

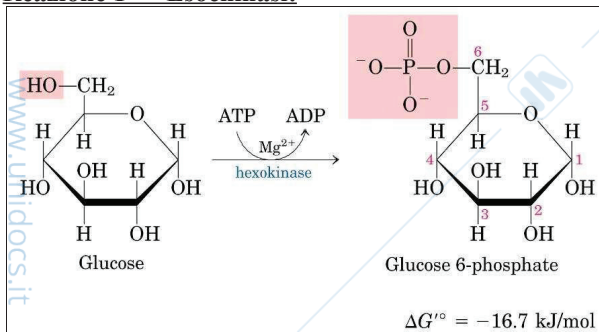
GLICOLISI

Il **Glicolisi** è una sequenza di 10 reazioni enzimatiche attraverso le quali una molecola di glucosio viene convertita in 2 molecole dello zucchero a 3 atomi di carbonio, il **Piruvato** con la concomitante produzione di 2 molecole di ATP.

Le 10 reazioni della glicolisi possono essere divise in due fasi principali:

- **Fase Preparatoria (Reazioni 1→5):** Fase di investimento energetico in cui lo zucchero 6 atomi di C di glucosio viene fosforilato e scisso in due molecole di zucchero a 3 atomi di C ovvero la **Gliceraldeide-3-fosfato**. In questa fase vengono consumate 2 molecole di ATP.
- **Fase di Resa (Reazioni 5→10):** Fase di recupero energetico in cui le due molecole di Gliceraldeide-3-fosfato vengono convertite in piruvato con la concomitante formazione di 4 molecole di ATP. La glicolisi quindi ha una resa netta di 2 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio.

Reazione 1 → Esochinasi:



In questa reazione si ha il trasferimento di un gruppo fosforico dall'ATP al glucosio con la formazione di **Glucosio-6-fosfato (G6P)**. L'enzima che catalizza questa reazione è l'**Esochinasi**.

Viene utilizzata 1 molecola di ATP.

Da notare che il **G6P** è il prodotto di degradazione del *Glicogeno*.

L'**esochinasi** è un enzima ubiquitario relativamente non specifico che catalizza la fosforilazione di esosi come il D-glucosio, il D-mannosio e il D-fruttosio.

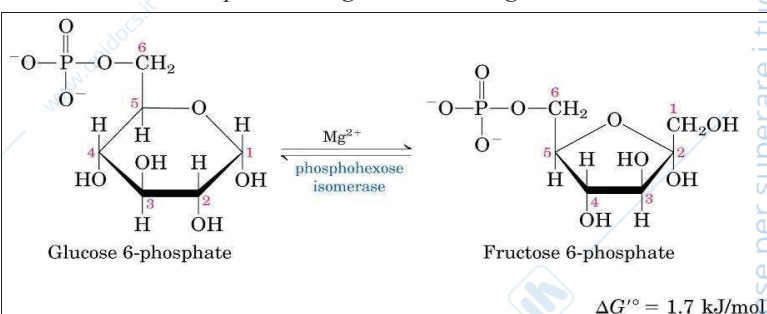
Reagisce inoltre con il complesso Mg^{2+} -ATP. Senza il Mg^{2+} questa reazione sarebbe sfavorita in quanto l'ATP è un potente inibitore competitivo dell'esochinasi. Nel muscolo è inibita dal suo prodotto **G6P** quando questo è in eccesso; nel fegato invece la forma predominante di questo enzima è la **glucochinasi** (isoenzima) che viene regolata

direttamente dai livelli di glucosio nel sangue ed inibita dal **F6P** la cui attività è mediata dalla *proteina regolatrice della glucochinasi*.

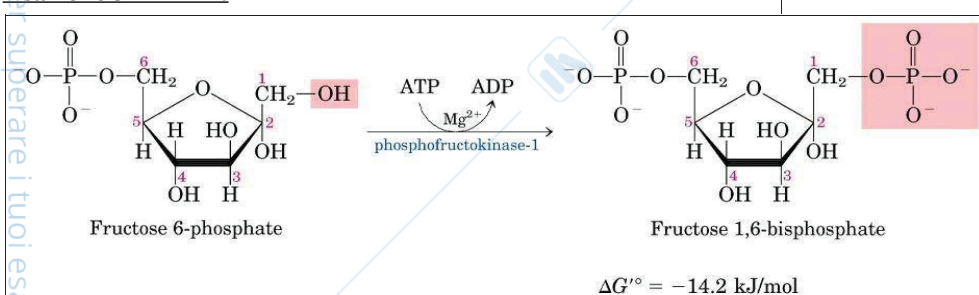
Reazione 2 → PGI:

In questa reazione avviene la conversione del **G6P** in **Fruttosio-6-fosfato (F6P)** ad opera dell'enzima **Fosfoglucosio Isomerasi (PGI)**. Questa è l'isomerizzazione di un aldosio in un chetosio.

Poiché il **G6P** e l'**F6P** sono di solito presenti nella loro forma ciclica, la reazione richiede l'apertura dell'anello seguita dall'isomerizzazione e dalla successiva richiusura dell'anello.



Reazione 3 → PFK:



In questa reazione la **Fosfofruttochinasi (PFK)** fosforilla l'**F6P** per ottenere **Fruttosio-1,6-bisfosfato (FBP o F1,6P)**. La reazione della PFK è molto simile alla reazione dell'esochinasi.

Viene utilizzata 1 molecola di ATP.

La **PFK** gioca un ruolo centrale nel controllo della glicolisi perché catalizza una delle reazioni che determinano la velocità dell'intera via metabolica.

La PFK è un enzima tetrameroico caratterizzato da due stati conformazionali, R e T in equilibrio tra loro. L'ATP si comporta sia da substrato sia da inibitore allosterico.

Altri composti tra cui l'ADP, AMP e **Fruttosio-2,6-bisfosfato**, rimuovono gli effetti inibitori dell'ATP e vengono quindi considerati **attivatori**. Ogni subunità del PKF ha due siti di legame per l'ATP: uno è il sito di legame per il substrato l'altro è il sito di legame per l'inibitore. Mentre il sito del substrato dell'ATP lega con uguale efficienza l'ATP in entrambe le conformazioni T e R, il sito di legame per l'inibitore lega quasi esclusivamente se l'enzima è nella conformazione T. Il substrato, l'**F6P** si lega di preferenza allo stato R dell'enzima. Di conseguenza un'alta concentrazione di ATP agisce da inibitore allosterico portando alla diminuzione dell'affinità della PFK verso l'**F6P**.

Possiamo quindi dire che la PFK è un enzima "intelligente" in quanto se la concentrazione di ATP è alta la sua capacità diminuisce notevolmente mentre se la concentrazione di ATP è bassa la sua attività cresce.

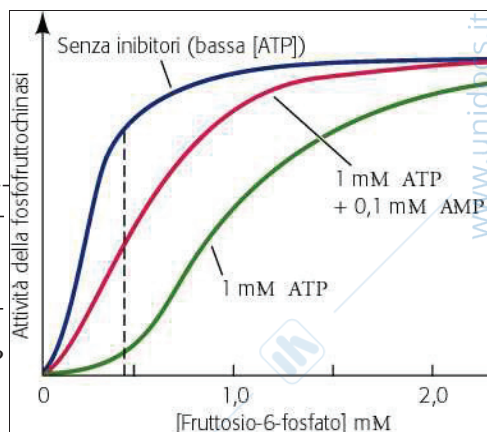
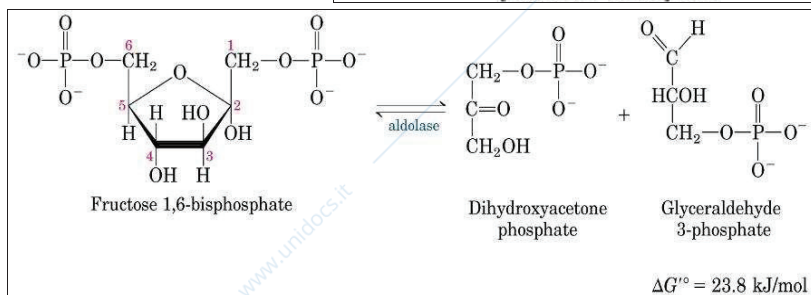
Reazione 4 → Aldolasi:

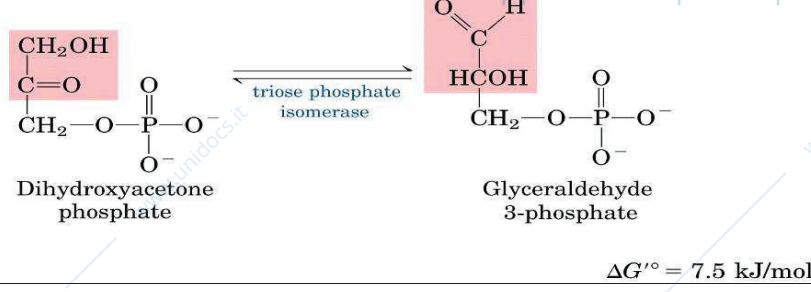
In questa reazione l'**Aldolasi** catalizza la scissione dell'**FBP** a formare i due triosi **Gliceraldeide-3-fosfato (GAP)** e **Diidrossiacetone fosfato (DHAP)**.

Notate che a questo punto della via metabolica il sistema di numerazione degli atomi di C cambia: gli atomi 1, 2, 3 del glucosio diventano gli atomi 3, 2, 1 del **DHAP** e gli atomi 4, 5, 6 diventano gli atomi 1, 2, 3 della **GAP**. Tale reazione è una **scissione aldolica** cioè l'inverso della condensazione aldolica.

La "logica" della **Reazione 2** nella via glicolitica, ovvero

l'isomerizzazione del **G6P** a **F6P**, è chiara: mentre la scissione del G6P porterebbe alla formazione di prodotti con un diverso numero di atomi di carbonio, la **scissione aldolica dell'**FBP**** porta alla formazione di due composti C_3 convertibili l'uno nell'altro che possono entrare in una via di degradazione comune.

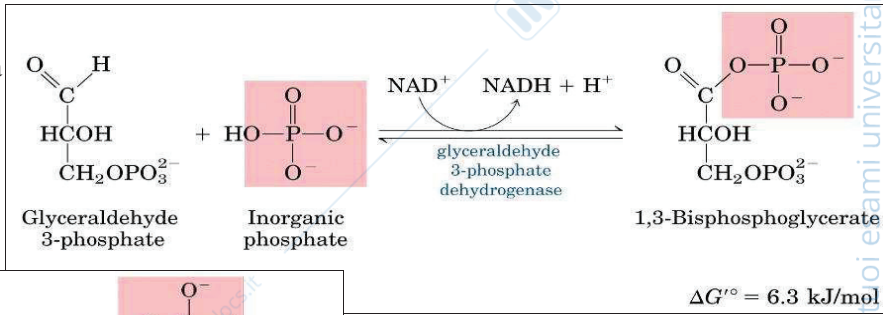




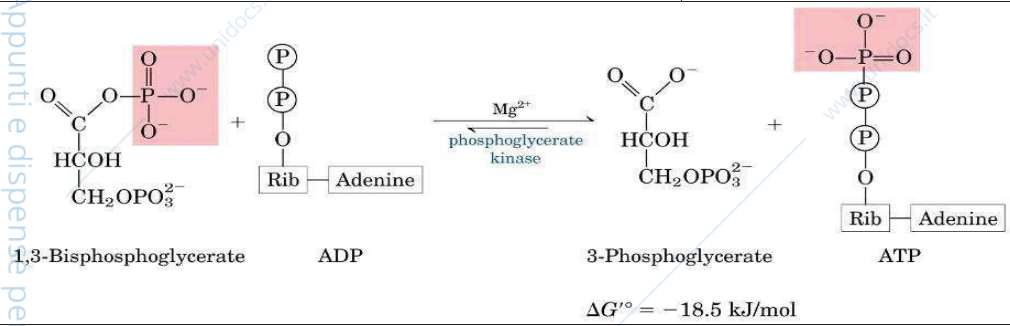
collidere in soluzione. La **GAP** e il **DHAP** vengono interconvertiti in maniera così efficiente che le concentrazioni di questi due metaboliti sono mantenute ai valori caratteristici della situazione di equilibrio in cui $[DHAP] \gg [GAP]$. Nelle condizioni di stato stazionario di una cellula però la **GAP** viene consumata nelle reazioni successive della via glicolitica e poiché la **GAP** viene utilizzata in questo modo, una maggiore quantità di **DHAP** viene convertita in **GAP** per mantenere il rapporto della situazione di equilibrio.

Reazione 6 → GAPDH:

In questa reazione la **GAP** viene ossidata e fosforilata ad opera di NAD^+ e di P_i , catalizzate dalla **Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi**. In questa reazione l'ossidazione dell'aldeide promuove la sintesi dell'acil fosfato **1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG)**.



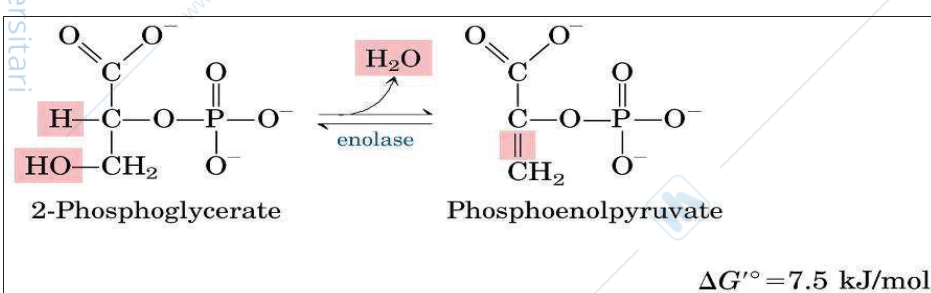
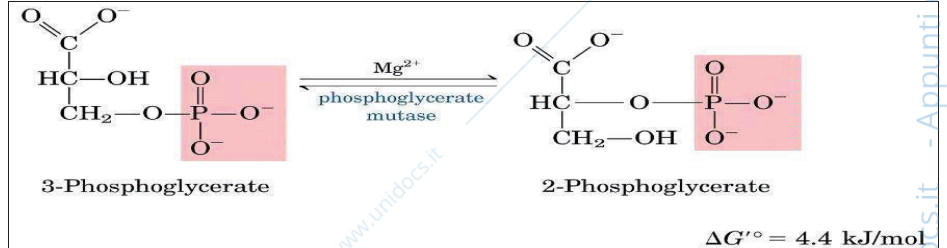
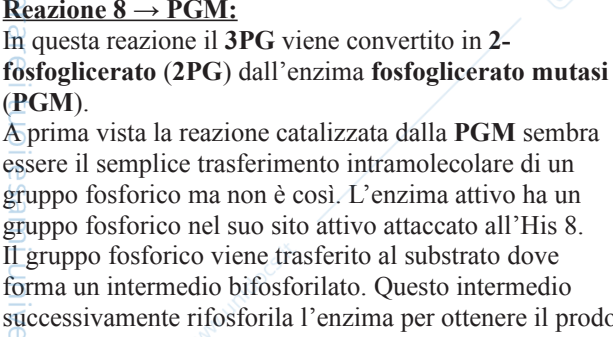
possibile la sintesi complessiva di **NADH** e **ATP** a partire da **GAP**, P_i , NAD^+ e **ADP**. Questa produzione di **ATP**, che non implica l'utilizzo di O_2 è un esempio di **fosforilazione a livello del substrato**.



