

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

**DOTTORATO DI RICERCA**

**BIOCHIMICA**

**Ciclo XXII**

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

**ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE  
DELLA CATENA RESPIRATORIA  
MITOCONDRIALE**

Presentata da: **Dott. Marco Faccioli**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. Giorgio Lenaz**

**Prof.ssa Anna Ida Falasca**

Esame finale anno 2010

# INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b>	p. 4
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	6
<b>INTRODUZIONE</b>	9
<b>1. Il mitocondrio</b>	9
[1.1] Struttura e mitocondrio	14
[1.2] Ipotesi simbiotica	14
[1.3] Molteplici funzioni	15
<b>2. La catena respiratoria mitocondriale</b>	16
[2.1] Complesso I	19
[2.2] Complesso II	28
[2.3] Coenzima Q	29
[2.4] Complesso III	32
[2.5] Il Citocromo c	36
[2.6] Complesso IV	37
[2.7] ATP sintasi	41
<b>3. Gli inibitori della catena respiratoria</b>	44
[3.1] Inibitori del Complesso I	48
[3.2] Inibitori del Complesso III	48
[3.3] Inibitori del Complesso IV	51
<b>4. Organizzazione strutturale della catena respiratoria mitocondriale</b>	52
[4.1] Introduzione	52
[4.2] Il modello delle collisioni casuali	53
[4.3] Il modello dei supercomplessi	54
<b>5. Il controllo di flusso</b>	61
[5.1] Metabolismo e controllo	61
[5.2] Il coefficiente del controllo di flusso	62
[5.3] I grafici soglia	65
[5.4] Il controllo della fosforilazione ossidativi	67
<b>MATERIALI E METODI</b>	70
<b>1. Preparazioni enzimatiche</b>	70
[1.1] Preparazione dei mitocondri di cuore bovino (BHM)	70
[1.2] Preparazione dei mitocondri di tubero di patata (POM)	71
[1.3] Preparazione dei mitocondri di fegato di ratto (RLM)	72
[1.4] Preparazione dei mitocondri di lievito <i>S. cerevisiae</i>	73
[1.5] Determinazione della concentrazione proteica	74

<b>2. DOSAGGI POLAROGRAFICI</b>	75
<b>3. DOSAGGI SPETTROFOTOMETRICI</b>	76
[3.1] Preparazione e dosaggio di decilubichinone ridotto (DBH <sub>2</sub> )	77
[3.2] Preparazione e dosaggio del Citocromo c <sup>3+</sup> Cit.c <sup>2+</sup>	78
[3.3] Determinazione dell'attività NADH ossidasica e NADH-DB ossidoreduttasica in mitocondri di fegato di ratto (RLM)	79
[3.4] Determinazione dell'attività enzimatica DBH <sub>2</sub> -Cit.c <sup>3+</sup> in mitocondri di fegato di ratto (RLM)	81
[3.5] Determinazione dell'attività enzimatica Cit c <sup>2+</sup> -O <sub>2</sub> in mitocondri di fegato di ratto (RLM)	82
<b>4. GEL-ELETTROFORESI</b>	82
[4.1] Premessa	82
[4.2] Blue-Native poliacrilammide gel elettroforesi (BN-PAGE)	83
[4.3] Sodio dodecil solfato poliacrilammide gel elettroforesi (SDS-PAGE)	87
[4.4] Immuno fissazione (western blot)	88
<b>RISULTATI</b>	90
<b>1. Evidenze dall'analisi del controllo di flusso metabolico</b>	90
[1.1] Analisi del controllo di flusso da parte del Complesso I, del Complesso III e del Complesso IV in mitocondri permeabilizzati di fegato di ratto (RLM).	92
[1.2] Analisi del controllo di flusso da parte del Complesso I e del Complesso III in mitocondri accoppiati di fegato di ratto (RLM)	95
[1.3] Grafici-soglia	98
<b>2. Evidenze dalla gel.elettroforesi</b>	102
<b>CONCLUSIONI</b>	107
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	112

# ABBREVIAZIONI

**6-ACA:** acido 6-ammino caproico

**ADP:** adenosina 5'- di fosfato

**AIF:** Apoptosis Induction factor

**AMP:** adenosina 5'- monofosfato

**ANT:** traslocatore adenin-nucleotidico

**ATP:** adenosina 5'- trifosfato

**BHM:** bovine heart mitochondria (mitocondri di cuore bovino)

**BN-PAGE:** Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**cAMP :** AMP ciclico

**Cit c :** citocromo c

**CoQ :** coenzima Q o ubiquinone

**COX :** citocromo c ossidasi

**DB:** decilbenzochinone

**DBH<sub>2</sub>:** decilbenzochinolo

**DOC:** deossicolato di sodio

**DNA:** acido desossiribonucleico o deossiribonucleico

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

**EGTA:** ethylene glycol tetraacetic acid

**EPR :** risonanza elettronica paramagnetica

**FAD<sup>+</sup>:** flavin-adenina-dinucleotide

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

**FMN:** flavin-mononucleotide

**HRSEM :** High-Resolution Scanning Electron Microscopy

(microscopia elettronica a trasmissione ad elevata risoluzione)

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

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

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

**NADPH :** nicotinammide adenin-dinucleotide fosfato

**nDNA :** acido deossiribonucleico nucleare

**Pi** : fosfato inorganico

**POM** :Potato mitochondria (mitocondri di tubero di patata)

**PMSF**: phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride

**PSST**: prolina-serina-serina-treonina

**PTP**: poro di transizione di permeabilità

**RLM**: Rat Liver Mitochondria (mitocondri di fegato di ratto)

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

**SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**SMP**: particelle submitocondriali di cuore bovino

**SOD**: superossido dismutasi

**SQR** : succinato ubichinone reduttasi

**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor

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

**UCPs** : uncoupling protein

**VDAC**: voltage-dependent anion channels ( canale anione voltaggio-dipendente)

# SCOPO DELLA TESI

La catena respiratoria mitocondriale è principalmente costituita da proteine integrali della membrana interna, che hanno la capacità di accoppiare il flusso elettronico, dovuto alle reazioni redox che esse catalizzano, al trasporto di protoni dalla matrice del mitocondrio verso lo spazio intermembrana. Qui i protoni accumulati creano un gradiente elettrochimico utile per la sintesi di ATP ad opera dell'ATP sintasi. Nonostante i notevoli sviluppi della ricerca sulla struttura e sul meccanismo d'azione dei singoli enzimi della catena, la sua organizzazione sovramolecolare, e le implicazioni funzionali che ne derivano, rimangono ancora da chiarire in maniera completa. Da questa problematica trae scopo la presente tesi volta allo studio dell'organizzazione strutturale sovramolecolare della catena respiratoria mediante indagini sia cinetiche che strutturali.

Il modello di catena respiratoria più accreditato fino a qualche anno fa si basava sulla teoria delle collisioni casuali (random collision model)<sup>[1]</sup> che considera i complessi come unità disperse nel doppio strato lipidico, ma collegate funzionalmente tra loro da componenti a basso peso molecolare (Coenzima Q<sub>10</sub> e citocromo c). Recenti studi favoriscono invece una organizzazione almeno in parte in stato solido, in cui gli enzimi respiratori si presentano sotto forma di supercomplessi <sup>[2,3]</sup> (respirosoma) con indirizzamento diretto (channeling) degli elettroni tra tutti i costituenti, senza distinzione tra fissi e mobili <sup>[4]</sup>. L'importanza della comprensione delle relazioni che si instaurano tra i complessi, deriva dal fatto che la catena respiratoria gioca un ruolo fondamentale nell'invecchiamento, e nello sviluppo di alcune malattie cronico degenerative attraverso la genesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) <sup>[5,6,7,8,9,10,11]</sup>. E' noto, infatti, che i ROS aggrediscono, anche i complessi respiratori e che questi, danneggiati, producono più ROS per cui si instaura un circolo vizioso difficile da interrompere <sup>[6,10,12,13]</sup>. La nostra ipotesi è che, oltre al danno a carico dei singoli complessi, esista una correlazione tra le modificazioni della struttura del supercomplesso, stress ossidativo e deficit energetico. Infatti, la

dissociazione del supercomplesso può influenzare la stabilità del Complesso I ed avere ripercussioni sul trasferimento elettronico e protonico; per cui non si può escludere che ciò porti ad un'ulteriore produzione di specie reattive dell'ossigeno <sup>[14,15]</sup>. I dati sperimentali prodotti a sostegno del modello del respirosoma si riferiscono principalmente a studi strutturali di elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti (BN-PAGE) che, però, non danno alcuna informazione sulla funzionalità dei supercomplessi.

Pertanto nel nostro laboratorio, abbiamo sviluppato una indagine di tipo cinetico, basata sull'*analisi del controllo di flusso metabolico* <sup>[16]</sup>, in grado di distinguere, funzionalmente, tra supercomplessi e complessi respiratori separati. Ciò è possibile in quanto, secondo la teoria del controllo di flusso <sup>[17]</sup>, in un percorso metabolico lineare composto da una serie di enzimi distinti e connessi da intermedi mobili, ciascun enzima esercita un controllo (percentuale) differente sull'intero flusso metabolico; tale controllo è definito dal coefficiente di controllo di flusso, e la somma di tutti i coefficienti è uguale a 1. In un supercomplesso, invece, gli enzimi sono organizzati come subunità di una entità singola. In questo modo, ognuno di essi controlla in maniera esclusiva l'intero flusso metabolico e mostra un coefficiente di controllo di flusso pari a 1 per cui la somma dei coefficienti di tutti gli elementi del supercomplesso sarà maggiore di 1.

In questa tesi sono riportati i risultati dell'analisi cinetica condotta su mitocondri di fegato di ratto (RLM) sia disaccoppiati, che accoppiati in condizioni fosforilanti (stato 3) e non fosforilanti (stato 4).

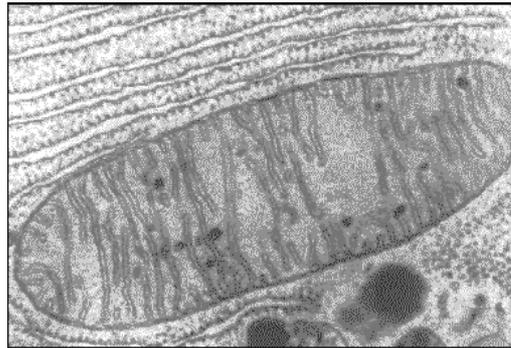
L'analisi ha evidenziato l'associazione preferenziale del Complesso I e Complesso III sia in mitocondri disaccoppiati che accoppiati in stato 3 di respirazione. Quest'ultimo risultato permette per la prima volta di affermare che il supercomplesso I+III è presente anche in mitocondri integri capaci della fosforilazione ossidativa e che il trasferimento elettronico tra i due complessi possa effettivamente realizzarsi anche in condizioni fisiologiche, attraverso un fenomeno di channeling del Coenzima Q<sub>10</sub>.

Sugli stessi campioni è stata eseguita anche un'analisi strutturale mediante gel-elettroforesi (2D BN/SDS-PAGE) ed immunoblotting che, oltre a supportare i dati cinetici sullo stato di aggregazione dei complessi respiratori, ci ha permesso di evidenziare il ruolo del citocromo c nel supercomplesso e in particolare per il Complesso IV e di avviare uno studio comparativo esteso ai mitocondri di cuore bovino (BHM), di tubero di patata (POM) e di *S. cerevisiae*.

# INTRODUZIONE

## 1. IL MITOCONDRIO

### [1.1] **Struttura e morfologia**



*Figura 1.* Fotografia al microscopio elettronico di un mitocondrio

I mitocondri sono organelli presenti nel citoplasma della maggior parte delle cellule eucariote. Sono implicati in molti e importanti processi cellulari ma in particolare svolgono la fondamentale funzione di recupero dell'energia contenuta negli alimenti per poi convertirla in energia chimica fruibile sotto forma di ATP (adenosintrifosfato).

Il termine mitocondrio deriva dai vocaboli greci mitos (“bastoncino”) e chondrion (“granulo”) conati alla fine del XIX secolo da Benda che fu il primo ad individuare questi organelli, mentre osservava la spermiogenesi degli insetti.

Hanno forma sferica o allungata press'a poco delle dimensioni di un batterio, essendo ad essi correlati sia dal punto di vista strutturale che evolutivo <sup>[18]</sup>.

E' stata documentata <sup>[19]</sup> l'esistenza anche di mitocondri altamente ramificati e che esibiscono forme specializzate, come dischi o coppe.

Tali forme aumentano il rapporto superficiale e il volume, aumentando lo scambio di metaboliti tra i mitocondri e il citosol <sup>[20]</sup>. Le modificazioni di forma e di volume possono essere dovute a variazioni osmotiche e chimiche; i

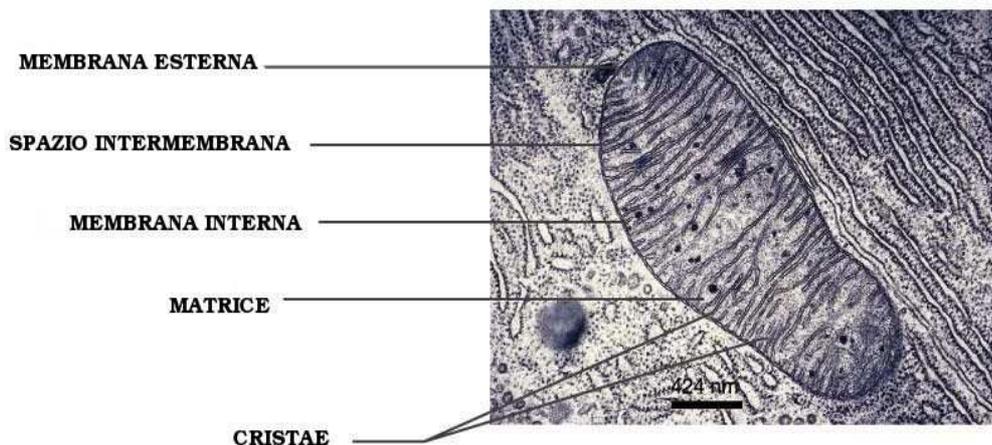
mitocondri possono, infatti, rigonfiarsi e contrarsi in seguito ai processi metabolici oppure in relazione alle variazioni della pressione osmotica nel mezzo ambiente. Nonostante la forma esterna dei mitocondri sia variabile, la loro organizzazione strutturale interna è altamente conservata [21].

Hanno un diametro di circa  $0,5\mu\text{m}$  e lunghezza di circa  $1-2\mu\text{m}$ , ma possono raggiungere dimensioni maggiori sino a  $10\mu\text{m}$  di lunghezza.

Il loro numero è molto variabile; esso va da un solo mitocondrio in alcune alghe unicellulari alle decine di migliaia degli ovociti ma, nella maggior parte delle cellule ne sono presenti in media 500-1000.

I mitocondri si muovono liberamente nel citoplasma e tendono ad addensarsi nei punti dove è maggiore la richiesta di energia (per esempio nelle fibre muscolari che circondano le miofibrille). Il movimento è stato riconosciuto come il risultato di intricate interazioni tra proteine sulla superficie esterna e vari componenti del citoscheletro, che includono i filamenti di actina, i microtubuli, e i filamenti intermedi [22].

Nella comprensione di questi organelli, importante è stata la separazione dei mitocondri dalle cellule, rendendo così possibile, con l'analisi chimica, la dimostrazione che rappresentano la sede della respirazione cellulare e la definizione della loro organizzazione ultrastrutturale



*Figura 2* Organizzazione strutturale mitocondriale

Il mitocondrio, come i cloroplasti e il nucleo, è delimitato da una doppia membrana, un' esterna a contatto con il citoplasma e una interna che si

introflette in pieghe dette creste (cristae). Entrambe le membrane hanno uno spessore di circa 5-6 nm e delimitano un volume di circa 8-20 nm chiamato compartimento o spazio intermembrana. La membrana interna racchiude la matrice del mitocondrio.

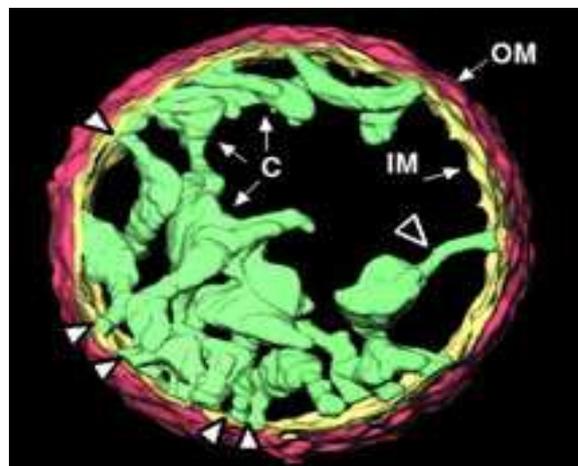
La **membrana esterna** è liscia e piuttosto elastica, <sup>[23]</sup> ha una costituzione relativamente semplice, con circa il 50% di lipidi e il 50% di proteine e con ridotte funzioni enzimatiche o di trasporto. Ha una struttura molto simile a quella del plasmalemma e a quella degli altri organelli cellulari ma, a differenza di queste, è dotata di una grande permeabilità. Sezionando la membrana con la tecnica del criodecappaggio, si osservano delle particelle assemblate a formare dei “pori”, costituiti di proteine del p.m. di circa 30.000 Dalton dette porine o canale anione selettivo voltaggio-dipendente (VDAC). Questa proteina, polimerizzando e formando pori (canali acquosi transmembrana), rende la membrana esterna liberamente permeabile agli ioni e alle molecole con peso molecolare inferiore a 5000 Dalton. Una tale permeabilità è confermata dal fatto che la composizione biochimica dello spazio intermembrana è simile a quella del citoplasma. La restante composizione proteica è costituita da un gruppo eterogeneo di componenti comprendenti vari enzimi coinvolti nel metabolismo dei fosfolipidi.

La **membrana interna** è strutturalmente e funzionalmente molto più complessa della membrana esterna. Approssimativamente per l'80% è costituita da proteine e per il rimanente 20% da lipidi. Differisce da tutti gli altri sistemi membranosi della cellula per l'assenza di colesterolo nel suo scheletro lipidico e per essere costituito da una grande componente di un fosfolipide acido: la cardiolipina. Quest'ultima, unita all'assenza di porina, rende la membrana interna selettivamente permeabile agli ioni, ed è importante per la formazione di gradienti transmembrana necessari alla funzione mitocondriale. La membrana contiene gran parte degli enzimi coinvolti nel trasporto degli elettroni e nella fosforilazione ossidativa, varie deidrogenasi e diversi sistemi di trasporto che catalizzano il trasferimento di substrati, intermedi metabolici e nucleotidi adenilici tra il citosol e la matrice.

Lo **spazio intermembrana**, poco conosciuto, è attraversato da strutture analoghe alle giunzioni serrate o gap junction che rendono contigue zone limitate delle membrane esterna e interna. Contiene un enzima specifico, la miochinasi, che catalizza la fosforilazione dell'adenosina 5'-monofosfato (AMP) a adenosina 5'-difosfato (ADP). Sono inoltre presenti le proteine proapoptotiche.

La **matrice** osservata al microscopio elettronico, presenta, all'interno di una fase simile a un gel omogeneo, dei granuli di struttura paracristallina, costituiti prevalentemente da sali di calcio, (dove qui, preferenzialmente si accumula) e dai ribosomi di struttura simile a quella dei batteri. Contiene inoltre numerose proteine tra cui gli enzimi del ciclo di Krebs, quelli della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e del metabolismo degli amminoacidi.

La tomografia elettronica insieme con la microscopia elettronica a trasmissione ad elevata risoluzione (HRSEM) ha rivelato nuove informazioni sulla struttura delle membrane mitocondriali e ha fornito nuove evidenze di compartimentazione mitocondriale.



*Figura 3.* Tomografia di un mitocondrio isolato da fegato di ratto: immagine 3D renderizzata della sezione del mitocondrio (C= cristae; IM= membrana mitocondriale interna; OM= membrana mitocondriale esterna; >= connessioni tubulari alla IM e tra cristae).

L'area di superficie topologicamente continua della membrana interna è ora divisa in due domini distinti le cui superfici sono contigue [24, 25].

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, quello periferico, e forma le creste, che si estendono all’interno del mitocondrio formando strutture tubulari o lamellari [26, 27]. Queste creste sono connesse tra loro e allo spazio intermembrana mediante piccole (diametro di circa 28 nm) giunzioni (aperture) tubulari chiamate “crista junction”[24]. Sulla base dei risultati ottenuti mediante la tomografia elettronica è stato delineato un nuovo modello che sostituisce il modello a invaginazioni per tutti i mitocondri: il modello “crista junction”, in cui le creste non sono più invaginazioni con ampie aperture sullo spazio intermembrana, ma sono compartimenti separati connessi tra loro e allo spazio tra le membrane mediante strette aperture tubulari.

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. Le nuove interpretazioni della struttura mitocondriale possono avere importanti implicazioni funzionali: si è ipotizzato che le “crista junctions” possano rappresentare una barriera alla libera diffusione degli ioni dallo spazio tra le creste allo spazio intermembrana, nonché una barriera alla diffusione delle proteine che verrebbero distribuite diversamente tra i due domini della membrana interna consentendo la compartimentazione delle sue funzioni.

Il **cromosoma mitocondriale** è presente in diverse copie in ogni mitocondrio: circolare, lungo circa 5µm; è relativamente piccolo (16569 paia di basi nell’uomo), compatto, privo di introni e codifica per 13 proteine dei complessi della catena respiratoria mitocondriale. Le altre proteine che compongono i cinque complessi sono invece codificate dal DNA nucleare, il che implica una stretta complementazione tra i due sistemi genetici. Il DNA mitocondriale non ha niente in comune con il DNA nucleare della cellula. Esso è trasmesso di generazione in generazione per via materna, dato che i mitocondri dello zigote sono quasi esclusivamente ovocitari (recentemente è stato visto nel

topo che un mitocondrio su mille può essere di eredità paterna). Il DNA mitocondriale dei mammiferi evolve molto rapidamente, subendo mutazioni con una frequenza dieci volte superiore a quella dei geni nucleari. Il progressivo accumulo di queste mutazioni contribuisce probabilmente al decadimento con l'età della capacità "respiratoria" dei muscoli e d'altri tessuti, ed è causa della contemporanea presenza di diversi genomi mitocondriali in uno stesso individuo.

## **[1.2] Ipotesi simbiotica**

I fossili vecchi più di 1,5 miliardi di anni si limitano a indicare la presenza di organismi piccoli e relativamente semplici, simili per dimensioni ai moderni procarioti. I fossili più recenti mostrano la comparsa di organismi più grandi e complessi, probabilmente le cellule eucariotiche primitive che si suppone, derivino dai primi procarioti. Infatti, le cellule che non erano in grado di utilizzare l'ossigeno come ossidante, crearono con i batteri un'associazione simbiotica che divenne poi permanente dando origine ai mitocondri e quindi alle cellule eucariotiche moderne <sup>[20]</sup>. Tutto ciò è sostenuto dalle numerose analogie esistenti tra mitocondrio e batteri: la localizzazione degli enzimi della catena respiratoria; presenti nella membrana plasmatica dei batteri e nella membrana interna dei mitocondri.

Inoltre la membrana plasmatica dei batteri presenta delle introflessioni (mesosomi) simili alle creste dei mitocondri. Il DNA mitocondriale è circolare come quello batterico. I ribosomi dei mitocondri sono costituiti di subunità con coefficiente di sedimentazione molto simile a quello dei batteri. Infine nei mitocondri e nei batteri, ma non nel citoplasma delle cellule eucariote, la sintesi proteica è inibita dal cloramfenicolo. Da tutte queste circostanze è scaturita l'ipotesi che la membrana interna e la matrice del mitocondrio rappresentano il simbionte di origine che sarebbe stato avvolto dalla membrana plasmatica e inglobato nella cellula eucariota.

### [1.3] Molteplici funzioni

Nel 1948 Eugene Kennedy e Albert Lehninger identificarono i mitocondri come il compartimento cellulare in cui avviene la fosforilazione ossidativa [28]; processo tramite il quale la cellula soddisfa circa il 90% del fabbisogno energetico, attraverso la riossidazione dei coenzimi piridinici e flavinici ridotti (NADH e FADH<sub>2</sub> rispettivamente), catalizzata dai complessi redox della catena respiratoria che porta alla sintesi dell'ATP.

I mitocondri sono polimorfici a livello morfologico e quindi funzionale, questo per poter rispondere alle diverse richieste di ogni singolo tessuto.

È quindi possibile trovare all'interno dei miociti un altissimo numero di mitocondri utilizzando una quantità di ossigeno 50 volte superiore a quella consumata dai mitocondri epatocitari, a causa dell'elevata energia richiesta nel continuo pompaggio del sangue.

Nonostante differiscano in struttura e funzione nelle diverse cellule, i mitocondri sono sempre "spazi chiusi" in cui avviene la maggior parte del metabolismo energetico [23].

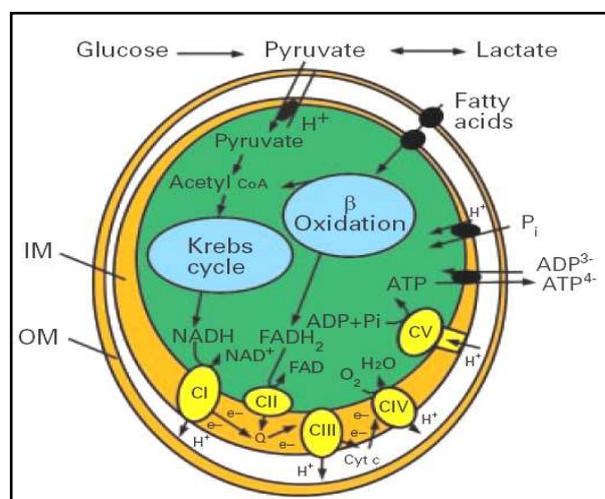


Figura 4. Schema di un mitocondrio (OM=membrana esterna, IM=membrana interna) e dei processi che in esso si svolgono

I mitocondri sono di cardinale importanza non solo nel mantenere la vita cellulare, ma anche nel controllare la morte cellulare programmata (**apoptosi**), attraverso meccanismi complessi che possono culminare con

l'apertura del poro di transizione di permeabilità (PTP) che è un canale transmembrana, voltaggio dipendente, appartenente alla membrana interna.

La sua apertura irreversibile causa disaccoppiamento della catena respiratoria con caduta del gradiente elettrochimico, cessazione della sintesi di ATP, rilascio di proteine mitocondriali dallo spazio intermembrana (es: il citocromo c , Smac/Diablo e AIF) <sup>[29,30,31]</sup> fuoriuscita di  $Ca^{2+}$  dalla matrice e generazione di anioni superossido. Molti tra questi eventi favoriscono a loro volta l'apertura del poro provocando l'amplificazione del processo.

Il risultato finale è il rigonfiamento osmotico (swelling) massivo del mitocondrio con successiva rottura della membrana mitocondriale esterna e completa depolarizzazione.

## **2. LA CATENA RESPIRATORIA MITOCONDRIALE**

E' il mezzo con il quale il mitocondrio, svolgendo la fosforilazione ossidativa, assolve alle richieste di ATP della cellula.

La catena respiratoria è costituita da una serie di trasportatori di elettroni (complessi), la maggior parte dei quali sono proteine integrali della membrana interna, contenenti gruppi prostetici in grado di accettare e di donare uno o due elettroni.

I complessi proteici trasportatori di elettroni originariamente descritti sono quattro: Complesso I, Complesso II, Complesso III e Complesso IV ai quali bisogna aggiungere due trasportatori mobili di elettroni: il Coenzima Q (CoQ) e il Citocromo c (cit c).

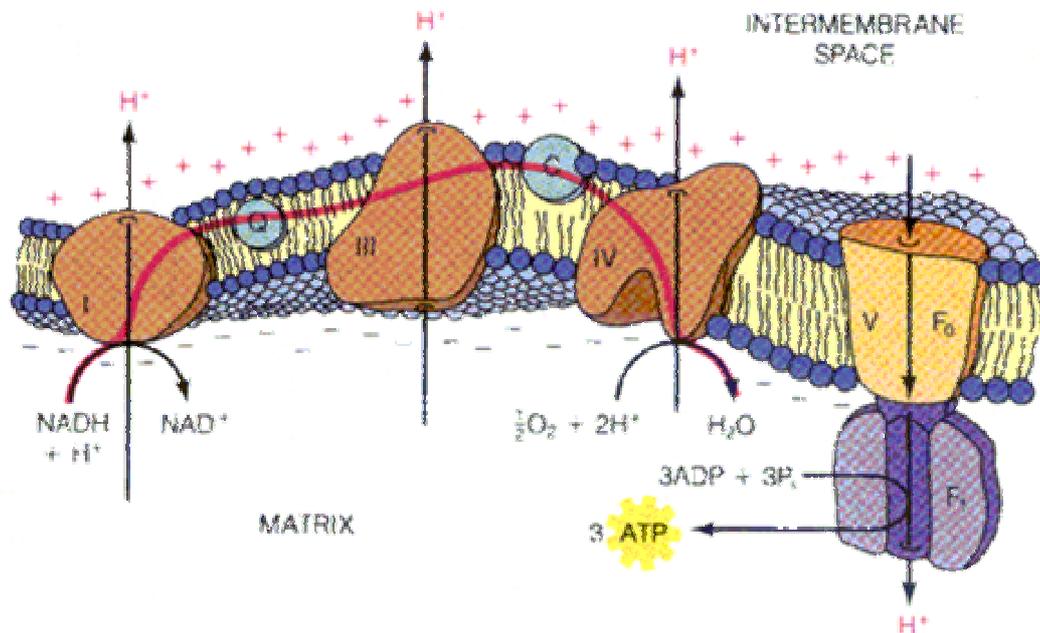


Figura 5. Rappresentazione dei complessi nello spessore della membrana interna con flusso degli elettroni fino all'  $O_2$  e produzione di ATP.

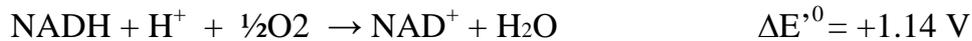
Le nostre conoscenze sulla sintesi di ATP sono sostanzialmente basate sull'ipotesi, proposta da Peter Mitchell nel 1961, in cui la traduzione energetica avviene mediante la creazione di gradienti protonici transmembrana associati al trasferimento elettronico: **la teoria chemiosmotica**. La membrana esterna sappiamo essere permeabile, al contrario di quella interna che non lo è affatto, anche nei confronti di piccole molecole e di quasi tutti gli ioni compresi i protoni ( $H^+$ ); le sole specie chimiche che possono attraversare la membrana sono quelle che possiedono uno specifico trasportatore inserito nella membrana stessa.

Queste sono le caratteristiche fondamentali per la creazione e il mantenimento del gradiente protonico.

La catena respiratoria riceve gli elettroni da equivalenti riducenti che entrano da punti separati.

Gli equivalenti riducenti sono il NADH (nicotinammide adenin dinucleotide) e il  $FADH_2$  ( flavina adenin dinucleotide), che trasferiscono gli elettroni ai complessi respiratori. Qui gli elettroni percorrono i centri redox del complesso, da quello con potenziale negativo, verso quello a potenziale positivo (questo fa sì che il trasporto degli elettroni lungo la catena sia un processo esoergonico) fino alla conversione di ossigeno molecolare in acqua. Il potenziale redox standard della coppia  $NADH-NAD^+$  è di  $-320mV$ , indice di una forte tendenza a donare elettroni, mentre quello della coppia  $H_2O-\frac{1}{2}O_2$  è di  $820 mV$ , indice di una forte tendenza ad accettare elettroni. Nel caso

dell'ossidazione del NADH, la reazione complessiva catalizzata dalla catena respiratoria è :



e la variazione corrispondente di energia libera standard è:

$$\Delta G'^0 = -n \cdot F \cdot \Delta E'^0 = -220 \text{ kJ/mole}$$

dove :

n= numero di elettroni trasferiti

F= costante di Faraday=  $96.5 \text{ KJ} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

$\Delta E'^0$ = differenza di potenziale standard a pH=7

Nel caso dell'ossidazione di coenzimi flavinici, invece, la differenza di potenziale redox è di 0.72V, che corrisponde a  $\Delta G'^0 = -139 \text{ kJ/mol}$ .

