



# Riassunti e dispense di Biochimica II

Biochimica (Università degli Studi di Firenze)

- **Il metabolismo** è l'insieme di tutti quei processi che usano l'ATP, mediante reazioni chimiche (che sono in parte spontanee e in parte non spontanee), con lo scopo di coordinare catabolismo ed anabolismo. Il **catabolismo** ha la funzione di degradare i nutrienti per recuperare energia. Questa energia viene incorporata nell'ATP. L'**anabolismo**, invece, è la funzione del metabolismo che è di tipo biosintetico e porta alla costruzione di molecole complesse. Queste molecole non necessariamente devono essere sintetizzate per motivi nutrizionali, ma anche per motivi costitutivi, strutturali (per esempio; una cellula che si divide deve raddoppiare il citoplasma, il DNA e la membrana, tutte queste strutture sono costituite da molecole complesse che devono essere sintetizzate con dei processi chiamati, nel loro insieme, anabolismo). Di conseguenza, ci saranno un insieme di reazioni che si chiamano vie metaboliche, che prevedono che una certa sostanza venga modificata attraverso trasformazioni fisiche. Il 99% delle trasformazioni fisiche che avvengono nelle cellule è operato da degli enzimi. **Gli enzimi** sono molecole proteiche in grado di velocizzare una reazione che comunque è già termodinamicamente spontanea. Essi non sono, cioè, in grado di interferire con la termodinamica della reazione, ma solo con la velocità, con il tempo di reazione.

### **Tutte le vie metaboliche hanno almeno queste caratteristiche:**

- - **Sono irreversibili.** Ovvero, si tratta di reazioni con una variazione di energia libera di Gibbs minore di 0 ( $\Delta G < 0$ ), che hanno perciò una spontaneità completa. **Tutte le reazioni con  $\Delta G$  negativo sono, infatti, spontanee.**
- - **Sono regolate.** Di solito viene regolata la prima tappa della via metabolica, o una delle prime. La biosintesi del colesterolo, ad esempio, non è regolata nella sua prima tappa, ma nella quarta. Infatti, le prime tre sono in comune con un'altra via. Quindi, se si andasse a regolare la prima tappa, di fatto, invece che regolare una sola via metabolica, ne regoleremmo due. Allora si regola la prima tappa che è specifica della biosintesi del colesterolo. Al di là di questo dettaglio, di solito le prime tappe della biosintesi della via metabolica sono regolate. Inoltre, se c'è una reazione che di solito è irreversibile, questa è proprio la prima in modo tale che, quando la via è commissionata, sia difficile tornare indietro.

### **Energia di Gibbs e spontaneità della reazione:**

Il professor Gibbs ha definito l'energia libera di Gibbs. Egli è il padre della regola che ormai viene imparata piuttosto mnemonicamente e che definisce la spontaneità delle reazioni. Gibbs osservò che, nei sistemi biologici, laddove almeno la temperatura e la pressione vengano mantenuti costanti (altrimenti la cosa si complica ulteriormente), le variazioni dell'energia libera di Gibbs (cioè di questa energia riutilizzabile al termine della trasformazione), dell'entalpia e dell'entropia sono correlate da questa formula:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ovvero, la quantità di energia riutilizzabile è in qualche modo proporzionale al calore sviluppato e all'aumento del disordine del sistema. Tanto più disordine si forma, tanto più alta è l'energia libera che si può riutilizzare. Tanto più calore si forma, tanto meno è l'energia che si può riutilizzare.

La variazione di energia libera tra l'inizio di una trasformazione e la fine di una trasformazione (per variazione si intende il valore dell'energia libera all'inizio della trasformazione e il valore di energia libera alla fine di una trasformazione) è un numero (con un'unità di misura dell'energia, quindi joule o calorie) che è in qualche modo proporzionale alle specie chimiche di una reazione chimica. Questa è la parte della formula di Gibbs che a noi biochimici interessa maggiormente capire. La variazione dell'energia libera è l'energia libera alla fine della trasformazione meno l'energia libera all'inizio della trasformazione, cioè quanta energia rimane da utilizzare.

È riassunta in questa formula:

$$\Delta G'^0 = -RT \cdot \ln K'_{eq}$$

Il simbolo «'» indica che i parametri  $G$  e  $K_{eq}$  sono riferiti ai sistemi biologici ( $pH = 7$ ). Le concentrazioni dell'acqua ( $\sim 55,5 \text{ M}$ ) e dello ione  $Mg^{2+}$  sono incorporate in  $K'_{eq}$ .

Nell'equazione troviamo:

- -  $R$ , che è una costante.
- -  $T$ , che è la temperatura assoluta.
- - il logaritmo naturale della costante di equilibrio. Quest'ultima dipende da alcune caratteristiche delle reazioni chimiche.

### → Riassumendo:

Quando una reazione porta ad un aumento dell'entropia (ovvero un aumento del disordine del sistema), quella trasformazione viene definita **spontanea**.

\* una **reazione spontanea** ha un  $\Delta G$  negativo (tanto più è spontanea, tanto più è negativo).

\* una **reazione non spontanea** ha un  $\Delta G$  positivo (tanto meno è spontanea, tanto più alto è il valore positivo).

I concetti base sono due:

-  $\Delta G$  negativo = spontaneità della reazione;  $\Delta G$  positivo = reazione non spontanea.

- La costante di equilibrio è importante in una reazione ed è fondamentale comprenderne il significato.

## L'ATP come trasportatore di energia:

ci sono dei composti che hanno una certa energia potenziale chimica, che di solito sono abbastanza ridotti e che sono depositari di una quantità di energia chimica che estraggono con i processi metabolici e immagazzinano in una sorta di accumulatori di energia, tra cui prevalentemente l'ATP, o *adenosintrifosfato*; ma non esclusivamente esso.

L'adenosintrifosfato è un accumulatore d'energia transitorio, perché questa energia accumulata in questi composti ad alto potenziale di trasferimento di fatto durano molto poco tempo. **L'ATP non è un vero accumulatore d'energia**; noi non possiamo accumulare ATP perché l'ATP è di fatto un regolatore negativo di una serie interminabile di vie metaboliche, pertanto se si accumula, tutte le vie regolate dalla sua concentrazione verrebbero inibite.

Quindi piuttosto che come accumulatore lo si può classificare come **trasportatore**, ossia possiede energia, ma ha il potenziale di trasferire tale energia a qualcos'altro, rivolgendosi al concetto in cui esistono reazioni termodinamicamente spontanee e non, e la differenza tra queste è il  $\Delta G$  (negativo per le reazioni termodinamicamente spontanee; positivo per le reazioni termodinamicamente non spontanee); ma se accoppiate, si deve osservare il  $\Delta G$  che nasce dalla somma algebrica dei due  $\Delta G$  delle reazioni accoppiate ed ecco che trasportare energia da una reazione esoergonica ( $\Delta G < 0$ ) ad una reazione endoergonica ( $\Delta G > 0$ ) è fondamentale; trasporto energia da una reazione che produce energia, che quindi non necessita di energia per funzionare, ad una reazione che ha bisogno di energia per funzionare.

Il trasportatore d'energia viene definito come una molecola con un alto potenziale di trasferimento di energia.

Trasferire l'energia serve ad esempio per espletare funzioni meccaniche e lì non è un vero e proprio trasferimento dato che non c'è una seconda relazione chimica, quanto un vero e proprio movimento ossia una trasformazione da energia chimica a cinetica. Molto spesso invece l'energia serve a rifornire (di energia appunto) delle reazioni che di solito non la producono e necessitano di essa per funzionare, qui si comprendono tutte le reazioni e le vie biosintetiche.

Le vie biosintetiche sono fatte da più reazioni, ognuna delle quali ha un suo  $\Delta G$  e nell'ambito di una via biosintetica magari una ha  $\Delta G$  uguale a zero, una lo ha minore ed un'altra ancora lo ha maggiore di zero; al momento non sappiamo dire quale reazione abbia bisogno di energia, ma la somma algebrica di una via biosintetica dimostra che questa ne ha in effetti bisogno per funzionare.

Si può effettuare la biosintesi di varie molecole, si possono sintetizzare ad esempio amminoacidi, e da questi le proteine, questo richiede ATP (o meglio **GTP**), che viene appunto utilizzato varie volte nella sintesi delle proteine.

Dal punto di vista energetico, utilizzare ATP o GTP non cambia molto; esistono dei sistemi nella cellula (enzimi), che faremo in dettaglio nell'arco del corso, che convertono i nucleotidi trifosfati tra loro isoergonicamente, ossia senza consumo di ulteriore energia, utili per esempio durante la sintesi degli acidi nucleici o delle proteine stesse. Dal punto di vista energetico non cambia niente, rimane un nucleotide con tre gruppi fosfato di cui un fosfato in alfa ( $P\alpha$ ), un fosfato in beta ( $P\beta$ ) ed un fosfato in gamma ( $P\gamma$ ), il quale possiede un alto potenziale di trasferimento e che viene trasferito facilmente. Il legame fosfoanidridico tra il fosfato  $\beta$  ed il fosfato  $\gamma$  è un legame che ha una buona probabilità di essere rotto e generare due specie molecolari, l'ADP (*adenosindifosfato*) ed il fosfato inorganico ( $P_i$ ), **reazione che ha  $\Delta G$  negativo ed è quindi termodinamicamente favorita**. Stessa cosa dicasi per quanto riguarda il GTP che non cambia dal punto di vista energetico.

La biosintesi riguarda poi gli acidi nucleici (DNA o RNA), i lipidi che siano trigliceridi di riserva o colesterolo per funzioni strutturali od ormonali, o i polimeri del glucosio che sono dei magazzini di glucosio (nell'uomo solo il **glicogeno** ma nelle piante anche *amido* o *cellulosa*).

### Struttura dell'ATP:

Da un punto di vista strutturale l'ATP è un **nucleotide**, costituito da una base azotata (l'**adenina**). (nucleotide di tipo purinico, a doppio anello) [*di questa dovremmo studiare le reazioni "salienti" della sua biosintesi, invece il suo catabolismo va saputo nel dettaglio dato che ad esso sono associate diverse patologie*]. Al nucleotide è poi associato uno **zucchero pentoso** (un **ribosio** nell'ATP). Questo ribosio può essere sostituito da un *desossiribosio* nel nucleotide dATP nell'RNA (quindi un *desossiribonucleotide*).

Quando la base azotata è attaccata allo zucchero non si parla di adenina, ma di **adenosina**, che a sua volta può essere mono/di/trifosforilata (rispettivamente in: AMP adenosinmonofosfato; ADP adenosindifosfato; ATP adenosintrifosfato).

### → Le reazioni di idrolisi dei legami fosfoanidridici:

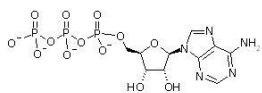
Quando ATP idrolizza in ADP e fosfato inorganico si ha una liberazione di  $-30\text{kJ/mol}$  di energia (il segno meno indica che è una reazione spontanea, un  $\Delta G$  negativo); quando invece l'ATP viene idrolizzato in AMP e **pirofosfato** (PPi), si libera più o meno la stessa energia,  $-32\text{kJ/mol}$ . Sebbene il legame tra il fosfato  $\alpha$  e fosfato  $\beta$  non sia così instabile come quello tra il fosfato  $\gamma$  ed il fosfato  $\beta$ , quando idrolizziamo ATP in AMP sembriamo ottenere più energia rispetto a quella ottenuta idrolizzando ATP in ADP; la spiegazione risiede nella formazione del pirofosfato, il quale viene poi idrolizzato in due molecole di fosfato.

L'idrolisi di ATP in AMP e PPi si compone di due reazioni accoppiate, la prima  $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PPi}$  alla quale poi segue la seconda  $\text{PPi} \rightarrow 2\text{Pi}$ , che è nuovamente una reazione esoergonica, con  $\Delta G$  sempre negativo, quindi considerando la somma algebrica il risultato è più esoergonico (minore) della precedente reazione d'idrolisi.

Complessivamente nel metabolismo molte volte l'ATP verrà idrolizzata, tuttavia ogni volta che questa "moneta" energetica viene spesa deve in qualche modo essere "riguadagnata" e quindi la cellula dovrà spendere un tipo di energia potenziale per recuperare ATP, o dall'ADP o dall'AMP. Va considerato però che costruire ATP dall'AMP ha un costo molto maggiore rispetto a costruire ATP dall'ADP, quindi quando l'evoluzione ha selezionato per la cellula quale delle due idrolisi fare, ci deve essere un motivo dato che infatti uno è meno favorevole rispetto all'altro.

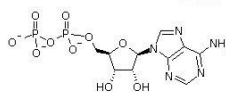
## Energia

• ATP



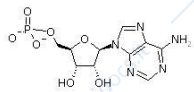
$$\Delta G_0' = -7.3 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$$

• ADP

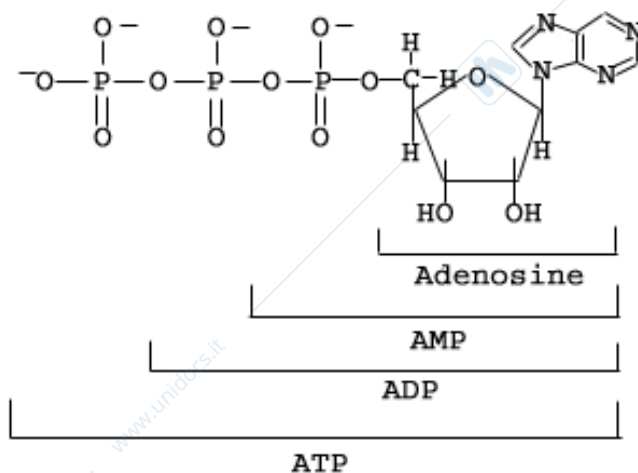
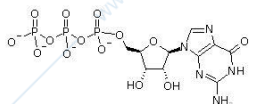


$$\Delta G_0' = -15.3 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$$

• AMP



• GTP



La differenza di guadagno nell'idrolisi è risibile, invece la differenza di spesa per la sintesi è molto grande, quindi non è mai vantaggiosa e quando viene scelta ci devono essere appunto delle motivazioni valide.

L'ATP viene utilizzato per diversi scopi, in primis per l'anabolismo: tutti i processi di biosintesi di molecole consumano ATP; per la contrazione muscolare o per meglio dire il movimento in generale all'interno dell'organismo; per lavoro elettrochimico di membrane nelle cellule eccitabili e in tutte le cellule dell'organismo.

[L'idrolisi del fosfato gamma libera 30kJ per mole che equivale a 7,3kcal per mole; conviene essere capaci di convertire Joule in Calorie e viceversa dato che alcuni libri utilizzano un'unità di misura o l'altra.]

### Qual è il motivo chimico o fisico per cui la rottura del legame fosfoanidridico tra P $\beta$ e P $\gamma$ genera una liberazione d'energia?

i due prodotti (ADP e P $_i$ ) sono più stabili del reagente (ATP), di conseguenza è più facilitata l'esistenza dei prodotti rispetto a quella del reagente; ma perché sono più stabili?

- 1) il gruppo fosfato idrolizzato risulta stabilizzato dal numero di formule di risonanza che possiede, infatti maggiore è il numero di formule di risonanza che possiede un composto, più tale composto è stabile e quindi termodinamicamente favorito.
- 2) osservando la formula dell'ATP vediamo quattro cariche negative, mentre nella formula dell'ADP ne notiamo solo due; quattro cariche negative nella solita molecola si respingono di più di quanto non si respingano due cariche negative (più attrazione nella molecola di ADP e quindi più stabilità)
- 3) la reazione di idrolisi avviene sempre in ambiente acquoso, l'acqua quindi solvata le specie presenti e si solvatano meglio due specie ioniche rispetto ad una sola specie, e tanto più una specie è solvabile, tanto più i composti entrano in soluzione spontaneamente.
- 4) la reazione causa l'aumento del numero di molecole con conseguente aumento dell'entropia e ciò è indicatore di un  $\Delta G$  negativo.

Per tutti questi motivi, questa reazione  $ATP \rightarrow ADP + P_i$  ha  $\Delta G$  negativo, funziona bene, è spontanea, libera l'energia quantificata come pacchetto d'energia da poter "spendere" in una seconda reazione che invece magari non è spontanea.

Nell'ambito del metabolismo troveremo alcune molecole che hanno dei valori molto interessanti di energia libera standard ( $\Delta G^{\circ}$ ) nelle loro reazioni di idrolisi, cioè hanno un alto potenziale di trasferimento dell'energia. Come notiamo nella tabella l'ATP idrolizzato o in ADP o in AMP risulta essere in mezzo ad un elenco di altre molecole, alcune migliori ed altre peggiori (dal punto di vista di potenziale di trasferimento energetico).

Un *fosfoenolpiruvato* che vale 61,9kJ/mol vale quasi il doppio dell'ATP; l'*1,3-bisfosfoglicerato* vale 49kJ/mol che è pur sempre maggiore del valore dell'ATP (entrambe le molecole compaiono come intermedi nella glicolisi). Come si sintetizza ATP?

### Esistono due metodi per sintetizzare l'ATP:

- **Fosforilazione a livello del substrato:** è il primo metodo per sintetizzare ATP, e consiste nel trovare una molecola che energeticamente valga più dell'ATP e spostare tale energia sull'ATP in modo da sintetizzarla; fosfoenolpiruvato e 1,3-

**Tabella 13.2. Energia libera standard di idrolisi del gruppo fosforico di alcuni composti di interesse biologico**

Composto	$\Delta G^{\circ}$ (kJ · mole <sup>-1</sup> )
Fosfoenolpiruvato	- 61,9
1,3-Bisfosfoglicerato	- 49,4
Acetil fosfato	- 43,1
Fosfocreatina	- 43,1
PP $_i$	- 33,5
ATP ( $\rightarrow$ AMP + PP $_i$ )	- 32,2
ATP ( $\rightarrow$ ADP + P $_i$ )	- 30,5
Glucosio-1-fosfato	- 20,9
Fruttosio-6-fosfato	- 13,8
Glucosio-6-fosfato	- 13,8
Glicerolo-3-fosfato	- 9,2

Fonte: Jencks, W.P., in Fasman, G.D. (a cura di), *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (3<sup>a</sup> ed.), Physical and Chemical Data, Vol. 1, pp. 296-304, CRC Press (1976).

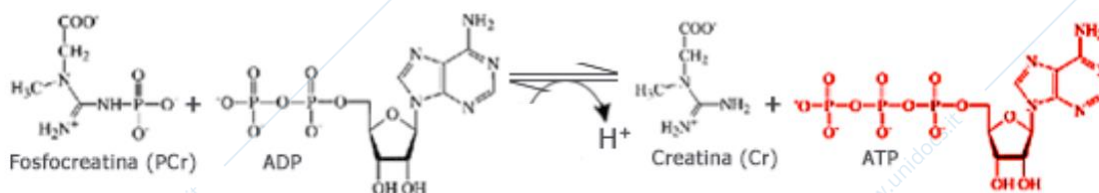
bisfosfoglicerato fanno proprio questo. Questo metodo non si definisce “biosintesi dell’ATP”, ma “fosforilazione a livello del substrato”, che si differenzia dalla fosforilazione ossidativa che invece è il secondo metodo di sintesi dell’ATP.

- **Fosforilazione ossidativa:** questo metodo prevede di prendere una forma d’energia completamente diversa (le piante utilizzano l’energia luminosa, gli animali utilizzano il potenziale chemiosmotico) e di convertire quest’energia in ATP utilizzando anche ossigeno nei mitocondri per eseguire la fosforilazione ossidativa dell’ADP.

Del metodo che coinvolge la fosforilazione a livello del substrato nella cellula ci sono solo tre esempi, di cui due sono nella **glicolisi** (fosfoenolpiruvato e 1,3-bisfosfoglicerato); ma questa metodica non necessita della presenza dei mitocondri, quindi questo metodo può essere attuato da cellule prive di mitocondri o che vivono in ipossia/ anossia come un organo mal rifornito dal torrente sanguigno o un eritrocito o una fibra muscolare bianca.

L’**acetilfosfato** compaia nella tabella e presenta un potere di trasferimento energetico superiore ma è scarsamente ritrovato nelle cellule; la **fosfocreatina** invece, ci interessa invece dato che l’ATP, come già detto, non può essere accumulato; sarà quindi la fosfocreatina ad immagazzinare energia in modo da poter poi sintetizzare alla necessità ATP in maniera rapida tramite una sola reazione catalizzata dall’enzima **fosfocreatinachinasi**.

La fosfocreatina si accumula in quegli organi che necessitano di reagire in maniera rapida dato che non hanno il tempo materiale di prendere un trigliceride, fare la trigliceridolisi, metabolismo degli acidi grassi, catabolismo mitocondriale, ciclo di Krebs, fosforilazione ossidativa; oppure prendere una molecola di glicogeno, effettuare la glicogenolisi, poi la glicolisi, ciclo di Krebs, fosforilazione ossidativa. Organi di questo tipo sono il **muscolo scheletrico** che deve reagire in maniera molto rapida, in questa sede la fosfocreatina ci dà la quantità di energia che ci permette di agire molto rapidamente (il cosiddetto scatto, per una decina di secondi che però possono fare la differenza nelle situazioni di pericolo)



### Consumo di Fosfocreatina per sintesi ATP durante sprint

Le molecole che invece stanno al disotto del valore di trasferimento energetico dell’ATP possono invece essere sintetizzate utilizzando l’energia dell’idrolisi dell’ATP stesso secondo il 2° principio della termodinamica (la trasformazione dell’energia dopo che si effettua, è irreversibile)

## Metabolismo delle biomolecole (generalità):

Il metabolismo glicidico prevede l'utilizzo dei carboidrati come substrato per ottenere energia, i carboidrati però sono solo uno dei nutrienti che noi possiamo utilizzare per ricavare energia. Proteine, carboidrati e grassi sono nutrienti che attraverso vie diverse, passano attraverso una **prima fase** in cui c'è una **digestione** (diversa per protidi, glicidi e lipidi) dalla quale si ottengono prodotti più semplici. Dalle proteine si passa agli amminoacidi; dai carboidrati ai monosaccaridi (glucosio, o simili poi riconvertibili in glucosio); dai grassi agli acidi grassi e glicerolo (gli acidi grassi sono particolarmente ricchi di energia ma considerati "di 2° livello" da un punto di vista gerarchico). Il nostro organismo ha un bisogno estremo di mantenere un livello costante di glicemia, quindi una concentrazione ematica di glucosio che sia nell'ambito della normoglicemia, se scendiamo sotto questo livello ed andiamo in ipoglicemia, mettiamo in atto un sistema per riportare questo livello alla normoglicemia; se il sistema non funziona o se non ingeriamo cibo dall'esterno per troppo tempo, la glicemia scende, con conseguente coma, convulsione, ed infine morte. Tutto ciò che nel nostro organismo può essere riconvertito in glucosio è un "nutriente di serie A" (o "di 1° livello") dato che ci permette di evitare di andare in ipoglicemia; tutto ciò che non si può riconvertire in glucosio, pur essendo molecole con un certo spessore nutrizionale, è considerato "nutriente di serie B" (o "di 2° livello"). Ecco perché sebbene gli acidi grassi quando catabolizzati producono molto ATP non possono essere in alcun modo convertiti in glucosio; il glicerolo invece può essere convertito in glucosio. **I semi delle piante sono piuttosto piccoli come dimensioni, salvo eccezioni, e contengono molto spesso oli (grassi), dai quali riescono a fare sufficiente energia per far crescere la plantula (il germoglio); le piante riescono quindi a trasformare gli acidi grassi prima in glucosio e poi in saccarosio.**

Nella **seconda fase** abbiamo intermedi catabolici, che possono essere diversi da cellula a cellula ed interscambiati tra esse, ciascuno dei quali segue la sua propria via: una via per ogni amminoacido; una via per il glucosio; molti esosi sono riconvertiti a glucosio; gli acidi grassi vengono in maggior parte convertiti in *palmitato*. e seguono una sola via catabolica che termina o nell'**acetil-coenzima A** (*acetil-CoA*) o in **intermedi per il ciclo di Krebs** che avviene all'interno del mitocondrio, in cui il catabolismo intermedio (dove convergono tutti i metaboliti intermedi) termina nella fosforilazione ossidativa ad opera di macromolecole poste nella membrana interna del mitocondrio che accumulano protoni  $H^+$  creando il cosiddetto gradiente elettrochimico.

Questo gradiente elettrochimico è la forza motrice, è un'energia potenziale chimica, che viene sfruttata per sintetizzare l'ATP. Quindi l'ATP è prodotto da tutti i nutrienti, che siano grassi, zuccheri, o proteine.

**In questo quadro però si inserisce anche una produzione di ATP un po' diversa da quella appena descritta e cioè mediante la così detta Fosforilazione a livello del substrato.**

Questo processo è presente solo nella glicolisi, prescindere dal mitocondrio (siamo ancora nel citoplasma ma fuori dal mitocondrio).

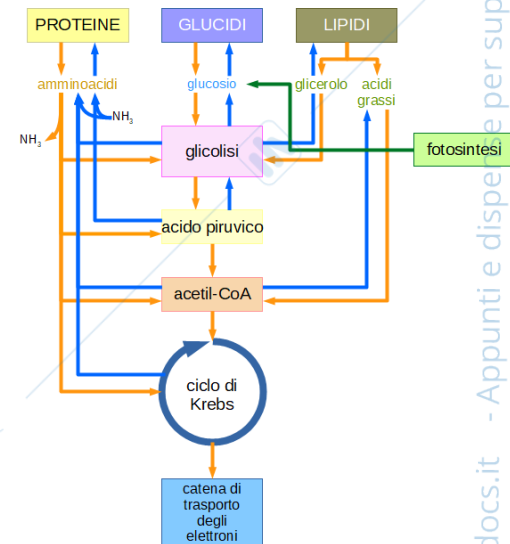
Con la fosforilazione ossidativa da una molecola di glucosio si ottengono 30 molecole di ATP; con la Fosforilazione a livello del substrato invece, se ne producono soltanto 2 ATP (non è super efficiente).

La produzione è quindi poca, ma si ottiene anche nelle cellule che non possiedono mitocondri e in quelle cellule che non utilizzano ossigeno.

### **Ma come risolve il problema della poca produzione la cellula senza mitocondrio?**

"Supponiamo di dover produrre 100 molecole di ATP; se io cellula non ho il mitocondrio, cosa mi invento? Potrei ad esempio consumare 50 molecole di Glucosio, che mi producono 2 molecole di ATP l'una, e ottenere così alla fine le mie 100 molecole di ATP totali.

Invece in una cellula che ha il mitocondrio, sfrutterei naturalmente il metabolismo ossidativo e non mi servirebbero più 50 molecole di glucosio per ottenere 100 molecole di ATP, invece, con la respirazione, da 1 molecola di Glucosio ottengo 30 ATP, quindi basterebbero soltanto circa 3 molecole di glucosio (e un po' più) per ottenere 100 ATP.



Quindi esiste questa enorme differenza di efficienza tra i due processi di produzione di ATP.

Pasteur si era accorto di questa differenza e aveva infatti definito il suo “**Effetto Pasteur**”: presa una beuta contenente microrganismi in grado di vivere sfruttando o meno l’ossigeno e quindi in grado anche di respirare (lui utilizzava i lieviti per i suoi esperimenti), si è accorto che se dava ossigeno, questi lieviti consumavano una quantità modesta di glucosio, ma se l’ossigeno veniva tolto, questi consumavano molto più molecole di glucosio.

La condizione aerobica determinava quindi un rallentamento del catabolismo del glucosio. Quindi **l’aumento di consumo di glucosio in assenza di ossigeno** è definito **effetto Pasteur**. Ma qual è il nesso tra i lieviti e le cellule dell’organismo umano?

Anche noi abbiamo molte cellule che non hanno accesso all’ossigeno o a cui limitiamo l’accesso all’ossigeno (pensiamo ad esempio al caso di un’ischemia cerebrale o cardiaca), oppure cellule che non hanno i mitocondri. Come si comportano? Subiscono all’effetto Pasteur, e se queste cellule non hanno un grande apporto di glucosio da consumare, o non hanno accesso al glucosio, muoiono.

*Quindi l’effetto Pasteur è molto rilevante anche per l’organismo umano (ad esempio lo è in particolar modo per il Tumore, che verrà spiegato approfonditamente quando si studierà la specializzazione della funzione degli organi).*

## **CARBOIDRATI – (Digestione → Trasporto negli enterociti → metabolismo glucidico)**

### **La digestione dei carboidrati (processi digestivi dei carboidrati):**

La digestione dei carboidrati inizia a livello della bocca (digerendo una piccola parte), prosegue nello stomaco dove il pH è molto basso e dove il bolo alimentare si suddivide nelle sue varie componenti (la componente proteica viene di solito denaturata, e infatti le proteine vengono per lo più digerite nello stomaco). la digestione termina nell’intestino, dove il pH si stabilizza a neutro o addirittura ad alcalino, grazie all’azione di diversi enzimi.

### **→ Quali sono i carboidrati che noi utilizziamo? E nel bolo alimentare cosa troviamo?**

Nel bolo alimentare troviamo cellulosa o amido o amilopectina tutte le volte che mangiamo vegetali, ma se mangiamo animali troviamo invece glicogeno, disaccaridi, o lattosio se assumiamo latte, etc.. più raramente troviamo dei monosaccaridi (perché più instabili).

### **Cosa non digeriamo?**

Il glicogeno lo digeriamo senza problemi, lo catabolizziamo tutto senza sprechi; l’amilosio non ramificato e l’amilopectina fortemente ramificata, anche, li digeriamo tutti. La cellulosa invece no, non possiamo digerirla. **Perché?**

La differenza sta in un legame anomerico glicosidico che nel glicogeno è  $\alpha$  1 – 4, mentre nella cellulosa è  $\beta$  1- 4. Queste diversi conformazioni vengono attaccate da diversi enzimi: le  $\alpha$  – **amilasi** che noi abbiamo (infatti noi possiamo digerire solo i polisaccaridi attaccabile dalle  $\alpha$  – amilasi) e mentre l’enzima che digerisce il cellulosa è  $\beta$  – **amilasi** che noi non abbiamo (ma non lo hanno nemmeno gli erbivori, ma a differenza di noi, loro possiedono nei loro stomaci dei commensali in grado di digerire questi polisaccaridi).

Il **glicogeno** è un polimero contenente legami **alfa 1-4** e possiede delle ramificazioni **alfa 1-6**. siamo in grado di accumularlo senza problemi e abbiamo due differenti modi di catabolizzarlo, a seconda che sia il nostro glicogeno che produciamo noi, o quello dell'animale che mangiamo:

**i)** il glicogeno alimentare assunto dalla carne dell'animale, entra nel canale alimentare e inanzitutto, viene digerito con gli **enzimi  $\alpha$  – amilasi salivare** nella bocca, e poi con  **$\alpha$  – amilasi pancreatica** nel pancreas;  
**ii)** se invece il glicogeno l'ho prodotto io nel mio fegato e nel mio muscolo, non è un glicogeno alimentare, ma è un glicogeno di riserva, quindi per degradarlo utilizzo un processo catabolico diverso detto **glicogenolisi**, che avviene in due organi: il fegato e il muscolo. Nel fegato attraverso la glicogenolisi ottengo i monomeri di glicogeno (molecole di glucosio) che servono per far innalzare la glicemia (in caso di ipoglicemia), mentre nel muscolo uso queste molecole per far funzionare (contrarre) il muscolo stesso.

L'**amido** è un polimero del glucosio, in cui i monomeri di glucosio sono legati tramite legami glicosidici di tipo  **$\alpha$  1-4**. tutti i polisaccaridi presentano un'estremità non riducente e una riducente. Il catabolismo e l'anabolismo sono sempre effettuati all'estremità non riducente, dove vengono attaccati i monomeri (polimerizzazione) o rimossi (depolimerizzazione). L'amido è un misto costituito da due polisaccaridi:

**amilosio**: costituito soltanto da legami **alfa 1-4** quindi lineare;

**amilopectina**: oltre ai legami  **$\alpha$  1-4**, ha anche delle ramificazioni  **$\alpha$  1-6**. Queste ultime vengono catabolizzate in modo particolare.

## Digestione di glicogeno e amido

**glicogeno e amido** anch'esso li digeriamo a livello della bocca e dell'intestino tenue grazie proprio agli **enzimi  $\alpha$  – amilasi** (1 – 4 e 1 – 6). troviamo nella bocca l'enzima  **$\alpha$  – amilasi salivare**, e a livello del pancreas troviamo  **$\alpha$  – amilasi pancreatica**.

Queste  **$\alpha$  amilasi**, sia sull'amido sia sul glicogeno, fanno un'iniziale digestione, una "tagliatina", dividono i polisaccaridi in frammenti più piccoli di circa una decina di residui, chiamati **destrine** (30%), e in molecole di **maltosio** (dimero di glucosio) e **maltotriosio** (trimero) – 70%.

A questo punto a digerire le destrine saranno altri enzimi a livello della superficie degli enterociti detti **destrinasi** che tolgono le destrine, e le **maltasi** che tolgono il maltosio e il maltotriosio, fino ad ottenere i **monomeri di glucosio libero** che successivamente entrano negli eritrociti intestinali tramite i trasportatori.

## - Digestione di saccarosio e lattosio (disaccaridi)

Oltre ai polisaccaridi abbiamo anche **saccarosio** e **lattosio**, due disaccaridi che sono idrolizzati da due idrolasi (**saccarasi** e **lattasi**) presenti nell'intestino tenue.

La **saccarasi** è una molecola presente in tutti gli organismi. La saccarasi scompone il saccarosio nei suoi componenti: glucosio e fruttosio. il glucosio entra nella via glicolitica in maniera diretta, il fruttosio ci entra in maniera indiretta ma è sempre un componente della glicolisi. Quindi il saccarosio dà due molecole che sono facile da digerire.

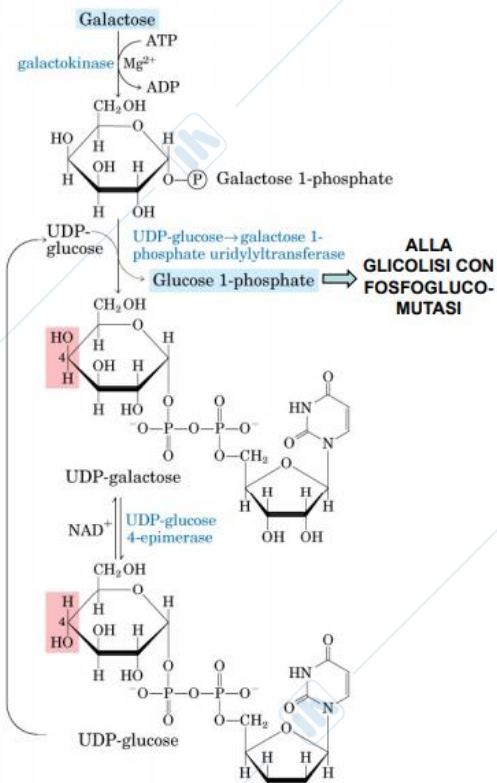
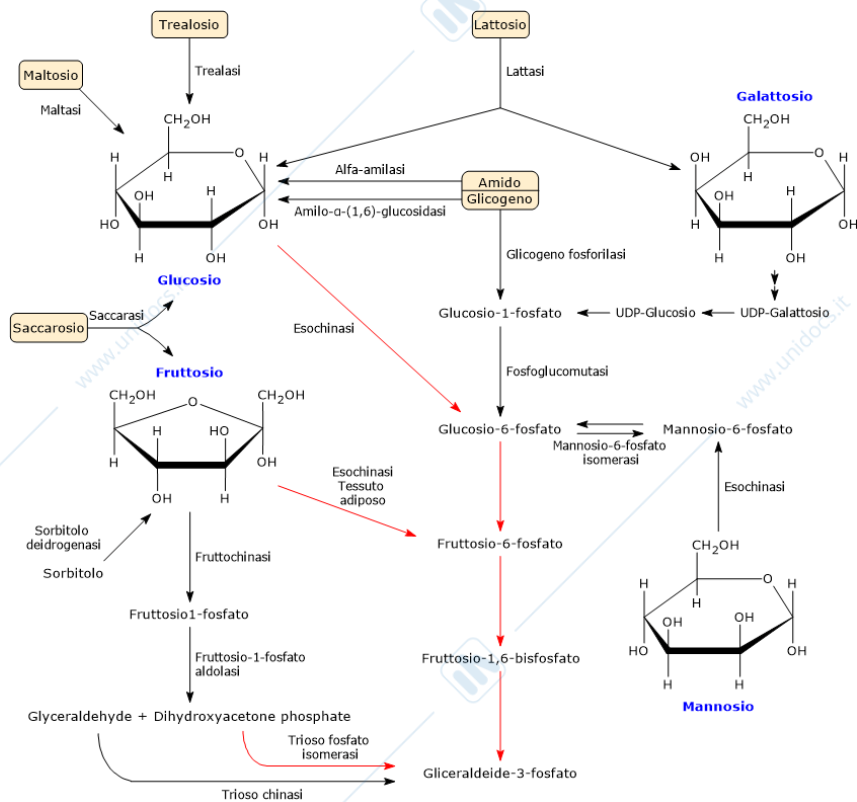
Le **lattasi** esistono almeno di due tipi diversi: **lattasi persistente** e **lattasi non persistente** che dividono le popolazioni del mondo: "persone che possono bere il

Carboidrato alimentare	Enzima/i implicato/i nella digestione	Prodotti finali della digestione	Sito/i in cui avviene la digestione
<b>Amido</b> (amilosio + amilopectina)	$\alpha$ -amilasi (salivare e pancreatica), maltasi, destrinasi	Glucosio	Bocca, Intestino tenue
<b>Glicogeno</b>	$\alpha$ -amilasi (salivare e pancreatica), maltasi, destrinasi	Glucosio	Bocca, Intestino tenue
<b>Saccarosio</b>	Saccarasi	Glucosio, Fruttosio	Intestino tenue
<b>Lattosio</b>	Lattasi	Glucosio, Galattosio	Intestino tenue

latte da adulti e persone che non possono bere il latte da adulti.

## METABOLISMO DEI DISACCARIDI

### Schema della glicolisi (include tanti glucidi):



### 1) Metabolismo del lattosio:

il lattosio è presente nel latte e nei suoi derivati. È un disaccaride costituito da glucosio e galattosio. Esiste un enzima, che si chiama **lattasi**, che scinde il lattosio in **glucosio** e **galattosio**. Il glucosio entra direttamente nella glicolisi, il galattosio, invece, vi entra in maniera indiretta, in seguito ad una serie di reazioni.

**- Metabolismo del galattosio:** Il galattosio è un monosaccaride complicato da utilizzare, in quanto entra in una serie di reazioni che costituiscono un ciclo. Il prodotto di questo ciclo sarà il glucosio. Inizialmente, il galattosio è ottenuto grazie alla lattasi, che è l'enzima idrolitico che idrolizza il lattosio in galattosio e glucosio.

Il primo enzima che agisce sul galattosio si chiama **galattochinasi**, una chinasi che lo fosforila in posizione 1 formando il **galattosio-1-fosfato** (galattochinasi è specifica per questo zucchero, non riconosce altri esosi). Il galattosio è un epimero del glucosio: la differenza fra i due sta nella posizione dell'ossidrile in C4 che nel glucosio è in basso, mentre nel galattosio è in alto. Per convertire questo galattosio in glucosio dovremmo lavorare su questo carbonio che deve spostare l'idrossile dall'alto in basso, per far questo interviene un enzima detto **epimerasi** (che è mutata in quei pazienti che sono affetti da galattosemie). Per far funzionare

l'epimerasi, è necessario attaccare un marcatore detto "**UDP**" sul galattosio. (il marcatore UDP o uridina fosfato, è composto da uracile, un ribosio e 2 gruppi fosfato).

Per cui: il galattosio-1-fosfato entra nel ciclo; anche un **UDP-glucosio** entra nel ciclo. L'enzima **galattosio-1-fosfato uridil transferasi** catalizza il trasferimento dell'UDP dal glucosio al galattosio, prodotti di questa reazione sono **UDP-galattosio** e **glucosio-1-fosfato**. Questo glucosio sarà il prodotto del ciclo (sotto forma di glucosio-1-fosfato).

A questo punto interviene un enzima chiamato **UDP-galattosio-4-epimerasi** che catalizza la reazione di epimerizzazione del C-4, convertendo l'UDP-galattosio in UDP-glucosio. Adesso si chiude il ciclo. In questo ciclo entra continuamente galattosio-1-fosfato ed esce continuamente glucosio-1-fosfato.

Il glucosio-1-fosfato prodotto da questo ciclo, non è un intermedio della glicolisi, infatti viene convertito grazie ad enzima detto **fosfoglutomutasi**, che muta la posizione del fosfato dalla posizione 1 alla posizione 6 formando il **glucosio-6-fosfato** (che è un intermedio della glicolisi).

(Questo enzima **fosfoglutomutasi** ci interesserà molto anche nel metabolismo dei polisaccaridi). Come meccanismo d'azione questo enzima assomiglia a un'altra mutasi che noi abbiamo conosciuto, la fosfogliceromutasi, che agisce nella glicolisi spostando la fosforilazione dell'acido fosfoglicerico dalla posizione 3 alla posizione 2 e ha come intermedio l'acido bisfosfoglicerico-2,3; quest'enzima ha un'istidina fosforilata che attacca transitoriamente il fosfato in posizione 3, formando il 2,3-BPG, per poi riprenderlo dalla posizione 2, formando il 3-fosfoglicerato. L'enzima fosfoglutomutasi appartiene alla stessa classe di enzimi e fa la stessa cosa, funzionando però sulle posizioni 1 e 6 del glucosio, e ha come intermedio fosforilato il glucosio-1,6-bisfosfato.

#### ----> Intolleranza al lattosio e galattosemie

Parliamo ora dell'enzima che sta a monte di tutto: la lattasi. La lattasi come reazione fa questa accanto. Si tratta di una reazione glicolitica: dal disaccaride otteniamo 2 monosaccaridi. È l'enzima che a monte permette di usare il lattosio; se non c'è ci fa venire la cacarella. Di fatto questa condizione si chiama intolleranza al lattosio: è una patologia non grave, che si esplica con qualche disturbo intestinale e con una autolimitazione nell'ingestione del lattosio. Perché noi ci nutriamo di lattosio? Perché è un nutriente importante. (qua spara una serie di cazzate). La cosa importante da sapere è che l'enzima lattasi è inducibile: se un individuo in età adulta non l'ha mai utilizzato, ha tutto il fenotipo di coloro che sono intolleranti al lattosio. Al di là del fatto che l'enzima venga indotto, esiste un fenotipo genetico che impedisce ad alcuni individui di catabolizzare il lattosio e utilizzarlo: questi hanno un gene chiamato lattasi non persistente, mentre tutti gli altri fenotipi hanno un gene chiamato lattasi persistente ("persistente" perché quando nasciamo ce l'abbiamo tutti dal momento che il latte è l'alimento dei mammiferi per eccellenza). Sui villi intestinali di questi individui, che possiedono il gene della lattasi non persistente, mancano dei granuli e quindi non si può utilizzare il lattosio. Non in tutte le popolazioni del mondo c'è la stessa frequenza di lattasi persistenza o non persistenza: la popolazione del nord Europa è fortemente persistente, la popolazione africana è fortemente non persistente. Dalla distribuzione geografica si intuisce che è un fattore genetico. Il deficit di lattasi è caratteristico di alcune popolazioni e non di altre ma quando il fenotipo è lattasi persistente vuol dire che da adulti continuiamo a esprimere la lattasi. Tuttavia, se questi adulti con il fenotipo lattasi persistente non assumono lattosio, piano piano il gene si reprime, anche se

può essere riattivato. Invece il fenotipo lattasi non persistente non ha la capacità di indurre la lattasi e quindi, in caso di ingestione del lattosio, questo viene fermentato dai microrganismi dell'intestino e provoca dei problemi di tipo diarroico. La componente proteica nel latte è interessante, perché ricca di aminoacidi essenziali, ovvero quelli che noi non sappiamo sintetizzare.

Ci sono delle patologie che sono correlate al catabolismo del galattosio: sono genetiche, al pari dell'incapacità di catabolizzare il lattosio (che è una caratteristica genetica che prevede la non persistenza dell'espressione del gene). In questo caso sono delle vere e proprie mutazioni dei geni che esprimono per gli enzimi che abbiamo visto lavorare nel metabolismo del galattosio:

il deficit di galattocinasi provoca la galattosemia di tipo II: questo enzima fosforila il galattosio e consente l'entrata del galattosio nella via catabolica. Non è una patologia grave: determina un po' di cataratta perché il galattosio si accumula a livello dell'occhio. Non risulta particolarmente grave perché l'esocinasi riesce a fosforilare un certo tipo di galattosio, per cui in assenza dell'enzima specifico per il catabolismo del galattosio essa può in parte sopperire alla sua mancanza (a differenza delle altre patologie che vedremo in seguito che saranno gravi proprio perché non c'è nessun altro enzima capace in parte di sopperire ad un loro deficit).

un deficit di galattosio-1-fosfato uridil trasferasi provoca la galattosemia di tipo I: l'enzima trasferisce UDP da glucosio al galattosio e permette l'ingresso nel ciclo del galattosio. Senza questo enzima, il ciclo non funziona. Questa galattosemia è molto più grave della precedente e risulta fatale nel periodo neonatale (più precoci sono le fatalità, più gravi sono le patologie in quanto impediscono lo sviluppo dell'organismo).

il deficit di galattosio epimerasi provoca la galattosemia di tipo III: questo enzima epimerizza il C4 e permette all'UDP-galattosio di essere convertito a glucosio. È una patologia un po' meno grave della galattosemia di tipo primo, ma i sintomi sono comunque gravi: ipotonia, malnutrizione, ittero, gravi epatopatie, ritardo della crescita, deficit funzionali. Però si riesce, anche se con una pessima qualità della vita, ad andare avanti grazie ad un regime alimentare di restrizione completa al galattosio.

**2) Metabolismo del trealosio:** il trealosio è un disaccaride costituito da due molecole di glucosio. C'è un enzima, che si chiama **trealsi**, che scinde il trealosio in due molecole di glucosio che entrano direttamente nella glicolisi.

### 3) Metabolismo del saccarosio:

il saccarosio è un disaccaride formato da una molecola di **glucosio** e una molecola di **fruttosio**.

La molecola di glucosio è già dentro la glicolisi. La molecola di fruttosio ha due vie metaboliche diverse per entrare nella glicolisi.

#### - Metabolismo del fruttosio:

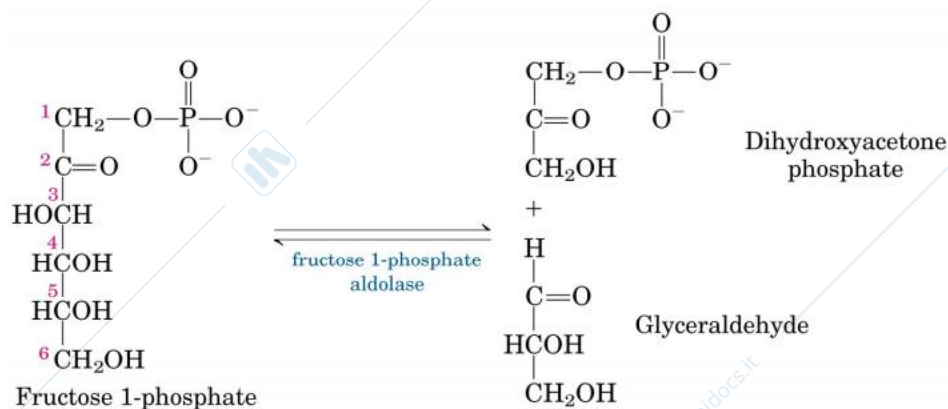
Il fruttosio può seguire due vie metaboliche diverse prima di entrare nella glicolisi:

- **La prima via** prevede una fosforilazione del fruttosio in posizione 6 da parte della **esochinasi** formando il **fruttosio-6-fosfato**. siamo a livello del fegato (il fruttosio può essere metabolizzato solo dal **fegato**). Il fruttosio-6-fosfato può entrare tranquillamente nella glicolisi e in questo caso potrebbe entrare nella glicolisi di qualsiasi cellula. Questa prima via avviene soprattutto negli individui che presentano mutazioni nel pathway, cioè avviene circa nel 2-3% dei casi, quindi è un pathway molto collaterale.

- **La seconda via** prevede che il fruttosio venga fosforilato dalla **fruttochinasi** che, a differenza dell'esochinasi, non fosforila in posizione 6 ma in posizione 1. Quindi il prodotto è il **fruttosio-1-fosfato**, una molecola che non è un intermedio della glicolisi. Questa molecola viene riconosciuta da un enzima ad espressione esclusiva epatica, che è un'aldolasi, detto **aldolasi A** o **fruttosio-1-fosfato aldolasi** (l'aldolasi della glicolisi è l'aldolasi B). **Nella glicolisi, aldolasi A riconosce un fruttosio-1,6- bisfosfato da cui**

deriveranno due zuccheri treosi tutti e due fosforilati (diidrossiacetone fosfato e la gliceraldeide-3-fosfato), l'**aldolasi A** in questo caso divide il fruttosio-1-fosfato in due zuccheri: una **gliceraldeide non fosforilata** e un **diidrossiacetone fosforilato**. una gliceraldeide non fosforilata non può procedere nella glicolisi, perché gli enzimi successivi non la riconoscerebbero, per cui, è necessario un passaggio successivo. Per cui, interviene l'enzima **gliceraldeide chinasi** che fosforila la gliceraldeide non fosforilata, formando la **gliceraldeide-3-fosfato**, che è un intermedio della glicolisi.

È una via collaterale semplice ma se non abbiamo la fruttocinasi e la fruttosio-1-fosfato aldolasi o aldolasi A, non possiamo catabolizzare il fruttosio. La frutta per l'homo sapiens è un alimento fondamentale quindi il metabolismo del fruttosio è una via metabolica importantissima. soprattutto perché il fruttosio si usa come dolcificante e, in particolare, come dolcificante elettivo per pazienti diabetici, perché vedremo che il fruttosio è capace di bypassare tutta una serie di controlli ormonali che gravano sull'insulina di cui i pazienti diabetici sono deficitari.



## Trasporto del glucosio all'interno delle cellule, dopo la digestione:

Dopo la digestione, il glucosio entra negli enterociti tramite un **sistema di simporto  $\text{Na}^+$ /glucosio** (sistema responsabile di trasportare glucosio per il 70%, ma trasporta anche il galattosio proveniente dal catabolismo del lattosio). Questo sistema di simporto funziona trasportando simultaneamente 2  $\text{Na}^+$  e una molecola di glucosio all'interno della cellula.

Questo sistema trasporta ioni sodio contro il lavoro costante della pompa sodio-potassio che fa entrare 2  $\text{K}^+$  e uscire 3  $\text{Na}^+$ , quindi fa entrare sodio e glucosio. Questo sistema trasporta il glucosio dentro anche contro gradiente (di glucosio).

Però non è un meccanismo completamente gratis per quanto riguarda l'energia, perché la cellula deve disfarsi di questo ione sodio, altrimenti si dissipa la differenza osmotica da dentro e fuori la cellula, quindi deve mettere in moto la pompa sodio-potassio che è una ATPasi).

### Esistono altri trasportatori per il glucosio : I TRASPORTATORI GLUT

I trasportatori del glucosio sono tanti, abbiamo: GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4, GLUT-5, GLUT-6 e sono diversi tra loro. Le differenze genericamente sono di due tipi:

1. Possono avere una costante di affinità con il glucosio, diversa tra loro. Ciò vuol dire che se la costante di affinità è molto alta, anche poco glucosio basterebbe per essere trasportato all'interno della cellula.

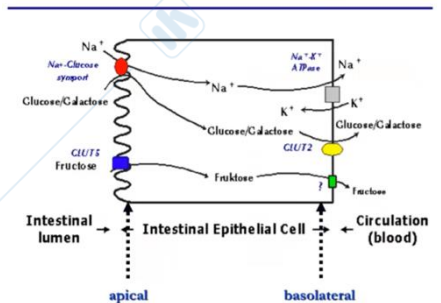
Se la costante di affinità è bassa, bisogna una concentrazione di glucosio molto alta per far funzionare il trasportatore. Questa cosa è importante per tanti organi; ci sono degli organi che devono concentrare glucosio. Il cervello e il tessuto nervoso in generale hanno bisogno di glucosio, talmente tanto, perché il loro metabolismo funziona esclusivamente su questa base, che hanno dei trasportatori con una **costante di affinità molto molto bassa, appena passa una molecola di glucosio la prendono**. Stessa cosa dicasi per l'intestino, nel bolo alimentare abbiamo dei trasportatori ad alta affinità. Ma un fegato, che è talmente altruista da donare glucosio a chiunque, è anche talmente altruista da formare il glucosio (con un processo che si chiama gluconeogenesi, biosintesi di glucosio).

Dato che il fegato non ha bisogno di prendere glucosio, per farlo disponibile per gli altri organi che ne hanno bisogno; il fegato esprime un trasportatore con una bassa affinità, questo trasportatore si chiama **GLUT-2** ed è abbastanza tipico del fegato, ma ci sono delle eccezioni, per esempio anche l'enterocita esprime il **GLUT-2**, dove è presente per un altro motivo: quando deve buttare il glucosio al torrente circolatorio (avendone tanto dentro l'enterocita) usa questo trasportatore GLUT-2 con bassa affinità per cedere il glucosio, ma l'enterocita esprime il GLUT-2 solo nella faccia basale-nucleare. **C'è proprio una differenziazione fisica dei trasportatori, da una parte quelli ad alta affinità: per prendere tutto; da una parte quelli a bassa affinità: per cedere tutto**. Altre cellule che esprimono il trasportatore GLUT-2 sono le **cellule beta del pancreas** che secernono l'insulina; l'insulina è un ormone che reagisce se siamo in condizione di iperglicemia e fa reagire l'intero organismo in modo che l'iperglicemia si abbassi alla normoglicemia: quindi, esprimendo il trasportatore GLUT-2, fa entrare il glucosio solo se questo è molto alto (durante iperglicemia), ma non fa entrare il glucosio se è molto basso nel sangue (durante ipoglicemia) essendo un trasportatore a bassa affinità.

Un altro trasportatore GLUT che è regolato dall'insulina, il **GLUT 4**, che viene espresso dalle cellule

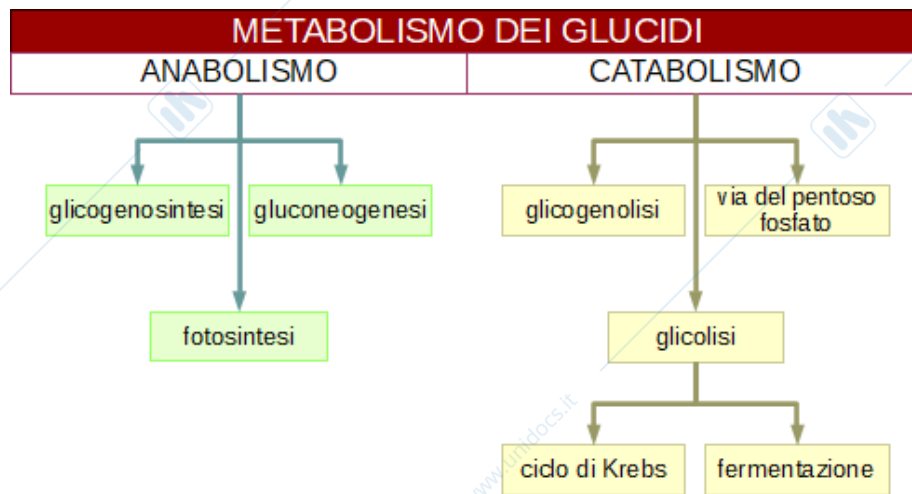
## Carbohydrate absorption

Uptake of Monosaccharides in the Small Intestine



muscolari. Questo trasportatore sta normalmente nella membrana di vescicole all'interno delle cellule muscolari. Quando arriva insulina, le vescicole contenenti il GLUT 4 si fondono con la membrana plasmatica e il trasportatore viene esposto sulla membrana.

## Metabolismo glucidico



Quando c'è bisogno di ATP (energia), si svolge il catabolismo del glucosio: innanzitutto, nel citoplasma ha luogo la **glicolisi** in cui dal glucosio si ottiene il piruvato.

### La glicolisi

è il processo del catabolismo del glucosio, da cui si ottiene: energia potenziale chimica sottoforma di 2 molecole di ATP, e il piruvato che dopo la glicolisi prosegue in una delle due strade: la **respirazione** (ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa se sono presenti i mitocondri e l'ossigeno) oppure la **fermentazione**. La glicolisi avviene nel citoplasma ed è divisa in **2 fasi** (fase preparatoria, fase di recupero energetico):

**1) Fase preparatoria** in cui il glucosio viene preparato ad essere catabolizzato. Consiste di **5 reazioni**. La parte preparatoria prevede anche la conversione del glucosio (esoso) in due triosi: la **gliceraldeide 3-fosfato** e il **diidrossiacetone fosfato**.

**La fase preparatoria consiste in una serie di 5 reazioni:**

#### **1° Reazione - Fosforilazione del glucosio**

Nella prima reazione avviene l'attivazione del glucosio che consiste nella fosforilazione, attaccando al glucosio un fosfato come un bollino che lo marca in modo che non potrà più uscire dalla cellula e viene indirizzato verso la via metabolica. Il substrato è il **glucosio** e l'enzima che catalizza la reazione è l'**esochinasi** (a livello del fegato si chiama **glucochinasi**, ci sono 4 varianti di esochinasi che sono espresse in modo diverso nei vari tessuti. Questi enzimi sono coinvolti nella regolazione della glicemia). Questi **chinasi** sono enzimi sempre ATP-magnesio dipendenti (in quanto l'ATP funziona solamente se coniugato al magnesio). Il magnesio ha due cariche positive che si intercalano con le cariche negative dell'ATP in modo da dargli una conformazione adeguata da essere riconosciuto dal sito catalitico dell'enzima. In questa reazione, l'enzima **esochinasi** attacca al glucosio un fosfato proveniente dall'idrolisi dell'ATP in ADP e fosfato, e così il glucosio si trasforma in **glucosio 6-fosfato**.

**2° Reazione - Isomerizzazione del glucosio 6-fosfato a fruttosio 6-fosfato:** avviene ad opera dell'enzima **fosfoesoso isomerasi** in cui un esoso viene trasformato in un altro esoso. Questa reazione è esoergonica e reversibile. (da glucosio 6-fosfato a fruttosio 6-fosfato e viceversa).

### 3° Reazione - Fosforilazione del fruttosio 6-fosfato (seconda fosforilazione nella glicolisi)

in questa reazione l'enzima **fosfofruttochinasi 1** o **PFK1**, fosforila il fruttosio 6-fosfato in posizione 1 trasformandolo nel **fruttosio 1,6-bisfosfato**. il fosfato aggiunto proviene dall'idrolisi di una molecola di ATP (in ADP e fosfato). anche qua c'è Anche qui c'è l'accoppiamento di due reazioni la cui somma dei  $\Delta G$  è molto negativa, anche qui avviene l'idrolisi dell'ATP e anche qui è presente il magnesio utile alla conformazione dell'ATP stesso. Il **fruttosio 1,6-bisfosfato**, che è l'**intermedio della glicolisi**, deve essere distinto dal fruttosio 2,6-bisfosfato, che è un regolatore allosterico positivo del PFK1.

### 4° Reazione - Scissione del zucchero a 6C in due zuccheri a 3C.

L'enzima coinvolto è l'aldolasi. Il fruttosio 1,6-bisfosfato che è uno zucchero a 6 atomi di carbonio, viene operato dall'aldolasi che lo divide tramite scissione litica in due zuccheri a 3 atomi di carbonio: **diidrossiacetone fosfato** e la **gliceraldeide 3-fosfato**. Esistono più tipi di aldolasi come l'aldolasi A o l'aldolasi B. Queste due aldolasi sono molto importanti: una nella via glicolitica e l'altra nel catabolismo del fruttosio.

### 5° Reazione - Isomerizzazione dei due zuccheri

L'ultima reazione della fase preparatoria della glicolisi è una reazione di isomerizzazione dei due zuccheri diidrossiacetone fosfato e gliceraldeide-3-fosfato. è catalizzata dall'enzima isomerasi che permette a queste due zuccheri di essere isomerizzate tra loro, e il diidrossiacetone viene convertito in **gliceraldeide-3-fosfato (che è l'unico che entra nella fase successiva della glicolisi)**. Si ottengono quindi 2 molecole di gliceraldeide 3-fosfato.

**2) Fase di recupero energetico della glicolisi**, in cui **reazioni di ossidazione**, e estrazioni di energia. in questa fase avviene la sintesi di 2 molecole di ATP.

**1° Reazione:** in questa reazione avviene l'ossidazione della **gliceraldeide 3-fosfato** convertendolo in **1,3-bisfosfoglicerato**, ad opera dell'enzima **gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi** (NAD<sup>+</sup> dipendente). In questa reazione il NAD<sup>+</sup> viene ridotto in NADH. il bifosfoglicerato ottenuto è **una molecola più ossidata** con un potenziale di trasferimento di energia superiore all'ATP, e quando uso questa molecola posso utilizzare la sua energia potenziale per sintetizzare ATP.

Per far avvenire questa reazione il NAD<sup>+</sup> deve essere costantemente rifornito (altrimenti senza NAD<sup>+</sup> questa reazione si fermerebbe).

### Ci sono due modi per riformare e fornire in maniera continua il NAD<sup>+</sup>:

- i) Attraverso la **fermentazione** (veloce, semplice ma meno vantaggioso in termini di ATP). Dalla fermentazione si ottiene solo NAD<sup>+</sup>).
- ii) Attraverso la **catena di trasporto degli elettroni** (più complicato, ma più vantaggioso). La conseguenza di queste reazioni è che si forma tanta ATP (30 o 32 in base al tessuto);

## 2° Reazione - Sintesi di ATP grazie al 1,3-bisfosfoglicerato (fosforilazione a livello del substrato)

In questa reazione sono coinvolti il 1,3-bisfosfoglicerato e una molecola di ADP. L'enzima coinvolto è la **fosfoglicerocinasi** che trasferisce il fosfato dal bifosfoglicerato all'ADP, formando la **prima molecola di ATP**. Dall'altro lato il bifosfoglicerato perdendo il fosfato diventa **3-fosfoglicerato**.

Si forma quindi il primo ATP, che viene raddoppiato per due, perché lo zucchero esoso di partenza viene convertito in due triosi. (ciascuno dei due triosi fornirà un fosfato a una molecola di ADP).

## 3° Reazione - Isomerizzazione del 3-fosfoglicerato in 2-fosfoglicerato

L'enzima di questa tappa è la **fosfoglicerato mutasi** che isomerizza il 3-fosfoglicerato a **2-fosfoglicerato**. quindi, il gruppo fosfato viene spostato dalla posizione 3 alla posizione 2.

l'enzima mutasi stacca il fosfato dalla posizione 3 del substrato e lo attacca sulla posizione 2 di un'altra molecola già fosforilata, ottenendo in modo transitorio l'intermedio 2,3-bisfosfoglicerato, poi da questo intermedio viene staccato il fosfato in posizione 3, lasciando così un **2-fosfoglicerato**.

Le **mutasi**, una classe di enzimi diversa dalle isomerasi. Questo enzima ha una istina che viene transitoriamente fosforilata per fosforilare a sua volta il fosfoglicerato in posizione 2 ottenendo dunque il 2,3- bisfosfoglicerato in modo transitorio (gli eritrociti, invece, mantengono questo intermedio). La fosfogliceromutasi ha sia una attività chinasi che fosfatasi: queste due attività funzionano in modo più o meno efficace, l'una rispetto all'altra, a seconda del tessuto preso in considerazione. La molecola del 2,3-bisfosfoglicerato è presente in varie cellule, anche in quelle tumorali, sebbene non hanno l'emoglobina.

## 4° Reazione - dal 2-fosfoglicerato al PEP (fosfoenolpiruvato)

il 2-fosfoglicerato subisce una reazione di disidratazione catalizzata dall'enzima **enolasi**, in cui il 2-fosfoglicerato perde una molecola di acqua, trasformandosi in **fosfoenolpiruvato** (PEP), un composto che ha un altissima energia potenziale di trasferimento.

## Ultima reazione - Dal PEP al piruvato

è la reazione finale della glicolisi in cui avviene la formazione della **seconda molecola di ATP**.

Ad opera dell'enzima **piruvato chinasi**, il fosfato ad alta energia presente sul fosfoenolpiruvato viene trasferito ad una molecola di ADP, formando così **piruvato** e **una molecola di ATP**.

Si forma così la seconda molecola di ATP, da moltiplicare per due (perché in ogni glicolisi vengono ossidate 2 triosi). Per cui, nella glicolisi vengono investite 2 molecole di ATP per ricavarne 4.

Quindi da questa reazione finale abbiamo ottenuto un'altra molecola di ATP per un guadagno totale di **2 ATP** (2ATP consumati nella prima fase e 4ATP prodotti nella seconda).

Dal trasferimento del gruppo fosfato del PEP alla molecola di ADP avanza un  $\Delta G = -31,4$  kJ/mol.

## A questo punto, il piruvato ha una delle due possibilità per proseguire nel metabolismo-->

**1) In presenza di mitocondri e ossigeno**, il piruvato continua nella **respirazione cellulare** che è una **via ossidativa** che avviene nei mitocondri in cui si ha decarbossilazione del piruvato ad **acetil-coenzima A** che poi entra nel **Ciclo di Krebs** in l'Acetil-CoA viene ossidato completamente a CO<sub>2</sub>, e produrrà molecole di NADH e FADH<sub>2</sub> che entrano nel processo della **fosforilazione ossidativa** andando ad alimentare la catena di trasporto degli elettroni presente nel mitocondrio, e alla fine si ottiene un sacco di ATP (circa 30 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio che viene catabolizzata).

**2)** Nel caso invece di condizioni anaerobiche o in assenza di mitocondri, il piruvato subisce fermentazione  
 Ci sono due tipi della fermentazione:

**i) fermentazione lattica:** che converte il piruvato ad acido lattico (nel nostro organismo ci sono cellule che fanno la fermentazione lattica: le fibre muscolari bianche, nicchie staminali, eritrociti, cellule tumorali, cellule ipossiche in generale).

In questo processo, un enzima detto **lattico deidrogenasi**, utilizza il NADH per ridurre il piruvato producendo **acido lattico** e NAD<sup>+</sup> (necessario per la glicolisi). L'accumulo dell'acido lattico tende a far denaturare le proteine, per cui l'acido lattico deve essere rimosso dalla cellula ipossica tramite dei trasportatori **MCT 4**. (**MCT: "trasportatore degli acidi monocarbossilici"**); esistono 4 tipi di MCT con caratteristiche diverse: **MCT 1,2,3 e 4**. le caratteristiche peculiari di ogni trasportatore vengono sfruttate da cellule diverse: **MCT4** fa uscire il lattato mentre MCT1, per esempio, lo fa entrare (come avviene nel ciclo di Cori).

**ii) fermentazione alcolica:** non avviene nell'uomo, ma è tipica dei lieviti, è comunque un processo importante da un punto di vista alimentare (il vino e la birra contengono etanolo che è un alimento perché fornisce energia). Nella fermentazione alcolica il piruvato viene trasformato in **etanolo**. Questo processo è costituito da 2 reazioni, la prima di queste prevede una **decarbossilazione del piruvato** ad opera dell'**enzima piruvato decarbossilasi** che utilizza la tiamina pirofosfato (TPP), per cui il piruvato si trasforma in acetaldeide con la perdita di una molecola di CO<sub>2</sub> e il piruvato diventa **acetaldeide** (una molecola molto reattiva con le proteine della membrana cellulare, e che dà gli effetti della sbornia - abuso di alcol).

Nella seconda reazione interviene l'enzima **alcol deidrogenasi** che utilizza NADH, e riduce l'acetaldeide in **etanolo**, liberando NAD<sup>+</sup> (che viene sfruttato per mandare avanti la glicolisi). L'**etanolo** è il prodotto finale nel lievito che lo libera nell'ambiente, ed è più ridotto rispetto all'acetaldeide.

Nel caso, invece, di un'assunzione di etanolo da parte dell'uomo: noi esprimiamo l'alcol deidrogenasi che svolge anche la reazione opposta trasformando l'etanolo in acetaldeide. Poi dopo il metabolismo converte l'acetaldeide in acetato poi in **acetil-coenzima A**, e spesso forma in **acidi grassi**, e questo è il motivo per cui il fegato grasso e la steatosi sono correlati all'abuso di alcol.

## Regolazione della glicolisi:

### \* meccanismi di regolazione della glicolisi:

#### 1) Regolazione dell'esochinasi: tramite 2 modi particolari:

**i) il primo modo** di regolare l'esochinasi è quello che dipende sull'affinità dell'enzima nei confronti del glucosio. Esiste il fattore Km che è un indice dell'affinità dell'esochinasi al glucosio. un Km basso vuol dire un'affinità alta per il glucosio e viceversa. Quest'affinità al glucosio è diversa per i diversi tipi di esochinasi. infatti l'esochinasi esiste in 4 forme principali (I, II, III, IV). L'**esochinasi IV** detto anche **glucochinasi** è espressa nel fegato. esiste poi **esochinasi I** che è espressa in tutti i tessuti del nostro organismo, e il cervello è ricco di questi esochinasi. Mentre L'**esochinasi II** è espressa prevalentemente nel **muscolo**.

il **glucochinasi** del fegato presenta una bassa affinità per il glucosio (quindi un  $K_m$  alto). mentre le esochinasi I e II presentano un'alta affinità per il glucosio (quindi un  $K_m$  basso)

Le esochinasi dei diversi tessuti si differiscono perché alcuni tessuti hanno più bisogno di fare glicolisi continuamente, altri invece meno. Per esempio, il cervello fa la glicolisi sempre e per questo riesce a sfruttare il glucosio al meglio. Anche il muscolo sfrutta la glicolisi per ricavare energia che serve per fare la contrazione. Quindi questi organi per essere in grado di fosforilare il glucosio immediatamente e utilizzarlo, hanno bisogno di un'esochinasi molto efficiente, altrimenti il glucosio uscirebbe dalla cellula.

Le **esochinasi I e II** sono quelle più efficienti, in questo modo, il muscolo e cervello si nutrono e funzionano anche in condizioni di ipoglicemia. La  $K_m$  delle esochinasi I e II (circa 0,1 mM) è molto più bassa della normoglicemia (4.5 mM), quindi sono molto affini, non appena arriva glucosio, lo fosforilano.

Viceversa, il fegato esprime la glucochinasi (esochinasi IV) ha una  $K_m$  molto alta (sui 10 mM) quindi ha un'affinità molto bassa. Il fegato infatti, non fosforila il glucosio immediatamente ma solo in condizioni di iperglicemia in cui sarà necessario che le cellule epatiche assorbano il glucosio al loro interno per poter ripristinare la normoglicemia. E quindi durante la normoglicemia, il fegato evita di fare glicolisi per lasciare il glucosio ad altri organi come il **muscolo e il cervello** che invece esprimono esochinasi più affini al glucosio perché questi organi hanno bisogno di fare glicolisi costantemente.

**ii) Secondo modo** di regolazione dell'esochinasi dipende su una **sostanze regolatrici della glucochinasi**.

Particolarmente la **glucochinasi** può essere legata a proteina detta "**proteina regolatrice dell'esochinasi**".

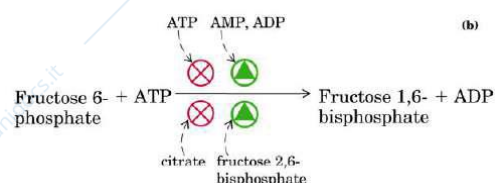
il legame tra la proteina regolatrice dell'esochinasi e la glucosinasi è regolato in maniera positiva dal glucosio stesso. Durante la normoglicemia, la proteina regolatrice dell'esochinasi lega la glucochinasi, mantenendola nel nucleo come un modo di "inattivarla" perché nel nucleo non c'è glucosio, quindi in questo modo la glucochinasi viene allontanata dal glucosio. Questo perché la glucochinasi del fegato deve funzionare poco in condizioni di normoglicemia. Invece, durante l'iperglicemia, le epatocite esprimono il GLUT2 per far entrare il glucosio per abbassare l'iperglicemia, poi questo il glucosio funziona da stimolo per liberare la glucochinasi dal nucleo al citoplasma in cui la glucochinasi fosforila il glucosio.

Anche il **fruttosio-6-fosfato** è un regolatore allosterico dell'esochinasi. Esso è un prodotto intermedio della glicolisi. Il fruttosio è uno zucchero che assumiamo con la dieta (presente nella frutta), e questo fruttosio, viene catabolizzato solo nel fegato, e ha un enzima (**fruttochinasi**) che lo trasforma in fruttosio-6-fosfato.

**2) Regolazione della fosfofruttochinasi 1 (PFK1)**, che catalizza la tappa di fosforilazione del fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bisfosfato. la fosfofruttochinasi 1 (PFK1) è un enzima multimerico molto grande, regolato allostericamente da altre molecole; (**l'ATP, e fruttosio 2,6-bisfosfato e ormoni regolatori: insulina, glucagone**)

**(i) L'ATP** → l'ATP è un prodotto della glicolisi, se esso è presente già in grandi quantità, non c'è bisogno di attivare la glicolisi per produrre più ATP, per cui viene inattivata la fosfofruttochinasi 1, inibendo la glicolisi. l'ATP è quindi un regolatore negativo.

**(ii) ADP e AMP** → Quando sono presenti indicano che era idrolizzato un legame fosforico e era consumata energia, quindi ADP e AMP sono regolatori positivi che segnalano alla cellula che c'è poco ATP.



**(iii) Regolazione della fosfofruttochinasi 1 (PFK1) mediata da ormoni insulina e glucagone**

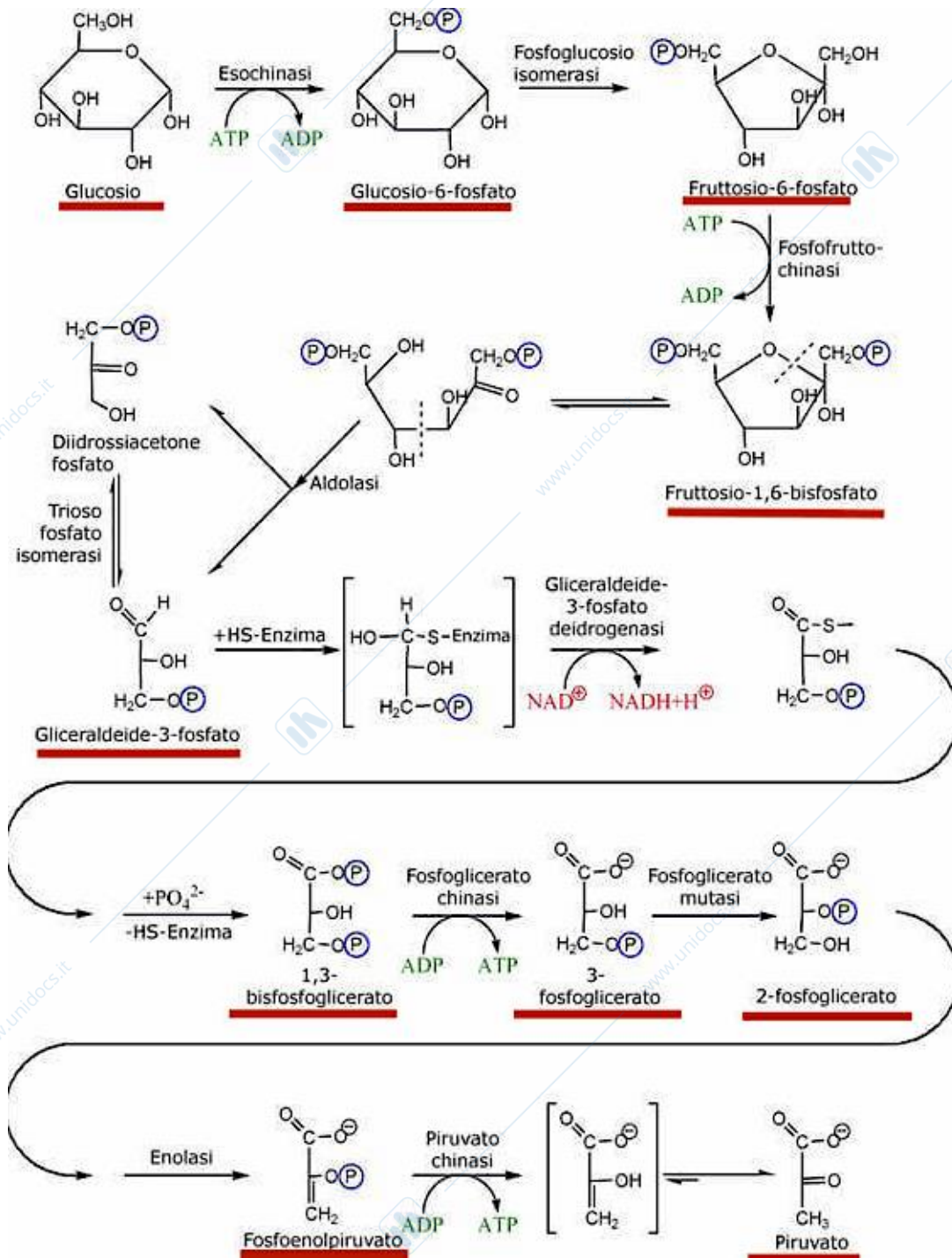
la **fosfofruttochinasi 1** ha un **regolatore allosterico positivo** che è il composto **Fruttosio 2,6-bisfosfato**. il fruttosio 2,6-bisfosfato viene sintetizzato da un enzima detto PFK2 (**fosfofruttochinasi 2**); che fosforila in posizione 2. Innanzitutto l'enzima PFK2 stesso è regolato dagli ormoni **insulina** e **glucagone**. L'insulina lo attiva (regolazione positiva della glicolisi), e il glucagone lo inattiva (regolazione negativa della glicolisi).

- **Effetto dell'insulina sulla PFK1:** il segnale dell'**insulina** attiva la **proteina fosfatasi** che defosforila il PFK2 che successivamente si attiva e fosforila in posizione 2 il fruttosio-6-fosfato che diventa **fruttosio-2,6-bisfosfato**, il che è un regolatore allosterico positivo della PFK1 che quindi si attiva e interviene nella glicolisi andando a fosforilare il fruttosio-6-fosfato in **fruttosio-1,6-bisfosfato** (intermedio in una reazione della glicolisi).
- **Effetto del glucagone sul PFK1:** Il glucagone è un ormone che inattiva la glicolisi, infatti fa uscire il glucosio dalle cellule nel sangue per alzare la glicemia. il segnale del glucagone attiva la **PKA (protein chinasi cAMP-dipendente)**, che va a fosforilare il PFK2 che quindi viene inibito, per cui viene meno la formazione del fruttosio-2,6-bisfosfato. Quindi, mancanza del fruttosio-2,6-bisfosfato vuol dire mancanza del regolatore positivo del PFK1, quindi viene meno l'attività del PFK1 che è un enzima della glicolisi, per cui si diminuisce la velocità della glicolisi.

**4) Regolazione della piruvato chinasi (enzima terminale della glicolisi)** → questo enzima è regolato dalla fosforilazione, quindi ne esistono due forme: una fosforilata (inattiva) ed una defosforilata (attiva). L'attivazione del piruvato chinasi avviene quando la glicolisi è stimolata e si sta effettuando (quindi sotto l'azione dell'insulina), in questo caso il segnale dell'insulina attiva la **proteina fosfatasi** che defosforila il piruvato chinasi attivandolo, successivamente la piruvato chinasi catalizza la conversione del fosfoenolpiruvato in piruvato. Invece nel caso di inattivazione, il **segnale del glucagone** attiva la proteina chinasi PKA (cAMP dipendente) che a sua volta va a fosforilare l'enzima piruvato chinasi inattivandolo.

→ Quindi insulina e glucagone vanno a regolare due punti della glicolisi: 1) La PFK1 2) La piruvato chinasi

## Schema dettagliata della glicolisi ---->



## Glicogeno (Immagazzinamento nel fegato e nei muscoli):

Il glicogeno è un polimero che contiene legami **alfa 1-4** e anche ramificazioni con legami **alfa 1-6**.

il glicogeno presenta tantissime ramificazioni che permettano di aumentare i punti di attacco per gli enzimi per effettuare i processi di polimerizzazione e depolimerizzazione.

Il fegato accumula glicogeno in quantità inferiori rispetto al muscolo, ma con uno scopo diverso:

il fegato conserva quantità minore di glicogeno (280 kCal), mentre il muscolo conserva di più (480 kCal): però la quantità di glicogeno del fegato è disponibile per qualsiasi organo che ha bisogno di nutrirsi, mentre le 480 kcal del muscolo sono disponibili solo per lui, rimangono per nutrire il muscolo. Poi ci sono altre riserve energetiche: il grasso prevalentemente accumulato nel tessuto adiposo e poi le proteine endocellulari muscolari, che rappresentano una riserva di energia molto importante in condizioni di digiuno prolungato.

Di solito le colazioni sono zuccherine, 90% dei casi: con essa, infatti, si ricostituiscono le riserve di glicogeno epatico, dopo le circa 12 ore passate dalla cena alla colazione. Durante la mattina il livello di glicogeno scende per poi risalire dopo il pranzo: i livelli non si alzano tantissimo perciò il pranzo è da considerare il pasto meno importante. I livelli di glicogeno scendono ancora fino alla cena, che è un pasto abbastanza importante: c'è un'attivazione notevole dell'apertura del magazzino epatico e della sintesi del glicogeno epatico, che poi durante la notte scende e lo fa più di quanto non abbia fatto tra colazione e pranzo, e pranzo e cena (intervalli di 4-5 ore). Il fegato è definito un organo altruista perché distribuisce il glucosio: compie la glicogenolisi e distribuisce il glucosio ottenuto a tutti gli altri organi. Questo è fondamentale per alcune cellule e tessuti che dipendono quasi esclusivamente dal glucosio, come sistema nervoso e eritrociti. Il muscolo fa l'opposto: immagazzina il glicogeno e lo usa per sé stesso, in quanto il muscolo scheletrico serve per fronteggiare problemi di emergenza, e deve quindi avere subito l'energia a disposizione. Il muscolo fa un lavoro discontinuo, mentre nel fegato è continuo.

### Glicogenolisi (catabolismo del glicogeno)

la glicogenolisi è un processo che avviene nel fegato e nei muscoli. Nel fegato avviene quando l'organismo ha bisogno di glucosio e la glicemia del sangue è bassa. Nel muscolo si fa quando ho bisogno di energia per far contrarre il muscolo, questa energia viene fornita dal glucosio che viene liberato dal glicogeno tramite la glicogenolisi.

#### TAPPE DELLA GLICOGENOLISI:

Il glicogeno nel fegato o nel muscolo viene catalizzato dall'enzima **glicogeno fosforilasi** che agisce sui legami alfa 1-4. inanzitutto questo enzima fa entrare il fosfato inorganico, fosforilizzando il glicogeno; e taglia il legame glicosidico alfa 1-4 staccando una molecola di glucosio dall'**estremità non riducente** della catena di glicogeno. Per cui, si stacca un **glucosio-1-fosfato**. in questo modo il glicogeno fosforilasi stacca tutti i glucosio fino ad arrivare a 4 molecole di glucosio dalla ramificazione—l'enzima glicogeno fosforilasi, è piridossalfosfato dipendente: il piridossalfosfato deriva dalla vitamina B6, che deve essere assunta con la dieta. La vitamina viene modificata nel nostro organismo con fosforilazioni, diventando piridossalfosfato. Quindi carenze di piridossina, provocano carenze di piridossalfosfato che portano a deficienze del metabolismo del glicogeno. il piridossalfosfato è legato covalentemente ad una lisina dell'enzima glicogeno fosforilasi come gruppo prostetico, mediante la formazione di una base di Schiff.

Le ramificazioni del glicogeno hanno legami alfa 1-6, ma glicogeno fosforilasi agisce solo su legami alfa 1-4, quindi per poter degradare le ramificazioni interviene l'**enzima deramificante** che agisce a livello della ramificazione. il glicogeno fosforilasi stacca tutti i glucosio fino ad arrivare a 4 molecole di glucosio dalla ramificazione; poi interviene l'enzima deramificante che prende tre dei 4 glucosio che sono rimasti a livello della ramificazione, li stacca e li mette davanti alla prima unità dell'estremità non riducente della catena principale, così questi 3 glucosio vengono staccati dalla glicogeno fosforilasi, e a questo punto rimane solo il **glucosio che forma il legame alfa 1-6**: questo viene attaccato dall'enzima deramificante, che fa un'idrolisi: quindi il legame alfa 1-6 viene idrolizzato e rotto e così non rimane nulla della ramificazione. Il **glucosio-1-fosfato** è substrato di dell'enzima **fosfoglucomutasi**, che isomerizza il glucosio-1-fosfato a **glucosio-6-fosfato**.

### Destino del glucosio dopo la glicogenolisi:

**Glicogenolisi nel fegato**, Se la glicogenolisi avviene nel fegato; il glucosio-6-fosfato viene indirizzato ad uno di 2 possibili destini: **(1)** potrebbe fare il **ciclo dei pentoso fosfati** (il fegato lo fa spesso) oppure **(2)** può essere **defosforilato** da un enzima detto **glucosio-6-fosfato fosfatasi** (enzima espresso solo nel fegato e il rene in condizioni di digiuno prolungato). Quindi durante un digiuno prolungato, questo enzima defosforila il glucosio-6-fosfato così che esce come **glucosio libero** dall'epatocita, quindi permette al fegato di rialzare la glicemia. inoltre, il fegato viene aiutato dal rene, che inizia ad esprimere gli enzimi del processo gluconeogenico (processo con cui gli organi producono glucosio da precursori non saccaridici).

### Glicogenolisi dei muscoli:

Nei muscoli: il glucosio-1-fosfato, viene operato la fosfoglucomutasi con formazione del glucosio-6-fosfato; questo lo usa per se stesso, quindi il glucosio-6-fosfato procede come intermedio della **glicolisi**: viene convertito in piruvato e poi, se è presente nelle fibre bianche procede con la fermentazione producendo acido lattico, mentre nelle fibre rosse procede con la respirazione cellulare.

### -> Il fegato e/o il muscolo con il glucosio-6-fosfato possono fare 3 processi:

**Glicolisi**, per produrre lattato/piruvato a seconda che la cellula respiri o no, ma comunque fare un processo catabolico

**Glicogenosintesi**, per produrre glicogeno

**Via dei pentosi fosfati** (importante soprattutto nel fegato)

-> Prima di effettuare glicogenosintesi o glicolisi: se abbiamo alti livelli di glucosio nel sangue, questo glucosio entrerà nelle epatocite del fegato tramite il GLUT2, il glucosio attiverà il processo di glicogenosintesi. Il muscolo anch'esso, usando un trasportatore diverso detto GLUT4, inizia ad assorbire il glucosio attraverso il GLUT 4. Il GLUT4 è un trasportatore traslocabile sulla membrana sotto il controllo dell'insulina: il segnale iperglicemico stimola la secrezione dell'insulina dalle cellule  $\beta$  del pancreas. l'insulina stimola le cellule del muscolo che inizieranno ad esprimere i trasportatori GLUT4, che prima sono contenuti all'interno di vescicole, poi le membrane di queste vescicole si fondono con la membrana della cellula esponendo i trasportatori sulla superficie della membrana. La proteina GLUT4 quindi si colloca sulla membrana della cellula e fa entrare il glucosio. Il glucosio entra nel muscolo e inizia il processo glicolitico se ha bisogno di energia (ad esempio per la sua contrazione), oppure lo immagazzina sotto forma di glicogeno (che sarà solo per l'uso del muscolo).

## **Glicogenosintesi**

Il processo di biosintesi del glicogeno avviene nel fegato e nei muscoli, è una via anabolica che a partire dal glucosio porta alla formazione del glicogeno (polimero di riserva del glucosio). Questo processo avviene sempre quando la concentrazione di glucosio nel sangue è elevata (sopra la normoglicemia di 5 mM), e in questa situazione di iperglicemia l'eccesso del glucosio entra nel muscolo e in particolare nel fegato viene assorbito dai trasportatori **GLUT2** che sono a bassa affinità per il glucosio ma che cominciano a far entrare glucosio nelle cellule quando il glucosio è sopra la normoglicemia.

Quindi, il glucosio entra nell'epatocita attraverso i GLUT2 e nella cellula muscolare attraverso i GLUT4, poi il glucosio all'interno della cellula viene operato dall'enzima **esochinasi** che lo fosforila liberando un residuo ADP e producendo **glucosio-6-fosfato**, in modo da bloccarlo nella cellula. ~~(questo passaggio è comune anche alla glicolisi ma serve solo per bloccare il glucosio nella cellula)~~; a questo punto interviene l'enzima **fosfoglucomutasi** ~~(questo è lo stesso enzima che abbiamo incontrato nella glicogenolisi quando da glucosio-1-fosfato si passava a glucosio-6-fosfato)~~ che cambia la posizione del fosfato, passandosi da glucosio-6-fosfato a **glucosio-1-fosfato**.

Il glucosio-1-fosfato poi viene legato ad un nucleotide detto **UDP** attraverso una reazione operata dall'enzima **uridil transferasi**, che utilizza un UTP e catalizza esterificazione sul carbonio 1 del glucosio formando un legame n-glicosidico con l'UDP e si libera un gruppo pirofosfato.

Otteniamo così un **UDP-glucosio**, questo UDP associato al glucosio funge da marcatore per far identificare il glucosio per poter procedere nella biosintesi del glicogeno ed essere riconosciuto dall'**enzima glicogeno sintasi**. A questo punto, la formazione del glicogeno può iniziare, che inizia con l'aggiunta del UDP-glucosio ad un "priming" di glicogeno già rimasto da una glicogenolisi precedente (infatti il glicogeno è una molecola che **non viene mai degradata completamente**, ne rimane una piccola catena **\priming** che serve come base per poterci attaccare nuovi monomeri di glucosio).

\* A questa reazione se ne associa un'altra reazione catalizzata dall'enzima pirofosforilasi, che utilizza il pirofosfato per scinderlo in due molecole di fosfato inorganico. associare le due reazioni è un modo per spostare il  $\Delta G$  e la costante di equilibrio della prima reazione, per tirarlo verso il basso. **Se infatti il prodotto della prima reazione - il pirofosfato - lo si idrolizza continuamente, rimuovendolo appunto dai prodotti della prima reazione perché lo si converte come reagente della seconda reazione, di fatto si sposta la costante di equilibrio e dunque il  $\Delta G$  della prima reazione, velocizzandola (applicazione della legge di massa). Questo metodo viene utilizzato tutte le volte che un nucleotide viene idrolizzato a pirofosfato.**

L'aggiunta del glucosio-UDP al primer è catalizzata dall'enzima **glicogeno sintasi** che può formare solo legami  $\alpha(1-4)$ . Quindi l'enzima **glicogeno sintasi** aggiunge il **glucosio-UDP** all'estremità non riducente della catena del priming, creando un legame glicosidico  $\alpha(1-4)$ . Poi interviene l'**enzima ramificante** che sa formare legami glicosidici  $\alpha(1-6)$ . Tramite l'idrolisi di un legame  $\alpha(1\rightarrow4)$ , l'enzima ramificante stacca un frammento di 6 o 7 residui dalla catena lineare del polimero appena formato e attacca questo frammento sul gruppo OH del carbonio 6 di un glucosio nel polimero stesso in modo da formare la ramificazione. l'enzima ramificante introduce una ramificazione dopo ogni 8 - 12 residui nel polimero. il prodotto finale è quindi il **glicogeno** (polimero ramificato).

**l'enzima ramificante** in questo caso è detto: **amilo (1 $\rightarrow$ 4) a (1 $\rightarrow$ 6) transglicosilasi. (\*)**

l'enzima **glicogeno sintasi**, che è una sintasi (le sintasi non hanno bisogno di idrolisi di ATP e sono quindi reazioni esoergoniche). tuttavia, in parallelo c'è un sistema, chiamato **nucleoside difosfato chinasi**, che serve a spostare l'energia potenziale dall'ATP - all'UDP per sintetizzare **UTP**. I due processi sono paralleli, ma regolati in maniera molto diversa e catalizzati da enzimi diversi.

### La ramificazione del glicogeno ha un doppio ruolo:

- a) Aumentare il numero di estremità non riducenti dove si polimerizza/depolimerizza a seconda delle necessità della cellula (se serve glucosio si depolimerizza, se ce n'è in abbondanza si polimerizza).
- b) Aumentare nel glicogeno il numero di gruppi idrofilici che possono richiamare acqua, il che rende il glicogeno solubile nel citoplasma. Questo è un aspetto importante per poter accedere ai gruppi idrossilici e ai legami glicosidici quando dobbiamo polimerizzare o depolimerizzare.
- c) dai processi di biosintesi del glicogeno noi consumiamo continuamente UTP, quindi bisogna rifornire UTP per far continuare il processo: esiste l'enzima **nucleoside difosfato chinasi**, che rigenera UTP, quest'enzima (che fa questa reazione con l'UDP ma anche con tutti gli altri nucleotidi) prende un gruppo fosfato dall'ATP e lo trasferisce sull'UDP, rigenerando così l'UTP.

### l'enzima Glicogenina:

L'enzima glicogenina è una sostanza che funziona da priming di glicogeno dopo subire un digiuno prolungato. Infatti a causa di un digiuno prolungato, è ovvio che per poter sopravvivere, l'organismo ha utilizzato **tutte le riserve di glicogeno** che aveva immagazzinato per momenti di emergenza, per cui vengono consumati addirittura i priming del glicogeno. Di conseguenza, quando il digiuno viene interrotto e si ingerisce il cibo, si inizia nuovamente ad accumulare il glicogeno, ma a questo punto non esistono i priming perchè il glicogeno era consumato tutto durante il digiuno prolungato, quindi c'è bisogno di un **priming** che è appunto l'enzima glicogenina su cui la glicogeno sintasi può aggiungere le unità di glucosio. Questo permette al nostro organismo di sopportare situazioni di digiuno prolungato.

La glicogenina, esiste sia nel fegato che nel muscolo, ha una tirosina nel suo sito catalitico. La tirosina assomiglia strutturalmente al glucosio (ha una forma ad anello e ha un OH), il che permette di iniziare la polimerizzazione. La glicogenina è l'enzima che inizia la polimerizzazione, aggiunge prima un glucosio-UDP e continua ad aggiungere molecole di glucosio nel suo sito catalitico. Continua così per 4/5 unità, poi il glicogeno sintasi continua il lavoro da e comincia a polimerizzare formando legami a 1-4, poi interviene l'enzima ramificante che costruisce le ramificazioni a legami a 1-6, infine si forma il glicogeno.

Noi non siamo più abituati ai digiuni prolungati ed è **rarissimo** che oggi un essere umano vada incontro a ciò. In passato invece era molto frequente perché l'approvvigionamento di cibo dell'homo sapiens, nella sua condizione arboricola, era molto saltuaria e quindi erano frequenti lunghi periodi di digiuno. **Per questo il nostro metabolismo è abituato al digiuno**, abbiamo vari sistemi per abituarci. Oggi sono rari questi momenti di digiuno ma possono esistere e li sappiamo affrontare: noi siamo in grado di sopravvivere quasi due mesi senza mangiare attivando tutta una serie di percorsi: ormoni vengono richiamati a funzionare per garantire la sopravvivenza.

## Regolazione della glicogenolisi :

CHINASI = fosforila ; fosfatasi = defosforila

### 1) Regolazione del glicogeno fosforilasi:

il glicogeno fosforilasi è l'enzima che opera la glicogenolisi: fa rimozione del glucosio dal polimero glucogenico. La glicogeno fosforilasi può esistere in due forme: la forma attiva (**fosforilasi a**) e la forma inattiva (**fosforilasi b**). Queste due forme differiscono per una fosforilazione sulla serina 14. La fosforilazione è una modifica post traduzionale che determina l'attività di enzimi (attivare o inattivare). Quando siamo in situazione ipoglicemia o abbiamo fame, si attiva il glicogeno fosforilasi per svolgere la glicogenolisi. questo enzima è regolato tramite **2 tipi di regolazioni**: allosterica e ormonale.

**Regolazione allosterica del glicogeno fosforilasi:** l'enzima glicogeno fosforilasi riceve una regolazione positiva o negativa da molecole che vanno ad agire su un sito diverso da quello catalitico, determinando una regolazione allosterica. la **regolazione allosterica** è diversa nel muscolo e nel fegato perché questi organi hanno funzioni diversi. Nel fegato si ha una inibizione del glicogeno fosforilasi da **glucosio-6-fosfato**, **ATP** e **glucosio libero**. il glucosio-6-fosfato inibisce questo processo perché è segno che abbiamo una quantità sufficiente di esso quindi non si ha bisogno di attivare la glicogenolisi e estrarre più glucosio; anche l'ATP, se presente in grandi quantità vuol dire che non abbiamo bisogno di estrarre glucosio per produrre energia ATP. solo il fegato contiene glucosio libero perché ha un enzima, detto **glucosio-6-fosfato fosfatasi**, che agisce durante situazioni di ipoglicemia rimuovendo il fosfato dal glucosio in modo da poter rilasciarlo libero fuori dalla cellula, al fine di rialzare la glicemia. Se abbiamo abbastanza glucosio libero nelle epatocite, vuol dire che non abbiamo bisogno di estrarre molecole di glucosio dal glicogeno quindi si inattiva l'enzima della glicogenolisi (glicogeno fosforilasi).

Nel muscolo si ha un'inibizione da **glucosio-6-fosfato** e **ATP** come avviene nel fegato, ma non si inibisce dal glucosio libero, perché il glucosio libero non si trova nel muscolo (Infatti il muscolo possiede l'esochinasi II che è molto efficiente che lega un fosfato alla molecola di glucosio libero trasformandolo in glucosio-6-fosfato). Inoltre, nel muscolo il glicogeno fosforilasi, viene attivato da **ione calcio** e da **AMP**. Questo accade perché: **l'ione calcio** è indispensabile all'attività contrattile del muscolo che è attivata da uno stimolo nervoso: la placca motrice dà un segnale di contrazione e il reticolo sarcoplasmatico si svuota di calcio, il citoplasma della cellula muscolare percepisce il rialzo del calcio che stimola la contrazione. Però per contrarsi, ha bisogno di energia e di conseguenza ha bisogno di glucosio, e se questo è incorporato nel glicogeno è necessario liberarlo, quindi il rilazo del calcio per far avvenire la contrazione funge da attivatore del glicogeno fosforilasi che è l'enzima chiave della glicogenolisi.

L'**AMP** è un attivatore della contrazione muscolare, due motivi:

**i) Primo motivo:** ATP e AMP sono **inversamente** proporzionali da un punto di vista di concentrazione. Se in una cellula è presente tanto AMP questo vuol dire che l'ATP era idrolizzato e consumato, quindi c'è poco ATP; quindi ho bisogno di ottenere ATP per poter svolgere la contrazione, per cui si attiva il glicogeno sintasi che fa la glicogenosintesi da cui si formerà il glucosio che verrà utilizzato per produrre ATP.

**ii) secondo motivo:** esiste un enzima che sente l'AMP, chiamato **AMP-chinasi**.-Questo enzima interagisce con l'AMP, si attiva e va a fosforilare altri substrati, attivando il metabolismo. Di solito il segnale fa attivare tutti le vie cataboliche se la cellula è povera di ATP: glicolisi, lisi dei lipidi, lisi amminoacidi. A quel punto tutti i nutrienti vengono catabolizzati portando alla biosintesi dell'ATP.

**Regolazione ormonale del glicogeno fosforilasi** L'enzima glicogeno fosforilasi esiste in 2 forme: fosforilasi A (attivato fosforilato) e fosforilasi B (defosforilato inattivato).

gli ormoni che **attivano l'enzima glicogeno fosforilasi** sono: il **glucagone** e l'**adrenalina**. Questi danno segnali simili, ma sono delle risposte a situazioni fisiologiche diversi: il glucagone viene secreto durante un digiuno, e per cui quest'ormone stimola la liberazione delle riserve di energia interna (sia glicogeno che lipidi). Adrenalina, invece che è prodotto dal midollare del surrene viene secreto durante le situazioni di stress e paura, e agisce stimolando la liberazione di glucosio perché c'è bisogno di energia per affrontare lo stress.

in entrambi i casi (fame o stress) abbiamo bisogno di energia, quindi bisogna scindere il glicogeno, per cui il glicogeno fosforilasi viene attivato da entrambi gli ormoni-glucagone e adrenalina.

Questi due ormoni agiscono sul glicogeno fosforilasi mediante un altro elemento intracellulare detto **AMP ciclico** (cAMP) che è un secondo messaggero.

L'**AMP ciclico** È un adenosinmonofosfato particolare: (a differenza dell'AMP che ha un fosfato sul carbonio 5 del ribosio, il cAMP invece ha un legame ciclico complicato del fosfato tra i due carboni 5' e 3' del ribosio (3'5'adenosinmonofosfatociclico). questo è un legame non molto stabile, e grazie a questa instabilità, può svolgere il ruolo di secondo messaggero all'interno della cellula: siccome non è tanto stabile non dura tanto all'interno della cellula: dà un segnale a impulso e subito dopo viene degradato.

#### **Glucagone e adrenalina attivano il glicogeno fosforilasi:**

glucagone funziona prevalentemente nel fegato mentre adrenalina prevalentemente nel muscolo. Il **glucagone** e l'**adrenalina** hanno i propri recettori sulla membrana, il recettore manda un segnale che attiva un enzima chiamato **AMP ciclasi**, che sintetizza la **cAMP**, che va a interagire con una proteina chinasi regolatrice detta la **PKA** (proteina chinasi AMP ciclico-dipendente). la PKA è costituita da quattro subunità di cui 2 regolatrici e 2 catalitiche. Le sue subunità regolatrici sono inibitorie, e quando sono legate alle catalitiche, le catalitiche non funzionano; quando arriva cAMP, interagisce con le subunità regolatorie che si staccano dalle subunità catalitiche, le subunità catalitiche diventano attive e vanno a fosforilare il **glicogeno fosforilasi** trasformandolo dalla sua forma inattiva (fosforilasi B) alla sua forma attiva (fosforilasi A).

#### **L'insulina provoca l'inibizione del glicogeno fosforilasi:**

Durante l'iperglicemia o dopo mangiare un pasto ricco di carboidrati, i livelli di glucosio aumentano nel sangue, per cui viene entra in gioco l'ormone insulina che viene prodotto dalle cellule beta del pancreas e poi va ad agire nei tessuti in particolare nel fegato, dove l'insulina interagisce col suo recettore presente sulle epatocite attivando il meccanismo di trasduzione del segnale, di conseguenza attiva la **fosfatasi PP1** che agisce in modo opposto alla chinasi, e va a defosforilare il glicogeno fosforilasi trasformandolo nella sua forma inattiva (fosforilasi B). Quindi in questo modo l'insulina inattiva la glicogenolisi.

Quindi: **glucagone** e **adrenalina** attivano il **glicogeno fosforilasi**, l'**insulina** lo inibisce.

il **glucagone** e **adrenalina** inibiscono il **glicogeno sintasi**, l'**insulina** lo attiva.

## Regolazione della glicogenosintesi (regolazione del glicogeno sintasi):

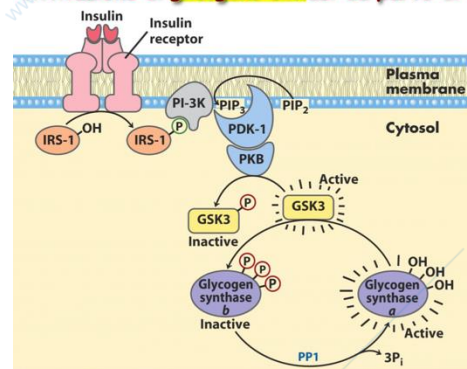
### i) Regolazione ormonale del glicogeno sintasi

la glicogeno sintasi esiste in 2 forme: A (attiva, defosforilata) e B (inattiva, fosforilata).

l'ormone **glucagone** e **adrenalina** provocano la fosforilazione del glicogeno sintasi convertendolo nella forma B inattiva, mentre l'**insulina** provoca la sua defosforilazione convertendolo nella forma A (attiva).

**Attivazione tramite insulina:** durante l'iperglicemia, l'insulina entra in gioco per abbassare e portare i livelli di glucosio alla normoglicemia, e lo fa stimolando le cellule ad assorbire il glucosio al loro interno per conservarlo sotto forma di glicogeno (attivando la glicogenosintesi). L'insulina prima viene rilasciato dalle cellule beta del pancreas, poi raggiunge le cellule epatiche e muscolari dove si lega ai suoi recettori presenti sulla membrana di queste cellule. il recettore dell'insulina è un recettore ad attività **tirosin chinasi**. il legame dell'insulina con il suo recettore innesca il meccanismo di trasduzione del segnale che mira a inattivare l'enzima **GSK3** che inibisce l'enzima **glicogeno sintasi** (l'enzima chiave di glicogenosintesi): l'enzima **GSK3** (glicogeno sintasi chinasi 3) è un enzima che fosforila l'enzima glicogeno sintasi in 3 posizioni inattivatrici. In risposta all'arrivo dell'insulina (per iperglicemia), viene innescato il meccanismo di trasduzione del segnale che porta alla fosforilazione e quindi inattivazione dell'enzima GSK3 da parte della proteina PKB, lasciando l'enzima glicogeno sintasi libero che verrà defosforilato per essere attivato: l'insulina induce la fosforilazione della proteina GM legata alla fosfatasi PP1 che avviene su un **sito di tirosina**, e determina l'attivazione della **fosfatasi PP1** che defosforila la glicogeno sintasi attivandola, stimolando la glicogenosintesi.

#### Attivazione di glicogeno sintasi da parte di insulina



1. Legame di Insulina - attivazione del recettore
2. Fosforilazione di IRS-1
3. Attivazione di PI-3K (legame di Tyr-P di IRS-1 al dominio SH2 di PI-3K)
4. Fosforilazione di PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub>
5. Legame di PIP<sub>3</sub> a PKB - attivazione di PKB (fosforilazione da parte di PDK-1)
6. Inattivazione di GSK3 (fosforilazione da parte di PKB) - aumento della sintesi di glicogeno

IRS-1: Insulin Receptor Substrate-1  
 PI-3K: fosfatidilinositolo 3-chinasi  
 PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositolo 4, 5-bifosfato  
 PIP<sub>3</sub>: fosfatidilinositolo 3, 4, 5-trifosfato  
 GSK3: glicogeno sintasi chinasi 3

L'inibizione del glicogeno sintasi tramite glucagone e adrenalina (Vedi ormone glucagone)

### ii) Regolazione allosterica:

**Glucosio-6-fosfato** opera una regolazione allosterica positiva dell'enzima glicogeno sintasi, quindi l'aumento del glucosio-6-fosfato aumenta l'attivazione della fosfatasi PP1 che a sua volta defosforila l'enzima glicogeno sintasi attivandolo.

la regolazione del glicogeno sintasi nel muscolo e fegato è la stessa, perchè la sintesi del glicogeno non differisce molto fra questi due, quello che differisce è il catabolismo, perché nel fegato darà luogo all'innalzamento della glicemia, nel muscolo servirà solo a alimentare il muscolo stesso utilizzando il glucosio derivato dal glicogeno per fornire energia.

**ci sono delle molecole in comune tra glicogeno sintasi e glicogeno fosforilasi:** ad esempio la proteina fosfatasi 1 (PP1), che agisce su entrambe in modi opposti. Questo perché a livello del fegato si forma un complesso in cui il glicogeno fosforilasi e il glicogeno sintasi sono legate tra loro dalla proteina fosfatasi 1, che può agire su l'una inibendola o sull'altra attivandola.

## Patologie di accumulo glicogeno

Sono patologie genetiche, dovute ad una mancanza di catabolismo del glicogeno, che verrà quindi accumulato.

Tipo 1(morbo di Von Gierke): carenza di glucosio 6 fosfatasi, importante per il ruolo del glucosio a valle della glicogenolisi, prima che esca dal fegato nel torrente circolatorio. Questo enzima fosforila il glucosio 6-fosfato in glucosio libero, che può uscire dal mezzo grazie al trasportatore; nel momento in cui non avviene la reazione, il glucosio 6-fosfato, che non è in grado di oltrepassare la membrana, viene accumulato. L'incremento della quantità di glucosio 6-fosfato, per la legge di massa, blocca tutte le reazioni a monte. Rimane, dunque, invariata la sorgente che va a produrre il glucosio 6-fosfato, accumulando così glicogeno. L'impossibilità di controllare la glicemia (ipoglicemia) influenza altri metabolismi:

- catabolismo dei nucleoti  $\Rightarrow$  II accumulo acido urico
- glicolitico  $\Rightarrow$  II acidemia lattica
- lipidico  $\Rightarrow$  II iperlipidemia

### **Fenomeni collaterali (non sono così importanti da essere disvitali):**

Tipo 2(morbo di Pompe): assenza 1-4 glucosidasi lisosomiale. Fenomeno collaterale che porta a patologie cardiocircolatorie, non blocca, infatti, tutto il processo glicolitico: questo sarebbe incompatibile con la vita.

Tipo 3(morbo di Cori): deficienza enzima deramificante

Tipo 4(morbo di Andersen): deficienza enzima ramificante

Tipo 5(morbo di Mc Ardle): assenza fosforilasi nel muscolo (ma nel fegato c'è)

## Gluconeogenesi (biosintesi di glucosio):

È il processo anabolico di sintesi del glucosio a partire da intermedi non glucidici, come quelli provenienti dalla glicolisi (lattato, piruvato o glicerolo e gli intermedi del ciclo di Krebs o scheletri carboniosi degli amminoacidi). Avviene in condizioni di digiuno o dopo uno sforzo fisico intenso, e il glucosio prodotto passa poi nel sangue per rifornire gli altri tessuti. Avviene principalmente **nel fegato** e in maniera minore nella corteccia surrenale. La gluconeogenesi parte per lo più dal **piruvato**, oppure dall'**ossalacetato** che può derivare a sua volta dal catabolismo dello scheletro carbonioso degli **amminoacidi glucochetici**, oppure dal **lattato** che deriva dalla fermentazione lattica nei muscoli.

### Precursori del glucosio (nella gluconeogenesi):

1) Il precursore classico del glucosio è il **piruvato**

2) esiste anche l'**alanina** (piruvato + gruppo amminico) che tramite il ciclo dell'alanina, viene portata dal muscolo scheletrico al fegato, dove può seguire 2 vie: la prima è la biosintesi del glucosio in cui il piruvato è usato per formare glucosio, la seconda è l'eliminazione del gruppo amminico che entra nel ciclo dell'urea.

3) **Lattato**: prodotto da organi che fanno glicolisi di tipo anaerobica e fermentazione lattica, poi è trasportato al fegato attraverso il sangue. Il lattato è il prodotto del **ciclo di Cori**. Se la gluconeogenesi parte dal lattato, il meccanismo cambia un po', viene svolta la **via del lattato** che è diversa dalla **via del piruvato**.

-> **il Ciclo di Cori**: è un processo ciclico che porta alla formazione di lattato, tramite "un lavoro" tra organi che usano glucosio e producono lattato ed organi che usano lattato per produrre glucosio. Il fegato riceve il lattato prodotto dal muscolo e dell'eritrocita e lo converte in glucosio rilasciandolo nel torrente circolatorio per raggiungere il muscolo che in caso di sforzi estremi può utilizzare il glucosio nella glicolisi e poi fermentazione lattica, producendo di nuovo il lattato. **È vero che la produzione di glucosio consumerà molta energia ma il fegato può supportare questo lavoro in quanto ha varie forme di nutrienti, a differenza del muscolo che ha bisogno di energia trasportata dal sangue per poter supportare l'attività contrattile.**

4) **Amminoacidi glucochetici**: attraverso la degradazione di alcuni amminoacidi possono dare origine a intermedi, come il triptofano, che produce piruvato che permette di sintetizzare glucosio, ~~ma produce anche Acetil-CoA che ovviamente non permette di fare glucosio glucochetici.~~

- **Gli amminoacidi si distinguono infatti in 2 gruppi: 1) glucochetici** (la maggior parte) **2) chetogenici**, che non sono in grado di supportare la gluconeogenesi, e si chiamano così perché supportano la biosintesi di chetoni, di corpi chetonici e sono pochissimi (soltanto due), gli altri sono glucochetici e supportano sempre la gluconeogenesi. In particolare durante un digiuno prolungato quando loro derivano dalla degradazione delle proteine muscolari che sono per noi uno stoccaggio, un magazzino che si usa 'ob torto collo' quando siamo in un digiuno prolungato, però sono un magazzino bello grande perché il muscolo è ampio rispetto al nostro peso.

**In generale noi non siamo in grado di sintetizzare il glucosio a partire da acidi grassi (Lipidi)**: Dalla degradazione di Gli acidi grassi a numero pari ottengo come unico intermedio l'Acetil-CoA, e da questo non si farà mai il glucosio. invece quando gli acidi grassi a numero dispari vengono degradati, l'ultimo gruppo di carboni che rimane è un gruppo di tre, e da questo si può ottenere glucosio ma succede raramente.

Il glucosio si può costruire solo e soltanto da **molecole a 3 atomi di carbonio**, non da molecole a solo **2 atomi di carbonio** (questo per quanto riguarda il uomo e gli animali, mentre le piante lo sanno fare anche da quelli che hanno un atomo di carbonio solo, anche dalla CO<sub>2</sub> fissando l'anidride carbonica e quindi le piante operano un tipo di metabolismo che noi non siamo in grado di fare).

## Fasi della gluconeogenesi:

Alcune reazioni della gluconeogenesi sono le reazioni reversibili della glicolisi, altre reazioni sono quelle di bypass (aggiramento). Nella gluconeogenesi si consumano 4 ATP e 2 GTP.

Partendo dal piruvato, la via anabolica è detta **via del piruvato**, le reazioni di gluconeogenesi sono:

**1) Aggiramento della piruvato chinasi:** è la prima fase della gluconeogenesi, avviene nella matrice mitocondriale, per cui il piruvato viene trasportato dal citosol al mitocondrio. **Consiste di 2 reazioni:**

**(i)** Nella prima reazione che è una reazione di carbossilazione biotina dipendente, in cui il piruvato viene convertito in **ossalacitato** dall'enzima **piruvato carbossilasi** presente nei mitocondri. Viene consumata una molecola di **ATP**. (( l'ossalacitato prodotto deve essere riportato dal mitocondrio al citosol dove deve continuare la gluconeogenesi, e per poter passare la membrana mitocondriale l'ossalacitato deve utilizzare il cosiddetto "**Sistema Navetta della via del piruvato**": inanzitutto, l'ossalacetato viene ridotto ad opera dell'enzima **malico deidrogenasi mitocondriale**, utilizzando un NADH mitocondriale, e così l'ossalacetato si trasforma in **malato**. il malato è considerato **l'ossalacetato+elettroni** e uscherà dal mitocondrio con un suo specifico trasportatore proteico. Una volta arriva l'ossalacetato nel citoplasma, l'enzima **malico deidrogenasi citosolico** ri ossida il malato trasformandolo nell'ossalacetato, e gli elettroni rilasciati riformano il NADH citosolico. A questo punto abbiamo **l'ossalacetato** nel citoplasma che continua nella via di gluconeogenesi. (è necessario l' NADH per poter proseguire la gluconeogenesi, come è necessario il NAD<sup>+</sup> nella glicolisi che porta alla formazione di NADH).



**ii)** nella seconda reazione l'**ossalacitato** viene convertito in **fosfoenolpiruvato** dall'enzima **fosfoenolpiruvato carbossichinasi**. Viene utilizzata una molecola di GTP. il fosfoenopiruvato ottenuto è una molecola ad alto potenziale di trasferimento energetico.

**\*\*2) REAZIONI REVERSIBILI:** a questo punto la gluconeogenesi prosegue svolgendo le reazioni reversibili di quelle della glicolisi: (quindi come substrato, dal **fosfoenolpiruvato** fino al **fruttosio 1,6-bifosfato**):  
 fosfoenolpiruvato → 2-fosfoglicerato → 3-fosfoglicerato → 1,3 bi-fosfoglicerato → gliceraldeide 3-fosfato → **fruttosio 1,6-bifosfato** che puoi subisce l'aggiramento della fosfofruttochinasi.

### **3) Aggiramento della fosfofruttochinasi:**

Questa reazione, a differenza della glicolisi in cui è catalizzata dalla fosfofruttochinasi, nella gluconeogenesi è catalizzata dalla **fruttosio 1,6-bifosfatasi**. il fruttosio 1,6-bifosfatasi defosforila il carbonio 1 del fruttosio 1,6-bifosfato convertendolo nel **fruttosio 6-fosfato** che puoi subisce una reazione reversibile della glicolisi:

**\*\*4) REAZIONE REVERSIBILE:** questa reazione è reversibile di una reazione della glicolisi. nella gluconeogenesi, il fruttosio 6-fosfato viene convertito in **glucosio 6-fosfato** tramite l'enzima **fosfoesoso isomerasi** (nella glicolisi questo enzima converte glucosio 6-fosfato in fruttosio 6-fosfato).

**5) Aggiramento dell'esochinasi:** è l'ultima fase che è un'idrolisi (tramite H<sub>2</sub>O) in cui il glucosio 6-fosfato viene defosforilato in **glucosio libero** ad opera dell'enzima **glucosio 6-fosfatasi**. Nel caso della glicolisi il substrato è catalizzato dalle esochinasi, che a spese d'ATP fosforilano il glucosio a glucosio 6-fosfato.

