

METABOLISMO DEI NUCLEOTIDI

Amminoacidi come precursori dei nucleotidi

Nella cellula esistono due vie che portano alla formazione dei nucleotidi:

- La sintesi de novo dove i nucleotidi sono sintetizzati a partire da precursori semplici
- La via di salvataggio dove vengono riciclate le basi libere e i nucleotidi che derivano dalla demolizione degli acidi nucleici.

Nel 1948 John Buchanan dimostrò l'origine dall'acido urinico degli atomi delle purine con esperimenti di marcatura isotopica di precursori usando il Carbonio¹⁴ e l'azoto¹⁵. I risultati di questi studi dimostrarono che l'N1 derivava dal gruppo amminico dell'asparato, il C2 e il C8 dall'aspartato, l' N3 e N9 dalla glutammina e C4, C5 e N7 dall'aa glicina, suggerendo che questa molecola era completamente incorporato nell'anello. La sintesi de novo dei nucleotidi purinici è simile in tutti gli organismi, con l'aggiunta di uno o pochi atomi per volta per formare l'anello. Ad

alcuni anelli è poi legato il ribosio-fosfato ed infine convertito nei nucleotidi comuni.

La via biosintetica inizia dal 5-fosfoliposil-1-pirofosfato che viene sintetizzato a partire dal ribosio 5-fosfato che è prodotto dalla via dei pentosi fosfati e catalizzata dalla ribosio-fosfato-Prifosfo-chinasi. La sintesi de novo dei nucleotidi purinici comprende 11 reazioni e termina con la produzione di inosina monofosfato. Gli enzimi che catalizzano queste reazioni costituiscono un grande complesso multienzimatico cellulare.

La sintesi di AMP e GMP derivano dall'inosina monofosfato, attraverso diverse vie metaboliche. La sintesi di AMP che richiede l'inserimento di un gruppo amminico dall'aspartato ed idrolisi di GTP. Mentre il GMP viene ossidato a livello del C2 mediante riduzione del NADH⁺ e successiva addizione del gruppo amminico dalla glutammina idrolizzando ATP. La regolazione della biosintesi dei nucleotidi purinici varia nei diversi organismi. In E.coli il sistema di controllo agisce nelle prime reazioni della via: il trasferimento di un gruppo amminico al PRPP per formare 5-fosforibosilammina, l'enzima che catalizza questa reazione è la glutammina-PRPP ammidotransferasi, che viene inibito dai prodotti finali IMP, AMP e GMP. GMP e AMP agiscono in questa inibizione in modo sinergico. Nel secondo meccanismo di controllo il GMP agisce inibendo in modo specifico la sua conversione da inosina monofosfato. Analogamente l'AMP controlla sia la via principale sia la via specifica senza modificare quella che porta alla produzione GMP attraverso un'inibizione che viene definita inibizione sequenziale retroattiva.

La sintesi de novo dei nucleotidi pirimidinici procede in modo diverso rispetto alla sintesi dei nucleotidi purinici, infatti prima viene costruito l'anello pirimidinico a sei membri, che viene poi legato al ribosio 5-fosfato. Questo processo inizia dal carbamil fosfato che è formato nel citosol da un enzima chiamato carbamil-fosfato sintetasi II. Il carbamil fosfato reagisce con l'aspartato, reazione catalizzata dall'aspartato transcarbamilasi (enzima allosterico più studiati e meglio caratterizzati). Mediante la rimozione di una molecola d'acqua dall'N-carbamilaspartato, una reazione catalizzata dalla diidroorotasi, l'anello pirimidinico viene chiuso sotto forma di L-diidroorotato. Questo composto viene ossidato producendo il derivato pirimidinico orotato; l'accettore finale di elettroni è il NAD⁺.

Negli eucarioti, i primi tre enzimi della via fanno parte di una proteina trifunzionale. Questa proteina, nota come CAD, contiene tre catene polipeptidiche identiche, ciascuna in grado di catalizzare tutte e tre le reazioni.

L'orotato viene legato a questo composto il ribosio-5-fosfato donato dal PRPP generando l'orotidilato che è decarbossilato a uridilato, quest'ultimo è fosforilato poi a UTP. Il CTP si forma dall'UTP ad opera della citidilato sintetasi.

La regolazione di questa via biosintetica in E.coli è dipendente dalla regolazione allosterica dell'aspartato transcarbammilasi (ATCasi) che catalizza la prima reazione della via metabolica. Questo enzima è inibito dal CTP, il prodotto finale di questa sequenza di reazioni. Quando il CTP tende ad accumularsi, si lega alle subunità regolatrici e ne modifica la conformazione. Questa modificazione viene trasmessa alle subunità catalitiche, che acquistano la conformazione inattiva. L'ATP impedisce questa modificazione conformazionale indotta dal CTP.

Negli animali invece l'aspartato transcarbammilasi non è un enzima negativo. Ma il ruolo di regolatore è svolto dalla Carbamil fosfato sintetasi II che è inibita dall'UDP e UTP e attivata dall'ATP e dal PRPP. La velocità di produzione dell'OMP cambia in dipendenza della disponibilità di quello che è il precursore 5-fosfoliposil-1 pirofosfato che è a sua volta controllato da PRPP che è modulata da ADP e GDP.



La deficienza di enzimi che catalizzano le reazioni 5 e 6 della biosintesi delle pirimidine può essere causata da mutazioni genetiche ereditarie che producono aciduria orotica, caratterizzata da una notevole escrezione di acido orotico nelle urine. È associata a ritardo mentale e anemia e può essere curata con la somministrazione di uridina e citidina. L'UMP successivamente formato sostituisce quello normalmente sintetizzato svolgendo un ruolo regolatorio negativo sulla carbammil fosfato sintetasi 2 e riducendo così la via biosintetica alterata e quindi anche la produzione di acido orotico.

I nucleotidi monofosfato sono convertiti in nucleotidi trifosfato

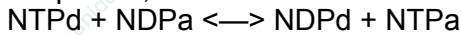
I nucleotidi sono usati per la biosintesi degli acidi nucleici nella forma di nucleosidi trifosfato. Le reazioni sono identiche in tutte le cellule. La fosforilazione dell'AMP ad ADP è catalizzata dall'adenilato chinasi nella reazione:



ADP viene ulteriormente fosforilato ad ATP dagli enzimi glicolitici o mediante la fosforilazione ossidativa. L'ATP viene utilizzato per la formazione degli altri nucleosidi difosfato da parte di una classe di enzimi chiamati nucleoside monofosfato chinasi. Questi enzimi catalizzano la seguente reazione:



I nucleosidi difosfato sono convertiti nei corrispondenti nucleosidi trifosfato da parte di un enzima, ubiquitario, chiamato nucleoside difosfato chinasi che catalizza la reazione:



Questo enzima ha la particolarità di non essere specifico né per la base (purinica o pirimidinica) né per il tipo di zucchero. Questa mancanza di specificità vale per l'accettare del gruppo fosforico (a) che per il donatore (d).

I ribonucleotidi sono i precursori dei deossiribonucleotidi

I deossiribonucleotidi, le unità che formano il DNA derivano dalla riduzione del Carbonio 2 del D-ribosio, che forma il 2-deossi derivato. Questa reazione è catalizzata dalla ribonucleotide reduttasi. Questo enzima catalizza la reazione di trasferimento di elettroni all'accettare finale della molecola di NADPH che si ossida a NADP⁺. Il trasporto avviene coinvolgendo la tioredossina, questa contiene due gruppi -SH che servono a trasportare due atomi di H dal NADPH al ribonucleotide difosfato. La forma ossidata con un ponte disolfuro della tioredossina viene ridotta dal NADPH in una reazione catalizzata dalla tioredossina reduttasi. La tioredossina ridotta viene poi utilizzata dalla ribonucleotide reduttasi per ridurre i ribonucleotidi difosfato a deossiribonucleotidi difosfato.

Una seconda fonte di equivalenti riducenti è il glutatione che partecipa alla alla riduzione di una proteina molto simile alla tioredossina, chiamata glutaredossina. La glutaredossina ridotta trasferisce gli equivalenti riducenti ricevuti dal glutatione alla ribonucleotide reduttasi. Questo serve a trasformare la tioredossina in tioredossina ossidata.

Ribonucleotide reduttasi

Questo è composto da due subunità indicate con R1(o alfa) e R2(o beta). La subunità R1 contiene due siti per modulatori. I due siti attivi sono localizzati alle interfacce tra la subunità R1 e R2. In ogni sito attivo R1 fornisce due gruppi tiolici necessari per l'attività catalitica e R2 fornisce un radicale tirosilico stabile. R2 contiene anche un cofattore contenete due atomi di ferro, che stabilizzano il radicale. La regolazione del ribonucleotide redattasi, i suoi effettori regolano non solo l'attività ma anche la specificità di substrato dell'enzima. Ciascuna subunità R1 possiede due tipi di siti regolatori. Uno regola l'attività enzimatica globale e lega sia l'ATP che attiva l'enzima sia il dATP che lo inattiva. Il secondo sito regolatore modifica la specificità di substrato che vi si lega. Quando si legano il dTTP o il dGTP viene stimolata la riduzione del GDP o ADP. La presenza di dATP in piccole quantità aumenta la riduzione dei nucleotidi pirimidinici. dTTP e dGTP stimolano la riduzione di GTP e ADP ma inibiscono la riduzione di CDP e UDP. Questo complesso è necessario per mantenere l'equilibrio del pool della sintesi dei deossiribonucleotidi.

Il timidilato deriva dal dCTP e dal dUMP

Il DNA contiene la timina, al posto dell'uracile, e la sintesi de novo dei derivati timidilici coinvolge solo i deossiribonucleotidi. Il precursore immediato del timidilato (dTMP) è il dUMP.

Nei batteri la via che porta alla sintesi del dUMP inizia con la formazione del dUTP, sia per la deamminazione del dCTP, sia per la fosforilazione del dUTP. Il dUTP viene convertito in dUMP da una dUTPasi. Questa ultima reazione deve essere estremamente efficiente per mantenere il pool del dUTP a livelli bassi in modo da impedire l'incorporazione dell'uridilato nel DNA. La conversione del dUMP in dTMP è catalizzata dalla timidilato sintasi. La timidilato sintasi utilizza N5N10-

metilentetraidrofolato per trasferire le unità carboniose a dUMP e quindi ridotta a gruppo metilico. La riduzione avviene a spese dell'ossidazione del tetraidrofolato a diidrofolato. Il diidrofolato viene ridotto a tetraidrofolato dalla diidrofolato reduttasi. Il tetraidrofolato viene utilizzato in molte reazioni ad esempio può essere convertito in diidrossimetil-transferasi.

La diminuzione della sintesi di timidilato causa un'anormale incorporazione dell'uracile nel DNA e provoca l'interruzione della catena nucleotidica. Circa il 10% della popolazione umana soffre di deficienza di acido folico dal quale il tetraidrofolato deriva. Questo può causare cancro, disturbi cardiaci e disfunzioni cerebrali. In gravidanza è la causa del formarsi della spina bifida nel feto. Poiché le cellule cancerose crescono più veloci rispetto a quelle normali molti farmaci chemioterapici inibiscono gli enzimi deputati alla sintesi dei nucleotidi. La timidilato sintasi costituisce un bersaglio terapeutico e viene bloccata dalla FdUMP (fluoro-deossi-uridinilato). Tuttavia le cellule dell'organismo che sono soggette ad un rapido riciclo possono anche essere danneggiate dal blocco della timidilato sintasi. Possono per esempio essere le cellule emopoietiche, quelle del midollo osseo o quelle dei follicoli del capello. Paragonando la normale conversione del dUMP in dTMP con l'inibizione operata dal FdUMP si può vedere che lo spostamento dell'idruro viene bloccato perché nella reazione 2 viene a formarsi un complesso stabile con il FdUMP che resta covalentemente legato all'enzima come inibitore suicida inattivando l'enzima.

