



# Biochimica per Medicina Veterinaria

Biochimica  
Università degli Studi di Teramo (UNITE)  
187 pag.

---

---

---

---

---

---

---

---

# Biochimica

Stella Murru



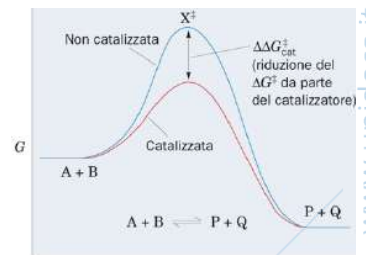
# ENZIMOLOGIA

## Reazioni (INIZIO LEZIONE 2, 23.03.21)

- Catalisi meccanismo in grado di velocizzare reazione chimica
  - Reazione chimica: da reagenti si formano prodotti
- **Enzima**
  - Non si consuma, non cambia termodinamica della reazione ovvero equilibrio chimico
  - Accelera il raggiungimento dell'equilibrio chimico
- **Reazioni sono lente**
  - Legami che devono rompersi sono stabili e hanno bisogno di catalisi
  - Senza enzima reazione non si realizza
- **Velocità reazione**
  - Rapporto tra prodotti formati e tempo necessario perché avvenga, variazione quantità reagenti o prodotti nel tempo
  - Senza enzima è molto bassa
  - Enzima permette che reazioni avvengano velocemente a velocità biologiche, microsec
- **Equilibrio**
  - Punto finale della reazione è equilibrio chimico
  - Velocità diretta uguale a quella inversa, composizione non varia
  - Non ottimale per cellula perché non può più controllare reazioni
- **Enzima**
  - accelera l'arrivo all'equilibrio di una reazione
  - Reazioni complete: tutti i reagenti si trasformano in prodotti
  - Reazioni non complete: solo frazione reagenti si trasforma in prodotti, dipende da stabilità relativa tra reagenti e prodotti

## Catalisi enzimatica

- **Catalizzatore** qualunque sostanza in grado di abbassare energia di attivazione
  - Affinché molecole reagiscano devono scontrarsi per penetrare nuvole elettroniche che causa aumento energia del sistema = energia di attivazione
  - Per questo motivo reazioni sono lente
  - Punto più alto della curva è **stato di transizione** in cui si stanno formando nuovi legami e c'è picco di energia potenziale
  - Enzima riduce altezza tra energia attivazione e energia dei reagenti
- **Condizioni operative**
  - Cellule fanno avvenire reazione in condizioni semplici da raggiungere, serve poco enzima e a condizioni fisiologiche
  - Enzimi riescono a raggiungere la loro potenza catalitica in condizioni fisiologiche (pH neutro, P= 1atm, T=25-27°C), perché evoluti in miliardi di anni grazie all'evoluzione per operare in queste condizioni
  - A differenza della chimica inorganica
- **Potere catalitico**
  - Rapporto tra velocità reazione catalizzata e quella non catalizzata
  - Varia a seconda dell'enzima da 10 mila a 10<sup>17</sup>, molta differenza tra organico e inorganico
  - Fattore che indica di quante volte l'enzima è in grado di accelerare la reazione



## • Specificità

- Riconoscimento stereospecifico dei substrati
- Enzimi sono proteine, ogni enzima ha particolare struttura, se la alteriamo non funziona più
- Molecole che reagiscono con enzimi=substrato
- Substrato riconosciuto in sito di legame, formato da struttura terziaria della proteina
  - Funzione di riconoscimento del substrato
- **Esocinasi** ha nel sito di legame una molecola di glucosio e una di ATP, fa reagire glucosio e ATP, sono legati, riconosciuti e posizionati nel corretto orientamento affinché possano interagire (teoria urti)
  - Enzima la cattura e la posiziona vicine l'una tra le altre e permette di indebolire legami e di far avvenire la reazione
  - Glucosio ha forma D e forma L ma enzima riconosce soltanto il D-glucosio
  - Vale anche per epimeri, mannosio (2C) e galattosio (4C) sono epimeri del glucosio e non vengono riconosciuti da enzima
- Grazie a specificità è in grado di mediare reazioni che formano prodotti specifici senza prodotti secondari

## • Regolabile

- Enzimi possono essere regolati attraverso interazione con altre molecole, enzima può essere inibito o indotto -> Enzimi regolatori o enzimi segnapasso

## • Importanza metabolismo

- Definiscono e regolano metabolismo
- Enzimi permettono di far avvenire reazione nel posto giusto e tempo giusto

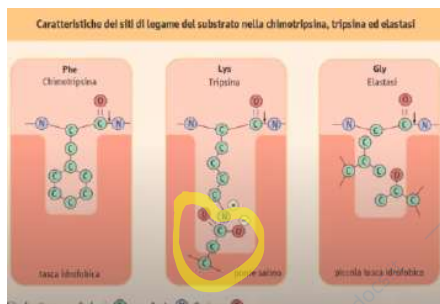
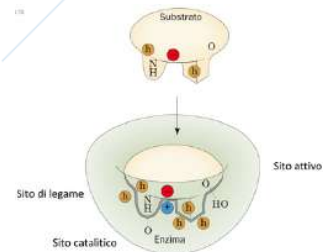
## • Attività enzimatica

- Misurata con *catal*: quantità di enzima in grado di convertire una mole di reagente al secondo in condizioni ottimali
- U o UI quantità enzima che converte una micromole di reagente in un minuto

## Proprietà strutturali degli enzimi

### Sito di legame

- Spazio organizzato da residui della catena (scheletro) dell'entità che serve per far accomodare substrato e avvenire riconoscimento
- Reagenti=substrati
- Riconoscimento stereospecifico
- Enzimi lavorano su legami specifici
- **Proteasi a serina** sono **endonucleasi** ovvero tagliano legame peptidico all'interno delle proteine, sono in grado di riconoscere leg peptidico
  - Enzimi che hanno un meccanismo catalitico che si basa sulla presenza di un residuo di **Ser** particolarmente reattivo, residuo di **His** e **Asp** nel sito attivo = **TRIADE catalitica**
  - Cambia amminoacido su cui va tagliato il legame, principali proteasi sono:



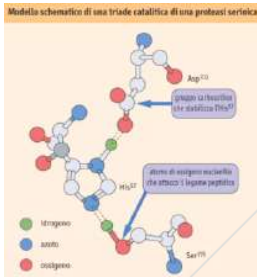
- **Chimotripsina** deve avere **amminoacidi aromatici** dunque idrofobico, poiché solo questo si può legare a **tasca idrofobica** di riconoscimento
- **Tripsina**, nella struttura c'è **aspartato**, **carico negativamente** acido, che si colloca in fondo alla tasca di legame e permette legame ionico con **amminoacido carichi positivamente** (a.a. basici Lys, Arg, His)
- **Elastasi**, piccola tasca idrofobica occupata da residui che impediscono ad amminoacidi grandi di legarsi, permettono legame solo con **amminoacidi piccoli** come la Gly e l'Ala (a.a. Ricchi nel connettivo)

- Hanno struttura simile, provengono da una stessa proteina ancestrale (serina proteasi) duplicazione gene e diversificazione

### Sito catalitico

- Formato da serie critica di amminoacidi catalitici come His, Ser, Asp ma anche Cys e Tyr
- In grado di indebolire legami chimici e interagire con substrato e formare addotti

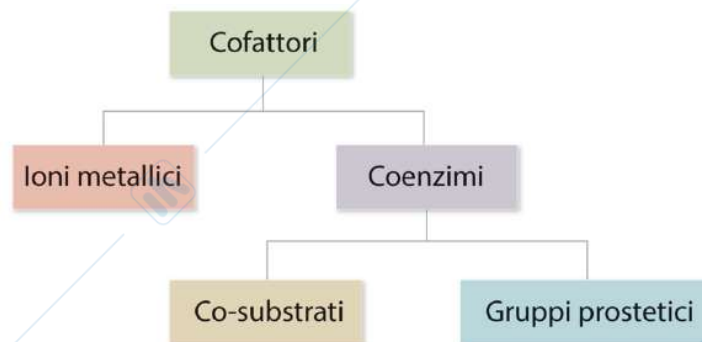
#### o Triade catalitica



- Serina proteasi formata da questa triade catalitica Ser, Hys e Asp legati da ponti H che formano relè chimico che serve a indebolire legame tra O2 e H della Ser e trasformarlo in alcolato
- Idrogeno è in grado di staccarsi dalla Ser195 grazie a presenza di Hys che è base e Asp aumenta capacità basiche della Hys facendo in modo da far esprimere comportamento acido della Ser, fanno sì che O2 si stacchi
- Di norma alcol NON si deprotona, succede solo per presenza altri a.a. Che ne fanno esaltare caratteristiche acide
- Esterasi rompono legami estere e hanno triade catalitica (acetilcolinesterasi)

### Cofattori

- Molecole che legano enzima e aumentano attività enzimatica
- In assenza di cofattori enzimi non possono operare
- Assenza o carenza compromette enzima dunque metabolismo
- Dobbiamo introdurli con dieta, parte integrante del meccanismo di azione degli enzimi



- Ioni metallici:
  - o Zn +2
    - **Anidrisi carbonica** complessato con catene laterali aventi 3 Hys messe in posizione corretta per poter catturare Zn+2
      - o Serve per effetto Bohr, trasformazione CO2 in acido carbonico e viceversa
      - o Acido cloridrico nello stomaco, controllo pH tutto legato a formazione CO2 in bicarbonato
      - o Se manca molecola non funziona
    - **Superossido dismutasi** (Cu/Zn) opera su anione superossido che si produce durante respirazione
    - **Carbossipeptidasi** sono **esoproteasi** e rimuovono amminoacido da estremità carbossi-terminale
    - Zinc fingers (dita di zinco) servono per controllo espressione geni
  - o Cu +2
    - Complesso IV nella catena di trasporto elettroni
    - **Superossido dismutasi** difesa da anione superossido
    - **Lisil ossidasi** servono per ossidare lisina per tessuto connettivo

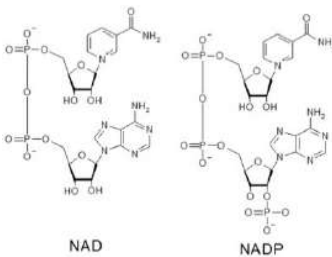
- Fe 2+, 3+
  - Hb/Mb proteine aventi gruppo eme che lega Fe<sup>2+</sup> che lega reversibilmente O<sub>2</sub> e lo trasportano
  - Citocromi, catena trasporto elettroni, trasformazione farmaci in fegato
  - **Catalasi** per difesa contro acqua ossigenata
  - Centri redox Fe-S per catena trasporto
  - Tossico se in forma libera
- Cobalto 2+, 3+
  - Legato a cobalammina e serve per far funzionare enzimi per formazione gruppi eme
  - Serve per enzimi per fisiologia globuli rossi e sangue
  - Cobalto come Fe in gruppo eme serve in coenzimi come cobalammina
- Cofattori organici= COENZIMI:
  - **Gruppi prostetici**
    - Legano stabilmente enzima, non viene mai rilasciato
    - Vitamine non possono essere sintetizzate da organismo ma assunti con la dieta
    - **Cobalammina**
      - Derivato della **vitamina B12**
      - Utilizzata da cellule come coenzimi cobalamminici per poter consentire a **metiltransferasi** il trasferimento di gruppi alchilici
      - Se carenza metiltransferasi **anemia perniciosa** causa lesioni neurologiche, danni epitelio gastroenterico, globuli rossi
        - Causa è dieta vegetariana perché si trova in alimenti di origine animale o deficit genetici
    - **Tiamina pirofosfato**
      - Derivato della **vitamina B1 - TIAMINA**
      - Cofattore di enzimi che servono a trasferire gruppi aldeidici
        - **Piruvato deidrogenasi**, ricava energia da zuccheri
        - **Chetoglutarato deidrogenasi**, per ciclo di Krebs (energia)
      - Carenza determina **Beriberi** che causa sindrome neurologica, cellule nervose molto sensibili a mancanza energia necessaria a reazioni
    - **Piridossalfosfato**
      - Derivato della **vitamina B6 - PIRIDOSSINA**
      - Gruppo prostetico che fa parte di enzimi come
        - **Glicogenofosforilasi**
        - **Transaminasi**, legate a metabolismo degli amminoacidi
    - **Flavina adenina dinucleotide FAD e flavina adenina monofosfato FMD** (INIZIO LEZIONE 3, 24.03.21)
      - Derivati della **vitamina B2 - FLAVINA**
      - Deidrogenazione, trasferimento atomi di H, rimuovere H da struttura carboniosa significa ossidarla
        - **Succinato deidrogenasi** contiene come gruppo prostetico FAD
      - Ruoli sono
        - In grado di accettare idrogeni, elettroni o idruri
        - Ossidazione degli acidi grassi nella via metabolica di questi chiamata betaossidazione
      - Carenza piuttosto rara
    - Enzima funzionante lega gruppo prostetico senza lasciarlo

o Vitamine

- VITAMINE= ammine necessarie alla vita
- Sono micronutrienti, devono essere introdotti in piccole quantità giornaliere con dieta per assicurare l'apporto giusto di cofattori necessari per attività degli enzimi
- **Vitamina C**, idrosolubile, acido L-ascorbico, media reazioni redox
  - Serve per enzima per formare fibre di collagene, grazie a idrossilazione di Pro e Lys, se no idrossilazione non si formano fibre
  - Se carenza causa **scorbuto**: ulcere cutanee, emorragie gengivali
  - Tipico nei marinai che non mangiano frutta e verdura fresche
  - Cane e gatto in grado di produrlo

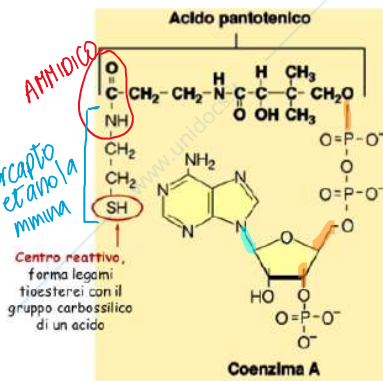
o Cosubstrati (coenzimi)

- Lega enzima ma poi si stacca, si associano temporaneamente, sono cosubstrati
- **Nicotinammide adenin dinucleotide NAD(P)**
  - Derivato della **vitamine B3 - NIACINA** o acido nicotinico
  - Carenza causa **pellagra**: dermatiti e demenza (essenziale per metabolismo cellulare, neuroni ne risentono, funzionalità cervello compromessa)
  - Abbondante nel grano ma scarsa nel mais
  - Abbiamo due forme:
    - o **NAD+** nicotinammide adenin dinucleotide
      - Servono per ossidazioni cataboliche, ossidare composti ricchi di energia per ricavare energia (con redox si ricava 90% dell'energia necessaria alle cellule)
    - o **NADP** è fosforilato in posizione 2
      - Usato nella sua forma ridotta NADPH
      - Serve per idrogenare, riduzioni biosintetiche
  - NAD+ forma ossidata, NADH forma ridotta
  - NADP + forma ossidata, NADPH forma ridotta



▪ **Coenzima A**

- Derivato della **vitamina B5 - PANTOTENATO** o acido pantotenico
- Coenzima è un nucleotide= zucchero, adenina e gruppo fosfato; fosfato legato a OH del ribosio (fosfoestere)
- Formato da 4-fosfopanteteina legata all'adenosina 3'-5' bifosfato
- Legami **fosfoestere**: fosfato-zucchero
- Legame **N-glicosidico**: base azotata-zucchero
- Parte reattiva è SH = tiolo o mercaptoetano
  - È la parte funzionale della molecola
- Gruppo alcolico è C=O+NH carbonio carbonilico legato a gruppo amminico -> si forma gruppo ammidico
- Serve per trasferimento gruppo acilico
  - **Acil-CoA sintetasi**, modo per attivare acido grasso e decidere cosa farne in base a necessità
- Carenza pantotenato piuttosto rara

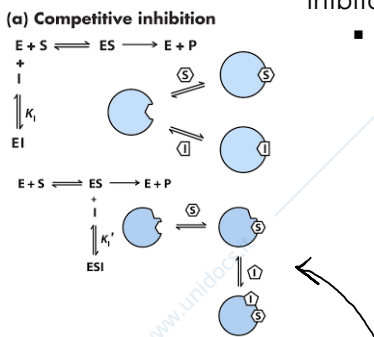


Coenzima	Precursore	Funzione	Enzimi	Avitaminosi associata
Tiamina pirofosfato (TPP)	Tiamina (vitamina B1)	Trasporto gruppo aldeidico attivato; decarbossilazione alfa-chetoacidi	Piruvico deidrogenasi; Piruvico decarbossilasi	<b>Beri-beri</b> (alimentazione a base di riso; incapacità di utilizzare il glucosio e di produrre acetilcolina; polinevrite)
Flavinadenin dinucleotide (FAD)	Riboflavina (vitamina B2)	Traferimento di atomi di H (reazioni redox)	Piruvico deidrogenasi; Succinico deidrogenasi	
Nicotinammide adenin dinucleotide (NAD); NADP	Acido nicotinico (vitamina B3)	Traferimento di atomi di H (reazioni redox)	Piruvico deidrogenasi; Lattico deidrogenasi; Glucosio-6-fosfato deidrogenasi	<b>Pellagra</b> (alimentazione a base di mais; scompenso metabolico grave; dermatite, diarrea, demenza)
Coenzima A	Acido pantotenico (vitamina B5)	Attivazione e trasporto di gruppi acile e acetile	Piruvico deidrogenasi	

### Sito regolatorio

- Inibitori

- Molecole che interagiscono con enzimi target
- Reversibile: legame è reversibile perché non forte, interrotta attraverso diluizione inibitore o allontanamento sostanza



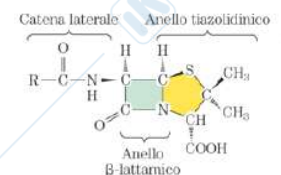
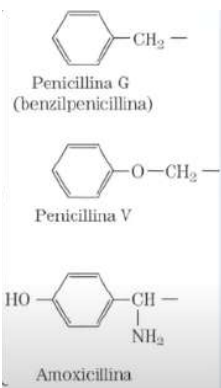
- Inibitori competitivi

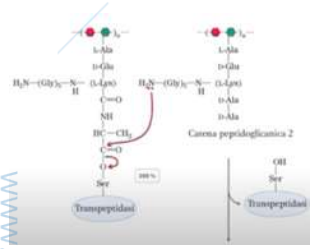
- Enzima lega substrato  $E+S \rightarrow ES \rightarrow E+P$ , trasforma substrato in prodotto
- Inibitore riconosciuto da enzima (perché molto simile a S) e si lega a sito attivo al posto del substrato e non consente reazione, sequestra molecole enzima, come tappo che blocca accesso a substrato
- Si può ridurre effetto I (inibitore) aumentando concentrazione S (competitor tra loro per legame E) si sposta equilibrio verso ES non facendo in modo che si legni I, unico che può essere fermato aumentando concentrazione S

- Irreversibili: si legano covalentemente a parte critica funzionale dell'enzima, ne compromettono attività, reazione catalizzata non avviene più

- Antibatterici

- Penicilline, antibiotici beta-lattamici, si distinguono in base alla catena R laterale:
- Penicillina G (originale)
  - Efficace ma sensibile (gruppo amide) a pH dello stomaco, no introdotta per vie orali, solo iniezioni intramuscolari
- Penicillina V
  - Meno efficace ma più resistente ad ambiente acido
- Amoxicillina
  - molto efficace, quasi quanto G, introdotta per via orale
- Target** penicillina: **transpeptidasi**
  - Dobbiamo impedire a batterio di proliferare

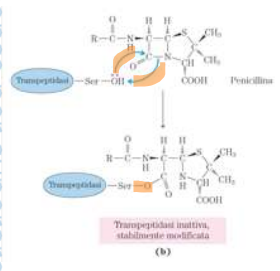




- Inibire produzione parete cellulare in particolare un componente strutturale ovvero il **peptidoglicano**=polimero di zuccheri e amminoacidi
- Peptidoglicani si trovano sia nei batteri gram + (pep molto più spesso) che -, è componente strutturale membrana batteri, assicura protezione meccanica e scissione binaria (necessaria per riproduzione)
- Per creare peptidoglicano batteri devono creare scheletro utilizzando amminoacidi per fare legami chimici che non vengono riconosciuti dalle proteasi animali
- Amminoacidi sia forma L che D, normalmente in natura sempre L, batteri hanno forma D che non viene sintetizzata quindi neanche riconosciuta dagli animali
- Proteasi non possono attaccare membrane perché resistenti a attacco proteolitico, amminoacido insolito impedisce riconoscimento
- Funghi e muffe hanno escogitato produzione sostanze che impediscono rafforzamento peptidoglicano attraverso formazione ponti ovvero legami crociati che uniscono catene di peptidoglicano
- Enzima chiave per la sintesi legami crociati che rafforzano peptidoglicani (formazione legami crociati) è **transpeptidasi**
- Transpeptidasi ha Ser molto reattiva le suo sito catalitico, serve per formare legame peptidico tra amminoacidi
- Ser serve per legare in modo transitorio la catena del peptidoglicano (leg peptidico) per poi permettere legame tra peptoglicani

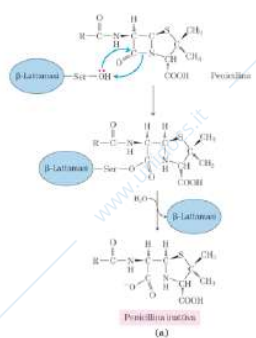
○ **Meccanismo d'azione penicillina**

- Inattivazione enzimatica da inibitore irreversibile
- Penicillina fa sì che anello beta-lattamico si leghi chimicamente alla serina del peptidoglicano con un **legame estere** stabile (serina ha OH + COOH peptidoglicano o anello?) -> enzima INATTIVO
- Enzima inattivo non più in grado di sintetizzare peptidoglicano e cellula muore

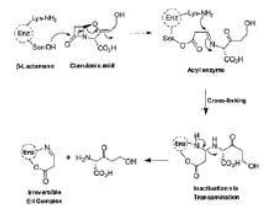


○ **Resistenza alla penicillina**

- Batteri creano **beta-lattamasi**, enzimi che idrolizzano gli anelli beta-lattamici
- Inattivazione irreversibile penicilline prima che agiscano su peptidiltransferasi
- Abbiamo Ser reattiva avente intorno chimico al sito catalitico specifico che permette di legare penicillina e di utilizzare molecola d'acqua per scindere legame estere che unisce serina a penicillina inattivata, impedendole di agire sul suo target
- Possono anche cambiare struttura della transpeptidasi, mutazione, o impedire che questa incontri penicillina evolvendo meccanismi di trasporto impedendo a penicillina di accumularsi e agire su target



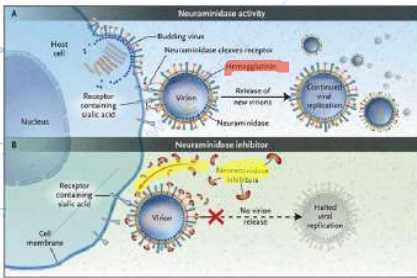
**Acido Clavulanico-Meccanismo di inibizione delle beta-Lattamasi**



- Industria produce inibitore della beta-lattamasi, l'**acido clavulanico**
  - Una volta che reagisce con beta-lattamasi questa non è più in grado di riattivarsi e si impedisce di farla agire sulle penicilline
- Farmaci contengono 2 inibitori, uno per transpeptidasi e altro per beta-lattamasi
  - Augmentin (antibiotico): amoxicillina (transpeptidasi)+acido clavulanico (beta-lattamasi)
  - Col tempo diventano meno efficaci perché anche beta-lattamasi si evolvono, soprattutto a causa dell'uso non corretto degli antibiotici

• **Antivirali**

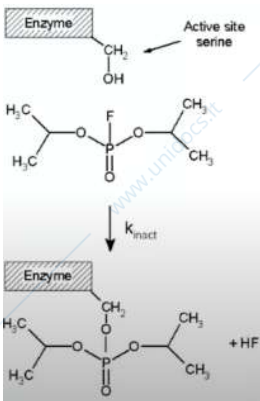
- **Hiv** primo virus contro cui si sono sviluppati farmaci, non eradicato ma controllato
- Target
  - Virus a RNA, serve **trascrittasi inversa** per avere dna da rna
  - **Integrasi** permette di far integrare DNA virus con dna ospite, HIV diventa cronico
  - **Proteasi virale** che permette maturazione capsidi, non completa ciclo vitale
- **Tamiflu**: farmaco antinfluenzale
  - Virus costituito da DNA/RNA, lipidi che formano capsidi che avvolge acido nucleico, proteine per ciclo vitale del virus
  - Virus non è una cellula, ha bisogno di cellula per potersi replicare. Per far questo ha bisogno di enzimi come la **neuroamminidasi**



- Enzima (si trova su sup. Cellula) che riconosce e taglia fosfolipidi delle cellule che è l'acido sialico
- **Acido sialico** utilizzato da virus sia per riconoscerla che per entrare dentro
- Quando virus deve uscire da cellula virale, acido sialico riconosce proteina **emagglutinina** del virus la quale si lega all'acido sialico ed è **recettore** del virus sulla cellula
- Quando virus deve uscire per continuare infezione, neuroamminidasi riconosce peptide che lega virus alla cellula e lo taglia
- Se **colpiamo neuroamminidasi**, virus può infettare cellula ma non è in grado di staccarsi da questa
- Per COVID si svilupperà inibitore per emagglutinina o neuraminidasi

• **Veleni respiratori**

- Biochimica utilizzata nelle guerre attraverso sviluppo gas tossici
- Gas nervini utilizzati anche in insetticidi
  - Derivati da **organofluorofosfato**, SARIN
  - Usato per inibire contrazione muscoli respiratori
  - Target: **colinesterasi**

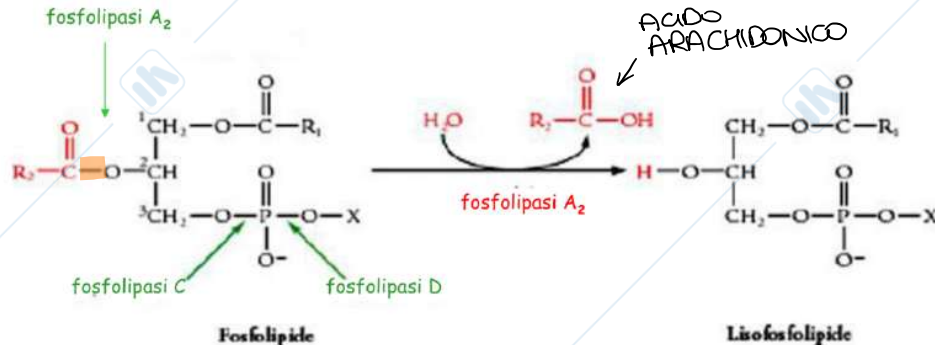


- Presente nelle giunzioni neuromuscolari, membrane delle cellule muscolari dove svolge ruolo essenziale di disattivatore dell'acetilcolina
- Acetilcolina serve per far contrarre muscoli
- **Acetilcolinesterasi** rimuove acetilcolina da spazio sinaptico e impedisce contrazione
- Colinesterasi presenta Ser reattiva nel sito catalitico che è bersaglio del veleno, in questo caso **diisopropilfluorofosfato** (DIFP) (è organofosfato)
  - Reazione chimica tra Ser e fosforo, si libera fluoruro HF
  - enzima rimane incastrato a formare legame chimico irreversibile, stabile, enzima non può svolgere ruolo fisiologico
- Quando acetilcolina non viene rimossa da spazi sinaptici cellule dei muscoli respiratori rimangono contratti -> organismo muore per mancanza di ossigeno
  - Intossicazione da insetticida negli animali

• **Farmaci antinfiammatori non steroidei FANS** (INIZIO LEZIONE 4, 29.03.31)

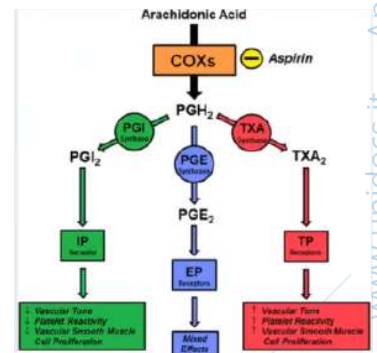
- Acido grasso che viene liberato da **fosfolipasi A2** = acido arachidonico in posizione 2
  - Fosfolipasi stacca uno dei due acidi grassi dal glicerolo del glicerofosfolipide che diventa lisofosfogliceride (gruppo fosfato+glicerolo+1 acido grasso)

- Tutte cellule corpo hanno fosfolipasi A2, viene attivato quando c'è danno, causa rilascio da parte dei fosfolipidi di membrana di acido grasso, attiva risposta infiammatoria
  - Fosfolipasi si avvicina e lega a fosfolipide e idrolizza **legame carbossi-estere** del fosfolipide, si forma lisofosfolipide (acido grasso che si stacca è acido arachidonico)

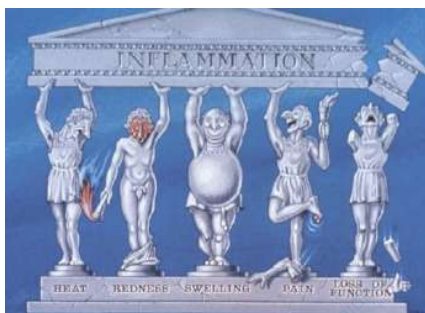


- **Acido arachidonico 20:4n6** posizione del primo carbonio con doppio legame a partire da estremità metilica in pos 6 = acido grasso polinsaturo omega6, doppi legami tutti cis
  - Coniugato attraverso legame estere nei lipidi di membrana, fosfolipidi
  - Precursore degli Eicosanoidi (20C), derivati dell'acido arachidonico
  - Dopo essere stato staccato viene riconosciuto dalle ciclossigenasi Cox, che sono poi i target dei farmaci antinfiammatori
- **Ciclossigenasi** trasformano acido arachidonico in **PGH2** da cui derivano prostaglandine e trombossani
  - 1 e 2 sono due isoenzimi, forme diverse ma stessa attività catalitica ovvero **ossidazione** dell'acido grasso **arachidonico**
  - **Cox1** è ubiquitaria, espressa da tutte cellule del corpo, PGE, PGI, TXA2, responsabile coagulazione (piastrine) e protezione (cellule stomaco)
  - **Cox2** è inducibile, prodotta da solo cellule danneggiate e attivate nell'infiammazione, PGE2, responsabile dell'infiammazione

- **Step**
  1. Rilascio acido arachidonico dal fosfolipide di membrana
  2. Trasformazione dell'acido arachidonico in PGH2 (intermedio) dalle ciclossigenasi
  3. Da PGH2 si ricavano (ottimizzazione stessa molecola per fini diversi)
    - a. Prostaglandine: **PGI** (**prostaglandina I sintasi**), **PGE** e **PGE2** (**prostaglandina E sintasi**)
    - b. Trombossano **TXA2** (**trombossani sintasi**)



- Prostaglandine
  - **PGE2** prodotta da **Cox2**, enzima inducibile, indotto quando cellula danneggiata



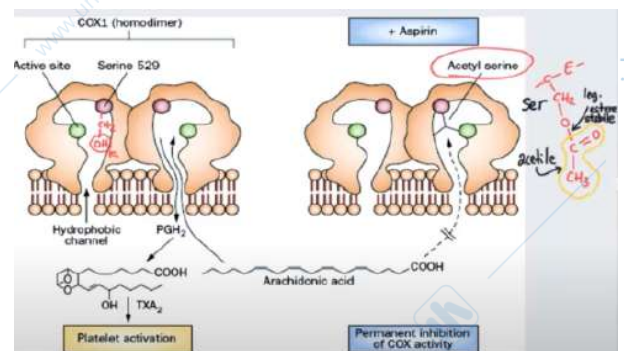
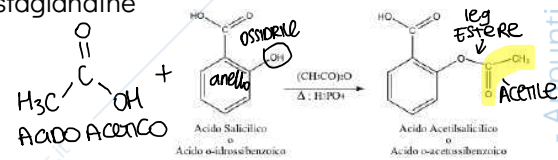
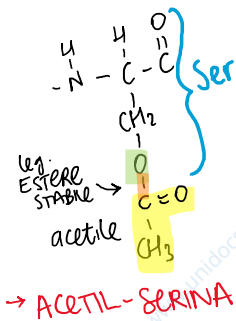
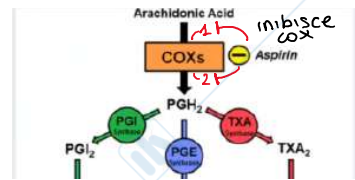
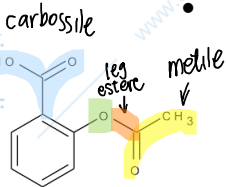
- **Risposta infiammatoria**, ne determina segni tipici: calore, rossore, rigonfiamento, dolore e funzione compromessa
- Vasodilatazione, reclutamento e attivazione dei leucociti che danno luogo a risposta infiammatoria con sintomi descritti
- Quando c'è danno cellula danneggiata produce citochine che reclutano leucociti
- Vasodilatazione per far passare leucociti

- Calore e rossore per attivazione e differenziamento leucociti che poi fagocitano cellule danneggiate e detriti ecc... fanno ritornare omeostasi nel tessuto
- Se risposta è prolungata non è fisiologica né produttiva per organismo
- PGE prodotta da Cox1, cellule stomaco
  - **Gastroprotezione**, protegge stomaco da ambiente acido, succhi gastrici
  - Mancata produzione -> formazione **ulcere gastriche**
    - Se inibiamo Cox1 cellule stomaco
- PGI prodotta da Cox1, cellule rene
  - **Controllo flusso sanguigno nel rene**
  - Mancata produzione -> **ischemia renale**
- Trombossani TXA2 prodotta da Cox1 prodotta da piastrine (trombociti)
  - Importanti per **coagulazione del sangue**
  - Mancata produzione -> **emorragie**, mancata cicatrizzazione ferite e anti-aggregazione piastrinica (FINE LEZIONE 3, 24.03.21)

• FANS inibiscono Cox e causano tutti i sintomi causati da mancanza PGE, PGE2, PGI e TXA2

• **Aspirina**, acido acetilsalicilico

- Target: **ciclossigenasi 1 e 2**, non è in grado di distinguere tra isoenzimi (Cox)
- È un inattivatore=inibitore irreversibile, si lega in modo specifico sull'enzima
- Struttura aspirina: **gruppo acetilico** legato con **legame estere** all'**ossidriile fenolico** dell'acido organico
- Cox è omodimero, sub identiche, nel sito catalitico ha residuo di Ser
- Gruppo acetilico utilizzato per acetilare la Ser catalitica della Cox
- Acetilando residuo di Ser catalitica la Cox non è più in grado di sintetizzare PGH2, da cui poi dovrebbero derivare PGE2, PGE, PGI e TXA2
- In questo modo attenua risposta infiammatoria e ha effetti secondari che abbiamo descritto come causati dalla mancanza di queste prostaglandine
- Acido (carbossile COOH) acetilsalicilico
- Fenolo+acido acetico=ESTERE
- **Acetile** verrà utilizzato per acetilare Ser
  - Ser ha catena laterale alcolica **OH**
  - Ossidriile verrà esterificato da aspirina e si formerà addotto acetilato stabile della serina (**acetil serina**) il quale inattiva l'enzima
- Siamo nella membrana di una piastrina, cox deve essere funzionante per iniziare cascata reazioni
- Non in tutti i fosfolipidi c'è l'acido arachidonico, cox attivata solo dove c'è
- Aspirina acetila cox di tutto il corpo
- Se abuso -> effetti gravi



- Farmaci hanno meccanismi diversi: inibizione non reversibile, allosterica, diversa specificità per cox1 e Cox2, ecc... (diclofenac, ibuprofene, nimesulide, coxib)
  - FANS non selettivi: aspirina, indometacina
  - FANS selettivi: COXIB
- Indicazioni terapeutiche
  - Patologie infiammatorie quali osteoartriti, periartriti, lombalgie, miositi, sciatalgie, fibrositi da traumatologia sportiva e accidentale, artrite reumatoide, febbre

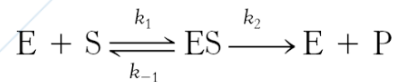
- Antipiretici (<T), analgesici (dolore), antinfiammatori

### Importanza struttura

- Per capire enzimi regolatori (segnapasso), funzionare in relazione a presenza di un composto legato a enzima attivo che fa cambiare curva cinetica enzima verso sx
- Se enzima inattivo verso dx, diminuisce
- Serve per controllo del flusso delle vie metaboliche
- Per capire che tipo di interazione vi è fra subunità e meccanismo di azione
- **Struttura sensibile:**
  - Variazione pH e presenza molecole che influenzano struttura terziaria o secondaria
    - Maggior parte enzimi hanno pH ottimale 7, se aumenta velocità enzimatica diminuisce in modo drastico
    - Enzimi si sono evoluti per lavorare in ambienti acidi
      - Pepsina lavoro in ambiente acido stomaco, funziona in modo ottimale
      - Tripsina
      - Lattato deidrogenasi
      - Fosfatasi alcalina, curve verso dx, valori alti pH
  - Temperatura
    - > T, >E cinetica molecole, >urti, >velocità reazione, fin quando T non raggiunge temperatura di denaturazione, perdita struttura nativa, si perde funzione
    - Se enzimi vitali denaturati -> incompatibile con la vita
  - Piccole molecole alterano struttura terziaria come
    - Agenti denaturanti: SDS (sodiodicilfosfato?) e urea (interferisce formazioni leg H tra proteine)
    - Inibitori enzimatici
    - Regolatori allosterici

### Cinetica enzimatica

- Studia velocità reazioni enzimatiche e parametri che la influenzano
  - $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P$
  - Trasformazione del substrato in prodotto
  - Enzima non è né reagente né prodotto quindi non appare nell'equazione finale
1. Enzima libero E in soluzione reagisce con substrato libero S in soluzione
  2. Si forma complesso ES enzima-substrato o di Michaelis Menten, si deve formare affinché enzima possa agire
  3. Da ES si ha -> formazione enzima libero E + prodotto P
- Processo è bidirezionale  $E+P \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E+S$



#### Costante di Michaelis Menten $K_m$

- Misura affinità enzima per substrato,
  - Se enzima non lega substrato reazione enzimatica non avviene
- $K_m$  è concentrazione del substrato in cui riusciamo ad occupare il 50% dell'enzima e formiamo il 50% di complesso ES, enzima è "semisaturo"
- Più è basso il valore, più bassa sarà concentrazione S necessaria a saturare metà delle molecole di enzima -> più alta affinità dell'enzima per il substrato
  - Enzima è saturo quando E si associa tutto a S, non c'è più E libero ma solo ES, abbiamo formato quantità massima di questo complesso, enzima solo in questa forma
- Più è alta  $k_m$ , minore sarà l'affinità dell'enzima per il substrato
  - Necessaria una maggiore concentrazione di substrato perché esso possa legare metà delle molecole di enzima presenti in soluzione
- $K_m$  dipende da enzima in relazione a substrato, ogni enzima ha  $K_m$  diversi per substrati diversi

- **Glucochinasi** (esochinasi IV) ha  $k_m=0.5$  mM per D-Glu e  $K_m=1.5$  mM per D-Fru
  - Ha maggiore affinità per il glucosio, 30 (1.5/0.5) volte più affine per il glucosio rispetto a fruttosio, fruttosio viene ignorato -> glucochinasi è enzima specifico per glucosio
  - Glucosio e fruttosio sono isomeri, anche L-Glu non riconosciuto->enzima molto specifico
- **Anidraasi carbonica** ha  $k_m=26$  mM per  $\text{HCO}_3^-$  (bicarbonato)
  - concentrazione ottimale nel sangue è 23-30 mM
  - Concentrazione ottimale substrato determina  $K_m$ -> $K_m$  dipende da conc. Ottimale!

### Costante catalitica $k_{cat}$

- Velocità con cui enzima trasforma substrato, non dipende da  $[E]$
- Pari a numero massimo di molecole di substrato convertite in prodotto da una singola molecola di enzima nell'unità di tempo, si può realizzare solo quando enzima completamente saturo, ES
- Solo quando enzima è completamente saturo ES, massima  $V$  a cui può operare
- Valori diversi per substrati diversi
- Chiamata anche **numero di turnover**:

- Numero max volte che enzima re-inizia per unità di tempo
- **Anidraasi carbonica** può convertire 600.000 al secondo, quando enzima è completamente saturo un sito catalitico dell'enzima è in grado di trasformare 600mila molecole di bicarbonato in anidride carbonica al sec
  - Deve essere elevato perché è processo vitale, si è evoluto per questo scopo
- Numero turnover della maggioranza degli enzimi nei confronti dei loro substrati fisiologici è compreso tra 1 e  $10^4$
- **Catalasi** ha come substrato l'acqua ossigenata, serve a detossificare
  - $k_{cat}=40 \times 10^6 / \text{s}$
  - Trasforma in un secondo 40 milioni di molecole di  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$

TABLE 8.6 Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

- **Anidraasi carbonica** ha  $S; \text{HCO}_3^-$  e ha  $k_{cat}=6 \times 10^5 / \text{s}$
- Inverso costante catalitica ( $1/k_{cat}$ ) ci da **tempo di catalisi**, quanto ci mette a trasformare una singola molecola di bicarbonato in anidride carbonica
- Per anidraasi carbonica tempo di catalisi è 1.7 microsecondi ( $1/6 \times 10^5$ )
  - Importante che reazioni avvengano rapidissimamente

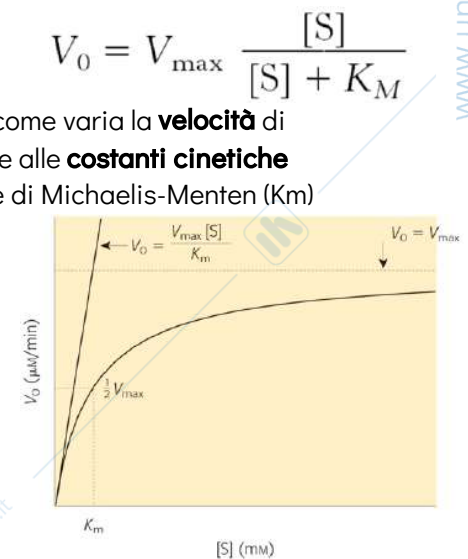
### Costante di specificità: rapporto $k_{cat}/K_m$

- Rapporto tra queste due grandezze
- Enzimi hanno  $k_m$  simile a concentrazione fisiologica substrato
- Determina specificità di un enzima per substrati in competizione (FINE LEZIONE 4, 29.03.21)

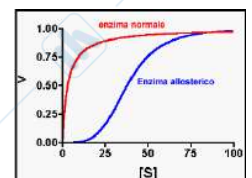
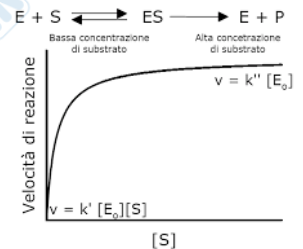
### Equazione di Michaelis-Menten (INIZIO LEZIONE 5, 30.03.21)

- $V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$
- Se  $[S] = K_m$  allora  $V_0 = V_{max} \frac{K_m}{K_m + K_m} \rightarrow V_0 = V_{max} \frac{1}{2} \rightarrow V_{max}/2$
- Equazione di Michaelis Menten è una curva iperbolica che descrive come varia la **velocità** di una **reazione** ( $V_0$ ) in **relazione** alla **concentrazione del substrato** ( $x$ ) e alle **costanti cinetiche** specifiche dell'enzima, ossia la velocità massima ( $V_{max}$ ) e la costante di Michaelis-Menten ( $K_m$ )

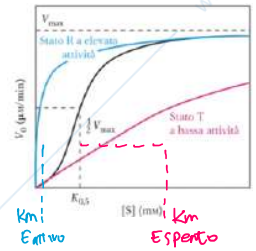
- Andamento iperbolico
  - Iperbole rettangolare, descrive come varia velocità di una reazione ( $V_0$ ) in rapporto a concentrazione substrato e alle costanti cinetiche specifiche dell'enzima
  - $V_{max}$  asintoto verso cui converge la curva quando concentrazione substrato è infinita
  - $K_m$  intercetta curva nel punto in cui la velocità è metà  $V_{max}$ , metà dell'enzima è saturo, metà dei siti catalitici dell'enzima sono saturi ( $V$  semimassimale)



- $V_o$ 
  - Velocità iniziale della reazione (stadio iniziale)
    - Velocità diretta da reagenti verso prodotti
    - Velocità inversa da prodotti a reagenti è 0 (non ci sono prodotti, o sono <10%)
  - Man mano che reazione procede si accumulano prodotti e vi è anche reazione inversa
  - $V_o$  in funzione di  $[S]$  e dipende da costanti cinetiche  $V_{max}$  e  $K_m$
  - Si considera velocità iniziale per semplificare si fa riferimento allo stadio iniziale
- $V_{max}$ 
  - Velocità massima a cui reazione catalizzata da enzima può andare
  - Collegata alla costante catalitica
  - Prodotto tra quantità enzima per costante catalitica
    - $V_{max} = k_{cat} \times [E]_{tot}$
    - $V_{max}$  dipende da quanto enzima è presente nel sistema
    - Costante catalitica è indipendente da conc. enzima  $[E]$
  - Velocità può essere controllata in vari modi:
    - Controllo della concentrazione dell'enzima
    - Costante catalitica è un parametro costante ma è possibile controllarla cambiandone la struttura tridimensionale con regolatori allosterici, inibitori o modificazioni covalenti
  - Velocità in cui reazione procede quando tutto l'enzima è saturo, tutto enzima legato a formare complesso ES, no E libero
    - Normalmente non si raggiunge, raramente
    - $V_{max}/2$  o semimassimale (ottimale per la cellula)
      - Reazione procede a velocità semimassimale quando enzima è semisaturo, quando  $[S]=K_m$  e avremo che  $[ES]=1/2 [E]_{tot}$ , concentrazione complesso ES è metà della concentrazione dell'enzima totale, metà è libero
      - Prima che  $[S]$  raggiunga  $K_m$  la reazione procede molto lentamente, solo quando si raggiunge  $K_m$  la velocità inizia ad essere accettabile (ottimo per regolazione cellule)
- $[S]$ 
  - Ci sono substrati che la cellula tende a mantenere in quantità costanti
    - Glucosio, ATP, NAD
  - Concentrazione substrato che può subire variazioni (dieta, digiuno)
    - Glucosio che diminuisce per ricavare energia, ecc...
  - **Stato stazionario**: concentrazione rimane costante, stato lontano da equilibrio, reazioni che sintetizzano glucosio sono bilanciate da reazioni che utilizzano glucosio
    - Cellula fa in modo di bilanciare le reazioni che portano alla sintesi e le reazioni che utilizzano queste molecole -> stato stazionario
    - Cellule sono in grado di influenzare processi nella direzione opportuna
- $K_m$ 
  - Equazione si applica per enzimi di Michaelis Menten, NON per enzimi regolatori (segnapasso)
  - Enzimi regolatori spesso con struttura quaternaria e allosterici, andamento cinetico può essere influenzato perché vi è cooperatività tra le subunità (ci sono anche altri meccanismi)



- Enzima di Michaelis Menten ha andamento iperbolico
  - Cinetica NON può essere influenzata, né Km né costante catalitica
- Enzima regolatorio ha curva sigmoide
  - Concentrazione substrato [S] influisce molto sulla velocità
  - Enzima può essere controllato, regolato → cambia Km e Vmax
    - Andamento a **dx**, più lento, se reazione non serve, serve [S] > per raggiungere Vmax/2, influenzato in modo negativo
    - Andamento a **sx**, più veloce, se cellula ha bisogno di reazione, assomiglia a iperbole molto spostata a sx, serve concentrazione MOLTO più bassa di S ([S] <<) per raggiungere Vmax/2, influenzato in modo positivo

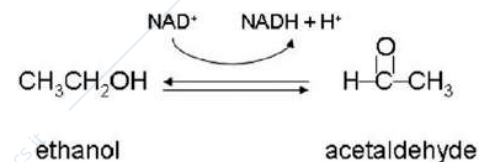


## Classificazione enzimi

### SIGLA

Commissione per gli enzimi ha formulato sigla formata da EC+ 4 numeri

- Prima cifra: **famiglia** a cui appartiene l'enzima
  - Ossidoreduttasi
  - Idrolasi, ecc...
- Seconda cifra: **sottoclasse**, tipo di **composti** su cui l'enzima è in grado di lavorare
  - Esterasi, legami estere
  - Peptidasi, legami peptidici
- Terza cifra: **sotto-sottoclasse**, su quale tipo di **legame** enzima lavora
  - Esterasi di esteri fosforici
  - Esterasi di esteri carbossilici
- Quarta cifra: specifica la **particolare reazione**
- Ossidazione etanolo ad acetaldeide, deidrogenazione dell'etanolo
  - Enzima: **alcol deidrogenasi**
  - EC 1.1.1.1
    - 1. Ossidoreduttasi
    - 1. Opera nella deidrogenazione
    - 1. Usa coenzima NADH
    - 1. Substrato è etanolo e acetaldeide



### Classi

1. **OSSIDOREDUTTASI**, reazioni redox (trasferimento elettroni tra due specie)
2. **TRANSFERASI**, trasferimento gruppi funzionali da una molecola ad un'altra
  - a. CHINASI, gruppo fosfato da ATP verso qualunque S che lo possa accettare
  - b. TRANSALDOLASI, TRANSCHEVOLASI
3. **IDROLASI**, usano acqua per scindere legami chimici o condensare legami per formare acqua
4. **LIASI** o **SINTASI**, eliminazione gruppi funzionale con formazione doppi legami
  - a. IDRATASI
5. **ISOMERASI**, spostano gruppi funzionali all'interno di una stessa molecola
  - a. EPIMERASI
6. **LIGASI** o **SINTETASI**, formazione legami chimici con idrolisi di ATP

Classificazione	Tipo di reazione catalizzata
1. Ossidoriduttasi	Reazioni di ossidoriduzione
2. Transferasi	Trasferimento di gruppi funzionali
3. Idrolasi	Reazioni di idrolisi
4. Liasi	Eliminazione di gruppi per generare doppi legami
5. Isomerasi	Isomerizzazione
6. Ligasi	Formazione di legami accoppiata all'idrolisi di ATP

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	O = Reduction equivalent	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases		C <sub>1</sub> -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases		Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")		C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases		Epimerases cis trans Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")		C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

## DIAGNOSTICA ENZIMATICA

Molecole che vengono analizzate sono enzimi di interesse diagnostico

### Enzimologia clinica

#### Contesti diagnostici

- Diagnosi malattie congenite
  - Misurare forma alterata enzima, ridotta espressione o attività che può essere alla base di un difetto metabolico grave
    - Fenilchetonuria: manca enzima per metabolismo Phe
    - Glicogenosi
- Diagnosi condizioni non genetiche
  - Enzimi usati come marcatori di funzionalità o lesioni di cellule e tessuti
    - Può cambiare nel tempo in termini di quantità
  - Prognosi

#### Dove si dosano?

- Nelle matrici biologiche come sangue (siero e plasma), urine, saliva e altri essudati corporei

#### Come si dosano?

- Unità enzimatica
  - Unità enzimatica U o UI, trasformare 1 mole di S in un minuto
  - Katal, quantità enzima che catalizza trasformazione di una mole di S in un s
  - Attività specifica, rapporto tra attività enzimatica misurata e V, mg della matrice
- Dosaggio enzimatico, come si misurano variazioni anabolita?
  - Tecniche spettrofotometriche
    - Molecole hanno capacità di assorbimento luce a certa lunghezza d'onda quando in una soluzione
    - Si utilizzano spettrofotometri
    - Anaboliti hanno caratteristiche spettrofotometriche, assorbire luce ad una certa lunghezza d'onda
  - Tecniche elettroforetiche
    - Riconoscimento isoenzimi

- Differenze peso proteina o capacità di spostarsi in campo B
- Tecniche per separarle e distinguerle le une dalle altre, mobilità elettroforetica
- Condizioni ottimali, enzima ha bisogno di:
  - Presenza molecole presenti in soluzioni, cofattori
  - PH deve essere quello in cui enzima ha picco attività
  - Cofattori, metallici o organici
  - Tendenza degli enzimi ad essere inibiti da certe sostanze
  - Enzima misurato in condizioni saturanti
    - Rischio di inibizione da eccesso di substrato
    - Si possono usare anche substrati artificiali per sfruttare caratteristiche e distinguere tra isoforme
      - **Fosfatasi acida** in grado di riconoscere in modo selettivo la timolftamina, usato per distinguere
- Inibizione enzimatica
  - Inibitori utilizzati per discriminare determinati isoenzimi
    - **Fosfatasi acida prostatica** inibita da **acido tartarico**
    - Variante anomala della **pseudocolinesterasi** non inibita da **cloridrato di dibucaina**
- Inibizione immunologica
  - Ab specifici contro **CK-M** ne inibiscono attività
  - Per distinguere tra trauma muscolare e infarto
  - CK-M **creatinachinasi**, isoforma specifica del muscolo scheletrico
  - Esistono anticorpi specifici che ne inibiscono l'attività
  - Isoforme del cuore o cervello non vengono inibiti da questi anticorpi
  - Misurando attività enzimatica in presenza/essenza di questi anticorpi è possibile capire se variazione concentrazione CK è imputabili a una isoforma o ad un'altra
  - Capire cosa causa variazione creatinochinasi, se isoforma del cuore, del cervello o del muscolo
- Inibizione termica
  - Inibire termicamente isoforme che sono più sensibili rispetto ad altre
  - ALP ossea termosensibile, altre isoforme (fegato, ecc...) non lo sono

### Isoenzimi

- Proteine diverse ma con la stessa proprietà catalitica
- Distinguibili in base a proprietà
  - Fisiche: peso molecolare, termostabilità
  - Biochimiche: numero sub, inibitori, parametri cinetici, riconoscimento Ab, pH ottimale
- Importante determinare quale isoforma sta variando azione enzimatica, da quale organo è stato rilasciato questo enzima
  - Aumentano valore predittivo ed il ruolo diagnostico dell'enzimologia
  - Dobbiamo capire a quale organo è dovuta variazione enzima

### Enzimi nel sangue (matrice più importante per indagini diagnostiche)

Classificazione	Esempi
Enzimi Plasma-Specifici	Trombina, fattore XII fattore X, enzimi fibrinolitici etc.
Enzimi Secreti	Lipasi ( <i>ghiandole salivari, gastriche oxintiche e pancreas</i> ), $\alpha$ -amilasi ( <i>da ghiandole salivari e pancreas</i> ) tripsinogeno, colinesterasi, fosfatasi acida prostatica etc.
Enzimi Cellulari	Lattato deidrogenasi, aminotransferasi, fosfatasi acida e alcalina ossee, creatina chinasi, gamma glutamiltrasferasi etc

Enzimi plasma-specifici, operano direttamente e funzionalmente nel sangue

- Enzimi legati a coagulazione, soluzione del coagulo, pseudocolinesterasi
- Devono essere monitorati

Enzimi non plasmatici

- Enzimi cellulari
  - Presenti normalmente nelle cellule, dove funzionano, e rilasciati nel sangue da parte del turnover cellulare (non funzionano più)
  - Localizzazione sub cellulare
    - Isoforme hanno diversa localizzazione cellulare e peso molecolare
    - Loro rilascio da una cellula danneggiata più o meno seriamente viene monitorato nel sangue, dinamica di comparsa di queste isoforme è legata a dove si trovano
    - Usiamo questa informazione per capire tipo danno e entità

Organello	Enzimi	Note
Mitocondri	mAST (AST2): aspartato transaminasi mitocondriale mCK: creatina chinasi mitondriale	
Citoplasma	LDH1,2,3,4,5: lattato deidrogenasi cAST: aspartato transaminasi citoplasmatica ALT: alanina aminotransferasi citoplasmatica CK1, CK2, CK3: isoforme creatina chinasi	
Lisosomi	ACP: fosfatasi acida lisosomiale	
Vescicole secretorie	AMY: Alfa-amilasi LIP: lipasi TRY: tripsina PchE: pseudocolinesterasi	Enzimi rilasciati da cellule dell'apparato digerente per digerire cibo, abbiamo forme inattive degli enzimi digestivi
Reticolo endoplasmatico	GGT: gammaglutammiltransferasi	stessa molecola con compartimentazione differenti
Membrana cellulare	GGT ALP: fosfatasi alcalina AchE: acetilcolimesterasi	

Organello	Enzima
Mitocondri	Aspartato aminotransferasi (AST) isoenzima mitocondriale Creatina chinasi (CK) isoenzima mitocondriale
Citoplasma	Lattato deidrogenasi (LDH), LDH1-5 Alanina aminotransferasi (ALT) Creatina chinasi isoenzimi citosolici (CK1-3)
Lisosomi	Fosfatasi acida (ACP)
Vescicole secretorie	Alfa-Amilasi (AMY) Lipasi (LIP) Tripsina (TRY)
Reticolo endoplasmatico	Gamma-glutamyl transferasi (GGT)
Membrana cellulare	Gamma-glutamyl transferasi (GGT) Fosfatasi alcalina (ALP) Acetilcolinesterasi (AChE)

- ENZIMI SECRETI

- Rilasciati nei dotti dalle ghiandole esocrine (pancreas, ghiandole salivari) e operanti nei liquidi organici (interno intestino, stomaco, bocca)
- Se c'è ostruzione dotti, che trasferiscono molecole dalla ghiandola al lume dove devono operare, enzimi possono passare nello spazio attraverso spazio extracellulare e raggiungere il flusso sanguigno
- Lipasi, amilasi, tripsina, fosfatasi acida prostatica
- Pseudocolinesterasi enzima rilasciato da fegato (cellule epatiche) attraverso meccanismo di esocitosi, nel sangue

- Unico esempio di rilascio diretto

- Meccanismi di variazione

- Valore di riferimento, dipendono da organismo

- Quando stiamo bene enzimi hanno valore normale, sono nel sangue perché ci sono meccanismi di rilascio
- Membrane cellulare possono rilasciare una certa quantità fisiologica di enzimi
- Dovuti a **turnover cellulare** (cellule che muoiono e si riproducono), processo di rinnovamento tessuti, enzimi rilasciati da cellule che muoiono, una volta fuori non funzionano più se ad esempio mancano cofattori, ma per diagnostica non è importante (si tiene conto anche di quelli inattivati, vengono "resuscitati")
- È più facile che vengano rilasciati enzimi citoplasmatici (non essenziali) quando rilasciati non più funzionanti
- Cambiano nel tempo a seconda delle caratteristiche dell'organismo e periodi, ad esempio fosfatasi alcalina elevata durante sviluppo perché serve alle ossa
- Specifici per ciascun enzima di interesse diagnostico, si tiene conto della continua produzione e del continuo rilascio
- Equilibrio tra quantità riversate in circolo e quelli eliminati dai reni, degradati o inattivati nel siero, equilibrio tra rilascio e produzione

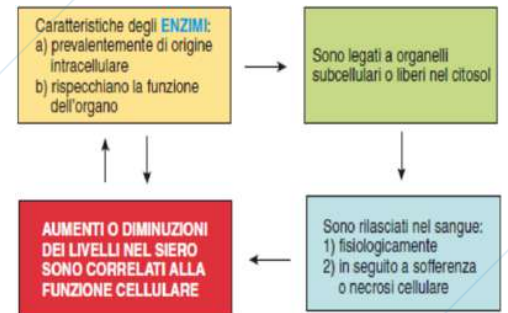
- Variazioni positive, > quantità enzimi nel sangue

Aumentato rilascio

- Necrosi cellulare, determina aumento massiccio di enzimi che non dovrebbero stare nel sangue causata da morte non controllata di certe cellule
  - Infarto miocardico, AST, ALT, LDH, CK
  - Epatite acuta
  - Pancreatite acuta
- Danno reversibile alle cellule, sofferenza cellulare può far uscire un po' del contenuto interno senza ucciderla
  - Distrofie progressive
  - Iperattività cellulare
  - Ipossia
  - Variazione pH

Sovraespressione enzima

- Induzione genetica: GGT enzima presente nel fegato, aumenta espressione quando individuo beve alcol, etanolo influenza espressione enzima
- Riattivazione genica: gene può essere riattivato



- Abnorme proliferazione cellulare: tumori, aumento cellule in cui è presente enzima

Meccanismo	Esempio	Principale enzima interessato
<b>1. Livelli serici aumentati</b>		
<b>1.A. Aumentato rilascio</b>		
1.A.1. Necrosi	Infarto miocardico	AST, ALT, LDH, CK
	Epatite acuta	LDH, ALT, ALP, GGT
	Pancreatite acuta	AMY, LIP, TRY
1.A.2. Aumento permeabilità	Distrofie progressive, delirium tremens, dermatomiositi	CK, AST, ALT, LDH
<b>1.B. Aumentata produzione</b>		
1.B.1. Induzione o riattivazione genica	Stasi biliare	GGT, ALP
	Abuso di alcool, farmaci epatotossici	GGT
	Pancreatite acuta	AMY, LIP, TRY
1.B.2. Iperproliferazione cellulare	Neoplasie	LDH
	Carcinoma prostatico	ACP
	Aumento dell'attività osteoblastica (sarcoma osteogenico, fratture)	ALP

- Variazioni negative, <quantità enzimi nel sangue
  - Ridotta espressione enzima per intervento genetico che ne abbassa espressione
  - Inibizione enzima dovuta ad esempio a intossicazione (FINE LEZIONE 5, 30.03.21)

Meccanismo	Esempio	Principale enzima interessato
<b>2. Livelli serici diminuiti</b>		
<b>2.A. Diminuita produzione</b>		
2.A.1. Genetica	Ipofosfatasia	ALP
	Deficit di pseudocolinesterasi	pseudoChE (pChE)
2.A.2. Acquisita	Epatiti	pChE
	Ipoalimentazione protratta	AMY
<b>2.B. Inibizione enzimatica</b>		
	Avvelenamento da insetticidi	AChE, pChE

## Enzimi diagnostici (INIZIO LEZIONE 6, 31.03.21)

### Acetilcolinesterasi AChE

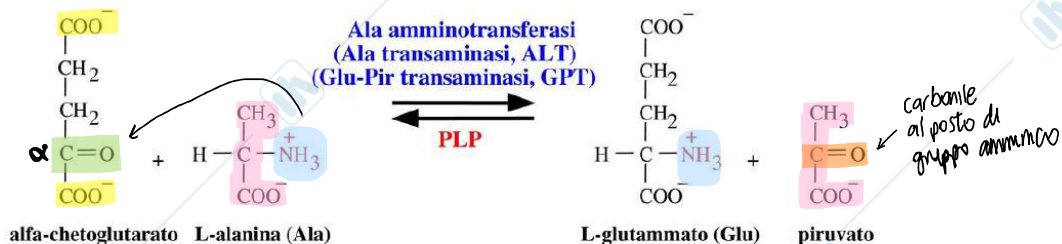
- Idrolasi, utilizza acqua per scindere legame estere presente nell'acetilcolina -> esterasi
- Si trova su membrana dei miociti (cellule muscolari)
- Ruolo di inattivare l'acetilcolina (idrolisi acetilcolina nelle giunzioni neuromuscolari) e permettere alla fibra muscolare di rilassarsi
- Colpito da tossine e veleni che ne compromettono funzione= respirazione

### Pseudocolinesterasi PchE

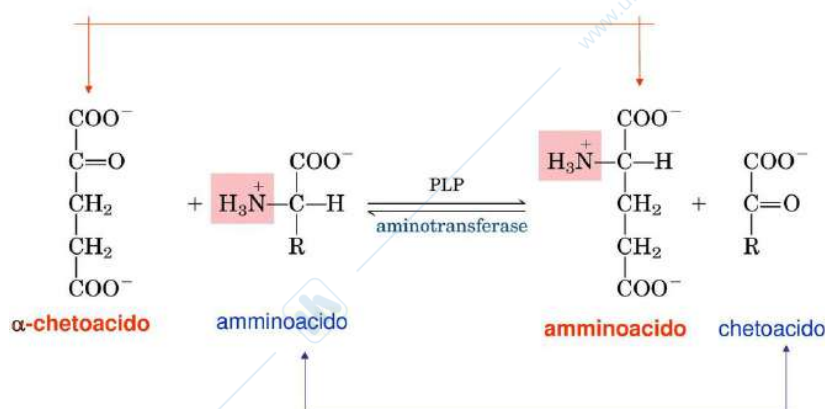
- Idrolasi, esterasi
- Operano entrambi su acetilcolina
- Prodotta da epatociti e rilasciata nel sangue dove viene dosata
- Rilevante durante operazioni con anestetici

## Alanina aminotransferasi ALT, GPT

- ALT o GPT (glutammato piruvato transferasi, reazione inversa, c'è equilibrio perché legami che si rompono hanno stessa forza di quelli che si rompono)
- Metabolismo amminoacidi
- Aminotransferasi sono transferasi
- Trasforma Ala nel suo  $\alpha$ -chetoacido corrispondente
- $\alpha$ -chetoacido è acido carbossilico con gruppo chetonico in posizione  $\alpha$ , ovvero sull'atomo di carbonio adiacente al carbonio carbossilico, si formano per deaminazione di amminoacidi
- Alanina è amminoacido alifatico con gruppo funzionale metile  $\text{CH}_3$
- Enzima riconosce alanina e ha compito di "transaminarla" trasformandola in un  $\alpha$ -chetoacido
- Substrati: alanina +  $\alpha$ -chetoglutarato
  - $\alpha$ -chetoglutarato è  $\alpha$ -chetoacido universale che accetta il **gruppo amminico** in queste reazioni di transaminazione
  - Acido bicarbossilico (2 gruppi **COOH**), ha una funzione **chetonica** ( $\text{C}=\text{O}$ ) in posizione  $\alpha$
  - È il derivato 'cheto' dell'acido glutarico ->  $\alpha$  cheto glutarato
- Con trasferimento gruppo amminico all' $\alpha$ -chetoglutarato
  - L-Ala si trasforma nell' $\alpha$ -chetoacido corrispondente -> PIRUVATO dove al posto del gruppo amminico ci sarà un gruppo carbonilico ( $\text{C}=\text{O}$ ) (si è ridotto)
    - Piruvato:  $\alpha$ -chetoacido a 3 atomi di C
  - Gruppo amminico che si sposta su gruppo carbonilico (chetone dell' $\alpha$ -chetoglutarato) forma un amminoacido -> L-GLUTAMMATO



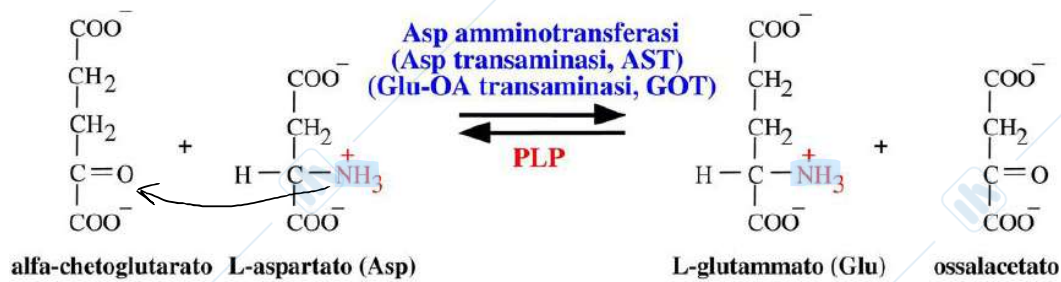
## Reazione di TRANSAMINAZIONE



## Aspartato aminotransferasi AST, GOT

- AST o GOT (glutammato-ossalacetato transferasi)
- Metabolismo amminoacidi
- Aspartato è amminoacido acido, ha un solo metilene
- L-Asp +  $\alpha$ -chetoglutarato (accettore, alfa-KG) si forma -> alfa-chetoacido corrispondente dell'aspartato = ossalacetato + L-Glu

- Trasferimento di un gruppo amminico da un aminoacido ad un  $\alpha$ -chetoadido accettore
- Attività max in fegato e muscoli scheletrici e cardiaci



### Alfa-amilasi AMY

- Idrolasi, utilizzano acqua per scindere legame glicosidico
- Idrolasi amido e glicogeno alimentare (legame  $\alpha$  1-4 glicosidici tra le molecole di glucosio)
- Enzima secreto da ghiandole salivari e pancreas
- Ruolo digestione dell'amido e glicogeno

### Creatina chinasi CK

- Transferasi, chinasi, trasferisce fosfato da ATP alla creatina formando  $\rightarrow$  creatina fosfato
- Ruolo: tamponamento ATP nelle cellule muscolari, necessario per contrazione
- ATP abbondante nelle cellule che ne hanno bisogno in modo continuativo, anche neuroni
- Esiste in 3 isoforme, tessuti diversi, si può capire da dove provengono

### Fosfatasi acida ACP

- Idrolasi di esteri fosforici
- Ph ottimale acido
- Marcatore di carcinoma prostatico
- Importante per prostata e liquido seminale

### Fosfatasi alcalina ALP

- Idrolasi di esteri fosforici
- Ph ottimale alcalino
- Ruolo biologico dipende da distretto cellulare dove viene prodotta
- Utilizzata per defosforilare fosfo-proteine
- Spesso ha funzione di biosegnalazione, associata a proliferazione cellulare

### Gamma-glutamil transferasi GGT

- Idrolasi, Peptidasi di oligopeptidi, taglia oligopeptidi e li rende disponibili per trasporto attraverso membrane
- Favorisce trasferimento gruppo glutammile da un glutammilpeptide a un altro peptide o ad un aminoacido
- Importante nel fegato

### Lattato deidrogenasi LDH

- Ossidoriduttasi
- Deidrogena il lattato (S)
- Ruolo:
  - Metabolismo del glucosio, glicolisi anaerobia
  - Riciclo dell'acido lattico e suo eventuale utilizzo per sintesi glucosio (reazione inversa)
- Esiste in 5 isoforme, tessuti diversi

### Lipasi LIP

- Idrolasi
- Secreti da cellule del pancreas esocrino a fine digestivo
- Digestione trigliceridi

## Tripsina TRY

- Idrolasi
- Secreti da cellule del pancreas esocrino a fine digestivo
- Digestione proteine
- Insieme a chimotripsina e elastina sono serina proteasi

## Enzimi aspecifici (distribuiti in tutto il corpo)






### Aspartato transaminasi AST, GOT

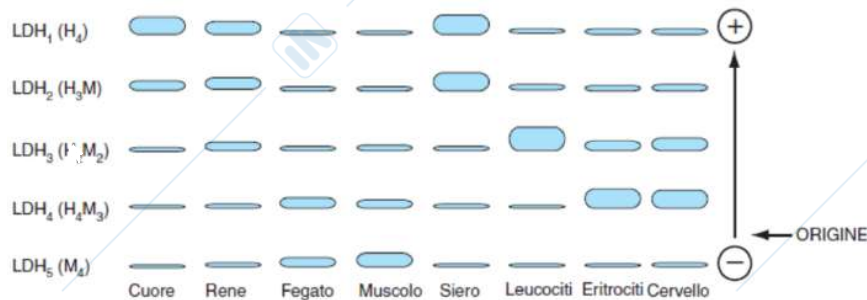
- Per capire ruolo dobbiamo capire dove sono
- A seconda di dove sono, loro rilascio da cellula danneggiata è più o meno veloce
- Sono importanti anche le dimensioni:
  - Proteina grande dimensioni difficile che attraversi membrana di cellula intatta
  - Se piccole dimensioni facile uscire da cellula sofferente, compare maggiormente nel sangue
- Struttura
  - Proteina omodimerica, 2 sub uguali, insieme 90 kDa
  - Cofattore: piridossalfosfato PLP
- Espressa maggiormente in
  - Tessuti di fegato, miocardio, muscolo, rene, globuli rossi
  - A livello subcellulare
    - AST 1 nel citoplasma 60%, rilasciata più velocemente
    - AST2 nei mitocondri 40%, rilasciata più lentamente se cellula danneggiata
      - È possibile distinguere forme isoenzimatiche per avere maggiore valore predittivo
- VARIAZIONI
  - Necrosi determina rilascio maggiore AST1>AST2
    - Per capire se c'è processo necrotico -> AST analizzata sempre insieme a ALT, rilascio AST più lento e minore rispetto a ALT
    - ALT nel citoplasma, AST due compartimenti, se rapporto AST/ALT è elevato -> è in corso un processo necrotico
    - Importante è tempo, più passa tempo più aumenta anche AST2 -> rapporto cambia
  - Studiando solo AST non possiamo realmente capire che processi sono in corso, devono essere studiati anche altri enzimi
  - Aumento
    - Marcato
      - Epatiti virali, necrosi
      - Necrosi epatica su base tossica
      - Infarto miocardio
    - Moderato
      - Cirrosi epatica
      - Ictericostatico
      - Carcinoma epatico
      - Malattie muscolari
      - Emolisi anche in vitro
        - Globuli rossi contengono AST, importante che campione venga trattato in maniera adeguata perché emolisi può alterare analisi dato, si devono evitare errori manipolazione matrice biologica
- Ruolo: metabolismo degli amminoacidi

## Alanina aminotransferasi ALT

- Struttura
  - Omodimero leggermente più grande di AST
  - Stesso cofattore PLP
- Espresso maggiormente in
  - Tessuti di fegato, miocardio, muscolo, rene, globuli rossi
  - A livello subcellulare
    - Si trova nel citoplasma (se necrosi->aumenta sensibilmente)
- Variazioni
  - Necrosi causa rilascio maggiore e più rapido rispetto a AST, perché nel citoplasma
  - Aumento
    - Marcato
      - Epatiti virali
      - Necrosi epatica, rilascio abbondante perché citoplasmatica
    - Moderato
      - Cirrosi, itterocolostatico, mononucleosi
- Ruolo: metabolismo amminoacidi

## Lattato deidrogenasi LDH

- Struttura
  - Grande, difficile che esca, 140 kDa
  - Tetrameric, subunità sono
    - H heart da gene H
    - M muscle da gene M
  - Coenzima
    - NAD (NAD<sup>+</sup> ossidata, NADH ridotta)
- Espressa soprattutto
  - È ubiquitaria!
  - Subcellulare: citoplasma
- Isoenzimi
  - Ve ne sono 5 diversi:
    - LDH1 (H<sub>4</sub>), cuore 
    - LDH2 (H<sub>3</sub>M), rene e cuore 
    - LDH3 (H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>), leucociti 
    - LDH4 (H<sub>1</sub>M<sub>3</sub>), cervello e eritrociti 
    - LDH5 (M<sub>4</sub>), muscolo e fegato 
  - Per elettroforesi è possibile discriminarle per peso molecolare diverso
  - In base a quale isoforma capiamo quale cellula sta subendo danno o altra alterazione
  - A seconda dei geni attivi in una cellula, vengono trascritti ed espressi quelli specifici, ad esempio cellule del cuore hanno gene H attivo ma non M (eritrociti non hanno corredo)



- Ruolo:
  - glicolisi anaerobia, in assenza di O<sub>2</sub>, tutte le cellule
  - Interconversione tra lattato e piruvato, lattato utilizzato come fonte di glucosio prevalentemente nel fegato e rene -> LDH è abbondante in questi organi
- Variazioni
  - Aumento marcato 5x
    - Anemie perniciose ed emolitiche, fragilità e rottura globuli rossi (emolisi) e conseguente aumento LDH 15.06, necrosi
    - Metastasi di carcinomi (soprattutto nel fegato), aumento perché tante cellule che producono LDH, aumento turnover, >enzima perché >cellule
    - Epatiti, rilascio per necrosi LDH5
  - Aumento moderato 3 a 5x
    - Infarto miocardio LDH1
    - Leucemie, aumentano globuli bianchi, LDH3
  - Aumento lieve
    - Epatopatie, sofferenza cellule fegato

### Fosfatasi alcalina ALP

- STRUTTURA
  - Omodimero
  - Cofattori: zinco e magnesio -> è metalloenzima
  - Sensibile a ph, condizioni ottimali alcaline
- Espressa maggiormente:
  - Tessuto
    - Ossa, Osteoblasti, producono tessuto osseo
    - Dotti biliari (fegato)
    - Mucosa intestinale
    - Placenta
  - Membrana cellulare
- Variazioni
  - Fisiologiche
    - Accrescimento
      - Intensa attività costruzione ossa, >osteoblasti, >ALP
      - Più sono presenti cellule che producono enzima, più enzima aumenta
    - Gravidanza
      - Placenta contiene grandi quantità enzima
    - Digestione
      - Turnover della mucosa intestinale
      - Analisi ALP a digiuno
  - Patologiche
    - Aumento marcato 5x
      - Iperattività osteoblasti, aumento fosfatasi ossea
        - Morbo di paget
        - Iperparatiroidismo
      - Ostruzione dotti biliari x calcolosi, aumento fosfatasi alcalina intestinale erode il fegato
    - Aumento moderato
      - Osteopatia metabolica
        - Rachitismo causato da avitaminosi vitB
      - Metastasi osse

- Aumento lieve
  - Intossicazione alcol del fegato
  - Epatiti virali
  - Fratture, si attivano osteoblasti >ALP
- Diminuisce
  - Ipoitiroidismo
  - Anemie
  - Scorbuto causato da avitaminosi vitC
- Isoforme
  - Distinguibili per
    - Termostabilità
    - Mobilità elettroforetica
- Valori di riferimento variano in base allo stadio di sviluppo
  - **Bambini fino ad 1 anno: da 110 a 700 unità per litro di sangue (U/L);**
  - **Bambini da 1 a 10 anni: da 110 a 550 U/L;**
  - **Bambini da 10 a 15 anni: da 130 e 700 U/L;**
  - **Adulti: da 50 a 220 U/L.**
  - Bambini ALP>>
  - Man mano che individuo invecchia valori ALP nel sangue <<
- Ruolo metabolico
  - Idrolizza fosfoproteine le quali hanno ruolo biologico nel controllo della proliferazione cellulare

## Enzimi organospecifici

### Cuore

#### Creatina chinasi 2 CK-MB

- Struttura
  - proteina quaternaria dimero, 60kD
- Isoforme:
  - 2 isoforme da
    - Gene B (brain)
    - Gene M (muscle)
- Nel cuore espressa maggiormente isoforma dimero MB
- Marcatore più rilevante per INFARTO del miocardio
  - Cellule muscolari cardiache hanno
    - CK-MM 80%
    - CK-MB 20%
  - Se infarto MB nel sangue aumenta in modo significativo ->
  - In condizioni normali nel sangue vi è una maggiore concentrazione di MM
  - Infarto porta a necrosi cellule muscolari cardiache e rilascio enzimi
    - Quindi aumenta concentrazione MB nel sangue
  - Variazioni dei valori causate da infarto
    - Aumento MB di 6-8x, esordio precocissimo dopo 4h
    - Raggiunge picco dopo 15-30h (grafico)
    - Torna a valori normali dopo 5 gg
- È un dimero con due subunità -> 3 isoforme

Tessuti	CK-MM (CK3)	CK-MB (CK2)	CK-BB (CK1)
Muscolo scheletrico	99%	1%	
Miocardio	80%	20%	-
Cervello	-	3%	97%

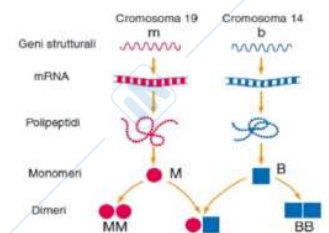
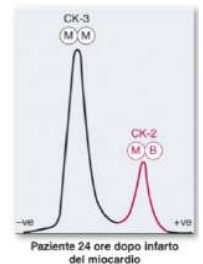
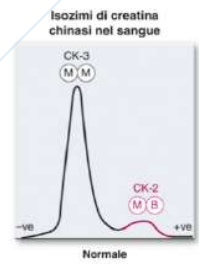
- MM espressa prevalentemente nel muscolo scheletrico il quale è molto esteso dunque abbondante nel corpo -> normalmente quantità MM nel sangue sempre elevata (picco nel grafico)
- MB espressa prevalentemente nel cuore, se muoiono cellule cuore, >MB nel sangue
- BB espressa prevalentemente nel cervello, se ictus, >BB nel sangue
- Isoforma può essere discriminata con inibizione immunologica: uso Ab specifici per inibire attività di una specifica CK
- Grazie a enzimi capiamo se c'è stato o no infarto, quando, che entità ha avuto sul cuore
  - Informazioni preziosissime per intervenire adeguatamente su paziente

#### Aspartato transaminasi AST

- Molto abbondante nel cuore
- Marcatore di infarto
  - Aumento 6-8x dopo 12-15h, esordio precoce ma più lento della CK, perché pesa 90 kDa
  - Raggiunge picco dopo 24-48h
  - Torna a valori normale dopo 7-10h
  - Ulteriori aumenti indicano estensione del focolaio infartuale o comparsa nuovo infarto

#### Lattato deidrogenasi LDH

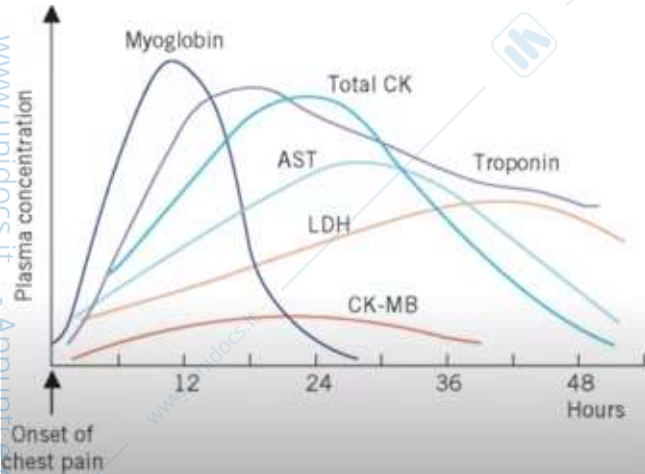
- LDH1>LDH2 nel cuore
- Comparsa più tardiva, pesa 140 kDa
- Marcatore tardivo di infarto
  - Aumenta 6-8x: esordio tardivo dopo 24h



- Raggiunge picco dopo 3-4gg
- Torna a valori normali dopo 7-10gg

### Mioglobina e troponine

- Sono marcatori non enzimatici per confermare diagnosi di infarto
- Mb 17kDa, monomerica, molto piccola
- Troponine 27-37kDa, per contrazione, I e T (isoforme cuore-specifiche)



