

Introduzione al metabolismo

METABOLISMO: L'insieme delle reazioni con cui gli esseri viventi ricavano e utilizzano energia libera per svolgere le loro funzioni.

- **Catabolismo:** degradazione dei nutrienti e dei costituenti cellulari per riutilizzarne i componenti e/o per produrre energia.

Sostanze nutrienti → $CO_2 + H_2O + \text{energia}$

- **Anabolismo:** sintesi delle molecole biologiche a partire da componenti più semplici

Energia + piccole molecole → *molecole complesse*

Reazioni cataboliche → ossidazione composti organici (es. nutrienti).

Ossidazioni = reazioni esoergoniche ($\Delta G < 0$) → liberano energia che può essere utilizzata per effettuare processi endoergonici quali:

- Reazioni anaboliche
- Lavoro meccanico (contrazione muscolare e movimenti cellulari)
- Trasporto attivo di molecole e ioni contro gradienti di concentrazione

Processi esoergonici ed endoergonici nella cellula sono generalmente accoppiati (sincronizzati) tra loro tramite la sintesi intermedia di un composto "ad alta energia" che svolge la funzione di *Trasportatore di energia*.

I principali di questi composti ad alta energia sono:

- ATP
- NADP⁺

Tutti gli organismi viventi ottengono l'energia necessaria per poter svolgere le reazioni endoergoniche (processi anabolici) mediante due modalità:

- Dalla luce: organismi *fitotrofi*, grazie alla fotosintesi clorofilliana utilizzano le radiazioni solari per sintetizzare carboidrati a partire da CO_2 e H_2O
- Da reazioni di ossidazione:
 - Organismi *chemiolitotrofi*, ricavano energia dall'ossidazione di semplici composti inorganici (NH_3 , H_2S , Fe^{++}).
 - Organismi *eterotrofi*, ricavano energia dall'ossidazione di composti organici (carboidrati, lipidi, proteine) prodotti dai fitotrofi o da altri eterotrofi.

A seconda dell'agente ossidante impiegato per demolire le sostanze nutrienti gli organismi possono poi essere classificati in:

- Aerobi obbligati (es. animali), possono utilizzare solo O_2
- Anaerobi (es. batteri) utilizzano solfati o nitrati.

Anaerobi facoltativi: possono vivere in assenza o in presenza di O_2

Anaerobi obbligati: avvelenati dalla presenza di O_2

Perché gli organismi viventi possono ricavare energia dalle reazioni di ossidazione?

Sono dette reazioni di ossidoriduzione o redox le reazioni che comportano un trasferimento di elettroni tra due specie chimiche.

Se una specie chimica (RIDUCENTE, che può essere un atomo isolato, un composto, uno ione) cede uno o più elettroni in una reazione chimica, si dice che si ossida e la reazione si chiama

"reazione di ossidazione".

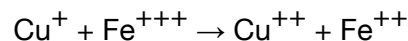
Se invece una specie chimica acquista uno o più elettroni (OSSIDANTE) si dice che si riduce e la reazione si chiama "reazione di riduzione".

Perché una specie chimica possa ossidarsi è necessario che, contemporaneamente, ci sia una specie chimica che possa ridursi (e viceversa): gli elettroni vengono perciò trasferiti da una specie chimica, che si ossida, ad un'altra specie chimica, che si riduce.

Una reazione di ossidoriduzione è quindi un trasferimento di elettroni e nella cellula vi sono quattro modi principali di farlo:

1. Trasferimento diretto di elettroni da una coppia redox

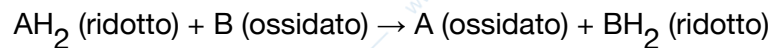
Esempio: $\text{Cu}^{++} / \text{Cu}^+$ cede un elettrone alla coppia redox $\text{Fe}^{++} / \text{Fe}^{+++}$ secondo l'equazione:



2. Trasferimento di un atomo di idrogeno (H) ricordando che esso è in definitiva composto da un elettrone e un protone ($\cdot\text{H}^+$).



AH_2 può cedere gli elettroni ad un altro composto B che si riduce:

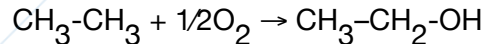


3. Trasferimento di elettroni sotto forma di ione idruro H^- , formato da due elettroni e un protone ($:\text{H}^-$).



4. Trasferimento di elettroni a seguito della combinazione diretta di un riducente organico con l'ossigeno a formare un composto in cui l'ossigeno è legato covalentemente.

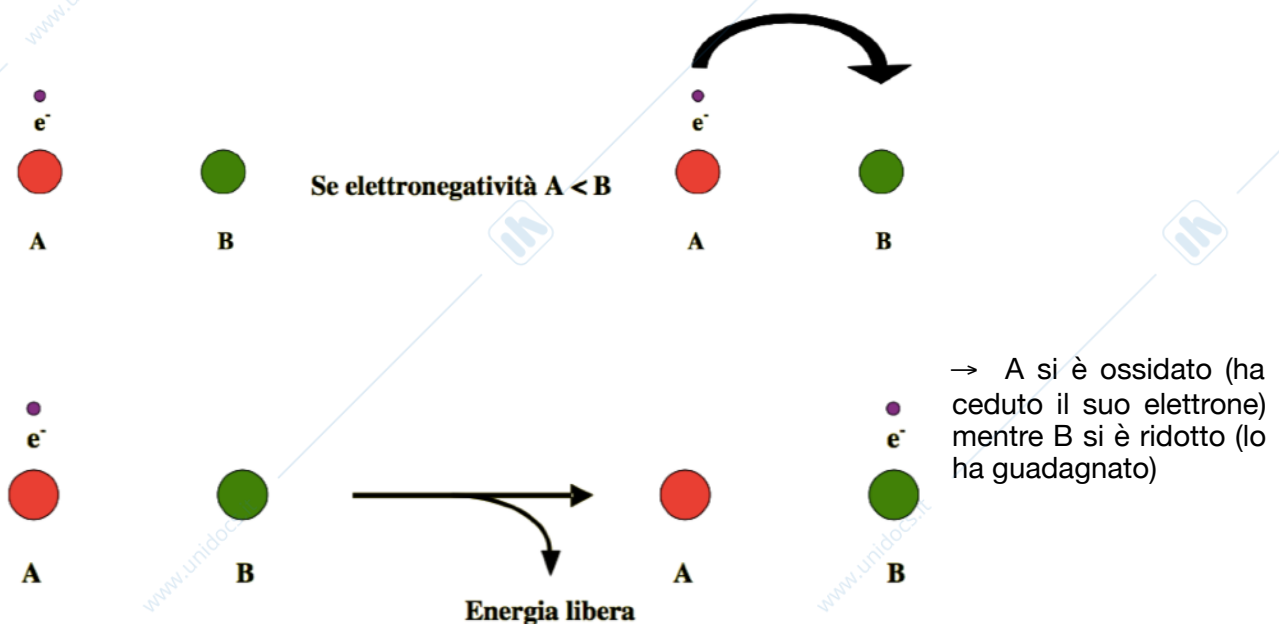
Es. ossidazione di un idrocarburo ad alcool:



In questa reazione il carbonio dell'idrocarburo (etano) è il donatore di elettroni e l'ossigeno (nell'etanolo) l'accettore.

L'elettronegatività è una misura relativa della capacità di un atomo di attrarre elettroni.

Un elettrone tende perciò a passare spontaneamente da un atomo meno elettronegativo (più elettropositivo) ad uno più elettronegativo.





Energia per strappare l'elettrone



Il passaggio di un elettrone da un atomo meno elettronegativo ad uno più elettronegativo è un processo esoergonico, che avviene con liberazione di energia libera.

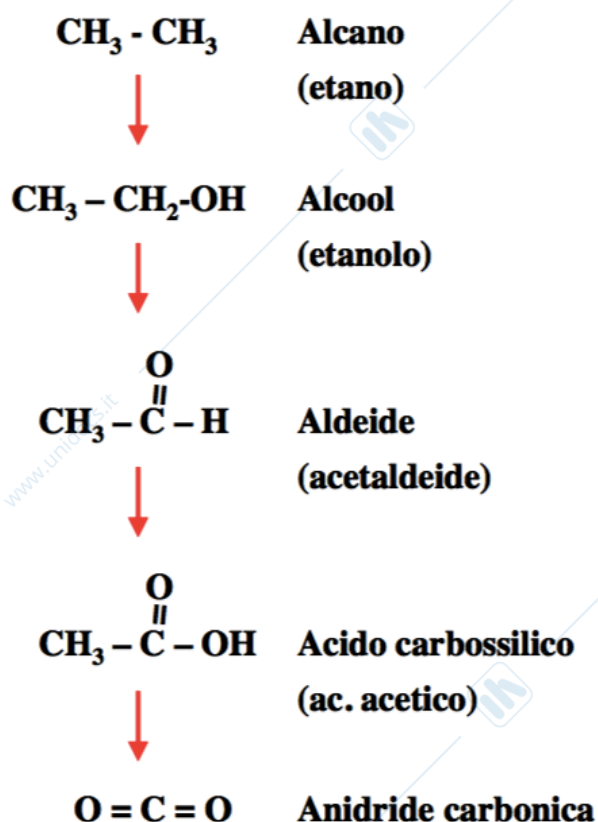
L'energia che si libera quando e^- si associa con B è maggiore di quella che si libera quando si associa con A.

Durante le ossidazioni biologiche si ha un graduale e strettamente regolato passaggio (flusso) di elettroni (e^-) da specie chimiche con minore affinità per gli e^- (che si ossidano) a specie chimiche con maggiore affinità per gli e^- (che si riducono) con progressiva liberazione di Energia (\rightarrow è un processo termodinamicamente favorevole = spontaneo).

L'elettronegatività degli atomi che compongono la stragrande maggioranza delle molecole biologiche cresce nell'ordine:



Nell'etano il C è molto ridotto (perché condivide gli e^- con l'H che è poco elettronegativo) \rightarrow può essere ossidato liberando tantissima energia.



Nell'etanolo il C è già stato leggermente ossidato (perché è legato anche all'O che è tantissimo elettronegativo) \rightarrow può, però, essere ulteriormente ossidato liberando ancora molta energia.

Man mano che il C si lega ad un numero maggiore di atomi di O il suo stato di ossidazione aumenta e quindi diminuisce l'energia che può essere liberata a seguito di sue ulteriori ossidazioni.

Alla fine si otterrà CO_2 che è la forma più ossidata del C (perché è legato solo a 2 atomi di O che sono molto più elettronegativi di lui). A questo punto non è più possibile liberare energia ossidando ulteriormente il C.

Negli organismi aerobi la maggior parte dell'energia biologica deriva dall'ossidazione dei metaboliti ridotti in una serie di reazioni, in cui l'ossigeno è l'accettore finale degli elettroni. L'energia potenziale conservata nei substrati organici viene rilasciata in piccole aliquote rendendo più agevoli il controllo dell'ossidazione e la cattura dell'energia.

Le vie anaboliche e cataboliche sono strettamente connesse → Le vie cataboliche generano energia (chimica) sotto forma di ATP, NADH, NADPH, FADH₂, che sono poi utilizzate nelle vie anaboliche per convertire piccoli precursori in macromolecole.

Le diverse vie cataboliche finiscono per convergere sull'acetil coenzima A (CoA) che viene poi metabolizzato in una via ossidativa centrale (*Ciclo dell'acido citrico*).

1. **Stadio I (Digestione):** Fase preparatoria, non libera energia.
2. **Stadio II:** Si generano piccole molecole che svolgono poi un ruolo centrale nel metabolismo. Si generano piccole quantità di ATP.
3. **Stadio III:** Generazione di grosse quantità di ATP dall'ossidazione completa delle unità acetiliche dell'acetil-CoA (che vengono completamente ossidate a CO₂).

Il catabolismo è un processo *convergente*: una grande varietà di molecole diverse si trasforma in pochi prodotti finali comuni.

L'anabolismo è un processo *divergente*: pochi precursori biosintetici formano una grande varietà di prodotti polimerici o comunque complessi.

In genere in ogni via metabolica vi è una reazione **IRREVERSIBILE** (fortemente esoergonica), normalmente all'inizio, che svolge un ruolo di controllo: in un certo senso "comanda" all'intermedio che essa produce di proseguire lungo la via (nel senso che l'intermedio una volta formato non può più tornare indietro).

La TAPPA DI CONTROLLO diventa spesso anche quella che limita la velocità (di solito è una reazione relativamente lenta → in questo modo l'intermedio che si forma non solo non può tornare indietro ma non ha neanche il tempo di accumularsi → viene rapidamente trasformato nelle successive reazioni della via metabolica).

Le cellule eterotrofe utilizzano molta dell'energia libera rilasciata durante il catabolismo delle molecole di sostanze nutrienti per produrre ATP a partire da ADP + P_i.

L'ATP immagazzina questa energia libera e ne cede poi una parte per "*spingere*" i processi endoergonici (reazioni accoppiate).

Perché l'ATP è un composto ad alta energia (molecola centrale di tutto il metabolismo energetico)?

L'idrolisi dei legami fosfoanidridici dell'ATP è un processo altamente esoergonico con un $\Delta G^{0'} = -31 \text{ kJ/mol}$ per ciascun legame:

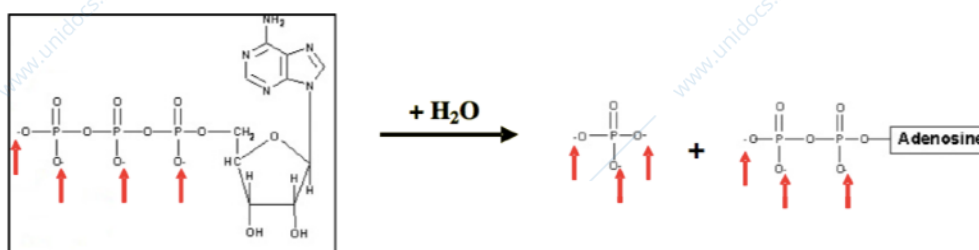
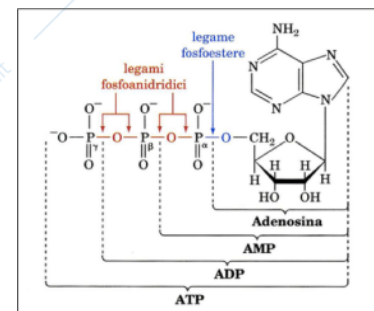
Perché l'idrolisi dei legami fosfoanidridici dell'ATP libera così tanta energia?

Varie ragioni:

1- Lo ione ortofosfato (HPO²⁻) indicato anche come P (fosfato inorganico) possiede 4 forme di risonanza:

Queste forme di risonanza (che non sono possibili nell'ATP) presentano un'elevata entropia e questo aumento di entropia del sistema spiega in parte il ΔG negativo della reazione d'idrolisi (*Stabilizzazione per risonanza del fosfato prodotto*)

2- La quantità totale di molecole d'acqua che si possono legare tramite ponti H è maggiore per l'ADP + P_i (più cariche negative) che non per l'ATP. L'aumento dei legami H fa diminuire l'energia libera del sistema (*Stabilizzazione dovuta all'idratazione*).



3- A pH fisiologico (~ 7) l'ATP contiene 4 cariche negative che si respingono tra loro. Quando l'ATP si idrolizza alcune cariche negative si allontanano e la repulsione diminuisce. La diminuzione della repulsione libera energia (ci va meno energia per tenere vicine delle cariche che tenderebbero a respingersi).

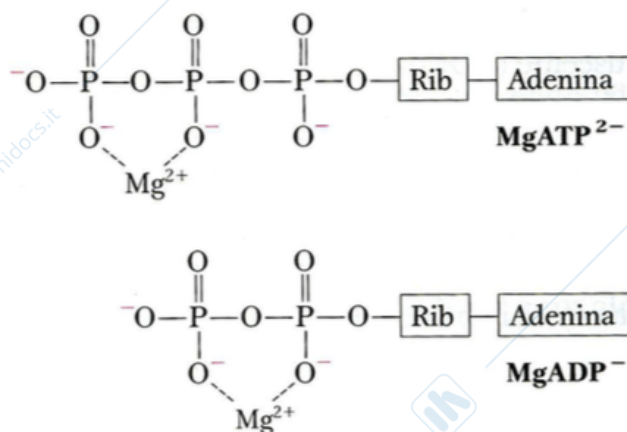
Spesso si dice che i legami fosfoanidridici dell'ATP sono legami ad alta energia. In realtà questa definizione non è proprio corretta, perché questi legami non hanno nulla di particolare (il legame di per se non contiene molta energia).

In realtà la grande variazione di energia libera di segno negativo che accompagna la rottura dei legami fosfoanidridici non dipende dal legame in se ma dal fatto che i prodotti della reazione hanno un contenuto energetico molto minore rispetto ai reagenti.

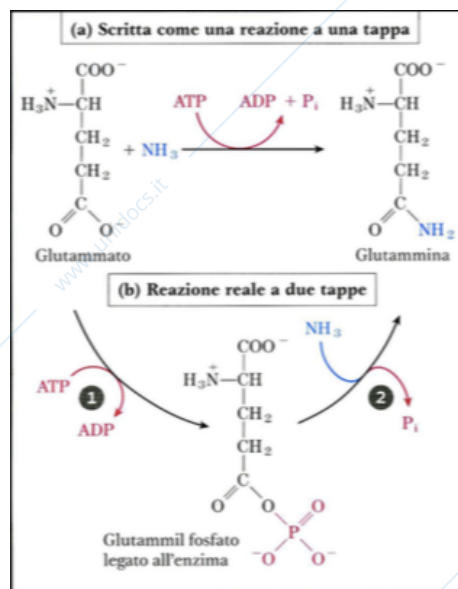
Il pirofosfato liberato PP_i viene poi idrolizzato dall'enzima ubiquitario pirofosfatasi inorganica con liberazione di ulteriore energia.

