

La glicolisi

Il **glucosio** è uno dei metaboliti essenziali per il nostro organismo ed è regolato da complessi meccanismi.

La principale funzione del glucosio è quella di essere convertito in piruvato che viene poi ossidato per produrre ATP. Ma possiede anche altre funzioni:

- Può essere convertito in trigliceridi,
- Viene utilizzato per sintetizzare i polisaccaridi della matrice extracellulare,
- Può formare ribosio 5-fosfato attraverso la via del pentosio fosfato per la sintesi degli acidi nucleici,
- Una piccola parte contribuisce alla formazione di riserve di granuli di glicogeno, insolubile.

Il glucosio proviene da varie fonti:

- Dalla **dieta**,
- Dai depositi di **glicogeno**,
- Dal **piruvato**
- Da **precursori** con almeno **3-4 atomi di carbonio**, si tratta di scheletri carboniosi di aminoacidi o di glicerolo, che deriva a sua volta dall'idrolisi dei trigliceridi.

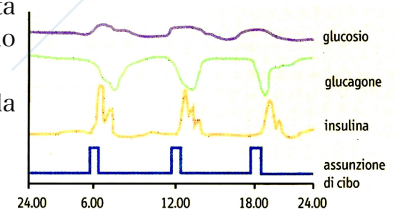
Il glucosio è una molecola molto stabile presente sia in **forma lineare** a bassa concentrazione, sia in **forma ciclica** α e β , ad alta concentrazione. Le forme cicliche del glucosio sono più stabili rispetto a quella lineare, la quale risulta più reattiva a causa del gruppo carbonilico libero.

In diversi contesti, il glucosio deve mantenere determinati valori per una corretta **omeostasi**:

- **160 g**, necessari per l'**organismo** in un giorno;
- **120 g**, usati solo dal **cervello**, che utilizza il glucosio come fonte principale di energia. Gli acidi grassi infatti non sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. In alcuni casi però, quando si verifica un basso apporto di carboidrati che va oltre i tre giorni, vengono utilizzati i corpi chetonici,
- **20 g**, glucosio in **circolo**,
- **190 g**, conservati sotto forma di **glicogeno** insolubile, usato dal tessuto muscolare quando viene sottoposto a uno sforzo elevato,
- **60-90 mg/100mL** o **3,6-5,8 mM**, **glicemia**, che equivale sempre al glucosio nel sangue,
- **40-60 mg/100mL** sono **dannosi** e provocano sintomi neurologici, fame, adrenalina, sudorazione e tremito,
- **0-40 mg/100mL** è ancora più **grave** e comporta letargia, convulsioni, coma, danni cerebrali permanenti e morte.

Il glucosio viene finemente regolato da vari ormoni, dei quali i principali sono prodotti dal pancreas:

- **L'insulina** (pancreas): diminuisce la glicemia poiché promuove l'ingresso del glucosio nel tessuto adiposo e muscolare e favorisce la sintesi di glicogeno lipidi e proteine; la risposta dell'insulina è molto rapida e immediata poiché a livelli troppo elevati di glucosio possono essere nocivi per l'organismo;
- Il **glucagone** (pancreas): aumenta la glicemia e favorisce la glicogenolisi, la gluconeogenesi e la chetogenesi,
- Il **cortisolo**, che è iperglicemizzante,
- **L'adrenalina**, anch'esso iperglicemizzante.



Il glucosio viene introdotto nel nostro organismo tramite varie fonti:

- Polisaccaridi: **amido** e **glicogeno**,
- Disaccaridi: **maltosio**, **lattosio** e **saccarosio**.

Amido —> omopolisaccaride di glucosio formato da strutture differenti, ovvero l'**amilosio**, una struttura lineare che contiene **legami α 1-4 glicosidici**, e l'**amilopectina**, che invece possiede una struttura ramificata (con ramificazioni ogni 24-30 residui) grazie all'aggiunta di **legami α 1-6 glicosidici**. Questa molecola permette di creare delle riserve energetiche nelle **piante**.

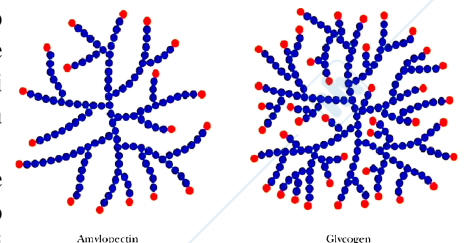
Glicogeno —> Struttura molto simile all'amido ma in questo caso le ramificazioni si presentano ogni 8-12 residui e si tratta quindi di molecole molto più ramificate. Le ramificazioni sono molto importanti poiché permettono di modulare la solubilità del glicogeno e di creare maggiori punti di attacco per gli enzimi che scindono i legami glicosidici.

Inoltre le ramificazioni presentano legami glicosidici differenti. Questa molecola stabilisce una riserva di energia nelle cellule **animali**.

Maltosio —> disaccaride costituito da due molecole di glucosio unite da **legami α 1-4 glicosidici**,

Lattosio —> disaccaride costituito da una molecola di glucosio e una di galattosio, epimeri che differiscono tra loro per il C4 e che sono legati tra loro da un **legame β 1-4 glicosidico**.

Saccarosio —> disaccaride costituito da una molecola di glucosio e una di fruttosio con **legame α 1-2 β glicosidico**.



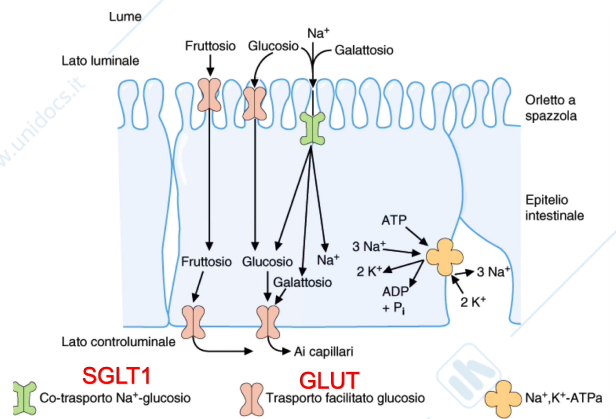
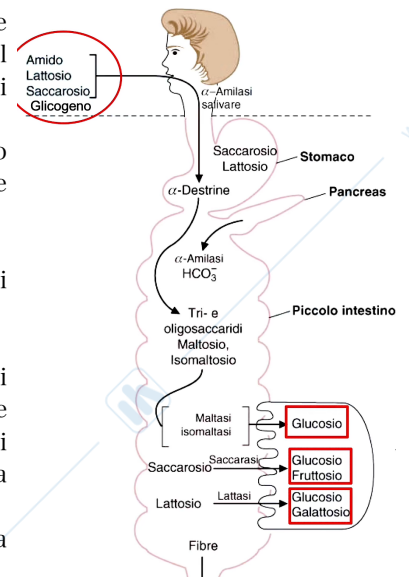
La digestione del glucosio inizia nella bocca, tramite l'enzima **amilasi salivare**, che dopo aver aggiunto lo stomaco viene denaturato a causa del pH acido, pH = 1-2. Nel frattempo i carboidrati proseguono nell'intestino dove vengono rilasciati altri enzimi che interagiscono con le varie fonti di glucosio:

- L'**amilasi pancreatica** spezza le catene lineari dei polisaccaridi, producendo molecole come il maltosio, il maltotrioso e le destrine limite che contengono le ramificazioni,
- L' **α -glicosidasi** scinde maltosio e maltotrioso in monomeri di glucosio,
- La **maltasi** è l'**isomaltasi** invece scindono le ramificazioni dei polisaccaridi contenute nelle destrine limite,
- La **saccarasi** e la **maltasi** scindono rispettivamente saccarosio e maltosio,
- La **lattasi** spezza i legami glicosidici del lattosio ma è un enzima che negli adulti tende a diminuire causando **intolleranza al lattosio**. Il lattosio non digerito viene circondato da acqua, aumenta quindi la ritenzione di acqua, e viene poi degradato dai metaboliti dei batteri, responsabili della sintomatologia tipica dell'intolleranza.