Molti agenti chemioterapici colpiscono enzimi delle vie biosintetiche dei nucleotidi

Composti che inibiscono la glutammilamidotransferasi (glutammilammina fa da donatore di azoto in almeno una dozzina di reazioni che fanno parte della biosintesi dei nucleotidi). I siti di legame per la glutammilammina e il meccanismo con cui viene staccato lo ione ammonio sono simili alla maggioranza di questi enzimi. Molti sono fortemente inibiti da analoghi della glutammilammina come l'azaserina e l'acivicina. L'azaserina ha lo stesso meccanismo chimico dell'enzima FdUMP, che si lega all'enzima e lo inattiva. Un'altro agente chemioterapico è il metotrexato, un inibitore della diidrofolato reduttasi. Il metotrexato è un analogo del folato e si comporta come un inibitore competitivo. Questa enzima però blocca tutte le sintesi che presentano tetraidrofolato dipendenti come anche le sintesi delle purine e la sintesi di aa come istidina e metionina. Anche la amminopterina è un inibitore della diidrofolato reduttasi. Il potenziale medico degli inibitori della sintesi dei nucleotidi non è limitato al trattamento del cancro. Un esempio è l'antibiotico trimetoprim che si lega alla diidrofolato reduttasi batterica con un'affinità circa 100 mila volte maggiore rispetto a quella dei mammiferi, e viene usato nel trattamento di alcune infezioni del tratto urinario e dell'orecchio medio.

Degradazione delle purine in acido urico ed urea

Dopo la sintesi, il catabolismo dei nucleotidi purinici, consiste in una sequenza di reazioni nelle quali in gruppo fosforico viene rimosso ad opera di 5'-nucleotidasi che trasformano ad esempio adenilato in adenosina deamminata a inosina, che viene ulteriormente modificata a ipoxantina ossidata a xantina ad opera dell'enzima xantina-ossidasi che la ossida ulteriormente ad acido urico. Acido urico è il prodotto finale che nei mammiferi viene ulteriormente degradato ad allantoina fino alla produzione di urea e ione ammonio negli invertebrati.

La Xantina ossidasi nei mammiferi agisce quasi esclusivamente nel fegato, nella mucosa intestinale e a come cofattori per il trasferimento di elettroni il FAD, 2 centri ferro-zolfo e un gruppo prostetico con un atomo di molibdeno che varia il suo stato di ossidazione tra 6 e 4. La xantina ossidasi costituisce una sorta di catena di trasporto degli elettroni, utilizza ossigeno molecolare come accettore finale, elettroni e produce acqua ossigenata e acido urico.

Elevati livelli di acido urico nei fluidi corporei e nel sangue possono causare la gotta. Vengono colpiti anche i reni, poiché l'acido urico si deposita anche nei tubuli renali. Malattia caratterizzata da attacchi ricorrenti di artrite, dolore, gonfiore a livello articolare per la precipitazione dell'urato di sodio sotto forma di cristalli. Si sospetta che la patologia sia dovuta alla mancanza di uno degli enzimi che intervengono nel metabolismo delle purine. La gotta può essere trattata con dieta accurata e alcuni farmaci. Cibi ricchi di acidi nucleici e nucleotidi come fegato devono essere eliminati dalla dieta. Un farmaco è l'allopurinolo, un inibitore della xantina ossidasi. L'allopurinolo è un substrato della xantina ossidasi che lo converte in ossipurinolo (alloxantina), un composto che rimane legato al sito attivo della xantina ossidasi nella sua forma ridotta inattivandola. Quando la xantina ossidasi viene inibita, vengono escreti xantina e ipoxantina che sono più solubili in acqua dell'acido urico e quindi formano meno depositi cristallini. È predominante nei maschi nei quali provoca la sindrome di Lesch-Nyhan, i sintomi compaiono nei bambini intorno a due anni che manifestano autolesionismo (si mutilano a morsi le mani e le dita dei piedi), in questi casi l'allopurinolo non è in grado di curare questi aspetti patologici.

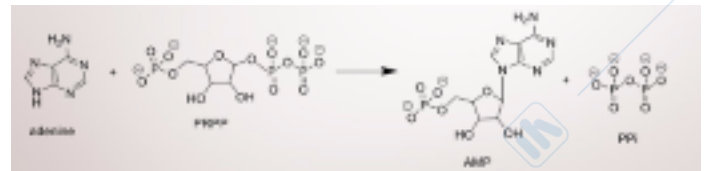
Ciclo dei nucleotidi purinici

La sintesi dell'inosina monofosfato (IMP) se combinata con la sintesi di adenosina monofosfato (AMP), produce l'effetto di deamminare l'aspartato a fumarato attraverso l'adenilo succinato che è l'intermedio. Questo ciclo è importante perché nel muscolo scheletrico rappresenta una via per implementare gli intermedi del ciclo dell'acido citrico in caso di una richiesta energetica dovuta ad un'intensa attività muscolare. Individui che hanno una deficienza di AMP deamminasi, si affaticano facilmente e soffrono di crampi dopo un'esercizio muscolare intenso. Alterazioni nel metabolismo delle purine portano a gravi patologie come nel caso della deficienza di adenosina deaminasi (SCID), dove il sito attivo è fortemente alterato. Nell'uomo causa una grave immunodeficienza nella quale i linfociti T e B che mediano la risposta immunitaria non sono sviluppati in modo normale per l'aumento di circa 100 volte della concentrazione di desossiATP, modulatore negativo della ribonucleotide reductasi. È una malattia genetica, causata da mutazioni puntiformi ed è stata la prima patologia ad essere curata con la terapia genica.

Degradazione delle pirimidine

Degradazione come il citidil-monofosfato (CMP), la defosforilazione avviene ad opera di nucleotidasi, seguita da una deamminazione nel caso del CMP e fosforilazione dell'uridina in modo da formare uracile, il cui legame glicosidico è scisso mediante riduzione NADPH dipendente piuttosto che ossidazione come invece avviene nella catalisi delle purine. I prodotti finali che sono la beta-alanina o beta-ammino-butirrato, sono aa e quindi successivamente catabolizzati come tali quindi sono oggetto di reazioni di transaminazione e poi attivati a malonil-coA o metilmalonil-coA. Le basi puriniche e pirimidiniche libere generate dal catabolismo dei nucleotidi sono per lo più riutilizzate per la sintesi di nuovi nucleotidi. Una delle vie principali è costituita da una sola reazione che è catalizzata dall'adenosina fosforibosil transferasi. L'adenosina reagisce con il PRPP per formare AMP e PPi (pirofosfato inorganico).

Un enzima differente ipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasi utilizza guanina e ipoxantina come substrato.



Sintesi di coenzimi nucleotidici

Dai nucleotidi derivano anche i coenzimi, quindi NAD⁺, NADP⁺, FMN, FAD e coenzima A. Il NAD⁺ e il NADP⁺ assunti con la dieta derivano dal nicotinato o anche dalla nicotinammide, vitamina B3 o dall'amminoacido essenziale triptofano. Nella maggior parte dei tessuti nei mammiferi la nictotinato-fosfo-ribosil transferasi trasforma il substrato che è il 5-fosforibosil-pirofosfato in nicotinammide mononucleotide trattandola come se fosse una base azotata, mentre il NADP⁺ è ottenuto per fosforilazione del residuo sul C2-OH del residuo di adenosina. Il FAD deriva dalla riboflavina, la vitamina B2, che a sua volta è sintetizzata dal GTP e il coA deriva dall'acido pantotenico o vitamina B5.

VITAMINE

Le vitamine sono nutrienti essenziali e la loro assunzione è indispensabile per il nostro organismo. Non sono per lo più sintetizzate dall'organismo umano, a parte alcune eccezioni come la vitamina D, ma si trovano in natura e devono quindi essere introdotte regolarmente con la dieta. Gli alimenti di origine vegetale sono quelli in grado di fornire maggior apporto vitaminico. Non esiste un cibo che contenga tutte le vitamine per questo ci deve essere un'alimentazione varia. Le vitamine svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione di molte reazioni chimiche. Possiamo suddividere le vitamine in idrosolubili e liposolubili.

Vitamine idrosolubili

Oltre al NAD⁺ e al NADP⁺ ci sono una serie di altre piccole molecole essenziali al metabolismo chiamate vitamine. Il termine deriva da quello coniato da Kazimiers Funk nel 1912 che scoprì la tiammina utilizzandola nel trattamento del beri-beri e la definì ammina vitale e lui propose che le vitamine potessero essere usate come agenti terapeutici. Esempio reazione catalizzata dalla piruvato deidrogenasi che utilizza il coenzima TPP per la rottura di legami adiacenti a gruppi carbonilici. Le vitamine devono essere necessariamente essere introdotte con la dieta perché non possono essere sintetizzate dall'organismo umano. Le vitamine idrosolubili fondamentali per l'uomo sono:

Vitamina	Coenzima	Funzione
Idrosolubili		
Tiammina (vitamina B ₁)	Tiammina pirofosfato	Decarbossilazione di α -chetoadidi Formazione e scissione di α -chetoacidi
Riboflavina (vitamina B ₂)	Flavina adenin dinucleotide (FAD) Flavin adenin mononucleotide (FMN)	Trasferimento di 1 e 2 elettroni
Niacina (vitamina B ₃ , acido nicotinic)	Nicotinamide adenin dinucleotide (NAD ⁺) Nicotinamide adenin dinucleotide fosfato (NADP ⁺)	Trasferimento di ioni idruo
Acido pantotemico (vitamina B ₅)	Coenzima A	Attivazione di gruppi acilici per il trasferimento tramite attacco nucleofilo e attivazione dell'Ho del gruppo α per la rimozione sottile del gruppo
Piridossale, Piridossina, Piridossammina (vitamina B ₆)	Piridossalfosfato	Formazione di basi di Schiff stabiliscono gruppi amminici dagli amminocidi; funziona come trappola di elettroni per stabilizzare gli intermedi di reazione
Cobalamina (vitamina B ₁₂)	5'-Desossadenosilcobalamina	Riammagliamento intramolecolare, riduzione di ribonucleotidi e ossidazione di metilcobalamina e trasferimento del gruppo metilico
Biotina (vitamina B ₇)	Complessi Biotina-Lys (Biotina)	Trasportatore di gruppi carbonilici nelle reazioni di carbossilazione
Acido folico (vitamina B ₉)	Tetraidrolato	Accettore e donatore di unità metilcobalamina a tutti i livelli di ossidazione del carbonio, escluso il CO

Attivazione della vitamina B12

Conversione della vitamina B12 dalla forma inattiva a quella attiva prevede 3 tappe che sono catalizzate da flavoenzimi che riducono in successione l'atomo di cobalto (passo dallo stato 3+ allo stato +), l'ultimo è un nucleofilo fortemente reattivo che quindi va ad attaccare il C-5' dell'ATP liberando l'anione trifosfato e formando 5'-desossadenosil-cobalamina. Poiché nella formazione di questo legame tra cobalto e carbonio sono stati utilizzati due elettroni, il cobalto torna allo stato 3+ (forma attiva del coenzima). Il coenzima B12 è utilizzato in una reazione che è catalizzata dalla metil-malonil-coA mutasi. Questa reazione è insolita e il gruppo carbonil-coA migra tra due atomi di carbonio adiacenti (questo avviene durante la degradazione beta-ossidativa degli acidi grassi a catena dispari).