La variazione di energia libera della reazione di idrolisi dell'ATP è di -31 kJ/mole in condizioni standard (ΔG°), ma la *reale* energia libera di idrolisi (ΔG) dell'ATP nella cellula vivente è molto diversa (pur restando sempre di segno negativo) per due motivi:

- Le [] intracellulari di ATP, ADP e P_i sono ben più basse della [] 1 M delle condizioni standard
- Nella cellula ATP e ADP sono normalmente complessati con Mg^{++} per cui l'ATP è nella forma $MgATP^{--}$.



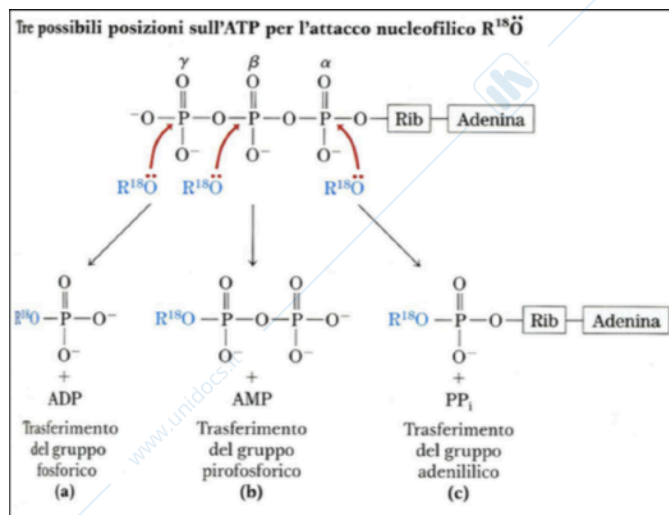
Di norma si dice l'idrolisi dell'ATP fornisce l'energia per una concomitante reazione di sintesi. E' una spiegazione un po' semplicistica perché in realtà l'idrolisi dell'ATP libera solo calore che nella cellula non può essere utilizzato per far avvenire reazioni endoergoniche.



Più correttamente si tratta di reazioni a due tappe nelle quali una parte dell'ATP (il P_i , il PP_i o l'AMP) viene prima trasferito ad un substrato o ad un residuo amminoacidico di un enzima aumentandone il contenuto di energia libera (1° tappa). Il P_i , il PP_i o l'AMP vengono quindi sostituiti da un altro gruppo chimico (2° tappa).

→ l'ATP non viene semplicemente idrolizzato ma partecipa covalentemente (con un intermedio di reazione) alla reazione catalizzata enzimaticamente a cui deve fornire energia.

Tutti e 3 i gruppi fosforici dell'ATP possono subire attacchi nucleofili ----->



Un'eccezione a questa regola generale è rappresentata da alcuni processi (es. contrazione muscolare o trasporto attivo attraverso la membrana cellulare) nei quali l'idrolisi diretta dell'ATP (ad ADP + Pi) fornisce ad una proteina l'energia necessaria per passare da una conformazione ad un'altra.

Il ruolo dell'ATP come molecola chiave del metabolismo energetico deriva non solo dall'elevato valore negativo del ΔG della sua reazione di idrolisi ma anche da una sua importantissima proprietà detta metastabilità.

Si definisce metastabile un composto che è termodinamicamente instabile ma che in assenza di catalizzatori si degrada molto lentamente.

→ L'ATP non dilapida l'energia in esso contenuta perché spontaneamente si idrolizza con tempi di emivita di molte ore (l'energia di attivazione per la reazione d'idrolisi dell'ATP è molto alta). Solo in presenza di enzimi specifici si idrolizza velocemente e libera l'energia.

Per via della sua metastabilità l'ATP cede la sua energia solo quando e dove serve!

N.B. Nei sistemi biologici l'ATP funge da principale fornitore immediato di energia, non da deposito di energia per lunghi intervalli di tempo.

→ Tipicamente in una cellula una molecola di ATP viene idrolizzata entro 1 minuto dalla sua sintesi.

Durante l'esercizio fisico la velocità di utilizzo dell'ATP può arrivare a 0,5 kg/min.

Durante una corsa di 2 ore vengono utilizzati anche 60 kg di ATP.

L'organismo deve costantemente rigenerare l'ATP a partire da ADP + Pi utilizzando l'energia prodotta con l'ossidazione dei nutrienti.

Metabolismo dei carboidrati

Le cellule intestinali sono capaci di assorbire solo i monosaccaridi

→ i carboidrati alimentari sia polisaccaridi (amido, glicogeno e destrine) che disaccaridi (lattosio e saccarosio) vengono preliminarmente digeriti in monosaccaridi da enzimi noti come idrolasi glicosidiche (glicosidasi).

Endoglicosidasi → degradano poli e oligosaccaridi

Disaccaridasi → degradano i tri e disaccaridi

I prodotti finali della digestione dei carboidrati sono glucosio, fruttosio e galattosio che vengono assorbiti dalle cellule dell'intestino tenue.

I legami α -1,4 glicosidici dei polisaccaridi vengono idrolizzati dalle:

- α -amilasi salivare agisce in bocca e viene rapidamente inattivata nello stomaco
- α -amilasi pancreatica agisce a livello intestinale.

Entrambe sono *Endoglicosidasi*.

Principali polisaccaridi di deposito introdotti con la dieta:

- Amido (di origine vegetale):

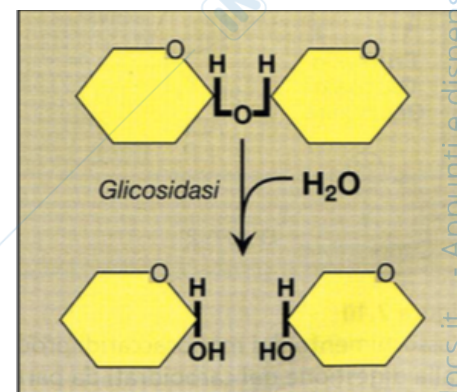
80% Amilopectina Polimero ramificato di α -D-glucosio (legami: α 1→4 e α 1→6 ogni 24-30 unità di glucosio) con P.M. fino a 10^8 Da.

20% Amilosio Polimero lineare di α -D-glucosio (legami: α 1→4) con P.M. tra 10^3 e 10^6 Da.

- Glicogeno (di origine animale, abbondante in muscolo e fegato):

Polimero ramificato di α -D-glucosio (legami: α 1→4 e α 1→6 ogni 8-10 unità di glucosio) con P.M. fino a 108 Da.

I mammiferi non possiedono β 1→4 endoglicosidasi e pertanto non sono in grado di digerire la cellulosa (polisaccaride lineare di origine vegetale formato da residui di glucosio uniti da legami β 1→4 glicosidici).



Oligosaccaridi derivanti dai polisaccaridi e disaccaridi alimentari sono idrolizzati a monosaccaridi da disaccaridasi e oligosaccaridasi intestinali.

Saccarosio → Saccarasi → Glucosio + Fruttosio
 Lattosio → Lattasi → Glucosio + Galattosio
 Trealosio → Trealasi → Glucosio
 Maltosio e Maltotriosio → Maltasi → Glucosio
 Destrine limite → Maltasi e Isomaltasi → Glucosio

Queste disaccaridasi e oligosaccaridasi sono glicoproteine ancorate alla membrana delle cellule della mucosa intestinale (digiuno superiore) con il sito attivo rivolto verso il lume intestinale.

ASSORBIMENTO INTESTINALE DEI MONOSACCARIDI

I monosaccaridi sono assorbiti nel duodeno e nel digiuno superiore ad opera di trasportatori specifici.

In generale il trasporto di un soluto attraverso una molecola biologica può essere suddiviso in tre classi: uniporto, simporto, antiporto.

Glucosio e Galattosio:
 trasportati nell'enterocita da SGLT-1

SGLT-1 → cotrasportatore-1 del glucosio dipendente dal sodio.

→ SGLT-1 trasporta glucosio e galattosio contro gradiente (trasporto attivo) insieme a 2 ioni Na^+ (trasporto simporto). Il trasporto dei monosaccaridi contro gradiente è reso possibile dal concomitante trasporto di Na^+ secondo gradiente. La $[\]$ di Na^+ nell'enterocita è bassa perché c'è una pompa "sodio-potassio" ATP-dipendente che espelle Na^+ (introducendo K^+). Quindi l'assorbimento di glucosio e galattosio a livello intestinale è un processo attivo che richiede energia (idrolisi ATP).

Fruttosio:
 trasportato nell'enterocita da GLUT5

→ trasporto in favore di gradiente (indipendente dal sodio e dall'energia)
 Dall'enterocita glucosio, galattosio e fruttosio passano in circolo passivamente per diffusione facilitata ad opera del carrier GLUT2.

Immessi nel circolo portale i monosaccaridi raggiungono il fegato. Galattosio e fruttosio vengono qui convertiti in glucosio.

In base allo stato nutrizionale e alle esigenze energetiche dell'organismo nel fegato il glucosio viene o depositato in forma di glicogeno (e in trigliceridi dopo essere stato trasformato in acidi grassi) oppure immesso nel circolo generale.

Gli epatociti presentano nella loro membrana cellulare GLUT2 → se la glicemia è elevata (dopo un pasto) il glucosio viene trasportato nelle cellule. Se la glicemia è bassa (digiuno) il glucosio viene trasportato dagli epatociti al sangue.

Nell'organismo esistono almeno 14 trasportatori del glucosio (da GLUT-1 → GLUT-14) che permettono la diffusione facilitata indipendente da sodio del glucosio (e per GLUT-5 del fruttosio) attraverso le membrane cellulari.

Sono tutte proteine integrali di membrana (con 12 α -eliche transmembrana) che differiscono per distribuzione tissutale e proprietà biochimiche (es. K_m per il glucosio).

PRINCIPALI TRASPORTATORI DEL GLUCOSIO **GLUT-1**

Ubiquitario → Trasporto continuo a velocità costante.

GLUT-2

Fegato, cellule β del pancreas, rene, intestino \rightarrow Trasporto continuo a velocità costante. Nel fegato trasporto bidirezionale. Bassa affinità per il glucosio (elevata K_m), che entra nelle cellule solo quando la sua concentrazione nel sangue è elevata. Regola la secrezione pancreatica di insulina.

GLUT-3

Cervello, testicoli \rightarrow Trasporto continuo a velocità costante.

GLUT-4

Muscolo, tessuto adiposo, cuore \rightarrow Depositati nel citoplasma e portati a livello della membrana plasmatica sotto stimolo dell'insulina (\rightarrow $>$ 6-10 volte i n° dei siti attivi), ipossia e apporto dietetico.

GLUT-5

Intestino tenue \rightarrow Trasporta il fruttosio

Il glucosio occupa una posizione centrale nel metabolismo di piante, animali e molti microorganismi.

E' ricco di energia potenziale \rightarrow la completa ossidazione del glucosio a CO_2 e H_2O libera 2840 kJ/mole.

E' un precursore versatile capace di fornire molti intermedi metabolici utilizzabili per le biosintesi (es. E. coli ricava dal glucosio tutti gli aminoacidi, nucleotidi coenzimi, acidi grassi).



\leftarrow Principali vie di utilizzo del glucosio nei mammiferi

Il glucosio è un combustibile importante, ampiamente utilizzato nel mondo vivente.

Nei mammiferi è il solo combustibile utilizzato dal cervello in condizioni nutrizionali normali (non digiuno) e il solo utilizzato in assoluto dagli eritrociti umani.

Come mai tra tutti i monosaccaridi è stato scelto il glucosio? Due possibili spiegazioni:

- Si può formare dalla formaldeide nelle condizioni che si presume ci fossero sulla terra prima della comparsa della vita \rightarrow disponibile come fonte di energia per i sistemi biologici primitivi.
- Ha scarsa tendenza a glicosilare non enzimaticamente

le proteine. Gli altri monosaccaridi tendono a passare dalla forma chiusa a quella aperta e con i loro gruppi carbonilici ($C=O$) si legano alle proteine (ai gruppi amminici) danneggiandole. Il glucosio invece tende a rimanere in forma chiusa.

GLICEMIA: concentrazione ematica di glucosio

Uomo:	5 mM	90 mg/100 ml
Cane :	3.6-6.5 mM	65-118 mg/100 ml
Gatto:	2.8-4.2 mM	50-75 mg/100 ml
Uccelli:	14 mM	250 mg/100 ml
Ruminanti:	2.5-4.2 mM	45-75 mg/100 ml

I livelli di glucosio nel sangue sono mantenuti costanti grazie all'azione coordinata di due ormoni peptidici, l'insulina e il glucagone che (supportati anche da adrenalina e noradrenalina) controllano il metabolismo energetico di molti tessuti ed in particolare di fegato, tessuto adiposo e muscolo. L'insulina segnala ai tessuti che la [] di glucosio nel sangue è più alta del necessario; il glucagone avverte che la disponibilità di glucosio è limitata.

INSULINA

- Secreta dalle cellule β degli isolotti di Langerhans del pancreas.
- Formata da 51 a.a. suddivisi in 2 catene polipeptidiche, A (21 a.a.) e B (30 a.a.).
- Sintetizzata Preproinsulina \rightarrow Proinsulina (nel reticolo endoplasmatico) \rightarrow Insulina (nel Golgi).
- Conservata in granuli citoplasmatici \rightarrow messa in circolo per esocitosi.
- La sequenza amminoacidica cambia nei mammiferi \rightarrow tenerne conto nella terapia del diabete.
- Ipoglicemizzante.
- Secrezione regolata dalla [] di glucosio nel sangue: aumento glicemia, il glucosio entra nelle cellule β tramite GLUT-2 \rightarrow rilascio insulina.
- In misura un po' minore anche un aumento [] amino acidi nel sangue (dopo pasto) \rightarrow rilascio insulina.
- In caso di stress Adrenalina e Noradrenalina per mobilitare le riserve energetiche bloccano per brevi periodi il rilascio di insulina (anche in presenza di elevate [] ematiche di glucosio).

EFFETTI METABOLICI DELL'INSULINA (RILASCIATA DOPO IL PASTO):

- \rightarrow aumenta l'assunzione del glucosio (muscolo, tessuto adiposo) incrementando la quantità di GLUT-4 (conservato all'interno di vescicole citoplasmatiche) presente nella membrana cellulare e stimolando la sintesi della glucochinasi (l'enzima che imprigiona il glucosio dentro all'epatocita)
- \rightarrow nel fegato e nel muscolo stimola la sintesi del glicogeno (polisaccaride di riserva) e riduce la sua degradazione (glicogenolisi)
- \rightarrow incrementa l'attività di alcuni enzimi intracellulari coinvolti nel catabolismo del glucosio (stimola la glicolisi)
- \rightarrow inibisce alcuni enzimi necessari per la sintesi del glucosio (gluconeogenesi)
- \rightarrow favorisce la sintesi degli acidi grassi (nel fegato, a partire da Acetil-CoA) e poi l'esterificazione degli acidi grassi in trigliceridi, specie nel tessuto adiposo. In questo modo parte del glucosio in eccesso viene trasformato in lipidi (trigliceridi) che vengono immagazzinati (conservazione dei combustibili metabolici in eccesso)
- \rightarrow facilita l'ingresso degli aminoacidi nelle cellule e incrementa la sintesi proteica, soprattutto nel fegato e nel muscolo. Gli a.a. non vengono catabolizzati e non originano precursori per la gluconeogenesi. Se catabolizzati \rightarrow AcetilCoA \rightarrow acidi grassi (no glucosio)

CARENZA DI INSULINA causa diabete mellito (\rightarrow iperglicemia, glicosuria)

GLUCAGONE

- Secreta dalle cellule α del pancreas.
- Polipeptide di 29 a.a.
- Insieme ad adrenalina, noradrenalina, cortisolo e ormone della crescita contrasta gli effetti dell'insulina.
- Agisce soprattutto su fegato e tessuto adiposo.
- Favorisce il rilascio in circolo di glucosio (quando la [] è troppo bassa) attivando la glicogenolisi epatica e la gluconeogenesi.

La secrezione di glucagone è stimolata da:

- \rightarrow basso livello ematico di glucosio (es. digiuno notturno o digiuno prolungato).
- \rightarrow aminoacidi (dopo un pasto ricco di proteine bilancia gli effetti dell'insulina).
- \rightarrow adrenalina e noradrenalina (nei periodi di stress, indipendentemente dai livelli di glucosio).

Al contrario:

- \rightarrow elevati livelli ematici di glucosio o di insulina bloccano la secrezione di glucagone

EFFETTI METABOLICI DEL GLUCAGONE (RILASCIATO LONTANO DAI PASTI):

- iperglicemizzante (stimola a livello epatico la glicogenolisi e la gluconeogenesi e inibisce la sintesi di glicogeno e la glicolisi).
- nel tessuto adiposo stimola la degradazione dei trigliceridi: si liberano acidi grassi (esportati nel fegato e in altri tessuti come combustibile metabolico) e glicerolo (utilizzato per la gluconeogenesi epatica).
- stimola l'ossidazione epatica degli acidi grassi e ne inibisce la sintesi. Si forma Acetil-CoA che viene in parte ossidato dal fegato (per produrre energia) e in parte convertito in corpi chetonici che vengono esportati verso altri organi come fonte energetica (fondamentali per il cervello a digiuno).
- aumenta l'ingresso degli a.a. nelle cellule epatiche (catabolizzati forniscono i precursori per la gluconeogenesi) e la degradazione proteica (liberazione a.a per gluconeogenesi).

