

ENZIMI

Catalizzatori biologici di tutte le nostre reazioni.

Hanno un ruolo essenziale i catalizzatori della nostra fosforilazione.

Le proteine non sono strutture rigide, ma flessibili, ovvero strutture che sono tenute insieme da interazioni deboli. Il riconoscimento del substrato metabolico è legato al fatto che le proteine sono flessibili, e sono in grado di interagire con altre sostanze. La struttura, pur flessibile, è essenziale per l'integrità della proteina, dunque anche dell'enzima.

L'ossigeno è l'accettore ultimo degli idrogeni che vengono strappati dai nostri nutrienti.

Il collagene è una proteina strutturale perché si trova nel tessuto connettivo, nelle articolazioni, nella matrice extracellulare della cellula. È una proteina resistente, a parità di diametro ha la stessa resistenza dell'acciaio.

La tripsina è secreta dal pancreas.

Le proteine sono tutte omogenee dal punto di vista strutturale. Il gene, prima di essere tradotto nella proteina finale, può ricevere dei tagli -o splicing- per cui da un gene possono nascere più proteine, che vengono sintetizzate a livello dei ribosomi; da un punto di vista strutturale sono accumulate dal fatto di essere polimeri costituite da amminoacidi.

- **La temperatura velocizza le reazioni**, è in grado anche di denaturare le proteine. Tutte le reazioni sono catalizzate, ovvero sotto il controllo degli enzimi: catalisi = acceleratore; gli enzimi velocizzano le reazioni!
- **Gli enzimi hanno natura proteica**
- **Gli enzimi sono specifici**, non catalizzano qualsivoglia reazione: ogni enzima catalizza una specifica reazione. Questo è un vantaggio complessivamente, ma potrebbe anche essere uno svantaggio perché non c'è ordine metabolico vista la vastità di reazioni.
- **Gli enzimi sono catalizzatori molto efficienti**, un enzima è in grado di processare migliaia di molecole per secondo o minuto. La quantità di enzimi in un estratto di organo è, infatti, difficile da quantificare. La concentrazione di enzimi non è quantificabile a livello quantitativo, ma attraverso la velocità della reazione. (tot unità enzimatica=misura strettamente legata alla velocità, serve a "quantificare" gli enzimi).

La maggior parte dei farmaci hanno come obiettivo degli enzimi, sono degli attivatori o inibitori di enzimi. Un processo patologico a pari di un processo fisiologico è determinato da eventi catabolici determinati da enzimi. Gli enzimi sono importanti anche come indicatori clinici di stati patologici. Per diagnosticare un qualcosa si fa un'analisi clinica di alcuni enzimi del sangue come primo passo.

L'anidrasi carbonica, per esempio, catalizza la reazione dell'anidride carbonica con l'acqua per formare l'acido carbonico, reazione che avviene spontaneamente. In presenza di questo enzima la reazione viene velocizzata di 10 milioni di volte in più.

Perché se è spontanea viene velocizzata? La CO₂ a livello cellulare è un gas, dunque è poco solubile in acqua. Dunque, una sostanza è "tossica" in base al contesto in cui è inserita. L'anidrasi carbonica è essenziale per abbassare la concentrazione di CO₂ nei tessuti.

- **Gli enzimi si comportano come interruttori molecolari**. La reazione senza l'enzima non avverrebbe, sarebbe molto più lenta; dunque, il solo fatto di esprimere o meno l'enzima, permette di regolare un processo in termini di "on" o "off".

NOMI E CLASSIFICAZIONE:

- **Ossido-reduttasi** → trasferimento di elettroni o atomi di H da una molecola ad un'altra
- **Transferasi** → trasferimento di gruppi funzionali da una molecola ad un'altra
- **Idrolasi** → idrolisi. Rottura di legami per addizione di una molecola d'acqua
- **Liasi** → rimozione di gruppi da un substrato con reazioni diverse dall'idrolisi
- **Isomerasi** → conversioni tra isomeri
- **Ligasi** → formazione di legami tra due molecole

Come funzionano gli enzimi?

Innanzitutto, sono identificabili da nome: hanno come desinenze: -ina e -asi (più frequente); in più un codice numero EC (Enzyme Commission/es. la lattato deidrogenasi ha come EC 1.1.1.1.27).

In una reazione i reagenti devono "incontrarsi". I legami si devono rompere e questo richiede energia (energia di attivazione); questa si forma perché le molecole si scontrano con una velocità sufficiente (**urto efficace**). A basse temperature l'ossigeno e il metano, per esempio, non reagiscono; perché per rompere legami stabili ci deve essere un'energia sufficientemente alta. La reazione avviene solo quando le molecole che reagiscono sono molto vicine al punto di toccarsi. L'enzima ha proprio la capacità di avvicinare le molecole tra loro. È necessario, pertanto, rompere i legami vecchi e fare incontrare i giusti substrati affinché avvenga la reazione. Una volta messe insieme le sostanze, l'enzima agisce rompendo queste due molecole che aveva avvicinato in una prima fase.

Perché l'enzima riesce a velocizzare la reazione?

Il sito attivo ha la conformazione corretta complementare al substrato; dunque, solo uno specifico substrato può trovare collocazione in uno specifico sito attivo. A incastrare il substrato nel sito attivo sono le interazioni elettrostatiche: le superfici sono elettrizzate, fatte di elettroni; pertanto, il sito attivo attira a sé il substrato.

La variazione di energia tra reagenti e prodotti è indicata con ΔG .

- Quando questo è negativo, cioè l'energia dei prodotti è minore dei reagenti, la reazione è detta **esoergonica**;
- Quando questo è positiva, cioè l'energia dei prodotti è maggiore dei reagenti, la reazione è **endoergonica**.

L'enzima non altera il ΔG , ma agisce solo sull'energia di attivazione e promuove la rottura dei legami.

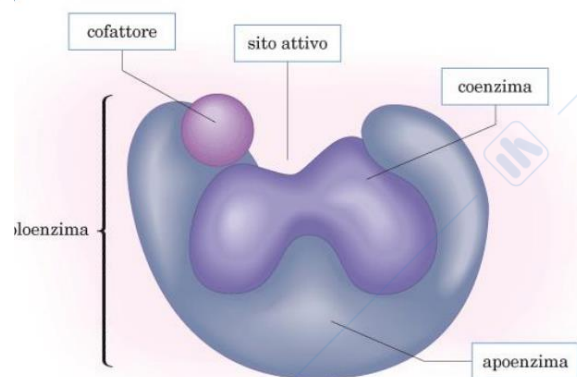
La macchina enzimatica è costituita da una parte proteica (**apoenzima**), la quale presenta una fessura/avvallamento nella quale si colloca il substrato, che si chiama **sito attivo**, e può avvalersi di molecole aggiuntive (come ioni o molecole di natura non proteica) che definiamo **cofattore** o presenza costante di una vitamina, definiti **coenzimi**.

Il complesso (cofattore + proteina), cioè l'enzima funzionante, viene detto **oloenzima**.

Le vitamine servono per sintetizzare i coenzimi.

Esempi: NAD e Coenzima A.

