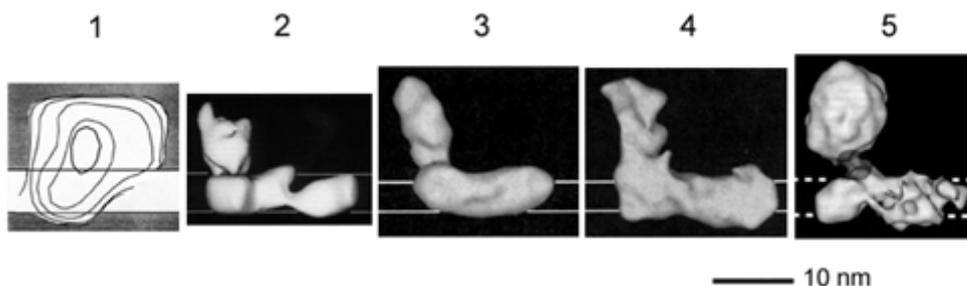


*Figura 5:* Subcomplessi e Subunità che costituiscono il Complesso I di mitocondri di cuore bovino. L'assegnazione delle subunità è in accordo con [21, 22]. La flavoproteina (FP) è parte di  $I\lambda$ , e  $I\alpha$  è all'interfaccia tra  $I\lambda$  e  $I\gamma$ .  $I\beta$  costituisce la maggior parte del dominio di membrana. Le subunità centrali sono rappresentate in blu. Le subunità accessorie, trovate negli enzimi eucariotici, sono rappresentate in rosso. Le subunità specifiche dei metazoi sono rappresentate in viola. Le subunità marcate con un asterisco contengono domini transmembrana singoli [22].

L'analisi di sequenza delle 14 subunità centrali ha rivelato che 7 subunità sono altamente idrofobiche e 7 sono idrofiliche. Queste ultime contengono i motivi di legame per i gruppi prostetici e per il donatore primario di elettroni all'enzima, il NADH. Le subunità idrofiliche si trovano in una posizione perpendicolare alla parte di membrana dell'enzima, che comprende le subunità idrofobiche. Il risultato di questa disposizione è un enzima con una forma di L, con un braccio idrofobico immerso nel doppio strato lipidico della membrana mitocondriale interna (braccio di membrana) e un braccio idrofilico che protrude verso la matrice (braccio periferico). Non è ancora stato possibile cristallizzare il Complesso I mantenendo intatto l'enzima, tuttavia sono state proposte

alcune strutture tridimensionali della proteina ottenute principalmente con tecniche di microscopia elettronica (*figura 6*).

Mediante questo tipo di analisi, sono state determinate le strutture tridimensionali a bassa risoluzione della NADH-ubichinone ossidoreduttasi di cuore bovino, di *Neurospora crassa* e di *Escherichia coli*.



*Figura 6:* Immagini di Complesso I ottenute con tecniche di microscopia elettronica

- 1) *N. crassa*. (Leonard et al., 1987) [23];
- 2) *N. crassa*. (Hofhaus et al., 1991) [24];
- 3) *N. crassa* (Guénebaut et al., 1997) [25]
- 4) *E. coli NDH-1* (Guénebaut et al., 1998) [26];
- 5) Cuore bovino (simulazione) (Grigorieff, 1998) [27].

Dalle immagini ottenute attraverso la microscopia elettronica è possibile osservare la caratteristica forma ad “L” dell’enzima, conservata sia nei procarioti che negli eucarioti, con i due domini maggiori perpendicolari l’uno all’altro, separati da un sottile ‘collare’ [28]. Questa regione di connessione tra i due domini a forma di peduncolo (chiamata “stalk”) è implicata nel trasferimento degli elettroni dal dominio di matrice, dove si trova il sito di legame del NADH, al dominio di membrana, che ospita il sito di legame dell’ubichinone. La regione “stalk” sembra essere assente in *N.crassa* dove i due domini appaiono invece separati da una larga cavità, all’interno della quale potrebbe essere localizzato il sito di legame dell’ubichinone [29].

Secondo alcuni autori la forma del Complesso I può subire modificazioni conformazionali in funzione dello stato dell’enzima. Secondo Friedrich [30] la conformazione attiva sembrerebbe quella in cui il braccio idrofilico si piega sul dominio di membrana assumendo una posizione a “ferro di cavallo” (*figura 7*).

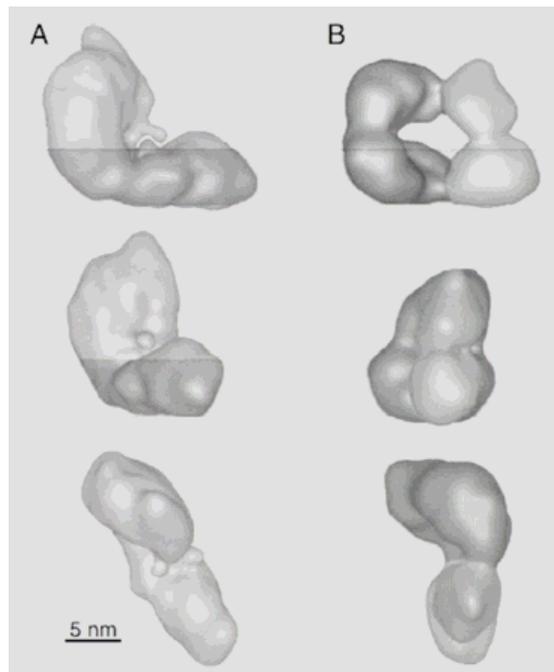


Figura 7: Modello proposto da Friedrich [30] per illustrare il cambiamento conformazionale nel Complesso I di *Escherichia Coli*, trattato con tampone ad alta (colonna A) e bassa (colonna B) forza ionica. La parte ombreggiata rappresenta la membrana lipidica.

#### 4.1.1- Dominio idrofilico

La parte idrofilica del Complesso I comprende il sito di legame del NADH, una flavina mononucleotide (FMN) e 8 o 9 centri ferro- zolfo (Fe-S).

Recentemente è stato cristallizzato il braccio periferico del Complesso I di *Thermus thermophilus* e ciò ha permesso di identificare la struttura del dominio idrofilico dell'enzima e la posizione dei centri Fe-S al suo interno [31] (figura 8). I 9 centri Fe-S rilevati corrispondono ai motivi di legame trovati nelle sequenze delle subunità centrali. I centri Fe-S comprendono due centri binucleari N1a e N1b e i centri tetranucleari N2, N3, N4, N5, N6a e N6b. Il Complesso I di *T. Thermophilus* e di altri batteri contiene anche il centro tetranucleare N7, assente nell'enzima eucariotico.

I centri Fe-S sono disposti in una catena lineare della lunghezza complessiva di 84 Å, separati da una distanza massima di 14 Å l'uno dall'altro, distanza massima per un trasferimento di elettroni sufficientemente veloce. Questa catena connette i due siti catalitici dell'enzima, terminando al centro tetranucleare N2 situato all'interfaccia tra i due domini della proteina.

Calcolando le distanze "edge to edge" tra i centri Fe-S identificati, N1a e N7 non partecipano alla catena di trasferimento degli elettroni perché troppo distanti dai centri

vicini per permettere un diretto scambio di elettroni. Tutti i centri Fe-S che fanno parte della catena, N3, N1b, N5, N4, N6a e N6b, sono isopotenziali ( $E_m = -250$  mV) ad eccezione del centro Fe-S N2 che ha un potenziale più positivo ( $E_m = -100$  mV).

Il dominio idrofilico del Complesso I è costituito dalle seguenti subunità centrali: 51 kDa, 24 kDa, 75 kDa, TYKY e 49 kDa (PSST).

La **subunità 51 kDa** comprende il sito di legame del NADH, il donatore primario di elettroni all'enzima, l'FMN e il centro Fe-S N3. Nel cristallo di *T. thermophilus* non è stata identificata la densità elettronica dell'FMN, ma è stato ipotizzato che sia localizzato tra i centri Fe-S N3 e N1a.

La **subunità 24 kDa** comprende il centro N1a che si trova ad una distanza di 12 Å dall'FMN dal quale può accettare elettroni, ma poiché si trova ad una distanza di 19 Å dal centro Fe-S più vicino (N3) non partecipa al trasferimento di elettroni. Piuttosto questo centro Fe-S sembra svolgere un ruolo antiossidante, prevenendo la formazione del semichinone della flavina [32]. L'FMN è infatti esposto alla fase acquosa e non è protetto dalla struttura proteica, come invece accade per gli altri centri Fe-S, quindi la formazione di un radicale instabile potrebbe favorire la generazione di specie reattive dell'ossigeno.

La **subunità 75 kDa** è la più estesa tra le subunità del dominio idrofilico e comprende i centri Fe-S N1b, N4, N5 e N7.

Il centro N5 appartiene ai centri Fe-S isopotenziali, ma la coordinazione con un residuo di istidina ne permette la modificazione del potenziale redox e conferisce a questo centro caratteristiche EPR particolari [33]. È stato ipotizzato che il centro N5 sia in grado di svolgere un ruolo addizionale all'interno dell'enzima.

Il dominio C-terminale della subunità 75 kDa coordina il centro Fe-S N7, troppo lontano dalla catena dei centri Fe-S per partecipare direttamente al trasferimento elettronico. Questo centro Fe-S, assente nell'enzima eucariotico ha la funzione principale di conferire stabilità strutturale al dominio. La flessibilità del dominio C-terminale è stata dimostrata osservando cambiamenti conformazionali in enzimi di *E. coli* in seguito a riduzione con NADH [34].

La **subunità TYKY** comprende i centri Fe-S N6a e N6b, successivi al centro N5 nella catena di trasferimento degli elettroni. In generale, la funzione di questa subunità è quella di stabilire una connessione tra i centri Fe-S a monte e l'ultimo centro Fe-S (N2) e conferire stabilità all'enzima interagendo con le altre subunità.

Il centro Fe-S N2 è legato alla **subunità PSST (49 kDa)** ad una distanza di soli 8 Å dall'interfaccia con il dominio di membrana in una regione meno protetta dalla struttura dell'enzima rispetto agli altri centri prostetici [31, 35]. Il potenziale di riduzione più

positivo rispetto agli altri centri Fe-S fa ipotizzare che questo centro sia il diretto donatore di elettroni all'accettore finale, l'ubichinone.

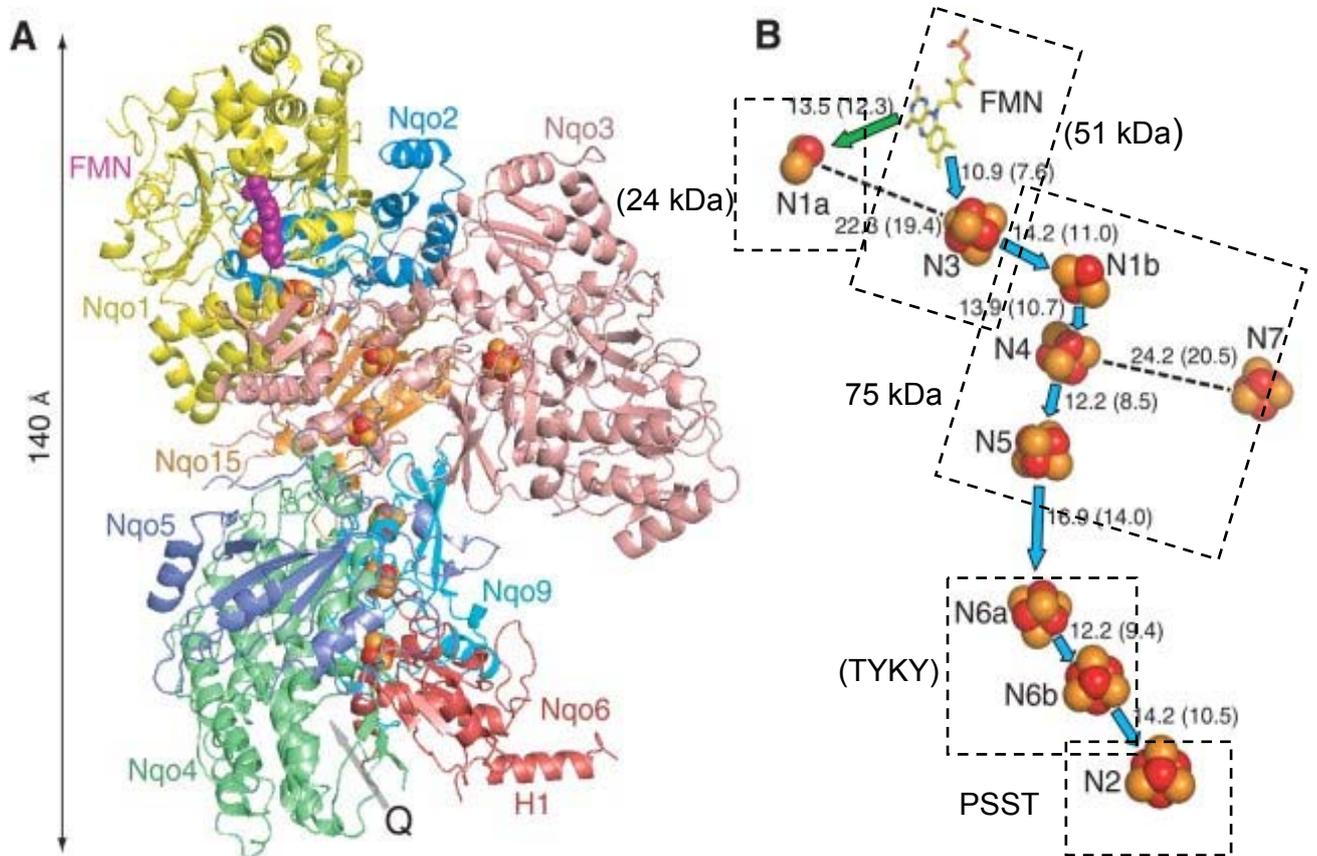


Figura 8: Struttura del dominio idrofilico del Complesso I di *T. Thermophilus*.

A) Le subunità e i centri redox sono rappresentati con colori differenti: FMN (viola), centri Fe-S, atomi di Fe (sfere rosse), atomi di S (sfere gialle); il possibile sito di riduzione del chinone è indicato con una freccia.

B) Arrangiamento dei centri Fe-S, disposti nello stesso orientamento della struttura rappresentata in A) e relativa appartenenza alle subunità. Sono indicate anche le distanze "edge to edge" e tra le estremità dei centri redox [31].

#### 4.1.2- Dominio idrofobico

Il dominio idrofobico del Complesso I è immerso nella membrana mitocondriale interna ed è costituito da sette subunità (ND1-6 e 4L), per un totale di 57 segmenti  $\alpha$ -elica transmembrana. Ad eccezione della subunità ND3, le estremità N terminali di tutte le subunità sono rivolte verso lo spazio intermembrana. Le subunità ND1 e ND2 sono

comprese nel subcomplesso  $\alpha$  che si trova all'interfaccia tra il dominio idrofilico e il dominio idrofobico.

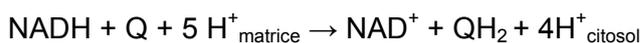
Sebbene sia noto il coinvolgimento del dominio di membrana nella riduzione dell'ubichinone e nel trasporto protonico, le funzioni delle singole subunità non sono completamente note. Ricerche cliniche su patologie mitocondriali, associate a deficienze del Complesso I ed esperimenti di mutagenesi sito-diretta condotti in batteri e in lieviti hanno evidenziato collegamenti tra le mutazioni genetiche a carico di alcune subunità e le dirette conseguenze biochimiche sulla funzionalità dell'enzima.

Questo ha suggerito i possibili ruoli fisiologici di alcune delle subunità del dominio idrofobico. Le subunità ND1 e ND6 sembrano essere coinvolte nel sito di legame del chinone. E' noto infatti che ND1 interagisce con il Rotenone, un inibitore del sito fisiologico del chinone [36].

Una mutazione sul gene che codifica ND6 è noto ridurre l'attività del Complesso I, suggerendo anche per questa subunità un ruolo nel sito di legame dell'ubichinone.

Le subunità omologhe ND2, ND3, ND4 e ND5 sembrano coinvolte nel trasferimento protonico. Alcuni studi hanno riportato che mutazioni della subunità ND4 cambiano la sensibilità dell'enzima al Rotenone, suggerendo che anche questa subunità possa essere coinvolta nel processo di riduzione dell'ubichinone [37, 38, 39].

L'attività fisiologica del Complesso I, come già accennato, consiste nel trasferimento di elettroni dal NADH ( $E_m = -320$  mV) all'ubichinone ( $E_m = +90$  mV). Questa attività è accoppiata alla formazione di un gradiente protonico transmembrana. La reazione complessiva catalizzata dall'enzima è la seguente:



Nonostante una differenza di potenziale redox tra i substrati di circa 400 mV, la reazione catalizzata dall'enzima è completamente reversibile, è stato infatti dimostrato che in presenza di una forza protonmotrice i mitocondri possono trasferire elettroni dal succinato al  $\text{NAD}^+$  [40, 41] svolgendo il trasferimento inverso di elettroni (Reverse Electron Transfer).

Il primo accettore di elettroni del Complesso I è l'FMN ( $E_m = -380$  mV), che viene ridotto a  $\text{FMNH}_2$  e trasferisce un elettrone alla volta ai centri Fe-S.

A lungo si è dibattuto riguardo al numero, alla sequenza dei centri Fe-S e all'assegnazione delle subunità all'interno dell'enzima. Dalla struttura del dominio idrofilico di *T. Thermophilus* è più chiaro che solo 7 dei 9 centri Fe-S del Complesso I, partecipano al trasferimento elettronico, connettendo l'FMN con l'accettore di elettroni finale, l'ubichinone. Ad eccezione del centro N2, tutti i centri redox della catena (N3, N1b, N5, N4, N6a e N6b) sono isopotenziali ( $E_m = -250$  mV). Il centro N2 è l'ultimo

centro redox della catena ed ha un potenziale più positivo e pH dipendente ( $E_m = -100$  mV). La sua dipendenza dal pH è stata attribuita alla presenza di un residuo di istidina conservato nella subunità a 49 kDa che funziona da gruppo redox con effetto Bohr legato al gruppo prostetico. La rimozione del residuo di istidina abolisce completamente la dipendenza dal pH del centro Fe-S N2 [35]. La localizzazione del centro N2 nella subunità 49 kDa, all'interfaccia tra il dominio idrofilico e idrofobico, la sua distanza di soli 8 Å dalla fase acquosa e il suo potenziale più positivo rispetto agli altri centri Fe-S fa ipotizzare che N2 sia il diretto donatore di elettroni all'ubichinone.

La localizzazione del sito di riduzione dell'ubichinone nel Complesso I non è ancora nota con precisione.

Studi EPR hanno mostrato l'esistenza di almeno tre specie di ubisemichinoni associate all'enzima ( $SQ_{Nf}$ ,  $SQ_{Ns}$ ,  $SQ_{Nx}$ ) [42, 43]. Tra queste, può essere osservata in particelle submitocondriali accoppiate la specie a rilassamento veloce  $SQ_{Nf}$  che è sensibile ai disaccoppianti. La specie  $SQ_{Nf}$  è localizzata vicino al centro N2, ad una distanza di circa 13 Å, tale da permettere la diretta interazione fra i due sistemi.

Le specie  $SQ_{Ns}$  a rilassamento lento e  $SQ_{Nx}$  a rilassamento molto lento non sono sensibili ai disaccoppianti. Il debole effetto di aumento di rilassamento di  $SQ_{Ns}$  suggerisce che questa specie è localizzata ad una distanza di circa 30 Å dal centro N2. Le diverse caratteristiche delle specie semichinoniche associate al Complesso I, indicano che queste specie potrebbero intervenire nel trasferimento elettronico e protonico in zone diverse.

Da studi sul rapporto struttura/attività di analoghi dell'ubichinone si è ipotizzato che almeno uno dei siti di legame del chinone sia costituito da una tasca sufficientemente spaziosa da contenere substrati ingombranti e poco specifica nei confronti dei sostituenti dell'anello chinonico. Si pensa quindi che l'ubichinone si leghi debolmente a questo sito, permettendo un rapido movimento di entrata e di uscita da esso [44].

In base alla struttura dei chinoni, caratterizzati da una testa ciclica polare e da una lunga coda idrofobica, è stato ipotizzato che la tasca che costituisce il sito di legame del chinone, sia costituita da una parte lipofila e da una parte idrofila. La porzione lipofila comprende alcune subunità del dominio di membrana, probabilmente le subunità ND1 e ND4; la porzione idrofila comprende invece la subunità 49 kDa del braccio periferico [52].

Per consentire lo spostamento del chinone dal dominio di membrana verso il sito catalitico del braccio periferico, è stata ipotizzata l'esistenza di una rampa o una fessura idrofobica, che connette i due domini (*figura 9*) [45]; ciò implicherebbe anche che molti inibitori idrofobici del Complesso I possano agire semplicemente bloccando in qualche punto questa via di connessione [46].

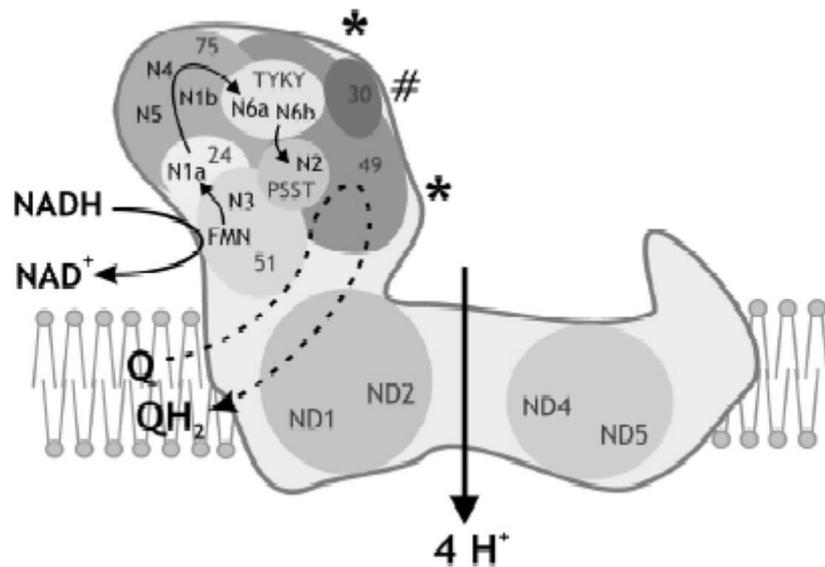


Figura 9: Rappresentazione della posizione approssimativa delle subunità principali e dei centri Fe-S del Complesso I, secondo il modello proposto da Brandt. Sono indicati con "\*" i siti di legame per gli anticorpi che riconoscono la subunità 49 KDa e con "#" i siti di legame per gli anticorpi che riconoscono la subunità 30 KDa. L'ipotetica sequenza del trasporto elettronico dal NADH all'ubichinone (Q) è indicata dalle frecce nere. La "rampa" di accesso dell'ubichinone è indicata dalla linea tratteggiata.

#### 4.1.3- Meccanismi di trasporto protonico

Il Complesso I accoppia l'energia di trasferimento degli elettroni con il trasporto di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, secondo la stechiometria  $4 H^+ / 2e^-$ .

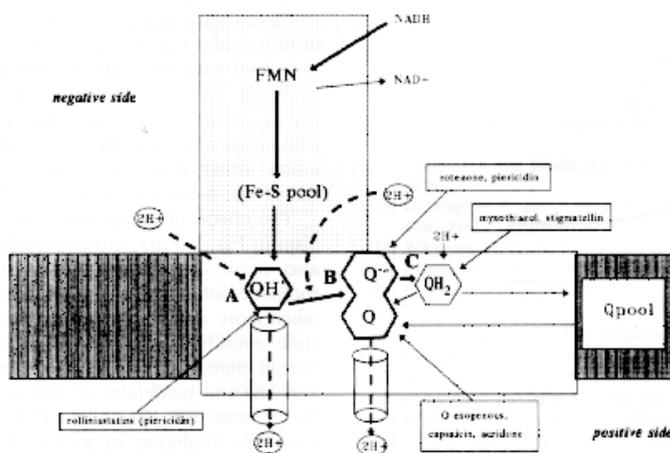
La dicotomia strutturale del Complesso I per la quale i centri redox si trovano nel dominio periferico e il trasporto vettoriale di protoni nel dominio transmembrana, rende difficile lo studio del meccanismo attraverso il quale può avvenire l'accoppiamento di queste due reazioni.

Sono stati ipotizzati tre meccanismi: un **meccanismo diretto** di accoppiamento del trasporto di protoni al trasferimento elettronico; un **meccanismo indiretto**, che prevede un cambiamento conformazionale dell'enzima; infine un **meccanismo misto**.

L'ipotesi di **meccanismo diretto** può essere ulteriormente divisa in due gruppi: secondo alcuni autori (Degli Esposti, Vinogradov e Stueber) l'ubichinone è coinvolto nella traslocazione protonica; altri autori (Brandt e Dutton) ipotizzano un meccanismo simile al "Q-cycle" che si svolge nel Complesso III.

Secondo il modello diretto proposto da Degli Esposti [47] suggerito sulla base dei diversi comportamenti di inibitori specifici del Complesso I, l'enzima possiede due

pompe protoniche connesse in serie, ognuna in relazione con un sito di legame dell'ubichinone. La *figura 10* rappresenta l'enzima schematizzato e il meccanismo di trasferimento protonico proposto da Degli Esposti: gli elettroni che provengono dai centri Fe-S vengono trasferiti ad un ubichinone legato al sito A e la formazione del semichinone è accoppiata al trasferimento protonico. L'ubisemichinone (QH) corrisponde al radicale osservato nel Complesso I, indipendente dal pH e Rotenone insensibile [47]. Il chinone endogeno o chinoni esogeni, come il decilubichinone, si legano al sito B e accettano un elettrone dalla specie QH. Formano così il semichinone anione B, che corrisponde al radicale sensibile al Rotenone, osservato più recentemente attraverso la spettroscopia EPR. La formazione o la stabilizzazione dell'ubisemichinone B sono accoppiate al trasferimento protonico attraverso la membrana. Il secondo elettrone che arriva dal NADH al sito A forma un altro semichinone nella parte del sito B dove il chinone è normalmente legato. Il chinolo si forma dalla dismutazione dei due semichinoni presenti sul sito B e viene rilasciato dall'enzima attraverso il sito C, in maniera non accoppiata al trasferimento protonico.



*Figura 10:* Modello di trasporto protonico nel Complesso I proposto da Degli Esposti.

L'altra ipotesi di meccanismo diretto è formulata da Brandt [48], il quale sostiene che nel trasferimento protonico sia coinvolto, oltre all'ubichinone anche il centro Fe-S N2. Per spiegare il trasferimento protonico accoppiato alla riduzione dell'ubichinone è previsto un meccanismo simile al "Q-cycle" che avviene nel Complesso III. Il modello proposto è schematizzato in *figura 11*.

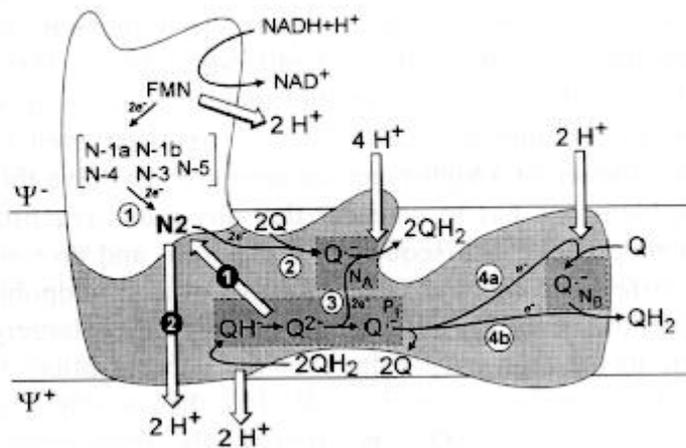


Figura 11: Modello di trasporto protonico nel Complesso I proposto da Brand.

Un altro sostenitore di un meccanismo diretto è Vinogradov [49] che ipotizza che anche l'FMN sia direttamente coinvolto nel trasferimento protonico, secondo lo schema riportato in figura 12. Tuttavia questa possibilità non sembra compatibile con la localizzazione dell'FMN.

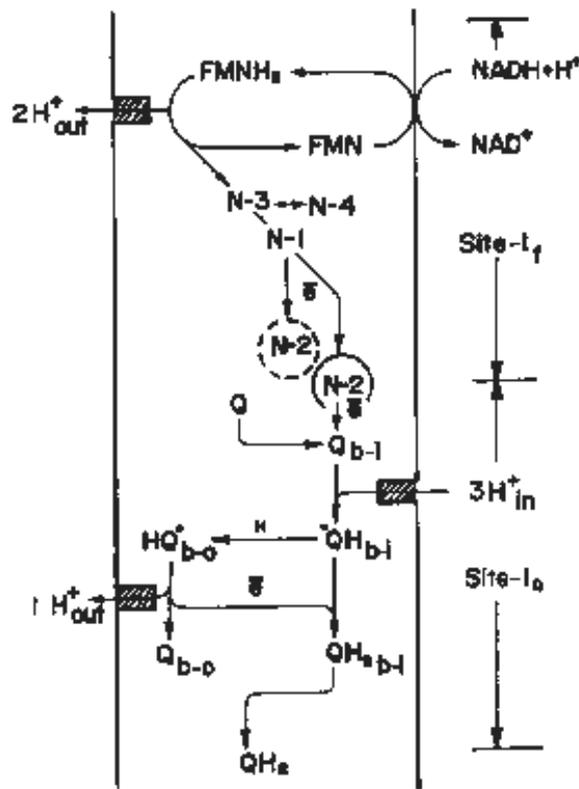


Figura 12: Modello di trasporto protonico nel Complesso I proposto da Vinogradov.

Secondo Hatefi [45] la traslocazione protonica all'interno del Complesso I avviene secondo un **meccanismo indiretto**. I cambiamenti conformazionali che si osservano nell'enzima coinvolgono sia le subunità che contengono i centri redox, sia quelle di membrana. L'ipotesi è che si inducano una serie di cambiamenti conformazionali, a partire dalla riduzione della flavina, che si trasmettono successivamente alle subunità fino al settore di membrana. Attraverso questi cambiamenti, l'energia derivata dal trasferimento elettronico attraverso i componenti catalitici dell'enzima, viene convogliata alle subunità di membrana, dove modificazioni del  $pK_a$  di specifici residui amminocidici, indotti dai cambiamenti conformazionali, permetterebbero l'uptake dei protoni e il loro rilascio nel lato opposto della membrana. Questa ipotesi di meccanismo indiretto è stata recentemente riproposta da Brandt nei suoi studi su *Y. lipolytica*.

Secondo alcuni autori infine, l'accoppiamento del trasferimento elettronico alla traslocazione di protoni avviene secondo un **meccanismo misto**. Friedrich propone due siti di accoppiamento per il Complesso I, uno di tipo diretto attraverso il centro Fe-S N2, l'altro di tipo indiretto che prevede un cambiamento conformazionale (figura 13). Questo meccanismo è in accordo con l'ipotesi che il Complesso I si sia evoluto da due preesistenti blocchi, uno per il trasporto elettronico e uno per la traslocazione protonica [30].

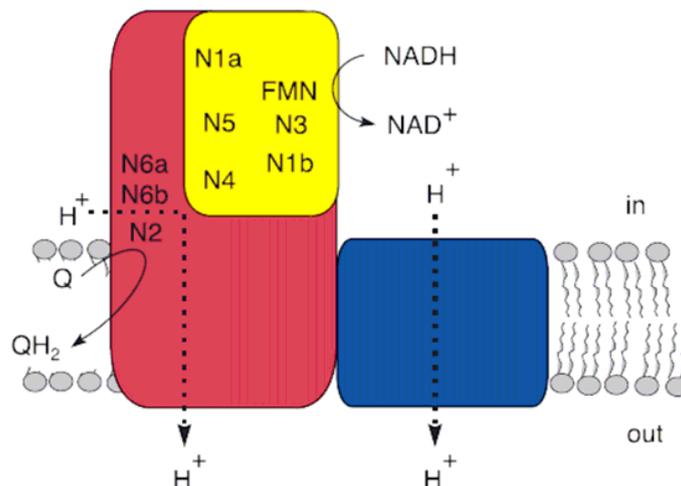


Figura 13: Modello di trasporto protonico "misto" nel Complesso I ipotizzato da Friedrich.

#### 4.1.4- Inibitori del Complesso I

Il Complesso I è inibito da più di 60 famiglie di composti [50] che comprendono anche molti insetticidi e acaricidi sintetici. Qui di seguito sono riportati e descritti alcuni di questi inibitori. Le formule di struttura sono rappresentate nella *figura 14*.

**Rotenone:** è un insetticida naturale rappresentante dei Rotenoidi, una famiglia di isoflavonoidi estratti dalle piante del tipo *Leguminose* [50]. Rappresenta l'inibitore classico e più potente del Complesso I.

La molecola è caratterizzata da cinque anelli e tre centri chirali. Mediante l'analisi a raggi X è stata determinata la struttura tridimensionale del Rotenone: la molecola è ripiegata nella congiunzione tra gli anelli B e C e questa caratteristica è indispensabile per la sua attività. Si è osservato infatti che gli isomeri del Rotenone con gli anelli B e C quasi complanari agiscono come inibitori meno potenti.

L'anello che porta i due gruppi metossi è correlato con la testa chinonica dell'ubichinone ed è fondamentale per un'efficace interazione con il sito di legame. Il resto della molecola potrebbe corrispondere funzionalmente alla coda isoprenoide dell'ubichinone [51].

Il Rotenone agisce interrompendo il trasferimento degli elettroni dal centro Fe-S N2 all'ubichinone, a livello del sito di legame del CoQ. Alcuni autori ipotizzano che questo inibitore si leghi ad un sito posto nelle immediate vicinanze del sito di legame dell'accettore endogeno, perché è emerso che il Rotenone non è competitivo con gli analoghi dell'ubichinone [17]. Affinché l'inibizione del Complesso I sia completa, è necessario che il Rotenone interagisca con entrambe le regioni che costituiscono il sito di legame dell'ubichinone.

**Piericidina A:** è un antibiotico prodotto da alcune specie di *Streptomyces*. Studi con Piericidina A hanno indicato che il Complesso I ha due siti di legame per l'inibizione nella membrana [53,54] uno dei quali inibisce il trasporto inverso di elettroni energia dipendente (RET) molto più del trasporto diretto (NADH-CoQ). È stato proposto un modello che localizza il sito di legame della Piericidina all'interfaccia tra il dominio idrofilico e quello idrofobico del Complesso I [55]. Secondo questo modello la subunità ND1/49kDa associata al dominio periferico del Complesso I contribuisce all'organizzazione del sito di legame Piericidina/ Rotenone.

**Coenzima Q<sub>2</sub> (CoQ<sub>2</sub>):** è un chinone a corta catena che funziona sia come substrato, accettando elettroni dal Complesso I, che nello stato ridotto come inibitore dell'attività NADH-CoQ reduttasica [56].

**Rolliniastatina-1 e Rolliniastatina-2:** le acetogenine sono molecole che derivano da piante *Annonaceae*, inizialmente caratterizzate come agenti antitumorali e

successivamente riconosciute come inibitori del Complesso I. La parte della molecola con il gruppo lattone potrebbe corrispondere alla coda idrofobica di altre molecole, mentre la parte alifatica potrebbe agire da ancora lipofila. Rolliniastatina-1 e Rolliniastatina-2 sono acetogenine con due tetraidrofurani adiacenti con una capacità di inibizione elevata ( $K_i = 0,3 \text{ nM}$ ) [57].

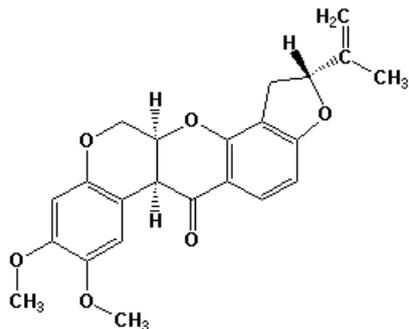
**Capsaicina:** è una molecola che rappresenta la famiglia dei *Vanilloidi*. È una sostanza pungente estratta dai peperoni piccanti [58].

I Vanilloidi sono principalmente usati in studi neurobiologici [50] e hanno applicazioni come analgesici topici e additivi alimentari. La tossicità mitocondriale della capsaicina deriva dalla sua attività come inibitore competitivo dell'ubichinone sul Complesso I isolato da cuore bovino [59]. Questa molecola è anche un inibitore del Complesso III della catena respiratoria mitocondriale.

