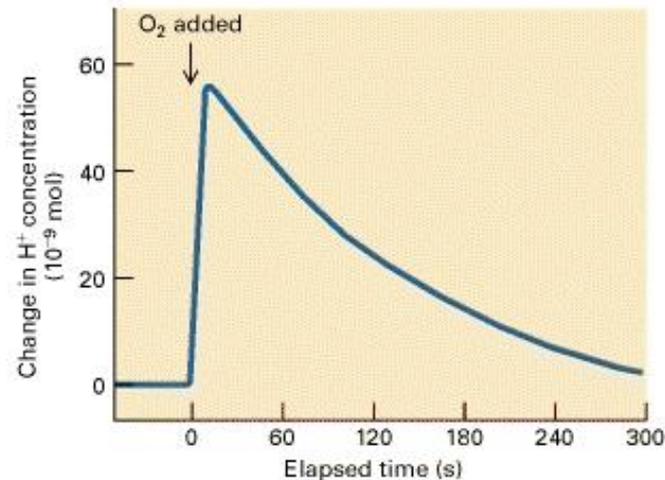
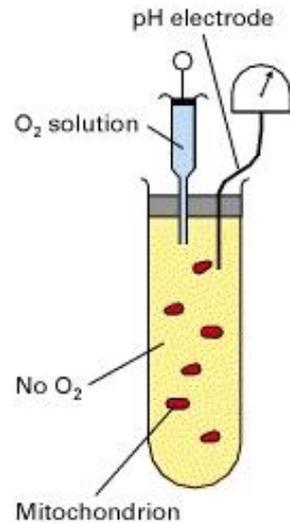


Transporte de electrones y la ATPasa mitocondrial

La cadena de transportadores puede ser descrita como un gran proceso de 3 eventos:

- Transferencia de los electrones del NADH y FADH₂ a otras sustancias, donde finalmente se reoxidan a NAD⁺ y FAD para seguir participando en más reacciones redox.
- Los electrones transferidos participarán en la oxidación-reducción secuencial de +10 centros redox en 4 complejos enzimáticos, antes de reducir el O₂ a H₂O.
- Durante la transferencia de los electrones, los H⁺ liberados por las coenzimas, serán expulsados de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, y creando una gradiente entre ambas. Finalmente, la ΔG de ésa gradiente electroquímica conducirá la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i a través de la fosforilación oxidativa.

Demostración experimental de que la oxidación del NADH y FADH₂ y la reducción del O₂ se encuentran acopladas al gradiente de pH

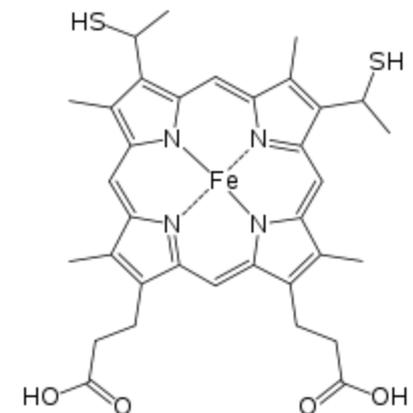
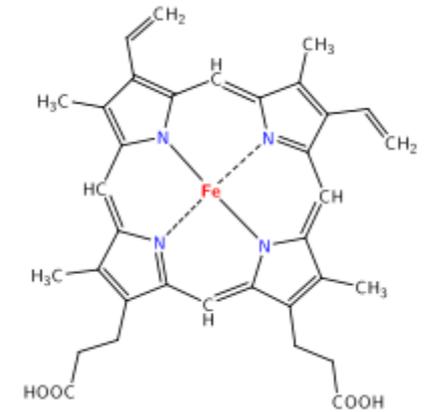
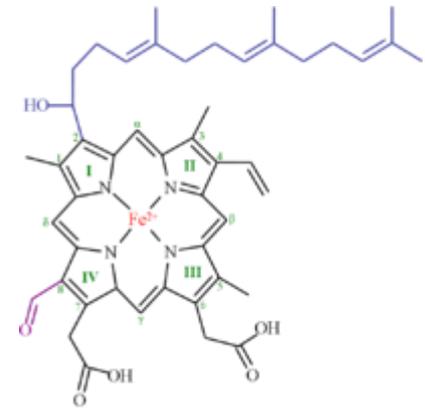


If a source of electrons for respiration, such as NADH, is added to a suspension of mitochondria depleted of O₂, no NADH is oxidized. When a small amount of O₂ is added to the system (arrow), the pH of the surrounding medium drops sharply — a change that corresponds to an *increase* in protons outside the mitochondria. (The presence of a large amount of valinomycin and K⁺ in the reaction dissipates the voltage gradient generated by H⁺ translocation, so that all pumped H⁺ ions contribute to the pH change.) Thus the oxidation of NADH by O₂ is coupled to the movement of protons out of the matrix. Once the O₂ is depleted, the excess protons slowly move back into the mitochondria (powering the synthesis of ATP) and the pH of the extracellular medium returns to its initial value.

Citocromos

Electron Transport Chain

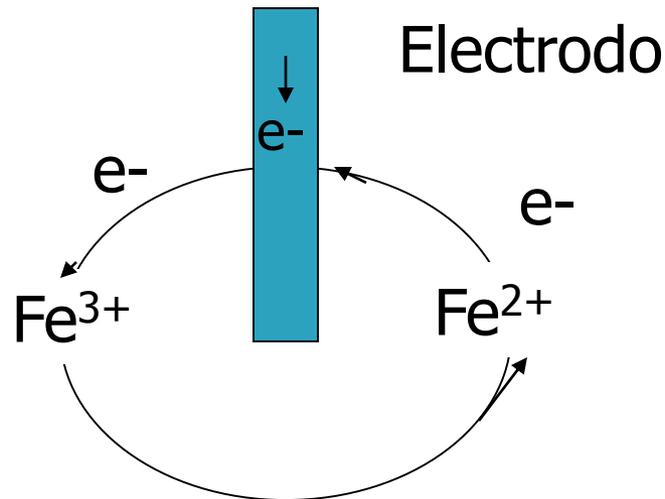
Enzyme Complex	Prosthetic Groups*
NADH-CoQ reductase	FMN FeS
Succinate-CoQ reductase	FAD FeS
CoQH ₂ - cytochrome <i>c</i> reductase	Heme <i>b</i> ₅₆₆ Heme <i>b</i> ₅₆₂ Heme <i>c</i> ₁ FeS
Cytochrome <i>c</i>	Heme <i>c</i>
Cytochrome <i>c</i> oxidase	Heme <i>a</i> Heme <i>a</i> ₃ Cu _a ⁺ , Cu _b ⁺



Potenciales redox

OXIDACIÓN. Pérdida de hidrógenos o electrones

REDUCCIÓN. Ganancia de hidrógenos o electrones

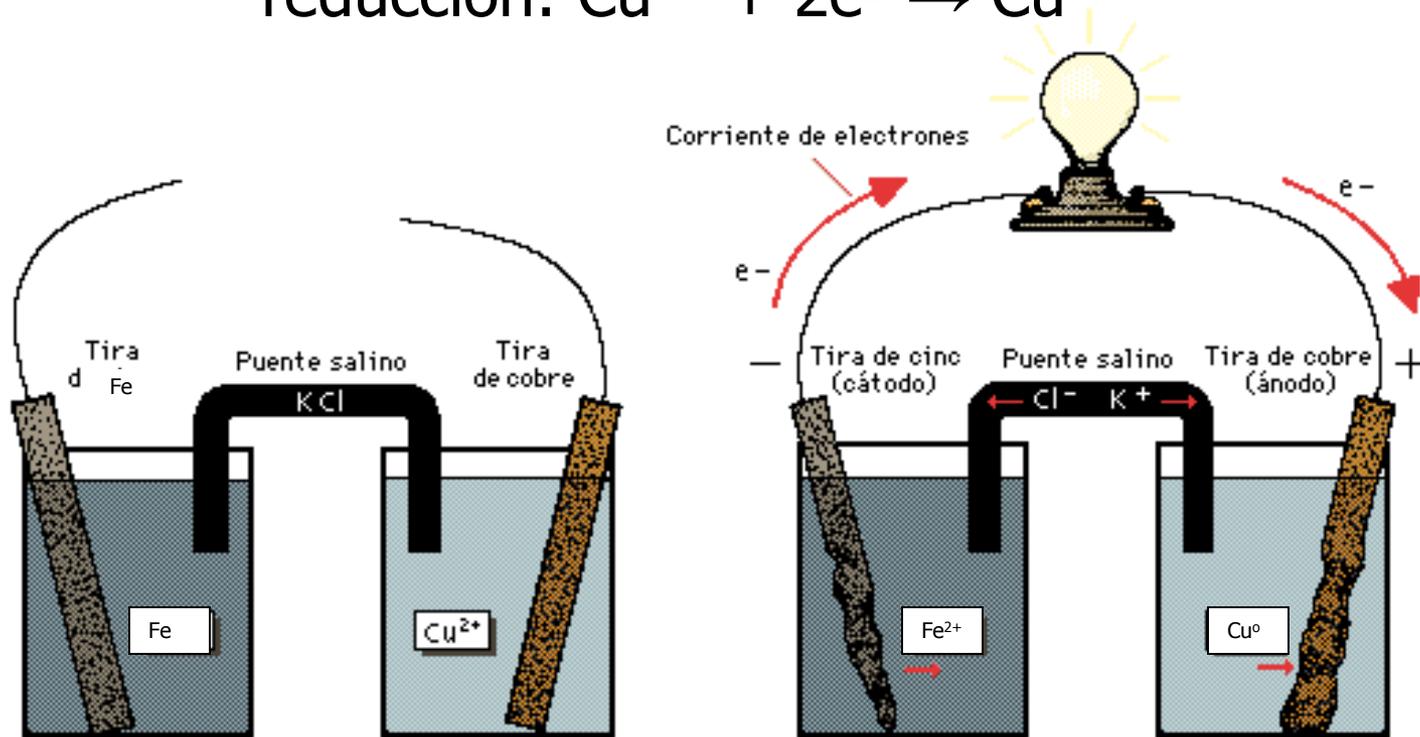


Par redox.

Agente reductor y agente oxidante

oxidación: $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$

reducción: $\text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}$



Potencial redox

- ▶ La capacidad de una molécula para recibir o donar electrones desde/hacia otra molécula.
- ▶ Los e^- son transferidos de un acarreador a otro:
 - A. El acarreador con el E más positivo es siempre el aceptor de electrones.
 - B. El acarreador con el E más negativo es siempre el donador de electrones.

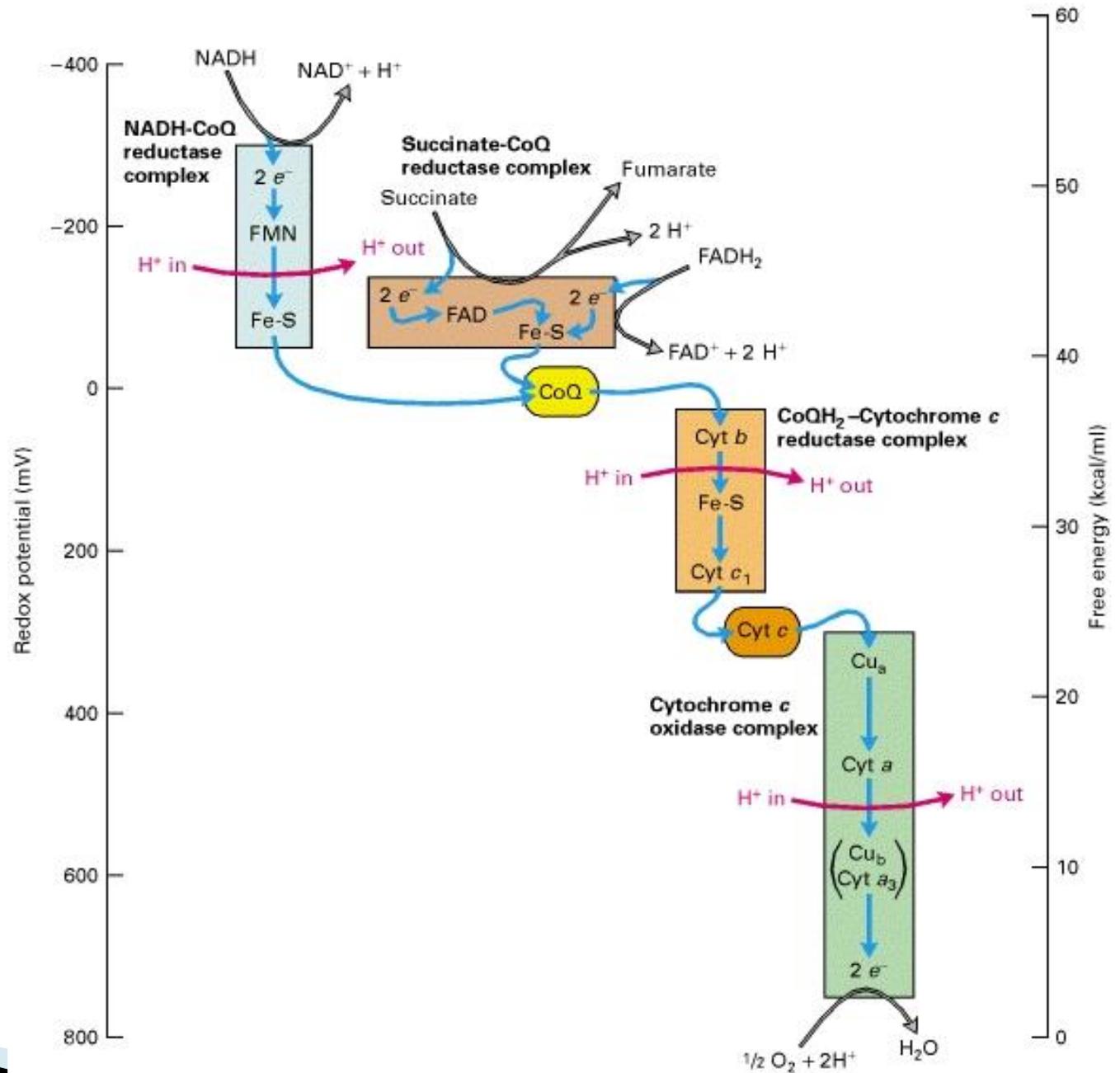
Acarreadores de electrones biológicos.

table 19-2

Standard Reduction Potentials of Respiratory Chain and Related Electron Carriers

Redox reaction (half-reaction)	E'° (V)
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$	-0.414
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADPH}$	-0.324
$\text{NADH dehydrogenase (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH dehydrogenase (FMNH}_2\text{)}$	-0.30
$\text{Ubiquinone} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{ubiquinol}$	0.045
$\text{Cytochrome } b (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } b (\text{Fe}^{2+})$	0.077
$\text{Cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{2+})$	0.22
$\text{Cytochrome } c (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } c (\text{Fe}^{2+})$	0.254
$\text{Cytochrome } a (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } a (\text{Fe}^{2+})$	0.29
$\text{Cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + e^- \longrightarrow \text{cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{2+})$	0.55
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.816

- ▶ Transferencia de electrones de cromóforos de Potencial redox negativo a positivo
- ▶ E (mV)

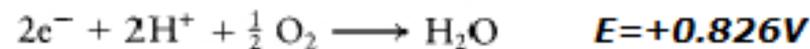


¿Cuánta energía se produce de la reducción del oxígeno por el NADH?

