



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**Centri Fe-S: ruolo nei complessi della catena di trasporto elettronica
nei mitocondri**

**Iron-sulfur clusters: their role in complexes of electron transport chain in
mitochondria**

Relatore: Prof.ssa Donatella Carbonera

Laureanda: Martina Tiozzo
(2032913)

Anno Accademico 2023-2024

Indice

1	Introduzione	3
1.1	Struttura e caratteristiche centri Fe-S	3
2	Mitocondri e catena di trasporto elettronica nella fosforilazione ossidativa	5
2.1	Complesso I	7
2.1.1	Centri Fe-S nel complesso I.....	8
2.2	Complesso II.....	11
2.2.1	Centri redox nel complesso II: cluster Fe-S e heme b.....	14
2.3	Complesso III	16
2.3.1	<i>Rieske protein</i> nel complesso III.....	17
3	Conclusioni.....	19
	Bibliografia.....	20

1 Introduzione

Nei sistemi biologici sono molti i cofattori che affiancano enzimi nelle loro funzioni, tra i più comuni ci sono i *centri (o cluster) Fe-S* che si ritrovano nella più ampia classe di metallo-proteine.¹

Nell'organismo sono in grado di svolgere svariati ruoli: sono coinvolti nella catena di trasporto elettronica, e, nei batteri, nella fotosintesi e nell'azotofissazione;¹ svolgono importanti funzioni come cofattori in catalisi enzimatiche oppure come acidi di Lewis situati in siti attivi, come accade per l'aconitasi mitocondriale;¹ sono molti anche i ruoli regolatori come la modulazione genica in risposta allo stress ossidativo attraverso le proteine SoxR (*superoxide response proteins*), la regolazione dei livelli di ferro mediante le proteine IRP1 e IRP2 (*Iron Response Proteins*), oppure la regolazione dei livelli di ossigeno ad opera delle proteine FNR (*fumarate-nitrate reduction proteins*).²

I centri Fe-S sono coinvolti anche nel metabolismo del DNA e si possono trovare nelle DNA primasi, nell'elicasi, nella DNA polimerasi e nelle nucleasi.²

Queste proteine sono situate generalmente nelle membrane interne delle cellule, nel citoplasma o all'interno di mitocondri, specialmente per gli organismi eucarioti, oppure nei cloroplasti.²

Di grande interesse, soprattutto per applicazioni in campo medico, è lo studio della biogenesi di queste proteine in quanto molte disfunzioni a livello neurologico, metabolico ed ematologico, sono correlate allo scorretto assemblaggio di esse.³

Le patologie generate sono spesso mortali nella prima infanzia e alcune tra le più importanti sono l'atassia di Friedreich, l'anemia sideroblastica e l'atassia cerebrale.³

1.1 Struttura e caratteristiche centri Fe-S

I *cluster*, in generale, sono complessi molecolari caratterizzati da legami metallo-metallo che generano strutture triangolari o cicliche estese, la definizione rigorosa escluderebbe dalla categoria i centri Fe-S in quanto gli atomi di Fe sono intervallati da atomi di S a ponte come ligandi; tuttavia, vengono incluse nella definizione anche strutture lineari metallo-metallo (M-M), e strutture con ligandi a ponte (M-L-M), come nel caso dei *cluster* in questione.⁴

Come le loro funzioni, anche le strutture dei centri Fe-S sono differenti, le più comuni ci sono quelle dei *cluster* [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S], dove la coordinazione degli ioni di ferro con catene proteiche avviene comunemente mediante i residui amminoacidici cisteina e, in alcuni casi, istidina, come per i centri di "Rieske"; la coordinazione, in generale, avviene sull'atomo di ferro con una geometria generalmente tetraedrica e gli ioni di ferro sono presenti come Fe(III) o Fe(II) a seconda dello stato redox del centro.^{1,5} (Figura 1 e Figura 2)

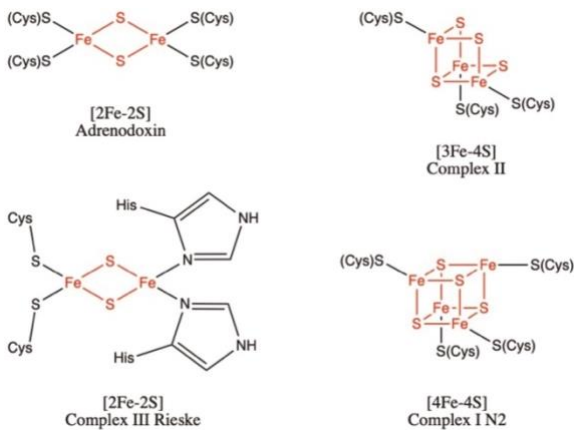


Figura 1. Strutture più comuni dei centri Fe-S. ²

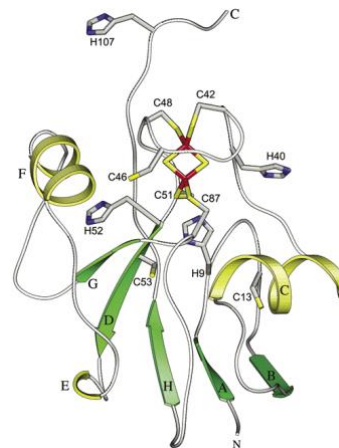


Figura 2. Cluster Fe-S con struttura adrenodoxin-type della proteina ferridossina, vengono evidenziate in giallo le eliche e in verde i beta-strands. ⁶

Il potenziale redox dei *cluster* è compreso tra i -700 e i +400 mV, questa diversità facilita il trasporto di elettroni nella catena respiratoria, è stato dimostrato che i legami ad idrogeno delle cisteine che fungono da leganti sono la causa principale di queste differenze di potenziale redox tra i vari centri, oltre al contributo dovuto alla presenza nel *backbone* di altri residui amminoacidici in grado di formare legami ad idrogeno. ⁷

Legami più forti e quindi distanze minori favoriscono l'aumento del potenziale di riduzione, il gruppo ammidico del residuo amminoacidico stabilisce un legame ad idrogeno con lo zolfo ($N-H \cdots S$) che provoca delocalizzazione elettronica e una stabilizzazione della carica negativa nello stato ridotto del cluster. ⁸

La struttura più comune è quella [2Fe-2S] tipica della proteina ferredossina dove i ligandi sono cisteinici, il potenziale di riduzione di questo centro varia da -250 mV a -420 mV, da ciò si può notare il suo carattere di forte riducente. ⁵ (Figura 2)

L'ossidazione di questi centri da parte di *reactive oxygen species* (ROS) and *reactive nitrogen species*, nei sistemi biologici, può portare a mutazioni o disassemblaggi della struttura dei centri Fe-S, queste modifiche sono spesso irreversibili ed è necessaria l'azione di enzimi per ristabilirne la struttura iniziale; un esempio è l'aconitasi per la quale avviene l'inattivazione del centro [4Fe-4S] da parte dello ione superossido, O_2^- , portando ad una nuova struttura [3Fe-4S] inattiva, l'enzima fratassina è coinvolto nel ripristino dell'attività del centro. ⁹

Nei capitoli successivi verrà trattato il ruolo biologico e la struttura dei centri Fe-S nei complessi mitocondriali che sono coinvolti nella catena di trasporto elettronica.

Questi *cluster* sono di importante interesse biologico perché mediano processi redox necessari alla respirazione cellulare, e la conoscenza dei meccanismi in cui essi prendono parte potrebbe offrire nuovi orizzonti di ricerca sulle patologie che causano l'invecchiamento cellulare e stress ossidativo dovuto alla produzione dei ROS. ²

Verrà inoltre trattato il meccanismo molecolare delle reazioni redox della fosforilazione ossidativa per i complessi contenenti i *cluster*, per poter contestualizzarne il loro ruolo e la provenienza degli elettroni trasportati.