Vitamina C o acido ascorbico

La sua mancanza porta ad alterazioni della struttura reticolare del collagene. È molto presente nelle verdure e negli agrumi. La biosintesi dell'acido ascorbico nelle piante e negli animali inizia in entrambi i casi utilizzando glucosio ma poi procede con diversi step che convergono nella

produzione di acido L-ascorbico. L'incapacità negli umani di sintetizzare acido L-ascorbico è dovuto alla mancanza dell'enzima L-gulonogamma-lattone ossidasi che nel corso dell'evoluzione ci ha penalizzati perché la sua sequenza è andata incontro a continue mutazioni e il gene umano, a forza di mutazioni ha smesso di funzionare e adesso esiste solo come pseudogene.

Alcuni animali soffrono dello stesso difetto genetico come le scimmie, cavia, i pipistrelli della frutta ecc..

I nostri antenati furono prontamente in grado di gestire questa carenza energetica perché nel loro habitat (giungla tropicale) le loro diete comprendevano grandi quantità di frutta e quindi di vitamina C.

Negli esseri umani la membrana di ogni globulo rosso contiene oltre 200 mila trasportatori del glucosio Glut1 e con l'aiuto della astomatina (proteina) sono in grado di riprogrammare il trasporto e di utilizzare questi sistemi per trasportare acido deidroascorbico, che una volta entrato nella cellula, va incontro a riduzione attraverso meccanismi sia non enzimatici che enzimatici che si basano sul NADPH e sul glutatione.

Per quanto riguarda le cellule nucleate queste sono in grado di mantenere una quantità di acido ascorbico intracellulare molto elevata rispetto alla concentrazione presente nei fluidi extracellulari. Ad esempio i linfociti accumulano acido ascorbico intracellulare quanto è a concentrazioni di circa 4 millimolare, mentre a livello plasmatico si ha una concentrazione di 40-80 micromolare. I neuroni mantengono concentrazione intracellulare di acido ascorbico fino a circa 10milli-molare. Le concentrazioni extracellulari di acido ascorbico sono mantenute intorno a 200-400 micromolare. Questo gradiente di concentrazione nelle cellule è generato dall'importazione di acido ascorbico da parte di trasportatori che sono sodio-dipendenti e quindi utilizzano il gradiente di concentrazione del sodio attraverso la membrana plasmatica sono chiamati SVCT.

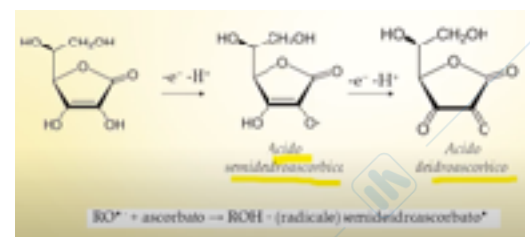
Un essere umano adulto mantiene la concentrazione di vitamina C di riserva di circa 2 grammi. Se questa quantità immagazzinata dovesse scendere sotto i 300 milligrammi presto comparirebbero i sintomi dello scorbuto. Nel 1971 è stato fatto uno studio su questo chiamato studio aiwa, sui volontari di una prigione. Questi soggetti inizialmente vennero sottoposti a una dieta di base in cui la vitamina C era completamente assente e successivamente veniva reintegrata. Le loro riserve corporee di vitamina C vennero utilizzate e poi man mano che il tempo passava si osservava la comparsa di una serie di sintomi. Dopo 40 giorni, quando il livello plasmatico in circolo di vitamina C diventava critico, intorno a 0,1 milligrammi su 100 mL di sangue comparivano delle macchie di sangue a chiazze. Dopo 50 giorni avevano gengive gonfie e sanguinanti, dopo 80 giorni dolori articolari e sanguinamento agli occhi. Dopo questo periodo di 100 giorni si è iniziato a somministrare vitamina C (circa 66 milligrammi al giorno) e man mano che veniva somministrata, gradualmente sono andati a ristabilirsi i livelli di riserva di vitamina C, quindi anche la concentrazione plasmatica andava a crescere fino a tornare alla normalità dopo circa un mese dalla partenza della somministrazione della vitamina C, con la scomparsa dei sintomi. Il contenuto plasmatico di vitamina C diminuisce nei fumatori in funzione al numero di sigarette fumate in un giorno, questo è dovuto all'aumento della concentrazione dei radicali liberi e al conseguente carico ossidativo che a sua volta porta ad una maggiore richiesta di vitamina C. Con più di 20 sigarette al giorno il fabbisogno di vitamina C di questi soggetti raddoppia. Si raccomanda nei soggetti fumatori l'assunzione giornaliera di 150 mg di vitamine al giorno.

In presenza di ossigeno l'acido ascorbico tende ad ossidare formando acido deidroascorbico, questo rappresenta un buon agente riducente e quindi un antiossidante. In presenza di radicali liberi si ha la formazione di acido semideidroascorbico che è inattivo e quindi non causa danni alla cellula.

Azioni biologiche dell'acido ascorbico:

- Effetti antiossidanti (protegge da stress ossidativo)
- Metabolismo del ferro
- Idrossilazione e biosintesi del collagene

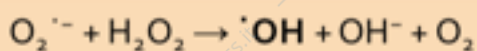
Gli antiossidanti possono essere classificati in base alla loro attività come antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Gli antiossidanti enzimatici agiscono neutralizzando e rimuovendo i radicali liberi, gli enzimi antiossidanti convertono i prodotti ossidati pericolosi in perossido di idrogeno e acqua ossigenata che poi viene trasformata in acqua, in un processo in più fasi in presenza di cofattori che possono essere rame, zinco, manganese e ferro. Gli antiossidanti non enzimatici agiscono interrompendo le reazioni a catena dei radicali liberi. Alcuni esempio di antiossidanti non enzimatici sono la vitamina C, E, carotenoidi e glutatione. Esempi di specie radicali derivanti dall'ossigeno sono $\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, H_2O_2 e sono prodotte quando si ha un rapido assorbimento e consumo di ossigeno. Questo avviene attraverso una iperattivazione della NADPH ossidasi e la produzione



del superossido radicale O_2^- carico negativamente con un elettrone spaiato che viene rapidamente convertito in acqua ossigenata (H_2O_2). Le specie reattive possono anche essere generate dal sistema della mieloperossidasi, questo enzima è presente nei granuli citoplasmatici ed in presenza degli ioni cloruro, presente in tutte le cellule, l'acqua ossigenata viene convertita in ipocloroso che è un potente ossidante e agente antimicrobico. I ROS sono anche generati dall'ossigeno stesso e H_2O_2 tramite quello che viene chiamato esplosione della respirazione. L'enzima ossido-nitrico sintasi che è quello che produce delle specie reattive che però sono dell'azoto come l'ossido nitrico oppure derivate dall'arginina, in particolare l'isoforma inducibile dell'enzima NOS è in grado di produrre continuamente grandi quantità di questo tipo di radicale (NO^*) che agisce con l'ossigeno proprio per produrre perossinitrito ($ONOO^-$) che è un ossidante fortissimo e può attaccare una vasta gamma di prodotti biologici. Il perossido nitrico reagisce con una serie di residui di aa, composti aromatici, enzimi determinando la nitratura di questi residui amminoacidici. L'ossido nitrico è un'importante molecola che può essere citotossica nella difesa contro le cellule tumorali ma anche di vari protozoi, funghi, micobatteri. Le altre fonti di reazioni di radicali liberi derivano dall'azione di ciclo-ossigenasi, lipossigenasi e perossidazione lipidica o anche dal metabolismo degli xenobiotici e dalle radiazioni ultraviolette. La vitamina C è uno scavenger solubile in acqua dei radicali liberi e le molecole di ascorbato reagiscono rapidamente con i radicali liberi generando deidroascorbato. Questa non ha nessuna capacità antiossidante e deve essere quindi riconvertito in ascorbato attraverso delle reazioni che sono catalizzate da delle glutatione ossido reduttasi o tramite reazioni di ossido riduzione.

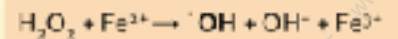
L'ascorbato svolge un ruolo importante anche nella regolazione del ferro, quasi tutti gli organismi richiedono ferro per il metabolismo e svolge una moltitudine di ruoli in batteri, piante, animali. Gli esseri umani adulti hanno 3/5 grammi di ferro nel corpo, la maggior parte del quale (l'80%) si trova nell'Hb dei globuli rossi e il 10/15% nella mioglobina muscolare e in altre proteine come coenzimi. Solo lo 0,1% circola nel plasma legato principalmente alla transferrina, mentre stoccato all'interno delle cellule associato alla ferritina. Tuttavia il ferro rosso, così chiamato attivo, può catalizzare la produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS), poiché troppo o troppo poco ferro sono entrambe condizioni dannose e quindi l'omeostasi del ferro cellulare deve essere finemente controllata. I più importanti complessi del ferro nei fluidi extracellulari sono la transferrina e il citrato (negli esseri umani). Nelle malattie che causano un sovraccarico di ferro come l'emocromatosi ereditaria, l'ipotransferrinemia e anche la beta-talassemia, la transferrina può diventare satura di ferro e quindi un eccesso di ferro può essere presente in forma libera nel sangue. In questi casi livelli plasmatici di ferro possono aumentare fino a raggiungere i 10/20 micromolare, nelle condizioni gravi di sovraccarico di ferro. La proteina DCYTB è una ferrireduttasi nella membrana del bordo striato degli enterociti duodenali che è responsabile della riduzione del ferro non eme, mediante l'assorbimento di ferro presente nella dieta. La sua attività può essere integrata anche da altri ferrireduttasi come il citocromoB-561 e altri membri di questa famiglia che catalizzano il trasferimento di elettroni transmembrana dall'ascorbato presente nel citosol a radicali ascorbici intravesicolari negli granuli secretori presenti ad esempio a livello neuroendocrino. Questo si verifica attraverso una serie di trasferimenti concertati di questi elettroni o protoni attraverso la membrana nei quali l'acido ascorbico risulta il principale elemento ossidante non enzimatico. L'acido ascorbico viene successivamente ossidato ad esempio dalla dopamina-beta-idrossilasi, che contiene rame. Tuttavia le funzioni di queste ferrireduttasi sono ancora poco chiare, di fatto comunque la riduzione del ferro viene accoppiata all'ossidazione da parte dell'ascorbato. Oltre ad essere implicato come ferrireduttasi sulla membrana del bordo striato degli enterociti duodenali è anche suggerito che questa proteina ferrireduttasi, il DCYTB, funzioni anche come ossidoreduttasi in una varietà di tessuti diversi tra cui anche gli eritrociti umani, nel polmone e nelle cellule epiteliali. L'ascorbato è probabilmente il donatore di elettroni prossimale più frequente per lo svolgimento di questa attività.

La reazione di reazione di haber weiss è una reazione chimica che produce radicali ossidrilici a partire da perossido di idrogeno e superossido. Questa reazione può verificarsi all'interno delle cellule e rappresenta una fonte di stress ossidativo, la reazione è :



E può essere suddivisa in due fasi:

1. Si ha la riduzione di ioni ferrici a ioni ferrosi
2. Seconda fase nota come reazione di Fenton si ha la formazione delle specie altamente reattive dell'ossigeno



La reazione di Haber-Weiss nel suo complesso può essere innescata durante il processo di infiammazione, dopo il rilascio di ferro da parte delle ferritine.

In merito al metabolismo del ferro l'ascorbato reagisce con il ferro ferrico (3+), per produrre ferro ferroso (2+) e radicale ascorbato.