Gli elettroni del NADH sono trasferiti al Complesso I e poi al CoQ, mentre quelli del succinato sono trasferiti al Complesso II e da qui al CoQ.

Dal CoQ gli elettroni passano al Complesso III, al citocromo c, poi al Complesso IV e infine all'ossigeno molecolare per dare H<sub>2</sub>O.

L'energia libera resa disponibile dal flusso di elettroni è accoppiata al trasporto endoergonico di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna. Tale trasporto protonico produce sia un gradiente chimico ( $\Delta\text{pH}$ ) sia un gradiente elettrico ( $\Delta\Psi$ ). Si genera così una 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> della ATP sintasi (o 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> della ATP sintasi. Parte dell'ATP è utilizzata per i bisogni propri del mitocondrio, ma la maggior parte è trasportata fuori dall'organello mediante il traslocatore adenin-nucleotidico (ANT) ed è usata per le diverse funzioni cellulari.

## [2.1] Complesso I

### (NADH-CoQ ossidoreduttasi o NADH deidrogenasi)

E' il più grande e complicato enzima della catena respiratoria sia per dimensioni che complessità. Fu isolato da Hatefi nel 1961 e, anche se molti sono stati i progressi verso la sua comprensione, moltissimo è quello che ancora non si conosce perché, soprattutto, non si è potuto cristallizzarlo. Ciò gli ha valso il nome di “black box”.

Gioca un ruolo fondamentale nella produzione di energia attraverso la fosforilazione ossidativa. Rappresenta il primo tra i complessi respiratori dove gli elettroni donati dall' ossidazione del NADH al cofattore FMN, vengono direzionati, attraverso 6-9 gruppi redox (Fe-S clusters), al primo trasportatore mobile: l'ubichinone. Questo trasferimento elettronico è accoppiato ad una traslocazione di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana con una stechiometria di  $4H^+/2e^-$  [32] il cui meccanismo è sostanzialmente ancora sconosciuto.

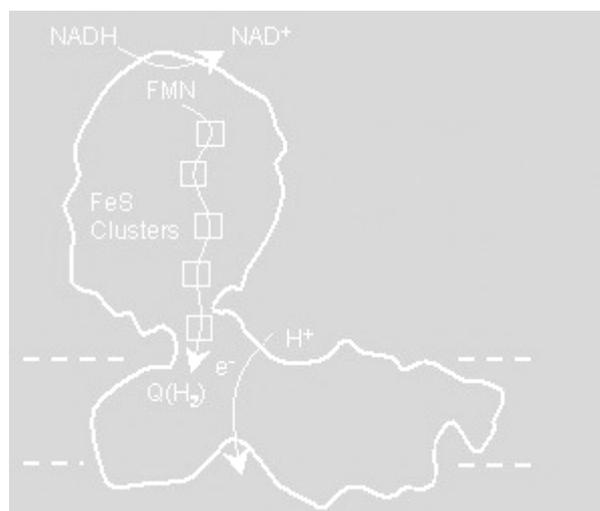
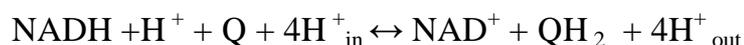


Figura 6. Struttura del Complesso I.

### L'organizzazione strutturale

Mediante l'analisi al microscopio elettronico, sono state determinate le strutture tridimensionali a bassa risoluzione della NADH-ubichinone ossidoreduttasi di cuore bovino, del fungo filamentoso *N. crassa*, del lievito

aerobico *Y. Lipolytica*, del batterio *E. coli* e *Aquifex aeolicus* [33]. In tutti questi studi si è evidenziato complessivamente una forma ad “L” con due domini maggiori perpendicolari l’uno all’ altro e separati da una sottile regione di connessione (collare) [34]; un dominio, idrofobico, è immerso nel doppio strato fosfolipidico della membrana mitocondriale interna ( ‘braccio di membrana’ ), mentre l’altro, idrofilico, è orientato verso la matrice ( ‘braccio periferico’ ). Il primo ha una forma allungata mentre il secondo sembra avere una struttura più globulare. Quasi sicuramente, la sottile 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, invece, ospita il sito di legame dell’Ubichinone.

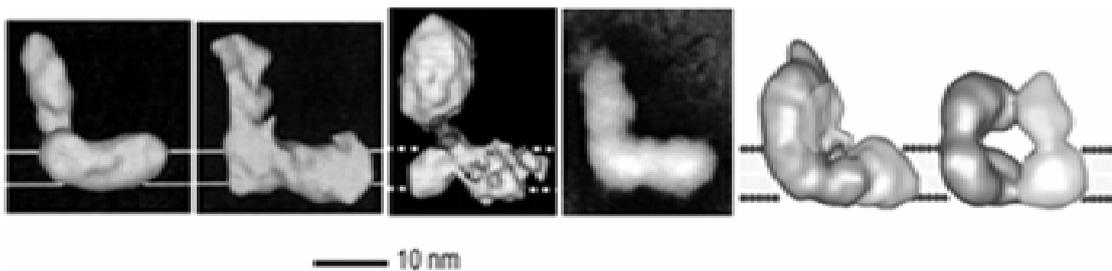


Figura 7. Complessi I appartenenti a diverse specie

1. *N. crassa* [35].
2. *E. coli* NDH-1 [36].
3. cuore bovino [37].
4. *Y. lipolytica* [38].
5. e 6. *E. coli* [39]; 5. La forma inattiva 6. La forma attiva.

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 [40].

Recentemente il complesso I di *E. coli* ha mostrato una conformazione addizionale a “ferro di cavallo” che potrebbe rappresentarne la forma attiva. Tuttavia, la rilevanza di questa osservazione non è chiara come l’induzione di questa forma alternativa che non è stata riprodotta in altri laboratori.

Il Complesso I dei procarioti, situato nella membrana plasmatica, ha una massa molecolare di circa 550 kDa. E' caratterizzato da una serie di cofattori redox (cluster Fe-S) equivalenti a quelli dell'enzima eucariota, ma, ha una struttura molto più semplice, costituita soltanto da 14 subunità che, comunque, mantengono le stesse funzioni del Complesso I mitocondriale, e per questo motivo sono dette "essenziali" [33,41,42].

In *E.coli*, i 13 geni del Complesso I, chiamato NDH-1, (due geni, *nuoC* e *nuoD*, sono fusi) sono organizzati nell' operone *nuo* (NADH: ubichinone ossidoreduttasi). Sei geni, codificano per sette subunità proteiche che andranno a costituire il dominio idrofilico, includendo tutte le proteine col sito di legame per il NADH, FMN e per tutti i cluster Fe-S. I sette altri geni codificano per altrettante proteine idrofobiche del dominio di membrana.

**Il Complesso I di cuore bovino** è uno degli enzimi di membrana strutturalmente più complessi, esso ha una massa molecolare di circa 980 kDa ed è composto da 45 subunità diverse. Le sette essenziali idrofobiche (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5; ND6 ) sono codificate dal genoma mitocondriale, mentre le altre sette idrofiliche essenziali con le rimanenti 31 dette "non essenziali" sono, invece, codificate dal genoma nucleare.

I centri redox comuni sia al Complesso I mitocondriale che a quello procariota sono rappresentati da una flavina legata non covalentemente alla subunità di 51kDa (flavina mononucleotide-FMN) e dai 6-9 centri Fe-S (N1-N6) riconosciuti mediante spettroscopia EPR.

Nel Complesso I mitocondriale possono trovarsi due tipi di centri Fe-S [42]: quello binucleare [2Fe-2S] e quello tetranucleare [4Fe-4S]. I centri binucleari sono costituiti da due atomi di Fe, legati ciascuno tramite legami di coordinazione a due atomi di S inorganici e ai gruppi sulfidrilici di due cisteine; quelli tetranucleari contengono quattro atomi di Fe, quattro atomi di S inorganici e quattro cisteine, arrangiati in una struttura cubica contorta.

Questi gruppi prostetici formano una lunga catena in grado di trasportare un elettrone per volta, grazie alla capacità degli atomi di Fe di passare alternativamente dallo stato ossidato +3 a quello ridotto +2 e viceversa. I due centri Fe-S, chiamati N1a e N1b, sono binucleari, mentre gli altri quattro,

chiamati N2, N3, N4, N5, sono tetranucleari.

Tramite spettroscopia UV/VIS sono stati osservati, nel complesso I di *E.coli*, altre due centri tetranucleari, chiamati N6a N6b, non rivelabili con la spettroscopia EPR standard <sup>[33]</sup> e presenti, anche, nel Complesso I mitocondriale <sup>[43, 44]</sup>.

Studi sul rapporto struttura/attività di molti analoghi dell'ubichinone ipotizzano che almeno uno dei siti di legame del chinone sia costituito, come già accennato, dall'ampia tasca presente tra i due domini, che è sufficientemente spaziosa da contenere substrati ingombranti e poco specifica nei confronti dei sostituenti dell'anello chinonico. Si pensa quindi che l'ubichinone si leghi solo debolmente a questo sito, permettendo un rapido movimento di entrata e di uscita da esso <sup>[45]</sup>. In base alla struttura dei chinoni, caratterizzati da una testa ciclica polare e da una lunga coda idrofobica, la tasca sarebbe costituita da una porzione lipofila e da una idrofila. Nella porzione lipofila è coinvolto il dominio di membrana, probabilmente le subunità ND1 e ND4, nella porzione idrofila sarebbe invece coinvolta la subunità 49 kDa del braccio periferico. Inoltre, poiché molti degli inibitori del Complesso I, che bloccano il trasferimento degli elettroni dal centro N2 al chinone, si legano alla subunità PSST (così detta per avere la sequenza N-terminale Prolina-Serina-Serina-Treonina) situata nella zona di connessione tra i due bracci, si suppone che anche questa subunità svolga un ruolo importante nel legame con il chinone <sup>[46]</sup>. Per consentire lo spostamento del chinone dal dominio di membrana, a cui sembra legato, verso il sito catalitico del braccio periferico, si può pensare che esista nella struttura dell'enzima una rampa o una fessura idrofobica che connette i due domini;

ciò implicherebbe anche che molti inibitori idrofobici del Complesso I possano agire semplicemente bloccando in qualche punto questa via di connessione <sup>[47]</sup>.



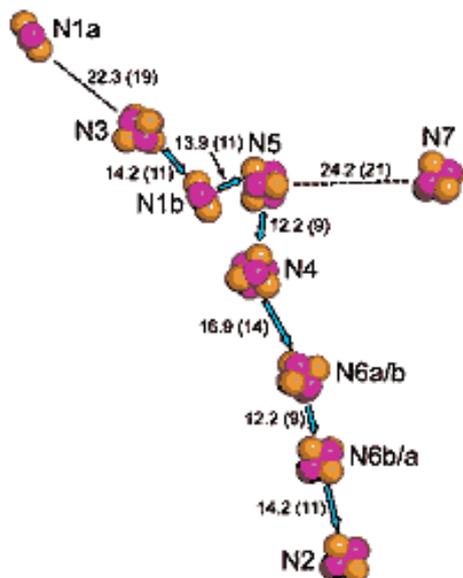


Figura 9. Modello di P. Hinchliffe e L.A Sazanov sulla sequenza dei cluster Fe-S

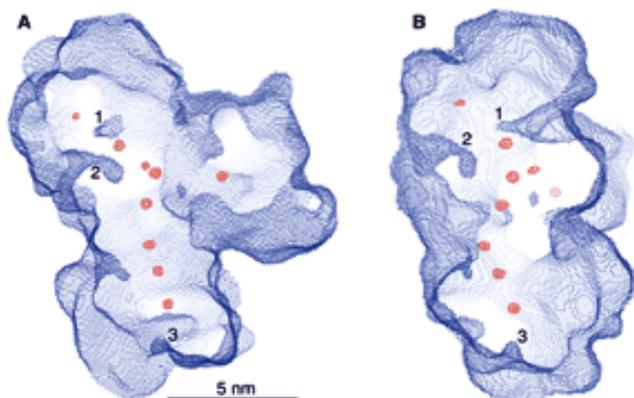


Figura 10. La densità dei cluster Fe-S (punti rossi) mostrata sotto la superficie del braccio periferico del Complesso I di *T.thermophilus*.

- n.1:** Possibile accesso per il NADH ad una distanza di 10Å dal primo cluster.
- n.2:** Secondo possibile accesso per il NADH ad una distanza di circa 15Å dal primocluster
- n.3:** Corto canale che potrebbe permettere al Q<sub>10</sub> di avvicinarsi all' N2.

Il NADH riduce l'FMN, localizzato tra l'N1a e l'N3, che ha un potenziale medio a pH 7,5 ( $E_{m,7.5}$ ) di -336 mV. Un elettrone per volta passa poi ai cluster N3, N1b, N5, N4 che sono detti isopotenziali, per il loro comune  $E_{m,7.5}$  di circa -250mV, l'ultimo è l'N2 con l'  $E_{m,7.0}$  più alto, variabile tra -50 e -150 mV (-100 in media), che affacciandosi all'interno della tasca, riduce l'Ubichinone ed ha, molto probabilmente, anche un ruolo fondamentale nella traslocazione protonica. IN *T. thermophilus* c'è un'ulteriore cluster: l'N7, al quale, essendo molto poco diffuso in natura, viene attribuito una funzione puramente strutturale, che è quella di stabilizzare la subunità batterica Nqo3 (75kDa, nel bovino) alla quale appartiene.

Il cluster N1a non è ridotto dal NADH a causa della distanza elevata dall'N3. Ha un  $E_{m, 7.0}$  che è il più basso: -370 mV in media, e per questo si suppone possa interagire con l'FMN, a impedire l'eccessiva riduzione della catena dei cluster, attraverso la ridistribuzione elettronica, prevenendo così la formazione di specie reattive dell'Ossigeno in un quantitativo superiore a quello fisiologico. Questo meccanismo è uguale a quello suggerito per l'eme b all'interno del Complesso succinato deidrogenasi.

### La pompa protonica

Il Complesso I da solo genera il 40% del gradiente protonico transmembrana della catena respiratoria <sup>[48]</sup> ma il meccanismo, altamente efficiente, di accoppiamento tra il trasferimento elettronico e il pompaggio dei protoni, rimane un mistero. Due modelli sono stati proposti da tempo: Diretto <sup>[49]</sup>, indiretto <sup>[43]</sup> e un altro più recente, il terzo, che presuppone una combinazione dei primi due <sup>[50]</sup>.

Il **meccanismo diretto** implica che il percorso elettronico sia guidato da intermedi chimici con il chinone come trasportatore mobile di protoni e elettroni; è una modificazione del Q-cycle.

Il **meccanismo indiretto** prevede che nel dominio idrofobico esistano due canali attraverso cui i protoni passano in seguito a cambiamenti conformazionali indotti dalla riduzione del dominio idrofilico. Ciò sembra essere confermato dal fatto che le sub-unità formanti i presunti canali (Nqo 12,13 e 14; secondo la classificazione di *Thermus*) siano altamente conservate e, nel batterio, costituiscono l'antiporto  $Na^+/H^+$ .

La **terza ipotesi**, la più recente, è ipotizzata dall'idea che le due teorie appena descritte non siano mutualmente esclusive e che una combinazione dei due sia possibile.

In condizioni riducenti avvengono piccoli ma significativi e concertati spostamenti di diverse  $\alpha$  eliche (H1/H2, residui 18-35, 143-160 di Nqo6 e 4HB, residui 110-297 di Nqo4) nell'interfaccia con il dominio di membrana che possono essere sufficienti a guidare la traslocazione protonica inducendo,

a loro volta, cambiamenti conformazionali nel dominio di membrana dove le 3 subunità Nqo farebbero passare altrettanti protoni; il quarto potrebbe essere traslocato vicino al sito del chinone con la partecipazione del cluster N2 e il tandem delle cisteine. Il modello è descritto in fig.11.

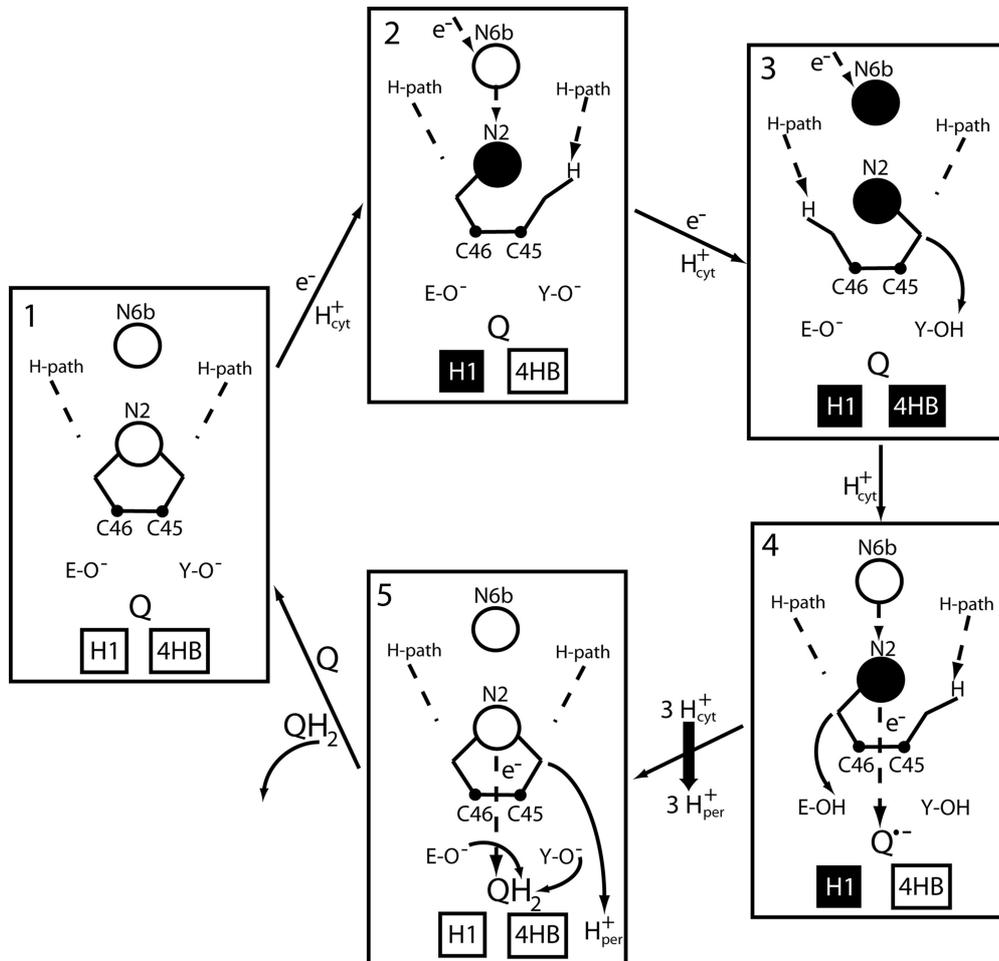


Figura 11. Il cluster ferro-zolfo N2 e N6b sono illustrati in forma ossidata o ridotta da, rispettivamente, cerchi vuoti e pieni. C45 e C46 sono le cisteine mentre Q/QH<sub>2</sub> indicano chinone/chinolo. Uno dei possibili accettori del protone di C45 è la Tyr<sup>87</sup> (Y-O) mentre di C46 è il Glu<sup>49</sup> (E-O). “H-path” indica uno dei possibili sentieri da cui i protoni passano dal dominio di matrice al tandem di cisteine e può essere lo stesso per entrambe oppure no. H1 e 4HB indicano le eliche di Nqo6 e le quattro eliche di Nqo4, rispettivamente, e sono colorate di nero quando sono spostate relativamente allo stato ossidato.

**Fase 1:** Stato ossidato, arriva il primo elettrone dal NADH fino al cluster N2 a ciò consegue (**fase 2**) la dissociazione e protonazione della cisteina 45. In questa fase il passaggio del protone, che va sulla cisteina, è permesso dal concertato spostamento di alcune  $\alpha$  eliche (H1). Nella **fase 3** si ha la riduzione del cluster N6b da parte del secondo elettrone, la riassociazione/deprotonazione della cisteina 45, il cui protone si lega a residui amminoacidici vicini (tyr<sup>87</sup> o Arg<sup>83</sup> (Y-OH)), e la dissociazione/protonazione della cisteina 46 il cui protone arriva tramite lo spostamento di altre  $\alpha$  eliche (4HB). Poi, **fase 4**, N2 dona il primo elettrone al CoQ<sub>10</sub>, riducendolo a radicale semichinonico, per poi tornare in forma ridotta ricevendo il secondo elettrone da N6b. Lo stato ossido riduttivo è molto simile a alla fase 2 perciò, si riassocia la cisteina 46, che dona il suo protone al Glu<sup>49</sup> (E-OH), mentre la cisteina 45 si dissocia e riprotona ancora. Nella **fase 5**, N2 riduce il semichinone il quale, a sua volta, riceve i protoni da Y-OH e E-OH: Otteniamo il CoQH<sub>2</sub>. Essendo N2 ossidato, le  $\alpha$  eliche H1 tornano nella posizione di partenza a cui fanno seguito modificazioni conformazionali delle tre sub-unità Nqo con traslocazione di altrettanti protoni. Il quarto protone deriva dalla riassociazione della cisteina 45 al cluster N2 e trasloca tramite un canale probabilmente localizzato in una adiacente subunità idrofobica. Ora il chinolo si stacca dal sito di legame mentre un chinone, invece, si lega; e il ciclo ricomincia.

## [2.2] Complesso II

Il Complesso II, detto anche **succinato-CoQ reduttasi** o **succinato deidrogenasi**, è il più semplice di tutti i complessi respiratori <sup>[25]</sup>.

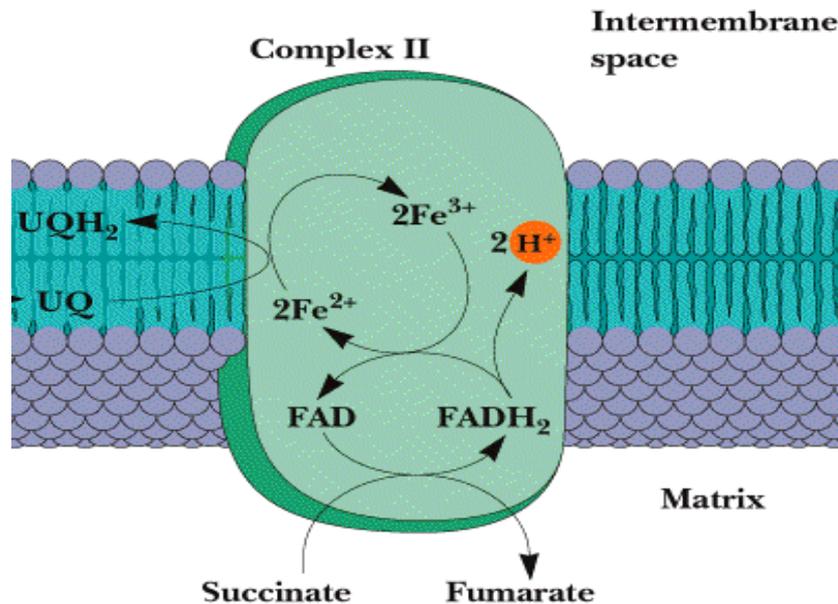


Figura 12. Struttura del Complesso II

E' un enzima del ciclo di Krebs, il solo ad essere legato alla membrana mitocondriale interna, e partecipa alla catena di trasporto elettronico trasferendo elettroni dal succinato al pool dell'Ubichinone. La struttura è finora disponibile in maniera indiretta e incompleta dalla struttura della fumarato reduttasi di *E.coli* <sup>[51]</sup>. L'enzima è assemblato a formare una struttura simile a un fungo con peso molecolare totale di 360 kDa ed è costituito da 4 polipeptidi diversi: due maggiori ( A e B ), idrosolubili, e due minori ( C e D), strettamente ancorati ai lipidi di membrana. Tutte le subunità sono codificate dal DNA nucleare.

I gruppi prostetici, coinvolti nel trasporto degli elettroni all'interno del Complesso II, sono: tre centri Fe-S (uno 4Fe-4S, uno 3Fe-3S, e uno 2Fe-S) legati esclusivamente alla subunità B, un FAD (Flavin-adenina-dinucleotide) legato covalentemente alla subunità A ed un citocromo b attraverso cui il Complesso II è ancorato alla membrana interna mitocondriale.

Il sito di legame dell'ubichinone si trova nelle subunità minori. Si pensa che gli elettroni passino dal succinato, ossidato a fumarato, al FAD e poi, attraverso i centri Fe-S, all'ubichinone <sup>[52]</sup>. Non è chiaro quale sia la funzione del gruppo eme b, potrebbe essere un meccanismo di “valvola di scarico” per gli elettroni <sup>[53]</sup> e, quindi, un'eventuale prevenzione della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il Complesso II non è implicato nella traslocazione di protoni, dalla matrice allo spazio intermembrana e non partecipa alla formazione del gradiente transmembrana <sup>[54]</sup>, di conseguenza si forma meno ATP dall'ossidazione del FADH<sub>2</sub> che dall'ossidazione del NADH. Il Complesso II è tuttavia necessario per consentire ad elettroni con potenziale relativamente elevato di entrare nella catena di trasporto 'saltando' il Complesso I.

### [2.3] Coenzima Q

Il **Coenzima Q** o **Ubichinone** è un para benzochinone sostituito in posizione 6 con una catena laterale formata da un numero variabile di unità isoprenoidi (n = 1-15 ; per lo più 10 nelle cellule di mammifero, CoQ<sub>10</sub> ). Il CoQ mitocondriale si trova inserito nel doppio strato lipidico della membrana interna dove diffonde liberamente tra i complessi respiratori. La molecola presenta tre diversi stati di ossidazione: completamente ossidato, **Q**, parzialmente ridotto, la forma semichinonica **QH<sup>•</sup>** o **Q<sup>-</sup>**, e completamente ridotto, **QH<sub>2</sub>**.

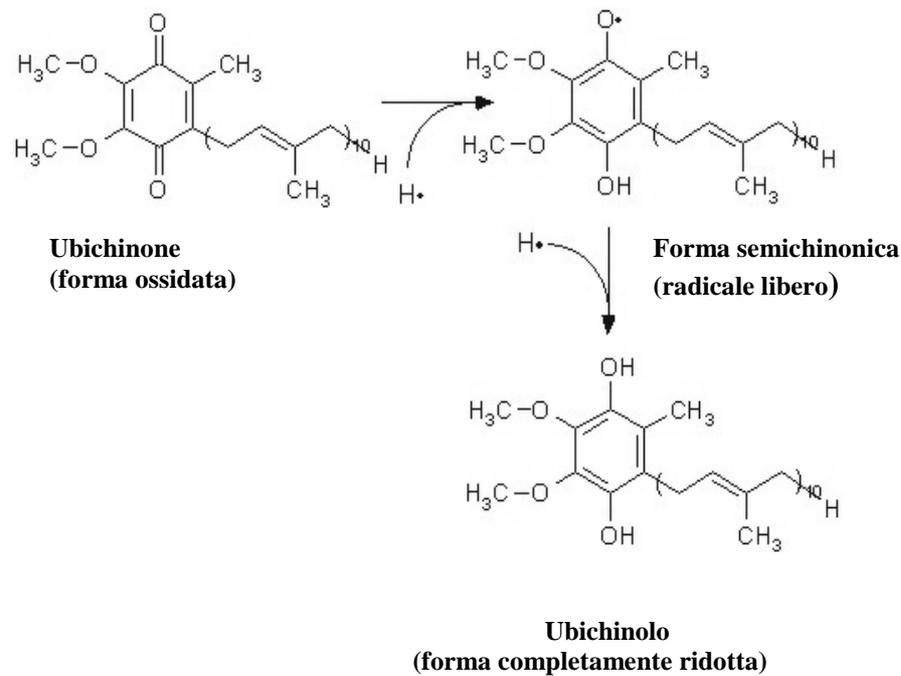


Figura 13. Riduzione dell'Ubichinone

L'Ubichinone viene ridotto a radicale libero semichinonico ( $Q^\bullet$ ) quando riceve un solo elettrone e la riduzione di quest'ultimo con un secondo elettrone porta alla formazione dell'ubichinolo (o idrochinone,  $QH_2$ ).

Il CoQ rappresenta un punto di raccolta per gli elettroni provenienti da diversi complessi deidrogenasici (non solo i Complessi I e II, ma anche la glicerolo 3-fosfato deidrogenasi e l'ETF-deidrogenasi), che poi trasferisce al Complesso III. Ciascuno di questi enzimi contribuisce alla formazione di un maggior numero di molecole di ubichinolo, che viene riossidato dal successivo componente della catena respiratoria mitocondriale. L'Ubichinone riossidato poi, diffondendo, viene nuovamente ridotto da parte dei Complessi I e II.

Il CoQ mitocondriale, nella forma ossidata, svolge un ruolo fondamentale per il funzionamento delle "uncoupling protein" (UCPs), una classe di proteine di trasporto situate nella membrana interna mitocondriale. La loro attivazione determina la dissipazione del gradiente elettrochimico esistente tra i due lati della membrana interna mitocondriale e il disaccoppiamento della respirazione cellulare dalla sintesi di ATP. A questi fenomeni si associano un aumento della respirazione cellulare e una produzione di calore <sup>[55]</sup>.

L'aumento della respirazione determina un aumento della funzionalità dei Complessi della catena respiratoria mitocondriale, pertanto, la possibilità che

singoli elettroni riescano a sfuggire da tali complessi per ridurre univalentemente l'ossigeno molecolare a superossido è molto bassa.

Le UCPs sono quindi in grado di modulare la generazione di ROS; recenti studi sull'espressione genica delle UCPs <sup>[56]</sup> hanno infatti dimostrato che in seguito ad una condizione di stress ossidativo, viene aumentata la sintesi di tali proteine tramite processi di regolazione genica. Il CoQ è anche un componente di catene redox extra mitocondriali <sup>[57]</sup>. La sua funzione, ancora non completamente chiarita, sembra quella di coadiuvare i mitocondri nella rimozione dell'eccesso di potere riducente che potrebbe formarsi durante la glicolisi, causando un'eccessiva produzione di lattato, nociva per la cellula.

In aggiunta a queste funzioni, si riconosce al CoQ un ruolo importante come antiossidante cellulare; inoltre, è stato studiato anche un effetto del CoQ sul poro di transizione di permeabilità, canale localizzato nella membrana mitocondriale interna, implicato nel processo di morte cellulare. Sembra che alcuni omologhi del CoQ possano influenzare l'apertura di questo canale controllando la cascata di eventi tipica dell'apoptosi <sup>[58]</sup>.

## [2.4] Complesso III

Il Complesso III, detto anche **Ubichinolo-citocromo c ossidoreduttasi** o **Complesso del citocromo bc<sub>1</sub>**, è il meglio compreso dei complessi respiratori. Trasferisce gli elettroni dall'Ubichinolo al Citocromo c e accoppia questa reazione redox con la traslocazione di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana mediante un meccanismo noto come "Q cycle".

