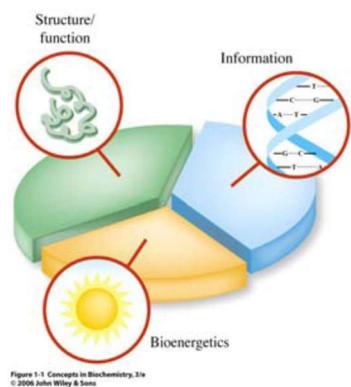


BIOCHIMICA

AMMINOACIDI E PROTEINE

La biochimica entra nel meccanismo e nella relazione fra funzione e struttura delle molecole. Si basa su leggi di chimica, fisica e biologia per spiegare i fenomeni che avvengono negli organismi viventi. Gli obiettivi sono descrivere i processi vitali a livello molecolare.



- settore della struttura/funzione: le macromolecole hanno una funzione legata alla loro struttura tridimensionale
- settore bioenergia: serve per crescere attraverso energia presa dall'esterno. L'energia va trasformata dalle cellule in una forma da loro utilizzabile
- settore trasduzione: sono inclusi gli acidi nucleici

La maggior parte dei composti biologici sono costituiti da SEI elementi principali: C, H, O, N, P, S. Gli elementi sono stati selezionati dall'evoluzione come componenti di organismi viventi perché possono formare legami covalenti con condivisione di coppie di elettroni: tranne l'idrogeno, formano tutti più di un legame. In questo modo si possono costruire molecole complesse con una struttura lineare o ciclica. Nelle piante e negli animali sono presenti solo 31 elementi chimici. Tutti gli organismi hanno vie biochimiche simili e tutti gli organismi usano lo stesso codice genetico. Un numero limitato di molecole è sufficiente a garantire la formazione di un elevato numero di macromolecole biologicamente attive.

LEGAME COVALENTE: condivisione di elettroni sullo stesso asse congiungente i nuclei. È un legame forte.

Le interazioni ioniche sono meno forti come anche le interazioni di Van de Waals (che permettono al geco di camminare sui muri), legami a idrogeno, interazione dipolo-dipolo. (diminuiscono di intensità)

I gechi non hanno sostanze collose, ventose o adesive, ma tante piccolissime lamelle, setole, sulle loro zampe che tramite un peduncolo e una testa, sfruttano le interazioni di Van der Waals sulla parete in modo da poter camminare sui muri senza cadere. Le forze di van der Waals sono relativamente deboli comparate ai legami chimici normali tra atomi: queste differiscono dal legame covalente e ionico in quanto dipendono dalle fluttuazioni nella distribuzione delle cariche nelle molecole; si tratta di forze attrattive a lungo raggio e repulsive a corto raggio.

Attraverso le interazioni covalenti, si può determinare la struttura primaria delle macromolecole: la forma tridimensionale ne definisce la funzione che si stabilizza per mezzo di legami non covalenti.

I legami covalenti danno rigidità allo scheletro delle molecole; le interazioni deboli ne compongono l'interno e, se sono molte, possono formare interazioni stabili ma possono essere notevolmente cambiate da piccole variazioni. Queste permettono alle macromolecole di essere flessibili, per riconoscere le macromolecole stesse ma anche di dissociarsi alla minima variazione.

ANTIGENE: parte della molecola che scatena una risposta negli organismi.

ANTICORPO: sistema di difesa.

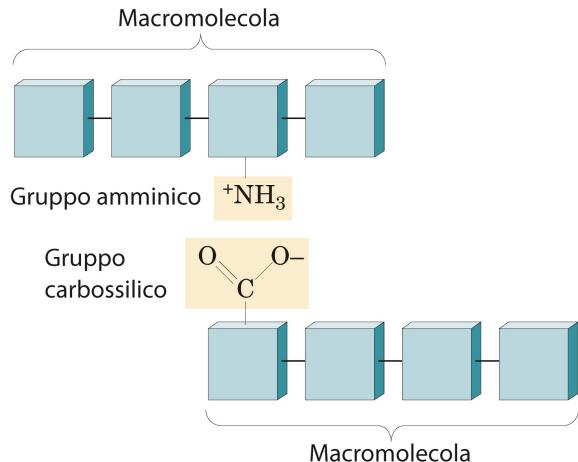
Gli enzimi servono a catalizzare ma devono riconoscere la molecola su cui lavorare.

Gli ormoni sono sostanze che servono a scatenare risposte ma non possono entrare nella cellula: si legano quindi ad un recettore sulla membrana della cellula per avere una risposta al suo interno.

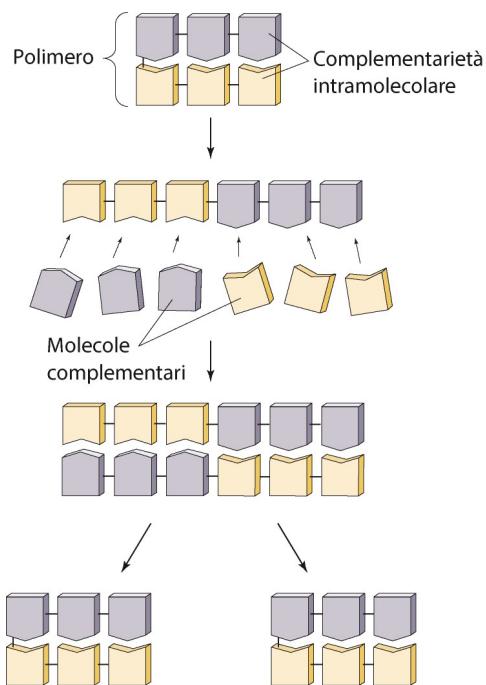
Le forze deboli costringono gli organismi in uno stretto intervallo di condizioni ambientali, determinato da temperatura e pH. Modificando il pH, variano anche le interazioni ioniche.

Le interazioni ioniche si instaurano fra acidi e basi.

Altri legami sono quelli metallici.



Le molecole si riconoscono e si associano grazie alle interazioni deboli. La complementarità è alla base della replicazione fra molecole.



Proprietà Distintive dei Sistemi Viventi

- Gli Organismi sono complicati ed altamente organizzati
 - Le strutture Biologiche servono per scopi funzionali
 - I sistemi viventi sono attivamente implicati nei meccanismi di trasformazione dell'energia
 - I sistemi viventi hanno la capacità di auto-replicazione
- IPOTESI SULL'ORIGINE DELLA VITA

1. molecole autoreplicanti (DNA): in realtà è più complesso da sintetizzare quindi l'origine è forse da associare all'RNA che può subire molte mutazioni e portare a diverse strutture più o meno vantaggiose che poi stabilizzano e si mantengono nel tempo.
2. Ipotesi metabolica: molecole che per reagire devono prima scontrarsi. Possiamo modificare dei parametri come, per esempio, la temperatura o il movimento delle molecole aumentando la probabilità che si scontrino. Anche la concentrazione può essere aumentata, mettendo le molecole in un ambiente ristretto: si creano compartimenti dove far concentrare le molecole e dove avverranno le reazioni.

Il metabolismo si evolve verso l'autoregolazione creando l'omeostasi, uno stato nel quale esiste un bilanciamento tra tutti i componenti cellulari ed una piccola perturbazione di uno di questi componenti è in grado di scatenare una risposta che avrà come scopo quello di ristabilire il bilanciamento originario. La capacità di alcuni metaboliti di attivare o inibire particolari reazioni è il maggiore contributo all'omeostasi. Le molecole che troviamo sono tutte ad una concentrazione di omeostasi che viene mantenuta costante. I processi che la consumano sono uguali ai processi che la producono per mantenere sempre un bilanciamento. Questi processi sono regolati dall'ATP.

Le vie metaboliche

- hanno un inizio e una fine e avvengono in determinati compartimenti
- non sono indipendenti
- serve molta regolazione

Quali sono le condizioni per stabilire se qualcosa è vivo?

Nel 2002 sono stati enunciati i 7 pilastri della vita per stabilire se qualcosa è vivo o meno:

- P-program: piano organizzato costante ma non rigido, la capacità di essere modificato in base all'ambiente esterno (evoluzione). Descrive gli ingredienti e la cinetica di interazione tra di essi che caratterizzano l'organismo vivente. Nei sistemi viventi questa funzione è eseguita dal DNA.
- I-improvisation: capacità lenta di modificare il programma in risposta a variazioni dell'ambiente esterno a cui si deve adattare. È dovuta all'evoluzione.
- C-compartmentalization: le molecole e le strutture sono concentrate per favorire l'organizzazione. Tutti gli organismi sono confinati in un volume ristretto (la membrana plasmatica separa l'organismo dal resto dell'ambiente), inoltre negli organismi più complessi (eucarioti) le varie funzioni sono compartmentate in organelli specifici.
- E-nergy: i sistemi viventi richiedono un continuo apporto di energia.
- R-regeneration: il sistema metabolico è costituito da catalizzatori (enzimi) e reagenti (metaboliti) che funzionano continuamente: dobbiamo considerare delle perdite che dovranno essere compensate dai sistemi di rigenerazione per mantenere la vita.
- A-daptability: risposta immediata allo stimolo esterno
- S-exclusion: vie metaboliche unidirezionali

POLIMERI BIOLOGICI

TABELLA 1.3 I principali polimeri di interesse biologico e i monomeri che li compongono

Polimero	Monomero
Proteina (polipeptide)	Amminoacido
Acido nucleico (polinucleotide)	Nucleotide
Polisaccaride (carboidrato complesso)	Monosaccaride (carboidrato semplice)

Le Proprietà delle Biomolecole Riflettono la loro compatibilità con le Condizioni della vita

- Le Macromolecole hanno una struttura direttamente correlata alla loro funzione
- Le Macromolecole contengono informazioni e questo deriva dal fatto che

hanno un senso, una direzione (gli amminoacidi vanno da N terminale a C terminale)

- le biomolecole hanno una caratteristica architettura tridimensionale
- forze deboli mantengono le strutture biologiche e determinano le interazioni biomolecolari

NUCLEOTIDE: zucchero a 5 atomi di carbonio con gruppo fosforico che può legarsi all'OH in posizione 3 dello zucchero di un altro nucleotide per formare un legame fosfodiesterico (da fosfato 5' a ossidrile in 3')

GLUCOSIO: gruppo ossidrilico in 1 che può formare un legame con un altro gruppo ossidrilico in 4 (α -1,4)

Le funzioni ossidriliche possono dare altri legami dando origine a polimeri ramificati. Le macromolecole possono organizzarsi per formare organelli che costituiscono le membrane.