Durante il rilascio di questi enzimi viene anche secreto il bicarbonato che neutralizza il pH acido dello stomaco.

Una volta ottenuto il glucosio questo viene messo in circolo e raggiunge il fegato e tutto ciò che non può essere digerito viene metabolizzato dai batteri. I meccanismi che permettono di attraversare la parete intestinale sono due:

- **Diffusione facilitata**, un sistema di trasporto passivo che non richiede il consumo di energia poiché il glucosio si sposta secondo gradiente di concentrazione, tramite trasportatori appartenenti alla famiglia **GLUT**.
- **Cotrasporto**, che entra in gioco quando la concentrazione di glucosio nell'intestino è molto bassa. In questo caso si utilizza un simporto che sfrutta l'energia rilasciata dall'ingresso di Na^+ secondo gradiente di concentrazione. Il trasportatore utilizzato appartiene alla famiglia delle **SGLT**.



I trasportatori

I trasportatori sono proteine di membrana che consentono il passaggio di molecole grandi o polari attraverso la membrana plasmatica. Questi formano con il ligando formando dei legami deboli, che possono essere facilmente formati e scissi da un punto di vista energetico. Quando si forma il legame, il trasportatore subisce un cambiamento conformazionale, una variazione della struttura terziaria della proteina, e il ligando, come il glucosio, viene rilasciato sul versante opposto. Successivamente il trasportatore riprende la sua conformazione originale per legare altre unità di glucosio.

I trasportatori di glucosio sono molto vari e con funzioni e caratteristiche diverse: differiscono per le K_m , per le costanti di affinità, per il distretto in cui agiscono ecc.

GLUT-1 —> ha un sistema di trasporto ad **alta affinità** e lega anche basse concentrazioni di glucosio. La costante di affinità con il ligando è infatti $K_M=1.5\text{mM}$

Questo si trova nelle cellule che dipendono strettamente dal glucosio, come le cellule della **barriera emato-encefalica** e degli **eritrociti**, i quali non hanno mitocondri e ricorrono esclusivamente alla glicolisi per ricavare energia.

GLUT1 possiede anche alta velocità di trasporto.

GLUT-2 —> GLUT2 è la forma prevalente nel **fegato**, che possiede bassa affinità con il ligando. La sua costante di affinità è infatti $K_M=20/40\text{mM}$

GLUT-3 —> Si trova soprattutto in cervello e reni e possiede alta affinità: $K_M=1-5\text{mM}$

GLUT-4 —> trasportatore sensibile all'insulina, abbondante nel tessuto **adiposo** e nel tessuto **muscolare** scheletrico. In seguito alla produzione di insulina, promuove l'esposizione dei trasportatori del glucosio per esocitosi, solitamente contenuti in delle vescicole sul versante intracellulare. I trasportatori esposti sulla membrana permettono l'ingresso del glucosio nella cellula con una $K_M=5\text{mM}$ Se i livelli di insulina sono bassi, i trasportatori rientrano nella cellula per endocitosi. Cervello, fegato ed eritrociti invece possiedono un trasporto indipendente dall'insulina.

GLUT-5 —> si trova nell'intestino e permette l'assorbimento del fruttosio.

La glicolisi

La glicolisi permette di degradare una molecola di glucosio e di ossidarla a 2 molecole di piruvato, un α -chetoacido:



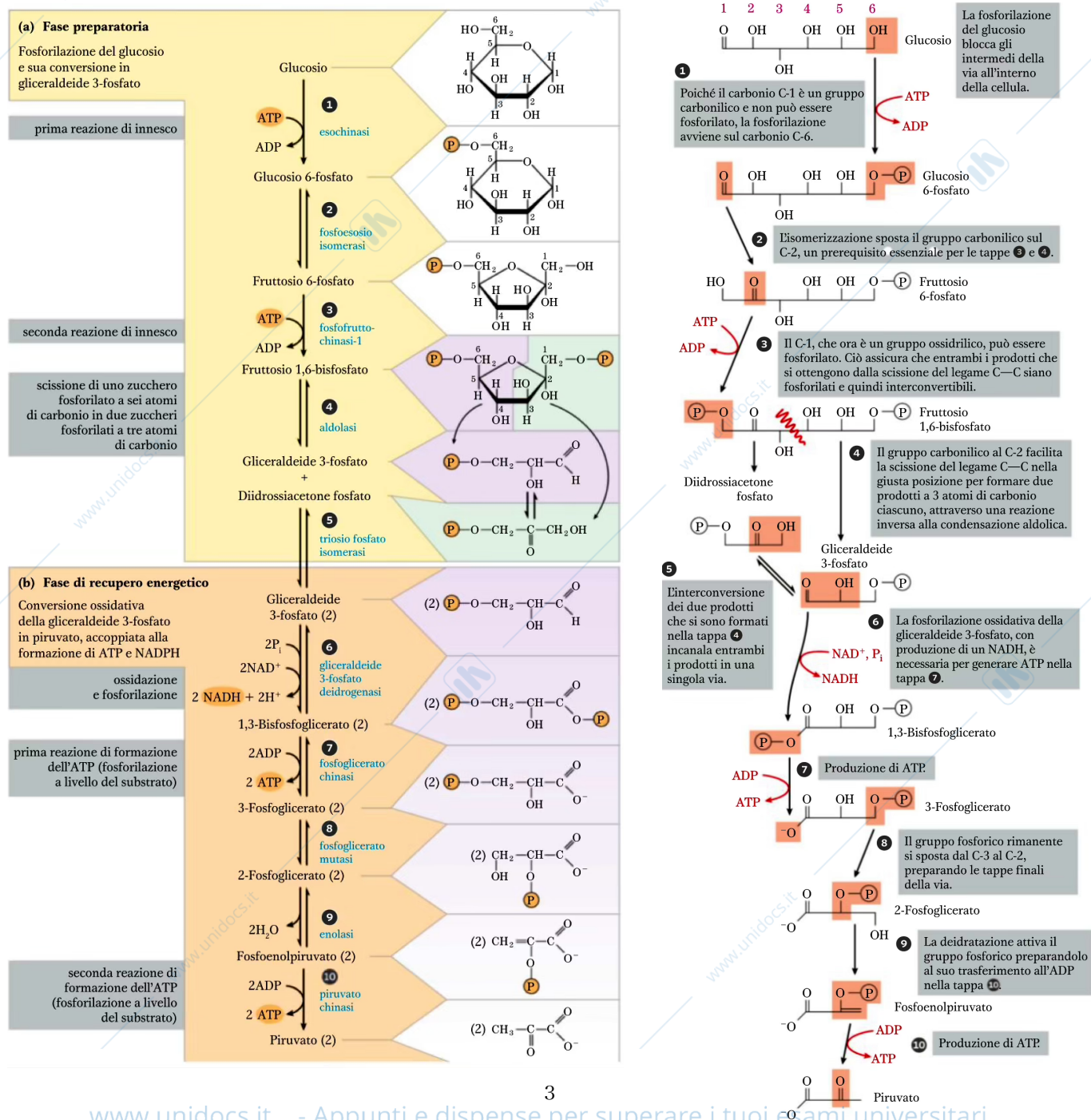
La glicolisi avviene in assenza di ossigeno ed è quindi anaerobia. Inoltre, avviene in tutte le cellule e si verifica nel citosol, dove si trovano tutti i suoi enzimi. In alcuni tipi di tessuti è l'unica fonte principale di energia come nel cervello, negli eritrociti e negli spermatozoi.

Anche le cellule tumorali prediligono l'utilizzo della glicolisi per formare energia, poiché permette anche la formazione di intermedi per le vie anaboliche. Produce intermedi che possono prendere vie alterative rispetto a quella di ossidazione del glucosio. La caratteristica della glicolisi è che può avvenire in condizioni anaerobiche, quando il muscolo è sotto stress e non risponde di ossigeno immediato.