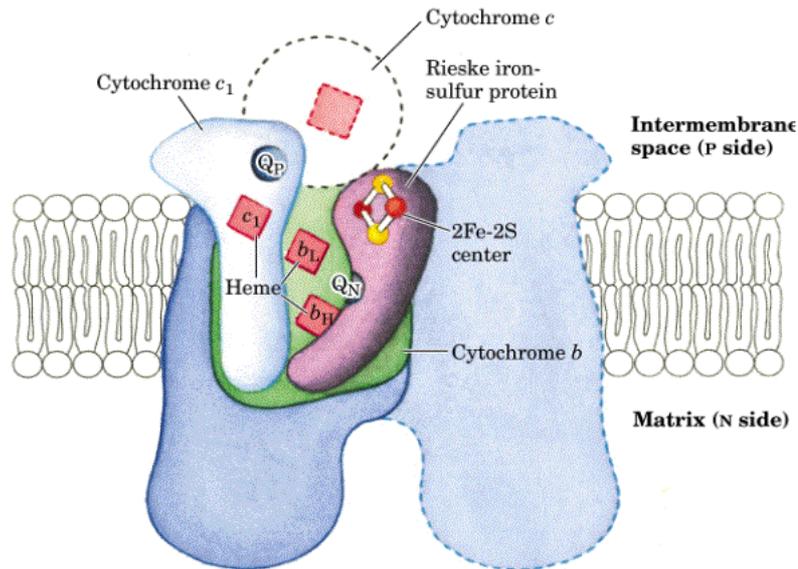


Figura 14. Struttura del Complesso III

La struttura dell'enzima bovino, dedotta dalla cristallografia ai raggi X, appare come un dimero simmetrico, stabile, con una parte più larga immersa nella matrice e una parte più stretta esterna. Ciascun monomero ha una massa molecolare di ~240 kDa e contiene undici subunità le cui sequenze amminoacidiche sono conosciute [34].

Tre subunità (III, IV e V) costituiscono il core funzionale dell'enzima e contengono i centri redox: il **Citocromo b**, codificato dal DNA mitocondriale, che possiede due gruppi eme ( $b_{562}$ ,  $b_{566}$ ), il **Citocromo c<sub>1</sub>** ancorato alla membrana, ed un centro **Fe-S** ad alto potenziale, chiamato centro di Rieske.

Le altre otto subunità sono per la maggior parte proteine che circondano il nucleo metallo-proteico; due di esse però si estendono nella matrice, sono simili e sono dette proteine "Core 1 e 2", la loro presenza contribuisce alla maggiore stabilità ed alla elevata attività del Complesso III bovino rispetto al

complesso batterico in cui tali subunità sono assenti.

Il modello proposto da Mitchell <sup>[59]</sup>, noto come “**Q cycle**”, è quello più adatto a spiegare il meccanismo della traslocazione protonica nel Complesso III.

Questo modello ipotizza l'esistenza di due distinti siti di legame per l'Ubichinolo e per l'ubichinone: il sito di legame dell'Ubichinolo, chiamato “**centro out**” o  $Q_o$  o P (positivo), è situato tra il centro di Rieske ed il Citocromo b, ed è rivolto verso il lato citoplasmatico della membrana interna; il sito di legame per l'ubichinone, chiamato “**centro in**” o  $Q_i$  o N (negativo), è invece situato sul versante opposto della membrana. Il ciclo <sup>[60]</sup>, che può essere diviso in due stadi, ha inizio quando l'ubichinolo legandosi al sito  $Q_P$  cede un primo elettrone al centro Fe-S, che attraverso il citocromo  $c_1$  giunge al citocromo c ottenendo così un semichinone  $UQ^-$  legato al sito  $Q_P$  con contemporanea emissioni di due protoni nello spazio intermembrana. Il semichinone  $UQ^-$  cede il secondo elettrone che è riciclato all'interno dell'enzima stesso: passa dal gruppo eme a basso potenziale ( $b_L$ ) a quello ad alto potenziale ( $b_H$ ), e da qui, a una molecola di ubichinone legato al sito  $Q_N$  che si riduce a ubisemichinone completando così la prima metà del ciclo.

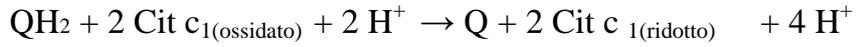
L'altra metà del ciclo è simile alla prima, con una seconda molecola di  $UQH_2$  che viene ossidata sul sito  $Q_P$ . Il primo elettrone arriva al citocromo c con il passaggio di altri due protoni nel lato positivo, il secondo arriva al sito  $Q_N$  dove, trovando l'Ubisemichinone precedentemente ottenuto, lo riduce completamente ad ubichinolo, il quale assume due protoni dalla matrice liberandosi dal sito  $Q_N$ , tornando così a fare parte del pool e completando il ciclo <sup>[59]</sup>.

In pratica il citocromo b crea un sistema ciclico che permette ad un trasportatore di due elettroni (l'Ubichinone) di interagire con un solo elettrone per volta (centro Fe-S). Per completare il ciclo, l'Ubichinone acquista dalla matrice due protoni, riducendosi ad ubichinolo ( $QH_2$ ).

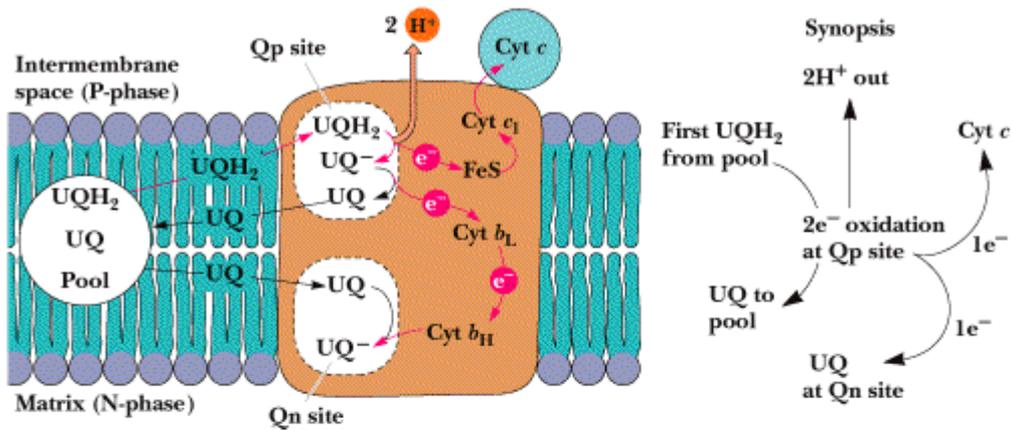
In totale si ha il trasferimento di due elettroni dall'ubichinolo al citocromo c e la traslocazione di quattro protoni dal lato di matrice della membrana a quello citoplasmatico.

Due protoni in entrata contro quattro protoni in uscita, fa sì che il Complesso III si comporti apparentemente come una pompa protonica sbilanciata.

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



(a) First half of Q cycle



(b) Second half of Q cycle

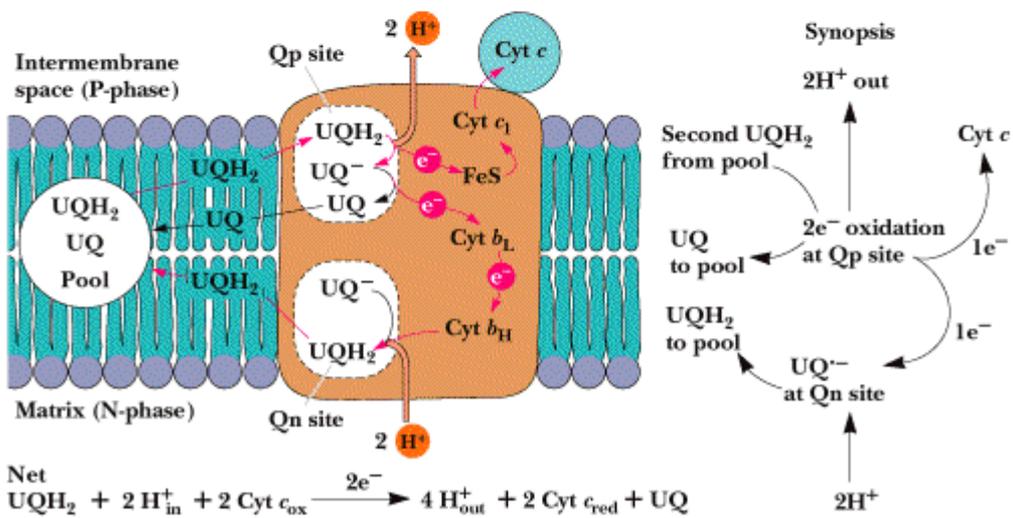


Figura 15. Q-cycle

## [2.5] Il Citocromo c

Il Citocromo è una piccola proteina solubile con una massa molecolare di circa 13000 u, composta da circa 100 residui, altamente conservati, nella maggior parte delle specie studiate. E' localizzata in prossimità del lato esterno della membrana interna mitocondriale, alla quale si lega mediante interazioni elettrostatiche, e rappresenta il secondo trasportatore mobile di elettroni della catena respiratoria tra il Complesso III e il Complesso IV.

Come gruppo prostetico contiene una ferro-protoporfirina IX legata covalentemente alla proteina mediante legami tioetere con due molecole di cisteina <sup>[61]</sup>.

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

### **Aspetti evuzionistici e struttura**

Poiché il citocromo c è così antico, conservato, piccolo e facilmente purificabile, è stato oggetto di grande attenzione da parte degli studiosi delle proteine interessati ai processi evolutivi. Infatti, dagli anni '60 ad oggi, ne è stata determinata la sequenza da oltre 100 specie diverse. Questo ha permesso di capire che, le differenze esistenti tra le sequenze amminoacidiche nelle diverse specie, sono tanto più spiccate quanto maggiore è la distanza lungo la scala evolutiva. Ciò ha consentito di tracciare complessi alberi genealogici ottenendo risultati perfettamente sovrapponibili a quelli della sistematica classica che ricorrere ai dati morfologici.

I citocromi c dell'uomo e del cavallo differiscono in 12 dei 104 amminoacidi; 19 separano vertebrati superiori, mammiferi, uccelli e rettili dai pesci e, invece, in media, 27 amminoacidi separano i vertebrati dagli insetti. La massima differenza tra due citocromi si riscontra tra l'uomo e la muffa del

pane (*Neurospora*); essi differiscono per più del 40% nella sequenza amminoacidica.

```
      10          20          30          40          50          60
MGDVEKGGKKI FVQKCAQCHT VEKGGKHKKTG PNLHGLFGRK TGQAPGFYTYT DANKNKGITW

      70          80          90          100
KEETLMEYLE NPKKYIPGTK MIFAGIKKKT EREDLIAYLK KATNE
```

*Fig. 16* Sequenza amminoacidica del citocromo c di cavallo.

Nonostante queste differenze, la funzione della proteina è mantenuta da alcuni tratti che non cambiano mai: Trentacinque dei 104 amminoacidi del citocromo c sono assolutamente invariati in tutte le specie conosciute; tra questi ricordiamo gli amminoacidi 14,17,18 e una lunga sequenza dal residuo 70 all'80. Inoltre, 23 siti possono essere occupati solo da due amminoacidi simili tra loro come l'arginina e la lisina (sostituzioni conservative). Soltanto in alcuni siti della catena possono essere tollerati dei cambiamenti radicali: il residuo 89 può essere acido, basico, polare non ionizzato, leggermente idrofobo come l'alanina o sprovvisto di catena laterale come la glicina. L'unico tipo di catena laterale che sembra non poter occupare questa posizione è un grosso gruppo idrofobico. Tali regioni variabili sono tuttavia rare e per questo il citocromo c nel suo complesso è, dal punto di vista evolutivo, altamente conservato.

Il fatto che esistano residui rimasti invariati ad oltre un miliardo di anni di evoluzione significa che sono assolutamente cruciali per la funzionalità della proteina rispetto a quelli altamente variabili. L'importanza di questi residui va ricercata nella struttura tridimensionale ottenuta, negli anni '60, dal citocromo c di cuore di cavallo con la cristallografia a raggi x.

In questo modo si è capito che la proteina forma una tasca nel quale si inserisce il gruppo eme e da cui rimane, nello stato ossidato, in parte esposto lateralmente per ricevere l'elettrone. La tasca è una parte critica per il corretto funzionamento del citocromo c e per questo i suoi due lati sono formati da amminoacidi invariati come la sequenza 70-80 per un lato. Inoltre, il gruppo eme è mantenuto in situ, da un lato, dalle cisteine 14,17 e dall'istidina 18 e,

dall'altro lato, dalla metionina 80. Interessante è la fenilalanina in posizione 82 che, nello stato ossidato, espone la sua catena idrofoba nell'ambiente acquoso pagando un alto prezzo in termini energetici. Però, il riarrangiamento amminoacidico che segue la riduzione dell'eme porta la fenilalanina a chiudere la tasca proteggendo l'eme dall'esterno fino al legame con la citocromo ossidasi. Evidentemente la chiusura della fessura dell'eme è importante per la sua attività biologica spiegando la conservazione assoluta di questo amminoacido durante tutta l'evoluzione. Data la natura di trasportatore mobile di elettroni, il citocromo c è destinato a prendere contatto con la sua reductasi e ossidasi attraverso interazioni di natura elettrostatica, per questo, anche la superficie è altamente conservata. Delle catene laterali esposte all'esterno, ricordiamo quelle positive delle lisine di cui il citocromo c è ricco; sono 19, e la maggior parte contribuisce alla carica di superficie. Tra queste, alcune, "ancorano" la piccola proteina alla citocromo ossidasi, che a sua volta espone catene laterali cariche negativamente. L'importanza delle lisine in questo legame è evidente dal fatto che ingombrando la numero 14 viene dimezzata la reattività del citocromo c con la sua ossidasi.

## [2.6] Complesso IV

Il Complesso IV, detto anche **Citocromo c ossidasi (COX)**, è l'enzima terminale della catena respiratoria. Catalizza il trasferimento di elettroni dal Citocromo c all'ossigeno molecolare che viene ridotto a due molecole di acqua.

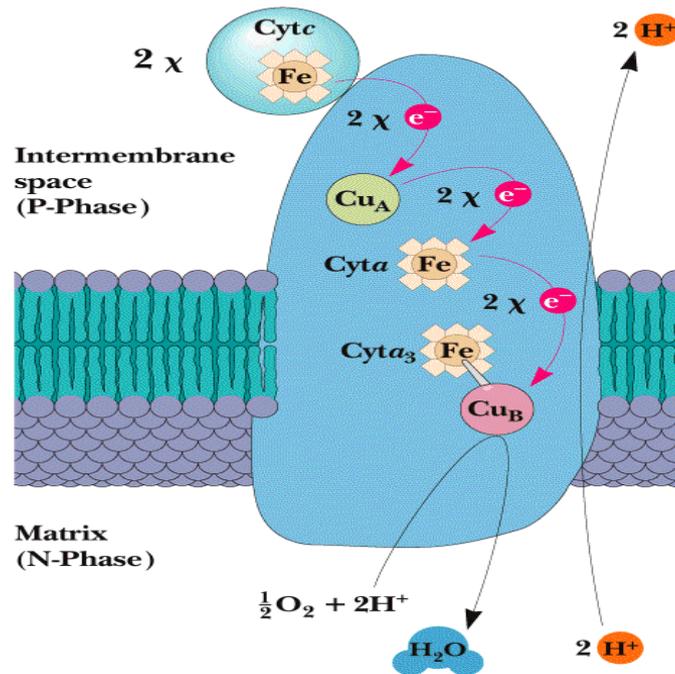


Figura 17. Struttura del Complesso IV

Il Complesso IV rappresenta il terzo sito di conservazione dell'energia nei mitocondri.

Il trasferimento degli elettroni avviene secondo la reazione:

$4 \text{ citocromo c (Fe}^{2+}) + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ citocromo c (Fe}^{3+}) + 2 \text{H}_2\text{O}$  ed è accoppiato alla traslocazione di 4 protoni (un protone per ogni elettrone trasferito) dalla matrice allo spazio intermembrana.

La struttura dell'enzima bovino è stata dedotta mediante cristallografia; esso appare come un dimero a forma di Y, in cui ciascun monomero è costituito da 13 subunità e ha una massa molecolare di circa 200 kDa <sup>[62,63]</sup>.

Le tre subunità maggiori (I, II, e III) sono codificate dal DNA mitocondriale e costituiscono il core catalitico dell'enzima, circondato dalle rimanenti dieci subunità, più piccole e codificate dal DNA nucleare <sup>[34]</sup>.

La subunità I ha una forma cilindrica e consiste di 12 eliche transmembrana che concorrono a formare canali per il passaggio dei protoni; contiene un gruppo eme *a* e il centro binucleare eme  $a_3$ -Cu<sub>B</sub>, responsabile della riduzione dell'ossigeno ad acqua.

Le subunità II e III si trovano su lati opposti rispetto alla subunità I e non entrano in contatto tra di loro. La subunità II ha un dominio transmembrana sul lato esterno della membrana interna; contiene il sito che lega il citocromo *c* e il centro Cu<sub>A</sub> che contiene una coppia di atomi di rame a valenza mista complessati con i gruppi tiolici (-SH) di 2 residui di Cisteina e di due Istidine ed è simile a un centro ferro-zolfo del tipo Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> [64]. Il centro Cu<sub>A</sub> rappresenta l'accettore primario di elettroni dal citocromo *c* ridotto. La subunità III consiste di 7 eliche transmembrana senza significativi domini extramembrana; presenta alcuni fosfolipidi legati e non contiene centri reattivi, il suo ruolo funzionale non è stato ancora definito. Oltre ai citocromi e agli atomi di Rame nel Complesso IV sono presenti un catione Magnesio, che coordina e stabilizza i centri redox, e un atomo di Zinco con funzione strutturale. Le dieci subunità codificate dal DNA nucleare svolgono solo un ruolo di regolazione e assemblaggio nel processo di trasferimento elettronico. Il Complesso IV riceve in successione 4 elettroni da 4 molecole di citocromo *c* ridotto [60].

Gli elettroni sono trasferiti dal citocromo *c* al sito Cu<sub>A</sub> dal quale sono successivamente ceduti, dopo un salto di 15Å, al Fe emico del citocromo *a* e da qui al sito Cu<sub>B</sub> (O→H).

Un secondo elettrone riduce poi il ferro ferrico (H→R) del citocromo  $a_3$  a ferro ferroso, portando al legame dell' O<sub>2</sub> (R→A) attraverso un ponte perossido tra l'eme  $a_3$  ed il sito Cu<sub>B</sub>. Questo equivale al trasferimento di due elettroni dal centro binucleare all' O<sub>2</sub> legato.

Il passo seguente comporta l'acquisizione di due protoni e di un terzo elettrone (P→F), con conseguente rottura del legame perossido e generazione del ferrile (Fe<sup>4+</sup>) nel gruppo eme.

Il quarto elettrone facilita la formazione di idrossido ferrico in questo centro (F→O') dove la liberazione di due molecole di acqua consegue

all'acquisizione, da parte dei gruppi idrossilici coordinati, di due protoni dalla matrice ( $O' \rightarrow O$ ). Il meccanismo con il quale i protoni sono trasferiti al lato citosolico della membrana è sconosciuto ma si sa che ciò avviene attraverso due canali idrofilici (D e K) contenuti nella subunità I. Complessivamente per ogni quattro protoni prelevati dalla matrice, due giungono nello spazio intermembrana.

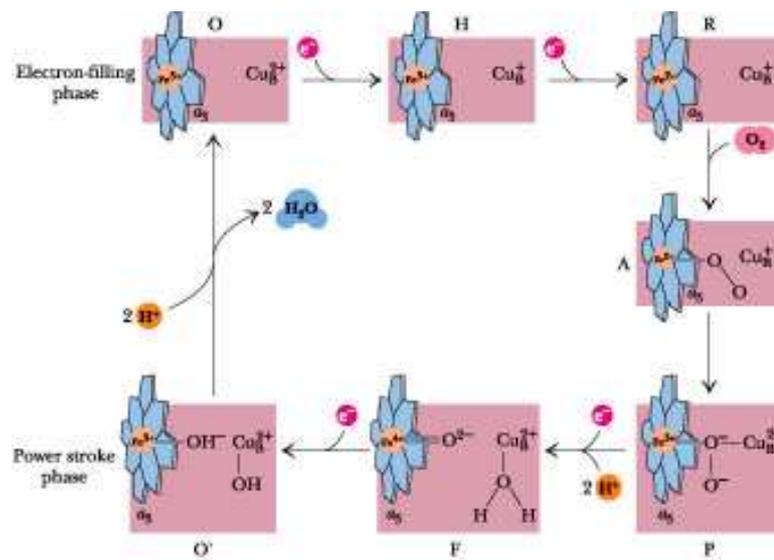


Figura 18. Il percorso elettronico nel Complesso IV fino all'acceptore finale: l' Ossigeno molecolare.

## [2.7] ATP sintasi

L' **ATP sintasi mitocondriale** o **F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasi** o **Complesso V** , è un enzima funzionalmente reversibile, può sintetizzare l'ATP usando la forza motrice protonica attraverso la membrana e può idrolizzare l'ATP per pompare protoni contro un gradiente elettrochimico.

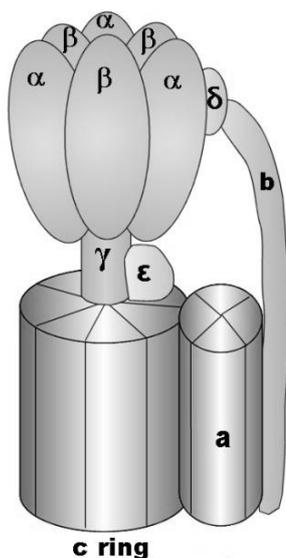


Figura 19. Struttura dell'ATP sintasi

L'enzima bovino sembra contenere 16 differenti proteine <sup>[65]</sup>, ha una massa molecolare totale di ~ 500 kDa e rappresenta il 15% delle proteine totali della membrana interna mitocondriale. È formato da due componenti principali, chiamati **F<sub>0</sub>** e **F<sub>1</sub>**, dove il pedice *o* sta ad indicare che quella è la porzione dell'ATP sintasi che conferisce al complesso la sensibilità all'Oligomicina, in inibitore di questo enzima e quindi della fosforilazione ossidativa.

Il componente **F<sub>1</sub>** fu per la prima volta estratto dalla membrana mitocondriale interna da Efraim Racker nel 1960 <sup>[60]</sup>.

Questo frammento isolato non può sintetizzare ATP partendo dai precursori ADP e Pi; catalizza la reazione inversa, cioè l'idrolisi di ATP, e per questa ragione l'enzima fu allora chiamato **F<sub>1</sub>ATPasi**. Ciò nonostante questa subunità, insieme con la **F<sub>0</sub>**, è fondamentale per la sintesi dell'ATP.

Il componente  $F_1$ , contiene diversi siti di legame per l'ATP e l'ADP, compreso il sito catalitico in cui avviene la sintesi dell'ATP. È un complesso proteico periferico che resta unito alla membrana mediante interazioni con il componente  $F_0$ , complesso proteico integrale di membrana, che costituisce un canale trans-membrana attraverso il quale possono passare i protoni. Fotografie al microscopio elettronico del Complesso V hanno mostrato che la struttura ha la forma di un pomello dove  $F_1$  è la testa globulare e  $F_0$  è la base, normalmente inserita nella membrana. Anche il complesso completo, come la parte  $F_1$  isolata, può idrolizzare l'ATP, ma la sua funzione biologica resta quella di produrre ATP a partire da ADP e  $P_i$ .

Ogni complesso  $F_1$  è formato da 5 subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) con una composizione del tipo  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  <sup>[34]</sup> dove le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  sono omologhe, entrambe legano i nucleotidi, ma solo quelle  $\beta$  hanno attività catalitica <sup>[66]</sup>, ciascuna delle quali possiede un sito attivo per la sintesi di ATP. Le subunità  $\delta$  e  $\epsilon$  regolano l'interazione tra  $F_1$  e  $F_0$  e, infine la subunità  $\gamma$  ha la funzione di regolare il flusso di protoni verso  $F_1$ . L'unità  $F_0$ , formante il canale, è composta di tre subunità idrofobiche indicate come **a**, **b**, e **c**, con una stechiometria apparente di  $a_1b_2c_{10-12}$ . Le due subunità **b** formano un peduncolo esterno, che insieme alle subunità  $\epsilon$  e  $\gamma$  (peduncolo interno), contribuiscono a tenere legate le due unità  $F_1$  e  $F_0$ .

La sintesi di ATP, che si alterna sui siti catalitici delle subunità  $\beta$  di  $F_1$ , è possibile grazie al flusso dei protoni attraverso  $F_0$  verso la matrice mitocondriale. Poiché il flusso protonico avviene secondo gradiente (di pH e di potenziale di membrana), durante il passaggio dei protoni si libera una quantità di energia sufficiente per consentire la sintesi di ATP.

Sembra che la funzione della pompa protonica non sia tanto quella di formare ATP, quanto piuttosto quella di favorire il distacco dall'enzima una volta formatosi. Il legame dell'ADP e del  $P_i$  ad un sito dell'ATP sintasi, sembra promuovere il distacco dell'ATP, cioè l'enzima ha attività catalitiche cooperative. Il meccanismo è determinato dalla rotazione di una porzione del complesso contenente  $F_1$  rispetto ad una parte fissa detta "statore".

La catalisi rotazionale implica che la porzione immersa nella membrana debba contenere una struttura che ruoti in risposta alla forza motrice protonica. Secondo questo meccanismo di catalisi alcuni componenti dell'enzima devono formare uno "statore" che interagisce con il "rotore" della membrana. E' stato proposto un modello in cui l'oligomero della subunità c forma il rotore con le subunità  $\gamma$  ed  $\epsilon$ , e le subunità a e b con la subunità  $\delta$  formano il braccio dello statore. Il flusso protonico attraverso l'interfaccia tra la subunità a e l'oligomero delle subunità c causerebbe una torsione quando lo statore e il rotore si muovono in direzioni opposte.

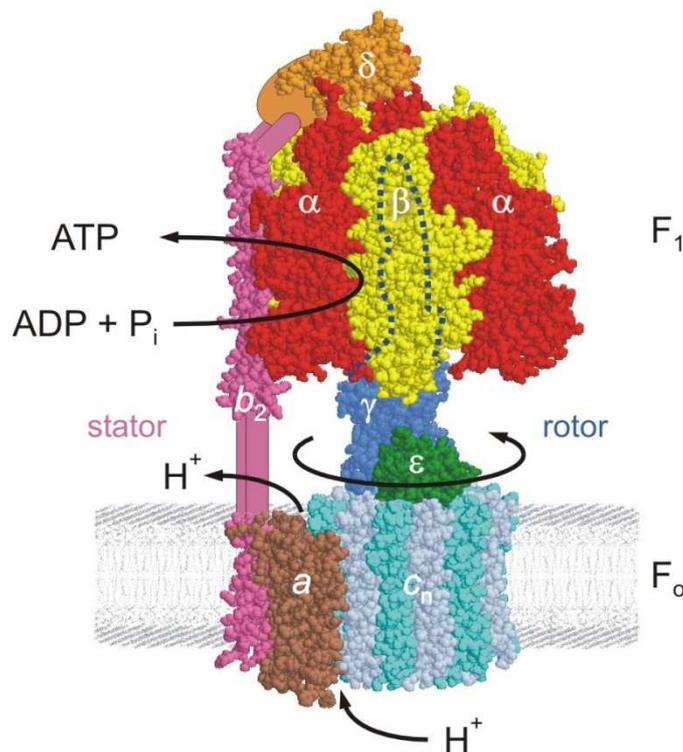


Figura 20. Meccanismo dell'ATP sintasi

## 3. GLI INIBITORI DELLA CATENA RESPIRATORIA

### [3.1] Inibitori del complesso I

#### (NADH- CoQ10 ossidoreduttasi)

Più di 60 differenti famiglie di composti (di origine naturale e sintetica) sono conosciuti come inibitori del Complesso I. Alcuni inibitori agiscono a livello del braccio periferico del complesso, impedendo il trasferimento degli elettroni dal NADH al gruppo flavinico ed alle proteine Fe-S; altri inibitori agiscono a livello dei siti di legame dei chinoni, o in prossimità di questi, impedendo la riduzione dell'ubichinone ad Ubichinolo. Questo secondo gruppo di inibitori è rappresentato da molecole lipofile, strutturalmente molto simili al chinone endogeno, caratterizzate da una testa ciclica, corrispondente all'anello chinonico, e da una coda idrofobica <sup>[67]</sup>. Sembra che il sito di legame degli inibitori lipofili sia un ampio dominio idrofobico, in grado di ospitare molecole diverse, i cui siti di legame delle varie molecole possono essere in parte sovrapposti. Questo dominio dovrebbe in parte coincidere con i siti di legame dell'ubichinone; è infatti stato ipotizzato che almeno uno di questi sia una tasca ampia e poco specifica in cui il chinone, debolmente legato, può scambiarsi facilmente con quello mobile di membrana <sup>[68]</sup>.

#### Rotenone

Il Rotenone è un insetticida naturale ed è il più potente rappresentante dei rotenoidi, una famiglia di isoflavonoidi estratti dalle piante del tipo *Leguminose* <sup>[67]</sup>, ed è diventato l'inibitore tipo del Complesso I.

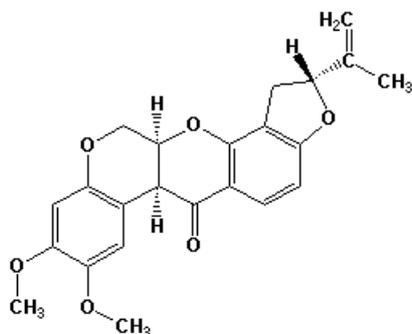


Figura 21. Struttura del Rotenone: La molecola è caratterizzata da cinque anelli e possiede tre centri chinali.

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 poiché gli isomeri del Rotenone con i suddetti anelli quasi complanari si comportano come inibitori meno potenti. L'anello che lega i due gruppi metossi è correlato con la testa chinonica dell'ubichinone e i due gruppi metossi sono fondamentali per un'efficace interazione con il sito di legame. Il resto della molecola potrebbe corrispondere funzionalmente alla coda isoprenoide dell'ubichinone <sup>[69]</sup>. Il Rotenone esplica la sua azione interrompendo il trasferimento degli elettroni dal centro N2 all'Ubichinone ed il suo sito di legame, posto all'interfaccia dei due domini dell'enzima, consiste di due regioni: una esterna, affacciata sul mezzo acquoso, ed una meno accessibile intimamente inserita nel dominio di membrana dell'enzima. Le subunità proteiche che compongono quest'ultima regione sono ND1, ND4 e la PSST, mentre la regione più idrofila è molto probabilmente costituita dalla subunità 49 kDa <sup>[33]</sup>.

Affinché l'inibizione del Complesso I da parte del Rotenone sia completa, è necessaria l'interazione con entrambe le regioni sopracitate. Poiché da diversi studi è emerso che il Rotenone non è competitivo nei confronti degli analoghi del CoQ, alcuni autori ritengono che esso non interagisca con il sito di legame dell'Ubichinone, ma con uno situato nelle immediate vicinanze <sup>[42]</sup>.

### **Piericidina A**

Le piericidine sono antibiotici prodotti da alcune specie di *Streptomyces*. Questi composti hanno contribuito ampiamente alla definizione delle caratteristiche funzionali del Complesso I.

Studi con la Piericidina A hanno indicato che il Complesso I ha due siti di legame per l'inibizione nella membrana <sup>[70,71]</sup>, uno dei quali inibisce il trasporto inverso di elettroni energia dipendente (RET) molto più del trasporto diretto (NADH-Q). 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 <sup>[72]</sup>. Secondo questo modello la subunità

ND1/49kDa associata al dominio periferico del Complesso I contribuisce all'organizzazione del sito di legame Piericidina/Rotenone.

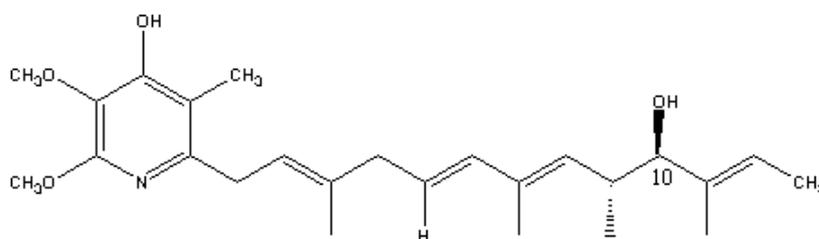


Figura 22. Struttura della Piericidina A

## Il Coenzima Q<sub>2</sub>

E' un chinone a corta catena che funge da substrato ed inibitore dell'attività NADH-Q redattasi. Questo chinone accetta elettroni dal Complesso I ed ha attività inibitoria una volta ridotto <sup>[73]</sup>.