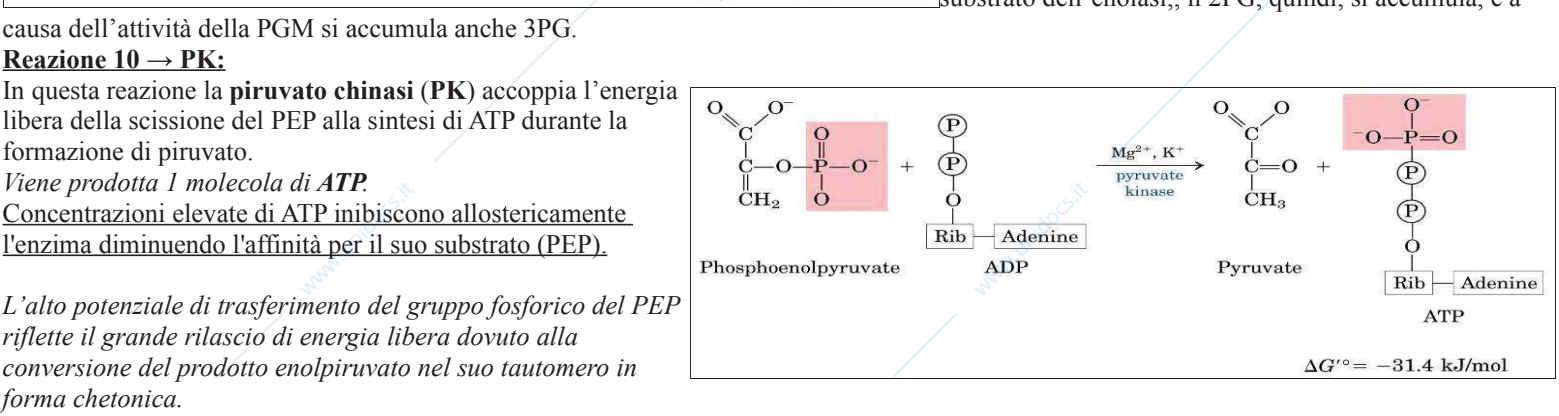
Reazione 9 → Enolasi:

In questa reazione il **2PG** viene deidratato a **fosfoenolpiruvato (PEP)** dall'enzima **enolasi**. L'enzima forma un complesso con un catione bivalente come il Mg^{2+} prima che si leghi al substrato. Gli ioni fluoruro inibiscono la glicolisi bloccando l'attività dell'enolasi. In presenza di P_i , gli ioni F^- bloccano il legame del substrato all'enolasi formando un complesso con il Mg^{2+} che si lega al sito attivo dell'enzima. Il substrato dell'enolasi, il **2PG**, quindi, si accumula, e a

causa dell'attività della **PGM** si accumula anche **3PG**.



causa dell'attività della **PGM** si accumula anche **3PG**.



Metabolismo degli esosi diversi dal Glucosio:

Insieme al Glucosio, gli esosi Fruttosio, Galattosio e Mannosio sono carburanti importanti. Dopo la digestione, questi monosaccaridi entrano nel circolo sanguigno che li trasporta ai vari tessuti. Questi zuccheri vengono convertiti in intermedi della glicolisi dove vengono successivamente metabolizzati.

Fruttosio: Vi sono due vie per il metabolismo del Fruttosio: una è presente nel muscolo l'altra nel fegato.

Nel muscolo il metabolismo del Fruttosio è quasi uguale a quelle del Glucosio.

L'**esochinasi**, che converte il glucosio in G6P, fosforila anche il Fruttosio formando **F6P**.

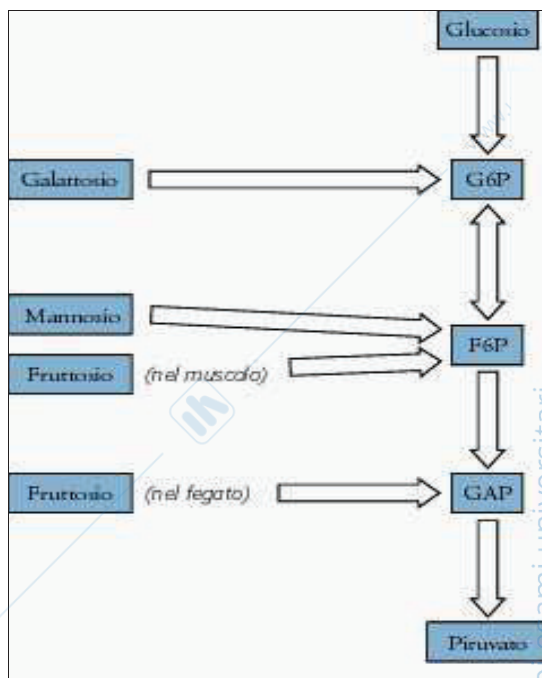
Il fegato invece contiene un'esochinasi chiamata **fruttochinasi**: questo enzima catalizza la fosforilazione del fruttosio al C1 invece che al C6; il **F1P** che si forma viene scisso in *Gliceraldeide* (che verrà fosforilata in seguito dalla Trioso Chinasi) e *DHAP* (che verrà convertito in GAP dalla Trioso Fosfato Isomerasi) dalla **Fruttosio 1 Fosfato aldolasi**.

Galattosio: L'esochinasi, anche se fosforila il Glucosio, il Fruttosio e il Mannosio non riconosce il Galattosio. Affinché possa entrare nella glicolisi è necessaria una reazione di *epimerizzazione* (in quanto Glucosio e Galattosio sono epimeri al C4). Questa reazione si verifica dopo la conversione del Galattosio in *Galattosio 1P* ad opera della *Galatto Chinasi* a spese di ATP. Successivamente entra UNDP-glucosio che trasforma il galattosio1P in UDP-galattosio con uscita di *Glucosio 1P* tramite il *galattosio 1P uridil-trasferasi* (G1P è trasformato grazie ad una fosfoglucomutasi in G6P che torna alla glicolisi).

Galattosio: L'esochinasi, anche se fosforila il Glucosio, il Fruttosio e il Mannosio non riconosce il Galattosio. Affinché possa entrare nella glicolisi è necessaria una reazione di *epimerizzazione* (in quanto Glucosio e Galattosio sono epimeri al C4). Questa reazione si verifica dopo la conversione del Galattosio in *Galattosio 1P* ad opera della *Galatto Chinasi* a spese di ATP. Successivamente entra UNDP-glucosio che trasforma il galattosio1P in UDP-galattosio con uscita di *Glucosio 1P* tramite il *galattosio 1P uridil-trasferasi* (G1P è trasformato grazie ad una fosfoglucomutasi in G6P che torna alla glicolisi).

Mannosio:

Il Mannosio, il prodotto di digestione dei polisaccaridi e delle glicoproteine, è l'epimero in C2 del glucosio. Il mannosio entra nella via glicolitica dopo essere stato convertito in **F6P** attraverso due reazioni; nella prima è fosforilato a spese di ATP al C6 dall'*Esochinasi*; nella seconda viene isomerizzato a F6P dalla *Fosfomannosio isomerasi*.



LA VIA DEL PENTOSIO FOSFATO

L'ATP è la "moneta energetica" della cellula; la sua scissione esoergonica viene accoppiata ad altre funzioni cellulari altrimenti endoergoniche. Le cellule possiedono inoltre una seconda moneta: il **Potere Riducente**. Molte reazioni endoergoniche in particolare la biosintesi degli acidi grassi e del colesterolo, necessitano oltre che di ATP anche di NADPH.

Nonostante la loro stretta somiglianza chimica, NADH NADPH non sono metabolicamente intercambiabili.

Mentre il NADH utilizza l'energia libera delle ossidazioni metaboliche per sintetizzare ATP (fosforilazione ossidativa), il NADPH invece utilizza l'energia libera dell'ossidazione metabolica per e biosintesi riduttive.

Questa distinzione è possibile perché le deidrogenasi coinvolte nel metabolismo ossidativo e riduttivo sono altamente specifiche nei confronti dei loro rispettivi coenzimi. Infatti le cellule mantengono normalmente il rapporto [NAD+]/[NADH] in corrispondenza di valori prossimi a 1000, fattore che favorisce l'ossidazione metabolica, e contemporaneamente mantengono il rapporto [NADP+]/[NADPH] a valori vicini a 0,01, favorendo le biosintesi riduttive.

Il NADPH viene generato dall'ossidazione del glucosio-6-fosfato mediante una via metabolica alternativa alla glicolisi: la via del pentosio fosfato o dello shunt dell'esosio monofosfato.

Nei tessuti coinvolti pesantemente nella biosintesi lipidica gli enzimi della via del pentosio fosfato sono presenti in grandi quantità. Infatti nel fegato circa il 30% dell'ossidazione del glucosio avviene mediante la via del pentosio fosfato invece che mediante la glicolisi.

La reazione complessiva della via del pentosio fosfato è:



Questa via metabolica può essere suddivisa in tre fasi principali:

Fase 1:

Composta da 3 reazioni ossidative che portano alla formazione di NADPH e **Ribulosio-5-fosfato (Ru5P)**.

- La **Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD)** catalizza il trasferimento netto di uno ione idruro dal C1 del G6P al NADP⁺ con la formazione di **6-fosfoglucono-δ- lattone**.
- La **6-fosfogluconolattolasi** aumenta la velocità di idrolisi del 6-fosfoglucono-δ-lattone a **6-fosfogluconato**
- La **6-fosfogluconato deidrogenasi** catalizza la decarbossilazione ossidativa del 6-fosfogluconato, a Ru5P e CO₂. *La formazione di Ru5P completa la fase ossidativa: in questa prima fase vengono sintetizzati 2 NADPH per ogni molecola di G6P che entra nella via.*

Fase 2:

Il Ru5P viene convertito a **R5P** dall'enzima **ribulosio-5-fosfato isomerasi** oppure a **Xu5P** dall'enzima **ribulosio-5-fosfato epimerasi**.

Queste reazioni di isomerizzazione e di epimerizzazione si pensa che avvengano con la formazione di un intermedio endiolato.

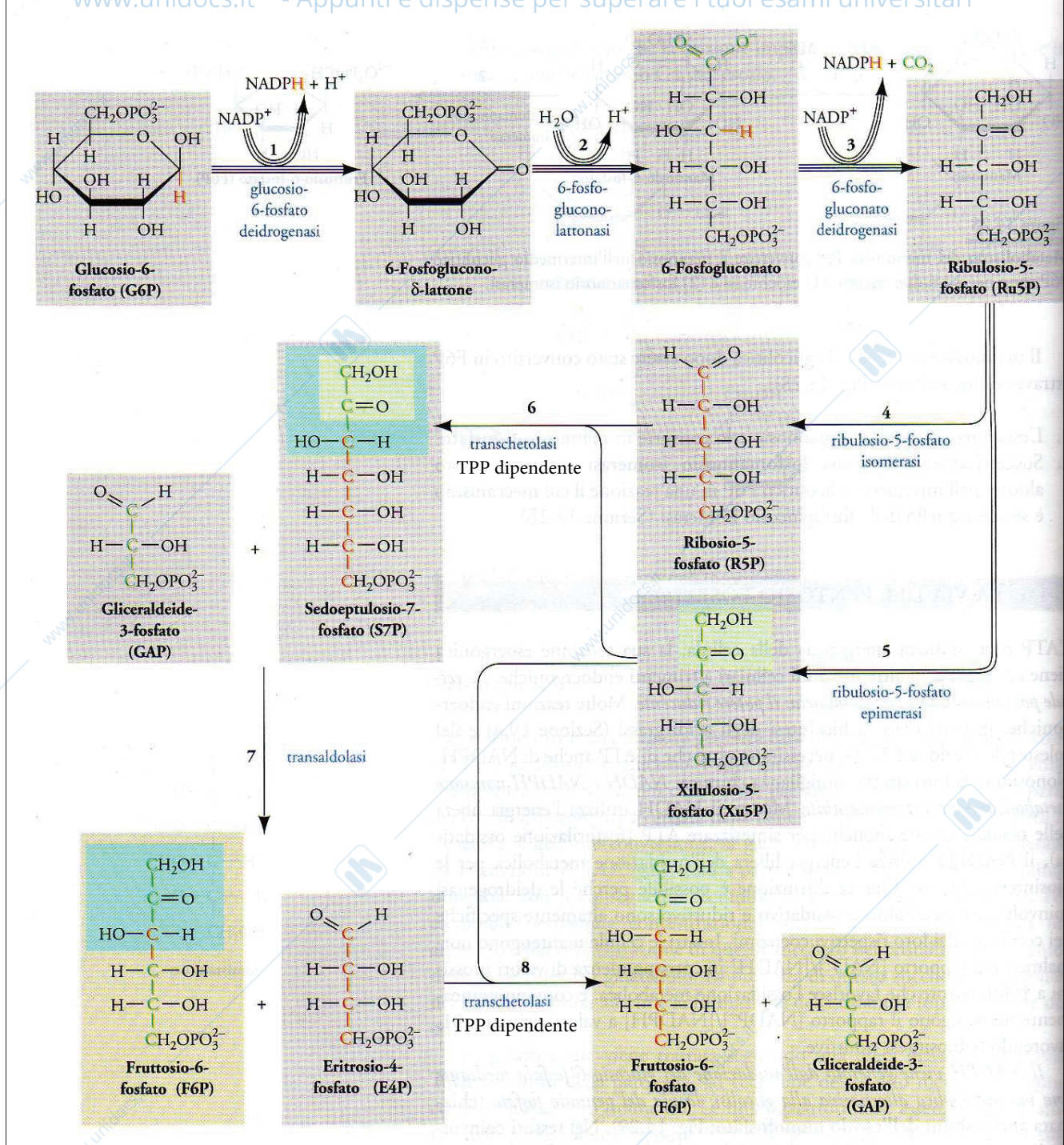
Fase 3:

Composta da 2 reazioni di rottura e formazione di legami C—C che trasformano 2 **Xu5P** e 1 **R5P** in 2 **F6P** e 1 **GAP**. La conversione di questi tre zuccheri C₅ a due zuccheri C₆ e uno zucchero C₃ viene catalizzata da due enzimi, la **tansaldolasi** e la **transchetolasi**.

- La **transchetolasi** che ha come cofattore la timina pirofosfato catalizza il trasferimento di unità C2 dallo Xu5P all'R5P con la formazione di **GAP** e **sedoepulosio-7-fosfato (S7P)**.
- La **tansaldolasi** catalizza il trasferimento di un'unità C3 dal S7P alla GAP con la formazione di **eritrosio-4-fosfato (E4P)** e **F6P**.