- Quando infarto:
  - Mb aumento molto rapido e precoce perché molto leggera, picco a 12h poi scende a 24h
  - Troponina aumenta velocemente ma meno dell'Mb, picco 12-14h, diminuisce lentamente nell'arco di 48h
  - Poi aumento AST, CK e LDH
- Grazie a questo possiamo capire quando episodio ha avuto luogo e in base ai valori comprendere entità

### Ossa

#### Fosfatasi alcalina ALP ossea

- Isozima osseo prodotto da osteoblasti (sintesi osso)
  - È termolabile (isozima epatico no)
  - Diversa motilità elettroforetica
  - Aumenta patologicamente in tutte le situazioni in cui è esaltata attività osteoblastica
    - Iperattività osteoblasti

### Pancreas

#### Amilasi AMY

- Più utilizzata, un tempo anche Lip e TRY
- Prodotta sia da pancreas che ghiandole salivari, 2 isoforme, devono essere discriminate per capire cosa causa variazione
- Aumenta quando
  - Pancreatite acuta e cronica
  - Coliche biliari e ulcera gastrica duodenale con interessamento del pancreas
  - Appendicite acuta
  - Occlusione intestinale alta a livello del duodeno (interessamento pancreas)
    - Interferisce rilascio succo pancreatico, ristagno e aumento quantità enzima nel sangue

#### Lipasi LIP e tripsina TRY

- Un tempo utilizzate, ma ora sempre meno, minore impiego in analisi clinica
- Aumento è indicativo di situazione stress del pancreas

### Muscolo scheletrico

#### Creatina chinasi CK3

- CK ruolo essenziale nel tamponamento dell'ATP
- Struttura
  - Dimero MM di 60 kD
- Specifico del muscolo scheletrico
  - MM 99% e MB <1%

- Valori di riferimento dipendenti da stato attività fisica del soggetto e massa muscolare
  - Soggetto sedentario 30-50 U/L
  - Soggetto atletico 500-1000 U/L (hanno ipertrofia muscolare, aumento massa)
    - È un aumento fisiologico
- Aumenta quando danno
  - Ischemico
  - Traumatico
  - Infiammatorio

## Fegato

### Pseudocolinesterasi

- Enzima specifico per fegato, prodotto da epatociti e rilasciato nel sangue
- Idrolizza esteri (NON idrolizza acetilcolina come AChE)
- Variazioni
  - Aumenta
    - Sindromi nefrosiche (patologie del rene)
  - Diminuisce
    - Stress fegato, riduzione espressione enzima, rilascio enzima nel sangue
    - Avvelenamento da insetticidi, inibizione enzimatica insieme a AChE
      - Organo-fosfati (usati come pesticidi) inattivano PChE e AChE
      - Usata per diagnosticare avvelenamento da insetticida
- Forme alleliche
  - Normale
    - Idrolizza succinilcolina usata in anestesia (miorilassante), fondamentale per:
      - Rimozione del miorilassante
      - Smaltimento anestesia
  - Atipica
    - Non è in grado di riconoscere quindi idrolizzare succinilcolina
    - Screening pre-operatorio:
      - È vitale sapere se paziente ha deficit di questo enzima prima di poterlo anestetzare con SUCCINILCOLINA
        - Succinilcolina è miorilassante, usato per anestetzare
      - Se animali hanno bassa quantità PChE o ne hanno una forma atipica, sono in pericolo di vita perché forma atipica non è in grado di idrolizzare succinilcolina -> prolungata paralisi -> apnea -> soffocamento
      - Screening per vedere se paziente ha forma atipica con inibitore specifico per la forma normale, si utilizza cloridrato di dibucaina
        - in grado di inibire selettivamente la forma normale ma non quella atipica
        - Se quando utilizzato non diminuisce livello PchE abbiamo forma atipica -> bisogna usare anestetico diverso (FINE LEZIONE 6, 31.03.21)

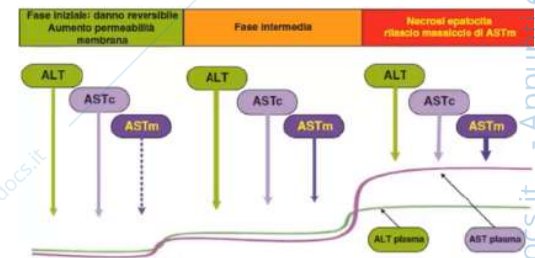
### Gammaglutamiltranspeptidasi GGT (INIZIO LEZIONE 7, 06.04.21)

- Transferasi
- Trasferimento gruppi amminici e favorisce passaggio amminoacidi attraverso membrana degli epatociti (da sangue a epatociti e viceversa)
- Specifica del fegato e del rene
- Marcatore di epatopatie (enzima organospecifico)
  - Ittero da ostruzione
  - Metastasi epatiche

- Colostasi intraepatica (comprende passaggio bile da fegato a cistifellea e da cistifellea al duodeno)
- Misurazione utile per comprendere se patologia interessa fegato o altri organi
- Se aumento ALP
  - Se aumento parallelo di GGT -> indicativo malattia epatica, ALP sia ossa, fegato ecc... ma GGT solo fegato->siamo sicuri sia fegato;
  - Se GGT non aumenta -> non è interessato il fegato
- Aumento isolato GGT è marker di:
  - Abuso di alcol
  - Effetti induttivi farmaci
  - Rilascio dovuto ad alcol e farmaci che sono in grado di modificare espressione genica dell'enzima, iperattivazione enzima -> sovrapproduzione enzima

### Enzimi di citolisi

- Citolisi: danneggiamento cellule, necrosi più o meno grave
- Citosolici
  - ALT è prettamente citosolici (solo nel citosol, a diff della AST)
  - AST: cAST 20% e mAST 80%
    - Enzimi che si trovano nel citoplasma sono quelli che fuoriescono per primi quando cellula è danneggiata (mitocondriale ci mette di più)
  - LDH5
- Mitocondriali
  - mAST 80% (più lente a fuoriuscire)
- Aumentano tutti nelle epatopatie!
- Rapporto tra enzimi mitocondriali e quelli citosolici ha valore diagnostico-prognostico in quanto è indice di gravità del danno cellulare e del processo necrotico
  - Grafico:
    - Condizioni normali **ALT** più abbondante nel sangue rispetto ad **AST** perché citosolica
    - Rapporto chiamato indice di Ripps
    - Fase iniziale: ALT > cAST
    - Quando danno si estende rilascio massiccio della forma mitocondriale mAST (molto più abbondante) e il rapporto aumenta
  - Condizione normale: AST/ALT < 1
  - Entità e gravità dell'epatopatia:
    - Aumenta il rapporto AST/ALT
    - Valore tanto maggiore quanto più è estesa la necrosi degli epatociti
      - <1 epatite non alcolica, cellula reversibilmente danneggiata, danno epatico lieve
      - >2 epatite alcolica
      - >10, epatite acuta (virale o da farmaci o autoimmune)



### Enzimi di colostasi

- Arresto totale o parziale del flusso della bile, da fegato a cistifellea e viceversa
- **ALP epatica**
  - Espressa da cellule epitelio dei dotti biliari
  - Forma termostabile (discriminabile rispetto alle altre)
  - Marcatore dell'ostruzione delle vie biliari (ALP aumenta)
- **Gammaglutamiltranspeptidasi GGT**

- Si trova nei dotti biliari
- Coespressa da cellule dei dotti insieme a ALP, se aumenta una aumenta anche l'altra
- Marcatore precoce e sensibile
- Insieme a ALP indicativa della colostasi
  - Se aumentano entrambe è marker FORTE di colostasi
  - Enzima aumenta per iperplasia dell'epitelio dei dotti indotta da colostasi
  - Più cellule ci sono che secernono quell'enzima->più enzima ci sarà
- **5-nucleotidasi**
  - Si occupa del metabolismo degli acidi nucleici
  - Specifico del fegato
  - Attualmente poco usato in diagnostica

## Condizioni cliniche

Patologia	Aumento ne è marker	Note
Carcinoma prostatico	ACP	
Infarto del miocardio	CK-MB, AST, LDH1 e LDH2	Rilascio dovuto a peso molecolare LDH1 e 2 tipiche dei tessuti a metabolismo anaerobio
Danno muscolare	CK-MM, AST, LDH5	LDH5 tipica dei tessuti capaci di metabolismo aerobio e ana
Pancreatite acuta	AMY, LIP, TRY	N.B. No AMY salivare
Avvelenamento da insetticida	PchE, AChE	Riduzione attività indica avvelenamento da organo-fosfati
Colostasi	GGT, ALP epatica	Interruzione o riduzione del flusso biliare nei canalicoli o nella cistifellea
Epatite acuta	ALT, AST, ALP, GGT, LDH5	Se rapporto AST/ALT elevato, danno è grave
Osteoartrite	ALP ossea	
Neoplasie leucocitarie	LDH3	Linfomi colpiscono gb dove vi è aumento di LDH3

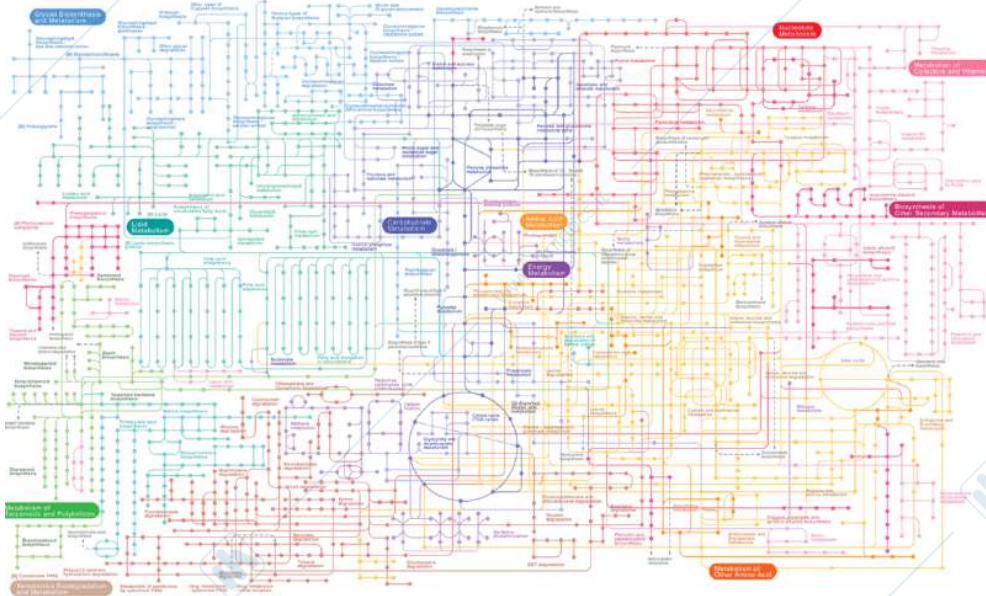
## Note generali

- Aumento AST va sempre interpretato insieme al valore di CK e ALT
  - AST e CK > è coinvolto
    - Cuore CK2
    - Muscolo scheletrico CK3
  - AST e ALT > (NO CK)
    - Danno epatico
- Contemporanea misura di GGT e ALP
  - Entrambe: patologia epatica
  - ALP >: patologia ossea (o intestinale)
  - GGT >: intossicazione alcol o farmaci
- Aumento significativo di ALT è indizio di epatopatia, essendo l'ALT molto abbondante nel fegato

# METABOLISMO

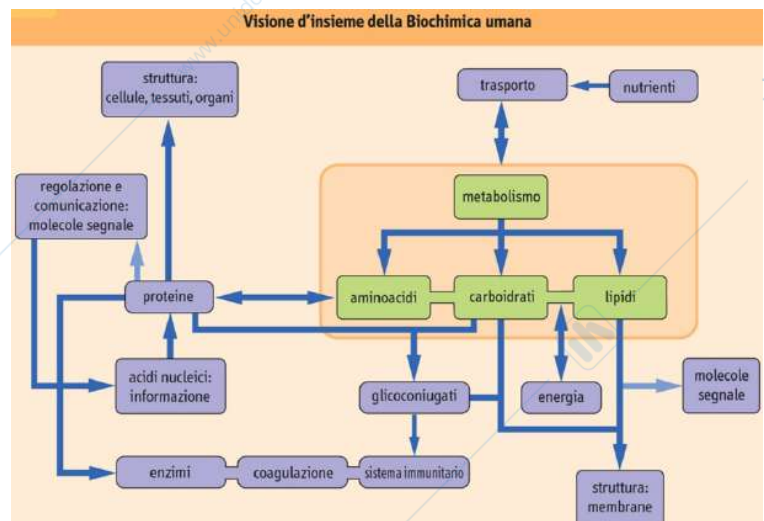
## Introduzione (LEZIONE 07, 06.04.21)

- Molecole di cui sono fatte cellule svolgono attività costanti dal punto di vista chimico  
Sono in grado di produrre nuove molecole a partire da molecole precostituite  
Continuità nella degradazione e produzione di molecole
- Energia per reazioni proviene da componenti presenti nei nutrienti, garantisce che le reazioni avvengano
- Insieme di tutte le reazioni chimiche -> METABOLISMO
- Per ogni reazione chimica c'è un enzima, grazie a enzima (attivo) avvengono ad una velocità accettabile
- Soltanto gli enzimi segnapasso sono controllati



## Schema

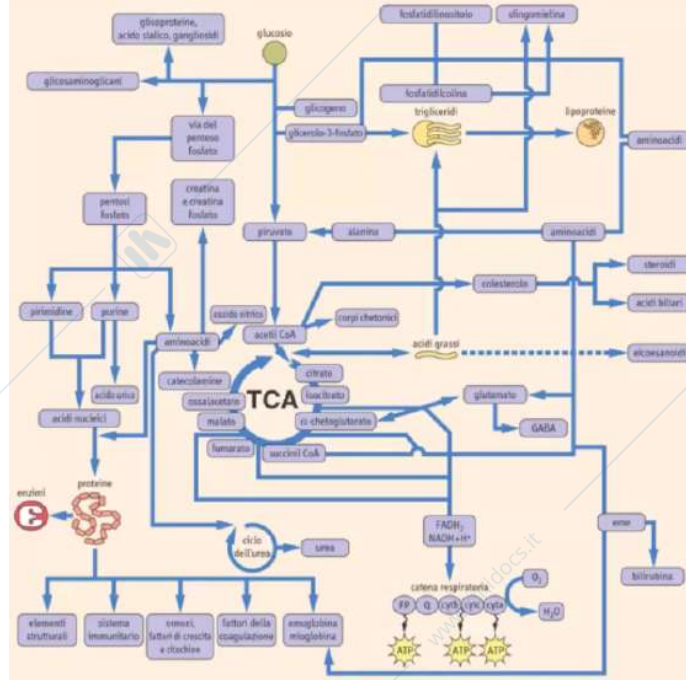
- Metaboliti sono interscambiabili
  - Lipidi in carboidrati, carboidrati in amminoacidi
  - Possibile solo se è presente enzima adatto, devono esserci vie metaboliche necessarie
  - Animali non sono in grado di trasformare gli acidi grassi in carboidrati (batteri si)
- Metaboliti importanti per estrazione energia chimica che serve ad alimentare tutte le attività essenziali della cellula
- Lipidi
  - Formare fosfolipidi di membrana
  - Acido arachidonico, possono formare molecole segnale come eicosanoidi
- Carboidrati
  - Energia
  - Glicoconjugati per sistema immunitario
- Amminoacidi
  - Produzione proteine
  - Produzione carboidrati e lipidi in alcuni casi



## Schema 2

- Glucosio è monosaccaride più importante per energia, universalmente usato nel metabolismo cellulare
- Da Glu parte la glicolisi: glucosio -> piruvato (da alanina e viceversa)

- Si producono anche glicoproteine, glicolipidi, proteine per collagene, ribosio, deossiribosio, basi azotate (via del pentono fosfato)
- Trasformarsi in glicogeno (gluconeogenesi), glicerolo-3-fosfato (da cui trigliceridi), ecc...



## Metabolismo

- Grande e altamente integrata rete di reazioni chimiche (ognuna delle quali mediata da uno specifico enzima) che si svolgono all'interno degli organismi viventi in ogni istante
- Suddiviso in due fasi funzionalmente distinte:
  - Catabolismo: fase degradativa
    - Glucosio, acidi grassi e amminoacidi (a volte) degradati per riutilizzarne componenti e per ricavarne energia (conservata sotto forma di ATP)
  - Metabolismo: fase biosintetica
    - Nuove molecole sintetizzate a partire dai loro componenti e dall'energia resa disponibile dalla degradazione catabolica
    - Energia sotto forma di ATP e NADPH (riduzione)

## Processo spontaneo o non

- Se può avvenire senza energia o meno
- $\text{Glc} + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ : spontaneo si ricava energia (esoergonico),
- $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc} + 6\text{O}_2$ : non spontaneo perché richiede energia
  - Avviene nella fotosintesi, utilizzano energia luminosa
- Se  $\Delta G < 0$ : SPONTANEO o ESOERGONICO e fornisce energia all'ambiente
- Se  $\Delta G > 0$ : NON SPONTANEO o ENDOERGONICO
- Negli animali deve esserci un continuo approvvigionamento di ATP E NADP per reazioni
- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ :  $\Delta G < 0$ , spontanea
  - Nella cellula avviene questa reazione di combustione
  - Se facciamo avvenire processo esoergonico e lo controlliamo, siamo in grado di utilizzare parte dell'energia che si libera dalla combustione del glucosio nella forma di energia che ci serve
  - Rendimento non è mai 100%:
    - Condizioni standard circa 25%
    - Condizioni fisiologiche circa 70%
    - Reazione non avviene in un solo passaggio ma tanti piccoli passaggi

# CATABOLISMO

## Glicolisi

- Via catabolica lineare
- Serie di 10 reazioni catalizzate da 10 enzimi
- Universale, tutti gli organismi viventi la presentano, una delle vie più antiche dal punto di vista evolutivo
- Ubiquitaria: espressa da tutte le cellule
- Citosolica: enzimi sono citosolici
- Da glucosio si ottengono due molecole di acido piruvico
- Sola via metabolica in grado di produrre ATP anche in assenza di ossigeno, non usa direttamente ossigeno e non ne è vincolata, utilizza reazione chimica aggiuntiva che serve per ripristinare il potere ossidante necessario a far svolgere processo di degradazione del glucosio. Esistono cellule in grado di non metabolizzare ossigeno, come globuli rossi, no mitocondri, non avrebbero modo di produrre ATP energia senza glicolisi → è ubiquitaria, posseduta da tutte cellule e fondamentale (sia ossigeno che senza, continua a produrre energia con via anaerobia)

### • Fase preparatoria

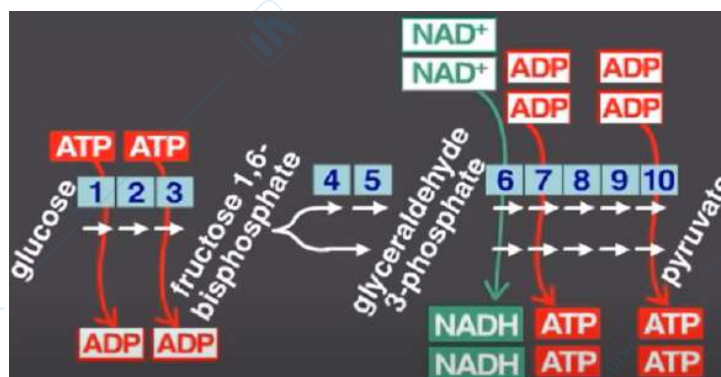
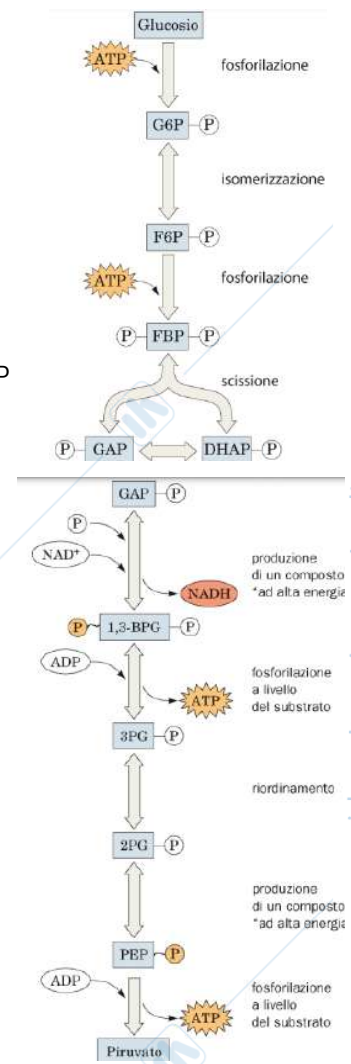
- Prima fase richiede energia (investe energia ma ne ricaverà di più)
- Prepara scheletro carbonioso per la scissione dello zucchero in due zuccheri più semplici
- Si usano 2 molecole di ATP (ATP→ADP), agente fosforilante, fosforila glucosio che è in grado di ricevere fosfato dall'ATP, si rompe legame fosfoanidridico (ATP) e si forma legame fosfoestere (G6P)
- Cellula fosforila composti usando ATP, per indebolire legame C-C del fru-6P per preparare scissione zucchero

### • Fase produttiva

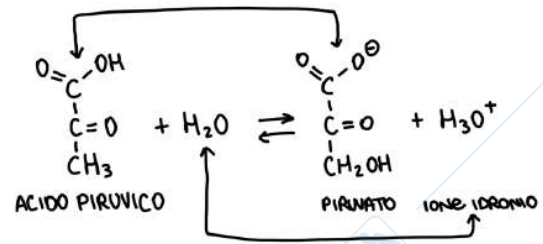
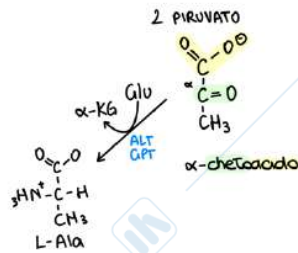
- Seconda fase produce energia (energia ricavata > energia utilizzata)
- Richiede coenzima nella sua forma ossidata NAD<sup>+</sup>
- Senza NAD<sup>+</sup>, GAP non potrebbe essere ossidata a formare il primo dei composti ad alto trasferimento del fosfato 1,3BPG che servirà per produrre ATP
- Settima tappa si recupera ATP consumato in precedenza
- Tappa 9 2PG si trasforma in fosfoenolpiruvato PEP (composto + energetico nel metabolismo) che verrà utilizzato nell'ultima tappa per produrre altro ATP
- Nel totale: Si ossida NAD<sup>+</sup>→NADH e si producono 4 molecole di ATP

### • Degradazione del glucosio in piruvato, parte dell'energia immagazzinata sotto forma di ATP

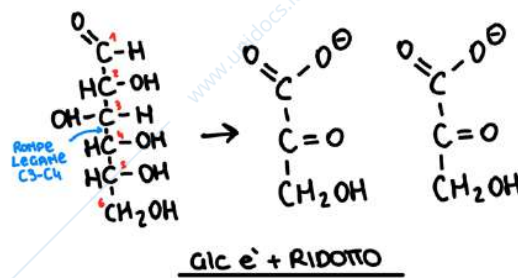
- Si formano due molecole di ATP per ogni molecola di glucosio trasformata in acido piruvico



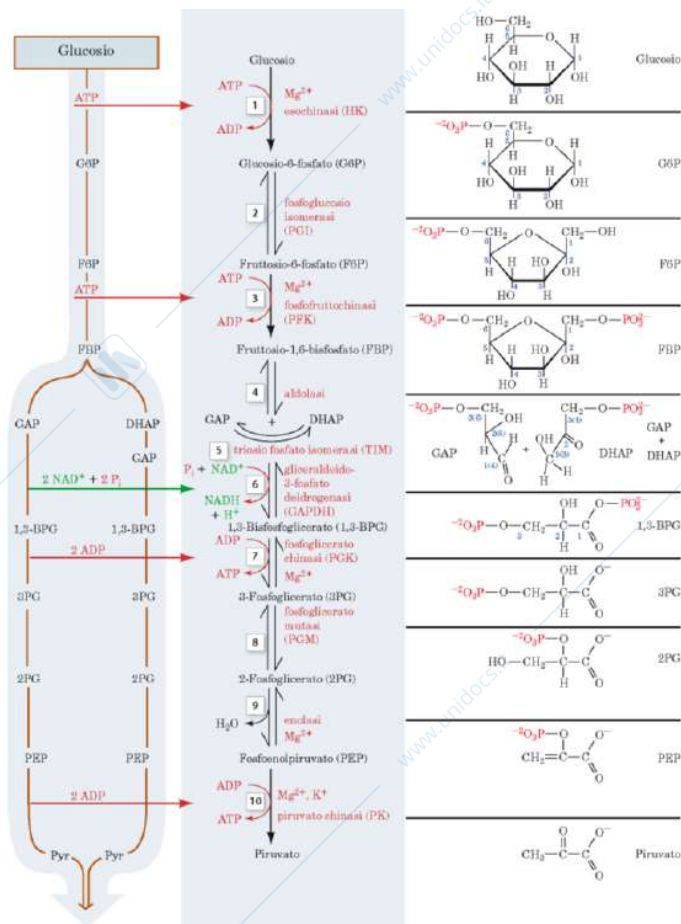
- o Si formano due molecole di piruvato, il quale è la forma dissociata dell'acido piruvico (senza H, protonata o deprotonata), se cellula ha bisogno di Ala avviene, nel citoplasma, la reazione catalizzata dal GPT o ALT che trasforma il piruvato in L-Ala



- o Passaggio da glucosio a piruvato è un processo parzialmente ossidativo, processi catabolici sono associati a processi di ossidoriduzioni
- o Il glucosio è più ridotto rispetto al piruvato (ha già preso)
- o Elettronegatività:  $H < C < S < N < O$ , più un composto contiene ossigeno più è ossidato, ossigeno tende a strappare elettroni di legame di quel composto
- o Si rompe legame C3-C4 per poter avere due molecole, per questo motivo fruttosio dovrà essere isomerizzato a glucosio



- NADH è carico di energia, a seconda di condizione cellulare aerobia o anaerobia, NADH potrà essere utilizzato o meno per produrre ATP (2NADH- $\rightarrow$ 5ATP, fosforilazione ossidativa)
  - o Se anaerobia NADH- $\rightarrow$ NAD<sup>+</sup>, cellula non ricava ulteriore energia metabolica
    - Glicolisi anaerobia o fermentazione omolattica
- Molto versatile, avviene in condizioni
  - o Aerobie: O<sub>2</sub> in concentrazione tale da consentire fosforilazione ossidativa
  - o Anaerobie: scarsa concentrazione O<sub>2</sub>, sforzo fisico causa maggiore consumo O<sub>2</sub>, ridotta velocità fosforilazione ossidativa
    - Avviene in cellule in cui non è possibile la fosforilazione ossidativa, non sono in grado di ripristinare NAD alla sua forma ossidata utilizzando l'ossigeno come accettore finale di elettroni portati da NADH (cellule sanguine, globuli rossi e certi leucociti aventi scarsi mitocondri)
    - Se non c'è abbastanza NAD<sup>+</sup> (potere ossidante), processo glicolitico si arresta per questo cellula ha bisogno di ripristinare NAD<sup>+</sup>, può farlo attraverso fosforilazione ossidativa o **fermentazione omolattica (con lattato deidrogenasi LDH)**

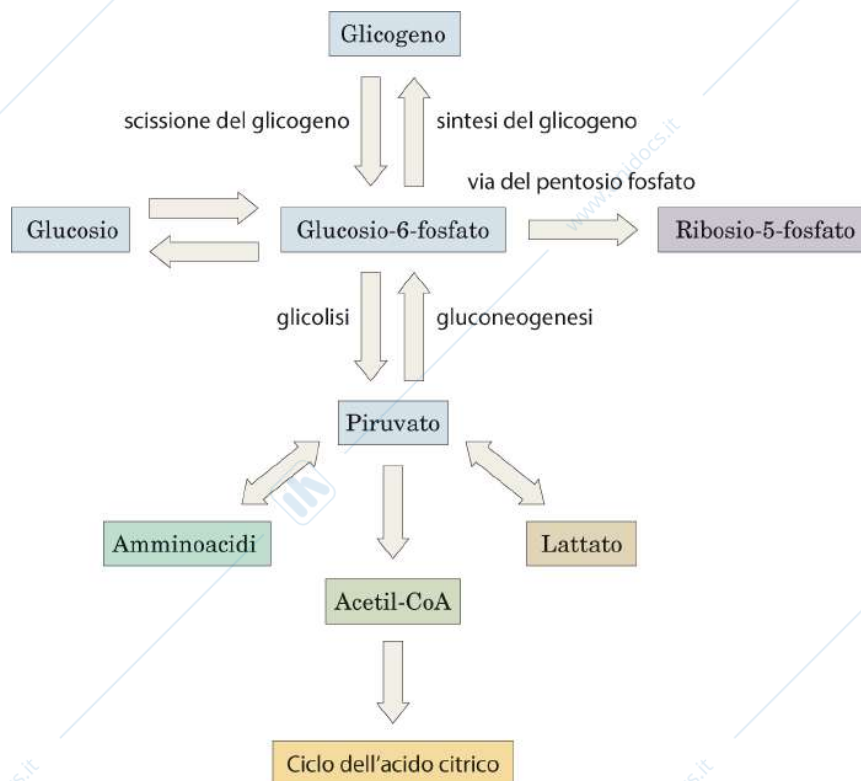
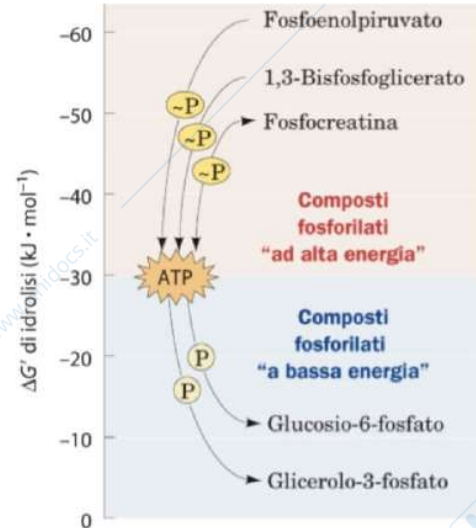


### Potenziale di trasferimento del gruppo fosfato (INIZIO LEZIONE 9, 13.04.21)

- Alla base del concetto di conservazione ed uso dell'energia metabolica da parte delle cellule
- Problema di ogni cellula è quello di recuperare l'energia metabolica per i processi che non avverrebbero spontaneamente, processi endoergonici, richiedono energia
  - Sintesi chimiche, produzione lipide da Acetil-CoA, ecc...
  - Energia metabolica assicurata da cellula con ATP e potere riducente
- Potere riducente per sintesi cellulari dato da NADPH non da NADH
- Dopo avere usato ATP la cellula deve ricaricarsi con le vie cataboliche
- Nella glicolisi compaiono due composti ad alto trasferimento del fosfato:
  - PEP (fosfoenolpiruvato) ha AG=-61.9, più è negativo, maggiore è la capacità di trasferire fosfato
  - 1,3-BPG ha AG=-49.4
  - Grazie alla loro energia di idrolisi molto elevata, anche più dell'idrolisi di ATP ( $ATP \rightarrow ADP + P_i$ ), AG=-30.5
- Composti sono tutti fosforilati, hanno fosfato inorganico associato a formare legami
  - Nel fruttosio-6fosfato e glucosio-6fosfato stesso legame, legame estere
  - Glicerolo-3fosfato ha legame estere ma potenziale di trasferimento più basso AG=-9.2
- Tutti composti hanno AG che va da -9 a -61, tutti negativi, tutte queste molecole sono in grado di trasferire all'acqua il fosfato
- AG di idrolisi, reazione di idrolisi un composto fosforilato + acqua, più è alto AG più è alta tendenza a trasferimento del fosfato
- ATP è nel mezzo della lista, è in grado di fornire fosfato a composti e molecole che hanno potenziale più basso mentre è in grado di ricevere fosfato da composti che hanno AG più alto
  - Fosfocreatina, AG=-43.1, molecola carica di energia che serve per tamponare ATP in quei tessuti che utilizzano ATP in modo continuativo e hanno bisogno di ripristinare quota ATP in tempi rapidissimi anche in assenza di ossigeno, prodotta da enzima creatinachinasi  $\rightarrow$  sintesi fosfocreatina

- 1,3BPG
- PEP
- Usati per fosforilare ADP perché si trovano sopra all'ATP nella lista
- ATP legame ad alto potenziale fosfoanidridico, >energia
- Fosfocreatina legame fosfoanidridico che libera >energia
- 1,3BPG legame fosfoanidridico misto, trasferimento ancora più alto dovuto a repulsione cariche
- Fosfoenolpiruvato contiene legame chimico ad altissimo trasferimento in grado di fosforilare qualsiasi composto si trovi in basso
- Da sotto ATP legame fosfoestere, <energia, potenziale trasferimento nettamente minore

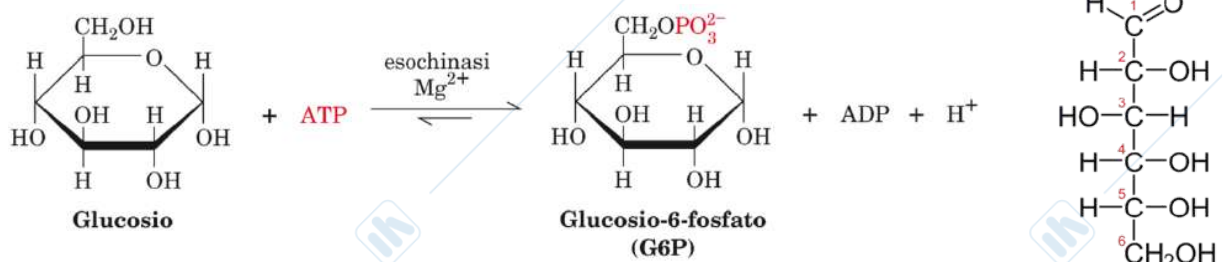
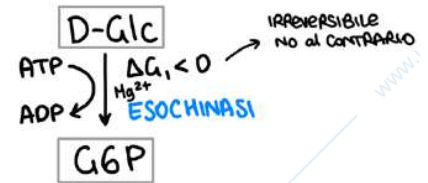
Fosfoenolpiruvato (PEP)	-61,9
1,3-Bisfosfoglicerato	-49,4
ATP ( $\rightarrow$ AMP + PP <sub>i</sub> )	-45,6
Acetil fosfato	-43,1
Fosfocreatina	-43,1
ATP ( $\rightarrow$ ADP + P <sub>i</sub> )	-30,5
Glucosio-1-fosfato	-20,9
PP <sub>i</sub>	-19,2
Fruttosio-6-fosfato	-13,8
Glucosio-6-fosfato	-13,8
Glicerolo-3-fosfato	-9,2



## Fase preparatoria

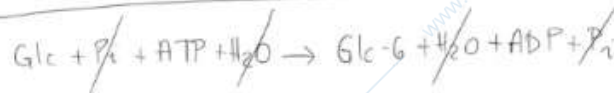
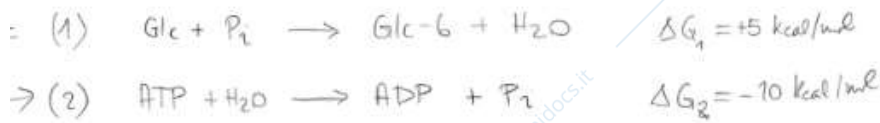
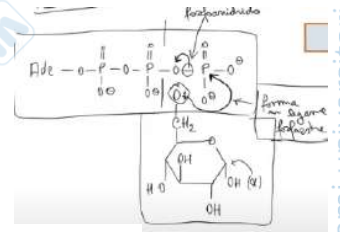
1. **ESOCHINASI** fosforilazione in posizione C6 il Glc; D-Glc->glucosio-6-fosfato (G6P)

- Enzima magnesio dipendente, trasferisce fosfato da ATP a Glc, transferasi
- Reazione **IRREVERSIBILE**
  - Energia di idrolisi dell'ATP è maggiore dell'idrolisi di G6P
  - Entrambi composti fosforilati, se idrolisi con acqua liberano energia, ATP di più quindi è fosfato dell'ATP ( $\Delta G = -30.5$ ) che si sposta a fosforilare il G6P ( $\Delta G = -13.8$ ) formando ADP
  - Prima tappa di controllo della glicolisi
  - Non vedremo mai due molecole di piruvato che reagiranno a riformare glucosio, esiste gluconeogenesi che condivide con glicolisi le tappe reversibili, altre tappe devono essere aggirate con reazioni diverse
- È una chinasi, quindi transferasi, riconoscono gli esosi (>aff per Glc) e fosforilano queste molecole utilizzando ATP
  - Esochinasi HM1,2,3
  - Si chiama esochinasi perché riconosce gli esosi (+imp: mannosio, fruttosio, galattosio) e fosforilano molecole in modo da consumare una molecola di ATP
  - Parametri cinetici sul Glc:
    - $K_m = 0.2 \text{ mM}$ , RICORDA: è affinità enzima per glucosio, si semisaturano a concentrazioni di 0.2
      - Normoglicemia è 5mM, decisamente superiore a  $K_m$
    - $V_{max} = 0.1 \mu\text{M}/\text{min}$
  - Esiste esochinasi HM4= glucochinasi, specifica degli epatociti, controllo omeostasi glucosio, far decidere a cellula se consumare o produrre glucosio, molto selettiva per Glc
- Lega ATP e glucosio e trasferisce un residuo di acido fosforico, formando un fosfoestere e trasformando questo composto neutro in composto carico
- Glucosio-6-fosfato è un derivato fosforilato del glucosio che non è più in grado di attraversare la membrana della cellula (si stabilisce destino catabolico del composto)
- Ogni cellula ha proteina trasportatrice GLUT (trasportatore del glucosio, trasporto passivo facilitato, no ATP, secondo gradiente) che trasporta glucosio attraverso la membrana Glucosio può uscire dalla cellula ma glucosio-6-fosfato no, lo sequestra, glielo impedisce
- Viene utilizzato ATP per produrre composto che altrimenti non si formerebbe
- Freccia destra più lunga (processo fortemente sbilanciato da reagenti verso prodotti) perché  $\Delta G < 0$  dunque spontaneo, processo esoergonico, lontano da equilibrio chimico (FINE LEZIONE 7, 06.04.21)

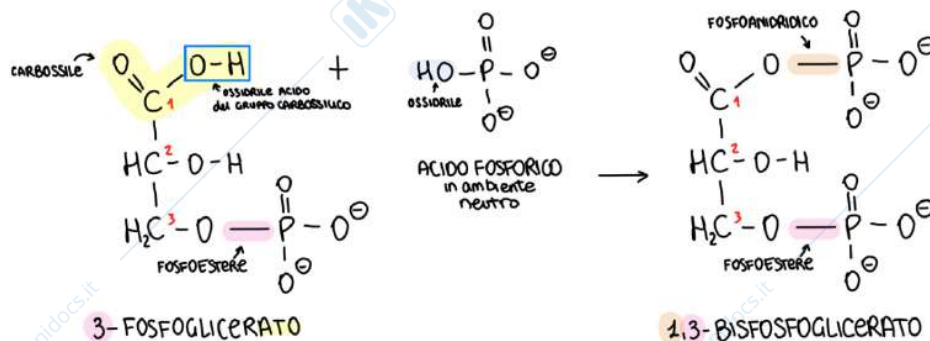


- Glucosio è un aldoseso (monosaccaride, ha gruppo aldeidico su C1), ha 6C, polidrossialdeide (più OH), è D-Glc e penultimo carbonio ha OH a dx, 3'OH a sx, quando ciclizza (OH C5 attacca con condensazione carbonio carbonilico aldeidico C1) si forma emiacetale che può essere  $\alpha$  o  $\beta$  a seconda di dove sia OH del C anomero (INIZIO LEZIONE 8, 07.04.21)
- D-Glc + Pi  $\rightarrow$  Glc-6P + H<sub>2</sub>O reazione di condensazione, glucosio nella sua forma ciclizzata viene fosforilato
  - Non è spontanea  $\Delta G > 0$  perché reazione opposta Glc-6P + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  Glc + Pi è spontanea  $\Delta G < 0$  (se una reazione è spontanea, inversa NON può essere spontanea)

- ii. Cellula estrae energia da certi processi esoergonici per creare condizioni chimiche adatte a far avvenire processi endoergonici
- iii. Cellula accoppia processo spontaneo come idrolisi ATP a processo non spontaneo come fosforilazione del glucosio; esochinasi (enzima magnesio-dipendente) lega i due substrati (glucosio e ATP) per ricavare energia da una e l'altra utilizza l'energia ricavata
- iv.  $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$  ha  $\Delta G \ll 0$
- v. ATP si lega a enzima, enzima lega glucosio; ossigeno alcolico (O di OH) dello zucchero attacca il fosfato dell'ATP e lo libera in forma di ADP  $\rightarrow$  ATP è agente fosforilante, fosfato è in grado di essere attaccato e di liberare energia
- vi. Si rompe un legame fosfoanidridico e dall'altra parte si crea un legame fosfoestere
  - 1. Spontanea/favorita perché rottura legame fosfoanidridico libera più energia di quanta non se ne formi quando si idrolizza il legame fosfoestere



- k. Queste due reazioni vengono accoppiate (processo fortemente esoergonico idrolisi ATP + processo endoergonico fosforilazione Glc), anche AG si somma e risulta  $< 0$  quindi esoergonico e spontaneo, la formazione di Glc è favorita
- l. ATP si può formare in due modi:
  - i. utilizzando processo più esoergonico di  $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$  (facciamo finta  $\Delta G = -10$ )
  - ii.  $ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O$  ( $\Delta G = +10$ ) essendo inverso dell'altro non può essere spontaneo, affinché reazione per formare ATP possa avvenire deve essere accoppiata ad un processo spontaneo che abbia un  $\Delta G$  maggiore ad esempio  $-15$
  - iii. Abbiamo bisogno di un composto fosforilato la cui energia di idrolisi deve essere maggiore dell'idrolisi di ATP
- m. Si usa 1,3-bisfosfoglicerato: glicerolo (3C e 2 funzioni alcoliche OH), ato (funzione carbossilica COOH nella sua forma deprotonata),
  - i. C3: si forma legame fosfoestere tra 3'OH e  $HPO_4$  (alcol+acido fosforico)
  - ii. C1: si forma legame fosfoanidridico tra 1'OH (da COOH) e  $HPO_4$  (acido organico + acido fosforico), ha energia di idrolisi  $\gg$  leg. Estere
  - iii. Cariche negative degli ossigeni dei gruppi P aumentano l'energia potenziale del composto, se allontaniamo fosfato alleggeriamo l'energia della molecola perché riduciamo la repulsione ionica (tra cariche) presenti sulla molecola stessa



- iv. Se idrolizziamo legame in 1' del 1,3-BPG:  $1,3\text{-BPG} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{PG} + \text{P}_i$  otteniamo 3fosfoglicerato (PO<sub>4</sub> solo al C3, quello iniziale, condensazione è processo inverso dell'idrolisi) e 2 fosfati (che andranno a fosforilare l'ADP facendolo diventare ATP?)
1. questa reazione (idrolisi 1,3-BPG) è altamente esoergonica, più del processo di idrolisi dell'ATP, quindi può far avvenire il processo opposto di fosforilazione dell'ADP ( $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ ), somma dei ΔG dei processi è < 0 quindi spontaneo

(1) PROCESSO NON SPONTANEO  $\Delta G_{ns}$   
 (2) PROCESSO SPONTANEO  $\Delta G_s$

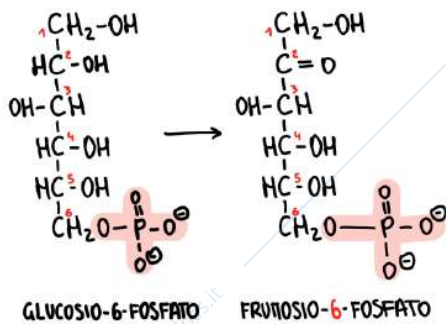
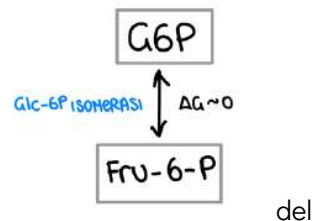
(3) COMBINAZIONE DEI DUE PROCESSI  $\Delta G_{comb} = \Delta G_{ns} + \Delta G_s < 0$   
 ALTRIMENTI NON AVVIENE

v. -> FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO: composti ad alto potenziale di trasferimento del fosfato sono in grado di fosforilare/donare fosfato all'ADP

1. Ne vedremo due: uno a carico della fosfogliceratochinasi (7) e piruvatochinasi (10), dobbiamo avere composti che abbiano potenziale di trasferimento del fosfato più alto di quello dell'ATP, la cui energia di idrolisi sia maggiore dell'energia di idrolisi dell'ATP
- n. Glucosio versatile perché può essere degradato per ottenere energia sia in condizioni aerobiche (+ossigeno, +energia) che anaerobiche (quando O<sub>2</sub> scarseggia)
- i. Anaerobia quando muscolo in ipossia non pericolosa, processi redox diminuiscono di intensità e glicolisi deve produrre ATP necessaria
- o. Prima tappa consiste in:  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$  con  $\Delta G < 0$  quindi spontanea e irreversibile (non percorribile al contrario) con esochinasi magnesio dipendente

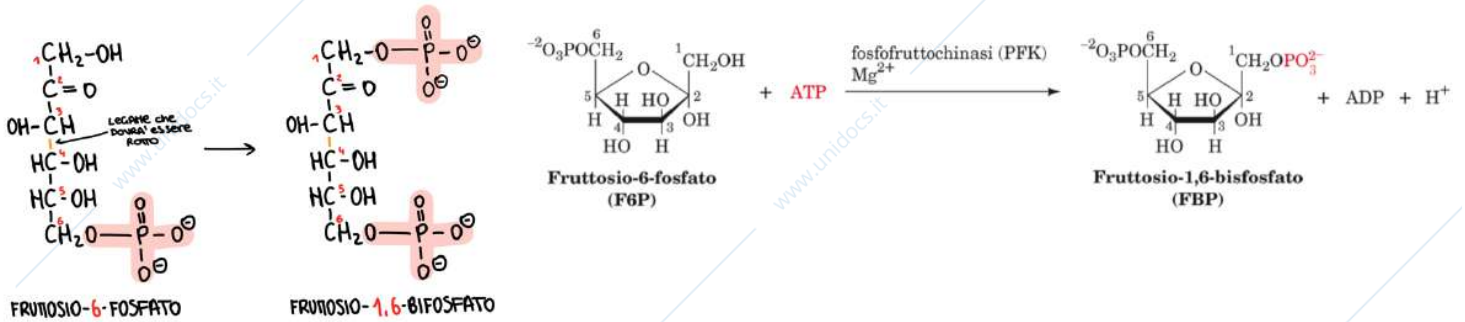
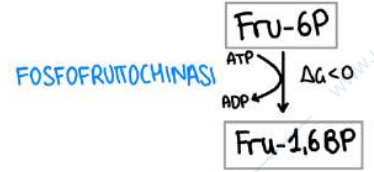
## 2. FOSFOGLUCOSIO ISOMERASI

- a. Isomerizza il glucosio-6-fosfato (aldosesio) → fruttosio-6-fosfato (Fru-6P) (chetoesosio)
- b. Reazione reversibile, come tutte le reazioni di isomerizzazione che non comportano particolare cambio di legami chimici tra reagenti e prodotti
- c. Isomerizzazione serve per indebolire legame tra C3-C4 spostando in posizione 2 il gruppo chetonico C=O
- d. Ossidrile alcolico condensa con un acido fosforico
- e. Cellula usa ATP (in questa fase non ne usa?) per formare legami fosfoestere
- f. Legame anidridico può essere utilizzato per formare legame estere
  - i. Legame fosfoestere non può essere utilizzato per formare un legame fosfoanidridico perché idrolisi legame fosfoestere libera meno energia dell'idrolisi del legame fosfoanidridico
- g. Isomerizzazione serve preparare lo scheletro carbonioso alla rottura legame C3-C4



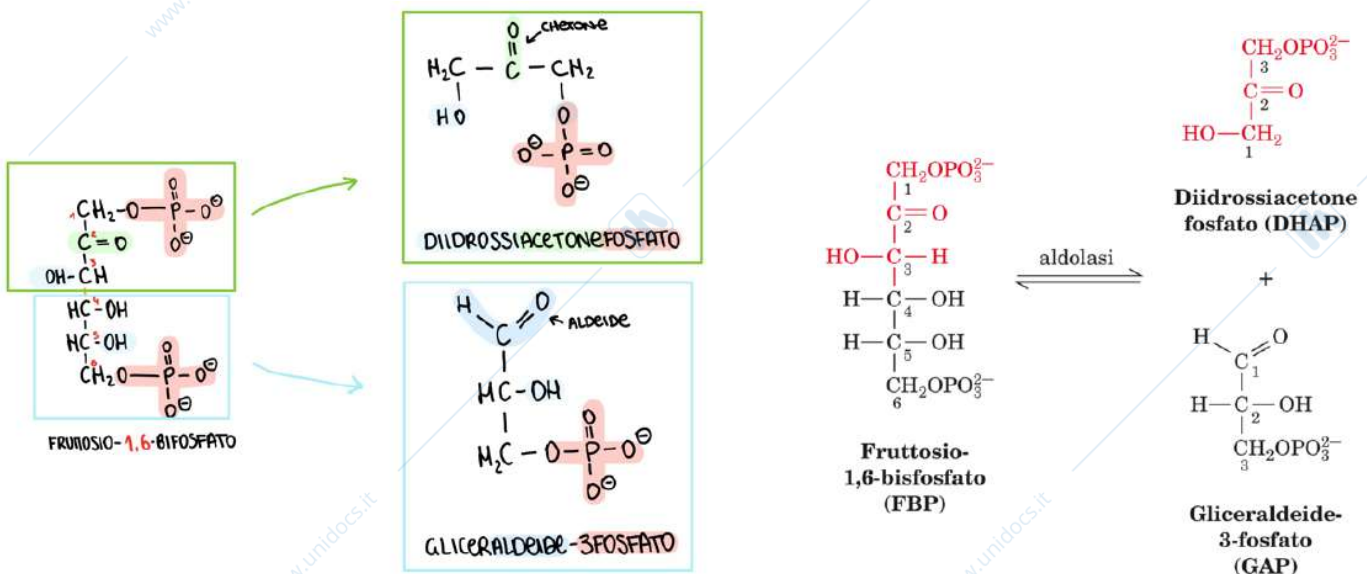
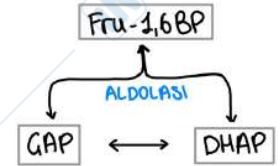
### 3. FOSFOFRUTTOCHINASI1 (PFK1)

- Irreversibile
  - Legame fosfoestere (ATP) idrolizzato libera meno energia di un legame fosfoanidridico (Fru-6P)
- Magnesio dipendente
- Fosforilazione del substrato
- Fruttosio-6-fosfato è fosforilato a fruttosio-1,6BP, legame fosfoestere C1-PO<sub>4</sub> (si aggiunge fosfato, legame fosfoestere)
- Spende ATP che verrà però recuperato in seguito
- Stiamo indebolendo scheletro mettendo due gruppi che sono carichi negativamente, repulsione elettrostatica molto intensa che tende a rompere molecola, non è un caso che siano in quella posizione, stanno indebolendo legame che deve essere scisso C3-C4
- I fosfati adesso hanno una posizione che li rende a basso trasferimento di fosfato, fosfoestere << fosfoanidridico



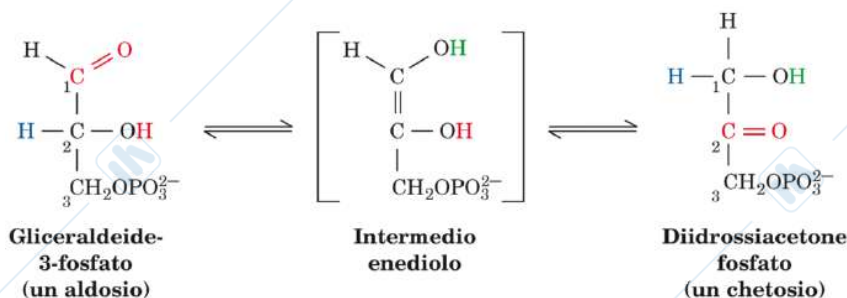
### 4. ALDOLASI

- Reversibile, legami che si rompono e formano hanno energie chimiche simili quindi non c'è preferenza verso l'uno o l'altro
- Liasi
- Fru-1,6BP viene scisso attraverso un processo chiamato scissione aldolica operato dall'aldolasi
- Si rompe il legame e si forma gliceraldeide-3-fosfato (GAP) e diidrossiacetonefosfato (DHAP)
  - DHAP è uno zucchero fosfato con 3C (cheotrioso), è un poliidrossichetone, c'è un gruppo chetonico e 2 gruppi ossidrilici, un 3'OH è libero e l'altro 1'OH è stato esterificato dal gruppo P che ha aggiunto la PFK1 (legame fosfoestere)
  - GAP è uno zucchero aldotrioso

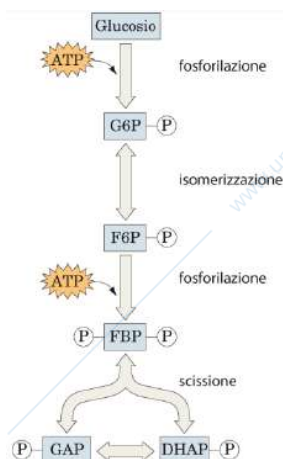


## 5. TRIOSOFOSFATO ISOMERASI (TIM)

- Reversibile
- Isomerizza DHAP (favorito da punto di vista dinamico, più stabile ma nella glicolisi non serve) chetoso in un aldoso GAP
- Trasforma DHAP in GAP



→ Queste prime 5 reazioni spendono 2 molecole di ATP e producono 2 molecole di GAP



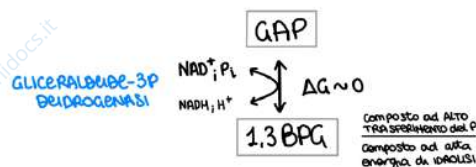
### Fase produttiva

Servono per trasformare scheletro carbonioso, degradarlo per estrarne energia sotto forma di 4 nuovi legami fosfoanidridici che andranno a rimpiazzare i 2 persi nella tappa 1 e 3

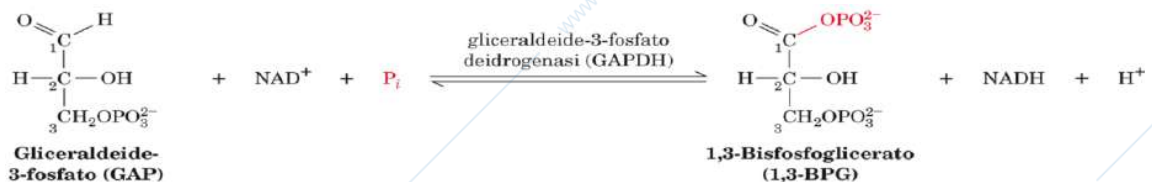
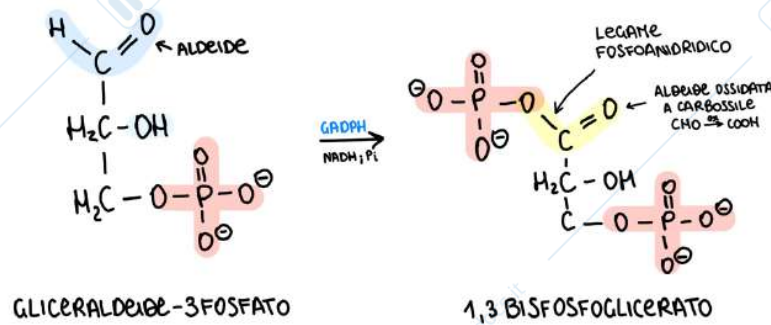
Resa netta: 2ATP per ogni molecola di glucosio degradata

## 6. GLICERALDEIDE-3-FOSFATO DEIDROGENASI (GAPDH)

- Reversibile perché stabilità energetica dei reagenti e dei prodotti è simile
  - Avviene al contrario solo quando c'è bisogno di sintetizzare glucosio, gluconeogenesi nella cellula epatica
- NAD<sup>+</sup> dipendente, unica tappa in cui si utilizza
- Deidrogenazione della GAP e fosforilazione del prodotto
- Si utilizza NAD<sup>+</sup> (forma ossidata) e Pi (fosfato inorganico)
- NAD<sup>+</sup> si trasforma nella sua forma ridotta NADH, quando questi enzimi intervengono vengono strappati due elettroni dal gruppo aldeidico che si ossiderà a gruppo carbossilico CHO → COOH, carbonio si ossida e perde due elettroni
  - Aldosi, monosaccaridi sono zuccheri riducenti: tendono a ridurre, in questo caso NAD<sup>+</sup> → NADH, formando un gruppo carbossilico, aldeide → acido carbossilico che contemporaneamente reagisce con acido fosforico ovvero gruppo fosfato inorganica che si trova nel citoplasma, inorganicazione del fosfato fondamentale per glicolisi
  - I due elettroni vanno a finire nel NADH sotto forma di idruro H<sup>-</sup> e H<sup>+</sup>
  - Se non c'è NAD<sup>+</sup> glicolisi si arresta, cellula non sarebbe più in grado di produrre energia, c'è bisogno di ri-ossidare NAD



- f. Reazioni sono deidrogenazioni e si ha fuoriuscita di 2 atomi di idrogeno che possono uscire come  $2\text{H} = \text{H}^+ + \text{H}^-$
- g.  $\text{P}_i$  è nel composto finale, si forma 1,3-BPG, composto ad alto trasferimento del  $\text{P}_i$  o composto ad alta energia di idrolisi, idrolisi 1,3-BPG libera molto energia, ha  $\Delta G \gg$  idrolisi ATP
- h. Ossidazione del gruppo aldeidico della gliceraldeide libera energia e parte dell'energia viene utilizzata dall'enzima per formare un legame altamente energetico fosfoanidridico
- i. Presenza cariche negative sulla stessa molecola che si respingono  $\rightarrow$  non è facile sintetizzare questo composto, energia in gioco fa sì che sia possibile reazione spontanea inversa
- j. Ora NADH deve essere riossidato



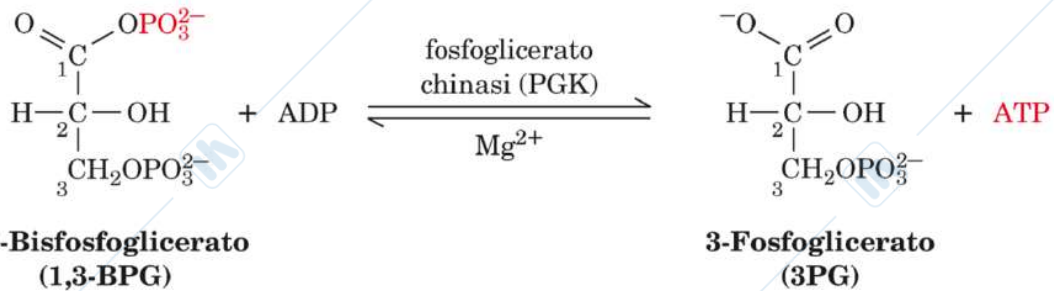
- k. Aerobiosi o anaerobiosi dipende da come cellula ripristina  $\text{NAD}^+$
- l. Tutte le cellule usano glucosio come fonte di energia con passi che possono aumentare o diminuire a seconda della necessità
  - i. Alcune cellule lo utilizzano per convertirlo in lipidi o amminoacidi ma maggior parte lo usa come metabolita energetico, reazione richiede che cellula abbia sempre  $\text{NAD}^+$  in una quantità sufficiente
  - ii. Rapporto tra  $\text{NADH}$  e  $\text{NAD}^+$  favorisce il  $\text{NAD}^+$ , la cellula è congegnata in modo da mantenere rapporto piuttosto basso, una molecola di  $\text{NADH}$  per ogni 100 di  $\text{NAD}^+$ , imperativo metabolico delle cellule

## 7. FOSFOGLICERATO CHINASI (PKG)

- a. Chinasi trasferisce fosfato da ATP a substrato
- b. Reversibile perché da un lato legame fosfoanidridico misto (1,3BPG) dall'altro fosfoanidridico puro (3PG), sono vicini dal punto energetico molto vicini
- c. Chinasi sposta fosfato da 1,3BPG verso ADP = fosforilazione a livello del substrato avente abbastanza energia da trasferire fosfato sull'ADP
  - i. ATP sintasi (non qui) è in grado di prendere fosfato inorganico e spostarlo su ADP
- d. Fosforilazione a livello del substrato dell'ADP da parte del 1,3-BPG, a formare ATP e 3PG
  - i. È il substrato che porta il fosfato
  - ii. Si accoppia un processo più esoergonico (idrolisi 1,3BPG) per poter far avvenire processo endoergonico ( $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ )
- e. Enzima che produce ADP e la fosforila a formare ATP ( $\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP}$ ) = FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO
- f. Permettono formazione ATP a partire dall'ADP avente meno energia
- g. Prima tappa in cui si PRODUCE ATP, ogni volta che  $1,3\text{-BPG} \rightarrow 3\text{PG}$ 
  - i. Si producono le prime 2 molecole di ATP perché abbiamo 2 molecole di 1,3BPG che si sono formate dalla deidrogenazione della GAP

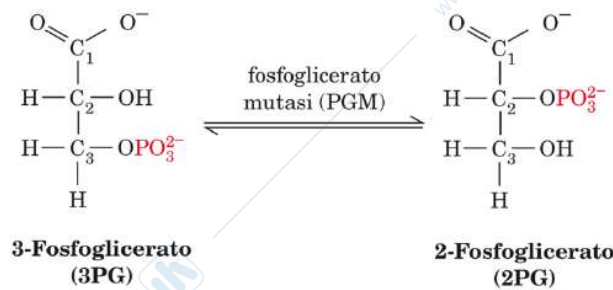


- h. Con questa tappa cellula recupera investimento iniziale di ATP utilizzate nella prima e nella terza tappa (FINE LEZIONE 8, 07.04.21)
- i. Nel 3PG il fosfato sul C3 instaura un legame fosfoestere quindi a basso potenziale di trasferimento di fosfato che non può essere utilizzato per trasferire su ADP
- i. In quella posizione è inutile quindi viene spostato in posizione 2 (reazione sotto)



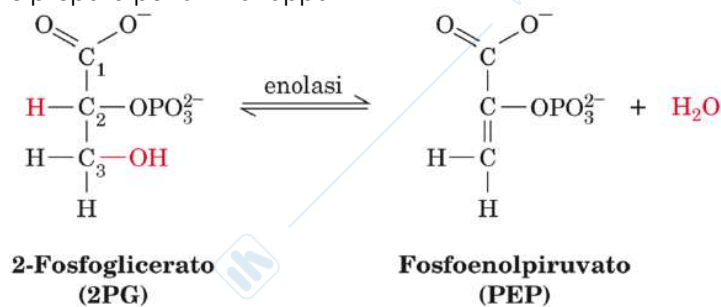
### 8. FOSFOGLICERATO MUTASI (PGM)

- a. Reazione reversibile perché si rompe legame fosfoestere e si forma lo stesso, due composti hanno  $\Delta G=0$  circa
- b. Fosfato spostato da C3 a C2
- c. Prepara composto a trasformarsi nel fosfoenolpiruvato PEP



### 9. ENOLASI

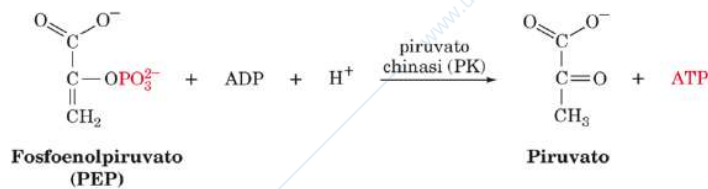
- a. Liasi
- b. Disidrata (perde  $\text{H}_2\text{O}$ ) 2PG la trasforma nel fosfoenolpiruvato PEP
- c. Composto a più alto trasferimento del fosfato che noi conosciamo
- d. Legame che tiene un fosfato associato ad un ene, alcol associato a un carbonio con una funzione enica (doppio legame)
- e. Composto particolarmente instabile, idrolisi libera molta energia -60kJ per mole
- f. Reazione che prepara per ultima tappa



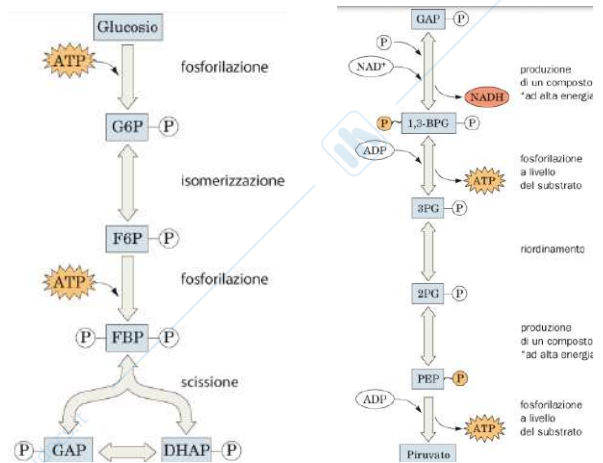
### 10. PIRUVATO CHINASI (PK)

- a. Reazione irreversibile per la differenza di energia tra reagenti e prodotti
- i. È talmente più stabile il piruvato rispetto al PEP che reazione è irreversibile
- ii. Se volessimo ricavare PEP da piruvato non potremmo usare stessa reazione e stesso enzima
- b. Permette di ricavare 2 molecole di ATP da due molecole di PEP che fosforilano a livello del substrato l'ADP

c. Si ricava ATP



Tappe irreversibili: 1, 3, 10 hanno energia libera talmente negativa che è impossibile percorrerle al contrario



## Reazione globale

### Glicolisi aerobia (INIZIO LEZIONE 10, 14.04.21)

Da tappa 1 a tappa 10:  $\text{D-Glc} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{piruvato} + 2 \text{ATP} + 2 \text{NADH}/\text{H}^+$

- 2 NADH/H<sup>+</sup> perché un idruo si lega a NAD<sup>+</sup> l'altro esce come protone H<sup>+</sup>
- Depauperamento del coenzima NAD<sup>+</sup> ogni volta che c'è trasformazione glucosio → piruvato
- Reazione non potrebbe avvenire a lungo perché concentrazione NAD<sup>+</sup> presente nel citoplasma andrebbe a consumarsi e bisogna riossidare il NADH

Ripristino del NAD<sup>+</sup>

- Se ossigenazione adeguata c'è **fosforilazione ossidativa**
- $2\text{NADH}/\text{H}^+ + \text{O}_2 + 5\text{ADP} + 5\text{P}_i \rightarrow 2 \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O} + 5\text{ATP}$
- Fosforilazione: da 5ADP + 5P<sub>i</sub> → 5ATP
- Ossidativa: ossigeno ossida NADH, prende elettroni da NADH formando acqua, è reazione redox che libera tantissima energia in grado di produrre 5 moli di ATP per ogni coppia di NADH che entra nel processo
- Cellula ripristina NAD<sup>+</sup> usando ossigeno, condizioni:
  - Mitocondri
  - Abbastanza ossigeno da compiere questo processo
- Avviene nel mitocondrio e richiede ossigeno per poter riossidare NADH
- Ossidazione mitocondriale del NADH e fosforilazione ossidativa dell'ADP
- Reazione redox che libera energia sufficiente a produrre 5 moli per ogni coppia di NADH
- Avviene nel mitocondrio
- Dipende da pO<sub>2</sub> nella cellula

Glicolisi aerobia: somma glicolisi + fosforilazione ossidativa

- $\text{D-Glc} + 7\text{ADP} + 7\text{P}_i + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{piruvato} + 7 \text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$
- Processo glicolitico di tipo redox
  - Glucosio passando a piruvato si ossida parzialmente
  - Parziale reazione di ossidoriduzione è in grado di liberare abbastanza energia che la cellula intrappola sottoforma di 7 legami fosfoanidridici dell'ATP
  - Richiede 1 mole di O<sub>2</sub> per ogni molecola di glucosio ossidato
  - NON produce CO<sub>2</sub>, non è un'ossidazione completa ma parziale
  - Ossigeno non reagisce direttamente con glucosio ma serve a riossidare il NADH
  - Se completa? produce acido debole non volatile, a carico di sistema che controlla pH
    - Qui si produce acido debole non volatile ovvero piruvato

- Nel ciclo di Krebs piruvato usato come metabolita energetico che viene ossidato completamente a formare anidride carbonica (acido debole volatile per eccellenza) e acqua

### Glicolisi anaerobia

- Quando non c'è ossigeno sufficiente o non ha mitocondri cellula utilizza glicolisi anaerobia per ricavare energia dal glucosio
- $\text{Glc} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \rightarrow 2 \text{L-lattato} + 2\text{ATP} + 2\text{H}^+$ 
  - $\text{H}^+$  vengono da acido lattico
  - Acido lattico è acido debole volatile, crea problemi all'omeostasi del pH
- Degradazione non ossidativa del glucosio  $\rightarrow$  lattato
  - Non abbiamo una specie che si ossida e una che si riduce  $\rightarrow$  no redox, n.o. sono uguali
- Non si produce  $\text{CO}_2$  e non consuma  $\text{O}_2$ , processo degradativo NON ossidativo
- Lattato, a differenza del piruvato, non può essere utilizzato dalle cellule del corpo tranne da quelle del fegato  $\rightarrow$  problema di gestione, acidità
  - Muscoli scheletrici, che fanno avvenire reazione quando scarsità di ossigeno per ipossia, producono lattato, non lo possono gestire e lattato acidifica queste cellule  $\rightarrow$  formazione crampi muscolari dovuti ad acidificazione causata dall'accumulo del lattato
- Si produce un acido debole non volatile: acidificazione del citoplasma
  - Lattato rilasciato nel torrente circolatorio

### Rigenerazione di $\text{NAD}^+$ in assenza di $\text{O}_2$ o catena di trasporto elettroni (CTE)

- Tessuti:
  - Globuli rossi
  - Corneociti
  - Muscolo scheletrico in ipossia
- Enzima: **LDH**
  - Fermentazione omolattica
    - $\text{Piruvato} + \text{NADH} \rightarrow \text{lattato} + \text{NAD}^+$
    - $\text{NADH}$  si ossida a  $\text{NAD}^+$  quindi piruvato si riduce a lattato  $\rightarrow$  reazione redox in cui cellula è in grado di recuperare  $\text{NAD}^+$  utilizzando piruvato come substrato e producendo lattato
  - Reazione reversibile
    - Verso dipende da concentrazioni relative tra reagenti e prodotti
    - AG legato a AG standard biochimico che stabilisce quanto sono stabili gli uni agli altri in condizioni standard, più un termine che varia a seconda delle concentrazioni attuali dei reagenti e dei prodotti
  - 5 isoforme distinte sulla base della composizione delle catene H e M (FINE LEZIONE 9, 13.04.21)

### Resa energetica:

- Glicolisi aerobia forma 7 ATP
- Glicolisi anaerobia forma 2ATP
  - $\rightarrow$  Glicolisi aerobia è 3.5 volte più efficiente della anaerobia

### Reazioni redox (INIZIO LEZIONE 10, 14.04.21)

Trasferimento di elettroni tra una specie chimica dona elettroni (si ossida, agente riducente) e altra li accetta (si riduce, agente ossidante)

- Trasferimento elettroni è evidente quando è completo
  - Due elementi allo stato elementare si combinano per formare un composto ionico, alta differenza di elettronegatività
  - $2\text{Na} + \text{Cl}_2 \rightarrow 2\text{Na}^+ + 2\text{Cl}^-$
  - Na ha ceduto elettrone, si ossida, agente riducente
  - Cl ha preso elettrone, si riduce, agente ossidante
- Quando si rompono e formano legami covalenti l'ossidazione è meno evidente

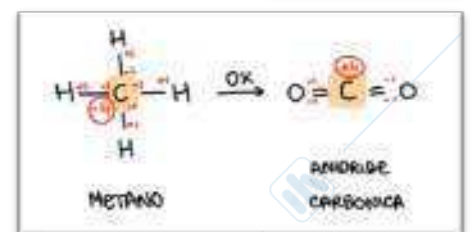
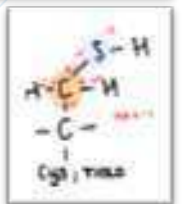
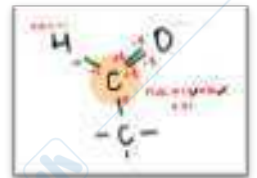
- Per vedere se la reazione è redox occorre assegnare i numeri di ossidazione agli atomi delle molecole
- Elementi che hanno differenza di elettronegatività non elevata
- $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$
- Si è formato un nuovo composto, O si è ridotto e H si è ossidato
- Elettroni spostati da atomi più elettronegativi, no spostamento formale

**Numero ossidazione**, nelle redox, varia tra reagenti e prodotti

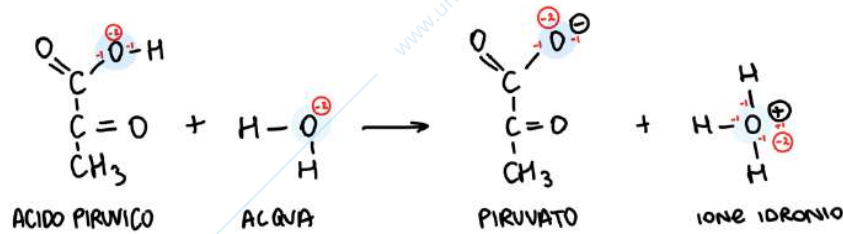
- Carica che atomo assumerebbe se elettroni impegnati nei legami chimici si avvicinassero ad atomo più elettronegativo
- Elettronegatività: tendenza atomo ad attrarre verso di sé gli elettroni di un legame covalente
  - Scala di Pauling:  $\text{O} > \text{N} > \text{S} > \text{C} > \text{H}$ ; dal più al meno elettronegativo
- Se ione, n.o. = carica; esempio  $\text{Na}^+$  ha n.o. = -1;  $\text{Ca}^{2+}$  ha n.o. = +2
  - O può anche non aver formato doppio legame ma può impossessarsi di un elettrone che diventa la sua carica: C-O ossigeno ha carica -1 ma n.o. totale (-1-1=-2) uno viene da legame uno da carica
- N.o. Molecole principali:
  - O: 0, quando molecola biatomica  $\text{O}_2$ , o -2
  - N: sempre -3
  - S: sempre -2
  - C: da -4 a +4, è l'atomo su cui focalizzarsi
  - H: sempre +1

**Esempi calcolo n.o.**

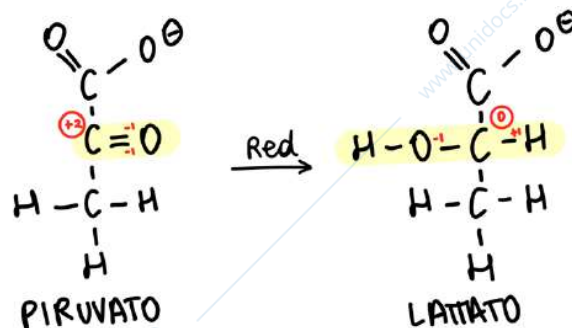
- A ciascun legame covalente si assegna un numero di ossidazione poi si sommano
- Aldeide
  - C=O: ogni doppio legame è -1, elettroni spostati verso O, sommando (-1-1) avremo che O avrà n.o. = -2
  - C aldeidico ha n.o. = -1
- Tiolo, catena laterale Cys
  - S più elettronegativo di C quindi attira a sé gli elettroni, n.o. = -1
  - C avrà n.o. = -1
- Aldeide → tiolo; C si riduce perché <n.o., ha acquistato e
- C-N legame ammidico, potrebbe unire 2 a.a.
  - N è il più elettronegativo n.o. sempre -3
  - C=O è carbonile ammidico perché non è chetone
  - C ammidico ha n.o. = +3
  - C aldeidico → C ammidico; carbonio si ossida, >n.o., perde e
- Più il carbonio è ossidato -> più la molecola è stabile -> più energia libera
- Metano -> anidride carbonica
  - Metano è molecola ricca di energia  $\text{CH}_4$ , n.o. C = -4, è un combustibile non è un gas
  - Da metano ad anidride carbonica  $\text{CO}_2$ , C si è ossidato, n.o. C = +4, molecola più stabile, ha liberato tutta l'energia intrappolata nei legami chimici C-H
  - C perde 8 elettroni che vanno all'ossigeno
- Reazione acido base
  - Acido piruvico + acqua -> piruvato +  $\text{H}_3\text{O}^+$ 
    - NON è reazione redox perché n.o. non cambia
    - Bisogna sempre tener conto di cariche!