MECCANISMO DI AZIONE DEL GLUCAGONE

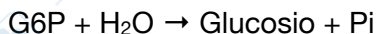
Si lega a recettori sulla membrana plasmatica degli epatociti (non sono presenti nel muscolo scheletrico) → attivazione dell'adenilato ciclasi di membrana che sintetizza cAMP a partire da ATP.

cAMP è il secondo messaggero del glucagone che a sua volta attiva la proteina chinasi A (cAMP-dipendente che fosforila alcuni specifici enzimi → attivazione o inibizione (mediata da fosforilazione) di enzimi regolatori fondamentali per il metabolismo dei carboidrati e dei lipidi.

L'ingresso del glucosio nella cellula è reversibile ma in pratica è reso irreversibile dalla sua immediata fosforilazione.

Gli zuccheri fosforilati sono troppo polari per attraversare la parte idrofobica interna della membrana cellulare e non esistono trasportatori specifici.

N.B. Solo nel fegato (e in minore misura nel rene) è presente una glucosio-6 P- fosfatasi che catalizza la reazione inversa:



La reazione di fosforilazione del glucosio è catalizzata da un enzima chiamato *esochinasi* del quale esistono 4 isoforme (I, II, III, IV) codificate da geni diversi, che variano a seconda di:

- Localizzazione tissutale.
- Caratteristiche cinetiche.
- Funzioni fisiologiche.

E' uno degli enzimi regolatori della glicolisi ed ha un'ampia specificità di substrato (fosforila anche altri esosi oltre al glucosio).

ESOCINASI I, II, III

- Elevata affinità per il glucosio (bassa Km, < 1mM).
- Variamente distribuite in tutti i tessuti.
- Inibite da G6P (prodotto della reazione).

ESOCINASI IV ("GLUCOCHINASI" GK)

- Presente solo a livello epatico e nelle cellule β del pancreas.
- Bassa affinità per il glucosio ma Vmax maggiore (Km = 10 mM).
- Non è inibita da G6P
- E' è inducibile (→ elevate [] glucosio)

Le esochinasi I-III hanno affinità elevata, velocità massimale più bassa e sono inibite dal G6P →

- Se il G6P si accumula (diminuisce il suo utilizzo metabolico) l'enzima evita di produrne altro.
- Il glucosio viene fosforilato (e quindi metabolizzato) anche quando la sua [] nel tessuto è molto bassa (in caso di necessità la cellula riesce ad utilizzare tutto il glucosio disponibile).
- Ha una velocità massimale bassa quindi anche per questo non fosforila più glucosio di quello che la cellula può effettivamente utilizzare.

A valori normali di *glicemia* (lontano dai pasti):

- Le esochinasi I-III sono completamente saturate (la loro attività è massima).

→ La glucochinasi è solo parzialmente saturata (la sua attività è molto al di sotto di quella massima). Il fegato non solo non rimuove glucosio dal circolo sanguigno ma anzi lo rilascia (il glucosio prodotto nel fegato a seguito del catabolismo del glicogeno viene fosforilato poco efficacemente e può così fuoriuscire dall'epatocita).

A valori elevati di *glicemia* (dopo un pasto abbondante di carboidrati):

→ In tutti i tessuti la [] di G6P aumenta → inibizione dell'esochinasi I-III.

→ Nel fegato la GK si attiva (perché aumenta negli epatociti la [] di glucosio) e quindi grazie alla sua elevata V_{max} rimuove efficacemente dal circolo l'eccesso di glucosio (che nel fegato verrà utilizzato per formare glicogeno = polisaccaride di riserva).

In questo modo il fegato concorre a stabilizzare la glicemia dopo un pasto abbondante.

La GK non direttamente inibita dal G6P ma è indirettamente inibita dal F6P tramite una proteina regolatrice della glucochinasi (GKRP) presente nel fegato.

GKRP lega reversibilmente GK e la sequestra nel nucleo inattivandola.

Il F6P facilita il legame tra GKRP e GK (agisce da effettore allosterico positivo) mentre il glucosio compete con il F6P per il legame con GKRP e determina il rilascio di GK (→ riattivandola).

In questo modo se nel fegato si accumula F6P (→ la glicolisi è saturata) la GK riduce la sua attività (→ anche la glicolisi rallenta).

Allo stesso tempo, però, l'epatocita riesce a gestire dopo i pasti elevate [] di G6P che viene indirizzato verso la sintesi di glicogeno.

Si è osservato che:

- Nell'uomo la GK è presente nel fegato solo dopo la nascita e raggiunge la concentrazione definitiva alla II settimana di vita.
 - Nel fegato di gatto, pollo, capra e trota sono assenti la GK e la proteina regolatrice.
 - Deficienza ereditaria di esochinasi causa anemia emolitica:
 - manca ATP, importante per il mantenimento della permeabilità della membrana cellulare
- N.B. Negli eritrociti il solo processo che produce ATP è la glicolisi citoplasmatica.

Il G6P a seconda delle necessità fisiologiche può andare incontro a:

- 1) Isomerizzazione in fruttosio 6P (→ Ossidazione tramite Glicolisi).
- 2) Ossidazione nel lattone dell'ac. 6P gluconico (→ Ossidazione alternativa Ciclo del pentosio fosfato).
- 3) Conversione in G1P (→ Sintesi glicogeno).
- 4) Idrolisi in glucosio e fosfato (fegato) e reintroduzione in circolo.

Glicolisi

Via catabolica nella quale una molecola di glucosio viene convertita in 2 molecole di piruvato con la concomitante produzione di 2 molecole di ATP (da 2 ADP + 2 Pi).

È un processo anaerobico (non richiede O_2) perché probabilmente è comparso già 3,5 miliardi di anni fa quando i primi organismi unicellulari vivevano in un'atmosfera priva di ossigeno.

La trasformazione del glucosio in piruvato (che avviene in assenza di O_2) viene chiamata *Glicolisi anaerobica*.

La glicolisi anaerobica costituisce il nucleo centrale del catabolismo ossidativo del glucosio comune a varie vie metaboliche.

Nei microorganismi anaerobici il piruvato viene ulteriormente convertito in altri composti quali l'acido lattico (il processo complessivo glucosio → lattato è detto Fermentazione lattica) o l'etanolo (glucosio → etanolo = Fermentazione alcolica).

Negli organismi aerobici il piruvato in generale viene poi completamente ossidato a CO_2 e H_2O → in questo caso l'intera viene chiamata Glicolisi aerobica.

In certe condizioni fisiologiche (es. nel muscolo scheletrico sotto intenso sforzo) e in certi tessuti

scarsamente vascolarizzati o in cellule prive di mitocondri (es. cornea, cristallino, midollare rene, testicoli, leucociti, globuli rossi) anche negli organismi aerobici il piruvato viene trasformato in lattato (→ Glicolisi anaerobica).

La demolizione del glucosio mediante la glicolisi è l'unica fonte di energia metabolica in alcuni tessuti di mammifero e in alcuni tipi di cellule (es. cervello, eritrociti, midollare rene, spermatozoi). Nelle cellule eucariotiche ha luogo nel citoplasma.

È una via metabolica che consta di 10 tappe e che da un punto di vista energetico può essere suddivisa in due stadi:

Stadio 1 (Tappe 1 → 5). Investimento energetico.

Fase di intrappolamento del glucosio e di preparazione alla sua demolizione. In questo primo stadio vengono consumate 2 molecole di ATP e il glucosio è scisso in due frammenti a tre atomi di carbonio.

Stadio 2 (Tappe 6 → 10). Recupero energetico.

In questa fase si ha l'ossidazione dei due frammenti a tre atomi di carbonio (generati nella fase precedente) con produzione di 4 molecole di ATP.

Bilancio netto: con la glicolisi (anaerobica) dall'ossidazione di 1 molecola di glucosio si ottengono 2 molecole di ATP.

Durante una delle reazioni della glicolisi (tappa 6) si ha però anche la riduzione di 2 molecole di NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$.

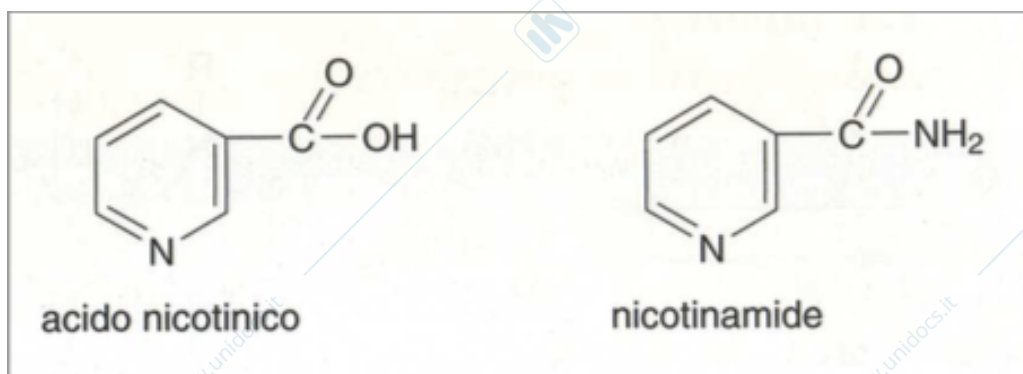
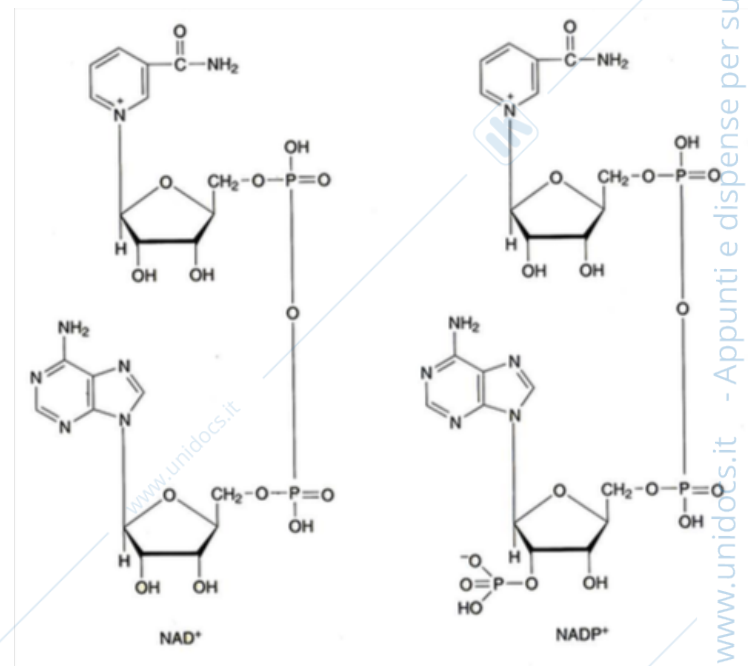
Nelle cellule la disponibilità di NAD^+ (che deriva dalla vitamina B3 o PP) è limitata. Il $\text{NADH} + \text{H}^+$ deve pertanto essere ri-ossidato a NAD^+ altrimenti la glicolisi si arresterebbe presto.

→ la tappa finale della glicolisi consiste nella rigenerazione del NAD^+ attraverso il metabolismo del piruvato.

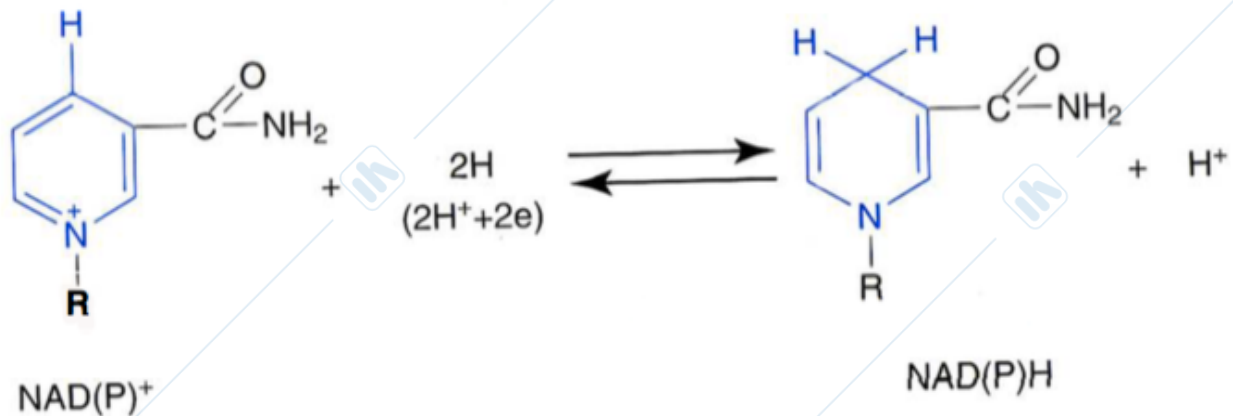
NAD^+ (Nicotinamide Adenin Dinucleotide)

NADP^+ (Nicotinamide Adenin Dinucleotide Fosfato)

Coenzimi di reazioni di ossidoriduzione catalizzate da enzimi detti comunemente deidrogenasi. Nella loro molecola contengono la vitamina PP o B3 (Niacina o acido nicotinic). Gli alimenti contengono anche la nicotinamide che nell'organismo viene rapidamente convertita in ac. nicotinic → nutrizionalmente sono equivalenti.



FUNZIONE: coenzimi di deidrogenasi → ossidazione e riduzione a carico dell'anello della NICOTINAMIDE.



Dei 2 H entrano nell'anello 2 e⁻ + 1 protone (ione idruro :H⁻). Un protone H⁺ viene rilasciato nel mezzo.

NIACINA (VIT. B3)

→ Nella maggior parte dei mammiferi viene sintetizzata dal triptofano in quantità però insufficiente al fabbisogno giornaliero.

→ Per gatti e altri felini la disponibilità di niacina nella dieta è indispensabile perché non riescono a sintetizzarla a partire da triptofano.

CARENZA: rara, soprattutto a seguito di diete povere di triptofano (il mais ne contiene molto poco).

Nell'UOMO causa la pellagra (malattia delle 3d)

- dermatite ("pelle agra = rugosa")
- diarrea
- demenza

Se non curata è mortale.

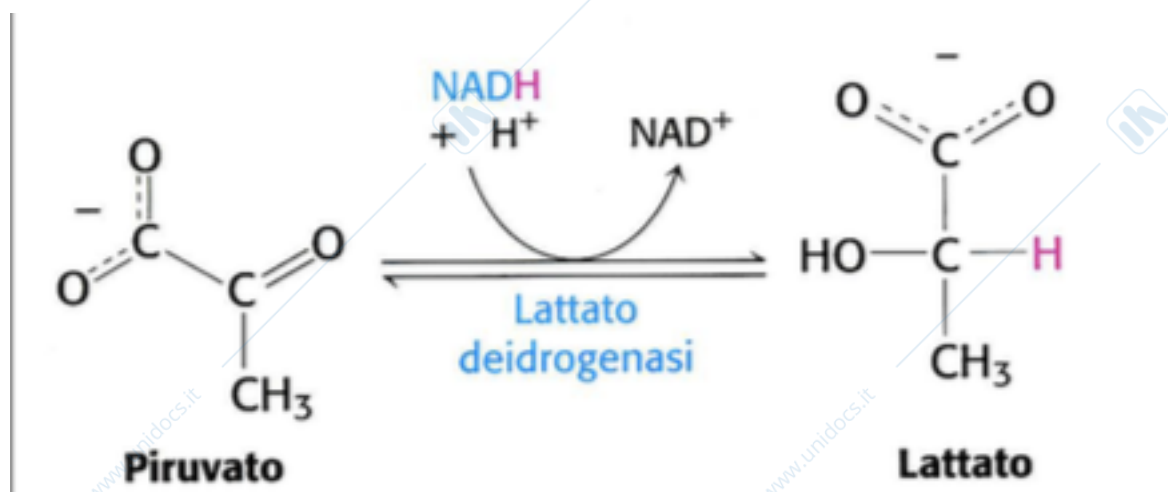
Nel CANE causa una patologia simile detta "black tongue".

Nel MAIALE causa alterazioni della cute e dell'apparato digerente.

Il destino metabolico del piruvato varia a seconda degli organismi e delle situazione funzionale degli organi.

1) Piruvato → Lattato

(Fermentazione lattica)



Avviene normalmente nei microorganismi anaerobi ma anche nelle cellule degli organismi superiori quando la quantità di O₂ disponibile è limitata (es. muscolo durante attività fisica intensa) o in cellule prive di mitocondri (es. eritrociti).