Regolazione:

Il flusso attraverso la via del pentosio fosfato e quindi la velocità di sintesi di NADPH viene controllata dalla velocità della reazione catalizzata dalla *Glucosio 6P Deidrogenasi* la cui attività viene regolata dalla [NADP⁺]: quando essa è elevata c'è stato alto consumo di NADPH e la velocità della reazione enzimatica è aumentata per rigenerare il NADPH.

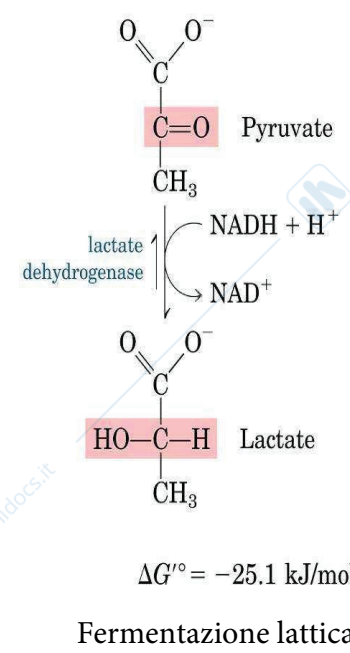
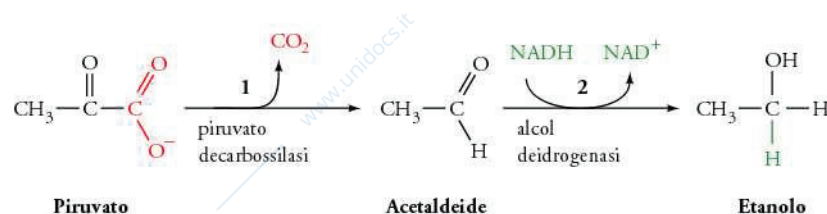


Fermentazione Lattica:

In condizioni anaerobiche il NAD^+ viene rigenerato dal **NADH** mediante la riduzione del **piruvato** a **lattato**. Avengono due reazioni di ossidoriduzione ma non si osserva nessuna variazione nello stato di ossidazione del C: nel glucosio e nell'acido lattico il rapporto H:C è lo stesso.

Fermentazione Alcolica:

Il glucosio viene convertito in **piruvato** nella glicolisi e in seguito il piruvato viene trasformato in **etanolo** e CO_2 . La **Tiamina Pirofosfato (TPP)** è un coenzima derivato dalla **vitamina B1**. Ha funzione rilevante nelle reazioni in cui si ha la rottura di un legame adiacente ad un gruppo carbonilico e nei riarrangiamenti chimici in cui vi è trasferimento di un gruppo aldeidico attivato da un C all'altro. La sua parte funzionale è l'anello tiazolico che agisce come "trappola per elettroni".



$\Delta G'^{\circ} = -25.1 \text{ kJ/mol}$

Fermentazione lattica

Fermentazione alcolica

GLUCONEOGENESI

La *Gluconeogenesi* è il processo mediante il quale viene sintetizzato glucosio a partire da precursori non glucidici quali i prodotti glicolitici *lattato*, *piruvato*, *glicerolo*, gli intermedi del ciclo dell'acido citrico e gli scheletri carboniosi della maggior parte degli amminoacidi. Tuttavia, prima di tutto queste sostanze devono essere tutte convertite nel composto a quattro atomi di carbonio **ossalacetato**. La maggior parte delle reazioni della gluconeogenesi sono reazioni glicolitiche che procedono in direzione inversa; solo tre reazioni (quelle in rosso in fig.) vengono catalizzate da enzimi diversi da quelli della glicolisi.

Da piruvato a fosfoenolpiruvato:

Poiché questa tappa è l'inverso della reazione altamente esoergonica catalizzata dalla *piruvato chinasi*, è necessario l'impiego di energia libera. Questo processo viene reso possibile dalla conversione del piruvato in ossalacetato (intermedio ad alta energia); il processo si svolge con la partecipazione di due enzimi:

- **Piruvato carbossilasi**, catalizza la formazione (ATP-dipendente) di **ossalacetato** a partire da piruvato e HCO_3^- . Esso è un enzima

biotinato (ha come gruppo prostetico la biotina) e la sua reazione avviene in due → fase1: la scissione dell'ATP in ADP agisce in modo da deidratare il bicarbonato mediante la formazione di un intermedio carbossifosfato ad alta energia. La CO_2 che si è formata possiede energia libera sufficiente per carbossilare la biotina.

Quindi, rispetto allo ione bicarbonato, il gruppo carbossilico legato alla biotina è attivato e può essere trasferito ad un'altra molecola senza richiedere altra energia libera.

→ fase2: il gruppo carbossilico attivato viene trasferito dalla carbossibiotina al piruvato con la formazione di ossalacetato mediante una reazione che avviene in tre tappe.

- **PEP carbossichinasi (PEPCK)**, converte l'ossalacetato in PEP mediante una reazione che utilizza GTP come donatore di un gruppo fosforico. Notare che la CO_2 che carbossila il piruvato per ottenere ossalacetato viene eliminata nella formazione di PEP. L'ossalacetato quindi può essere considerato come piruvato "attivato", con la CO_2 e la biotina che facilitano l'attivazione a spese dell'ATP.

La gluconeogenesi richiede il passaggio di metaboliti tra i mitocondri e il citosol

La formazione di ossalacetato avviene **SOLO nei mitocondri**, mentre gli enzimi che convertono il PEP in glucosio sono citosolici. Affinché possa svolgersi la gluconeogenesi, o l'ossalacetato deve lasciare i mitocondri per essere trasformato in PEP, oppure il PEP che si è formato deve passare nel citosol. Il PEP viene trasportato attraverso la membrana mitocondriale attraverso specifiche proteine trasportatrici di membrana; per l'ossalacetato invece non esiste un tale sistema di trasporto, per cui, in quelle specie in cui la PEPCK è citosolica, l'ossalacetato deve essere prima convertito o in aspartato o in malato per i quali esiste un sistema di trasporto mitocondriale. La via che coinvolge la *malato deidrogenasi* porta al trasferimento di equivalenti riducenti dal mitocondrio al citosol poiché utilizza NADH mitocondriale e produce NADH citosolico. Nella via dell'*aspartato amminotrasferasi* non è coinvolto il NADH. Il NADH citosolico è necessario per la gluconeogenesi, quindi la via del malato è spesso una necessità; tuttavia, quando il precursore della gluconeogenesi è il lattato, la sua ossidazione a piruvato genera NADH citosolico: in questo caso possono essere utilizzate entrambe le vie.

Regolazione della gluconeogenesi

Vi sono tre cicli del substrato e quindi tre punti di controllo potenziali per la regolazione del flusso i glicolitico nei confronti della gluconeogenesi.

Il **fruttosio-2,6-bisfosfato** (che non è un intermedio della glicolisi) è un **attivatore allosterico** della **fosfofruttochinasi (PFK)** e un **inibitore** la **fruttosio-1,6-bisfosfatasi (FBPasi)**.

Il flusso netto attraverso il ciclo del substrato creato dalle reazioni opposte della PFK e della FBPasi viene determinato dalla concentrazione di **fruttosio-2,6-bisfosfato (F2,6P)**.

Nella cellula la concentrazione di **F2,6P** dipende dall'equilibrio che intercorre tra le velocità delle sue reazioni di sintesi e di degradazione catalizzate rispettivamente dalla **PFK-2** e dalla **FBPasi-2** (localizzati su domini diversi della **cAPK**).

Questo enzima bifunzionale viene regolato da diversi effettori allosterici e da un processo di fosforilazione e defosforilazione promosso dalla **cAPK** e dalla **fosfoproteina fosfatasi**.

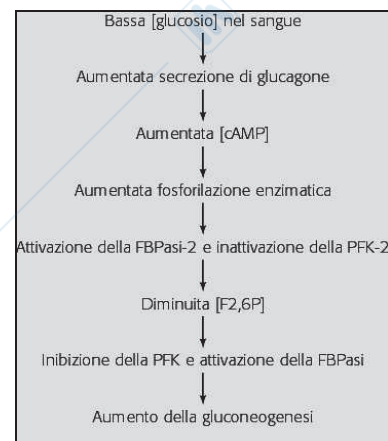
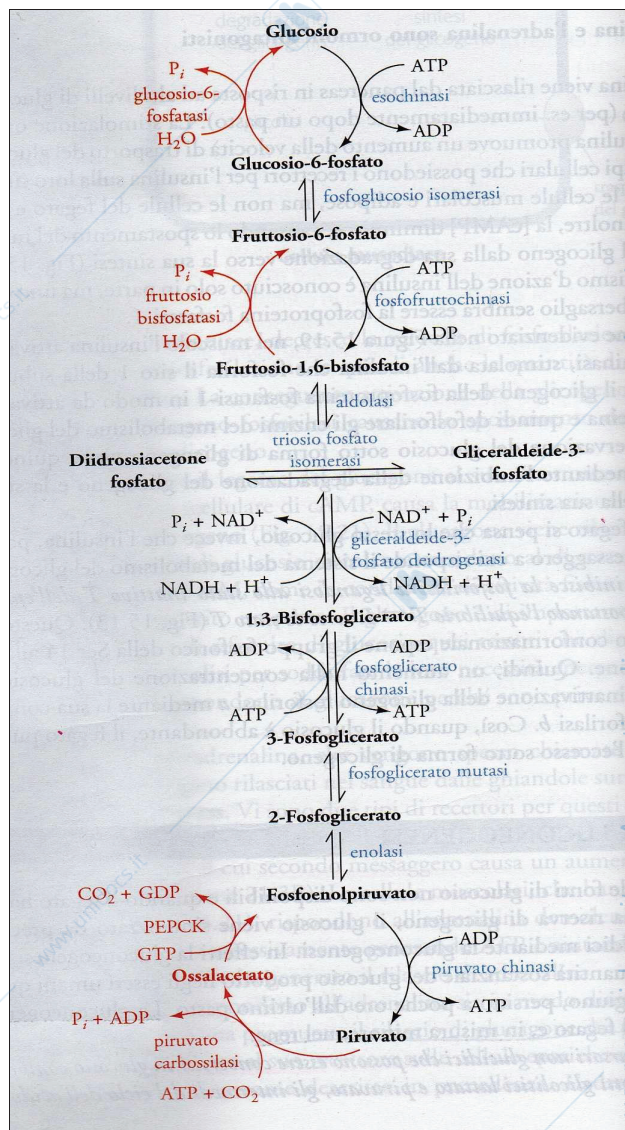
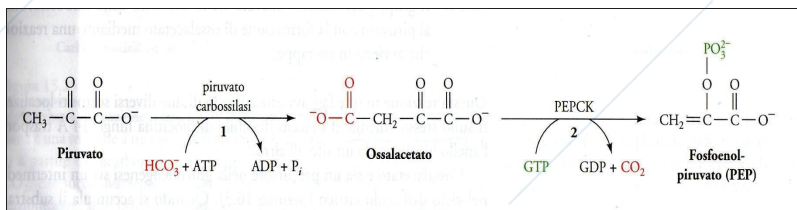
Così, l'equilibrio che si crea tra glicolisi e gluconeogenesi è sotto controllo ormonale.

Per esempio, quando la concentrazione di glucosio nel sangue è bassa, il **glucagone** stimola la produzione di cAMP nelle cellule epatiche. Il cAMP attiva la cAPK, che a sua volta fosforila e quindi inattiva la PFK-2 attivando indirettamente quindi la FBPasi-2.

Il risultato netto è la diminuzione della concentrazione di F2,6P, che sposta l'equilibrio tra le reazioni della PFK e della FBPasi verso la intensità di FBP e quindi verso un aumento del flusso gluconeogenico.

Il concomitante aumento nella velocità della gluconeogenesi e della demolizione del glicogeno consente al fegato di rilasciare il glucosio nel circolo ematico. Viceversa, quando la concentrazione di glucosio è alta, i livelli di cAMP diminuiscono, e l'aumento nella concentrazione di F2,6P che ne deriva stimola la glicolisi

Glucosio 6-fosfatasi: idrolizza l'estere fosforico nella 10° reazione della gluconeogenesi, catalizza quindi la conversione di Glucosio 6-fosfato in Glucosio. L'enzima si trova solo nel lume dell'ER degli epatociti, nel rene e nell'intestino tenue; in modo che nelle altre cellule non sottragga G6P alla glicolisi. Per questo motivo le cellule che lo possiedono sono le uniche in grado di regolare il livello di glucosio nel sangue.



GLICOGENOLISI

Il *glicogeno* è un polimero costituito da molecole di D-glucosio unite tra loro da legami α (1 \rightarrow 4) con ramificazioni determinate da legami α (1 \rightarrow 6) che si formano ogni 8 – 14 residui. Ha una struttura molto ramificata che consente una rapida mobilitazione del glucosio attraverso il rilascio simultaneo di più unità in corrispondenza di ogni ramificazione.

Per la sua demolizione sono necessari tre enzimi:

Glicogeno fosforilasi:

La glicogeno fosforilasi si presenta in due conformazioni : una **conformazione attiva , R**, e una **inattiva , T**.

Esso è un dimero, regolato sia da interazioni allosteriche che da modificazioni covalenti, che *catalizza la reazione che limita la velocità della demolizione del glicogeno*.

Per quanto riguarda le interazioni allosteriche troviamo degli **inibitori allosterici** tra cui l'*ATP* legato alla forma T, *G6P* e *glucosio* e degli **attivatori allosterici**, come l'*AMP* legato alla forma R, che interagiscono in modo differente con fosfo- e defosfoenzima. Le modificazioni covalenti consistono invece in **fosforilazione e defosforilazione**.

La forma fosforilata dell'enzima, la *fosforilasi a*, ha un gruppo fosforico esterificato sulla Ser14; la forma defosforilata è chiamata invece *fosforilasi b*. La glicogeno fosforilasi catalizza la rottura di un legame con la sostituzione di un gruppo fosforico (**fosforolisi**) per dare *G1P*.

L'attività enzimatica della glicogeno fosforilasi richiede il cofattore **piridossal-5'-fosfato (PLP)**, un derivato della vitamina B6 che fornisce il gruppo fosforico e si comporta da catalizzatore agendo come acido-base.

L'enzima nello stato T è caratterizzato da un sito attivo poco accessibile e quindi con una bassa affinità per i suoi substrati, mentre quando l'enzima è nello stato R il suo sito catalitico è più accessibile ed ha un'alta affinità per il legame con il fosfato. L'*AMP* promuove nella fosforilasi il cambiamento conformazionale T \rightarrow R in quanto si lega allo stato R dell'enzima a livello del sito per l'effettore allosterico. Anche l'*ATP* si lega al sito per l'effettore allosterico ma quando la fosforilasi è nello stato T, in modo da inibire, invece che promuovere, il cambiamento conformazionale T \rightarrow R. Mentre la *fosforilasi b* necessita quindi di AMP per essere attivata, la *fosforilasi a* è attiva anche senza AMP.