Gerarchia delle Biomolecole Molecole Semplici sono le Unità per la costruzione delle Strutture Complesse

- Metaboliti e Macromolecole • Organelli • Membrane • Le Unità della vita è la Cellula

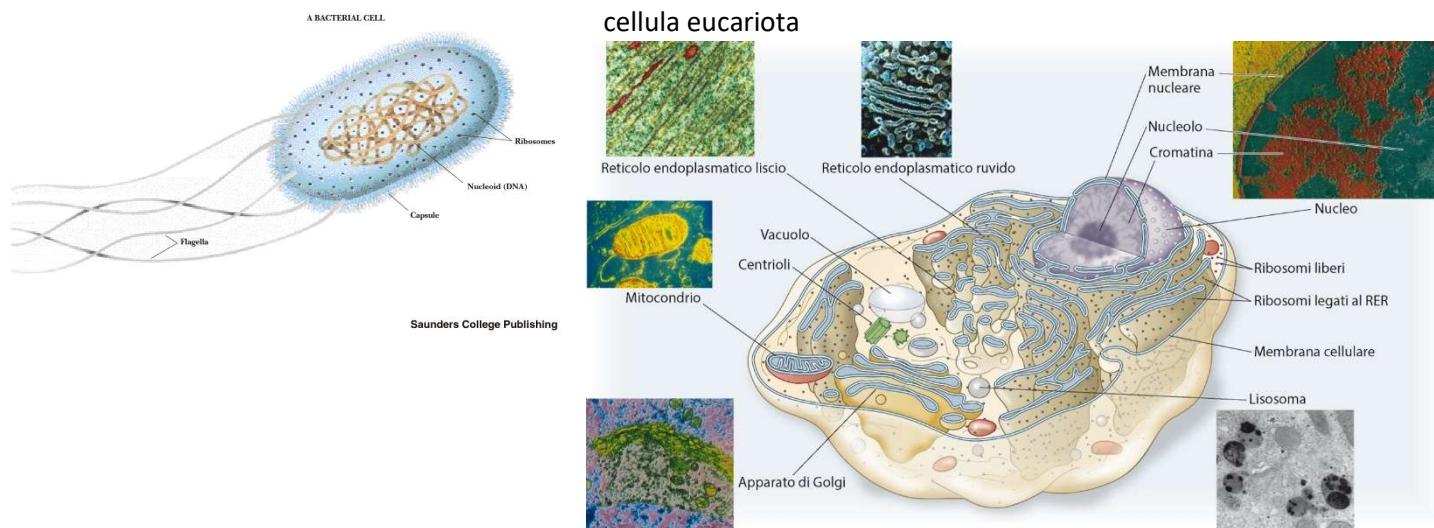
Architettura cellulare

- La compartmentazione cellulare promuove l'efficienza delle reazioni mantenendo alta la concentrazione locale dei reagenti.
- Le vie metaboliche si sono evolute per sintetizzare molecole e per produrre energia.
- Le cellule più semplici sono i procarioti.
- Gli eucarioti sono caratterizzati dalla presenza di numerosi organelli circondati da membrane, compreso il nucleo.

- L'albero filogenetico della vita comprende tre domini: bacteria, archaea ed eukarya.
- L'evoluzione avviene tramite la selezione naturale che agisce sulle variazioni casuali che avvengono negli individui

Cellula procariota

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 1.21



La struttura degli amminoacidi

Struttura generale di α -amminoacido

La catena laterale (R) può influenzare la pK_a : quella del gruppo ossidrilico è circa 2, del gruppo amminico 9. La pK_a è la tendenza di un acido a liberare ioni H^+ : se si libera lo ione H^+ di OH , si ha una carica negativa sul gruppo carbossilico che potrebbe poi legarsi a NH_2 per dare NH_3^+ .

Gli ioni sono sempre meno stabili delle molecole: tenderanno ad associarsi al protone. La carica positiva sul gruppo amminico rende COO^- più stabile.

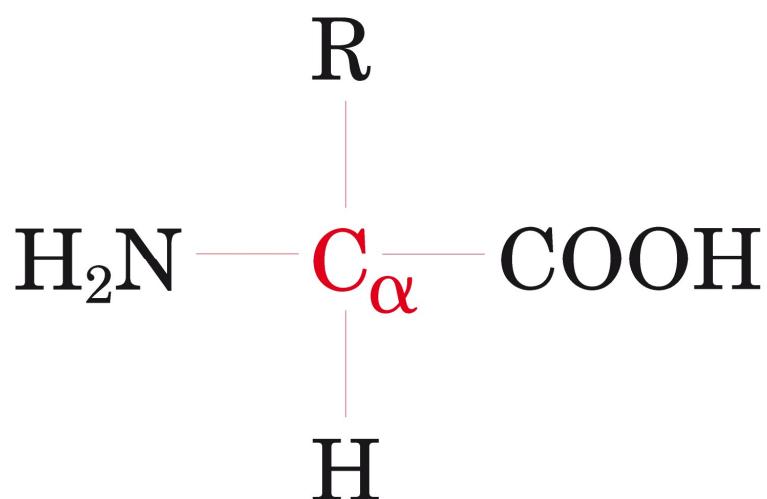
Se la catena laterale è un idrogeno, l'amminoacido in questione è la **glicina**, il più semplice. Non ha un enantiomero in quanto non presenta un carbonio chirale.

Se la catena laterale è un metile, abbiamo l'**alanina**. Possiamo avere anche catene alcaniche: gli alcani sono chiamati anche paraffini perché reagiscono poco e sono poco affini all'acqua, dando all'amminoacido caratteristiche idrofobiche dovute alle catene laterali idrocarburiche (possono essere anche aromatiche).

La **serina** ha una catena laterale con funzione alcolica primaria in quanto R è CH_2OH : un OH può portare a interazioni con molecole d'acqua (attraverso legami a idrogeno). Parliamo in questo caso di amminoacidi polari.

Un altro esempio di amminoacido polare è la **glicina** ma non è carica.

La **treonina** ha una funzione alcolica secondaria.



La **tirosina** ha un anello aromatico ma la presenza di un OH la rende più polare: si può ionizzare, può quindi liberare un protone fenolico, in condizioni particolari. Non ionizza abbastanza per essere considerato polare carico, è infatti apolare. La sua pKa è di circa 10.

L'**acido aspartico** ($R=CH_2COOH$) e l'**acido glutammico** hanno funzioni carbossiliche nella catena laterale: sono amminoacidi acidi.

La **lisina** ha una funzione amminica nella catena laterale e questo la rende un amminoacido basico.

In funzione della catena laterale, li distinguiamo in:

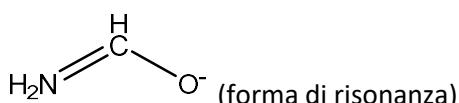
polari:

- polari carichi acidi, con carica negativa se ionizzati
- polari carichi basici, con carica positiva se ionizzati
- polari non carichi quindi senza gruppi ionizzabili

apolari:

- con ioni idrocarburi aromatici o alifatici. Sono idrofobici, non affini all'acqua

L'**asparagina** ha come gruppo amminico NH_2 , non si può ionizzare: il doppietto dell'azoto può formare un doppio legame con il carbonio diventando



Vale anche per la **glutammina**. Queste due derivano rispettivamente da acido aspartico e acido glutammico per reazione con ammoniaca.

La **metionina** ha zolfo nella catena laterale legato a due carboni. È apolare.

La **cisteina** ha lo zolfo terminale nel gruppo SH ed è polare.

La catena laterale può avere pKa per gruppi ionizzabili.

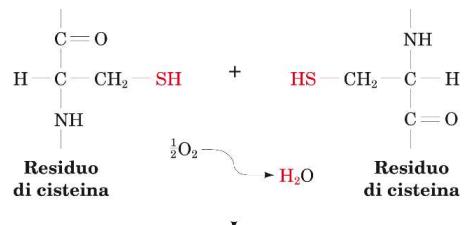
19 su 20 amminoacidi possono esistere nella forma D e L in quanto possiedono un carbonio simmetrico.

La **prolina** fa un ciclo che comprende azoto in alfa ed è per questo un α -amminoacido.

La **fenilalanina** forma legami covalenti semplici perché dotata di libera rotazione.

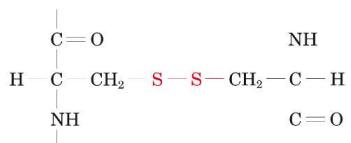
Nella prolina, il legame semplice fa parte dell'anello ed è piuttosto rigido cosa che conferisce rigidità all'amminoacido in quanto comprende un legame imminico.

Se il pH è inferiore alla pKa, prevale la specie protonata; viceversa prevale la specie deprotonata.



Se è un acido, la specie deprotonata è carica positivamente, se è una base è scarica.

La **cisteina** è un chialcol ossia un alcol con zolfo e non ossigeno che è più elettronegativo (più acido): può liberare quindi protoni. Può formare ponti disolfuro.



Se in una proteina sono presenti 2 cisteine vicine in presenza di ossigeno, possono ossidarsi quindi perdere idrogeni dai due SH, e formare legami covalenti fra lo zolfo, attraverso ponti disolfuro,

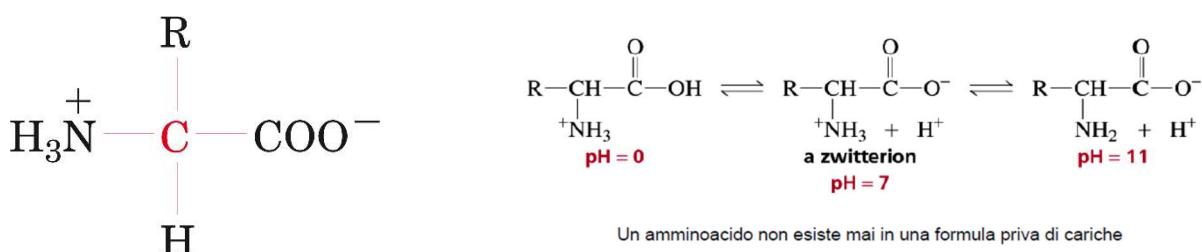
ottenendo la forma ossidata delle due cisteine. Li chiamiamo residui di cisteina perché fanno parte della catena polipeptidica. Gli unici legami covalenti sono quelli che tengono i due amminoacidi e i ponti disolfuro.

Gli amminoacidi carichi sono la lisina, l'arginina, l'istidina, l'acido aspartico e glutammico.

SOLUZIONE TAMPONE: tende a mantenere il pH costante anche con poca aggiunta o rimozione di acido o base in quanto nella stessa soluzione è presente un acido debole e la sua base coniugata (l'intervallo di $\text{pH}=\text{pK}_a+/-1$).

Solo il pH dell'istidina si avvicina a quello fisiologico, infatti è l'unica ad avere proprietà tampone a pH fisiologico.