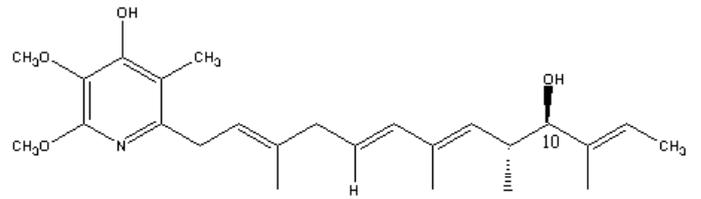
**Mixotiazolo:** è un antibiotico prodotto da *Myxococcus fulvus*, in grado di legarsi al Complesso III ad un sito posto nelle vicinanze del gruppo eme  $b_{566}$  e di impedire il trasferimento di un elettrone dall'ubichinolo alla proteina Fe-S di Rieske. Ciò comporta il blocco della riduzione del citocromo  $c_1$  [50,47]. A concentrazioni elevate il Mixotiazolo è in grado di inibire l'attività del Complesso I.

**Mucidina:** è un antibiotico fungicida isolato dalle colture di *Oudemansiella mucida*, che si lega al sito "o" del Complesso III, bloccando il trasferimento di elettroni dall'ubichinolo alla proteina Fe-S di Rieske. A concentrazioni elevate la Mucidina inibisce l'attività del Complesso I.

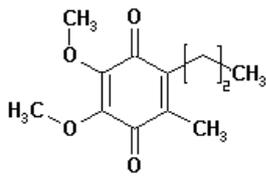
**Stigmatellina:** è un antibiotico isolato dal ceppo *Stigmatella*, che si lega allo stesso sito sul Complesso III al quale si lega anche la Mucidina. Anche la Stigmatellina utilizzata ad alte concentrazioni è in grado di inibire il Complesso I.



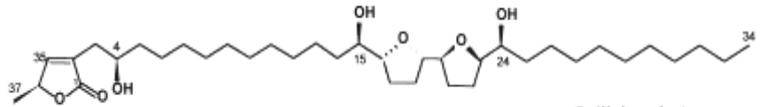
Rotenone



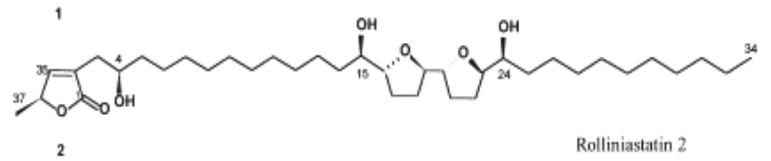
Piericidina A



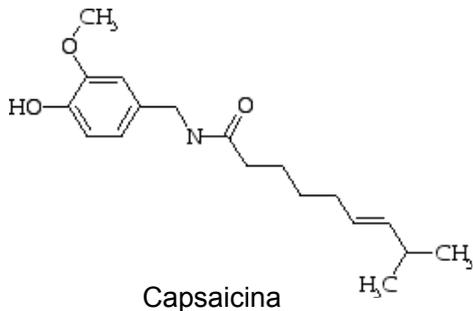
CoQ<sub>2</sub>



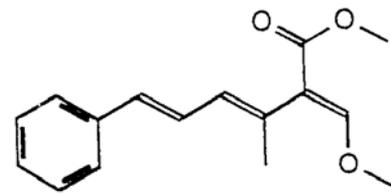
Rolliniastatin 1



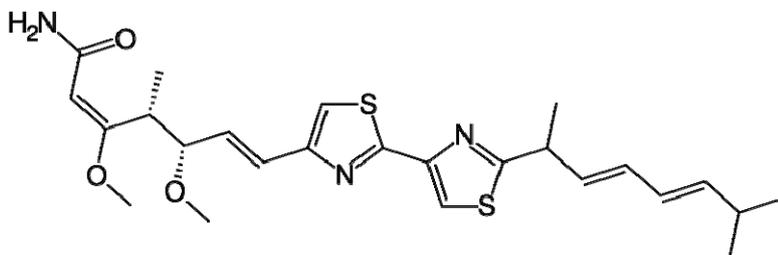
Rolliniastatin 2



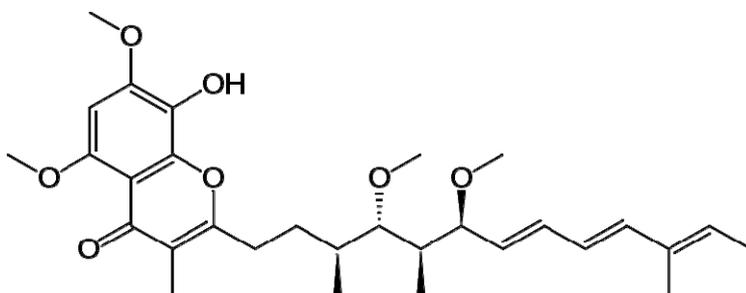
Capsaicina



Mucidina



Mixotiazolo



Stigmatellina

Figura 14: Strutture degli inibitori del Complesso I.

### 4.1.5 Meccanismi di inibizione

Gli inibitori del Complesso I sono stati raggruppati in tre classi da Degli Esposti [50], in funzione del loro effetto sull'attività cinetica dell'enzima: classe I/A, classe II/B e classe C (tabella 1, figura 15).

Gli inibitori di classe I/A, il cui rappresentante è la Piericidina A, sono antagonisti diretti dell'ubichinone. Queste molecole come già illustrato, possiedono una struttura comune, caratterizzata da due teste, una ciclica e una idrofobica, entrambe contenenti un sostituente ossidrilico. A questa classe appartengono anche Rolliniastatina-2 e Idebenone. Il sito di legame di questi inibitori sembra essere collocato profondamente nella struttura dell'enzima.

Gli inibitori di classe II/B, il cui rappresentante è il Rotenone, sono antagonisti del semichinone ed è stato ipotizzato che agiscano a livello della tasca idrofobica per l'accesso dell'ubichinone al sito catalitico dell'enzima. Questo sito è accessibile a molti inibitori oltre al Rotenone, tra i quali Rolliniastatina-1 e gli inibitori appartenenti alla classe I/A, come la Piericidina A.

Gli inibitori di classe C, il cui rappresentante è la Stigmatellina, sono antagonisti della formazione dell'ubichinolo,, perchè interferiscono con la dismutazione dei semichinoni o agiscono impedendo il rilascio dell'ubichinolo dal sito attivo dell'enzima.

Appartengono a questa classe molecole caratterizzate da una testa chinonica contenente un sostituente amminico o ossidrilico tra cui Mixotiazolo, Capsaicina e la forma ridotta del coenzima Q<sub>2</sub>, analogo a catena corta del coenzima Q<sub>10</sub>.

Inhibitor type and action	Representative inhibitors	Likely inhibitors
Type A—quinone antagonists	Rolliniastatin-2 Piericidin A (first site) <sup>a</sup> Idebenone	other annonaceous acetogenins Erythrosin iodoacetamide Aurachin A Phenalamid Ranolazine
Type B—semiquinone antagonists	Rotenone Piericidin A (second site) <sup>a</sup> Piericidin B Aureothin Amytal 4-alkyl-acridones 4'-alkyl-MPP <sup>+</sup> analogues <sup>c</sup> Phenoxan	other rotenoids Ubicidins Reduced Q-2 <sup>b</sup> 4-alkyl-quinazolines (SAN 547A) Pyrazole acaricides Squamocin Onivarin Quinolones
Type C—quinol antagonists	Quinol products reduced Q-2 <sup>b</sup> Myxothiazol Stigmatellin TDS 2M-TIO Meperidine (Demerol) NP	4'-alkyl-MPP <sup>+</sup> analogues <sup>c</sup> 4'-alkyl-pyridines Myxalamid Vacor Carbocyanine dyes Acridine dyes DNP and other uncouplers

Tabella 1: Classificazione degli inibitori del Complesso I, basata sull'effetto dei composti sull'attività cinetica dell'enzima [50].

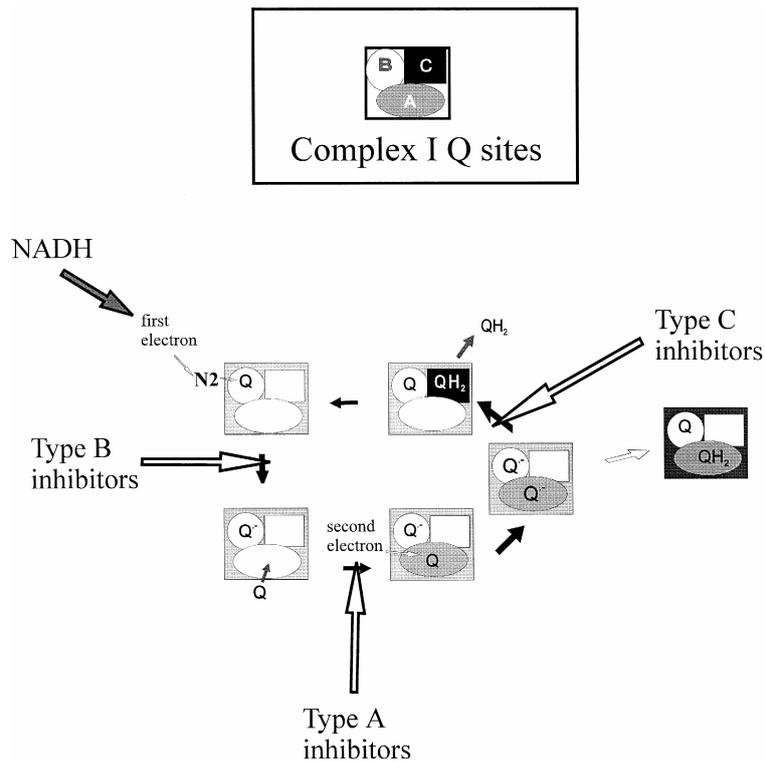


Figura 15: Azione dei tre tipi di inibitori del Complesso I sul trasferimento elettronico [50].

Dagli studi cinetici condotti sul Complesso I non è stato possibile assegnare siti differenti di inibizione per queste tre classi di inibitori. E' comunemente accettato che gli inibitori del Complesso I identificati condividano la stessa larga tasca idrofobica e il loro sito di legame sia parzialmente sovrapposto [60] (figura 16).

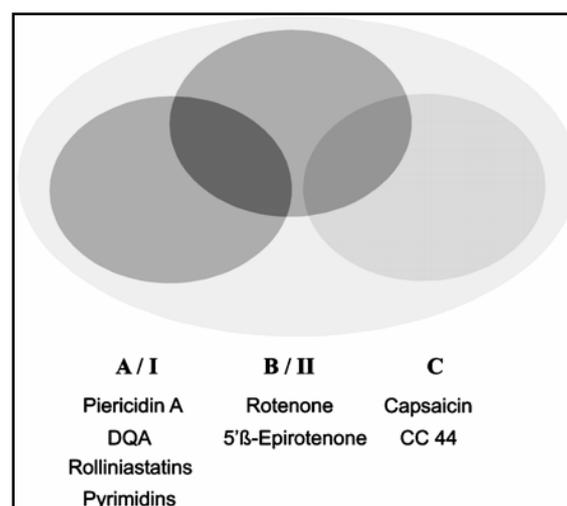


Figura 16: Rappresentazione schematica del dominio di legame degli inibitori del Complesso I [60].

Una delle tecniche più usate per localizzare specifici siti di legame di substrati o inibitori è la cosiddetta "radioactive photoaffinity labeling". Analoghi radioattivi del Rotenone sono stati utilizzati per marcare la subunità ND1 del Complesso I isolato. È stato inoltre identificato un sito ad alta affinità per la sonda  $[H_3]TDP$  nella subunità PSST, la cui marcatura è correlata con l'inibizione dell'attività NADH ossidasica dell'enzima. La marcatura della subunità PSST con  $[H_3]TDP$  viene completamente prevenuta da inibitori quali Rotenone, Piericidina A, Bullatacina, Fenzaquin e Fenpyroxomato. Ciò indica che questi composti condividono lo stesso sito di inibizione.

Sebbene la marcatura del sito su ND1 non sia correlata con un'inibizione dell'enzima, esperimenti con altri inibitori (per esempio Stigmatellina) hanno suggerito un'azione cooperativa fra PSST e ND1 [61].

Una mutazione nella subunità 49 kDa in *R. Capsulatus* ha conferito resistenza per  $[H_3]TDP$  [62].

Questi risultati, insieme a molti esperimenti di mutagenesi sito-diretta delle subunità PSST, indicano che il dominio di legame degli inibitori del Complesso I debba comprendere le tre subunità 49 kDa, ND1 e PSST.

### **4.3- Complesso II**

La Succinato-ubichinone ossidoreduttasi (Succinato deidrogenasi o Complesso II) è un enzima legato alla membrana mitocondriale interna che partecipa al trasferimento elettronico della catena respiratoria. È l'unico che partecipa sia al ciclo di Krebs che alla fosforilazione ossidativa, catalizzando l'ossidazione a due elettroni del succinato a fumarato e la riduzione dell'ubichinone a ubichinolo.

La reazione catalizzata dalla Succinato deidrogenasi è reversibile, quindi la direzione degli elettroni attraverso l'enzima è dettata dalla relativa concentrazione dei reagenti e dei prodotti.

L'enzima è composto da 4 subunità, con un peso complessivo di 360 kDa. Le due subunità più grandi sono idrofiliche e protrudono nella matrice (A e B), le altre due subunità sono idrofobiche e legate alla membrana mitocondriale interna (C e D).

La subunità A è una flavoproteina che comprende il sito di legame per l'ossidazione del succinato e una flavin-adenina dinucleotide legata covalentemente (FAD). La subunità B contiene tre centri ferro-zolfo deputati al trasferimento degli elettroni:  $[2Fe- 2S]$ ,  $[4Fe- 4S]$  e  $[3Fe- 4S]$ .

Le subunità C e D sono proteine integrali di membrana, ognuna con tre eliche transmembrana; contengono un citocromo b che le ancora alla membrana interna, un gruppo eme (eme b) e il sito di legame per l'ubichinone.

Il FAD ridotto a FADH<sub>2</sub> dall'ossidazione del succinato a fumarato, cede elettroni alla catena dei centri Fe-S all'interno della subunità B dell'enzima, fino a raggiungere il centro 3Fe-4S che sembra essere il diretto donatore di elettroni all'ubichinone [63].

Il Complesso II, a differenza degli altri complessi della catena respiratoria, non pompa protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, probabilmente perché la reazione di trasferimento degli elettroni catalizzata da questo enzima non è sufficientemente esoergonica da promuovere la traslocazione di protoni. Dato che questo enzima non contribuisce alla generazione del gradiente protonico transmembrana, si forma meno ATP dall'ossidazione del FADH<sub>2</sub>, che dall'ossidazione del NADH [64].

Il gruppo eme non sembra essere coinvolto direttamente nel trasferimento degli elettroni all'interno dell'enzima e non è ancora stata chiarita la sua funzione. Si ipotizza che possa servire come "valvola di scarico" degli elettroni [65] ed evitare in questo modo che l'intermedio semichinonico che si forma nel sito attivo dell'enzima, possa interagire con l'ossigeno molecolare e produrre specie reattive dell'ossigeno.

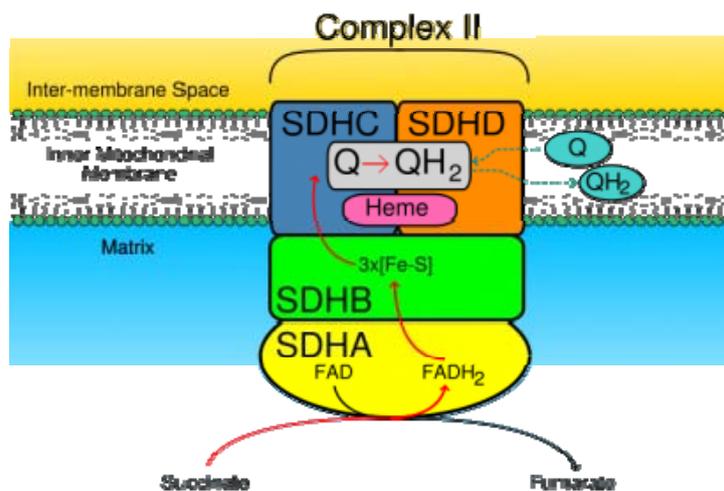


Figura 17: Rappresentazione schematica della struttura del Complesso II e del meccanismo di trasferimento degli elettroni al suo interno.

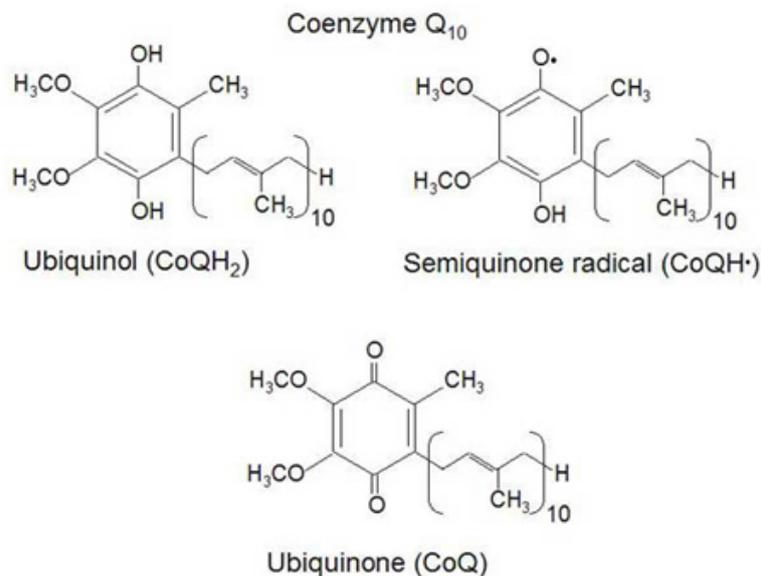
### 4.3- Coenzima Q

Il coenzima Q (CoQ) è un lipide diffuso in tutte le membrane e la sua biosintesi avviene in tutte le cellule e tessuti degli organismi animali [66]. La concentrazione di CoQ è specifica per ogni tipo di membrana ed è in relazione con la distribuzione degli altri lipidi come il colesterolo, il dolicolo e l'α-tocoferolo.

Il coenzima Q (2,3-dimetossi, 5-metil, 6-polisoprene, 1,4-parabenzochinone) è un parabenzochinone sostituito in posizione 6, con una catena laterale formata da un numero variabile di unità isoprenoidi. Il numero delle unità isoprenoidi è specie-specifico e varia da 1 a 15; il CoQ delle membrane cellulari umane ha 10 unità isoprenoidi (CoQ<sub>10</sub>).

La testa chinonica permette al CoQ di funzionare come trasportatore di elettroni. Questa molecola infatti esiste in tre diversi stati di ossidazione (*figura 18*): completamente ossidato (Q), parzialmente ridotto nella forma semichinonica (QH<sup>•</sup> o Q<sup>•-</sup>) e completamente ridotto (QH<sub>2</sub>).

La coda isoprenoide idrofobica permette all'ubichinone di diffondere liberamente nel bilayer lipidico delle membrane cellulari. Nella membrana mitocondriale interna ha la principale funzione, come i suoi analoghi plastochinone nei cloroplasti e menachinone nei batteri, di trasportare elettroni tra i complessi della catena respiratoria. CoQ trasporta equivalenti riducenti dal Complesso I e dal Complesso II, nella forma ridotta CoQH<sub>2</sub>, al Complesso III e ritorna nella forma ossidata, come CoQ, diffondendo nella membrana per essere nuovamente ridotto.



*Figura 18:* Stati di ossidazione dell'ubichinone.

L'ubichinone rappresenta un punto di raccolta di elettroni provenienti non solo dai Complessi della catena respiratoria, ma anche dal glicerolo 3-fosfato deidrogenasi e dalla ETF (flavo proteina di trasferimento di elettroni) deidrogenasi, enzimi appartenenti al metabolismo degli acidi grassi.

Oltre alla funzione di trasportatore di elettroni nella catena respiratoria, il CoQ funziona come antiossidante intervenendo nella sua forma ridotta, sulla perossidazione dei lipidi e sull'ossidazione delle proteine. Questa molecola funziona anche come attivatore di proteine disaccoppianti ed è in grado di influenzare l'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale [67].

#### 4.4- Complesso III

Il Complesso III o Ubichinolo-citocromo c ossidoreduttasi (complesso del Citocromo  $bc_1$ ) è una proteina oligomerica di membrana, componente della catena respiratoria mitocondriale e della catena di trasporto degli elettroni di molti batteri che utilizzano ossigeno, azoto e composti solforati come accettori terminali di elettroni. Il complesso del Citocromo  $bc_1$  partecipa anche al trasferimento di elettroni nel centro di reazione fotosintetico.

Questo complesso enzimatico catalizza il trasferimento di due elettroni dall'ubichinolo ( $QH_2$ ) a due molecole di citocromo c e il contemporaneo trasferimento di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, dalla matrice allo spazio intermembrana, attraverso un meccanismo chiamato "Q cycle".

Le informazioni strutturali sull'enzima bovino provengono da studi di cristallografia a raggi X che rivelano che il Complesso III è un dimero simmetrico stabile, costituito da due monomeri, formati ciascuno da 11 subunità, per un peso molecolare di circa 240 kDa.

Ogni monomero contiene tre subunità catalitiche che comprendono i centri redox dell'enzima: il citocromo b, con due gruppi eme ( $b_{562}$ ,  $b_{566}$ ), il citocromo  $c_1$  e la proteina di Rieske, costituita da un centro 2Fe-2S. Le altre 8 subunità sono proteine che circondano il nucleo metallo proteico. Due di queste (Core 1 e Core 2) costituiscono un largo dominio che si estende nella matrice e sembrano avere la funzione di stabilizzare l'enzima (*figura 19*).

Un'importante caratteristica della proteina Fe-S di Rieske rilevata per la prima volta attraverso la cristallografia a raggi x, è la mobilità del suo dominio catalitico, che funziona come navetta per gli elettroni trasportati al citocromo  $c_1$ . Dalla cristallografia a raggi x la proteina era visibile e risolta in una conformazione definita solo se bloccata con l'utilizzo di inibitori, diversamente era mobile e non visibile [68]. Studi di mutagenesi hanno inoltre rivelato che la limitazione della mobilità del dominio catalitico della proteina di Rieske riduce l'attività dell'enzima [69].

Il modello Q cycle proposto da Mitchell (*figura 20*) comprende l'ossidazione di due molecole di ubiquinolo e il riciclo di un elettrone per ogni ossidazione, mentre il secondo elettrone passa attraverso la proteina Fe-S di Rieske e il citocromo  $c_1$ , fino alla riduzione del citocromo c.

I due elettroni riciclati attraverso l'enzima riducono una molecola di ubiquinone, passando attraverso un intermedio semichinonico stabile. L'ossidazione delle due molecole di ubiquinolo determina il rilascio di 4 protoni nello spazio intermembrana, mentre la riduzione dell'ubichinone ne accetta 2 provenienti dalla matrice.

Le reazioni redox e il trasferimento di protoni avvengono in due siti topograficamente distinti. Il sito di legame dell'ubichinolo è chiamato “**centro out**” o  $Q_o$  o P (positivo), è rivolto verso il lato citoplasmatico della membrana interna ed è situato tra il centro di Rieske ed il citocromo b; il sito di legame per l'ubichinone è chiamato “**centro in**” o  $Q_i$  o N (negativo) ed è situato sul versante opposto della membrana.

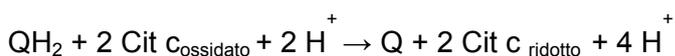
Il ciclo inizia con il legame dell'ubichinolo al centro  $Q_o$  dell'enzima. Con l'ossidazione dell'ubichinolo, un elettrone è trasferito al centro Fe-S di Rieske e al citocromo  $c_1$  che riduce poi il citocromo c.

Il secondo elettrone che risulta dall'ossidazione dell'ubichinolo, è trasferito al gruppo eme a basso potenziale ( $b_L$  o  $b_{566}$ ), poi al gruppo eme a più alto potenziale ( $b_H$  o  $b_{562}$ ) che riduce una molecola di ubiquinone legata al centro  $Q_i$  nella forma semichinonica. I due protoni provenienti dall'ossidazione della molecola di ubiquinolo sono rilasciati nel lato citoplasmatico della membrana.

Per completare il ciclo, viene ossidata nel centro  $Q_o$  un'altra molecola di ubiquinolo con il contemporaneo rilascio di altri due protoni sul versante citoplasmatico. Ancora un elettrone è trasferito alla proteina di Rieske, al citocromo  $c_1$  e al citocromo c e l'altro elettrone passa attraverso i gruppi eme  $b_L$  e  $b_H$  fino a ridurre il semichinone sul centro  $Q_i$  a ubiquinolo, con la contemporanea traslocazione di due protoni dalla matrice allo spazio intermembrana.

Il ciclo completo determina quindi l'ossidazione di due molecole di ubiquinolo, la riduzione di due molecole di citocromo c e la traslocazione netta di due protoni dalla matrice allo spazio intermembrana [69, 70, 71].

L'equazione netta per le reazioni redox del ciclo Q è:



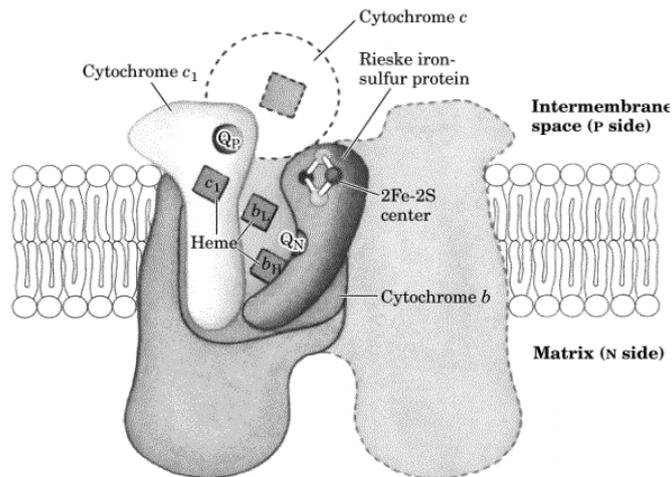


Figura 19: Struttura del Complesso III.

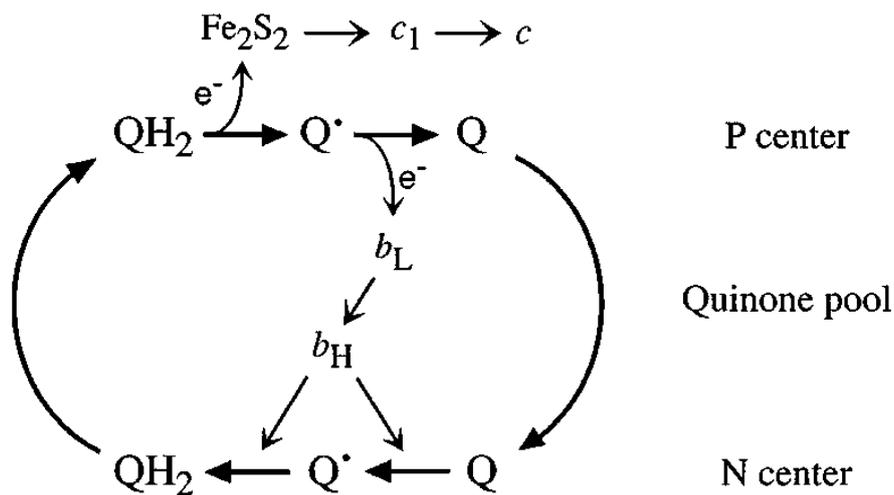


Figura 20: Rappresentazione schematica del "Q-cycle".

#### 4.4.1- Inibitori del Complesso III

Gli inibitori del Complesso III sono stati divisi in due classi basandosi sul loro sito di inibizione. Gli inibitori di classe I hanno come bersaglio il centro  $Q_o$  e sono divisi ulteriormente in tre sottoclassi (Ia, Ib e Ic) a seconda delle loro caratteristiche chimiche e degli effetti biofisici e spettroscopici che mostrano in seguito al legame sui loro siti di inibizione specifici.

Gli inibitori di classe Ia bloccano il trasferimento di elettroni dall'ubichinolo alla proteina Fe-S di Rieske e comprendono le molecole con  $\beta$ -metossialacrilato come gruppo

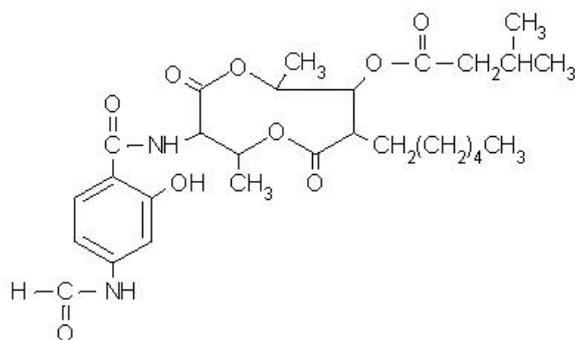
funzionale (inibitori MOA) e i loro analoghi strutturali. In questo gruppo di inibitori è compreso il Mixotiazolo (*figura 14*).

Gli inibitori di classe Ib inibiscono il trasferimento di elettroni dalla proteina Fe-S di Rieske al citocromo  $c_1$ , provocando un incremento del potenziale redox della proteina di Rieske. Hanno come composto rappresentativo la Stigmatellina (*figura 14*).

Gli inibitori di classe Ic comprendono analoghi del 2-idrossichinone, bloccano il trasferimento degli elettroni in modo simile agli inibitori di classe Ib, ma non determinano un forte incremento del potenziale redox della proteina Fe-S di Rieske [72]. Una caratteristica comune a tutti gli inibitori di classe I è la loro capacità di bloccare la produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte dell'enzima.

Gli inibitori di classe II sono composti più eterogenei che mostrano poche analogie strutturali. Si tratta di sostanze che bloccano il trasferimento degli elettroni dall'eme  $b_H$  al chinone e viceversa, sono quindi più comunemente noti come inibitori del centro  $Q_i$ .

L'inibitore rappresentante di questa classe è Antimicina A (*figura 21*), un antibiotico prodotto da varie specie di *Streptomyces*. La sua struttura chimica consiste in un acido 3-formamido salicilico legato attraverso un gruppo amidico ad un anello dilattone sostituito. Dall'analisi della mappa a densità elettronica è evidente che l'Antimicina A agisce in prossimità del gruppo eme  $b_H$  ed è in grado di impedire il legame delle molecole di ubiquinone all'enzima [47]. Il blocco del Complesso III con Antimicina A determina un notevole aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte dell'enzima.



*Figura 21: Struttura di Antimicina A.*

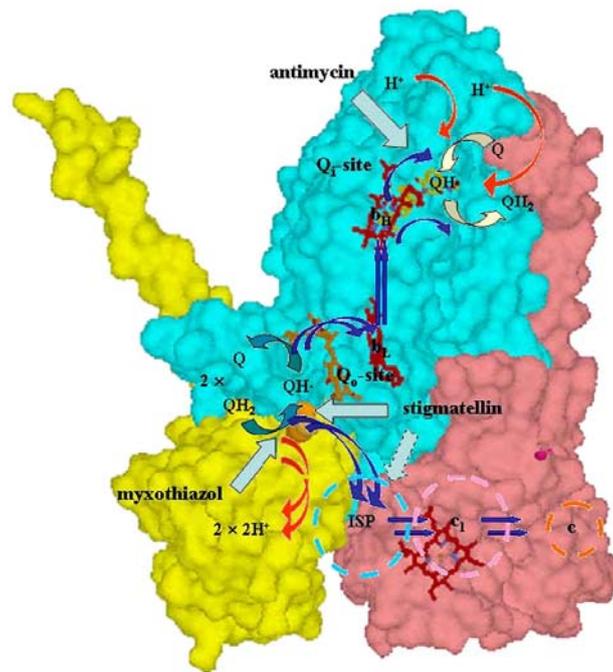


Figura 22: Meccanismo del Q-cycle sovrapposto alla struttura del Complesso III di *Rb. Sphaeroides*. Il trasferimento di elettroni è rappresentato dalle frecce blu; il passaggio degli ioni  $H^+$  con le frecce rosse. Sono indicati anche i siti di inibizione degli inibitori classici del Complesso III rappresentativi delle due classi: Antimicina A, Stigmatellina e Mixotiazolo [73].

#### 4.5- Citocromo c

Il citocromo c è una piccola emoproteina associata alla membrana mitocondriale interna. E' un componente essenziale della catena respiratoria perché responsabile del trasferimento degli elettroni dal Complesso III al Complesso IV. Il gruppo prostetico è rappresentato da una ferro-protoporfirina IX legata covalentemente alla proteina [74].

Il trasferimento di elettroni dal Complesso III al Complesso IV sul lato citoplasmatico della membrana interna è legato allo stato di ossidazione dell'atomo di ferro del gruppo eme ( $Fe^{2+} - Fe^{3+}$ ) del citocromo c. Quando il gruppo eme accetta un elettrone dal Complesso III, il citocromo c si sposta verso il Complesso IV per donare l'elettrone al centro rameico binucleare di questo enzima.

#### 4.6- Complesso IV

Lo stadio finale della catena respiratoria mitocondriale è rappresentato dal trasferimento degli elettroni dal citocromo c ridotto da parte del Complesso III

all'ossigeno molecolare che viene ridotto ad H<sub>2</sub>O. Questa reazione è catalizzata dall'enzima Citocromo c ossidasi (Complesso IV).

La struttura dell'enzima bovino è conosciuta grazie a studi di cristallografia a raggi X. L'enzima è un dimero, ciascun monomero è costituito da 13 subunità, 3 delle quali (subunità I, II, III) sono codificate dal genoma mitocondriale e costituiscono il centro catalitico dell'enzima. Le altre 10 subunità sono codificate dal genoma nucleare [71] e svolgono il ruolo di assemblaggio e regolazione del processo di trasferimento elettronico.

L'enzima Citocromo c ossidasi contiene due gruppi eme A (eme a ed eme a<sub>3</sub>) e tre ioni rame che formano due centri Cu. Un centro (CuA/ CuA) è costituito da due ioni rame legati da residui di cisteina che fanno da ponte, questo centro accetta elettroni dal citocromo c ridotto (subunità II). Il restante ione rame costituisce il centro CuB coordinato da residui di istidina. L'eme a ha la funzione di trasportare elettroni dal centro CuA/ CuA, l'eme a<sub>3</sub> trasporta invece elettroni al centro CuB con il quale forma il centro attivo in cui l'ossigeno molecolare viene ridotto ad H<sub>2</sub>O (subunità I) (*figura 23*).

La subunità III non contiene centri reattivi e la sua funzione non è ancora stata completamente chiarita.

All'interno dell'enzima sono presenti anche un catione magnesio che coordina e stabilizza i centri redox e un atomo di zinco con funzione strutturale.

Il ciclo catalitico ha inizio con il trasferimento di un elettrone dal citocromo c ridotto al centro CuA/ CuA. Da qui l'elettrone passa all'eme a, poi all'eme a<sub>3</sub> e infine al CuB, ridotto dalla forma Cu<sup>2+</sup> alla forma Cu<sup>+</sup>.

Una seconda molecola di citocromo c porta un secondo elettrone che fluisce lungo la stessa via, arrivando all'eme a<sub>3</sub> che viene ridotto nella forma Fe<sup>2+</sup>. In questo stato l'enzima è in grado di legare l'ossigeno. La vicinanza del centro CuB ridotto all'eme a<sub>3</sub> complessato con l'ossigeno, ne permette la riduzione a perossido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>) che forma un ponte tra il Fe<sup>3+</sup> dell'eme a<sub>3</sub> e il Cu<sup>2+</sup> del centro CuB. L'arrivo di un terzo elettrone, portato da una terza molecola di citocromo c e di un protone, determina la scissione del ponte O-O, con la formazione di un gruppo ferrilico e di CuB<sup>2+</sup>-OH. L'aggiunta dell'elettrone finale e di un secondo protone riduce il gruppo ferrilico a Fe<sup>3+</sup>-OH. La reazione con due protoni determina infine il rilascio di due molecole di H<sub>2</sub>O e riporta l'enzima alla forma iniziale completamente ossidata.