Enzima deramificante del glicogeno:

L'enzima deramificante del glicogeno agisce da α (1 \rightarrow 4) *transglicosilasi* (*glicosiltransferasi*) e rimuove le ramificazioni del glicogeno, rendendo altre subunità accessibili (trasferisce un'un'unità trisaccaridica che ha legami α (1 \rightarrow 4) da una ramificazione limite del glicogeno all'estremità non riducente di un'altra ramificazione). Esso agisce inoltre da α (1 \rightarrow 6) *glicosilasi* e rimuove il residuo legato in α (1 \rightarrow 6) (senza fosforilarlo ma idrolizzandolo), liberando glucosio. L'enzima deramificante ha siti attivi separati per l'attività transferasica e per l'attività α (1 \rightarrow 6) glicosidasi.

Fosfoglucomutasi:

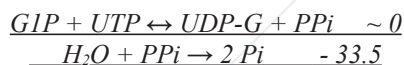
La *fosfoglucomutasi* converte il G1P in G6P. Un gruppo fosforico viene trasferito dal fosfoenzima attivo al G1P, con la formazione di glucosio-1,6-bisfosfato, che successivamente rifosforila l'enzima producendo G6P.

GLICOGENOSINTESI

In condizioni fisiologiche la demolizione del glicogeno è un processo esoergonico. Sempre in condizioni fisiologiche la sintesi di glicogeno a partire da *G1P* è termodinamicamente sfavorevole senza un'immissione di energia libera, per cui la sintesi e la demolizione di glicogeno devono avvenire attraverso vie separate. Tre sono gli enzimi che partecipano alla sintesi del glicogeno:

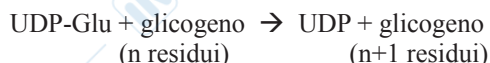
UDP-glucosio pirofosforilasi

Poiché in condizioni fisiologiche la conversione diretta del G1P in glucosio e P_i è termodinamicamente sfavorevole (ΔG positivo), la biosintesi del glicogeno necessita di una tappa esoergonica. Questo processo viene promosso combinando il G1P con l'uridina trifosfato (UTP) in una reazione catalizzata dall'*UDP-glucosio pirofosforilasi*. Il prodotto di questa reazione, l'UDP-glucosio può donare un'unità glicosilica alla catena di glicogeno in crescita. La formazione di UDPG ha un $\Delta G \approx 0$ ma la successiva idrolisi esoergonica di PP_i , catalizzata dall'enzima *pirofosfatasi inorganica* rende esoergonica la reazione complessiva.

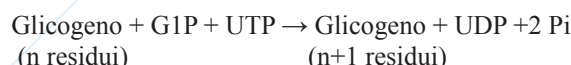


Glicogeno sintasi

In questa tappa della sintesi del glicogeno, l'unità glicosilica dell'UDPG viene trasferita al gruppo OH del C4 di una delle estremità non riducenti del glicogeno per formare un legami α (1 \rightarrow 4)glicosidico.



Combinando le prime due reazioni della sintesi del glicogeno si ottiene:



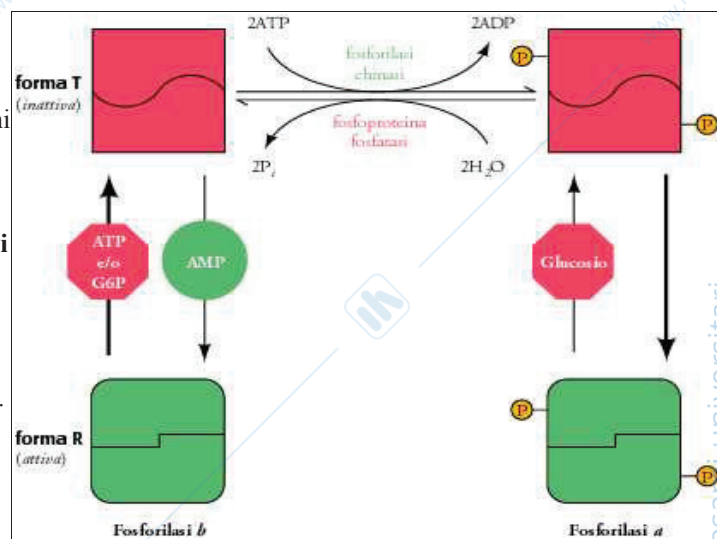
Quindi una molecola di UTP viene scissa ad UDP per ogni residuo di glucosio incorporato nel glicogeno.

La *glicogeno sintasi* ha, come la glicogeno fosforilasi, due orme enzimatiche interconvertibili tra loro; in questo caso, però, *la forma b fosforilata è meno attiva e la forma a defosforilata è più attiva*.

Questo enzima è sotto controllo allosterico: viene inibito da AMP e attivato da ATP e G6P. L'enzima defosforilato (forma a) è attivato dal G6P.

Enzima ramificante del glicogeno:

Le ramificazioni caratteristiche del glicogeno sono dovute a questo enzima il cui nome scientifico è *amilo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglicosilasi*. Una ramificazione si origina dal trasferimento di un segmento di 7 residui dall'estremità di una catena al gruppo OH del C6 di un residuo di glucosio localizzato sulla stessa o su un'altra catena di glicogeno. Ogni segmento trasferito deve derivare da una catena costituita da almeno 11 residui, e il nuovo punto di ramificazione deve avere una distanza di almeno 4 residui dagli altri punti di ramificazione.



CONTROLLO DEL METABOLISMO DEL GLICOGENO

Il metabolismo del glicogeno deve essere controllato in funzione delle necessità cellulari e la sua regolazione comporta sia un controllo allosterico sia un controllo ormonale che si manifesta con la modificazione covalente degli enzimi regolatori della via metabolica.

Controllo allosterico diretto della glicogeno fosforilasi e della glicogeno sintasi:

Un preciso controllo del flusso di una via metabolica è possibile quando a un enzima che funziona in condizioni lontane dall'equilibrio viene opposto un enzima controllato separatamente. Così la velocità della reazione diretta e inversa variano in modo indipendente. Questa situazione accade nel metabolismo del glicogeno mediante le reazioni opposte della *glicogeno fosforilasi* e della *glicogeno sintasi*. Tutte e due gli enzimi sono sotto controllo allosterico da parte di effettori che comprendono ATP, G6P e AMP.

La *glicogeno fosforilasi* è attivata dall'AMP e inibita dall'ATP e dal G6P. La *glicogeno sintasi* invece viene attivata dal G6P e ATP e inibita da AMP.

Modificazione covalente della glicogeno fosforilasi e della glicogeno sintasi:

L'interconversione nelle forme *a* e *b* della fosforilasi e della sintasi viene realizzata mediante un processo di fosforilazione e defosforilazione catalizzato enzimaticamente, che agisce sotto controllo ormonale. La cascata che governa l'interconversione enzimatica della glicogeno fosforilasi coinvolge tre enzimi:

1. La **fosforilasi chinasi** fosforila specificamente la *glicogeno fosforilasi b*:

Ha una composizione in subunità $(\alpha \beta \gamma \delta)_4$: l'attività catalitica risiede nella subunità δ o

Calmodulina mentre le altre svolgono una funzione regolatrice. Questo enzima è soggetto a duplice regolazione: è convertita in una forma a bassa attività ed una forma ad alta attività dalla

fosforilazione della sua subunità β . Può essere attivata dalla PKA o Protein chinasi A (che viene attivata da un secondo messaggero il cAMP) e da ioni Ca^{2+} .

Il legame del Ca^{2+} ad uno dei due domini della CaM induce in quel dominio un cambiamento conformazionale tale da esporre una superficie idrofobica che si lega a sua volta al dominio della CaM che a sua volta lega la subunità γ dell'enzima.

2. **Proteina chinasi cAMP-dipendente (cAPK)** fosforila e quindi attiva la *fosforilasi chinasi*:

La concentrazione di cAMP costituisce il principale segnale intracellulare per l'attivazione della glicogeno fosforilasi da parte della fosforilasi chinasi. In una cellula la concentrazione di cAMP è in funzione del rapporto tra la sua velocità di sintesi a partire dall'ATP e la sua velocità di demolizione per formare AMP. L'AMP ciclico è assolutamente necessario per l'attività della PKA, un enzima che fosforila sia *fosforilasi chinasi* che *glicogeno sintasi*. In assenza di cAMP, la cAPK è un tetramero inattivo che consiste di due subunità regolatorie e due subunità catalitiche,

R_2C_2 . Il cAMP si lega alla subunità regolatoria e causa la dissociazione dei monomeri catalitici attivi. Quindi, la concentrazione intracellulare di cAMP determina la quantità di cAPK nella forma attiva e di conseguenza la velocità alla quale essa fosforila i suoi substrati.

3. **Fosfoproteina fosfatasi-1** defosforila e quindi inattiva sia la *glicogeno fosforilasi a* che la *fosforilasi chinasi*.

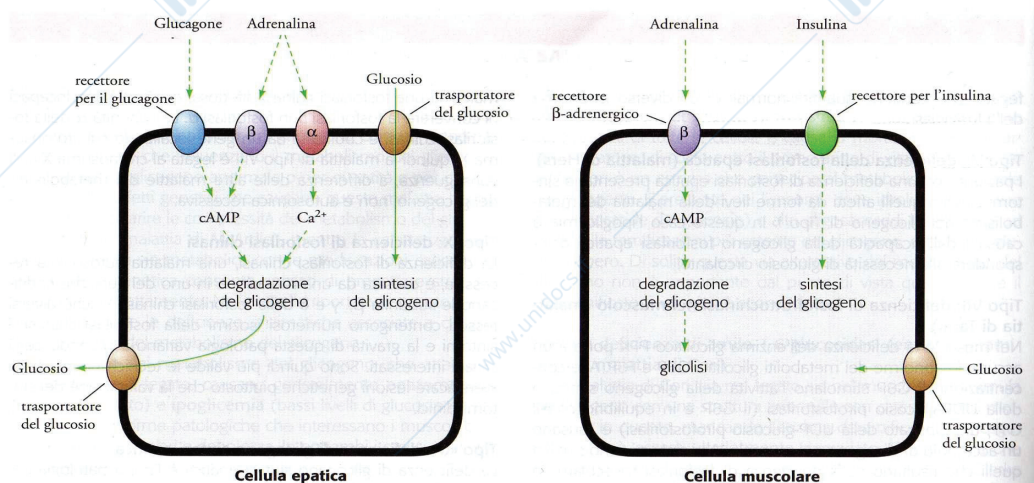
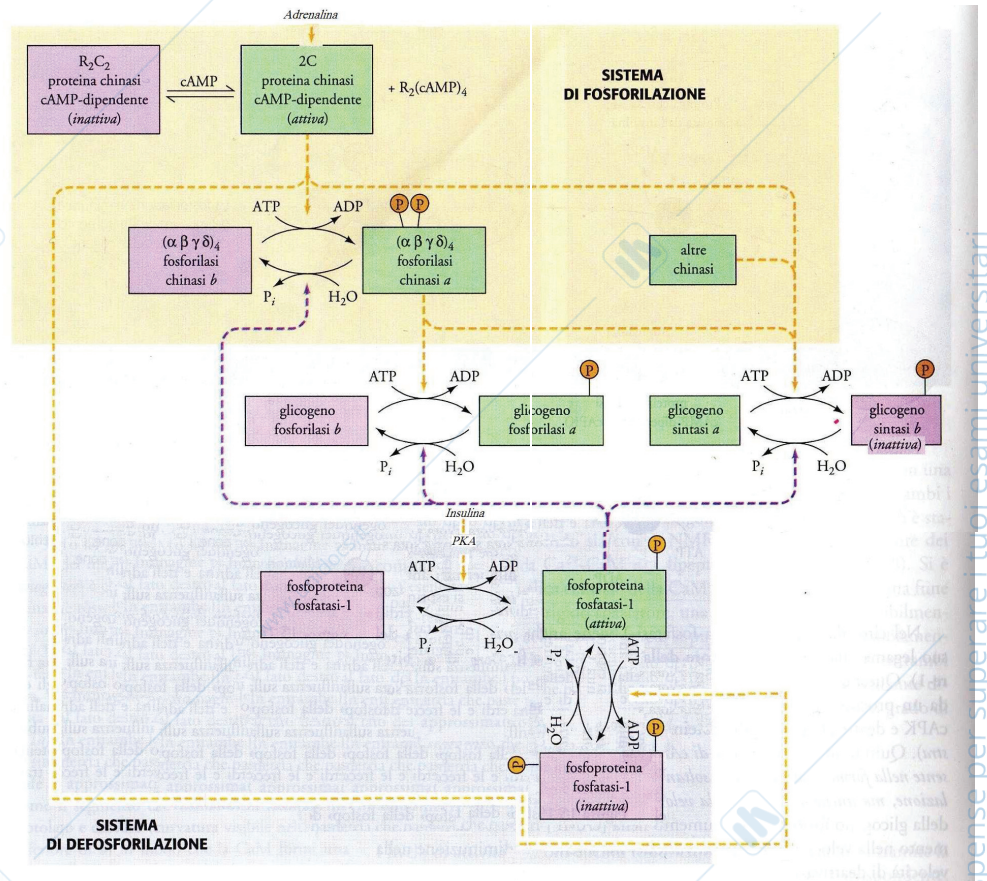
Nel muscolo, è attiva solo quando è legata al glicogeno mediante la sua subunità G. Nel fegato l'attività della fosfoproteina fosfatasi-1 è controllata dal suo legame alla *glicogeno fosforilasi a*. Nei muscoli e in altri tessuti il controllo viene esercitato dall'*insulina* (che fosforila la fosfoproteina fosfatasi-1 attivandola) e dagli ormoni adrenergici *adrenalina* (che attiva la cAPK che fosforila per la seconda volta la fosfoproteina fosfatasi-1 inattivandola).

Nel fegato:

L'adrenalina promuove il rilascio di glucagone dal pancreas e il legame di questo ormone ai suoi recettori α e β sulle cellule epatiche stimola rispettivamente l'aumento della $[Ca^{2+}]$ intracellulare (rinforzando la risposta cellulare al cAMP) e il rilascio di cAMP (che stimola la produzione di cAPK) per la demolizione del glicogeno.

Nel muscolo:

L'adrenalina promuove la degradazione del glicogeno legandosi ai recettori β che stimolano il rilascio di cAMP (che stimola a sua volta la produzione di cAPK).



IL CICLO DELL'ACIDO CITRICO

Il ciclo dell'acido citrico è una via metabolica centrale in grado di recuperare energia da alcuni combustibili metabolici che comprendono carboidrati, acidi grassi e amminoacidi che vengono degradati ad *acetil-CoA* per ossidazione.

È una ingegnosa serie di otto reazioni che ossidano il gruppo acetile dell'*acetil-CoA* a due molecole di CO_2 in modo da conservare l'energia libera che si ottiene nei composti ridotti NADH e FADH_2 .