Dopo somministrazione orale e parentale l'acido ascorbico raggiunge delle concentrazioni farmacologiche equivalenti nel sangue e nel liquido extracellulare. Nel liquido extracellulare una molecola di acido ascorbico può perdere elettroni e formare radicali ascorbato. Questo elettrone successivamente va a ridurre uno ione metallo presente sulle proteine che contengono ferro mostrato quindi come riduzione del ferro da Fe^{3+} a Fe^{2+} . Questo complesso dona un elettrone all'ossigeno molecolare formando anioni superossido, che interagendo con i protoni generano ossigeno e H_2O_2 che alla fine metabolizzata dalla catalasi.

In condizioni di bassa concentrazione intracellulare il ferro viene internalizzato mediante recettore della transferrina per endocitosi, l'acidità del vacuolo poi porta al rilascio di ferro da parte della transferrina intraendosomiale che viene quindi ridotto a Fe^{2+} e trasportato attraverso la membrana endosomiale dal trasportatore quindi viene a far parte del cosiddetto pool di ferro labile (LIP). Ferro può poi essere immagazzinato nella ferritina mentre l'ascorbato intracellulare va a migliorare l'assorbimento di ferro, ferritina-dipendente, migliora la quantità di ferro labile e favorisce la sintesi di ferritina e l'immagazzinamento di ferro nella cellula. Questo processo comporta anche l'importazione diretta dell'ascorbato nell'endosoma e la ferririduzione diretta o chimica comporta la fornitura degli elettroni ad una ferrireduttasi endosomiale per migliorare l'erogazione del ferro. Per quanto riguarda il flusso di ascorbato dalle cellule nei mammiferi, questo sembra avvenire attraverso canali anionici, posti sulla membrana plasmatica che sono sensibili al volume delle cellule. L'omeostasi del ferro cellulare è regolata prevalentemente a livello della traduzione delle principali proteine della regolazione del ferro che sono coinvolte nell'assorbimento, conservazione e rilascio. Il sistema responsabile di questa regolazione è quello delle proteine leganti l'RNA IRP che controllano in modo post-trascrizionale l'espressione di proteine trascritte da mRNA che contengono una sequenza IRE nelle loro regioni 5' o 3' non tradotte, o sopprimendo la traduzione dell'mRNA in cui questa sequenza IRE è posizionata in 5' oppure migliorando la stabilità dei messaggeri contro l'attacco di nucleasi e far sì che la sequenza IRE venga posizionata in 3'. Un importante regolatore dell'omeostasi del ferro è il fattore trascrizionale IF alfa che esercita un controllo a livello dei geni bersaglio e a bassi livelli di ossigeno e di ferro attivano la trascrizione dei geni bersaglio di IF attraverso la formazione di eterodimeri con la subunità IF1beta costitutivamente espressa. IF1alfa è espresso in modo ubiquitario mentre IF2alfa ha una distribuzione tissutale più selettiva. Questi eterodimeri che si formano con IF1beta, traslocano nel nucleo e vanno ad attivare i geni specifici che contengono questi elementi di risposta all'ipossia nella sequenza genomica.

In condizioni di basse concentrazioni di ferro, ossigeno e acido ascorbico, le proteine IF1alfa e IF2beta sono stabilizzate e formano gli eterodimeri con IF1beta che sono trascrizionalmente attiva. Mentre in condizioni di alte concentrazioni di ferro, ossigeno e acido ascorbico le proteine IF1alfa e IF2beta vengono idrossilate a livello di residui di prolina (classe di enzimi detti prolil-idrossilasi) che espone ad ulteriori modifiche da parte della ubiquitina ligasi E3 che aggancia loro ubiquitina marcandoli verso il proteasoma. Inoltre alti livelli di ferro, ossigeno e acido ascorbico aumentano l'attività di idrossilazione della asparagin-idrossilasi che è un fattore inibitorio di IF1. La prolil-idrossilasi del collagene è un altro membro di questi enzimi che sono noti essere delle idrossilasi alfa-chetoglutarato dipendenti. Questi enzimi catalizzano l'incorporazione di ossigeno in substrati organici attraverso un meccanismo che richiede l'alfa-chetoglutarato, il ferro $^{2+}$ e l'ascorbato.

Le lisil-propil-idrossilasi sono enzimi che catalizzano l'idrossilazione delle lisine e proline durante la maturazione del collagene. Il cross-link dei residui di lisina e idrossilisina si verifica nei telopeptidi dopo l'elaborazione del collagene e la sua secrezione nello spazio extracellulare. L'idrossilisina è il precursore di questi legami crociati, intermolecolari, covalenti caratterizzati dalle molecole di pirridinolina (PYL) e deossipirridinolina (DPL) che sono complessi fluorescenti che formano un reticolo tra le fibre. L'efficienza di idrossilazione si riflette nel rapporto tra pirridinolina e deossipirridinolina e nel rapporto di altre due molecole simili che sono la pirrolisina e la desossipirrolisina. Le catene del collagene formano una rete con questi composti in modo da assicurarsi una maggiore stabilità. La formazione di cristalli di apatite di calcio avviene in aree che

sono adiacenti ai siti di reticolazione, pertanto la mineralizzazione aberrante può essere dovuta nell'alterazione degli schemi di formazione di questi legami crociati che possono essere causati da una sovraespressione di lisil- e proli-idrossilasi. La pirridinolina è presente soprattutto nell'osso che è costituito dal 90% dal collagene di tipo 1, e nella cartilagine e in minor misura nei tendini e nei legamenti. La deossipirridinolina è presente sempre nel collagene di tipo 1 dell'osso ma anche della dentina. La pirridinolina (PYL) e deossipirridinolina (DPL) derivano esclusivamente dalla degradazione del collagene maturo, possono essere rilasciate nel sangue durante i processi di degradazione ed escrete nelle urine. Pazienti che sviluppano mutazioni in questi enzimi sviluppano patologie come la sindrome di Ehlers-Danlos che hanno un basso contenuto di idrossilisina nel collagene. Questi enzimi sono un marcatore del collagene nei processi osteolitici e anche di osteoporosi.

L'escrezione urinaria di questi complessi di idrossipirridinolina un pazienti che hanno artrite reumatoide rappresenta un marker.

La formazione del cross-link nel collagene può essere sia di tipo enzimatico sia di tipo non enzimatico.

Il primo passo per la reticolazione enzimatica all'interno del collagene sono le reazioni controllate dalla lisina idrossilasi e sono rese possibili dalla lisilossidasi che contiene rame e converte la lisina in un'aldeide che è l'allilisina.

Il primo passo per la reticolazione non enzimatica è la produzione di prodotti di glicosilazione avanzata, ossidoriduzione e stress ossidativo che avviene tra i residui di idrossilisina e gli zuccheri. Il collagene infatti contiene anche carboidrati che rappresentano fino il 12% del suo peso e principalmente sono costituiti da glucosio e galattosio legati ad un residuo di 5-idrossilisina.

Applicazioni terapeutiche delle vitamine idrosolubili:

- neuropatie alcoliche - vitB1
- Dermatiti - vitB2
- Neuropatie periferiche - vit B6
- Pellagra - vit B3
- Anemia megaloblastica, in gravidanza - acido folico e vit B12
- Scorbuto/ prevenzione influenzale - vit C

Vitamine liposolubili

Non rappresentano coenzimi ma sono comunque fondamentali in processi biologici. Sono tutti composti isoprenoidi composti come gli steroidi da unità attivate a 5 atomi di carbonio. Hanno quindi struttura simili ma funzioni biologicamente differenti.

Vitamina
Liposolubili
Retinolo (vitamina A)
Retinale (vitamina A)
Acido retinoico (vitamina A)
Ergocalciferolo (vitamina D ₂)
Colecalciferolo (vitamina D ₃)
α-Tocoferolo (vitamina E)
Menachinone (vitamina K)

Vitamina A

Della vitamina A esistono 3 forme attive, in base allo stato di ossidazione del gruppo funzionale terminale, possiamo avere il retinolo tutto trans, retinale e acido retinoico. Tutti quelli 3 insieme prendono il nome di retinoidi. La vitamina A può essere assunta come retinolo esterificato con la dieta (fegato, burro, uova, latticini, verdure di colore giallo o verde contenenti anche beta-carotene) oppure essere sintetizzata a partire dal precursore beta carotene. Nell'intestino una monoossigenasi scinde il beta-carotene a 30 atomi di carbonio in due molecole di retinale tutto trans e sono poi ridotte a retinolo. La forma retinolo tutto trans, è quella circolante nel sangue ed è anche la forma attiva della vitamina A. Nei tessuti periferici delle deidrogenasi specifiche originano gli altri retinoidi. L'ossidazione del retinolo a retinale che è un aldeide a 15 atomi di carbonio è una reazione reversibile mentre la successiva ossidazione del retinale ad acido

retinoico è irreversibile. Per avere un microgrammo di retinolo servono 12 microgrammi di beta carotene ed eventualmente 24 microgrammi di altri carotenoidi.

I derivati della vitamina A svolgono ruoli funzionali diversi. L'11-cis retinale è essenziale nel processo visivo a livello dei bastoncelli della retina, mentre l'acido retinoico modula l'espressione guidando la cellula verso il differenziamento e morte cellulare. I retinoidi esterificati: retinolo e provitaminaA e beta-carotene assunti con la dieta vengono assorbiti a livello dell'intestino tenue e poi impacchettati nei chilomicroni e secreti nel sistema linfatico. I retinoidi esterificati nei chilomicroni subiscono poi lipolisi e rimodellamento nel circolo sanguigno, poi i retinoidi esterificati possono seguire diversi destini:

- Possono essere idrolizzati a retinolo ad opera di lipasi ed essere assorbiti nei tessuti periferici
- Possono essere ritrasportati nel fegato per essere immagazzinati. Il 90% viene immagazzinato sotto forma di palmitato (circa 300/900 milligrammi) e il 10% invece nel tessuto adiposo intraperitoneale nei reni e nei polmoni. Il fegato può anche secernere un pò di retinoidi modificati associati alle VLDL e possono quindi essere trasferiti ad altri tipi di lipoproteine sia HDL che LDL. I retinoidi esterificati legati a queste particelle possono essere assorbiti ulteriormente dai tessuti periferici.

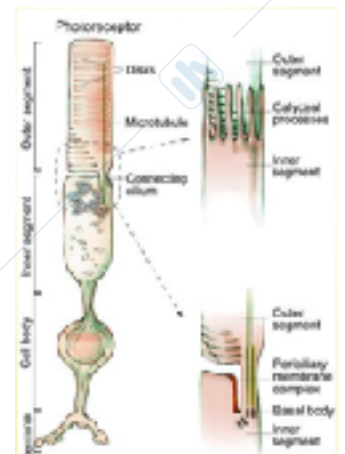
I retinoidi o provitaminaA quindi carotenoidi vengono trasferiti alle cellule dei tessuti attraverso una serie di percorsi e di trasportatori. I retinoli esterificati, sono erogati confezionati in chilomicroni oppure legati alle VLDL o HDL, questo nella circolazione sanguigna, ma il retinolo può anche essere legato a una proteina detta RBP4 a formare un complesso che grazie all'aiuto di una proteina di membrana l'astra 6 può essere assimilato all'interno delle cellule. Il retinolo può anche essere somministrato alle cellule sottoforma di un analogo che è il retinil-beta-glucoronide che è solubile in acqua, ma in genere questi sono presenti in circolo a concentrazione molto bassa, sottoforma di acido retinoico una volta entrato nella cellula, dove svolge un ruolo molto importante perché attiva una serie di geni bersaglio dei retinoidi. L'acido retinoico tutto trans lega il recettore RAR, mentre l'acido retinoico nella forma 9-cis acido retinoico lega il recettore RXR, nella forma di omo ed eterodimeri, questi poi possono andare a modulare in modo positivo o negativo i geni bersaglio sul genoma a livello di zone di regolazione dei promotori.

