

Metabolismo cellulare

Glicolisi

(Metabolismo dei carboidrati)

Il glucosio (6 atomi di C) entra nella via metabolica, e dopo un certo numero di reazioni viene trasformato in 2 molecole di piruvato (3 atomi di C). Il prodotto finale di questa via catabolica, che sono le 2 molecole di piruvato, sono diverse dal glucosio per il fatto che si perdono atomi di H: il piruvato è una molecola più ossidata, non al massimo livello, per avere ossidazione completa a CO₂ dovremo aspettare altri passaggi (ciclo di krebs, la catena respiratoria) però è già molto più ossidata del glucosio. Questo è infatti lo scopo della glicolisi: ossidare glucosio e ricavarne energia. Questo è lo scopo finale del catabolismo, parte del metabolismo che permette di ricavare energia dai nostri nutrienti.

Glicolisi:

Via metabolica più antica, poichè tutti gli organismi utilizzano glucosio come fonte di energia, anche i batteri. E' universale, perchè tutte le cellule usano glicolisi. E' la base del metabolismo. Alcune cellule/tessuti molto specializzate, come eritrociti o neuroni, si basano da un punto di vista energetico sulla glicolisi (anche cellule dei testicoli o della cornea). Questi organi/cellule così specializzati hanno un bisogno assoluto di glucosio e ricavano energia dalla glicolisi. Il cervello di un uomo adulto consuma 100/110 grammi di glucosio al giorno.

Dove:

La glicolisi è una via citoplasmatica, avviene nel citoplasma di tutte le cellule.

Perchè: via iniziale del catabolismo del glucosio, e anche di altri glucidi che andranno a convergere sul glucosio (ad es il lattosio, saccarosio, disaccaridi, polisaccaridi ecc.)

Come:

Sono 10 reazioni che trasformano il glucosio in 2 molecole di piruvato e producono 2 molecole di ATP e due molecole di coenzima ridotto NADH. E' una via molto lunga con un risultato abbastanza ridotto da un punto di vista energetico, poichè è una via antica e non ancora perfetta da un punto di vista metabolico. Non è però solo catabolica: alcuni intermedi partecipano anche ad altre vie metaboliche. Il metabolismo, infatti, è una rete complessa di interazioni dove molti metaboliti sono condivisi da più vie metaboliche; molti metaboliti si trovano in "punti di snodo metabolici" (e il glucosio è uno di questi metaboliti).

Dopo:

Dopo la glicolisi dobbiamo distinguere 2 situazioni: in presenza di O₂ il piruvato entrerà nel mitocondrio, dove verrà ossidato ulteriormente. In assenza di O₂, invece, prenderanno il via molteplici possibili reazioni di fermentazione (noi vedremo le fermentazioni del rumine).

Con la dieta, generalmente, assumiamo carboidrati complessi come l'amido, glicogeno, cellulosa (polisaccaride di sostegno vegetale) che devono essere digeriti/idrolizzati. Noi possediamo amilasi per scindere legami alfa-glicosidici, ma non possediamo enzimi per scindere legami beta-glicosidici, mentre la flora ruminale ha proprio la funzione di idrolizzare questi legami beta degli alimenti che assumono gli erbivori.

In circolo nel sangue abbiamo alte concentrazioni di glucosio. Nel cane ci sono circa 60-120 milligrammi di glucosio/decilitro. Dopo le proteine, il glucosio è uno dei metaboliti circolanti più abbondanti, proprio perchè essenziale a tutte le cellule. Il glucosio poi entra nelle cellule mediante trasportatori di membrana specifici chiamati GLUT. I GLUT sono "facilitatori di passaggio", fanno passare glucosio secondo gradiente di concentrazione dall'esterno all'interno della cellula grazie all'alternarsi dei loro due stati di conformazione (quindi non consumano energia). I trasportatori GLUT sono una grande famiglia con molti componenti: GLUT1 e GLUT3 sono ubiquitari, presenti nella maggior parte delle nostre cellule, e sono quelli responsabili del trasporto basale del glucosio

(glut 1 abbondante soprattutto negli eritrociti). GLUT2 invece è un trasportatore più specializzato in quanto è presente negli organi di regolazione/controllo della glicemia. Nelle cellule beta del pancreas, Glut2 svolge la funzione di sensore della glicemia, perchè le cellule beta del pancreas sono deputate alla produzione di insulina, ormone ipoglicemizzante. Quindi glut2, quando la glicemia si alza, fa partire una serie di segnali intracellulari che determinano il rilascio di insulina in circolo. Glut2 è importante anche nel fegato, poichè anche il fegato ha funzione di omeostasi della glicemia, in quanto interviene quando si alza la glicemia, facendo entrare più glucosio negli epatociti e andando a depositarlo all'interno di queste cellule sotto forma di glicogeno come riserva. GLUT4 è presente soprattutto nei muscoli e nelle cellule adipose, in quanto i muscoli sono tra i principali consumatori di glucosio per il movimento, e nelle cellule adipose poichè viene trasformato in lipide.

Quindi il glucosio è entrato nelle cellule con questi trasportatori e ora può entrare nella via metabolica.

Reazioni della glicolisi

Intro:

La glicolisi è un processo fatto di molte reazioni perchè si tratta di reazioni che liberano molta energia, che non potrebbe essere liberata in pochi passaggi, ma che deve essere frazionata in tante tappe.

La glicolisi è divisa in 3 fasi:

Le prime 3 reazioni (1-2-3) servono per attivare il glucosio. In questa prima fase consumeremo energia (ATP) perchè dovremo portare il glucosio sulla sommità di una collina energetica. Poi vi sono 2 reazioni intermedie (4-5) che taglieranno il glucosio in 2 parti uguali: l'esoso del glucosio viene tagliato in 2 triosi. Poi ci saranno le ultime 5 reazioni (6-7-8-9-10) da cui ricaveremo energia. Otterremo energia in 2 forme: energia chimica (il legame altamente energetico dell'ATP) ma anche coenzimi ridotti, quindi potere riducente, che verrà speso in catena respiratoria.

Reazione 1:

Reazione catalizzata dall'enzima endochinasi. Il glucosio viene attivato mediante fosforilazione: un fosfato viene aggiunto sul C6. Si forma glucosio-6-fosfato. Reazione che necessita ATP. Le chinasi sono enzimi della classe delle transferasi che trasferiscono gruppi fosfato e hanno bisogno di magnesio come cofattore. Spesso il donatore del gruppo fosfato è l'ATP, ma non sempre. La reazione 1 è fortemente esoergonica. Questa reazione in vivo è fortemente esoergonica, ΔG molto inferiore a 0, quindi in vivo (non condizioni standard ma con concentrazione dei reagenti e prodotti nelle cellule) la reazione è praticamente irreversibile. La reazione è anche soggetta a regolazione (sono 3 le reazioni soggette a regolazione, la prima, la ... e l'ultima). Tutte 3 queste reazioni irreversibili in vivo e regolate sono catalizzate da delle chinasi.

Ripasso sulle reazioni accoppiate:

La reazione finale di glucosio + ATP (glucosio-6-fosfato + ADP) è fortemente esoergonica. In realtà questa reazione è la somma di 2 semireazioni: una è la fosforilazione del glucosio che è endoergonica (sfavorita) ma che accoppiata all'idrolisi di ATP, che è fortemente esoergonica, la reazione sfavorita diventa esoergonica e addirittura irreversibile. Quindi l'idrolisi di ATP, con tutta l'energia che libera, quando viene accoppiata ad una reazione sfavorita in vivo la può rendere possibile.

La prima tappa di fosforilazione del glucosio è molto importante: porta il glucosio su una collina di energia potenziale, attiva il glucosio e lo rende più disponibile per percorrere la glicolisi. Seconda funzione è quella di trasformare il glucosio da una molecola che riuscirebbe a passare la membrana secondo gradiente grazie al trasportatore glut poichè non carica, in una molecola che invece diventa carica (glucosio-6-fosfato ha la carica negativa del fosfato) e che rimane nella cellula. La molecola carica è come intrappolata all'interno della cellula perchè sulla membrana non ci sono sistemi di trasporto per gli zuccheri fosforilati: la cellula ha investito energia per fosforilare il glucosio, e ora non se lo lascia scappare, rimarrà sempre all'interno della cellula.

Questa reazione irreversibile in vivo è un punto chiave per la regolazione della glicolisi.

Reazione 2:

(fosfoglicoso isomerasi)?

Reazione catalizzata dall'enzima isomerasi, che trasforma il glucosio-6-fosfato in un fruttosio-6-fosfato (sempre a 6C). Reazione molto semplice di cambiamento di struttura molecolare, perchè il fruttosio è molto più semplice da dividere a metà. Però, prima di essere diviso a metà in 2 triosi uguali, la molecola di fruttosio deve essere ulteriormente fosforilata per essere resa simmetrica. Infatti vedi reazione 3.

Reazione 3:

Ulteriore reazione di fosforilazione, esattamente uguale alla prima: il fruttosio-6-fosfato, in presenza dell'enzima fosfo-frutto-chinasi1, ATP e magnesio, viene fosforilato a fruttosio1-6difosfato. Abbiamo fosforilato anche il C1. Ora abbiamo una molecola perfettamente simmetrica che potrà essere tagliata a metà nella fase successiva. L'enzima fosfo-frutto-chinasi1 è piuttosto grande, con 4 subunità, ed è un classico enzima allosterico con attivatori e inibitori. E' forse il principale enzima che regola la via metabolica.

Reazione molto esoergonica, praticamente irreversibile in vivo.

Siamo giunti alla fine della prima fase. Per ora abbiamo soltanto investito energia, consumato 2 ATP, 2 chinasi (esochinasi(?), fosfo-frutto-chinasi1). Il fruttosio1-6difosfato a questo punto è un metabolita esclusivo della glicolisi, e il suo destino è diventare piruvato con le prossime 7 reazioni. Con le prime 3 reazioni siamo arrivati ad avere fruttosio1-6-difosfato, molecola simmetrica attivata, pronta per essere tagliata.

Ora vedremo che le reazioni 4-5 tagliano il fruttosio1-6-difosfato e otteniamo 2 triosi. I 2 triosi verranno finalmente ossidati, e dalle loro ossidazioni ricaveremo energia, produciamo ATP. Poi rimaneggiamo ancora la molecola e finalmente arriva l'ultima chinasi e l'ultima molecola di ATP prodotta, e avremo finalmente il piruvato.

31 marzo

Reazioni di triosi: 4 e 5

Ora vediamo le due reazioni intermedie che ci permetteranno di ottenere 2 molecole con 3C, 2 triosi uguali, 2 molecole uguali di 3-fosfo-gliceraldeide, che saranno quelle che poi entreranno nell'ultima fase della glicolisi, nelle ultime 5 reazioni.

Reazione 4:

Catalizzata dall'enzima aldolasi, che taglia a metà la molecola di fruttosio1-6difosfato.

Si formano 2 triosi, con 3C, diversi tra di loro perchè il diidrossi-acetone-fosfato è un chetone, mentre la gliceraldeide3fosfato è un aldeide, ma hanno strutture molto simili.