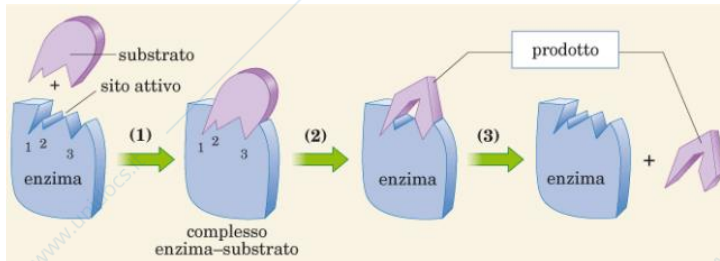
- **NAD**: deriva dalla PP. La parte superiore del NAD è formata da ribosio e adenina. La parte inferiore è formata da nicotinamide e ribosio.
- **Coenzima A**: deriva da altre vitamine che sono utilizzate per sintetizzare il coenzima stesso. Questo enzima ha un ruolo importante nel legare gli acidi grassi.



Quando il substrato aderisce al sito attivo dell'enzima, si forma il **complesso enzima-substrato**. I prodotti poi si distaccano, perché non hanno più la stessa forma della chiave iniziale e non riconoscono più il sito attivo; di conseguenza vengono allontanati ad un'elevata velocità. Il turnover, cioè il numero di molecole che per minuto incontrano e lasciano il sito attivo, è altissimo. Se il meccanismo di espulsione non fosse altrettanto rapido a quello di assemblaggio, il processo sarebbe lento.

Conclusione sul meccanismo di azione:

1. L'enzima favorisce il contatto dei reagenti (substrati);
2. Abbassa l'energia di attivazione, dunque promuove la rottura dei legami e permette alla reazione di avvenire.



Le reazioni si distinguono in due tipi:

1. **Irreversibili**: come l'idrolisi dell'ATP, o la combustione del metano; sono fortemente esoergoniche.
2. **Reversibili**: quando è avvenuta la reazione non tutti i prodotti sono trasformati in reagenti, ma coesistono entrambi nella stessa reazione. La trasformazione può procedere in un senso o nell'altro.

In queste reazioni, se si misura la concentrazione dei reagenti e dei prodotti che coesistono, si osserva che queste concentrazioni stanno tra di loro secondo un'equazione.

$$\frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]} = \text{COSTANTE (Keq)}$$

Il sistema di una reazione reversibile è in grado di reagire alla perturbazione creata. L'equilibrio che si crea è dinamico, ed è chiamato **principio di Le Chatelier**.

Secondo il principio di Le Chatelier, se viene variata la concentrazione di una specie in un sistema chimico all'equilibrio, esso reagirà in modo da compensare la variazione subita.

- Se $K_{eq} > 1$, allora predominano i **prodotti**
- Se $K_{eq} < 1$, allora predominano i **reagenti**

Come calcolare la quantità di enzimi?

L'attività enzimatica si esprime in unità enzimatiche (U \rightarrow 1U=1 μ mol [S]/minuto)

Un dato enzima è codificato da più geni molto simili: gli isoenzimi.

Questo fenomeno è evidente, per esempio, nella lattato deidrogenasi, che partecipa alla trasformazione di acido piruvico in acido lattico e succede quando la cellula va in anaerobiosi. Ha una struttura quaternaria ed è codificata, pertanto, da altrettanti alleli. Queste 4 subunità sono molto simili, derivano da un gene ancestrale. In particolare, si sono sviluppati due alleli, H espresso principalmente nel cuore ed M nel muscolo scheletrico. Negli altri tessuti questi due alleli possono trovarsi con diverse combinazioni. Una volta dosato e identificato questo enzima nel siero, esso diveniva marcatore di una specifica patologia. Con degli anticorpi specifici è possibile determinare, attraverso dei test che impiegano come sonda di riconoscimento un anticorpo, la tipologia della lattato deidrogenasi.

Riassumendo, **gli isoenzimi sono importanti per la diagnostica, perché un enzima viene espresso da alleli diversi da tessuto a tessuto.**

Enzimi = interruttori molecolari in quanto facilitatori di reazioni. Per fare avvenire una reazione bisogna che l'enzima sia espresso; le nostre cellule esprimono i propri enzimi e i propri geni, che non sono costantemente espressi nell'arco della vita di una cellula, ma in risposta a determinati stati fisiologici. La cellula muscolare esprimerà per esempio miosina ed actina; quella nervosa non esprimerà mai questi geni, nonostante siano nell'archivio genetico.

L'espressione selettiva di alcuni enzimi determinerà certe reazioni e non altre.

Molti enzimi, una volta espressi, possono essere attivi o non attivi, e la loro attività può essere modulata.

STRATEGIA PER REGOLARE UN ENZIMA

L'effetto allosterico varia la forma della proteina. Se agisce sull'attività, varia la forma del sito attivo che può agire con più o meno agilità con il substrato.

Se una cellula non ha bisogno di energia, quindi l'acido piruvico non deve essere ossidato ulteriormente, non ha più senso trasformare glucosio in acido piruvico perché si accumulerebbe, così come l'acido piruvico non può più essere trasformato in ATP.

La cellula non sopporta che la concentrazione globale subisca trasformazione rispetto al valore osmotico (300 Osm/l). L'acido piruvico agisce da effetto inibisce degli enzimi che stanno a monte della sua produzione, solo i più specializzati sono sottoposti a una regolazione allosterica, dunque modulati finemente. In base all'aumento della concentrazione dell'acido piruvico, si possono bloccare o inibire tanto o poco gli enzimi che lo producono. Se la cellula ha tanto glucosio e poca energia, può essere trasformata in acido piruvico e così diventa effetto positivo. L'ATP blocca alcuni enzimi chiave, ma quando questo viene utilizzato per produrre energia ecco viene trasformato in ADP. I livelli di ADP alti sono un indicatore che le riserve di energia sono in caro: infatti è un attivatore positivo dei processi ossidoriduttivi. Questo tipo di regolazione allosterica è chiamato anche **regolazione a feedback**.

Un altro meccanismo di regolazione che interessa più l'approccio farmacologico, è quella per cui **un inibitore si lega sul sito attivo al posto del substrato "vero"**. Alcuni farmaci si legano sui siti attivi degli enzimi, non permettendo al substrato biologico di attaccarsi come dovrebbe. Vengono chiamati anche inibitori competitivi, perché competono con il substrato. **QUESTI SONO SOPRATTUTTO FARMACI!!!!!!** L'approccio razionale per sviluppare i farmaci, distinto da un approccio empirico (consistente nel provare casualmente una sostanza e vedere se ha effetto sull'enzima. È un approccio casuale) è più costoso, in quanto richiede molti investimenti dovuti alla ricerca.

Altro processo: **modifica chimica di un enzima da parte di un altro enzima**; è una modifica mediata da altri enzimi che devono essere attivati a loro volta. In altre parole, **un enzima può essere bloccato chimicamente trasferendo un enzima all'enzima stesso attraverso una fosfotrasferasi**. Dunque, un enzima blocca un altro enzima.

Vantaggio? La regolazione si espande in una cellula molto velocemente perché nella regolazione precedente c'era un effetto e il suo enzima (rapporto 1:1); qui il rapporto è enzima-enzima (1:2), ma l'enzima 1 è in grado di regolare migliaia di enzimi 2. Questa regolazione è molto più efficiente. È anche reversibile, dunque un gruppo fosforico può essere anche rimosso da un terzo enzima.

METABOLISMO E NUTRIZIONE

Gli enzimi, per il metabolismo, sono fondamentali: agiscono da catalizzatori e da interruttori molecolari. Le vie metaboliche sono integrate, in quanto alcuni metaboliti sono comuni a più vie metaboliche.