- ▶ Los potenciales de oxidación son:



- ▶ Las semireacciones son



- ▶ Entonces el cálculo de energía es

$$\begin{aligned} \Delta G (\text{cal/mol}) &= -nF\Delta E = -2 (23,062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \Delta E \\ &= -2 (23,062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \cdot 1.14\text{V} \\ &= -52,581 \text{ cal/mol, or } 52.58 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

En condiciones estándar

$$\begin{aligned}\Delta G \text{ (cal/mol)} &= -n\mathcal{F}\Delta E = -2(23,062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \Delta E \\ &= -2(23,062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) 1.14\text{V} \\ &= -52,581 \text{ cal/mol, or } 52.58 \text{ kcal/mol}\end{aligned}$$



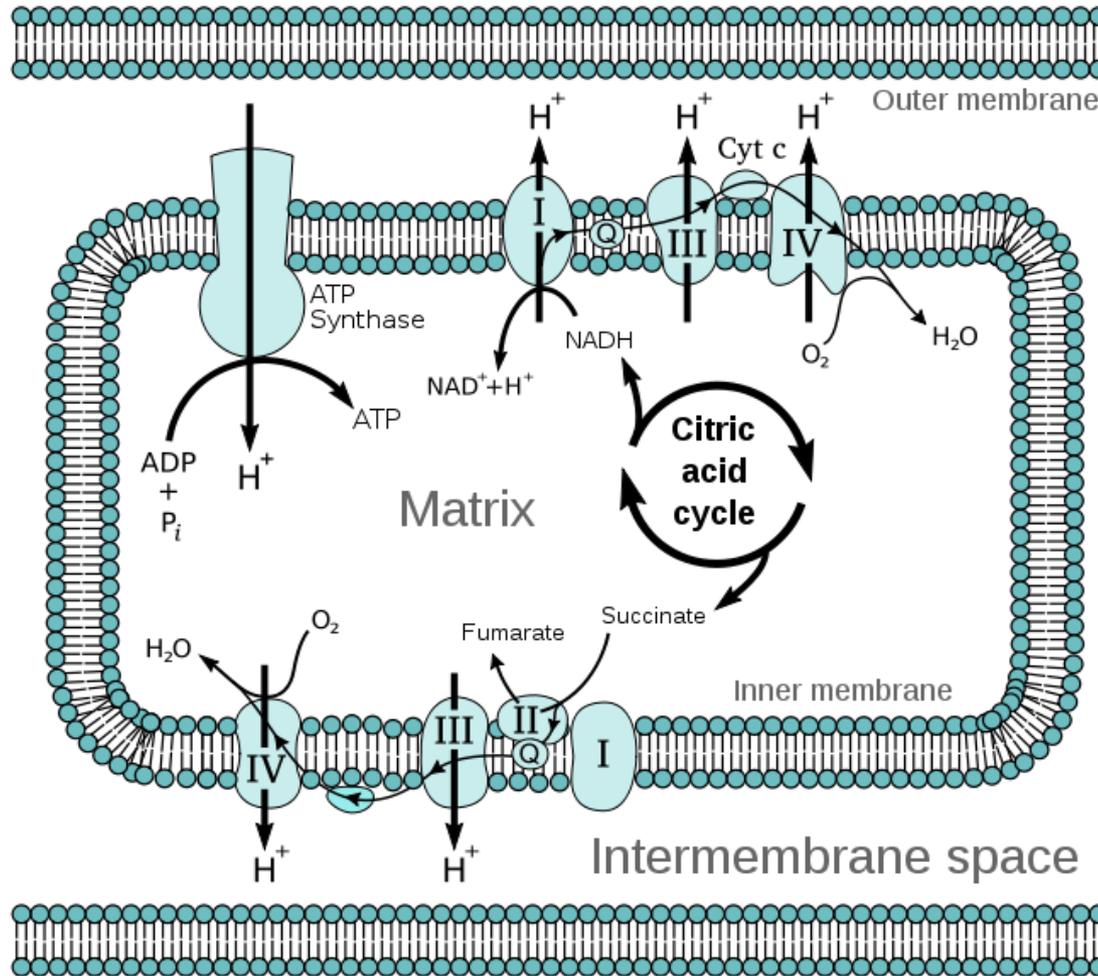
- ▶ Aunque en condiciones normales en la mitocondria probablemente se necesiten de 10 a 12 Kcal/mol para sintetizar ATP

Además, sólo el 42% de la energía que se desprende reducción del O₂ por el NADH es almacenada.

$$\Delta G = -52,581 \text{ calorías/mol}$$

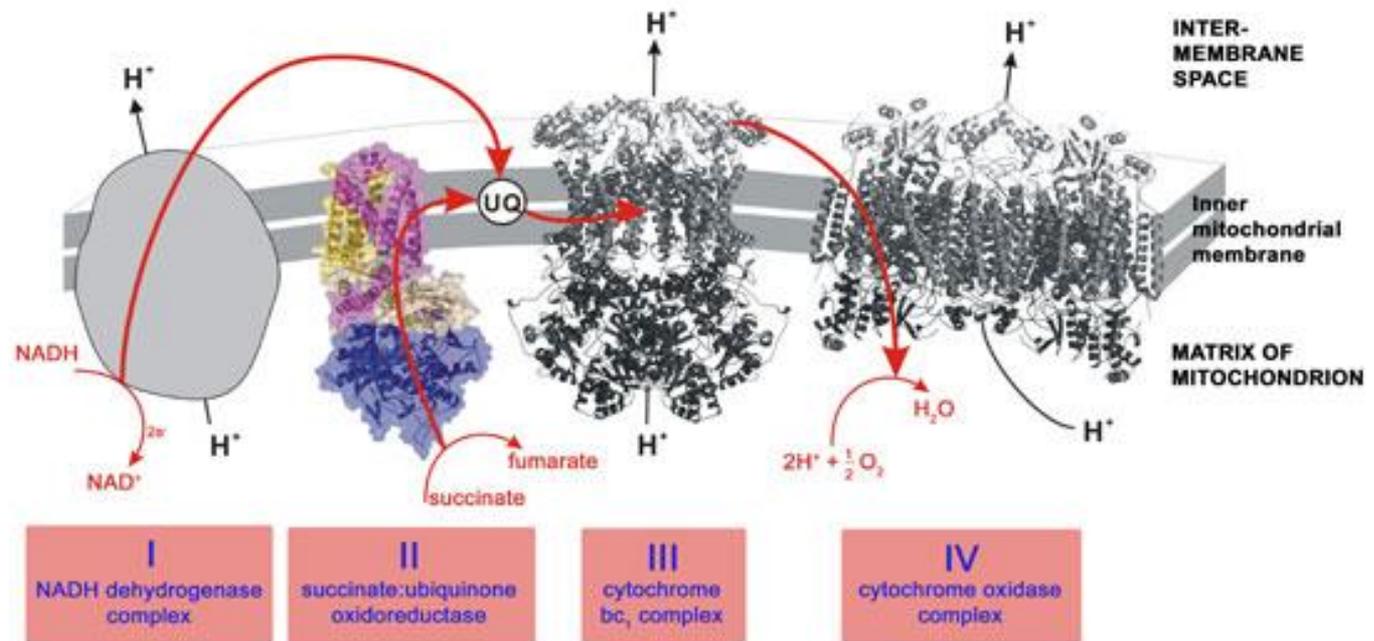
- ▶ El paso de 2 electrones genera la síntesis de 3 moléculas de ATP, sabemos que: $\Delta G_{\text{ATP}} = 7,300 \text{ calorías/mol}$, al X 3 nos da 21,900 calorías/mol,
- ▶ El resto se libera en forma de calor.

Cadena transportadora de electrones



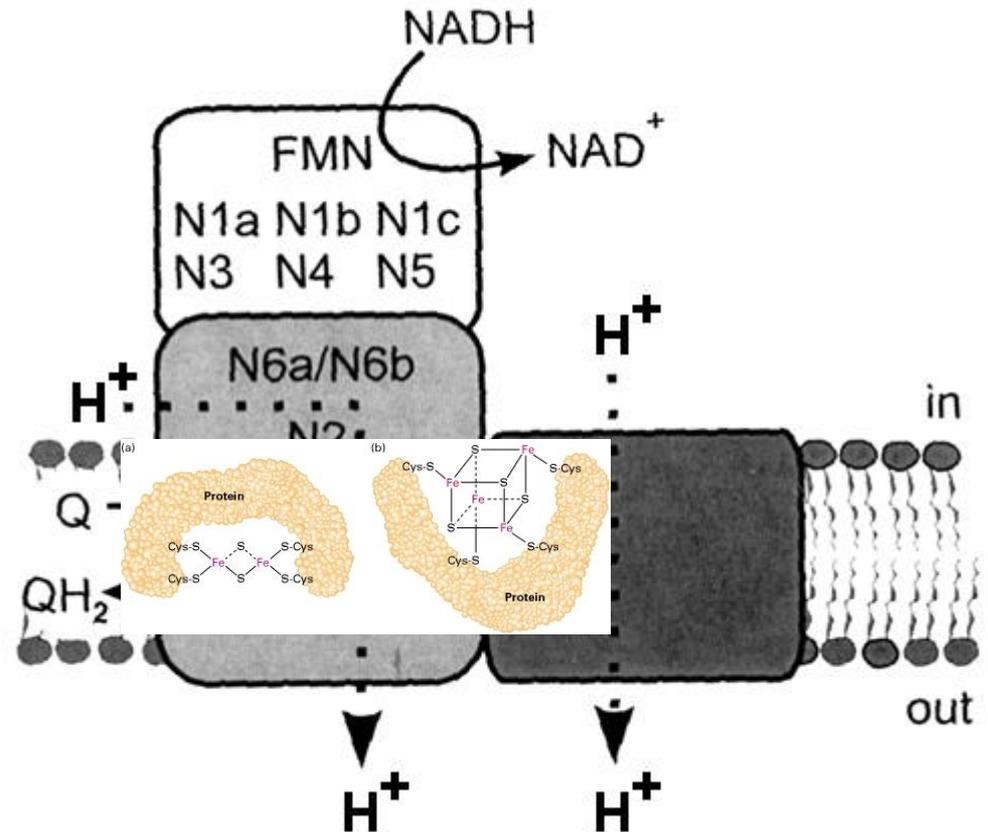
Cadena transportadora de electrones

- ▶ Complejo I: NADH ubiquinona oxidoreductasa
- ▶ Complejo II: Succinato CoQ oxidoreductasa
- ▶ Complejo III o complejo bc1: ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase
- ▶ Complejo IV: Citocromo oxidasa



Mecanismo de movimiento de electrones

Nombre	NADH Deshidrogenasa
	NADH:ubiquinona óxido-reductasa
Masa Molar	850 kDa
Subunidades	43
Proteicas	
Grupos Prostéticos	FMN, centros Fe-S
Inhibidores	Amital rotenona Pieridicina A



Reduce a la quinona y bomba protones

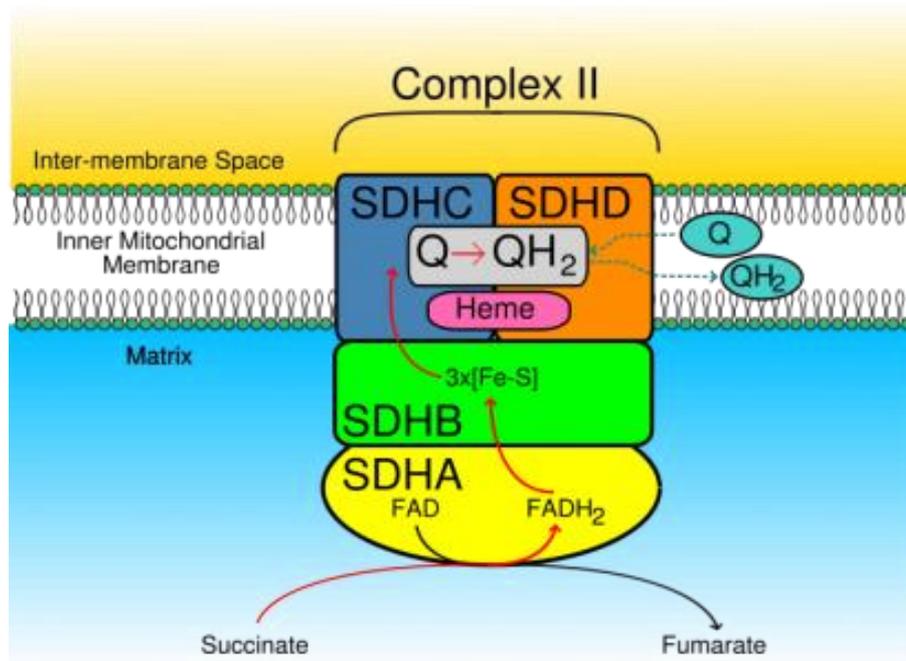


Inhibitors of complex I

Type of compounds	Compounds	Source
Rotenoids	Rotenone Deguelin	plants
Piericidins	Piericidin A Ubicidin-3	<i>Streptomyces</i> synthetic
Annonaceous acetogenins	Rolliniastatin-1 Rolliniastatin-2 (Bullatacin)	plants
Vallinoids	Capsaicin	plants
Pesticides/insecticides	Pyridaben Fenpyroximate	synthetic synthetic
Drugs/toxins	Amytal MPP ⁺	synthetic synthetic
Q antagonists	quinolines quinolones	synthetic synthetic

Modified from Degli Esposti (1998) *BBA* 1364:222-235.