Reazione molto endoergonica in condizioni standard ma in vivo ha DeltaG negativo, perchè le reazioni a valle della glicolisi saranno reazioni che terranno bassa la concentrazione dei prodotti e di conseguenza sposteranno l'equilibrio verso il compimento della reazione.

Reazione 5:

Reazione di isomerizzazione reversibile, l'enzima è un'isomerasi che trasforma il diidrossi-acetone-fosfato in gliceraldeide3fosfato in modo da avere 2 triosi uguali per proseguire nella glicolisi.

L'enzima trioso-fosfato-isomerasi trasforma il diidrossi-acetone-fosfato in gliceraldeide-3-fosfato, così che da una molecola iniziale di glucosio, dopo 5 reazioni otteniamo 2 molecole uguali di gliceraldeide-3-fosfato. Abbiamo diviso il glucosio a 6C in 2 molecole a 3C, tutte e due attivate da questo fosfato sul C3. Finora abbiamo solo speso 2 molecole di ATP e guadagnato niente.

Reazione endoergonica anche in vivo, non è favorita, ma avviene perchè il prodotto della reazione gliceraldeide-3-fosfato viene continuamente sottratta dalla reazione 6 successiva, mantenendo i valori della gliceraldeide-3-fosfato così bassi che trascinano il compimento della reazione verso destra. Quindi anche se è una reazione reversibile è spostata verso la produzione del prodotto.

Riflettiamo prima di passare alla 6: le prime 5 reazioni della glicolisi sono servite a produrre 2 molecole di gliceraldeide-3fosfato attivate (perchè hanno il fosfato che le renderà in grado di

produrre energia). Di conseguenza metà della glicolisi è stata usata per attivare il glucosio e dividerlo in due triosi uguali. Ora siamo pronti per entrare nella fase 3, nelle ultime reazioni che recupereranno l'energia.

Reazione 6:

Reazione chiave della glicolisi. Il gliceraldeide-3-fosfato in presenza dell'enzima gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi. Le deidrogenasi sono enzimi della classe delle ossidoreduttasi, tra gli enzimi più importanti nel metabolismo. In presenza di glic-3fosf., dell'enzima deidrogenasi, di NAD (coenzima ossidato) e fosfato inorganico, in una reazione estremamente complessa il gruppo aldeidico della gliceraldeide viene ossidato a gruppo carbossilico. Questa ossidazione avviene in presenza di una molecola di H₂O presente nel citoplasma della cellula che cede il suo O. Contemporaneamente il NAD viene ridotto a NADH. Questa reazione di ossidazione è talmente esoergonica che permette di legare un fosfato inorganico, che si trova nel citoplasma, a questo gruppo carbossilico. E tutto ciò senza impiego di ATP. In questo caso non è un legame estere, ma un legame di tipo anidride. Si forma la molecola 1-3bifosfo-glicerato, una molecole con 3C e 2 fosfati legati, molecola altamente energetica. Questo legame ha contenuto energetico così elevato che nella prossima reazione porterà alla sintesi di ATP. E' un legame ad alta energia. La reazione è una esoergonica.

Reazione 7:

Abbiamo l'1-3bifosfo-glicerato. Ora interviene un'enzima chinasi, che trasferisce gruppi fosfato utilizzando ATP. Questa volta però non è l'ATP che cede il suo gruppo fosfato come nelle 2 chinasi viste in precedenza, ma è il fosfo-glicerato, che ha un fosfato così energetico da poterlo cedere all'ADP e quindi formare una molecola di ATP. La chinasi usa il magnesio. Quindi nella reazione 7 grazie alla presenza della molecola fosfo-glicerato ad altissimo contenuto energetico abbiamo formato il primo ATP della glicolisi. Questo tipo di fosforilazione si chiama fosforilazione a livello del substrato, perchè abbiamo un substrato altamente energetico contenente il gruppo fosfato che può essere utilizzato per formare ATP.

Riassumendo: l'1-3-difosfo-glicerato, in presenza di ADP, magnesio e l'enzima fosfo-glicerato chinasi porta alla formazione di una molecola di ATP con un meccanismo di fosforilazione a livello del substrato. Rimane una molecola che è il 3-fosfo-glicerato, scarica energeticamente perchè ha perso il suo fosfato ad alta energia, ma ha ancora un fosfato da spendere per la sintesi di ATP durante le ultime 3 reazioni.

Reazione esoergonica in vivo, reversibile, ma che procede spontaneamente verso il compimento.

Reazione 8:

Reazione catalizzata da un enzima mutasi, che sposta il gruppo fosfato dal C3 al C2. E' una reazione molto semplice di spostamento del fosfato dalla posizione 3 alla 2. Lo mette in una posizione energeticamente molto più favorevole per formare poi un composto ad alta energia (nella reazione successiva). Si passa da 3-fosfo-glicerato a 2-fosfo-glicerato. Anche questo enzima richiede magnesio come cofattore. Questi composti, che sono acidi, vengono indicati nella forma dissociata/ionizzata, come sali, perchè nell'ambiente intracellulare il gruppo carbossilico è ionizzato.

Reazione leggermente endoergonica ma il prodotto 2-fosfo-glicerato viene consumato dalla reazione 9 successiva, quindi l'equilibrio è sempre spostato a dx.

Reazione 9:

Reazione catalizzata dall'enzima enolasi. Di nuovo serve magnesio come cofattore. Enolasi toglie una molecola di H₂O (un OH e un H) dalla molecola 2-fosfo-glicerato, che diventa così fosfo-enol-piruvato. Si forma un doppio legame e il fosfo-enol-piruvato (molecola ad alta E). Il fosfato che si trova sul C2 del fosfo-enol-piruvato è un fosfato ad alta energia. Con la rimozione di una molecola d'acqua, la formazione di un doppio legame, e con la presenza di questa tautomeria cheto-enolica il fosfato legato al C2 è un fosfato ad alta energia. Di conseguenza questo fosfato sarà utilizzato per sintetizzare ATP.

Reazione 10:

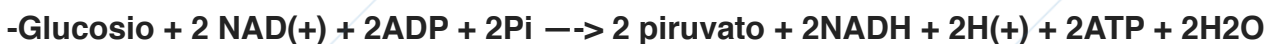
Reazione catalizzata dall'enzima piruvato chinasi, che in presenza di magnesio e ADP, catalizza il trasferimento del fosfato in C2 (del fosfo-enol-fosfato) sull'ADP formando ATP, e formando come prodotto finale di reazione e di glicolisi il piruvato. E' una reazione di fosforilazione a livello del substrato (perchè abbiamo un substrato altamente energetico con un legame così energetico che dalla sua idrolisi si può sintetizzare ATP). Il fosfo-enol-piruvato è un composto ad alta energia, il gruppo fosfato è legato con un legame altamente energetico alla molecola. Infatti, in vivo viene liberata talmente tanta energia che la reazione è fortemente esoergonica, irreversibile. Da la spinta finale a tutta la via metabolica, a tutta la glicolisi. Questo enzima è un'altra chinasi, ed è il terzo enzima deputato alla regolazione della via metabolica.

Quindi ci sono 3 punti di regolazione della glicolisi: a livello del primo enzima, l'esochinasi, a livello del terzo enzima, fosfo-frutto-chinasi1, e a livello dell'ultimo enzima piruvato-chinasi. Quindi è una via tenuta sotto strettissimo controllo, molto regolata.

Vediamo cosa produce questa via, che da glucosio a piruvato prende il nome di glicolisi anaerobica:

Prodotti della glicolisi anaerobica:

Siamo partiti da glucosio e siamo arrivati a 2 molecole di piruvato. Abbiamo utilizzato 2 coenzimi NAD ossidati, 2 molecole di ADP, 2 fosfati inorganici (nella r.5). Abbiamo prodotto 2 molecole di piruvato, 2 NADH, 2H⁺, 2 ATP, e 2 molecole di H₂O. Non abbiamo ancora perso atomi di C (avevamo 1 C₆ ed ora abbiamo 2 C₃). Di netto abbiamo ottenuto 2 ATP, ma in realtà se ne producono 4 (2 dalla reazione 10 della piruvato-chinasi e 2 dalla reazione 7 della glicerato-chinasi), però poi 2 le abbiamo consumate, per attivare il glucosio a glucosio-6-fosfato e per far passare il fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-difosfato. La glicolisi produce molto poco da un punto di vista energetico, ma la via è ancora molto lunga: alla fine dovremo arrivare a CO₂ e H₂O, e finora non abbiamo ancora ossidato il C in maniera definitiva a CO₂.



Siamo arrivati ad avere il piruvato.

Il destino del piruvato è molto diverso a seconda che sia presente O₂, quindi che venga usato ossigeno per ossidare i carboni a CO₂, oppure che non ci sia ossigeno. In presenza di O₂, il piruvato entrerà nel mitocondrio, andrà soggetto a reazioni nel ciclo di krebs che produrranno CO₂ dove verrà ossidato e che produrranno CO₂. I coenzimi ridotti prodotti nel ciclo di krebs andranno in catena respiratoria. In catena respiratoria finalmente produrremo l'energia necessaria sotto forma di ATP. Questo è il destino del piruvato nella maggior parte delle cellule. Però il piruvato può essere catabolizzato anche in assenza di ossigeno, ad es in microrganismi che hanno vie finali di fermentazione, che producono molteplici prodotti finali. Questa via senza ossigeno avviene anche negli eritrociti, che sono cellule senza nucleo e senza mitocondri, oppure nelle fibre bianche dei muscoli.

Composti fosforilati ad alta energia:

In glicolisi abbiamo visto 1-3-difosfoglicerato e il fosfo-enol-piruvato. Questi composti che hanno DeltaG di idrolisi del gruppo fosfato molto negativo, così negativo da essere superiore all'energia richiesta per fosforilare ADP a ATP, infatti dalla loro idrolisi è possibile fosforilare ADP e sintetizzare ATP. Sono composti che hanno il DeltaG di idrolisi del gruppo fosfato superiore a -30 kJ/mole, ovvero quelle che servono a sintetizzare ATP. I composti ad alta energia sono quelli responsabili poi della fosforilazione "a livello del substrato". Un altro composto ad alta energia è la fosfocreatina. La fosfocreatina è localizzata soprattutto nei muscoli, ed è una forma di riserva di fosfati ad alta energia che vengono utilizzati nel muscolo per sintetizzare ATP necessaria per la contrazione muscolare. La fosfocreatina è in grado di fosforilare ADP per formare ATP. La fosfocreatina quando viene idrolizzata diventa creatina. La creatina diventa creatinina.

Regolazione glicolisi:

Vediamo la regolazione dei 3 enzimi chiave che abbiamo già nominato: esochinasi, fosfo-frutto-chinasi e piruvato-chinasi.

Qualche utile richiamo:

Esistono molte possibilità per regolare l'attività enzimatica e la via metabolica alla quale l'enzima appartiene.