2 Mitochondri e catena di trasporto elettronica nella fosforilazione ossidativa

I mitocondri sono organelli, situati all'interno delle cellule sia eucariote sia procariote, adibiti alla respirazione cellulare.¹⁰ Sono presenti in essi due zone: lo spazio intermembrana e la matrice mitocondriale, generate da una doppia membrana mitocondriale, una interna e una esterna ripiegata con numerose creste.¹⁰ Nella matrice vengono svolte la maggior parte delle reazioni del ciclo dell'acido citrico (o ciclo di Krebs) e dell'ossidazione degli acidi grassi, mentre nella membrana interna, dove sono collocati quattro complessi proteici, avviene la *fosforilazione ossidativa*. (Figura 3)

La matrice contiene il patrimonio genetico del mitocondrio, si ritrovano in essa molecole di DNA, RNA e ribosomi adibiti alla sintesi proteica.^{10,11}

I metaboliti necessari al processo di fosforilazione ossidativa entrano attraverso la membrana esterna, diffondendo verso l'interno mediante porine e proteine situate su di essa.¹⁰

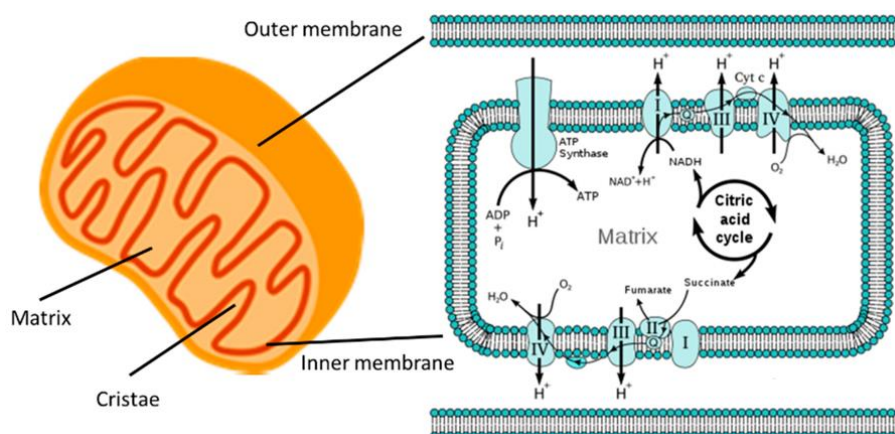


Figura 3. A sinistra struttura schematica del mitocondrio, a destra schema dei complessi enzimatici e dell'ATP sintasi necessari alla fosforilazione ossidativa presenti sulla membrana interna del mitocondrio.¹²

La *fosforilazione ossidativa* è il processo che, a partire da NADH e FADH₂, prodotti dal ciclo dell'acido citrico, genera acqua sfruttando la riduzione dell'ossigeno molecolare per la produzione di ATP.¹¹

In un primo step, gli elettroni, per la riduzione dell'ossigeno, vengono trasportati dalla catena di trasporto elettronica che è costituita da quattro proteine di membrana chiamate *Complesso I*, *Complesso II*, *Complesso III* e *Complesso IV*.¹⁰ I primi tre complessi sono adibiti al trasporto degli elettroni derivati dall'ossidazione di NADH e FADH₂, il quarto catalizza la riduzione dell'ossigeno con gli elettroni che hanno percorso la catena.¹¹ Il trasporto elettronico avviene mediante centri redox che nei vari complessi assumono potenziali via via maggiormente positivi e dunque con maggiore affinità verso gli elettroni.¹⁰ (Figura 4)

Il secondo step è invece costituito dalla produzione di ATP attraverso la forza proton-motrice, nel complesso ATP sintasi.¹¹

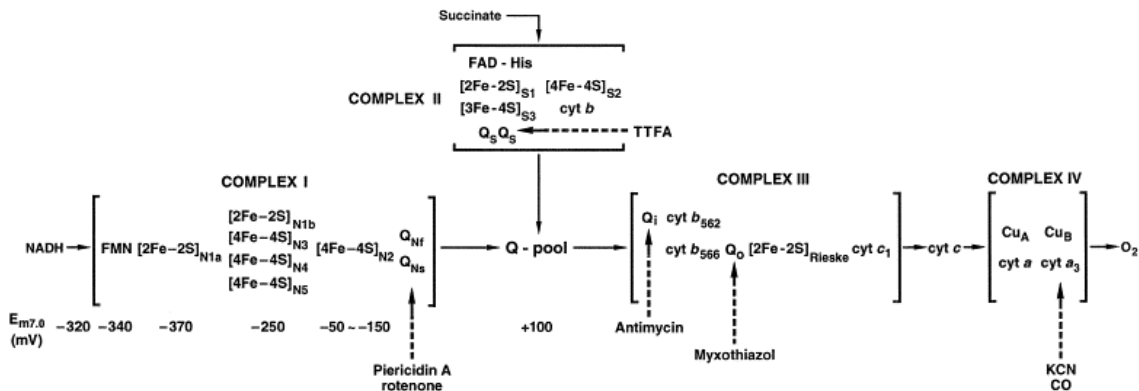
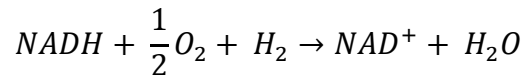
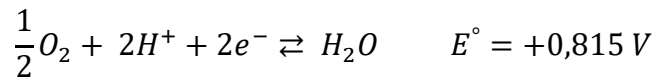


Figura 4. Schema delle specie redox nella membrana interna mitocondriale.¹³

La reazione di ossidazione di NADH è riportata di seguito:



L'efficienza termodinamica del processo di trasporto elettronico è calcolabile considerando le semi-reazioni dell'equazione sopra riportata e i relativi potenziali standard di riduzione.¹⁰



Il potenziale standard associato alla reazione completa è $\Delta E^\circ = 0,815 - (-0,315) = 1,130 V$. L'energia libera è calcolabile dalla relazione qui di seguito riportata, dove n indica il numero di elettroni scambiati e F è la costante di Faraday.¹⁰

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ = -2 \cdot 1,130 \cdot F = -218 \text{ kJ/mol}$$

Dunque, l'ossidazione di una mole di NADH da parte di O_2 consente di produrre un'energia libera pari a 218 kJ che viene sfruttata per la produzione di ATP alla fine del processo.¹⁰

La produzione di una mole di ATP richiede un'energia pari a 30,5 kJ/mol e durante la fosforilazione ossidativa per ciascuna molecola di NADH vengono prodotte 2,5 molecole di ATP in condizioni biochimiche standard.¹⁰

L'efficienza termodinamica del processo è dunque:¹⁰

$$Efficienza = \frac{2,5 \cdot 30,5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{218 \text{ kJ/mol}} \cdot 100 = 35\%$$

2.1 Complesso I

Gli elettroni trasportati dal NADH entrano nella catena respiratoria a livello del *Complesso I* (chiamato anche *NADH-Q ossidoreduttasi*), la struttura di questa proteina di membrana è nota grazie a studi effettuati mediante cristallografia a raggi X¹⁴ e microscopia elettronica¹⁵. Grazie ad essi è stata evidenziata la presenza di un braccio periferico contenente nove cluster Fe-S e un braccio in membrana coinvolto nel trasferimento protonico, dove sono presenti dei semicanali,¹⁶ alcuni aperti verso la matrice, altri verso lo spazio intermembrana, e collegati tra loro da una sequenza idrofobica di residui amminoacidici carichi e polari.¹⁷ Nel braccio in membrana sono presenti anche una lunga elica orizzontale e una serie di forcine β .¹¹(Figura 5)

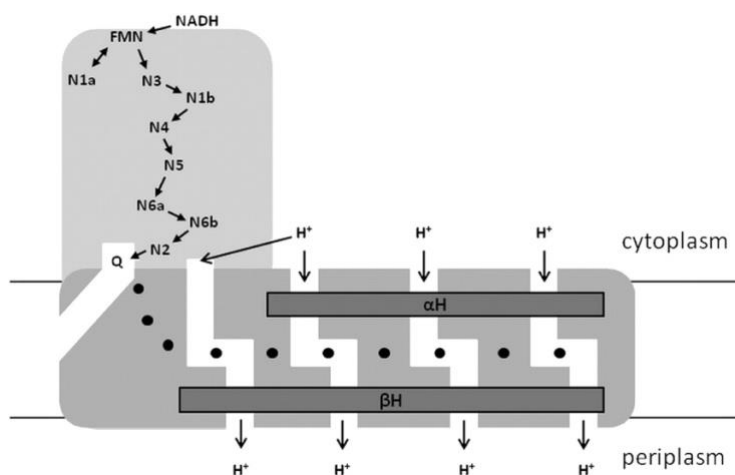


Figura 5. Schema struttura complesso I, in grigio chiaro è evidenziato il braccio periferico, in grigio medio il braccio nella membrana, i centri ferro-zolfo sono indicati con la lettera N e per semplicità di visualizzazione non è stato inserito N7 tipico di *E. coli*. αH rappresenta un'elica orizzontale mentre βH una forcina, i punti in nero rappresentano i residui amminoacidici polari e carichi.¹⁶

All'interno di questo enzima avviene dapprima il legame con il NADH, ($E_m \cong -320$ mV a pH=7)¹⁸, e il successivo trasferimento degli elettroni al gruppo prostetico *flavina mononucleotide*, FMN ($E_{m7} \cong -380$ mV)¹⁸, portando all'ossidazione di NADH a NAD^+ e alla riduzione di FMN a $FMNH_2$;¹¹ gli elettroni, dalla flavina ridotta, vengono poi trasferiti da sette centri Fe-S fino al sito di legame con l'ubichinone.¹⁶