- Acido piruvico + acqua  $\rightarrow$  piruvato +  $H_3O^+$



- Piruvato  $\rightarrow$  lattato
  - Lattato è  $\beta$ -idrossiacidocarbossilico
  - C piruvato ha n.o.=+2
  - C lattato ha n.o.=0
  - C si è ridotto
  - Se passiamo da lattato  $\rightarrow$  piruvato otteniamo molecola piú stabile perché piú ossidata, formazione legami chimici piú stabili
  - Ox o red dipende da numero di legami che C forma con atomo + elettronegativo: nel piruvato ne forma 2 quindi + ossidato, nel lattato ne forma uno quindi + ridotto



### Semireazioni, avvengono contemporaneamente

- Reazione di riduzione
  - Acquista un elettrone e n.o.<
  - $Fe^{3+} + e \rightarrow Fe^{2+}$ ; ione ferrico acquista elettrone si riduce
- Reazione di ossidazione
  - Cessione di elettroni, n.o.>
  - $Cu \rightarrow Cu^{2+} + 2e$ ; ione rameoso cede un  $e$  e si ossida
  - Il piú ossidato è quello che ha la carica maggiore
- Reazioni devono avvenire contemporaneamente perché deve esserci una specie chimica che dona elettrone (ox) e un'altra che lo riceve (red)

### Potenziale di riduzione

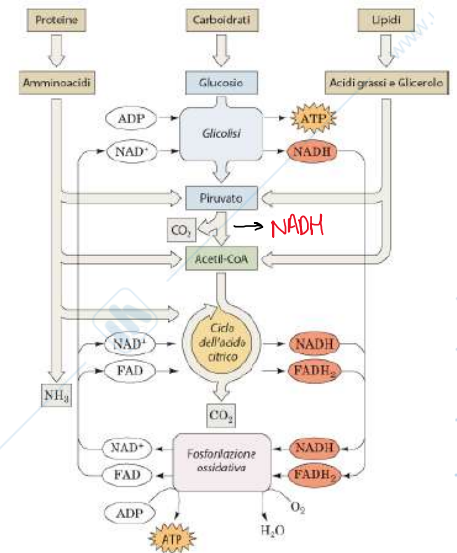
- Misura della tendenza di una specie chimica ad acquisire elettroni, cioè ad essere ridotta
- Agente piú ossidante nella biologia è l'ossigeno molecolare
  - Nella glicolisi aerobia cattura gli elettroni perché ha il potenziale di cattura piú alto
  - $E^h$  di  $O_2 = +0.82$  V (Volt, potenziale elettrico)
- In ordine decrescente  $O_2 > Fe^{3+} > Cu^{2+} > NAD^+ > H^+$ 
  - $H^+$  per convenzione ha  $E=0.00$  V
- Piú è basso potenziale redox, meno quella specie chimica tende a strappare elettroni = ridursi
  - Ottimo riducente, pessimo ossidante
- Piú è alto potenziale redox, piú quella specie chimica tende a strappare elettroni = ridursi
  - Ottimo ossidante, pessimo riducente
- Tendenza naturale è quella di formare prodotti piú stabili che liberano verso ambiente maggiore quantità di energia possibile

## Coppie redox

- Dato che gli elettroni non possono essere isolati, non si può avere una reazione di riduzione o una reazione di ossidazione isolate, ma i due processi sono simultanei, coinvolgenti due sostanze diverse
- Accettore di elettroni: agente ossidante
  - Ha potenziale di riduzione maggiore tra i due
  - Acquista elettroni da altra sostanza e quindi la ossida
  - Acquistando elettroni si riduce e  $<n.o.$
- Donatore di elettroni; agente riducente
  - Cede elettroni all'altra sostanza e quindi la riduce
  - Cedendo elettroni si ossida e  $>n.o.$
- Coppia coniugata tra coppia ossidata e forma ridotta
  - Esempio 1
    - Coppia  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  ha  $E=+0.77V$  (+alto)
    - Coppia  $Cu^{2+}/Cu^+$  ha  $E=+0.16$  (+basso)
    - Coppia avente potenziale redox  $>$  (tendenza ad accettare elettroni) che ossida
      - $Fe^{3+}$  acquista elettroni e si riduce
      - $Cu$  cede elettroni e si ossida
  - Esempio 2
    - NADH reagisce nel mitocondrio a dare energia, reazione redox con ossigeno forma ATP
    - Coppia  $O_2/H_2O$  ha  $E=+0.82V$  (+ alto)
    - Coppia  $NAD^+/NADH, H^+$  ha  $E=-0.32V$  (+basso)
    - Coppia che ha  $E >$  accetta elettroni, altra dona
      - $O_2$  accetta elettroni e si riduce
      - NADH cede elettroni e si ossida

## Fosforilazione ossidativa

- Via finale del metabolismo energetico, in cui gli elettroni (NADH e FADH<sub>2</sub>) provenienti dalle molecole energetiche (monosaccaridi, acidi grassi, amminoacidi, corpi chetonici) sono trasferiti all'ossigeno molecolare in modo da alimentare la sintesi di ATP
  - Dai monosaccaridi otteniamo NADH (tutti monosaccaridi diventano glucosio e vengono ossidati allo stesso modo)
  - Dagli acidi grassi NADH e FADH<sub>2</sub>
  - Amminoacidi vengono transaminati e formano NADH e FADH<sub>2</sub>
  - Corpi chetonici (chetogenesi nel fegato) formano NADH e FADH<sub>2</sub>
- Fosforilazione è fondamentale per ricavare NADH e FADH<sub>2</sub>
  - Glicolisi produce NADH
  - Via che produce più NADH è ciclo di Krebs
  - Piruvato → Acetil-CoA è reazione redox che produce NADH
  - Coenzimi redox, attraverso fosforilazione ossidativa, vanno a cedere elettroni all'ossigeno e quindi a fornire energia per produrre ATP
- Caratteristiche:
  - Via lineare che si svolge con una serie di reazioni redox in cui sono coinvolti
    - Coenzimi redox ridotti: NADH e FADH<sub>2</sub>
    - Trasportatori mobili di elettroni (modo reversibile): citocromo c e ubiquinone
    - Centri redox fissi su complessi multiproteici transmembrana, nella mmi
- Via mitocondriale
  - Si svolge nella **membrana mitocondriale interna mmi**
    - Ha composizione lipidica e proteica molto specializzata
      - 80% proteine e 20% lipidi (fosfoglicolipidi, cardiolipina)
      - Membrana deve essere molto selettiva
        - Possono attraversarla molecole aventi sulla membrana un traslocatore/trasportatore proteico
        - Proteina transmembrana che attraverso mmi riconosce molecole sulla membrana
          - ADP, Pi e ATP
          - Piruvato
          - L-malato
          - Citrato
          - Acil-carnitina/carnitina
        - Queste molecole possono attraversare mmi perché ci sono proteine specializzate che le riconoscono e gli permettono il passaggio
        - NON possono attraversarla
          - NADH/NAD<sup>+</sup>
          - Ossalacetato
          - E ogni altro metabolita che non abbia un apposito trasportatore
    - Sistemi di trasporto
      - Mitocondrio is the powerhouse of the cell, si produce la maggior parte dell'ATP necessario alle funzioni cellulari quindi c'è continuo scambio di ADP che proviene da cellula che ha appena consumato ATP e dall'altra produce ATP e lo scambia con ADP
        - Permessato da **ADP/ATP traslocasi**
      - Per formare ATP c'è bisogno di fosfato inorganico che si produce nella cellula dall'idrolisi di ATP, Pi insieme a ADP deve entrare nel mitocondrio per assicurare fosforilazione di questa molecola, c'è bisogno di carrier ovvero una proteina che lega fosfato e lo fa entrare



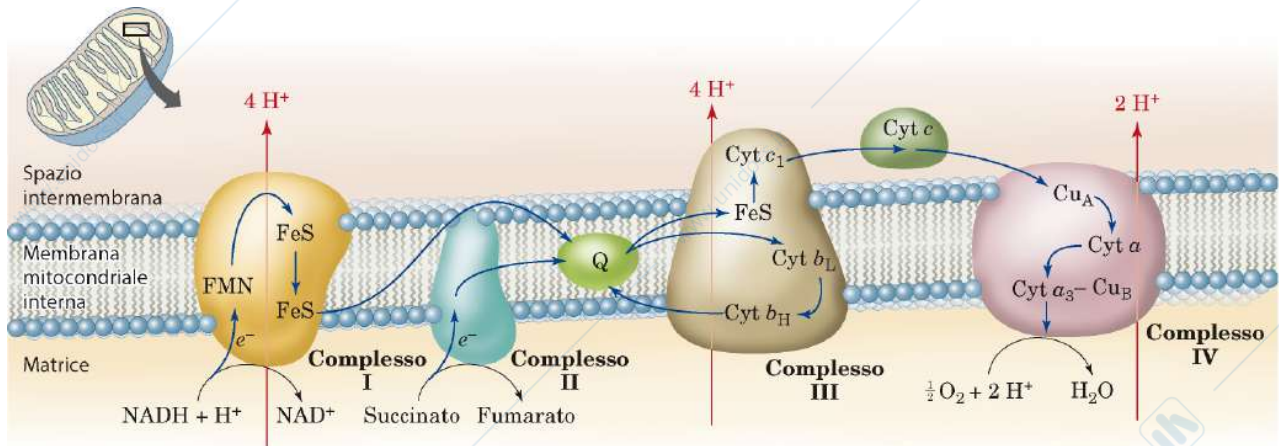
- Carrier del fosfato, a differenza dell'altro, richiede energia ed è un trasporto attivo secondario
- Per spostare fosfato da citoplasma dentro matrice mitocondriale richiede un consumo di energia sotto forma di gradiente di ioni H<sup>+</sup>
- **Membrana mitocondriale esterna**
  - Poco selettiva perché su membrana ci sono porine che fanno passare tutti i metaboliti più importanti da citoplasma verso spazio intermembrana
- **Spazio intermembrana**
  - Spazio compreso tra membrana interna e esterna
- **Matrice mitocondriale**, spazio più interno
  - Contiene la
    - **Piruvato deidrogenasi**
    - Enzimi del ciclo di Krebs tranne la succinato deidrogenasi
    - Enzimi della beta-ossidazione degli acidi grassi
  - Ha invaginazioni dette creste mitocondriali, tanto più numerose quanto più mitocondrio sta respirando, è attivo da punto di vista respiratorio, meccanismi si attivano qui
- Mitocondrio decide destino cellula si può attivare morte cellulare programmata o apoptosi, può essere rilasciato citocromo c in modo controllato, entrato nel citoplasma della cellula porta alla morte cellulare
- Via aerobica

### Catena di trasporto degli elettroni (CTE)

- Parte essenziale della fosforilazione ossidativa
- Fosforilazione dell'ADP può avvenire in due modi
  - Fosforilazione a livello del substrato dove è un substrato fosforilato che cede fosfato all'ADP come in due tappe della glicolisi
  - Fosfato inorganico che un particolare enzima presente nel mitocondrio è in grado di organizzare utilizzando l'energia incamerata con l'ossidazione dei coenzimi redox
    - Coenzimi redox sono una forma di energia mobile, sono come elettroni mobili, entrano nel citoplasma, diffondono nella cellula e raggiungono il confine del mitocondrio, NADH non può entrare nel citoplasma dove avviene processo, NADH prodotto nel citoplasma quindi come fa ad essere ossidato nel mitocondrio? Lo spiegherò
- Serve a creare fonte di energia necessaria per ATP sintasi
- Complessi respiratori
  - Trasportatori mobili di elettroni
    - Servono a collegare funzionalmente i complessi proteici
    - Ubichinone (CoQ)
      - Lipide isoprenoide derivato da isoprene con estremità isopreniche ripetute 10 volte, 2 funzioni chinoniche ovvero chetoni in anello alifatico
      - Specie redox che ha forme redox:
        - Ubichinone, ox
        - Ubichinolo, red
          - Chetoni si riducono ad alcoli
        - Oscilla tra forma ox e red per trasferire elettroni da complesso all'altro
      - Trasferisce elettroni dai complessi I e II e li trasferisce al III
        - Prende e da complesso I e II e li trasferisce al III, UNO ALLA VOLTA!
      - Essendo lipide può attraversare membrana mitocondriale nel suo spazio lipofilo, parte interna della membrana, apolare
    - Citocromo c (Cit c)
      - Piccola globulare proteina che contiene gruppo eme
      - A-eliche intrappolano gruppo eme che contiene parte reattiva ovvero Fe
      - Cisteina e istidina che complessano ferro che oscilla tra ox e red
      - Cit c oscilla tra due forme redox
        - Cit c ossidato (Fe<sup>3+</sup>)

- Cit c ridotto (Fe<sup>2+</sup>)
  - Trasferisce elettroni da complesso III a complesso IV
  - Proteina periferica, si associa su versante intermembrana della membrana mitocondriale interna e si sposta da III a IV
- Complessi multiproteici transmembrana
  - Sono 4 complessi: I, II, III, IV, V, hanno altri nomi a seconda dei substrati redox, specie che si ossida e specie che si riduce, molecola che dona e molecola che prende
  - Tutte reazioni redox organizzate a formare altre reazioni redox
  - Complesso I
    - **NADH-CoQ reduttasi** (NADH ox, CoQ red)
    - Centro redox che trasferisce elettroni dal NADH al CoQ
    - È una pompa protonica
      - Ogni volta che passano 2 elettroni sposta 4 protoni da matrice mitocondriale verso spazio intermembrana
      - Inibitore è rotenone
    - Fe-S è centro ferro-zolfo, cisteine che complessano ioni ferro e che servono a trasferire da un punto all'altro della struttura costituita da più subunità proteiche organizzate per attivare un movimento direzionato di protoni dalla matrice mitocondriale verso lo spazio intermembrana
  - Complesso II
    - **Succinato-CoQ reduttasi**
    - Trasferisce elettroni dal succinato al CoQ (succinato ox e CoQ red)
    - NON è pompa, non sposta nulla, non ha abbastanza energia
    - Succinato viene ossidato a fumarato, elettroni che questo perde servono per ridurre CoQ ma non sono sufficienti a spostare contro gradiente nessun H<sup>+</sup>
    - Contiene la **succinato deidrogenasi** FAD-dipendente (anche ciclo Krebs)
  - Complesso III
    - **CoQ-cit c reduttasi**
    - Trasferisce elettroni dal CoQ al citocromo c (CoQ si ossida e cit c si riduce)
    - Pompa protonica: sposta 4 elettroni che seguono potenziale redox crescente, vanno da potenziale redox minore del NADH verso quello più alto dell'ossigeno, così facendo liberano energia che viene sfruttata da macchine per spostare protoni
    - 2 elettroni si spostano da CoQ a cit c e 4 elettroni vengono spostati contro gradiente
    - Spostiamo sia specie chimiche ma anche cariche, movimento cariche, stiamo caricando negativamente matrice, spazio intermembrana invece si carica positivamente
    - Abbiamo sia differenza potenziale elettrico sia gradiente di concentrazione
    - Stiamo togliendo elettroni da interno
      - Dentro <H
      - Fuori >H
      - Catene trasporto elettroniche mitocondriale stanno creando gradiente di concentrazione protonico
    - Inibitore pompa è antimicina A
  - Complesso IV
    - **Cit c ossidasi** (cit c ox)
    - Trasferisce elettroni da citocromo c ridotto all'ossigeno molecolare O<sub>2</sub>
    - O<sub>2</sub> si trova alla fine della catena
    - Lo scopo di tutto era riossidare NADH
    - Donatore è NADH/H<sup>+</sup>, agente riducente, donando elettroni si ossida a NAD<sup>+</sup>

- Accettore finale degli elettroni donati da NADH è O<sub>2</sub>, agente ossidante della reazione globale, si riduce e forma H<sub>2</sub>O, n.o. da 0 a -2
- NADH si riossida all'inizio → NAD<sup>+</sup> ed è pronto per nuovo ciclo di glicolisi
- Pompa protonica, trasferisce soltanto due protoni per ciascuna coppia di elettroni che poi vanno a ridurre l'ossigeno in acqua
  - Inibitori sono cianuro e monossido di carbonio, veleni respiratori non perché bloccano acetilcolinesterasi, ma perché impediscono a IV di produrre energia necessaria per mantenere alta la carica energetica della cellula, cellula non ripristina potere ossidante e non produce ATP, uccidendo cellule principali come cuore, polmoni avviene morte
- TOTALE PROTONI: 4H<sup>+</sup> + 4H<sup>+</sup> + 2H<sup>+</sup> = 10H<sup>+</sup>
  - 10 protoni per ciascuna coppia di elettroni che fa questo percorso
- Agente ossidante della reazione è l'ossigeno che si riduce passando da O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O

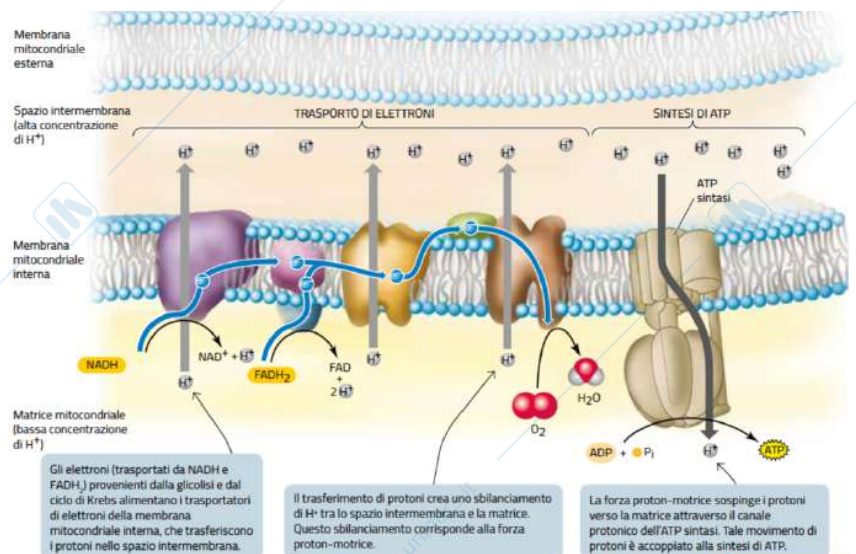
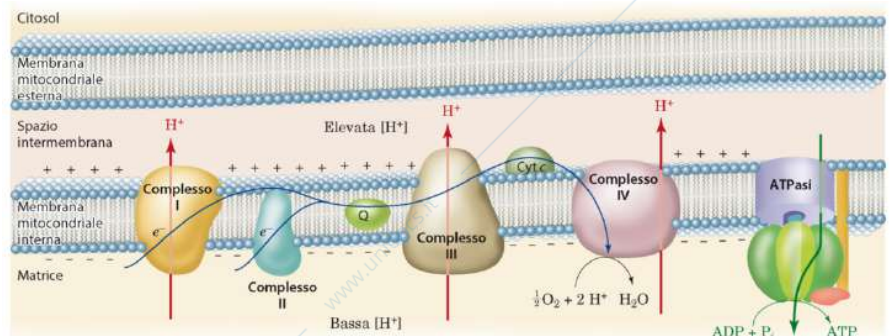
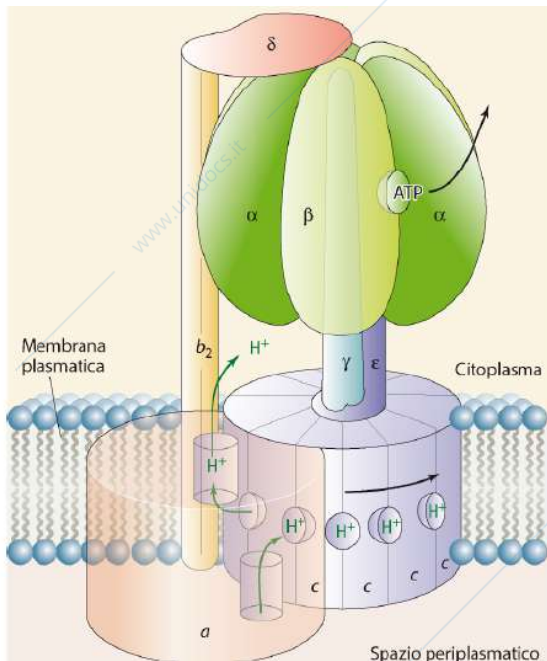


- Elettroni passano attraverso complesso I, raggiungono CoQ e lo riducono, CoQ ridotto va attraverso complessi che contengono vari centri redox in cui ci sono citocromi che prendono elettroni, li portano a citocromo c e lo riducono, elettrone trasportato da cit c ridotto va a uno ione ferro che poi trasferisce cit - cit - cit e alla fine c'è ossigeno
- Corrente elettrica che attraversa membrana mitocondriale interna, passando attraverso centri redox dei trasportatori mobili, serve ad alimentare pompe protoniche che spostano contro gradiente ioni H<sup>+</sup> da matrice mitocondriale verso spazio intermembrana

### Reazione globale della fosforilazione ossidativa:

- $2\text{NADH}/\text{H}^+ + \text{O}_2 + 5\text{ADP} + 5\text{P}_i \rightarrow 2\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O} + 5\text{ATP}$
- Abbiamo visto che NADH cede elettroni all'ossigeno molecola che forma, in presenza di 5ADP e 5P<sub>i</sub>, 5 molecole di ATP, parte che dà nome a fosforilazione ossidativa, ma dove sono ADP e P<sub>i</sub>?
- Complesso V = **ATP sintasi**
  - EC 7.1.
    - Nel 2018 commissione internazionale ha aggiunto nuova classe di enzimi, ora 7
    - Nuova classe è **enzimi traslocati**, molecole a cavallo tra trasportatori e enzimi
  - Parte finale della catena di trasporto elettroni
  - Non veicola elettroni ma genera corrente protonica
  - Esempio di **trasduzione energetica**: trasformazione energia da una forma ad un'altra
  - Attività della CTE è quella di generare un gradiente elettrochimico protonico attraverso la mmi
  - Gradiente è una forma di energia potenziale elettrochimica
  - Sia gradiente di concentrazione sia potenziale elettrico, energia accumulata viene accumulata dall'attività protonica delle pompe dei complessi I, III, IV
  - Combinazione tra processo esoergonico (H<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O) che libera tanta energia che la cellula utilizza per una reazione spezzettata in tante piccole reazioni in modo da poterla gestire per far muovere dei protoni secondo una direzione precisa

- No reazione in modo incontrollato ma controllata e ordinata in grado di produrre lavoro
- Lavoro delle molecole è un lavoro osmotico,
- Lavoro carica il sistema di energia (capacità di compiere lavoro), adesso mmi può fare lavoro attraverso ATP sintasi
- Motore molecolare, pompa ionica, trasportatore, enzima
- Sfrutta gradiente di protoni che si è accumulato nello spazio periplasmatico, fa entrare attraverso canale,
- Costituita da due motori elettrici
  - Rotore  $F_0$ , sotto, rotore elettrico azionato da gradiente di concentrazione di protoni che si muove e fa rientrare il protone secondo gradiente nella matrice del mitocondrio e permette la rotazione della struttura
    - $F_0$  dove 'o' sta per oligomicina, molecola che inibisce movimento di rotazione garantito da flusso protoni
  - $F_1$ , in alto, parte dove ha luogo la fosforilazione ossidativa, interviene nel legame tra ADP e  $P_i$ . Grazie al movimento ordinato garantito dal flusso di protoni questo rotore gira e girando fa cambiare conformazione alle subunità della porzione  $F_1$  e il cambiamento di conformazione della molecola permette di avere il processo di trasformazione energetica
    - Da energia elastica di deformazione della struttura della proteina in energia chimica intrappolata nel legame fosfoanidridico dell'ATP
- Catalisi rotazionale in cui la rotazione del rotore  $F_0$  è associata al meccanismo catalitico della parte  $F_1$  che, grazie a movimento ordinato del rotore, permette alle subunità di legare da un lato ADP e  $P_i$  e dall'altro, grazie ad un cambiamento di affinità delle subunità garantito da un cambiamento di conformazione a sua volta associato a movimento del rotore, la produzione di ATP
- Esempio trasformazione energetica
  - Flusso di protoni secondo gradiente – movimento rotazionale parte  $F_0$  – cambiamento conformazionale  $F_1$  – trasformazione movimento rotazionale in energia chimica



È dalla fosforilazione ossidativa che la cellula ricava la maggior della ATP, l'energia metabolica di cui ha bisogno

- Alcune cellule non sopravvivrebbero utilizzando solo glicolisi (muscoli glicolisi anaerobia non è sufficiente, epatociti) (FINE LEZIONE 10, 14.04.21)

### Resa energetica fosforilazione ossidativa (INIZIO LEZIONE 11, 19.04.21)

- Quando NADH trasferisce i suoi elettroni all'ossigeno, il flusso di elettroni=corrente elettrica alimenta le pompe protoniche che muovono contro gradiente 10 protoni
- Protoni utilizzati dall'ATP sintasi per formare ATP
- 3 protoni traslocati generano una molecola di ATP, servono per far girare il rotore FO di circa 120°, la rotazione permette la sintesi di una singola molecola di ATP
- Per formare ATP abbiamo bisogno di ADP e Pi, molecole che devono essere presenti nella matrice mitocondriale, dove vi è F1
- ADP e Pi si spostano attraverso traslocatore che li muove in antiporto
  - Ci sono trasportatori specifici sulla mmi che permettono il passaggio di molecole che altrimenti rimarrebbero all'esterno della matrice, sono i precursori dell'ATP sintasi
  - Per trasferire il gruppo fosfato, la cellula ha bisogno di spendere un protone, utilizza un protone che ha pompato nello spazio periplasmatico perché Pi richiede trasporto attivo contro gradiente
- Cellula per produrre ATP deve consumare 3H<sup>+</sup> del suo gradiente per ruotare FO e consumare 1H<sup>+</sup> per spostare, nella matrice mitocondriale interna, un gruppo fosfato
- IN TOTALE
  - Per produrre una molecola di ATP occorre traslocare secondo gradiente 4 H<sup>+</sup>
  - Ossidazione NADH produce 2.5ATP
    - Traslocazione 10H<sup>+</sup> da complesso I a O<sub>2</sub>; 4+4+2=10
    - Rapporto fra 10 protoni traslocati / 4 numero protoni necessari per 1ATP =2.5ATP
  - Ossidazione FADH<sub>2</sub> produce 1.5ATP (6H<sup>+</sup>)
    - Traslocazione 6H<sup>+</sup> da complesso II a O<sub>2</sub>; 4+2=6
    - FADH<sub>2</sub> interviene nel secondo complesso quando ossida succinato a fumarato e sposta i suoi due elettroni al CoQ
    - Ma complesso II non è pompa protonica quindi quando due elettroni si spostano dal succinato fino all'ossigeno riescono a pompare nella matrice 4+2=6H<sup>+</sup>
    - Rapporto tra 6H<sup>+</sup> traslocati / 4H<sup>+</sup> per 1ATP = 1.5ATP

### Resa globale

- Ossidazione NADH
  - $2\text{NADH}/\text{H}^+ + \text{O}_2 + 5\text{ADP} + 5\text{Pi} \rightarrow 2\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O} + 5\text{ATP}$
- Ossidazione FADH<sub>2</sub>
  - $2\text{FADH}_2 + \text{O}_2 + 3\text{ADP} + 3\text{Pi} \rightarrow 2\text{FAD} + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{ATP}$
- Sintesi ATP per ossidazione di composti ad alto potenziale di trasferimento di elettroni (potenziali riducenti)

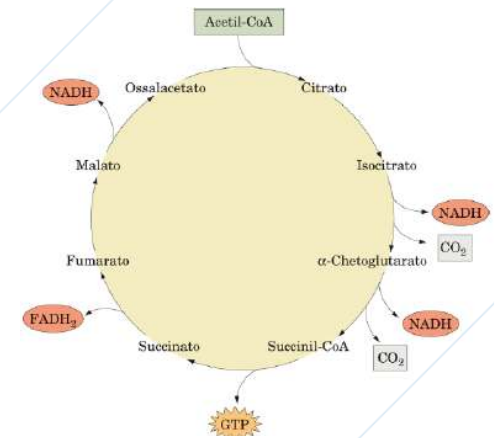
### Termodinamica

- Processi esoergonici:
  - AG<0, prodotti hanno G minore di G dei reagenti
  - Spontanei quindi non reversibili, irreversibili, unidirezionale
  - Si manifestano liberando energia nell'ambiente
- Processi all'equilibrio:
  - Tra reagenti e prodotti non c'è differenza di G, AG=0
  - Sistema ha raggiunto equilibrio
  - Non hanno più tendenza a cambiare composizione chimica
  - Reversibili
  - Se aumento reagenti si trasformano in prodotti e viceversa per ristabilire equilibrio
- Processo endoergonico:

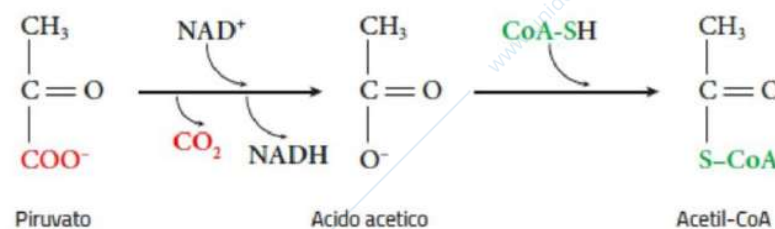
- $AG > 0$
- Processi che non possono verificarsi spontaneamente, in natura non avvengono, deve esserci 'qualcosa' che fornisce l'energia necessaria
- Sono 'resi possibili', resi esoergonici, dall'impiego dell'energia metabolica intrappolata durante i processi catabolici
  - $Glc + Pi \rightarrow Glc-6P + H_2O$  endoergonico, non avviene spontaneamente
  - $Glc + ATP \rightarrow Glc-6P + ADP$  esoergonico, energia viene dall'idrolisi dell'ATP e viene utilizzata per far avvenire reazione endoergonica
  - Per far avvenire reazioni endoergonici, questi devono essere accoppiati a composti ad alto potenziale del trasferimento
- Nelle cellule tutti i processi sono esoergonici, al massimo all'equilibrio

## Ciclo di Krebs

- Processo catalitico ciclico a 8 tappe, che si chiudono su sé stesse, che converte i gruppi acetile derivati dai metaboliti energetici (acetil-CoA) in  $CO_2$ , producendo NADH, FADH<sub>2</sub> e GTP (energia metabolica, equivalente a ATP)
  - Tappe vanno a riformare ossalacetato utilizzato per far entrare Acetil-CoA
- Entra Acetil-CoA, precursore e metabolita centrale della cellula che viene prodotto da numerose reazioni metaboliche
- Fonti di Acetil-CoA
  - Decarbossilazione ossidativa del piruvato

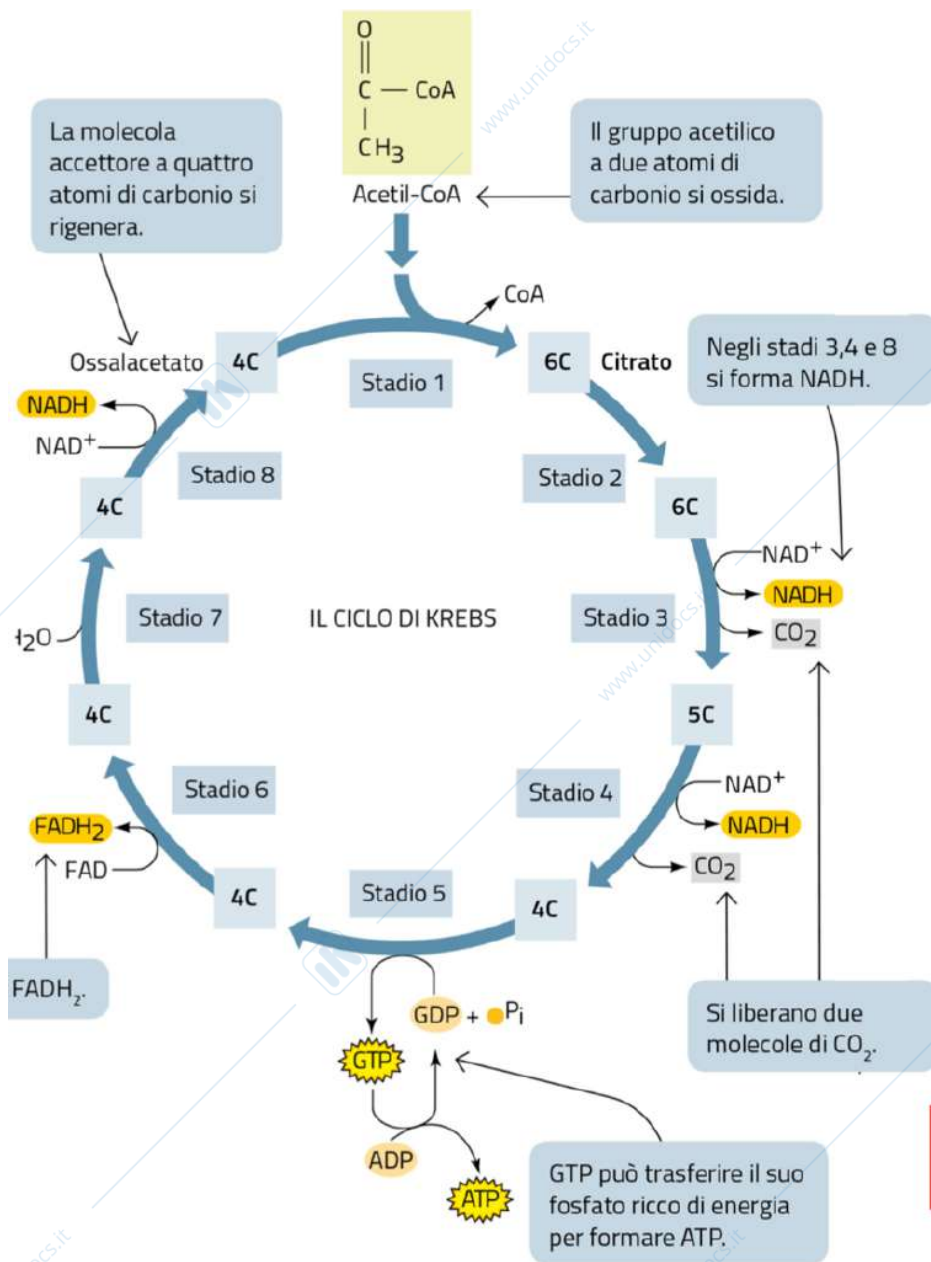


- Piruvato, prodotto dalla glicolisi, perde un atomo di carbonio, sotto forma di  $CO_2$ , e si lega al CoA
- Fuoriuscita  $CO_2$  e ossidazione contemporanea acido piruvico a formare l'acido acetico attivato ovvero l'Acetil-CoA, un acetato attivato dal legame tioestere con il CoA
- Acetil-CoA può provenire da metabolismo carboidrati, monosaccaridi attraverso glicolisi e successiva decarbossilazione ossidativa del piruvato
- Reazione estremamente controllata che coinvolge 5 diversi cofattori all'interno dell'enzima ovvero CoA, NADH, tiamina pirofosfato TPP, lipoato e FAD
- Reazione irreversibile che viene controllata all'interno delle cellule per evitare di sprecare piruvato quando ce n'è poco (scarsa alimentazione, ecc...)



- B-ossidazione
  - Processo che ne produce di più
- Catabolismo ossidativo degli amminoacidi in eccesso dopo transaminazione e/o deaminazione ossidativa, formano scheletro carbonioso che può essere trasformato in coa
- Tutti i nutrienti energetici, monosaccaridi, acidi grassi e amminoacidi, convergono verso produzione CoA che viene consumato come catabolita ricco di energia da cui la cellula può ricavare energia metabolica ha bisogno
- Non si formano molecole di ATP tranne in una reazione dove si forma GTP a livello del substrato, GTP è equivalente, da punto di vista energetico, a ATP. Idrolisi GTP può essere utilizzata per formare ATP
- Si formano 3NADH e 1FADH<sub>2</sub>
- Caratteristiche:
  - Noto come ciclo dell'acido citrico, o ciclo degli acidi tricarbossilici

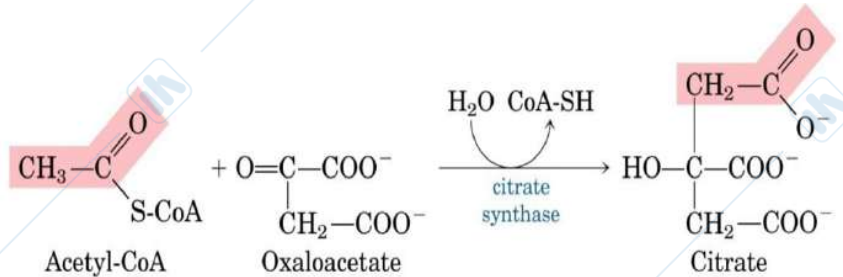
- Via metabolica circolare di 8 reazioni, 4 delle quali redox, si formano 4 coenzimi redox ridotti, 3 NADH e un FADH<sub>2</sub>
  - Nelle ossidoriduzioni abbiamo il massimo rilascio dell'energia e quindi è questo il modo con cui scheletri carboniosi provenienti da nutrienti energetici possono essere completamente ossidati, infatti vi è comparsa delle prime molecole di CO<sub>2</sub>, esempio più classico di respirazione cellulare
  - Respirazione cellulare del glucosio è glucosio+ossigeno → CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O; acqua l'abbiamo vista nella riduzione dell'ossigeno molecolare ad opera del NADH, la CO<sub>2</sub> nel ciclo di Krebs
  - Principale via metabolica di una cellula che respira è ciclo dell'acido citrico
- Via mitocondriale si svolge nella matrice mitocondriale
- Via catabolica centrale per tutte le cellule dotate di mitocondri (no GR)
  - Permette ossidazione completa degli scheletri carboniosi dei nutrienti energetici
- Strettamente aerobica, serve ossigeno per ossidare coenzimi redox, è una via aerobia
  - Coenzimi redox mitocondriali devono essere riossidati dall'O<sub>2</sub> nella CTE



## Enzimi

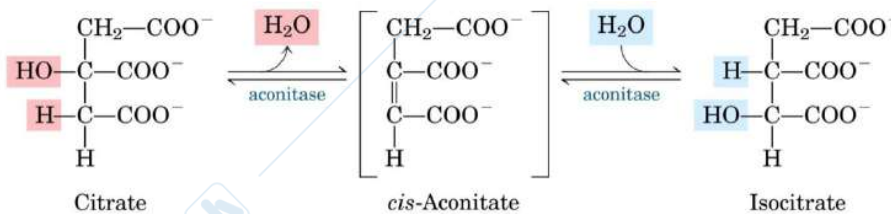
### 1. Citrato sintasi

- Irreversibile
- Condensa una molecola di Acetil-CoA con ossalacetato -> acido citrico
  - Acido tricarbossilico, 3 funzioni acide, un ossidrilico alcolico che rende molecola simmetrica, è achirale
- Ossalacetato chetoacido con 4C struttura ricorda Ala



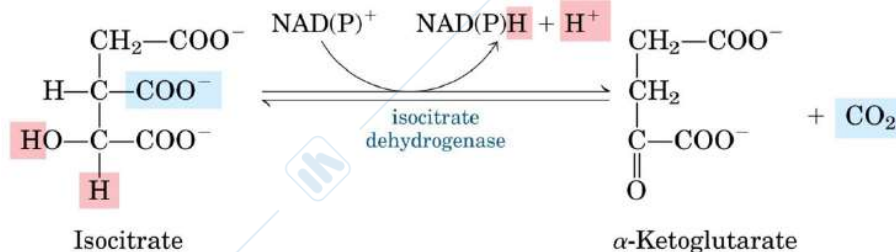
### 2. Aconitasi

- Reversibile
- Liasi, NO isomerasi
- Rende acido citrico asimmetrico quindi chirale -> isocitrato
- Media formazione doppio legame con cui enzima è in grado di spostare OH dalla posizione centrale verso gruppo carbossilico, possibilità di liberare il carbossile centrale, permette alla molecola di sganciare gruppo COOH sotto forma di CO<sub>2</sub>



### 3. Isocitrato deidrogenasi

- Prima reazione redox, decarbossilazione e ossidazione
- Deidrogenazione NAD-dipendente dell'isocitrato ad α-chetoglutarato con rilascio di CO<sub>2</sub>
- Isocitrato → α-chetoglutarato
  - Deriva da transaminazione del glutammato
- α-chetoglutarato si forma dalla decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato
- Reazione NAD dipendente
  - NAD ossida isocitrato e contemporaneamente fa uscire la prima molecola di CO<sub>2</sub> (COO<sup>-</sup> in posizione 2 che era stato liberato nella reazione precedente)
- Irreversibile, ogni volta che esce molecola di CO<sub>2</sub> si ha una forte liberazione di energia

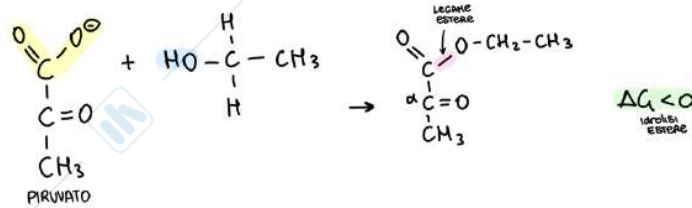


### 4. α-chetoglutarato deidrogenasi

- Deidrogenazione NAD-dipendente dell'α-chetoglutarato a succinil-CoA con rilascio di CO<sub>2</sub>
- Reazione NAD-dipendente, meccanismo simile a quello della piruvato deidrogenasi
  - α-chetoglutarato e piruvato sono entrambi α-chetoacidi
- Formazione succinil-CoA, composto ad alto trasferimento del fosfato perché c'è un legame tioestere

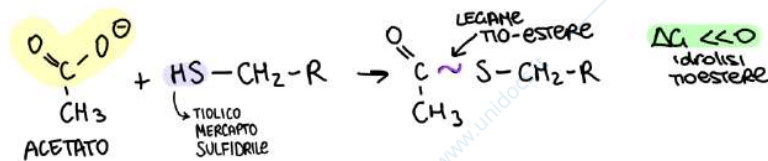
1. Legame tioestere, presente in Acetil-CoA, è un legame ad alta energia, a differenza del legame estere avente potenziale di trasferimento più basso
- d. Terzo esempio di enzima che è in grado di formare un legame fosfoanidridico a livello del substrato, è il legame tioestere che consente spostamento fosfato
- e. Immagine 1: piruvato + OH → legame estere (COOH + OH)

1.  $\Delta G < 0$

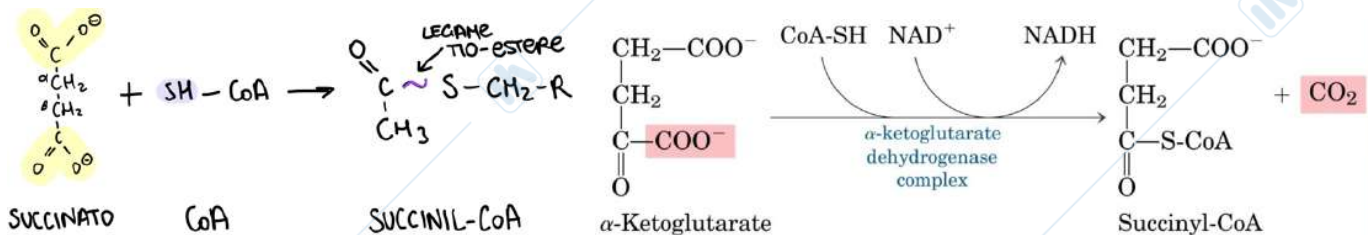


- f. Immagine 2: acetato + SH → legame tio-estere (perché composto che si addensa con acido è un tiolo e non un alcol)

1.  $\Delta G \ll 0$ , energia di idrolisi molto più negativa rispetto a estere

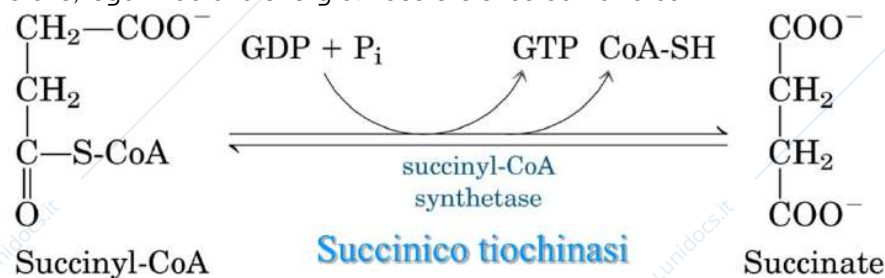


- g. Idrolisi legame tio-estere nel succinil-CoA può servire a sintetizzare un legame fosfoanidridico nel GTP di quella tappa
- h. Entra CoA, interviene NAD<sup>+</sup> che ossida α-chetoglutarato in succinil-CoA, esce molecola di CO<sub>2</sub>
- i. Succinato è acido bicarbossilico, (2 COO<sup>-</sup>) che reagisce con tiolo del coenzima A a formare un legame tio-estere



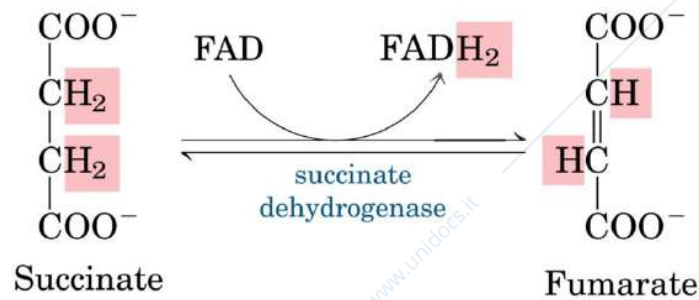
### 5. Succinil-Coa sintetasi

- a. Conversione del succinil-CoA a succinato e formazione di GTP per fosforilazione a livello del substrato, si rompe legame tioestere e CoA esce
- b. Legame tio-estere viene sfruttato da succinil-CoA sintetasi per formare una molecola di GTP che a sua volta potrà spostare il suo fosfato sull'ADP formando ATP
- c. Terzo esempio di enzima in grado di sintetizzare un legame fosfoanidridico a livello del substrato, è il succinil-CoA che è sufficientemente energetizzato per consentire lo spostamento del fosfato sul GTP
- d. Esce CoA e si forma succinato libero
- e. Processo va nella direzione di ripristinare l'intermedio iniziale, l'ossalacetato
- f. Tra ossalacetato e succinato, l'ossalacetato è più ossidato quindi il succinato deve essere ossidato, in particolare metilene CH<sub>2</sub> dovrà essere ossidato con paio di tappe redox, NAD e FAD
- g. Reversibile, legami ad alta energia: tioestere e fosfoanidridico



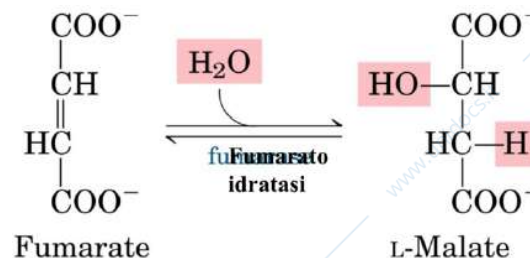
## 6. Succinato deidrogenasi

- Deidrogenazione FAD dipendente del succinato a fumarato
- Succinato viene deidrogenato, stessa reazione sia nel ciclo di Krebs che nella CTE (complesso II) quindi elettroni vanno direttamente a O<sub>2</sub>, e si forma fumarato
- Acido fumarico
  - Togliendo 2H ai due metileni si forma un doppio legame al centro, acido grasso bicarbossilico insaturo
  - Su quel doppio legame si aggiungerà molecola d'acqua
- Fa parte del complesso II della CTE
- Reversibile
- Riduzione di FAD a FADH<sub>2</sub>



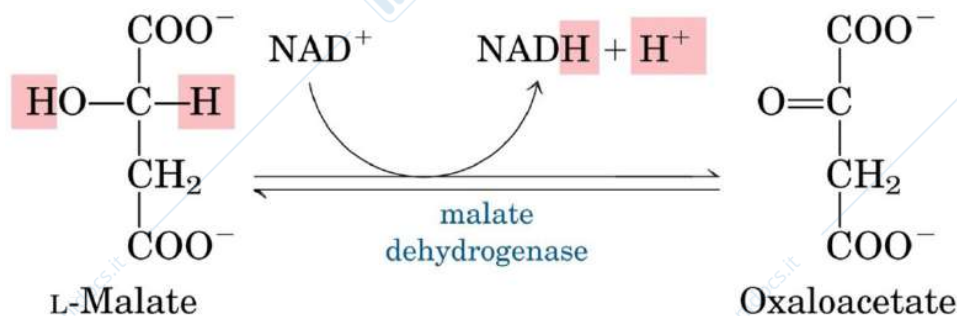
## 7. Fumarasi

- Idratazione del fumarato a L-malato
- Reversibile
- Su quel doppio legame si aggiunge molecola d'acqua, perché abbiamo bisogno di ossigeno per ossidare
- Si forma gruppo alcolico, acido L-malico è un acido bicarbossilico con una funzione alcolica in posizione 2
  - Lo troveremo anche nella gluconeogenesi e trasporto ossalacetato da mitocondrio a citoplasma
- Malato è ancora ridotto rispetto a ossalacetato



## 8. Malato deidrogenasi

- Deidrogenazione NAD-dipendente dell'L-malato a ossalacetato
- Gruppo alcolico trasformato in gruppo chetonico
- Riduzione NAD<sup>+</sup> a NADH, si produce terzo NADH, e si ripristina l'ossalacetato

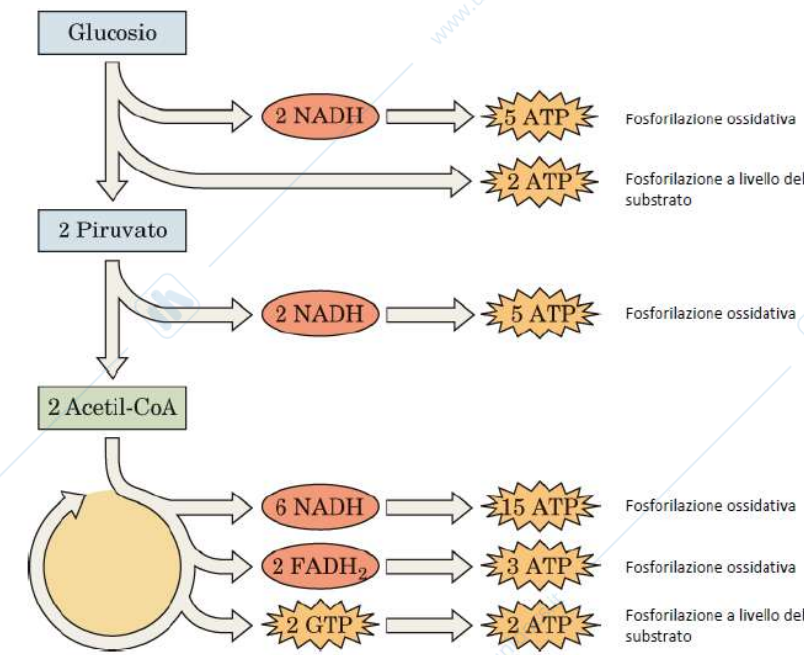


- Da una molecola di Acetil-CoA che contiene 2 carboni, gruppo metilico CH<sub>3</sub> e gruppo carbonilico C=O, i quali verranno ossidati a CO<sub>2</sub> nelle tappe della isocitrato deidrogenasi e dell'α-chetoglutarato deidrogenasi
  - Entrano due carboni, sotto forma di metile e carbonile, ed escono due carboni sotto forma di anidride carbonica CO<sub>2</sub>
- È un ciclo ossidativo in cui carbonio assume il suo massimo n.o.
- Per ogni ciclo abbiamo trasferimento di 4 coppie di elettroni, 8 elettroni totali, che vanno ad alimentare la CTE quindi a produrre abbastanza ATP da rifornire l'attività della cellula
- Ciclo nel suo complesso è irreversibile, unidirezionato
  - Sebbene vi siano reazioni reversibili
  - Quando molecola Acetil-CoA entra nel ciclo non ne può uscire se non sotto forma di CO<sub>2</sub>
- Via anfibolica
  - Non è solo catabolica ma anche anabolica perché produce metaboliti che vengono usati nei processi anabolici di sintesi
  - Da un lato produce energia metabolica mentre dall'altro produce precursori utilizzati per sintetizzare molecole più complesse
  - Intermedi sono:
    - Citrato: sintesi acidi grassi e steroli
    - α-chetoglutarato: transaminato a Glu che produce purine e Arg, Pro e Gln
    - Succinil-CoA: gruppo eme, porfirine
    - Ossalacetato:
      - Fosfoenolpiruvato PEP che poi sintetizza Gly, Ser, ecc... (gluconeogenesi)
      - Può essere transaminato a Asp da cui poi deriva Asn che produce pirimidine

### Resa energetica

- Produce molta più energia degli altri cicli
- Acetil-CoA + 3NAD<sup>+</sup> + FAD + GDP + Pi → CoA + 2CO<sub>2</sub> + 3NADH/H<sup>+</sup> + FADH<sub>2</sub> + GTP
- Per ogni Acetil-CoA che entra nella via si riducono 3NADH/H<sup>+</sup> + FADH<sub>2</sub> e si fosforila una molecola di GDP a formare due molecole di CO<sub>2</sub> e CoA
- Abbiamo una singola molecola di GTP per singolo Acetil-CoA completamente ossidato a CO<sub>2</sub>
- Dobbiamo aggiungere l'ATP proveniente dalla riossidazione dei coenzimi redox
  - Ossidazione 3NADH produce 2.5 x 3 = 7.5 ATP
  - Ossidazione 1FADH<sub>2</sub> produce 1.5 ATP
  - 1 GTP che equivale a 1 ATP
    - Nucleosidi difosfato chinasi hanno compito di mantenere costanti le concentrazioni di nucleotidi trifosfati
    - Se si accumula GTP nella cellula la reazione che l'enzima catalizza è
      - GTP + ADP = GDP + ATP
      - GTP trasferisce il suo fosfato alla ADP per formare ATP
      - AG=0 perché si forma e si rompe sempre un legame fosfoanidridico
    - Oppure ATP + NDP = ADP + NTP (sarebbe reazione generale dove ATP trasferisce fosfato ad un nucleotide difosfato come GDP per formare GTP e ADP)
  - TOTALE= (7.5+1.5+1) 10 ATP
    - Per ogni molecola di acetile si producono 10 ATP
    - Dalla glicolisi si formano 2 Acetil-CoA perché si formavano 2 piruvati, i quali venivano decarbossilati con piruvato deidrogenasi si trasformavano in Acetil-CoA
  - Ogni 2 Acetil-CoA si producono quindi 20 ATP
    - Glicolisi aerobia ne produce 7
    - Durante trasformazione piruvato si producono due molecole di NADH le quali, attraverso la fosforilazione ossidativa, produrranno ognuna 2.5 ATP
  - SOMMA TOT: 7 (glicolisi) + 10x2 (ciclo di Krebs) + 2.5x2 (riossidazione NADH) = 7+20+5= 32 ATP

- Resa in ATP dalla glicolisi, dalla riossidazione del NADH e da ciclo di Krebs



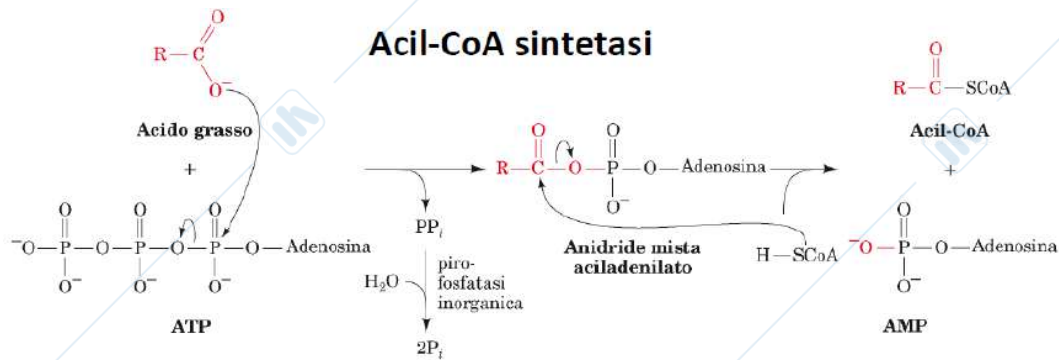
### β-ossidazione degli acidi grassi

- Processo che sprigiona molta più energia del catabolismo dei monosaccaridi
  - Monosaccaridi sono parzialmente ossidati
  - Acidi grassi sono fortemente ridotti, unica parte ossidata è COOH
  - Loro metabolismo libera la maggior parte dell'energia di cui un organismo ha bisogno
- Serve per produrre ATP
- Via metabolica a spirale
- Via mitocondriale
  - Si svolge nella matrice mitocondriale
  - Solo cellule aventi mitocondri
- Ossida acidi grassi ad acetil-CoA, riducendoli, ha una certa quantità di enzimi redox
- Via aerobia, serve ossigeno per ossidare coenzimi redox
  - Soddisfa fabbisogno energetico di cuore, muscoli scheletrici e soprattutto fegato, e di molti altri tessuti con un metabolismo aerobico
  - Acidi grassi non possono essere usati come carburanti metabolici né dai neuroni (acidi grassi non in grado di attraversare barriera emato-encefalica, neuroni non riescono a recuperarli dal sangue) né dai globuli rossi (assenza dei mitocondri)
- Acidi grassi sono ossidati mediante una sequenza di 4 reazioni in cui atomo C β è trasformato in un gruppo chetonico C=O
  - Come ossidazione succinato a malato (?) deidrogenazione (FAD) all'inizio, idratazione e deidrogenazione (NAD)
  - Ossidazione è seguita da rottura del legame tra gli atomi di C alfa e β ad opera di una tiolasi (liasi)

#### Fase preparatoria

- Membrana mitocondriale interna è estremamente selettiva (dipende da trasportatori presenti) è impermeabile agli acidi grassi, naturalmente presenti nel sangue, con catene >12C
  - Quelli con catene minori <12 C possono passare senza essere processati
- Quando gli acidi grassi entrano nella cellula entrano nel citoplasma, ma β-ossidazione avviene nel mitocondrio, dunque cellula ha bisogno di trasformarli in modo che possano passare
- Attivazione:**
  - Acido grasso nel citoplasma viene attivato attraverso una reazione chimica catalizzata dall'**Acil-CoA sintetasi**, essendo sintetasi ha bisogno di energia metabolica quindi ATP

- o Acido grasso + ATP + CoA → Acil-CoA + AMP + 2P<sub>i</sub>
- o Acido grasso reagendo con ATP e CoA forma Acil-CoA + AMP + 2 fosfati
- o Forma attivata degli acidi grassi è Acil-CoA
- o Attivazione è particolarmente dispendiosa perché richiede il consumo di ben due legami fosfoanidridici (ATP → AMP + 2P<sub>i</sub>) per attivare l'acido grasso
- o Acil-CoA però ancora non può attraversare membrana mitocondriale



### Trasporto citoplasma-matrice mitocondriale

- Acil-CoA non è ancora in grado di attraversare mmi
- La mmi è impermeabile anche agli Acil-CoA grassi
- Acil-CoA nel citoplasma può seguire due strade:
  - o Usato per sintetizzare fosfolipidi di membrana o trigliceridi, dipende dalla cellula
    - Cellula mammaria trigliceridi per latte
    - Fegato trigliceridi come fonte energia metabolica
  - o Se cellula ha bisogno di sintetizzare Acil-CoA come fonte di energia, non avendo bisogno di accumulare lipidi, si attivano processi di biosegnalazione di controllo delle vie metaboliche, che destinano l'Acil-CoA ad essere catabolizzato attraverso la β-ossidazione
    - Sistema della 'shuttle carnitina': per essere importato nel mitocondrio l'Acil-CoA trasferisce il suo acile attivato alla L-carnitina, un amminoacido non standard necessario per il catabolismo ossidativo degli acidi grassi
    - Tale reazione è operata dalla **carnitina acil transferasi**, un enzima con due isoforme: una situata sulla mme (CAT1) e una sulla mmi (CAT2)
- Punto chiave per il destino dell'acido grasso
  - o Se acido grasso non entra nel mitocondrio non viene catabolizzato, se entra viene ossidato

### β-ossidazione

- Consiste nella ripetizione di 4 reazioni che si susseguono che alla fine del ciclo rimuovono dallo scheletro del carbonio un Acil-CoA e accorciano la catena dell'acido grasso legato all'Acil-CoA di una doppia unità di carboni
  - o Ogni volta che spirale si completa acido grasso diventa più corto di 2 carboni e questi 2 carboni formano l'acetil-CoA
- Ossidazione perché vi sono almeno due ossidazioni, una di due metileni e una di un gruppo alcolico, che devono trasformare un carbonio β metilenico ridotto in un carbonio ossidato chetonico

#### 1. Acil-CoA deidrogenasi

- Acil-CoA: coa, S zolfo legato con legame tio-estere alla catena acilica dell'acido grasso, R catena alifatica
- Ossidazione carbonio α attraverso deidratazione FAD dipendente di quei due carboni
- Deidrogenazione produce una molecola di FADH<sub>2</sub>, si forma doppio legame → **enoil-CoA**
- Dove 'en' sta per doppio legame C=C, 'oil' per gruppo carbossilico alifatico, CoA

## 2. Enoil-CoA idratasi

- Doppio legame pronto per accettare addizione molecola d'acqua, ovvero idratazione
- Si forma  $\beta$ -idrossiacil-CoA, doppio legame si trasforma da ene ad alcol,  $\beta$ -idrossi derivato

## 3. $\beta$ -idrossiacil-CoA deidrogenasi

- $\beta$ -idrossiacil-CoA viene ossidato da reazione redox NAD dipendente
- Si forma molecola di NADH/H<sup>+</sup>
- Carbonio man mano che la reazione va avanti diventa piú ossidato, da doppio legame a carbonio chetonico
- Si forma  $\beta$ -chetoacil-CoA

## 4. Tiolasi

- Utilizza coa mitocondriale e determina scissione tiolitica (rottura legame C-C con addizione gruppo tiolico = tiolisi) scinde legame C-C che lega carbonio  $\beta$  con il resto della struttura dell'acido grasso
- Scindendo legame si libera parte iniziale CoA e si forma la prima molecola di acetil-CoA e acido grasso che ha catena laterale di due carboni ovvero Acil-CoA (n-2 atomi di C)

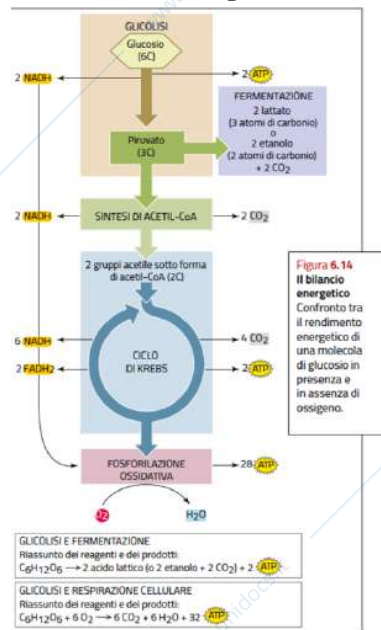
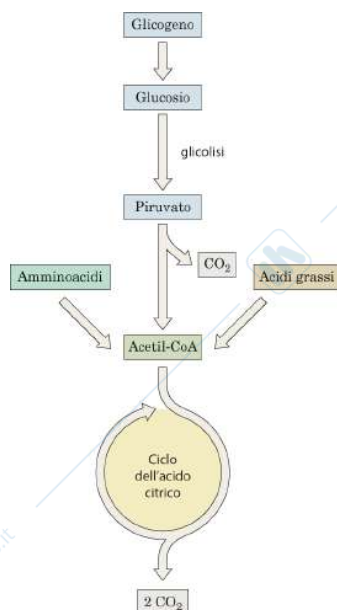
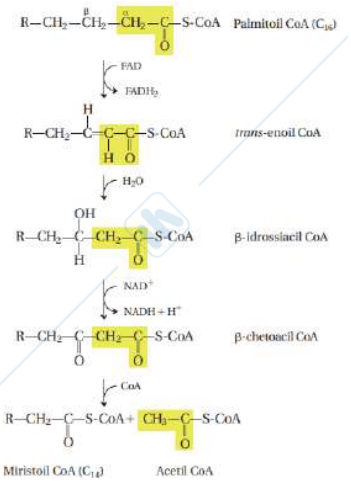
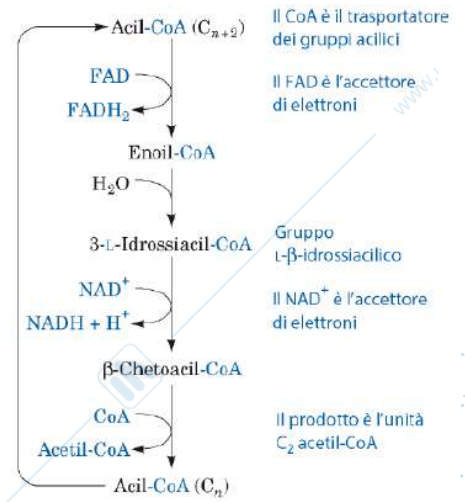
- Acil-CoA tornerà alla reazione iniziale e ripeterà ciclo n-volte, quante volte sono i legami chimici che devono essere rotti per formare alla fine soltanto molecole di acetil-CoA

- Acido palmitico contiene 16 atomi di carbonio con 7 doppi legami

- Dobbiamo ripetere ciclo 7 volte
- Per ogni ciclo si forma una molecola di FADH<sub>2</sub> e una di NADH
- Si formano 7 FADH<sub>2</sub> e 7NADH

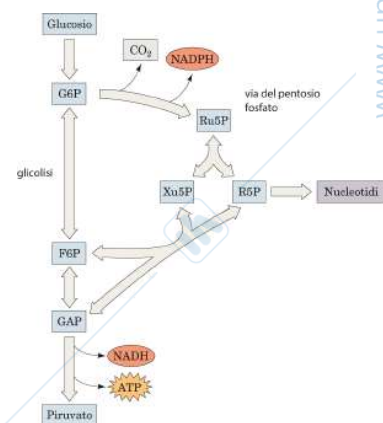
### • Resa finale $\beta$ -ossidazione dell'acido palmitico

- Palmitato + 2 ATP + 7 NAD<sup>+</sup> + 7 FAD → 8Acetil-CoA + 2 ADP + 2 Pi + 7 NADH/H<sup>+</sup> + 7 FADH<sub>2</sub>
- 8 Acetil-CoA verranno poi ossidati da ciclo di Krebs, altra energia ancora
- Da 7 NADH abbiamo 2.5x7= 17.5 ATP
- Da 7 FADH<sub>2</sub> abbiamo 1.5x7= 10.5 ATP
- Ma dobbiamo sottrarre i 2 ATP usati inizialmente per l'attivazione dell'acido grasso
- SOMMA: 17.5 ATP + 10.5 ATP - 2 ATP = 28-2= **26 ATP**
- La glicolisi produce 7 ATP, ma dipende anche da dimensioni, glucosio 6C, acido palmitico 16C



## Via dei pentosi fosfato

- Pentosi fosfato sono zuccheri a 5C fosforilato
- Via catabolica citosolica e ubiquitaria
- Fondamentale perché genera il coenzima redox NADPH nella sua forma ridotta e zuccheri pentosi (5-4 atomi di carbonio) che sono importanti metaboliti per le vie anaboliche
- Il precursore di questa via è un intermedio della glicolisi ovvero il G6P
- Attiva nei tessuti che producono lipidi (fegato, tessuto adiposo, ghiandola mammaria) e che hanno bisogno di produrre potere riducente per contrastare gli effetti ossidativi dei ROS, specie reattive dell'ossigeno
  - Globuli rossi per contrastare lo stress ossidativo, dovuto alla presenza dell'ossigeno legato all'emoglobina, devono continuamente produrre NADPH per difendersi dai danni causati da queste specie reattive
- **Fase ossidativa**, irreversibile
  - Produce NADPH e rilascia nel citoplasma una molecola di anidride carbonica
  - Prodotti:
    - Ribulosio-5P (chetopentoso), analogo del ribosio (aldopentoso) componente essenziali nucleotidi, RNA ma anche precursore dei desossinucleotidi perché da esso si forma il deossiribosio
    - Eritrosio-4P (aldotetroso) che è precursore
      - Amminoacidi aromatici attraverso la via dello scichimato
      - Vit. B6 (PLP, piridossalfosfato)
- **Fase non ossidativa**
  - Scheletro di carboni che si ottiene dalla ossidazione parziale del G6P viene rimaneggiato per produrre degli zuccheri a 6-5-4-3 atomi di C
- NADPH
  - Coenzima redox
  - Coenzimi niacidici, nicotinamidici
  - Provengono da metabolismo niacina (vit.B3), la cui carenza determina pellagra
  - Controllo dell'omeostasi redox intracellulare
    - Stato redox gruppi SH delle Cys delle proteine, li mantiene ridotti
    - Ripristino di glutatione nella sua forma ridotta (GSH)
      - Glutatione è tripeptide fondamentale per detossificare cellula da formazione di perossidi organici che sono la causa della maggior parte dei danni cellulari necrotici che portano all'emolisi dei GR quando NADPH scarseggia
  - Ruolo nelle riduzioni biosintetiche
    - Somiglia a contrario  $\beta$ -ossidazione, dove si riducono doppi legami, gruppi chetonici come nella biosintesi degli acidi grassi, quindi avremmo bisogno di trasportatore di elettroni (FINE LEZIONE 11, 19.04.21)
- Caratteristiche:
  - Anche chiamata "shunt" (deviazione) della glicolisi
    - Inizia con un intermedio della glicolisi, il G6P, e si ricongiunge su altri intermedi della glicolisi, a livello del Fru-6P e GAP
  - Via citosolica: enzimi sono citosolici
  - Via catabolica centrale per tutte le cellule, assenza porta a danni irreversibili
  - NON richiede ossigeno per ripristinare potere ossidante NADP+
  - Produce una molecola di CO<sub>2</sub> per ogni molecola di G6P, ossida in modo importante il glucosio, non produce tanto CO<sub>2</sub> quanto il ciclo di Krebs
    - Solo l'atomo di carbonio dell'aldeide subisce ossidazione e viene rilasciato come anidride carbonica

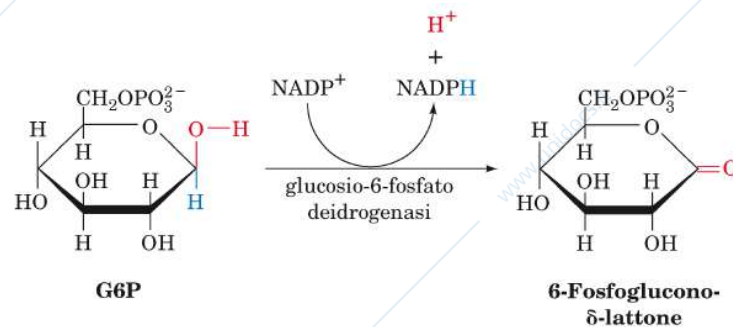
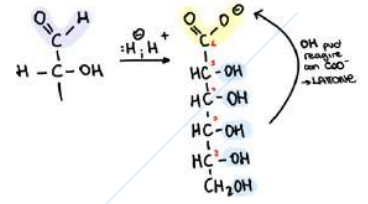


**Fase ossidoriduttiva o redox**, irreversibile

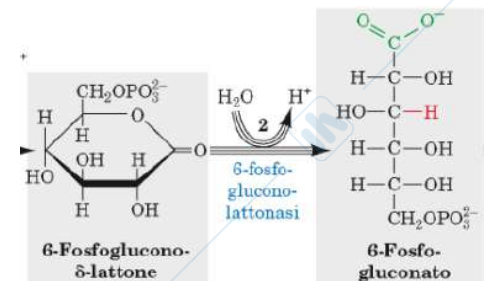
Consta di 3 reazioni al termine delle quali di producono 2 molecole di NADPH, una molecola di CO<sub>2</sub> e (6 carboni - 1 ne rimangono 5) una di ribulosio-5P, per ogni molecola di G6P ossidato

**1. Glucosio-6fosfato deidrogenasi G6DPH**

- Reazione irreversibile che controlla la velocità della via
  - Velocità dipende dal rapporto tra le forma ridotta e ossidata del NADP
  - Se cellula ha quantità di NADPH prevalente la via si rallenta
  - Se aumenta forma ossidata, aumenta la velocità
  - C'è un controllo a feedback da prodotto, controllando enzima controlla velocità
- Enzima segnapasso regolatorio
- Deidrogenazione NADP-dipendente del gruppo aldeidico del Glc-6C
- Si forma un lattone ovvero un estere ciclico
- Ossidando aldeide otteniamo acido carbossilico
- Gruppo carbossilico reagisce con gruppo alcolico, si chiude estere su sé stesso formando un anello e si forma **6-fosfogluconolattone** (emiacetale ossidato)
- Enzima codificato da un gene tra i più mutati nella popolazione umana, variazione comporta ridotta attività -> favismo, sensibilità a farmaci, entrambi causano emolisi
  - Alcuni medicinali sono sconsigliati a persone che hanno carenza di G6P
  - NADPH è fondamentale per mantenere l'integrità strutturale delle membrane dei globuli rossi
  - Se enzima è carente, si produce poco NADPH e globulo rosso ha possibilità di contrastare effetti ossidativi sulla membrana ridotti questo causa debolezza intrinseca del globulo rosso che può andare incontro da emolisi se ulteriormente sollecitato da stimolo che ne aumenta lo stress ossidativo come assunzione fave o farmaci
  - È molto diffuso tra la popolazione umana perché soggetti che avevano variante avevano un vantaggio selettivo contro la malaria
  - Zanzara anofele con plasmodium falciparum, parassita è sensibile a stress ossidativo e si riproduce nei globuli rossi, i globuli rossi deboli rispetto ad altri sono avvantaggiati perché più resistenti (vanno incontro ad emolisi e non lasciano sopravvivere parassita)

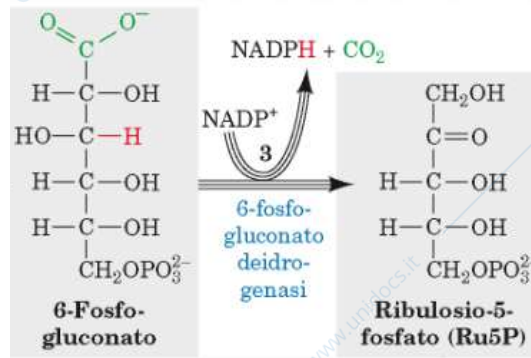
**2. 6-fosfoglucono-lattoneasi**

- Idrolasi
- 6-fosfogluconolattone + H<sub>2</sub>O → gluconato-6fosfato
- Idrolizza lattone, enzima taglia estere interno che ha un gruppo carbossilico al posto del gruppo aldeidico dunque non è più uno zucchero ma un acido gluconico ovvero un derivato ossidato del G6P
- Idrolizza legame lattonico del 6-fosfogluconolattone, linearizzarizzazione del **gluconato-6fosfato**
- Reazione reversibile, può riformarsi il lattone per condensazione

**3. Fosfogluconato deidrogenasi**

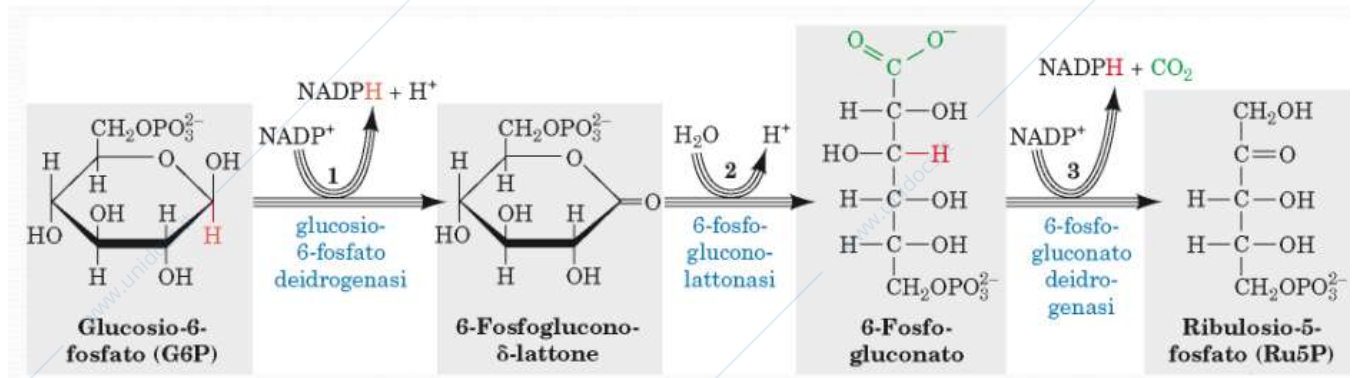
- Irreversibile

- b. Deidrogenazione NADP-dipendente del gruppo carbossilico del gluconato-6P
- c.  $\text{Gluconato-6-fosfato} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{ribulosio-5P} + \text{NADPH}/\text{H}^+ + \text{CO}_2$
- d.  $\text{NADP}^+$  nella sua forma ossidata
- e. Carbonio del carbossile  $\text{COOH}$  non è massimamente ossidato, lo è il carbonio della  $\text{CO}_2$ , estrazione di un idruro da parte di  $\text{NADP}^+$
- f. Molecola si trasforma nel primo zucchero fosfato ovvero il **ribulosio-5fosfato**
- g. Forma anidride carbonica citoplasmatica che dovrà essere rapidamente trasformata in qualcosa di più solubile ovvero in acido carbonico che poi si dissocia in ione bicarbonato
  - i. Può essere utilizzato per produrre urea, sintesi degli acidi grassi, tampone per mantenere pH



### Reazione netta

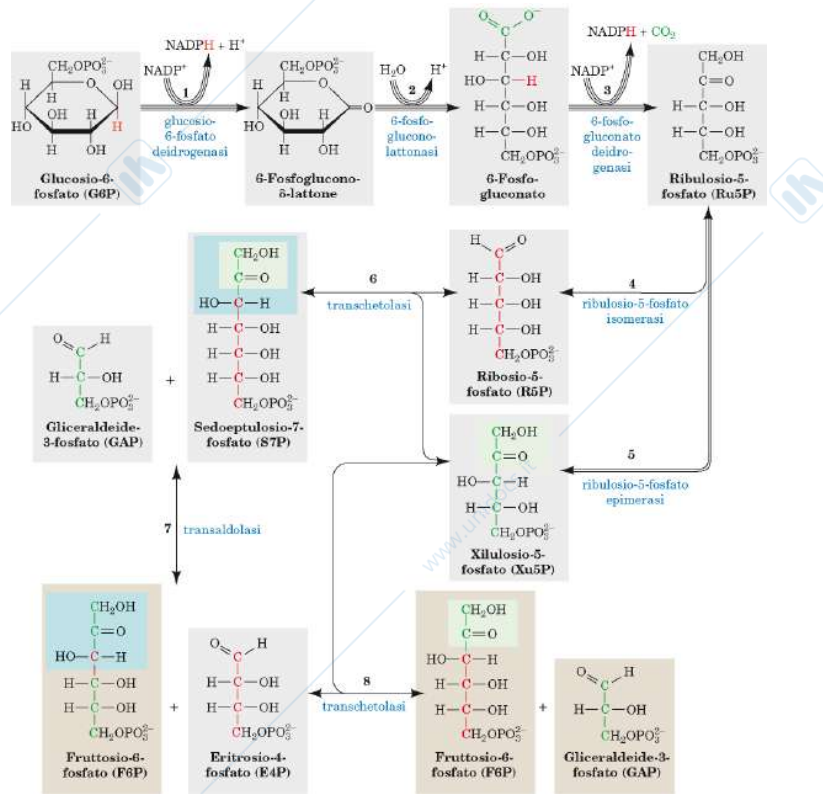
- $\text{Glc} + 2\text{NADP}^+ \rightarrow \text{R5P} + \text{CO}_2 + 2\text{NADPH}/\text{H}^+$



### Fase non redox, reversibile

- Ribulosio-5fosfato (Ru5P) può essere reversibilmente convertito in xilulosio-5fosfato o ribosio-5fosfato (convertendo chetoso in aldoso), zuccheri a diversa lunghezza di catena
  - Intermedi possono spostarsi verso formazione di nucleotidi (R5P) o reindirizzati all'interno della glicolisi per continuare il metabolismo dello scheletro di carbonio che è stato parzialmente ossidato
- Rimaneggiamento ad opera di transchetolasi e aldolasi ha lo scopo di ottenere composti utili per la cellula
  - Si forma GAP (deriva dai 3C sotto dello Xu-5P) che può essere reimmessa nella glicolisi, come anche Fru-6P
  - Eritrosio-4P è importante, precursore degli amminoacidi aromatici e vit.B6
- Se cellula non ha bisogno di sintetizzare nucleotidi o amminoacidi sintetizza

- o Fru-6P e GAP che vengono reimmessi nella glicolisi per produrre ATP e piruvato
- Se cellula ha bisogno di sintetizzare metaboliti precursori sintetizza
  - o Ribosio-5P (nucleotidi) e eritrosio-4P
- Consta di diverse reazioni di trasferimento di gruppi aldeidico e chetonici, ad opera di transchetolasi o transaldolasi, che rimangono lo zucchero a 5C, formando ribulosio-5fosfato, ecc...