LATTATO DEIDROGENASI (LDH)

Presente nel citosol, tetramero costituito da tutte le possibili combinazioni di due diverse catene polipeptidiche:

H (heart: cuore) M (muscle: muscolo)

- H₄ (LDH1) : predominante nel muscolo cardiaco.
- M₄ (LDH5): prevalente nel muscolo scheletrico e fegato.
- 3 ibridi
 - HHHM (LDH2)
 - HHMM (LDH3)
 - HMMM (LDH4)

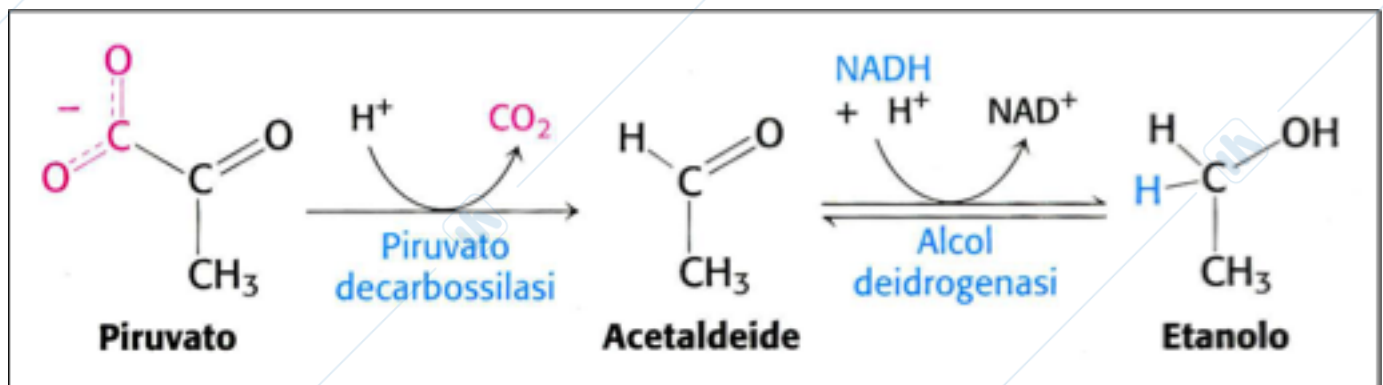
Diversamente distribuiti nei vari tessuti e con diverse proprietà biochimiche.

H₄ ossida il lattato a piruvato che viene usato nel cuore come combustibile in condizioni aerobiche (il cuore non funziona mai in condizioni anaerobiche).

M₄ può anche agire in senso opposto (riducendo il piruvato a lattato) per permettere la glicolisi in condizioni anaerobiche.

2- Piruvato → Etanolo

(Fermentazione alcolica)



Avviene nei lieviti e in altri microorganismi in assenza di O₂.

3- Piruvato → CO₂ + H₂O

In presenza di ossigeno, negli organismi pluricellulari e in molti unicellulari il piruvato viene completamente ossidato a CO₂ e H₂O (tramite la decarbossilazione ossidativa e il ciclo dell'acido citrico). In questo caso le 2 molecole di NADH + H⁺ vengono riossimate dall'O₂ nella catena respiratoria.

La glicolisi anaerobica e le fermentazioni lattica ed etilica forniscono solo una piccola frazione dell'energia che si ottiene con l'ossidazione completa del glucosio in presenza di O₂ (glicolisi aerobica):

→ da 1 molecola di glucosio 2 molecole di ATP (glicolisi anaerobica/fermentazioni) contro 38 (glicolisi aerobica).

Perché le fermentazioni sono così diffuse?

- Non necessitando di O₂ permettono a molti organismi di adattarsi ad ambienti inospitali: sottosuolo, fondo del mare, pori della pelle.
- Le fermentazioni possono essere 100 volte più veloci rispetto alla glicolisi aerobica. Si produce meno ATP ma molto più velocemente.
- Il muscolo scheletrico può funzionare anaerobicamente per brevi periodi. Sforzo molto intenso e breve → la richiesta di ATP supera la capacità dell'organismo di fornire O₂ ai muscoli → per brevi periodi l'ATP viene prodotto dalla glicolisi anaerobica con trasformazione del piruvato in lattato. N.B. Questo processo non rappresenta uno spreco di glucosio, perché il lattato viene

trasportato nel fegato (dove viene nuovamente ossidato a piruvato e utilizzato o per risintetizzare glucosio o ulteriormente catabolizzato nel ciclo dell'acido citrico) e nel cuore (dove viene nuovamente ossidato a piruvato e utilizzato esclusivamente nel ciclo dell'acido citrico).

Ciclo di Cori

Glucosio → Lattato (Nel muscolo).

Lattato → Glucosio (Nel fegato).

Glicolisi

Da Glucosio a Piruvato → 10 reazioni (Tappe) CITOPLASMATICHE

1° Tappa **Fosforilazione del Glucosio (→ Glucosio 6-fosfato, G6P)**

2° Tappa **Isomerizzazione del G6P a Fruttosio 6-fosfato (F6P)**

L'enzima fosfoesosio isomerasi (fosfoglucoisomerasi) catalizza l'isomerizzazione reversibile del G6P (aldoso) in F6P (chetoso).

3° Tappa **Fosforilazione del F6P a Fruttosio 1,6-bisfosfato (F1,6BP)**

(N.B. bi = 2 gruppi fosforici legati separatamente, di = 2 gruppi fosforici uniti tra di loro).

L'enzima fosfofruttochinasi-1 (PFK-1) catalizza la fosforilazione del F6P. Reazione essenzialmente irreversibile (ΔG molto negativo), può essere considerata la prima reazione "di comando della glicolisi", controlla la velocità e non permette alla via metabolica di tornare indietro.

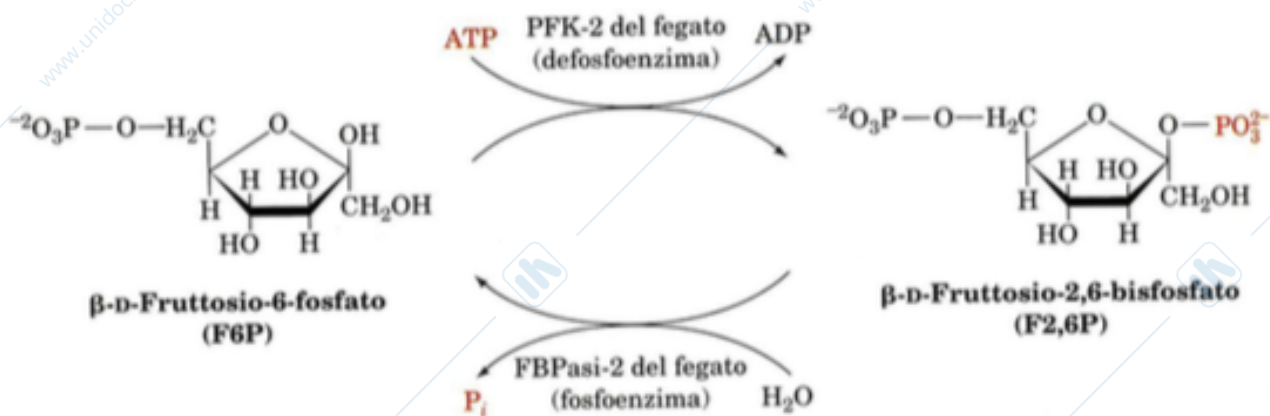
Fosfofruttochinasi-1 (PFK-1) → enzima chiave della glicolisi anche perché quando il G6P deriva dal glicogeno (es. nel muscolo scheletrico) l'attività dell'esochinasi non è indispensabile.

La PFK-1 è un enzima tetramerico sottoposto a controllo allosterico ad opera di molti effettori:

- Citrato, ATP Indicano che nella cellula c'è già un'abbondanza di composti ad alta energia (→ la glicolisi non serve).

+ AMP, ADP, Pi Indicano che nella cellula c'è scarsità di composti ad alta energia (→ la glicolisi viene attivata).

Un potentissimo effettore + della PFK-1 è il fruttosio 2,6-bisfosfato (F2,6BP) → fa aumentare di molto l'affinità della PFK-1 per il F6P.



Le attività PFK-2 e F2,6 bisfosfatasi sono localizzate su 2 domini diversi di una stessa proteina (enzima bifunzionale). La regolazione di questo enzima bifunzionale dipende dal suo stato di fosforilazione/defosforilazione.

Una PROTEINA CHINASI stimolata (tramite AMPc) da glucagone fosforila l'enzima: Glucagone (fosforilazione enzima):

→ inibisce la PFK-2



Non si forma F2,6BP → La glicolisi rallenta

→ attiva F2,6 bisfosfatasi

Insulina attiva una proteina fosfatasi (defosforilazione dell'enzima):

→ attiva la PFK-2

→ inibisce F2,6 bisfosfatasi



Si forma F2,6BP → La glicolisi viene fortemente stimolata

N.B. Il fruttosio 2,6 bisfosfato non solo stimola la glicolisi (attivando la PFK-1) ma contemporaneamente inibisce la gluconeogenesi (inibisce un enzima chiave di questa via anabolica, la fruttosio 1,6-bisfosfatasi).

4° Tappa **Scissione del F1,6BP**

L'enzima aldolasi scinde il F1,6BP in diidrossiacetone fosfato (chetoso) e gliceraldeide 3-fosfato (aldoso). Anche se il $\Delta G'^{\circ}$ è positivo, in realtà alle [] di reagenti presenti nella cellula la variazione di energia libera è minima e quindi la reazione è facilmente reversibile (può avvenire nelle 2 direzioni a seconda delle necessità della cellula).

5° Tappa **Isomerizzazione dei triosofosfati**

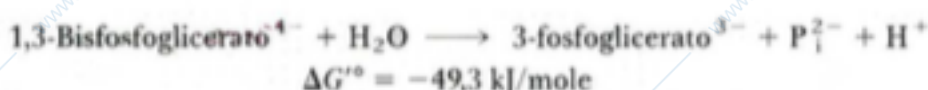
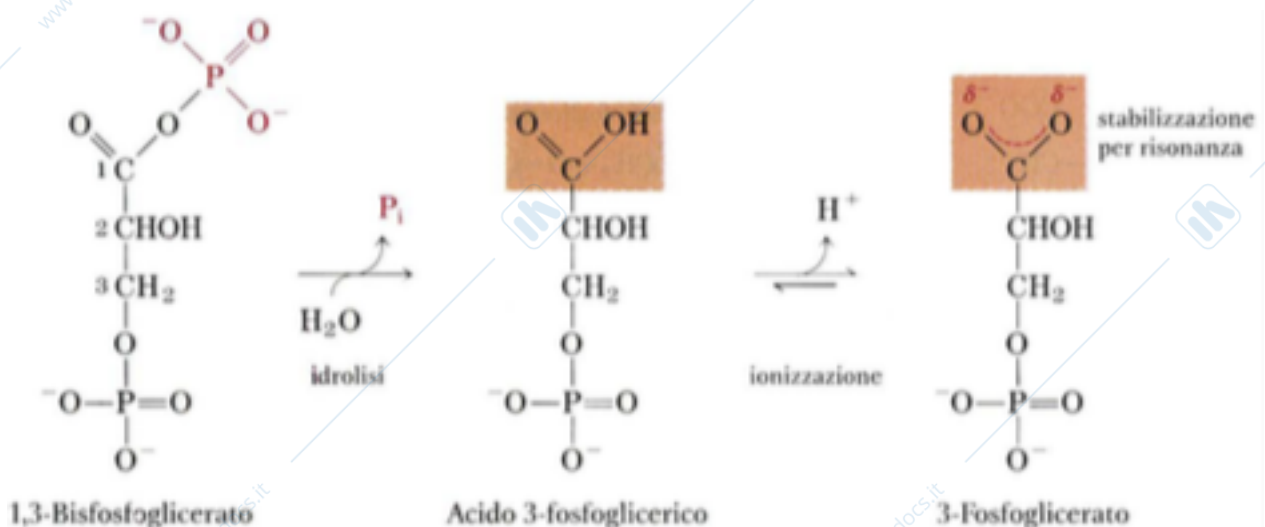
Solo la gliceraldeide 3-fosfato può essere degradata nelle tappe successive della glicolisi. Il diidrossiacetone fosfato viene quindi rapidamente e reversibilmente convertito in gliceraldeide 3P dalla triosio fosfato isomerasi.

6° Tappa **Ossidazione della gliceraldeide 3P a 1,3-bisfosfoglicerato**

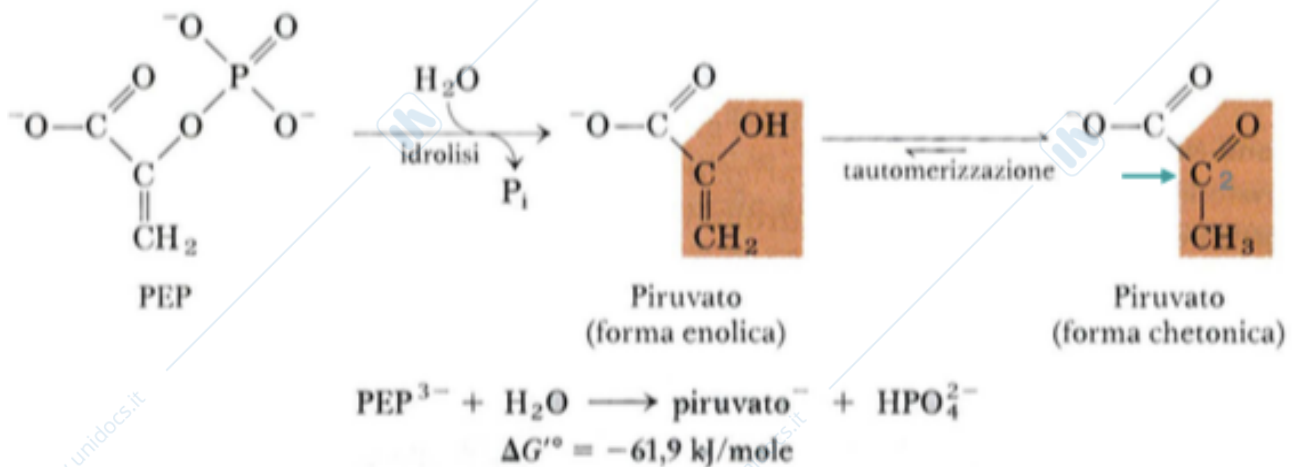
Questa reazione catalizzata dalla gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi è la prima delle due reazioni della glicolisi in cui viene recuperata l'energia necessaria alla sintesi di ATP. Il gruppo aldeidico della gliceraldeide 3P viene ossidato ma non a formare un gruppo carbossilico libero (-COOH) ma un'anidride tra un gruppo carbossilico e l'acido fosforico. Questo tipo di anidride (chiamato acil fosfato) ha un'elevatissima energia libera standard di idrolisi ($\Delta G'^{\circ} = -49,3 \text{ kJ/mol}$) → quando si idrolizza libera energia sufficiente per la sintesi di 1 molecola di ATP.

L'1,3-bisfosfoglicerato (così come il fosfoenolpiruvato, PEP) è un composto con un'energia libera di idrolisi molto elevata (→ la variazione di energia libera standard della reazione di idrolisi è molto grande perché l'energia libera dei prodotti è molto più bassa di quella del reagente).

Nel caso dell'1-3 bisfosfoglicerato (reagente) si forma acido 3-fosfoglicerico che si stabilizza per ionizzazione (può formare molti ponti H) e poi per risonanza (si formano 2 strutture, aumenta l'entropia).



Nel caso del fosfoenolpiruvato (reagente) si forma piruvato che si stabilizza per tautomerizzazione (isomerizzazione). Il piruvato è molto più stabile (\rightarrow ha un'energia libera minore del PEP) perché nella forma chetonica il C 2 è molto più ossidato.



7° Tappa **Trasferimento del gruppo fosforico del 1,3 bisfosfoglicerato all'ADP**

L'enzima fosfoglicerato chinasi trasferisce all'ADP il gruppo fosforico ad alta energia del gruppo carbossilico dell'1,3-bisfosfoglicerato per formare ATP e 3-fosfoglicerato.

L'energia rilasciata durante l'ossidazione di un gruppo aldeidico a gruppo carbossilico (tappe 6° e 7°) viene conservata attraverso la reazione accoppiata di sintesi di ATP da ADP e P_i .

La formazione di ATP per trasferimento di un gruppo fosforico da un substrato (quale l'1,3 bisfosfoglicerato) all'ADP è detta Fosforilazione a livello di substrato per distinguerla dalla fosforilazione accoppiata alla catena respiratoria (Fosforilazione ossidativa mitocondriale).

Fosforilazione a livello di substrato:

\rightarrow coinvolge enzimi solubili e intermedi chimici (es. l'1,3 bisfosfoglicerato).

Fosforilazione dipendente dalla catena respiratoria:

\rightarrow coinvolge enzimi legati alla membrana e gradienti protonici transmembrana.

8° Tappa **Conversione del 3P-glicerato in 2-fosfoglicerato**

La reazione avviene in 2 tappe e necessita di un gruppo fosforico inizialmente legato a un residuo di istidina (His) della mutasi. Questo fosforo viene trasferito all'ossidrilico in C-2 del 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Successivamente il fosfato in C-3 viene trasferito allo stesso residuo di His dell'enzima. Si forma così il 2-fosfoglicerato e l'enzima fosforilato viene rigenerato.

9° Tappa **Deidratazione del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato**

L'enzima enolasi catalizza la rimozione reversibile di una molecola d'acqua dal 2-fosfoglicerato per generare fosfoenolpiruvato (PEP).

La reazione converte un composto con un potenziale di trasferimento del gruppo fosforico relativamente basso (il $\Delta G'^{\circ}$ di idrolisi del 2-fosfoglicerato è $-17,6 \text{ kJ/mole}$) in uno con un elevato potenziale di trasferimento (il $\Delta G'^{\circ}$ di idrolisi del PEP è di $-61,9 \text{ kJ/mole}$).

10° Tappa **Trasferimento del fosfato dal PEP all'ADP**

L'enzima piruvato chinasi opera una seconda fosforilazione a livello del substrato dell'ADP ad ATP.