ZWITTERIONE: un amminoacido dipolare. È un doppio ione, dipende dal pH. R non è ionizzabile e non ha una carica totale in quanto è una molecola elettricamente neutra anche se presenta cariche negative e positive localizzate. I composti che si presentano come zwitterioni sono poco solubili nei solventi organici e abbastanza solubili in acqua.

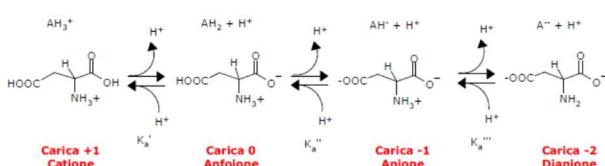


Se il $\text{pH}=0$ ($\text{pH}<\text{pK}_a=2$) è protonato con carica totale sull'amminoacido positiva. A $\text{pH}=7$ prevale la forma zwitterionica. A $\text{pH}=11$ l'amminoacido ha carica negativa.

Se è nella forma di doppio ione, non si muove perché non possiede una carica netta.

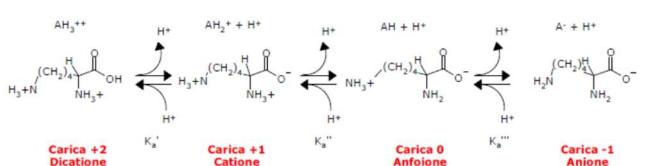
Proprietà acido-base degli AA acidi

- In presenza un gruppo acido oltre ai due gruppi funzionali $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_3^+$ gli AA si comportano come acidi triprotici AH_3^+ .



Proprietà acido-base degli AA basici

- In presenza un gruppo basico oltre ai due gruppi funzionali $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_3^+$ gli AA si comportano come acidi triprotici AH_3^{++} .



Il punto isoelettrico (punto in cui l'amminoacido è presente in forma di ione dipolare) negli amminoacidi polari non carichi e apolari è la media fra i pK_a del gruppo α carbossilico e del gruppo amminico. Per gli amminoacidi non ionizzabili è attorno a 6.

- Il pI di un AA acido è dato dalla media dei due valori minori di pK_a :

$$\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}_a'_{(\alpha-\text{COOH})} + \text{pK}_a''_{(\text{R}-\text{COOH})})$$

- Mentre il pI di un AA basico è dato dalla media dei due valori maggiori di pK_a :

$$\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}_a''_{(\alpha-\text{NH}_3^+)} + \text{pK}_a'''_{(\epsilon-\text{NH}_3^+)})$$

A pH acido (pH=0) tutti e due i gruppi carbossilici sono protonati e questo comporta una carica positiva del gruppo amminico.

Se pH=3 (pH>pKa=2) il gruppo carbossilico è al 90% deprotonato ma non deprotone il gruppo della catena laterale. Al punto isoelettrico la carica è pari a 0.

A pH=7 il gruppo carbossilico della catena laterale è deprotonato e la carica totale è pari a 1.

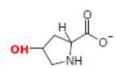
A pH=11 ho due cariche negative e la carica totale è quindi uguale a -2.

La carica totale va da -1 a +2 e il punto isoelettrico è a 0 in un amminoacido acido. (è a pH acido dato dalla media dei pH acidi) Se l'amminoacido è basico, sarà dato da un pH basico.

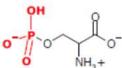
Aminoacidi modificati

- Modificazioni post-traduzionali

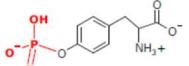
- 4-idrossiprolina



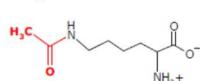
- O-fososerina



- O-fosftiroicina



- N-Acetillisina



AMMINOACIDO: possiede un gruppo amminico e un gruppo carbossilico sullo stesso carbonio alpha della molecola. Possiamo avere anche amminoacidi con gruppi su diversi carboni.

20 amminoacidi servono per sintetizzare le proteine ma queste possono subire modificazioni post-trasenzionali (solo in amminoacidi con gruppi che possono fare reazioni).

La prolina viene ossidata per dare l'idrossiprolina, costituente principale del collagene, una proteina strutturale.

DIVERSITÀ POLIPEPTIDI

Tutti i 20 amino acidi in forma pura sono solidi cristallini bianchi ad elevato punto di fusione.

Gli amino acidi possono agire come: enzimi (catalizzatori), intermedi metabolici, trasportatori di energia e prodotti di scarto ed ormoni.

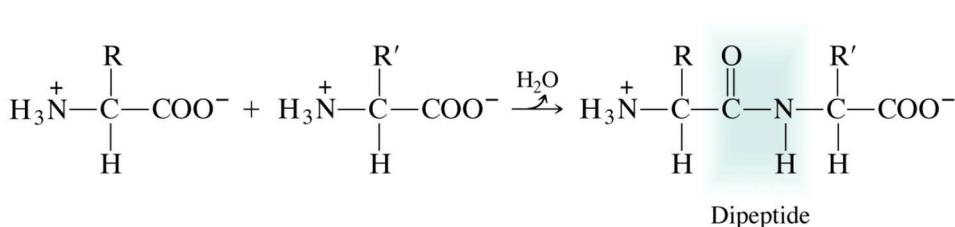
Gli amino acidi sono le unità di base per la sintesi delle proteine.

Le proteine sono le macromolecole più abbondanti presenti nelle cellule. Nelle cellule umane sono presenti 0.1 milioni di proteine diverse. Esse giocano un ruolo centrale in tutti i processi biologici.

Generalmente le proteine sono prodotte a partire da 20 diversi amino acidi presenti in natura.

Il solo modo per legare gli amminoacidi fra loro è tramite legame peptidico, un legame covalente che forma la catena peptidica che, una volta ripiegata, da forma, struttura e funzione. La sequenza di amminoacidi che compongono la proteina definisce la sua struttura e funzione. Le proteine mostrano un elevato grado di diversità.

Il legame peptidico



- Il legame peptidico è un legame ammidico formato da una reazione di condensazione (perdita di acqua)

- Lega il gruppo alfa-carbossilico di un amino

Unnumbered figure pg 74 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

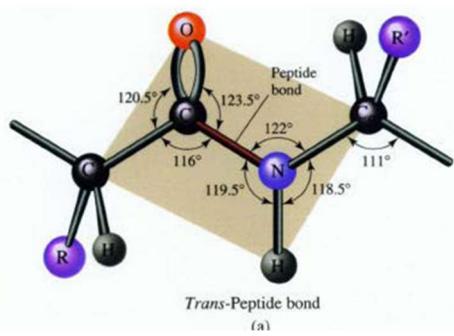
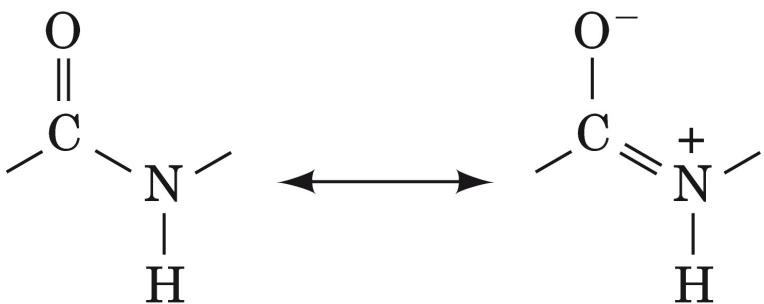
acido con il gruppo alfa-amminico di un altro amino acido

- I gruppi R rimangono INVARIATI – rimangono attivi
- Il gruppo amminico N-terminale ed il gruppo carbossilico C-terminale sono disponibili per altre reazioni

Risonanza del legame peptidico

I peptidi sono sempre scritti nella direzione N->C: ciascun gruppo peptide ha un solo gruppo amminico libero ed un solo gruppo carbossilico libero; tutti gli altri sono impegnati nella formazione di legami peptidici.

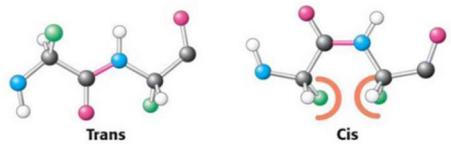
CARATTERISTICHE: il legame peptidico ha un parziale carattere di doppio legame derivante dalla stabilizzazione di risonanza (il legame C-N ha un 40% di carattere di doppio legame) C-N e C-O hanno un parziale carattere di doppio legame dovuto alla possibile sovrapposizione di orbitali p. Questo parziale carattere di doppio legame rende il legame peptidico più forte di un legame covalente. Non ha tendenza a protonarsi.



L'azoto ha un doppietto elettronico libero che può essere usato per il doppio legame fra carbonio e azoto.

Le strutture di risonanza causano un irrigidimento del legame, evitando la libera rotazione.

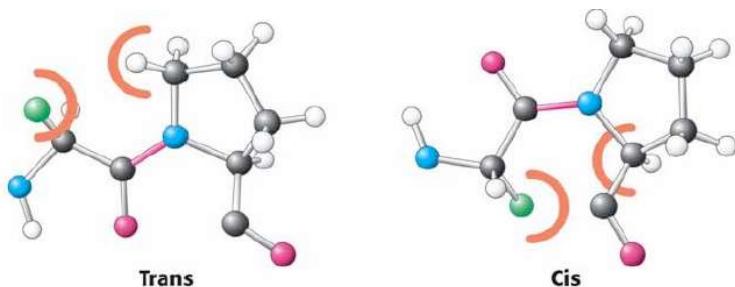
Il legame peptidico è infatti planare e rigido: C, N, O e H sono tutti sullo stesso piano. I gruppi R



sui carboni alpha sono su lati opposti rispetto al legame peptidico, il più lontano possibile gli uni dagli altri.

La catena si ripiega perché gli altri legami possono ruotare attorno al carbonio alpha.

La presenza di un doppio legame ci dà molecole cis o trans, quest'ultima più stabile, da una configurazione parallela. La configurazione cis è molto rara in quanto l'ingombro sterico è molto grande.



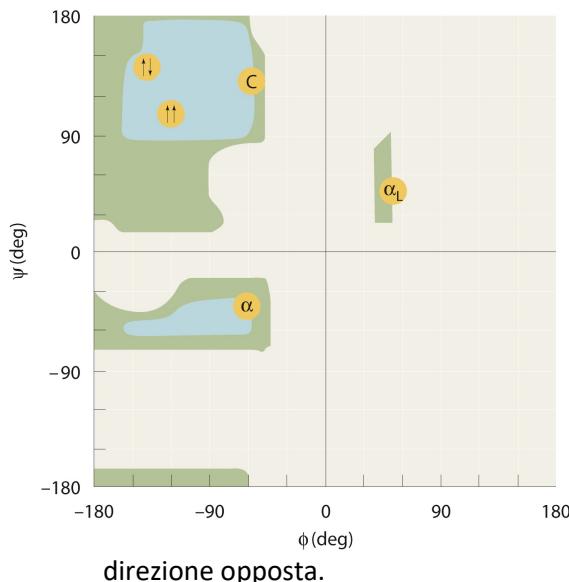
La prolina ha un ingombro sterico sia in cis che in trans quindi il passaggio fra i due legami avviene con poca energia perché la stabilità delle forme è molto simile.