I quattro protoni che intervengono nel ciclo catalitico provengono dalla matrice e questo contribuisce alla generazione del gradiente protonico. Inoltre nel corso di ciascun ciclo di reazione, altri quattro protoni sono pompato dalla matrice allo spazio intermembrana per un totale di otto protoni rimossi dalla matrice. Il meccanismo di pompaggio di protoni durante il ciclo catalitico dell'enzima non è legato direttamente al trasferimento

elettronico e questo avviene principalmente grazie a due fattori. All'interno dell'enzima tende ad essere mantenuta la neutralità delle cariche, quindi il legame di un elettrone ad un sito favorisce il legame di un protone ad un sito vicino. Inoltre durante il ciclo catalitico avvengono cambiamenti conformazionali soprattutto a carico del centro eme  $a_3$ /  $\text{Cu}_B$  che permettono ai protoni di entrare esclusivamente dal versante della matrice ed uscire dal versante citosolico [71, 75].

La reazione complessiva catalizzata dalla Citocromo c ossidasi è la seguente:

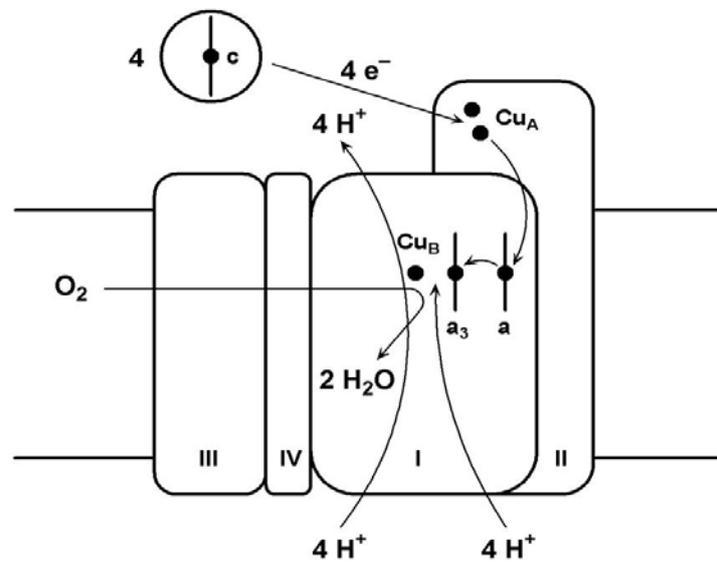
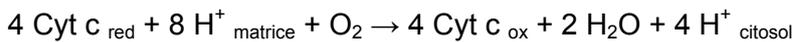


Figura 23: Rappresentazione schematica della struttura del Complesso IV e del meccanismo di trasferimento elettronico al suo interno.

#### 4.6.1- Inibitori del complesso IV

Il Complesso IV può essere inibito da composti quali il cianuro di potassio (KCN), il monossido di carbonio (CO), l'azide ( $\text{N}_3$ ) e il monossido di azoto (NO).

Il cianuro è un inibitore non competitivo in grado di determinare un'inibizione totale dell'enzima. Il tempo richiesto per ottenere l'inibizione dell'attività enzimatica dipende dallo stato redox del gruppo eme  $a_3$ : è stato dimostrato che il cianuro può agire in maniera rapida solamente se l'ossidasi è parzialmente ridotta. Poiché tale forma è transiente e compare solamente durante il turnover dell'enzima in presenza del

substrato (cit  $c^{2+}$ ), l'inibizione della respirazione mitocondriale o dell'attività dell'enzima isolato, da parte del cianuro, richiede qualche minuto [76].

L'azide è cineticamente competitiva con il substrato del Complesso IV nelle cellule di lievito e nei mitocondri, ma è non competitiva nell'enzima isolato.

Il monossido di carbonio inibisce legandosi al ferro del gruppo eme  $a_3$ . L'inibizione dell'enzima ottenuta mediante il monossido di carbonio e l'azide è incompleta.

## 4.7- ATP sintasi

Il gradiente elettrochimico transmembrana generato dai complessi della catena respiratoria guida la sintesi di ATP da parte dell'enzima ATP sintasi (Complesso V). Questo grande complesso enzimatico, anch'esso parte della membrana mitocondriale interna, catalizza la formazione di ATP da ADP e fosfato inorganico ( $P_i$ ) promossa dal flusso di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice. La reazione complessiva catalizzata dall'enzima è la seguente:

$$ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \leftrightarrow ATP^{4-} + H_2O$$

L'ATP sintasi è costituita da due distinte componenti: la subunità  $F_1$  e la subunità  $F_0$  (figura 24). La subunità  $F_1$  sporge nella matrice ed è la porzione con attività ATPasica. Questa subunità è costituita da cinque tipi di catene polipeptidiche nella stechiometria indicata:  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ed  $\epsilon$  [28].

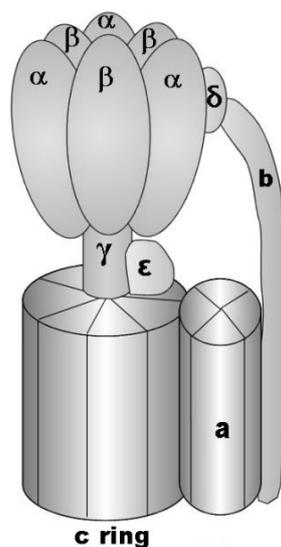


Figura 24: Struttura dell'ATP sintasi.

Le catene  $\alpha$  e  $\beta$  sono omologhe e disposte in modo alternato a formare un anello esamerico; entrambe legano i nucleotidi, ma solo le catene  $\beta$  partecipano direttamente alla catalisi. Le catene  $\gamma$  ed  $\epsilon$  costituiscono lo stelo centrale, in particolare la subunità  $\gamma$  si estende nel centro dell'esamero  $\alpha_3 \beta_3$  rompendo la simmetria dell'anello. Ogni catena  $\beta$  si distingue dalle catene  $\alpha$  per l'interazione con lo stelo centrale.

La subunità  $F_0$  è il segmento idrofobico dell'enzima che contiene il canale protonico e si estende da un versante all'altro della membrana mitocondriale interna. Questo canale è costituito da un anello di subunità  $c$  e da una singola subunità  $a$  che si lega all'esterno di questo anello.

Le subunità  $F_1$  e  $F_0$  sono connesse tra loro attraverso lo stelo centrale  $\gamma\epsilon$  e una colonna esterna che comprende la subunità  $a$ , la catena  $\delta$  e due subunità  $b$ .

Le due componenti funzionali dell'enzima possono essere rappresentate come un rotore (anello  $c$  e stelo centrale  $\gamma\epsilon$ ) e uno statore, la parte immobile che comprende il resto dell'enzima.

Il flusso protonico all'interno dell'ATP sintasi avviene secondo gradiente di pH e di potenziale di membrana, quindi durante il passaggio dei protoni attraverso la subunità  $F_0$  si libera una quantità di energia sufficiente per consentire la sintesi di ATP.

Questo processo avviene attraverso un meccanismo di modificazione del legame dell'ATP favorito dal flusso protonico. Modificazioni delle proprietà delle tre catene  $\beta$ , grazie alle interazioni con la catena  $\gamma$ , permettono in sequenza il legame di ADP e  $P_i$ , la sintesi di ATP e il rilascio di ATP. Una subunità  $\beta$  può trovarsi nella conformazione serrata (T) che lega l'ATP ad alta affinità, una seconda subunità  $\beta$  si trova nella conformazione lassa (L) che lega i substrati ADP e  $P_i$ , l'ultima si trova nella conformazione aperta (O) che può esistere in uno stato legato al nucleotide o rilasciare il nucleotide. L'interconversione tra queste tre forme è favorita dalla rotazione della catena  $\gamma$ ; in questo modo la conformazione T viene convertita nella O e l'ATP che si è formato verrà rilasciato. La subunità nella conformazione L verrà convertita in T permettendo la transizione di ADP e  $P_i$  in ATP. Infine la conformazione O verrà convertita in L legando i substrati (*figura 25*).

La rotazione è favorita dalla differenza tra le concentrazioni dei protoni e i potenziali tra i due versanti della membrana, questo determina diverse protonazioni dei residui di della subunità  $c$  che, una volta neutralizzata, ruota. Il movimento è trasmesso alle catene  $\gamma$  e  $\epsilon$  che vengono fatte ruotare all'interno dell'anello esamerico  $\alpha_3 \beta_3$  [71, 75].

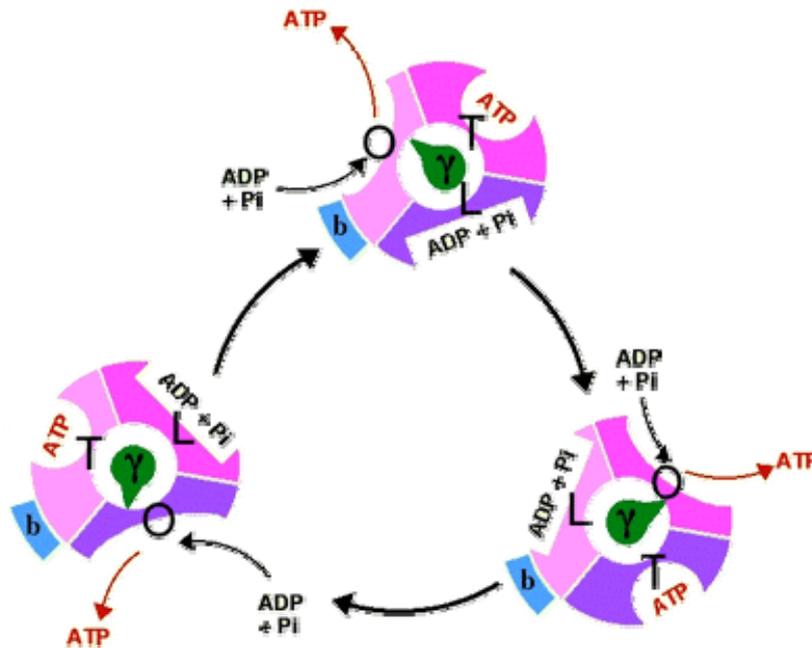
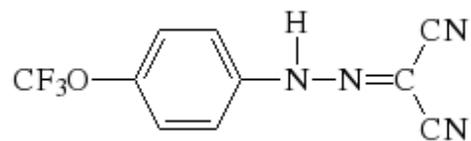
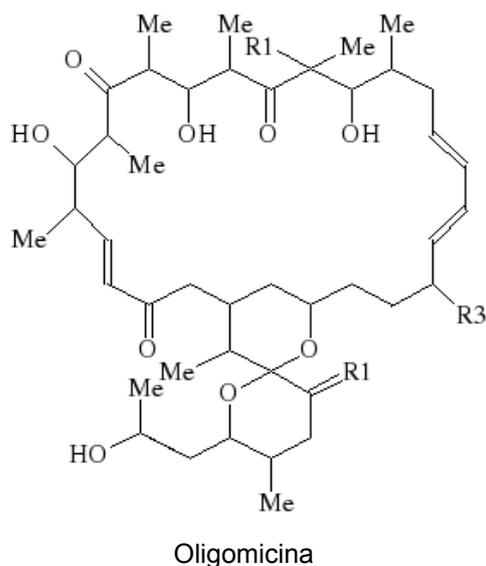


Figura 25: Meccanismo di sintesi dell'ATP da parte delle subunità catalitiche dell'ATP sintasi.

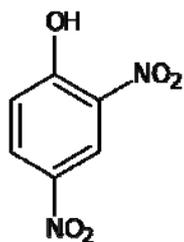
#### 4.7.1- Inibitori del Complesso V

Anche l'ATP sintasi può essere inibita. L'Oligomicina e la Diccloesilcarbodiimide (DCDD) impediscono il flusso di protoni attraverso l'enzima (figura 26). Se i mitocondri durante la respirazione vengono trattati con un inibitore dell'ATP sintasi, la catena di trasporto degli elettroni cessa di funzionare. Questo dimostra lo stretto accoppiamento tra il trasporto degli elettroni attraverso la catena respiratoria e la sintesi di ATP.

La fosforilazione ossidativa e la catena respiratoria possono quindi essere disaccoppiate da alcune molecole tra le quali composti aromatici debolmente acidi, come il 2,4-dinitrofenolo (DNP) o il carbonilcianuro p-trifluoro-metossifenilidrazone (FCCP) (figura 26). Queste molecole lipofile sono in grado di trasportare protoni attraverso la membrana mitocondriale interna e quindi dissipano il gradiente protonico. In questo modo il mitocondrio continua ad ossidare NADH senza produrre ATP e la cellula degrada grandi quantità di glucosio e di acidi grassi. L'energia liberata nel processo di ossidazione viene dissipata sotto forma di calore nella reazione di formazione di  $H_2O$  da  $H^+$  e  $OH^-$ .



carbonilcianuro p-trifluoro-metossifenilidrazone (FCCP)



2,4-dinitrofenolo (DNP)

Figura 26: Struttura degli inibitori del Complesso V e dei disaccoppianti della catena respiratoria.

### 5- Le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

I mitocondri sono considerati la maggiore fonte di specie reattive dell'ossigeno (ROS) la cui produzione è inevitabile durante il normale metabolismo ossidativo e aumenta notevolmente in condizioni patologiche.

L'ossigeno è una molecola fortemente ossidante, quindi accetta facilmente elettroni da altre molecole dando origine a prodotti parzialmente ridotti, noti come ROS. Poiché queste specie hanno uno o più elettroni spaiati (radicali liberi), sono instabili e particolarmente reattive, quindi tendono ad appaiare gli elettroni cedendo o ricevendo un elettrone di spin opposto da altre molecole per raggiungere una conformazione stabile. Queste specie parzialmente ridotte possono reagire con altri radicali, ma anche con molecole organiche non radicaliche (DNA, acidi grassi, proteine) sia come agenti

ossidanti che riducenti, generando una serie di reazioni a catena potenzialmente dannose per i sistemi biologici.

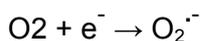
L'aumento di concentrazione delle specie reattive dell'ossigeno e delle specie reattive dell'azoto (RNS) provoca il cosiddetto "stress ossidativo". Questo fenomeno è il risultato dello sbilanciamento nell'omeostasi delle specie reattive: nelle cellule in condizioni normali l'eccesso di ROS o RNS è prevenuto dai sistemi detossificanti e dalla capacità di alcune di queste specie ( $H_2O_2$ ) di permeare liberamente la membrana mitocondriale diffondendo nel citosol, dove svolgono ruoli fisiologici e vengono detossificate.

Lo stress ossidativo causato dall'effetto delle ROS nelle cellule è implicato nella patogenesi di molte malattie, soprattutto quelle neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer, la malattia di Huntington e la sclerosi amiotrofica laterale. Queste malattie hanno caratteristiche diverse, sia dal punto di vista patologico che sintomatico, ma hanno in comune difetti mitocondriali e lo stress ossidativo sembra avere un ruolo importante nella loro patogenesi [77]. Non è comunque ancora chiaro se l'accumulo di ROS sia l'evento scatenante o la conseguenza di altre disfunzioni cellulari.

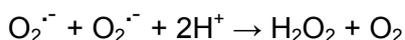
Le **ROS** includono l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e il suo acido coniugato radicale idroperossile ( $HO_2^{\cdot}$ ); il radicale ossidrilico ( $OH^{\cdot}$ ), il carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ), il perossile ( $RO_2^{\cdot}$ ) e l'alcossile ( $RO^{\cdot}$ ). Anche alcune specie neutre, non radicaliche sono considerate ROS, tra queste il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), HOCl, aldeidi reattive, l'ossigeno singoletto e idroperossidi degli acidi grassi (FAOOH) [78].

Le **RNS** comprendono, come nel caso delle specie reattive dell'ossigeno, sia specie radicaliche come il monossido di azoto ( $NO^{\cdot}$ ) che specie non radicaliche, come il perossinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ) e il suo acido coniugato ( $HOONO$ ),  $N_2O_3$ , N-nitrosoammine e acidi grassi nitrosilati [78]. Di seguito sono riportate le caratteristiche chimiche di alcune specie reattive.

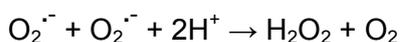
**Anione superossido** ( $O_2^{\cdot-}$ ): è un precursore di altre ROS. E' prodotto in seguito alla riduzione monoelettronica dell'ossigeno molecolare [79] secondo la reazione:



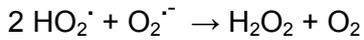
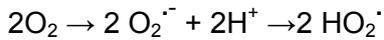
Due molecole di superossido possono dismutare spontaneamente, dando origine ad una molecola di perossido d'idrogeno:



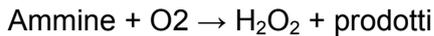
Questa reazione può essere catalizzata anche da un'enzima intracellulare, la superossido dismutasi (SOD):



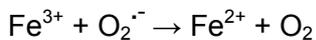
**Perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** si genera dalla dismutazione del radicale superossido e dalla protonazione del radicale diossido di idrogeno (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>) che reagisce con un'altra molecola di superossido per dare perossido di idrogeno:



La formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nella cellula può avvenire anche attraverso l'azione di ossidasi, tra cui l'enzima monoaminoossidasi ( MAO ).



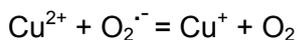
Il perossido di idrogeno è una molecola poco reattiva, ma in presenza del radicale superossido e di cationi metallici, come ferro e rame, genera il radicale ossidrile attraverso una reazione nota come reazione di Fenton:



Questa reazione può avere luogo nel corso di processi infiammatori e necrotici, durante i quali si assiste spesso al rilascio di metalli, normalmente complessati ad enzimi (superossido dismutasi, glutatione perossidasi, xantina ossidasi e NADPH ossidasi) e a proteine come l'emoglobina e la mioglobina. Questo evento rappresenta un fattore determinante per la produzione del radicale ossidrile che, a sua volta, provoca l'amplificazione del danno strutturale ai tessuti [80].

**Radicale ossidrile (OH<sup>·</sup>):** la tossicità dell'acqua ossigenata, ampiamente dimostrata soprattutto per il sistema nervoso, solitamente non è imputabile ad un effetto diretto della stessa, tranne nel caso di eccessi non fisiologici. Il perossido di idrogeno è infatti il precursore di un radicale molto reattivo, ad alto potere ossidante responsabile dei danni ossidativi a proteine, lipidi e DNA: il radicale ossidrile (OH<sup>·</sup>). Si forma dalla reazione tra il ferro bivalente e il perossido di idrogeno attraverso la reazione di Fenton già illustrata.

Nonostante la maggior parte dei radicali ossidrilici si formi via Fenton (con rame o ferro), esiste un'ulteriore reazione definita di Haber-Weiss, in cui il rame o il ferro possono nuovamente essere ridotti dall'acido ascorbico o dall'anione superossido, anche se in questo caso i due metalli fungono unicamente da catalizzatori.



Alcune catecolamine hanno la stessa funzione dell'acido ascorbico e del superossido, cioè quella di accelerare la formazione rame o ferro dipendente di OH<sup>·</sup> da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

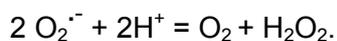
**Monossido di azoto (NO<sup>•</sup>):** è un radicale libero che fa parte delle RNS, sintetizzato dall'enzima ossido nitrico sintasi e rilasciato da numerosi tipi di cellule, soprattutto dalle cellule dell'endotelio vascolare e dai fagociti [81]. Nei vertebrati il monossido di azoto (NO<sup>•</sup>) è un'importante molecola coinvolta nelle normali funzioni fisiologiche, come la regolazione del tono vascolare, la trasduzione del segnale nel sistema nervoso e l'eliminazione degli organismi patogeni in risposte immunitarie non specifiche. L'NO<sup>•</sup> reagisce con il superossido a pH fisiologici, per formare una specie non radicalica, il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un composto labile, ma altamente tossico [82]. La tossicità del perossinitrito è ampiamente discussa in letteratura: può essere direttamente citotossico, attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici e allo stesso tempo può originare OH<sup>•</sup> attraverso una reazione di decomposizione [83].

Il monossido di azoto è coinvolto nel normale funzionamento eccitatorio di aminoacidi come il glutammato e allo stesso tempo è responsabile di effetti dannosi prodotti da un suo eccesso.

## 5.1- La catena respiratoria mitocondriale come fonte di ROS

La catena respiratoria mitocondriale rappresenta la principale fonte di specie reattive dell'ossigeno in una cellula, in particolare di anione superossido. Questa specie radicalica si genera quando una parte del flusso elettronico proveniente dai substrati riducenti come il NADH o il FADH<sub>2</sub> sfugge al controllo della catena e riduce mono elettronicamente l'ossigeno molecolare. La maggior parte dell'anione superossido prodotto dai mitocondri (circa il 70-80%) viene rilasciato nella matrice, il restante (20-30%) è rilasciato nello spazio intermembrana.

L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> rilasciato nella matrice viene detossificato da una specifica superossido dismutasi intramitocondriale (MnSOD), che catalizza la reazione seguente:



La concentrazione di O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nella matrice mitocondriale in stato stazionario è di circa 0,2-0,3 nM, con una concentrazione di enzima MnSOD pari a 10-40 μM. L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> rilasciato nello spazio intermembrana reagisce con il citocromo c localizzato nella membrana interna e con l'enzima Cu-Zn-SOD dello spazio intermembrana [84].

La riduzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ROOH è catalizzata dall'enzima Glutazione perossidasi, l'unico che utilizza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei mitocondri delle cellule animali, ad eccezione delle cellule cardiache in cui è presente una catalasi. La Glutazione perossidasi è responsabile della

maggior parte della detossificazione del perossido di idrogeno intracellulare; difetti in questo enzima sono associati a disfunzioni mitocondriali e a conseguente danno cellulare [85].

I maggiori produttori di specie radicaliche della catena respiratoria sono il Complesso I e il Complesso III che producono anione superossido, rispettivamente dal lato della matrice e verso lo spazio intermembrana.

### 5.1.1- Il Complesso I come fonte di ROS

Il Complesso I è considerato l'enzima che maggiormente contribuisce alla produzione di ROS nei mitocondri. Le conoscenze parziali riguardo al meccanismo di trasferimento degli elettroni all'interno di questo enzima non hanno permesso di stabilire con precisione quale sia il sito di fuga degli elettroni per la riduzione monovalente dell'ossigeno molecolare.

Sono stati proposti alcuni siti di fuga degli elettroni dal Complesso I elencati qui di seguito: 1) il centro ferro zolfo N2; 2) il centro N1a 3) l'ubisemichinone 4) l'FMN.

Studi condotti da Lambert e Brandt hanno dimostrato che la produzione di anione superossido da parte del Complesso I durante il trasporto diretto di elettroni provenienti dal NADH è meno del 10%, rispetto alla produzione del superossido che avviene durante il trasporto inverso degli elettroni (RET) provenienti dal succinato, anche quando l'enzima è completamente ridotto da piruvato e malato, in presenza di Stigmatellina, inibitore del Complesso III [86]. Durante il RET, in presenza di un forte gradiente di forza elettromotrice, gli elettroni sono spinti dall'ubichinolo ridotto, all'interno del Complesso I fino a ridurre il  $\text{NAD}^+$  a NADH sul sito dell'FMN [87]. La produzione di superossido da parte del trasporto inverso degli elettroni è abolita dal Rotenone e questo conferma l'entrata degli elettroni attraverso il sito di legame dell'ubichinone [86].

Di particolare interesse è inoltre la stretta dipendenza della produzione di superossido durante il RET dal gradiente di forza elettromotrice, il cui calo determina l'abolizione della produzione di ROS, probabilmente a causa del calo della forza termodinamica che spinge gli elettroni verso il sito di produzione di ROS [88, 89]. Inoltre la produzione di ROS è molto più sensibile ai cambiamenti nel gradiente di pH ( $\Delta\text{pH}$ ) che del gradiente del potenziale di membrana ( $\Delta\psi$ ) quali componenti della forza elettromotrice totale [88, 90].

La rilevanza fisiologica del trasporto inverso di elettroni, comunque non è ancora stata chiarita, è probabile che avvenga prevalentemente in vivo in condizioni di ipossia.

L'esatto sito di produzione di ROS durante il trasporto elettronico diretto è ancora dibattuto.

Uno dei siti proposti è la flavina (FMN) [91, 92]. L'uso dell'inibitore difenileniodonio (DPI), che agisce a livello dell'FMN, inibendo la riduzione dei centri Fe-S a valle e stabilizzando lo stato ridotto della flavina, ha fornito dati per l'identificazione del sito. Questo inibitore blocca la produzione di ROS durante il trasferimento inverso degli elettroni [91]. Tuttavia alcuni dati ottenuti dal nostro laboratorio mostrano che il DPI è in grado di bloccare la formazione di ROS anche durante il trasporto diretto di elettroni. L'ipotesi della flavina come sito di produzione di superossido è sostenuta da studi condotti sul Complesso I su un mutante di *Yarrowia lipolytica*, mancante del centro Fe-S N2 in cui si assiste alla produzione di ROS [93].

La mancanza di produzione di ROS durante l'inibizione con DPI sembra escludere l'FMN come sito responsabile della produzione di specie radicaliche a vantaggio dei centri Fe-S. L'ipotesi che favorisce il coinvolgimento dell'FMN è ancora molto dibattuta soprattutto a causa della difficoltà nell'ottenere una totale inibizione dell'enzima: l'inibizione sul Complesso I infatti non supera mai l'85-90 % e questo determina un flusso residuo di elettroni ai centri redox a valle del punto di inibizione.

Alcuni autori hanno mostrato che utilizzando inibitori dei centri Fe-S come l'anidride etossiformica [94] si assiste alla diminuzione della produzione di radicali, escludendo quindi la flavina come sito di riduzione dell'ossigeno.

Tuttavia l'FMN potrebbe avere un ruolo nella produzione di ROS in presenza di chinoni fisiologici, come i derivati delle catecolamine. L'adrenocromo provoca l'aumento della formazione di ROS da parte del Complesso I, attività insensibile sia al Rotenone che al p-IMB (para- idrossi- mercuribenzoato) quindi probabilmente a carico di un sito situato a monte dei centri redox dell'enzima e presumibilmente coincidente con l'FMN [95].

Recentemente studi EPR sui centri redox dell'enzima sembrano escludere il semichinone della flavina come produttore di ROS perché stabilizzato dai centri redox vicini, in particolare dal centro Fe-S N1a.

Inoltre i diversi effetti degli inibitori del Complesso I sulla produzione di ROS, ci hanno portato ad identificare due classi, ciascuna con comportamento opposto sulla produzione di specie radicaliche. Questo ci ha fatto ipotizzare che la flavina non possa essere il sito di produzione di ROS, perché localizzata a monte dei siti di inibizione degli inibitori utilizzati [96].

Questo non esclude il coinvolgimento del centro Fe-S N2, che condivide parte del sito del chinone e sembra esserne il diretto donatore di elettroni. Il diverso effetto di Piericidina A e Rotenone sulla produzione di ROS nel trasporto diretto e inverso degli

elettroni, fa ipotizzare il coinvolgimento del centro Fe-S N2 e del chinone ad esso legato nella produzione di ROS [97].

Tra tutti i centri Fe-S responsabili del trasferimento degli elettroni all'interno del Complesso I, il centro Fe-S N2 sembra essere il candidato più probabile per la produzione di ROS.

A differenza degli altri centri redox ben protetti dalla struttura proteica dell'enzima, il centro N2 è localizzato all'interfaccia fra i domini idrofilico e idrofobico, in una regione accessibile all'ubichinone, ad  $H^+$ , agli ioni e alle molecole di acqua; quindi probabilmente accessibile anche all'ossigeno molecolare.

Inoltre il potenziale del centro Fe-S N2 (da -0,15 V a -0,05 V) è compatibile con quello della coppia ossigeno-anione superossido (circa -0,14 V). I valori calcolati del potenziale della coppia superossido/ossigeno rendono improbabile che gruppi a più basso potenziale come l'FMN o centri Fe-S a monte di N2 possano essere donatori di elettroni all'ossigeno molecolare e quindi potenziali siti di produzione di ROS [97].

### **5.1.2- Complesso III come produttore di ROS**

Il contributo del Complesso III alla produzione di ROS è maggiormente compreso rispetto a quello del Complesso I.

Durante il "Q cycle" si assiste alla formazione di un semichinone a livello del sito  $Q_o$  dell'enzima, perché l'ubichinolo che entra a livello di questo sito dona il primo elettrone alla proteina Fe-S di Rieske. Normalmente questo semichinone è immediatamente ossidato dal citocromo  $b_L$ , ma quando il trasferimento elettronico è rallentato da un alto potenziale di membrana, l'ossigeno molecolare disciolto nella membrana può reagire con il semichinone dando origine all'anione superossido [98]. Grazie alla vicinanza del sito  $Q_o$  allo spazio intermembrana, l'anione può essere facilmente diretto verso la parte citosolica della membrana. Il suo passaggio verso la matrice sarebbe sfavorito dal  $\Delta\psi$  negativo.

Alcuni autori hanno dimostrato che circa la metà del superossido prodotto dal Complesso III viene rilasciato nella matrice e hanno proposto due modelli [99]. Secondo il primo modello esiste un "tunnel idrofobico" attraverso cui passa il semichinone dal sito  $Q_o$  verso il centro della membrana; da qui il semichinone può reagire con l'ossigeno generando superossido che può dirigersi su entrambi i versanti, diffondendo nello strato lipidico della membrana. L'altro modello proposto, ipotizza che non si formi l'anione superossido, bensì il suo acido coniugato radicale idroperossile, grazie a residui di glutammato in prossimità del sito  $Q_o$ . E' difficile spiegare però come

questa specie radicalica riesca a raggiungere l'interfaccia membrana/ fase acquosa senza reagire con i componenti lipidici della membrana.

La fuga di elettroni dal Complesso III è favorita dalla presenza di Antimicina A che blocca il trasferimento di elettroni dal citocromo  $b_H$  al centro  $Q_i$  di legame dell'ubichinone, rivolto verso il lato interno della membrana mitocondriale. In questo modo questo inibitore prolunga la presenza del semichinone nel sito  $Q_o$ , incrementando la possibilità di reazione con l'ossigeno.

Inibitori che bloccano il centro  $Q_o$  (Stigmatellina e Mucidina) non permettendo il trasferimento del primo elettrone, non determinano la produzione di ROS da parte dell'enzima e sono in grado di bloccare anche l'induzione della produzione di ROS da parte degli inibitori del centro  $Q_i$ . Gli inibitori che agiscono sul centro  $Q_o$  bloccando il passaggio del secondo elettrone al citocromo  $b$  (Mixotiazolo), favoriscono la generazione del semichinone e quindi la produzione, anche se modesta, di ROS.

E' quindi ipotizzabile che il sito di produzione delle specie reattive dell'ossigeno nel Complesso III sia a livello del centro  $Q_o$  e che il maggiore responsabile di questa produzione sia il semichinone [100].

### 5.1.3- Altre fonti di ROS

La reazione di riduzione ad un elettrone dell'ossigeno molecolare è termodinamicamente favorevole per molte ossidoreduttasi mitocondriali, perché il potenziale redox della coppia superossido/ossigeno è  $-160$  mV. Nonostante queste fonti siano in grado di produrre ROS in maniera significativa, negli esperimenti con enzimi isolati o con mitocondri, il loro contributo alla produzione totale di specie reattive da parte del mitocondrio in condizioni fisiologiche non è ancora del tutto nota.

**Citocromo  $b_5$  reduttasi:** è un enzima localizzato nella membrana mitocondriale esterna, distribuito in tutti i tessuti dei mammiferi. Catalizza l'ossidazione del NAD(P)H e la contemporanea riduzione del citocromo  $b_5$ . Questo enzima è in grado di ridurre il radicale libero ascorbico, quindi sembra essere coinvolto nella rigenerazione dell'ascorbato nel tessuto epatico [101]. La citocromo  $b_5$  reduttasi produce superossido alla velocità di circa  $300$  nmol/min per mg di proteina [102].

**Monoammina ossidasi (MAO):** è una flavoproteina, anch'essa localizzata nella membrana mitocondriale esterna ed espressa in tutti gli organismi eucarioti. Catalizza l'ossidazione delle ammine primarie e terziarie, accompagnata dal rilascio di  $H_2O_2$ . La capacità di questi enzimi di produrre  $H_2O_2$  supera largamente quella di altre fonti

mitocondriali (50 volte superiore rispetto alla produzione da parte del Complesso III inibito con Antimicina A) [103].

Gli enzimi MAO sono la maggiore fonte di  $H_2O_2$  nei tessuti ischemici e nell'invecchiamento. E' stato rilevato inoltre che la sovraregolazione di questi enzimi e il conseguente aumento della concentrazione di  $H_2O_2$  potrebbero essere responsabili del danno mitocondriale che provoca il Parkinson [104].

**Diidrorotato deidrogenasi:** è un enzima localizzato nella membrana mitocondriale interna, catalizza la conversione del diidrorotato in orotato nella sintesi delle pirimidine. In assenza del suo accettore di elettroni fisiologico, il coenzima Q, il diidrorotato ridotto può produrre  $H_2O_2$  [105].

**Glicerolo 3-fosfato deidrogenasi:** è un enzima che contiene FAD, anch'esso localizzato nella membrana mitocondriale interna. Catalizza l'ossidazione del glicerolo 3-fosfato a diidrossiacetone fosfato e utilizza il coenzima Q come accettore di elettroni. Questa reazione è coinvolta nel metabolismo dei lipidi e nella navetta del glicerolo fosfato che rigenera  $NAD^+$  dal NADH formato nella glicolisi.

**Aconitasi:** localizzato nella matrice mitocondriale, fa parte del ciclo di Krebs, dove catalizza la conversione del citrato in isocitrato. L'enzima viene inattivato per ossidazione dei centri Fe-S da parte del superossido [106]. Dopo inattivazione, l'enzima isolato produce radicale idrossile mediato dal rilascio di  $Fe^{2+}$ .

**Complesso dell'alfa chetoglutarato deidrogenasi:** è un complesso enzimatico associato alla membrana mitocondriale interna, dal lato della matrice. Questo complesso è costituito da tre enzimi: l'alfa chetoglutarato deidrogenasi, la lipoamide deidrogenasi e la diidrolipoamide succiniltransferasi. Il complesso catalizza l'ossidazione dell'alfa-chetoglutarato a succinil- coA utilizzando  $NAD^+$  come accettore di elettroni. Basse concentrazioni di  $NAD^+$  inducono produzione di ROS [107, 108].

**Succinato deidrogenasi (Complesso II):** è un enzima che fa parte della catena respiratoria il cui ruolo nella produzione di ROS è controverso. L'enzima isolato, reincorporato in liposomi, è in grado di produrre ROS attraverso il FAD ridotto, in assenza di accettori di elettroni [109]. Nelle particelle submitocondriali la produzione di ROS da parte dell'enzima è inibita da Carboxina, tuttavia questo inibitore abbatte la produzione di ROS anche da parte del Complesso III inibito da Antimicina A, quindi non è chiaro il suo ruolo nella produzione di ROS nella catena respiratoria.

# Scopo della tesi

Il Complesso I è un enzima di grandi dimensioni che rappresenta il punto di ingresso degli elettroni nella catena respiratoria mitocondriale. Il numero totale di subunità del Complesso I bovino è 46 [21] per una massa molecolare totale di circa 1000 kDa.

Tra queste, 7 subunità sono codificate dal genoma mitocondriale [112, 113] e appartengono al dominio idrofobico dell'enzima (ND1-ND6 e ND4L). Il meccanismo molecolare del funzionamento di questo enzima non è ancora completamente compreso soprattutto a causa della mancanza di informazioni strutturali. Le uniche informazioni sulla struttura del Complesso I provengono da studi di cristallografia a raggi X condotti recentemente da Sazanov e Hinchliffe [31] sull'enzima HB-8 di *Thermus thermophilus*.

Le conoscenze limitate riguardo alla struttura tridimensionale del Complesso I rendono difficile anche lo studio del meccanismo di pompaggio dei protoni attraverso la membrana mitocondriale interna da parte di questo enzima [114, 35].

Oltre al conosciuto ruolo redox svolto all'interno della catena respiratoria, il Complesso I è uno dei maggiori siti di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Gli elettroni che sfuggono all'enzima, riducono l'ossigeno molecolare e danno origine ad anione superossido [115]. Le scarse conoscenze dell'esatta sequenza del trasferimento elettronico e del meccanismo di pompaggio di protoni all'interno dell'enzima, non permettono di conoscere con precisione il meccanismo e il sito di produzione di superossido.