Complejo II



Complejo inusual:

1. No sólo forma parte de la cadena transportadora de electrones, también forma parte del ciclo de Krebs
2. No es una bomba de protones

Nombre	Succinato Deshidrogenasa
---------------	-------------------------------------

Masa Molar	140 kDa
-------------------	---------

Subunidades	4
--------------------	---

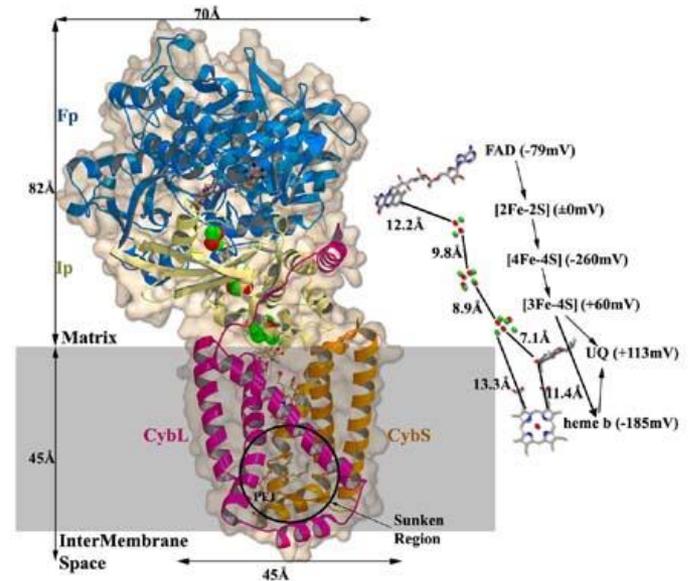
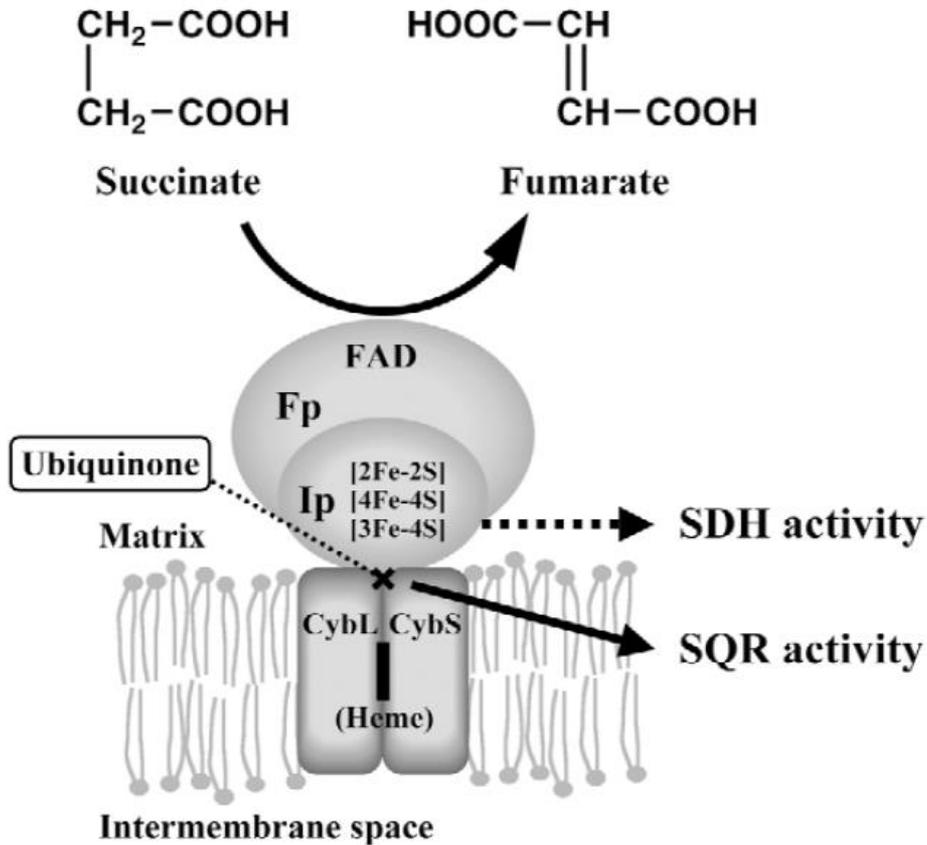
Proteicas

Grupos	FAD, centros Fe-
---------------	------------------

Prostéticos	S
--------------------	---

Inhibidores	
--------------------	--

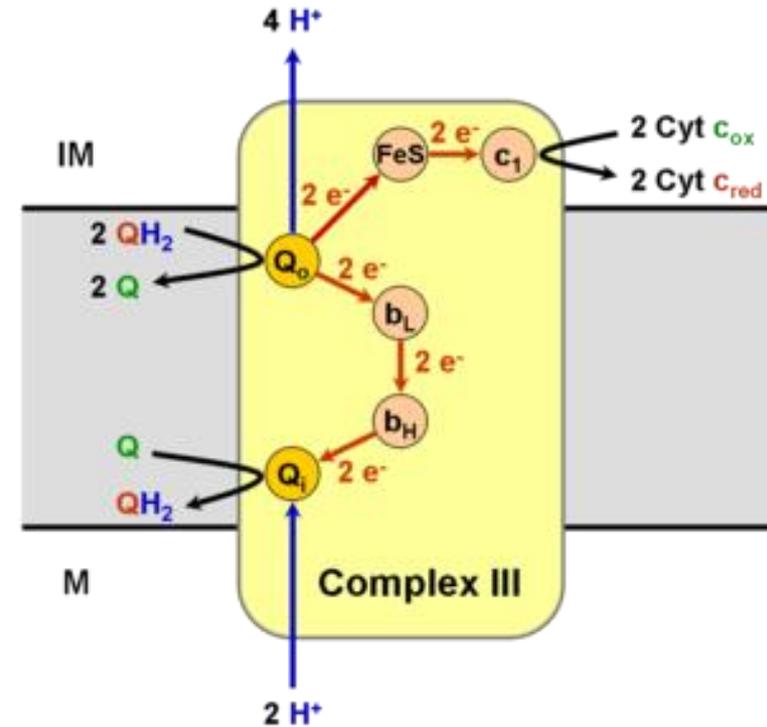
Reacción del complejo



Complejo III

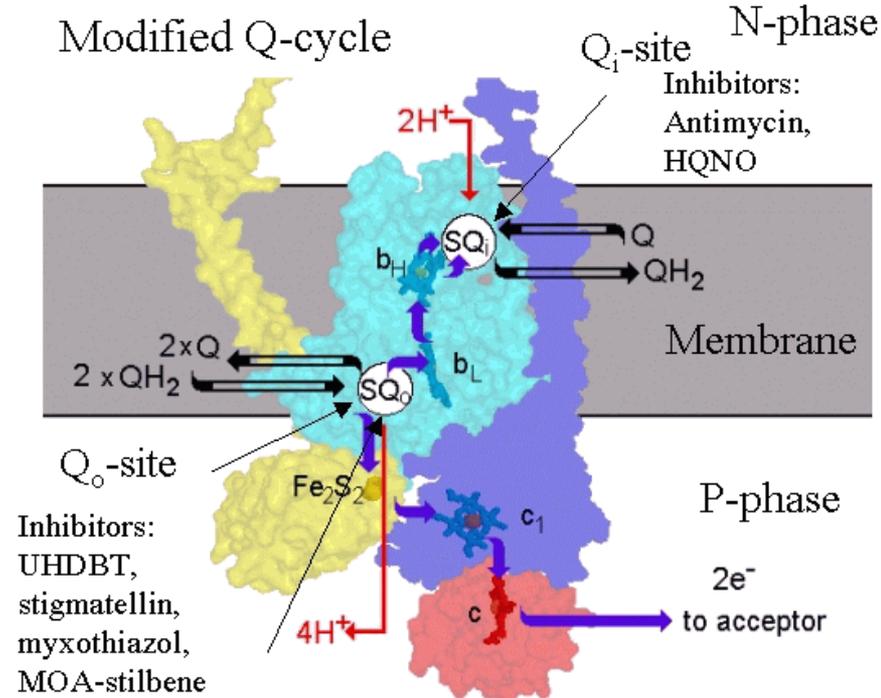
Transfiere electrones desde QH_2 (ubiquinol) a citocromo C, junto al transporte vectorial de protones (H^+) desde la matriz al espacio intermembrana, por un proceso denominado Ciclo Q.

Nombre	Ubiquinona-citocromo C oxidoreductasa
Masa Molar	250 kDa
Subunidades Proteicas	11
Grupos Prostéticos	Hemos, Fe-S
Inhibidores	Antimicina A



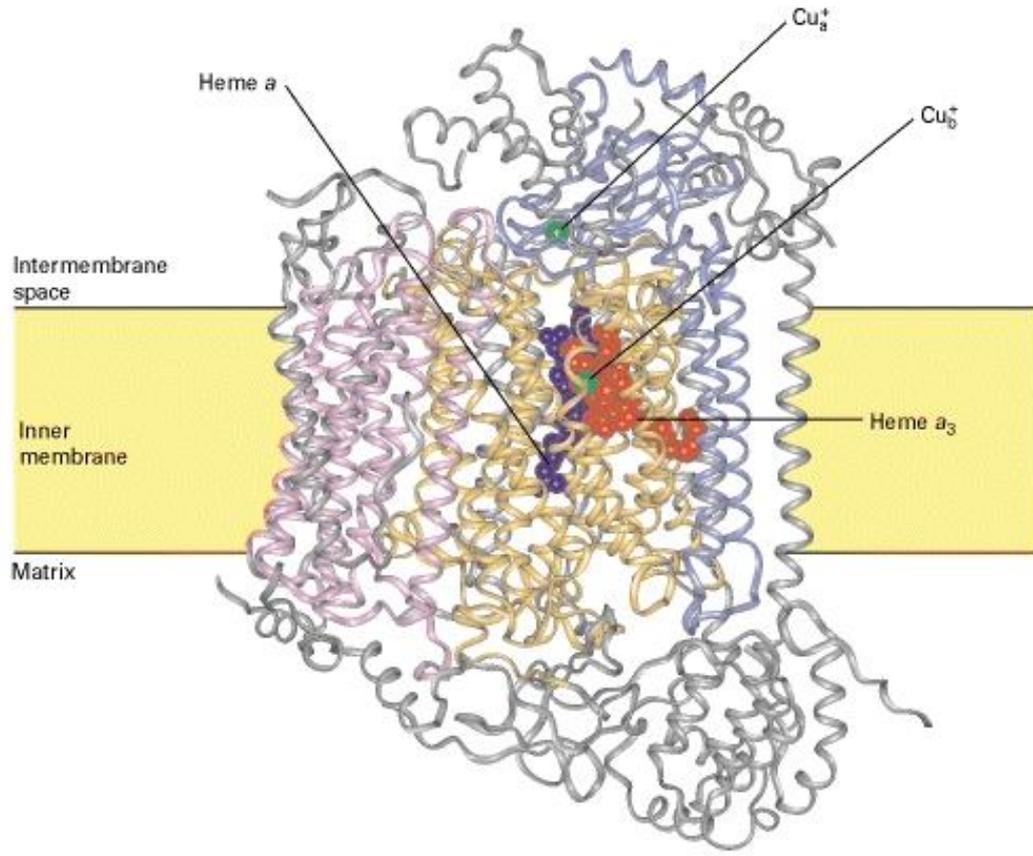
Ciclo Q: modelo de paso de electrones y protones a través del Complejo III, en 2 Ciclos. La esencia del ciclo Q es que QH_2 pasa por una reoxidación bicíclica en donde QH (semiquinona) será un intermediario estable.

Reacción Global del Ciclo Q:



Complejo IV

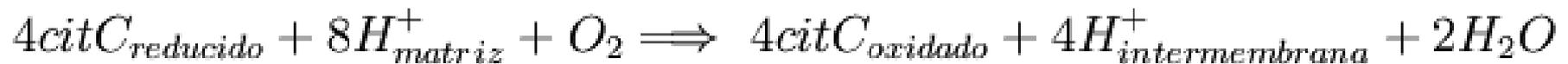
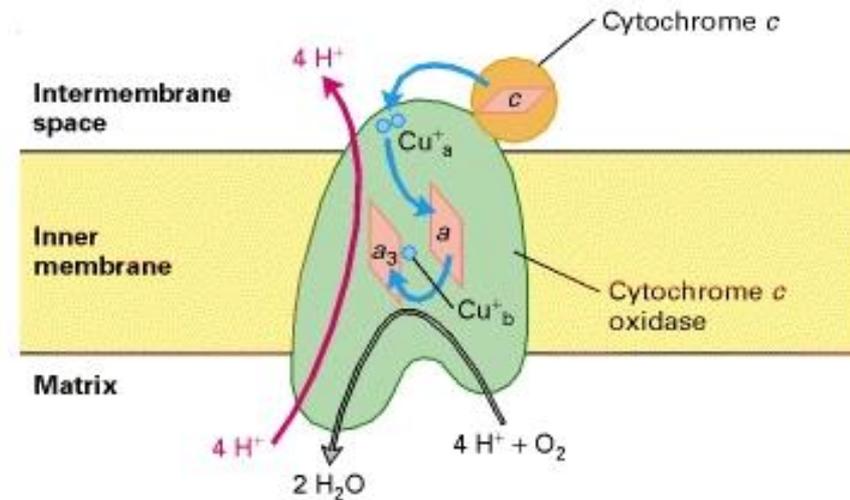
Nombre	Citocromo Oxidasa
Masa Molar	160 kDa
Subunidades Proteicas	13
Grupos Prostéticos	Hemos, Cu _A , Cu _B
Inhibidores	CN ⁻ (cianuro) Monóxido de Carbono



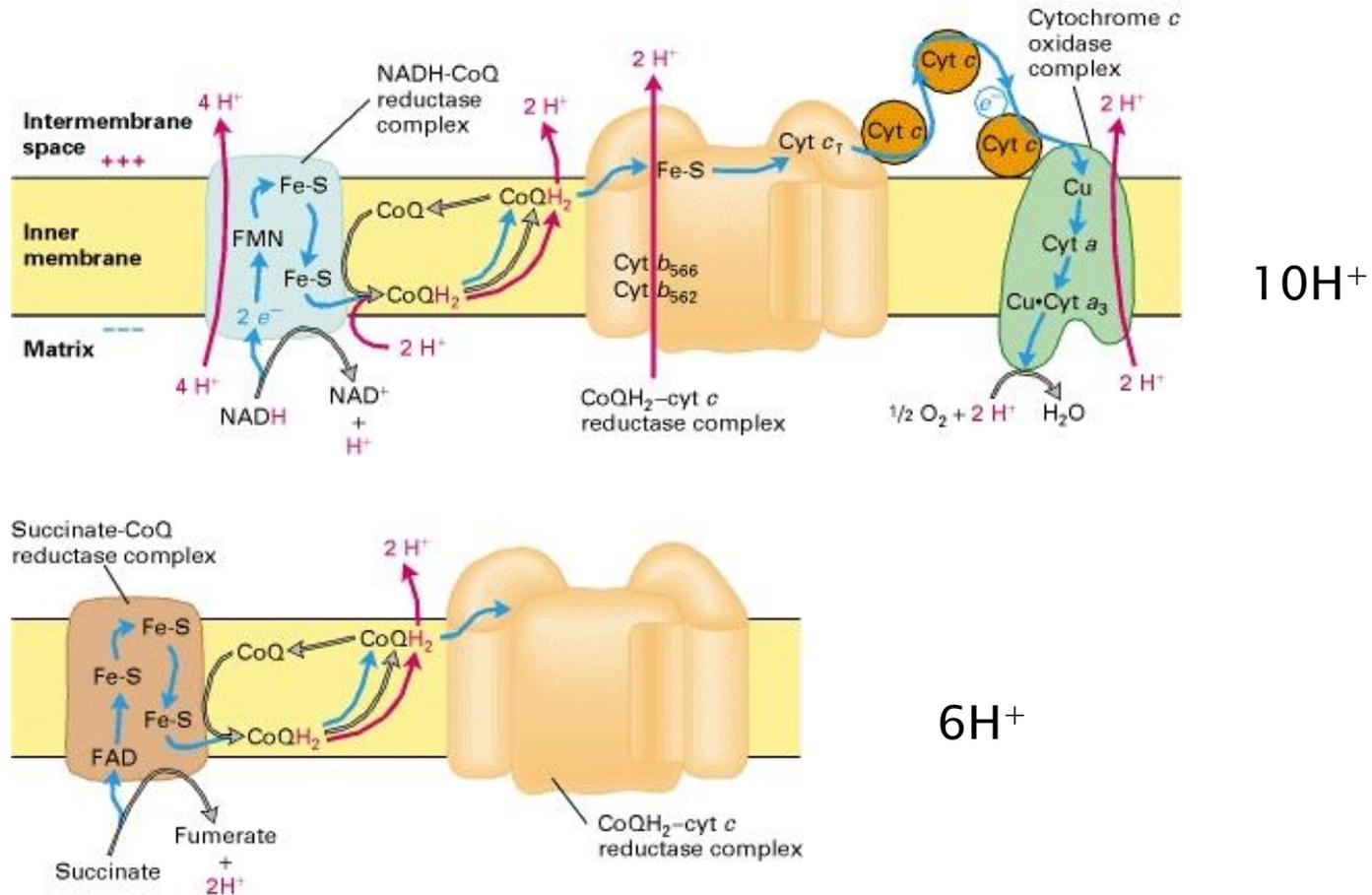
Molecular structure of the core of the cytochrome c oxidase complex in the inner mitochondrial membrane
Mitochondrial cytochrome c oxidases contain 13 different subunits, but the catalytic core of the **enzyme** consists of only 3 subunits: I (yellow) II (blue), and III (pink). Hemes a and a₃ are shown as blue and red space-filling models, respectively, and the copper atoms are green. (1996, *Science* 272:1136;)

Complejo IV

- ▶ Transporta electrones desde el citocromo C a O_2 (Oxígeno molecular) formando H_2O .
- ▶ Por cada 4 electrones que pasan por el complejo, la enzima consume $4H^+$ de la matriz, reduciendo el O_2 en H_2O , y usa la energía de ésta reacción pasando un H^+ al espacio intermembrana por cada electrón que pasa por ella.