# BIOCHIMICA DEI SISTEMI

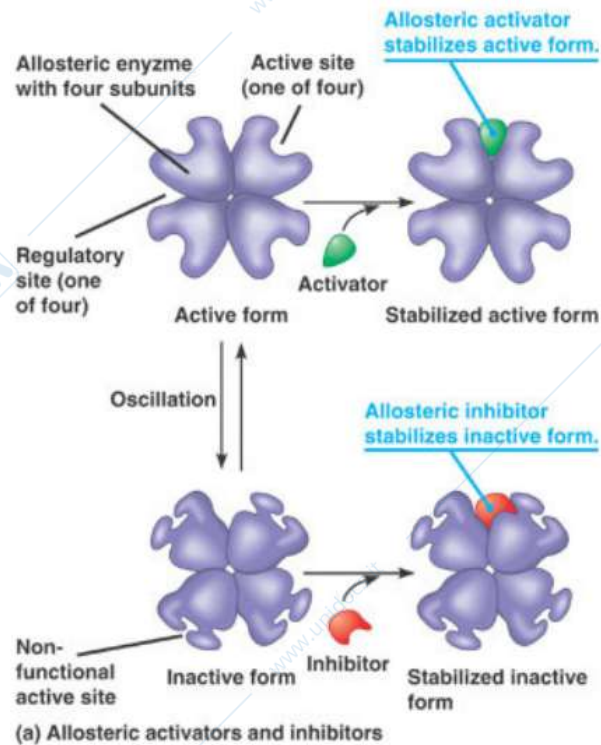
## Sistemi di regolazione enzimatica

La maggior parte degli enzimi, che seguono la cinetica di Michaelis-Menten, catalizzano reazioni reversibili ( $\Delta G=0$ ) non possono essere utilizzate per compiere lavoro chimico e decidere la direzione della via metabolica, almeno una tappa però è irreversibile e catalizzata da un enzima regolatorio segnapasso che deve essere regolato attraverso vari modi

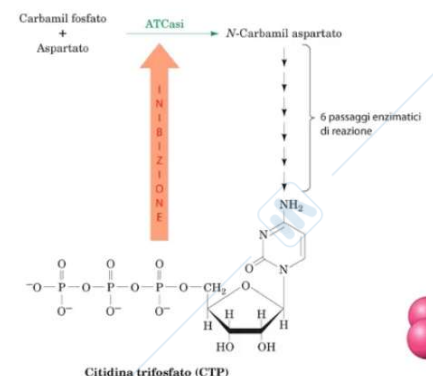
### Ligando-mediata (INIZIO LEZIONE 12, 20.04.21, 35:00)

- Meccanismo di controllo ligando-mediato o allosterico
- Facendo interagire enzima con ligandi specifici che interagendo con l'enzima oligomero (costituito da più subunità) possono influenzare altre subunità non coinvolte nel legame
- Enzimi segnapasso sempre oligopeptidi, costituiti da più subunità, struttura quaternaria, possibilità di modificare conformazione, come emoglobina cooperatività di legame
- Legame di una subunità influenza sito di legame di un'altra subunità
- Meccanismo più rapido
  - Frazioni di secondo
  - Possibilità di scontrarsi con molecole
- **Inibitori competitivi**
  - Somigliano a substrati specifici dell'enzima e competono con il substrato per formare il complesso ES, legano sito catalitico
  - Non cambiano  $V_{max}$
  - Aumentano  $K_m$
- **Inibitori non competitivi**
- **Misti**
  - Non si legano stabilmente e irreversibilmente all'enzima ma tendono a legarsi all'enzima in relazione alla loro affinità per l'enzima stesso in relazione alla loro concentrazione
- **Irreversibili**
  - Formano degli addotti covalenti stabili con l'enzima, inattivandolo
  - Esempi:
    - Aspirina: cox
    - Penicilline: traspeptidasi
    - Insetticidi: acetilcolinesterasi (addotto stabile con Ser del sito catalitico)
    - Gas nervini: acetilcolinesterasi
- **Modificazione allosterica**
  - Positiva: favorisce forma R, tendono a stabilizzarla, attivatori allosterici, R è forma attiva nella trasformazione del substrato
  - Negativa: favorisce forma T
  - Effettori allosterici possono essere positivi o negativi e modificano l'attività dell'enzima ovvero la  $k_{cat}$  e la  $V_{max}$  a cui possono trasformare i substrati
  - **Enzimi allosterici**
    - Molecole la cui concentrazione la cellula controlla
    - Esempio: quantità effettore allosterico nella glicolisi (consuma glucosio) e nella gluconeogenesi (produce glucosio)
      - Avvengono nella stessa cellula ma non devono avvenire contemporaneamente perché si creerebbe un ciclo futile, non produce nulla se non inutile dispendio di energia (idrolisi ATP)
    - Controllano equilibrio di enzima allosterico
    - Segnapasso/regolati
    - Esempi: **aspartatotranscarbamilasi, glicogenofosforilasi, glicogenosintasi**
    - Multimerici: due o più unità
      - Sito attivo è il solco poi c'è sito allosterico dove si legano gli effettori allosterici

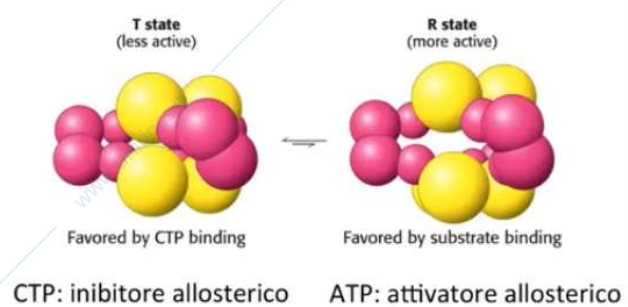
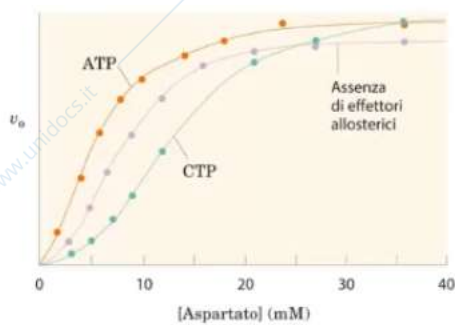
- Verde è effettore allosterico positivo si lega e stabilizza la forma R che è attiva nella conversione del substrato



- Senza modulatori enzimi oscillerebbero tra forma R e T (sx), equilibrio conformazionale favorisce forma T perché termodinamicamente più stabile, non è particolarmente attivo in assenza di modulatori
- Rosso è effettore allosterico negativo o inibitore allosterico, si lega a sito presente solo nella forma T, stabilizza forma T
- Dipende da concentrazione effettori e dallo stato dell'enzima
- Equilibrio allosterico
  - Forma R: più attiva, meno stabile
    - Effettore positivo sposta equilibrio verso forma R
  - Equilibrio conformazionale: normalmente favorisce forma T perché termodinamicamente più stabile
  - Forma T: meno attiva, più stabile, di solito in questa forma
    - Effettore negativo sposta equilibrio verso forma T
- Enzima regola presenza o assenza inibitore/effettore allosterico?
- Biosintesi delle pirimidine: inibizione retroattiva dell'aspartato transcarbamilasi
  - Via anabolica di sintesi, investe molta energia, ha 7 reazioni, da 2 a 7 consumano energia, punto di controllo della velocità è all'inizio
  - Aspartato transcarbamilasi è l'enzima segnapasso della via di produzione dei nucleotidi pirimidinici, fondamentali alla cellula per la proliferazione cellulare
  - Enzima allosterico è costituito da più unità ed esiste un equilibrio conformazionale tra la forma T e la forma R
  - Curva che esprime la velocità dell'enzima in funzione della concentrazione dei suoi substrati
    - In assenza di modulatori (viola) è sigmoide
    - Per aumentare velocità senza aumentare la concentrazione si deve usare un effettore allosterico positivo ovvero l'ATP



- Effettore allosterico purinico, deve esserci uguale numero di purine e pirimidine per poter replicare DNA
- Se aumentano purinici è indizio di sbilancio di nucleotidi purinici rispetto ai pirimidinici
- ATP si lega a forma R e modifica caratteristiche cinetiche, curva si sposta verso sinistra e a parità di concentrazione di substrato la velocità aumenta
- Se si produce tanta citidina trifosfato (CTP), si usa lo stesso prodotto finale della via per inibire in modo allosterico l'enzima che lo produce → meccanismo di retroazione, **feedback negativo**, prodotto della via retroagisce sull'enzima che lo produce e inibisce produzione, smette di sprecare energia perché ha prodotto la quantità di enzima necessaria
  - CTP stabilizza forma T meno attiva, a parità di substrato diminuisce la velocità (curva a dx)
- Enzima ha come substrati aspartato e carbamamil fosfato



## Covalente

- Modificazione covalente dell'enzima segnapasso può avvenire in modo reversibile o irreversibile
- Un gruppo chimico si lega e aumenta o riduce attività
- Tempi brevi ma non come ligando-mediato, secondi/minuti, servono anche enzimi perché legami devono formarsi e rompersi

## Reversibile:

Ciclo di fosforilazione e defosforilazione dell'enzima bersaglio

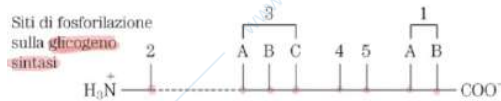
- Fosforilazione catalizzata da **chinasi** che sono modificanti dello stato di fosforilazione
  - Trasferiscono fosfato da ATP ad un particolare residuo dell'enzima target
  - Esempi (RICORDA)
    - **PKA, PKB, glicogenofosforilasi chinasi, PKSI** protein chinasi sensibile all'insulina, **GSK3** glicogenosintasi chinasi 3
  - Sono chinasi, quindi trasferasi, che fosforilano
    - Ser e Thr, residui aminoacidici aventi un gruppo alcolico, riconosciute da **serina/treonina chinasi**
    - Tyr, aminoacido con ossidril fenolico riconosciute da **tirosina chinasi**
  - Sequenze consenso
    - Le diverse protein chinasi
    - A, B, C riconoscono sulla proteina target particolari sequenze consenso con Ser e Thr vicine ad una particolare sequenza di aminoacidi, sono serina/treonina chinasi
    - Questo fa sì che le chinasi fosforilino proteina nella regione giusta

- Insulin receptor chinasi è una Tyr chinasi, bersaglio è Y quindi tirosina, capacità di riconoscimento è ancora più elevata, fosforila solo le tirosine che abbiano questo intorno di aminoacidi

**TABLE 6-10 Consensus Sequences for Protein Kinases**

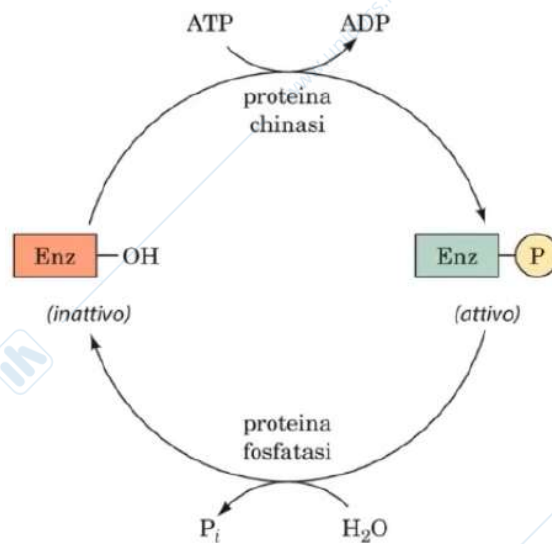
Protein kinase	Consensus sequence and phosphorylated residue*
Protein kinase A	-x-R-[RK]-x-[ST]- <b>P</b>
Protein kinase G	-x-R-[RK]-x-[ST]-x-
Protein kinase C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Protein kinase B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca <sup>2+</sup> /calmodulin kinase I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca <sup>2+</sup> /calmodulin kinase II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Myosin light chain kinase (smooth muscle)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Phosphorylase b kinase	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Cyclin-dependent protein kinase (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Casein kinase I	-[STp]-x(2)-[ST]-B <sup>+</sup>
Casein kinase II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
β-Adrenergic receptor kinase	-[DE](n)-[ST]-x(3)
Rhodopsin kinase	-x(2)-[ST]-E(n)-
Insulin receptor kinase	-x-E(3)-Y-M(4)-K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
Epidermal growth factor (EGF) receptor kinase	-E(4)-Y-F-E-L-V-

- Glicogeno sintasi** è enzima segnapasso della sintesi di glicogeno, se estendiamo sequenza primaria ci accorgiamo che vi sono diversi punti di fosforilazione, ve ne sono 8, su cui possono agire le varie chinasi



Proteina chinasi	Siti di fosforilazione	Grado di inattivazione della sintasi
Proteina chinasi A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteina chinasi G	1A, 1B, 2	+
Proteina chinasi C	1A	+
Proteina chinasi calcio/calmodulina-dipendente	1B, 2	+
Fosforilasi chinasi b	2	+
Caseina chinasi I	Almeno 9 siti	++++
Caseina chinasi II	5	0
Glicogeno sintasi chinasi 3	3A, 3B, 3C	+++
Glicogeno sintasi chinasi 4	2	+

- A seconda della chinasi che la cellula possiede e che viene attivata, avremo un profilo di fosforilazione differente ed enzima sarà più attivo o meno attivo a seconda del particolare meccanismo di controllo
  - Fosforilazione non può solo bloccare ma anche attivare, fosforilando siti differenti si hanno azioni differenti
- Defosforilazione catalizzata da **fosfatasi**
  - Idrolizzano fosfo-amminoacidi
  - Rimuovono fosfato aggiunto dalle chinasi sull'enzima target, lo defosforilano, lo ripristinano alla forma non modificata
  - Fosfatasi antagonizzano chinasi
  - Riconoscono fosfato sull'enzima modificato e idrolizza il legame fosfoestere (entra acqua ed esce fosfato) e ripristina l'enzima nella sua forma non modificata
  - OH dell'enzima inattivo può appartenere a Thr/Ser o Tyr
    - Esempi
      - Proteina fosfatasi 1 PP1**
      - Fosfodiesterasi PDE**
        - Sono idrolasi che rimuovono legame fosfoestere

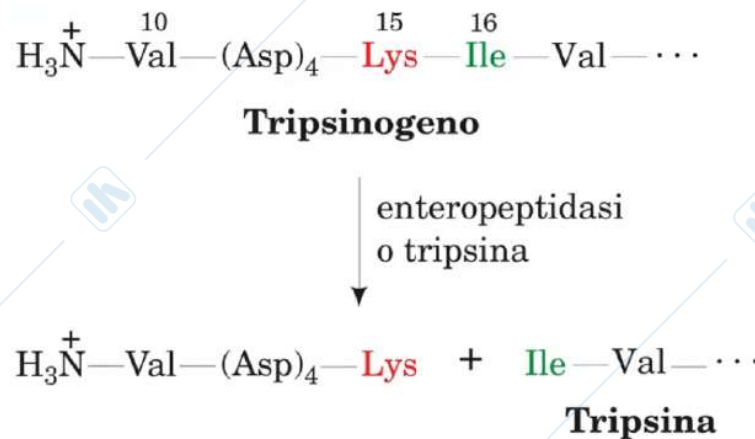


## Irreversibile

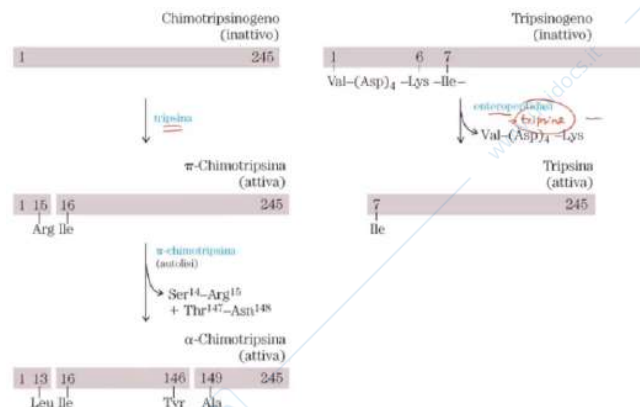
### Taglio proteolitico

- Zimogeni sono enzimi nella loro forma inattiva, normalmente enzimi digestivi ma anche quelli coinvolti nella coagulazione del sangue (emostasi)
  - Vengono prodotti in forma inattiva e possono essere attivati solo tramite un taglio di una particolare regione
  - Esempi:
    - Pancreatici: digestione macronutrienti
      - Sono proteasi
      - **Tripsinogeno** (forma inattiva pepsina), **procarbossipeptidasi**, **chimotripsinogeno** e **prolelastasi**
    - Ematici
      - Inattivi finché non serve processare fibrinogeno per formare i coaguli di fibrina
      - **Fattore IX** (proteasi), **procarbossipeptidasi** (forma legami isopeptidici, serve per stabilizzare le fibre di fibrina che si formano), **protombina** (enzima proteolitico)
    - Gastrici
      - **Pepsinogeno** per digestione proteine è prodotto dalle cellule della mucosa gastrica e attivato in modo autoproteolitico grazie all'ambiente acido dello stomaco
- Meccanismo attivazione per taglio proteolitico controllato
  - Attivazione zimogeni pancreatici proteolitici che si occupano di completare la digestione delle proteine
  - Pancreas esocrino li produce in forma inattiva, altrimenti avviene l'autodigestione poiché sono molto aggressivi nei confronti delle proteine di cui tutte le cellule sono formate
  - Sistema che si è evoluto per evitare che gli enzimi operino nel luogo sbagliato
  - Forma inattiva differisce da quella attiva per delle sequenze amminoacidiche che servono per bloccare l'attività dell'enzima stesso

- Tripsinogeno differisce dalla tripsina per una sequenza di 6 a.a. Che quando viene rimossa per azione della **enteropeptidasi** o della tripsina stessa attiva, taglia legame peptidico che unisce Lys a Ile e rimuove questo frammento N-terminale determinando il riarrangiamento della conformazione della proteina che la rende attiva



- Tripsina attivata va ad attivare altre molecole di tripsinogeno, meccanismo a **feedback positivo**, determina autocatalisi
- Processo è molto rapido quando inizia
- Meccanismo viene innescato nel lumen del duodeno dove il succo pancreatico viene rilasciato quando il bolo alimentare passa dallo stomaco all'intestino
- **Enteropeptidasi** è una proteasi che la mucosa del duodeno secerne quando l'alimento raggiunge l'intestino
  - Enzima modificante che attivando anche una singola molecola di tripsina, con taglio proteolitico tra la Lys15 e la Ile16, determina un meccanismo autocatalitico che in breve tempo permette alla tripsina di autoattivarsi (caratteristica di tagliare legami peptidici che siano contigui a catene laterali basiche Lys)
- Tripsina va ad agire anche su altri zimogeni come chimotripsina, carbossipeptidasi
- Chimotripsina attivata a sua volta si autocatalizza, cascata autoproteolitica, autocatalitica che rapidamente trasforma forme inattive in forme attive nel luogo e nel momento giusto (FINE LEZIONE 12, 20.04.21)



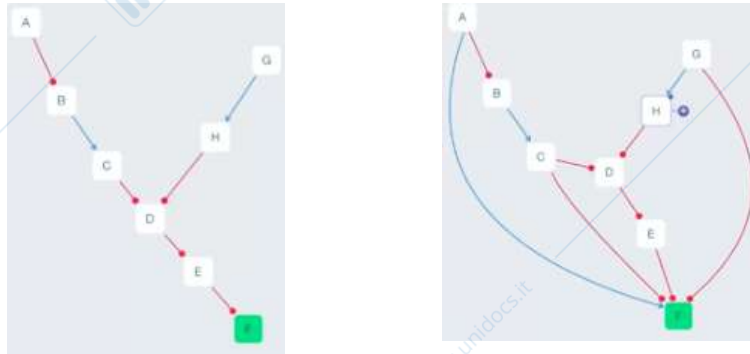
### Espressione

- Controllo dell'espressione dell'enzima, controllando la quantità dell'enzima siamo in grado di regolare la velocità della via metabolica
- Tempi molto più lunghi, minuti, ore o giorni, dipende dalla velocità con cui il gene dell'enzima viene trascritto e tradotto in una proteina
- Sistemi di controllo che possono controllare la quantità di trascritto

- Controllo della betalattasi, si trova sulle cellule duodeno allo scopo digerire lattosio, quando svezzamento gene non viene più espresso e cellule intestino non sono più in grado di digerire latte → intolleranza al lattosio

## Biosegnalazione (INIZIO LEZIONE 13, 21.04.21)

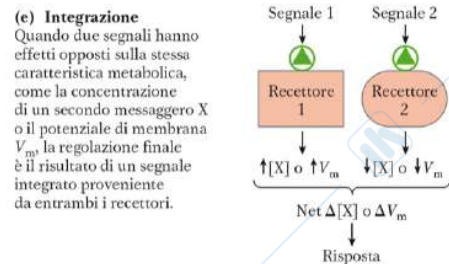
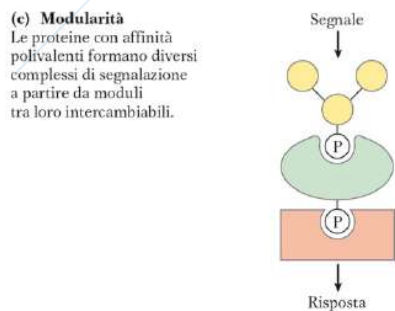
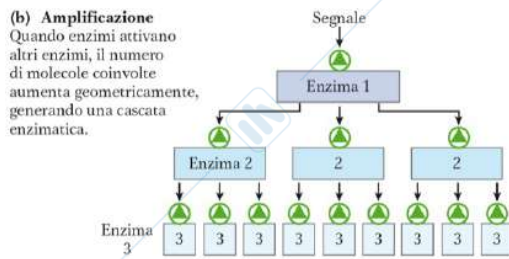
- Assegna alle frecce blu + e alle frecce rosse -
- Da A a F ci sono 4 frecce rosse quindi moltiplichiamo i - tra di loro e otteniamo +. Moltiplichiamo + per + e otteniamo + quindi A → F, la attiva.
- Da G a F abbiamo 3- quindi - moltiplicato per + sempre - quindi G inattiva F



- Enzimi controllano reazioni chimiche che avvengono nelle cellule, enzimi devono essere attivati
- Enzimi sono attivati a seconda delle informazioni che ricevono dall'esterno
  - Nel caso del glucosio dipende dalla glicemia ovvero la concentrazione di glucosio nel sangue

## Sistemi di trasduzione del segnale

- Sistemi estremamente importanti per la vita di un organismo, non meno del 20% dei geni sono coinvolti nella comunicazione tra cellule e intracellulare
- Servono alle cellule per decidere che tipo di attività svolgere in ogni istante della propria vita
- Vi è un segnale biochimico ma anche fisico, che certe cellule possono interpretare, come fotoni che colpiscono e vengono assorbiti dalla retina e ci permettono di vedere
- Cellule interpretano segnale chimico=ligando che possono essere
  - Ormoni prodotti da ghiandole endocrine
  - Mediatori locali prodotti da cellule di vari tessuti che rispondono ad un certo stimolo ad esempio un danno (trombossani, prostaglandine, ecc...)
  - Neurotrasmettitori utilizzati nella comunicazione tra cellule nervose o cellule nervose e cellule effettrici come nel caso della sinapsi neuromotoria
- Ormoni che controllano glicemia sono di natura proteica: insulina e glucagone
- Glicemia è un parametro sottoposto ad un rigido controllo
  - Informazione riguardo alla concentrazione attuale del glucosio viene raccolta da una cellula specializzata presente nel pancreas endocrino, questa dà poi luogo, attraverso un meccanismo di segnalazione, alla produzione di sostanze ricche di informazioni che vengono veicolate nel sangue e raggiungono gli organi bersaglio che devono contenere il recettore che sia in grado di riconoscere questo segnale biochimico, nel caso della glicemia un ormone proteico. L'ormone viene riconosciuto da un recettore che si trova sulla membrana delle cellule bersaglio, ora l'ormone dovrà dar luogo a processo di trasduzione del segnale che porta alla trasformazione del segnale da extracellulare a intracellulare.
  - Segnali sono glucagone e insulina, rimangono all'esterno della cellula, sono delle proteine che non possono attraversare membrana e quindi devono essere riconosciute da un recettore specifico che possa quindi determinare la risposta che questi segnali trasmettono
- Gluconeogenesi: fegato specializzato nella produzione e l'immagazzinamento del glicogeno, l'organo che si occupa invece del suo degradamento è il muscolo (vie specifiche di tessuti specializzati)



### Segnale: ligando

- Vengono chiamati primi messaggeri, ad esempio ormoni che vengono rilasciati da ghiandole endocrine come pancreas che è il principale sistema di controllo della glicemia attraverso la produzione dei due ormoni insulina e glucagone
- Prima molecola che viene prodotta in risposta ad una variazione di glicemia e che viene riconosciuta da un recettore che si trova sulla membrana delle cellule bersaglio le quali trasferiranno questa informazione all'interno della cellula producendo così un segnale intracellulare chiamato secondo messaggero

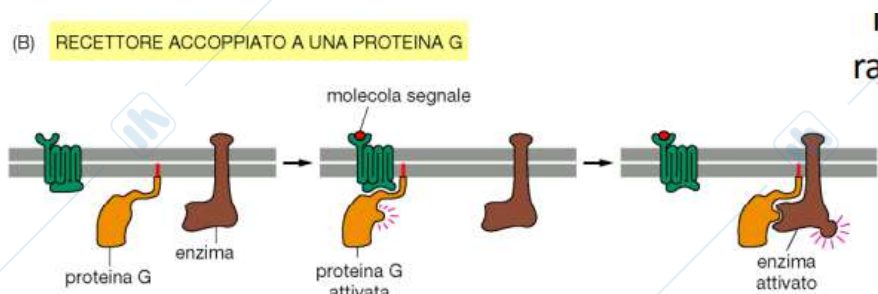
### Recettore

- Molecola deve essere riconosciuta da una proteina che abbia la capacità di legarla in modo specifico, sono interazioni non covalenti dunque reversibili, molecola deve avere un recettore che la leghi
- Recettore deve essere congegnato in modo tale da rispondere a questa interazione cambiando la sua conformazione e quindi attivandosi
  - Cambia la sua capacità di interagire con altre molecole all'interno della cellula
- Trasduzione perché trasformazione del segnale, nel caso degli ormoni il segnale extracellulare deve essere trasferito e amplificato all'interno della cellula (reso intracellulare)
  - Recettore deve riconoscere segnale e trasdurlo all'interno
- Alcuni recettori non hanno capacità enzimatiche ma la loro forma attivata è in grado di modificare l'attività di altre proteine accessorie che si trovano all'interno della cellula ovvero il sistema di trasduzione che comprende proteine, enzimi, metaboliti e che serve a trasformare il segnale da esterno a interno e amplificarlo

### Recettori non associati a enzimi

- Di membrana, **GPCR**
  - G protein coupled receptor = recettore associato a proteina G
  - Recettori a 7 eliche transmembrana
    - Costituiti da una singola catena polipeptidica che attraversa 7 volte la membrana cellulare formando 7 eliche transmembrana
  - In grado di interagire reversibilmente con proteine trasduttrici G

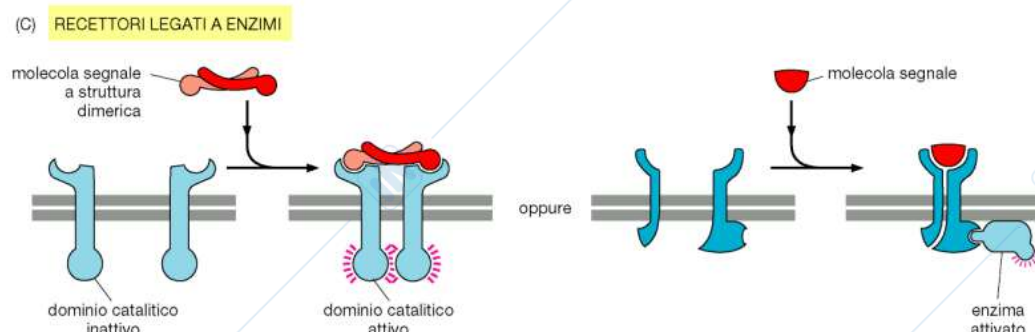
- Ne esistono almeno un migliaio
  - Recettore che ci permette di vedere è un GPCR in cui vi è un derivato della vit.A, che è il pigmento della visione, in grado di assorbire fotoni luminosi e innescare la trasduzione del segnale che ci permette di vedere
  - Recettori salato, acido, dolce sono tutti accoppiati a recettori G
  - Anche i recettori che si trovano nella mucosa olfattiva che sono responsabili degli odori



- Sono anche rilevanti dal punto di vista farmacologico perché controllano moltissime attività cellulari come la neuro-eccitazione, neurotossicità, proliferazione cellulare, l'infiammazione e sono quindi target fondamentali di farmaci che possono essere:
  - Agonisti: attivatori o ligandi, stimolano la risposta del recettore, attiva recettore, si attivano recettori in tutti i posti in cui si trova
  - Antagonisti: inibitori, inibiscono l'attività del recettore, spegne recettore
  - Modulatori allosterici: modulano la risposta del recettore, sia positivo che negativo, non lo spegne né attiva, è un modo meno traumatico di agire, si attiva o spegne recettore laddove è attivato o spento, è un metodo più mirato
- Citosolici/nucleari
  - Ormoni lipofili hanno recettori citosolici che si possono spostare dal citoplasma verso il nucleo a seconda che siano legati dal loro ligando
  - Quando un ormone steroideo viene prodotto e attraversa la membrana cellulare (essendo lipofilo non ha bisogno di trasportatore) dove la cellula può rispondere a quell'ormone c'è un recettore steroideo citosolico che lo lega e una volta avvenuto il legame l'ormone modifica la struttura del recettore e lo trasforma in un fattore di trascrizione che si sposta nel nucleo e media la trascrizione di geni chiave che mediano la risposta cellulare

### Recettori associati a enzimi con attività enzimatica

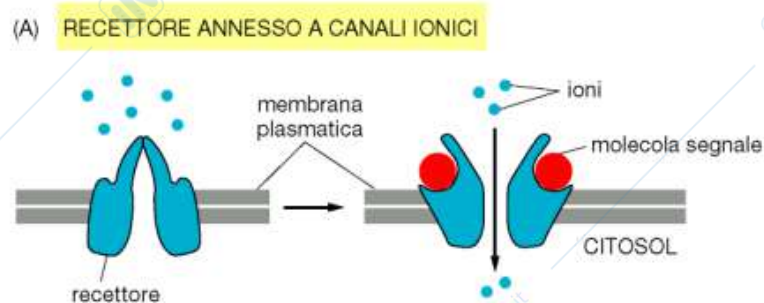
- Esempio importante il recettore dell'insulina **InsR**, accoppiato ad attività enzimatica quindi è un recettore che è anche un enzima
- **Attività tirosinchinasica**: una volta che il recettore è stato attivato, e quindi ha cambiato conformazione dopo aver legato insulina, comincia a fosforilare delle Tyr specifiche presenti sulle proteine target (fosforila anche le sue Tyr)



### Canali ionici attivati da ligando

- Proteine che attraversano la membrana cellulare aventi al centro un poro la cui apertura è stimolata dal legame con il proprio ligando
- Recettore dell'acetilcolina

- Acetilcolina è un neurotrasmettitore che agisce sulla fibra muscolare legandosi al recettore ionotropico, presente sulla membrana delle fibre, e ne determina apertura del poro dei recettori per il passaggio di ioni Na attraverso la membrana della cellula, c'è una depolarizzazione della membrana che ne determina la contrazione muscolare
- Si aprono e fanno passare ioni Na, Cl, Ca, quindi elettroliti, il motivo per cui cellula mantiene un gradiente di concentrazione elettrochimica di protoni, ioni è perché questi rappresentano, oltre che una fonte di energia che può essere utilizzata per il trasporto di soluti come glucosio, un sistema di segnalazione intracellulare ed extracellulare, ioni Na, Ca, K e Cl sono elementi importantissimi per la neuro-eccitazione cellulare, permettono la propagazione dei **potenziali d'azione**



### Sistema effettore

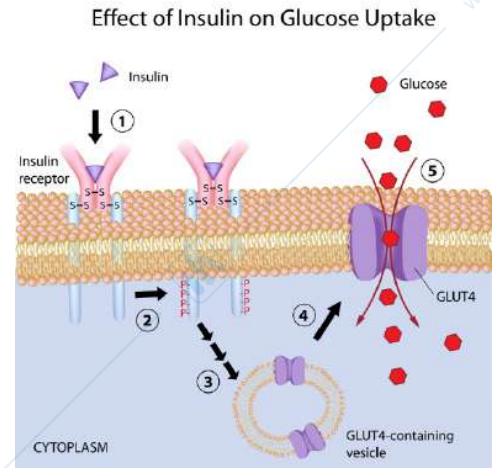
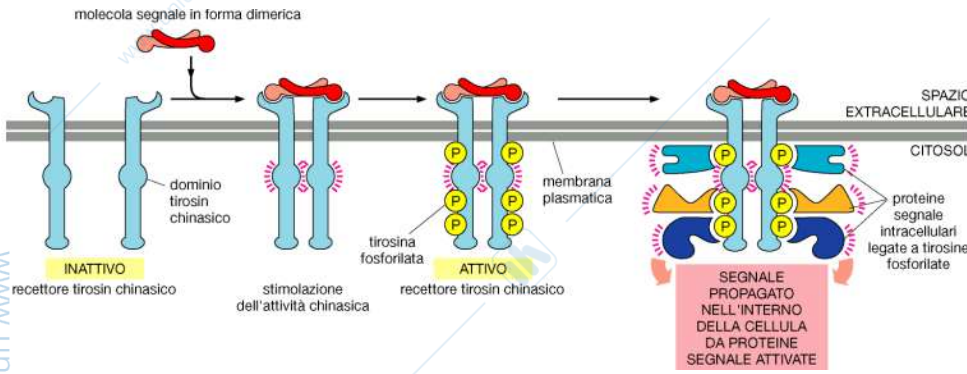
- Affinché cellula possa rispondere al segnale esterno il macchinario di biosegnalazione deve agire, positivamente o negativamente, su alcune molecole chiave della cellula che controllano le caratteristiche cellulari come la proliferazione, l'apoptosi, la crescita, ecc...
- Enzimi effettori sono enzimi segnapasso che controllano i flussi attraverso i pathways metabolici
  - Si decide quali enzimi spegnere e quali attivare
- Dentro una stessa cellula convivono anche vie opposte
  - Gluconeogenesi: via che produce glucosio
  - Via dei pentosi fosfati, glicolisi: vie che consumano glucosio
  - Devono essere bilanciate tra di loro in modo tale che se è attiva via sintetica le vie degradative devono essere inattive
- Sistemi di trasduzione del segnale devono colpire vari bersagli, target che possono essere enzimi segnapasso ma anche proteine

### Proteine trasduttrici

Proteine adattatrici/di raccordo

- Proteina che riconosce il recettore attivato e ci si lega, funge da impalcatura per la costruzione del complesso di segnalazione (INIZIO LEZIONE 14, 26.04.21)
- Trasferiscono informazioni attraverso interazioni non covalenti tra una molecola e il suo recettore che fa cambiare conformazione, il cambiamento di struttura viene riconosciuto da proteine che si adattano al recettore modificato e lo raccordano con altre proteine
- Una volta che il recettore è attivato deve essere riconosciuto da una proteina che legandosi permette il trasferimento delle informazioni all'interno delle cellule
- **IRS-1**
  - Nel caso dell'insulina abbiamo le proteine IRS-1, Insuline Receptor Substrate 1 ovvero il substrato 1 del recettore dell'insulina
  - Insulina è un recettore accoppiato ad attività tirosinchinasica, è sia un recettore che quindi riconosce segnale che un enzima e una volta legato svolge la sua funzione di tirosinchinasi, prima fosforila se stesso, infatti i domini intracellulari si fosforilano tra loro, autofosforilazione del recettore dell'insulina

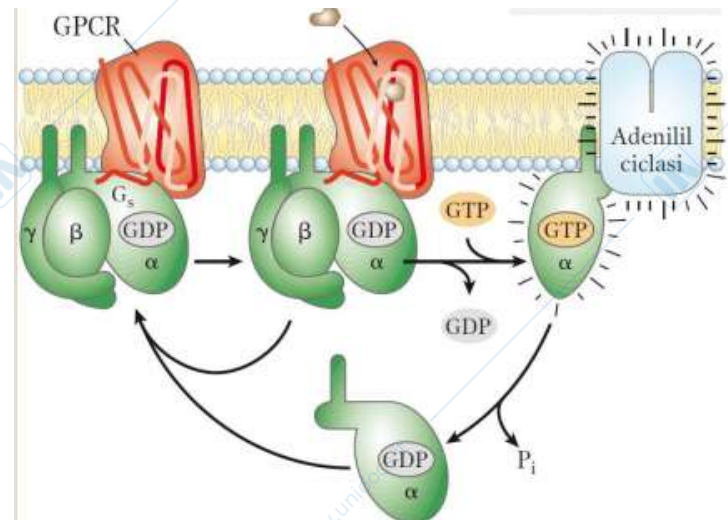
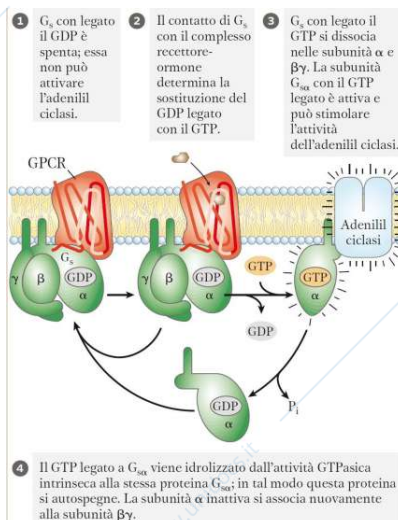
- o Non ha attività enzimatica, viene fosforilata dal recettore, IRS1 diventa impalcatura dove si lega enzima



### • GRB2

#### Proteine G

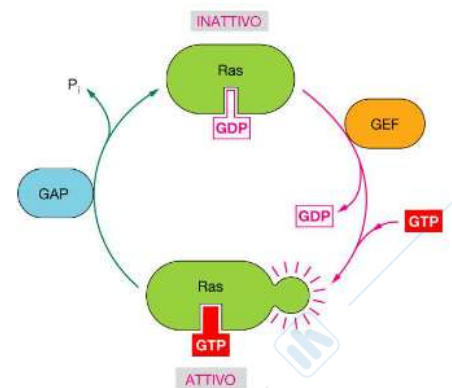
- Proteine adattatrici che si legano al recettore una volta che è attivato
- Quando legame è stabilito, il recettore attivato è in grado di attivare/modificare l'attività della proteina G, chiamate così perché legano nucleotidi guanosinici, responsabili del processo di internalizzazione del segnale
- **(etero)Trimeriche:** perché costituite da 3 subunità diverse ovvero
  - o  $G\alpha$ 
    - Lega il GTP /GDP
      - Forma attiva quando lega GTP
        - o Quando lega GTP si dissocia dalle altre due subunità e si sposta da sola sulla membrana fino ad incontrare un enzima
        - o È attiva quando il recettore, stimolato dal legame con il suo ligando, lega la proteina G eterotrimerica e media lo scambio della GDP con la GTP
        - o Recettore cambiando conformazione interagisce con la proteina G che si trova nella sua forma inattiva (alfa lega GDP) e ne determina lo scambio di un GDP con un GTP presente nella cellula
        - o Subunità alfa si stacca dal trimero, viaggia lungo la membrana e raggiunge l'**adenilil ciclasi**
      - Forma spenta quando lega GDP
        - o Quando è nella sua forma inattiva, legata al GDP, si associa alle altre due subunità  $\beta$  e  $\gamma$  formando l'eterotrimerico  $G\alpha$ - $G\beta$ - $G\gamma$



- Idrolizza il GTP in GDP
  - Attività GTPasica intrinseca, idrolasi del GTP
  - Orologio molecolare controlla idrolisi del GTP (legato ad  $\alpha$ ) che lo trasforma in GDP, in tal modo la proteina G si autospegne
  - Subunità alfa si spegne e ritorna a formare il trimero con le subunità  $\beta$  e  $\gamma$
- $G\beta$  e  $G\gamma$  legate a  $G\alpha$  nella sua forma inattiva per formare l'eterotrimerico (FINE LEZIONE 13, 21.04.21)
- Le proteine G eterotrimeriche le troveremo nel sistema di segnalazione del glucagone
- Esistono diverse famiglie di proteine G e i diversi recettori attivano le diverse proteine
  - **Famiglia Gs**, proteine G stimolatorie
- **Monomeriche:** Ras
  - Insulina
  - Lega GTP/GDP
    - Attiva quando lega GTP
    - Spenta quando lega GDP
  - Attività idrolitica GTPasica, si autospegne attraverso idrolisi GTP

### Proteine G vengono controllate attraverso due classi di proteine

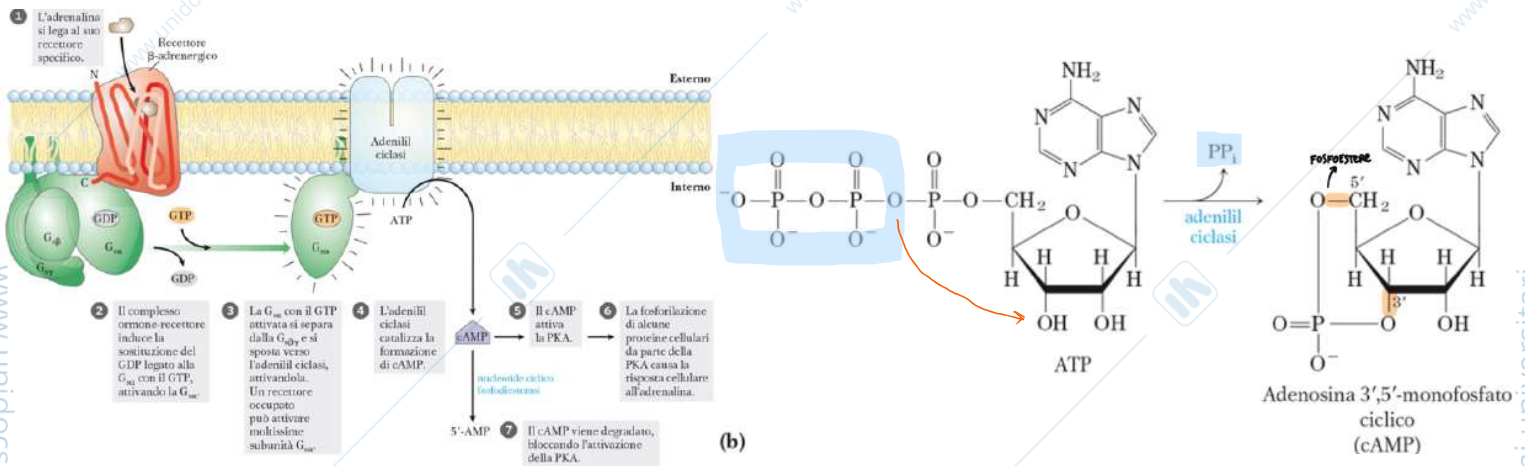
- GEFs
  - GTP Exchange Factors
  - Proteine che facilitano lo scambio di GDP con GTP
  - Aumenta l'attivazione della proteina G
    - GTP attiva la proteina G
    - Recettore attivato è GEF
- GAPs
  - GTPase Activator Proteins
  - Proteine che attivano l'attività GTPasica quindi idrolitica della proteina G, scambio GTP con GDP
  - Facilitano lo spegnimento delle proteine G
    - GDP inattiva proteina G



### Enzimi che producono secondi messaggeri

- Formazione molecola rapidamente sintetizzabile e degradabile
- Proteine adattatrici G si devono accoppiare ad enzimi in grado di produrre secondi messaggeri
- **Adenilato ciclasi AC**
  - Recettore gamma degli oppioidi come la morfina
  - Recettore gamma è un recettore accoppiato a proteine Gs (stimolatorie) responsabili dell'attività dell'adenilato ciclasi
  - La subunità alfa della proteina G attivata va ad interagire con l'adenilato ciclasi e la attiva
    - Proteina G attiva adenilato ciclasi
  - L'enzima attivato quindi ciclizza **cAMP** (AMP ciclico) che deriva dalla reazione dell'ATP che fa uscire un pirofosfato e ciclizza il fosfato su C5 del ribosio con OH del C3 dello zucchero

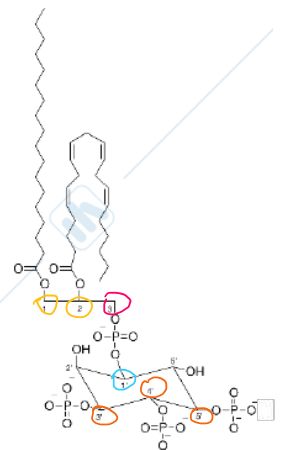
- o Quando condensiamo acido con ossidril si forma un legame fosfoestere, siccome l'acido forma due legami con due OH diversi si forma un legame fosfodiester



- o AMP ciclico è il derivato di ATP in cui un pirofosfato PPI è uscito dalla molecola e otteniamo un fosfodiester interno dove il fosfato si richiude a formare un secondo legame con il ribosio
- o Molecola segnale solubile prodotta in grosse quantità dall'adenilato ciclasasi attivato

**Fosfoinositide-3-chinasi PI3K**

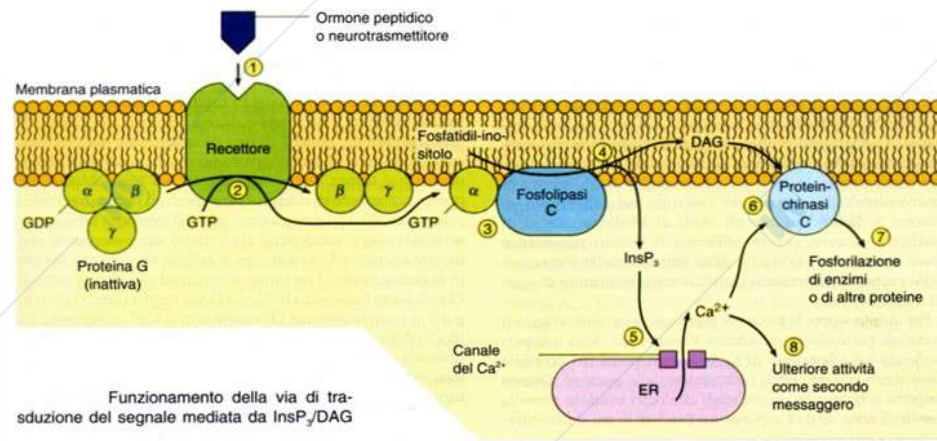
- o PIP3 ovvero il fosfatidilinositolo-3fosfato è prodotto dell'azione dell'enzima che fosforila un fosfolipide di membrana
- o Nelle membrane biologiche sono presenti anche lipidi che contengono come testa polare l'inositolo (derivato degli zuccheri è un poli-alcol) che contiene 3 residui fosforici attaccati in posizione 3', 4', 5' e in posizione 1' il fosfoinositide, derivato del glicerolo che lega in 1' e 2' due acidi grassi e in 3' un acido fosforico, è un acido fosfatidico
- o Presenza della particolare parte polare dà il nome al fosfolipide, è un fosfatidilinositolo, importante perché utilizzato come molecola segnale
- o Molecola segnale è prodotta dalla PI3K, la quale fa parte del sistema di segnalazione dell'insulina. Quando l'insulina si attiva, attiva questa chinasi la quale a sua volta produce questo secondo messaggero che, a differenza del cAMP, è vincolato alla membrana, può diffondersi solo nel monostrato che costituisce la membrana cellulare dove si è formato
  - Insulina -> recettore attivo -> PI3K attiva -> produce PIP3



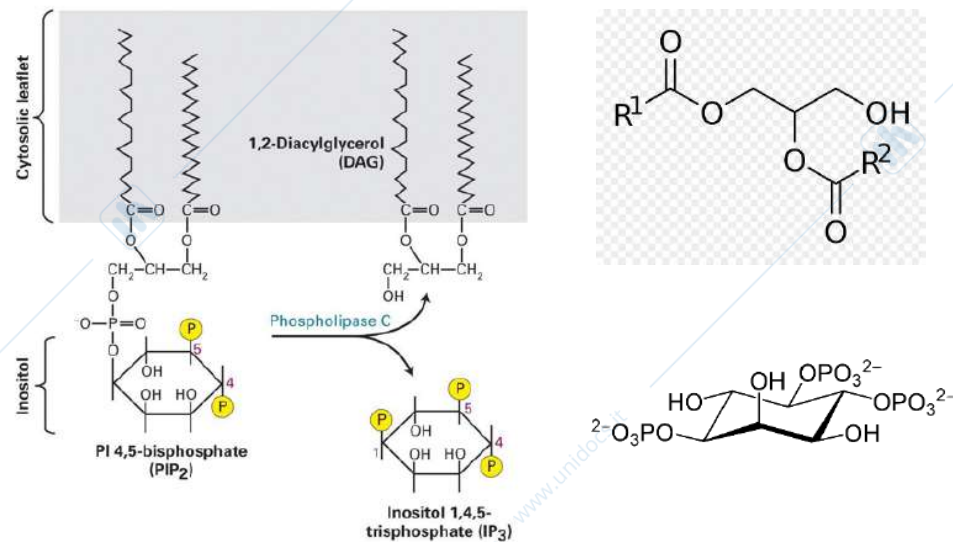
**Fosfolipasi C PLC**

- o Sono tutti enzimi di membrana
- o Attivata da azione di un recettore legante il proprio ligando, va ad agire su un ulteriore lipide di membrana. Da fosfoinositolo-bisfosfato produce due secondi messaggeri DAG e IP3
- o Abbiamo un fosfatidilinositolo difosfato PIP2 (quello di prima ma senza un fosfato)
- o Taglia fosfolipide idrolizzando legame fosfoestere in 3' e si forma diacilglicerolo (DAG, 2 acili + glicerolo) e inositolo-3fosfato (IP3)
- o IP3 è molecola estremamente polare che viaggia nel citoplasma ed andrà ad agire su un target proteico
  - Legandosi ad un particolare recettore associato a canale ionico attivato da ligando fa uscire dal reticolo endoplasmatico il calcio conservato in questo organello
  - L'aumento del calcio all'interno della cellula è un evento importante di segnalazione e il calcio è un secondo messaggero perché è uno ione la cui presenza è finemente controllata

- Quando la cellula ha bisogno di attivare un segnale può facilmente controllare il flusso di questo ione all'interno del citoplasma, controllando l'attività di alcune proteine effettrici come la **PKC** che è attivata dal congiunto legame della proteina chinasi C con il DAG e il calcio



- DAG diacilglicerolo ha due catene alifatiche R, due esteri e un ossidrilico OH del glicerolo rimasto libero dopo l'idrolisi del legame fosfoestere
  - È un secondo messaggero e, come il PIP<sub>3</sub>, rimane vincolato sulla membrana e può diffondere sulla membrana e raggiungere target ovvero la proteina chinasi C



- Ci sono vari enzimi attivati dal recettore che ha riconosciuto il suo ligando o direttamente o indirettamente con delle proteine di raccordo
- Il legame di un ormone su un recettore può portare alla formazione, nella cellula, di un numero elevato di molecole intracellulare che diffondono all'interno della cellula, nel citoplasma o sulla membrana, che vanno a veicolare il segnale originariamente portato dall'ormone
- Riconoscimento- variazione conformazione- attivazione proteina- attivazione enzima- produzione molecole = esempio di amplificazione, fondamentale per la trasduzione del segnale

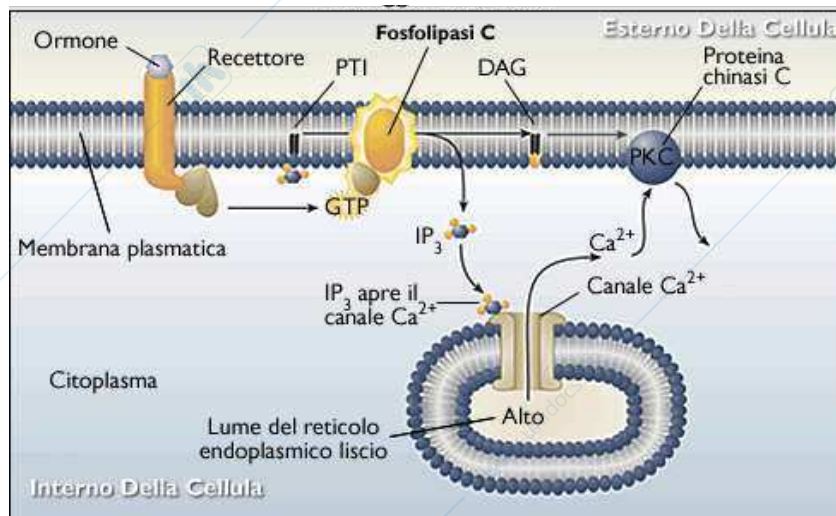
### Sistema effettore

- Sistema che è in grado di rispondere al segnale
- Scelta se degradare glucosio attraverso glicolisi o far avvenire processo opposto
- C'è bisogno di andare a modificare l'attività delle proteine che si occupano di queste strade
  - Solo gli enzimi segnapasso, che quindi si trovano nei punti strategici, devono essere modificati
- Sistema effettore è costituito da tutti quegli enzimi bersaglio che vengono regolati direttamente o indirettamente dal secondo messaggero

Enzimi e proteine target regolati dal secondo messaggero

Enzimi modificatori dello stato di fosforilazione

- **Chinasi** sono enzimi modificatori dello stato di fosforilazione delle proteine perché aggiungono fosfati sulle proteine target
  - **PKA**: attivata da AMP ciclico, enzima target del cAMP; **cAMP** -> **PKA**
  - **PKB**: nota come AKT attivata dalla via di segnalazione dell'insulina; insulina-> PKB
  - **PKC**: attivata dal calcio che è un ulteriore secondo messaggero prodotta grazie a IP<sub>3</sub>; Ca -> PKC



- È attivata dal congiunto legame della PKC con il DAG e il calcio
- Se non c'è DAG e calcio all'interno della cellula, PKC non è attiva
- Si attiva soltanto quando, per effetto dell'attivazione di un particolare recettore di un ormone, si attiva il sistema di segnalazione che va ad attivare la **fosfolipasi C**

- **Fosfatasi**, sistema di controllo della segnalazione che lo porta a disattivarsi
  - **PP1 proteina fosfatasi 1**: toglie fosfati a proteine fosforilate da chinasi
  - **PP2 fosfodiesterasi 2**: si occupa di degradare/disattivare il secondo messaggero cAMP;
    - **PP2 --| cAMP**
- A seconda del tipo di risposta la fosforilazione può attivare o disattivare una proteina

Enzimi e proteine target che impostano la risposta al segnale

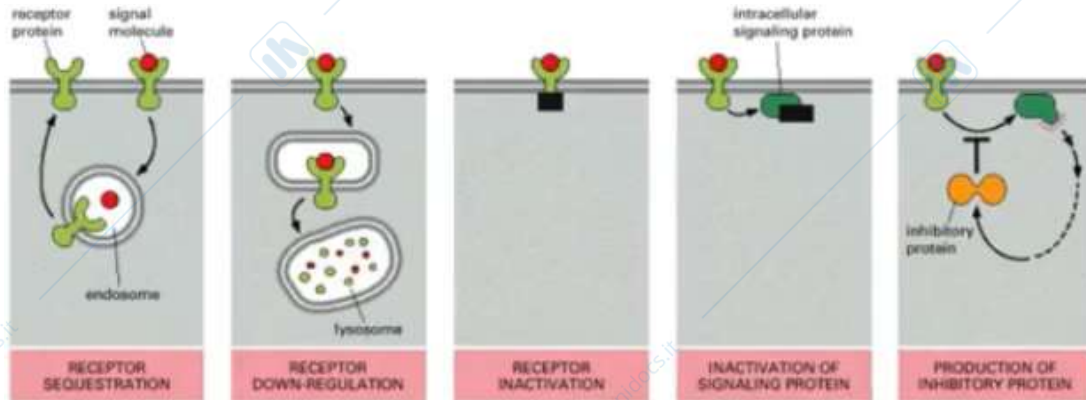
- Proteine target possono essere enzimi
  - Attivazione di un enzima da parte di altro enzima è un meccanismo a **feedback positivo autocatalitico**, la cascata enzimatica permette la rapida attivazione o disattivazione delle proteine coinvolte
- Enzimi segnapasso
- Fattori di trascrizione
  - Controllano l'espressione degli enzimi o delle proteine importanti per quella risposta

### Sistemi di spegnimento

- Tutti i sistemi di segnalazione hanno un meccanismo a tempo che agisce su tutti i livelli come riconoscimento da parte del recettore del ligando, la produzione del ligando segnale
- Se concentrazione glucosio torna normale ormone che veniva rilasciato nel sangue smette di essere prodotto
- Meccanismo di internalizzazione o sequestro del recettore
  - Ormone che ha legato recettore determina meccanismo di internalizzazione del recettore che dalla membrana passa dentro la cellula attraverso l'endocitosi, ovvero la fase di sequestro del recettore, che permette il riciclo e il recupero del recettore per una nuova fase di segnalazione
- Meccanismo di inattivazione
  - Se la segnalazione dura per un tempo eccessivo la cellula evita il danno da una sovraeccitazione/sovraesposizione distruggendo i recettori responsabili di quella risposta e

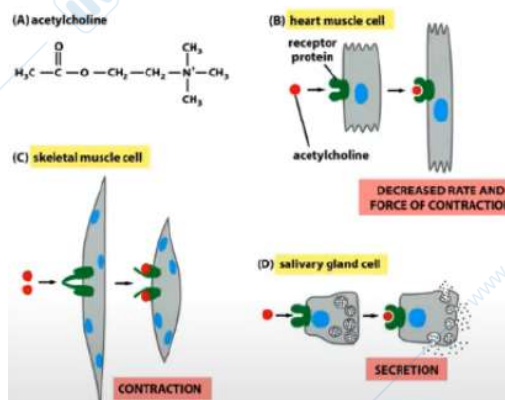
mandando il recettore con il suo ligando verso un compartimento di idrolisi, di degradazione del recettore stesso

- o Irreversibile, completa distruzione del sistema
- Produzione di una proteina inibitrice
  - o Recettore stimolando la via stimola anche la sua inattivazione
  - o Enzimi che vengono prodotti agiscono sul recettore, lo fosforilano e ne bloccano l'attività
  - o Recettore stimola una proteina che a sua volta stimola un'altra proteina che va a bloccare il sistema di segnalazione del recettore



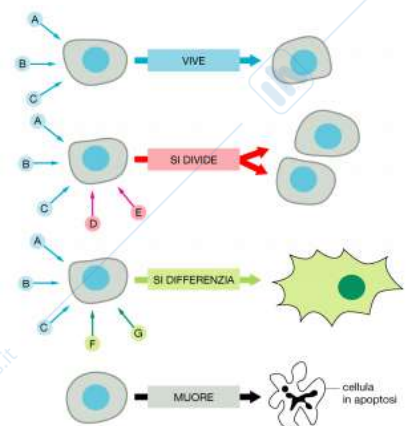
### Diversa risposta a stesso segnale

- Acetilcolina può essere sia neurotrasmettitore che ormone
- Neurotrasmettitore: utilizzata nel cervello all'interno delle sinapsi colinergiche
- Ormone: rilasciato nel sangue e attraverso l'interazione con recettori diversi che la riconoscono in modo specifico situati in cellule diverse la stessa molecola può indurre risposte diverse
  - o Recettore su cellule muscolari scheletriche → contrazione muscolo
  - o Recettori sulla fibra muscolare cardiaca → diminuzione della forza e della velocità di contrazione
  - o Recettori sulle ghiandole salivari → aumento dei secreti



### Una cellula decide cosa fare in funzione dei segnali che riceve dal suo ambiente

- Segnali di sopravvivenza
  - o A, B, C
  - o Indicano alla cellula di mantenere omeostasi, immutata
  - o Se non arrivano → apoptosi, morte cellulare programmata
- Segnali di divisione
  - o D, E
- Segnali di differenziamento
  - o F, G
  - o Modifica struttura e funzione

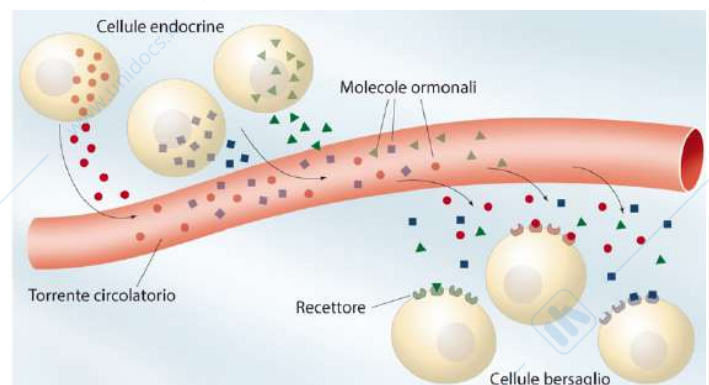
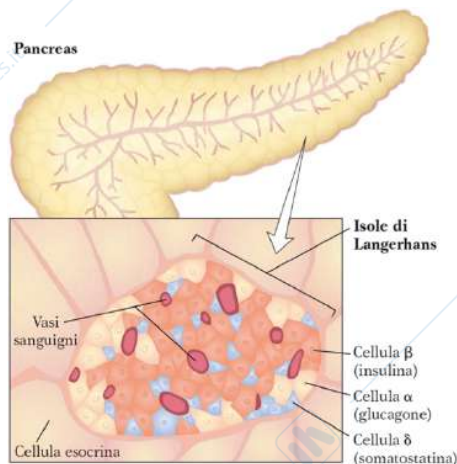


## Insulina

- Recettore insulina è un recettore costituito da 4 subunità
- Insulina stimolando il suo recettore va a stimolare una serie di segnali fino ad arrivare a Ras che attiva Raf che attiva Mek che attiva Erk
  - Ultime 3 sono chinasi, fanno parte della cascata delle MAP chinasi cioè chinasi attivate da mitogeno ovvero fattori che aumentano la proliferazione cellulare

## Iperglicemia

- Insulina è un ormone di natura proteica
  - Quando glicemia si alza = iperglicemia, concentrazione glucosio >5mM
- Nel pancreas endocrino ci sono le isole del Langerhans in cui vi sono cellule  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  (INIZIO LEZIONE 15, 27.04.21),
  - Cellule  $\alpha$  e  $\beta$  sono specializzate nel rilascio degli ormoni glucagone e insulina
  - Cellule  $\beta$  percependo iperglicemia reagiscono rilasciando nel torrente circolatorio l'insulina, c'è un'esocitosi dei granuli contenenti insulina la quale viaggia attraverso il sangue e raggiunge le cellule bersaglio aventi i recettori per l'insulina InsR sulla superficie



### Organi bersaglio dell'insulina ed effetti

- Organi bersaglio sono il fegato, il tessuto adiposo e il muscolo scheletrico
- Effetto insulina su organi è diverso, questa diversità riflette la specializzazione funzionale dei vari organi
- **Fegato:** è un organo glucostatico, si occupa di mantenere costante la glicemia
  - Sintetizza glucosio a partire da composti non carboidratici
  - Rilascia glucosio a partire dalla sua forma di deposito ovvero il glicogeno
  - È in grado di catabolizzare il glicogeno quando presente in grande quantità ad esempio dopo pasto ricco di carboidrati, anche il processo glicolitico è regolabile
  - Sintesi di glicogeno (enzima glicogeno sintasi), lipogenesi (sintesi acidi grassi e trigliceridi da zuccheri come glucosio) e gluconeogenesi (sintesi glucosio)
  - Visto che fegato può sia produrre che degradare glucosio (gluconeogenesi e glicolisi) e acidi grassi (glicogeno sintesi e beta-ossidazione), quindi contiene sia le vie di sintesi che quelle degradative, può controllarne la produzione, modificando in senso opposto via che antagonizza
    - Se aumenta produzione acidi grassi, blocca beta-ossidazione
    - Se diminuisce gluconeogenesi, aumenta la glicolisi
  - Se insulina aumenta sintesi glicogeno, diminuisce via degradazione
- **Muscolo:** sintetizza glicogeno ma non lo può utilizzare
  - Glucagone non ha effetto su muscolo perché questo non è in grado di sintetizzare il glicogeno ma soltanto di degradarlo completamente per il proprio fabbisogno energetico
  - Muscolo non ha recettori per glucagone perché non è in grado di produrre glucosio
  - Ha recettori per insulina perché nell'iperglicemia muscolo contribuisce ad abbassare la concentrazione di glucosio sequestrandolo dal sangue e utilizzandolo per la propria attività energetica

- **Tessuto adiposo** non ha voce riguardo al glicogeno perché ne conserva piccolissime quantità e non ha effetto sul suo metabolismo

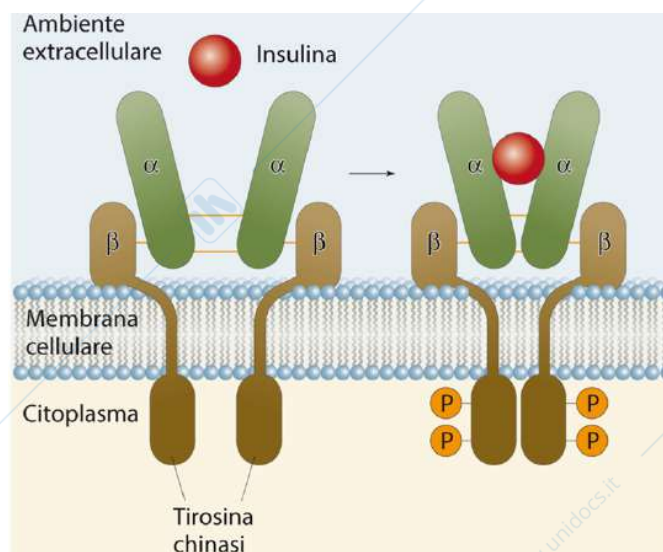
TABELLA 22.1 Effetti ormonali sul metabolismo energetico

Tessuto	Insulina	Glucagone	Adrenalina
Muscolo	↑ Assorbimento di glucosio ↑ Sintesi di glicogeno	Nessun effetto	↑ Glicogenolisi
Tessuto adiposo	↑ Assorbimento di glucosio ↑ Lipogenesi ↓ Lipolisi	↑ Lipolisi	↑ Lipolisi
Fegato	↑ Sintesi di glicogeno ↑ Lipogenesi ↓ Gluconeogenesi	↓ Sintesi di glicogeno ↑ Glicogenolisi	↓ Sintesi di glicogeno ↑ Glicogenolisi ↑ Gluconeogenesi

- Nel muscolo e nel fegato vi sono le principali riserve di glicogeno e l'insulina determina un aumento della sintesi del polisaccaride in entrambi (differenze muscolo sotto)

#### Recettore InsR

- Recettore dell'insulina è una proteina transmembrana costituita da 4 catene polipeptidiche a due a due uguali
  - Due catene più lunghe  $\beta$  (transmembrana) e due catene più corte  $\alpha$  (all'esterno della cellula) che sono legate tra di loro da ponti disolfuro, ricorda la struttura delle immunoglobuline
- Nell'ambiente extracellulare presenta la regione che riconosce l'insulina
  - Insulina quando si lega nel sito di riconoscimento del recettore ne fa cambiare la conformazione
- Questa variazione si trasmette all'interno della proteina, nella parte citosolica, dove ci sono due domini con attività enzimatica **tirosinchinasica**
  - Vi sono delle Tyr
  - Quando il recettore è attivato un dominio autofosforila l'altro
- Proteina transmembrana che ha una parte extracellulare legata con ponti disolfuro ad un'altra subunità extracellulare  $\alpha$
- Subunità  $\beta$  dentro la cellula ha un dominio tirosinchinasico, nell'immagine a sx, inattivo perché il recettore non ha ancora legato il ligando
- Molecola è simmetrica, abbiamo una subunità  $\beta$  transmembrana e una subunità  $\alpha$  legate da ponte disolfuro e insieme formano un dimero di dimeri (ricorda immunoglobulina)
- Questo recettore, a differenza di quello del glucagone che è un GEF, ha anche attività enzimatica tirosinchinasica che va a fosforilarsi e così facendo attiva il suo percorso di segnalazione



Effetto insulina su fattori di trascrizione e proteine bersaglio

- 1. Iperglicemia stimola la produzione, da parte delle cellule beta del pancreas delle isole del Langherans, dell'insulina = iperglicemia → produzione insulina
- 2. Insulina viaggia nel torrente circolatorio e raggiunge le cellule bersaglio aventi i recettori per riconoscerla che sono particolarmente presenti nelle cellule epatiche, nelle cellule adipose e nel tessuto muscolare scheletrico
- 3. Insulina si lega al recettore e il recettore stimolato che presenta due domini con Tyr non fosforilate
  - Un dominio attivato fosforila l'altro e viceversa e queste tirosine si fosforilano, i fosfati vengono dall'ATP → insuline receptor è attivato
- 4. Attivazione del recettore ne modifica lo stato di fosforilazione, cosa che viene percepita dal sistema di segnalazione dell'insulina
- 5. InsR si autofosforila e questo segnale determina avvicinamento IRS-1, proteina che ha la funzione di riconoscere Tyr fosforilate appartenenti al recettore dell'insulina
  - IRS-1 si lega alla fosfoTyr del recettore attivato
- 6. Recettore attivato fosforila IRS-1 su 2 Tyr
- 7. Proteina adattatrice GRB2 che porta con sé SOS
  - GRB2 non si lega a IRS-1 finché non è fosforilato
  - Quando IRS-1 è fosforilato si lega alla sua fosfoTyr con legato a sé SOS
  - SOS è un GEF che facilita scambio dei nucleotidi guanidici su una proteina G monomerica che è Ras
    - SOS permette l'attivazione di Ras permettendogli di scambiare il suo GDP con GTP citosolico e facendolo così attivare
- 8. Ras, una proteina G attivata, attiva una proteina effettrice, una chinasi chiamata Raf
  - Raf è una MAPK-K-K-K, chinasi di una MAP chinasi chinasi
- 9. Raf attiva MEK, una MAP chinasi chinasi, MAPK-K, è una chinasi di una MAP chinasi
- 10. MEK attiva ERK, una MAPK
  - Una MAP chinasi è una protein chinasi attivata da mitogeni
- 11. ERK agisce sui fattori di trascrizione legati ad esempio alla proliferazione cellulare come Myc, Fos
  - Insulina può controllare espressione di geni importanti per la proliferazione cellulare
- 11. ERK stimola anche proteine ed enzimi bersaglio

Sistema di spegnimento

- Come tutte le vie di segnalazione, deve contenere al suo interno un **sistema di disattivazione**
- Sistema portato da una proteina chiamata GAP che riconosce IRS-1 fosforilato e si lega alla seconda Tyr fosforilata
  - Essendo GAP va ad aumentare l'attività GTPasica di Ras, così facendo Ras viene spenta
  - In questo modo sistema ha elemento per autodisattivarsi
  - Se Ras si blocca anche Raf, MEK e ERK si bloccano

Controllo della sintesi proteica

- 1. Anche chinasi PI3K si lega al recettore dell'insulina grazie a IRS-1 fosforilato
  - PI3K si attiva e produce il secondo messaggero PIP3 ovvero fosfatidilinositolo-3fosfato
- 2. PIP3 attiva Akt/PKB
- 3. Akt attiva mTOR, una chinasi
- 4. mTOR favorisce i processi di sintesi proteica dove gli aminoacidi vengono utilizzati per formare proteine
  - Ricordiamo che insulina è un ormone che segnala l'abbondanza di nutrienti che non è rappresentata solo dall'iperglicemia ma anche dall'abbondanza di aminoacidi

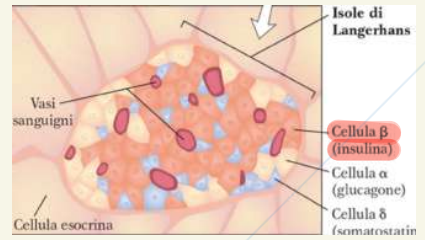
Attivazione della sintesi del glicogeno

- Glicogeno è una forma di accumulo di glucosio da parte dell'organismo
- Fegato è la sede in cui l'organismo accumula questo monosaccaride in forma stabile

# Iperglicemia

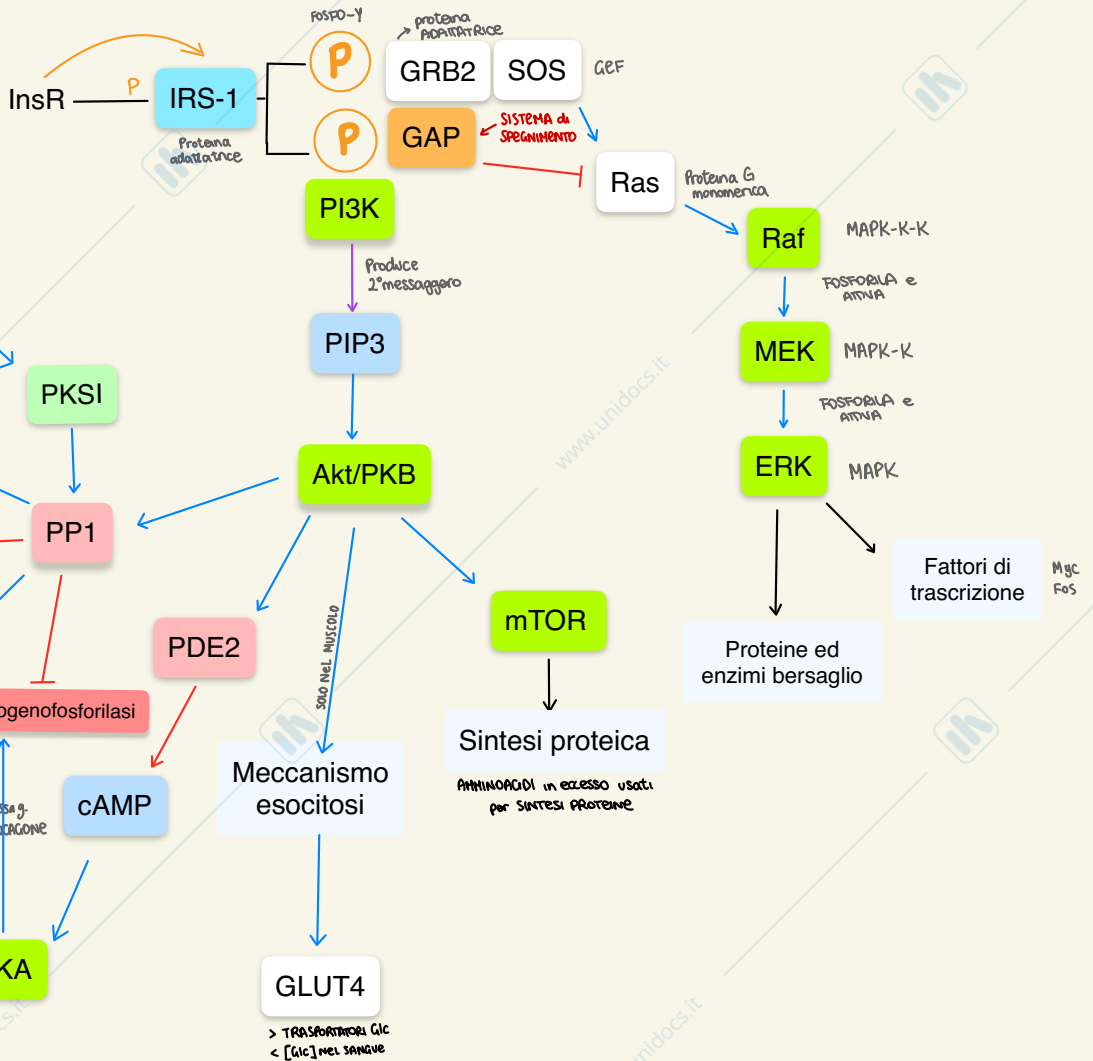
Cellule β pancreas

Insulina



SI FOSFORILANO a VICENDA

RECIPIENTE è ATTIVO!



- Insulina, che segnala alla cellula un'abbondanza di monosaccaridi, dice alla cellula che deve usare il glucosio in eccesso per sintetizzare il glicogeno
- Sistema di segnalazione deve attivare enzima segnapasso che produce il glicogeno e d'altra parte deve spegnere l'enzima segnapasso che degrada il glicogeno
- 1. Akt stimola proteina fosfatasi 1 che toglie fosfati
- 2. PP1 ha come target principale l'enzima segnapasso della sintesi del glicogeno ovvero **glicogeno sintasi**
  - Iperglicemia/insulina porta all'attivazione dell'enzima segnapasso della sintesi del glicogeno

#### Intervento sul glucagone

- Sistema deve anche intervenire sul sistema di segnalazione del glucagone
  - Glucagone si trova sempre nel sangue, la sua concentrazione può aumentare o diminuire in risposta a variazioni di concentrazione del glucosio
  - Quando glucosio si abbassa, glucagone diminuisce
- Quando iperglicemia nel sangue ci sono anche grandi quantità di insulina che prevalgono sulla segnalazione del glucagone
  - Sistema dell'insulina va ad antagonizzare il sistema del glucagone
- 1. Akt ha come target e stimola anche PDE2
- 2. PDE2 ha come target cAMP ovvero il secondo messaggero prodotto dal glucagone
  - PDE2 blocca, degrada e dunque inattiva cAMP
- 3. cAMP non è in grado di attivare la PKA
- 4. PKA la quale dovrebbe inattivare la glicogenosintasi
  - Da una parte la PKB attiva la glicogeno sintasi attraverso l'azione della PP1
  - Dall'altra la attiva rimuovendo il blocco rappresentato dalla PKA che se fosse attiva la inibirebbe (FINE LEZIONE 14, 26.04.21)

#### Nel muscolo scheletrico

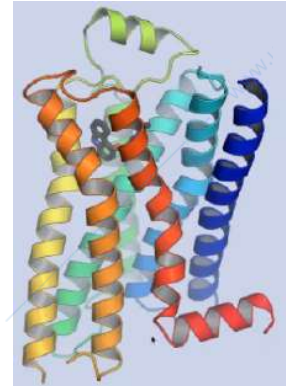
- Akt va ad influenzare il meccanismo di esocitosi del trasportatore glucosio GLUT4 (specifico delle cellule muscolari e adipose) attraverso membrane
- Aumento sulla superficie della cellula di un trasportatore del glucosio ne diminuisce la concentrazione nel sangue perché la cellula è in grado di captarlo in quantità maggiori
- Muscolo scheletrico grazie a recettori di insulina sulla membrana delle sue cellule è in grado di intervenire rapidamente sulla concentrazione di glucosio circolante nel sangue

#### Ipoglicemia

- Concentrazione < 2.8mM
- Cellule  $\alpha$  del pancreas endocrino sentono un abbassamento del glucosio perché lo percepiscono attraverso dei sensori del glucosio
  - Glucosio stesso è un segnale che inibisce la produzione di glucagone
- Quando il glucosio <2.8mM le cellule perdono il controllo negativo da parte del glucosio e rilasciano il glucagone, ormone peptidico
- Ipoglicemia è causata, ad esempio, da un digiuno prolungato per effetto del consumo continuo del glucosio da parte delle cellule di tutto il corpo
  - Se non c'è apporto dall'esterno di metaboliti che sostituiscano quello consumato il glucosio diminuisce sotto <2.8mM
- Intenso sforzo fisico fa bruciare glucosio presente nel sangue da parte del muscolo scheletrico, contraendosi in modo anaerobio consuma in modo inefficiente il glucosio e ne abbassa la quantità

### Recettore GLP-1

- Recettore accoppiato a proteine G detto anche a 7 eliche transmembrana
- Struttura è data da una singola catena polipeptidica che si ripiega a formare 7 alfa eliche che attraversano la membrana per 7 volte
- Forma delle eliche e la loro collocazione garantisce al recettore un dominio extracellulare (in alto) che può agire col ligando
- La parte più citosolica ha un'elica parallela alla posizione della membrana che conferisce ulteriori caratteristiche e domini a questa proteina
- Legame del recettore con ligando ne cambia la conformazione, quando il recettore ha la conformazione attivata interagisce con le proteine Gs
  - Forma inattiva eterotrimerica legano il GDP (a sub  $\alpha$ )
  - Forma attiva si lega la proteina G e promuove lo scambio di GDP con GTP, GDP esce da subunità  $\alpha$  del trimero e viene rimpiazzato da un GTP che si trova nel citoplasma della cellula
    - Trimero si dissocia e diventa dimero  $\beta$ - $\gamma$ , subunità  $\alpha$  legando il GTP si dissocia e viaggiando sul lato citosolico della membrana raggiunge il suo enzima target ovvero l'**adenilato ciclasi** responsabile della sintesi del secondo messaggero **cAMP**
- Recettore è un GEF che si attiva e promuove lo scambio di GDP con GTP
- GLP-1 si trova sulle membrane dei miociti e degli adipociti



### Meccanismo di attivazione della degradazione del glicogeno e inibizione della sintesi

1. Cellule  $\alpha$  rilasciano glucagone
2. Glucagone va fino al suo recettore GLP-1 che si trova sulla superficie dell'epatocita (ad esempio)
3. Recettore quindi si attiva
  - Promuove scambio GDP con GTP
  - Eterotrimerico si dissocia e diventa dimero  $\beta$ - $\gamma$
  - GTP va sulla sub.  $\alpha$  e la attiva
4. Sub.  $\alpha$  si sposta sulla membrana fino ad incontrare ed attivare l'**adenilato ciclasi**
5. Adenilato ciclasi è l'enzima effettore produce il secondo messaggero **cAMP**
6. cAMP va a legarsi e ad attivare la **PKA**
7. PKA è una chinasi capace di fosforilare proteine target come
  - **Fattori di trascrizione CREB**: cAMP response element binding protein, proteina che lega gli elementi responsivi del cAMP
    - PKA attivo si lega su questi pezzi di DNA e modifica l'espressione di geni importanti del metabolismo glicidico e lipidico
  - **Proteine ed enzimi bersaglio**
  - Se cellula sta rispondendo ad una ipoglicemia la sintesi del glicogeno deve diminuire e deve aumentare la sua degradazione, da un lato epatocita blocca sintesi dall'altro ne promuove la degradazione quindi il rilascio del glucosio
  - PKA attivata da cAMP va a fosforilare la **fosforilasi chinasi** (chinasi di fosforilasi)
  - Fosforilasi CHINASI fosforila e attiva la **glicogeno fosforilasi**
    - Enzima segnapasso della degradazione del glicogeno, la sua fosforilazione la attiva
    - PKA stimola > degradazione glicogeno!
  - PKA fosforila e inibisce la **glicogenosintasi** quindi blocca sintesi del glicogeno
    - Inibisce enzima segnapasso della sintesi di glicogeno
    - PKA inibisce sintesi glicogeno!
  - Blocca una via e ne attiva un'altra
  - Fosforila e attiva anche la **glicogeno sintasi chinasi GSK3**
  - GSK3 fosforila la **glicogeno sintasi** e la blocca!
  - PKA blocca sintesi glicogeno fosforilandone l'enzima segnapasso anche attraverso GSK3

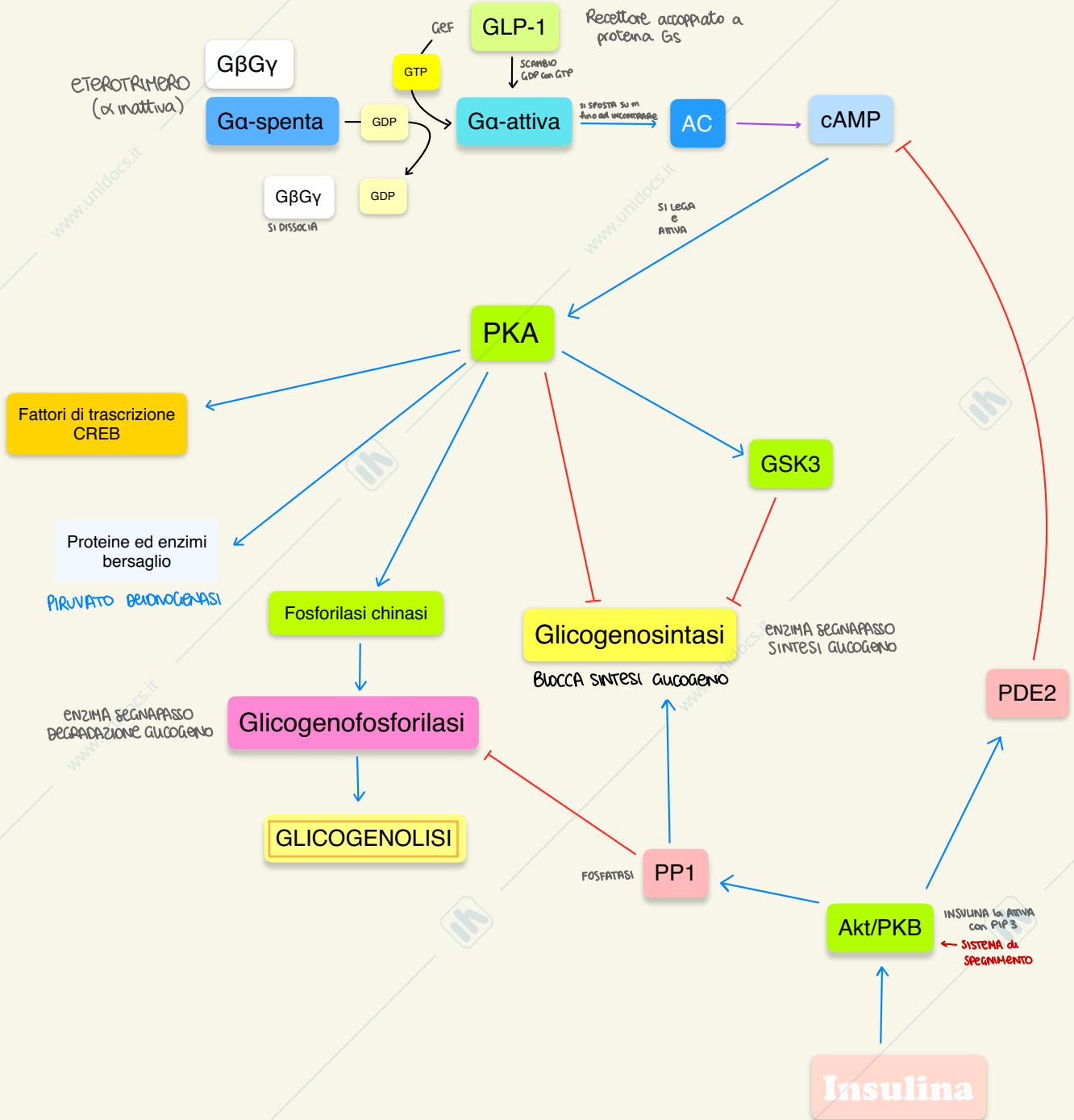
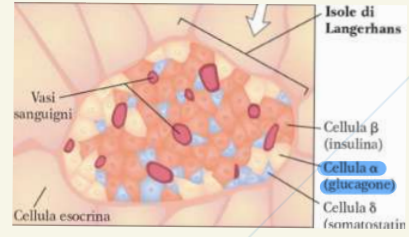
### Sistema di spegnimento e di controllo

- Ogni via di segnalazione deve avere sistema di spegnimento e di controllo

# Ipoglicemia

Cellule  $\alpha$  pancreas

Glucagone



- 1. Insulina attiva **Akt/PKB** attraverso l'interazione con il secondo messaggero PIP3
- 2. Akt attiva la PDE2
- 3. PDE2 blocca cAMP tagliandolo, idrolizzandolo
- 4. Akt attiva PP1
- 5. PP1 è una fosfatasi quindi defosforila
  - Glicogenosintasi, attivandola → PP1 attiva sintesi
  - Glicogenofosforilasi, inibendola → PP1 inibisce degradazione
- Le due vie di segnalazione, insulina e glucagone, vanno ad agire in modo opposto sui due enzimi segnapasso
  - Glucagone blocca sintesi e favorisce degradazione
  - Insulina blocca degradazione e favorisce sintesi