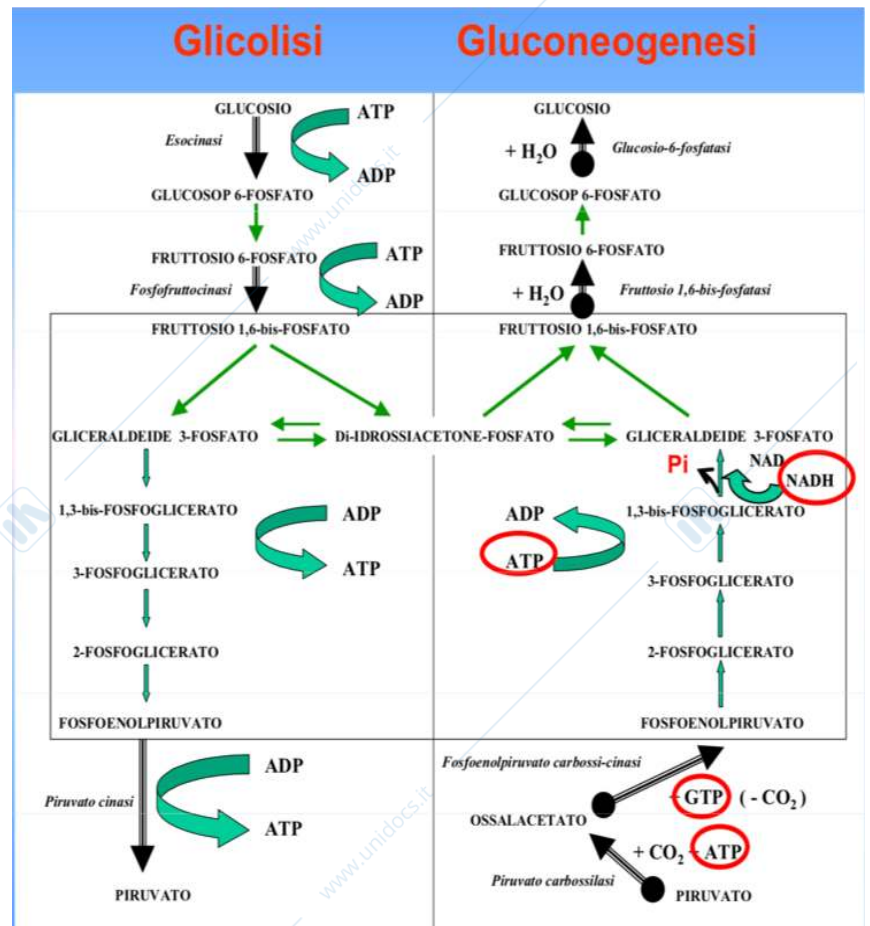
La molecola consente l'idrolisi del glucosio 6-P a glucosio libero che quindi può uscire il fosfato, la reazione non avviene nel citosol bensì nel reticolo endoplasmatico. Dal reticolo il glucosio libero passa nel citoplasma tramite un trasportatore che è intracellulare, poi il glucosio libero esce dalla cellula tramite il trasportatore GLUT2 (~~può essere usato anche per entrare ma ha bassa affinità~~). GLUT2 è anche il trasportatore tipico del fegato che garantisce a questo la possibilità di prendere il glucosio solo se supera i livelli di normoglicemia. **Solo GLUT2 consente la fuoriuscita**, mentre gli altri GLUT fanno solo entrare.

**VIA DEL LATTATO (Via di destra; ossalacetato si trasforma in fosfoenolpiruvato per poter uscire dal mitocondrio, NADH già formato nel citoplasma)**

Se la cellula compie il processo della gluconeogenesi a partire da LATTATO le cose cambiano. La prima reazione è la conversione di lattato in piruvato grazie ad un enzima, **lattico deidrogenasi** che prende il NAD<sup>+</sup> e lo converte in NADH (tutto questo però citosolico); e qua situazione cambia perché abbiamo ottenuto il NADH nel citoplasma da questa reazione quindi non c'è bisogno di rifornirlo dalla riduzione del piruvato nel mitocondrio. Il piruvato viene poi portato dentro il mitocondrio e convertito in ossalacetato che non viene ridotto a malato perché il NADH era già formato nel citoplasma, ma comunque l'ossalacetato deve in qualche modo uscire dal mitocondrio: in questo caso l'ossalacetato viene convertito in **fosfoenolpiruvato** dall'enzima **PEP Carbossichinasi Mitocondriale**.

**fosfoenolpiruvato** dall'enzima **PEP Carbossichinasi Mitocondriale**.

La cellula può quindi scegliere uno dei due percorsi (lattato o piruvato) a seconda che serve il NADH citosolico o no. Esistono degli enzimi che si chiamano **sirtuine** che percepiscono la quantità di NADH e che quindi regolano questo processo.



## Regolazione della gluconeogenesi

Insulina	inibisce
Glucagone	attiva
Acetil-CoA	attiva (attivatore allosterico della piruvato carbossilasi)
Fruttosio 2,6-bis-fosfato	inibisce (inibitore allosterico della fruttosio bis-fosfatasi)
Segnali metabolici ad alta energia	attivano
Segnali metabolici a bassa energia	inibiscono

### Regolazione della gluconeogenesi:

La gluconeogenesi e la glicolisi sono regolate reciprocamente: l'attivazione della glicolisi porta all'inibizione della gluconeogenesi e viceversa.

#### 1) Regolazione da Acetil-CoA

Se prendiamo il piruvato questo può essere convertito in ossalacetato e portare alla formazione di glucosio, ma

Il piruvato può anche andare incontro ad una decarbossilazione e formazione di Acetil-CoA che entra poi nel ciclo di Krebs fino a formare di ATP. Quindi il **piruvato** è un intermedio comune tra le due vie.

Quando la concentrazione di Acetil-CoA è elevata questo si accumula e questo vuol dire che abbiamo una ottima situazione energetica, e quindi non bisogna formare ATP, quindi in questo caso l'Acetil CoA funge da regolatore allosterico negativo della reazione di decarbossilazione del piruvato e di **regolatore allosterico positivo della piruvato carbossilasi della gluconeogenesi**, perchè la concentrazione alta di Acetil-CoA inibisce la trasformazione di ulteriori piruvati in Acetil-CoA (per il ciclo di Krebs) quindi rimarrà piruvato che sarà operato dall'enzima **piruvato carbossilasi della gluconeogenesi** che trasformerà il piruvato in ossalacetato.

#### 2) Regolazione del fruttosio 2,6-Bifosfato

Il fruttosio 2,6-bifosfato è una molecola regolatrice sia della glicolisi che della gluconeogenesi. Esso è un attivatore della glicolisi e un inibitore della gluconeogenesi.

la **presenza del fruttosio 2,6-bifosfato** permette la regolazione allosterica positiva dell'enzima PFK-1 che attiva la glicolisi fosforilando il fruttosio-6-fosfato in fruttosio 1,6-bifosfato, attivando quindi la glicolisi, il che porta logicamente **all'inibizione della gluconeogenesi**; e viceversa, l'**assenza** del fruttosio 2,6-bifosfato attiva e permette la gluconeogenesi in cui il fruttosio 1,6-bifosfatasi defosforila il fruttosio 1,6-bifosfato in fruttosio-6-fosfato.

**-Regolazione ormonale del fruttosio 2-6 Bifosfato:** Il livello di fruttosio 2-6 Bifosfato viene regolato dal sistema ormonale dipendente dal cAMP cioè dalla PROTEINA CHINASI cAMP-DIPENDENTE.

**Glucagone:** Se il glucagone dà il segnale, il livello di cAMP aumenta, il cAMP attiva la protein chinasi cAMP-dipendente che fosforila l'enzima **PFK-2: questo enzima ha due attività, una di fosforilazione (PFK-2 fosforilare il fruttosio in posizione 2), e una di defosforilazione (defosforilare il fruttosio in posizione 2).**

Quindi se il **glucagone** da il segnale (durante un digiuno, durante un bisogno della gluconeogenesi) questo enzima PFK-2 ha l'attività defosforilante quindi defosforila il fruttosio 2,6-bifosfato in posizione 2 che viene defosforilato e destrutturato, e quindi sotto lo stimolo di glucagone, avviene la fosforilazione e distruzione del fruttosio 2,6-bifosfato che è un regolatore positivo del PFK1 della glicolisi, per cui si inibisce la glicolisi e si attiva la gluconeogenesi.

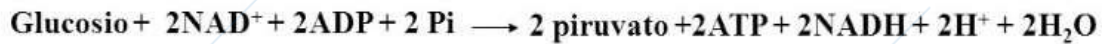
**Insulina:** Se viceversa il segnale che arriva è dell'insulina si avrà una defosforilazione dell'enzima PFK2 che quindi avrà PFK-2 con l'attività fosforilante, per cui si sintetizza il fruttosio 2,6-bifosfato che attiva il PFK1 che a sua volta attiva la glicolisi, e inattiva la gluconeogenesi.

## Respirazione cellulare

I prodotti finali della glicolisi sono 2 molecole di **piruvato** che deve proseguire in una delle due vie:

1) in presenza di Ossigeno: la **respirazione cellulare** e in questo caso il piruvato prima deve essere trasformato in Acetil-CoA che poi entra nel ciclo di krebs.

La glicolisi, riassunta in una singola reazione che racchiude tutte e 10 le reazioni che la compongono, è la seguente:



2) La seconda possibile via del piruvato è la **fermentazione**, che avviene nelle cellule ipossiche, cellule muscolari ad alta attività, nicchie staminali dove la pressione d'ossigeno è molto bassa.

### RESPIRAZIONE CELLULARE:

La respirazione cellulare è un processo di combustione in cui biomolecole provenienti dai nutrienti, come glucosio, acidi grassi, amminoacidi, vengono demoliti al fine di ottenere energia sotto forma di ATP. Quella fondamentale che avviene nel nostro organismo è la **respirazione cellulare aerobica** che avviene in presenza di ossigeno e mitocondri. Le fasi di respirazione cellulare sono 3: il **metabolismo intermedio** in cui avviene la formazione di Acetil-CoA, il **ciclo di Krebs** dove acetil-CoA viene ossidato a CO<sub>2</sub>, e la **fosforilazione ossidativa** (catena respiratoria) in cui elettroni vengono trasportati da coenzimi alla catena respiratoria e viene generato il gradiente protonico da cui si ottiene la maggior parte di ATP.

**La respirazione cellulare viene svolta in 3 fasi:**

1) **metabolismo intermedio** (formazione dell'Acetil-CoA)

2) **Ciclo di Krebs**

3) **Fosforilazione ossidativa**

#### 1) FASE I → **METABOLISMO INTERMEDIO: formazione dell'Acetil-CoA**

La prima fase è detta il metabolismo intermedio che avviene nel citosol delle cellule, e in cui si ha la produzione di **Acetil-CoA** (per esempio dalla decarbossilazione ossidativa del piruvato ad opera dell'enzima piruvato deidrogenasi, si produce Acetil-CoA). Le vie metaboliche che convergono in questa fase sono: glicolisi, il metabolismo lipidico, degli amminoacidi, del glicogeno, la via dei pentosi fosfati. In questa fase le molecole vengono parzialmente demolite attraverso una serie di reazioni, alcune di queste sono reazioni ossidative. Il substrato, si ossida, cede elettroni che vengono acquistati da un agente ossidante come NAD e FAD, e anche l'ossigeno che ha un potere ossidante forte da generare le specie reattive dell'ossigeno pericolose. ~~Per questo motivo l'ossigeno interviene solo nella terza e ultima fase della respirazione cellulare.~~ Gli agenti ossidanti che intervengono nel metabolismo intermedio e anche nel metabolismo terminale sono **coenzimi**, che vengono definiti **trasportatori di elettroni**; i più importanti sono il **NAD (nicotin-ammide adenin dinucleotide; forma ridotta NADH, forma ossidata NAD<sup>+</sup>)** e il **FAD (flavina adenin dinucleotide)**. Il **NAD** è una molecola *derivata dalla vitamina B3* che ha la capacità di legare un ione idruro H quindi da un substrato che viene ossidato in una reazione catalizzata da un enzima detto **deidrogenasi**,

vengono estratti due ioni idruro ( $2H^-$ ). Se il NAD e il FAD sono gli agenti ossidanti, questi prendono protoni e si riducono; in particolare il  $NAD^+$  si riduce a  $NADH + H^+$ , mentre il FAD si riduce a  $FADH_2$ . ~~Questi coenzimi intervengono anche nelle fasi successive, la II e la III.~~

## 2) FASE II → **METABOLISMO TERMINALE: Krebs (o Ciclo dell'acido critico).**

In questa fase i due atomi di carbonio dell'Acetil-CoA vengono completamente ossidati a  $CO_2$ . Durante questo ciclo vengono estratti moltissimi elettroni che vengono ceduti al NAD e al FAD, che si riducono in NADH e  $FADH_2$ , che verranno riossidati nell'ultima fase del metabolismo terminale, ovvero durante la respirazione cellulare: quindi il NADH, ossidandosi a  $NAD^+$  e elettroni, cederà i suoi elettroni nella catena respiratoria, che tramite molteplici passaggi, arriveranno finalmente all'ossigeno (l'accettore finale); l'ossigeno svolge il suo ruolo ossidante all'interno della catena respiratoria. Qui si genera una quota importante di energia che consentirà di produrre molecole di ATP.

Per subire il ciclo di Krebs della respirazione cellulare, e essere ossidato, il NADH deve entrare nel mitocondrio proprio dove avviene il ciclo di Krebs. La molecola di NADH non passa tutta ma solo i suoi elettroni si spostano dal citoplasma al mitocondrio e viceversa. **La membrana mitocondriale esterna è permeabile perché ha delle proteine che creano dei pori grandi che permettono il passaggio di metaboliti (non proteici) a basso peso molecolare senza ostacoli. invece la membrana mitocondriale interna è estremamente impermeabile, quindi i metaboliti che devono attraversarla devono utilizzare dei trasportatori di membrana specifici (proteine di trasporto).**

L'assenza di un sistema di trasporto per questo coenzima crea due tipi di NADH, **uno citosolico e uno mitocondriale**: il NADH non si trasporta, solo i suoi elettroni

-> **Il trasporto del NADH avviene con due sistemi che vengono detti shuttle del NADH:**

### 1. Navetta del malato aspartato

Il trasporto degli elettroni del NADH avviene mediante una ossidoriduzione nel citoplasma ed una ossidoriduzione nel mitocondrio.

Nel citoplasma è presente il NADH ridotto che deriva dalla glicolisi. L'enzima **malato deidrogenasi citosolica** (che è una ossidoriduttasi) fa una reazione di ossidoriduzione in cui un  $\alpha$ -chetoacido detto **ossalacetato** viene ridotto trasformandosi nel **malato**, e il NADH viene ossidato a  $NAD^+$  con perdita di due elettroni. **(La rigenerazione del  $NAD^+$  è indispensabile affinché la glicolisi possa continuare: infatti serve all'enzima glicolitico gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi che è un enzima NADH dipendente).** La riduzione dell'ossalacetato avviene a livello del carbonio in posizione  $\alpha$  (quello carbonilico più vicino alla parte più ossidata) quindi si passa da un carbonio chetonico dell'ossalacetato a un carbonio idrossilico nel **malato** (aggiungendo al gruppo chetonico due atomi di idrogeno provenienti proprio dal NADH). il malato è un  $\alpha$ -idrossiacido. Il malato (dotato degli elettroni del NADH) deve portare questi elettroni nel mitocondrio: il malato può attraversare la membrana mitocondriale interna grazie ad un cotrasportatore, un sistema di **antiporto**, che fa entrare il malato e uscire  **$\alpha$ -chetoglutarato**. A questo punto il malato si trova all'interno della matrice mitocondriale ed è il substrato di un altro enzima, **malato deidrogenasi mitocondriale** che lo ritrasforma in ossalacetato: il malato viene ossidato cedendo i suoi elettroni ad un NAD nel mitocondrio che prende questi elettroni e si trasforma nella sua forma ridotta (NADH), in questo modo abbiamo

"trasportato" il NADH all'interno del mitocondrio, e ora questo NADH essend all'interno della matrice mitocondriale potrà cedere i suoi elettroni nella catena respiratoria. Però l'ossalacetato prodotto deve essere riportato dal mitocondria al citosol, ma non esiste un trasportatore per l'ossalacetato all'interno della membrana mitocondriale interna, per risolvere questo problema, l'ossalacetato subisce una reazione di **TRANSAMINAZIONE**, in cui un gruppo amminico viene trasferito da una molecola donatrice (di solito un amminoacido) ad una molecola accettrice, un  $\alpha$ -chetoacido. L'ossalacetato è un  $\alpha$ -chetoacido, e quindi accetta un gruppo amminico da un amminoacido donatore che è l'**acido glutammico** o **glutammato** (a 5C, il suo carbonio  $\alpha$  porta il gruppo amminico). quindi l'acido glutammico cede il suo gruppo amminico trasformandosi nell' $\alpha$ -chetoacido corrispondente che è l' **$\alpha$ -chetoglutarato** (quello che usciva con l'antiporto di prima).

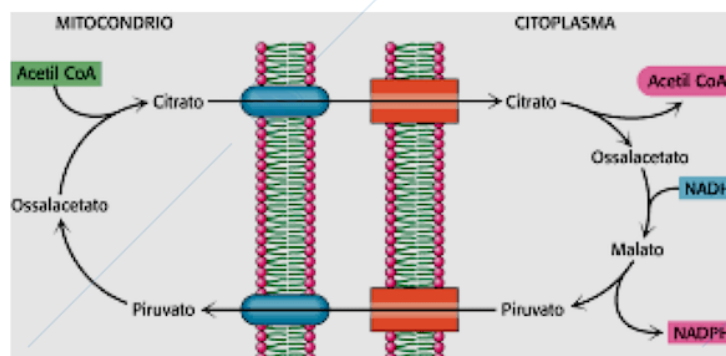
Questo gruppo amminico viene trasferito sul carbonio  $\alpha$  dell'ossalacetato, per cui l'ossalacetato si trasforma in un amminoacido detto **aspartato**.

(Il legame  $C=O$  dell'ossalacetato è diventato  $CHNH_3$  nell'aspartato). L'aspartato ottenuto può uscire dalla matrice mitocondriale grazie tramite **un sistema di antiporto**: un cotrasportatore che fa uscire aspartato e fa entrare glutammato.

Si può notare come le molecole di aspartato e glutammato siano molto simili: quello che cambia è la lunghezza della catena laterale poiché c'è un  $CH_2$  in più nel glutammato, che quindi possiede 5 atomi di carbonio, mentre l'aspartato ha 4C. Per analogia ossalacetato e  $\alpha$ -chetoglutarato sono molto simili: 4 atomi di carbonio nell'ossalacetato, 5 nell'  $\alpha$ -chetoglutarato che ha un  $CH_2$  in più; sono entrambi  $\alpha$ -chetoacidi.

Una volta che l'aspartato è tornato nel citosol, si ha una reazione di transaminazione (tra **aspartato** e  **$\alpha$ -chetoglutarato**) contraria a quella precedente: in questa reazione di transaminazione l'aspartato trasferisce il suo gruppo amminico all' $\alpha$ -chetoglutarato: per cui l'aspartato si trasforma nell'**ossalacetato**, e  $\alpha$ -chetoglutarato che accetta il gruppo amminico diventa **glutammato**. ~~Glutammato e  $\alpha$ -chetoglutarato passavano in antiporto attraverso i due trasportatori~~ → si chiude così il cerchio.

**Riassumendo:** Nel citosol ho riciclato NAD ossidato, che serve alla glicolisi per procedere; il NAD ridotto si è generato nella matrice mitocondriale, andrà a cedere gli elettroni all'ossigeno nella catena respiratoria, si formerà acqua e si genera NAD ossidato ( $NAD^+$ ) a livello della matrice.



## 2. Sistema Navetta del Glicerolo 3 fosfato (Riossidare il NADH citosolico per essere riutilizzato dalla glicolisi):

Questo sistema si basa su due enzimi: uno citosolico e uno sulla membrana mitocondriale. Questo sistema risolve il problema di riossidare il NADH citosolico: la glicolisi genera NAD ridotto e questo NAD ridotto deve essere riossidato, così da poter essere riutilizzato nella glicolisi. In questo sistema navetta l'enzima che riossida il NADH è la **glicerolo 3-fosfato deidrogenasi citosolica**: riduce (il coenzima che entra in gioco è il NAD ridotto, che è un riducente, quindi cede elettroni) il **diidrossiacetone fosfato** (che è la forma ossidata del diidrossiacetone), esso è uno zucchero che possiede un gruppo riducibile, il C=O, ~~presente anche nell'ossalacetato, nell'  $\alpha$ -chetoglutarato, nel piruvato.~~

Vi vengono legati due atomi di idrogeno provenienti dal NADH, e si forma **glicerolo 3-fosfato** (forma ridotta del diidrossiacetone fosfato)  $\rightarrow$  ~~C=O è diventato una funzione alcolica secondaria (CHOH) e si è il~~ NADH si ossida rigenerando il **NAD ossidato**. A questo punto abbiamo il **glicerolo 3-fosfato** che è substrato di un'altra **glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale** che non si trova nella matrice mitocondriale, ma è legato alla faccia esterna della membrana mitocondriale interna, quindi è accessibile per il glicerolo 3-fosfato. Questa **glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale**; che è **FAD dipendente**: utilizza come agente ossidante il FAD: ad opera di questo enzima, i due atomi di idrogeno presenti sul glicerolo 3-fosfato vengono presi dal FAD, che diventa **FADH<sub>2</sub>**; il glicerolo 3-fosfato torna così ad essere diidrossiacetone fosfato. Il FAD ridotto (FADH<sub>2</sub>) trasferisce i suoi elettroni alla catena respiratoria, in particolar modo ad un trasportatore, l'**ubichinone coenzima Q (CoQ)**, che prendendo questi due atomi di idrogeno, si riduce a **ubichinolo (QH<sub>2</sub>)**, che a sua volta cede gli elettroni al complesso III (poi  $\rightarrow$  al citocromo C  $\rightarrow$  al complesso IV e infine all'ossigeno che è l'accettore finale, formando H<sub>2</sub>O).

**Riassumendo:** abbiamo due sistemi navetta: il **sistema malato/aspartato** prende gli elettroni dal NAD ridotto citosolico e li trasferisce nella matrice mitocondriale sotto forma di NAD ridotto; invece il **sistema del glicerolo fosfato** prende gli elettroni dal NAD ridotto citosolico e li trasferisce all'interno del mitocondrio sotto forma di FAD ridotto. Quindi c'è una piccola differenza tra i due sistemi; dal FAD ridotto si ottiene un po' meno energia rispetto al NAD ridotto.

### **- DESTINO DEL PIRUVATO DOPO LA GLICOLISI:**

Oltre al NADH, il secondo prodotto della glicolisi è il **piruvato**, nel caso di respirazione cellulare in presenza di ossigeno, il piruvato subisce una reazione detta **decarbossilazione ossidativa** trasformandosi in **Acetil-CoA**. il substrato è il piruvato ( $\alpha$ -chetoadico a 3C), i prodotti della reazione sono l'**acetil-CoA** e una molecola di **CO<sub>2</sub>**. quindi il piruvato può essere trasformato in acetil-CoA ma questo processo avviene nel mitocondrio quindi il piruvato deve essere trasportato nella matrice mitocondriale. Questo avviene perché c'è un trasportatore specifico per il piruvato, che si trova sulla membrana mitocondriale interna  $\rightarrow$  Questo trasportatore fa sì che il piruvato entri nella matrice mitocondriale, dove il piruvato si trasforma in acetil-CoA tramite una reazione catalizzata da un **complesso multienzimatico** detto **complesso della piruvato deidrogenasi**. Un **complesso multienzimatico** è una struttura sovramolecolare in cui coesistono molteplici attività enzimatiche, più siti attivi, più coenzimi che partecipano a queste reazioni; grazie a questo complesso il substrato viene trasformato in prodotto che sarà il substrato della reazione successiva, senza che gli intermedi (che si formano durante questa trasformazione) abbiano la possibilità di liberarsi e di diffondere nel mezzo circostante. Quindi il vantaggio di un complesso multienzimatico: non c'è dispersione, viene massimizzata l'efficienza delle reazioni.

Anche nella biosintesi degli acidi grassi c'è un **complesso multienzimatico**, detto **complesso dell'acido grasso sintasi**.

Nel **complesso della Piruvato Deidrogenasi**, gli intermedi che si formano non si disperdono, quindi possono essere contenuti all'interno di questo complesso multienzimatico in modo da massimizzare la resa delle reazioni. Questa reazione, catalizzata dalla piruvato deidrogenasi, si svolge nel mitocondrio, nell'uomo avviene solo in presenza di ossigeno. In altri organismi possono essere presenti altri agenti ossidanti, come nitrato, solfato, ione ferrico; nell'uomo deve esserci ossigeno perché questa reazione ha bisogno di NAD ossidato. ~~come detto prima~~; i sistemi navetta trasportano gli elettroni sotto forma di NADH nella matrice mitocondriale e questo deve essere riossidato in NAD. Quindi quel NADH ridotto che arriva dalla glicolisi, o che arriva dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi deve essere riossidato nella catena respiratoria, che avviene solo e soltanto se è presente ossigeno.

Il piruvato viene trasformato in Acetil CoA tramite una reazione detta **Decarbossilazione Ossidativa del piruvato** catalizzata dal **complesso della piruvato deidrogenasi**: il substrato è il piruvato ( $\alpha$ -chetoacido a 3C), i prodotti della reazione sono due molecole di **acetil-CoA** e una molecola di **CO<sub>2</sub>** (dai 3 atomi di C del piruvato si passa ai 2 atomi C dell'acetil-CoA, e l'ultimo atomo di carbonio forma l'CO<sub>2</sub>, ~~che inizialmente era il gruppo carbossile del piruvato~~).

si chiama "decarbossilazione" perché il gruppo carbossile se ne va sotto forma di CO<sub>2</sub>, "ossidativa" perché il gruppo sottostante, che è un carbonile chetonico viene ossidato.

Il gruppo chetonico (C=O) presente nel piruvato è lo stesso dell'acetil-CoA, è sempre un C=O, però se si libera dall'acetil-CoA diventa un carbossile; l'acetil-CoA è un acetato attivato legato al coenzima A.

**Il Complesso della Piruvato Deidrogenasi** (presente anche in Escherichia Coli; un batterio gram negativo presente nell'intestino): \_\_\_\_\_

Il complesso del piruvato deidrogenasi è un complesso multienzimatico che trasforma il piruvato in **Acetil-CoA** mediante un processo irreversibile detto **decarbossilazione ossidativa del piruvato**. in questo modo si crea la **congiunzione** tra la glicolisi (che porta alla formazione di piruvato) e il ciclo di Krebs (che svolge l'ossidazione completa di atomi di carbonio dell'acetil-CoA).

Nel complesso del piruvato deidrogenasi si individuano **3 enzimi, 5 diversi coenzimi, e 2 proteine regolatrici**.

**\* i 3 enzimi (o componenti enzimatiche):**

- La componente **E1: Piruvato Deidrogenasi** (presente in 24 coppie)
- La componente **E2: Diidrolipoil Trans-acetilasi** (24 coppie)
- La componente **E3: Diidrolipoil Deidrogenasi** (12 coppie)

**\* i 5 coenzimi, che sono all'interno del complesso, sono:**

- 1) **TPP** (derivato dalla vitamina B1)
- 2) **lipoato** (acido che non deriva da una vitamina)
- 3) **coenzima A** sotto forma di **CoA-SH** (il coenzima A deriva dalla vitamina B5 o acido pantotenico).
- 4) **FAD** (flavin adenina dinucleotide- che deriva dalla vitamina B2)
- 5) **NAD+** -nicotinamide adenina dinucleotide- che deriva dalla vitamina PP).

**\* le 2 proteine regolatrici presenti nel complesso:**

- una **proteina chinasi**, che è in grado di fosforilare il complesso della piruvato deidrogenasi, inattivandolo.
- una **proteina fosfatasi**, che stacca i gruppi fosfato dalle proteine del complesso, ripristinando la forma defosforilata del complesso piruvato deidrogenasi, attivandolo.

**La componente E2 presenta:** un sito attivo, un dominio catalitico, un dominio di interazione con E1 ed E3, e ha anche **un braccio mobile**; a questo braccio è legata una molecola di acido lipoico ed è chiamato **Dominio Lipoilico**. È un braccio mobile perché è in grado di interagire con E1, con il sito attivo di E2 e poi con E3. Nei mammiferi i bracci mobili sono due e quindi ci sono **due molecole di piruvato**; ~~quella dei lieviti ne ha uno solo, quella di Escherichia Coli ne ha tre.~~ **Questo braccio mobile lega l'acido lipoico** → si ha la **catena polipeptidica del dominio lipoilico di E2, una catena laterale di Lys (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) al cui NH<sub>2</sub> è legata la molecola di lipoato** tramite un legame ammidico.

L'acido lipoico o **lipoato** presenta 8 atomi di carbonio e un gruppo carbossile. Nelle varie fasi del funzionamento del complesso della piruvato deidrogenasi, si possono osservare 3 forme dell'acido lipoico:

- o - **Forma ossidata:** con un ponte disolfuro (S-S) → è la forma fisiologicamente attiva all'inizio di tutto il funzionamento;
- o - **Forma ridotta:** con i due gruppi tiolici (-SH) sul C6 e C8;
- o - **Forma acetilata:** presenta un gruppo acetile (CO-CH<sub>3</sub>) legato con legame tioestere.

\* La parte importante è il piccolo gruppo tiolico **-SH**, tanto che il coenzima A viene rappresentato come CoA-SH. Questo gruppo funzionale tiolico serve ad **attivare i gruppi carbossilici di certi substrati**; per esempio, l'acetato, per essere metabolicamente attivo deve essere impegnato in un legame tioestere con un gruppo tiolico -SH.

Nell'uomo, la decarbossilazione ossidativa del piruvato è **irreversibile** (si va da piruvato ad acetil-CoA, non si va mai in senso contrario). Il  $\Delta G'^{\circ}$  è di -33.4 kJ/mol, quindi libera molta energia. L'irreversibilità di questa reazione è spiegata dal fatto che nei mammiferi non esiste un modo per sintetizzare piruvato (o altro intermedio della glicolisi) a partire da acetil-CoA. e questo sta alla base di una legge metabolica importante: nell'uomo **gli zuccheri possono essere trasformati in grassi, ma i grassi non possono essere trasformati in zuccheri**. Invece nei semi di germinazione delle piante, l'acetil-CoA può essere convertito in piruvato e quindi nelle piante l'acetil-CoA può essere trasformato in zuccheri, tramite un processo detto ciclo del gliossilato.

## DECARBOSSILAZIONE OSSIDATIVA DEL PIRUVATO

è un processo metabolico che avviene nel mitocondrio, e che converte il **piruvato** (prodotto dalla glicolisi) in **Acetil-CoenzimaA** che sarà il substrato del ciclo di Krebs.

Questo processo è catalizzato dal complesso della piruvato deidrogenasi che è costituito da **3 enzimi** presenti in copie molteplici:

- Enzima **1: Piruvato Deidrogenasi** (24 coppie)
- Enzima **2: Diidrolipoil Trans-acetilasi** (24 coppie); che contiene domini catalitici e un braccio mobile in cui è situata una molecola di acido lipoico legata a una lisina quindi **lipoil-lisina**.
- Enzima **E3: Diidrolipoil Deidrogenasi** (12 coppie); è FAD dipendente.

### Fasi della Decarbossilazione del piruvato:

#### **1. Piruvato + TPP → CO<sub>2</sub> + idrossietil-TPP**

Il piruvato è una molecola a tre atomi di carbonio, un'α-chetoacido, che entra in contatto con il sito attivo dell'E1 (**piruvato deidrogenasi**) dove avviene un trasferimento del gruppo acetile del piruvato (~~costituito dal 2° e 3° atomo di carbonio del piruvato~~) sul coenzima presente, che è la **tiamina pirofosfato (TPP)**. La TPP lega questo gruppo acetile sotto forma di gruppo idrossietilico, formando l'**idrossietil-TPP**, mentre il primo atomo di carbonio del piruvato viene rilasciato sotto forma di **CO<sub>2</sub>**. Dunque la molecola di piruvato ha perduto il suo gruppo carbossile sotto forma di anidride carbonica, ~~il frammento a due atomi di carbonio idrossietilico viene legato al livello della tiamina pirofosfato.~~ Questa è la tappa più lenta di tutto il ciclo.

#### **2. Idrossietil-TPP + lipoil-lisina (ox) → Acetil-lipoil-lisina** (lipoil-lisina + gruppo acetato\acetile)

L'idrossietil-TPP entra in contatto con il **braccio mobile dell'E2** contenente la molecola di **acido lipoico**. Quindi avviene un trasferimento del frammento idrossietilico sulla lipoil-lisina (che inizialmente si trova nella sua forma ossidata con il ponte disolfuro S-S). Nel momento in cui si ha questo trasferimento, il ponte disolfuro **si riduce** in quanto acquista elettroni (dal frammento idrossietilico), formando i gruppi tiolici -SH (~~e la lipoil lisina acquista la forma ridotta~~), mentre il frammento idrossietilico si ossida a **gruppo acetato** (~~acetile CO-CH<sub>3</sub>~~). Questa riduzione avviene a carico dell'idrossietile con trasformazione della funzione alcolica secondaria (CH<sub>2</sub>OH) in gruppo chetonico.

Il gruppo acetilico ottenuto si trova legato alla lipoil-lisina formando: **acetil-lipoil-lisina** (~~il lipoato è legato covalentemente a una catena laterale di lisina dell'enzima 2~~).

**A questo punto il braccio mobile si sposta dall'interfaccia con la componente E1, al sito catalitico della componente E2.**

#### **3. Formazione Acetil-coA: Gruppo Acetile + CoA-SH → Acetil-CoA + lipoato ridotto**

Il sito catalitico E2 è una transacetilasi (diidrolipoil transacetilasi). In E2 troviamo un sito di legame del CoA-SH, e il gruppo acetile viene trasferito dal lipoato al CoA-SH dando origine all'**Acetil-CoA** (acetil coenzima A) e **lipoato ridotto** (con due gruppi tioli -SH).

A questo punto la reazione non è terminata perché abbiamo il lipoato in forma ridotta con due gruppi SH: in queste condizioni il lipoato non è in grado di dare nuovamente inizio al ciclo perché, come visto inizialmente la forma attiva del lipoato è quella ossidata (con il ponte disolfuro S-S). **Quindi il lipoato deve essere riossidato.**

**\*(i) Ripristinazione del lipoato ossidato: Lipoato ridotto + FAD → lipoato ossidato + FADH<sub>2</sub>.**

l'ossidazione dei due SH del lipoato avviene ad opera del terzo enzima: **diidrolipoil-deidrogenasi**, che è FAD-dipendente (utilizza FAD come agente ossidante). I due atomi di idrogeno presenti sul lipoato ridotto vengono ceduti al FAD che si riduce diventando FADH<sub>2</sub>.

A questo punto l'acido lipoico torna alla forma ossidata, con il ponte disolfuro S-S.

~~In questa reazione si può notare che il braccio mobile si è di nuovo spostato, è passato dal sito attivo dell'enzima 2, all'interfaccia con l'enzima 3.~~

**\*(ii) FADH<sub>2</sub> + NAD → FAD + NADH + H<sup>+</sup>**

L'ultimo passaggio prevede che il FADH<sub>2</sub> viene riossidato grazie ad una molecola di NAD. Il NAD prende gli elettroni del FADH<sub>2</sub> che si ossida diventando FAD, e il NAD si riduce a: NADH + H<sup>+</sup>

## REGOLAZIONE DEL PIRUVATO DEIDROGENASI (PDH)

La piruvato deidrogenasi è il primo enzima del processo della decarbossilazione ossidativa del piruvato che mira a formare l'Acetil-CoA. E questo enzima è regolato a seconda delle necessità della cellula. Le modalità di regolazione sono due: allosterica e covalente

### Regolazione Allosterica

Per quanto riguarda la regolazione allosterica ci sono degli **effettori allosterici positivi** e **negativi**, cioè delle molecole che si legano a certi siti della piruvato deidrogenasi e inducono una modificazione conformazionale che determina un nuovo ritmo dell'attività del complesso.

#### Gli effettori allosterici POSITIVI della piruvato deidrogenasi sono:

- - **ADP e AMP** (L'Adenosin-monofosfato= è una molecola che indica stato energetico deficitario della cellula, quindi promuove l'attivazione di tutti i sistemi che producono energia sotto forma di ATP. Uno di questi sistemi attivati è proprio la piruvato deidrogenasi che trasforma il piruvato in acetil-CoA, che sarà il substrato del ciclo di Krebs (ovvero del metabolismo terminale del glucosio) che porta alla formazione di **tantissime molecole di ATP**.
- - **Cofattori:** come **Coenzima A** libero e **NAD**
- - **Ioni Ca<sup>2+</sup>:** Gli ioni calcio hanno un ruolo importante nel promuovere il metabolismo del glucosio, in più attivano diverse reazioni del ciclo di Krebs, quindi promuovono l'ossidazione del substrato (da parte della piruvato deidrogenasi).

#### Gli effettori allosterici NEGATIVI della piruvato deidrogenasi sono:

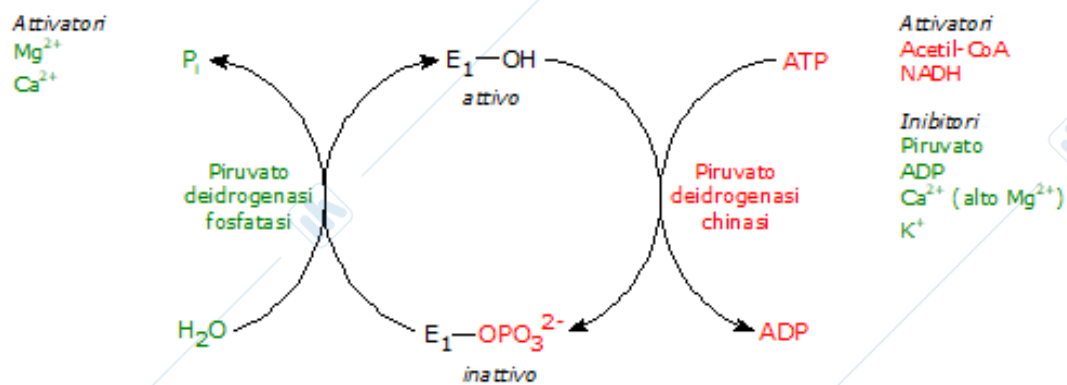
- - **ATP** che indica un'abbondanza energetica della cellula.
- - **Acetil-coA** e il **NADH** che sono due prodotti formati dal complesso della piruvato deidrogenasi (se aumentano provocano un feedback negativo sulla piruvato deidrogenasi stessa).
- - **Acidi grassi.** sono effettori allosterici negativi della piruvato deidrogenasi. Quando sono presenti nel mitocondrio significa che sono stati trasferiti al fine di metabolizzare, quindi di essere demoliti per ottenere proprio L'Acetil-CoA che entrerà nel ciclo di Krebs per produrre energia. Quindi se gli acidi grassi sono presenti nella cellula significa che avrò già Acetil-CoA a disposizione, quindi è inutile metabolizzare il piruvato, per cui si diminuisce il lavoro della piruvato deidrogenasi. \*\*\*Quasi tutte le cellule reagiscono così ad eccezione le cellule prive di mitocondri, e **le cellule del tessuto nervoso** perché non hanno accesso agli acidi grassi e quindi sono costrette a svolgere il metabolismo energetico a spesa del glucosio. Quindi ha senso che alcune cellule sanno usare gli acidi grassi per ottenere energia, così da preservare il glucosio per il tessuto nervoso.

## Regolazione covalente

il complesso della piruvato deidrogenasi oltre ad avere molte subunità catalitiche: 24 ( $\times 4$ ) subunità E1, 24 ( $\times 4$ ) subunità E2 e 12 subunità E3, contiene un'unità di **proteina-chinasi** e un'unità di **fosfoproteina-fosfatasi**; entrambe con una funzione regolatoria.

**La protein chinasi** viene attivata dall'ATP; quando questa chinasi si attiva, fosforila il complesso della piruvato deidrogenasi inibendo allostericamente l'attività del piruvato deidrogenasi.

**La fosfoproteina fosfatasi** invece è un enzima viene attivata quando i livelli di ATP sono bassi. Questo enzima fa l'opposto della protein chinasi: quindi defosforila il complesso della piruvato deidrogenasi, stacca i gruppi fosfato che erano legati covalentemente alle catene laterali di serina e treonina, attivando il complesso della piruvato deidrogenasi.



# CICLO DI KREBS

La respirazione cellulare si svolge in **3 fasi** che sono la **glicolisi** con formazione di piruvato ossidato per produrre acetil-CoA, il **ciclo di Krebs** dove acetil-CoA viene ossidato a  $\text{CO}_2$ , e la **fosforilazione ossidativa** (catena respiratoria) in cui elettroni e protoni vengono trasportati da coenzimi.

Il **ciclo di krebs** è un processo metabolico fondamentale che avviene in presenza di ossigeno. È una tappa del processo della respirazione cellulare svolto dagli organismi aerobici per produrre energia chimica sotto forma di ATP.

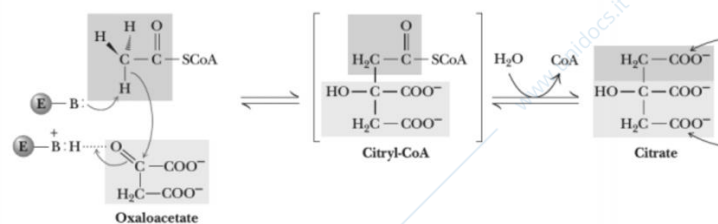
Il ciclo di krebs è un processo ciclico di **8 reazioni** che avviene nella matrice mitocondriale, e utilizza l'**Acetil-CoA**

proveniente dalla decarbossilazione ossidativa del piruvato oppure dalla beta ossidazione degli acidi grassi o anche dal catabolismo delle proteine. Nel ciclo di Krebs la molecola di Acetil-CoA viene ossidata infine in due molecole di  $\text{CO}_2$ . È un processo che ci consente di legare vie cataboliche a vie anaboliche.

## 1° reazione

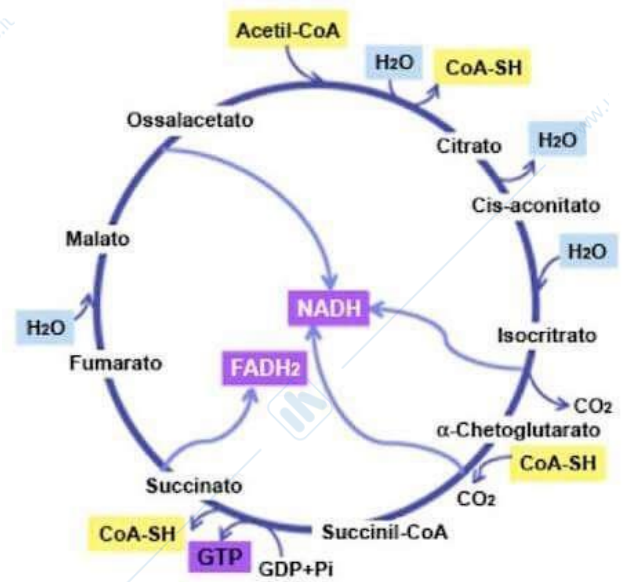
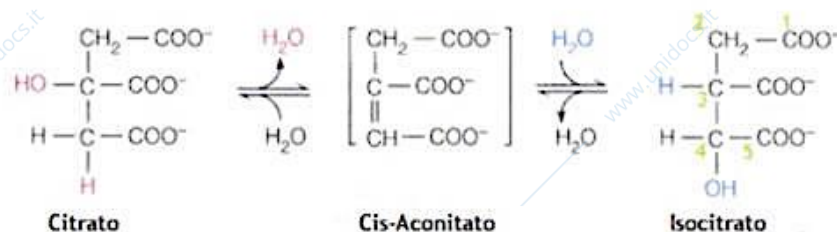
È una reazione di condensazione dell'**acetil-CoA** con l'**ossalacetato**, catalizzata dall'enzima allosterico detto **citrato sintasi**. L'enzima inizialmente causa una deprotonazione del gruppo del metile dell'Acetil-CoA il cui carbonio va ad attaccare il carbonio carbonilico dell'ossalacetato formando l'intermedio **Citril-CoA**, successivamente il **legame tioestere -S-** dell'Acetil-CoA viene idrolizzato e rotto, liberando **CoA** e portando alla formazione del **citrato** che è un acido tricarbossilico.

È una reazione esoergonica irreversibile. L'energia viene fornita dalla rottura del legame tioestere stesso



## 2° reazione

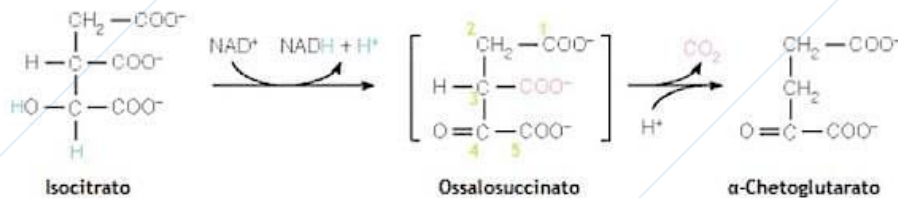
È catalizzata da un'isomerasi detto **aconitasi** che catalizza una reazione di isomerizzazione reversibile del **citrato**: ad azione dell'aconitasi, il citrato inizialmente si trasforma nell'intermedio **cis-aconitato**, perdendo un H e un gruppo OH, sottoforma di una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$ , poi viene riaddizionata una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  che si attacca questa volta su un atomo di carbonio diverso da quello di partenza, proprio per formare lo stereoisomero. Quindi l'intermedio **cis-aconitato** riottiene il gruppo OH e H trasformandosi in **Isocitrato** (isomero del citrato).



### 3° reazione

Ad opera dell'enzima **isocitrato deidrogenasi** che utilizza il coenzima  $\text{NAD}^+$ , si ha la decarbossilazione ossidativa dell'**isocitrato** a **alfa-chetoglutarato** eliminando la **prima molecola di  $\text{CO}_2$**  e liberando  $\text{NADH}$ . Il carbonio della molecola di  $\text{CO}_2$  liberata non appartiene all'acetil-CoA di partenza, ma all'ossalacetato.

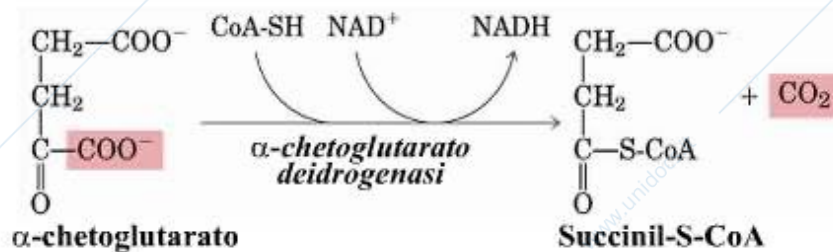
Come intermedio si forma l'ossalosuccinato, che si forma dall'ossidazione liberando la molecola di  $\text{NADH}$ , e una volta perde la molecola di  $\text{CO}_2$ , si trasforma in alfa-chetoglutarato.



### 4° reazione

Ad opera dell'enzima, **alfa-chetoglutarato deidrogenasi**, utilizzando il coenzima  $\text{NAD}^+$ , si ha una seconda decarbossilazione ossidativa in cui l'alfa chetoglutarato viene trasformato in **succinil-CoA** con liberazione della **seconda molecola di  $\text{CO}_2$**  e si forma  $\text{NADH}$ .

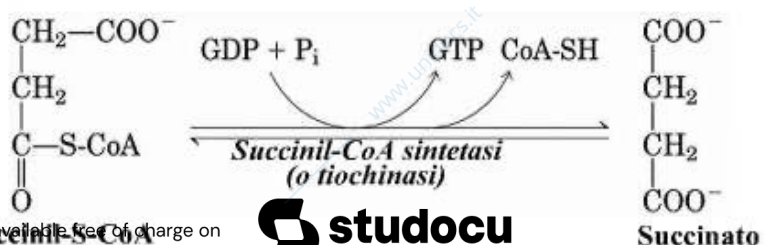
Questa reazione è catalizzata da un complesso mutienzimatico molto simile alla piruvato deidrogenasi, costituito da 3 enzimi e 5 cofattori.



### 5° reazione

In questa reazione **si ha un guadagno di GTP**: interviene l'enzima **succinil-CoA sintetasi** (tiochinasi) che catalizza la scissione del legame tioestere da cui si libera energia che viene utilizzata per formare una molecola di **GTP** a partire da **GDP** e fosfato, cioè dal legame tioestere si libera energia che viene immagazzinata nel legame fosfoanidridico del GTP, inoltre viene rilasciato  $\text{CoA-SH}$  e si forma il **succinato**. Questa reazione è un esempio di fosforilazione a livello del substrato. (altri due esempi sono nella glicolisi).

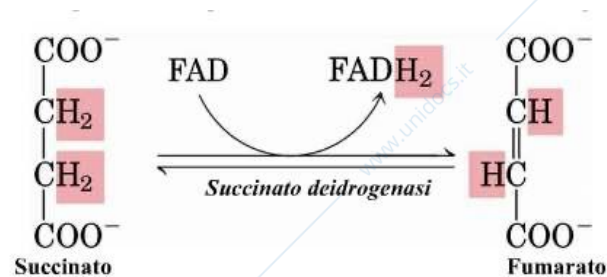
In questa reazione, c'è una fase intermedia in cui un residuo di **istidina**, presente nel sito attivo dell'enzima, che diventa fosforilato e si forma succinato, infine entra il **GDP**, l'enzima catalizza il trasferimento del gruppo fosfato a formare **GTP**.



## 6° reazione

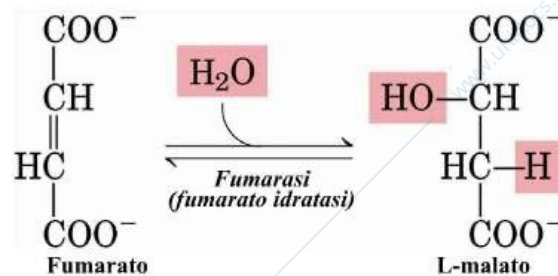
Attraverso una reazione di deidrogenazione stereospecifica catalizzata dall'enzima **succinato deidrogenasi** che è FAD-dipendente, il succinato viene trasformato in **fumarato**. Gli elettroni vengono ceduti dal succinato al coenzima FAD che si riduce in FADH<sub>2</sub>.

La succinato deidrogenasi è il complesso 2 della catena respiratoria, è l'unico enzima del ciclo situato internamente sulla membrana mitocondriale interna, poiché esso è insolubile nella matrice mitocondriale. Il coenzima è quindi immobile e dunque svantaggiato dall'incapacità di movimento, nella cessione degli elettroni. In questo è utile la localizzazione del complesso, infatti, è il coenzima Q (ubichinone) a riossidare nuovamente il FAD permettendo un riciclo del complesso.  $\Delta G'^{\circ} = 0$  kJ/mol.



## 7° reazione

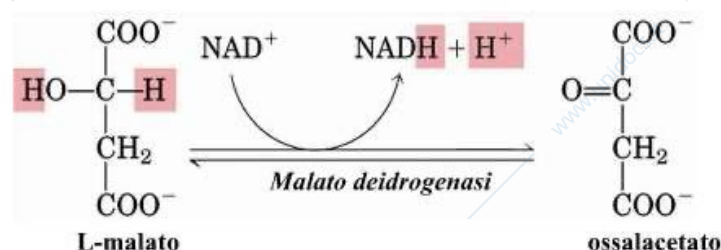
Ad opera dell'enzima **fumarato idratasi** e introducendo una molecola di acqua, il fumarato va incontro a idratazione reversibile diventando **L-malato**. Anche in questo caso l'enzima è stereospecifico. la reazione è reversibile.

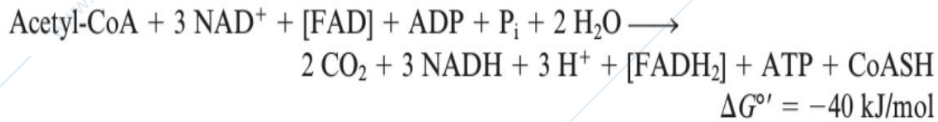


## 8° reazione

Nell'ultima reazione, l'enzima **malato deidrogenasi mitocondriale** NAD dipendente catalizza l'ossidazione del malato ad **ossalacetato**, e si ha la formazione della terza e ultima molecola di NADH.

Abbiamo ottenuto l'ossalacetato che può interagire con una nuova molecola di Acetil-CoA facendo partire un altro ciclo di Krebs, e così via.



**REAZIONE NETTA:**

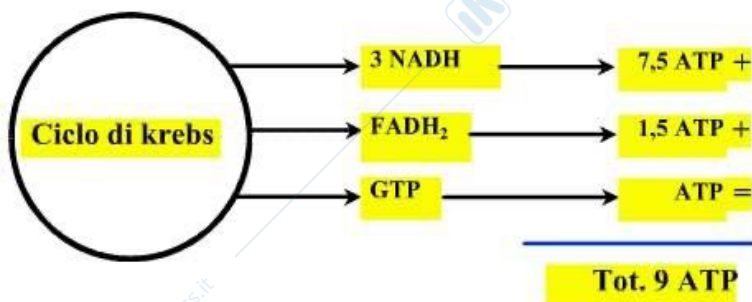
L'Acetil-CoA viene ossidato a due CO<sub>2</sub>, gli elettroni persi vengono utilizzati per ridurre **3 molecole di NADH**, **1 molecola di FADH<sub>2</sub>** e **1 molecola di GTP** convertibile in ATP. La reazione netta mi restituisce un  $\Delta G^{\circ'} = -40 \text{ kJ/mol}$  totale, la via metabolica è fortemente spontanea. **(DA CONTINUARE NELLA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA)**

**BILANCIO**

Nel ciclo è entrato un gruppo acetilico con due atomi di carbonio che si è combinato all'ossalacetato. I due atomi di carbonio sono poi usciti dal ciclo sotto forma di due molecole di CO<sub>2</sub> dall'ossidazione prima dell'isocitrato e poi dell'alfa chetoglutarato. L'energia ricavata da queste ossidazioni è stata conservata mediante la riduzione di 3 molecole NAD<sup>+</sup> e una di FAD e una molecola di GTP o ATP.

E alla fine del ciclo è stata rigenerata una molecola di ossalacetato.

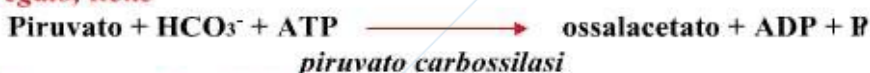
Il ciclo produce di per 1 molecola di ATP per giro, ma **nelle reazioni di ossidazione che avvengono nel ciclo sono liberati molti elettroni trasferiti poi al NADH e FADH<sub>2</sub> alla catena respiratoria determinando poi un gran numero di molecole di ATP durante la fosforilazione ossidativa.**



Il ciclo di krebs è una via anfibolica, serve cioè sia ai processi anabolici sia a quelli catabolici.

Non soltanto infatti agisce nel catabolismo di carboidrati amminoacidi e acidi grassi, ma produce anche i precursori per molte vie biosintetiche. Es: Chetoglutarato e ossalacetato vengono ottenuti da ciclo di krebs per la biosintesi di amminoacidi.

Quando al ciclo di krebs vengono sottratti intermedi da utilizzare come precursori in altre vie, vengono rimpiazzati attraverso reazioni anaplerotiche. Tra le più importanti:

**Fegato, Rene****Cuore, muscolo scheletrico**

## REGOLAZIONE DEL CICLO DI KREBS:

La regolazione della velocità del ciclo di Krebs è molto influente, da esso dipende gran parte dell'attività della cellula e la sua disponibilità energetica. Come gran parte delle vie metaboliche cellulari, dunque anch'esso è soggetto a una regolazione. La regolazione può dipendere da vari fattori, quali condizioni esogene, enzimi di controllo, inibizione degli enzimi direttamente coinvolti nella via, disponibilità del substrato. Il ciclo di Krebs dipende principalmente da:

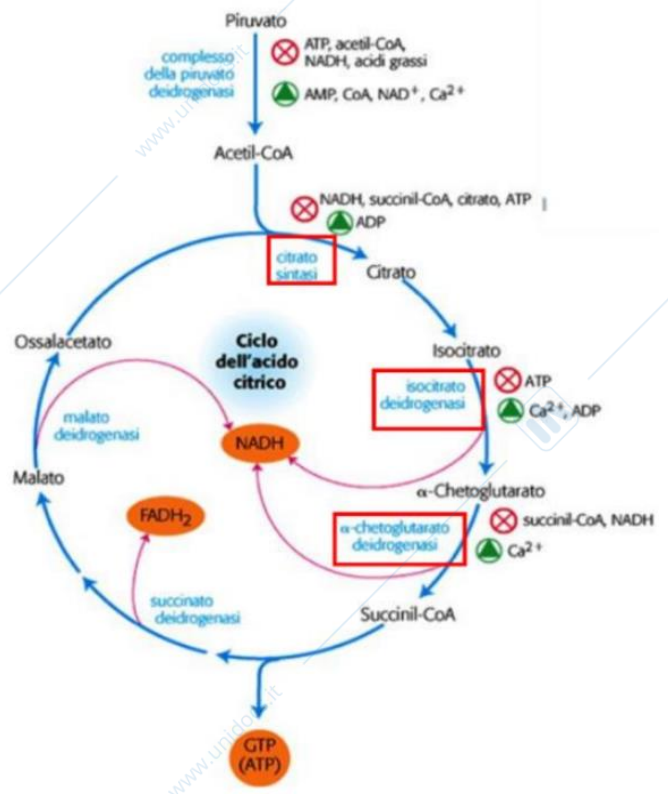
1. **Disponibilità del substrato:** regolando la disponibilità del substrato primario, l'Acetil-CoA, si può regolare la velocità dell'intero ciclo.
2. **Disponibilità di intermedi:** questo ci suggerisce che il ciclo di Krebs è un ciclo aperto. Dalla disponibilità degli intermedi i quali possono essere sottratti o inseriti nel ciclo. Quando questi vengono sottratti la resa e la velocità sarà comprensibilmente più bassa, come, contrariamente, aggiungendo intermedi sarà più alta. Si è descritto il ciclo, approssimandolo, come una serie di otto reazioni seriali, catalizzate da otto enzimi specifici, la realtà è molto più complessa. Il ciclo è dunque dipendente da più enzimi intermedi qua descritti, i quali possono, come già affermato, sottratti o addizionati, influenzando la resa complessiva della reazione.
3. **Dipendenza dal potenziale energetica:** parlando di dipendenza dal potenziale energetico si fa riferimento a due rapporti di concentrazione, dai quali dipendono molte vie metaboliche regolate dalla cellula.  $\frac{[NADH]}{[NAD^+]}$  e  $\frac{[ATP]}{[ADP]+[AMP]}$ . Il primo corrisponde al rapporto tra coenzima ridotto e lo stesso coenzima in forma ossidata, maggiore è il rapporto, ovvero maggiore è la quantità di coenzima ridotto, tanto meno la cellula sarà "sazia di energia", e dunque la velocità del ciclo sarà limitata. Il secondo rapporto si basa sullo stesso principio prendendo in esame, ovviamente, altri fattori quali ATP e le sue forme defosforilate.

Questi rapporti regolano la velocità del ciclo, è quindi opportuno capire come riescano effettivamente a influire su quest'ultimo. Le variazioni di concentrazione vengono risentite da tre enzimi, già affrontati, del ciclo. Questi tre enzimi sono:

1. **citrato sintasi**
2. **isocitrato deidrogenasi**
3.  **$\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi**

Sono enzimi la cui velocità è limitante quella del ciclo: sono enzimi più lenti che danno la velocità a tutta la via e possiamo quindi regolare tutto il ciclo agendo su di loro. Le reazioni regolate devono inoltre essere irreversibili e produrre un intermedio unico nella via.

La loro attività "detta", grazie al sistema a catena della via, la velocità complessiva. Nella figura si possono osservare gli inibitori (X) e gli attivatori (Δ). Notiamo più di due rapporti, come ad esempio  $\frac{[Succinil-CoA]}{[CoA]}$ . Questi, seppur importanti e da tener in considerazione, sono comunque meno influenti dal punto di vista regolatorio, in confronto ai sopracitati.



Reaction	Enzyme	$\Delta G^{\circ\prime}$ (kJ · mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ · mol <sup>-1</sup> )
1	Citrate synthase	-31.5	Negative
2	Aconitase	~5	~0
3	Isocitrate dehydrogenase	-21	Negative
4	$\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex	-33	Negative
5	Succinyl-CoA synthetase	-2.1	~0
6	Succinate dehydrogenase	+6	~0
7	Fumarase	-3.4	~0
8	Malate dehydrogenase	+29.7	~0

Per rimarcare la differenza tra il  $\Delta G^{\circ\prime}$  standard e il  $\Delta G$ : Osservando queste otto reazioni e come variano i  $\Delta G^{\circ\prime}$  in condizioni standard (reagenti a concentrazione 1M, eccetto H<sup>+</sup>), possiamo notare che:

- i primi tre enzimi hanno un  $\Delta G^{\circ\prime}$  standard decisamente negativo;

- la malato deidrogenasi ha un  $\Delta G$  enormemente positivo.

È stata fatta per alcuni di questi enzimi la stima più accurata possibile del vero  $\Delta G$  in condizioni fisiologiche, in vivo, ed è stato dimostrato che tutti gli enzimi sono di fatto all'equilibrio, ovvero hanno un  $\Delta G \approx 0$  (solo tre enzimi lo presentano molto negativo).

Se sono presenti valori strani del  $\Delta G^{\circ\prime}$  è perché è in condizioni standard. Quando prodotti e reagenti sono in vitro, la cosa assume un senso.

Quindi, l'analisi del valore del  $\Delta G^{\circ\prime}$  ci fornisce valori per la tendenza alla spontaneità, poi in vivo in condizioni effettive di concentrazione dei substrati e prodotti

intracellulari, sono sostanzialmente diverse dalle concentrazioni standard. Infatti, non c'è mai la concentrazione 1M in vivo e quindi si può avere anche valori diversi.

La verità ce la dice il  $\Delta G$  e non  $\Delta G^{\circ\prime}$  che ci dice solo la "tendenza", o meglio, ci fornisce il valore del  $\Delta G$  solo in condizioni standard.

Gli step irreversibili sono quelli di controllo e sono tutti regolati da enzimi esclusivi del ciclo di Krebs:

citrato sintasi

isocitrato sintasi

$\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi

### REGOLAZIONE DEL CICLO DI KREBS

Le regolazioni reversibili post-traduzionali sono le fosforilazioni (enzima viene fosforilato e si attiva o si inibisce).

Nel caso del ciclo di Krebs, tutti gli enzimi coinvolti, e soprattutto quelli mitocondriali sono regolati.

Sono regolati attraverso **acetilazione** e **deacetilazione** reversibile.

Gli enzimi vengono:

- acetilati da acetilasi

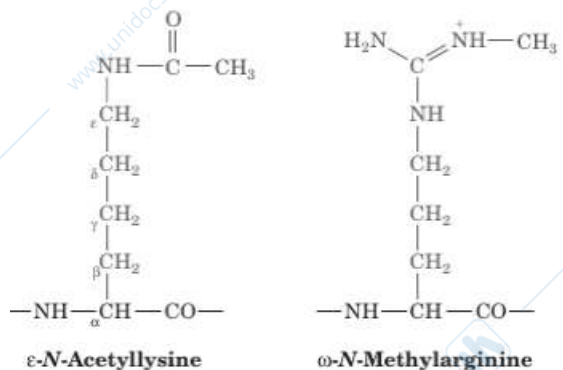
- deacetilati da deacetilasi

Es.) enzima della classe delle **sirtuine**, che regolano lo stato di acetilazione e l'attività degli enzimi mitocondriali.

È un meccanismo di regolazione degli enzimi metabolici sconosciuto fino a 10 anni fa, che può attivare o inibire.

Le sirtuine sono delle deacetilasi e hanno a che vedere con le

disregolazioni metaboliche che accompagnano le neoplasie: le disregolazioni di enzimi di regolazione del ciclo di Krebs, si ritrovano correlate a fenotipi alterati.



## CICLO DEL GLIOSSILATO

Avviene nelle **piante**, che utilizzano **Acetil-CoA** per sintetizzare **glucosio**

**Negli animali** il mondo dei carboidrati e dei lipidi sono separati dalla barriera costituita dalla reazione irreversibile della piruvato deidrogenasi, per cui

**Negli animali**, si può convertire carboidrati in lipidi, ma **non** si può convertire da lipidi in carboidrati.

Le piante invece in grado di convertire riserve lipidiche in intermedi che possono essere utilizzati per la sintesi dei carboidrati.

il Ciclo del gliossilato avviene in una particolare fase del ciclo vitale delle piante: germinazione di semi, che hanno bisogno di energia ma che non possono svolgere la fotosintesi: i semi quindi utilizzano i loro lipidi che hanno al loro interno e li convertono in carboidrati. Questo processo avviene in organuli speciali detti **gliossisomi**, che si trovano nelle cellule vegetali in fase di germinazione.

All'interno del Ciclo del Gliossilato sono presenti enzimi simili un po' a quelli del Ciclo di Krebs.

Inanzitutto le riserve lipidiche sotto forma di trigliceridi vengono scissi in acidi grassi e glicerolo. gli acidi grassi vengono successivamente degradati nella beta ossidazione formando **l'Acetil-CoA**, che è il substrato di partenza del ciclo del gliossilato.

Quindi si parte dall'**Acetil-CoA** proveniente dal catabolismo degli acidi grassi. La prima reazione è catalizzata dall'enzima **citrato sintasi** che fa reagire l'Acetil-CoA con l'ossalacetato formando il **citrato**.

Il citrato ad opera di un enzima isomerasi (**aconitasi**) viene convertito in **isocitrato** (6C), attraverso **la stessa reazione che avviene nel Ciclo di Krebs**. Poi, un enzima esclusivo delle cellule vegetali detto **isocitrato liasi** rompe il legame C-C dell'isocitrato formando il **gliossilato** (a 2 atomi di C), e **succinato** (4C) che darà origine al glucosio: ma prima il **succinato** deve entrare nel ciclo di Krebs per essere trasformato in **ossalacetato**, per cui, il succinato esce dal gliossisoma, entra nel mitocondrio, e tramite il ciclo di Krebs il succinato viene deidrogenato a **fumarato**, che a sua volta viene trasformato in **malato**. Il malato viene operato dall'**enzima malato deidrogenasi NAD** dipendente che lo ossida trasformandolo in **ossalacetato** (il vero precursore degli zuccheri). L'ossalacetato, una volta uscito dal mitocondrio, può concludere la sua trasformazione in **glucosio** tramite la gluconeogenesi. Dal glucosio, la pianta forma il saccarosio che verrà passato alla linfa e utilizzato per il suo accrescimento. Questa particolare via metabolica consente al seme di generare un precursore degli zuccheri a partire da una molecola che è inutilizzabile per questo scopo nel caso delle nostre cellule.

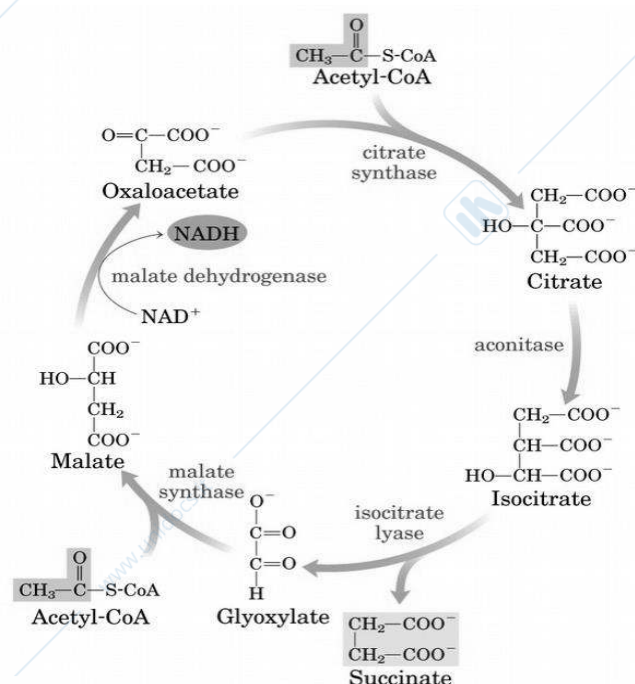
Per far continuare il ciclo, il **gliossilato** prosegue:

La **malato sintasi** (un altro enzima esclusivo solo delle cellule vegetali) fa reagire il **gliossilato** con un'altra molecola di **Acetil-CoA** che reagisce con, dando origine al **malato**.

Il malato viene operato dall'enzima **malato deidrogenasi NAD<sup>+</sup> dipendente** che lo ossida a **ossalacetato**, liberando **NADH**.

l'ossalacetato ottenuto è pronto per legare un'altra molecola di acetil-CoA e fare il ciclo gliossilato di nuovo.

il bilancio complessivo del ciclo del gliossilato



## L'ATP

A pH fisiologico, l'ATP ha 4 cariche negative ed è un composto che ha un'energia libera alta.

I suoi prodotti di idrolisi, che sono Pi e ADP, hanno un'energia libera più bassa, perché il fosfato, una volta libero, è **stabilizzato per risonanza** (si abbassa l'energia libera) e perché l'ADP ha un **addensamento di carica minore** (solo 3 cariche negative) che la rende più stabile (si abbassa anche qui l'energia libera).

La somma delle energie libere dei prodotti è quindi minore della somma delle energie libere dei reagenti --> la reazione di idrolisi dell'ATP è **spontanea** --> i **legami fosfoanidridici sono ad alta energia** perché la loro idrolisi porta ad una liberazione di energia libera (non di energia di legame, che è, invece, l'energia necessaria per rompere un legame). I

Viceversa, la reazione inversa, ovvero la sintesi di ATP è endoergonica (costa energeticamente).

L'ATP è una moneta di scambio energetico (trasporta energia).

- A cosa serve l'ATP?

Serve per rendere possibili termodinamicamente reazioni che non lo sono, ovvero le reazioni non spontanee di biosintesi (da molecole semplici si sintetizzano molecole complesse).

**Serve per mantenere l'equilibrio osmotico cellulare attraverso un trasporto attivo** (contro gradiente) dalla pompa Na<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> (ATP dipendente, consuma 20-50% dell'ATP che la cellula produce).

A dimostrazione del fatto che l'ATP sia indispensabile per fornire l'energia minima necessaria alla vita, possono essere prese molecole, quali inibitrici della glicolisi e della catena respiratoria, ad esempio il cianuro. Se esse venissero poste in un terreno di coltura in mezzo ad alcune cellule, quest'ultime morirebbero in maniera pressoché istantanea, perché non riescono a produrre ATP.

**un'altra funzione tissutale in cui serve l'ATP è la contrazione muscolare.**

Infine, l'ATP è indispensabile perché una buona parte dei processi cellulari viene infatti usato per fornire energia da un punto di vista chimico, per l'utilizzo di reazioni accoppiate, quelle reazioni in cui il prodotto di una reazione è il substrato di un'altra.

- **Con quali metodi viene prodotto l'ATP?**

- attraverso la **fosforilazione a livello del substrato**: vengono utilizzate molecole che hanno un potenziale di trasferimento del substrato oppure un'energia libera di idrolisi più alti dell'ATP.

Es.) il fosfoenolpiruvato ha un'energia libera di idrolisi maggiore dell'ATP quindi può essere utilizzato per sintetizzare ATP a partire da ADP e Pi;

- attraverso la **fosforilazione ossidativa**, processo quantitativamente più rilevante.

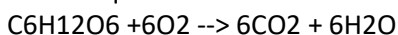
- **Rarissimamente l'ATP viene utilizzato in maniera direttamente idrolitica. Allora, in che modo viene utilizzato l'ATP? La maggior parte delle reazioni sfruttano transferasi e non idrolasi. Ad esempio, nella pompa Na<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> viene utilizzata ATP che, però, non viene idrolizzata in maniera diretta.**

Schema riassuntivo:

la glicolisi produce 2 molecole di NADH, la piruvato deidrogenasi altre 2.

La maggior parte dei coenzimi ridotti sono prodotti dal Ciclo di Krebs

In tutto questo vi è l'ossidazione completa dei C del glucosio.



- 2 ATP glicolisi
- 2 GTP ciclo di Krebs
- Coenzimi ridotti: 10 NADH e 2 FADH<sub>2</sub>

*I coenzimi prodotti verranno riossidati a livello della catena degli elettroni producendo energia sufficiente per la produzione di ATP.*

## FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

La fosforilazione ossidativa è la fase terminale della respirazione cellulare negli organismi aerobici.

Consiste nell'ossidazione di NADH e FADH<sub>2</sub> che erano prodotti nel Ciclo di Krebs, e la riduzione dell'O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O.

- avviene all'interno dei **mitocondri**.

Tutte le tappe di catabolismo dei carboidrati, amminoacidi e degli acidi grassi terminano nella fosforilazione ossidativa in cui l'energia prodotta dalle ossidazioni viene utilizzata per sintetizzare ATP. La fosforilazione ossidativa avviene nei mitocondri e consiste nell'ossidazione del NADH e FADH<sub>2</sub> (che erano prodotti nel ciclo di Krebs) che quindi cedono elettroni all'ossigeno molecolare che è l'accettore finale. Il trasferimento di questi elettroni avviene mediante una serie di trasportatori associati alla membrana mitocondriale interna che formano la **catena di trasporto degli elettroni**. L'ossigeno molecolare, accettando gli elettroni viene successivamente ridotto ad **H<sub>2</sub>O**.

La sintesi dell'ATP si basano sul **modello chemiosmotico di mitchell**. Secondo cui le differenze nella concentrazione dei protoni tra le due facce della membrana rappresentano un modo per conservare l'energia estratta dalle ossidazioni metaboliche.

**CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI**

$$\text{NADH} + \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{NADH} \quad \mathcal{E}^{\circ'} = -0.315 \text{ V}$$

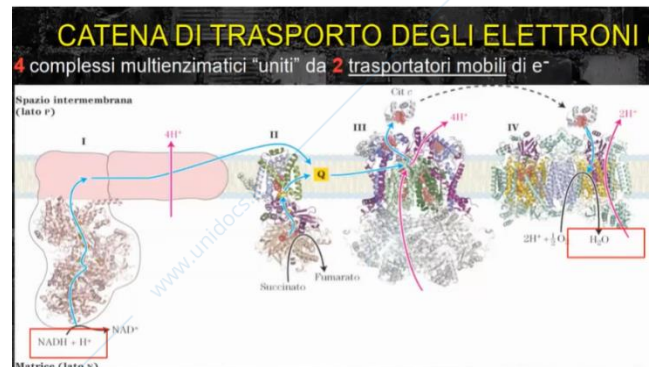
$$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} \quad \mathcal{E}^{\circ'} = 0.815 \text{ V}$$

$$\Delta \mathcal{E}^{\circ'} = \mathcal{E}^{\circ'}_{(e^- \text{ acceptor})} - \mathcal{E}^{\circ'}_{(e^- \text{ donor})}$$

$$\Delta \mathcal{E}^{\circ'} = 0.815 - (-0.315) = 1.130 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -nF \Delta \mathcal{E}^{\circ'}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -2 \frac{\text{mol } e^-}{\text{mol reactant}} \times 96,485 \frac{\text{C}}{\text{mol } e^-} \times 1.13 \text{ J} \cdot \text{C}^{-1}$$

$$= -218 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$


## Fosforilazione ossidativa - LA CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

Negli eucarioti, **La catena di trasporto di elettroni** è localizzata sulla membrana mitocondriale interna.

È composta da 4 complessi proteici multienzimatici che sono trasportatori capaci di acquistare elettroni da molecole donatori che sono i coenzimi NADH, FADH<sub>2</sub>, e succinato, e questi complessi trasportatori trasportano gli elettroni verso l'accettore finale che è l'ossigeno molecolare. I trasportatori hanno potenziali di riduzione crescenti in modo che gli elettroni, passando via via a uno potenziale di riduzione maggiore, liberano energia che viene utilizzata per attivare **le pompe protoniche transmembrana, che pompano protoni contro gradiente, nello spazio intermembrana, generando un gradiente elettrochimico protonico che fornisce la forza termodinamica necessaria per la sintesi di ATP.**

La catena di trasporto degli elettroni è composta da **4 complessi** proteici multienzimatici di membrana:

- **Complesso I** NADH DEIDROGENASI
- **Complesso II** SUCCINATO DEIDROGENASI
- **Complesso III** CITOCROMO C-UBICHINOLO OSSIDOREDUCTASI
- **Complesso IV** CITOCROMO C-OSSIDASI

Questi complessi sono uniti da **trasportatori mobili di elettroni, che sono:**

- **Coenzima Q-Ubichinone** un lipide, che trasporta elettroni dal complesso II al complesso III o dal complesso I al complesso III
- **Citocromo C**: una proteina, che si trova nello spazio intermembrana, che trasporta elettroni dal complesso III al IV.

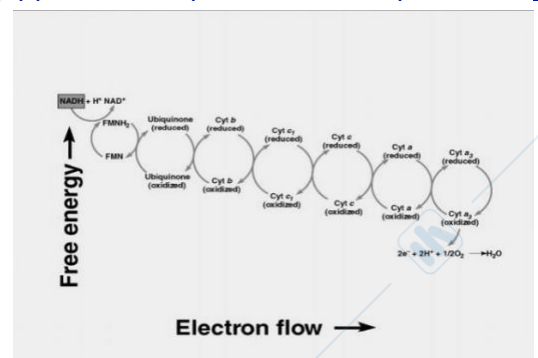
### TAPPE DEL TRASPORTO DEGLI ELETTRONI:

Il trasporto di elettroni inizia con l'ossidazione del NADH che rilascia due elettroni, che prima vengono presi dal complesso I e poi percorrono tutta la catena di trasporto e infine arrivano al complesso IV dove verranno utilizzati per ridurre l'ossigeno ad H<sub>2</sub>O.

Gli elettroni passano spontaneamente attraverso una serie di coppie redox, spostandosi sempre verso la coppia redox a potenziale di riduzione maggiore; questo processo è spontaneo perché c'è liberazione di energia, è quindi esoergonico.

L'energia liberata tramite ossidazione diretta del NADH ad opera dell'ossigeno, è uguale all'energia che si ottiene facendo passare gli elettroni attraverso N passaggi intermedi. Se il passaggio fosse diretto, però, si avrebbe tanta calore e quindi non si potrebbe immagazzinare energia sottoforma di ATP.

Il passaggio di elettroni attraverso varie coppie redox rende possibile intrappolare l'energia sottoforma di ATP.



## COMPLESSO I – NADH DEIDROGENASI

È un complesso costituito da più di 40 proteine diverse. il **complesso I** accetta due elettroni dal NADH e li cede al Coenzima Q, passando da una coppia redox ad un'altra coppia di redox a potenziale di riduzione maggiore. inanzitutto, il complesso I contiene il cofattore FMN

(flavin mononucleotide) che reagisce nel sito attivo del **complesso I** legandosi al **NADH**: si ha una reazione di ossidoriduzione in cui il NADH rilascia 2 elettroni ossidandosi ad  $NAD^+$ , e i 2 elettroni rilasciati vengono trasferiti all'FMN che si riduce in **FMNH<sub>2</sub>**.

~~L'FMN è una porzione che possiede un gruppo OH del ribitolo esterificato dal fosfato. L'FMN e il FAD (che è un FMN a cui viene aggiunto un nucleotide che è la AMP) sono trasportatori di elettroni, hanno la stessa porzione adibita al trasporto, ovvero la riboflavina.~~

### L'FMN:

- può acquisire un elettrone, viene ridotto l'azoto e si forma una forma semi chinonica, **FMNH**
- può acquisire due elettroni si ha la forma completamente ridotta che è la forma **FMNH<sub>2</sub>**

Il  $NAD^+$  rimane nella matrice mitocondriale e può essere nuovamente rifornito e ridotto all'interno del ciclo di Krebs

Esistono poi altri trasportatori contenenti una serie di proteine **Centri ferro-zolfo**: sono proteine che legano atomi di ferro attraverso legami di coordinazione, o con 4 residui di cisteina (formando solfuri organici) oppure formano solfuri inorganici.

I centri ferro-zolfo sfruttano il ferro per il trasporto di elettroni perchè lo ione ferro è in grado di ossidarsi e ridursi; quindi lo ione ferro acquisisce un'elettrone passandosi da +3 a +2, e quando cede l'elettrone ad un altro accettore ritorna allo stato di +3. Quindi esistono una serie di centri ferro-zolfo e l'ultimo centro Ferro-zolfo cede 2 elettroni al coenzima Q.

Il **coenzima Q** è il primo trasportatore di elettroni, è un lipide. prima si trova nella forma completamente ossidata (ubichinone) in cui possiede 10 unità isopreniche ripetute e una coda apolare attraverso cui è ancorato alla membrana mitocondriale interna. il Coenzima Q quindi si colloca in un altro sito attivo del complesso I, riceve i **due elettroni** e si riduce completamente a ubichinolo QH<sub>2</sub> (forma ridotta).

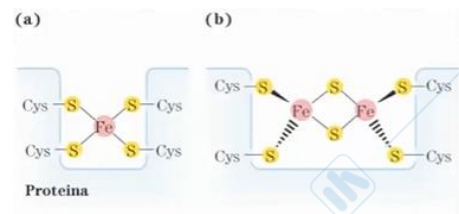
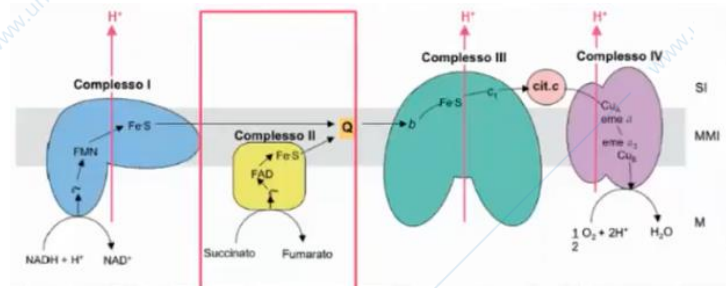
il coenzima Q è un lipide e quindi diffusibili sulla superficie della membrana mitocondriale interna, successivamente trasporta gli elettroni che ha acquistato dal complesso I al III.

il Coenzima Q può essere:

- 1) nella forma completamente ossidata: coenzima Q-ubichinone
- 2) può prendere un solo elettrone e trasformarsi in un radicale ubichinonico \*QH
- 3) può prendere due elettroni e ridursi completamente a ubichinolo QH<sub>2</sub>

### ALLO STESSO TEMPO; il complesso I pompa 4 protoni dalla matrice verso lo spazio intracellulare:

Il complesso I, oltre a trasportare elettroni, è anche una pompa protonica; il passaggio degli elettroni attraverso il complesso I induce un trasporto di 4 protoni dalla matrice verso lo spazio intermembrana, che è quindi reso più acido della matrice stessa. Questo è un trasporto attivo contro gradiente, che sfrutta energia che viene fornita dalla perdita di energia degli elettroni che passano attraverso i complessi redox. Per ogni NADH che si ossida vengono rilasciati 2 elettroni, vengono pompati 4 protoni dalla matrice verso lo spazio intermembrana.



### Come vengono pompati i protoni?

Nella conformazione **I (prima)** il complesso I espone dei siti ad alta affinità per i protoni verso la matrice, il passaggio degli elettroni, induce un cambiamento conformazionale del complesso I, ad opera di un alfa elica che rende possibile il cambio di conformazione e induce la conversione della forma I nella forma **II (seconda)** che è a bassa affinità per i protoni che vengono quindi rilasciati nello spazio intermembrana.

Ogni 2 elettroni, 4 protoni passano dalla matrice verso l'esterno, si converte l'energia degli elettroni in una forma di energia potenziale, cioè in un accumulo di gradiente.

Come nella cellula, si trasforma energia chimica in energia potenziale, ovvero in un gradiente di protoni.

### COMPLESSO II - SUCCINATO DEIDROGENASI

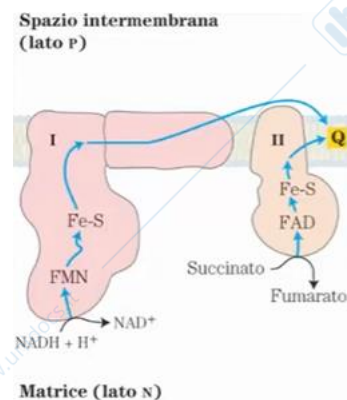
È l'unico complesso del ciclo di Krebs associato alla membrana, tutti gli altri sono enzimi solubili.

il **complesso II succinato deidrogenasi** è una **flavoproteina** che, oltre a essere componente della catena respiratoria, è anche un enzima chiave del ciclo di Krebs; ad opera di esso, il succinato si ossida a fumarato, il FAD viene ridotto a FADH<sub>2</sub> che a sua volta cede gli elettroni a un centro ferro-zolfo presente nel complesso del succinato deidrogenasi, e l'accettore finale degli elettroni è il Coenzima Q. Quindi al coenzima Q arrivano elettroni sia dal complesso I che II.

-> Un'altra flavoproteina mitocondriale è la glicerolo 3-fosfato deidrogenasi situata sul lato citosolico della membrana mitocondriale interna che può essere un'altra via per ridurre il coenzima Q: quindi in questo caso la glicerolo fosfato deidrogenasi ossida il glicerolo-3-fosfato in **di-idrossi-acetone fosfato**, il FAD viene ridotto a FADH<sub>2</sub> che poi cede gli elettroni sul coenzima Q ubiquinone che accetta gli elettroni riducendosi in ubiquinol QH<sub>2</sub>, che a sua volta trasporta questi elettroni dal al complesso III.

-> *nella via metabolica degli acidi grassi troviamo un'altra flavoproteina, l'Acil-CoA deidrogenasi.*

**Il complesso II** è una pompa **protonica**.



### COMPLESSO III

Il Complesso III prende elettroni dall'ubichinolo QH<sub>2</sub> (donatore) e li cede al **citocromo C** che è il secondo trasportatore mobile di elettroni della catena respiratoria.

Il Complesso III è composto da proteine diverse, e possiede centri ferro-zolfo simili a quelli del complesso I per trasportare elettroni.

il complesso III contiene anche citocromi.

**I Citocromi**, sono proteine che contengono come gruppo prostetico l'**eme**, un gruppo **tetrapirrolico**; ne esistono vari tipi e differiscono tra loro per la struttura e perchè ciascuno di loro lega un gruppo eme diverso.

**I citocromi del complesso III:**

il citocromo C1 → lega un eme di tipo C

I citocromi BL e BH (che appartengono ai citocromi B) → entrambi legano eme tipo B

L'eme tipo B, è quello contenuto nell'emoglobina dove però l'atomo di ferro non cambia numero di ossidazione, è sempre ridotto, mentre nei citocromi l'atomo di ferro viene ridotto e ossidato in modo reversibile.

L'eme di tipo C, che si trova nei citocromi c, la struttura dell'anello tetra pirrolico è pressoché identica, cambia in alcuni sostituenti, l'eme c in particolare è l'unico gruppo eme che si presenta legato covalentemente alla proteina attraverso due residui di cisteina.

L'eme tipo A che sta nel citocromo a, cambiano i sostituenti.

Queste strutture presentano molti doppi legami coniugati che gli conferiscono capacità di assorbire la luce nel visibile, lo spettro di assorbimento cambia nei vari gruppi eme che quindi permette di identificarli, e cambia anche se l'eme è ossidato o ridotto.

Il complesso III ha un citocromo C1 che fa parte del complesso, è interno e non fuoriesce mai, mentre il citocromo C è il trasportatore mobile, ovvero che accetta gli elettroni dal complesso III.

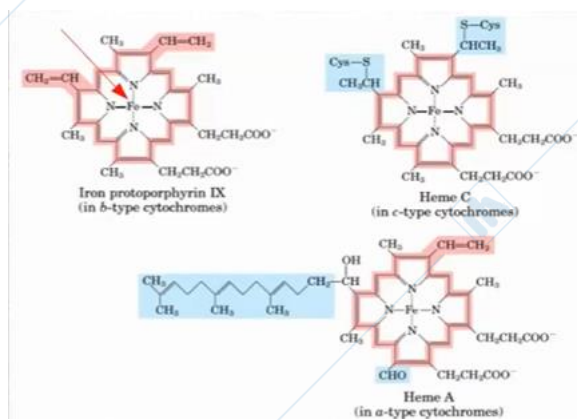
Il complesso III ha la funzione di convertire tramite il **ciclo Q**, il flusso di due elettroni al flusso di un elettrone, perché il donatore di elettroni è l'ubichinolo che trasporta due elettroni, mentre l'accettore di elettroni che escono dal complesso III è il citocromo C che può acquistare un elettrone alla volta poiché possiede un solo atomo di ferro che passa da +3 a +2, infine questo ferro cede l'elettrone al complesso IV, ritornando a +3.

#### il CICLO Q:

- Arriva un ubichinolo  $QH_2$  e porta due elettroni, entra nel sito attivo del complesso III, viene ossidato diventandosi **ubichinone Q**.
- i due elettroni che il  $QH_2$  rilascia prendono due strade diverse:
- uno dei due elettroni è utilizzato per ridurre un centro Fe-S, dal centro Fe-S l'elettrone passa sul **citocromo C1**, che contiene un solo atomo di ferro, che cede l'elettrone al **citocromo C** che è già fuori dal complesso e lo trasporterà al complesso IV. (**strada breve**)
- il secondo elettrone passa attraverso una **strada lunga**. Passa dai **citocromi BL e BH** e infine arriva in un sito attivo del complesso III dove è presente un chinone, totalmente ossidato, che viene ridotto dall'elettrone arrivato, formando un **radicale semi-chinonico**  $*QH$ , che **non è un prodotto**, ma è un intermedio che rimane legato al sito attivo per essere ridotto in  $QH_2$  quando arriva un altro elettrone:
- Quindi, quando arriva una seconda molecola di ubichinolo  $QH_2$  che porta due elettroni, si ha lo stesso processo: uno dei due elettroni prende la **prima strada breve** e va sul citocromo C, l'altro elettrone prende la strada più lunga, questa volta però trova il semi-chinone  $*QH$ , che quindi viene ridotto in ubichinolo  $QH_2$  che si libera.

Anche il complesso III è una **pompa protonica**, trasporta protoni sempre dalla matrice allo spazio intermembrana, attraverso delle reazioni di ossidazioni asimmetriche.

Tramite queste reazioni, l'ubichinolo  $QH_2$  cede 2 elettroni che passano attraverso il complesso III, e allo stesso tempo pompa **2 protoni** dalla matrice verso lo spazio intermembrana.

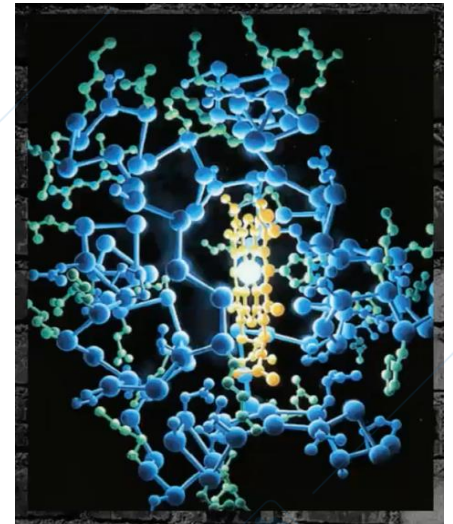


## Citocromo c

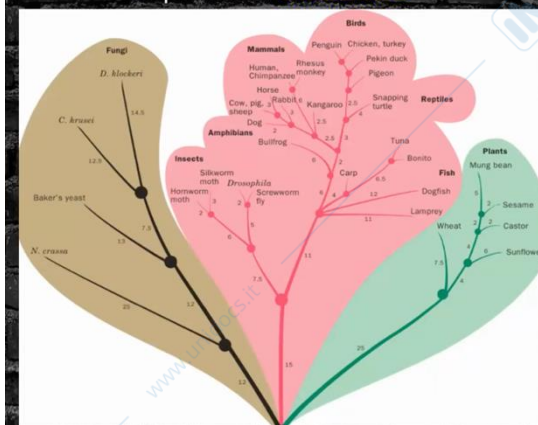
Il **citocromo c** è una trasportatore proteico mobile situata nello spazio intermembrana, più precisamente sul lato esterno della membrana mitocondriale interna.

il citocromo C presenta un gruppo eme (**porzione gialla**), al cui interno è situato un atomo di ferro. A livello del complesso III questo atomo di ferro viene ridotto, passando quindi da un numero di ossidazione +3 a un numero di ossidazione pari +2, per poi ossidarsi nuovamente a livello del complesso IV.

Questa proteina è stata studiata nel corso del tempo perché è considerata una delle proteine che si è maggiormente "conservata" nel corso dell'evoluzione, ovvero che nel corso di miliardi di anni la sua sequenza amminoacidica, composta da circa 98 amminoacidi, è rimasta quasi invariata e simile in tutti gli organismi. Proprio per questa sua poca variabilità si dice che sia un **fossile molecolare**, a differenza delle altre proteine che invece possiedono un'alta variabilità.



Albero filogenetico basato sulla comparazione di sequenze del **citocromo C**

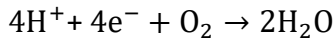


Grazie all'osservazione della struttura primaria dei citocromi c di due specie, in particolare l'analisi quantitativa delle loro differenze, è possibile risalire a quanto tempo prima si sia divisa la loro strada nel percorso evolutivo. Osservando le sequenze primarie di queste proteine in tutte le specie è possibile ricostruire un albero filogenetico, osservando quali specie sono più vicine nella linea evolutiva.

Il citocromo c è considerata una **moonlight protein**, ovvero svolge due differenti lavori. Oltre che trasportare elettroni, gioca un ruolo fondamentale nel processo di **apoptosi**, la morte programmata della cellula. Questo processo viene attivato da un evento che può essere **intrinseco**, qualora la cellula decida spontaneamente di morire, o **estrinseco**, se interviene una molecola esterna, ad esempio un linfocita, che porti la cellula alla morte. In entrambi i casi determinate proteine, dette **bad protein**, si legano alla superficie del mitocondrio formando dei pori che permetteranno ai citocromi c di fuoriuscire dallo spazio intermembrana e dirigersi verso il citoplasma. La fuoriuscita del citocromo c è l'evento che darà inizio alla formazione dell'**apoptosoma**, un complesso proteico che attiva delle proteasi dette **caspasi**, che degradano tutte le proteine cellulari, portando quindi alla morte cellulare.

## Complesso IV

Questo complesso, detto Citocromo C Ossidasi, si occupa di prendere gli elettroni dal citocromo c e trasporta 4 elettroni sull'ossigeno per ridurlo completamente ad acqua.

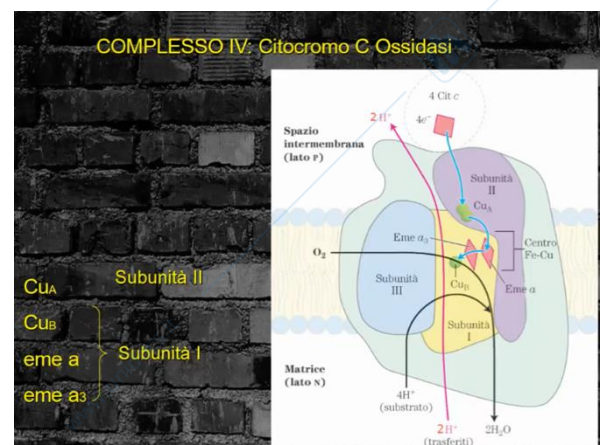


Il complesso IV è anch'esso una **pompa protonica**, che si trasporta **2 protoni  $\text{H}^+$**  dalla matrice verso lo spazio intermembrana per ogni due elettroni ceduti dal NADH. (I Complessi I e III, le altre due pompe protoniche, trasportavano entrambe 4 protoni nello spazio intermembrana ogni due elettroni).

il Citocromo C Ossidasi deve rapportarsi con l'ossigeno. Se da un lato l'ossigeno ha un alto potenziale di riduzione che lo rende un potente ossidante, dall'altro lato interagire con questa molecola porta a due problemi: il primo è che essendo un gas è difficile legarlo al sito attivo a causa della sua alta capacità di diffusione rispetto ad una molecola solubile in acqua. Il secondo problema è che qualora l'ossigeno non venga ridotto completamente in acqua accettando 4 elettroni, esiste il rischio di formare i radicali liberi ROS (specie reattive dell'ossigeno) che sono pericolose perché molto diffusibili e fortemente ossidanti che possono danneggiare molecole come gli acidi grassi delle membrane, che, ossidandosi portano alla perossidazione lipidica che cambia la permeabilità della membrana; oppure possono ossidare gli enzimi portando alla perdita della loro funzione oppure possono ossidare le basi azotate del DNA portando a mutazioni genetiche.

Il compito della Citocromo C Ossidasi è quindi quello di lavorare con un reattivo pericoloso, l'ossigeno, cercando di ridurlo senza produrre ROS.

Questo complesso è formato da una **Subunità I** che contiene un **ione rame B** ( $\text{Cu}_B$ ) e una **Subunità II** che contiene un **ione rame A**. lo ione rame in queste subunita' trasporta elettroni ossidandosi e riducendosi. Sono presenti anche 2 **citocromi di tipo a**: il **citocromo a** e il **citocromo  $a_3$**  che contengono rispettivamente l'eme a e l'eme  $a_3$ .



**Il processo di riduzione dell'ossigeno che avviene nel complesso IV è composto da fasi:**

- 1) Il primo elettrone rilasciato dal citocromo C passa all'**ione rame A** della subunità II del complesso IV.
- 2) Dall'ione rame A, l'elettrone passa al **gruppo eme a** della subunità I del complesso IV.
- 3) Questo elettrone entrerà poi nel sito attivo del complesso IV (detto **centro binucleare**) che contiene lo ione rame B, e il gruppo eme  $a_3$ .
- 4) lo ione rame B accetta il primo elettrone, mentre il gruppo eme  $a_3$  accetta un secondo elettrone, e entrambi quindi si riducono (Ferro diventa +2, Rame diventa +1)
- 5) A questo punto l'ossigeno entra nel sito attivo, e iniziano le reazioni di ossidoriduzione in cui avviene l'ossidazione del ferro e del rame, e si riduce l'ossigeno. **Il passaggio di questi due elettroni deve essere contemporaneo**, formando un radicale libero: ione perossido  $\text{O}_2^{2-}$  che rimane vicino al complesso. (perchè essendo uno ione dotato di due cariche negative, è attratto dalle cinque cariche positive possedute dal ferro e dal rame ( $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ))
- 6) Con l'arrivo di altri 2 elettroni e 4 protoni, l'ossigeno si riduce completamente formando 2 molecole di acqua.

(complessivamente coinvolge 4 elettroni portati dal citocromo c)

## Come si forma l'energia sottoforma di ATP durante la fosforilazione ossidativa?

Considerando i complessi I, III e IV, per ogni 2 elettroni trasportati dal NADH all'ossigeno, vengono pompate 10 protoni nello spazio intermembrana, si forma così il **gradiente protonico**, che è correlato alla **sintesi di ATP**. Questa conclusione si basa sul **Modello chemiosmotico** di Peter Mitchell che ha dimostrato la correlazione tra il gradiente di protoni e la sintesi di ATP. secondo questo modello, il gradiente protonico viene sfruttato da un enzima detto **ATP sintasi** in grado di trasformare l'energia potenziale fornita dal gradiente, in energia chimica sottoforma di ATP.

### --> L'esperimento di Peter Mitchell:

Per dimostrare la sua ipotesi, Mitchell ha utilizzato un farmaco, il dinitrofenolo, che possiede la capacità di alterare la permeabilità della membrana mitocondriale interna, rendendola permeabile ai protoni. ha inserito mitocondri in due provette diverse, ma solo in una delle due aveva messo il farmaco; ha osservato che nella provetta senza il farmaco, i mitocondri consumavano ossigeno e producevano ATP normalmente, invece nella provetta con il farmaco notò che il passaggio di elettroni avveniva, mentre la produzione di ATP non avveniva. Questo perché il farmaco agisce da **disaccoppiante**, ovvero disaccoppia il passaggio di elettroni dalla sintesi di ATP. Infatti, se rendiamo la membrana interna permeabile ai protoni, i protoni tendono a rientrare nel mitocondrio, per cui non formano un gradiente protonico e quindi non generano energia potenziale da trasformare in ATP.

~~Parte di energia generata dal passaggio di elettroni, quindi, invece di trasformarsi in energia chimica, diventa interamente calore.~~

## Enzima superossido dismutasi e formazione di radicali liberi

La produzione di ROS entro certi limiti è un processo fisiologico in tutte le cellule che respirano. Queste cellule possiedono sistemi attivi e passivi in grado di neutralizzare la capacità ossidante dei radicali liberi. Gli enzimi sono un esempio di sistema attivo, e in particolare gli enzimi che combattono la formazione di ione superossido sono le **superossido dismutasi**.

La superossido dismutasi promuove una reazione di dismutazione, ovvero una reazione di ossidoriduzione interna che comporta la contemporanea ossidazione e riduzione della stessa molecola, convertendo lo ione superossido in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$  acqua ossigenata). Nonostante il perossido di idrogeno non sia un radicale, viene considerato tale per il suo grande potere ossidante, tipico proprio della classe dei radicali. Questa molecola può andare poi incontro all'attività catalitica della **glutazione perossidasi**, un enzima che utilizza gli elettroni del glutatione, e li trasferisce sul perossido di idrogeno, formando acqua.

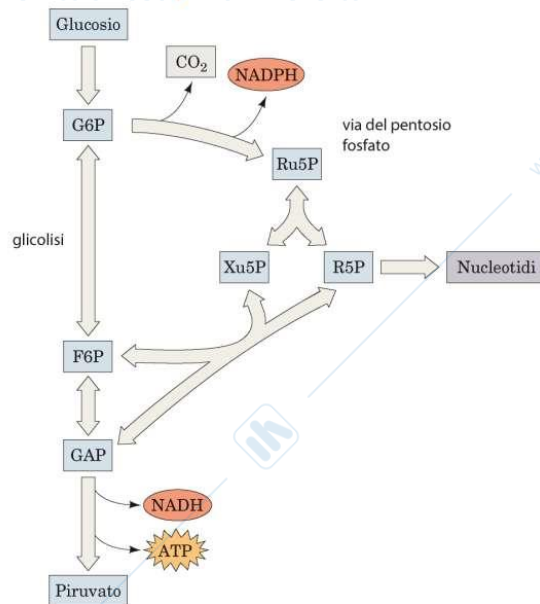
L'acqua ossigenata può anche essere degradata dalla **catalasi**, anch'essa un enzima che catalizza una reazione di dismutazione, che converte due molecole di  $H_2O_2$  in acqua e ossigeno molecolare. (Es. se mettiamo l'acqua ossigenata su una ferita, si forma schiuma biancastra che è data da ossigeno e acqua, prodotti dall'azione della **catalasi** che tenta di detossificare il tessuto).

## LA VIA DEI PENTOSI FOSFATI

La via del pentosio fosfato è un processo metabolico importante perchè porta alla formazione del pentoso **ribosio-5- fosfato** e della molecola importante **NADPH**.

Questa via parte dal **glucosio-6-fosfato** (perché all'interno della cellula troviamo sempre il glucosio fosforilato).

Il NADPH è una molecola uguale al NADH da un punto di vista di potenziale ossidoriduttivo, ma il NADPH presenta un gruppo fosfato legato al ribosio. Ma da un punto di vista biochimico, la maggior parte (se non esclusivamente) delle reazioni metaboliche ossidative utilizzeranno NAD<sup>+</sup>/NADH, mentre gli enzimi che partecipano ai processi riduttivi di biosintesi utilizzano il NADPH.



### La via di pentosi fosfati è divisa in due parti (o fasi):

- **Una prima parte ossidativa**, che produce NADPH e lo zucchero a 5 atomi di carbonio (**ribulosio-5-P**).
- **Una seconda parte** non ossidativa: in cui dal ribulosio si producono **ribosio-5-fosfato** e **xilulosio-5-P**.

### **Prima parte della via dei pentosi fosfati (Parte ossidativa):**

-> In questa via metabolica si parte dal **glucosio-6-fosfato** che viene catalizzato dal primo enzima detto **glucosio-6-fosfato deidrogenasi**; da questa prima reazione si forma il **gluconolattone** (6-Fosfogluculonolattone). Questo enzima, una volta che ha formato il gluconolattone, rende possibile l'attività del secondo enzima, cioè la **lattonasi**. La lattonasi, è in grado di lavorare sul gluconolattone che è il suo substrato, aggiungendo una molecola di H<sub>2</sub>O e formando il **6-fosfogluttonato**. Il 6-fosfogluttonato è riconosciuto dalla seconda deidrogenasi importante che è la **6-fosfogluttonato deidrogenasi**, che catalizza l'ossidazione del 6-fosfogluttonato a **ribulosio-5-fosfato** (che è un chetoso, perché ha un gruppo carbonilico C=O all'interno), mentre il NADP si riduce a **NADPH**, e viene eliminata una molecola di CO<sub>2</sub>.

Con questa via quindi, partendo dal glucosio, si formano 2 molecole di NADPH e uno zucchero a 5C che è il ribulosio.

Il destino del ribulosio-5-fosfato dipende dal bisogno del corpo: tramite le vie non sono biosintetiche può essere convertito in metaboliti importanti, ma se una cellula va in divisione o ha bisogno di sintetizzare dei nucleotidi, utilizza questo ribulosio. Infatti abbiamo la capacità di sintetizzare *ex novo* i nucleotidi partendo da ribosio nuovo e con altre molecole si costituiscono le basi, ma abbiamo anche delle vie di recupero che ci permettono di utilizzare i nucleotidi che derivano dalle vie di degradazione intracellulari.

### A cosa serve il NADPH prodotto da questa via ?

- 1)** Il NADPH non entra nella via della fosforilazione ossidativa, ma viene utilizzato soltanto nella biosintesi di acidi grassi, colesterolo e ormoni steroidei; generalmente le deidrogenasi sono specifiche o per il NAD o per il NADP.
- 2)** Il NADPH inoltre è utilizzato per le **vie di detossificazione** (es. citocromo P450 a livello epatico).
- 3)** Il NADPH è importante anche per gli eritrociti: **Gli eritrociti** hanno un'intensa attività dei pentosi fosfati,

perché da questa via ottengono il NADPH che è utilizzato da un enzima detto **glutazione riduttasi** presente negli eritrociti che impedisce l'ossidazione dell'emoglobina grazie a cui l'eritrocita può fare gli scambi gassosi di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e trasportare l'ossigeno ai tessuti del corpo. Quindi il NADPH è una molecola importante, tant'è che tutte le nostre cellule utilizzano questa via (pentoso fosfati) per produrlo. Quando in una cellula il NADPH diminuisce, viene stimolata la via dei pentosi fosfati.

La cellula utilizzerà gli zuccheri a 5 atomi di carbonio, prodotti dalla prima parte ossidativa, per produrre dei composti che la cellula stessa può utilizzare attraverso la seconda parte non ossidativa: il fruttosio-6-fosfato e la gliceraldeide-3-P; dunque la seconda parte non ossidativa viene intrapresa dalla cellula nel caso non ci fosse bisogno di zuccheri a 5 C per la sintesi di nucleotidi. Quando invece i livelli di NADPH sono sufficienti per soddisfare la richiesta cellulare viene inibita questa via ed attivata quella glicolitica (se siamo a livello epatico il glucosio-6-fosfato servirà per quello che la cellula epatica sa fare sotto controllo ormonale).

## Regolazione del Glucosio 6 fosfato deidrogenasi

il primo enzima (glucosio-6-fosfato deidrogenasi) è il più importante della via dei pentoso fosfati. Se non parte il primo enzima della reazione, non si forma il 6-fosfoglucono-lattone e non agisce il secondo enzima o il terzo enzima. Quindi il primo enzima della reazione (glucosio-6-fosfato deidrogenasi) è importante perché, se lui è inibito non si formano gli altri prodotti e la via metabolica non va avanti. Se invece la G-6-P deidrogenasi è attiva forma il primo composto (il 6-fosfoglucono-lattone) e quindi anche le altre reazioni possono progredire.

è Regolato da: **NADH e Acidi grassi**

- **NADH**: il primo enzima **glucosio-6-fosfato deidrogenasi** è attivato dalla carenza di NADPH perchè la carenza di NADPH vuol dire che abbiamo bisogno di rifornirlo (facendo la via dei pentosi fosfati) Quando i livelli di NADPH sono alti, vuol dire che non abbiamo bisogno di rifornire NADPH quindi si inibisce il glucosio-6-P deidrogenasi per bloccare la via dei pentosi fosfati.

- **ACIDI GRASSI**: quando troviamo degli acil-CoA all'interno della cellula (acidi grassi attivati a livello del fegato), questi vanno ad inibire l'azione della G-6-P deidrogenasi, bloccando la via dei pentosi fosfati.

## **ALDOSI E CHETOSI**

Gli zuccheri possono essere degli aldosi o dei chetosi: nel **aldoso** il gruppo carbonilico (C=O) si trova un'estremità, mentre nei **chetosi**, il gruppo carbonilico si trova all'interno della catena di carboni. Nel primo caso si parla di aldosi, nel secondo di chetosi. Gli aldosi che abbiamo trovato sono la gliceraldeide, l'eritrosio, il ribosio, lo xilosio e altri come il glucosio e il galattosio. I chetosi hanno il gruppo carbossile all'interno e hanno all'interno del nome "ul" (quindi ribosio – ribulosio, xilosio – xilulosio, eritrosio – eritrusio). Però ci sono delle eccezioni, per esempio il fruttosio che è un chetoso che non presenta all'interno del nome "ul".

## **Seconda parte della via dei pentoso fosfati (Parte non ossidativa):**

I pentosi fosforilati (zuccheri a 5C fosforilati) prodotti nella parte ossidativa di questa via (come il ribosio, ribulosio, e l'xilulosio) se non vengono utilizzati dalla cellula per la biosintesi di nucleotidi, vengono utilizzati nella seconda parte della via dei pentoso fosfati che è **la parte non ossidativa**, al fine di produrre intermedi della glicolisi (Fruttosio-6-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato):

in questa parte sono coinvolti **2 enzimi** che permettono di utilizzare questi pentosi: il primo è **transchetolasi**, il secondo è il **transaldolasi**. Sia la reazione della transchetolasi sia quella della transaldolasi sono **reazioni reversibili**.

**1)** La **transchetolasi**, utilizzando la **TTP (tiaminapirofosfato)** come coenzima, catalizza il trasporto di un frammento a 2 atomi di carbonio da un chetoso ad un aldoso; per cui nei prodotti della reazione questo aldoso accettore con due atomi di C di più diventa **chetoso**, mentre il chetoso donatore di partenza diventa **aldoso**.

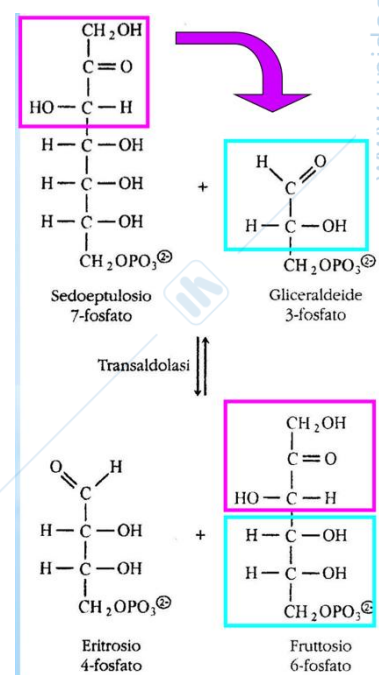
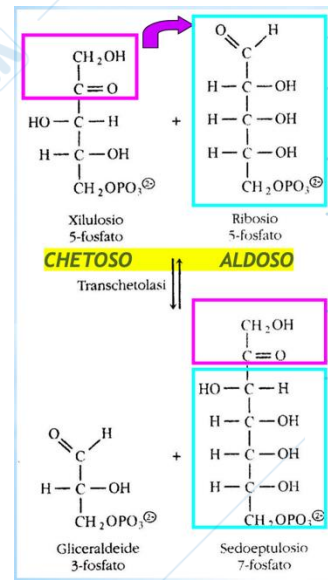
**2)** Dalla via dei pentosi fosfati otteniamo all'interno della cellula zuccheri a 5C fosforilati (con fosfato), quindi si trova aumentata la concentrazione di chetosi (per esempio aumenta la concentrazione del chetoso xilulosio-5-fosfato); per cui, la **transchetolasi** con la **TTP**, trasferisce il gruppo a due atomi di carbonio dello xilulosio (quindi del chetoso) ad un aldoso che è il ribosio-5-fosfato, che prendendo questi due carboni, si trasforma nel **sedoeptulosio-7-fosfato** che è un **chetoso** (a 7 atomi di C); mentre l'xilulosio-5-fosfato che era un chetoso (a 5 atomi di C) cedendo quei due carboni che erano trasferiti, diventa il **gliceraldeide-3-fosfato** che è un aldoso (a 3 atomi di C).

Quindi attraverso queste reazioni abbiamo ottenuto la gliceraldeide che possiamo utilizzare in generale.

**3) Tuttavia, può presentarsi un problema:** Se queste reazioni vanno avanti, si producono tanti NADPH tanti pentosi, e quindi aumenta la concentrazione di sedoeptulosio-7-fosfato che non sappiamo utilizzare, per cui interviene un altro enzima che deve agire su questo zucchero a 7 atomi di carbonio; questo enzima è la cosiddetta **transaldolasi**. La transaldolasi non usa coenzimi, ma ha un sito attivo che forma una base di Schiff con il carbonile del chetoso. La transaldolasi agisce trasferendo un gruppo a 3 atomi di carbonio sempre da un chetoso ad un aldoso. La transaldolasi trasferisce dal Sedoeptulosio-7-fosfato un pezzo di catena carboniosa a 3 atomi e lo porta su un aldoso che in questa reazione è la gliceraldeide-3-fosfato che quindi accetta questo pezzo a 3 atomi di carbonio, trasformandosi in un chetoso a 6C che è il **fruttosio-6-fosfato**. Invece il chetoso sedoeptulosio-7-P che ha perso i 3 atomi di carbonio, diventa un aldoso a 4 atomi di carbonio che è l'**eritrosio-4-fosfato**.

È importante che si mantenga il fosfato legato all'ultimo atomi di C della catena, perché la cellula è in grado di utilizzare la gliceraldeide-3-P e il fruttosio-6-P.

**4)** A questo punto abbiamo ottenuto da queste reazioni il gliceraldeide-3-fosfato e il fruttosio-6-fosfato che sono entrambi substrati della via glicolitica, ma l'**eritrosio-4-fosfato** invece non sappiamo utilizzarlo. Per cui, se queste reazioni vanno avanti a causa della prevalenza dei reagenti rispetto ai prodotti, oppure se si verifica un aumento della concentrazione di eritrosio, la **transchetolasi**, se ha a disposizione anche lo xilulosio-5-P trasferisce due atomi di C (unità bicarboniosa) dall'xilulosio (che è un chetoso) all'eritrosio (che è un aldoso): di conseguenza, l'xilulosio-5-P da 5 di C, perde 2 atomi di carbonio trasformandosi in **gliceraldeide-3-fosfato**, e l'eritrosio-4-P accetta questi due atomi di C, diventando un chetoso a 6 di C che è il **fruttosio-6-fosfato** che la cellula può usare per la via glicolitica.



**Riassumendo:** attraverso l'azione della transaldolasi e della transchetolasi, questi zuccheri a 5C (ribosio, ribulosio e xilulosio) sono convertiti a fruttosio-6-P e a gliceraldeide-3-P. Quindi via via che si formano questi zuccheri a 5C, se non vengono utilizzati per la biosintesi di nucleotidi, abbiamo ribosio, ribulosio e xilulosio che, attraverso l'azione della transchetolasi e della transaldolasi, sono trasformati in fruttosio-6-P e gliceraldeide-3-P che possono andare nella via glicolitica.

\*\*\*\*\*

**--- dettagliato (Parte ossidativa del ciclo dei pentoso fosfati):**

## MECCANISMO D'AZIONE DELLA 6-FOSFOGLUTONATO DEIDROGENASI

L'ultima reazione da 6-fosfoglutonato, attraverso la seconda deidrogenasi, porta ad avere un'ossidazione e l'eliminazione di una molecola di  $\text{CO}_2$  arrivando al ribulosio-5-fosfato. La reazione è catalizzata dalla 6-fosfoglutonato deidrogenasi, cioè la seconda deidrogenasi che utilizza l'anello attivo del  $\text{NADP}^+$ .

Il 6-fosfoglutonato ha il C3 a cui è legato un  $-\text{OH}$  e che quindi presenta un  $\delta^+$  ed è capace di fare un attacco sul carbonio dell'anello del  $\text{NADP}^+$ . In questo modo si ha la perdita di due atomi di idrogeno (uno era direttamente legato al C3, l'altro era legato all'ossidrilico-3' che si è ossidato in carbonile), con la formazione di  $\text{NADPH}$ . La reazione quindi forma un intermedio, un  $\beta$ -chetoacil (ovvero un acido con un gruppo chetonico al carbonio- $\beta$ ). Il C1 del  $\beta$ -chetoacido, il quale presenta un addensamento di carica positivo perché legato a due atomi di ossigeno ( $\delta^+$ ), reagisce con il carbonio successivo (C2) che è legato ad un altro carbonio che presenta un addensamento di carica positivo perché legato con un doppio legame all'ossigeno ( $\delta^+$ ). Il  $\beta$ -chetoacido risulta essere molto instabile: per questo motivo reagisce in modo tale che il gruppo  $\text{COO}^-$  si stacchi, si liberi anidride carbonica e, attraverso un riassetto di legami, resti questa molecola a 5 C con il gruppo  $\text{C}=\text{O}$  all'interno della catena, cioè un chetoso che è il ribulosio-5-P. Dunque durante questa reazione di decarbossilazione ossidativa si forma un intermedio di reazione, il  $\beta$ -chetoacido, che perde il gruppo carbossilico  $\text{COO}^-$  sottoforma di  $\text{CO}_2$ , formando il ribulosio-5-P con produzione di  $\text{NADPH}$ .

## RIBULOSIO, RIBOSIO E XILULOSIO

Questo ribulosio è importante perché, una volta che è presente nella cellula, può essere riconosciuto, per esempio da una isomerasi che lo trasforma in ribosio. Quindi via via che la via dei pentosi fosfati va avanti, il ribulosio può essere trasformato in ribosio e, se è necessaria la sintesi ex novo di nucleotidi, questo ribosio sarà utilizzato. Se invece non abbiamo bisogno di utilizzare il ribosio all'interno della cellula, rimarranno nella cellula delle molecole di ribulosio e delle molecole di ribosio, perché l'isomerasi è un enzima che non cambia l'equilibrio di reazione. Via via che aumenta il livello di ribulosio attraverso l'isomerasi si forma il ribosio e attraverso l'epimerasi possiamo avere lo xilulosio.

Questa via può essere importante, più che per il ribosio per la formazione di  $\text{NADPH}$ . Questo perché una cellula può avere bisogno di un'intensa sintesi di composti e non necessariamente può aver bisogno di sintetizzare dei nucleotidi ex novo (sia per fare mRNA sia per passare da ribonucleotidi a deossiribonucleotidi e quindi andare in divisione). Inoltre il  $\text{NADPH}$  può essere utilizzato per quei processi di detossificazione intracellulari. Quindi possono esserci delle reazioni che interessano il  $\text{NADPH}$ , quindi il livello intracellulare di  $\text{NADPH}$  si abbassa, quello di  $\text{NADP}^+$  si alza allora la G-6-P deidrogenasi, che è il primo enzima su cui si agisce con la regolazione, viene attivata. La cellula quindi può intraprendere la via dei pentosi fosfati perché è interessata prevalentemente al  $\text{NADPH}$ . Ecco che allora se la cellula ha bisogno di tante molecole di  $\text{NADPH}$  inizia ad attivare la G-6-P deidrogenasi per produrre il  $\text{NADPH}$  necessario. La cellula quindi ha anche formato un certo numero di molecole di ribulosio. Il ribulosio, aumentando la propria concentrazione intracellulare, potrà essere utilizzato:

- dalla isomerasi, per cui da ribulosio si forma il ribosio
- dalla epimerasi, per cui da ribulosio si forma xilulosio

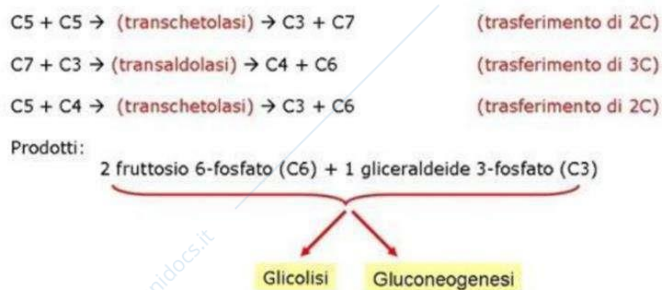
Quindi progressivamente all'interno della cellula si producono 1/3 di ribuloso, 1/3 di ribosio e 1/3 di xiluloso. La cellula cerca di utilizzarle questi zuccheri a 5C. Ad esempio questa via è importante per l'eritrocita (poi vedremo perché), ma è chiaro che questo eritrocita non può buttare via uno scheletro carbonioso a 5 atomi, quindi o l'eritrocita o un'altra cellula che ha usato il glucosio per avere NADPH, ha bisogno di riutilizzare questi zuccheri attraverso una via che non è ossidativa, ma che permette di utilizzare queste molecole formando degli zuccheri che potranno partecipare alla via glicolitica.