The pathway of electron transport (blue arrows) and proton transport (red arrows) in the inner mitochondrial membrane



En la reacción final 10H^+ han sido translocados al espacio intermembrana

We can calculate the amount of free energy released by the passage of 1 mol of protons down an electrochemical gradient of 220 mV (0.22 V) from the Nernst equation, setting $n = 1$ and measuring ΔE in volts:

$$\begin{aligned}\Delta G (\text{cal/mol}) &= -nF\Delta E = -(23,062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \Delta E \\ &= (23,062 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})(0.22 \text{ V}) \\ &= -5,080 \text{ cal/mol, or } -5.1 \text{ kcal/mol}\end{aligned}$$

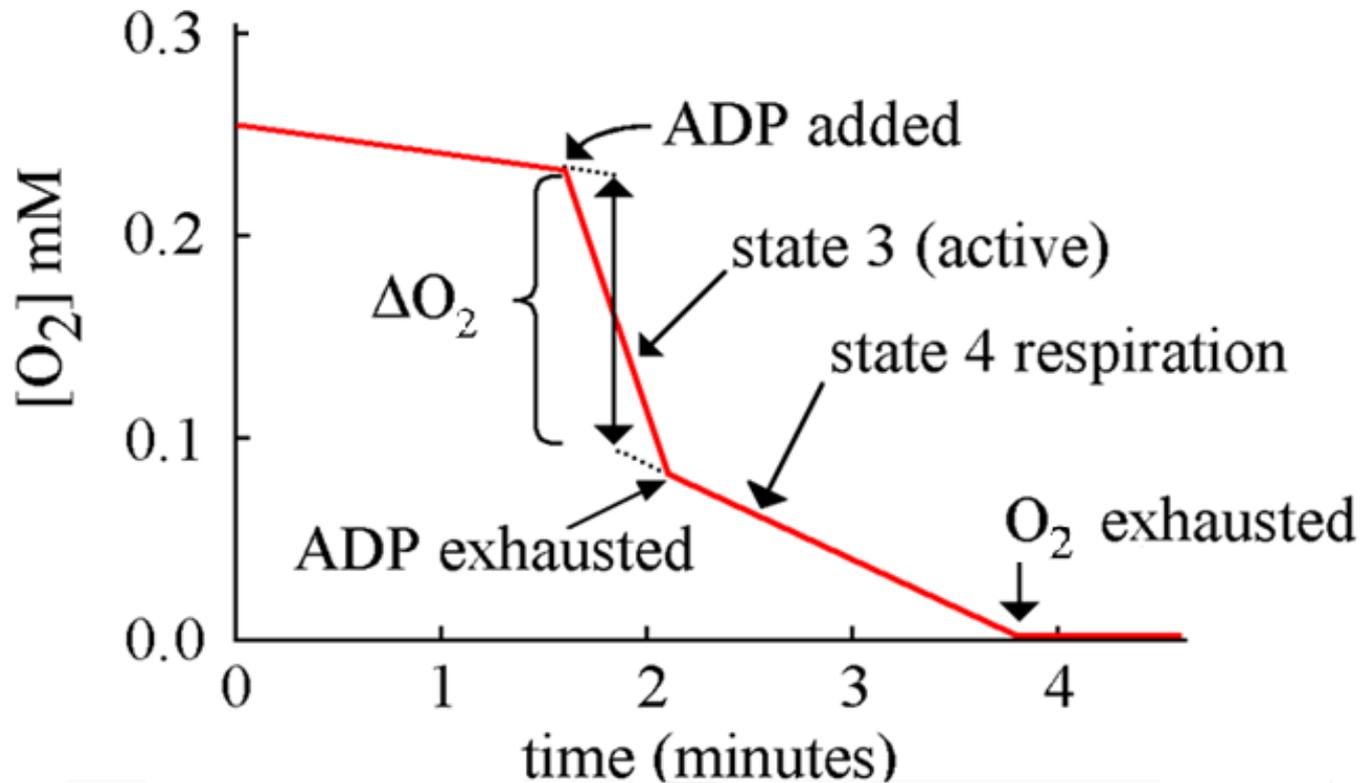
- ▶ Siendo 5 Kcal/mol por cada protón esto quiere decir que el paso de al menos 3 protones nos daría la energía de 12 Kcal/mol necesarias para la síntesis de 1 molécula de ATP. En la realidad se necesitan 4 protones
- ▶ Por lo que de 1 mol NADH

$$\frac{10 \text{ H}^+}{4 \text{ H}^+} = 2.5 \text{ mol ATP}$$

Inhibitors of Oxidative Phosphorylation

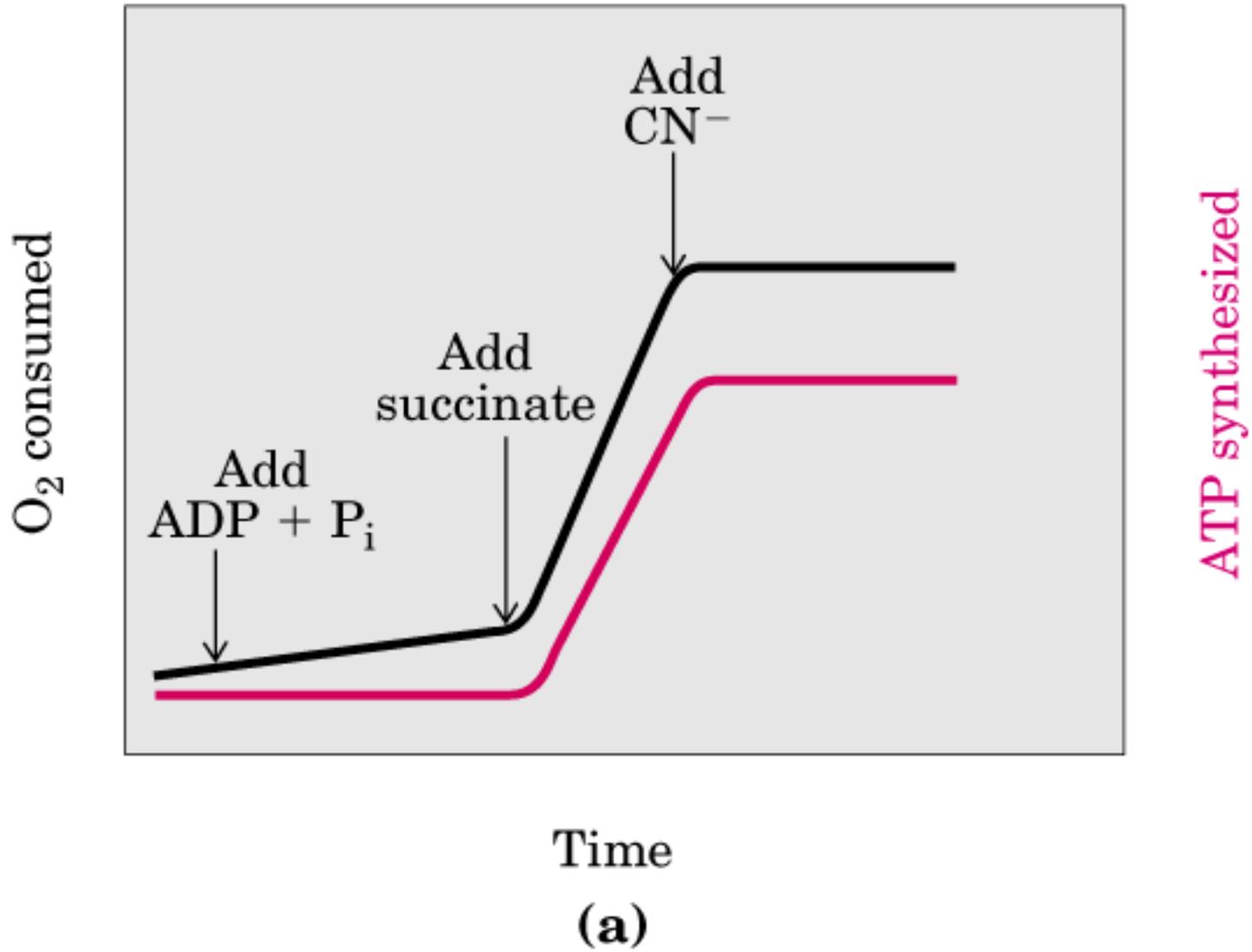
Name	Function	Site of Action
Rotenone	e^- transport inhibitor	Complex I
Amytal	e^- transport inhibitor	Complex I
Antimycin A	e^- transport inhibitor	Complex III
Cyanide	e^- transport inhibitor	Complex IV
Carbon Monoxide	e^- transport inhibitor	Complex IV
Azide	e^- transport inhibitor	Complex IV
2,4,-dinitrophenol	Uncoupling agent	transmembrane H^+ carrier
Pentachlorophenol	Uncoupling agent	transmembrane H^+ carrier
Oligomycin	Inhibits ATP synthase	OSCP fraction of ATP synthase

- ▶ Utilización de oxígeno y ADP al oxidar sustratos.
- ▶ Relación producción ATP y consume de Oxígeno

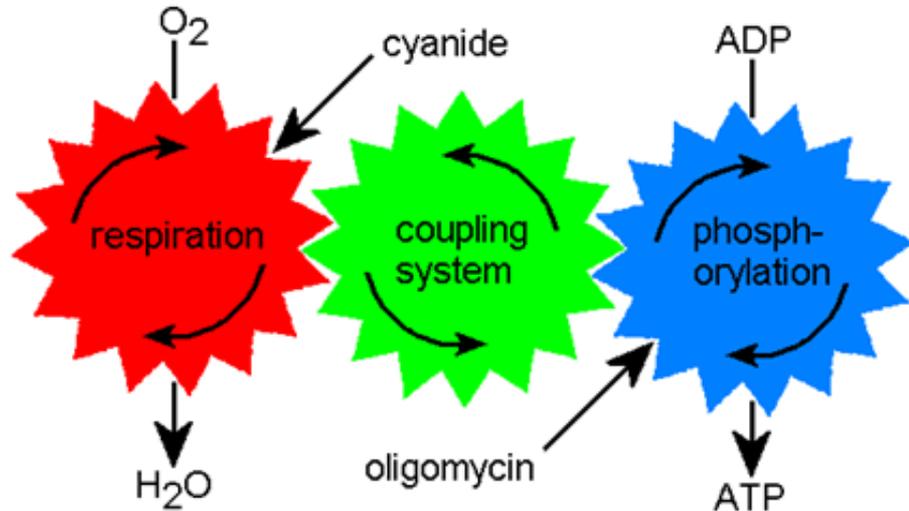


substrate: 5mM succinate

The P:O ratio is about 2.5 for NAD-linked substrates, or 1.5 for succinate.



Síntesis de ATP no ocurre en el mismo sistema proteico que usa el oxígeno

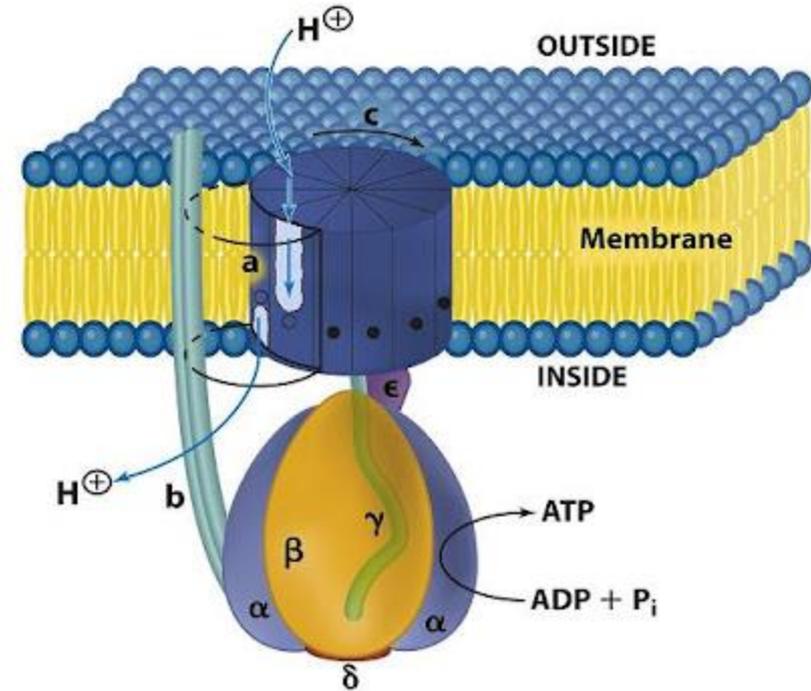


Mitochondrial Respiration Rates

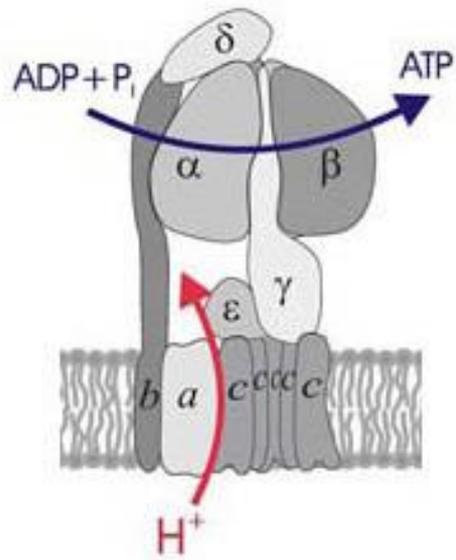
additions	none	oligomycin	cyanide
none	low	low	zero
ADP	high	low	zero
uncoupler	high	high	zero

All the incubations contained respiratory substrate, oxygen & inorganic phosphate

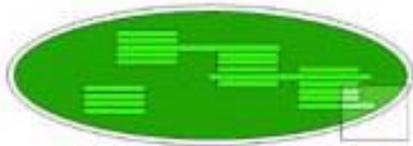
1960 Efraim Racker y sus colaboradores aislaron a la enzima mitocondrial, FoF1 ATPasa o ATPsintasa



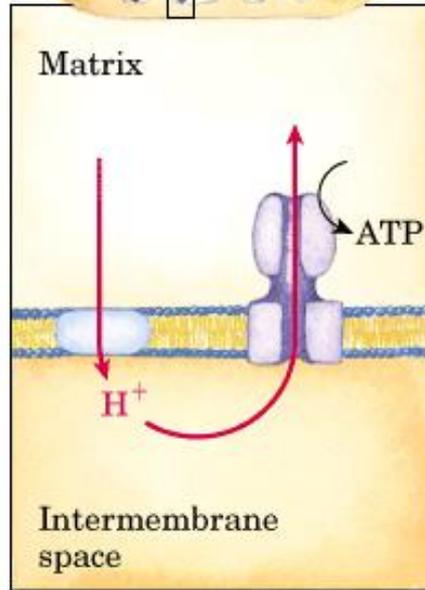
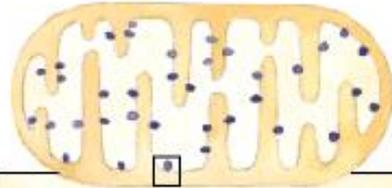
- ▶ Demostraron que en ausencia de F₀ la enzima realizaba la hidrólisis del ATP
- ▶ En presencia de membrana y unidas F₀ a F₁ llevaba a cabo la síntesis del ATP