Un'informazione più dettagliata riguardo al funzionamento del Complesso I è importante non solo per il progredire delle conoscenze di base, ma anche per la ricerca biomedica. Il Complesso I è coinvolto nella patogenesi di malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson, in patologie come il diabete e nell'invecchiamento.

Il Complesso I è inibito da più di 60 diverse famiglie di composti comunemente usati come pesticidi, acaricidi, insetticidi o antielmintici.

Abbiamo utilizzato alcuni di questi inibitori per dissezionare funzionalmente l'enzima, sia dal punto di vista dell'attività cinetica, sia dal punto di vista della produzione di ROS allo scopo di comprendere il meccanismo di trasferimento elettronico all'accettore fisiologico, l'ubichinone.

Abbiamo valutato l'effetto degli inibitori classici del Complesso I sulla produzione di ROS, utilizzando le sonde fluorescenti DCFDA, Amplex Red e diidroetidio, in presenza di chinoni a corta catena. Abbiamo condotto gli esperimenti utilizzando queste tre diverse sonde per la rilevazione delle specie radicaliche dell'ossigeno, a causa delle limitazioni che le molecole mostrano, ottenendo risultati sovrapponibili.

Sono state utilizzate particelle submitocondriali isolate da mitocondri di cuore bovino (SMP), trattate con concentrazioni saturanti di NADH.

Partendo dai dati ottenuti sulla produzione di ROS mediante l'uso di sonde fluorescenti abbiamo condotto uno studio cinetico sull'enzima, misurando l'attività NADH-DCIP reduttasica del Complesso I. L'attività è stata misurata in presenza degli inibitori, utilizzando come accettore di elettroni la molecola idrosolubile dicloroindofenolo (DCIP) e come donatore di elettroni NADH, in presenza o assenza di chinoni a corta catena. Il DCIP è un accettore di elettroni idrofilico che non interagisce solo con il sito di riduzione fisiologico dell'enzima, ma è in grado di prendere elettroni direttamente dalla flavina (a monte del sito fisiologico).

Attraverso la Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) abbiamo indagato gli stati di riduzione dei centri Fe-S all'interno dell'enzima e la presenza del semichinone, trattando i campioni con gli inibitori e gli analoghi del chinone a corta catena (CoQ<sub>1</sub>, DB, CoQ<sub>2</sub>). Abbiamo registrato gli spettri EPR delle particelle submitocondriali alla temperatura di 180 K per ottenere dati preliminari sulla presenza del radicale semichinone nei campioni. In seguito ci siamo occupati dell'analisi degli stati di riduzione dei centri Fe-S, conducendo le misure EPR alla temperatura di 9 K.

Infine abbiamo approfondito l'analisi del segnale del semichinone registrando gli spettri alla temperatura di 40 K, alla quale è possibile rilevare contemporaneamente i segnali di un centro Fe-S ridotto (N1b).

I dati ottenuti ci hanno permesso di ipotizzare un meccanismo attraverso il quale gli elettroni vengono trasferiti all'interno del Complesso I mitocondriale.

# Materiali e Metodi

## 1- Preparazione di mitocondri di cuore bovino (BHM)

### **Materiale:**

Tampone Saccarosio 0.25 M

Tris 1 M

Tampone di risospensione (pH=7.6): Saccarosio 0.25 M, Tris-HCl 10 mM

### **Preparazione:**

La preparazione di mitocondri da cuore bovino segue il metodo di Smith (1967).

Il cuore di un bovino giovane adulto viene pulito dai tessuti connettivi e grassi e lavato abbondantemente con una soluzione di KCl 0.15 M, per eliminare sangue e tessuti non muscolari.

Il cuore viene poi omogeneizzato in presenza di tampone Saccarosio 0.25 M (portato a pH 7.6 con Tris 1 M). Durante l'omogeneizzazione il pH viene controllato e mantenuto fra 7.6 e 8 con Tris 1 M.

In seguito l'omogenato viene centrifugato in una centrifuga Beckman con rotore SA 10 a 2000 RPM per 20 minuti. Il surnatante viene centrifugato con centrifuga Beckman con rotore SA 10 a 9000 RPM per 30 minuti. Il precipitato ottenuto è costituito da mitocondri, che vengono risospesi in tampone Saccarosio Tris-HCl per effettuare il lavaggio del preparato. I mitocondri sono quindi sottoposti ad una ulteriore centrifugazione (centrifuga Beckman, rotore SA 10) a 9000 RPM per 30 minuti. Il precipitato costituito da mitocondri viene poi risospeso in tampone Saccarosio Tris-HCl a una concentrazione di circa 50 mg/ml e conservato a -80°C.

## 2- Preparazione di particelle submitocondriali di cuore bovino (SMP)

### **Materiale:**

Tampone Saccaroso-Tris (pH=7.8): Saccaroso 0.25 M, Tris 0.01 M

### **Preparazione:**

Le particelle submitocondriali (SMP) si ottengono per sonicazione dei mitocondri di cuore bovino secondo le modalità di Hansen e Smith (1964).

I mitocondri vengono congelati e scongelati tre volte per ottenere la rottura delle membrane. I BHM vengono poi diluiti con due volumi di tampone Saccarosio-Tris e sottoposti a trattamento di sonicazione in ghiaccio (sonicatore MSE, potenza: 150 W) per 4 volte, per la durata di un minuto ciascuna con pause di 30 secondi.

Vengono poi centrifugati (centrifuga Spinco, rotore SS34) a 15000 RPM per 10 minuti a 4°C. Si preleva quindi il surnatante e si centrifuga (centrifuga Spinco, rotore SS34) a 40000 RPM per 45 minuti a 4°C. Il pellet formato da particelle submitocondriali viene risospeso in tampone Saccarosio-Tris e conservato a -80 °C .

### 3- Determinazione della concentrazione proteica

Per determinare la concentrazione proteica dei campioni si utilizza il **Metodo del Biureto** (Gornall, A.G., 1949), con albumina di siero bovino come standard di riferimento.

Il reattivo del biureto si prepara sciogliendo 1,5 g di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 6 g di tartrato di Na e di K in 500 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ , aggiungendo quindi 300 ml di NaOH al 10%, e portando infine il volume a 1 L con acqua .

Il metodo si basa sulla capacità dello ione  $\text{Cu}^{2+}$  di essere chelato dai residui amminoacidici delle proteine che formano dei complessi blu-violetto. L'assorbanza della soluzione, determinata spettrofotometricamente, è proporzionale alla quantità di proteina contenuta nel campione analizzato.

Si prepara, come standard di riferimento, una soluzione di albumina 1 mg/ml e se ne determina la concentrazione esatta misurando la sua assorbanza a  $\lambda = 278 \text{ nm}$  (1mg/ml albumina: 100 mA).

Per ogni campione da analizzare, si preparano 2 provette contenenti ognuna: un volume noto di sospensione proteica, da 20 a 50  $\mu\text{l}$  corrispondente a circa 1 mg di proteina mitocondriale, 100  $\mu\text{l}$  di deossicolato di Na al 10% (DOC) un detergente per denaturare le proteine,  $\text{H}_2\text{O}$  fino a portare tutte le soluzioni al volume di 1,5 ml ed 1,5 ml del reattivo del biureto, fino ad un volume totale di 3 ml. Analogamente alle provette con il campione, viene preparato il campione bianco, sostituendo al volume di soluzione proteica il tampone di risospensione di quest'ultima.

Per accelerare la reazione si immergono le provette in acqua bollente per 30 secondi e si raffreddano rapidamente sotto l'acqua corrente fino a raggiungere la temperatura ambiente. Si eseguono le letture spettrofotometriche a  $\lambda = 540 \text{ nm}$  (rispetto ad  $\text{H}_2\text{O}$ ) in cuvette di plastica da 3 ml.

Si calcola la media dei valori di assorbanza dei campioni e a questi viene sottratto il valore del bianco. La concentrazione proteica nel campione analizzato viene calcolata facendo una proporzione rispetto alla concentrazione dell'albumina standard.

## 4- Dosaggi fluorimetrici

### 4.1- Misura della produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

Il metodo usato per misurare la produzione di ROS in mitocondri isolati e in SMP è basato sull'uso delle sonde fluorescenti 2',7'-Diclorodihidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA), diidroetidio (HE) e 10- acetil-3,7-diidrossifenoxazine (AmplexRed).

DCFDA (*figura 27*) emette un'intensa fluorescenza verde dopo deacilazione e conseguente ossidazione da parte di perossido di idrogeno ( $\lambda$  eccitazione= 498 nm;  $\lambda$  emissione= 522 nm). Il vantaggio nell'uso di questa sonda è che non inibisce l'attività del Complesso I [119]. Amplex Red (*figura 29*) è una molecola non fluorescente che se ossidata da  $H_2O_2$  in presenza dell'enzima HRP (Horse Radish Peroxidase), origina resorufina, un prodotto altamente fluorescente ( $\lambda$  eccitazione= 563 nm;  $\lambda$  emissione= 587 nm) [120, 121]. Infine il diidroetidio (HE) (*figura 30*) ossidato dall'anione superossido, origina etidio ( $E^+$ ), un composto fluorescente ( $\lambda$  eccitazione= 520 nm;  $\lambda$  emissione= 610 nm) [123].

La produzione di ROS da parte di SMP è stata misurata utilizzando un fluorimetro multipiastra Multilabel Counter Victor 2 WALLAC 1420, alla temperatura di 25°C, caricando i campioni in piastre da 96 pozzetti ciascuna. Le misure sono state effettuate ad intervalli di 360 secondi, per un tempo complessivo di 3600 secondi.

Ogni pozzetto è stato riempito con 0.5 mg/ml di SMP e 200  $\mu$ L di un tampone così composto: KCl 50 mM, TRIS 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.5. Al tampone vengono aggiunte le sonde per la rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno alle seguenti concentrazioni: DCFDA 5  $\mu$ M, Amplex Red 10  $\mu$ M, diidroetidio 10  $\mu$ M.

Il sistema è stato energizzato con l'aggiunta di NADH 150  $\mu$ M, in presenza o assenza di diversi inibitori, accettori di elettroni e analoghi chinonici.

Le concentrazioni degli inibitori utilizzate nei saggi fluorimetrici, tali da bloccare completamente il Complesso I, sono state determinate valutando spettrofotometricamente l'attività NADH-CoQ reduttasica dell'enzima:

Rotenone (ROT) 1  $\mu$ M

Antimicina A (AA) 2  $\mu$ M

Piericidina A 20 nM

Capsaicina 50  $\mu$ M

Mucidina 1.8  $\mu$ M e 50  $\mu$ M

Stigmatellina 50  $\mu$ M

Rolliniastatina-1 30 nM

Rolliniastatina-2 60 nM

CoQ<sub>2</sub> 20  $\mu$ M

Accettori di elettroni utilizzati:

MTT (Metiltiazoltetrazolio) 75  $\mu$ M

CoQ<sub>1</sub> 75  $\mu$ M

DB (Decilubichinone) 50  $\mu$ M

## 5- Saggi enzimatici

### 5.1- Attività NADH-CoQ reduttasica

L'attività NADH CoQ reduttasica è stata misurata in particelle submitocondriali di cuore bovino (SMP) ad una concentrazione di 40 $\mu$ g/ml, seguendo l'ossidazione del NADH ( $\epsilon = 3,5 \text{ mM cm}^{-1}$ ) alla lunghezza d'onda di 340- 380 nm.

E' stato utilizzato uno spettrofotometro Jasco V550, dotato di un sistema di misura a doppia lunghezza d'onda, alla temperatura di 30°C, usando come accettore di elettroni CoQ<sub>1</sub> 75  $\mu$ M o decilubichinone (DB) 20 $\mu$ M, in un tampone contenente KCl 50 mM, TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, a pH 7.5. L'enzima è stato energizzato con NADH 75  $\mu$ M. Il Complesso I è stato isolato funzionalmente aggiungendo in cuvetta Antimicina A 2  $\mu$ M per bloccare il Complesso III e KCN 2 mM per bloccare il Complesso IV.[122]

### 5.2- Attività NADH-DCIP reduttasica

L'attività NADH-DCIP reduttasica è stata valutata in SMP (40 $\mu$ g/ml) seguendo la riduzione del dicloroindofenolo (DCIP) ( $\epsilon = 0,8 \text{ mM cm}^{-1}$ ) a 748 nm da parte del Complesso I energizzato con NADH 75  $\mu$ M. E' stato utilizzato uno spettrofotometro Jasco V550, alla temperatura di 30°C.

La reazione è stata condotta in un tampone contenente KCl 50 mM, TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, a pH 7,5. Il Complesso I è stato isolato funzionalmente aggiungendo in cuvetta Antimicina A 2  $\mu$ M per bloccare il Complesso III e KCN 2 mM per bloccare il Complesso IV. [123]. È stato utilizzato DPI (difenileniodonio) 10  $\mu$ M, un inibitore del

Complesso I che agisce bloccando il trasferimento di elettroni dall'FMN ai centri ferro zolfo, per valutare la riduzione del DCIP dal sito fisiologico dell'enzima.

## **6- Saggi di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR)**

### **6.1- Preparazione dei campioni**

I campioni per le misure EPR sono stati preparati come segue. Le particelle submitocondriali (SMP) sono state risospese in un tampone Saccarosio 0.25 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, fino ad una concentrazione di 30 mg/ml. Poi sono state incubate 5 minuti in ghiaccio con i seguenti inibitori: Antimicina A 5  $\mu$ M e Mucidina 1,8  $\mu$ M per bloccare il Complesso III e Carboxina 100  $\mu$ M per bloccare il Complesso II.

Il preparato di SMP così trattato è stato diviso in volumi di 300  $\mu$ l e i campioni sono stati incubati con vari inibitori del Complesso I ad una concentrazione tale da inibire completamente l'enzima: Rotenone 10  $\mu$ M e Stigmatellina 80  $\mu$ M. Gli accettori di elettroni esogeni utilizzati nei saggi sono i seguenti: CoQ1 150  $\mu$ M, CoQ<sub>2</sub> 150  $\mu$ M e DB150  $\mu$ M. Dopo l'energizzazione dei campioni con NADH 300  $\mu$ M, i campioni sono stati trasferiti nei tubi EPR e rapidamente congelati in una miscela di ghiaccio secco ed etanolo, circa 10 secondi dopo l'aggiunta del substrato. I campioni vengono conservati in azoto liquido fino al momento della misura.

### **6.2- Misure EPR**

Gli esperimenti EPR sono stati condotti nel Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova utilizzando uno spettrometro Bruker ER 200D operante in banda X (9,4 GHz) equipaggiato con una cavità rettangolare ER4102ST e un controllo di temperatura Bruker ER 4111 VT; la frequenza delle microonde è stata misurata da un frequenzimetro HP 5342A.

Tutti gli spettri dei campioni in esame sono stati ottenuti utilizzando i seguenti parametri: potenza delle microonde 0.66 mW; ampiezza di modulazione 0.5 mT; frequenza di modulazione 100 kHz; costante di tempo 41 ms; tempo di conversione 82 ms; larghezza dello spettro 10 mT su 1024 punti; temperatura 180 K, 40 K o 9 K.

Gli spettri mostrati sono la media di 9 scansioni e sono stati corretti con la sottrazione del segnale di fondo degli SMP ossidati.

# Risultati e discussione

## 1- Utilizzo delle sonde fluorescenti per studiare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in particelle submitocondriali (SMP)

Per indagare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle particelle submitocondriali (SMP) isolate da mitocondri di cuore bovino, abbiamo utilizzato dosaggi fluorimetrici basati sull'uso di sonde fluorescenti.

Attualmente sono disponibili varie sonde in grado di rilevare le specie reattive dell'ossigeno, tra le quali alcuni diidrocomposti: 2',7'-Diclorodidrossifluoresceina diacetato (DCFH-DA), 10-acetil-3,7-diidrossifenoxazine (AmplexRed) e diidroetidio (HE). Nonostante ciascuna sonda sia indicata per rilevare una specie radicalica in particolare, è importante considerare che queste molecole sono particolarmente reattive e quindi non selettive. Le sonde sono in grado di reagire con diverse specie radicaliche rendendo difficile l'analisi qualitativa delle ROS nel sistema [88, 116, 117]; è quindi più corretto utilizzarle per rilevare lo stress ossidativo totale nelle cellule, nei tessuti o negli organelli isolati.

Le sonde DCFH-DA e Amplex Red sono considerate specifiche per il perossido di idrogeno, il diidroetidio sembra invece essere più specifico per l'anione superossido.

### DCFDA

La sonda DCFH-DA (forma diacetata) (*figura 27*) viene utilizzata nei sistemi cellulari grazie alla sua capacità di diffondere attraverso le membrane. Una volta all'interno delle cellule la sonda viene idrolizzata da esterasi nella forma DCFH che, ossidata dalle specie radicaliche origina DCF, un composto fluorescente ( $\lambda$  eccitazione= 498 nm;  $\lambda$  emissione= 522 nm). Come già accennato, è generalmente accettato che questa sonda sia specifica per l' $H_2O_2$ , ma è stato osservato che può reagire anche con altre specie reattive come  $HO^\bullet$ , radicali perossile, e specie radicaliche dell'azoto [118].

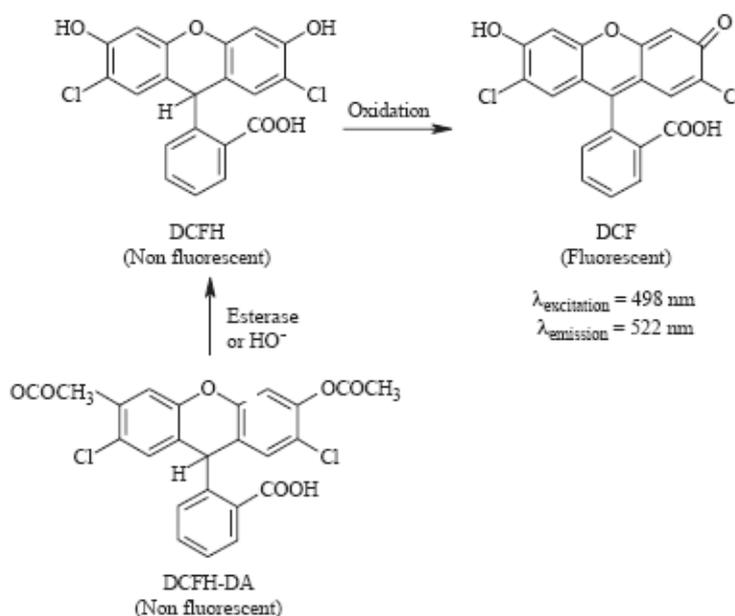
E' stato dimostrato che non solo le cellule intatte, ma anche i mitocondri isolati e le particelle submitocondriali (SMP), sono in grado di deacetilare la sonda [119] rendendola disponibile per l'ossidazione da parte delle specie reattive.

L'attività deacetilasica degli SMP ci permette di misurare le ROS prodotte da questo sistema molto semplificato rispetto ad una cellula; per far questo dobbiamo dimostrare che la deacetilazione della sonda e la conversione di superossido in perossido di

idrogeno, in SMP, procedano ad una velocità di reazione non limitante rispetto alla reazione di produzione di superossido. La *figura 28* mostra che l'aggiunta di  $H_2O_2$  a campioni di SMP in presenza della sonda DCFDA aumenta l'ossidazione della sonda, fino ad un valore largamente superiore rispetto a quello ottenuto in SMP energizzati con NADH e trattati con Rotenone, un inibitore classico che induce produzione di ROS. Questo dimostra che la reazione di deacetilazione della sonda non è limitante per la determinazione della produzione di ROS nel nostro sistema.

Per dimostrare che anche la conversione di superossido in perossido di idrogeno non fosse una tappa limitante per la corretta rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno da parte della sonda e considerando che DCFH è ritenuta più specifica per il perossido di idrogeno, abbiamo valutato gli effetti dell'enzima superossido dismutasi (SOD) sulla fluorescenza rilevata.

L'aggiunta di SOD al nostro sistema sperimentale aumenta la velocità di conversione dell'anione superossido a perossido di idrogeno, senza tuttavia recare sostanziali alterazioni dei rapporti quantitativi tra la produzione di  $H_2O_2$  indotta dagli inibitori del Complesso I e il controllo (*Tabella 2*). Infine per confermare la specificità della sonda al perossido di idrogeno abbiamo utilizzato la catalasi, un enzima che trasforma  $H_2O_2$  in acqua e ossigeno molecolare. La catalasi aggiunta al nostro sistema diminuisce significativamente la fluorescenza confermando l'effettiva capacità della sonda di rilevare perossido di idrogeno (dati non mostrati).



*Figura 27:* Meccanismo di de-esterificazione di 2,7-diclorodihidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA) a 2,7-diclorodihidrofluoresceina (DCFH) e ossidazione nella forma fluorescente 2,7-diclorofluoresceina (DCF) da parte di ROS e RNS.

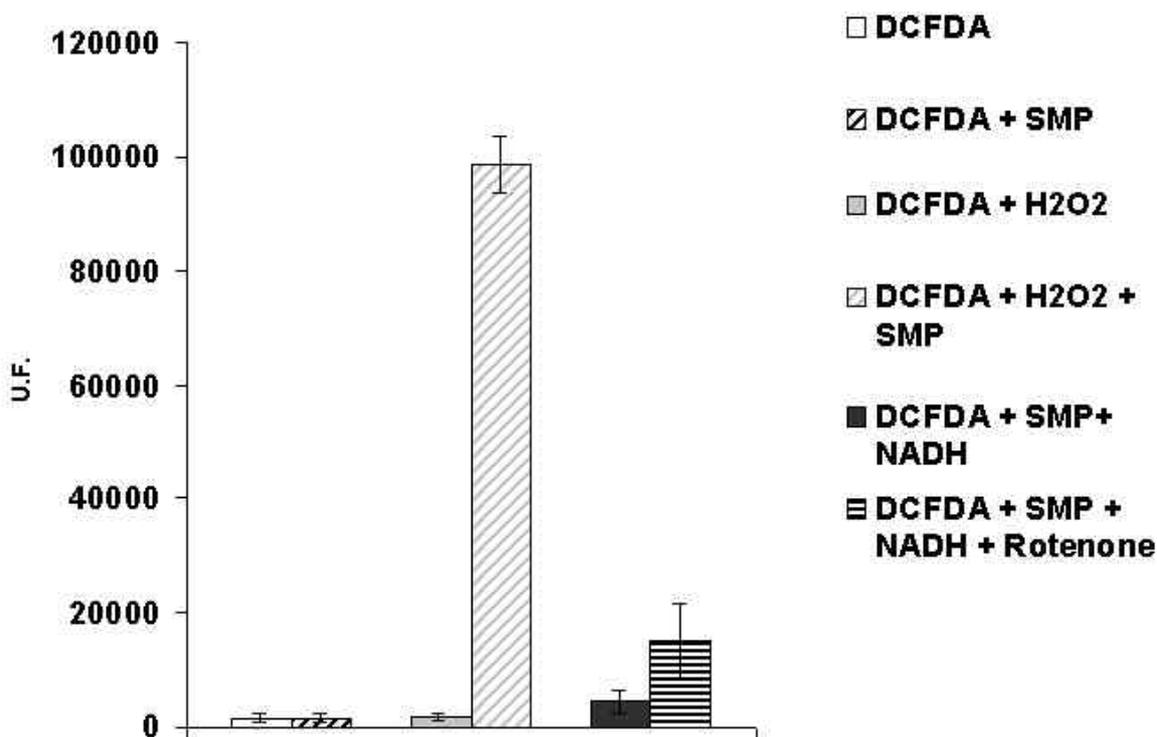


Figura 28: Utilizzo della sonda DCFDA (5  $\mu$ M) per la determinazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in SMP (0.5 mg/ml) con l'aggiunta di NADH 150  $\mu$ M (CTRL) e trattati con Rotenone 1  $\mu$ M (Rotenone).

La quantità di sonda deacetilata dagli SMP è largamente superiore a quella ossidata dai substrati respiratori, come mostrato dagli alti valori di fluorescenza rilevati in presenza di 5  $\mu$ M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'intensità di fluorescenza è stata rilevata dopo 2400 secondi dall'aggiunta di NADH. Non è stata rilevata alcuna fluorescenza aggiungendo 5  $\mu$ M di perossido di idrogeno in assenza di SMP. I dati mostrati rappresentano la media di 5 differenti esperimenti.

	Rotenone	CoQ <sub>2</sub>
<b>+SOD</b>	<b>+ 253 %</b>	<b>- 39 %</b>
<b>- SOD</b>	<b>+ 221 %</b>	<b>- 43 %</b>

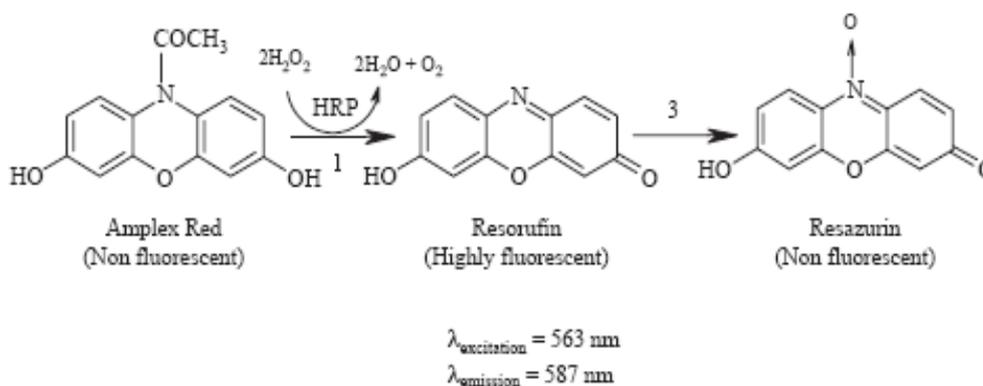
Tabella 2: Effetto di 50 unità/ml di SOD sul rapporto relativo tra la produzione di perossido di idrogeno indotta da inibitori del Complesso I (Rotenone 1 $\mu$ M, CoQ<sub>2</sub> 20 $\mu$ M) e il controllo non inibito, espresso come variazione di fluorescenza percentuale della sonda DCFDA. Sono stati utilizzati SMP (0,5 mg/ml) trattati con Mucidina 1,8  $\mu$ M (per ottenere la completa inibizione del Complesso III) ed energizzati con NADH 150 $\mu$ M. L'intensità di fluorescenza è stata misurata 2400 secondi dopo l'aggiunta di NADH.

## Amplex Red

Amplex Red (*figura 29*) è una molecola non fluorescente che se ossidata da  $H_2O_2$  in presenza dell'enzima HRP (Horse Radish Peroxidase), origina resorufina, un prodotto altamente fluorescente ( $\lambda$  eccitazione= 563 nm;  $\lambda$  emissione= 587 nm). Questa sonda ha il vantaggio di avere una fluorescenza di base molto bassa, proprio perché fluoresce solo il prodotto ossidato. Le sue lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione si trovano in una zona dello spettro poco sensibile alle interferenze da autofluorescenza, un problema comune nei saggi dove vengono utilizzati campioni biologici [120, 121].

Nel nostro sistema costituito da particelle submitocondriali otteniamo l'ossidazione di Amplex Red anche in assenza di HRP. L'aggiunta di KCN ai campioni blocca completamente l'ossidazione della sonda e poiché questo composto viene largamente utilizzato come inibitore di enzimi ad attività ossidasica e perossidasi [122], abbiamo ipotizzato che nelle membrane mitocondriali siano già presenti enzimi capaci di attività perossidasi che catalizzano l'ossidazione della sonda in presenza di ROS.

Va tenuto inoltre in considerazione che nei sistemi biologici il NADH può interferire con l'Amplex Red provocando la diminuzione della fluorescenza [118].



*Figura 29:* Schema di reazione per l'ossidazione di Amplex Red da parte di  $H_2O_2$ , catalizzata da HRP.

## Diidroetidio

Il diidroetidio (HE) (*figura 30*) è considerato una sonda fluorescente relativamente specifica per l' $O_2^{\cdot -}$ . L'ossidazione di HE da parte dell'anione superossido origina etidio ( $E^+$ ), un composto fluorescente ( $\lambda$  eccitazione= 520 nm;  $\lambda$  emissione= 610 nm) [123].

Questa sonda presenta alcune limitazioni, soprattutto se utilizzata per la rilevazione di ROS nei mitocondri. Il citocromo c ossida HE, un aspetto che potrebbe essere rilevante in sistemi sperimentali in cui il citocromo c viene rilasciato nel citosol a causa di processi apoptotici. Inoltre la sonda stessa aumenta la dismutazione superossido/perossido di idrogeno [124, 125].

Questa sonda è più indicata per la rilevazione di ROS nelle cellule piuttosto che in un sistema senza DNA, come le particelle submitocondriali perché la fluorescenza del composto ossidato  $E^+$  aumenta per intercalazione con il DNA.

Proprio a causa delle limitazioni che mostrano queste sonde, abbiamo condotto gli esperimenti utilizzandole tutte, ottenendo risultati relativamente sovrapponibili.

Tutti i dati mostrati in seguito si riferiscono agli esperimenti condotti con DCFDA.

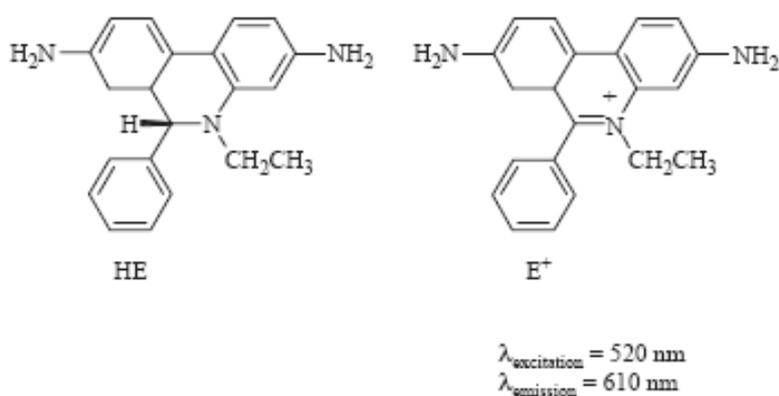


Figura 30: Struttura chimica di diidroetidio (HE) ed etidio ( $E^+$ ).

## 2- Produzione di ROS da parte del Complesso I in presenza di substrati riducenti e ossidanti

Il Complesso I è uno degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale responsabili della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Le conoscenze parziali riguardo al meccanismo di trasferimento degli elettroni all'interno di questo enzima non hanno permesso di stabilire con precisione quale sia il sito di fuga degli elettroni all'ossigeno molecolare. I siti di fuga proposti sono la flavina nella forma semichinonica, l'ubisemichinone e il centro Fe-S N2.

La conoscenza del meccanismo di produzione di ROS da parte del Complesso I può essere utile proprio per comprendere il meccanismo attraverso il quale gli elettroni vengono trasferiti all'interno dell'enzima.

Per studiare la produzione di ROS da parte del Complesso I *in situ*, abbiamo usato frammenti di membrane mitocondriali (SMP) ottenuti per sonicazione dei mitocondri isolati da cuore di bue (BHM).

Gli SMP sono considerati un sistema ideale per studiare il trasporto degli elettroni all'interno del Complesso I perché non hanno barriere di permeabilità che impediscano l'entrata di substrati come il NADH o l'entrata delle sonde fluorescenti utilizzate per rilevare le specie reattive dell'ossigeno [126].

A causa dell'assenza di barriere di permeabilità gli SMP non sono in grado di generare il gradiente elettrochimico sfruttato dall'ATP sintasi per produrre ATP, quindi il trasporto di elettroni all'interno della catena respiratoria non è accoppiato alla generazione di energia, per questo gli SMP che utilizziamo vengono definiti "disaccoppiati". Inoltre gli SMP disaccoppiati non sono in grado di sostenere il trasporto inverso di elettroni da succinato a NAD<sup>+</sup> (Reverse Electron Transfer).

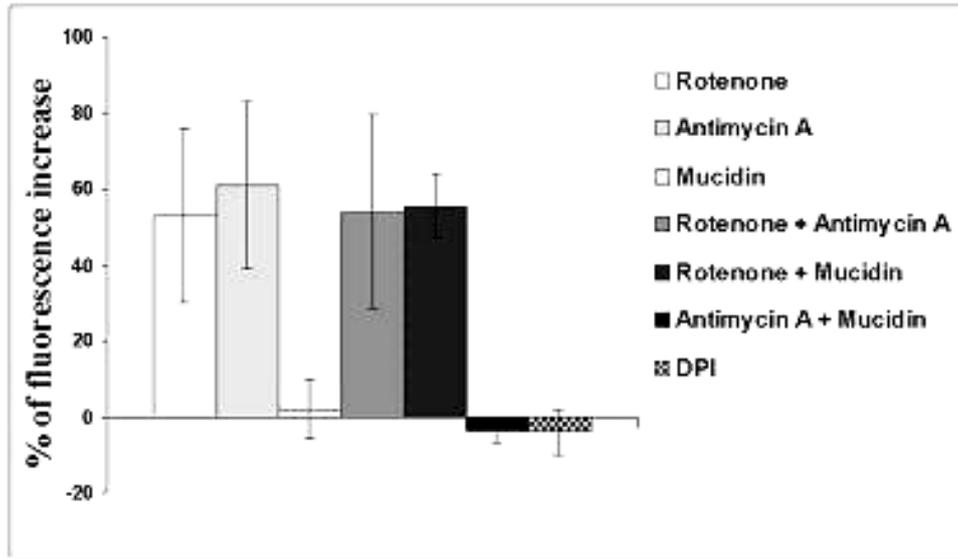
Queste particelle rappresentano quindi il sistema ideale per investigare il trasferimento di elettroni diretto dal NADH all'ubichinone all'interno dell'enzima e chiarire il meccanismo di produzione di ROS da parte dell'enzima.

Anche il Complesso III contribuisce alla produzione di specie reattive dell'ossigeno nella catena respiratoria, quindi si è reso necessario isolare funzionalmente il Complesso I per assicurare che la produzione di ROS osservata fosse completamente a carico dell'enzima in studio.

Il Complesso III può essere inibito da diverse molecole, alcune delle quali hanno l'effetto di indurre la produzione di ROS da parte dell'enzima, altre di bloccare questa produzione.

Antimicina A è un inibitore del Complesso III che agisce a livello del centro "i" (o N) provocando la fuga di elettroni dall'enzima e la conseguente riduzione dell'ossigeno molecolare e la produzione di ROS. Mucidina è un inibitore che agisce a livello del centro "o" (o P) del Complesso III bloccando il flusso di elettroni dall'ubichinolo alla proteina Fe-S di Rieske e prevenendo la formazione di ROS da parte dell'enzima [127]. L'effetto di blocco della produzione di ROS da parte di questo inibitore è esercitato anche in presenza di Antimicina A.

La *figura 31* mostra la produzione di ROS espressa dalla variazione di fluorescenza della sonda DCFDA, in SMP energizzati con NADH e trattati con diversi inibitori del Complesso I e III utilizzati da soli o in combinazione, in rapporto all'aumento di fluorescenza del controllo non inibito.



*Figura 31:* Effetto di diversi inibitori della catena respiratoria mitocondriale sulla produzione di ROS in SMP (0.5 mg/ml) trattati con NADH 150 $\mu$ M, in presenza di DCFDA 5  $\mu$ M. Gli inibitori sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni: Rotenone 1  $\mu$ M, Antimicina A 2  $\mu$ M, Mucidina 1,8  $\mu$ M, Difenileniodonio (DPI) 20  $\mu$ M. L'intensità di fluorescenza della sonda DCF ossidata è stata misurata 2400 secondi dopo l'aggiunta di NADH. I valori di intensità di fluorescenza sono espressi come cambiamento percentuale rispetto al controllo non inibito.