- **DIGESTIONE:** assorbimento a livello intestinale. L'assorbimento dei nutrienti richiede la digestione delle macromolecole, nutrienti come glucidi, lipidi complessi, proteine. Le piccole molecole non necessitano di essere ingerite. *Perché digeriamo il cibo?*
 1. Per assorbire i nutrienti sotto-forma di molecole di piccole dimensioni

2. Non stimolare il sistema immunitario
3. Difenderci dagli organismi patogeni

Gli enzimi digestivi catalizzano le reazioni di idrolisi dei nutrienti nel tubo digerente.

Enzimi legati alla digestione degli zuccheri:

- **Ptialina** (nella bocca)
- **Amilasi** pancreatica
- **Maltasi** (mucosa intestinale)
- **Lattasi e saccarasi** (mucosa intestinale)

Enzimi legati alla digestione delle proteine:

Se il cibo è stato cotto, le proteine hanno subito denaturazione, ma quella principale la subiscono dal pH dello stomaco.

- **Acidità dello stomaco**
- **Pepsina** (stomaco): rompe in piccoli pezzi le proteine (peptide); non è molto specifica, rompe i legami peptidici. Da una proteina non si rompono tutti i legami, ma i pezzi di proteine vengono poi aggrediti da:
 - **tripsina e chimotripsina**: prodotti dal pancreas; anche in questo caso le proteine non vengono distrutti del tutto, se non grazie alle:
 - **ammino e carbossi peptidasi** (mucosa intestinale): trasformano i frammenti in amminoacidi. La celiachia, per esempio, è legata allo stato infiammatorio intestinale generato da peptidi che si formano in seguito alla digestione del glutine; l'intolleranza al lattosio è il risultato della scarsa diffusione della lattasi invece. Non essendo digeribile, rimane nell'intestino causando coliti. Le cellule intestinali poi hanno degli inibitori in grado di assorbire gli aminoacidi.

Enzimi legati alla digestione dei lipidi:

Nel neonato che si alimenta con il latte, viene prodotta una:

- **Lipasi gastrica**: molto attiva la lattasi in quanto il lattosio è lo zucchero di cui si nutre il neonato. Il latte, da un punto di vista nutrizionale, è il nutriente completo.
- **Lipasi pancreatica** (azione della bile)

Il problema della digestione dei lipidi è la scarsa solubilità in acqua. È indispensabile l'intervento del fegato che, secernendo i sali biliari, fa un'azione di emulsione dei lipidi stessi: li solubilizza! Questo è il motivo per cui la digestione dei lipidi risulta più lenta e difficoltosa.

- **CATABOLISMO (o fabbisogno energetico)**: insieme di reazioni di ossidoriduzioni per estrarre l'energia chimica immagazzinata nei nutrienti e immagazzinarla in molecole ad alta energia come l'ATP.
- **RISERVE**: i nutrienti in eccesso vengono immagazzinati nei tessuti di riserva (tessuto adiposo, fegato, muscolo e organi in genere)
- **ANABOLISMO (o biosintesi delle molecole)**: i nutrienti forniscono il materiale molecolare indispensabile per sintetizzare le molecole di cui le cellule necessitano.

TRASPORTO DI GLUCOSIO NELLE CELLULE

Il trasporto di glucosio nelle cellule avviene grazie a una proteina canale (**GLUT**=trasportatore (uniporto) del glucosio), proteina di membrana codificata da più alleli.

GLUT 4, per esempio, è attivato dall'insulina e viene attivato solo a livello del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo; non avrà effetto su un organo come il fegato.

Questa proteina è una proteina canale, ovvero una "porta" sempre aperta che trasporta SOLO il glucosio, il quale può entrare o uscire indifferentemente. **A decidere l'entrata o l'uscita del glucosio è la concentrazione.** La glicemia cresce a livello globale su tutti i tessuti esternamente. Essendo i trasportatori di glucosio GLUT, essi sono sempre e costantemente aperti. La cellula, però, ha sviluppato dei meccanismi per non far uscire il glucosio dalla cellula; questi meccanismi non prevedono la chiusura del GLUT (che rimane sempre aperto), ma le cellule, soprattutto le muscolari, hanno un fabbisogno maggiore di glucosio perché sviluppano la forza della contrazione che richiede molta energia (es. muscolo cardiaco che pompa sangue e si contrae continuamente). Le cellule, se non ci fosse un meccanismo continuo che trattiene il glucosio, si svuoterebbero. Questo meccanismo comporta il trasferimento di un gruppo fosforico da un ATP al glucosio: **FOSFORILAZIONE DEL GLUCOSIO**. Questo impedisce al glucosio di uscire dalle cellule perché il GLUT non fa passare un glucosio trasformato in glucosio fosforilato.

Normalmente, il trasportatore si trova non sulla membrana plasmatica, ma in una vescicola che fluttua nel citoplasma. Questa vescicola è fatta da una membrana plasmatica vuota al suo interno. L'insulina, essendo un ormone, stimola la fusione di queste vescicole con la membrana plasmatica dal lato interno della cellula. Quando le vescicole si fondono, i trasportatori si trovano sulla superficie della cellula e si aggiungono ai trasportatori che già la cellula dispone.

Il glucosio è una molecola piccola che i nostri reni sono in grado di assorbire fino a un certo punto: quando la glicemia è troppo, la capacità di assorbire glucosio nell'urina primaria non è sufficiente; dunque, l'eccesso andrà all'urina secondaria; per questo è necessario assorbire glucosio.

Nel tessuto muscolare e nel tessuto adiposo avviene l'assorbimento. Le cause del diabete sono due: la produzione di insulina (danno a livello pancreatico che determina una non produzione di insulina) e danni a livello dei recettori di insulina (es. se le cellule non esprimono il recettore dell'insulina). Sulla base del danno metabolico, il diabete si distingue in: diabete di tipo I e diabete di tipo II. Il destino metabolico dei carboidrati è cruciale già dalle prime fasi.

Il glucosio, una volta assorbito, a seconda delle necessità fisiologiche della cellula, prende strade diverse.

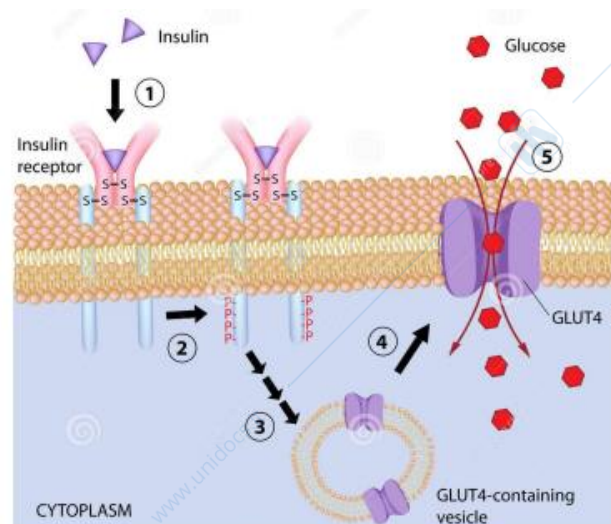
Il **fegato** è l'organo che assorbe in modo massiccio il glucosio, più di tutti gli altri organi. Il fegato riesce ad assorbire una quantità di glucosio che supera il 10% del suo peso. Nessun altro tessuto/organo ha questa capacità. Esso non utilizza il glucosio per le sue esigenze, ma lo immagazzina sotto forma di glicogeno e lo ridistribuisce al corpo nei periodi di digiuno (lo usa per mantenere la glicemia costante).