La glicolisi è costituita da dieci tappe che vengono suddivise in due fasi:

- Una **fase preparatoria**, che comprende le prime 5 reazioni, in cui si ha un investimento energetico di ATP per aumentare il contenuto di energia libera dei composti e renderli più suscettibili alle reazioni di scissione a cui devono andare incontro e per impedire che questi composti escano dal citosol; in questa fase il glucosio viene scisso in due molecole di gliceraldeide 3-fosfato.
- Una **fase di recupero**, in cui le successive reazioni producono 4 ATP, generando un guadagno netto di 2 ATP. In questa fase invece le molecole di gliceraldeide 3-fosfato vengono trasformate in due molecole di piruvato.

Il vantaggio della glicolisi è di sintetizzare una quota di ATP anche in assenza di ossigeno, garantendo ad esempio al muscolo di poter proseguire la propria attività catabolica senza fosforilazione ossidativa. Tuttavia la maggior parte della sintesi di ATP avviene tramite la fosforilazione ossidativa che richiede ossigeno.



Qual è la funzione dei gruppi fosforici?

- Impedire che i composti fuoriescano dalla cellula, grazie al fatto che le membrane non possiedono trasportatori in grado di legare molecole fosforilate,
- Permettono di conservare l'energia metabolica, infatti quando i legami dell'ATP vengono rotti, parte dell'energia viene immagazzinata dagli esteri che si formano nella glicolisi, i quali poi restituiscono nuovamente l'energia all'ADP per formare ATP,
- L'energia contenuta nell'energia di legame con il gruppo fosforico permette di destabilizzare la molecola e abbassare l'energia di attivazione.

1	Glucosio + ATP \rightarrow glucosio 6-fosfato + ADP	-16,7	-33,4
2	Glucosio 6-fosfato \rightleftharpoons fruttosio 6-fosfato	1,7	da 0 a 25
3	Fruttosio 6-fosfato + ATP \rightarrow fruttosio 1,6-bisfosfato + ADP	-14,2	-22,2
4	Fruttosio 1,6-bisfosfato \rightleftharpoons diidrossiacetone fosfato + gliceraldeide 3-fosfato	23,8	da -6 a 0
5	Diidrossiacetone fosfato \rightleftharpoons gliceraldeide 3-fosfato	7,5	da 0 a 4
6	Gliceraldeide 3-fosfato + P _i + NAD ⁺ \rightleftharpoons 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H ⁺	6,3	da -2 a 2
7	1,3-Bisfosfoglicerato + ADP \rightleftharpoons 3-fosfoglicerato + ATP	-18,8	da 0 a 2
8	3-Fosfoglicerato \rightleftharpoons 2-fosfoglicerato	4,4	da 0 a 0,8
9	2-Fosfoglicerato \rightleftharpoons fosfoenolpiruvato + H ₂ O	7,5	da 0 a 3,3
10	Fosfoenolpiruvato + ADP \rightarrow piruvato + ATP	-31,4	-16,7

Durante la glicolisi, oltre all'ATP, grazie alla riduzione di NAD⁺ si ottengono delle molecole di NADH. Il NADH è un coenzima molto simile al NAD⁺ dal quale si distingue perché ha un gruppo fosfato in più. Tutte le vie cataboliche ossidative prevalenti nel mitocondrio che portano alla liberazione di elettroni, generalmente portano alla produzione di coenzimi ridotti come NADH e FADH₂, che usano il NAD e il FAD come accettori di elettroni. Le reazioni biosintetiche che hanno bisogno di equivalenti riducenti per avere elettroni, usano come donatore l'NADPH e si trovano nel citosol.

1° fase preparatoria

1° reazione: glucosio \rightarrow glucosio-6-fosfato

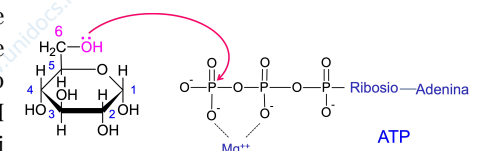
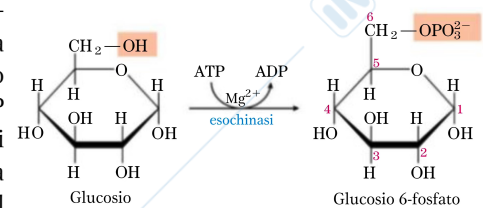
Nella prima tappa il glucosio viene dall'**esochinasi** convertito in glucosio 6-fosfato grazie all'aggiunta di un gruppo fosforico sul C6 proveniente da una molecola di ATP, realizzando una **sostituzione nucleofila**, in cui il nucleofilo ricco di elettroni si sostituisce al gruppo uscente che in questo caso è l'ATP che lascerà il gruppo fosfato al nucleofilo che è l'ossidrile del glucosio. Si tratta di una reazione irreversibile, accompagnata da una reazione ad alta energia. Il glucosio 6-fosfato infatti ha un potenziale di trasferimento del fosfato più basso dell'ADP, pertanto non potrà rilasciare il P_i all'ADP per formare ATP.

L'enzima che catalizza questa prima reazione si chiama **esochinasi** o **glucochinasi**, la cui azione dipende fortemente dal **magnesio Mg²⁺**, uno ione positivo che stabilizza le cariche negative dell'ATP. In particolare, protegge le cariche negative più interne tramite forze repulsive che impediscono l'interazione di queste cariche, rendendo l'atomo di fosforo terminale più accessibile all'attacco nucleofilo da parte dell'—OH del C6. Tramite la formazione di questi legami, l'esochinasi subisce dei cambiamenti conformazionali che permettono di avvicinare glucosio e ATP e soprattutto di escludere le molecole d'acqua, il cui ossigeno andrebbe a idrolizzare i legami fosfoanidridici dell'ATP. Senza questo catione quindi la chinasi risulta inattiva.

Questa tappa è un importante punto di controllo della via metabolica glicolitica: è una tappa irreversibile, con $\Delta G^0 \ll 0$, ma non è una tappa che limita la velocità. Questa reazione non avverrebbe in condizioni standard, ma risulta esoergonica nell'ambiente intracellulare, accoppiata all'idrolisi di ATP.

L'**esochinasi** è un enzima presente in varie isoforme, che si distinguono per la localizzazione tissutale e soprattutto per i parametri cinetici differenti che si adeguano alle esigenze metaboliche del tessuto in cui si trovano. Questi enzimi catalizzano la stessa reazione ma hanno la **K_m** diversa. La **K_m** è la concentrazione di substrato alla quale si misura la metà della velocità massima e una **K_m** alta indica una bassa affinità dell'enzima per il substrato, viceversa una **K_m** bassa, indica un'alta affinità. Ne esistono tre:

- L'**esochinasi I** (cervello) e l'**esochinasi II** (muscolo) sono dotate di una **K_m molto bassa (0,1 - 0,01 mM)**, quindi di un'affinità elevata, presente soprattutto nel cervello che viene privilegiato, anche se in determinate condizioni può usare anche i corpi chetonici;
- L'**esochinasi IV** (epatica) è chiamata anche glucochinasi e presenta una **K_m più alta (10 mM)**, ovvero meno affine. Infatti il fegato, prima di metabolizzare il glucosio, fa in modo di metterlo in circolo per renderlo a disposizione degli altri tessuti. Tenendo in considerazione che la concentrazione di glucosio deve essere mantenuta tra 4 e 5 mM nel sangue, la **K_m** dell'esochinasi IV sarà quindi maggiore della concentrazione di glucosio del sangue perché solo a quel punto il fegato può prendere il glucosio e metabolizzarlo.



L'esochinasi IV inoltre è **specifica** per il glucosio, mentre le altre due possono fosforilare anche il fruttosio, galattosio e mannosio

Infine, l'esochinasi I e II, a differenza dell'esochinasi IV, possono essere regolate tramite **inibizione allosterica**. Infatti quando c'è una concentrazione elevata di glucosio 6-fosfato, esso si lega ad un sito allosterico diverso dal sito catalitico e induce un cambiamento conformazionale bloccando l'enzima. L'esochinasi IV invece non è inibita dal prodotto perché il fegato può usare il glucosio in tanti modi diversi, ma viene comunque regolata da una proteina.