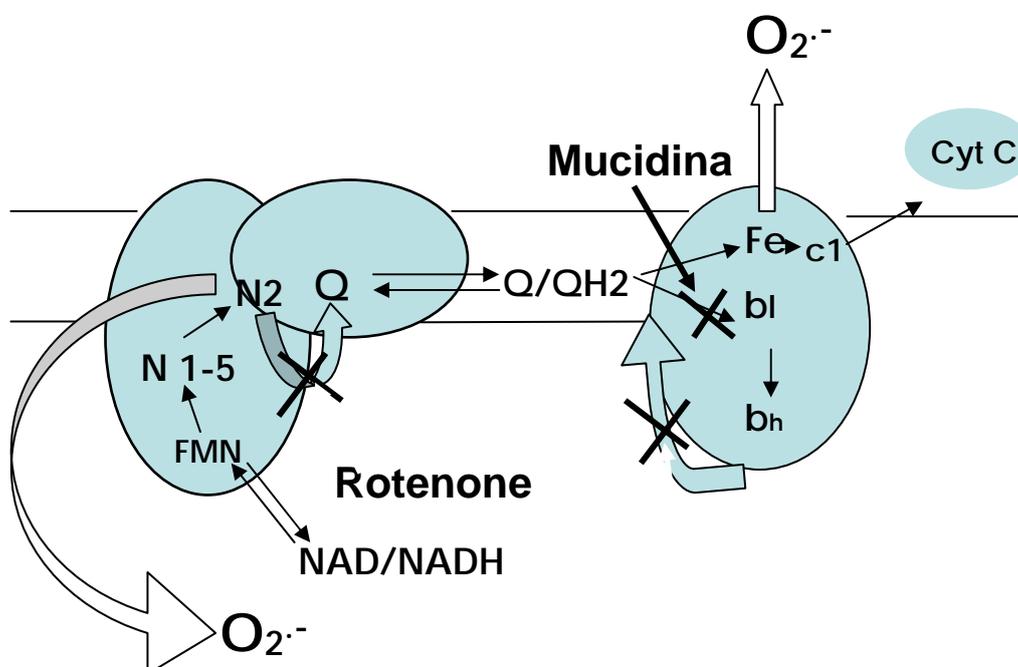
Il trattamento degli SMP con Mucidina alla concentrazione di 1,8  $\mu$ M, tale da inibire unicamente il Complesso III, non ha alcun effetto sulla produzione di ROS. Negli SMP inibiti con Antimicina A si assiste ad un aumento della produzione di ROS a carico del Complesso III e il suo effetto è contrastato dall'aggiunta contemporanea di Mucidina. Le particelle trattate con Rotenone, un classico inibitore del Complesso I, mostrano un forte incremento della produzione di ROS, insensibile alla Mucidina. La produzione di ROS di SMP inibiti con Rotenone e Mucidina, aggiunta ad una concentrazione tale da inibire il Complesso III è infatti simile alla produzione di ROS di particelle inibite solo con Rotenone. Questo indica chiaramente che la produzione di ROS osservata avviene a carico del Complesso I e che l'uso di mucidina 1,8 $\mu$ M è in grado di isolare funzionalmente il Complesso.

Nel grafico di *figura 31* è mostrato l'effetto del difenileniodonio (DPI) sulla produzione di ROS in SMP. Il DPI è un inibitore del Complesso I che blocca il passaggio degli elettroni dall'FMN ai centri Fe-S. Il blocco dell'enzima con DPI non determina alcuna produzione di ROS. La mancata produzione di ROS in SMP inibiti con DPI potrebbe indicare che il sito di produzione delle ROS è localizzato a valle rispetto al sito d'azione del DPI

Riassumendo, i risultati illustrati mostrano che l'utilizzo di Mucidina 1,8  $\mu\text{M}$  è utile per isolare funzionalmente il Complesso I dagli altri componenti della catena respiratoria ed essere certi che la variazione di fluorescenza della sonda osservata sia determinata principalmente dalle specie reattive prodotte proprio da questo enzima.

I risultati mostrano anche che lo stato ridotto dei centri redox del Complesso I ottenuto energizzando con concentrazioni saturanti di NADH gli SMP trattati con Mucidina, non è una condizione sufficiente per determinare la produzione di ROS, ma è necessaria la presenza di un inibitore del Complesso I, come il Rotenone.

Poiché quindi la Mucidina 1,8  $\mu\text{M}$  isola funzionalmente il Complesso I senza interferire con la sua capacità di produrre ROS, le particelle così inibite saranno utilizzate come controllo in tutti gli esperimenti.



*Figura 32:* Schema che rappresenta l'isolamento funzionale del Complesso I nelle condizioni sperimentali da noi utilizzate per la rilevazione di ROS.

I saggi enzimatici per valutare l'attività cinetica del Complesso I vengono normalmente condotti utilizzando accettori di elettroni esogeni come il coenzima  $\text{Q}_1$  ( $\text{CoQ}_1$ ) e il decilubichinone (DB), analoghi a corta catena dell'accettore endogeno il Coenzima  $\text{Q}_{10}$  ( $\text{CoQ}_{10}$ ). L'utilizzo di questi analoghi si rende necessario a causa dell'elevata idrofobicità del  $\text{CoQ}_{10}$  che ne rende difficile l'impiego in saggi acquosi.

Abbiamo indagato quale potesse essere l'effetto di questi chinoni a corta catena sulla produzione delle specie reattive dell'ossigeno da parte dell'enzima.

Aggiungendo il CoQ<sub>1</sub> o il DB a SMP inibiti con Mucidina 1,8 μM non si osserva alcun incremento nella produzione di ROS, rispetto alle particelle inibite con Mucidina senza aggiunta di analoghi a corta catena, che rappresentano il controllo (*figura 33*).

L'aggiunta degli stessi chinoni alle particelle trattate con Rotenone, che ha la capacità di indurre un incremento della produzione di ROS, ha un effetto diverso a seconda del chinone utilizzato. Trattando gli SMP con CoQ<sub>1</sub> e Rotenone si ottiene un incremento di fluorescenza maggiore rispetto al controllo positivo, rappresentato dagli SMP inibiti con Rotenone. La produzione di ROS risulta invece minore del controllo positivo, trattando gli SMP con DB e Rotenone.

Poiché entrambi i chinoni utilizzati in questi esperimenti sono buoni accettori di elettroni, è necessario spiegare il motivo del diverso comportamento osservato sulla produzione di ROS in presenza di Rotenone. Abbiamo quindi considerato la diversa solubilità di queste due molecole: il CoQ<sub>1</sub> è più idrofilico del DB [56].

L'attività proossidante del CoQ<sub>1</sub> osservata sulla produzione di ROS da parte del Complesso I inibito con Rotenone, potrebbe essere attribuita alla capacità di questa molecola di ridursi mono elettronicamente a livello di un sito idrofilico sull'enzima, responsabile della fuga degli elettroni all'ossigeno. Il semichinone instabile che si forma in questo modo sarebbe in grado di reagire con l'ossigeno molecolare generando superossido.

Il DB, essendo più idrofobico del CoQ<sub>1</sub> non può essere ridotto mono elettronicamente su un eventuale sito idrofilico dell'enzima e quindi non è in grado di esercitare alcuna attività proossidante.

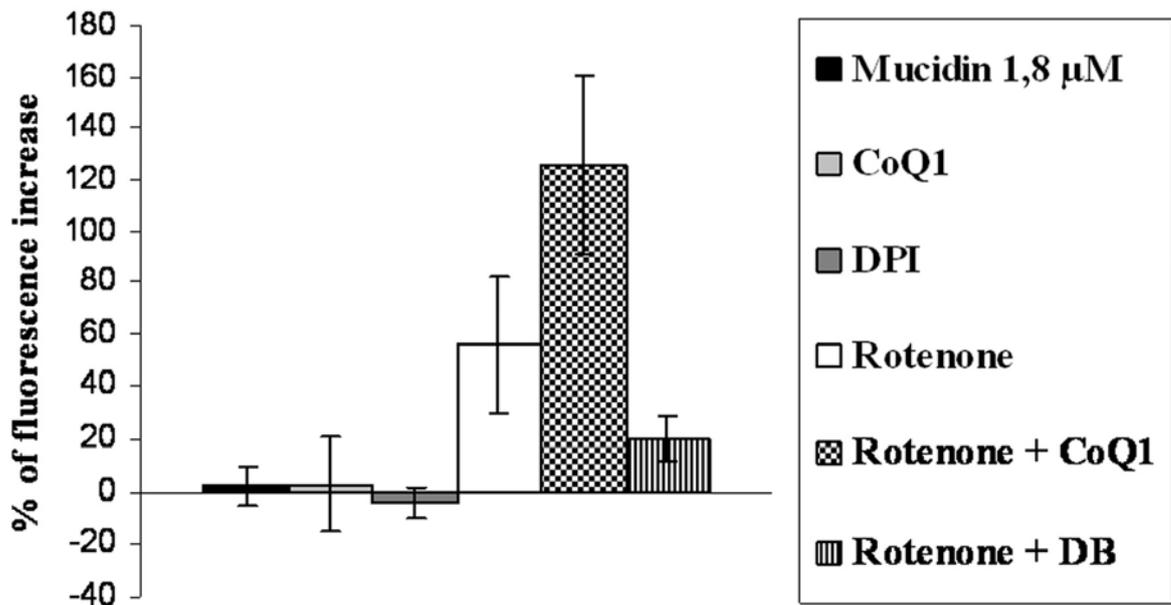


Figura 33: Produzione di ROS in SMP (0.5 mg/ml ) trattati con Mucidina 1.8μM, DPI 10μM, CoQ<sub>1</sub> 75μM, Rotenone 1μM, Rotenone 1μM e CoQ<sub>1</sub> 75μM, Rotenone 1μM e DB 50μM. La produzione di ROS è stata rilevata seguendo la variazione di fluorescenza in presenza di DCFDA 5μM.

L'intensità di fluorescenza è stata misurata 2400 secondi dopo l'aggiunta di NADH 150μM. I valori di intensità di fluorescenza sono espressi come cambiamento percentuale rispetto al controllo non inibito. I dati mostrati sono la media di 4 differenti determinazioni.

### 3- Effetto degli inibitori del Complesso I sulla produzione di ROS

Da una prima indagine sulla produzione di ROS da parte del Complesso I in SMP, abbiamo rilevato che l'inibizione dell'enzima è una condizione necessaria per indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno.

Il Complesso I è sensibile a molti composti [50] che sono in grado di bloccare cineticamente l'enzima. Tra i molti inibitori del Complesso I, strutturalmente molto diversi tra loro, si possono trovare anche chinoni a corta catena come il CoQ<sub>2</sub> e alcuni inibitori classici del Complesso III, in particolare del centro "o" dell'enzima, tra i quali Stigmatellina.

Abbiamo condotto un'analisi sull'effetto di alcuni di questi inibitori sulla produzione di ROS.

I risultati riportati nelle *figure 34 A, B e C* e nella *tabella 3* ci hanno permesso di distinguere gli inibitori in due classi, sulla base del loro diverso effetto sulla produzione

di ROS in particelle submitocondriali energizzate con una concentrazione saturante di NADH.

Piericidina A e Rolliniastatina 1 e 2 mostrano un comportamento simile al Rotenone, sono cioè in grado di aumentare la produzione di ROS. Abbiamo chiamato questo tipo di inibitori “**Rotenone-simili**” e raggruppati come **inibitori di Classe A**.

Stigmatellina, Capsaicina, Mucidina e Coenzima Q<sub>2</sub> (CoQ<sub>2</sub>) prevengono completamente l’ossidazione della sonda, quindi la produzione di ROS; abbiamo chiamato questo tipo di inibitori “**Stigmatellina-simili**” e li abbiamo raggruppati come **inibitori di Classe B**.

L’effetto sulla produzione di ROS degli inibitori Rotenone-simili è abolito dalla contemporanea presenza di un inibitore Stigmatellina-simile

Analizzando i composti elencati nelle due classi e riportati in *tabella 3* si può notare che la distinzione tra inibitori Rotenone-simili e Stigmatellina-simili rispecchia l’effetto antagonista dei composti nei riguardi del chinone e del chinolo, descritta in letteratura [50] e illustrata precedentemente.

Rotenone, Piericidina A e Rolliniastatina 1 e 2, inibitori che fanno parte del gruppo Rotenone-simili, vengono classificati come antagonisti del chinone e del semichinone; Stigmatellina, analoghi dell’ubichinone nella forma ridotta e Mixotiazolo, inibitori raggruppati nella classe Stigmatellina-simili, sono invece classificati come antagonisti dell’ubichinolo [50].

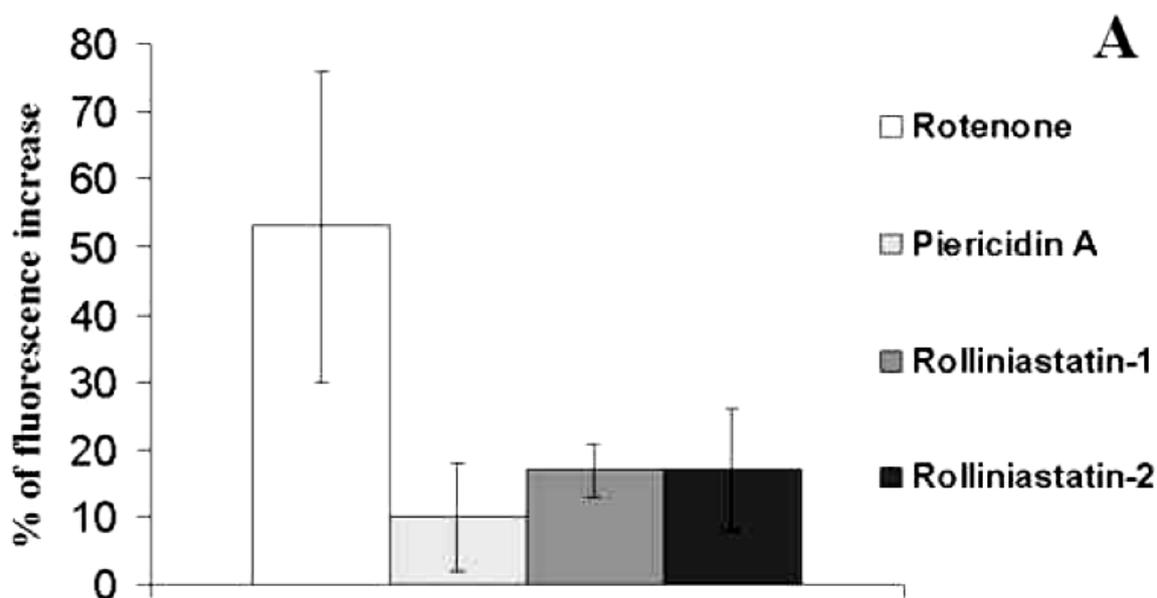
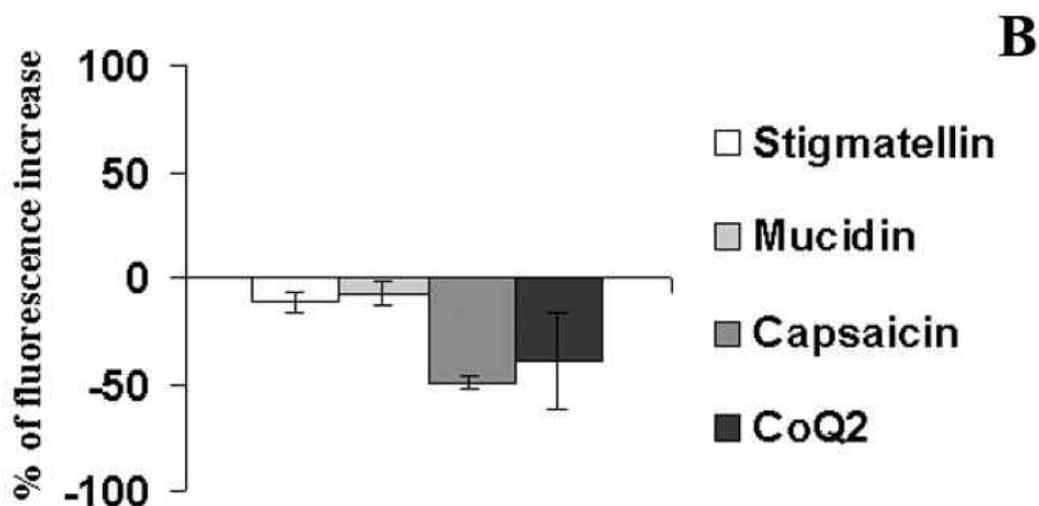


Figura 34 A: Effetto dell’aggiunta di Rotenone 1µM, Piericidina A 30 nM, Rolliniastatina -1 e -2 30 nM sulla produzione di ROS in SMP (0.5 mg/ml) energizzati con NADH 150 µM, trattati con

Mucidina 1,8  $\mu\text{M}$  e in presenza di DCFDA 5  $\mu\text{M}$ . L'intensità di fluorescenza della sonda DCF ossidata è stata misurata 2400 secondi dopo l'aggiunta al sistema di NADH. I valori di intensità di fluorescenza sono espressi come cambiamento percentuale rispetto al controllo inibito con Mucidina 1,8  $\mu\text{M}$ .



*Figura 34 B:* Effetto dell'aggiunta di Stigmatellina 50  $\mu\text{M}$ , Mucidina 60  $\mu\text{M}$ , Capsaicina 80  $\mu\text{M}$  e CoQ<sub>2</sub> 20  $\mu\text{M}$  sulla produzione di ROS in SMP (0.5 mg/ml) energizzati con NADH 150  $\mu\text{M}$ , trattati con Mucidina 1,8  $\mu\text{M}$  e in presenza di DCFDA 5  $\mu\text{M}$ . L'intensità di fluorescenza della sonda DCF ossidata è stata misurata 2400 secondi dopo l'aggiunta al sistema di NADH. I valori di intensità di fluorescenza sono espressi come cambiamento percentuale rispetto al controllo inibito con Mucidina 1,8  $\mu\text{M}$ .

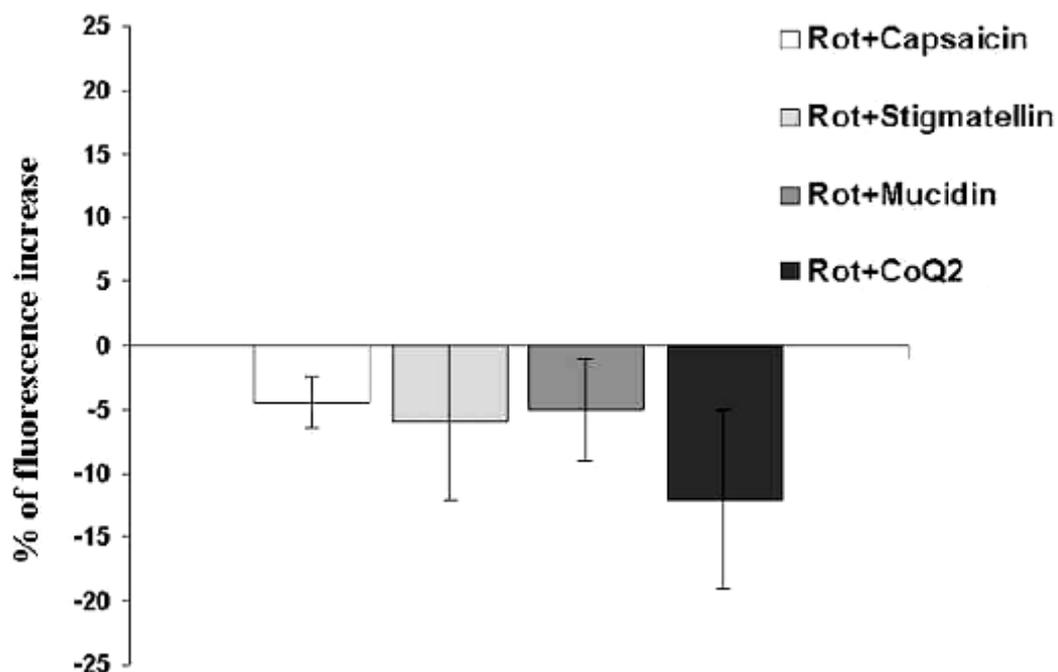


Figura 34 C: Effetto della presenza contemporanea di inibitori della classe Rotenone-simili (Rotenone 1 $\mu$ M) e Stigmatellina-simili (Stigmatellina 50 $\mu$ M, Mucidina 60 $\mu$ M, CoQ<sub>2</sub> 20 $\mu$ M) sulla produzione di ROS in SMP (0,5 mg/ml) energizzati con NADH 150  $\mu$ M, trattati con Mucidina 1,8  $\mu$ M e in presenza di DCFDA 5  $\mu$ M. L'intensità di fluorescenza della sonda DCF ossidata è stata misurata 2400 secondi dopo l'aggiunta di NADH. I valori di intensità di fluorescenza sono espressi come cambiamento percentuale rispetto al controllo inibito con Mucidina 1,8  $\mu$ M.

Inibitore	DCFDA	Amplex Red
Rotenone	+53% $\pm$ 23	+62% $\pm$ 3
Piericidina A	+101% $\pm$ 30	+53% $\pm$ 5
Rolliniastatina 1	+17% $\pm$ 4	
Rolliniastatina 2	+17% $\pm$ 9	
Stigmatellina	-11% $\pm$ 5	-34% $\pm$ 3
Mucidina	-7% $\pm$ 6	-8% $\pm$ 3
Capsaicina	-49% $\pm$ 3	
CoQ <sub>2</sub>	-39% $\pm$ 23	

*Tabella 3:* Percentuale di incremento di fluorescenza rispetto al controllo non inibito di SMP (0,5 mg/ml) trattati con inibitori di Classe A e Classe B. I dati si riferiscono alla fluorescenza rilevata con DCFDA 5  $\mu$ M e Amplex Red 10  $\mu$ M, dopo 2400 secondi dall'aggiunta di NADH 150  $\mu$ M.

I grafici riportati nella *figura 35* riportano l'andamento tipico di una curva che mostra la produzione di ROS, espressa in unità di fluorescenza arbitrarie, di SMP non inibiti che rappresentano il controllo e SMP trattati con Rotenone e Stigmatellina.

La risposta della sonda DCFDA alla produzione di ROS utilizzando una concentrazione di SMP pari a 0,5 mg/ml, non è lineare. Il segnale è basso nei primi 15 minuti (*figura 35, pannello A*) come è evidente nell'ingrandimento del grafico, riportato a fianco di ciascun pannello e che rappresenta l'esperimento per intero (tempo complessivo di 45 minuti) e aumenta esponenzialmente in tempi successivi. Per questo motivo abbiamo scelto i 40 minuti come tempo rappresentativo per effettuare i confronti tra i campioni.

Esperimenti condotti in parallelo (*figura 35, pannello B*) utilizzando concentrazioni maggiori di proteina (1,5 mg/ml) mostrano che il rapporto di fluorescenza ottenuto tra i campioni inibiti con Rotenone e Stigmatellina e il controllo è mantenuto, sia a 10 che a 40 minuti.

Questi risultati dimostrano che l'incremento di fluorescenza osservato è rappresentativo della quantità relativa di ROS prodotti nel nostro sistema sperimentale. La produzione di ROS non può essere oggetto di un'analisi quantitativa in senso assoluto, a causa delle limitazioni e dell'aspecificità delle sonde e a causa del fatto che l'ossidazione della sonda è tipicamente una reazione a catena, descritta da un incremento non lineare della fluorescenza nel tempo. Tuttavia come già accennato, è possibile condurre un'analisi della produzione relativa delle specie reattive tra i campioni in studio.

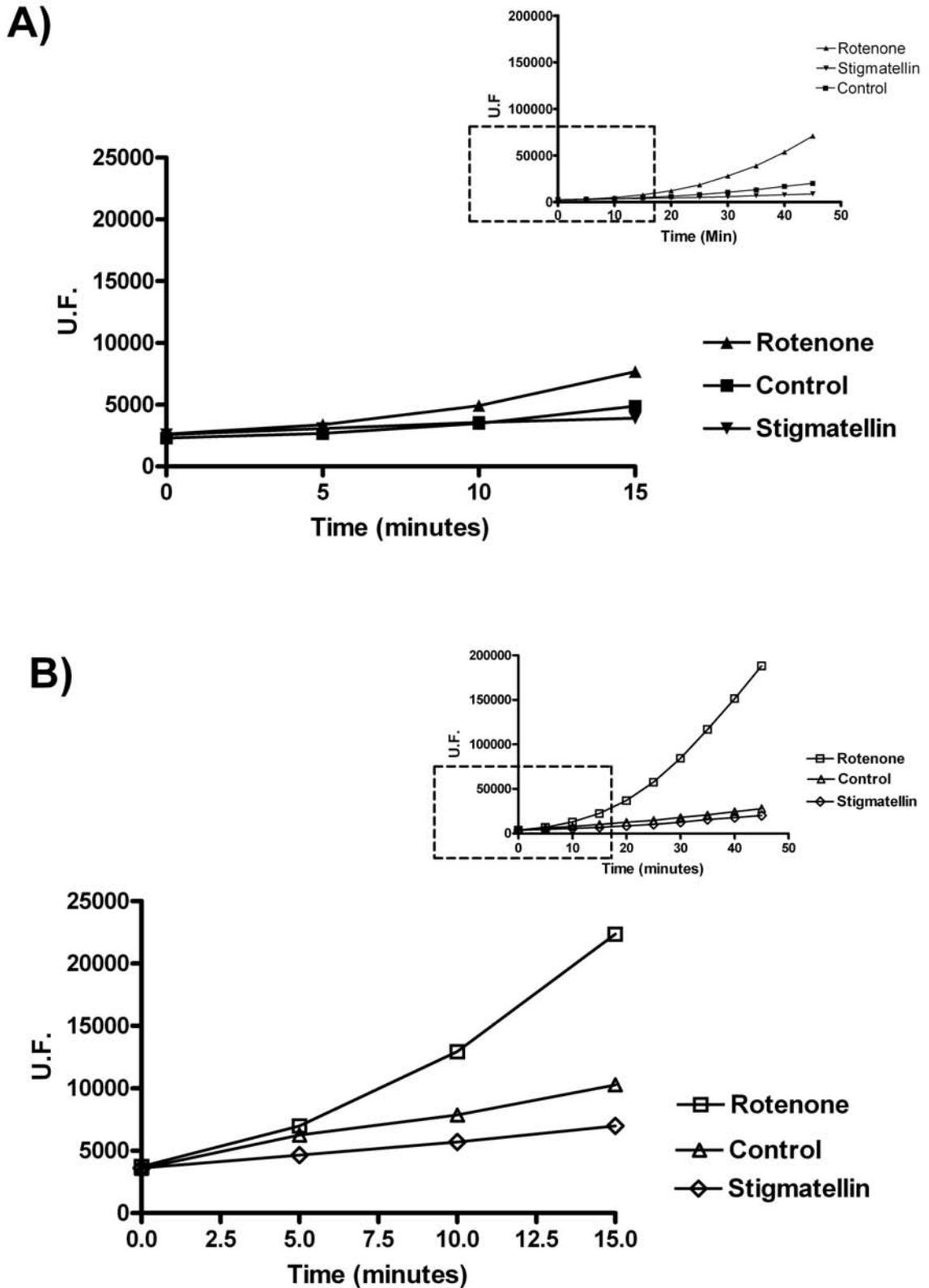


Figura 35:

Panello A: Esperimento rappresentativo della rilevazione di ROS in SMP (0.5 mg/ml) inibiti con inibitori di Classe A (Rotenone 2  $\mu$ M) e di Classe B (Stigmatellin 60  $\mu$ M). I campioni sono stati

trattati con Mucidina 1.8  $\mu\text{M}$  (per bloccare il trasferimento di elettroni e prevenire la produzione di ROS da parte del Complesso III) ed è stato aggiunto NADH 150  $\mu\text{M}$ , in presenza di DCFDA 5  $\mu\text{M}$ .

*Pannello B*: Si veda il Pannello A, eccetto la concentrazione degli SMP (1.5mg/ml) e di Mucidina (5.4  $\mu\text{M}$ ). L'insero a fianco mostra l'intera durata dell'esperimento (45 minuti).

Come è stato mostrato la capacità del Complesso I di produrre ROS è strettamente correlata all'inibizione dell'enzima. Abbiamo quindi valutato quale fosse la relazione tra la capacità del Complesso I di produrre ROS e la percentuale di inibizione sull'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica dell'enzima, esercitata dagli inibitori. La produzione di ROS è stata valutata con il metodo fluorimetrico basato sull'ossidazione della sonda DCFDA, contemporaneamente l'inibizione del Complesso I è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del NADH a 340 nm, utilizzando come accettore di elettroni esogeno il CoQ<sub>1</sub>.

I grafici *A* e *B* riportati nella *figura 36* mostrano la produzione di ROS da parte del Complesso I in funzione della percentuale di inibizione esercitata da due inibitori appartenenti alla classe A in grado di indurre produzione di ROS da parte del Complesso I, Rotenone (*pannello A*) e Piericidina A (*pannello B*).

In entrambi i casi, a concentrazioni del composto tali da non inibire completamente l'enzima, si assiste ad una bassa rilevazione della fluorescenza. Questo ritardo comune sia agli SMP trattati con Rotenone che a quelli trattati con Piericidina A, può essere attribuito alla minore sensibilità della sonda a basse concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno prodotte nella fase iniziale dell'esperimento e non meno importante, all'interferenza del NADH con la sonda fluorescente. Per dimostrare l'interferenza del NADH con la sonda, abbiamo effettuato esperimenti utilizzando una fonte di radicali non enzimatica, AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) diidrocloreuro). Anche in questo sistema sperimentale abbiamo rilevato bassi livelli di fluorescenza della sonda DCFDA in seguito all'aggiunta di NADH. Inoltre si osservava che la diminuzione di fluorescenza era proporzionale alla concentrazione di NADH nel sistema.

Nonostante il ritardo comune nella rilevazione della fluorescenza osservato negli SMP trattati con Rotenone e Piericidina A, si può notare che è necessaria una diversa percentuale di inibizione dell'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica da parte dei due inibitori di classe A per indurre produzione di ROS da parte dell'enzima. Negli SMP trattati con concentrazioni crescenti di Rotenone (*pannello A*) è necessaria un'inibizione di circa 20-30% dell'attività dell'enzima per indurre produzione di ROS. Nel caso degli SMP

inibiti con concentrazioni crescenti di Piericidina A (*pannello B*) è necessaria una percentuale di inibizione di circa il 60-70% sul Complesso I per indurre produzione di ROS.

Per spiegare la necessità, nella produzione di ROS di un maggiore grado di inibizione dell'enzima da parte di Piericidina A rispetto al Rotenone, abbiamo ipotizzato la presenza di due siti di legame per Piericidina A, già ipotizzati in letteratura [50], parzialmente sovrapposti a quello del Rotenone. Questo inibitore potrebbe legarsi ad un sito a più alta e uno a più bassa affinità, condiviso con il Rotenone [53]. La Piericidina A, a più basse concentrazioni, si legherebbe al sito a maggiore affinità inibendo il trasferimento di elettroni all'interno del Complesso I, quindi bloccando l'attività NADH- CoQ<sub>1</sub> reduttasica, senza però indurre produzione di ROS. A più alte concentrazioni, Piericidina A si lega al sito a minore affinità condiviso con il Rotenone, bloccando il trasferimento di elettroni e inducendo produzione di ROS.

A conferma della parziale sovrapposizione dei siti di Rotenone e Piericidina A abbiamo pre-inibito gli SMP con Piericidina A (ad una concentrazione tale da ottenere circa il 30% di inibizione dell'enzima) e correlato la percentuale di inibizione dell'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica esercitata da Rotenone con la produzione di ROS da parte dell'enzima, espressa come variazione di fluorescenza della sonda DCFDA. I risultati riportati nella *figura 37* mostrano l'effetto additivo dei due inibitori, che si traduce nella perdita della fase di ritardo ("lag-time") della rilevazione della fluorescenza. È necessaria un'inibizione del Complesso I minore del 20% da parte del Rotenone per ottenere produzione di ROS in un enzima già inibito con una quantità di Piericidina A che normalmente non induce produzione di ROS.

Poiché tra gli inibitori del Complesso I ci sono anche composti in grado di bloccare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (classificati come inibitori Stigmatellina-simili), abbiamo correlato anche per questa classe di composti la percentuale di inibizione esercitata sull'attività NADH- CoQ<sub>1</sub> reduttasica e l'effetto sulla produzione di ROS.

Nei *pannelli C e D* della *figura 36* è mostrato l'effetto di concentrazioni crescenti di Stigmatellina sull'attività NADH- CoQ<sub>1</sub> reduttasica del Complesso I, in relazione alla produzione di ROS indotta dal 100% di inibizione da Rotenone (*pannello C*) e dal 100% di inibizione indotta da Piericidina A (*pannello D*).

In entrambi i casi osserviamo una diminuzione nella produzione delle ROS ma l'andamento delle curve ottenute titolando Stigmatellina sugli SMP inibiti con Rotenone e Piericidina è diverso: nel primo caso (*pannello C*) si osserva una correlazione lineare tra la percentuale di inibizione dell'enzima esercitata da Stigmatellina e il decremento della produzione di ROS. Nel secondo caso (*pannello D*) la curva segue un andamento

sigmoidale, suggerendo che il sito di legame della Piericidina A può essere parzialmente sovrapposto con quello della Stigmatellina.

Riassumendo, analizzando i dati ottenuti si può ipotizzare la parziale sovrapposizione dei siti di legame degli inibitori di classe A, Rotenone e Piericidina A. Questo spiegherebbe la maggiore percentuale di inibizione necessaria per indurre produzione di ROS in SMP inibiti con Piericidina A. Il sito di legame di Piericidina A a maggiore affinità per l'enzima potrebbe inoltre essere parzialmente condiviso da Stigmatellina, come mostrato dall'andamento sigmoidale della curva che correla il decremento della produzione di ROS in SMP inibiti con Piericidina A e l'inibizione dell'enzima da parte di Stigmatellina.

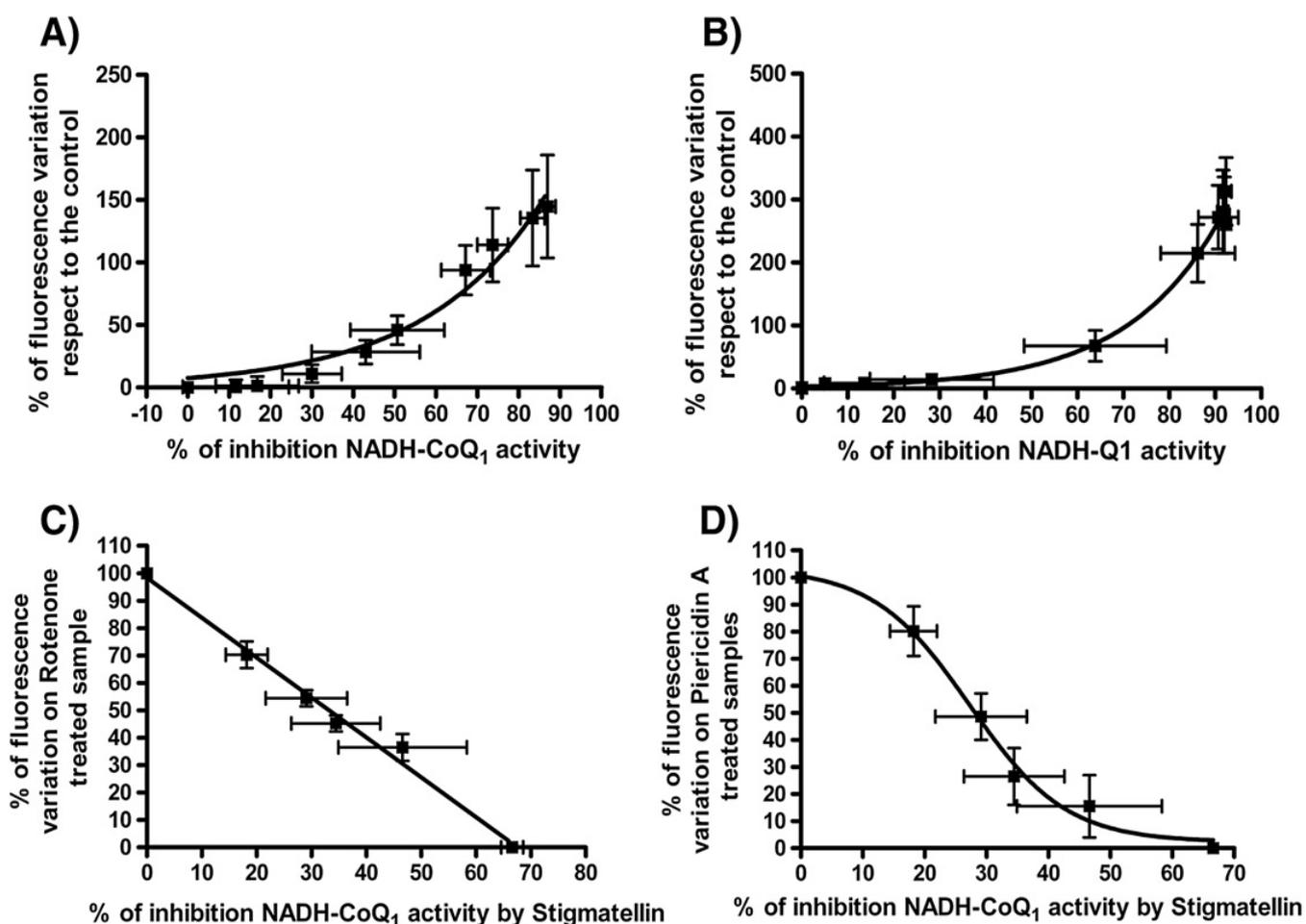


Figura 36: Correlazione tra la percentuale di variazione di fluorescenza della sonda DCFDA 5  $\mu$ M e la percentuale di inibizione dell'attività NADH-CoQ<sub>1</sub>, reduttasica in presenza degli inibitori del Complesso I appartenenti alle due classi.