Essi possono interagire con geni associati alla riproduzione e quindi essere implicati nello sviluppo embrionale e anche post-natale e nel differenziamento epiteliale. La loro efficacia inoltre, ad indurre in certi dosaggi anche l'apoptosi cellulare (morte programmata), attivate da specifiche cascate di segnale di transmembrana, regolate dall'attivazione di geni specifici ne fa una molecola ampiamente studiata anche per gli effetti antiproliferativi e quindi anticancro. È utilizzato nella leucemia mieloide acuta e in altre neoplasie del sistema emopoietico, tuttavia può dare luogo a fenomeni di resistenza a causa della risposta di altre cellule tumorali che agiscono alterando l'espressione di geni che quindi potrebbero rappresentare dei marcatori di resistenza al farmaco, mentre altre cellule possono essere invece molto più sensibili ed in questo caso i geni coinvolti rappresentano dei biomarcatori, indice di una risposta positiva al farmaco.

L'acido retinoico tutto trans sembra essere efficace nel trattamento combinato con altri agenti anticancro e che quindi possono essere utilizzati anche a dosi più basse e quindi riducendo quelli che sono gli effetti collaterali dei chemioterapici. È utile perché va a silenziare una serie di geni che possono essere ad esempio responsabili della resistenza farmacologica o al trattamento chemioterapico.

La sua azione può riguardare anche geni associati ad infiammazione determinando inibizione dei geni pro-infiammatori e aumento di citochine che possono avere un ruolo antinfiammatorio come ad esempio le interleuchine (es. interleuchine10).

L'11-cis retinale è un fattore essenziale nel processo biochimico sul quale si basa la vista. Nella retina sono presenti 5 diversi tipi di neuroni, recettori, coni e bastoncelli, cellule gangliari, cellule orizzontali e cellule paracrine e le fibre di Muller. Queste cellule e i loro prolungamenti sono disposte in strati quindi avremo uno strato dei recettori, uno strato nucleare esterno, uno strato nucleare interno, strato delle cellule gangliari e strato delle fibre nervose. La luce deve quindi attraversare tutti questi strati prima di raggiungere i fotorecettori. Le cellule epiteliali che contengono melanina si trovano a livello dell'epitelio retinico pigmentato e quindi sono a stretto contatto con i fotorecettori. I fotorecettori sono cellule bipolari e cellule gangliari che costituiscono la via attraverso la quale il flusso verticale delle informazioni dai recettori ai neuroni sensoriali viene trasmesso. Le cellule orizzontali sono responsabili del flusso a livello laterale delle informazioni. Nella retina umana ci sono 100 milioni di bastoncelli e 6 milioni di coni e solo un milione di cellule



gangliari quindi ci deve essere una notevole convergenza dei fotorecettori sulle cellule gangliari che costituiscono la via attraverso la quale i segnali visivi vengono poi inviati alla corteccia cerebrale per dare sensazioni coscienti. Le cellule a bastoncello della retina sono responsabili della visione in condizioni di scarsa visibilità (nella visione notturna) e con scarsa capacità di rilevazione del colore e sono formati da una pila di dischi. Questi dischi sono membranosi e vanno a formare quello che è il segmento esterno e contengono pigmenti fotosensibili, ricchi di una proteina chiamata opsina. Questo segmento è collegato poi da un breve ciglio al segmento interno contenente il nucleo, il citosol e il corpo sinaptico, attraverso il quale la differenza di potenziale creata dalla stimolo luminoso viene poi trasmessa a più neuroni nella retina.

Nei dischi il retinolo tutto trans viene deidrogenato producendo l'11-cis retinale che forma una base di shift con un residuo di lisina proprio della proteina opsina. La lisina in gioco è la lisina196. Si va così ad originare rodopsina. La rodopsina è formata quindi da una parte proteica, l'opsina, una proteina integrale che attraversa sette volte la membrana plasmatica con tratti ad alfa elica e un gruppo prostetico cromoforo che è rappresentato dall'11-cis retinale localizzato nella zona centrale della membrana del disco ed è orientato a formare quasi un angolo retto alla superficie della membrana stessa. La rodopsina ha un ampio spettro di assorbimento che va dai 350 ai 620 nm abbracciando gran parte dello spettro visibile. La rodopsina umana presenta un picco massimo di assorbimento di 500 nanometri che corrisponde alla luce verde. Al buio il retinale è nella sua forma cis, in seguito all'assorbimento di un fotone isomerizza a produrre la forma tutto trans.

L'assorbimento di un fotone induce trasformazioni termiche nella rodopsina che diventa batoropsina, lumirodopsina, metarodopsina e la separazione poi del complesso opsina-11 cis retinale formando così il tutto trans retinale per un nuovo ciclo. Delle varie reazioni solo quella iniziale è fotochimica e impiega circa 6 picosecondi per avvenire mentre le successive reazioni termiche si realizzano con velocità che sono progressivamente decrescenti e vanno dai nanosecondi ai secondi. Nell'ultima reazione viene idrolizzata la base di shift che lega il gruppo aldeidico del retinale tutto trans ad un epsinol ammino gruppo di uno specifico residuo di lisina della metarodopsina2 causando la dissociazione del gruppo prostetico dall'opsina. La metarodopsina2 nota anche come rodopsina fotoattiva è la forma proteica che da poi inizio al fenomeno di iperpolarizzazione della membrana plasmatica dei bastoncelli. Questo processo va sotto il nome di ciclo di Wald o processo della visione.

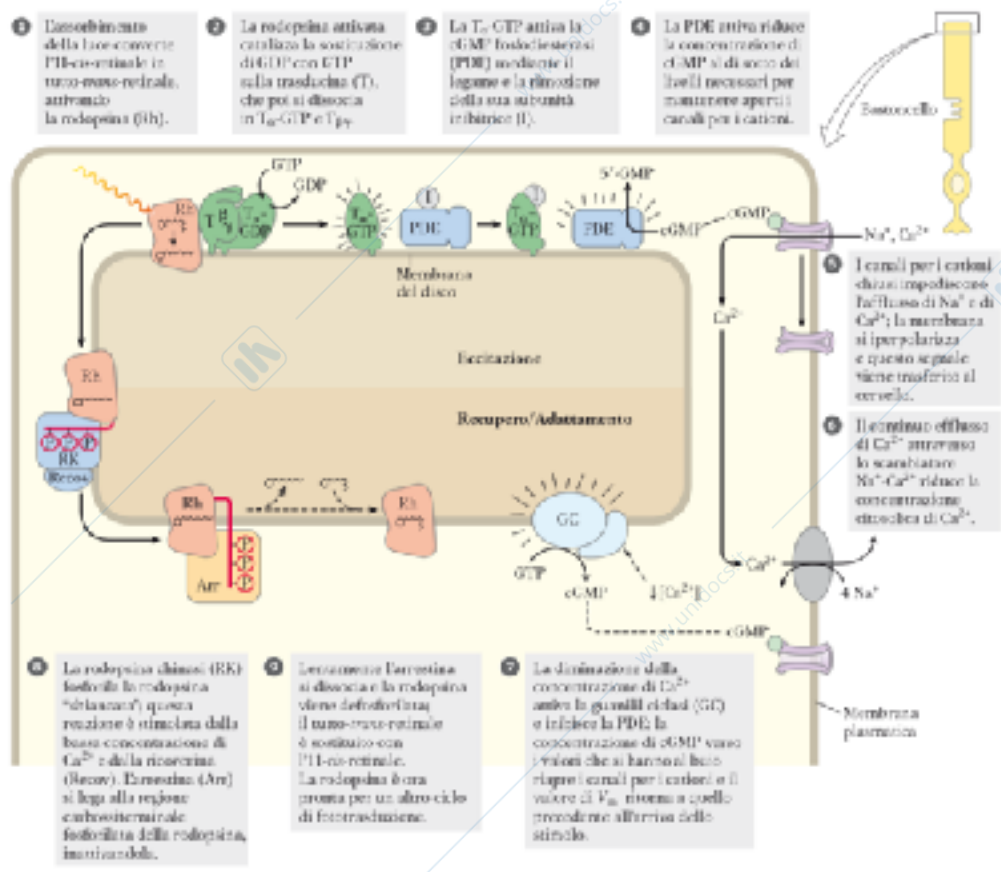
Le conorodopsine hanno una struttura simile a quella della rodopsina ma una differente sensibilità alla luce. Il picco di assorbimento che per la rodopsina è attorno ai 500 nm per le altre conopsine varia e può essere dai 420 ai 560 che assorbono nel blu, verde, rosso. Negli invertebrati i fotorecettori rispondono ad uno stimolo luminoso con una depolarizzazione della membrana mentre nei vertebrati i fotorecettori rispondono provocando una iperpolarizzazione, tanto maggiore quanto più intenso è lo stimolo luminoso. Questa risposta è associata ad una diminuzione di una corrente che è chiamata di Guigoc, responsabile del basso valore del voltaggio della membrana cellulare in assenza di stimolo alla luce.

In seguito all'impulso luminoso e alla dissociazione della metarodopsina2, producendo retinale tutto trans si verificano delle variazioni alla permeabilità al sodio della membrana plasmatica delle cellule che generano un impulso nervoso a livello delle sinapsi all'estremità opposta del bastoncello. Infatti in presenza di uno stimolo luminoso i canali per il sodio, detti cationici CNG che sono presenti nelle membrane dei dischi si chiudono. Grazie ad una serie di reazioni enzimatiche a cascata in cui è coinvolta anche la proteina regolatrice trasduttore che causa la riduzione dei livelli di GMP ciclico causando la chiusura dei canali cationici per il sodio/calcio riducendo quindi il flusso degli ioni sodio verso l'interno della cellula, quindi all'interno del disco, cosicché la carica elettrica all'interno della membrana diventa più negativa. L'accumulo di sodio all'interno dei dischi è responsabile di questa iperpolarizzazione della membrana del bastoncello che poi si propaga fino al corpo sinaptico dove, inibendo il rilascio dei neurotrasmettitori, trasduce questo segnale luminoso originario in un impulso nervoso sulla membrana post-sinaptica. La fotoisomerizzazione della rodopsina è il segnale intracellulare che trasferisce l'informazione della membrana che avviene a livello dei dischi verso la membrana esterna determinando il cambiamento del voltaggio. Al buio questi canali del sodio sono aperti e il flusso degli ioni sodio attraverso questi canali è detto corrente di buio che innescano quindi una depolarizzazione della membrana. Questi meccanismi di trasporto attivo primario, regolati dalla pompa sodio/potassio e secondario cioè quello che avviene con lo scambiatore funzionano per mantenere costante le concentrazioni ioniche intracellulari di sodio/calcio e potassio riportando il potenziale di membrana alle condizioni iniziali. La risposta dei fotorecettori è funzione dell'intensità della luce che colpisce il bastoncello e ogni bastoncello è in grado di rispondere ad ogni singolo fotone. In un bastoncello che è completamente adattato all'oscurità ogni fotone che viene assorbito dalla rodopsina provoca un

decremento della corrente di buio e induce iperpolarizzazione della membrana plasmatica di circa 1 millivolt. Il cGMP che è il messaggero intracellulare che porta l'informazione dalla membrana dei dischi che viene indotta dalla attivazione della rodopsina la trasmette alla membrana cellulare determinando la chiusura dei canali che erano responsabili della corrente del buio.