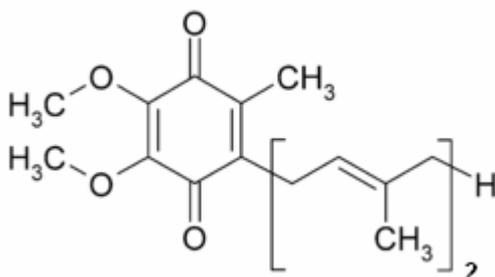


Figura 23. Struttura del Q<sub>2</sub>

## Rolliniastatina-1 e Rolliniastatina-2

Le acetogenine sono prodotti naturali derivanti da piante *Annonaceae* inizialmente caratterizzate come agenti antitumorali e successivamente riconosciute come inibitori del Complesso I. Le acetogenine con due tetraidrofurani adiacenti sono appunto la rolliniastatina-1 e rolliniastatina-2. Sembra che agiscano come il Rotenone e ciò dipende in particolare dalla presenza di un gruppo idrossilico vicino al lattone sostituito <sup>[74]</sup>.

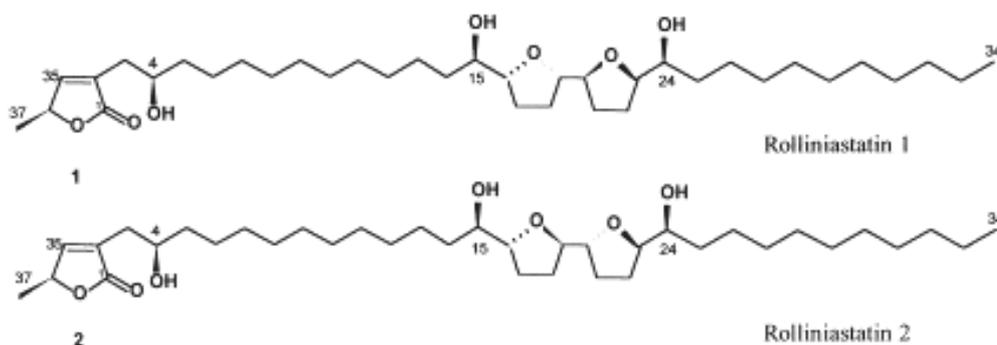


Figura 24. Struttura di Rolliniastatina-1 e Rolliniastatina-2

## Capsaicina

La Capsaicina è il membro più rappresentativo dei *Vanilloidi*, è una sostanza pungente estratta dai peperoni piccanti [75].

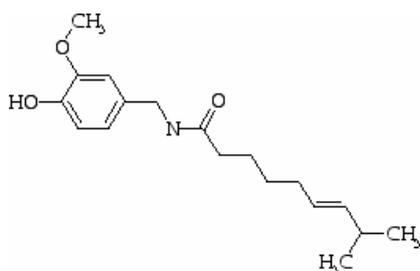


Figura 25. Struttura della Capsaicina

I Vanilloidi sono principalmente usati per studi neurobiologici [67] e hanno applicazioni come analgesici topici e additivi alimentari. La tossicità mitocondriale della Capsaicina deriva dalla sua inibizione del Complesso I [76]. La capsaicina agisce come inibitore competitivo dell'ubichinone con NADH-ubichinone ossidoreduttasi isolata da cuore bovino [76].

Usando particelle submitocondriali preparate da cuore bovino e da diverse membrane batteriche, Yagi [77] ha dimostrato che l'inibizione dell'attività della NADH-ubichinone ossidoreduttasi di molti organismi per mezzo della Capsaicina è ben correlata con la presenza di un sito di accoppiamento energetico in questo segmento della catena respiratoria.

Una serie di analoghi della Capsaicina sono stati sintetizzati per esaminare i fattori strutturali richiesti per l'inibizione e per provare le proprietà strutturali del sito catalitico dell'Ubichinone delle varie NADH-ubichinone reduttasi.

### [3.2] Inibitori del Complesso III (Ubichinolo-Citocromo c ossido riduttasi)

Secondo il modello proposto da Mitchell (“Q-cycle”), il Complesso III contiene due siti distinti di legame, uno per l’ubichinolo (il centro “out”) e l’altro per l’Ubichinone (il centro “in”), situati su due lati opposti della membrana interna mitocondriale. L’esistenza di questi due siti distinti del CoQ è dimostrata anche dall’esistenza di inibitori che, legandosi a tali centri, inibiscono esclusivamente l’enzima a livello del centro “out” o del centro “in”.

Un esempio di inibitori del centro “out” sono Mixotiazolo e Mucidina che agiscono sia bloccando la riduzione dell’eme  $b_{566}$  che quella della Fe-S proteina.

#### **Mixotiazolo** (anche inibitore del Complesso I)

Il Mixotiazolo è un antibiotico prodotto da *Myxococcus fulvus*, in grado di legarsi 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. Ciò comporta il blocco della riduzione del citocromo  $c_1$  [67,74]. A concentrazioni elevate il Mixotiazolo può inibire anche l’attività del Complesso I.

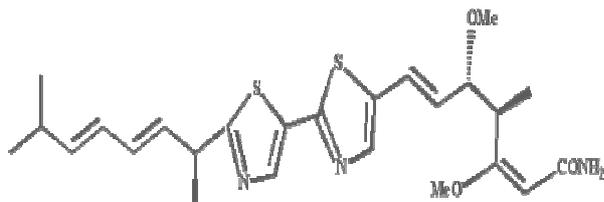


Figura 26. Struttura del Mixotiazolo

**Mucidina** (anche inibitore del Complesso I)

E' un antibiotico fungicida isolato dalle colture di *Oudemansiella mucida*, che si lega allo stesso sito del Mixotiazolo ed agisce in maniera analoga ad esso.

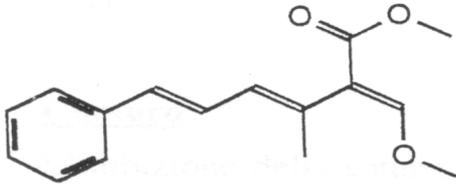


Figura 27. Struttura della Mucidina

**Stigmatellina** (anche inibitore del Complesso I)

E' un antibiotico isolato dal ceppo *Stigmatella*, che si lega allo stesso sito del Mixotiazolo. A basse concentrazioni è un inibitore del centro out del Complesso III. Ad alte concentrazioni è un inibitore dell'attività NADH-Q<sub>1</sub> del Complesso I.

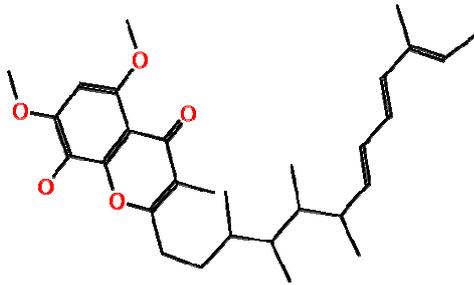


Figura 28. Struttura della Stigmatellina

Gli inibitori del centro “out” impediscono il trasferimento di un elettrone dal chinolo alla proteina Fe-S ed evitano la produzione di specie reattive dell'Ossigeno da parte dell'enzima.

Gli inibitori del centro “in” sono una classe più eterogenea di composti che non mostrano analogie strutturali tra loro, come invece spesso accade per quelli del centro “out”. Si tratta essenzialmente di sostanze che bloccano il trasferimento degli elettroni dall'eme b<sub>562</sub> al chinone e viceversa come è stato osservato utilizzando Antimicina A, l'inibitore più noto appartenente a questa categoria. Il blocco dell'enzima con Antimicina A comporta un notevole

aumento della produzione di specie reattive dell'Ossigeno.

### Antimicina A

L'Antimicina A è un antibiotico prodotto da varie specie di *Streptomyces*; la sua struttura chimica consiste in un acido 3-formamido salicilico legato , tramite un gruppo amidico ad un anello dilattonico sostituito.

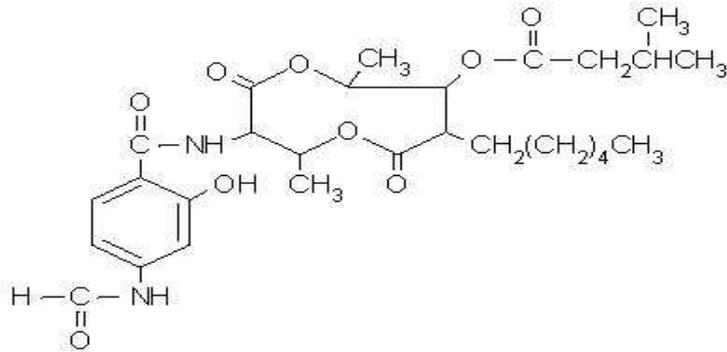


Figura 29. Struttura dell' Antimicina A

Dall'analisi della mappa a densità elettronica del Complesso III inibito con Antimicina, si nota che essa agisce legandosi ad un sito prossimale al gruppo eme b<sub>562</sub>. Inoltre, la densità elettronica è talmente estesa da dimostrare che l'Antimicina è in grado di spiazzare le molecole di Ubichinone legate al complesso nello stato naturale. Quest'ultimo aspetto suggerisce che il sito di legame dell'Antimicina si sovrappone in parte al sito Q<sub>i</sub> di riduzione dell'Ubichinone [74].

### [3.3] Inibitori del Complesso IV (citocromo-ossidasi)

Il Complesso IV della catena respiratoria può essere inibito impiegando composti quale il Cianuro di Potassio (KCN), il Monossido di Carbonio (CO) e l'azide ( $N_3$ ) e l'ossido nitrico.

L'inibizione del Complesso IV ottenuta mediante il monossido di Carbonio e l'azide è incompleta.

L'**azide** è cineticamente competitiva con il substrato della citocromo ossidasi nelle cellule di lievito e nei mitocondri, ma è non competitiva nella Citocromo ossidasi isolata.

Il **Cianuro** è un inibitore non competitivo in grado di determinare una inibizione totale. Il tempo richiesto per ottenere l'inibizione dell'attività enzimatica dipende dallo stato redox del gruppo eme  $a_3$  ed è stato dimostrato a tale proposito 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 <sup>[78]</sup>.

Il **monossido di Carbonio** inibisce la Citocromo ossidasi mediante un processo relativamente semplice che prevede il legame di tale ligando al Ferro del gruppo eme  $a_3$  esplicando in questo modo il suo effetto inibitorio.

#### L'ossido nitrico (NO)

Ad alte concentrazioni e con un tempi lunghi di esposizione è anche un inibitore del Complesso I e l'effetto inibitorio è prolungato nel tempo. Invece, la Citocromo ossidasi è inibita molto rapidamente e reversibilmente da basse concentrazioni di NO anche in presenza di un'alta tensione di ossigeno. L'inibizione si esplica attraverso due vie alternative che portano alla formazione di nitrosil- o nitriti-eme  $a_3$  derivati <sup>[79]</sup>.

## 4. ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DELLA CATENA RESPIRATORIA MITOCONDRIALE

### [4.1] Introduzione

Numerosi approcci sperimentali, migliorati nel corso degli anni, hanno fornito informazioni sulla struttura dei complessi proteici transmembrana che formano la catena respiratoria mitocondriale <sup>[34]</sup>. Tutti i complessi della catena respiratoria mostrano omologie con quelli batterici, per cui vengono usati per estrapolare una grande quantità di informazioni utilizzate per la comprensione degli enzimi mitocondriali <sup>[80,54]</sup>. Di tutti i complessi respiratori è stato possibile ottenere il cristallo eccezion fatta per il complesso I di cui esiste il cristallo del solo dominio di matrice. Ciò nonostante, alla luce delle conoscenze apprese la catena respiratoria cela in sé ancora tanti segreti, tra i quali la sua organizzazione strutturale.

Sono 2 i modelli più accreditati a descrivere l'arrangiamento dei complessi nella membrana e che, nel corso dei decenni, si sono alternati (Figura 30) :

- “**Il modello delle collisioni casuali**” (*random collision model*) <sup>[1]</sup>, è stato tradizionalmente il più accettato: I complessi sono indicati come elementi individuali ed il flusso elettronico è garantito da collisioni diffusionali e casuali tra i complessi e le piccole molecole diffusibili (Coenzima Q e citocromo c).
- “**il modello dei supercomplessi**” in cui l'unione dei diversi complessi, in stechiometrie fisse, forma aggregati stabili che si comportano funzionalmente come un unico enzima <sup>[2]</sup>.

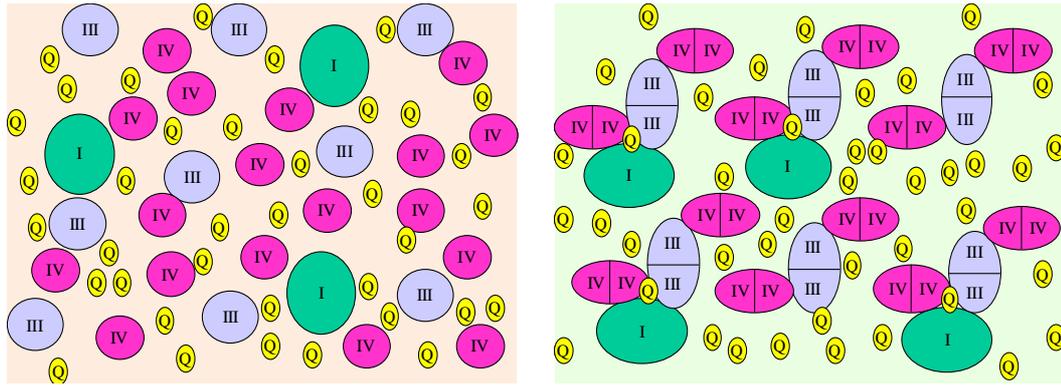


Figura 30. I due modelli più accreditati a rappresentare l'organizzazione strutturale dei componenti della catena respiratoria nella membrana mitocondriale interna. A sinistra il modello delle collisioni casuali proposto da Hackenbrock; a destra il modello degli aggregati enzimatici (Supercomplessi) proposto da Schagger.

## [4.2] Il modello delle collisioni casuali

Il modello a stato-solido fu il primo a essere proposto già negli anni '40 da Chance <sup>[81]</sup> ma fu sostituito da quello delle collisioni casuali dopo aver scoperto che gli enzimi respiratori mitocondriali sono funzionalmente attivi anche quando sono isolati in complessi individuali. Questo modello venne proposto da Green e collaboratori e prevede i complessi enzimatici individuali dissolti nel bilayer lipidico della membrana interna mitocondriale <sup>[82]</sup>. Fu Hackenbrock poi a portare avanti tale ipotesi formulando, in modo sistematico, il suo *random collision model*, che reca importanti informazioni strutturali e funzionali per spiegare il trasferimento elettronico mitocondriale. Hackenbrock rifiuta la concezione di uno stato-solido, secondo il quale esistono degli aggregati permanenti o transienti dei componenti redox nella membrana interna e sostiene che la membrana interna mitocondriale sia uno stato-fluido dove tutte le proteine di membrana, quindi anche i grossi complessi multiproteici che catalizzano il trasporto di elettroni e la sintesi di ATP, sono elementi individuali in grado di muoversi liberamente e in maniera indipendente per diffusione laterale. I complessi non si trovano, quindi,

ancorati rigidamente tra loro all'interno della membrana, ma bensì distribuiti casualmente nel piano rappresentato dal doppio strato lipidico <sup>[1]</sup>.

Secondo Hackenbrock il trasferimento elettronico nelle membrane mitocondriali dipende proprio dalla collisione diffusionale random tra i complessi enzimatici, indipendentemente immersi nel bilayer <sup>[83]</sup>, e le piccole molecole diffusibili (coenzima Q e citocromo c). E' stato da lui proposto, in aggiunta, che la tappa limitante di tale processo cinetico di trasporto elettronico sia la diffusione del CoQ.

Il modello delle collisioni casuali, formulato da Hackenbrock, è fondato su 5 postulati :

- 1) Tutti i componenti redox *diffondono lateralmente in modo indipendente*;
- 2) il citocromo c diffonde principalmente in *tre-dimensioni*;
- 3) il trasporto di elettroni è un processo cinetico *diffusion-coupled* (accoppiato alla diffusione);
- 4) il trasporto elettronico è un processo *diffusionale multicollisionale*;
- 5) la velocità di diffusione dei componenti redox ha un'influenza diretta su tutto il processo completo di trasporto elettronico e può essere la *tappa limitante*, come in un *processo controllato dalla diffusione*.

### **[4.3] Il modello dei supercomplessi**

Sebbene il random collision model sia stato per lungo tempo ritenuto il più adatto a descrivere l'organizzazione strutturale della catena respiratoria, quello in stato-solido non venne mai del tutto abbandonato e, oggi, ha riacquisito notevole considerazione <sup>[28]</sup>. Nel 1994 venne riproposto da H. Shägger in seguito ai suoi studi condotti con una metodica da lui stesso messa a punto: la gel elettroforesi in condizione nativa (BN-PAGE) <sup>[84]</sup>. Già Hatefi, con i suoi studi pionieristici, isolò dai mitocondri preparazioni non risolte di complessi I-III e di complessi II-III dopo frazionamento con desossicolato e ammonio acetato o desossicolato e ammonio solfato. Il complesso ricostruito I-III era stabile e mostrava la stessa attività NADH-citocromo c reduttasi di quella misurata direttamente sui mitocondri isolati <sup>[85, 86, 87]</sup>.

Nel 1982 Yu e collaboratori isolarono il Complesso II associato al III che poteva poi essere risolto nella succinato CoQ reductasi e nella ubiquinolo citocromo c reductasi [88].

Nel 1987, Ozawa [89] ha evidenziato il concetto di “Sopramolecola”, un assemblaggio di complessi respiratori e di ATPasi a formare un aggregato con un peso molecolare di  $1.8-1.9 \times 10^6$ .

Importantissimi sono le svariate indicazioni funzionali dell'esistenza di interazioni permanenti tra i complessi ottenuti con analisi cinetiche [90].

Si è anche chiarita l'organizzazione della catena respiratoria di certi batteri. Supercomplessi stabili formati dai complessi I, III e IV sono stati studiati ed isolati da *Paracoccus denitrificans* [91], dal batterio termofilo *Bacillus PS3* [92], dall'archeon termoacidofilico *Sulfolobus* [93] e da *Corynebacterium glutamicum* [94].

Inoltre Schagger, tramite le sue indagini elettroforetiche, ha prodotto nuove evidenze di assemblaggi stechiometrici preferenziali di singoli complessi in mitocondri di lievito e di mammifero, suggerendo un nuovo modello di catena respiratoria (*il respirosoma*) basato sul “channeling” diretto tra i complessi e non sulla collisione random [4,95].

Il pool del CoQ dissolto nel doppio strato lipidico, in questo caso potrebbe essere considerato in contatto con il CoQ trattenuto dentro i supercomplessi, per cui la sua funzione potrebbe essere non di più che quella di un serbatoio di molecole [90]. Secondo Schagger l'aggregazione dei complessi respiratori della catena di trasporto può servire a migliorare il flusso elettronico per effetto del direzionamento del substrato (“substrate channeling”) per cui un intermedio si trova ad essere indirizzato ad uno specifico enzima piuttosto che disperdersi lasciando che altri enzimi competano per esso [2].

Studi effettuati sulla catena respiratoria del *Saccharomyces cerevisiae* cresciuto in terreno di coltura con glucosio o lattato o lattato e galattosio, dopo solubilizzazione con digitonina ed elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizione nativa (BLUE native PAGE), hanno mostrato l'esistenza di aggregazioni tra il complesso III ed il IV in cui i singoli componenti si assemblano in stechiometrie diverse a seconda delle differenti condizioni di

crescita del lievito. Le diverse forme di aggregazione III-IV sembrano formarsi quindi in base alla domanda energetica cellulare. In tutte le condizioni di crescita analizzate, impiegando terreni di coltura diversi, il complesso IV di *S. cerevisiae* non viene mai rilevato nella forma libera, sembra quindi che tutto questo complesso sia legato al complesso III [90].

Questi risultati sono in accordo con quelli di altri autori che hanno dimostrato, con tecniche di titolazioni enzimatiche, che in questo lievito non è verificata la funzione pool del citocromo c ad indicare la presenza di meccanismi di channeling diretto del substrato [96].

Il supercomplesso formato dal complesso III e IV è stabilizzato dalla cardiolipina, un glicerofosfolipide carico negativamente che intergisce specificatamente con molte proteine della membrana interna mitocondriale. Comunque la formazione del supercomplesso si osserva anche in mutanti di *S. cerevisiae* che non contengono questo lipide [97].

Aggregazioni di singoli enzimi in supercomplessi, simili a quelle osservate in lievito, sono state riscontrate da Schagger, anche in mitocondri di cuore di bovino: le associazioni dei complessi I-III rivelano la presenza di un supercomplesso  $I_1-III_2$  che è stato trovato a sua volta aggregato in due supercomplessi più grandi ( $I_1-III_2-IV_2$  e  $I_1-III_2-IV_4$ ) comprendenti numeri di copie diverse di complesso IV. E' stato sviluppato così un modello per il respirosoma di mammifero (Figura 31). Questo modello suggerisce che il respirosoma è costituito da due supercomplessi in un rapporto di 2:1; vale a dire un grande supercomplesso che comprende il complesso I (monomero), il complesso III (dimero), e il complesso IV in due/quattro copie, ed un supercomplesso più piccolo contenente il complesso III e IV ma mancante del complesso I. La percentuale di complesso I trovata nella forma libera è solo del 14-16%, per cui tutto il complesso I si trova legato al complesso III [2].

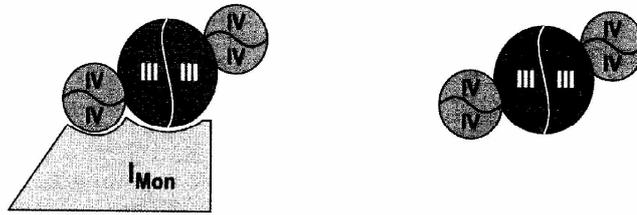


Figura 31. Modello di organizzazione strutturale dei due Supercomplessi ( $I_1$ -III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub> e III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>) in mitocondri di cuore bovino

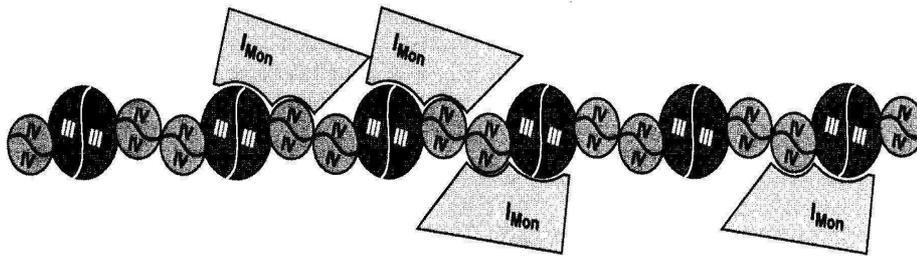


Figura 32. Modello di associazione lineare dei Supercomplessi della catena respiratoria mitocondriale a formare il respirosoma.

Eva Schäfer attraverso la microscopia elettronica ha recentemente proposto un modello 3D del respirosoma di cuore bovino (fig.33). Indica che i siti di legame tra i complessi respiratori contengono, anche solo in parte, quelli dei trasportatori mobili di elettroni con possibili implicazioni per il flusso elettronico a favore del channelig<sup>[98]</sup>

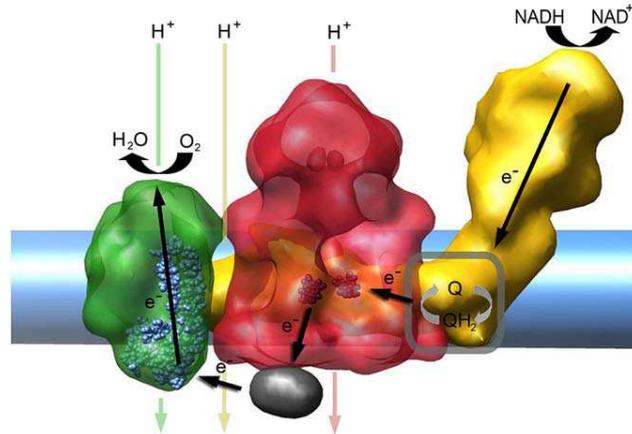


Figura 33. Ipotetico flusso elettronico nel supercomplesso I-III<sub>2</sub>-IV: Il Complesso I è mostrato in giallo, il Complesso III in rosso, il Complesso IV in verde e la membrana in blu. Il NADH è ossidato a NAD<sup>+</sup> e gli elettroni arrivano, tramite il Complesso I, all'Ubichinone. Il suo sito di legame, posto tra il Complesso I e Complesso III<sub>2</sub>, è disegnato in grigio. Dal Complesso III<sub>2</sub>, un elettrone alla volta riduce il citocromo c (in nero) localizzato in prossimità del Complesso IV che una volta, in possesso di 4 elettroni, riduce l'ossigeno molecolare in acqua.

Studi effettuati da Braun e collaboratori sulla catena respiratoria di *Arabidopsis*, patata (*Solanum tuberosum*), fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) ed orzo (*Hordeum vulgare*), dopo solubilizzazione con digitonina ed elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizione nativa, hanno mostrato che anche in mitocondri vegetali esistono associazioni preferenziali tra i complessi respiratori. In mitocondri di questo tipo, una percentuale di complesso I tra il 50% ed il 90% partecipa alla formazione del supercomplesso I-III<sub>2</sub> [99].

Questo aggregato di 1.500 kDa è stato purificato da Braun e collaboratori tramite ultracentrifugazione su gradiente di saccarosio di mitocondri di *Arabidopsis* solubilizzati con digitonina ed il supercomplesso è stato caratterizzato attraverso la microscopia elettronica e l'analisi della singola particella con una risoluzione di 18 Å (Figura 26) [100].

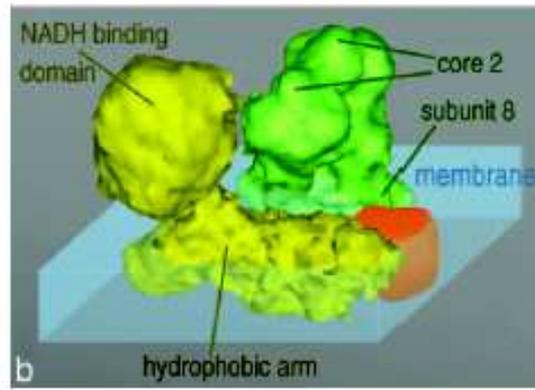


Figura 34. Modello della struttura del supercomplesso I-III<sub>2</sub> in Arabidopsis; il complesso I (in giallo) forma con il dimero di complesso III (in verde) un angolo di 45° fuori dal piano della membrana

L'analisi del supercomplesso rileva una associazione laterale tra il dimero di complesso III e l'estremità del braccio di membrana del complesso I con la formazione, al di fuori dal piano della membrana, di un angolo di 45° tra i due complessi <sup>[100]</sup>. Poiché probabilmente il dominio del complesso I che lega l'ubichinone si localizza sul braccio di membrana immediatamente vicino all'inizio del braccio periferico <sup>[101]</sup>, il dominio di legame dell'ubichinone non sarebbe racchiuso nella zona di interazione tra il complesso I e il dimero del III. Secondo questi autori risulterebbe perciò improbabile un ipotetico meccanismo di channeling dell'ubichinone all'interno del supercomplesso; comunque anche in assenza di un channeling diretto dell'ubichinone la velocità di trasferimento elettronico all'interno del supercomplesso dovrebbe risultare più alta che in una situazione di libera diffusione del chinone tra i singoli componenti enzimatici <sup>[100]</sup>.

Recentemente studiando i mitocondri di patata si è osservato che alcuni supercomplessi appaiono essere associati in strutture ancora più grandi chiamate megacomplexi. Tali strutture sono impossibili da osservare dopo trattamento con digitonina e ha richiesto l'utilizzo della microscopia a singola particella, che permette di osservare la presenza di lunghe code di supercomplessi legati tra di loro e composte dalla ripetizione dell'unità I(2)+III(2)+IV(2)<sup>[102]</sup>.

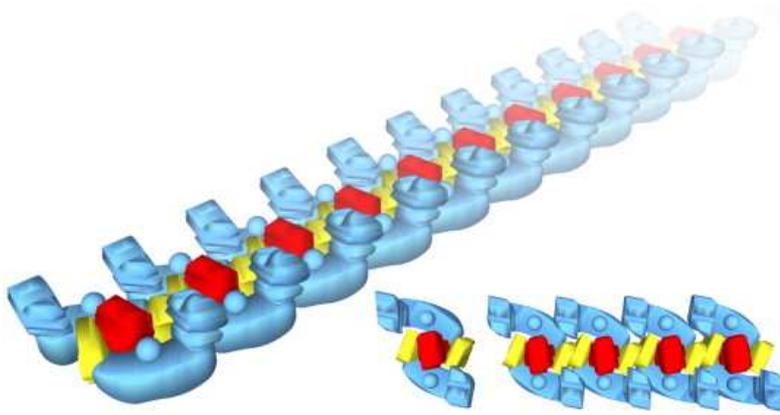


Figura 35. Modello schematico dell'organizzazione dei complessi della catena respiratoria in megacomplexi. L'unità base consiste di due copie di Complesso I (blue), una copia di Complesso III2 (rosso), e due copie di Complesso IV (giallo). L'associazione di unità base in stringhe è mediato dal Complesso IV, il quale interagisce con un altro complesso IV su un'altra unità base.

Dati recenti evidenziano come la funzionalità della catena respiratoria potrebbe essere garantita dalla formazione dei supercomplessi.

Delezioni del complesso III e IV di *P. denitrificans* causano una diminuzione del contenuto di Complesso I in membrana: se il Complesso I non si assembla correttamente nel supercomplesso viene alterato quindi l'assemblaggio e la stabilità dell'enzima stesso <sup>[103]</sup>.

Analoghi risultati si sono ottenuti in mitocondri di muscolo scheletrico umano: la formazione del respirosoma nella catena respiratoria umana, secondo Schagger, è essenziale per la funzionalità del complesso I. Questo dato potrebbe avere implicazioni notevoli nella diagnosi di disordini mitocondriali: un difetto genetico del complesso III potrebbe impedire la formazione del respirosoma e portare a un conseguente difetto del complesso I <sup>[104]</sup>.

Al contrario sia in *P. denitrificans* sia in *S. cerevisiae* sia in mitocondri umani la mancata formazione del supercomplesso non altera l'assemblaggio e la stabilità dei complesso III e IV <sup>[91]</sup>.

Questi dati sembrano in accordo anche con un recente studio condotto nel fungo *Podospora anserina* che mette in relazione la funzionalità respiratoria e

la formazione di aggregati stabili tra i complessi enzimatici con la longevità [105]

## **5. IL CONTROLLO DI FLUSSO**

### **[5.1] Metabolismo e controllo**

Lo studio del controllo dei processi metabolici interessa i fattori che possono alterare la velocità del metabolismo. La velocità di un processo può essere alterata da un cambiamento dell'attività di un particolare enzima, per cui lo studio del controllo di un percorso metabolico implica l'identificazione di una tappa limitante (“*rate-limiting step*”) intesa come lo stadio più lento dell'intero processo.

Il concetto di tappa limitante non è tuttavia completamente corretto ed è un'espressione da usare con cautela poiché svariati enzimi possono condizionare il flusso che si compie in un processo; ragione per cui, abitualmente, gli studi sul controllo metabolico rimandano a concetti sviluppati dall'Analisi del Controllo Metabolico [106].