Pannello A: correlazione tra la percentuale di produzione di ROS e la percentuale di inibizione del Complesso I da parte di concentrazioni crescenti di Rotenone.

*Pannello B:* correlazione tra la percentuale di produzione di ROS e la percentuale di inibizione del Complesso I da parte di concentrazioni crescenti di Piericidina A.

I campioni sono stati preparati come segue: gli SMP sono stati incubati con concentrazioni crescenti di Rotenone o Piericidina A. Per ogni campione sono state misurate l'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica e la produzione di ROS.

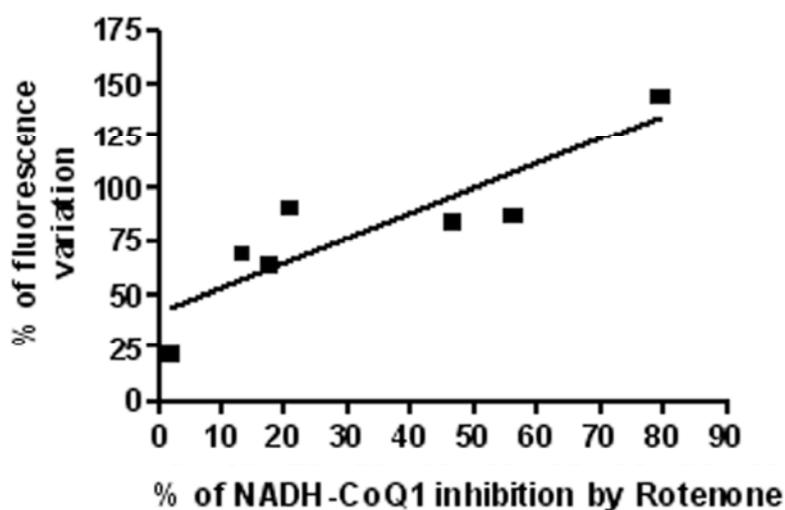
*Pannello C:* effetto di concentrazioni crescenti di Stigmatellina sulla produzione di ROS in SMP inibiti al 100% con Rotenone 2  $\mu$ M.

*Pannello D:* effetto di concentrazioni crescenti di Stigmatellina sulla produzione di ROS in SMP inibiti al 100% con Piericidina A 2  $\mu$ M.

I campioni sono stati preparati come segue: gli SMP completamente inibiti con 2 $\mu$ M di Rotenone o Piericidina A, sono stati trattati con concentrazioni crescenti di Stigmatellina ed è stata misurata la produzione di ROS.

La percentuale di inibizione dell'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica esercitata dalle stesse concentrazioni di Stigmatellina è stata misurata in esperimenti condotti in parallelo.

Ogni valore riportato è la media di almeno 10 differenti determinazioni.



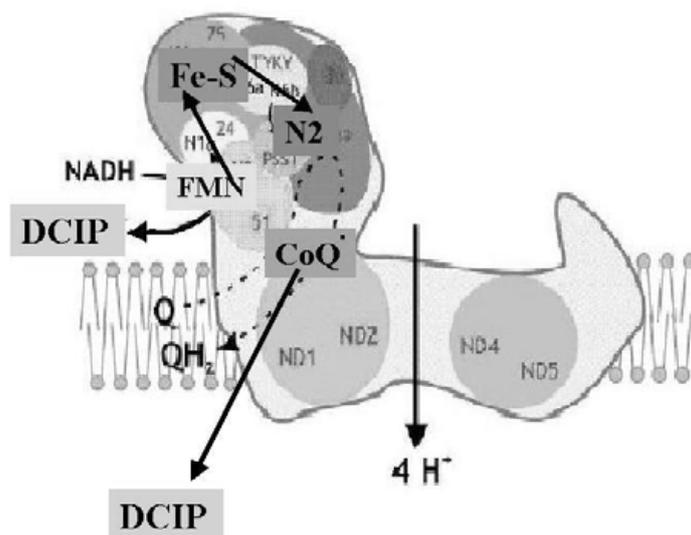
*Figura 37:* Correlazione tra la percentuale di variazione di fluorescenza della sonda DCFDA 5  $\mu$ M e la percentuale di inibizione dell'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica in presenza di concentrazioni crescenti di Rotenone, in SMP pretrattati con Piericidina A.

#### 4- Analisi dell'attività NADH-DCIP reduttasica del Complesso I in presenza di inibitori

I dati ottenuti mediante l'uso di sonde fluorescenti suggeriscono che il sito di produzione delle ROS sia localizzato in una regione idrofila dell'enzima. Partendo da questa ipotesi abbiamo studiato l'effetto degli inibitori del Complesso I sulla cinetica di trasferimento di elettroni ad un accettore in grado di interagire prevalentemente con il sito responsabile della produzione delle ROS. Gli analoghi idrofilici del Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>1</sub> e DB) sono ridotti completamente solo nel sito attivo del Complesso I per cui non sono utili a questo proposito, mentre il dicloroindofenolo (DCIP), un accettore idrofilico di elettroni già usato negli studi cinetici dei Complessi I e II della catena respiratoria mitocondriale, si è dimostrato molto più adatto ai nostri scopi.

È noto infatti che l'attività NADH-DCIP reduttasica è poco sensibile all'inibizione di composti classici come il Rotenone. Solo il 30% dell'attività DCIP reduttasica coinvolge il sito fisiologico di riduzione dell'ubichinone (*figura 38*).

L'elevata insensibilità dell'attività NADH-DCIP reduttasica al difenilen-iodonio (DPI) suggerisce che il DCIP sia in grado di prendere elettroni direttamente dalla flavina, infatti il DPI blocca il trasferimento elettronico dall'FMN ai centri ferro-zolfo (*figura 38*).



*Figura 38:* Schema che rappresenta i siti di riduzione del DCIP sul Complesso I: l'FMN e il sito fisiologico localizzato all'interno della tasca idrofobica.

La *figura 39* mostra la velocità di riduzione del DCIP da parte del Complesso I, trattando l'enzima con chinoni a corta catena (CoQ<sub>1</sub> e DB) e con gli inibitori DPI,

Rotenone (solo e in associazione con DB) e Stigmatellina (sola e in associazione con DB).

Dal grafico si osserva che il blocco da parte del DPI interessa il 30% dell'attività enzimatica totale, e quindi solo questa frazione di elettroni è quella in grado di ridurre il DCIP sul sito fisiologico.

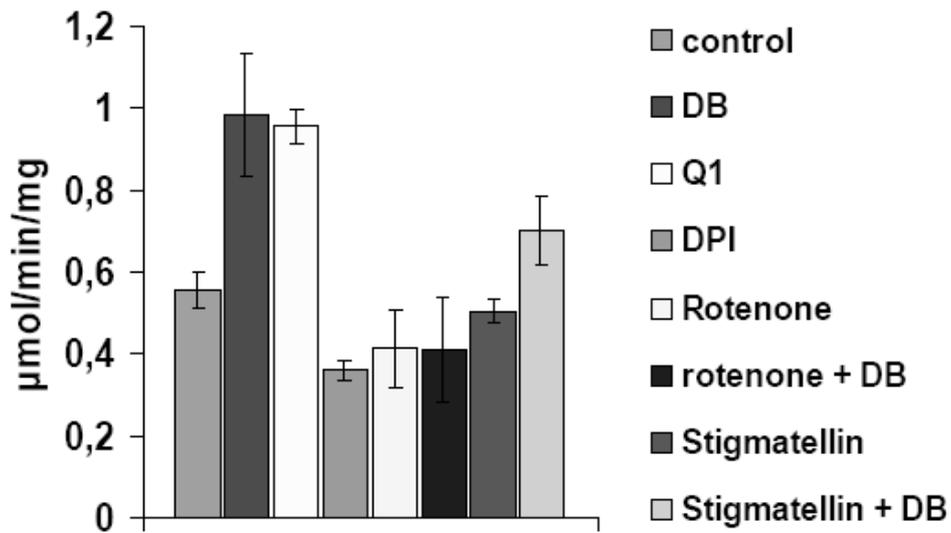
Abbiamo notato che chinoni a corta catena come il CoQ<sub>1</sub> e il DB aumentano la riduzione del DCIP dal sito fisiologico, come indicato dalla sensibilità al Rotenone di questo incremento. Nella *figura 40*, sono rappresentati i dati relativi all'attività NADH-DCIP reduttasica totale, sottratta dell'attività DPI insensibile. Escludendo una diretta riduzione del DCIP da parte della forma chinolica del Coq<sub>1</sub>/DB, abbiamo ipotizzato che il DCIP possa interagire direttamente con la specie semichinonica che si forma durante il normale trasferimento di elettroni ai chinoni nel sito fisiologico dell'enzima.

Trattando il Complesso I con gli inibitori capostipiti delle due classi Rotenone e Stigmatellina, abbiamo osservato che il primo blocca questa attivazione, mentre in presenza di Stigmatellina la velocità di riduzione del DCIP è ancora stimolata dalla presenza di CoQ<sub>1</sub>/DB.

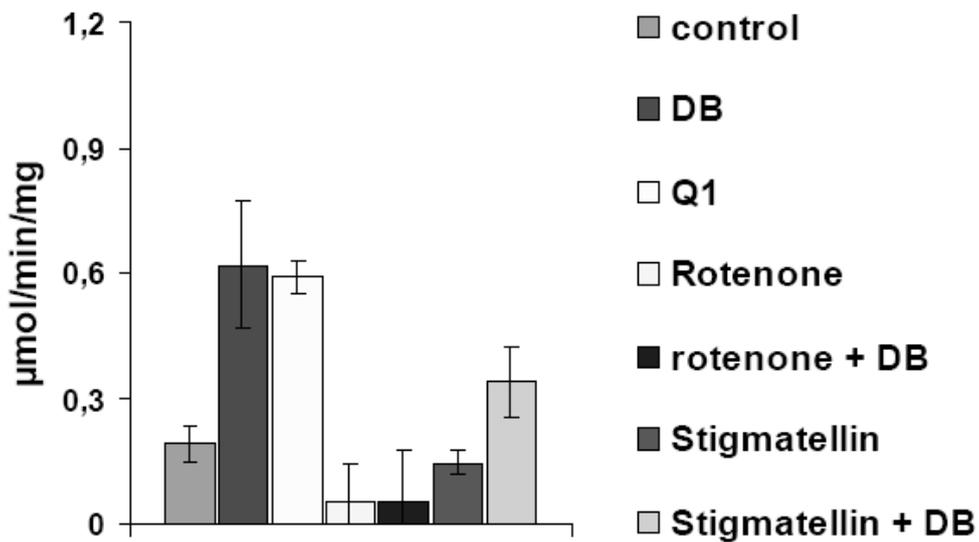
Quest'ultima osservazione sperimentale è molto importante perché rappresenta l'unico dato cinetico a favore di un'azione diversa di due inibitori (Rotenone e Stigmatellina) sul meccanismo di trasferimento di elettroni a livello del Complesso I.

Poiché entrambe le classi di inibitori bloccano la riduzione dell'ubichinone a ubichinolo i dati ottenuti suggeriscono che, in presenza di inibitori della classe Stigmatellina-simili, l'aumento di attività NADH-DCIP reduttasica sia dovuto alla presenza di un semichinone nel sito fisiologico di riduzione dell'enzima. Gli inibitori Rotenone-simili, bloccando l'ingresso dei chinoni nel sito attivo del Complesso I, preverrebbero la formazione di questo semichinone e quindi la conseguente riduzione dell'accettore.

Per verificare questa ipotesi abbiamo condotto studi di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) per indagare la presenza del semichinone e lo stato di riduzione dei centri Fe-S dell'enzima, in presenza delle due classi di inibitori.



*Figura 39:* Velocità di riduzione da parte del complesso I dell'accettore elettronico DCIP 150  $\mu\text{M}$ , utilizzando SMP (40 $\mu\text{g/ml}$ ) in tampone KCl 50mM, TRIS 10mM, EDTA 1mM, Antimicina A 2  $\mu\text{M}$ , KCN 2 mM NADH 150  $\mu\text{M}$ . Sono riportati i valori relativi al controllo, all'aggiunta di DB 50  $\mu\text{M}$ , CoQ<sub>1</sub> 75  $\mu\text{M}$  e degli inibitori DPI 10  $\mu\text{M}$ , Rotenone 1  $\mu\text{M}$  solo e in presenza di DB, Stigmatellina 50  $\mu\text{M}$  sola e in presenza di DB.



*Figura 40:* Velocità di riduzione da parte del Complesso I dell'accettore elettronico DCIP 150  $\mu\text{M}$  utilizzando SMP (40 $\mu\text{g/ml}$ ) sottratti dell'attività DPI insensibile, per evidenziare la componente di riduzione del DCIP a carico del sito fisiologico. Sono riportati i valori relativi al controllo, all'aggiunta di DB 50  $\mu\text{M}$ , CoQ<sub>1</sub> 75  $\mu\text{M}$ , Rotenone 1  $\mu\text{M}$ , solo e in presenza di DB; Stigmatellina 50  $\mu\text{M}$ , sola e in presenza di DB.

## 5- Indagine del Complesso I attraverso la Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR)

### 5.1- Introduzione alla tecnica di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR)

La spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR) è una delle tecniche più utili per individuare e risolvere i segnali dei centri paramagnetici della catena respiratoria mitocondriale, come i centri ferro-zolfo (Fe-S) dei Complessi I e III. Inoltre è possibile rilevare la presenza di specie semichinoniche e metalli di transizione come il rame del Complesso IV. Per quanto riguarda il Complesso I tutti i centri Fe-S sono paramagnetici, quindi potenzialmente individuabili all'EPR (sono stati rilevati solo 6 degli otto centri) nel loro stato ridotto [128-131], mentre la flavina e l'ubichinone sono visibili nello stato di radicale semichinonico [132, 133].

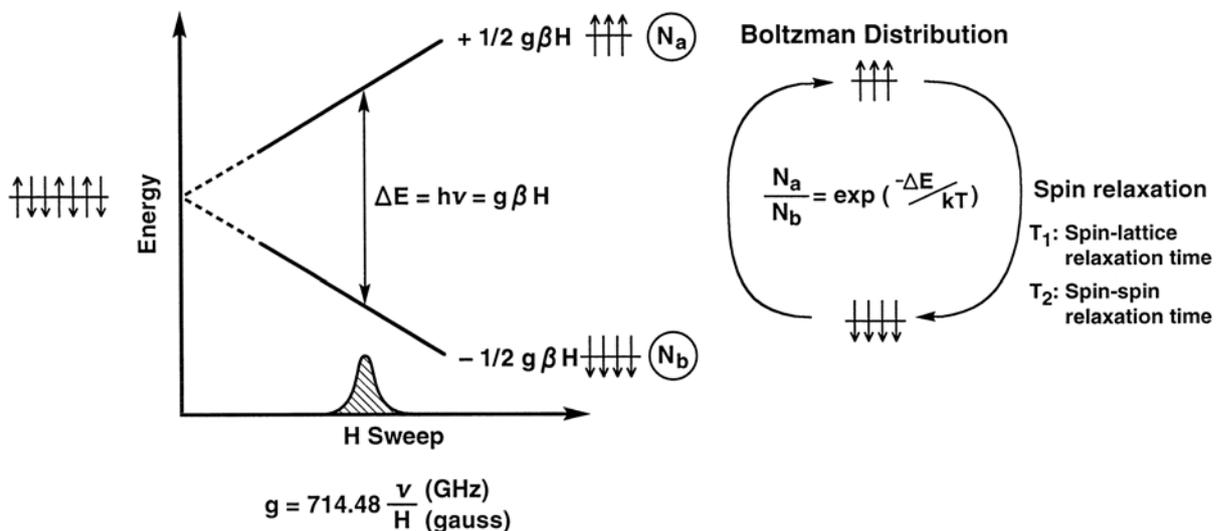
Questa tecnica si rivela quindi di particolare interesse sia nello studio del trasferimento di elettroni durante il normale turn-over dell'enzima, che in condizioni di blocco con inibitori specifici. Poiché come è stato descritto precedentemente, l'inibizione del Complesso I ha due diversi effetti sulla produzione di ROS, abbiamo utilizzato questa tecnica per valutare lo stato redox dei centri Fe-S dell'enzima e identificare il sito responsabile della fuga degli elettroni all'ossigeno molecolare. Inoltre abbiamo indagato la formazione di specie semichinoniche, in presenza di analoghi ed omologhi del CoQ<sub>10</sub>, sia per chiarire il meccanismo di trasferimento degli elettroni al substrato, che per approfondire lo studio dell'effetto dei chinoni a corta catena sulla produzione di ROS.

Per illustrare i principi della spettroscopia EPR facciamo l'esempio di una sostanza paramagnetica con un solo elettrone spaiato e quindi spin  $S = \frac{1}{2}$ : questo rappresenta bene il caso degli elettroni liberi, ma anche di radicali quali i semichinoni. I centri Fe-S sono entità più complesse e il loro stato di spin dipende dall'accoppiamento ferromagnetico o antiferromagnetico degli atomi di ferro nel centro, tuttavia nel caso del Complesso I, i centri Fe-S nello stato ridotto hanno spin totale  $S=1/2$ .

In assenza di campo magnetico tutti gli spin nel campione in esame (indicati nella *figura 41* con le frecce) hanno la stessa energia. Quando il campione è sottoposto ad un campo magnetico (H), il momento magnetico degli elettroni spaiati tenderà ad allinearsi in modo parallelo o anti-parallelo alla direzione del campo magnetico (Zeeman "splitting").

In queste condizioni gli elettroni nel campione si dividono in due popolazioni: una con minore energia  $-(\frac{1}{2}) g\beta H$ , con spin antiparallelo al campo magnetico ed una a

maggior energia  $+ (\frac{1}{2}) g\beta H$ , con spin parallelo al campo magnetico; nelle equazioni appena descritte  $\beta$  e' il magnetone di Bohr e  $g$  e' il fattore  $g$ . La differenza di energia ( $\Delta E$ ) tra i due stati di spin dipende dal valore del campo magnetico applicato. Applicando al sistema una radiazione elettromagnetica di frequenza  $\nu$ , e quindi energia  $h\nu$  ( $h$  e' la costante di Planck) e variando il campo magnetico  $H$ , si verifica una condizione di risonanza quando la differenza di energia  $\Delta E$  tra i due stati ( $g\beta H$ ) e' uguale a  $h\nu$ : la condizione di risonanza e' quindi  $h\nu=g\beta H$ . La transizione indotta dalla radiazione tra i due livelli energetici e' osservabile tramite la tecnica di spettroscopia EPR (*figura 41*). Gli spettri EPR si ottengono generalmente scansionando il campo magnetico fino a trovare la posizione di risonanza, ad una frequenza della radiazione fissa. La frequenza utilizzata piú spesso e' attorno ai 9.5 GHz e cade nella regione delle microonde dello spettro elettromagnetico. Questa frequenza viene chiamata banda X. E' da notare che a causa del metodo di acquisizione la forma di riga negli spettri EPR non e' quella in assorbimento, ma in derivata prima. Per convenzione gli spettri sono sempre riportati in derivata (*figura 42*).



*Figura 41:* Rappresentazione schematica della distribuzione degli elettroni nel campione in due popolazioni sottoposte ad un campo magnetico e distribuzione di Boltzmann con relativo fenomeno di rilassamento.

Convenzionalmente si esprime il segnale della posizione di risonanza utilizzando il valore  $g$ , la costante di magnetizzazione, caratteristico di ogni sostanza ( $g= h\nu/\beta H$ ). Il valore del fattore  $g$  per un elettrone nel vuoto e'  $g_e=2,0023$ , detto anche fattore di

Lande'. In realta' per sistemi piu' complessi di un elettrone nel vuoto, il fattore g rivela la sua natura tensoriale, ci sono quindi tre valori principali di g ( $g_x$ ,  $g_y$ ,  $g_z$ ) osservati nello spettro quando il campo magnetico e' allineato rispettivamente lungo ciascuna direzione principale. Per sistemi a simmetria piu' elevata il numero di elementi unici si riduce (*figura 42*): per una simmetria sferica il tensore g e' ridotto ad un solo parametro (fattore g con  $g_x = g_y = g_z$ ); se il sistema ha simmetria assiale il numero degli elementi unici si riduce a due ( $g_{||}$  e  $g_{\perp}$ ). Non entreremo in ulteriori dettagli sulla natura del fattore g dato che la sua discussione esula dall'ambito di questa tesi e non risulta essenziale per comprenderne i risultati.

Nel caso di radicali centrati al carbonio o all'ossigeno o radicali della flavina spesso e' sufficiente utilizzare il solo fattore g che peraltro devia poco dal valore dell'elettrone libero ( $g=2.003/5$ ), per specie paramagnetiche che coinvolgano atomi pesanti i valori di g possono deviare ed essere anche molto piu' alti o bassi (ad es. picchi a  $g\sim 4$  per il ferro in alcuni gruppi eme). Il centro Fe-S N2 ha simmetria assiale che si traduce in uno spettro a due picchi, mentre i centri N3, N4 e N5 hanno simmetria rombica con spettro a tre picchi. I centri N1a e N1b hanno simmetria mista, sia assiale che rombica.

Le popolazioni di spin a minore energia ( $N_B$ ) e a maggiore energia ( $N_A$ ) sono determinate dalla distribuzione di Boltzmann, rappresentata dalla seguente equazione:

$$N_A / N_B = \exp(-g\beta H/kT).$$

In condizioni di risonanza la probabilita' che la popolazione di spin anti-parallelo assorba energia per salire al livello piu' alto e' uguale alla probabilita' che la popolazione di spin parallelo ceda energia per andare al livello piu' basso (*figura 41*). Poiche' l'assorbimento netto osservato all'EPR aumenta al diminuire del rapporto  $N_A / N_B$ , se le due popolazioni fossero quantitativamente identiche, non si osserverebbe alcun segnale; tuttavia la popolazione del livello ad energia piu' bassa e' maggiore rispetto a quella del livello ad energia piu' alta, quindi si rileva un assorbimento netto. L'assorbimento di microonde tende ad eguagliare le due popolazioni, tuttavia i processi di rilassamento riequilibrano costantemente le popolazioni ai livelli di Boltzmann.

Il processo di rilassamento e' caratterizzato da due costanti, entrambi caratteristiche delle singole specie paramagnetiche:  $T_1$  (tempo di rilassamento spin-reticolo) e  $T_2$  (tempo di rilassamento spin-spin). Se i tempi di rilassamento non sono abbastanza brevi da mantenere la differenza tra le due popolazioni durante l'applicazione della radiazione, l'intensita' del segnale EPR decresce. Questo fenomeno e' chiamato "saturazione". L'analisi quantitativa della saturazione del segnale e' utile per discriminare specie diverse o con intorno diverso, inoltre e' possibile valutare attraverso questo parametro le distanze tra le specie paramagnetiche.

Un altro importante effetto dei tempi di rilassamento è in relazione al profilo dello spettro che si ottiene. Se i tempi di rilassamento sono troppo corti, gli spettri EPR saranno troppo allargati per poterne identificare i picchi caratteristici. Per esempio i centri 4Fe-4S (N2, N3, N4, N5, N6a e N6b) hanno tempi di rilassamento molto brevi, quindi è necessario abbassare la temperatura al di sotto dei 20 K [17] per ottenere spettri con picchi rilevabili. Per questo motivo abbiamo registrato gli spettri EPR a bassa temperatura, utilizzando un criostato che sfrutta un flusso di elio liquido intorno alla cavità dello strumento dove viene posto il campione per raggiungere le temperature necessarie allo studio dei centri Fe-S del Complesso I.

SCHMATIC REPRESENTATION OF THE SHAPE OF THE MAGNETIC MOMENT OF A PARAMAGNETIC CENTER, g VALUES, AND EPR SPECTRAL LINE SHAPE

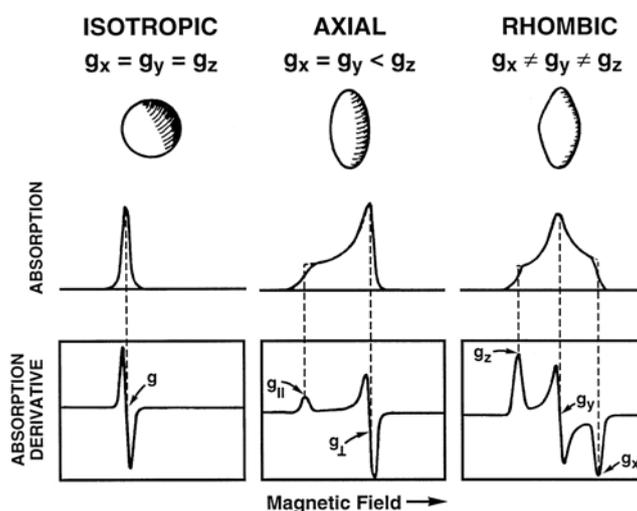


Figura 42: Rappresentazione schematica dei parametri che determinano il valore di g e la relazione tra i valori di g e le derivate delle curve di assorbimento che si ottengono con la tecnica EPR.

## 5.2- Dati EPR preliminari: analisi del semichinone

Molti autori ipotizzano che la riduzione dell'ubichinone a ubichinolo da parte del Complesso I avvenga attraverso due stadi, ognuno caratterizzato dal trasferimento di un elettrone al chinone. Durante il primo stadio si forma una specie semichinonica, ridotta a chinolo dal trasferimento del secondo elettrone. Gli effetti degli inibitori specifici dell'enzima sulla formazione della specie semichinonica sono stati studiati a fondo.

Dati in letteratura mostrano che inibitori come Rotenone e Piericidina A, che agiscono nella tasca idrofobica dell'enzima, la quale comprende il sito di riduzione dell'ubichinone, provocano lo spegnimento del segnale EPR del semichinone [135]. Non sono però disponibili dati sull'effetto degli inibitori "Stigmatellina-simili" sul segnale del radicale semichinone. Poiché si ipotizza che il sito di azione delle due classi di inibitori, discriminate in precedenza sulla base della produzione di ROS sia diverso, abbiamo ritenuto utile indagare se questo potesse riflettersi anche in un diverso effetto sul semichinone. Abbiamo inoltre indagato come le specie semichinoniche di analoghi ed omologhi del CoQ<sub>10</sub> con diverse caratteristiche chimico-fisiche, siano coinvolte nell'induzione dello stress ossidativo da parte del Complesso I. Abbiamo registrato gli spettri EPR di particelle submitocondriali (30 mg/ml) alla temperatura di 180 K, trattate con inibitori appartenenti alle due classi, distinte sulla base della produzione di ROS: abbiamo utilizzato Rotenone e Piericidina A come inibitori di Classe A, in grado di indurre produzione di ROS; Stigmatellina e Mucidina come inibitori di Classe B, in grado di bloccare la produzione di ROS. Gli inibitori capostipiti delle due classi (Rotenone e Stigmatellina) sono stati anche utilizzati contemporaneamente nello stesso campione. La concentrazione degli inibitori utilizzata è tale da inibire completamente l'attività NADH-CoQ<sub>1</sub> reduttasica del Complesso I. Tutti i campioni sono stati precedentemente trattati con Antimicina A 5 µM e Mucidina 1,8 µM per bloccare il Complesso III e Carboxina 100 µM per bloccare il Complesso II. In questo modo un'eventuale fuga di elettroni dall'enzima non determina la riduzione di centri paramagnetici a valle del Complesso I che potrebbe interferire con i segnali delle specie di interesse. È stato utilizzato NADH alla concentrazione di 300 µM come donatore di elettroni e in questo caso, CoQ<sub>1</sub> 150 µM come accettore di elettroni esogeno.

È necessario l'uso di un analogo del CoQ<sub>10</sub> non solo perché è normalmente utilizzato in cinetica come accettore, ma anche per amplificare il segnale del semichinone endogeno. La rilevabilità dell'ubisemichione endogeno è controversa: alcuni autori sostengono che il CoQ<sub>10</sub> sia rilevabile anche senza l'aggiunta di chinoni a corta catena, altri autori sostengono invece che le concentrazioni di semichinone endogeno siano sotto la soglia di rilevabilità.

I risultati riportati nella *figura 43* mostrano gli spettri ottenuti in presenza dei diversi inibitori. Le tracce mostrano il tipico andamento attribuibile ad un radicale e il segnale è centrato a  $g=2,005$ . Ciò ci permette di attribuire il segnale al radicale semichinone.

In condizioni non inibite, in SMP energizzati con NADH, è visibile un forte segnale del semichinone (traccia nera). La presenza degli inibitori Rotenone (traccia verde) e Piericidina A (traccia rosa) determina la riduzione dell'intensità del segnale,

comportamento non condiviso dai campioni trattati con Stigmatellina (traccia rossa) e Mucidina (traccia azzurra), in cui l'intensità del segnale è circa il 60-70% rispetto al controllo non inibito.

Trattando gli SMP con gli inibitori capostipiti delle due classi Rotenone e Stigmatellina contemporaneamente (traccia blu), l'intensità del segnale è uguale a quella ottenuta inibendo le particelle con la sola Stigmatellina. La Stigmatellina sembra quindi abolire l'effetto del Rotenone.

Il risultato ottenuto sul segnale del radicale semichinone trattando gli SMP con gli inibitori capostipiti delle due classi evidenzia il diverso comportamento già osservato sulla produzione di ROS.

In presenza di entrambe le classi di inibitori sembra prevalere l'effetto della Stigmatellina, in un caso mantenendo il segnale del semichinone, nell'altro abolendo la produzione di ROS indotta dal Rotenone. Per evidenziare questo comportamento nella *figura 44* sono stati confrontati gli spettri del semichinone in presenza di Rotenone e Stigmatellina e con i due inibitori contemporaneamente, già rappresentati nella *figura 43*.

La capacità di Stigmatellina di mantenere il segnale del semichinone conferma l'ipotesi formulata osservando i risultati dell'attività NADH-DCIP reduttasica in presenza di inibitori Stigmatellina-simili. L'aumento di riduzione del DCIP a carico del sito fisiologico in presenza di chinoni a corta catena, in SMP trattati con Stigmatellina ci aveva infatti portato ad ipotizzare che questo tipo di inibitori permettesse la presenza del radicale semichinone nel sito fisiologico dell'enzima.

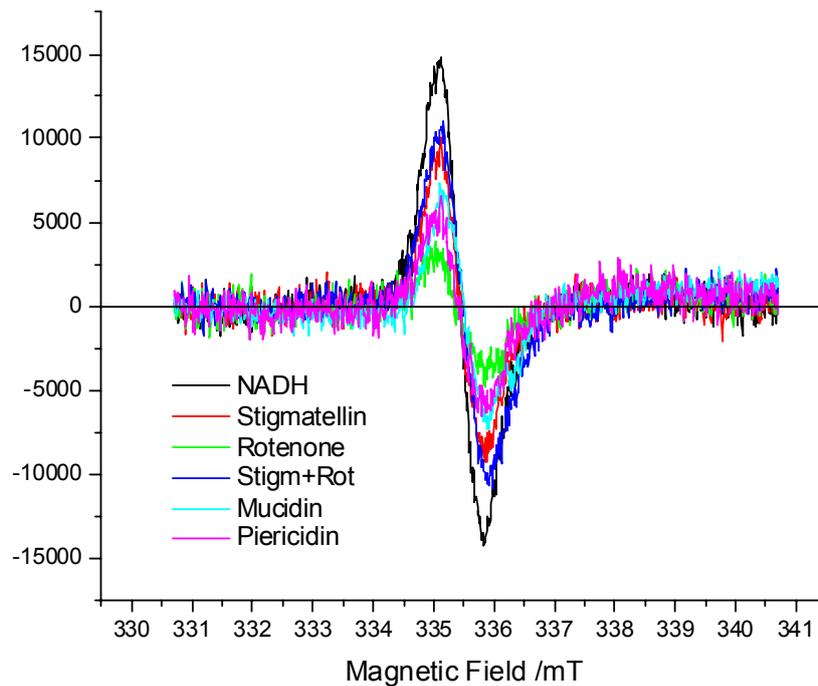


Figura 43: Spettri EPR del radicale semichinone nel Complesso I alla temperatura di 180 K e a una frequenza delle microonde di 9.4121 GHz. Il valore del fattore g e'  $g=2.005$ , tipico del radicale semichinone. I campioni contengono 300  $\mu\text{l}$  di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml e  $\text{CoQ}_1$  150  $\mu\text{M}$ , trattati con Stigmatellina 80  $\mu\text{M}$ , Rotenone 10  $\mu\text{M}$ , Mucidina 80  $\mu\text{M}$ , Piericidina A 10  $\mu\text{M}$  e Rotenone+Stigmatellina. Gli SMP sono stati energizzati con NADH 300  $\mu\text{M}$ .

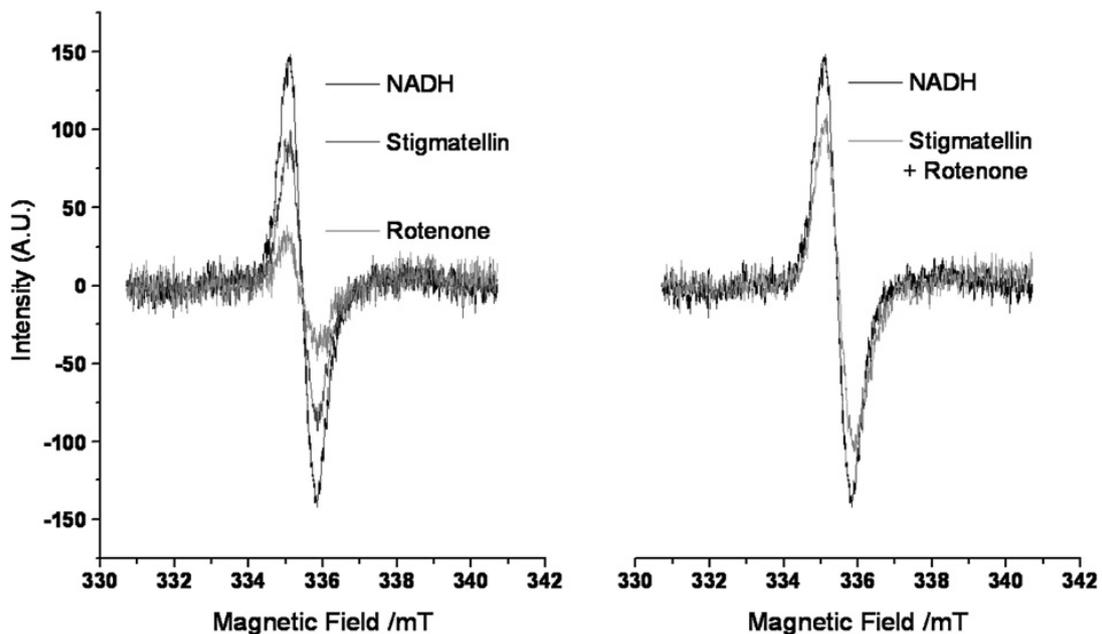


Figura 44: Segnale EPR del radicale del semichinone nel Complesso I alla temperatura di 180 K in SMP controllo e trattati con Rotenone, Stigmatellina e Rotenone+Stigmatellina. Le tracce riportate sono state isolate dal grafico riportato nella figura 43.

### 5.3- Analisi dei centri Fe-S del Complesso I

Dopo avere valutato l'effetto degli inibitori sulla presenza del radicale semichinone nel Complesso I, ci siamo occupati dell'analisi degli stati di riduzione dei centri Fe-S presenti nell'enzima. Il diverso comportamento riscontrato per le due classi di inibitori ci ha portato ad ipotizzare che anche la distribuzione degli elettroni seguisse due modalità diverse.