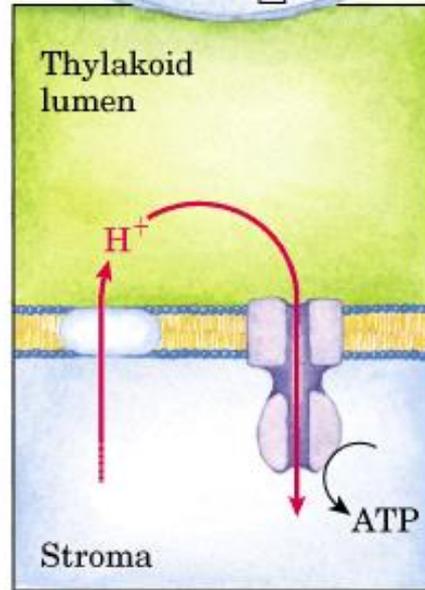
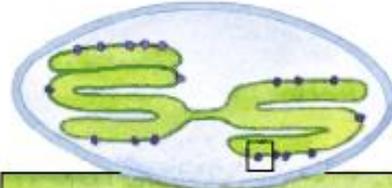
Chloroplasts



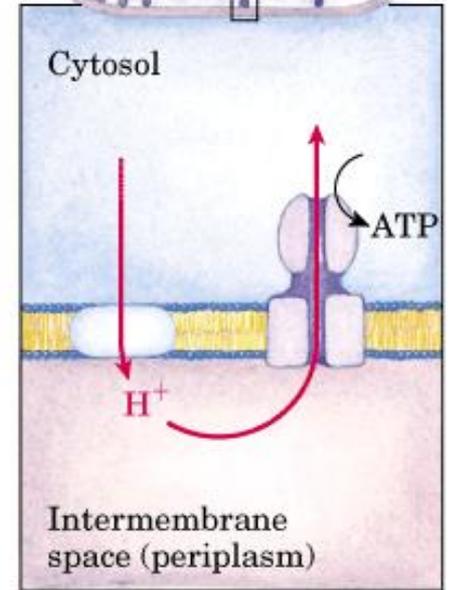
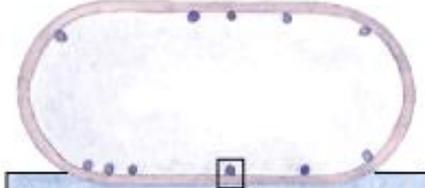
Mitochondrion



Chloroplast



Bacterium (*E. coli*)



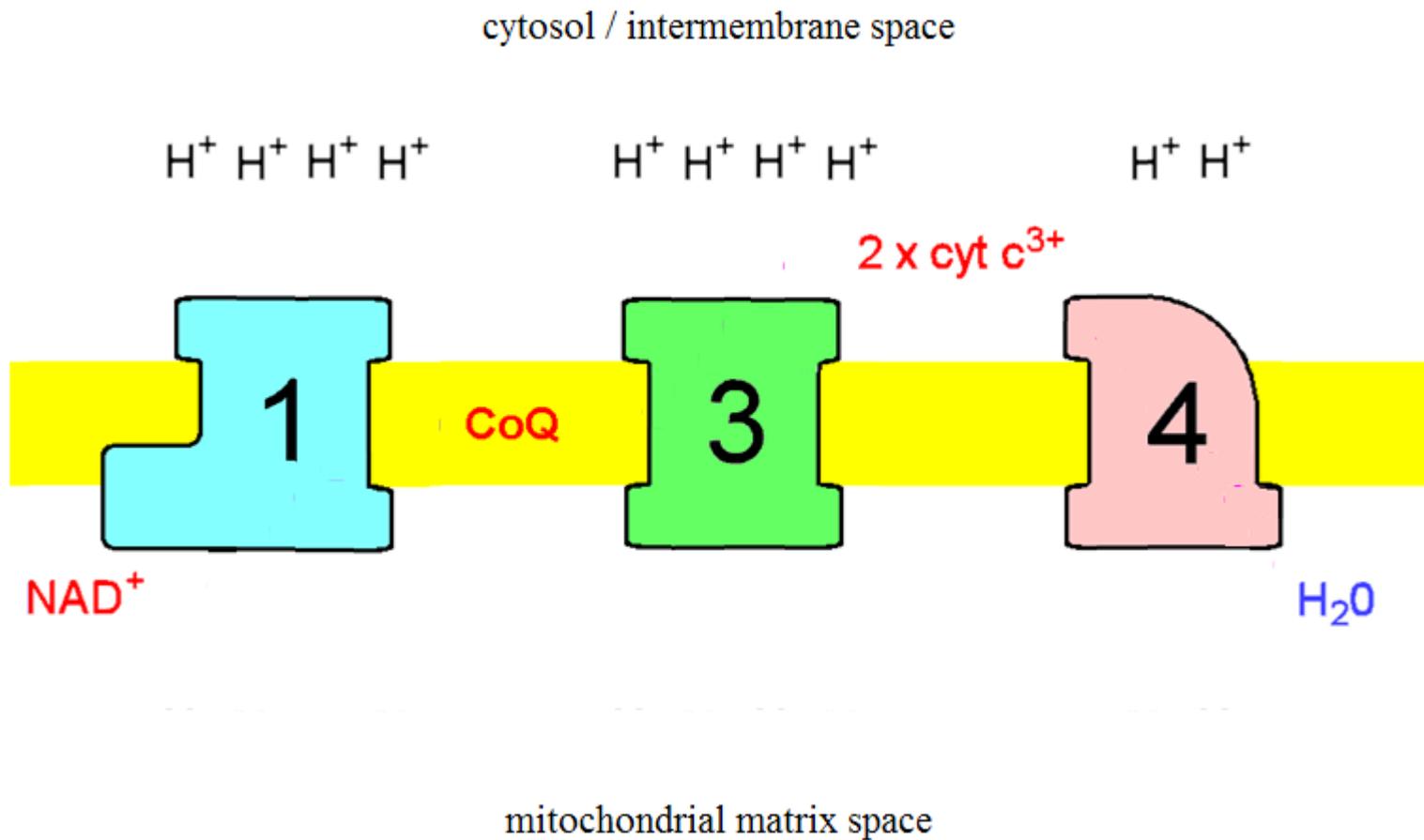
Acoplamiento quimiosmótico

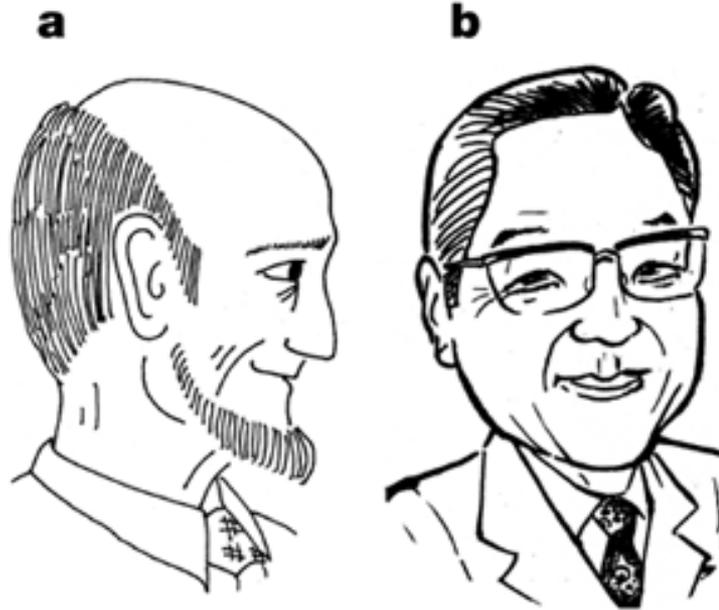


Premio Nobel de Química
1978

1961 Peter Michel propuso la hipótesis quimiosmótica

1. **NO EXISTE** un intermediario fosforilado de alta energía que transfiere su fosfato al ADP
2. **POSTULÓ** un estado de alta energía **GRADIENTE ELECTROQUÍMICO DE PROTONES A TRAVÉS DE LA MEMBRANA**
3. Una enzima disipa el gradiente: la ATPsintasa como la enzima que transloca protones para llevar a cabo la síntesis de ATP.

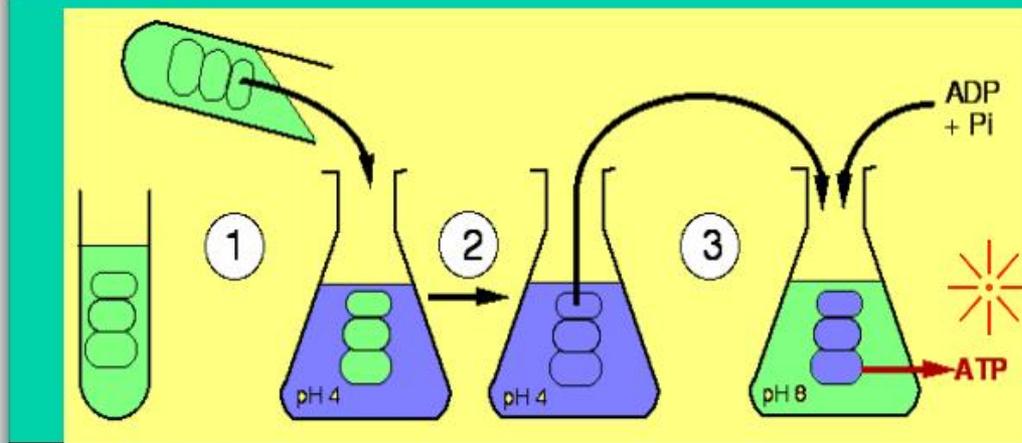
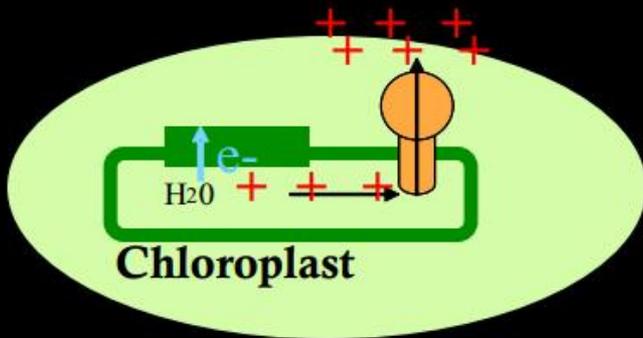




1966 Andre Jagendorf (a) experimento transición ácido-base, comprobando la síntesis de ATP en ausencia de luz en el cloroplasto.

Yasuo Kagawa (b) realizó la reconstitución in vitro de la ATPsintasa e impuso un gradiente electroquímico artificial llevando a la síntesis de ATP por la enzima.

Jagendorf's chloroplast work provided powerful support for Peter Mitchell's theory for ATP generation



Andre T. Jagendorf

¿Cómo la ATPsintasa intercambia la energía del flujo de protones en F₀ hacia la síntesis o hidrólisis de ATP en la porción F₁?

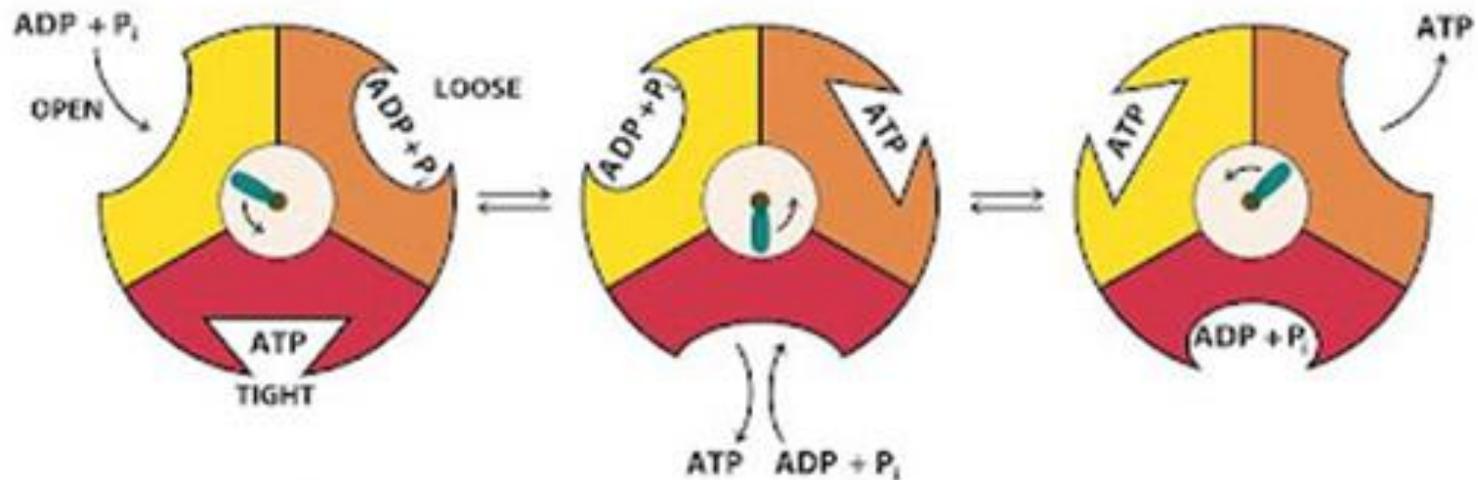


Paul D. Boyer

- ▶ Midiendo la cinética enzimática del intercambio de ^{18}O entre H_2O y P_i/ATP , '**binding change mechanism**' en 1977.
- ▶ Propuso que cada una de las 3 subunidades catalíticas en la ATP sintasa alternaba secuencialmente entre diferentes estados con diferentes afinidades para los nucleótidos.

Mecanismo de unión y cambio

- ▶ Propone 3 sitios en la enzima:
- ▶ 1. Beta-tight. Sitio que une ATP y fuertemente cerrado
- ▶ 2. Beta-loose. Sitio de unión a $\text{ADP} + \text{P}_i$
- ▶ 3. Beta-open. Sitio vacío o abierto.



Boyer además propuso que la rotación física de la subunidad central de la ATPsintasa era la que causaba los cambios secuenciales de la enzima y las afinidades distintas por los nucleótidos

Recibió el Premio Nobel de Química en 1997 por sus investigaciones sobre el mecanismo enzimático para la síntesis del trifosfato de adenosina (ATP).