L'ubichinone, Q ($E_{m7} \cong +90$ mV)¹⁸, è un trasportatore di elettroni capace di diffondere nella membrana interna dei mitocondri e permettere il loro trasferimento nella sua forma ridotta QH_2 tra i vari complessi.¹¹

Attraverso la generazione di un potenziale elettrochimico di membrana, in grado di guidare gli elettroni lungo la catena di centri Fe-S, essi vengono ceduti all'ubichinone che assume la configurazione Q^{2-} .¹⁸

L'ubichinone nella forma ridotta acquista due protoni dalla matrice passando alla forma QH_2 .¹¹ Successivamente QH_2 viene spostato nel *pool Q* affinché il ciclo possa continuare.¹¹ Il *pool Q* è la zona intermembrana in cui l'ubichinone è presente sia nella forma Q che nella sua forma ridotta e permette il collegamento di esso tra i vari complessi.¹¹ (Figura 6)

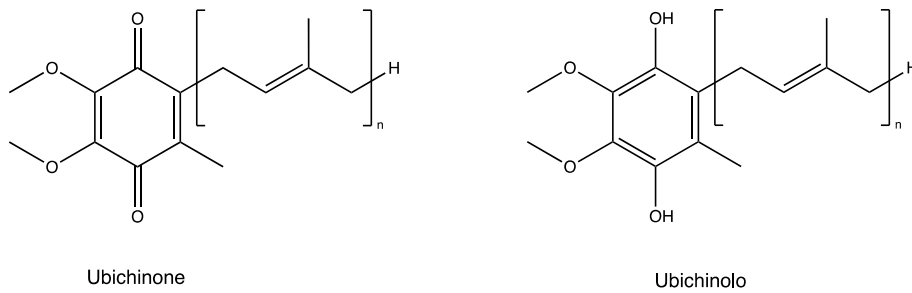
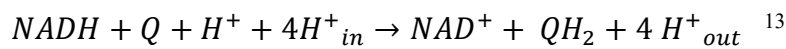


Figura 6. Struttura di ubichinone Q a sinistra e ubichinolo QH₂ a destra.

La reazione che avviene nel NADH-Q ossidoreduttasi è dunque descritta dalla seguente equazione:



Ad ogni molecola di NADH è associato il trasferimento di due elettroni al *pool* dell'ubichinone e allo spostamento di quattro protoni dal lato negativo a quello positivo della membrana mitocondriale interna, con la generazione di un gradiente elettrochimico di membrana, energia usata per la produzione di ATP.¹⁹

È stato ipotizzato che il processo di riduzione dell'ubichinone possa generare delle variazioni conformazionali delle eliche orizzontali e delle pK_a dei residui amminoacidici, innescando un meccanismo di apertura e chiusura dei canali in grado di prelevare protoni dalla matrice e trasportarli nello spazio intermembrana.²⁰

2.1.1 Centri Fe-S nel complesso I

I *cluster* ferro-zolfo presenti nel complesso I sono nove: N1a, N3, N1b, N4, N5, N6a, N6b, N2 e N7, situati nel braccio periferico.¹⁸ (Figura 7)

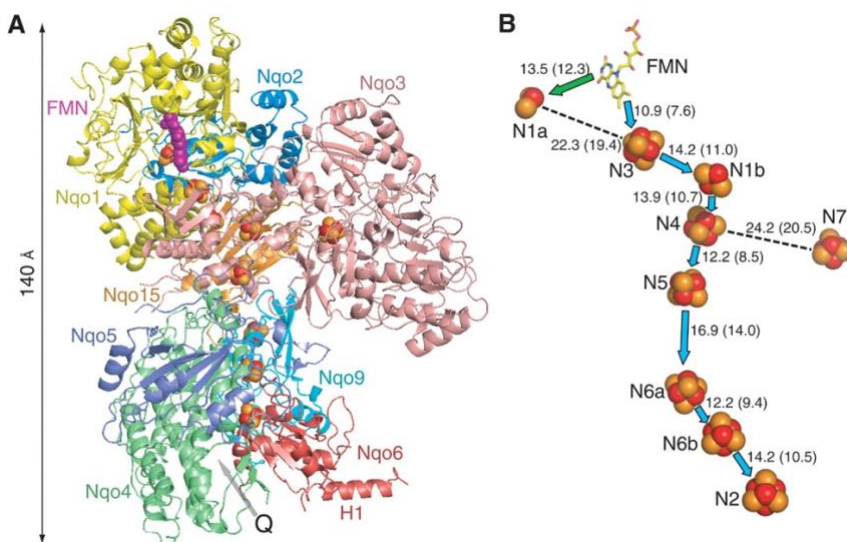


Figura 7. Braccio periferico del complesso I. A) vengono evidenziate le diverse subunità del complesso (NqoX) e i centri Fe-S con sfere arancioni e gialle, in violetto FMN e con H1 viene specificata l'elica. B) schema della disposizione dei centri con le relative distanze.²¹

Due dei quali, N1a ($E_{m7} \cong -370$ mV) e N7 ($E_{m6} \cong -250$ mV)¹⁷, quest'ultimo solo per alcuni organismi procarioti, non appartengono alla catena che collega elettronicamente FMN e ubiquinone.¹⁸

I *clusters* N1a e N1b hanno una struttura [2Fe-2S], da questo anche la comunanza nella nomenclatura, mentre gli altri sono nella forma [4Fe-4S].²

I *clusters* N3, N1b, N4, N5, N6a e N6b, ad eccezione di N2, presentano tutti dei potenziali di circa

-250 mV, escluso l'ultimo centro di questa catena N2 che presenta un potenziale di riduzione maggiore $E_{m7} \cong -100$ mV,¹⁷ e pH dipendente.¹⁸ (Figura 8)

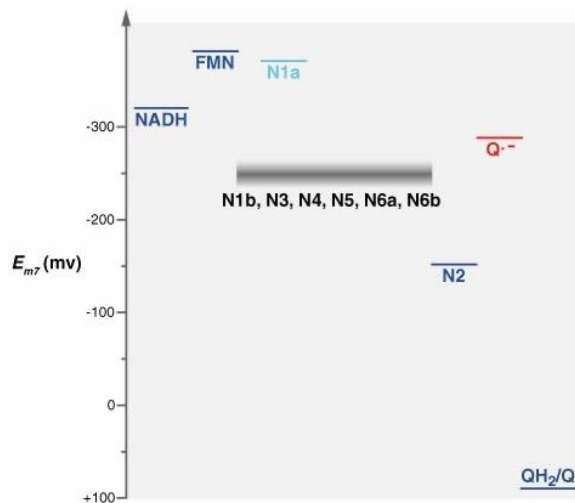


Figura 8. Potenziali di riduzione dei centri redox e dei substrati nel complesso I.¹⁸

Brandt U. 2006.
Annu. Rev. Biochem. 75:69-92

La catena di centri inizia dal sito in cui avviene il legame con NADH e termina al sito di legame con l'ubichinone.²

La riduzione del cluster N3 avviene attraverso l'acquisizione di 2 elettroni da parte di FNMH₂ e l'isopotenzialità dei centri della catena fa sì che possa avvenire la redistribuzione degli elettroni agli altri centri nella scala dei microsecondi fino ad arrivare al centro N2;²² solo tra i cluster N5 e N6, maggiormente distanti tra di loro, 14 Å contro i circa 8 Å di distanza tra gli altri, vi è un leggero ritardo nella ricezione degli elettroni di una decina di microsecondi.²²

Il *cluster* N1a a causa della sua posizione e del potenziale molto negativo, a confronto con quelli della catena, è stato rilevato essere adibito alla prevenzione della produzione dei ROS ed è stato dimostrato essere un regolatore dell'ossidazione di NADH stabilizzando il legame con NAD⁺ oppure destabilizzando il legame con NADH a seconda del fabbisogno.² La produzione di ROS avviene quando la concentrazione di ubiquinolo nel *pool Q* è troppo elevata e si osserva un trasferimento elettronico inverso dal sito di riduzione dell'ubichinolo al cluster N2.²

La produzione di ROS, inoltre, dipende dallo stato redox della flavina nucleotide, in particolare quando essa è completamente ridotta, la modulazione avviene agendo sulla velocità di dissociazione del legame con il complesso I e NAD⁺, più essa è lenta meno velocemente si legherà un'altra molecola di NADH per evitare l'ulteriore riduzione di FMN.²³

Il NADH si inserisce in una porzione più stretta dell'enzima ridotto mentre il NAD⁺ si inserisce in una tasca più larga periferica dell'enzima ossidato.²³