## Sistemi di trasporto

### Attraverso il sangue

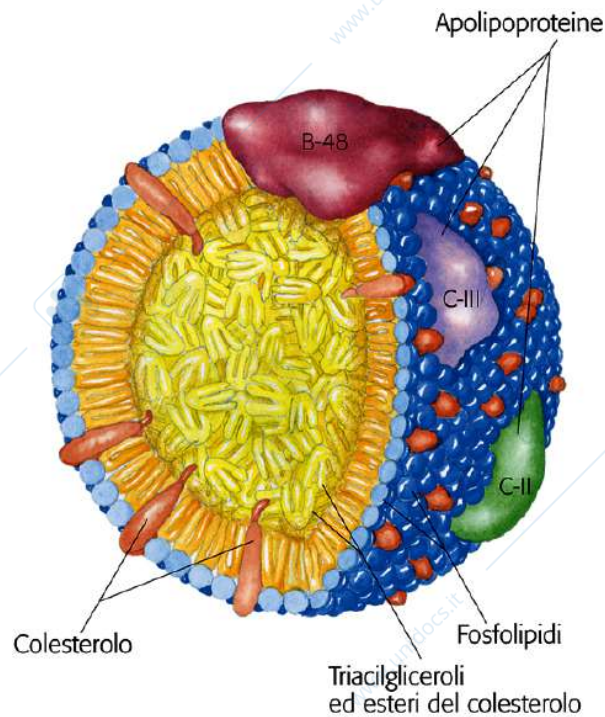
#### Trasporto lipidi

- Lipidi sono composti eterogenei scarsamente solubili in acqua e solubili in solventi organici
- Acidi grassi, essendo anfipatici, possono avere effetti dannosi su membrane cellulari (come lipasi  $\alpha_2$  serpente), non possiamo accumulare grosse quantità nel sangue perché costituirebbe un pericolo
- Trigliceridi, ancora più apolari degli acidi grassi non avendo carica, tendono a formare micelle che causano gravi embolie di grasso
- Cellule non possono rilasciare queste molecole direttamente nel torrente circolatorio, ci sarà bisogno di trasportatori
- Acidi grassi a catena corta (4-10C), come l'acido butirrico, possono liberamente muoversi nel sangue in quanto la loro carica negativa gli permette di sciogliersi nel sangue
- Acidi grassi a medio-lunga catena (12-20C) devono legarsi a delle proteine di trasporto, nel particolare all'albumina serica
  - Vengono rilasciati dalle cellule che si occupano di conservarli sotto forma di trigliceridi in particolare le cellule adipose del tessuto adiposo bianco
- Trigliceridi, colesterolo e derivati come esteri vengono veicolati nel sangue attraverso la formazione di complessi liposolubili chiamati **lipoproteine**
- Acidi grassi della dieta (prelevati dagli enterociti nel lumen dell'intestino) o quelli neosintetizzati (epatociti) vengono metabolizzati a formare esteri del glicerolo (trigliceridi) e del colesterolo e quindi inviati ai tessuti sotto forma di lipoproteine

#### Lipoproteine

- Sono complessi multimolecolari costituiti da decine di migliaia di molecole
  - Trigliceridi, essendo lipidi neutri, si separano dall'acqua formando una fase distinta
  - La parte centrale della molecola è formata da queste molecole apolari neutre come esteri del colesterolo, trigliceridi, vitamine liposolubili (formano il core)
- Questa struttura tenderebbe a coalescere con altre strutture se non ci fosse rivestimento esterno costituito da un monolayer di fosfolipidi che delimita la superficie della lipoproteina
- Accanto ai fosfolipidi vi è il colesterolo che è un lipide anfipatico

- Deve avere anche proteine specializzate dette **apolipoproteine**



#### Apolipoproteine

- Fondamentali per la forma e la solubilità della lipoproteina
- Solo cellule che riconoscono lipoproteine possono fermarle e dirigere i processi metabolici ed enzimatici che liberano dalla struttura gli acidi grassi presenti
- Regolano:
  - Forma e la solubilità del complesso
  - Attività enzimatica del metabolismo lipidico
- Sono ligandi riconosciuti dai recettori che si trovano sulle cellule bersaglio
  - Possono servire per arrestare il movimento delle vescicole attraverso il sangue tramite meccanismi di endocitosi che captano le LDL e HDL tramite il riconoscimento di specifiche apolipoproteine in queste contenute
  - A seconda della loro identità dirigono lipoproteine verso destino differente

#### Tipologie lipoproteine

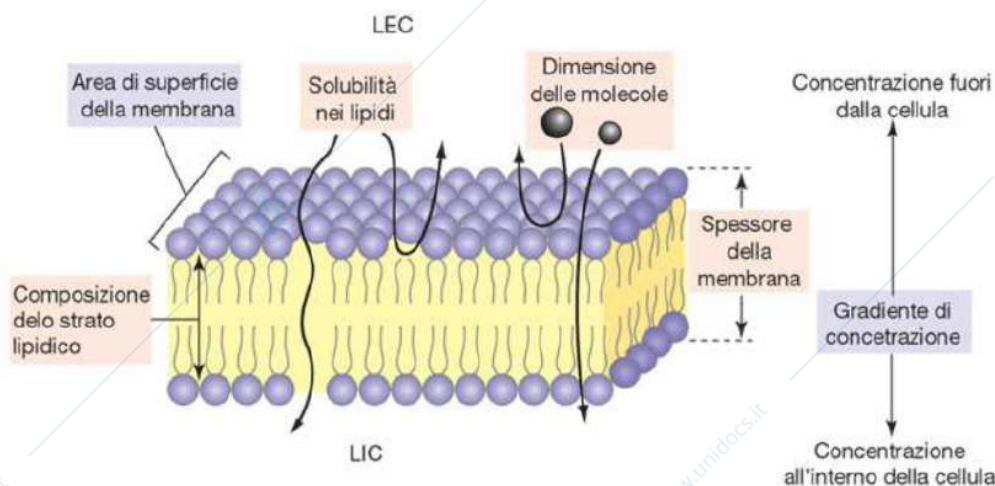
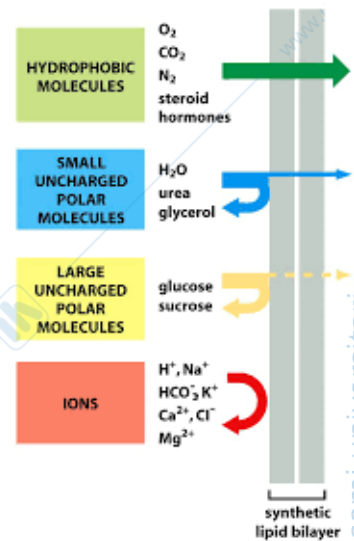
- Le lipoproteine si differenziano in base alla dimensione
- Maggiore è la quantità in proteine, maggiore è la sua densità
  - A sinistra più grandi e meno dense perché hanno una quantità relativa in lipidi e proteine profondamente diversa
- Lipoproteine comunicano tra loro e non si passano soltanto lipidi ma anche apolipoproteine
- **Chilomicroni**
  - Prodotti da enterociti (cellule intestino) dopo un pasto ricco di lipidi
  - È la forma con cui gli enterociti veicolano i lipidi della dieta a tutto l'organismo per rifornire di acidi grassi e colesterolo tutte le cellule del corpo
  - Rilasciati nei vasi linfatici che sboccano nel dotto toracico da dove raggiungono la vena succlavia e arrivano fino a tessuti che recuperano trigliceridi
  - Le rimanenze dei chilomicroni raggiungono il fegato dove vengono captate da epatociti per endocitosi
  - Densità bassa <0.95g/ml
    - Contengono la maggior parte dei lipidi 84-89% che sono <densi rispetto alle proteine
    - Colesterolo libero 1-3%

- Proteine 1.5-2.5%
- **VLDL** (Very Low Density Lipoprotein)
  - Prodotte da fegato per veicolare la sintesi di nuovi lipidi endogeni (prodotti endogenamente) dal fegato verso altri organi
  - Cellule utilizzano VLDL e le trasformano in vescicole che hanno una densità via via crescente
  - Svuotamento dei trigliceridi da parte delle cellule dell'organismo determina la trasformazione di queste lipoproteine nelle varie tipologie
- **IDL** (Intermediate Density Lipoprotein) e **LDL** (Low Density Lipoprotein)
  - Prodotti del rimaneggiamento delle VLDL
    - Quando le VLDL passano dal fegato verso i tessuti, i tessuti le metabolizzano, estraggono trigliceridi, colesterolo e proteine dalle lipoproteine e ne modificano la composizione
    - Aumenta la composizione in proteine e diminuisce la quantità di trigliceridi, da 45-65 nelle VLDL a 22 a 3, man mano che questi vengono estratti
  - LDL svolgono il ruolo di trasferire il colesterolo dal fegato (dove viene prodotto colesterolo endogeno) ai tessuti periferici
    - Se si accumula nei vasi sanguigni provoca acheromi, placche aterosclerotiche
- **HDL** (High Density Lipoprotein)
  - HDL prodotte da epatociti ed enterociti in forma immatura
  - Svolgono il ruolo opposto a quello delle LDL
    - Veicolano colesterolo in eccesso nei tessuti periferici verso il fegato che le riconosce e captandole è in grado di rimuovere il colesterolo in eccesso dal sangue (colesterolo buono) per utilizzarlo come precursore per la vit.B o per i sali biliari

LIPOPROTEINA				
PRINCIPALI CARATTERISTICHE				
caratteristiche	chilomicroni	VLDL	LDL	HDL
mobilità elettroforetica	nessuna	alfa <sub>2</sub>	beta	alfa <sub>1</sub>
densità (g/ml)	0,94	0,94-1,006	1,006-1,063	1,063-1,210
diametro (nm)	75-1200	30-70	18-30	5-12
costituenti %				
proteine	1-2	6-10	18-22	45-55
fosfolipidi	3-6	15-20	18-24	26-32
colesterolo	1-3	4-8	6-8	3-5
trigliceridi	80-95	45-65	4-8	2-7
colesteril esteri	2-4	16-22	45-50	15-20

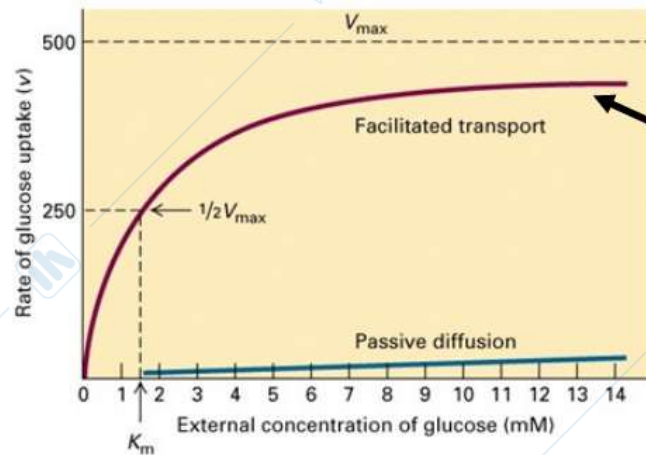
## Trasporto attraverso membrane cellulari

- Membrana è costituita da un doppio strato di fosfolipidi che impedisce il passaggio libero delle molecole
- Velocità con cui una molecola può attraversare la membrana dipende da:
  - Dimensioni, più è piccola più è in grado di attraversare la membrana
  - Polarità e idrofobicità: meno polare e più piccola è la molecola, più è in grado di attraversare la membrana
  - Questo vale per ossigeno, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, molecole lipofile come gli ormoni steroidei, piccole molecole apolari come il benzene e il cloroformio che sono in grado di attraversarla senza problemi
- Piccole molecole polari come H<sub>2</sub>O, urea e glicerolo passano difficilmente
  - Acqua attraversa senza problemi la membrana ma con una velocità molto bassa, seguendo il suo gradiente di concentrazione è un trasporto di diffusione semplice/passivo che ha una sua cinetica\*
- Molecole grandi come glucosio e saccarosio, più grandi e più polari dell'urea, non sono in grado di attraversare la membrana se non con un tramite
- Se molecole sono cariche non possono passare perché la membrana è impermeabile
- Nella membrana sono presenti fosfolipidi e colesterolo
  - Alcuni di questi fosfolipidi possono essere trasformati in secondi messaggeri,
  - Membrana è attraversabile da lipidi neutri ma non da specie cariche e/o polari

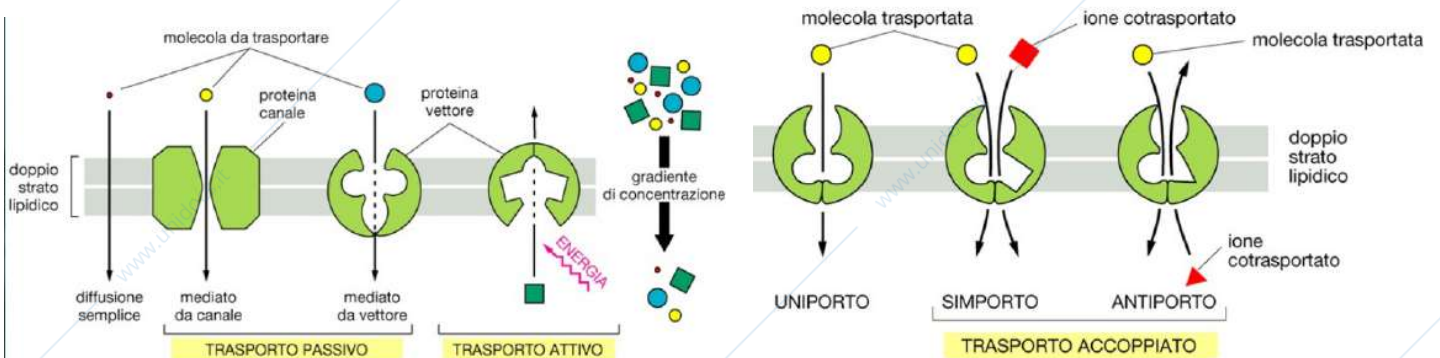


- Passaggio di una sostanza è dettato da fattori energetici come
  - Concentrazione della specie chimica ai lati della membrana
  - Se la specie è carica, anche dal potenziale elettrico di membrana, le specie cariche si muovono attraverso un gradiente elettrico che può aumentare o diminuirne il flusso di queste specie
- \*Velocità di passaggio di una molecola polare attraverso la membrana
  - Diffusione semplice
    - Glucosio, con abbastanza tempo, può attraversare membrana ma con una cinetica lentissima
    - Deve esserci una concentrazione esterna molto elevata per avere una velocità apprezzabile
    - Velocità aumenta molto lentamente all'aumentare della concentrazione del soluto
  - Diffusione facilitata
    - Se c'è un effettore del trasporto ovvero un trasportatore, il trasporto avviene con una velocità molto maggiore
    - Andamento cinetico è molto simile a quello di un enzima

- Cinetica segue un andamento iperbolico avente una sua affinità,  $K_m$ ,  $v_{max}$ , velocità semimassimale



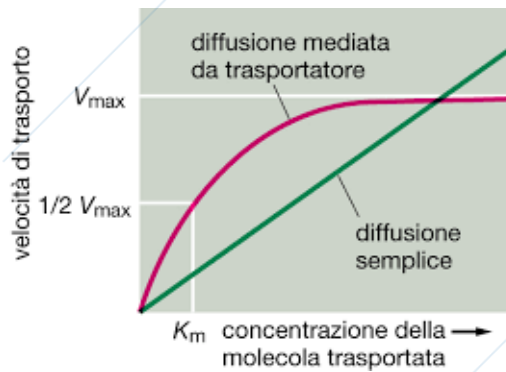
- **Diffusione semplice** è il passaggio di una molecola attraverso la membrana non mediato, data solo dalla sua capacità intrinseca di attraversare la membrana
- **Trasporto facilitato** o mediato coinvolge una proteina, che prende il nome di trasportatore, in grado di riconoscere la molecola e di trasportarla attraverso la membrana
  - Passivo
    - Non richiede consumo di energia
    - Molecola segue il suo gradiente di concentrazione
    - Soluti tendono spontaneamente a spostarsi da concentrazione max → min
  - Attivo
    - Molecola spostata contro il gradiente di concentrazione
    - Cellula deve investire energia metabolica
  - Esistono tre tipi di trasporti mediati da proteina
    - Uniporto: singola molecola
    - Simporto: due molecole, stessa direzione
    - Antiporto: due molecole, direzione opposta



#### Trasporto passivo

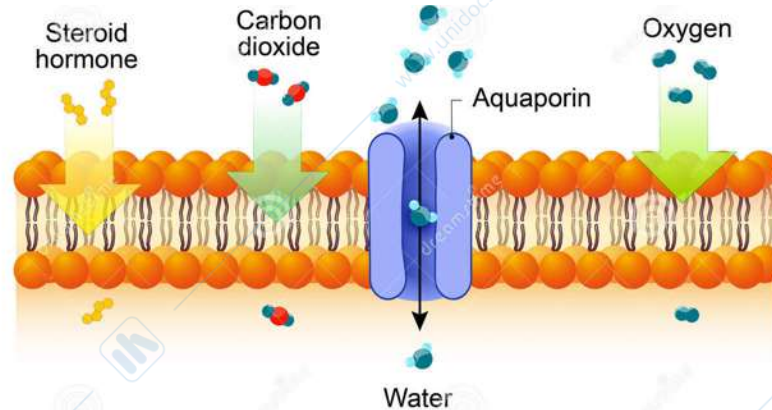
- Diffusione semplice, no proteina
  - Molecole apolari gassose,  $O_2$  e  $CO_2$ , si muovono seguendo il gradiente di concentrazione dalla parte più concentrata a quella meno concentrata
  - Anche molecole lipofile come ormoni steroidei, benzene
  - Aumenta all'aumentare della concentrazione del soluto
- Diffusione facilitata, proteina
  - Specifica: proteina riconosce in modo selettivo il soluto e fa passare solo quella molecola
    - Trasportatore glucosio è in grado di discriminarlo dal fruttosio
  - Saturabile: se occupiamo tutti i trasportatori la velocità rimane costante, se aumentiamo la concentrazione del soluto non aumenta la velocità

- $K_m$ : concentrazione di soluto che semisatura il trasportatore a cui corrisponde la velocità semimassimale  $1/2 V_{max}$  del trasporto di quella sostanza
- $V_{max}$ ; flusso massimo che quel trasportatore può garantire attraverso la membrana
  - Dipende dalla quantità di trasportatore che si trova sulla membrana

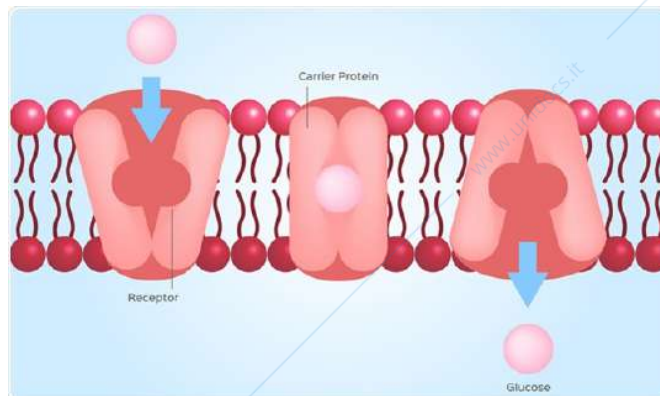


o Serve per sostanze polari come

- Acqua: per aumentare flusso esistono delle proteine specializzate chiamate **acquaporine** che sono canali che riconoscono le molecole acqua e le fanno passare a seconda della necessità della cellula di controllare il bilancio idrosalino

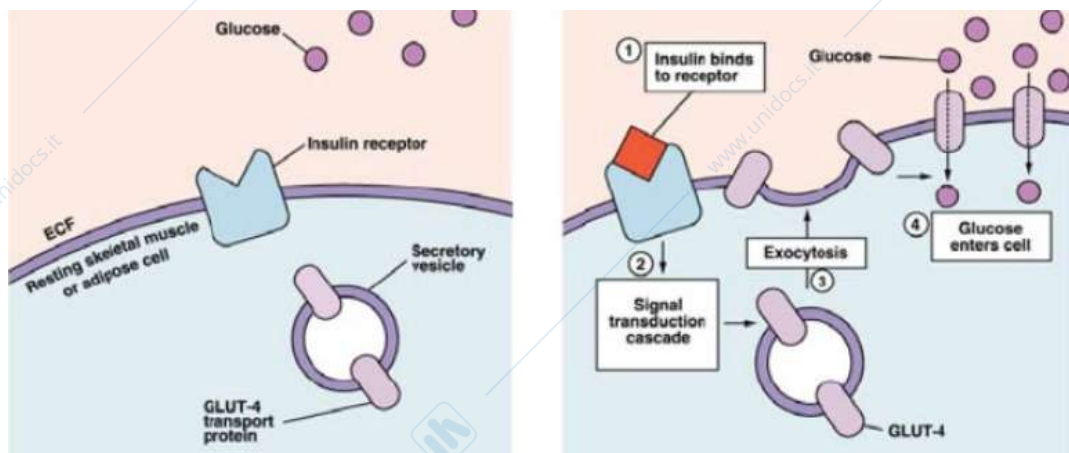


- Monosaccaridi: glucosio entra nella cellula solo se cellula ha trasportatori specifici

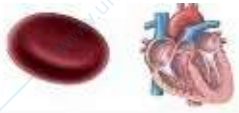





- GLUT1
  - o Ubiquitario ma particolarmente abbondante nei globuli rossi
  - o Garantisce rifornimento base delle molecole di glucosio
  - o  $K_m=1mM$
  - o Normoglicemia 5mM
  - o Se concentrazione substrato è 5 volte maggiore della  $k_m$  si dice che l'enzima lavora in condizioni di semisaturazione (se 10, saturo)
  - o Velocità con cui GLUT1 fa entrare il glucosio nella cellula è quasi vicina a  $V_{max}$

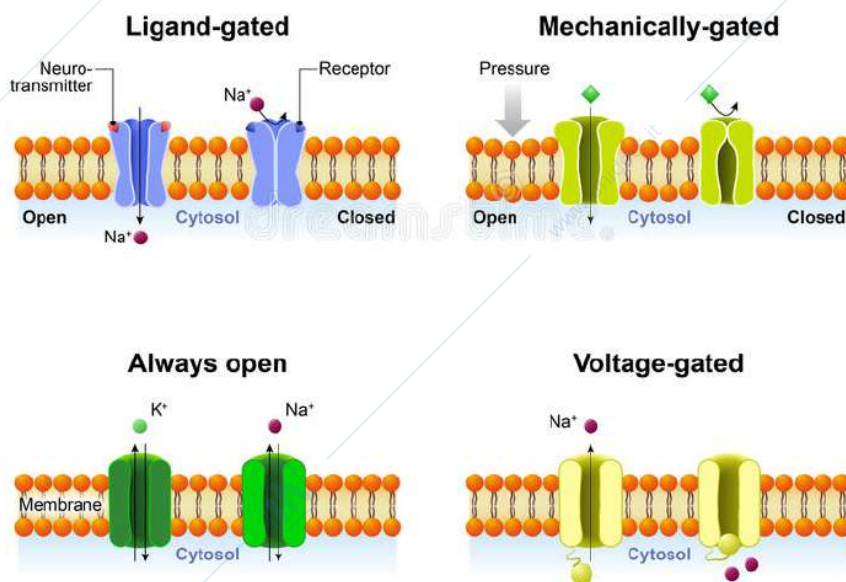
- Anche se la concentrazione del glucosio si abbassa la velocità è sempre alta perché il globulo rosso ne ha sempre bisogno perché è la sua unica fonte energetica
- GLUT2
  - Epatociti
  - Km=10-15mM
    - 10-15 volte meno affine al glucosio rispetto al GLUT1
  - Lavora in una condizione poco efficiente per trasferire il glucosio dal sangue al fegato perché il fegato non ne ha bisogno
  - Quando il fegato può evitare di usare glucosio non lo prende dal sangue
  - Lavora a una velocità minima alla concentrazione normale
  - Se ipoglicemia (<2.8mM) la velocità diminuisce sensibilmente
  - Ha una buona velocità solo quando c'è iperglicemia, il trasporto del glucosio negli epatociti diventa significativo
- GLUT3
  - Neuroni, usano prevalentemente glucosio
  - Km=1mM
  - Cellule necessitano di avere un afflusso costante di glucosio in qualunque condizione
- GLUT4
  - Miociti e adipociti
  - Km=5mM
  - Vmax viene controllata dalla insulina
    - Vmax dipende dalla concentrazione del trasportatore, in questo caso una proteina di membrana
  - Insulina attraverso Akt controlla la presenza del GLUT4 sulla membrana delle cellule
    - Quando le cellule devono incamerare glucosio, in condizioni di iperglicemia, le cellule del tessuto adiposo bianco e muscolari espongono trasportatori del glucosio e ne favoriscono la rimozione dal sangue



- GLUT5

	o Trasporta fruttosio		
<b>GLUT1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood</li> <li>• Blood-Brain Barrier</li> <li>• Heart (lesser extent)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulin-Independent</li> <li>- Low <math>K_m=1mM</math></li> <li>- High affinity</li> </ul>
<b>GLUT2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liver</li> <li>• Pancreas</li> <li>• Small Intestine</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulin-Independent</li> <li>• High <math>K_m=10-15mM</math></li> <li>• Low Affinity</li> </ul>
<b>GLUT3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brain</li> <li>• Neurons</li> <li>• Sperm</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulin-Independent</li> <li>• Low <math>K_m=5mM</math></li> <li>• High Affinity</li> </ul>
<b>GLUT4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Skeletal Muscle</li> <li>• Adipose Tissue</li> <li>• Heart</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insulin-dipendent</li> <li>- &gt; con iperglicemia</li> </ul>
<b>GLUT5 GLUT5</b>			- Trasporta FRUTTOSIO

- Trasporto passivo di specie cariche (elettroliti)
  - o Trasporto deve controllare sia concentrazione che potenziale elettrico
  - o Non richiede energia
  - o Garantito da canali ionici, ad esempio attivati da ligando
  - o Effetto di contrazione dell'acetilcolina sulle cellule muscolari è garantito dalla presenza di questo tipo di canali sulle cellule muscolari che vengono attivati dall'acetilcolina facendo passare ioni sodio all'interno della cellula, depolarizzandola, come segnale per la sua contrazione muscolare
  - o Possono essere attivati da ligando o dallo stato di tensione della membrana, i così detti meccanoceettori o attivati dal voltaggio della membrana (variazione potenziale membrana permette apertura e chiusura canali)



#### Trasporto attivo

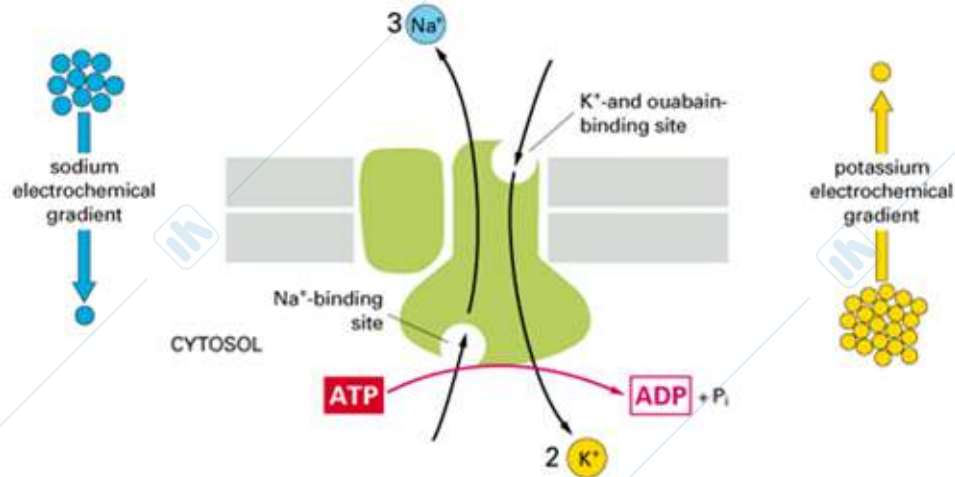
- Comporta consumo di energia
  - o Energia metabolica proviene da idrolisi legame fosfoanidridico dell'ATP
  - o Energia favorisce processo non spontaneo che può essere utilizzato come fonte di energia come ad esempio il passaggio di elettroni/protoni
- Primario (elettroliti)

- Pompe ioniche ATP-dipendenti, complessi proteici in grado di trasferire degli ioni grazie all'idrolisi dell'ATP
- Elettroliti più importanti
  - $\text{Na}^+$  è mantenuto, dall'attività metabolica della cellula, > concentrato est che < int
  - $\text{K}^+$  maggiore interno, minore esterno, per garantirlo cellula deve continuamente consumare energia
  - $\text{Mg}^{2+}$  differenza molto limitata
  - $\text{Ca}^{2+}$  esterno 1-2mM ma all'interno è molto bassa  $10^{-4}$ 
    - Dentro le cellule usato come secondo messaggero
    - Concentrazione estremamente controllata, molto bassa e aumenta solo quando cellula deve rispondere ad un certo stimolo
    - Contrazione muscolare è garantita dall'aumento repentino e controllato del calcio nel citoplasma, questo elettrolita viene rapidamente riportato alla condizione iniziale per permettere alla cellula di decontrarsi
    - Usato come segnale chimico
  - $\text{H}^+$  importante nei sistemi tampone 7.4-7.2
  - $\text{Cl}^-$  più concentrato all'esterno 100 e meno all'interno 5-15

Ione	Intracellulare	Extracellulare
$\text{Na}^+$	5-15 mM	145 mM
$\text{K}^+$	140 mM	5 mM
$\text{Mg}^{2+}$	0,5 mM	1-2 mM
$\text{Ca}^{2+}$	$10^{-7}$ mM	1-2 mM
$\text{A}^-$	65 nM/L	0
$\text{Cl}^-$	5-15 mM	110 mM

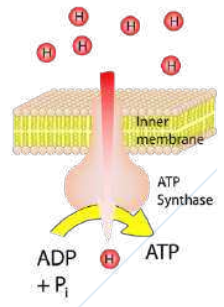
- Gradienti elettrochimici che la cellula utilizza in modo differente
  - $\text{Ca}^{2+}$  come segnale chimico
  - Sodio, potassio e cloruro servono come segnali di depolarizzazione, trasferimento di segnali elettrici da una cellula all'altra o diverse regioni della stessa cellula
- Il mantenimento dei gradienti elettrochimici è garantito dall'idrolisi continua di ATP da parte delle pompe
  - Interno della cellula è sempre mantenuto ad un potenziale inferiore all'esterno
  - Tra interno e esterno c'è una differenza di potenziale elettrico
  - All'interno il potenziale elettrico è negativo mentre all'esterno è positivo
- Per il passaggio di uno ione da una parte all'altra della membrana si deve tener conto sia della concentrazione che del potenziale elettrico
- **Pompa sodio-potassio**
  - Presente in tutte le cellule
  - Garantisce il mantenimento del gradiente di concentrazione di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  tra l'interno e l'esterno della cellula
  - Accoppiano idrolisi ATP con trasferimento antiporto di 3  $\text{Na}^+$  da int→est e 2 $\text{K}^+$  da est→int
  - Concentrazione sodio alta fuori, potassio dentro
  - Potenziale negativo all'interno e positivo all'esterno
    - Favorisce il passaggio di  $\text{K}^+$  all'interno perché ione positivo va verso negativo
    - Sfavorisce il passaggio di  $\text{Na}^+$  perché ione positivo verso positivo
  - Concentrazione
    - La forza che traina il passaggio di Na dall'esterno all'interno è maggiore della forza che traina il passaggio di K dall'interno all'esterno

- Due contributi: gradiente di concentrazione e differenza di potenziale
- Pompa è elettrogenica, spostando cariche genera un'asimmetria di carica (gradiente di carica) che è alla base della differenza di potenziale tra l'interno e l'esterno della cellula



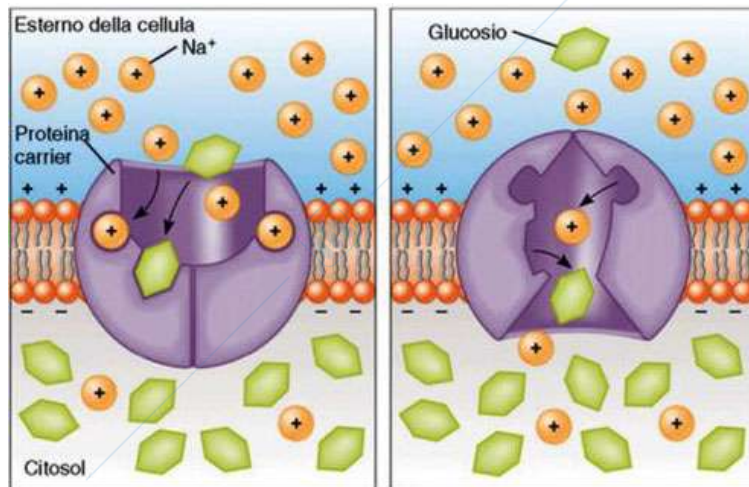
o **ATP sintasi**, complesso V

- Può agire in due direzioni
- Nella catena di trasporto degli elettroni permette la fosforilazione di ADP per formare ATP grazie al passaggio di H<sup>+</sup> dallo spazio intermembrana del mitocondrio verso matrice
- Può agire anche nel verso opposto e formare un gradiente di concentrazione di ioni sodio, potassio, calcio spendendo energia metabolica quindi ATP



o Secondario

- Metaboliti polari
  - Trasportatore fa un lavoro osmotico utilizzando energia, non dall'ATP, ma da gradiente elettrochimico ad esempio degli ioni sodio che viene generato dalla pompa sodio-potassio
  - Gradiente serve a favorire passaggio contro gradiente, quindi attivo, del glucosio dal lume dell'intestino verso il citoplasma dell'enterocita
  - Trasporto attivo simporto: due molecole si spostano nella stessa direzione
    - o Glucosio si sposta contro gradiente (trasporto attivo)
    - o Sodio si sposta secondo gradiente
  - Glucosio entra all'interno della cellula e si accumula nel citoplasma grazie al gradiente creato dal sodio

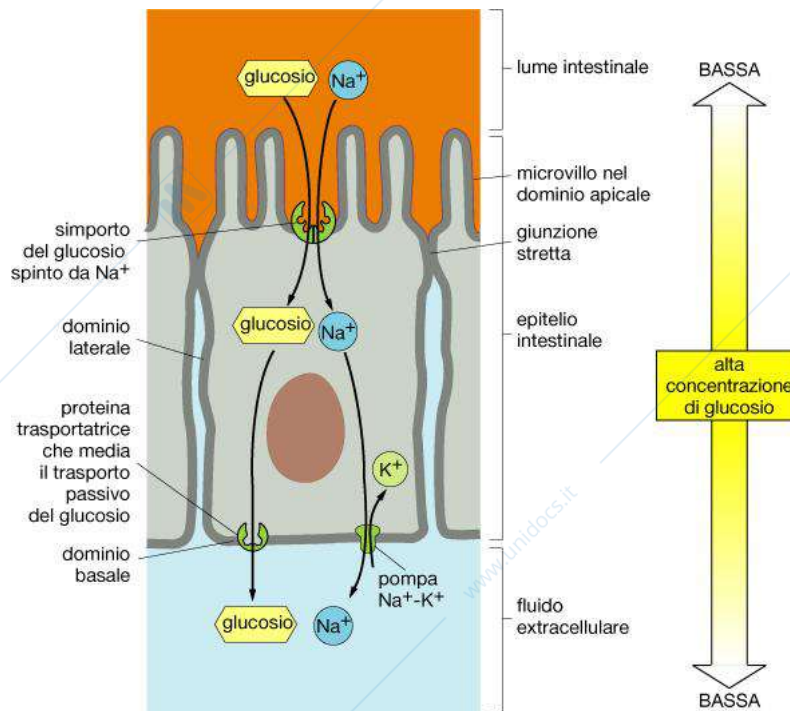


1 Gli ioni sodio ed il glucosio si legano alla proteina carrier.

2 La proteina carrier cambia conformazione e rilascia gli ioni sodio ed il glucosio all'interno della cellula.

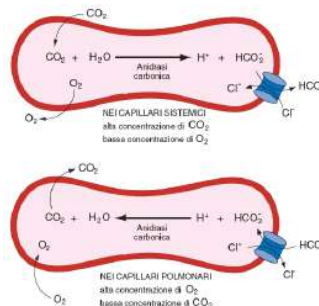
- GLUT2

- Si trova su enterociti, membrana basolaterale
- Non ha bisogno di energia
- Trasporto passivo facilitato del glucosio



- Metaboliti carichi

- Passaggio di ioni è favorito dalla distribuzione asimmetrica di concentrazione
- Nei mitocondri il passaggio di piruvato e fosfato è garantito dal gradiente di concentrazione di H<sup>+</sup> che favorisce il passaggio della molecola nella direzione desiderata
- Piruvato si forma nel citoplasma e deve essere veicolato nel mitocondrio, per essere metabolizzato, attraverso un **sistema antiporto piruvato/H<sup>+</sup> = trasportatore del monocarbossilato** (piruvato è acido monocarbossilico)
- Fosfato, importante per la rigenerazione ATP, deve essere fatto entrare nella matrice mitocondriale per essere riaccoppiato con l'ATP
  - Abbiamo bisogno di **co-trasporto**, in cui si spende il gradiente di concentrazione protonico generato dalla catena di trasporto degli elettroni, per veicolare il fosfato nel compartimento dove viene utilizzato
- **Antiporto del bicarbonato-cloruro**
  - Nel globulo rosso
  - Reversibile a seconda della concentrazione, intracellulare ed extracellulare, del bicarbonato
  - Trasporto permette il passaggio dalla cellula verso l'esterno o dall'esterno verso la cellula a seconda di cosa dovrà essere prodotto nei vari distretti
  - Noto come proteina banda 3 o AE1 (FINE LEZIONE 15, 27.04.21)

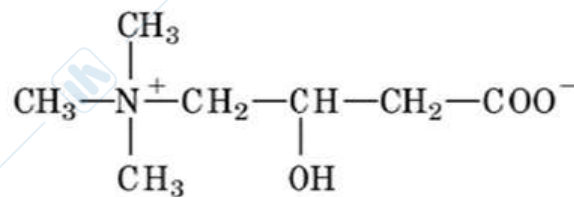


**Sistemi navetta** (INIZIO LEZIONE 1, 28.04.21)

Molecola che viene trasportata deve essere trasformata in qualcos'altro per poter attraversare la membrana, non possono attraversarla né da soli né attraverso il riconoscimento specifico da un trasportatore

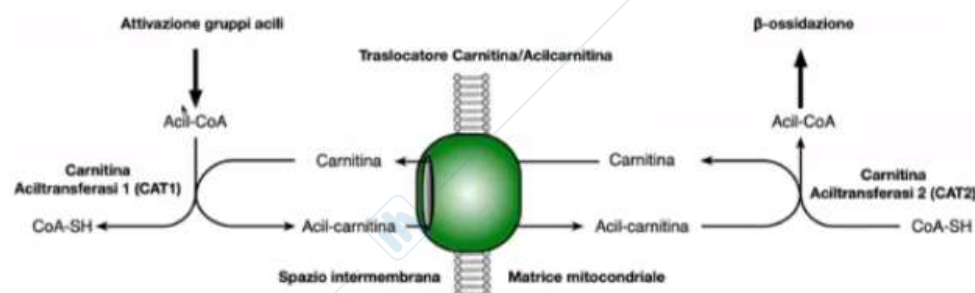
Carnitina

- Beta-ossidazione si svolge all'interno della matrice mitocondriale, ma i lipidi che devono essere trasportati provengono dallo spazio extramitocondriale e devono essere trasportati ad esempio dall'albumina che li veicola dal tessuto adiposo alle cellule che ne hanno bisogno
- Acido grasso, combustibile della cellula, deve innanzitutto essere veicolato nel sangue legato a qualcosa che ne permette la solubilizzazione, passare attraverso la membrana e arrivare al citoplasma e da lì arrivare al mitocondrio
- Per garantire questo spostamento, che non è permesso né all'acido grasso né all'acil-CoA (prodotto dall'acil-CoA sintetasi nel citoplasma) né al CoA, c'è bisogno di questo sistema
- Sistema è costituito da 3 componenti proteiche: 2 transferasi e un trasportatore
  - Transferasi
    - **Carnitina acil transferasi 1:** isoforma citosolica associata a mme
    - **Carnitina acil transferasi 2:** isoforma mitocondriale associata a mmi nel versante intramitriale
  - **Trasportatore acilcarnitina-carnitina**
    - Sistema antiporto che veicola lo spostamento di due molecole in direzione opposta
    - Riconosce la carnitina e l'acilcarnitina
- Carnitina è un composto che contiene
  - Gruppo ammonio quaternario, carico positivamente
  - Gruppo carbossilico COO<sup>-</sup>, carico negativamente a pH neutro
  - Ossidrilico OH legato vicino a un gruppo carico positivamente e uno negativamente



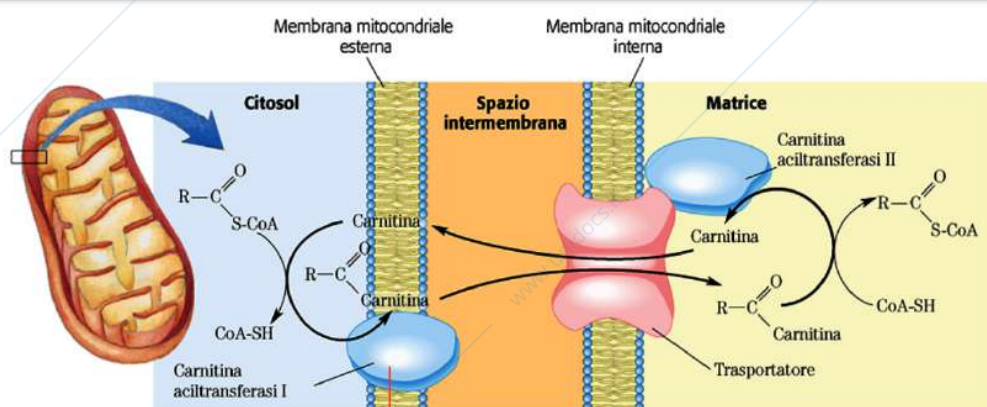
Carnitine

- Fondamentale per garantire il catabolismo degli acidi grassi, senza questa molecola la cellula non è in grado di assicurare un continuo trasporto degli acidi grassi dal citoplasma, dove vengono attivati, al mitocondrio, dove vengono bruciati attraverso la beta-ossidazione
  - Per bruciare grassi in eccesso si prende come supplemento la L-carnitina



1. Acido grasso che proviene dal deposito degli acidi grassi entra nella cellula e viene attivato dalla **acil-coa sintetasi** che consuma ATP per produrre l'acil-CoA il quale può svolgere due ruoli importanti
  - a. C'è una separazione delle vie metaboliche perché sia la sintesi degli acidi grassi che la sintesi dei trigliceridi avvengono nel citoplasma
  - b. Importante che la cellula separi queste due vie anaboliche (citoplasma) dalla via anabolica ovvero la beta-ossidazione che avviene invece nel mitocondrio
  - c. Destino dell'acil-CoA citosolico è segnato dall'attività questo sistema di trasporto

2. **CAT1** trasferisce il gruppo acilico dal CoA alla carnitina, gruppo carbossilico  $\text{COO}^-$  si lega con un legame estere all'OH della carnitina, formando **acil-carnitina**
  - a. Si forma acil-carnitina
  - b. CoA viene rilasciato
  - c. Avviene nel citosol, nella regione intermembrana del mitocondrio?
3. Acil-carnitina viene scambiata con una molecola di carnitina
  - a. Acil-carnitina citosolica viene scambiata con una carnitina mitocondriale/matriciale
  - b. **Sistema di antiporto**: acil-carnitina entra, carnitina esce
4. Acil-carnitina subisce un trasferimento di gruppi ad opera della **CAT2** mitocondriale che fa il processo opposto
  - a. Trasferisce l'acile attivato dalla carnitina al CoA
  - b. Si riforma l'**acil-CoA**

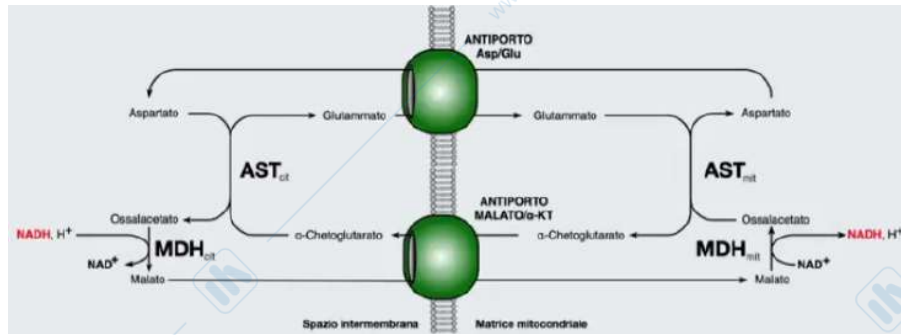


- Non abbiamo traslocatore di Acil-Coa, questo deve essere trasferito su un sistema navetta che è la carnitina (shuttle carnitina) che si occupa di trasferirlo nella matrice del mitocondrio e di rilegarlo al CoA
- CoA mitocondriale e CoA citosolico sono due molecole ben distinte e con ruoli diversi
  - Citosolico ha ruolo specifico nella sintesi degli acidi grassi e trigliceridi e nell'attivazione degli acili che devono essere degradati
  - Mitocondriale ha il compito di assicurare che gli acili che entrano nella cellula, attraverso lo shuttle, vengano degradati
    - Quando acile entra sotto forma di acil-carnitina nel mitocondrio il suo destino metabolico è segnato, non ha altra strada che quella della beta-ossidazione
- **CAT1** è **enzima segnapasso** (controlla) della beta-ossidazione, è la tappa che limita l'ingresso degli acili attivati all'interno del mitocondrio
  - **Malonil-CoA**, precursore della sintesi degli acidi grassi, è potente inibitore allosterico della CAT1
    - Quando si forma malonil-CoA vuol dire che la cellula è pronta per sintetizzare acidi grassi quindi blocca la loro degradazione (beta-ossidazione)
    - Si utilizza l'intermedio attivato della sintesi come inibitore della degradazione

#### Malato-aspartato

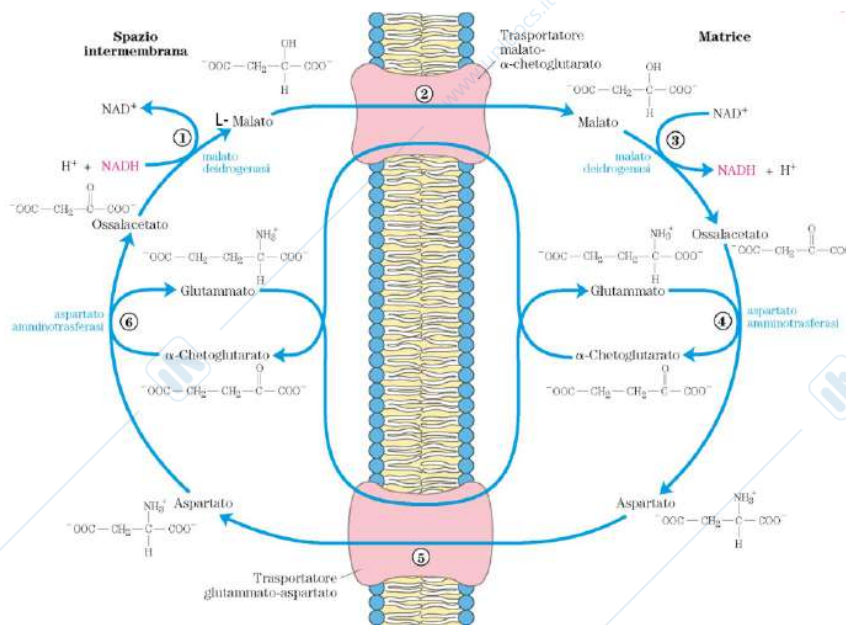
- Glicolisi può avvenire in due modalità: se abbastanza ossigeno aerobia, altrimenti anaerobia
- Epatociti sempre glicolisi aerobia perché costantemente irrorato di sangue e dunque ricco di ossigeno, i NADH devono essere riossidati utilizzando l'ossigeno come accettore finale di elettroni
- NADH e  $\text{NAD}^+$  non possono attraversare la mmi né da soli né con trasportatori
  - I  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  citoplasmatici e mitocondriale sono due pool differenti
- Glicolisi ha bisogno che il NADH venga riossidato per la tappa 6 della GAPDH

- Stesso concetto della carnitina, non si sposta il NADH ma gli elettroni ( $H^-$ ;  $H^+$ ) ovvero gli atomi di H che lui ha strappato alla GAP sotto forma di acido L-malico

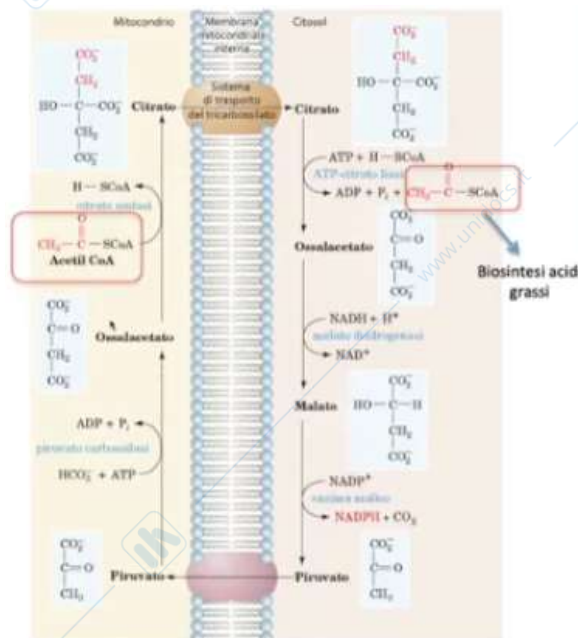


1. Reazione catalizzata dalla **MDH malato deidrogenasi** citosolica (no mitocondriale del ciclo di Krebs)
    - a. N.B. Ossalacetato non è in grado di attraversare la mmi → solo malato usando **trasportatore antiporto di acidi bicarbossilici** (malato-alfachetoglutarato)
    - b. Trasportatore fa uscire dal mitocondrio l'alfa-chetoglutarato mitocondriale e lo fa entrare nel citoplasma mentre il malato appena prodotto nel citoplasma, veicolando gli elettroni presi dal NADH, va nel mitocondrio = trasferimento del potenziale riducente preso dal NADH dal citoplasma al mitocondrio
    - c. Ossalacetato viene ridotto a malato che prende elettroni dal NADH che quindi si ossida a  $NAD^+$
  2. MDH catalizza la reazione opposta che ossida il malato, che cede elettroni al  $NAD^+$  mitocondriale che quindi si riduce a NADH, a ossalacetato
    - a. Il **NADH** che si è formato andrà incontro a fosforilazione ossidativa (nel mitocondrio) quindi cederà i suoi elettroni all' $O_2$  che si ridurrà a  $H_2O$  alimentando la corrente elettrica che diventerà la forza motrice necessaria alla sintesi di ATP
    - b. Malato deve tornare a essere ossalacetato
    - c. Alfa-chetoglutarato che è uscito dal mitocondrio dovrà ritornarvi sotto altra forma
  3. Si deve ripristinare il circuito
    - a. AST ha due forme: una mitocondriale e una citosolica
    - b. AST è una transaminasi, PLP dipendente, che trasferisce gruppi amminici da un amminoacido donatore ad un alfa-chetoacido accettore ovvero il glutammato
    - c. Il glutammato mitocondriale sposta il suo gruppo amminico all'ossalacetato
      - i. Ossalacetato diventa aspartato (accetta gruppo amminico)
      - ii. Glutammato diventa alfa-chetoglutarato (dona gruppo amminico) che era uscito per far avvenire il trasferimento (antiporto)
  4. Aspartato deve uscire dalla cellula per riformare l'ossalacetato che era stato consumato all'inizio
    - a. Abbiamo alfa-chetoglutarato che era uscito in concomitanza con l'entrata del malato
    - b. Alfa-chetoglutarato reagisce, grazie ad **AST citosolica**, con l'aspartato per dare da un lato l'ossalacetato iniziale e dall'altro, prendendo il gruppo amminico dall'aspartato, riformare il glutammato che è essenziale per trasferire l'aspartato dal mitocondrio al citoplasma
      - i. Alfa-chetoglutarato riprende il gruppo da aspartato e riforma glutammato
      - ii. Aspartato perdendo gruppo riforma ossalacetato
- **Antiporto aspartato/glutammato** (di amminoacidi) lavora in congiunzione con l'**antiporto malato/alfa-chetoglutarato** (degli acidi bicarbossilici)

Citrato-malato piruvato

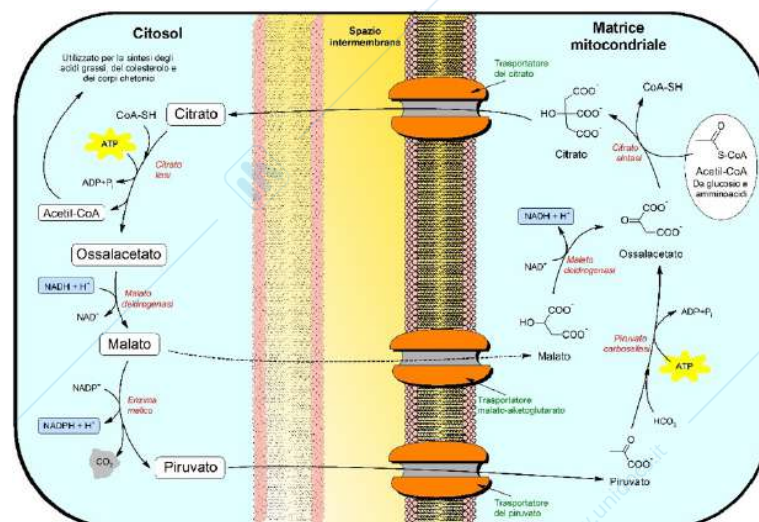


- Circuito chiuso che verrà utilizzato allo scopo di trasferire acetil-CoA dal mitocondrio, dove si sta accumulando, al citoplasma
  - La fonte è la decarbossilazione del piruvato o il catabolismo degli aminoacidi che convergono infatti verso la sintesi dell'acetil-CoA
    - Se si assumono troppi carboidrati e proteine, la parte in eccesso verrà trasformata in lipidi
  - Non è possibile che sia beta-ossidazione perché processo di sintesi non può avvenire insieme a quello di degradazione
- Quando cellula accumula nel mitocondrio acetil-coa è sinonimo di eccesso di nutrienti energetici e quando questo succede la cellula predispone che questi gruppi attivati ricchi di energia vengano utilizzati per la sintesi di composti di deposito, quindi per la sintesi degli acidi grassi



1. Acetil-CoA deve essere trasferito al mitocondrio, né il CoA né l'acetil-CoA possono passare
2. La cellula trasferisce l'acetile su una molecola in grado di attraversare la membrana
  - a. Reazione di condensazione, **citrato sintasi**, tra acetil-CoA e ossalacetato a formare il citrato che può attraversare la membrana
  - b. Citrato si accumula solo se c'è eccesso di alimentazione e dunque la carica energetica della cellula è alta, c'è tanto ATP e NADH mitocondriale il che causa il rallentamento del ciclo di Krebs

- c. Per far avvenire ciclo di Krebs c'è bisogno di potere ossidante ma se la cellula ha molto da bruciare il NADH si accumula
3. Citrato si accumula e viene trasferito per effetto di un gradiente di concentrazione da dove si sta accumulando, nel mitocondrio, verso il citoplasma dove verrà utilizzato come navetta dell'acetil-CoA
  - a. **Sistema di trasporto del tricabossilato** fa spostare il citrato dal mitocondrio al citoplasma
4. Nel citoplasma c'è l'**ATP citrato liasi** che catalizza la reazione opposta a quella della citrato sintasi
  - a. ATP citrato liasi scinde il citrato in ossalacetato e acetil-CoA
  - b. Reazione di condensazione è spontanea quindi irreversibile e non può avvenire il processo inverso senza che la cellula non spenda energia
  - c. Tiolisi del legame con CoA e ATP
  - d. ATP serve per trasformare il citrato in ossalacetato e rispostare il gruppo acetilico sul CoA per formare l'acetil-CoA che verrà utilizzato per la sintesi degli acidi grassi
5. Il resto della catena serve per due scopi
  - a. Chiudere il circuito, si deve riformare ossalacetato
  - b. Produzione del NADPH (**enzima malico**) che viene utilizzato dalla cellula non per ricavare energia ma per la sintesi degli acidi grassi
6. **Malato deidrogenasi citosolica**, ossalacetato viene ridotto dal NADH (che si ossida a  $\text{NAD}^+$ ) ad acido malico
7. Acido malico, attraverso **enzima malico**, viene deidrogenato in modo ossidativo, esce  $\text{CO}_2$  e si forma una molecola di NADPH, e si trasforma in piruvato
  - a. Ossidazione carbonio da alcol a chetone
  - b. Rilascio del carbossile sotto forma di  $\text{CO}_2$  (reazione irreversibile)
8. Piruvato attraversa la membrana con il suo trasportatore ed entra nel mitocondrio dove deve riformare l'ossalacetato
  - a. Piruvato reagisce con il bicarbonato attivato dall'ATP per produrre ossalacetato
  - b. **Piruvato carbossilasi** è un enzima mitocondriale, avviene solo nel mitocondrio
- Per far uscire un acetil-CoA dal mitocondrio la cellula ha speso:
  - 2 ATP
  - 2.5 ATP dal NADH (ossalacetato-malato)
  - = 4.5 ATP + NADPH
  - NADPH trasduzione dell'energia, da metabolica a energia di riduzione biosintetica
    - Se cellula ha abbastanza NADPH, il malato può passare con l'alfa-chetoglutarato in antiporto direttamente nel mitocondrio e ritrasformarsi in ossalacetato attraverso la malato deidrogenasi mitocondriale
    - Tutto dipende se la cellula ha bisogno di quantità di NADPH maggiori di quanto non ne garantisca la via dei pentoso fosfati
- Questo trasferimento è essenziale perché gli acetil-CoA si formano nel mitocondrio ma si usano nel citoplasma per formare acidi grassi, colesterolo e tutto ciò che ne deriva



## Sistemi tampone

Ph è un parametro fondamentale per il corretto funzionamento di cellule e organi e per questo è sottoposto, come la glicemia, ad una rigida regolazione attraverso vari sistemi di controllo che hanno lo scopo di mantenere costante la concentrazione di idrogenioni in soluzione

### Reazioni acido base

- Reazioni rapide, a differenza delle altre, che hanno una energia attivazione piuttosto bassa molto vicina a quelle delle molecole pronte a reagire
- Scambio di uno o più protoni da specie chimica che li dona (acido) ad una che le accetta (base)
- Come nelle reazioni redox abbiamo un doppio sistema reattivo
  - Serve almeno una coppia acido-base che fanno da reagenti
- **Acido:** specie chimica in grado di protonare che, dunque, abbia almeno un protone che è cedibile
  - $AH + H_2O \rightarrow A^- + H_3O^+$
  - Alcol non è un acido perché il suo H non è cedibile
  - Bronsted: sostanza in grado di cedere protoni
  - Forza è la tendenza a cedere protoni rispetto a qualcosa che li accetta
    - Per poter confrontare forza dell'acido dobbiamo farlo reagire con una base di riferimento ovvero l'acqua
  - Costante di dissociazione acida  $K_a$ 
    - Concentrazione prodotti all'equilibrio con acqua protonata (forma acida dell'acqua) / concentrazione dei reagenti
      - $$K_a = \frac{[A][H_3O^+]}{[AH][H_2O]}$$
    - Acqua omessa perché acqua non è solo reagente ma anche il solvente, se consideriamo quanta acqua viene protonata rispetto all'acqua totale ci accorgiamo che la concentrazione dell'acqua non varia, di conseguenza la concentrazione dell'acqua viene considerata è costante ed è integrata in Ka
  - Acido forte, un acido è tanto più forte quanto più si dissocia
    - $K_a \gg 1$ 
      - All'equilibrio prevale forma dissociata, numeratore elevato
      - Un acido è tanto più forte quanto maggiore è la  $K_a$
    - Esempi
      - Acido cloridrico HCl che si forma nello stomaco
      - Acido solforico  $H_2SO_4$  che si forma dal catabolismo degli amminoacidi solforati come Cys e Met
  - Acido debole
    - $K_a \ll 1$ 
      - All'equilibrio prevale la forma indissociata, denominatore elevato
    - Forza si misura con logaritmo  $pK_a = -\log K_a$ 
      - Acido è tanto più forte quanto più piccolo è il valore della pKa
  - Sostanza acida quando cede protoni passa alla sua forma deprotonata chiamata base coniugata  $A^-$ 
    - Coppia acido-base è  $AH/A^-$
    - Coppia base-acido  $H_2O/H_3O^+$
    - Coppia acido-base: acido piruvico/piruvato
      - $Acido\ piruvico + H_2O \rightarrow Piruvato + H_3O^+$
      - Forma acida:  $AH$  = acido piruvico
      - Forma basica:  $A^-$  = piruvato
      - $pK_a = 2.4$  (più è piccolo, più forte è l'acido)
- **Base:** specie chimica in grado di accettare uno o più protoni
  - $B + H_2O \rightarrow BH^+ + OH^-$

- La base ha un doppietto libero :
- Forza base è la sua tendenza ad accettare i protoni, si misura con acido standard di riferimento ovvero l'acqua per vedere quanti protoni accetta la base da questo
- Costante di dissociazione basica  **$K_b$** 
  - $K_b = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B:][H_2O]}$
  - La base è tanto più forte quanto più forte è la  $K_b$
  - Basi forti  $K_b \gg 1$ 
    - Idrossido di sodio NaOH e idrossido di potassio KOH
  - Basi deboli  $K_b \ll 1$ 
    - Ammoniaca
  - La forza si misura con la  $pK_b = -\log K_b$ 
    - Tanto è più piccola, tanto è più forte la base
    - Per qualunque base possiamo ottenere il valore della  $pK_a$  dell'acido coniugato della base con questa espressione  $pK_a = 14 - pK_b$
- Quando una base accetta protoni diventa l'acido coniugato
  - Coppia acido base  $NH_4^+/NH_3$ 
    - $NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$
    - Forma basica: B: =  $NH_3$  (ammoniaca)
    - Forma acida:  $BH^+ = NH_4^+$  (ione ammonio)
    - $pK_b = 4.75$ 
      - Capacità dell'ammoniaca di strappare protoni all'acqua
    - $pK_a = 9.25$ 
      - $pK_a = 14 - 4.75 = 9.25$
      - Forza dell'acido coniugato
      - Forza dello ione ammonio di protonare l'acqua
      - Acido piruvico ha  $pK_a = 2.4$ 
        - Acido più forte, relativamente, è l'acido piruvico perché più è bassa la  $pK_a$  più l'acido è forte
        - Sono entrambi acidi deboli



- N.B. Acqua è un acido e base debole
  - Acido piruvico è più acido dell'acqua quindi cede elettroni
  - Ammoniaca è più basica e prende gli elettroni dall'acqua

## Sistemi acido-base

- Come gli elettroni, anche i protoni non possono esistere isolati e può essere ceduto solo se c'è qualcosa che li accetta → coppie acido-base
- La forma della coppia acido-base che ha la forza acida maggiore, quindi  $pK_a$  minore, è la forma acida che protona la forma basica della coppia con  $pK_a$  minore
  - Quando abbiamo due acidi, vince chi ha  $pK_a$  minore e che quindi si comporterà da acido
  - Coppia con  $pK_a$  maggiore formerà la base
  - Quando abbiamo le coppie acido piruvico/piruvato e ammoniaca/ione ammonio sappiamo che sarà l'acido piruvico a cedere protoni all'ammoniaca a formare ione ammonio e piruvato
    - Acido piruvico + ammoniaca → piruvato + ione ammonio

- Non sarà lo ione ammonio a donare protone al piruvato per formare acido piruvico e ammoniaca. Può succedere solo se in quel sistema vi sono solo piruvato+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- Reazioni acido-base sono reazioni reversibili
  - Acidi e basi deboli – reazione reversibile
  - Acidi e basi forti – reazione irreversibile
- **Acqua** è una sostanza anfotera, si comporta da acido (dona H<sup>+</sup>) in presenza di una base e da base (accetta H<sup>+</sup>) in presenza di un acido
  - $H_2O + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^-$
  - Una molecola si comporta da base e l'altra si comporta da acido
  - Molecole d'acqua dà un protone ad una molecola d'acqua vicina e si trasforma in OH<sup>-</sup> e protona l'altra molecola formando ione idronio H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>
  - La forza si misura con
    - $pH = -\log [H^+]$ 
      - H<sup>+</sup> = H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, non può esistere da solo ma sempre in associazione a qualco'altro, in questo caso ad una molecola d'acqua
    - $pOH = -\log [OH^-]$
  - Costante di dissociazione acida dell'acqua = di autoprotolisi dell'acqua
    - $K_w = [H_3O^+][OH^-] = 10^{-14}$  è una costante a 25°C
    - Rapporto tra le specie prodotte / le specie che reagiscono
    - Acqua è costante integrata all'interno di K<sub>w</sub>
    - $-pK_a = 14$  è la somma  $pH + pOH = 14$  che sarebbe  $-\log K_w = pH + pOH = 14$ 
      - Possiamo conoscere il pH conoscendo la concentrazione degli idrogenioni
      - O il pOH conoscendo la concentrazione degli H<sup>+</sup>
      - Perché c'è un equilibrio: se variamo pH varia pOH e viceversa ma la loro somma sarà sempre 14 (FINE LEZIONE 16, 28.04.21)

### Equazione di Henderson-Hasselbach (INIZIO LEZIONE 17, 03.05.21)

- Consideriamo un equilibrio acido-base semplificato
- $AH \rightarrow A^- + H_3O^+$ 
  - AH è molecola acida che reagisce con acqua (trascurata perché concentrazione non varia)
  - Acido si dissocia a formare la sua base coniugata A<sup>-</sup> e l'acido coniugato dell'acqua ovvero lo ione idronio H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> che si può semplificare come H<sup>+</sup>
- $K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}$ 
  - Rapporto tra la concentrazione dei prodotti (forma basica acida e idrogenioni) e la concentrazione della forma acida (tutte concentrazioni all'equilibrio)
- $-\log K_a = -\log \left( \frac{[H_3O^+][A^-]}{[AH]} \right) = -\log [H_3O^+] - \log \left( \frac{[A^-]}{[AH]} \right)$ 
  - Regola logaritmi: logaritmo di due termini che si moltiplicano è uguale alla somma di questi
  - $-\log [H^+] = pH$  e  $pK_a = -\log K_a$
  - Ricaviamo l'equazione di Henderson-Hasselbach
- $pH = pK_a + \log \left( \frac{[A^-]}{[AH]} \right)$ 
  - Concentrazioni sempre all'equilibrio
- Equazione è un'approssimazione di ciò che succede in soluzione perché abbiamo trascurato
  - Acqua e la sua dissociazione che, per una certa percentuale, contribuisce nella formazione degli idrogenioni e degli ioni OH<sup>-</sup>
  - Nel passare da AH a A<sup>-</sup> una certa quota dell'acido si dissocia, cambia la concentrazione. Concentrazione A<sup>-</sup> aumenta rispetto alla concentrazione iniziale
- Nonostante ciò ci permette di calcolare, con un limite di accettabilità, il valore del pH o del rapporto tra la concentrazione dell'acido e della sua base coniugata
  - Ignora l'equilibrio di autoprotolisi dell'acqua (non conta i protoni provenienti dall'acqua)
  - Valida per soluzioni diluite
  - Range di utilizzabilità va dal micromolare al millimolare

- Valori numerici approssimati sulla prima cifra decimale
- Serve per calcolare pH di un sistema tampone che nella biologia presenta un range di attuazione che è in quello dell'utilizzabilità di questa formula
- Possibile misurare il pH di qualunque sistema tampone biologico conoscendone le caratteristiche acide come
  - pKa dell'acido debole
  - Rapporto relativo delle sue componenti, forma acida e forma basica
- Se abbiamo pH possiamo calcolare il rapporto relativo

### Omeostasi della concentrazione degli idrogenioni

- pH varia entro dei limiti ben precisi a seconda dei tessuti e del distretto cellulare che consideriamo
- È importante che il pH di questi distretti si mantenga entro certi limiti perché è fondamentale per il mantenimento delle caratteristiche strutturali e quindi funzionali delle proteine e quindi degli enzimi
  - Vi sono 5 diverse catene laterali di amminoacidi che si possono ionizzare quindi caricare, positivamente o negativamente, a seconda del pH
  - pH può variare la forma di dissociazione delle catene laterali di questi 5 aa carichi e così facendo modifica anche le caratteristiche strutturali della proteina che li contiene
- Sappiamo che la cellula mantiene attraverso le sue membrane dei gradienti di concentrazione elettrochimici che comprendono ad esempio Na e K
  - Na e K sentono la concentrazione di H<sup>+</sup> e questi possono influenzare la loro concentrazione intracellulare ed extracellulare andando ad alterare anche caratteristiche importanti di caratteristiche di eccitabilità neuronale, cellulare
    - Importante è l'eccitabilità delle cellule del miocardio che sono molto sensibili alle concentrazioni del K extracellulare, gravi danni quando pH varia oltre il range consentito
- pH nel sangue ha un valore che si aggira intorno ai 7.4
- **Range** accettabile è 0.3
  - Entro questo intervallo l'organismo riesce ad attuare una serie di meccanismi omeostatici che riportano il pH intorno al valore normale
  - <7.1 vi è acidosi grave che può essere fatale
  - >7.7 vi è alcalosi “ “
- pH è **neutro** quando [H<sup>+</sup>] = [OH<sup>-</sup>] = 10<sup>-7</sup>
  - Moltiplicati danno il valore della costante di dissociazione acido-basica dell'acqua ovvero 10<sup>-14</sup>
  - pH neutro = 7
- pH **fisiologico** è leggermente alcalino 7.4
  - >7.4 = alcalemia
  - <7.4 = acidemia
  - Indicano condizioni in cui il pH è superiore o inferiore al pH di riferimento
  - Incompatibili con la vita perché modificando la carica di molecole presenti nelle proteine, ad esempio enzimi vitali, oppure andando a influenzare l'equilibrio idrosalino delle cellule si andrebbe a compromettere la funzione di molecole importanti come il trasporto dell'ossigeno, anidride carbonica, organi vitali come cuore, cervello
- C'è bisogno di sistemi complessi di controllo di queste variazioni

### Processi che portano alla variazione del pH ematico

- Alcalosi >pH
  - Alcalosi metaboliche se prodotte da processi metabolici
  - Alcalosi respiratorie se la loro causa primaria è riconducibile ad alterazioni nel tasso respiratorio
- Acidosi <pH
  - Acidosi metaboliche “ “
  - Acidosi respiratorie “ “

- Processi principali di alterazione del pH sono processi di acidosi, spesso metabolici ma anche respiratori

### Clinica

In **clinica** per capire se c'è uno stato alterato del pH ematico si misura il pH, con il pH-metro, nel sangue arterioso la pressione parziale di CO<sub>2</sub> e di O<sub>2</sub>

- In base ai valori ottenuti, conoscendo il valore di pK<sub>a</sub> del tampone bicarbonato, possiamo risalire alla situazione del processo in atto, se sta aumentando o diminuendo la concentrazione di anidride carbonica o dello ione bicarbonato
- $pH = pK_a + \log \left( \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2(aq)]} \right)$  per forma disciolta, moli per litro disciolte in soluzione acquosa
- $pH = pK_a + \log \left( \frac{[HCO_3^-]}{K_{diss} * pCO_2(aq)} \right)$  per forma gassosa
- Se misuro pH (pH-metro) e conosco la pK<sub>a</sub>, posso verificare, data la [CO<sub>2</sub>], se il bicarbonato [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] sta aumentando o diminuendo
  - <pCO<sub>2</sub> = alcalosi respiratoria
  - >pCO<sub>2</sub> = acidosi respiratoria
  - > bicarbonato = alcalosi respiratoria
  - < bicarbonato = acidosi metabolica
  - Dobbiamo valutare le concentrazioni rispetto ai valori di riferimento per capire quale condizione sta alterando il pH ematico
- Ricorda! CO<sub>2</sub> è un gas ed esiste in due fasi: gassosa e disciolta
  - Gassosa si misura con pressione parziale pCO<sub>2</sub>
  - Disciolta si misura in moli per litro

### Range nei diversi compartimenti

- Cellule
  - Citoplasma: 7.2
  - Lisosoma: 2-3
- Spazio extracellulare: 7.4
  - È a contatto diretto con il sangue quindi ha stesso pH
- Sangue: 7.4

### Input acidi da parte del metabolismo

Acidosi sono più frequenti ad alcalosi perché il metabolismo cellulare determina continuamente una produzione di acidi

- Acido volatile: CO<sub>2</sub>
  - Si idrata a formare acido carbonico
    - CO<sub>2</sub> di per sé non è un acido ma interagendo con l'acqua forma un acido
  - 20 moli/die
    - 20 moli di anidride carbonica che si sviluppa per il metabolismo basale dell'organismo e che devono essere smaltiti attraverso la respirazione
- Acidi non volatili
  - Acidi che non possono essere smaltiti attraverso i polmoni e che quindi devono essere eliminati altrimenti il pH diminuirebbe e causerebbe una pericolosa acidosi
  - 50-80 mmoli/die
    - Quantità circa 1000 volte più bassa rispetto alla CO<sub>2</sub> che si sviluppa
  - Acido lattico
    - Prodotto da glicolisi anaerobia
    - Eritrociti, miociti (muscolo scheletrico soprattutto), cheratinociti, corneociti
  - Corpi chetonici
    - Epatociti
      - Digiuno prolungato
      - Diete chetogeniche (basso tenore di carboidrati e alto di lipidi e amminoacidi)

- Diabete non trattato
- Acido solforico
  - Catabolismo amminoacidi solforati Cys e Met
- Acido fosforico
  - Catabolismo di acidi nucleici e fosfolipidi

## Tampone biologico

- Ci concentriamo sulle variazioni che il pH può subire nel sangue a causa del normale metabolismo
- Importanza fisiologica dello sviluppo di un certo numero di sistemi tampone biologici che servono a limitare in modo importante la variazione che il pH del sangue può subire quando nel sangue vengono riversati questi quantitativi di acidi (sia forti che deboli)
- Tampone è un sistema chimico in grado di limitare la variazione del pH di una soluzione dopo l'aggiunta di moderate quantità di acido o base forte
  - Organismo deve evitare che il pH vada oltre il range di 0.3
- ✓ Tampone è una soluzione equimolare di un acido debole e della sua base coniugata
  - Non si può avere tampone usando un acido forte, come HCl, perché si dissocia completamente e quindi si potrà mai avere una soluzione equimolare di acido cloridrico e della sua base coniugata
  - Deve esserci un acido debole e la sua base coniugata deve avere una concentrazione simile a quella dell'acido debole

### Esercizio

- Calcolare la variazione del pH di 1L di acqua quando vengono aggiunti 0.1millimoli di un acido forte, prima senza tampone poi con
- Quando misuriamo pH dell'acqua pure pH=7 neutro, unico equilibrio chimico acido-base è quello dell'autoprotolisi dell'acqua
- pH della soluzione se aggiungiamo 0.1millimoli di HCl
  - Essendo HCl un acido forte si dissocerà completamente in  $H^+$  e  $Cl^-$  quindi la concentrazione molare di  $H^+$  sarà uguale a quella iniziale di HCl,  $M=0.1 \times 10^{-3} = 10^{-4} M \rightarrow pH=4$
  - Senza tampone acqua passerebbe da pH 7 a 4, variazione di 3 unità inaccettabile in un sistema biologico
    - Variazione  $pH = 7-4 = 3$
- Tampone è garantito da di miscela di acido fosforico diidrogenofosfato  $H_2PO_4^-$  (forma acida) e della forma basica idrogenofosfato  $HPO_4^{2-}$ 
  - Abbiamo 2mM di ciascuna forma
  - Forma acida ha una sola carica negativa perché ha perso un protone
  - Forma basica ha carica -2 perché ha perso due protoni
  - $pK_a=6.82$  (della coppia acido-base)
  - Si usa la formula  $pH = pK_a + \log ([A^-]/[AH])$  per calcolare il pH dell'acqua tamponata
  - $pH=6.82 + \log (2/2) = 6.82+0=6.82$
  - Se mettiamo in una soluzione una stessa quantità di un acido debole e della sua base coniugata e sono quindi equimolari, per l'equazione di Henderson-Hasselbach, il pH sarà uguale al  $pK_a$  del tampone  $\rightarrow pH=pK_a$
- Come varia il pH=6.82 se aggiungo 0.1mmoli di acido in 1L di acqua tamponata?
  - Quando acido è forte si dissocia completamente
    - Se mettiamo acido forte in acqua, esso formerà una quantità equimolare di  $H^+$  dunque  $[H^+] = 0.1mmoli$
    - $HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$
  - Quando acido debole solo una parte si dissocia a formare la base
  - Sistema tampone reagisce neutralizzando l'acido
    - Forma basica del tampone  $HPO_4^{2-}$  reagisce con l' $H^+$  di HCl e lo preleva formando il suo acido coniugato

- $\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{O}$
  - **Neutralizzazione** degli  $\text{H}^+$  aggiunti
  - L'aggiunta di 0.1 mmol di  $\text{H}^+$  nel litro d'acqua porta alla formazione di ulteriori 0.1mmol di  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (forma acida del tampone a scapito della scomparsa di 0.1mmol della base)
  - Tampone subisce la variazione della composizione dei suoi componenti
    - Base diminuisce della quantità aggiunta di acido
      - $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = (2-0.1\text{mmol}) \text{ mmol/L}$
      - Diminuisce a causa della sua reazione con gli idrogenioni provenienti dalla completa dissociazione dell'acido forte
    - Acido aumenta della stessa quantità
      - $[\text{HPO}_4^{2-}] = (2+0.1) \text{ mmol/L}$
      - Aumenta per effetto della protonazione della sua base coniugata
  - $\text{pH finale} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} \right) = 6.82 + \log \left[ \frac{(2-0.1)}{(2+0.1)} \right] = 6.76$
  - Variazione del  $\text{pH} = 6.82 - 6.76 = 0.06$
  - Variazioni
    - Senza tampone  $\text{pH} = 7 - 4 = 3$
    - Con tampone  $\text{pH} = 6.82 - 6.76 = 0.06$
    - La forza del tampone è quella di limitare la variazione del pH in aggiunta di una stessa quantità di acido forte
  - Limiti del tampone:
    - Quantità di acido che può tollerare
- Caratteristiche del tampone
- Capacità o forza tamponante
    - Capacità di un tampone di neutralizzare aggiunte di acidi o di basi forti
    - È tanto maggiore quanto più il sistema è equimolare quindi quando abbiamo la stessa quantità di forma acida e basica
    - Condizione migliore è quella in cui nel tampone prevale una forma rispetto all'altra di più di 100 volte, ad esempio se la forma acida è 100 volte meno della forma basica il tampone riesce a tamponare meno bene la soluzione
  - Ogni tampone ha un range in cui la forza tamponante è massima, questo range possiede la sua massima capacità tamponante per valori vicini al  $\text{pK}_a$  dell'acido debole
    - $\text{pH} = \text{pK}_a \pm 2$
    - $\text{pK}_a - 2 < \text{pH} < \text{pK}_a + 2$
    - Per essere efficace il tamponamento le due specie possono variare in un rapporto massimo di 1/100
    - Perché se pH supera questo range avremo che la forma acida e la forma basica saranno troppo diverse come concentrazione
  - Capacità tamponante dipende dalla concentrazione della coppia acido-base che lo costituisce

## Tamponi fisiologici

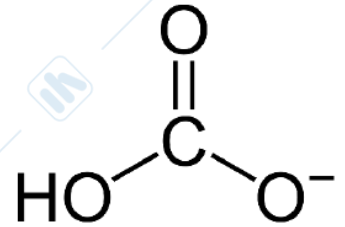
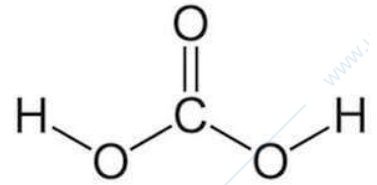
Tamponi che gli organismi mettono in atto per limitare la variazione di pH quando gli acidi volatili o meno vengono riversati nel sangue, cellule o spazio extracellulare

### Tampone bicarbonato

- Tampone più importante nel sangue
- Capacità tamponante nel sangue del 75%

Componenti

- Forma acida: acido carbonico  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 
  - Acido diprotico
  - Carbonio legato a due ossidrilici che si dissociano
    - Alla prima dissociazione si trasforma nella sua forma basica
    - $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+$
    - $K_{a1} = 2.7 \times 10^{-4}$
    - $\text{p}K_{a2} = 3.6$
- Forma basica: bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$ 
  - È diprotico perché può sia accettare un protone ( $\text{O}^-$ ) che cederlo ( $\text{OH}$ ) quindi è sia acido che base debole
  - Bicarbonato quando si dissocia ( $2^\circ \text{H}^+$ ) forma ione carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ 
    - $K_{a1}$  costante dissociazione primo  $\text{H}^+$  dell'acido carbonico
    - $K_{a2}$  costante dissociazione secondo  $\text{H}^+$  del bicarbonato (monoprotico)
      - $\text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_3\text{O}^+$
      - $K_{a2} = 1.0 \times 10^{-11}$
      - $\text{p}K_{a2} = 11$



#### Reazione acido-base

- Acido carbonico + acqua  $\rightarrow$  bicarbonato +  $\text{H}^+$
- $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+$

#### Apparenti discrepanze sull'efficacia di questo tampone

- $\text{p}K_{a1} = 3.6$  quando dovrebbe tamponare il sangue a  $\text{pH} = 7.4$ 
  - Se questa reazione (sopra) fosse quella di tamponamento sarebbe inutile perché il  $\text{p}K_{a1}$  è troppo distante dal  $\text{pH}$  fisiologico
  - Per avere la massima capacità tamponante, acido e base devono essere equimolari
- Se applichiamo equazione, conoscendo la  $\text{p}K_a$  dell'acido carbonico, il  $\text{pH}$  del sangue e sapendo che la concentrazione del bicarbonato nel sangue è circa 25mM otteniamo che la concentrazione dell'acido è 6000 volte più diluita di quella della base
  - $7.4 = 3.6 + \log [(25\text{mM}/[\text{HCO}_3^-])]$  deriva che  $[\text{HCO}_3^-] = 4\mu\text{M}$
  - $[\text{HCO}_3^-] / [\text{H}_2\text{CO}_3] = 10^{(\text{pH}-\text{p}K_a)} = 10^{(7.4-3.6)} = 6309$
  - Rapporto relativo tra forma acida e basica è troppo sbilanciato verso la forma basica
    - $[\text{H}_2\text{CO}_3] = 25 \text{ mM}$
    - $[\text{HCO}_3^-] = 4\mu\text{M}$