Isozimi:

Enzimi, isoforme enzimatiche che differiscono nella loro sequenza amminoacidica, nella loro localizzazione tissutale o subcellulare, nelle caratteristiche cinetiche e nelle proprietà regolatorie, ma che catalizzano la stessa reazione. Gli isozimi o isoenzimi sono quindi enzimi che catalizzano la stessa reazione chimica ma che presentano caratteristiche diverse. Sono un esempio di adattamento tissutale o cellulare a specifiche caratteristiche metaboliche.

Esochinasi: (isozimi)

L'esochinasi presenta diversi isozimi, distribuiti nei vari tessuti perché ogni tessuto ha esigenze metaboliche diverse di glucosio. Ad es nel cervello ci sono gli isozimi 1 e 3 caratterizzati da una elevata capacità di fosforilare il glucosio, utilizzano il glucosio molto in fretta. Altre cellule, come le cellule del fegato e le cellule β del pancreas hanno invece un ruolo omeostatico e di controllo: il fegato controlla la glicemia, mentre le cellule beta del pancreas sono responsabili della produzione dell'ormone insulina che abbassa la glicemia. Quindi fegato e pancreas lavorano insieme per regolare la concentrazione del glucosio in circolo e per mantenerla a una giusta concentrazione. Questi tessuti/cellule hanno l'isozima 4, chiamato glucochinasi. Questi isozimi hanno anche caratteristiche cinetiche diverse.

Esochinasi ha K_M piccolissima (0,1 molare), perché è l'enzima presente nei tessuti che hanno grande necessità di utilizzare glucosio, devono estrarlo il più possibile dal circolo sanguigno e usarlo anche quando le concentrazioni di glucosio sono basse, a digiuno. Quindi hanno elevatissima affinità e k_m molto bassa.

Glucochinasi:

Situazione inversa per la glucochinasi, che ha k_m altissima (fra 5 e 10 millimolare) perché è l'isozima del fegato, che deve poter smaltire il glucosio in eccesso. Quindi questo enzima deve saper funzionare anche con concentrazioni così elevate perché deve drenare il glucosio in eccesso.

La glucochinasi (isozima del fegato) è anche soggetta ad un altro meccanismo di regolazione: GK compartimentalizzazione. Quando c'è troppo glucosio si forma molto glucosio6fosfato e molto fruttosio6fosfato. Quando la concentrazione del fruttosio6fosfato è troppo elevata (e bisogna che la glicolisi rallenti o le reazioni a valle non riescono a smaltire tutto il fruttosio6fos) la glucochinasi viene sequestrata dentro al nucleo e viene legata a questa proteina di regolazione che la imprigiona e la tiene dentro al nucleo finché la concentrazione di fruttosio6fosfato non torna a livelli normali (finché non viene consumato dalle reazioni a valle). A questo punto la glucochinasi viene liberata dalla proteina di regolazione, torna nel citoplasma e riprende la sua attività enzimatica. Tutto questo si fa per evitare che si accumuli troppo fruttosio6fosfato che poi dovrebbe essere fosforilato, consumando ATP e portando al blocco di tutte le reazioni che seguono.

Fosfo-frutto-chinasi1 o PFK1:

Fosfo-frutto-chinasi1 o PFK: enzima chiave della regolazione. Ha una regolazione molto complessa. Ci sono diversi meccanismi di regolazione visto che è l'enzima più importante nella regolazione della glicolisi, ma noi ne vedremo uno. Questo enzima catalizza una reazione irreversibile. È la prima reazione obbligata della glicolisi. Ci sono 3 geni che catalizzano 3 tipi di subunità: L, M e P. La fosfo-frutto-chinasi1 è un tetramero, costituita da 4 subunità. Queste 4 subunità possono essere tutte di uno stesso tipo, ad es tutte M come nel muscolo, tutte L come nel fegato, oppure possono combinarsi in vario modo per formare il tetramero.

L'isozima che guardiamo nel dettaglio è l'isozima del fegato, che è anche quello più soggetto a regolazioni. Il fegato infatti è un organo omeostatico, oltre che sintetico di molte molecole, è anche deputato alla regolazione di molti processi.

Regolazione allosterica fosfo-frutto-chinasi1 o PFK1:

Gli enzimi allosterici sono enzimi che, oltre al sito attivo dove avviene la catalisi, presentano altri siti attivi dove si legano i regolatori allosterici attivatori o inibitori.

Gli **inibitori** allosterici della fosfo-frutto-chinasi1: ATP e citrato. Il citrato è un intermedio del ciclo di krebs.

Ci sono poi diversi **attivatori**: ADP e AMP e fruttosio2-6difosfato. Il fruttosio2-6difosfato è il principale attivatore/regolatore allosterico della molecola; è un segnale di abbondanza di glucosio. ATP invece è sia inibitore che un substrato, quindi è essenziale come substrato: a basse concentrazioni di ATP si lega al sito attivo dell'enzima insieme al fruttosio1-6difosfato, ma quando ce n'è troppo di ATP, cioè quando la cellula è ricca di energia e quindi la glicolisi deve rallentare (è inutile che consumi glucosio per produrre atp quando ce n'è già in abbondanza), l'ATP in questo caso si può anche legare al sito di regolazione comportandosi da inibitore, e rallenta l'attività dell'enzima facendogli assumere una conformazione meno affine ai substrati.

Ricordiamoci il ruolo degli attivatori e inibitori allosterici, che legandosi al loro sito di regolazione modificano la struttura 3 e 4 dell'enzima rendendolo più o meno affine al substrato, inibendo o stimolando la reazione.

La curva di saturazione è di tipo sigmoide, non la classica curva di Michaelis Mentel, infatti l'enzima è cooperativo e allosterico.

Quando l'enzima glucochinasi produce troppo glucosio6fosfato e di conseguenza si accumula fruttosio6fosfato, questo metabolita attiva un processo di compartimentalizzazione: la proteina regolatoria lega la glucochinasi e la sequestra all'interno del nucleo. Quando poi il fruttosio accumulato è stato smaltito e di conseguenza non c'è più glucochinasi, si accumula glucosio che favorisce il ritorno della glucochinasi nel citoplasma in modo che riprenda l'inizio della glicolisi. Tutto questo meccanismo di regolazione impedisce che si accumuli fruttosio6fosfato consumando inutilmente ATP quando le reazioni a valle non riescono a utilizzarlo. E' un meccanismo di regolazione a feedback, che sequestra la glucochinasi quando ha prodotto glucosio6fosfato e di conseguenza troppo fruttosio6fosfato.

Piruvato-chinasi o PK:

Ha isozimi tessuto-specifici. E' un enzima cooperativo e allosterico ed è regolata tramite fosforilazione/defosforilazione.

La piruvato chinasi è un tetramero (4 subunità). 2 geni: L e M. Il gene L produce due isozimi specifici, L (isozima del fegato) e R (dei globuli rossi). Sono entrambi enzimi allosterici sotto controllo ormonale. Vengono prodotti da un unico gene. Il gene M invece produce sempre due isozimi: l'isozima M1 (nei tessuti muscolari e cervello) non è regolato, non è un enzima allosterico e funziona ad alta velocità. L'isozima M2 (isozima fetale, delle cellule meno differenziate, che viene riattivato nelle cellule tumorali, poco differenziate). M2 non deve esserci nei tessuti adulti sani.

Regolazione allosterica della piruvato chinasi o PK:

Prevede un attivatore, il fruttosio1-6difosfato e un inibitore, l'ATP. Anche l'alanina è un inibitore della PK ma meno importante di atp. Il fruttosio1-6difosfato è anche intermedio della glicolisi, è il prodotto della reazione della fosfo-frutto-chinasi1. E' un attivatore della piruvato chinasi perchè così si stabilisce un collegamento metabolico tra le due parti importanti della glicolisi: la parte iniziale di attivazione e la parte finale di produzione di energia. Questo collegamento metabolico viene detto feed-forward, ed è un controllo che la parte iniziale della via metabolica esercita sulla parte finale: se viene prodotto molto fruttosio1-6difosfato questo intermedio va ad attivare l'ultimo enzima della via metabolica così che andando a ritroso vengano stimulate tutte le reazioni intermedie reversibili (attivando l'ultima reazione è come se creassimo una depressione lungo un condotto, e aspirando alla fine stimoliamo il flusso all'interno di esso). La reazione della piruvato chinasi, che è l'ultima ed è irreversibile in vivo, funziona da pompa, che una volta attivata trascina le altre reazioni intermedie verso la fine. Sposta tutti gli equilibri verso dx.

Regolazione piruvato-chinasi o PK per fosfo/defosforilazione:

Piruvato-chinasi è soggetta anche a regolazione mediante fosforilazione e defosforilazione.

L'enzima può essere fosforilato, diventando meno attivo, oppure defosforilato, diventando più

attivo. E' un meccanismo sotto controllo ormonale: l'enzima piruvato-chinasi viene fosfo/defosforilata in determinate condizioni metaboliche. La piruvato-chinasi viene fosforilata e resa inattiva quando c'è poco glucosio: poco glucosio è nelle cellule a disposizione per la glicolisi che quindi dovrà rallentare. Quando invece c'è molto glucosio in circolo che può entrare nelle cellule la glicolisi dovrà funzionare ad alta velocità e la piruvato-chinasi viene attivata defosforilandosi, togliendo il gruppo fosfato. Il gruppo fosfato viene staccato e riattaccato per rendere più o meno attivo l'enzima.

Piruvato-chinasi e fosfo-frutto-chinasi sono entrambe inibite da ATP, poichè entrambi sono enzimi di una via catabolica che deve produrre ATP come prodotto finale più importante: quando la cellula è ricca di ATP la via citoplasmatica che produce atp deve essere rallentata.

C'è anche da tenere conte della carica energetica cellulare, ovvero il rapporto tra le forme cariche di energia (ATP e ADP) e tutti i nucleotidi adenilici (compreso AMP che è la forma scarica). Questo valore che varia da 0 a 1 è un parametro molto importante per studiare e valutare lo stato energetico di una cellula. Nelle cellule normale attive è compreso tra 0,8 e 0,95. Quando scende al di sotto di 0,5-0,6 la cellula in genere non è più viva perchè non può più riformare atp.

2 aprile

Fermentazioni: cosa avviene quando non c'è ossigeno

Fermentazione lattica:

Le cellule tumorali in attivo accrescimento hanno glicolisi in assenza di ossigeno, le cellule al centro della massa tumorale sono in condizioni di ipossia (carenza di ossigeno) e sfruttano la glicolisi come fonte di energia. Quando invece il muscolo deve lavorare ad intensità metabolica elevatissima, come durante uno scatto di 100 metri, i muscoli risultano essere in carenza di O₂ perchè il sangue non riesce a rifornire adeguatamente le cellule di O₂ a causa della contrazione velocissima. In questo caso le cellule muscolari si trovano in condizioni di anossia o ipossia funzionale. Nei movimenti così, corti ma intensi, lavora soprattutto la componente bianca del muscolo. Questo tipo di metabolismo anaerobico si dice funzionale (perchè collegato alla funzione del muscolo).

Alcuni organismi invece si possono trovare in certi momenti della vita in mancanza di ossigeno nell'ambiente. Questo capita ad durante le basse maree, quando gli organismi marini sono esposti all'aria. Gli animali in questo caso sono in anarobiosi o anossia ambientale.