Quando il NADH si lega all'enzima nella tasca stretta, avviene lo spostamento del gruppo carbonilico appartenente al legame peptidico tra E95^F e S96^F del complesso, rivolgendolo verso il centro Fe-S N1a, a questo punto avviene lo scambio di protoni tra NADH e FMN per la formazione di NAD⁺ e FMNH₂.²³

Il trasporto di elettroni lungo la catena fino all'ubichinone porta alla ri-ossidazione di FMNH₂ e lo *shift* del gruppo carbonilico nuovamente nella posizione iniziale; ciò favorisce lo spostamento della molecola di NAD⁺ verso la tasca più larga da cui dissocia facilmente, consentendo ad una nuova molecola di NADH di legarsi.²³

Se gli elettroni rimangono all'interno del complesso, quando si è in presenza di ubichinone prevalentemente ridotto, si ha la riduzione del centro N1a che previene lo spostamento del carbonile, facendo permanere il NAD⁺ all'interno della tasca stretta, dove la dissociazione non è favorita, ciò previene il legame con altre molecole di NADH impedendo, dunque, la riduzione totale di FMN e quindi regolando la produzione di ROS.²³

Lo spostamento del carbonile dovuto allo stato redox del centro N1a avviene per la presenza di una molecola di acqua strutturale che è covalentemente legata al gruppo carbonilico e anche al residuo amminoacidico C127^E che è un ligando del cluster Fe-S.²³ (Figura 9)

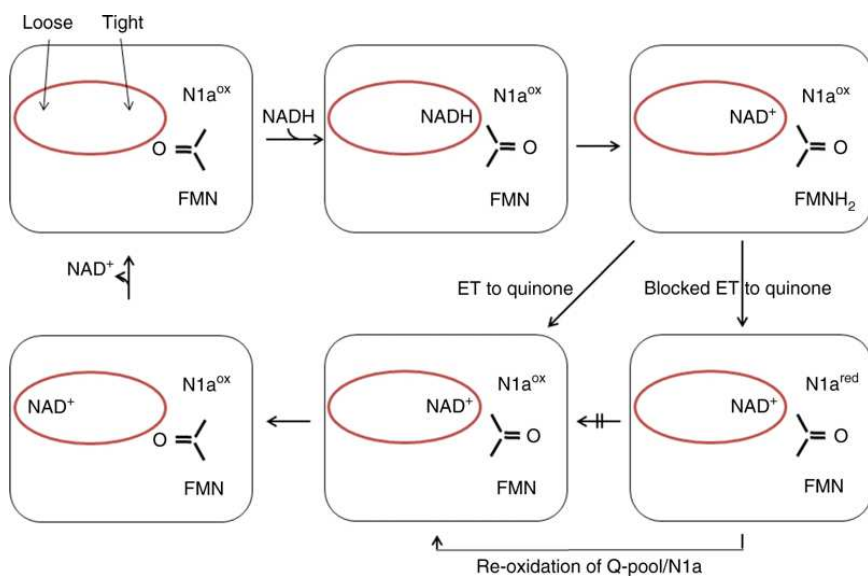


Figura 9. Schema di spostamento del gruppo carbonilico dovuto al legame con NADH e alla riduzione di FMN.²³

L'ultimo cluster della catena, N2, è correlato alla riduzione dell'ubichinone, e ha lo scopo di interagire paramagneticamente con le specie semichinone che si formano durante la reazione redox: SQ_{Nf} e SQ_{Ns}, radicali semi ridotti.¹⁸ Il nome delle due specie è dovuto al diverso rilassamento di spin che queste hanno nella spettroscopia EPR, anche se non è ancora stato identificato se esse corrispondano a ubichinoni provenienti da siti di *binding* differenti oppure se corrispondano a stati diversi della stessa molecola.^{18,19} È stato riscontrato che il meccanismo di traslocazione di protoni verso la membrana interna possa essere collegato alla

protonazione/deprotonazione delle specie semichinoniche, tuttavia un ulteriore ruolo di questo centro non è ancora stato definito con certezza.²⁴

Infine, il potenziale di N2 elevato e pH dipendente è dovuto alla formazione di un legame ad idrogeno tra His²²⁶ e il cluster.² (Figura 10)

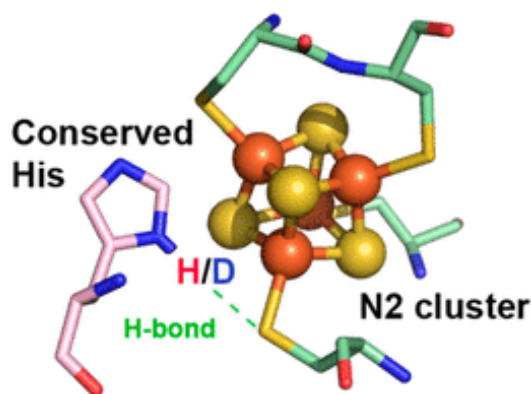


Figura 10. Cluster N2 del complesso I, viene evidenziata la posizione dell'istidina con cui interagisce.²⁴

L'ultimo centro appartenente a questo complesso è N7 esclusivamente per alcuni organismi batterici (come *E. coli*)¹⁷ e la sua distanza di 21Å dal *cluster* N4, esclude la sua partecipazione alla catena di trasferimento elettronico.²²

Ciò è stato dimostrato mediante spettroscopia EPR dove è stato evidenziato che N7 non viene ridotto dal NADH, nonostante il suo potenziale di circa -250 mV, a pH=6, ciò indicherebbe la possibilità di essere ridotto dal nucleotide se fosse inserito nella catena di centri.¹⁷

N7 non è presente negli organismi eucarioti probabilmente per ragioni evoluzionistiche.¹⁷

Infine, questo *cluster* contribuisce alla stabilità e all'assemblaggio del complesso I, evidenze di ciò sono state riscontrate valutando i cambiamenti osservati sostituendo i residui cisteina a cui N7 è legato e valutando l'impossibilità di isolare il complesso I della specie *E. coli* in mancanza del centro.²⁵

2.2 Complesso II

La seconda tappa della catena di trasporto elettronica si svolge nel *Complesso II* (anche chiamato *succinato-Q riduttasi*), complesso enzimatico che ha lo scopo di collegare la fosforilazione ossidativa con il ciclo di Krebs, la sua struttura è stata identificata mediante cristallografia a raggi X, e questo complesso non è implicato nel trasporto di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana.²⁶

I suoi enzimi hanno il ruolo di catalizzare le reazioni di ossidoriduzione di succinato e fumarato in un dominio solubile del complesso e le reazioni di ossidoriduzione di ubiquinolo e ubiquinone in un dominio *membrane-spanning*.²⁷

Sono state identificate delle super-famiglie di enzimi che hanno un'efficienza cinetica maggiore quando catalizzano la reazione in una sola direzione: le *succinato-ubichinone ossidoreduttasi* (SQR o anche *succinato deidrogenasi*) con lo scopo di ossidare il succinato e ridurre l'ubichinone, processo necessario alla fosforilazione ossidativa, e le *chinolo-fumarato riduttasi* (QFR) che ossidano l'ubichinolo e riducono il fumarato, che fanno parte della *fumarate respiration*.^{27,28}

A prescindere dalla preferenza catalitica i domini presenti nelle superfamiglie sono gli stessi anche se con qualche differenza strutturale; il dominio solubile è molto esteso e contiene due catene polipeptidiche: una flavoproteina, SdhA/FrdA, in grado di legare una molecola di FAD e una proteina Fe-S, SdhB/FrdB, che coordina tre centri Fe-S;²⁷ il dominio *membrane-spanning* contiene due subunità, SdhC/FrdC e SdhD/FrdD, differenti anche all'interno delle stesse superfamiglie, con cinque o sei eliche transmembrana e da zero fino a due gruppi *heme* di tipo b.²⁷ (Figura 11) (la denominazione SdhX viene utilizzata per i domini dell'enzima SQR, mentre FrdX per l'enzima QFR)

Le reazioni che vengono accoppiate dall'enzima SQR per la fosforilazione ossidativa sono:

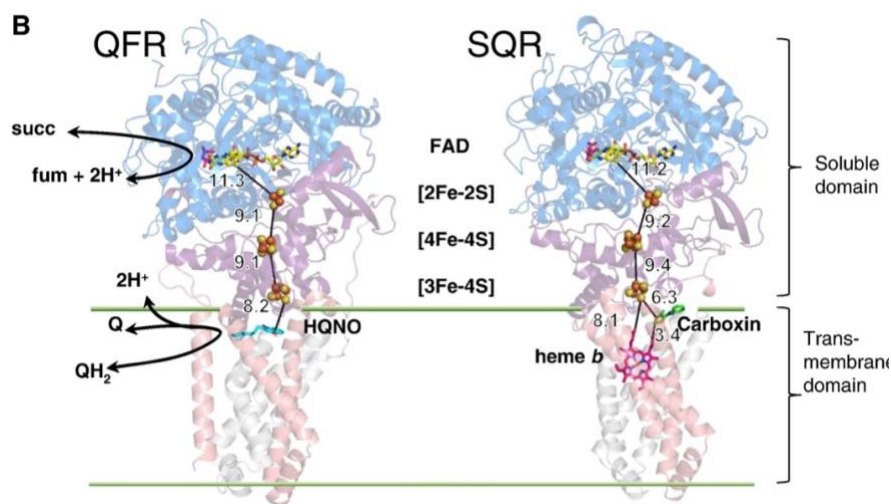
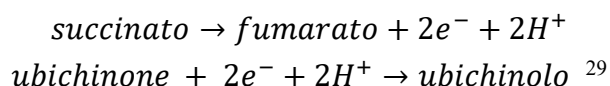
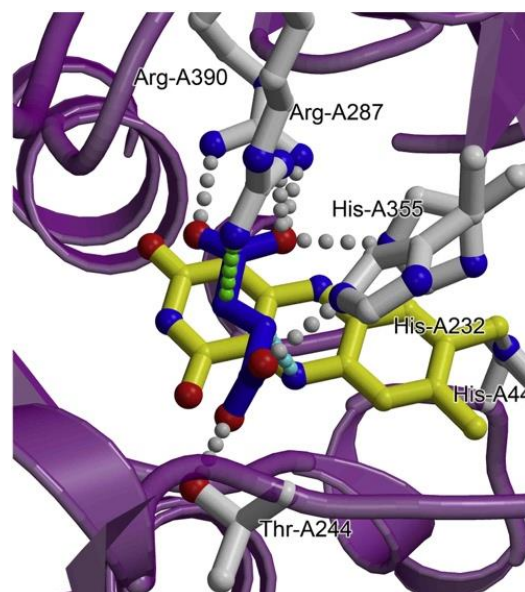


Figura 11. Struttura del complesso II, a sinistra QFR e a destra SQR di *E.coli*. In blu sono evidenziate le flavoproteine (SdhA/FrdA), in violetto le proteine Fe-S (SdhB/FrdB), in rosa e in grigio i domini *membrane-spanning*, (SdhC/FrdC) e (SdhD/FrdD); in azzurro è evidenziato HQNO l'inibitore specifico per QFR e in verde Carboxina inibitore specifico per SQR; e con le sfere gialle e arancioni sono riportati i centri Fe-S. (adattato da³⁰)

La riduzione di fumarato a succinato avviene con un processo mediato dall'enzima QFR, e come spesso accade per molti batteri, l'enzima partecipa alla respirazione anaerobica dove il fumarato è l'ultimo accettore di elettroni,²⁷ a differenza della respirazione aerobica dove l'accettore ultimo è l'ossigeno.³¹ Tuttavia questa attività inversa rispetto alla reazione di catalisi di SQR è stata dimostrata anche nei mitocondri dei mammiferi in condizioni in cui il *pool* dell'ubichinone è altamente ridotto e quando le concentrazioni di fumarato riescono a influire sulla termodinamica del processo, portando il complesso II ad avere ruoli anche regolatori.²⁶ Negli enzimi QFR dapprima avviene l'inserimento del fumarato nel sito di inter-conversione del dicarbossilato, il *binding* consente l'allineamento del legame C2-C3 del cofattore FAD ridotto al legame C4-C5 del substrato, promuovendo il trasferimento di idruro dal carbonio C5 al carbonio C2 del doppio legame molecola, con la formazione di un intermedio carbanionico del fumarato.²⁷

Successivamente avviene il trasferimento di un protone da una catena laterale di arginina, Arg-A287, all'altro carbonio del doppio legame per completare la riduzione.^{27,29} (Figura 12)

Figura 12. Sito attivo di interconversione fumarato-succinato dell'enzima QFR, in blu viene evidenziata la molecola di fumarato, in giallo la molecola di FAD, in viola il backbone dell'enzima e in grigio le catene laterali dei residui amminoacidici dell'enzima che partecipano alla stabilizzazione con legami ad idrogeno, punti grigi; con i punti azzurri è indicato il trasferimento di idruro, in verde invece il trasferimento di protoni da un'arginina.²⁷



Nell'enzima QFR il processo di ossidazione dell'ubichinolo avviene nel sito di *binding* Q_d (distale), dove avviene il legame del substrato mediante interazioni ad idrogeno con i residui amminoacidici nel sito; la deprotonazione delle posizioni O4 e O1 avviene da parte dei residui amminoacidici, Glu-C29 e Lys-B228, rispettivamente, che fungono da accettori di protoni e li rilasciano nel sito dove avviene la riduzione del fumarato;²⁷ gli elettroni vengono trasferiti, invece, da una serie di gruppi prostetici: due gruppi eme con differente potenziale di riduzione e tre centri Fe-S, il ruolo di questi centri verrà trattato nella sezione successiva.²⁹ Il processo catalizzato dall'enzima QFR è nel complesso elettro-neutrale.²⁷

L'enzima SQR che è coinvolto nella respirazione aerobica, ed è direttamente parte del ciclo dell'acido citrico, in esso avviene l'ossidazione del succinato.²⁷ Al giorno d'oggi il meccanismo non è ancora ben delineato, ma potrebbe prevedere una reazione inversa a quella che avviene nell'enzima QFR di cui ne è stato identificato il meccanismo.²⁷ Sono stati condotti studi che hanno però evidenziato la presenza di un legame covalente con la molecola di FAD ridotto ad un residuo di istidina, che genera un innalzamento del potenziale di riduzione del cofattore da -219 mV a circa -80 mV.^{27,30}

Nell'enzima SQR il *binding* con l'ubichinone, per la sua riduzione, avviene similmente a quello per l'enzima QFR, nel sito Q_p (prossimale), la posizione O1 interagisce con legami ad idrogeno con i residui Tyr-D83 e Trp-B164 e la presenza di elettroni derivanti dall'ossidazione del succinato, facilita l'avvicinamento dell'ubichinone verso il residuo Ser-C27 che forma un legame ad idrogeno con O4.³² Si ha inoltre un'interazione tra il gruppo metossi in posizione 3 e His-B207 che conferisce maggior stabilità.³² Queste interazioni permettono il trasferimento di due elettroni all'ubichinone e di due protoni, questi ultimi provenienti dalla *proton pathway* costituita in tutto da dodici molecole di acqua che collegano l'apertura della membrana verso il citoplasma con il sito Q.³² (Figura 13)

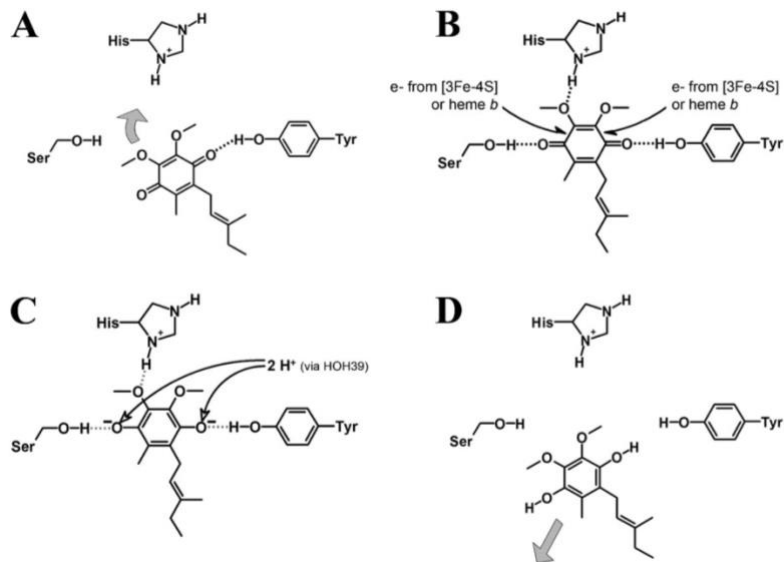
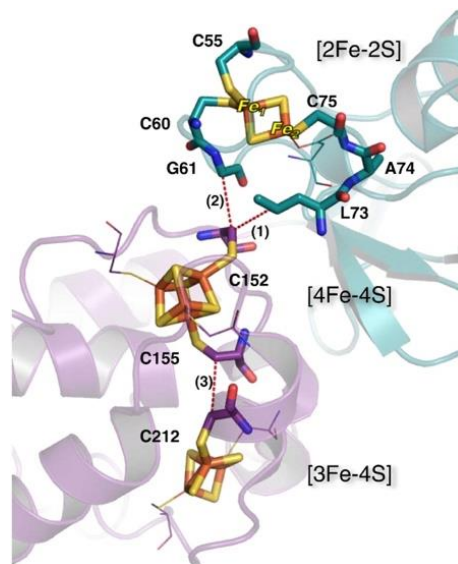