Per intraprendere queste reazioni il ribuloso ha una ribuloso-5-P isomerasi che può trasformarlo nel suo isomero, il ribosio-5-P, e anche una ribuloso-5-P epimerasi che lo trasforma in xiluloso-5-P. Le reazioni sono reversibili, però se io ho fatto questa via metabolica e ho aumentato i livelli di ribuloso, la reazione andrà verso la formazione del ribosio e verso la formazione dello xiluloso.

## BILANCIO DELLA FASE NON OSSIDATIVA

Facendo un bilancio delle reazioni si può notare che sono stati prodotti diversi zuccheri a 5C: nella prima reazione a partire da due zuccheri a 5C (ribosio e xiluloso), abbiamo formato uno zucchero a 7C e uno zucchero a 3C (seuoepptoloso e gliceraldeide); nella reazione successiva, sempre tra aldosi e chetosi (gliceraldeide e seuoepptoloso), attraverso la transaldolasi, abbiamo formato uno zucchero a 6C e uno zucchero a 4C (fruttosio ed eritrosio); mentre attraverso l'ultima reazione dallo xiluloso a 5C e dall'eritrosio a 4C, si forma una molecola a 6C e una a 3C (fruttosio e gliceraldeide).

Se si fa una somma di queste reazioni si può notare che complessivamente sono state utilizzate 3 molecole a 5 atomi di carbonio che sono ribosio5-P, ribuloso5-P e xiluloso5-P e attraverso queste reazioni abbiamo formato complessivamente 2 molecole a 6 atomi di carbonio che è il fruttosio 6 fosfato e abbiamo prodotto come bilanciamento una molecola di gliceraldeide-3-fosfato, quindi se la cellula necessita di un NADPH i prodotti a 5 atomi di carbonio (i pentosi) attraverso l'azione reversibile delle transchetolasi e delle transaldolasi possono essere convertiti in molecole che sappiamo utilizzare che sono il fruttosio-6-fosfato e la gliceraldeide-3-fosfato.



In questa serie di reazioni abbiamo visto come il glucosio può essere utilizzato per produrre NADPH, ribosio ed eventualmente con la fase non ossidativa composti che vanno nel composto della glicolisi.

Quindi nella via dei pentosi fosfati noi abbiamo la possibilità di intervenire, e tutte le reazioni che noi abbiamo visto sono delle reazioni che portano all'utilizzo di queste molecole.

## Cosa succede in una cellula dopo aver prodotto i pentosi fosfati?

La via dei pentosi fosfati è una via ubiquitaria cioè è una via metabolica che si trova in tutte le cellule del nostro organismo. Ci sono 3 casi in cui la cellula può utilizzare i prodotti della via pentosi fosfati:

**Caso 1:** La cellula ha bisogno di zuccheri pentosi ma non di NADPH. per esempio per proliferare o produrre nucleotidi; in questo caso la cellula ha bisogno di zuccheri a 5 atomi di carbonio, per cui la via dei pentosi fosfati sarà utilizzata prevalentemente per produrre il ribosio, e quindi a partire dal glucosio si utilizzerà questo per fare la gliceraldeide e attraverso l'azione delle transchetolasi o delle transaldolasi **produciamo**

**principalmente ribosio.** Quindi non verrà utilizzata la parte ossidativa della via dei pentosi fosfati perché il NADPH non serve alla cellula, ma verrà utilizzata direttamente la gliceraldeide per produrre ribosio-5-fosfato utilizzando gli enzimi transchetolasi e transaldolasi, ~~poiché attraverso la transchetolasi la utilizzeremo per la produzione di xilulosio ed eritrosio. Quindi gli enzimi che andremo ad utilizzare saranno le transchetolasi e le transaldolasi che ci porteranno alla produzione di ribosio-5-fosfato.~~

**Caso 2:** La cellula ha bisogno di NADPH, ma non di zuccheri pentosi. Questa cellula può essere molto attiva anabolicamente o attiva nella **detossificazione da farmaci**, ma dato che non sta proliferando non necessita dei pentosi. Questa cellula fa tutto il ciclo dei pentosi fosfati a partire dal glucosio, e il NADPH prodotto viene usato dalla cellula mentre i pentosi vengono trasformati in intermedi della glicolisi o della gluconeogenesi a seconda del tipo di cellula, ad opera delle transaldolasi e transchetolasi. In generale, fruttosio e gliceraldeide possono essere utilizzati nella glicolisi per formare ATP.

**Però, a livello del fegato può avvenire la gluconeogenesi:** A livello delle epatocite che hanno utilizzato la via dei pentosi fosfati per produrre il NADPH, se siamo in condizioni di ipoglicemia, tramite l'ormone glucagone viene segnalata una carenza di glucosio nel sangue, in questo caso; il **gliceraldeide** e il **fruttosio-6-fosfato** prodotti dalla via dei pentosi fosfati possono essere utilizzati nella **gluconeogenesi** in modo da produrre glucosio che verrà rilasciato nel plasma per rialzare la glicemia.

**Caso 3:** La cellula ha bisogno di NADPH e di energia. In questo caso la cellula svolge tutta la via dei pentosi con produzione di NADPH e pentosi. Il fruttosio-6-fosfato e la gliceraldeide che vengono prodotti prenderanno la via glicolitica per produrre molecole di ATP. Quindi in questo scenario, la via dei pentosi fosfati viene compiuta per intero dalla cellula.

**Via dei pentosi fosfati nei globuli rossi:** il globulo rosso non ha mitocondri quindi non svolge la respirazione cellulare per ottenere ATP, invece usa la glicolisi per produrre ATP, per questo il **suo consumo di glucosio è molto grande** (necessita di molto glucosio per effetto Pasteur). inoltre, il globulo rosso utilizza il glucosio anche per svolgere la via dei pentosi fosfati.

**il globulo rosso svolge solo la prima parte del ciclo dei pentosi, producendo pentosi e NADPH.**

**i pentosi** prodotti entrano come intermedi nella glicolisi con lo scopo di produrre l'energia necessaria per il globulo stesso.

**il globulo rosso ha bisogno dell'ATP per:** mantenere il ferro dell'emoglobina in forma ridotta ( $Fe^{++}$ ). mantenere alti livelli di potassio  $K^+$  e bassi livelli di  $Na^+$  e  $Ca^{+2}$  all'interno del citoplasma; mantenere in forma ridotta i gruppi -SH di emoglobina, enzimi e proteine di membrana. E mantenere la sua caratteristica forma biconcava.

**il NADPH:** che serve come agente antiossidante contro l'azione dell'ossigeno nei confronti del ferro dell'emoglobina: l'ossigeno ossida il ferro ferroso  $+2$  dell'emoglobina che si trasforma nella **metaemoglobina con il ferro ferrico  $+3$** , e quindi l'ossigeno si riduce all'**anione superossido** che è un radicale libero pericoloso. Questi problemi vengono risolti grazie ad un tripeptide detto **glutazione**.

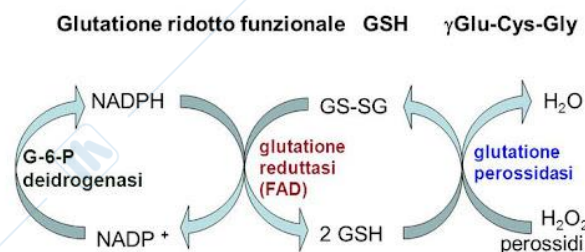
il **glutazione** è un **tripeptide** (formato da 3 amminoacidi: l'acido glutammico, la cisteina e la glicina), ~~esso è l'unico tripeptide in cui il legame peptidico fra gli amminoacidi è sintetizzato in maniera enzimatica.~~ il glutazione è importante perché viene ossidato (al posto del ferro dell'emoglobina) grazie alla presenza del gruppo tiolico -SH sulla cisteina del glutazione stesso.

**(1) il NADPH risolve il problema dell'emoglobina ossidata:** ad opera di un enzima detto **glutazione riduttasi**, il NADPH cede i suoi elettroni al glutatione ossidato GSSG (che è un tripeptide) che diventa glutatione ridotto (GSH), e il NADPH si ossida a NADP+. In una reazione catalizzata dalla **metaemoglobina riduttasi**, questo glutatione ridotto, con gli elettroni che ha acquistato dal NADPH viene riossidato, e dall'altra parte viene ridotta la metaemoglobina (con il ferro ferrico+3) trasformandosi nell'emoglobina funzionante (con il ferro ferroso+2).

**(2) Detossificazione dell'anione superossido:** per neutralizzare l'alta attività ossidante dell'**anione superossido** interviene l'enzima **superossido dismutasi**; che catalizza una reazione di **dismutazione** (ossidazione e riduzione interna) che comporta la contemporanea ossidazione e riduzione dell'anione superossido trasformandolo in **acqua ossigenata ( $H_2O_2$ )** - perossido di idrogeno), che però anch'esso ha un potere ossidante. L'acqua ossigenata  $H_2O_2$  è il substrato di un enzima presente in tutte le nostre cellule detto **glutazione perossidasi** che catalizza una reazione di ossidoriduzione tramite cui l'acqua ossigenata viene ridotta in **acqua  $H_2O$** , mentre il **glutazione ridotto** viene ossidato in **glutazione ossidato**:



#### DIFESA DAL DANNO OSSIDATIVO



La glutazione perossidasi è un **enzima a selenio**: contiene Se-cisteina (Sec)

**NOTA:** L'acqua ossigenata può anche essere degradata dalla **catalasi**, anch'essa un enzima che catalizza una reazione di dismutazione, che converte due molecole di  $H_2O_2$  in acqua e ossigeno molecolare. (Es. quando si mette l'acqua ossigenata su una ferita, si forma una schiuma biancastra che è data da ossigeno e acqua, causata dalla catalasi che tenta di detossificare il tessuto).

#### L'importanza dei processi di detossificazione:

Le reazioni di detossificazione, sono molto importanti, perché sono utilizzate nel metabolismo di alcuni farmaci e cibi.

Il **favismo** è una manifestazione clinica caratterizzata da emolisi in risposta al consumo di fave (una pianta) ma può manifestarsi anche per assunzione di farmaci.

È una condizione che indica la carenza dell'enzima **glucosio-6-fosfato deidrogenasi** che è il primo enzima della via dei pentosi fosfati. Se l'enzima **glucosio-6-fosfato deidrogenasi** non funziona in individuo, la produzione di NADPH all'interno della cellula sarà difettiva; quindi si avrebbe la mancanza di NADPH importante per ridurre il glutatione ad opera del glutatione riduttasi, per cui si ha anche una mancanza del glutatione ridotto che è importante per detossificare. Per esempio, l'eritrocita possiede dipende solo dal glutatione ridotto per detossificare, per cui la mancanza del glutatione ridotto potrebbe causare dei

**problemi di detossificazione** in un individuo che non produce NADPH efficiente perchè non sarà in grado di compensare lo stress ossidativo, e per questo l'eritrocita va incontro ad emolisi. Può essere un'emolisi che si manifesta in presenza di alcuni cibi o farmaci, mentre se il danno è della glucosio-6-fosfato deidrogenasi, le conseguenze si possono manifestare in maniera cronica.

**I deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi possono tuttavia essere classificati in base alla gravità:**

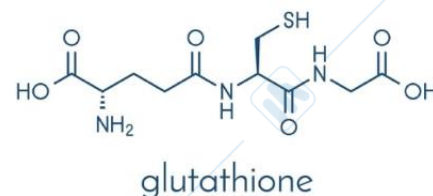
- 1) Possiamo infatti avere un enzima che funziona male, che darà un'anemia emolitica cronica, nei soggetti in cui si manifesta un'emolisi in maniera costante.
- 2) Se invece la deficienza di questo enzima è meno grave possiamo avere delle emolisi intermittenti.
- 3) Possiamo avere una deficienza lieve in cui l'attività della glucosio-6-fosfato, anche se in parte, è presente, quindi si avrà emolisi in pochissime condizioni.

## Glutazione - sintesi e funzione

Il **glutathione** ( $\gamma$ -glutamminil-cisteinil-glicina) è un **tripeptide** (formato da 3 amminoacidi: l'acido glutammico, la cisteina e la glicina), questo è l'unico tripeptide in cui il legame peptidico fra gli amminoacidi è sintetizzato in maniera enzimatica.

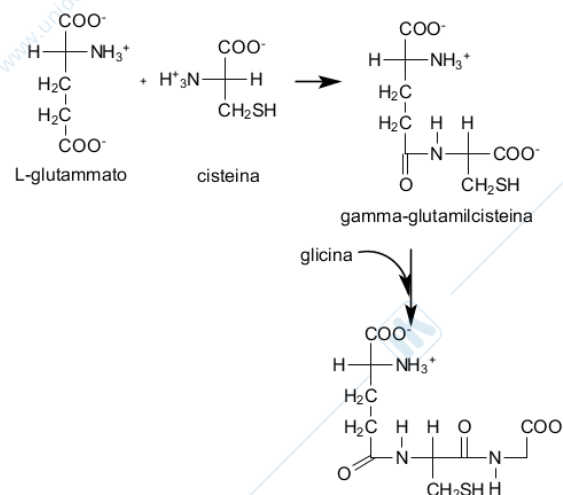
il glutathione è importante perché esso viene ossidato al posto di composti, quindi riduce così gli ossidanti pericolosi eliminandoli (riduce il perossido di idrogeno in acqua  $H_2O$ ).

Il glutathione può ridurre gli agenti ossidanti grazie alla presenza del gruppo tiolico -SH sulla cisteina del glutathione stesso.



**La sintesi del glutathione avviene nel citosol attraverso 2 tappe:**

- 1) **Nella prima tappa**, l'enzima  **$\gamma$ -glutamminil-cisteina sintetasi**.  **$\gamma$ -glutamminil-cisteina transferasi** catalizza la formazione del legame  **$\gamma$ -peptidico** tra il gruppo carbossilico presente in  $\gamma$  sulla catena laterale del glutammato e il gruppo amminico della cisteina, con l'intervento di una molecola di ATP, si ottiene così il dipeptide  **$\gamma$ -glutamminil-cisteina**.



- 2) **Nella seconda tappa**, l'enzima **glutathione sintetasi**, con l'intervento di una molecola di ATP, unisce la  $\gamma$ -glutamminil cisteina con la **glicina**, formando il **glutathione**.

La caratteristica fondamentale del glutatone è data dal **gruppo tiolico (-SH) della cisteina**. Il glutatone è una formidabile sostanza **antiossidante**: tende a ossidarsi in presenza di forti agenti ossidanti, impendendo altre molecole importanti di ossidarsi. Nel momento in cui il glutatone si ossida, due molecole di glutatone ridotto (GSH) reagiscono fra loro, si forma un ponte disolfuro fra i due residui di cisteina e vengono liberati due protoni. L'agente ossidante che reagisce con il glutatone appartiene alla categoria dei radicali reattivi dell'ossigeno (ROS): **anione superossido, radicale idrossilico e perossido di idrogeno**. Esiste un enzima fondamentale, la **glutazione perossidasi**, un enzima che presenta una seleniocisteina nel sito attivo, che elimina il perossido di idrogeno riducendolo ad  $H_2O$  e  $O_2$ . Esiste poi un altro enzima, la **glutazione reduttasi**, che è in grado di ridurre il glutatone ossidato a spese del NADPH che può essere ottenuto grazie ad altre vie metaboliche. Quindi l'azione combinata di glutazione perossidasi e glutazione reduttasi consente di creare un sistema di smaltimento di sostanze ossidanti pericolose.

### Detossificazione dell'anione superossido grazie al glutatone:

Per neutralizzare l'alta attività ossidante dell'**anione superossido** interviene l'enzima **superossido dismutasi**; che catalizza una reazione di **dismutazione** (ossidazione e riduzione interna) che comporta la contemporanea ossidazione e riduzione dell'anione superossido trasformandolo in **acqua ossigenata ( $H_2O_2$  - perossido di idrogeno)**, che però anch'esso ha un potere ossidante. L'acqua ossigenata  $H_2O_2$  è il substrato di un enzima presente in tutte le nostre cellule detto **glutazione perossidasi** che catalizza una reazione di ossidoriduzione tramite cui l'acqua ossigenata viene ridotta in **acqua  $H_2O$** , mentre il **glutazione ridotto** viene ossidato (**glutazione ridotto** -> **glutazione ossidato**):

Il glutatone svolge delle funzioni importanti infatti non solo partecipa alle reazioni redox, ma anche al trasporto degli aminoacidi, e alla detossificazione dei farmaci.

Il glutatone ossidato (ovvero due molecole di glutatone legate insieme da un ponte disolfuro G-S-S-G), si può formare tramite un'ossidazione diretta oppure tramite l'azione della **glutazione perossidasi**.

### L'importanza della detossificazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS):

Se all'interno della cellula si produce una grande quantità di specie radicaliche in seguito alla respirazione cellulare (nella catena respiratoria con la riduzione dell'ossigeno ad acqua), oppure in seguito a vie metaboliche (ad esempio il **citocromo P450**), o da processi infiammatori, la cellula in questi casi va incontro ad una **condizione di stress ossidativo**, perché i radicali vanno ad agire sul DNA, sulle molecole del doppio strato fosfolipidico e anche sulle proteine rendendole inattive. E un prolungato stress ossidativo (causato da carenza di enzimi o anche di vitamine) porta all'invecchiamento e al mal funzionamento degli organi e alla formazione di trombi e placche arteriosclerotiche. Per questo motivo è importante l'esistenza nella cellula di sistemi che controllano le specie radicaliche. A livello dell'eritrocita un forte stress ossidativo causa emolisi ma anche porta alla precipitazione di emoglobina ossidata formando i **corpi di Heinz**.

### Patologie a causa di deficit nella via dei pentosi fosfati:

**1) Deficit nell'enzima chiave glucosio-6-fosfato deidrogenasi:** Ci sono persone che presentano un deficit dell'enzima chiave del ciclo pentosi fosfati (glucosio-6-fosfato deidrogenasi): è più raro trovare queste persone nelle popolazioni che sono affette da malaria, perché quando il plasmodio della malaria trova eritrociti che non sono funzionanti per il deficit della glucosio-6-fosfato deidrogenasi o un altro enzima o vitamina, in questo eritrocita si può avere un **maggior stress ossidativo** e questo ha reso questi soggetti più resistenti all'infezione del plasmodio della malaria. (deficit G-6-P deidrogenasi ---> carenza di NADPH--> carenza di detossificazione dei radicali liberi --> radicali ROS attivi che provocano un maggior stress ossidativo).

## 2) Deficit nelle transchetolasi e transaldolasi:

Oltre al deficit della glucosio-6-fosfato deidrogenasi esistono anche patologie che sono legate ad un cattivo funzionamento di due enzimi che sono la **transchetolasi** e la **transaldolasi**. Se la transchetolasi non funziona bene o funziona in maniera ridotta causa una via dei pentosi fosfati non ossidativa che non funziona bene, come per esempio nella cirrosi epatica e nell'infertilità maschile. Può funzionare male quando abbiamo una dieta povera della vitamina B1, perchè da questa vitamina deriva il TPP (tiaminapirofosfato) che la transchetolasi utilizza come cofattore, quindi si manifestano patologie a causa di un deficiente funzionamento della transchetolasi. Lo stress ossidativo può causare mutazioni che vanno ad agire sul DNA, causando dei tumori.

### I ROS sono finemente controllati: il bilancio redox dipende sia dalla velocità di produzione che di eliminazione

- "Sistemi antiossidanti"
  - Superossido dismutasi (SOD)*
  - Catalasi*
  - glutazione perossidasi (Selenio dipendente)*
- "Sistemi di assorbimento disponibili"
  - albumina*
  - acido urico*
  - bilirubina*
  - glutazione*
 Non inducibili
- Vitamine ad azione antiossidante
  - Vit. A*
  - Vit. E*
  - Vit. C*
 Sono stabilizzate in prevalenza nelle membrane cellulari o in strutture simili
- Coenzima Q10 e acidi  $\alpha$ -lipoici
  - Carotenoidi e Flavonoidi
 Il  $\beta$ -carotene ha un'ottima azione antiossidante a basse tensioni di ossigeno (tessuti ischemici)

## Perchè l'iperglicemia è pericolosa - i composti di glicazione (AGE)

~~Se i livelli glicemici sono bassi il nostro cervello subisce dei danni (quindi vi è compromessa la condizione di sopravvivenza), se invece ho~~

Se un soggetto presenta dei livelli glicemici alti egli subirà danni a livello di cuore e muscoli, reni e organi interni ma in generale è garantita la sopravvivenza (i danni sono nel lungo tempo).

La presenza di glucosio alto a livello ematico porta alla formazione di **composti di glicazione non enzimatica** (AGE) che non è controllata da degli enzimi. Questi composti si formano in maniera chimica senza l'azione biologica, e questi composti portano alla formazione dei **danni del diabete anche a lungo termine**.

L'esempio più importante dei composti di glicazione è l'**emoglobina glicata** (HbA1c), sostanza che deriva dalla glicazione avanzata dell'emoglobina. L'emoglobina glicata si forma quando si accumula nel sangue troppo glucosio: attraverso un processo che si chiama glicosilazione, una molecola di zucchero si lega all'emoglobina contenuta nei globuli rossi (che hanno vita media di circa 120 giorni), in maniera proporzionale alla glicemia. I valori di HbA1c rispecchiano le concentrazioni medie di glucosio nel sangue negli ultimi tre mesi. Pertanto, **l'emoglobina glicata consente di sapere se la glicemia ha superato i livelli di "guardia" nelle persone diabetiche o a rischio di diventarlo.**

invece se i livelli di emoglobina glicata sono normali allora il soggetto avrà avuto picchi glicemici sporadici.

## LIPIDI:

I lipidi si classificano in **lipidi di riserva** (accumulati nel tessuto adiposo bianco e bruno sotto forma di diacilgliceroli e trigliceridi, quindi esteri del glicerolo) e **lipidi di membrana**: glicolipidi, e fosfolipidi (che possono essere glicerofosfolipidi o sfingolipidi).

### Funzioni dei lipidi:

- **Funzione energetica:** i lipidi costituiscono la maggior parte delle riserve energetiche dell'organismo costituendo circa l'85% delle riserve. Il 14% di queste sono fornite dalle proteine e solo una piccola parte (1%) sotto forma di carboidrati. i carboidrati sono estremamente idrofili, e pur avendo una bassa capacità osmotica trattengono acqua se accumulati. In questo modo limitano la massa di glicogeno che può essere depositata nella cellula: in stato di digiuno le riserve di glicogeno sono ridotte a zero (dopo 24 ore o meno già sono carenti). Nel corso della notte le riserve di glicogeno epatico sono quindi insufficienti per permettere di mantenere la glicemia a valori opportuni, con conseguente avvio del processo di gluconeogenesi. **i lipidi invece sono idrofobi** e presentano capacità osmotica pari a zero (in particolare i trigliceridi, che saranno accumulati come riserva energetica).
- **Funzione termica:** isolano gli organi interni attivamente.
- **Funzione strutturale:** i lipidi sono costituenti principali delle membrane cellulari.
- **Funzione regolatoria:** svolta da ormoni e secondi messaggeri di natura lipidica. Gli ormoni steroidei sono di natura lipidica, e anche secondi messaggeri che sono molecole che trasducono il segnale: PIP3, ceramide, DAG.

### Digestione e assorbimento dei lipidi:

I lipidi del nostro organismo possono derivare da **fonti esogene** (quindi dalla dieta) o da **fonti endogene** (sintetizzati dall'organismo stesso): infatti le nostre cellule hanno la capacità di sintetizzare lipidi da composti molecolari più semplici. I grassi assunti con la dieta sono digeriti a livello dell'intestino tenue. Qui saranno **emulsionati** dagli acidi biliari della **bile** proveniente dalla cistifellea (acidi biliari derivati dal colesterolo e sintetizzati dagli epatociti). Con l'arrivo del bolo alimentare nel duodeno, si ha la contrazione della cistifellea, con l'arrivo della bile nel duodeno. Questi acidi biliari disgregano gli aggregati lipidici emulsionando questi composti (agiscono quindi come detersivi). Il processo di emulsione aumenta quindi la superficie di contatto dei lipidi con la soluzione idrofilica, con un corrisponde aumento nella velocità di degradazione, che avverrà grazie agli enzimi digestivi prodotti nel pancreas esocrino.

Gli **enzimi pancreatici** sono tre:

- I. **Lipasi pancreatici:** che appartiene alla classe delle idrolasi. Questo enzima catalizza la digestione dei **trigliceridi** rompendo il legame estere che lega il **glicerolo** all'**acido grasso**. Per il corretto funzionamento necessita inoltre di un coenzima, la colipasi, che aiuta la funzione della lipasi ponendosi sulla superficie esterna delle gocce lipidiche.
- II. **Colesterolo esterasi:** è un enzima che catalizza la scissione degli esteri del colesterolo. il **colesterolo** può infatti esistere nel nostro organismo in due forme:
  - a. **Libero**, e quindi assorbito come tale.
  - b. **Esterificato**, la forma più comune del colesterolo assunto con l'alimentazione.

L'esterificazione avviene sul gruppo ossidrilico e nella maggior parte dei casi lega la molecola con un acido grasso insaturo. Il colesterolo esterificato si scinde il legame estere con formazione di **colesterolo libero** e di un **acido grasso**.

**III. Fosfolipasi A2:** un **fosfolipide** è formato da glicerolo con 3 gruppi OH di cui 2 gruppi OH sono esterificati con **acidi grassi**, mentre il terzo OH è legato ad un **gruppo fosfato**, legato a sua volta ad una **testa polare**. Esistono diversi tipi di fosfolipasi a seconda del legame estere che viene idrolizzato: A1, A2, C e D. **Questi legami sono chimicamente identici, ne consegue che la catalisi sarà identica ma condotta in punti differenti**. L'enzima pancreatico è la fosfolipasi A2, che in seguito all'idrolisi formerà un **lisofosfolipide** (ovvero un lipide privo dell'acido grasso in posizione 2) ed un **acido grasso libero**. **I lisofosfolipidi saranno successivamente assorbiti dalle cellule endoteliali che li trasformeranno nei fosfolipidi di partenza. Le altre fosfolipasi non sono coinvolte nella digestione dei lipidi.**

Questa classe di fosfolipasi è molto importante perché è la componente fondamentale dei veleni di ape e di cobra. Le fosfolipasi di questi veleni hanno una grande concentrazione di lisofosfolipidi, con conseguente lisi cellulare che permette un efficiente passaggio di tossine.

--->L'idrolisi di questi composti porterà quindi alla formazione di **monogliceridi** e **acidi grassi liberi**, che passeranno attraverso la cellula intestinale. Questi saranno qui riconvertiti nelle molecole originali, cioè trigliceridi di partenza. Anche i lisofosfolipidi saranno trasformati nei fosfolipidi in seguito al legame con un acido grasso; anche il colesterolo libero, che passato attraverso il plasmalemma delle cellule intestinali sarà per la maggior parte esterificato, e una piccola parte rimarrà come colesterolo libero.

La cellula intestinale è in grado di sintetizzare **lipoproteine**, complessi caratterizzati da una componente lipidica (in questo caso di origine esogena), e proteine (apolipoproteine) di natura anfipatica, con una porzione idrofobica di legame con i lipidi ed una idrofila che permette il loro trasporto in circolo. Le lipoproteine trasportano i lipidi nel circolo linfatico e in quello circolatorio, e quelle sintetizzate dalle cellule intestinali prendono il nome di **chilomicroni**. Questi chilomicroni sono caratterizzati da un core fortemente idrofobico, con la componente che rifugge l'acqua (acidi grassi) verso l'interno; e da una superficie idrofila (teste polari dei fosfolipidi). Il colesterolo si colloca intercalandosi sulla superficie esterna. Al colesterolo e teste polari dei fosfolipidi si aggiunge la componente proteica del chilomicro: la **Apolipoproteina-48**. I chilomicroni si riversano nella linfa, e raggiungeranno il sistema circolatorio. **L'apolipoproteina B-48** è l'unica formata dalle cellule intestinali, ~~le altre sono formate dagli epatociti.~~

### Funzioni delle apolipoproteine:

- \* Stabilizza le sospensioni micellari in acqua.
- \* vengono riconosciuti da recettori, e inviano segnali che permettono alla lipoproteina di essere captata in senso periferico. A svolgere questa funzione sono in particolare due **apolipoproteine**:

i) **B-48**, riconosciuta da un recettore collocato nel tessuto epatico. Tramite questo legame la lipoproteina sarà endocitata e catturata dal fegato.

ii) **B-100**, proteina epatica. Tutte le cellule del nostro organismo presentano un recettore per questa proteina.

\*Alcune funzionano da cofattori enzimatici, indispensabili quindi per l'attivazione degli enzimi. Queste sono: **i) ApoC-2**      **ii) ApoA-1**.

Queste si associano a determinati enzimi, attivandoli, come accade per la ApoC-2 che attiva la lipasi endoteliale.

Esistono vari tipi di lipoproteine, come le **VLDL**, le **LDL** e le **HDL**, di origine epatica. La differenza tra questi 3 tipi si basa sulla densità. Le lipoproteine infatti si classificano in famiglie in base alla diversa densità. Abbiamo quindi le very low density lipoprotein (VLDL), le low density lipoprotein (LDL) e le high density lipoprotein (HDL). I **chilomicroni** sono lipoproteine giganti, molto più voluminosi degli altri complessi e presentano inoltre la densità più bassa. Il grado di densità deriva dal rapporto fra proteine e lipidi: maggiore sarà il numero di lipidi minore sarà la densità. minore sarà la percentuale di proteine, minore sarà la densità.

I **chilomicroni** sono lipoproteine giganti, che trasportano trigliceridi di natura esogena assunti con la dieta. La composizione di queste lipoproteine:

- 90% **trigliceridi**
- 3% **esteri del colesterolo**
- **Apolipoproteine**, di cui la più presente è **B-48**, che ha origine intestinale. Le altre lipoproteine sono acquisite in seguito ad uno scambio con lipoproteine epatiche.

▪ I **chilomicroni** sono sintetizzati dalle cellule intestinali, composti per il 90% da trigliceridi e per il 10% da glicerolo. I chilomicroni trasportano i lipidi dall'intestino verso il fegato prevalentemente, e durante la loro permanenza in circolo tendono a perdere trigliceridi sotto forma di acidi grassi e glicerolo, grazie all'enzima lipoproteina lipasi endoteliale: Quando entrano nella circolazione scambiano apolipoproteine con le **HDL** (in particolare dall'HDL prendono **ApoC-2** e la **ApoE**, e cedono invece la **ApoA-1**). **ApoC-2** è molto importante, essendo questa l'attivatore della **lipoproteina lipasi endoteliale**. Questa lipasi, che fa parte della classe delle idrolasi, è rivolta verso il lume dell'endotelio (porzione luminale). I chilomicroni circolano nel lume, rotolando su di esso. Quando si avrà il legame fra la apolipoproteina C2 e il suo recettore si ha l'inizio dell'attività lipasica dell'enzima lipasi, con la degradazione dei diacilgliceroli contenuti nella lipoproteina: per cui il chilomicrone perderà progressivamente acidi grassi e glicerolo durante il suo circolo, cioè risulterà sempre più povero di trigliceridi. Si trasformeranno quindi in **chilomicroni secondari** (remnants) che possiedono la lipoproteina Apo-E, riconosciuta da recettori presenti negli epatociti. Questo riconoscimento permette al fegato di assorbire i chilomicroni secondari per endocitosi. A questo punto il fegato va a riutilizzare i lipidi che ha accumulato formando un altro tipo di lipoproteine : le **VLDL** (anch'esse trasportatori di trigliceridi). (nonostante la lipoproteina lipasi venga definita endoteliale questa viene prodotta dal tessuto su cui la proteina è collocata, per passare quindi al glicocalice.) Ne consegue che il termine endoteliale indica solamente la collocazione, non l'origine.

### **VLDL (very low density lipoprotein)**

Sono lipoproteine caratterizzate da una percentuale proteica bassa (10%). Sono sintetizzate dal fegato e sono 15. Sono trasportatori dei trigliceridi. I lipidi trasportati da questa classe sono di natura endogena, sintetizzati continuamente dal fegato; Questo è molto importante in quanto i chilomicroni si trovano in circolo in maniera incostante, hanno concentrazioni rilevanti a seguito di un pasto, e dopo qualche ora vanno a 0. Le VLDL invece mantengono una concentrazione più o meno costante durante le 24 ore della giornata, pertanto sono un trasportatore alternativo per trasportare lipidi verso quei tessuti che hanno un metabolismo basale lipidico, come ad esempio il tessuto muscolare o il fegato stesso, ~~sebbene quest'ultimo non necessiti di un sistema di trasporto in quanto possiede lipidi a sufficienza di per sé.~~

Subito dopo essere sintetizzate dal fegato, le VLDL sono ricche di trigliceridi e una volta secrete nel plasma vengono dette **VLDL nascenti**. Le VLDL nascenti acquisiscono dalle HDL due apolipoproteine, la Apo-E e la Apo-C2. Così facendo diventano delle VLDL mature costituite dai trigliceridi oltre il 50-60%, la restante parte invece è carica di altre tipologie di lipidi, tra cui fosfolipidi, colesterolo esterificato e colesterolo libero.

Analogamente ai chilomicroni, la Apo-C2 presente sulle VLDL è un attivatore della lipoproteina lipasi endoteliale la cui azione è di scindere i trigliceridi in acidi grassi e glicerolo, che passano per diffusione nel tessuto dove questa è presente. Dunque le VLDL rimanendo costantemente in circolo sono soggetti a perdita continua della loro componente di trigliceridi.

Nei capillari dei tessuti extraepatici la lipoproteina lipasi depaupera le VLDL che in circolo divengono prima **IDL** (intermediate density lipoprotein- perché la perdita di lipidi comporta un cambiamento della densità e consequenzialmente della classificazione) e in seguito si convertono in **LDL**.

In questo passaggio da VLDL a LDL c'è un rimaneggiamento della componente lipidica: aumenta la concentrazione percentuale di colesterolo esterificato e libero vista la diminuzione dei trigliceridi.

**N.B.** il colesterolo può essere sia esogeno che endogeno (esogeno=assunto con la dieta, endogeno=prodotto dal corpo stesso). tuttavia è per la maggior parte endogeno poiché è neosintetizzato dal fegato, che produce circa 2/3 del nostro fabbisogno di colesterolo giornaliero.

**IDL (intermediate density lipoprotein)** sono forme di conversione intermedia.

### **LDL (low density lipoprotein)**

sono lipoproteine con una percentuale di proteine più alta (25%), sono inoltre caratterizzate da una elevata concentrazione di colesterolo (con una percentuale che supera il 50%). Le LDL si formano dalla maturazione delle VLDL (parte del *metabolismo intravasale*) dopo che le VLDL perdono alcune apolipoproteine, e quindi diventano LDL che conservano dalle VLDL solo una apolipoproteina - che è la B-100. Le LDL trasportano perlopiù colesterolo (con una percentuale che supera il 50%) dal fegato verso i tessuti periferici.

**L'importanza di trasportare il colesterolo e fornirlo ai tessuti periferici:** il colesterolo è uno dei componenti fondamentali delle membrane e quindi il suo trasporto verso i tessuti serve per rifornire le cellule che lo usano prevalentemente per andare a comporre le membrane cellulari, dove il colesterolo svolge una importante funzione di regolatore della fluidità del plasmalemma.

**in che modo queste cellule acquisiscono il colesterolo necessario per preservare la giusta fluidità della loro membrana plasmatica?** è un meccanismo comune a tutte le cellule, epatociti comprese: Innanzitutto avviene un legame fra l'apolipoproteina B-100 e i suoi specifici recettori di membrana posseduti da tutte le cellule del nostro organismo, e da questa interazione proteina-recettore seguita dall'endocitosi da parte della cellula, quindi la formazione di un endosoma tramite la clatrina (che poi verrà persa in seguito). I recettori che riconoscono la apolipoproteina vengono separati dall'endosoma primario e gemmati fuori mediante una vescicola, l'LDL invece rimane all'interno di quello che sarà l'endosoma secondario. l'endosoma secondario si fonde con i lisosomi e forma un fagosoma, che contiene delle **idrolasi acide** (enzimi digestivi che degradano sia la parte lipidica sia la parte proteica) e **i lipidi vengono liberati e trasportati dalle LDL con una grande quota di colesterolo, oltre ai trigliceridi che vengono degradati a**

**glicerolo e acidi grassi.** \*I recettori che erano stati separati dall'endosoma primario vengono riciclati sulla membrana plasmatica dove continuano la loro azione

### **HDL (high density lipoprotein)**

Si tratta delle proteine ad alta densità, ovvero che presentano una maggiore percentuale di proteine rispetto alle altre lipoproteine.

Le *HDL* sono prodotte principalmente dal fegato (ma in piccola parte anche dall'intestino) e trasportano anch'esse colesterolo, tuttavia il loro trasporto è retrogrado, ovvero trasportano colesterolo dai tessuti periferici verso il fegato.

Le *HDL nascenti* hanno una forma discoidale -dovuta al basso contenuto lipidico e alla loro alta densità- con un alto contenuto di proteine, e l'apolipoproteina principale qui è la Apo-A1.

l'apolipoproteina A1 delle HDL attiva l'enzima **lecitina colesterolo acil- transferasi (LCAT)**, che trasferisce l'acido grasso (insaturo, di solito) in posizione 2 di un fosfolipide al colesterolo libero, esterificandolo. Da questa reazione di trasferimento si formano un **colesterolo esterificato** e la **lisolecitina**.

Nelle lipoproteine la forma di trasporto favorita del colesterolo è quella esterificata che ne va a comporre il nucleo principale; nelle cellule e nelle membrane si trova invece in forma libera che permette di regolare la fluidità. L'esterificazione da parte della lecitina colesterolo acil-transferasi aumenta ancora di più la lipofilia del colesterolo, e quest'azione permette di estrarre il colesterolo libero dal plasmalemma e ad inserirlo all'interno dell'HDL. Questo step comporta l'acquisizione della forma sferica e quindi la promozione ad *HDL mature*, che in seguito vengono degradate a livello del fegato.

### **Patologie correlate**

Il trasporto dei lipidi come si può immaginare è estremamente importante nei termini della fisiologia generale, al punto che eventuali disfunzioni che possono aver luogo in questo ambito possono portare a patologie anche gravi, racchiuse nell'ambito patologico delle dislipidemie.

Le dislipidemie esistono in due forme, ovvero dislipidemie primarie e dislipidemie secondarie.

Dislipidemie **primarie** o primitive: derivano da qualche tipo di difetto genetico che interferisce con il meccanismo di trasporto dei lipidi

Dislipidemie **secondarie**: derivate da altre patologie che come conseguenza presentano un aumento di queste lipoproteine a livello del plasma, patologie che vengono quindi dette iper-lipoproteinemie. Sono molto più comuni e varie delle dislipidemie primarie, tuttavia a noi biochimica interessano più le primarie in quanto consentono di comprendere meglio il meccanismo con cui avvengono questi scambi lipidici.

Nel caso, ad esempio, di una iperlipoproteinemia che si manifesta con un accumulo di

chilomicroni la forma primaria riguarda o dei problemi nella sintesi dei chilomicroni o nell'attivazione della lipoproteina-lipasi. Può quindi essere causata da un deficit della lipoproteina lipasi che può mancare oppure viene espressa a basse concentrazioni per un problema genetico.

Un altro deficit può essere a carico della Apo-CII, lipoproteina attivante la lipoproteina- lipasi, quindi ci sono dei pazienti che hanno o una diminuita concentrazione o una perdita di struttura della Apo CII che quindi non consente l'attivazione della LPL, sebbene questa sia in buono stato.

In entrambi i casi i chilomicroni non vengono degradati velocemente per cui si ha una iperlipoproteinemia. Così come si può avere un eccesso di chilomicroni si può anche avere un eccesso di LDL plasmatiche, per cui si parla di ipercolesterolemia. Nel caso primario questa patologia è dovuta all'assenza o deficienza dei recettori per l'LDL (a causa di difetti genetici), di conseguenza la mancanza di uptake periferico di LDL causa iperlipoproteinemia plasmatica o ipercolesterolemia familiare in quanto la causa scatenante è un difetto genetico ereditario.

Un accumulo di VLDL può anch'esso avere una forma primaria molto rara, dovuta ad un difetto nel gene che codifica per l'ApoE. L'Apo E serve infatti per la ricaptazione delle VLDL a livello del fegato che, in carenza o in un malfunzionamento dell'ApoE, ha un basso reuptake a livello intravasale delle VLDL che quindi si accumulano in circolo.

Un altro tipo di iperlipoproteinemia dovuta alle VLDL è la iperlipoproteinemia endogena dovuta ad una mancata sintesi di acilgliceroli epatici. Non è un problema di ricaptazione ma un problema di una eccessiva sintesi di trigliceridi a livello epatico: il riassorbimento di VLDL a livello epatico è normale, tuttavia queste vengono secrete in maniera eccessivamente massiccia.

In una forma ancora più rara si può avere una iperlipoproteinemia dovuta sia ad un eccesso di VLDL sia da un eccesso di chilomicroni e le cause primarie sono molto simili, in quanto difetti della lipoproteina lipasi influenzano il catabolismo di entrambe le lipoproteine. Lo stesso tipo di problema livello genico può dare sia un eccesso di chilomicroni ematico, sia un eccesso di VLDL.

### **Coronaropatie ed elevata colesterolemia**

Nella società occidentale una delle più grandi cause di morte sono le coronaropatie, e la mortalità delle coronaropatie è correlata con un'alta concentrazione di colesterolo ematico: maggiore è la colesterolemia, maggiore è la probabilità di andare incontro a problemi cardiovascolari, in particolare l'infarto.

Fino a non molti anni fa la soglia di attenzione per i livelli di colesterolo totale era 250 mg/ dl, ultimamente questa soglia è stata abbassata per prevenire eventuali rischi a 200 mg/dl. In questo intervallo qui si arriva addirittura a dimezzare la probabilità di insorgenza di eventuali coronaropatie.

I farmaci utilizzati nella terapia per una elevata colesterolemia sono le statine, che sono tra i farmaci più utilizzati nel mondo occidentale. In realtà, il vero problema della gestione della colesterolemia è distinguere fra i due tipi di colesterolo che troviamo in circolo: ovvero il colesterolo contenuto nelle LDL e il colesterolo contenuto nelle HDL. Infatti tanto maggiore è la concentrazione di HDL tanto è più basso il rischio di coronaropatie. È informativo da un punto di vista clinico il colesterolo totale, ma è opportuno conoscere quanto è presente in percentuale il colesterolo LDL e quanto è presente in percentuale il colesterolo HDL per fare una diagnosi che abbia un senso.

## Catabolismo degli acidi grassi:

quantitativamente è il metabolismo catabolico principale, ed è svolto particolarmente dal tessuto muscolare.

Gli acidi grassi possono essere endogeni o esogeni (derivati dalla dieta).

i chilomicroni, trasportano gli acidi grassi sotto forma di trigliceridi che poi si idrolizzano ad acidi grassi e glicerolo, e gli acidi grassi possono essere derivati dal fegato (endogeni) e risultano contenuti all'interno delle VLDL, oppure possono derivare dalla degradazione cioè dalla **lipolisi** di trigliceridi di origine endogena a livello del tessuto adiposo.

La cellula adiposa è una cellula che conserva all'interno del suo citoplasma un'unica goccia di lipidi molto grande, composta in maggior parte da **triacilglicerolo**. In seguito a certi stimoli, per esempio in una situazione di digiuno, si attiva la lipolisi e i trigliceridi endogeni vengono idrolizzati in **acidi grassi** e **glicerolo** che vengono riversati nel plasma.

Il glicerolo verrà prevalentemente trattenuto dalle cellule epatiche, mentre gli acidi grassi andranno prevalentemente a rifornire quei tessuti che utilizzano gli acidi grassi come fonte di energia e che hanno un metabolismo che dipende dall'ossidazione degli acidi grassi.

### Mobilizzazione degli acidi grassi nel tessuto adiposo: \_\_\_\_\_

La **mobilizzazione di acidi grassi** consiste nell'idrolisi **dei** trigliceridi situati all'interno **degli** adipociti ad **acidi grassi** e glicerolo. Questi **acidi grassi**, detti "liberi" perché non più esterificati, prendono anche il nome di **FFA** (Free Fatty Acids).

inanzitutto, viene indotta la **lipolisi**. **Il tessuto adiposo risponde a vari tipi di stimoli, possiede infatti recettori per glucagone, insulina e adrenalina.**

Gli ormoni che vanno ad indurre la **lipolisi** sono il glucagone e l'adrenalina. Sono due ormoni diversi che rispondono a due condizioni diverse, che comunque svolgono la stessa azione a livello dell'adipocita (inducono la lipolisi)

**1) il glucagone**, è un ormone peptidico prodotto dalle cellule  $\alpha$  del pancreas in risposta ad una situazione di ipoglicemia, dunque è un ormone iperglicemizzante, ma è anche coinvolto nella regolazione dei lipidi (anche per l'insulina vale questa caratteristica).

A livello degli adipociti il glucagone si lega ad un recettore che appartiene alla **categoria GPCR** (G-protein coupled receptor), che è tra l'altro la categoria recettoriale più diffusa nei meccanismi di segnalazione metabolica.

**2) L'adrenalina** viene secreta in condizioni di stress, e si lega ad un recettore adrenergico (diverso da quello del glucagone ma appartenente alla stessa categoria dei GPCR);

Come già accennato questi due recettori sono associati a delle proteine G, che sono proteine trimeriche cioè posseggono tre subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e si chiamano proteine G in quanto legano il GDP e il GTP. In condizioni di riposo (di non stimolazione), la proteina G si trova nella sua forma inattiva legata al GDP. Quando arriva un ormone (condizione di stimolazione), il recettore si lega all'ormone, avviene un cambio

di conformazione del recettore, che lo rende in grado di legare la proteina G. Il legame fra recettore e proteina G induce la proteina G ad espellere il GDP e prendere invece un GTP che si lega alla subunità  $\alpha$  della proteina G. Si attiva così la proteina G.

A questo punto si staccano le due subunità inibitorie  $\beta$  e  $\gamma$ , e la proteina  $\alpha$ -GTP si lega ad un'altra proteina di membrana che è la **adenilato ciclasi**.

L'adenilato ciclasi si attiva e converte l'ATP in **AMP ciclico** e pirofosfato. Il pirofosfato viene in seguito idrolizzato in modo tale da rendere tale reazione fortemente esoergonica. L'AMP ciclico (cAMP) è un secondo messaggero, e quindi per definizione è una molecola che trasduce il segnale che deriva da un recettore di membrana. ~~Il messaggero iniziale è un ormone, il messaggero secondario è quella molecola segnale che viene prodotta in seguito al legame messaggero ormone.~~

La concentrazione di cAMP in condizione base è pari a zero, e viene mantenuta bassa dall'azione dell'enzima fosfodiesterasi, che scinde il cAMP in AMP, rendendo le sue concentrazioni molto basse.

In seguito all'azione della adenilato ciclasi quindi cresce la concentrazione di cAMP, e questo è un segnale per la **PKA (protein chinasi A)**.

La **PKA** possiede 4 subunità: due catalitiche e due regolatorie: il cAMP si lega alle due subunità regolatorie, staccandole dalle catalitiche e fa sì che dunque la PKA acquisti la sua capacità catalitica di **fosforilare**. Come tutte le chinasi, la PKA trasferisce il fosfato in posizione  $\gamma$  dell'ATP su una delle proteine bersaglio, nello specifico è in grado di andare a fosforilare i residui di serina e di treonina.

Nel tessuto adiposo ci sono due principali proteine bersagli della PKA. Una di queste è la **perilipina**:

**La perilipina** è una proteina che ha una funzione prevalentemente strutturale, che va a stratificarsi intorno al vacuolo lipidico presente all'interno del citoplasma dell'adipocita, formando un'interfaccia che si interpone fra questa grande goccia lipidica e il citoplasma.

la fosforilazione della perilipina da parte della PKA fa sì che l'avvolgimento della perilipina intorno al vacuolo lipidico viene. La seconda proteina bersaglio di fosforilazione dalla PKA è una proteina detta **lipasi ormone-sensibile**, che è una idrolasi che va a idrolizzare i trigliceridi in acidi grassi e glicerolo.

Infatti la fosforilazione della perilipina ha un doppio scopo:

**i)** La rimozione della perilipina (dopo che diventa fosforilata dalla PKA) permette l'accesso della lipasi ormone-sensibile ai trigliceridi contenuti nella goccia lipidica.

**ii)** la perilipina fosforilata attiva un'altra lipasi detta **adipose triglyceride lipase (ATGL)** che opera nella degradazione dei trigliceridi.

a questo punto, i prodotti di idrolisi (glicerolo e acidi grassi liberi) vengono riversati nel torrente circolatorio: il glicerolo è molto solubile e non ha problemi ad essere trasportato in circolo, invece gli acidi grassi liberi sono molecole lipidiche e quindi insolubili in acqua, per cui vengono captati dall'albumina, la più concentrata proteina serica, a cui si legano e da cui vengono trasportati in circolo. Ci sarà poi un rilascio di acidi grassi a livello periferico, dove le cellule che dipendono da questo tipo di substrato hanno trasportatori di membrana che facilitano l'ingresso di acidi grassi liberi nel citoplasma dove vengono ossidati.

## Funzione endocrina del tessuto adiposo :

il tessuto adiposo è anche un organo endogeno ed è in grado di produrre ormoni. Gli ormoni prodotti dal tessuto adiposo sono di due generi:

- \* ormoni pro-infiammatori,
- \* ormoni anti-infiammatori.

Le citochine prodotte dal tessuto adiposo sono dette **adipochine**.

Le adipochine pro-infiammatorie più importanti sono l'**interleuchina 6**, il **TNF** (tumor necrosis factor) e la **Leptina**. La leptina è un ormone che agisce a livello dei neuroni dell'ipotalamo regolando il senso di fame e di sazietà.

Il tessuto adiposo può secernere anche adipochine anti-infiammatorie, di cui la più importante è la adiponectina che aumenta la sensibilità all'insulina, mentre il TNF induce la resistenza all'insulina. ~~L'adiponectina agisce quindi non solo sull'omeostasi dei lipidi, ma anche su quello della membrana.~~ Molte malattie di tipo metabolico, come il diabete di tipo II, sono aggravate dalle adipochine pro-infiammatorie che si hanno in questo tipo di paziente. Infatti il diabete di tipo II è associato all'obesità e le due condizioni insieme portano a una prevalenza delle adipochine pro-infiammatorie (soprattutto leptina e TNF) che peggiorano il quadro patologico di queste malattie; di fatto creano un'aumentata risposta infiammatoria e una disfunzione metabolica. È stato visto recentemente che disfunzioni metaboliche hanno anche effetti sistemici dovuti a un aumento della produzione di citochine pro- infiammatorie.

## Destino del glicerolo

Il glicerolo nel plasma deriva quasi esclusivamente dalla lipolisi e quindi dal tessuto adiposo.

Il **glicerolo** viene fosforilato nel fegato dall'enzima **glicerolo- chinasi** che lo converte in **glicerolo-3 fosfato**, con la spesa di una molecola di ATP (fosforilazione ATP-dipendente).

**\*\*l'enzima che fosforila il glicerolo (glicerolo chinasi) è un enzima esclusivamente epatico, quindi solo il fegato è in grado di captare e metabolizzare il glicerolo.**

Il glicerolo-3-fosfato è poi ossidato dal **glicerolo-3-fosfato deidrogenasi** (enzima citosolico) che trasforma il glicerolo-3-fosfato in **diidrossiacetone fosfato**.

Il diidrossiacetone fosfato è un intermedio della glicolisi, quindi il glicerolo attraverso questi due enzimi è in grado di proseguire nella glicolisi diventando piruvato, oppure, più frequentemente, prosegue come precursore della gluconeogenesi.

Di solito, nelle condizioni che siamo esaminando, in cui cioè c'è un'attiva glicolisi, la via preferita di utilizzo di glicerolo a livello del fegato è quella della gluconeogenesi.

In teoria il diidrossiacetone fosfato può fare entrambe le cose, ma nelle condizioni in cui è presente glicerolo (lipolisi), in cui cioè è presente glucagone e si ha ipoglicemia, la strada prevalente è quella della gluconeogenesi.

## Attivazione

### Destino degli acidi grassi:

#### 1) Attivazione degli acidi grassi:

L'attivazione gli acidi grassi liberi è la prima cosa che avviene quando questi entrano in una cellula per poter diventare **metabolicamente reattivo**, perché col gruppo carbossilico libero non potrebbe essere reattivo. L'attivazione dell'acido grasso avviene nel citoplasma ad opera dell'enzima **acil-coenzima A sintetasi** (una **ligasi** un enzima della classe 6): Il substrato di questo enzima è la **molecola dell'acido grasso** che viene attivato nello stesso modo sia se fosse saturo o insaturo, lungo o breve, non importa.

#### La reazione si svolge in due passaggi:

**Primo passaggio:** nel primo passaggio il gruppo carbossile dell'acido grasso reagisce con la molecola di ATP presente a livello del sito attivo. In questo caso, l'idrolisi dell'ATP produce **AMP + Pirofosfato**, che ha una resa energetica superiore (rispetto a ADP+Pi). (**Pirofosfato= P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**).

Poi, questo **AMP** prodotto dall'idrolisi, va a legarsi al gruppo carbossile dell'acido grasso formando un legame tra il carbossile e il fosfato dell'AMP formando, così, un **Acil-AMP** (aciladenilato).

Questa, è una situazione che troviamo anche in altri processi, come nell'attivazione degli amminoacidi prima che vengano legati al tRNA durante la sintesi proteica; Il gruppo carbossile degli amminoacidi viene attivato in questo modo, e accade tutte le volte che risulta necessario attivare il gruppo carbossile.

-> Questo Acil- AMP formato è un intermedio della reazione e rimane confinato all'interno del sito attivo.

L'altro prodotto dell'idrolisi è il **pirofosfato**, che invece, viene liberato immediatamente dal sito attivo per poi essere idrolizzato da una **pirofosfatasi** per ottenere **2 gruppi fosfato** (2 Pi). Questo pirofosfato idrolizzato viene sottratto all'equilibrio della reazione. ~~Sottraendo continuamente uno dei prodotti della reazione, questa continua a procedere verso destra, ovvero verso il prodotto.~~

#### Secondo passaggio (SOSTITUZIONE NUCLEOFILA)

Nel secondo passaggio entra una molecola di **CoA** (legata ad un gruppo tiolo -SH). Il **CoA-SH**, attraverso il suo gruppo tiolo -SH che è un gruppo funzionale reattivo, va a legarsi al carbossile dell'Acil-AMP tramite un legame tioestere, sostituendo l'AMP tramite una sostituzione nucleofila. Il prodotto da questa reazione è **Acil-CoA + AMP**.

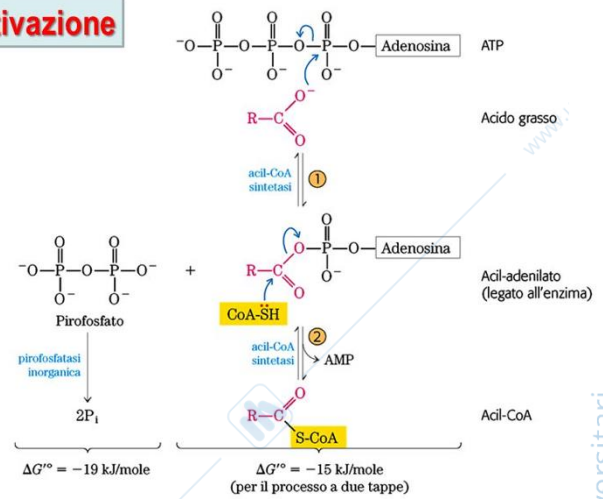
Quindi, questo **Acil-CoA** prodotto, presenta l'acido grasso, il cui gruppo carbossilico non è più libero ma è impegnato in un legame tioestere, che è un legame ad elevato contenuto energetico che rende l'acile reattivo.

Poi quest'acido grasso deve essere trasportato tramite il sistema navetta carnitina nel mitocondrio dove avviene la sua ossidazione (beta ossidazione)....->

L'**AMP**, invece reagisce subito con una il pirofosfato (prodotto nel primo passaggio) per formare 2 ATP.

**N.B.** Il CoA deriva dal **pantotenato**, che è una vitamina; non può essere sintetizzata dalla maggior parte delle cellule animali perché non sono presenti gli enzimi necessari per la sua sintesi. La parte importante del CoA è il gruppo -SH, che permette l'attivazione di acidi grassi. L'attivazione degli acidi grassi serve dal punto di vista metabolico perché il carbossile degli acidi grassi è un gruppo che ha una reattività molto bassa e per renderlo più reattivo il carbossile **deve essere variamente derivatizzato**. Uno dei modi per attivare il carbossile è quello di derivatizzarlo con il CoA. Il legame con il CoA è "ad alta energia" e può essere utilizzato dalle reazioni cataboliche successive.

**N.B.** La maggior parte delle reazioni fatte da enzimi dipendenti da ATP non sono reazioni di idrolisi ma reazioni di trasferimento. Gli enzimi che idrolizzano ATP non sono quasi mai idrolasi, la maggior parte degli enzimi che utilizzano l'energia chimica contenuta nell'ATP lo fa per trasferimento e non per idrolisi.



## **Trasporto dell'acido grasso (Acil-CoA) dal citoplasma al mitocondrio (Sistema Navetta Carnitina):**

Le reazioni di attivazione svolte dal gruppo di enzimi acil-CoA sintetasi, avvengono nel citoplasma. L'ossidazione degli acidi grassi invece è un processo chiamato  **$\beta$ -ossidazione** e avviene nei mitocondri, per cui l'acil-CoA deve essere trasportato all'interno del mitocondrio, ma così non può attraversare la membrana mitocondriale perché non ci sono trasportatori per l'acil-CoA.

L'Acil-CoA per essere trasportato nel mitocondrio, utilizza il cosiddetto **sistema navetta carnitina**: inanzitutto subisce una reazione mediata dall'enzima **carnitina-acil-transferasi 1** che si trova sulla membrana mitocondriale esterna: l'acido grasso viene trasferito dal CoA sulla carnitina. **La carnitina** è una molecola simil-vitaminica derivata dall'amminoacido lisina, e trasporta gli acili dal citoplasma al mitocondrio.

La **Carnitina-Acil-Transferasi 1** ha come substrati la **L-carnitina** e l'**Acil-CoA**, e catalizza il trasferimento del **gruppo acile** da Acil-CoA alla carnitina; i prodotti sono **CoA libero** nel citoplasma e **Acil-carnitina**: ~~l'OH della carnitina è derivatizzato dall'acido grasso con formazione di un legame tioestere.~~

L'acil-carnitina ha un trasportatore che è **traslocasi** che agisce come **sistema di antiporto**: fa entrare l'acil-carnitina nella matrice mitocondriale in cambio di una molecola di carnitina libera. Entra, quindi, una molecola di acilcarnitina ed esce una molecola di carnitina libera.

Una volta entrato nella matrice mitocondriale è presente sulla membrana mitocondriale interna un altro enzima detto **Carnitina-Acil-Transferasi 2** con il sito attivo rivolto verso la matrice. Quest'enzima fa il lavoro contrario rispetto alla carnitina-acil-transferasi 1: lega **Acil-carnitina**, e lega anche un **CoA**, e trasferisce il gruppo acile dall'Acil-carnitina al CoA riformando **Acil-CoA** e **carnitina libera**. Questo sistema è detto sistema navetta della carnitina.

### **Ciclo futile nel fegato (inibizione del sistema navetta carnitina per poter sintetizzare acidi grassi):**

La carnitina-aciltransferasi 1 è inibita da una molecola, il **Malonil-CoA** che è una molecola la cui concentrazione aumenta quando l'epatocita del fegato sta sintetizzando acidi grassi. Sempre, se un acido grasso entra nella matrice mitocondriale, questo viene degradato, e se il nostro fegato sta sintetizzando acidi grassi, deve essere inibita la degradazione di questi acidi grassi; per cui è necessario impedire l'accesso dell'acido grasso nel mitocondrio. L'ingresso viene impedito inibendo il sistema di trasporto, quindi **inibendo l'enzima carnitina-Acil-Transferasi 1 da parte del Malonil-CoA**, così gli acidi grassi possono continuare ad essere sintetizzati per poi essere trasformati in trigliceridi (sempre nel fegato). Altrimenti, se gli acidi grassi appena sintetizzati passano nel mitocondrio attraverso il sistema carnitina, verrebbero degradati subito e, dato che, energeticamente è più costoso costituire gli acidi grassi di quanto non si ottenga nel degradandoli, si instaurerebbe un ciclo futile che comporterebbe uno spreco energetico.

## **2) La beta ossidazione:**

Il **catabolismo degli acidi grassi** si svolge principalmente attraverso una via ossidativa detta  **$\beta$ -ossidazione**, che avviene nei mitocondri.

Questo è un processo che avviene in fasi ossidative consecutive e in ogni fase della  **$\beta$ -ossidazione** l'acido grasso viene accorciato di 2 carboni, quindi si staccano progressivamente 2 atomi di C, formando **Acetil-CoA**. Oltre a questo, nella  **$\beta$ -OSSIDAZIONE** si ha la riduzione di due coenzimi formando **FADH<sub>2</sub>** e **NADH**. Gli acidi grassi hanno in media catene di 16-18 atomi di carbonio.

Si chiama  $\beta$ -ossidazione perchè l'ossidazione avviene sul carbonio  $\beta$ . Ci sono vari modi di identificare i carboni di un acile: il carbonio più ossidato è il carbonio 1, e i carboni successivi al carbonio 1 si numerano così:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ... (la beta ossidazione avviene sul carbonio  $\beta$ ).

Dato che la  $\beta$ -ossidazione è un fenomeno che avviene nel mitocondrio, l'acetil-CoA che ne deriva è il metabolita del ciclo di Krebs (è un'altra delle vie di derivazione dell'acetil-CoA per il ciclo di Krebs).

La  $\beta$  ossidazione è una **via catabolica con spiccato carattere ossidativo** che avviene con ripetitivi cicli di quattro reazioni: una deidrogenazione FAD dipendente, una idratazione, una deidrogenazione NAD dipendente e infine una tiolisi.

### $\beta$ ossidazione degli acidi grassi con numero PARI di atomi di C:

La maggior parte degli acidi grassi degli animali **sono pari**: a 16C, 18C o, più raramente, a 20 atomi di carbonio. In generale, gli acili sono per la maggior parte a numero pari di atomi di carbonio.

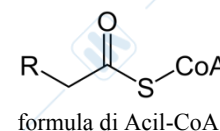
Nel caso di un acido grasso con numero pari di atomi di carbonio, ogni ciclo di  $\beta$  ossidazione porta al distacco di una molecola di **Acetil-CoA** e all'accorciamento della catena dell'acido grasso fino a far rimanere solo Acetil-CoA.

La biosintesi degli acidi grassi avviene con una serie di reazioni inverse a quelle della  $\beta$ -ossidazione: quindi se utilizzo catene bicarboniose, alla fine ottengo principalmente catene a numero pari di atomi di carbonio.

### $\beta$ ossidazione degli acidi grassi con numero DISPARI di atomi di C:

Nella natura esistono rari acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio. Nella degradazione di questi acidi grassi, la  $\beta$ -ossidazione prosegue normalmente, fino a che non rimane un residuo a 3 atomi di carbonio, il **propionil-coA**, che poi prosegue in altre reazioni.

## Beta ossidazione DEGLI ACIDI GRASSI SATURI (con numero pari di C)



**Prima reazione: Deidrogenazione** → La prima reazione è una reazione di **deidrogenazione** catalizzata dall'enzima **Acil-CoA deidrogenasi** che è un enzima *FAD dipendente* (è una deidrogenasi flavinica). Questo enzima catalizza l'ossidazione dell'Acil-CoA prelevando da questo **2 atomi di H**, uno dal carbonio  $\alpha$  e l'altro dal carbonio  $\beta$ , e genera un doppio legame tra i due carboni  $\alpha$  e  $\beta$  producendo un **enoil-CoA** che in questo caso è un **trans-enoil-CoA** perchè la configurazione negli acidi grassi saturi è in  $\beta$  (**invece negli acidi grassi insaturi naturali come l'acido linoleico, i doppi legami sono in configurazione cis**). e il FAD prende questi 2 atomi di H trasformandosi nella sua forma ridotta **FADH<sub>2</sub>**; poi gli elettroni del FADH<sub>2</sub> passano ad una proteina detta **ETF** (electron transferring flavoprotein) che è una proteina allo stato ossidato che prende i 2 elettroni e passa allo stato ridotto. Questa ETF ridotta, a sua volta, trasferisce ad un'altra flavoproteina, l'**ETF ubiquinone ossidoreduttasi** che poi trasferisce questi elettroni all'ubichinone che prende 2H<sup>+</sup> diventando **ubichinolo**.

**Esistono 3 isoenzimi di questa Acil-CoA deidrogenasi**; ciascuno di questi è specifico a seconda della lunghezza della catena: ci sono delle deidrogenasi che agiscono su acidi grassi a catena breve (da 4 a 8 atomi di carbonio), delle deidrogenasi che agiscono sugli acidi grassi a catena media (da 8 a 14 atomi di C) e delle deidrogenasi che agiscono su acidi grassi a catena lunga (da 12 a 18 atomi di C).

**Seconda reazione:** La seconda reazione è una reazione di **idratazione**. In questa reazione, per mezzo dell'enzima **enoil-CoA idratasi** (liasi), il gruppo idrossilico (OH) dell'H<sub>2</sub>O va a legarsi al carbonio  $\beta$  del trans-enoilCoA, mentre l'atomo di idrogeno (H) si lega sul carbonio  $\alpha$ , e il prodotto è **3-L-idrossiacil-CoA** (**o  $\beta$ -idrossiacil-CoA è importante ricordarsi che l'OH è legato al carbonio  $\beta$** ). A questo punto, il carbonio  $\beta$  è già più ossidato: prima era CH<sub>2</sub> ora è COH.

**Terza reazione:** La terza reazione è una **deidrogenazione NAD dipendente**, catalizzata dall'enzima **idrossiacil-CoA deidrogenasi NAD dipendente**; per cui dall'idrossiacil-CoA vengono staccati i **2 atomi di idrogeno** legati al carbonio  $\beta$ , uno di questi due idrogeni è quello della funzione alcolica secondaria presente sul carbonio  $\beta$  stesso). Dalla funzione alcolica secondaria si produce una **funzione chetonica (C=O)**, e così l' **idrossiacil-CoA** si trasforma in  **$\beta$ -chetoacil-CoA**.

l'enzima **idrossiacil-CoA deidrogenasi** utilizza NAD come agente ossidante: quindi il **NAD** accetta un idrogeno riducendosi a **NADH**, e l'altro idrogeno si libera come idrogenione ( $H^+$ ).

**Quarta reazione:** La quarta reazione è una reazione di **tiolisi**, catalizzata dall'enzima **tiolasi**. In questo caso, viene fatta anche una *sostituzione nucleofila*. in questa reazione di tiolisi **si rompe il legame tra carbonio  $\alpha$  e carbonio  $\beta$** , entra una molecola di CoA che tramite il suo gruppo tiolo -SH si lega tramite uno nuovo legame tioestere al carbonio carbonilico  $\beta$  del chetoacil-CoA che successivamente si trasforma nell'Acil-CoA-2 che è un "**Acil-CoA più corto di 2 carboni**"; mentre secondo prodotto che si ottiene da questa reazione è un **Acetil-CoA** (che contiene appunto l'ex carbonio  $\alpha$  che ha accettato l'idrogeno proveniente dal gruppo -SH)

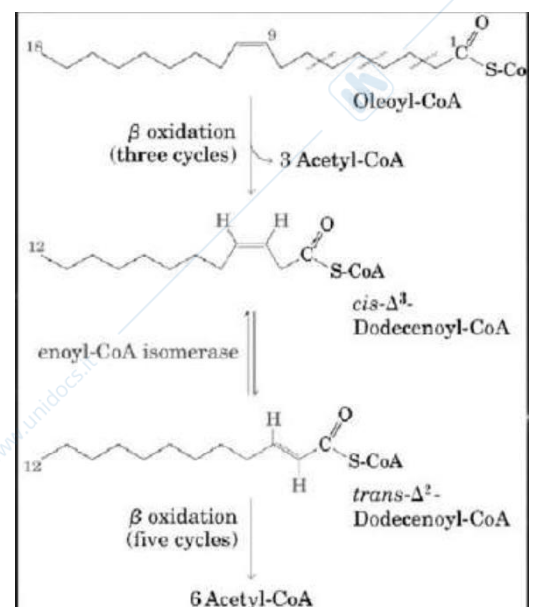
La reazione della tiolasi è una reazione **REVERSIBILE**.

\* **Inizio di un nuovo ciclo** → Una volta è stata allontanata la molecola di Acetil-CoA, rimane l'**acil-CoA** accorciato di due C. Se si tratta dell'**acido palmitico** (che è un acido grasso saturo a 16 atomi di C), questo dopo il primo ciclo diventa a 14C. Poi subisce il secondo ciclo, quindi subisce di nuovo le 4 reazioni: deidrogenazione FAD dipendente, l'idratazione, deidrogenazione NAD dipendente e tiolisi; viene quindi staccata una seconda molecola di Acetil-CoA accorciando l'acil-CoA di altri 2 carboni, quindi da C14 si passa a C12, poi a C10 e così via, liberando sempre una molecola di Acetil-CoA. Una volta si arriva a C4 che è il **butanoil-CoA**, si fa l'ultimo ciclo (il settimo ciclo) in cui si ottengono **2 molecole di Acetil-CoA**. Quindi, la molecola di acido palmitico (che è un acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio) ha bisogno di 7 cicli per demolirla, ottenendo: **8 molecole di Acetil-CoA** e, **7 molecole di FAD ridotto**, e **7 molecole di NAD ridotto** (dato che per ogni ciclo si producono un FAD ridotto e un NAD ridotto  $7 \times 1 = 7$ ).

## Beta ossidazione DEGLI ACIDI GRASSI INSATURI (con numero pari di C)

Gli **acidi grassi insaturi** subiscono una beta ossidazione con delle differenze rispetto a quella che svolgono gli acidi saturi, perchè gli acidi insaturi presentano doppi legami, hanno una configurazione differente e possono avere una posizione differente rispetto a quella degli acidi grassi saturi. gli acidi grassi insaturi sono gli acidi grassi naturali in cui configurazione del doppio legame è cis.

**1) beta ossidazione degli acidi grassi monoinsaturi:** esempi: acido palmitoleico, acido oleico (a 18C);



**ESEMPIO:** l'**acido palmitoleico**: presenta 16 atomi di carbonio, un **doppio legame  $\beta$ - $\gamma$**  fra C9 e C10, e la configurazione del doppio legame è **cis**. La  $\beta$ -ossidazione inizia dell'acido palmitoleico regolarmente: ci sono 3 cicli di  $\beta$ -ossidazione, che staccano le prime 3 molecole di Acetil-CoA, e a questo punto si arriva alla situazione in cui abbiamo il doppio legame cis tra carbonio  $\beta$  e carbonio  $\gamma$ . Nella cellula esiste un enzima, che risolve velocemente il problema, che è l'**enoil-CoA isomerasi**, che sposta il doppio legame dal carbonio  $\beta$  al carbonio  $\alpha$  cambiando la configurazione da cis a **trans**. Il ciclo successivo non prevede l'intervento della deidrogenasi FAD dipendente, perché il doppio legame c'è già e quindi si può procedere con l'idratazione del doppio legame, poi l'ossidazione NAD dipendente, poi la tiolisi con cui si distacca un acetil-CoA; poi i cicli di  $\beta$ -ossidazione proseguono regolarmente fino al termine.

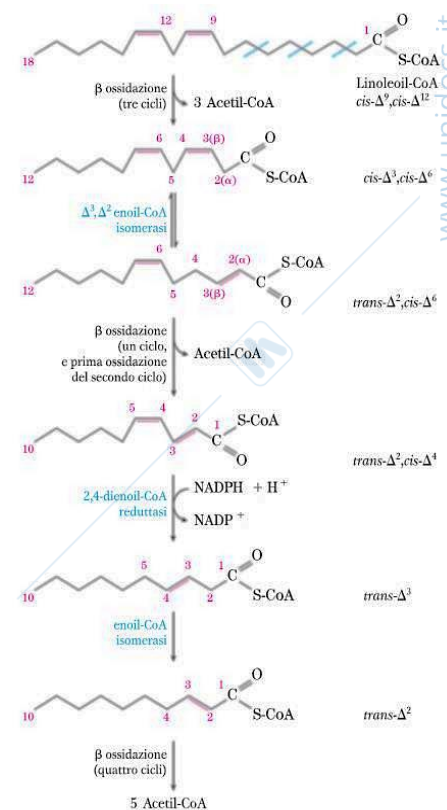
## 2) beta ossidazione degli acidi grassi polinsaturi:

**ESEMPIO:** l'**acido linoleico**, che ha 18 atomi di C, presenta **due doppi legami**; il primo in posizione 9 (posizione dispari) e il secondo in posizione 12 (posizione pari). la sua forma attivata è il **linoleoil-coA** (*cis- $\Delta^9$ , cis- $\Delta^{12}$* ); All'inizio si svolgono **3 cicli** di  $\beta$ -ossidazione allontanando le prime 3 molecole di Acetil-CoA e accorciando 6 atomi di carbonio dall'acido grasso (e questa è una fase analoga alla beta ossidazione degli acidi grassi monoinsaturi). si passa così a *cis- $\Delta^3$ , cis- $\Delta^6$*  in cui troviamo ancora il problema del doppio legame  $\beta$ - $\gamma$ . A questo punto interviene l'enzima **enoil-CoA isomerasi** che trasferisce questo legame  $\beta$ - $\gamma$  facendolo diventare  $\alpha$ - $\beta$ , si passa così alla configurazione **trans- $\Delta^2$ , cis- $\Delta^6$** , a questo punto la  $\beta$ -ossidazione può riprendere partendo da idratazione, e poi si rilascia il quarto Acetil-CoA, quindi l'intermedio **trans- $\Delta^2$ , cis- $\Delta^6$**  si è accorciato di 2 atomi di carbonio diventando il **trans- $\Delta^2$ , cis- $\Delta^4$** , che è ancora problematico perché ci sono due doppi legami distanziati da 2 atomi di C che sono in configurazioni diverse (trans in C2 e cis in C4), per cui interviene un enzima reduttasi NADPH dipendente detto **2,4-dienoil-CoA reduttasi**, che utilizza il NADPH come donatore di elettrone. Questo enzima elimina uno dei due legami doppi (quello trans in posizione C2 e quello cis in C4) e mantiene solo l'altro legame doppio spostandone la posizione. Per cui si genera un solo doppio legame in trans tra C3 e C4. A questo punto interviene l'enoil-CoA isomerasi che sposta il doppio legame dalla posizione C3-C4 alla posizione C3-C2, e la  $\beta$ -ossidazione può proseguire partendo da una idratazione  $\rightarrow$  deidrogenazione NAD dipendente  $\rightarrow$  tiolisi, e così via.

## $\beta$ -OSSIDAZIONE DI ACIDI GRASSI con numero dispari di C:

Nel caso di rari acidi grassi con numero dispari di C, la  $\beta$ -ossidazione va avanti finché non rimane un residuo a 3 atomi di Carbonio che è il **propionil-CoA**.

Il propionil-coA subisce una reazione di carbossilazione da parte dell'enzima **propionil-coA carbossilasi\*** che usa la **biotina** come cofattore. Il prodotto è il **D-metilmalonil-CoA** che va incontro alla reazione della **metil-malonil-CoA epimerasi**, che converte l'epimero D in L. C'è, quindi, un cambio di conformazione intorno al carbonio asimmetrico, con formazione dell'**L-metilmalonil-coA**. Quest'ultimo subisce all'azione di un enzima isomerasi detto **metil-malonil-coA mutasi**, in una reazione dipendente dal coenzima B12. Questo enzima converte l'L-metilmalonil-coA in **succinil-coA**. Il succinil-coA che si forma con questa via può entrare nel ciclo di Krebs. Per cui possiamo affermare che la degradazione di acidi grassi a catena dispari è una via anaplerotica del ciclo di Krebs. (una via anaplerotica è una via metabolica che produce intermedi di un'altra via).



### \* Le carbossilasi:

Le carbossilasi sono una famiglia di enzimi che catalizzano l'aggiunta di un atomo di carbonio, che deriva dal bicarbonato, sulla molecola di substrato. Questa reazione è endoergonica (RICORDA: le decarbossilazioni sono esoergoniche). Infatti, sono reazioni ATP dipendenti e **biotina** dipendenti. La biotina è il coenzima delle carbossilasi e media il trasferimento del bicarbonato sulla molecola bersaglio. (*la struttura della biotina va conosciuta*). Trattandosi di una famiglia di enzimi, le carbossilasi hanno alcune caratteristiche in comune, tra cui la struttura tridimensionale.

Le carbossilasi sono una famiglia di enzimi costituiti da due siti attivi:

- Un sito in cui c'è l'attivazione del bicarbonato con legame alla biotina. Si forma carbossi-biotina. Questo dominio si è conservato, nel corso dell'evoluzione, in tutti gli enzimi facenti parte di questa famiglia.
- Un sito in cui viene legato il substrato. È questo il sito che definisce le differenze tra le varie carbossilasi. Nel corso dell'evoluzione è infatti cambiata la specificità, e da un unico enzima si è creata un'intera famiglia. Per esempio, la piruvato carbossilasi è specifica solo per il piruvato mentre la propionil-coA carbossilasi è specifica solo per il propionil-coA.

### β OSSIDAZIONE PEROSSISOMIALE

La β-ossidazione degli acidi grassi avviene anche nei **perossisomi**, che sono organuli ricchi di enzimi. In questi organuli vengono accorciati gli acidi grassi a catena molto lunga, con un numero di carboni più/uguale a 22. questi acidi grassi a lunga catena sono più comuni nei vegetali, e infatti la beta ossidazione perossisomiale è piuttosto comune nelle piante. Questi acidi grassi, vengono inizialmente indirizzati all'interno del perossisoma, e tramite una serie di reazioni vengono accorciati a 18 o 16 atomi di carbonio. L'acido grasso accorciato rientra poi nel mitocondrio dove terminerà la β ossidazione.

il primo enzima è l'**acil-coA ossigenasi FAD dipendente** (quindi diverso dal primo enzima è acil-coA deidrogenasi della beta ossidazione mitocondriale). Questo enzima catalizza la **prima reazione di ossidazione FAD dipendente** in cui gli elettroni vengono usati per ridurre il FAD a FADH<sub>2</sub>. Tuttavia, per continuare, deve cedere elettroni a "qualcuno", per tornare allo stato ossidato, e quindi cede gli elettroni all'**ossigeno** che successivamente si riduce a perossido di idrogeno **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (invece nel mitocondrio, il deidrogenasi può cedere gli elettroni direttamente al coenzima Q, attraverso una piccola catena di trasporto degli elettroni, che nei perossisomi invece non esiste).

Il perossido di idrogeno è un radicale reattivo (ROS), che è una molecola pericolosa e potenzialmente dannosa. Tuttavia, nei perossisomi ci sono enzimi, come la **catalasi**, che catalizzano la dismutazione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno, annullandone gli effetti tossici. ~~Questa ossidazione va di fatto "sprecata", perché non viene convertita in energia, ma non c'è altra soluzione.~~

-> **Le reazioni procede poi nello stesso modo della β ossidazione nei perossisomi:**

- **nella seconda reazione** si fa una idratazione in cui il carbonio β viene idrossilato
- **nella terza reazione** si fa una **deidrogenazione NAD dipendente** in cui il NAD<sup>+</sup> è ridotto a NADH, con formazione del **β-cheto-acil-coA**
- **nella quarta reazione** la tiolasi scinde successivamente il β-cheto-acil-coA in acetil-coA e acido grasso accorciato di due carboni.

~~Il NADH prodotto nei perossisomi viene esportato prima nel citoplasma e poi reintrodotta nel mitocondrio. Questi elettroni andranno a finire nella catena respiratoria.~~

\* questi acidi grassi continuano ad essere accorciati nei perossisomi tramite 2 o 3 cicli di beta ossidazione, poi l'acido grasso accorciato rientra poi nel mitocondrio dove terminerà la β ossidazione.

## Sindrome di Zellweger

Questa via alternativa è molto importante. Ci sono pazienti che hanno difetti genetici che portano a un difetto nella biogenesi dei perossisomi, cioè o non li hanno o sono difettosi o funzionano male. Il fenotipo dei pazienti che hanno questo difetto può essere molto grave: vari tipi di patologie, ritardo mentale, fegato parzialmente funzionante, cisti renali, ipotonia etc. Difatti queste manifestazioni patologiche derivano dalla mancata degradazione degli acidi grassi a catena lunga. Quindi questa sindrome si manifesta perché, in maniera cronica e progressiva nel tempo, c'è la deposizione nei tessuti, come il muscolare, epatico e nervoso, di acidi grassi a catena lunga che non possono essere degradati. L'unico intervento che può essere fatto è quello di fare una diagnosi precoce neonatale, in modo da adottare una dieta sin da subito priva di alimenti di origine vegetale, così da attenuare e magari annullare le conseguenze della mutazione.

### $\alpha$ - OSSIDAZIONE (alfa ossidazione)

Questo tipo di ossidazione avviene per gli acidi grassi a catena ramificata con numero dispari di atomi di carbonio, che non possono andare incontro a  $\beta$  ossidazione. L'acido grasso a catena ramificata più comune è l'**acido fitanico**. L'acido fitanico deriva dal fitolo che è un acido grasso legato alla clorofilla e quindi è una molecola altamente presente nei vegetali. Innanzitutto, si ha una reazione di attivazione a **fitanoil coA**, ad opera dell'enzima **fitanoil-coA sintetasi** (ATP e coA dipendente).

A questo punto c'è una reazione di ossidazione, in particolare di idrossilazione, sul carbonio  $\alpha$  (da qui il nome) da parte dell'enzima **fitanoil-coA idrossilasi**. Le idrossilasi o mono ossigenasi sono enzimi che catalizzano le reazioni di idrossilazione, e per farlo hanno bisogno di un composto riducente. La fitanoil-coA reduttasi utilizza come riducente l' $\alpha$ -chetoglutarato che si ossida a succinato tramite una decarbossilazione ossidativa, con fuoriuscita di CO<sub>2</sub> e acqua. Quindi queste idrossilasi utilizzano uno dei due atomi di ossigeno per ossidare il substrato, l'altro viene ridotto ad acqua. A questo punto si ha la rottura del legame C-C senza l'utilizzo di acqua, catalizzata dalla **2-idrossifitanoil-coA liasi**, con fuoriuscita del formil-coA. Dalla rottura di questo legame rimane un carbonio a n.o. 2, cioè una aldeide. Quest'aldeide viene ossidata a carbossile, con formazione del corrispondente acido. Gli elettroni che derivano da questa ossidazione sono poi trasferiti sul NAD<sup>+</sup> a formare NADH. Il (-) sta a dire che ci sono isoforme di questo enzima che usa anche il NADP<sup>+</sup>. Da un punto di vista sostanziale c'è quindi bisogno di un NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>.

Si forma una molecola di NADH e una di **acido pristanico**, che viene attivata da una sintetasi con formazione del corrispondente acil-coA. A questo punto questa molecola va incontro a 6 cicli di  $\beta$  ossidazione da cui si ottengono 2-metil-malonil-coA, tre acetil-coA e tre propionil-coA.

### Malattia di Refsum

L' $\alpha$ -ossidazione è importante perché anche in questo caso ci sono dei pazienti che sono soggetti a una malattia ereditaria congenita che porta all'accumulo di acido fitanico nei tessuti. Se ci sono delle mutazioni del genoma che portano al difetto di uno di questi enzimi, si ha la manifestazione di una malattia da accumulo. Questo provoca disturbi neurologici e tremori. Una diagnosi precoce attraverso uno screening genetico permette di risolvere la questione attraverso una dieta priva di vegetali che contengono clorofilla e priva di prodotti caseari, in quanto nel latte di mucca o dei vegetali si trovano derivati della clorofilla. In questo modo si può prevenire l'insorgere dei sintomi.

## Omega Ossidazione DEGLI ACIDI GRASSI

è un processo particolare, l' $\omega$ -ossidazione degli acidi grassi, che riguarda l'estremità metilica dell'acido grasso. Questa non avviene nei mitocondri ma nel **reticolo endoplasmatico liscio** ed è un processo secondario, riguarda acidi grassi a catena media e assume una certa importanza solo quando ci sono dei problemi con la  $\beta$ -ossidazione (es. deficit di carnitina).

All'inizio della reazione un'ossidasi a funzione mista va a ossidare il C in posizione omega, poi l'enzima **alcol deidrogenasi** ossida questa funzione alcolica primaria in funzione aldeidica, e successivamente l'aldeide deidrogenasi ossida la funzione aldeidica in funzione carbossilica, si genera quindi un **acido bicarbossilico** che va incontro ai normali cicli di  $\beta$ -ossidazione, con formazione di Acetil-CoA, Succinato e Adipato.

## REGOLAZIONE DELLA DEGRADAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

il **sito di controllo primario** è il *sistema di trasporto* dell'acido grasso dal citosol al mitocondrio ed in particolare la *carnitina-acil-transferasi 1*, quella disposta sulla membrana mitocondriale esterna con il sito attivo aperto verso il citosol, è l'enzima che sposta il gruppo acile dall'acetil-CoA alla carnitina, formando acil-carnitina e consentendo l'ingresso dell'acile all'interno del mitocondrio.

Il *malonil-CoA* è uno degli intermedi nella sintesi degli acidi grassi e segnala che la cellula sta attivamente sintetizzando acidi grassi, bloccando quindi il trasporto degli acidi grassi dal citosol al mitocondrio.

I **siti di controllo secondario** si hanno ad esempio quando il *rapporto NAD ridotto/NAD* è elevato, quindi c'è una buona disponibilità energetica, e quindi la  $\beta$ -ossidazione viene rallentata; inoltre la *presenza di quantità importanti di acetil-CoA* inibisce la tiolasi.

Esiste infine una **regolazione a lungo termine**, che si basa su questi *recettori PPAR* (recettori attivati da proliferatori perossisomiali) e che comprende una serie di fattori di trascrizione che regolano diversi processi metabolici, fra cui la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. I recettori si trovano sulla membrana nucleare, una volta legati gli acidi grassi migrano nel nucleo e grazie a fattori di trascrizione, modulano la trascrizione genica.

Questo avviene sia direttamente con gli acidi grassi, sia indirettamente, dopo che gli acidi grassi (es. acido arachidonico) sono stati trasformati in prostaglandine e leucotrieni.

## CORPI CHETONICI

I corpi chetonici sono 3 composti: **acetone**, **acetoacetato** e  **$\beta$  - idrossibutirrato**.

Sono prodotti normalmente nei mitocondri del **fegato**, in un processo di biosintesi detto **Chetogenesi** che parte dall'Acetil-CoA.

La concentrazione dei corpi chetonici nel plasma è di solito bassa (circa 0,1 mM), ma può aumentare molto in due condizioni:

**i)** Digiuno prolungato **ii)** Diabete non trattato

### Biosintesi dei corpi chetonici in condizione di digiuno prolungato o diabete non trattato:

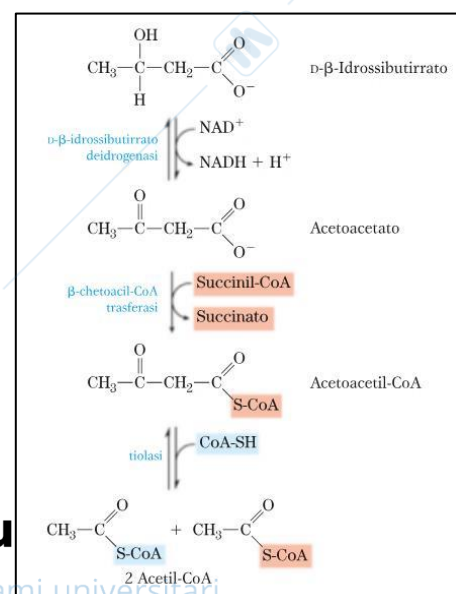
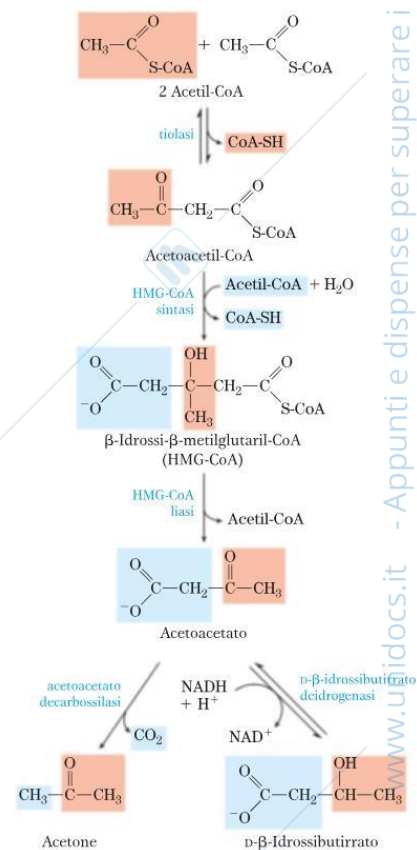
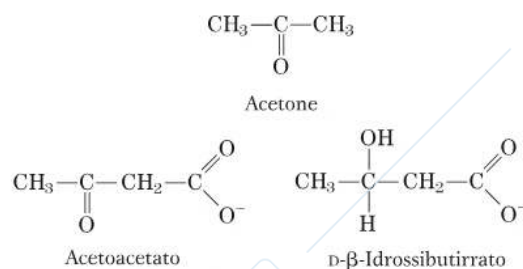
Il precursore iniziale dei corpi chetonici è l'**Acetil-CoA**. Noi otteniamo l'acetil-CoA maggiormente dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, in parte anche dal complesso della piruvato-deidrogenasi e anche dalla degradazione di certi aminoacidi. Una gran parte di questo acetil-CoA va a combinarsi con l'ossalacetato per formare acido citrico. Ma durante il digiuno prolungato ci sono degli organi, come il cervello, che in carenza di glucosio soffrono molto perché dipendono dalla glicolisi, e oltre a questo, gli acidi grassi non arrivano nel cervello perché non possono attraversare la barriera ematoencefalica; per questo il fegato che presenta grande quantità di acidi grassi (provenienti dalla lipolisi del tessuto adiposo) catabolizza questi acidi grassi (attraverso la  $\beta$ -ossidazione) producendo molecole di **Acetil-CoA**. Il nostro organismo non può produrre glucosio a partire da Acetil-CoA, quindi il fegato produce i **corpi chetonici** da queste molecole di Acetil-CoA, perché questi corpi chetonici possono attraversare la barriera ematoencefalica e possono fungere da combustibili utilizzabili dal cervello.

### Fase della biosintesi dei corpi chetonici:

Nel fegato, l'acetil-CoA in eccesso rispetto all'ossalacetato ~~ottenuto dal catabolismo degli zuccheri e dal catabolismo di alcuni aminoacidi~~, reagisce con sé stesso in una reazione catalizzata dalla **tiolasi**, viene liberata una CoA-SH e si ottiene una molecola di **Acetoacetil-CoA**. L'acetoacetil-CoA si combina con una terza molecola di Acetil-CoA grazie all'azione dell'enzima **HMG-CoA sintasi (idrossimetilglutaril-CoA sintasi)** e si forma il **3-idrossi-3-metilglutaril-CoA** (a 5 atomi di C, chiamato anche acido glutarico), che a sua volta subisce una reazione, catalizzata dalla **HMG-CoA liasi (idrossimetilglutaril-CoA liasi)**, che lo scinde in acetil-CoA e nel primo corpo chetonico **acetoacetato**, da cui poi derivano gli altri due corpi chetonici:

**$\beta$  - idrossibutirrato** e **acetone**. Dopo aver prodotto i corpi chetonici, il fegato li mette in circolo, in particolare il  **$\beta$  - idrossibutirrato**, che passa la barriera ematoencefalica e viene assorbito dalle cellule del sistema nervoso, in queste cellule viene poi riconvertito in **acetoacetato**, e durante la reazione si ottiene anche NADH ridotto che può cedere elettroni alla catena respiratoria, generando quindi energia.

L'acetoacetato deve essere degradato in **Acetil-CoA** utilizzabile dal metabolismo energetico, ma per farlo prima deve diventare Acetoacetil-CoA, per cui interviene l'enzima **tiolasi** (che è una transferasi) che prende il **CoA** da una molecola già presente che è succinil-CoA, e lo trasferisce all'acetoacetato, dando come prodotti: **Acetoacetil-CoA** e **succinato**. A questo punto si verifica una tiolisi e si ottengono 2 molecole di acetil-CoA, che quindi possono far partire 2 giri di ciclo di Krebs (ma solo in presenza di ossalacetato).



**Nel diabete mellito**, il metabolismo dei carboidrati non funziona, manca insulina o c'è un difetto di risposta all'insulina, quindi il glucosio tende a rimanere in circolo e non viene utilizzato in maniera corretta dall'organismo, in particolare dal fegato. Questo porta a poco ossalacetato, molto acetil-CoA, e quindi **un'elevata chetogenesi**. Normalmente nel sangue i corpi chetonici devono avere una concentrazione inferiore a 3 mg/dL, in corso di digiuno si può arrivare anche a 20-30 mg/dL, in corso di diabete si può arrivare fino a 90 mg/dL. Il problema è che a livelli così alti si verifica **chetosi**, ovvero aumentano queste sostanze chetoniche nel sangue e si inizia ad avere un odore di acetone forte e una presenza di sostanze acide nel sangue e questo può portare ad una diminuzione del pH nel sangue se i sistemi tampone non sono sufficienti ad impedire questo abbassamento. Quando questa condizione si verifica si parla di **acidosi metabolica**. L'**acidosi metabolica** può provocare anche crampi muscolari, dolori articolari, inappetenza. Un'**acidosi** grave e acuta predispone alla disfunzione cardiaca con ipotensione e aritmie ventricolari. Nelle forme non curate si **può** arrivare addirittura al coma.

## Il $\beta$ -idrossibutirrato come fonte di energia

Il D- $\beta$ -idrossibutirrato sintetizzato nel fegato viene trasportato dal flusso sanguigno agli altri tessuti, dove viene convertito in tre tappe in acetil-coA. Il  $\beta$ -idrossibutirrato viene convertito prima ad acetato tramite una reazione di ossidazione NAD<sup>+</sup> dipendente. Successivamente l'acetoacetato viene attivato mediante il legame al coA. Questa reazione può avvenire in due maniere:

- Attraverso una reazione di transferasi: l'enzima  **$\beta$ -chetoacil-coA transferasi**, che usa come substrato il succinil-coA, catalizza il trasferimento del coA dal succinil-coA all'acetoacetato. I prodotti sono succinato e acetoacetil-coA. Questa reazione avviene all'equilibrio perché si rompe un legame tioestere e se ne forma un altro identico.
- Attraverso una sintetasi ATP dipendenti: l'ATP viene idrolizzato a AMP+PPi, e il coA viene legato all'acetoacetato. Questa seconda via prevede il consumo di due molecole di ATP.

L'acetoacetil-coA è soggetto all'attività della tiolasi che produce due molecole di acetil-coA. L'acetil-coA così formato rientra solitamente nel ciclo di Krebs.

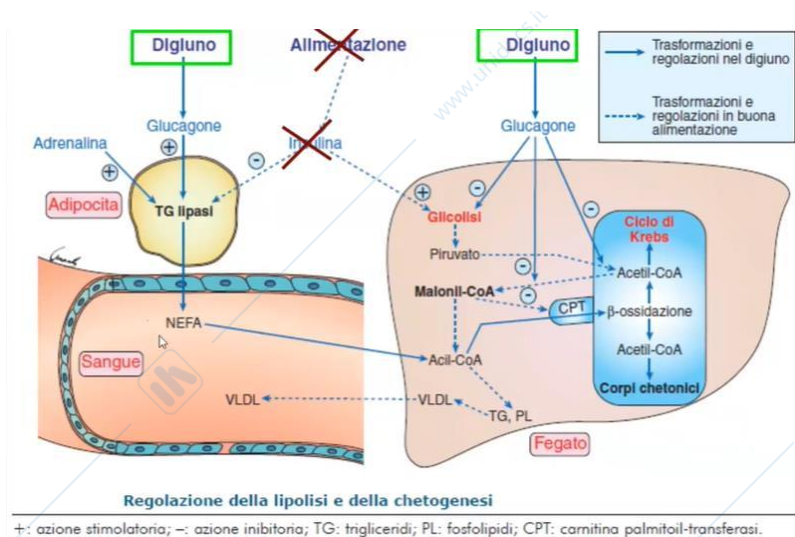
### L'acetil-coA nel fegato può andare incontro a due destini:

- Può essere indirizzato verso il ciclo di Krebs
  - Può essere utilizzato per la biosintesi dei corpi chetonici
- Anche in questo caso, ci sono dei **sistemi di regolazione** che indirizzano l'acetil-coA verso il giusto destino metabolico.

### Nel fegato il destino dell'acetil-coA dipende dal rapporto NAD<sup>+</sup>/NADH:

- - NAD<sup>+</sup>/NADH alto (tanto NAD<sup>+</sup>): l'epatocita si trova in difetto energetico. Il NAD<sup>+</sup> stimola il ciclo di Krebs e l'acetil-coA viene indirizzato verso la via ossidativa, in modo da produrre energia per la cellula. Quindi quando il fegato è in carenza di ATP, l'acetil-coA viene utilizzato per il sostentamento dell'epatocita stesso.
- - NADH/NAD<sup>+</sup> alto (tanto NADH): il ciclo di Krebs viene inibito, la concentrazione di acetil-coA cresce e, siccome la cellula lavora all'equilibrio, viene indirizzato verso la produzione dei corpi chetonici.

infatti in condizioni di digiuno la chetogenesi risolve solo parzialmente il problema dell'eccesso di acidi grassi (dovuti alla lipolisi), in quanto li converte in un eccesso di corpi chetonici. Non è una soluzione ottimale, perché il problema non viene risolto, ma solo convertito in un altro problema. Se aumentano i corpi chetonici, vuol dire che il fegato li produce a una velocità maggiore di quella con cui vengono utilizzati.



## Chetogenesi nel diabete non trattato

La chetogenesi è stimolata anche nel diabete non trattato. Nel diabete di tipo 1, in qualunque condizione il corpo si trovi (sia di sazietà che di digiuno), non essendo prodotta insulina prevale il setting metabolico del digiuno e di conseguenza viene sempre prodotto glucagone. Quindi nei pazienti diabetici non trattati, l'organismo si comporta come se si trovasse in un perenne stato di digiuno, anche se hanno mangiato. Questo comporta un aumento di corpi chetonici nel plasma, che essendo acidi, provocano un abbassamento del pH ematico (acidosi metabolica) che può portare a ulteriori problemi, tra cui insufficienza respiratoria. (RICORDA: l'abbassamento di pH diminuisce l'affinità dell'Hb all'ossigeno)

DOMANDA: Fare attività fisica la mattina a digiuno, per utilizzare direttamente gli acidi grassi, è una pratica consigliata?

Da un punto di vista biochimico, i muscoli hanno la propria riserva di glicogeno, quindi una parte di energia deriva dalla degradazione del glicogeno muscolare. Se sei a digiuno da 10 ore, in queste condizioni prevale

già il glucagone e quindi la lipolisi. Se a questa aggiungi attività fisica, con secrezione di adrenalina, di sicuro la velocità della lipolisi aumenta.

## BIOSINTESI DEGLI ACIDI GRASSI

Avviene in diversi tessuti, da un punto di vista quantitativo è particolarmente importante a livello del tessuto epatico e del tessuto adiposo, ma comunque tutte le cellule dei vari tessuti sono in grado di farla, anche se in alcuni è molto attiva ed in altri meno.

La degradazione degli acidi grassi è una via metabolica che avviene nella matrice mitocondriale, mentre la sintesi degli acidi grassi avviene nel citosol. Questo è un classico esempio di separazione di vie metaboliche antagoniste, compartimenti diversi fanno vie metaboliche opposte per evitare che ci sia un intreccio fra reazioni di biosintesi e degradazione, intreccio che è comunque impedito dai controlli che la cellula mette in atto per evitare che si possano svolgere dei cicli futili.

### L'Acetil-CoA

Il precursore della biosintesi degli acidi grassi è l'Acetil CoA, che però si forma per la maggior parte a livello del mitocondrio e non ha un trasportatore sulla membrana mitocondriale interna per fare questo passaggio.

Il trasporto avviene attraverso un meccanismo di trasporto che prevede il trasporto di una molecola di citrato, nella matrice mitocondriale la citrato sintasi, utilizzando ossalacetato sintetizza citrato e coenzima A libero. Il citrato ha un trasportatore sulla membrana mitocondriale interna, un trasportatore degli acidi tricarbossilici, è un tipo di trasporto passivo e trasporta il citrato verso lo spazio intermembrana.

Sorge il problema che il citrato è un intermedio essenziale del ciclo di Krebs, per capire in quali condizioni il citrato può uscire dalla cellula bisogna considerare che il ciclo di Krebs è regolato a livello di tre enzimi che fanno reazioni irreversibili, ovvero la citrato sintasi, l'isocitrato deidrogenasi e l' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi: la possibilità del citrato di uscire dal mitocondrio è legata di fatto alla sua concentrazione allo stato stazionario nella matrice, quando c'è una concentrazione relativamente alta vuol dire che il ciclo di Krebs è momentaneamente rallentato, la cellula è in condizioni di sazietà energetica, un relativo eccesso di citrato contenuto nella matrice può essere trasportato fuori a favore di gradiente. La condizione affinché si abbia l'esportazione del citrato, e la successiva biosintesi degli acidi grassi è che la cellula sia ricca di energia. Un aumento di concentrazione del citrato si può avere se gli enzimi a valle della produzione del citrato, quindi l'isocitrato deidrogenasi e l' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi, in quel momento vanno ad una velocità più bassa di quanto procede la citrato sintasi, quindi se la velocità di degradazione del citrato è rallentata, per esempio in presenza di un alto rapporto ATP/ADP si può avere istantaneamente un aumento della concentrazione del citrato.

Il citrato nel citoplasma va incontro all'azione di un enzima, l'ATP citrato liasi, che riconverte il citrato in Acetil CoA e ossalacetato, svolge quindi una reazione inversa rispetto a quella della citrato sintasi. A questo punto l'Acetil CoA mitocondriale è passato nel citoplasma, ma in realtà è passato anche ossalacetato, che funziona da molecola che accompagna il passaggio dell'acetile.

Visto che è uscita più massa di quanto si vuole l'ossalacetato deve essere fatto rientrare nella matrice, in modo analogo a quanto detto per la navetta del malato-aspartato, affinché possa avvenire un altro ciclo.

Un'apparente stranezza è il fatto che la reazione che porta alla sintesi del citrato apparentemente avviene senza ATP, quindi senza necessità di energia metabolica, ma è una reazione biosintetica, e quando ci sono le reazioni di biosintesi l'energia libera corre. Mentre un'altra reazione paradossale è quella della liasi, che converte una molecola più complessa in due molecole più semplici, ci si aspetta che la reazione sia

spontanea, esoergonica, invece non lo è, occorre ATP per farla avvenire. Biochimicamente non è niente di strano, la reazione della citrato sintasi in realtà ha un'energia libera che viene liberata dalla rottura di un legame "ad alta energia", un legame tioestere, quindi l'energia libera necessaria alla formazione del citrato deriva dall'acetile che è attivato dal coenzima A. Lo stesso discorso vale per la citrato liasi, non è semplicemente una liasi che catalizza la rottura di una molecola grande in due molecole più piccole, in quel caso sarebbe spontanea, in questo caso l'energia libera che deriva dalla scissione dell'ATP è indispensabile per riformare il legame tioestere. L'energia è spesa per riformare una molecola attivata, l'Acetil CoA, non è una semplice rottura, che sarebbe spontanea, ma è un trasferimento dell'acetile sul CoA e questo richiede la formazione di un legame ad "alta energia" ed in questo senso è spesa ATP.

Considerando il rientro dell'ossalacetato, che può venire ridotto a malato da una malato deidrogenasi che è un enzima citosolico, ma ce ne sono diverse forme, una citosolica e una mitocondriale.

Utilizza una molecola di NADH, l'ossalacetato viene ridotto a malato, il malato può rientrare e sappiamo che c'è un trasportatore che è un antiporto, può essere ritrasportato come tale all'interno del mitocondrio, però in opportune condizioni fisiologiche intracellulare il malato ha anche un'altra opzione, oltre che rientrare come tale può essere anche convertito in piruvato da un enzima che è l'enzima malico, che fa una reazione di decarbossilazione ossidativa del malato.

Quindi il malato viene decarbossilato ed ossidato a piruvato e l'enzima malico ha come coenzima il NADP+ che si converte in NADPH, naturalmente c'è fuoriuscita di CO<sub>2</sub> perché è una decarbossilazione ossidativa. Non c'è un guadagno netto da un punto di vista redox, di fatto queste due reazioni, della malato deidrogenasi e dell'enzima malico, consumano un NADH e producono un NADPH, non c'è un guadagno netto dal punto di vista degli elettroni, di fatto le reazioni trasferiscono virtualmente due elettroni dal NADH sul NADP+. Il NADPH che si forma dalle reazioni dell'enzima malico si vedrà in reazioni permissive per la sintesi degli acidi grassi, è una molecola utile perché permette la degradazione degli acidi grassi, che è uno dei processi ossidativi, evidentemente la biosintesi, che a grandi linee è l'inverso della degradazione, è un processo riduttivo, quindi occorre per farla avvenire del potenziale riducente che è il NADPH.

La molecola di NADPH che si forma, se si forma, se la via preferenziale è questa, è utile per le reazioni biosintetiche riduttive che serviranno successivamente.

Il piruvato è un trasportatore sulla membrana mitocondriale interna, entra nel mitocondrio come tale e qui subisce l'azione della piruvato carbossilasi, enzima ATP dipendente, che riconverte il piruvato in ossalacetato. Considerando la serie di reazioni al netto quello che è successo è il trasferimento momentaneo di una catena carboniosa dal mitocondrio al citoplasma. I carboni dell'Acetil CoA vengono trasferiti all'esterno del mitocondrio, solo i carboni perché il coenzima A non passa. L'altra cosa netta in tutto quello che è successo di fatto è la produzione di una molecola di NADPH a partire da una molecola di NADH, i substrati sono acetil-CoA e NADH, a parte i prodotti tutto il resto sono intermedi, la cui concentrazione all'equilibrio non cambia.

Il NADPH è un coenzima particolarmente importante perché nel citoplasma

è presente una concentrazione di NADPH/NADP+ estremamente elevata, quindi la maggior parte di questo coenzima si trova in forma ridotta nel citoplasma, è indispensabile perché è la molecola che mantiene l'alto potenziale riducente intracellulare.

Il NADPH è prodotto solamente da due reazioni, perlomeno quelle più quantitativamente importanti sono la decarbossilazione ossidativa del malato a piruvato e la via del glucosio fosfato, negli epatociti, ma vale per la maggior parte delle cellule, ma negli epatociti il rapporto NADPH/NADP+ è particolarmente elevato, nelle altre cellule invece di essere 40 può essere 40, 20.. ecc. è sempre prevalente la concentrazione di questo coenzima allo stato ridotto, è essenziale per le reazioni riduttive, ma serve anche a mantenere un

alto potenziale di riduzione del citoplasma che consente il mantenimento dello stato ridotto delle proteine, come nel caso delle cisteine, che è indispensabile per l'attività di molti enzimi che hanno cisteine nel sito attivo che funziona allo stato ridotto e quindi un ambiente riducente favorisce il mantenimento del sito catalitico nel modo in cui deve funzionare, con la cisteina ridotta, come la gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi che ha una cisteina nel sito attivo e questa funziona solo quando è allo stato ridotto. Inoltre il potenziale redox serve anche da punto di vista funzionale per mantenere ridotte le cisteine per evitare che si formino dei ponti disolfuro e si formino degli aggregati proteici. L'ossidazione delle cisteine in proteine con conformazione tale che le cisteine debbano essere nello stato ridotto porta a danni strutturali e alla perdita di funzione. Quindi è essenziale che nel citoplasma l'ambiente sia fortemente riducente. Le strutture del NADH e del NADPH vanno sapute bene, la funzione di questi due coenzimi molto

simili da un punto di vista strutturale è molto diversa, infatti nel citoplasma il rapporto NADH/NAD<sup>+</sup> è molto minore, nel citoplasma prevalentemente c'è il NAD<sup>+</sup>, quindi sono due coenzimi che hanno una funzione diversa perché gli enzimi che li utilizzano sono diversi e questo rapporto è regolato in maniera indipendente.

## Il malonil-CoA

Considerate le differenze funzionali bisogna conoscere le differenze strutturali.

Il destino dell'acetil-CoA nel citoplasma: l'acetil-CoA è il substrato di un enzima, l'**acetil-CoA carbossilasi**, che come tutte le carbossilasi è ATP dipendente e fa la carbossilazione dell'Acetil CoA e lo converte in malonil-CoA, più ADP

e fosfato, questa reazione è irreversibile, come tutte le reazioni che vedono coinvolta l'ATP, è una reazione esoergonica, completamente spostata a destra con  $\Delta G < 0$  ed è una reazione che produce un metabolita unico della biosintesi degli acidi grassi.

Quindi tutte le volte che si è in presenza di reazioni irreversibili il cui prodotto è una molecola che è indirizzata irreversibilmente verso una precisa via metabolica, queste reazioni sono nella maggior parte dei casi soggette a regolazione.

Il meccanismo dell'Acetil CoA carbossilasi, come tutte le carbossilasi, la prima reazione di questo tipo di enzimi è l'attivazione del bicarbonato attraverso il trasferimento di un fosfato dell'ATP, del fosfato in  $\gamma$  dell'ATP, sul bicarbonato formando un carbossifosfato intermedio.

Si ha il trasferimento del fosfato e la formazione di un legame anidridico, che è ad alta energia.

Questo è un intermedio che avviene quasi all'equilibrio, perché si rompe un legame fosfoanidridico e se ne forma un altro, quindi da un punto di vista energetico il  $\Delta G$  è intorno a 0.

Nella seconda reazione che avviene su questo intermedio, l'enzima catalizza il trasferimento del carbossile sulla biotina, che è un coenzima con una corta catena alifatica che contiene un carbossile (la struttura della biotina va saputa), è legata con un legame ammidico ad un residuo di lisina presente nel sito attivo di tutte le carbossilasi. L'enzima catalizza il trasferimento del carbossile sull'azoto formando la carbossi-biotina, naturalmente viene liberato fosfato, l'energia libera per fare il legame carbonio-azoto deriva dalla rottura del legame fosfoanidridico.

Il trasferimento del bicarbonato sulla biotina avviene su un sito attivo, uno dei due siti attivi delle carbossilasi, questo sito attivo è comune a tutte le carbossilasi, che sono una famiglia di enzimi che hanno due siti attivi diversi, in uno c'è la carbossilazione della biotina, che è comune a tutti, nell'altro sito attivo invece c'è il trasferimento del carbossile su un determinato substrato, in questo caso sull'Acetil-CoA, a seconda del tipo di carbossilasi cambia la specificità per il substrato che è l'accettore del carbossile.

Questo spostamento avviene perché, una volta formata la carbossi-biotina, la corta catena di  $\text{CH}_2$  costituisce di fatto un braccio mobile e quindi tutta la carbossi-biotina viene spostata sull'altro sito attivo, è una forma di trasferimento di intermedi che avviene grazie anche alla biotina.

La carbossi-biotina si sposta sul secondo sito attivo dove sempre questo enzima catalizza il trasferimento del gruppo carbossilico sull'Acetil-CoA, formando in questo caso il malonil-CoA e la biotina torna libera.

Il malonil-CoA è anche un inibitore della Carnitina-acil-transferasi I, la proteina che catalizza la conversione dell' Acil-CoA in Acil-Carnitina.

Un metabolita della sintesi degli acidi grassi è anche inibitore della sintesi di questo enzima e questo garantisce che nel momento in cui la cellula sta sintetizzando acidi grassi si blocca contestualmente il trasporto dell'acile e quindi di fatto c'è un blocco delle beta-ossidazione, questo impedisce che le vie antagoniste di sintesi e degradazione avvengano contemporaneamente.

L'Acetil-CoA carbossilasi è un enzima che regola, fa la reazione limitante per la velocità complessiva di sintesi degli acidi grassi è soggetta a regolazioni e come tutti gli enzimi che regolano vie molto importanti è regolato a due livelli: attraverso un controllo endogeno, i controlli endogeni rispondono a necessità della cellula, quindi la cellula a seconda della condizione istantanea può decidere di procedere con la sintesi o di diminuirla, di attivarla o di inibirla. In alcuni tipi di cellule in alcuni tipi di tessuti c'è anche un controllo esogeno che deriva dalla segnalazione ormonale. Questi due controlli si integrano, cioè sono entrambi funzionanti, perché per una singola cellula devono essere soddisfatte le necessità prima di tutto endogene e poi, se dal punto di vista metabolico è tutto regolare, si è in grado di rispondere, se c'è anche un altro livello di consenso che deriva dalla regolazione ormonale.

È un enzima particolare perché è regolato per oligomerizzazione, vuol dire che può esistere sotto due forme: una forma monomeriche, che è inattiva, ed una forma polimerica che è cataliticamente attiva. L'interconversione tra queste due forme, cioè l'equilibrio fra la forma polimerica e la forma monomeriche è regolato, per l'appunto un controllo endogeno, da parte di due molecole. Il citrato favorisce la polimerizzazione, quindi sposta a destra l'equilibrio, mentre l'Acil-CoA sposta l'equilibrio verso sinistra, quindi funziona da inibitore.

Il citrato è l'attivatore perché è il precursore dell'Acetil-CoA, che è il substrato dell'Acetil-CoA carbossilasi, mentre un aumento di concentrazione del citrato citosolico chiaramente indica delle condizioni permissive per la biosintesi. L'inibizione dell'Acil-CoA è invece una classica inibizione a feedback negativo a lungo raggio, perché non il prodotto dell'enzima, ma il prodotto finale della via metabolica, che è l'Acil-CoA inibisce l'Acil-CoA carbossilasi, quindi quando cresce il prodotto finale della via vuol dire che evidentemente la molecola non è utilizzata altrettanto velocemente per quanto velocemente è sintetizzata e quindi si ha un classico esempio di feedback negativo dove il prodotto finale della via blocca la prima reazione della via metabolica stessa.

Inoltre l'Acetil-CoA carbossilasi è soggetta ad un secondo livello di regolazione, è un enzima molto grande dimensionalmente, è composto da 2346 amminoacidi, quindi una proteina molto grande e appunto è schematizzata la sequenza che costituisce il punto di carbossilazione della biotina ed in giallo si ha la sequenza primaria, che costituisce il dominio del trasferimento del carbossile. Un'altra cosa evidenziata dalla figura è come la zona vicino all'N-terminale, dall'amminoacido 1 al 95 più o meno, ci sono molti siti di fosforilazione, cioè questo enzima può venire fosforilato su specifici residui di serina o di treonina, questi amminoacidi costituiscono dei siti di fosforilazione per altrettante protein-chinasi, le chinasi sono enzimi che appunto fosforilano altre proteine target e ne regolano l'attività. Questo enzima è il target dell'attività di molte protein-chinasi diverse, infatti può essere fosforilato, per esempio fra quelle più importanti dalla protein-chinasi A e anche dalla AMP-chinasi. Quando viene fosforilato, ogni chinasi ha siti specifici di fosforilazione, la fosforilazione da parte di queste chinasi, quando viene modificato post-traduzionalmente in questo modo l'effetto complessivo è inibitorio, quindi la fosforilazione inibisce l'attività dell'Acetil-CoA carbossilasi, questo perché la fosforilazione fa sì che l'enzima abbia una diminuita affinità per il citrato, che

è l'attivatore, ed un'aumentata affinità per il palmitoil-CoA, che è un inibitore. Quindi la fosforilazione dell'enzima diminuisce l'affinità con il citrato e amplifica gli effetti inibitori e blocca gli effetti attivatori. La Pka sia a livello del tessuto adiposo, che a livello del tessuto epatico è attivata dalla segnalazione del glucagone, quindi il glucagone attiva la protein-chinasi A (Pka), che fa tante cose, tra cui fosforila l'Acetil-CoA carbossilasi inibendola. Quindi il glucagone, che è indice di digiuno blocca una via sintetica. L'AMP-chinasi invece è una chinasi più che da una regolazione esterna è attivata dall'AMP, quindi si attiva in conseguenza di una scarsità di energia della cellula stessa, quindi l'AMP chinasi reagisce in seguito a situazioni endogene della cellula, certamente non sono vie favorevoli per la sintesi e quindi inibisce le vie biosintetiche, infatti l'AMP chinasi inibisce molte vie metaboliche fra cui la biosintesi degli acidi grassi, Pka invece in tessuti come quello epatico o adiposo risente di stimoli esterni, fa parte di un quadro di regolazione sistemico. Viceversa l'ormone antagonista del glucagone, l'insulina fa esattamente l'azione contraria: attiva la proteina fosfatasi 1 e questa sposta l'equilibrio fosforilazione/defosforilazione sull'Acetil-CoA carbossilasi verso la forma defosforilata e la defosforilazione aumenta l'attività dell'Acetil-CoA carbossilasi. In questo caso la segnalazione è esogena, il fatto che si attivi la segnalazione insulinica significa che almeno a livello sistemico c'è una grande disponibilità di energia, l'insulina fa molte cose, fra cui chiaramente stimola la sintesi degli acidi grassi e la sintesi dei trigliceridi.