Esistono enzimi per modificare questa struttura.

Lo **scheletro peptidico** è costituito da piani rigidi uniti mediante i carboni alpha, attorno a cui può ruotare la struttura stessa. Lo scheletro può formare un angolo con un piano e un angolo con l'altro: parliamo in questo caso di N-C α 1 (ϕ) e C α 2-C (ψ). Attorno a questi angoli possiamo avere una rotazione di 360° ma ci sono delle limitazioni per i gruppi funzionali legati al carbonio che possono collidere ruotando. Questo determina una limitazione nella forma che una proteina può assumere. Non tutti gli angoli di psi e phi sono permessi, la

presenza di altri atomi o gruppi atomici sul carbonio alpha limita le possibili conformazioni della catena polipeptidica.

DIAGRAMMA DI RAMACHANDRAN



Il **diagramma di Ramachandran** riporta i valori degli angoli di rotazione permessi. La figura indica che il 77% del diagramma (parte vuota) corrisponde a coppie di angoli non stericamente permessi. Le regioni corrispondenti agli angoli permessi sono riconducibili a strutture secondarie ben definite come:

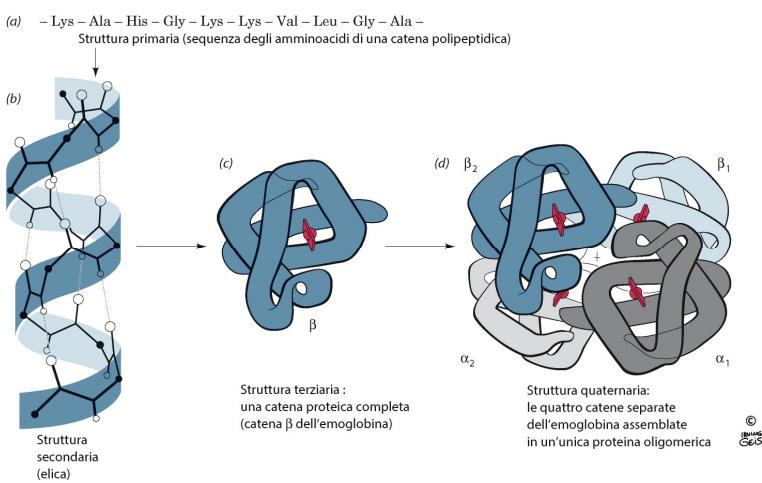
- 1) alfa elica destrorsa: gli angoli di psi e phi vanno da -40 a -70 . Si trovano nel quadrante negativo
- 2) Foglietto beta ripiegato: gli angoli sono fra 120 e 180 e danno una struttura a foglietto β . Più strutture β vicine danno origine al foglietto β . È indicato con le frecce perché ha un verso da N al C terminale. È definito parallelo se vanno nella stessa direzione mentre antiparallelo se hanno direzione opposta.
- 3) Alfa elica sinistrorsa: gli angoli vanno da $+40$ a $+70$ e girano in direzione opposta rispetto a quella destrorsa

L'alpha elica destrorsa è più presente.

Il ripiegamento della catena polipeptidica da una proteina.

Il ripiegamento o guanto β coinvolge pochi amminoacidi come struttura: è semplice e comprende solo 4 amminoacidi piccoli e poco flessibili. In questo caso, la catena polipeptidica torna indietro cambiando direzione (antiparallela).

Come possono ripiegarsi le proteine? Hanno 4 livelli di organizzazione



STRUTTURA PRIMARIA: è data dalla sequenza di amminoacidi nella catena polipeptidica

STRUTTURA SECONDARIA: α -elica; foglietto β ; gomitolo β

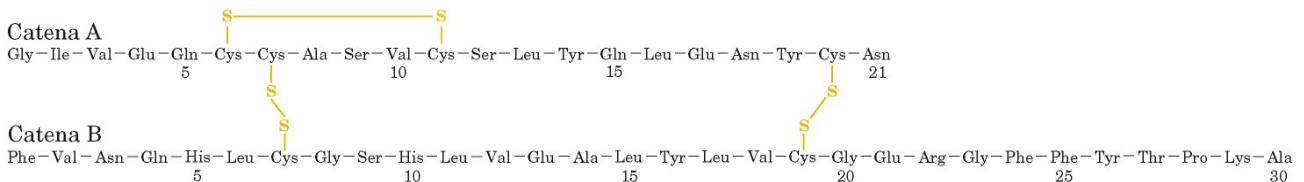
STRUTTURA TERZIARIA: è la forma tridimensionale della proteina data dal ripiegamento della catena

STRUTTURA QUATERNARIA: alcune proteine devono essere costituite da più catene polipeptidiche per funzionare:

serve un alto livello di organizzazione per descrivere come si ripiegano fra di loro.

Mioglobina ed emoglobina: legano entrambe l'ossigeno ma c'è una differenza strutturale e funzionale. La mioglobina è una riserva di ossigeno, è una proteina monomerica fatta da una sola catena (si ferma quindi alla struttura terziaria). L'80% è in α -elica (con 8 tratti di α -elica). L'emoglobina si occupa del trasporto di ossigeno: è una proteina multimerica con struttura quaternaria.

LEGAME PEPTIDICO: è caratteristico della struttura primaria dove ciascun amminoacido è legato al suo successivo. Sono indicati come residui amminoacidici perché impegnati nel legame peptidico. L'insulina è una catena multimerica in cui sono presenti ponti disolfuro, intra o intercatena. I ponti disolfuro possono dare una struttura primaria o terziaria: primaria se abbiamo un legame covalente in quanto è presente solo nella struttura primaria; terziaria se stabilizza la struttura tridimensionale e la forma delle proteine.

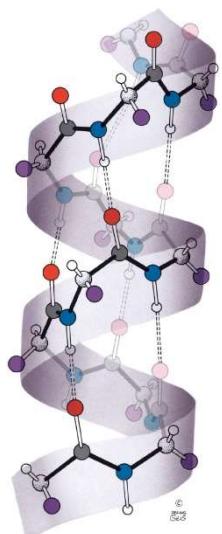


STRUTTURA SECONDARIA: l' α -elica e il foglietto β dipendono dagli angoli Ψ e ϕ : la spirale va stabilizzata formando interazioni che mantengano la struttura. Queste interazioni sono i ponti idrogeno a carico dei legami peptidici: il donatore è l'idrogeno ammidico e l'accettore è l'ossigeno del gruppo carbonilico. In questo caso parliamo di ponti intracatena. Sulla catena laterale posso avere ponti idrogeno ma non vengono presi in considerazione per la stabilità.

La struttura secondaria di una proteina fa riferimento all'ordine locale di un tratto di catena polipeptidica caratterizzato da uno specifico ripiegamento definito dagli angoli di torsione dei legami $\text{C}\alpha\text{---N}$ e $\text{C}\alpha\text{---C=O}$. Le catene laterali sono all'esterno perché ogni atomo che partecipa alla struttura ha un suo ingombro che riempie l'interno della spirale. Le catene laterali sono poste in modo radiale per minimizzare le interazioni fra di loro e massimizzarne la struttura.

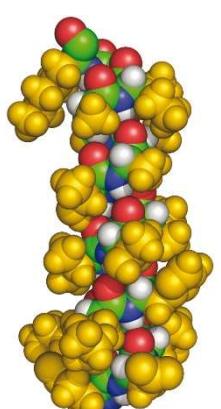
L' α -elica

- È il più comune
- È una struttura con ripiegamento elicoidale
- Ciascun H ammidico e ciascun O carbonilico sono coinvolti nella formazione di ponti idrogeno che stabilizzano l'elica (ponti intracatena)
- L'ossigeno del carbonile di un residuo amminoacidico (n) forma un ponte idrogeno con l'idrogeno ammidico di un residuo che si trova 4 amminoacidi dopo una lunga catena ($n+4$)
- I ponti idrogeno sono paralleli rispetto all'asse maggiore della struttura
- Ci sono 3.6 residui di amminoacidi per ogni giro d'elica.
- La struttura tridimensionale forma una tasca dove si inserisce il gruppo eme che permette alla mioglobina di legare l'ossigeno.
- Il passo dell'elica è di 5.4 angstroms
- Coinvolge una sola catena polipeptidica. Gli atomi che compongono lo scheletro principale sono localizzati all'interno della struttura mentre i gruppi R sono all'esterno



I foglietti β

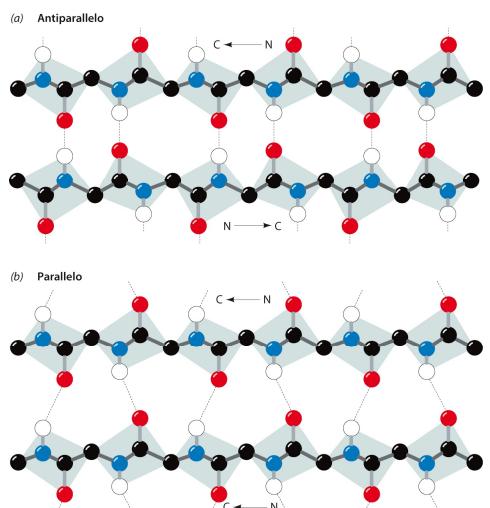
- Tutti gli ossigeni carbonilici e gli idrogeni ammidici sono coinvolti nella formazione di ponti idrogeno perpendicolari tra catene vicine (ponti intercatena)
- Due possibili orientazioni: parallelo se gli N terminali sono dalla stessa parte; antiparallelo se l'N terminale di una catena è dalla stessa parte del C terminale



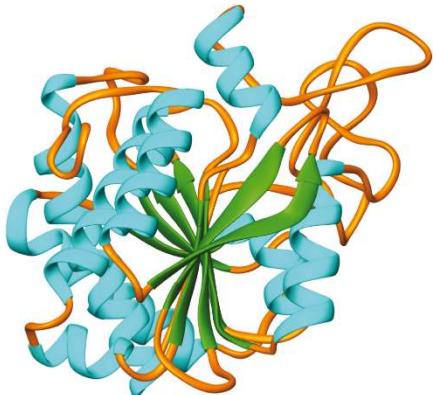
dell'altra catena. In quello antiparallelo, non tutti i legami peptidici riescono a formare legami a idrogeno, qualcuno salta: non c'è differenza di stabilità fra parallelo e antiparallelo

- Gli angoli sono quasi piatti, da 120 a 180. Lo scheletro è quasi completamente steso
- I legami lineari sono più stabili di quelli angolati
- Servono almeno due tratti di catena polipeptidica. Abbiamo interazioni anche intracatena
- Le catene laterali sono disposte alternativamente sopra e sotto il piano per diminuire l'ingombro sterico e stabilizzare la struttura.