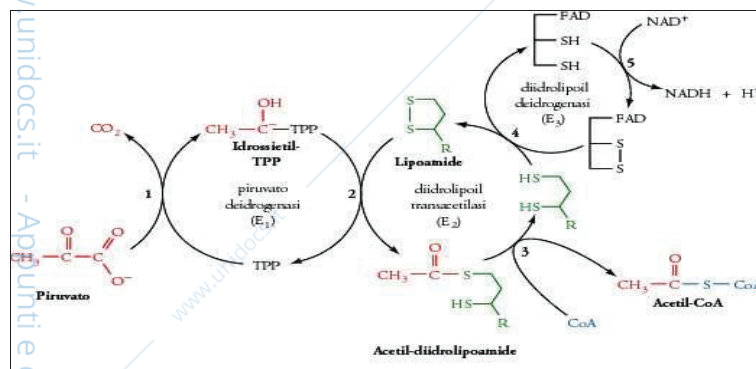
Un ciclo completo produce due molecole di CO_2 , tre di NADH , una di FADH_2 e una di un composto "ad alta energia" (GTP o ATP). In ogni giro viene ossidato un gruppo acetile a CO_2 . La reazione netta del ciclo è:



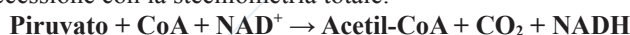
L'ossalacetato che viene consumato nella prima tappa del ciclo viene rigenerato nell'ultima reazione: il ciclo dell'acido citrico quindi si comporta come un catalizzatore a tappe multiple in grado di ossidare un numero illimitato di gruppi acetili.

Negli eucarioti tutti gli enzimi di questo ciclo sono localizzati nei mitocondri per cui, tutti i substrati, devono essere generati nei mitocondri o devono essere trasportati dal citosol all'interno di essi. Inoltre gli intermedi del ciclo sono precursori della biosintesi di altri composti.

L'*acetil-CoA* si forma dalla decarbossilazione ossidativa del piruvato tramite l'azione di un *complesso multienzimatico* chiamato **piruvato deidrogenasi**. I complessi multienzimatici sono costituiti da enzimi associati in modo non covalente che catalizzano due o più tappe in successione di una via metabolica. I loro vantaggi sono l'aumento della velocità della reazione, la minimizzazione delle reazioni collaterali e il controllo coordinato delle reazioni.



Il complesso della **piruvato deidrogenasi** contiene tre enzimi in copie multiple: la *piruvato deidrogenasi* (E1), la *diidrolipoil transacetilasi* (E2) e la *diidrolipoil deidrogenasi* (E3). Questo complesso catalizza 5 reazioni in successione con la stechiometria totale:



Sono necessari 5 diversi coenzimi: *Tiamina Pirofosfato* (TPP), *Lipoamide*, *CoA*, *FAD*, *NAD*.

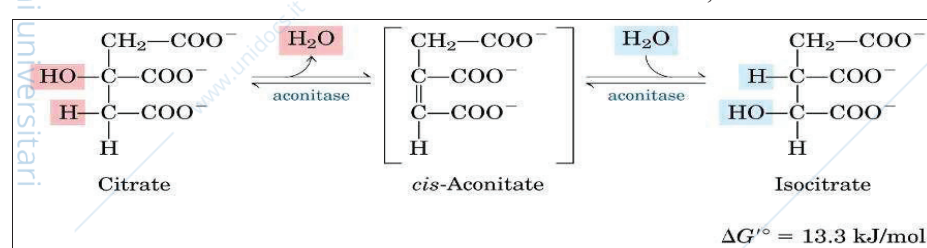
Il residuo di acido lipoico e la catena del residuo di Lys a cui esso è attaccato costituiscono un braccio (braccio di *lipoillisina*) che si comporta come una lunga articolazione che fa oscillare il gruppo disolfuro da E1 (dove raccoglie un gruppo idrossietilico) al sito attivo di E2 (dove il gruppo idrossietilico viene trasferito per formare Acetil-CoA) e da lì su E3 (dove viene riossidato il gruppo disolfuro ridotto).

1 La **citrato sintasi** catalizza la condensazione dell'ossalacetato con acetil-CoA, ad ottenere **citrato**. La sua struttura quaternaria consta di due subunità che permettono la formazione di una fessura contenente il sito di legame per l'ossalacetato. Quando quest'ultimo si lega, il dominio enzimatico più piccolo subisce un cambiamento conformazionale che genera il sito di legame per l'acetil-CoA e sigilla il sito di legame per l'ossalacetato in modo che il solvente non possa entrare in contatto con il substrato legato.

In seguito al legame tra le due molecole, il gruppo tioestere (CoA)

viene idrolizzato, formando così la molecola di *citrato*. La reazione è altamente esoergonica, motivo per cui questo step è irreversibile. Il citrato prodotto dall'enzima, inoltre, è in grado di inibire competitivamente l'attività dell'enzima. Pur essendo la reazione molto favorita (perché esoergonica), dunque, la citrato sintasi può essere saldamente regolata. Questo aspetto ha una notevole importanza biologica, dal momento che permette una completa regolazione dell'intero ciclo di Krebs, rendendo l'enzima una sorta di *pacemaker* dell'intero ciclo.

2 La **aconitasi** catalizza la isomerizzazione reversibile del citrato, attraverso la formazione di *cis*-aconitato, ad **isocitrato**. La reazione ha inizio



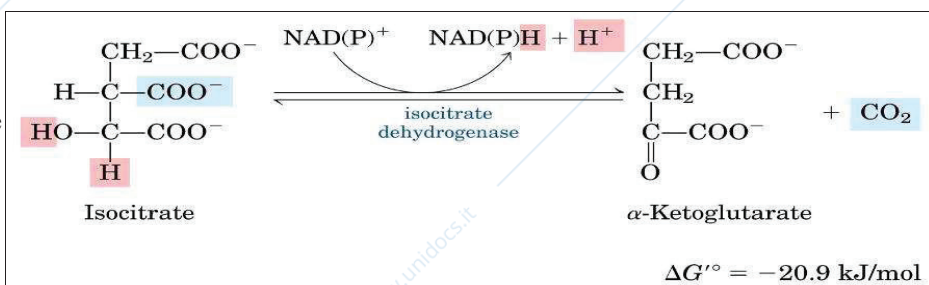
con una tappa di *deidratazione* in cui vengono rimossi un protone e un gruppo OH. Nel sito attivo dell'enzima è presente un *cluster ferro-zolfo* (chiamato *cubano*) che coordina il gruppo OH del citrato in modo da facilitarne l'eliminazione.

La seconda tappa della reazione dell'aconitasi è la *reidratazione* del doppio legame del *cis*-aconitato, con la formazione di isocitrato. Anche se l'aggiunta di acqua al

doppio legame del *cis*-aconitato potrebbe potenzialmente portare alla formazione di 4 stereoisomeri, l'aconitasi catalizza l'aggiunta stereospecifica di OH^- e H^+ con la produzione di un solo stereoisomero dell'isocitrato.

3 La **isocitrato deidrogenasi** mitocondriale è un enzima dipendente dalla presenza di NAD^+ e di Mn^{2+} e/o Mg^{2+} . Inizialmente, l'enzima catalizza l'ossidazione dell'isocitrato (alcol secondario) ad *ossalsuccinato* (chetone), che genera la prima molecola di NADH (del ciclo) a partire da NAD^+ .

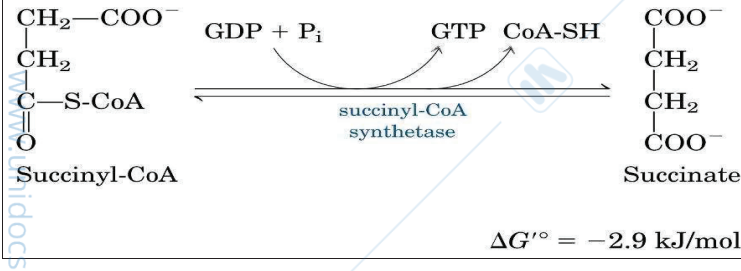
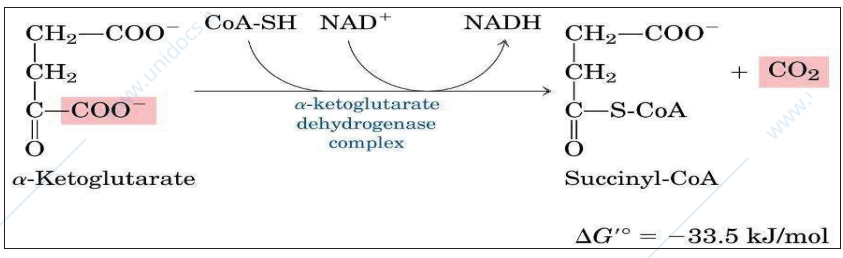
Successivamente, la presenza di uno ione bivalente che complessa gli ossigeni del gruppo carbossile in posizione alfa aumenta l'elettronegatività di quella regione di molecola. Ciò genera un riarrangiamento degli elettroni della molecola, con conseguente rottura del legame tra il carbonio in posizione *gamma* e l'adiacente gruppo carbossile. In questo modo si ha dunque una *decarbossilazione* (ossia l'uscita della prima molecola di CO_2 dal ciclo), che porta alla formazione di **α -chetoglutarato**, caratterizzato da un chetone in posizione beta e due carbossili alle estremità.



4 L' α -chetoglutarato deidrogenasi catalizza la decarbossilazione ossidativa dell' α -chetoglutarato (chetoadido).

Questa reazione produce la seconda molecola di CO₂ e di NADH del ciclo. Questa reazione è molto simile a quella catalizzata dalla piruvato deidrogenasi.

È un complesso multienzimatico costituito dall' α -chetoglutarato deidrogenasi (E1), dal diidrolipoil trans-succinilasi (E2) e dalla diidrolipoil deidrogenasi (E3): le reazioni catalizzate da questo complesso multienzimatico avvengono seguendo un meccanismo identico a quello del complesso della piruvato deidrogenasi. Il prodotto finale è un tioestere ad alta energia, in questo caso il succinil-CoA.

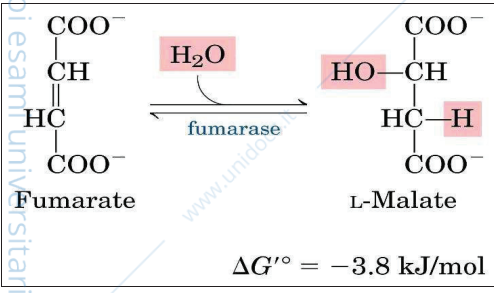
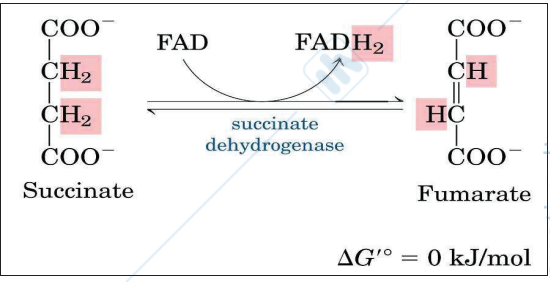


5 L'enzima succinil-CoA sintetasi si serve del legame ad alta energia del succinil-CoA per fosforilare un nucleoside difosfato purinico come il GDP. L'energia proveniente dal tioestere viene semplicemente convertita in energia legata ad un legame fosfato. Il primo passaggio della reazione genera un nuovo intermedio ad alta energia, noto come succinil fosfato. Successivamente, una istidina presente nel sito catalitico rimuove il fosfato dalla molecola glucidica, generando il prodotto succinato ed una molecola di fosfoistidina, che dona velocemente il fosfato ad un nucleoside difosfato, ricaricandolo a trifosfato. Si tratta dell'unico passaggio del ciclo

in cui si ha una fosforilazione al livello del substrato. Il GTP è principalmente coinvolto nei pathway di trasduzione del segnale: il suo ruolo in un processo energetico come il ciclo di Krebs è invece essenzialmente quello di tramite per il trasferimento di gruppi fosfato verso l'ATP, in una reazione catalizzata dalla nucleoside difosfochinasi.

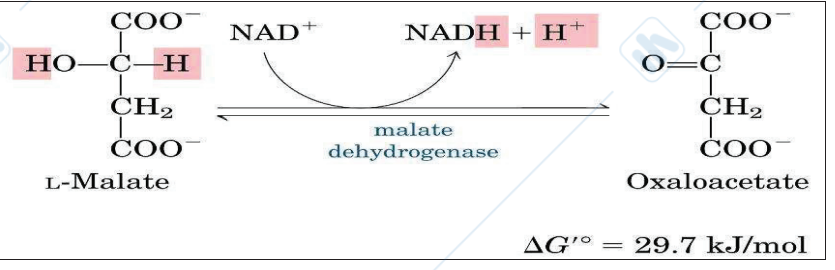
[La parte finale del ciclo vede il riarrangiamento di molecole a quattro atomi di carbonio fino alla rigenerazione dell'ossalacetato. Perché ciò sia possibile, il gruppo metile presente sul succinato deve essere convertito in un carbonile. Come avviene in altri pathways (ad esempio la beta ossidazione degli acidi grassi), tale conversione avviene attraverso tre passaggi: una prima ossidazione, una idratazione ed una seconda ossidazione. Questi tre passaggi, oltre a rigenerare ossalacetato, permettono l'estrazione di ulteriore energia attraverso la formazione di FADH₂ e NADH.]

6 La prima reazione di ossidazione è catalizzata dalla succinato deidrogenasi (Complesso II), l'unico enzima del ciclo ad avere come accettore di idrogeno il FAD anziché il NAD⁺: generalmente il FAD agisce biochimicamente per ossidare alcani ad alcheni, mentre il NAD⁺ partecipa all'ossidazione maggiormente esoergonica degli alcoli ad aldeidi o chetoni. L'enzima si serve del FAD poiché l'energia associata alla reazione non è sufficiente per ridurre NAD⁺. Tale enzima è anche l'unico ad essere annidato all'interno della membrana mitocondriale. Tale posizione è dovuta anche al coinvolgimento dell'enzima nella catena di trasporto degli elettroni. Gli elettroni passati sul FAD vengono dunque immessi direttamente nella catena, grazie al legame stabile tra l'enzima ed il cofattore stesso.



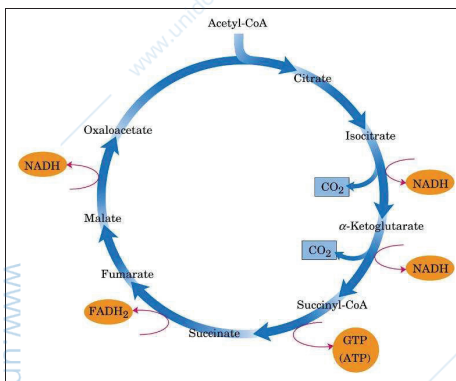
7 La fumarasi catalizza l'aggiunta in trans di un protone e di un gruppo OH⁻ provenienti da una molecola d'acqua al fumarato per formare malato. L'aggiunzione di OH⁻ avviene prima dell'aggiunzione di H⁺. Dal momento che l'enzima è in grado di legare OH⁻ solo da un lato, il fumarato può essere convertito solo in L-malato.