## L'acido grasso sintasi

Negli animali la **acido grasso sintasi** è una proteina omodimerica, cioè fatta da due proteine identiche, che formano un dimerico. Sempre negli animali è costituita da multidomini, il dominio è una parte della primaria che per definizione ha una struttura tridimensionale indipendente, è una porzione di una struttura più grande che ha una struttura indipendente dal resto. L'acido grasso sintasi è una proteina che ha molti domini diversi, deriva da un unico gene, e nell'organizzazione tridimensionale si organizza in domini diversi, ognuno ha associata un'attività catalitica diversa. È una proteina multi-enzimatica, nel senso che ha domini che fanno reazioni catalitiche diverse. Nei batteri e nelle piante esiste una proteina molto simile, però è costituita da proteine distinte, sono non un unico gene ma molti geni diversi, ognuno dei quali forma una proteina e queste proteine si uniscono a formare un complesso multienzimatico.

Fondamentalmente quando è funzionante l'acido grasso sintasi è in forma dimerica, due zone di questo enzima sono particolarmente importanti per il meccanismo di azione, sono due domini, due porzioni della struttura tridimensionale della proteina. Uno è il dominio **ACP**, ACP sta per acil-carrier protein, cioè è una porzione strutturalmente distinta della proteina che è caratterizzata da avere un gruppo prostetico, cioè non proteico, che è la **4-fosfo-panteteina**, che è un derivato dell'acido pantotenico, che costituisce la parte vitaminica ed è legato alla  $\beta$ -mercaptoetilammina. C'è un gruppo solfidrilico che è particolarmente importante durante la catalisi. Questo gruppo prostetico funziona da braccio mobile, un po' come per la biotina, nel senso che è un cofattore che ha una catena in grado di spostarsi fra i vari siti attivi e di trasferire nei vari siti attivi gli intermedi delle reazioni di sintesi degli acidi grassi. Il dominio ACP è particolarmente importante perché media il trasferimento degli intermedi di reazione nei vari siti attivi. Quindi focalizzandosi sul gruppo solfidrilico, che è la porzione attiva, bisogna ricordare che la 4-fosfo-panteteina fa parte anche del coenzima A, per lo stesso motivo c'è una porzione che è legata covalentemente al dominio ACP dell'acido grasso sintasi. L'altro SH importante è un SH, residuo di cisteina, che si trova nel sito attivo del dominio KS, che è uno dei domini dell'acido grasso sintasi, che viene chiamato anche SH periferico. Quindi le porzioni notevoli dell'acido grasso sintasi sono due gruppi SH: un gruppo SH sta sulla 4-fosfo-panteteina, mentre l'SH nel dominio KS è un residuo di cisteina. il primo dominio che entra in funzione nella sintesi dell'acido grasso sintasi è il dominio MAT, che sta per Malonil/Acetil-CoA-ACP trans-acilasi, la prima molecola iniziale è una molecola di Acetil-CoA, il MAT catalizza il trasferimento dell'acetile dall'Acetil-CoA su ACP, è una reazione che avviene senza problemi energetici perché si rompe un legame tioestere e se ne forma un altro, la seconda reazione, sempre catalizzata da MAT, è il trasferimento dell'acetile dall'acetil-ACP a KS, nella maggior parte dei libri il passaggio intermedio viene saltato, in realtà la reazione è frutto di due trasferimenti. Il secondo substrato che entra è una molecola di malonil-CoA, che è l'acetile carbossilato, sempre MAT trasferisce il malonile

dal CoA su ACP, dal punto di vista energetico non c'è nessuno problema perché si rompe un legame tioestere e se ne forma un altro, a questo punto l'ACP trasferisce il malonile all'interno del sito attivo di KS. Entra in azione il dominio di KS, a questo punto in KS sono presenti l'acetile, legato alla sua cisteina, ed il malonile che è legato all'ACP, attraverso il braccio mobile della 4-fosfo-panteteina si garantisce il trasferimento dell'intermedio. A questo punto entra in azione il dominio catalitico di KS, che è la beta-cheto-acil-ACP-sintasi e catalizza la formazione del beta-cheto-butidril-ACP, l'acetile legato a KS viene trasferito su un carbonio formando beta-cheto-butidril-ACP, c'è una reazione di condensazione catalizzata da KS, accompagnata da una decarbossilazione del malonile, quindi esce una molecola di CO<sub>2</sub>.

A questo punto ACP porta legato il beta-cheto-butidril, l'SH di KS torna libero. Da un punto di vista energetico la reazione è di sintesi, quindi necessita di energia libera per poter avvenire, perché si ha la formazione di un legame carbonio-carbonio che è una reazione endoergonica, la cui fonte di energia deriva dall'energia libera liberata in seguito alla rottura del legame tioestere, inoltre c'è un rilascio di energia libera anche in conseguenza della decarbossilazione,

quindi c'è una doppia fonte energetica che garantisce che questa reazione avvenga in maniera molto veloce e molto efficiente, quindi che sia totalmente spostata a destra. L'energia libera che deriva dalla decarbossilazione del malonile inizia a far capire a cosa serve, per quale motivo c'è la conversione di acetile in malonile che spende ATP. Apparentemente è una reazione assurda: prima un enzima fa la carbossilazione dell'acetile, poi l'enzima successivo lo decarbossila, sembra una perdita di energia inutile, ma in realtà il malonil-CoA è la forma attivata dell'acetil-CoA. Si spende energia per sintetizzare il malonil-CoA, quindi si crea un intermedio ad alta energia libera, questa energia libera all'interno della molecola è sfruttata per la reazione successiva. A questo punto ACP esce dal sito attivo di KS, ACP che ha legato appunto il beta-cheto-butidril-ACP, e trasferisce questo intermedio di reazione su un altro substrato, che un altro sito attivo: il sito attivo di KR. KR è il dominio nel quale avviene la prima reazione di riduzione, dato che il catabolismo è ossidativo la biosintesi è riduttiva, porta legata una molecola di NADPH e lo ossida NADP<sup>+</sup>, c'è la riduzione del gruppo carbonilico del beta-cheto-butidril-ACP a gruppo alcolico, si forma il beta-idrossi-butidril-ACP. Quindi la prima reazione di riduzione è NADPH-dipendente, il NADPH è il coenzima classico delle biosintesi, ovviamente di quelle riduttive.

ACP a questo punto trasporta il beta-idrossi sul sito attivo di una deidratasi del dominio DH dell'acido grasso sintasi, dove c'è una reazione di deidratazione, esce una molecola d'acqua e si forma un gruppo enolico. A questo punto ACP ritrasporta l'intermedio sul sito attivo di una seconda reduttasi, che è ER, l'enoil-reduttasi, la riduzione avviene sempre grazie al NADPH, il riducente che si ossida in NADP<sup>+</sup>, quindi per ogni unità bicarboniosa aggiunta alla catena occorrono anche due molecole di NADPH che si ossidano. A questo punto c'è la formazione del **butiril-ACP**, un mini acido grasso a 4 atomi di carbonio. A questo punto ACP trasferisce il butirile sull'SH di KS, questo è catalizzato da MAT, ed ACP, sempre grazie a MAT, riprende la seconda molecola di malonil-CoA.

quindi ricapitolando: MAT trasferisce la catena acilica nascente, ovvero il butirile, sull'SH di KS, così l'ACP torna libero e MAT trasferisce la seconda molecola del malonil-CoA sull'ACP. A questo punto il malonil-CoA legato ad ACP finisce nel sito attivo del dominio KS e si ha una seconda reazione dove c'è di nuovo il trasferimento del butirile, con conseguente decarbossilazione ed allungamento della catena. Ad ogni ciclo di allungamento la catena si allunga di due residui carboniosi.

La fase di allungamento avviene fino alla formazione di un acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio, il palmitoil-CoA, quindi l'allungamento della catena si ferma una volta raggiunti i 16 atomi di carbonio, infatti l'acido grasso sintasi si chiama palmitoil-CoA sintasi, questo probabilmente perché poi l'ingombro sterico della catena da trasferire sarebbe tale da non permettere queste reazioni, quindi il limite con tutta probabilità è dovuto all'ingombro sterico della catena alifatica nascente. Quindi quando la catena arriva a 16 atomi di carbonio c'è l'azione di una tiesterasi, c'è l'idrolisi della catena nascente dall'ACP, quindi si riforma l'ACP libero e l'acido palmitico viene rilasciato e sarà poi attivato a palmitoil-CoA, così termina la reazione biosintetica del precursore degli acidi grassi che si trovano negli animali.

I tessuti dove avviene in maniera più massiccia la biosintesi degli acidi grassi sono il tessuto epatico ed il tessuto adiposo, il punto di regolazione è l'acetil-CoA carbossilasi, che viene attivata dalla stimolazione insulinica ed inibita dal glucagone, l'insulina favorisce il legame con il citrato, invece il glucagone aumenta l'affinità dell'acetil-CoA carbossilasi con il palmitato.

Il malonil-CoA, che è il prodotto dell'acetilCoA carbossilasi è inibitore della carnitina acil-transferasi I, blocca l'ingresso degli acili all'interno del mitocondrio e quindi blocca la beta-ossidazione in condizioni in cui prevale la stimolazione a sintetizzare acidi grassi. Il fegato sintetizza acidi grassi e li usa fondamentalmente per sintetizzare trigliceridi, che vengono riutilizzati per sintetizzare le vldl, che vengono liberate nel torrente circolatorio e rappresentano la forma di trasporto dei trigliceridi e degli acidi grassi verso i tessuti periferici. A livello dell'adipocita esiste l'azione antagonista da parte dell'insulina

che stimola la sintesi degli acidi grassi nell'adipocita stesso, viceversa il glucagone stimola la lipolisi e quindi la stimolazione di acidi grassi in condizioni di digiuno.

## Allungamento degli acidi grassi

L'acido grasso sintasi arriva fino alla sintesi di palmitato, che è un acido grasso a 16 atomi di carbonio, però chiaramente gli animali hanno anche acidi grassi insaturi e più lunghi, quindi successivamente alla formazione del palmitato avvengono altri due processi: un processo di allungamento, dove dal palmitato si passa allo stearato, quindi un 18 saturo, entrambi possono andare in contro a reazioni di insaturazione e quindi formazione di acidi grassi insaturi che sono il palmitoleato e l'oleato. Successivamente alla sua sintesi l'acido grasso può andare in contro a queste reazioni, negli animali in generale e nell'uomo in particolare non ci possono essere insaturazioni oltre il carbonio 9, oltre può avvenire solo nelle piante, dove può essere prodotto il linoleato; se gli animali lo ottengono sono in grado sia di allungarlo che di desaturarlo, quindi il linoleato ma anche l'acido linoleico sono acidi grassi essenziali, ovvero l'organismo lo deve prendere attraverso l'alimentazione perché non è in grado di sintetizzarli.

Le reazioni di allungamento avvengono due sedi diverse, possono avvenire nei mitocondri o nel reticolo endoplasmatico, questi due modi di allungamento sono fatti partire da precursori diversi. Nei mitocondri il palmitoil-CoA a 16 atomi di carbonio può andare in contro a reazioni più o meno inverse rispetto a quelle della beta-ossidazione, quindi si può avere l'azione della tirolasi, che è reversibile, che aggiunge acetil-CoA per formare un beta-cheto-acil-CoA, aggiungendo un acetile al 16C, la molecola viene ridotta dall'idrossi-acil-CoA deidrogenasi, NADH dipendente, quindi il NADH è usato in via riduttiva e si ossida a NAD<sup>+</sup>, il carbonio carbonilico viene ridotto a carbonio alcolico, si forma quindi l'idrossi-acil-CoA. A questo punto c'è una deidratazione, si forma un transenoil-CoA, su cui agisce una seconda deidrogenasi, questa volta NADPH dipendente che riduce la molecola ad acil-CoA, tramite queste reazioni che sono quasi inverse alla betaossidazione si ha l'allungamento da 16 a 18 a 20 atomi di C.

Queste reazioni avvengono nella matrice mitocondriale, non sono uguali alla beta-ossidazione perché è diverso l'ultimo enzima: nella beta-ossidazione c'è l'acil-CoA deidrogenasi, FAD dipendente che fa una reazione irreversibile di ossidazione, viceversa qua c'è una deidrogenasi NADPH dipendente, 3 enzimi su 4 sono comuni, 1 diverso. Nonostante si abbia già un enzima che catalizza l'allungamento si usa l'acido grasso sintasi per via della velocità: l'acido grasso sintasi utilizza il malonil-CoA, che ha un contenuto di energia libera maggiore e quindi le reazioni avvengono con più rapidità, la tiolasi invece per fare la reazione di biosintesi dell'aggiunta dell'acetile sfrutta solo l'energia che deriva dalla rottura del legame tioestere. Probabilmente la questione più importante è che l'acido grasso sintasi opera come un complesso enzimatico, che è enormemente più efficiente e veloce di enzimi che operano in maniera separata. Si può pensare che il meccanismo di sintesi preferenziale di sintesi degli acidi grassi è quello della acido grasso sintasi a causa della sua rapidità. Il fatto che il vantaggio sia nel complesso enzimatico è confermato dal secondo modo di allungamento, che avviene nel reticolo endoplasmatico e questa volta le reazioni sono simili a quelle dell'acido grasso sintasi, quindi c'è un'aggiunta e riduzione del malonil-CoA ad opera di enzimi diversi. Quindi non c'è un complesso ma sono vari enzimi che fanno reazioni molto simili a quelle viste nell'acido grasso sintasi, in questo caso il substrato è il malonil-CoA, più attivato rispetto all'acetil-CoA, evidentemente la reazione nel reticolo endoplasmatico è molto più lenta perché fatta da enzimi separati che operano in maniera sequenziale.

## Le desaturasi

L'insaturazione avviene ad opera di enzimi che sono le desaturasi, nelle piante ci sono le desaturasi, che operano preferenzialmente oltre il carbonio 9 mentre negli animali le insaturazioni avvengono su carboni più vicini al carbossile.

Quindi l'acido linolenico e linoeico sono acidi grassi essenziali, bisogna includerli nella dieta perché sono la base per sintetizzare l'acido arachidonico che è un polinsaturo molto importante nella fisiologia umana. Le desaturasi negli animali sono un gruppo di enzimi:  $\Delta 2$ ,  $\Delta 5$  e  $\Delta 9$ , sono enzimi diversi che fanno insaturazione su carboni diversi, non c'è nessuna desaturasi oltre il  $\Delta 9$ . Sono ossidasi a funzione mista, hanno come substrato l'acido grasso saturo e utilizzano come ossidante l'ossigeno, che viene completamente ridotto a due molecole di acqua, per fare questo occorrono 4 elettroni, 2 derivano dall'ossidazione del substrato, gli altri due da un riducente, che nel caso dei mammiferi è il NADPH, che si ossida a NAD<sup>+</sup>, la particolarità dell'attività delle desaturasi è che non legano direttamente il

NADPH, ma i suoi elettroni arrivano all'**acil-CoA desaturasi** attraverso una mini catena di trasporto degli elettroni che necessita di due proteine: la citocromo B5 reduttasi, il cui FAD si riduce a FADH<sub>2</sub> una volta presi gli elettroni, il NADPH diventa NADP<sup>+</sup>, poi la citocromo B5 reduttasi viene riossidata e i due elettroni vanno a finire su due proteine che sono citocromi di tipo B5, trasportano ciascuno un atomo di ferro che dallo stato 3 passa allo stato 2, poi cedono elettroni alla desaturasi. I citocromi contengono un gruppo eme di tipo B ed un atomo di ferro che può essere ossidato o ridotto.

# Biosintesi dei lipidi

## Biosintesi dell'acido arachidonico

Un lipide polinsaturo particolarmente importante è l'**acido arachidonico**. Per la sintesi di questo acido grasso, si parte da un acido grasso essenziale che è l'**acido linoleico**. **Gli animali non sono in grado di inserire insaturazioni dopo il C9 e l'acido linoleico ha insaturazione sul C12, quindi deve essere assolutamente introdotto con la dieta.** Successivamente viene attivato attraverso l'aggiunta di un Coenzima-A (CoA) e si forma il **linoleoil-CoA**. Una volta formato, questo va incontro ad una reazione di insaturazione tramite una delta 6 desaturasi, che catalizza la

formazione di un doppio legame sul C6, formando un acido grasso a 18 atomi di C con 3 insaturazioni. Questo intermedio biosintetico viene ulteriormente allungato utilizzando il **malonil-CoA** nel reticolo endoplasmatico:

L'allungamento con il malonil-CoA è proprio del reticolo endoplasmatico, e ciò avviene con reazioni simili a quelle dell'acido grasso sintasi, ma queste sono svolte nel reticolo endoplasmatico da enzimi singoli, non c'è un grande complesso che catalizza l'allungamento. Si ha quindi allungamento di due carboni dell'acido grasso e si forma un acido grasso a 20 atomi di C. Ciò comporta uno scivolamento dell'insaturazione, perchè l'aggiunta avviene dalla parte del carbossile e quindi tutte le insaturazioni slittano di due carboni: quella che era presente sul C6 slitta sul C8, quella sul C9 va su C11 e quella sul C12 slitta sul C14. Infine c'è un'ulteriore azione catalitica della delta5 desaturasi nel reticolo endoplasmatico e si forma l' **Arachidonoil-CoA**, che è un polinsaturo a 20 atomi di carbonio con 4 insaturazioni su C5, C8, C11 e C14. Questo è utilizzato da un punto di vista biosintetico perchè viene inserito nei fosfolipidi. Abbiamo avuto modo di apprezzare che i fosfolipidi presentano un C2 che porta un acido grasso insaturo, mentre il C1 usualmente ha un acido grasso saturo. Talvolta sul C2 è presente l'**acido arachidonico**. L'acido arachidonico è molto importante perchè è precursore di molecole bioattive che sono le **prostaglandine**.

**Prostaglandine** sono ormoni, interagendo con i propri recettori, trasducono il segnale e alcuni recettori portano all'attivazione di enzimi di membrana come la fosfolipasi A2 membranaria; questa di fatto catalizza l'idrolisi dell'acido grasso in C2 dei fosfolipidi e nel caso in cui la posizione 2 sia occupata dall'acido arachidonico, l'azione idrolitica della fosfolipasi A2, porta alla liberazione dell'arachidonato, precursore di prostaglandine e leucotrieni. Queste ultime sono molecole con attività biologica paracrina (agiscono nei pressi della cellula che le secerne). Da notare che è la seconda volta che ci imbattiamo in una fosfolipasi A2, l'avevamo vista anche come enzima pancreatico, deputata alla degradazione dei fosfolipidi che derivano dalla dieta. Questo invece è tutt'altro enzima, è associato alla parte interna della membrana cellulare e media la trasduzione del segnale, funziona quindi in tutt'altra maniera e ha tutt'altro significato. Dal punto di vista catalitico però fa la stessa cosa, catalizza l'idrolisi di un legame estere in posizione 2 di un fosfolipide.

## I DERIVATI DELL'ACIDO ARACHIDONICO: GLI EICOSANOIDI

Gli **eicosanoidi** sono mediatori locali che agiscono principalmente con meccanismo paracrino o anche autocrino, in quanto agiscono a breve raggio su cellule vicine o da loro sintetizzate. Per questo è preferibile parlare di mediatori locali e non di ormoni, perchè non agiscono su cellule bersaglio che si trovano a grande distanza e quindi non è previsto il passaggio nel circolo sanguigno.

Abbiamo parlato dell'acido arachidonico nei glucocorticoidi, ormoni che hanno azione anti-infiammatoria e anche di altri farmaci, come l'aspirina, che fa parte dei cosiddetti FANS (cioè farmaci anti-infiammatori non steroidei). Questi composti hanno la stessa funzione ma agiscono con due meccanismi differenti. Tra i glucocorticoidi, il cortisolo porta alla sintesi di una proteina che si chiama **lipocortina**, che inibisce la **fosfolipasi A2**; questa idrolizza il glicerolo in posizione 2 liberando un acido grasso. L'acido grasso che viene liberato è quasi sempre l'acido arachidonico, precursore di questi mediatori locali, che sono principalmente mediatori dell'infiammazione.

I **glucocorticoidi** agiscono a monte, inibendo il rilascio dell'acido arachidonico, bloccano la sintesi di questi mediatori locali. La sintesi dei mediatori è ad opera di enzimi che usano acido arachidonico come substrato soltanto se è libero (cioè non esterificato al glicerolo nei fosfolipidi di membrana), quindi il primo step è liberare l'acido arachidonico perchè diventi substrato.

L' **acido arachidonico** è un acido grasso a 20 atomi di carbonio, con 4 doppi legami ed è il precursore di tutti i mediatori locali: leucotrieni, prostaglandine, prostacicline e trombassani e può:

- essere introdotto con la dieta e inserito nelle membrane biologiche
- derivare dall'acido linoleico per aggiunta di 2 atomi di C e successiva desaturazione.

## RECETTORI DEGLI EICOSANOIDI

- Tutti i recettori di questi mediatori locali sono dei recettori a **7 domini transmembrana** che nella maggior parte dei casi producono cAMP, cioè sono correlati a proteine G $\alpha$  stimolatorie. Ma ciò non è esclusivo, è comunque nota l'attivazione di proteine G $\alpha$ Q, quindi la via di diacilglicerolo, IP3 e calcio. In rarissimi casi ci sono anche inibizioni dell'adenilato ciclasi.

## Biosintesi dei trigliceridi:

I trigliceridi sono delle molecole di riserva, accumulate e in parte sintetizzate nel tessuto adiposo. Un'attiva sintesi dei trigliceridi l'abbiamo vista nell'intestino, da parte delle cellule della mucosa intestinale, durante la fase di assorbimento ed elaborazione degli acidi grassi di origine esogena. Un'altra attiva sintesi dei trigliceridi si ha nel tessuto epatico. Nei tessuti extraepatici, quindi fondamentalmente il tessuto adiposo e l'epitelio della mucosa intestinale, la sintesi dei trigliceridi comincia dal **diidrossiacetone-fosfato**, intermedio glicolitico che viene ridotto dalla glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (enzima NADH dipendente), che fa una reazione redox, ovvero ossida il NADH a NAD<sup>+</sup> e i due elettroni che ne derivano, servono per ridurre il carbonio del diidrossiacetone-fosfato, formando il **Glicerolo-3- fosfato**. A questo intermedio si può arrivare anche tramite la diretta fosforilazione del glicerolo con la glicerolo-chinasi, enzima ATP dipendente, che catalizza il trasferimento del fosfato in gamma dell'ATP sul carbonio in posizione 3, formando **glicerolo-3-fosfato**. Questo è un enzima esclusivamente epatico.

In un modo o nell'altro si arriva al glicerolo-3-fosfato, precursore biosintetico dei trigliceridi, in quanto per azione di una acil-transferasi, si ha il trasferimento dell'acile dall' acil-CoA sul carbonio 1 del glicerolo- 3-fosfato, formando un **Mono acil-glicerofosfato**. La formazione di un legame estere sarebbe una reazione endoergonica, quindi non spontanea, ed è resa possibile da una contestuale rottura di un legame tioestere, che libera una grande quantità di energia libera.

Successivamente sul Mono acil-glicerofosfato avviene un secondo trasferimento di un secondo acile. Il donatore dell'acile è sempre l'acil-CoA e si forma l'**acido fosfatidico**. Questa volta l'acile va sul C2 e si forma questo intermedio molto importante. L'acido fosfatidico si trova nelle membrane come intermedio biosintetico, perchè è il precursore sia dei trigliceridi che dei fosfogliceridi.

L'acido fosfatidico va incontro ad una reazione catalizzata da fosfatasi, che sono delle **idrolasi**. Si ha quindi idrolisi del legame estere fosforico, uscita di fosfato inorganico e formazione del **Diacilglicerolo**. Questa reazione, essendoci una fosfatasi, avviene con aggiunta di una molecola di acqua. Sul diacilglicerolo viene aggiunto il terzo acile, sempre attraverso l'azione di un acil-transferasi, che utilizza l'acil-CoA. Si ha uscita di CoA e a questo punto si forma il **trigliceride maturo**. A seconda del tessuto questo viene immagazzinato in modi diversi. Nel tessuto adiposo viene immagazzinato all'interno di una grande goccia lipidica. **Se la biosintesi avviene invece negli enterociti, piuttosto che negli epatociti, in condizioni fisiologiche, i trigliceridi non sono accumulati, ma sono i precursori delle lipoproteine.** L'acido fosfatidico è un punto di snodo perchè è anche un precursore del fosfolipide. **Naturalmente per ottenere un fosfolipide maturo deve essere aggiunta una testa polare.**

## Biosintesi dei fosfolipidi

La biosintesi dei fosfolipidi è un processo biosintetico costitutivo nelle cellule, cioè avviene in tutte le cellule e in maniera continuativa, perchè la degradazione dei fosfolipidi di membrana avviene altrettanto regolarmente. Nelle cellule tutte le macromolecole vengono degradate tranne il DNA. Le altre macromolecole sono soggette a turnover, alcune lento, altre veloce. La cellula degrada i fosfolipidi grazie ai lisosomi. Li sintetizza invece a livello del reticolo endoplasmatico, poi i fosfolipidi vengono trasferiti agli altri compartimenti (membrana nucleare, mitocondriale, lisosomi ecc) tramite delle molecole che sono le **PLEP (PhosphoLipid Exchange Proteins)**. Inoltre all'interno della cellula c'è un attivo trasporto vescicolare che media il trasporto di proteine ma anche di fosfolipidi. Quindi il trasferimento dei fosfolipidi agli altri compartimenti intracellulari è mediato dal traffico vescicolare insieme alle PLEP.

Ci sono fondamentalmente due tipi di strategie per la biosintesi dei fosfolipidi generali. Nella strategia 1 il glicerolo viene attivato attraverso il legame con un nucleotide che è il CDP (Citidin-difosfato), perchè per legare la testa polare occorre fare un legame estere. La formazione di un legame estere è un processo non spontaneo, è endoergonico,

quindi occorre un modo per fornire energia. Un modo per garantire ciò, è creare degli intermedi di reazione con un'alta energia libera. Legando un nucleotide difosfato al diacilglicerolo, si forma il **CDP-diacilglicerolo**, che è la forma attivata del diacilglicerolo. La formazione del legame estere fosforico della molecola polare al fosfato avviene così contestualmente alla rottura di un legame fosfoanidridico, che libera molta energia libera e CMP. Il processo viene quindi reso termodinamicamente possibile.

Nella strategia 2 si può attivare la testa polare. La testa polare contiene un gruppo alcolico, questa può essere attivata con CDP (citosinadifosfato) e può utilizzare la reazione vista precedentemente. Si ha uscita di CMP per formare il glicerofosfolipide.

Entrambe le strategie sono presenti in natura. Il tipo di strategia che viene utilizzata prima di tutto deriva dal tipo di organismo. Ogni organismo utilizza prevalentemente la 1 o la 2. La modalità con la quale queste vengono utilizzate oltre a differire da organismo a organismo, dipende dal tipo di fosfolipide che deve essere sintetizzato. E' importante ricordare che sono però di fatto equivalenti.

Esempi:

Nei mammiferi la prima strategia è utilizzata per la sintesi di **fosfatidil-inositolo** e **fosfatidil-glicerolo**. Si parte da **acido fosfatidico** e intervengono enzimi come le transferasi. La transferasi trasferisce il CDP sull'acido fosfatidico formando il **CDP-diacilglicerolo** e l'altro prodotto è il pirofosfato. Le transferasi utilizzano l'energia dalla rottura tra il fosfato alfa e il fosfato in beta del nucleotide trifosfato; la rottura del legame ad alta energia permette la sintesi del **CDP-diacilglicerolo** e la formazione di un altro legame fosfoanidridico ad alta energia. Si ha l'uscita del pirofosfato che viene idrolizzato dalla pirofosfatasi inorganica, liberando energia libera che spinge a destra la reazione. Questa è una reazione irreversibile di fatto. Tutte le volte che esce pirofosfato la reazione è di fatto completamente spostata verso destra. I motivi di tutto ciò li possiamo trovare considerando che l'idrolisi del pirofosfato libera energia libera, quindi questa può essere vista come una reazione irreversibile analizzandola da un punto di vista termodinamico, oppure si può considerare l'equilibrio della reazione. Secondo il principio di Le Chatelier, la sottrazione di uno dei prodotti sposta l'equilibrio a destra, la reazione è quindi irreversibile.

Il diacilglicerolo attivato è soggetto all'azione catalitica di un'altra transferasi che ha come substrato il glicerolo-3-fosfato e trasferisce CMP. Si rompe successivamente il legame ad alta energia e al posto del CMP c'è una reazione di sostituzione col glicerolo-3-fosfato, formando il **fosfatidil-glicerolo-fosfato**. A questo punto c'è la defosforilazione grazie ad una fosfatasi. Anche questa è una reazione irreversibile, entra H<sub>2</sub>O, esce P inorganico e si forma il **fosfatidil-glicerolo**, che è già un fosfolipide maturo. La stessa cosa si ha se il sostituente invece che glicerolo è l'inositolo, un polialcol ciclico. Si ha quindi una reazione di sostituzione dell'inositolo, che entra al posto del fosfato grazie ad una transferasi. La transferasi catalizzando questa reazione determina l'uscita di CMP e si forma **fosfatidil-inositolo**, che è un fosfolipide maturo.

La strategia 2 è utilizzata nei mammiferi per la sintesi di **fosfatidil-colina** e **fosfatidil-etanolamina**. La colina viene prima fosforilata dalla colina-chinasi, che usa ATP per fosforilare il gruppo alcolico. Si forma fosfocolina, che è soggetta all'azione di una transferasi, la citidil-transferasi, che catalizza il trasferimento del CMP sulla fosfocolina e si stacca un pirofosfato. Il pirofosfato è idrolizzato e si forma un intermedio, la forma attivata della colina, la **CDP-colina**. Questa è utilizzata ad opera di un enzima la fosfocolina-transferasi, che utilizza come substrato il diacilglicerolo e la CDP-colina, esce CMP e si forma la fosfatidil-colina che è il fosfolipide maturo. Per l'etanolamina la reazione è identica e si forma la fosfatidil-etanolamina, fosfolipide maturo molto diffuso.

Nei mammiferi avviene diversamente la sintesi della **fosfatidil-serina**, che si crea attraverso una reazione di sostituzione. Si parte da un fosfolipide maturo, la **fosfatidil-etanolamina** e un aminoacido, la **serina**. La fosfatidiletanolamina-serina-transferasi, enzima che catalizza la sostituzione dell'etanolamina con la serina, catalizza l'attacco nucleofilo dell'-OH della serina sul fosfato, durante l'attacco si rompe il legame, esce l'etanolamina e si forma la fosfatidil-serina. Si ha quindi un trasferimento di una serina su un fosfolipide maturo.

I fosfolipidi e gli sfingolipidi sono continuamente sintetizzati e degradati nella cellula e queste molecole di membrana sono degradate nei lisosomi. I lisosomi contengono moltissimi tipi di idrolasi acide, che degradano molte macromolecole e contengono molte fosfolipasi. La fosfolipasi 1 lisosomiale catalizza la rottura tra C1 e l'acido grasso

formando un lisofosfolipide e un acido grasso libero. Altrimenti può essere degradato dalla fosfolipasi A2 lisosomiale, che scinde il legame estere in posizione 2 e forma un lisofosfolipide e un acido grasso libero. La fosfolipasi A2 è il terzo esempio di fosfolipasi e questa è completamente diversa dagli altri due, nonostante catalizzi l'idrolisi dello stesso legame con addizione di una molecola di acqua sono proteine completamente diverse.

I lisofosfolipidi sono soggetti all'azione idrolitica di **PLB/lisofosfolipasi** che staccano anche l'altro acido grasso e rimane il glicerolo esterificato con un solo gruppo fosfato. Sono presenti anche fosfolipasi C e D. La fosfolipasi D lisosomiale idrolizza il legame estere formando acido fosfatidico, si stacca la testa polare come gruppo alcolico. La fosfolipasi C catalizza l'idrolisi del legame estere formando diacilglicerolo e la testa polare fosforilata. L'insieme dell'attività di questi enzimi degrada sia i fosfolipidi che gli sfingolipidi.

I fosfolipidi hanno funzione strutturale, ma possono essere anche precursori di molecole segnalatorie per la trasduzione del segnale. La fosfolipasi A2 libera l'acido arachidonico. Quindi l'attivazione di questo enzima fosfolipasi A2, che non ha a che fare con quello lisosomiale, promossa da un'opportuna segnalazione, libera acido arachidonico, successivamente convertito in **prostaglandine e leucotrieni**.

Un'altra molecola segnalatoria importante deriva dall'attivazione dei recettori **GPCR/ seven spanning receptor** e sono i recettori che attraversano 7 volte la membrana. Sono recettori accoppiati a proteine G. Noi abbiamo studiato altri recettori GPCR come quello del glucagone o dell'adrenalina, associato ad una proteina G stimolatoria, o come nell'attivazione dell'adenilato ciclasi. Però ce ne sono altri che usano altri tipi di proteine G. Queste sono simili ma ce ne sono di vari tipi, proteine Gs, Gi (stimolatorie o inibitorie). Ci sono anche le proteine Gq, che se attivate stimolano attivando la fosfolipasi C, che agisce su un fosfolipide che è il **fosfatidil-inositolo-4-5-bisfosfato**, convertendolo in diacilglicerolo e inositolo trifosfato. Il diacilglicerolo è un attivatore della PKC e induce il rilascio di ioni calcio dai depositi intracellulari. L'attività della fosfolipasi C porta alla formazione di fosfolipidi con attività segnalatoria, il diacilglicerolo attiva la protein-chinasi-C, che media gli effetti di questo recettore a valle, all'interno del plasmalemma.

Molti tipi di segnali sia che provengano da recettori GPCR sia cascate segnalatorie, che partano da recettori RTK (recettori a tirosinkinasi, come l'epiderma growth factor), stimolano l'attivazione della fosfolipasi D. Questa porta alla formazione di acido fosfatidico. L'acido fosfatidico è una molecola che di fatto agisce come secondo messaggero. I fosfolipidi sono importanti ed essenziali come funzione strutturale, ma la loro idrolisi, portata avanti da enzimi di membrana, porta alla formazione di molecole che sono attive, l'attività di questi enzimi non è legata alla degradazione, ma serve a mediare l'effetto dell'ormone all'interno della cellula.

## GLICERONEOGENESI

La gliceroneogenesi è la **sintesi de novo** del glicerolo e serve alla sintesi dei trigliceridi. Può essere preso

da fonti esogene, con la dieta, o può essere preso da degradazione dei trigliceridi, ma se siamo in condizioni fisiologiche opposte, cioè se si devono sintetizzare trigliceridi ex novo, serve anche una sintesi ex novo del glicerolo. Questo avviene nel tessuto adiposo e epatico, dove contestualmente alla sintesi degli acidi grassi, esiste la sintesi de novo del glicerolo: la gliceroneogenesi. Questa deriva dal **piruvato**. È stato visto sperimentalmente che deriva dalle vie della gluconeogenesi, che però arrivano fino al diidrossiacetone fosfato, che è il precursore del **glicerolo-3-fosfato** nei tessuti extra epatici e epatici quando si è in condizioni di carenza di glicerolo esogeno. È stato visto che la velocità con cui avviene la sintesi del glicerolo dipende dalla PEP-carbossichinasi, un enzima già studiato nella gluconeogenesi. Quindi il diidrossiacetone fosfato è un intermedio sia della glicolisi che della gliceroneogenesi, ma dal punto di vista sperimentale è stato visto che durante la biosintesi del glicerolo, la velocità con cui avviene la sintesi del glicerolo dipende dalla fosfoenolpiruvato-carbossichinasi, controllata a sua volta dalla sua concentrazione. Quindi la cellula regolando la concentrazione dell'enzima allo stato stazionario, regola a sua volta la velocità della via metabolica che porta da piruvato a **diidrossiacetone fosfato**, che poi è substrato della glicerolo-3-fosfato-deidrogenasi e porta alla formazione del **glicerolo-3-fosfato**, per la sintesi dei trigliceridi. Questo è uno degli esempi in cui è evidente che la velocità della reazione dipende dalla concentrazione dell'enzima. È un tipo di regolazione estremamente più lenta rispetto ad altre che avvengono tramite inibitori e attivatori o modificazioni post-traduzionali. Regolando invece la concentrazione dell'enzima che guida la fase più lenta, la regolazione può avvenire nella velocità di sintesi o di degradazione dell'enzima. Questa modalità è più lenta rispetto agli altri tempi molecolari.

Come viene regolata la gliceroneogenesi a livello sistemico?

In condizioni di digiuno questa viene inibita nel tessuto adiposo, perchè viene bloccata la sintesi dei trigliceridi e anche il processo di gliceroneogenesi. Per esempio i **glucocorticoidi** che sono ormoni che segnalano stress, vengono secreti in condizioni di digiuno, insieme al glucagone, in particolare i glucocorticoidi inibiscono la trascrizione. Agiscono a livello genico inibendo la trascrizione della fosfoenolpiruvato-carbossichinasi nel tessuto adiposo, quindi diminuendo la velocità di gliceroneogenesi nel tessuto adiposo, diminuisce anche la velocità di sintesi dei trigliceridi, perchè a condizioni di digiuno è attivo il processo opposto, la mobilizzazione di trigliceridi.

Lo stesso ormone, il **cortisolo**, ha un effetto contrario a livello epatico durante i momenti di digiuno. Lì si ha una stimolazione a livello trascrizionale del gene della fosfoenolpiruvato-carbossichinasi, perchè c'è un' incrementata necessità biosintetica di trigliceridi per la produzione delle **VLDL**. Siccome una delle funzioni del fegato è la produzione di VLDL per il trasferimento dei lipidi verso i tessuti periferici, che è particolarmente utile nei momenti di digiuno, lo stesso tipo di segnalazione ormonale che a livello adiposo blocca, a livello epatico stimola la sintesi dei trigliceridi. A maggior ragione in tempi di digiuno le VLDL vengono maggiormente prodotte perchè servono al mantenimento metabolico.

Questa via metabolica della gliceroneogenesi, è sfruttata anche in alcuni tipi di patologie. Per esempio in una patologia come il diabete di tipo 2, un diabete insulino dipendente (l'insulina è presente, il problema è a causa dei recettori a livello tissutale. Si manifesta quindi come eccedenza di insulina.), l'iperglicemia è una spia per capire che c'è il diabete, molto spesso però è anche associata ad altri tipi di dismetabolismi, come l'obesità. Essendoci un' insufficiente risposta ad una stimolazione insulinica, una delle conseguenze è l'aumento di acidi grassi liberi nel plasma, che a loro volta rinforzano la patologia. Uno dei farmaci usati per il diabete di tipo 2 sono i tiazolidinedioni, stimolatori che attivano un attivatore trascrizionale, il **PPAR-gamma**, che se attivato stimola e attiva molti geni, tra cui quello della fosfoenolpiruvato-carbossichinasi. I pazienti trattati con questo tipo di farmaco hanno un'incrementata concentrazione di PEP-carbossichinasi, quindi c'è stimolazione nella gliceroneogenesi nel tessuto adiposo, che ha come conseguenza una diminuzione degli acidi grassi liberi. In parte spezza questo circuito vizioso che parte dall'insulino resistenza e passa attraverso l'aumento degli **FFA plasmatici** (free fatty acids). In questo modo diminuendo gli acidi grassi liberi nel plasma, diminuisce l'insulino resistenza e alcuni degli effetti causati dal diabete di tipo 2.

### Biosintesi dei sfingolipidi

Gli sfingolipidi sono costituenti delle membrane plasmatiche e sono presenti particolarmente nella glia e nel SNC. Sono caratterizzati dal fatto di avere non il glicerolo ma la sfingosina, un aminoalcol come nucleo. La sfingosina ha il gruppo NH<sub>2</sub> che fa un legame ammidico con un acido grasso, mentre l'-OH è esterificato con altre molecole come la fosfocolina, formando la sfingomieline, oppure è impegnato a formare legame glicosidici con zuccheri, formando glicolipidi neutri, oppure con disaccaridi e oligosaccaridi formando gangliosidi.

Si parte da due molecole, che sono il **Palmitoil-CoA**, che deriva da sintesi dell'acido grasso, e da un amminoacido che è la serina. La serina è un amminoacido standard che si ritrova nella biosintesi delle proteine e serve in diversi tipi di biosintesi, compresa la sintesi degli sfingolipidi. La serina va incontro all'azione dell'enzima diidrosfingolo-sintetasi (le sintetasi fanno reazioni di sintesi senza utilizzare ATP) che è dipendente da piridossal-fosfato. Quest'ultimo è coenzima delle transaminasi, coenzima della glicogenofosforilasi ed è il coenzima di questa sintetasi, perchè catalizza la reazione. E' indispensabile nella formazione dell'intermedio aldiminico, che deriva dalla alfa-decarbossilazione della serina, attraverso un meccanismo di reazione che studieremo più precisamente quando faremo il meccanismo delle transaminasi. Il Piridossal-fosfato è importante perchè catalizza la rottura del legame tra il C alfa e il carbossile, si ha alfa-decarbossilazione e ciò porta alla fuoriuscita di anidride carbonica. Si forma un carbanione, utilizzato dall'enzima 3-cheto-diidrosfingolosintetasi per fare un attacco nucleofilo sul gruppo carbonilico, portando alla rottura del legame tioestere e alla formazione del **3-cheto- diidrosfingolo**. Si ha anche CoenzimaA libero. La rottura del legame tioestere permette di ottenere energia libera per fare la reazione. A questo punto la reazione è portata avanti da una reductasi che utilizza NADH come donatore di elettroni, questo si ossida a NAD<sup>+</sup> e due elettroni sono utilizzati per ridurre il C=O e si crea il diidrosfingolo. Il diidrosfingolo va incontro ad una reazione di attivazione, di trasferimento di un gruppo acilico sull'NH<sub>2</sub>, con formazione di un legame ammidico. Anche per la formazione del legame ammidico serve energia, energia data dalla rottura del legame tioestere. Entra poi in azione la diidrossidasi, che fa un meccanismo d'azione come le desaturasi, ovvero utilizza come donatore di elettroni il NADPH e ossigeno

molecolare. Si ha la formazione di due molecole di acqua. Per la riduzione completa di O<sub>2</sub> occorrono quattro elettroni, 2 derivano dal NADPH, gli altri dall'ossidazione dei due carboni, con formazione di un doppio legame. L'enzima è un ossidasi, utilizza ossigeno e porta alla formazione di un **ceramide**, precursore degli sfingolipidi.

A questo punto ci può essere l'azione di una transferasi, che trasferisce la **fosfocolina** su un ceramide e forma **diacilglicerolo e sfingomieline**. Questo enzima opera una reazione di trasferimento, usa come substrato il ceramide e la fosfatidilcolina e catalizza il trasferimento della fosfocolina dal fosfolipide, portando alla produzione di sfingomieline e poi diacilglicerolo.

Alternativamente si può avere l'aggiunta di una molecola di glucosio, attraverso il legame sul carbonio anomero. In questo caso agisce un enzima transferasi che utilizza la forma attivata del glucosio, UDP-glucosio-transferasi, che trasferisce il glucosio sull'-OH. Si forma un legame glicosidico, sul carbonio 1 anomero, esce un UDP e si forma un cerebroside.

La degradazione degli sfingolipidi avviene nei lisosomi. Noi abbiamo fatto la biosintesi del cerebroside, però molti sfingolipidi contengono non solamente glucosio ma anche oligosaccaridi lineari o ramificati. Il GM1 è uno sfingolipide che contiene una corta catena ramificata di oligosaccaridi. Nella sua degradazione, viene prima degradata la parte oligosaccaridica e poi si ottiene il ceramide che viene degradato a sfingosina. Intervengono una serie di enzimi che sono le glicosidasi che staccano una alla volta le unità saccaridiche. La galattosidasi rompe idroliticamente il legame glicosidico, esce galattosio e si forma una forma accorciata di GM1. Successivamente altri enzimi simili staccano altre unità da GM1, passando così a GM2, GM3 ecc.

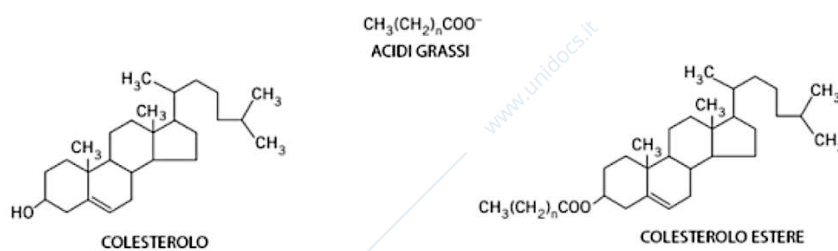
## Biosintesi del colesterolo

### Generalità sul colesterolo:

Il colesterolo è un lipide che ha importanti funzioni sia strutturali sia come precursore degli ormoni steroidei e degli acidi biliari. Inoltre, particolarmente nelle cellule eucariote, il colesterolo costituisce un importante componente della membrana plasmatica, in cui il **colesterolo libero** funge da regolatore della fluidità della membrana.

Il colesterolo si trova sotto forma di due molecole:

- il **colesterolo libero**, presenta l'OH sul C3 libero, e si trova all'interno delle membrane.
- il **colesterolo esterificato**, in cui un acido grasso esterifica l'OH del C3. Il carbonio esterificato è la forma prevalente nelle lipoproteine, quindi il colesterolo viene trasportato sotto forma di colesterolo esterificato.



Grazie alle lipoproteine HDL il colesterolo è riportato al fegato, dove è trasformato in acidi e sali biliari, poi immessi nella bile. una piccola quantità di questi acidi biliari viene eliminata con le feci, e questa quantità eliminata corrisponde alla quantità di colesterolo eliminato dall'organismo dato che nel nostro organismo non esiste una via catabolica a carico del colesterolo. Invece la maggior parte di questi acidi biliari viene riassorbita grazie al **circolo enteroepatico**.

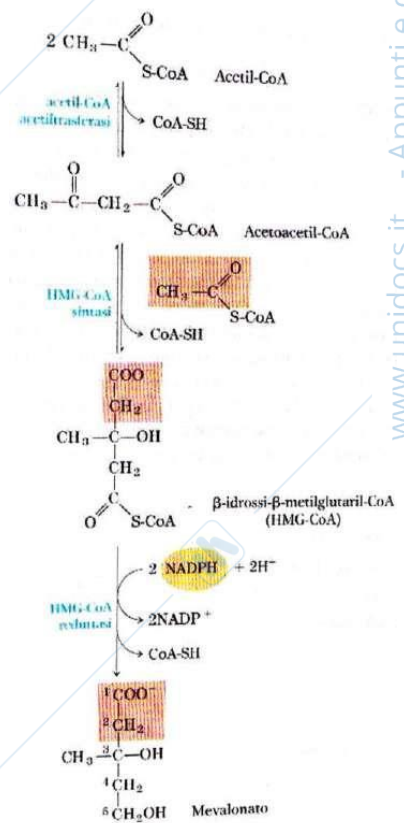
## SINTESI DEL COLESTEROLO

La sintesi del colesterolo avviene quando c'è abbondanza energetica, e si producono molecole che si distribuiscono nell'organismo dove possono servirlo, per esempio, per ricostituire le membrane cellulari.

La sintesi del colesterolo avviene nel citoplasma delle **cellule epatiche** (nel fegato), e inizia dallo stesso precursore degli acidi grassi: l'**acetil-CoA**.

L'acetil-CoA arriva nel citoplasma sotto forma di **citrato** (proveniente dalla matrice mitocondriale dal ciclo di Krebs) e si trasforma, grazie al **citrato liasi** in **Acetil-CoA** e **ossalacetato**. Poi, l'ossalacetato ad opera del malato deidrogenasi diventa malato e poi, il malato viene catalizzato dall'enzima malico producendo piruvato e ritornando al citoplasma anche **NADPH** (che entra nella sintesi del colesterolo).

Quindi **gli ingredienti per la sintesi del colesterolo e degli acidi grassi sono esattamente gli stessi: acetil-CoA e potere riducente (NADPH)**. Nel caso della sintesi del colesterolo, l'acetil-CoA non ha bisogno di essere attivato, attraverso una carbossilazione, per ottenere malonil-CoA, come invece avviene nella sintesi degli acidi grassi.



## TAPPE DELLA BIOSINTESI DEL COLESTEROLO

La biosintesi del colesterolo può essere divisa in quattro tappe di reazioni:

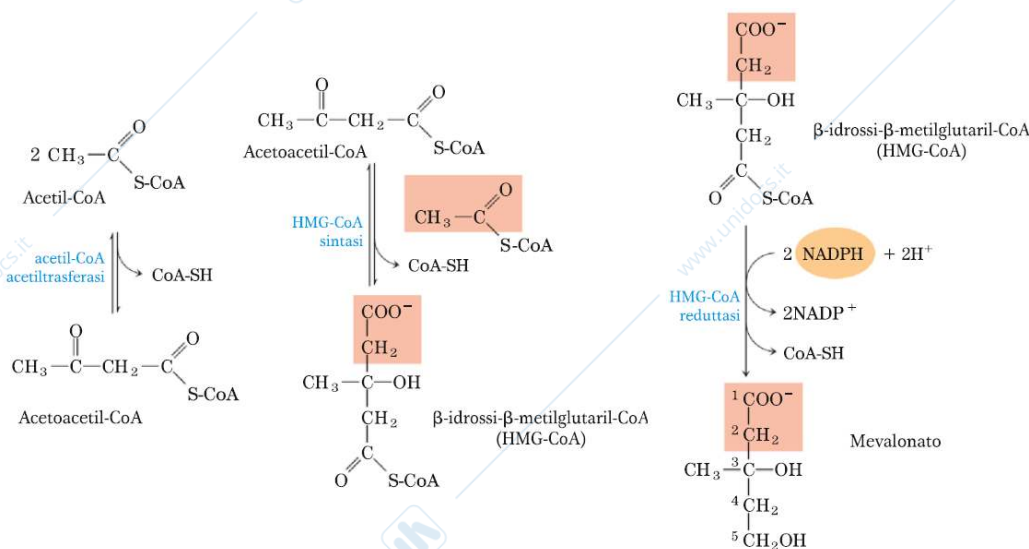
1. Condensazione di tre unità di acetato per formare un intermedio a 6 atomi di carbonio (**mevalonato**).
2. Conversione del mevalonato in **unità isopreniche**;
3. Polimerizzazione di unità isopreniche a 5 atomi di carbonio per formare lo **squalene**, composto lineare a 30 atomi di carbonio;
4. Conversione dello squalene nel nucleo steroide a quattro anelli, da cui, attraverso una serie di altre modifiche si forma il colesterolo.

### TAPPA 1

Due molecole di acetil-CoA reagiscono tra ad opera dell'enzima **Acetil-CoA acetiltrasferasi** per formare **acetoacetil-CoA** che a sua volta reagisce con una terza molecola di **Acetil-CoA**, ad opera dell'enzima  **$\beta$ -idrossi- $\beta$ -metilglutaril-CoA sintasi** per formare  **$\beta$ -idrossi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA)**.

((Queste due reazioni si ritrovano anche nella biosintesi dei corpi chetonici. La differenza è che nella biosintesi dei corpi chetonici a questo punto interviene una liasi che scinde l'HMG-CoA in acetoacetato e acetil-CoA.))

a questo punto, l'**HMG-CoA** subisce una reazione irreversibile catalizzata dall'enzima **HMG-CoA reduttasi** (enzima **NADPH dipendente**) che utilizza 2 molecole di NADPH per ridurre il gruppo carbossilico (dell'HMG-CoA) a gruppo alcolico. Allo stesso tempo, in questa reazione avviene anche la rottura del legame e il distacco del CoA (coenzima A) e si forma il **mevalonato**. Questa reazione irreversibile rappresenta lo **step di controllo** dell'intero processo biosintetico del colesterolo.

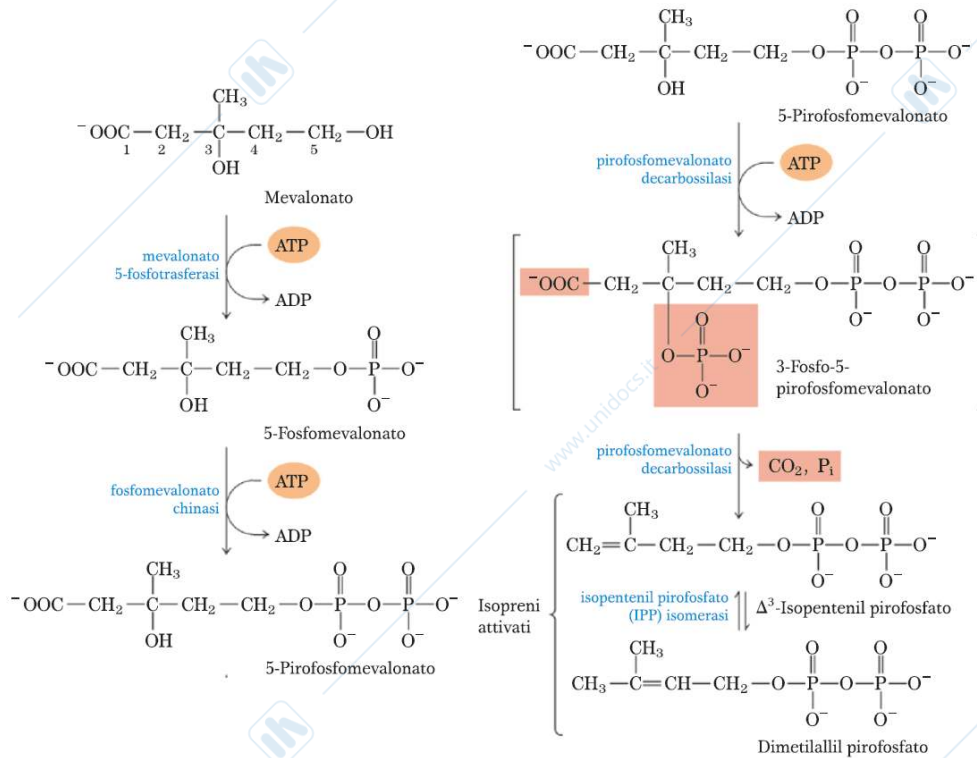


### TAPPA 2

in questa tappa, Il mevalonato viene fosforilato attraverso delle fosfotransferasi ATP dipendenti, quindi prende il **fosfato** dall'ATP, e viene rilasciato l'ADP. Innanzitutto interviene la **5-fosfotransferasi** che catalizza il trasferimento del fosfato in  $\gamma$  dell'ATP sull'OH legato al C5 del mevalonato, che si trasforma quindi nel **5-fosfomevalonato**.

Successivamente, ad opera dell'enzima fosfomevalonato chinasi ATP dipendente, si ha un'altra fosforilazione sul C5 carbonio del 5-fosfomevalonato trasformandolo nel **5-pirofosfomevalonato**.

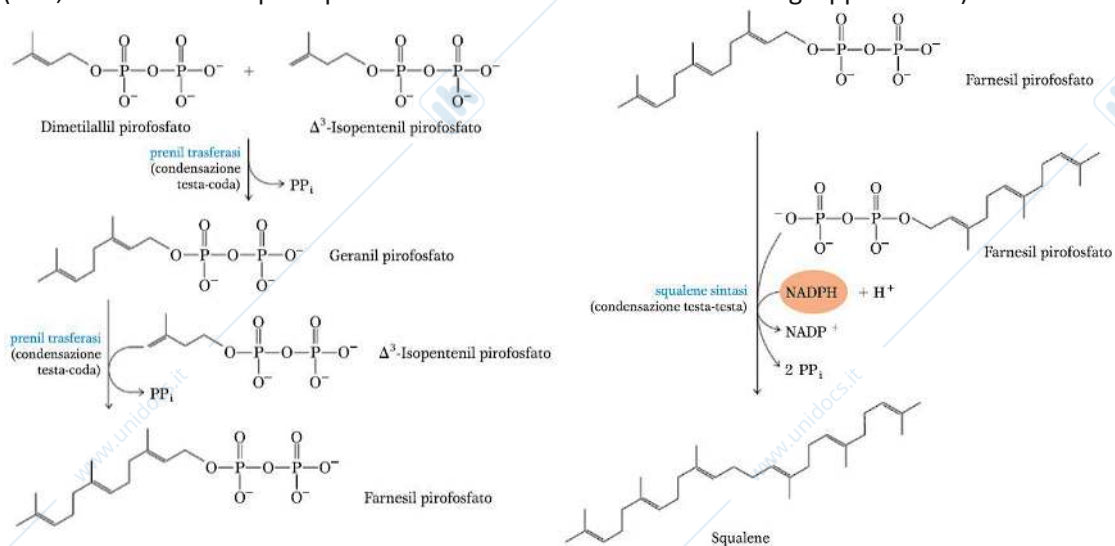
Una terza fosforilazione ATP dipendente avviene sul C3, ad opera dell'enzima **pirofosfomevalonato decarbossilasi**, formando il **3-fosfo-5-pirofosfomevalonato**, che è una molecola relativamente instabile, che, ancora ad opera dell'enzima **pirofosfomevalonato decarbossilasi**, subisce la decarbossilazione del gruppo carbossilico legato al C-2, e la defosforilazione del gruppo fosfato legato al C-3, rilasciando così CO<sub>2</sub> e Pi, e come prodotti di reazione si formano **due molecole di isopreni attivi**: il **dimetilallil pirofosfato** e **isopentenil pirofosfato**. Questi due composti a 5 atomi di carbonio sono le forme attivate, i metaboliti attivati che consentono poi la costruzione del colesterolo.



### TAPPA 3

L'isopentenil pirofosfato e il dimetilallil pirofosfato vanno incontro ad una condensazione "testa-coda" con l'eliminazione di un gruppo pirofosfato (PP<sub>i</sub>) tramite l'enzima **Prenil trasferasi**, per formare il **Geranil pirofosfato** (10C). Il geranil pirofosfato subisce un'altra condensazione testa-coda con un Δ<sup>3</sup>-isopentenil pirofosfato, ad opera dell'enzima **Prenil trasferasi**, con eliminazione di un gruppo pirofosfato, per formare il **farnesil pirofosfato** (15C).

Infine, due molecole di **farnesil pirofosfato** condensano testa-testa in una reazione catalizzata dall'enzima **squalene sintasi** che usa il coenzima NADPH + H<sup>+</sup>, per cui vengono eliminati i due gruppi pirofosfati (2 PP<sub>i</sub>) per formare lo **squalene** (30C, 24 nella catena principale e 6 sotto forma di ramificazioni di gruppi metilici).



## TAPPA 4

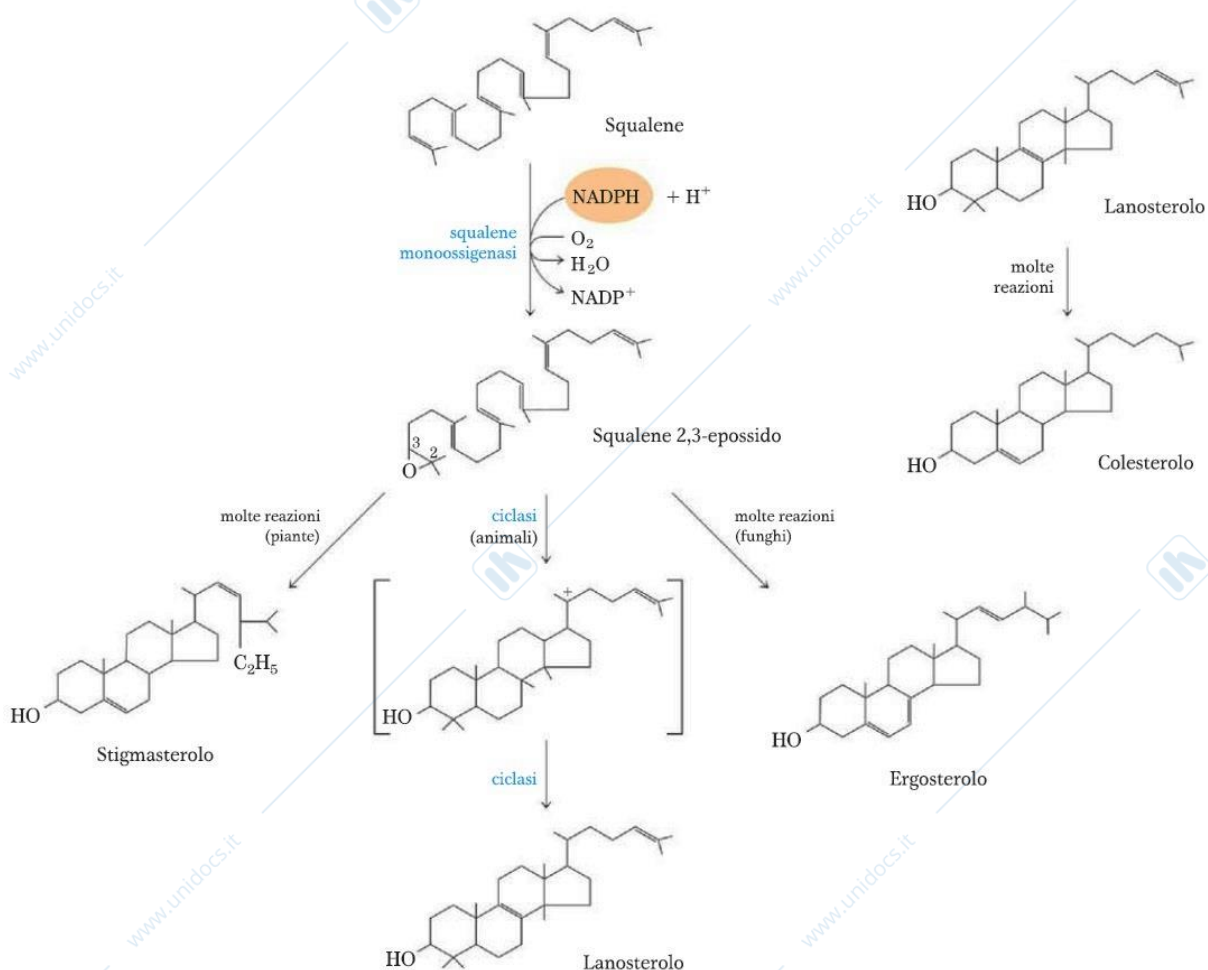
In questa ultima tappa interviene l'enzima **squalene monossigenasi**. Quest'enzima utilizza come un cofattore il NADPH, e prende un atomo di ossigeno dall'agente ossidante che è l'ossigeno molecolare, e aggiunge questo atomo di ossigeno all'estremità dello squalene, formando un epossido detto **squalene 2,3-eossido**, e vengono rilasciati H<sub>2</sub>O e NADP<sup>+</sup>.

Questo **squalene epossido**, grazie all'azione di una **ciclasi**, viene ciclizzato, con formazione della struttura policiclica e attraverso un altro passaggio si forma il **lanosterolo**. Il lanosterolo poi subisce circa 20 reazioni che determinano la rimozione di gruppi metilici (-CH<sub>3</sub>), trasformando il lanosterolo in **colesterolo**.

il colesterolo è uno sterolo tipico degli animali, con 27 atomi di carbonio. **Nelle piante si forma lo stigmasterolo, che assomiglia molto al colesterolo, mentre nei funghi l'ergosterolo.**

### Destini del colesterolo dopo che viene sintetizzato:

- viene incorporato nelle **membrane** degli epatociti;
- viene escreto come **acidi biliari**: la bile è costituita da acidi biliari, derivati del colesterolo, sintetizzati nel fegato;
- **Colesterolo esterificato**: si forma grazie all'enzima **acil-CoA-colesterolo aciltrasferasi (ACAT)**. Questo enzima trasferisce un acido grasso dal CoA al gruppo idrossilico del colesterolo, convertendolo in una forma ancora più idrofobica. Questi colesteroli esterificati o vengono conservati nel fegato come gocce lipidiche o vengono trasportati da **lipoproteine VLDL** verso tessuto e organi che richiedono colesterolo, esempi: **tessuti** le cui cellule hanno bisogno del colesterolo per la formazione delle loro membrane, la **corteccia del surrene** dove le cellule ghiandolari utilizzano il colesterolo per produrre **ormoni steroidei**.



## REGOLAZIONE SINTESI DEL COLESTEROLO

La reazione chiave del processo è quella catalizzata dall'**HMG-CoA reduttasi** ( $\beta$ -idrossi- $\beta$ -metilglutaril-CoA reduttasi).

Questa enzima può essere regolata tramite due meccanismi:

### 1) Regolazione a breve termine (regolazione covalente)

in questo caso l'HMG-CoA reduttasi è regolata per fosforilazione o defosforilazione tramite una modificazione covalente reversibile catalizzata dalla **proteina chinasi AMP dipendente (AMPK)**:

**Fosforilazione (inibizione dell'HMG-CoA reduttasi):** è indotta dal glucagone che viene secreto quando il contenuto energetico nella cellula è basso, quindi avviene la fosforilazione catalizzata dalla **proteina chinasi AMP dipendente (AMPK)**, che percepisce la concentrazione elevata di AMP (che è indice di una bassa concentrazione di ATP), quindi fosforila l'HMG-CoA reduttasi **inattivandola**, e si inibisce così la sintesi del colesterolo.

**Defosforilazione (attivazione dell'HMG-CoA reduttasi):** è indotta dall'insulina, che viene secreto quando c'è un'abbondante energia, quindi l'HMG-CoA reduttasi viene defosforilata e quindi **attivata**, favorendo così la sintesi del colesterolo (che avviene soprattutto durante un'abbondanza energetica).

### 2) Regolazione a lungo termine:

Questo meccanismo dipende dalla concentrazione del colesterolo:

L'aumento del colesterolo, prodotto finale della via, e dei suoi derivati, gli ossisteroli, mette in moto un meccanismo del tutto specifico che prevede l'**ubiquitinazione dell'HMG-CoA reduttasi** che quindi viene demolita a livello del **proteasoma**, un meccanismo dunque di degradazione dell'enzima ubiquitina-dipendente. Parte da un frammento proteico che, in determinate condizioni, attiva la trascrizione del DNA che codifica per enzimi che sintetizzano i lipidi, tra cui l'enzima HMG-CoA reduttasi.

#### i) Regolazione mediata da fattori di trascrizione SREPB:

**Quando la concentrazione del colesterolo nella cellula è sufficiente**, i colesteroli si legano a una serie di proteine sensori del colesterolo: una di queste è detta "**Insig**", proteina di un gene indotto dall'insulina. Alla proteina Insig viene legata una proteina attivatrice detta **SCAP**, che provoca la scissione del fattore di trascrizione. a questo complesso dell'Insig vengono inoltre legati dei fattori di trascrizione dette **SREPB**, che in questo modo vengono trattenute nel complesso proteico assemblato nel reticolo endoplasmatico, e quando viene trattenuta all'interno di questo complesso, questi fattori di trascrizione SREPB non possono funzionare, vengono inattivati.

**Quando la concentrazione degli steroli diminuisce**, le proteine SREPB si staccano da SCAP e da Insig, poi:

- Insig viene ubiquitinata e destinata alla degradazione.
- SCAP e SREPB passano dal reticolo endoplasmatico al Golgi.

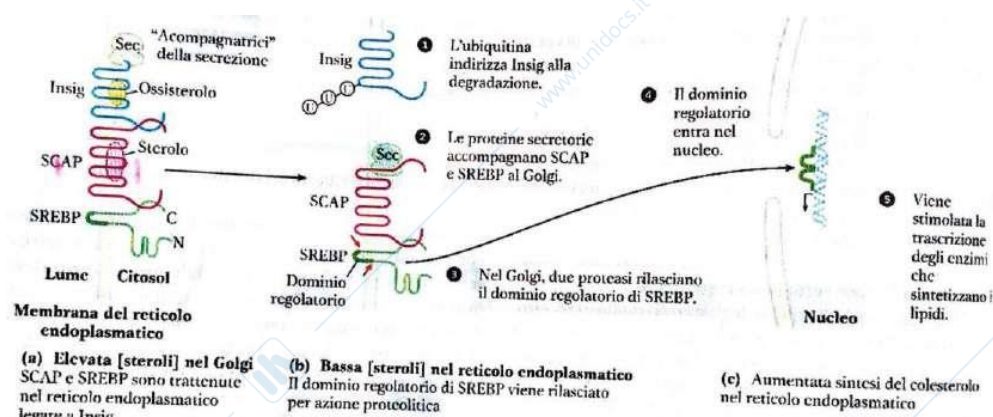
Nel Golgi la proteina attivatrice SCAP viene attivata, e all'azione di due proteasi, stacca da SREPB un piccolo peptide, il dominio regolatorio, che entra nel nucleo per legarsi al DNA, aumentando la trascrizione degli enzimi che sintetizzano i lipidi (tra questi l'HMG-CoA reduttasi) quindi viene attivata la sintesi del colesterolo.

**ii) Regolazione mediata dai recettori X:**

Il recettore X (**LXR**) è un fattore di trascrizione nucleare attivato da ligandi ossisterolici (che indicano alti livelli di colesterolo). ne esistono 2 tipi: **LXR $\alpha$**  (presente solo nel fegato, tessuto adiposo e macrofagi) ed **LXR $\beta$**  (espresso in tutti i tessuti).

Quando LXR è legato a steroli, si associa con i recettori X dei retinoidi (**RXR**). Il dimero così formato va ad attivare la trascrizione di geni che permettono l'abbassamento della concentrazione di colesterolo.

Quindi si può dire che SREBP viene attivato da bassi livelli di colesterolo, LXR da alti livelli. Entrambi collaborano per regolare la sintesi del colesterolo.



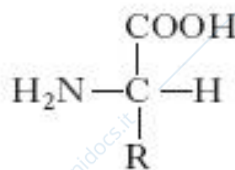
**Figura 21.44** Regolazione della sintesi del colesterolo da parte delle SREBP. Le proteine che legano l'elemento regolatore degli steroli (SREBP, in verde) appena sintetizzate sono immerse nella membrana dell'ER insieme alla proteina attivatrice della scissione della SREBP (SCAP, in rosso), che a sua volta è legata a Insig (in blu). (N e C rappresentano le terminazioni ammino- e carbossiterminali delle proteine.) (a) Quando è legata alla SCAP e a Insig, la SREBP

è inattiva. (b) Quando il livello degli steroli diminuisce, i siti di legame degli steroli su Insig e su SCAP sono occupati, il complesso proteico migra nel Golgi e la SREBP viene scissa liberando il dominio regolatorio che, (c) agisce nel nucleo, facendo aumentare la trascrizione dei geni regolati dagli steroli. Insig viene indirizzata alla degradazione dall'attacco di diverse molecole di ubiquitina.

# Amminoacidi, Peptidi, e Proteine

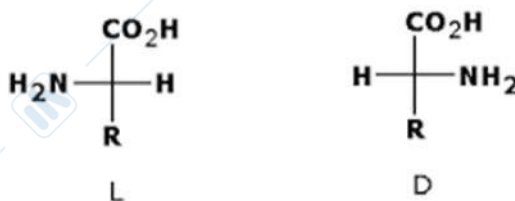
## Gli amminoacidi

Esistono **20 amminoacidi** differenti presenti nelle proteine che **sono sempre alfa-amminoacidi**. ogni amminoacido è formato da un atomo di carbonio centrale (carbonio-alfa) a cui è legato un gruppo carbossilico, un gruppo amminico, un idrogeno e una catena laterale (catena R) il quale è diverso per ogni amminoacido e si differenzia per struttura, dimensione e carica e quindi influenza anche la solubilità dell'amminoacido in acqua. Il **carbonio-alfa** degli amminoacidi lega 4 gruppi atomici diversi, quindi è un centro chirale (ad eccezione di quello della glicina, che ha due idrogeni).



formula generale dell'amminoacido

A causa della disposizione tetraedrica degli orbitali di legame, i quattro gruppi funzionali possono disporsi in due modi differenti nello spazio, quindi per ogni amminoacido sono possibili due stereoisomeri, in particolare due enantiomeri: **D** e **L** (un enantiomero è l'immagine speculare dell'altro, non sovrapponibile).



## Classificazione degli amminoacidi

Gli amminoacidi in generale si classificano in **essenziali** e **non essenziali**. Quelli essenziali non possono essere sintetizzati attraverso il metabolismo e quindi devono essere introdotti con la dieta. Gli amminoacidi possono essere classificati in **5 classi principali** in base alle proprietà dei **gruppi R** utilizzando in particolare la polarità: cioè la tendenza ad interagire con l'acqua.

**-Gruppi R alifatici non polari:** in questo gruppo ci sono gli amminoacidi con gruppi R non polari e quindi idrofobici. Le catene laterali di: ALANINA, VALINA, LEUCINA e ISOLEUCINA tendono a raggrupparsi all'interno della proteina stabilizzando la struttura con interazioni idrofobiche.

La GLICINA invece ha la struttura più semplice e la sua piccola catena laterale non contribuisce alla formazione di interazioni idrofobiche. La METIONINA è uno dei due amminoacidi non polari contenente zolfo (l'altra è la cisteina) e la PROLINA invece ha una caratteristica struttura ciclica.

**-Gruppi R aromatici:** sono tre e sono: FENILANINA, TIROSINA e TRIPTOFANO, con le loro catene aromatiche sono relativamente non polari e possono intervenire nelle interazioni idrofobiche.

**-Gruppi R polari non carichi:** i gruppi R di questi amminoacidi sono solubili in acqua perché contengono gruppi funzionali che formano legami a idrogeno con l'acqua. Comprende: SERINA, TREONINA, CISTEINA, ASPARAGINA E GLUTAMMINA. La polarità della serina e treonina è dovuta al loro gruppo ossidrilico, quella dell'asparagina e glutammina ai loro gruppi amminici mentre quella della cisteina è molto modesta ed è dovuta al gruppo solfidrilico.

**-gruppi R carichi positivamente (basici):** sono la LISINA, l'ARGININA e l'ISTIDINA

**-gruppi R carichi negativamente (acidi):** sono l'ASPARTATO e il GLUTAMMATO.

---> i 20 amminoacidi con le loro formule:

\*di cui ci sono **8 amminoacidi essenziali** in **BOLD**, il resto sono non essenziali o semiessenziali.

Formula	Nome	Formula	Nome
	<b>glicina</b> (Gly)		<b>serina</b> (Ser)
	<b>alanina</b> (Ala)		<b>treonina</b> (Thr)
	<b>valina</b> (Val)		<b>cisteina</b> (Cys)
	<b>leucina</b> (Leu)		<b>metionina</b> (Met)
	<b>isoleucina</b> (Ile)		<b>prolina</b> (Pro)
	<b>acido aspartico</b> (Asp)		<b>asparagina</b> (Asn)
	<b>acido glutammico</b> (Glu)		<b>glutammina</b> (Gln)
	<b>fenilalanina</b> (Phe)		<b>lisina</b> (Lys)
	<b>tirosina</b> (Tyr)		<b>arginina</b> (Arg)
	<b>triptofano</b> (Trp)		<b>istidina</b> (His)

## LE PROTEINE

Le proteine sono le macromolecole più abbondanti in natura, presenti in tutte le cellule, e sono formate da serie di residui amminoacidici uniti covalentemente da legami peptidici (un amminoacido diventa residuo quando perde una molecola di H<sub>2</sub>O legandosi ad un altro amminoacido).

Le proteine sono polimeri di amminoacidi che posso variare da 3 fino a migliaia di residui.

Due amminoacidi si legano covalentemente attraverso un legame peptidico.

Questo legame avviene tra il gruppo carbossilico di un primo amminoacido con il gruppo amminico di un secondo e porta all'eliminazione di una molecola d'acqua attraverso una reazione di condensazione.

Il legame peptidico è molto stabile.

Quando il numero degli amminoacidi è relativamente piccolo viene detto oligopeptide, se invece gli amminoacidi sono tanti viene detto polipeptide.

L'amminoacido con cui inizia la catena che ha il gruppo amminico libero è detto ammino terminale mentre l'estremità finale con il gruppo carbossilico libero è detto carbossiterminale.

Alcune proteine sono costituite da una singola catena polipeptidica, mentre altre chiamate proteine multi subunità o multimeri hanno due o più polipeptidi associati in modo non covalente. Un multimeri formato da poche subunità è anche detto oligomero. Le catene polipeptidiche presenti in una proteina multi subunità possono essere identiche o diverse tra loro. Se almeno due sono identiche, la proteina viene detta oligomera e le unità identiche sono chiamate protomeri. L'emoglobina per esempio ha quattro sub-unità polipeptidiche: due catene alfa identiche e due catene beta identiche.

Molte proteine invece sono costituite soltanto da amminoacidi e nessun altro gruppo chimico queste sono considerate proteine semplici. Altre proteine presentano oltre agli amminoacidi altri gruppi chimici addizionali associati permanentemente e sono chiamate proteine coniugate. La parte non amminoacidica della proteina coniugata viene detta gruppo prostetico. per esempio, le lipoproteine contengono lipidi o glicoproteine che contengono zuccheri.

Ogni proteina ha un'unica sequenza amminoacidica che le conferisce una particolare struttura tridimensionale ed in base alla struttura e quindi al tipo ripiegamento le proteine hanno determinate funzioni:

**funzione di trasporto:** emoglobina e albumina ecc.

**funzione catalitica:** enzimi

**funzione strutturale:** cheratine e collagene ecc....

**funzioni specializzate:** immunoglobuline

## FUNZIONI DELLE PROTEINE

la funzione di ogni proteina è correlata alla struttura tridimensionale delle proteine, le proteine però sono molecole dinamiche, le cui funzioni dipendono da interazioni con altre molecole.

Le funzioni di molte proteine richiedono il legame reversibile con altre molecole.

-Una molecola unita reversibilmente ad una proteina viene detta ligando; un ligando può anche essere un'altra proteina.

-un ligando si lega ad un sito della proteina detto sito di legame, l'interazione è specifica: la proteina può discriminare tra migliaia di molecole diverse intorno a se e legarne una sola o poche.

-il legame tra una proteina e un ligando è spesso seguito da una modificazione conformazionale che nella proteina è chiamato adattamento indotto. Se ciò avviene in un sistema multisubunità una singola modifica ad una subunità può influenzare anche le altre.

## LE PROTEINE CHE LEGANO OSSIGENO

La **mioglobina** e l'**emoglobina** sono proteine che legano l'ossigeno. Fanno parte della famiglia delle globine e formano un legame reversibile con il loro ligando, che è l'ossigeno. La mioglobina deposita ossigeno nei tessuti muscolari, mentre emoglobina trasporta ossigeno dai polmoni ai tessuti. L'ossigeno è poco solubile in acqua e quindi senza l'emoglobina non può essere trasportato in quantità sufficiente nei tessuti. Nessuna delle catene laterali degli amminoacidi è in grado di legare reversibilmente ossigeno, quindi questo ruolo viene svolto da un metallo di transizione che è il **ferro** (~~o rame~~) che ha una forte tendenza a legare ossigeno. Questo ferro è incorporato nel **gruppo prostetico** legato all'emoglobina, detto **gruppo eme**, localizzato in una tasca idrofobica.

### STRUTTURA DEL GRUPPO EME

Il gruppo eme è considerato il gruppo prostetico dell'emoglobina (legato ad essa). Il gruppo eme è un **tetrapirrolo** (dato dalla **protoporfirina**, un composto organico) a cui è legato un **atomo di ferro** allo stato ossidato ferroso, ovvero  $Fe^{2+}$ .

L'atomo di ferro ha 6 legami di coordinazione, 4 di questi sono impegnati con 4 atomi di azoto a formare l'anello porfirinico, altri 2 invece sono perpendicolari al piano della porfirina.

Gli atomi di azoto coordinati impediscono la conversione dell'ferro dell'eme nello stato ferrico  $Fe^{3+}$  che non è in grado di legare

ossigeno e reagirebbe con esso portando alla formazione di radicali reattivi ROS molto tossiche e dannose per le molecole biologiche. ~~Quando l'eme è inserito in una proteina questa reazione non avviene. Quando si lega l'ossigeno, le proprietà elettroniche si modificano è ciò spiega il colore diverso del sangue venoso povero di ossigeno (rosso scuro) rispetto a quello arterioso ricco di ossigeno (rosso brillante).~~

### EMOGLOBINA

È una proteina tetramerica contenente 4 gruppi prostetici eme, uno per ciascuna subunità. Contiene due tipi di globine: **due catene alfa** (141 residui ciascuna) e **due catene beta** (146 residui ciascuna)

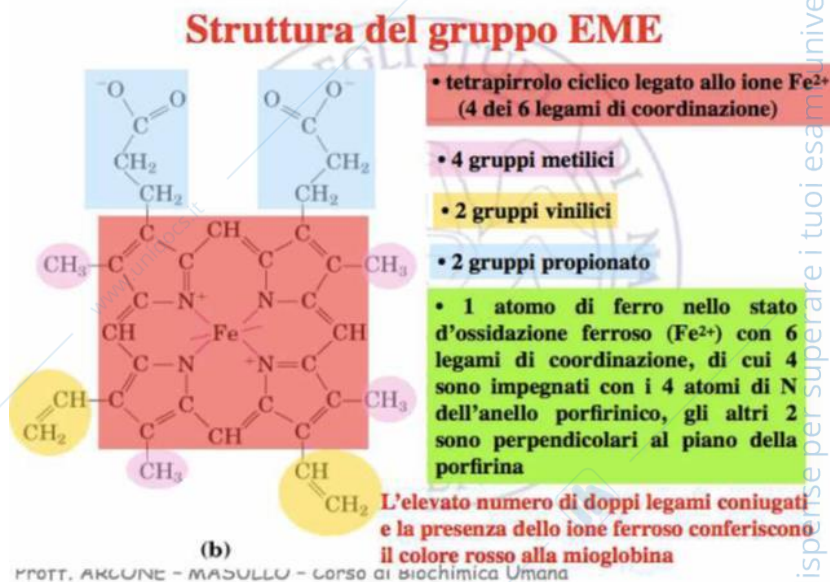
La struttura quaternaria dell'emoglobina è caratterizzata da interazioni molto forti tra le 4 subunità: sono interazioni idrofobiche, e legami a idrogeno. L'emoglobina è disciolta nel citosol dei globuli rossi ad una concentrazione molto elevata, e l'emoglobina garantisce la funzione degli eritrociti perchè la usano per trasportare l'ossigeno in circolo.

**il legame dell'ossigeno alla mioglobina è allosterico poiché induce modificazione conformazionali a carico degli altri siti di legame dell'emoglobina**

L'analisi ai raggi x due differenti conformazioni dell'emoglobina: lo stato R e lo stato T.

**L'ossigeno si lega ad entrambi gli stati dell'emoglobina ma ha una maggiore affinità per lo stato R.**

In assenza di ossigeno invece (in laboratorio) lo stato T è più stabile ed è chiamata deossiemoglobina.



## Effetto Bohr

Per effetto Bohr si intende: il rilascio di molecole di ossigeno da parte dell'emoglobina quando l'emoglobina perde affinità per l'ossigeno perché viene influenzata da alta concentrazione di **CO<sub>2</sub>** e **ioni idrogeno H<sup>+</sup>** (che determinano un pH più basso).

il CO<sub>2</sub> prodotto dall'ossidazione dei nutrienti nei mitocondri, deve essere idratato ad opera dell'enzima **anidrasi carbonica**:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$

Dall'idratazione del CO<sub>2</sub> si determina un'aumento della concentrazione di ioni H<sup>+</sup> e quindi una diminuzione del pH nei tessuti.

- Quando la concentrazione di anidride carbonica è alta nei tessuti, alcune molecole di CO<sub>2</sub> si legano alla emoglobina, in particolare il CO<sub>2</sub> si lega sotto forma di **carbammato** al gruppo alfa-amminico dell'estremità amminoterminale di ciascuna catena globinica formando il **carbammio-globulina**. Anche questa reazione **rilascia ioni H<sup>+</sup>** abbassando ancora il pH, e quindi contribuendo a generare l'effetto Bohr.

L'aumento degli ioni H<sup>+</sup> influisce l'emoglobina diminuendo la sua affinità per l'ossigeno quindi l'emoglobina rilascia l'ossigeno ai tessuti. (conformazione T = emoglobina non affine a O<sub>2</sub>).

A questo punto abbiamo l'emoglobina legata all'anidride carbonica e ioni H<sup>+</sup> per trasportarli ai polmoni e reni attraverso cui vengono eliminati. Quando l'emoglobina raggiunge i polmoni, trova un pH sanguigno più alto e elevata concentrazione di O<sub>2</sub> che quindi determina il rilascio del CO<sub>2</sub> dall'emoglobina, e si lega l'ossigeno all'emoglobina per ridistribuirlo ai tessuti del corpo.

L'emoglobina trasporta ai polmoni e ai reni circa il 40 % dei ioni H<sup>+</sup> totali e il 15-20% della CO<sub>2</sub> formata dai tessuti.

## L'EFFETTO DELLA BPG SUL LEGAME DELL' OSSIGENO ALL' EMOGLOBINA

Il legame dell'ossigeno all'emoglobina è regolato anche dal 2,3-bisfosfoglicerato (BPG).

IL BPG è presente in concentrazioni relativamente elevate nei globuli rossi, che è difficile rimuovere completamente. La BPG riduce fortemente l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno. Esiste quindi una relazione inversa tra il legame dell'O<sub>2</sub> e quello della BPG. Possiamo dunque scrivere un'altra reazione del legame dell'ossigeno all'emoglobina:  $\text{HbBPG} + \text{O}_2 = \text{HbO}_2 + \text{BPG}$ .

La BPG si lega in un sito distante da quello dell'ossigeno e regola l'affinità del legame dell'O<sub>2</sub> all'emoglobina. La BPG si lega all'emoglobina nella cavità tra le subunità beta dello stato T.

Questa cavità è rivestita da amminoacidi carichi positivamente che interagiscono con i gruppi carichi negativamente del BPG creando 5 coppie ioniche.

La BPG abbassa l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno e stabilizza lo stato T, la transizione allo stato R restringe la tasca in cui si va a legare la BPG impedendogli qualsiasi interazione.

In assenza della BPG l'emoglobina presenta una curva di saturazione iperbolica.

La regolazione del legame dell'ossigeno dell'emoglobina operata dalla BPG ha una funzione essenziale nello sviluppo fetale, per questo l'emoglobina fetale ha un'affinità molto bassa per il BPG

## MIOGLOBINA

La mioglobina è una proteina monomerica, formata da un singolo polipeptide di 153 residui amminoacidici che contiene un gruppo eme. La sua catena è costituita da 8 segmenti ad alfa elica che vengono indicati con le lettere da A ad H.

Nella mioglobina il quinto sito di coordinazione del ferro è occupato dall'anello imidazolico di un residuo di His (istidina)(elica F8) denominata His Proximale.

Mentre il quinto sito di coordinazione non è occupato ed è disponibile per il legame con l'ossigeno. E l'istidina distale (elica E7) fornisce la geometria giusta per far avvenire il legame con l'ossigeno impedendolo con il monossido di carbonio.

La funzione della mioglobina dipende dalla capacità delle proteine di legare ossigeno e anche di rilasciarlo quando è necessario.

Il legame di un ligando ad una proteina è molto complesso.

L'interazione dipende dalla struttura della proteina che spesso è accompagnata da una modificazione conformazionale. Il legame dell'ossigeno al gruppo eme nella mioglobina dipende dai movimenti molecolari o respirazione della proteina. La molecola dell'eme è immersa in profondità nella struttura proteica e l'ossigeno non ha una via diretta per passare. Se la proteina fosse rigida infatti l'O<sub>2</sub> non potrebbe entrare o uscire dalla tasca dell'eme in quantità apprezzabili. I movimenti molecolari molto rapidi delle catene laterali degli amminoacidi producono cavità transitorie che permettono all'ossigeno di passare. Una volta entrato l'ossigeno impegna la sesta valenza di coordinazione del Fe<sup>2+</sup>.

### Effetti allosterici: modificazione strutturale reversibile per interazione con una piccola molecola

Nella forma deossigenata dalla mioglobina, il Fe<sup>2+</sup> si trova fuori dal piano dell'eme.

Quando l'ossigeno si lega all'eme, il Fe<sup>2+</sup> tende ad allontanarsi dall'His F8.

Ma siccome essi sono legati, si avrà un avvicinamento di His F8 all'eme. Ciò comporta una modifica conformazionale a carico dell'elica F e quindi dell'emoglobina.

## PROTEINE CONTRATTILI: ACTINA E MIOSINA

Gli organismi si muovono sia a livello di apparati, sia a livello cellulare che a livello sub-cellulare.

La maggior parte di questi movimenti deriva dall'attività di alcune proteine motrici che sfruttano l'energia chimica fornita dall'ATP.

La forza contrattile del muscolo è generata dall'interazione di due proteine: actina e miosina. Queste proteine sono organizzate in filamenti che attraverso interazioni scivolano l'una sull'altra generando la contrazione.

## LA MIOSINA

È costituita da 6 subunità: 2 catene pesanti e 4 catene leggere. Nella regione carbossi-terminale esse sono organizzate in struttura ad alfa elica che si avvolgono l'una sull'altra generando una regione super-avvolta (coiled coil). Nella regione ammino-terminale ciascuna catena pesante forma un grande dominio globulare

, il quale contiene un sito in cui avviene l'idrolisi dell'ATP, mentre le catene leggere sono associate ai domini. Nelle cellule del muscolo le molecole di miosina si aggregano formando strutture dette

**FILAMENTI SPESSI**, che costituiscono l'unità contrattile più importante. All'interno di ogni filamento alcune centinaia di molecole di miosina interagiscono tramite le loro code fibrose formando lunghe strutture bidirezionali

### L'ACTINA

Essa è molto abbondante in tutte le cellule eucariotiche. Le molecole di actina monomerica detta G-actina si associano nel muscolo formando lunghi polimeri chiamati F-actina.

Questi polimeri di F-actina insieme ad altre proteine che sono la tropomiosina e la troponina formano i

**FILAMENTI SOTTILI**. Ogni monomero di actina in un filamento sottile può legarsi specificamente e saldamente alla testa di una miosina.

## METABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI

Gli aminoacidi sono le unità che formano le proteine. il loro metabolismo avviene in 2 stadi:

**1) Degradazione (proteolisi) delle proteine formando aminoacidi**

**2) Catabolismo degli aminoacidi nei mitocondri (avviene maggiormente nel fegato)**

### DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE;

La degradazione delle proteine (ovvero la proteolisi) può avvenire mediante 3 diversi processi:

- I) **Digestione gastrointestinale** (riguarda **proteine esogene dalla dieta**)
- II) **Degradazione lisosomiale** (riguarda **proteine cellulari**)
- III) **Degradazione Ubiquitina dipendente** (riguarda **proteine cellulari**)

\*\*\*\*\*

### Digestione Gastrointestinale delle proteine assunti dalla dieta:

**(proteine esogene dalle dieta):** nell' uomo le proteine ingerite con la dieta vengono degradate ad **amminoacidi liberi** nel tratto gastrointestinale mediante alcuni enzimi proteolitici quali la **pepsina** che idrolizza i legami peptidici della proteina generando peptidi più piccoli, e da alcuni enzimi pancreatici come la **tripsina** e la **chimotripsina**, e da carbossipeptidasi e aminopeptidasi che rimuovono i residui amminoacidici dall'estremità carbossiterminale o aminoterminali dei brevi peptidi. Gli aminoacidi liberi sono poi trasferiti al circolo sanguigno che li trasporta soprattutto al fegato e al muscolo.

Nell'uomo, le proteine assunte con la dieta vengono digeriti e degradate ad **amminoacidi liberi** nel tratto gastrointestinale. L'ingresso delle proteine della dieta nello stomaco stimola la mucosa gastrica a secernere l'ormone **gastrina**, che a sua volta stimola la secrezione di acido cloridrico da parte delle cellule parietali, e la secrezione del **pepsinogeno** (precursore dell'enzima pepsina) da parte delle cellule adelmorfe delle ghiandole gastriche. Il pepsinogeno, un precursore inattivo o zimogeno, viene convertito in **pepsina** attiva mediante una scissione autocatalitica, che avviene solo a pH bassi (generati grazie al succo gastrico acido pH 1 - 2.5). Il succo gastrico acido (pH da 1,0 a 2,5) agisce sia da antisettico, perchè uccide la maggior parte dei batteri e delle cellule estranee, sia da agente denaturante, perchè denatura le proteine globulari rendendole meno ripiegate. Nello stomaco, la **pepsina** idrolizza le proteine ingerite rompendo i legami peptidici formati dai residui aromatici **Phe, Trp e Tyr**, a livello del loro gruppo amminico, generando così peptidi più piccoli. ~~L'azione dell'enzima proteolitico su un polipeptide genera una miscela di peptidi più piccoli.~~

Quando il contenuto dello stomaco passa nell'intestino tenue, il pH basso provoca la secrezione dell'ormone **secretina** nel sangue. La secretina stimola il pancreas a secernere il bicarbonato nell'intestino tenue, per neutralizzare il chimo acido proveniente dallo stomaco, portando il valore del pH vicino a 7. La digestione delle proteine ora continua nell'intestino tenue. L'arrivo degli aminoacidi nella prima parte dell'intestino (duodeno) causa il rilascio nel sangue dell'ormone **colecistochinina**, che stimola la secrezione di alcuni enzimi pancreatici, e un pH ottimale è intorno a valori di 7 e 8. Il tripsinogeno, il chimotripsinogeno, e la procarbossipeptidasi A e B – gli zimogeni della tripsina, della chimotripsina e delle carbossipeptidasi A e B – vengono sintetizzati e secreti dalle cellule esocrine del pancreas. Il tripsinogeno viene convertito nella sua forma attiva, la **tripsina**, dall'enzima **enteropeptidasi** (un enzima proteolitico secreto dalle cellule intestinali). La **tripsina** libera catalizza la conversione di

altro tripsinogeno in tripsina. La tripsina attiva poi il **chimotripsinogeno** che si trasforma nell'enzima **chimotripsina**, le **procarbossipeptidasi** che si trasformano nelle **carbossipeptidasi** e la **proelastasi**.

La conservazione degli enzimi sottoforma di precursori protegge le cellule esocrine dall'attacco proteolitico che gli enzimi hanno nella loro forma attiva. Il pancreas si protegge ulteriormente contro l'autodigestione sintetizzando uno specifico inibitore, l'**inibitore pancreatico della tripsina**, che previene la produzione prematura di enzimi proteolitici nelle cellule pancreatiche.

La tripsina e la chimotripsina idrolizzano ulteriormente i peptidi prodotti dalla pepsina dello stomaco, formando peptidi ancora più piccoli, la cui degradazione viene completata dall'intestino tenue dalle altre **peptidasi intestinali**: tra cui le **carbossipeptidasi A e B** (enzimi contenenti zinco) e una **ammino-peptidasi**, che rimuovono rispettivamente residui amminoacidici dall'estremità carbossiterminale o idrolizzano residui aminoterminali da brevi peptidi. Gli **amminoacidi liberi** vengono assorbiti dagli enterociti dell'intestino tenue, poi entrano nei capillari dei vasi dei villi intestinali, poi nel circolo sanguigno, fino a giungere il fegato.

Gli amminoacidi sono assorbiti mediante un **trasporto attivo secondario** a carico di un cotrasportatore sulla membrana dell'enterocita che fa entrare l'amminoacido insieme allo ione  $\text{Na}^+$  che si muove secondo gradiente. Esistono 6 tipi diversi di trasporto attivo secondario per gli amminoacidi e differiscono in base alla specificità:

- Uno funziona per Serina, Treonina e Alanina
- Uno funziona per gli amminoacidi aromatici
- Uno funziona per Prolina
- Uno funziona per gli amminoacidi ramificati
- Uno funziona per amminoacidi basici quali Lisina e Arginina e per la Cisteina
- Uno funziona per gli amminoacidi acidi quali Aspartato e Glutammato.

**Degradazione lisosomiale (proteine cellulari)**: con questo processo, ad opera delle proteasi, vengono degradate tutte le proteine che le cellule assumono per endocitosi. è un processo che svolge il normale turnover delle proteine. Nei lisosomi le proteasi agiscono a un pH ottimale intorno a 5 e sono praticamente inattive a pH neutro. la cellula capta attraverso processi di pinocitosi o endocitosi del materiale che si inserisce in dei vacuoli endosomici che poi si fondono con i lisosomi contenenti enzimi idrolitici di cui le più comuni sono le **cathepsine**.

### **Degradazione tramite il Sistema Ubiquitina-proteasoma:**

Il sistema ubiquitina-proteasoma è la via principale della degradazione di proteine che hanno una bassa emivita, proteine invecchiate, o proteine che hanno perso la loro struttura, o proteine danneggiate (proteine misfolded).

L'ubiquitina è una piccola proteina che è formata da 76 amminoacidi, una Glicina terminale e un paio di Lisine all'interno della catena. **Le molecole di ubiquitina possono legarsi tra di loro: la Glicina dell'estremità C-terminale di una può legarsi alla catena laterale di un residuo di Lisina di un'altra.** L'ubiquitina da sola non è attiva, e necessita di un **enzima attivatore dell'ubiquitina (E1)**, che possiede nel suo sito attivo una Cisteina (che presenta un tiolo **-SH**). questo enzima catalizza la formazione di un legame tioestere ( $\text{S-C=O}$ ) tra carbossile terminale dell'ubiquitina e il gruppo tiolo **-SH** dell'enzima stesso, in maniera ATP-dipendente: inanzitutto l'ATP viene scisso in **AMP e pirofosfato**. l'AMP si lega al carbossile terminale formando **Acil-AMP**, il pirofosfato, che viene idrolizzato in modo tale da portare la reazione verso destra. l'-SH della cisteina interagisce con Acil-AMP, con cui forma un legame tioestere (**Acil-SH**), spiazzando l'AMP. Interviene poi l'**enzima di coniugazione (E2)** che a sua volta possiede una cisteina nel sito attivo. L'enzima E1 scambia l'ubiquitina con l'enzima E2, quindi l'ubiquitina si ritrova legata con all'enzima E2 tramite la formazione di un legame tioestere.

Poi si forma un complesso tra l'enzima **E2** e l'enzima **ubiquitina-ligasi E3** e la **proteina da degradare** che deve essere ubiquitinata. a questo punto, l'**enzima ubiquitina-ligasi E3** catalizza il legame tra l'**ubiquitina** (attivata dall'enzima E2) e la **proteina che deve essere degradata**. L'ubiquitina con il suo gruppo carbossile deve essere trasferita su una catena laterale di Lisina della proteina da degradare.

E3 riconosce la proteina da legare mediante l'azione di **proteine adattatrici F-box**. Queste proteine riconoscono le proteine da legare per una serie di motivi: per esempio le proteine che hanno arginina o una lisina all'estremità N-terminale devono rimanere nel RE perché destinate all'esportazione. Tuttavia, se si trovano libere nel citosol E3 le riconosce grazie alle F-Box. Infine la proteina da degradare viene ubiquitinata, poi viene spedita al **proteosoma** (che svolge la vera e propria proteolisi della proteina). Una volta che la proteina raggiunge il proteosoma, si spoglia dall'ubiquitina. L'ubiquitina viene recuperata. Poi, attraverso un **processo ATP-dipendente** (molto costoso energeticamente) la proteina viene idrolizzata fino a ottenere i **singoli amminoacidi**.

Il **proteosoma** è una struttura cilindrica cava; è formato da un nucleo centrale 20S costituito da quattro anelli (2 $\alpha$  e 2 $\beta$ ) di sette subunità ciascuna che formano una struttura a barile di 28 "ciambelle". Esistono come due coperchi, uno sopra e uno sotto, che una volta che la proteina è entrata nel proteosoma chiudono la struttura e innescano il processo proteolitico.

## CATABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI

Gli amminoacidi non si trovano accumulati nelle cellule ma incorporati nelle proteine, e dalla proteolisi di queste proteine, gli amminoacidi vengono liberati.

La fonte principale degli amminoacidi è costituita dalle proteine ingerite dalla dieta o da proteine che non servono più alla loro funzione (enzimi, immunoglobuline ecc..).

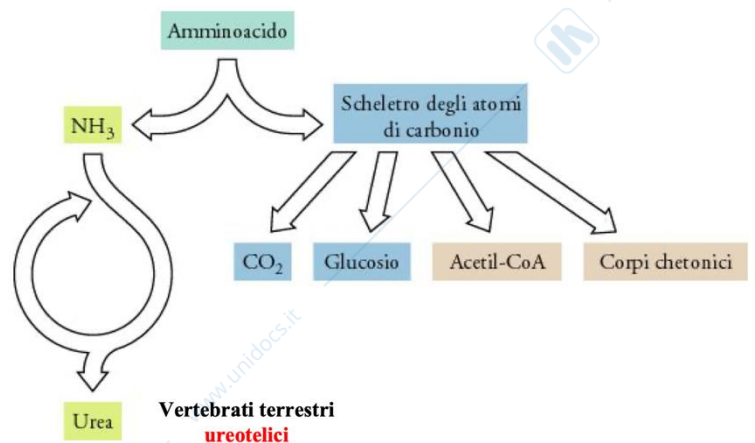
Gli amminoacidi possono essere degradati tramite un processo detto **degradazione ossidativa** al fine di ottenere energia metabolica, o per essere trasformati in intermedi del metabolismo. La quantità di energia ottenuta dagli amminoacidi varia notevolmente a seconda del tipo di tessuto e delle condizioni metaboliche dell'organismo.

Negli animali, gli amminoacidi vanno incontro alla **degradazione ossidativa** in una di 3 possibili situazioni:

1. Dalla proteolisi normale delle proteine vengono liberati alcuni amminoacidi che non sono necessari per la sintesi di nuove proteine, e che vanno incontro a degradazione ossidativa.
2. Se la dieta è ricca di proteine e gli amminoacidi ingeriti sono in eccesso rispetto al fabbisogno per la sintesi proteica, l'eccesso viene catabolizzato, perchè gli amminoacidi non possono essere immagazzinati.
3. Quando i carboidrati non sono disponibili (durante il digiuno), o quando non sono utilizzabili (in diabete non controllata), in questi casi le proteine cellulari vengono utilizzate come **combustibile metabolico**.

Durante la **degradazione ossidativa**, un amminoacido perde il suo **gruppo amminico** e viene trasformato nel corrispondente **chetoacido** cioè nel suo "scheletro carbonioso".

**il gruppo amminico liberato** viene inserito in una via biosintetica oppure entra nel ciclo dell'urea per essere eliminato. invece lo **scheletro carbonioso** proveniente dall'amminoacido entra nel ciclo di Krebs (come i derivati degli zuccheri e degli acidi grassi, anche gli scheletri carboniosi derivati dagli amminoacidi entrano nel ciclo di Krebs).



a differenza dei processi catalitici di altri nutrienti; la degradazione degli amminoacidi comprende una tappa in cui il **gruppo α-amminico** deve essere staccato dallo scheletro carbonioso e inserito in uno specifico metabolismo.

L'azoto, N<sub>2</sub>, è molto abbondante nell'atmosfera, ma è troppo inerte per essere usato nella maggior parte dei processi biochimici. Poiché solo pochi microrganismi possono convertire l'N<sub>2</sub> in forme inutili, come

La maggior parte degli amminoacidi viene metabolizzata nel fegato. Lo ione ammonio generato in questi processi viene in parte utilizzato in una serie di vie biosintetiche, e l'eccesso viene escreto come tale, oppure convertito dell'organismo in urea o acido urico che verranno poi eliminati. L'eccesso di ioni ammonio generato in altri tessuti (extraepatici) giunge al fegato per essere trasformato nelle forme di escrezione.

Il glutammato e la glutammina fungono da "**punti di raccolta dei gruppi amminici**".

**Nel citoplasma degli epatociti del fegato**, i gruppi amminici degli amminoacidi vengono trasferiti all' $\alpha$ -chetoglutarato, formando glutammato, che entra nei mitocondri dove perde il gruppo amminico sotto forma di  $\text{NH}_4^+$ .

**Nella maggioranza degli altri tessuti**, l'eccesso di ammonio viene convertito nell'azoto amidico della glutammina, che viene trasportata al fegato e quindi entra nei mitocondri epatici. ~~La glutammina e il glutammato sono presenti a concentrazioni più elevate degli altri amminoacidi nella maggior parte dei tessuti.~~

**Nel muscolo scheletrico**, i gruppi amminici in eccesso vengono in genere trasferiti al piruvato formando **alanina**, un'altra importante molecola che funge da trasportatore dei gruppi amminici al fegato.

**Catabolismo degli amminoacidi:** **1) Transamminazione** **2) Deamminazione ossidativa**

### Transamminazione

Per poter degradare gli amminoacidi, avviene il distacco del gruppo  $\alpha$ -amminico da questi, tramite una reazione detta **transamminazione**, catalizzata da enzimi chiamati **transamminasi** (o **amminotrasferasi**). In queste reazioni di transamminazione, ad opera dell'enzima amminotrasferasi, il **gruppo  $\alpha$ -amminico** dell'amminoacido viene trasferito al carbonio  $\alpha$  dell' **$\alpha$ -chetoglutarato**; di conseguenza l' $\alpha$ -chetoglutarato accetta il gruppo amminico trasformandosi nel **glutammato**, mentre l'amminoacido diventa  **$\alpha$ -chetoacido**. Quindi si ha contemporaneamente un'amminazione dell' $\alpha$ -chetoglutarato e una deamminazione dell' $\alpha$ -amminoacido. Il glutammato funge poi da donatore del gruppo amminico per le reazioni delle vie biosintetiche, oppure per le reazioni delle vie di eliminazione dei prodotti azotati di scarto (ciclo dell'urea). Le cellule contengono diverse amminotrasferasi, molte delle quali sono specifiche per l' $\alpha$ -chetoglutarato e accettore del gruppo amminico. Le amminotrasferasi differiscono invece nella specificità per l'altro substrato, l'L-amminoacido che deve donare il gruppo amminico.

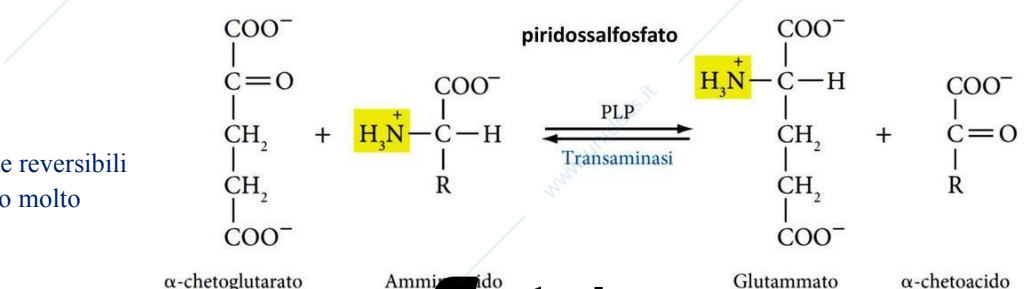
il prodotto di reazione  $\alpha$ -chetoacido viene sfruttato come intermedio di vie metaboliche importanti:

A seconda della caratteristica dell'amminoacido, lo scheletro carbonioso (**alfa chetoacido**) può avere 2 destini cioè quello glucogenetico (diventando glucosio o entrando nel metabolismo dei carboidrati, fornendo energia) o quello chetogenetico (cioè formare corpi chetonici, che sono di derivati dei lipidi).

**\* meccanismo della reazione di transamminazione:**

il **primo substrato**, l'amminoacido, si lega al sito attivo dell'enzima transamminasi, dona il suo gruppo amminico al **piridossal fosfato** (coenzima legato al sito attivo della transamminasi) per cui l'amminoacido esce sotto forma di un  **$\alpha$ -chetoacido**, e il piridossal fosfato si trasforma così dalla sua forma aldeidica (che può accettare) nel piridossammina fosfato (forma amminata, che può donare). Il **secondo substrato**, l' $\alpha$ -chetoglutarato, si lega poi al sito attivo della transamminasi e accetta il gruppo amminico dalla piridossammina fosfato, uscendo sotto forma di **glutammato** (un amminoacido trasportatore del gruppo amminico).

Le reazioni catalizzate dalle amminotrasferasi sono facilmente reversibili e hanno una costante di equilibrio molto vicina a 1.



This document is available free of charge on



Scaricato da Michela Moschiano (michelamoschiano99@gmail.com)

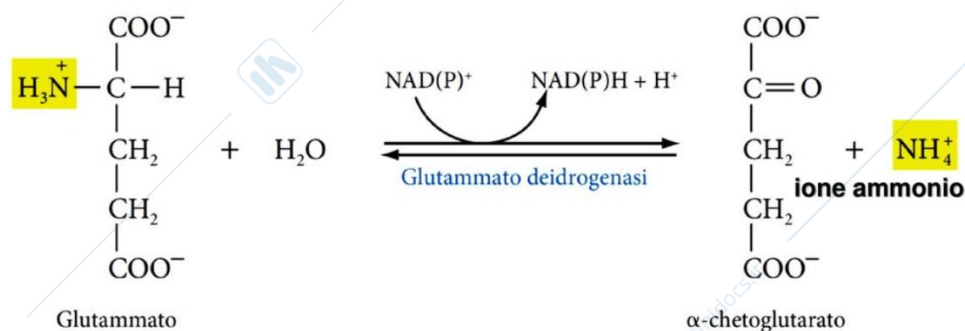
## Meccanismo dell'amminotrasferasi durante una reazione di transaminazione:

Tutte le amminotrasferasi hanno lo stesso gruppo prostetico che è il **piridossal fosfato (PLP)**, la forma coenzimatica della piridossina (vitamina B6). Il piridossal fosfato agisce come un trasportatore di gruppi amminici a livello del sito attivo della amminotrasferasi. Questo cofattore va incontro a trasformazioni reversibili tra la sua forma aldeidica, il piridossal fosfato che può accettare un gruppo amminico, e la sua forma amminata, la piridossamina fosfato che può donare il suo gruppo amminico all'alfa chetoglutarato. Il piridossal fosfato è in genere legato covalentemente al sito attivo dell'enzima mediante un legame aldiminico (base di Schiff) con il gruppo amminico e di un residuo di Lys.

## Deaminazione ossidativa:

è una reazione in cui dal glutammato viene rilasciato il gruppo amminico sotto forma di ione ammonio  $\text{NH}_4^+$ , trasformando il glutammato in alfa chetoglutarato che verrà recuperato per la transaminazione.

Inanzitutto, il glutammato formato dalla transaminazione, trasporta con sé il gruppo amminico dell'amminoacido da degradare. Successivamente i gruppi amminici devono essere rimossi dal glutammato. Negli epatociti, il glutammato viene trasferito dal citoplasma ai mitocondri, dove va incontro ad una **deaminazione ossidativa**, catalizzata dalla **L-glutammato deidrogenasi** presente nella matrice mitocondriale che utilizza  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . Questo enzima causa il rilascio del gruppo amminico sotto forma di **ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ )** e rigenera l' **$\alpha$ -chetoglutarato** (che serverà ad alimentare le reazioni di transaminazione). Lo ione ammonio dovrà essere eliminato, tramite l'urea.



Tutte le cellule sono in grado di accoppiare queste due reazioni, quindi tutte le cellule sono in grado di generare ammonio che dovrà essere eliminato, incorporato nell'urea.

**Eccezioni:** La Serina, la Treonina, la Cisteina e l'Istidina vanno incontro a demminazione non ossidativa.

## Destino dell'ione ammonio:

Tutte le volte che nei tessuti avviene il catabolismo di un amminoacido, **viene prodotto l'ione ammonio**, che è in equilibrio con l'ammoniaca. A pH fisiologico l'equilibrio è totalmente spostato verso lo ione ammonio (98% ione ammonio ; 2% ammoniaca). Queste due sostanze sono tossiche, perchè sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, quindi non devono accumularsi nel nostro corpo, e in realtà non si accumulano e rimangono a concentrazioni bassi grazie ad un processo detto ciclo dell'urea, svolto nel fegato che trasforma l'ione ammonio in **urea** per eliminarlo dal corpo con le urine.

## Trasporto dello ione ammonio dai tessuti del corpo al fegato:

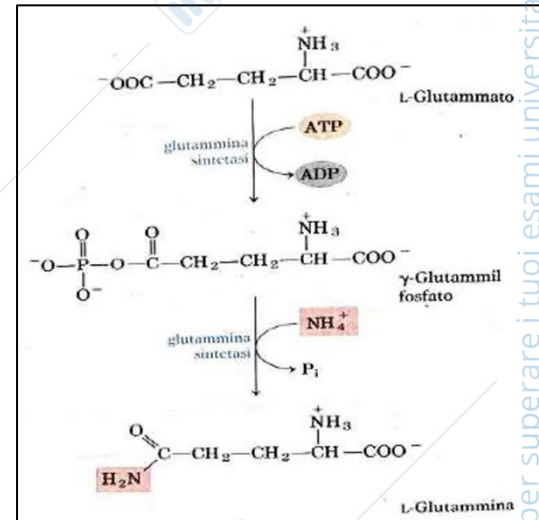
Lo ione ammonio viene prodotto a livello di tutti i tessuti che catabolizzano gli aminoacidi e quindi è necessario trasferire questo ione al fegato, perché solo il fegato si occupa della sua eliminazione. questi tessuti legano lo ione ammonio a certe molecole che lo trasportano al fegato attraverso il sangue, e per fare questo ci sono due possibilità, a seconda del tipo di tessuto da cui proviene l'ione ammonio:

- 1) Attraverso la **sintesi della glutammina**: avviene in tutti i tessuti, compreso il tessuto nervoso;
- 2) Attraverso il **Ciclo glucosio-alanina**: è un ciclo inter-organo, che coinvolge il fegato e il muscolo.

## SINTESI DELLA GLUTAMMINA

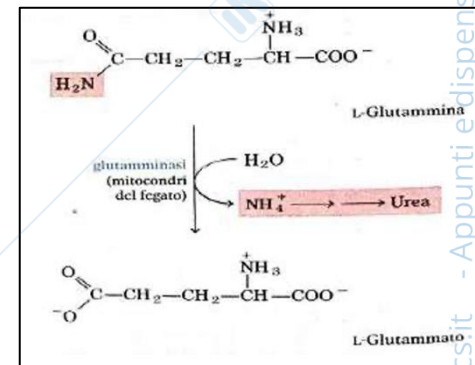
Tutte le volte che si ha un catabolismo amminoacidico, il glutammato intracellulare viene convertito in glutammina. È il gruppo carbossile della catena laterale del glutammato a legare l'ammonio, formando l'amide corrispondente, ovvero la **glutammina**. Questo processo è catalizzato dall'enzima **glutammina sintetasi**, che utilizza ATP e che catalizza la reazione che si svolge in 2 passaggi:

1. Il glutammato, si lega al sito attivo dell'enzima, e viene attivato grazie all'idrolisi di una molecola di ATP che genera ADP e gruppo fosfato. il gruppo fosfato viene legato al gruppo carbossile della catena laterale del glutammato, formando **gamma glutammil fosfato** (un intermedio reattivo che rimane localizzato nel sito attivo dell'enzima);



2. A questo punto entra in gioco lo **ione ammonio** che sostituisce il gruppo fosfato legato sul carbossile del gamma-glutammil-fosfato, formando così la **glutammina**.

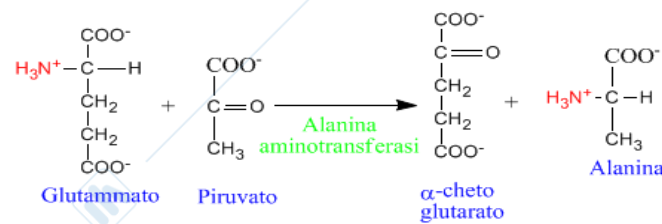
3. La glutammina viene messa in circolo e arriva al fegato e in minima parte anche al rene. Qui viene ritrasformata in glutammato grazie all'azione della **glutamminalasi**, enzima che scinde il legame amminico nella catena laterale della glutammina, liberando **ione ammonio** e **glutammato**. A questo punto se siamo nel rene questo ammonio viene riversato nell'urina, invece se siamo nel fegato, lo ione ammonio entra prima nel ciclo dell'urea poi viene escreto con le urine sotto forma di urea.



## CICLO GLUCOSIO ALANINA (Biosintesi di alanina)

È un processo ciclico che connette il muscolo con il fegato. Questo processo parte dal piruvato e il glutammato che vengono riforniti continuamente. Inanzitutto, lo ione ammonio che deriva dal metabolismo degli aminoacidi nei muscoli, subisce una transaminazione (ad opera della **transamminasi**) per essere incorporato nel glutammato. Poi, interviene l'enzima **alanina transaminasi (ALT)**, che catalizza il **trasferimento del gruppo amminico dal glutammato ad una molecola di piruvato**. Il glutammato era accumulato per via del catabolismo degli AA mentre il piruvato in seguito alla glicolisi. A questo punto, il **piruvato** che ha accettato il gruppo amminico diventa **alanina** (amminoacido corrispondente del piruvato), e il glutammato che ha perso il gruppo amminico diventa **α-chetoglutarato**. L'alanina passa nel sangue e viene captata dal fegato. Nel fegato si ha una transaminazione tra alanina e α-chetoglutarato l'alanina cede il gruppo amminico all'α-chetoglutarato riformando **piruvato** e **glutammato**. Nel fegato il glutammato subisce la reazione della glutammato deidrogenasi, libera **ammoniaca**  $\text{NH}_3$  che viene subito incorporato in una molecola indirizzata al ciclo dell'urea. Il piruvato ottenuto da questa reazione viene riconvertito in glucosio attraverso la gluconeogenesi. Il glucosio è immesso in circolo e viene captato dal

muscolo che lo può utilizzare a scopo energetico. Con questo tipo di processo si hanno due vantaggi: il primo è quello di trasferire lo ione ammonio dal muscolo al fegato, il secondo è quello di non sprecare energia. -Questo tipo di processo metabolico coinvolge gli stessi organi, muscolo e fegato, coinvolti nel Ciclo di Cori.



## Ciclo dell'urea

è un processo ciclico, tramite cui l'ammoniaca oppure lo ione ammonio derivato dal processo di deaminazione del gruppo amminico (proveniente dall'amminoacido) viene convertita in urea che viene poi eliminata tramite le urine.

il ciclo dell'urea avviene negli epatociti del fegato (prima nel mitocondria e poi continua nel citosol) e consiste di **5 reazioni**:

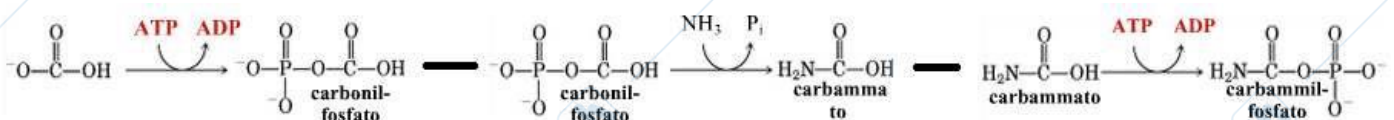
i due atomi di azoto provengono dall'ammoniaca e dall'aspartato, e il carbonio invece proviene dallo ione bicarbonato (proveniente dall'idratazione del CO<sub>2</sub> che è prodotto di scarto delle cellule)

### 1° reazione

Si verifica nella matrice mitocondriale in 3 fasi catalizzate dall'enzima: **carbamil-fosfato-sintasi**.