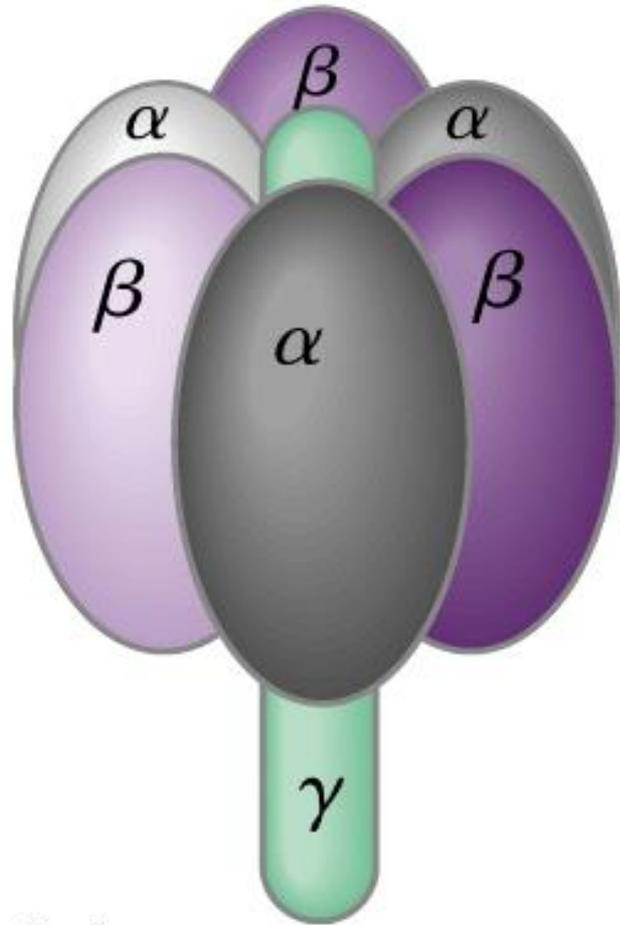


John E. Walker

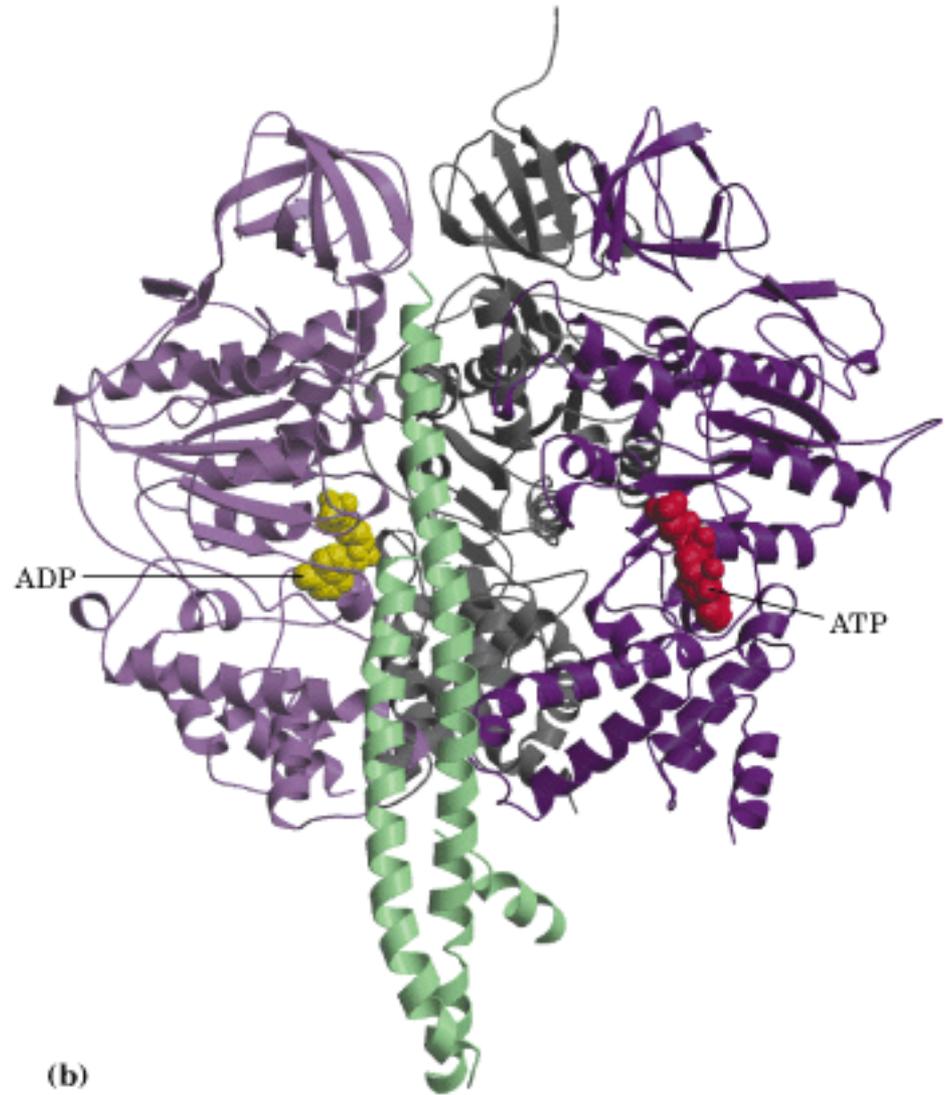
La estructura de cristal de la F_1 se determinó por el grupo que dirige John Walker (C. Gibbons, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, & J. E. Walker, 2000, PDB 1E79), quién fue galardonado en 1997 con el Premio Nobel de Química por su trabajo experimental sobre la ATPasa.

Encontró que la subunidad gama es una proteína helicoidal que constituye el eje en el medio del anillo de las subunidades alfa y beta.

Arreglo hexamérico de $3\alpha,3\beta$

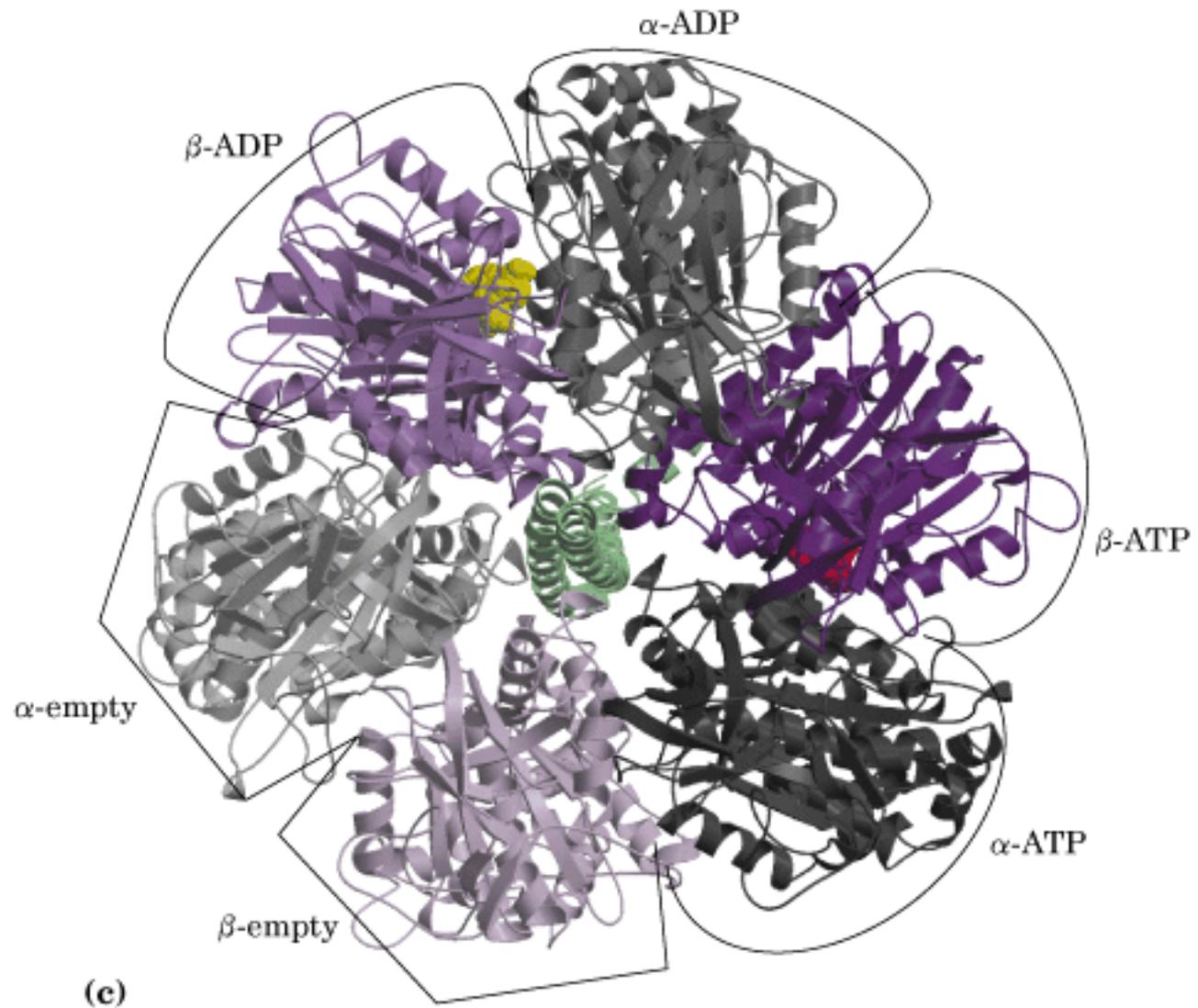


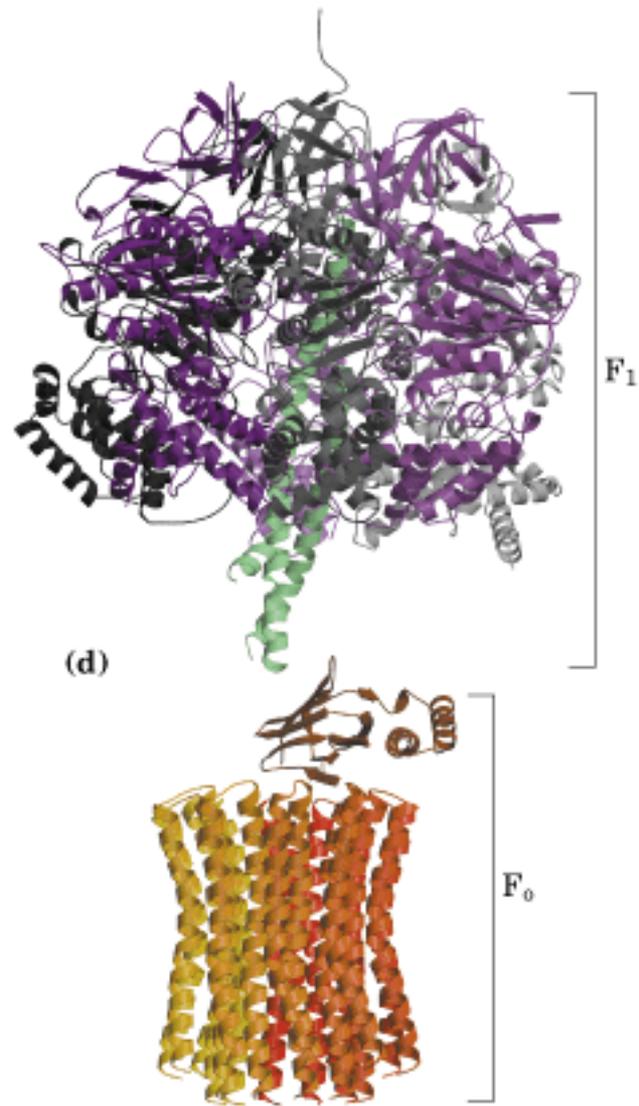
(a)

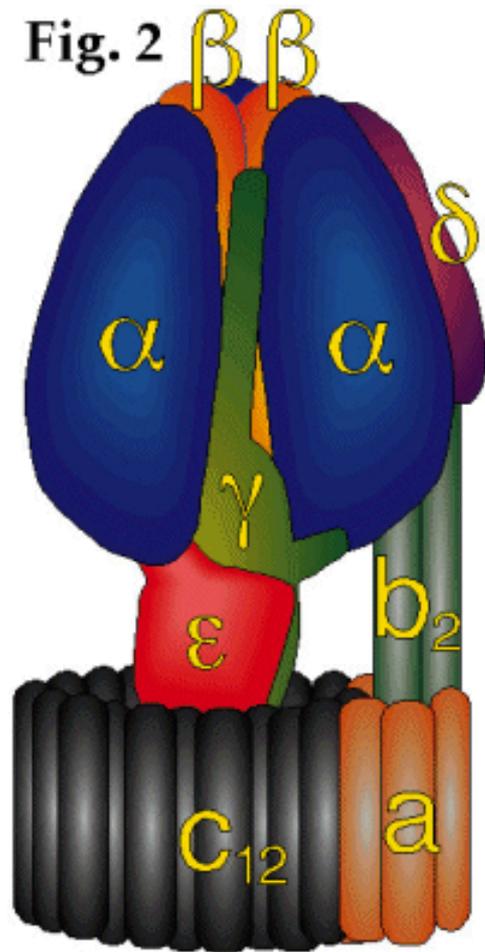


(b)