Gli amminoacidi non sono colorati perché non assorbono la luce nel visibile. È il gruppo eme dell'emoglobina colorato, non la parte proteica.



Anse (Loops) o Ripiegamenti (Turns)



Piccole regioni dello scheletro polipeptidico possono formare delle Anse (loops). Sono regioni che non hanno strutture secondarie ben definite in quanto contengono **glicina** (piccola e flessibile) e **prolina** (causa ripiegamenti per la sua rigidità). Troviamo la prolina dove varia la direzione della catena polipeptidica rompendo l' α -elica. La glicina è più compatibile con il foglietto β .

Le anse connettono le regioni di struttura secondaria e non sono strutture periodiche, sono irregolari e anche abbastanza estese: un loop può contenere 6 -16 amino acidi ed essere lungo $\sim 10 \text{ \AA}$

La struttura primaria influenza quella secondaria: non tutti gli amminoacidi sono compatibili con le strutture secondarie: ad esempio la glicina e la prolina non sono compatibili con la struttura α -elica per due motivi opposti. La glicina è l'amminoacido più piccolo ed è quello che conferisce maggiore flessibilità alla catena polipeptidica e proprio per questo non è adatto alla struttura ordinata dell'elica. La prolina invece, che è un α -imminoacido, ha una struttura molto rigida che non si adatta al ripiegamento dell' α -elica. Glicina e proline sono amminoacidi che favoriscono la formazione di ripiegamenti β .

STRUTTURA TERZIARIA: è la struttura tridimensionale. Si forma spontaneamente ed è mantenuta da interazioni non covalenti tra le catene laterali che ripiegandosi, le faranno avvicinare. Ne definisce la funzione.

Tipi di interazioni che stabilizzano la struttura terziaria:

- ponti disolfuro tra due residui di cisteina
- ponti salini tra due catene laterali contenenti gruppi ionizzabili come $-\text{COO}^-$ ed $-\text{NH}_3^+$. I ponti salini sono delle interazioni fra la parte acida e la parte basica

La struttura è più conservata della sequenza

STRUTTURA QUATERNARIA: la forma funzionale di molte proteine non corrisponde ad una singola catena polipeptidica, ma spesso è costituita da più catene polipeptidiche aggregate. La struttura quaternaria è l'organizzazione delle catene polipeptidiche, chiamate subunità, che costituiscono una proteina multimerica. È stabilizzata dallo stesso tipo di interazioni che stabilizzano la struttura terziaria, quindi sono legami deboli.

Una subunità è una catena polipeptidica caratterizzata da una struttura primaria, secondaria e terziaria che fa parte di una proteina più grande.

L'emoglobina ne è un esempio: è formata da 4 catene.

Le proteine hanno diverse funzioni in relazione alla loro forma. Le distinguiamo in proteine fibrose e globulari: le prime hanno una forma allungata, hanno forza meccanica (si occupano del movimento degli organismi), sono insolubili in acqua e fanno parte dei componenti strutturali. Le proteine globulari si trovano in soluzione acquosa, possono avere la funzione di trasporto o essere enzimi o ormoni (proteine regolatrici).

Una proteina funziona solo per la sua forma. L'emoglobina per svolgere la sua funzione ha bisogno del gruppo eme. Una proteina si definisce semplice se è fatta solo da amminoacidi.

Una proteina è definita coniugata se contiene altri componenti oltre agli amminoacidi

Classe	Gruppo Prostetico	Esempio
Nucleoproteine	Acidi Nucleici	Virus
Lipoproteine	Lipidi	Lipoproteine Seriche
Glicoproteine	Carboidrati	Mucina nella saliva
Fosfoproteine	Gruppo Fosfato	Caseina nel latte
Emoproteine	Eme	Emoglobina, citocromi
Metalloproteine	ferro, zinco	Ferritina, Emoglobina

Il ripiegamento delle proteine

Una proteina che si ripiega passa da uno stato di elevata energia ed entropia ad uno di bassa energia ed entropia. La proteina disolfuro isomerasi catalizza la formazione dei ponti disolfuro.

I processi che portano ad un aumento del disordine sono stabili da un punto di vista termodinamico.

Una proteina si ripiega per nascondere gli amminoacidi apolari dall'ambiente acquoso mettendoli all'interno della struttura tridimensionale e lasciando prevalentemente fuori gli amminoacidi polari dato che la proteina si trova in ambiente acquatico.

Possono esserci tantissimi modi di ripiegamento ma solo uno è quello che porta la proteina ad avere la giusta forma per poter funzionare. La proteina si ripiega in diversi modi prima di stabilizzarsi in quella corretta. In questo modo però servirebbe troppo tempo, più del tempo di vita della cellula stessa.

In vivo (nella cellula) la velocità di ripiegamento è più veloce che in vitro perché in vivo il ripiegamento è assistito da altre proteine (chaperoni molecolari) che aiutano la proteina a ripiegarsi. Questi operano tramite un meccanismo di legame e rilascio dipendente dall'ATP. Le malattie amiloidi derivano da un non corretto ripiegamento delle proteine. Le proteine non correttamente ripiegate formano fibrille contenenti strutture β estese.

Lo stato natio è quello a meno energia, è il più stabile proprio perché è lo stadio a più bassa energia.

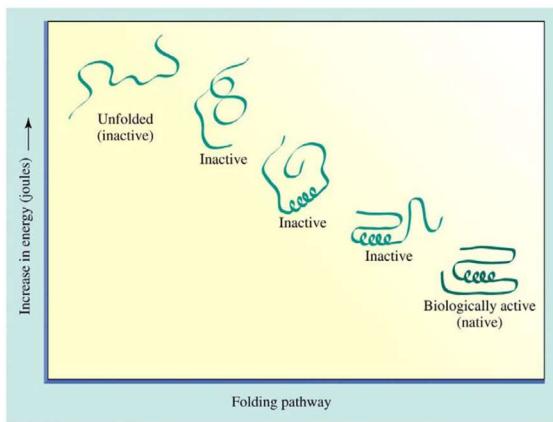


Figure 4-13 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

α -elica anfipatiche: α elica dove le catene laterali idrofile sono presenti prevalentemente su una faccia mentre sull'altra sono concentrati amminoacidi idrofobici. Sono importanti per le membrane dove creano canali.

β -barile: canale dove passano le molecole nella membrana. Una parte di proteina che attraversa la membrana è normalmente α -elica.

Verso i lipidi è rivolta la parte idrofobica, quindi, guarda la membrana esterna mentre quella interna è guardata dalla parte idrofila. In questo modo si può creare un canale.

Anche il foglietto β può essere anfipatico.

α -elica è adatta ad attraversare la membrana perché i ponti idrogeno diminuiscono la polarità del legame peptidico. Con α -elica sono poco compatibili glicina e prolina (che cambia direzione rompendo l' α -elica).

Ciò che spinge le proteine a ripiegarsi sono le interazioni idrofobiche fra amminoacidi non polari.

Tranne il ponte disolfuro, il resto sono tutte interazioni deboli.

Ci sono differenze fra lo stato natio e lo stato ripiegato.

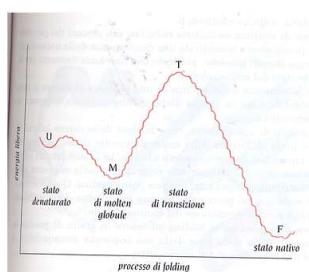
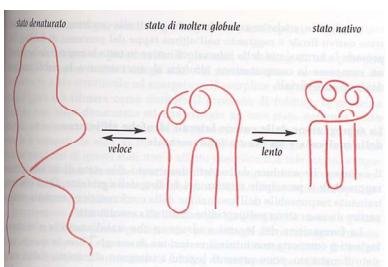
Entalpia: legami che si possono fare fra i componenti e fra gli amminoacidi e l'ambiente. È l'energia delle interazioni non covalenti all'interno della catena. Le interazioni sono molto più numerose nello stato nativo: la differenza di entalpia fra stato nativo e denaturato può essere di alcune centinaia di Kcal/mole.

Entropia: grado di disordine. Lo stato natio è molto più ordinato dello stato denaturato: dal punto di vista dell'entropia lo stato denaturato sarà più vantaggioso, anche in questo caso la differenza può essere di alcune centinaia di Kcal/mole sebbene di segno opposto a quello della differenza di entalpia.

Differenza di Energia Libera = poche Kcal/mole (5-15Kcal/mole). L'energia libera tiene in considerazione entrambi i parametri.

Sono le interazioni idrofobiche che determinano la maggiore stabilità spingendo la proteina a ripiegarsi.

Altre ipotesi: stato di globulo fuso.

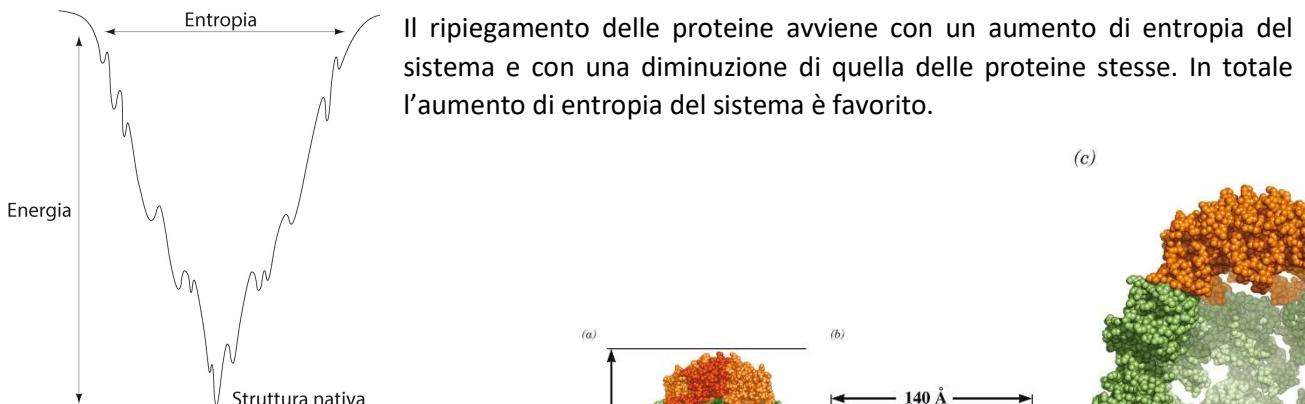


La proteina denaturata raggiunge la forma ripiegata attraverso un primo stadio veloce dove assume un ripiegamento simile a quello finale: è lo stadio di globulo fuso e ha la forma che hanno le proteine nel citosol.