Le fondamentali differenze tra la concezione di *rate-limiting step* e l'Analisi del Controllo Metabolico vengono sottolineate dalla questione che concerne la relazione esistente tra il flusso in un processo metabolico e l'attività di un particolare enzima. Nel primo caso ci si propone di capire “se” l'enzima considerato sia il responsabile nel limitare la velocità, supponendo che la risposta possa essere positiva oppure negativa; nel secondo caso ci si domanda, invece, “come” oppure “quanto” il flusso metabolico vari se l'attività dell'enzima cambia, a tal proposito la risposta concede tutte le possibilità comprese tra “per nulla” e “completamente”.

L'Analisi del Controllo Metabolico prevede la definizione di un coefficiente che quantifica questa variabilità di risposta, vale a dire il *coefficiente del controllo di flusso*.

## [5.2] Il coefficiente del controllo di flusso

Il concetto di coefficiente di controllo di flusso è stato introdotto da Kacser e Burns <sup>[107]</sup> e da Heinrich e Rapoport allo scopo di quantificare l'entità del controllo esercitato da uno stadio (enzima) in un processo metabolico sul flusso che avviene attraverso tale processo.

Il coefficiente di flusso metabolico è la misura relativa di quanto una perturbazione sia in grado di intaccare un sistema variabile, per cui è definito come la variazione frazionaria del flusso totale lungo il processo metabolico in esame, causata dalla variazione frazionaria a carico dell'enzima considerato, ed in termini matematici viene calcolato usando la seguente equazione:

$$C_i = (dJ/J / de/e)_{\text{stato stazionario}}$$

dove  $J$  è lo stato stazionario del flusso attraverso l'intero processo ed  $e$  è la concentrazione dell'enzima.

Un'importante proprietà del sistema in stato stazionario è stata scoperta mediante il controllo di flusso metabolico: è stato dimostrato infatti che, se la concentrazione iniziale del substrato e quella finale del prodotto della via metabolica sono mantenute costanti, la somma dei coefficienti di controllo di flusso di tutti quei componenti che partecipano al processo metabolico è uguale all'unità (teorema della somma):

$$\sum c_i = 1$$

Secondo quanto enunciato dal teorema della somma gli enzimi di un processo metabolico possono concorrere in percentuali distinte al controllo di flusso metabolico.

Per definizione tutti i coefficienti devono avere un valore o di zero oppure positivo, ed il massimo valore che un coefficiente può assumere è 1; in tal caso tutti gli altri enzimi devono avere necessariamente un coefficiente pari a zero. Un enzima che abbia coefficiente pari ad 1 viene definito limitante,

poiché ad un controllo di flusso pari ad 1 corrisponde una relazione proporzionale tra l'attività dell' enzima e il processo del flusso.

Esistono fondamentalmente due approcci sperimentali utilizzati in letteratura per il calcolo del coefficiente di controllo di flusso.

Un primo metodo si basa sulla determinazione dei coefficiente di elasticità mentre il secondo metodo si basa sul perturbare la singola parte della via metabolica che si sta analizzando; queste variazioni si possono ottenere in diversi modi [[dbk.ch.umist.ac.uk/mca\\_home.htm](http://dbk.ch.umist.ac.uk/mca_home.htm)]:

- a) alterando la concentrazione dell'enzima considerato attraverso metodi genetici
- b) titolando la tappa metabolica con un inibitore specifico
- c) titolando l'enzima purificato

Utilizzando questo metodo è importante verificare che la perturbazione utilizzata colpisca solamente una tappa del percorso e la stessa procedura deve essere ripetuta per tutte le tappe. Nel primo caso (a), perché il calcolo del  $C_i$  sia corretto e specifico per la tappa analizzata, la relazione tra la percentuale della reazione enzimatica deve cambiare linearmente con la concentrazione dell'enzima e non essere, per esempio, influenzata da fattori esterni. Negli altri due casi (b,c) gli inibitori utilizzati devono essere specifici per la tappa considerata e non devono perturbare la via in altri punti; la perturbazione inoltre dovrebbe causare variazioni dell'attività massima al di sotto del 10%.

L'approccio sperimentale utilizzato in questa ricerca ha valutato l'effetto di cambiamenti infinitesimali della attività enzimatica dei singoli complessi della catena respiratoria mediante l'impiego di inibitori specifici. Kacser e Burns hanno mostrato che l'effetto di un inibitore sullo stato stazionario di un processo integrato, dipende da due parametri:

- a) il primo è l'effetto dell'inibitore sull'attività specifica dell'enzima isolato e studiato nelle stesse condizioni sperimentali del processo integrato,
- b) il secondo è l'entità del controllo esercitato da quell' enzima sull'intero flusso metabolico.

Questa relazione può essere descritta matematicamente come:

$$\frac{(dJ / J)}{(dI / I)_{\substack{\text{stato} \\ \text{stazionario}}}} = C_i \cdot \frac{(dv_i / v_i)}{(dI / I)}$$

dove I è la concentrazione dell'inibitore e  $v_i$  l'attività specifica dell'enzima in esame. Poiché le curve di inibizione sono abitualmente costruite come percentuale di attività in funzione della concentrazione di inibitore, entrambe le curve ( $J$  e  $v_i$ ) assumono il valore di 100% in corrispondenza di  $I = 0$ .

Ne deriva che il valore dei coefficienti di controllo di flusso dell'enzima non inibito può essere calcolato applicando la seguente equazione:

$$C_i = \frac{(dJ / dI)_{I \rightarrow 0}}{(dv_i / dI)_{I \rightarrow 0}}$$

dove  $(dJ/dI)_{I \rightarrow 0}$  è la pendenza del tratto iniziale della curva di inibizione dell'intero flusso metabolico ( $J$ ) e  $(dv_i/dI)_{I \rightarrow 0}$  è la pendenza del tratto iniziale della curva di inibizione della singola tappa enzimatica presa in esame.

Per definizione, quindi,  $C_i$  è un numero compreso tra 0 ed 1. Se ne deduce che, graficamente, dalla forma della curva di titolazione di un processo metabolico si può capire se una tappa controlla o non controlla il flusso.

Mentre la curva di inibizione di un stadio isolato (enzima) appare iperbolica, in seguito alla veloce diminuzione dell'attività enzimatica all'aumentare della concentrazione dell'inibitore specifico, la curva di inibizione dell'intero flusso, per valori corrispondenti di inibitore, può assumere una forma sigmoide o iperbolica (**Figura 36**).

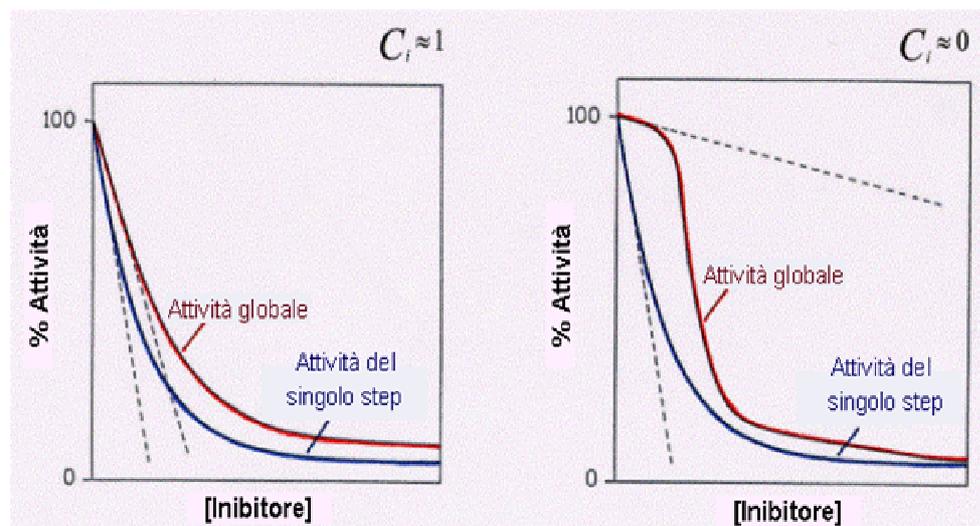


Figura 36. Curve di titolazione nelle due condizioni limite: (sinistra) quando la tappa individuale (in blu) controlla fortemente l'intero processo metabolico (in rosso) e (destra) quando la tappa individuale esercita poco controllo sull'attività globale

Infatti quando la singola tappa esercita poco controllo sull'attività globale, quest'ultima mostra una scarsa sensibilità all'effetto di piccole dosi di inibitore e solo quando il singolo enzima raggiunge un livello di inibizione tale da diventare limitante su tutto il flusso, si verifica una rapida diminuzione dell'attività globale. Contrariamente quando la tappa individuale controlla fortemente il processo metabolico integrato, anche quest'ultimo presenta lo stesso andamento iperbolico di inibizione. In termini matematici nel primo caso, il rapporto tra le pendenze iniziali delle due curve di inibizione (Figura 36 destra) tende al valore minimo di zero, mentre nel secondo il rapporto (Figura 36 sinistra) si approssima al valore massimo di 1.

### [5.3] I grafici soglia

I grafici soglia si possono derivare dalle curve di titolazione ponendo in grafico la percentuale dell'attività globale residua in funzione della percentuale di inibizione di una singola tappa enzimatica, per valori corrispondenti della concentrazione di inibitore.

Un grafico soglia mette graficamente in rilievo quello che il coefficiente di controllo di flusso esprime in modo matematico. Nella situazione limite di una

tappa che controlla fortemente la velocità del processo metabolico ( $C_i \sim 1$ ), la percentuale di attività del processo decresce in modo lineare con l'aumentare dell'inibizione dell'attività della singola tappa enzimatica (Figura 37a). Contrariamente, quando l'enzima specifico esercita un basso controllo ( $C_i \sim 0$ ), la traccia presenta un andamento bifasico (Figura 37b) dovuto al fatto che inizialmente l'inibizione dell'attività del singolo enzima ha poco effetto iniziale sul flusso metabolico e solo quando si raggiunge un'inibizione piuttosto alta dell'attività enzimatica (valore soglia) si osserva, allora, una brusca diminuzione della velocità del processo integrato.

Sebbene da un punto di vista qualitativo un grafico soglia possa offrire le stesse informazioni che si ottengono dalle curve di titolazione, la stima quantitativa del valore soglia è spesso più arbitraria del valore di coefficiente di controllo di flusso calcolato metabolicamente. In particolare, la determinazione di un preciso valore soglia si rivela difficoltosa nel caso in cui l'andamento bifasico del grafico non presenta un netto ed evidente punto di rottura.

I grafici soglia sono, comunque, strumenti utili nei casi in cui si debba operare un confronto tra tracce differenti, poiché consentono una chiara discriminazione visiva tra l'una e l'altra traccia.

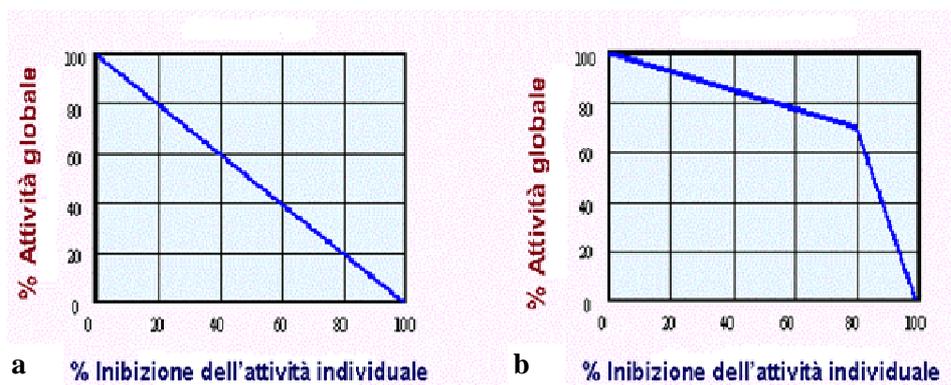


Figura 37. Rappresentazione dei grafici soglia nelle due situazioni limite. a) andamento lineare riferibile ad un alto controllo di flusso metabolico; b) andamento bifasico attribuibile ad un basso controllo di flusso.

## [5.4] Controllo della fosforilazione ossidativa

La teoria del controllo di flusso, sviluppata da Kacser e Burns, è stata largamente applicata all'analisi della fosforilazione ossidativa, per ottenere una migliore comprensione del ruolo svolto dai differenti enzimi nella regolazione dell'intero processo metabolico <sup>[108,109]</sup>.

Come descritto in precedenza, il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria mitocondriale avviene attraverso complessi enzimatici diversi e per ciascuno di essi possono essere individuati inibitori specifici da impiegarsi per valutare l'effetto della variazione di una specifica attività sull'intera attività della catena, come può accadere in condizioni fisiopatologiche e nell'invecchiamento, allo scopo di caratterizzare le tappe limitanti della catena respiratoria.

La letteratura è particolarmente ricca di informazioni su quest'argomento e l'idea generale che ne deriva è che il controllo della fosforilazione ossidativa sia distribuito tra più tappe enzimatiche differenti per cui non si può parlare di una singola vera e propria tappa limitante.

Numerosi studi hanno mostrato che la distribuzione del controllo cambia sia in funzione del tipo di tessuto da cui originano i mitocondri, sia in dipendenza dalla velocità di fosforilazione alla quale il mitocondrio sta operando <sup>[108,109]</sup>.

Sembra che il complesso I sia la tappa che maggiormente controlla il consumo di ossigeno in ogni tessuto, e che la restante parte del controllo sia da attribuire al complesso III e al IV, nel caso del tessuto muscolare e cardiaco oppure alla ATP sintasi e ai trasportatori di fosfato nel fegato, rene e cervello. Occorre comunque considerare che questi studi sono generalmente eseguiti analizzando il controllo esercitato dal complesso I e dagli altri enzimi della catena sulla respirazione in stato-4 o in stato-3 di mitocondri intatti, in presenza di substrati NAD-dipendenti. I coefficienti di controllo che si ottengono in questi studi hanno valori compresi in un range tra 0.1 e 0.3, come ci si aspetta che sia, in accordo con il teorema della somma, enunciato da Kaser e Burns <sup>[107]</sup>.

L'analisi del controllo di flusso, condotta su frammenti di membrana di mitocondri di fegato, ha confermato che l'attività del complesso I è la maggiore tappa di controllo anche sull'attività della catena respiratoria in quanto tale, cioè sul trasferimento di elettroni da NADH ad ossigeno [122].

La misura dei coefficienti di controllo è di particolare importanza per la comprensione delle conseguenze di un difetto enzimatico in condizioni patologiche [110].

Le patologie mitocondriali sono un gruppo eterogeneo di disordini metabolici caratterizzati da ultrastrutture mitocondriali alterate che possono provocare un mal funzionamento della fosforilazione ossidativa [111] ma rimane ancora problematica la relazione tra la presenza di patogeniche mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) e il manifestarsi del fenotipo clinico.

Infatti lo stesso fenotipo clinico può essere causato da mutazioni diverse nel mtDNA e, al contrario, diverse mutazioni possono portare agli stessi disordini clinici. Inoltre le citopatie mitocondriali mostrano spesso specificità di tessuto; infatti, anche se una stessa mutazione genetica si presenta in tutti i tessuti, solo in alcuni di essi la mutazione si esplica in patologia.

Il perché una mutazione può portare a differenti manifestazioni cliniche può essere spiegato dalla % di eteroplasmia del mtDNA che può variare sia tra individui diversi sia tra cellule e tessuti all'interno dello stesso paziente; l'eteroplasmia è il rapporto tra il DNA mitocondriale mutato e quello wild-type dovuta alla segregazione del mtDNA durante l'embriogenesi. Comunque solo il livello di eteroplasmia non è sufficiente a spiegare il forte divario che si presenta in molti casi tra la presenza della mutazione e il manifestarsi del fenotipo clinico [112].

Ad esempio nel caso della manifestazione specifica del quadro clinico in un tessuto piuttosto che in altro, occorre considerare anche il diverso coefficiente di controllo di flusso per un dato complesso enzimatico in funzione del tessuto di origine del mitocondrio [113]. Si può assumere che, dove il coefficiente di controllo è più alto, il tessuto sarà più sensibile verso un difetto del complesso enzimatico.

Molti autori hanno dimostrato come sia possibile inibire considerevolmente l'attività di un singolo complesso della catena respiratoria mitocondriale fino a un valore critico senza alterare la respirazione mitocondriale o la sintesi di ATP. Questo fenomeno è stato definito effetto di soglia biochimica: fenotipi clinici di malattie metaboliche mitocondriali possono apparire solo quando l'attività di un enzima è ridotta a livelli estremamente bassi [Rossignol R. (2003)]. L'analisi del controllo di flusso finalizzata allo studio dei valori soglia, in questi casi, favorisce la comprensione delle conseguenze dovute al difetto di enzimi implicati nella fosforilazione ossidativa <sup>[114]</sup>.

L'analisi del controllo metabolico della fosforilazione ossidativa può fornire un importante strumento anche per la determinazione degli effetti soglia nelle condizioni fisiologiche dell'invecchiamento<sup>[111]</sup>. Poiché spesso questo fenomeno è stato messo in relazione con l'accumulo di mutazioni nel mtDNA e con la conseguente alterazione strutturale delle subunità appartenenti ai complessi enzimatici coinvolti nel processo di fosforilazione ossidativa (teoria mitocondriale dell'invecchiamento) <sup>[115, 116]</sup>.

# MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti e i solventi utilizzati sono stati acquistati dalla ditta SIGMA ALDRICH (Milano).

## 1. PREPARAZIONI ENZIMATICHE

### **[1.1] Preparazione dei mitocondri di cuore bovino (BHM)**

#### **Materiale**

- 2-4 Cuori di bue
- KCl 0.15M
- Tampone Saccaroso 0.25 M
- Tris 1 M
- Tampone di risospensione (S.T. a pH 7.6): Saccaroso 25 mM  
Tris - HCl 10 mM

#### **Preparazione :**

La preparazione di mitocondri da cuore bovino segue essenzialmente il metodo di *Smith A.L.* <sup>[117]</sup>. Il cuore bovino, prelevato da macello, viene pulito dai tessuti connettivi e grassi e lavato abbondantemente con una soluzione di KCl 0.15 M in modo da eliminare il più possibile il sangue e i tessuti non muscolari. In seguito il tessuto muscolare sminuzzato viene omogeneizzato in frullatore, in presenza di una soluzione Saccaroso 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 centrifuga Beckman rotore JA 10 a 2000 RPM per 20 minuti per far precipitare tessuti e cellule non rotte, nuclei, e materiale pesante. Il surnatante è poi centrifugato in Beckman rotore JA 10 a 9000 RPM per 30 minuti.

Il precipitato ottenuto è già costituito da una frazione mitocondriale grezza che è ulteriormente purificata risospingendola nel tampone S.T. e ricentrifugata in centrifuga Beckman con rotore JA 10 a 9000 RPM per 30 minuti. Il pellet viene risospeso nel tampone S.T. avendo cura di mantenere la concentrazione tra 50-60 mg/ml di proteina mitocondriale e poi congelati e mantenuti a una temperatura di -80°.

### **[1.2] Preparazione dei mitocondri di tubero di patata (POM).**

Tampone di risospensione "B2", pH 7.2:	Mannitolo	0.4 M
	EGTA	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	PMSF	0.2mM

I mitocondri di patata sono stati preparati da tuberi di patata (*Solanum tuberosum*) nel laboratorio del Prof. Braun H.P. all'Università di Hannover in Germania. I tuberi una volta raccolti vengono piantati e fatti crescere al buio a 20 °C. Dopo 20 giorni, il materiale (200 g) viene omogeneizzato a 4°C con Waring blender per 3 x 5 s, filtrato con 4 layers di garza e purificato con centrifugazioni differenziali, terminando con una centrifugazione a gradiente di densità di Percoll <sup>[118,119]</sup>.

I mitocondri sono risospesi nel tampone "B2" e conservati a -80 °C.

### [1.3] Preparazione dei mitocondri di fegato di ratto (RLM).

Tampone estrazione, pH 7.4:	Mannitolo	0,22M
	Saccaroso	0,07M
	Hepes	20mM
	EDTA	1mM
Tampone "B", pH 7.2:	Mannitolo	0,22M
	Saccaroso	0,07M
	Tris	10mM
	EDTA	1mM

Il fegato una volta espianato è lavato, pesato e omogeneizzato finemente in omogeneizzatore di *Potter-Elvehjem* (5 cicli) in presenza di tampone di estrazione addizionato con albumina (0,4%). L'omogenato è centrifugato a 2000rpm per 10 minuti (Sorvall RC5B, rotore SS34) per precipitare la parte pesante non mitocondriale e trattenere quella mitocondriale contenuta, invece, nel sopranatante. Quest'ultimo è filtrato con garza in un nuovo tubo e centrifugato a 9000rpm per 10 minuti (stesso rotore). Il pellet, costituito da mitocondri, è risospeso in pari volume di tampone B, riprecipitato alle medesime condizioni e risospeso ancora in tampone B alla concentrazione finale di 20-40 mg/ml ; infine, aliquotato e congelato a -80°C.

## [1.4] Preparazione dei mitocondri di lievito (*S. cerevisiae*)

▪ DTT-buffer, pH 9.4:	Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM
	Ditiotreitolo (DTT)	10 mM
▪ Zymolyase-buffer, pH 7.4	Sorbitolo	1.2 M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
<i>Zimolasi aggiunta prima dell'uso in base alla proteina (3mg/g di p.)</i>		
▪ Homogenisation-buffer, pH 7.4	Sorbitolo	600 mM
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	PMSF	1 mM
	BSA	0,2 (w/v)
▪ SEM-buffer, pH 7.2	Saccarosio	250 mM
	EDTA	1 mM
	MOPS-KOH	10 mM

### Passaggi a temperatura ambiente

La preparazione dei mitocondri di lievito segue essenzialmente quanto descritto da *Truscott* <sup>[120]</sup>.

Le cellule sono centrifugate a 3000g per 5 minuti, risospese in acqua e ricentrifugate alle medesime condizioni. Il pellet ottenuto è lavato in tampone con DTT a 30°C (2ml/g), agitato per 20 min, poi, centrifugato a 3000g per 5 min. Le cellule sono risospese, prima, in tampone zimolasi senza zimolasi (7ml/g) a 3000g per 5minuti e, poi, nello stesso tampone addizionato con zimolasi (7mg/ml con 3mg/g di zimolasi), in cui rimangono per 30-45 minuti a 30°C affinché la membrana cellulare si rompa. L'enzima viene eliminato centrifugando a 3000g per 5 minuti e risospendendo in tampone senza zimolasi (7ml/g).

### Passaggi in ghiaccio

All'ultimo precipitato mitocondriale è addizionato il tampone di omogeneizzazione (6.5ml/g), omogeneizzato con omogeneizzatore di *Potter-Elvehjem* (15 volte), centrifugato a 1500g e, poi, a 4000g per 5 minuti, gettando ogni volta il pellet. I mitocondri contenuti nel sopranatante sono

sedimentati a 12000g per 15 minuti e risospesi in tampone SEM (1ml/20mg di p.); infine, aliquotati e congelati a -80°C.

## **[1.5] Determinazione della concentrazione proteica**

### **Materiali:**

- Reattivo del biureto (vedasi preparazione nel testo che segue)
- DOC 10% (deossicolato di sodio)

### **Procedura :**

La concentrazione proteica viene valutata con il metodo del biureto <sup>[121]</sup> usando albumina di siero bovino come standard di riferimento.

Il reattivo biureto si prepara sciogliendo 1.5 g di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 6 g di tartrato di sodio e potassio in 500 ml di acqua distillata; si aggiungono sotto agitazione 300 ml di NaOH al 10% e si addiziona acqua distillata fino a raggiungere il volume di un litro.

Per ciascun campione si preparano due provette contenenti ciascuna 20  $\mu\text{l}$  della sospensione di cui si vuole conoscere la concentrazione proteica, a cui si aggiungono in ordine:

1. 100  $\mu\text{l}$  di deossicolato di sodio (Na-DOC) al 10%
2. 1380  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata
3. 1500  $\mu\text{l}$  di reattivo biureto

Il campione di riferimento (bianco) si prepara allo stesso modo mettendo però al posto del campione proteico, 20  $\mu\text{l}$  del tampone usato per sospendere la frazione proteica.

Dopo essere state vorticate, le provette sono immerse per 30 secondi in acqua bollente in modo da rendere più veloce la reazione. Si misura quindi l'assorbimento spettrofotometrico di ciascuna provetta a 540 nm, dal quale si sottrae l'assorbimento del bianco dopo aver fatto la media dei campioni in duplicato. Si calcola la concentrazione della proteina di ciascun campione

sapendo che: 0.1 ml di una soluzione di albumina 10 mg/ml, dosata nelle stesse condizioni, assorbe 0.1 unità di assorbanza.

## 2. DOSAGGI POLAROGRAFICI

La misura del consumo di ossigeno da parte della sospensione mitocondriale di RLM (preparata in giornata) è stata effettuata a 30°C con un ossigrafo ad elettrodo di Clark <sup>[122]</sup>.

Dopo aggiunta di Glutammato – Malato (6mM) i mitocondri iniziano a consumare ossigeno e quindi l'intensità della corrente misurata dall'elettrodo diminuisce con una velocità proporzionale a quella della respirazione mitocondriale e il segnale viene rivelato da un registratore. Questa fase viene chiamata “stato 4” e, se il mitocondrio è integro, corrisponde alla fase lenta della respirazione perché limitata dall'assenza di ADP. In queste condizioni, se al sistema viene aggiunto ADP (0,6mM), il mitocondrio è stimolato a produrre ATP, il gradiente elettrochimico si consuma e di conseguenza si ha un aumento del consumo di ossigeno per ripristinarlo. Questa fase viene definita “stato 3” e corrisponde alla fase veloce di respirazione mitocondriale. Una volta fosforilato tutto l'ADP a ATP, il mitocondrio torna allo “stato 4”.

Nei nostri campioni l'indice di controllo respiratorio, definito come il rapporto tra velocità di consumo di ossigeno in stato 3 e stato 4, è sempre risultato vicino a 5, a indicare un buon accoppiamento tra la respirazione mitocondriale e la sintesi di ATP.

La titolazione con inibitori è stata eseguita con quantità crescenti di Rotenone (inibitore Complesso I) e Mucidina (inibitore Complesso III) incubate con la proteina per 5 minuti nella camera ossigrafica prima dell'aggiunta dei substrati respiratori

### 3. DOSAGGI SPETTROFOTOMETRICI

Le sostanze impiegate per l'analisi, inibitori e substrati, vengono dosate allo spettrofotometro UV-visibile (Jasco V-550), per essere certi della loro effettiva concentrazione, prima di utilizzarle nell'esperimento.

Ogni dosaggio richiede una specifica lunghezza d'onda ( $\lambda$ ); occorre conoscere anche il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) proprio di quella sostanza.

Sfruttando la legge di Lambert-Beer si risale quindi alla concentrazione della sostanza. Nella **tabella 1** sono riportate le sostanze ed i loro rispettivi valori di  $\lambda$  e  $\epsilon$ . Tutte le soluzioni preparate sono conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

<i>Sostanza</i>	<i>Massa molecolare</i>	<i>Solvente</i>	$\lambda_{max}$ (nm)	$\lambda_{max}$ (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
<b>Antimicina A</b>	534.6	etanolo	320	4.8
<b>Citocromo c</b>	12384	H <sub>2</sub> O	550-540	19.1
<b>DB</b>	322.4	etanolo	290	4
<b>DBH<sub>2</sub></b>	324.4	etanolo	275	12.5
<b>Mucidina</b>	258	etanolo	292	21.2
<b>NADH</b>	709.4	H <sub>2</sub> O	340-380	5.5
<b>Rotenone</b>	394.4	etanolo	292	25

Tabella1. *Alcune caratteristiche chimiche e spettroscopiche dei substrati e degli inibitori.*

### **[3.1] Preparazione e dosaggio di decilubichinone ridotto (DBH<sub>2</sub>)**

Questa procedura si applica a vari analoghi ed omologhi del CoQ <sup>[123]</sup>. Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato un analogo del CoQ<sub>10</sub>: il decilubichinone (DB: 2,3-dimetossi-5-metil-6-decil-1,4-benzochinone).

In un tubo con tappo smerigliato da 30 ml si mette 1mg di DB partendo da una madre di DB concentrata circa 10mM. Si porta la soluzione a un volume di 5 ml di etanolo e si aggiungono 15 ml di tampone Saccaroso 0,25 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M a pH 7,4. Si aggiunge una piccola quantità di ditionito di Na (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) fino a che la soluzione diventa incolore, indicando che si è completata la riduzione del chinone.

Si aggiungono 2 ml di cicloesano, agitando. Si centrifuga a 2000 rpm per pochi minuti e si preleva la fase superiore organica, con pipetta Pasteur, mettendola in un secondo tubo di vetro con tappo smerigliato, rivestito con carta stagnola poiché l'ubichinolo è fotosensibile e tende a riossidarsi. Si ripete l'estrazione con cicloesano e si uniscono le fasi organiche.

Per evitare che restino tracce di ditionito, si esegue un lavaggio aggiungendo 15ml di tampone nel secondo tubo, agitando, centrifugando come sopra e prelevando la fase organica, che viene trasferita in un tubo di vetro con tappo a vite.

Si evapora il cicloesano sotto flusso di azoto, coprendo il tubo con carta stagnola, e si risolubilizza l'ubichinolo in etanolo con circa metà del volume iniziale di DB prelevato.

Per rallentare la riossidazione dell'ubichinolo, si aggiungono alla soluzione 10 µl di HCl 1N e si conserva a -20°C.

La concentrazione di decilubichinone ridotto (DBH<sub>2</sub>) viene determinata mediante dosaggio allo spettrofotometro. La lettura spettrofotometrica viene effettuata mettendo in cuvetta 1000 µl di etanolo a cui si aggiungono 2 µl di DBH<sub>2</sub>, usando come soluzione di riferimento etanolo. Si esegue la prima lettura alla  $\lambda=290$  nm; si ottiene il valore di assorbanza del DBH<sub>2</sub> ridotto e si calcola la sua concentrazione usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon=4\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

Si effettua una seconda lettura alla  $\lambda=275$  nm per verificare che il  $\text{DBH}_2$  in cuvetta sia completamente nella forma ridotta. Si aggiungono poi  $2\mu\text{l}$  di KOH sciolti in etanolo per ossidare completamente l'aliquota di  $\text{DBH}_2$  a DB e, mantenendo la stessa lunghezza d'onda ( $\lambda=275$  nm), si esegue una nuova lettura. La concentrazione di DB ossidato si calcola, sottraendo al valore di assorbanza trovato per il DB ossidato il valore di assorbanza trovato prima di aggiungere l'agente ossidante, il KOH, e utilizzando  $\epsilon=12.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Si verifica poi se le due concentrazioni trovate sono uguali.

### **[3.2] Preparazione e dosaggio di soluzioni di Citocromo c ossidato ( $\text{Cit.c}^{3+}$ ) e ridotto ( $\text{Cit.c}^{2+}$ )**

La soluzione di citocromo c ossidato ( $\text{Cit c}^{3+}$ ) viene dosata allo spettrofotometro. La lettura spettrofotometrica viene effettuata mettendo in cuvetta di plastica  $1000\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata a cui si aggiungono  $10\mu\text{l}$  di soluzione di citocromo ossidato  $\sim 6\text{mM}$ , usando come soluzione di riferimento (bianco)  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata. Si esegue la prima lettura (ox) alla  $\lambda=550$  nm. Il citocromo  $\text{c}^{3+}$  viene poi ridotto a  $\text{cit c}^{2+}$  aggiungendo in cuvetta una piccola quantità di ditionito di Na, fino a completa riduzione del citocromo, e si effettua una seconda lettura (red) sempre alla stessa lunghezza d'onda ( $\lambda=550$  nm). La concentrazione della soluzione di citocromo ossidato si ottiene sottraendo al valore di assorbanza trovato per il citocromo ridotto (red) il valore di assorbanza trovato per il citocromo ossidato (ox) e utilizzando  $\epsilon=19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

La preparazione della soluzione di citocromo c ridotto viene effettuata mediante aggiunta di una piccola quantità di Na-ditionito ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) ad una soluzione di citocromo c ossidato ( $\text{Cit c}^{3+}$ )  $6\text{mM}$ , a completa riduzione del citocromo c. Il ditionito in eccesso viene quindi rimosso per purificazione su colonna Sephadex G-25 pre-condizionata (il liquido di conservazione della colonna viene aspirato con pasteur di vetro e si esegue un lavaggio con  $15 \text{ ml}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata); si aggiunge prima la soluzione di citocromo  $\text{c}^{2+}$  e poi  $\text{H}_2\text{O}$



permette al NADH esogeno di raggiungere il suo sito di legame sul Complesso I per essere ossidato. La sonicazione è eseguita con il sonicatore (Labsonic B.Braun) in bagno di ghiaccio e sotto flusso di azoto (per ridurre i fenomeni perossidativi) 6 volte A 50W per 10 secondi intervallati da 50 secondi di pausa.