Il piruvato prodotto compare prima nella sua forma enolica e poi tautomerizza rapidamente e spontaneamente (a pH 7) nella forma chetonica.

La reazione complessiva ha una variazione di energia libera standard fortemente negativa.

Circa metà dell'energia rilasciata dall'idrolisi del PEP ($\Delta G'^{\circ} = -61,9$ kJ/mole) viene conservata nella formazione del legame fosfoanidridico dell'ATP ($\Delta G'^{\circ} = -30,5$ kJ/mole) mentre la restante parte (-31,4 kJ/mole) serve come forza trainante per spingere la reazione verso la sintesi di ATP.

La piruvato chinasi (PK) è regolata da effettori allosterici:

+ Fruttosio 1,6-bisfosfato (prodotto dalla PFK-1, indica che la glicolisi sta lavorando pieno regime).
 - Citrato, ATP, Acetil-CoA, acidi grassi a lunga catena (indicano che nella cellula già un buon apporto energetico → la glicolisi non serve).

Esistono 3 isoenzimi della PK:

- A. M: muscoli e cervello.
- B. A: altri tessuti.
- C. L: fegato.

La sola forma L è soggetta a regolazione mediante meccanismi di fosforilazione e defosforilazione.

Forma fosforilata → meno attiva (glucagone stimola la fosforilazione).
 L'insulina invece fa aumentare per induzione la quantità di enzima PK.

Bilancio complessivo glicolisi:

Glucosio + 2ATP + 2NAD + 4ADP + 2Pi → 2piruvato + 2ADP + 2NADH + 2H + 4ATP + 2H₂O

Eliminando i termini comuni a destra e sinistra si ottiene l'equazione complessiva della glicolisi in condizioni aerobiche:

Glucosio + 2NAD + 4ADP + 2Pi → 2piruvato + 2NADH + 2H + 2ATP + 2H₂O

Se si parte da glicogeno intracellulare si ricavano 3 ATP perché il G1P si forma per fosforilazione mediante un Pi e non tramite un ATP.

REGOLAZIONE GLICOLISI

1. Fondamentali sono:
 La disponibilità di glucosio nella cellula.
2. La concentrazione di G6P: l'aumento di G6P inibisce l'esochinasi e stimola la glicogeno sintasi.
3. Le attività di PFK-1 e PK.
4. Disponibilità di NAD⁺.

N.B.

- Tutti i metaboliti intermedi della glicolisi si presentano fosforilati e perciò rimangono nel citoplasma a disposizione degli enzimi glicolitici.
- Fegato e rene possiedono la G6-fosfatasi → liberano glucosio nello spazio extracellulare (in circolo).

Attivazione/inibizione allosterica e tramite fosforilazione/defosforilazione degli enzimi:
 → Modulazione a breve termine (regola il consumo di glucosio per minuti/ore).

Regolazione dei livelli (quantità) di enzimi indotti da insulina e glucagone:

→ Modulazione a lungo termine (per instaurarsi richiedono giorni e gli effetti perdurano a lungo).
 In particolare l'insulina attiva la trascrizione dei geni dell'esochinasi II, della glucochinasi, della PFK-1, della PK e della PFK-2/FBPasi-2.

METABOLISMO GLICIDICO NEI GLOBULI ROSSI (GR).

La 7° tappa della glicolisi nei GR presenta anche una variante.

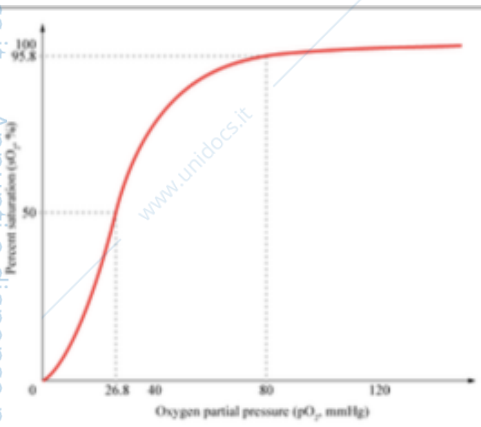
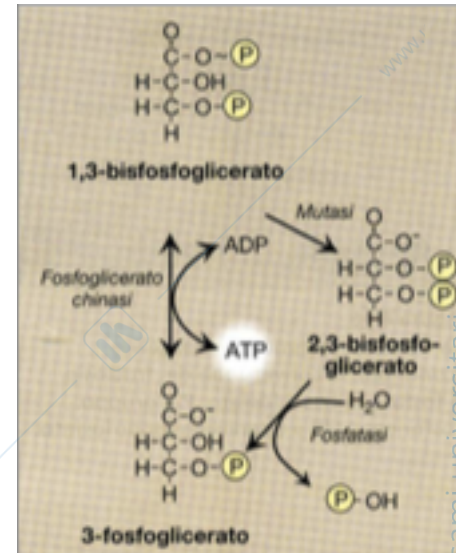
L'1,3-bisfosfoglicerato può essere anche trasformato da una *Mutasi* in 2,3-bisfosfoglicerato che viene poi convertito da una *Fosfatasi* in 3-fosfoglicerato (→ senza sintesi di ATP).

Solo nei GR la [] di 2,3-bisfosfoglicerato è molto elevata. *Perché?*

Il 2,3-bisfosfoglicerato agisce come modulatore dell'affinità dell'emoglobina (Hb) per l'O₂ → favorisce il rilascio di O₂ nei tessuti stabilizzando la conformazione della deossiHb.

Emoglobina A → Proteina presente solo nei GR, è composta da 4 catene polipeptidiche (2 catene α e 2 catene β) unite da interazioni non covalenti. Trasporta 4 atomi di O₂ dai polmoni ai capillari tissutali. Il tetramero è formato da 2 dimeri (αβ) e ciascun monomero contiene un gruppo eme che lega l'ossigeno.

L'emoglobina esiste in 2 forme interconvertibili dette "forma T" (deossi Hb), bassa affinità per l'O₂ e "forma R" (ossi Hb), alta affinità per l'O₂.



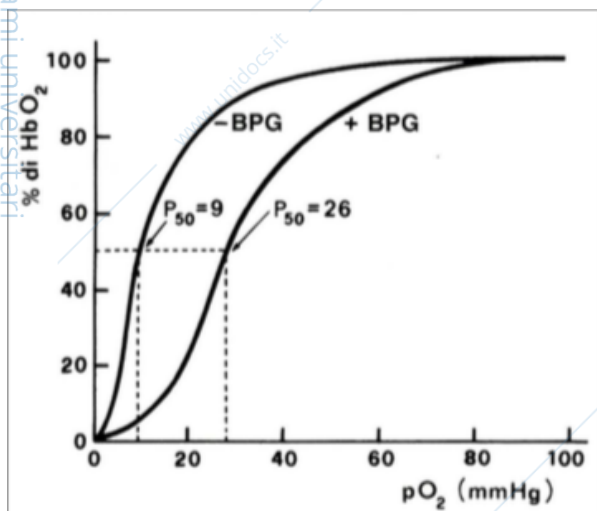
Grado di saturazione (Y) dell'O₂ varia da 0 (Hb non ha legato O₂) a 100% (tutti i siti di legame sono occupati da O₂).

Curva di dissociazione dell'ossigeno: grafico che mostra il variare di Y al variare della pressione parziale dell'ossigeno (pO₂).

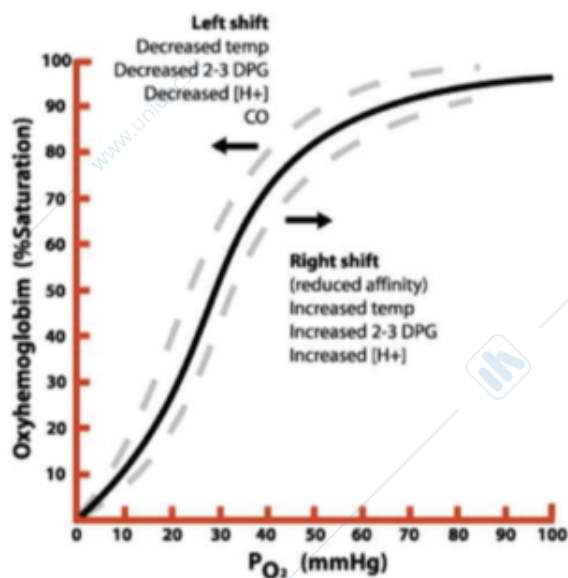
Andamento sigmoide → le subunità cooperano nel legame con l'O₂. Il legame di una molecola di O₂ con una catena di Hb fa aumentare l'affinità per l'ossigeno delle altre catene del tetramero.

L'andamento sigmoide della curva di dissociazione dell'O₂ dall'Hb di legare molto ossigeno (nei polmoni) e di rilasciarlo tutto nei tessuti, nonostante la differenza di pO₂ tra alveoli e capillari non sia molto accentuata.

Il 2,3-BPG si lega solo alla deossi Hb e stabilizza la forma T (a bassa affinità per l'O₂) → riduce l'affinità dell'Hb per l'ossigeno, la curva di dissociazione dell'O₂ si sposta verso destra (diventa ancor più sigmoide).



Facilita ancor più il rilascio dell'O₂ ai valori di pO₂ che si riscontrano nei tessuti.



Stesso effetto se si abbassa il pH (glicolisi anaerobica → produzione lattato) o se aumenta la T° (sforzo muscolare intenso).

La [] di 2,3-BPG nei globuli rossi aumenta:

- 1- In risposta all'ipossia cronica: malattia cronica polmonare ostruttiva (es. enfisema). Ad altitudini elevate.
- 2- In caso di anemia cronica: un numero ridotto di GR deve soddisfare le necessità dell'organismo.



Diminuisce l'affinità dell'Hb per l'O₂ e quindi è facilitata la cessione dell'ossigeno nei tessuti.

ALTERAZIONI DEL METABOLISMO GLICIDICO NEI GLOBULI ROSSI (GR).

Il glucosio è l'unico combustibile utilizzato dai globuli rossi (GR) che possono ricavare ATP esclusivamente dalla glicolisi anaerobica (poiché sono privi di mitocondri).

Nei GR l'ATP è indispensabile per le necessità metaboliche e soprattutto per alimentare le pompe ioniche necessarie per mantenere l'integrità e la flessibilità della membrana eritrocitaria. Carenza di enzimi glicolitici nei GR → anemia emolitica (determinata da alterazione della membrana cellulare e fagocitosi da parte dei macrofagi della milza).

Questo tipo di anemia emolitica (su base enzimatica) è principalmente causata da una carenza della *Piruvato chinasi* (PK) o, in misura minore, dell'*Esochinasi*.

PK → enzima mutato, poco abbondante e/o poco attivo. La gravità della malattia dipende dal grado di deficit enzimatico (variabile tra il 5% e il 35% di quello normale). Nelle forme più gravi sono indispensabili trasfusioni regolari.

GLICOLISI E CANCRO.

Le cellule tumorali trasportano più velocemente il glucosio al loro interno e hanno una glicolisi più attiva (metabolizzano il glucosio in lattato anche in presenza di O₂).

L'aumento del trasporto del glucosio (captazione) correla con l'aggressività del tumore e con una prognosi infausta.

→ questa proprietà viene sfruttata per visualizzare i tumori utilizzando un analogo radioattivo non metabolizzabile del glucosio (che si accumulerà nelle cellule tumorali) che può essere poi individuato dalla tomografia per emissione di protoni (PET).

Perché le cellule tumorali metabolizzano con accresciuta efficienza il glucosio a lattato?

→ secernono lattato che facilita l'infiltrazione del tumore e protegge le cellule cancerose dall'attacco del sistema immunitario.

→ le cellule cancerose crescono più rapidamente dei vasi sanguigni che le nutrono. Si riduce anche l'apporto di O₂ (ipossia) e questo giustifica un ricorso preferenziale alla glicolisi anaerobica

(che però ha una resa energetica molto minore e quindi c'è necessità di utilizzare molto più glucosio).

L'ipossia attiva il "fattore di trascrizione indotto dall'ipossia (HIF-1)" che fa aumentare l'espressione della maggioranza degli enzimi glicolitici e di due trasportatori del glucosio (GLUT-1 e GLUT-3). Inoltre HIF-1 aumenta anche l'espressione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) che promuove la vascolarizzazione del tumore (angiogenesi) → in questo modo il tumore riceve comunque abbastanza nutrimento per accrescersi.

Sono attualmente allo studio farmaci antitumorali che mirano ad inibire la glicolisi (inibitori dell'esochinasi) o l'angiogenesi dei tumori.

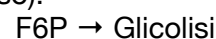
Effetti simili (aumento della produzione di ATP in condizioni anaerobiche e aumento della vascolarizzazione) si osservano anche nell'allenamento molto intenso in condizioni anaerobiche degli atleti.

Oltre al glucosio, altre molecole possono entrare nella glicolisi, convertite da opportuni enzimi in uno degli intermedi di questa via.

FRUTTOSIO

- Fornisce il 10% delle calorie della dieta (paesi occidentali)
- Deriva principalmente dal saccarosio.
- Presente come monosaccaride nella frutta, miele, sciroppo di mais.
- Il suo assorbimento cellulare non è regolato dall'insulina e non promuove il rilascio di insulina.

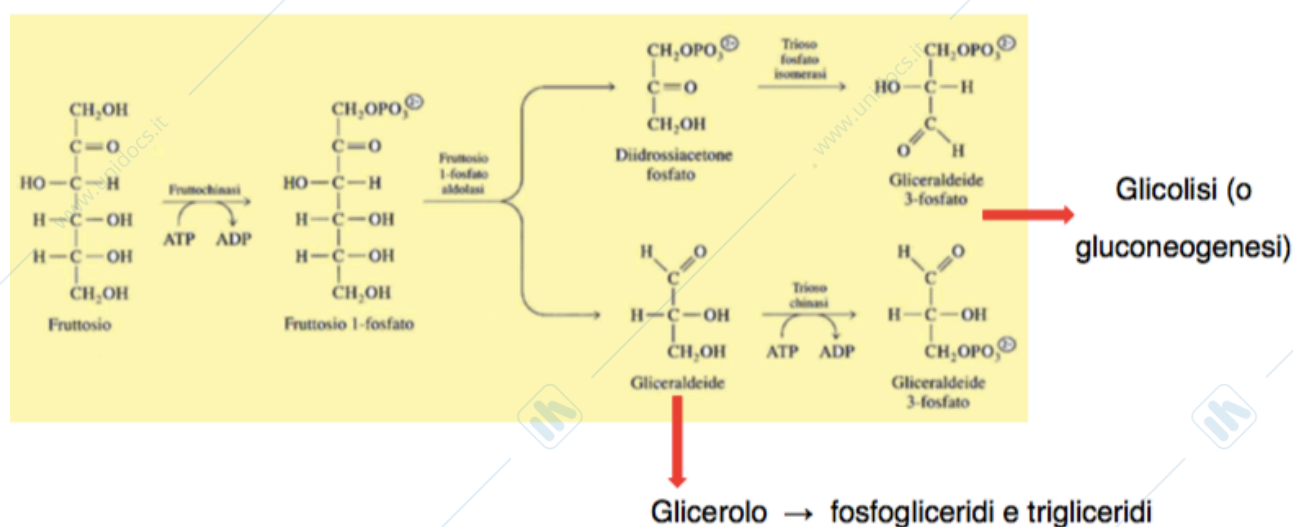
► Nella maggior parte delle cellule (es. muscolo, tessuto adiposo).



Reazione catalizzata dall'esochinasi che ha una K_m molto elevata per il fruttosio (→ fosforila maggiormente il glucosio).

► Nel fegato (e in misura minore reni e mucosa intestino tenue).

L'enzima *Fruttochinasi* fosforila il fruttosio a F1P.



La Fruttochinasi ha bassa K_m ed elevata V_{max} per il fruttosio.

Fruttosio 1-P aldolasi o Aldolasi B riesce a scindere anche il F1P.

L'aldolasi B sembra poco efficiente nel fegato di gatto → limitare l'assunzione di saccarosio e di fruttosio!

MANNOSIO

Presente in molte glicoproteine, glicolipidi e polisaccaridi. Epimero del glucosio in C2.
 Mannosio + ATP → Mannosio 6P + ADP
 Esochinasi

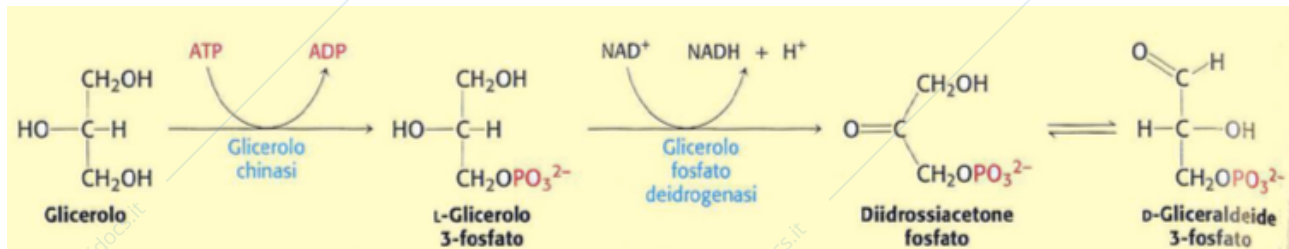
Mannosio 6P → Fruttosio 6P

Mannosio isomerasi

F6P → Glicolisi

GLICEROLO

Viene prodotto dall'idrolisi dei trigliceridi e può entrare nella glicolisi in questo modo:



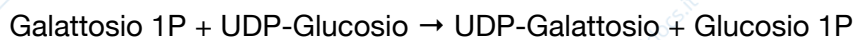
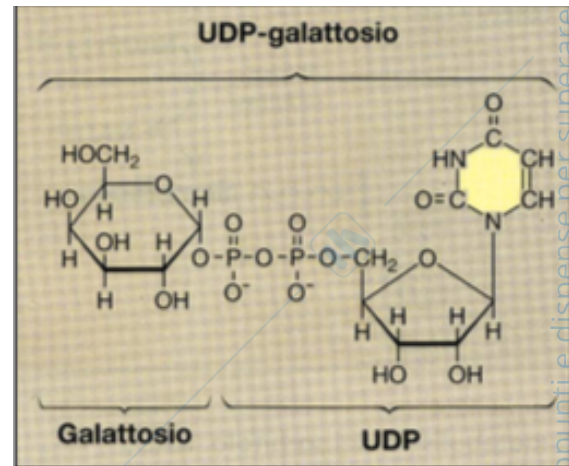
GALATTOSIO

Deriva dal lattosio introdotto con la dieta. L'ingresso del galattosio nella cellula non è regolato dall'insulina. Metabolizzato a livello epatico.