Fonti del glucosio 6-fosfato:

- **Fosforilazione** del glucosio libero,
- Scissione del **glicogeno** durante il digiuno notturno,
- **Gluconeogenesi**, una via che consiste nella formazione di glucosio a partire da uno scheletro carbonioso preformato che non necessariamente deriva da uno zucchero. Può derivare anche da un amminoacido o dal glicerolo stesso, molecola presente nei trigliceridi.

Destini del glucosio 6-fosfato:

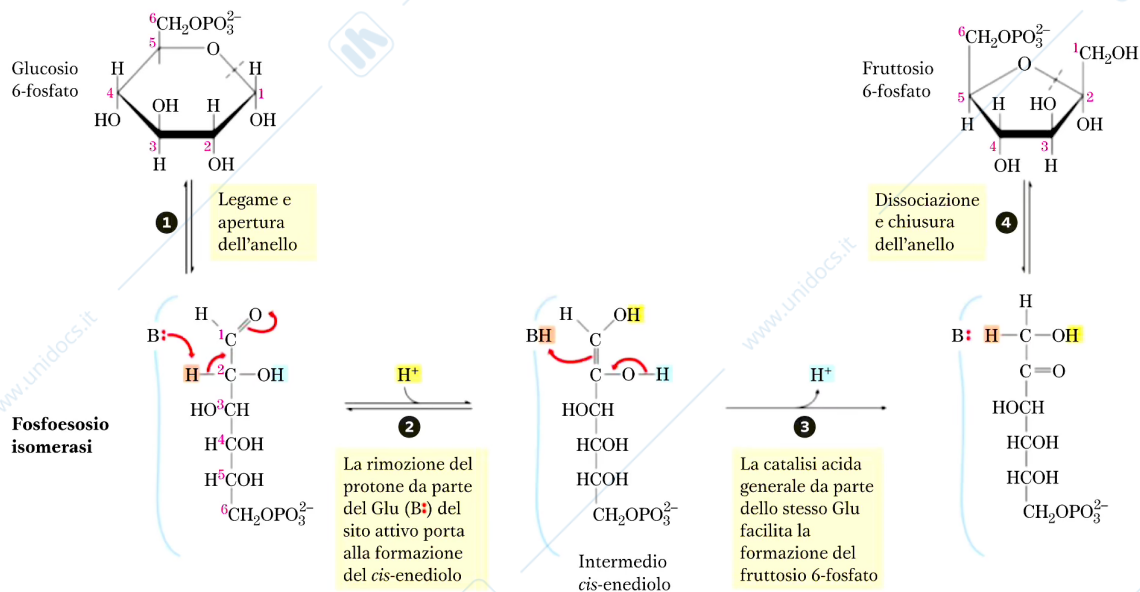
- **Piruvato** nella glicolisi,
- **Ribosio 5-fosfato** tramite la via del pentosio fosfato, una via fondamentale per la sintesi degli acidi nucleici,
- Glicogeno, nelle vie di sintesi di questo. Sintesi e demolizione di glicogeno infatti hanno come metabolita comune il glucosio 6 fosfato ma ci sono dei meccanismi di controllo così sofisticati in modo tale che sintesi e degradazione non avvengano contemporaneamente perché le condizioni che promuovono la degradazione del glicogeno sono diverse da quelle che ne promuovono la sintesi.

2° reazione: glucosio 6-fosfato \longrightarrow fruttosio 6-fosfato

Nella seconda reazione l'enzima **fosfoesoso isomerasi** catalizza una **isomerizzazione** del glucosio 6-fosfato in fruttosio 6-fosfato in cui:

- il gruppo aldeidico legato al C1 del glucosio 6-fosfato viene ridotto in gruppo alcolico,
- il gruppo alcolico del C2 viene ossidato a gruppo chetonico.

Si tratta di una **catalisi acido-base generale**, in cui le catene laterali degli amminoacidi che caratterizzano il sito catalitico possono comportarsi sia da acido che da base, come il Glutammato.



1. L'anello si apre, favorita dalla **catalisi acida** di un residuo di Lisina che dona un H⁺ al C5 (non rappresentato),
2. Un residuo di Istidina o Glutammato effettua una **catalisi basica** strappando un H⁺ al C2,
3. Si forma una specie instabile che prende il nome di **cis-enediolo** in cui vengono ridistribuite le cariche a causa della presenza del gruppo carbonilico: si forma un doppio legame tra il C1 e il C2, mentre l'ossigeno del gruppo carbonilico strappa gli elettroni del doppio legame e lega un protone H⁺,
4. Successivamente il residuo del sito catalitico effettua una **catalisi acida** e dona il protone H⁺ al C1,
5. Il doppio legame C1—C2 si spezza e si forma il gruppo chetonico,
6. Infine l'anello si richiude grazie ad un'ulteriore **catalisi basica** (non rappresentata) in cui una base del sito catalitico ruba un H⁺ al C5.

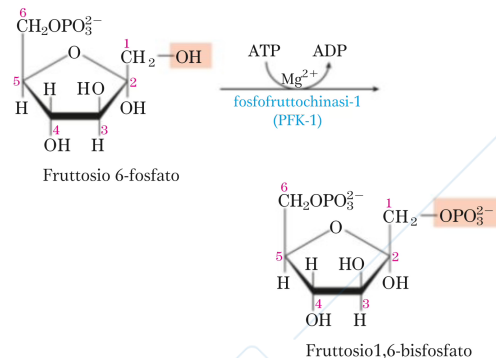
L'isomerizzazione è una reazione reversibile quindi è controllata solo per effetto di massa dalla **concentrazione dei substrati e dei prodotti**: se c'è tanto glucosio 6-P la reazione è spostata a destra, se c'è tanto fruttosio 6-P la reazione si sposta a sinistra. Non ci sono modificazioni covalenti e neanche meccanismi di regolazione allosterica.

N.B. l'ossidazione totale della molecola non cambia ma varia solo all'interno dei singoli elementi.

Questa reazione è molto importante poiché propedeutica alla scissione

3° reazione: fruttosio 6-fosfato → fruttosio 1,6-bisfosfato

La **terza fase** consiste nella fosforilazione del fruttosio 6-fosfato in fruttosio 1,6-bisfosfato tramite la chinasi **fosfofruttochinasi 1 (PFK1)**, che investe la seconda molecola di ATP. Questa è la seconda reazione irreversibile e quindi rappresenta un ulteriore sito di controllo che non viene regolato per effetto di massa. Questa reazione è molto importante per la via glicolitica poiché rappresenta una **tappa decisionale**, grazie al fatto che il fruttosio 1,6-bisfosfato è un intermedio esclusivo della glicolisi e non si trova in nessun'altra via metabolica.



N.B. Quando ci sono due gruppi fosfati legati a due gruppi diversi, bisogna utilizzare il prefisso **bis**. Se invece due fosfati che sono legati tra loro e a loro volta legati vengono a un altro gruppo si usa il prefisso di-fosfato.

La **PFK1** è un enzima regolato dalla **carica energetica**, che esprime la disponibilità di ATP che abbiamo. Nel nostro organismo può essere accumulata solamente una certa quantità di ATP e quando questa viene raggiunta la produzione di tale molecola deve essere fermata. Quindi quando questa quantità di ATP viene raggiunta, le vie che portano alla produzione di ATP vengono rallentate. Questo rallentamento avviene grazie a dei meccanismi di **regolazione allosterica**. Sulla base di ciò la PFK1 possiede due siti di legame per l'ATP:

- Un **sito catalitico ad alta affinità**, che lega l'ATP quando possiede basse concentrazioni e stimola l'enzima a far proseguire la via glicolitica;
- Un **sito allosterico a bassa affinità**, che invece lega l'ATP quando questa raggiunge alte concentrazioni e segnala all'enzima di rallentare la via della glicolisi, poiché la concentrazione di ATP è sufficiente. Questa concentrazione va da 2 mM a 3 mM.