8 La malato deidrogenasi catalizza la rigenerazione dell'ossalacetato attraverso l'ossidazione del gruppo ossidrilico del malato in una reazione NAD⁺ dipendente. Il valore di $\Delta G'^{\circ}$ per questa reazione è di circa +29,7 kJ/mole quindi all'equilibrio la concentrazione di ossalacetato rispetto a quella di malato è molto bassa. Bisogna ricordare tuttavia che la reazione catalizzata dalla citrato sintasi, la prima reazione del ciclo, è fortemente esoergonica ($\Delta G'^{\circ} = -31.4$ kJ/mole) a causa della rottura del legame tioestere del citril-CoA. A questo punto risulta chiaro la necessità di un processo che in apparenza sembrava totalmente inutile. Per mezzo di questa reazione la formazione di citrato diventa un processo esoergonico anche a basse concentrazioni di ossalacetato presenti nelle cellule e quindi aiuta lo svolgersi del ciclo dell'acido citrico.

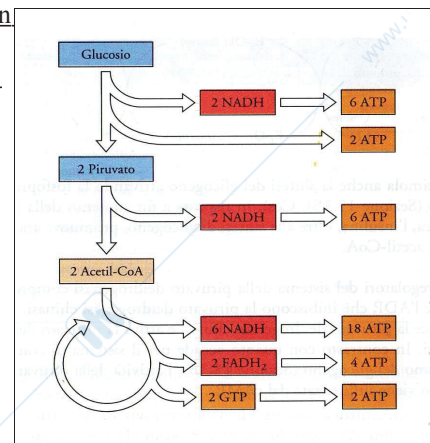


REGOLAZIONE CICLO DELL'ACIDO CITRICO

I fattori che influenzano la velocità del ciclo sono: la disponibilità di substrati; la necessità di intermedi del ciclo dell'acido citrico come precursori biosintetici; la richiesta di ATP. Inoltre gli enzimi del ciclo dell'acido citrico sono fisicamente associati, facilitando così una regolazione coordinata. L'ossidazione del gruppo acetile a due molecole di CO₂ è un processo che coinvolge quattro coppie di elettroni. Per ogni molecola di *acetil-CoA* che entra nel ciclo, tre molecole di NAD⁺ vengono ridotte a NADH con

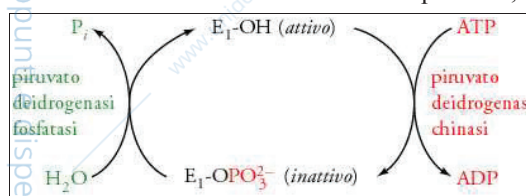


l'acquisto di 3 coppie di elettroni, e una molecola di FAD viene ridotta a FADH₂ con l'acquisto della quarta coppia di elettroni: viene inoltre prodotto un GTP o un ATP. Gli elettroni trasportati dal NADH e dal FADH₂ vengono instradati sulla catena di trasporto degli elettroni, con la riduzione finale di O₂ ad H₂O. L'energia ricavata dal trasporto degli elettroni viene conservata per la sintesi di ATP che avviene con la fosforilazione ossidativa. Per ogni molecola di NADH che trasferisce i suoi elettroni vengono prodotti circa 3 ATP a partire da ADP + P_i; per ogni molecola di FADH₂ vengono prodotti circa 2 ATP. Quindi alla fine con un giro completo dell'acido citrico si generano circa 12 molecole di ATP.



Regolazione Piruvato Deidrogenasi:

La decarbossilazione del piruvato da parte del complesso della **piruvato deidrogenasi** è un processo irreversibile e, poiché nei mammiferi non vi sono altre vie per la sintesi dell'acetil-CoA partendo dal piruvato è importante che questa reazione sia accuratamente controllata. Vengono utilizzati due sistemi regolatori: **Inibizione da prodotto** NADH e Acetil-CoA competono per i siti di legame sui loro rispettivi enzimi con NAD⁺ e CoA: rapporti elevati di [NADH]/[NAD⁺] e di [Acetil-CoA]/[CoA] modificano l'attività del complesso enzimatico causando una diminuzione nella velocità di decarbossilazione del piruvato; **Modificazione covalente di E₁** il NADH e l'Acetil-CoA attivano la *piruvato deidrogenasi*



chinasi che fosforila un residuo di Ser sulla piruvato deidrogenasi inattivando l'intero complesso enzimatico. L'*insulina* però, l'ormone che segnala abbondanza di carburante metabolico rimuove l'inattivazione in quanto attiva la *piruvato deidrogenasi fosfatasi* che stacca i gruppi fosforici dalla piruvato deidrogenasi. Altri regolatori del sistema sono il *piruvato* e l'*ADP* che inibiscono la *piruvato deidrogenasi chinasi*, e il *Ca²⁺* che inibisce la *piruvato deidrogenasi chinasi* e attiva la *piruvato deidrogenasi fosfatasi*.

Regolazione velocità del ciclo:

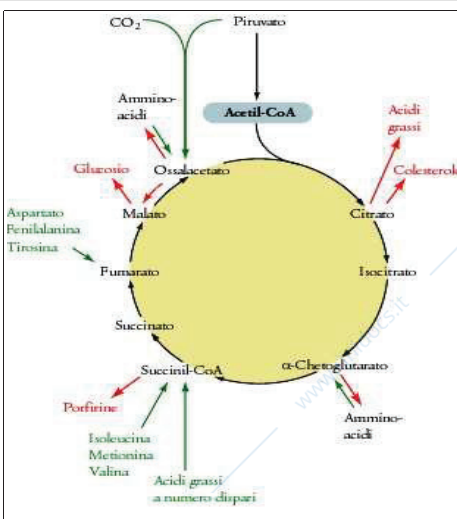
Tre degli enzimi del ciclo operano in condizioni fisiologiche lontane dall'equilibrio: la *citrate sintasi*, l'*isocitrato deidrogenasi NAD⁺ dipendente* e l'*α-chetoglutarato deidrogenasi*. Questi sono quindi gli enzimi che determinano la velocità del ciclo. Questi enzimi controllano la velocità del ciclo principalmente mediante tre semplici meccanismi: **disponibilità di substrato**; **inibizione da prodotto**; **inibizione retroattiva competitiva da parte di intermedi prodotti più avanti lungo il ciclo**.

I più importanti regolatori del ciclo sono gli stessi substrati: l'*acetil-CoA*, l'*ossalacetato* e il suo prodotto *NADH*.

La disponibilità di substrati per la *citrate sintasi* (acetil-CoA e ossalacetato) varia a seconda dello stato metabolico della cellula e in alcuni casi può limitare la velocità della formazione del citrato. Il NADH, un prodotto dell'ossidazione dell'*isocitrato* e dell'*α-chetoglutarato* può accumularsi e, quando il rapporto [NADH/NAD⁺] tende ad aumentare, entrambe le reazioni deidrogenasiche sono inibite per azione di massa. La reazione della *malato deidrogenasi* è pressoché in equilibrio all'interno della cellula, ma quando il rapporto [NADH/NAD⁺] è elevato, la concentrazione di ossalacetato diminuisce limitando anche la velocità della prima tappa del ciclo.

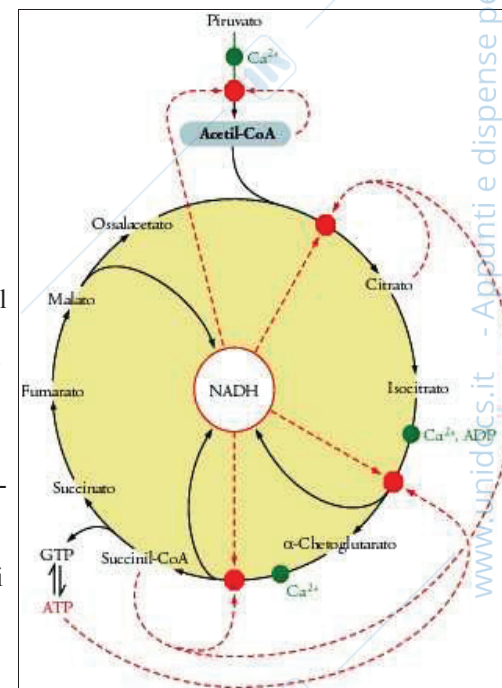
Un accumulo dei prodotti inibisce tutte e tre le tappe limitanti del ciclo: il *succinil-CoA* inibisce l'*α-chetoglutarato deidrogenasi* (e anche la *citrate sintasi*), il *citrato* blocca la *citrate sintasi*, e l'*ATP* inibisce sia la *citrate sintasi* sia l'*isocitrato deidrogenasi*. L'inibizione della citrate sintasi da ATP viene eliminata dall'*ADP*, un attivatore allosterico di questo enzima. Le concentrazioni dei substrati e degli intermedi del ciclo sono quindi in grado di aggiustare il flusso attraverso la via in modo da avere la massima concentrazione di ATP e NADH.

Reazioni Correlate al ciclo dell'acido citrico:



Il ciclo dell'acido citrico è una via catabolica, tuttavia, alcune vie biosintetiche utilizzano intermedi di questo ciclo come materiale di partenza per le reazioni anaboliche. Il ciclo dell'acido citrico è quindi *anfibolico*. Gli intermedi del ciclo sono precursori nella *biosintesi di carboidrati* (poiché la gluconeogenesi si svolge nel sito dove l'ossalacetato deve essere convertito in malato o aspartato per essere trasportato fuori dai mitocondri); *acidi grassi* (è un processo citosolico che richiede acetil-CoA citosolico che viene quindi generato dalla scissione del citrato che può attraversare la membrana mitocondriale attraverso la reazione catalizzata dalla *ATP citrato liasi*); *amminoacidi* (viene utilizzato come materiale di partenza α-chetoglutarato e ossalacetato).

Negli organismi aerobici il ciclo dell'acido citrico costituisce la principale fonte di energia libera, quindi la funzione catabolica non può essere interrotta e gli intermedi dirottati altrove devono essere ripristinati. Le reazioni di riempimento sono chiamate **reazioni anaplerotiche**, la più importante delle quali è catalizzata dalla *piruvato carbossilasi* che produce ossalacetato a partire dal piruvato: questo enzima "sente" grazie al suo attivatore acetil-CoA quando sono necessarie maggiori quantità di intermedi del ciclo. Qualsiasi diminuzione della velocità del ciclo causata da una insufficiente quantità di ossalacetato o di altri intermedi consente alla concentrazione di acetil-CoA di aumentare.



Sistemi di trasporto nei mitocondri

La membrana interna dei mitocondri è liberamente permeabile solo all'O₂, alla CO₂ e all'H₂O e contiene proteine di trasporto che controllano il passaggio di metaboliti come ATP, ADP, piruvato, Ca²⁺ e fosfato. L'impermeabilità controllata a ioni e metaboliti permette la generazione di gradienti ionici e porta alla compartimentazione delle funzioni metaboliche tra citosol e mitocondri.

Sistema navetta del glicerofosfato: gli elettroni del NADH citosolico vengono trasportati alla catena di trasporto degli elettroni nel mitocondrio mediante un processo a tre tappe: 1) reazione di ossidazione citosolica del NADH da parte del DHAP catalizzata dalla 3-fosfoglicerolo deidrogenasi 2) ossidazione del 3-fosfoglicerolo catalizzata dalla flavoproteina deidrogenasi con la riduzione del FAD a FADH₂ 3) riossidazione del FADH₂ con il passaggio degli elettroni sulla catena di trasporto degli elettroni.

Traslocatore ADP-ATP: presente nella membrana mitocondriale interna che trasporta l'ATP (4 cariche negative) fuori dalla matrice scambiandolo con l'ADP (3 cariche negative) prodotto nel citosol dall'idrolisi dell'ATP. Ha un solo sito di legame per il quale competono ATP e ADP e deve interagire con il ligando per passare da una conformazione all'altra. Il P_i che è necessario per la sintesi di ATP nella matrice viene importato dal citosol mediante un simporto P_i-H⁺ elettrogenico

Trasporto del Ca²⁺: l'entrata del Ca²⁺ è promossa dal potenziale di membrana che attrae cationi e la sua uscita è modulata dallo scambio con ioni Na⁺.

Trasporto degli elettroni

L'ossidazione del NADH e del FADH₂ viene compiuta dalla catena di trasporto degli elettroni, un insieme di complessi proteici contenenti centri redox caratterizzati da affinità per gli elettroni progressivamente crescenti: tali elettroni viaggiano lungo questa catena partendo da potenziali di riduzione standard più bassi verso potenziali più alti.

Gli elettroni vengono trasportati dai **Complessi I e II** al **Complesso III** mediante il **coenzima Q (CoQ o ubiquinone)** e dal **Complesso III** al **Complesso IV** attraverso la proteina periferica di membrana **citocromo c**.

- Complesso I → ATP**
NADH + CoQ (oss) → NAD⁺ + CoQ (rid)
- Complesso II → no ATP**
FADH₂ + CoQ (oss) → FAD + CoQ (rid)
- Complesso III → ATP**
CoQ (rid) + citocromo c (oss)
- Complesso IV → ATP**
CoQ (oss) + citocromo c (rid)

Complesso I e Complesso II:

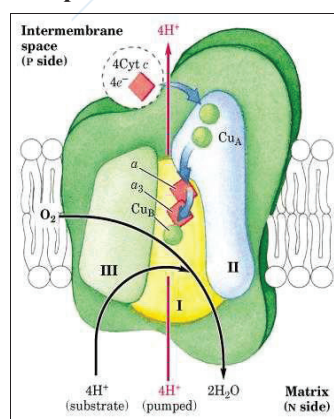
Il **Complesso I** contiene 43 catene polipeptidiche con massa di circa 850kD, una molecola di **FMN**, 6 o 7 **centri ferro-zolfo** [2Fe-2S] [4Fe-4S] che partecipano al trasporto degli elettroni: questi centri sono i gruppi prostetici delle proteine ferro-zolfo. Sia **FMN** che i **centri ferro-zolfo** possono assumere tre stati di ossidazione diversi e quindi accettare o donare o uno o due elettroni poiché le loro forme semichinoniche sono stabili (radicali liberi). Il transito degli elettroni dal NADH al CoQ probabilmente avviene mediante un meccanismo a tappe seguendo il potenziale di riduzione dei vari centri redox presenti nel complesso I. Nel momento in cui gli elettroni vengono trasportati tra i vari centri, 4 protoni vengono trasferiti fuori dalla matrice nello spazio intermembrana.

Il **Complesso II** contiene l'enzima **succinato deidrogenasi** e altre piccole subunità idrofobiche: passa gli elettroni dal succinato al CoQ. I gruppi redox di tale complesso comprendono il **FAD** (legato all'enzima), 3 centri ferro-zolfo e un **citocromo b₅₆₀**. L'energia libera per il trasferimento degli elettroni dal succinato al CoQ è insufficiente per promuovere la sintesi di ATP, ma è comunque un complesso importante poiché consente agli elettroni con un potenziale relativamente alto di entrare nella catena di trasporto degli elettroni saltando il complesso I.