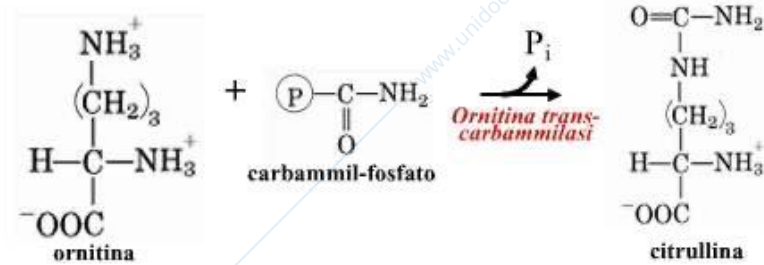
- Con il consumo di una molecola di ATP, prima viene attivato lo ione bicarbonato HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formando il **carbonil-fosfato** e rilasciando ADP. Poi, l'ammoniaca sostituisce il fosfato sul carbonil-fosfato, formando il **carbammato**, e il fosfato viene rilasciato.

-una seconda molecola di ATP fosforila il carbammato, rilasciando ADP, e trasformando il carbammato in **carbammil-fosfato**.



### 2° reazione

è catalizzata dall'enzima **ornitina trans-carbamilasi**, e in questa reazione il **carbammil-fosfato** perde il suo gruppo fosfato, e va a legarsi al gruppo amminico dell'**ornitina** (che è un'amminoacido non proteico che viene formato dal ciclo dell'urea stesso), con formazione della **citrullina** e rilascio di fosfato. L'**ornitina** svolge un ruolo simile all'ossalacetato del ciclo di krebs. La citrullina esce poi dal mitocondrio per continuare il ciclo nel citosol.



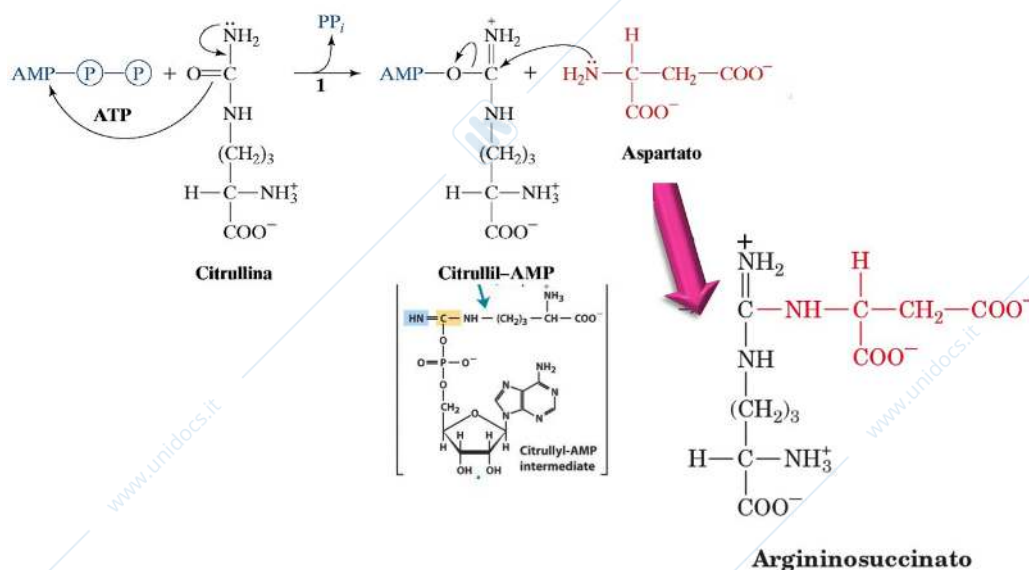
### 3° reazione

la **citrullina** subisce una reazione catalizzata dall'enzima **argininosuccinato sintetasi**, con consumo di ATP che si scinde in AMP e pirofosfato. l'AMP va a legarsi alla citrullina formando **citrullil-AMP**, mentre il pirofosfato (PPi) viene scisso da una pirofosfatasi per trascinare energia verso il prodotto.

A questo punto, nello stesso sito attivo dell'enzima, la citrullil-AMP reagisce con l'**aspartato** che proviene dal mitocondrio; e attraverso il suo gruppo amminico l'**aspartato** si lega sul carbonio del citrullil-AMP (si lega sullo stesso carbonio a cui è legato il gruppo amminico proveniente dall'amminoacido degradato), e l'AMP si stacca dal citrullil-AMP, formando così il prodotto **argininosuccinato**.

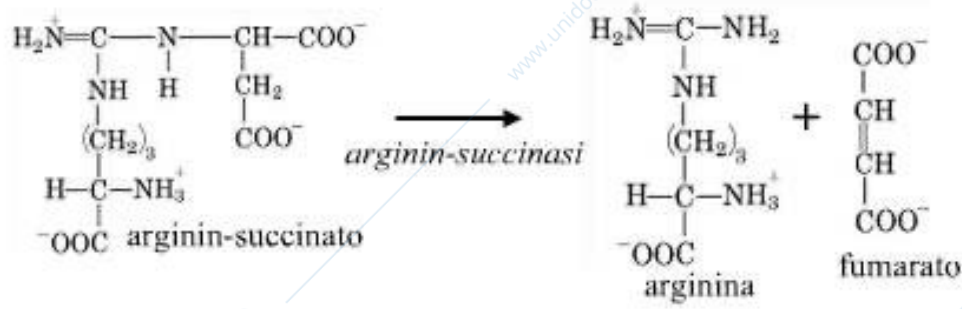
Il gruppo terminale della catena laterale della citrullina,  $-NH-C=O-NH_2$ , prende il nome di gruppo **ureidico**.

Il gruppo amminico dell'aspartato è andato a legarsi al gruppo ureidico della citrullina.



### 4° reazione

È una reazione di idrolisi catalizzata dall'enzima **arginino-succinasi** che scinde il legame tra  $-NH$  che era il gruppo amminico dell'aspartato, e tra l'ex carbonio  $\alpha$  dell'aspartato, per cui l'argininosuccinato si divide in **arginina** e **fumarato** (che corrisponde all'aspartato meno il gruppo  $-NH_2$ ). L'arginina procede nel ciclo, mentre il fumarato deve essere trasportato nel mitocondrio per rifornire aspartato. ma per fare questo prima viene trasformato in **malato** ad opera dell'enzima malato fumarasi, poi viene trasportato nei mitocondri, in cui viene trasformato in **ossalacetato** dalla malato deidrogenasi e poi l'ossalacetato può rigenerare **aspartato** mediante una transaminazione (Glutamato+Ossalacetato  $\xrightarrow{\text{transaminasi}}$  Aspartato +  $\alpha$ -chetoglutarato). (L'aspartato è un intermedio del ciclo di krebs, e del ciclo dell'urea, quindi queste reazioni costituiscono "il biciclo di Krebs" che descrive **collegamenti metabolici** tra il ciclo dell'urea e il Ciclo di krebs).

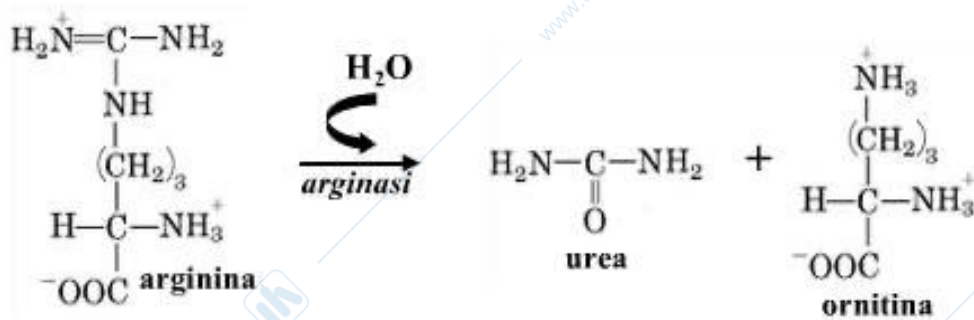


### 5° reazione

Nella reazione finale del ciclo dell'urea, un enzima idrolasi detto **arginasi**, catalizza l'idrolisi dell'arginina in **urea** e **ornitina**.

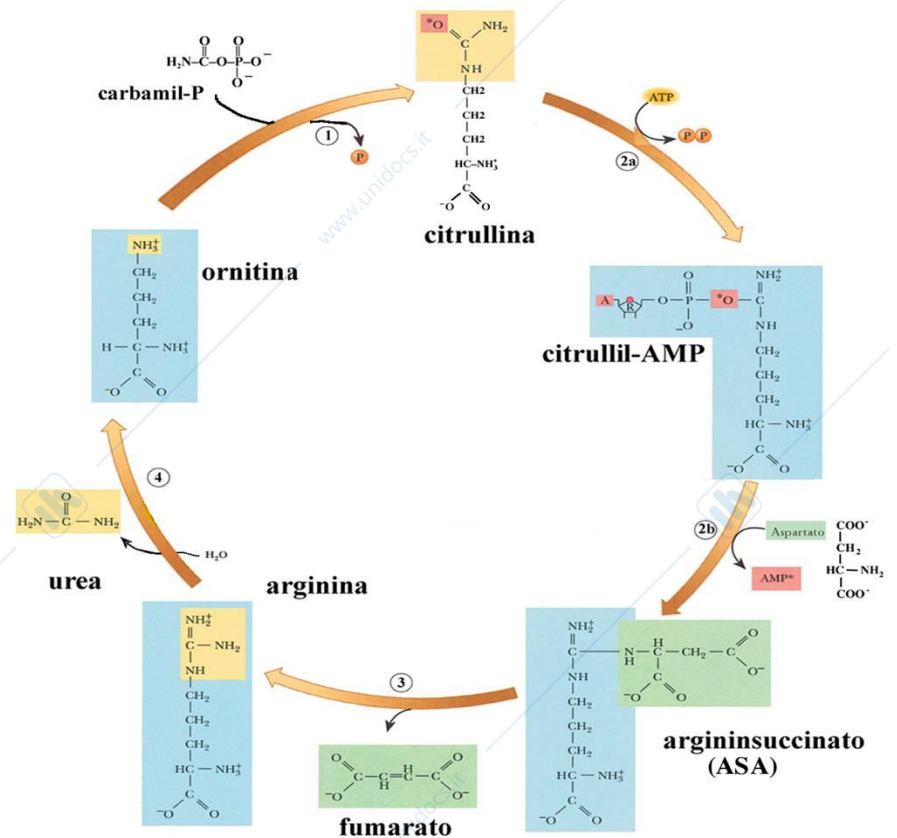
L'ornitina può far partire un nuovo ciclo di urea, dopo essere trasportata nel mitocondrio.

L'urea prodotta è molto solubile in acqua, e viene rilasciata nel sangue che la trasporta al rene attraverso cui viene eliminata con le urine, fuori dal corpo.



### BILANCIO

Anche se nel ciclo dell'urea vi è un consumo di 3 molecole di ATP in realtà l'energia raccolta dal NADPH (glutammico deidrogenasi) e dal NADH (malato deidrogenasi) può generare durante la fosforilazione ossidativa fino a 5 molecole di ATP.



## REGOLAZIONE DEL CICLO DELL'UREA

Il ciclo dell'urea è regolato attraverso 2 tipi di meccanismi:

### Regolazione a lungo termine:

**Se la dieta è ricchissima di proteine**, gli scheletri carboniosi degli amminoacidi vengono usati come combustibile metabolico, e l'urea viene prodotta in eccesso a causa dell'aumentata disponibilità di gruppi amminici.

**Durante il digiuno prolungato**, la degradazione delle proteine muscolari diventa un importantissimo fonte di energia, e la produzione di urea aumenta considerevolmente.

--> Durante queste due situazioni, i **5 enzimi del ciclo dell'urea, compreso il carbamil fosfato sintasi I** vengono sintetizzati a una velocità molto più elevata rispetto alle situazioni regolari.

### Regolazione a breve termine:

Questo meccanismo dal primo enzima del ciclo dell'urea, la **carbamil fosfato sintetasi I**; questo enzima viene attivato allostericamente da un cofattore particolare detto **N-acetilglutammato**. Quindi la disponibilità di questo cofattore, attiva l'enzima carbamil fosfato sintetasi, che a sua volta fa partire il ciclo dell'urea.

il cofattore **N-acetilglutammato** viene sintetizzato a parire da **Acetil-CoA** e **glutammato** ad opera dell'**enzima N-acetilglutammato sintasi**. la produzione dell'N-acetilglutammato a sua volta è favorita dalla presenza di **arginina**.

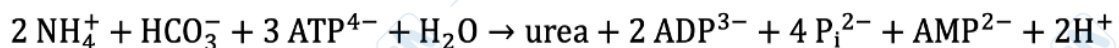
Questo enzima catalizza la prima tappa della sintesi de novo di arginina dal glutammato nelle piante e nei microrganismi, mentre nei mammiferi l'N-acetilglutammato sintasi nel fegato svolge un'azione di pura regolazione.

Il livello di N-acetilglutammato è mantenuto allo stato stazionario dalle concentrazioni di glutammato e di acetil-CoA e di arginina.

### Come si riducono i costi energetici del ciclo dell'urea?

Se il ciclo dell'urea fosse una via metabolica isolata, la sintesi di una molecola di urea richiederebbe quattro gruppi fosforici ad alta energia. Occorrono due molecole di ATP per formare il carbamil fosfato, una molecola di ATP per produrre argininosuccinato, ma questa ultima molecola di ATP va incontro ad una scissione di AMP e PPI, che viene idrolizzato in due gruppi fosforici liberi.

La reazione complessiva del ciclo dell'urea è:

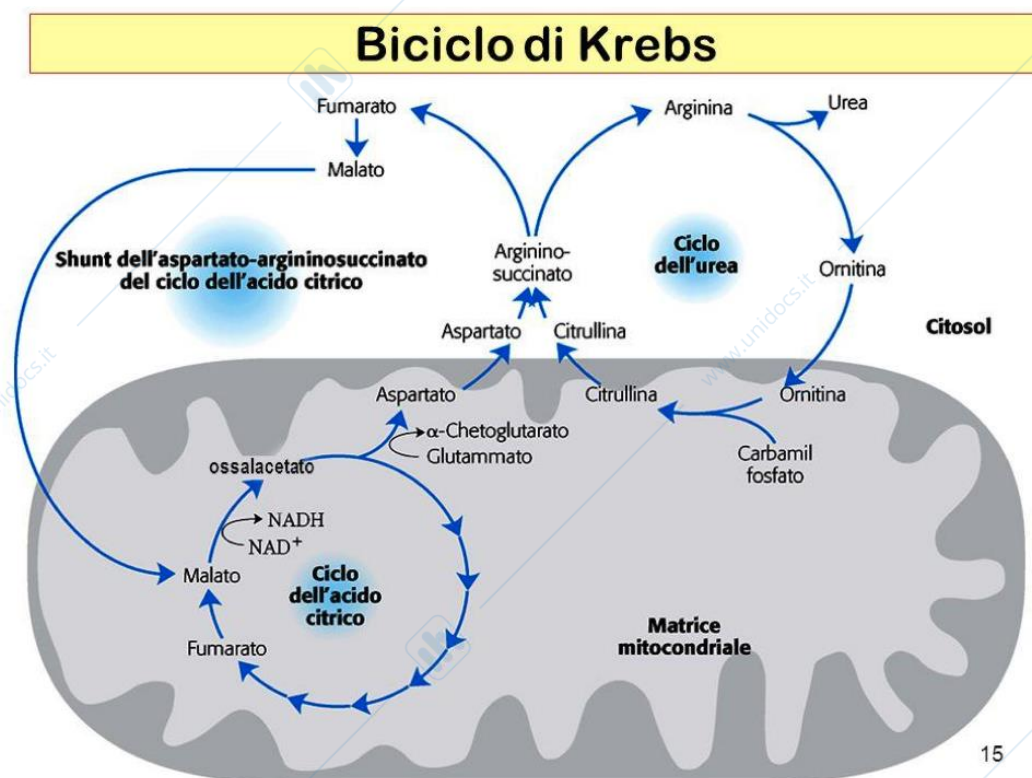


Tuttavia il ciclo dell'urea provoca la conversione netta di ossalacetato in fumarato (via aspartato), e la rigenerazione di ossalacetato produce NADH nella reazione della malato deidrogenasi. Ciascuna molecola di NADH può generare più di 2,5 molecole di ATP durante la respirazione mitocondriale, riducendo così il costo energetico della sintesi dell'urea.

## Biciclo di Krebs (collegamento del ciclo dell'urea con il ciclo di Krebs)

Dal ciclo dell'urea viene prodotto il **fumarato** attraverso la reazione dell'argininosuccinato. Questo **fumarato** è anche un intermedio del ciclo dell'acido citrico. I due cicli, in teoria, sono collegati in un processo detto "biciclo di Krebs".

Tuttavia ciascun ciclo può operare indipendentemente dall'altro e la loro comunicazione è dovuta al passaggio di intermedi chiave tra i mitocondri e il citosol. Diversi enzimi del ciclo dell'acido citrico, tra cui la fumarasi (fumarato idratasi) e la malato deidrogenasi, sono presenti anche nel citosol in forme isoenzimatiche diverse. Il fumarato generato nel processo citosolico di sintesi dell'arginina può quindi essere convertito in malato nel citosol; questi intermedi possono essere ulteriormente metabolizzati nel citosol, oppure essere trasportati nei mitocondri, dove vengono utilizzati nel ciclo dell'acido citrico. L'aspartato, formato nei mitocondri mediante transaminazione dell'ossalacetato ad opera del glutammato, può essere trasportato nel citosol, dove agisce da donatore di azoto nella reazione del ciclo dell'urea catalizzata dall'argininosuccinato sintetasi. Queste reazioni, che costituiscono **lo shunt dell'aspartato-argininosuccinato**, forniscono collegamenti metabolici tra due vie separate che processano gruppi amminici e scheletrici carboniosi degli amminoacidi.



15

## Biosintesi degli amminoacidi

L'azoto entra nelle vie di biosintesi degli amminoacidi come glutammato o glutamina. Le vie di biosintesi degli amminoacidi aromatici sono le più complesse. I mammiferi possono sintetizzare solo una decina di AMMINOACIDI NON ESSENZIALI, mentre gli AMMINOACIDI ESSENZIALI devono essere forniti con la dieta. Le vie biosintetiche vengono raggruppate in sei famiglie, corrispondenti ai loro precursori metabolici.

L'azoto può essere utilizzato e incorporato nelle biomolecole soltanto nella sua forma più ridotta che è ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ) o ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), che è quello che alla fine liberiamo dal catabolismo degli amminoacidi. Di questo ione ammonio non è che in natura ce ne sia una grandissima disponibilità. C'è una disponibilità praticamente infinita di azoto gassoso ( $\text{N}_2$ ) che sta nell'aria, così come ci sono quantità elevatissime di nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) nel terreno, quindi molecole azotate in cui il numero di ossidazione dell'azoto è più alto: nell'azoto molecolare è 0, nello ione nitrato è +5, mentre nello ione ammonio è -3. Noi dobbiamo avere a disposizione ammoniaca e ione ammonio per poter introdurre azoto nelle nostre molecole nei vari processi biosintetici. L'unica possibilità è dunque che l'azoto atmosferico venga fissato in più passaggi in ammoniaca e che questi nitrati, presenti nel terreno, vengano ridotti. Noi non siamo in grado di fare queste cose, ma vengono fatte da certi batteri, certi microorganismi e dalle piante. Vediamo in che modo cominciando dalla fissazione dell'azoto.

### Fissazione dell'azoto

Ci sono in particolar modo dei microrganismi, gli Azotium, i Frankia che sono chiamati **batteri azotofissatori**. Questi sono in grado di prendere l'azoto dall'aria e trasformarlo in qualcosa di diverso. Alcuni di questi azotofissatori vivono in simbiosi con le leguminose, in particolare nelle radici delle piante leguminose, formando quelli che vengono chiamati noduli radicali. È per questo che le leguminose vengono utilizzate per rigenerare i terreni. Quando il terreno viene coltivato intensivamente ad esempio a cereali l'azoto viene consumato, il terreno si impoverisce e si deve cambiare il tipo di coltivazione. Ad un certo punto viene messo dentro un legume proprio perché in queste piante leguminose ci sono i batteri fissatori dell'azoto che di fatto riarricchiscono il terreno di azoto. Ancora più curiosamente c'è una pratica agronomica, si chiama sovescio, che si può osservare nelle vigne. Per arricchire di azoto il terreno in cui vengono per esempio coltivate delle viti molto pregiate, si piantano delle leguminose ai piedi delle viti, in modo che queste leguminose, grazie alla presenza dei noduli radicali dove sono presenti batteri azotofissatori, fissano l'azoto e arricchiscono il terreno di sostanze che possono poi essere utilizzate dalla pianta ai propri scopi.

ediamo che cosa accade nella fissazione dell'azoto. È interessante perché si trovano delle proteine particolari, come ad esempio enzimi con dentro il molibdeno. Il molibdeno è un metallo che viene utilizzato dai batteri all'interno di certi enzimi, come quelli che partecipano al processo di fissazione dell'azoto. In buona sostanza l'azoto viene trasformato in ammoniaca grazie ad una nitrogenasi batterica che contiene questo centro ferro-molibdeno (Fe-Mo) al suo interno e che lavora in ambiente assolutamente privo di ossigeno, in ambiente anaerobio. L'eventuale ossigeno presente viene sequestrato dalla

leghemoglobina che è una proteina della pianta. Qui vedete la simbiosi: il batterio rischia stando da solo di avere il processo inibito in presenza di ossigeno, ma stando con la pianta beneficia della sua presenza perché la pianta mette a disposizione questa proteina che sequestra l'ossigeno e consente lo svolgimento della fissazione dell'azoto in maniera ottimale; ovviamente la pianta beneficia della presenza del batterio, perché il batterio trasforma l'azoto in ammoniaca e la pianta se la prende. Quindi questa nitrogenasi ha il centro Fe-Mo che viene ossidato, quindi c'è un rilascio di elettroni che vengono catturati dall'azoto il quale diventa ammoniaca. La nitrogenasi si ossida e deve essere riportato allo stato ridotto. Questo avviene grazie ad una reduttasi che invece contiene dei centri Fe-S e la reduttasi nella forma ossidata viene riportata allo stato ridotto grazie ad una proteina messa a disposizione dalla pianta, la ferredossina che si ossida. Per poter ridurre completamente una molecola di azoto a due molecole di ammoniaca ci vogliono 6 elettroni. Il sistema non è perfetto, c'è una dispersione elettronica per cui si sa che invece ce ne vogliono 8 di elettroni. Per ogni elettrone vengono consumate 2 molecole di ATP. Quindi la riduzione di una molecola di azoto in due molecole di ammoniaca richiede una spesa di 16 molecole di ATP. A questo punto però abbiamo a disposizione ammonio e ammoniaca e la pianta li può utilizzare come vuole per produrre composti azotati, in particolar modo amminoacidi e successivamente proteine.

## Riduzione dei tritati

L'altra possibilità è invece la riduzione dei nitrati, e questa avviene sia nei batteri sia nelle piante. A livello del citosol esiste una nitrato reductasi che trasforma lo ione nitrato in ione nitrito, grazie all'intervento di un riducente NADH. Il nitrito nelle piante viene trasferito all'interno dei cloroplasti e poi questi ioni nitrito vengono ridotti a loro volta in ammoniaca dalla nitrito reductasi.

Quindi due possibilità: fissazione dell'azoto e riduzioni dei nitrati. Così si ottiene ammoniaca, ovvero azoto utilizzabile per l'incorporazione nelle biomolecole.

## FISSAZIONE DELL'AMMONIACA

Noi dobbiamo assumere l'azoto sotto forma di ammoniaca e lo fissiamo grazie alla **glutammina deidrogenasi**. Questa è una reazione che vi ho già fatto vedere, ma in senso opposto, quando vi ho fatto

vedere la deidrogenazione, cioè la deaminazione ossidativa del glutammato. Qui ve la faccio vedere in senso inverso, in senso anabolico: l'ammoniaca o l'ammonio che si lega all'  $\alpha$ -chetoglutarato per formare glutammato. Questa è una reazione che va controllata, perché, ve l'ho già detto, la tossicità dell'ammoniaca è legata a questo aspetto, cioè al fatto che troppa ammoniaca o troppo ione ammonio significano un consumo eccessivo di una molecola implicata nel ciclo dell'acido citrico. Questa è infatti una reazione cataplerotica, cioè una reazione che impoverisce il ciclo dell'acido citrico di un intermedio e quindi potrebbe avere, nel caso che decorresse molto velocemente e molto intensamente, degli effetti deleteri sul metabolismo energetico. Però è anche il modo con cui l'ammoniaca può essere fissata. Non è l'unico, l'altro sistema è quello che si basa sull'attività della glutammina sintetasi. Naturalmente c'è un altro sistema ulteriore dato dal fatto che noi assumiamo azoto alimentandoci con cibi e nutrienti che contengono composti azotati: amminoacidi, basi azotate, ma soprattutto amminoacidi. Una volta che gli amminoacidi li abbiamo introdotti ci sono le **transaminasi** nelle nostre cellule che cominciano a transaminare. Le transaminazioni spostano gruppi amminici da una parte all'altra, quindi ci sono attività di interconversione tra gli amminoacidi molto importanti.

Poi abbiamo l'arma della **glutammina sintetasi** che ovviamente è molto importante, soprattutto per alcuni organismi come le piante. Anche questo enzima l'abbiamo già incontrato, quando vi feci la lezione sulla struttura delle proteine e vi feci vedere questo dodecamero, proteina enorme di 600mila Da, con 12 subunità. La glutammina sintetasi trasforma glutammato in glutammina con spesa di una molecola di ATP: si forma un intermedio glutammilfofata poi entra l'ammonio e diventa glutammina.

L'assimilazione dell'azoto nell'uomo avviene grazie all'attività di due enzimi, la **glutammina deidrogenasi** e la **glutammina sintetasi**. Tra i due, il secondo è importante perché la glutammina

partecipa a numerosissimi processi biosintetici che riguardano gli amminoacidi e, soprattutto, di tanti altri composti azotati.

Il vero nodo nella biosintesi degli aa è la produzione del **glutammina**, la sua assimilazione, da parte della **glutammina deidrogenasi**: questa reazione può andare a tamponare l'eccesso di ione ammonio provocando però squilibri metabolici importanti, perché va a sottrarre  $\alpha$ -chetoglutarato dal ciclo dell'acido citrico. È più importante invece la reazione inversa con cui il glutammato viene ossidato e deaminato fino a produrre  **$\alpha$ -chetoglutarato**: si tratta di una deaminazione ossidativa.

Secondo alcuni scienziati il gruppo amminico in  $\alpha$  dei vari amminoacidi sarebbe essenziale poiché, per poter produrre tutti vari amminoacidi per transaminazione, è necessario che l'azoto dell'ammonio venga legato all'  $\alpha$ -chetoglutarato. Secondo questa teoria la reazione che va da  $\alpha$ -chetoglutarato a glutammato non avrebbe una grande importanza. Si comincia a pensare che effettivamente l'azoto del gruppo amminico in  $\alpha$  sia essenziale e sia coperto da assunzione di proteine con l'alimentazione. È ancora una cosa ipotetica, non la trovate scritta sul Leningher, la trovate scritta sul Goe.

Nella biosintesi degli amminoacidi entrano in gioco in maniera molto importante le reazioni di transaminazione che sono reazioni che consentono l'interconversione tra i diversi amminoacidi. Nell'immagine a fianco abbiamo una visione di insieme, con mescolato sia ciò che riguarda la produzione degli aa non essenziali, sia la produzione di quelli essenziali, che noi non siamo in grado di produrre.

Gli amminoacidi in generale derivano, tramite transaminazioni, da intermedi di tre processi metabolici che sono:

#### Glicolisi:

- 3-fosfoglicerato
- Piruvato
- Fosfoenolpiruvato

#### Via Pentoso Fosfati:

- Ribosio-5-fosfato • Eritrosio-4-fosfato

#### Ciclo dell'Acido Citrico:

- Ossalacetato
- $\alpha$ -chetoglutarato

L'**istidina**, che è un aa essenziale, è prodotta a partire dal **ribosio-5- fosfato**, proveniente dalla via dei pentoso fosfati. Questo però è un processo che nell'uomo non avviene e può avvenire solo in altri tipi di organismi.

Dall'**eritrosio-4-fosfato**, un aldotetroso, si possono ottenere i tre amminoacidi aromatici, **triptofano, fenilalanina e tirosina**, in un processo lungo e dispendioso dal punto di vista energetico, che non è svolto nel nostro organismo. Nelle nostre cellule si producono amminoacidi come la serina, glicina e cisteina a partire da un intermedio glicolitico, il 3-fosfoglicerato, oppure glutammato, glutamina, arginina e prolina dall'  $\alpha$ -chetoglutarato, intermedio del ciclo dell'acido citrico, o ancora aspartato e asparagina dall'ossalacetato. Poi, per esempio, partendo dall'ossalacetato oltre all'aspartato e asparagina che l'uomo è in grado di produrre, sono prodotti da altri organismi anche metionina, treonina e lisina, che sono per noi aa essenziali.

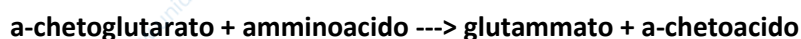
Il motivo per cui alcuni amminoacidi sono essenziali sta nel fatto che la loro sintesi sarebbe una grande perdita di tempo e un dispendio di energia, nel corso dell'evoluzione si è preferito prendere questi amminoacidi dall'esterno perdendo le capacità biosintetiche.

## BIOSINTESI DEGLI AMMINOACIDI NON ESSENZIALI

### SINTESI DI AMMINOACIDI CHE DERIVANO DA $\alpha$ -CHETOGLUTARATO

#### Glutammato

È un amminoacido fondamentale perchè partecipa alle reazioni di transaminazione. Può essere prodotto dal fissaggio dell'ammonio sull' $\alpha$ -chetoglutarato. **Nei batteri e nelle piante esiste una glutammato sintasi NADPH dipendente che fa reagire la glutamina, sintetizzabile con la reazione della glutamina sintetasi, con l' $\alpha$ -chetoglutarato per produrre due molecole di glutammato, questa però è una reazione che non riguarda la biochimica umana.** Nel nostro organismo può formarsi glutammato tramite la reazione catalizzata dalla **glutammato deidrogenasi**, reazione prevalente nelle cellule nervose, ma nel fegato questo si forma per **transaminazione** di altri amminoacidi su  **$\alpha$ -chetoglutarato** formando così il glutammato:



rafforzando l'ipotesi riguardo l'essenzialità dell'azoto amminico legato al carbonio  $\alpha$ .

## Prolina

Dall' $\alpha$ -chetoglutarato e quindi dal glutammato possiamo sintetizzare la prolina, in un processo che è praticamente l'inverso rispetto a quello visto per la sua degradazione. Il glutammato può andare in contro ad una riduzione NADPH dipendente sul gruppo carbossile della catena laterale, con consumo di ATP.

L'enzima coinvolto è diverso rispetto a quello coinvolto nel catabolismo, la *glutammato semialdeide deidrogenasi*. L'enzima **glutammato chinasi** con consumo di ATP porta alla formazione di  **$\gamma$ -glutammil-fosfato** che poi viene ridotto e defosforilato a **glutammato semialdeide** (con un gruppo aldeidico) dalla **glutammil fosfato reduttasi**. Dalla semialdeide dell'acido glutammico possiamo ottenere attraverso una reazione di deidratazione spontanea la chiusura dell'anello **pirrolinico**. Quest'ultimo può essere ridotto in una reazione NADPH dipendente a Prolina.

## Arginina

La semialdeide glutammico dell'acido può anche transaminare sul gruppo aldeidico in gamma, acquisendo un gruppo amminico in gamma e formando la **ornitina**, un amminoacido importante dal punto di vista metabolico che però non entra nella costituzione delle proteine.

L'ornitina partecipa al ciclo dell'urea: è in grado di legare una molecola di **carbamil-fosfato** per formare la **citrullina**. Dalla citrullina, che esce dal mitocondrio, si può ottenere **argininosuccinato** e poi grazie alla **argininosuccinasi** si genera **Arginina**. In questo caso la biosintesi dell'urea può essere letta anche come processo metabolico fondamentale per generare Arginina.

## SINTESI DI AMMINOACIDI CHE DERIVANO DA 3-FOSFOGLICERATO

Alcuni amminoacidi derivano da un intermedio della glicolisi, il **3-fosfoglicerato**, che si forma nella glicolisi nella reazione catalizzata dalla **fosfoglicerato chinasi**: una molecola di 1,3-bisfosfoglicerato reagisce con una molecola di ADP. Si ha quella che viene chiamata fosforilazione a livello del substrato: il fosfato che era legato al carbossile dell'1,3-bisfosfoglicerato viene trasferito sull'ADP per generare una molecola di ATP, l'altro prodotto della reazione è il 3-fosfoglicerato.

## Serina

Il 3-fosfoglicerato proseguendo con la glicolisi può diventare 2-fosfoglicerato, oppure può essere utilizzato per sintetizzare amminoacidi. Questo avviene grazie ad una **fosfoglicerato deidrogenasi** che agisce sul 3-fosfoglicerato e va ad ossidare il gruppo alcolico secondario legato al carbonio  $\alpha$  generando il gruppo chetonico del **fosfoidrossipiruvato**, il prodotto dell'ossidazione del 3-fosfoglicerato. Questo prodotto può partecipare ad una reazione di transaminazione con il glutammato: arriva dal glutammato il gruppo amminico. Il gruppo amminico passa sul fosfoidrossipiruvato e si forma l'amminoacido corrispondente che è la **3-fosfoserina**, alla quale viene staccato il gruppo fosfato in una reazione di idrolisi catalizzata da una **fosfatasi** e si genera **serina**. Quindi la serina si genera in pochi passaggi a partire da un intermedio della glicolisi. Tutto attraverso reazioni di: deidrogenazione, transaminazione e idrolisi.

## Glicina

Dalla serina è possibile ottenere la glicina grazie all'intervento dell'enzima **idrossimetiltransferasi** che utilizza come cofattore il **tetraidrofolato**. Questo è in grado di legare un frammento monocarbonioso rilasciato dalla serina, un idrossimetile, formando **metilen-THF**, e in questo modo la serina diventa glicina.

La stessa reazione ma in direzione opposta avviene nel catabolismo della glicina: può essere demolita ottenendo anidride carbonica, ammonio e un frammento monocarbonioso che viene legato al tetraidrofolato. In questo caso invece il metilen-THF cede il suo frammento monocarbonioso alla glicina per formare serina. Si può osservare in senso catabolico o in senso anabolico.

## Cisteina

Sempre dal 3-fosfoglicerato, ovvero dalla serina, può essere prodotta anche la cisteina. La serina reagisce con l'omocisteina formando **cistationina**, è una reazione già vista. L'omocisteina si ottiene tutte le volte in cui nel ciclo delle reazioni di metilazione la S-adenosilmetionina perde il gruppo metile che viene trasferito su un substrato, con formazione della S-adenosilomocisteina. Da lì si ottiene poi l'omocisteina per idrolisi. L'omocisteina può convertirsi in metionina grazie a quell'enzima che utilizza come cofattore la vitamina B12 trasferendo un metile dal metil-THF. Altrimenti l'omocisteina può andare a produrre cistationina. L'enzima che produce cistationina si chiama **cistationina sintasi**: si ha perdita di una molecola di acqua. Omocisteina e serina si uniscono per le catene laterali, va via acqua e si forma un ponte di zolfo. Un secondo enzima che si chiama **cistationina liasi** porta alla formazione di **cisteina** e  **$\alpha$ -chetobutirrato** con ingresso di acqua e uscita di uno ione ammonio. L' $\alpha$ -chetobutirrato viene tranquillamente metabolizzato attraverso la decarbossilazione ossidativa formando propionil-CoA. La cisteina può essere utilizzata tra il pool di aminoacidi cellulari per sintetizzare le proteine.

## SINTESI DI TIROSINA DALLA FENILALANINA

La tirosina non è essenziale perché viene prodotta a partire dalla fenilalanina. Interviene l'enzima **fenilalanina idrossilasi**, che inserisce un atomo di ossigeno proveniente dalla molecola di ossigeno sull'anello fenolico della Fenilalanina. È coinvolto anche un donatore di idrogeno che è la **tetraidrobiopterina**: si riduce a **diidrobiopterina** cedendo questi idrogeni al secondo atomo di ossigeno per formare una molecola di acqua. Abbiamo già visto questa reazione: è una reazione chiave (non intesa come tappa lenta e regolata) ma perché partecipa a più processi metabolici. Ci sono ambiti differenti in cui possono realizzarsi queste reazioni.

## SINTESI DI AA. CHE DERIVANO DA OSSALACETATO

### Aspartato

L'aspartato si produce attraverso la transaminazione del glutammato sull'ossalacetato.

### Asparagina

L'aspartato può ricevere un gruppo ammidico sulla catena laterale da una glutammina attraverso il consumo di ATP, l'enzima è la **asparagina sintetasi**. Questa è una reazione di **transammidazione**. Il gruppo ammidico presente sulla catena laterale della glutammina si trasferisce su quella della asparagina. Dalla glutammina si ottiene quindi glutammato.

Le due reazioni di sintesi sono collegate, infatti il glutammato prodotto può essere utilizzato per la transaminazione su ossalacetato.

## SINTESI DI AMMINOACIDI CHE DERIVANO DA PIRUVATO

### Alanina

Dal Piruvato otteniamo per transaminazione l'alanina, altro aminoacido non essenziale.

Le vie di biosintesi di tutti questi aminoacidi non essenziali non sono molto complesse, glutammato, glutammina, serina, glicina, cisteina, aspartato e asparagina. La situazione cambia radicalmente quando si va a vedere la sintesi degli aminoacidi essenziali.

## BIOSINTESI DELL'EME:

La biosintesi dell'eme inizia **nel mitocondrio e continua in parte nel citoplasma e in parte ancora nel mitocondrio**, fino all'ultima reazione (catalisi) che avviene a livello del mitocondrio da cui si ottiene il gruppo eme che poi viene trasportato nel citoplasma e unito alla globina per dare **l'emoglobina**.

### STRUTTURA DEL GRUPPO EME

Il gruppo eme è considerato il gruppo prostetico dell'emoglobina (legato ad essa). il gruppo eme è un **tetrapirrolo** (dato dalla **protoporfirina**, un composto organico) a cui è legato un **atomo di ferro** allo stato ossidato ferroso  $Fe^{2+}$ . L'atomo di ferro ha 6 legami di coordinazione, 4 di questi sono impegnati con 4 atomi di azoto a formare l'anello porfirinico, altri 2 invece sono perpendicolari al piano della porfirina.

Gli atomi di azoto coordinati impediscono la conversione dell'ferro dell'eme nello stato ferrico  $Fe^{3+}$  che non è in grado di legare ossigeno e reagirebbe con esso portando alla formazione di radicali reattivi ROS molto tossiche e dannose per le molecole biologiche.

La biosintesi dell'eme è una via metabolica ubiquitaria, avviene in tutte le cellule, in quanto tutte le cellule possiedono gli **enzimi detti citocromi** che sono costituiti a partire dal tetrapirrolo che è la base di tutti i tipi di eme, e tutte le cellule sono in grado di sintetizzare l'anello tetrapirrolico, poi ci sono diversi gruppi eme a seconda dei vari tipi di citocromi. Anche se questo è vero,

**la biosintesi dell'eme avviene prevalentemente in due tessuti:**

- 1. Il tessuto ematopoietico**, nelle cellule eritroidi (precursori degli eritrociti), che utilizzano questa via biosintetica per sintetizzare la **protoporfirina IX** (9), poi l'eme, che è un **Eme di tipo b** e che andrà a far parte dell'emoglobina. A livello di queste cellule si ha la sintesi della maggior parte, 80/90%, dell'eme dell'organismo;
- 2. Fegato:** responsabile per il 10/20% della biosintesi dell'eme nell'organismo. Nel fegato c'è il **citocromo P450**, che è utilizzato nelle reazioni di detossificazione e quindi è una proteina contenente eme frequentemente sintetizzata nel fegato.

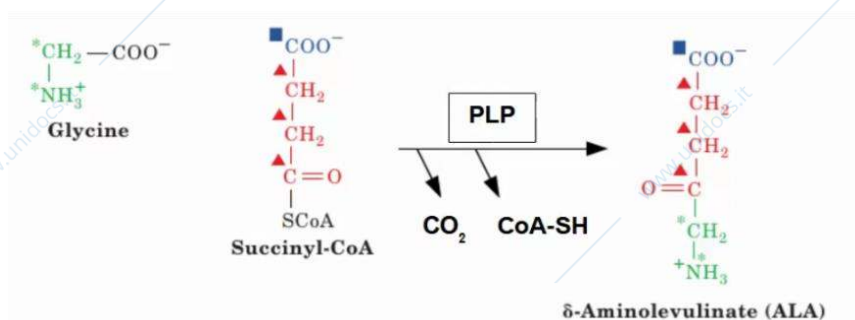
### LE TAPPE DELLA BIOSINTESI DELL'EME:

**La 1° tappa** avviene nel mitocondrio, ad opera del primo enzima:  **$\delta$ -ammino-levulinato sintasi**, che è un enzima mitocondriale, **piridossalfosfato dipendente**. Questo enzima usa i substrati **glicina** e **succinil-CoA**, portando alla formazione del  **$\delta$ -ammino-levulinato** (o **ALA**)

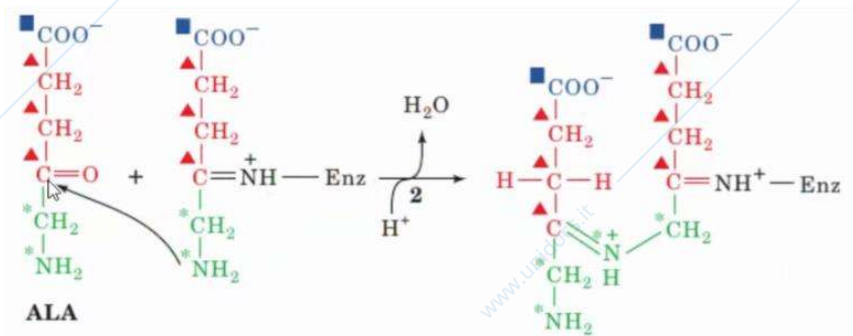
Quel che avviene in primo luogo è una  **$\alpha$ -decarbossilazione della glicina**, quindi si ha una rottura eterolitica nella glicina tra il carbonio alfa e il carbossile, grazie alla presenza del piridossalfosfato. Per cui, da questa rottura, fuoriesce anidride carbonica, e si forma un carbanione sul carbonio alfa della glicina.

Poi, il carbanione fa un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico del succinil-coA **rompendo il legame tioestere**, e quindi viene aggiunto il gruppo  $CH_2-NH_3$  su questo carbonio carbonilico, e viene rilasciata CoA-SH

L'energia libera necessaria per far avvenire questa reazione di sintesi deriva dalla decarbossilazione (reazione esoergonica) e soprattutto dalla rottura del legame tioestere.



**Nella 2° tappa** è coinvolto l'enzima **porfo-bilinogeno sintasi**, che ha come substrati due molecole di **acido 5-amino-levulinico**. Avviene una prima reazione in cui una molecola di ALA (aminolevulinato) si lega al gruppo NH<sub>2</sub> del sito attivo dell'enzima con formazione di una base di Schiff (**C=N**), poi entra la seconda molecola di aminolevulinato. A questo punto si svolge una **catalisi di tipo acido-base**. Si ha l'attacco nucleofilo del gruppo NH<sub>2</sub> di un aminolevulinato sul carbonio carbonilico (stabilizzato per risonanza) dell'altro aminolevulinato, formando un intermedio detto **porfo-bilinogeno**. ~~(un residuo dell'enzima strappa gli elettroni al carbonio che ha subito l'attacco nucleofilo; si forma un carbanione che fa un ulteriore attacco nucleofilo su un altro carbonio)~~ Il porfo-bilinogeno è un pirrolo con un gruppo acetilico (H<sub>3</sub>C=C=O), e un gruppo propilico (R-C).



**Nella 3° tappa**, il porfobilinogeno è substrato dell'**uroporfirinogeno sintasi** che utilizza 4 molecole di porfobilinogeno in sequenza per costruire un **tetrapirrolo lineare**, che risulta formato da 4 anelli pirrolici legati tra loro da **ponti metilenici (-CH=)**. Quando si forma un ponte metilenico tra un anello pirrolico e un altro, si stacca l'ammoniaca NH<sub>3</sub>, per cui in questa reazione si staccano 3 molecole di ammoniaca.

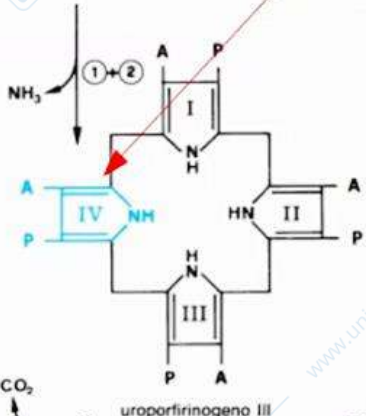
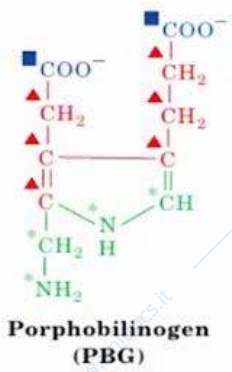
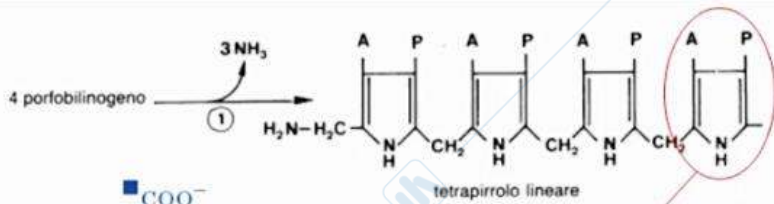
**Nella 4° tappa**, si ha la **ciclizzazione** del tetrapirrolo lineare ad opera dell'enzima **uroporfirinogeno III cosintasi**, che opera insieme all'enzima **uroporfirinogeno sintasi**. inizia la ciclizzazione a partire dall'eliminazione di un'altra molecola di ammoniaca ad opera dell'uroporfirinogeno sintasi, e la **cosintasi** catalizza l'**inversione dei sostituenti sull'anello 4** in senso antiorario, formando così l'**uroporfirinogeno III**.

**Nella 5° tappa**, ad opera dell'enzima **uroporfirinogeno decarbossilasi** si ha la **decarbossilazione** di tutti i 4 acetili formando i gruppi metilici (M), e si forma il **coproporfirinogeno III**.

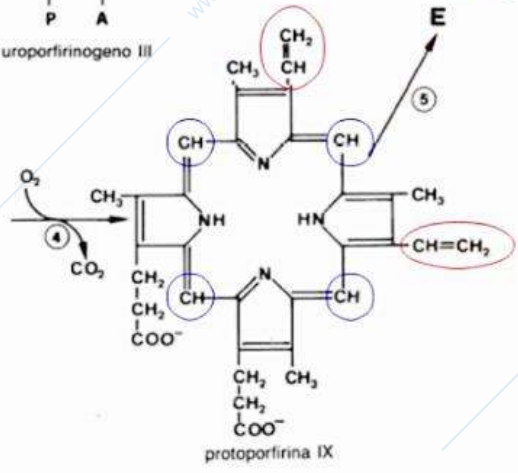
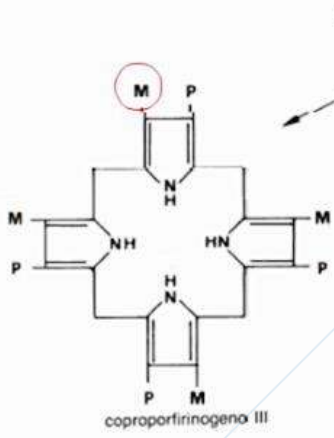
**Nella 6° tappa**, si ha l'azione dell'enzima **coproporfirinogeno ossidasi**, che utilizza come agente ossidante l'ossigeno molecolare. Ossida due **propili a vinili** (~~i cerchi rossi in figura~~) e ossida i **gruppi metilici** a **gruppi metilenici** -CH<sub>2</sub> (~~cerchi viola~~): quindi questa **doppia ossidazione** porta alla formazione della **protoporfirina IX** (un eme di tipo B).

**La 7° e ultima tappa**, è catalizzata dall'enzima **ferrochelatasi** che aggiunge il Ferro ferroso Fe<sup>2+</sup> (stato ridotto) al centro dell'anello tetrapirrolico formando l'**Eme**.

Il gruppo eme poi viene trasportato nel citoplasma e unito alla globina (una proteina) per dare l'**emoglobina**.



- 1) uroporfirinogeno sintasi
- 2) uroporfirinogeno III cosintasi
- 3) uroporfirinogeno decarbossilasi;
  - decarboss. acetili
- 4) coproporfirinogeno ossidasi;
  - Ox di 2 propili a vinili
  - Ox dei gruppi metilici a metilenici



## REGOLAZIONE DELLA BIOSINTESI DELL'EME:

La sintesi dell'eme dell'organismo, avviene per gran parte all'interno delle cellule eritroidi (80%), e per la rimanente parte avviene a livello del fegato (20%) in cui avviene la sintesi di alcuni citocromi, in particolare il **citocromo p450** (detossificante)

### - Regolazione nel fegato:

**l'EME provoca un feedback negativo:** l'ultimo prodotto della via metabolica (l'Eme stesso) inibisce il primo enzima (L'ALA sintasi), che compie una reazione irreversibile. L'EME inibisce il primo enzima in vari modi:

1. **Ha un'azione diretta sull'ALA sintasi** in quanto è il suo inibitore.
2. **Inibisce il trasporto dell'ALA sintasi** all'interno del mitocondrio, l'ALA sintasi, come tutte le altre proteine mitocondriale, è sintetizzata a livello dei ribosomi citosolici, e poi ci sono sistemi di trasporto addatti al suo trasporto nel mitocondrio, l'Eme può inibire questi sistemi di trasporto.
3. **Reprime la sintesi di ALA sintasi:** L'eme è un inibitore che agisce a livello trascrizionale, quindi si lega a una proteina (cofattore trascrizionale) presente nel nucleo.

### - Regolazione nelle cellule eritroidi

Nelle cellule eritroidi **la velocità della produzione dell'EME non è limitata**, perché le cellule eritroidi sono una linea cellulare che si sta differenziando dai eritroblasti fino agli eritrociti e durante il proprio percorso di differenziamento deve per forza accumulare velocemente una grande quantità di emoglobina che servirà all'eritrocita maturo. Per cui, non c'è una limitazione della velocità con cui l'eme viene trascritto in queste cellule.

Ci può essere una limitazione solo nel caso in cui c'è una carenza di ferro, e la **reazione limitante** sarebbe quella della **ferrochelatasi**.

~~Regolazioni completamente diverse si comprendono alla luce delle funzioni svolte.~~

## PERICOLOSITA' DELLE PORFIRINE

Queste porfirine, a differenza dei porfirinogeni, sono pericolose: è per questo che nella via di biosintesi la porfirina si forma solo in fondo. La loro pericolosità è data dal fatto che la presenza dei ponti metinici fa estendere la delocalizzazione elettronica all'interno della molecola. Questo meccanismo determina il classico colore rosso del sangue: la struttura può essere facilmente eccitata dall'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche nello spettro del visibile. La radiazione di colore rosso non viene però assorbita, viene riflessa, di conseguenza soluzioni contenenti Protoporfirina appaiono di questo colore.

Queste sostanze però, se si accumulano oltremisura (ad esempio nella cute), sono **fotosensibilizzanti**. Lo stato eccitato può assorbire energia e liberarla producendo **specie reattive dell'ossigeno**: queste possono creare danni ossidativi importanti. Tutto questo non succede in condizioni fisiologiche: solitamente non appena si forma la Protoporfirina IX questa subisce l'ultima reazione che consiste nell'inserimento di uno ione  $Fe^{2+}$  da parte di una **Ferrochelatasi** al centro della struttura.

La regolazione della via è data proprio dal prodotto finale: l'Eme, che inibisce le prime due tappe.

## PATOLOGIE CONNESSE ALLA BIOSINTESI DELL'EME (PORFIRIE)

Ci possono essere malattie e sindromi che derivano dal fatto che un gene di una particolare via metabolica, di un enzima, non esprima quel determinato enzima (o lo esprima non funzionante). In questi casi il metabolismo si inceppa a livello della reazione catalizzata da quell'enzima. Come esempio abbiamo già visto i deficit enzimatici a carico del ciclo dell'urea, quelli che influenzano il metabolismo amminoacidico e ci sono poi anche deficit che colpiscono il metabolismo dell'Eme e la sua biosintesi. Ad esempio, non abbiamo visto deficit enzimatici che colpiscono il ciclo di Krebs poiché essi sarebbero incompatibili con la vita. Quelli che sono chiamati "errori genetici del metabolismo" sono deficit genetici riferibili a vie metaboliche nelle quali in qualche modo si può sopperire: non c'è incompatibilità con la vita. Nella via di biosintesi dell'Eme ognuno degli enzimi che partecipa può essere deficitario. Ci sono diversi tipi di malattie chiamate "**porfirie**" in cui sono deficitari, uno per volta, i vari enzimi che abbiamo visto. In queste porfirie, se un enzima è deficitario, si accumula il substrato di quell'enzima, che può distribuirsi nell'organismo e creare problemi. Le porfirie non sono tutte uguali. Alcune di esse danno i maggiori segni e

sintomi a carico del fegato: sono le **porfirie epatiche**. Ci sono poi le porfirie che danno i maggiori sintomi a carico del sistema di produzione dei globuli rossi: le **porfirie eritropoietiche**. Tutte le porfirie, soprattutto quelle che colpiscono gli enzimi finali della via biosintetica, danno problemi a **livello dermatologico**. Questo perché si accumulano Uroporfirinogeni e vengono trasformati nella porfirina corrispondente, che si deposita a livello cutaneo ed essendo fotosensibilizzante possono venir fuori problemi importanti sulla cute (**dermatiti** ma anche insorgenza di **tumori cutanei**).

## Degradazione dell'eme e formazione della bilirubina:

La degradazione del gruppo eme porta alla formazione del pigmento biliare **bilirubina**.

L'emoglobina si trova all'interno dei globuli rossi, e quando questi finiscono il loro ciclo vitale di 120 giorni, entrano nel **sistema reticoloendoteliale nella milza**, dove le cellule e l'emoglobina vengono degradati. La parte proteica (globina) viene separata dal gruppo eme. Il gruppo eme non può essere recuperato dall'organismo e quindi viene degradato e trasformato in **bilirubina**, mentre il ferro viene recuperato.

La bilirubina è il principale pigmento biliare che conferisce alla bile il suo caratteristico colore giallo. Deriva dal catabolismo dell'emoglobina quando i globuli rossi si invecchiano e si distruggono (dopo che finiscono la loro emivita di 120gg).

### La degradazione dell'eme avviene in un ambiente extracellulare:

**Nella 1° reazione**, l'enzima **eme ossigenasi** catalizza l'ossidazione dell'eme. In questa reazione sono richieste 4 atomi di ossigeno (provenienti da 2 molecole di ossigeno molecolare **O<sub>2</sub>**) e il **NADH** come riducente che fornisce gli atomi di idrogeno;

2 atomi di ossigeno vengono introdotti all'interno dell'eme ossidandolo causando la sua trasformazione da un anello tetrapirrolico ad un composto lineare detto **biliverdina**.

Il terzo atomo di ossigeno viene ridotto ad acqua H<sub>2</sub>O (gli atomi di idrogeno sono forniti dal NADPH).

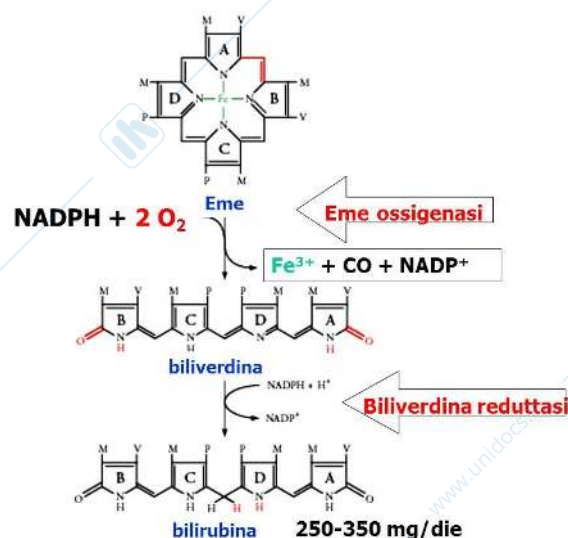
L'ultimo atomo di ossigeno diventa monossido di carbonio (CO) che viene liberato (come un gas).

**Nella 2° reazione**, grazie all'intervento dell'enzima **biliverdina reduttasi** che utilizza NADPH, la **biliverdina** viene ridotta a **bilirubina**, e si libera NADP<sup>+</sup>.

La bilirubina circola nel sangue legata all'albumina (principale sieroproteina).

Una piccola quantità dell'emoglobina può sfuggire a questo processo degradativo e liberarsi nel circolo sanguigno. L'emoglobina che sfugge da quel processo degradativo vengono catturate dall'**aptoglobina** che la lega formando il **complesso aptoglobina-emoglobina** che viene degradato a **bilirubina** o nel sistema reticoloendoteliale della milza o nelle cellule epatiche di Kupfer.

I livelli di aptoglobina nel siero possono essere misurati: quando abbiamo una quota eccessiva di emoglobina libera in circolo si assiste ad una diminuzione dei livelli di aptoglobina nel siero; questo perché l'emoglobina libera viene legata dall'aptoglobina la cui concentrazione inizia a esaurirsi.



## Destino della bilirubina (e la sua eliminazione attraverso la bile)

La bilirubina proviene dalla degradazione del gruppo eme e poi viene liberata dalla milza al circolo sanguigno dove viene legata all'albumina, per essere captata poi dal fegato dove viene trasformata in bilirubina coniugata.

la bilirubina è il principale pigmento biliare che conferisce alla bile il suo caratteristico colore giallo. Deriva dal catabolismo dell'emoglobina quando i globuli rossi si invecchiano e si distruggono (dopo che finiscono la loro emivita di 120gg).

la bilirubina è una sostanza che non può accumularsi oltre certi livelli, inoltre è una molecola idrofoba non facilmente eliminabile. Allora avviene una **reazione di coniugazione** (appartenente a meccanismi di detossificazione) detta anche **glucuronazione**.

Nel fegato, la bilirubina si lega alla **proteina Y** (detta anche **ligandina**) e viene coniugata con 2 molecole di **glucuronato** grazie all'**enzima glucuronil-bilirubina**, e si forma la **bilirubina coniugata** (o **bilirubina diretta**), quindi la bilirubina si trasforma da una bilirubina indiretta a una bilirubina diretta.

Il glucuronato è utilizzato dal fegato come molecola per processi di coniugazione appartenenti a meccanismi di detossificazione.

La **bilirubina coniugata** acquista maggiore idrofilia e questo rende possibile la sua eliminazione attraverso la **bile**, di cui costituisce il pigmento.

La bile che contiene bilirubina esce dal fegato e viene riversata nel duodeno; poi nel colon viene ridotta a **urobilinogeno** da parte dei batteri della flora batterica intestinale. L'urobilinogeno ha due possibili vie:

- La maggior parte dell'urobilinogeno prosegue all'interno dell'intestino e viene trasformato in **sterco-bilinogeno** e poi **sterco-bilina** che viene eliminato con le feci.
- il restante parte dell'urobilinogeno viene riassorbito, trasformato in **urobilina** e eliminato con l'urina (l'urobilina conferisce il colore giallo alle urine).

Il termine diretto o indiretto si riferisce ad una reazione di laboratorio: se la bilirubina reagisce *direttamente* con il **reagente di Van der Bergh** (acido diazosulfanilico), mentre la bilirubina non coniugata reagisce con tale reagente *solo in presenza di alcool etilico*.

### **RISCONTRI CLINICI:**

La misurazione della bilirubina in circolo viene eseguita quando si osserva una colorazione anomala della cute che

tende al giallastro. Tale condizione prende il nome di ittero (o sub-ittero quando non è immediatamente evidente) e può avvenire in situazioni di ostruzione biliare, di emolisi eccessiva o in caso di problemi intrinseci del

fegato che non è in grado di coniugare la bilirubina. La bilirubina allora viene riassorbita in circolo e può accumularsi al livello del sistema nervoso determinando danni neurologici importanti.

## METABOLISMO DELLE AMMINE BIOGENE

Le **ammine biogene** sono molecole estremamente attive che derivano dagli amminoacidi attraverso una reazione di decarbossilazione. Sono implicate in numerosi processi fisiologici importanti, e agiscono a basse concentrazioni. Spesso sono implicati in processi di:

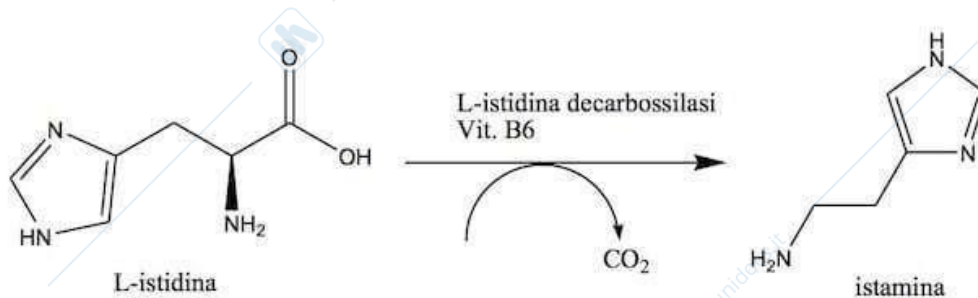
- Comunicazione cellulare (sotto forma di ormoni)
- Neurotrasmissione (esempi: le ammine GABA e serotonina)
- Processi di impacchettamento del DNA (**avvolgimento dell'DNA e formazione di cromatina**)
- Possono mediare altri processi fisiologici come vasodilatazione/vasocostrizione e secrezione.

### ISTAMINA

L'istamina è un potente vasodilatatore implicato nella risposta allergica e che stimola anche la secrezione gastrica. Esistono antistaminici che possono essere usati sia nel trattamento di fenomeni allergici, ad esempio della rinite allergica, ma anche per regolare i fenomeni di secrezione gastrica.

L'istamina è un'ammina derivata dalla istidina attraverso un processo di decarbossilazione. Questa reazione è catalizzata dall'**istidina decarbossilasi**, che utilizza PLP (piridossalfosfato) come coenzima e che stacca sotto forma di  $\text{CO}_2$  il carbossile dell'istidina. Il PLP, coenzima derivato dalla vitamina B<sub>6</sub>, ricorre in tutti gli enzimi che utilizzano un amminoacido come substrato.

Ad esempio utilizzano il PLP come coenzima le transaminasi, la serina e la treonina deidratasi (deaminazione non ossidativa), le amminoacido decarbossilasi (di cui l'istidina decarbossilata è un esempio).



#### Ammine biogene che fungono da neurotrasmettitori:

**GABA:** (o l'acido Gamma-Amminobutirrico) ha una funzione inibitoria, deriva dall'acido glutammico per il distacco del carbossile in carbonio  $\alpha$ , ad opera dell'enzima **glutammato decarbossilasi**.

**SEROTONINA:** deriva dall'idrossilazione in posizione 5 dell'aminoacido triptofano grazie all'enzima **triptofano idrossilasi** che utilizza l'ossigeno come agente ossidante (e nelle ossigenasi un atomo di ossigeno viene inserito sul substrato mentre l'altro viene legato a due atomi di H forniti da un donatore che è chiamato tetraidrobiopterina; come nella reazione che consente di passare da fenilalanina a tirosina). Il 5-idrossitriptofano subisce poi una decarbossilazione, per cui si libera  $\text{CO}_2$  e si forma la **serotonina** (5-idrossitriptamina). La serotonina è liberata a livello delle sinapsi da un neurone trasmettitore.

## CATECOLAMINE

Le catecolamine sono **ammine biogene**, e sono molecole che contengono il gruppo catecolo al loro interno (formato da un anello fenolico con due gruppi OH adiacenti). Le catecolamine più importanti sono **dopamina, adrenalina e noradrenalina**.

La sintesi avviene a partire dalla tirosina a carico della quale agisce l'enzima tirosina idrossilasi, la quale utilizza tetraidrobiopterina come donatore di H e ossigeno come agente ossidante. Un atomo di ossigeno viene inserito sull'anello accanto a quello già esistente e si forma il nucleo catecolico. Questa molecola prende il nome di diidrossifenil-alanina o **DOPA**. L'isomero L del DOPA è un farmaco di largo impiego nella terapia del Parkinson. Questa DOPA subisce una decarbossilazione (catalizzata da un enzima che agisce su tutti gli aminoacidi aromatici) e diventa **dopamina**.

Il morbo di Parkinson è caratterizzato dalla perdita dei neuroni che si trovano nella "substantia nigra" e che sono collegati con il nucleo striato. Questi sono neuroni dopaminergici (utilizzo di dopamina come neurotrasmettitore) e quindi se questi vengono meno viene meno la trasmissione dopaminergica, si perdono le normali caratteristiche motorie. La dopamina non può essere somministrata perché non arriverebbe alla substantia nigra, per cui viene usato il suo precursore diretto (DOPA) riuscendo a controllare i sintomi della malattia.

Ci sono neuroni che invece usano la noradrenalina, i neuroni adrenergici (es. quelli del sistema ortosimpatico). La **noradrenalina** viene prodotta a partire dalla dopamina con idrossilazione, dove la vitamina C svolge il ruolo di donatore di idrogeno.

Per ottenere l'**adrenalina** (che è un ormone) viene legato alla noradrenalina, grazie ad una metiltransferasi, un gruppo metile (donato dalla S-adenosil metionina) a livello del gruppo amminico che diventa così secondario. Essa è prodotta a livello della porzione midollare della ghiandola surrenale ed è anche chiamato ormone dello stress, coinvolto nella reazione "attacca o fuggi".

Tutte queste sostanze hanno un'emivita breve e i sistemi di degradazione delle catecolamine si basano sull'attività di due enzimi:

- **CATECOLO O METIL TRANSFERASI** (o COMP) che effettua il trasferimento di gruppo metile su uno dei due OH del catecolo. Uno dei gruppi OH del catecolo diventa OCH<sub>3</sub> e si forma un gruppo metossile.
- **MONOAMMILOSSIDASI** (o MAO) che va a ossidare il carbonio  $\alpha$  che riportava il gruppo amminico e che diventa prima gruppo aldeidico e poi per ossidazione gruppo carbossile.

I due enzimi possono agire nell'ordine che vogliono, non c'è una sequenza. Per azione combinata dei due enzimi su adrenalina e noradrenalina alla fine otteniamo l'**ACIDO VANIL-MANDELICO**, dove l'OH dell'anello catecolico è diventato OCH<sub>3</sub> e il carbonio  $\alpha$  è diventato COOH. Questa molecola è il prodotto di degradazione delle due catecolamine adrenalina e noradrenalina e viene eliminato con le urine. Questa è una sostanza che si trova nelle urine in quantità bassissima in condizioni normali, ma aumenta in caso di un tumore benigno che colpisce la midollare del surrene ed è un tumore secernente grandi quantità di adrenalina.

La sostanza che deriva invece dalla dopamina per azione di questi due enzimi è l'**ACIDO OMOVANILLICO**, che si distingue dalla precedente perché gli manca un OH.

# NUCLEOTIDI

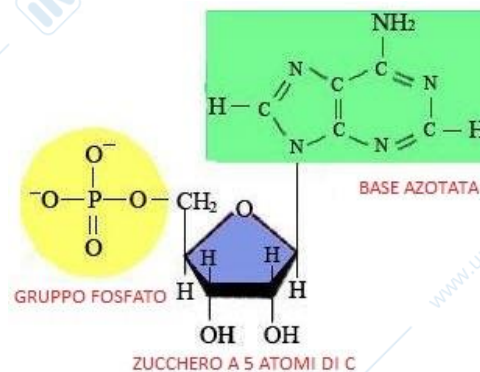
I nucleotidi sono presenti in maniera **ubiquitaria** in tutte le cellule e partecipano alla maggior parte dei processi biochimici. I nucleotidi sono precursori degli acidi nucleici; sono le **unità ripetitive degli acidi nucleici** (DNA, RNA..) ~~i nucleotidi sono presenti a bassi livelli nelle cellule, salvo l'ATP che gioca un ruolo diverso.~~

I nucleotidi hanno diverse funzioni nella cellula. Essi sono:

- 1) sono i precursori del DNA e dell'RNA;
- 2) alcuni nucleotidi come ATP e il GTP sono i trasportatori essenziali dell'energia chimica;
- 3) Sono i componenti di cofattori come il NAD, il FAD, l'S-adenosil-metionina e il coenzima A, e di alcuni intermedi biosintetici attivati come l'UDP-glucosio e il CDP-di-acil-glicerolo;
- 4) funzionano da secondi messaggeri cellulari (cAMP, cGMP).

## La struttura generale dei nucleotidi – come sono fatti:

I nucleotidi sono molecole composte da una **base azotata purinica** o **pirimidinica** legata mediante **legame N-glicosidico** al C1 di uno **zucchero pentoso** come il **Ribosio**, o come **2-Deossiribosio** in cui il C2 lega un atomo di idrogeno invece di una funzione alcolica. Inoltre, l'OH del C5 del pentoso è esterificato con un **gruppo fosfato**.



Le basi azotate per la maggior parte sono legate al C1 dello zucchero pentoso, e si dividono in:

- **2 PURINE:** Adenina e Guanina
- **3 PIRIMIDINE:** Citosina e Timina (nel caso del DNA); Uracile (nel caso del RNA)

La Timina è la forma metilata dell'Uracile, infatti viene anche definita come **5-metiluracile**.

Queste 5 basi azotate costituiscono la struttura degli acidi nucleici (DNA e RNA) e sono quelle più rappresentate.

## Introduzione alla biosintesi dei nucleotidi:

I nucleotidi nel nostro organismo non sono ottenuti dall'esterno, infatti quelli che **provengono dalla dieta** sono **tutti degradate**, quindi non ci sono fonti esogene dei nucleotidi presenti nel nostro corpo, e non ci sono nemmeno trasportatori sul plasmalemma per nucleotidi assunti dalla dieta. Tutte le **cellule** del nostro organismo devono **sintetizzare** i propri nucleotidi, e per questo motivo la biosintesi dei nucleotidi è un processo ubiquitario.

La **velocità** di sintesi dei nucleotidi **dipende dalle condizioni cellulari**, che possono essere condizioni di quiescenza replicativa o condizioni di replicazione.

- Durante la duplicazione del DNA (processo che avviene nella fase S del ciclo cellulare), il fabbisogno di **deossiribonucleotidi** è molto elevato: il DNA aploide è una molecola molto estesa, costituita da più di 3 miliardi di paia di basi e quindi il DNA diploide è costituito da 6 miliardi di paia di basi - ~~tutto è sintetizzato ex novo.~~
- In una cellula che invece non si sta replicando in un determinato momento, il processo di biosintesi di nucleotidi avviene in misura minore in quanto è attiva la biosintesi dell'RNA, e del RNA messaggero: la trascrizione è un processo sempre attivo, anche in cellule in quiescenza, e la sintesi di RNA, di qualunque tipo esso sia, richiede ovviamente **ribonucleotidi** che vengono riciclati per la maggior parte in cellule in quiescenza dalla degradazione di acidi nucleici DNA o RNA preesistenti. **Dalla degradazione degli acidi nucleici e acidi ribonucleici si ottengono ribonucleotidi monofosfato: la maggior parte vengono riconvertiti a ribonucleotidi trifosfato per poter essere riutilizzate per la sintesi di RNA (l'RNA polimerasi necessita di ribonucleotidi trifosfati) e una parte minore viene degradata.**

Quindi in cellule che non si replicano la biosintesi dei nucleotidi è un processo costantemente attivo ma che viaggia a una velocità relativamente bassa perchè deve rigenerare/riciclare nucleotidi che sono stati degradati.

Ci sono due tipi di nucleotidi:

- **Nucleotidi purinici**, che hanno come base azotata una purina (**adenina** o **guanina**)
- **Nucleotidi pirimidinici** che hanno come base azotata una pirimidina (**Citosina** e **Timina** o **Uracile**).

Le vie sintetiche per questi due tipi sono diverse.

## Biosintesi dei nucleotidi ;

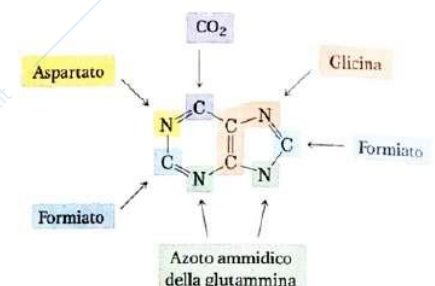
Ci sono due processi metabolici distinti che portano alla formazione dei nucleotidi:

1. **Via di sintesi de novo:** riguarda le purine e anche le pirimidine, e avviene in tutti gli organismi e ha un costo energetico elevato;
2. **Via di recupero:** riguarda le purine, ed è più importante della via di sintesi de novo delle purine. Essa consente di recuperare le basi azotate che vengono ottenute dalla demolizione endogena degli acidi nucleici. Infatti, le basi azotate ottenute dalla degradazione di acidi nucleici non vengono demolite, ma vengono recuperate per riformare nucleotidi tramite i processi di biosintesi. **L'importanza di questa via si evince in una particolare patologia la sindrome di Lesch-Nyhan.**

## Via di sintesi de novo

Nella via di sintesi de novo vengono utilizzati i precursori (degli atomi del nucleotide da sintetizzare), sono precursori molto semplici;

- **Glicina** (amminoacido importante per la sintesi della purina)
- **Glutammina:** dona i gruppi amminici
- **Formil-tetraidrofolato:** dona il gruppo formile (R-C=O)
- **CO<sub>2</sub>:** dona C attraverso una reazione di carbossilazione
- **Aspartato** (amminoacido importante per la sintesi della pirimidina).



## - Via di sintesi de novo dei nucleotidi purinici:

Nel caso delle basi puriniche la sintesi de novo avviene su un precursore detto **5-fosforibosil-1-pirofosfato**, quindi non si forma una base azotata isolata, ma si forma direttamente un nucleotide purinico che è **inosinato (IMP)**

### Formazione del 5-fosforibosil-1-pirofosfato:

Per ottenere il 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) partiamo da ribosio-5-fosfato che reagisce con una molecola di ATP che gli dona un gruppo pirofosfato (PPi), rilasciando AMP. Il prodotto da questa reazione è il **5-fosforibosil 1-pirofosfato** in cui il gruppo pirofosfato legato al carbonio 1 rende lo stesso carbonio 1 metabolicamente attivo, (caratteristica che la molecola di ribosio-5-fosfato non ha). biosintesi

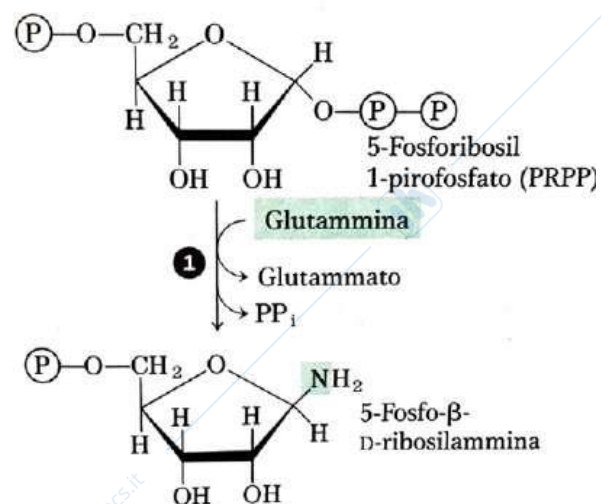
La via di sintesi de novo del nucleotide purinico inizia dal precursore **5-fosforibosil 1-pirofosfato** (detto PRPP):

La **1° reazione** è catalizzata dalla **glutamina-PRPP- amidotrasferasi** (l'enzima più importante).

In questa reazione il **5-fosforibosil-1-pirofosfato** riceve un gruppo amminico dalla catena laterale della **glutamina**, e questo gruppo amminico va a legarsi al carbonio del fosforibosilpirofosfato, che perde pirofosfato e successivamente si trasforma in **5-fosforibosil-ammina**. La glutamina che perde un gruppo amminico si trasforma in **glutammato**.

**Il prodotto presenta legato al ribosio il primo atomo dell'anello guanidinico sotto forma di gruppo amidico.**

È una reazione che non utilizza energia, però per creare il 5-fosforibosilpirofosfato è stata utilizzata una molecola di ATP che si è idrolizzata a AMP, la quale a sua volta ha reagito con un'ATP per formare in totale due molecole di ADP e due Pi, quindi complessivamente sono state utilizzate due molecole di ATP.

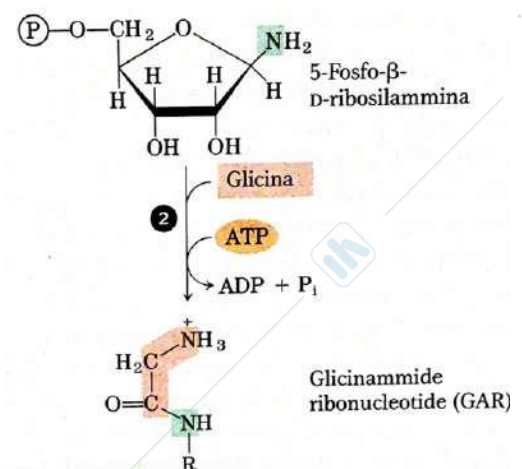


Nella **2° tappa**, ad opera dell'enzima **glicinammide-ribonucleotide sintetasi** si forma un legame tra il gruppo carbossilico di una molecola di glicina (un amminoacido) e il gruppo amminico della fosforibosil-ammina, formando una molecola detta **glicinammide ribonucleotide (GAR)**. Per poter formare questo legame è necessaria l'idrolisi di una molecola di ATP ad ADP, inoltre viene liberata una molecola di H<sub>2</sub>O che però è quella che va ad idrolizzare la molecola di ATP quindi non c'è né consumo né produzione di acqua.

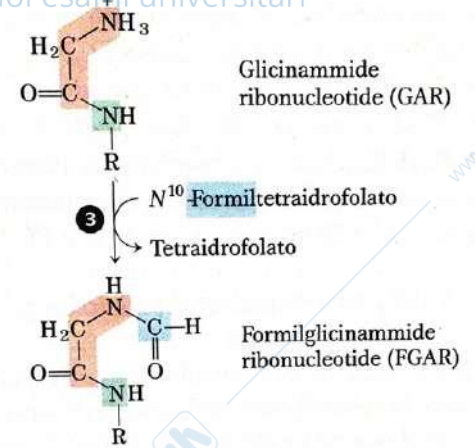
**glicinammide-ribonucleotide (GAR)** è un'amide della glicina in quanto la glicina forma un legame amidico.

Questi sono già tutti atomi che fanno parte dell'anello purinico; la

costruzione avviene sul ribosio, questo dimostra come stiamo sintetizzando un nucleotide e non una base azotata.



La **3° reazione** interviene una molecola di **formil-tetraidro-folato (formil-THF)** che presenta un gruppo formile (frammento monocarbonioso H-C=O) che viene donato alla glicinamide-ribonucleotide, ad opera dell'enzima **GAR transformilasi**. Quindi si forma un legame tra il gruppo amminico (che apparteneva alla glicina) e il carbonio del gruppo formile fornito dal formil-THF, per cui il glicinamide-ribonucleotide diventa **Formil glicinamide ribonucleotide (FGAR)** mentre il formil-THF che ha ceduto il gruppo formile, diventa **tetraidrofolato** che potrà essere ricaricato prelevando un frammento monocarbonioso.

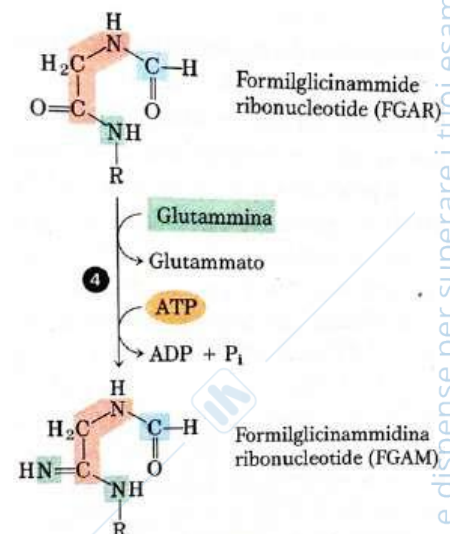


A questo punto abbiamo il formil-glicinamide-ribonucleotide che ha **5 atomi** che fanno parte del primo anello del nucleo purinico (quello a 5 atomi), però ancora non si vede, perché la struttura non è ciclizzata.

Nella **4° reazione** interviene di nuovo di una molecola di **glutamina**. La glutamina cede il gruppo amminico della catena laterale trasformandosi in glutammato. ad opera dell'enzima **amidotransferasi** il gruppo ribamminico ceduto va a legarsi al carbonile che apparteneva alla glicina: da C=O si passa a C=NH, per cui il **formil-glicinamide-ribonucleotide** si trasforma in **formil-glicinamidina ribonucleotide (FGAM)**. in questa reazione si consuma una molecola di ATP, rilasciando ADP e Pi.

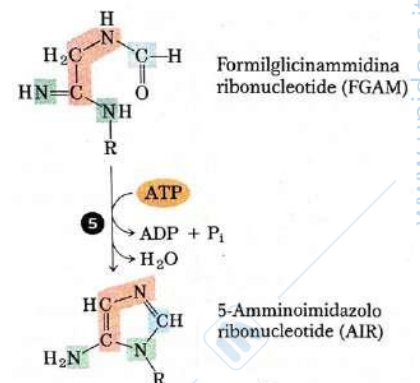
Anche qui si consuma ATP, infatti tutte le volte che entra in gioco la glutamina che cede il gruppo amminico viene consumato un legame ad alta energia.

A questo punto abbiamo **6 atomi** per la formazione del primo anello purinico.



La **5° reazione** è la reazione di ciclizzazione catalizzata da una **ciclastasi**: in questo caso il gruppo aldeidico si trova in prossimità del gruppo amminico secondario e in questo punto si chiude e si forma il **primo anello "imidazolo"** detto **5-ammino-imidazolo ribonucleotide**. in questa reazione si consuma una molecola di ATP.

Il prodotto è il (l'anello è imidazolico) **come quello che si trova nella catena laterale dell'istidina**, però in questo caso abbiamo un gruppo amminico in più, quindi si chiama **amminoimidazolo**.



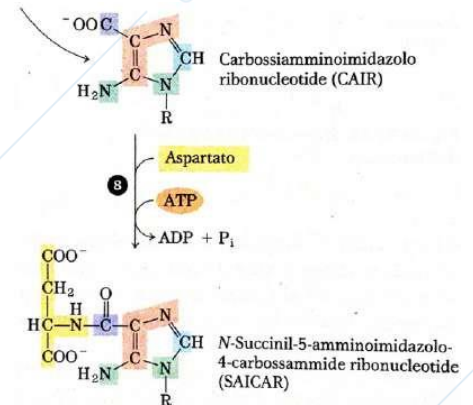
Poi comincia la costruzione del secondo anello che presenta 6 atomi: **Osservando bene si può notare che già 3 dei 6 atomi sono presenti: l'atomo di azoto che lega due idrogeni e i due atomi di carbonio legati da un doppio legame.**

**Nella 6° reazione**, interviene un'enzima **carbossilasi** che catalizza una **carbossilazione** sul 5-ammino-imidazolo-ribonucleotide: In questo caso entra uno ione bicarbonato HCO<sub>3</sub>, che si lega, sotto forma di gruppo carbossile all'atomo di carbonio dell'5-ammino-imidazolo-ribonucleotide che si trasforma quindi in **5-carbossi-ammino-imidazolo-ribonucleotide**. in questa reazione viene consumata ATP che si idrolizza in ADP. A questo punto sono presenti **4 atomi** dell'anello che stiamo costruendo.

La reazione è un esempio di carbossilazione biotina indipendente, in quanto questo enzima carbossilasi agisce senza la presenza del cofattore tipico delle carbossilasi, ovvero la biotina.

**Nella 7° reazione**, viene aggiunto un atomo di azoto tramite l'aggiunta di una molecola di asparato al Carbossi-ammino-imidazolo-ribonucleotide: quindi la molecola di aspartato, attraverso il suo gruppo amminico va a legarsi al gruppo carbossile presente sul Carbossi-ammino-imidazolo-ribonucleotide che successivamente diventa **N-succinil-5-amminoimidazolo-4-carbossammide ribonucleotide**. Nella reazione viene consumata una molecola di ATP che si idrolizza ad ADP+Pi. ~~Dopo questo si libera fumarato, in modo che l'atomo di azoto dato dall'aspartato rimane legato al carbossile.~~

~~Questa reazione assomiglia molto a quella presente nel ciclo dell'urea, tanto che si forma un composto particolare, un intermedio dal nome impronunciabile (N-succinil-5-amminoimidazolo-4-carbossammide).~~



Dopo succede proprio quello che avviene nel ciclo dell'urea: si libera fumarato, cosicché l'atomo di azoto dato dell'aspartato rimanga legato al carbossile.

**Nell'8° reazione**, lo scheletro **carbonioso** dell'aspartato viene rimosso da una **liasi** ed esce come **fumarato**, però al ribonucleotide rimane legato l'azoto proveniente dall'aspartato (sotto forma di gruppo amminico), e si ottiene il composto **5-amino-imidazolo-4-carbossammide ribonucleotide (AICAR)**.

Si è appena formata un'ammide e gli atomi presenti sono 5, perciò ne manca solo uno.

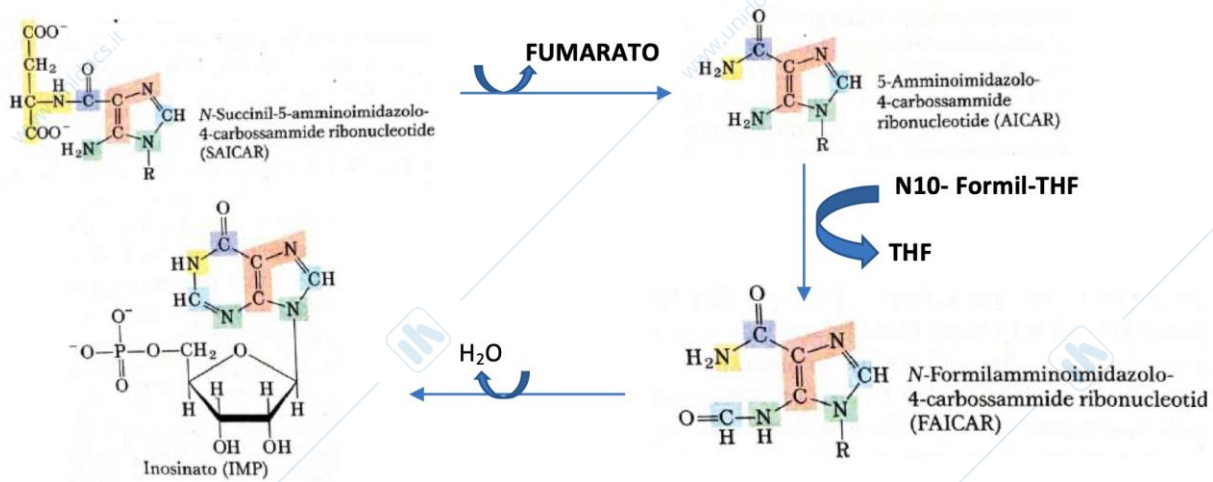
**Nella 9° reazione**, viene aggiunto l'ultimo atomo che è un atomo di carbonio proveniente da un **formil-THF**: quindi il formil-THF cede il suo gruppo formile (H-C=O), che si lega all'atomo di azoto dell'anello in formazione, ottenendo così **N-formil-amino-imidazolo-4-carbossammide ribonucleotide**. e viene rilasciato tetraidrofolato.

**Nell'ultima reazione (10°)** si ha una ciclizzazione, avviene quindi la chiusura e formazione del secondo anello con liberazione di una molecola di H<sub>2</sub>O, formando così il nucleotide **inosinato (IMP)**.

\*\*L'inosinato è un nucleotide purinico, ed è il primo intermedio nella sintesi de novo, che può essere utilizzato per produrre gli altri nucleotidi purinici: **AMP** (adenosin-monofosfato) e **GMP** (guanosina monofosfato), ma non entra nella costituzione degli acidi nucleici.

**L'inosinato (o inosinmonofosfato, IMP) è un nucleotide composto da:**

- - **Anello purinico** (che è la base azotata purina)
- - **Ribosio** (che è zucchero pentoso)
- - **Gruppo fosfato** legato al carbonio 5 del ribosio.



## Formazione di altri nucleotidi purinici a partire dall'IMP :

### Sintesi di AMP a partire di IMP ( Sintesi di Adenina monofosfato)

Si compone di 2 reazioni:

- 1) il gruppo carbonile C=O presente sull'IMP deve diventare un gruppo amminico C-NH<sub>2</sub>. il donatore del gruppo amminico è l'aspartato (come avviene nel ciclo dell'urea): Ad opera dell'enzima **adenilosuccinato sintetasi**, l'aspartato si lega attraverso il suo gruppo amminico al carbonio **chetonico** dell'IMP, formando così l'**adenilosuccinato**. per formare questo legame, questa reazione richiede energia che viene fornita dall'idrolisi della molecola di GTP, che esce come GDP e Pi (questo serve a mantenere la via di sintesi dell'AMP non dipendente dalla presenza di nucleotidi adenilici (ATP/ADP/AMP).
- 2) nella seconda reazione, interviene l'enzima **adenilosuccinato liasi** che rimuove lo scheletro carbonioso dell'aspartato che esce come **fumarato**, mantenendo però il gruppo amminico legato all'adenilatosuccinato che così diventa **Adenilato (AMP)**.

### Sintesi di GMP a partire da IMP ( Sintesi di guanina monofosfato)

Si compone di 2 reazioni:

- 1) la prima reazione è una deidrogenazione dell'IMP catalizzata dall'**enzima IMP deidrogenasi**, e si usano H<sub>2</sub>O che fornisce il gruppo carbonilico, e il NAD<sup>+</sup> come agente ossidante: Quindi vengono estratti 2 idrogeni dalla molecola di H<sub>2</sub>O che successivamente fornisce un gruppo carbonilico all'IMP, trasformandolo nel nucleotide **xantosina-monofosfato (XMP)**, e l'NAD<sup>+</sup> si riduce in NADH.
- 2) Nella seconda reazione, il gruppo carbonilico che è stato aggiunto deve essere sostituito da un gruppo amminico che in questo caso viene fornito dalla **glutammina**: quindi ad opera dell'enzima **amidotransferasi**, al posto del gruppo carbonilico, un gruppo amminico viene legato all'xantosina che si trasforma quindi nel **guanilato (GMP)**. La glutammina perdendo il gruppo amminico esce come glutammato. E viene consumata una molecola di ATP che si idrolizza in AMP e pirofosfato (PPi).

**---> Formazione di ATP e di GTP (Da AMP a ATP) e (Da GMP a GTP):**

Per ottenere il **nucleotide trifosfato**, ciascuno dei nucleotidi monofosfato AMP e GMP va incontro a due reazioni che permettono l'aggiunta di due gruppi fosfato formando ATP e GTP:

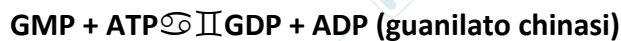
**1° reazione - Da nucleotide monofosfato a nucleotide difosfato:**

in questa reazione viene formato il nucleotide difosfato ad opera dell'enzima chinasi: l'adenilato chinasi (nel caso di AMP) e guanilato chinasi (nel caso di GMP) che agiscono rispettivamente su questi nucleotidi monofosfati, portando alla trasformazione del AMP in ADP (adenosina difosfato), e del GMP in GDP (guanosina difosfato). Il meccanismo di reazione prevede che un nucleotide monofosfato reagisce con una molecola di ATP che trasferisce un gruppo fosfato sul nucleotide, e ci sono due possibilità di reazione a seconda del nucleotide monofosfato di partenza:

**i)** Se il nucleotide monofosfato è AMP, questo reagisce con una molecola di ATP ottenendo **2 molecole di ADP** (ATP perde fosfato diventando la prima molecola di ADP, e AMP prende questo fosfato diventando la seconda molecola di ADP).



**ii)** Se il nucleotide monofosfato è GMP, questo reagisce con una molecola di ATP ottenendo **1 molecola di GDP e 1 molecola di ADP** (ATP perde fosfato diventando la molecola di ADP, e GMP prende questo fosfato diventando la molecola di GDP).

**2° reazione: Da nucleotide difosfato a nucleotide trifosfato:****i) Da ADP a ATP:**

Tutte le volte che viene prodotta **ADP**, questa passa al livello della matrice mitocondriale grazie al sistema antiporto che fa entrare ADP nella matrice e fa uscire ATP: quindi nel mitocondrio l'ADP viene convertita in **ATP** grazie al trasferimento di elettroni nella fosforilazione ossidativa a livello della membrana mitocondriale interna. oppure grazie alla fosforilazione del substrato come avviene nella glicolisi durante il trasferimento di un fosfato dal 1,3-bisfosfoglicerato oppure dal fosfoenolpiruvato.

**ii) Da GDP a GTP:**

il **GDP** per essere convertito in GTP subisce l'azione di una chinasi non specifica (una **nucleoside difosfato chinasi**) detta **NDP-chinasi**, che può agire sul GDP, ma anche su altri nucleotidi difosfato purinici come l'UDP, CDP..

L'enzima **NDP chinasi** utilizza ATP come donatore di gruppo fosfato che viene trasferito sul GDP per formare il **GTP**.

## Regolazione della biosintesi di purine:

### Meccanismi di regolazione:

**1)** Se abbiamo ricchezza di nucleosidi monofosfato, sia di **AMP** che di **GMP**, accade che queste molecole vanno ad **inibire il passaggio da fosfo-ribosil-pirofosfato a fosfo-ribosil-ammina** che è il primo passaggio della biosintesi della via de novo. L'accumulo di IMP (a causa dell'accumulo di AMP e GMP) **blocca il passaggio da fosforibosilfosfato a fosforibosilammina**, e l'IMP si accumula ulteriormente, e si blocca la sintesi di AMP e GMP. Si parla di **inibizione retroattiva sequenziale**.

Inoltre, l'accumulo di AMP **blocca il passaggio da inosinmonofosfato (IMP) all'adenilosuccinato**, aumentando così i livelli di IMP che non proseguono nella sintesi di AMP, quindi l'AMP se aumenta blocca la sintesi di sé stesso. Il **GMP blocca la sintesi della xantosina monofosfato che poi porta alla sintesi di GMP**

**2)** Se si accumula AMP ma non GMP, l'AMP non viene più sintetizzato ma viene sintetizzato il GMP, e viceversa.

**3)** **ADP e GDP inibiscono** la sintesi del **fosforibosilpirofosfato**, quindi se aumentano inibiscono la sintesi de novo di loro stessi.

**4)** La presenza di **ATP** favorisce la sintesi di nucleotidi **guaninici (GMP..)**, mentre la presenza di **GTP** favorisce la sintesi di quelli **adeninici**. C'è un reciproco effetto stimolante.

- Il fatto che questa via metabolica abbia vie di regolazione a più livelli è motivato dalla grande quantità energetica che viene utilizzata. Tutte le volte in cui non c'è bisogno di generare nucleotidi de novo, questa via non deve essere innescata, perché energeticamente è molto costosa; quindi questi sistemi di controllo contribuiscono ad impedire un consumo inutile di energia.

### - VIA DI RECUPERO DEI NUCLEOTIDI PURINICI

La via di recupero riguarda solo i nucleotidi purinici, ed è più importante perché non implica un eccessivo spreco di energia ed è più semplice, quindi minimizza la spesa energetica della sintesi de novo. La via di recupero si fa quando vengono degradati gli acidi nucleici, come l'RNA che viene demolito in continuazione, quindi si recuperano **nucleotidi, nucleosidi e basi azotate libere**. La via di recupero dei nucleotidi purinici è importante perché esiste una patologia (**sindrome di Lesch-Nyhan**) legata a difficienze nell'enzima che gestisce la via di recupero stessa

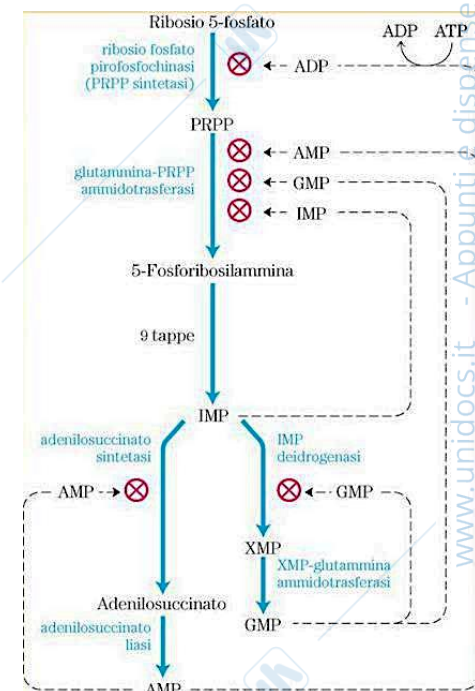
In questa via intervengono 2 enzimi:

- L'enzima **Adenosina fosforibosiltransferasi (APRT)**: recupera come base azotata libera l'adenina, poi fa reagire l'adenina con il **fosforibosil pirofosfato (PRPP)** in modo diretto; e da questa reazione si ottengono **AMP** e **pirofosfato**;

#### Adenina + PRPP $\rightleftharpoons$ AMP + P<sub>i</sub> (adenina fosforibosiltrasferasi)

- L'enzima **ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT)**: recupera la guanina, e l'ipoxantina, ovvero quella molecola che costituisce la base azotata dell'IMP. e lo fa reagire con il fosforibosil pirofosfato ottenendo come prodotti **GMP** e pirofosfato.

#### Guanina + PRPP $\rightleftharpoons$ GMP + P<sub>i</sub> (ipoxantina-guanina fosforibosiltrasferasi)



## Sindrome di Lesch-Nyhan

è una patologia genetica legata al cromosoma X (quindi colpisce più frequentemente gli individui maschili), in cui il gene che codifica la **ipoxantina-guanina fosforibosiltrasferasi** è mutato e che quindi questo enzima non viene sintetizzato. la carenza di questo enzima implica la riduzione dell'utilizzo della via di recupero dei nucleotidi purinici. Questa deficienza porta all'insorgenza di terribili sintomi: per esempio, questi bambini hanno un'attitudine di automutilarsi: mordono le loro dita e anche le labbra, tanto che in alcuni casi una terapia consiste in rimuovergli i denti per impedire questa terribile abitudine. Altri sintomi sono il ritardo mentale, disturbi nello sviluppo del sistema nervoso che porta a microcefalia e convulsioni.

Infine, si hanno dei sintomi simili a quelli della malattia gotta, sintomi come: rigonfiamenti e dolori al livello delle articolazioni. Questo è legato al fatto che le base puriniche (in particolare la guanina) non vengono recuperate, quindi vengono degradate, e dalla loro degradazione si forma acido urico, i cui livelli quindi si alzano. grande quantità di acido urico vanno a depositarsi a livello delle articolazioni provocando una reazione infiammatoria.

## - Via di sintesi de novo dei nucleotidi pirimidinici:

La biosintesi dei nucleotidi pirimidinici è molto più semplice e meno costosa rispetto alla biosintesi delle purine; ~~altra differenza è che non vi sono vie di recupero e le reazioni sono in numero decisamente minore.~~ da questa via si forma un nucleotide pirimidinico (**orotidilato**) da cui si possono generare gli altri nucleotidi **UMP** e **CMP**.

**Nella prima reazione**, si parte dal **carbamil-fosfato**. Il carbamilfosfato in questo caso viene sintetizzato nel citosol grazie all' enzima **Carbamilfosfato sintetasi II**. (mentre il carbamil fosfato necessario alla sintesi dell'urea viene prodotto nei mitocondri da parte dall'altro enzima mitocondriale carbamil fosfato sintetasi I che utilizza lo ione ammonio libero, mentre la carbamilfosfato sintetasi II utilizza glutammina come donatore di azoto, glutammina che diventa poi glutammato);

Ad opera dell'enzima **aspartato trans-carbamilasi**: il fosfato viene rilasciato sotto forma di fosfato inorganico, e il carbamato del **carbamilfosfato** reagisce con il gruppo amminico di una molecola di **aspartato**, formando un legame tra carbammato e aspartato, e otteniamo così **N- carbamil-aspartato**. A questo punto abbiamo gli ingredienti per chiudere l'anello pirimidinico in quanto ci sono 6 atomi: 4 di C e 2 di N.

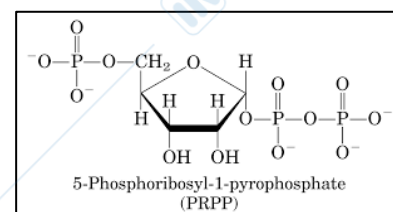
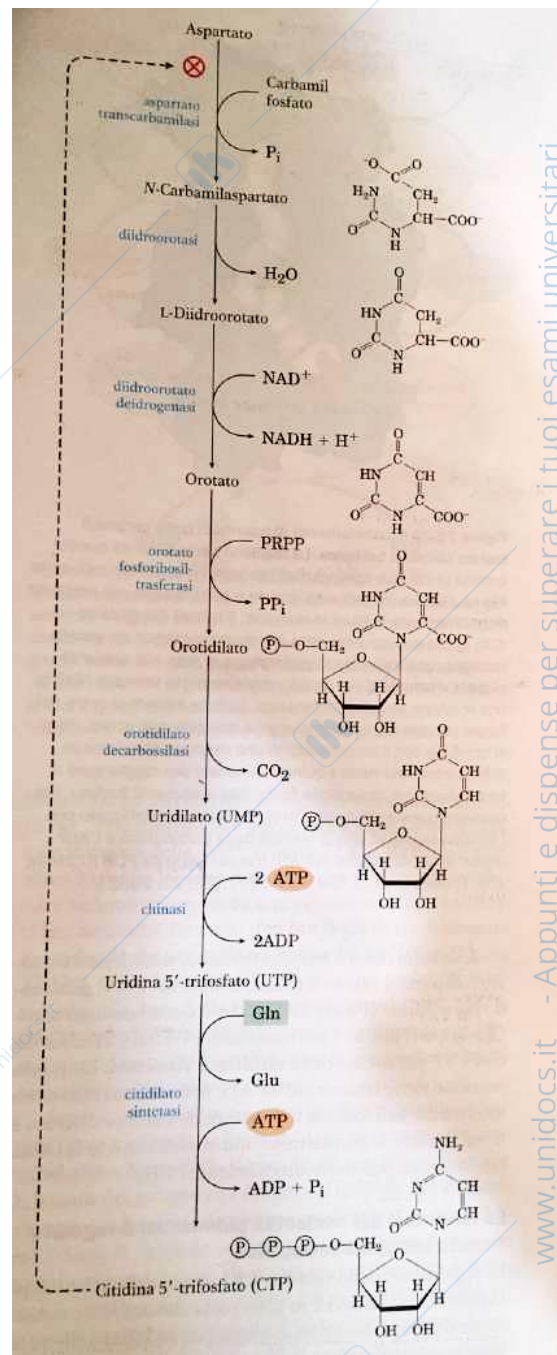
**Nella 2° reazione**, l'anello pirimidinico si ciclizza ad opera dell'**enzima diidroorotasi**: quindi il gruppo carbossile che apparteneva alla catena laterale dell'aspartato si lega al gruppo amminico del carbamato, viene rilasciata una molecola d'acqua, e si forma l'anello **diidroorotato**, e si chiude, senza consumo di energia.

**Nella 3° reazione**, Il diidroorotato, che è già una base azotata pirimidinica, va incontro ad una reazione di ossidazione che è una deidrogenazione NAD-dipendente catalizzata dall'enzima diidroorotato deidrogenasi, per cui il diidroorotato, ossidandosi perde un atomo di idrogeno legato ad un suo carbonio, trasformando un legame singolo in un legame doppio, il diidroorotato si trasforma così nel **orotato**, che è una base azotata pirimidinica. il NAD si riduce in NADH che viene liberato.

**Differenza in questa tappa tra purine e piramidine;** Per le basi puriniche si parte dal fosforibosilpirofosfato che fa produrre necessariamente un nucleotide che contiene la base azotata, quindi non si forma una base azotata libera, la base azotata si costruisce sul ribosio formando un nucleotide. Invece nella sintesi delle basi pirimidiniche si forma la base azotata orotato che non è un nucleotide.

**La 4° reazione** è catalizzata dall'**orotato fosforibosil-transferasi**, e entra in gioco il fosforibosilpirofosfato (PRPP). (questa reazione equivale all'adenina fosforibosiltransferasi e alla ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT) delle vie di recupero delle basi puriniche).

L'orotato reagisce con il fosforibosilpirofosfato, il gruppo pirofosfato legato sul carbonio 1 del fosforibosil-pirofosfato viene eliminato, e il carbonio 1 liberato dal fosfato, va a legarsi tramite un legame N- glicosidico all'atomo di azoto dell'orotato che si trasforma quindi in **orotidilato, che è il primo nucleotide pirimidinico** (OMP/orotidinmonofosfato). ----->



**Il risparmio energetico nella biosintesi di nucleotidi pirimidinici:** In questo caso, il consumo di energia è nella sintesi del carbamilfosfato in cui ho consumato 2 molecole di ATP e nell'attivazione del fosforibosilpirofosfato altre 2 molecole di ATP: quindi ottengo l'OMP con il consumo di 4 molecole di ATP, meno costoso delle 7 molecole di ATP necessarie a formare i nucleotidi purinici.

### Sintesi di UMP a partire da orotidilato:

Dall'orotidilato si possono generare gli altri nucleotidi, **UMP** (uridina monofosfato) e **CMP** (citidina monofosfato).

Il passaggio da orotidilato a UMP prevede una semplice reazione di decarbossilazione, viene perduto il gruppo carbossile legato alla base zotata dell'orotidilato, se ne va sotto forma di CO<sub>2</sub> e si ottiene **UMP (uridina monofosfato)**. Per quanto riguarda gli altri nucleotidi pirimidinici bisogna aggiungere un gruppo amminico per formare la citidina e un metile per la timina.

### **-> Da UMP a UTP:**

Attraverso l'azione di 2 chinasi, si passa da UMP a UTP consumando 2 molecole di ATP:

la prima chinasi forma l'UDP, la seconda forma l'**UTP** (che è un substrato per la sintesi dell'RNA durante la trascrizione).

La seconda chinasi è la nucleoside difosfato chinasi aspecifica.

### Formazione di CTP a partire da UTP:

L'UTP viene convertito in CTP attraverso l'azione di una sintetasi, detta **citidilato sintetasi** che usa glutammina come donatore di gruppo amminico, quindi il gruppo amminico va a sostituire un carbonile sull'uracile dell'UTP trasformando l'uracile in citosina, ottenendo così la base pirimidinica **CTP**, che è anch'esso substrato della RNA polimerasi.

Tutte le volte che viene trasferito un gruppo amminico da una glutammina, questo trasferimento è accompagnato dall'uso di ATP, quindi evidentemente le reazioni di amidazione sono endoergoniche dal punto di vista termodinamico.

## Regolazione della biosintesi di pirimidine

C'è una regolazione a livello del primo stadio della biosintesi, e un'altra regolazione a livello del 2° stadio:

**1)** Nel primo stadio, la regolazione dipende dal **primo enzima carbamilfosfato sintetasi II**, che fa una reazione reversibile, che produce nel citoplasma il carbamilfosfato.

Quando c'è aumento di concentrazione dei nucleotidi pirimidinici UDP e UTP, si genera un segnale di **feedback negativo** che blocca l'enzima carbamilfosfato sintetasi II, bloccando la biosintesi.

L'enzima è attivato dall'**ATP** e dal **fosforibosilpirofosfato**, che quindi causano un effetto di **feedback positivo**.

**2)** Nel secondo stadio la regolazione agisce sul secondo enzima **aspartato transcarbamilasi**, un enzima allosterico attivato da ATP e inibito da CTP, quindi l'ATP è il prototipo che attiva la via di biosintesi delle pirimidine, mentre il CTP, che è il prodotto finale di questa via, è un inibitore.

## BIOSINTESI DEI DEOSSIRIBONUCLEOTIDI

La citosina è una base pirimidinica che entra nella formazione dell'RNA e anche dell'DNA, mentre l'Uracile entra solo nella costituzione del RNA. Il DNA contiene la base pirimidinica Timina al posto dell'uracile.

I nucleotidi presenti nel DNA sono **deossinucleotidi**. Lo zucchero del RNA è il ribosio mentre quello del DNA è il **deossiribosio**; la differenza tra i due zuccheri è che nel ribosio, il carbonio 2 dello zucchero è legato ad un gruppo OH, mentre il carbonio 2 nel deossiribosio è legato solo ad un idrogeno -H.

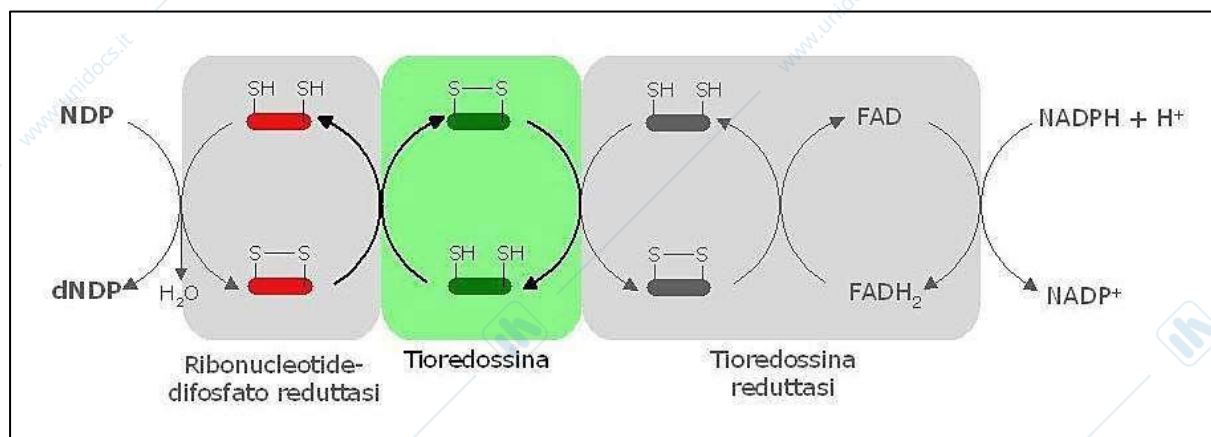
Per cui in questo caso è necessaria una modificazione sul ribosio, perché nel DNA i nucleotidi sono **deossinucleotidi**, quindi non contengono ribosio ma contengono **deossi-ribosio**.

Quindi è necessario **ridurre** il ribosio a deossiribosio, e per fare questo interviene un enzima detto **ribonucleotide reduttasi** che riduce il C2 del ribosio: in questo enzima sono presenti 2 gruppi tioli -SH, da cui si staccano i due idrogeni 2H che si uniscono all'atomo di Ossigeno proveniente dal ribosio del nucleotide, formando una molecola di acqua attraverso cui quindi viene eliminato l'atomo di ossigeno, e così il ribosio diventa **deossiribosio**.

Dopo l'ossidazione dei gruppi tiolici, si forma il ponte disolfuro S-S all'interno dell'enzima ribonucleotide reduttasi che deve essere riportato nella forma ridotta (senno il sistema non funziona più). Ciò succede anche per la piruvato deidrogenasi, il meccanismo è sempre quello: se l'enzima si modifica durante la reazione, per poter poi proseguire il ciclo e dar luogo ad altre reazioni successive, si deve ripristinare la condizione iniziale.

Quindi il ponte disolfuro deve essere riportato allo stato ridotto riformando i gruppi SH.

Per far questo interviene una proteina che si chiama **Tioredoxina**, che ha due gruppi -SH ridotti, sono loro che donano l'idrogeno al ponte disolfuro della ribonucleotide reduttasi riportandola alla condizione iniziale, per cui la tioredossina a sua volta si ossida, formando il ponte disolfuro **S-S** su di essa, quindi interviene un altro enzima detto **tioredossina reduttasi**, che contiene due gruppi SH liberi che riducono il ponte disolfuro della tioredossina riportandola nella condizione ridotta, e a sua volta la tioredossina reduttasi si ossida formando il ponte disolfuro. Alla fine però interviene finalmente una molecola di **FAD ridotto (FADH)** che riduce il ponte disolfuro della tioredossina reduttasi riportandola nelle condizioni iniziali, il FADH si ossida a FAD<sup>+</sup>, e il FAD<sup>+</sup> torna a FADH grazie a una molecola di **NADPH**, l'agente riducente classico. Quindi, alla fine tutto il sistema utilizza **NADPH (NADP ridotto)**, che agisce come agente riducente affinché il ribonucleotide possa diventare **deossiribonucleotide**.



Nel sito attivo di questa ribonucleotide reduttasi c'è un cluster che non si è mai visto, c'è un gruppo Fe-O-Fe, c'è un atomo d'ossigeno che è fa da ponte fra due ioni Fe. In questo caso il ferro non è inserito all'interno di gruppi eme, non è un classico centro ferro-zolfo. Quindi il ferro si può trovare all'interno di proteine, enzimi, nell'eme, nei cluster ferro-zolfo più o meno complessi, e lo ritroviamo ancora in un'altra forma, questo gruppo Fe-O-Fe, circondato da amminoacidi. In prossimità di questo gruppo si trova una tirosina che nel meccanismo d'azione della ribonucleotide reduttasi forma un radicale tirosile.

## Biosintesi del nucleotide TMP (timidilato) da CDP e UMP:

il timidilato viene formato a partire dal UDP (che a sua volta deriva dall'orotidilato)

il nucleotide pirimidinico TMP è prodotto dal dUMP e l'enzima che catalizza la reazione è il **timidilato sintasi**; il donatore del gruppo metilico è il **metilen-tetraidrofolato** con il frammentino monocarbonioso. Il metilen-tetraidrofolato cede il gruppo metilene CH<sub>2</sub>, ma deve essere legato il gruppo metile CH<sub>3</sub>, per cui il tetraidrofolato nell'andare a metilare l'uracile per andare a formare la timina, si ossida da tetraidrofolato a diidrofolato.

Affinche il processo può essere ripetuto, serve un altro dUMP ma è necessario che il diidrofolato si riduce a metilen-tetraidrofolato, Per farlo, serve per prima la riduzione del diidrofolato a tetraidrofolato, reazione catalizzata da un'enzima che si chiama **diidrofolato reduttasi**, che utilizza il NADPH come agente riducente. Poi il tetraidrofolato acquista la catena laterale di una molecola di serina, che diventa glicina, e il tetraidrofolato diventa metilen-tetraidrofolato ed è pronto a metilare una nuova molecola di dUMP.

Questo sistema è così importante perché è un bersaglio farmacologico, se viene ostacolata la sintesi del TMP di fatto si ostacola la sintesi del DNA, mentre la sintesi del RNA continua ad avvenire; ostacolando questo processo biochimico si interferisce nella duplicazione delle cellule ma non con la sintesi delle proteine, dal momento che l'RNA continua ad essere prodotto. Di conseguenza, le cellule con scarsa attività mitotica, bloccando questo sistema biochimico, non risentono del farmaco contrariamente a quelle con spiccata attività mitotica (all'interno di questa categoria rientrano pure le cellule tumorali).

Quindi i farmaci che bloccano questo processo biochimico sono in grado di colpire le cellule tumorali, tuttavia esso è un sistema poco selettivo, in quanto colpisce indistintamente le cellule che si duplicano, ci saranno dunque degli effetti collaterali.

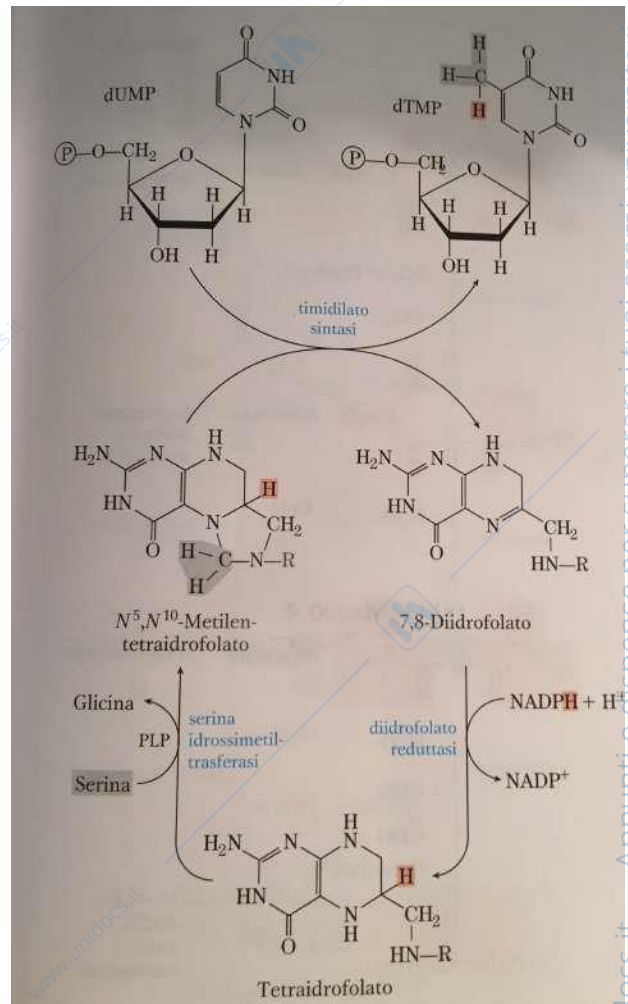
Ci sono diversi farmaci che colpiscono questo sistema, uno molto noto è il **fluorouracile**, in cui c'è un atomo di F legato all'anello dell'uracile al posto di un atomo di H. Quando questa molecola va a legarsi al sito attivo della **timidilato sintasi**, forma un legame covalente e la inattiva rendendola inutilizzabile, dunque il dTMP non è più prodotto.