- Non sarebbe un sistema tampone utile per i sistemi biologici a 7.4

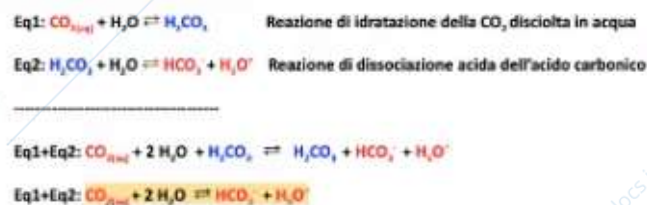
#### È il più efficace perché

1. Acido carbonico è in rapido equilibrio con  $\text{CO}_2$  disciolta in soluzione la cui concentrazione è 1.2-1.4 mM
- Se facciamo rapporto tra concentrazione  $\text{CO}_2$ /bicarbonato vediamo che  $25/1.3=19$ , quindi il rapporto relativo si tiene sotto 1/100 perché è solo 20 volte minore
- Non è l'acido carbonico ad essere la forma acida del tampone ma l'anidride carbonica ad essere l'acido in questo sistema
- L'acido carbonico deriva dalla  $\text{CO}_2$  che si produce con il metabolismo aerobio all'interno delle nostre cellule sotto forma di gas
  - $\text{pCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$  nel tessuto periferico
  - $\text{pCO}_2 = 10 \text{ mm Hg}$  negli alveoli
- **Forma acida è  $\text{CO}_{2(aq)}$**  disciolta in soluzione
  - $[\text{CO}_{2(aq)}] = 1.2-1.4 \text{ mM}$
  - $\text{CO}_2$  disciolta è in rapidissimo equilibrio con l'acido carbonico
  - Tampone all'esterno del corpo sarebbe poco efficace (se mettiamo  $\text{CO}_2$  in acqua, pochissima diventa acido carbonico, processo lento)
  - Nel nostro corpo la reazione è veloce perché abbiamo l'**anidrase carbonica** (abbondante soprattutto nei GR)

- **Anidrasi carbonica** serve a trasformare rapidamente la CO<sub>2</sub> disciolta nel citoplasma in acido carbonico
- Non è l'acido carbonico la forma acida del sistema, [H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] = 4mM (trascurabile)
- Anche ione carbonato CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> è trascurabile; [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] = 6mM
- Tampone vero è formato da
  - Forma acida: anidride carbonica CO<sub>2</sub> ; [CO<sub>2</sub>] = 1.2-1.4mM
    - Non è la CO<sub>2</sub> che perde protoni perché non può, è l'acido carbonico
  - Forma basica: ione bicarbonato HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ; [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 25Mm
- Forma gassosa in equilibrio con quella disciolta in acqua
- CO<sub>2</sub> rapido equilibrio con l'acido carbonico perché anidrasi carbonica
- 3. Il tampone prevede la compresenza di **due equilibri associati** che rapidamente interconvertono la CO<sub>2</sub> disciolta in bicarbonato e viceversa, da cui deriva una pKa apparente vicina al valore del pH fisiologico
- Primo equilibrio: idratazione della CO<sub>2</sub> disciolta ad acido carbonico
  - CO<sub>2(aq)</sub> + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Secondo equilibrio: acido carbonico che reagisce con base e da acido e base coniugata
  - H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>
- Da questi equilibri multipli deriva che la pKa apparente = 6.1, molto vicino a 7.4 (range ±2)

### Equilibri multipli

- Dissoluzione della CO<sub>2</sub>
  - CO<sub>2(gas)</sub> → CO<sub>2(aq)</sub>
  - Equilibrio tra forma gassosa e forma acquosa disciolta in acqua
  - Costante di dissoluzione dipende da quanto polare è la molecola di gas rispetto all'interazione del solvente attorno
    - CO<sub>2</sub> è più polare dell'acqua
    - Costante di dissociazione della CO<sub>2</sub> in acqua è K<sub>diss</sub> = 0.03mM/mmHg
    - Quando CO<sub>2</sub> è presente in forma gassosa ad una pressione=1mmHg si scioglie in acqua formando 0.03M di anidride carbonica
      - 100 volte più elevato del valore di dissociazione dell'ossigeno
- Reazione di idratazione della CO<sub>2</sub>
  - CO<sub>2(aq)</sub> + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - **Anidrasi carbonica**, enzima Zn-dipendente
  - Ha costante termodinamica di idratazione, data dal rapporto tra prodotti e reagenti (acido carbonico/CO<sub>2</sub> disciolta), K<sub>idr</sub> = 3.0 x 10<sup>-3</sup>
- Equilibrio acido base: reazione di dissociazione dell'acido carbonico
  - H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>
  - Costante di dissociazione pK<sub>a1</sub> = 3.6
  - Costante di dissociazione acida è K<sub>a</sub> = 2.7 x 10<sup>-4</sup>
- Reazione di dissociazione acida del carbonato
  - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O → CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>
  - Poco rilevante in condizioni di pH fisiologico
  - Pochissimo bicarbonato si dissocia a formare ione carbonato
  - Trascurabile
- Abbiamo due equilibri che coesistono
  - Idratazione CO<sub>2</sub> disciolta in acqua
  - Dissociazione acida dell'acido carbonico



- Se sommiamo i due equilibri avremo reazione globale in cui

- $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$
- C'è l'acido carbonico ma non lo vediamo perché è in rapido equilibrio con la  $\text{CO}_2$  disciolta

- $\text{pH (sol. tamponata)} = \text{pK}_{\text{a app}} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{aq})]}$

- $\text{pK}_{\text{a}}$  è la combinazione della concentrazione delle specie che sono in rapido equilibrio
  - $\text{K}_{\text{a app}} = \text{K}_{\text{idr}} \times \text{K}_{\text{a1}} = 3.0 \times 10^{-3} \times 2.7 \times 10^{-4} = 8.1 \times 10^{-7}$
  - $\text{pK}_{\text{a app}} = -\log \text{K}_{\text{a app}} = -\log (8.1 \times 10^{-7}) = 6.1$
- Conoscendo pH sangue possiamo valutare il rapporto specifico tra  $\text{CO}_2$  disciolto nel sangue e il bicarbonato disciolto e così capire di fronte a che situazione siamo, se acidosi o alcalosi metabolica o respiratoria
- **Espressione analitica** che serve per calcolare tampone bicarbonato
  - Tampone usato per spiegare come fanno i GR a contribuire al trasporto  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  sia al tamponamento del sangue (FINE LEZIONE 17, 03.05.21)

#### Caratteristiche tampone

È un sistema **tampone aperto** (INIZIO LEZIONE 18, 04.05.21)

- In un sistema tampone classico
  - Molecole presenti nel sistema non cambiano, il numero di moli inizialmente presenti delle due forme possono convertirsi in base all'aggiunta o meno di una base o di un acido forte
  - Contenuto totale non varia
- Nel caso del bicarbonato possiamo eliminare eccesso di  $\text{CO}_2$  che si forma per acidosi metabolica o conservarla per tamponare un eccesso di alcali (alcalosi)
  - $\text{CO}_2$  concentrazione regolabile tramite respirazione polmonare
    - Modificare rapidamente la quantità di anidride carbonica disciolta nei liquidi
  - $\text{HCO}_3^-$  concentrazione regolabile tramite attività del rene
    - Apparato escretore del rene
    - Recupero e produzione ex novo del bicarbonato
- Organismo usa tampone per minimizzare le variazioni di pH che si possono instaurare a causa di alterazioni nella respirazione come ostruzione, iperventilazione, acidosi o alcalosi metabolica
- Molto efficace rispetto a tamponi chiusi
- $\text{pH (sol. tamponata)} = \text{pK}_{\text{a app}} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{aq})]}$

#### Compensazione della componente respiratoria $\text{CO}_2$

- Al denominatore c'è un parametro controllato dai polmoni, la  $\text{CO}_2$ , che può diminuire o aumentare in funzione della velocità della respirazione e quindi è compensabile dal punto di vista respiratorio e può aumentare o ridurre a seconda se si deve ridurre  $\text{CO}_2$  in eccesso o aumentare quella in difetto
- Aumento ventilazione polmonare
  - Per ridurre  $\text{CO}_2$  in eccesso
  - Acidosi
  - Se nel sangue c'è un aumento della concentrazione degli idrogenioni, la forma basica  $\text{HCO}_3^-$  reagisce con l'idrogenione formando  $\text{CO}_2$ 
    - $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2$
  - $\text{CO}_2$  aumenta nel sangue e il nostro organismo reagisce con un aumento della ventilazione polmonare facendo diminuire  $\text{CO}_2$
- Riduzione ventilazione polmonare
  - Per aumentare la  $\text{CO}_2$  in difetto
  - Alcalosi
  - Acido carbonico reagisce con  $\text{OH}^-$  (alcal) per formare bicarbonato in modo da depauperare la quantità di anidride carbonica disciolta nell'acqua
  - $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{OH}^- \rightarrow \text{HCO}_3^-$
  - Organismo reagisce a questa variazione riducendo la respirazione polmonare e rialzando la  $\text{CO}_2$  nel sangue

## Compensazione bicarbonato

- Eliminazione
  - Tasso di riassorbimento da parte del rene
- Produzione
  - Tasso di produzione da parte del rene
- Tasso di riassorbimento o di produzione è molto più lento
  - Controllo è più lento rispetto a quello della CO<sub>2</sub> (ore non minuti)

**pK<sub>a</sub><sub>app</sub> = 6.1**

- Vicino a pKa fisiologico 7.4
- Situazione vantaggiosa per la sua capacità tamponante

Tampone piuttosto **concentrato**

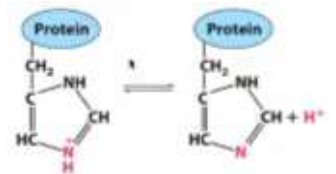
- Capacità tamponante dipende dalla sua concentrazione ovvero la quantità di tampone presente in soluzione
- Bicarbonato nel sangue
  - È molto solubile
  - Arterioso, [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 25Mm
  - Venoso, [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 28 mM
- CO<sub>2</sub> nel sangue
  - CO<sub>2</sub> nel sangue è in equilibrio con la CO<sub>2</sub> nei polmoni
  - Rapporto ben preciso di dissoluzione governato dalla K<sub>diss</sub> = 0.03 mM/mmHg
  - Arterioso
    - pCO<sub>2</sub> = 40 mmHg
    - [CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub> = 1.2mM
  - Venoso
    - pCO<sub>2</sub> = 46mmHg
    - [CO<sub>2</sub>]<sub>aq</sub> = 1.4mM
  - CO<sub>2</sub> è presente 20 volte meno del bicarbonato (deve stare max nel 1/100), condizione favorevole per la forza del tampone

**Tampone proteico**

Dovuto alle catene laterali degli amminoacidi che hanno un pH vicino a quello fisiologico

- Capacità tamponante del sangue: 24%

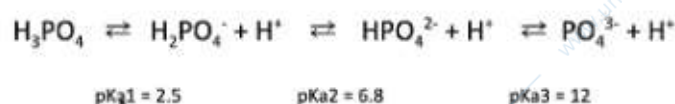
- Componenti
  - **Hys**: anello imidazolico
    - pKa=6.1 quasi uguale a fisiologico
    - Forma acida: HysH<sup>+</sup>
    - Forma basica: Hys
    - Le due forme sono all'equilibrio, prevale l'una o l'altra a seconda della concentrazione di H<sup>+</sup>
  - Amminoacidi polari: **Cys** avente pKa=8.0, leggermente basico, può essere protonata o deprotonata come Hys dunque contribuisce a mantenere pH intorno a valore fisiologico
  - Residui N-terminali di ciascuna catena polipeptidica
    - Gruppo amminico è leggermente meno alcalino del gruppo amminico
    - pKa=6.8-8 è all'interno del range efficace di tamponamento
    - NH<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> (gruppo amminico/ammonico)
  - Amminoacidi carichi
    - Amminoacidi basici, carichi positivamente a pH neutro, sono acidi debolissimi
      - Arg, pKa=12.49
      - Lys, pKa= 10.54
    - Amminoacidi acidi, carichi negativamente a pH neutro, troppo acidi
      - Asp, pKa=3.9
      - Glu, pKa= 4.1



- Valori di pKa troppo distanti dal pH fisiologico per essere usati come sistemi tampone
  - Ogni macromolecola ha almeno un gruppo N-terminale, un numero variabile di Hys e Cys (tiolo)
- Proteine plasmatiche
  - Proteine sciolte nel sangue sono in media 15mM o 200-240g/L
- Proteine citosoliche
  - Emoglobina
    - All'interno dei globuli rossi ha concentrazione 5mM, è molto concentrata
    - Sistema tampone che si trova all'interno dei GR
    - Ogni molecola di Hb ha 38 residui di Hys con cui la proteina tampona gli H<sup>+</sup> che si formano nel GR in seguito alla formazione dell'acido carbonico dall'idratazione della CO<sub>2</sub>
    - Lega in modo cooperativo l'ossigeno, in base alla concentrazione la sua affinità cambia
    - Hb funziona anche da sensore dell'O<sub>2</sub>
      - Nei tessuti periferici dove la pO<sub>2</sub> è bassa, l'Hb diventa più basica e quindi più pronta a tamponare H<sup>+</sup>
        - deossiHb:  $\text{Hb}(\text{H}^+) \rightarrow \text{Hb} + \text{H}^+$  con pKa=7.8
        - Più basica quindi prende
      - Nel polmone, dove la pO<sub>2</sub> aumenta, l'Hb diventa meno basica (e quindi più acida) e cede protoni che nel citoplasma protonano HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> per riformare CO<sub>2</sub> che viene espirata dai polmoni
        - ossiHb:  $\text{HbO}_2(\text{H}^+) \rightarrow \text{HbO}_2 + \text{H}^+$  con pKa=7.0
        - Più acida quindi cede per formare CO<sub>2</sub>
    - Fa lo stesso per idrogenioni e anidride carbonica
  - Altre proteine che incidono in misura minore

### Tampone fosfato

- **Capacità tamponante sangue: 1%**
- Scarsamente concentrato 1-2mM
  - È la forma acida più presente nel sangue
  - Concentrazione non può andare oltre questo range
  - Fosfato, come tutte le molecole, è sottoposto a un rigido controllo omeostatico ovvero l'equilibrio idrosalino governato dalla capacità del rene di aumentare o diminuire l'escrezione delle forme ioniche presenti nelle urine e nel sangue
- $\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+$



- Acido fosforico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
  - pKa<sub>1</sub>=2.5
    - Forza con cui l'acido cede il primo H<sup>+</sup>
    - Molto vicino a 1, acido molto forte ma non completamente dissociato in acqua
  - Forma acida ha pKa troppo elevato ed è quasi completamente dissociato a formare H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> a pH=7.4
- Diidrogenofosfato H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>
  - pKa<sub>2</sub>=6.8
    - Forza con cui l'acido cede il secondo H<sup>+</sup> è molto più bassa
    - 6.8 molto vicino a pH fisiologico
  - Forma acida prevalente è H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>
- Idrogenofosfato HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>
  - pKa<sub>3</sub>=12
    - Forza con l'acido cede il terzo H<sup>+</sup>

- Forma basica del tampone
- Ione fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ 
  - A  $\text{pH}=7.4$  è presente in piccolissime quantità
  - L'equilibrio è prevalentemente spostato verso i reagenti, importanza delle due forme al centro
- Vantaggio rispetto a tampone bicarbonato
  - Bicarbonato è meno efficace a tamponare basi perché l'acido carbonico è molto diluito quindi scarsamente presente  $[\text{H}_2\text{CO}_3] = 4 \mu\text{M}$ 
    - Tampona bene acidi perché bicarbonato è  $25\text{Mm}$ , rilasciato dalle cellule della mucosa gastrica ad esempio dopo vomito o un alterazione dell'omeostasi dell'intestino, vengono rilasciate quantità di basi che vanno ad alzare  $\text{pH}$  invece di abbassarlo
  - Forma acida del tampone fosfato è presente in quantità  $1\text{-}2\text{Mm}$  (acido carbonico invece  $4 \mu\text{M}$ ) quindi è molto più concentrato (1000 volte) e preparato a reagire rapidamente e tamponare le basi che verranno rilasciate nel sangue (LEZIONE 18, 04.04.21, 14:37)

# BIOCHIMICA DEGLI ORGANI

## Globuli rossi (LEZIONE 18, 04.05.21, 34:00)

### Citologia

- Chiamati anche
  - Emazie
    - Contengono emoglobina, gruppo eme
  - Eritrociti
    - Dal greco eritros ovvero rosso, cellule rosse del sangue
    - Rosse perché emoglobina è pigmento rosso dovuto a ferro nel suo stato ferroso



### Morfologia

- Tra le cellule più piccole nel nostro organismo
  - Diametro  $7\mu\text{m}$
  - Volume 100 femtoL
- Cellule anucleate con aspetto di lente biconcava
  - Forma perfetta per attraversare i capillari
- Nei polli eritrociti hanno nuclei
- Nell'uomo non hanno nuclei e organelli (mitocondri) e dunque non possono utilizzare ossigeno, non possono avere metabolismo aerobio
  - La loro funzione non è usarlo ma trasportarlo grazie all'Hb

### Proteine

- Hb
  - Molto concentrata nel citoplasma, 5mM
- **Anidrasi carbonica**
  - Per mantenere equilibrio veloce tra  $\text{CO}_2$  disciolta e acido carbonico
  - Esistono diverse isoforme a seconda della cellula che le esprime
  - Globuli rossi la esprimono in maggior quantità
- **Lattato deidrogenasi LDH**
  - Isoforma MD3H o LDH4
  - Tipica delle cellule con metabolismo anaerobio
- **GLUT1**
  - Trasportatore di membrana
  - Assicura il trasporto base di glucosio attraverso la cellula
  - $K_m=1\text{mM}$ , altissima affinità
    - Glucosio è essenziale per energia metabolica
- Pompa sodio-potassio ATP-dipendente
- Scambiatore bicarbonato-cloruro (proteina banda 3)
- Enzimi redox
  - Controllano stato redox della cellula
  - Quando GR ossigenati c'è grande quantitativo di ossigeno vicino a ione ferroso che tende a ossidarsi e quindi a formare forme radicaliche/reattive
- Enzimi metabolismo del 2,3BPG
  - Isomero del 1,3-BPG (intermedio della glicolisi)
  - Non viene usato per ricavare energia
  - Effettore allosterico negativo dell'Hb
  - Cellula deve spendere abbastanza energia per produrlo
    - Si lega in rapporto 1:1 con Hb
    - Se  $\text{Hb}=5\text{mM}$  allora  $2,3\text{BPG}=5\text{mM}$

- Si lega al canale centrale costituito dalle subunità dell'Hb, ne modifica la struttura e fa in modo che Hb abbia curva di saturazione sigmoide
- Tanto più 2,3BPG quanto meno ossigeno respiriamo

#### Densità

- Cellule del sangue sono le più numerose
  - $5 \times 10^6$ /micron litro
  - Volume base sangue 5L
  - Numero globuli rossi  $25 \times 10^{12}$ 
    - Volume: 2.5L pari a 3Kg
    - Costituiscono il 4% del peso totale di un uomo adulto
- Tessuto fluido estremamente importante
- Consumano mediamente 10g di glucosio al giorno, non lo bruciano completamente, degradazione irreversibile

#### Produzione ed eliminazione

- Prodotte dal midollo osseo continuamente
- Vita media: 120gg
  - Non avendo il nucleo non possono riparare i danni che subiscono a carico di proteine e lipidi
- Alla fine della loro vita vengono fagocitati e distrutti dalle cellule della milza

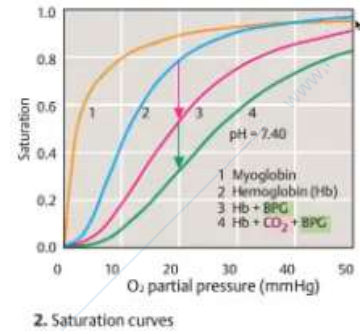
## Funzione fisiologica

- **Trasporto dei gas**, ossigeno e anidride carbonica, che nei globuli rossi è abbinato al
- **Tamponamento degli acidi** prodotti dal metabolismo dei tessuti

#### Componenti

- O<sub>2</sub>
  - Effettore omotropico allosterico positivo
- CO<sub>2</sub>
  - Effettore allosterico negativo
- H<sup>+</sup>
  - Effettore allosterico negativo
- 2,3-BPG
  - Effettore allosterico negativo
  - Deve essere molto concentrato perché si lega 1:1 con Hb
  - Come per tutti i metaboliti vi è una via di sintesi e una via di degradazione
  - Via di sintesi: deriva da 1,3-BPG con **bisfosfoglicerato mutasi**
    - $1,3\text{BPG} \rightarrow 2,3\text{BPG}$
    - Sposta fosfato da 1 a 2
    - Così facendo fa perdere energia alla cellula perché non può fosforilare a livello del substrato
    - Cellula lo produce perché gli serve garantire il perfetto funzionamento dell'Hb
  - Via di degradazione: garantita da **bisfosfoglicerato fosfatasi** (idrolasi) essendo questo un composto fosforilato
    - Scinde idroliticamente il fosfato dal substrato che quindi si idrolizza a formare 2PG (intermedio glicolisi)
    - $2,3\text{BPG} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{PG} + \text{P}_i$
    - È una deviazione della glicolisi
- Hb
  - Curva 1 = Mioglobina
    - Andamento iperbolico

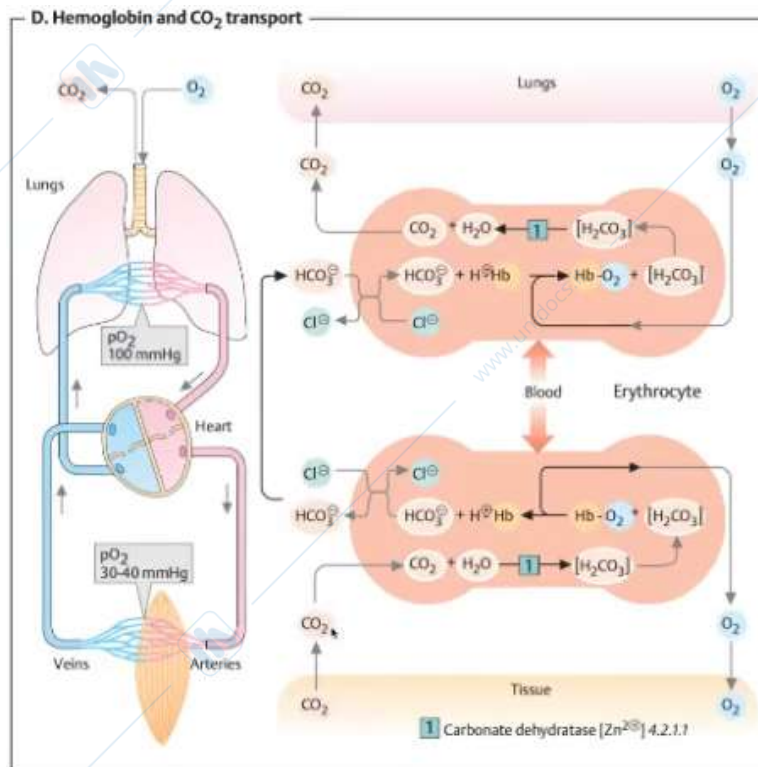
- No trasportatore ma deposito ossigeno intercellulare
  - Curve 2, 3 e 4 = Emoglobina
    - Curva sigmoide, cambia con la presenza di effettori come:
      - Ossigeno è effettore omotropico positivo
      - 2,3BPG, CO<sub>2</sub>, H<sup>+</sup> sono effettori eterotropici negativi
  - Emoglobina è in grado di
    - Registrare la pressione parziale dell'ossigeno pO<sub>2</sub>
    - Rilasciare O<sub>2</sub> nei tessuti periferici respiranti dove ve n'è bisogno
    - Legare O<sub>2</sub> negli alveoli dove ve n'è in abbondanza
  - Capacità di trattenere O<sub>2</sub> cambia in relazione agli effettori
    - Effettori influenzano l'affinità dell'Hb per O<sub>2</sub>
- **Anidraasi carbonica**
  - Citoplasma del globulo rosso
  - Interscambio rapido di anidride carbonica e acido carbonico
- **Scambiatore bicarbonato-cloruro**
  - Antiporto reversibile
  - Fa passare bicarbonato e ione cloruro da una parte all'altra della membrana



Trasporto gas respiratori e tamponamento fisiologico

Acido volatile: CO<sub>2</sub>

- Tutte le cellule del corpo bruciano acidi grassi il che produce CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O
  - Nei tessuti periferici si forma CO<sub>2</sub>
  - Hanno abbastanza ossigeno da garantire lo spostamento di elettroni nella CTE
- La CO<sub>2</sub> che si forma nei tessuti metabolizzanti è un gas, attraversa la membrana cellulare, dallo spazio extracellulare raggiunge il sangue

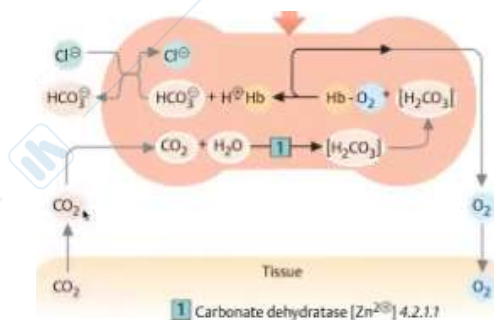


- Quando CO<sub>2</sub> entra nel GR incontra l'anidraasi carbonica e reagisce
  - $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$
  - Acido carbonico, molto più solubile, si forma per idratazione della CO<sub>2</sub>
- Trasporto CO<sub>2</sub>

- Dissolta nel plasma del sangue ha concentrazione  $[CO_2]=1.2mM$  ed è statica
  - Il resto non si può sciogliere, se saturiamo liquido con un gas si formano bolle quindi embolie, trombi che bloccano il passaggio del sangue
- Viene legata in piccola parte dall'Hb soprattutto nei residui amminici N-terminali delle catene della proteina formando un addotto chiamato **carbammino-emoglobina**
- Il restante 90% si converte in acido carbonico con l'**anidrasi carbonica**
- All'interno della cellula il  $pH=7.2$  quindi la maggior parte dell'acido carbonico si dissocerà
  - $H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3^-$
  - Acido carbonico si dissocia a formare  $H^+$  e bicarbonato

Cosa succede agli  $H^+$

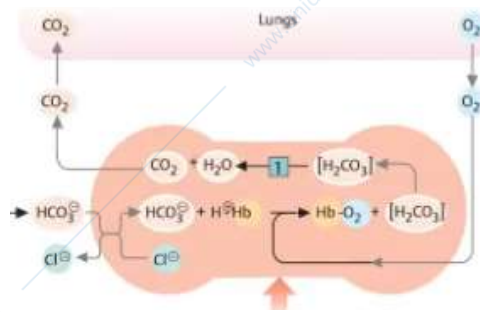
- La respirazione cellulare produce protoni che sono una forma di acido volatile
  - $H^+$ , prodotti dall'idratazione della  $CO_2$ , acidificano il tessuto che respira ed è questo che il sistema tampone deve bloccare
- $H^+$  vengono legati alla Hb
  - Molto abbondante (5mM) e presenta 38 Hys
  - Più basica del solito perché ha ceduto ossigeno ed è quindi più in grado di legare  $H^+$
  - Hb cattura  $H^+$  e li neutralizza = tampone proteico dell'Hb
    - $H^+ + Hb: \rightarrow HbH^+$
    - Importanza nel controllare la variazione di pH dovuta alla produzione del  $CO_2$
- Effetto Bohr
  - Caratteristica dell'Hb che la rende più basica ( $pK_a=7.8$ ) quando è nella forma deossiHb
    - Bassa  $pO_2$  e alta  $pCO_2$
  - Acidità  $[H^+]$  e la  $CO_2$  stimolano il rilascio di  $O_2$  dall'Hb



Cosa succede al bicarbonato  $HCO_3^-$

- Bicarbonato si è formato nella cellula
- Interviene lo scambiatore che si trova sulla membrana
- Durante tutta la vita della cellula vi sono una pompa sodio-potassio e pompa cloruro che mantiene costante la concentrazione di cloruro
  - Bassa dentro e alta fuori
- Questa differenza di concentrazione permette alla cellula di spostare contro gradiente, e in flusso costante, il bicarbonato con il cloruro (cloruro va dentro dove concentrazione è minore)
  - Cellula si carica di cloruro e immette nel sangue il bicarbonato
- Sangue periferico si arricchisce di bicarbonato che si scioglie fino a raggiungere gli alveoli polmonari

Cosa avviene negli alveoli



- Alveoli hanno
  - Alta concentrazione di O<sub>2</sub> perché a contatto con l'aria esterna
    - 20% rispetto agli altri gas
  - Bassa concentrazione di CO<sub>2</sub>, molto rarefatta
  - Variazione di pressione tra la quantità CO<sub>2</sub> disciolta nel sangue e le sue altre forme
- O<sub>2</sub>-HbH<sup>+</sup> → H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub>-Hb:
  - Ossigeno si lega alla ossiHb
  - OssiHb è più acida e tende a cedere i H<sup>+</sup> che aveva trasportato
- O<sub>2</sub>-HbH<sup>+</sup>: Hb da un lato tampona gli H<sup>+</sup> presi dal sistema periferico, dall'altro li trasporta nel luogo dove serviranno per riprodurre la CO<sub>2</sub> e quindi permettere l'espiazione di questo gas
- H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub>-Hb :Hb rilascia i protoni che aveva legato a livello periferico
  - Protoni acidificano il citoplasma della cellula
  - Contemporaneamente la cellula, con il trasportatore, fa spostare il bicarbonato dal plasma verso il citoplasma della cellula dove avviene la reazione inversa
- Bicarbonato tampona gli ioni H<sup>+</sup> che vengono rilasciati dall'emoglobina formando acido carbonico
  - H<sup>+</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - Si riforma l'acido carbonico
- Effetto Haldane
  - Elevata pO<sub>2</sub> negli alveoli polmonari fa diventare Hb più basica e induce il distacco di H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub>
  - Effetto che rende, negli alveoli, la ossiHb più acida della deossiHb
- Riformazione acido carbonico
- Conversione dell'acido carbonico, grazie ad **anidrasi carbonica**, in CO<sub>2</sub> e acqua
  - H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> → CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O
- CO<sub>2</sub> per effetto della diversa pressione tra la cellula e lo spazio alveolare viene espirata ed eliminata
- Acido volatile non è un acido che compromette il sistema biologico, viene semplicemente veicolato dal sangue per poi essere eliminato
  - CO<sub>2</sub> è poco solubile, la trasformazione avviene perché dobbiamo renderla solubile e per poi ricrearla nel posto opportuno per eliminarla

#### Acidi non volatili

- Tessuti periferici oltre a bruciare glucosio e acidi grassi rilasciano degli acidi
  - Acidi forti
    - Metabolismo acidi nucleici rilascia acido fosforico (acido forte)
    - Metabolismo amminoacidi solforati rilascia acido solforico (acido forte)
  - Acidi non volatili
    - Corpi chetonici come acetoacetato e diidrossibutirrato ovvero acido acetoacetico e acido diidrossibutirrico insieme all'acido lattico che viene prodotto quando il tessuto è in ipossia e avviene glicolisi anaerobia
    - Molecole non possono essere espirate
    - Contribuiscono a variare e abbassare il pH perché aumentano concentrazione H<sup>+</sup>
- Cellula produce H<sup>+</sup> che provengono dal metabolismo di acidi nucleici, amminoacidi solforati, metabolismo anaerobio dei muscoli

- H<sup>+</sup> vengono parzialmente tamponati attraverso
  - Proteine intracellulari
  - Tampone fosfato, presente non soltanto nello spazio extracellulare ma anche dentro le cellule
- Se pH si abbassa troppo cellule sono in grado di farli uscire, attraverso delle pompe ATP-dipendenti, nello spazio extracellulare
  - Nello spazio extracellulare vengono riconosciuti dal bicarbonato che si trova nel sangue
  - Protoni, che provengono da acidi non volatili, vengono tamponati dal bicarbonato (come per CO<sub>2</sub>) e si forma acido carbonico
  - $H^+ + HCO_3^- \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O$
  - Nel sangue si forma acido carbonico e quando attraversa la membrana viene trasformato da **anidrasi carbonica** in CO<sub>2</sub> e acqua
- Differenza rispetto a prima, H<sup>+</sup> è stato neutralizzato dal bicarbonato il che porta ad una riduzione della concentrazione ematica del bicarbonato che prima non avevamo
- Meccanismo finisce uguale a prima, globulo rosso arriva agli alveoli dove la CO<sub>2</sub> verrà espirata, in questo caso però abbiamo perso bicarbonato
  - Bicarbonato è importante perché nel nostro corpo la quantità totale di bicarbonato è elevatissima
    - 1000-4300 mmol ovvero 1-4moli di bicarbonato che serve per tamponare H<sup>+</sup> che provengono dagli acidi, il che depaupera la quantità totale
  - Dobbiamo risintetizzare bicarbonato per tenere concentrazione costante
    - Rene si occupa di risintetizzare il bicarbonato attraverso l'ossidazione della glutammina il cui metabolismo produce 2 molecole di bicarbonato che vanno a rimpiazzare quello perso per tamponare l'acido
    - Ogni volta che si forma acido carbonico nella cellula renale si forma un H<sup>+</sup> (perché solo bicarbonato viene rilasciato) il quale viene secreto dalla cellula nelle urine, acidificazione dell'urina

## Metabolismo

### Glicolisi

- Processo citosolico che nei GR avviene anaerobicamente perché, non avendo mitocondri, manca di CTE e non può riossidare il NADH che si produce durante la glicolisi
  - È l'unica via che il GR ha per **produrre ATP**
    - Essenziale per le attività cellulari come il lavoro osmotico delle pompe Na/K e Cl<sup>-</sup>
- Consumano il 10% del consumo totale giornaliero di Glc, circa 10g
- Una parte usata per **produrre 2,3BPG** da 1,3-BPG
  - Modulatore allosterico essenziale per la funzione di Hb
  - Ulteriore perdita energetica

### Via dei pentosi fosfato

Necessario per produrre una quantità sufficiente NADPH

- Controlla stress ossidativo intracellulare
- Controlla stato redox del Fe emico che deve essere Fe<sup>2+</sup> per potersi ossidare a Fe<sup>3+</sup>
  - È in grado di ripristinare stato redox del ferro per farlo reagire dinuovo
  - Quando Hb ha Fe<sup>3+</sup> diventa meta-emoglobina e non è più funzionale, non in grado di legare reversibilmente O<sub>2</sub>

### Stress ossidativo

O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup>

- Fe<sup>2+</sup> emico abbondante nei GR
- A contatto con ossigeno, normalmente non subisce reazione redox
- A volte viene ossidato e si formano
  - Fe<sup>3+</sup>, elettrone che perde va a formare

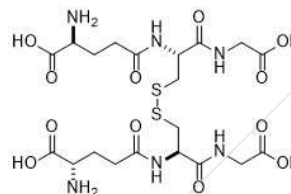
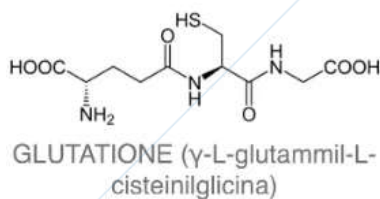
- $O_2^-$  : anione superossido, si riduce e forma specie radicale instabile
    - - sta per elettrone che ha preso e il . per l'elettrone strappato al ferro
- $O_2^-$
- Specie reattiva molto pericolosa per la cellula da cui derivano tutte le specie reattive dell'ossigeno
    - Esempi
      - Anione superossido  $.O_2^-$
      - Radicale ossidrilico OH. la più pericolosa
      - Acqua ossigenata (perossido di idrogeno)  $H_2O_2$

### Stress o danno ossidativo

- Hb
  - Danneggia Hb ossidando il  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  il che la fa diventare **meta-Hb**
  - NADPH serve a ripristinare situazione normale
- Membrane
  - Fatta da doppio strato di fosfolipidi la cui parte sensibile è rappresentata dagli acidi grassi insaturi e polinsaturi
  - Acido oleico,  $C_{18}-1n-9c$ 
    - 18 atomi carbonio, 1 solo doppio legame, 9 posizione doppio legame, c configurazione cis
    - Uno dei più abbondanti nelle membrane delle cellule
  - Palmitato, acido palmitoleico (1 doppio legame cis in pos 7)
  - Doppi legami sono sede dove specie reattive dell'ossigeno vanno a colpire
  - Formano **perossidi-lipidici** molto sensibili all'ossidazione da parte dell'ossigeno che si trova nelle nostre cellule il che porta alla rottura del legame C-C e alla formazione di un addotto di due molecole molto reattive, membrana si sfalda, emolisi
  - Importanza di controllare questi meccanismi ossidativi attraverso le difese redox

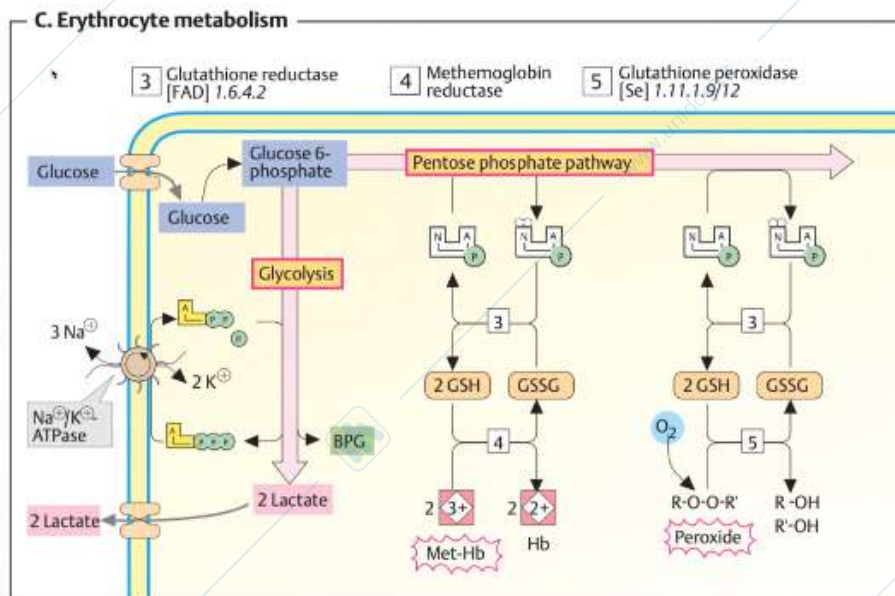
### Difese redox

- Metaboliti essenziali
  - Coenzima NADP
    - NADP<sup>+</sup> (ox)
    - NADPH (red)
    - Fondamentale per mantenere glutanione nella sua forma ridotta GSH
  - Glutazione è antiossidante intracellulare
    - GSSG (ox)
    - GSH (red)
    - Viene utilizzato da **perossidasi** biologiche, enzimi che lo legano e con esso sono in grado di neutralizzare gli idroperossidi (perossidi organici)
    - Tripeptide: glutammato che forma un legame isopeptidico (gamma) con la parte che contiene il sito reattivo ovvero la Cys e la Gly
      - Carbonio invece di fare legame peptidico con il suo gruppo carbossilico in alfa lo fa con quello in posizione in gamma
    - Parte reattiva è il tiolo che reagisce con un altro tiolo di una seconda molecola di glutazione a formare glutazione ossidato
    - Nell'ossidazione il glutatione può ridurre la specie reattiva dell' $O_2$  e impedire che prosegua a danneggiare la membrana



- Metaboliti antiossidanti

- Topochoerolo (Vit.E) e Ubichinolo CoQ
  - Particolarmente rilevanti perché si trovano nella membrana biologica e sono in grado di arrestare processo che scinde acidi grassi, proteggono le cellule
- Vit. A
- Vit. C
- Caroteinoidi, beta-carotene
- Bilirubina da catabolismo gruppo eme
- Acido urico
- Enzimi
  - **Glutazione perossidasi**
    - $2\text{GSH} + \text{perossido organico} \rightarrow \text{GSSG} + \text{alcol}$
    - Utilizza due molecole di glutatione per detossificare il perossido inorganico e trasformarlo in alcol, si forma glutatione ossidato GSSG che deve essere ridotto
  - **Glutazione reduttasi** fa tornare il glutatione alla sua forma ridotta
    - Selenio-dipendente, uno dei pochi ad avere selenio organicato nella forma di selenio-cisteina = 21esimo amminoacido
    - $\text{GSSG} + \text{NADPH}/\text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
    - Riduzione del glutatione ossidato
    - NADPH-dip, per questo cellula ne ha bisogno grandi quantità
    - Via dei pentoso fosfati è essenziale per produrre NADPH
    - **G6PDH** carenza è la più comune dell'enzimopatie ereditarie, cromosoma X, porta a emolisi
  - **Catalasi** protezione da acqua ossigenata
    - Contiene Fe-eme
    - $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
    - Catalizza la disproporzione dell'acqua ossigenata in acqua e ossigeno
- **Glucosio-6fosfato deidrogenasi G6PDH** è l'enzima chiave della via dei pentosi fosfati
  - Carenza è la più comune delle enzimopatie ereditaria a carico del cromosoma X
  - Causa anemia emolitica acuta
    - Dovuta alla ridotta presenza del NADPH nelle cellule del sangue e quindi danneggiamento ossidativo delle membrane dei GR



- GR fa passare attraverso GLUT1 (indipendente da concentrazione, passa sempre) glucosio
- Glucosio fosforilato dalla chinasi e diventa G6P che ha due strade nel GR
  - Via dei pentoso fosfati

- Per garantire produzione del NADPH necessario a mantenere stato red del glutatione che è necessario per impedire accumulo e danni alle membrane da parte delle specie reattive dell'ossigeno
- Azione ossidasi-dipendente e glutatione ridotto-dipendente
- Glicolisi anaerobia
  - Produce lattato che dal sangue finisce al fegato che metabolizza la maggior parte dei nutrienti
  - ATP usato per far muovere contro gradiente gli elettroliti della cellula con pompe (FINE LEZIONE 18, 04.05.21)

## Fegato (INIZIO LEZIONE 19, 05.04.21)

### Caratteristiche

- Più voluminoso degli organi viscerali
  - Massa 1.5kg
  - Rappresenta il 2-3% della massa totale
- Consuma il 25-30% dell'ossigeno
  - Metabolismo fortemente aerobio per alimentare vie biosintetiche che richiedono molta energia

### Cellula specifica: epatocita

- Costituisce il 60-70% delle cellule totali del fegato
- Presenta la maggiore versatilità metabolica
- Proteine specifiche
  - **GLUT2**
    - Km=10-15mM
      - Alta rispetto alla normoglicemia perchè epatocita non usa glucosio per metabolismo energetico, la maggior parte dell'energia la ottiene dal catabolismo anaerobio degli acidi grassi
      - Controllo della glucoasi (fegato usa glucosio per questo)
    - Trasportatore passivo, non spende energia
  - **Glucocinasi**
    - Isoforma della esochinasi
    - Nella glicolisi
  - **Glicerolo chinasi**
    - Utilizza glicerolo che proviene da demolizione tessuto adiposo a fini energetici
  - **Glutammato deidrogenasi GluDH**
    - Preparazione al ciclo dell'urea
    - Fegato è coinvolto nel bilancio dell'azoto
    - Metabolismo amminoacidico produce urea come sottoprodotto
  - **Glutaminasi**
  - **ALT e AST** epatiche
  - **Gamma-glutamiltanspeptidasi (GGT)**
  - **Pseudocolinesterasi PChE**

### Funzioni

- Metabolismo di nutrienti e metaboliti endogeni
  - Prende forma a seconda del cangiare dell'organismo, a seconda che abbia bisogno di riserve energetiche o ne ha troppo (catabolismo/anabolismo)
  - Attività cataboliche
    - Glicolisi
      - Non usata per mantenere energia metabolica ma usata come fonte di energia per produrre lipidi
      - Ruolo funzionale nella omeostasi del glucosio

- Beta-ossidazione
  - Meccanismi principali da cui fegato ricava energia di cui ha bisogno
  - Momenti in cui organismo richiede approvvigionamento di nutrienti per produrre glucosio endogeno o corpi chetonici
- Ciclo di Krebs
  - Produce la maggior parte dell'ATP necessario
- Glicogenolisi
  - Degradazione del glicogeno
- Catabolismo degli amminoacidi
  - Quando in eccesso amminoacidi vengono catabolizzati, ne modifica struttura e neutralizza le catene laterali
    - Transaminazioni
    - Deaminazioni ossidative
    - Ciclo urea
- Captazione e riciclo delle lipoproteine e dei loro lipidi
  - Rimane dei chilomicroni
  - HDL mature che trasportano colesterolo in eccesso da tessuti a fegato
- Degradazione proteine epatiche e del sangue
- Attività di sintesi
  - Gluconeogenesi: sintesi di nuovo glucosio a partire da
    - Lattato
    - Glicerolo
    - Alanina
  - Glicogenosintesi: glicogeno
    - Glc
    - Fru
  - Sintesi di acidi grassi
    - Eccesso glucosio
    - Eccesso amminoacidi
  - Chetogenesi: corpi chetonici (digiuno prolungato)
    - Da acidi grassi
    - Da amminoacidi (da degradazione proteine del sangue, epatiche, muscolari)
  - Lipogenesi: trigliceridi
    - Acidi grassi
    - Glicerolo
  - Produzione proteine plasmatiche (no anticorpi e fattore VIII)
  - Colesterolo
    - 20% da dieta
    - 80% endogeno
    - Da Glc e acidi grassi e HDL mature
  - Sali biliari (digestione lipidi)
    - Da colesterolo
    - Ghiandola esocrina
  - Produzione di lipoproteine
    - VLDL
    - HDL immature
- Accumulo
  - Glicogeno
    - Riserva glucostatica
    - Per mantenere costante la glicemia nel sangue
    - Iperglicemia si forma

- Ipoglicemia degrada
  - Vitamine
    - Liposolubili A, D
    - Idrosolubili B12
- Escrezione/ detossificazione
  - Ciclo urea: gruppi amminici degli aa poiché altrimenti si formerebbe l'ammoniaca
  - Degradazione Hb: bilirubina
  - Composti esogeni e endogeni come farmaci, ormoni steroidei che devono essere eliminati dopo un certo tempo
- Omeostasi
  - Glicemia
  - Energetica
  - Concentrazione dei aminoacidi del sangue

## Gluconeogenesi

Sintesi nuovo glucosio a partire da composti che non sono glucosio, viene utilizzato ATP per favorire processo che altrimenti non avverrebbe

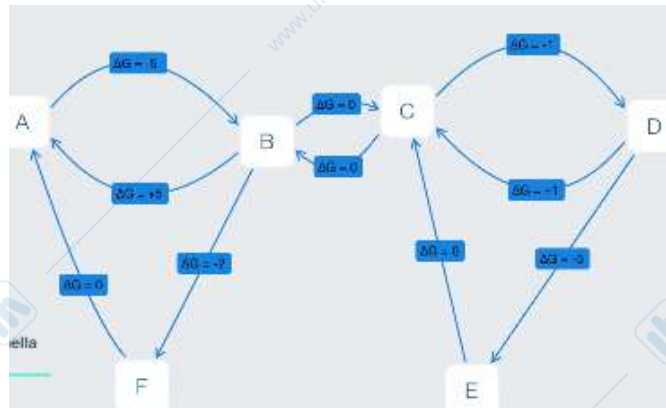
- Funzionale all'omeostasi del glucosio
- Si attiva quando nel corpo inizia a scarseggiare glucosio
  - Ad esempio se il glucosio che viene consumato non viene reintrodotta con l'alimentazione, sinonimo di ipoglicemia a cui fegato reagisce con gluconeogenesi
- Interviene dopo rispetto alla glicogenolisi
  - Sono due vie che intervengono con lo stesso scopo ovvero quello di rialzare la concentrazione nel sangue quando diminuisce
- Precursori glucosio sono
  - Acido lattico
    - Proviene da GR, fermentazione omolattica operata da tessuto muscolare, cellule pelle, cornea aventi metabolismo meno aerobio perché concentrazione ossigeno bassa perché meno irrorate di vasi sanguigni
    - Lattato deriva dal glucosio perché è il prodotto della glicolisi anaerobica, viene riciclato per riformare glucosio che in realtà era già presente nell'organismo
  - Glicerolo
    - Deriva da catabolismo trigliceridi depositati negli adipociti
  - Aminoacidi
    - Presenti nelle proteine non essenziali, del sangue, del fegato e muscolari (proteine contrattili dei miociti scheletrici)
  - Nuovo glucosio deriva essenzialmente da glicerolo e aminoacidi
- Dialogo metabolico tra organi diversi
  - Ciclo di Cori
    - Coinvolto fegato, muscolo scheletrico, GR e altri organi che producono acido lattico
  - Ciclo del Glc Ala
    - Dialogo tra muscolo scheletrico e fegato in condizioni di digiuno
  - Garantire apporto costante di glucosio per impedire che scenda sotto il valore critico che porterebbe al coma ipoglicemico

Caratteristiche

Via fisiologicamente opposta alla glicolisi

- No termodinamicamente, se spontanea in una direzione, non lo è nella direzione opposta
- Enzimi delle reazioni irreversibili sono enzimi segnapasso che quindi controllano la velocità di quella via
- In caso di necessità impellente di glucosio si utilizza la glicogenolisi piuttosto che la gluconeogenesi perché più rapida in quanto il glucosio è già presente

- Deve presentare almeno una tappa diversa



- Non potendo fare la via diretta 'inversa' aggiunge delle reazioni
- Dobbiamo controllare gli enzimi segnapasso

Dove avviene?

- Se precursore è glicerolo avviene nel citoplasma
- Se precursore è lattato avviene in parte nel mitocondrio in parte nel citoplasma

Quando?

- Quando la glicemia è bassa

Precursori

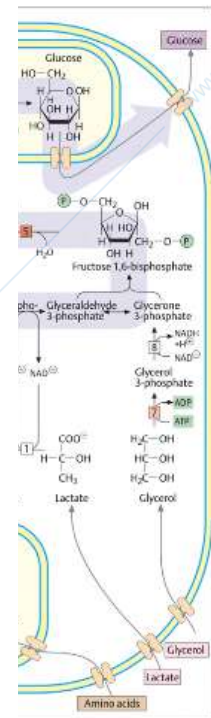
- Lattato
  - Lattato viene convertito in piruvato che a sua volta si trasformerà in ossalacetato il quale servirà a creare glucosio bypassando tappe irreversibili
- Alanina
  - Alanina si transamina a piruvato con ALT
- Aspartato
  - Aspartato si transamina a ossalacetato
- Glicerolo
  - Proviene soprattutto da metabolismo dei trigliceridi
  - Si trasforma prima in glicerolo-P poi in DHAP
  - Vi sono intermedi della glicolisi (piruvato e DHAP) che vanno al contrario a formare glucosio percorrendo le vie reversibili
  - Glicerolo si forma nel tessuto adiposo e si sviluppa quando c'è una carenza di glucosio, tessuto adiposo è indotto a liberare i suoi trigliceridi idrolizzandoli = acidi grassi + glicerolo
  - Glicerolo non può essere utilizzato dal tessuto adiposo perché non ha enzima che trasforma il glicerolo in glicerolo-P
  - Enzima è epatospecifico: **glicerolo chinasi**
    - $\text{Glicerolo} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicerolo-3fosfato} + \text{ADP}$
    - Può essere utilizzato per risintetizzare i trigliceridi ma anche come precursore della gluconeogenesi
  - **Glicerolo-3fosfato deidrogenasi** (altro enzima epatospecifico)
    - $\text{Glicerolo-3fosfato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{DHAP} + \text{NADH}/\text{H}^+$
    - DHAP utilizzata nella gluconeogenesi

Reazioni

Glicerolo

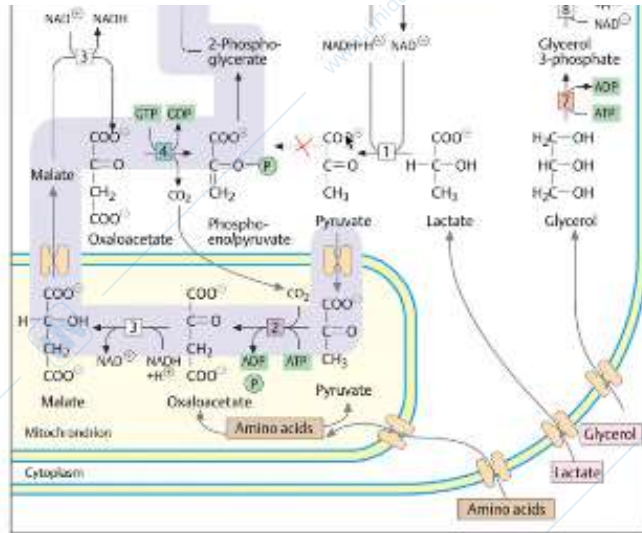
- Glicerolo proviene dal metabolismo dei trigliceridi

- Del trigliceride soltanto il glicerolo può essere usato a formare acidi grassi. Si trasforma in gliceroglofosfato poi in diidrossiglicergolofosfato DHAP
- 10% della massa di un trigliceride
- Contribuisce solo per una piccola alla sintesi di nuovo glucosio, la maggior parte viene dagli amminoacidi
- Può essere usato dal fegato perché vi è la **glicerolo chinasi**
  - Glicerolo viene fosforilato a formare glicerolo-3fosfato
- Viene ossidato dalla **glicerolo-3fosfato deidrogenasi** a formare DHAP
- Una molecola di DHAP si trasforma in GAP tramite **TIM**
- DHAP e GAP fanno condensazione aldolica (processo opposto ad aldolasi) formando il Fru-1,6BP con **aldolasi**
- Fru-1,6BP proviene dalla terza reazione della glicolisi che è irreversibile e catalizzata dalla fosfofruttochinasi1 che usa ATP per fosforilare il Fru-6P
  - Reazione inversa è non spontanea, c'è bisogno di un nuovo enzima ovvero il 5...

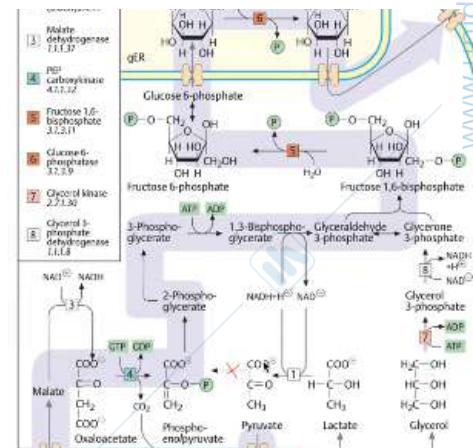
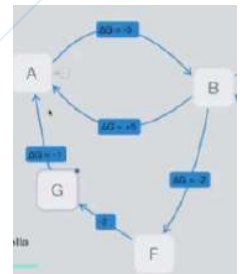


### Lattato

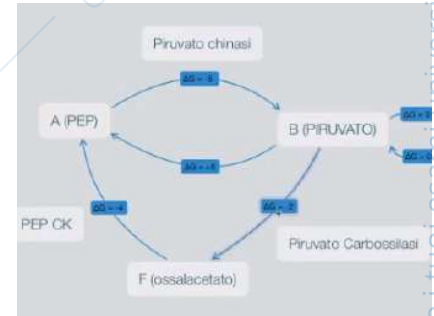
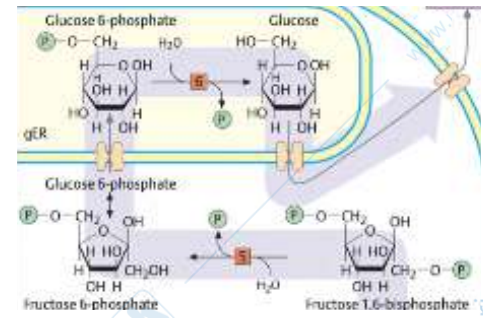
- Nel citoplasma c'è la **lattato deidrogenasi** che ossida il lattato a piruvato producendo NADH
- Reazione da piruvato a fosfoenolpiruvato PEP è l'inverso della reazione catalizzata dalla piruvatochinasi e non può venire all'inverso, è irreversibile
  - PEP ha fosfato con cui può fosforilare a livello del substrato ADP formando piruvato e ATP
  - Cellula deve bypassare la reazione, non può trasformare direttamente piruvato → PEP ma deve trasformarlo in qualcosa di più reattivo
- Zuccheri non possono essere tolti completamente dalla dieta perché ciò causa una over-produzione di corpi chetonici e dunque una acidosi metabolica che può risultare fatale
- Lattato si trasforma in piruvato nel citoplasma dell'epatocita dove la concentrazione di NAD<sup>+</sup> prevale rispetto a quella ridotta NADH
  - NADH che si forma verrà utilizzato nella reazione che riduce 1,3BPG in GAP, ossidando NADH a NAD<sup>+</sup>, reazione catalizzata dalla GAPDH
- Piruvato, non potendosi trasformare in PEP trova altro sistema
- Piruvato entra nel mitocondrio attraverso il trasportatore del monocarbossilato
- **Piruvato carbossilasi** utilizza una molecola di ATP e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (proveniente da H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> che si è formata grazie all'anidraasi carbonica) ed è in grado di associare al piruvato un carbossile COO<sup>-</sup> a formare ossalacetato
  - Piruvato + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + ATP → ossalacetato + ADP + Pi
- PROF DICE: prende la CO<sub>2</sub> dal piruvato attraverso l'ATP che quindi dissocia un carbossile COO<sup>-</sup> dal piruvato e lo trasforma in anidride carbonica con anidraasi carbonica
  - Piruvato + ATP → ossalacetato + CO<sub>2</sub> + ADP
- Ossalacetato non può uscire da mitocondrio e deve essere trasformato a malato
- Abbiamo bisogno che nel citoplasma si accumuli NADH ma vi è più NAD<sup>+</sup>, abbiamo il problema opposto dove dobbiamo portare NADH fuori dal mitocondrio invece che dentro
- Ossalacetato viene ridotto a malato (ossidando NADH a NAD<sup>+</sup>) il quale passa attraverso la membrana mitocondriale poiché vi è trasportatore degli acidi bicarbossilici (malato-alfaKT), tutto con **mMDH**
  - Ossalacetato + NADH → malato + NAD<sup>+</sup>
  - Malato sta portando gli elettroni presi dal NADH



- Malato va nel citoplasma e viene riossidato a ossalacetato da **cmdh** riformando/ri-riducendo  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ 
  - $\text{Malato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{ossalacetato} + \text{NADH}/\text{H}^+$
  - È un trasferimento di elettroni dal mitocondrio al citoplasma attraverso  $\text{NAD}^+$
  - Trasferimento del potere riducente dal mitocondrio al citoplasma
- Ossalacetato è il primo intermedio della gluconeogenesi, si forma nel mitocondrio e si sposta nel citoplasma con sistema navetta del malato e reagisce con il GTP ad opera di un enzima che si chiama **fosfoenolpiruvatocarbossichinasi**
  - Usa GTP per convertire ossalacetato a fosfoenolpiruvato PEP
  - $\text{Ossalacetato} + \text{GTP} \rightarrow \text{PEP} + \text{GDP}$
- Serve molta energia per trasformare piruvato in PEP perché è il metabolita che presenta il maggior potenziale di trasferimento di fosfato
  - C'è bisogno di ben 2 legami fosfoanidridici
  - Cellula non può direttamente trasformare  $\text{B} \rightarrow \text{A}$  perché non è spontanea (piruvato  $\rightarrow$  PEP) ma deve trasformare piruvato  $\rightarrow$  ossalacetato  $\rightarrow$  malato  $\rightarrow$  ossalacetato  $\rightarrow$  PEP
- Sono due reazioni (non contando sistema navetta)
  - **Piruvato carbossilasi**
  - **Fosfoenolpiruvatocarbossilichinasi**
- Fosfoenolpiruvato PEP può andare al contrario perché le reazioni dal PEP al DHAP sono reversibili
- Nella reazione da 3PG a 1,3BPG deve usare 1ATP per fosforilare il 3PG
  - $3\text{PG} + \text{ATP} \rightarrow 1,3\text{BPG} + \text{ADP}$
- $1,3\text{BPG} + \text{NADH} \rightarrow \text{GAP} + \text{NAD}^+$ 
  - Inverso della **GAP deidrogenasi** ( $\text{GAP} \rightarrow 1,3\text{BPG}$ )
  - GAP viene ridotto e quindi riformato
  - Se c'è abbastanza  $\text{NADH}$  nel citoplasma
- Poi come abbiamo già detto avviene, con aldolasi, la condensazione aldolica tra  $\text{GAP} + \text{DHAP} \rightarrow \text{Fru-1,6BP}$
- Adesso devo trasformare Fru-1,6BP in Fru-6P
  - Non uso ADP per prendere il fosfato perché non voglio formare ATP



- o Con una idrolasi consumo il legame fosfoestere tra P e C1 idrolizzandolo, legame viene scisso con acqua e si forma Fru-6P
- o Reazione catalizzata da una fosfatasi: **Fruttosio-1,6 bisfosfatasi**
- Fru-6P si isomerizza a Glc-6P con **fosfoglicosio isomerasi** (reversibile)
- Glc-6P entra nel reticolo endoplasmatico attraverso trasportatore dove si trova l'enzima finale ovvero la **glucosio-6fosfatasi** che riconosce Glc-6P e rimuove per idrolisi il fosfato riformando Glc
  - o  $\text{Glc-6P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc} + \text{P}$
- Glucosio esce dal RE e attraversando GLUT2 dell'epatocita raggiunge sangue per andare a rialzare la glicemia



## Sintesi

- Se cellula ha bisogno di energia: glicolisi
  - o  $\text{PEP} \rightarrow \text{Piruvato}$  con **piruvato chinasi**
- Se cellula ha bisogno di glucosio: gluconeogenesi
  - o Non potendo fare da  $\text{B} \rightarrow \text{A}$  perché non spontanea la bypassa
  - o Piruvato  $\rightarrow$  ossalacetato con **piruvato carbossilasi**
  - o Ossalacetato  $\rightarrow$  PEP con **PEP carbossichinasi**
  - o (senza contare sistema navetta)
  - o  $\text{AG} < 0$  perché abbiamo utilizzato GTP e ATP
    - Mentre sappiamo da dove proviene NADH (sistema navetta) non sappiamo da dove proviene energia metabolica (lo scopriremo)
  - o Tappe sono 11 in tutto invece di 10

### 1. Piruvato carbossilasi

- Piruvato +  $\text{CO}_2$  + ATP  $\rightarrow$  ossalacetato + ADP + Pi
- Reazione irreversibile, tappa segnapasso

### 2. PEP carbossichinasi

- Ossalacetato (cit.) + GTP  $\rightarrow$  PEP +  $\text{CO}_2$  + GDP
- Reazione irreversibile, tappa segnapasso

### 3. Da PEP a Fru-1,6BP stesse reazioni della glicolisi ma al contrario

### 9. Fruttosibisfosfatasi-1 (FBPasi-1)

- $\text{Fru-1,6BP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fru-6P} + \text{Pi}$
- Reazione irreversibile, tappa segnapasso
- Tutte le reazioni di idrolisi sono più o meno spontanee a seconda del legame che si idrolizza

### 10. Glucosioisomerasi

- $\text{Fru-6P} \rightarrow \text{G6P}$

### 11. Glucosio-6 fosfatasi (G6Pasi)

- $\text{G6P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc} + \text{Pi}$
- Reazione irreversibile, tappa segnapasso

## Reazioni nette

- $2 \text{ piruvato} + 6 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH}/\text{H}^+ (=5 \text{ ATP}) \rightarrow \text{Glc} + 6 \text{ ADP} + 6 \text{ Pi} + 2 \text{ NAD}^+$ 
  - o Per produrre una molecola di glucosio vengono usate 6 ATP o 11 ATP se consideriamo NADH, invece di usarlo per energia metabolica lo usa per processo sintetico
  - o Glicolisi è un processo catabolico che produce 7 ATP
  - o Processo fisiologicamente opposto (gluconeogenesi) non ne richiede 7 ma ben 11
    - Costruire è più difficile che distruggere
  - o RESA ENERGETICA piruvato  $\rightarrow$  glucosio = - 11 ATP
- $2 \text{ lattato} + 6 \text{ ATP} \rightarrow \text{Glc} + 6 \text{ ADP} + 6 \text{ Pi}$ 
  - o Lattato è meno ossidato del piruvato quindi più energia che viene usata per la reazione della GAPDH

- L'energia ricavata è quella dei 2 NADH che derivano dall'ossidazione del lattato a piruvato
  - Lattato + NAD<sup>+</sup> → Piruvato + NADH
  - Se ossido lattato ottengo energia per ridurre costo gluconeogenesi
- RESA ENERGETICA lattato → glucosio = - 6 ATP
- 2 Glicerolo + 2 ATP + 2 NAD<sup>+</sup> → Glc + 2 ADP + 2 Pi + 2 NADH/H<sup>+</sup> (=5 ATP)
  - Spesa ATP per fosforilarlo: 2 ATP per 2 gliceroli
  - Glicerolo è più ridotto del lattato quindi ha più energia
    - Glicerolo essendo poli-alcol è più avvantaggiato
  - Si ricava un po' di energia di cui abbiamo bisogno
    - Non abbiamo bisogno di NAD<sup>+</sup> ma di NADH quindi la cellula ricava 2 NADH=5 ATP
  - RESA ENERGETICA glicerolo → glucosio = + 3 ATP

Perché cellule non producono glucosio dagli acidi grassi?

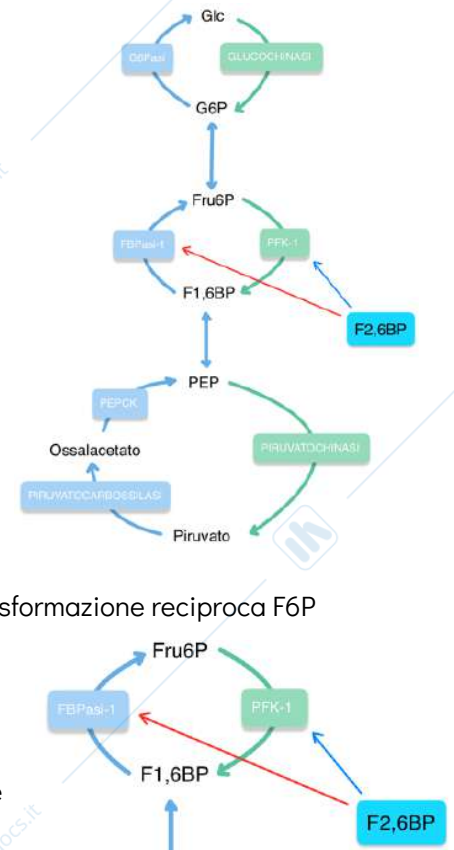
- Acetil-coa non può essere usato per formare glucosio perché, durante il ciclo di Krebs, i suoi due carboni dell'acetil-CoA vengono persi sotto forma di due molecole di CO<sub>2</sub>
- La reazione piruvato -> acetil-CoA è irreversibile negli animali
- Acetil-coa non sono precursori della sintesi del glucosio
- Negli animali gli acidi grassi non possono essere usati come fonte di glucosio
- Le piante e i batteri sono in grado di usare acidi grassi come fonti di glucosio attraverso la via del gliossilato che permette di bypassare reazione irreversibile della piruvato deidrogenasi quindi faccio tornare l'acetil-coa a piruvato (no ciccia → glucosio)
- Tutti gli **acidi grassi pari** non possono essere usati per sintesi glucosio
- Quelli a catena dispari invece danno luogo all'acido propionico intermedio della gluconeogenesi

La maggior parte delle reazioni che si svolgono all'interno della cellula sono reversibili, soltanto poche sono irreversibili

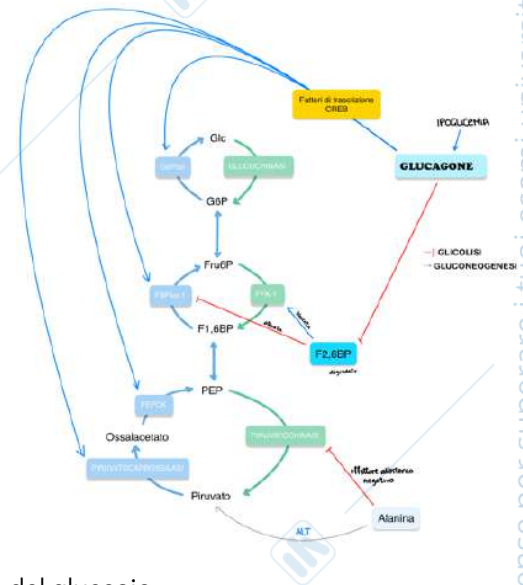
- Cellula non può decidere la direzione delle reazioni reversibili, lo determina la concentrazione relativa dei reagenti e dei prodotti
- Cellula controlla le tappe segnapasso o irreversibili

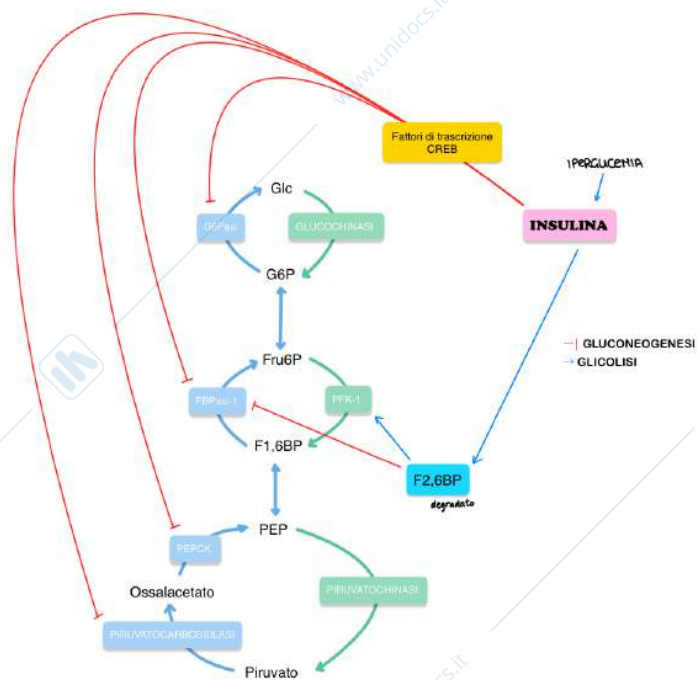
### Regolazione reciproca gluconeogenesi-glicolisi

- Sintesi glucosio
  - Piruvato → ossalacetato → PEP → Fru-1,6BPG
  - Da fru-1,6BP c'è reazione catalizzata da **fruttobisfosfatasi 1** :  
Fru-1,6BP → F6P
  - **Glucosiofosfatoisomerasi** F6P → G6P
  - **G6P fosfatasi**: G6P → Glc
- Glicolisi
  - **Glucocinasi**: Glc → G6P
  - **Fosfofruttochinasi1**: F6P → F-1,6BP
  - **Piruvato chinasi**: PEP → piruvato
- Fru-2,6BPG è un effettore allosterico
  - Viene utilizzato per controllare l'attività di due enzimi segnapasso contemporaneamente
    - Si lega ai due enzimi segnapasso che controllano la trasformazione reciproca F6P ↔ F1,6BP
  - È questo metabolita, che si produce all'interno della cellula, che governa il flusso
    - Attivatore della **PFK1**
      - Si lega e ne modifica struttura e quindi funzione
    - Inattiva la **fruttobisfosfatasi 1**



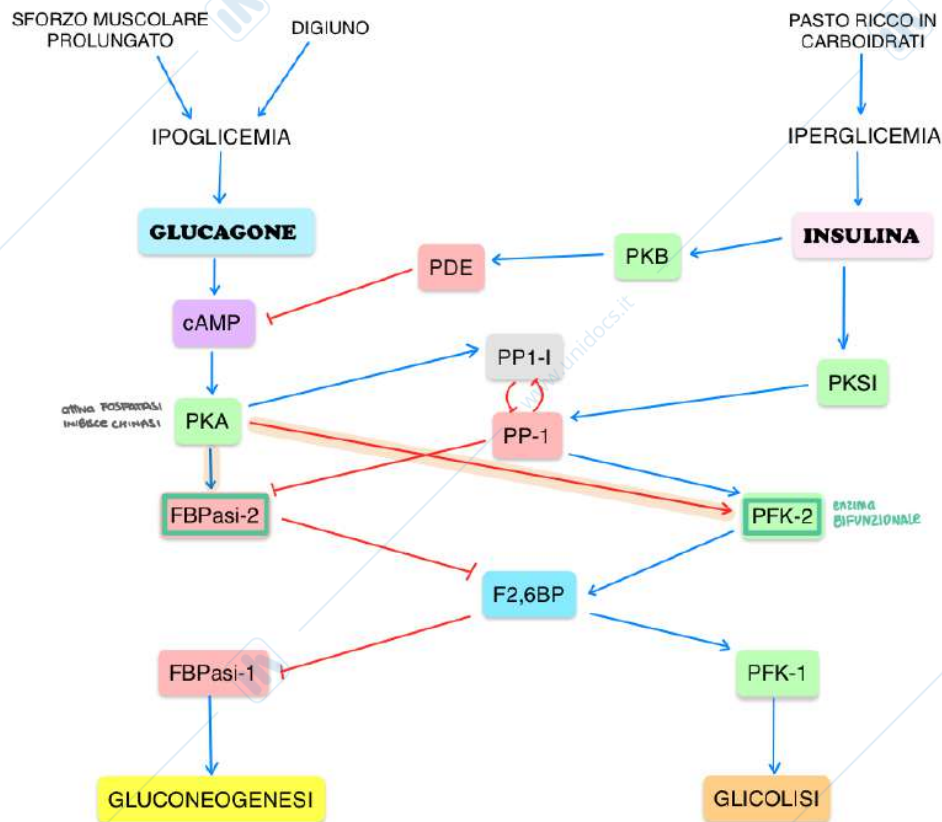
- Cellula deve controllarne la concentrazione
  - Se ce n'è poco prenderebbe il sopravvento la gluconeogenesi perché
    - PFK1 non verrebbe attivata (Deve reagire agli stimoli provenienti dalla cellula)
    - Fosfatasi1 non verrebbe inibita e Fru-1,6BP trasformato in Fru-6P
- Viene prodotto da enzimi e degradato da un altro
  - Attività di questi enzimi che controllano la concentrazione cellulare di Fru-2,6BP è controllata a sua volta a livello ormonale da ormoni glucostatici ovvero insulina e glucagone
  - Questo controllo lo vediamo in atto solo nell'epatocita perché è l'unico in grado di attuare la gluconeogenesi (miociti e adipociti no)
- **Ipoglicemia → glucagone**
  - Quando siamo in situazione di ipoglicemia cellula epatica deve bloccare la glicolisi e attivare la gluconeogenesi
  - Glucagone determina la degradazione del Fru-2,6BP e così facendo, bloccando la PFK-1, **BLOCCA GLICOLISI!**
  - D'altra parte il blocco della Fru-2,6BP rimuove il blocco della FBPasi-1. FBPasi-1 (enzima segnapasso della gluconeogenesi) si attiva e trasforma il Fru-1,6BP → Fru-6P = **ATTIVA GLUCONEOGENESI!**
  - Glucagone agisce, attraverso la PKA, sui fattori di trascrizione CREB (elementi genici responsivi all'cAMP) che sono importanti per alcuni trascritti di enzimi segnapasso della gluconeogenesi = espressione enzimi gluconeogenesi aumenta!
  - Nel fegato si accumula l'alanina captata dal sangue
    - Alanina è un precursore del glucosio perché tramite l'ALT viene trasformata in piruvato che è il precursore del glucosio
    - Alanina si accumula nel sangue quando siamo in una situazione di ipoglicemia e al fegato viene imposta la sintesi di glucosio ex novo
    - Alanina è un potente effettore allosterico negativo della piruvato chinasi quindi dell'enzima più importante che controlla il destino del PEP
    - Se enzima non venisse bloccato PEP verrebbe consumato in un ciclo futile dalla piruvato chinasi e trasformato in piruvato e si dovrebbe rifare quel percorso per farlo tornare a PEP
  - **Iperglicemia → insulina**
    - Insulina determina produzione Fru-2,6BP che attiva glicolisi e blocca gluconeogenesi
    - Insulina agisce in modo negativo sui fattori di trascrizione CREB che venivano invece attivati dal glucagone





- Cellula agisce a vari livelli
  - Controllo espressione enzimi attraverso la loro interazione con effettori allosterici (metaboliti che la cellula interpreta come stimoli gluconeogenici o glicolitici)
  - Modificazione degli enzimi: fosforilazione e defosforilazione (chinasi e fosfatasi) (FINE LEZIONE 19, 05.05.21)
- Queste due vie sono entrambe irreversibili quindi spontanee (INIZIO LEZIONE 20, 10.05.21)
  - Glicolisi è una via catabolica che permette di ottenere energia metabolica sotto forma di ATP
  - Gluconeogenesi è resa spontanea dall'investimento di energia metabolica sotto forma di ATP che la cellula deve garantire nelle tappe della piruvato carbossilasi e PEPCK
- Vie devono essere controllate in modo che se una via è accesa l'altra è spenta
  - Controllo può essere allosterico, covalente o di espressione
  - F2,6BP è modulatore allosterico più importante per controllare il flusso attraverso queste due vie
    - È un potente attivatore della PFK1 (processo glicolitico) e contemporaneamente un
    - Potente inibitore allosterico della FBPasi-1 (enzima segnapasso della gluconeogenesi)
    - Quando si lega ne modifica la struttura quindi anche la funzione
- Digiuno e intenso sforzo muscolare determinano ipoglicemia funzionale
  - Ipoglicemia → rilascio glucagone
  - Glucagone → stimola produzione cAMP
  - cAMP → si lega e attiva PKA
  - PKA → fosforila l'enzima bifunzionale ovvero avente due domini con attività enzimatiche differenti: FBPasi-2 e PFK-2
    - PKA → attiva FBPasi-2
    - PKA --- inibisce PFK-2
  - FBPasi-2 (fosfatasi) defosforila F2,6BP e lo degrada
    - FBPasi-2 --- inibisce F2,6BP che quindi non può né andare a inibire la FBPasi-1 né andare ad attivare la PFK-1
    - FBPasi-2, quindi attiva, avvia il processo gluconeogenico
  - PFK-2 inibita non può attivare la produzione di F2,6BP che poi andrebbe ad attivare la PFK-1 per GLICOLISI
  - GLUCAGONE → GLUCONEOGENESI
  - Digiuno da un lato blocca glicolisi e aumenta la gluconeogenesi
- Pasto ricco in carboidrati → iperglicemia → insulina
  - Insulina → PKB → PDE --- cAMP

- Impediamo al cAMP di attivare PKA che andrebbe ad attivare la FBPasi-2
- Insulina → PKSI → PP1
  - PP1 --- FBPasi-2: PP1 defosforila enzima bifunzionale
    - Inibisce FBPasi-2
    - Attiva PFK-2
- PFK2 → F2,6BP → PFK-1 → GLICOLISI
- Esiste inibitore della PP1 chiamato PP1-I: PP1-I --- PP-1
  - PKA → PP1-I --- PP1
  - Quando però PP1 è attiva la inibisce a sua volta PP1---PP1-I



## Metabolismo del glicogeno

### Note generali

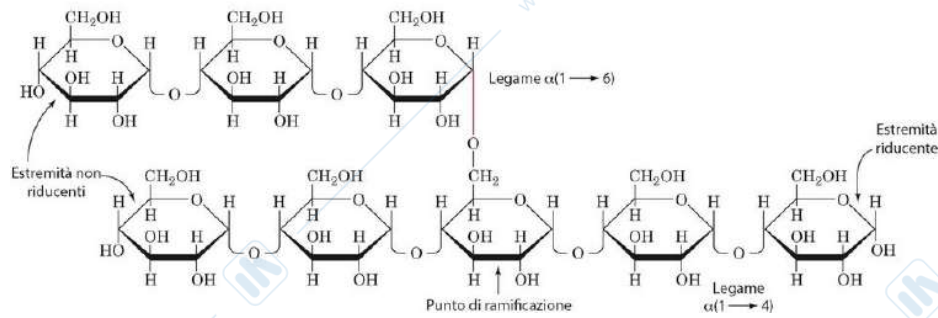
- Non è una via metabolica esclusiva del fegato, sintesi e degradazione avvengono anche nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, tessuto adiposo e in parte nei GR
- Nel fegato il metabolismo del glicogeno, come quello del glucosio, ha una funzione prettamente glucostatica
  - Glicogeno è una forma di deposito del glucosio quando questo è in eccesso
  - O può essere mobilitato quando glucosio è in difetto
  - Glicogeno può essere fonte di glucosio quando scarseggia o un modo di rimuoverlo quando è in eccesso
- Iperglicemia: [Glc] >5mM ma può arrivare anche a 40mM
  - Transitoria:
    - Dopo un pasto ricco di carboidrati
    - Glicolisi epatica: degrada glucosio
    - Glicogenosintesi: sequestra glucosio che può essere poi rilasciato in condizione di bisogno dell'organismo
  - Permanente:
    - Uso di farmaci iperglicemizzanti come farmaci steroidei
    - Stati patologici come malattie del sistema endocrino come ipertiroidismo e diabete

- Ipoglicemia: [Glc]<4mM, non deve scendere sotto 2.8mM (coma ipoglicemico)
  - Transitoria:
    - Prime fasi del digiuno (consumo costante che le cellule del nostro corpo attuano) o intenso sforzo muscolare (contrazione anaerobia)
  - Permanente:
    - Trattamento con insulina di soggetti diabetici
    - Mentre organismo può sopportare alti valori iperglicemici, non può tollerare <2.8mM perché incompatibile con la vita, situazione estremamente critica su cui si deve immediatamente intervenire
    - Glicogenolisi: rilascio di glucosio dalla sua forma di deposito