Il glucosio entrato nella cellula può seguire più destini metabolici; in tutte le cellule, però, il glucosio viene ossidato ad acido piruvico per produrre energia.

GLICOLISI

È un processo catabolico che avviene nel citosol di tutte le cellule e non richiede ossigeno.

Avviene in 10 tappe e comprende generalmente reazioni reversibili: **solo 3 reazioni sono irreversibili.**



PRIMO STEP: Fosforilato a una fosforasi, o meglio esochinasi, si trasferisce un gruppo fosforico da un ATP al C6 del glucosio. La presenza di un gruppo fosforico introduce due cariche negative, un atomo di fosforo e 3 atomi di ossigeno; ciò impedisce al glucosio di tornare indietro dal canale GLUT. La prima tappa della glicolisi consuma una molecola di ATP; dunque, ha un costo energetico. La glicolisi è un processo che serve per produrre ATP, ma all'inizio ne verrà consumato.

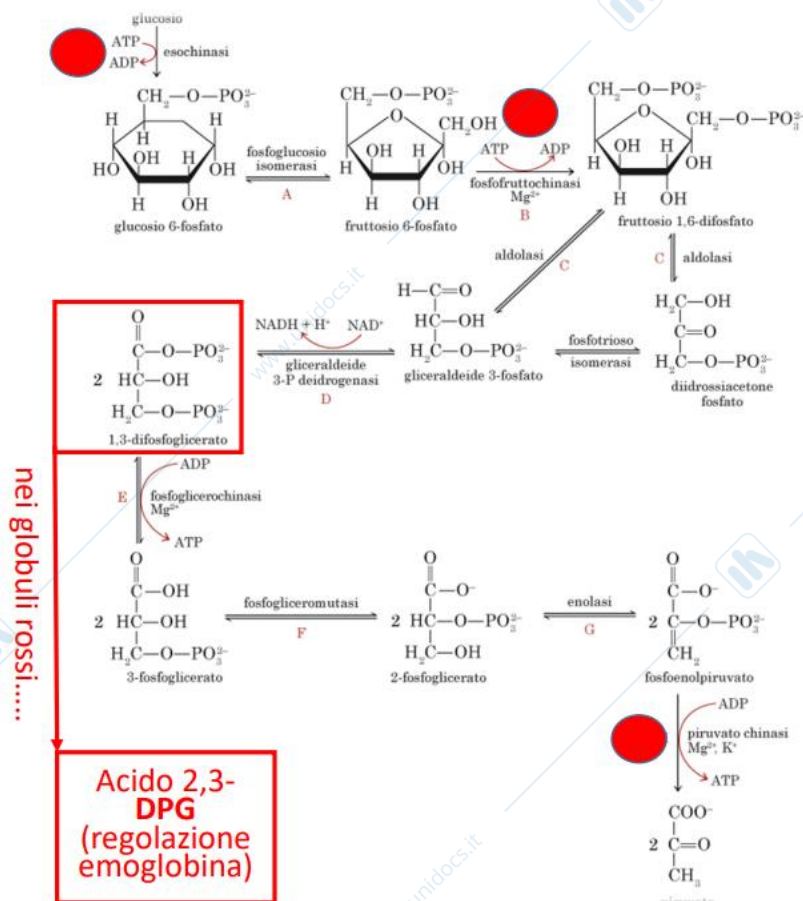
DA RICORDARE: i prodotti che si ottengono, gli stati di partenza e gli enzimi coinvolti. Dunque, il prodotto è la formazione del glucosio fosforilato, dunque glucosio 6 fosfato. I substrati sono due: il glucosio e l'ATP; l'enzima coinvolto è una transferasi chiamato esochinasi.

Il prodotto di questa reazione è un substrato per un altro enzima: isomerasi, che trasforma il glucosio in fruttosio.

SECONDO STEP: mantiene sempre gruppo fosforico in C6, in più si ottiene un fruttosio 6-fosfato come prodotto.

TERZO STEP: Successivamente, il fruttosio 6-fosfato, viene fosforilato ulteriormente, dunque si consuma un altro ATP, che però interessa il C1. Il glucosio si è trasformato in fruttosio ed ha consumato due molecole di ATP.

Queste prime tre reazioni costituiscono la prima parte della glicolisi e hanno portato al consumo di energia. Nella seconda parte si produce ATP:



QUARTO STEP: il fruttosio 1.6-difosfato viene tagliato in due; è un esoso, formato da 6 atomi di C. Ad opera di un aldolasi, questa struttura a 6 atomi viene spezzata in due zuccheri a 3 atomi di C: gliceraldeide 3-fosfato e diidrossiacetone fosfato; questi portano in eredità i gruppi fosforici del glucosio fosforilato; dunque, sono anch'essi fosforilati e interconnettibili in quanto isomeri.

QUINTO STEP: C'è un isomerasi che trasforma l'idrossiacetone in gliceraldeide.

Una molecola di glucosio viene trasformata in due molecole di gliceraldeide fosforilata, perché il diidrossiacetone può essere convertito in gliceraldeide. Le isomerasi permettono un'interconversione dei componenti di base e questo permette all'organismo di soddisfare il fabbisogno di base.

Per ogni molecola di glucosio che entrano in glicolisi si formano due molecole di gliceraldeide! Serve a fare un bilancio energetico.

SESTO STEP: ossidazione della gliceraldeide in acido corrispondente: 1,3- difosfoglicerato. L'agente ossidante è chimico e meno aggressivo. Il NAD ha ruolo di agire come ossidante; agisce così perché contiene una base azotata che è **niacina**, una vitamina che ha la spiccata capacità di ossidare le molecole organiche. La sua azione è la capacità di strappare 2H dal substrato organico di ogni molecola. Questo viene sostituito da un

legame. Il gruppo aldeidico in posizione 1 si trasforma così in gruppo carbossilico. Dunque, il NAD agisce come coenzima di questa deidrogenasi che strappa i due H, in una reazione di deidrogenazione. L'ossigeno sostituisce i due H, per questo è chiamata anche reazione di ossidazione. Il nutriente, qualsiasi esso sia, viene ossidato da nucleotidi che contengono delle basi ossidanti come la miacina.

Molti enzimi, per funzionare, richiedono, oltre ai coenzimi vitaminici, anche i cofattori quali ioni tipo il Mg, essenziali per il buon utilizzo dei nutrienti.

Questo processo di ossidazione che libera energia non è l'unico che avviene in questo passaggio. Il prodotto finale (acido fosfoglicerico) ha due gruppi fosforici su C1 e C3, gruppo che non arriva da ATP, ma dal fosfato organico presente nel citoplasma: in questo modo il fosfato viene legato al carbonio formando legame ad alta energia. Questo perché la reazione della gliceraldeide è molto esoergonica, e viene utilizzata per legare il gruppo fosforico.

SETTIMO STEP: il fosfato su C1 dell'acido fosfoglicerico viene trasferito sulla molecola di ATP, producendo energia, dunque ATP. L'acido fosfoglicerico che presentava due gruppi fosforici (C1 e C3) si trasforma, liberando energia pura, in un acido fosfoglicerico che presenta un solo gruppo fosforico in C3.

OTTAVO STEP: il gruppo fosforico in posizione 3 viene trasferita in posizione 2, tramite isomerasi (acido 2-fosfoglicerico)

NONO STEP: L'acido 2-fosfoglicerico viene disidratato, viene tolta una molecola di acqua e si forma l'acido fosfoenolpiruvico (è il penultimo intermedio della glicolisi). L'enzima prodotto si chiama enolasi.