Un'altra molecola che regola l'attività della PFK1 è il **citrato**, che regola anche altre vie come il ciclo di Krebs.

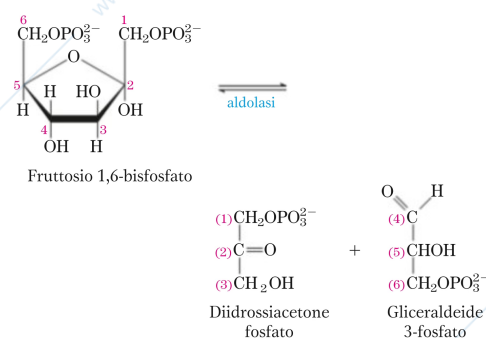
Ciò avviene perché il citrato è un prodotto del ciclo dell'acido citrico, via metabolica che accoglie i metaboliti che provengono dai carboidrati, dai lipidi e dagli amminoacidi per produrre alla fine CO₂. Quindi anche il citrato è una molecola in grado di comunicare quando la concentrazione di ATP è elevata e quindi quando le vie di produzione devono rallentare.

Oltre alla PFK1, il nostro organismo produce la **fosfofruttochinasi 2 (PFK2)** che, invece di catalizzare la conversione del fruttosio 6-fosfato in 1,6-fruttosio bisfosfato, catalizza la fosforilazione del fruttosio 6-fosfato in **fruttosio 2,6-bisfosfato**, una molecola in grado di andare a regolare ulteriormente l'attività della PFK1, che possiede un sito allosterico dedicato. La PFK2 in particolare possiede due siti catalitici in grado di catalizzare due reazioni differenti:

- Quando l'enzima è **defosforilato** assume **attività fosfatasica** catalizza la fosforilazione del fruttosio 6-fosfato, che a sua volta attiva PFK1;
- Quando l'enzima viene **fosforilato** invece assume **attività chinasi** che catalizza la defosforilazione del fruttosio 2,6-bisfosfato in fruttosio 6-fosfato, rallentando la glicolisi e favorendo la gluconeogenesi.

4° reazione: fruttosio 1,6-bisfosfato → diidrossiacetone fosfato + gliceraldeide 3-fosfato

Nella quarta parte della fase preparatoria avviene la scissione del fruttosio 1,6 bisfosfato in due triosi:



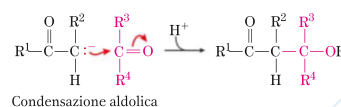
• Il **diidrossiacetone fosfato**, un chetotrioso,

• La **gliceraldeide 3-fosfato**, un aldotrioso,

ottenuti per **scissione aldolica** tramite

l'**aldolasi**, questa reazione corrisponde

all'inverso della **condensazione aldolica**, nella quale avviene la formazione del legame C—C in cui si ha un carbanione che si comporta da nucleofilo e un carbonio di un gruppo carbonilico che si comporta da elettrofilo, con formazione di un composto β idrossi-carbnilico. Nella scissione invece si verifica l'apertura dell'anello del fruttosio che all'inizio è legato nel sito catalitico dell'enzima nella sua forma stabile chiusa. Una volta aperta, la struttura risulta instabile e tende a scindersi.



Nella scissione risulta molto importante l'**isomerizzazione** della 2° reazione, infatti se il glucosio non fosse stato isomerizzato a fruttosio, durante questa scissione sarebbero stati prodotti due composti totalmente differenti. Grazie a ciò invece sono presenti un gruppo carbonilico in C2 e un gruppo ossidrilico in C4, che stabilizzano la struttura in modo tale da effettuare la scissione tra il C3 e il C4. Se il glucosio 6-fosfato non fosse stato isomerizzato, sarebbero stati prodotti due composti molto diversi tra loro: uno a due atomi di carbonio e uno a quattro atomi di carbonio che avrebbero dovuto prendere vie diverse.

Entrambi i triosi sono interconvertibili tra loro ed essendo entrambi fosforilati non possono uscire dalla cellula. Ciò è dovuto alla fosforilazione della terza reazione che permette di "bloccare" all'interno della cellula entrambe le molecole che si ottengono con la quarta reazione.

Quindi, se non ci fosse stata l'isomerizzazione del glucosio in fruttosio e la doppia fosforilazione, la reazione avrebbe prodotto due metaboliti differenti per cui usare enzimi diversi, in questo modo invece la glicolisi viene sdoppiata e per entrambi i metaboliti vengono usati ovviamente gli stessi enzimi, la reazione di scissione.

La reazione possiede un $\Delta G^{\circ} > 0$ ed è quindi endoergonica ma riesce comunque a procedere poiché viene accoppiata alla reazione successiva. La gliceraldeide 3-fosfato infatti viene subito sequestrata dalla reazione successiva e la concentrazione dei prodotti viene sempre mantenuta bassa, spostando la reazione verso destra.

Collegamento con metabolismo lipidi

Il Diidrossiacetone fosfato è un metabolita che appartiene anche alle vie metaboliche dei lipidi: la **glicerolo 3-fosfato deidrogenasi**, ad esempio è un enzima importante nel trasporto di elettroni dal citosol al mitocondrio per raggiungere la catena di trasporto degli elettroni, e può convertire il diidrossiacetone fosfato in glicerolo 3-fosfato, il precursore dei trigliceridi e dei fosfolipidi, tale per cui può portare, quando la concentrazione di diidrossiacetone fosfato è elevata e la glicolisi è attiva, alla sintesi dei trigliceridi e fosfolipidi.

Questa reazione può procedere anche in maniera inversa, grazie alla glicerolo chinasi presente nel fegato, che converte il glicerolo direttamente in glicerolo 3-fosfato. In caso di lipolisi attiva, per un'intensa attività fisica e quindi sotto stimolo di adrenalina, può aumentare la mobilizzazione dei grassi di riserva ed esserci glicerolo 3-fosfato disponibile. A quel punto la concentrazione di glicerolo 3-fosfato aumenta e la reazione si sposta verso sinistra.

5° reazione: diidrossiacetone fosfato \longrightarrow gliceraldeide 3-fosfato

L'ultima tappa della prima via è l'interconversione di diidrossiacetone fosfato in gliceraldeide 3-fosfato, per azione dell'enzima **triosofosfato isomerasi**. È una reazione reversibile, come tutte le isomerasi, la cui direzione è guidata dalla concentrazione dei substrati e dei prodotti: all'aumento della concentrazione di diidrossiacetone fosfato la reazione è spostata verso destra, mentre all'aumento della concentrazione di gliceraldeide 3-fosfato la reazione è spostata verso sinistra.

La reazione è in realtà favorita verso destra poiché la gliceraldeide 3-fosfato appena si forma viene immediatamente convertita nel prodotto successivo.

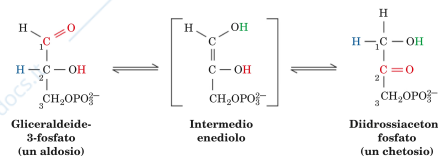


Quest'enzima è talmente efficiente che la velocità di produzione del prodotto a partire dal substrato è prossima alla velocità di diffusione, la quale controlla quanto tempo impiegano le molecole ad incontrarsi, a vincere l'attrito. Normalmente in acqua la velocità di diffusione è circa $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mentre qui è 10^8 , quindi molto elevata.

Come in tutte le isomerasi non si ha una ossidoriduzione totale ma una ossidoriduzione interna, per cui non cambia lo stato di ossidazione totale della molecola.

Si tratta di una **catalisi acido base**:

- Il gruppo basico del sito catalitico, cioè il glutammato, estrae un protone acido per la presenza del carbonile, e l'istidina stabilizza l'intermedio concedendo un altro protone.
- Il glutammato successivamente cede nuovamente il protone che lega il C1, mentre l'istidina ruba il protone precedentemente concesso.



Durante questa reazione si forma un intermedio molto tossico per il nostro organismo, l'enediolo, che però viene intrappolato all'interno del sito catalitico dell'enzima, rendendolo innocuo.