Complesso III:

Il **Complesso III** è composto da 2 **citocromi b (Low High)**, 1 **citocromo c₁** e 1 **centro ferro-zolfo**. Tale complesso funziona per consentire ad una molecola di **CoQH₂**, un trasportatore a due elettroni di ridurre due molecole di **citocromo c**, un trasportatore a un elettrone. Questo accade per un'insolita biforcazione del flusso degli elettroni dal CoQH₂ al citocromo c₁ e al citocromo b (in quest'ultimo il flusso è ciclico), è il cosiddetto **Ciclo Q** che consente al complesso III di pompare dei protoni dalla matrice allo spazio intermembrana. La sua essenza è che il CoQH₂ subisce una riossidazione che avviene in due cicli, in cui il semichinone, CoQ[•], è un intermedio stabile.

Complesso IV:



Il **Complesso IV (citocromo c ossidasi)** catalizza le ossidazioni di quattro molecole consecutive di citocromo c ridotto e la contemporanea riduzione di una molecola di O₂ utilizzando quattro elettroni per formare due molecole di H₂O. Nel processo di riduzione dell'O₂ da parte della citocromo ossidasi vengono consumati quattro protoni dalla matrice. Il complesso inoltre utilizza anche l'energia di questa redox per pompare un H⁺ nello spazio intermembrana per ogni elettrone che lo attraversa aumentando ulteriormente il potenziale elettrochimico prodotto dal trasporto protonico attraverso il Complesso I e il Complesso III.

È un dimerico di 400kD e contiene 4 centri redox: 1 **citocromo a**, 1 **citocromo a₃**, 1 **Cu_B** e alcuni **Cu_A**. Il trasferimento degli elettroni è un processo lineare che procede dal citocromo c al centro Cu_A, quindi all'eme a, e infine all'eme a₃ e a Cu_B.

La riduzione di 1/2 O₂ a 1 molecola di H₂O da parte della citocromo c ossidasi avviene a livello del complesso binucleare citocromo a₃ - Cu_B e richiede il trasferimento per 2 volte consecutive di un elettrone per volta dai siti di Cu_A e del citocromo a.

Fosforilazione Ossidativa (Teoria Chemiosmotica)

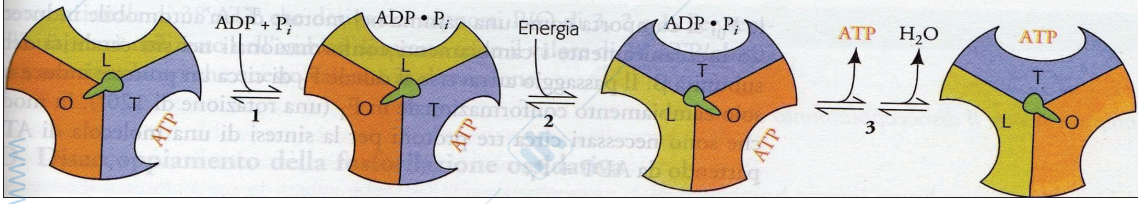
L'energia libera prodotta durante il trasporto degli elettroni viene conservata pompando ioni H⁺ dalla matrice mitocondriale nello spazio intermembrana per creare attraverso la membrana mitocondriale interna un gradiente elettrochimico di H⁺. Il potenziale elettrochimico di questo gradiente viene sfruttato per sintetizzare ATP dalla **ATP sintasi**.

Il trasporto degli elettroni promuove il trasferimento dei protoni da parte dei Complessi I, III e IV dalla matrice contenente una bassa $[H^+]$, attraverso la membrana mitocondriale interna, allo spazio intermembrana caratterizzata da un'alta concentrazione di $[H^+]$. Poiché il pH (fuori) è minore del pH dentro, l'esportazione di protoni fuori dalla matrice mitocondriale è un processo endoergonico.

ATP sintasi (Complesso V):

ATP sintasi è un proteina transmembrana di 450kD. È costituita da due unità funzionali, **F₀** (canale protonico transmembrana insolubile in acqua) e **F₁** (proteina periferica di membrana solubile). La **componente F₀** contiene sei copie di una proteina che lega DCCD (*dicicloesilcarbodiimide*) che formano un canale polare per il passaggio di H^+ . La **componente F₁** invece è un esamero che costituisce una struttura sferoidale "montata" su un lungo stelo poggiato a sua volta sulla componente **F₀**.

Meccanismo per la sintesi di ATP:



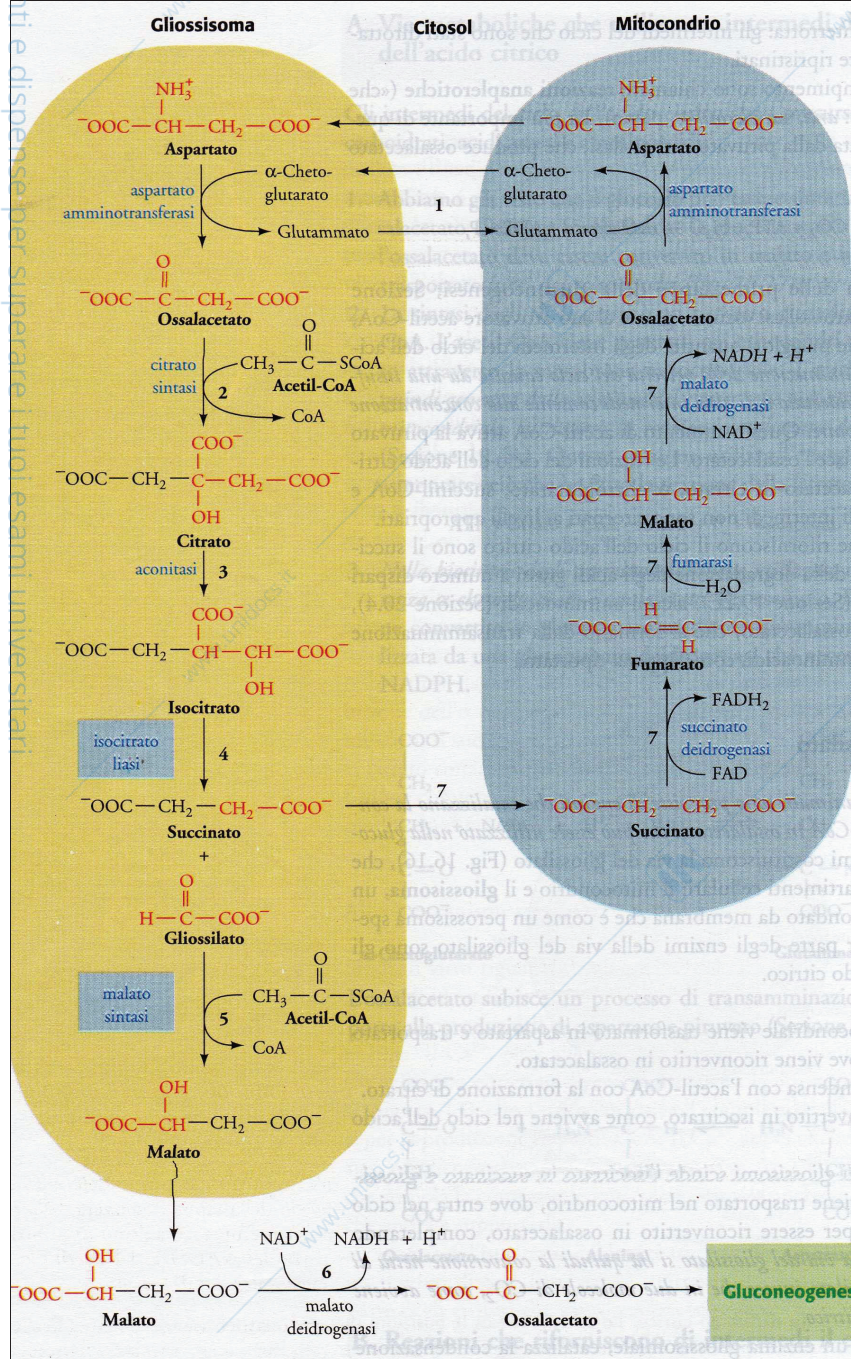
- 1 Traslocazione di protoni promossa da F₀.
- 2 Formazione catalitica del legame fosfoanidridico dell'ATP promosso da F₁.
- 3 Accoppiamento della dissipazione del gradiente protonico con la sintesi

di ATP che necessita dell'interazione di F₁ con F₀.

F₁ possiede tre protomeri catalitici che interagiscono tra di loro, ognuno dei quali è caratterizzato da un diverso stato conformazionale: uno stato conformazionale in cui substrati e prodotti si legano debolmente (L) un altro in cui si legano saldamente (T) un altro ancora in cui non si legano per niente (O). *L'energia libera rilasciata durante la traslocazione dei protoni viene sfruttata per interconvertire questi tre stati conformazionali. Il legame fosfoanidridico dell'ATP viene sintetizzato solo nello stato T e l'ATP viene rilasciato solo nello stato O.*

Rapporto P/O :

Mette in relazione la quantità di ATP sintetizzata con la quantità di O₂ che viene ridotto. Il flusso di 2e attraverso i complessi I, III, IV, porta alla traslocazione di 10 H⁺ nello spazio intermembrana che produrranno circa 3 ATP (3H⁺ → 1ATP).
L'ossidazione di **NADH** è associata con la sintesi di **3 ATP**, il **FADH₂** con **2 ATP**, il **tetrametil-p-fenilendiammina** **1 ATP**.

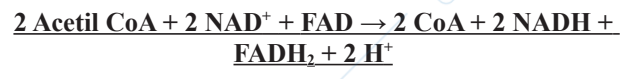


LA VIA DEL GLIOSSILATO

Le piante ma non gli animali sono provviste di enzimi che catalizzano la conversione netta di acetyl-CoA in ossalacetato che può essere utilizzato nella gluconeogenesi.

Questi enzimi costituiscono la via del gluossilato che si svolge nel mitocondrio e nel gliossisoma (perossisoma specializzato)

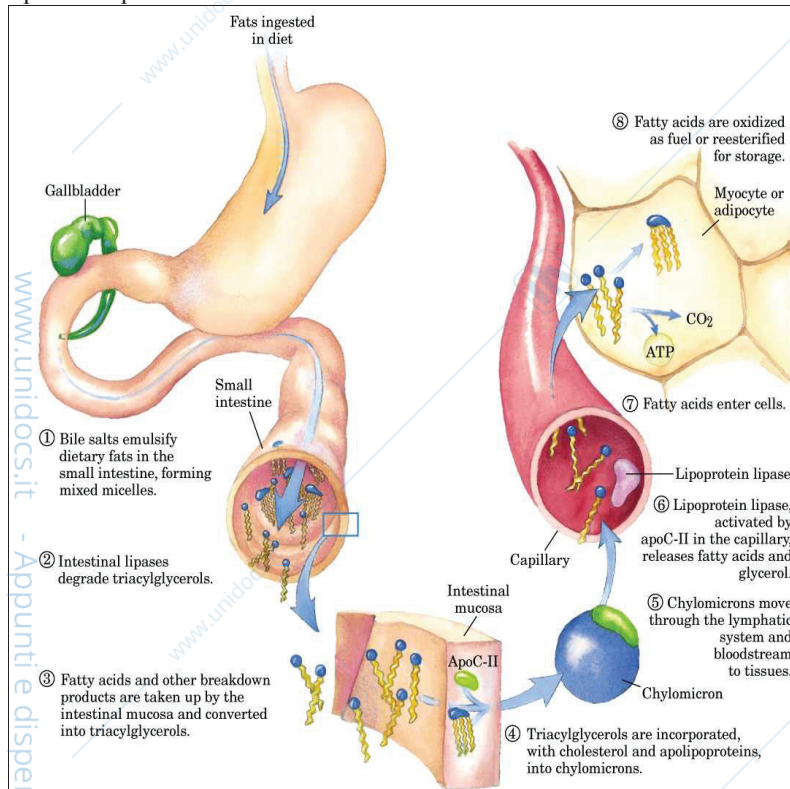
- 1 L'ossalacetato mitocondriale viene trasformato in aspartato e trasportato nel gliossisoma dove viene riconvertito in ossalacetato.
- 2 L'ossalacetato si condensa con l'acetyl-CoA con la formazione di citrato.
- 3 Il citrato viene convertito in isocitrato come avviene nel ciclo dell'acido citrico.
- 4 L'**isocitrato liasi** del gliossisoma scinde l'isocitrato in succinato e **gliossilato**. Il succinato viene trasportato nel mitocondrio dove entra nel ciclo dell'acido citrico per essere riconvertito in ossalacetato completando così il ciclo. *Con la via del gluossilato si ha quindi la conversione netta di acetyl-CoA in gliossilato invece che in due molecole di CO₂ come avviene nel ciclo dell'acido citrico.*
- 5 La **malato sintasi**, un enzima gliossisomale catalizza la condensazione di una molecola di gliossilato con una seconda molecola di acetyl-CoA con la formazione di malato.
- 6 Il malato esce dal gliossisoma e la malato deidrogenasi citosolica catalizza la sua ossidazione ad ossalacetato con la riduzione del NAD⁺.
- 7 Il succinato viene trasportato nei mitocondri dove viene riconvertito in ossalacetato mediante il ciclo dell'acido citrico.



METABOLISMO DEI LIPIDI

Digestione, assorbimento e trasporto dei lipidi

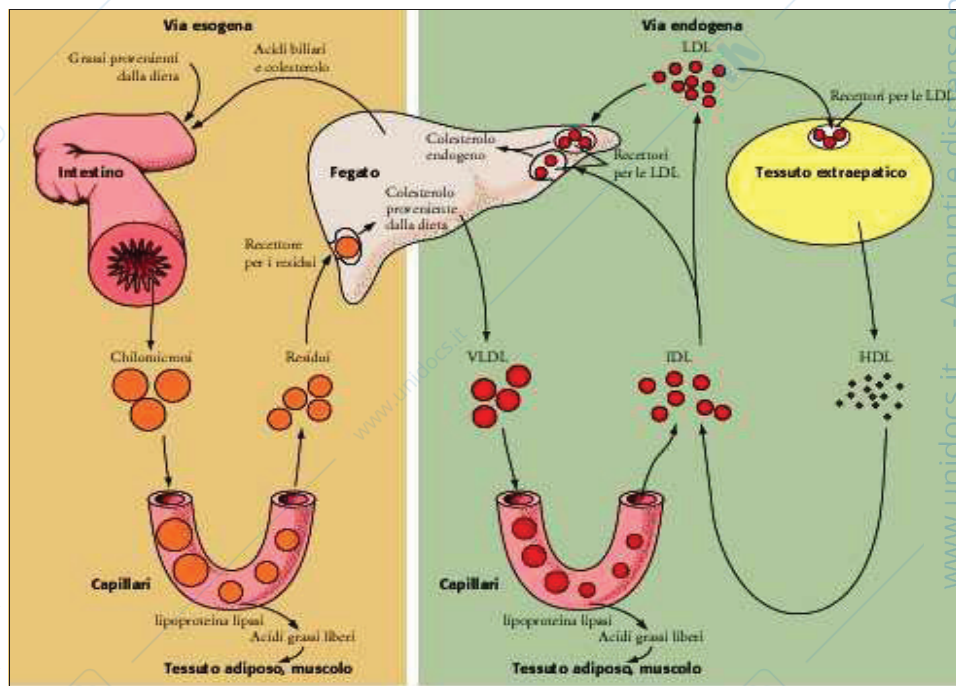
I triacilgliceroli costituiscono il 90% circa dei lipidi della dieta e sono la principale forma di accumulo di energia metabolica negli esseri umani. Poiché essi sono insolubili in acqua, mentre gli enzimi digestivi sono solubili in acqua, la digestione dei triacilgliceroli avviene all'interfaccia tra lipidi e acqua.