Tutte queste situazioni sono accomunate dalla reazione che chiude la glicolisi, ovvero la riduzione del piruvato a lattato, in presenza di una ossido-reduttasi chiamata lattato-deidrogenasi.

Questo enzima, in presenza del coenzima ridotto NADH, riduce il C2 e trasforma il gruppo carbonilico in un gruppo ossidrilico. La reazione in condizioni standard è spostata a dx, anche in vivo, ma non è irreversibile. Questa ultima reazione in mancanza di ossigeno è essenziale. Se non ci fosse quest'ultima reazione, l'enzima gliceraldeide3fosfato-deidrogenasi avrebbe trasformato tutto il NAD ossidato in NADH. Quest'ultima reazione, consumando il NADH rimette in gioco il NAD ossidato, che può essere così utilizzato di nuovo dall'enzima gliceraldeide3fosfato-deidrogenasi e può continuare la glicolisi. Quindi il significato dell'enzima lattico-deidrogenasi è di rimettere a disposizione della glicolisi il NAD ossidato. Si forma un ciclo metabolico tra la

gliceraldeide3fosfato-deidrogenasi e la lattico-deidrogenasi; in questo modo la glicolisi può continuamente funzionare. La lattato-deidrogenasi possiede isozimi, è un enzima tetrameric, con 4 subunità di 2 tipi: la subunità H e la M, codificate da 2 geni diversi. A seconda di come sono combinate tra loro le 2 subunità possiamo avere 5 isoenzimi diversi, localizzati in tessuti specifici.

Abbiamo LDH1 con 4 sub. H tipica di eritrociti, cuore, e reni. LDH5, con 4 sub. M è tipico del muscolo scheletrico, fegato. Poi abbiamo anche LDH2,3,4. Questo tipo di fermentazione, la fermentazione lattica, la troviamo nei lattobacilli, ma anche nel metabolismo di alcuni nostri tessuti (eritrociti, m. scheletrico, a livello vaginale). La fermentazione lattica è causa delle carie, perchè i lattobacilli si moltiplicano bene nella placca, e coinvolta nella preparazione di alimenti come yogurt, kefir, crauti.

Fermentazione alcolica:

Il piruvato può andare in contro a diversi tipi di fermentazioni (non solo la fermentazione lattica), ad es la fermentazione alcolica:

il piruvato prima viene decarbossilato dall'enzima piruvato decarbossilasi ad acetaldeide, perde il gruppo carbossilico che se ne va come CO₂. Poi l'acetaldeide viene ridotta dall'alcol deidrogenasi e si forma l'etanolo. Come la lattico-deidrogenasi, l'alcol deidrogenasi riossida il NADH e riforma il NAD che verrà poi usato dalla gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi per far funzionare la glicolisi.

Fermentazioni del rumine:

L'ambiente ruminale è molto particolare, virtualmente anaerobico o fortemente ipossico (carenza di ossigeno), quindi favorevole a sviluppo di microorganismi che non amano l'ossigeno. È un ambiente a pH acido (6-6.5) perché i prodotti delle fermentazioni sono acidi, a temperatura elevata. Tutto ciò favorisce la fermentazione, metabolismi anaerobici. Il rumine è popolato da una ricca microflora, con miliardi di batteri per cm cubo, i principali protagonisti delle fermentazioni. Ci sono anche protozoi (milioni per cm cubo) e ficomiceti (migliaia per cm cubo). I ficomiceti sono l'8% dei microorganismi ruminanti, importanti per la degradazione dei vegetali. Queste popolazioni vivono in equilibrio fra di loro. Ognuna di queste specie è altamente specializzata sia per l'utilizzo di determinate sostanze che per la produzione di specifici prodotti finali delle fermentazioni. Le principali specie sono strettamente dipendenti nel loro numero dal tipo di alimentazione.

Il microbiota intestinale è molto suscettibile al tipo di alimentazione, e può essere modificato a seconda di quello che mangiamo.

I polisaccaridi di origine vegetale principali sono cellulosa e amido. La flora dei ruminanti possiede tutti gli enzimi idrolitici per degradarle e trasformarle in monosaccaridi: enzima alfa-amilasi, beta-cellulasi, pectine, ecc. I monosaccaridi alla fine convergono tutti sul glucosio, che può essere glucosio tale e quale quando deriva da cellulosa o da amido, ma possono essere anche forme fosforilate del glucosio (che non sempre sono glucosio-6-fosfato, ma spesso è glucosio-1-fosfato), e in questo caso delle isomerasi lo trasformano in fruttosio-6-fosfato. Da qui in avanti la glicolisi è come al solito e si arriva al piruvato. Dal piruvato si avranno molti prodotti finali, a seconda della specie batterica. I prodotti finali delle fermentazioni del rumine sono 5: CO₂ e metano, prodotti dai metanobatteri (fino a 1000 L di gas al giorno), e le molecole di acetato (2C), propionato (3C), butirato (4C), che sono degli acidi grassi volatili. I batteri del rumine poi producono anche amminoacidi e vitamine. Si stabilisce una simbiosi tra i microorganismi e l'organismo che li ospita. Questi prodotti finali (soprattutto acetato, propionato e butirato), che sono scarti metabolici della microflora ruminale, vengono riutilizzati dal ruminante e diventano substrati per il suo metabolismo, perché entreranno nel ciclo di Krebs. Si crea un circolo di riutilizzo degli scarti, gli scarti dei microorganismi del rumine diventano substrati metabolici per la sopravvivenza dell'organismo che li ospita. I principali prodotti delle fermentazioni sono: acido acetico (60-70%), acido propionico (20-30%) e acido butirrico (10%) con aceto-batteri che producono acido acetico, i propionobatteri che producono acido propionico e butirrobatteri che producono acido butirrico.

Approfondimento fosfocreatina, creatina e creatinina:

L'enzima che trasforma la creatina in fosfocreatina e viceversa si chiama creatina chinasi, e appunto fosforila la creatina in presenza di ATP e forma la fosfocreatina, e viceversa, quando c'è tanta fosfocreatina, che è la sostanza di riserva di energia nel muscolo oltre all'ATP, l'enzima trasforma fosfocreatina in creatina e forma ATP. Inoltre, dalla creatina si può ottenere anche creatinina, che non è altro che il prodotto della degradazione spontanea della creatina. È una reazione spontanea che trasforma creatina in creatinina; la quantità di creatinina che si produce è proporzionale alla massa muscolare, e avviene a velocità costante. Un'uomo adulto produrrà più creatinina di un bambino o di una donna. La creatinina quindi si ritrova nel sangue, poi viene filtrata dal rene e si ritrova nelle urine. La quantità di creatinina che troviamo in circolo e nelle urine è un importante indice della funzionalità del rene: se c'è un aumento possiamo sospettare un danno alla funzionalità renale e alla filtrazione del glomerulo.

20 aprile

In presenza di ossigeno:**Decarbossilazione del piruvato**

Complesso della piruvato deidrogenasi (PDH).

Vediamo ora l'ingresso del piruvato nel mitocondrio e la sua decarbossilazione ad acetil-coA.

Ricordiamoci che mentre la glicolisi è una via citoplasmatica, le restanti reazioni avvengono nel mitocondrio.

Per prima cosa il piruvato deve entrare nel mitocondrio. Il mitocondrio è una struttura estremamente complessa, possiede due membrane che la separano dalla cellula, una esterna più facilmente permeabile perchè ha diversi tipi di trasportatori, e una interna che ha una struttura ondulata, a creste. Sulla membrana interna il piruvato incontra un trasportatore specifico MPC, che trasporta il piruvato nella matrice mitocondriale. Nella matrice mitocondriale il piruvato viene subito catturato dall'enzima piruvato deidrogenasi che lo trasforma in acetil-coA. Acetil-coA entrerà poi nel ciclo di krebs, nel cuore del metabolismo ossidativo.

La molecola del piruvato la dobbiamo saper riconoscere e sapere riprodurre. E' un composto a 3C, contiene 1 metile, 1 gruppo chetonico centrale e un gruppo carbossile terminale. Dal piruvato si ricavano molte altre molecole, lattato, etanolo, alanina, acetil-coA...

Come si ottiene acetilcoA? Dopo la reazione catalizzata dalla piruvato deidrogenasi si perde un'unità carboniosa sotto forma di CO₂, quindi il piruvato è stato decarbossilato. E' la prima reazione di decarbossilazione che vediamo nel metabolismo. Con la decarbossilazione viene tolto un gruppo carbossilico sotto forma di CO₂. Lo scopo finale del metabolismo ossidativo è l'ossidazione delle molecole organiche a CO₂ e H₂O, quindi iniziamo a vedere prodotti finali.

Siamo partiti da una molecola di glucosio, abbiamo prodotto 2 molecole di piruvato, e adesso abbiamo tolto 2 atomi di C sotto forma di CO₂. Stiamo iniziando a ossidare la grande molecola di glucosio che era entrata nella cellula all'inizio. (Ossidare significa anche aggiungere ossigeno al carbonio). Decarbossilazione con ossidazione, quindi con anche aggiunta di ossigeno.

All'acetile è stato aggiunto del coA mediante un legame energetico: la molecola del piruvato è stata trasformata in acetile e attivata come acetil-coA. La reazione è molto complessa perchè sono coinvolti 5 coenzimi, e la reazione è catalizzata dal complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi che è composto da 3 diverse attività enzimatiche. E' una reazione che procede in vivo con una forte liberazione di E, è fortemente esoergonica, perchè da la spinta alla prossima fase ossidativa del ciclo di krebs. Queste molecole vengono come portate su una collina di energia potenziale dalla quale poi si parte verso le reazioni successive grazie alla spinta di questo DeltaG così negativo. 5 coenzimi partecipano a questa reazione così complessa (CoA, NAD, FAD, acido lipoico, tiamina pirofosfato) e 3 enzimi che ripetendosi formano un complesso enorme di più di 100 subunità. Questo complesso è come un enorme fabbrica dove entra piruvato, entrano i vari coenzimi ed esce acetil-coA. Questi 3 enzimi/attività enzimatiche cosa fanno?:

La prima è la piruvato deidrogenasi, che in realtà è una decarbossilasi, che ha come coenzima una tiamina pirofosfato e serve a togliere la CO₂ al piruvato. La piruvato deidrogenasi catalizza la decarbossilazione del piruvato in presenza del coenzima tiamina pirofosfato (vitamina B1) ed è il classico coenzima delle reazioni di decarbossilazione. Il secondo enzima, che occupa la parte centrale del complesso, ha come coenzima l'acido lipoico, che è legato fisicamente nel sito attivo dell'enzima. Questo enzima lega l'acetile al coenzima A. Acetil-coA poi uscirà dal complesso e andrà nel ciclo di krebs. Il terzo enzima contiene i due coenzimi NAD e FAD, che servono per riossidare l'acido lipoico. Ricordiamoci che FAD e NAD sono entrambi coenzimi delle reazioni di ossido-riduzione, ma c'è una differenza fondamentale nel loro meccanismo e funzionamento: FAD è un vero e proprio gruppo prostetico legato fisicamente all'enzima, mentre il NAD è un trasportatore mobile di atomi di H, quindi si muove all'interno della cellula, che sia citoplasma o matrice mitocondriale. Questi atomi di H vengono chiamati anche potere riducente poichè vengono usati nelle redox e sono in grado di ridurre altre molecole.