Per registrare il segnale dei centri Fe-S del Complesso I è necessario condurre le misure EPR alla temperatura di 9 K, perché come già accennato i centri Fe-S hanno tempi di rilassamento molto brevi e per ottenere spettri con picchi rilevabili è necessario abbassare la temperatura al di sotto di 20 K.

In letteratura sono riportati i valori di  $g$  dei centri Fe-S del Complesso I alla temperatura di 9 K ottenuti in campioni ridotti con un riducente chimico, il ditionito di sodio. La riduzione non enzimatica con ditionito di sodio permette di rilevare il segnale di tutti i centri paramagnetici visibili ad una certa temperatura ed è utile per determinare il 100% di riduzione dei centri Fe-S presenti. Può essere quindi sfruttata per normalizzare i segnali ottenuti nei campioni ridotti enzimaticamente.

Nella *figura 45* sono riportati due spettri EPR: uno spettro corrisponde al campione completamente ridotto con ditionito (traccia verde) e l'altro spettro al campione non energizzato (traccia rosa), quindi completamente ossidato. Sono indicati inoltre i valori di  $g$  dei principali picchi degli spettri.

Nello spettro del campione ossidato si osservano un picco a  $g=2,03$ , che corrisponde al centro S3 del Complesso II, che si sovrappone anche a  $g=2,09$  al segnale dell'eme b del Complesso III.

La traccia del campione ridotto con ditionito presenta diversi picchi attribuibili ai centri Fe-S del Complesso I. Nella *tabella 4* sono riportati i valori di  $g$  per questi centri e le relative attribuzioni.

Il centro Fe-S N2 ha due picchi caratteristici con valori di  $g$  di 1,94 e 2,06; N3 corrisponde a valori di  $g$  di 1,94 e 1,95; N4 ha delle componenti a  $g$  di 1,89 e 1,95 e N1b ha un picco che si sovrappone a quello di N4 a 1,95. Il picco a 2,03 che corrisponde al segnale di S3 del Complesso II comprende le componenti di N1b e in parte anche di N4.

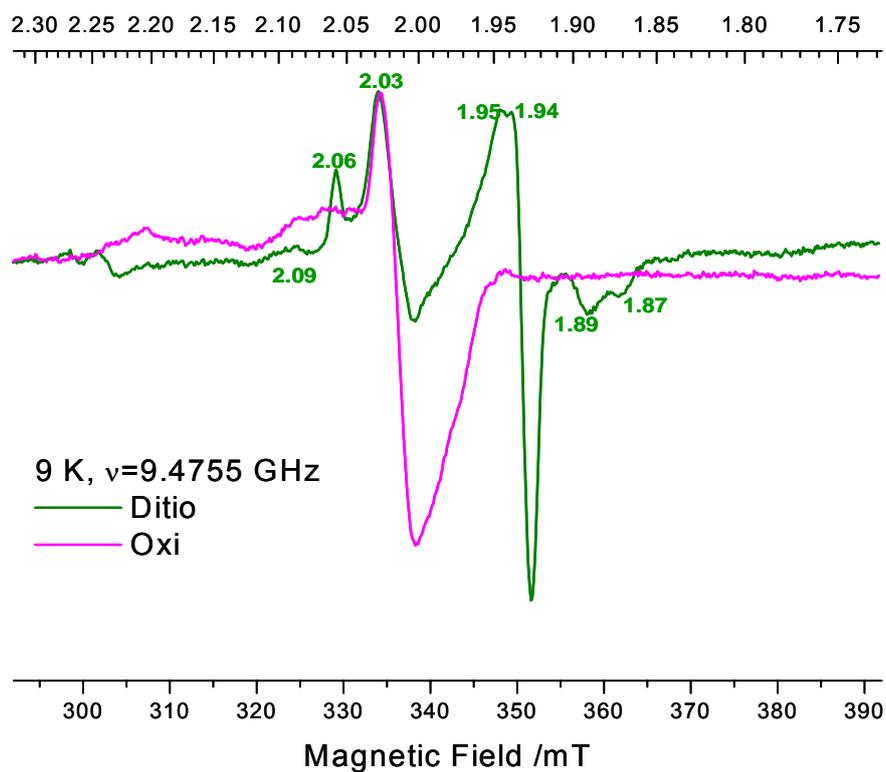


Figura 45: Spettri EPR di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml ossidati (traccia rosa) e ridotti con ditionito (traccia verde) a 9 K,  $\nu=9.4755$  GHz. In figura sono riportati i valori di g dei principali picchi osservabili (vedi testo). In ascissa sono riportati i valori di campo magnetico (scala inferiore) e i valori corrispondenti di g (scala superiore).

g	ATTRIBUZIONE
2,09	eme b, Complesso II
2,06	N2
2,03	S3, Complesso II (NB: in questa zona anche le componenti di N1b e, meno, N4)
1,95	N4, N1b
1,94	N2, N3
1,89	N4
1,87	N3

Tabella 4: Valori di g e relative attribuzioni ai centri paramagnetici a 9 K,  $\nu=9.4755$  GHz.

Inizialmente abbiamo analizzato l'effetto dei singoli inibitori capostipiti delle due classi, Rotenone e Stigmatellina, sullo stato di riduzione dei centri Fe-S in SMP energizzati con NADH.

Ad ogni spettro EPR sperimentale è sovrapposto anche lo spettro simulato, ottenuto calcolando i parametri teorici dei centri in esame. In ogni grafico è rappresentato anche lo spettro dei campioni non energizzati (ossidati). Lo spettro del campione ossidato serve per normalizzare la quantità di proteina e rendere confrontabili gli spettri ottenuti da campioni diversi.

In *figura 46 (pannello A)* osserviamo che l'inibizione da parte di Rotenone induce un alto stato di riduzione del centro N2, il cui segnale è ben visibile ai valori di  $g=1,94$  e  $g=2,06$ . Il segnale del centro ottenuto sperimentalmente è perfettamente sovrapponibile a quello teorico. Nel campione ossidato il segnale del centro N2 non è presente.

In *figura 46 (pannello B)* si osserva che l'inibizione del Complesso I da parte di Stigmatellina induce solo una parziale riduzione del centro N2, mentre sembrano emergere i segnali di altri centri a monte del centro N2. In particolare emerge il segnale del centro N4 al valore di  $g=1,89$ .

Confrontando i due inibitori capostipiti, emerge quindi che il segnale del centro N2 è più abbondante in presenza di Rotenone, rispetto ai campioni trattati con Stigmatellina.

Questo comportamento, messo in relazione con la capacità di questi composti di indurre o abolire la produzione di specie reattive dell'ossigeno, potrebbe indicare il centro Fe-S N2 come un possibile candidato per la fuga degli elettroni all'ossigeno molecolare. Infatti Stigmatellina, mantenendo ossidato il centro Fe-S N2, non permetterebbe la fuga di elettroni all'ossigeno, al contrario la forte riduzione del centro indotta da Rotenone permetterebbe la riduzione dell'ossigeno. La comparsa di ulteriori centri Fe-S ridotti in presenza di Stigmatellina suggerisce per questo composto un sito di inibizione localizzato a monte rispetto a quello del Rotenone.

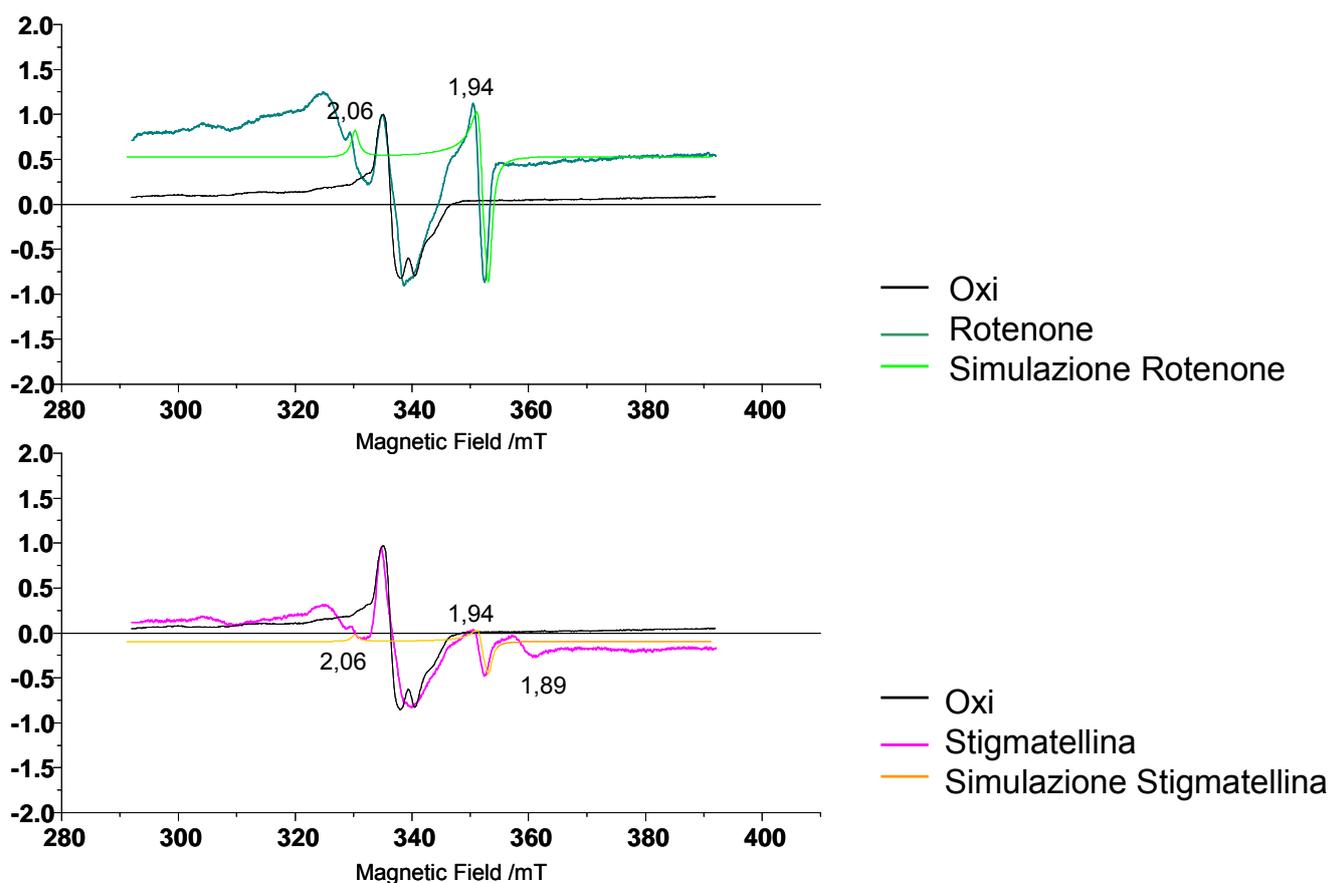


Figura 46: Spettri EPR di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml a 9 K,  $\nu=9.4755$  GHz. In nero lo spettro di riferimento del campione ossidato; in blu e in rosa gli spettri sperimentali del campione trattato con Rotenone 10  $\mu$ M e Stigmatellina 80  $\mu$ M; in verde/arancio lo spettro simulato del centro N2. I campioni sono stati trattati con NADH 300  $\mu$ M. Gli spettri sono riportati sulla stessa scala in unita' arbitrarie, per evidenziare il diverso stato di riduzione del centro N2.

#### 5.4- Analisi dell'effetto di analoghi a corta catena

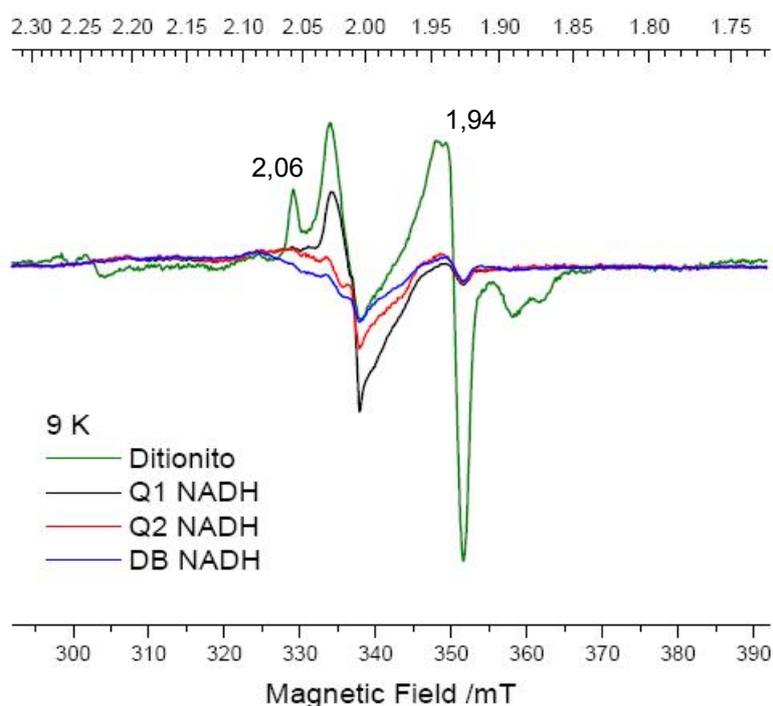
Abbiamo determinato l'effetto di chinoni a corta catena (CoQ<sub>1</sub>, CoQ<sub>2</sub> e DB) sulla presenza del semichinone e sulla riduzione dei centri ferro-zolfo all'interno del Complesso I.

L'analisi condotta in precedenza sull'effetto di questi composti riguardo alla produzione di ROS ha evidenziato come chinoni idrofilici (CoQ<sub>1</sub>) siano in grado di aumentare la produzione di ROS in enzimi inibiti con composti appartenenti alla classe Rotenone-simili. D'altra parte, l'effetto proossidante esercitato dal CoQ<sub>1</sub> non è condiviso da chinoni più idrofobici come decilubichinone o CoQ<sub>2</sub>.

Abbiamo condotto un'analisi con la tecnica EPR per valutare l'effetto degli analoghi a corta catena (CoQ<sub>1</sub>, DB, CoQ<sub>2</sub>) sulla distribuzione degli elettroni nel Complesso I, effettuando misure in SMP trattati solo con gli analoghi e in SMP trattati con gli analoghi e inibiti con Rotenone e Stigmatellina. Tra i chinoni utilizzati di particolare interesse è il CoQ<sub>2</sub>, perchè presenta un'idrofobicità intermedia tra il DB e il CoQ<sub>1</sub> ed è in grado di inibire il Complesso I.

La *figura 47* mostra gli spettri registrati alla temperatura di 9 K, relativi a SMP non inibiti, trattati con gli analoghi del chinone alla stessa concentrazione ed energizzati con NADH. Alla temperatura di 9 K i segnali dei semichinoni sono completamente saturati, pertanto non visibili, ma è possibile invece rilevare i segnali dei centri Fe-S eventualmente ridotti all'interno del Complesso I. Nella figura è mostrata anche la traccia dei campioni ridotti con ditionito.

Si può notare che i centri Fe-S in una condizione di normale turn-over dell'enzima, quando cioè l'enzima non è inibito, sono fondamentalmente ossidati rispetto alla traccia degli SMP ridotti con ditionito. Osservando i picchi relativi al centro Fe-S N2, che risulta l'unico centro visibile ( $g=1,94$  e  $g=2,06$ ), non si rilevano differenze tra le tre diverse condizioni con i diversi chinoni utilizzati.



*Figura 47:* Spettri EPR di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml a 9 K,  $\nu=9.4755$  GHz. In verde lo spettro di riferimento del campione ridotto con ditionito; in nero lo spettro del campione trattato con CoQ<sub>1</sub>; in rosso lo spettro del campione trattato con CoQ<sub>2</sub>; in blu lo spettro del campione trattato con DB. Tutti i campioni trattati con analoghi a corta catena del chinone (150

$\mu\text{M}$ ) sono stati energizzati con NADH  $300 \mu\text{M}$ . Tutti gli spettri sono normalizzati per intensità rispetto a quello del ditionito.

La *figura 48* mostra lo stato di riduzione dei centri Fe-S in SMP trattati con gli inibitori Rotenone e Stigmatellina, confrontati in presenza degli analoghi a corta catena  $\text{CoQ}_1$ , DB e  $\text{CoQ}_2$ .

Dalle tracce si osserva che Stigmatellina è in grado di mantenere il centro Fe-S N2 meno ridotto rispetto al Rotenone, anche in presenza dei chinoni esogeni.

Il minore stato di riduzione del centro N2 si ottiene in presenza di  $\text{CoQ}_2$ , probabilmente perchè è anche un inibitore Stigmatellina-simile, quindi potrebbe incrementare l'effetto già esercitato da Stigmatellina.

In presenza di  $\text{CoQ}_1$  si osserva che il centro Fe-S N2 è più ridotto rispetto agli altri casi. Questo comportamento può essere attribuibile all'elevata idrofilicità della molecola, che potrebbe permettere al  $\text{CoQ}_1$  di interagire con l'enzima in maniera diversa rispetto agli analoghi più idrofobici.

Nella *figura 49* sono confrontati gli stessi spettri riportati in *figura 48*, raggruppati però sulla base dell'inibitore utilizzato. La *figura 49 (pannello A)* mostra gli spettri relativi ai chinoni in presenza di Rotenone, la *figura 49 (pannello B)* mostra quelli relativi a Stigmatellina.

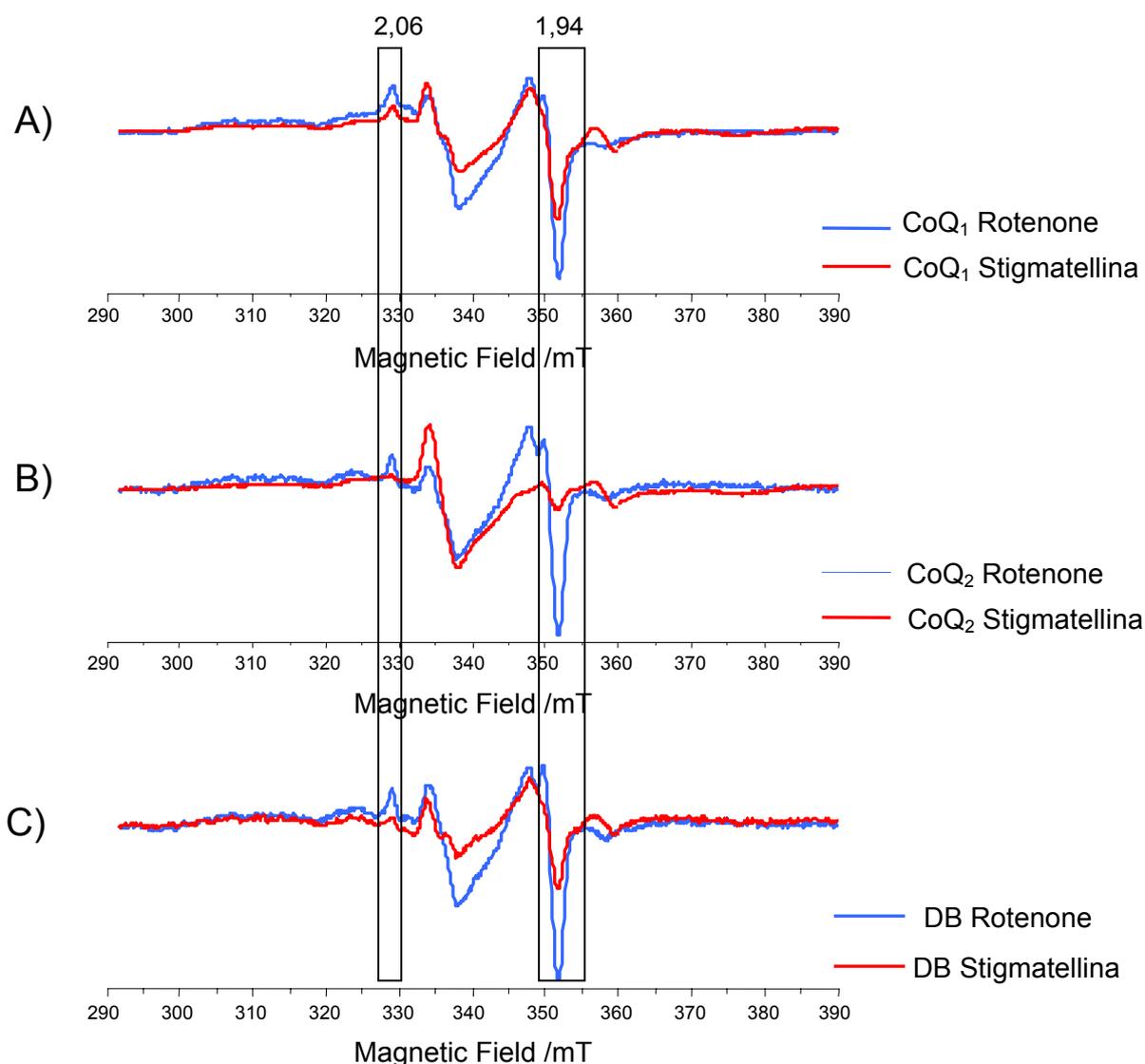
Dalle tracce in *figura 49 A*, si osserva che lo stato di riduzione del centro N2 nei campioni trattati con Rotenone, varia in funzione dell'analogo del chinone usato. L'effetto si evidenzia analizzando il picco a  $g=2,06$ , perchè il segnale a  $g=1,94$ , sebbene sia più intenso, potrebbe essere sovrapposto a quello di altri centri potenzialmente ridotti. L'interferenza si potrebbe rivelare maggiore utilizzando la classe B di inibitori Stigmatellina-simili che, come visto in precedenza, mantiene la riduzione di alcuni centri a monte del centro N2.

Osservando i picchi a  $g=2,06$  è evidente che il centro N2 è più ossidato in presenza di  $\text{CoQ}_1$ .

Questo dato è in accordo con i risultati ottenuti sulla produzione di ROS indotta dagli inibitori Rotenone-simili.

L'aggiunta di  $\text{CoQ}_1$  a SMP inibiti con Rotenone aumenta la produzione di ROS e determina una parziale ossidazione del centro, dovuta alla fuga di elettroni verso l'ossigeno molecolare. Questo fenomeno non si riscontra in presenza di analoghi più idrofobici (DB e  $\text{CoQ}_2$ ) che come è stato osservato in precedenza, non sono in grado di aumentare la produzione di ROS in presenza di Rotenone. Questo dato rafforza l'ipotesi che abbiamo formulato che il sito di produzione di ROS sia il centro N2.

In presenza di Stigmatellina (*figura 49 B*), lo stato del centro N2 è ossidato rispetto al campione trattato con ditionito e non si evidenziano particolari differenze trattando gli SMP con i diversi chinoni a corta catena. Questo dato è in accordo con gli esperimenti sulla produzione di ROS condotti in presenza di Stigmatellina.



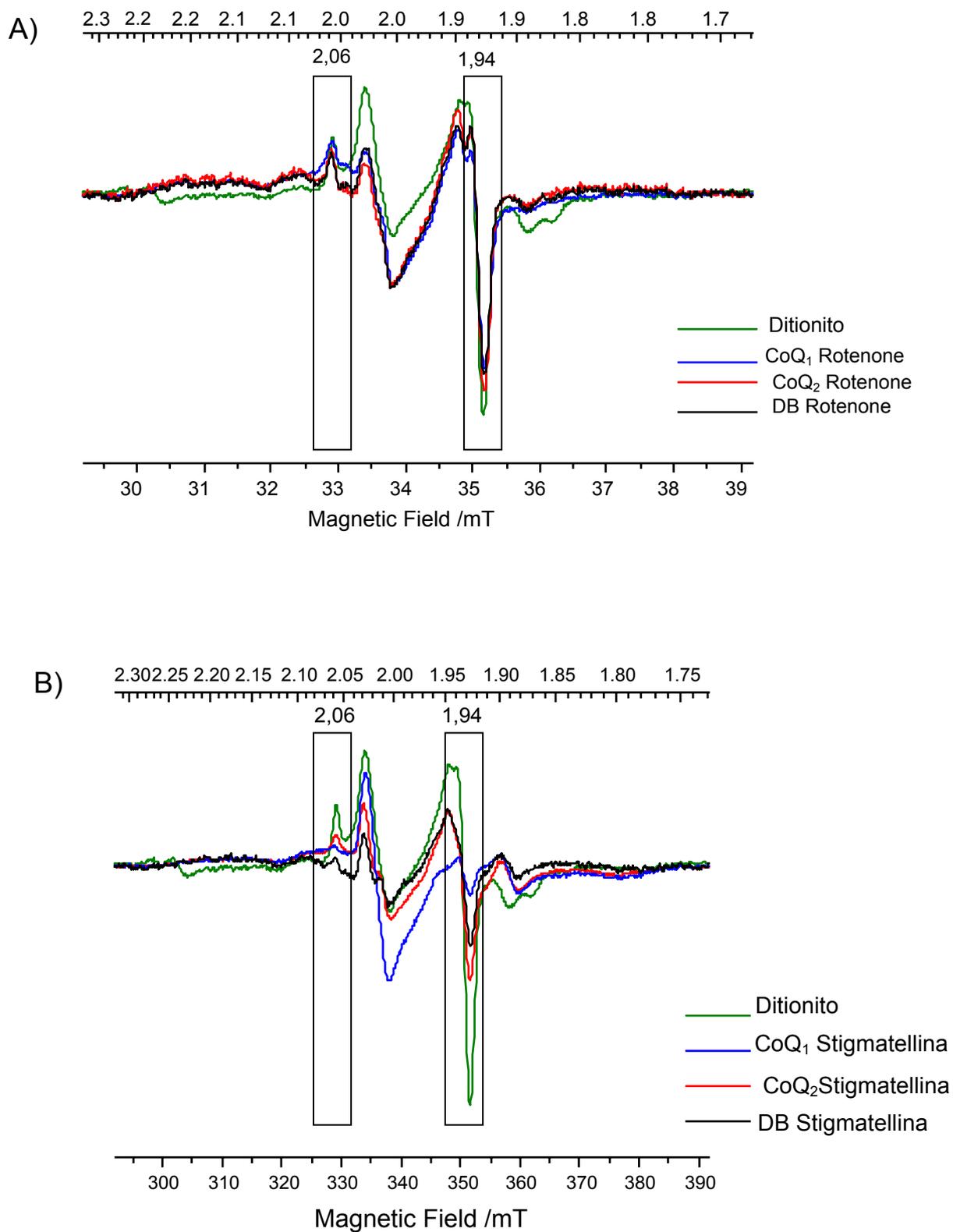
*Figura 48:* Spettri EPR di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml, energizzati con NADH 300  $\mu$ M a 9 K,  $\nu=9.4755$  GHz.

*Pannello A:* in blu lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M, in rosso lo spettro Stigmatellina 80  $\mu$ M + CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M.

*Pannello B:* in blu lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + CoQ<sub>2</sub> 150  $\mu$ M, in rosso lo spettro Stigmatellina 80  $\mu$ M + CoQ<sub>2</sub> 150  $\mu$ M.

Pannello C: in blu lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu\text{M}$  + DB 150  $\mu\text{M}$ , in rosso lo spettro Stigmatellina 80  $\mu\text{M}$  + DB 150  $\mu\text{M}$ .

Gli spettri sono riportati sulla stessa scala in unita' arbitrarie, per evidenziare il diverso stato di riduzione dei centri Fe-S.



*Figura 49:* Spettri EPR di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml, energizzati con NADH 300  $\mu$ M a 9 K,  $\nu=9.4755$  GHz.

*Pannello A:* in verde lo spettro del campione ridotto con ditionito; in blu lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M; in rosso lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + CoQ<sub>2</sub> 150  $\mu$ M; in nero lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + DB 150  $\mu$ M.

*Pannello B:* in verde lo spettro del campione ridotto con ditionito; in blu lo spettro del campione Stigmatellina 80  $\mu$ M + CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M; in rosso lo spettro del campione Stigmatellina 80  $\mu$ M + CoQ<sub>2</sub> 150  $\mu$ M; in nero lo spettro del campione Stigmatellina 80  $\mu$ M + DB 150  $\mu$ M.

Gli spettri riportati sono gli stessi rappresentati in figura 48, ma sono raggruppati in funzione dell'inibitore utilizzato.

## 5.5- Analisi del centro N1b e del semichinone

Abbiamo approfondito l'analisi del segnale del semichinone registrando gli spettri alla temperatura di 40 K. A questa temperatura è possibile rilevare contemporaneamente i segnali del semichinone e del centro Fe-S N1b. Lo studio dello stato di riduzione del centro N1b è di particolare interesse perché è un centro Fe-S localizzato subito dopo l'FMN e quindi lontano dal centro Fe-S N2; questo centro presenta inoltre caratteristiche di potenziale differenti dai centri Fe-S isopotenziali successivi. L'esperimento è stato condotto in presenza degli analoghi a corta catena CoQ<sub>1</sub> e DB, utilizzando SMP inibiti con Rotenone e con Stigmatellina.

La *figura 50 (pannello A)* mostra che, in assenza di inibitori e in presenza di CoQ<sub>1</sub>, è presente una specie semichinonica (traccia verde). Se trattiamo gli SMP con Stigmatellina si osserva una lieve diminuzione del segnale del semichinone e una contemporanea presenza del segnale del centro Fe-S N1b ridotto (traccia rossa). In presenza di Rotenone il segnale del semichinone è abolito e il segnale del centro Fe-S N1b è scarsamente visibile (traccia blu). La traccia nera rappresenta la simulazione dello spettro del centro Fe-S N1b ridotto.

La *figura 50 (pannello B)* mostra le tracce relative all'esperimento in presenza di DB. Anche in questo caso si osserva il medesimo comportamento osservato utilizzando CoQ<sub>1</sub>.

Trattando gli SMP con Rotenone e utilizzando un analogo più idrofobico quale il DB, si aboliscono completamente i segnali del semichinone e del centro Fe-S N1b (traccia blu), mentre trattando i campioni con Stigmatellina la leggera diminuzione del semichinone osservata nella *figura 50 A* con CoQ<sub>1</sub> non è più rilevata (traccia rossa).

Ciò è spiegabile in virtù delle caratteristiche diverse dei chinoni usati. Anche in questo caso il DB sembrerebbe agire a livello del sito fisiologico diversamente dal CoQ<sub>1</sub>, che essendo più idrofilico sembra essere in grado di interagire anche ad un livello diverso. Ancora una volta osserviamo chiaramente un comportamento diverso per quanto riguarda l'inibizione con Rotenone e Stigmatellina: nel primo caso gli elettroni si trovano preferenzialmente nei centri localizzati a valle del complesso, in particolare sul centro Fe-S N2, nel secondo caso la distribuzione elettronica sembra localizzarsi nei centri che si trovano a monte dell'enzima. Ciò è in contrasto con un possibile coinvolgimento dell'FMN nella produzione di ROS, sebbene non sia possibile determinare con questi esperimenti lo stato redox della flavina.

Inoltre il segnale più intenso del semichinone generato in presenza di CoQ<sub>1</sub> rispetto al DB potrebbe essere spiegato con la presenza di una quota di semichinone "esterno", che cioè non sia localizzato a livello del sito fisiologico. Ulteriori indagini sono necessarie per discriminare questo comportamento.

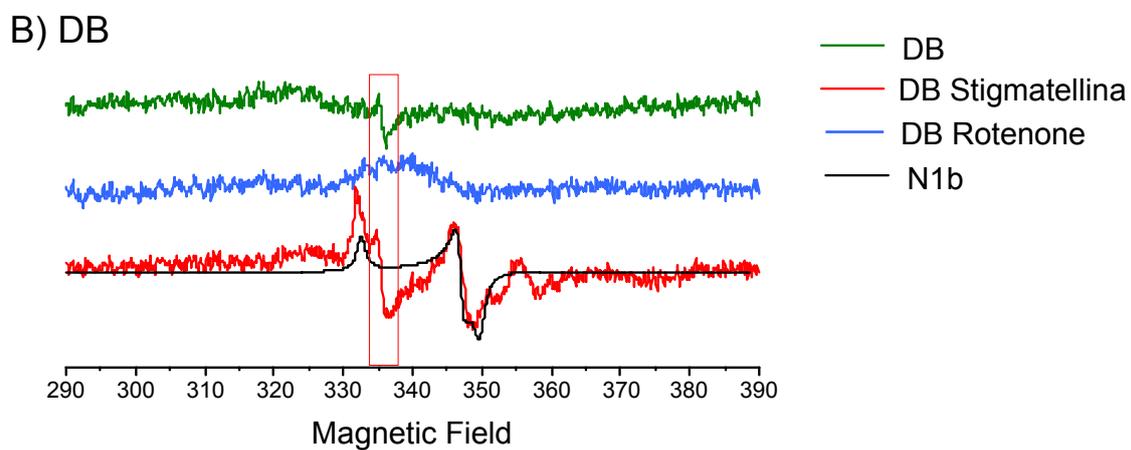
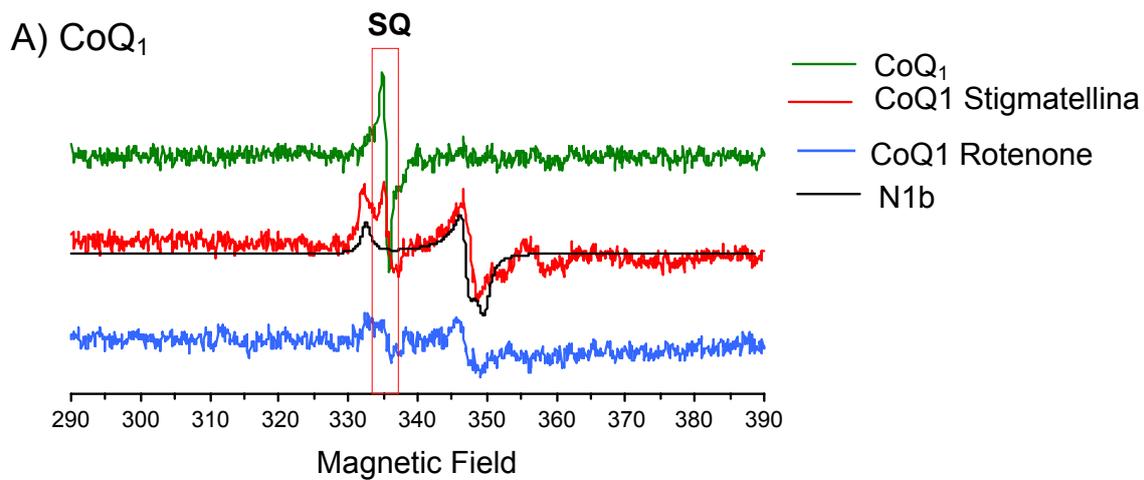


Figura 50: Spettri EPR di SMP alla concentrazione di 30 mg/ml, energizzati con NADH 300  $\mu$ M a 140 K,  $\nu=9.4755$  GHz.

*Pannello A:* in verde lo spettro del campione trattato con CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M; in rosso lo spettro del campione Stigmatellina 80  $\mu$ M + CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M; in blu lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + CoQ<sub>1</sub> 150  $\mu$ M; in nero lo spettro simulato del centro N1b.

*Pannello B:* in verde lo spettro del campione trattato con DB 150  $\mu$ M; in rosso lo spettro del campione Stigmatellina 80  $\mu$ M + DB 150  $\mu$ M; in blu lo spettro del campione Rotenone 10  $\mu$ M + DB 150  $\mu$ M; in nero lo spettro simulato del centro N1b.

# Conclusioni

Il Complesso I è uno degli enzimi meno conosciuti della catena respiratoria mitocondriale principalmente a causa della sua complessità strutturale e dell'elevato numero di centri redox coinvolti nel trasferimento degli elettroni dal NADH all'ubichinone.

Dall'analisi dei potenziali redox dei gruppi prostetici dell'enzima, l'FMN sembra essere il punto di entrata degli elettroni donati dal NADH, mentre il centro Fe-S N2 è considerato il diretto donatore degli elettroni all'accettore finale, l'ubichinone.

Il Complesso I è inibito da un grande numero di composti che bloccano il trasferimento di elettroni dai centri Fe-S dell'enzima al pool di chinoni. Nonostante le diverse strutture chimiche degli inibitori del Complesso I non è stato possibile identificare diversi siti di legame all'interno dell'enzima, è quindi comunemente accettato che condividano una larga tasca idrofobica con i siti di legame parzialmente sovrapposti [60].

Abbiamo indagato la capacità del Complesso I di trasferire elettroni direttamente all'ossigeno molecolare e quindi produrre ROS, allo scopo non solo di chiarire quale possa essere il sito di fuga degli elettroni, ma anche per comprendere il meccanismo di trasferimento elettronico all'interno dell'enzima.