Più lentamente il globulo fuso si riarrangia per assumere lo stato nativo. Possono esserci più globuli fusi simili fra loro quindi possiamo avere un cammino ramificato o lineare.

La segregazione delle catene laterali idrofobiche all'interno della molecola proteica è la forza trainante per il ripiegamento della catena polipeptidica. Questo comporta un notevole aumento di entropia dovuto all'eliminazione dello strato di molecole di acqua altamente ordinato che interagisce con questi residui nello stato denaturato.

Aumenta l'entropia per un elevato numero di molecole d'acqua disordinate.



Struttura della chaperonina GroEL/ES

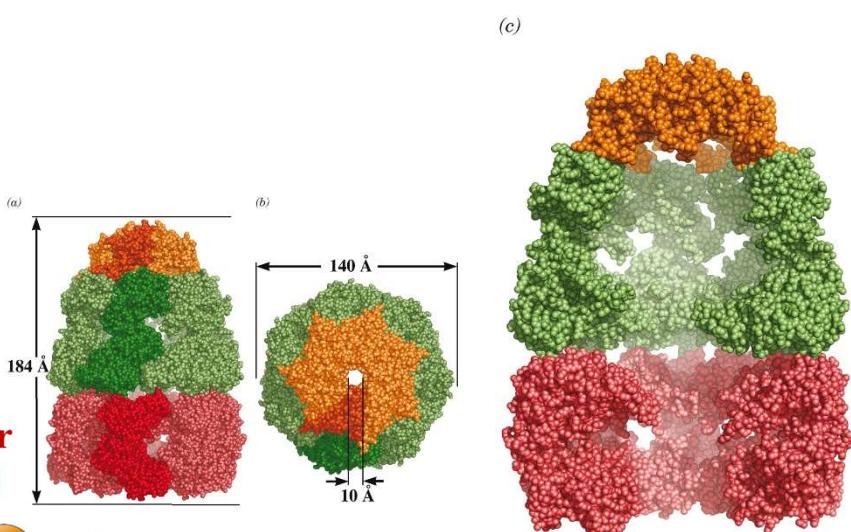
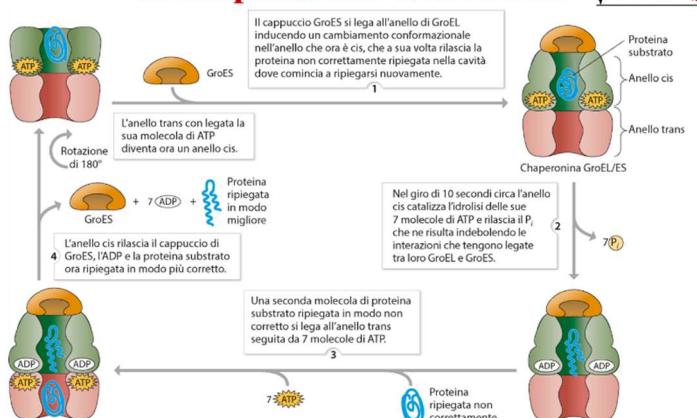


Diagramma di processo per la chaperonina GroEL/ES



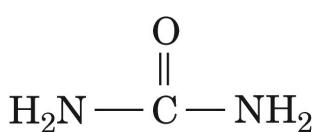
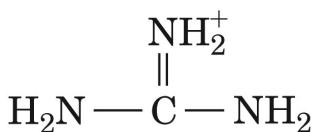
È un sistema fatto da un cilindro interno e da un tappo. Il cilindro ha due settori con 7 catene polipeptidiche in ciascuno che aiutano la proteina a ripiegarsi. La proteina entra nel cilindro e GroES chiude la struttura dove viene consumando ATP per dare energia. Oltre all'ATP, viene consumata anche la proteina. L'ATP diventa ADP, il tappo si toglie e la proteina può uscire. Esce in modo completamente ripiegato ma se

non fosse così, tornerebbe nella struttura. Vengono consumate 7 molecole di ATP ma può essere un valore molto alto a seconda della proteina.

Una volta che è completamente ripiegata si allontana dalla struttura.

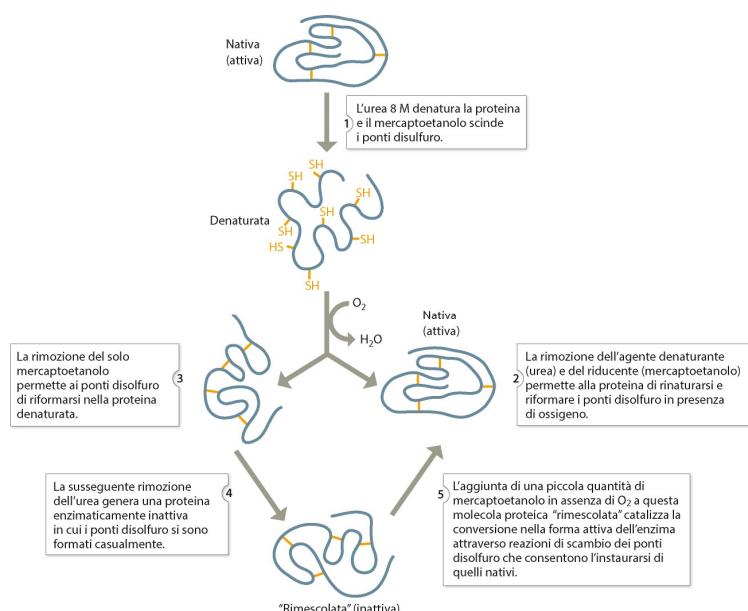
Una proteina non perfettamente ripiegata avrà specifiche catene idrofobiche da nascondere all'interno.

Le proteine possono essere denaturate usando agenti caotrotici come ione guanidinio e urea.



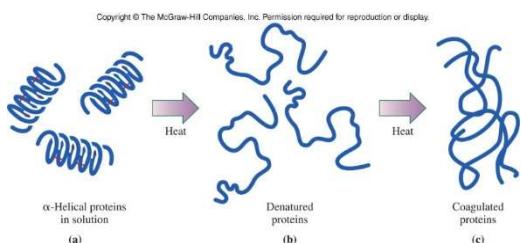
La proteina può poi rinaturarsi.

Ione guanidinio



Urea

l'RNAasi si occupa di degradare l'RNA. È una proteina monomerica stabilizzata anche da ponti disolfuro. Il mercaptoetanolo è riduttore dei ponti disolfuro, l'urea denatura gli altri legami. Se la proteina è denaturata, non può degradare l'RNA. L'ossigeno potrebbe riossalidare i ponti disolfuro togliendo il mercaptoetanolo. Togliendo l'urea invece si riformano le altre interazioni. La proteina si è ripiegata ma è ancora inattiva: si deve tagliare l'agente denaturante e poi mercaptoetanolo ottenendo così una proteina attivata e ripiegata. Nel primo caso, non è detto che i ponti disolfuro fossero quelli corretti. Nella struttura aminoacidica è già scritto tutto quello che serve alla proteina per ripiegarsi raggiungendo la sua forma nativa.

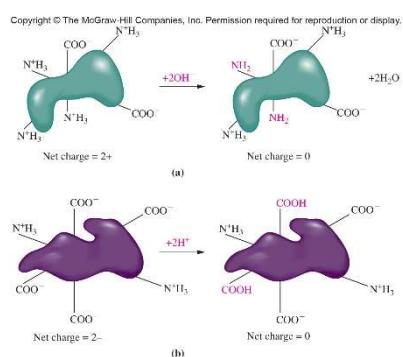


Le proteine possono essere denaturate con variazioni di temperatura, di pH o tramite agitazione meccanica.

La denaturazione è la perdita dell'organizzazione strutturale delle proteine, senza alterazioni nella struttura primaria.

L'idrolisi è la rottura dei legami. Servono variazioni di temperatura e pH molto più grandi. La proteina va messa in una soluzione di acido cloridrico 6 molare a temperature elevate per tempi lunghi. Per la denaturazione sono sufficienti temperature più basse.

Effetto del pH sulle proteine



Una proteina ha carica netta $+/-2$ e aggiungendo una base, alcuni gruppi amminici protonati perdono i loro protoni e la carica netta diventa 0. Un'altra proteina ha carica totale -2 e aggiungendo un acido, i gruppi carbossilato verranno protonati facendo passare la carica netta ad un valore pari a 0 (punto isoelettrico). Ha solubilità minima perché le molecole si aggregano e tendono a precipitare.

In entrambi i casi, in seguito alla variazione di pH, la proteina si disavvolgerà a causa delle repulsioni elettrostatiche.

Il pH può essere usato per separare le proteine.

Nel sangue o nei tessuti, le proteine denaturate non svolgono più le loro funzioni.

BIOENERGIA

Termodinamica

L'energia si conserva e può presentarsi in forme differenti. Nella maggior parte dei sistemi biochimici, l'entalpia equivale al calore. L'entropia, una misura del disordine presente in un sistema, tende ad aumentare. La variazione di energia libera di un sistema è determinata dalla variazione di entalpia ed entropia. Un processo spontaneo avviene con diminuzione di energia libera. La variazione di energia libera di una reazione può essere calcolata a partire da temperatura, concentrazione e stechiometria di reagenti e prodotti.

Il processo si definisce spontaneo se la differenza di calore fra prodotti e reagenti è negativa. Da un punto di vista entropico il processo è spontaneo se la differenza è positiva.

L'entalpia e l'entropia sono due funzioni di stato: l'energia libera li raccoglie entrambi: ci permette di stabilire la spontaneità del processo. Non possiamo determinare il valore assoluto ma la variazione di entropia e entalpia.

Per i biochimici le condizioni standard sono:

- P=1 atm
- T=25°C
- pH=7: equivale alla concentrazione di ioni H⁺ 1 molare. Il pH standard in chimica è uguale a 0
- concentrazione standard reagenti prodotti= 1 molare.
- La concentrazione dell'acqua è costante per i biochimici perché le reazioni avvengono in ambiente acquoso.

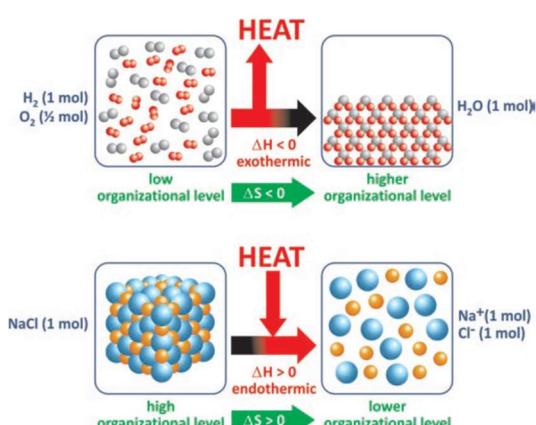
Gli organismi sono visti come dei sistemi aperti.