A un volume di sospensione mitocondriale permeabilizzata si aggiungono quantità crescenti di rotenone (1.5, 3, 6, 12, 50, 400 pmoli rotenone/mg proteina) oppure di Mucidina, oppure di KCN per ottenere campioni di RLM inibiti progressivamente. Il tutto viene lasciato incubare per 5 minuti. In questo modo l'inibitore è in grado di esplicare al meglio la sua funzione. Volumi opportuni di proteina vengono poi aggiunti in una cuvetta contenente tampone di dosaggio e substrati di reazione come indicato nello schema seguente.

- “Tampone di dosaggio KCl”, 2500  $\mu$ l
- RLM, concentrazione finale di 80  $\mu$ g prot/ml
- NADH, 75  $\mu$ M

In queste condizioni, misurando la velocità di diminuzione dell'assorbimento differenziale del NADH alla coppia di lunghezze d'onda di 340-380 nm ( $\epsilon=3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (spettrofotometro Jasco V-550 attrezzato per letture a doppia lunghezza d'onda) si stima l'attività NADH-O<sub>2</sub> <sup>[124]</sup>.

Per i soli campioni destinati alla titolazione con rotenone, l'attività specifica del Complesso I viene determinata in successione dopo aver inibito il Complesso III ed il Complesso IV aggiungendo in cuvetta Antimicina A 1 $\mu$ g/ml e KCN 1mM, e dopo aver aggiunto quantità saturanti dell'accettore di elettroni del Complesso I: in questo caso, abbiamo utilizzato il decilubichinone (DB 60  $\mu$ M).

### [3.4] Determinazione dell'attività enzimatica DBH<sub>2</sub>-Cit.c<sup>3+</sup> in mitocondri di fegato di ratto (RLM)

La proteina viene permeabilizzata come descritto nel paragrafo 3.3.

La miscela di reazione per il dosaggio dell'attività ubichinolo-Cit.c ossidoreduttasica (DBH<sub>2</sub>-Cit c<sup>3+</sup>) è la seguente:

- “Tampone di dosaggio KCl” (vedi par. 3.3) KCN 1mM; 2500 µl.  
(il pH è riportato a 7.4 dopo l'aggiunta del KCN)
- Cit c<sup>3+</sup>, 50 µM.
- RLM, concentrazione finale 20µg prot/ml.
- Per ogni punto di titolazione, concentrazioni di **Mucidina** (0-6000 nM), corrispondenti a quelle impiegate per la titolazione dell'attività NADH ossidasica, vengono aggiunte in cuvetta contenente già il tampone e la proteina e lasciate incubare per 5 minuti.
- DBH<sub>2</sub>, 15 µM

La riduzione del Cit. c<sup>3+</sup> è seguita spettrofotometricamente (Jasco V-550 attrezzato per letture a doppia lunghezza d'onda) a  $\lambda = 550-540$  nm utilizzando  $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Per l'esatta valutazione della velocità di riduzione del Cit. c dovuta alla sola attività enzimatica, viene sottratto il contributo dato dalla reazione chimica tra ubichinolo e citocromo c, precedentemente stimato in assenza di proteina.

### **[3.5] Determinazione dell'attività enzimatica Cit c<sup>2+</sup>-O<sub>2</sub> in RLM.**

La miscela di reazione per il dosaggio dell'attività citocromo ossidasica è la seguente:

- “Tampono di dosaggio KCl” 2500 µl con Antimicina 1µg/ml.
- RLM, concentrazione finale 3 µg prot/ml
- Per ogni punto di titolazione concentrazioni di KCN (0-200 µM) corrispondenti a quelle impiegate per la titolazione dell'attività NADH ossidasica, vengono aggiunte in cuvetta contenente già tampone e RLM e vengono lasciate incubare 5 minuti
- Cit c<sup>2+</sup>, 60 µM

L'ossidazione del Cit c<sup>2+</sup> è stata seguita spettrofotometricamente (Jasco V-550 attrezzato per letture a doppia lunghezza d'onda) a  $\lambda = 550-540$  nm utilizzando  $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## **4. GEL – ELETTROFORESI**

### **[4.1] Premessa**

Le difficoltà che si incontrano nel separare proteine di membrana, come i complessi respiratori, derivano dalla loro tendenza ad aggregare, anche in presenza di detergenti, e di denaturarsi a seguito della parziale perdita di lipidi operata dal detergente. Questi problemi possono essere superati con una particolare tecnica gel elettroforetica, da noi utilizzata, che separa le proteine in condizione nativa con l'uso del colorante Coomassie Blu G-250 (1D BN-PAGE) affiancato da un blando detergente non ionico <sup>[84]</sup>. Il colorante ha la proprietà di legarsi reversibilmente alle proteine rivestendole con una nuvola di cariche negative che ha due funzioni principali: 1) Impedire la formazione di aggregati proteici grazie ai fenomeni repulsivi tra le cariche negative stesse 2) Permettere la migrazione delle proteine verso l'anodo indipendentemente dal loro punto isoelettrico, separandole per criterio dimensionale nel gel di poliacrilammide.

I detergenti blandi usati in questa metodologia hanno la proprietà di estrarre dalla membrana i complessi respiratori mantenendo loro un *annulus* lipidico che impedisce i fenomeni denaturanti da delipidizzazione. I detergenti utilizzabili sono diversi ma quello da noi scelto è la Digitonina in un opportuno rapporto con la proteina (vedi in seguito). I complessi respiratori separati in questo modo possono essere ulteriormente risolti nelle sub-unità costituenti previo trattamento con detergenti anionici, composti riducenti e trasferimento orizzontale in un altro gel (2D-SDS PAGE).

#### [4.2] **Blue-Native Poliacrilammide Gel Elettroforesi (BN-PAGE)**

Questa metodica è stata applicata sia con mini gel pre-confezionati (NativePAGE 3-12% BisTris gel, BN2011BX10) sia con gel 20x20x0.15 cm con gradiente 4-16% preparato in laboratorio con l'ausilio della pompa peristaltica (Peristaltic Pump P-3, Phamacia Fine Chemicals).

##### *Preparazione del campione*

La sospensione mitocondriale è portata alla concentrazione di circa 2mg/ml in tampone "B" (vedi preparazione dei mitocondri di fegato di ratto) e, quando richiesto dall'esperimento, è aggiunto il citocromo c equino (Sigma, C-2506) in quantità 3–10 volte rispetto a quella fisiologica. Il campione è sonicato 6 volte in ghiaccio (10 secondi e 50 secondi di pausa a 50W) con il Labsonic B.Braun sotto flusso di azoto e centrifugato in Beckman ottenendo un pellet arricchito in complessi della catena respiratoria. Si scarta il soprannatante e il pellet è risospeso con digitonina in un rapporto variabile con la proteina di, (5-8):1 w:w; incubare 20 minuti in ghiaccio. Si centrifuga 20 minuti a 12500rpm con il rotore JA18.1 (20300g), scartando il pellet che rappresenta la frazione insolubile, e recuperando il soprannatante

Nelle fasi iniziali della preparazione è necessario individuare il rapporto digitonina:proteina ideale per il campione da analizzare.

### *Elettroforesi con mini gel pre-cast.*

Tampone risospensione, pH 7	NaCl	50mM
	Imidazolo	50mM
	ac.6-amminoesanoico (6-ACA)	5mM

Solvente Coomassie	6-ACA	500mM
--------------------	-------	-------

Soluzione Digitonina:	5% (w/v) in tamp. risospensione
-----------------------	---------------------------------

Soluzione Coomassie G-250	5% (w/v) in solvente coomassie
---------------------------	--------------------------------

Glicerolo (87%)

I seguenti prodotti sono stati acquistati dalla ditta "Invitrogen":

Tampone "Anodo"(20X, BN2001): (30ml + 570ml H <sub>2</sub> O)	Bis-Tris Tricine pH 6.8	50mM 50mM
--	-------------------------------	--------------

Soluzione "Catodo"(20X BN2002):	Coomassie G-250	0.4% (w/v)
---------------------------------	-----------------	------------

Tampone Catodo "dark"(200ml)	BN2001	10ml
	BN2002	10ml
	H <sub>2</sub> O	180ml

Tampone Catodo "light"(200ml)	BN2001	10ml
	BN2002	1ml
	H <sub>2</sub> O	180ml

NativePAGE 3-12% BisTris gel  
(BN2011BX10)

Al campione (sopranatante ottenuto come descritto sopra) contenente i complessi respiratori solubilizzati, si aggiunge il Coomassie in rapporto con la

digitonina di, rispettivamente, 1:10 w:w e glicerolo alla concentrazione dell'11% v:v per appesantire il campione.

Quest'ultimo è inserito in uno o più pozzetti del gel, collocato, a sua volta, nella cella elettroforetica (Xcell SureLock Mini-Cell, EI0001) allestita con il tampone anodo e catodo "dark".

Applicando la differenza di potenziale, la proteina migra in direzione dell'anodo. Prima, per 2cm a 70V(costanti) ~4mA in modo tale che possa entrare lentamente nel gel, poi, a 150V avendo cura, a 1/3 della corsa elettroforetica, di sostituire il catodo "dark" con quello "light".

### *Elettroforesi con gel 20x20x0.15cm*

Acrilammide 40% (Applichem A0946):	Acrilammide	38.8% (w/v)
	Bisacrilammide	1.2% (w/v)
350ml, Tampone catodo (pH 7; 4°C):	Tricine	250mM
	Bis-Tris	75mM
	Coomassie G-250	0.1%
1.2l, Tampone anodo (pH 7; 4°C):	Bis-Tris	300mM
Tampone gel BN (pH 7; 4°C):	6-ACA	1.5M
	Bis-Tris	150mM
Blue loading buffer	6-ACA	750mM
	Coomassie G-250	5%

Allestiti le due piastre di vetro con gli spaziatori (0.9x22x0.15cm) tra i quali verrà colato il gel dal basso attraverso la pompa peristaltica. Preparare le due soluzioni di acrilammide al 4,5% e 16% dalla cui miscelazione si otterrà il gradiente.

	Camera 1	Camera 2
	<b>4.5%</b>	<b>16%</b>
ddH <sub>2</sub> O a 4°C	<b>16.5ml</b>	<b>5.1ml</b>
6 x Gel buffer BN	<b>3.8ml</b>	<b>3.3ml</b>
Acrilammide 40%	<b>2.6ml</b>	<b>8.2ml</b>
100% glicerolo	/	<b>3.9ml</b>
<b>Σ</b>	<b>22.9ml</b>	<b>20.5ml</b>
<b>Raffreddare le soluzioni 10' a -20°C poi, appena prima dell'uso, aggiungere:</b>		
10% APS	<b>104μL</b>	<b>68μl</b>
TEMED	<b>10.4μL</b>	<b>6.8μl</b>

Lavorando a 4°C pompare un piccolo volume di ddH<sub>2</sub>O (overlay solution, 1cm di altezza) seguito dalla miscela di acrilammide. Pompare, inizialmente, in modo graduale fino ad arrivare a 1.6 ml/min (tacca 3 della pompa) nell'arco di 1 minuto. Colato il gradiente si polimerizza in termostato a 37°C per 45 minuti. Solidificato il gel si elimina l'overlay solution, si inserisce il pettine che darà forma ai pozzetti e si aggiunge una soluzione di acrilammide al 4% (sample gel).

ddH <sub>2</sub> O	11ml
6xGel buffer BN	2,5ml
Acrylamide 40%	1,5ml
<b>Σ</b>	<b>15ml</b>
<b>Appena prima dell'uso aggiungere:</b>	
10% APS	65μl
TEMED	6,5μl

Polimerizzato anche questa soluzione si toglie il pettine, e si allestisce la cella elettroforetica (Protean II, Biorad) con i tamponi “catodo” e “anodo”.

Al campione digitonizzato è aggiunto il “blu loading buffer” (5µL /mg di proteina) e caricato in uno o più pozzetti del gel.

Applicando la differenza di potenziale la proteina migra in direzione dell’anodo. Prima, a 100V e 15mA (costanti) per 45’, poi, a 500V e 15mA (costanti) per 16 ore (Power pack 3000, Biorad).

### **[4.3] Sodio dodecil solfato poliacrilammide gel elettroforesi (SDS-PAGE)**

I seguenti prodotti sono stati acquistati dalla ditta “Invitrogen”:

Sample buffer:	NP0008 (4X)	4ml
	H <sub>2</sub> O	12ml
Soluzione riducente:	Sample buffer	4.5ml
	NP0009	0.5ml
Soluzione alchilante:	Sample buffer	5ml
	N,Ndimetilacrilammide	28µL
Soluzione “Quenching”:	Sample buffer	4ml
	Etanolo	1ml
	NP0009	50µL
Running buffer (anodo)	NP0001(20X)	40ml
	H <sub>2</sub> O	760ml
Running buffer (catodo):	anodo	200ml
	NP0005(antiox.)	0.5ml

NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel (NP0324BOX)

Questa metodica è stata applicata con i mini gel pre-cast (NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel, NP0324BOX). Il gel ottenuto con la 1D BN PAGE è tagliato, e trattato in sequenza, prima, con la soluzione riducente (5ml), che trasforma i ponti disolfuro in gruppi tiolici, metilati, poi, dalla seconda soluzione (5ml), quella alchilante. La soluzione “quencing”

(5ml)rafforza e mantiene la denaturazione. Ognuna si esse è mantenuta a contatto con il gel per 20 minuti sotto blanda agitazione orbitalica. La 1D è lavata con acqua e inserita orizzontalmente, ben a contatto, nel secondo gel. Si allestisce la cella elettroforetica con il catodo e anodo e si applica la differenza di potenziale: 100V e 60mA (per 1 gel) per 75 minuti.

#### [4.4] Western Blot e Immuno rivelazione

La separazione per criterio dimensionale dei complessi respiratori con la BN-PAGE e, delle loro subunità costituenti con la SDS-PAGE, è seguita dal Western Blot. Dalla seconda dimensione le subunità dei complessi respiratori sono trasferite ad un film di nitrocellulosa (0.45µm) dove, con l'ausilio di anticorpi specifici, sono identificate tramite rivelazione chemioluminescente.

Tampone di trasferimento:	NuPAGE, Transfer buffer 20X (NP0006)	50ml
	Metanolo	100ml
	Invitrogen,antiox (NP0005)	1ml
	H <sub>2</sub> O	849ml
PBS (10X), pH 7.4:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10mM
	NaCl	1,5M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30mM
PBS-Tween	PBS(1X)	
	Tween (Biorad)	0.05% (v/v)
Blocking solution:	PBS-tween	
	BSA (albumina)	2% (v/w)
	Non fat dry milk	2% (v/w)

La membrana di nitrocellulosa opportunamente adagiata sul gel di poliacrilammide è poi alloggiata nell'apposito supporto e introdotta nella cella elettroforetica (mini protean, Biorad) in cui il trasferimento orizzontale avviene a 100V (costanti) e 400mA per 90 minuti.

Al termine della corsa, la membrana è lavata in PBS tween per 5 minuti e i siti aspecifici di legame sono saturati dalla blocking solution incubata per 1 ora a temperatura ambiente con agitazione orbitalica o, in alternativa, a 2-8°C overnight.

La membrana è lavata 3 volte per 5 minuti con PBS-Tween, si espone a 5 ml della soluzione di anticorpo primario (mitosciences, anti-mouse vari tipi come specificato nelle didascalie delle rispettive figure) diluito in blocking solution (1:1000) e si incuba per 1 ora. In questo tempo l'anticorpo si lega in maniera specifica. Trascorsa un'ora si recupera l'anticorpo, si lava la membrana 3 volte con PBS-Tween per 5 minuti e si aggiunge 5 ml dell'anticorpo secondario (Molecular Probes, anticorpo anti-goat anti-mouse IgG<sub>H+L</sub>), diluito in blocking solution (1:1000), e si incuba per 1 ora. L'anticorpo secondario si lega al primario precedentemente aggiunto.

Si recupera l'anticorpo e si lava la membrana 2 volte per 5 minuti con PBS-Tween e 1 volta con PBS 1X per 5 minuti. Si miscelano parti uguali delle soluzioni "A" e "B" (RPN2106, GE Healthcare) e la soluzione ottenuta è messa a contatto con la membrana 5 minuti. In questa fase, l'HRP (Horse Radish Peroxidase) coniugato all'anticorpo secondario catalizza l'ossidazione del luminolo con liberazione di luce. Si elimina l'eccesso di reagente dalla membrana la quale è inserita nel rivelatore chemiluminescente (Fluor-S MAX, Biorad) e l'immagine è acquisita a diversi tempi di esposizione.

# RISULTATI

## 1. EVIDENZE DALL'ANALISI DEL CONTROLLO DI FLUSSO METABOLICO.

L'analisi del controllo di flusso impiegata in questo studio rappresenta un approccio originale con il quale ottenere informazioni sulla struttura sovramolecolare della catena respiratoria. Questa analisi, applicata ai complessi della catena respiratoria dei mitocondri di fegato di ratto (RLM), sia permeabilizzati, sia accoppiati, in stato 3 (condizione fosforilante) e in stato 4 di respirazione (non fosforilante), ci ha permesso di discriminare tra i due modelli più accreditati a rappresentare l'organizzazione strutturale della catena respiratoria mitocondriale. I dati ottenuti si inseriscono all'interno di un panorama dominato dalla gel elettroforesi che, però, non è in grado di dare alcuna informazione qualitativa di tipo cinetico sullo stato di aggregazione della catena respiratoria.

In questa sezione vengono riportati i grafici che mostrano le curve di titolazione con inibitore. Ogni grafico mette a confronto: i valori dell'attività specifica dell'enzima considerato e quelli dell'attività dell'intero percorso metabolico di cui l'enzima è parte (attività integrata), in funzione di concentrazioni corrispondenti di inibitore (par.5.2). Questi valori, espressi come percentuale di attività residua rispetto al controllo senza inibitore, rappresentano le serie complete di dati sperimentali da noi ottenute per i diversi animali.

I dati sperimentali sono stati interpolati con procedure di regressione non lineare, utilizzando il programma di analisi matematica Sigma Plot [Jandel SigmaPlot Scientific Graphing Software].

Come descritto nel paragrafo 5.2, dopo aver scelto la funzione matematica più adatta a definire la curva che interpola i punti di titolazione, viene tracciata anche la retta tangente al tratto iniziale della curva per meglio evidenziarne la pendenza. Il valore del coefficiente angolare di tale retta tangente si ottiene calcolando il limite della derivata della funzione che tende al punto iniziale

della curva ( $X \rightarrow 0$ ). Il coefficiente di controllo di flusso ( $C_i$ ) è dato dal rapporto delle pendenze iniziali delle curve: attività integrata/attività specifica.  $C_i$  sarà tanto più vicino a 1 quanto più le due pendenze saranno simili. Dalle titolazioni con inibitore si ricavano anche i “grafici-soglia” (paragrafo 5.3) ponendo in grafico la percentuale di attività integrata residua in funzione della percentuale di inibizione dell’attività della singola tappa enzimatica. Se l’enzima in esame esercita un forte controllo sull’attività integrata otteniamo un grafico lineare. Quando, invece, il controllo esercitato dall’enzima specifico è basso, il grafico presenta un andamento bifasico che evidenzia un valore soglia, superato il quale, si osserva una brusca diminuzione del processo integrato.

**[1.1] Analisi del controllo di flusso da parte del Complesso I, del Complesso III e del Complesso IV in mitocondri permeabilizzati di fegato di ratto (RLM).**

<b>RLM: Valori medi di attività espressi in nmoli/min/mg proteina</b>	
Attività NADH ossidasica	<b>60.4 ± 7.8</b>
Complesso I (NADH-DB ossidoreduttasi)	<b>82.3 ± 7.6</b>
Complesso III (DBH <sub>2</sub> -Cit.c <sup>3+</sup> ossidoreduttasi)	<b>432.2 ± 87.5</b>
Complesso IV (citocromo ossidasi)	<b>575</b>

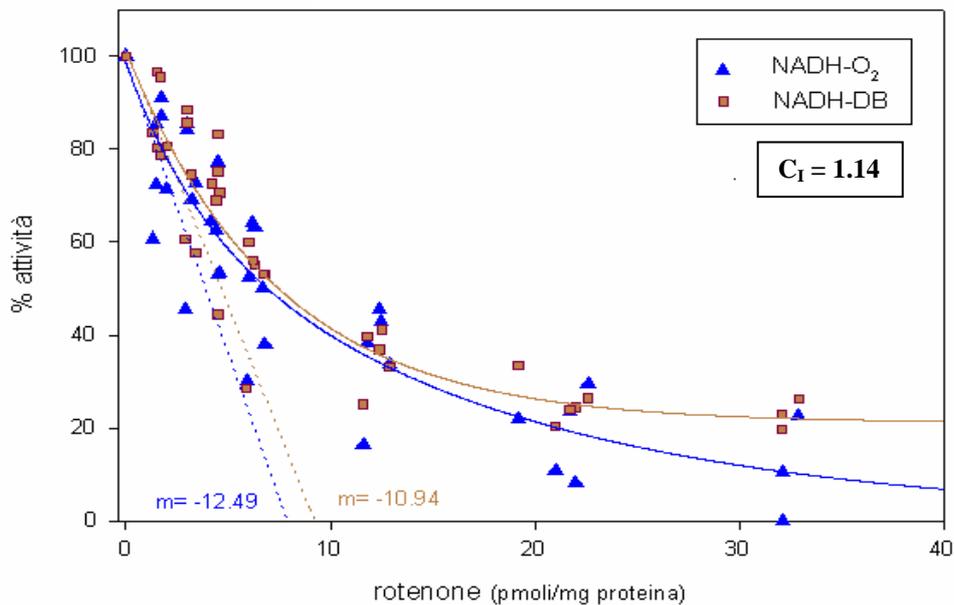
Tabella 1. Valori medi di attività espressi in nmoli/min/mg di proteina

La permeabilizzazione ottenuta attraverso la sonicazione (par.3.3) porta alla rottura delle due membrane mitocondriali con la conseguente perdita del “controllo respiratorio” cioè la dipendenza della velocità di respirazione dalla concentrazione di ADP. La fosforilazione ossidativa si dice “disaccoppiata” dalla respirazione. Quest’ ultima è sempre elevata anche in assenza di ADP, e manca la sintesi di ATP.

Le curve di inibizione ottenute mediante titolazione con rotenone sia dell’attività integrata NADH ossidasica (NADH-O<sub>2</sub>) sia dell’attività specifica del Complesso I (NADH-DB) sono riportate in **figura 1**. Analizzando il primo tratto del grafico, si osserva che le rette tangenti ai tratti iniziali delle due curve sono pressoché parallele tra loro; ciò è dimostrato dal fatto che i coefficienti angolari di tali rette sono simili (-12.49 e -10.94, rispettivamente per l’attività integrata e per l’attività specifica). Calcolando il coefficiente di controllo di flusso del Complesso I si ottiene un valore pari a 1.14.

In **figura 2** sono riportate le curve di titolazione con mucidina dell’attività totale NADH ossidasica (NADH-O<sub>2</sub>) e dell’attività specifica del Complesso III (DBH<sub>2</sub>-Cit.c<sup>3+</sup>). Entrambe le curve mostrano un decadimento dell’attività secondo un andamento iperbolico: e i punti sperimentali dei rispettivi tratti

iniziali si sovrappongono estesamente ( $C_{III} = 0.45$ ). Il grafico mostrato in **figura 3** riporta, invece, le curve di titolazione con KCN dell'attività totale ( $NADH-O_2$ ) e dell'attività specifica del Complesso IV (Cit.  $c^{2+}-O_2$ ). Per interpolare le due serie di punti sperimentali, è stato necessario ricorrere a funzioni matematiche diverse che mettono in risalto la grande diversità tra le pendenze iniziali delle due curve: l'andamento dell'attività integrata si presenta decisamente meno ripido rispetto all'andamento dell'attività specifica, e ciò indica una più lenta risposta dell'attività integrata a quantità corrispondenti di inibitore. Calcolando il coefficiente di controllo di flusso del Complesso IV si ottiene un valore di 0.06.



*Figura 1.* Confronto tra l'attività integrata ( $NADH-O_2$ ) e l'attività specifica del Complesso I ( $NADH-DB$ ) titolate con rotenone in RLM.

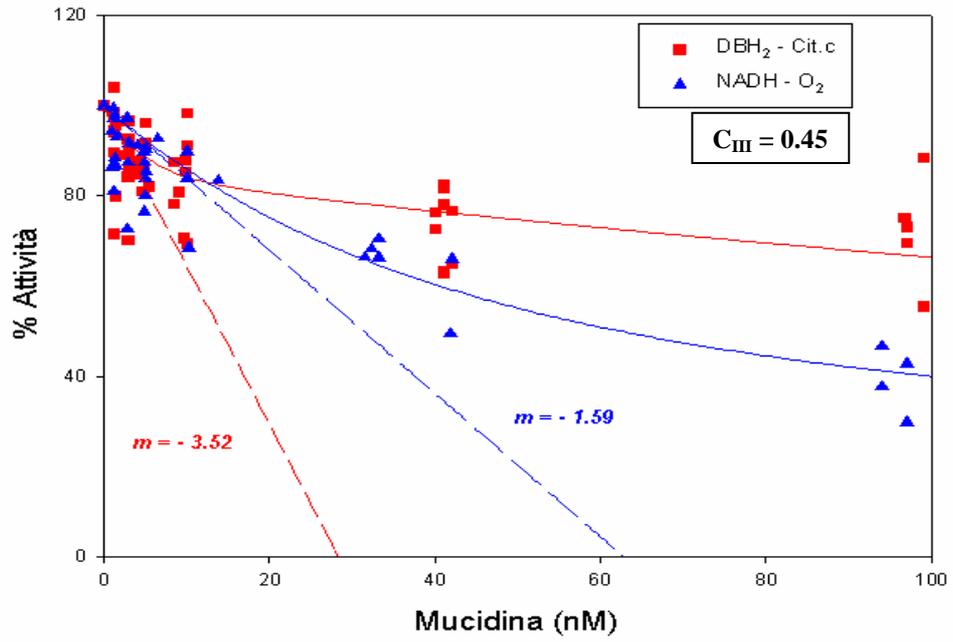


Figura 2. Confronto tra l'attività integrata (NADH-O<sub>2</sub>) e l'attività specifica del Complesso III (DBH<sub>2</sub>-Cit.c) titolate con mucidina in RLM.

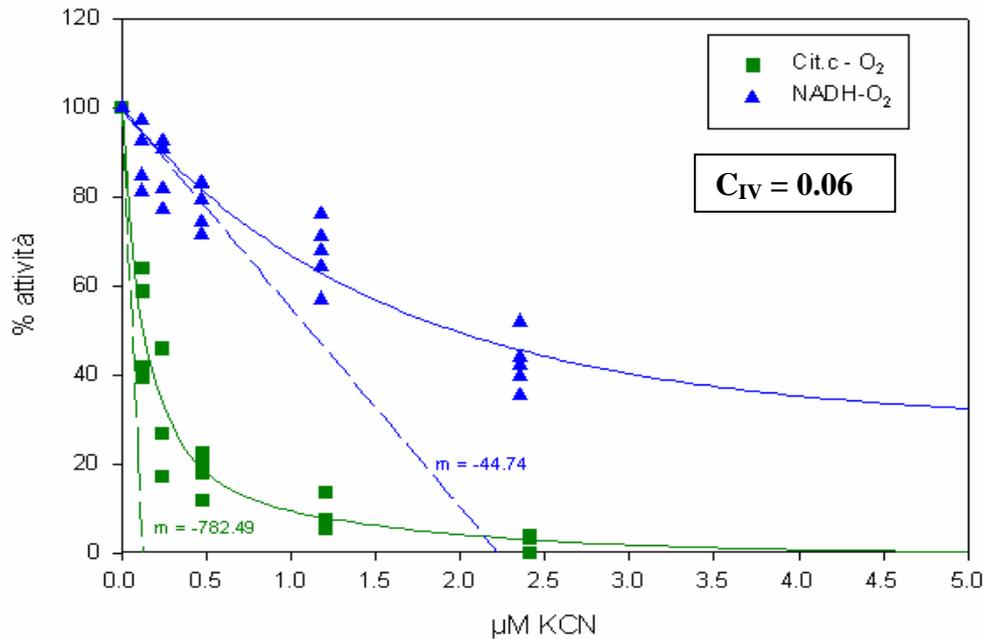


Figura 3. Confronto tra l'attività integrata (NADH-O<sub>2</sub>) e l'attività specifica del Complesso IV (Cit.c<sup>2+</sup>-O<sub>2</sub>) titolate con KCN in RLM.

**[1.2] Analisi del controllo di flusso da parte del Complesso I e del Complesso III in mitocondri accoppiati di fegato di ratto (RLM).**

E' una condizione prossima a quella fisiologica perchè i mitocondri sono integri, c'è il "controllo respiratorio" e quindi sono capaci di compiere la fosforilazione ossidativa.

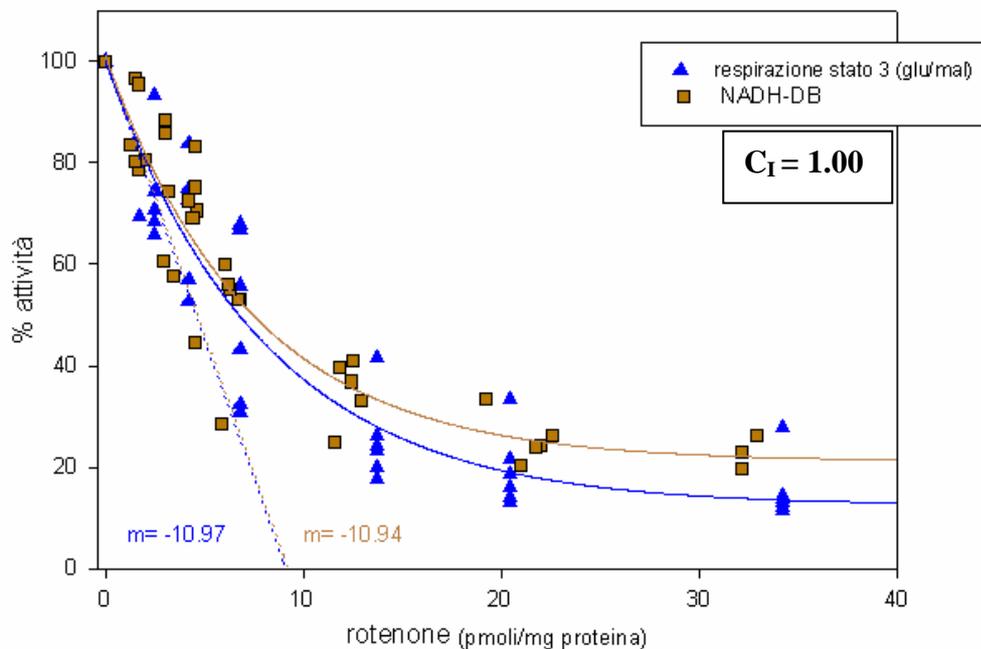
Le curve di inibizione ottenute in RLM, mediante titolazione con rotenone sia dell'attività respiratoria integrata NADH-dipendente in **stato 3** (misurata in presenza di glutammato/malato e ADP), sia dell'attività specifica del Complesso I (NADH-DB), sono riportate in **figura 4**.