DECIMO STEP: l'acido piruvico (prodotto finale che non contiene gruppi fosforici) si ottiene dall'acido fosfoenolpiruvico per rimozione dell'ultimo gruppo fosforico che ha in posizione 2, il quale viene sottratto e trasferito sulla molecola di ADP; così facendo si forma nuovamente ATP.

BILANCIO NETTO DELL'ATP PRODOTTO: è la differenza tra ATP prodotto finale – quello consumato.

ATP prodotto = 4 (perché la seconda parte della glicolisi è portata avanti da due molecole di gliceraldeide, non da uno) – **2** (della prima parte della glicolisi) = **2 ATP TOTALI.**

$$\text{ATP PRODOTTO} = 4 - 2 = 2 \text{ ATP}$$

*******IMPORTANTE!!!** Per capire se si è prodotto tanto o poco ATP, in termini di energia (Kcal/mol): 1 mol di ATP produce 7,3 Kcal. Quindi da due 2 mol di ATP (derivate da una mole di glucosio, pari al suo peso molecolare =180 g. Da 180 g mi aspetto di ottenere $180 \times 4 = 730$ Kcal possibili) si producono circa 15 Kcal. Pertanto, la glicolisi da sola produce poca energia: per produrre di più bisogna ossidare ulteriormente l'acido piruvico, dunque essere in condizioni di aerobiosi. *****

In conclusione, la glicolisi produce un'energia non eccessiva. Il bilancio di un processo metabolico non si fa solo in termini di ATP. Il NAD è una molecola che fa parte del corredo molecolare di ogni cellula, come l'ATP. Quindi, **per far avvenire questo processo, c'è bisogno di glucosio, di NAD ossidato e di acido piruvico che esca e non si accumuli (l'eliminazione di questo acido in condizione di aerobiosi avviene trasformandolo in acido lattico).**

Se si accumulasse l'acido piruvico, la cellula andrebbe in sofferenza osmotica. Dunque, questo processo non è scollegato da tutto il resto.

Il vantaggio di questa reazione di ossidazione è che possiamo produrre energia anche senza ossigeno (il glucosio svolge questa importante funzione).

Per questo il metabolismo energetico di un atleta è glicolitico (= processo anaerobico che non richiede ossigeno e che consuma glucosio come nutriente ossidante). I lipidi o gli amminoacidi non sono indipendenti

dall'ossigeno. Il grande vantaggio della glicolisi è proprio questo da un punto di vista nutrizionale ed energetico.

Regolazione: alcuni enzimi, i più specializzati, possono essere regolati dall'interazione con altre sostanze: così facendo puoi regolare un'intera azione metabolica. Es. se la cellula è a riposo e le sue molecole di ATP sono accumulate, è uno spreco trasformare in acido piruvico. Viceversa. Se c'è tanto glucosio e molto ADP è necessario attivare la glicolisi: infatti glucosio e ATP funzionano come attivatori.

Solo tre enzimi possono agire per regolare la glicolisi, quelli che catabolizzano le reazioni irreversibili, perché i prodotti hanno energia molto diversa rispetto ai substrati. Essi sono:

1. **ESOCINASI**
2. **FOSFOFRUTTOTRAFERASI**
3. **PIRUVATO CHINASI**

L'**acido 2,3-DPG** (regolazione emoglobina), convertito nei globuli rossi da 1,3 DPG a 2,3 DPG stimola il rilascio di ossigeno da parte dell'emoglobina nei soggetti in ipossia.

FERMENTAZIONE LATTICA E FORMAZIONE ACETIL-COENZIMA A

Galattosio e fruttosio, grazie a degli enzimi, vengono convertiti in glucosio perché più facile da assorbire. La prima via che abbiamo visto è la glicolisi. La molecola che si ottiene dalla glicolisi è il piruvato (una molecola a 3 atomi) che avrà poi altri fini.

Per una via metabolica noi dobbiamo conoscere:

1. **I substrati di partenza** (che alimentano la via);
2. Quali sono **i prodotti ottenuti**;
3. **Lo scopo** della via metabolica;
4. Capire quali sono **i passaggi principali**

NEL CASO DEL GLUCOSIO

1. Il Glucosio 6-fosfato è il substrato di partenza (minuscolo)
2. Il prodotto sono due molecole di piruvato
3. Per far avvenire questa via abbiamo usato due molecole di NAD^+ e i passaggi cruciali sono quelli catalizzati da enzimi che vengono regolati e coincidono con le tre reazioni irreversibili
4. Lo scopo della via è quella di produrre energia con un netto di 2 molecole di ATP (2 consumate all'inizio e 4 prodotte)

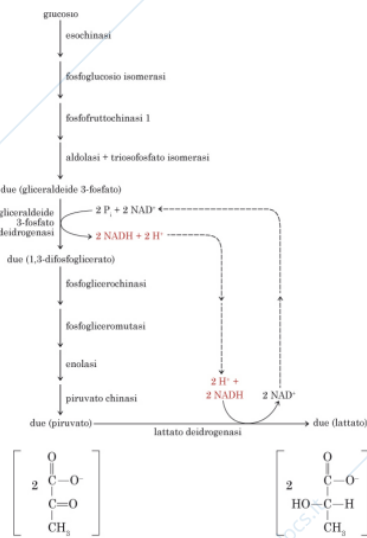
L'unica cosa che può bloccare questa via è la poca disponibilità di NAD^+ ossidato (agente ossidante) specialmente nelle cellule muscolari.

L'unica cosa che riesce ad entrare ed uscire facilmente dalla cellula (membrana plasmatica) è l'acqua, l'acido piruvico non riesce ad uscire dalla cellula mentre sotto forma di acido lattico esce molto più facilmente; quindi, grazie alla NADH cede due ioni H^+ al piruvato e lo riduce in acido lattico e otteniamo NAD^+ che useremo poi nelle glicolisi

Questa reazione avviene solo se avviene la glicolisi e in condizioni di anaerobiosi (assenza di ossigeno) e l'enzima che regola tale processo è la **lattato deidrogenasi**. Grazie a questo non si crea accumulo nella cellula perché il piruvato esce sotto forma di acido lattico. La cosa più importante è che il NADH una volta che si ossida (dopo aver ceduto due H⁺ al piruvato) verrà riutilizzato nella glicolisi.

Fermentazione lattica.