Senza l'enzima, questo intermedio verrebbe defosforilato e poi decomposto in **metil gliossale**, un composto molto reattivo che contiene un gruppo aldeidico che può reagire con un gruppo amminico formando una **base di Schiff** e dare luogo al fenomeno della **glicazione**, che si verifica senza catalisi quando il glucosio raggiunge elevate concentrazioni nel sangue. Durante questo processo, l'emoglobina liberata dagli eritrociti, reagisce con questo composto formando l'emoglobina glicata, che rappresenta un ottimo segno da indagare tramite analisi del sangue nel caso in cui si sospetti il diabete di tipo II.

L'esatta conformazione della triosofosfato isomerasi fa sì che l'intermedio non sia accessibile al solvente e ciò avviene grazie all'ansa che si muove occludendo il sito catalitico e si sposta solo nel momento in cui c'è il prodotto finale. Se non ci fosse questo sistema una parte del metil gliossale potrebbe in qualche modo sfuggire al sito catalitico e andare a reagire con i gruppi aldeidici.

I° fase di recupero

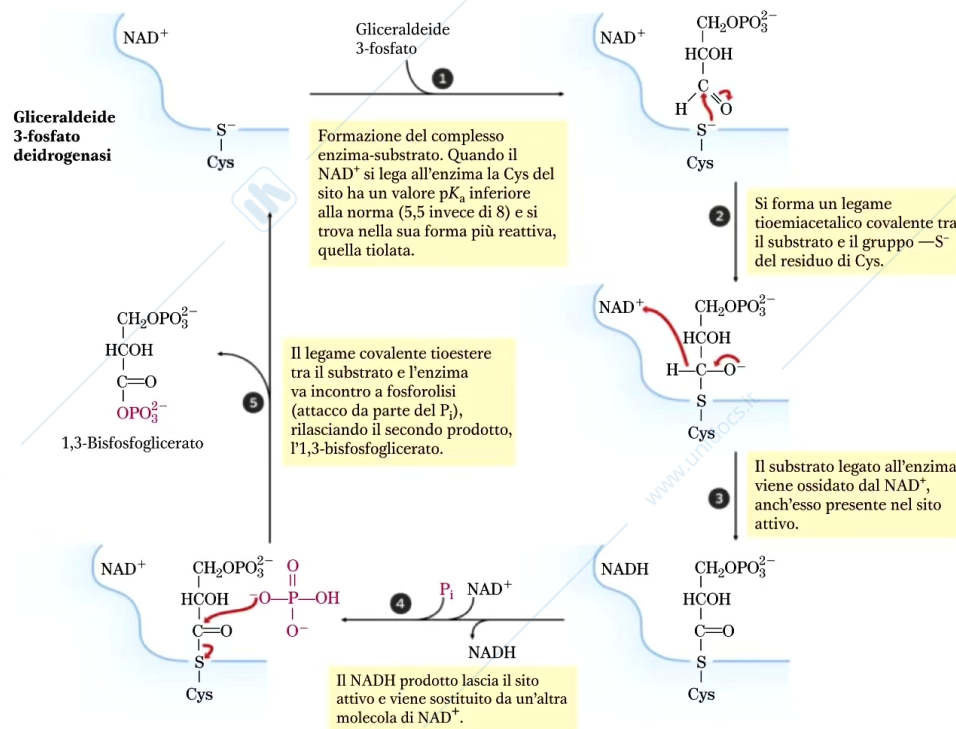
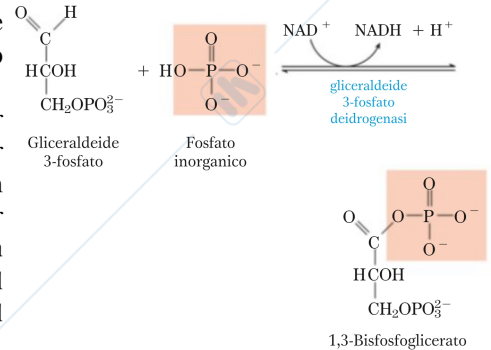
Questa fase porterà ad una produzione di energia che verrà immagazzinata in parte nelle 2 molecole di ATP, la parte restante invece tramite gli elettroni verrà trasferita al NAD^+ con formazione di NADH . Da qui può esserci produzione di energia, sia come fosforilazione a livello di substrato e quindi produzione di ATP indipendentemente dalla fosforilazione ossidativa, sia come produzione di NADH , che per essere riciclato e continuare ad accettare elettroni dovrà cedere i protoni alla catena di trasporto mitocondriale, per poi raggiungere l'ossigeno che sarà ridotto ad acqua e portare alla sintesi di ATP.

6° reazione: gliceraldeide 3-fosfato \longrightarrow 1,3-bisfosfoglicerato

La gliceraldeide 3-fosfato è il primo metabolita della fase di recupero che viene convertito in 1,3-bisfosfoglicerato dalla **gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi**.

Questa è una reazione molto importante dal punto di vista energetico, pur non essendo una reazione di controllo vera e propria, perché per poter funzionare ha bisogno di NAD^+ e non di ATP. Il gruppo fosfato stavolta non viene quindi dall'ATP ma si tratta di **fosfato inorganico** e l'energia per formare questo legame viene dal trasferimento degli elettroni dalla gliceraldeide 3-fosfato al NAD^+ , tramite una reazione di ossidazione del gruppo aldeidico che forma non un gruppo carbossilico ma un'anidride tra il gruppo carbossilico e l'acido fosforico.

Le reazioni di ossidazione che vengono da una specie a potenziale maggiore a una a potenziale minore infatti sono reazioni esoergoniche e quindi producono energia. L'energia che si libera dall'ossidazione viene utilizzata anche per la fosforilazione e dato che è stata fornita energia, il composto 1-3 bisfosfoglicerato, si trova ad un livello energetico molto elevato. La reazione quindi possiede un ΔG° positivo ma, grazie all'accoppiamento con la reazione successiva, il ΔG° totale delle due reazioni risulta essere negativo e quindi anche la sesta reazione procede regolarmente.



Tutte le **deidrogenasi** catalizzano le reazioni di ossidoriduzione attraverso un **coenzima**, che può essere NAD o FAD che, attraverso interazioni deboli, si lega alla deidrogenasi in un sito di legame specifico, un dominio definito **Rossmann Fold** uguale per tutte le deidrogenasi, in quanto devono svolgere lo stesso tipo di reazione, e ciò che cambia è la specificità del substrato.

In questo caso la deidrogenasi oltre al NAD , presenta una cisteina con un gruppo $-\text{SH}$ essenziale per la catalisi.

1. Quando il NAD si lega all'enzima, la cisteina assume un valore di pK_a di 5,5 invece di 8, la K_{cat} assume un valore più basso e si trova quindi in una forma più reattiva, cioè quella tiolata $-\text{S}^-$.
2. Quando il substrato entra nel sito catalitico forma un legame tioemiacetalico con il residuo di cisteina,
3. Successivamente il NAD ossida il substrato, strappando un protone al C1 in basso,
4. Il NADH viene rilasciato e viene sostituito da un nuovo NAD ,
5. Il substrato viene fosforilato da un fosfato inorganico e viene quindi rilasciato 1,3-bisfosfoglicerato.

La gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi è inibita da metalli pesanti come il mercurio, che reagisce con il gruppo SH della cisteina, bloccando l'attività dell'enzima e quindi la glicolisi, dai cui appunto sorge il cosiddetto avvelenamento da mercurio.

NAD/NADH — NADP/NADPH

NAD è un coenzima che partecipa alle reazioni di ossidoriduzione e funziona sia da accettore (NAD) che donatore (NADH) di elettroni. È composto da un nucleo detto **nicotinammide adenina dinucleotide**, di cui l'adenina non partecipa direttamente alle reazioni. Il nucleo funzionale è quello della **nicotinammide**, che è in grado, grazie alla presenza di elettroni localizzati e dell'azoto, di stabilizzare la carica e di esistere sia nella forma ridotta che ossidata.