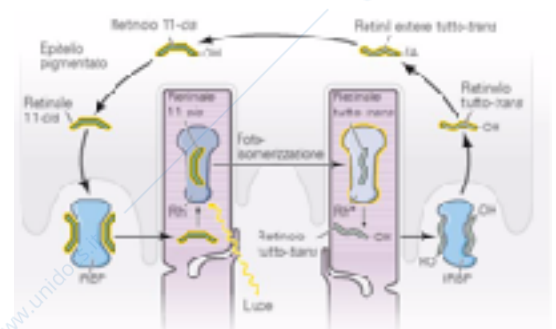
La fotoisomerizzazione della rodopsina a metarodopsina2 dà inizio al processo di trasduzione del segnale che è promosso da una cascata intracellulare, che inizia con l'attivazione di una proteina che è la trasducina (Tg) e la sua subunità alfa rimuove la subunità inibitoria (detta gamma) dalla fosfodiesterasi (PDE). Questo permette quindi alle due subunità catalitiche che sono la PDE alfa e beta di esercitare la loro azione di idrolisi del GMP ciclico e questo va a comportare la chiusura dei canali calcio-sodio. La trasducina si dissocia dalla subunità della PDE gamma e si associa agli altri monomeri beta-gamma e va a ricostituire l'isoforma di trasducina inattiva. Analogamente anche la fosfodiesterasi viene ricostituita nella forma inattiva.

La metarodopsina questa viene inattivata dall'azione di una chinasi congiunta all'azione dell'arrestina. Il processo di trasduzione del segnale è caratterizzato da un'enorme amplificazione del segnale in quanto una molecola di metarodopsina2 attiva fino a 500 molecole di trasducina e ogni molecola di PDE attivata dalla trasducina è in grado di idrolizzare circa 1000 molecole di cGMP ogni secondo.



Dopo l'isomerizzazione dovuta al fotone il retinale tutto trans si dissocia dall'oxina ed è convertito in retinolo tutto trans e trasportato dalla proteina chaperon IRBP nell'epitelio pigmentato, qui in un processo che avviene a più tappe avviene la riconversione a retinale11 cis e il suo trasferimento al segmento esterno del fotorecettore dove si ricombina con l'oxina.

Alterazioni genetiche nel ciclo della visione causano una forma di degenerazione giovanile della macula che è circondata da macchie giallastre rotonde a livello dell'epitelio pigmentato della retina.



Effetto della carenza di vitamina A:

- Cheratinizzazione dei tessuti epiteliali (tratti respiratorio e urogenitale),
- cecità notturna e ipercheratosi (inizialmente reversibili),
- danno alla cornea e cheratolalacia,
- cecità nei bambini di età inferiore ai 3 anni (70% dei paesi sottosviluppati),
- suscettibilità alle infezioni,
- carenza di ferro
- malformazioni fetali

Livelli superiori a 300mg/al giorno possono causare tossicità che può insorgere anche dando manifestazioni acute fino alla morte. La tossicità si manifesta con:

- manifestazioni cutanee, apparato digerente, neuromuscolare derivante probabilmente da azione simile ai detergenti esercitata dagli esteri del retinolo. Più grave negli anziani
- Ipercalcemia, riassorbimento osseo e inibizione nuovo osso
- Effetti teratogeni

I carotenoidi nelle piante assorbono la luce solare e favoriscono la fotosintesi e l'eliminazione di radicali liberi. Hanno un colore diverso in funzione del numero dei doppi legami presenti e quindi captano lunghezze d'onda diverse della luce solare. In natura ne conosciamo 600 e sono molto rappresentati nella dieta comune. Per quanto riguarda gli alfa-beta e gamma caroteni essi non contengono ossigeno nella loro struttura mentre la luteina, la zeaxantina e la cantaxantina contengono ossigeno sotto forma di alcol o gruppo carbonilico. La luteina e la zeaxantina aumentano la pigmentazione del tuorlo dell'uovo e sono usati come additivi nei mangimi. Anche la astaxantina è usata come additivo per dare colore rosa al salmone. Nei vegetali verdi sono presenti carotenoidi e xantofille, nei frutti/giallo rossi sono presenti soprattutto caroteni, i vegetali giallo/arancio essi contengono soprattutto xantofille legate con acidi grassi.

L'assunzione di licopene (pomodoro, carote) correla inversamente col cancro orale, all'esofago, stomaco, colon e retto. Ha azione protettiva da cancro al seno e della pelle.

L'assunzione di luteina (spinaci, kiwi) e zeaxantina (mais, patate) inversamente correla con la progressione della cataratta e protezione dei lipidi della ossidazione.

La cantaxantina è pubblicizzata negli USA come sostanza autoabbronzante naturale, il cui abuso causa la formazione reversibile di cristalli nella retina.

I retinoidi possono essere usati come farmaci, la loro sintesi è iniziata a partire dagli anni '60, quando la struttura chimica della vitamina A è stata leggermente modificata dando luogo a farmaci di:

- Prima generazione → il gruppo alcolico della vitamina A viene trasformato in acido estere o etere dando origine per esempio alla tretinoina, questo è usato nel trattamento dell'acne locale applicabile in crema
- Seconda generazione → si ha la sostituzione con un anello aromatico come nel caso dell'eritratrato, usato per forme di psoriasi gravi e anche per artropatie
- Terza generazione → presentano variazioni delle catene laterali e sono raggruppati con il nome di arotinoidi.

Vitamina D

Possiamo trovare sia la vitamina D2 (ergocalciferolo, presente solo nelle piante e non può essere sintetizzata nell'uomo) che D3 (colecaciferolo, origine animale).

Per quanto riguarda il suo assorbimento, è incorporato in micelle miste, composti da sali biliari e acidi grassi liberi o monogliceridi, viene assorbito a livello del duodeno, diffonde poi per via linfatica associato anche qui ai chilomicroni e successivamente arriva nel circolo sanguigno. L'assorbimento sembra avvenire tramite diffusione passiva, è lento, 10 ore dopo l'assorbimento di vitamina C marcata al 50% della radioattività persiste ancora nei vasi linfatici, quindi l'assorbimento di vitamina C è incompleto. Nel sangue il colecaciferolo si fissa ad una proteina detta DBF e viene rapidamente captato dal fegato e ulteriormente trasformato nei suoi derivati a livello renale.

È più corretto pensare alla vitamina D come un proormone visto che viene convertito in un metabolita che agisce in modo analogo agli ormoni steroidei. La forma più abbondante è la vitamina D3 questa però non è propriamente una vitamina perché non è essenziale ma può essere sintetizzata negli estratti basali delle cellule dell'epidermide a partire dal 7-deidrocolecaciferolo, che rappresenta un intermedio della sintesi del colesterolo. La sintesi di vitamina D3 è promossa dai raggi ultravioletti della luce solare. Viene rapidamente captato dal fegato dove viene idrossilato sul C25 formando 25-idrossicolecaciferolo, questa reazione è catalizzata dalla vitamina D25 idrolisi

(complesso microsomiale). E successivamente avviene un'altra modifica e questo derivato diventa substrato di un'altra idrossilazione sul C1 che avviene nei mitocondri formando l'1-25-diidrossi-calciferolo. Questa reazione è attivata dall'ormone paratiroideo secreto dalla ghiandola paratiroidea quando i livelli di calcio sono bassi. Gli enzimi che sono coinvolti nella produzione di questi derivati sono tutte ossidasi a funzione mista. Quando i livelli di calcio sono invece adeguati viene idrossilato il C24 generando 24-25-idrossicalciferolo che è un metabolita inattivo. L'1-25-diidrossi-calciferolo è la forma attiva della vitamina D3 che svolge il ruolo di ormone. E regola il metabolismo del calcio e del fosforo. Stimola un aumento dell'assorbimento intestinale sia del calcio che del fosforo e svolge un'azione in relazione alla sintesi della matrice inorganica dell'osso stimolando l'assorbimento di calcio depositato come fosfato di calcio. Ci sono altri due ormoni che intervengono nel metabolismo del calcio e sono il paratormone (PTH) che è secreto dalle paratiroidi ed è ipercalcizzante ed è stimolato da condizioni di ipocalcemia e questo comporta un'escrezione urinaria di fosfato e la stimolazione di 1-25-diidrossi-calciferolo. La calcitonina secreta dalla tiroide porta ad una ipocalcemizzazione ed è stimolata da altre concentrazioni di calcio, questa frena il riassorbimento osseo del calcio che stimola l'escrezione urinaria di calcio e di fosfato. Insieme questi due ormoni controllano l'omeostasi fosfo-calcica. Esistono dei recettori per 1-25-diidrossi-calciferolo anche in organi diversi dall'intestino, come osso, rene, paratiroidi. Ad esempio nella ghiandola mammaria potrebbero essere implicati nella concentrazione di calcio durante la gravidanza e l'allattamento. La sintesi di Calcio-binding-protein (CABP) aumenta e provoca un aumento dell'assorbimento a livello intestinale del calcio ma anche della placenta dove l'ormone 1-25-diidrossi-calciferolo controlla il trasporto placentare del calcio. Quindi sono implicati nella mineralizzazione dello scheletro del feto. Nel muscolo la vitamina D è necessaria per il buon funzionamento muscolare, infatti durante le carenze di vitamina D si osservano anomalie a livello di elettromiografia e anche debolezza muscolare. Il muscolo svolge un ruolo di riserva di calcio. Sono stati osservati dei recettori per l'1-25-diidrossi-calciferolo in organi che non sono direttamente implicati nel metabolismo fosfo-calcico lasciando supporre che la vitD svolga un ruolo biologico molto più ampio di quello conosciuto. Le cellule beta delle isole del Langerhans sono particolarmente ricche di CBP, in caso di carenza di vitamina D si osserva una diminuzione di sintesi di insulina. Inoltre l'1-25-diidrossi-calciferolo esercita un'effetto sulla crescita e sulla differenziazione cellulare, induce la formazione di macrofagi dai precursori mieloidi, inibisce la proliferazione di linfociti B e T, stimola l'aggregazione piastrinica. Vi sono alcune aree del cervello nei quali sono stati evidenziati dei recettori per l'1-25-diidrossi-calciferolo ma non si sa ancora il ruolo fisiologico.

L'effetto della vitD nella sclerosi multipla è stato studiato in modo intensivo e risultati dei diversi studi hanno evidenziato degli aspetti correlati alla vitamina D in questi pazienti.

La CABP (calcio binding protein) è codificata da un gene che è regolato positivamente dalla vitamina D, media il trasporto di calcio nel sangue e anche l'internalizzazione mediante un recettore specifico per il calcio. Tale azione attiva numerosi segnali sia extracellulari, inducendo ad esempio la depolarizzazione della membrana plasmatica delle cellule neuronali ma anche intracellulari attivando le cascate modulate dai geni con il cAMP fosfodiesterasi e il calcio-ATPasi.

Ci sono prove evidenti date da esperimenti eseguiti sia su culture cellulari che in modelli animali che la vitamina D ha effetti anticancro. Sembra che intervenga bloccando le prime fasi del tumore, stimolando difese antinfiammatorie e determinando anche un effetto antiossidante nei processi di riparazione ai danni del DNA. Sembra promuovere processi antiproliferativi di differenziamento, apoptosi e anche induzione di autofagia delle cellule tumorali stesse.

Nei tessuti bersaglio il calcitriolo si lega al suo recettore VDR (membro della famiglia dei recettori nucleari, che sono fattori trasfrizionali attivati da ligando) che induce sia una regolazione a livello genomico sia a livello non genomico e questa avviene proprio in seguito alla formazione del complesso recettore-ligando, che poi entra nella cellula e può in questo modo andare a creare dei dimessi recettoriali VDR e RXR che vanno a legare i promotori di geni bersaglio, modulandone l'espressione. Un'altra proteina la P62 può essere ubiquitinata e interagire con LC3 ed essere indirizzata verso il fagosoma per la degradazione di questi eterodimeri → ulteriore elemento regolativo.