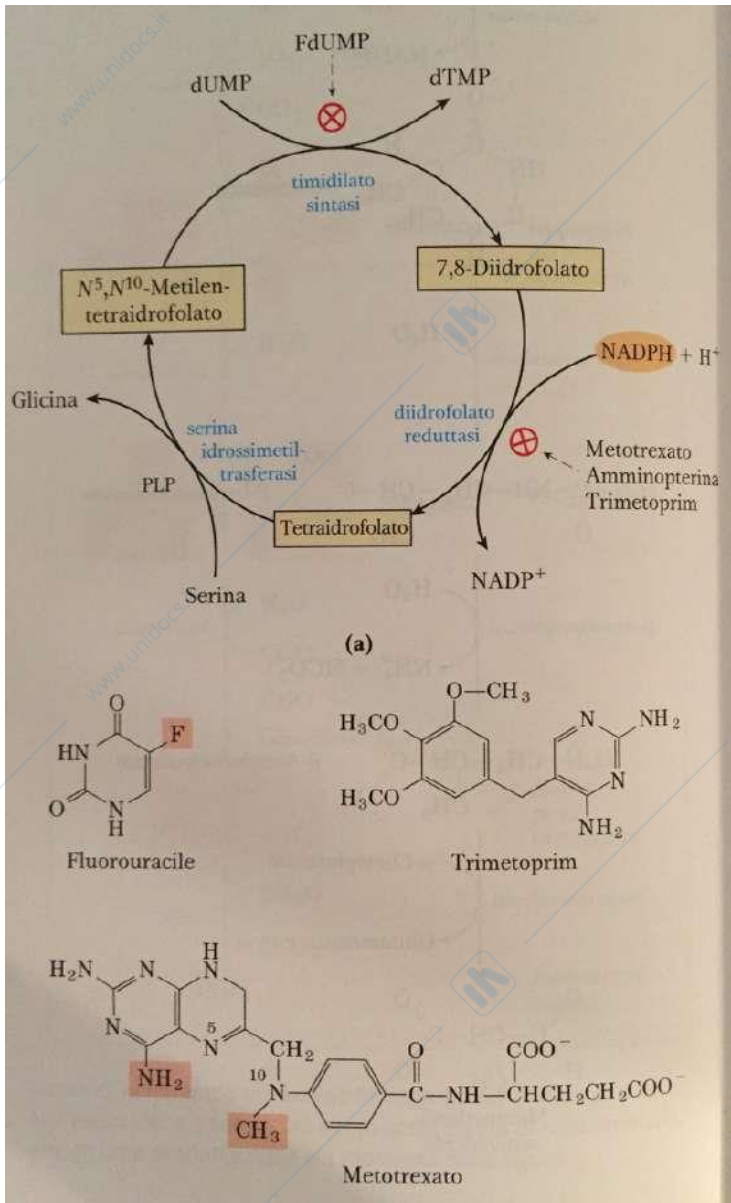
È possibile rinforzare questa azione: nel caso in cui l'enzima dovesse comunque funzionare generando dTMP si formerebbe anche il Diidrofolato, e perciò è possibile colpire la **deiidrofolato reduttasi** utilizzando delle molecole come **metotrexato** e **amminopterina** che inibiscono la diidrofolato reduttasi, impedendo di fatto al deiidrofolato di tornare a tetraidrofolato.

Un'altra molecola la **trimetoprim** ha un'azione molto simile al metotrexato, ovvero un'azione inibitoria sulla diidrofolato reduttasi, solo che il trimetoprim a differenza del metotrexato ha una discreta selettività:

- blocca specificamente la deiidrofolato reduttasi di microrganismi, in particolar modo di batteri e di protozoi
- solo a concentrazioni molto alte blocca anche la deiidrofolato reduttasi umana. Quindi è possibile utilizzare dosi di trimetoprim tali da bloccare la deiidrofolato reduttasi dei microrganismi, senza avere effetti collaterali.

Il fluorouracile invece si lega al metilen-tetraidrofolato, quando è sotto forma di nucleotide, e il complesso entra nel sito attivo dell'enzima timidilato sintasi e lo blocca in maniera definitiva.





## Degradazione delle purine (formazione dell'acido urico)

La degradazione delle purine avviene tramite una sequenza di reazioni. Inanzitutto avviene una prima reazione di idratazione, catalizzata dagli enzimi **nucleotidasi** che staccano i fosfati, quindi da nucleotidi si passa a nucleoside:

### Nel caso del nucleotide purinico GMP:

Ad azione delle nucleotidasi, il GMP perde il fosfato e diventa il nucleoside **guanosina**. Successivamente, l'enzima **nucleosidasi** stacca lo zucchero dalla guanosina, liberando **guanina** come base azotata libera. Poi, interviene l'enzima **guanina deamminasi** che stacca il gruppo amminico dalla guanina trasformandola in **xantina**, e ad opera dell'enzima **xantina ossidasi** viene aggiunto un ossigeno alla xantina trasformandola in **acido urico**, che viene escreto con le urine.

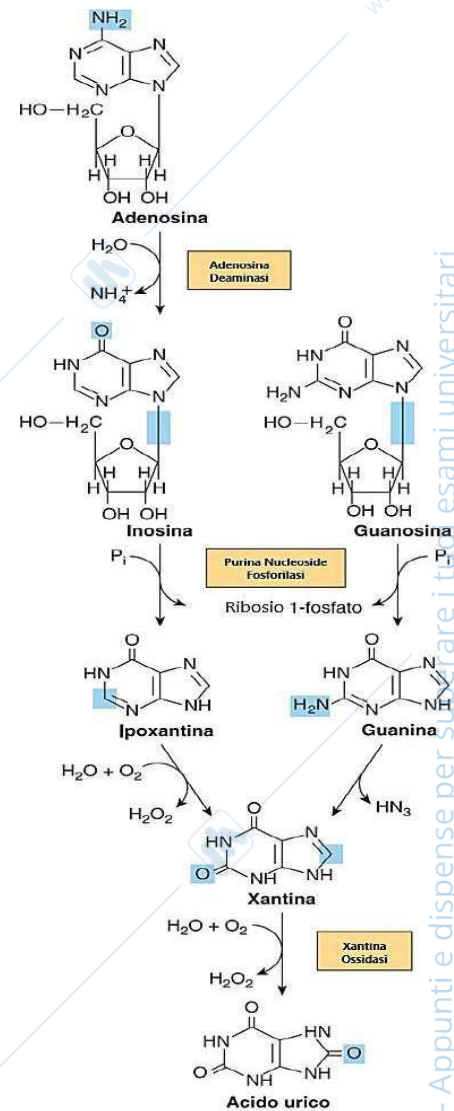
### Nel caso del nucleotide purinico AMP:

Ad azione delle nucleotidasi, l'AMP perde il fosfato diventando il nucleoside **adenosina**, l'adenosina subisce l'azione dell'enzima **adenosina deamminasi** che deammina l'adenosina che quindi diventa **inosina** (anch'essa un nucleoside), l'inosina viene poi idrolizzata nella base purinica **ipoxantina**, e in ribosio. l'ipoxantina poi viene ossidata dall'enzima **xantina ossidasi**, utilizzando l'ossigeno molecolare e una molecola di acqua, e l'ipoxantina quindi diventa **xantina**. Successivamente viene aggiunto un ultimo atomo di ossigeno alla xantina formando **acido urico**.

L'**acido urico** viene escreto con le urine, ed è una forma importante di eliminazione dell'azoto oltre all'urea.

## Uricemia e la patologia Gotta

L'**acido urico** verrà eliminato dal nostro organismo. Se la quantità di acido urico nel sangue (uricemia) diventa troppo alta (ovvero oltre i 7mg/dL), si determina una condizione di iperuricemia, e l'eccesso di acido urico può essere trasformato in **allantoina** dall'azione dell'enzima urato ossidasi. A quote elevate di acido urico vi è la possibilità che cristalli di urati si depositino a livello articolare, richiamando cellule infiammatorie che possono dar luogo a un processo infiammatorio importante. Questa situazione patologica si chiama **Gotta**, il farmaco utilizzato regolarmente è l'allopurinolo, una molecola simile all'ipoxantina (~~differiscono solo per aver invertito due atomi dell'anello~~). questa molecola entra nel sito attivo della xantina ossidasi e la blocca, impedendo dunque la formazione di nuovi urati, non si forma più acido urico e quindi il processo infiammatorio viene più provocato.



## Catabolismo delle pirimidine

Consiste in un processo di demolizione dell'anello pirimidinico (**da non imparare**): l'uracile viene ridotto a diidrouracile, l'anello viene aperto e si forma dunque una particolare molecola da cui sarà ottenuta beta-alanina e tramite altre reazioni si otterrà acido malonico/metil-malonico, che sono intermedi metabolici abbastanza noti.

Il nucleotide è il CMP, e viene prima tolto il fosfato, poi lo zucchero e poi viene degradata la base. Si forma il nucleotide corrispondente, che è la citidina, e poi c'è la citidina-deaminasi che fa la reazione di idrolisi di questo gruppo NH<sub>2</sub>, e si forma l'uridina. All'uridina ci si può arrivare anche attraverso ovviamente l'attività della nucleotidasi sull'UMP, in cui l'UMP perde il fosfato e si converte in uridina. Quindi l'uridina è un punto di convergenza sia del CMP che dell'UMP.

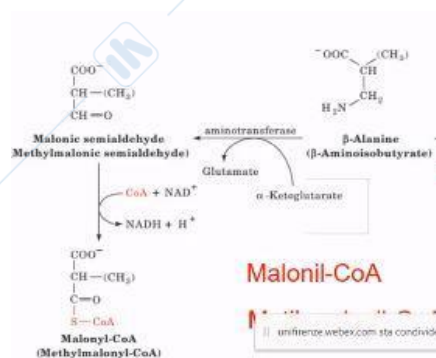
È messa anche la degradazione della terza base pirimidinica, che è la timina, solo che la timina è legata al deossiribosio, quindi il punto di partenza è dTMP. CH<sub>3</sub> è il DTMP, se al posto del CH<sub>3</sub> c'è un protone allora si parla di uracile. Si può quindi avere uridina o deossitimidina, a seconda se ci sia un metile o un atomo di idrogeno.

A questo punto si toglie lo zucchero, è una reazione che produce ribosio-1-fosfato, e si forma la corrispondente base, o uracile o timina. La reazione di degradazione non è complicata perché è simile al processo biosintetico, uracile o timina vanno incontro a una deidrogenasi, si perdono due elettroni e il doppio legame viene ridotto. I due elettroni persi dal NADPH servono per ridurre questo doppio legame, e si forma diidro-uracile o diidro-timina.

A questo punto, un'idratasi fa un'idrolisi di questo legame ammidico, e si forma il beta-ureidopropionato. C'è poi un'altra reazione da parte di un'idratasi, che è la beta-ureidopropionasi, che catalizza il distacco di un gruppo NH<sub>2</sub> e un bicarbonato, e rimane la beta-alanina. Beta-alanina significa che il gruppo NH<sub>2</sub> è sul carbonio beta. Quello che è successo è una reazione idrolitica in due livelli, esce NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, esce CO<sub>2</sub> e rimane la beta-alanina.

La beta-alanina è soggetta a una reazione di transaminazione, da parte di una transaminasi, e quindi c'è il trasferimento del gruppo NH<sub>2</sub> dalla beta-alanina sull'alfa-chetoglutarato, che diviene glutammato, e chiaramente la beta-alanina si converte nella semi-aldeide dell'acido malonico.

Quest'ultimo composto va incontro a una reazione di ossidazione da parte del NAD<sup>+</sup>, il quale viene ridotto in NADH, e l'aggancio del coenzima A sul carbossile permette la formazione del malonil-CoA. Questo può essere usato come precursore biosintetico degli acidi grassi, se invece è il metil-malonil-CoA, si ottiene il Succinil-CoA (reazione anaplerotica del Ciclo di Krebs). Quindi, anche il catabolismo delle pirimidine porta alla formazione di ammonio, il cui eccesso va a finire nel ciclo dell'urea.



# Biochimica Ormonale e sistematica

## CLASSIFICAZIONE DEGLI ORMONI

Gli ormoni si possono classificare in idrofili e lipofili, oppure in base alla natura chimica in: ormoni derivati da aminoacidi, ormoni proteici, e ormoni derivati da molecole lipidiche.

**Ormoni lipofili** → Per circolare nel sangue, devono essere associati a molecole carrier specifiche, perché non possono stare in un ambiente acquoso come il plasma. Esistono molecole specifiche (carrier) e molecole aspecifiche generali (albumina). L'ormone non è funzionale quando è associato a molecole trasportatori; deve perdere questa associazione per poter funzionare. Inoltre, gli ormoni lipofili attraversano bene la membrana, infatti hanno **recettori intracellulari**, che possono essere anche nucleari. Un ormone di natura lipofila non ha secondi messaggeri perché è lui stesso che entra all'interno della cellula e va ad attivare o inibire la trascrizione genica.

**Ormoni idrofili** → questi non hanno bisogno di un carrier solitamente, circolano tranquillamente nel sangue, hanno recettori di membrana sulla superficie perché non riescono ad attraversarla, per questo hanno una serie di secondi messaggeri (cAMP, Ca<sup>2+</sup>) che vanno ad agire sulla trascrizione.

In entrambi i casi, la modalità è diversa ma alla fine quello che succede è la modifica della trascrizione. Tanto più un ormone è lipofilo tanto meno è conservato perché passa la membrana, quindi viene sintetizzato e rilasciato. Invece, nel caso delle catecolammine (adrenalina e noradrenalina) esse sono conservate in vescicole intracellulari e solo in seguito a uno stimolo c'è la fusione della vescicola che contiene l'ormone con la membrana plasmatica e viene rilasciato all'esterno. Riepilogando, i recettori sono classicamente nucleari o citoplasmatici per i lipofili o di membrana per gli ormoni peptidici e le catecolammine.

## RECETTORI:

### Recettori accoppiati alle proteine G

Il legame di un ligando esterno (S) al recettore (R) attiva una proteina intracellulare che lega il GTP (G), che a sua volta regola un enzima (Enz), che genera un secondo messaggero intracellulare, X.

### Recettore con attività tirosina chinasi

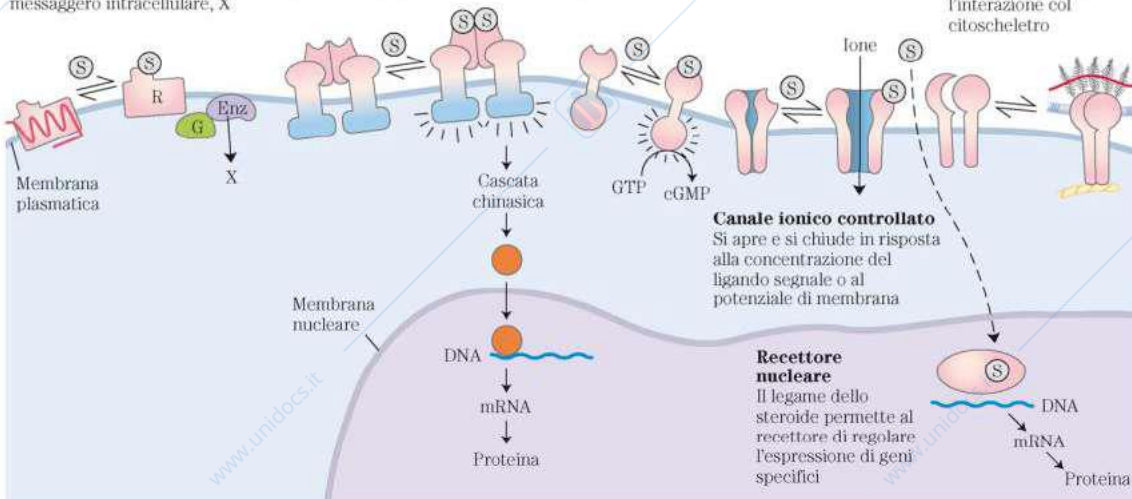
Il legame del ligando innesca l'attività tirosina chinasi per autofosforilazione.

### Recettore con attività guanil ciclasica

Il legame del ligando al dominio extracellulare stimola la formazione del secondo messaggero, il cGMP.

### Recettore di adesione (integrina)

Legna molecole della matrice extracellulare, cambia la propria conformazione ed altera l'interazione col citoscheletro.



## RECETTORI DI MEMBRANA

1. **RECETTORI ACCOPPIATI ALLE PROTEINE G**
2. **CANALI IONICI**
3. **Recettori dotati di un'attività enzimatica.** Es: **recettori accoppiati A TIROSINOCHINASI**; reclutano un enzima all'interno della cellula.
4. **RECETTORI ATTIVATI MEDIANTE PROTEOLISI LIMITATA.**

### 1. RECETTORI ACCOPPIATI ALLE PROTEINE G

Sono recettori di membrana costituiti di 7 domini transmembrana proteici detti **7-spanning-membrane-domains**. le sue porzioni transmembrana sono costituite prevalentemente da alpha eliche idrofobe, poi abbiamo una parte N-terminale fuori dalla cellula e una parte C-terminale all'interno della cellula. Questi recettori si associano ad un trasduttore che sono le proteine G, che sono proteine trimeriche (alfa, beta, gamma).

Le proteine G sono una classe di molecole evolute come "interruttori" che hanno due stati: uno attivo quando lega GTP e uno inattivo quando lega GDP. le proteine G fungono anche da enzimi idrolasi del GTP. La proteina G sta attaccata alla faccia intracellulare o citosolica della membrana.

**Quando il recettore si attiva, la proteina G si attiva, e le sue 3 subunità si staccano:**

- La subunità alfa va a regolare un **effettore** (come l'adenilato ciclasi, fosfolipasi C, SRC), che cambia a seconda dell'ormone.
- Le subunità beta-gamma fanno sempre la stessa cosa: si occupano della desensitizzazione e della terminazione del segnale.

**Cosa succede al recettore quando arriva il segnale ormonale?**

- Il recettore interagisce con l'ormone, cambia conformazione e attiva la proteina G.
- Il cambio di conformazione permette alla proteina G un'interazione proteina-proteina.
- La subunità alpha si stacca dalle subunita' beta-gamma, che invece rimangono associate insieme.
- La subunità alpha leggerà un GTP.
- La subunità alpha va verso l'effettore attivandolo. mentre, le subunità beta-gamma rimangono ancora vicino al recettore.

**ESEMPIO:** Se l'effettore è l'adenilato ciclasi che ciclizza l'ATP formando cAMP (AMP ciclico; un secondo messaggero), successivamente si aumenta la concentrazione dell'cAMP, che attiva proteina chinasi A [**PKA**] (trasduttore del segnale). Questa proteina è fatta di quattro subunità di cui due inibitorie che si staccano per l'aumento di concentrazione del cAMP consentendo alle subunità catalitiche di attivarsi e andare a fosforilare vari substrati (ad esempio la glicogeno fosforilasi, i canali per il potassio...). Inoltre, quando si attiva la subunità catalitica espone sequenze di localizzazione nucleare, entra nel nucleo e fosforila la proteina **CREB** (proteina che lega l'elemento CRE). **CRE è una sequenza palindromica del DNA nel promotore a monte di tutti i geni regolati dagli ormoni che sono attivi sull'adenilico ciclasi. CRE= elemento di risposta all'cAMP.**

CREB fosforilata lega un elemento sul promotore e lega P300-CBP che è una istone-deacetilasi che deve acetilare gli istoni in modo che la cromatina sia resa accessibile alla trascrizione. Questo complesso che lega il promotore permette la trascrizione del gene e la produzione di una proteina che svolgerà la risposta generata inizialmente dal segnale ormonale. Quando la proteina G leggerà il GDP e ritornerà nella sua fase inattiva, l'effettore si spegne e il segnale è finito.

Le subunità delle proteine G sono ancorate alla membrana attraverso zone lipofile, queste zone lipofile sono delle ancore lipidiche che possono essere:

- un acido grasso  $\text{C}_{16}$  acido palmitico o acido miristico.
- Prenile  $\text{C}_{15}$  gruppo farnesilico o geranilico. In questo caso si tratta quindi di frammenti di 10/15/20 atomi di carboni (multipli di cinque in quanto sono derivati dall'isoprene, costituito da 5 atomi di carbonio).

## 2. RECETTORI AD ATTIVITÀ ENZIMATICA

### i) Recettori ad attività tirosino-chinasica (Tirosino chinasi)

Sono recettori dotati di attività catalitica sul dominio intracellulare. Il recettore è monomero sulla membrana e quando lega l'ormone dimerizza. Dopodiché avviene una **trans fosforilazione** cioè le due subunità unite si fosforilano a vicenda. Il dimero così fosforilato è più attivo e svolge la seconda attività di fosforilazione chiamata **cis- fosforilazione**. Ogni subunità fosforila su sé stessa le varie tirosine del recettore (possono essere fino a 15 tirosine, a seconda del tipo di recettore).

Successivamente vengono reclutate proteine effettrici: fosfatidil inositolo 3 chinasi (**PI3 chinasi**), fosfolipasi C gamma, GTP. Queste proteine regolano a loro volta i segnali: la fosfatidil inositolo 3 chinasi regola un segnale di sopravvivenza attraverso la fosforilazione della cosiddetta "proteina GAP" che regola l'attività delle piccole GTPasi quindi attiva una via di trasduzione del segnale mitotica, la fosfolipasi C gamma è un generatore di secondi messaggeri lipidici che vanno a regolare la concentrazione di calcio e il tipo di lipidi sulla membrana.

### ii) Recettore del monossido di azoto

È un recettore dotato di un'attività enzimatica, che reagisce con il monossido di azoto innescando una risposta cellulare. Esempio: nelle cellule muscolari lisce.

Innanzitutto, il monossido di azoto viene sintetizzato dalle cellule endoteliali in seguito ad uno stimolo nervoso acetilcolina-dipendente che attiva l'enzima **sintasi dell'ossido nitrico (NOS)**. Questo enzima catalizza due reazioni che dipendono dal NADPH, a partire da un substrato che è l'amminoacido **arginina**, e da queste reazioni si ottengono come prodotti: il **monossido di azoto**, e la citrullina che rientra nel ciclo dell'urea.

Il monossido di azoto è un mediatore paracrino perché è molto reattivo e non può stare nel circolo per tanto tempo.

l'NO poi fuoriesce rapidamente dalla cellula endoteliale e raggiunge la cellula muscolare liscia, sulla cui membrana è presente il recettore del monossido di azoto.

#### il recettore del monossido di azoto:

- è costituito da due subunità;
- presenta un gruppo eme con un atomo di ferro.

Questo atomo di ferro viene ossidato dal radicale libero del monossido di azoto e induce una modifica conformazionale nel tetrapirrolo e dunque nelle due subunità e, di conseguenza attiva la componente enzimatica del recettore che svolge un'attività di **guanilato ciclasi** che produce il **GMP ciclico (cGMP)** a partire dal GTP.

il GMP ciclico a sua volta inibisce la miosina dal contatto con l'actina, determinando così il rilassamento della muscolatura liscia.

## RECETTORI ASSOCIATI A CANALI IONICI

Questi recettori hanno poco o nulla in comune con i recettori precedentemente osservati, parliamo dei canali ionici.

Sono costituiti da una proteina di membrana, solitamente multimerica, che attraversa la membrana 4-5, mai 7 volte, si associano e formano un canale che si trova chiuso finché non avviene l'interazione con

l'ormone che induce una modifica conformazionale sulla subunità che ha interagito con l'ormone e che si propaga alle altre subunità permettendo l'apertura del canale ed il passaggio dello ione. Ci sono canali molto disparati così come sono diversificati anche gli ioni che li attraversano, qui in particolare è riportato il recettore per l'acetilcolina, un ormone che presenta più tipologie di recettori: esistono i recettori **nicotinici** ed i recettori **muscarinici**, inibiti rispettivamente dalla nicotina e dalla muscarina, quest'ultima presente in una specie di fungo. Sono due classi di recettori che rispondono entrambi all'acetilcolina ma con criteri differenti. I recettori nicotinici sono quelli rappresentati nell'immagine sulla sinistra; strutture semplici che si basano sull'apertura e sulla chiusura del canale. I muscarinici invece sono del tipo accoppiati alle proteine G, un po' più complicati. Lo stesso ormone presenta recettori diversi per svolgere funzioni diverse.

Esistono poi due recettori differenti per ciascuna tipologia (2 nicotinici e 2 muscarinici) per differenziare ulteriormente le varie segnalazioni.

Parlando dei recettori nicotinici abbiamo detto che si tratta di strutture semplici, "buchi" nella membrana. Tuttavia questi "buchi" possono presentare una certa regolazione: esiste uno stato di riposo, in cui il canale è chiuso e l'ormone non è arrivato; uno stato di eccitazione in cui l'ormone ha interagito con il recettore ed il canale è

aperto; e poi esiste uno stato desensitizzato, in cui il canale non è né ben aperto né completamente chiuso, dovuto ad una situazione in cui l'ormone è rimasto un po' troppo al lungo. In questo caso è solo una questione sterica, conformazionale, ovvero non vi è l'azione della beta arrestina che induce la fosforilazione, c'è solo la presenza di questi tre stati.

## RECETTORI ATTIVATI MEDIANTE PROTEOLISI LIMITATA

Questa è l'ultima classe di recettori ("*molto strani*"). Sono dei recettori attivati per **proteolisi limitata**, ovvero un'idrolisi di un legame covalente peptidico non su tutta la proteina ma appunto limitato solo ad un segmento della proteina che viene quindi "scorciata" e in questo modo attivata. Abbiamo già osservato nel metabolismo delle proteine come questo fenomeno funzioni in maniera ottimale nel nostro tratto digerente dove gli zimogeni vengono infatti attivati per proteolisi limitata.

Questi recettori sono molto coinvolti nello sviluppo ontogenetico, ovvero nel differenziamento.

Sono dei recettori di membrana costituiti da grandi proteine che vengono protolizzati quantomeno due volte:

- **il primo taglio** avviene nel reticolo del golgi durante la maturazione della proteina, prima dell'esposizione alla membrana (nell'immagine possiamo vedere come questo taglio avvenga sul sito 1 prima che avvenga l'interazione con l'ormone). A questo punto la proteina viene esposta sulla membrana citoplasmatica e le due subunità proteiche che si sono venute a formare in seguito al primo taglio proteolitico si vanno ad associare tramite un'interazione proteina-proteina e per un legame covalente;
- a questo punto avviene l'interazione con un ligando per questo recettore, solitamente una proteina di membrana di un'altra cellula (parliamo allora di una segnalazione eterotipica)

nella fattispecie nell'immagine possiamo osservare l'interazione tra il recettore **NOTCH** ed il ligando **Delta** (proteine riconosciute durante degli studi effettuati sui drosophila ma che presentano gli stessi nomi anche nell'uomo). Delta

interagisce con la subunità extracellulare di NOTCH e induce il **secondo taglio** su NOTCH da parte di una proteasi vicina alla membrana. NOTCH a questo punto perde la subunità extracellulare che resta attaccata a Delta, mentre la porzione extracellulare della subunità transmembrana subisce una proteolisi limitata che porta all'attivazione di NOTCH;

- questa attivazione prosegue all'interno della cellula che porta ad un **terzo taglio** che questa volta avverrà sul versante citosolico portando al distacco della componente citosolica della proteina e lasciando adesa alla membrana solo la porzione idrofobica .

Questa porzione citosolica della proteina, una volta separata dalla componente che la legava alla membrana, si trova libera all'interno del citoplasma e migra all'interno del nucleo dove andrà ad associarsi con dei fattori trascrizionali andando a regolare l'espressione genica.

Quindi possiamo osservare come i meccanismi terminali di queste segnalazioni siano sempre gli stessi, a modificarsi, anche ampiamente, sono le metodologie di ricezione del segnale che osserviamo a livello della membrana.

## SECONDI MESSAGGERI;

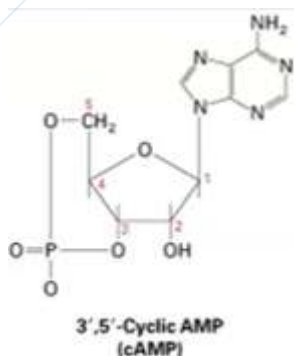
Secondi messaggeri sono molecole di segnalazione intracellulare rilasciate dalla cellula.

Esistono 3 principali famiglie di secondi messaggeri: Molecole idrofobiche: diacilglicerolo e fosfatidilinositolo con i suoi derivati. Molecole idrofile: cAMP, cGMP, IP3 ed il Ca. Molecole gassose: l'ossido nitrico (NO) ed il monossido di carbonio (CO).

## IL cAMP

L'AMP, ciclico o **adenosino monofosfato 5'-3' ciclico**, è costituito dalla base azotata adenina legata tramite un legame N-glicosilico al ribosio ed i carboni 3 e 5 del ribosio sono legati da un legame fosfodiesterico ciclico che è stato sintetizzato dall'enzima **adenilato ciclasi** a partire da una molecola di ATP. Questo secondo messaggero ha poi un sistema per essere recepito dalla cellula che prende il nome di **PKA**, protein chinasi AMP ciclico dipendente. Il cAMP è un secondo messaggero molto utilizzato, ad esempio lo troviamo nelle segnalazioni mediate dall'adrenalina, dall'ormone adreno-corticotropo, dal glucagone, dall'ormone follicolo-stimolante, dall'ormone luteinizzante, dall'ormone tireotropo, dall'ormone paratiroideo, dalla vasopressina, da diverse

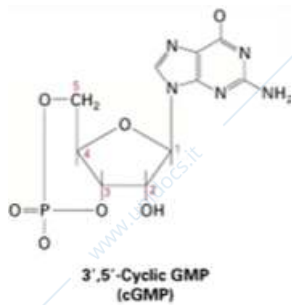
prostaglandine, ed altri ancora. Possiamo quindi dire che questo secondo messaggero è molto utilizzato, forse il più utilizzato, motivo per cui è stato il primo ad essere scoperto e caratterizzato come secondo messaggero.



## IL cGMP

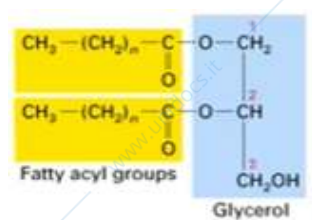
Molto simile al primo troviamo il **guanosin monofosfato ciclico**, la cui unica differenza dal cAMP sta nella base azotata che non è più un'adenina ma una guanosina, per il resto ritroviamo la stessa struttura già osservata. Ovviamente questa volta troveremo l'enzima **guanilato ciclasi** che andrà a formare il nostro secondo messaggero a partire da una molecola di GTP.

Viene percepito anche lui dalla cellula da una protein kinasi in questo caso una **PKG** ovvero proein kinasi GMP ciclico dipendente. Un'altra caratteristica che accomuna questi due secondi messaggeri è che possono essere entrambi idrolizzati dalle **fosfodiesterasi**, degli enzimi specifici per ciascuno dei due secondi messaggeri che vanno a distruggerli appunto per idrolisi. Quindi per controllare la concentrazione di questi secondi messaggeri posso agire sia sull'enzima che li sintetizza che su quello che li distrugge, attivandoli o inibendoli. Ad esempio nella visione inibiamo una fosfodiesterasi.



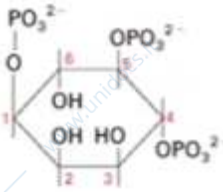
## DAG

Un altro secondo messaggero è il **diacil glicerolo**. Un glicerolo, che presenta tre atomi di carbonio, in cui la prima e la seconda posizione rimangono esterificate ad un acido grasso mentre la terza no, così come avviene nei fosfolipidi solo che questi ultimi presentano anche un gruppo fosfato con una testa polare. Questo secondo messaggero deriva infatti da un fosfolipide a cui è stata rimossa la testa polare.



## IP3

In questo caso il secondo messaggero è costituito da una testa polare. L'**inositolo 1,4,5 trifosfato**, lo abbiamo già osservato parlando dei meccanismi di rilascio del calcio dai depositi del reticolo endoplasmatico. Per comprendere la relazione tra l'IP3 e il DAG pensiamo alla struttura del fosfatidil inositolo, un fosfolipide molto importante nelle membrane biologiche, possiamo osservare come questo sia solitamente fosforilato in posizione 4 e 5, in più c'è il gruppo fosfato che sta a ponte tra la testa polare e il glicerolo. Se un enzima idrolizza il legame in terza posizione liberando la testa polare ci dà il diacil glicerolo. IP3 e DAG sono in connessione.



## Ca<sup>2+</sup>

Le due molecole appena descritte sono in relazione non solo tra loro ma anche con un altro secondo messaggero che è il calcio. Essendo il messaggio qualcosa che posso recepire/rilevare, anche uno ione come il calcio la cui concentrazione viene mantenuta bassa all'interno della cellula, può fungere da secondo messaggero mediante un aumento della sua concentrazione intracellulare, un messaggio che verrà recepito grazie ad una serie di proteine in grado di legare il calcio la cui capostipite è una proteina molto piccola chiamata **calmodulina**. Questa proteina è solitamente una subunità di proteine multimeriche calcio dipendenti, ovvero tutte le proteine calcio-dipendenti presentano tra le loro subunità una calmodulina in grado di legare gli atomi di calcio in quanto presenta degli amminoacidi carichi negativamente nel sito catalitico che attirano il calcio che è un catione instaurando questo legame di tipo elettrostatico.

La calmodulina esiste in due conformazioni, una aperta ed una chiusa, la conformazione aperta è data con il legame con 4 ioni calcio (in giallo nell'immagine). Il legame con gli ioni calcio determina un'attivazione della calmodulina che viene propagata alla proteina di cui la calmodulina fa parte. Un esempio è la glicogeno fosforilasi che ha tra le sue subunità una calmodulina che ne permette la regolazione tramite il calcio, cosa non presente nel fegato ma che è fondamentale nel muscolo dove l'attività della glicogeno fosforilasi è strettamente legata alla contrazione che a sua volta è anch'essa regolata dalla presenza di ioni calcio nel citoplasma.

Altre proteine che vanno ad utilizzare il calcio come sensore sono la F-actinina, un regolatore del citoscheletro; la calcineurina B, una proteina molto importante nella neurotrasmissione; la calretinina, anch'essa coinvolta nella neurotrasmissione; la mieloperossidasi, fondamentale nei meccanismi di infiammazione ad opera dei neutrofili; la tioredossina riduttasi, importante nella biosintesi del DNA; la troponina C, coinvolta nella contrazione muscolare; e tante altre.

L'aumento del calcio è un secondo messaggero stimolato dall'arrivo

dello spermatozoo. Questi colori indicano l'imponenza dell'aumento di calcio, dal colore rosso che rappresenta un imponente aumento della concentrazione intracellulare di calcio fino al blu che invece non presenta un aumento dello ione percepibile.

Precedentemente abbiamo accennato al fatto che questi ultimi tre secondi messaggeri sono associati tra loro, ovvero quando c'è uno troviamo anche gli altri. Nell'immagine possiamo osservare il **fosfatidil inositolo 4-5 bifosfato**, un fosfolipide di membrana, uno dei più comuni. Possiamo osservare: il glicerolo; i due acidi grassi, uno saturo ed uno insaturo, quest'ultimo solitamente in posizione 2; più sotto vediamo il gruppo fosfato; e sotto ancora c'è l'inositolo fosforilato nelle posizioni 4 e 5. Questo fosfolipide incontra il suo effetto ovvero l'enzima **fosfolipasi C** che va ad idrolizzare il legame tra il fosfato ed il glicerolo e rilascia il diacilglicerolo, le cui code apolari, i due acidi grassi, rimangono dentro la membrana, parliamo quindi di un secondo messaggero **lipofilo**; e poi c'è l'inositolo trifosfato, IP3, tre perché un fosfato deriva dal fosfolipide. L'IP3 va a questo punto sui depositi reticolari del calcio dove vi è un suo recettore, un canale che viene regolato dall'inositolo trifosfato. Questo canale prende il nome di **canale del calcio rianodina-dipendente**, così chiamato perché l'agonista **riadonina**, un farmaco, è in grado di modularlo.

Sia il calcio che il Diacil glicerolo sono dei regolatori di una protein kinasi, ovvero per il calcio la **protein kinasi C**, o **PKC**, che va a fosforilare delle molecole come la glicogeno fosforilasi o dei canali.

Anche il DAG che rimane in seguito al taglio adesivo alla membrana va ad attivare la PKC.

Come accennato il calcio viene mantenuto costantemente a concentrazioni molto basse così da permettergli di funzionare da secondo messaggero. Ci sono infatti una serie di trasportatori che consentono in maniera efficiente il mantenimento di questa concentrazione molto bassa. Nella fattispecie, sulla membrana abbiamo sia uno **scambiatore calcio-sodio** (trasporto attivo secondario) che una **pompa per il calcio ATPasica**, mentre nel reticolo agirà principalmente la pompa e nel mitocondrio avremo un'attività prevalente ad opera dello scambiatore.

## PI3P

Il **fosfatidil inositolo 3 fosfato** è un secondo messaggero, molto particolare. È e rimane un fosfolipide di membrana. Che il fosfatidil inositolo sia fosforilato o meno nelle posizioni 4, 5 o entrambe, non fa differenza l'importante è che ad essere fosforilata sia la posizione 3 in quanto funge da sito di attivazione della molecola. Avremo quindi un enzima, la **fosfatidil inositolo 3 cinasi**, che lo fosforila in posizione 3 formando il nostro secondo messaggero. Questa molecola è una dei più importanti secondi messaggeri se non la più importante, perché è un segnale di sopravvivenza e la sopravvivenza della cellula è il punto primo affinché la cellula stessa possa percepire gli altri segnali, se la cellula va in apoptosi gli altri segnali saranno inutili.

Questo secondo messaggero abbiamo detto che è un fosfolipide di membrana ed andrà ad attivare proteine e regolatori che si trovano sulla membrana. Ed è questo che lo rende tanto diverso dagli altri secondi messaggeri in quanto non andrà né nel citoplasma e tantomeno nel nucleo. L'altra caratteristica di questa molecola, in questo

caso più comune, è che presenta un senso, una cinasi che viene attivata appunto dal fosfatidil inositolo e prende il nome di **PKB**

La PKB è anche un oncogene, ovvero un gene che se dovesse essere mutato o alterato nella sua funzione indurrebbe la calcinogenesi, una trasformazione neoplastica. Quando sono un oncogene presentano un nome diverso ovvero **Akt** (*il nome è differente in quanto nello stesso periodo due ricercatori distinti hanno scoperto la stessa molecola, uno come recettore del segnale di sopravvivenza e lo ha chiamato PKB; mentre il secondo gruppo di ricercatori ha scoperto questa proteina mutata in un tessuto tumorale e l'ha chiamata Akt. Solo successivamente si sono resi conto che si trattava della stessa molecola che aveva però subito una mutazione*).

## ORMONI DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISARIO

A livello dell'ipotalamo sono prodotti degli ormoni che, a loro volta, vanno a stimolare il rilascio di altri ormoni dall'ipofisi.

nell'ipofisi distinguiamo due regioni. Una porzione, detta l'**adenoipofisi**, è quella che viene influenzata dagli ormoni prodotti nell'ipotalamo, gli ormoni ipotalamici raggiungono l'adenoipofisi attraverso un letto vascolare che li collega. In seguito a questa stimolazione, l'adenoipofisi a sua volta rilascia nuovi prodotti che hanno come bersaglio vari tessuti del nostro organismo. Ad esempio: viene rilasciato dall'ipotalamo il **TRH** (tireotropina releasing hormone) che raggiunge l'adenoipofisi che libera il **TSH** (ormone tireostimolante) che, attraverso il torrente sanguigno, arriva alla tiroide per stimolarla a secernere gli ormoni tiroidei, **T3** e **T4**. Lo stesso discorso vale per quanto riguarda il **CRH** (ormone di rilascio della corticotropina), stimola il rilascio di **ACTH** (ormone adrecorticotropo) da parte dell'adenoipofisi che a sua volta va a stimolare la sintesi di glucorticoidi a livello della ghiandola surrenale e così via.

In quest'asse si ha sia un'amplificazione da un punto di vista quantitativo di ormoni rilasciati, che un'azione a feedback negativo; solitamente gli ormoni che sono rilasciati a livello dei tessuti periferici, vanno ad inibire, con un meccanismo a feedback negativo, il rilascio sia degli ormoni ipotalamici che di quelli ipofisari.

Un discorso un po' a parte è quello che riguarda la **neuroipofisi**, situata nel lobo posteriore dell'ipofisi, dove i prodotti dell'ipotalamo vengono rilasciati direttamente ad essa grazie agli assoni dei neuroni stessi. Quindi il passaggio tra ipotalamo e ipofisi non è mediato da un letto vascolare, ma è la stessa cellula nervosa che li rilascia alla neuroipofisi. In questo caso ci saranno soltanto due ormoni prodotti: l'**ossitocina**, importante nella contrazione uterina durante il parto; la **vasopressina** o ormone antidiuretico avente una duplice azione. Da un lato svolge un ruolo di vasocostrittore (aumenta la pressione sanguigna), dall'altro riassorbe acqua a livello renale, permettendo il rilascio di urina più concentrata; un deficit di tale ormone può portare ad una produzione giornaliera anche di 20L di urina.

### ESEMPI - Ormoni prodotti nell'ipotalamo, e che agiscono a livello dell'ipofisi:

#### - **CRH** (ormone di rilascio della corticotropina)

Determina a livello ipofisario il rilascio soprattutto di **ACTH** (adrenocorticotropin) che ha come bersaglio la ghiandola surrenale, in particolare la **porzione corticale**.

La ghiandola surrenale è infatti divisibile in due regioni: la **corticale**, che produce ormoni steroidi: alcuni ormoni sessuali deboli androgeni, glucocorticoidi, mineralcorticoidi; la **midollare** responsabile della produzione delle catecolamine.

#### - **TRH** (ormone di rilascio della tireotropina)

Ormone secreto dall'ipotalamo che stimola l'adenoipofisi a liberare il TSH e in parte, come effetto secondario, anche il rilascio di prolattina (PRL)

#### - **TSH** (ormone tireostimolante)

#### - **Ormone di rilascio della gonadotropina (GNRH):**

A livello dell'ipofisi determina il rilascio di **LH** (ormone luteinizzante) e **FSH** (ormone follicolo stimolante) che hanno come bersaglio l'apparato riproduttore sia maschile che femminile. Ad esempio FSH agisce a livello delle cellule del Sertoli nell'uomo, nella donna a livello dell'ovaio.

## - GHRH e somatostatina

Sono due ormoni che regolano il rilascio dell'ormone GH: il **GHRH** (growth hormone realising hormone) promuove il rilascio dell'ormone della crescita a livello dell'adenoipofisi; la **somatostatina** che inibisce il rilascio dell'ormone della crescita.

Il GH agisce su vari tessuti: per esempio a livello del fegato determina il rilascio dell'IGF1, agisce rilasciando, in vari distretti, IGF2. Il GH promuove anche il rilascio degli ormoni tiroidei T3 e T4, che sono sotto controllo primario anche da TRH e TSH.

## ORMONE DELLA CRESCITA (GHRH)

il **GHRH** (growth hormone realising hormone) è prodotto dall'ipotalamo e promuove il rilascio dell'ormone della crescita a livello dell'adenoipofisi;

Ha come segnalazione la via della **JAK-STAT**. Questa è la tipica segnalazione di alcuni recettori per le citochine che non sono dotati di attività cinasica intrinseca; le JAK, reclutate a livello del recettore, si legano ad esso, lo fosforilano, si autofosforilano e vanno soprattutto a fosforilare i mediatori della segnalazione vera e propria, le proteine STAT. Queste dimerizzano, migrano nel nucleo e promuovono la trascrizione di alcuni geni specifici.

Parallelamente a questa via, che è quella canonica e peculiare di questi recettori citochinici, l'ormone della crescita può anche attivare delle vie attivate da tantissimi altri recettori quali: la via delle **MAPchinasi**, la via della **diacilglicerolo** e dell'**inositolo 3-fosfato**.

Il GH viene sintetizzato dalla componente acidofila della ghiandola pituitaria, è un ormone proteico ed è essenziale per l'accrescimento postnatale, infatti i deficit legati ad esso possono portare al **nanismo**. Come detto in precedenza, esercita la sua azione tramite il rilascio di IGF1 ed in minor misura IGF2. Quando si parla di casi di nanismo è necessario distinguere due casi diversi.

Si può avere **nanismo legato al deficit di GH** (più classico), curato somministrando l'ormone della crescita esogeno. Questo fu una delle prime proteine sintetizzate dall'ingegneria genetica perché si tratta di un ormone estremamente specifico, il cui corrispettivo di origine animale non può essere somministrato. L'altra tipologia di nanismo, tipica delle popolazioni pigmee, dove in realtà i livelli di GH sono normali, ma **manca la produzione di IGF1**; dunque il deficit non è ipofisario, ma è più a valle a livello dei mediatori.

**Funzioni:** ha un'azione anabolica che comporta un aumento della sintesi proteica; incrementa la glicemia sia attraverso un aumento della gluconeogenesi che della glicogenolisi epatica; mobilizza gli acidi grassi dal tessuto adiposo, facendo aumentare la disponibilità di riserve energetiche; promuove la ritenzione idrica ed è fondamentale durante la fase di sviluppo per sostenere la crescita delle ossa e delle cartilagini.

*Negli allevamenti ittici viene somministrato GH ricombinante specifico per l'animale per ottenere delle specie commerciali con dimensioni estremamente aumentate.*

Quando c'è un eccesso di GH, solitamente è dovuto a condizioni di neoplasie a livello ipofisario, se questa condizione di alti livelli di ormone della crescita colpisce i bambini prima della conclusione dell'accrescimento, si ha il fenomeno di **gigantismo**; se questo, invece, si verifica quando l'accrescimento è già terminato, si verifica il fenomeno dell'**acromegalia**, cioè all'ingrossamento delle ossa acrali, mani, piedi e così via.

## PROLATTINA (PRL)

La prolattina è un ormone proteico che viene rilasciato a livello ipofisario. A livello ipotalamico è presente il fattore di rilascio della prolattina o il fattore inibente. Possiede un recettore associato alle proteine citoplasmatiche Jak/Stat; La trasduzione del segnale ha inizio con recettori tipici delle citochine, che non sono dotati di nessuna attività enzimatica, che in seguito all'interazione con la prolattina dimerizzano e reclutano le proteine Jak. Queste fosforilano il recettore stesso e poi vanno a mediare la trasduzione del segnale. La trasduzione, principalmente ma non esclusivamente, passa per l'attivazione delle proteine STAT che migrano nel nucleo e attivano la trascrizione. La prolattina, insieme all'ossitocina (altro ormone tipico della neuroipofisi) è fondamentale per la produzione (**galattopoiesi**) e la secrezione del latte materno. La sua funzione principale è quella della produzione; infatti tra i geni che vengono trascritti in seguito all'attivazione delle proteine STAT c'è quello per la caseina del latte, mentre partecipa insieme alla ossitocina alla secrezione. Ha anche un ruolo importante nello sviluppo della ghiandola mammaria; in particolare è necessaria per uno sviluppo ottimale dei dotti mammari. Le cellule deputate alla sintesi di questo ormone sono le **cellule acidofile** della pituitaria anteriore; queste cellule subiscono un aumento numerico molto consistente durante la gravidanza, in preparazione alla lattazione.

Le patologie associate alla prolattina riguardano soprattutto una iperproduzione dell'ormone stesso, solitamente dovuta a neoplasie a livello ipofisario. Può colpire entrambi i sessi: nel maschio dà impotenza e ginecomastia (sviluppo del seno) mentre nella femmina causa amenorrea e produzione di latte al di fuori del canonico periodo postparto.

Analizziamo ora una famiglia di ormoni molto simili strutturalmente ma che possiedono evidenti differenze funzionali. Questi 4 ormoni sono:

**-TSH:** ormone tireostimolante. È rilasciato in seguito alla stimolazione di TRH ipotalamico e ha poi come bersaglio la tiroide andando a produrre T3 e T4 (ormoni tiroidei).

**-LH e FSH:** ormone luteinizzante e ormone follicolo stimolante. Questi sono fondamentali per la gametogenesi e per la produzione di ormoni sessuali in entrambi i sessi.

**-CG:** gonadotropina corionica. Questa non è un ormone ipofisario ma appartiene a questa famiglia a causa della somiglianza strutturale. Sono tutti delle glicoproteine che, oltre ad essere massicciamente glicosilate, sono anche molto modificate a livello post traduzionale. Sono sintetizzati come pre-pro-ormoni e successivamente subiscono tagli proteolitici. Presentano residui di cisteina che sono impegnati in ponti disolfuro. Questi ormoni si trovano tutti in forma dimerica, un dimero alpha-beta, in cui la subunità alpha è presente in tutti i 4 membri della famiglia (costante) mentre la subunità beta è diversa ed è quella che distingue i singoli ormoni (variabile). Si pensa che i geni che codificano per le varie subunità beta si siano sviluppati, da un punto di vista evolutivo, per duplicazione e successiva divergenza a partire da un gene ancestrale che codificava per una subunità alpha. Presentano un tipo di trasduzione del segnale simile: tutti e quattro portano alla produzione di cAMP attraverso le proteine G-alpha stimolatorie e avviene così la cascata di segnalazione che abbiamo incontrato più volte.

## FSH e LH

Sia FSH che LH agiscono a livello di entrambi i sessi.

Sono implicati in due fenomeni: **-Gametogenesi:** nello sviluppo dei gameti femminili e maschili. In particolare nella donna FSH stimola le cellule follicolari dell'ovaio (le cellule che rivestono la cellula uovo) mentre nell'uomo FSH agisce a livello delle cellule del Sertoli, che hanno funzione di supporto/trofica nello sviluppo dello spermatozoo.

### -Produzione di ormoni sessuali:

nell'uomo LH stimola la sintesi di

testosterone da parte delle cellule del

Leydig mentre nella donna LH stimola la produzione del progesterone da parte del corpo luteo, prima che la

produzione di esso diventi a carico della placenta stessa. Gli ormoni sessuali sono di origine lipidica, derivati dal colesterolo. FSH e LH stimolano la produzione degli ormoni sessuali attraverso due modalità:

1. 1) Aumentano la conversione di acetato in squalene (precursore del colesterolo)
2. 2) Promuovono la conversione del colesterolo in **pregnenolone**, un precursore di tutti gli ormoni che derivano dal colesterolo. Possiede 21 atomi di C e si ottiene dal colesterolo tagliando la catena laterale, rilasciata come aldeide isocaproica. Il pregnenolone è il precursore di tutti gli ormoni prodotti a livello

della surrenale (mineralcorticoidi, glucocorticoidi e alcuni precursori degli ormoni sessuali maschili).

## GONADOTROPINA CORIONICA (GC)

La gonadotropina corionica è un ormone placentare e non ha niente a che fare con l'asse ipotalamo-ipofisario (la poniamo qui perché appartiene alla stessa famiglia di TSH, LH e FSH). È la proteina che viene rilevata nei commerciali test di gravidanza in quanto è uno dei primi ormoni che viene prodotto subito dopo la fecondazione. La sua prima funzione è quella di impedire che il corpo luteo degeneri (**sostentamento corpo luteo**). La sua espressione è circoscritta nel tempo; la troviamo a livelli alti fino al terzo mese di gravidanza per poi scomparire e essere sostituita dal progesterone.

## TSH

TSH -ormone tireostimolante : è secreto dall'adenoipofisi, ha come bersaglio la tiroide inducendola a produrre gli ormoni tiroidei T3 e T4.

Il TSH ha come bersaglio la tiroide. È un ormone glicoproteico che induce la **sintesi degli ormoni tiroidei**. Questi possiedono una biosintesi particolare in quanto sono le uniche molecole che possediamo contenenti iodio. La loro sintesi parte dalla captazione a livello tiroideo dello ione ioduro, una successiva ossidazione e infine l'organizzazione all'interno di una proteina, la tireoglobulina (azione a breve durata). La stimolazione prolungata comporta un generico aumento della sintesi proteica (gli ormoni tiroidei hanno come effetto anche quello di **aumentare la sintesi proteica**) e soprattutto determina l'ipertrofia della tiroide.

Alti livelli di TSH sono spesso associati a bassi livelli di T3 e T4 attivi per mancanza di iodio; questa condizione porta al gozzo tiroideo. Questi ormoni del sistema ipofisi-ipotalamo hanno un meccanismo a feedback negativo: la presenza di T3 e T4 determina un abbassamento dei livelli di TSH mentre l'assenza di iodio non permette la sintesi di T3 e T4 e quindi non viene inibita la sintesi di TSH che rimane ad alti livelli. Tutti questi fattori indicano un malfunzionamento della tiroide che accumula tireoglobulina senza però produrre ormoni biologicamente attivi.

## ORMONE ADRENOCORTICOTROPO (ACTH)

Viene rilasciato in seguito alla stimolazione da parte di CRH ipotalamico, ormone di rilascio della corticotropina. CRH non stimola solo il rilascio di ACTH ma anche di una serie di ormoni a questo associati in quanto ACTH è uno dei frammenti che si generano per proteolisi limitata a partire da un prodotto proteico, la **pro-opio-melanocortina (POMC)**. Essa è una proteina di 285 amminoacidi ed è sintetizzata a livello dell'adenipofisi; sotto stimolo di CRH viene processata a dare ACTH e altri prodotti come le **endorfine** (mediatori del dolore) e l'**alpha-MSH** (ormone

melanocita stimolante), responsabile dell'imbrunimento della pelle (stimola la sintesi della melanina da parte dei melanociti). In realtà questi prodotti proteici non si trovano solo a livello dell'adenipofisi ma anche a livello di una serie di tessuti periferici; si pensa che la produzione sia locale e che quindi non arrivino nelle varie sedi dopo la produzione a livello dell'adenipofisi (la pro-opio-melanocortina si può trovare anche in tessuti periferici dove subisce i tagli proteolitici analoghi a quelli che avvengono nel lobo anteriore dell'adenipofisi).

In realtà l'adenipofisi si divide in una porzione anteriore e una intermedia; nel lobo intermedio la pro-opio-melanocortina è processata completamente mentre in quello anteriore il processamento si ferma ad ACTH e beta-lipotropina. Nel lobo intermedio procede fino alla produzione delle endorfine e sono gli stessi tagli che troviamo anche a livello dei tessuti periferici.

L'ACTH ha come bersaglio la zona corticale del surrene, per l'esattezza le regioni fasciolata e reticolare (regioni della corteccia surrenalica in cui si sintetizzano glucocorticoidi e i precursori degli ormoni sessuali maschili). Un po' come succede con FSH e LH, ACTH agisce promuovendo la sintesi di squalene e la produzione di pregnenolone; indirizza la produzione di questi ormoni stimolando la produzione di colesterolo, dei precursori e il rilascio dei glucocorticoidi.

ACTH ha un recettore accoppiato a proteine G stimolatorie e determina un aumento di cAMP.

La patologia più nota connessa all'ACTH è la **sindrome di Cushing**, in cui si hanno elevati livelli di ACTH. Da un punto di vista clinico si osserva una iperglicemia in quanto l'ACTH stimola la produzione di glucocorticoidi che stimolano a sua volta la gluconeogenesi. Può determinare diabete mellito e obesità centripeta. Le persone sotto cortisonici, ad esempio, hanno una ridistribuzione della massa grassa con deposizione di lipidi localizzata (es: volto gonfio) e lipolisi in altre regioni (es: gambe molto magre).

## ORMONI DELLA NEUROIPOFISI:

Questi ormoni sono l'**ossitocina** e la **vasopressina**; prodotti nell'ipotalamo e rilasciati dalla neuroipofisi.

Vasopressina e ossitocina sono due ormoni peptidici molto piccoli; sono lunghi solo 9 amminoacidi. In entrambi gli ormoni tra l'amminoacido 1 e l'amminoacido 6 si forma un ponte disolfuro e quindi hanno una forma ciclica per via di questo legame intramolecolare. Vengono prodotti nel nucleo sopraottico e paraventricolare dell'ipotalamo, e poi riversati nella neuroipofisi da cui neuroni poi si rilasciano nel torrente circolatorio per raggiungere i loro bersagli. Nel trasferimento assonico sono associati a proteine particolari che sono le **neurofisine**.

### OSSITOCINA

L'ossitocina, sintetizzata nel nucleo paraventricolare, ha come bersaglio la muscolatura liscia dell'utero e la ghiandola mammaria. Ha un ruolo fondamentale sia nella contrazione durante il parto sia nella **secrezione del latte**.

L'**ossitocina** È un peptide di **9 amminoacidi** ed è secreto insieme alla neurofisina 1 che lo accompagna nel trasporto assonale. È un ormone accoppiato a proteine G stimolatorie e quindi porta ad un aumento di cAMP.

**OSSITOCINA:**

- Sintetizzato nel nucleo paraventricolare
- Regola la secrezione del latte dalle ghiandole mammarie e la contrazione uterina (mestruazioni e parto)
- Peptide di 9 aa con un ponte disolfuro
- E' secreto insieme alla proteina che ne media il trasporto nell' assone, la Neurofisina I
- Vita media di 2-4 minuti
- Ha un recettore accoppiato a proteine G associato ad aumento di cAMP
- E' secreto in risposta allo stimolo di suzione dei capezzoli, alla produzione di estrogeni ma e' inibito dai progestinici

### VASOPRESSINA (ADH)

La vasopressina (o ormone antidiuretico ADH) ha un'**azione vaso costrittiva** e quindi porta ad un aumento della pressione sanguinea. Ha anche un'**azione antidiuretica**, cioè stimola il riassorbimento di fluidi dalle urine a livello del rene, rendendo l'urina più concentrata. La carenza di questo ormone provoca la produzione di abbondante quantità di urine poco concentrate, fino a volumi di 20 litri al giorno proprio perché manca questa azione di recupero di fluidi. **La vasopressina** è una proteina di **9 amminoacidi** e viene trasportata insieme alla neurofisina 2.

**L'azione di assorbimento di fluidi:** la vasopressina viene secreta quando il plasma sanguigno è molto concentrato (aumento elettroliti) alcuni recettori a livello ipotalamico vengono stimolate, provocando la produzione di vasopressina si ha un recupero di liquidi per diminuire la concentrazione di elettroliti nel plasma. **L'altra azione è vasocostrizione**, soprattutto a livello delle arteriole. Quindi quando si ha una diminuzione della pressione sanguinea, per esempio in seguito a particolari perdite ematiche, i recettori a livello degli atri cardiaci lo avvertono e attraverso l'azione della vasopressina determinano una vasocostrizione e l'aumento della pressione per ripristinare le condizioni ideali. per il fatto che ha due azioni, ha anche due tipi di recettori diversi: **Il recettore V1** è presente in tutti i tessuti e risponde a ADH soprattutto nelle arteriole; **attraverso la produzione di diacilglicerolo, IP3 e calcio media l'effetto di vasocostrizione e provoca un aumento di pressione**. **i recettori V2** sono presenti a livello dei dotti collettori del rene dove viwn, che classicamente agiscono con un aumento di cAMP e provocano il riassorbimento di acqua nei dotti collettori del rene. Questo è possibile grazie all'azione delle **acquaporine**, i trasportatori dell'acqua. L'attivazione del recettore provoca un aumento di cAMP, attivando la PKA che fosforila le acquaporine. Questa fosforilazione determina la loro esposizione a livello della membrana e comincia così il riassorbimento di acqua dal lume del dotto collettore. Le urine si concentrano e l'acqua abbassa la concentrazione elettrolitica del plasma. Se c'è una carenza di vasopressina questo meccanismo viene meno e vengono prodotte grandi quantità di urine poco concentrate e si ha un aumento degli elettroliti nel plasma. **Questa condizione è una patologia, denominata diabete insipido, che non ha nulla a che vedere con il diabete mellito. Non c'è una iperglicemia ma vi è un aumento del volume delle urine, non associato all'aumento di glucosio come nel diabete mellito.**

## ORMONI TIROIDEI

I principali ormoni tiroidei sono due: T4 e T3. Il T4 è più abbondante, ed è considerato la riserva dell'ormone T3, che è invece l'ormone tiroideo più attivo metabolicamente. Questi due ormoni vengono prodotti dalla tiroide in seguito a stimolazione da parte dell'ormone TSH, a sua volta prodotto nell'ipofisi in seguito a stimolazione dall'ormone TRH ipotalamico.

Il T3 o **3,5,3' tri-iodio-tironina** poiché è formato dalla fusione di 2 anelli provenienti da 2 residui di tirosina che contengono 3 atomi di iodio nella loro molecola. Il T3 possiede attività biologica maggiore pur essendo meno abbondante del T4.

Il T4 o **tiroxina** o **3,5,3',5' tetra-iodio-tironina**: da esso si può ottenere il T3, tramite deiodinazione del T4.

La iodinazione sugli anelli di tirosina e la successiva condensazione delle due tirosine interessate nel legame avviene quando queste sono incorporate in una proteina più grande che è la **tireoglobulina**; quest'ultima si trova dentro la colloide dei follicoli tiroidei.

Se la T3 anziché in posizione 3,5,3' è iodinata in 3,3',5' si ha il "T3 reverse", biologicamente inattivo. Tutte e due queste forme possono derivare alternativamente dalla deiodinazione della T4.

### Biosintesi degli ormoni tiroidei:

Nella ghiandola tiroide, gli ormoni tiroidei vengono prodotti a partire dalla tireoglobulina che è il principale costituente della sostanza colloide presente nei follicoli tiroidei.

La tireoglobulina è il substrato di un particolare enzima detto la **tireoperossidasi**, che catalizza la produzione degli ormoni tiroidei. La tireoglobulina contiene 115 residui di tirosina che subiscono reazioni di iodinazione (formazione di legame covalente di iodio all'interno del loro anello). La tireoglobulina viene sintetizzata all'interno dei tireociti (cellule follicolari), poi viene rilasciata nella colloide dove subisce queste reazioni di iodinazione.

La tireoperossidasi si trova sulla superficie luminare delle cellule follicolari. Questa proteina contiene un gruppo eme all'interno della sua struttura.

### Queste reazioni si suddividono in tappe:

#### 1. sotto lo stimolo del TSH, si ha la captazione dello ione ioduro a livello delle cellule follicolari.

La tiroide è l'unico tessuto in grado di captare l'ione dell'iodio e questo viene fatto contro gradiente di concentrazione dal sangue all'interno della cellula follicolare mediante un trasportatore detto **NIS**. In realtà lo iodio viene preso dalle cellule follicolari sotto forma di simporto con il sodio (2 ioni sodio e 1 ione ioduro). Lo iodio si trova sotto forma di ioduro nel plasma e viene così trasportato. Il trasporto attivo è garantito da un simporto con il sodio (2 ioni sodio e 1 ione ioduro) operato dalla pompa **Na/K** ATP-asi che consuma energia sotto forma di ATP pompando ioni sodio all'esterno, e prendendo ioduro all'interno. Questo primo step della captazione di ioduro viene stimolato dalla TSH ipofisario. Tuttavia, lo iodio in forma di ioduro non è attivo e quindi subisce una ossidazione e poi una reazione di organizzazione.

#### 2. Ossidazione dello ione ioduro

Lo ione ioduro viene ossidato a **iodio molecolare** ad opera dell'enzima **tireoperossidasi**, che usa l'acqua ossigenata come agente ossidante. Una volta che lo ioduro è stato ossidato a iodio molecolare si ha la reazione di organizzazione, cioè l'incorporazione dello iodio nella tireoglobulina, ad azione della tireoperossidasi.

### 3. Organizzazione dell'iodio molecolare (incorporazione dello iodio nella tireoglobulina)

Questa reazione è catalizzata dall'enzima tireoperossidasi, e consiste nell'aggiunta del iodio molecolare ai residui di tirosina presenti nella molecola della tireoglobulina.

La prima posizione ad essere iodinata è sempre la posizione 3 e poi 5 dell'anello benzoico della tirosina. Si possono ottenere 2 molecole diverse in base alla iodinazione

- **MIT** (mono-iodio-tironina) che presenta solo una iodinazione (in posizione 3);
- **DIT** (di-iodio-tironina) che presenta due iodinazioni (in posizione 3 e 5).

Quindi queste due molecole MIT e DIT si trovano nel colloide all'interno della tireoglobulina uniti con legami peptidici ad amminoacidi adiacenti presenti nella sequenza della tireoglobulina stessa.

### 4. Accoppiamento.

Due DIT possono unirsi per formare quello che sarà il T4 (tiroxina), oppure un MIT può unirsi con un DIT a dare quello che sarà il T3. Queste associazioni avvengono sempre grazie alla tireoperossidasi. Questi prodotti: T3 e T4, a questo livello, si trovano ancora inclusi nella tireoglobulina e quindi non sono ancora biologicamente attivi.

### 5. Secrezione.

In seguito alla stimolazione TRH-TSH, viene indotta la secrezione di T3 e T4 nel tireocita, ma per poter essere secreti, i T3 e T4 devono prima subire un'idrolisi che libera questi ormoni dalla tireoglobulina. Per cui, tireoglobulina viene ricaptata da vescicole di endocitosi all'interno dei tireociti, queste vescicole si fondono poi con i lisosomi che hanno al loro interno gli enzimi **proteasi** che idrolizzano la tireoglobulina iodata liberando: **T3 e T4**, e MIT e DIT che non hanno reagito assieme.

MIT e DIT non hanno una funzione biologica e vanno così incontro a una reazione di deiodinazione da parte delle **deiodinasi** dentro la cellula follicolare in modo da recuperare lo iodio; questo elemento è molto importante per mantenere il "pool di ioni iodio" ~~insieme allo iodio proveniente dalla ossidazione degli ioni ioduro.~~

Gli ormoni T3 e T4 possono uscire attraverso la membrana plasmatica perchè possiedono caratteristiche lipofile e vengono così trasportati nel sangue associati a 2 tipi di proteine carrier, **TBG** (globulina legante la tiroxina) e **TBPA** (pre-albumina legante tiroxina). TBG è molto più affine a questi ormoni rispetto all'TBPA. Questi ormoni non sono attivi quando sono legati alle proteine carrier specifici, e per esplicare la loro azione devono dissociarsi dai carrier.

### *Come gli ormoni tiroidei T3 e T4 esplicano la loro funzione?*

A livello periferico, il T3 va ad esplicare la sua azione biologica legando il proprio recettore nucleare e attivando la trascrizione genica, mentre T4 va incontro a deiodinazione producendo 2 possibili molecole, il "T3 reverse" inattivo e il T3 biologicamente attivo. La deiodinazione extratiroidea (da T4 a T3) produce 80% dell'ormone funzionale T3. Il T3 reagisce con il recettore nucleare degli ormoni tiroidei con affinità 10 volte maggiore rispetto al T4.

### Effetti biologici degli ormoni tiroidei T3 e T4:

- Aumentano il **metabolismo basale**, aumentando il consumo di ossigeno a livello cellulare. Lo fanno soprattutto aumentando la sintesi di alcuni enzimi della catena respiratoria mitocondriale.
- Regolano la **termogenesi** producendo termogenina. La funzione di termogenesi viene principalmente svolta da proteine disaccoppianti, capaci di disaccoppiare il flusso di elettroni dalla sintesi di ATP, producendo calore. ~~Queste dissipano il gradiente elettrochimico a livello della membrana producendo calore. Attraverso la termogenina esplicano questa funzione.~~ T3 e T4 stimolano il metabolismo e la catena respiratoria, quindi favoriscono il meccanismo della termogenesi.

- Aumentano le **riserve energetiche**, in particolare il glucosio libero stimolando la gluconeogenesi e la glicogenolisi. In più aumentano la mobilitazione degli acidi grassi liberi.
- Inducono un aumento della **gittata cardiaca**.
- Negli altri animali per esempio questi ormoni sono importanti nella **metamorfosi**. Siccome sono responsabili della sintesi della carbammil-fosfato sintetasi 1, enzima chiave del ciclo dell'urea, permettono di passare da un metabolismo ammoniotelico a un metabolismo uricotelico. Sono fondamentali nel riassorbimento della coda del girino durante il cambiamento morfologico.
- Nell'uomo regolano in parte lo sviluppo perché regolano il passaggio dell'emoglobina fetale a quella dell'adulto.

## PATOLOGIE CONNESSE AGLI ORMONI TIROIDEI:

**Ipotiroidismo:** Si classifica in tre tipi a seconda di dove sia la deficienza:

1) Ipotiroidismo primario: quando il deficit è a carico della tiroide. Per esempio: l'asportazione della tiroide che porta alla mancanza di produzione di T3 e T4.

2) Ipotiroidismo secondario: quando il deficit è a carico del TSH. Ad esempio quando si ha la presenza di anticorpi anti-TSH e quindi la funzionalità del TSH viene bloccata.

3) Ipotiroidismo terziario: quando il deficit è a livello ipotalamico con problemi di secrezione di TRH.

L'ipotiroidismo è correlato a una diminuzione del metabolismo basale, provocando **sintomi**, come: sonnolenza, sensazione amplificata del freddo. Se colpisce i bambini, l'ipotiroidismo può essere legato a nanismo e cretinismo (associato a sottosviluppo mentale) in quanto T3 attiva la trascrizione dell'ormone di crescita (GH)

Il **Gozzo** è un tipico esempio di un deficit di ormoni tiroidei dovuto principalmente a carezza di iodio. Non si trova spesso questa patologia grazie all'utilizzo del sale iodato. in questo caso, i bassi livelli degli ormoni tiroidei nel sangue provocano un aumento del TSH, per la mancanza di feedback negativo che inibisce la produzione di TSH a livello ipofisario, quindi non si smette di produrre il TSH.

**Iperitiroidismo:** Malattia di Graves è una malattia autoimmune causata dalla presenza di anticorpi tireostimolanti che attivano il recettore del TSH. Si ha un aumento del volume della tiroide associato anche ad un aumento degli ormoni T3 e T4 in circolo.

**I sintomi sono:** tachicardia, aumento della pressione etc.

La terapia principale è quella di utilizzare dei farmaci che inibiscono le deiodinasi in modo da impedire la massiccia produzione di T3 a partire da T4, oppure tramite la distruzione della tiroide con radioattività.

## Biochimica del tessuto epatico (FEGATO)

### FUNZIONI DEL FEGATO

1. Ha un ruolo centrale nel **metabolismo delle sostanze esogene** (alimenti, farmaci) che provengono dall'esterno attraverso il canale alimentare e vengono filtrate dal fegato.
2. Ha un ruolo centrale nel **metabolismo delle sostanze endogene:** trasformazione e produzione di sostanze che possono essere utili.

3. **Omeostasi della glicemia:** controlla la glicemia.
4. **Detossificazione di farmaci e antibiotici:** attraverso modificazioni trasforma queste sostanze rendendole più facilmente eliminabili.
5. **Biosintesi e degradazione di lipoproteine.**
6. **in esso avviene il Ciclo dell'urea** (eliminazione dei cataboliti delle proteine)
7. **Biosintesi delle proteine plasmatiche** che svolgono funzioni diversi.
8. **Produzione e secrezione degli acidi biliari** (sostanze emulsionanti importanti per la digestione dei lipidi).
9. Emocateresi (funzione svolta principalmente dalla milza).

---

### **Insulina (innesca glicogenosintesi, glicolisi e lipogenesi).**

È un ormone che viene prodotto dalle cellule beta della porzione endocrina (isole di Langerhans) del pancreas. L'insulina è un ormone peptidico, quindi è idrofilo e polare. Ha **azione ipoglicemizzante**: viene secreto dalle cellule  $\beta$  del pancreas quando c'è un aumento dei livelli glicemici del sangue. L'insulina è costituita da due catene, **a** e **b** che sono mantenute unite da due ponti disolfuro.

**Attività** L'insulina può avere 2 tipi di attività:

- 1) Attività metabolica**, L'insulina svolge l'attività metabolica principalmente nel fegato, nel muscolo e nel tessuto adiposo.
- 2) Attività Mitogenica**, che induce una proliferazione di alcuni citotipi, in vari tessuti.

**Quando viene secreta** Normalmente la glicemia deve essere mantenuta in un range tra 4.5 - 5 mM. Nel momento in cui i livelli glicemici iniziano a salire, ad esempio dopo un pasto, si ha la secrezione dell'insulina da parte delle cellule  $\beta$  pancreatiche. Quando arriva lo stimolo iperglicemico i granuli secretori presenti nelle cellule  $\beta$  pancreatiche vengono riversati all'esterno e l'insulina può entrare nel sangue.

La secrezione dell'insulina può essere indotta anche dalla diminuzione dei livelli di glucagone, e viceversa, nel momento in cui il glucagone è alto l'insulina non viene secreta.

**Inibitori dell'insulina:** La secrezione è inibita dalla **somatostatina** e dalle catecolamine **adrenalina** e **noradrenalina**. L'inibizione deriva dal fatto che hanno un effetto opposto, l'insulina, infatti, è anabolizzante, mentre adrenalina e noradrenalina sono catabolizzanti.

*Tra le catecolamine annoveriamo anche la dopamina, che tuttavia non ha azione ormonale, ma è un neurotrasmettitore a livello del Sistema Nervoso Centrale. Anche adrenalina e noradrenalina hanno tale effetto se prodotte dal SNC.*

## SINTESI DELL'INSULINA e MATURAZIONE

\* inizialmente, L'insulina viene prodotta a livello delle cellule  $\beta$  del pancreas sotto forma di un pre-ormone detto **Preproinsulina**, è una forma dell'ormone insulina che contiene all'estremità amminoterminale la sequenza segnale per poter essere inviato al Reticolo endoplasmatico dove l'ormone subisce delle modifiche e viene indirizzato verso le vescicole secretorie. Quando il preproinsulina entra nel reticolo endoplasmatico, questa sequenza segnale viene rimossa, per cui la preproinsulina si converte **pro-insulina** (pro-ormone)

- All'interno del reticolo la **proinsulina** va incontro a delle modifiche, tra cui la formazione di 3 ponti disolfuro. Il pro-ormone è costituito da una catena peptidica A (più chiara) da una catena B (la più scura) e da una catena C (colore intermedio). Si formerà quindi un ponte disolfuro intracatena a livello della catena A e due pontidisolfuro tra le catene A e B.
- A livello del reticolo endoplasmatico e del Golgi, la proinsulina subisce un taglio proteolitico rimuovendo il peptide C, formando così l'**insulina matura**, costituita soltanto da due catene unite tra loro per la presenza di 2 ponti disolfuro. Questa insulina matura e il peptide C che si è distaccato con il secondo taglio proteolitico rimangono entrambi a livello dei granuli secretori, e quando arriva lo stimolo per la secrezione di queste vescicole, vengono secreti insulina e anche il peptide C.

## Controllo della glicemia: Rilascio di insulina

Quando la glicemia aumenta e supera i valori 4.5/5 mM, questo stimola le cellule beta per secernere **insulina** all'esterno, e questo avviene tramite alcuni passaggi:

**1)** Inanzitutto, l'iperglicemia aumenta l'**assorbimento del glucosio** tramite i **trasportatori GLUT2** espressi **nel fegato e nel pancreas**:

Le cellule  $\beta$  pancreatiche, insieme alle cellule epatiche, hanno la caratteristica di avere i trasportatori GLUT2 per il glucosio, che sono caratterizzati da una bassa affinità per il glucosio. quindi, i GLUT2 legano il glucosio e gli permettono di attraversare la membrana solo quando il glucosio supera una concentrazione pari a 5 mM.

**A livello del fegato:** Il fegato quindi esprime trasportatori GLUT2 che sono poco affini per il glucosio per lasciarlo ad altri tessuti che hanno bisogno di utilizzarlo in condizioni di normoglicemia, mentre in condizioni di iperglicemia, il GLUT2 del fegato prenderà per forza il glucosio in eccesso proprio per controllare la glicemia e abbassarla.

**A livello del pancreas (secrezione di insulina):** Quando le cellule  $\beta$  pancreatiche recepiscono un segnale di iperglicemia sopra il livello di 5 mM, il trasportatore GLUT 2 assume affinità per il glucosio e lo fa entrare all'interno delle cellule dove viene catabolizzato, si attiva quindi la glicolisi in maniera abbondante, quindi si ha un incremento del ciclo di krebs, e un aumento della sintesi di ATP. (normalmente la cellula  $\beta$  pancreatica si trova nel suo **stato resting** in cui è una cellula spenta, ha bassi livelli di ATP, ma in condizioni di iperglicemia, si aumenta molto la glicolisi e produzione di ATP)

**3)** Questo aumento nella concentrazione intracellulare di ATP va a inibire dei canali per il potassio ATP-dipendenti, in modo che solo una minor quantità di potassio possa uscire dalla cellula, quindi il potassio si accumula nel versante intracellulare dove aumenta la carica positiva, creando un effetto di **depolarizzazione**.

**4)** Questa depolarizzazione di membrana attiva i canali per il calcio voltaggio-dipendenti detti **canali VOC** che successivamente si aprono e fanno entrare calcio all'interno della cellula. Il calcio è il segnale che induce la secrezione delle vescicole secretorie, quindi avviene la fusione delle vescicole preformate con la membrana e l'**ormone insulina** viene riversato all'esterno della cellula, che poi va ai diversi tessuti per reagire sui propri recettori tirosinocinasi dipendenti.

il **calcio** funziona nella trasmissione sinaptica, quando si ha la liberazione delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore, a livello del terminale presinaptico nello spazio intersinaptico. Il calcio ha lo stesso significato.

### Trattamento pazienti con difficoltà a livello di secrezione nelle cellule $\beta$ pancreatiche

I canali del potassio sono un target farmacologico, perché, come abbiamo visto, tutto il processo si basa sulla loro regolazione ATP dipendente. Quando c'è una ridotta capacità secretoria da parte delle cellule  $\beta$  pancreatiche questo si ripercuote su una bassa capacità di secernere insulina. I pazienti possono essere trattati con dei farmaci che si chiamano **sulfaniluree**, che vanno a determinare una chiusura dei canali per il potassio indipendentemente da tutto il segnale metabolico. Quindi stimolano la secrezione di insulina andando a determinare per via farmacologica la chiusura dei canali per il potassio, lo stimolo depolarizzante e l'apertura dei canali per il calcio.

### Recettore dell'insulina tirosinochinasi - Meccanismo di trasduzione del segnale:

L'insulina, una volta rilasciata, va ad agire su diversi tessuti, soprattutto nel fegato, il muscolo e il tessuto adiposo. Questi tessuti esprimono il recettore per l'insulina, un recettore che appartiene alla sottoclasse II dei **recettori tirosin chinasi** (RTK), che inizialmente sono dimeri. Il recettore dell'insulina è costituito da due monomeri, ogni monomero è formato da una catena beta legata a una catena alfa, e i due monomeri si legano con un ponte disolfuro tramite le catene alfa formando un dimero (beta-alfa-alfa-beta).

Le subunità alfa sono extracellulari, prendono contatto con il ligando:

Le subunità beta, hanno una piccola porzione extracellulare, una porzione transmembrana e una porzione intracellulare dove risiede l'attività tirosin chinasi.

**Dimerizzazione:** nel momento in cui si lega l'insulina si osserva un avvicinamento tra le due catene beta.

L'avvicinamento sarà importante per portare le catene beta a distanza idonea in modo che un monomero possa fosforilare tirosine sull'altro monomero.

un monomero attraverso la sua attività tirosin chinasi va a fosforilare tirosine sull'altro monomero, quindi **trans fosforilazione**, che porta alla formazione di residui di tirosina fosforilati su entrambi i monomeri.

Dopodiché le tirosine fosforilate (fosfotirosine) a livello del versante intracellulare reclutano particolari effettori a livello del recettore fosforilato (e quindi attivato), questi effettori saranno diverse a seconda che l'insulina ha un'attività metabolica o un'attività mitogenica:

#### - Nel caso di attività metabolica (iperglicemia), in questo caso:

##### 1. Il recettore dell'insulina fosforila IRS1

Il recettore attivato con le sue fosfotirosine funziona da **docking site** (sito di reclutamento) della **proteina IRS1** che è un substrato specifico del recettore dell'insulina (insuline receptor substrate). ~~Ne esistono 4 isoforme, ma la prevalente è l'isoforma uno.~~ IRS1 ha dei domini SH2 (che sono domini di proteine che hanno alta affinità per le fosfotirosine) e grazie a questi domini la IRS1 viene reclutata a livello del recettore attivato e si lega alle sue fosfotirosine, e successivamente la **proteina IRS1 viene fosforilata** dal recettore formando così fosfotirosine anche a livello dell'IRS1.

##### 2. IRS1 attiva il PI3K

Le fosfotirosine dell'IRS1, a loro volta, diventeranno **docking site** per il reclutamento e l'attivazione di un altro effettore detto **fosfatidil inositolo 3 chinasi (PI3K)** che è una chinasi che può avere due attività: può andare a fosforilare delle proteine, quindi può agire da protein chinasi (in particolare da serino treonina chinasi) ma può avere anche un'attività di lipido chinasi, fosforila lipidi di membrana.

### 3. La PI3K fosforila PIP2

La PI3K va a fosforilare il **fosfatidil-inositolo 4,5 bisfosfato** o **PIP2**: lo fosforila in posizione 3 e anche nella posizione 3 della testa polare, trasformandolo nel **fosfatidil inositolo 3,4,5, trisfosfato (PIP3)**.

### 4. PIP3 attiva PKB

A questo punto il PIP3 fa il reclutamento di una proteina detta **PKB** che è una proteina **serino-treonino chinasi**, che contiene i **domini PH** in grado di interagire con il fosfatidil inositolo 3, 4, 5, trisfosfato. Quindi la PKB viene reclutata e attivata. anche PPK a sua volta attiverà PKB e ne determinerà la fosforilazione.

PKB a questo punto può andare ad agire sui suoi 2 target: **GSK3** e **PP1**

### 5. Inibizione GSK3

Uno dei target della PKB è il **glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3)** che è una chinasi dell'enzima glicogeno sintasi. Quindi il **PKB** fosforila la chinasi GSK3 **inattivandola**. Quindi la GSK3 inattiva a questo punto non sarà più in grado di andare a fosforilare e inattivare l'enzima glicogeno sintasi, quindi l'insulina fa sì che l'enzima glicogeno sintasi possa essere attiva e catalizza la **glicogenosintesi** come modo di smaltire il glucosio e abbassare i suoi livelli nel sangue, portando così alla **normoglicemia**. Quindi grazie all'insulina, che agisce a livello delle cellule epatiche e muscolari, il glucosio viene accumulato in queste cellule formando molecole di riserva (glicogeno).

Tutto questo viene favorito anche dal secondo target del PKB è la **fosfatasi PP1**, che va a defosforilare la glicogeno sintasi mantenendola defosforilata e quindi attiva, quindi mantiene attiva la glicogenosintesi favorendo l'obiettivo di abbassare l'iperglicemia.

### - Nel muscolo e tessuto adiposo avviene un processo in più - l'insulina induce l'espressione dei trasportatori **GLUT4**:

Durante l'iperglicemia e la secrezione di insulina, a livello del muscolo e del tessuto adiposo l'insulina stimola l'espressione sulla membrana plasmatica di un altro trasportatore del glucosio che è il **GLUT 4**, che è l'unico tra i trasportatori GLUT che non è sempre presente sulla membrana plasmatica, ma viene esposto soltanto quando c'è una stimolazione da parte di insulina, tutti gli altri GLUT sono sempre esposti sulla membrana.

Quindi quando arriva la stimolazione con l'insulina, parte una segnalazione che induce la fusione delle vescicole che hanno i GLUT sulla loro membrana, con la membrana plasmatica. Questo aumenta la capacità recettiva nei confronti del glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo, che sono i tessuti più abbondanti nel corpo, per cui l'espressione di questi tanti trasportatori nei muscoli e tessuti adiposi porta a rimozione del glucosio molto più rapida.

Nelle **cellule muscolari** e **cellule adipose** l'insulina induce anche il glicogeno sintesi, soprattutto a livello di muscolo induce la glicogenosintesi, mentre a livello del tessuto adiposo induce la **lipogenesi** per far immagazzinare l'eccesso di glucosio sotto forma di lipidi. Il tessuto adiposo in parte forma da solo i propri lipidi, e in parte li riceve dal fegato.

Nelle **Cellule epatiche** : L'insulina attiva la glicogeno sintesi, quindi utilizza il glucosio in eccesso per stoccarlo sotto forma di glicogeno per utilizzi futuri. Inoltre attiva la glicolisi soprattutto per produrre acetil coenzima A, attivando l'anabolismo lipidico. Quindi tutto questo glucosio in eccesso al posto di utilizzarlo per fare energia non necessaria, viene accumulato sotto forma di glicogeno nel fegato e nel muscolo che fino ad un limite non saranno più in grado di immagazzinare glicogeno, e quindi il fegato fa la glicolisi trasformando il glucosio in acidi grassi e trigliceridi che poi vengono inviati al tessuto adiposo dove entrano nell'anabolismo lipidico, formando lipidi di riserva. In questo modo si elimina l'eccesso di glucosio.

## Azione metabolica dell'insulina nei processi metabolici (SPIEGATI TUTTI PRIMA, anche regolazione)

- 1) Metabolismo del glicogeno (**glicogenosintesi** e **glicogenolisi**)
- 2) Metabolismo del glucosio (glicolisi e gluconeogenesi)
- 3) Metabolismo dei lipidi
- 4) Metabolismo proteico.



## INSULINA: EFFETTO MITOGENICO

### (Attivazione della via delle MAP CHINASI o MAPK)

L'insulina, oltre all'effetto metabolico, ha un effetto mitogenico, cioè può indurre i processi di mitosi nelle cellule portando alla proliferazione cellulare. Il signaling mitogenico dell'insulina parte sempre dal recettore tirosino-chinasi dell'insulina che viene dimerizzato e transfosforilato in seguito all'interazione con il ligando, si ha sempre il reclutamento di IRS-1 che quale viene reclutato dal recettore attivato e fosforilato a sua volta dall'attività tirosinchinasica del recettore.

Ma, diverso dal caso del signaling metabolico in cui le fosfotirosine di IRS-1 servono da docking site per reclutare la PI3K, nel caso del signaling mitogenico, le fosfotirosine di IRS-1 servono da docking site per la proteina **Grb2** che è una **proteina adattatrice**, che presenta domini **SH2** che sono affini alle fosfotirosine dell'IRS-1 per cui riesce a legarsi all'IRS-1. La proteina Grb2 lega anche una proteina detta SOS (proteina ricca di prolina) e la Grb2 riesce a legare la SOS perchè la Grb2 presenta i domini SH3 affini per le sequenze ricche in prolina. Quindi Grb2 da una parte con i suoi domini SH2 lega IRS-1, con i suoi domini SH3 lega le sequenze ricche in prolina di SOS.

La **Grb2** E' una proteina fondamentale perchè riesce a combinare due mediatori della via di trasduzione del segnale che sono: **IRS-1** e **SOS**, in modo che questi due mediatori si riconoscono a vicenda.

**Sos** è un fattore di scambio di nucleotidi della **proteina G-Ras**, che è una piccola proteina G monomerica che è attiva quando lega GTP, inattiva quando lega GDP. *Cosa fa Sos?* SOS scambia nucleotidi della Ras: la SOS lega GDP, mentre la Ras lega GTP e quindi viene attivata.

Una volta attivata Ras, questa determina l'attivazione allosterica di un **enzima serino treonino chinasi** detto **Raf**, questo enzima andrà a fosforilare e ad attivare l'enzima **MEK** che a sua volta va a fosforilare e attivare le **MAP chinasi (MAPK)**.

A questo punto, la **MAP chinasi** fosforilata entra nel nucleo e si lega a fattori trascrizionali e quindi occupa i siti di geni specifici a livello del promotore, e inducono la **trascrizione di geni sotto il controllo dell'insulina**. Questi geni servono per la proliferazione cellulare. Quindi in questo modo l'insulina svolge un effetto mitogenico cioè induce i processi di mitosi nelle cellule.

## GLUCAGONE (Innesca la glicogenolisi e la gluconeogenesi)

Il glucagone fa l'esatto opposto di quello che fa l'insulina. Il glucagone è un ormone peptidico prodotto dalle cellule alfa delle isole di Langherans della porzione endocrina del pancreas. È un oligopeptide di 29 amminoacidi che ha un'azione iperglicemizzante, cioè in situazioni di ipoglicemia per esempio durante il digiuno, il glucagone induce l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue per risabilire la normoglicemia.

In realtà questa azione iperglicemizzante ce l'avranno anche i glucocorticoidi (cortisolo) e in parte anche le catecolammine. Però, mentre i glucocorticoidi inducono questo effetto iperglicemizzante soprattutto in

seguito a condizioni di stress, fisici e psicologici, il glucagone risponde invece ad uno stimolo ipoglicemizzante da digiuno. Il glucagone agisce soltanto a livello del fegato e del tessuto adiposo. Perché solo le cellule del fegato e tessuto adiposo esprimono i recettori specifici per il glucagone.

Quindi, le cellule alfa pancreatiche vengono stimulate primariamente da una riduzione dei livelli di glucosio in circolo, ma subiscono uno stimolo positivo anche da parte degli amminoacidi (come l'arginina che stimola la secrezione di glucagone). Le cellule alfa ricevono anche una stimolazione dal sistema parasimpatico e del sistema simpatico, in particolare da acetilcolina che viene attivata soprattutto in seguito a processi digestivi o in seguito alle catecolammine, adrenalina e non adrenalina. Le cellule alfa ricevono però stimoli inibitori da parte dell'insulina e della somatostatina. ~~Quindi la somatostatina prodotta dalle cellule delta del pancreas ha un'azione inibitoria sia per quanto riguarda la secrezione di insulina, che per quanto riguarda la secrezione di glucagone.~~ Quindi alti livelli di insulina inibiscono la secrezione di glucagone e viceversa.

Il glucagone fa aumentare la lipolisi a livello del tessuto adiposo mentre a livello del fegato induce la glicogenolisi e gluconeogenesi, producendo glucosio da questi processi proprio per aumentare i livelli di glucosio nel sangue e ristabilire la normoglicemia. Allo stesso tempo il glucagone inibisce la glicogenosintesi e la glicolisi. Il recettore per il glucagone appartiene alla classe dei **recettori accoppiati a proteine G**, quindi diverso dall'insulina che invece fa parte della classe di recettori tirosino-chinasi. In particolare il glucagone si lega ad una proteina G trimerica che ha come subunità alfa la subunità alfa **GS** (subunità che stimola l'Adenilato ciclasi).

### Recettori del glucagone - Trasduzione del segnale del glucagone

La via di trasduzione del segnale del glucagone inizia quando il glucagone si lega al suo recettore (G-dipendente), Poi, il recettore va incontro ad una modifica conformazionale che porta alla attivazione della proteina G trimerica. L'attivazione della proteina G trimerica è dovuta ad una dissociazione del dimero beta gamma inibitorio rispetto alla subunità Alfa GS. La sub unità Alfa GS, una volta liberata dal dimero inibitorio si sposta sulla membrana per incontrare il suo effettore che è l'**Adenilato ciclasi**, che quindi interagisce con la subunità alfa Gs (GTP bound), per cui l'adenilato ciclasi si attiva e va a idrolizzare l'ATP in AMP e gruppo difosfato, e l'AMP viene utilizzato per ciclizzare il fosfato in alfa tra le posizioni 3 e 5 formando così il **secondo messaggero AMP ciclico**. L'Adenilato ciclasi si attiva in seguito all'interazione con la sub unità Alfa GS GTP bound e porta avanti la sua attività. L'attività dell'Adenilato ciclasi è quella di utilizzare ATP per formare AMP ciclico. Quindi si rimuove il gruppo difosfato dall'ATP e AMP viene utilizzato per ciclizzare il fosfato in alfa tra le posizioni 3' e 5'.

L'AMP ciclico, una volta formato, va a fungere da attivatore allosterico di **PKA** (proteina chinasi AMP ciclico dipendente). PKA è costituito da quattro subunità, due catalitiche e due regolatorie: quando 4 AMP ciclico si legano alle due subunità regolatorie, queste perdono affinità per le subunità catalitiche e le subunità catalitiche si dissociano e vanno a smascherare il sito attivo che quindi sarà accessibile ai target che sono l'ATP e il target di PKA, target che può essere diverso a seconda della via metabolica, in questo caso il target della PKA è l'enzima **glicogeno fosforilasi chinasi**, che ad opera della PKA viene fosforilato e attivato. Il **glicogeno fosforilasi chinasi** a sua volta fosforila e attiva l'enzima **glicogeno fosforilasi** attivando la glicogenolisi.

La PKA andrà anche a fosforilare la **glicogeno sintasi** per inibirlo.

Nel fegato e nel muscolo l'**adrenalina** coopera con il glucagone per innescare la glicogenolisi.

La PKA insieme alla glicogeno fosforilasi vanno a interrompere e inibire la via dell'insulina, per potenziare la via della glicogenolisi: Per cui la PKA va a fosforilare la cosiddetta **proteina IP** che, quando è fosforilata funziona un inibitore dell'enzima **fosfatasi PP1**, quindi la proteina IP fosforilata inibisce la fosfatasi PP1 che quindi non sarà più in grado di defosforilare la glicogeno sintasi che rimane quindi nello stato fosforilato inattivo, così viene inibita la glicogenosintesi.

**Quando lo stimolo del glucagone verrà meno** e quindi i livelli di AMP ciclico cominceranno a calare, chiaramente si verificherà l'effetto opposto. La fosfatasi PP1 non sarà più inibita quindi potrà di nuovo a defosforilare i suoi substrati che sono da una parte la **glicogeno fosforilasi chinasi** e la **glicogeno fosforilasi** che successivamente vengono inattivati, per cui viene inattivata anche la glicogenolisi, dall'altra parte, la fosfatasi PP1 potrà defosforilare anche la **glicogeno sintasi** attivando la glicogenosintesi e questo sarà promosso anche dal segnale insulina dipendente.

#### Metabolismo del glucosio: enzimi chiave regolati dal glucagone

L'attività del glucagone nel mediare questa attivazione della gluconeogenesi si esplica sulla regolazione dell'enzima bifunzionale.

Quindi la PKA va a fosforilare l'enzima bifunzionale e la fosforilazione dell'enzima

bifunzionale porta allo spegnimento dell'attività chinasica PFK2 e attivazione dell'attività fosfatasica fruttosio 2,6 bifosfatasi.

Quindi la fruttosio 2,6 bifosfatasi va a idrolizzare il fruttosio 2,6 bifosfato a fruttosio 6 fosfato comportando un crollo dei livelli di fruttosio 2,6. Se i livelli di fruttosio 2-6 calano, da una parte si inibisce la PFK-1, dall'altra si attiva la fruttosio 1,6 bifosfatasi e quindi avremo una diminuzione della glicolisi e un aumento della gluconeogenesi. (Niente di più di quello che abbiamo visto al contrario per l'insulina).

#### Ruolo del glucagone a livello del tessuto adiposo

Stessa cosa per il metabolismo dei lipidi, anche in questo caso niente di diverso da quello che abbiamo visto prima. *Come fa*

*il glucagone ad avere questa attività*

*lipolitica a livello del tessuto adiposo?*

Perché PKA attivata dal glucagone, da una parte fosforila la perilipina, la fosforilazione della perilipina consente

alle molecole di perilipina di dissociarsi le une dalle altre e questo va a rompere il guscio proteico che mantiene isolati i trigliceridi all'interno. Questo fa sì che la lipasi ormone sensibile, a sua volta fosforilata e attivata da PKA, possa entrare all'interno della goccia lipidica e avere accesso per la mobilizzazione dei trigliceridi. (Lo avete già visto con il prof Cirri ma sapete che la lipasi ormone sensibile non trigliceride lipasi ma è

una digliceride lipasi.) Quindi ci vuole un enzima che agisca prima sui trigliceridi che vada a rimuovere il primo acido grasso. La trigliceride lipasi, quindi il primo enzima che agisce sui trigliceridi, in realtà viene attivata dal distacco. **ATGL** è la trigliceride lipasi che è la prima che agisce sui trigliceridi e questa ATGL viene attivata perché la fosforilazione della perilipina non serve solo a aprire il varco ma serve anche a liberare questa proteina che si chiama **CGI**, che è un attivatore della trigliceride lipasi. Finché CGI viene mantenuta legata alla perilipina non può attivare l'enzima, ma quando la perilipina viene fosforilata perde affinità per questa CGI, la quale viene liberata e può andare ad interagire con la trigliceride lipasi e quindi viene attivata.

La trigliceride lipasi stacca il primo acido grasso (quindi un acido grasso più triacilglicerolo). È sul diacilglicerolo che agirà la lipasi ormone sensibile perché questa è una digliceridelipasi e staccherà quindi il secondo acido grasso. Si formerà un monoacilglicerolo su cui agirà la monoacilglicerollipasi che quindi produrrà il glicerolo e l'ultimo acido grasso.

La trigliceridelipasi in realtà è un enzima citosolico che, nel momento in cui la perilipina si apre, arriva e con la dissociazione di CGI dalla perilipina si attiva e quindi può cominciare la mobilizzazione dei trigliceridi.

### Profilo metabolico indotto da glucagone

Questo è il profilo metabolico indotto da glucagone. Il glucagone agisce primariamente sul fegato e sul tessuto adiposo. A livello del tessuto adiposo induce la lipolisi, quindi si liberano acidi grassi e glicerolo che entreranno nel circolo. A livello del fegato, invece, il glucagone induce sia la glicogenolisi, quindi rende disponibile subito glucosio che può essere immesso all'esterno aumentando la glicemia ematica e quindi andando a rifornire glucosio per il cervello, che è uno dei tessuti glucosio dipendenti, ma visto che il glicogeno comunque limitante a livello del fegato si attiva anche la gluconeogenesi, che chiaramente supporterà questo ruolo iperglicemizzante.

*Come fa il fegato ad avere precursori per la gluconeogenesi?* Li ha ha perché il glicerolo arriva dal tessuto adiposo e può essere un precursore per gluconeogenesi, ma a livello del muscolo che non sente più lo stimolo dell'insulina, in presenza del glucagone, si avrà un aumento della degradazione delle proteine, quindi questo libererà amminoacidi e in particolare l'alanina andrà a diventare un precursore per la gluconeogenesi. Quindi in condizioni di digiuno si avrà anche un aumento della degradazione di proteine a livello del muscolo che formeranno precursori per la gluconeogenesi.

Gli acidi grassi che si liberano dal tessuto adiposo serviranno per supportare l'attività anabolica gluconeogenetica del fegato perché formeranno un nutriente che sarà utilizzato per via energetica. Quindi siccome il fegato non può utilizzare glucosio perché sta producendo glucosio, utilizzerà per avere energia gli acidi grassi che provengono dal tessuto adiposo. Quindi al livello del fegato si innescherà la beta ossidazione e questa supporterà dal punto di vista energetico il fegato. Oltre a questo in condizioni di digiuno e soprattutto di digiuno prolungato, vista questa forte attività catabolica nei confronti degli acidi grassi, a livello del fegato si avrà anche la produzione di corpi chetonici perché c'è una forte produzione di acetilcoenzimaA perché è fortemente stimolata la beta ossidazione. Ma tutto questo acetilcoenzimaA non potrà essere smaltito per via ossidativa, perché contemporaneamente il fegato sta facendo gluconeogenesi quindi utilizza e preleva ossalacetato dal ciclo di Krebs per garantire la gluconeogenesi.

Quindi questa riduzione dei livelli di ossalacetato, perché questi sono utilizzati per la gluconeogenesi, fa sì che questa acetilcoenzimaA non trovi un corretto smaltimento via ciclo di Krebs ed è per questo che l'acetilcoenzimaA viene deviato verso la sintesi dei corpi chetonici. Quindi in una situazione di digiuno prolungato il fegato viene definito un fegato cheto genetico, vuol dire che ha fortemente attivati il catabolismo degli acidi grassi, l'anabolismo del glucosio e la sintesi dei corpi chetonici. Corpi chetonici che servono

indubbiamente per rifornire, per garantire la presenza di un nutriente alternativo in condizioni di emergenza, quando il glucosio può diventare limitante e che può essere utilizzato dal cuore e dal cervello. Un nutriente che può essere utilizzato in condizioni di uricemia.

# Diabete

Un diabetico è un individuo che presenta livelli glicemici molto alti perché ha un difetto nella segnalazione ormonale dell'insulina e quindi il soggetto non è in grado di far entrare il glucosio nelle cellule e utilizzarlo al fine di abbassare l'iperglicemia.

(la glicemia = il valore di glucosio a livello ematico). Di norma deve aggirarsi attorno agli 80-100 mg/dl, però possono verificarsi anche di cambiamenti fisiologici normali della glicemia per esempio dopo un pasto la glicemia tende ad aumentare mentre a digiuno o con lo sforzo fisico tende a diminuire.

L'ormone ipoglicemizzante è l'insulina quindi rende possibile l'utilizzo del glucosio, invece gli ormoni iperglicemizzanti sono il glucagone e il cortisolo.

I **test diagnostici** sono dei test che permettono di osservare i livelli glicemici a digiuno. Le conseguenze del diabete sono non solo livelli glicemici alti ma anche il processo di chetoacidosi (a livello del sangue sono presenti i corpi chetonici e anche un pH del sangue più acido), quindi il problema del diabete è associato ad un cattivo utilizzo del glucosio e come conseguenza ci sarà la formazione di corpi chetonici.

## I tipi di diabete sono 3:

**Diabete di tipo 1:** è detto **diabete mellito** o giovanile. È insulina-dipendente, in cui manca la secrezione di insulina da parte delle cellule beta pancreatiche perché queste cellule vengono distrutte a causa di una risposta autoimmune. Questo caso viene trattato con la somministrazione di insulina giornaliera, e con cambiamenti nella dieta. Le persone affette di questo tipo di diabete hanno un'aspettativa di vita ridotta di un terzo. E sono più soggetti a chetoacidosi, disfunzioni renali e cecità.

**Diabete di tipo 2:** è diabete insulina-dipendente. comune tra gli adulti sopra 40 anni. In questo caso, è presente un difetto nel sistema recettoriale, e manca una risposta adeguata all'insulina.

**Diabete giovanile ad insorgenza tardiva (MODY):** che invece è dovuto a mutazioni a livello di **glucochinasi epatica**, che non sarà in grado di fosforilare e intrappolare il glucosio nel fegato, per cui aumentano i livelli di glucosio nel sangue (si ha l'iperglicemia).

## --- > IL DIABETE MELLITO

Nel paziente affetto da diabete mellito, il metabolismo si comporta in modo analogo al digiuno prolungato, nonostante vi sia una glicemia molto elevata.

Il termine "diabete mellito" deriva dal fatto che le urine presentano elevate quantità di glucosio (glicosuria). La carenza di insulina, tipica del diabete, determina un aumento della glicemia: quando questa supera i 180 mg/dL, il glucosio viene escreto con le urine. Esistono diversi tipi di diabete mellito, tutte caratterizzate dalla perdita di glucosio nelle urine.

Questo glucosio è molto elevato, quindi lo stimolo che le cellule dovrebbero sentire dovrebbe essere di ricchezza energetica, al contrario invece percepiscono uno stimolo di fame, perché non è possibile attivare lo stimolo di traslocazione del trasportatore GLUT-4, che da un lato dà luogo alla regolazione della glicemia e quindi l'abbassamento della glicemia, ma dall'altro sicuramente "impalla" anche il sistema di sensing della cellula che si sente priva di glucosio (quindi non può entrare), quando invece fuori ce ne sarebbe molto.

PRESO DA INTERNET: (Il trasportatore del glucosio più conosciuto e studiato è il GLUT-4, a causa della sua sensibilità diretta all'insulina. In condizioni normali, questo carrier si trova in sede citoplasmatica e la sua traslocazione sulla

membrana cellulare viene stimolata dal legame dell'insulina con il recettore di membrana. Questo processo favorisce lo spostamento del glucosio dal liquido interstiziale all'interno della cellula. Quando la concentrazione ematica di glucosio si normalizza e l'insulina viene eliminata, le molecole di GLUT 4 vengono lentamente rimosse dalla membrana plasmatica e sequestrate per endocitosi in vescicole intracellulari.)

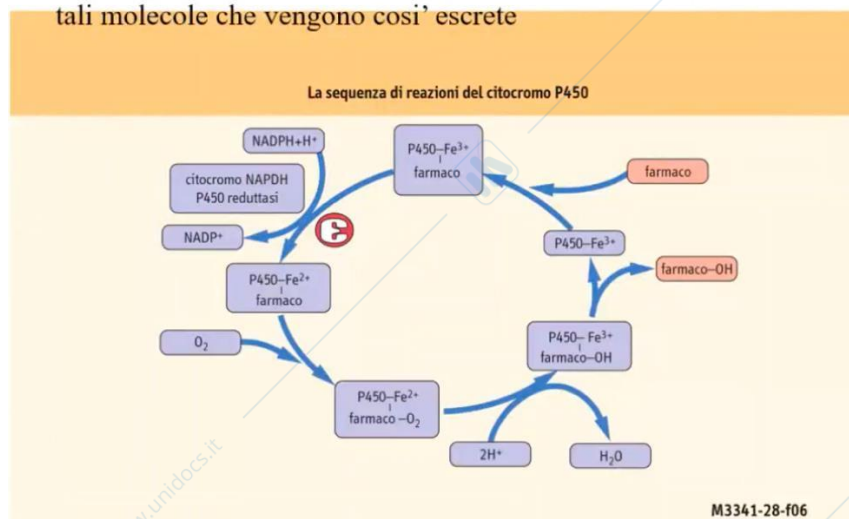
Ne consegue che il metabolismo è simile a quello del digiuno prolungato.

Il fegato attiva corposamente la gluconeogenesi, nonostante l'elevata presenza di glucosio, in quanto non riesce a percepirlo. Nelle cellule epatiche sono presenti i GLUT-2, che non sono dei sensori del glucosio come i Glut-4.

Il fegato dunque sintetizza corpi chetonici fino ad aumentare i livelli di chetonemia, di conseguenza aumenta l'acidità del plasma e l'acidosi porta ad un'aumentata escrezione di ione  $H^+$ , nel tentativo di compensare questo difetto. Insieme agli ioni  $H^+$  vengono escrete grandi quantità di acqua, per cui si ha poliuria (tipica del diabete). Durante la malattia, viene quindi coinvolto gravemente anche il rene. Il diabete mellito somiglia talmente tanto al digiuno prolungato che il rene percepisce la disfunzione metabolica, aumentando la gluconeogenesi. Il muscolo si comporta come il fegato, perché anch'esso non presenta i GLUT-4.

Il tessuto adiposo invece, sentendosi in uno stato di depauperamento energetico, catabolizza gli acidi grassi. Il tessuto adiposo è sensibile all'insulina, in quanto presenta i glut-4. Nei pazienti con diabete c'è un aumento di trigliceridi plasmatici, perché il tessuto adiposo reagisce come se fosse "affamato".

La idrossilazione di molecole da parte del fegato: viene utilizzata per generare un gruppo reattivo (OH) per il trasferimento di acido glucuronico o solfati. Il fine è di inattivare e rendere più solubili tali molecole che vengono così escrete



## Funzione di detossificazione nel fegato

Il fegato è l'unico organo in grado di detossificare l'organismo dalle sostanze lipofile dannose e inutili. (lipofilo per cui non può essere escreta con i fluidi biologici).

Ci sono due modi per assumere queste sostanze: tramite **farmaci**, oppure con i xenobiotici.

I xenobiotici sono molecole che "contaminano" i cibi che consumiamo normalmente: quelle idrofile vengono eliminate facilmente, invece quelle lipofile e idrofobiche vengono modificate dal fegato che converte queste molecole da lipofile a idrofile. La modifica classica che rende una molecola idrofila è la glicosilazione. Dato che le molecole lipofile non hanno gruppi con cui è possibile fare una reazione di glicosilazione, vengono coinvolti enzimi particolari detti **citocromi P450**.

### Citocromi P450:

Sono prevalentemente espressi nel fegato, nel tratto gastro-intestinale e nel surrene, e nelle ghiandole sessuali. Nelle cellule si trovano prevalentemente nel reticolo endoplasmatico (dove avviene la detossificazione degli xenobiotici) e nel mitocondrio delle cellule che sintetizzano ormoni steroidei. Esistono tanti tipi del citocromo P450, ogni tipo corrisponde ad una diversa funzione, e per conoscere l'emivita di un farmaco è importante sapere quale citocromo P450 agisce.

Le funzioni dei citocromi P450 vanno dal metabolismo dei farmaci e degli ormoni steroidei a quello degli acidi grassi. Sono inoltre responsabili dell'insaturazione degli acidi grassi e del metabolismo della vitamina A e dell'acido retinoico.

### Meccanismo di detossificazione epatico - Metabolismo Xenobiotici

È il meccanismo di modificazione della molecola lipofila tramite cui viene ottenuta una molecola idrofila che può essere eliminata facilmente con la bile o le urine. Consiste di **2 fasi**:

#### 1° Fase:

I citocromi P450 sono molecole composte da un gruppo eme (che contiene un ferro che oscilla tra lo stato ferroso e lo stato ferrico:  $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ ) quindi ossidandosi e riducendosi trasporta elettroni.

I citocromi P450 funzionano da **monossigenasi**: cioè strappano un atomo di ossigeno dall' $O_2$

e lo utilizzano per ossidare la molecola lipofila che viene infatti **idrossilato (acquista un gruppo OH)**.

L'altro atomo di ossigeno dell' $O_2$  viene espulso sotto forma di acqua. Contemporaneamente, il citocromo P450 viene ridotto dal NADPH, ad opera dell'enzima "**NADPH-citocromo P450 reduttasi**", quindi il ferro ferrico del citocromo viene ridotto a **ferro ferroso (Fe<sup>2+</sup>)**, viene liberata NADP<sup>+</sup>.

#### citocromo P450

è una monoossigenasi che catalizza la reazione di ossidrilazione



Coinvolto nel metabolismo di numerosi composti idrofobici

- sostanze endogene come il colesterolo, steroidi e lipidi
- sostanze esogene come farmaci, inquinanti ambientali

#### Localizzazione d'organo

Fegato  
Apparato gastrointestinale  
Ghiandola surrenale

#### Localizzazione cellulare

Mitocondrio: colesterolo, ormoni steroidei  
Enzimi specifici  
Reticolo endoplasmatico: xenobiotici  
Enzimi poco specifici

**2° FASE:**

Durante la seconda fase avviene il metabolismo di fase 2 avviene la coniugazione del substrato idrossilato con un **composto endogeno polare**.

Questo composto può essere:

- **Acido glucuronico**; se vogliamo glicosilare il gruppo OH del substrato, viene aggiunto ad opera dell'enzima **UDP glucuronil transferasi**.
- **Solfato**; se vogliamo solfatore il substrato, viene aggiunto ad opera dell'enzima **solfotransferasi** (il gruppo solfato avendo diverse cariche negative, è un buon modificatore).
- **Glutathione** (che ha proprietà antiossidanti), viene addizionato ad opera dell'enzima **Glutathione S-transferasi**.

Dopo essere state coniugate ad un composto polare, le molecole lipofile diventano solubili in acqua e quindi vengono eliminate facilmente tramite la bile o le urine.

**Citocromo P450 E PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI**

I citocromi P450 durante la scissione dell'ossigeno, portano frequentemente alla produzione di radicali liberi. Questo perché vengono trasportati diversi elettroni. Il ferro aiuta ad ostacolare la formazione di ROS ma può portare un solo elettrone.

il citocromo P450 legando  $O_2$  per ossidare il substrato, potrebbe formare lo ione superossido.

i citocromi P450 sono tantissimi e differiscono per la catena polipeptidica, che è leggermente diversa.

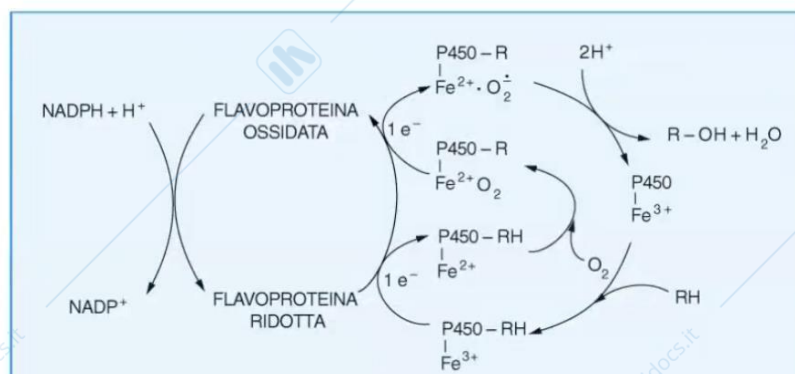
Questi sono coinvolti sia nel metabolismo dei composti idrofobici, ma anche **nelle modifiche di colesterolo, steroidi e lipidi**.

il NADPH ossidandosi, cede **2 elettroni**, ma il citocromo P450 può portare un solo elettrone alla volta e quindi si crea un punto "leakage" in cui il secondo elettrone può essere accettato dall'ossigeno formando l'anione superossido.

**Il cytP450 e' una fonte di radicali liberi**

La sintesi e la attivita' di cytP450 e' indotta da **etanolo**, ergo negli etilisti c'e' una produzione cronica di ROS (stress ossidativo epatico)

I ROS reagiscono con l'etanolo stesso per produrre il radicale idrossietile, che determina ossidazione delle proteine epatiche e malfunzionamento



## I LIVELLI DI P450

I livelli di P450 sono abbastanza soggettivi, variano da individuo a individuo, per cui ognuno ha una capacità diversa di catabolizzare i farmaci. Queste quantità cambiano anche in base a fattori genetici o ambientali.

Un classico esempio è l'esposizione cronica all'alcool, che fa aumentare molto l'espressione dei P450 con conseguenze sul catabolismo dei farmaci, come avviene negli alcolizzati.

Altri fattori che portano all'aumento sono ad esempio: fumo di sigaretta (che aumenta la necessità di detossificare).

## CONTROLLO TRASCRIZIONALE:

Esiste inoltre un controllo trascrizionale estremamente complesso: questo prevede che ci siano dei recettori per gli xenobiotici.

Ci sono dei recettori chiamati: AhR, PXR, e ACR.

- I recettori Ahr sono recettori per gli idrocarburi, la quale assunzione dipende molto da fattori alimentari (es. mangiare cibi carbonizzati) e ambientali (ad es. un benzinaio che sta sempre a contatto con fonti di idrocarburi avrà più stimolati questi recettori e avrà una iperproliferazione dei microsomi con i rispettivi citocromi P450).
- I recettori PXR del pregnano e ACR degli androstani sono meno diffusi.

Tutti questi recettori sono dei fattori trascrizionali, quindi segnalatori che vanno nel nucleo a regolare la trascrizione (essendo lipofili possono attraversare la membrana e quindi incontrare il recettore dentro la cellula).

Questi, per attivare la trascrizione, devono essere eterodimerizzati con una particolare molecola che si chiama recettore per l'acido retinoico.

L'acido retinoico, che noi conosciamo come precursore della vitamina A, ha un suo recettore (molecola ad attività trascrizionale) che deve dimerizzare per diventare un fattore trascrizionale.

Questa dimerizzazione è mediata da un ponte disolfuro di tipo attivatorio.

Tramite dimerizzazione può formarsi:

- un omodimero (2RXR) e allora in quel caso ha un'azione prevalentemente differenziativa, molto importante in tutti gli organismi.
- Oppure può eterodimerizzare con altri recettori, producendo di conseguenza una proteina recettoriale diversa (una proteina che riconoscerà una proteina disposta su geni diversi).

Se dimerizza con uno dei tre recettori visti precedentemente (Ahr,PXR,ACR), trascriverà i geni del metabolismo degli xenobiotici, sia di fase 1 che di fase 2.

Tutti questi fattori trascrizionali che si sono formati in maniera eterodimerica, riconoscono degli elementi di risposta presenti nei geni del metabolismo di fase 1 e 2: gli XRE = xenobiotic response element quindi il concetto è sempre: c'è un elemento di DNA comune che viene letto da un fattore trascrizionale, il quale riconosce i geni da attivare in quel momento.

**Controllo trascrizionale degli enzimi di fase I e II tramite recettori nucleari:** recettori per gli steroidi/xenobiotici attivati dai ligandi

### Sensori degli xenobiotici

AhR = recettore per gli idrocarburi

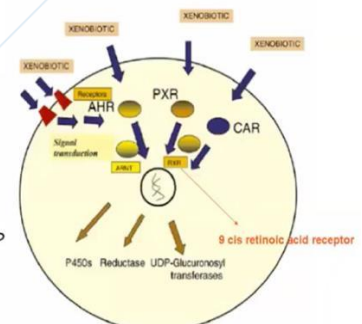
PXR = recettore X del pregnano

ACR = recettore costitutivo per gli androstani

formano eterodimeri con RXR (recettore per l'acido retinoico)

riconoscono nel promotore dei geni CYP

XRE = xenobiotic response element



## METABOLISMO DELL'ETANOLO

L'etanolo assomiglia molto agli xenobiotici, ma lo assumiamo in quantità variabile. È introdotto nel corpo quando si consuma l'alcool. Si considera tossico per un consumo eccessivo. È un alimento calorico, e anche carburante del ciclo di Krebs.

Il metabolismo dell'etanolo si può avere in 2 modi in base alla quantità di alcol consumato:

- Se il consumo è moderato, l'etanolo va incontro ad una via catabolica che lo converte in **acetil-coA**.
- Se invece il consumo è eccessivo, si attiva un'altra via catabolica Citocromo P450 dipendente, che richiede quindi il **complesso enzimatico MEOS** (un tipo di citocromo P450) (chiamato così perché si trova nel microsoma).

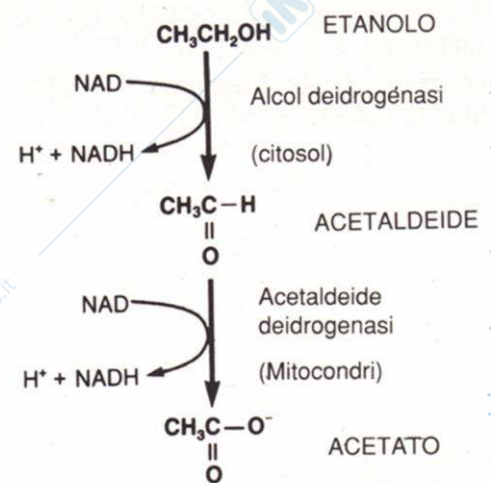
L'etanolo viene perlopiù catabolizzato nel fegato, ma una piccola quota viene eliminata anche attraverso la sudorazione, essendo una molecola piccola.



### 1° tipo di metabolismo dell'etanolo (consumo moderato)

La prima reazione è una redox in cui l'**etanolo** viene trasformato in **acetaldeide**. L'enzima coinvolto è **Alcol deidrogenasi** e la reazione è NAD dipendente. successivamente, interviene l'enzima **acetaldeide deidrogenasi** NAD dipendente che trasforma l'acetaldeide in **acetato**. L'acetato può essere trasformato in Acetil-CoA che entra in varie vie metaboliche. quindi in questo caso l'etanolo si considera un alimento che ci nutrice.

(questa reazione è simile un po alla fermentazione alcolica, è leggermente diversa). L'alcol deidrogenasi è presente in due tipi: uno costitutivo e uno indotto. Quello indotto è espresso maggiormente: negli individui maschi e dopo una certa età. Ma l'enzima limitante è l'aldeide deidrogenasi. Questo è ancora meno presente nelle donne che hanno una sopportazione minore dell'alcol.



### 2° tipo di metabolismo dell'etanolo (consumo eccessivo)

Se invece il consumo è elevato si attiva il **meccanismo MEOS**: ad opera del **complesso citocroma P450 di tipo MEOS** l'etanolo viene trasformato in **acetaldeide**. A questo punto l'acetaldeide deve subire una reazione NAD dipendente che lo trasforma in acido acetico. Durante un consumo eccessivo di alcol, aumenta il metabolismo dell'etanolo, quindi si ha una considerevole riduzione del NAD<sup>+</sup> in quanto due reazioni su due coinvolgono l'uso di NAD<sup>+</sup>, il che porta riduzione dell'attività degli enzimi NAD dipendenti, perchè questi necessitano di NAD<sup>+</sup> per funzionare. A causa di questa carenza di NAD, la reazione successiva catalizzata dall'acetaldeide deidrogenasi funziona meno efficientemente della prima, ed è più lenta. Per cui si accumula l'acetaldeide. L'acetaldeide è appiccicosa, e in questa situazione di consumo elevato di alcol, si ha una produzione maggiore di acetaldeide che successivamente tende a formare legami con le proteine, provocando la sensazione della "sbornia".