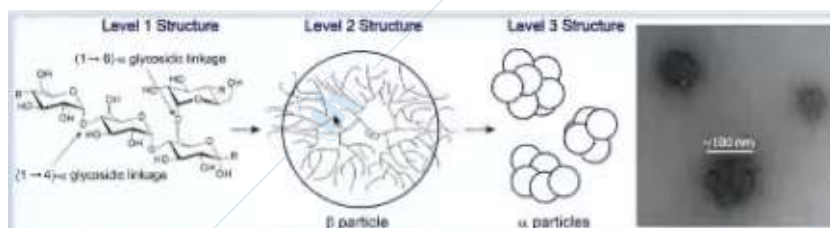
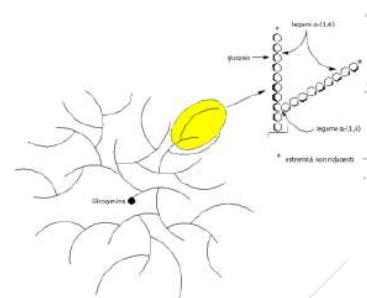
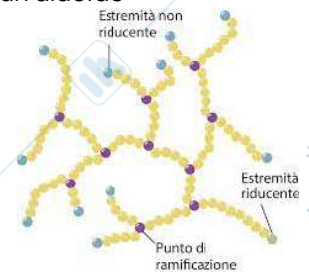
#### Proprietà biochimiche del glicogeno

- Quantità di glucosio normale è circa **500g**
  - 1/3 nel fegato = **100g** nel fegato
  - 2/3 nei muscoli scheletrici e in quello cardiaco = **400g** nel muscolo
- Quantità di glucosio accumulabile da un organismo (a differenza di quella dei lipidi) è limitata dalle caratteristiche dell'organismo stesso
  - È una molecola fortemente polare e pertanto estremamente idratata
  - Una parte di glicogeno richiede il legame con 3 parti di acqua (1glicogeno : 3acqua)
    - Muscolo cardiaco ha 400g di glicogeno e quindi vi sono 1.5kg di acqua legati in modo funzionale a questa macromolecola
  - Glicogeno quindi sequestra molecole d'acqua ma vi è un limite a questo perché acqua è estremamente importante per la funzionalità della cellula
- Ragioni della polimerizzazione del Glc
  - Motivi osmotici
    - Come tutte molecole disposte in soluzione che si trovano di fronte ad una membrana che le impedisce il passaggio libero, la concentrazione del soluto è rilevante per determinare il valore finale della pressione osmotica che questo soluto esercita sulla membrana cellulare
    - Motivo per cui glucosio non può essere depositato sotto forma di singola molecola ma di macromolecola è dovuto all'osmolarità differente delle due molecole
      - Fegato abbiamo 100g di Glc
      - Volume fegato = 1.5L
      - Se fegato immagazzinasse Glc sotto forma di molecole singole all'interno si creerebbe una **pressione osmotica elevatissima**  $R=0.082L \text{ atm mol}^{-1}$  di 9 atmosfere
  - Motivi chimici
    - Glucosio presenta un gruppo aldeidico che è piuttosto reattivo, è un buon riducente, ha un gruppo facilmente ossidabile
    - Interessante dal punto di vista clinico perché quando concentrazione glucosio aumenta troppo, gruppo reattivo tende a reagire con gruppi amminici primari che si trovano nelle proteine o nei fosfolipidi di membrana
      - Processi di **glicazione** che portano a modificazione più o meno gravi su proteine e lipidi
      - Glicazione Hb è un buon marcatore dello stato di glicemia del paziente, se eccesso Hb glicata, glicemia è consistente e il diabete non è ben trattato, permette di monitorare lo stato di salute del paziente
      - Modificazioni irreversibili delle molecole che vengono indicate con il nome di **prodotti di glicazione avanzata (AGE)**, indicativi di una non perfetta omeostasi del glucosio
- Struttura del glicogeno

- o Omopolimero ramificato del D-Glc



- o Polisaccaride costituito da un unico tipo di monomero che è legato agli altri tramite legami di tipo  **$\alpha$ - $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)**, legame che si ripete tranne nei punti di ramificazione
- o Nei **punti di ramificazione** vi è un legame glicosidico di tipo  **$\alpha$ (1-6)**
  - Ramificazioni simili a quelle dell'amilopectina
  - Ramificazioni ogni 8-10 unità
  - Punti di ramificazione determinano più punti di accesso per la sintesi e la degradazione della macromolecola
  - Se la molecola fosse ad una singola catena avremo una singola estremità
- o Un'estremità è riducente quando abbiamo il carbonio anomero libero: OH aldeidico che si può convertire in gruppo carbossilico COOH (CHO $\rightarrow$ COOH) (dice che è riducente perché può esporre gruppo aldeidico...)
- o Estremità non riducente ha il carbonio anomero impegnato a creare dei legami acetalici che sono dei legami stabili che impediscono al carbonio di reagire come se fosse un'aldeide
- o Il glicogeno ha una sola estremità riducente che è il primo zucchero che viene 'montato' per costruire la struttura
- o Poi abbiamo N-estremità non riducenti su cui si esplica il meccanismo di sintesi e degradazione
  - Ce ne sono molte per permettere una maggiore idrofilicità quindi idrosolubilità della macromolecola e perché rende più rapida la capacità della cellula di degradare e sintetizzare questa molecola
- o L'unica estremità riducente è legata ad una proteina chiamata **glicogenina**, importante per la cellula per controllare il numero di macromolecole di glucosio presenti all'interno della cellula stessa
- o Ogni macromolecola è formata da circa **50.000 residui di glucosio**, quindi al massimo il peso molecolare sarà **PM = 10<sup>7</sup> Da**
  - Vantaggio del conservare il glucosio sottoforma di macromolecola che come singola unità saccaridica
- o Livelli di struttura delle molecole di glicogeno
  - Glicogeno contiene vari livelli di organizzazione



- Sfera è molecola di glicogenina da cui parte la catena del glicogeno
- Singola molecola di glicogeno che dimerizza con una seconda attraverso un ponte disolfuro tra due molecole di glicogenina
- Questa struttura che contiene due molecole di glicogeno è chiamata **particella beta**
  - Diametro di circa 25nm

- Numero di residui totali 100.000 unità di glucosio
- $PM = 2 \times 10^7$  Da
- Particelle beta formano aggregati chiamati **particelle alfa**
  - Diametro di circa 100nm

Vie metaboliche opposte: glicogenolisi e glicogenosintesi

## Glicogenolisi

Caratteristiche

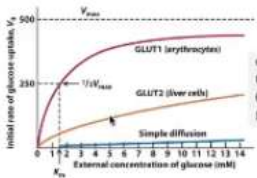
- Citosolica
  - Glicogeno ha quella struttura perché deve essere solubile in acqua, nel citoplasma
- Rapida
  - Struttura ramificata perché rende conto della velocità a cui la cellula deve demolirlo
  - Su ciascuna delle estremità non riducenti si legano gli enzimi deputati al metabolismo degradativo
- Controllata da:
  - **Glicemia** nel sangue: [Glc] ematico
  - Ormoni che indicano stato di alimentazione
    - **Glucagone**: in caso di digiuno fa sì che glucosio venga rilasciato per rialzare la glicemia
    - **Insulina** blocca la glicogenosintesi
  - Ormone dello stress
    - **Adrenalina**: azione iperglicemizzante, sul fegato comporta rilascio di glucosio per preparare tessuto muscolare per reagire prontamente alla sfida che si presenta di fronte all'organismo

Enzimi

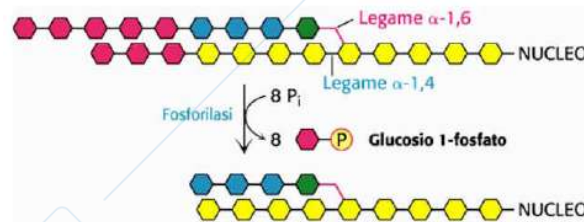
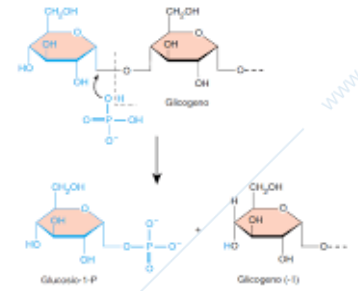
- Enzimi hanno isoforme diverse nei vari organi (isoforme epatiche e muscolari)

### 1. Glicogenofosforilasi (fosforilasi)

- Enzima segnapasso
- Regolazione
  - Allosterica
    - **Glucosio** è effettore allosterico negativo per la isoforma epatica (no muscolare)
    - Quando c'è glucosio nella cellula epatica, il che si verifica solo in condizioni di iperglicemia quando GLUT2 ( $K_m=10-15mM$ ) ha un'alta affinità
    - Quando c'è iperglicemia glucosio si accumula e blocca la glicogenofosforilasi
    - Infatti quando c'è troppo glucosio questo deve essere accumulato e non rilasciato
  - Covalente
    - Insulina: inibizione della via
    - Glucagone: attivazione della via
    - Stato di fosforilazione dell'enzima segnapasso
      - Forma fosforilata (Ser-P) → forma ATTIVA
        - Glucagone con la sua azione **PKA** mediata stabilisce forma attiva della glicogenofosforilasi
      - Forma defosforilata (Ser-OH) → forma INATTIVA
        - Insulina attraverso la **PP1** va a defosforilare la glicogenofosforilasi e quindi la inattiva
  - Adrenalina
    - Adrenalina ha recettore, come glucagone, legato a proteine G
    - Quando si lega a recettore causa la produzione di cAMP e quindi anche fosforilazione della glicogenofosforilasi e dunque la sua attivazione

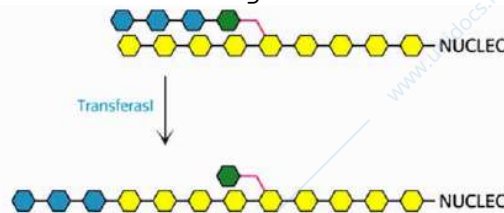


- Cofattore: PLP (piridossalfosfato)
- Rimuove residui di glucosio usando fosfato (non acqua): FOSFOROLISI
  - Non è idrolasi perchè non scinde legami con acqua, se scindesse legami con acqua avremo produzione di glucosio
  - Scinde i legami con il fosfato, il che determina la produzione dei **glucosio-1-fosfato**
  - Nel fegato la fosforolisi è meno immediata che nel muscolo scheletrico
  - Nel muscolo avere G1P è vantaggioso perché nella glicolisi lo avrebbe dovuto fosforilare con ATP ma invece così è già fosforilato
    - G1P contiene al suo interno già energia metabolica, cellula non deve utilizzare altro ATP
  - Poi se si liberasse troppo glucosio insieme ciò andrebbe ad aumentare la pressione osmotica (non sicuro, potrebbe)
  - Muscolo e tessuto adiposo non hanno G6Pasi quindi non possono convertire G6P → Glc e dunque non contribuiscono al mantenimento della glicemia nel sangue
- Glicogenofosforilasi scinde una molecola di glicogeno rimuovendo, ogni volta che agisce, una molecola di glucosio-1-fosfato (rompe legami 1-4)
  - Lo fa fino a quando catena di glicogeno non raggiunge la dimensione di 4 residui perché la sua struttura non è in grado di legarsi a questa molecola e quindi di continuare a scindere legami, interverrà un altro enzima



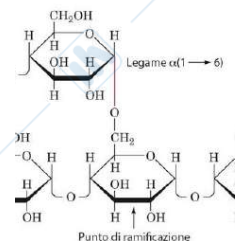
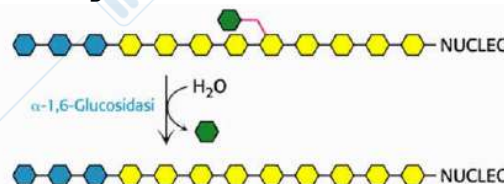
## 2. Enzima deramificante

- Riconosce le ramificazioni che non possono essere tagliate dalla glicogenofosforilasi
- Ha due attività:
  - **Glicosiltransferasica**
    - Trasferisce 3 residui di glucosio (trisaccaride) su un'estremità vicina del glicogeno riformando un legame  $\alpha(1 \rightarrow 4)$



- **$\alpha$ -1,6-gluconidasi**

- Una volta che ha scoperto il glucosio legato con legame  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ , riconosce questo legame e lo idrolizza usando l'acqua e rimuove un residuo di glucosio



- Azione sinergica di questi due enzimi, glicogenofosforilasi e enzima deramificante, va a degradare completamente la macromolecola di glicogeno in glucosio-1-fosfato e glucosio

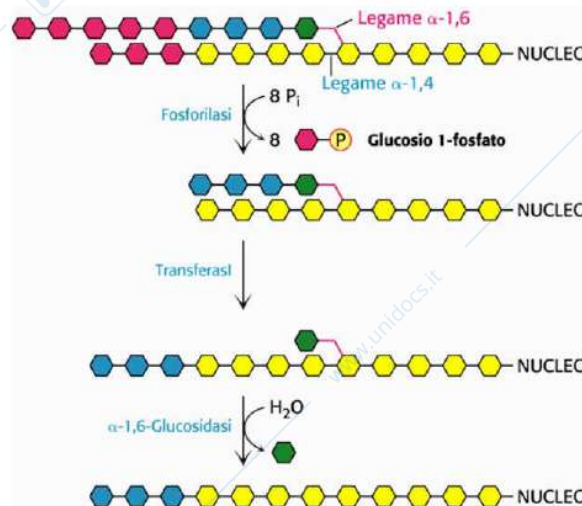
- 10% del glucosio è nella forma ramificata quindi 10% di glucosio libero
- Il compito di questa via è quello di produrre glucosio non G1P

### 3. Fosfoglucomutasi

- Isomerizza quel 90% di G1P → G6P

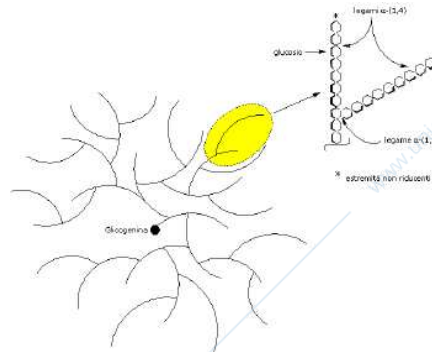
### 4. G6P fosfatasi

- Già vista nella gluconeogenesi
- Solo nel RE
- Defosforila il G6P:  $G6P \rightarrow Glc + Pi$
- Adesso il glucosio può essere trasportato con il suo trasportatore GLUT2 dalla cellula verso il sangue



#### Reazione netta

- GLICOGENO (n residui) +  $Pi + H_2O \rightarrow Glc + Pi + GLICOGENO (n-1 \text{ residui})$
- $Pi$  e  $H_2O$  usati per scindere legami
- Si produce  $Glc$  che senza  $Pi$  può uscire dalla cellula,  $Pi$  rimosso da G6P
- Glicogeno si scinde finchè non diventa sempre più piccolo
- Processo estremamente rapido: migliaia di molecole che agiscono su ogni punto di ramificazione



## Gluconosintesi

### Caratteristiche

- Glicogeno è prodotto in situazione di iperglicemia dove dobbiamo attenuare eccesso di glucosio
  - Dovuta a pasto ricco in carboidrati
- Citosolica
- Rapida
- Processo anabolico che quindi richiede consumo di energia metabolica ( $UTP = ATP$ )
- Controllata da
  - Glicemia

- Ormoni dello stato di alimentazione
  - Insulina la attiva
- Ormone dello stress
  - Adrenalina
- Quantità di glicogeno presente nelle cellule
  - Satura tutte le singole particelle beta e caricando 100.000 residui di Glc

## Enzimi

- Sappiamo che in condizione di iperglicemia il GLUT2 fa entrare nell'epatocita grandi quantità di glucosio che quindi si accumula

- Glucosio inibisce glicogenofosforilasi

### 1. Glucochinasi

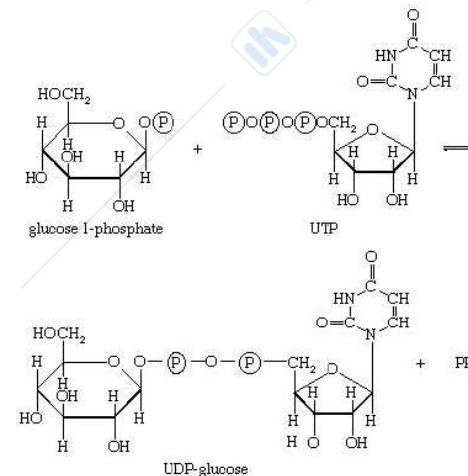
- Isoforma dell'esochinasi che, a loro differenza, non è inibita dal glucosio e G6P
  - Non saturabile perché riesce ad utilizzare tutto il Glc che incontra e trasformarlo in G6P
- Fosforila glucosio:  $\text{Glc} + \text{ATP} \rightarrow \text{G6P} + \text{H}_2\text{O}$ 
  - Glucosio è bloccato nell'epatocita
  - Irreversibile
- G6P può essere utilizzato nella glicolisi, nella via dei pentosi fosfati e anche nella glicogenosintesi

### 2. Fosfoglucomutasi

- Isomerizza G6P  $\rightarrow$  G1P
- Reversibile
- G1P è il prodotto della degradazione del glicogeno quindi questo lo prepara ad entrare nella macromolecola
- Enzima in comune con la glicogenolisi

### 3. UDP glucosio pirofosforilasi

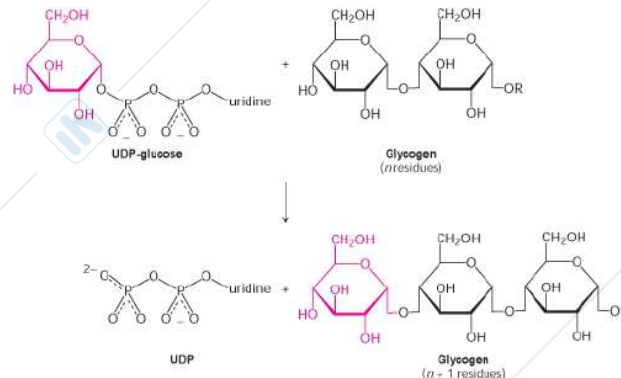
- Irreversibile
- G1P ha un legame fosfoestere quindi non ad alta energia
- Per produrre una macromolecola cellula ha bisogno di usare energia metabolica e di questo se ne occupa questo enzima
- Attiva il G1P in UDP-Glc
  - $\text{G1P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-Glc} + \text{PPi}$
  - Si forma un legame fosfoanidridico UDP-Glc
- Utilizza UTP per produrre la forma attiva del glucosio UDP-Glc rilasciando PPi
- PPi verrà riconosciuto dalla **pirofosfatasi inorganica** e verrà scisso in fosfato
  - $\text{PPi} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Pi}$
  - Si rompe un legame fosfoanidridico PPi
- La cellula per produrre UDP-Glc consuma un legame fosfoanidridico



### 4. Glicogenosintasi

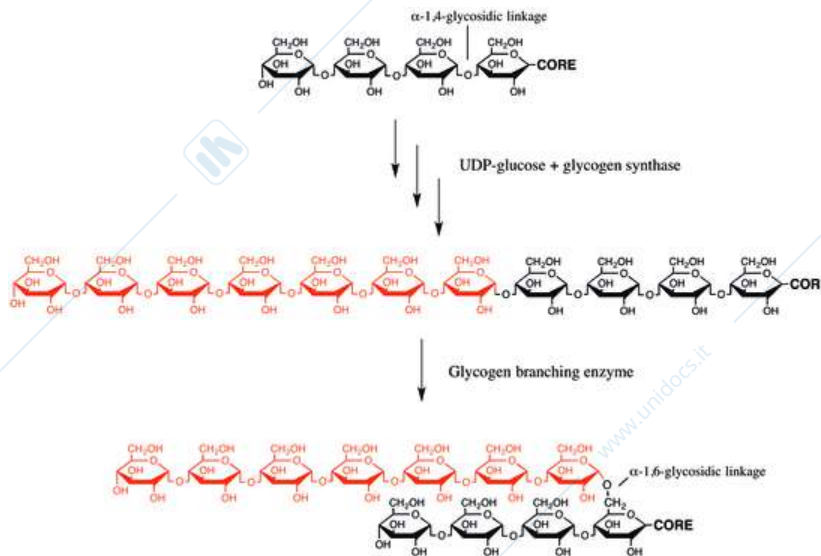
- Enzima segnapasso
- Regolazione
  - Allosterica
    - +G6P che si forma e si accumula quando c'è molto glucosio da smaltire, cellula sa che deve usare questo glucosio in eccesso per ripristinare glicemia
  - Covalente
    - + Insulina
      - Attiva glicogenosintasi
      - Spegne la glicogenofosforilasi
    - - Adrenalina
    - - Glucagone

- Stato di fosforilazione
  - Forma defosforilata = ATTIVA
  - Forma fosforilata = INATTIVA
- UDP-Glc + GLICOGENO (n residui) → UDP + GLICOGENO (n+1 residui)
  - Utilizza UDP come elemento per sintetizzare un legame glicosidico (Glc-Glc)
- SINTASI = LIASI forma legami  $\alpha$  (1→4)



## 5. Enzima ramificante

- Forma legami  $\alpha$  (1→6)
- Opposto dell'enzima deramificante
- Dopo che la struttura del glicogeno ha raggiunto una lunghezza di 10-11 residui, stacca un frammento di 6-8 unità e lo riattacca su una catena vicina instaurando un legame  $\alpha$  (1→6)
- Stacca legame  $\alpha$  (1→4) e riassume l'oligosaccaride formando un legame glicosidico  $\alpha$  (1→6) e quindi creando un nuovo punto di ramificazione



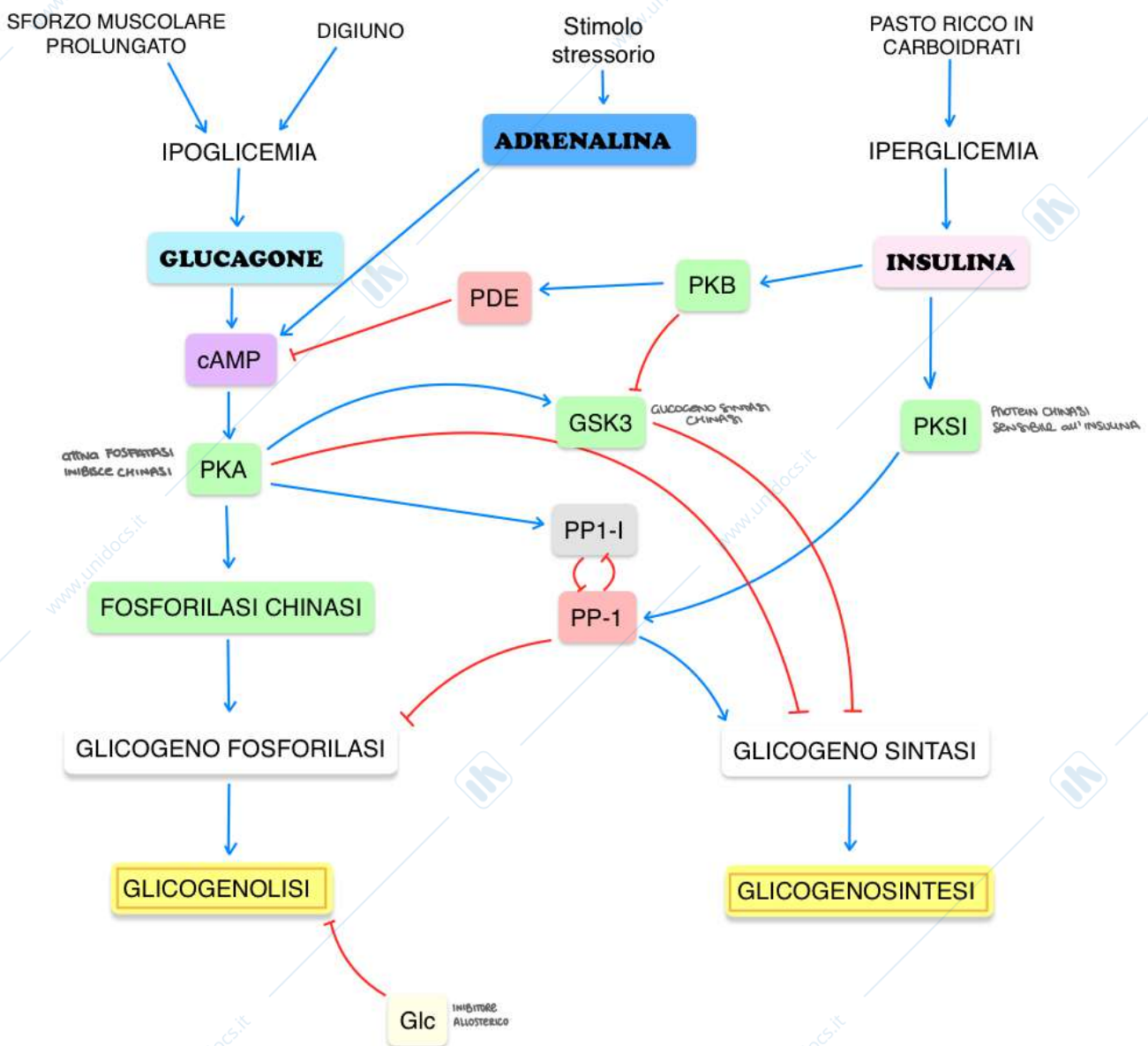
### Reazione netta

- Glucosio + GLICOGENO (n residui) + ATP + UTP → GLICOGENO (n+1 residui) + ADP + UDP + 2Pi
- Consumo per ogni residuo attaccato di 2 legami fosfoanidridici (quelli da ATP e UTP, equivalenti a 2ATP)
- Quando si vanno a ri-usare le molecole di glucosio si dovrebbe aggiungere l'ATP che serve per riattivarli ma questo non accade perché glucosio è già fosforilato G1P

### Controllo reciproco di vie opposte

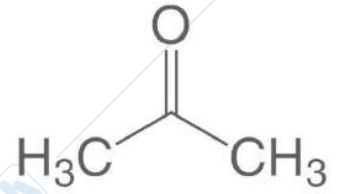
- Quando è attiva la glicogenolisi la glicogenosintesi deve essere spenta e viceversa
- Glucagone → PKA → GLICOGENOFOSFORILASI → GLICOGENOLISI
  - D'altra parte il glucagone BLOCCA la glicogenosintesi bloccando la glicogenosintasi attraverso PKA che
    - PKA → GSK3 —| glicogeno sintasi

- PKA → PP1-I —| PP1 che avrebbe attivato la glicogenosintasi
- Glicogeno sintasi fosforilata = inibita
- Glicogeno fosforilasi fosforilata = attivata
- Adrenalina è ormone prodotto dal rene in risposta ad uno stimolo stressorio che serve a preparare l'organismo ad una risposta immediata
  - Fa rilasciare glucosio dal glicogeno del fegato = attiva glicogenolisi
  - Agisce su recettori molto simili a quello del glucagone, legato a proteine Gs che attivano la produzione del cAMP che quindi attiva la glicogenolisi
- Insulina attiva
  - PKSI che attiva la PP1 che
    - Defosforila e disattiva glicogenofosforilasi
    - Defosforila e attiva la glicogenosintasi
  - PKB che
    - Inibisce GSK3 che doveva inibire la glicogenosintasi
    - Attiva PDE che degrada il cAMP
- N.B. nel fegato il glucosio è inibitore allosterico che quando si accumula inibisce la glicogenofosforilasi e quindi il processo glicogenolitico





- Anche il carbonio alcolico legato a OH è leggermente polarizzato, abbiamo un ossigeno che può formare un legame idrogeno usando H come donatore di legame idrogeno e può accettare due legami H come accettore
    - Sono polari, considerati acidi grassi solubili
  - **Acetone** (INIZIO LEZIONE 21, 11.05.21)
    - Si forma per degradazione non enzimatica dell'acetoacetato
      - Dall'acetoacetato esce COO sotto forma di CO<sub>2</sub>
    - Origina per decarbossilazione spontanea del betachetoacido
    - Sottoprodotto che fa perdere energia metabolica al nostro organismo che non viene utilizzato perché non viene riconosciuto dal macchinario enzimatico delle cellule
    - Eliminato attraverso apparato respiratorio e urine
    - La sua quantità dipende da quella dell'acetoacetato
    - Marcatore stato di produzione dei corpi chetonici, in condizioni critiche è marcatore importante dello stato diabetico
    - Quando si accumula acetoacetato c'è produzione crescente di acetone perché ne deriva
  - Si producono a causa di un
    - Digiuno prolungato
    - Dieta chetogenica la quale riduce sensibilmente l'apporto di carboidrati
    - Diabete non trattato che, dal punto di vista metabolico, è equivalente a digiuno prolungato perché glucosio nel plasma non viene correttamente utilizzato per un cattivo funzionamento della via di segnalazione dell'insulina
    - Digiuno, dieta o malattia
- Via lineare di 3-4 reazioni
- Via mitocondriale: si svolge nella matrice mitocondriale
- Si attiva quando
  - Ipoglicemia: concentrazione glucosio si abbassa
  - Aumenta la concentrazione di acidi grassi liberi nel sangue, tipica di una condizione di digiuno o diabete
  - Aumenta la concentrazione mitocondriale dell'acetyl-CoA che è il precursore della loro sintesi
- Via utilizzata dall'epatocita per recuperare il pool di CoA necessario per i meccanismi di beta-ossidazione che si attuano nel mitocondrio epatico
  - Ciclo di Krebs comincia a difettare a causa di una concomitante azione dovuta alla carenza di glucosio nel sangue
- In situazione di ipoglicemia il fegato si occupa, dapprima, di riversare il glucosio contenuto nel glicogeno e poi di produrre glucosio da composti non saccaridici
  - Come acido piruvico, ossalacetato (intermedio ciclo di Krebs, quando serve glucosio viene esportato dal mitocondrio al citoplasma)
  - Deficit ossalacetato causa difetti nel ciclo di Krebs
- Formazione degli acidi (corpi chetonici) porta ad una **acidosi chetonica**
  - In condizione di digiuno abbiamo acidosi dovuta all'aumento della produzione dei corpi chetonici e una stimolazione dei sistemi tampone che intervengono prontamente
  - All'interno delle cellule intervengono tamponi fosfato e proteici
  - All'esterno i tamponi bicarbonato, Hb e tamponi controllati dall'azione del rene

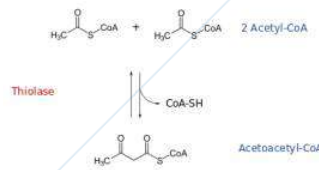


Enzimi

- Come se fosse beta-ossidazione al contrario

### 1. Acetil-CoA acetil transferasi (o tiolasi)

- Condensa 2 acetil-CoA, che si stanno accumulando nel mitocondrio, ad acetoacetil-coa (betachetoacile)



- Stesso enzima che catalizza la reazione opposta nella beta-ossidazione

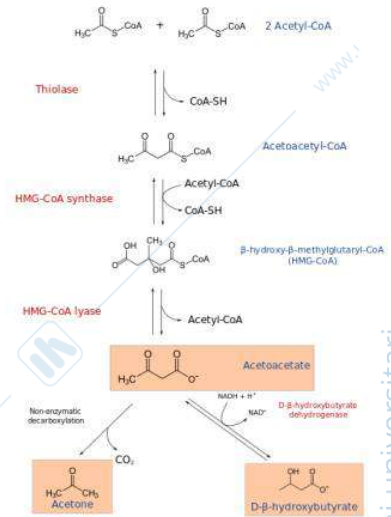
- Acetil-CoA proviene tutto dalla **beta-ossidazione** degli acidi grassi

- Non provengono dalla decarbossilazione di piruvato perché siamo in condizione di ipoglicemia e l'epatocita smette di utilizzare il piruvato per formare acetil-coa perché perderebbe un precursore del glucosio
  - Glucagone infatti attraverso la PKA va a inibire la piruvato deidrogenasi in modo che il piruvato non possa essere consumato irreversibilmente a formare acetil-coa
- 18/20 amminoacidi hanno una catena laterale da cui si può produrre glucosio quindi acetil-CoA non viene da amminoacidi
- Glicogeno non può essere usato per produrre corpi chetonici perché il fegato lo usa per rilasciare glucosio in situazione di ipoglicemia
- I globuli rossi consumano circa 200g di glucosio al giorno, quando consumiamo questo glucosio dopo neanche un giorno tutto il glucosio epatico andrebbe a compensare questo deficit
- Finito il glucosio epatico (sotto forma di glicogeno) il fegato si occupa di produrre quei 200g di glucosio al giorno attraverso la gluconeogenesi
- Nel tempo questi 200g però non possono più essere sostenuti (no costante) e diventano quindi sempre meno fino a raggiungere un adattamento
- Quando non introduciamo più nuovo glucosio nel sangue il corpo si deve adattare e deve consumare sempre meno glucosio di quanto non ne usasse prima
- Questo perché il glucosio deve provenire da qualche parte che ovviamente non sia glucosio, dunque il glucosio proviene dal metabolismo degli amminoacidi
  - Soltanto una piccolissima parte di lipidi viene trasformata in glucosio (10% del nuovo glucosio), questa parte è il glicerolo che forma i trigliceridi
  - Il 90% del nuovo glucosio proviene dal metabolismo degli amminoacidi, i quali provengono dal muscolo che è il maggior deposito di proteine nel corpo
  - Il muscolo scheletrico smonterà le sue proteine contrattili e invierà al fegato, non tutti, ma soltanto alcuni amminoacidi (glutammato?)
- Acetil-coa provengono dalla beta-ossidazione degli acidi grassi i quali aumentano nel plasma nel digiuno
  - Acidi grassi vengono captati dal fegato dal sangue e vengono metabolizzati nella matrice mitocondriale, attraverso la beta-ossidazione, a formare acetil-coa

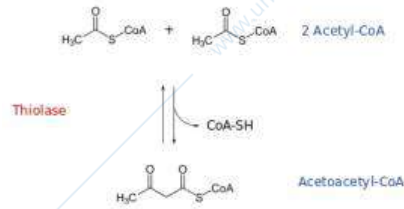
- La beta-ossidazione per poter continuare ha bisogno di CoA libero

- CoA viene liberato dal ciclo di Krebs e torna nella beta-ossidazione
- Se ciclo di Krebs rallenta è la chetogenesi che permette la liberazione di CoA

- La prima tappa quindi comporta la formazione di acetoacetil-coa e la liberazione di una molecola di CoA che quindi può essere usato dalle beta-ossidazione per ossidare ancora acidi grassi

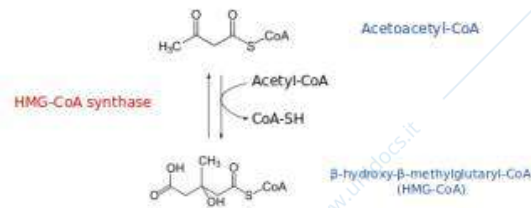


- Acetil-coa + acetil-coa → acetoacetil-coa + CoA



## 2. β-idrossi-β-metilglutaril-CoA sintasi

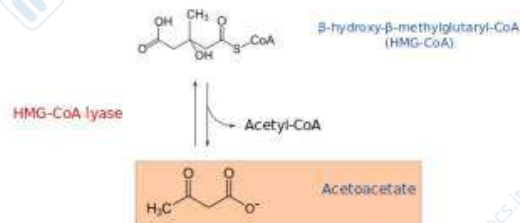
- Acetoacetil-coa reagisce con una terza molecola di acetil-CoA a formare il β-idrossi-β-metilglutaril-CoA
- Quando si forma nel citoplasma è un precursore del colesterolo
- Nel mitocondrio invece è usato per formare acetoacetato
- Acetoacetil-coa + acetil-coa → β-idrossi-β-metilglutaril-CoA + CoA
  - Si perde la seconda molecola di CoA



- Non si consuma energia metabolica, si stanno usando i legami ad alta energia tio-estere che si trovano nelle molecole di acetil-coa

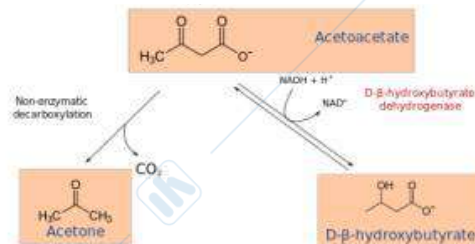
## 3. β-idrossi-β-metilglutaril liasi

- Scinde questo composto, attraverso un processo di LIASI, in acetil-CoA e acetoacetato (primo corpo chetonico)
- Fin qui la cellula ha impiegato 2 Coa, liberato 2 CoA e prodotto una molecola di acetoacetato
- β-idrossi-β-metilglutaril-CoA → acetil-coa + acetoacetato



## 4. β-idrossibutirrato deidrogenasi

- Enzima NAD-dipendente
- Acetoacetato viene ridotto a butirrato
  - Molecola ricca di energia metabolica



- Cellule del sistema nervoso inizieranno a farsi bastare il glucosio che il fegato riesce a produrre attraverso la gluconeogenesi mentre il resto dell'energia verrà tirato fuori dal β-idrossiacetone e β-idrossibutirrato
- Tutte le cellule del corpo lo utilizzano, devono possedere delle attività enzimatiche in grado di trasformare l'acetoacetato in acetil-coa

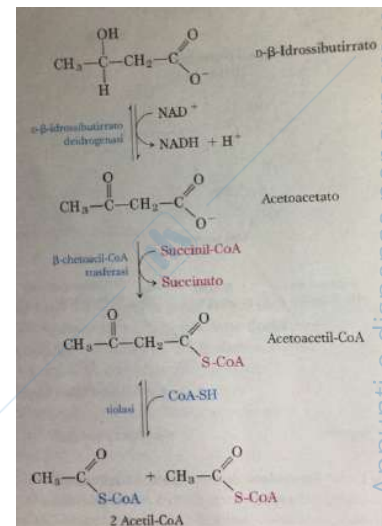
- Acetoacetato è un modo, che l'epatocita ha, di trasferire l'acetil-coa dalla sua sede di produzione (mitocondrio dell'epatocita) al mitocondrio della cellula bersaglio
  - Tutte le cellule aventi mitocondri possono ricavare energia dai corpi chetonici sotto forma di molecole di acetil-coa (GR non possono utilizzarli)
  - $\beta$ -idrossibutirrato è vantaggioso perché
    - Più stabile dell'acetoacetato, non si scinde in acetone
    - È più ridotto quindi quando la cellula lo riceve è in grado di incamerare una molecola di NADH che rappresenta energia metabolica
5. Reazione spontanea irreversibile che determina il distacco del carbossile sotto forma di CO<sub>2</sub> e la formazione del terzo corpo chetonico inutile per la cellula: l'acetone
- Limita la perdita di composti carboniosi grazie alla formazione dell'acetone

#### Reazione netta

- Tre reazioni se consideriamo fino all'acetoacetato
  - $2 \text{ acetil-coa} \rightarrow 2 \text{ CoA} + \text{ACETOACETATO}$
- Quattro reazioni se consideriamo tutto
  - $2 \text{ acetil-coa} + \text{NADH}/\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ CoA} + \beta\text{-IDROSSIBUTIRRATO} + \text{NAD}^+$
- Fegato potrebbe usare i corpi chetonici ma non li usa perché non ha la **tioforasi**, essenziale per attivare l'acetoacetato e consentire la retrotrasformazione dei corpi chetonici fino alle due molecole di acetil-coa

#### Come viene usato il $\beta$ -idrossibutirrato?

- **$\beta$ -idrossibutirrato deidrogenasi**
  - $\beta\text{-idrossibutirrato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetoacetato} + \text{NADH}/\text{H}^+$
  - $\beta$ -idrossibutirrato è più ridotto quindi quando viene ossidato libera una molecola di NADH (ATP)
- **Tioforasi**
  - $\text{Acetoacetato} + \text{succinil-CoA} \rightarrow \text{acetoacetil-CoA} + \text{succinato}$
  - Attivazione dell'acetoacetato tramite legame tioestere con CoA che viene donato dal succinilcolina-CoA (intermedio del ciclo di Krebs)
- **Tiolasi**
  - $\text{Acetoacetil-CoA} + \text{CoA} \rightarrow 2 \text{ acetil-CoA}$
  - Acetoacetato-CoA viene scisso in due molecole di acetil-CoA che entreranno nel ciclo di Krebs



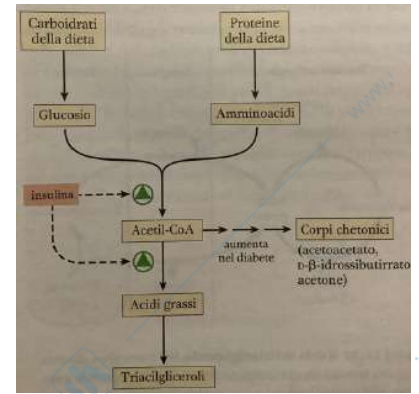
#### Biosintesi degli acidi grassi

- Acidi grassi sono la principale riserva energetica di grande capacità e anche la loro forma di deposito ovvero i triacilgliceroli
- Forma di deposito: **triacilgliceroli**
  - Triesteri del glicerolo
- Fondamentali come metaboliti energetici perché
  - Sono meno ossidati di carboidrati e proteine e quindi a parità di peso liberano più energia
  - Sono anidri
    - Non catturano, come il glicogeno, acqua metabolica e quindi possono essere immagazzinati all'interno delle cellule in quantità notevoli
  - Sono accumulabili ad libitum
    - Tessuto adiposo: 4-20% della massa corporea, 60% nei soggetti iperobesi

#### Caratteristiche

- Si svolge principalmente, ma non solo, nel fegato
- Fegato sintetizza acidi grassi in caso di **abbondanza di nutrienti** ad esempio se dieta prevede eccesso di carboidrati o proteine
  - Se eccesso di lipidi questi vengono trasportati attraverso le lipoproteine
- Catabolismo dei carboidrati e delle proteine (della dieta) converge verso la formazione di acetil-CoA

- o Carboidrati -> glucosio -> acetil-CoA
- o Proteine -> Amminoacidi -> acetil-CoA
- o Insulina favorisce l'attivazione della piruvato carbossilasi (DH)
- o Trigliceridi vengono mandati attraverso proteine verso il tessuto adiposo che è la più grande sede di deposito
- o Per i neo-grassi **acetil-coa** proviene dal **catabolismo** ossidativo del **glucosio** e degli **amminoacidi**

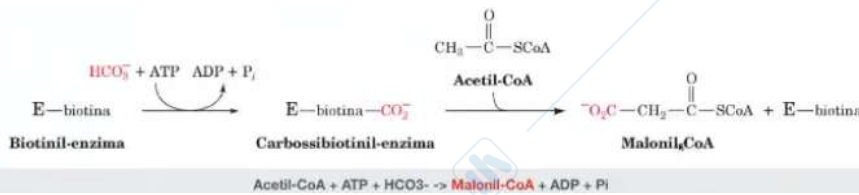


- Via anabolica citosolica
  - o Consumo di energia metabolica sotto forma di ATP e potere riducente NADPH
  - o Richiede
    - Acetil-CoA citosolici
    - ATP
    - NADPH (citoplasma) prodotto dalla via dei pentosi fosfato e dalla navetta del citrato con enzima malico
- Prevalente nel fegato ma presente anche,
  - o Nella fase di allattamento nelle ghiandole mammarie
  - o Adipociti che usano zuccheri in eccesso da dieta per sintetizzare acidi grassi, in misura minore

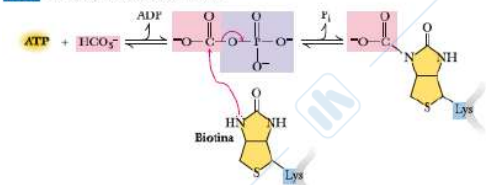
### Enzimi

#### • Acetil-CoA carbossilasi

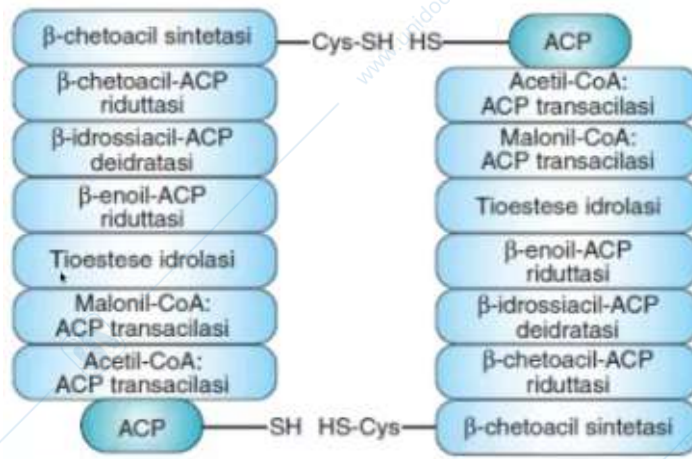
- o Enzima segnapasso biotina-dipendente
- o Reazione irreversibile
- o Carbossila l'Acetil-CoA



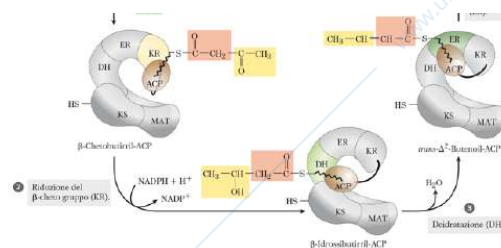
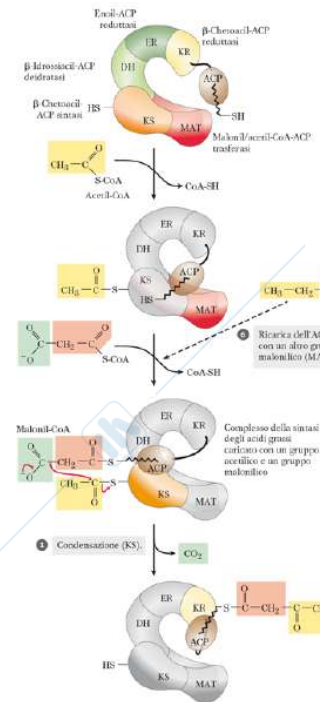
Fase I La carbossilazione della biotina



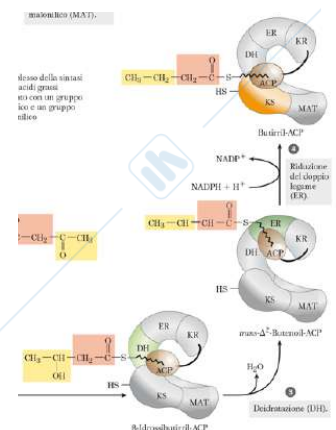
- o Carbossilazione prevede sempre la presenza della biotina che è collegata in modo prostetico all'enzima stesso
- o Serve bicarbonato che viene attivato attraverso il consumo di un legame fosfoanidridico dell'ATP, investimento di una molecola di ATP per energizzare questo processo che altrimenti non sarebbe spontaneo
- o La biotina carbossilata va a carbossilare l'acetil-coa formando il **malonil-coa**
  - Inibitore allosterico della **CAT1**, enzima necessario per trasferire acidi grassi dal citoplasma al mitocondrio
- o Reazione si svolge nel citoplasma, quindi quando il malonil-coa si forma è segno che l'altra via opposta (beta-ossidazione) deve essere arrestata
- **Acido grasso sintasi**
  - o Usa acetil-CoA e la forma attivata malonil-CoA
  - o Per formare un acido grasso abbiamo bisogno di una molecola di acetil-coa e di un certo numero di malonil-coa, si forma un acido grasso con numero di carboni pari
    - In base alla lunghezza, ad esempio 18, avremo bisogno di 1 acetil-coa e 7 malonil-coa, avremo bisogno di 8 se vorremmo fare l'acido stearico (C18)..
  - o Enzima citoplasmatico
  - o Dimerico negli eucarioti
  - o Consta di 8 domini proteici ognuno dei quali, tranne uno, ha un'attività specifica intrinseca
  - o È un enzima multifunzionale con diversi domini che permettono il movimento degli intermedi della reazione, raccogli i mattoni con cui deve sintetizzare la molecola e reitera un certo numero di volte il processo opposto della beta-ossidazione ovvero una beta-riduzione



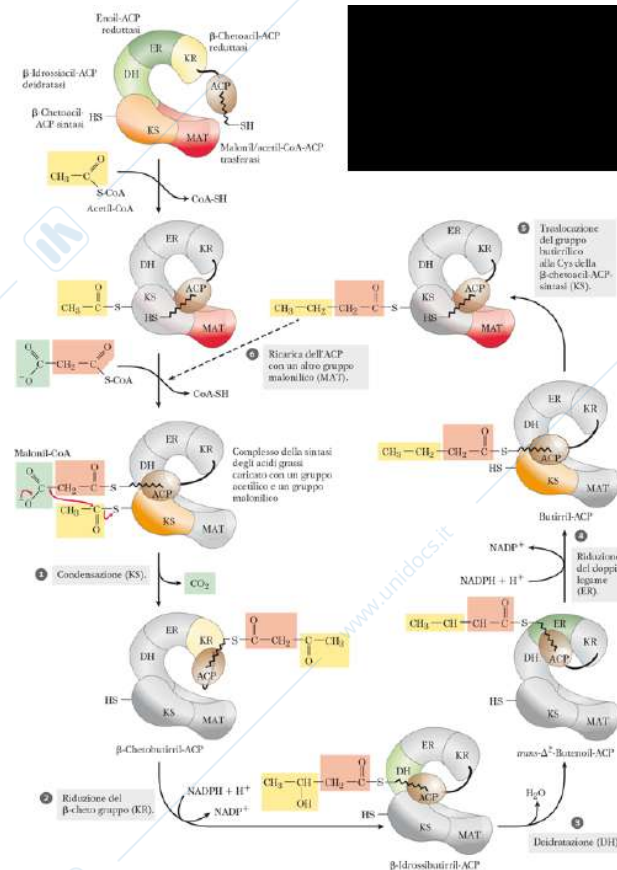
- ACP, proteina carrier degli acili, proteina che trasporta gli acili
  - Ha una Cys-SH con la quale forma degli intermedi covalenti con i precursori del processo di sintesi
  - Sorta di braccio mobile che sposta intermedi da un dominio catalitico ad un altro man mano che la reazione procede
- Inizio sintesi prevede la presenza dell'unica molecola di acetil-coa che è il primer del processo e un certo numero di malonil-coa
- Acetil-coa viene legato a una Cys di un dominio di questa proteina
- Si aggiunge malonil-coa che è una sorta di acetile attivato
  - Carbossile (verde) serve a consentire la condensazione del metilene sul carbonio carbonilico dell'acetile associato all'enzima (giallo), carbossile si stacca e permette la sintesi di un betachetoacile coniugato all'enzima (giallo-rosso)
- Il dominio ACP della proteina con Cys lega questo betachetoacile che presenta il carbonio beta (C=O giallo) che, a differenza della beta-ossidazione dove viene ossidato, deve essere ridotto fino a trasformarsi in un gruppo metilenico, ed è per questo che c'è NADPH+H<sup>+</sup>
- **Prima reazione:** condensazione di due scheletri carboniosi a formare un betachetoacile
- **Seconda reazione:** riduzione del betachetoacile a formare un idrossile quindi un betaidrossiacile (perché C beta lega OH)



- **Terza reazione:** gruppo OH viene deidratato a formare un doppio legame CH=CH e si forma un beta-enoile
- **Quarta reazione:** doppio legame viene ridotto da una seconda molecola di NADPH a formare il metilene CH2 che serve per completare il processo riduttivo dell'addotto iniziale
  - Se idrolizzassimo questo composto (giallo-rosso) avremo un acido grasso a catena corta ovvero l'acido butirrico = butirrato



- o Processo continua N volte fin quando non si forma una catena con ad esempio 16C e a quel punto la molecola viene idrolizzata e quindi allontanata dall'enzima sottoforma di palmitato che è il prodotto finale di questo processo biosintetico



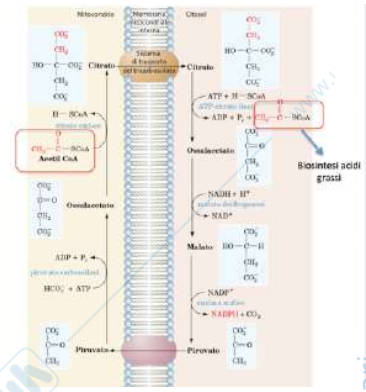
**Sintesi:**

- Bisogna energizzare un certo numero di acetil-coa per formare malonil-coa e quindi mettere questo gruppo carbossilico in questa posizione e consentire la produzione di un beta-chetoacile che subirà processi opposti a quelli della beta-ossidazione per produrre un composto con un numero pari di atomi di C che provengono dall'acetil-coa

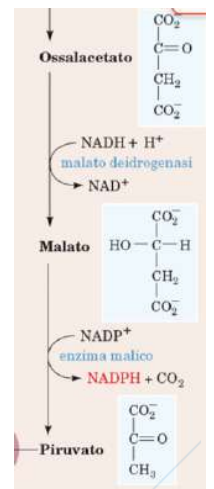
**Reazione netta del palmitato**

- Acido grasso saturo C16
- RICHIESTA: 8 acetil-coa + 7 ATP + 14 NADPH
  - o Solo il primo di questi 8 acetil-coa viene assemblato all'inizio, gli altri 7 devono essere tutti attivati, 7 ATP provengono quindi dalla reazione dell'acetil-coa carbossilasi
  - o NADPH: numero dipende dal numero dei chetoacili che si producono, se ne producono 7 che sono i 7 processi che si reiterano per produrre una catena di acido grasso a 16C
    - 7x2= 14 NADPH
- Da dove proviene acetil-coa?
  - o Citoplasma: Glucosio viene degradata a piruvato attraverso glicolisi
  - o Mitocondrio: decarbossilazione del piruvato con **piruvato DH**, piruvato -> acetil-CoA
  - o Acetil-coa si forma quindi nel mitocondrio

- Cellula deve trasferire 8 acetil-coa dalla sede di produzione (mitocondrio) alla sede di utilizzo (citoplasma)
- Come otteniamo i 14 NADPH?
  - NADPH sono equivalenti, solo dal punto di vista energetico, al NADH
  - Se cellula deve fare il trasferimento di 8 acetili dal mitocondrio al citoplasma sappiamo che esiste il sistema di trasporto del citrato-piruvato
  - Acetil-coa si forma nella matrice mitocondriale e si sposta nel citoplasma grazie a questo sistema navetta



- Questo però richiede del consumo energetico ovvero ATP (**ATP citrato liasi** citoplasmatica) e dopo che l'ossalacetato è stato ridotto a malato dalla MDH e quindi il malato è stato trasformato in acido piruvico dall'enzima malico, occorrerà trasformare il piruvato in ossalacetato il che richiede un'altra molecola di ATP (**piruvato carbossilasi**)
    - Trasporto richiede 2 ATP
  - Si converte 1 NADH che proviene dalla **glicolisi** che fornisce anche l'acetil-coa tramite piruvato, glicolisi è molto presente nell'epatocita perché siamo in condizione di iperglicemia, insulina stimola glicolisi che produce piruvato (che nel mitocondrio si trasforma in acetil-coa) e NADH citoplasmatico che in parte viene usato per fornire energia e in parte per fornire una parte del NADPH che serve per ridurre i betachetoacidi di questo processo (si sono prodotti 8 acetil-CoA quindi si formano 8 NADH=NADPH)
  - Altra fonte di NADPH è la **via dei pentoso fosfato** che utilizza come metabolita il glucosio
  - Glucosio attraverso
    - Glicolisi fornisce acetil-coa
    - Via dei pentoso fosfato fornisce NADPH
    - Insieme favoriscono la trasformazione dei carboni in eccesso in acidi grassi
  - Dovendo spostare 8 acetil-coa si vengono a formare **8 NADPH** (glicolisi)
  - SPESA= 2 ATP + 2.5 ATP (da NADH) = 4.5 x 8= 36 ATP
    - Cellula usa NADH non per fosforilazione ossidativa ma per trasformarlo in NAD<sup>+</sup> ovvero per la **riduzione ossalacetato** -> malato
    - Occorrono 36 ATP per spostare 8 acetil-coa dal citoplasma al mitocondrio e formare 8 molecole di NADPH che serviranno per la sintesi dell'acido grasso
  - Di questi 8 acetil-coa, 7 devono essere trasformati in malonil-coa
    - Richiede consumo di 7 ATP ad opera dell'acetil-coa carbossilasi
  - Di NADPH ne servono 14 quindi ne mancano 6 che vengono forniti da
    - Ossalacetato → malato (MDH) = -2.5 ATP
    - Malato → piruvato (enzima malico) = + 1 NADPH
    - Prevedono la conversione netta di 2.5 ATP per singola molecola di NADPH formata
      - Ogni 2.5 ATP si forma 1 NADPH
      - 2.5 ATP x 6 = 15 ATP = SPESA
    - Se la cellula usasse questo NADH per produrre ATP ne potrebbe formare 15 ma lo sta usando per produrre NADPH
- Spesa totale per la sintesi di un acido palmitico a partire da 8 acetil-coa mitocondriali
  - SPESA TOTALE= 36 (navetta) + 7 (attivazione) + 15 (navetta) = 58 ATP
  - Resa in ATP della beta-ossidazione dell'acido palmitico
    - Palmitato + 2 ATP + 7 NAD<sup>+</sup> + 7 FAD → 8 ACETIL-COA + 2 ADP + 7 NADH + 7 FADH<sub>2</sub>
    - RESA = 28 - 2 = 26 ATP
  - Costruire richiede più energia che distruggere



## Catabolismo degli amminoacidi

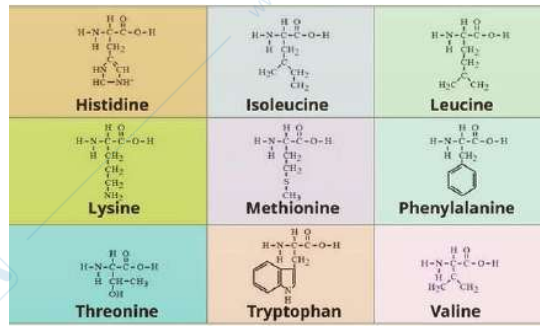
- Fegato è in grado di controllare la quantità di aminoacidi e quindi il **bilancio dell'azoto** nell'organismo, monitorando attraverso la captazione dal plasma gli aminoacidi presenti in circolazione, eliminando quelli in eccesso e determinando la detossificazione del gruppo amminico ad esempio con la formazione dell'urea

## Metabolismo proteico

Continuo turnover proteico: dobbiamo introdurre giornalmente un certo quantitativo di proteine

- Sono gli agenti funzionali di cui le nostre cellule sono fatte e rappresentano circa il **10-15%** della **massa totale** dell'organismo
  - Di queste il **50%** sono **proteine contrattili** dei muscoli
  - Cellule diverse hanno un contenuto in proteine diverse
    - Cellule muscolari: 20%
    - Neuroni: 10%
    - Adipociti ancora meno
- Si valuta che circa **3-6g di proteine per kg di peso corporeo** vengano giornalmente **scissi** in aminoacidi i quali vengono utilizzati dal nostro corpo per tre strade principali:
  - **Sintesi proteine**
    - Processo dispendioso: per ogni grammo di proteina sintetizzata occorre 1 kcal di energia metabolica (ATP) il che corrisponde a circa il **12% del metabolismo basale**
    - Ogni singola proteina del nostro organismo viene degradata a un certo punto della sua esistenza e per poter tornare a funzionare deve essere risintetizzata
  - **Sintesi di composti azotati**
    - Basi azotate: Gly, Asp, Gln
    - Gruppi eme: Hys e Gly
    - Produzione di composti metabolici
      - GSH: Glu, Cys, Gly
      - Neurotrasmettitori come acetilcolina, adrenalina (anche ormone), dopamina, serotonina, GABA: Phe, Tyr, Trp
      - Carnitina: Lys e Met
      - Creatina (tamponamento ATP nei muscoli): Gly e Arg
      - Istamina: Hys
      - Lipidi di membrana: Ser
      - Parte degli aminoacidi essenziali come Hys, Phe, Lys, Met vengono usati dalla cellula per produrre questi composti
    - Costituisce una perdita da recuperare con la dieta
  - **Produzione di energia metabolica**
    - Aminoacidi possono essere bruciati per formare CO<sub>2</sub>, acqua e composti azotati come urea e ammoniaca con lo scopo di ottenere energia metabolica
    - CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + UREA + NH<sub>3</sub> → ATP
    - Costituisce un ulteriore perdita da recuperare con la dieta
    - In un uomo di 70kg circa **100g di aminoacidi** al giorno sono **ossidati a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O**
    - Di questi aminoacidi 10 sono essenziali e pertanto devono essere reintrodotti con la dieta
      - Non si devono reintrodurre 100g perché noi siamo in grado di formare metà di questi aminoacidi da composti che abbiamo
      - Di questi 100g almeno **50g giornalieri** devono essere reintrodotti con la dieta perché non siamo in grado di produrre questi composti autonomamente, possiamo introdurne anche solo 50g

- Senza questi aminoacidi le proteine non potrebbero essere risintetizzate e quindi il turnover proteico andrebbe in crisi

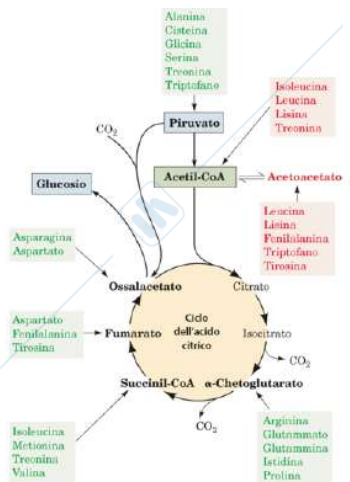


- Gli aminoacidi essenziali sono: Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Hys, Lys, Thr e Met
  - Per i bambini anche Arg

**Aminoacidi dieta**

Aminoacidi in eccesso non possono essere accumulati a differenza di glucosio (glicogeno) e acidi grassi (trigliceridi)

- Una quota viene usata per la sintesi (funzione plastica)
  - Proteine endogene
  - Composti azotati
- Aminoacidi in eccesso vengono metabolizzati dal fegato a scopi energetici
  - Utilizzabilità dello scheletro carbonioso per produrre
    - Glucosio da **aminoacidi glucogenici** (tutti tranne Lys e Leu)
    - Acetil-coa: metabolita principale verso cui convergono **TUTTI** aminoacidi in eccesso
      - Aminoacidi esclusivamente chetogenici: Lys e Leu
      - Aminoacidi chetogenici**: TUTTI (??) perché tutte le molecole che provengono dagli aa possono infine essere ricondotte, più o meno direttamente, ad acetil-coa
        - Possono esser usati per produrre acetil-coa e il suo derivato ovvero l'acetoacetato



- Immagine:
  - Verde**: aminoacidi glucogenici, il loro metabolismo dà luogo a un composto che può essere trasformato metabolicamente al precursore del piruvato che è l'ossalacetato, oppure alfaCK (glutammato e glutammina basta transaminarli), succinil-coa, fumarato e piruvato
  - Rosso**: aminoacidi chetogenici, solo Leu e Ile sono esclusivamente chetogenici, non possono dare luogo al glucosio

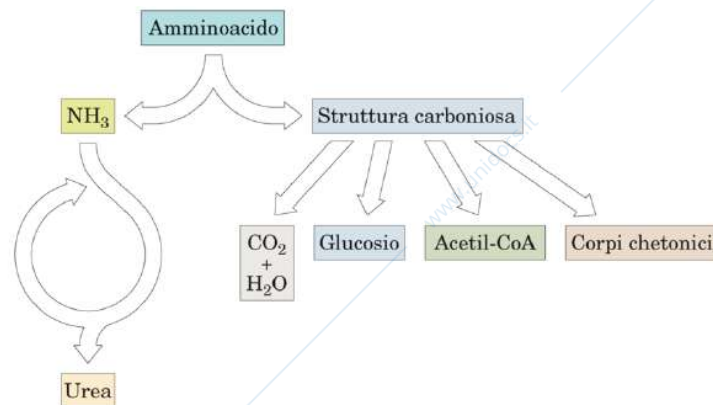
**Prodotti catabolismo AA**

- Aminoacidi in eccesso o quando il fegato deve metabolizzarli per produrre glucosio in caso di ipoglicemia
- Una volta che il gruppo amminico è stato rilasciato e non essendo le nostre cellule in grado di ossidarlo e utilizzarlo come fonte di energia questo causa l'esigenza di produrre urea (FINE LEZIONE 20, 11.05.21)
- Metaboliti glucogenici sono 5:
  - Piruvato
  - Intermedi del ciclo di Krebs:
    - Alfa-chetoglutarato
    - Succinil-coa
    - Fumarato
    - Ossalacetato

**Tabella 14.4** Gli aminoacidi glucogenici raggruppati per sito d'ingresso

<b>Piruvato</b> Alanina Cisteina Glicina Serina Treonina Tryptofano*	<b>Succinil-CoA</b> Isoleucina* Metionina Treonina Valina
<b>α-Chetoglutarato</b> Arginina Glutammato Glutammina Istidina Prolina	<b>Fumarato</b> Fenilalanina* Tirosina*
	<b>Ossalacetato</b> Asparagina Aspartato

- Amminoacidi verdi sono la fonte da cui il fegato è in grado di estrarre lo scheletro carbonioso necessario per produrre glucosio la cui presenza deve essere mantenuta entro il limite di 3mM anche in condizioni di digiuno prolungato
- Metaboliti chetogenici sono 2:
  - Acetil-coa (non utilizzabile per ricavare glucosio)
  - Acetoacetato (deriva da acetil-coa)
  - Amminoacidi rossi danno luogo in parte anche a questi metaboliti
- Amminoacidi in eccesso sono quindi metabolizzati per dar luogo a glucosio o metaboliti chetogenici quindi per produrre acidi grassi
- Il resto viene ossidato a  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{UREA}$ 
  - Urea è il metabolita che viene prodotto, nel ciclo dell'urea, con lo scopo di evitare la produzione dell'ammoniaca che deriva dalla deaminazione degli amminoacidi
  - Il gruppo amminico che si estrae non può essere utilizzato dagli eucarioti superiori e rappresenta un problema fisiologico perché l'ammoniaca è neurotossica



#### Bilancio dell'azoto

- Amminoacidi non possono essere accumulati e quindi vi è un vero e proprio bilancio dell'azoto che deve essere ben equilibrato, non deve esserci né un eccesso né un difetto
- Pareggio
  - Entrate e uscite sono bilanciate
  - Bilancio prevede uno stato stazionario in cui quindi le entrate di composti amminoacidi e le uscite da parte dei meccanismi di degradazione e di utilizzo di questi composti sono perfettamente bilanciate
  - Esempio: individuo adulto ben alimentato
- Positivo
  - Entrate superano le uscite
  - Quando c'è entrata di amminoacidi superiore a quella che viene degradata
  - O amminoacidi che entrano rimangono intrappolati sotto forma di nuova materia organica, nuovi tessuti che sono imputabili a una crescita/sviluppo dell'organismo o per riparazione di traumi, questo è l'aspetto plastico delle proteine
  - Esempi
    - Crescita/sviluppo
    - Rigenerazione tessuti
    - Gravidanza
    - Produzione latte
- Negativo
  - Uscite superano le entrate
  - Situazione dannosa per l'organismo
  - Esempi
    - Stati di malattia

- Stati di digiuno prolungato
- Dieta povere di proteine
- Dieta povera di amminoacidi essenziali
  - Proteine vegetali sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali e ciò causa un danno al bilancio dell'azoto
  - Se manca anche un solo amminoacido essenziale la sintesi proteica si blocca compromettendo il normale turnover proteico e la funzionalità delle proteine

Valore energetico delle proteine corporee

- Le proteine rappresentano il 10-15% della massa totale
- In un individuo adulto equivalgono a circa **10.5kg**
  - Di questa massa proteica circa il 60% sono proteine contrattili (actina e miosina) quindi associate ai muscoli sia scheletrici che cardiaco
- Normalmente questa quantità non viene intaccata, solo in condizioni di necessità circa il 50% può essere degradata per produrre energia soprattutto zuccheri, glucosio
  - In condizioni di digiuno prolungato la **gluconeogenesi** è alimentata dal catabolismo delle proteine del sangue (albumina), proteine epatiche e in misura superiore dalle proteine muscolari non essenziali che ammontano ad un massimo di circa 3kg

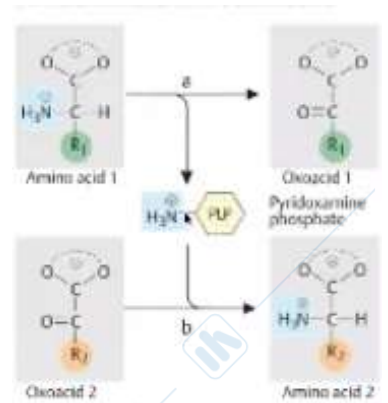
## Catabolismo amminoacidi

Ciclo dell'urea

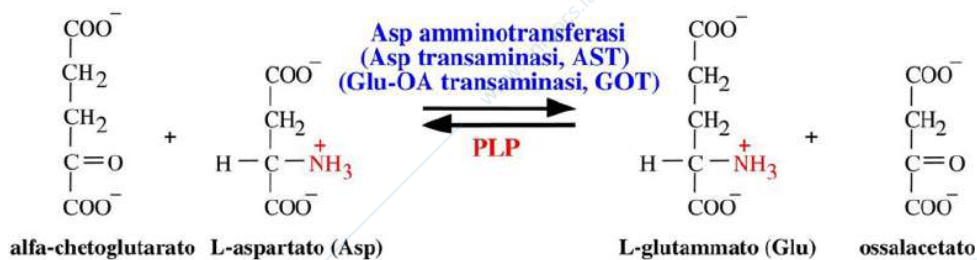
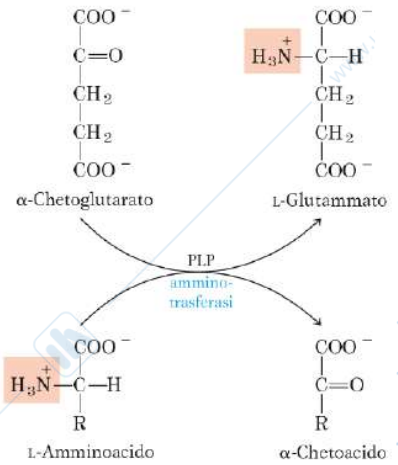
- Come il ciclo di Krebs, prevede una reazione preparatoria in cui si forma il carbamil-fosfato e poi ha luogo un ciclo di reazioni (4) in parte una reazione si svolge nel mitocondrio e le altre tre nel citoplasma

Transaminazione

- Preparazione dello scheletro di carboni dei vari amminoacidi che devono essere trattati in modo da tirar fuori il gruppo amminico
- Gruppo amminico è pericoloso e deve essere tirato fuori con attenzione nel posto giusto, normalmente in cellule specializzate come quelle **epatiche**, si realizzano anche in altri organi come il **muscolo scheletrico** in attività dove si possono produrre piccole molecole di ammoniaca come anche nell'**intestino** (rumine)
  - All'interno del rumine l'urea prodotta dal fegato si trasforma per effetto delle ureasi batteriche in ammoniaca e l'ammoniaca ritorna nel fegato attraverso il sangue dove dovrà essere riutilizzata per riformare ammoniaca...
- Gli amminoacidi devono essere catabolizzati in caso di pasto abbondante contenente proteine animali, la digestione delle proteine determina un rilascio da parte dell'intestino di amminoacidi della dieta all'interno del sangue che attraverso il **circolo portale** raggiungerà l'organo principale deputato al bilancio dell'azoto ovvero il fegato
- Gli amminoacidi in eccesso raggiungono quindi gli epatociti all'interno dei quali vengono utilizzati in parte per risintetizzare le **proteine del sangue** e l'eccesso verrà utilizzato per la formazione in parte di **glucosio** e ad esempio **lipidi**
- Qualunque amminoacido dovrà essere innanzitutto transaminato perché la prima cosa che deve fare la cellula per utilizzare l'amminoacido è togliere questo gruppo amminico dal composto e ottenere un ossiacido quindi l'alfachetoacido corrispondente dell'amminoacido
  - **Transaminazione** = transaminamento del gruppo amminico tramite le transaminasi accoppiate a **PLP** (gruppo prostetico)

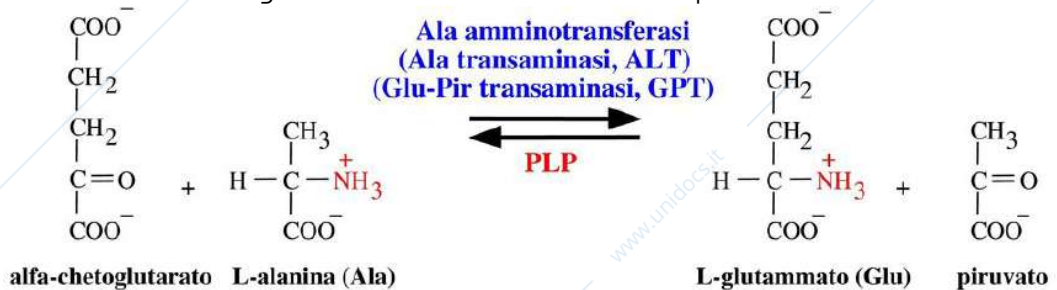


- o Il gruppo amminico quindi viene spostato su un alfa-chetoacido accettore come piruvato, ossalacetato, alfa-chetoglutarato, a formare aminoacidi
- Gli unici aminoacidi che non subiscono transaminazione sono Pro, Lys e Thr che devono invece essere deaminati
- Principali alfa-chetoacidi utilizzati dalle transaminasi sono
  - o **Piruvato → alanina**
  - o **Ossalacetato → aspartato**
  - o **Alfa-chetoglutarato → glutammato**
  - o Ossalacetato e alfa-chetoglutarato sono gli alfa-chetoacidi accettori universali dei gruppi amminici che provengono dagli aminoacidi perché il fegato dovrà produrre urea tramite il ciclo dell'urea
    - Aspartato è un precursore dell'urea insieme all'ammoniaca e una molecola di bicarbonato. Aspartato fa parte del meccanismo biochimico di produzione dell'urea e dello smaltimento dei gruppi amminici
      - Asp si forma dal Glu ad opera della AST
      - Aspartato + alfa-chetoglutarato → ossalacetato + Glutammato



Glutammato è il principale collettore dei gruppi amminici che provengono dagli aminoacidi transaminabili

- Glu si forma dall'Ala ad opera della ALT
- alfa-chetoglutarato + alanina → Glutammato + piruvato

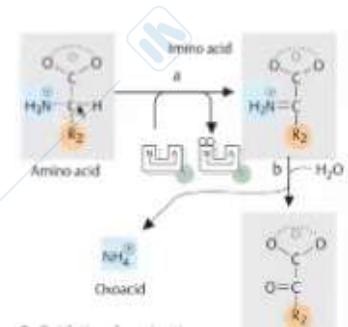


- AST e ALT sono abbondanti nel tessuto epatico e muscolare
  - ALT solo citosolico
  - AST isoforma mitocondriale e citosolica (cit. svolge transaminazione dell'Asp)

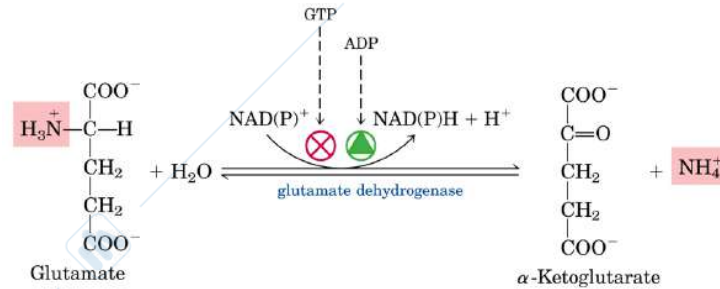
- Gli organi periferici organi i **gruppi amminici in eccesso sottoforma** di questi due aa: **Ala e Glu**
- Transaminasi sono PLP-dipendenti e reazioni sono irreversibili

#### Deaminazione ossidativa

- Processo di rimozione del gruppo amminico di tipo ossidativo, non c'è un trasferimento
- Ossidazione coinvolge coenzimi redox NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>
- Ossidazione del carbonio centrale che da carbonio legato a gruppo amminico diventa chetonico
- Processo pericoloso perché rilasciata ammoniaca (qui) protonata che è estremamente tossica per la cellula e quindi questo processo è estremamente controllato



- Gli enzimi sono specifici per ogni amminoacido
- Un enzima importante a questo processo nel fegato è la **glutammato deidrogenasi**
  - Deidrogena/ossida il glutammato → alfa-chetoglutarato + ammoniaca



- Lo trasforma in alfa-chetoglutarato e rilascia ammoniaca
- Uno dei pochi enzimi che utilizza sia NAD<sup>+</sup> che NADP<sup>+</sup> perché non distingue questi coenzimi nicotinamidici
- È un processo che produce energia metabolica perché l'energia dell'ossidazione viene catturata sotto forma della forma ridotta dell'enzima
- Enzima mitocondriale
- Enzima sottoposto a severo controllo
  - Il fegato è l'organo giusto perché, a differenza del cervello, gli epatociti sono in grado di tollerare grandi concentrazioni di ammoniaca (cellule nervose no)
  - Per questo ciclo dell'urea si svolge nel fegato
  - Modulatore allosterici
    - Positivi: ADP e GDP (bassa carica energetica)
    - Negativi: ATP e GTP (indicano eccesso di energia metabolica)
- La deaminazione ossidativa serve alla cellula da un lato per produrre l'ammoniaca (precursore ciclo urea) dall'altra per liberare l'alfa-chetoglutarato ovvero il principale recettore di gruppi amminici che la cellula usa per le transaminazioni
  - Cellula può riutilizzarlo per transaminare altri amminoacidi

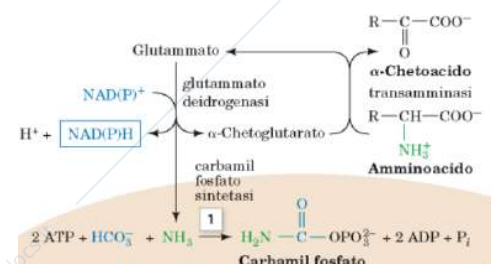
### Ciclo dell'urea

#### Precursori

- Bicarbonato HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>
  - Prodotto per idratazione della CO<sub>2</sub> che si forma nelle cellule dotate di mitocondri per esempio attraverso il ciclo di Krebs
  - Anidrasi carbonica idrata CO<sub>2</sub> a formare acido carbonico che a pH neutro si dissocia in bicarbonato e H<sup>+</sup>
    - CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
    - H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup>
- Ammoniaca NH<sub>3</sub>
  - Si forma per effetto della **glutammato deidrogenasi** mitocondriale che trasforma il glutammato in alfa-chetoglutarato e libera ammoniaca e NADH
  - Glu + NAD<sup>+</sup> → alfa-chetoglutarato + NADH/H<sup>+</sup> + NH<sub>3</sub>
- Carbamil fosfato
- Aspartato con AST
  - Glutammato + ossalacetato → aspartato + alfa-chetoglutarato

#### Enzimi

- Da notare che le transaminazioni avvengono nel citoplasma, il glutammato subisce un'ossidazione dalla **glutammato deidrogenasi** e viene trasferito all'interno della matrice mitocondriale dove rilascia ammoniaca
- Il bicarbonato viene prodotto per effetto dell'anidrasi carbonica dalla CO<sub>2</sub>

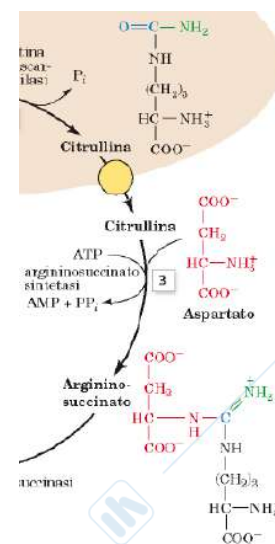
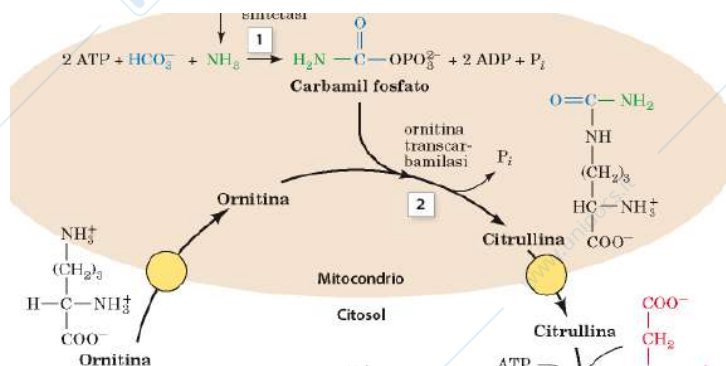


## 1. Carbamil fosfato sintetasi (CPS1)

- Produce il carbamilfosfato
  - Un'ammide, C=O gruppo carbossilico acido dell'acido carbonico, azoto amminico proveniente dall'ammoniaca e fosfato che proviene dall'ATP
  - Carbamil fosfato è un composto altamente reattivo
  - Urea è un'ammide, abbiamo carbonio del gruppo carbonilico, il carbonio proviene dalla CO<sub>2</sub> che è stata idratata ad acido carbonico e poi bicarbonato, il gruppo ammidico verde era l'ammoniaca rilasciata dal **glutammato**, gruppo ammidico (ammoniaca + acido = ammido) rosso proviene dall'**aspartato**
- 
- La prima è una reazione preparatoria che serve a formare un metabolita che entra nel ciclo e ne esce modificato sotto forma di urea, il primo metabolita è il carbamil fosfato
  - Composto energizzato, richiede 2 ATP quindi l'idrolisi di due legami fosfoanidridici per la sua sintesi
  - Reazione mitocondriale
  - $\text{NH}_3 + \text{HCO}_3^- + 2 \text{ATP} \rightarrow \text{CARBAMIL FOSFATO} + 2 \text{ADP} + 2 \text{P}_i$
  - Enzima segnapasso perché catalizza una reazione irreversibile (la più importante)
  - Regolato in modo allosterico da un lato dal **glutammato** che si accumula nell'epatocita quando c'è un eccesso di amminoacidi per la dieta o digiuno prolungato e dall'altro lato dall'**acetil-coa** che si accumula quando c'è un eccesso di nutrienti o c'è bisogno di produrre corpi chetonici per rispondere al digiuno prolungato = composto che lo regola è l'**N-acetilglutammato**