Il piruvato decarbossilato dal primo enzima viene poi passato al secondo enzima, legato all'acido lipoico e poi viene trasferito al CoenzimaA sotto forma di acetil-coA. L'ultimo enzima torna a riossidare l'acido lipoico, tramite un passaggio abbastanza complesso di atomi di H prima al FAD e poi al NAD.

Coenzimi:

La tiamina pirofosfato è il coenzima delle reazioni di decarbossilazione. Contiene all'interno un anello tiazolico (parte attiva della tiamina). La tiamina è anche chiamata vitamina B1. Infatti le vitamine idrosolubili sono essenziali poiché coenzimi di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo. L'acido lipoico presenta come gruppo acido il gruppo carbossilico, mentre la parte attiva è data da 2 gruppi SH, gruppi molto importanti poiché o vengono usati dalle proteine per fare ponti disolfuro per stabilizzare la struttura (ruolo strutturale), oppure, quando sono presenti in queste piccole molecole come l'acido lipoico, hanno importante funzione antiossidante perché vengono ceduti a molecole ossidate per ridurle. Questi gruppi SH hanno la caratteristica di alternarsi tra forma ridotta e forma ossidata quando perdono gli atomi di H (il loro potere riducente). L'acido lipoico è coinvolto nel secondo enzima, diidrolipoil transacetilasi che trasferisce l'acetile al CoenzimaA, e l'acido lipoico si alterna tra forma ossidata e ridotta.

L'ultimo coenzima è il CoenzimaA, che ha struttura estremamente complessa: contiene nella sua struttura un ADP, la vitamina idrosolubile B3(acido pantotenico), e il gruppo reattivo SH, che è l'unica parte reattiva della molecola che legherà l'acetile. CoenzimaA è il trasportatore classico di gruppi acili, lo incontreremo quindi anche nella ossidazione dei lipidi/acidi grassi, e li trasporta in forma attivata (il legame con il gruppo SH attiva la molecola) per far poi partecipare al metabolismo la molecola.

Perché il CoenzimaA ha questa struttura così grande e complessa ma solo un piccolo pezzo reattivo? A cosa servono gli altri pezzi che la compongono?: il CoenzimaA contiene un ADP, poi un lungo braccio mobile che contiene acido pantotenico (vitamina B3), e un piccolo pezzettino con alla fine un gruppo reattivo SH. I nucleotidi adenilici all'interno della struttura dei coenzimi (anche in FAD/FADH e NAD) sono le parti che vengono riconosciute dagli enzimi. Il gruppo adenilico viene afferrato dall'enzima.

Perché è necessario tutto questo complesso multienzimatico? E' necessario perché intanto un solo enzima non è in grado di affrontare una serie di reazioni così complesse, e inoltre questi diversi enzimi uniti nel complesso evitano la dispersione degli intermedi delle varie reazioni, facilita il passaggio degli intermedi da un enzima all'altro. Quindi, il complesso serve per affrontare reazioni così difficili che un enzima da solo non può svolgere, e per facilitare il passaggio degli intermedi da un enzima all'altro.

Come viene regolata la reazione?

Una reazione così complessa ha anche una regolazione complessa. Ha regolazione di tipo allosterico. Il complesso multienzimatico è inibito dai suoi prodotti: acetil-coA e NADH. Inoltre è inibita anche da ATP, che non è direttamente un prodotto della reazione, ma è il prodotto del catabolismo ossidativo. Molti enzimi del catabolismo ossidativo sono inibiti da ATP e attivati dalle forme scariche (come AMP o ADP) e dai reagenti che sono il CoenzimaA e il NAD. Quindi dalle forme scariche di energia e di potere riducente c'è attivazione, mentre le forme cariche, NADH e ATP inibiscono il metabolismo ossidativo. Inoltre la piruvato deidrogenasi è anche regolata da meccanismi di fosforilazione/defosforilazione. l'enzima viene inattivato quando fosforilato (in presenza di molto ATP), mentre viene riattivato per defosforilazione.

23 aprile

Ciclo di krebs

Proseguiamo con il nostro processo di degradazione del glucosio: glucosio \rightarrow piruvato \rightarrow piruvato entra nel mitocondrio \rightarrow Acetil-coA. Acetil-coA entra in una serie di 8 reazioni cicliche localizzate nella matrice mitocondriale.

Dove:

Matrice mitocondriale.

Perchè:

È il cuore del metabolismo ossidativo, la parte centrale su cui convergono tutte le vie di degradazione dei nostri nutrienti.

Delle 8 reazioni cicliche del ciclo di krebs, la metà sono reazioni di ossidazione: continuiamo col processo di ossidazione della materia organica che ci permetterà di ricavare dei coenzimi ridotti che andranno in catena respiratoria. In una di queste 8 reazioni viene prodotto anche un GTP. La resa energetica del ciclo di krebs è molto più alta della glicolisi (che produceva solo 2 ATP): per ogni giro del ciclo di krebs vengono prodotte 12 ATP. Dopo il ciclo di krebs ci sarà la catena respiratoria dove andranno a scaricare il potere riducente tutti i coenzimi ridotti, e avverrà la sintesi degli atp di prima mediante la fosforilazione ossidativa.

Tutto questo avviene nella matrice del mitocondrio, ecco perchè il mitocondrio è considerato la centrale energetica della cellula.

Si formano 3NAD ridotti e 1FAD ridotto, quindi avvengono 4 importanti reazioni di ossidazione e la formazione di 1GTP.

Vediamo nel dettaglio queste reazioni:

Reazione 1:

Con enzima citrato sintasi, che non richiede idrolisi di ATP ma idrolisi di legame: l'energia deriva dalla rottura del legame tioestere dell'Acetil-coA. Unione dell'Acetil-coA con ossalacetato (il prodotto finale del ciclo). L'ossalacetato è un composto a 4C, bicarbossilico (2 gruppi carbossilici terminali). Ossalacetato ha C2 gruppo carbonilico. Ossalacetato reagisce con l'Acetil-coA a formare citrato, con la citrato sintasi come enzima. Citrato ha 6C, è tricarbossilico, in testa Acetil-coA, sotto ossalacetato, gruppo carbonilico diventa ossidrilico grazie a ingresso di H₂O. Viene rotto un legame altamente energetico e l'energia che si libera da questa idrolisi rende la reazione fortemente esoergonica. L'enzima è una sintasi in quanto non richiede idrolisi di ATP (non una sintetasi), l'energia infatti deriva dall'idrolisi di questo legame.

Reazione 2:

Catalizzata dall'enzima aconitasi. Da citrato si ottiene isocitrato. È una reazione semplice: c'è solo lo spostamento del gruppo OH dal C3 al C5. Sono stati semplicemente invertiti i due gruppi, sono isomeri. Il gruppo OH viene spostato in una posizione energeticamente più favorevole per la reazione successiva, che sarà una reazione di ossidazione molto importante. Reazione molto endoergonica in vivo, ma avviene poiché l'equilibrio viene spostato dalla reazione successiva che invece è molto esoergonica.

Reazione 3:

Reazione catalizzata dalla isocitrato deidrogenasi. Inizia la serie di ossidoriduzioni. È una decarbossilazione ossidativa, poiché viene tolto un gruppo carbossilico (si perde CO₂), e c'è un'ossidazione su un'atomo di C (simile a quella che abbiamo visto quando il piruvato è diventato acetil-coA). 2 atomi di H vengono staccati dall'isocitrato e portati sul NADH. È una decarbossilazione ossidativa con formazione di un coenzima ridotto NADH. Viene prodotto l'alfa-cheto-glutarato, a 5C, e non 6C perchè abbiamo perso 1C come CO₂. Quindi si perde CO₂ e si forma NADH (primo coenzima ridotto). Il prodotto è alfa-cheto-glutarato. In vivo esoergonica. Ossidazione dell'isocitrato ad alfa-cheto-glutarato

Quindi nelle prime 3 reazioni: abbiamo formato citrato (1), trasformato in isocitrato (2) e abbiamo fatto la prima decarbossilazione ossidativa (3).

27 aprile

Ricordiamoci che il prodotto finale del catabolismo è l'ossidazione della materia organica a CO₂ e H₂O. (Un'altra CO₂ l'abbiamo vista con la decarbossilazione ossidativa del piruvato)

Reazione 4:

Procediamo con le reazioni di ossidazione e decarbossilazione. Siamo nel cuore del catabolismo ossidativo. E' una reazione di decarbossilazione ossidativa, che trasforma alfa-cheto-glutarato a 5C in succinil-coA a 4C. Reazione complessa, simile a quella della piruvato deidrogenasi, infatti l'enzima è l'alfacheto-glutarato deidrogenasi, che ha struttura molto simile alla piruvato deidrogenasi: è un grande complesso che contiene 3 attività enzimatiche con i 5 coenzimi.

Reazione procede per tappe all'interno di questo grande complesso enzimatico: prima avviene decarbossilazione, poi avviene il legame al CoA e si forma succinil-coA, e poi avviene formazione del coenzima ridotto. Reazione fortemente esoergonica, in vivo irreversibile. Si forma il secondo coenzima ridotto NADH. Parte dell'energia viene conservata nel legame tioestere del coenzimaA con succinile.

Reazione 5:

Catalizzata da enzima succinil-coA sintetasi (ci sarà trasferimento energetico). Succinil-coA, in presenza di GDP e fosfato, l'energia contenuta nel legame tioestere, al momento dell'idrolisi per formare il succinato, E viene raccolta per formare GTP. Si forma un nucleotide ad alta energia. GTP potrà trasferire il suo legame altamente energetico all'ADP che diventerà ATP. Si stacca il coA. L'energia che si era liberata dall'ossidazione della reazione precedente e che si era conservata in questo legame altamente energetico viene liberata e conservata nel legame altamente energetico del GTP. Questo tipo di formazione di legami altamente energetici si chiama fosforilazione a livello del substrato, perchè c'è un substrato altamente energetico che viene idrolizzato a favore della sintesi di un nucleotide trifosfato.

Si forma succinato, acido bicarbossilico con 4C e questa reazione è leggermente esoergonica in vivo ma facilmente reversibile.

Finora abbiamo perso 2 CO₂, formato 2 NADH (NAD ridotti) e un nucleotide trifosfato (ATP).

Reazione 6:

Enzima succinato deidrogenasi. Proseguiamo con le reazioni di ossido riduzione. E' una reazione di deidrogenazione. 2H vengono trasferiti al coenzima FAD che si riduce (si forma FADH₂), si forma un doppio legame tra i 2 atomi di C 2, e 3 e si forma fumarato.

Parentesi:

I coenzimi trasportatori di potere riducente del metabolismo sono NAD e FAD. Questi coenzimi trasportano entrambi atomi di H, ma lavorano con le loro deidrogenasi in modo diverso: NAD è un trasportatore mobile/libero, mentre il FAD (coenzima flavinico, flavin-adenin-dinucleotide) è legato all'enzima, è un gruppo prostetico fisso legato all'enzima. I due coenzimi hanno modalità di funzionamento diverso.