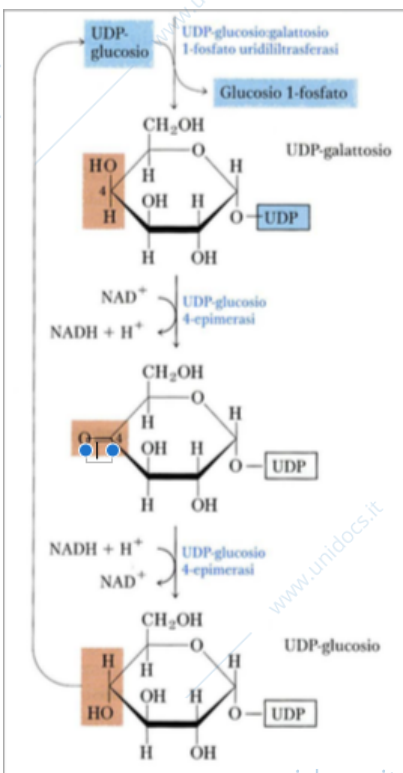
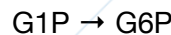
Inizialmente il galattosio viene fosforilato a galattosio 1P dalla galattochinasi.

Per poter entrare nella glicolisi il galattosio 1P deve prima essere trasformato in uridina difosfato (UDP)-galattosio.

La sintesi dell'UDP-galattosio avviene in una reazione di scambio catalizzata dall'enzima galattosio 1-fosfato uridiltrasferasi (GALT).



Il Glucosio 1P viene trasformato in G6P dalla fosfoglucomutasi e utilizzato nella glicolisi.



L'UDP-Galattosio viene invece convertito in UDP-Glucosio dall'enzima UDP-esoso 4 epimerasi (tramite l'ossidazione del gruppo - OH in C-4 a gruppo chetonico e la successiva riduzione ad ossidrile). La molecola di UDP-Glucosio che si forma può essere impiegata in varie vie biosintetiche (tra le quali la sintesi del lattosio) oppure essere utilizzata nella reazione catalizzata dalla GALT per liberare una molecola di G1P (utilizzando una nuova molecola di Galattosio 1P) per la glicolisi.

SINTESI DEL LATTOSIO.

Il lattosio (galattosil β 1 \rightarrow 4 glucosio) è lo "zucchero del latte" ed è prodotto dalla ghiandola mammaria della maggior parte dei mammiferi durante la lattazione. Rappresenta la principale fonte energetica durante l'allattamento.

Viene sintetizzato nell'apparato del Golgi (deve essere secreto \rightarrow pathway secretorio) dalla lattosio sintetasi che catalizza la seguente reazione:



La lattosio sintetasi è un enzima dimerico formato dall'unione della Proteina A e della Proteina B.

Proteina A (β -D-galattosil transferasi):

presente in numerosi tessuti dove è coinvolta nell'inserimento del galattosio (a partire da UDP-galattosio) in molte glicoproteine.

Proteina B (α -lattalbumina):

presente solo nella ghiandola mammaria in lattazione. La sua sintesi è stimolata dall'ormone ipofisario prolattina. Associandosi con la Proteina A ne modifica le proprietà in modo che trasferisca il galattosio al glucosio (e non alle glicoproteine).

DIGESTIONE DEL LATTOSIO.

Operata dalla lattasi (intestino tenue) \rightarrow galattosio + glucosio

- ▶ Fornisce il Galattosio ai neonati, utile anche per la sintesi dei gangliosidi nel cervello in sviluppo.
- ▶ E' una β -galattosidasi (nell'uomo unico enzima in grado di rompere un legame β -glicosidico). ▶ È inducibile.
- ▶ Appare nel feto solo negli stadi avanzati di gestazione ($>$ dopo la nascita, $<$ 3-5 anni).

Bassi livelli: intolleranza al lattosio.

Gluconeogenesi

- Comporta la formazione di glucosio a partire da precursori NON glicidici.
- Si attiva lontano dai pasti ed in particolare nei casi di digiuno prolungato, quando l'organismo ha esaurito le riserve glicidiche (glicogeno epatico) e inizia a demolire le proteine secondo un controllo ormonale (cortisone, cortisolo, aldosterone).
- Il glicogeno epatico può soddisfare le esigenze di glucosio dell'organismo (a digiuno) solo per 10-24 ore (a seconda delle condizioni).
- Avviene principalmente nel fegato e in misura minore nella corteccia del rene e nelle cellule epiteliali della mucosa dell'intestino tenue.
- Molto importante per encefalo, globuli rossi, surreni, cornea, cristallino, testicoli, muscoli in esercizio, che richiedono un continuo apporto di glucosio come combustibile metabolico (dipendono totalmente o quasi dall'apporto di glucosio con il sangue).
- Il cervello necessita di ca. 120 g di glucosio al giorno, 160 g sono il fabbisogno totale dell'organismo, 190 g sono quelli che in totale il fegato può ricavare dal glicogeno (\rightarrow dopo 1 giorno di digiuno il fegato ha praticamente esaurito la sua scorta di glicogeno).
- Durante il digiuno notturno circa il 90% della gluconeogenesi avviene nel fegato, il rimanente 10% nei reni.
- Durante il digiuno prolungato i reni arrivano fino al 40% della produzione totale.
- Il meccanismo enzimatico per la gluconeogenesi è estremamente sviluppato nelle bovine da latte mentre l'ossidazione del glucosio nei ruminanti è inferiore rispetto ai non ruminanti.
- I principali precursori non glicidici sono:
 - Lattato (\rightarrow convertito in Piruvato).
 - Aminoacidi gluconeogenici (\rightarrow convertiti in α -chetoacidi).
 - Glicerolo (\rightarrow convertito in glicerolo fosfato).

LATTATO

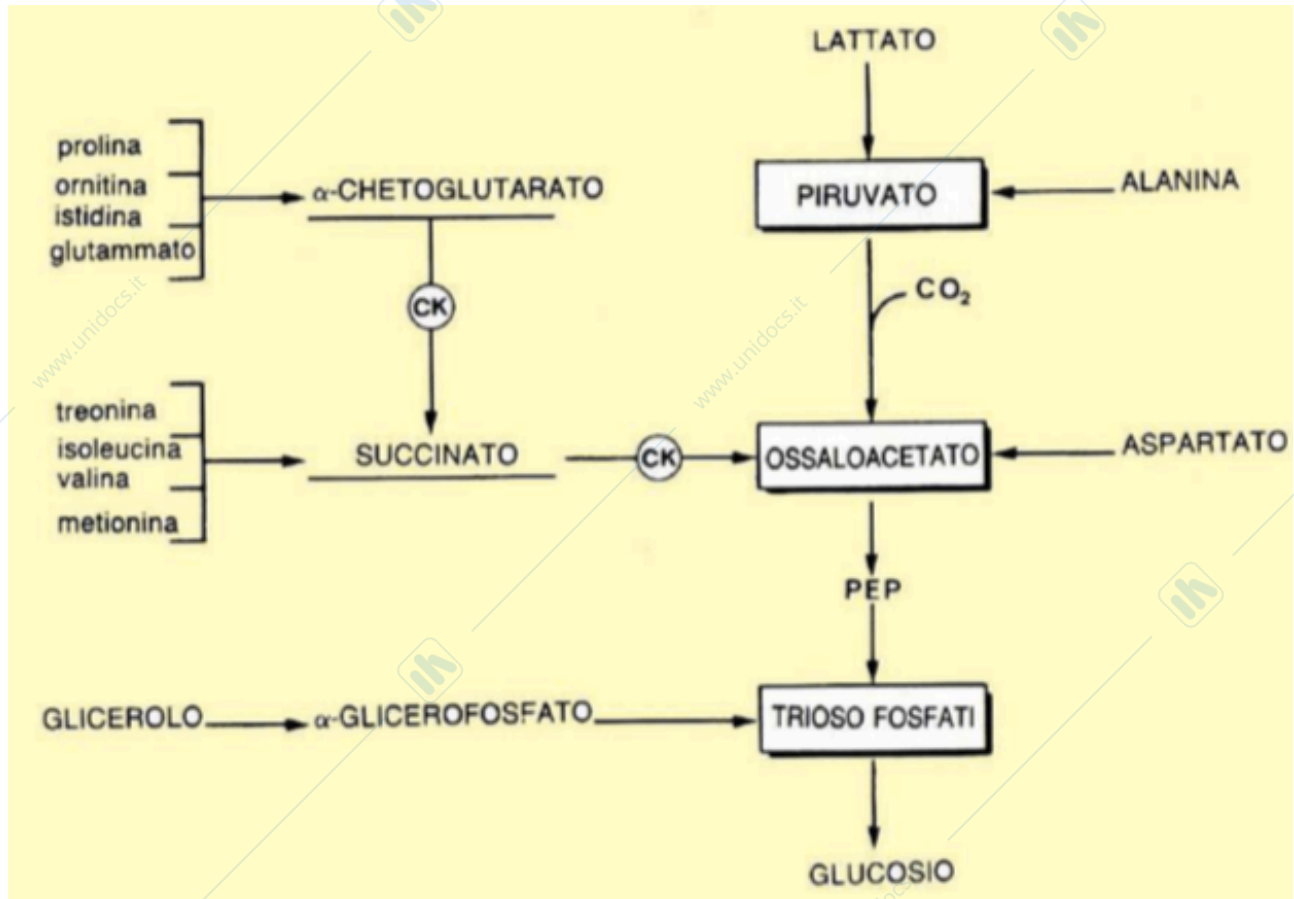
- Proveniente dagli eritrociti.
- Proveniente dal muscolo scheletrico sotto sforzo.

AMINOACIDI

- Derivati dalle proteine introdotte con la dieta e, soprattutto nel digiuno, dalle proteine del m. scheletrico.

GLICEROLO

- Proveniente dalla demolizione dei trigliceridi (tessuto adiposo → sangue → fegato).

Substrati utilizzabili nella gluconeogenesi

Gli unici aminoacidi che negli animali non possono fornire precursori per la sintesi del glucosio sono la leucina e la lisina perché dal loro catabolismo si genera esclusivamente Acetil-CoA e nei mammiferi non vi è nessuna via metabolica per convertirlo in Ossalacetato (→ a digiuno originano corpi chetonici = fonte energetica alternativa rispetto al glucosio).

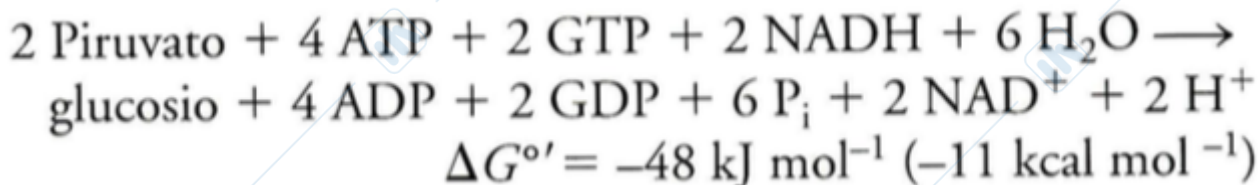
Piruvato	Succinil-CoA
Alanina	Isoleucina*
Cisteina	Metionina
Glicina	Treonina
Serina	Valina
Treonina	
Triptofano*	Fumarato
	Fenilalanina*
α-Chetoglutarato	Tirosina*
Arginina	
Glutammato	Ossalacetato
Glutammina	Asparagina
Istidina	Aspartato
Prolina	

Aminoacidi glucogenici raggruppati per sito d'ingresso.

*** Anche chetogenici.**

Anche gli acidi grassi negli animali non possono servire da precursori del glucosio, poiché sono catabolizzati ad Acetil-CoA. Dal loro catabolismo si forma però l'ATP che viene utilizzato per la gluconeogenesi.

- Durante la gluconeogenesi gli enzimi regolatori della glicolisi sono relativamente inattivi.
- La spesa energetica per la sintesi di glucosio è maggiore dell'energia ricavata dalla glicolisi.
- L'equazione netta della gluconeogenesi è:



- Per ogni molecola di glucosio vengono consumati 4 legami fosforici dell'ATP e 2 del GTP.
- Sono inoltre necessarie 2 molecole di NADH.
- La biosintesi del glucosio dal piruvato è un processo dispendioso da un punto di vista energetico. L'idrolisi dell'ATP e del GTP serve per rendere possibile un processo energeticamente sfavorevole (l'inverso della glicolisi che invece è energeticamente favorevole).

La gluconeogenesi non è semplicemente l'inverso della glicolisi perché ci sono tre reazioni irreversibili in vivo:

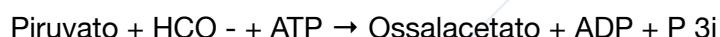
- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| 1) PEP + ADP → piruvato + ATP | Piruvato Chinasi (PK) |
| 2) Fruttosio 6P + ATP → F1,6 BP + ADP | Fosfofruttochinasi-1 (PFK-1) |
| 3) Glucosio + ATP → G6P + ADP | Esochinasi (EK) |

Queste tre tappe sono superate mediante un diverso gruppo di enzimi che catalizzano reazione sufficientemente esoergoniche da essere ugualmente irreversibili (come le corrispettive della glicolisi) nella direzione della sintesi del glucosio.

1) Piruvato → ossalacetato → fosfoenolpiruvato (Trasformazione catalizzata da enzimi sia citoplasmatici che mitocondriali).

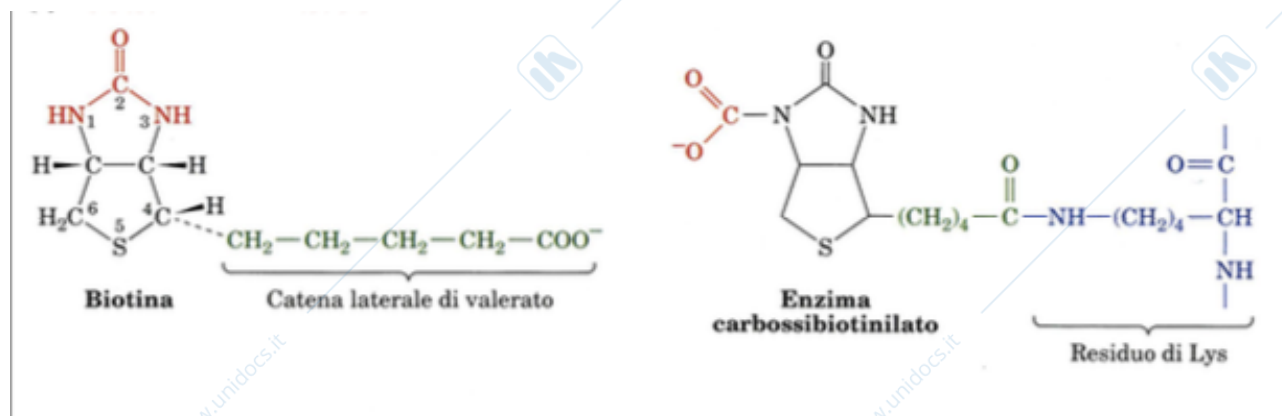
PIRUVATO CARBOSSILASI

- Grande complesso enzimatico (4 subunità identiche).
- Ogni subunità ha un gruppo prostetico di biotina legato covalentemente a un residuo di lisina.
- La biotina serve per aggiungere la CO₂ al piruvato (N.B. la CO₂ deriva dal bicarbonato HCO₃⁻).



BIOTINA (Vitamina H)

Trasportatore di CO₂, lega un carbossile a livello del suo gruppo ureidico.



DISTRIBUZIONE

- Fegato, rene, tuorlo d'uovo, ostriche, cioccolato.
- La flora batterica intestinale la sintetizza.
- Nell'albume è presente l'avidina (inattivata dalla cottura), una glicoproteina che si lega alla biotina inattivandola

CARENZA: può essere causata da:

- Antibiotici.
- Ingestione di notevoli quantità di albume crudo (uomo, animali da pelliccia, maiali).
- In bambini con deficienza di biotinidasi (idrolasi presente nel succo pancreatico che separa la biotina dalle proteine permettendone l'assorbimento intestinale). → Biocitina (ϵ -N-biotinillisina) nelle urine.