Di recente è stata anche evidenziata una via alternativa, sempre riguardante il metabolismo della vitamina D che coinvolge il gene Chip11A che è una monossigenasi del citocromo P450, che catalizza l'idrossilazione della catena laterale e la scissione del colesterolo in pregnenolone. Sta emergendo che questo nuovo enzima potrebbe metabolizzare la vitamina D nei tessuti periferici

come la pelle e il tratto gastrointestinale. Questa via metabolica alternativa potrebbe produrre più di 21 idrossimetaboliti della vitamina D.

Vi è una via non genomica nella quale la vitamina D interagisce con il proprio recettore e questo va ad attivare una serie di eventi a cascata di signalling intracellulare che regolano la concentrazione di calcio. Molti geni sono attivati da questo tipo di interazione come la PKC, le MAP-chinasi e il signalling che tramite la AKT va ad agire su mTORC1 che va ad attivare l'autofagia. Nella via genomica il calcitriolo o vitD interagisce con il recettore ma va a promuovere la dimerizzazione con il recettore RXR e va a riconoscere a livello del promotore genico le sequenze VDRE. Nella regione del promotore di questi geni bersaglio vengono reclutati dei coattivatori o corepressori per regolare l'espressione di queste molecole di RNA.

Oltre alla formazione di eterodimeri tra VDR e RXR possono essere formati anche eterodimeri con i cosiddetti recettori orfani dei retinoidi che sono ROR-alfa e ROR-gamma, questi hanno dimostrato di funzionare come nuovi recettori proprio per i metaboliti della vitamina D che sono derivati dalla monossigenasi. ROR svolgono un ruolo nella regolazione di molti processi fisiologici e sono implicati in diverse patologie come il cancro, malattie autoimmuni, sindromi metaboliche. I metaboliti della vitD agiscono come agonisti inversi, legano il RORalfa e RORgamma e vanno in questo modo ad inibire la trascrizione dei geni bersaglio, sono quindi in grado di sopprimere la trascrizione di questi geni bersaglio dei recettori orfani dei retinoidi.

La regione del promotore di questa monossigenasi del citocromo P450, ad esempio la Chip24-A1 catalizza sempre l'idrossilazione della catena laterale e la scissione del colesterolo in pregnenolone. Il promotore del gene che codifica per la monossigenasi contiene due sequenze VDRE che riconoscono il recettore per la vitD:

- una localizzata a 150-200bp a monte del sito di inizio della trascrizione e determina una forte induzione modulata dalla vitamina D. Il calcitriolo può anche essere regolato dalla mediazione di acetil-transferasi che agiscono sugli istoni quindi le acetil-transferasi come la H4 possono essere reclutate a modificare gli istoni e agiscono anche interfacciandosi con RNAPol2.
- Altri recettori localizzate a valle del sito di inizio della trascrizione, 50/70 kb dopo

Il recettore della vitamina D è anche espresso nella maggior parte dei tipi delle cellule ma l'espressione si riduce progressivamente durante i processi di dedifferenziamento cellulare, cioè durante la progressione del tumore (trasformazione da cellula normale a cellula tumorale). Elevati livelli di recettori per la vitamina D sono associati ad un ridotto rischio di progressione del cancro alla prostata e migliore sopravvivenza nei pazienti che presentano carcinoma polmonare. Una ridotta espressione della VDR è osservata nel carcinoma della vescica ed è associata a prognosi favorevole. Tutto questo suggerisce che l'espressione del recettore VDR può essere utile come biomarcatore diagnostico ma anche prognostico, infatti l'espressione delle cellule tumorali di VDR e i suoi effetti sui geni bersaglio sono modificati e reindirizzati a causa di mutazioni in antioncogeni come P53 o attraverso il reclutamento di fattori soppressori del promotore di VDR.

A seconda della fascia di età l'apporto nutrizionale consigliato cambia. Negli adulti è di circa 10-15 microgrammi al giorno ma negli anziani e nei bambini, che non si espongono tanto al sole, c'è la necessità di essere reintegrata con prodotti farmaceutici.

La quantità di vitamina D riscontrata nel sangue in soggetti adulti sani è mediamente 10-24 nanogrammi per mL. La quantità varia nei diversi organi. La valutazione clinica dei livelli nel siero del 25-idrossicalciferolo, la vitamina D attivata evidenzia situazioni di inadeguatezza tra i 20-30 nanogrammi per mL, carenza se siamo sotto i 20 ng/mL.

La mancata esposizione poi ai raggi solari può comportare carenza di vitamina D, per produrre malformazioni ossee che vanno sotto il nome di rachitismo. Lievi riduzioni nei livelli possono comportare osteoporosi e carenza di calcio nelle ossa. Questa vitamina è spesso addizionata agli elementi come al latte.

Altre patologie che sono associate a carenza di vitamina D:

- Diversi tipi di cancro → cervello, prostata, seno, sistema immunitario
- Malattie autoimmuni → osteopatie, diabete, patologie polmonari e respiro sibilante
- Malattie cardiovascolari
- Malattie mentali → schizofrenia e depressione

Vitamina E

Scoperta del 1922 nei vegetali verdi e sintetizzata solo nelle piante fotosintetiche ed è stata individuata perché in alcuni esperimenti nei quali venivano nutriti dei ratti con questi alimenti erano in grado di prevenire la sterilità, per questo è stata chiamata alfa-tocoferolo (tocos=nascita). Svolge un ruolo importante come antiossidante, protegge gli acidi grassi polinsaturi dei lipidi di membrana dagli attacchi dei radicali liberi, quindi previene l'ossidazione delle lipoproteine LDL. La struttura chimica ad anello funzionale fenolico, con una catena laterale isoprenica caratterizzata da quattro derivati tocoferoli e quattro derivati tocotrienoli che hanno una diversa attività biologica. In questi analoghi strutturali gli alfa hanno due gruppi metilici, i beta un gruppo metilico e i delta hanno H al posto dei gruppi metilici. Sono localizzate in zone che sono ricche di lipidi oppure associate a lipoproteine e quindi vanno a costituire i depositi dei grassi. Il deposito è a carico del tessuto adiposo, nel fegato e nel muscolo. La catena isoprenica può subire anche omega-ossidazioni ed essere degradata da parte del sistema enzimatico epatico del citocromo P450 e può essere coniugata all'acido glucuronico o a dei solfati.

È presente soprattutto in alimenti di origine vegetale come olio d'oliva e oli vegetali, quello che cambia è la percentuale nelle diverse forme di vitamina E. L'alfa-tocoferolo è presente nell'olio d'oliva, girasole e mandorle, nelle parti grasse della carne dell'animale. Il gamma-tocoferolo è molto presente nell'olio di mais e di soia. È suscettibile al calore, alla luce, all'esposizione all'aria ed è perduta nei processi di cottura.

Funzioni vitE:

- L'alfa-tocoferolo si localizza nella membrana stabilizzandola.
- Interagisce coi radicali liberi, impedendo la loro interazione con gli acidi grassi
- Previene l'ossidazione della LDL
- Regola enzimi di membrana e la trasduzione del segnale (protein chinasi C, lipossigenasi, ciclossigenasi) influenzando aggregazione piastrinica, risposta immunitaria, proliferazione cellule muscolari lisce.

Queste funzioni garantiscono una protezione alle malattie causate dai radicali liberi (es. arteriosclerosi, cancro, fertilità). Ha anche una protezione contro le specie ossigeno reattive che possono causare perossidazione lipidica. I radicali vanno ad interagire con le catene degli acidi grassi e andare a formare con gli acidi grassi polinsaturi dei radicali liberi molto reattivi di tipo lipidico che alterano fortemente la struttura della membrana plasmatica. Il radicale ossidrilico sottrae un atomo di H all'acido grasso polinsaturo dando origine ad una serie di reazioni che portano alla produzione di perossidi lipidici che sono prodotti di degradazione dei lipidi a formare dei prodotti caratteristici come il malonil-dialdeide che interagiscono con proteine generando dei legami crociati nei prodotti proteici di lipossidazione avanzata. Il tocoferolo reagisce con questi radicali liberi ed è in grado di generare tocoferossile e tocoferrilchinone che sono dei prodotti di ossidazione ed impediscono in questo modo che proceda la perossidazione lipidica.

Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale alfa-tocoferossilico che è piuttosto stabile grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza nella struttura chimica. Il tocoferolo è poi rigenerato ad ascorbato attraverso la deidroascorbato deidrogenasi e la glutatione riduttasi nel ciclo che viene chiamato dell'ascorbato glutatione. Oltre che con la vitE i radicali del tocoferolo possono reagire con il glutatione stesso e con il coenzima Q per riformare l'alfa-tocoferolo nella forma attiva. Vi sono evidenze sperimentali che dimostrano un'azione dell'alfa-tocoferolo inibitoria sulla protein-chinasi C (PKC), questa inibizione sembra essere associata alla formazione di ioni superossidi che avviene nei macrofagi e nei neutrofili e riguarda l'assemblaggio e l'attività di proteine che sono NADPH ossidasi (es. citocromo B-558).

Altri ritengono che l'effetto diretto sulla PKC è minimo e piuttosto il tocoferolo interagisce direttamente con una proteina fosfatasi 2 A, che defosforila diversi substrati attivandoli e tra questi alcune isoforme di PKC. In questi meccanismi il tocoferolo può comportarsi da antiproliferativo nelle cellule tumorali.

Le possibili attività antineoplastiche dell'alfa-tocoferolo e di un potente analogo strutturale l'alfa-TOS sono state analizzate in topi nudi. Sono modelli di topo nei quali vengono iniettate delle cellule tumorali (es. cancro al colon) e quindi vanno a sviluppare un tumore. I topi che sono stati trattati con alfa-tocoferolo mostrano una diminuzione nella dimensione della massa tumorale mentre quelli trattati con l'alfa-TOS mostrano una riduzione ancora maggiore del cancro nonostante i livelli nel sangue siano inferiori a quelli dell'alfa-tocoferolo.

Modello proposto per il traffico di vitamina E all'interno della cellula

Questo avviene attraverso l'interazione dell'alfa-tocoferolo che viene internalizzato mediante vescicole per endocitosi negli epatociti e queste vescicole interagiscono con la proteina TTP, che

guida le vescicole verso la membrana plasmatica. La proteina TTP una volta arrivata a livello della membrana plasmatica interagisce con fosfatidil-inositolo-4,5P₂ e determina dei cambiamenti di conformazione che provocano il rilascio della vitamina E dal complesso che passa a livello della membrana plasmatica, viene quindi trasferita a proteine di membrana e quindi può venire secreta dalla cellula. Questo provoca anche il distacco della TTP che quindi torna per un nuovo ciclo ad agganciare nuove vescicole che contengono vitE.

Dopo il rilascio sulla membrana plasmatica la vitE fuoriesce attraverso un trasportatore e si associa a particelle lipoproteiche per poi arrivare ai tessuti extraepatici bersaglio.

Diverse proteine leganti la vit E, sono probabilmente coinvolte nella captazione della vitE nella distribuzione sia verso l'interno che l'esterno della cellula, e probabilmente sono anche coinvolte con l'interazione degli enzimi che modulano la trasduzione del segnale.

Sono importati anche altre proteine che sono i recettori delle lipoproteine, utili per regolare la concentrazione extracellulare. Quello che può modificare l'omeostasi della vitamina E può dipendere dall'eterogeneità genetica che riguarda i geni. In realtà si è visto che i geni che direttamente legano tocoferolo non sono polimorfici e sembrano essere soggetti ad avere più eterogeneità genetica quelli che sono associati alle lipoproteine.