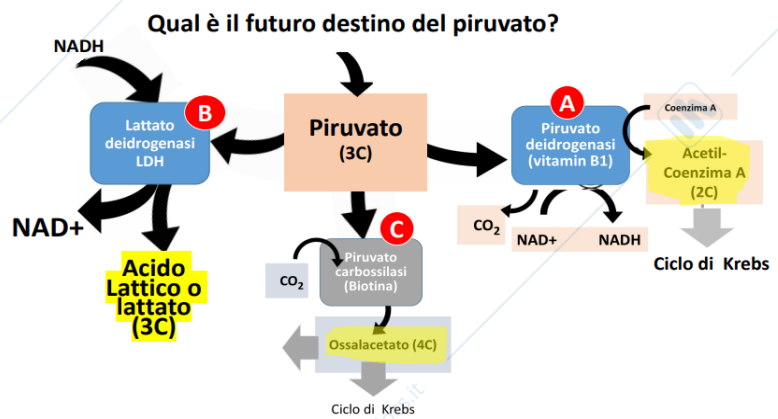
In assenza di ossigeno il piruvato (ac. piruvico) viene convertito in lattato (ac. lattico) dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH), in questo modo si rigenera (per riossidazione) il NAD e la glicolisi può avvenire anche in assenza di ossigeno (anaerobiosi)



Il principale destino però del piruvato è la trasformazione in acido acetico più precisamente acido acetico

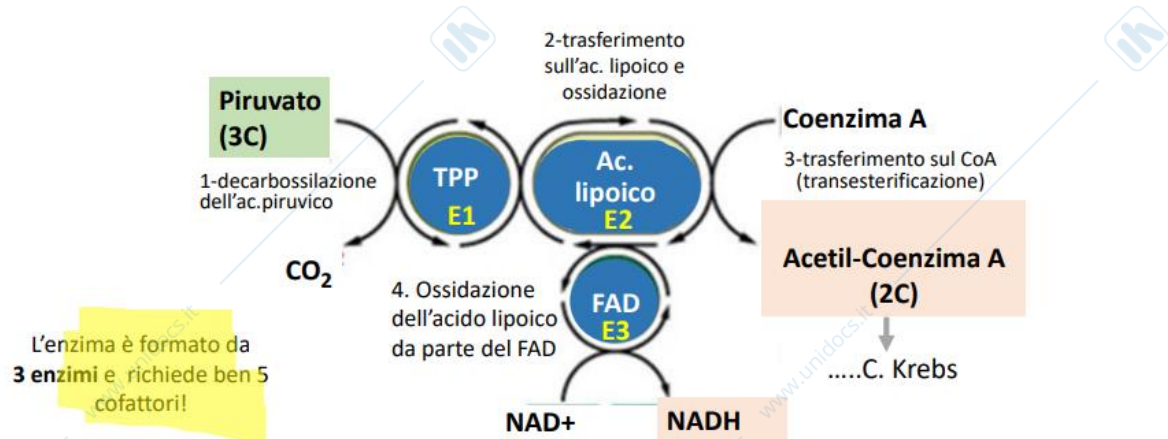
attaccato al coenzima A (acetilcoenzima A) che ha la funzione di trasportare l'acido acetico a tutte le molecole a cui serve

La trasformazione del piruvato in acido ossalacetico (ossalacetato) avviene nelle cellule epatiche ed è regolato dall'enzima piruvato carbossilasi e serve per convertire il glicogeno in glucosio; quindi, quando il glucosio è scarso, entra in gioco proprio il fegato perché è lui che regola i valori di glucosio. Questa è una via che è in grado di produrre glucosio.



Il **piruvato deidrogenasi** è l'enzima che trasforma il piruvato in acetilcoenzima A, è l'enzima più complessa perché sfrutta 5 vitamine/cofattori (la prima vitamina è la B1 che viene assunta attraverso la dieta specialmente nei vegetali) e catalizza contemporaneamente tre reazioni perché sono tre enzimi insieme.

Questi tre enzimi insieme formano il piruvato deidrogenasi, uno degli enzimi più importanti presente nella maggior parte delle cellule che consumano ossigeno (non tutte, per esempio i globuli rossi non hanno questo enzima perché non consumano ossigeno)



Il piruvato viene decarbossilato dalla TPP grazie alla vitamina B1, il piruvato decarbossilato va poi all'acido lipoico dove viene ossidato e poi trasferito al coenzima A e diventare acetil coenzima A.

L'acido lipoico si è ridotto e lo usiamo come cofattore per riossidarlo il FAD e una volta che questo si è ridotto viene riossidato dal NAD.

Il piruvato deidrogenasi mostra tutti i metodi di regolazione tipica degli enzimi. In particolare, vediamo la **regolazione covalente** dell'enzima stesso che consiste nella fosforilazione, ovvero nel trasferimento del gruppo fosfato dall'ATP all'enzima; questo perturba molto la struttura della proteina e la modifica in modo inibitorio o attivatorio. In questo caso la inibisce, ovvero la modifica non permette di riconoscere i substrati. Il gruppo fosfato viene trasferito su amminoacidi specifici della proteina (piruvato deidrogenasi) e si legano mediante legame estere e verrà poi rimosso per idrolisi grazie ad un enzima specifico **la fosfatasi** (rimuove gruppo fosforico). Basta una piccola modifica della fosfatasi o chinasi per modificare il piruvato deidrogenasi; infatti, un solo chinasi inibisce migliaia di piruvato deidrogenasi mentre se ci fosse stata una regolazione diretta il rapporto sarebbe 1:1.

Quel è il vantaggio regolato da questi enzimi rispetto una regolazione diretta?

In una regolazione diretta il rapporto molecole enzima è 1:1 mentre in un'indiretta, questo rapporto non è 1:1 ma anche 1 a 100 quindi è molto più sensibile: usiamo un meccanismo a cascata che è molto più efficace, la piruvato deidrogenasi è attivato dal coenzima A, un altro attivatore è l'insulina e l'adrenalina che aumentano il valore di calcio nel sangue e fanno iniziare il processo.

CICLO DI KREBS

Tutti i lipidi vengono trasformati in acetil coenzima A, è la via metabolica oltre dei carboidrati anche delle proteine.

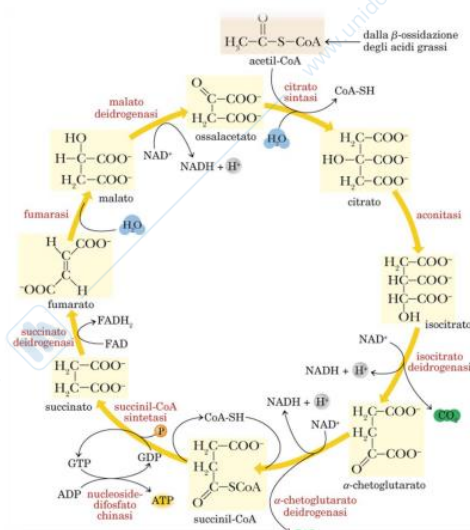
Nell'acetil-coenzima A i due carboni dell'acetile vengono trasformati in CO₂ che producono molta energia (ATP). La sintesi dell'acetil-coenzima A e la successiva degradazione porta alla produzione di CO₂ eliminata poi dai polmoni. Il gruppo acetile è ossidato da NAD⁺ e si formerà NADH.

I passaggi principali del ciclo di Krebs sono 8 reazioni.

Come prima cosa è un ciclo, quindi si formeranno alla fine le molecole di partenza.

- Nel primo passaggio: l'acetil-coenzima A, trasformato così perché deve entrare nei mitocondri, viene trasferito sull'acido succinico che dà come prodotto l'acido **citrico**, costituito da 6 atomi di carbonio (4 dal succinico e 2 dall'acetil). I passaggi successivi si basano sull'ossidazione dei due carboni che provenivano dell'acetil in CO₂ e la parte sotto dell'acido citrico non viene toccata e, proprio per questo, alla fine si riforma l'acido succinico che si legherà poi nuovamente all'acetil.

Per fare tutto questo servono 4 molecole di NAD⁺ e 1 di FAD.



Substrati:

- Acetil-Coenzima A,
- Ossalacetato,
- NAD⁺ e FAD
- GDP

Prodotti:

- Coenzima A
- Ossalacetato
- ATP
- NADH e FADH₂
- CO₂

Grazie ai mitocondri i NAD ridotti (NADH) dal ciclo di Krebs vengono riossidati, ma per far questo serve l'ossigeno: ecco perché avviene in condizioni di aerobiosi e questa fase è chiamata **catena respiratoria**.