Un sistema è una porzione dell'universo sotto esame; l'ambiente è ciò che lo circonda.

Un sistema può essere

- Aperto se scambia energia e materia con l'ambiente
- Chiuso se scambia solo energia
- Isolato se non scambia né energia e né materia

ESEMPIO 1



Idrogeno e ossigeno gassosi possono reagire fra di loro dando acqua. La reazione è esotermica perché si libera molto calore $\Delta H \ll 0$. Lo stato gassoso è sempre più disordinato, l'entropia è minore di 0. ΔS è positivo ma minore della negatività del ΔH che dà ancora una somma negativa. La reazione può avvenire anche se $\Delta S < 0$ per la negatività di ΔH .

Il processo è spontaneo per ΔH molto negativo.

Anche l'energia libera è una funzione di stato $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

$\Delta G = 0$ reazione all'equilibrio

$\Delta G < 0$ reazione spontanea: $\Delta H < 0$ processo spontaneo; $\Delta S < 0$ processo spontaneo

Se ΔH è negativo e ΔS è positivo, ΔG sarà negativo

Se ΔH è negativo così come ΔS , ΔG è negativo e il processo sarà spontaneo guidato dall'entalpia.

ESEMPIO 2

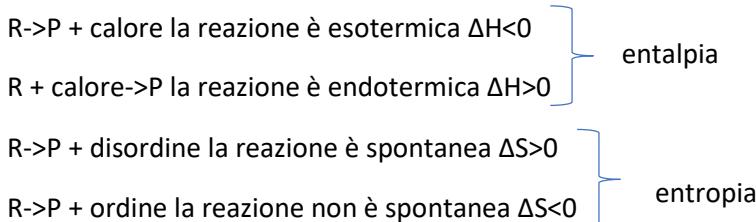
NaCl in acqua si scioglie

$$\Delta S > 0$$

Dobbiamo dare calore quindi avremo $\Delta H > 0$ ma la reazione avviene con un aumento di disordine quindi il processo sarà spontaneo perché ΔS supera $\Delta H > 0$

In condizioni reali i processi si comportano diversamente.

Le leggi della termodinamica governano tutti i processi



Le cellule creano ordine perché sono dei sistemi aperti

Reazione esotermica: se l'energia richiesta per rompere un legame è inferiore a quella rilasciata nella formazione del legame stesso, c'è un rilascio netto di energia che è uno dei prodotti della reazione.

Reazioni endotermiche: se l'energia richiesta per rompere i legami è superiore a quella rilasciata dalla formazione dei legami stessi, il processo necessita dell'apporto di energia dall'esterno.

Le reazioni spontanee avvengono senza l'apporto esterno di energia e la maggior parte sono reazioni esotermiche. Grazie alla termodinamica e all'entropia possiamo capire se una reazione potrà avvenire.

L'**entropia (S°)** è la misura del disordine di un sistema: se è alta, il sistema è molto disordinato, senza strutture regolari ripetute. Se è bassa, il sistema è ben organizzato secondo una struttura cristallina.

- Se una reazione **esotermica** ha un ΔS° **positivo** è **spontanea**
- Se una reazione **endotermica** ha un ΔS° **negativo** non è **spontanea**

Indicando con W il numero di stati microscopici che un sistema può assumere a determinate condizioni di temperatura, pressione e concentrazione, l'entropia è data da

$$S = k \ln W \text{ dove } k \text{ è la costante di Boltzman che vale } 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$$

Essendo l'entropia correlata ai processi di trasferimento di calore, è data anche da

$dS_{\text{reversibile}} = dq/T$ dove dS è la variazione di entropia per un sistema in un processo reversibile e q è la quantità di calore trasferita alla temperatura T

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \text{ per tutti i processi a P e T costante}$$

ΔG riassume sia ΔH che ΔS (energia libera, è una quantità ipotetica)

Se $\Delta G < 0$ la reazione è esoergonica, quindi è spontanea e si libera energia libera

Se $\Delta G > 0$ la reazione è endoergonica, non è spontanea e assorbe energia libera

Se $\Delta G = 0$ la reazione è all'equilibrio e l'energia libera è pari a 0 perché è la quantità necessaria di energia per compiere lavoro e se questo non viene fatto, non c'è energia libera. Una reazione procede fino a quando i prodotti aumentano e i reagenti calano, all'equilibrio la concentrazione dei due non cambia e dal punto di vista termodinamico la reazione non lavora.

Anche la temperatura può determinare la spontaneità di una reazione

$\Delta H +, \Delta S -$: ΔG è sempre +, indipendentemente dalla temperatura

$\Delta H -, \Delta S +$: ΔG è sempre -, indipendentemente dalla temperatura

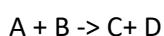
$\Delta H +, \Delta S +$: il segno di ΔG dipende dalla temperatura

$\Delta H -, \Delta S -$: il segno di ΔG dipende dalla temperatura

Le condizioni standard vengono indicate con ΔG° ΔH° ΔS°

Per valutare la variazione di calore, la reazione deve avvenire in un sistema isolato. È più complicato valutare la variazione di ordine.

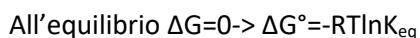
L'importante è capire se la reazione è possibile a condizioni fisiologiche. Il ΔG reale della reazione va messo in relazione con ΔG° e la concentrazione dei reagenti e dei prodotti renderà diverso ΔG da ΔG°



$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln([C][D]/[A][B])$$

Se ΔG° è leggermente positivo, la reazione non è molto spontanea; se il logaritmo è negativo, in valore assoluto, il rapporto ha un valore <1 quindi ΔG è negativo. Se il rapporto ha un valore <1, sono presenti più reagenti che prodotti.

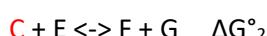
Nelle vie metaboliche possiamo favorire un ΔG totale negativo andando a operare sui sottoprodotto e spingendo la reazione verso di loro.



Possiamo misurare il ΔG° conoscendo K_{eq} , essendo più facile da calcolare. Se una reazione è spostata verso i prodotti ho una K_{eq} molto grande in quanto la loro concentrazione è maggiore rispetto a quella dei reagenti (credo). ΔG sarà molto negativo e la reazione molto spontanea.

Reazioni esoergoniche ed endoergoniche riguardano accoppiamento energetico e processi di trasferimento di energia.

Composti ad alta energia possono accoppiare reazioni che producono energia con quelle che richiedono energia. Il prodotto di una reazione deve essere però il reagente dell'altra reazione.



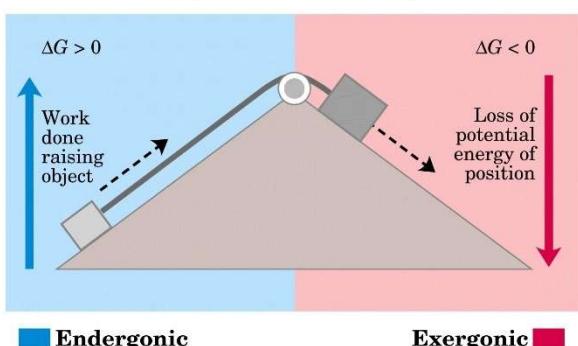
Se ΔG°_3 è minore di 0, la reazione è spontanea così come anche se entrambi i ΔG° sono negativi o se uno è positivo e l'altro è più negativo.

$$RT \ln K'_{eq3} = RT \ln K'_{eq1} + RT \ln K'_{eq2}$$

$$K'_{eq3} = K'_{eq1} \times K'_{eq2}$$

ESEMPIO MECCANICO

(a) Mechanical example



Per un processo endoergonico, serve energia per spostare il masso dalla base alla cima; per un processo esoergonico non serve energia per spostare il masso dalla cima alla base.

ESEMPIO CHIMICO

Il glucosio più il fosfato inorganico danno glucosio 6 fosfato tramite reazione di glicolisi. Il prodotto ha più energia quindi la reazione non è spontanea.

Nella reazione di ATP, questa si trasforma in ADP più fosfato inorganico. L'ATP è ad alto contenuto energetico mentre l'ADP ne ha meno: in questo caso il prodotto ha meno energia del reagente e la reazione è spontanea.

Si possono unire le due reazioni sommandole:



$$\Delta G_3 = \Delta G_1 + \Delta G_2 \text{ ma } \Delta G_2 \ll \Delta G_1 \text{ quindi } \Delta G_3 < 0 \text{ e la reazione può avvenire.}$$

Si ottiene glucosio 6 fosfato se usiamo ATP e non fosfato inorganico.

Trasferimento di energia: un processo biologico cruciale

L'energia acquistata dalla luce solare o dal cibo deve essere usata per guidare processi endoergonici, che richiedono quindi energia.

Servono intermedi e due classi di biomolecole fanno ciò:

- I coenzimi ridotti (NADH, FADH₂)
- I composti fosforilati ad alta energia, con un'energia libera di idrolisi maggiore di -25 kJ/mol (va visto il valore assoluto)

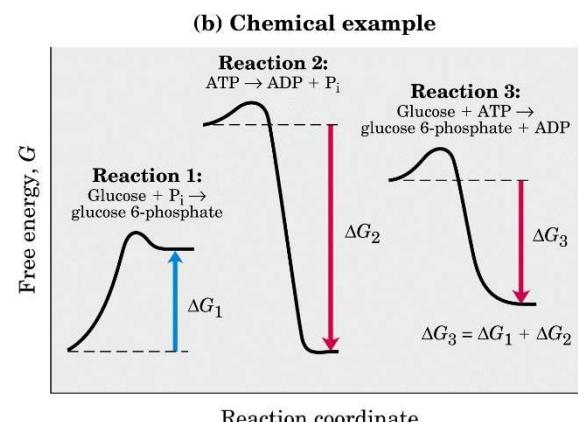
I coenzimi sono molecole non proteiche che aiutano le proteine a lavorare.

NADH e FADH₂ sono la forma ridotta; NAD⁺ e FAD sono la forma ossidata.

Le reazioni di ossidazione liberano energia, quelle di riduzione la richiedono.

I composti fosforilati ad alta energia contengono gruppi fosforici.

L'ATP ha una posizione centrale in quanto moneta di scambio, è un trasportatore di energia in quanto



ENERGIA LIBERA STANDARD DI IDROLISI DEL GRUPPO FOSFORICO

COMPOSTO	ΔG°(kJ/mole)
FOSFOENOLPIRUVATO	-61.9
1,3-BIFOSFOGLICERATO	-49.4
ACETILFOSFATO	-43.1
FOSFOCREATINA	-43.1
PP _i	-33.5
ATP (AMP + PP _i)	-32.2
ATP (ADP + P _i)	-30.5
GLUCOSIO-1-FOSFATO	-20.9
FRUTTOSIO-6-FOSFATO	-13.8
GLUCOSIO-6-FOSFATO	-13.8
GLICEROLO-3-FOSFATO	-9.2

Prodotti durante il catabolismo del glucosio

trasferisce velocemente la sua energia ai processi che ne richiedono. Non è però una riserva di energia, va rigenerata.