Interazioni biochimiche del tocoferolo possono avvenire anche con i recettori perossisomali, via attiva soprattutto in pazienti affetti da diabete, il tocoferolo sembra esercitare un effetto benefico probabilmente riducendo lo stress ossidativo che è caratteristico di questa condizione metabolica alterata.

Il tocoferolo-fosfato può essere anche sintetizzato in vivo. Questo è un derivato del tocoferolo ed è trasportato attraverso la barriera intestinale. Le cellule di mammiferi che contengono un'attività di tocoferolo chinasi competente per fosforilare l'alfa-tocoferolo in tocoferolo fosfato. Ecco che a livello cellulare il tocoferolo fosfato attraversa la membrana cellulare ed è riconosciuto da appositi trasportatori TAP. È improbabile che la vitamina fosforilata sia una forma di conservazione data la sua quantità che è di 3 ordini di grandezza inferiore rispetto a quelli della vitamina libera, piuttosto questo derivato, può rappresentare la forma attiva della vitamina attivata attraverso la fosforilazione intracellulare. Gli effetti della vitE potrebbero essere dovuti alla sua fosforilazione. L'attività biologica della vitE dipende dalla percentuale dei diversi analoghi che la costituiscono. La vitE naturale ha un'attività doppia rispetto a quella somministrata. La carenza di vitE può causare lisi degli eritrociti e disfunzioni a livello muscolari. La carenza di vitE è rara. La carenza può dipendere da sindromi di malassorbimento, come malattie croniche epatiche e nei neonati prematuri.

Vitamina K

L'attività biologica della vit-K dipende dai suoi due analoghi:

- K1 è il fillochinone ed è presente nelle piante
- K2 presente in animali e batteri chiamato menachinone che possiede una catena laterale che è parzialmente insatura

La vitamina K deriva da coagulation vitamin, coniata nel 1935 da Peter Dam, per indicare quei composti che avevano attività antiemorragica e si osservava in animali che avevano un'alimentazione a base di cereali e lieviti. Negli anni successivi questo composto risultava essere essenziale per mantenere i livelli di alcuni fattori della coagulazione.

Nel 1974 venne scoperto il meccanismo di funzionamento della vitamina K, in particolare è coinvolta in una reazione: la carbossilazione in gamma dei primi 10 residui di acido glutammico che sono presenti all'estremità N-terminale in proteine e tra queste c'è la protombina e altri fattori della coagulazione come il fattore X, IX e VII. Questa reazione di carbossilazione avviene a livello del carbonio 4 di residui di glutammato di queste proteine, e prevede il trasferimento di un gruppo carbossilico sul C4 ad opera dell'enzima gamma-glutammi-carbossilasi che porta alla produzione di acido gamma carbossiglutamico. Questa gamma-glutammi-carbossilasi utilizza la vit-K nella sua forma ridotta che viene ossidata dall'ossigeno molecolare a produrre vitamina K ossidata (KO) che rappresenta l'eossido della vitamina K. La proteina KO per essere riutilizzata deve essere rigenerata e la sua rigenerazione avviene ad opera di due enzimi che sono due reduttasi (vit.K reduttasi 1 e 2). Queste due reduttasi sono a loro volta inibite dal cumadin e dal warfarin → fattore limitante della coagulazione perché manca vitamina K.

La vitamina K determina la carbossilazione di residui di acido glutammico per formare acido gamma-carbossiglutamico (GLA) e questo aa aumenta la sensibilità al calcio nel processo della coagulazione. Il calcio che è carico positivamente fa da ponte alle cariche negative dell'acido gamma-glutammino, presente nei fattori della coagulazione e le teste fosfolipidiche cariche negativamente della membrana piastrinica. I cambiamenti conformazionali facilitano quindi

l'inserimento di questi fattori della coagulazione nelle regioni idrofobiche del doppio strato fosfolipidico per svolgere la coagulazione. Il calcio media il legame dei complessi enzimatici delle altre proteine all'atenasi agendo sui residui gamma-carbossilici che sono presenti nei fattori della coagulazione. Modificando la superficie delle piastrine che a sua volta attiva la protombina per produrre la trombina quindi produce fibrina e fibrinogeno. Il calcio agisce da catalizzatore per questa reazione aumentando la velocità. I processi di stimolazione sono stimolati dalla vitamina K. La vitamina K ha tre effetti fondamentali:

- Carbossilazione dei fattori di coagulazione
- Sensibilità al calcio della coagulazione
- Carbossilazione di proteine tissutali/ossee

Tra le altre proteine che possono essere soggette a carbossilazione ci sono le proteine C,S,V e Z (sempre fattori della coagulazione), osteocalcina e la proteina Gla della matrice dell'osso.

Le proteine contenenti acido-gamma-carbossiglutamminico della matrice sono proteine che sono secrete, possono contenere 5 residui di acido glutammico che possono essere carbossilate dalla vitamina K e in questo modo acquisiscono la capacità di legare il calcio.

Ciclo della vitamina K avviene in assenza e in presenza di un inibitore, di un antagonista della vitamina K. Nel reticolo endoplasmatico abbiamo la carbossilazione a livello post-traduzionale di residui di glutammato legati a proteine ricche in glutammato (MPG), queste proteine della matrice contenenti glutammato, quindi vanno incontro a gamma-carbossilazione e vengono secrete in circolo e qui oltre ad agire come fattori di coagulazione possono legare il fattore BMP-2 e legando il calcio possono inibirlo e sottrarlo e inibire la formazione di cristalli di calcio.

Nella situazione in presenza di warfarin come antagonista e la vitamina K presente a bassi livelli, questa viene ossidata e si ha un accumulo dei prodotti KO perchè viene inibita il processo di rigenerazione della vitamina K. Ecco che in queste condizioni avviene la secrezione di una particolare proteina che viene chiamata PIVKA.

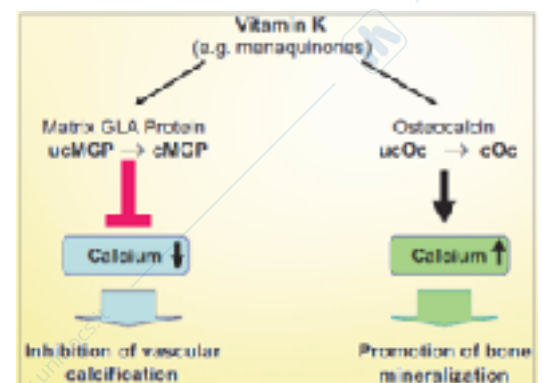
In condizioni in cui si abbiano alti livelli di calcio extracellulare, questo entra nella cellula, trasloca nei canali del calcio, nel compartimento intracellulare e determina un aumento di calcio citosolico e questo è una condizione di stress del reticolo endoplasmatico e porta alla formazione e alla secrezione di queste vescicole che sono cariche di queste proteine della matrice contenenti GLA. Quando queste proteine non sono attive le vescicole si associano a collagene ed elastina e formano in questo modo dei nuclei di mineralizzazione. Stimoli osteogenici e il BMP2 vengono neutralizzati dalle MGP, ma se le MGP non sono carbossilate ecco che il BMP2 può attivare il differenziamento osteogenico delle cellule muscolari vascolari lisce. Questo va anche ad aumentare a livello della cellula i livelli della proteina chiamata PIT1 che trasloca fosforo inorganico e induce quindi la formazione di un fenotipo osteogenico di queste cellule muscolari vascolari lisce. Ciò causa allo stesso tempo una down-regolazione dell' MPG della matrice.

Normalmente le cellule muscolari lisce vascolari in presenza di vitamina K sintetizzano queste proteine nella matrice ricche in glutammato carbossilate e questo previene la mineralizzazione dell'osso. Queste cellule hanno un macchinario che è completamente funzionante a sintetizzare appunto MPG carbossilata, questo non fa altro che limitare la calcificazione e mantenere quindi le cellule della muscolatura liscia contrattili e in grado di svolgere la loro funzione essendo fibre elastiche.

Mentre nel caso in cui si abbia una forte pressione di mineralizzazione queste vescicole sono ripiene cariche di proteine al di là della matrice che però non sono carbossilate e in condizioni di induzione della mineralizzazione e in questo caso una volta secrete queste vescicole con proteine MGV, incapaci di contrastare i processi di mineralizzazione ecco che inizia la formazione dei cristalli che iniziano ad indurre anche l'apoptosi di queste cellule vascolari muscolari lisce, insieme all'aumento dei livelli di fosfato inducono un fenotipo osteogenico. Le cellule iniziano a calcificare.

In presenza di alti livelli di vitamina K la proteina GLA della matrice viene carbossilata e il calcio viene deviato verso le ossa dove avviene la mineralizzazione. Quando la vitamina K è scarsa la proteina G della matrice non può essere attivata e quindi il calcio si infiltra nelle arterie dando luogo a fenomeni di calcificazione all'interno dei vasi provocando arteriosclerosi.

La mancata ottimizzazione della carbossilazione delle proteine della matrice GLA è un importante fattore di rischio oltre che



per l'arteriosclerosi anche per l'infarto coronarico e per patologie renali. Nei pazienti che sono trattati con il warfarin tutto questo è accelerato proprio per la riduzione di vit-K e la calcificazione delle arterie.

La vitamina K si trova sia negli alimenti vegetali sia in quelli animali e in più viene sintetizzata dai batteri intestinali, è presente anche nell'alga spirulina (utilizzata come integratore alimentare). Fabbisogno è di almeno 60 microgrammi al giorno.

Vitamina K3 o menadione è di origine sintetica. Le varie forme di vit-K sono assorbite in varie parti dell'intestino:

- K1 a livello del bileo con un meccanismo energia-dipendente
- K3 a livello del colon

Assorbimento favorito dalla presenza di grassi. Vit K viene inserita nei chilomicroni e da qui passa alla VLDL e alle lipoproteine a bassa densità e da qui viene ceduta ai tessuti.

La vit K viene depositata assai poco e presenta un'emivita di 17 ore che ne rende necessario un continuo apporto.

Vit K1 e K2 sono sottoposte a beta-ossidazione e poi escrete nelle urine come tali oppure coniugate con acido glucuronico.

Il menadione viene escreto con le urine agganciato a gruppi fosfato come fosfato o glucoronide.

Non sono noti effetti tossici dati dall'iperassunzione di vit K.

Alti livelli di menadione possono sviluppare effetti tossici e diminuire i livelli di glutazione e provocare emolisi.

Vista la diffusione nei cibi è difficile avere quadri di carenza di vitamina K. Carenza di vit K può verificarsi negli anziani per mancanza assorbimento dovuto a patologie derivate da malassorbimento o alterazioni che provocano diminuzioni nell'escrezione di bile. Si possono formare in questo caso ecchimosi nei vasi sanguigni che si rompono e quindi danno luogo a delle emorragie sottopelle (queste persone sono trattate con antagonisti della vitamina K e quindi presentano carenza di vitamine K). Questi soggetti possono assumere probiotici per i bacilli intestinali che inducono la produzione di vit K. La carenza all'inizio si sviluppa con un aumento del tempo di coagulazione dovuta ad una diminuzione della protombina.

Carenza di vit K nei neonati perché passa poco attraverso la placenta e il latte materno non ne presenta grandi quantità e anche l'intestino nei primi giorni di vita è sterile, non ancora colonizzato dai batteri, quindi il neonato è particolarmente a rischio di sviluppare fenomeni emorragici dovuti a deficit di vitamina K.

Applicazioni cliniche delle vitamine liposolubili:

- vitamina A acne, leucemia mieloide, metaplasia
- Vitamina D insufficienza renale, osteoporosi
- Vitamina E insufficienza vascolare periferica
- Vitamina K malattia emorragica perinatale