La nicotinammide è una vitamina idrosolubile che deriva dalla niacina e può essere anche formata a partire dal triptofano. Questo però non è sufficiente, motivo per cui va introdotto con la dieta.

Il NAD è quindi una molecola molto preziosa che non possiamo sintetizzare se non in piccole parti e quindi deve essere continuamente riciclata. NAD infatti non viene mai metabolizzato, rimane sempre lo stesso continua a ossidarsi e ridursi.

Quando si ha una carenza di NAD, i prodotti della glicolisi non vengono più metabolizzati dal ciclo di Krebs ma vanno incontro a **fermentazione**.

Quando siamo sotto sforzo e la quantità disponibile di NAD non è in grado di soddisfare le richieste del muscolo, il piruvato viene convertito in acido lattico attraverso una reazione di riduzione per recuperare NAD, il quale si ottiene dal NADH che viene ossidato; nel frattempo l'acido lattico viene trasportato al fegato per dare seguito alla glicolisi.

La fermentazione è quindi una sorta di bypass temporaneo che consente all'organismo, soprattutto al muscolo e al fegato, di riadattarsi ad una nuova velocità. La concentrazione di NAD è minore o uguale a 10^{-5} M, il che è molto inferiore a quella di glucosio tale per cui, il NADH deve essere continuamente riossidato per rigenerare NAD.

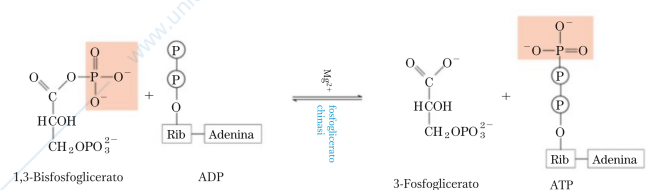
La glicolisi è l'unica via in grado di produrre ATP anche in condizioni di anaerobiosi e quindi risulta essere una via metabolica essenziale per l'**eritrocita** che non ha mitocondri. Nonostante il metabolismo degli eritrociti è ridotto, poiché la sua funzione è principalmente quella di contenere emoglobina e trasportarla, ha comunque delle sue esigenze, che vengono appunto sostenute dalla glicolisi.

L'energia ricavata dalla glicolisi è necessaria per la produzione di **2,3-bisfosfoglicerato**, a partire dall'1,3-bisfosfoglicerato, attraverso l'enzima **bisfosfoglicerato mutasi**. Questi due composti si differenziano solo per il fatto che il fosfato, invece di stare legato al carbonio 1, si trova in posizione 2.

Il 2,3-bisfosfoglicerato è un effettore allosterico dell'emoglobina che modula il rilascio di ossigeno, legandosi tra le subunità α e β . In particolare, stabilizza la forma deossigenata attraverso un'interazione elettrostatica con l'interfaccia tra le due subunità. Quindi ad esempio il 2,3-bisfosfoglicerato è importante quando diminuisce la pressione parziale dell'ossigeno come quando andiamo in alta montagna. In queste situazioni infatti alcune persone subiscono il cosiddetto mal di montagna, un affaticamento che si percepisce quando si passa dal livello del mare ad alta montagna. N.B. il 2-3 bisfosfoglicerato si lega in prossimità dell'interazione α e β , per cui non è in grado di legarsi all'emoglobina fetale costituita dalle subunità α e γ . Nelle prime settimane di vita quindi, finché l'emoglobina non è completamente adulta e le subunità γ non saranno sostituite completamente da quelle β , i bambini non andrebbero spostati, ad eccezione di chi è nato in alta montagna ed è già adattato a quelle condizioni.

7° reazione: 1,3-bisfosfoglicerato \longrightarrow 3-fosfoglicerato + ATP

In questa reazione 1,3-bisfosfoglicerato trasferisce un gruppo fosfato a una molecola di ADP e si trasforma in 3-fosfoglicerato, producendo quindi la **prima molecola di ATP**. Questa reazione viene catalizzata dalla **fosfoglicerato chinasi**, che catalizza la reazione in entrambe le direzioni. Questa è una reazione fortemente esoergonica che viene accoppiata alla precedente tramite l'intermedio comune 1,3-bisfosfoglicerato



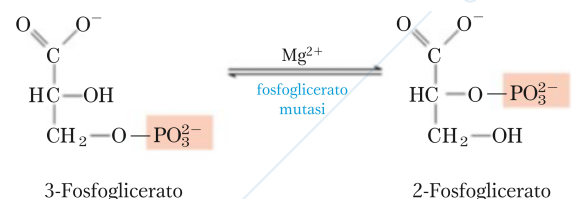
8° reazione: 3-fosfoglicerato \longrightarrow 2-fosfoglicerato

Dal 3-fosfoglicerato si passa al 2-fosfoglicerato che richiede magnesio per stabilizzare le cariche negative. Grazie a ciò, si forma un composto β -idrossicarbonilico, in cui un carbonio è legato ad un gruppo ossidrilico in posizione β rispetto al gruppo carbonilico. La reazione viene catalizzata dalla **fosfoglicerato mutasi**.

N.B. Il carbonio alfa è quello che si trova legato al gruppo carbonilico. L'enzima è una mutasi che ha il compito di staccare un gruppo fosfato legato con un legame covalente e spostarlo su un altro. Durante la catalisi avviene la formazione di 2,3-bisfosfoglicerato che viene poi convertito in 2-fosfoglicerato.

L'enzima possiede nel sito catalitico un residuo di istidina, che ha un pK_a che si trova vicino alla neutralità. Quindi a $pH=7$ lo si può trovare sia protonato che deprotonato

L'istidina cede il gruppo fosfato al 3-fosfoglicerato e si forma l'intermedio 2,3-bisfosfoglicerato. Successivamente il gruppo fosfato del C3 viene restituito all'istidina, rigenerando l'enzima. Si tratta quindi di una **catalisi acido base**.

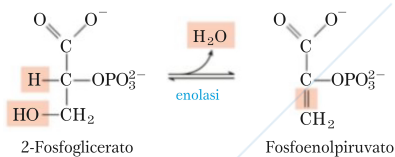


9° reazione: 2-fosfoglicerato \longrightarrow fosfoenolpiruvato

Il 2-fosfoglicerato, che ha il gruppo fosfato in posizione 2, in presenza di **enolasi**, va incontro a disidratazione, cioè eliminazione di una molecola d'acqua, e si forma il fosfoenolpiruvato. È una reazione di eliminazione di una molecola d'acqua molto comune nelle vie metaboliche. La reazione avviene in corrispondenza tra il carbonio α e il carbonio β .

Il **fosfoenolpiruvato** non è un composto instabile ad alta energia perché:

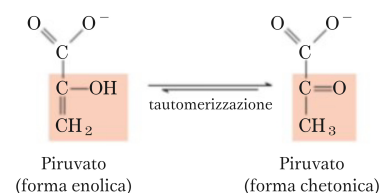
- Ci sono cariche negative vicine e non c'è possibilità di stabilizzarle mediante delocalizzazione (ci sono legami covalenti e non semplici);
- Il doppio legame tra due atomi di carbonio non permette la delocalizzazione perché è un legame rigido;
- Si tratta di una molecola che si trova ad un livello energetico molto alto.



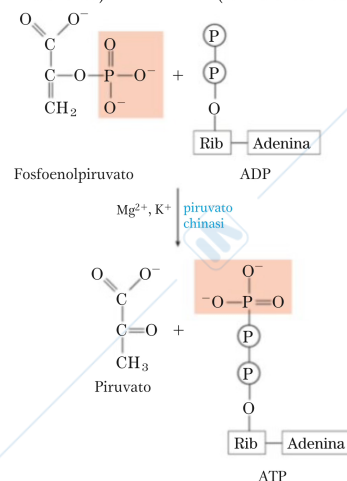
Quindi il fosfoenolpiruvato è stato caricato di energia per consentire la reazione successiva che appunto richiede energia e si tratta di una fosforilazione a livello del substrato, ovvero la sintesi della seconda molecola di ATP. Quindi il fosfoenolpiruvato è un intermedio ad alto potenziale energetico con $\Delta G^0 > 0$, ma nelle condizioni intracellulari la reazione può avvenire poiché accoppiata alla successiva.