Come evidenziato dalle rette tangenti ai tratti iniziali delle due curve, che risultano pressoché coincidenti tra loro, il Complesso I ha un controllo elevato ( $C_I = 1$ ), sulla capacità respiratoria mitocondriale in condizioni di accoppiamento metabolico con il processo della fosforilazione ossidativa (stato 3).

Un risultato analogo è stato ottenuto titolando con mucidina, l'attività integrata glutammato/malato-O<sub>2</sub> in **stato 3** e quella specifica del Complesso III (DBH<sub>2</sub>-Cit.c<sup>3+</sup>) (**figura 5**). Infatti, gli andamenti iperbolici di entrambe le curve di inibizione, indicano, un elevato controllo da parte del Complesso III sull'attività totale (C<sub>III</sub> = 0.69 ).

In **figura 6** e **figura 7** sono confrontate, rispettivamente, le curve di inibizione del Complesso I e del Complesso III con le corrispondenti curve di inibizione dell'attività integrata glutammato/malato-O<sub>2</sub> in **stato 4**.

Il controllo esercitato dai due complessi sull'attività glutammato/malato-O<sub>2</sub> in stato 3 (figure 4 e 5) viene meno in **stato 4**. Ciò è in accordo con il presupposto che, in quest'ultima condizione metabolica, altri fattori possono controllare il processo di respirazione (potenziale di membrana, ATP sintasi, trasportatori dei substrati, glutammato deidrogenasi e il passaggio ossidativo da  $\alpha$ -chetoglutarato a ossalacetato nel ciclo dell'acido citrico).



*Figura 4.* Confronto tra l'attività integrata (glutammato/malato-O<sub>2</sub>) e l'attività specifica del Complesso I (NADH-DB) titolate con rotenone in RLM accoppiati in stato3.

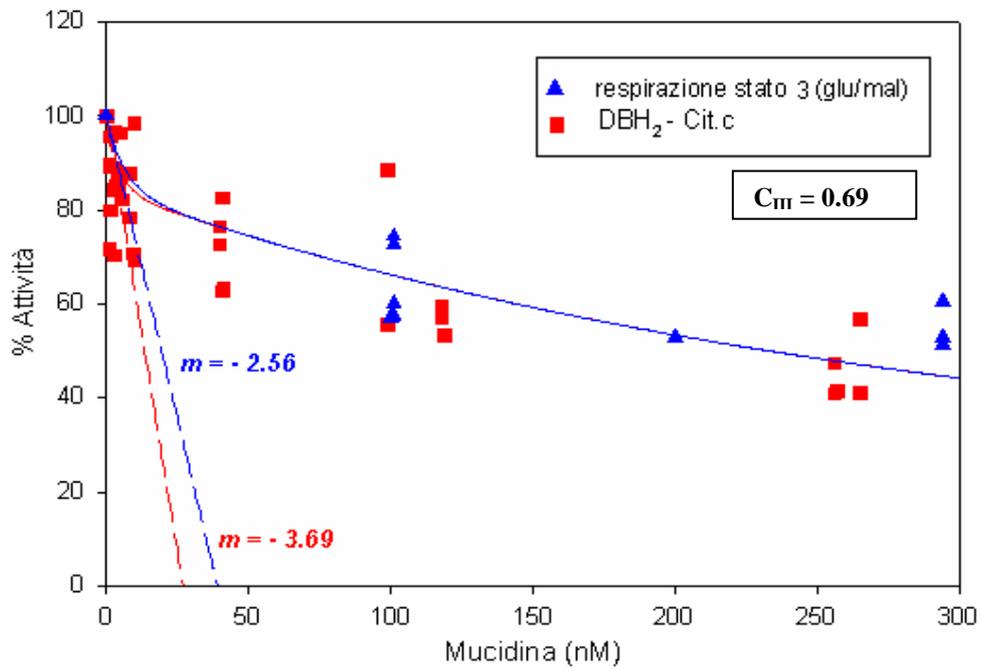


Figura 5. Confronto tra l'attività integrata (glutammato/malato-O<sub>2</sub>) e l'attività specifica del Complesso III (DBH<sub>2</sub>-Cit.c<sup>2+</sup>) titolate con rmucidina in RLM accoppiati in stato3.

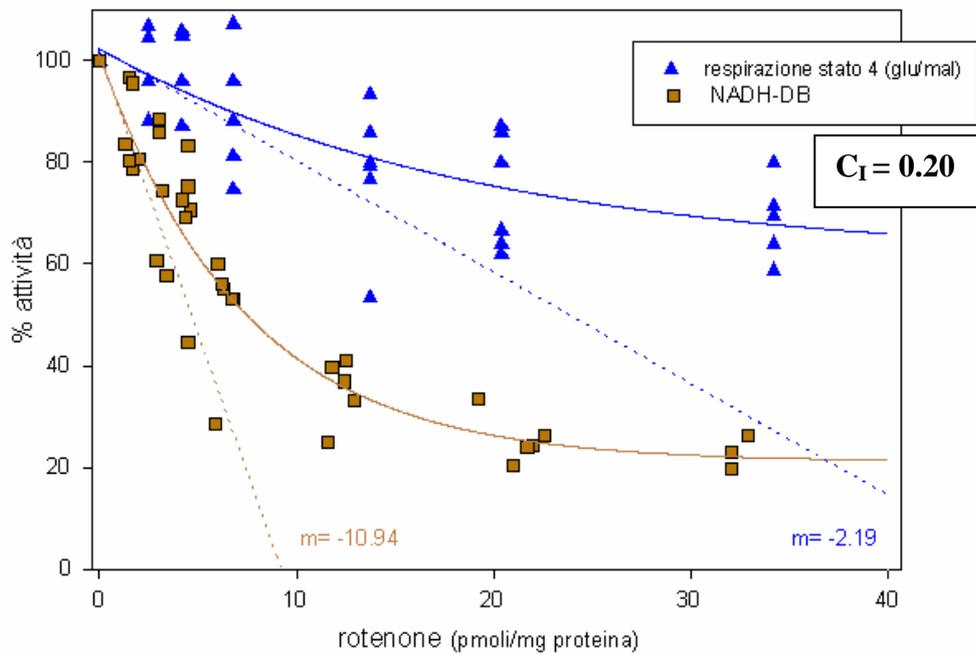


Figura 6. Confronto tra l'attività integrata (glutammato/malato-O<sub>2</sub>) e l'attività specifica del Complesso I (NADH-DB) titolate con rotenone in RLM accoppiati in stato 4.

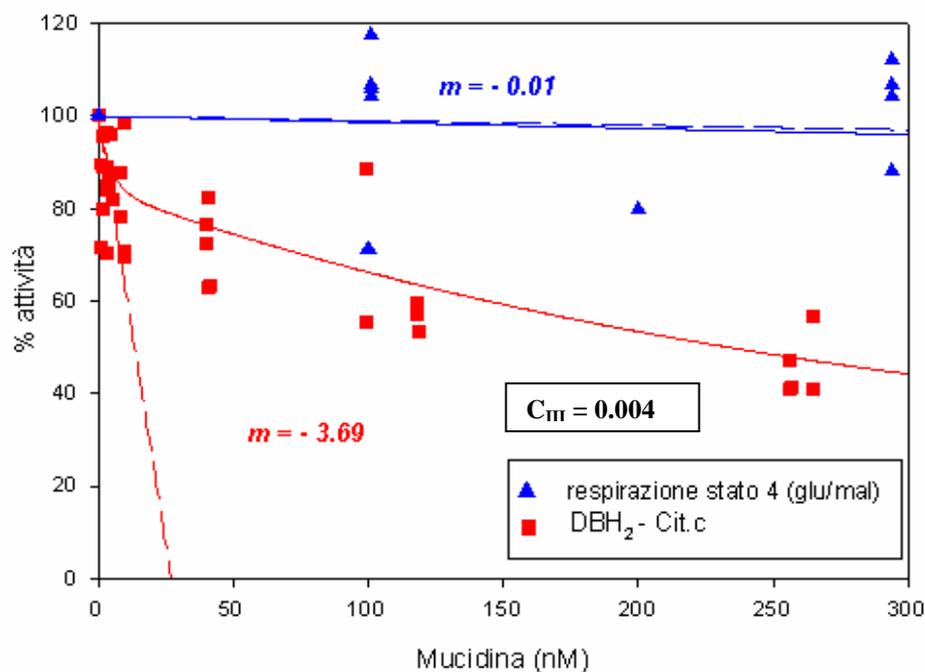


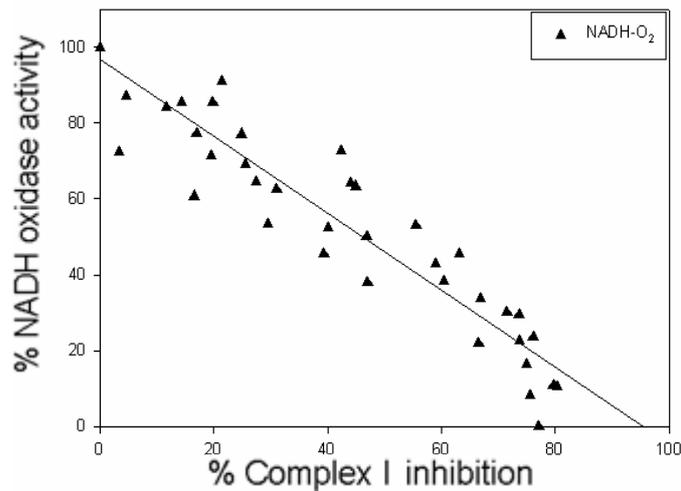
Figura 7. Confronto tra l'attività integrata (glutammato/malato-O<sub>2</sub>) e l'attività specifica del Complesso III (DBH<sub>2</sub>-Cit.c<sup>2+</sup>) titolate con mucidina in RLM accoppiati in stato 4.

### [1.3] Grafici-soglia.

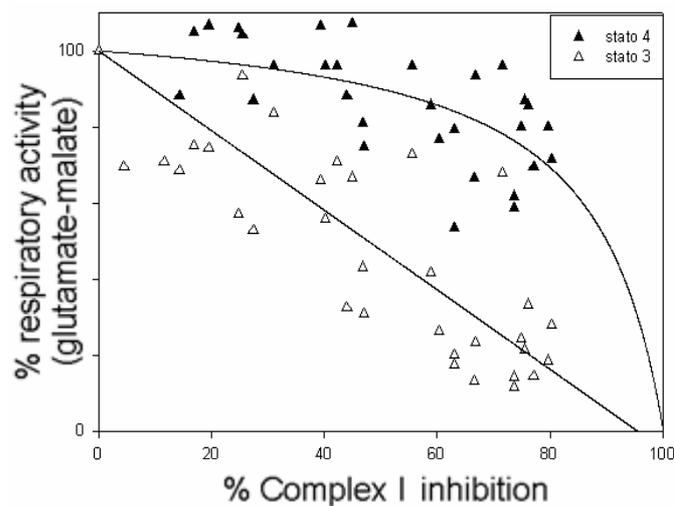
L'elaborazione in forma di grafici-soglia dei dati sperimentali raccolti in questo studio ha prodotto la serie di figure riportate nelle pagine seguenti (Figure 8-12).

L'andamento lineare dei grafici riferiti al Complesso I ed al Complesso III (Figure 8, 9 e 10, 11) rivela la forte dipendenza dell'attività NADH ossidasica e glutammato/malato ossidasica in stato 3 dalla capacità catalitica specifica di questi due enzimi. Per questo motivo, in accordo con i principi dell'Analisi del Controllo di Flusso<sup>[107]</sup>, possiamo ritenere che il Complesso I e il Complesso III detengono la quasi totalità del controllo metabolico sulla respirazione sia in mitocondri permeabilizzati che in mitocondri accoppiati in condizioni fosforilanti (stato3).

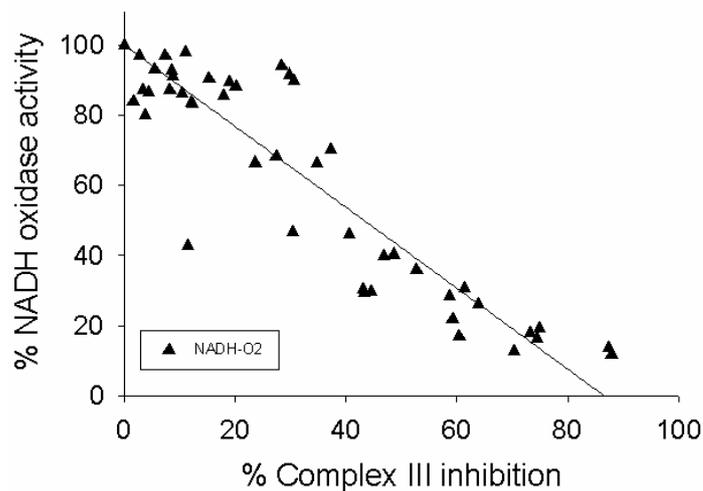
Il Complesso IV, invece, controlla in misura minima l'ossidazione aerobia del NADH: il grafico-soglia, in **figura 12**, mostra un andamento chiaramente bifasico, ad indicare che solo quando l'attività specifica della citocromo ossidasi risulta fortemente inibita (soglia di inibizione oltre il 60% circa) si possono avere ripercussioni sensibili a livello della catena respiratoria.



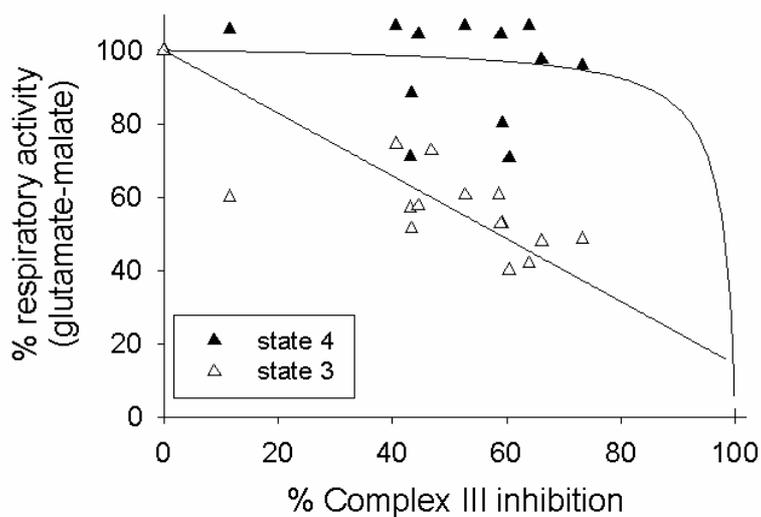
*Figura 8.* Grafico soglia dell'attività NADH-ossidasi residua, in funzione della percentuale di inibizione del Complesso I in mitocondri permeabilizzati di fegato di ratto.



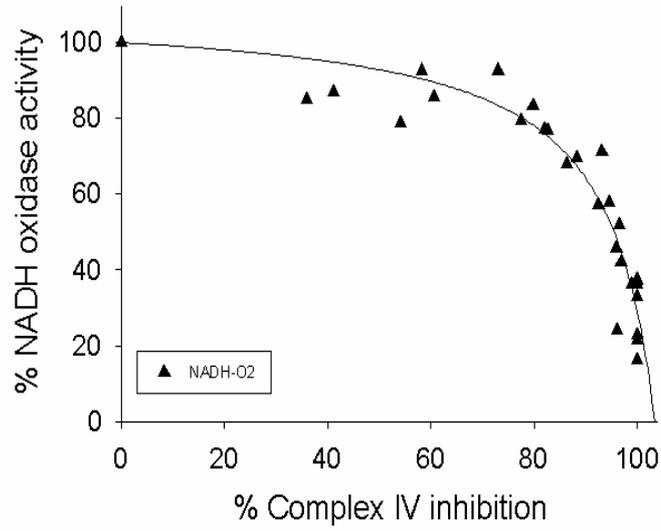
*Figura 9.* Grafici soglia dell'attività glutammato/malato-ossidasi residua, in funzione della percentuale di inibizione del Complesso I in RLM accoppiati in stato 3 e in stato 4.



*Figura 10.* Grafico soglia dell'attività NADH-ossidasi residua, in funzione della percentuale di inibizione del Complesso III in mitocondri permeabilizzati di fegato di ratto.



*Figura 11.* Grafici soglia dell'attività glutammato/malato-ossidasi residua, in funzione della percentuale di inibizione del Complesso III in RLM accoppiati in stato 3 e in stato 4.



*Figura 12.* Grafico-soglia dell'attività NADH-ossidasi residua, in funzione della percentuale di inibizione del Complesso IV in mitocondri permeabilizzati di fegato di ratto.

## 2. EVIDENZE DALLA GEL ELETTROFORESI

In questa sezione vengono riportati i risultati ottenuti con tecniche elettroforetiche applicate a mitocondri di fegato di ratto (RLM), di cuore bovino (BHM) e di tubero di patata (POM). Come descritto nel capitolo 4, la BN-PAGE (par. 4.2) permette la separazione dei complessi enzimaticamente attivi e la visualizzazione di bande elettroforetiche ad alto peso molecolare riferibili ai supercomplessi purificati, usando detergenti non ionici. Le singole subunità costituenti i complessi respiratori, siano essi in forma di unità singole o di supercomplessi, sono state risolte con la 2D SDS-PAGE (par. 4.3) e poi rivelate, dopo wester blotting, attraverso il sistema chemiluminescente descritto nel par. 4.4.

Esempi di 2D BN/SDS PAGE di RLM, in cui sono state messe in rilievo alcune subunità specifiche dei Complessi I, III, IV e V, sono mostrati in **figura 13A e 13B**. La presenza di subunità dei complessi respiratori in corrispondenza della zona ad altissimo peso molecolare della BN PAGE (>1200kDa), indica la loro associazione in forma di un supercomplesso del tipo I+III<sub>2</sub>+IV<sub>x</sub>. Si osserva, inoltre, la co-migrazione del Complesso V in forma dimerica (V<sub>2</sub>).

Nella regione dei pesi molecolari ≤1000 kDa, si evidenziano le subunità degli stessi complessi respiratori presenti come unità indipendenti, non aggregate in supercomplessi.

Inoltre, la nostra indagine ha compreso il citocromo *c*, allo scopo di dimostrare una sua eventuale presenza all'interno delle sovrastrutture respiratorie mitocondriali.

I supercomplessi di RLM appaiono privi di citocromo *c* (**figura 13A e 13B**). Pertanto, abbiamo pensato di impiegare aliquote di RLM per studiare quale potesse essere l'effetto di una supplementazione *in vitro* di citocromo *c* esogeno. Le aliquote sono state miscelate in provetta con quantità crescenti di citocromo *c* standard di origine equina e, mediante 2D BN/SDS PAGE e successivo immuno-blotting, abbiamo potuto verificare che il citocromo *c* è

presente nella frazione proteica mitocondriale (recuperata dopo trattamento con digitonina) sia in forma libera sia in forma legata ai supercomplessi (**figura 14**). Questo dato, che è particolarmente evidente nei campioni trattati con il dosaggio più elevato (18ng di cit. c/ $\mu$ g di prot.), induce a pensare che la presenza di un consistente pool di molecole di citocromo c libero possa “costringere” alcune particelle all’interno del supercomplesso I+III+IV, dove rimangono legate anche dopo trattamento con digitonina.

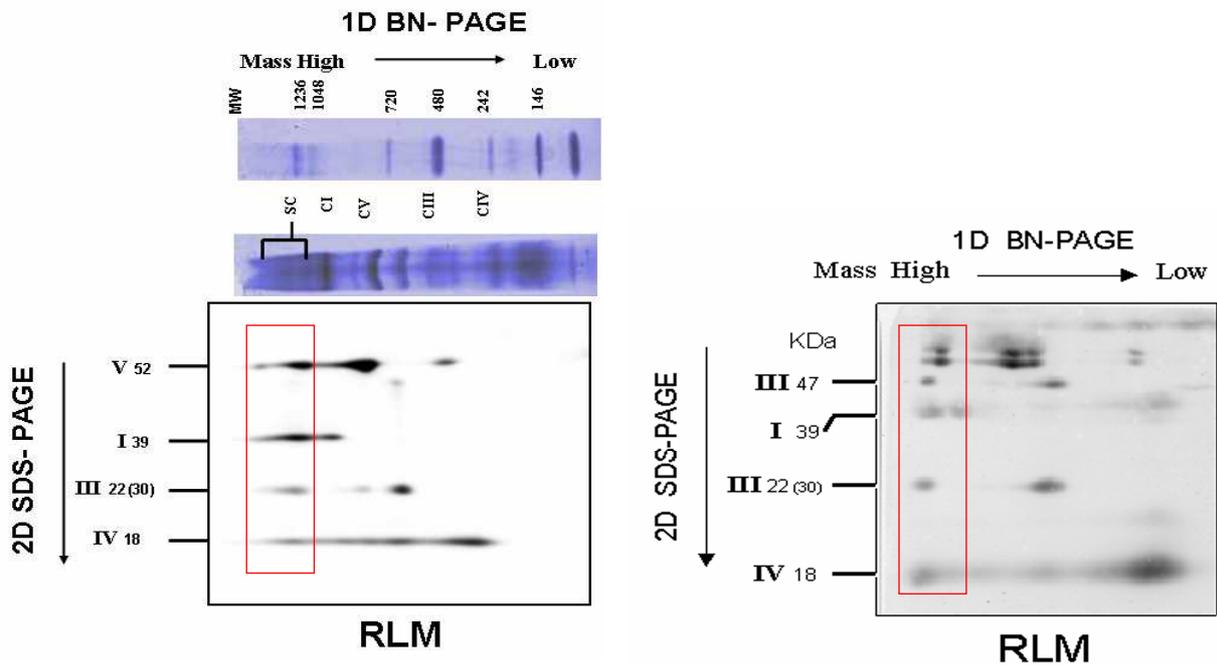
E’ interessante notare che, invece, nei POM (**figura 15**) si dimostra chiaramente la presenza di citocromo c endogeno sia in forma libera sia, soprattutto, in forma legata a strutture proteiche di elevato peso molecolare che abbiamo identificato come supercomplessi respiratori composti da Complesso I, III e IV.

Nei BHM (**figura 16**) si evidenzia la presenza dei complessi respiratori in corrispondenza della zona ad altissimo peso molecolare della BN PAGE (>1200kDa) a indicare la loro associazione in forma di un supercomplesso del tipo I+III<sub>2</sub>+IV<sub>x</sub>. Si osserva, inoltre, la co-migrazione del Complesso V in forma dimerica (V<sub>2</sub>) e nella regione dei pesi molecolari  $\leq$ 1000 kDa, si evidenziano le subunità degli stessi complessi respiratori presenti come unità indipendenti, non aggregate in supercomplessi.

Dopo trattamento con digitonina si sono potute evidenziare solo piccole tracce di citocromo c (dato non mostrato).

I mitocondri di *S. cerevisiae* (**figura 17**) rappresentano un modello interessante per lo studio dei supercomplessi in quanto in questo lievito è assente il Complesso I e i Complessi III e IV, come già dimostrato in letteratura <sup>[125]</sup>, sono aggregati in due diverse stechiometrie (III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> e III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>). Pensando che all’interno di questi supercomplessi potesse trovarsi il citocromo c, abbiamo eseguito l’indagine 2D BN/SDS PAGE e wester blotting, ma non è stato possibile rilevare la presenza di tracce di citocromo nell’aggregato. Al contrario, l’analisi mostra una forte presenza di citocromo c in forma libera. Tuttavia, si può presumere che originariamente esso fosse

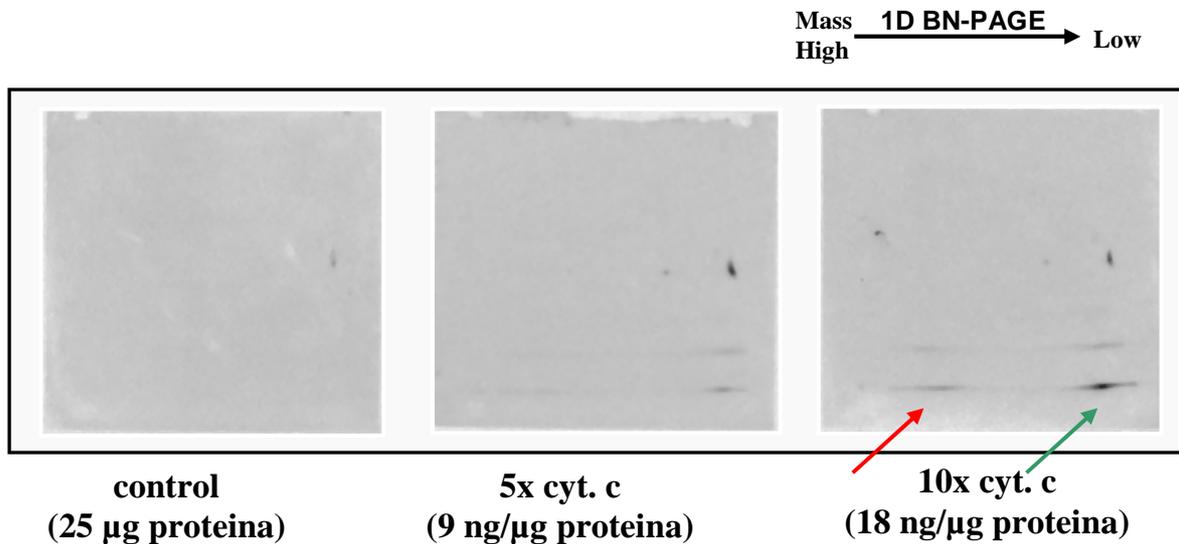
debolmente legato al supercomplesso III + IV, e che tale legame non abbia resistito al trattamento con digitonina.



*Figura 13A (destra) e 13B (sinistra). Separazione elettroforetica (2D BN/SDS PAGE) dei supercomplessi del sistema della fosforilazione ossidativa in mitocondri di fegato di ratto (RLM). I gel di seconda dimensione blottati sulla membrana sono stati esposti a cocktail di anticorpi monoclonali specifici per alcune subunità di ciascun complesso della catena respiratoria e per l'ATP sintasi: NDUF9 (39kDa) del Complesso I, la proteina di Rieske (22kDa dal peso molecolare apparente di 30kDa) del Complesso III, la subunità Core-1 (47 kDa, fig.13B) del Complesso III, COX-IV (18kDa) del Complesso IV e subunità  $\beta$  (52kDa) della F1Fo-ATPasi, come indicato nelle immagini.*

13A. 2D BN/SDS PAGE eseguita mediante minigel, come descritto nel par 4.2

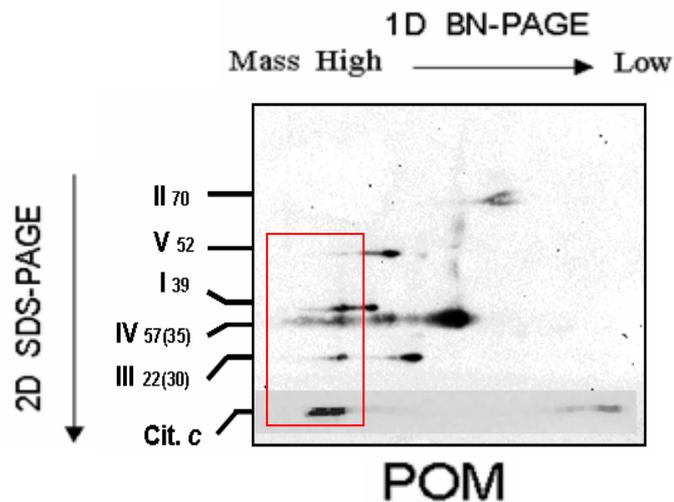
13B. 2D BN/SDS PAGE eseguita mediante 1D BN-PAGE gel 20x20x0.15cm (descritta nel par. 4.2) seguita da trattamento con una soluzione di SDS e  $\beta$ -mercaptoetanolo entrambe all'1% per 30 minuti e allestimento di una SDS PAGE 20x20x0.15cm a gradiente fisso del 10%.



**Figura 14. Immunoblotting dopo 2D BN-SDS PAGE di mitocondri di fegato di ratto (RLM) in presenza di quantità crescenti di citocromo c equino aggiunto al campione prima del trattamento con digitonina.**

La membrana di nitrocellulosa è stata esposta all'anticorpo monoclonale specifico per il citocromo c (Invitrogen, 33-8500).

È interessante notare che il citocromo c si accumula in quantità crescente sia come molecola libera (freccia verde, corrispondente ai 15kDa nella 1D) sia come molecola legata nel supercomplesso (freccia rossa, corrispondente alla zona ad alto peso molecolare nella 1D).



**Figura 15. Immunoblotting dopo 2D BN-SDS PAGE BN/SDS PAGE di mitocondri di tubero di patata (POM).**

La membrana di nitrocellulosa è stata esposta ad un cocktail di anticorpi monoclonali specifici per ogni complesso della catena respiratoria.

NDUFA9 (39kDa) del Complesso I, la subunità 70kDa del Complesso II, la proteina di Rieske (22kDa dal peso molecolare apparente di 30kDa) del complesso III, COX-I (57kDa dal peso apparente di 35kDa) del Complesso IV, subunità  $\beta$  (52kDa) della F1Fo-ATPasi e anti-citocromo c (invitrogen, 33-8500).

All'interno del supercomplesso I+III<sub>2</sub>+IV<sub>x</sub> (rettangolo rosso) è stato possibile osservare la presenza del citocromo c endogeno.

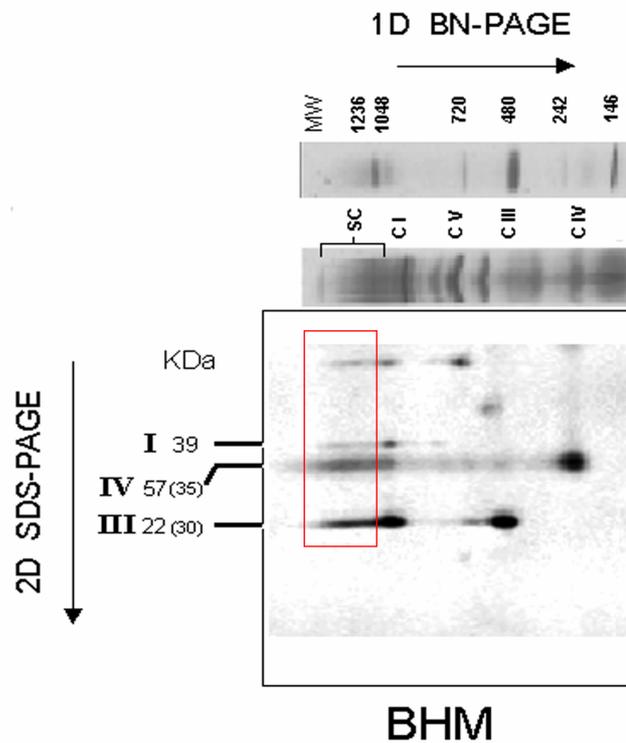
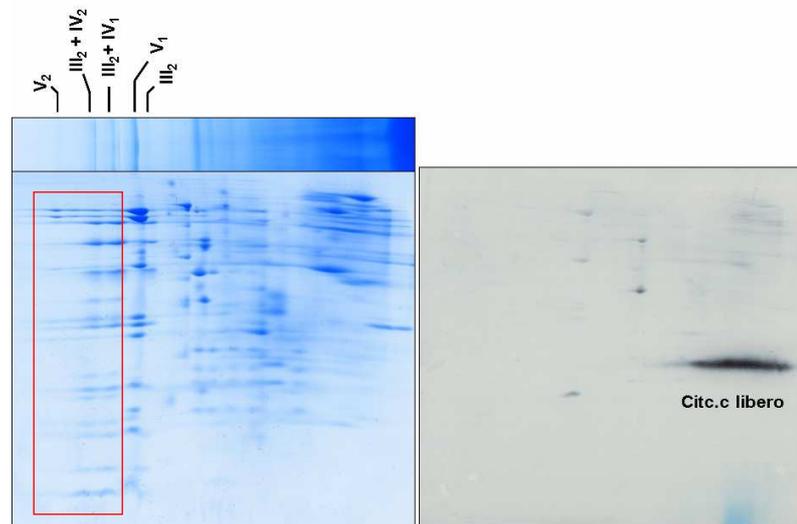


Figura 16. Immunoblotting dopo 2D BN-SDS PAGE BN/SDS PAGE di mitocondri di cuore bovino (BHM).