SINTOMI

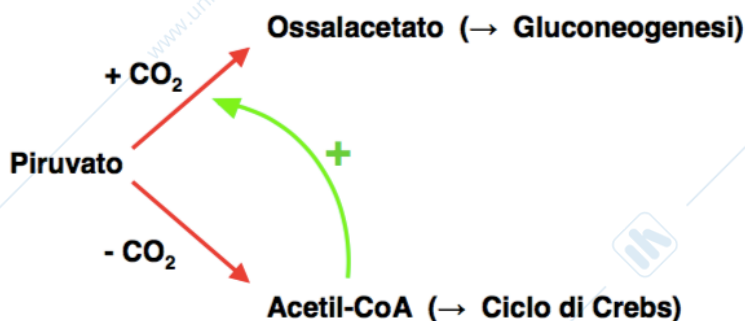
Pallore, dolori muscolari, affaticabilità, alopecia, dermatiti.

PIRUVATO CARBOSSILASI

Attivatore allosterico dell'enzima è l'acetil-CoA (la biotina non si carbossila se l'acetil-CoA non è legato all'enzima).

La piruvato carbossilasi ha sede mitocondriale → per essere trasportato attraverso la membrana mitocondriale (che è impermeabile all'ossalacetato), l'ossalacetato viene convertito in malato, ad opera di una malato deidrogenasi (MDH) NADH dipendente.

- 1- Piruvato carbossilasi
- 2- MDH mitocondriale
- 3- MDH citoplasmatica



Con questo meccanismo vengono anche esportati (indirettamente) dei NADH dal mitocondrio al citosol, dove vengono successivamente impiegati per la gluconeogenesi.

Infine nel citoplasma l'ossalacetato viene simultaneamente decarbossilato e fosforilato dalla **FOSFOENOLPIRUVATO CARBOSSICHINASI (PEPCK)** che utilizza il GTP.

La fosforilazione è resa termodinamicamente possibile dalla concomitante idrolisi del GTP e dalla decarbossilazione.

Complessivamente, la sintesi a partire da piruvato di un composto ad altissima energia libera di idrolisi come il PEP è reso possibile dalla concomitante idrolisi di 1 ATP e 1 GTP.

Una via alternativa prevede che l'ossalacetato prodotto nel mitocondrio venga direttamente trasformato in PEP in questa sede da una PEP-carbossichinasi mitocondriale (senza formazione di malato). Il PEP così originato esce poi dal mitocondrio e viene utilizzato per la gluconeogenesi. In questo caso, però, non vi è rilascio indiretto di NADH dal mitocondrio al citosol. Questa "variante" si ha soprattutto quando il piruvato deriva dal lattato (→ NADH nel citoplasma si è già formato nella deidrogenazione del lattato stesso).

L'attività della PEPCK è influenzata da controlli della trascrizione del suo gene.

- Nei mammiferi gli ormoni tiroidei, l'acido retinoico e gli ormoni che vengono secreti durante il digiuno, come il glucagone e i glucocorticoidi, determinano un incremento della trascrizione del gene codificante nel fegato (→ aumento della sintesi dell'enzima).
- L'insulina ha effetti opposti.

In molte specie batteriche la conversione del piruvato a fosfoenolpiruvato può avvenire molto più velocemente in modo diretto tramite un enzima specifico detto fosfoenolpiruvato sintasi (ATP dipendente) in modo da garantire una gluconeogenesi più efficiente (→ molti batteri non possono contare su una fonte esogena di glucosio).

2) Defosforilazione del F-1,6 BP in F6P.

L'enzima Fruttosio 1,6 bisfosfatasi (FBPasi-1) catalizza l'idrolisi irreversibile del gruppo fosforico in C-1 e NON il suo trasferimento all'ADP.

Regolatori allosterici:

+ ATP.

- AMP, Fruttosio 2,6 BP.
→ regolazione ormonale

Glucagone attiva la gluconeogenesi epatica abbassando [F 2,6 BP]. Insulina inibisce la gluconeogenesi epatica alzando [F 2,6 BP].

3) Defosforilazione del G6P in glucosio.

L'enzima Glucosio 6-fosfatasi agisce come fosfoidrolasi. Presente nel lume del reticolo endoplasmatico soprattutto negli epatociti (in misura minore nel rene e intestino) → il fegato rifornisce di glucosio il sangue.

- Il G6P viene trasportato nel lume del Reticolo Endoplasmatico; la G6 fosfatasi si trova legata alla membrana del reticolo ed è necessaria una proteina che lega il Ca^{++} che stabilizza l'enzima.
- Il Glucosio e il Pi vengono poi trasferiti nel citosol da una coppia di trasportatori.

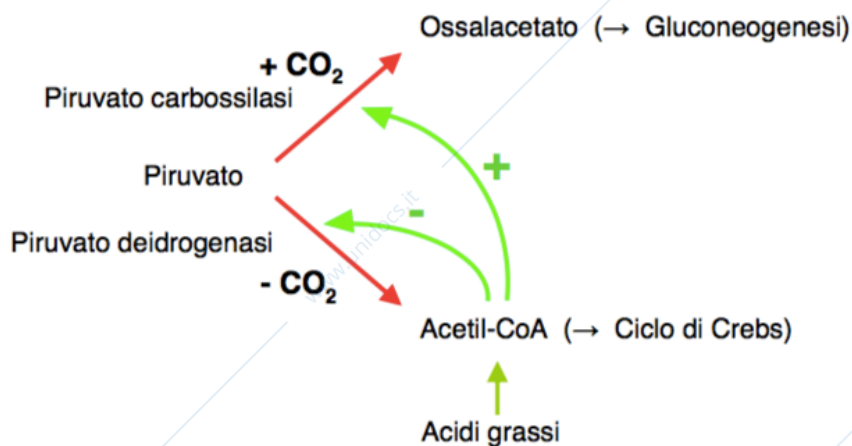
Regolazione della gluconeogenesi

Glicolisi e gluconeogenesi nella cellula sono due processi strettamente coordinati, in modo che una via sia relativamente inattiva quando l'altra è pienamente attiva (→ viene evitato che siano attive contemporaneamente).

Sia la quantità che l'attività degli enzimi chiave di ciascuna via sono controllati in modo da impedire che entrambe le vie siano pienamente attive nello stesso momento.

In carenza di Glucosio la β -ossidazione degli acidi grassi (liberati dal tessuto adiposo) sostiene la gluconeogenesi (da un punto di vista energetico, NON fornendo precursori).

Si liberano $FADH_2$ e $NADH + H^+$ (catena respiratoria → ATP) e acetil-CoA (attivatore allosterico della piruvato carbossilasi). L'acetil-CoA inibisce anche la piruvato deidrogenasi (PDH) e quindi da solo può indirizzare il piruvato verso la gluconeogenesi.



- Il ciclo di Krebs può funzionare grazie all'acetil-CoA derivato da lipidi e all'ossalacetato di origine non glicidica (da catabolismo degli aminoacidi). → la fosforilazione ossidativa assicura per un certo periodo la produzione dell'ATP necessario per la gluconeogenesi.
- Elevato ATP/(ADP+AMP) inibisce la glicolisi e attiva la gluconeogenesi.
- Aminoacidi (→ dalla degradazione delle proteine muscolari) possono essere convertiti in intermedi del ciclo di Krebs → ossalacetato → gluconeogenesi.
- L'alanina prodotta a livello muscolare a seguito del catabolismo di alcuni aminoacidi può rifornire il fegato di piruvato.

Regolazione ormonale

Il glucagone stimola la gluconeogenesi attraverso tre meccanismi:

- 1) Fa abbassare il livello del F2,6BF favorendo così la gluconeogenesi (stimola la fruttosio 1,6-bisfosfatasi) rispetto alla glicolisi (inattiva la PFK-1).

2) Induce la fosforilazione della piruvato chinasi (PK) epatica inattivandola. Si accumula PEP che viene indirizzato alla gluconeogenesi (non venendo trasformato in piruvato).

3) Fa aumentare la sintesi della PEP-carbossichinasi.

I glucocorticoidi fanno anch'essi aumentare la sintesi della PEP-carbossichinasi, mentre l'insulina la fa diminuire.

- Nei suinetti alla nascita gli enzimi gluconeogenici sono insufficienti.

L'induzione della sintesi enzimatica è legata all'alimentazione: se non si nutrono entro 24-48 ore → ipoglicemia, coma e morte.

Se si nutrono gli enzimi raggiungono livelli ottimali entro 1-2 settimane.

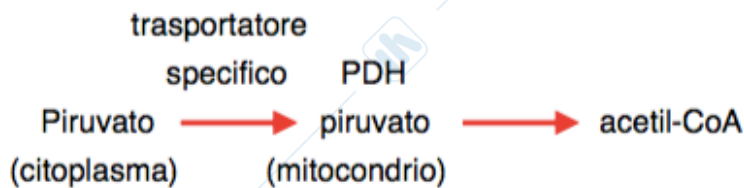
- Agnelli, vitelli, puledri hanno livelli enzimatici sufficienti già alla nascita e possono resistere al digiuno circa una settimana.

CICLO GLUCOSIO-ALANINA

Nel muscolo sotto sforzo si forma alanina (per transaminazione del piruvato ad opera del glutammato) che viene messa in circolo e raggiunge il fegato. Qui l'alanina viene deaminata a piruvato e il gruppo amminico trasferito all' α -chetoglutarato (formando glutammato). Il piruvato viene utilizzato per la gluconeogenesi, mentre lo ione ammonio è convertito in urea che viene escreta. Questo ciclo permette il trasporto di gruppi amminici al fegato in forma non tossica.

Decarbossilazione ossidativa del piruvato

In presenza di quantità sufficienti di O₂ negli organismi aerobici:



La decarbossilazione ossidativa del piruvato è operata da un complesso enzimatico chiamato PIRUVATO DEIDROGENASI (PDH).

Da una molecola di piruvato si formano 1 molecola di CO₂, 1 di NADH + H⁺ (→ catena respiratoria → 3 ATP) e 1 di acetil-CoA (tioestere

con elevato potenziale di trasferimento del gruppo acilico).

E' una reazione irreversibile → rende impossibile la formazione di piruvato a partire da acetil-CoA (→ nella gluconeogenesi il glucosio non può formarsi a partire da acetilCoA).

La PDH controlla l'immissione di acetil-CoA nel ciclo di Krebs.

E' un grosso complesso costituita da molte copie di 3 unità funzionali:

E1 = Piruvato deidrogenasi (TPP)

E2 = Lipoil transacetilasi (ac. lipoico)

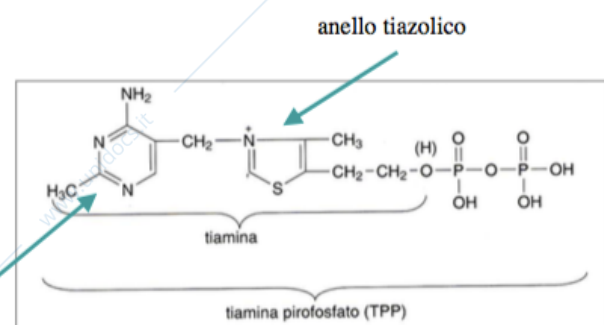
E3 = Diidrolipoil deidrogenasi (FAD)

gruppi prostetici (saldamente legati agli E)

Inoltre cooperano CoASH e NAD⁺ (coenzimi stechiometrici) e sono presenti due enzimi regolatori: PDH chinasi e PDH fosfatasi.

TIAMINA (Vitamina B1)

Presente nei piselli, fagioli, lenticchie, lieviti, crusca di frumento e di riso,



anello pirimidinico

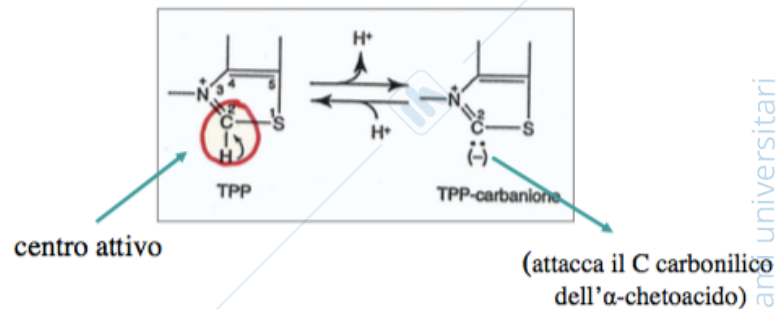
nocciole, carne (soprattutto maiale).

COENZIMA → TIAMINA PIROFOSFATO (TPP o DPT), fosforilata da ATP:



E' coenzima in reazioni di decarbossilazione di chetoacidi catalizzate da:

- Piruvato deidrogenasi (PDH).
- α -chetoglutarato deidrogenasi.
- Transchetolasi.



CARENZA: Sintomi soprattutto a livello di SNC perché il cervello dipende essenzialmente dal glucosio (e non dai lipidi) come fonte energetica. Si blocca la PDH e non si forma acetyl-CoA per il ciclo di Krebs.

Si può avere:

BERI BERI, grave malattia diffusa in estremo oriente. Il riso è povero di tiamina e la contiene solo nel rivestimento esterno che viene rimosso con la pilatura.

Forma secca: gravi disturbi neurologici

Forma umida: gravi disturbi neurologici + edemi causati da insufficienza circolatoria (anche il cuore non riesce a ricavare sufficiente energia dal ciclo di Krebs).

Inoltre si ha > acido piruvico nel sangue e nei tessuti.

L'alcol etilico altera l'assorbimento intestinale della vitamina B1 e inoltre le lesioni epatiche (causate dall'alcool) non ne permettono la conversione in TPP. Nei casi gravi si può avere:

SINDROME ENCEFALOPATICA DI WERNICK -KORSAKOFF (negli alcolisti), grave encefalopatia caratterizzata da:

- Nistagmo
- Stato confusionale
- Atassia
- Amnesia

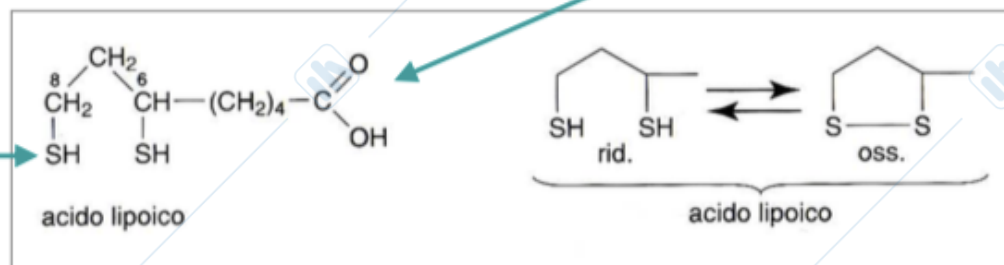
► Sindrome che può essere alleviata con alte dosi di vitamina B1

ACIDO LIPOICO

► può esistere in forma OSSIDATA e RIDOTTA

si lega all' ϵ -amino gruppo di una lisina dell'enzima E2

qui si lega
l'ac. acetico

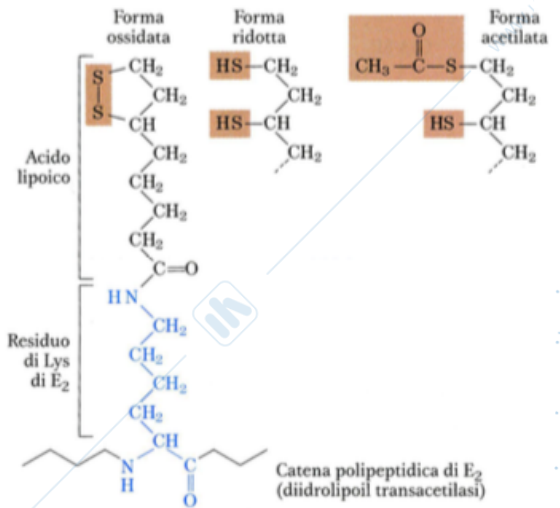


Cofattore necessario per l'attività della:

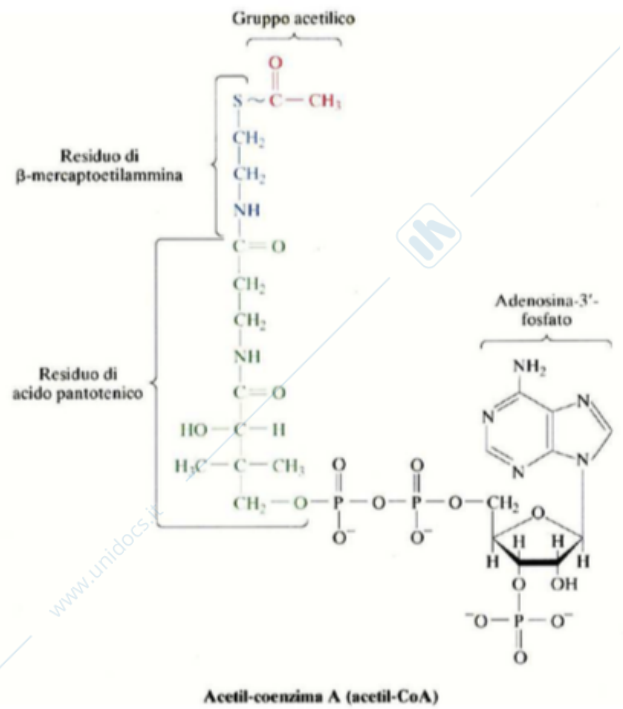
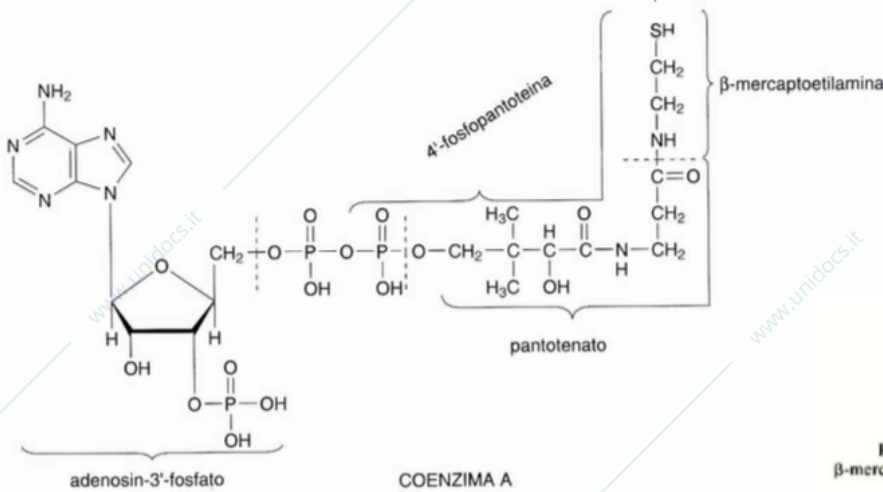
- Piruvato DH.
- α -chetoglutarato DH.