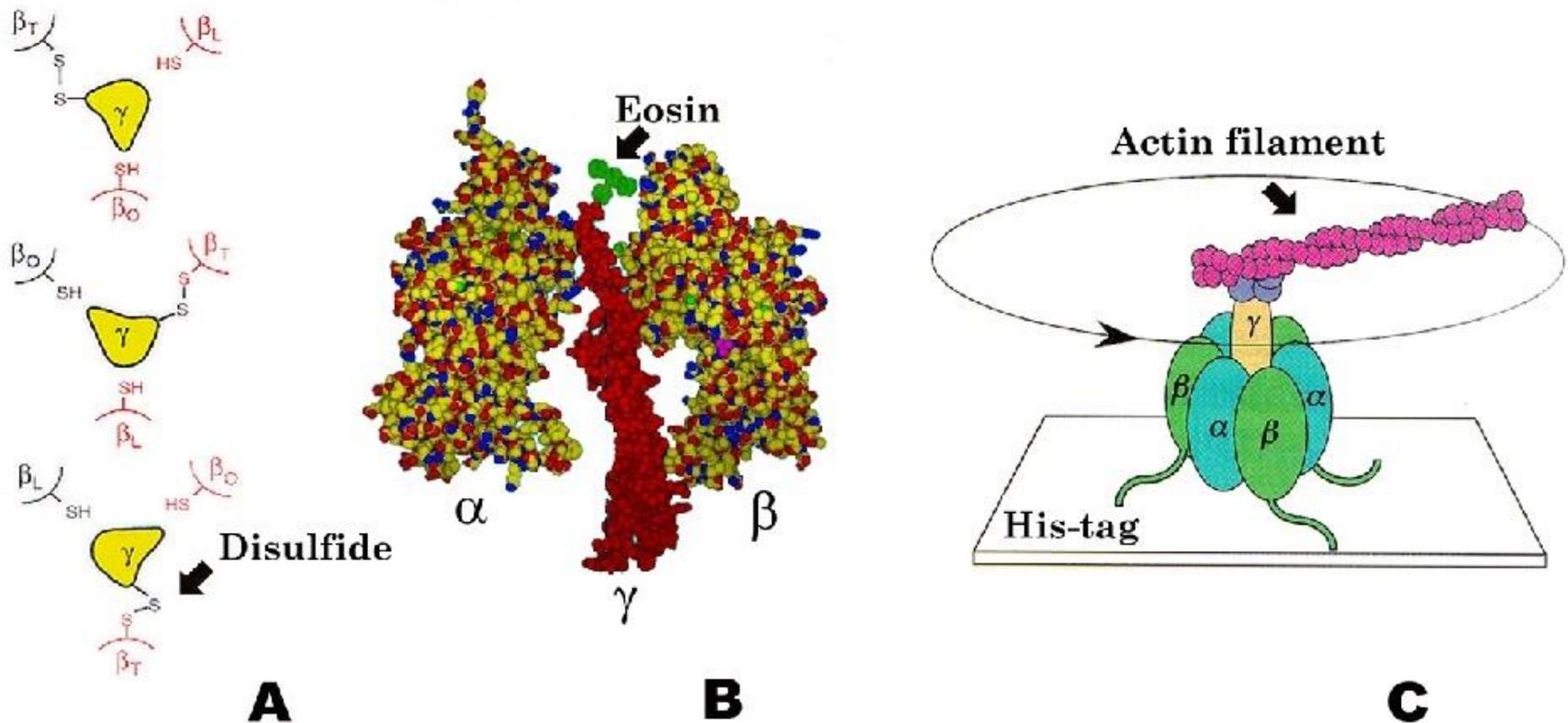
Subunidades beta catalíticas

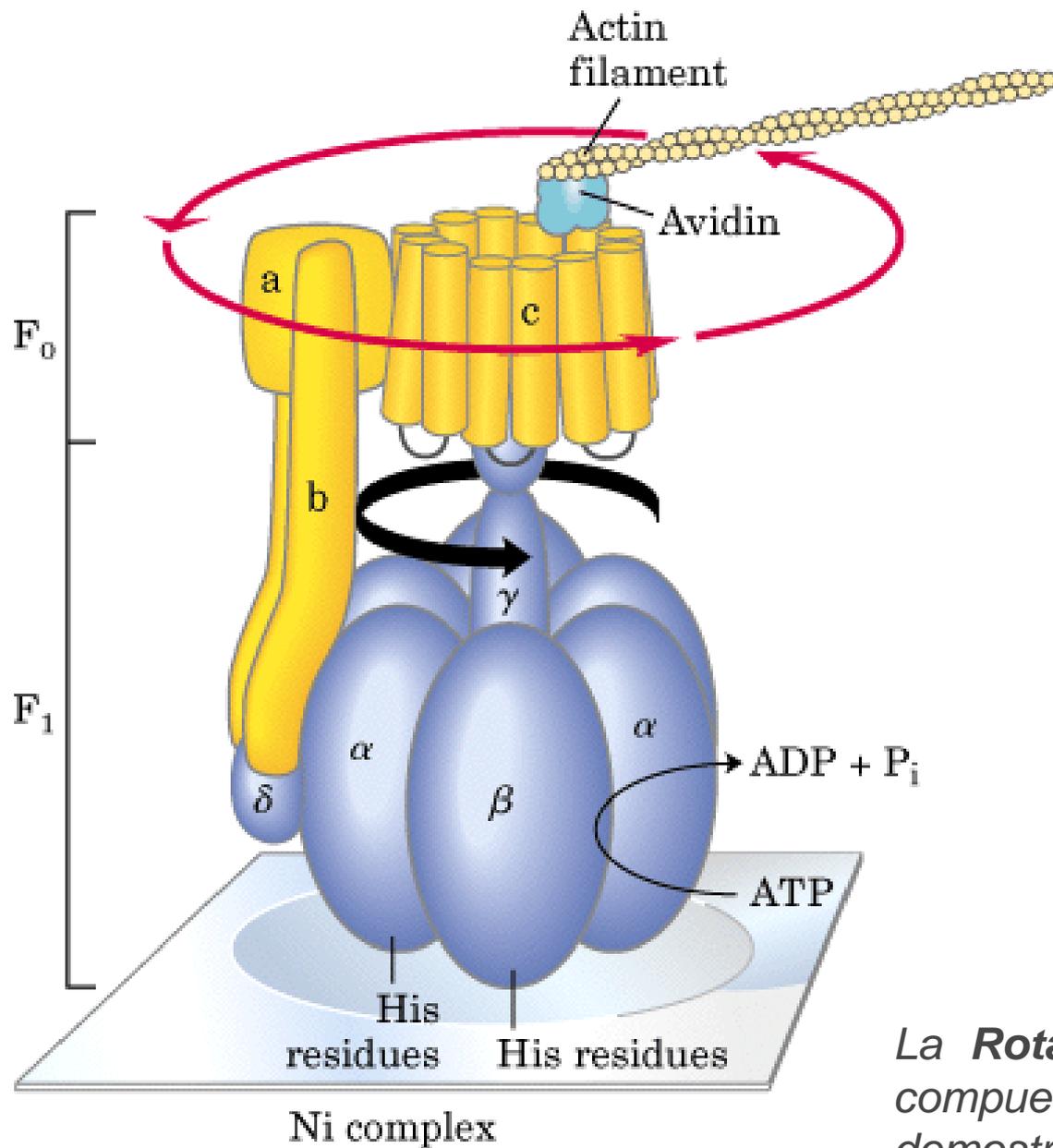






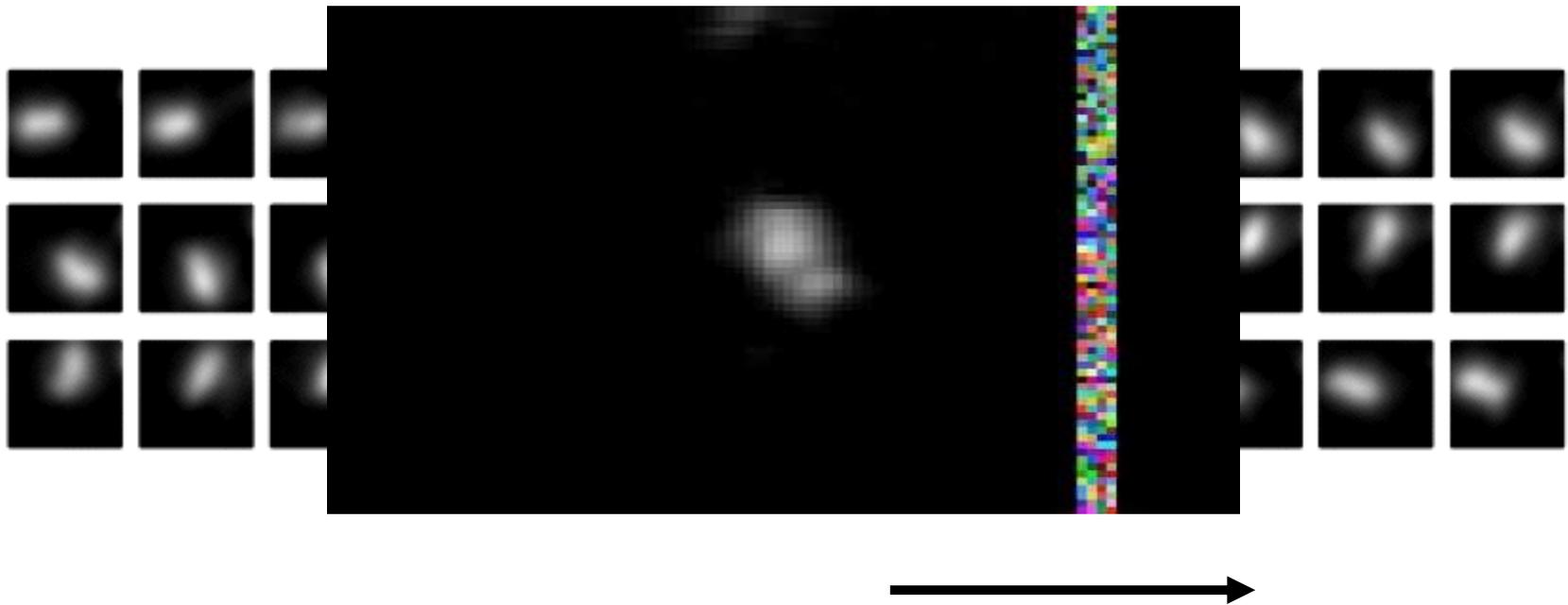
Tres técnicas para detectar la rotación de la ATPasa



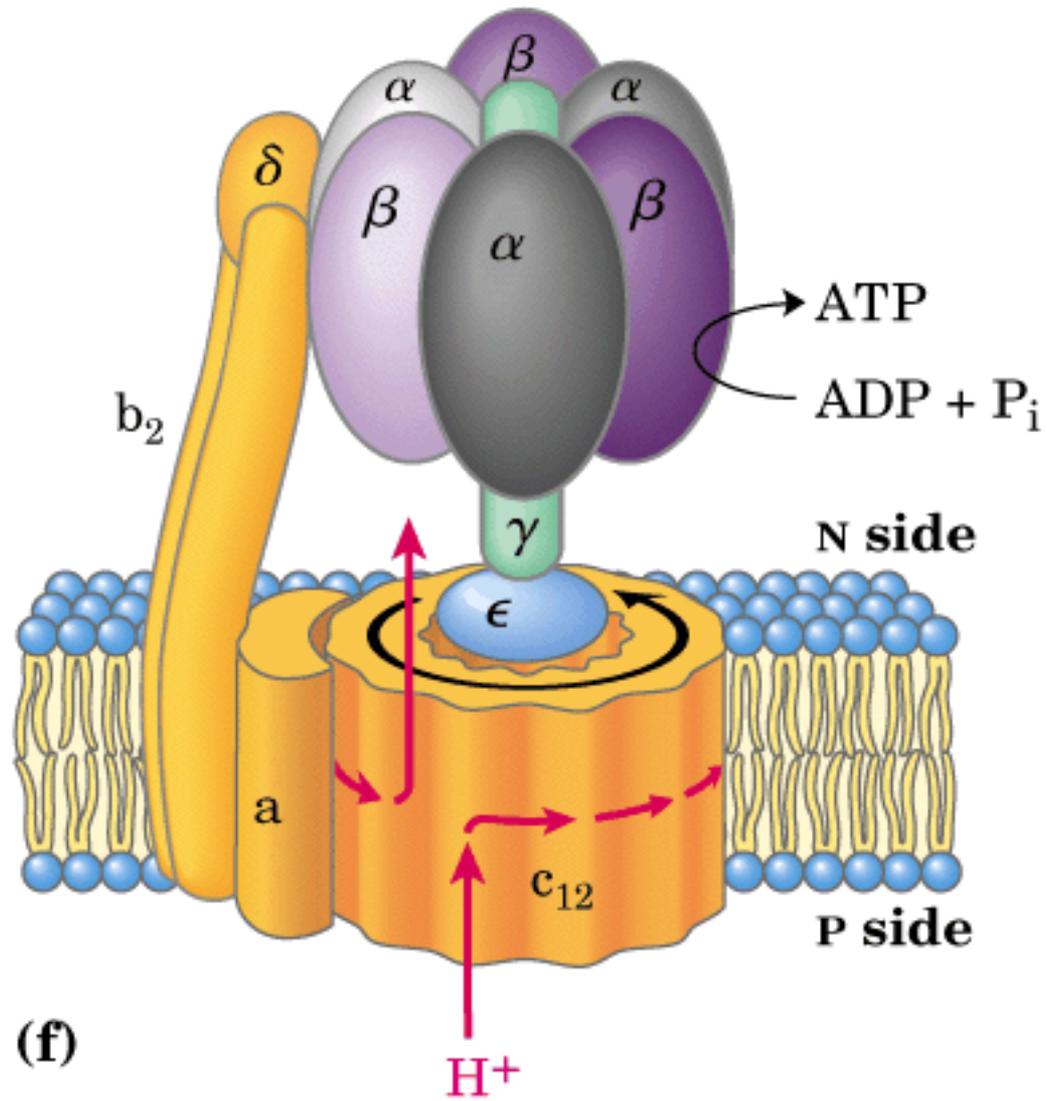


*La Rotación del eje γ relativo al anillo compuesto por las subunidades **a** y **b** se demostró por H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida & K. Kinoshita.*