**2. Consumo elevato****SISTEMA MICROSOMIALE CHE OSSIDA L'ETANOLO**(MEOS microsomal ethanol oxidizing system) **sistema inducibile****Meccanismo generale del metabolismo degli xenobiotici**

1. idrossilazione mediante MONOOSSIGENASI  
 $\text{R-H} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-OH} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
2. Coniugazione con composti polari (es. glucuronato)
3. Eliminazione

Circa il 50% dei farmaci metabolizzato da questa via -  
 competizione alcol - farmaco (droga)

ETILISTA aumenta il sistema cit P450 - più rapido metabolismo farmaci

L'etanolo al pari di tutti gli xenobiotici è capace di attivare i geni che hanno l'elemento di risposta agli xenobiotici. Quindi tutti i geni del metabolismo 1 e 2 sono attivati nell'alcolista cronico in quanto ha epatociti pieni di microsomi che hanno proliferato.

Ci sono delle modificazioni metaboliche:

Il rapporto fra NAD<sup>+</sup>/NADH è circa 1000 in condizioni normali, mentre in condizioni di presenza di etanolo diminuisce di quattro volte, in base alla quantità di etanolo assunto.

Il rapporto lattato/piruvato cambia subito in quanto la lattico deidrogenasi funziona da partnership. Diminuisce il piruvato, per cui la possibilità di fare glucosio nell'etilista è molto di meno. Spesso questi individui sono ipoglicemici, non riescono a mantenere la glicemia a livelli normali. Di conseguenza si blocca il ciclo di Krebs, perché c'è una carenza di ossalacetato che viene usato per costruire più glucosio possibile, di conseguenza la **lipogenesi** si aumenta a causa dell'aumento di Acetil-CoA, che non riesce a entrare nel ciclo di Krebs (perché c'è carenza dell'altro reagente chiave del ciclo di Krebs: ossalacetato, usato per costruire glucosio)

Tutti questi lipidi rimanenti si accumulano nel fegato, causando **steatosi epatica** (fegato grasso).

Quindi abbiamo:

- - Iperlipidemia
- - Ipoglicemia
- - Steatosi epatica

Negli alcolisti, a causa del rilascio di catecolammine, si verifica una vasodilatazione periferica che provoca una dissipazione del calore corporeo. Ciò determina il trasporto del calore alla periferia, causando un considerevole abbassamento della temperatura corporea, Infatti gli alcolisti cronici spesso muoiono per assideramento(freddissimo).

# BIOCHIMICA DEL TESSUTO RENALE

## Struttura del rene

Il rene è composto da una zona midollare e una corticale che funzionano in partnership secondo un metabolismo sinergico simile a quello tra fegato e muscolo. L'unità fondamentale del rene è il nefrone, presente in più di 900.000 unità per rene, costituito dal glomerulo e dal sistema tubulare, una struttura anatomicamente molto complessa che partecipa alla filtrazione del plasma. Il glomerulo è la parte iniziale di questa struttura e si trova prevalentemente nella zona corticale, in cui è situato anche il tubulo distale.

Le anse e il dotto collettore si trovano invece nella parte midollare. Questa struttura tubuliforme, molto convoluta, composta da branca ascendente, branca discendente, dotto convoluto e dotto collettore, coopera all'eliminazione di alcune sostanze e al riassorbimento di altre. Ciò avviene attraverso un metabolismo estremamente complesso il cui strumento principale sono i trasportatori selettivi. Questi trasportatori fanno quasi sempre un trasporto secondario che sfrutta il gradiente del sodio. L'energia per il trasporto è fornita dall'ATP attraverso la pompa sodio-potassio che ristabilisce il gradiente. Ci sono tuttavia delle eccezioni, ad esempio le pompe a protoni.

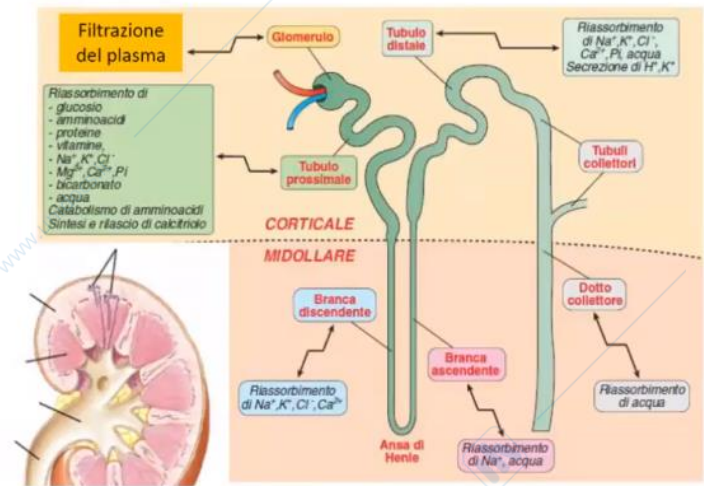
## Funzioni del rene

Il rene ha un metabolismo molto specializzato e svolge ruoli estremamente peculiari:

- recupero di nutrienti
- escrezione delle molecole indesiderate
- recupero dell'acqua
- controllo del volume e della qualità ematica (eliminazione e recupero)
- durante il digiuno prolungato coopera con il fegato nella gluconeogenesi, diventando anche importante per la biosintesi del glucosio come molecola "salvavita".
- ruolo di ghiandola endocrina.

Attraverso le strutture tubulari avviene anche il riassorbimento forzato di molecole che non sono ioni, ad esempio glucosio, glutammina e acqua. Il controllo renale della permeabilità all'acqua è cruciale per garantire il giusto volume ematico. L'organismo immette acqua attraverso lo stimolo della sete e la elimina attraverso il rene, ma questo è anche capace di concentrare e recuperare l'acqua nel momento in cui non è possibile bere. Il rene fa quindi da coadiuvante dello stimolo dell'ingestione dell'acqua.

1 RENE CONTIENE 900.000 NEFRONI  
NEFRONE = GLOMERULO + SISTEMA TUBULARE



## IL RENE COME GHIANDOLA ENDOCRINA

Funzioni endocrine: secerne ormoni ad azione sistemica

- ✓ **RENINA** per la regolazione della pressione arteriosa sistemica
- ✓ **ERITROPOIETINA** principale regolatore dell'eritropoiesi
- ✓ **1-25 DIIDROSSICOLECALCIFEROLO** forma attiva della vitamina D3, importantissimo ormone regolatore del metabolismo del calcio.

## FUNZIONI DEL RENE

- ✓ regolazione del contenuto di acqua e di elettroliti (= > controllo pressione arteriosa ed equilibrio idrico-salino)
- ✓ regolazione del pH plasmatico (equilibrio acido-base)
- ✓ controllo della calcemia
- ✓ controllo concentrazione proteine plasmatiche e metaboliti
- ✓ controllo emopoiesi
- ✓ eliminazione dei prodotti finali del catabolismo, dei prodotti tossici e di farmaci
- ✓ **Ruolo metabolico nel digiuno: gluconeogenesi**

Altri ruoli del rene sono: regolazione del contenuto d'acqua e di elettroliti; controllo di alcuni specifici elettroliti come il calcio; controllo della concentrazione di proteine plasmatiche, alcune delle quali vengono recuperate selettivamente attraverso dei sistemi recettore-mediati.

Il rene ha anche funzione endocrina, come quasi tutti gli organi poiché il ruolo di ghiandola è scarsamente selettivo. In questa veste il rene svolge i seguenti compiti:

- Controllo dell'emopoiesi attraverso la produzione di eritropoietina.
- Produzione di renina che consente la conversione proteolitica del sistema angiotensinogeno-angiotensina.
- Maturazione di 1,25-diidrossi-colecalciferolo o vitamina D che è sintetizzata nel nostro organismo attraverso uno step non autonomo riservato alla luce, ma necessita di altri step autonomi, di cui uno svolto nel rene, per giungere alla forma attiva, la vitamina D3, a partire dalla D2.

Per di più il rene ha il compito di eliminare gli xenobiotici modificati dai citocromi P450 epatici che vengono di solito glucuronati, resi solubili ed escreti.

Il ruolo nella gluconeogenesi, infine, è centrale ed è molto regolato ormonalmente.

## Produzione di renina

La renina è una proteasi la cui secrezione da parte del rene è stimolata da ipotensione e da diminuzione nella concentrazione plasmatica di sodio. Il rene prevede quindi la presenza sia di chemiocettori che di barocettori capaci di percepire variazioni nel volume ematico. Di solito la renina è già sintetizzata ed incorporata in vescicole, pronta per essere secreta, analogamente a quanto accade per l'insulina. La secrezione di questo ormone determina la proteolisi limitata di un precursore plasmatico, l'angiotensinogeno, in angiotensina I, un ormone attivo su un recettore accoppiato a proteine G la cui subunità  $\alpha$  di tipo S ha come effettore l'adenilato ciclasi. L'angiotensina I è poco attiva sul recettore, per cui viene convertita in una forma più attiva detta angiotensina II che è ottenuta mediante un successivo taglio proteolitico limitato da parte dell'*angiotensin converting enzyme* (ACE). Quando l'angiotensina II attiva i recettori determina vasocostrizione, mentre nelle cellule della corticale del surrene, quelle deputate alla produzione dell'aldosterone, attiva la proteina STAR, la quale è deputata al taglio della catena laterale del colesterolo e al suo commissariamento alla biosintesi degli ormoni steroidei. In sintesi quindi l'angiotensina II determina la sintesi di aldosterone. L'effetto finale di questa segnalazione è il riassorbimento di sodio e acqua che contrasta gli effetti che avevano causato la liberazione di renina, ovvero ipotensione e abbassamento della concentrazione di sodio.

## Produzione di eritropoietina

L'eritropoietina è un ormone polipeptidico glicoproteico ed ha un recettore associato ad attività tirosina-chinasica che agisce sul midollo per la proliferazione degli eritroblasti, i precursori degli eritrociti. La sintesi dell'eritropoietina è controllata da un fattore trascrizionale del quale abbiamo già parlato: HIF 1 (Hypoxia Inducible Factor). Lo stimolo di ipossia determina intuitivamente uno stimolo che la combatte: in carenza di ossigeno viene prodotta eritropoietina per far proliferare gli eritroblasti e aumentare il numero degli eritrociti. Ciò avviene perché l'ossigeno regola le proli idrossilasi che quindi idrossilano la subunità  $\alpha$  del fattore trascrizionale indirizzandolo alla degradazione ubiquitina-dipendente; se questo evento non si verifica a causa dell'ipossia la subunità  $\alpha$  non viene distrutta ma si associa con quella  $\beta$  formando il fattore trascrizionale funzionante e quindi il gene per l'eritropoietina viene trascritto.

# ORMONI DEL SURRENE

IL surrene si divide in una porzione corticale esterna, e una porzione midollare interna.

## Ormoni della corticale del surrene (Ormoni steroidei)

Gli ormoni prodotti nel surrene sono ormoni lipofili detti **ormoni steroidei**, che vengono prodotti nella corticale del surrene, e sono di 3 tipi:

**1) Ormoni mineralcorticoidi**, vengono prodotti nella zona glomerulare della corticale del surrene, sotto stimolo dell'ACTH ipofisario. I **mineralcorticoidi**, in particolare l'**aldosterone**, sono composti a 21 atomi di carbonio, e hanno il ruolo di regolare il riassorbimento di sodio a livello dei tubuli renali, regolando l'equilibrio idrosalino. Questi ormoni vengono secreti in seguito a una riduzione del volume del plasma e in seguito a uno stimolo di ipotensione, contrastandolo e determinando un aumento del volume plasmatico e quindi della pressione sanguigna. ~~Questa funzione è svolta in concomitanza con la vasopressina o ormone antidiuretico che viene prodotto dalla neuroipofisi.~~

**2) Ormoni glucocorticoidi**, vengono prodotti principalmente nella zona fasciolata della corticale del surrene, e un po' nella zona reticolata (**cortisolo** e **corticosterone**).

I glucocorticoidi sono anch'essi ormoni a 21 atomi di carbonio e si occupano di regolare il metabolismo del glucosio, promuovendo la gluconeogenesi e la glicolisi, e regolano anche il metabolismo del glicogeno. Il più importante è il **cortisolo**, che viene secreto in seguito a stimolazione da parte dell'ACTH ipofisario.

**3) Androgeni**, ormoni a 19 atomi di carbonio, vengono prodotti nella zona reticolata della corticale del surrene e nelle gonadi sessuali. Gli androgeni prodotti nella corticale del surrene sono: **deidro-epiandrosterone** e l'**andro-stenedione** che hanno una bassa attività biologica per cui dovranno convertirsi in androgeni più attivi (testosterone) dopo subire una modificazione in sede extracorticale, principalmente nelle gonadi sessuali stesse.

### Biosintesi degli ormoni steroidei:

Gli ormoni steroidei derivano dal **colesterolo**. Il colesterolo può essere assunto con la dieta (attraverso alimenti di origine animale): in questo caso il colesterolo viene assorbito a livello intestinale e attraverso i chilomicroni viene poi trasportato ai tessuti del corpo, ma principalmente al fegato dove viene accumulato.

il colesterolo possiamo averlo anche da una fonte endogena, cioè tramite la **sintesi endogena di colesterolo** nella corteccia surrenale ma principalmente nel fegato. **la sintesi endogena di colesterolo avviene soprattutto in alcune situazioni (per esempio durante grande disponibilità di Acetil- CoA).**

il colesterolo, dopo essere sintetizzato a livello del fegato, viene trasportato in circolo incorporandolo nelle lipoproteine VLDL che lo trasportano ai tessuti che utilizzano il colesterolo, tra cui la corteccia del surrene, le cui cellule ghiandolari usano il colesterolo per produrre gli ormoni steroidei.

il colesterolo, o viene sintetizzato nelle cellule corticali del surrene, o proviene dal fegato attraverso le lipoproteine VLDL. In entrambi i casi, il colesterolo verrà accumulato sotto forma di gocce lipidiche nelle cellule della corticale, e verrà liberato dalle gocce, quando c'è bisogno della sintesi di ormoni steroidi, che avviene in **più tappe**:

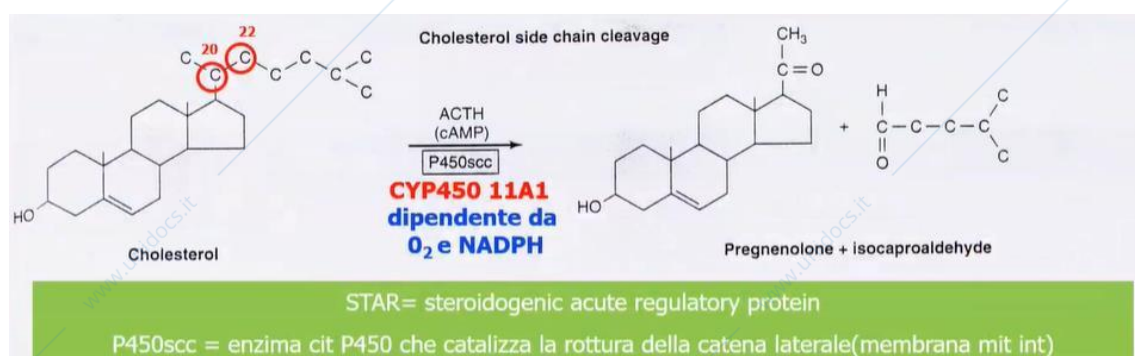
**La prima parte** inizia con il **segnale di un ormone**: L'ormone **ACTH** va ad agire a livello della zona fascicolata e zona reticolata dove promuove la mobilizzazione del colesterolo dalle gocce lipidiche per produrre ormoni steroidei. Invece, in seguito ad una riduzione del volume del sangue o della pressione sanguigna, l'ormone **angiotensina II** va ad agire a livello della zona glomerulare promuovendo la mobilizzazione del colesterolo dalle gocce al mitocondria per formare l'ormone steroideo mineralcorticoide **aldosterone** che ha il compito di rialzare il volume/pressione sanguigna.

Nella **traslocazione del colesterolo** dal citoplasma alla matrice mitocondriale svolge un ruolo importante l'**ACTH**, il quale la promuove a livello delle zone fascicolata e reticolata.

L'ACTH è un ormone ipofisario che, nelle zone fascicolata e reticolata, si lega a recettori accoppiati a **proteine Gs-alfa**, con conseguente aumento **cAMP** e attivazione della **PKA** (proteina chinasi a). In questo modo, l'ACTH può innescare **effetti a breve termine**, che sono l'attivazione della PKA che agisce su due target: prima va a fosforilare e attivare una **colesterolo esterasi**, che catalizza la mobilizzazione del colesterolo dalle gocce lipidiche. Il secondo target della PKA attivata è una proteina integrale della membrana mitocondriale interna, la **StAR** (Steroidogenic Acute Regulatory protein), che ha la funzione di trasportare il colesterolo dal citoplasma verso la matrice mitocondriale.

L'ACTH può innescare anche **effetti a lungo termine** che riguardano la regolazione dell'espressione genica, in particolare causa l'aumentare la trascrizione di tutti i geni codificanti enzimi coinvolti nella biosintesi degli ormoni steroidei.

**2° tappa della biosintesi degli ormoni steroidei (Formazione del pregnenolone)** consiste di una reazione che avviene a livello della matrice mitocondriale, dove il colesterolo viene convertito nel **pregnenolone** che è il precursore di tutti gli ormoni steroidei. Questa reazione è catalizzata da una **monossigenasi mitocondriale**, appartenente alla famiglia delle citocromo P450 ossidasi (proteina **CYP450-11A1**), che viene stimolata a sua volta da ACTH, e che usando NADPH e O<sub>2</sub>, induce una doppia idrossilazione a livello della catena alifatica del colesterolo (prima sul carbonio 22 e poi sul C20), successivamente questo enzima catalizza un taglio della catena laterale del colesterolo, formando **pregnenolone** e **isocapro-aldeide** che non ha più una funzionalità biologica. **Avvengono due idrossilazioni, quindi verranno utilizzate 2 molecole di O<sub>2</sub>, 2 di NADPH e usciranno 2 molecole di acqua.**

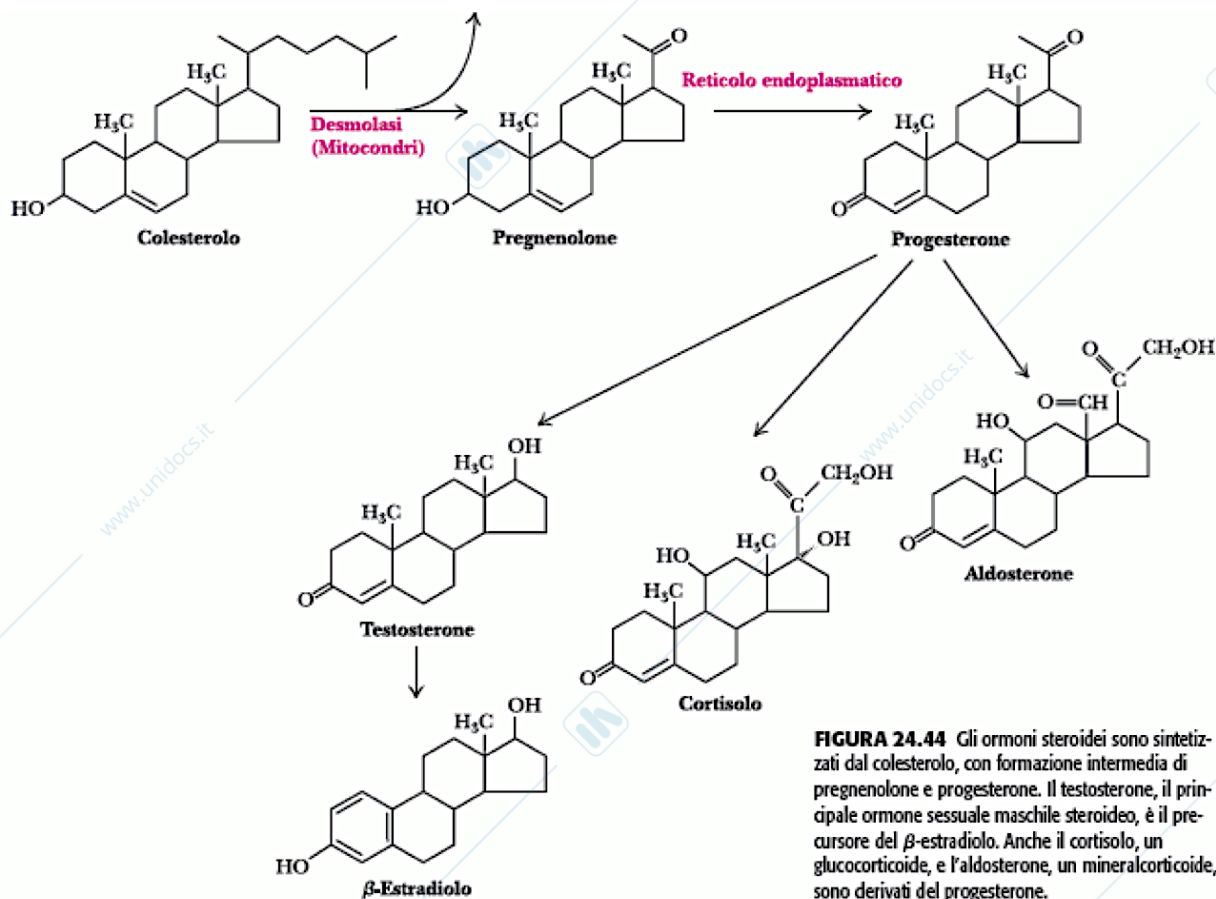


**I citocromi P450** sono degli enzimi che utilizzano ossigeno e prendono il nome di monossigenasi perché soltanto uno degli atomi di ossigeno verrà introdotto nel substrato, in questo caso verranno introdotti due gruppi idrossilici (in posizioni 22 e 20). L'altro atomo di ossigeno verrà ridotto ad acqua. Quindi, grazie agli elettroni donati dal NADPH, entrambi gli atomi di ossigeno della molecola di  $O_2$  verranno ridotti ma soltanto uno dei due verrà introdotto nel substrato. In definitiva qui sono 2 step di idrossilazioni, verranno utilizzate 2 molecole di  $O_2$ , 2 di NADPH e usciranno 2 molecole di acqua.

A partire dal pregnenolone potranno essere sintetizzati con vie di sintesi particolari e specifiche i diversi ormoni steroidei per ogni zona della corticale del surrene:

- - **Mineralcorticoidi (zona glomerulare):** aldosterone.
- - **Glucocorticoidi (zona fasciolata):** cortisolo e corticosterone;
- - **Androgeni (zona reticolata):** androstenedione e deidroepiandrosterone;

Per quanto riguarda gli androgeni: **estradiolo** (l'estrogeno più importante) e **progesterone** non vengono sintetizzati a livello della corticale del surrene, e invece: - L'estradiolo a livello dell'ovaio e del tessuto adiposo; - Il progesterone a livello dell'ovaio, del corpo luteo e della placenta.



**FIGURA 24.44** Gli ormoni steroidei sono sintetizzati dal colesterolo, con formazione intermedia di pregnenolone e progesterone. Il testosterone, il principale ormone sessuale maschile steroideo, è il precursore del  $\beta$ -estradiolo. Anche il cortisolo, un glucocorticoide, e l'aldosterone, un mineralcorticoide, sono derivati del progesterone.

## Sintesi di aldosterone (zona glomerulare).

Ad azione degli ormoni **ACTH** e **angiotensina II**, il colesterolo viene liberato dalle gocce lipidiche immagazzinati nelle cellule corticali del surrene e trasportato dal citoplasma alla matrice mitocondriale dove colesterolo viene trasformato nel **pregnenolone** che è il precursore dell'aldosterone e altri ormoni steroidei. ([!vedi reazioni precedenti, come arriva colesterolo e si trasforma in pregnenolone!](#))

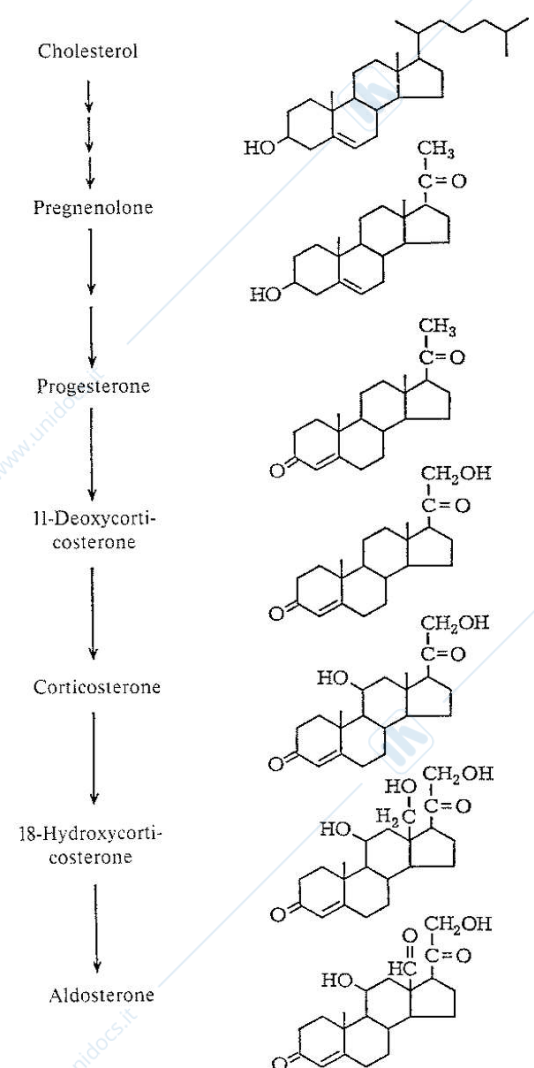
Inizialmente, il **pregnenolone** si forma nella matrice mitocondriale. Poi il pregnenolone viene trasportato al reticolo endoplasmatico liscio dove sono presenti gli enzimi delle reazioni successive.

A livello del Reticolo endoplasmatico liscio, ci sono due enzimi, la **3- $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi** e la  **$\Delta$ 5,4-isomerasi**, che agiscono sul **pregnenolone** che subisce quindi l'ossidazione del gruppo ossidrilico in posizione 3 (conversione dell'OH in gruppo chetonico), e lo spostamento del doppio legame dalle posizioni 5,6 alle posizioni 4,5. Si trasforma così il **pregnenolone** in **progesterone** che viene utilizzato soltanto come un intermedio della via biosintetica.

Sempre a livello del REL, agirà una **21-idrossilasi** (che alla famiglia delle **citocromo P450 monossigenasi**), la quale catalizzerà l'idrossilazione del carbonio in posizione 21 del progesterone. Si viene a formare così il **deossi-corticosterone**, che verrà trasportato nuovamente a livello del mitocondrio dove agirà l'enzima **11- $\beta$ -idrossilasi**. Questo enzima catalizza l'aggiunta di un OH in posizione 11, formando il **corticosterone**, il quale può essere già secreto dalla corticale del surrene, ma presenta una bassa attività biologica.

Per essere convertito nel mineralcorticoide **aldosterone**, il corticosterone sarà substrato di due enzimi mitocondriali, localizzati solo nella zona glomerulare.

Quindi i mineralcorticoidi vengono sintetizzati soltanto nella glomerulare poiché soltanto qua sono presenti i due enzimi che catalizzano questa reazione. Questi enzimi sono la **18-idrossilasi** e la **18-idrossisteroide deidrogenasi**, la loro azione è quella di convertire il gruppo idrossilico sulla catena laterale (~~che parte dal ciclopentano~~) in un gruppo aldeidico, ottenendo così l'aldosterone, che può essere rilasciato dal surrene. [Questa via metabolica viene stimolata dalla presenza dell'angiotensina II.](#)



## Sintesi di cortisolo e corticosterone (zona fascicolata)

**Corticosterone** e di **cortisolo**, sono i due ormoni glucocorticoidi che vengono sintetizzati a livello della zona fascicolata del surrene. In questo caso, la via biosintetica viene attivata in seguito a stimolazione con **ACTH**.

Ad azione dell'ormone **ACTH**, il colesterolo viene liberato dalle gocce lipidiche immagazzinati nelle cellule corticali del surrene e poi trasportato dal citoplasma alla matrice mitocondriale dove il colesterolo viene trasformato nel **pregnenolone** che è il precursore del cortisolo e altri ormoni steroidei. (!vedi reazioni precedenti, come arriva colesterolo e si trasforma in pregnenolone!)

Inizialmente, il **pregnenolone** si forma nella matrice mitocondriale. Poi il pregnenolone viene trasportato al reticolo endoplasmatico liscio dove sono presenti gli enzimi delle reazioni successive.

il **pregnenolone** subisce l'azione dell'enzima **17 $\alpha$  idrossilasi** (presente nel REL della zona fascicolata e della zona reticolata, appartiene alla famiglia di citocromo P450 monossigenasi), che porta alla conversione del **pregnenolone** in **17-idrossipregnenolone**.

Sempre nel REL, agiranno poi la **3- $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi** e la  **$\Delta$ 5,4- isomerasi**, che ~~come avviene nella glomerulare~~, catalizzano la trasformazione del gruppo idrossilico in posizione 3, in gruppo carbonilico, e spostano il doppio legame dalle posizioni 5,6 alle posizioni 4,5, formando **17-idrossiprogesterone**. poi, sul 17-idrossiprogesterone agiscono due enzimi: la **21-idrossilasi** (che aggiunge un gruppo idrossilico al carbonio 21) e poi l'enzima **11 $\beta$ -idrossilasi**, formando così il **cortisolo**. (l'ormone glicocorticoide).

Questa è la via principale che porta alla sintesi dei glucocorticoidi (nello specifico cortisolo), che avviene a livello della **zona fascicolata della surrene**.

In piccola parte, il pregnenolone potrà seguire la via biosintetica a livello della zona glomerulare, dove viene trasformato in **corticosterone** che però non procede nella biosintesi, perchè qui non sono presenti gli enzimi necessari.

### Trasporto plasmatico del cortisolo e corticosterone (ormoni glucocorticoidi)

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei e quindi, essendo lipofili, non possono circolare liberamente nel torrente circolatorio ma hanno bisogno di una proteina carrier. Il carrier è costituito principalmente dalla **transcortina**, che è detta anche CBG (globulina legante i corticosteroidi), deputata principalmente al trasporto di cortisolo e corticosterone a livello ematico. In parte, anche l'**albumina** svolge questo ruolo, ma si occupa principalmente del trasporto dell'**aldosterone** che viene secreto dalla zona glomerulare.

I glucocorticoidi vengono secreti dalla corticale del surrene e raggiungono i loro tessuti bersaglio, dove andranno ad espletare il loro ruolo. Questi tessuti bersaglio possono essere diversi e per quanto riguarda il controllo metabolico saranno principalmente il fegato dove stimolano la glicogenolisi e gluconeogenesi e nel muscolo scheletrico e cardiaco dove stimolano a glicogenolisi.

### Catabolismo degli ormoni glucocorticoidi

Il **fegato e il rene**, avviene il catabolismo e degradazione dei glucocorticoidi. Infatti, in queste sedi, gli ormoni vengono inattivati mediante la formazione di 17-idrossicorticosteroidi: l'idrossilazione in posizione 17 porta alla formazione di glucocorticoidi inattivi che poi subiranno anche altre modifiche, tra cui una solfonazione e una glucurazione, che li renderanno più solubili e permetteranno la loro escrezione con le urine.

## Gli effetti degli ormoni glucocorticoidi

- 1. Regolare il metabolismo del glucosio e del glicogeno:** aumentano i livelli plasmatici di glucosio, in modo da renderlo disponibile per i vari tessuti, tra cui l'SNC. Questo aumento del glucosio ematico si ha principalmente in seguito ad eventi di stress fisico e psicologico (mediata principalmente dal cortisolo), a differenza dell'iperglicemia post digiuno che è mediata dalla stimolazione da parte del glucagone. Come abbiamo detto prima, a livello del muscolo scheletrico e del fegato, che sono gli organi nei quali si ha una attivazione sostanziale di glicogenolisi (entrambi) e di gluconeogenesi (solo nel fegato), si ha questa risposta che porta poi all'effetto iperglicemico.
- 2.** Tramite la loro degradazione aumentano gli amminoacidi glucogenici disponibili per supportare gluconeogenesi a livello muscolare.
- 3. Incremento della lipolisi nel tessuto adiposo:** il ruolo è sempre quello di sostenere la glicemia ematica. Il tessuto adiposo fornisce acidi grassi, in modo che questi possano essere utilizzati come substrati energetici per risparmiare il glucosio. A livello epatico, questi acidi grassi sosterranno anche l'intensa gluconeogenesi che viene attivata dal cortisolo. Se si stimola lipolisi a livello del tessuto adiposo al fine di immettere in circolo acidi grassi, un effetto contrario si ha a livello del tessuto adiposo che si trova nel volto e nel tronco: in questo caso, i glucocorticoidi, invece di indurre un effetto lipolitico, inducono un effetto lipogenico.
- 4. Aumento della ritenzione idrica:** lieve effetto ipertensivo.
- 5. Soppressione della risposta infiammatoria e immunitaria:** questo perché aumentano la produzione di citochine anti-infiammatorie e riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie. Hanno anche un'azione diretta a livello dei leucociti circolanti, sui quali vanno a ridurre la motilità, impedendo loro di raggiungere la sede dell'infiammazione, e inducono anche la produzione di lipocortine, che sono prodotti lipofili che sono sintetizzati a partire dall'acido arachidonico, e hanno il ruolo di inibire la fosfolipasi A2 (che ha il ruolo di rilasciare acido arachidonico da parte dei fosfolipidi di membrana), così da garantire disponibilità di acido arachidonico e quindi inibire la sintesi di prostaglandine e leucotrieni. In particolare, le prostaglandine che sono i mediatori dell'infiammazione.

## SINTESI DEL TESTOSTERONE

### Sintesi del testosterone a livello della corticale del surrene (via del deidroepiandrosterone)

La biosintesi del testosterone avviene in piccole quantità a livello della zona reticolata della corticale del surrene, e viene innescata da una stimolazione dall'ormone **ACTH**.

Ad azione dell'ormone **ACTH**, il colesterolo viene liberato dalle gocce lipidiche immagazzinate nelle cellule corticali della zona reticolata e poi trasportato dal citoplasma alla matrice mitocondriale dove il colesterolo viene trasformato nel **pregnenolone** che è il precursore del testosterone e altri ormoni steroidei. (!vedi reazioni precedenti, come arriva colesterolo e si trasforma in pregnenolone!)

Inizialmente, il **pregnenolone** si forma nella matrice mitocondriale. Poi il pregnenolone viene trasportato al reticolo endoplasmatico liscio dove sono presenti gli enzimi delle reazioni successive.

il **pregnenolone** subisce l'azione dell'enzima **17 $\alpha$  idrossilasi** (presente nel REL della zona fascicolata e della zona reticolata, appartiene alla famiglia di citocromo P450 monossigenasi), che porta alla conversione del **pregnenolone** in **17-idrossipregnenolone**.

Il **17-idrossipregnenolone** va incontro per la maggior parte a una reazione catalizzata da un enzima detto la **17,20-liasi**, che catalizza la rimozione della catena laterale del C-17. Otteniamo in questo modo la formazione del **deidro-epi-androsterone**.

il **deidro-epi-androsterone**, presenta una bassa attività, e può subire una di 3 possibili vie di conversione:

- 1) Una piccola quantità di testosterone può essere formata a livello della reticolata del surrene, perchè in essa è presente l'enzima che catalizza la reazione di sintesi, ma è poco rappresentato e presenta scarsa attività.
- 2) il **deidro-epi-androsterone** può andare incontro alla reazione catalizzata dal **3- $\beta$ - idrossisteroide deidrogenasi** e la  **$\Delta$ 5,4-isomerasi (nel reticolo)**, con formazione **andro-stenedione**, questo è un androgeno a bassa attività. L'andro-stenedione verrà poi rilasciato in sede extracorticale (gonadi) dove convertito in **testosterone** mediante una riduzione a livello del C-17.
- 3) Il deidroepiandrosterone, può essere rilasciato dalla corticale del surrene, e trasportato alle **gonadi** dove funge da intermedio che viene convertito in androgeni più attivi.

## Sintesi del testosterone a livello delle gonadi sessuali (via di deidroepiandrosterone e via del progesterone)

La sintesi del testosterone avviene per la maggior parte a livello delle gonadi maschili (**cellule di Leydig e del Sertoli**), e in piccole quantità viene prodotta a livello della zona reticolata del corticale del surrene (**VEDI REZIONI PRECEDENTI!**). la sintesi del testosterone avviene anche in piccole quantità nelle gonadi femminili delle femmine. (**cellule della teca e della granulosa dell'ovaio**).

### Tappe della biosintesi del testosterone:

#### 1° TAPPA - formazione del pregnenolone

La produzione di testosterone a livello del testicolo è stimolata dall'ormone LH, che interagisce con il suo recettore accoppiato alla proteina  $G_{\alpha}$ , presente sulle cellule di Leydig che "sentono" questa stimolazione. per cui avviene la stimolazione del cAMP e della **proteina chinasi A** (PKA) che andrà a stimolare il colesterolo esterasi e anche la **proteina StAR** per far trasportare il colesterolo dal citoplasma al mitocondrio. quindi il colesterolo viene staccato dalle gocce lipidiche e poi trasportato dal citoplasma alla matrice mitocondriale dove ad azione dell'enzima **monossigenasi mitocondriale** il colesterolo viene trasformato nel **pregnenolone** che è il precursore del testosterone e altri ormoni steroidei. (vedi reazioni precedenti, come arriva colesterolo e si trasforma in pregnenolone)

#### 2° TAPPA - via di deidroepiandrosterone o via del progesterone

Una via di proseguire per sintetizzare il testosterone è quella del **deidroepiandrosterone**, che è prevalente a livello delle gonadi maschili (testicoli), l'altra è la via del **progesterone**, prevalente nelle gonadi femminili (ovaie).

#### Via di deidroepiandrosterone (via di destra)

Dalla matrice mitocondriale, il pregnenolone viene trasportato al reticolo endoplasmatico liscio dove sono il **pregnenolone** subisce l'azione dell'enzima **17 $\alpha$ -idrossilasi** (presente nel REL), che porta alla conversione del **pregnenolone** in **17-idrossipregnenolone**. Il **17-idrossipregnenolone** va incontro per la maggior parte a una reazione catalizzata da un enzima detto **17,20-liasi**, che catalizza la rimozione della catena laterale del C-17, formando il **deidro-epi-androsterone**. Grazie a un enzima che è presente soltanto nelle gonadi, la **17 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi**, che catalizza la riduzione del gruppo carbonilico a gruppo idrossilico, trasformando il deidro-epiandrosterone in **andro-stenediolo**. L'androstenediolo viene convertito in **testosterone** ad azione di due enzimi: ~~che agiscono anche a livello della corticale del surrene, la~~ **3- $\beta$ -idrossi-steroide deidrogenasi** e la  **$\Delta$ 5,4-isomerasi**.

#### Via del progesterone (via di sinistra)

È una via diversa che parte sempre dal **pregnenolone**, che poi viene convertito in **progesterone** grazie all'azione di la **3- $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi** e  **$\Delta$ 5,4-isomerasi**. Successivamente, l'enzima **17 $\alpha$ -idrossilasi** converte il progesterone in **17 $\alpha$ -idrossi-progesterone**, poi interviene l'enzima **17,20-liasi** che causa la rimozione della catena laterale in posizione 17, con formazione di **androstenedione**. infine, l'enzima **17 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi** converte l'androstenedione in **testosterone**.

## TRASPORTO DEL TESTOSTERONE

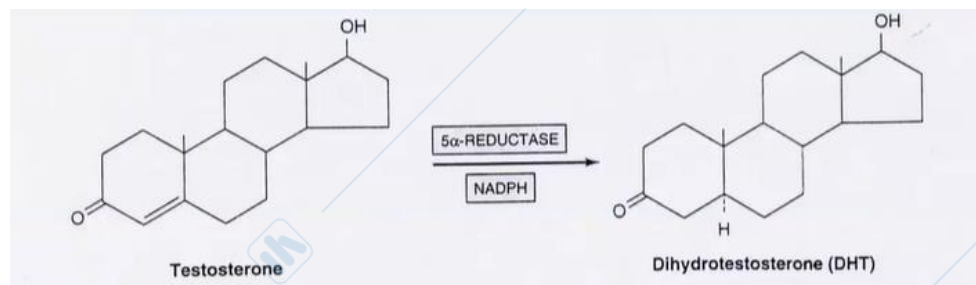
Il testosterone viene trasportato in circolo legato a proteine plasmatiche, in particolare:

- - **SHBG** (sex hormone binding globulin), sintetizzata dal fegato;
- - **TEBG** (testosterone-estrogen binding globulin), prodotta nel testicolo dalle cellule del Sertoli;
- - **Albumina**: presenta bassa affinità nei confronti degli ormoni steroidei ma ha comunque la capacità di legarli e di trasportarli tutti; l'albumina è più affine all'**aldosterone**.

### Destini del testosterone:

1) Nel maschio, quando il testosterone arriva in un tessuto bersaglio (che può essere la ghiandola prostatica e i genitali esterni), il testosterone viene convertito nel vero androgene con massima attività biologica detto **5-alfa-diidro-testosterone (DHT)**, la conversione avviene ad opera dell'enzima **5 $\alpha$ -reduttasi** (espresso dalle cellule bersaglio), che riduce il doppio legame presente nell'anello A del testosterone, rimuovendo l'insaturazione.

il **5-alfa-diidro-testosterone (DHT)** ottenuto è un androgene ad alta attività perché presenta **maggiore affinità** per il recettore del testosterone. Nelle femmine si arriva al massimo alla produzione di testosterone in quanto non hanno il 5 $\alpha$ -reduttasi e quindi avviene la produzione di DHT.



Nonostante il DHT sia l'androgene più attivo, la sua concentrazione in circolo è circa 10 volte inferiore rispetto alla concentrazione di testosterone, poiché il testosterone verrà convertito in DHT soprattutto a livello dei tessuti bersaglio. Possiamo confrontarlo a ciò che abbiamo detto per gli ormoni tiroidei: il T3 è più attivo del T4, ma presenta una concentrazione circa 10 volte inferiore.

Mentre il testosterone può essere un precursore per la sintesi degli estrogeni, una volta che è stato ridotto in DHT, questo non può essere convertito in estrogeni. Per questo nelle donne l'ormone principale è l'estrogene, perché il testosterone verrà subito convertito in estrogeni.

Vi sono degli individui che presentano delle **mutazioni a carico della 5 $\alpha$ -reduttasi** che sono associate a **ermafroditismo maschile**.

2) Un altro destino del testosterone è quello di raggiungere il **fegato** e di andare incontro a **reazioni di degradazione**, in cui il testosterone viene ossidato in posizione 17 mediante l'azione dell'enzima **17 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi II**, con produzione dei **17-chetosteroidi inattivi** (principalmente androsterone). 17-chetosteroidi vengono associati con acido glucuronico o con solfati che li rendono più idrosolubili, e poi vengono eliminati con le urine.

**3)** Un'altro destino che il testosterone può avere è quello di essere convertito in **17 $\beta$ -estradiolo** (che è il principale estrogeno prodotto nelle ovaie delle femmine). questa conversione avviene nelle **gonadi femminili (ovaie)**, e può avvenire anche nel **tessuto adiposo**: quindi ad azione dell'enzima **aromatasi**, il testosterone viene aromatizzato (quindi l'anello A viene convertito in anello aromatico) trasformando il testosterone in **17 $\beta$ -estradiolo**.

**Soltanto nelle donne**, a livello delle ovaie, il testosterone sarà il precursore degli estrogeni, mediante l'azione dell'enzima **aromatasi**, che è maggiormente rappresentato in questa sede.

Durante la **vita fetale**, si producono grandi quantità di DHT e questo rende conto dello sviluppo dei genitali esterni maschili nei maschi, ma **alla nascita** la sintesi viene inibita. Riprenderà alla pubertà e durerà per tutta la vita nei maschi.

### Funzioni del testosterone

Il testosterone ha vari ruoli, tra cui quello di umentare la gametogenesi (spermatogenesi nel maschio), di determinare il differenziamento e la maturità sessuale e quello di promuovere l'anabolismo a livello del tessuto muscolare.

**Tra gli effetti mediati del testosterone e degli altri androgeni troviamo:**

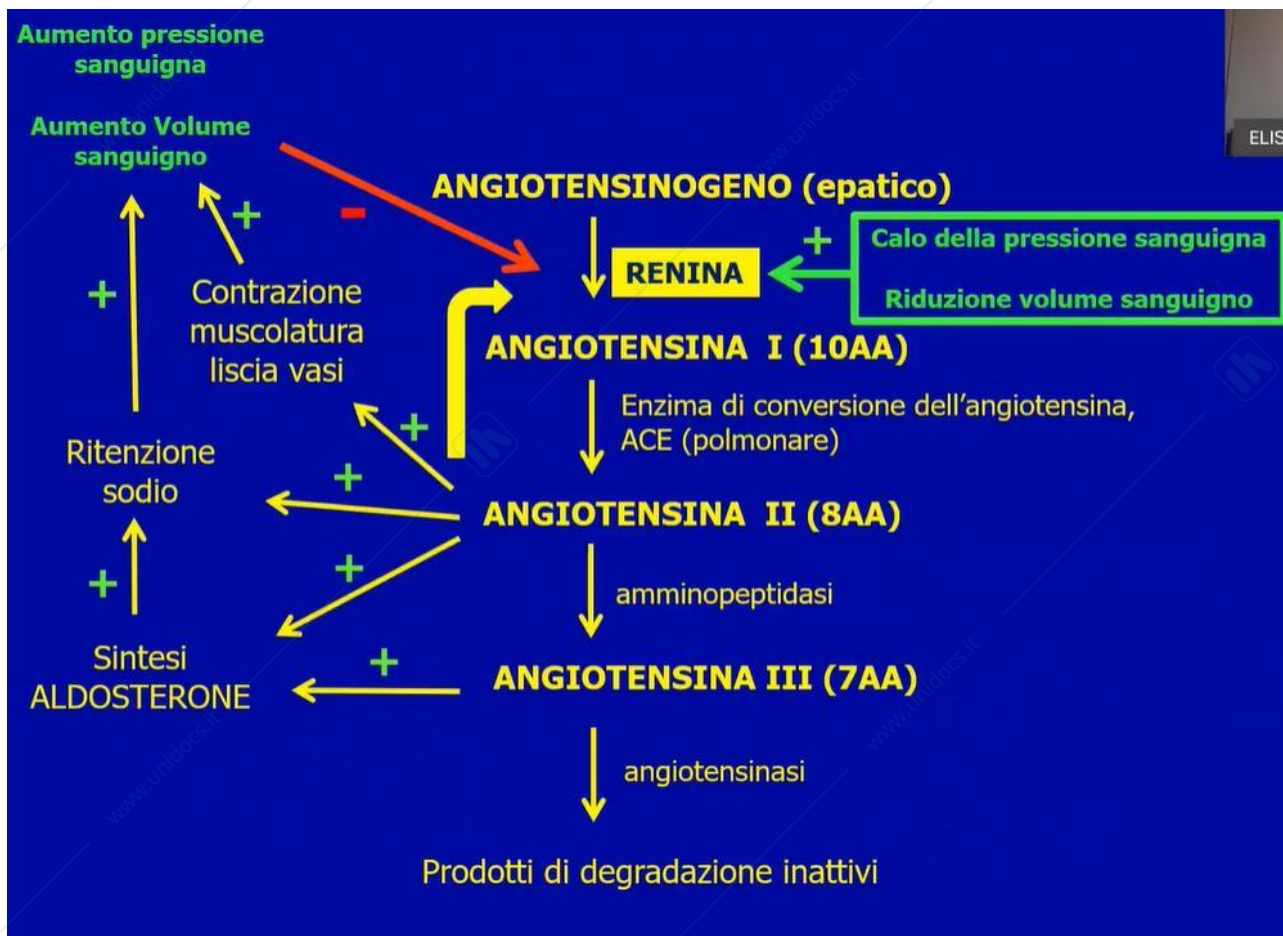
- Promozione della comparsa dei **caratteri sessuali secondari** durante la pubertà e il raggiungimento della maturità sessuale;
- **Induzione della virilizzazione**: crescita dei peli pubici, degli arti e del volto; modifiche del tono di voce; stimola l'attività delle ghiandole sebacee, etc;
- - Controllo **della spermatogenesi**, della fertilità e della funzione riproduttiva maschile;
- - Hanno **effetti anabolici** su massa muscolare e tessuto osseo (determinando in questo modo la crescita corporea, e lo sviluppo della massa muscolare e della massa ossea).

## MINERALCORTICOIDI

## Secrezione dei mineralcorticoidi

I mineralcorticoidi vengono prodotti a livello della zona glomerulare, mediante stimolazione da parte dell'**angiotensina II**, che è prodotta in seguito a uno stimolo di riduzione del volume ematico e della pressione sanguigna. Il processo che porta alla sintesi di angiotensina II si ha a partire da uno stimolo recettoriale, che viene "sentito" dai barocettori che si trovano a livello della zona iuxtaglomerulare del rene.

I barocettori sono molto sensibili alla distensione o rilassamento della parete del vaso. Quindi, quando si ha rilassamento a livello della parete del vaso, dovuto a una riduzione della pressione sanguigna o del volume plasmatico, i barocettori inviano un segnale che a livello del rene si traduce con l'attivazione di una proteasi, la **renina**.



## Meccanismo di segnalazione degli ormoni steroidei

Questi effetti, sia dei mineralcorticoidi che dei glucocorticoidi, sono mediati a livello dei tessuti bersaglio (cellule muscolari lisce dei vasi, cellule dei tubuli distali del rene) da dei recettori che servono a recepire il segnale portato dagli ormoni della corticale del surrene.

I recettori per gli ormoni della corticale del surrene (aldosterone, glucocorticoidi, androgeni) sono i cosiddetti "recettori per gli ormoni steroidei". Sono recettori localizzati a livello citosolico, in quanto questi ormoni sono lipofili ed entrano direttamente nelle cellule del tessuto bersaglio.

A differenza dei recettori per gli ormoni tiroidei, i quali erano già presenti in sede nucleare e già associati alla cromatina, i recettori per gli ormoni della corticale del surrene si trovano a livello citosolico, resi inattivi mediante il legame con delle heat shock protein (hsp). Questa inibizione è analoga a quella del recettore dell'acido retinoico (rxr) per il recettore degli ormoni tiroidei.

Le hsp che si associano al recettore per questi ormoni della corticale e che inibiscono la sua attività sono diversi a seconda del tipo di ormone (vedi figura).

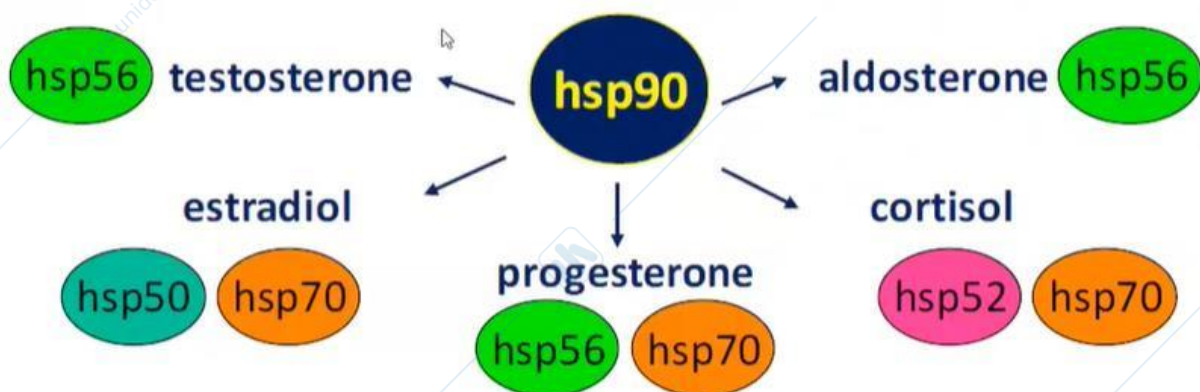
Queste hsp mantengono in uno stato inattivo questi recettori citosolici. Nel momento in cui arriva l'ormone, questo si lega al recettore spiazzando il legame che questi avevano con le hsp, rendendo attivo il recettore.

Quindi, a questo punto il recettore può migrare nel nucleo e legarsi ai cosiddetti hormone responsive elements a livello dei promotori dei geni specifici, regolando così la trascrizione di geni responsivi all'ormone che sta portando avanti la sua segnalazione.

Ci troviamo in un tipo di regolazione a lungo termine.

Importante però sottolineare che prima di migrare nel nucleo, i recettori per gli ormoni corticali subiscono anche una dimerizzazione. Non si tratta di omodimerizzazione come nel caso degli ormoni tiroidei che aveva un ruolo inattivante, ma bensì si tratta di una omodimerizzazione in senso attivante.

Affinché i recettori per gli ormoni corticali siano attivi devono legare l'ormone, formare un omodimero ed essere fosforilati; una volta attivi potranno entrare nel nucleo e legarsi a specifici elementi sul DNA, attivando la trascrizione di geni specifici.



## Sintesi di estrogeni e progesterone (ormoni sessuali) (+322 sbobine 2021)

Gli estrogeni più importanti sono 3, ovvero il **17-β-estradiolo**, il principale estrogeno prodotto dalle ovaie, l'**estrone** e l'**estriolo** che sono sintetizzati, in particolare il secondo, dalla placenta.

Per ottenerli è necessaria la presenza dell'enzima **aromatasi**, responsabile della formazione dell'anello aromatico a livello dell'anello A sfruttando una molecola di ossigeno, NADPH e citocromo P450 tramite 3 reazioni consecutive. Il substrato dell'aromatasi può essere il testosterone, da cui si forma il 17-β-estradiolo, o l'androstenedione, da cui si produce estrone che, se ulteriormente ossidato in C16, darà estriolo.

Nell'ovulazione e nella produzione di cellule uovo sono coinvolti oltre agli estrogeni anche i progestinici, i quali sono l'altra grande categoria di ormoni prodotti nella donna. Si sintetizzano a livello ovarico, dove sono implicati nella regolazione dell'ovulazione, ma anche a livello del corpo luteo, della placenta e in livello minore dal fegato, dal tessuto adiposo e dalla cute. Il principale progestinico è il **progesterone** che può dare luogo al **pregnandiolo** il quale però non ha attività ormonale, ossia è biologicamente inattivo.

Le cellule uovo sono prodotte sotto stimolazione di estrogeni e progestinici che sono fondamentali anche nel mantenimento e nella maturazione dell'apparato riproduttore femminile, sono responsabili dell'ovulazione, sono fondamentali nel garantire il corretto svolgimento della gravidanza e hanno anche un ruolo nel parto dove però non interviene solo la componente ormonale. Sono importanti anche per l'impianto dello zigote e lo sviluppo della blastocisti garantendo che l'endometrio sia in uno stato proliferativo ideale.

Gli ormoni sessuali sono prodotti a livelli bassi durante l'infanzia e questo dipende probabilmente dalla regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisiario dal quale si innesca un circuito che, anche a basse dosi di ormoni sessuali, causa una forte inibizione del rilascio di gonadotropine, perciò gli ormoni sessuali sono tenuti a bassi livelli in un loop. Nell'adolescenza, con meccanismi non chiariti, a livello dell'asse ipotalamo-ipofisiario, si ha un abbattimento dell'inibizione, alla quale diviene meno sensibile, così che in maniera ritmica si abbia il rilascio di FSH e LH che regoleranno ritmicamente il ciclo mestruale.

### + Ruolo degli ormoni nell'oogenesi (362 , 2019)

L'oogenesi è lo sviluppo della cellula uovo a partire da un ovogonio, od oogonio, ovvero una cellula diploide. Mensilmente uno, o raramente più di uno oocita primario, va incontro a un processo che porta alla liberazione di un ovocita maturo e aploide, i cui cromosomi sono fermi in metafase della seconda divisione meiotica, che verrà portata a termine solo in seguito alla fecondazione. A partire da un follicolo primario otterremo quindi un ovocita maturo, che verrà rilasciato lasciando quello che diverrà il corpo luteo (che produrrà progesterone e continuerà a farlo ma solo in caso di fecondazione), fino a che, in questo ruolo, non subentrerà la placenta. Nel caso in cui non si inizi la gravidanza, il corpo luteo produrrà progesterone per un tempo limitato tendendo poi a degenerare, formando il corpus albicans.

All'interno della vita fertile femminile, matureranno solo 400 oociti perché un numero elevato di cellule uovo in via di sviluppo andrà incontro a degenerazione. Alla trentesima settimana intrauterina, le cellule uovo sono circa 6 milioni però la maggior parte degenera e soltanto 2 milioni arrivano alla nascita per poi diminuire ancora nella vita adolescenziale in cui si prevede di arrivare a circa 300-400 mila cellule uovo delle quali solo

## Ormoni della midollare del surrene (Ormoni peptidici)

Nella porzione midollare del surrene vengono prodotti due ormoni peptidici importanti: **noradrenalina** e l'**adrenalina**, che sono catecolammine (un esempio di ammine biogene).

### Biosintesi delle catecolammine

Le catecolammine principali sono: dopamina, adrenalina e noradrenalina. Vengono prodotte a livello del midollare del surrene, e a livello dei neuroni del sistema nervoso centrale (perché le catecolammine non possono attraversare la barriera ematoencefalica).

La dopamina viene prodotta a livello dei neuroni dopaminergici del Sistema Nervoso Centrale, dove la dopamina può essere il prodotto finale ed essere rilasciata come un neurotrasmettitore. Invece la dopamina prodotta a livello del midollare del surrene non viene rilasciata a questo livello e deve per forza proseguire nella via biosintetica per formare **noradrenalina**.

Le catecolammine vengono sintetizzate a partire dall'amminoacido precursore **tirosina** (da cui derivano anche gli ormoni tiroidei).

La tirosina a sua volta è un amminoacido non essenziale quindi può essere prodotto nel corpo a partire dalla fenilalanina (ad opera di fenilalanina-idrossilasi).

### Sintesi di dopamina:

**Prima reazione:** si parte dal precursore **tirosina**, presente nelle cellule cromaffini della midollare del surrene, la tirosina è il substrato dell'enzima **tirosina idrossilasi**, questo enzima catalizza una reazione di ossidoriduzione, riducendo 2 atomi di una molecola di ossigeno: per cui un atomo di ossigeno viene ridotto a gruppo idrossilico -OH che viene inserito nel substrato tirosina, l'altro atomo di ossigeno viene ridotto ad acqua che viene rilasciata. gli elettroni forniti all'ossigeno sono forniti dal coenzima **tetroidrobiopterina**, che sarà ridotta a **diidrobiopterina**; (un cofattore essenziale per garantire la funzionalità della tirosina-idrossilasi). A questo punto si forma la **DOPA** (o **diidrossifenilalanina**, perché la tirosina deriva da un'idrossilazione della fenilalanina, e a sua volta la tirosina viene idrossilata dalla tirosina-idrossilasi, e per questo avremo due gruppi idrossilici sull'anello aromatico; Dii)

La DOPA subisce la **seconda reazione** catalizzata dalla **DOPA Decarbossilasi**, che è un enzima **PLP dipendente** (dipende dal piridossalfosfato, utilizzato come cofattore). La DOPA viene quindi decarbossilata: perde gruppo carbossilico -COO- legato al Carbonio alfa con formazione della **Dopamina**.

**Nei neuroni dopaminergici nel SNC, la dopamina può essere il prodotto finale della via biosintetica e essere rilasciato come neurotrasmettitore;** invece nelle cellule della midollare del surrene la dopamina deve per forza proseguire nella via biosintetica per formare la noradrenalina.

(non c'è rilascio di dopamina a livello della midollare del surrene.)

**Regolazione della sintesi di dopamina:** Tirosina idrossilasi, è l'enzima della tappa limitante dell'intero sistema. Questo enzima viene inibito tramite "**feedback negativo**" dalle Catecolammine (Adrenalina, Noradrenalina) e questa ha il ruolo di impedire un'eccessiva produzione di catecolammine quando queste sono già prodotte in maniera sufficiente (**azione retroattivo da prodotto**, per cui i prodotti finali della via biosintetica vanno ad inibire l'enzima della prima tappa della stessa via).

## Sintesi di noradrenalina:

la noradrenalina deriva dalla dopamina. la dopamina è il substrato dell'enzima **dopamina beta-idrossilasi** (monossigenasi) che, usando una molecola di ossigeno, riduce un atomo di ossigeno a gruppo idrossilico che viene inserito sul substrato dopamina, che così viene idrossilata a **noradrenalina**, e l'altro atomo di ossigeno viene ridotto a H<sub>2</sub>O. Il riducente e donatore di elettroni in questa reazione è la **vitamina C (l'acido ascorbico)** che dopo cedere i suoi elettroni in questa reazione si trasforma nella forma ossidata (acido deidroascorico)

Prima che arriva lo stimolo per la produzione della noradrenalina, l'enzima dopamina beta-idrossilasi viene introdotto all'interno delle vescicole di secrezione, dove potrà catalizzare il proseguimento della sintesi di noradrenalina a partire da dopamina, proprio a livello di queste vescicole.

In alcune cellule, la via biosintetica continua e la noradrenalina viene convertita in **adrenalina**.

## Sintesi di adrenalina:

L'adrenalina viene prodotta nel citosol, a partire dalla noradrenalina: inanzitutto l'adrenalina subisce l'azione dell'enzima **PNMT (fenil-etanol-ammina N- metiltransferasi)**, che è un enzima che si trova a livello citosolico e non nei granuli di secrezione, per cui, dato che la noradrenalina viene sintetizzata nei granuli di secrezione, per trasformare la noradrenalina in adrenalina, la noradrenalina deve uscire dai granuli di secrezione e arrivare nel citosol per subire l'azione dell'enzima **PNMT** che trasformerà la noradrenalina in adrenalina. L'**enzima PNMT** è un metil-transferasi; trasferisce un gruppo metilico da **S- adenosil-metionina** che viene legato al gruppo amminico della noradrenalina, formando così l'**adrenalina**.

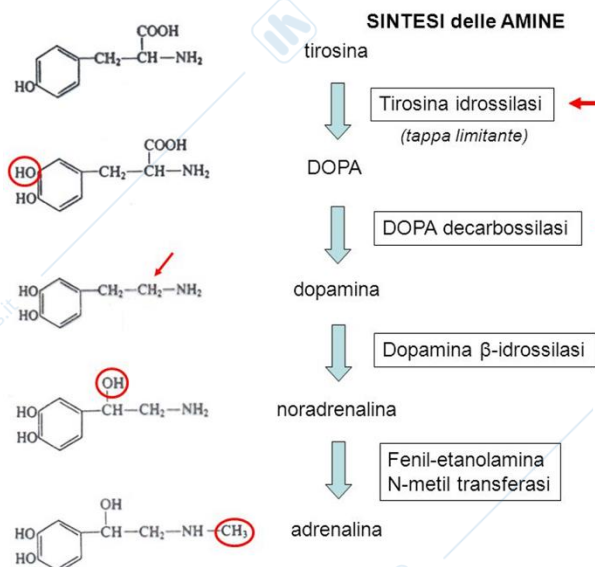
S-adenosil-metionina, cedendo il suo gruppo metilico, esce come **S-adenosil-cisteina**.

Una volta che si è formata adrenalina nel citosol, questa deve essere reimpressa nei granuli di secrezione, tramite un trasporto attivo a spesa di ATP (perchè si formano trasportatori che andranno a concentrare l'adrenalina nei granuli di secrezione).

**Regolazione della sintesi di adrenalina:** i **Glucocorticoidi**, in particolare il **Cortisolo** (prodotto dalla corticale del surrene) stimola la sintesi e attività della PNMT e quindi **stimola la midollare a produrre e a secernere adrenalina**.

Alcuni granuli contengono solo adrenalina, altri solo noradrenalina (o norepinefrina), altri ancora contengono entrambi; infatti, una volta che l'adrenalina è portata fuori dai granuli secretori e viene convertita, grazie alla PNMT citosolica, ed accumulata nei granuli di secrezione, questi potranno contenere o adrenalina o noradrenalina.

Perciò esistono cellule che secernono solo adrenalina e sono **Adrenaliniche**, e cellule che secernono solo noradrenalina, e quindi **noradrenaliniche**,



## Secrezione delle catecolammine:

Nelle situazioni in cui l'organismo ha bisogno dell'azione delle **catecolammine**, si ha una stimolazione colinergica da parte dei neuroni simpatici pre-gangliari che costituiscono il nervo splancnico, rilasciando acetilcolina a livello delle cellule cromaffini del midollare del surrene, il che provoca un **innalzamento dei livelli di calcio**, stimolando così il **rilascio dei granuli di secrezione** (contenenti le catecolammine).

Le catecolammine non possono attraversare la barriera ematoencefalica e perciò, per essere utilizzati come neurotrasmettitori, **devono essere prodotti nel sistema nervoso centrale stesso**, nel cervello e non nella midollare del surrene.

per cui la dopamina viene prodotta anche a livello dei neuroni dopaminergici, e verrà utilizzato come altro ormone adrenergico.

Ci sono alcune patologie del SNC, tra cui il **Morbo Di Parkinson**, in cui c'è una carenza nella sintesi nel SNC delle catecolammine: si può prevedere un trattamento con *L-Dopa*, che è una *forma modificata della DOPA che può attraversare adesso la barriera ematoencefalica* e quindi garantire, a livello dell'SNC, un intermedio della via biosintetica nel **favorire la sintesi di dopamina, adrenalina e noradrenalina**, contrastando in parte quest'alterazione tipica di queste disfunzioni neurologiche.

## Degradazione delle catecolammine:

La **degradazione delle catecolammine** è un processo che avviene ad opera dell'attività sinergica di due enzimi che sono **Catecol-O-Metili-Transferasi**, e **Mono-ammino-ossidasi**. Prima può agire la MAO e poi la COMT e viceversa, e in entrambi i casi si formano intermedi differenti, ma il prodotto finale sarà sempre lo stesso: **acido vanilmandelico** per la degradazione di adrenalina e noradrenalina; e **acido omovanillico** per la degradazione di dopamina.

## LE REAZIONI;

**1) Catecol-O-Metili-Transferasi (o COMT):** enzima che catalizza il trasferimento di un metile in posizione 3 dell'anello benzenico tramite un processo **S-adenosil-metionina dipendente**.

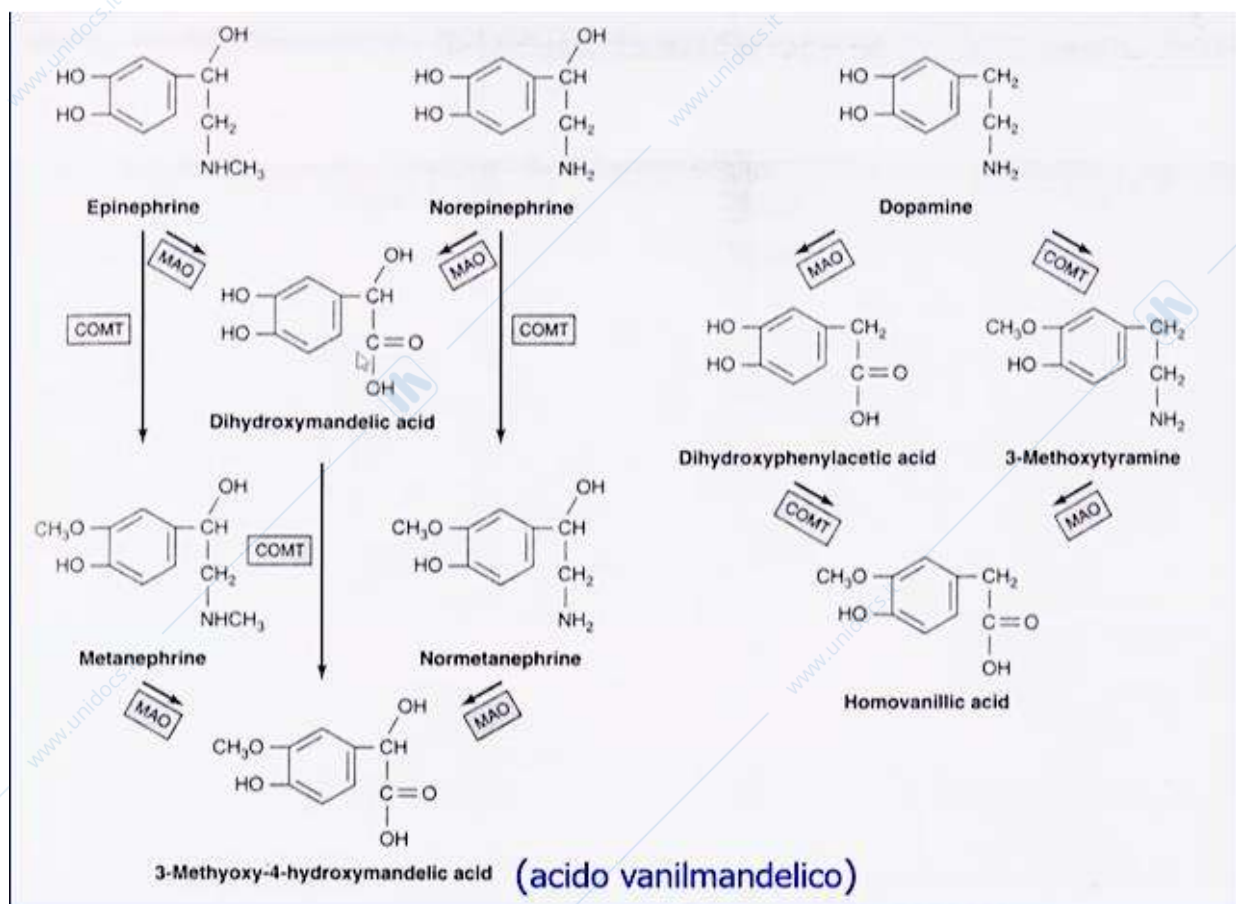
**2) Mono-ammino-ossidasi (o MAO):** enzima redox che determina una deaminazione ossidativa delle catecolammine. Esistono due isoforme della MAO che si dividono nella **MAO-A** espressa principalmente nel tessuto nervoso e nella **MAO-B** che invece è espressa in tutti i tessuti; **inoltre gli inibitori delle MAO vengono utilizzati anche come antidepressivi**.

**Per quanto riguarda adrenalina e noradrenalina** (che differiscono soltanto per quanto riguarda il gruppo metilico presente nell'adrenalina), se prima agisce la MAO si ha questa deaminazione ossidativa e quindi si rimuove il gruppo amminico, con formazione di un gruppo idrossilico formando **l'acido diidrossimandelico**. A questo punto agisce la COMT, che catalizza l'aggiunta del gruppo metilico per formare il prodotto finale **acido vanilmandelico**. Invece, se prima agisce la COMT si avranno prodotti intermedi differenti: per quanto riguarda l'adrenalina si aggiunge un gruppo metilico e si va a formare la **metanefrina**, mentre per quanto riguarda la noradrenalina il gruppo metilico viene aggiunto formando la **nor-metanefrina**, poi interviene il secondo enzima MAO, che agisce formando il prodotto finale: **acido vanilmandelico**.

lo stesso concetto vale anche per la dopamina, il cui prodotto finale è l'**acido omovanillico**.

Successivamente avviene l'eliminazione dei prodotti di degradazione delle catecolammine:

a livello del fegato, tramite una **reazione di glucuronazione**, ai prodotti finali della degradazione delle catecolammine viene aggiunto un **gruppo glucuronico** sia sull'acido **vanilmandelico**, sia sull'acido **omovanillico**, e quindi verranno poi escreti con le urine.



## RECETTORI ADRENERGICI e DOPAMINERGICI: i recettori delle catecolammine

Quando agiscono da ormoni, le catecolammine **adrenalina** e **noradrenalina** segnalano attraverso recettori accoppiate a proteine G, che sono detti **recettori adrenergici** che interagiscono con l'adrenalina o con la noradrenalina. Esistono i **recettori alfa adrenergici** (alfa1 e alfa2) e **beta adrenergici** (beta1, beta2 e beta3). Tutti questi recettori sono accoppiati a proteine G. La subunità alfa della proteina G del recettore alfa1, e alfa 2 sono diverse l'uno dall'altro, e diverse anche da quella dei recettori beta dove invece la subunità alfa è uguale in ciascuno dei recettore beta1, beta2, beta3.

i recettori alfa sono piu affini per l'adrenalina, mentre i recettori beta sono piu affini per la noradrenalina, (entrambi i tipi dei recettori sono affini ai due ormoni, cambia solo l'affinità). Quando queste catecolammine vengono liberate dal midollare del surrene, vanno a legarsi su questi recettori che raccolgono lo stimolo.

Invece a livello del Sistema Nervoso Centrale, quando viene prodotta la **dopamina**, questa va a stimolare un neurone postsinaptico legandosi ai suoi propri recettori detti **recettori dopaminergici** che possono essere di due tipi: **Recettore D1** e **Recettore D2** che determinano la stimolazione di una depolarizzazione di membrana, innescando la propagazione del potenziale d'azione.

### Localizzazioni dei vari recettori adrenergici e i loro meccanismi:

- **Recettori  $\alpha 1$** : sono localizzati nel fegato, nel sistema nervoso centrale, e nella muscolatura liscia dei vasi sanguigni e degli organi: stomaco, intestino, tratto genito-urinario, sfinteri. sono associati alle proteine Gq, e, attraverso IP3, diacilglicerolo e calcio, mediano la contrazione della muscolatura liscia dei vasi e del tratto gastrointestinale. Stimolano la glicogenolisi per aumentare il substrato energetico (glucosio), inoltre aumentano la contrazione della muscolatura liscia dei vasi e del tratto genitourinario, rilassano la muscolatura di stomaco e intestino con conseguente blocco della digestione.
- **Recettori  $\alpha 2$**  sono distribuiti sia a livello pre-sinaptico che post-sinaptico (**terminazioni nervose**) in vari tessuti nel corpo: nel SNC, nella muscolatura liscia dei vasi e degli organi, nel rene, nel pancreas, sulle piastrine. I recettori  $\alpha 2$  abbassano i livelli di cAMP. Mediano la contrazione della muscolatura liscia dei vasi perché si legano alla proteina G $\alpha$  inibitoria che abbassa i livelli di cAMP e rende meno attiva la PKA che così non fosforila la MLCK, che quindi diventa attiva e può fosforilare la catena leggera della miosina inducendo la contrazione.
- **Recettori  $\beta 1$**  sono distribuiti a livello del rene e del **miocardio** e aumentano la frequenza della contrattilità del muscolo cardiaco perché portano all'attivazione dell'adenilato ciclasi, che quindi aumenta i livelli di cAMP, si attiva la PKA che a sua volta va a fosforilare i canali del calcio. Una volta aperti si ha un innalzamento dei livelli del calcio che determinano una fosforilazione della MLCK che sarà quindi in grado di fosforilare la catena leggera della miosina determinando la contrazione.
- **Recettori  $\beta 2$**  presenti nel fegato, nella **muscolatura** scheletrica e in quella liscia dei vasi e organi, e mediano principalmente il rilassamento perché nei tessuti dove sono espressi, la PKA va a fosforilare direttamente la MLCK, rendendola inattiva. In questo modo non viene più attivata la catena leggera della miosina per cui si determina il rilassamento.
- **Recettori  $\beta 3$** : sono espressi a livello del **tessuto adiposo** e determinano la lipolisi. con attivazione classica del cAMP e della PKA che fosforila lipasi e perilipina. Le perilipina è quella proteina che protegge le gocce lipidiche dall'aggressione delle lipasi. quando la PKA fosforila la perilipina, la perilipina fosforilata viene allontanata dalle gocce lipidiche esponendole all'azione delle lipasi che quindi svolgono la lipolisi; ~~si ha la~~ **mobilitazione degli acidi grassi che possono essere utilizzati come combustibile energetico.**

Recettore	Tessuto	Mecc. trasduzione	Risposta
$\alpha_1$	<b>Muscolatura liscia vasale</b> <b>Muscolatura liscia organi</b> Stomaco, pareti dell'intestino Tratto genito-urinario, sfinteri <b>Fegato</b> <b>SNC</b>	$\uparrow IP_3/DAG$ $\uparrow IP_3/DAG$ $\uparrow IP_3/DAG$ $\uparrow IP_3/DAG$	Contrazione  Rilassamento Contrazione Glicogenolisi, gluconeogenesi Stato di veglia Secrezione ACTH, LH
	<b>Terminazioni nervose</b> Catecolaminergiche Gangli intramurali dello stomaco <b>Muscolatura liscia vasale</b> <b>Muscolatura liscia organi</b> <b>Rene</b> <b>Pancreas</b> <b>Piastrine</b> <b>SNC</b>	$\downarrow cAMP$ $\downarrow cAMP$ $\downarrow cAMP$ $\downarrow cAMP$ $\downarrow cAMP$ $\downarrow cAMP$	Inibizione liberazione NA Inibizione liberazione ACh  Contrazione Rilassamento (presinaptico) Diminuzione escrezione Sali Diminuzione secrezione insulina Aggregazione Aumento secrezione GH

Recettore	Tessuto	Mecc. trasduzione	Risposta
$\beta_1$	<b>Cuore</b> Nodo SA Atrio Nodo AV  Hiss-Purkinje  Ventricolo	$\uparrow cAMP$	Aumento frequenza Aumento contrattilità Aumento velocità di conduzione Aumento automatismo Aumento velocità di conduzione Aumento automatismo Aumento contrattilità Aumento velocità di conduzione Aumento automatismo Aumento secrezione renina
	<b>Rene</b>	$\uparrow cAMP$	Aumento secrezione renina
$\beta_2$	<b>Muscolatura liscia vasale</b>	$\uparrow cAMP$	Rilassamento
	<b>Muscolatura liscia organi</b>	$\uparrow cAMP$	Rilassamento
	<b>Muscolatura scheletrica</b>	$\uparrow cAMP$	Glicogenolisi
	<b>Fegato</b>	$\uparrow cAMP$	Glicogenolisi, gluconeogenesi
$\beta_3$	<b>Tessuto adiposo</b>	$\uparrow cAMP$	lipolisi

ORGANO O TESSUTO	ADRENORECETTORI PREDOMINANTI	EFFETTI DI ATTIVAZIONE	EFFETTI FISIOLGICI
CUORE	$\beta_1$	Contrazione muscolare	Incremento di frequenza e forza del cuore
MUSCOLO LISCIO BRONCHIALE	$\alpha_1$	Contrazione del muscolo liscio	Chiusura delle vie aeree
	$\beta_2$	Rilassamento del muscolo liscio	Dilatazione e apertura delle vie aeree
MUSCOLO LISCIO DELLE ARTERIOLE	$\alpha_1$ e $\alpha_2$	Contrazione del muscolo liscio	Costrizione delle arteriole e incremento della pressione sanguigna (IPERTENSIONE)
	$\beta_2$	Rilassamento del muscolo liscio	Dilatazione delle arteriole e incremento del sangue che arriva ai muscoli
VENE	$\alpha_1$	Contrazione del muscolo liscio	Costrizione delle vene e incremento della pressione sanguigna (IPERTENSIONE)
	$\beta_2$	Rilassamento del muscolo liscio	Dilatazione delle vene e decremento della pressione sanguigna (IPOTENSIONE)
FEGATO MUSCOLO	$\alpha_1$ (muscolo) e $\beta_2$ (muscolo e fegato)	Attivazione degli enzimi che metabolizzano il glicogeno e inattivazione degli enzimi che lo sintetizzano	Demolizione del glicogeno per produrre glucosio
MUSCOLO LISCIO DEL TRATTO GI	$\alpha_1$	Rilassamento	Arresto temporaneo della digestione
RENE	$\beta_1$	Incremento della secrezione di renina	Incremento della pressione sanguigna
TESSUTO ADIPOSO	$\beta_3$	Attivazione delle lipasi	Demolizione del grasso

## BIOCHIMICA DEL TESSUTO ADIPOSO

Esistono dei sottoinsiemi del tessuto adiposo caratterizzati da metabolismi molto differenti tra di loro:

1. tessuto bianco; associato ad una serie di patologie tra cui la sindrome metabolica.
2. tessuto bruno; maggiormente associato al benessere.
3. tessuto rosa; non ne conosciamo ancora definitivamente le caratteristiche.

Tra le prime due tipologie di tessuto adiposo esiste un equilibrio dinamico che deriva dal processo di *browning*, in cui il tessuto bianco diventa bruno, e *Whiting*, in cui il tessuto bruno diviene bianco. Esistono come conseguenza tutta una serie di tessuti intermedi di colorazione *beige*. Quest'ultima tipologia di tessuto ha caratteristiche intermedie tra bianco e bruno.

	Tessuto adiposo bianco	Tessuto adiposo bruno
Principale funzione	Riserva energetica	Termogenesi
Risposta al freddo	Lieve	Intensa
Distribuzione anatomica	Estesa	Ristretta
Innervazione simpatica	Relativamente scarsa	Estesa
Vascolarizzazione	Relativamente scarsa	Estesa
Gocce lipidiche	Uniloculari	Multiloculari
Mitocondri	Scarsi	Numerosi
Metabolismo ac. grassi	Rilascio in circolo	Ossidazione <i>in situ</i>
Proteina disaccoppiante	Assente	Presente
Recettori adrenergici	$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \alpha_2$	$\beta_1, \beta_3, \alpha_1$
5'-deiodinasi ( $T_4 \rightarrow T_3$ )	Assente	Presente

- La funzione di riserva energetica del tessuto bianco può essere considerata positiva nel momento in cui le risorse esterne scarseggiano, cosa che non corrisponde alla nostra realtà. Il tessuto bruno ha la principale funzione di termogenesi grazie alla elevata concentrazione di *termogenina* (riferimento alla lezione sulla fosforilazione ossidativa del prof. Cirri).
- Parlando della risposta al freddo, il tessuto bianco pur non possedendo la termogenina prevede comunque una risposta, se pur lieve, al freddo. Uno dei motivi risiede nella sua caratteristica di isolante termico; un altro motivo, di tipo metabolico, verrà spiegato nel corso di quest'ultima parte della lezione. Per quanto riguarda il tessuto bruno, ovviamente, risponde in maniera molto più efficace al freddo.
- La distribuzione anatomica è molto differente tra il tessuto bianco e il tessuto bruno; anche se in passato si pensava che il tessuto adiposo bruno fosse tipico dell'età neonatale, questo tipo di tessuto è presente anche in organismi di età adulta. E' molto regolato da fattori come il freddo (durante l'inverno aumentiamo la quantità di tessuto bruno; è per questo che i primi freddi stagionali li percepiamo maggiormente rispetto agli'ultimi). Un altro importante fattore che aumenta il tessuto bruno è l'esercizio fisico.
- L'innervazione simpatica e la vascolarizzazione sono molto più sviluppate nel tessuto bruno. Infatti le catecolamine sono delle regolatrici di questo tipo di tessuto. La vascolarizzazione è necessaria per trasportare l'ormone endocrino al suo bersaglio.
- Il deposito dei lipidi: in figura (a destra) sono mostrate le differenze tra gli adipociti di tipo bianco e di tipo bruno. A differenza di quelli di tipo bianco, quelli di tipo bruno presentano tanti piccoli globulini di trigliceridi e la cellula è in generale più piccola e meno rotondeggiante. Nella figura a sinistra invece vediamo come risponde un adipocita al digiuno e allo stato di alimentazione.

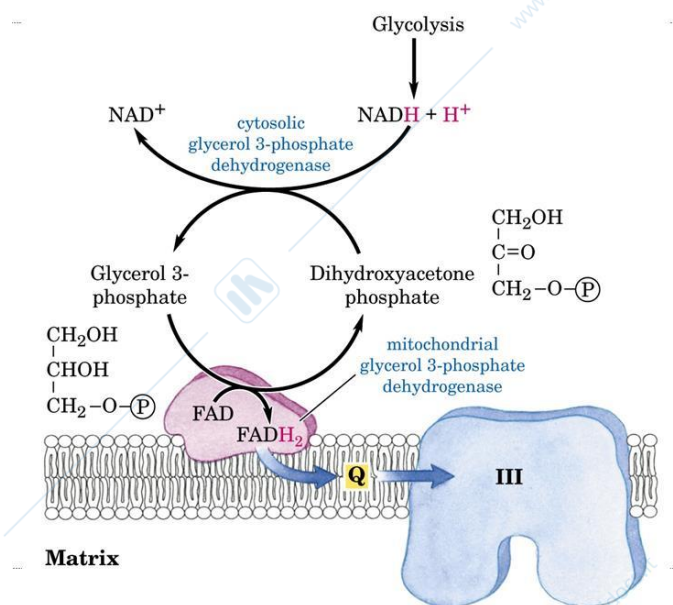
- Il tessuto adiposo bianco compie una lieve respirazione, tuttavia in maniera molto minore rispetto a quello bruno. I mitocondri sono presenti dunque in entrambi i tessuti, difatti il tessuto bianco è chiamato così solo per distinguerlo da quello bruno perché nella realtà ha un colore giallo (i mitocondri sono colorati dai citocromi). L'uso da parte del bruno dei mitocondri prevede in particolare la termogenesi.
- Il metabolismo degli acidi grassi è differente. Il bianco è un deposito, rilascia gli acidi grassi in circolo attraverso la trigliceride-lipasi, quindi è un deposito per tutto l'organismo. Il bruno invece usa i trigliceridi accumulati in situ per la termogenesi.
- UCP (proteine disaccoppiate), ne esistono due isoforme, UCP1 e UCP2. Sono assenti o quasi nel bianco e largamente presenti nel bruno.
- Recettori adrenergici (riferimento alle lezioni della Giannoni). Mediamente la adrenalina e la noradrenalina funzionano in modo differenziale tra bianco e bruno, in quanto la prima preferisce il bianco mentre la seconda preferisce il bruno. La grande differenza sta nella quantità di recettori  $\beta_3$  (sono maggiormente affini per la noradrenalina) presenti largamente sul bruno e scarsamente sul bianco. Lo scopo di questi ormoni è differente in base ai tessuti: sul bianco hanno la funzione di stimolare la azione della trigliceridi-lipasi ormone dipendente per liberare gli acidi grassi contenuti nei depositi; lo scopo sul bruno hanno lo scopo di attivare il disaccoppiamento tra la catena di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa dunque la termogenesi. Esiste un'altra funzione delle catecolamine che è quella del differenziamento tra bianco e bruno (inducono browning).
- La deiodinasi è un enzima che converte il T4 in T3; quindi è attivatrice dell'ormone tiroideo. La deiodinasi è espressa solo dal tessuto adiposo bruno, poiché l'ormone tiroideo è un altro dei fattori favorevoli al browning.

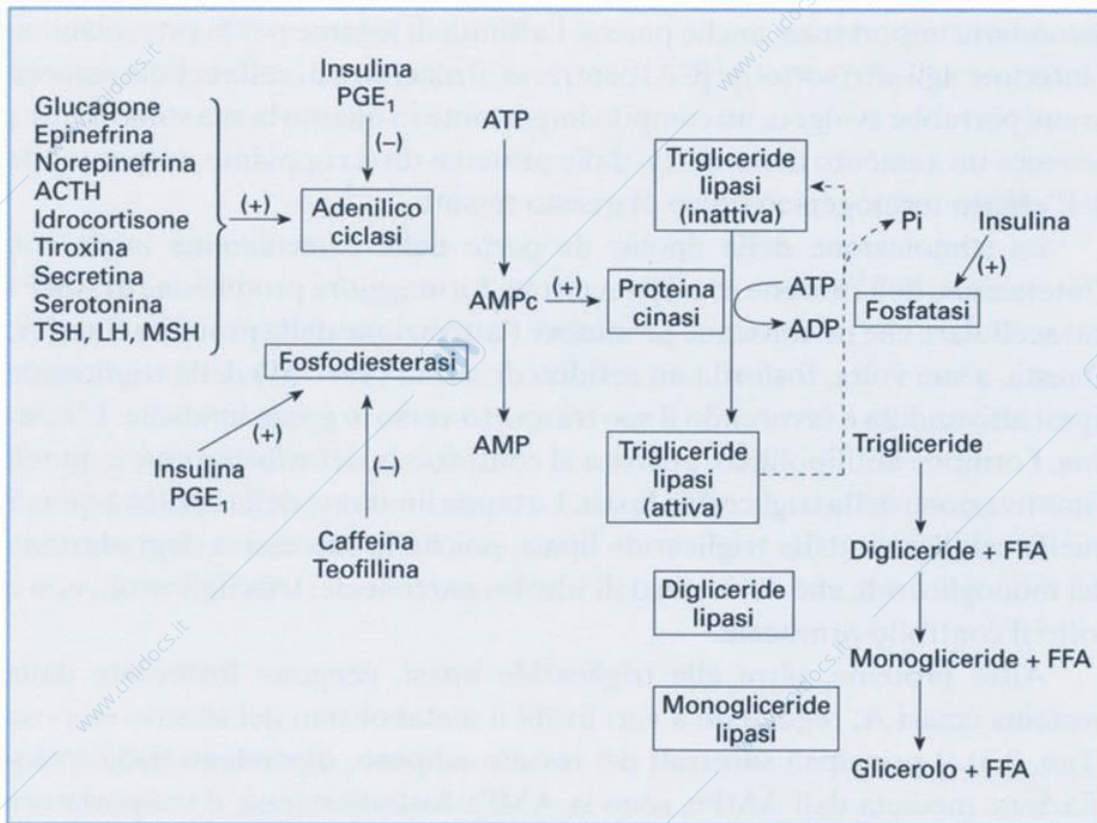
**[la prof parla dei sistemi shuttle ricordando brevemente le differenze tra lo shuttle malato- aspartato e quello glicero-fosfato]**

Il tessuto adiposo utilizza unicamente lo shuttle del glicero-fosfato (produce un po' meno ATP in quanto salta del tutto il complesso I). Pur essendo leggermente sfavorevole energeticamente, il tessuto adiposo è costretto ad usare questo sistema perché il glicerolo è presente in alta concentrazione (stock di trigliceridi).

Lipolisi: processo opposto al deposito, altrettanto importante. L'enzima chiave è la trigliceride lipasi ormone dipendente, la quale è attivata da una serie di ormoni via AMP ciclico.

La lipolisi produce l'idrolisi di tre legami ad alta energia, dunque durante il processo si libera molto calore. Questo è il principio metabolico che determina la termogenesi del tessuto adiposo bianco di cui abbiamo parlato prima.





Per ricollegarci alla lezione precedente, mostra un'immagine. Questo è un tessuto adiposo misto, in cui si possono vedere il tessuto bianco e quello bruno, uno accanto all'altro; si nota facilmente che il bianco è uniloculare, cioè presenta un unico grande deposito di lipidi. Il tessuto adiposo bruno invece, che è più colorato, ha anche un citoplasma, il quale è quasi assente nel bianco a causa della grandezza del vacuolo. Inoltre vi sono molti piccoli depositi - è multiloculare - e dunque anche il tessuto adiposo bruno è molto ricco in trigliceridi.

La scorsa lezione eravamo arrivati a descrivere lo **shuttle del glicero-fosfato**, utilizzato dal tessuto adiposo al posto dello shuttle del malato-aspartato per portare il NADH citosolico nel mitocondrio, affinché sia utilizzato per la sintesi di ATP. Lo shuttle del glicero-fosfato è meno conservativo rispetto all'altro, perché converte il NADH in FADH<sub>2</sub>; lo shuttle del glicero-fosfato è estremamente utile per il tessuto in questione, in quanto lavora sul glicerolo esterificando e de-esterificando i trigliceridi. Quindi questo sistema permette al tessuto adiposo di usare il glicerolo e il diidrossiaceton-fosfato, mettendo in correlazione il metabolismo dei trigliceridi e la glicolisi.

Poi avevamo descritto la **lipolisi**, estremamente importante nel tessuto adiposo, che è finemente regolata da una pletera di ormoni. Alcuni ormoni, come il glucagone, l'adrenalina, la noradrenalina, l'ACTH, l'idrocortisone, la tiroxina, la secretina e la serotonina, attivano un metabolismo catabolico dei trigliceridi; al contrario, l'insulina e le prostaglandine (qua è rappresentata la PGE<sub>1</sub>, ma le prostaglandine sono una grande famiglia), agiscono sulle fosfodiesterasi del cAMP, invece che sull'adenilato ciclasi, esercitando un controllo inibitorio sulla trigliceride lipasi.

## TERMOGENESI

La **trigliceride lipasi**<sup>1</sup> è un enzima che catalizza la reazione di distacco di un acido grasso alla volta dal

trigliceride; questo è un processo importante dal punto di vista energetico, in quanto è estremamente

favorito termodinamicamente, poiché la biosintesi dei trigliceridi necessita di un ATP per ogni acido grasso che viene attivato. In realtà è come se per ogni acido grasso venissero usati due ATP, perché lo si utilizza idrolizzando ad AMP e pirofosfato: quindi per risintetizzare l'ATP è necessaria un'energia doppia. Il fatto che queste tre reazioni siano estremamente favorite da un punto di vista energetico, significa che liberano energia, ed in questo caso la liberano sotto forma di calore; dal momento che questa reazione avviene in maniera cospicua in un tessuto abbondante e delocalizzato nell'organismo, questo sviluppo di calore è importante per la nostra termogenesi.

La maggiore attività di termogenesi, però, è affidata alla **termogenina**, o **UCP** (uncoupling protein), che è la responsabile diretta della generazione di calore regolata del nostro corpo. Questa proteina è espressa nel tessuto adiposo bruno, il cui scopo principale è proprio la termogenesi. La termogenina è un canale nella membrana mitocondriale interna, la quale è estremamente selettiva (non fa passare i nutrienti e gli ioni, compreso l'idrogenione H<sup>+</sup>). La membrana del mitocondrio ha proprio il ruolo di segregare gli idrogenioni in modo da sfruttare il flusso che si crea per il gradiente elettrochimico per l'ATP sintasi, o complesso V, per la sintesi di ATP. La termogenina fa passare protoni, cortocircuitando il gradiente elettrochimico e dissipandolo, liberando così energia sotto forma di calore. L'espressione e la permeabilità agli idrogenioni della termogenina, quindi, sono forieri di calore.

Esistono due isoforme della termogenina: **UCP1 e UCP2**. Tutto ciò che è stato detto fino a questo punto, è caratteristico della UCP1, che viene appositamente sintetizzata per produrre calore dissipando il gradiente, ovvero diminuendo la potenzialità delle cellule di produrre ATP, sebbene quest'ultimo non sia il suo scopo. L'UCP2, invece, ha proprio il secondo scopo; questa non è espressa nel tessuto adiposo bruno, ma è espressa frequentemente nelle cellule in attiva proliferazione e soprattutto nelle cellule tumorali. *(Il metabolismo dei tumori sarà oggetto di una futura lezione, ma in questo momento viene comunque affrontata superficialmente la UCP2, per poter avere un paragone con la UCP1.)*

Abbiamo sempre visto che le cellule producono più ATP possibile, utilizzando al massimo i nutrienti, mentre i tumori sembra che non si adoperino per questo, nonostante siano in attiva proliferazione e in un ambiente più stressogeno, e quindi in teoria necessitino di più ATP. I tumori in realtà si adoperano per produrre meno ATP possibile, attuando una serie di strategie come, ad esempio, il cambiamento del metabolismo (da ossidativo a fermentativo) o la maggior espressione di UCP2, con conseguente dissipazione elettrochimica. Inoltre i tumori tendono ad acquisire tutti i metaboliti possibili. Infatti, a differenza delle cellule normali, non istaurano una partnership e si accaparrano tutti i nutrienti a disposizione. Dunque il problema dell'approvvigionamento non esiste per le cellule tumorali, che esprimono numerosissimi trasportatori per potersi approvvigionare in maniera efficiente. Il risultato è che le cellule circostanti muoiono, cedendo spazio al tumore che può crescere ulteriormente. I nutrienti, presenti in quantità enormi, possono essere sfruttati anche meno efficientemente, e addirittura vedremo che la cellula tumorale sceglie di fare un metabolismo fermentativo invece che respiratorio, nonostante produca molta meno ATP (2 molecole invece che più di 30 per ogni glucosio). Lo stesso accade per la catena di trasporto degli elettroni, che, a causa dell'espressione di un'UCP particolare, viene cortocircuitata; solitamente, lo scopo non è produrre energia termica, bensì quello di creare molti anaboliti per la sintesi di citoplasma, per permettere l'accrescimento. Di conseguenza verranno prodotti molti amminoacidi, nucleotidi e lipidi a partire da vari intermedi delle vie metaboliche. *(L'argomento verrà approfondito nella lezione sui tumori)*

Il calore prodotto grazie alla termogenina è regolato a livello ormonale: infatti, ci sono ormoni che sono capaci di regolare la nostra produzione di calore. Un esempio sono le **catecolammine**: una stimolazione adrenergica ci dà una vampata di calore, che da un lato è dovuta anche alla vasodilatazione. Il motivo per cui questa regolazione è possibile è che è presente un recettore sulle cellule del tessuto adiposo bruno, in particolare tutti quelli della sottocategoria  $\beta$ , che attivano l'adenilico ciclasi grazie alla G $\alpha$ S; nella fattispecie, si occupano della regolazione della termogenesi il recettore  $\beta_3$  e in parte il  $\beta_2$ , mentre il  $\beta_1$  non esegue questo processo.

La stimolazione è quella canonica: vi è la stimolazione del recettore accoppiato a proteine G, l'attivazione dell'adenilico ciclasi, la sintesi di cAMP, la stimolazione della protein chinasi cAMP-dipendente (PKA) e l'attivazione CREB-dipendente<sup>2</sup> dei geni che hanno l'elemento di risposta sensibile al cAMP (CRE). Fra questi geni vi è quello per la termogenina, ovvero il gene principale fra quelli regolati da cAMP e CRE in queste cellule. In questo modo si aumenta moltissimo la generazione di calore. Tra i geni che hanno CRE, vi sono anche quelli coinvolti nel transdifferenziamento bianco-bruno (processo di *browning*) e quelli del catabolismo dei trigliceridi; la trigliceride lipasi fa parte di quest'ultimo gruppo.

## IL TESSUTO ADIPOSO COME ghiandola ENDOCRINA

Il tessuto adiposo, soprattutto quello bianco, è un organo endocrino, cioè produce ormoni. Questa è una funzione piuttosto inusuale. Alcuni degli ormoni che produce hanno una funzione **pro-infiammatoria**, come interleuchina-6 o **IL-6**, **TNF- $\alpha$**  e **TGF- $\beta$** , secreti esclusivamente dal tessuto adiposo bianco, soprattutto da quello viscerale. Questi ormoni infiammano e sostengono l'infiammazione, in particolare causando un'attivazione endoteliale: in questo modo l'endotelio diventa più aterosclerotico. Il risultato è quello di favorire l'insorgenza di patologie cardiovascolari.

Questo non è l'unico fattore, infatti sono determinanti anche la soggettività e l'interazione con altri ormoni.

Gli altri due ormoni di cui parleremo sono l'adiponectina e la leptina.

L'**adiponectina** ha delle caratteristiche estremamente interessanti, in quanto è *insulina mimetico*. L'insulina è l'ormone che, attraverso la stimolazione del recettore a tirosino chinasi, induce la down-regolazione della glicemia dopo un pasto e tutto ciò che gli consegue. Carenze di insulina, per reazioni immunitarie contro gli isolotti  $\beta$  del pancreas, portano prima all'insulina resistenza e successivamente all'insorgenza del diabete.

Esistono vari tipi di diabete, fra cui il diabete di tipo I, dovuto alla carenza di insulina, e il diabete di tipo II che invece è dovuto alla carenza della segnalazione dell'insulina; questo vuol dire che i diabete di tipo II possono essere di molte tipologie diverse, perché la carenza della segnalazione può dipendere da dei problemi del recettore o di una delle innumerevoli molecole che partecipano alla trasduzione del segnale.

In qualunque punto sia il difetto, l'idea di avere un ormone insulino mimetico, che quindi possa dare un segnale simile a quello dell'insulina quando questa è assente o non percepibile dai recettori, è una buona idea. Il tessuto adiposo bianco produce l'adiponectina, che stimola un recettore accoppiato a proteina G (GPCR) piuttosto strano, perché, mentre tutti i GPCR hanno l'N-terminale all'esterno della membrana e il C-terminale all'interno, questo è al contrario: infatti presenta il C-terminale all'esterno. La motivazione è tutt'ora ignota. Questo recettore è in grado di dare uno stimolo insulino mimetico, e quindi di fare tutto quello che non può più fare l'insulina nei vari tipi di diabete.

Nei casi di diabete conclamato non si può risolvere del tutto il problema, però nei casi di insulino resistenza, in cui vi è solo una segnalazione diminuita dell'insulina, questo tipo di segnale è adiuvante. Quindi una classe di farmaci, i tiazolinedioni (TZD), sono molto utilizzati come antidiabetici, soprattutto per trattare pazienti affetti da diabete di tipo II. I tiazolinedioni, come pioglitazone e rosiglitazone, sono degli stimolatori della biosintesi dell'adiponectina, che di conseguenza sarà iperprodotta e agirà maggiormente sul suo recettore, inducendo un effetto insulino mimetico più efficiente. Chiaramente l'adiponectina ha anche un effetto sul fegato, il quale trasloccherà il suo GLUT4 sulla membrana: questo evento, tipicamente dovuto all'insulina, abbasserà molto la glicemia. Questo ormone ha lo stesso effetto anche sul muscolo scheletrico.

La leptina dà un segnale concettualmente semplice: il tessuto adiposo bianco è troppo, deve essere ridotto. Questo obiettivo viene raggiunto tramite due stimoli: diminuendo l'apporto di cibo e aumentando l'esercizio fisico.

## Meccanismo di trasduzione del segnale della leptina :

se c'è un aumento di peso (weight gain), aumenta il livello di leptina e l'ipotalamo, che ha i recettori per quell'ormone, risponde dando il segnale di "stop eating, start exercising"; dall'altra parte, se c'è una diminuzione di peso (weight loss), diminuisce il segnale della leptina e anche in questo caso l'ipotalamo risponde, ma in maniera opposta.

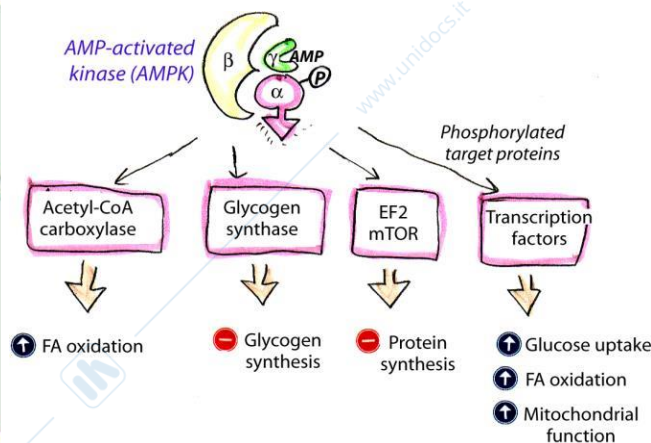
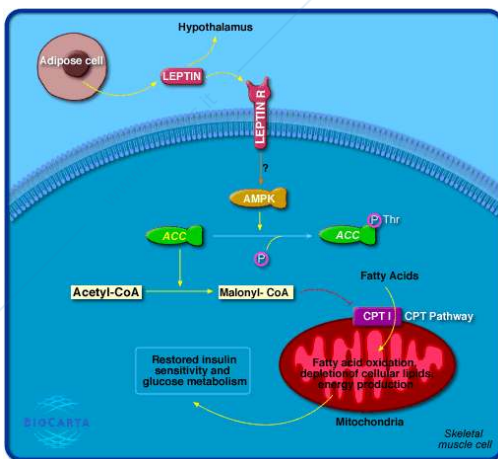
Da un punto di vista molecolare, la leptina agisce su un recettore accoppiato a tirosino-chinasi, un recettore di membrana; d'altronde la leptina è un ormone proteico. Nell'immagine a fianco, il recettore sembra monomero, ma in realtà è dimerico e, come tutti i recettori a tirosino-chinasi, dimerizza in seguito ad interazione con l'ormone. Il recettore stimola una chinasi, che si chiama AMP chinasi o AMPK (diversa dalla PKA, in quanto AMPK dipende da AMP, mentre PKA è cAMP dipendente).

AMPK è composta di tre subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ): la subunità  $\gamma$  è quella che interagisce con AMP.

Il segnale dell'AMP nella cellula segnala carenza di ATP, ovvero indica che sono stati catabolizzati pochi nutrienti. Lo stato di attivazione del recettore, allora, risponde a un duplice stimolo, ovvero quello indotto dalla leptina e quello dipendente dalla concentrazione di AMP. Quando il recettore lega la leptina, fosforila AMPK, aumentando l'attività catalitica: AMPK fosforilata, in assenza di AMP, non è attivata pienamente, mentre se c'è povertà energetica (quindi alta concentrazione di AMP) e in più è fosforilata dal recettore della leptina, allora si raggiunge la piena attivazione.

A questo punto AMPK attivo darà luogo a una serie di effetti:

- viene stimolato il catabolismo delle risorse energetiche, per esempio la  $\beta$ -ossidazione aumenta
- viene inibita la sintesi del glicogeno (nel tessuto adiposo il glicogeno viene immagazzinato in quantità modeste, ma dobbiamo considerare che anche il fegato risponde a questo segnale)
- viene inibita la sintesi proteica
- vengono stimolati i processi di approvvigionamento di nutrienti: per esempio si aumenta la trascrizione dei geni che codificano per i trasportatori per il glucosio
- dal momento che la funzione mitocondriale aumenta l'efficienza con cui si possono utilizzare i nutrienti, viene incrementata la sintesi delle proteine mitocondriali ed è aumentata la riproduzione per fissione.



Il gene della leptina è stato molto studiato perché provoca obesità. Nella fattispecie, i topi che sono ob/ob, cioè omozigoti per una mutazione nel gene della leptina, sono obesi e sono gli unici modelli per studiare il diabete negli animali. Questo perché dopo qualche mese di età sviluppano il diabete, che è una conseguenza della loro obesità.

## TESSUTO ADIPOSO ROSA

Il tessuto adiposo rosa è uno stadio differenziativo diverso dagli altri ed è una terza popolazione adipocitaria, tipica della ghiandola mammaria nell'ultima fase della gravidanza e della lattazione. Gli adipociti bianchi, che sono la sorgente di quelli rosa nel processo di pinkening<sup>8</sup>, cambiano completamente: si attivano dei geni responsabili della sintesi di molti nutrienti, vale a dire i componenti del latte materno. Gli adipociti rosa, a differenza di quelli bruni, producono ancora la leptina; quest'ultima sembra essere importante per prevenire l'obesità dei cuccioli, i quali assumono il prodotto degli adipociti rosa. Come le cellule adipocitarie bianche e brune, gli adipociti rosa sono ancora cellule mesenchimali, dal momento che vi può essere transdifferenziazione fra adipociti bianchi e rosa; purtroppo ancora non è stata verificata questo processo fra tessuto adiposo bruno e rosa, anche se sembra possibile.

## BIOCHIMICA DEL TESSUTO NERVOSO

Il tessuto nervoso svolge due lavori principali:

1. Deve produrre dei neurotrasmettitori. Questi vengono utilizzati come messaggi nella sinapsi.
2. Deve produrre uno stimolo elettrico che si propaga nelle sue membrane specializzate.

Tutto il metabolismo è atto a questo. Di fatto porta un segnale anche da un capo all'altro del nostro organismo e lo fa propagando un segnale elettrico attraverso il corpo cellulare dei neuroni che cominciano e finiscono in un certo punto. Quando finisce una cellula e ne inizia un'altra c'è una zona in cui la cellula A contatta la cellula B e questa zona prende il nome di sinapsi. In questo punto non c'è una continuità elettrica e il lavoro del sistema nervoso è quello di trasferire uno stimolo chimico che esce dalla cellula A, viene liberato nello spazio intersinaptico e agisce sulla cellula B. Quest'ultima che riceve il segnale chimico del neurotrasmettitore lo sente attraverso un sistema recettoriale e traduce dalla vecchia lingua chimica alla nuova lingua elettrica.

### BIOSINTESI DEI NEUROTRASMETTITORI

Il neurotrasmettitore è un ormone vero e proprio, sono molecole sintetizzate da cellule che vengono liberate dalla cellula stessa e sentite da un'altra cellula attraverso un sistema recettoriale e tradotte in un segnale.

Metabolicamente la sintesi del neurotrasmettitore costa, quindi buona parte del metabolismo della cellula nervosa è devoluta alla biosintesi del neurotrasmettitore. Il trasferimento del potenziale di azione dello stimolo elettrico all'interno della membrana delle cellule nervose ha bisogno di depolarizzazione o iperpolarizzazione. Si cambia il potenziale di membrana della cellula e per fare questo devo coinvolgere delle pompe di membrana per far passare gli ioni. Le pompe di membrana consumano ATP. Dunque, le cellule nervose utilizzano il metabolismo sia per sintetizzare il neurotrasmettitore sia per ristabilire il potenziale d'azione. Alcuni neurotrasmettitori sono:

1. Monoammine: acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina e istamina.
2. Amminoacidi: acido glutammico, GABA, glicina.
3. Peptidi: metionina encefalica, encefaline, neuropeptide Y, dinorfina, sostanza P, oppioidi,  $\beta$ -endorfina.

I peptidi derivano da un precursore comune e poi cellule diverse sforbiciano questo precursore in modo diverso a produrre dei prodotti di proteolisi limitata. I peptidi, inoltre, sono piccoli: si va dai trenta amminoacidi ai 3 amminoacidi. Le endorfine, per esempio, sono molecole che danno una sensazione di benessere.

### I RECETTORI PER I NEUROTRASMETTITORI

I recettori per i neurotrasmettitori sono divisi tecnicamente e farmacologicamente in due grandi gruppi: i recettori ionotropici e i recettori metabotropici. Gli **ionotropici** sono dei canali di membrana, i **metabotropici** sono recettori accoppiati a proteine G e quindi sono un po' più lenti perché appunto coinvolgono la proteina G.

### ACETILCOLINA

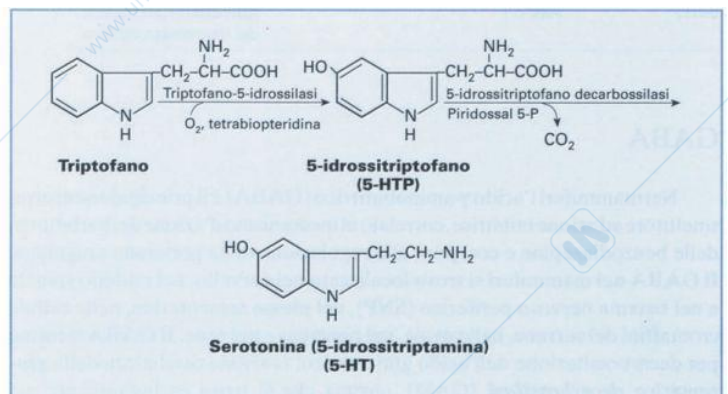
L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che ha dei recettori ionotropici e dei recettori metabotropici. Gli ionotropici sono due e sono dei canali per il sodio. Si chiamano colinergici perché sentono l'acetilcolina e sono presenti nei muscoli striati scheletrici e sul sistema nervoso simpatico e parasimpatico. I metabotropici si chiamano anche muscarinici perché un'antagonista è la muscarina, una molecola tossica che è stata estratta per la prima volta dalla amanita muscaria. Sono accoppiati a proteine G, in particolare alla G- $\alpha$ -i, che inibisce l'adenilato ciclasi diminuendo la concentrazione dell'AMP ciclico e quindi disattiva la proteina chinasi AMP ciclico dipendente, che andava a fosforilare i canali ma ora non potrà più farlo.

## CATECOLAMMINE

Le catecolammine vengono sintetizzate a partire da tirosina e vengono riversate nello spazio presinaptico. I neuroni che sono capaci di sintetizzare adrenalina e noradrenalina, sintetizzano queste molecole nel pirenoforo e poi devono mandare questa molecola verso il bottone sinaptico. Per far questo noi dobbiamo coinvolgere un segnale  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente. Quando il calcio ha incrementato la sua concentrazione nel pirenoforo si attiva il sistema di sintesi del neurotrasmettitore: un neurone serotoninergico attiverà la triptofano-5-monoossigenasi, un neurone adrenergico attiverà la tirosina-monoossigenasi.

## SEROTONINA

La serotonina deriva dal triptofano e la biosintesi è caratterizzata da due tappe: si ha la triptofano-5-idrossilasi che dipende dalla tetrabiopteridina e poi c'è la 5-idrossitriptofano decarbossilasi. Tutte le decarbossilasi hanno sempre in comune di essere piridossalfosfato dipendenti. La decarbossilasi produce la 5-idrossitriptamina, ovvero si ha l'ammina dell'amminoacido, la serotonina. La serotonina dà meravigliosi sensazioni di felicità. La serotonina ha molti recettori: 1A, 1B, 1C, 1D, 2, 3, 4. Il 3 è l'unico recettore ionotropico, apre e chiude il canale cationico. Gli altri sono tutti recettori metabotropici, quindi accoppiati a proteine G. L'1A regola la concentrazione dell'AMP ciclico e regola i canali del potassio; l'1B regola la concentrazione dell'AMP ciclico; l'1C regola l'idrolisi del fosfatidil inositolo; l'1D regola la concentrazione dell'AMP ciclico; il recettore 2 regola negativamente l'idrolisi del fosfatidil inositolo; il 4 aumenta la concentrazione dell'AMP ciclico.



Sottotipi	Effetti	Risposta
5-HT <sub>1A</sub>	AMPc ↓; canali K <sup>+</sup> ↑	Ipotensione, iperpolarizzazione neuronale
1B	AMPc ↓	Inibizione del rilascio del neurotrasmettitore
1C	Idrolisi PI	↑ PI turnover
1D	AMPc ↓	Inibizione del rilascio del neurotrasmettitore
5-HT <sub>2</sub>	Idrolisi PI; canali K <sup>+</sup> ↓	Vasocostrizione, aggregazione piastrinica
5-HT <sub>3</sub> 5-HT <sub>4</sub>	Canale cationico AMPc ↑	Depolarizzazione Attivazione del rilascio del neurotrasmettitore

## ACIDO GAMMA AMMINO BUTIRRICO (GABA)

Il GABA viene sintetizzato con sistemi diversi in neuroni diversi:

1. **Prima via:** glutammato decarbossilasi. L'acido gamma ammino butirrico è il glutammato senza un carbossile. Questa reazione è piridossalfosfato dipendente.
2. **Seconda via:** nei nervi periferici (gabaergici). Questa via prevede di utilizzare l'arginina o l'ornitina o la prolina per sintetizzare il GABA. Ci sono varie reazioni catalizzate da vari enzimi che saranno

espressi nelle cellule che seguiranno questa via e produrranno il GABA

3. **Terza via:** si chiama shunt del GABA, è una deviazione dal ciclo di Krebs. Lo shunt prevede che dall'acido  $\alpha$ -chetoglutarico si vada ad acido glutammico mediante una reazione di transaminazione, dopo si ha una decarbossilazione dell'acido glutammico attraverso una reazione di decarbossilazione piridossalfosfato dipendente e si ottenga l'acido gamma ammino butirrico. Questo è uno dei neurotrasmettitori che dopo aver agito viene ricaptato dal neurone presinaptico e viene riconvertito in semialdeide succinica e acido succinico.

## Recettori GABA

I recettori del GABA sono particolarmente interessanti perché sono il target delle benzodiazepine e dei barbiturici. Sono sia ionotropici che metabotropici. Sia le benzodiazepine che i barbiturici stimolano questi recettori, ma la differenza sta nel fatto che uno dei due ha bisogno anche del ligando: le benzodiazepine

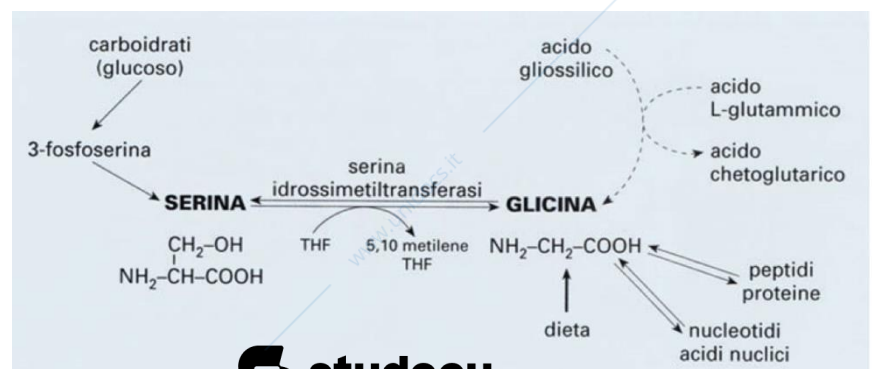
hanno bisogno che il GABA sia legato al recettore, quindi carenze di GABA importanti non possono essere trattate con le benzodiazepine, mentre il barbiturico ce la fa. Lo ionotropico fa passare gli ioni negativi, nello specifico il cloro e quindi crea iperpolarizzazione. Il GABA è quindi un iperpolarizzante. I recettori metabotropici sono dei regolatori attraverso la stimolazione di proteinchinasi che vanno a regolare la

fosforilazione dei canali della conduttanza al K e della conduttanza al calcio. Questo effetto è tenuto grazie ad una  $G_{\alpha i}$ .

## Glicina

La glicina, il più piccolo amminoacido, viene sintetizzato da alcuni neuroni che lo incorporano in vescicole di secrezione e lo rilasciano all'esterno nello spazio sinaptico come neurotrasmettitore. La sintesi della glicina si caratterizza di un singolo passaggio catalizzato dalla serina idrossimetiltransferasi, un enzima molecola di glicina a una di serina e viceversa a seconda delle necessità metaboliche. In questo contesto analizziamo questo enzima come sintetizzatore della glicina, ma può allo stesso modo catalizzare anche la reazione inversa in altri contesti fisiologici, dato che il metabolismo del frammento monocarbonioso è estremamente attivo in tutte le cellule e che questo enzima, considerato pleiotropico da un punto di vista metabolico, consente anche di guadagnare un frammento monocarbonioso cedibile al THF.

Questo piccolo amminoacido, l'unico non otticamente attivo perché privo di carboni asimmetrici, ha un suo recettore specifico e determina un'iperpolarizzazione nel neurone post-sinaptico aumentando la conduttanza allo ione cloruro che, entrando nella cellula, aumenta la concentrazione delle cariche negative e conseguentemente anche il potenziale delle cellule rendendole iperpolarizzate.



## Glutammato

Un altro amminoacido utilizzato dalle cellule come neurotrasmettitore è il glutammato, che ha un effetto eccitatorio ed è sintetizzato come già studiato. Il glutammato è un amminoacido che riveste un ruolo particolare nel metabolismo delle cellule in quanto principale protagonista del metabolismo del gruppo amminico. In qualità di portatore di gruppi amminici è fondamentale nell'escrezione dell'ammoniaca e nella gestione del pH. La biosintesi del glutammato nella cellula glutammergica è estremamente abbondante, non si tratta di un processo collaterale ma di un processo primario e può svilupparsi a partire da tre differenti vie tra loro indipendenti: da glutammina, ornitina o prolina. I neuroni sono specializzati per produrre glutammato seguendo l'una o l'altra di queste a seconda di quali sono gli enzimi iperespressi nei loro pirenofori.