Figura 13. Meccanismo di riduzione dell'ubichinone nell'enzima SQR.³²

2.2.1 Centri redox nel complesso II: cluster Fe-S e heme b

I tre *cluster* presenti, [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S], sono disposti linearmente con una distanza che varia tra i 9,1 Å e gli 11,3 Å, compatibili con un efficiente trasferimento di elettroni e hanno lo scopo di facilitare il trasferimento di elettroni dal sito di legame del fumarato/succinato presente nella flavoproteina al Q-site.³⁰ (Figura 14)

Figura 14. Intorno chimico dei centri Fe-S nel complesso II dell'enzima SQR, il dominio N terminale è rappresentato in turchese e quello C terminale in viola, le linee tratteggiate riportano le vie di trasferimento elettronico, la via (1) rappresenta la via di trasferimento elettronico da evidenze sperimentali, la seconda via (2) è una possibile via teorica di trasferimento.³⁰



La subunità proteica SdhB/FrdB si ripiega portando alla formazione di due domini distinti e alla possibilità coordinare con il dominio N-terminale i cluster [4Fe-4S] e [3Fe-4S], mentre il dominio C-terminale il centro [2Fe-2S].³⁰

I potenziali di riduzione dei diversi centri Fe-S sono compatibili con la direzione di catalisi dei due diversi enzimi: studi svolti sulle variazioni dei residui amminoacidici hanno dimostrato la tendenza dell'enzima SQR a catalizzare la reazione diretta di ossidazione del succinato rispetto a quella inversa di riduzione del fumarato, osservando le variazioni dei potenziali di riduzione dei cluster e la loro incidenza sulla cinetica di reazione.³⁰ (Tabella 1)

Tabella 1. Potenziali di riduzione delle specie redox negli enzimi SQR e QFR per le diverse specie. (MQ menachinone).³⁰

Species	FAD	[2Fe-2S]	E_m (mV)		
			[4Fe-4S]	[3Fe-4S]	b heme
SQR-UQ					
<i>E. coli</i>	-80	-15 to +10	-213 to -175	+55 to +70	+15 to +30
<i>Bos taurus</i>	-79	0	-260	+60	-185
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		+50	-250	+80	
SQR-MQ					
<i>Micrococcus luteus</i>		+70	-295	+10	b ^h +65
<i>Bacillus subtilis</i>		+80	-240	-25	b ^l -95
QFR					
<i>E. coli</i>	-50 to -90	-79	-300 to -333	-70	None
<i>Wolinella succinogenes</i>		-59	-250	-24	b ^h +20 b ^l -200

Il potenziale di [3Fe-4S] in SQR è molto simile al potenziale delle specie accettore di elettroni ubichinone ($E_m \cong +100$ mV) mentre in QFR è molto simile alla specie donatrice di elettroni ubichinolo ($E_m \cong -100$ mV); il cluster [4Fe-4S] invece presenta per entrambi gli enzimi un potenziale molto negativo rispetto agli altri centri, esso costituisce una barriera di potenziale per gli elettroni, tuttavia nella comunità scientifica ci sono ancora controversie sul ruolo di centri redox con potenziali di riduzione così negativi.^{30,33}

Nell'enzima SQR il primo *cluster* [2Fe-2S] accetta elettroni provenienti dal FAD e li cede al secondo centro [4Fe-4S], una delle possibili vie di trasferimento potrebbe coinvolgere il residuo amminoacidico Leu-73 in contatto con il residuo Cys-B152 del cluster [4Fe-4S].^{2, 30}

Lo step successivo vede la cessione degli elettroni dal cluster [4Fe-4S] a [3Fe-4S], dove i residui Cys-B155 e Cys-B212 sono posizionati uno di fronte all'altro in modo da facilitare il trasporto elettronico tra i cluster.³⁰

In questa tipologia di enzimi, a circa 8,1 Å dal *cluster* [3Fe-4S], è presente un ulteriore centro redox, il gruppo *heme b*, la cui funzione catalitica è ancora non perfettamente delineata, esso mostra una differenza di potenziale di riduzione notevole nelle diverse specie, potrebbe non essere direttamente coinvolto nel trasferimento elettronico, ma ha la capacità di stabilizzare il dominio transmembrana e le sue quattro subunità, e di regolare la produzione di specie reattive dell'ossigeno come H₂O₂.^{34, 9}

La produzione di ROS da parte del complesso II è minore rispetto a quelle del complesso I e III, ma si può osservare anche quando la concentrazione di succinato è elevata e si ha un'inversione della direzione degli elettroni, verso il complesso I.³⁵

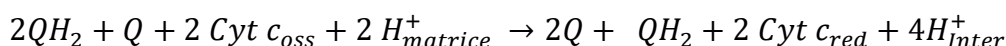
Infine, il primo elettrone ceduto al cluster [3Fe-4S] viene equilibrato rapidamente tra il gruppo *heme b* e l'ubichinone e quando raggiunge quest'ultimo nel Q-site avviene la riduzione dell'ubichinone, dopodiché esso può trasferire gli elettroni al *complesso III*.^{30,34}

2.3 Complesso III

Il terzo e ultimo complesso facente parte della catena di trasporto elettronica è il *Complesso III* (anche chiamato *Q-citocromo c ossidoriduttasi*), in esso è presente l'ultimo dei centri Fe-S della catena di trasporto elettronica e due citocromi: *citocromo c₁* e *citocromo b*.²

La funzione del Q-citocromo c ossidoriduttasi è quella di mediare il trasporto elettronico dall'ubichinone, proveniente dal *pool Q*, al citocromo c, generando un gradiente protonico tra la membrana mitocondriale che permette il passaggio di quattro protoni nello spazio intermembrana prelevandone due dalla matrice e due dall'ubichinolo.^{36,11}

La reazione catalizzata è la seguente:¹¹



La struttura di questo complesso è omodimerica, ciascuna subunità per i mammiferi è costituita da undici catene polipeptidiche, ma ci può essere una variazione tra le diverse specie, e sono individuabili tre regioni: una *membrane-spanning*, una nella matrice e una intermembrana.³⁷

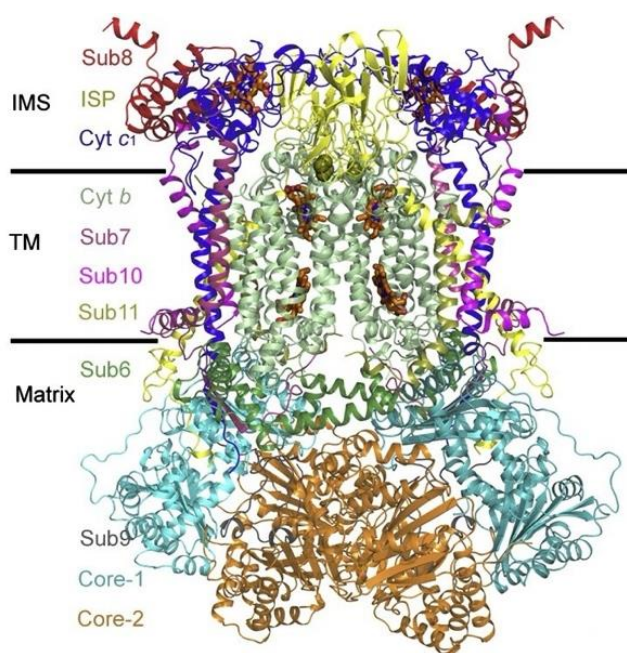


Figura 15. Struttura omodimerica del Q-citocromo c ossidoriduttasi bovino, le undici catene polipeptidiche vengono individuate in colori diversi e la struttura generale può essere divisa nei tre settori matriciale (Matrix), transmembrana (TM) e intermembrana (IMS) a seconda della posizione rispetto alla membrana mitocondriale, in arancione con modello ball and stick vengono individuati i gruppi prostetici heme *b_L*, *b_H*, e *c₁*, e con sfere verde oliva i centri Fe-S.³⁷