L'enzima succinato deidrogenasi lo incontreremo di nuovo: è l'unico enzima del ciclo di krebs non localizzato nella matrice, ma è legato alla membrana mitocondriale interna. Lo vedremo nella catena respiratoria. La reazione è all'equilibrio in vivo, può funzionare in entrambi i sensi. Si forma il terzo coenzima ridotto, e la molecola è sempre più ossidata, sta perdendo atomi di H.

Reazione 7:

Reazione di idratazione: aggiunta di H₂O al doppio legame (sui 2 atomi di C). Enzima è fumarasi che trasforma fumarato in L-malato (isomero levogiro, OH a sinistra). C'è perdita del doppio legame, ossidrilico sul C2 e atomo di H sul C3. E' stata aggiunta H₂O al doppio legame. Reazione moderatamente esoergonica in vivo. Però gli equilibri si possono spostare modificando le concentrazioni di reagenti e prodotti.

Reazione 8:

Reazione che chiude il ciclo. Catalizzata da malato deidrogenasi, che in presenza di NAD toglie i 2H sul C2 e forma NAD ridotto, e inserisce il gruppo carbonilico/chetonico e si forma ossalacetato (molecola che all'inizio si era unita ad Acetil-coA per formare citrato). Abbiamo formato il terzo e ultimo NAD ridotto del ciclo. Reazione fortemente endoergonica in vivo, che sembrerebbe un

blocco al ciclo, perchè in vivo potrebbe avvenire solo in presenza di E. In realtà l'equilibrio è talmente spostato a dx dal fatto che le concentrazioni di ossalacetato sono tenute bassissime. Di conseguenza, il fatto che l'ossalacetato come si forma viene subito consumato dalla reazione successiva del ciclo di krebs fa sì che l'equilibrio venga spostato a dx, verso il compimento. L'enzima malato deidrogenasi ha altissima specificità di substrato perchè lavora solo con l'isomero L, ha il sito attivo finemente stereospecifico.

Bilancio del ciclo di krebs:

Per ogni AcetilCoA che entra nel ciclo si formano: 2 molecole di CO₂ (reazioni 2-3), passando da 6C del citrato ai 4C dell'ossalacetato. Vengono prodotti 3 NAD ridotti (NADH) (reazioni 1-3-8), 1 FAD ridotto (FADH₂) nella reazione 6, e 1 GTP (reazione 5). Produce molti più coenzimi ridotti rispetto alla glicolisi. Questi coenzimi ridotti andranno in catena respiratoria per la produzione di grandi quantità di ATP.

(Entra un C₂ che si unisce all'ossalacetato formando citrato (C₆). Dal citrato C₆ si perdono 2 molecole di CO₂, quindi si ritorna ad un C₄; se ne va il coenzimaA che era legato all'acetil-coA)

Prodotti ciclo di krebs: 2 CO₂, 3 NADH, 1 FADH₂, 1 GTP

Regolazione ciclo di krebs:

Il ciclo di krebs è regolato da 2 fattori fondamentali: il livello energetico nella cellula e il potere riducente. Il livello energetico/ carica energetica della cellula è il rapporto tra ATP (che inibisce gli enzimi) e ADP (che li attiva). La carica energetica cellulare fa riferimento allo stato di energia della cellula: se la cellula è ricca di ATP la via catabolica viene rallentata e saranno stimulate le vie anaboliche che costruiscono molecole, mentre se c'è poco ATP, e quindi aumenta ADP o AMP, la via catabolica viene attivata. Il potere riducente invece corrisponde a quanti coenzimi ridotti ci sono, è il rapporto tra NADH/NAD. NAD ridotto (alto potere riducente) blocca la via catabolica, mentre poco NADH e molto NAD (basso potere riducente) attiva la via catabolica.

Il ciclo di krebs non ha solo ruolo catabolico, ma ha anche un ruolo anabolico, infatti si dice che ha natura anfibolica. Il ruolo anabolico lo vedremo più avanti.

Riassuntino generale:

Abbiamo visto la glicolisi nel citoplasma. Abbiamo visto il destino del piruvato, che in assenza di ossigeno va incontro a fermentazioni, mentre in presenza di O₂ il piruvato entra nel mitocondrio col suo trasportatore e viene catturato dal grande complesso della piruvato deidrogenasi. Quindi siamo nella matrice mitocondriale. Abbiamo formato Acetil-coA che entra nel ciclo di krebs. La maggior parte degli enzimi visti fino ad ora sono enzimi polimerici, e quindi soggetti a regolazioni. Si tratta di tutte reazioni finemente regolate.

Approfondimento Aconitasi:

Aconitasi: enzima che trasforma citrato in isocitrato, del ciclo di krebs localizzato nella matrice mitocondriale. Esiste anche una forma citoplasmatica di questo enzima, che oltre la sua funzione di aconitasi, ha anche un'altra funzione che abbiamo già visto, in quanto aconitasi citoplasmatica è anche una proteina che regola il metabolismo del ferro (già incontrata con il nome di IRP nella regolazione traduzionale della ferritina). Quindi l'aconitasi ha un doppio ruolo nel citoplasma: enzima che lavora col citrato e proteina che regola il metabolismo del ferro.

Approfondimento composti del fluoro e metabolismo dei carboidrati:

Il fluoro, alogeno, inibisce due enzimi della glicolisi: enolasi e piruvato chinasi. Ma alcuni composti organici del fluoro, come ad es fluoro-acetato sono molto tossici in quanto inibiscono il ciclo di krebs. Fluoro-acetato entrato all'interno della cellula viene metabolizzato come fosse un acetato, quindi diventa fluoro-acetilCoA, si unisce con l'ossalacetato ed entra nel ciclo di krebs, dove agisce da inibitore sia della citrato sintasi che dell'aconitasi bloccando completamente il ciclo di krebs e il metabolismo ossidativo. Fluoro-acetato è presente in alcune foglie di piante come l'astragalò, pesticida naturale contro gli erbivori.

Fluoro-acetato di sodio (conosciuto come 1080) è un potente pesticida che appartiene alla categoria degli organo-fluorurati. Estremamente tossico. Usato anche per proteggere le coltivazioni

dagli erbivori selvatici e per proteggere gli animali dai predatori (lupi, volpi, coyote). In Australia veniva usato per sterminare le popolazioni di conigli che non erano autoctone e che non avendo trovato predatori si sono moltiplicate tantissimo.

28 aprile

Beta ossidazione degli acidi grassi

Dove:

Localizzazione intracellulare all'interno del mitocondrio, nella matrice mitocondriale. Il cuore del metabolismo ossidativo è intramitocondriale.

Perchè:

La funzione di questa via è il catabolismo ossidativo degli acidi grassi, ricavare energia dagli acidi grassi.

Come:

Gli acidi grassi sono molecole molto monotone, lunghe catene alifatiche CH-CH₂ con un gruppo carbossilico finale CH₃. Per catabolizzarle vengono divise in piccole unità carboniose di Acetil-coA e fatte entrare nel ciclo di krebs. E' una via catabolica molto semplice. Gli acidi grassi essendo molecole molto ridotte sono ricche di potere riducente, quindi si produrranno molti coenzimi ridotti e di conseguenza molta ATP. L'Acetil-coA prodotto entra nel ciclo di krebs, i coenzimi vanno in catena respiratoria e si produce ATP mediante fosforilazione ossidativa.

Abbiamo trigliceridi di origine alimentare, glicerolo + 3 acidi grassi. I trigliceridi vengono assorbiti a livello intestinale e assemblati sotto forma di grosse molecole chiamate chilomicroni. I chilomicroni in circolo giungono agli organi periferici. Vengono catturati da recettori di membrana di alcuni tipi di cellule: cellule muscolari, epatiche (perchè nel fegato avviene la maggior parte del metabolismo degli acidi grassi) e adipociti. Gli adipociti sono cellule di deposito dove i trigliceridi vengono depositati in vescichette, e quando necessario i trigliceridi vengono idrolizzati: si staccano gli acidi grassi e vengono rimessi in circolo, trasportati dall'albumina ai tessuti periferici (poichè lipofili e non possono circolare liberi), dove vengono utilizzati a scopi catabolici.

1) Attivazione acidi grassi:

Acidi grassi entrano nelle cellule e a livello citoplasmatico vengono attivati per entrare nel mitocondrio e andare incontro a beta ossidazione. Un substrato energetico, per entrare nelle vie cataboliche deve essere attivato. Come avviene l'attivazione? Azione catalizzata dall'enzima Acil-coA sintetasi che in presenza di ATP lega l'acido grasso al CoA. L'attivazione degli acidi grassi è molto endoergonica, richiede molta energia derivante da ATP, servono 2 legami altamente energetici: l'ATP viene idrolizzato a AMP e pirofosfato, e il pirofosfato verrà poi ulteriormente idrolizzato dall'enzima pirofosfatasi inorganica a 2 fosfati inorganici. L'attivazione dell'acido grasso consiste nel legarlo al coenzimaA, che è il trasportatore di acili in forma attivata. Il gruppo sulfidrilico SH è la parte reattiva del CoenzimaA che lega l'acido grasso a livello del gruppo carbossilico tramite un legame altamente energetico. Quindi alla fine vengono consumati 2 legami altamente energetici per l'attivazione dell'acido grasso. L'acido grasso attivato prende il nome di Acil-coA. La prima tappa della beta ossidazione è quindi l'attivazione dell'acido grasso nel citoplasma.

2) Ingresso acido grasso nel mitocondrio:

L'acido grasso ora deve entrare nel mitocondrio. L'ingresso è complesso poichè il mitocondrio ha due membrane da passare: mentre la membrana esterna è abbastanza permeabile, quella interna è invaricabile per la maggior parte delle molecole, ed è quella dove avverranno i processi della fosforilazione ossidativa, ed è una struttura altamente regolata. Per fare entrare gli acidi grassi dal citoplasma alla matrice mitocondriale è necessario un sistema di trasporto estremamente complesso.

L'Acil-coA nel citoplasma viene trasferito da una transferasi a una molecola di trasporto, la carnitina. La carnitina con legato l'acido grasso passa la membrana esterna ed entra nello spazio tra le due membrane, nella matrice mitocondriale. L'Acil-coA-carnitina ora deve cedere l'acido grasso a cui è legata al CoenzimaA che si trova dentro la matrice mitocondriale. A questo punto, una seconda transferasi sulla membrana mitocondriale interna trasferisce l'acido grasso dalla

carnitina al CoA che si trova dentro al mitocondrio. Si forma di nuovo l'Acil-coA che poi entrerà nella beta ossidazione.

Il CoA viene perso nel citoplasma quando l'acido grasso è legato alla carnitina, poi viene ripreso nella matrice mitocondriale quando l'acil carnitina cede il suo acido grasso al CoA che è dentro al mitocondrio, un CoA intramitocondriale.