La sua sintesi in questa sede è esclusivamente volta a farlo interagire con i recettori ad esso adibiti, classificati con i nomi dei farmaci antagonisti o agonisti che a questi si legano. I recettori per il glutammato si dividono in ionotropici e metabotropici.

I recettori metabotropici, accoppiati a proteine G, prevedono rialzo di secondo messaggero ione calcio: il processo genera il rilascio della subunità  $G\alpha Q$  e stimola fosfolipasi C (PLC) a tagliare il fosfatidil inositolo in inositolo trifosfato e diacilglicerolo liberando calcio dai suoi depositi reticolari. Alcuni di questi recettori possono però anche stimolare l'azione della fosfolipasi A2, enzima coinvolto nella sintesi degli eicosanoidi che taglia i fosfolipidi di membrana in una posizione diversa, cioè sul carbonio 2, liberando quindi l'acido grasso esterificato in seconda posizione. Generalmente l'acido grasso che si libera è l'acido arachidonico, il precursore degli eicosanoidi. L'acido arachidonico sovrintende alla generazione di ormoni o mediatori locali ad azione a raggio limitato (mediatori paracrini che quindi funzionano particolarmente bene come neuromodulatori) di varia natura come prostaglandine, trombossani, prostaciline o leucotrieni. La capacità del recettore metabotropico del glutammato di usare come effettore la fosfolipasi A2 e generare eicosanoidi è abbastanza inusuale ma è perfettamente logica rispetto al funzionamento dei recettori accoppiati a proteine G.

## Metabolismo del tessuto nervoso

Il gravoso compito di sintesi dei neurotrasmettitori è gestito dal tessuto nervoso tramite un metabolismo esclusivamente respiratorio, nonostante siano presenti gli enzimi propri della fermentazione, perché l'accumulo di lattato ha effetti nefasti sul tessuto. In caso di glicolisi anaerobica, infatti, si verifica l'acidificazione di un tessuto e questo, andando incontro a diminuzioni del pH, si correla a patologie quali ischemia e ipossia. La capacità dell'acido lattico di denaturare le proteine non è controbilanciata dall'eliminazione del lattato a causa di una minore vascularizzazione del tessuto nervoso rispetto ad altri come quello muscolare. Poiché la glicolisi anaerobia non deve avvenire, i mitocondri sono ben mantenuti e protetti da percorsi antiossidanti particolarmente efficienti che proteggono da stress ossidativo. Accade spesso infatti che le patologie neurodegenerative abbiano come sorgente ossidazioni che causano un danni a cellule, membrane o proteine.

Oltre oltre ad essere strettamente respiratorio, il metabolismo del tessuto nervoso prevede utilizzo esclusivo di glucosio. Nessun altro tessuto viene servito di glucosio con la stessa efficacia, anche in condizioni ipoglicemiche; proprio per questo motivo il primo tessuto che soffre un'eventuale carenza di glucosio nell'organismo è proprio quello nervoso. La presenza di mitocondri all'interno dei neuroni permetterebbe a questo tessuto di usare acidi grassi per produrre ATP; tuttavia questi, in quanto molecole stericamente ingombranti, non passano la barriera emato-encefalica, salvo quelli di dimensione inferiore a 6-8 atomi di carbonio che però non hanno lo stesso valore energetico di quelli a catena lunga.

L'approvvigionamento del glucosio dev'essere, proprio perché di fatto il metabolismo energetico ne dipende, estremamente efficiente. L'espressione dei trasportatori GLUT1 e GLUT3, i migliori dal punto di vista di costante di affinità per il glucosio, consente assunzione di glucosio anche a basse concentrazioni. In conseguenza di questa assunzione esclusiva di glucosio da parte del tessuto nervoso, gli altri tessuti hanno sviluppato una maggiore flessibilità metabolica che gli permette di trarre energia anche da altre classi di molecole come acidi grassi, corpi chetonici, ecc.

Il tessuto nervoso si avvale anche del miglior corpo chetonico: il  $\beta$ -idrossibutirrato, che in quanto più ridotto prevede nel suo catabolismo anche il rifornimento di un NADH, utile alla produzione di 2,5 ATP nel ciclo di Krebs.

Il tessuto nervoso non fa la gluconeogenesi perché non ne ha nessuna necessità. Nell'ambito di un grande organismo molto differenziato, la gluconeogenesi è attribuita ad altri organi. Per non correre rischi non vengono espressi gli enzimi della gluconeogenesi come la fosfofruttosio bisfosfatasi [*probabilmente la professoressa intendeva la fruttosio 1,6-bisfosfatasi o FBPasi*].

Il ciclo dei pentoso fosfati viene portato avanti in grande quantità ed è un altro motivo che si cela dietro al grande consumo di glucosio. Formando pentosi e NADPH, si garantisce rispettivamente l'occorrenza per sintetizzare RNA (ma non DNA essendo questo un tessuto non in attiva replicazione) e il NADPH necessario alla sintesi dei lipidi che non attraversano la barriera emato-encefalica e che sono così importanti per le membrane delle cellule neuronali.

La produzione di acido lattico, come accennato in precedenza, deve invece essere assolutamente evitata, ed è anzi correlata a ipossia o danno ischemico, quindi a condizioni patologiche, non fisiologiche.

Il glucosio viene infine usato per la sintesi di alcuni neurotrasmettitori, ad esempio glutammato, ma ovviamente non di quelli che sono di natura peptidica.

*Domanda: come mai il tessuto nervoso è biancastro nonostante sia ricco di mitocondri?*

*Il colore biancastro del tessuto nervoso è dato dalla mielina. La presenza di una grande specificità lipidica conferisce la possibilità di una conduzione particolare che si chiama conduzione saltatoria. La conduzione saltatoria ha bisogno di una struttura di rivestimento fatta da lipidi modificati che hanno un colore biancastro.*

### Trasporto di glucosio nel sistema nervoso

Il trasporto del glucosio è di norma molto specializzato e questo è valido anche nel tessuto nervoso. Si analizzano in seguito i vari trasportatori del glucosio e la rispettiva presenza o assenza in questa sede.

- GLUT1: in quanto trasportatore ad elevata affinità verso il glucosio, il GLUT1 è un trasportatore perfetto per situarsi nel tessuto nervoso, proprio come il GLUT3.
- GLUT2: è un sensore della glicemia che si esprime nelle cellule che rilevano la glicemia esterna. Il GLUT2 gestisce entrata ed uscita di glucosio nella cellula in relazione ai valori della normoglicemia, ovvero il glucosio entra solo se è in concentrazione maggiore di quella normoglicemica. Si trova nel fegato e nelle cellule  $\beta$  del pancreas.
- GLUT3: analogamente al GLUT1 anche il GLUT3 presenta alta affinità per il glucosio ed è per questo motivo presente in questo tessuto.
- GLUT4: questo trasportatore non è sempre espresso sulle membrane cellulari ma la sua espressione è direttamente correlata all'interazione dell'insulina con l'apposito recettore. Si potrebbe pensare che, non potendo l'insulina passare la barriera ematoencefalica, il GLUT4 non sia espresso dai neuroni, e di fatto non lo è. L'insulina tuttavia non è affatto irrilevante nel tessuto nervoso che la sintetizza.
- GLUT5: nonostante la sua espressione sia tipicamente appartenente ai villi intestinali, si rileva questo trasportatore anche nel tessuto nervoso. GLUT5 ha anch'esso alta affinità e consente nell'intestino di sottrarre la maggior quantità possibile di glucosio dal bolo.

## 1. Il ruolo dell'insulina nel metabolismo del tessuto nervoso

In quanto polipeptide, l'insulina non dovrebbe essere in grado di passare la barriera emato-encefalica, eppure il tessuto nervoso è pieno di recettori per accoglierla. L'insulina, infatti, prodotta dalle cellule  $\beta$  del pancreas, attraversa la barriera legandosi ai recettori dell'endotelio e il complesso ormone-recettore riesce a passare la barriera e si rileva in piccola quantità nel cervello, quantità tuttavia troppo modesta per spiegare gli effetti dell'ormone. L'insulina nel tessuto nervoso non è un regolatore metabolico, ma del comportamento sessuale, sulla regolazione dell'estro e ha effetto anoressizzante, agendo cioè sul comportamento.

Nella tabella a lato si evidenziano gli ormoni oressizzanti, che aumentano la nostra voglia di cibo, e quelli anoressizzanti, che invece danno una sensazione di sazietà. L'effetto anoressizzante dato dall'insulina è analogo a quello della leptina, un altro ormone anoressizzante sintetizzato anche a livello cerebrale. Leptina e insulina instaurano una partnership determinando l'associazione dei loro recettori in cluster sulla membrana dando un segnale potenziato all'insuline receptor substrate, il trasduttore fondamentale dell'insulina che colloquia con la fosfatidilinositolo-3-chinasi, l'esecutore materiale del segnale, che in questo caso è incrementato rispetto a quello della semplice insulina.

Questa partnership tra leptina e insulina segnala un cambio comportamentale: smettere di mangiare e iniziare a fare esercizio per dissipare energia.

Anche altri recettori simili a quelli dell'insulina, gli insuline-like growth factor (IGF), possono agire analogamente. IGF (detto anche fattore di crescita insulino-simile) è uno dei fattori di crescita principali le cui mutazioni sono correlate al nanismo. Si formano dei veri recettori ibridi perché i due recettori sono simili, quindi invece di formare degli omodimeri si formano degli eterodimeri composti dalla subunità per l'insulina e dalla subunità per l'IGF1. Questi recettori ibridi funzionano meglio dando vita ad una partnership particolare.

La partnership tra insulina e IGF, a causa della formazione dell'eterodimero, è peculiare rispetto a quella con leptina, in cui i recettori per i due ormoni, essendo di due classi diverse (uno dotato di attività chinasi, l'altro che recluta le chinasi intracellulari), non dimerizzano ma sono solo vicini. Gli eterodimeri sono molto funzionali e determinano: (a) effetti anabolici tipici dell'insulina (ad esempio protein translation) (b) effetti stressogeni tra cui aumento dello stress ossidativo e dell'autofagia per cui la cellula si autodigerisce e recupera i componenti che ha degradato per riutilizzarli (proteofagia, mitofagia ovvero degradazione dei mitocondri, lipofagia ovvero degradazione delle membrane, etc.) (c) proliferazione che ovviamente nel tessuto nervoso avviene pochissimo, in casi molto particolari e sicuramente non in cellule già differenziate perché il tessuto nervoso è scarsamente proliferativo.

L'insulina nel tessuto nervoso comporta quindi un ampio spettro di effetti. L'importanza di questo ormone nella funzionalità del tessuto è dimostrata dal diabete di tipo III: questa patologia, anche detta diabete cerebrale, è un'insulino-resistenza determinata dal funzionamento difettoso del recettore cerebrale dell'insulina. Esattamente come negli altri tipi di diabete, dunque, questa forma patologica è correlata a una disfunzione nella segnalazione dell'insulina, ma ne differisce per la localizzazione. Il diabete di tipo III è fortemente correlato (70% dei casi) col morbo di Alzheimer, una patologia neurodegenerativa da stress ossidativo che è una caratteristica comune alla disfunzionalità di molte vie di trasduzione del segnale. Alla luce di ciò si può comprendere l'importanza dell'insulina nel sistema nervoso da un punto di vista fisiopatologico.

## Anabolismo dei lipidi - sintesi dei lipidi nel tessuto nervoso

Due vie molto attive nel tessuto nervoso, come già accennato, sono il metabolismo dei lipidi e il ciclo dei pentosi fosfati, soprattutto con lo scopo di produrre NADPH. La necessità della sintesi dei lipidi, e di conseguenza di NADPH, deriva da due fattori: il primo è che i lipidi devono essere prodotti in sede perché quelli derivanti dalla dieta non possono attraversare la barriera emato-encefalica, il secondo è che i lipidi necessari sono abbastanza atipici per cui verosimilmente non sono introdotti notevolmente con la dieta e non sarebbero comunque distribuiti dal torrente circolatorio. **Le membrane del tessuto nervoso sono infatti ricche di:**


- acidi grassi a catena lunga, tra 18-24 atomi di carbonio
- acidi grassi polinsaturi, infatti la capacità di insaturazione degli acidi grassi è potenziata nel tessuto nervoso
- lipidi modificati con aggiunta di idrossili o di di pendagli glicidici legati ad idrossili, che sono spesso inseriti proprio per attaccarvi il pendaglio glicidico con un'O-glicosilazione.
- lipidi specializzati come gli sfingolipidi, sintetizzati in modo specifico dal sistema nervoso.

Il fatto che questi acidi grassi siano molto specifici del tessuto nervoso si capisce anche dalla loro nomenclatura: notare come i nomi "acido cerebronico", "acido nervonico" e "acido ossinervonico" rimandino immediatamente alla loro sede.

La tabella sulla sinistra va così interpretata: c'è una struttura base del lipide indicata nella colonna a sinistra, struttura costituita da glicerolo (in alto) o sfingosina (in basso). Nelle colonne successive sono indicate possibili aggiunte di un componente R (seconda colonna) e di uno A (terza colonna); nella quarta colonna c'è scritto il nome del lipide derivante. Nella tabella sono indicate da una parte le modifiche a carico del glicerolo che producono fosfolipidi ben noti sin dallo studio di biochimica strutturale: fosfatidilinositolo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, ecc. La sfingosina è mostrata invece non modificata, come ceramide, poi

come sfingomielina, sotto forma di cerebrosidi (aggiunta di monosaccaridi) e gangliosidi (aggiunta di oligosaccaridi). L'associazione tra molecole polari e non polari nelle modificazioni dei lipidi di membrana consente la formazione di strutture molto particolari: le membrane dei neuroni, capaci di evolvere verso la loro funzione primaria, ovvero di condurre uno stimolo elettrico. Questo stimolo dev'essere condotto anche per lunghe distanze e il tempo di conduzione non è irrilevante, per cui si è evoluto un sistema che abbatte il tempo necessario. Questo è detto sistema della conduzione saltatoria per cui la depolarizzazione che conduce lo stimolo avviene soltanto in aree precise, i nodi di Ranvier [*il nome si pronuncia alla francese*], per cui la conduzione "salta" da un nodo a un altro. Ciò è possibile solo attraverso membrane molto peculiari ricche di acidi grassi modificati al punto da essere molecole decisamente anfipatiche in modo tale da poter interagire con proteine particolari creando la struttura mielinica.

### Metabolismo dei lipidi: i lipidi complessi

Struttura di base	R	A	Composto
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{R} \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{A} \\   \\ \text{CH}_2 \end{array}$	Ac. grasso	H	Acido fosfatidico
	Ac. grasso	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Fosfatidiletanolamina
	Ac. grasso	$-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$	Fosfatidilserina
Molecola fosfatidica	Ac. grasso	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina
	Ac. grasso		Fosfatidilinositolo
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{R} \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	Ac. grasso		Cardiolipina (difosfatidilglicerolo)
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}=\text{CH}- \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{O}-\text{A} \\   \\ \text{OH} \text{ NH} \\   \\ \text{R} \end{array}$	H	H
	Ac. grasso	H	Ceramide (N-acilsfingosina)
	Ac. grasso	Colina	Sfingomielina
	Ac. grasso	Galattosio o glucosio	Cerebroside
	Ac. grasso	Oligosaccaride, acido sialico (acido N-acetilneuraminico)	Ganglioside

## Funzione visiva e meccanismo della visione

Una specializzazione di funzione del tessuto nervoso è quella della visione (a cui è stato già accennato parlando della trasduzione del segnale) che è espletata da cellule specializzate: le cellule fotorecetrici, cioè coni e bastoncelli. Il meccanismo della visione prevede la percezione di uno stimolo luminoso, che con un'accezione ampia possiamo considerare l'ormone, la ricezione di questo stimolo fisico da parte di un recettore di membrana, la

trasduzione, l'elaborazione e la conversione di questo stimolo fisico prima in uno chimico, poi in uno elettrico in un neurone che esce dalla retina. Per fare ciò è necessaria una serie di trasformatori.

Il primo trasformatore è quello che converte lo stimolo fotonico in uno chimico: la vitamina A o retinolo che deriva dall'idrolisi del  $\beta$ -carotene. Il retinolo ha un gruppo idrossile sull'ultimo carbonio che viene ossidato ad aldeidico, per cui la molecola diventa retinale. Il retinale, avendo un doppio legame tra il C11 e il C12, ha due conformazioni possibili, la cis o la trans. Rispetto al piano del legame  $\pi$  i sostituenti sono tutti e due dalla stessa parte del piano quando la conformazione è cis e uno da una parte e l'altro dall'altra se questa è trans, per cui da un punto di vista di formula bruta non c'è nessuna variazione, ma da un punto di vista sterico le due molecole sono diverse. Il retinale è capace di assorbire la luce come tutte le molecole che hanno doppi legami alternati con singoli, ad esempio l'eme che è infatti ha una colorazione rosso-bruna, i citocromi, la clorofilla (verde), la xantofilla (gialla); il retinale è arancione/rossastro ed è il  $\beta$ -carotene da cui deriva a conferire questo colore alle carote.

Il retinale è capace di assorbire un fotone e questo lo porta dallo stato cis allo quello trans, un cambiamento semplice ma percettibile fisicamente da un punto di vista strutturale. Il retinale interagisce con una molecola che si chiama opsina formando la rodopsina, ovvero l'opsina rossa (esistono anche quelle di altri colori che consentono la visione a colori, come vedremo a breve). Quindi è possibile percepire la luce grazie al retinale e trasdurre il suo segnale perché l'opsina è una proteina. Possiamo quindi considerare la rodopsina il recettore della luce se consideriamo la luce come un ormone, concetto ardito ma corretto. Guardiamo ora nel dettaglio come funziona la segnalazione luminosa e quindi il meccanismo della visione:

- Opsina e retinale sono associati in rodopsina. Nel momento in cui arriva il fotone questo determina la conversione cis-trans del retinale per cui l'opsina si stacca. È il cambiamento conformazionale del retinale a determinare tutta la successiva trasduzione del segnale.
- Questo recettore funziona come un normale recettore accoppiato a proteine G: il recettore ha sette domini transmembrana ed è associato a una proteina G trimerica e intracellulare. L'opsina, dissociatasi dal retinale, attiva la subunità  $G\alpha$  della proteina G.
- Le subunità  $\beta$  e  $\gamma$  si staccano da quella  $\alpha$ , legano la  $\beta$ -arrestina e down-regolano il recettore desensitizzandolo. La subunità  $\alpha$ , che nel caso di questo recettore si chiama trasducina o subunità  $G\alpha_T$ , è un trasduttore.
- L'effettore della trasducina è la fosfodiesterasi (PDE) del cGMP. Il cGMP, che è un fosfodiesterato interno, ha un legame fosfodiesterato intramolecolare tra la posizione 3' e 5' del ribosio e la fosfodiesterasi rompe questo legame trasformando il cGMP in GMP. Il cGMP è un secondo messaggero mentre il GMP non lo è.
- Quando è presente cGMP, questo lega un canale del calcio e del sodio che quindi è aperto, mentre quando la fosfodiesterasi è attiva il cGMP è assente il canale cambia conformazione. Potremmo chiamare questo canale recettore metabotropico dato che si trova nel sistema nervoso, salvo che non si attivi a causa della presenza di un neurotrasmettitore ma per un fotone. La trasduzione del segnale luminoso determina quindi la regolazione della permeabilità di un canale del calcio e del sodio.
- **SEGNALE DI BUIO:** in assenza di fotoni, cGMP è presente nella cellula e lega il suo canale sia nei coni che nei bastoncelli dato che nessuno ha attivato le fosfodiesterasi. Quando il canale lega cGMP è aperto e fa passare il sodio e il calcio, determinando depolarizzazione. La cellula fotorecetrica è glutammergica per cui la sua depolarizzazione determina produzione e secrezione di glutammato nello spazio intersinaptico. La presenza di glutammato è un segnale percepito come buio.

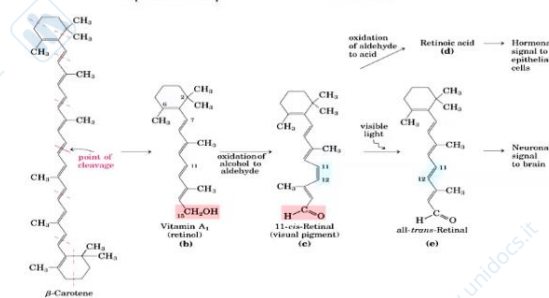
● **SEGNALE DI LUCE:** Il fotone viene assorbito dal cis-retinale che si converte in trans-retinale, di conseguenza la rodopsina si dissocia e l'opsina attiva la subunità  $G\alpha$ ; la trasducina attiva la fosfodiesterasi, la fosfodiesterasi idrolizza cGMP che quindi non è più presente nella cellula e si stacca dal suo canale; il canale si chiude, per cui la cellula non viene più depolarizzata e di conseguenza non secreta più glutammato. L'assenza di glutammato nella sinapsi è un segnale di luce.

● **TORNA IL SEGNALE DI BUIO:** se i fotoni vengono a mancare il retinale torna alla conformazione cis e l'opsina si riassocia al retinale riformando la rodopsina; le subunità  $\beta$  e  $\gamma$  legano la  $\beta$ -arrestina bloccando il segnale del recettore, la fosfodiesterasi si disattiva e quindi il livello del cGMP aumenta; questo lega il canale aprendolo e la membrana nuovamente si depolarizza e secreta glutammato. In questo modo torna il segnale di buio.

Questo sistema è estremamente funzionante. Nelle specie e negli individui che vedono a colori il meccanismo è ancora più raffinato, la visione a colori è infatti specializzata e correlata ad un alto livello evolutivo. Gli uccelli, ad esempio, vedono molto bene a colori e sono evolutivamente molto avanzati. Si capisce se un animale vede o meno a colori banalmente osservando se li usa, se questi determinano il loro comportamento in quanto segnali.

Per avere questo tipo di visione abbiamo due tipi di cellule fotorecetriche: coni e bastoncelli. I bastoncelli (in inglese rods) sono wild-type, cioè più antichi e permettono una visione detta scotoscopica o crepuscolare, molto acuta e sensibile, che non include i colori. Il meccanismo appena descritto, quello della rodopsina e del glutammato, è proprio quello che garantisce questo tipo di visione.

- La Vit A svolge un ruolo fondamentale nel processo della visione.
- Struttura: il retinolo ha una catena isoprenoide. Questa serie di doppi legami alternati costituisce una lunga rete elettronica  $\rightarrow$  cromoforo (assorbe la luce).
- Il retinolo deriva dal  $\beta$ -carotene per scissione enzimatica



<b>Data:</b>	16/12/2019
<b>Materia:</b>	Biochimica II
<b>Professore:</b>	Prof. Taddei
<b>File audio di riferimento:</b>	BIOCHIMICAII-16-12-2019.mp4
<b>Controllore:</b>	Procopio
<b>Coppia:</b>	Violani - Quarrella

## TESSUTO MUSCOLARE STRIATO SCHELETRICO

### TIPOLOGIE DI FIBRE MUSCOLARI

La fibra muscolare è un miocita, una struttura ricca di miofibrille in cui sono presenti delle proteine contrattili. La membrana cellulare crea un sistema canalicolare, i cosiddetti tubuli trasversi, che prendono contatto con le cisterne del RE. Questo consente una più veloce depolarizzazione al momento in cui arriva l'impulso nervoso, con un rapido rilascio di ioni calcio all'interno della cellula muscolare. Le fibre muscolari striate sono dei sincizi strutturali, quindi delle cellule che possiedono più nuclei. Si trovano diversi tipi di fibre muscolari striate scheletriche:

- **Fibre di tipo 1**, chiamate anche fibre **lente**, rosse;
- **Fibre di tipo 2**, chiamate anche fibre **rapide**, che possono essere: rosse, le fibre 2a; o bianche, le fibre 2b.

Il colore rosso è dato dalla ricchezza in mioglobina: le fibre di tipo 1 sono molto ricche di mioglobina e quindi riescono ad accumulare notevoli quantità di ossigeno. Svolgono quindi un lavoro prevalentemente aerobico. Dunque hanno sviluppato tutto l'apparato cellulare che consente il metabolismo ossidativo. Si hanno quindi grandi capacità ossidative ed un numero molto elevato di mitocondri, dato che la fonte primaria dell'energia è proprio la fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale. L'attività glicolitica è limitata. Sono fibre che resistono alla fatica, quindi si ritrovano molto spesso nei muscoli posturali, tipo i muscoli paravertebrali che mantengono la stazione eretta.

Le fibre rapide hanno caratteristiche opposte. Qui si descrivono le fibre 2b, quelle bianche, perché le fibre 2a hanno delle caratteristiche intermedie fra le fibre 1 e le fibre 2b. Le fibre bianche hanno una capacità glicolitica molto grande, quindi un metabolismo prevalentemente anaerobio: hanno pochi mitocondri e scarsa vascolarizzazione. Sono caratteristici dei muscoli come quelli oculari, che muovono i bulbi oculari, che sono facilmente affaticabili.

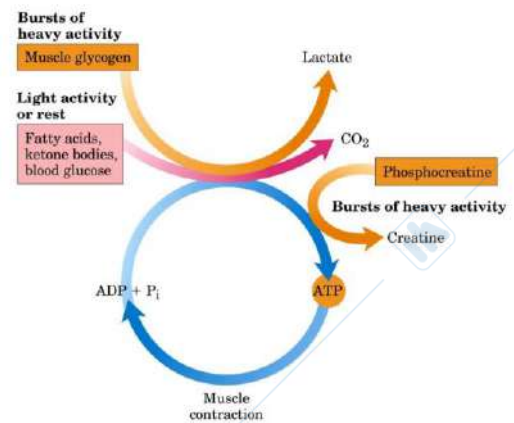
Andando a considerare la composizione in fibre muscolari dell'intero organismo [vedi tabella], questa cambia a seconda che il soggetto sia un soggetto normale, sedentario o poco allenato, o che invece sia un atleta. La situazione cambia inoltre se l'atleta svolge esercizi prevalentemente anaerobi, per esempio la corsa veloce, piuttosto che esercizi di lunga durata e meno intensi, quindi aerobi. Le fibre lente aumentano a seguito di allenamenti di tipo aerobio, come per i maratoneti o i fondisti. Aumenta lentamente la percentuale di fibre lente e si riduce in maniera netta la percentuale di fibre rapide. Queste invece aumentano negli atleti che fanno prestazioni molto rapide, che durano poco tempo, in cui bisogna sprigionare nel minor tempo possibile la maggiore energia possibile, come nel salto in alto o nel lancio degli attrezzi. Sono pochi secondi di sforzo in cui non c'è bisogno di avere un rapporto di energia che duri nel tempo, ma ci vuole una grande riserva di energia di pronto impiego.

Tipo di fibra	Persona normale	Persona con allenamento di velocità	Persona con allenamento aerobico
I	40%	40%	55%
II A	50%	20%	40%
II B	10%	40%	5%

## “COMBUSTIBILI” DELLA FIBRA MUSCOLARE

Il metabolismo di queste fibre è complesso. Esso cambia a seconda della tipologia di fibre considerate e anche a seconda della durata dello sforzo. I combustibili a cui può fare riferimento il muscolo sono vari. Ci sono le riserve di **ATP**, che però sono estremamente ridotte, anche perché l'ATP è una molecola che svolge un ruolo di regolazione e quindi non può accumularsi in grande quantità. Quindi il muscolo utilizza come fonte energetica di rapidissimo impiego più che l'ATP la **fosfocreatina**, che si ottiene dall'ATP attraverso una semplice reazione. Per ottenere l'ATP dalla fosfocreatina basta ripercorrere indietro la reazione, in tempi molto molto brevi. Ci sono poi delle fonti energetiche interne al muscolo, in particolar modo le riserve di zucchero delle fibre muscolari: il **glicogeno muscolare**. Qui si può attingere a certi quantitativi di glucosio che possono essere sottoposti a glicolisi. È chiaro che per ottenere energia dalla demolizione del glicogeno si ha necessità di un maggiore intervallo di tempo, perché il glicogeno va demolito e il glucosio ottenuto opportunamente trasformato tramite glicolisi fino a piruvato e poi lattato. Infine si ha, nel caso di prolungato esercizio, la possibilità di attingere a fonti energetiche extramuscolari, quindi il **glicogeno epatico**, ma soprattutto gli **acidi grassi** che provengono dal tessuto adiposo. Questo perché queste sostanze, in corso di esercizio fisico, possono essere mobilizzate, catturate dal muscolo e utilizzate. In questo caso il tempo necessario per ottenere energia dal metabolismo di queste sostanze è superiore.

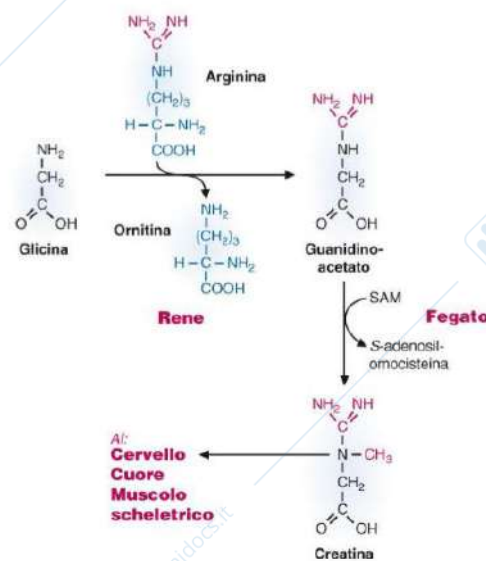
Nei momenti di intensa attività si utilizzano le riserve intramuscolari (fosfocreatina, glicogeno muscolare). Se l'attività è leggera, moderatamente dispendiosa, ma prolungata nel tempo, si attinge a queste sostanze extramuscolari (acidi grassi, il glucosio che viene fornito dal glicogeno epatico, i corpi chetonici).

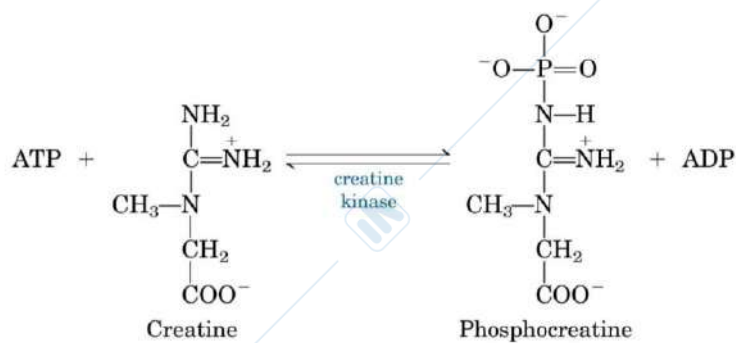


## ATP E FOSFOCREATINA

Nelle fibre muscolari ci sono piccole quantità di ATP, grossomodo 4-5 nmol di ATP per mg di proteine. Le quantità non sono elevate perché l'ATP ha ruolo regolatorio, è un effettore allosterico di numerosi enzimi impiegati nel metabolismo. Quindi queste piccole riserve di ATP possono servire per una contrazione massimale che può durare al massimo un secondo. Le riserve di ATP sono quindi poco rilevanti perché si esauriscono subito.

Una molecola di riserva importante è la fosfocreatina. Viene sintetizzata nel rene e nel fegato a partire da due amminoacidi, la glicina e l'arginina. Nel rene, si ha una reazione di trans-guanidinazione, quindi la catena laterale dell'arginina viene frammentata, viene staccato un piccolo frammento (quello colorato in viola) che è legato al gruppo amminico della glicina. Il gruppo guanidico si ricostituisce sopra la glicina nel momento in cui si forma una molecola di guanidina citrata o acido guanidrinico. L'arginina dopo aver perso questo piccolo frammento si trasforma in ornitina. Si passa poi nel fegato, dove avviene una metilazione, che è (*audio incomprensibile*) dipendente e si passa da guanidina citrata a creatina. La creatina poi è distribuita in particolar modo al muscolo scheletrico, ma anche al cuore.





Una volta che la creatina è arrivata a queste cellule, la reazione che consente di immagazzinare la sostanza derivata dall'energia libera di idrolisi è catalizzata dall'enzima **creatina chinasi CK**, in cui la creatina reagisce con l'ATP: un gruppo fosfato viene staccato dall'ATP, che diventa ADP, e legato al gruppo guanidinico della creatina, in particolar modo all'atomo di azoto. Si genera un legame diretto fra il fosforo del fosfato e l'atomo di azoto della catena della creatina.

Questo è un **legame fosfo-ramidico**. È un legame ad elevata energia libera di idrolisi, ed è una reazione altamente reversibile. Si svolge all'interno della cellula anche in due momenti diversi in senso opposto, però in linea di massima si svolge prevalentemente verso destra [vedi figura] tutte le volte che il muscolo non lavora ed è a riposo, mentre si svolge verso sinistra quando si va incontro ad un esercizio fisico intenso. La quantità di fosfocreatina all'interno della cellula muscolare è 4-5 volte superiore a quella dell'ATP e quindi consente un'attività contrattile più lunga, di 4-5 secondi. Sommando i 4-5 secondi della creatina con quelli dell'ATP si arriva ad un quantitativo di energia che è sufficiente per svolgere una prestazione atletica di importantissima intensità ma molto breve. Il metabolismo in quel momento è anaerobico, e si brucia fosfocreatina.

## VARIAZIONI DEL LIVELLO DEI METABOLITI DEL METABOLISMO ANAEROBIO

Nella tabella si può vedere cosa accade al contenuto di metaboliti che hanno a che fare con il metabolismo anaerobio dopo un esercizio intenso. A riposo si trova una certa quantità di ATP, fra i 4 e i 5  $\mu\text{mol}$  per grammo di tessuto, 17  $\mu\text{mol}$  di fosfocreatina, 88  $\mu\text{mol}$  di glicogeno; il pH è fondamentalmente neutro, e poi ho anche piccole quantità di lattato.

Si va a svolgere un esercizio fisico molto intenso e si va a misurare il contenuto degli stessi metaboliti dopo 15 secondi e dopo 30 minuti, cioè dopo che si è avuto del tempo per recuperare.

Subito dopo lo svolgimento dell'esercizio i livelli di ATP si sono abbassati, ma si sono abbassati soprattutto i livelli di fosfocreatina.

Metabolita	$\mu\text{mol/g}$ di tessuto fresco		
	Riposo	Dopo esercizio	
		15 sec.	30 min.
ATP	4,6	3,4	4,8
Fosfocreatina	17,0	3,7	18,8
Glicogeno	88,0	58,8	70,0
Lattato	1,1	30,5	6,0
pH	7,1	6,3	7,0

È importante che l'ATP rimanga a quei livelli. Si sono ridotte invece le scorte energetiche di fosfocreatina, si passa da 17 a 3,7, e in buona parte anche il glicogeno muscolare si riduce. Che sia stato uno sforzo anaerobico lo si vede dall'aumento del contenuto di lattato, aumentato di 30 volte. Questo può comportare un abbassamento del pH all'interno della cellula, che scende a 6,3.

Vi sono dei sistemi tampone all'interno della cellula. Intervengono anche delle particolari reazioni che generano ammoniaca, utile per tamponare l'acido lattico che si sta formando. Questi sistemi tampone possono però non essere sufficienti: ci può essere l'abbassamento del pH che porta al blocco delle attività contrattili, anche perché un aumento della concentrazione idrogenionica inibisce l'attività della PFK 1 bloccando l'attività glicolitica.

Con un recupero di mezz'ora l'ATP torna grossomodo alla concentrazione iniziale. Anche la fosfocreatina torna alla concentrazione iniziale, mentre ci vuole più tempo per recuperare le scorte di glicogeno iniziali. In questa mezz'ora la concentrazione di acido lattico è diminuita anche se non è ancora tornata a quella iniziale, e di conseguenza il pH si è rialzato ed è tornato quasi alla normalità. Questo anche perché nella

fase di recupero si mettono in moto dei processi metabolici che consentono un tamponamento più efficace di queste quantità.

## AMP

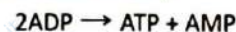
Tutte le volte che si svolge uno sforzo muscolare molto intenso, quindi consumando ATP e fosfocreatina, si compie glicolisi anaerobia, e si generano grandi quantità di ADP, il prodotto di idrolisi dell'ATP che avviene a livello della testa delle miosine. Questo ADP non si accumula mai, perché è possibile portare a fondo l'utilizzo dell'energia contenuta in questa molecola. Ciò avviene grazie alla presenza di un enzima che si chiama **miocinasasi**, che catalizza una reazione di trasferimento di un gruppo fosfato da una molecola di ADP ad una seconda molecola di ADP. I prodotti della reazione sono una molecola di ATP e una molecola di AMP. L'ATP che si genera può essere riutilizzata, l'AMP va invece incontro a modificazioni.

L'AMP come tale ha anche un importante ruolo regolatorio: come aumenta di concentrazione va a stimolare l'attività di una chinasi che si chiama **chinasi AMP dipendente**, che non deve essere confusa con la PKA, la chinasi AMP ciclico dipendente. Fanno cose simili perché fosforilano residui di serina e treonina su proteine substrato, ma è diverso il meccanismo di attivazione: la PKA si attiva sotto stimolo adrenalinico, del glucagone, o di altre molecole segnale, mentre la chinasi AMP dipendente si attiva quando la cellula sta utilizzando in maniera intensiva le sue riserve di energia. Questa chinasi AMP dipendente fosforila una serie di substrati che determinano un maggiore utilizzo del glucosio e degli acidi grassi. Per esempio: **attiva la PFK 2**, che fosforila il fruttosio-6-fosfato a fruttosio-2,6-bisfosfato, che è un attivatore della PFK 1; **attiva il trasporto e la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi**. Quindi questo accumulo di AMP consente di utilizzare più a fondo quelle poche riserve di energia che sono rimaste.

Questo AMP si accumula, e avvengono delle reazioni particolari che hanno un ruolo rilevante:

- La reazione di deaminazione dell'AMP. C'è un enzima, **AMP deaminasi**, che distacca il gruppo amminico presente sull'anello purinico dell'adenina dell'AMP. Così facendo si genera **IMP**, o **inosinmonofosfato**. La cosa più importante è che si libera **ammoniaca**: questa è una base debole che è in grado di tamponare la quantità di acido lattico che si sta formando, quindi ostacola in qualche modo l'abbassamento del pH all'interno della cellula muscolare. L'IMP può essere riconvertito in AMP. L'IMP è in grado di reagire con una molecola di aspartato in presenza di GTP. Viene idrolizzata la molecola di GTP a GDP più fosfato, e si genera l'energia necessaria per fare reagire l'aspartato, mediante il suo gruppo amminico, con l'anello della base azotata ipoxantina. Si forma adenilsuccinato che poi viene scisso, se ne va via fumarato, che è la parte dell'acido aspartico che ha ceduto il gruppo amminico, mentre il gruppo amminico che era nell'aspartato viene riposizionato sull'anello purinico rigenerando AMP.

- **Miocinasasi (o adenilato chinasi):**

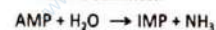


(AMP è un attivatore allosterico di PFKI)

*Ha la funzione di recuperare ATP e di stimolare la glicolisi.*

*Attiva la AMP-chinasi che stimola l'utilizzazione di glucosio e acidi grassi (traslocazione dei trasportatori GLUT-4 e FAT/CD36; attiva la PFK-2; attiva il trasporto mitocondriale degli acidi grassi e la loro ossidazione)*

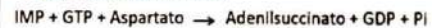
- **AMP deaminasi:**



(L'ammoniaca tampona il lattato prodotto dalla glicolisi anaerobia e sblocca la PFKI)

Riconversione dell'IMP in AMP

- **Adenilsuccinato sintetasi**



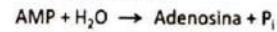
- **Adenilato liasi**



(L'azione combinata di questi due enzimi rigenera AMP)

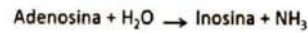
- L'altra possibilità è che l'AMP subisca una reazione catalizzata dalla **nucleotidasi**. La nucleotidasi stacca il fosfato, generando **adenosina**, un nucleoside, più fosfato. L'adenosina è una molecola importante, perché può fuoriuscire dalla cellula muscolare e determinare vasodilatazione. Questo fa aumentare l'afflusso sanguigno alle fibre muscolari. L'adenosina può essere deaminata formando inosina. L'inosina può essere idrolizzata formando ipoxantina, l'ipoxantina può essere recuperata.

- **5'-nucleotidasi**



(l'adenosina è liberata all'esterno della cellula e provoca vasodilatazione. Aumento del flusso ematico alle cellule muscolari)

- **Adenosina deaminasi:**

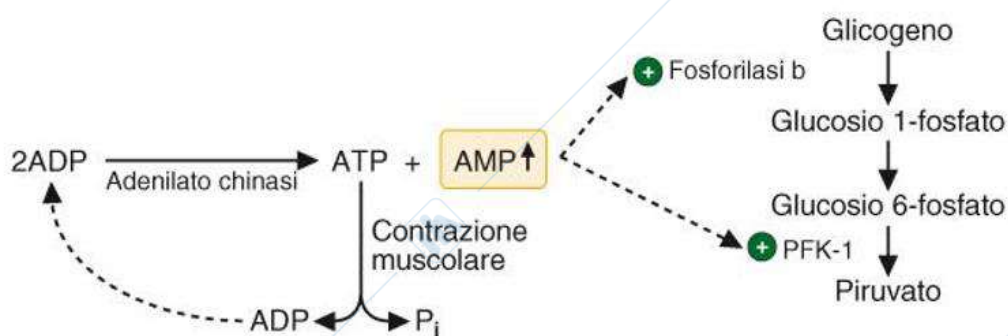


Quindi, dietro l'attività metabolica principale che si ha nelle cellule muscolari, che in generale è l'utilizzo dell'ATP per fare avvenire la contrazione muscolare; dietro l'idrolisi di ATP che si svolge sulle teste miosiniche che consente lo scorrimento dei filamenti di actina e di miosina l'uno sull'altro; dietro questi aspetti principali ci sono delle reazioni collaterali che hanno un loro significato.

## GLICOGENO MUSCOLARE

Andando al di là dell'utilizzo delle fonti più semplici di energia si ha il glicogeno muscolare. Le molecole di ADP reagiscono fra loro per generare ATP e AMP, determinando un aumento della concentrazione dell'AMP. A prescindere dal suo destino, **da un punto di vista di regolazione l'AMP ha un effetto fondamentale come stimolatore dell'utilizzo delle scorte glucidiche**. Esso lavora direttamente come regolatore allosterico positivo della **fosforilasi B**, che è la forma non fosforilata dell'enzima glicogeno fosforilasi. Questo attacca le estremità non riducenti del glicogeno, quelle che hanno l'OH libero in posizione 4, generando **glucosio-1-fosfato**. La fosforilasi esiste in due forme: la **fosforilasi B**, non fosforilata, inattiva, e la **fosforilasi A**, fosforilata e attiva. La fosforilasi B, che è inattiva, prima ancora di essere fosforilata può attivarsi legando AMP. **Quindi l'AMP agisce su due livelli: attiva la fosforilasi B (effetto allosterico positivo) e la attiva ancora più fortemente perché l'AMP attiva la protein chinasi AMP dipendente che attiva la fosforilasi B facendola diventare fosforilasi A.**

La glicogenolisi porta al glucosio-6-fosfato. La glicolisi viene attivata a livello della PFK 1. Anche qui si ha un'azione diretta dell'AMP, **effetto allosterico positivo**, e un'azione indiretta attraverso l'attivazione della **protein chinasi AMP dipendente**, che **fosforila la PFK 2**, facendola agire e **così aumentando la concentrazione di fruttosio-2,6-bifosfato che è un effettore allosterico positivo della PFK 1**.



Quindi il consumo di ATP porta a un potenziamento dello sfruttamento delle risorse interne alla cellula muscolare. Ci sarebbe una reazione ostacolante, che è l'acidificazione del mezzo, che porterebbe al blocco della PFK 1. Però è contrastata dall'ammoniaca che si libera dalla reazione di idrolisi dell'AMP a IMP più ammoniaca.

L'idrolisi del glicogeno avviene a seguito di una cascata di attivazione: nell'ultima parte, la fosforilasi B che è inattiva, non fosforilata, in presenza di AMP si attiva parzialmente ed è più facilmente soggetta a fosforilazione che la trasforma in fosforilasi A, fosforilata e attiva. Questa trasforma il glicogeno in glicogeno meno un'unità di glucosio.

La glicogeno fosforilasi viene fosforilata dalla **fosforilasi chinasi**, un enzima specifico che esiste in due forme: una forma B, non fosforilata, inattiva basalmente a meno che non vi siano livelli elevati di ioni calcio, che ci sono in un muscolo che si sta contraendo. La fosforilasi chinasi è un enzima ottamerico fatto da ripetizioni di dimeri di unità varia. Ha subunità calmoduliniche, che legano calcio, portando ad una attivazione di base anche nella forma non fosforilata. Però la fosforilasi chinasi più attiva è quella fosforilata. A fosforilare la fosforilasi chinasi è la **protein chinasi A**, cAMP dipendente, che si attiva tutte le volte che c'è una stimolazione opportuna sulla membrana cellulare. In questo caso la stimolazione è data da un solo ormone: l'**adrenalina**. L'adrenalina ha tutte una serie di conseguenze sul corpo: vasodilatazione o vasoconstrizione a seconda dei distretti, aumento della frequenza cardiaca, aumento della forza della contrazione cardiaca, ecc. Tra questi effetti c'è anche la stimolazione della cellula muscolare attraverso un recettore, accoppiato a proteine G stimolatorie, che si chiama beta-adrenergico. L'effetto è quello di attivare una proteina G che attiva l'adenilato ciclasi, che determina la formazione di cAMP, che attiva la PKA, che fosforila diverse cose fra cui la fosforilasi chinasi. La cascata procede fino a produrre glucosio e poi lattato. Dall'altra parte la PKA fosforila anche la glicogeno sintasi, l'enzima che sintetizza il glicogeno. Anche questa esiste in due forme: la forma A, non fosforilata, attiva; e la forma B, fosforilata, inattiva. La forma fosforilata e inattiva non sintetizza glicogeno.

## L'EFFETTO DELL'ACCUMULO DEL LATTATO

Esiste una **soglia anaerobia**, ossia un livello di lattato che si può sopportare prima di andare in una condizione di fatica muscolare. Questa soglia dipende dall'individuo e soprattutto dal livello di allenamento. Questa soglia la si raggiunge quando ci si impegna in un esercizio, e l'intensità di esercizio sopportabile da vari individui è diversa: per produrre quantità di acido lattico tali da determinare un blocco dell'attività muscolare ad un individuo normale basta un esercizio di media intensità, mentre un atleta può sopportare carichi di esercizio molto più intensi e quindi andare in lattacidosi molto più tardi. L'utilizzo dei prodotti di scarto della glicolisi anaerobia cambia a seconda della fibra muscolare considerata. Il lattato viene prodotto dalle fibre muscolari e può essere utilizzato dal fegato attraverso il **ciclo di Cori**, che smaltisce il lattato convertendolo in glucosio. Ma anche le fibre rosse e il cuore sono in grado di utilizzare il lattato. È un buon combustibile per le fibre ricche di mioglobina e di mitocondri, in grado di fare un metabolismo ossidativo. Il lattato viene convertito in piruvato e poi indirizzato verso il metabolismo terminale, con la produzione di CO<sub>2</sub>.

## VARIAZIONI DEL LIVELLO DEI METABOLITI DEL METABOLISMO ANAEROBIO

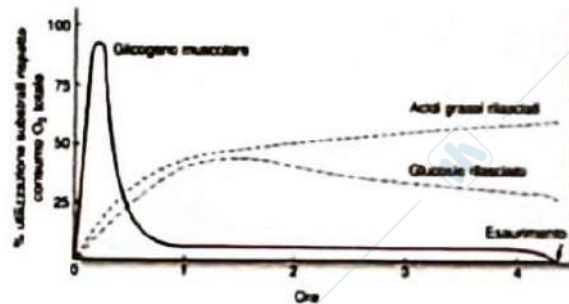
Per quanto riguarda il metabolismo aerobio muscolare, questo lo si ha o in condizioni di riposo, o in condizioni di esercizio fisico che debba avere una durata molto lunga nel tempo, quindi che richieda delle riserve di energia molto importanti ma utilizzate solo nel tempo. L'organismo può essere allenato a utilizzare tutte queste riserve importanti nei tempi opportuni salvaguardando le riserve di rapido consumo. Significa che un atleta di alto livello ha ancora delle riserve rapide (glicogeno muscolare) a cui può attingere per lo sprint finale, e quindi può aumentare l'intensità dell'esercizio.

Durante un esercizio viene dato un contributo diverso dalle varie riserve energetiche. [vedi figura a pagina successiva] Il glicogeno muscolare dà un contributo importante all'inizio, ma non si esaurisce. Il glucosio contribuisce nel medio periodo e poi si riduce. Gli acidi grassi continuano ad aiutare fino alla fine. Alla fine c'è l'esaurimento del glicogeno muscolare. Il glucosio si mantiene grossomodo costante, ha una crescita iniziale, poi si stabilizza. Gli acidi grassi invece aumentano. Il glicogeno muscolare invece diminuisce ma non si esaurisce.

Tabella 26.V

Contributo percentuale del glucosio e dei NEFA ematici, e del glicogeno muscolare alla produzione di energia dei muscoli durante un esercizio prolungato di media intensità.

Durata dell'esercizio muscolare (min)	Glucosio ematico	NEFA ematici	Glicogeno muscolare
40	27	37	36
90	41	37	22
180	36	50	14
240	30	62	8



## ATTIVITÀ SECRETORIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO

Il muscolo scheletrico ha anche un'attività secretoria molto importante. Produce sostanze che hanno un effetto sia sul muscolo, un effetto quasi autocrino, sia su tessuti di vario tipo. Per esempio ci sono tutta una serie di **interleuchine**, compreso il fattore di inibizione LIF della leucemia, che hanno un effetto importante stimolando l'ipertrofia muscolare. Questo effetto è contrastato da un'altra sostanza prodotta dal muscolo stesso che è una **miostatina**, in sinergia con la follistatina del fegato, che inibisce la miostatina. L'**irisina**, insieme all'interleuchina-6 (IL-6), gioca un ruolo molto importante nella mobilizzazione dei grassi da tessuto a tessuto. Gioca un ruolo importante anche nella conversione del tessuto adiposo bianco in tessuto adiposo bruno. L'esercizio fisico nel tempo ha un ruolo importante, anche se viene fatto in modo molto moderato, nella prevenzione del rischio cardiovascolare, perché il tessuto adiposo lavora insieme al tessuto muscolare. È come se venissero consumate le scorte di tessuto adiposo, che possono essere utilizzate maggiormente per la produzione di calore: infatti il tessuto adiposo bruno ha un ruolo importante nella termogenesi. Ci sono anche altre attività: per esempio l'attività fisica stimola il pancreas a produrre maggiori quantità di insulina; poi ci sono fattori che promuovano la rivascolarizzazione, la formazione dell'osso e via dicendo.

## TESSUTO MUSCOLARE STRIATO CARDIACO

Il cuore lavora in maniera continuativa ed ha un metabolismo aerobico. È come se fosse costituito da tutte fibre di tipo 1, in netta prevalenza. Però le fibre cardiache non sono le stesse di quelle scheletriche: hanno delle differenze morfologiche e funzionali importanti. Non sono dei sincizi veri e propri, perché hanno un solo nucleo, ma dei sincizi funzionali: le fibre cardiache sono tutte collegate fra loro grazie ai dischi intercalari, permettendo

### Miocardio

- Struttura dei sarcomeri analoga
- Miofibrille simili
- Meccanismo della contrazione analogo
- Minor massa fibrillare
- Singolo nucleo
- Sincizio funzionale
- Maggior numero di mitocondri
- Metabolismo completamente aerobio
- Glicocalice abbondante (lega  $Ca^{2+}$ )
- Tubuli T più ampi
- Cisterne del reticolo meno ampie
- Presenza di dischi intercalari
- Abbondanza di *gap junctions* e desmosomi nei dischi (canali del  $Ca^{++}$ )
- Estrema ricchezza di mioglobina

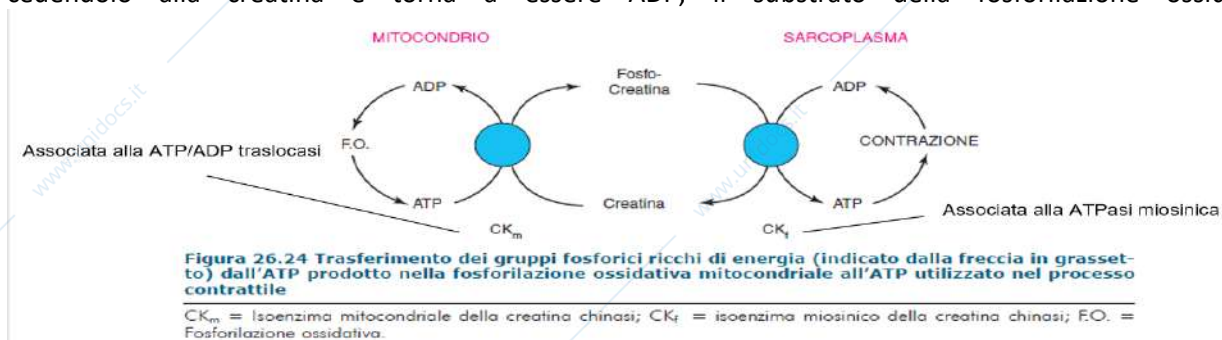
### Muscolo scheletrico (fibre I)

- Struttura dei sarcomeri analoga
- Miofibrille simili
- Meccanismo della contrazione analogo
- Maggior massa fibrillare
- Nuclei multipli
- Sincizio strutturale
- Minor numero di mitocondri
- Metabolismo in gran parte aerobio
- Glicocalice scarso
- Tubuli T meno ampi
- Cisterne del reticolo più ampie
- Assenza di dischi intercalari
- Scarsità di contatti intercellulari
- Ricchezza di mioglobina

così una contrazione sincrona. Hanno un abbondante numero di mitocondri, attività aerobica, abbondante mioglobina, tubuli T molto ampi, cisterne del reticolo meno ampie. I dischi intercalari fanno sì che le varie cellule siano collegate fra loro da tutta una serie di giunzioni che permettono il passaggio di ioni.

## METABOLISMO DEL TESSUTO MUSCOLARE CARDIACO

Il metabolismo è totalmente aerobio. La **fosfocreatina** nel muscolo cardiaco si genera a livello della membrana mitocondriale interna. C'è una **creatina chinasi** associata alla membrana mitocondriale interna che è in collegamento fisico strettissimo con il traslocatore di nucleotidi (lo scambiatore ATP-ADP). L'ATP in questo caso cede il gruppo fosfato alla creatina, formando fosfocreatina. La creatina si genera sul lato citosolico della membrana mitocondriale interna. L'ATP non ha più bisogno di uscire, perché perde il fosfato cedendolo alla creatina e torna a essere ADP, il substrato della fosforilazione ossidativa.



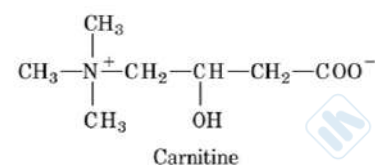
La fosfocreatina citosolica è in grado di cedere il suo gruppo fosfato all'ADP del citosol, riformando ATP e creatina. In questo caso agisce una creatina chinasi che è associata all'**ATPasi miosinica**, una ATPasi presente sulle teste delle molecole di miosina. Questo accelera molto il processo, perché viene meno il passaggio attraverso i sistemi di membrana.

Il **glucosio** fornisce una piccola quota di energia e lo fa attraverso il metabolismo aerobio: quindi formazione di piruvato che penetra nel mitocondrio, si forma acetil-CoA e si effettua il ciclo dell'acido citrico, in cui il citrato può anche uscire e andare nel citosol dove esercita il famoso effetto Pasteur di inibizione allosterica sulla PFK.

I substrati più importanti del miocardio sono gli **acidi grassi**, per cui si vede come questo tessuto si comporti come il tessuto muscolare striato scheletrico a fibre rosse. Il 70% dell'energia viene infatti dagli acidi grassi. Questo è il classico sfruttamento degli acidi grassi, che vengono legati al CoA dall'acil-CoA sintetasi, si forma acil-CoA che poi si scambia con la carnitina, si forma acilcarnitina che passa dentro il mitocondrio, l'acido grasso viene riconvertito in acil-coA che viene demolito mediante la  $\beta$ -ossidazione. La molecola che trasferisce dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale è la carnitina.

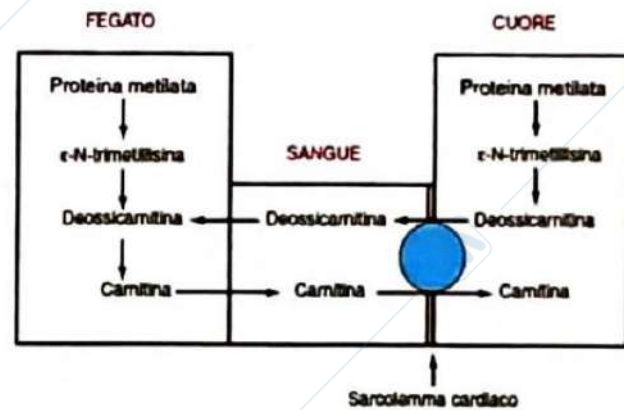
## CARNITINA

La carnitina è una molecola che viene sintetizzata nel fegato, a partire da residui di lisina presenti in certe proteine. Questi residui di lisina vengono trimetilati sul gruppo amminico in  $\epsilon$ . La trimetil-lisina formata



viene idrossilata sul carbonio  $\beta$ , poi agisce una liasi che stacca una catena laterale generando glicina, e da questa catena laterale si forma deossicarnitina. Poi con un'ultima reazione di idrossilazione vitamina C dipendente si passa a carnitina. La carnitina viene immessa in circolo, arriva al cuore dove viene scambiata con la deossicarnitina e poi utilizzata come tale per il trasferimento di acidi grassi nel mitocondrio. Anche nel cuore succede che si possa avere fino a un certo punto la sintesi della carnitina: infatti ci si ferma all'ultimo step, per cui nel cuore si può formare deossicarnitina. Questa esce, va nel sangue, viene recuperata dal fegato e il fegato la può convertire in carnitina. (È possibile fare un parallelismo molto forzato con il glicerolo, per cui il glicerolo prodotto nel tessuto adiposo dalla degradazione dei trigliceridi viene immesso in circolo, recuperato dal fegato il quale con la glicerolo chinasi lo riattiva e lo riusa per

formare nuovi trigliceridi. Qui c'è un meccanismo simile: viene utilizzata la carnitina, viene prodotta deossicarnitina, che viene immessa in circolo e il fegato la converte in carnitina che può essere riutilizzata.) **Quindi il cuore non è in grado di effettuare l'ultimo step della sintesi della carnitina.** Comunque la demolizione proteica avviene anche nel cuore, per cui le proteine contrattili, in particolar modo la miosina, sono le fonti più importanti di carnitina. Questo avviene anche nel tessuto scheletrico, dove comunque non si forma carnitina in sé ma deossicarnitina.



## UTILIZZO DEL LATTATO

L'acido lattico può essere prodotto dai globuli rossi, dalle cellule muscolari in intensa attività. Esso viene recuperato non solo dal fegato che lo riconverte con la gluconeogenesi in glucosio, ma può essere anche captato dal miocardio. Quindi oltre al classico utilizzo del glucosio attraverso la glicolisi aerobia fino a piruvato, il lattato può essere catturato dalla cellula miocardica e può essere ossidato a piruvato. Questa ossidazione avviene con la formazione di una molecola di NADH. Il NADH attraverso i sistemi navetta passa nel mitocondrio. Il piruvato entra anch'esso nel mitocondrio e viene poi ossidato. **Quindi una quota di lattato viene consumata a scopo energetico dal miocardio, ed è una cosa che distingue in maniera importante la cellula muscolare miocardica da quella scheletrica.**

## ATTIVITA' ENDOCRINA DEL CUORE

Si parla di attività endocrina perché il cuore produce due peptidi: uno a livello atriale, il cosiddetto **ANP** o Peptide (o fattore) Natriuretico Atriale, e l'altro a livello ventricolare è il **BNP** (B=Brain). Fra i due è più importante l'ANP. Questi due peptidi vengono liberati in condizioni analoghe, ossia tutte le volte in cui si ha una distensione delle pareti cardiache dovuta fondamentalmente ad un aumentato ritorno venoso. Ci sono troppi liquidi in circolo, torna troppo sangue al cuore: gli atri si dilatano, la dilatazione porta ad un aumento della contrazione del ventricolo, ma l'effetto immediato è quello di produrre questo fattore, che ha un doppio effetto. Il primo effetto è quello di **inibire la produzione di aldosterone**. L'aldosterone è un ormone mineralcorticoide, prodotto dalla porzione glomerulare della corteccia surrenalica. La produzione di questo ormone avviene sotto stimolo dell'angiotensina II, che dipende a sua volta dalla renina. La renina è un enzima prodotto dal rene. Tutte le volte in cui questo sensore rivela una riduzione del volume circolante, una ipovolemia, che porta ad un abbassamento della pressione vascolare, viene secreta la renina. La renina idrolizza il suo substrato, che è l'angiotensinogeno, una proteina prodotta dal fegato, che viene scisso: uno di questi frammenti si chiama angiotensina I, che è un  $\beta$ -peptide. L'angiotensina I ancora non ha piena azione: può determinare una contrazione della muscolatura liscia che circonda le arteriole, però più che altro è substrato di un altro enzima, l'enzima convertitore dell'angiotensina o ACE. Questo stacca due amminoacidi dell'angiotensina I trasformandola in angiotensina II. La sua funzione è di vasocostrizione e favorisce la produzione di aldosterone. L'aldosterone a livello renale agisce sui tubuli, favorendo il riassorbimento di sodio e di acqua, facendo aumentare il volume circolante. Il peptide natriuretico atriale ha funzione opposta. Inibisce la produzione di aldosterone, quindi non si ha più riassorbimento di sodio e di acqua. Anzi, all'opposto, aumenta l'afflusso ematico a livello renale, quindi aumenta la pressione di filtrazione e soprattutto **ostacola il riassorbimento del sodio**: quindi vengono eliminati sodio e acqua, diminuendo la pressione osmotica. In questo modo si riduce il volume circolante. L'ANP ha un recettore ad attività guanilato ciclasica, quindi attiva una guanilato ciclasi, producendo cGMP, che determinano questi effetti sull'eliminazione del sodio.

<b>Data:</b>	19/12/2019
<b>Materia:</b>	Biochimica
<b>Professore:</b>	Niccolò Taddei
<b>File audio di riferimento:</b>	
<b>Controllore:</b>	Valgimigli
<b>Coppia:</b>	Paganin - Soriani

## SANGUE

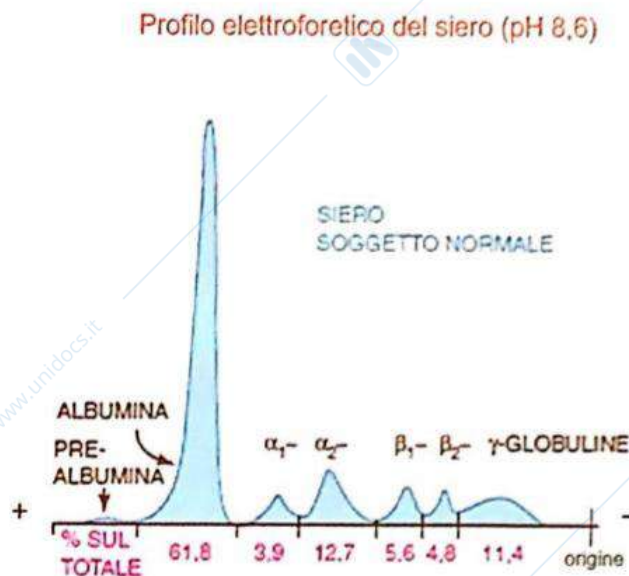
Il **sangue** rappresenta l'8% della massa corporea. Se si osserva la costituzione del sangue, si nota che il 45% è rappresentato dagli **elementi figurati**, ossia da cellule o frammenti di cellula, e il 55% è rappresentato dal **plasma**, ossia dalla parte liquida.

Il valore percentuale riferito agli elementi figurati è quello che in laboratorio si chiama **ematocrito**. In un  $\text{mm}^3$ , ossia in un  $\mu\text{l}$  della parte figurata, sono presenti circa 5.000.000 eritrociti, circa 250-400mila piastrine e qualche migliaio di leucociti o globuli bianchi.

Nella parte liquida, è presente fondamentalmente acqua, ma anche proteine, presenti in una percentuale del 7%, ossia sono presenti 7 g di proteine per dl, sali e altre sostanze disciolte.

Il **siero** deriva dal plasma: se si priva la parte liquida degli elementi implicati nel processo di coagulazione, in primo luogo il fibrinogeno, si passa dal plasma al siero.

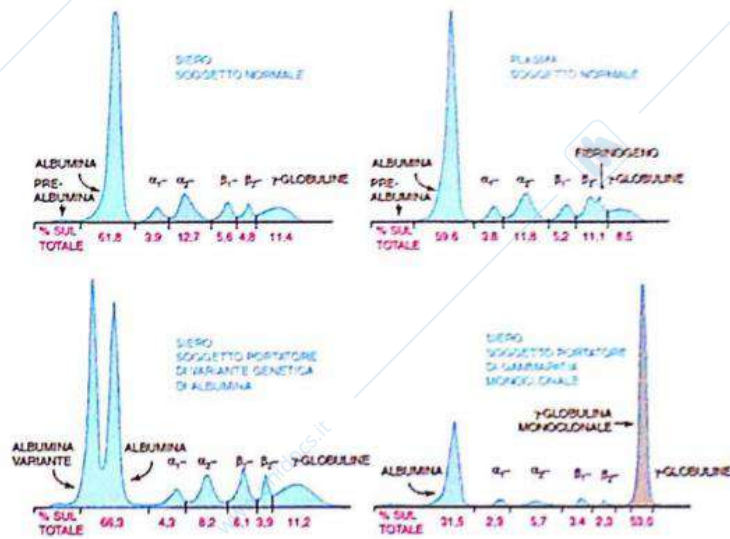
In questo **profilo elettroforetico**, il campione di siero di un soggetto sano equilibrato a pH 8.6 viene sottoposto a un campo elettrico su un supporto solido. Le proteine contenute in questo campione di siero si separano in base alle loro caratteristiche, fondamentalmente in base alla densità di carica elettrica di superficie e in base alla massa molecolare. A destra, al polo negativo, è presente il punto in cui è stato deposto il campione e le proteine migrano verso sinistra, verso il polo positivo, nonché il catodo. Le proteine sono fondamentalmente molecole anioniche, sono quasi tutte provviste di carica negativa e migrano verso il



polo positivo. Si generano dei picchi che indicano la quantità di proteina presente. Il picco più abbondante è quello relativo all'**albumina** che, tra l'altro, è tra quelle che migrano maggiormente. La pre-albumina migra ancora di più dell'albumina ma è quantitativamente poco rilevante. Sono presenti anche altre bande a indicare la presenza di altri tipi di proteine che sono raggruppati secondo la classificazione elettroforetica in  $\alpha_1$ -globuline,  $\alpha_2$ -globuline,  $\beta_1$ -globuline,  $\beta_2$ -globuline e  $\gamma$ -globuline.

In alto a sinistra si osserva il siero di un soggetto sano, mentre in alto a destra si osserva il plasma di un soggetto sano, poiché è presente il picco relativo al fibrinogeno. Invece, in basso a sinistra si osserva il siero di una persona che porta una variante anomala dell'albumina, infatti il picco relativo all'albumina è sdoppiato in quanto l'albumina è presente in due forme, ossia nella forma normale e nella forma diversa da quella normale; questa diversità

Profili elettroforetici del siero o del plasma



è dettata da un'anomalia su base genetica. In basso a destra, il picco relativo alle  $\gamma$ -globuline risulta essere particolarmente alto e stretto. Questo è un tipico profilo elettroforetico di un soggetto affetto da gammopatia monoclonale, come il plasmocitoma o mieloma multiplo, ossia il tumore che colpisce i globuli bianchi, i linfociti di tipo B che sono maturati e si sono trasformati in plasmacellule. In questo caso, un tipo di plasmacellule si riproduce in maniera incontrollata, produce un tipo di  $\gamma$ -globulina monoclonale e quello che si ha è questo profilo con un picco alto e stretto relativo alle  $\gamma$ -globuline. Se si va ad analizzare, la  $\gamma$ -globulina che è aumentata è una sola, ossia quella che viene generata da quella specifica plasmacellula che è andata incontro a trasformazione tumorale.

PROTEINE SIERICHE

Classificazione delle proteine plasmatiche in base alla migrazione elettroforetica (pH 8.6)

Tabella 27.1  
Concentrazione, peso molecolare e stile delle principali proteine plasmatiche elencate seguendo l'ordine di migrazione elettroforetica a pH 8.6.

Proteina	P.M. (kDa)	Valori normali (g/100 ml)
Pre-albumina (proteina trasportante la tiroxina, TBPA)	54,0	0,05-0,07
<b>Albumina</b>	69,0	3,50-5,00
$\alpha_1$ -Globuline (totali)		0,05-0,39
• Fattori della coagulazione VII, XII, XIII; precalcitonina; chinogeno (HMW)		
• Transcortina (CBG)	55,7	
• $\alpha_1$ -Glicoproteina acida (orosomucoide)	42,0	
• Antitripsina ( $\alpha_1$ -AT)	54,0	
• Fattori della coagulazione IX, X, II		
• Globulina legante la tiroxina (TBG)	54,0	
• Transcortina	55,7	
• Transcobalamina I (TC-I)	45,0	
• $\alpha$ -Fetoproteina	64,0	
• Antigene carcino-embriale (CEA)	200,0	
$\alpha_2$ -Globuline (totali)		0,28-0,74
• Proteina legante il retinolo (RBP)	30,0	
• Proteina legante la Vit. D (VDBP)	51,0	
• Apolipoproteine (Apo)	100-400	
• Ceruloplasmina	150,0	
• Collinesterasi	348,0	
• $\alpha_2$ -Macroglobulina	725,0	
• Antiplasmina, antitrombina (AT-III)		
• Lipoproteine HDL	200-400	
• Alcuni fattori del complemento		

l'*antitripsina*, dunque una septina inibitore della tripsina, la *globulina legante la tiroxina*, la *transcobalamina* che trasporta la vitamina B<sub>12</sub> e proteine presenti in piccole quantità nel siero che

L'**albumina** rappresenta oltre il 60% delle proteine sieriche e sono presenti 3.5-5 g/dl.

La **pre-albumina** è poco rappresentata, infatti i valori sono molto bassi, ed è la proteina trasportatrice dell'ormone tiroideo.

Tra le  **$\alpha_1$ -globuline** si includono alcuni *fattori della coagulazione*, la *transcortina*, ossia la proteina trasportatrice del cortisolo, l' *$\alpha_1$ -glicoproteina acida* o *orosomucoide*,

possono essere utilizzate come markers di patologia e che possono aumentare a testimoniare la presenza di patologie anche gravi, come l' $\alpha$ -fetoproteina e l'antigene carcino-embrionale (CEA).

Tra le  **$\alpha_2$ -globuline** si includono proteine trasportatrici come la *proteina che lega il retinolo*, le *aptoglobine* che legano l'emoglobina libera, la *ceruloplasmina* che trasporta il rame, l' $\alpha_2$ -*macroglobulina* che è una proteina piuttosto grande e che ha la funzione inibitoria nei confronti di alcune proteasi, altre proteine ad azione inibitoria, come l'*antiplasmina* e l'*antitrombina*, e le *lipoproteine della classe delle HDL*.

Tra le  **$\beta_1$ -globuline** si includono *fattori della coagulazione*, la *transcobalamina II* che trasporta la vitamina B<sub>12</sub>, l'*emopexina* che lega l'eme libero, la *proteina C reattiva (PCR)* che aumenta in particolar modo quando si hanno dei processi infiammatori diffusi, la *transferrina* che trasporta il ferro, la *proteina trasportatrice degli ormoni sessuali* e le *lipoproteine della classe delle LDL e delle VLDL*.

Nell'ambito delle  **$\beta_2$ -globuline** si includono un *fattore della coagulazione*, la  $\beta_2$ -*microglobulina* e il *fibrinogeno* (se l'elettroforesi viene effettuata sul plasma e non sul siero).

Invece, le  **$\gamma$ -globuline** sono i cosiddetti anticorpi o immunoglobuline e sono di diverse classi: *IgA*, *IgG*, *IgM* e *IgD*.

<b><math>\beta_1</math>-Globuline</b>		0,25-0,45
• Fattori della coagulazione V, VIII, fXIII, plasminogeno	54,0	
• Transcobalamina II (TC-II)	60,0	
• Emopexina (Hp)	62,0	
• Proteina C reattiva (CRP)	65,0	
• Proteina legante gli ormoni sessuali (SHBG)	79,5	
• Transferrina	440,0	
• Fibronectina	2000-10000	
• Lipoproteine LDL (e VLDL)		
<b><math>\beta_2</math>-Globuline (totali)</b>		0,44-0,80
• Fattore della coagulazione XII	340,0	
• Fibrinogeno	62,0	0,30-0,40
• Proteina S		
• Alcuni fattori del complemento	12,0	
• $\beta_2$ -Microglobulina		
<b><math>\gamma</math>-Globuline</b>		0,80-2,0
• IgA	64,0	0,15-0,35
• IgG	53,0	0,65-1,65
• IgM	70,0	0,08-0,18
• IgD	18,0	circa 0,003
<b>Post-<math>\gamma</math>-Globuline</b>		
• Lisacina	14,0	

## PROTEINE CON MAGGIOR CONTENUTO DI CARBOIDRATI

Proteine con maggior contenuto di carboidrati

Proteina	Contenuto di carboidrati (% sul peso)	Contenuto nel plasma (mg/100 ml)
<b><math>\alpha_1</math>-Globuline</b>		
• $\alpha_1$ -Glicoproteina acida (orosomucoide)	~ 42	55-140
• $\alpha_1$ -Fetoproteina	3,4	0,001
• Globulina legante la tiroxina	~ 13	1-2
• Transcortina	~ 26	3-3,5
<b><math>\alpha_2</math>-Globuline</b>		
• Ceruloplasmina	~ 7	15-60
• Aptoglobina, tipo I	~ 19	100-200
<b><math>\beta_1</math>-Globuline</b>		
• Transferrina	6	200-320
• Emopexina	22	50-100
<b><math>\gamma</math>-Globuline</b>	3	800-2000

**acida**, che può arrivare ad avere il 42% in peso di carboidrati. Altre glicoproteine sono la *globulina legante la tiroxina*, la *transcortina* che trasporta gli ormoni steroidei, come il cortisolo, la *ceruloplasmina* che trasporta il rame, l'*aptoglobina di tipo I*, la *transferrina* e l'*emopexina*. Inoltre, le  $\gamma$ -globuline stesse sono glicoproteine.

È possibile considerare le proteine sieriche guardandole sotto angolature diverse. Ad esempio, si possono osservare le **proteine sieriche che contengono quote importanti di carboidrati**, ossia quali sono le proteine glicosilate, le glicoproteine. La glicoproteina più importante per quanto riguarda il contenuto di carboidrati è l' **$\alpha_1$ -glicoproteina**

## CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE DELLE PROTEINE SIERICHE

## Classificazione funzionale delle proteine plasmatiche

Tipo di funzione	Proteina plasmatica	Ligandi e molecole trasportate (per la funzione di trasporto)
Trasporto di ioni e molecole	Prealbumina	Tiroxina
	Albumina	Ioni: $Ca^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ bilirubina; acidi grassi liberi; alcuni farmaci; alcuni ormoni steroidei e loro metaboliti.
Difesa immunitaria	Ceruloplasmina	Cu <sup>2+</sup>
	Transferrina	Ferro
	Transcortina	Cortisolo
	Aptoglobina	Emoglobina extraeritrocitaria
	Lipoproteine (chilomicroni, VLDL, HDL, LDL)	Trigliceridi, colesterolo, colesterolo esterificato
	$\alpha_2$ -globulina legante gli ormoni tiroidei	Tiroxina e triiodotiroxina
	Emopexina	Eme libero
	Transcobalamina I, II, III	Vitamina B <sub>12</sub>
	Proteina legante il retinolo	Retinolo
	Globulina legante gli ormoni sessuali	Testosterone, estradiolo
Risposta infiammatoria (fase acuta)	$\gamma$ -Globuline (immunoglobuline)	
	Proteine del complemento	
	$\beta_2$ -Microglobulina	

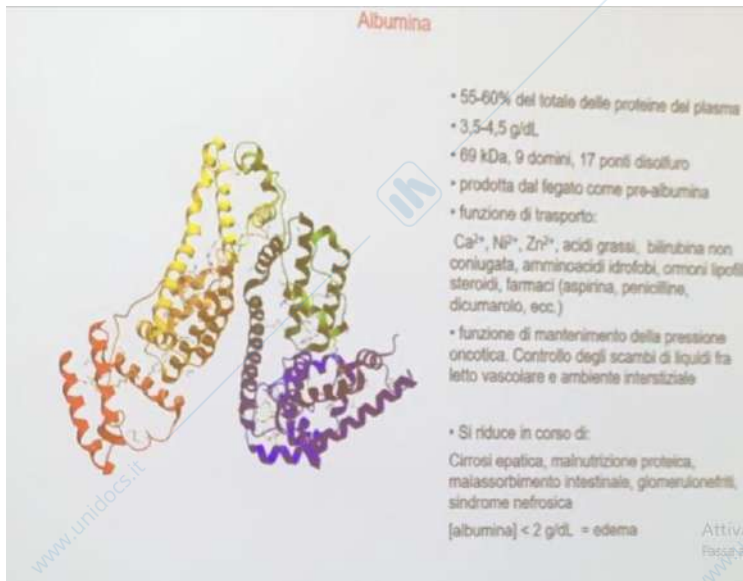
Le proteine sieriche possono essere classificate anche in base alla loro **funzione**:

- **trasporto di ioni e molecole**: ad esempio, l'*albumina* lega gli acidi grassi, gli ormoni steroidei, gli ioni calcio, rame e zinco e la bilirubina indiretta. È un trasporto abbastanza aspecifico, dunque il legame che si crea è a bassa affinità. Di solito, queste sostanze vengono trasportate anche da altri trasportatori specifici con cui hanno maggiore affinità. Inoltre, la *ceruloplasmina* trasporta il rame, la *transferrina* trasporta il

ferro, la *transcortina* trasporta il cortisolo, le *aptoglobine* trasportano l'emoglobina libera che si trova al di fuori dei globuli rossi, l'*emopexina* trasporta l'eme, le *lipoproteine* trasportano grassi, la *proteina che trasporta il retinolo* lega il retinolo, la *transcobalamina* trasporta la vitamina B<sub>12</sub> ed è presente anche una *globulina che trasporta gli ormoni sessuali*;

- **difesa immunitaria**: sono presenti proteine sieriche implicate nei sistemi di difesa immunitaria come le  $\gamma$ -globuline, le *proteine del complemento* e la  $\beta_2$ -microglobulina;
- **risposta infiammatoria (fase acuta)**: sono presenti proteine implicate nella risposta infiammatoria, ossia le cosiddette proteine della fase acuta, come la *proteina C reattiva*, l' $\alpha_1$ -glicoproteina acida, l' $\alpha_1$ -antitripsina, il *fibrinogeno*, l'*amiloides sierica A* e l'*amiloides sierica P*;
- **funzione ormonale**: ad esempio, l'*insulina*, l'*angiotensina* e la *leptina*;
- **funzione enzimatica (o di regolazione di enzimi)**: si includono gli *enzimi della coagulazione del sangue*, alcune *proteasi*, gli *enzimi lisosomiali* e gli *enzimi di secrezione*;
- **emostasi**: si includono il *fibrinogeno*, presente nel plasma, e *fattori della coagulazione* che non hanno una natura enzimatica;
- **azione antiproteasica**: sono inibitori di proteasi l' $\alpha_1$ -antitripsina, l' $\alpha_2$ -macroglobulina, l' $\alpha_2$ -antiplasmina e l'*antitrombina*.

Funzione ormonale	Entropoietina; ormoni ipofisari organotropici; insulina; glucagone; leptina; angiotensina; ormone natriuretico atriale; peptide natriuretico cerebrale (BNP), ecc.
Funzione enzimatica (o di regolazione di enzimi)	Molti fattori della coagulazione e della fibrinolisi; renina; colinesterasi; enzimi (o regolatori di enzimi) rilasciati da cellule e tessuti (enzimi della membrana plasmatica; enzimi citosolici; enzimi lisosomiali; enzimi mitocondriali); enzimi di secrezione; tropomiosine; mioglobina.
Emostasi	Fibrinogeno; fattori della coagulazione e della fibrinolisi ad azione non enzimatica
Azione antiproteasica	$\alpha_1$ -Antitripsina; $\alpha_2$ -Macroglobulina; $\alpha_2$ -Antiplasmina; Antitrombina III

**ALBUMINA**

L'**albumina** è la principale proteina plasmatica. Rappresenta il 55-60% del totale delle proteine plasmatiche e ne sono presenti 3,5-4,5g/dl.

È una proteina piuttosto grande, di 69 kDa, con 9 domini ed è una proteina a prevalente struttura  $\alpha$ . Viene prodotta dal fegato come pre-albumina e liberata in circolo.

Ha due funzioni fondamentali:

1. **trasporto di ioni** come calcio, rame e ferro e **di sostanze idrofobe** come gli acidi grassi, la bilirubina indiretta, gli amminoacidi idrofobi e gli ormoni steroidei;
2. **mantenimento della pressione colloidale-osmotica del sangue o pressione oncologica.**

Di fatto, la presenza dell'albumina consente di trattenere all'interno del letto vascolare la componente liquida che, per motivi di osmosi, tende a passare nell'ambiente interstiziale. Quando i livelli di albumina nel sangue diminuiscono e scendono sotto i 2 g/dl, ad esempio a causa di un problema a livello del fegato che non è più in grado di produrre corrette quantità di albumina, si ha un passaggio di liquidi dal letto vascolare verso l'ambiente interstiziale e si genera un edema, ossia una trasudazione di liquidi.

Quando si ha un versamento intraperitoneale e non si riesce a identificare la natura infiammatoria, bisogna pensare che può essere dovuto ad una carenza di albumina. Infatti, questi versamenti intraperitoneali possono essere riassorbiti andando a infondere nel paziente soluzioni contenenti albumina. Le condizioni patologiche in cui la concentrazione di albumina nel sangue può diminuire sono, ad esempio, la cirrosi epatica e la malnutrizione proteica, la cosiddetta Kwashiorkor, diffusa nei paesi del terzo mondo, in cui l'alimentazione è povera delle parti proteiche e si ha difficoltà nella sintesi delle proteine, tra cui l'albumina. Di conseguenza, il tipico ventre prominente è un versamento intraperitoneale perché i liquidi sfuggono dal letto vascolare. Invece, la sindrome nefrosica è una sindrome in cui il rene non è in grado di filtrare correttamente. Il rene è un filtro che permette il passaggio di liquidi e sostanze di piccole dimensioni, come ioni e piccole molecole, ma non delle proteine che vengono invece trattenute. Nella sindrome nefrosica, il rene non riesce a trattenere le proteine che vengono eliminate con l'urina. Si parla di **albuminuria** per indicare una perdita di albumina con le urine.

**PROTEINE DELLA FASE ACUTA**

**Proteine della fase acuta**

Le proteine della fase acuta sono quelle proteine di produzione epatica la cui sintesi aumenta in conseguenza di uno stimolo infiammatorio. L'entità della risposta della fase acuta è correlata alla severità dello stato infiammatorio. Proteine della fase acuta sono state definite quelle la cui concentrazione aumenta minimo del 25% in seguito allo stimolo infiammatorio.

PROTEINA	CONCENTRAZIONE PLASMATICA NORMALE (µg/DL)	AUMENTO OSSERVATO	PRINCIPALI FUNZIONI BIOLOGICHE
Ceruloplasmina	15-60	50%	Trasporto del rame; scavenger di radicali liberi
C3 (componente del complemento)	80-170	50%	Modulazione dell'infiammazione; difesa dell'ospite
Glicoproteina acida $\alpha_2$	55-140	2-3x	Modulazione dell'infiammazione
$\alpha_1$ -antitripsina	220-420	2-3x	Inibizione delle proteasi
Aptoglobina	40-180	2-3x	Trasporto dell'emoglobina
Fibrinogeno	200-450	2-3x	Coagulazione
Proteina C-reattiva	< 0,5	100-1000x	Infiammazione; difesa dell'ospite
Proteina SAA	< 10	100-1000x	Somoclasti

Di (21), modifcato.

Proteine di fase acuta «negative»: diminuiscono in corso di infiammazione  
Albumina, transferrina, proteina legante il retinolo e alcune altre

Le **proteine della fase acuta** sono proteine la cui concentrazione nel plasma aumenta in modo sensibile, ossia aumenta di oltre almeno il 25% rispetto ai valori normali, in corso di processi infiammatori. Tra le proteine della fase acuta, una delle più importanti, nonché tra quelle che vengono misurate per verificare se la persona ha uno stato infiammatorio in corso, è la **proteina C reattiva (PCR)** che, di

norma, è presente nel plasma in concentrazioni molto basse, ossia meno di 0,5 mg/dl; in corso di processo infiammatorio diffuso, la concentrazione della PCR può aumentare di 100 o 1000 volte. La PCR è un indice molto importante di infiammazione. È un esame di laboratorio che è condotto correntemente, così come anche la VES (velocità di eritrosedimentazione) che è però aspecifica. Altre proteine della fase acuta sono: la **proteina SAA o amiloide sierica A**, che aumenta di 100-1000 volte nel corso di un processo infiammatorio; il **fibrinogeno**, che è il precursore della fibrina implicato nel processo coagulativo, ma che è anche una proteina della fase acuta la cui concentrazione aumenta di 2-3 volte nel corso di un processo infiammatorio; l'**aptoglobina**, che trasporta l'emoglobina libera, ma che è anche una proteina della fase acuta; l' **$\alpha_1$ -glicoproteina acida**; l' **$\alpha_1$ -antitripsina**.

Inoltre, esistono proteine della fase acuta "negative" la cui concentrazione diminuisce in corso di processi infiammatori. Sono meno indicative e sono, ad esempio, l'**albumina**, la **transferrina** e la **proteina legante il retinolo**.

**PROTEINE A FUNZIONE ENZIMATICA**

Le proteine che hanno funzione enzimatica nel plasma possono essere raggruppate in tre grandi sottoclassi:

- enzimi la cui azione si svolge fondamentalmente nel sangue:** come tutti gli **enzimi implicati nel processo della coagulazione del sangue, ma anche nella rimozione del coagulo, ossia nella fibrinolisi**. Ad esempio, la **plasmina** è un enzima la cui funzione è quella di frammentare il coagulo favorendone il riassorbimento.

Invece, la **renina** è prodotta dall'apparato iuxtaglomerulare del rene. In caso di

**Proteine a funzione enzimatica del plasma**

- Enzimi la cui azione si svolge propriamente nel sangue**  
Enzimi della coagulazione e della fibrinolisi, sistema renina-angiotensina.  
Sono prodotti come proenzimi inattivi (coagulazione) oppure come enzimi attivi (renina).
- Enzimi secreti dalle ghiandole esocrine**  
Prodotti da pancreas, prostata, mucosa gastrica e intestinale, ghiandole lacrimali, presenti in quantità molto piccole. Lisozima.
- Enzimi tissutali**  
Secreti nel sangue (come la colinesterasi, prodotta dal fegato) o derivati dal distacco di tessuto a seguito di patologie (LDH, transaminasi, CK, amilasi, fosfatasi ecc.).  
Se l'aumento è relativo ad una isoforma organo-specifica, possono essere utilizzati come markers diagnostici (insieme a proteine non enzimatiche, es. troponina cardiaca, mioglobina).

abbassamento pressorio, il rene risponde producendo la renina, enzima che svolge la sua funzione nel sangue dove trova il suo substrato nell'angiotensinogeno, proteina prodotta dal fegato;

- enzimi secreti dalle ghiandole esocrine:** le ghiandole esocrine producono enzimi che dovrebbero raggiungere l'esterno o qualche cavità interna, ma una quota di questi raggiunge il sangue dove sono presenti in bassissime concentrazioni. Sono enzimi prodotti dal pancreas, dalla prostata e dalla mucosa gastrica e intestinale;
- enzimi tissutali:** sono enzimi che possono essere secreti nel sangue, come la *colinesterasi* prodotta dal fegato, o derivati dal disfacimento tissutale a seguito di processi patologici, come la *latticodeidrogenasi*, la *transaminasi*, la *creatinchinasi*, l'*amilasi pancreatica* e la *fosfatasi prostatica*. Questi ultimi sono enzimi che sono sempre presenti nel sangue in quantità bassissime ma, in corso di processi patologici, quando si ha un aumento della massa tissutale come può succedere nel caso di una patologia neoplastica o quando si ha un processo necrotizzante in cui il tessuto viene danneggiato, possono aumentare nel sangue. Alcuni di questi enzimi, insieme ad altre sostanze di natura proteica non enzimatica, possono fungere da markers di patologia. La *creatinchinasi*, nella fattispecie l'isoenzima MB, tipico del miocardio, aumenta in corso di ischemia del miocardio: quando non arriva sangue al cuore a causa, solitamente, di un'ostruzione di un'arteria coronaria o di un ramo dell'arteria coronaria, il tessuto che sta a valle della parte ostruita va in sofferenza perché non riceve ossigeno; le cellule cominciano a fare metabolismo anaerobio producendo lattati e possono andare incontro a necrosi. In questo caso, liberano il loro contenuto nell'ambiente interstiziale e la concentrazione dell'isoenzima MB aumenta andando a testimoniare il fatto che c'è stato un episodio di ischemia. Invece, l'*amilasi pancreatica* è un enzima organo-specifico che aumenta in circolo in caso di pancreatite acuta; infatti, se si sospetta una pancreatite, si misura l'*amilasi pancreatica*.

## PROTEINE PLASMATICHE CON FUNZIONI PARTICOLARI

- **crioglobuline** → sono un insieme di proteine che hanno una caratteristica in comune ovvero che quando si abbassa la temperatura, tra 0° e 22°C, tali proteine tendono a precipitare. Se si è molto vicino allo 0°C è possibile che precipitino anche altre proteine, se si è intorno ai 20°C di norma non accade niente e le proteine rimangono in soluzione, se invece sono presenti quantità importanti di queste crioglobuline precipitano e si formano quindi delle velature del plasma che sono misurabili in laboratorio. Queste crioglobuline raggruppano più proteine come alcune immunoglobuline, le componenti del fibrinogeno, la fibronectina... e la cosa fondamentale è che nel corso di certe patologie possono aumentare in maniera significativa, dando luogo a fenomeni di precipitazione proteica importanti che possono dare anche dei sintomi.

-  **$\beta_2$ -microglobulina** → è una proteina molto particolare. È un frammento che si origina da proteine di superficie cellulare, cioè proteine di membrana, di alcune cellule coinvolte in processi immunitari, in particolar modo linfociti e macrofagi. Normalmente viene filtrata a livello renale perché è sufficientemente piccola e viene eliminata, per cui è una proteina di cui si registra un

### Proteine con funzioni particolari

#### 1. Crioglobuline

Insieme eterogeneo di proteine plasmatiche che precipitano fra 0 e 22°C. Fra queste, immunoglobuline, componenti del fibrinogeno, fibronectina, ecc.

Aumentano in corso di numerose condizioni patologiche tumorali, infettive, cronico-degenerative o essenziali (es. mieloma multiplo, alcune leucemie, epatite cronica, collagenopatie, crioglobulinemia essenziale)

#### 2. $\beta_2$ -microglobulina

Proteina di 10 kDa, che si stacca dalla superficie di cellule immunitarie (macrofagi e linfociti).

Aumenta nel mieloma multiplo, in alcune neoplasie, nell'insufficienza renale. Viene filtrata a livello glomerulare e riassorbita a livello del tubulo renale. Può dare origine ad una amiloidosi, soprattutto a livello articolare, in seguito a emodialisi da lunga data.

#### 3. $\alpha_1$ -glicoproteina acida (orosomucoide)

181 amminoacidi. Di origine epatica. Molto ricca di carboidrati. Aumenta in molte patologie infiammatorie, in vari tumori e in gravidanza.

#### 4. $\alpha$ -fetoproteina

Molto presente nel plasma fetale. Diminuisce moltissimo alla nascita. Significato diagnostico: a) spina bifida e altre malformazioni della colonna vertebrale; b) epatoma primario e altri tumori del fegato.

aumento della concentrazione in determinate patologie come ad esempio mieloma multiplo, plasmocitoma, in altre forme di tumore e nell'insufficienza renale. La cosa interessante è che questa proteina tende ad aumentare in maniera importante, cronica e si stabilizza a livelli alti nei pazienti che sono sottoposti a emodialisi da molto tempo. Quei soggetti che hanno un'insufficienza renale cronica, il cui rene non è più in grado di svolgere la sua funzione e devono essere sottoposti a emodialisi, nell'arco di qualche anno sviluppano, quasi tutti, una particolare forma di amiloidosi: cioè un accumulo di fibre amiloidi, costituite fondamentalmente da  $\beta_2$ -microglobulina, a livello delle articolazioni, dei muscoli e più in generale dell'apparato muscolo-scheletrico.

-  **$\alpha_1$ -glicoproteina acida (o orosomucoide)** → ha un'importante contenuto di carboidrati circa il 40/45% ed è una delle proteine principali della fase acuta ed aumenta in corso di patologie infiammatorie.

-  **$\alpha$ -fetoproteina** → è una proteina che è assolutamente abbondante nel plasma fetale e testimonia il processo di accrescimento del feto, dopo la nascita però diminuisce in maniera vertiginosa, non se ne trova più, meno che non vi sia una patologia. Ha perciò un significato diagnostico: reperire determinati livelli di tale proteina significa che vi è un problema. Il problema può essere sia la presenza di malformazioni a livello del neonato oppure la presenza di un tumore del fegato (epatoma) o l'insorgenza di patologie a carico sempre di tale organo nell'adulto.

Di proteine di questo genere ve ne sono molte, come ad esempio l'antigene carcinoembrionario o altre che hanno delle sigle composte da lettere e numeri; queste sono dei markers tumorali che in un soggetto normale sono presenti a concentrazioni bassissime, al contrario aumentano molto nel sangue quando si presenta un certo tumore. Uno dei più noti è il cosiddetto **PSA**, cioè l'antigene specifico prostatico, il quale viene misurato nei soggetti di sesso maschile e la cui concentrazione nel sangue deve essere sotto determinati livelli poiché quando aumenta è segno di una patologia, non necessariamente tumorale. La registrazione di tale dato infatti, indica che la prostata sta aumentando di dimensioni e tale accrescimento può essere dettato da un semplice processo infiammatorio, ma potrebbe anche essere determinato da un processo neoplastico.

## PROTEINE CON FUNZIONE INIBITORIA NEI CONFRONTI DI PROTEASI

-  **$\alpha_1$ -antitripsina** → è prodotta dal fegato e ha la funzione di inibire l'elastasi, soprattutto a livello del sistema respiratorio dove, infatti, un deficit genetico di tale proteina determina l'insorgenza del cosiddetto enfisema polmonare precoce. Si è già visto tale fenomeno quando si è studiato l'aggregazione proteica; queste forme alterate di  $\alpha_1$ -antitripsina tendono a precipitare ed aggregarsi nella sede di origine, determinando un danneggiamento del fegato che però non è così rilevante poiché l'aggregazione di tale proteina non è di tipo amiloide per cui non dà particolari problemi. Ciò che è problematico è il fatto che venga a mancare la sua funzione fisiologica a livello bronchiale nel polmone. Infatti, tutte le proteasi che vengono prodotte dai globuli bianchi che si trovano a livello del bronco non subiscono il contrasto dovuto da parte dell' $\alpha_1$ -antitripsina e lavorano degradando il collagene interstiziale; in

### Proteine ad attività antiproteasica

#### 1. $\alpha_1$ -antitripsina

Prodotta dal fegato e dai macrofagi. Inibisce le serina-proteasi (elastasi e tripsina).

Un suo deficit genetico causa l'enfisema polmonare precoce. Lo stesso deficit può generare cirrosi epatica da accumulo di materiale fibrillare

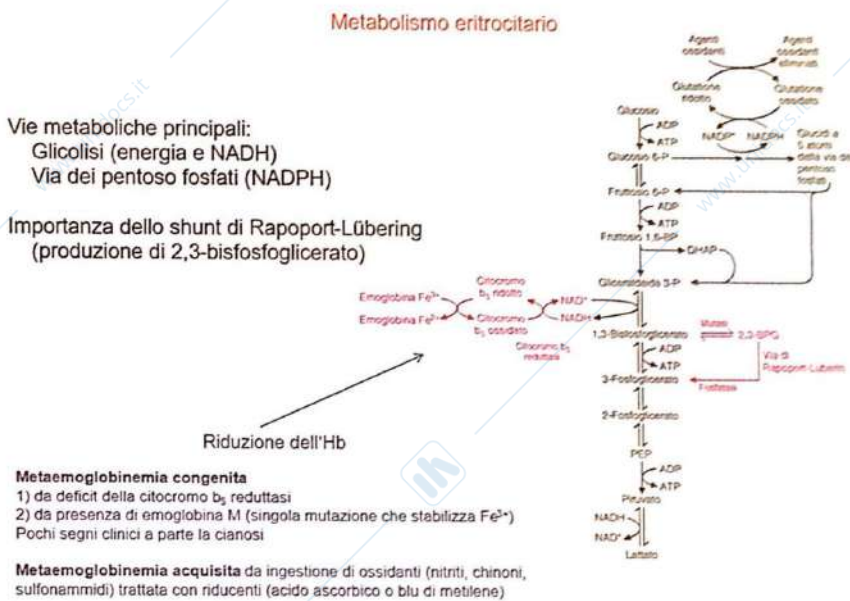
#### 2. $\alpha_2$ -macroglobulina

Glicoproteina costituita da 4 subunità (totale 720 kDa). Inibisce numerose proteasi (tripsina, plasmina, trombina, chimotripsina, callicreina). E' coinvolta nella regolazione della coagulazione. E' anche coinvolta nel trasporto dello zinco e di numerose citochine.

questo modo le pareti alveolari vengono danneggiate dall'apertura di cavità importanti e si ha l'insorgenza dell'enfisema. Questa è una patologia che si può verificare comunemente, ma nei soggetti in tarda età e fumatori, il problema è quando insorge in età giovanile, in questo caso è dettata da cause diverse tra cui una può essere il deficit di  $\alpha 1$ -antitripsina.

-  **$\alpha 2$ -macroglobulina** → è una proteina di dimensioni importanti, appartenente al gruppo delle  $\alpha 2$ -globuline e la cui funzione è proprio quella di inibire numerose proteasi (tripsina, plasmina, trombina, chimotripsina e callicreina); la si considera un inibitore importante nella regolazione del processo coagulativo.

## METABOLISMO SPECIFICO DELLE CELLULE DEL SANGUE



In questa parte verranno tratti in particolare modo gli eritrociti e i globuli bianchi, soprattutto i granulociti.

**Metabolismo eritrocitario:** è abbastanza semplice poiché tali cellule non possiedono mitocondri, non svolgono metabolismo ossidativo, sono ricchissimi di emoglobina grazie alla quale sono dei trasportatori di ossigeno, questo si lega all'emoglobina solo se il ferro presente nell'eme ha uno stato di ossidazione 2+, se invece lo

stato di ossidazione è 3+ per cui il ferro è ferrico, si parla di metaemoglobina in cui la sesta posizione di coordinazione viene occupata da una molecola di acqua e non vi è più la possibilità di legare l'ossigeno. Per tale motivazione è importante che il ferro rimanga allo stato ridotto e di conseguenza l'intero metabolismo eritrocitario è dedicato alla produzione di sostanze antiossidanti: **NADPH** e **glutazione**. L'eritrocita perciò produce quella poca energia che gli può servire attraverso la glicolisi anaerobia, con produzione di lattato, e poi ovviamente compie molta via dei pentoso fosfati per produrre NADPH.

Oltre a ciò l'eritrocita possiede anche quantità importanti di una molecola che svolge un ruolo fondamentale nel funzionamento dell'emoglobina: il **2,3-bisfosfoglicerato**, ovvero un effettore allosterico negativo dell'emoglobina. Tale molecola è presente anche in altre cellule, che non sono eritrociti, poiché è un cofattore della fosfoglicerato mutasi, l'enzima glicolitico che trasforma il 3-fosfoglicerato in 2-fosfoglicerato, ma in tal caso le sue concentrazioni sono molto basse perché lavora con un rapporto di 1:1 con l'enzima cui è associato. Al contrario gli eritrociti contengono concentrazioni di 2,3-bisfosfoglicerato molto elevate poiché qui svolge il ruolo di inibitore allosterico dell'emoglobina ed essendo questa tanta ne serve una concentrazione elevata. Di norma nei globuli rossi la concentrazione di 2,3-bisfosfoglicerato è intorno a 5 mM, perciò una notevole concentrazione. Tale molecola, inoltre, non è un intermedio glicolitico, per cui i globuli rossi hanno una specifica via di produzione di 2,3-bisfosfoglicerato che prende il nome di **via di Rapoport-Luebering**. Questa via si compone fondamentalmente di due reazioni: una catalizzata da una mutasi e l'altra da una fosfatasi. La mutasi agisce sull'1,3-bisfosfoglicerato, che è un intermedio della glicolisi che si forma nella reazione catalizzata dalla gliceraldeide deidrogenasi (la

quale trasforma la gliceraldeide 3-fosfato in 1,3-bisfosfoglicerato con la riduzione di una molecola di NAD) che è l'unica reazione ossidativa della glicolisi. Dopodiché nell'eritrocita l'1,3-bisfosfoglicerato oltre ad essere substrato della fosfoglicerato chinasi (la quale fa reagire questa molecola con ADP per formare 3-fosfoglicerato e ATP, un enzima che catalizza perciò una fosforilazione a livello di substrato), è anche substrato di una mutasi che sposta il gruppo fosfato dalla posizione 1 alla posizione 2, modificazione che può essere fatta tranquillamente perché il fosfato in posizione 1 è legato con un legame fosfoanidridico. In questo modo si trasforma l'1,3-bisfosfoglicerato in 2,3-bisfosfoglicerato che può accumularsi, l'eventuale eccesso di tale molecola viene poi metabolizzato grazie all'azione di una fosfatasi che distacca, attraverso un processo di idrolisi, il fosfato in posizione 2 producendo 3-fosfoglicerato. Quindi questo shunt (o via di rapoport-luebering) di fatto impedisce la produzione di una molecola di ATP, ma consente la produzione di quantità rilevanti di 2,3-bisfosfoglicerato che nel globulo rosso ha un ruolo importante.

La necessità di produrre invece equivalenti riducenti si nota nel fatto che il NAD ridotto viene utilizzato per ridurre il piruvato a lattato, che poi viene messo in circolo e recuperato dal fegato, oppure serve per mantenere allo stato ridotto il citocromo B5 attraverso l'azione della citocromo B5 reduttasi, poiché questo citocromo B5 ha la funzione a sua volta di ridurre la metaemoglobina prodotta ad emoglobina funzionale con stato di ossidazione del ferro 2+.

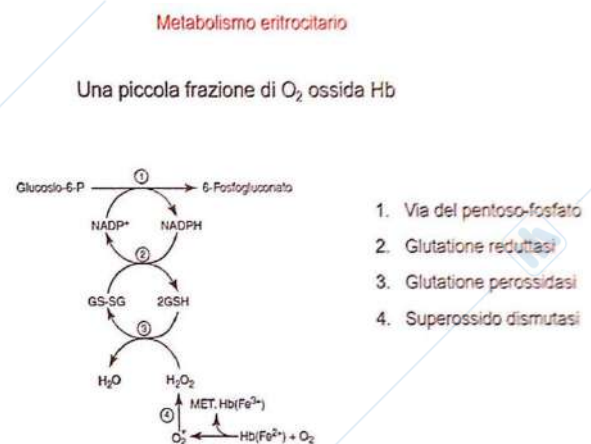
Vi sono condizioni patologiche in cui si ha una elevata concentrazione di metaemoglobina (cioè emoglobina con ferro 3+), questa può essere:

- **Congenita:** se ha base genetica, ovvero se è dovuta al deficit di qualche proteina come per esempio un deficit genetico di citocromo B5 reduttasi: se questa manca non vi è la sua funzione riduttiva nei confronti della metaemoglobina che perciò si accumula. Si può manifestare anche con una singola mutazione a carico dell'emoglobina come avviene nel caso dell'emoglobina M: questa ha infatti una sequenza amminoacidica, e quindi una struttura, che stabilizza il ferro allo stato di ossidazione 3+.
- **Acquisita:** in questo caso l'elevata presenza di metaemoglobina è data dall'assunzione di quantitativi importanti di agenti ossidanti (nitriti, chinoni...), i quali possono essere anche farmaci.

### Importanza della via del pentoso fosfato nell'eritrocita:

Questa immagine mostra nello specifico la via di produzione di NADP ridotto con la via del pentoso fosfato.

Il NADPH ha la funzione fondamentale di ridurre il glutatione attraverso la glutatione reduttasi che è un enzima NADPH dipendente e consente di avere concentrazioni importanti di glutatione ridotto, questo a sua volta ha la funzione fondamentale di detossificare il perossido di idrogeno attraverso la glutatione perossidasi che trasforma l'acqua ossigenata in acqua. Nel globulo rosso è infatti possibile trovare perossido di idrogeno perché possono sorgere problemi con l'ossigeno legato all'emoglobina: ad esempio è molto probabile che l'ossigeno legato al ferro 2+ prelevi un elettrone trasformandosi in anione superossido e trasformando il ferro in 3+. Di norma questa situazione è



contenuta, si verifica in bassa percentuale durante il trasporto ed è reversibile, non avviene quasi mai la liberazione di anione superossido e in quei rari casi in cui ciò si verifici le quantità sono molto ridotte. Quello che accade però a queste piccole quantità di anione superossido rilasciate è l'azione della *superossido dismutasi*, ovvero un enzima che provvede a trasformarlo in perossido di idrogeno e che è uno degli enzimi protettivi più importanti contro le ROS.

L'acqua ossigenata prodotta è poi substrato della glutatione perossidasi, la quale la elimina ma produce glutatione ossidata che verrà ridotto attraverso la glutatione reduttasi che utilizza come equivalente riducente NADPH. Ecco perché la via del pentoso fosfato si attua in maniera importante nell'eritrocita.

Vi è anche una importante patologia genetica che ha a che fare con i globuli rossi e con la via del pentoso fosfato: si ha un **deficit della glucosio 6-fosfato deidrogenasi**, ovvero il primo enzima che interviene in tale via metabolica e che si occupa di trasformare il glucosio 6-fosfato in glucono-fosfo-lattone con l'impiego di una molecola di NADPH.

Se infatti per motivi genetici la glucosio 6-fosfato deidrogenasi non viene prodotta in quantità ottimali, l'eritrocita si ritrova con quantità inferiori di agenti riducenti, in particolare NADP ridotto e di conseguenza anche glutatione. Questa situazione di norma non dà problemi, poiché le difese antiossidanti sono comunque abbastanza importanti da impedire alle specie reattive dell'ossigeno di danneggiare i fosfolipidi di membrana dell'eritrocita (lipoperossidazione).

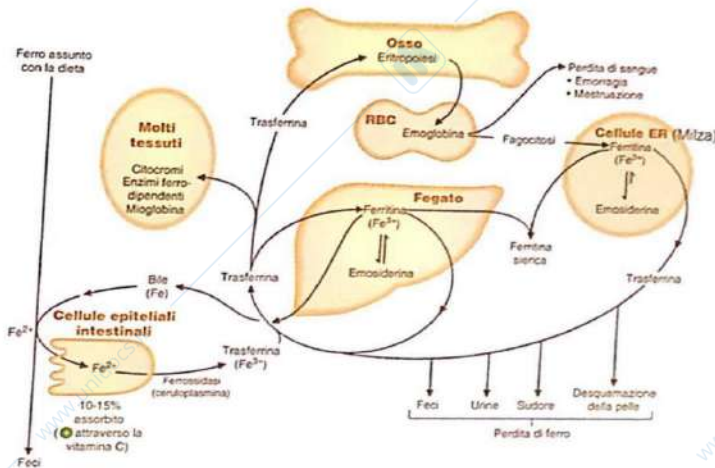
La patologia si può manifestare però se tali individui assumono particolari sostanze: alcuni farmaci antimalarici ad esempio primachina e cloroquina, alcuni sulfamidici, antibiotici, alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei e le fave. Quest'ultime contengono infatti una particolare sostanza ossidante che è la **divicina**, perciò ogni volta che un soggetto affetto da tale patologia mangia un piatto di fave emerge l'azione ossidante della divicina che a sua volta causa l'emergere del deficit genetico presente nei globuli rossi e si scatena tutta una serie di eventi che portano alla lipoperossidazione delle membrane eritrocitarie, danneggiamento dei globuli rossi ed emolisi. Quindi si possono avere delle crisi emolitiche importanti, in cui grandi quantità di globuli rossi vanno incontro a distruzione e viene liberata emoglobina. Questa viene in parte legata dall'aptoglobina e in parte viene metabolizzata con la formazione di grandi quantità di bilirubina, soprattutto bilirubina indiretta. Tale quantità di bilirubina se molto elevata si può depositare nella cute e nei tessuti ed emerge una colorazione gialla della cute e la condizione di ittero.

Il "vantaggio" di questa patologia come di altre (talassemie, anemia falciforme...) è che i globuli rossi sono fragili e la loro vita non raggiunge mai i 120 giorni come avviene nei globuli rossi normali, così facendo non possono essere utilizzati dal plasmodium della malaria nel suo ciclo riproduttivo e quindi i soggetti affetti da questa patologia sono resistenti alla malaria. Proprio per questo motivo in paesi in cui la malaria colpisce ancora duramente e causa morte, tale condizione che è di per sé svantaggiosa viene selezionata: meglio essere malati di deficit genetico della glucosio 6-fosfato deidrogenasi che di malaria.

*Il professore affronta in modo molto rapido questi argomenti: le varie forme dell'emoglobina (già viste nella biochimica 1), la sintesi dell'eme (anche questa già descritta) e i deficit enzimatici ad essa associata, il metabolismo del ferro (è spiegato in modo approfondito su un file in piattaforma).*

**METABOLISMO DEL FERRO (brevemente):****Metabolismo del ferro**

Il ferro libero è tossico. Si lega a transferrina nel sangue. Capacità legante 0,3 mg/dL  
Sideremia (ferro legato a transferrina) 60-170 µg/dL



3+ ai vari tessuti che sono in grado di sintetizzare specie chimiche, proteine, cofattori in cui sia presente il ferro; tali tessuti sono soprattutto il fegato ed il midollo osseo dove è impiegato nel processo di eritropoiesi.

All'interno delle cellule il ferro viene tenuto legato da una proteina di deposito che si chiama **ferritina**, la quale poi può trasformarsi in un'altra forma che si chiama **emosiderina**, quando si lega con componenti di natura diversa.

Dalla presenza di queste proteine si comprende che il ferro deve essere sempre legato, non può stare in forma libera, dato che è una specie molto pericolosa, perché nella forma libera può reagire con l'acqua ossigenata nella reazione di Fenton, che è una reazione in cui si produce il radicale ossidrilico che è la specie reattiva dell'ossigeno più potente in assoluto (da non confondere con lo ione ossidrilico: il radicale ha un elettrone spaiato, mentre lo ione ha un elettrone in più e perciò ha carica negativa).

Vi sono alcuni **parametri** a proposito del ferro:

- **Sideremia**: è la concentrazione del ferro nel sangue, ovviamente non in forma libera, ma legato alla transferrina, il valore normale di tale parametro va da 60 µg/dl a 170 µg/dl;
- **Transferrina**: è anche questa un parametro misurabile in quanto proteina trasportatrice del ferro (solo se nello stato di ossidazione 3+) e i suoi livelli vanno da 200 mg/dl a 360 mg/dl, di questa non tutta è legata vi è anche una parte di transferrina libera.

Quando si è in condizioni di *iposideremia*, situazione in cui la concentrazione di ferro circolante è bassa, la concentrazione di transferrina tende ad aumentare e ad essere più alta.

Il ferro viene assunto dal nostro organismo attraverso la dieta e per essere ben assorbito si deve presentare nello stato di ossidazione 2+; non tutto il ferro contenuto negli alimenti è infatti ugualmente assorbibile, ad esempio quello contenuto negli spinaci non lo è affatto, molto meglio invece quello che si trova nelle carni rosse.

Il ferro viene assorbito dalle cellule intestinali e viene immesso in circolo legato alla **transferrina**, che è appunto la proteina sierica che si occupa di trasportare il ferro però allo stato di ossidazione 3+. Dopodiché la transferrina distribuisce questo ferro

- **Transferrina:**

Proteina del plasma ( $\beta_1$ -globulina) di 78 kDa. Lega due ioni  $Fe^{3+}$  con affinità elevatissima. Sintetizzata dal fegato. Livelli normali 200-360 mg/dL. Satura con ferro solo in parte. La concentrazione di transferrina aumenta quando il ferro diminuisce (anemia sideropenica) e in altre condizioni (es. gravidanza)

- **Ferritina:**

Proteina intracellulare (fegato, milza, midollo osseo, muscolo). Una molecola lega fino a 4500 ioni  $Fe^{3+}$ . È indice del contenuto in ferro dell'organismo. Aumenta nell'emocromatosi in cui si hanno abnormi quantità di ferro nell'organismo.

- **Emosiderina:**

Proteina di deposito (fegato, midollo osseo, milza). Data dalla condensazione di ferritina con altre componenti (lipidi, porfirine, acido sialico). Ferro difficilmente metabolizzabile

La ferritina è, come si è già detto, la proteina di deposito del ferro, si distingue per la sua grande capacità legante, fino a 4500 ioni ferro. L'emosiderina deriva dalla ferritina quando vi si legano componenti di natura lipidica, acido sialico, porfirine...

### Metabolismo dei globuli bianchi:

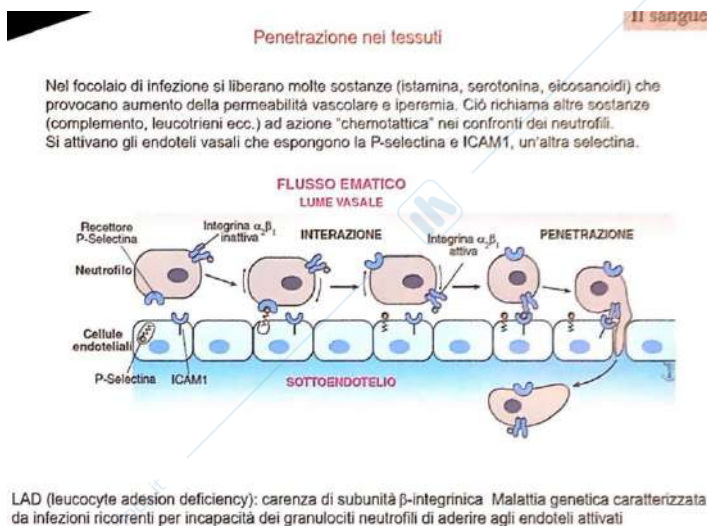
#### Metabolismo dei leucociti

- Glicolisi molto attiva
- Via dei pentoso fosfati molto attiva
- Moderata fosforilazione ossidativa (pochi mitocondri)
- Attività specifiche che consumano intensamente  $O_2$ :

mieloperossidasi

NADPH ossidasi

Per quanto riguarda il metabolismo dei globuli bianchi, in particolare modo i **granulociti**, ovvero le cellule fagocitarie, hanno glicolisi e via del pentoso fosfato molto attive, perciò producono grandi quantità di NADP ridotto, al contrario non hanno un metabolismo ossidativo particolarmente accentuato; la caratteristica importante che li contraddistingue, e che è propria soprattutto dei granulociti, è che hanno delle attività specifiche che portano al consumo intenso di ossigeno, ma che non sono però reazioni ossidative. Il protagonista di tali attività è l'enzima **NADPH ossidasi** anche conosciuto come **NOX**.



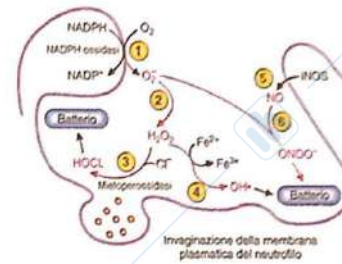
Il globulo bianco nel capillare rallenta, dopodiché grazie all'interazione di integrine e selectine fuoriesce dalle cellule endoteliali e passa nel tessuto interessato; qui l'attività fagocitaria inizia, oltre che con la formazione di invaginazioni volte a conglobare le sostanze, con la produzione di sostanze fortemente ossidanti: **specie reattive dell'ossigeno**, questo è l'unico caso in cui la formazione di ROS è fisiologica. Queste specie reattive dell'ossigeno vengono prodotte quasi esclusivamente dall'attività della NADPH ossidasi, questa utilizza NADP ridotto e

ossigeno per la formazione dei prodotti NADP ossidato e anione superossido. Tale anione superossido serve per danneggiare una cellula batterica che è stata conglobata, lo può fare direttamente oppure subire prima l'azione della superossido dismutasi, formare acqua ossigenata, la quale a sua volta può intraprendere più reazioni: formazione di acido ipocloroso sotto l'azione della mieloperossidasi oppure formazione di un radicale ossidrilico con la reazione di Fenton, entrambi i prodotti sono tossici per la cellula batterica. Inoltre, una terza via per l'anione superossido è quella di reagire con il monossido di azoto (ottenuto da un enzima chiamato ossido di azoto sintasi), il prodotto in questo caso è perossinitrito, anche questa una specie reattiva sia dell'ossigeno che dell'azoto e nociva per il batterio.

Si nota come il globulo bianco, o granulocita coinvolto nel processo di fagocitosi, riesca a produrre una batteria di sostanze fortemente ossidanti, come quelle menzionate finora, la cui azione tossica è specialmente rivolta contro l'agente estraneo, ma non solo poiché dopo aver fatto ciò anche il globulo bianco muore.

L'intero metabolismo del globulo bianco è perciò incentrato sull'attivazione della NOX, enzima che porta alla formazione di anione superossido e che dimostra la sua presenza attraverso l'ingente uso di ossigeno, anche detto *burst respiratorio*, non inteso in senso stretto ma semplicemente come *consumo di ossigeno non finalizzato alla produzione di energia, ma finalizzato alla produzione di specie tossiche*.

### Fagocitosi e degradazione



In risposta alla presenza di agenti infettivi i fagociti manifestano rapido consumo di  $O_2$

1. Attivazione di NADPH ossidasi (NOX) – Inizio *respiratory burst*
2. Formazione del vacuolo e produzione di  $H_2O_2$
3. Granuli di mieloperossidasi – Formazione di HOCl
4. Reazione di Fenton – Formazione del radicale ossidrilico
5. Induzione di iNOS (NO sintasi inducibile)
6. Formazione di perossinitrito