Il citocromo *c₁* contiene un gruppo *heme* di tipo b ($E_{m7} = +265$ mV per i batteri e $E_{m7} = +230$ mV per i bovini);³⁶ la proteina Fe-S detta anche di “*Rieske*” contiene un cluster Fe-S, [2Fe-2S] ($E_{m7} = +280$ mV per i batteri e $E_{m7} = +250$ mV per i bovini), essa verrà trattata nello specifico nel capitolo successivo;^{2, 36} il terzo centro redox è il citocromo b che contiene due gruppi *heme* con differenti caratteristiche, uno viene detto *heme b_L*, e l'altro *heme b_H*, dove L sta ad indicare il basso potenziale di riduzione, mentre H l'alto ($E_{m7} = -90$ mV per i batteri e $E_{m7} = -30$ mV per i bovini, per il primo) ($E_{m7} = +50$ mV per i batteri e $E_{m7} = +100$ mV per i bovini, per il secondo).³⁷ I due gruppi *heme* del citocromo b sono situati nei siti attivi dove viene catalizzata la reazione opposta di ossidoriduzione dell'ubichinolo: il gruppo *heme b_L* è situato nel sito Q_p dove si lega

l'ubichinolo per l'ossidazione di quest'ultimo; il gruppo *heme* b_H invece si trova nel sito Q_N dove entra l'ubichinone per la sua riduzione.³⁷(Figura 15)

Il complesso III è dunque in grado di svolgere l'ossidazione e la riduzione dell'ubichinolo/ubichinone con un meccanismo denominato *Q-cycle*.¹¹ Questo processo ciclico avviene con l'entrata del substrato QH_2 nel sito Q_P dove uno dei suoi elettroni viene diretto dalla proteina Fe-S e dal citocromo c_1 , catena ad alto potenziale, verso il *citocromo c* che poi dirige gli elettroni verso il *Complesso IV*.³⁸ L'altro elettrone viene condotto attraverso la catena a basso potenziale, costituita dai gruppi *heme* b_L e b_H verso il sito Q_N dove si lega una molecola di ubichinone che viene ridotta a semichinone da questo secondo elettrone.³⁸ I due protoni derivati dalla deprotonazione della molecola QH_2 vengono invece traslocati nello spazio intermembrana.³⁸ Il ciclo dev'essere ripetuto una seconda volta affinché la molecola di semichinone venga totalmente ridotta a ubichinolo e possa lasciare il sito Q_N dopo aver acquisito due protoni dalla matrice.³⁸ (Figura 16)

Questo processo ciclico ripetuto due volte consente di traslocare in tutto quattro protoni nello spazio intermembrana.^{38, 11}

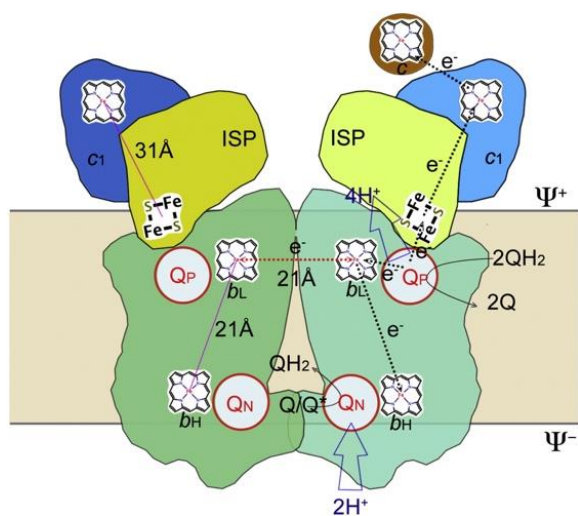


Figura 16. Schema del meccanismo del *Q-cycle*.³⁷

2.3.1 *Rieske protein* nel complesso III

La proteina di "*Rieske*" ha questa caratteristica denominazione dovuta alla presenza del cluster $[2Fe-2S]$, detto appunto "*cluster di Rieske*", che prevede la coordinazione con due ligandi cisteina e due istidine a differenza dei più comuni cluster $[2Fe-2S]$ che sono coordinati solo da leganti cisteina.³⁹ (Figura 17)

La coordinazione di questo cluster con leganti istidina innalza il potenziale di riduzione a causa della più elevata elettronegatività del legante cisteina che si ha nei cluster più comuni e lo rende pH dipendente a causa della possibile protonazione/deprotonazione dell'istidina.⁴⁰

mediante la formazione di legami ad idrogeno e un secondo tipo che invece ne promuove la mobilità.⁴¹

La biforcazione della via di trasporto elettronico è alla base della produzione di ROS del complesso III in quanto la specie semichinone $Q^{\cdot-}$ reagisce con l'ossigeno molecolare portando alla formazione di specie come H_2O_2 , soprattutto in presenza di inibitori del *Q-cycle* come l'antimicina che bloccano l'ossidazione completa del semichinone.⁴³

3 Conclusioni

In questo elaborato sono stati descritti i meccanismi di catalisi dei complessi I, II, e III inseriti nel processo della fosforilazione ossidativa, con una particolare attenzione al ruolo dei centri Fe-S facenti parte della catena di trasporto elettronica.

Gli aspetti generali che riguardano la fosforilazione ossidativa sono noti, ma per molti meccanismi la conoscenza scientifica non è ancora arrivata al dettaglio molecolare: come, per esempio, per l'enzima SQR del complesso II, come nel caso del ruolo del cluster Fe-S N7 del complesso I, o di quello del centro [3Fe-4S] del complesso II, o il coinvolgimento della proteina di *Rieske* nella possibile biforcazione del percorso degli elettroni nel complesso III.

La comprensione dei meccanismi di trasferimento elettronico dei centri Fe-S, soprattutto quelli del complesso I e del complesso III, sono importanti oltre che a livello biologico, per comprendere i meccanismi di funzionamento degli organismi, anche a livello medico perché correlati alla produzione di ROS. Le specie reattive dell'ossigeno sono coinvolte sia in patologie neurodegenerative come nel morbo di *Parkinson*, nella malattia di *Alzheimer*, nell'invecchiamento o nella comparsa di tumori, ma anche in processi regolatori della presenza di ossigeno nei tessuti come nell'ipossia.^{2, 44}

Il ruolo dei centri Fe-S nella produzione dei ROS è un campo emergente della ricerca biochimica in quanto nella loro produzione ci sono variazioni degli stati redox delle specie coinvolte, cioè i *cluster* Fe-S sono molto sensibili. dunque, lo studio di questi centri è importante per poter agire contro la produzione di specie dannose per gli organismi e per ridurne la concentrazione oltre che per individuarne i loro ruoli regolatori.²

Bibliografia

- (1) Kiley, P. J.; Beinert, H. The Role of Fe–S Proteins in Sensing and Regulation in Bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **2003**, *6* (2), 181–185. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00039-0).
- (2) Read, A. D.; Bentley, R. E.; Archer, S. L.; Dunham-Snary, K. J. Mitochondrial Iron-Sulfur Clusters: Structure, Function, and an Emerging Role in Vascular Biology. *Redox Biol* **2021**, *47*, 102164. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>.
- (3) Lill, R.; Freibert, S.-A. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu Rev Biochem* **2020**, *89*, 471–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111540>.
- (4) Housecroft, Catherine E., 1955- author.; Sharpe, A. G., author. *Inorganic Chemistry*, 6th ed.; Pearson: Harlow, England, 2014.
- (5) *Bioinorganic chemistry / Ivano Bertini, Harry B. Gray, Stephen J. Lippard, Joan Selverstone Valentine \editors*, 21st ed.; Sausalito, Calif. : University science books, 1994.
- (6) Kakuta, Y.; Horio, T.; Takahashi, Y.; Fukuyama, K. Crystal Structure of Escherichia Coli Fdx, an Adrenodoxin-Type Ferredoxin Involved in the Assembly of Iron–Sulfur Clusters. *Biochemistry* **2001**, *40* (37), 11007–11012. <https://doi.org/10.1021/bi010544t>.
- (7) Carvalho, A. T. P.; Swart, M. Electronic Structure Investigation and Parametrization of Biologically Relevant Iron–Sulfur Clusters. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (2), 613–620. <https://doi.org/10.1021/ci400718m>.
- (8) *Changes in hydrogen-bond strengths explain reduction potentials in 10 rubredoxin variants.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0505521102>.
- (9) Castro, L.; Tórtora, V.; Mansilla, S.; Radi, R. Aconitases: Non-Redox Iron–Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (9), 2609–2619. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00150>.
- (10) Pratt, Charlotte W.; Voet, Donald; Voet, Judith G. *Fondamenti Di Biochimica*, 4. ed. italiana condotta sulla 5. ed. americana.; Zanichelli: Bologna, 2017; Vol. risorsa elettronica.
- (11) Berg, Jeremy M.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert. *Biochimica*, 8 ed. condotta sulla 9 ed. americana.; Zanichelli: Bologna, 2020.
- (12) Bartolák-Suki, E.; Imsirovic, J.; Nishibori, Y.; Krishnan, R.; Suki, B. Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (8), 1812. <https://doi.org/10.3390/ijms18081812>.
- (13) Ohnishi, T. Iron–Sulfur Clusters/Semiquinones in Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1998**, *1364* (2), 186–206. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00027-9).
- (14) Baradaran, R.; Berrisford, J. M.; Minhas, G. S.; Sazanov, L. A. Crystal Structure of the Entire Respiratory Complex I. *Nature* **2013**, *494* (7438), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11871>.
- (15) Vinothkumar, K. R.; Zhu, J.; Hirst, J. Architecture of Mammalian Respiratory Complex I. *Nature* **2014**, *515* (7525), 80–84. <https://doi.org/10.1038/nature13686>.
- (16) Friedrich, T.; Dekovic, D. K.; Burschel, S. Assembly of the *Escherichia Coli* NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Respiratory Complex I). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2016**, *1857* (3), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.004>.
- (17) Friedrich, T. On the Mechanism of Respiratory Complex I. *J Bioenerg Biomembr* **2014**, *46* (4), 255–268. <https://doi.org/10.1007/s10863-014-9566-8>.
- (18) Brandt, U. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Review of Biochemistry* **2006**, *75* (Volume 75, 2006), 69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539>.
- (19) Ohnishi, T.; Salerno, J. C. Conformation-Driven and Semiquinone-Gated Proton-Pump