I risultati riportati in questo lavoro ci hanno permesso di dividere gli inibitori del Complesso I in due classi, sulla base del loro effetto sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte dell'enzima.

Gli inibitori di Classe A (Rotenone-simili) inducono un forte aumento della produzione di ROS in esperimenti condotti su particelle submitocondriali. Fanno parte di questa classe Piericidina A, Rolliniastatina 1 e 2.

Gli inibitori di Classe B (Stigmatellina-simili) prevengono la produzione di ROS da parte degli SMP. Fanno parte di questa classe Capsaicina, Mucidina e Coenzima Q<sub>2</sub>. Molti inibitori di Classe B, tra i quali Stigmatellina, Capsaicina e Mucidina, sono inibitori classici del Complesso III e agiscono a livello del centro "o" dell'enzima bloccando il trasferimento di elettroni dall'ubichinolo alla proteina Fe-S di Rieske. Il CoQ<sub>2</sub> è noto invece essere un accettore poco efficiente di elettroni dal Complesso I, sul quale è in grado di agire anche come inibitore nella sua forma ridotta [56].

Abbiamo ipotizzato che gli inibitori di Classe A siano in grado di prevenire l'accesso del chinone endogeno, il coenzima Q<sub>10</sub>, al sito fisiologico dell'enzima mantenendo ridotto il Complesso I e favorendo quindi la fuga degli elettroni all'ossigeno molecolare [134]. Gli

inibitori di Classe B prevengono la riduzione monoelettronica dell'ossigeno, probabilmente agendo sul sito di fuga degli elettroni [50].

Questo comportamento pone quindi la questione di quale possa essere il sito di riduzione dell'ossigeno molecolare, già discussa nell'introduzione e qui di seguito riassunta.

Uno dei possibili candidati è la specie semichinonica [86]; I dati EPR riportati dal gruppo della Ohnishi hanno però mostrato che inibitori quali il Rotenone e la Piericidina A spengono il segnale EPR del semichinone [135]. I nostri risultati sulla produzione di ROS mostrano che questi inibitori in grado di spegnere il segnale EPR del semichinone sono molto efficienti nell'indurre produzione di ROS.

Questo suggerisce che il semichinone endogeno che si forma durante il ciclo redox dell'enzima non possa essere coinvolto nel trasferimento di elettroni all'ossigeno molecolare. Questa osservazione è inoltre in accordo con lavori precedenti che dimostrano che mitocondri depleti di CoQ erano in grado di produrre ROS quanto i mitocondri non privati del CoQ endogeno [127].

Un secondo probabile responsabile della produzione di ROS è l'FMN [115, 91, 92]: recentemente Brandt ha infatti mostrato che mutanti di *Yarrowia lipolytica* mancanti del centro Fe-S N2 sono in grado di produrre ROS, sostenendo il diretto coinvolgimento dell'FMN in questa attività [93].

D'altra parte è stato dimostrato che l'utilizzo di DPI inibisce la produzione di ROS nel trasferimento diretto di elettroni e la aumenta nel trasferimento inverso [97].

Questo potrebbe escludere qualsiasi coinvolgimento dell'FMN in favore di un diretto coinvolgimento di un centro Fe-S a valle del sito di inibizione del DPI, sebbene non sia del tutto noto il meccanismo di inibizione del DPI sulla flavina.

Il coinvolgimento dell'FMN nella produzione di ROS, in relazione all'inibizione con DPI, rimane una questione aperta soprattutto a causa della difficoltà nel raggiungere una completa inibizione dell'attività reduttasica del Complesso I, inoltre sembra essere molto importante il rapporto della concentrazione NAD<sup>+</sup>/NADH nel determinare la fuga degli elettroni all'ossigeno molecolare da parte dell'FMN [136].

I nostri risultati ci hanno permesso di distinguere gli inibitori che agiscono a valle dell'FMN in due classi con effetto opposto sulla produzione di ROS. Per questo motivo concludiamo che l'FMN non sia direttamente coinvolto nella fuga di elettroni all'ossigeno nelle nostre condizioni sperimentali di trasferimento diretto di elettroni all'interno dell'enzima.

Un altro probabile sito per la produzione di ROS è il centro Fe-S N2, a causa del suo potenziale di riduzione più alto rispetto agli altri centri Fe-S dell'enzima e a causa della sua localizzazione in una zona all'interfaccia tra la porzione idrofilia e quella idrofobica

del Complesso I. Studi strutturali e funzionali hanno localizzato il centro Fe-S N2 in una regione accessibile al chinone, agli ioni  $H^+$  e all'acqua, quindi probabilmente questa regione è anche accessibile all'ossigeno molecolare [31,35]. I centri ferro-zolfo localizzati a monte del centro Fe-S N2 sono invece protetti dalla struttura dell'enzima e difficilmente raggiungibili.

Infine il potenziale del centro N2 di circa 0.15/0.05 V [17] è compatibile con la coppia ossigeno/ anione superossido, il cui potenziale è 0.14 V [97].

Per queste ragioni e analizzando i dati ottenuti sulla produzione di ROS da parte del Complesso I in SMP di cuore bovino, abbiamo ipotizzato che possa essere il centro N2 il più probabile sito di fuga degli elettroni dall'enzima.

Abbiamo notato che in presenza di 1.8  $\mu M$  di Mucidina e di concentrazioni saturanti di NADH, il Complesso III è completamente inibito e il Complesso I è ridotto, ma non si assiste ad alcuna produzione di ROS. I nostri dati indicano che lo stato ridotto del Complesso I è una condizione necessaria, ma non sufficiente alla produzione di ROS. La produzione di specie reattive da parte dell'enzima richiede infatti la presenza di inibitori di Classe A.

Abbiamo ipotizzato che gli inibitori di Classe A siano in grado di indurre un cambiamento conformazionale dell'enzima che rende il sito di fuga degli elettroni più accessibile all'ossigeno molecolare. Gli inibitori di Classe B potrebbero invece bloccare questo sito o renderlo meno accessibile.

Abbiamo inoltre approfondito lo studio dei meccanismi alla base della produzione di ROS da parte del Complesso I trattando gli SMP con analoghi del  $CoQ_{10}$  a corta catena ( $CoQ_1$  e DB).

La funzione proossidante del  $CoQ_1$  in presenza di inibitori di classe A potrebbe essere spiegata considerando la sua maggiore idrofilicità rispetto alle altre specie chinoniche in esame e in particolare rispetto al  $CoQ_{10}$ . In queste condizioni il  $CoQ_1$  potrebbe non raggiungere il sito fisiologico dell'enzima.

In presenza di Rotenone e Piericidina A, l'enzima è completamente ridotto e il  $CoQ_1$  potrebbe reagire con un sito idrofilico localizzato a monte del sito attivo fisiologico dando origine ad un semichinone instabile in grado di reagire con l'ossigeno. Questo potrebbe spiegare il comportamento proossidante del  $CoQ_1$  non condiviso dagli analoghi del chinone più idrofobici, come il DB.

La presenza di specie semichinoniche all'interno del Complesso I è stata indagata cineticamente attraverso lo studio dell'attività NADH-DCIP reduttasica dell'enzima.

L'extrariduzione del DCIP osservata in presenza di chinoni a corta catena ( $CoQ_1$  e DB) è sensibile agli inibitori di Classe A; al contrario il trattamento degli SMP con inibitori di Classe B mantiene l'extrariduzione del DCIP in presenza degli analoghi del chinone.

Poiché entrambe le classi di inibitori sono in grado di bloccare l'attività cinetica dell'enzima, abbiamo ipotizzato che, l'aumento di attività NADH-DCIP reduttasica osservato in presenza di inibitori della classe Stigmatellina-simile, sia dovuto alla presenza di un semichinone nel sito fisiologico dell'enzima. Gli inibitori Rotenone-simili, bloccando l'ingresso dei chinoni nel sito attivo dell'enzima, preverrebbero la formazione del semichinone e la conseguente riduzione di un accettore.

Gli studi condotti sulla produzione di ROS attraverso l'uso di sonde fluorescenti e lo studio dell'attività cinetica dell'enzima utilizzando l'accettore DCIP attraverso tecniche spettroscopiche, sono stati correlati ai dati ottenuti utilizzando tecniche di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR). Questa tecnica permette di rilevare sia la presenza dei semichinoni che lo stato di riduzione dei centri Fe-S all'interno dell'enzima.

Abbiamo valutato la presenza del semichinone in SMP energizzati con NADH e trattati con gli inibitori rappresentativi delle due classi, Rotenone e Stigmatellina, utilizzando DB e CoQ<sub>1</sub> come accettori esogeni di elettroni e come specie in grado di aumentare il segnale del semichinone rilevabile con questa tecnica.

Come già descritto in letteratura, il Rotenone spegne il segnale del radicale semichinone [135]. Abbiamo osservato che al contrario degli inibitori di classe A, Stigmatellina mantiene il segnale del semichinone, in accordo con i dati ottenuti attraverso lo studio dell'attività NADH-DCIP reduttasica. Per localizzare il sito di riduzione dell'ossigeno molecolare abbiamo analizzato gli stati di riduzione dei centri Fe-S all'interno dell'enzima, in presenza dei due inibitori capostipiti e di diversi chinoni a corta catena (CoQ<sub>1</sub>, CoQ<sub>2</sub> e DB).

Abbiamo osservato che l'inibizione con Rotenone mantiene ridotto il centro N2, mentre l'inibizione con Stigmatellina mantiene il centro N2 parzialmente ossidato e i centri Fe-S a monte del centro N2 parzialmente ridotti. Questo comportamento è in accordo con l'ipotesi che sia il centro N2 il sito di produzione di ROS, dal centro ridotto possono infatti sfuggire elettroni verso un accettore come l'ossigeno.

Inoltre, in presenza di Rotenone, si assiste ad un diverso comportamento dei chinoni a corta catena in relazione alle loro caratteristiche idrofobiche: in presenza di CoQ<sub>1</sub> il centro è leggermente più ossidato rispetto a DB e CoQ<sub>2</sub>. Questo indicherebbe una possibile interazione del centro, in presenza di CoQ<sub>1</sub> e Rotenone, con l'ossigeno molecolare. Questo effetto non è condiviso da chinoni come il DB e il CoQ<sub>2</sub>. Ciò si correla ai dati ottenuti in fluorescenza sulla produzione di ROS, che descrivono il comportamento proossidante del CoQ<sub>1</sub>, non condiviso da DB e CoQ<sub>2</sub>.

Per evidenziare il diverso comportamento di Rotenone e Stigmatellina sulla distribuzione degli elettroni nei centri Fe-S del Complesso I e sulla presenza di semichinone abbiamo condotto esperimenti EPR alla temperatura di 40 K, che

permettono il rilevamento contemporaneo del radicale semichinone e del centro Fe-S N1b, che si trova a monte nella catena di trasferimento di elettroni rispetto al centro Fe-S N2.

Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di un chinone a corta catena idrofilico, il CoQ<sub>1</sub> e di uno più idrofobico, il DB. I dati confermano il comportamento già osservato negli esperimenti precedenti. Il Rotenone spegne il segnale del semichinone sia in SMP trattati con DB che con CoQ<sub>1</sub>; la Stigmatellina è in grado invece di mantenere il segnale del semichinone in entrambi i casi.

Da questi esperimenti è emersa anche una diversa distribuzione degli elettroni nell'enzima: in presenza di Stigmatellina si osserva il segnale del centro Fe-S N1b, assente negli SMP trattati con Rotenone. Ciò conferma l'ipotesi che in presenza di inibitori Stigmatellina-simili gli elettroni siano localizzati a livello dei centri Fe-S a monte del centro N2, mentre in presenza di inibitori Rotenone-simili gli elettroni siano localizzati principalmente a livello del centro N2. Questo diverso comportamento indicherebbe ancora una volta che il centro N2 possa essere un possibile sito di fuga degli elettroni all'ossigeno molecolare.

Abbiamo schematizzato il meccanismo di trasferimento degli elettroni all'interno del Complesso I e il meccanismo di produzione di superossido in presenza delle due classi di inibitori nella *figura 51*.

Secondo la nostra ipotesi, durante il normale turn-over dell'enzima, il chinone presente nel sito attivo viene ridotto attraverso il passaggio successivo di due elettroni, a carico del centro Fe-S N2 (*figura 51, schema A*). Poiché è improbabile che il chinone possa raggiungere siti di riduzione diversi dal centro N2 che è l'unico centro Fe-S all'interfaccia con il dominio idrofilico dell'enzima, il passaggio dei due elettroni al chinone potrebbe essere favorito da un riarrangiamento conformazionale del sito attivo dell'enzima.

La presenza del chinone nella forma ossidata nel sito attivo determina il passaggio del primo elettrone e la riduzione a semichinone. La presenza del semichinone provocherebbe un cambiamento conformazionale e il passaggio del secondo elettrone con la completa riduzione del chinone a chinolo.

Gli inibitori di Classe A (Rotenone-simili) (*figura 51, schema B*) non permettendo l'accesso del chinone nel sito attivo bloccherebbero l'enzima in una conformazione che non determina la riduzione del chinone e mantiene il centro N2 ridotto, dal quale potrebbero fuggire gli elettroni all'ossigeno molecolare e formare ROS.

Gli inibitori di classe B (Stigmatellina-simili) (*figura 51, schema C*) bloccherebbero invece l'enzima in una conformazione che permette il passaggio del primo elettrone con la conseguente riduzione dell'ubichinone a semichinone. Questa conformazione

non permette la riduzione del centro Fe-S N2, che rimane quindi ossidato e non in grado di dare elettroni all'ossigeno e produrre ROS. Gli elettroni saranno quindi distribuiti tra i centri Fe-S a monte del centro N2.

L'ipotesi formulata riguardo al meccanismo di trasferimento degli elettroni all'interno del Complesso I richiede certamente ulteriori esperimenti e la caratterizzazione più approfondita attraverso le tecniche EPR degli stati redox dei gruppi prostetici all'interno dell'enzima.

Inibitori	Produzione di ROS	Radicale Semichinone	Centro Fe-S N2 ridotto
Controllo	-	+	+
Rotenone-simili	+	-	++
Stigmatellina-simili	-	+	-

*Tabella 5:* Schema riassuntivo del comportamento degli inibitori Rotenone-simili e Stigmatellina-simili.

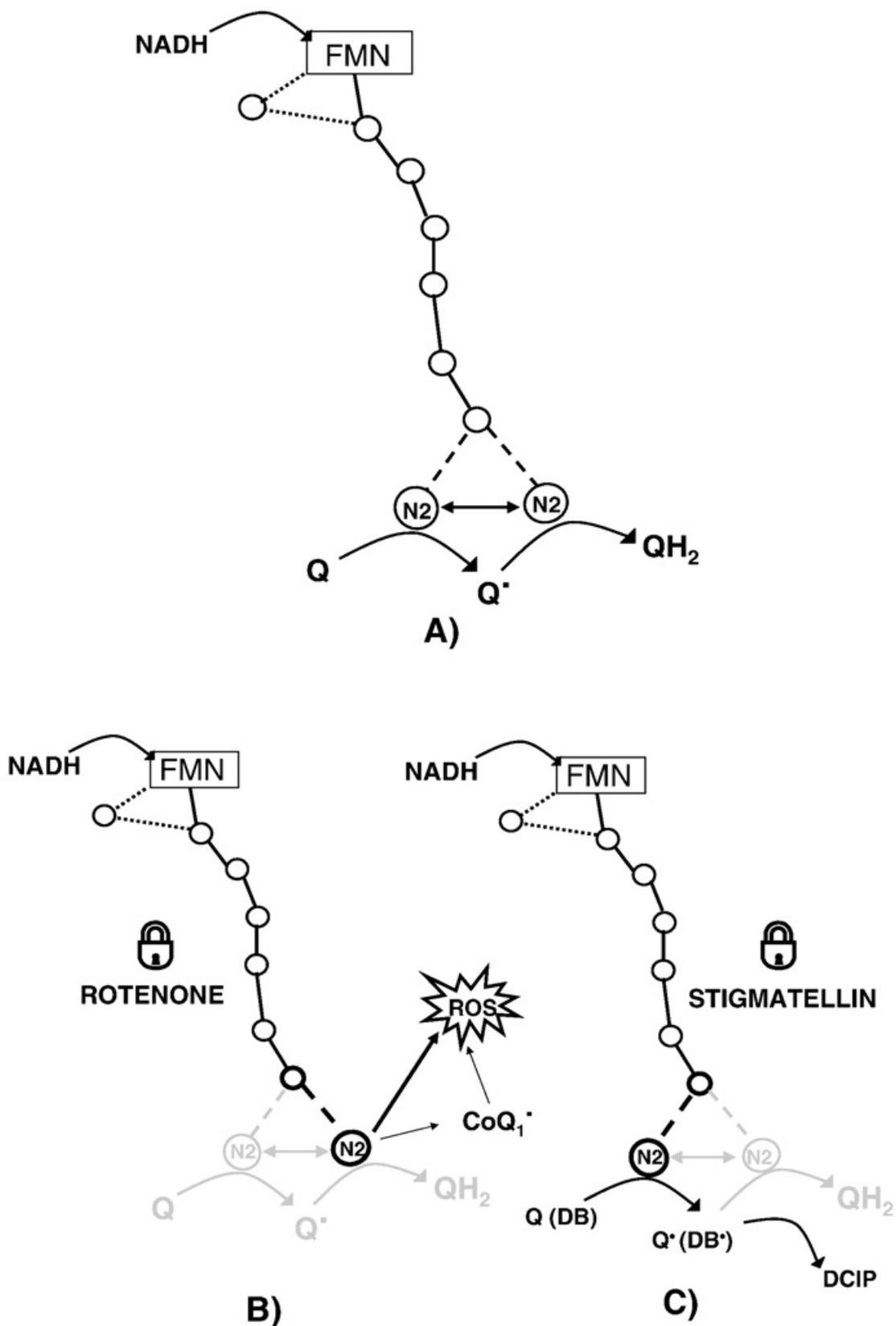


Figura 51: Meccanismo proposto per il trasferimento di elettroni dal NADH all'ubichinone nel Complesso I (A), in presenza di inibitori Rotenone-simili (B) e in presenza di inibitori Stigmatellina-simili (C). Nello schema è evidenziato anche il ruolo proposto per gli analoghi a corta catena dell'ubichinone (CoQ<sub>1</sub> e DB).

# Abbreviazioni

**AA:** antimicina A

**AAPH:** (2,2'-Azobis (2-metilpropionammina) diidrocloreuro)

**ATP:** adenosina 5'- trifosfato

**BHM:** mitocondri di cuore bovino

**Cit c:** citocromo c

**CoQ:** coenzima Q o ubichinone

**DB:** decilubichinone

**DCFDA:** diclorofluorescina diacetato

**DCIP:** dicloroindofenolo

**DOC:** deossicolato di sodio

**DPI:** difenilen-iodonio

**EDTA:** acido etilen-diammino-tetracetico

**EPR:** risonanza elettronica paramagnetica

**FADH:** flavin-adenina-dinucleotide

**FADH<sub>2</sub>:** flavin-adenina-dinucleotide ridotto

**FMN:** flavin-mononucleotide

**HE:** diidroetidio

**HRSEM:** microscopia elettronica a trasmissione ad elevata risoluzione

**MAO:** monoaminoossidasi

**mtDNA:** DNA (acido deossiribonucleico) mitocondriale

**NAD<sup>+</sup>:** nicotinammide-adenin-dinucleotide

**NADH:** nicotinammide-adenin-dinucleotide ridotto

**NADPH:** nicotinammide adenin-dinucleotide fosfato

**NOR:** reactive nitrogen species (specie reattive dell'azoto)

**P<sub>i</sub>:** fosfato inorganico

**RET:** trasporto inverso di elettroni energia dipendente

**ROS:** reactive oxygen species (specie reattive dell'ossigeno)

**SMP:** particelle submitocondriali di cuore bovino

**SOD:** superossido dismutasi

**SQR:** succinato ubichinone reduttasi

**TEM:** microscopia elettronica a trasmissione

**TRIS:** 2-amino-2-idrossimetil propan-1,3-diolo

# Bibliografia

- [1] Sjostrand F.S., 1956 *Int. Rev. Cytol.* 5, 455-533
- [2] Palade G., 1952 *Anatomical Record.* 114, 427-451
- [3] Hackenbrock C.R., 1966 *J.Cell. Biol.* 30, 269-297
- [4] Daems W.T. and Wisse E., 1966 *J. Vitra. Struct. Res.* 16, 123-140
- [5] Mannella C.A., Marko M., Penczek P., Barnard D., Frank J., 1994 *Micros. Res. Tech.* 27, 278-283
- [6] Mannella C.A., Marko M., Buttle K.F., 1997 *TIBS* 22, 37-38
- [7] Perkins G., Renken C., Martone M.E., Young S.J., Ellisman M., Frey T., 1997 *J. Struct. Biol.* 119, 260-272
- [8] Scheffler E.I., 2001 *Mitochondrion* 1, 3-31
- [9] Lehninger et al. 2000
- [10] Chance B. and Williams G.R., 1955 *Nature* 176, 250-254
- [11] Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupte S.S., 1986 *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 331-338
- [12] Schagger H., Pfeiffer K., 2000 *EMBO J.* 19, 1777-1783
- [13] Bianchi C., Genova M. L., Parenti Castelli G., Lenaz G., 2004 *J. Biol. Chem.* 279 (35), 36562-36569
- [14] Ragan C.I., 1987 *Curr. Top. Bioenerg.* 15, 1-36
- [15] Hirst J., Caroll J., Fearnley I.M., Shannon J.R., Walker J.E., 2003 *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 135-150
- [16] Brandt U., Kerscher S., Drose., Zwicker K., Zickermann., 2003 *FEBS Letters* 545, 9-17
- [17] Ohnishi T., 1998 *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 186-206
- [18] Walker, J.E., 1992 *Q. Rev. Biophys.* 25, 253-324.

- [19] Papa S, Sardanelli AM, Scacco S, Petruzzella V, Technikova-Dobrova Z, Vergari R, Signorile A., 2002 *J. Bioenerg. Biomembr.* 34, 1-10.
- [20] Sazanov L.A., Peak-Chew S.Y., Fearnley I.A. and Walker J.E., 2000 *Biochemistry* 39, 7229-7235
- [21] Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker J.E., 2003 *Mol. Cell. Proteomics* 2, 117–126
- [22] Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker J.E., 2003 *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 135–50
- [23] Leonard K, Haiker H, Weiss H., 1987 *J. Mol. Biol.* Mar 20, 194(2), 277-86
- [24] Hofhaus G, Weiss H, Leonard K., 1991 *J. Mol. Biol.* 221, 1027-43
- [25] Guenebaut V, Vincentelli R, Mills D, Weiss H, Leonard KR., 1997 *J. Mol. Biol.* Jan 31, 265(4), 409-18
- [26] Guenebaut V., Schlitt A., Weiss H., Leonard K., Friedrich T., 1998 *J. Mol. Biol.* Feb 13, 276(1), 105-12
- [27] Grigorieff N., 1998 *J. Mol. Biol.* Apr 17, 277(5), 1033-46
- [28] Saraste M., 1999 *Science* 283, 1488-1493
- [29] Grigorieff N., 1999 *Curr. Opin. Struct. Biol.* Aug 9(4), 476-83
- [30] Friedrich T. Bottcher B., 2004 *Biochim. Biophys. Acta* 1608, 1–9
- [31] Sazanov L.A. and Hinchcliffe P., 2006 *Science* 311, 1430-1436
- [32] Hinchcliffe P. and Sazanov L.A., 2005 *Science* 309, 771
- [33] Yano T. et al., 2003 *J. Biol. Chem.* 278, 15514
- [34] Mamedova A.A., Holt P.J., Carrol L.J., Sazanov L.A., 2004 *J. Biol. Chem.* 279, 23830
- [35] Brandt U. 2006 *Ann. Rev. Biochem.* 75, 69-92
- [36] Earley F.G., Ragan C.I., 1984 *Biochem. J.* 224, 525–534.
- [37] Degli Esposti M., Carelli V., Ghelli A., Ratta M., Crimi M., Sangiorgi S., Montagna P., Lenaz G., Lugaresi E., Cortelli P., 1994 *FEBS Lett.* 352, 375–379.

- [38] Carelli V., Ghelli A., Ratta M., Bacchilega E., Sangiorgi S., Mancini R., Leuzzi V., Cortelli P., Montagna P., Lugaresi E., Degli Esposti M., 1997 *Neurology* 48, 1623–1632.
- [39] Brown M.D., Trounce I.A., Jun A.S., Allen J.C., Wallace D.C., 2000 *J. Biol. Chem.* 275, 39831–39836.
- [40] Klingerberg M., Slenczka W., 1959 *Biochemistry Z.* 331, 486-517
- [41] Chance B., Hollunger G., 1960 *Nature* 185, 666-72
- [42] Vinogradov A.D., Sled V.D., Burbaev D.S., Grivennikova V.G., Moroz I.A., Ohnishi T., 1995 *FEBS Lett.* 370, 83–87.
- [43] Ohnishi T., Sled V.D., Yano T., Yagi T., Burbaev D.S., Vinogradov A.D., 1998 *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 301–308.
- [44] Lenaz G., 1998 *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 53-67
- [45] Belogradov G. and Hatefi Y., 1994 *Biochemistry* Apr. 19, 33(15), 4571-6
- [46] Zickermann V., Bostina M., Hunte C., Ruiz T., Radermacher M., Brandt U., 2003 *J. Biol. Chem.* Aug 1, 278(31), 29072-8. Epub 2003 May 16
- [47] Degli Esposti M. and Ghelli A., 1994 *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 116-120
- [48] Brandt U., 1997 *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 79-91.
- [49] Vinogradov A., 1993 *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 367-375
- [50] Degli Esposti M., 1998 *Biochim. Biophys. Acta* 1364 222-235
- [51] Singer T.P., Ramsay R.R., 1994 *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 198-202
- [52] Brandt U., Kerscher S., Droese, Zwicker K., Zickermann, 2003 *FEBS Letters* 545, 9-17
- [53] Gutman M., Singer T.P., Casida J.E., 1970 *J. Biol. Chem.* 245, 1992-1997
- [54] Gutman M., 1980, *Biochim. Biophys.* 594, 53-84
- [55] Darrouzet E., Issartel J.P., Lunari J., Dupuis A., 1998, *FEBS Letters* 431,34-38
- [56] Fato R., Estornell E., Di Bernardo S., Pallotti F., Parenti Castelli G., Lenaz G., 1996 *Biochemistry* 35,2705-2716

- [57] Degli Esposti M., Ghelli A., Ratta M., Cortes D., Estornell E., 1994 *Biochem. J.* 301,161-7
- [58] Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D., 1997 *Nature* 389, 816-824.
- [59] Shimomura Y., Kawada T., Suzuki M., 1989, *Arch. Biochim. Biophys.* 270, 573-577
- [60] Okun J.G., Lummen P. and Brandt U., 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 2625-2630
- [61] Schuler F., Casida J.E., 2001 *Biochim. Biophys. Acta* 1506, 79–87
- [62] Darrouzet E., Dupuis A., 1997 *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 1–4
- [63] Cecchini G., Shroder I., Gunsalus R.P., Maklashina E., 2002 *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 140
- [64] Roy C. and Lancaster D., 2002 *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 1-6
- [65] Yu L., Xu J.X., Haley P.E., Yu C.A., 1987 *J. Biol. Chem.* 262, 1137
- [66] Turunen M., Olsson J., Dallner G., 2004 *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 171-199
- [67] Bentinger M., Brismark, Dallner G., 2007 *Mitochondrion* 7S, 41-50
- [68] Zhang Z., Huang L., Schulmeister V.M., Chi Y.I., Kim K.K. Hung L.W., Crofts A.R., Berry E.A., Kim S.H., 1998 *Nature* 392, 677-684
- [69] Hunte C., Palsdottir H., Trumpower B.L., 2003 *FEBS Letters* 545, 39-46
- [70] Trumpower B.L., 1990 *J. Biol. Chem.* 265 (20), 11409-11412
- [71] Schultz B.E. and Chan S.I., 2001 *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 23-65
- [72] Esser L., Quinn B., Li Y.F., Zhang M., Elberry M., Yu L., Yu C., Xia D., 2004 *J. Mol. Biol.* 341, 281-302
- [73] Crofts A.R., Holland T.J., Victoria D., Kolling D.R.J., Dikanov S.A., Gilbreth R., Lhee S., Kuras R., Kuras M., 2008 *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1001-1019
- [74] Swanson R., Trus B.L., Mandel N., Mandel G., Kallai O.B., Dickerson R.E., 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 759-775
- [75] Stryer L., Berg L.M., Tymoczko J.L. *Biochimica* 5 ed. Zanichelli
- [76] Jones M.G., Bickar D., Wilson M.T., Brunori M., Colosimo A., Sarti P., 1984 *J. Biochem.* 220, 57-66

- [77] Beal M.F., 2003 *Ann. Neurol.* 53 (suppl. 3) S39-S47
- [78] Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 2002 *Free Radicals in Biology and Medicine* (3<sup>rd</sup>ed.), Oxford University Press
- [79] Diplock A.T., 1994 *Molec. Aspects Medicine* 15, 293-376
- [80] Ernest L., 1993 *Active Oxygen, Lipid Peroxides and Antioxidants* (K. Yagi, Ed) CRC Press, Boca Raton, 1-38
- [81] Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E., 1992 *J. Lab. Clin. Med.* 119(6), 598-620
- [82] Saran M. and Bors W., 1990 *Radiat. Environ. Biophys.* 29, 249-262
- [83] Bredt D.S., Snyder S.H., 1994 *Annu. Rev. Biochem.* 63, 175-195
- [84] Navarro A. and Boveris A., 2007 *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292, 670-686
- [85] Meister A., 1995 *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 35-42
- [86] Lambert A.J. and Brand M.D., 2004 *J. Biol. Chem.* 279, 39414-20
- [87] Chance B. and Hollunger G., 1961 *J. Biol. Chem.* 236, 1534-1543
- [88] Lambert A.J. and Brand M.D., 2004 *Biochem. J.* 382, 511-517
- [89] Takeshige K. and Minakami S., 1979 *Biochem. J.* 180, 129-135
- [90] Liu S.S., 1997 *Biosci. Rep.* 17, 259-272
- [91] Liu Y., Fiskum G., Schubert D., 2002 *J. Neurochem.* 80, 780-7
- [92] Vinogradov A.D., 1998 *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 169-85
- [93] Galkin A., Brandt U., 2005 *J. Biol. Chem.* 280, 30129-35
- [94] Herrero A. and Barja G., 2000 *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 609-15
- [95] Genova M.L., Abd-Elsalam N.M., Mahdy E.S., Bernacchia A., Lucarini M., Pedulli G.F., Lenaz G., 2006 *Arch. Biochem. Biophys.*
- [96] Lenaz G., Fato R., Genova M.L., Bergamini C., Bianchi C., Biondi A., 2006 *Biochim, Biophys. Acta* 1757, 1406-1420
- [97] Ohnishi S.T., Ohnishi T., Muranaka S., Fujita H., Kimura H., Uemura K., Yoshida K., Utsumi K., 2005 *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 1-15
- [98] Muller F.L., Roberts A.G., Bowman N.K., Kramer D.M., 2003 *Biochemistry* 42, 6493-6499

- [99] Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H., 2004 *J. Biol. Chem.* 279, 49064-49073
- [100] Casteilla L., Rigoulet M., Pénicaud L., 2001 *IUBMB Life* 52, 181-188
- [101] Nishino H. and Ito A., 1986 *J. Biochem. (Tokio)* 100, 1523-1531
- [102] Whatley S.A. et al., 1996 *Neurochem. Res.* 21, 995-1004
- [103] Hauptmann N., Grimsby J., Shih J.C., Cadenas E., 1996 *Eur. J. Pharmacol.* 448, 225-230
- [104] Kumar M.J., Nicholls D.G., Andersen J.K., 2003 *J. Biol. Chem.* 278, 46432-46439
- [105] Loffler M., Becker C., Wegerle E., Schuster G., 1996 *Histochem. Cell. Biol.* 105, 119-128
- [106] Gardner P.R., 2002 *Meth. Enzymol.* 349, 9-23
- [107] Tretter L. and Adam-Vizi V., 2004 *J. Neurosci.* 24, 7771-7778
- [108] Starkov A. et al., 2004 *J. Neurosci.* 24, 7779-7788
- [109] Zhang L., Yu L., Yu C.A., 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 33972-33976
- [110] Matsuno-Yagi A. and Yagi T., 2001 *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 155-157
- [111] Saraste M., 1999 *Science* 283 1488-1493
- [112] Chomyn A., Cleeter M. W., Ragan C. I., Riley M., Doolittle R. F., Attardi G., 1986 *Science* 234, 614-618
- [113] Chomyn A., Mariottini P., Cleeter M. W., Ragan C. I., Matsuno-Yagi A., Hatefi Y., Doolittle R. F., Attardi G., 1985 *Nature* 314, 592-597
- [114] Ohnishi T., Johnson J. E. Jr., Yano T., Lobrutto R., Widger W. R., 2005 *FEBS Letters* 579, 500-506
- [115] Kussmaul L. and Hirst J., 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7607-7612
- [116] Kushnareva Y., Murphy A.N., Andreyev A., 2002 *Biochem. J.* 368, 545-553
- [117] Yagi T., Seo B.B., Di Bernardo S., Nakamaru- Ogiso E., Kao M.C., Matsuno- Yagi A., 2001 *J. Bioenerg. Biomembr.* 681, 33 233-242
- [118] Gomes A., Fernandes E., Lima J.L., 2005 *J. Biochem. Biophys. Methods* 65, 45-80
- [119] Degli Esposti M., 2002 *Methods* 26, 695 335-340

- [120] Mohanty J.G., Jaffe J.S., Schulman E.S., Raible D.G., 1997 *J. Immunol. Methods* 202, 133-141
- [121] Zhou M., Diwu Z., Panchuk- Voloshina N., Haugland R.P., 1997 *Anal. Biochem* 253, 162–168
- [122] Solomonson L.P., Vennesland In: B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J., Wissing I. 710 (Eds.), *Cyanide in Biology*, Academic Press New York, 1981
- [123] Munzel T., Afanas'ev I.B., Kleschyov A.L., Harrison D.G., 2002 *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1761- 8
- [124] Benov L., Szejnberg L., Fridovich I., 1998 *Free Radic. Biol. Med.* 25, 826- 831
- [125] Tarpey M.M., Wink D.A., Grisham M.B., 2004 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R431- 444
- [126] Fato R., Cavazzoni M., Castelluccio C., Parenti Castelli G., Palmer G., Degli Esposti M., Lenaz G., 1993 *Biochem. J.* 290, 225-236
- [127] Genova M.L., Ventura B., Giuliano G., Bovina C., Formiggini G., Parenti castelli G., Lenaz G., 2001 *FEBS Lett.* 505, 364- 368
- [128] Ohnishi T., 1979 *Membrane Proteins in Energy Transduction*, in: Capaldi R.A. Ed. pp. 1–87, Marcel Dekker, New York
- [129] Ohnishi T., Salerno J.C., 1982 *Iron–Sulfur Proteins*, Vol. 4 pp. 285–327, in: Spiro T.G. Ed., Wiley, New York
- [130] Beinert H., Albracht S.P., 1982 *Biochim. Biophys. Acta* 683, 245–277
- [131] Johnson M.K., 1994 *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 4, in: King R.B. Ed., Wiley, UK, pp. 1896–1915
- [132] Sled V.D., Rudnitzky N.I., Hatefi Y., Ohnishi T., 1994 *Biochemistry* 33, 10069–10075
- [133] Bowyer J.R., Ohnishi T., 1985 *Coenzyme Q* in: G. Lenaz Ed., Wiley, New York, pp. 409–432
- [134] Friedrich T., Ohnishi T., Forche E., Kunze B., Jansen R., Trowitzsch W., Hofle G., Reichenbach H., Weiss H., 1994 *Biochem. Soc. Trans.* 22, 226–230

[135] Magnitsky S., Touloukhonova L., Yano T., Sled V.D., Hagerhall C., Grivennikova V.G., Burbaev D.S., Vinogradov A.D., Ohnishi T., 2002 *J. Bioenerg. Biomembr.* 628 34, 193–208

[136] Barker C.D., Reda T., Hirst J., 2007 *Biochemistry* 46, 3454–3464