Da una molecola di NAD vengono prodotte 3 di ATP; mentre da una di FAD, 2 di ATP.

Catena respiratoria e ciclo di Krebs avvengono nei mitocondri in presenza obbligatoriamente di ossigeno!!!

Glicemia: misura della concentrazione del glucosio nel sangue. Quando la glicemia sale oltre un certo livello, innesca la produzione di una quota di insulina, meccanismo ormonale per assorbire più velocemente il glucosio stesso. Il fruttosio è il secondo zucchero che ingeriamo. Su 10g di saccarosio, 5 sono di glucosio e 5 di fruttosio. Il fruttosio non ha potere sull'insulina: quindi, è buono per il nostro organismo.

Da un punto di vista nutrizionale, il fruttosio ha un altro vantaggio oltre a non stimolare il pancreas: è più veloce rispetto agli altri zuccheri, quindi ne basta una quantità inferiore per ottenere lo stesso potere energizzante.

Il glucosio in eccesso si accumula a livello d'organo → steatosi.

Prima trasformazione: glucosio in acido piruvico, risultato della via glicolitica. È importante conoscere in un processo glicolitico: i substrati di partenza e i prodotti, bisogna saper fare un'analisi quantitativa.

A ossidare il glucosio è il NAD e, per ossidare una molecola di glucosio in 2 molecole di acido piruvico, *quanto NAD serve?*

Il Coenzima A è un trasportatore di molecole di acido acetico; quindi, per ossidare il glucosio, abbiamo bisogno di altre 3 mol di NAD.

I prodotti del ciclo di Krebs consistono nell'ossidazione completa dell'ex acido piruvico, precedentemente ossidato ad acido piruvico, viene ossidato completamente a CO₂: per ogni ciclo del ciclo di Krebs si producono 2 molecole di CO₂.

Perché è un ciclo? Perché i prodotti finali coincidono con i substrati di partenza.

L'acido ossalacetico è un metabolita molto importante per diversi motivi: la sua funzione nel ciclo è essere un legante dell'acido acetico (2C) → formano una molecola a 6C → acido citrico. Le tappe successive non sono altro che caratterizzate dall'ossidazione dei 2 atomi di C dell'acido acetico (non coinvolto direttamente, se non come supporto dell'acido acetico) a CO₂ (decarbossilazione). Rimane a fine del ciclo una molecola a 4C che è proprio la molecola di partenza: l'acido ossalacetico.

Oltre all'acido ossalacetico e il CoA, mi servono degli agenti ossidanti: NAD⁺ e FAD (nucleotide che opera nello stesso modo → per una molecola di Acetil CoA ho bisogno di 3 molecole di NAD) → si producono 2 molecole di CO₂ e una 1 di ATP.

BILANCIO DEL CICLO DI KREBS (domanda d'esame!):

Noi siamo partiti dal glucosio. Quindi, quante molecole di NAD si producono ossidando una molecola di glucosio?

Dalla glicolisi si attivano 2 di NAD, poi altre 2 si attivano per trasformare acido piruvico in acido acetico; nel ciclo di Krebs 6 NAD (perché si formano "di acetil CoA x 3 di NAD) ... in tutto **10 molecole di NAD!**

Le vie metaboliche sono flussi dinamici, per essere in movimento una via metabolica deve essere alimentata. A parte l'acido acetico, che deriva dal glucosio, affinché questa macchina sia in movimento servono NAD e FAD.

NAD: deidrogenazione, strappa due atomi di H dalla molecola che deve essere ossidata → per poi legare l'ossigeno. Questo è un problema, perché il NAD non è un nutriente. Il NAD è un componente delle nostre cellule, essenziale è che il NAD venga a sua volta ossidato. Nella glicolisi questa riossidazione era portata

avanti dalla lattato deidrogenasi che trasformava il piruvico in acido lattico. Nei mitocondri questo non può avvenire e sarebbe comunque insufficiente: è necessario un meccanismo sufficiente a ossidare in NAD.

Il NAD diventa limitante in poco tempo. Ho bisogno di un ossidante più forte in grado di deidrogenare il NAD per rigenerarlo in forma ossidata e avere il tempo disponibile per un altro ciclo di Krebs: solo così può funzionare. Questa operazione fondamentale viene portata avanti da un sistema enzimatico che si chiama **CATENA RESPIRATORIA**.

10 mol di NAD → ossidare una mole di glucosio (1 mol di glucosio = peso molecolare = 180 g). Per ossidare 180g avrei bisogno di 10 moli di NAD. In realtà in tutto il mio corpo ho 0,1 mole; quindi, le moli a disposizione sono piccolissime: per questo è importante riossidare continuamente il NAD.

Problema: la glicolisi avviene nel citoplasma, mentre la rigenerazione del NAD avviene nei mitocondri (separati dal citoplasma da due membrane). Acido plasmatico e NAD sono separati da membrane mitocondriali.

Non essendoci canali che portano il NAD, il trasporto viene mediato dall'acido spartico (amminoacido) e idrossiacetone (che si forma nella via glicolitica): queste due sostanze vengono ridotte e possono attraversare membrana mitocondriale per poi, una volta entrate, essere riossimate da NAD interno.

Questa ossidazione avviene grazie a quattro complessi enzimatici che si trovano nella membrana interna dei mitocondri: dal punto di vista chimico hanno un potere ossidante via via crescendo.

PRIMO COMPLESSO ENZIMATICO: enzima ossido-riduttivo che stacca H e rigenera il NAD ossidato pronto per alimentare il ciclo di Krebs. Questa ossidazione non finisce qui, perché nelle ossidazioni si libera energia; dunque, non si limita a strappare idrogeni, ma separa anche gli elettroni dagli H.

SECONDO COMPLESSO ENZIMATICO: l'elettrone staccatosi passa a questo secondo complesso e poi al terzo e al quarto: dunque nella catena respiratoria si crea una vera e propria corrente elettrica. C'è un accumulo di ioni H⁺.

QUARTO COMPLESSO ENZIMATICO: lega l'ossigeno come substrato, ossigeno che riceve questi elettroni: un ossigeno con soli elettroni sarebbe una specie reattiva, molto tossica; in effetti questa situazione tossica viene neutralizzata facendo rientrare gli H usciti e si fanno ricombinare con O₂ → si forma acqua.

Riassumendo, l'ossidazione del NAD è talmente complicata che comporta anche la separazione degli H dai loro elettroni, al generazione di corrente e accumulo di elettroni. Il pompaggio verso l'esterno di ioni H⁺ non è specifico solo del complesso, ma è il risultato del refluire della corrente elettrica.

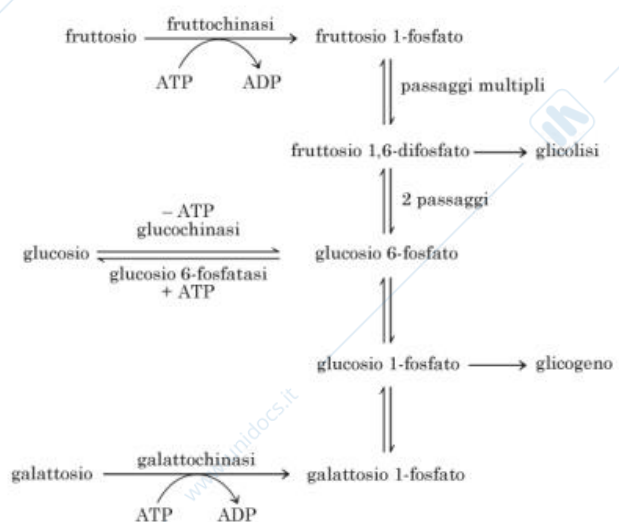
Si formano 3 molecole di ATP ogni molecola di NADH.