Il gruppo fosfato mantiene il fosfoenolpiruvato in una forma instabile: la forma enolica in cui si ha un doppio legame C=C legato all'ossigeno. Il fosfoenolpiruvato risulterebbe più stabile nella forma chetonica ma non si può formare poiché bloccato dal gruppo ossidrilico. È quindi chiaro che questa forma altamente instabile si trova ad alto potenziale di trasferimento.

N.B. La forma chetonica e la forma enolica si chiamano **tautomeri** (tautomeria chetoenolica): sono degli isomeri strutturali che differiscono soltanto nella posizione degli atomi di idrogeno e dei legami doppi.

**10° reazione: fosfoenolpiruvato \longrightarrow piruvato + ATP**

Il gruppo fosforico del fosfoenolpiruvato viene trasferito all'ADP, con formazione di piruvato e di ATP. L'ADP possiede un potenziale di trasferimento più alto più basso del fosfoenolpiruvato è quindi riceve il fosfato formando ATP. Questa reazione viene catalizzata dalla **piruvato chinasi**. L'eliminazione del gruppo fosfato, inoltre, favorisce la forma chetonica rispetto a quella enolica.

**Considerazioni sulla glicolisi**

Durante il processo di glicolisi:

- Sono state consumate 2 molecole di ATP:
 - ➔ Una molecola di ATP per fosforilare il glucosio,
 - ➔ Un'altra per fosforilare ulteriormente il fruttosio-6-fosfato,
- Sono state guadagnate 2 molecole di ATP nella formazione del 3-fosfoglicerato e altre 2 nella formazione del piruvato

Il guadagno netto finale è di 2 molecole di ATP.

Nel piruvato c'è ancora tanta energia poiché ci sono ancora tanti atomi di carbonio da ossidare. Infatti con la glicolisi si ha una produzione di energia uguale a -85kJ/mol, mentre con l'ossidazione completa si hanno -2840kJ/mol.

A questo punto il piruvato, una volta formato dalla glicolisi nel citosol, può seguire due strade:

- Viene ossidato completamente a CO_2 e H_2O quindi entra come AcetilCoA nel **ciclo di Krebs**, nel mitocondrio,
- Viene ridotto a lattato attraverso un processo che viene chiamato **fermentazione**.

Funzioni della glicolisi

La glicolisi è una via che serve ad ossidare parzialmente il glucosio per produrre 2 molecole di ATP,

La glicolisi fornisce i precursori per alcune vie biosintetiche:

- Nell'effetto di Warburg, caratteristico delle tumori, le cellule tumorali preferiscono usare la glicolisi piuttosto che la respirazione aerobia perché hanno bisogno di costruire, espandersi e dividersi, tramite scheletri carboniosi che derivano dalla glicolisi,
- Deviazione sul metabolismo dei lipidi: il diidrossiacetone fosfato può essere convertito in glicerolo 3-fosfato, il precursore dei trigliceridi e dei fosfolipidi, tale per cui può portare, quando la concentrazione di diidrossiacetone fosfato è elevata e la glicolisi è attiva, alla sintesi dei trigliceridi e fosfolipidi.
- Può formare precursori di amminoacidi non essenziali
 - 3-fosfoglicerato: può essere convertito in serina, che è precursore della cisteina e della glicina,
 - Piruvato: è precursore di amminoacidi perché può essere convertito in alanina per mezzo di transaminasi e poi nella valina, isoleucina e leucina.

La fermentazione lattica

La **fermentazione** consente la produzione di energia in assenza di ossigeno.

In condizioni fisiologiche un'intensa attività muscolare o svariate condizioni patologiche possono provocare una **carenza di ossigeno**, che in realtà si tratta di una condizione in cui l'ossigeno non riesce a ricevere tutti gli elettroni che provengono dalle ossidazioni a causa della carenza di **NAD**, quindi per una questione di flusso, il piruvato viene ridotto in **lattato**, in una reazione di riduzione, per rigenerare **NAD⁺**. Inoltre, se non c'è **NAD** la glicolisi si blocca, perché si blocca la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi.

Glicolisi e gluconeogenesi hanno luogo entrambe nel citosol ma quando facciamo uno sforzo eccessivo il glucosio va incontro a fermentazione e viene convertito in **lattato**, viene inviato nel fegato che lo trasforma in glucosio tramite la gluconeogenesi e ritorna al muscolo. Nel frattempo le condizioni si sono normalizzate per quando riguarda il riciclaggio di **NAD** e quindi tutto questo processo ritorna alla normalità.

In condizioni normali, la concentrazione di lattato è minore di **2mM**; quando si verificano condizioni di acidosi lattica, la concentrazione del lattato è intorno a **5mM** perché il fegato non riesce a smaltirlo e il pH scende a 7,2.

Perché si va in acidosi se ci sono i sistemi tampone nel sangue?

Perché i sistemi tampone funzionano solo in un intervallo di pH limitato.

La reazione è molto semplice, reversibile e viene catalizzata dall'enzima **lattato deidrogenasi**.

Questa reazione avviene nel muscolo che si contrae e consuma ATP così velocemente che la cellula non riesce a stare al passo. Di conseguenza, il **NADH** non viene rigenerato alla stessa velocità alla quale viene consumato ATP e non si riesce a mantenere lo stato stazionario. Perché quindi è importante rigenerare **NAD⁺**? Perché la sua concentrazione è bassa e perché se non c'è **NAD⁺** la glicolisi si blocca, perché si blocca la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi.

La fermentazione lattica è **NADH** dipendente, reversibile, ma nel caso in cui sia necessario **NAD⁺** la reazione è spostata verso destra. Le deidrogenasi sono tutte reversibili, per cui sono 'controllate dai substrati', in questo caso quello che spinge la direzione della lattato deidrogenasi è la concentrazione elevata di **NADH**. La rigenerazione di **NAD⁺** è importante per far progredire la glicolisi.

La **lattato deidrogenasi** è un enzima polimerico presente in più isoforme. Ciascuna di queste isoforme è un tetramero formato da quattro subunità che possono essere diversamente assortite. Nei vari tessuti queste isoforme si trovano diversamente assortite:

- Nel cuore e negli eritrociti vi è una prevalenza di subunità H (heart),
- Nel muscolo scheletrico e nel fegato vi è una prevalenza di subunità M (muscle).

Quando c'è un danno tissutale vi è lisi di cellule, vengono messi in circolo metaboliti di enzimi che normalmente non sono presenti e con un'analisi del sangue è possibile evidenziare una quantità diversa di questi enzimi nel sangue, in particolare della lattato deidrogenasi, in seguito a danno tissutale a livello epatico, del muscolo scheletrico, del muscolo cardiaco.

Perché la lattato deidrogenasi può costituire un supporto alla diagnosi del danno? Perché queste isoforme si distinguono per i parametri cinetici e per la mobilità elettroforetica. L'**elettroforesi** è quella tecnica che permette di separare proteine e acidi nucleici quando sottoposti su campo elettrico su base della carica e del peso molecolare. Dal profilo elettroforetico si può stabilire se c'è una prevalenza di subunità H o di subunità M e quindi si può stabilire se il danno è a livello del muscolo cardiaco o a livello del muscolo scheletrico o ancora livello epatico.

Abbiamo 5 tipi di isoforme:

- LDH1 → HHHH → cuore ed eritrociti
- LDH2 → HHHM → cuore ed eritrociti
- LDH3 → HHMM → cervello e rene
- LDH4 → HMMM → muscolo e scheletrico e fegato
- LDH5 → MMMM → muscolo e scheletrico e fegato

Alcune cellule come gli eritrociti, senza mitocondri, o le cellule del cristallino, con pochi mitocondri, prendono l'ATP dalla glicolisi e la fermentazione è l'unica via per poter rigenerare il **NAD⁺**.