E' una PSEUDOVITAMINA: gli animali superiori lo sintetizzano nella quantità minima necessaria (→ 50 mg/die). Presente in tessuti ricchi di mitocondri.

Il lipoato è sia un trasportatore di gruppi acetilici (o acilici) che di H.



qui si lega l'acido acetico con un legame tioesterico

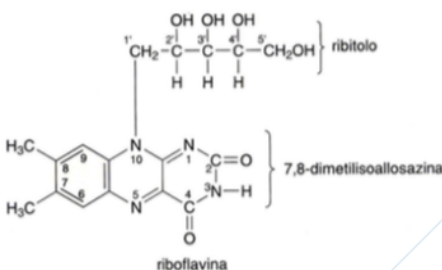


Il CoA funziona come trasportatore di gruppi acili ed entra nel metabolismo di → carboidrati → aminoacidi → ac.grassi → steroidi
I tioesteri (come l'acetil-CoA) hanno un elevato potenziale di trasferimento del gruppo acilico (→ il ΔG della reazione di idrolisi è molto negativo) e quindi possono essere considerati come una forma di acile "attivata".

COENZIMI FLAVINICI

- FMN Flavin mononucleotide
- FAD Flavin adenin dinucleotide

Derivano dalla vitamina B2 (riboflavina).



RIBOFLAVINA

DIFFUSIONE:

Molto diffusa nel regno animale e vegetale. La flora intestinale di alcuni ruminanti è in grado di sintetizzarla.

CARENZA:

Molto rara.

COENZIMI FLAVINICI (FMN e FAD)

Assorbiti con gli alimenti vengono idrolizzati a livello intestinale e la riboflavina è trasportata nel sangue associata all'albumina.

Nelle cellule:

FMN



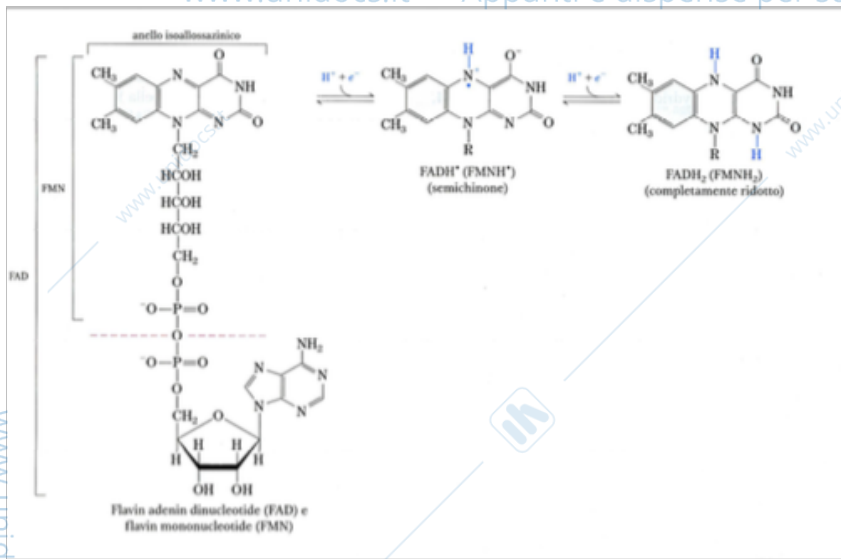
flavochinasi

FAD



sintetasi

FAD e FMN sono cofattori di reazioni di ossidoriduzione.

**Tappe 1-2:**

Il piruvato si lega alla TPP della Piruvato deidrogenasi (E1) che lo decarbossila e lo trasferisce alla forma ossidata dell'ac. lipoico legato all'enzima E2.

Tappa 3:

Reazione di transesterificazione, il gruppo -SH del CoA sostituisce il gruppo -SH di E2 → si forma acetil-CoA e si riduce completamente il gruppo lipoilico.

Tappe 4-5:

E3 trasferisce 2 H dal gruppo lipoilico ridotto (che così torna allo stato iniziale ossidato) di E2 al suo gruppo prostetico FAD (riducendolo a FADH₂). Infine il FADH₂ si riossida trasferendo uno ione idruro (:H⁻) al NAD⁺ (che si riduce). A questo punto il complesso enzimatico è pronto per un altro ciclo.

La PDH è presente in forma defosforilata (attiva) e fosforilata (inattiva) controllate rispettivamente da una fosfoproteina fosfatasi (PDH fosfatasi) e una proteina chinasi (PDH chinasi), parti integranti del complesso.

I fattori allosterici che inibiscono la PDH sono (attivando la PDH chinasi):

- Acetil-CoA e NADH + H⁺ (prodotti della reazione).
- Acidi grassi e corpi chetonici (riforniscono i mitocondri di acetil-CoA).
- Elevato rapporto ATP/ADP.

Fattori allosterici che attivano la PDH sono:

- Carezza di acidi grassi e corpi chetonici (→ poco acetil-CoA → bassa attività della PDH chinasi)
- Basso rapporto ATP/ADP (→ bassa attività della PDH chinasi)
- Piruvato, NAD⁺, CoASH (→ inattivano la PDH chinasi)
- Ca⁺⁺ (→ attiva la PDH fosfatasi, nel m. scheletrico si libera Ca⁺⁺ durante la contrazione che stimola la PDH e quindi la produzione di ATP).

Una deficienza congenita di PDH causa l'acidosi lattica congenita (piruvato → lattato), caratterizzata da atassia, ritardo psicomotorio, lesioni cistiche e necrotiche al SNC.

L'acetil-CoA formatosi dal piruvato, insieme a quello proveniente dalla β-ox degli acidi grassi o dal catabolismo di alcuni aminoacidi, viene ossidato a CO₂ nel ciclo di Krebs.

Ciclo di krebs (degli acidi tricarbossilici o del citrato)

E' la via metabolica finale sulla quale convergono il metabolismo ossidativo dei carboidrati, degli aminoacidi e degli acidi grassi.

- Gli scheletri carboniosi delle sostanze nutrienti sono infine completamente ossidati a CO₂.
- Il ciclo ha luogo interamente nel mitocondrio (Vicino alla catena respiratoria).
- Dal catabolismo di alcuni aminoacidi si formano intermedi del ciclo.
- L'energia liberata dalle successive reazioni di ossidazione di intermedi del ciclo permette la sintesi di cofattori ridotti (NADH+H⁺ e FADH₂) che vengono poi riossidati nella catena respiratoria mitocondriale cedendo i loro e⁻ all'O₂ (con formazione di H₂O) e portando alla sintesi di ATP.
- Le reazioni che come quelle del catabolismo di alcuni amino acidi generano intermedi del ciclo vengono definite anaplerotiche (di ricarica).
- Si generano anche intermedi per vie anaboliche quali la gluconogenesi (ossalacetato), la sintesi di alcuni amino acidi e la sintesi dell'eme.
- Nel suo complesso il Ciclo di Krebs viene pertanto definito come una via anfibolica → serve sia ai processi catabolici che a quelli anabolici.

Negli eucarioti la decarbossilazione ossidativa del piruvato e le reazioni del ciclo di Krebs avvengono nella matrice mitocondriale, al contrario di quelle della glicolisi che avvengono nel citoplasma.

- E' un ciclo perché inizialmente l'ossalacetato si condensa con il gruppo acetilico di una molecola di acetil-CoA per poi rigenerarsi al completamento del ciclo.
- L'ingresso di un acetil-CoA non comporta la produzione o il consumo netto degli intermedi (→ l'acetil-CoA non può generare extra ossalacetato per la gluconeogenesi).
- I due atomi di C che entrano nel ciclo come acetil-CoA escono dal ciclo come CO₂ (anche se si tratta dei carboni dell'acetil-CoA entrato nel ciclo precedente).
- Ad ogni tornata del ciclo si generano 3 NADH + H⁺ (dalla cui riossidazione nella catena respiratoria si originano 3 ATP) 1 FADH₂ (dalla cui riossidazione nella catena respiratoria si originano 2 ATP) e 1 GTP (o ATP).

1° Reazione: formazione del citrato.

La *citrato sintasi* catalizza la condensazione dell'acetil-CoA con l'ossalacetato per formare citrato. Reazione fortemente esoergonica (→ equilibrio spostato verso la sintesi di citrato anche quando la [] dei ossalacetato è bassa). Il CoA-SH rilasciato può partecipare alla decarbossilazione ossidativa di un'altra molecola di piruvato.

Nel corso della reazione si forma un intermedio transitorio (il citril-CoA) che va incontro ad una rapida idrolisi. L'idrolisi di questo intermedio tiostere ad elevata energia rende la reazione estremamente esoergonica.

2° Reazione: isomerizzazione del citrato a isocitrato.

La *aconitasi* isomerizza il citrato (che ha un gruppo -OH terziario, più resistente alle ossidazioni) in isocitrato (con gruppo -OH secondario, più ossidabile). L'enzima opera una deidratazione con formazione del cis-aconitato (legato all'enzima); segue una idratazione (il gruppo - OH del citrato viene trasferito all'atomo di C adiacente).

3° Reazione: ossidazione dell'isocitrato a α-chetoglutarato.

L'enzima *isocitrato deidrogenasi* catalizza la 1° decarbossilazione ossidativa del ciclo. Si forma prima ossalsuccinato che viene poi decarbossilato a α-chetoglutarato. Questa è la prima tappa in cui l'ossidazione è accoppiata alla produzione di NADH + H⁺ e nella quale si forma CO₂.

L'isocitrato DH è l'enzima regolatore della velocità del ciclo. Effettori allosterici sono:
+ Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, ADP, NAD⁺
- ATP, NADH, NADPH

4° Reazione: ossidazione dell'α-chetoglutarato a succinil-CoA.

L'enzima *α-chetoglutarato deidrogenasi* catalizza la 2° decarbossilazione ossidativa del ciclo. Questo enzima è un complesso multimerico molto simile alla PDH. Anch'esso è formato da:

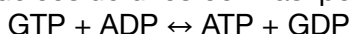
- E1 → α-chetoglutarato DH (coenzima TPP).
- E2 → diidrolipoamide succiniltransferasi (cofattori lipoato, CoASH).
- E3 → diidrolipoil deidrogenasi (cofattori FAD, NAD⁺).

In questa reazione si produce una seconda molecola di NADH + H⁺ e una seconda molecola di CO₂. A questo punto, essendo state prodotte 2 molecole di CO₂, l'ossidazione del gruppo acetile è completa.

5° Reazione: conversione del succinil-CoA a succinato.

Reazione catalizzata dall'enzima *succinil-CoA sintetasi* (succinato tiocinasi). L'energia rilasciata dall'idrolisi del legame tiostere viene usata per favorire la sintesi del legame fosfoanidride del GTP o dell'ATP (fosforilazione a livello di substrato).

Nel corso della reazione possono formarsi o direttamente ATP o GTP. Il GTP viene prevalentemente utilizzato dalla nucleoside difosfochinasi per una transfosforilazione:



6° Reazione: ossidazione del succinato a fumarato.

L'enzima succinato deidrogenasi catalizza l'ossidazione del legame singolo centrale del succinato a legame doppio "trans" formando fumarato con riduzione di 1 FAD (FAD → FADH₂).

La succinato DH è l'unico enzima del ciclo che non si trova nella matrice mitocondriale ma ancorato alla membrana mitocondriale interna (MMI) → è direttamente legato alla catena respiratoria.

7° Reazione: idratazione del fumarato a malato.

L'enzima fumarasi catalizza l'idratazione del doppio legame del fumarato formando L-malato. Enzima altamente stereospecifico, catalizza l'idratazione del doppio legame in trans del fumarato ma non quello in cis del maleato (isomero cis del fumarato). 8° Reazione: ossidazione del malato a ossalacetato.

L'enzima malatoDH riforma ossalacetato ossidando il gruppo alcolico secondario del malato al chetone corrispondente e si riduce il 3° NAD⁺ (→ NADH + H⁺).

In condizioni standard la reazione è endoergonica, ma nelle condizioni cellulari la reazione è esoergonica (→ avviene verso dx) perché l'ossalacetato è immediatamente rimosso dalla reazione estremamente esoergonica della citrato sintasi.

Nel ciclo di Krebs i gruppi acetilici vengono perciò ossidati completamente a CO₂:



NADH + H⁺ e FADH₂ sono prodotti "vitali" del ciclo: la loro riossidazione da parte dell'O₂ attraverso la catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa completa la demolizione delle sostanze nutrienti → ATP.

Regolazione della velocità del Ciclo

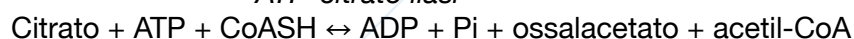
- Elevate [] di ATP, NADH + H⁺, intermedi del ciclo stesso (citrato, succinil-CoA) inibiscono gli enzimi regolatori del Ciclo (→ il loro accumulo indica che la situazione energetica della cellula è già ottimale).
- Elevate [] di ADP, NAD⁺, Ca⁺⁺ (indica intensa contrazione muscolare) stimolano allostericamente gli enzimi chiave del ciclo (→ la cellula ha bisogno di energia).

VIE CHE UTILIZZANO INTERMEDI DEL CICLO DI KREBS**- GLUCONEOGENESI**

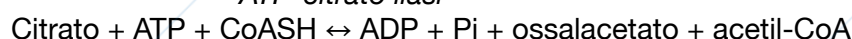
Utilizza l'ossalacetato, che però non può attraversare la MMI. Viene quindi:

1- Ridotto a malato (che passa la MMI) e viene nuovamente ossidato a ossalacetato nel citosol; Oppure

2- Trasformato in citrato (che attraversa la MMI) e viene poi riconvertito in Ossalacetato nella reazione:

**- BIOSINTESI DEI LIPIDI (ac. grassi e colesterolo)**

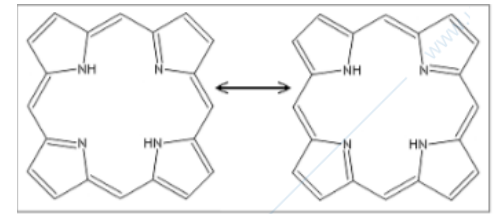
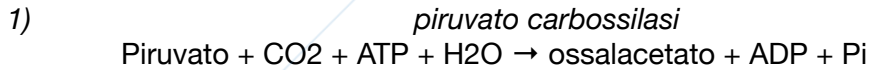
Utilizza come composto di partenza l'acetil-CoA → quello dei mitocondri non passa però attraverso la MMI direttamente ma solo sotto forma di citrato. Nel citosol poi:

**- BIOSINTESI DEGLI AMINOACIDI**

- α-chetoglutarato (+ NH₃) → glutammato (glutammato DH).
 - α-chetoglutarato e ossalacetato → glutammato e aspartato (transaminasi).
- N.B. Glutammato e aspartato sono precursori di molti altri amino acidi e di nucleotidi.

- BIOSINTESI DELLE PORFIRINE

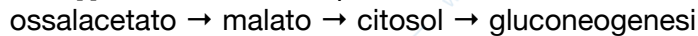
Utilizza Succinil-CoA e glicina per formare la porfina da cui derivano le porfirine che sono il nucleo centrale (organico) di importanti gruppi prostetici quali l'eme e la clorofilla.

**PORFINA****REAZIONI CHE RIFORNISCONO IL CICLO DI INTERMEDI (“anaplerotiche” cioè “di riempimento”)**

La piruvato carbossilasi “sente” la necessità di produrre intermedi del ciclo di Krebs mediante il suo attivatore acetil-CoA:

poco ossalacetato \rightarrow \uparrow acetil-CoA \rightarrow attivazione piruvato carbossilasi \rightarrow produzione di ossalacetato.

Se però vi è alta [] di NADH + H⁺ l'aumento di ossalacetato (in fegato e rene) non attiverà il ciclo (che è inibito da elevate [] di NADH + H⁺ e quindi:



- 2) Ossidazione di ac. grassi a n° dispari di C \rightarrow succinil-CoA.
- 3) Demolizione di alcuni aminoacidi (isoleucina, metionina, valina) \rightarrow succinil-CoA.
- 4) Transaminazione e deaminazione degli a.a. \rightarrow α -chetoglutarato, ossalacetato.