Vediamo come esempio la beta ossidazione dell'acido palmitico, acido grasso saturo a 16C. Acido grasso legato al CoenzimaA. Dopo 4 reazioni cicliche di beta ossidazione otteniamo un acido grasso con 14C, e gli ultimi 2C dal lato del carbonile diventano AcetilcoA. Le 4 reazioni hanno ossidato il carbonio in beta, carbonio che all'inizio è ridotto, lega dell'H, mentre alla fine è ossidato. Ci saranno reazioni di ossido-riduzione che porteranno alla formazione di coenzimi ridotti, verranno tolti degli atomi di H e al loro posto ci sarà O.

Come avvengono le 4 reazioni:

Reazione 1:

Partiamo dall'acido palmitico a 16C. Reazione di deidrogenazione, togliamo atomi di H. Catalizzata da enzima deidrogenasi FAD dipendente. Si forma tra il C-beta e C-alfa un doppio legame, perchè abbiamo tolto 2H che sono stati trasferiti sul FAD. FAD è diventato FADH₂. Deidrogenazione con formazione di doppio legame. Enzima FAD dipendente.

Reazione 2:

Reazione di idratazione, enzima idratasi. Addizione di H₂O al doppio legame. Ora dobbiamo far entrare ossigeno perchè dobbiamo ossidare. Lavoriamo sempre tra C-alfa e C-beta.

Reazione 3:

Seconda reazione di deidrogenazione, NAD dipendente. Togliamo i 2H con un'altra deidrogenasi NAD dipendente. Si forma un NAD ridotto e ossidiamo il C-beta, sul C-beta appare il gruppo carbonilico.

Reazione 4:

Reazione di tiolisi, distacco di Acetil-coA e di acido grasso con 2C in meno, da 16C a 14C: dobbiamo staccare la parte finale di Acetil-coA. L'enzima tiolasi fa entrare il CoA che si legherà dove c'era il C-beta, si stacca Acetil-coA e rimane un acido grasso con 2C in meno, quindi 14C invece che 16C. Il CoA stesso stacca il legame tra carbonio carbonilico in beta e il carbonio in alfa, scinde questo legame e si porta via l'Acetil-coA.

A questo punto si riprende il ciclo delle 4 reazioni: avremo una nuova deidrogenazione tra alfa e beta, una idratazione, una seconda deidrogenazione e una tiolisi con distacco di un altro Acetil-coA e la formazione di un acido grasso a 12C. Poi si riprende fino ad avere 10C, 8C ecc. L'ultimo ciclo presenta un acido grasso a 4C che poi vengono divisi in 2 Acetil-coA. Dopo 7 cicli di beta ossidazione con un acido grasso con 16C abbiamo 8 AcetilcoA. Per ogni ciclo formiamo 1 FAD ridotto (tot. 7 FAD) e 1 NAD ridotto (tot. 7 NAD) e 7H⁺. Gli Acetil-coA entrano nel ciclo di krebs, e per ogni Acetil-coA che entra nel ciclo si producono 3 NAD ridotti, 1 FAD ridotto e 1GTP (molti coenzimi ridotti). Il bilancio finale di ATP sarà quindi molto elevato. I cicli sono sempre tanti quanti gli atomi di C : 2, -1.

Cosa succede agli acidi grassi dispari e agli acidi grassi insaturi? Con un acido grasso dispari, all'ultimo ciclo avremo 5C invece che 4C. Facciamo la reazione di tiolisi, e da una parte ci troviamo un Acetil-coA (acetile con 2C), e dall'altra parte un acido grasso a 3C che è il propionato (visto nelle fermentazioni del rumine). L'acido propionico sarà legato ad un CoA, quindi diventerà un propionil-CoA. Il propionil-CoA può entrare nel ciclo di krebs solo dopo carbossilazione, e dopo una serie di 2 reazioni diventa metil-malonil-CoA e poi succinil-CoA. Questo è un sistema che utilizzano i ruminanti per utilizzare i prodotti delle fermentazioni del rumine. Quindi, dagli acidi grassi dispari si forma del propionato che diventa propionil-CoA, e che tramite una carbossilazione e altre 2 reazioni viene trasformato in succinil-CoA ed entra nel ciclo di krebs.

Gli acidi grassi insaturi invece, per entrare in beta ossidazione devono essere desaturati. I doppi legami devono essere ridotti. Degli enzimi desaturasi trasformano i doppi legami in legami semplici. Dopodichè gli acidi grassi desaturati entrano normalmente in beta ossidazione.

30 aprile

Catena respiratoria e fosforilazione ossidativa

Entriamo nella parte finale del metabolismo ossidativo.

Dove:

La catena respiratoria e la successiva fosforilazione ossidativa sono localizzate sulla membrana mitocondriale interna, che è ricca di proteine.

Perchè:

Fase finale del catabolismo ossidativo, l'O verrà ridotto ad H₂O, l'ossigeno è l'accettore finale di tutto il processo di ossidazione. CO₂ si è già formata nel ciclo di Krebs e piruvato deidrogenasi. Si formerà tanta ATP, recupereremo l'energia immagazzinata nei precursori, nelle molecole che sono state ossidate.

Come:

La catena respiratoria è un'insieme di trasportatori che secondo gradiente elettrochimico passano dai coenzimi ridotti formati fino all'ossigeno. L'energia che viene liberata in questi passaggi viene conservata nell'ATP.

La membrana mitocondriale interna non è lineare, ma organizzata in creste, digitazioni, per aumentare la sua superficie e ospitare tutti i complessi. La catena respiratoria comprende 4 complessi sopramolecolari, ognuno di questi costituito da tante subunità, soprattutto il complesso 3 e 4. Questi complessi contengono molte catene polipeptidiche, trasportatori citocromi, dei centri redox ferro-zolfo. Inoltre i complessi 1, 3 e 4 sono anche pompe protoniche: usano l'energia che si libera dalle reazioni di ossidoriduzione che avvengono al loro interno per pompare protoni dalla matrice del mitocondrio nello spazio tra le membrane. Questo gradiente protonico transmembrana verrà usato per la sintesi di ATP, ed è quello che accoppia la catena respiratoria, che libera energia, alla fosforilazione ossidativa (cioè sintesi di ATP) che richiede energia.

Ai primi 2 complessi arrivano i coenzimi ridotti formati nel catabolismo dei glucidi e degli acidi grassi. Al complesso 1 arriva NAD ridotto che si riossida, al complesso 2 arriva FAD ridotto, che si riossida anche lui. Il potere riducente viene passato a trasportatori mobili (nel nostro caso il coenzima Q) che fanno da navetta all'interno della membrana e trasportano il potere riducente ai complessi successivi. Sul complesso 4 avviene la riduzione dell'O₂ ad H₂O: l'ossigeno è un substrato del complesso 4, complesso che passa il potere riducente ricevuto dai complessi precedenti sull'O₂ che viene ridotto ad H₂O.

L'O₂ è l'accettore finale del nostro metabolismo ossidativo, del potere riducente che abbiamo estratto dalle sostanze introdotte con la dieta.

I trasportatori della catena respiratoria:

Con potere riducente si intende atomi di H ed elettroni. Nella catena respiratoria ci sono diversi tipi di trasportatori. Alcuni trasportatori possono trasportare atomi di H come il NAD, FAD e flavin mononucleotide (FAD senza adenina). Altri trasportatori invece trasportano solo elettroni, come i centri ferro-zolfo, dove il ferro è un elemento redox che può passare da ridotto 2+ a ferro ossidato 3+ e perdere un elettrone, e viceversa. Altri trasportatori di elettroni sono i citocromi (proteine), mentre il coenzima Q o ubiquinone trasporta in genere atomi H.

Complesso 1:

Molto grande, costituito da diversi polipeptidi. Ha una parte integrata nella membrana e una che sporge verso la matrice mitocondriale. Sul complesso 1 arriva NAD ridotto, che si ossida. I suoi 2 elettroni, dei 2 atomi di H, passano all'interno dei trasportatori e unendosi con i protoni rimasti nella matrice vengono ceduti al coenzima Q che si riduce. Il coenzima Q poi andrà nel complesso 3. Quindi, il complesso 1 ha due funzioni principali: riossidare il NAD e pompare protoni verso lo spazio tra le due membrane. È una pompa protonica che manda fuori protoni verso lo spazio tra le membrane.

Complesso 2:

Il complesso 2 è la molecola succinato deidrogenasi, già incontrata nel ciclo di krebs (nella reazione che trasforma succinato in fumarato e produce un FAD ridotto). Succinato deidrogenasi è in parte legato alla membrana mitocondriale interna, mentre una parte sporge verso la matrice, dove c'è il sito attivo catalitico dell'enzima che trasforma succinato in fumarato e forma un FAD ridotto. Dal FAD vengono presi gli elettroni dei 2 atomi H e trasferiti al coenzima Q.

Coenzima Q o ubiquinone:

Molecola costituito da una parte idrofila e una lunga catena/coda isoprenica lipofila (10 unità isopreniche). Grazie alla lunga coda si muove liberamente nella catena mitocondriale interna. L'ubichinone raccoglie il potere riducente dal complesso 1 e 2. Raccoglie il potere riducente sotto forma sia di protoni che elettroni. Si forma la sua forma ridotta, l'ubichinolo. I 2 atomi di H vengono aggiunti sui due gruppi chetonici, che diventano gruppi alcolici OH e OH. L'ubichinone è una delle più importanti molecole antiossidanti, infatti è anche usato per la cura di moltissime malattie, neurodegenerative, cancro, patologie cardiache, che hanno tutte alle base condizioni di stress ossidativo, condizioni ossidanti.

Complesso 3:

Sempre sul coenzima Q converge anche il potere riducente che avevamo estratto come FAD ridotto dagli acidi grassi durante beta ossidazione. La beta ossidazione avviene nella matrice mitocondriale, e la prima deidrogenasi della beta ossidazione è un'enzima FAD dipendente. Quindi si forma FAD ridotto che viene ceduto a una proteina di trasporto che lo cede ad una seconda proteina di trasporto di matrice che infine lo cede al coenzima Q. Quindi anche il potere riducente tolto nella prima reazione della beta ossidazione converge sul coenzima Q. Possiamo considerare il coenzima Q come collettore generali di potere riducente sia da NAD ridotto che da FAD ridotto. Il coenzima Q, che ora è libero di muoversi nella membrana mitocondriale interna va verso il complesso 3. Il complesso 3 è costituito da molte subunità. Ha una parte che sporge verso la matrice, una transmembrana, e una che sporge verso lo spazio tra le membrane. Il coenzima Q scarica il suo potere riducente sul complesso 3, ritorna in forma ossidata e riprende il suo mestiere. Sul complesso 3 ci sono citocromi, proteine di trasporto solo di elettroni: gli atomi di H che trasportava il coenzima Q vengono separati in protoni che vanno all'esterno e elettroni che vengono portati all'interno del complesso. Coenzima Q trasportava potere riducente sotto forma di atomi H, che arrivati al complesso 3 vengono separati in protoni che vengono pompati fuori, nello spazio tra le due membrane (infatti il complesso 3 è anche una pompa protonica), mentre gli elettroni vengono ceduti a una serie di molecole proteiche chiamati citocromi che sono proteine che trasportano elettroni. L'ultimo citocromo a cui vengono ceduti gli elettroni è il citocromo C, esterno al complesso, che è un sistema di trasporto che permette di portare gli elettroni dal complesso 3 al complesso 4. La proteina citocromo C è presente in tutti gli organismi, piccola, pesa 12 kilodalton, 104 aa, è molto conservata quindi ha strutture simili in tutte le specie. Lega il gruppo EME che contiene ferro, ed è proprio su questo atomo di ferro che avviene il trasporto degli elettroni, perchè il ferro può passare dallo stato bivalente a trivalente e viceversa, e il cambio di stato di ossidazione fa sì che si possano trasportare elettroni da una molecola all'altra. Una differenza con l'emoglobina è nel legame dell'EME alla proteina: nel citocromo C è legato a delle cisteine, mentre nell'emoglobina è legato a istidine. Il citocromo C però, a differenza dell'emoglobina, non trasporta ossigeno: il ferro viene usato solo per le sue proprietà redox. Citocromo C, oltre a essere essenziale nella catena di trasporto degli elettroni, è anche coinvolto nel processo di apoptosi, morte cellulare programmata, dove fa da importante mediatore: quando nella cellula si attivano i segnali di apoptosi il citocromo C esce dal mitocondrio e si fa da messaggero intracellulare dell'attivazione del processo di apoptosi.