Ciclo di Krebs (10 mol di NAD), ogni mol di NAD porta alla sintesi di 3ATP (10 x 3) → 30 **ATP**.

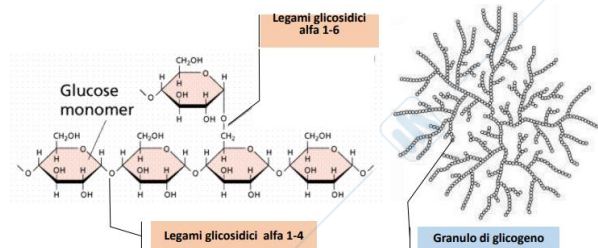
In tutto, per tutti i processi, vengono prodotti 38 molecole di ATP.

METABOLISMO DEI CARBOIDRATI

Il glucosio è senza dubbio il più importante. Nella dieta i carboidrati sono circa il 55%. Il glucosio riveste una rilevante importanza per i muscoli, il cervello e per i globuli rossi. Stimola il pancreas per la formazione di insulina. Tuttavia, nella via glicolitica ci sono anche altri due esosi che vi possono entrare convertendosi (attraverso i relativi enzimi



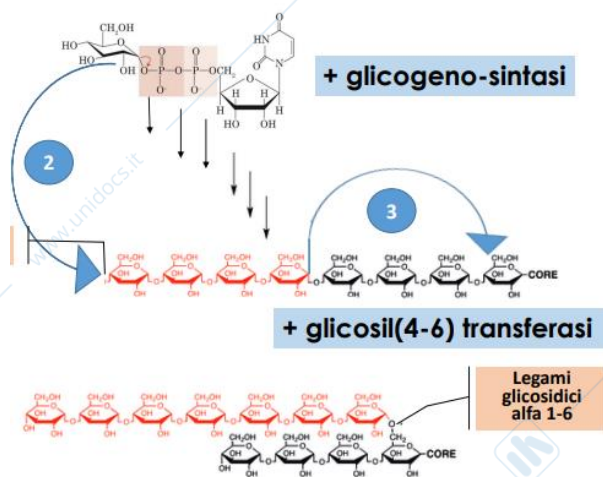
fruttochinasi e galattochinasi) in glucosio: il fruttosio e il galattosio, che vengono fosforilati affinché non escano più dalle cellule. Gli zuccheri assunti con la dieta, infatti, possono essere convertiti l'uno nell'altro. Non esistono zuccheri essenziali.



Glicogenosintesi → il glicogeno è una molecola con peso molecolare altissimo ed è un polimero ramificato del glucosio.

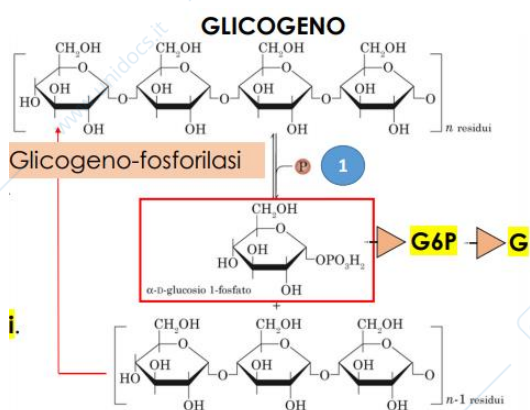
La glicogenosintesi è, per l'appunto, quel processo che porta alla formazione di glicogeno.

Processo: il glucosio entra nella cellula e viene fosforilato in posizione 6 per poi essere trasformato in glucosio 1-fosfato cosicché non venga trasformato in fruttosio, ma venga piuttosto favorita la sintesi del glicogeno. Il C1 viene reso più reattivo grazie al legame con una molecola ad alta energia: l'UDP (U sta per uracile, non si usa più la base azotata adenina). Cos' facendo il glucosio viene attivato e reagisce come substrato per la sintesi e polimerizzazione di tante molecole di glucosio. A unire le lunghe catene di glucosio è l'enzima glicogeno-sintasi mediante legami glicosidici **alfa 1-4**. Un secondo enzima forma le ramificazioni "staccando" frammenti oligosaccaridici e riunendoli con legami glicosidici alfa 1-6: si forma un sistema ramificato.



Dunque, da ricordare sono questi tre passaggi:

1. Attivazione tramite UDP
2. Sintesi delle catene grazie a glicogeno-sintetasi
3. Ramificazione di tali catene.



Glicogenolisi → comporta la rottura dei legami creati attraverso la glicogenosintesi. In particolare, dei legami alfa 1-4, per addizione non di una molecola d'acqua, ma di una molecola di fosfato; così facendo, per mezzo dell'enzima glucosio 6-fosfatasi, si rompe il legame e si forma il glucosio-1P che verrà poi convertito in glucosio-6P e poi in glucosio.

Qual è la differenza biochimica tra muscolo e fegato per il metabolismo del glucosio?

La differenza è che il fegato dispone di una fosfatasi in grado di fosforilare il glucosio, mentre il muscolo non possiede quest'ultimo enzima.

Gluconeogenesi → avviene nel **fegato**, che può sintetizzare glucosio partendo da amminoacidi, e in parte nei reni. La gluconeogenesi è una via anabolica indispensabile per la regolazione della glicemia. Lo scopo è quello di sintetizzare il glucosio quando le riserve di glicogeno nel fegato sono esaurite. Sfrutta gli enzimi della via glicolitica, infatti ripercorre in senso inverso la glicolisi tenendo in considerazione ed escludendo le tre tappe che prevedono le reazioni irreversibili. Avviene nel fegato proprio perché esso ha enzimi che permettono di aggirare al contrario questo processo. Questi enzimi sono delle **fosfatasi**:

- **PIRUVATO CARBOSSILASI:** grazie al quale l'acido piruvico viene convertito in acido acetico
- **FOSFOENOLPIRUVATO:** grazie al quale l'ossalacetato viene convertito in fosfoenolpiruvato.

Lo scopo, come già detto, è quello di sintetizzare glucosio. *Ma quali sono i substrati? E chi lo alimenta?*

Il piruvato carbossilasi (che richiede ATP e H_2CO_3) e l'ossalacetato (che deriva dal primo substrato del ciclo di Krebs).

La gluconeogenesi è una via anabolica che dipende da tutto il metabolismo, dallo stato nutrizionale delle cellule. Deve essere alimentata da altri nutrienti diversi dagli zuccheri: gli AMMINOACIDI!

CONSEGUENZE IMPORTANTI: L'acido ossalacetato è fondamentale per il ciclo di Krebs. Pertanto, se una cellula va incontro a gluconeogenesi, non c'è più a disposizione tale molecola. In questi casi si va incontro a **chetogenesi**, un processo che si ha quando nella dieta non c'è più glucosio, si attiva gluconeogenesi e si accumula Acetil-CoA: si ha la formazione di corpi chetogeni, corpi acidi che fanno acidosi (es. acetone).

Infine, gli ormoni più importanti per il metabolismo dei carboidrati sono: insulina (ipoglicemizzante), glucagone e adrenalina.