La membrana di nitrocellulosa è stata esposta ad un cocktail di anticorpi monoclonali specifici per ogni complesso della catena respiratoria.

NDUFA9 (39kDa) del Complesso I, la proteina di Rieske (22kDa dal peso molecolare apparente di 30kDa) del complesso III, COX-I (57kDa dal peso apparente di 35kDa) del Complesso IV, subunità  $\beta$  (52kDa) della F1Fo-ATPasi.

Nel rettangolo rosso si evidenzia la presenza del supercomplesso I+III<sub>2</sub>+IV<sub>x</sub>.



## S.cerevisiae

Figura 17. Immunoblotting dopo 2D BN-SDS PAGE BN/SDS PAGE (vedi fig. 13B) di mitocondri di S.cerevisiae.

Il gel di seconda dimensione blottati sulla membrana sono stati esposti all' anticorpo monoclonale specifico per il citocromo c (Invitrogen 33-8500).

# CONCLUSIONI

I nostri dati sperimentali sull'attività respiratoria mitocondriale sono stati interpretati alla luce di quanto previsto dalla teoria del controllo di flusso metabolico e di quanto osservato con la gel elettroforesi.

In particolare, abbiamo visto che, in RLM permeabilizzati, la somma dei coefficienti di controllo di flusso del Complesso I e del Complesso III è maggiore di 1 e abbiamo dimostrato che questi due complessi esercitano, entrambi, un forte controllo anche in RLM accoppiati in condizioni fosforilanti (stato 3).

Per cui, in accordo con la teoria del controllo di flusso, si può postulare l'esistenza di un'associazione preferenziale tra Complesso I e Complesso III della catena respiratoria mitocondriale. Una analoga indicazione era già stata prodotta nel nostro laboratorio <sup>[3]</sup> impiegando mitocondri di cuore bovino permeabilizzati ma, per la prima volta, siamo ora in grado di affermare che il supercomplesso I-III è presente anche in mitocondri (RLM) integri, cioè capaci di compiere il processo di fosforilazione ossidativa, per cui è verosimile pensare che il trasferimento elettronico da Complesso I a Complesso III possa effettivamente realizzarsi, anche in condizioni fisiologiche, attraverso un fenomeno di channelling del Coenzima Q (vedi par. 4.3). Bisogna, però, sottolineare che questa indicazione è da riferirsi ad una condizione di respirazione mitocondriale in stato 3 e che, al momento, non è possibile ricavare informazioni riguardo l'organizzazione strutturale della catena respiratoria mediante analisi del controllo di flusso in stato 4. Infatti, è noto che in questa condizione altri processi metabolici intervengono a controllare il sistema della fosforilazione ossidativa (es. il potenziale transmembrana) per cui si misurano coefficienti di controllo di flusso molto bassi per tutti gli enzimi redox della catena e non è possibile evincere quale sia il loro stato di aggregazione.

Il Complesso IV studiato in RLM permeabilizzati si comporta in maniera differente, tale da far supporre che esso non sia coinvolto nella formazione di aggregati sopramolecolari funzionali con gli altri enzimi della catena respiratoria. Infatti, solo quando l'attività specifica della citocromo ossidasi

risulta fortemente inibita (soglia di inibizione oltre il 60% circa) si possono avere ripercussioni sensibili a livello della attività NADH ossidasi della catena respiratoria (figura 12).

Come schematizzato in **figura 18** l'idea che Complesso I e III siano associati tra loro ( $I_1III_2$ ) trova conferma nell'analisi strutturale da noi condotta, mediante gel elettroforesi, ed è in linea con evidenze analoghe della letteratura. Tuttavia, mentre l'analisi del controllo di flusso condotta su RLM suggerisce che il Complesso IV non sia aggregato ai supercomplessi, con la gel elettroforesi si osserva anche l'esistenza di aggregati del tipo  $I-III_2-IV_x$  **figura 18B**.

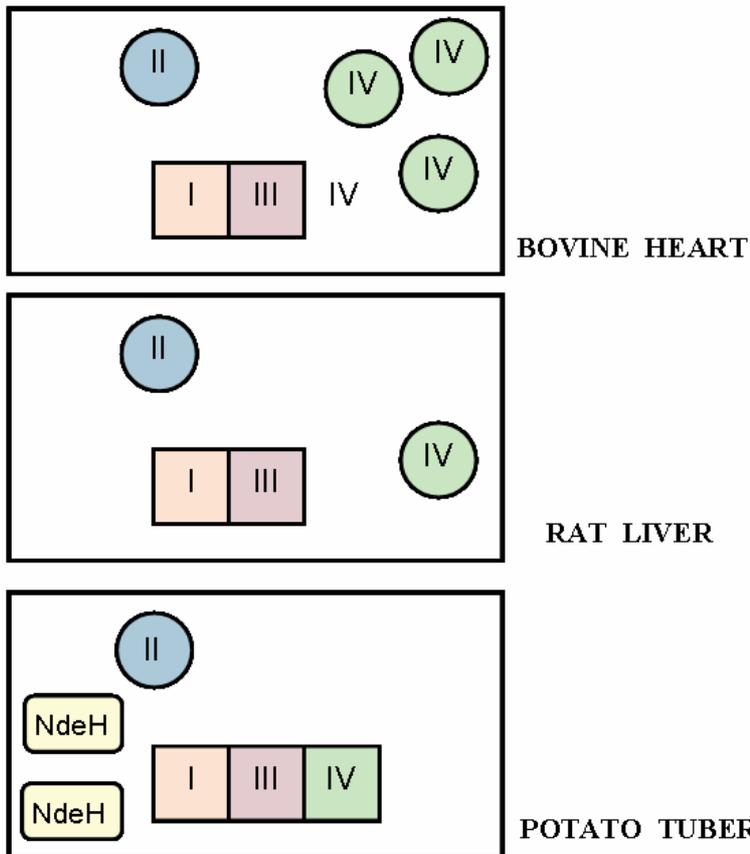
	<b>BHM</b>	<b>POM</b>	<b>RLM</b>
<b>Citocromi "b"</b>	584 ± 51	337 ± 37	46.98 ± 3.5
<b>Citocromi (c + c<sub>1</sub>)</b>	568 ± 33	421 ± 19	184 ± 19.8
<b>Citocromi (a + a<sub>3</sub>)</b>	710 ± 48	202 ± 33	47.4 ± 13.5
<b>Rapporto Complesso III/Complesso IV</b>	<b>2.4</b>	<b>1.2</b>	<b>0.9</b>

Tabella 2. Valori medi del contenuto di citocromi. I dati sono espressi in pmoli/mg proteina.

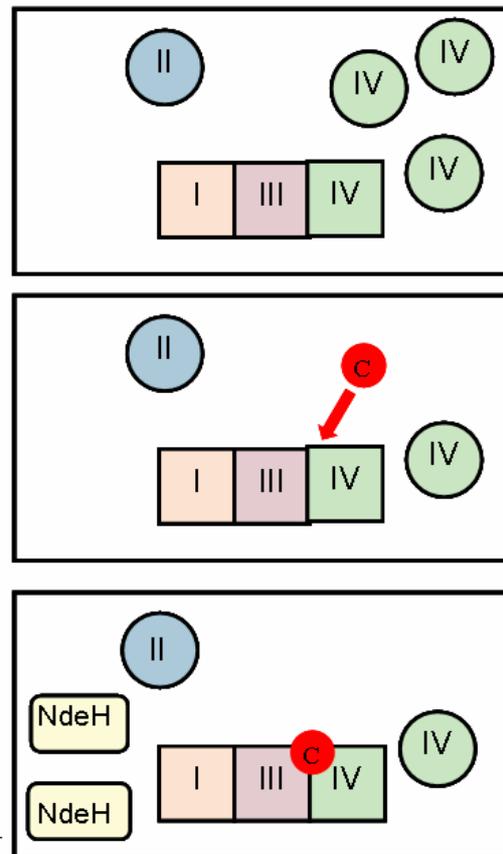
L'ipotesi già avanzata in passato per giustificare una simile discrepanza rilevata in BHM suggeriva che l'analisi del controllo di flusso potesse essere inficiata da una forte presenza di unità di Complesso IV in forma monomeric, tale da mascherare un'eventuale frazione legata al supercomplesso I-III. Negli RLM, però, il rapporto stechiometrico tra Complesso III e Complesso IV è di 1 a 1, come è anche nei POM (**Tabella 2**) e, come in questo ultimo caso, l'analisi cinetica dovrebbe essere in grado di rilevare aggregati funzionali in cui è coinvolto il Complesso IV. Infatti, studi sui POM condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato per i complessi I, III, IV un controllo di flusso che porta a grafici sogli con andamento lineare, per tutti e tre i complessi, con i rispettivi coefficienti di controllo di flusso pari circa a 1 (**Tabella 3**). In realtà, una importante differenza tra i due casi è data dal fatto che, dopo 2D BN/SDS PAGE, il citocromo c appare legato al supercomplesso nei POM, ma

non negli RLM. Inoltre, i nostri dati indicano che dopo trattamento con citocromo c esogeno, in RLM si assiste ad un aumento della frazione libera e contemporaneamente il supercomplesso I-III-IV tende ad arricchirsi di cit. c. E' presumibile che il citocromo c aggiunto, una volta inseritosi nel supercomplesso, sia importante per il funzionamento del Complesso IV aggregato e che ciò possa essere rilevato dall'analisi del controllo di flusso metabolico.

### Evidenze dai dati cinetici



### Evidenze dalla gel-elettroforesi



*Figura 18A (sinistra) e 18B (destra). Immagine che mette a confronto i dati cinetici ottenuti con l'analisi del controllo di flusso metabolico e quelli strutturali ottenuti con la 2D BN/SDS PAGE.*

**18A.** L'analisi cinetica evidenzia l'aggregato I+III<sub>2</sub> in tutti i campioni studiati e il coinvolgimento anche del Complesso IV nell'aggregato solo nei POM. Nei BHM è molto probabile, dato l'elevato numero di Complessi IV, che la frazione eventualmente associata sia mascherata dalla frazione libera. Negli RLM, come nei POM, la quantità di Complesso IV è simile nei due casi e quindi la frazione legata dovrebbe essere osservabile cineticamente.

**18B.** La gel elettroforesi applicata a tutte e 3 i campioni mitocondriali rivela il supercomplesso I+III<sub>2</sub>+IV<sub>x</sub>. Nei BHM la grossa frazione libera di Complesso IV, come atteso, ha mascherato cineticamente la frazione legata.

Nei supercomplessi purificati dai RLM non si può rilevare la presenza del citocromo c che, se addizionato esogenamente compare, prima, come frazione libera e, poi, legata. Ciò suggerisce per questa proteina un ruolo di "pool". Questa osservazione unita a quella dei POM, in cui il supercomplesso è osservato con entrambe le metodologie, ed è presente endogenamente il citocromo c, suggerisce che questa proteina sia fondamentale per il funzionamento del Complesso IV nell'aggregato multienzimatico dei RLM.

	BHM		POM	
	Attività NADH ossidasi	Attività succinato ossidasi	Attività NADH ossidasi	Attività Succinato ossidasi
<b>Complex I</b>	1.06	n.a.	0.89	n.a.
<b>Complex II</b>	n.a.	0.88	n.a.	0.38
<b>Complex III</b>	0.90	0.34	1.11	1.05
<b>Complex IV</b>	0.26	0.20	1.15	0.94

**n.a.: non applicabile**

*Tabella 3.* I coefficienti di controllo di flusso ( $C_i$ ) dei complessi della catena respiratoria coinvolti nell'ossidazione del NADH e del succinato in mitocondri di cuore bovino (BHM) e in mitocondri di tubero di patata (POM) <sup>[4]</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

- 
- <sup>1</sup> Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupte S.S., The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18 (1986) 331-368.
- <sup>2</sup> Schägger H., Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37861-37867.
- <sup>3</sup> Bianchi C., Genova M.L., Parenti Castelli G., Lenaz G. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36562-36569.
- <sup>4</sup> Genova M.L., Baracca A., Biondi A., Casalena G., Faccioli M., Falasca A.I., Formiggini G., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G. Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim. Biophys. Acta.* 1777(7-8) (2008) 740-6.
- <sup>5</sup> Chan D.C., Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125 (2006) 1241-1252.
- <sup>6</sup> Lenaz G., Baracca A., Fato R., Genova M.L., Solaini G. New insights into structure and function of mitochondria and their role in ageing and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 417-437.
- <sup>7</sup> Lenaz G., Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* 1366 (1998) 53-67.
- <sup>8</sup> McFarland R., Taylor R.W., Turnbull D.M. Mitochondrial disease--its impact, etiology, and Pathology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 77 (2007) 113-155.
- <sup>9</sup> Reeve A.K., Krishnan K.J., Turnbull D.M. Age related mitochondrial degenerative disorders in humans. *Biotechnol. J.* 3 (2008) 750-756.
- <sup>10</sup> Wallace D.C., A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 359-407.
- <sup>11</sup> Zeviani M., Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 20 (2007) 564-571.
- <sup>12</sup> Kukat A., Trifunovic A., Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp. Gerontol.* 44 (2009) 101-105.

- 
- <sup>13</sup> Gruber J., Schaffer S., Halliwell B., The mitochondrial free radical theory of ageing—where do we stand? *Front. Biosci.* 13 (2008) 6554-6579.
- <sup>14</sup> Rosca M.G., Vazquez E.J., Kerner J., Parland W., Chandler M.P., Stanley W., Sabbah H.N., Hoppel C.L. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative Phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 80 (2008) 30-39.
- <sup>15</sup> Lenaz G., Genova M.L. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (2007) C1221-1239.
- <sup>16</sup> Kacser A., Burns J.A. Molecular democracy: who shares the controls? *Biochem. Soc. Trans.* 7 (1979) 1149–1160.
- <sup>17</sup> Moreno-Sánchez R., Bravo C., Westerhoff H.V. Determining and understanding the control of flux. An illustration in submitochondrial particles of how to validate schemes of metabolic control. *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 427–433.
- <sup>18</sup> Schon E.A. Il DNA mitocondriale in patologia umana. *Raven Press Ltd.* New York (1993).
- <sup>19</sup> Munn E.A. The structure of mitochondria. New York *Academic Press*, (1974).
- <sup>20</sup> Perkins G.A., Frey T.G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* 31(2000) 97-111.
- <sup>21</sup> Yaffe M.P. The machinery of mitochondrial inheritance and behaviour. *Science* 283 (1999) 1493-1497.
- <sup>22</sup> Scheffler E.I. Mitochondria, 1st edition, Wiley, New York (1999).
- <sup>23</sup> Passarella S., Atlante A., Valenti D., De Bari L. The role of mitochondrial transport in energy metabolism. *Mitochondrion* 2 (2003) 319-343.
- <sup>24</sup> Perkins G., Renken C., Martone M.E., Young S.J., Ellisman M., Frey T., Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* 119 (1997) 260-272.
- <sup>25</sup> Scheffler E.I. *Mitochondrion* 1 (2001) 3-31.
- <sup>26</sup> Frey T.G., Mannella C.A. The internal structure of mitochondria *Trends Biochem. Sci.* 25(8) (2000) 319-324.

- 
- <sup>27</sup> Frey T.G., Renken C.W., Perkins G.A., Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta* 1555 (2002) 196-203.
- <sup>28</sup> Lehninger A.L., Nelson D., Cox M. *Principi di Biochimica* (2010).
- <sup>29</sup> Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303) (1997) 1129-32.
- <sup>30</sup> Fontaine E., Bernardi P., Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31(4) (1999) 335-45.
- <sup>31</sup> Bernardi P., Colonna R., Costantini P., Eriksson O., Fontaine E., Ichas F., Massari S., Nicolli A., Petronilli V., Scorrano L. The mitochondrial permeability transition. *Bio Factors* 8 (3-4) (1998) 273-281.
- <sup>32</sup> Vogel R., Nijtmans L., Ugalde C., van den Heuvel L., Smeitink J. Complex I assembly: a puzzling problem. *Curr. Opin. Neurol.* 17(2) (2004) 179-86.
- <sup>33</sup> Brandt U., Kerscher S., Drose., Zwicker K., Zickermann., Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Letters* 545(1) (2003) 9-17.
- <sup>34</sup> Saraste M., Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283(5407) (1999) 1488-1493.
- <sup>35</sup> Guénebaut V., Vincentelli R., Mills D., Weiss H., Leonard KR. Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J. Mol Biol.* 265(4) (1997) 409-18.
- <sup>36</sup> Guénebaut V., Schlitt A., Weiss H., Leonard K., Friedrich T. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J. Mol. Biol.* 276(1) (1998) 105-12.
- <sup>37</sup> Grigorieff N. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J. Mol. Biol.* 277(5) (1998) 1033-46.
- <sup>38</sup> Djafarzadeh R., Kerscher S., Zwicker K., Radermacher M., Lindahl M., Schagger H., Brandt U. Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459(1) (2000) 230-8.

- 
- <sup>39</sup> Böttcher B., Scheide D., Hesterberg M., Nagel-Steger L., Friedrich T. A novel, enzymatically active conformation of the Escherichia coli NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 277(20) (2002) 17970-7.
- <sup>40</sup> Grigorieff N. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) *Curr. Opin. Struct. Biol.* Grigorieff N. 9(4) (1999) 476-83. Review.
- <sup>41</sup> Hirst J., Carroll J., Fearnley I.M., Shannon J.R., Walker J.E. The nuclear encoded subunits of Complex I from bovine heart mitochondria.; *Biochim. Biophys. Acta.* 1604(3) (2003) 135-150.
- <sup>42</sup> Ohnishi T. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364(2) (1998) 186-206.
- <sup>43</sup> Rasmussen T., Scheide D., Brors B., Kintscher L., Weiss H., Friedrich T., Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry* 40(20) (2001) 6124-31.
- <sup>44</sup> Friedrich T., Brors B, Hellwig P., Kintscher L., Rasmussen T., Scheide D., Schulte U., Mäntele W., Weiss H. Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochim Biophys Acta.* 1459(2-3) (2000) 305-9.
- <sup>45</sup> Lenaz G. Quinone specificity of complex I. *Biochim Biophys Acta.* 1364(2) (1998)207-21.
- <sup>46</sup> Yano T., Magnitsky S., Ohnishi T. Characterization of the complex I-associated ubisemiquinone species: toward the understanding of their functional roles in the electron/proton transfer reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459(2-3) (2000) 299-304.
- <sup>47</sup> Zickermann V., Bostina M., Hunte C., Ruiz T., Radermacher M., Brandt U., Functional implications from an unexpected position of the 49-kDa subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 278(31) (2003) 29072-8.
- <sup>48</sup> Hinchliffe P., Sazanov LA. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory Complex I. *Science.* 309(5735) (2005) 771-4.
- <sup>49</sup> Ohnishi T., Ohnishi ST., Shinzawa-Ito K., Yoshikawa S. Functional role of coenzyme Q in the energy coupling of NADH-CoQ oxidoreductase (Complex I): Stabilization of the semiquinone state with the application of inside-positive membrane potential to proteoliposomes. *Biofactors.*32(1-4) (2008)13-22.

- 
- <sup>50</sup> Berrisford J.M., Sazanov L.A. Structural basis for the mechanism of respiratory Complex I. *J. Biol. Chem.* 284(43) (2009) 29773-83.
- <sup>51</sup> Iverson T.M., Luna-Chavez C., Cecchini G., Rees DC. Structure of the Escherichia coli fumarate reductase respiratory complex. *Science.* 284(5422) (1999) 1961-6.
- <sup>52</sup> Cecchini G, Schröder I, Gunsalus RP, Maklashina E. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553(1-2) (2002)140-57.
- <sup>53</sup> Yu L., Xu JX., Haley PE, Yu CA. Properties of bovine heart mitochondrial cytochrome b560. *J. Biol. Chem.* 262(3) (1987)1137-43.
- <sup>54</sup> Lancaster CR. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553(1-2) (2002)1-6. Review.
- <sup>55</sup> Rousset S., Alves-Guerra M.C., Mozo J., Miroux B., Cassard-Doulcier A.M., Bouillaud F., Ricquier D. *Diabetes Journal org.* 53 suppl 1:S (2004) 130-135.
- <sup>56</sup> Brand MD., Buckingham JA., Esteves TC., Green K., Lambert AJ., Miwa S., Murphy MP., Pakay JL., Talbot DA., Echtay KS. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem. Soc. Symp.* (71) (2004) 203-13. Review.
- <sup>57</sup> Crane FL., Sun IL., Crowe RA., Alcaín FJ., Löw H. Coenzyme Q10, plasma membrane oxidase and growth control. *Mol. Aspects. Med.*15 (1994) Suppl:s1-11.
- <sup>58</sup> Fontaine E., Ichas F., Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 273(40) (1998) 25734-40.
- <sup>59</sup> Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* 59(2) (1975)137-9.
- <sup>60</sup> Garrett R.H., Crisham C.M.(1998) *Biochimica.*
- <sup>61</sup> Swanson R., Trus BL., Mandel N., Mandel G., Kallai OB., Dickerson RE. Tuna cytochrome c at 2.0 Å resolution. I. Ferricytochrome structure analysis. *J. Biol. Chem.* 252(2) (1977) 759-75.
- <sup>62</sup> Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 272(5265) (1996)1136-44.

- 
- <sup>63</sup> Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yamashita E., Inoue N., Yao M., Fei M.J., Libeu C.P., Mizushima T., Yamaguchi H., Tomizaki T., Tsukihara T. Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science*. 280(5370) (1998) 1723-9.
- <sup>64</sup> Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 269 (5227) (1995)1069-74.
- <sup>65</sup> Lutter R., Saraste M., van Walraven H.S., Runswick M.J., Finel M., Deatherage J.F., Walker J.E. F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem. J.* 295 ( Pt 3) (1993)799-806.
- <sup>66</sup> Elston T., Wang H., Oster G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. 391(6666) (1998) 510-3.
- <sup>67</sup> Degli Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys Acta*. 1364(2) (1998) 222-35.
- <sup>68</sup> Yano T. The energy-transducing NADH: quinone oxidoreductase, Complex I. *Mol. Aspects Med.* (5) (2002)345-68.
- <sup>69</sup> Singer T.P., Ramsay R.R. The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1187(2) (1994)198-202.
- <sup>70</sup> Gutman M., Singer T.P., Casida J.E. Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XVII. Reaction sites of piericidin A and rotenone. *J.Biol.Chem.* 245(8) (1970) 1992-7.
- <sup>71</sup> Gutman M. Electron flux through the mitochondrial ubiquinone. *Biochim. Biophys. Acta*. 594(1) (1980) 53-84. Review.
- <sup>72</sup> Darrouzet E., Issartel J.P., Lunardi J., Dupuis A. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Lett.* 431(1) (1998) 34-8.
- <sup>73</sup> Fato R., Estornell E., Di Bernardo S., Pallotti F., Parenti Castelli G., Lenaz G. Steady-state kinetics of the reduction of coenzyme Q analogs by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in bovine heart mitochondria and submitochondrial particles. *Biochemistry*. 35(8) (1996) 2705-16.

- 
- <sup>74</sup> Degli Esposti M., Crimi M., Ghelli A.. Natural variation in the potency and binding sites of mitochondrial quinone-like inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* (1) (1994) 209-13.
- <sup>75</sup> Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389(6653) (1997) 816-24.
- <sup>76</sup> Shimomura Y., Kawada T., Suzuki M. Capsaicin and its analogs inhibit the activity of NADH-coenzyme Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain. *Arch. Biochem. Biophys.* 270(2) (1989) 573-7.
- <sup>77</sup> Yagi T. Inhibition by capsaicin of NADH-quinone oxidoreductases is correlated with the presence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 281(2) (1990) 305-11.
- <sup>78</sup> Jones M.G., Bickar D., Wilson M.T., Brunori M., Colosimo A., Sarti P. A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *Biochem. J.* 220(1) (1984) 57-66.
- <sup>79</sup> Brunori M., Forte E., Arese M., Mastronicola D., Giuffrè A., Sarti P. Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1757(9-10) (2006) 1144-54.
- <sup>80</sup> Yagi T., Seo B.B., Di Bernardo S., Nakamaru-Ogiso E., Kao M.C., Matsuno-Yagi A. NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33(3) (2001) 233-42. Review.
- <sup>81</sup> Chance B., Williams G.R. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*. 176 (4475) (1955) 250- 4.
- <sup>82</sup> Hatefi Y., Haavik A.G., Fowler L.R., Griffiths D.E. Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1676-80.
- <sup>83</sup> Hackenbrock C.R., Höchli M., Chau R.M. Calorimetric and freeze fracture analysis of lipid phase transitions and lateral translational motion of intramembrane particles in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 455(2) (1976) 466-84.
- <sup>84</sup> Schägger H., Cramer W.A., von Jagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217(2) (1994) 220-30.
- <sup>85</sup> Hatefi Y., Haavik A.G., Jurtschuk. Studies on the electron transport system. XXX. DPNH-cytochrome c reductase I. *Biochim. Biophys. Acta.* 52 (1961) 106-18.

- 
- <sup>86</sup> Hatefi Y. Introduction--preparation and properties of the enzymes and enzymes complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Methods Enzymol.* 53 (1978) 3-4.
- <sup>87</sup> Hatefi Y. Reconstitution of the electron-transport system of bovine heart mitochondria. *Methods Enzymol.* 53 (1978) 48-54.
- <sup>88</sup> Yu L., Yu C.A. Quantitative resolution of succinate-cytochrome c reductase into succinate-ubiquinone and ubiquinol-cytochrome c reductases. *J.Biol.Chem.* 257(4) (1982) 2016-21.
- <sup>89</sup> Tanaka M., Nishikimi M., Suzuki H., Tada M., Ozawa T., Koga Y., Nonaka I. Deficiency of subunits of complex I or IV in mitochondrial myopathies: immunochemical and immunohistochemical study. *J. Inherit. Metab. Dis.* 10(3) (1987) 284-8.
- <sup>90</sup> Lenaz G. A critical appraisal of the mitochondrial coenzyme Q pool. *FEBS Lett.* 509(2) (2001) 151-5. Review.
- <sup>91</sup> Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1555(1-3) (2002)154-9. Review.
- <sup>92</sup> Sone N., Sekimachi M., Kutoh E. Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc1 complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. *J.Biol.Chem.* 262(32) (1987) 15386-91.
- <sup>93</sup> Iwasaki T., Matsuura K., Oshima T. Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J.Biol.Chem.* 270(52) (1995) 30881-92.
- <sup>94</sup> Niebisch A., Bott M. Purification of a cytochrome bc-aa3 supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome aa3 oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome c1. *J.Biol.Chem.* 278(6) (2003)4339-46.
- <sup>95</sup> Schägger H., Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19(8) (2000)1777-83.
- <sup>96</sup> Boumans H., Grivell L.A., Berden J.A. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J.Biol.Chem.* 273(9) (1998) 4872-7.

- 
- <sup>97</sup> Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J.Biol.Chem.* 278(52) (2003) 52873-80.
- <sup>98</sup> Vonck J., Schäfer E. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793(1) (2009) 117-24. Review.
- <sup>99</sup> Eubel H., Jänsch L., Braun H.P. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant. Physiol.* 133(1) (2003) 274-86.
- <sup>100</sup> Dudkina N.V., Eubel H., Keegstra W., Boekema E.J., Braun H.P. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(9) (2005) 3225-9.
- <sup>101</sup> Friedrich T., Böttcher B. The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochim. Biophys. Acta.* 1608(1) (2004) 1-9. Review.
- <sup>102</sup> Bultema J.B., Braun H.P., Boekema E.J., Kouril R. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787(1) (2009) 60-7.
- <sup>103</sup> Stroh A., Anderka O., Pfeiffer K., Yagi T., Finel M., Ludwig B., Schägger H. Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J.Biol.Chem.* 279(6) (2004) 5000-7.
- <sup>104</sup> Schägger H., de Coo R., Bauer M.F., Hofmann S., Godinot C., Brandt U. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J.Biol.Chem.* 279(35) (2004) 36349-53.
- <sup>105</sup> Krause F., Reifschneider N.H., Vocke D., Seelert H., Rexroth S., Dencher N.A. "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J.Biol.Chem.* 279(46) (2004) 48369-75.
- <sup>106</sup> Fell D., Shell K. Ed. Portland Press Ltd, London, (1997) 101-134.
- <sup>107</sup> Kacser H, Burns JA The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27 (1973) 65-104.
- <sup>108</sup> Tager J.M., Wanders R.J., Groen A.K., Kunz W., Bohnensack R., Küster U., Letko G., Böhme G., Duszynski J., Wojtczak L. Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* 151(1) (1983) 1-9.
- <sup>109</sup> Groen A.K., Wanders R.J., Westerhoff H.V., van der Meer R., Tager J.M. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257(6) (1982) 2754-7.

- 
- <sup>110</sup> Letellier T., Malgat M., Mazat J.P. Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies. *Biochim. Biophys. Acta.*1141(1) (1993) 58-64.
- <sup>111</sup> Mazat J.P., Letellier T., Bédès F., Malgat M., Korzeniewski B., Jouaville L.S., Morkuniene R. Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. *Mol. Cell. Biochem.* 174(1-2) (1997)143-8.
- <sup>112</sup> Rossignol R., Faustin B., Rocher C., Malgat M., Mazat J.P., Letellier T. *Biochem J.* Mitochondrial threshold effects. 370(Pt 3) (2003)751-62.
- <sup>113</sup> Rossignol R., Malgat M., Mazat J.P., Letellier T. Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J Biol Chem.* 274(47) (1999) 33426-32.
- <sup>114</sup> Letellier T., Heinrich R., Malgat M., Mazat J.P. The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem. J.* (1994) 302 ( Pt 1):171-4.
- <sup>115</sup> Miquel J., Economos A.C., Fleming J., Johnson J.E. Jr. *Exp Gerontol.* Mitochondrial role in cell aging.15(6) (1980) 575-91.
- <sup>116</sup> Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet.*1(8639) (1989) 642-5.
- <sup>117</sup> Smith A.L. *Methods Enzymol.* 10 (1967) 81-86.
- <sup>118</sup> Braun H.P., Schmitz U.K. Affinity purification of cytochrome c reductase from potato mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 208(3) (1992) 761-7.
- <sup>119</sup> Neuburger, M., Journet, E.-P., Bligny, R., Carde, J.-P. and Douce, R. (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 312-323.
- <sup>120</sup> Meisinger C., Pfanner N., Truscott K.N. Isolation of yeast mitochondria. *Methods in Molecular Biology.* Vol. 313 Yeast Protocols (2005) Second Edition, Humana Press Inc.
- <sup>121</sup> Gornall A.G, Bardawill C.J, David M.M Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177(2) (1949) 751-66.
- <sup>122</sup> Ventura B., Genova M.L., Bovina C., Formiggini G., Lenaz G. Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553(3) (2002) 249-60.

---

<sup>123</sup> Rieske J.S. *Methods Enzymol.* 10,(1967) 239-245.

<sup>124</sup> Estornell E., Fato R., Pallotti F., Lenaz G. Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett.* 332(1-2) (1993)127-31.

<sup>125</sup> Heinemeyer J, Braun H.P., Boekema E.J., Kouril R.J A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *Biol. Chem.* 2007 282(16) (2007)12240-8.