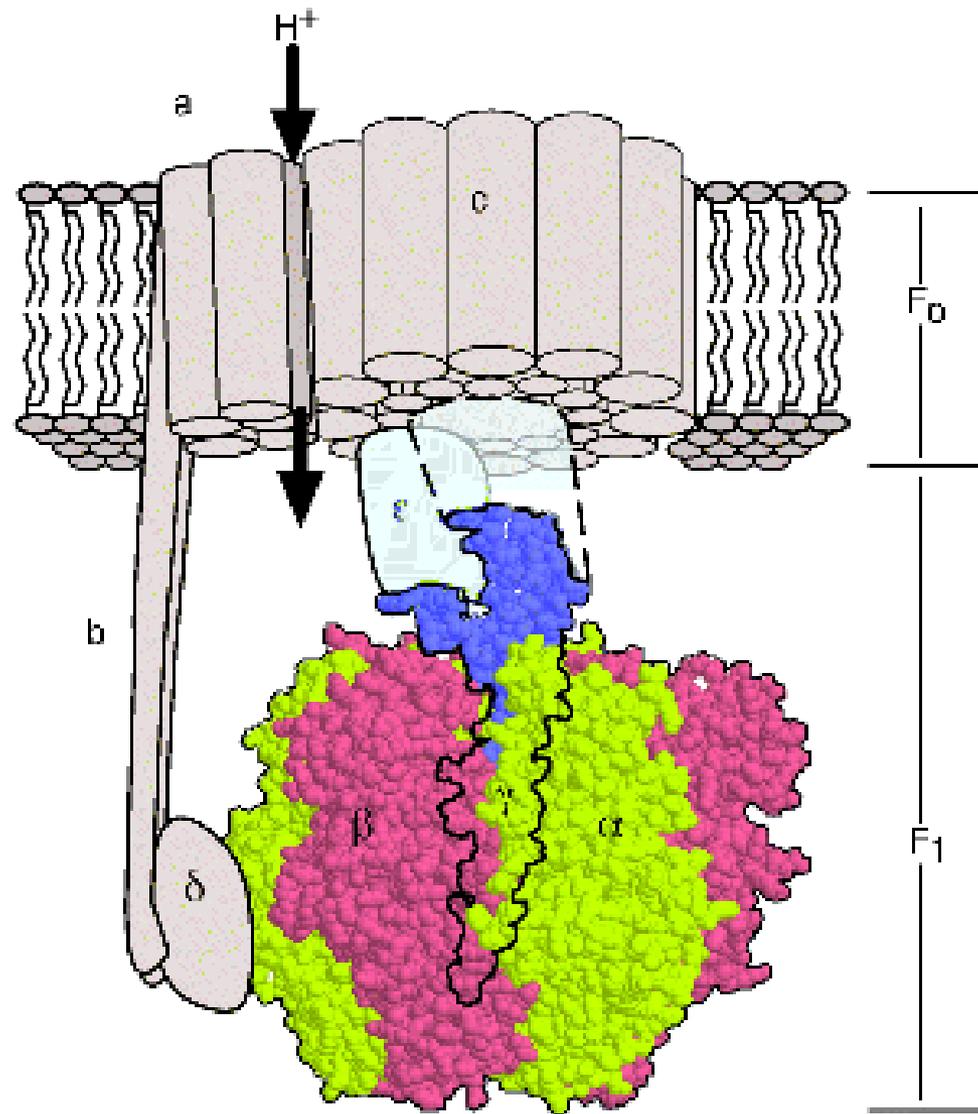
Monitoreo de la fluorescencia



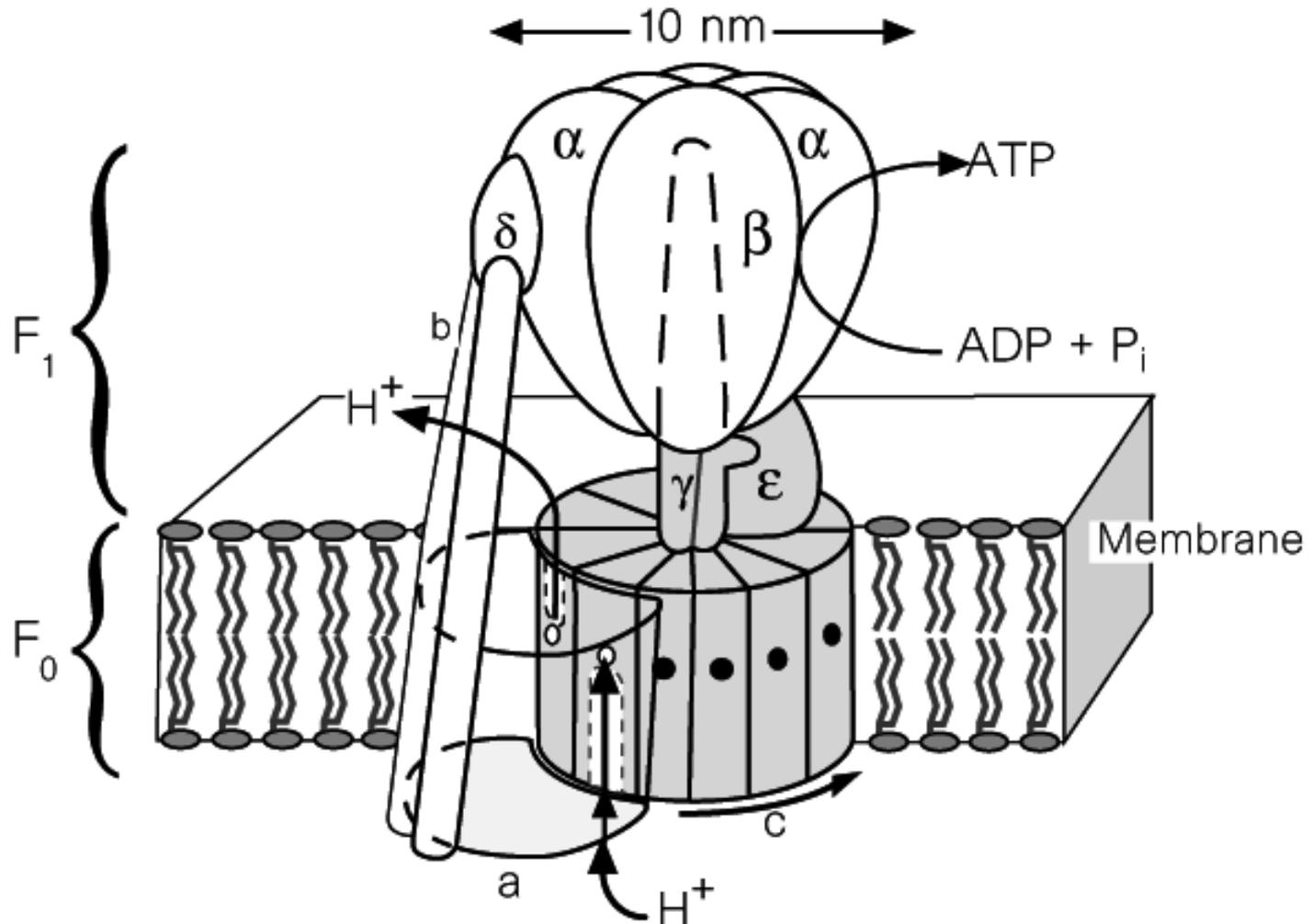
Rotary motion of the motor that produces
ATP in mitochondria



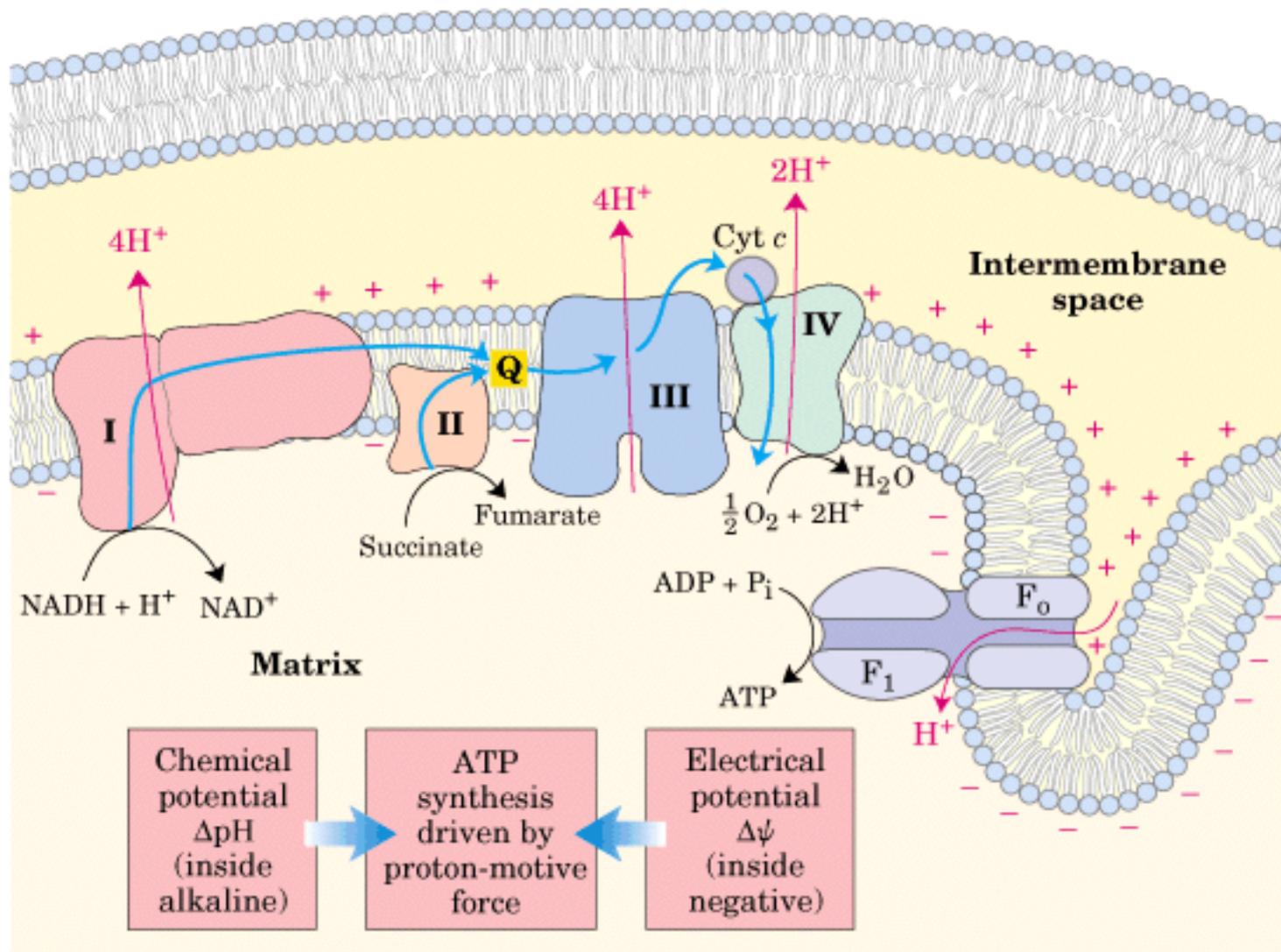
Paso de protones y
movimiento conformacional
de γ



Paso de los protones provoca el movimiento conformacional de las subunidades de F1.



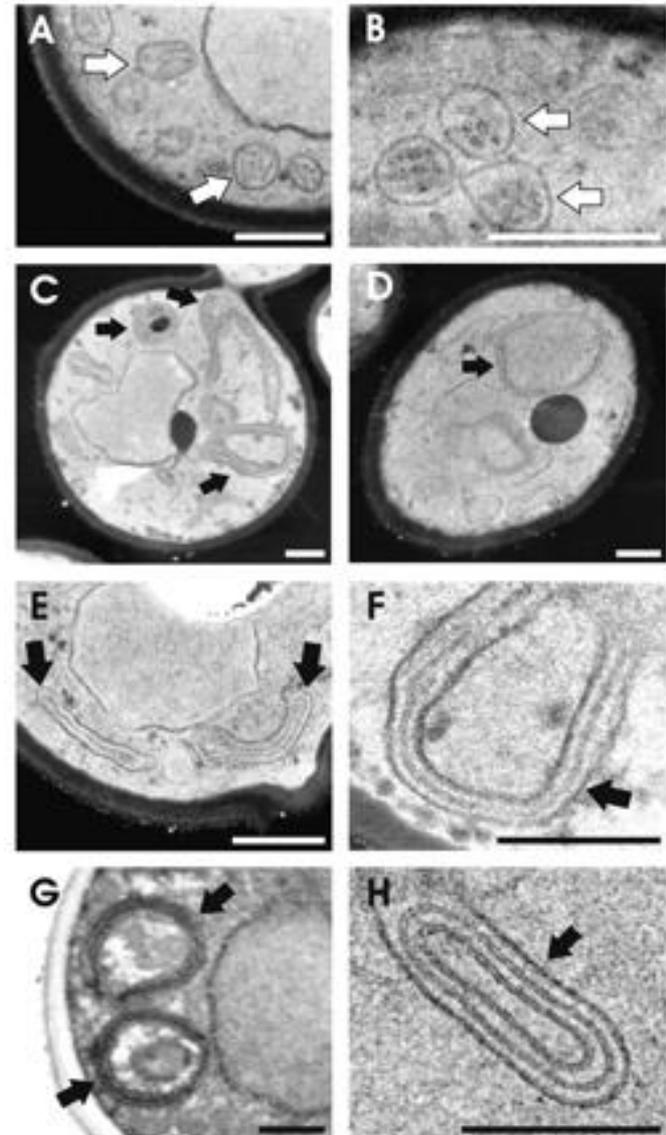
El estator impide que toda la ATPasa gire en la membrana



Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae

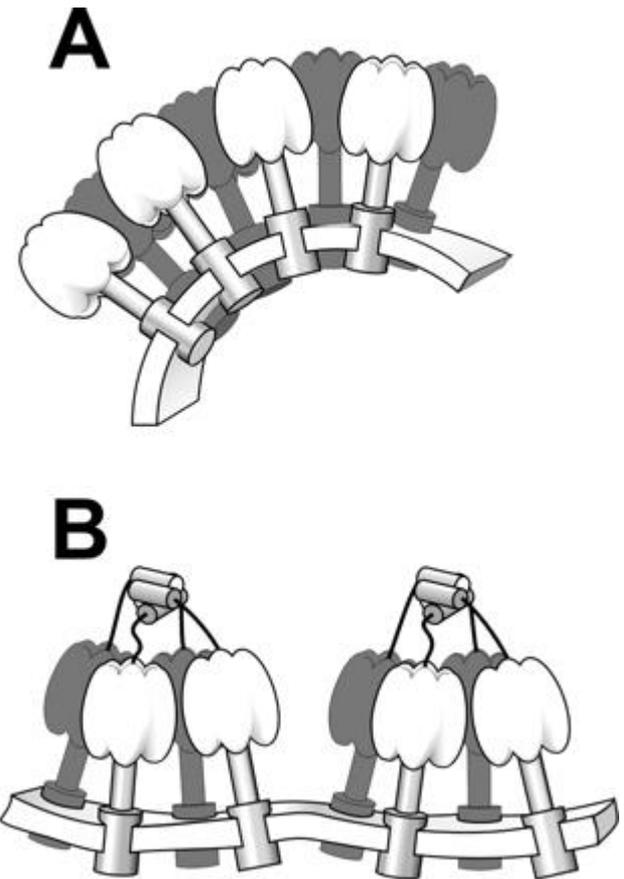
Paul D. Gavin, Mark Prescott, Susan E. Luff and Rodney J. Devenish

- ▶ Normal mitochondria are indicated by white arrows; abnormal mitochondria are indicated by black arrows. Images are presented in reverse contrast, with membranes being black. Bars, 0.5 μm .
- ▶ (A) YRD15 (B) -27-GFP, (C-F) -27-DsRed, (G,H) A20N.



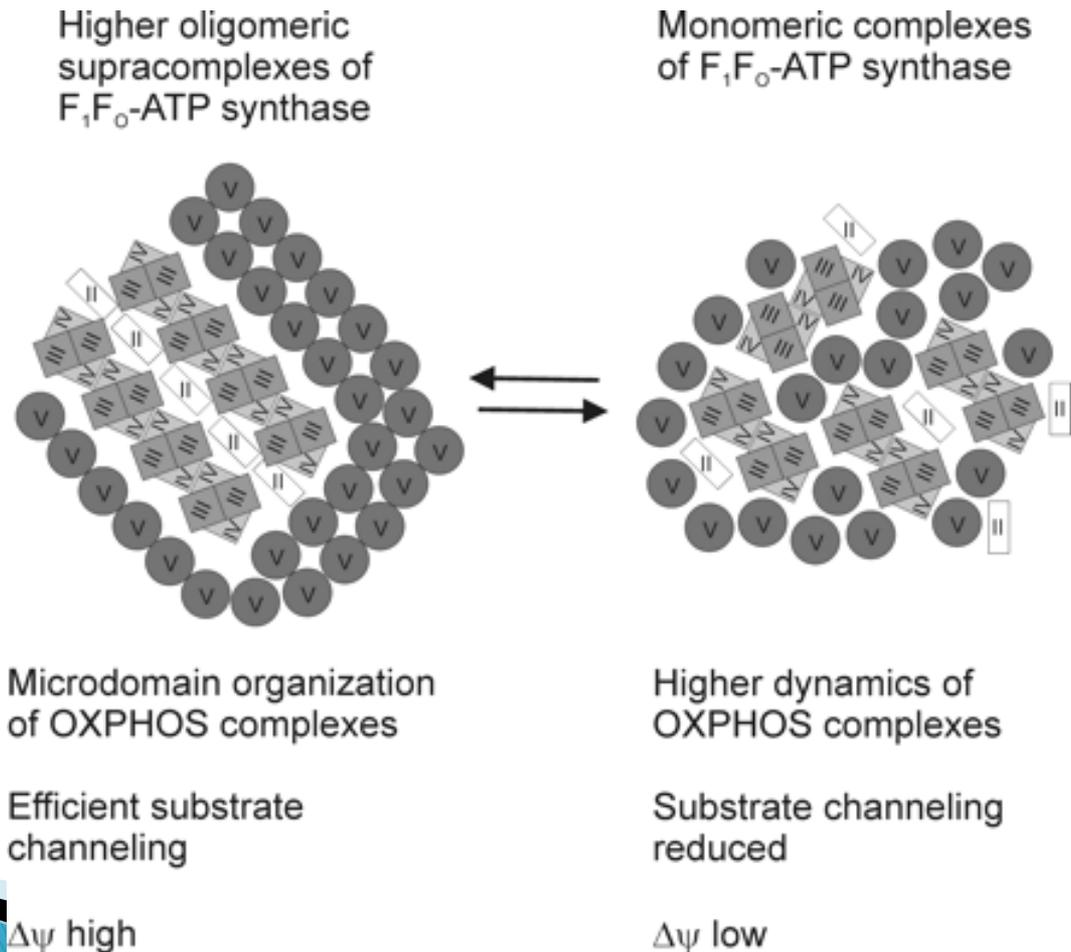
Tetrameric mtATPase assemblies in the membrane.

- ▶ The oligomerisation of identical mtATPase complexes has been proposed to form a rigid arc that leads to a protrusion of the inner mitochondrial membrane (A) (adapted from Allen, 1995). Here, for simplicity the contributing complexes are shown lacking the peripheral stator stalk and FO subunits aside from the subunit 9 (c) ring.
- ▶ Interactions between the DsRed moiety of mtATPase tetramers in -27-DsRed cells may prevent the component monomers from arcing away from each other and out from the membrane, thus promoting sheets of inner mitochondrial membrane lacking curvature (B).



Mitochondrial Membrane Potential Is Dependent on the Oligomeric State of F_1F_0 -ATP Synthase Supracomplexes^{*§}

Carsten Bornhövd[†], Frank Vogel[§], Walter Neupert[†], and Andreas S. Reichert^{†1}



Comparación entre fotofosforilación y la fosforilación oxidativa

1. Lugar donde se localiza
2. Primer donador de los electrones
3. Reducción de la quinona
4. Presencia de b_6f o bc_1
5. Último aceptor de los electrones
6. Formación de gradiente de pH