- Mechanism in the NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *FEBS Lett* **2005**, 579 (21), 4555–4561. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.086>.
- (20) Ohnishi, T. Piston Drives a Proton Pump. *Nature* **2010**, 465 (7297), 428–429. <https://doi.org/10.1038/465428a>.
- (21) *Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from Thermus thermophilus*. <https://doi.org/10.1126/science.1123809>.
- (22) Moser, C. C.; Farid, T. A.; Chobot, S. E.; Dutton, P. L. Electron Tunneling Chains of Mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, 1757 (9), 1096–1109. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.015>.
- (23) Schulte, M.; Frick, K.; Gnannt, E.; Jurkovic, S.; Burschel, S.; Labatzke, R.; Aierstock, K.; Fiegen, D.; Wohlwend, D.; Gerhardt, S.; Einsle, O.; Friedrich, T. A Mechanism to Prevent Production of Reactive Oxygen Species by Escherichia Coli Respiratory Complex I. *Nat Commun* **2019**, 10 (1), 2551. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10429-0>.
- (24) Le Breton, N.; Wright, J. J.; Jones, A. J. Y.; Salvadori, E.; Bridges, H. R.; Hirst, J.; Roessler, M. M. Using Hyperfine Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy to Define the Proton-Coupled Electron Transfer Reaction at Fe–S Cluster N2 in Respiratory Complex I. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (45), 16319–16326. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09261>.
- (25) Pohl, T.; Bauer, T.; Dörner, K.; Stolpe, S.; Sell, P.; Zocher, G.; Friedrich, T. Iron–Sulfur Cluster N7 of the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Is Essential for Stability but Not Involved in Electron Transfer. *Biochemistry* **2007**, 46 (22), 6588–6596. <https://doi.org/10.1021/bi700371c>.
- (26) Iverson, T. M.; Singh, P. K.; Cecchini, G. An Evolving View of Complex II—Noncanonical Complexes, Megacomplexes, Respiration, Signaling, and Beyond. *Journal of Biological Chemistry* **2023**, 299 (6), 104761. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104761>.
- (27) Iverson, T. M. Catalytic Mechanisms of Complex II Enzymes: A Structural Perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, 1827 (5), 648–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.008>.
- (28) Lancaster, C. R. D. The Di-Heme Family of Respiratory Complex II Enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, 1827 (5), 679–687. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.02.012>.
- (29) Lancaster, C. R. D. Succinate:Quinone Oxidoreductases – What Can We Learn from *Wolinella Succinogenes* Quinol:Fumarate Reductase? *FEBS Letters* **2001**, 504 (3), 133–141. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02706-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02706-5).
- (30) Maklashina, E.; Cecchini, G.; Dikanov, S. A. Defining a Direction: Electron Transfer and Catalysis in *Escherichia Coli* Complex II Enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, 1827 (5), 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.010>.
- (31) Kröger, A.; Biel, S.; Simon, J.; Gross, R.; Unden, G.; Lancaster, C. R. D. Fumarate Respiration of *Wolinella Succinogenes*: Enzymology, Energetics and Coupling Mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2002**, 1553 (1), 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00234-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00234-1).
- (32) Horsefield, R.; Yankovskaya, V.; Sexton, G.; Whittingham, W.; Shiomi, K.; Ōmura, S.; Byrne, B.; Cecchini, G.; Iwata, S. Structural and Computational Analysis of the Quinone-Binding Site of Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase): A MECHANISM OF ELECTRON TRANSFER AND PROTON CONDUCTION DURING UBIQUINONE REDUCTION*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (11), 7309–7316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508173200>.
- (33) Cheng, V. W. T.; Ma, E.; Zhao, Z.; Rothery, R. A.; Weiner, J. H. The Iron-Sulfur Clusters in *Escherichia Coli* Succinate Dehydrogenase Direct Electron Flow*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (37), 27662–27668. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604900200>.
- (34) *Electron-Transfer Pathways in the Heme and Quinone-Binding Domain of Complex II (Succinate Dehydrogenase) | Biochemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi401630m>

(accessed 2024-09-03).

- (35) Dröse, S. Differential Effects of Complex II on Mitochondrial ROS Production and Their Relation to Cardioprotective Pre- and Postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827* (5), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.004>.
- (36) Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J. K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T. A.; Ramaswamy, S.; Jap, B. K. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome *Bc1* Complex. *Science* **1998**, *281* (5373), 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>.
- (37) Xia, D.; Esser, L.; Tang, W.-K.; Zhou, F.; Zhou, Y.; Yu, L.; Yu, C.-A. Structural Analysis of Cytochrome *Bc1* Complexes: Implications to the Mechanism of Function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827* (11), 1278–1294. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.008>.
- (38) Xia, D.; Yu, C.-A.; Kim, H.; Xia, J.-Z.; Kachurin, A. M.; Zhang, L.; Yu, L.; Deisenhofer, J. Crystal Structure of the Cytochrome *Bc1* Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science* **1997**, *277* (5322), 60–66. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.60>.
- (39) Iwata, S.; Saynovits, M.; Link, T. A.; Michel, H. Structure of a Water Soluble Fragment of the ‘Rieske’ Iron–Sulfur Protein of the Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome *Bc1* Complex Determined by MAD Phasing at 1.5 Å Resolution. *Structure* **1996**, *4* (5), 567–579. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00062-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00062-7).
- (40) Boncella, A. E.; Sabo, E. T.; Santore, R. M.; Carter, J.; Whalen, J.; Hudspeth, J. D.; Morrison, C. N. The Expanding Utility of Iron-Sulfur Clusters: Their Functional Roles in Biology, Synthetic Small Molecules, Maquettes and Artificial Proteins, Biomimetic Materials, and Therapeutic Strategies. *Coordination Chemistry Reviews* **2022**, *453*, 214229. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214229>.
- (41) Xia, D.; Esser, L.; Yu, L.; Yu, C.-A. Structural Basis for the Mechanism of Electron Bifurcation at the Quinol Oxidation Site of the Cytochrome *Bc1* Complex. *Photosynth Res* **2007**, *92* (1), 17–34. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9155-3>.
- (42) Esser, L.; Gong, X.; Yang, S.; Yu, L.; Yu, C.-A.; Xia, D. Surface-Modulated Motion Switch: Capture and Release of Iron–Sulfur Protein in the Cytochrome *Bc1* Complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (35), 13045–13050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601149103>.
- (43) Quinlan, C. L.; Gerencser, A. A.; Treberg, J. R.; Brand, M. D. The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-Inhibited Mitochondrial Q-Cycle*. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (36), 31361–31372. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.267898>.
- (44) Brand, M. D. Mitochondrial Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide as the Source of Mitochondrial Redox Signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *100*, 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.

Un ringraziamento alla Prof.ssa Donatella Carbonera
per avermi seguito nel conseguimento della laurea.

Un ringraziamento a mio fratello Alberto,
che nonostante la sua disabilità mi supporta ogni giorno
donandomi tutto l'amore dell'universo.

Ringrazio inoltre
Filippo che mi è sempre accanto e illumina le mie giornate,
mia mamma, mio papà e mia Zia Arianna,
che con tanto amore e pazienza mi sostengono sempre,
supportano e danno la possibilità di studiare e imparare.

Un grazie anche a tutti i miei amici.