## 2. Ornitina transcarbamilasi

- Carbamil fosfato + ornitina → citrullina
- Ornitina è un alfa-amminoacido non standard che somiglia alla Lys, unica differenza è un CH<sub>2</sub> metilenico in meno
- Ornitina attraversa la mmi perché ha un trasportatore specifico e reagisce, all'interno della matrice, con il carbamil fosfato formando citrullina
- Citrullina è un altro amminoacido non standard in grado di attraversare la mmi e raggiungere il citoplasma dove si completa il ciclo



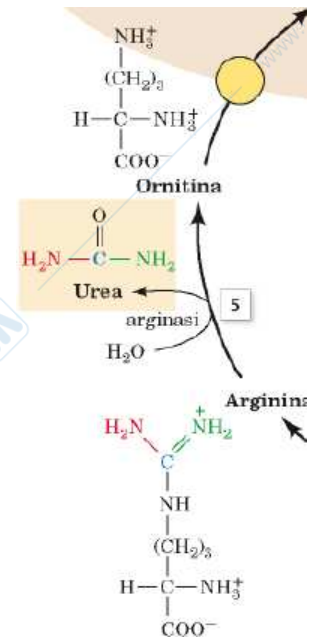
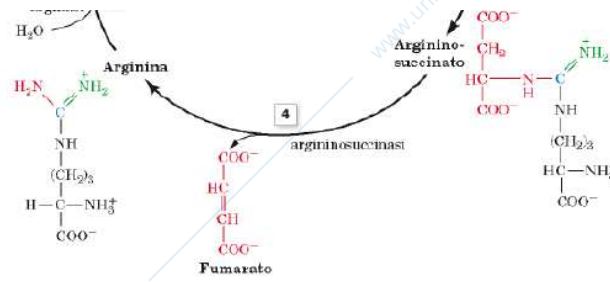
## 3. Arginino-succinato sintetasi

- Utilizza ATP per produrre un legame chimico ad alta energia
  - $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$
  - Idrolisi di due legami fosfoanidridici, PP<sub>i</sub> successivamente degradato dalla **pirofosfatasi inorganica** in 2P<sub>i</sub>
- Aspartato si condensa con la citrullina formando arginino-succinato

## 4. Argininosuccinasi

- Arginino-succinato attraverso una liasi forma il fumarato e l'arginina
- Fa uscire il fumarato dall'argininosuccinato rilasciando un amminoacido standard ovvero l'arginina

- o Arginina è aminoacido più basico che abbiamo all'interno del nostro organismo

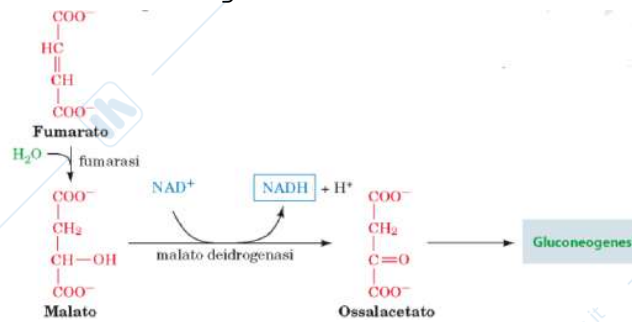


### 5. Arginasi

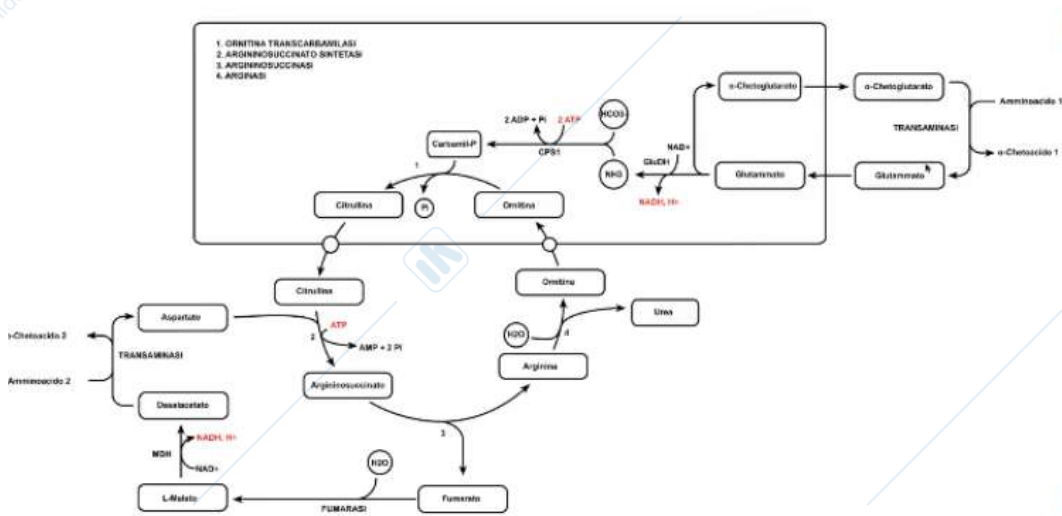
- o Arginina subisce un processo di idrolisi e abbiamo il rilascio dell'urea
- o Urea è prodotto che permette di veicolare ben due gruppi amminici dal luogo di sintesi (fegato) al luogo di escrezione (rene)
- o Quest'ultima reazione trasforma l'arginina in ornitina che riprende il ciclo

Reazione netta

- $\text{HCO}_3^- + \text{NH}_3 + \text{Asp} + 4 \text{ATP} \rightarrow \text{UREA} + \text{fumarato} + 4 \text{ADP} + 4 \text{Pi}$ 
  - o 3 ATP in realtà, di cui uno idrolizza due legami fosfoanidridici
  - o Urea si forma con il consumo di 4 legami anidridici
  - o Concomitante trasformazione di Asp in fumarato
  - o Fumarato è un intermedio del ciclo di Krebs, nel citoplasma può essere idratato dalla fumarasi a malato, malato con cMDH si converte in ossalacetato il quale può essere utilizzato per formare glucosio
  - o Questo è un modo in cui l'aspartato va a contribuire alla sintesi di glucosio (gluconeogenesi) nel momento in cui l'eccesso di aminoacidi deve essere smaltito
  - o Sia condizioni normali che di digiuno

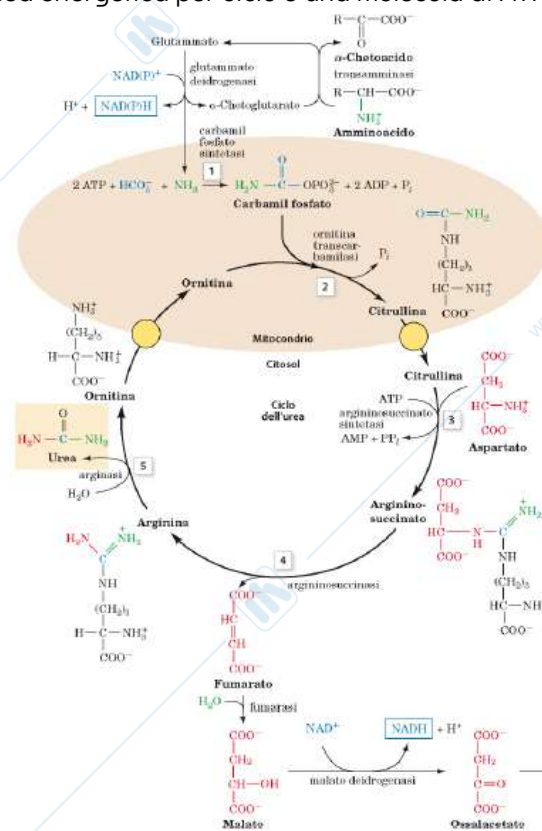


Se analizziamo dal punto di vista funzionale il ciclo dell'urea e partiamo dagli aminoacidi che sono le fonti da cui la cellula produce urea



- I gruppi amminici provengono da aminoacido 1 e aminoacido 2

- Primo aminoacido viene transaminato dalla ALT a glutammato formando un alfa-chetoadido, il glutammato entra nel mitocondrio, viene deaminato ossidativamente dalla **glutammato deidrogenasi** a formare alfa-chetoglutarato (che torna nel ciclo) e ammoniaca NH<sub>3</sub>
  - Questa reazione produce NADH e una molecola di ammoniaca
- L'ammoniaca reagisce con il bicarbonato ad opera della **CPS1** consumando 2 molecole di ATP e formando carbamil fosfato
- **Ornitina transcarbamilasi**: produce dall'ornitina la citrullina
- Citrullina esce dal mitocondrio e reagisce con l'aspartato e ATP per produrre arginino-succinato ad opera dell'**argininosuccinato sintetasi**
- L'aspartato proviene dalla transaminazione dell'amminoacido 2 in presenza di ossalacetato a formare alfa-chetoglutarato 2, aspartato entra nel ciclo dell'urea e forma l'arginino succinato
  - Si consumano altri due legami fosfoanidridici
- Arginino succinato si trasforma per opera dell'**argininosuccinasi** in fumarato e dà luogo all'arginina la quale viene trasformata in urea con **arginasi** e il ciclo si chiude
- Per quanto riguarda il destino del fumarato
  - Fumarato viene idratato dalla **fumarasi** a formare malato
  - Malato viene deidrogenato dalla **malato deidrogenasi** e si forma ossalacetato che andrà a reagire con l'amminoacido 2 per trasformarsi in aspartato che entra nel ciclo
- Entra il gruppo amminico degli aminoacidi
- Escono
  - Alfa-chetoadidi 1 e 2 (transaminazioni)
  - 1 NADH (da ammoniaca) + 1 NADH (ossidazione malato)
  - 2 ADP + 2 Pi (formazione carbamil fosfato) e AMP + 2 Pi (citrullina + aspartato)
- Reazione netta
  - 2 aminoacidi + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + 2 NAD<sup>+</sup> + 4 ATP → UREA + 2 alfa-chetoadidi + 2 NADH/H<sup>+</sup> + 4 ADP + 4 Pi
  - Resa energetica netta: 5 - 4 = 1 ATP
    - Resa energetica per ciclo è una molecola di ATP per una molecola di urea prodotta



## Muscolo scheletrico

### Caratteristiche

#### Istologiche

- Tessuto più abbondante ed esteso del corpo umano, rappresenta circa il **40%** del peso corporeo
- Massa variabile in funzione di sesso, età, dieta, allenamento fisico
- **20%** del tessuto muscolare è formato da **proteine** e buona parte di queste sono proteine contrattili
- Il consumo di ossigeno è variabile: ha bisogno di una certa quantità a riposo che aumenta con l'attività e all'intensità della contrazione muscolare
- Organo contrattile controllato dal sistema nervoso volontario
- Metabolismo che può essere aerobio ma anche anaerobio
- Se guardiamo al contributo di ciascun organo relativo al metabolismo basale e all'attività metabolica specifica calcolata al consumo energetico per kg di ciascun organo, vedremo che il tessuto muscolare non è quello che ha l'attività metabolica più elevata
- Rene, cuore, fegato considerando la massa consumano più energia
- Tessuto muscolare scheletrico contribuisce circa al **20%** al **fabbisogno energetico basale**
- Tessuto muscolare ha circa il 40% della massa corporea (se 70kg, 28kg sono muscoli)
  - Anche se la sua attività metabolica a riposo è 13kcal/kg il suo contributo finale è pari a quella del fegato → 20% del metabolismo basale è riconducibile a quello del muscolo

Organo	Massa (kg)	Peso (%)	Attività metabolica specifica (Kcal/kg/die)	Metabolismo basale (%)
Reni	0.3	0.4	440	8
Cuore	0.4	0.5	440	9
Cervello	1.5	2.0	240	20
Fegato	1.5	2.0	220	21
Tessuto adiposo	14	20	4.5	4
Tessuto muscolare scheletrico	28	40	13 (variabile con l'attività)	22
Altro	24.3	35.1	4	16

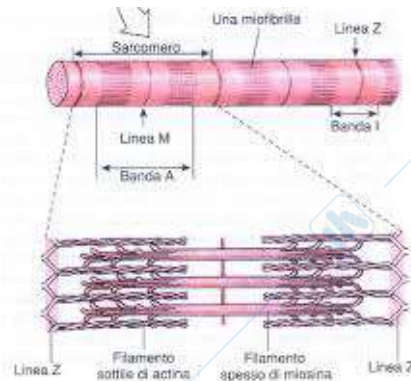
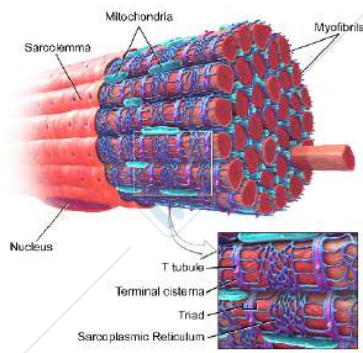
#### Funzioni

- **MOVIMENTO:** serve per trasformare l'energia chimica dell'ATP in energia meccanica di contrazione
  - Sistemi specializzati nell'uso di ATP
  - Sistemi di produzione di ATP
    - Creatina chinasi: tampona ATP nei muscoli
    - Glicolisi
    - Ciclo di Krebs
    - Beta-ossidazione
    - Fosforilazione ossidativa
  - Sistemi di accumulo di energia metabolica di rapida mobilizzazione
    - Metabolismo del glicogeno
- Ruolo di **deposito** di emergenza per **substrati glucogenici**
  - Amminoacidi delle proteine contrattili possono essere usati per produrre glucosio
  - Abbiamo 3-4kg di queste proteine contrattili
- **Termogenesi**
  - Produce calore
  - Contrazione muscolare da brividi
  - 18% metabolismo basale

#### Citologia

- Cellule specifiche: **miociti** o fibre muscolari scheletriche o fibrocellule
- Un miocita è una cellula molto differenziata che proviene dalla fusione di più cellule, si parla infatti di **sincizio** (cellule polinucleati)
- Cellula molto lunga che può raggiungere le dimensioni di cm

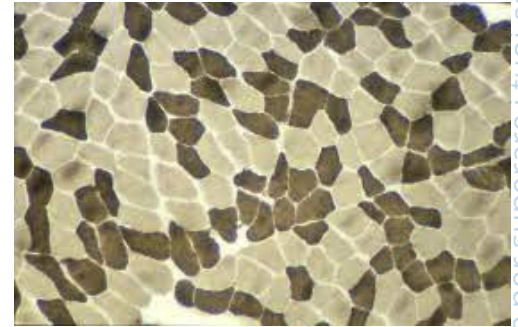
- All'interno di queste cellule vi è un insieme di strutture specializzate, l'elemento contrattile dal punto di vista citologico, è la **miotibrilla** che è costituita dall'unità ripetitiva chiamata **sarcomero**
- Sarcomero è racchiuso tra due linee beta, contiene filamenti sottili e filamenti spessi che sono costituiti da proteine contrattili



- Miociti vengono distinti in due tipologie:

- **Fibre rosse** o lente o fibre I

- Diametro minore delle bianche
    - Ricche di
      - Mitocondri
        - Grande capacità ossidativa, metabolismo prettamente aerobio
      - Mioglobina che gli dà il colore rosso
        - Legata alla necessità dei mitocondri di legare ossigeno per la contrazione
    - Contrazione **lenta**: bassa potenza ma di lunga durata
      - Resistenza all'affaticamento
      - Bassa attività ATPasica della miosina



- **Fibre bianche** o rapide o fibre IIA e IIB

- Diametro maggiore
    - Meno ricche di mitocondri e mioglobina
      - Minore capacità aerobia e maggiore capacità glicolitica anaerobia
    - Contrazione **rapida**: elevata velocità e potenza ma di breve durata
      - Rapidamente affaticabili
      - Elevata attività ATPasica della miosina

- Proteine specifiche

- Proteine miofibrillari: 70% delle proteine di tutto il muscolo

- Proteine contrattili (65%)

- Miosina (43%)

- Forma i filamenti spessi

- Actina (22%)

- Forma microfilamenti

- È una piccola proteina globulare che quando si associa con altre diventa actina F (F sta per filamento)

- Microfilamento è una struttura sovramolecolare di molecole di actina associate tra di loro a formare actina F

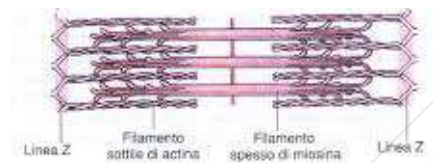
- Proteine di controllo (5%)

- Troponina (C, I, T)

- Tropomiosina (alfa, beta)

- Rilevanti da punto di vista diagnostico, marker di infarto

- Piccole proteine che quindi vengono rilasciati più facilmente degli enzimi



- Enzimi
  - **Creatina chinasi muscolare CK3** (CK-MM)
  - **ALT**
  - **AST**
  - **Glutamina sintetasi** (legata al metabolismo dell'azoto)
  - **Glicogeno fosforilasi** (isoforma muscolare)
  - **Glicogeno sintasi** (isoforma muscolare)
- Recettori
  - InsR
  - Recettore cortisolo
  - Beta-adrenergico (adrenalina)
  - Non ha recettore del glucagone
    - Tessuti dei muscoli volontari non reagiscono al glucagone perché non ha ruolo diretto nel periodo di digiuno perché utilizza il glicogeno per il suo fabbisogno personale e non per mantenere costante la glicemia
- Trasportatore
  - **GLUT4** che è sensibile all'insulina
    - Insulina è in grado di trasferire GLUT4 che si trovano a livello di vescicole intracellulari sulla superficie della membrana cellulare per esocitosi
- Proteine deposito
  - Mioglobina
    - Tampone dell'ossigeno, deposito intracitoplasmatico

## Sistemi biochimici che riforniscono energia ai muscoli durante attività fisica

### Immediato

- Meccanismi che forniscono energia
  - ATP
    - presente nella cellula a riposo nella sua forma fosforilata massima
    - $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$
    - Ricordare che è la **miosina** che ha attività enzimatica **ATPasica** e che l'idrolisi dell'ATP è essenziale per lo scivolamento dei filamenti sottili sui filamenti spessi che è alla base dell'assottigliamento del sarcomero e quindi la contrazione della miofibrilla → contrazione muscolare
  - CREATINA-FOSFATO
    - Molto più abbondante dell'ATP
    - Riserva di fosfati ad alta energia
    - Ha un potenziale del trasferimento del fosfato leggermente superiore all'ATP e quindi è in grado di cedere il fosfato all'ADP quando si inizia ad accumulare
    - $Creatina-P + ADP \rightarrow ATP + Creatina$
    - **Creatina chinasi** tampona la riduzione dell'ADP, usa la creatina fosfato per riosforilare l'ADP e formare ATP
  - Fosforilazione a livello del substrato tra nucleotidi difosfato (2 ADP)
    - Nuovo ATP viene di nuovo idrolizzato dalla miosina e si riforma ADP, quando questo si inizia ad accumulare troppo c'è **adenilato chinasi** (miochinasi) che aiuta a mantenere i livelli di ATP elevati per la contrazione
    - Trasferisce un fosfato da ADP ad ADP formando ATP e AMP
      - $ADP + ADP \rightarrow ATP + AMP$
    - AMP sarà un segnale importante per la cellula muscolare che la sua riserva di immediato utilizzo di energia metabolica sta ormai scarseggiando
    - AMP è anche un importante effettore allosterico, va ad agire sulla glicolisi per aumentarne il flusso
- Questo meccanismo è già presente nella cellula a riposo

- Può assicurare sforzi/contrazioni di breve durata ma di elevata intensità
- Durata: pochi secondi
  - Limitata dalla quantità cellulare di ATP e CREATINA-FOSFATO
- Potenza: 50 kcal/min

### Anaerobio

- Dopo quello immediato, che dura solo pochi secondi, interviene un meccanismo generatore di **energia di emergenza** di ATP che non ha bisogno di ossigeno
- Si attiva immediatamente in attesa che il muscolo possa essere correttamente irrorato, cuore deve pompare, vasi sanguigni si devono dilatare per consentire un afflusso maggiore di sangue ossigenato che proviene da una maggiore respirazione a livello polmonare
- Prima che questo succeda (qualche minuto) c'è bisogno di assicurare nuovo ATP in modo da recuperare l'ATP che è stato consumato all'inizio della contrazione
- Trasformazioni metaboliche di glicogeno e poi G6P in lattato
  - Glicogenolisi
    - Smonta il glicogeno muscolare in G6P
    - $\text{Glicogeno (n)} + \text{Pi (H}_2\text{O)} \rightarrow \text{Glc-6P (90\%)} + \text{(Glc 10\%)} + \text{glicogeno (n-1)}$
    - Ecco perché il glicogeno non viene smontato con l'acqua (idrolisi) ma con il fosfato, per avere glucosio già fosforilato e non sprecarne altro. Si forma per il 90% G1P che si isomerizza a G6P e per il 10% Glc proveniente dai punti di ramificazione
  - Glicolisi anaerobia
    - $\text{Glc, Glc-6P} \rightarrow \text{lattato} + 2 \text{ (o } 3) \text{ ATP}$
    - Le molecole prodotte dalla glicogenolisi vengono usate dalla glicolisi che parte dal Glc (10%) (Glc preso sia da sangue che glicogeno) o da G6P
    - Processo glicolitico anaerobio porta a formazione di una molecola di lattato e ATP
      - Se partiamo da Glc la glicolisi anaerobia ci dà 2 ATP
      - Se partiamo da G6P che proviene da glicogeno non abbiamo bisogno di spendere ATP per attivare il glucosio e la resa netta sarà di 3 ATP
- Più lento rispetto a quello immediato perché abbiamo una serie di reazioni chimiche (degradazione glicogeno, isomerizzazione, glicolisi e lattato deidrogenasi)
- Sforzi di durata limitata a qualche minuto e di elevata intensità
  - Durata: approvvigionamento di ATP qualche minuto perché è un **meccanismo limitato** da
    - Quantità di glicogeno presente nel muscolo
      - Più glicogeno c'è e più il muscolo è in grado di funzionare a lungo attraverso questo organismo
    - Accumulo intramuscolare del lattato
      - Acido organico che quindi genera acidosi metabolica, determina una riduzione del pH che viene definita **acidosi lattica**
      - Acidosi determina stanchezza muscolare perché la variazione in basso del pH determina
        - Una ridotta attivazione degli enzimi glicolitici quindi una riduzione del processo glicolitico
        - Riduzione della capacità ATPasica della miosina di utilizzare l'ATP presente nel muscolo e la sua capacità di interagire con l'actina
    - Meccanismo non ha bisogno di ossigeno ma porta ad un **debito di ossigeno** che deve essere pagato all'organismo nel momento in cui questo si ferma per
      - Riossigenare la Hb e Mb presente nel sangue e nelle cellule
      - Smaltimento di tutto l'acido lattico che si è prodotto che va a finire attraverso il ciclo di Cori nel fegato il quale, attraverso la fosforilazione ossidativa, utilizzerà l'ossigeno per trasformare l'acido lattico in piruvato e da piruvato in glucosio
  - Potenza: 30 kcal/min
    - Minore rispetto a quello immediato ma di maggiore durata

- Prevalente nelle **fibre bianche**
  - Fibre bianche hanno pochi mitocondri e sono in grado di catabolizzare in modo anaerobio, per la presenza dei giusti enzimi, il glucosio presente nella forma di glicogeno
  - Nella tabella vediamo la differenza della concentrazione di questi metaboliti nel muscolo a riposo e nel muscolo appena dopo lo sforzo e dopo un certo tempo di recupero dallo sforzo
  - Non c'è una variazione significativa dell'ATP perché a tamponare questa riduzione è intervenuta la fosfocreatina che da 17 arriva a 3.7 e dopo pochi minuti torna ai valori stazionari

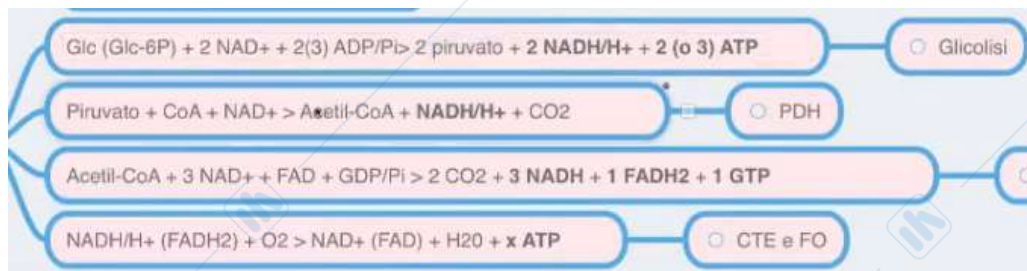
Metabolita	μmol/g di tessuto fresco		
	A riposo	Tempo dopo esercizio fisico intenso	
		15 secondi	30 minuti
ATP	4.6	3.4	4.8
Fosfocreatina	17.0	3.7	18.8
Glicogeno (nmol/g)	0.80	0.52	0.64
Lattato	1.1	30.5	6.0
pH	7.1	6.3	7.0

- Glicogeno diminuisce quasi della metà da 0.8 a 0.52 e in 30 minuti viene ripristinato parzialmente ai valori originari (da notare la velocità con cui il glicogeno viene smontato e riassembleto)
- Lattato a riposo è 1.1 e aumenta di quasi 30 volte subito dopo l'attività del muscolo il che determina una riduzione importante del pH da 7.1 a 6.3 che in poco tempo deve essere riportato al valore fisiologicamente accettabile per il muscolo che è 7.1 (cellule 7.2)

### Ossidativo/aerobio

- **Fibre rosse** hanno metabolismo molto aerobio e si attivano contemporaneamente alle fibre bianche per assicurare il proseguimento dell'attività muscolare e garantire un'erogazione di potenza muscolare anche per svariate ore
- A dare l'energia non può essere la glicolisi anaerobia perché a un certo punto produce troppo acido lattico che determinerebbe l'affaticamento irreversibile del muscolo
- Questo meccanismo prevede l'ossidazione completa del glucosio e di altri metaboliti intermedi come acidi grassi
  - Glicogenolisi
    - $\text{Glicogeno (n)} + \text{P}_i (\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{Glc-6P (Glc 10\%)} + \text{glicogeno (n-1)}$
    - Rilascia il glucosio presente nel muscolo
    - Prima muscolare perché il muscolo riesce a usare tutto il glicogeno presente all'interno della fibra muscolare
    - Quando l'attività muscolare dovesse proseguire dopo che tutto il glicogeno muscolare è stato consumato viene degradato anche quello epatico
    - Quando il muscolo scheletrico consuma glucosio questo si abbassa anche nel sangue (ipoglicemia indotta da sforzo fisico) che determina una risposta da parte del fegato. Ipoglicemia comporta produzione di glucagone e soprattutto adrenalina ovvero l'ormone dello stress acuto il quale segnala agli organi di prepararsi ad una azione fisica e determina, nel caso del fegato, la glicogenolisi che mette a disposizione del muscolo anche il glicogeno epatico
  - Glicolisi aerobia

- Produce piruvato che verrà trasformato in acetil-coa (piruvato carbossilasi) il quale dovrà essere ossidato a CO<sub>2</sub> tramite il ciclo di Krebs e infine i coenzimi ridotti dovranno essere riossidati da queste fibrocellule muscolari attraverso la catena di trasporto di elettroni e la fosforilazione ossidativa



- Rendimento:  $\text{Glc (G6P)} + 6 \text{ O}_2 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 32 \text{ (33) ATP}$ 
  - 16 volte superiore a quello della glicolisi anaerobica (2/3 ATP) il che permette di far durare il processo di contrazione molto più a lungo
- Catabolismo ossidativo degli amminoacidi
  - Quando comincia a scarseggiare il glucosio ematico a causa del consumo da parte del muscolo anche gli amminoacidi del muscolo vengono, in parte, catabolizzati perché si instaura un rapporto tra il muscolo scheletrico e il fegato quindi si attiva ad esempio la gluconeogenesi
- Beta-ossidazione
  - Comincia ad essere importante dopo un po' di tempo, all'inizio contribuisce poco al ripristino dell'ATP
  - Quando glicogeno comincia a scarseggiare la beta-ossidazione diventa la parte più importante di questo meccanismo di produzione di energia metabolica
- Ciclo di Krebs
  - Fondamentale perché è l'unico modo che la cellula ha per bruciare in modo completo metaboliti energetici come Glc, amminoacidi e acidi grassi che appunto convergono verso la formazione di acetil-coa
- Fosforilazione ossidativa
  - Riossidazione O<sub>2</sub>-dipendente dei coenzimi ridotti
  - Mioglobina si carica nel muscolo a riposo e contribuisce al passaggio dal sangue alla fibra muscolare quando questa comincia a consumare ossigeno in modo massiccio
- Questo meccanismo richiede ossigeno perché è basato sulla respirazione cellulare (CTE)
  - Fornisce molte più molecole di ATP degli altri due sistemi
- Sforzi di durata prolungata e di bassa intensità
  - Durata: qualche ora
  - Potenza: 12 kcal/min
- Prevalente nelle fibre rosse (FINE LEZIONE 22, 17.05.21)

## Metabolismo (INIZIO LEZIONE 23, 18.05.21)

### Glicogeno

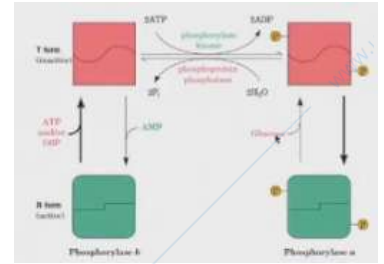
- Polimero ramificato del glucosio che viene sintetizzato a partire da un dimero di **glicogenina** che è in grado di produrre una catena lineare di glucosio
  - Oltre a funzionare da starter della molecola di glucosio sono anche degli enzimi che catalizzano la sintesi dell'innesco di glicogeno
- Intervengono poi gli enzimi deputati alla sintesi:
  - **Glicogeno sintasi** e **enzima ramificante** che permettono con un'azione combinata la crescita di questa catena di glucosio sia in senso lineare sia ramificata
- Ruolo

- Nel muscolo scheletrico il glicogeno è una riserva di glucosio che il muscolo libera quando deve sostenere l'attività muscolare in condizioni sia aerobiche che anaerobiche (tossiche)
- Il metabolismo del glicogeno risente
  - Segnali interni deputati a chiarire alla cellula se ha bisogno di utilizzare glicogeno oppure se può stoccarlo sotto forma di glicogeno
    - **AMP**
      - Adenosinammonofosfato si accumula quando il muscolo consuma le riserve di ATP perché si sta contraendo in modo consistente
      - Il suo accumulo è segnale di **BASSA CARICA ENERGETICA**, indica al muscolo di degradare glicogeno
    - **ATP e G6P**
      - Indica che c'è una **ALTA CARICA ENERGETICA** e che il muscolo può produrre glicogeno invece di degradarlo
  - Segnali esterni
    - **Adrenalina**
      - Indica al muscolo che il glicogeno conservato può essere smontato perché adrenalina è l'ormone dello stress acuto, risposta adattativa dell'organismo ad una situazione che deve essere fronteggiata rapidamente attraverso un combattimento o una fuga
      - Messaggio extracellulare prodotto dalla ghiandola del surrene
      - Interagisce con i recettori beta-adrenergici dei miociti per prepararli all'azione
    - **Insulina**
      - Indica situazione di buona alimentazione
      - Indica al muscolo di produrre glicogeno
- Glicogeno è la riserva di glucosio del nostro organismo e il muscolo scheletrico grazie alla sua estesa abbondanza nel corpo umano è il tessuto che ne conserva la maggiore quantità
  - Riserva massima: 500g
- Ormoni
  - Non reagisce al glucagone perché non ha il compito di produrre o rilasciare glucosio per far fronte ad una situazione di digiuno, non ha GLP-1
  - Risponde a
    - Insulina
      - Azione glucostatica
      - Importante per riportare in basso la glicemia che è aumentata dopo un pasto
      - Agisce sia su tessuto muscolare che adiposo, questi due tessuti sono in grado di captare il glucosio esterno più concentrato per farne entrare il più possibile dentro le cellule e contribuire a ridurre la glicemia
      - GLUT4 che si trova in queste cellule ha un livello di regolazione della sua espressione sulla superficie della cellula che è determinato dal grado di fusione di vescicole intracellulari, che contengono questi trasportatori, che la cellula è in grado di esportare dall'interno della cellula verso la membrana e viceversa, meccanismo reversibile di esocitosi e endocitosi che è controllato in senso positivo dalla via di segnalazione dell'insulina

- Glicogenolisi

- Enzima segnapasso: **glicogeno fosforilasi**

- Nel muscolo c'è isoforma muscolare che, a differenza di quella epatica, risente della concentrazione dell'ATP e G6P
    - Nel fegato la glicogeno fosforilasi è sensibile al glucosio il quale è un effettore allosterico negativo
    - Nel muscolo la fosforilasi è in grado di legarsi, e modificare la sua attività, sia all'ATP che al G6P che all'AMP
    - AMP favorisce la forma R attiva della fosforilasi mentre l'ATP e G6P si legano e favoriscono la forma T inattiva
    - Questo in assenza di qualunque segnalazione/regolazione covalente perché il muscolo scheletrico usa il glucosio per la propria contrazione che è indipendente dalla quantità di insulina nel sangue
    - Il muscolo deve contrarsi quando c'è bisogno di muoversi quindi la necessità di demolire oppure di produrre glicogeno dipende dalla quantità citoplasmatica di molecole che segnalano la carenza o l'abbondanza di energia metabolica (diverso da glicogeno fosforilasi epatica il cui ruolo è legato alla concentrazione di glucosio all'esterno della cellula)
    - Regolazione
      - Allosterica
        - + AMP
        - - ATP
        - - G6P
        - Non lega il glucosio come la sua isoforma epatica
      - Covalente
        - + adrenalina (prepara muscolo a contrazione)
        - - insulina



- Una volta che il glicogeno è degradato per azione della fosforilasi si formano

- 90% G6P
    - 10% Glc
    - Queste molecole non vengono rilasciate nel torrente circolatorio e possono essere, destino del Glc rimosso dal glicogeno:
      - Glicolisi (piruvato + ATP + NADH)
      - PDH (piruvatodeidrogenasi, Acetil-CoA + NADH)
      - TCA (CO<sub>2</sub> + NADH + FADH<sub>2</sub> + GTP)
      - CTF e FO (H<sub>2</sub>O + ATP)

- Glicogenosintesi

- Enzima segnapasso: **glicogenosintasi**

- Regolazione covalente:

- + insulina
      - Contribuisce a contrastare l'iperglicemia perché il muscolo scheletrico insieme al tessuto adiposo e al fegato contribuisce al sequestro del glucosio extracellulare che si accumula dopo un pasto abbondante in carboidrati
    - - adrenalina
      - Cellula è indotta a utilizzare il glicogeno e questo determina un blocco della via opposta per evitare un inutile ciclo metabolico futile

- Riassunto:

- Muscolo utilizza glicogeno
  - Con insulina lo utilizza per ripristinare la sua riserva di glicogeno e aiutare l'azione del fegato e del tessuto adiposo a ridurre la concentrazione di glucosio che si è accumulato dopo il pasto

- Nella contrazione muscolare il glicogeno serve per liberare molecole di glucosio che il muscolo utilizzerà attraverso la glicolisi aerobia/anaerobia per garantire per un certo tempo l'attività di contrazione

### Metabolismo proteico

- Muscolo è il depositario della maggior parte delle proteine che possono essere utilizzate in condizioni estreme in cui in assenza di fonti esterne di carboidrati l'organismo deve fornire al fegato gli scheletri carboniosi con cui costruire il glucosio attraverso la gluconeogenesi
  - In particolare l'**Ala** e **Glutammina**
- Importanza strategica del tessuto muscolare e della quantità di proteine utilizzabili
  - Non tutte le proteine possono essere utilizzate, al **massimo il 50%** perché l'attività muscolare è garantita dalle proteine contrattili e ridurre troppo quantità porterebbe all'incapacità dei muscoli respiratori di garantire il ritmo respiratorio stesso

### Catabolismo proteico

- **Proteolisi**
  - In condizioni di digiuno prolungato la ghiandola del surrene produce un ormone di natura lipofila che rappresenta un segnale di stress cronico
  - Il digiuno prolungato determina quindi il rilascio di **cortisolo** il quale è il principale attore del processo proteolitico nei muscoli scheletrici
    - L'azione del cortisolo non è solo quella di favorire la degradazione delle proteine ma anche quella di bloccare la sintesi, antagonizzando l'azione dell'insulina
- Una volta che le proteine muscolari siano state degradate ad amminoacidi dentro al muscolo si accumulano i 20 amminoacidi standard
  - Avremo delle transaminazioni
    - Liberano alfa-chetoacidi tra cui alfa-chetoglutarato, ossalacetato, piruvato che non sono altro che alfa-chetoacidi utilizzati dalle transaminasi per rimuovere i gruppi amminici degli amminoacidi
    - Una parte degli amminoacidi produrrà dei composti prettamente chetogenici come l'acetil-coa e l'acetoacetato
- Come fa il muscolo a mandare gli scheletri carboniosi al fegato per la gluconeogenesi?
  - Non li rilascia nel torrente circolatorio
  - Muscolo attiva le sue transaminasi e trasferisce i gruppi amminici dagli amminoacidi agli alfa-chetoacidi accettori
    - Alfa-chetoglutarato → glutammato
    - Piruvato → alanina
  - Alanina è uno dei due principali amminoacidi che il muscolo scheletrico rilascia nel torrente circolatorio
    - [Ala] nel plasma: 4mM ma può aumentare in risposta al fabbisogno
  - Tabella: notare la differenza tra Ala-Asp e Gln-Glu in fattore 1000
    - Indica che sono Ala e Gln ad essere inviati dal muscolo scheletrico verso il fegato
  - Non è il glutammato ad essere rilasciato nel torrente circolatorio ma la glutammina perché
    - È neutra mentre il glutammato è un acido e disturberebbe l'equilibrio acido base del sangue
    - Glutammina porta due gruppi amminici per volta
  - **Ala** e **Gln** oltre a trasportare i gruppi amminici trasferiscono anche scheletri carboniosi per la sintesi del glucosio
    - Ala trasferisce piruvato
    - Gln trasferisce l'alfa-chetoglutarato
  - Glutammina
    - [Gln] nel plasma: 7mM

Aminoacido	Concentrazione plasmatica
Ala	4 mM
Asp	10 μM
Gln	7 mM
Glu	25-50 μM

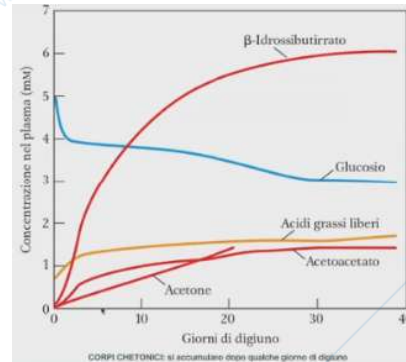
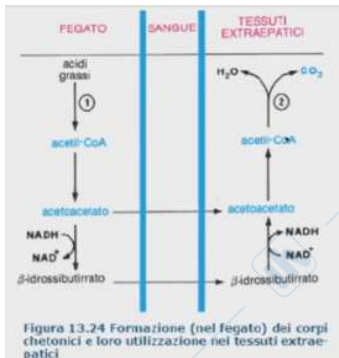
- Si forma grazie alla **glutammina sintetasi** la quale è una dei pochi enzimi che riesce a lavorare con l'ammoniaca che si forma durante il catabolismo degli amminoacidi muscolari
  - $\text{Glu} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{Gln} + \text{ADP} + \text{P}_i$
  - Durante il catabolismo amminoacidi rilasciano gruppi amminici (alcuni più di altri), questi gruppi amminici di Gly, Ser, Thr, Asparagina, Met, Cys e Trp vengono liberati sotto forma di ammoniaca  $\text{NH}_3$
  - Ammoniaca viene subito detossificata grazie all'azione di questo enzima per produrre dal glutammato la glutammina

Anabolismo proteico

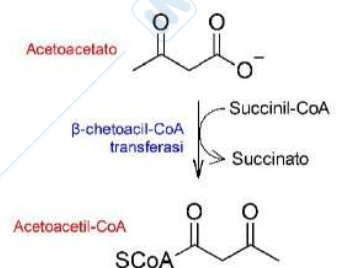
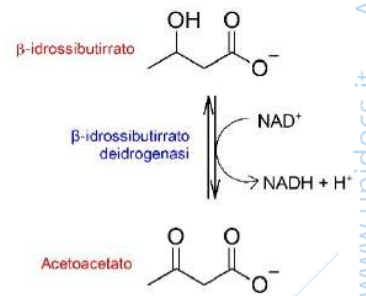
- Stimolato dall'insulina che segnala al muscolo un'abbondanza di amminoacidi che proviene dalla dieta

**Chetolisi**

- Fase di utilizzo dei corpi chetonici che si realizza soltanto negli organi aventi cellule dotate di mitocondri e che hanno enzima in grado di attivare l'acetoacetato
- Corpi chetonici
  - Acetoacetato
  - Beta-idrossibutirrato, più ridotto quindi contiene più energia e una volta che ha raggiunto il tessuto extraepatico (quindi la cellula bersaglio) viene ossidato con un enzima NAD-dipendente ad acetoacetato che dovrà essere attivato per poter essere utilizzato, attraverso il ciclo di Krebs, per produrre energia metabolica

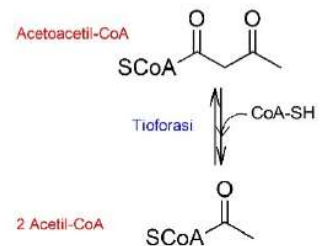


- Corpi chetonici si accumulano soltanto dopo digiuno prolungato fino a raggiungere concentrazioni mM
- Una volta raggiunte le cellule il beta-idrossibutirrato viene convertito in acetoacetato, l'enzima è quello opposto alla sua sintesi ed è la **beta-idrossibutirrato deidrogenasi** che utilizza il  $\text{NAD}^+$  per ossidarla e riformare l'acetoacetato
  - Nel citoplasma delle cellule la forma più attiva di questo coenzima è quella ossidata, abbiamo un rapporto che favorisce quella ossidata a quella ridotta quindi dentro al citoplasma che hanno bisogno di un supplemento di energia metabolica (glucosio diminuito, cellule iniziano a rimpiazzarlo con queste molecole)
  - Cellula produce  $\text{NADH}$  con il quale potrà produrre  $\text{ATP}$
- Acetoacetato si sposta nel mitocondrio dove incontra l'enzima **tioforasi** che è assente nel fegato ed è quindi l'enzima responsabile della chetolisi



- Acetoacetato viene attivato ad acetoacil-coa
- Enzima particolare perché invece di acetyl-coa utilizza un analogo ovvero il succinil-coa (intermedio del ciclo di Krebs)
- Succinil-coa viene utilizzata quando c'è situazione di digiuno e quindi quando si accumula l'acetoacetato nel mitocondrio
- Reazione da una parte libera una molecola di succinato dall'altra attiva l'acetoacetato

- Dal punto di vista energetico la conversione dell'acetoacetato in acetoacetyl-coa determina la perdita di succinil-coa il quale era importante nella tappa che portava alla formazione di succinato tramite fosforilazione a livello del substrato (+GTP) attraverso la **succinil-coa sintetasi**
  - Questo intermedio lo perdiamo con la tioforasi
  - Dal punto di vista energetico questa trasformazione comporta alla cellula la **spesa** di una molecola di **ATP** che non può essere sintetizzata perché il legame tioestere del succinil-coa viene utilizzato per sintetizzare un legame tioestere nell'acetoacetyl-coa
- Parte dell'acetoacetato si trasforma in modo non enzimatico in acetone
  - Motivo per cui corpi chetonici non sono particolarmente efficienti nel portare energia metabolica alle cellule perché una parte si perde per effetto di questa instabilità chimica intrinseca di questo chetoacido
- Scissione da parte della **tiolasi** dell'acetoacetyl-coa in 2 acetyl-coa
  - Catalizza anche beta-ossidazione, si trova nel mitocondrio e opera nella direzione dove si stanno accumulando i reagenti
  - Acetyl-coa che verrà utilizzato nel ciclo di Krebs per produrre energia metabolica di cui la cellula ha bisogno
- Resa energetica
  - Beta-idrossibutirrato
    - $\text{Beta-idrossibutirrato} + 4.5 \text{ O}_2 \rightarrow 4 \text{ CO}_2 + 4 \text{ H}_2\text{O}$
    - Per essere completamente ossidato dalla cellula ha bisogno di 4.5 molecole di  $\text{O}_2$  mentre l'acetoacetato 4 perché il beta è più ridotto e richiede quantitativo di ossigeno superiore
    - Sintesi di
      - 1 NADH = 2.5 ATP (per conversione ad acetoacetato)
      - - 1 GTP = -1 ATP (per tiolisi del succinil-coa)
      - Resa del ciclo di Krebs con 2 acetyl-coa
        - 6 NADH =  $6 \times 2.5 = 15$  ATP
        - 2 FADH =  $2 \times 1.5 = 3$  ATP
        - 2 GTP = 2 ATP
      - TOTALE = 21.5 ATP
        - Da combustione completa di beta-idrossibutirrato ad anidride carbonica e acqua tramite chetolisi, ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa
  - Acetoacetato
    - TOTALE =  $21.5 - 2.5 = 19$  ATP
  - A queste rese bisogna togliere il quantitativo di corpi chetonici che si trasformano inevitabilmente in acetone



## Tessuto adiposo bianco

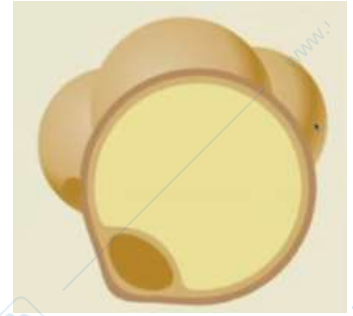
### Caratteristiche

- Tessuto che ha origine nel mesenchima
- Estensione dal **15-20%** del peso corporeo che può aumentare o diminuire in base all'apporto calorico (energico) giornaliero
  - Minimo: 4% che è grasso strutturale
  - Massimo: 60% in condizioni di iperobesità
- Tessuto meno ricco d'acqua che può arrivare all'8-18%

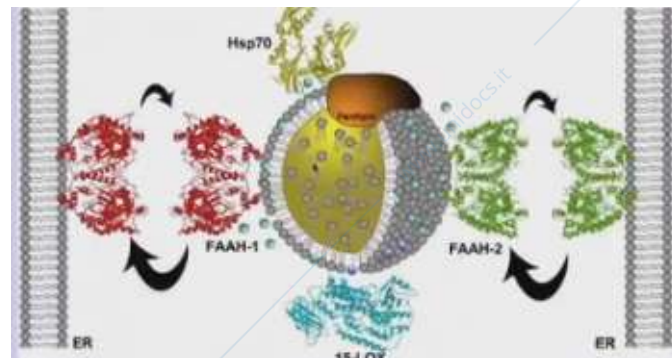
### Cellule specializzate: **adipocita**

- Stesso ruolo per gli acidi grassi che l'epatocita ha per il glucosio (deposito di glucosio, glicogeno)

- Adipocita è la cellula specializzata nel conservare gli **acidi grassi** sotto forma di **trigliceridi** che possono essere utilizzati da tutto l'organismo (acidi grassi → triacilgliceroli TAG)
- Sono molecole **apolari**, (vantaggio rispetto a glicogeno) non richiedono acqua d'idratazione quindi non disturbano la funzione del citoplasma e la funzione citoplasmatica delle cellule tant'è che si possono accumulare in quantità enormi fino ad arrivare in condizioni come in figura dove la maggior parte del volume cellulare è costituito da questo accumulo ingente di trigliceridi che costituisce l'**adiposoma** o **gocciolina lipidica** (organello intracitoplasmatico)



- Al centro dell'**adiposoma** ci sono i trigliceridi neutri
- In periferia a formare un'epidermide di questa vescicola c'è un monostrato di fosfolipidi in cui si possono abbinare delle molecole di colesterolo
- In superficie ci sono delle proteine specializzate come la **perilipina** e alcune proteine specializzate nel metabolismo lipidico che ne controllano la sintesi e la degradazione



- L'adiposoma può aumentare a seconda delle condizioni cellulari fino a 8000 volte rispetto alle dimensioni minime
- Organello dinamico
  - In condizioni di buona alimentazione può crescere a dismisura
  - In condizioni di digiuno può frammentarsi in tanti piccoli organelli e favorire il rilascio degli acidi grassi contenuti
- Vantaggio rispetto al glicogeno
  - Può accumularsi in quantità notevoli infatti il tessuto adiposo aumenta in base alla quantità di trigliceridi che accumula

- Guardando la tabella
  - L'attività metabolica specifica del tessuto adiposo è tra le più basse (4.5) rispetto agli altri organi
  - Indica che adipociti hanno **attività metabolica debole** perché sono cellule con pochissimo citoplasma e mitocondri
  - Incidono per un 4% sul metabolismo basale nonostante la loro massa sia considerevole e rappresentino il 20% del peso corporeo
  - Sono depositi dinamici di trigliceridi che non hanno altre funzioni rilevanti

Organo	Massa (kg)	Peso (%)	Attività metabolica specifica (Kcal/kg/die)	Metabolismo basale (%)
Reni	0.3	0.4	440	8
Cuore	0.4	0.5	440	9
Cervello	1.5	2.0	240	20
Fegato	1.5	2.0	220	21
Tessuto adiposo	14	20	4.5	4
Tessuto muscolare scheletrico	28	40	13 (variabile con l'attività)	22
Altra	24.3	35.1	4	16

- Funzioni
  - **Riserva energetica**

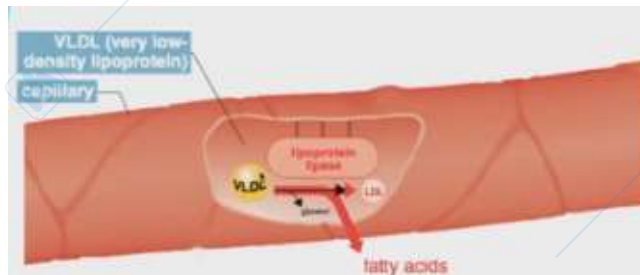
- Conservano trigliceridi perché quando ce n'è bisogno vengono rilasciati per fornire gli acidi grassi necessari al metabolismo
- **Isolamento termico**
  - Si accumulano nel tessuto sottocutaneo → grasso sottocutaneo
- **Endocrina**
  - Sono in grado di produrre ormoni come la **leptina**
    - Prodotta in quantità proporzionale alla dimensione del tessuto adiposo
    - Segnala stato di **sazietà**

## Metabolismo

Gestiscono sintesi e degradazione dei trigliceridi contenuti al loro interno

Lipolisi

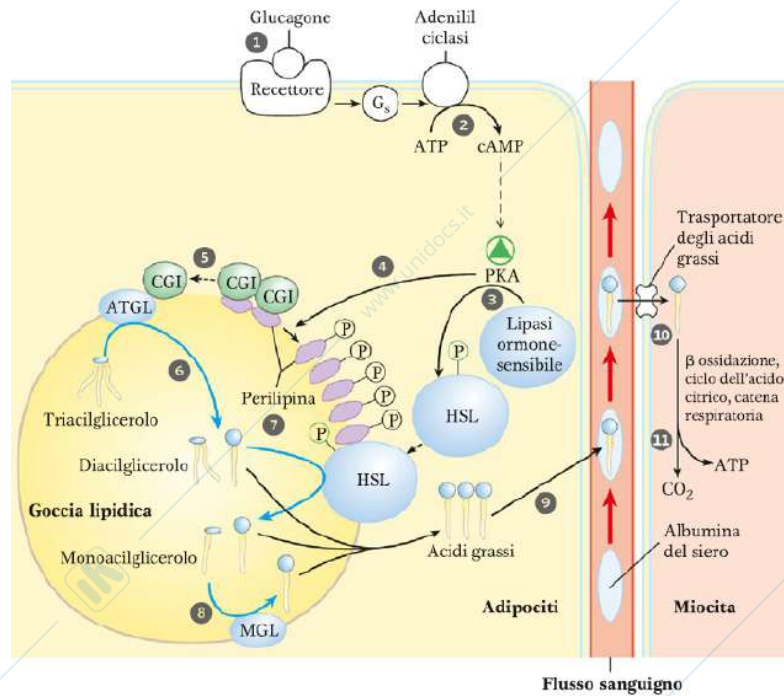
- Processo di idrolisi dei triacilgliceroli e degli esteri del glicerolo
  - Sono coinvolti enzimi idrolitici chiamati **lipasi**
- Può avvenire in due compartimenti separati: lipolisi extracellulare e intracellulare
- **Lipolisi extracellulare**
  - Quando dopo un pasto il tessuto intestinale ha prodotto i chilomicroni e quindi sta trasferendo i lipidi della dieta, attraverso i dotti linfatici, fino al tessuto muscolare o adiposo
  - Sulla superficie degli endoteli dei vasi sanguigni le cellule producono e rilasciano la **lipoproteina lipasi** (LPL) che si trova quindi all'esterno delle cellule in particolare a contatto con il plasma sanguigno
    - Proteina che lega, immobilizza e degrada i trigliceridi presenti nei chilomicroni o in questo caso nelle VLDL perché quest'attività si ha sia per i lipidi provenienti dalla dieta che per quelli che provengono dalla sintesi endogena da parte del fegato
    - Fegato in abbondanza di nutrienti (glucosio, proteine) li trasforma in lipidi/trigliceridi e li veicola all'esterno formando le VLDL



- **LPL** si occupa di far uscire, da questi cargo di trigliceridi, gli acidi grassi
- Regolazione: è sensibile agli ormoni dello stato di alimentazione
  - **Aumenta** espressione in presenza dell'**insulina** che segnala stato di buona alimentazione e alta carica energetica
    - Cellule si predispongono a captare questi lipidi e immobilizzarli all'interno del loro citoplasma
  - Diminuisce con il **glucagone**
    - Cellule non captano e degradano lipidi perché eccesso di nutrimento
- L'attività di questo enzima è quello di liberare dai chilomicroni o dalle VLDL
  - **Acidi grassi** che vengono captati dagli adipociti
  - **Glicerolo**
    - Non può essere utilizzato dalle cellule perché non hanno un enzima specifico che li rende in grado di utilizzarlo per il metabolismo
    - Viene lasciato in circolo dove raggiungerà il **fegato** che ha l'attività metabolica che può impiegare correttamente questo composto (**gluconeogenesi**, glicerolo chinasi e glicerolo DH)
- **Lipolisi intracellulare**
  - Processo opposto, ha lo scopo di demolire i trigliceridi che si sono formati all'interno della cellula

o **Lipasi ormone sensibile (HSL)**

- Enzima sensibile agli ormoni
- Si attiva quando c'è bisogno di liberare gli acidi grassi presenti negli adiposomi e quindi c'è bisogno di energia metabolica
- Glucagone porta segnalazione di digiuno e quindi di fabbisogno energetico, adrenalina segnala solo fabbisogno energetico
  - Glucagone e adrenalina sono in grado di stimolare quest'enzima
- Sono, nel caso dell'adipocita, associati a dei recettori che stimolano le proteine G<sub>s</sub> (stimolatorio) che sono associate all'attivazione dell'adenilato ciclasi il quale produce cAMP che stimola la PKA che è responsabile dell'attivazione dell'HSL che idrolizza i trigliceridi a diacilgliceroli e a monoacilgliceroli quindi si liberano gli acidi grassi

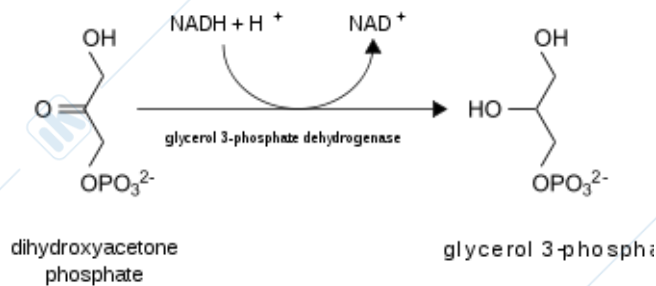


- Monoacilglicerolo viene degradato dal **monoacilglicerolo lipasi** che determina la formazione di glicerolo (non mostrato) e di acidi grassi
  - Una volta che questi sono stati liberati dall'adiposoma vengono rilasciati nel torrente circolatorio legati all'albumina e quindi trasportati nei tessuti periferici
    - Ad esempio nei miociti, adrenalina serve per captare acidi grassi che proviene dal muscolo scheletrico
    - Fegato utilizza acidi grassi per produrre corpi chetonici e garantisce la gluconeogenesi (glicerolo)
- o La lipolisi intracellulare, quindi la mobilitazione degli acidi grassi incamerati nei trigliceridi di queste cellule, è
- Stimolata da
    - Glucagone
    - Adrenalina
      - o Recettori sono diversi da quelli del muscolo, sono beta-3-adrenergici, ma comunque di tipo beta quindi associati ad una proteina di tipo stimolatorio
  - Sensibile all'insulina che indica condizione di alta quantità di grassi
    - Insulina spegne con PP1 la HSL e impedisce che questa possa idrolizzare trigliceridi e favorisce il processo opposto della lipogenesi
- o Lipolisi intracellulare serve per liberare

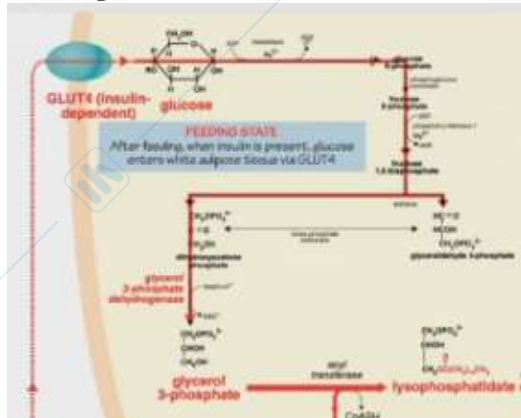
- Acidi grassi che vengono rilasciati nel sangue associati ad albumina e poi captati
  - Non possono viaggiare liberi perché sono molecole lipofile, anfipatiche hanno azione detergente, è importante che vengano veicolati da proteine specifiche di trasporto
- Glicerolo che servirà al fegato per produrre glucosio

### Lipogenesi

- Processo che permette all'adipocita di accumulare trigliceridi nella sua gocciolina lipidica
- Precursori
  - C'è bisogno di glicerolo ma questo non può essere utilizzato dagli adipociti perché non ha la **glicerolo chinasi** cioè l'enzima che fosforila e attiva il glicerolo per essere parte della sintesi dei trigliceridi
  - Per poter formare trigliceridi l'adipocita ha bisogno di glucosio che è fondamentale per poter accumulare nell'adipocita i trigliceridi
    - Zuccheri importanti per garantire il deposito di lipidi all'interno di queste cellule
    - Glucosio è in grado di produrre GAP che può essere ridotto a glicerolo-3fosfato dalla **glicerolo-3P deidrogenasi**
  - Acidi grassi
- Enzimi
  - Produzione di glicerolo-3P
    - Reazioni glicolitiche dal Glc al DHAP
    - **Glicerolo-3fosfato deidrogenasi** (GAPDH)
      - $\text{DHAP} + \text{NADH}/\text{H}^+ \rightarrow \text{GLICEROLO-3P} + \text{NAD}^+$
      - Riduce DHAP, un chetone, in un alcol formando glicerolo-3P ovvero il precursore dei trigliceridi

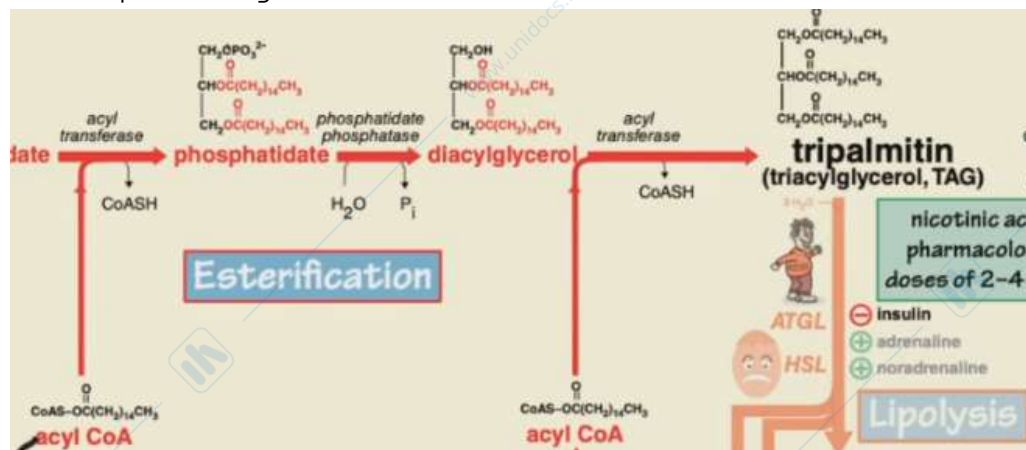


- Pasto ricco in lipidi e carboidrati da un lato rilascia glucosio che causa rilascio di insulina che porta all'aumento del GLUT4 sulla superficie dell'adipocita
- Glucosio dalla dieta entra nell'adipocita
- Glucosio viene metabolizzato tramite glicolisi a formare DHAP → isomerizzato a GAP → ridotto da GAPDH in glicerolo-3P = precursore sintesi dei trigliceridi
  - Tripalmitina è trigliceride che contiene 3 residui di acido palmitico



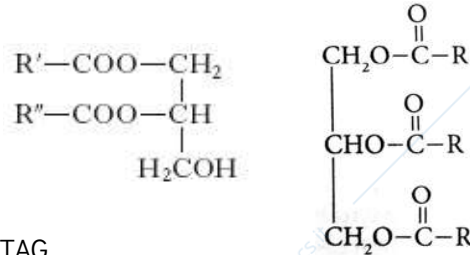
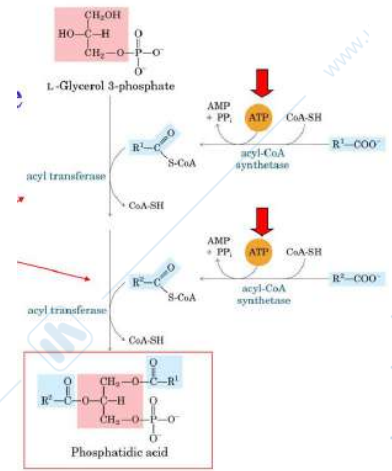
o Sintesi TAG

- Dal glicerolo-3P attraverso l'azione combinata di alcuni enzimi
- Chilomicroni prodotti dalle cellule dell'intestino che quindi contengono lipidi esogeni trasportano il loro carico fino al tessuto adiposo dove incontrano la **lipoproteina lipasi** che li idrolizza
  - Glicerolo va nel plasma fino al fegato
  - Acidi grassi captati dall'adipocita e attivati dall'acil-coa sintetasi che attiva l'acido grasso ad acil-coa
- Attivazione acidi grassi ad acil-coa con **acil-CoA sintetasi**
  - Ogni attivazione richiede consumo di 2 legame fosfoanidridico
  - Per attivare 3 acidi palmitici a palmitoil-coa cellula deve consumare 6 ATP
- Glicerolo-3P ha due gruppi alcolici con i quali esterificherà due acidi grassi, enzima che se ne occupa è l'**acil-transferasi** che sfrutta l'acido grasso attivato (acil-CoA) e lo assembla sulla molecola crescente di trigliceride
  - Abbiamo lisofosfatidato che a sua volta verrà palmitoilato a formare il fosfatidato
  - Fosfatidato è il precursore dei fosfolipidi quindi può essere utilizzato dalla cellula per produrre lipidi di membrana ma nel caso degli adipociti verrà usato per produrre trigliceridi



- Per formare trigliceridi, il fosfatidato deve liberare il fosfato (in alto) ovvero questo ossidrilico che adesso è esterificato con il fosfato
    - Enzima che se ne occupa è il **fosfatidato fosfatasi** che forma quindi il diacilglicerolo
  - Il **diacilglicerolo** con l'**acil-transferasi** viene esterificato in posizione 3 formando il **trigliceride** che viene quindi depositato nella gocciolina lipidica insieme a tutte le altre molecole
- Se invece siamo lontani dal pasto e questo conteneva una grossa quantità di carboidrati e di proteine il fegato avrà prodotto dei grassi (da questo eccesso di nutrienti non lipidici) e li avrà trasformati in acidi grassi, in trigliceridi endogeni
  - Queste molecole verranno processate nello stesso modo con **lipoproteina lipasi** e poi tutto uguale
  - Lipogenesi non ce l'ha solo l'adipocita ma anche tutte le altre cellule come il tessuto muscolare (piccole quantità di lipidi intracellulari)

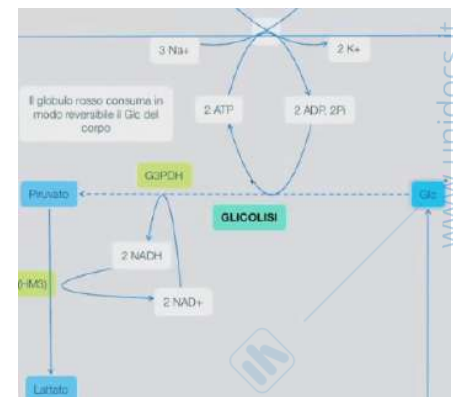
- Reazione di attivazione degli acidi grassi
  - Acil-coa sintetasi
    - $\text{acido grasso} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{Acil-CoA} + \text{AMP} + 2\text{Pi}$
- Reazioni di esterificazione del glicerolo attivato
  - Acil transferasi
    - $\text{Acil-CoA} + \text{glicerolo-3P} \rightarrow \text{LISOFOSFATIDATO}$
  - Acil transferasi
    - $\text{Acil-CoA} + \text{lisofosfatidato} \rightarrow \text{FOSFATIDATO}$
  - Fosfatidato fosfatasi
    - $\text{Fosfatidato} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAG} + \text{Pi}$
    - Rimozione del fosfato dal fosfatidato a formare il diacilglicerolo



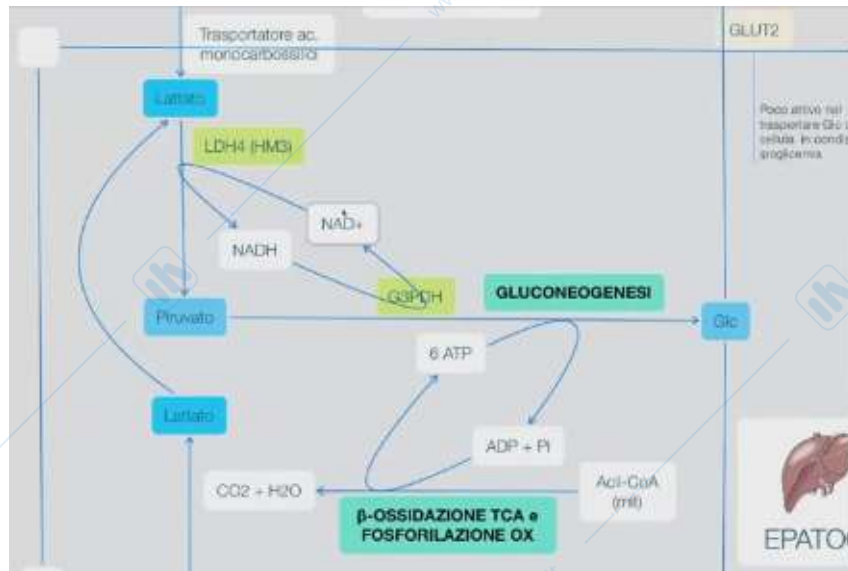
- Acil transferasi
  - $\text{Acil-CoA} + \text{DAG} \rightarrow \text{TAG}$
- Reazione netta
  - 1 ATP
    - Da Glc a DHAP (sarebbero 2 ATP per 2 DHAP quindi diviso 2 fa 1 ATP ciascuno)
  - 2.5 ATP
    - Equivalente in ATP del NADH necessario a ridurre il DHAP
  - 6 ATP (2x3)
    - ATP necessari per attivare 3 acili a acil-coa
  - TOTALE = 9.5 ATP
    - Per ogni molecola di TAG prodotta

## Ciclo di Cori

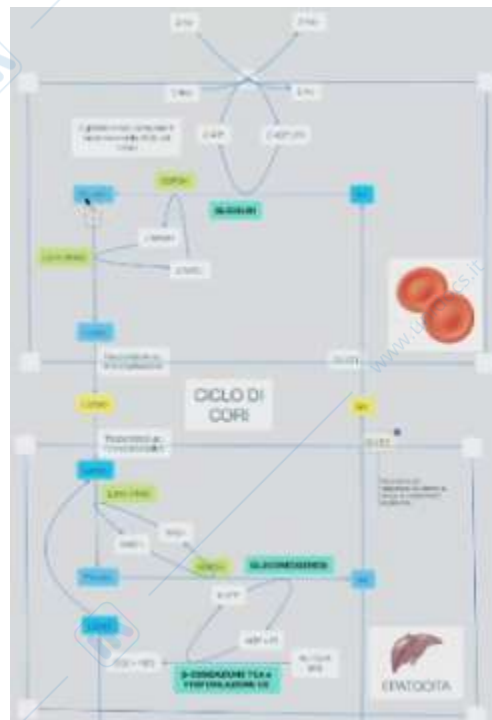
- Ciclo metabolico tra vari organi come epatociti e organi che non degradano in modo completo quindi irreversibile il glucosio (glicolisi anaerobia) come i GR o le fibre bianche del tessuto muscolare
- Globulo rosso deve utilizzare la glicolisi per produrre ATP, è l'unico modo per produrre energia metabolica
- ATP è fondamentale al GR per mantenere il gradiente di concentrazione degli elettroliti Na e K, la pompa consuma ATP che viene poi riprodotto tramite il consumo di glucosio a piruvato
- Glucosio entra nel GR con GLUT1 sulla membrana
- In una reazione della glicolisi si produce NADH dal  $\text{NAD}^+$  che è essenziale per l'ossidazione temporanea del glucosio perché il piruvato all'interno del globulo rosso non viene degradato ad acetil-coa ma, per azione della **lattato deidrogenasi** (HM3/LDH4), viene ridotto a lattato
  - LDH4 dà al GR la possibilità di proseguire la glicolisi ripristinando il coenzima nella sua forma ossidata
- Lattato prodotto esce dal GR attraverso un trasportatore dell'acido monocarbossilico che si trova sulla membrana, attraverso il sangue raggiunge l'epatocita attraverso un trasportatore specifico
- Nell'epatocita c'è sempre LDH4 e il lattato nell'epatocita viene ossidato nuovamente a piruvato
  - Epatocita mantiene costante ed elevato il rapporto tra  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  tant'è che nel citoplasma dell'epatocita c'è molto più  $\text{NAD}^+$  che NADH e questa reazione è favorita nella formazione dell'acido piruvico



- Piruvato viene trasformato in glucosio attraverso la gluconeogenesi (fegato) utilizzando il NADH appena prodotto dalla LDH4 per far avvenire al contrario la reazione catalizzata dalla G3PDH (GAPDH)



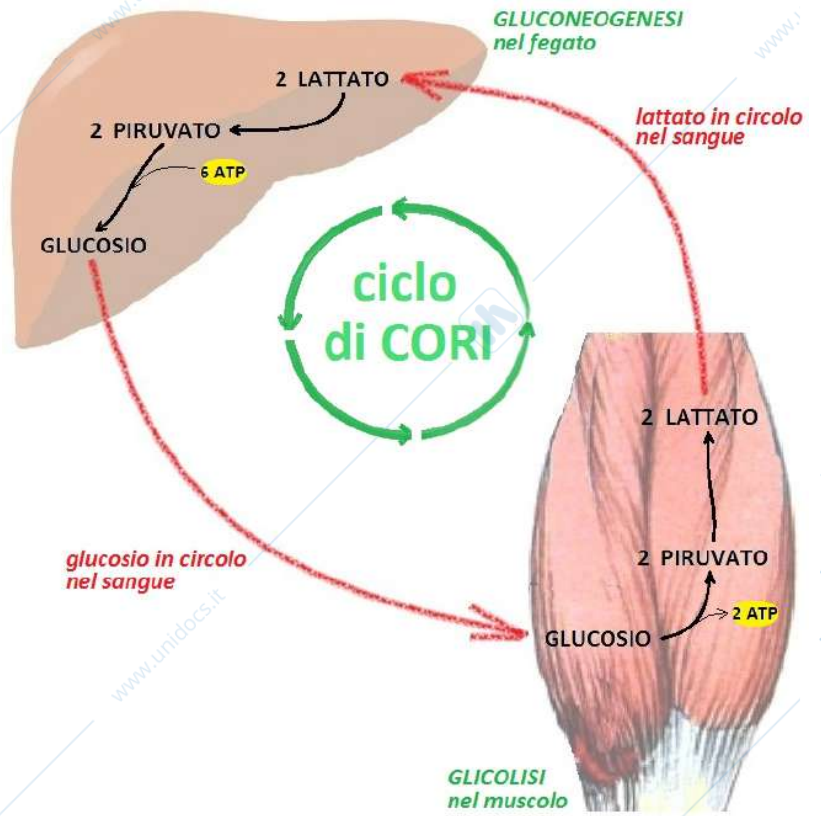
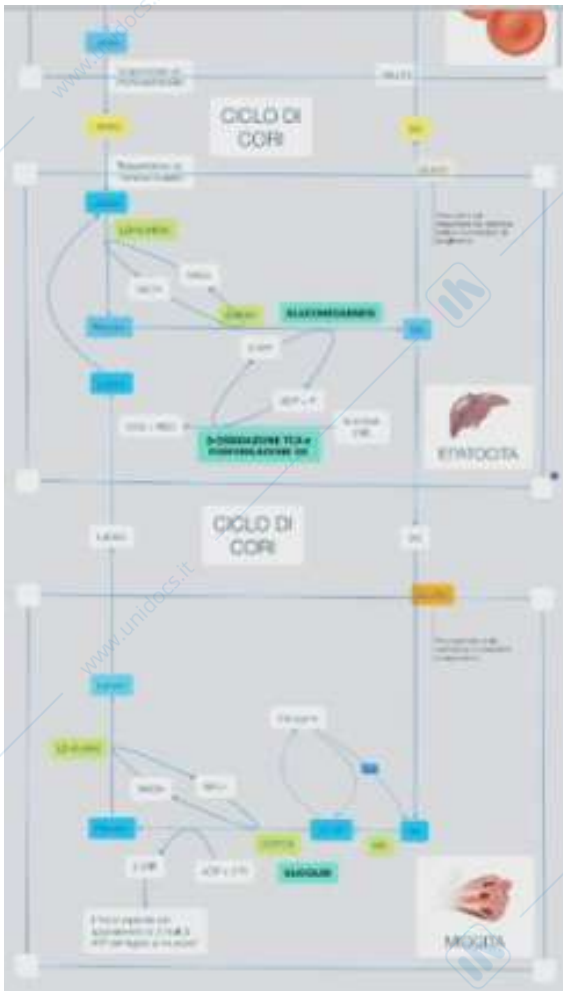
- Per far avvenire al contrario la trasformazione di piruvato in glucosio c'è bisogno anche di investire 6 ATP che devono essere consumate per consentire a 2 piruvato di trasformarsi in glucosio
  - ATP utilizzato proviene dalla beta-ossidazione degli acidi grassi
    - Quindi abbiamo un acil-coa mitocondriale che tramite beta-ossidazione (acetil-coa), ciclo di Krebs (CO<sub>2</sub> + ATP) e fosforilazione ossidativa (H<sub>2</sub>O) viene trasformato in CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + ATP
- Il glucosio prodotto in questo modo chiude il ciclo uscendo dall'epatocita tramite il GLUT2 e attraverso il sangue raggiungendo il GR (GLUT1)



- Dal punto di vista del bilancio netto, il ciclo di cori è il trasferimento di energia metabolica dall'epatocita al GR
  - GR guadagna 2 ATP per ogni molecola di glucosio che l'epatocita gli riinvia
  - Il fegato spende 6 ATP
- Il ciclo consuma energia metabolica che proviene dal consumo degli acidi grassi del fegato e degli acidi grassi che al fegato sono arrivati tramite il trasporto del sangue degli acidi grassi adipocitari



- Trasferimento di 6 ATP per solo 2 ATP effettivi

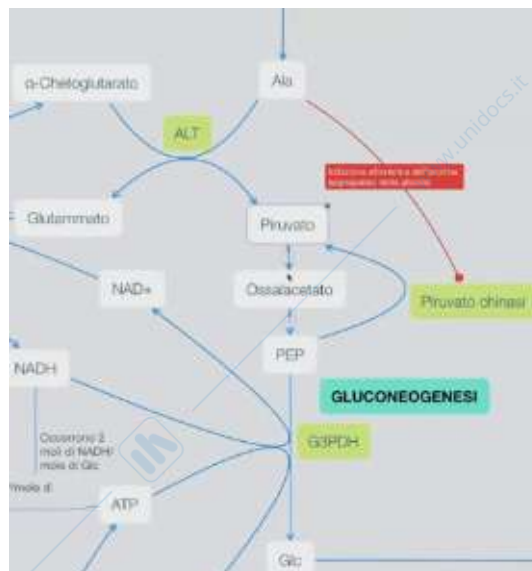


## Ciclo dell'alanina-glucosio

- Quando il muscolo non è in condizioni ipossiche e può usare l'ossigeno per ripristinare il NADH nella sua forma ossidata, avviene la glicolisi aerobia e quindi il piruvato non viene ridotto a lattato con la LDH ma viene usato dall'ALT per formare alanina
- Per fare questo il muscolo ha bisogno di amminoacidi che provengono dal bilancio tra i processi opposti di proteolisi delle proteine contrattili e di sintesi proteica per riformare proteine contrattili
  - Dentro il muscolo abbiamo amminoacidi che possono essere utilizzati per questo tipo di transaminazione
- L'amminoacido trasferisce al piruvato il gruppo amminico e si forma alanina
  - Piruvato + gruppo  $\rightarrow$  alanina
  - Amminoacido - gruppo  $\rightarrow$  alfa-chetoacido
    - Questo alfa-chetoacido potrà essere utilizzato per sintetizzare alfa-chetoglutarato, ossalacetato, piruvato per le sue attività metaboliche



- Alanina è uno dei due amminoacidi che il muscolo produce per inviare i gruppi amminici necessari per il catabolismo degli amminoacidi ma anche per trasferire uno scheletro carbonioso per la gluconeogenesi
- Alanina si accumula nel plasma e raggiunge il fegato dove abbiamo l'ALT che opera il processo opposto
  - Alfa-chetoglutarato + gruppo  $\rightarrow$  glutammato
  - Alanina - gruppo  $\rightarrow$  piruvato
- Piruvato attraverso la gluconeogenesi porta alla formazione di glucosio e quindi verrà rilasciato dalla cellula per chiudere il circuito (entra nel muscolo da GLUT4)

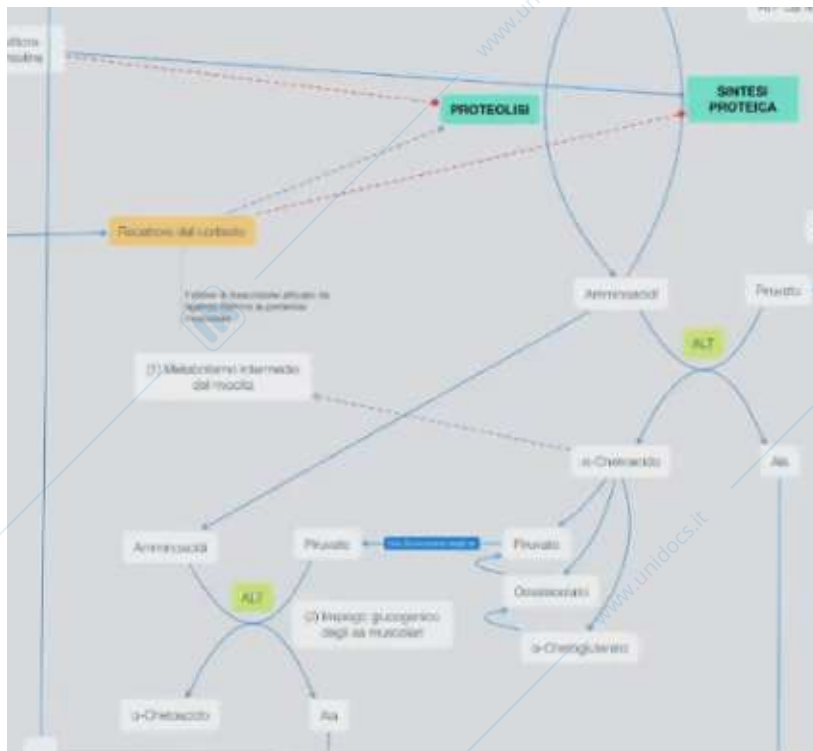


- Ciclo è un modo alternativo che il muscolo scheletrico ha per farsi risintetizzare dal fegato il glucosio fornendo non lattato ma alanina
  - Vantaggio è che alanina non è un acido e quindi non acidifica l'organismo

- o Alanina è un modo per eliminare i gruppi amminici in eccesso infatti il gruppo amminico che è passato al glutammato, attraverso la **glutammato deidrogenasi**, verrà rilasciato sotto forma di ammoniaca e come tale entrerà nella forma di urea che poi verrà eliminata attraverso l'escrezione renale



- In condizioni di digiuno prolungato il ciclo dell'alanina non è più un vero e proprio ciclo (quello normale si perché non si consuma nulla se non i gruppi amminici che vengono eliminati)
  - o Si rilascia **cortisolo** che aumenta il processo proteolitico e blocca la sintesi proteica si ha un accumulo di amminoacidi (che provengono dalla proteolisi delle proteine contrattili)
  - o Questi amminoacidi vengono transaminati in modo attivo dal muscolo scheletrico fornendo parecchia alanina la quale, rilasciata nel sangue, verrà utilizzata dal fegato per trasformarla in glucosio che poi verrà usato per mantenere la glicemia a valori normali
  - o Alanina porterà i gruppi amminici che poi verranno smaltiti dal fegato tramite l'urea



- Questo è il modo in cui i vari organi si organizzano nella propria attività metabolica per gestire di volta in volta i diversi fabbisogni energetici
  - o Muscolo fa catabolismo delle proteine depositarie degli scheletri carboniosi necessari per la sintesi di glucosio attraverso
    - Transaminazione
    - Formazione di uno dei due amminoacidi utilizzati per il trasferimento di questi gruppi al fegato
    - Occupazione del fegato per produrre
      - Glucosio che serve per mantenere glicemia in condizioni accettabili
      - Escrezione dell'ammoniaca che si accumula per l'effetto dell'aumentata proteolisi muscolare (FINE)