Complesso 4:

Riceve il citocromo C con i suoi elettroni. Citocromo C trasporta 1 elettrone alla volta (perché il ferro passando da bi a trivalente lega un elettrone solo). Citocromo C ridotto arriva al complesso 4 e scarica l'elettrone. Il complesso 4 contiene rame invece che ferro. Contiene 2 atomi di rame in due zone, zona A e zona B, perché anche il rame è un elemento redox, passa da bivalente a monovalente riducendosi e da monovalente a bivalente ossidandosi. L'elettrone va a ridurre il rame che si trova nella zona A. Poi l'elettrone viene passato a un'altro citocromo, il citocromo A, poi viene passato in un citocromo nella zona B e finalmente l'elettrone arriva a destinazione sull'ossigeno. Per ridurre l'ossigeno molecolare (O_2 , due atomi di O) ad H_2O servono 4 protoni e 4 elettroni, e si formano 2 molecole di H_2O . Quindi per ridurre l'ossigeno ad acqua devono arrivare in contemporanea/strettissima successione 4 elettroni. Il complesso 4 è anche una pompa protonica: prende dalla matrice dei protoni e li pompa verso l'esterno. L'attività delle pompe protoniche del complesso 1, 3 e 4 toglie protoni dalla matrice e li porta fuori nello spazio tra le due membrane con formazione di un gradiente transmembrana che presenta cariche negative verso la matrice dove togliamo protoni e cariche positive verso lo spazio tra le membrane dove mettiamo protoni. Si forma un gradiente elettrochimico di protoni ammassati all'esterno. Membrana mitocondriale interna è come una diga che non può essere attraversata dall'acqua (in questo caso impermeabile ai protoni) dove però il gradiente elettrochimico spinge per poter rientrare all'interno della matrice mitocondriale. Anche un'altra forza agisce a livello della catena respiratoria oltre al gradiente elettrochimico: il potenziale redox.

Lungo la catena respiratoria abbiamo visto i coenzimi all'inizio e l'ossigeno alla fine. Tra coenzimi ridotti e l'ossigeno abbiamo visto un passaggio di elettroni a livello di diverse coppie redox che erano all'interno dei complessi (centri ferro-zolfo, citocromi, coenzima Q...). Il passaggio degli elettroni, del potere riducente, va da una coppia che cede volentieri gli elettroni a una coppia che in questo caso è ossigeno/acqua finale che riceve volentieri gli elettroni. La differenza di avidità nei confronti degli elettroni si quantifica nel potenziale redox che libera tantissima energia: -220 kilojoule per mole. Per sintetizzare ATP servono 30 kilojoule per mole, quindi potremmo sintetizzare circa 7 ATP. Poi la resa effettiva sarà più bassa, però l'energia a disposizione per sintetizzare ATP è molta. A livello del complesso 1, 3 e 4 c'è un salto di energia libera molto ampio, e sarà qui che verrà liberata l'energia sufficiente per la sintesi di ATP. Quindi a livello di questi complessi l'energia liberata nelle reazioni di ossido-riduzione è così elevata che permetterà di sintetizzare dell'ATP. Alla fine, partendo dal NADH e arrivando all' O_2 che è l'accettore finale, in catena respiratoria si libera l'energia sufficiente per sintetizzare 3 ATP.

4 maggio

Abbiamo visto la catena di trasporto elettroni con il passaggio degli elettroni lungo i 4 complessi della catena respiratoria, complessi collegati anche da trasportatori mobili, coenzima Q e citocromo C, dove coenzima Q trasporta atomi di H (protoni ed elettroni insieme). I coenzimi trasportano solo 1 elettrone alla volta. Tutti gli elettroni convergono sul complesso 4 dove avviene la riduzione dell' O_2 ad H_2O . Abbiamo visto il diverso destino dei protoni pompati fuori dalla matrice mitocondriale nello spazio tra le membrane da pompe protoniche localizzate a livello dei complessi 1, 3 e 4. Questo crea a livello di membrana mitocondriale interna un gradiente elettrochimico, elettrico perché all'esterno ci sono più cariche positive che all'interno della membrana, ma anche chimico perché i protoni sono più concentrati nello spazio tra le membrane rispetto alla matrice. Gli elettroni inoltre percorrono la catena respiratoria in discesa dal punto di vista energetico perché passano da un potenziale redox negativo (nel caso della coppia NADH/NAD) a un potenziale positivo (nel caso dell'O), e in tre punti di questa discesa (complesso 1, 3, 4) ci sono 3 salti energetici che liberano l'energia sufficiente per andare a sintetizzare ATP a livello dell'ultimo complesso della catena respiratoria che vediamo adesso.

ATP sintasi (complesso 5):

Ultimo complesso della catena respiratoria è l'ATP sintasi:

ATP sintasi è localizzata nella membrana mitocondriale interna. Ha una parte intramembrana (segmento F_0 costituito da molte subunità), un piccolo collo, e una grossa parte catalitica F_1 che

sporge nella matrice mitocondriale. F0 e F1 sono collegate da una subunità B che fa da braccio di collegamento. Questo complesso 5 sintetizza ATP partendo da ADP e fosfato. Permette di recuperare l'energia, che era stata liberata dal passaggio degli elettroni nella catena respiratoria, nel legame altamente energetico dell'ATP.

Questa molecola è un motore molecolare. In realtà contiene 2 motori molecolari alimentati da 2 combustibili biochimici diversi: F0 (parte all'interno della membrana) è un canale protonico, all'interno vuoto, costituito da molte subunità che formano un canale, dove all'interno passano i protoni che erano stati accumulati nello spazio tra le due membrane. Quindi i protoni del gradiente elettrochimico passano attraverso F0. Questo passaggio libera energia, che viene trasformata in energia di movimento, meccanica: F0 ruota ed essendo collegato a F1 dal braccio F1, che è il secondo motore, è un generatore che sfrutta questo movimento/energia meccanica per sintetizzare ATP. Quindi in questo caso si ha energia meccanica che diventa energia chimica nel legame dell'ATP.

Resa energetica metabolismo ossidativo:

-Per ogni NADH che arriva sul complesso 1 e si riossida diventando NAD abbiamo 3 salti energetici, quindi si formeranno 3 ATP per ogni NADH che arriva in catena respiratoria.

-Per ogni FAD ridotto, che arriva sul complesso 2 sul quale non ci sono salti energetici, si formano solo 2 ATP perchè viene saltato il complesso 1. Il potenziale redox del FAD ridotto è un po' inferiore rispetto a quello del NAD e rende meno in ATP.

-Ricordiamoci che dalla glicolisi c'è l'enzima gliceraldeide 3-fosfato-deidrogenasi che produce 2 NADH nel citoplasma. Un sistema di trasporto trasporta gli equivalenti riducenti di questi nel mitocondrio, quindi ci saranno 2 NADH intramitocondriali, i quali ognuno produce 3 ATP, quindi in totale vengono prodotte 6 ATP dalla glicolisi in condizioni aerobiche (in anaerobiche solo 2).

-Piruvato deidrogenasi produce 2 NADH, 1 per ogni molecola di piruvato. Quindi $2 \times 3 = 6$ ATP.

-Ciclo di krebs produce 3 NADH ($3 \times 3 = 9$) quindi 9 ATP, un FAD che sono 2 ATP e un GTP. Quindi il ciclo di krebs produce ad ogni ciclo 12 ATP, quindi saranno 24 ATP per i 2 Acetil-coA che entrano nel ciclo. Due cicli producono 24 ATP.

Dall'ossidazione completa del glucosio a CO₂ e H₂O si ottengono in totale 38 ATP.

Quanti ATP vengono prodotti dall'acido palmitico?

Acido palmitico (C16) produce 129 ATP. La resa è più elevata perchè gli acidi grassi sono molecole più ridotte, hanno più atomi di H del glucosio. La beta ossidazione produce ad ogni ciclo di 4 reazioni 1 FAD e 1 NAD, quindi 5 ATP per ciclo (2+3). Essendo 7 cicli si avrà un totale di 35 ATP. Ad ogni ciclo inoltre si producono Acetil-coA che vanno nel ciclo di krebs (8 cicli di krebs). Ogni ciclo di krebs produce 12 ATP, quindi $12 \times 8 = 96$ ATP. $96 + 35 = 131$ ATP. Però per attivare l'acido grasso a palmitil-coA si usano 2 legami altamente energetici, quindi la resa finale sarà $131 - 2 = 129$ ATP. I lipidi sono molto più energetici dei glucidi dal punto di vista metabolico.

I disaccoppianti:

Il grasso bruno, chiamato così perchè ricco di mitocondri, è utilizzato per produrre calore. Sulla membrana mitocondriale interna dei mitocondri del grasso bruno c'è la proteina termogenina. La termogenina è un canale ionico per protoni. Più molecole di termogenina sono presenti nella membrana mitocondriale interna e più velocemente il gradiente protonico prodotto dalla catena respiratoria viene dissipato, perchè i protoni passano all'interno della termogenina che però non produce ATP (è solo un'autostrada per protoni). Quindi i protoni passano all'interno della termogenina e dissipano il gradiente elettrochimico sotto forma di calore non producendo ATP. Nel grasso bruno l'energia che abbiamo ottenuto dai nutrienti viene dissipata come calore.

Veleni che bloccano la catena respiratoria:

Cianuro: blocca il complesso 4. Si lega agli ioni ferro dei citocromi A e A3. In questo modo il ferro non può cambiare stato di ossidazione e svolgere la sua funzione redox: il flusso degli elettroni si ferma e la catena respiratoria viene bloccata perchè l'accettore finale degli elettroni che è l'ossigeno non riceve più gli elettroni.

Rotenone: blocca il complesso 1. **Oligomicina:** blocca atp-sintasi. Questi veleni sono stati usati per studiare la funzione dei vari componenti della catena respiratoria.