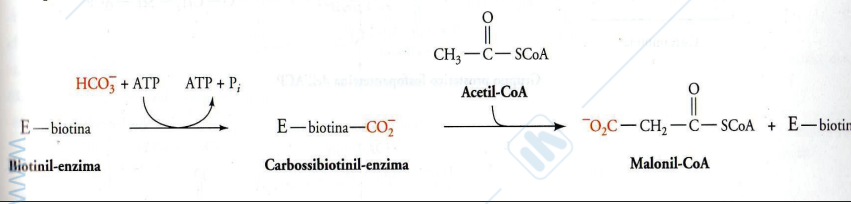
I grassi che vengono ingeriti dalla dieta passano nello stomaco dove vengono coniugati con gli acidi biliari (o sali biliari). Gli **acidi biliari** (derivati del colesterolo sintetizzati dal fegato) sono molecole anfipatiche simili a detergenti che agiscono in modo da rendere solubili i globuli di grasso. Questi grassi emulsionati formano delle **micelle miste** che vengono aggredite da una serie di enzimi intestinali che si chiamano lipasi che degradano i triacilgliceroli ad acidi grassi. Le **lipasi** agiscono a livello dell'interfaccia lipide-acqua; la lipasi pancreatica ad esempio catalizza l'idrolisi dei triacilgliceroli a livello delle posizioni 1 e 3 con la formazione di 1,2-diacilgliceroli e 2-acilgliceroli. L'attività enzimatica aumenta quando è in contatto con l'interfaccia lipide-acqua (attivazione per interfaccia); il legame all'interfaccia necessita della **colipasi** pancreatica. L'enzima è formato da un'estremità non catalitica C-terminale e una catalitica all'N-terminale; in quest'ultima si trova un'elica chiamata **coperchio** che copre il sito attivo che in presenza delle micelle si apre lasciando scoperto il sito attivo che diventa disponibile per interagire con i lipidi che vengono trasformati in acidi grassi liberi (mono/di-acilgliceroli) e viene stabilizzato dalla colipasi attraverso legami idrogeno. All'interno delle cellule intestinali gli acidi grassi formano complessi con la proteina **I-FABP** (proteina che lega gli acidi grassi intestinali). Essa porta a un aumento della solubilità effettiva di queste sostanze insolubili in acqua, consente il trasporto e la riconversione degli acidi grassi e protegge la cellula dai loro effetti detergenti. A questo punto gli acidi grassi sono liberi di passare attraverso la mucosa intestinale, vengono convertiti in triacilgliceroli e

impacchettati in particelle lipoproteiche chiamate **chilomicroni** (sistemi di trasporto che contengono colesterolo e triacilgliceroli). Questi, a loro volta, vengono rilasciati nella linfa dell'intestino e dopo essere passate nel circolo linfatico defluiscono nel circolo sanguigno venoso da dove raggiungono diversi tessuti. I chilomicroni aderiscono ai siti di legame presenti sulla superficie interna dei capillari del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo. I triacilgliceroli contenuti in essi vengono idrolizzati tramite l'azione dell'enzima **lipoproteina lipasi** e assunti dai tessuti in forma di acidi grassi. I chilomicroni si restringono progressivamente finché non rimangono **chilomicroni residui** ricchi di colesterolo che ritornano nel circolo sanguigno per essere assunti dal fegato.

Esistono altre lipoproteina classificate in base alla densità: **VLDL** (lipoproteina a densità molto bassa), **IDL** (a densità intermedia), **LDL** (a bassa densità), **HDL** (ad alta densità). Esse consentono di trasportare i lipidi polari in un ambiente acquoso. Lo scheletro di glicerolo degli acidi grassi che non vengono trasportati ai tessuti, viene portato al fegato o a i reni dove viene convertito in diidrossiacetone. Il fegato raccoglie colesterolo endogeno e quello proveniente dalla dieta. Quest'ultimo viene legato dalle **VLDL** che lo trasportano di nuovo nel flusso ematico per arrivare al tessuto muscolare e adiposo. Anche da questo trasporto rimangono dei residui che vengono legati dalla **IDL** e successivamente dalle **LDL** per poi essere riportate al fegato dove vengono assunte tramite un processo di endocitosi mediata da recettore. La lipoproteina **HDL** invece, riveste una funzione opposta rispetto alla LDL: essa rimuove il colesterolo dai tessuti. Il processo digestivo è regolato da ormoni. L'ormone che proviene dal flusso ematico lega il suo recettore, il recettore attiva l'**adenilato ciclasi** che converte l'ATP in cAMP. Il cAMP a sua volta stimola una **proteina chinasi** che stimola **triacilglicerol lipasi**. Quindi il triacilglicerolo viene convertito in acidi grassi e glicerolo. Gli acidi grassi raggiungono il flusso ematico, vengono legati all'**albumina** e trasportati fino al tessuto bersaglio in cui trovano un trasportatore degli acidi grassi che consente l'entrata nella cellula. Gli acidi grassi vengono poi β -ossidati fino a dare una serie di prodotti quali CO_2 e ATP.



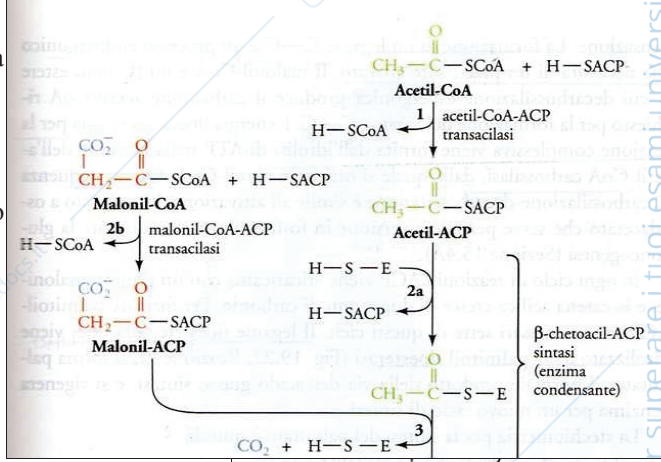
La biosintesi degli acidi grassi avviene tramite la condensazione di unità bicarboniose (C₂), un processo inverso alla β-ossidazione. Ci sono cinque grandi differenze rispetto al processo di degradazione: 1 la biosintesi avviene nel citoplasma, 2 il trasportatore del gruppo acile è l'ACP e non il CoA, 3 il donatore di elettroni è in NADPH e non il FADH₂, 4 il donatore di unità bicarboniose è il **malonil-CoA** invece dell'acetil-CoA. L'acetil-CoA, il materiale di partenza per la biosintesi degli acidi grassi, viene generato nei mitocondri dalla decarbossilazione ossidativa del piruvato catalizzata dalla piruvato deidrogenasi oppure l'ossidazione degli acidi grassi. La biosintesi degli acidi grassi però avviene nel citosol, e la membrana interna dei mitocondri è impermeabile all'acetil-CoA. Quest'ultimo passa nel citosol nella forma di citrato mediante il sistema di trasporto dei *tricarbossilati*. L'ATP citrato liasi catalizza una reazione che trasforma il citrato in ossalacetato che a sua volta subisce una riduzione a malato che a sua volta viene decarbossilato a piruvato (citrato+CoA+ATP → acetil-CoA+ossalacetato+ADP+P_i).



Acetil-CoA carbossilasi → catalizza la prima tappa caratteristica della biosintesi degli acidi grassi e una delle tappe che ne controllano la velocità. La reazione avviene in due fasi: l'attivazione di una molecola di CO₂ e un processo di carbossilazione. Il risultato della reazione è un gruppo a tre atomi di carbonio, il **malonil-CoA**.

Acido grasso sintasi → anche se la sintesi degli acidi grassi inizia con la sintesi di un estere del CoA, il *malonil-CoA*, la catena dell'acido grasso in crescita è ancorata a una **proteina trasportatrice di acili (ACP)**. Le reazioni catalizzate dall'acido grasso sintasi sono sette:

- 1 e 2 → reazioni di innesco nelle quali la sintasi viene caricata con i precursori della reazione di condensazione: un gruppo acetile originariamente legato nella forma di tioestere nell'acetil-CoA viene trasferito prima all'ACP e poi a un residuo di Cys dell'enzima; in modo analogo, un gruppo malonile viene trasferito dal malonil-CoA al malonil-ACP.
- 3 → nella reazione di condensazione il malonil-ACP viene decarbossilato con il carbanione risultante, che attacca l'acetil-tioestere con la formazione di un β-chetoacil-ACP. La reazione di decarbossilazione promuove la reazione di condensazione.
- 4-6 → due riduzioni e una deidratazione convertono il gruppo β-chetonico in un gruppo alchilico. Il coenzima che partecipa a entrambe le tappe riduttive è il NADPH.

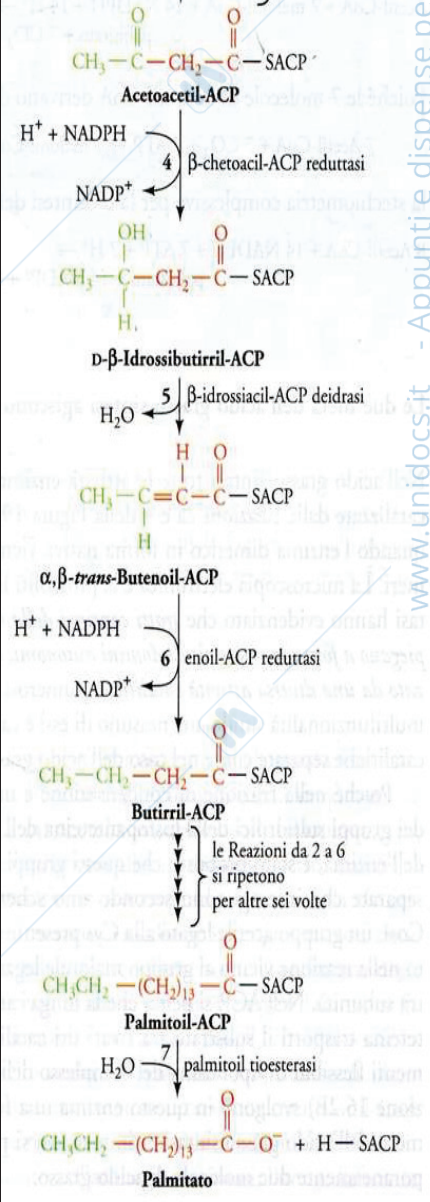


A questo punto il gruppo acile, che in origine era un gruppo acetile, è stato allungato di un C₂. Questo gruppo butirile viene poi trasferito dall'ACP alla Cys-SH dell'enzima in modo che possa essere allungato da ulteriori cicli della sequenza di reazioni dell'acido grasso sintasi.

Regolazione del metabolismo degli acidi grassi

Le cellule α e β del pancreas rilevano lo stato energetico e di nutrimento dell'organismo principalmente mediante la concentrazione ematica del glucosio. Le cellule α rispondono a basse concentrazioni di glucosio secernendo glucagone, le cellule β rispondono ad alti livelli di glucosio secernendo insulina. L'insulina causa una diminuzione dei livelli di cAMP, portando alla defosforilazione e quindi alla inattivazione della *lipasi ormone-sensibile*, per cui si ha una diminuzione della quantità di acidi grassi disponibili per l'ossidazione. Questo ormone attiva anche l'**acetil-CoA carbossilasi** sempre a causa della defosforilazione.

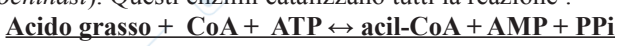
Il glucagone e l'adrenalina portano a un aumento delle concentrazioni tissutali di cAMP, questo attiva allostericamente la PKA che a sua volta fosforila diversi enzimi tra cui la *lipasi ormone-sensibile* che si attiva. La stessa fosforilazione cAMP dipendente inibisce invece l'**attività dell'acetil-CoA carbossilasi**.



Ossidazione degli acidi grassi

L'ossidazione degli acidi grassi avviene nei mitocondri, quindi deve esserci un sistema di trasporto che li possa trasferire all'interno di questi organelli; ma prima che questo accada, e affinché vengano degradati, gli acidi grassi devono essere **attivati**.

Il processo di attivazione viene catalizzato da una famiglia di enzimi che comprende almeno tre **acil-CoA sintetasi**. (*Tiochinasi*). Questi enzimi catalizzano tutti la reazione:



La reazione complessiva è portata a compimento dall'idrolisi fortemente esoergonica del pirofosfato catalizzata dalla **pirofosfatasi inorganica**.

L'acil-CoA formato nel citosol, deve entrare nel mitocondrio e lo può fare utilizzando una molecola chiamata **carnitina**. Nello spazio intramembrana il CoA viene staccato, il gruppo acile si lega alla carnitina e si forma un *acil-carnitina* che è in grado di attraversare la membrana interna del mitocondrio.

| Biosintesi | β-Ossidazione |
|--|---|
| Avviene nel citoplasma | Avviene nel mitocondrio |
| L'ACP è il trasportatore del gruppo acile | Il CoA è il trasportatore del gruppo acile |
| Il NADPH è il donatore degli elettroni | Il FAD è l'accettore degli elettroni |
| Gruppo D-β-idrossiacile | Gruppo α-β-idrossiacile |
| Il NADPH è il donatore degli elettroni | Il NAD ⁺ è l'accettore degli elettroni |
| Il donatore di unità C ₂ è il malonil-CoA | L'unità C ₂ prodotta è l'acetil-CoA |

Dopo il passaggio viene rilasciato il gruppo acilico che ritrova un CoA e forma un altro acil-CoA e la carnitina viene riciclata. L'entrata e l'uscita della carnitina è regolata e aiutata dagli enzimi **carnitina acil trasferasi I e II**, sono omologhi e sono localizzati sulla superficie esterna (I) e interna (II) della membrana. Il processo di traslocazione è inoltre mediato da una specifica proteina trasportatrice che trasferisce l'acil-carnitina nel mitocondrio con il contemporaneo trasporto di carnitina libera nella direzione opposta.