Si consuma ATP pari quasi al peso della persona.

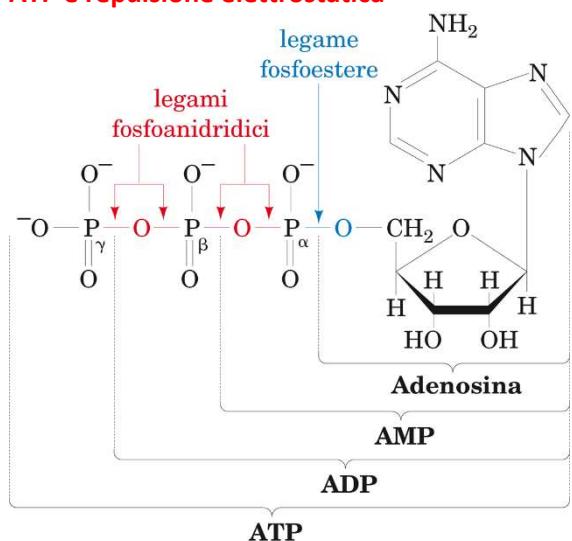
L'energia contenuta nel fosfoenolpiruvato e nell'1,3-bisfosfoglicerato ed il gruppo fosfato sono trasferiti all'ADP per formare ATP.

ATP e ADP sono anidridi dell'acido fosforico.

L'energia libera di idrolisi è fortemente negativa grazie a:

- Repulsione elettrostatica
- Stabilizzazione dei prodotti mediante ionizzazione e risonanza
- Fattori entropici

ATP e repulsione elettrostatica

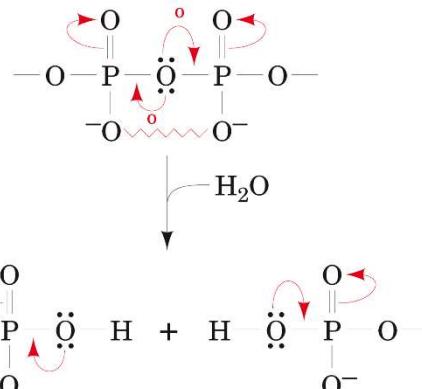


È una catena polifosforica con 3 gruppi fosforici legati fra loro tramite un legame estere fra lo zucchero e il primo gruppo (α) e un legame fosfoanidridico fra β e γ (ad alta energia).

L'adenosin è formata da uno zucchero, il ribosio e una base azotata, l'adenina.

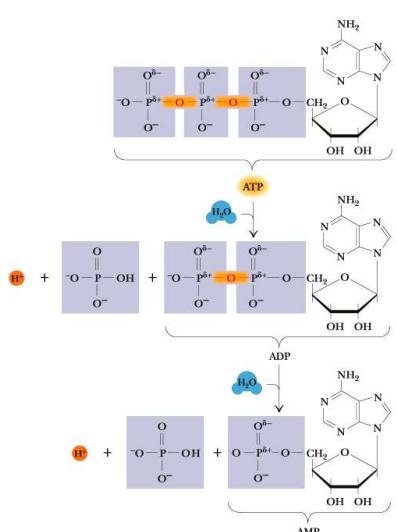
Se sono presenti tre gruppi fosfato parliamo di adenosin trifosfato, se ne sono presenti due adenosin difosfato, se è solo uno, adenosin monofosfato.

Il fosfato deriva dall'acido fosforico, un acido forte che libera ioni H^+ .



A pH fisiologico tutti i gruppi sono carichi negativamente (sono presenti 4 cariche -) ed è richiesta molta energia per tenerle vicine dato che cariche uguali si respingono. Quindi è stabilitizzata per risonanza.

L'ordine di una molecola è dato dal numero di forme che può assumere: minore è e maggiore sarà il suo ordine.



Se i prodotti di idrolisi dell'ATP hanno più energia dei reagenti, la reazione è spontanea.

L'aumento delle specie in soluzione comporta un aumento di entropia.

Il pirofosfato è una molecola ad alta energia.

Idrolizzando i due gruppi fosfato, i prodotti di reazione hanno un numero di risonanza superiore rispetto ai reagenti quindi sono maggiormente in disordine.

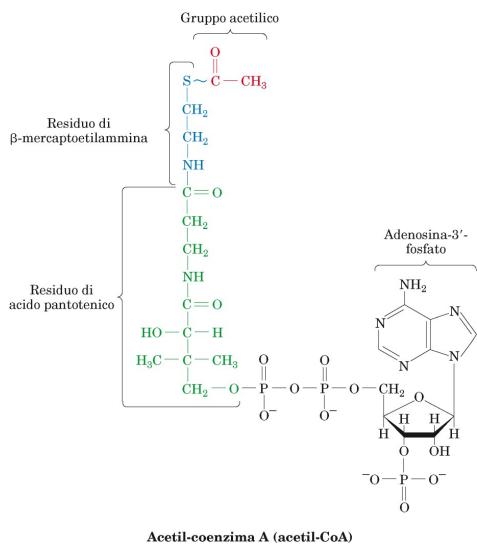
In soluzione ci sono 3 specie, è presente anche il protone libero dell'acqua.

La rottura dei legami è spontanea.

L'ADP ha ancora un po' di energia e rompendo il legame, diventa AMP, difficile da rompere perché a bassa energia.

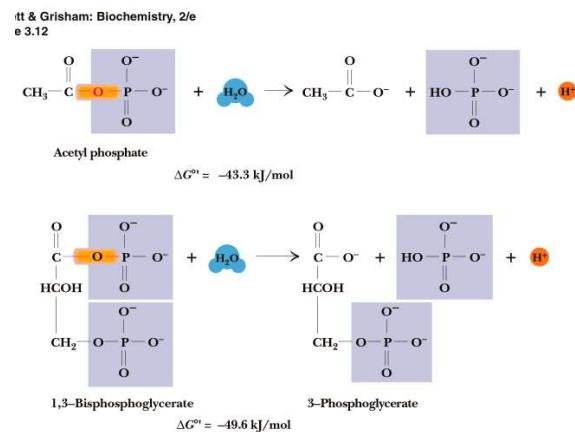
Altre anidridi sono acetilfosfati e 1,3-bisfosfoglicerato. La prima è un'anidride mista, la seconda ha 2 gruppi fosfati di cui solo uno è ad alta energia (il primo) in quanto uno dei due è un estere.

TAUTOMERIA: trasformazione di un alcol vinilico in forma chetonica quindi una forma più stabile dell'enolica.



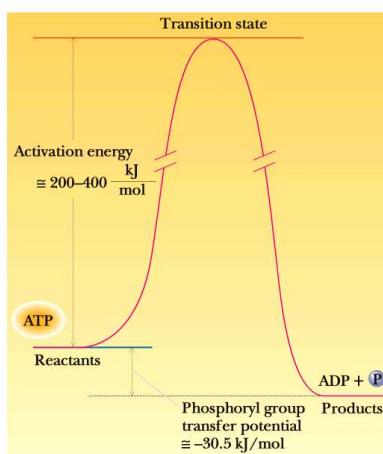
TIOESTERI: sono esteri ad alta energia con lo zolfo che fa da ponte.

~ si indica un legame ad alta energia



Nucleotidi ridotti, tioesteri e composti fosforilati ad alta energia sono tutti ad alta energia.

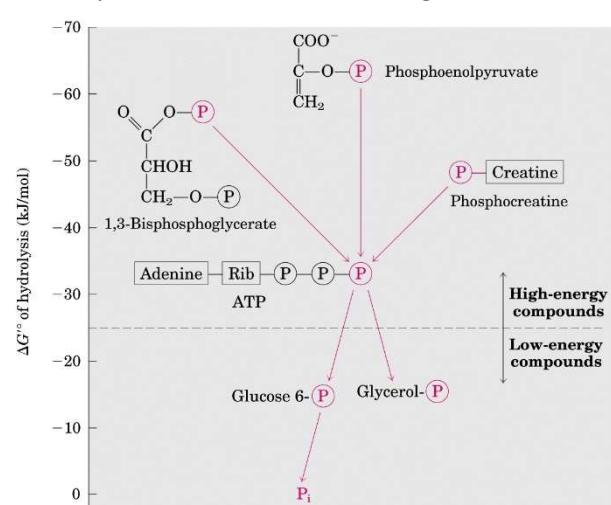
Diagramma energetico dell'idrolisi dell'ATP



Nella cellula l'idrolisi di ATP libera -90 KJ/mol e i prodotti sono più stabili dei reagenti. In condizioni fisiologiche se ne liberano di più di quelle in condizioni standard. Se la reazione fosse veloce, non ci sarebbe mai ATP nelle cellule.

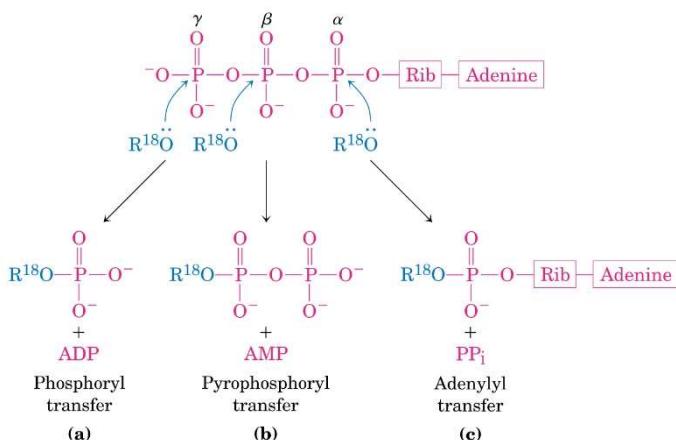
Andamento della reazione di idrolisi: la via mediante la quale l'ATP diventa ADP è in salita e deve superare una barriera di energia dai 200 ai 400 KJ/mol. Normalmente non tende ad idrolizzarsi in quanto l'ATP è abbastanza stabile.

Questa barriera permette alle cellule di gestire l'uso di ATP modificando la barriera tramite enzimi. Questa barriera separa reagenti da prodotti e se si abbassa, la reazione diventa possibile e accessibile a più molecole. Gli enzimi abbassano la barriera di attivazione velocizzando le reazioni.



Trasferimento gruppo fosforico

Three positions on ATP for attack by the nucleophile R¹⁸O



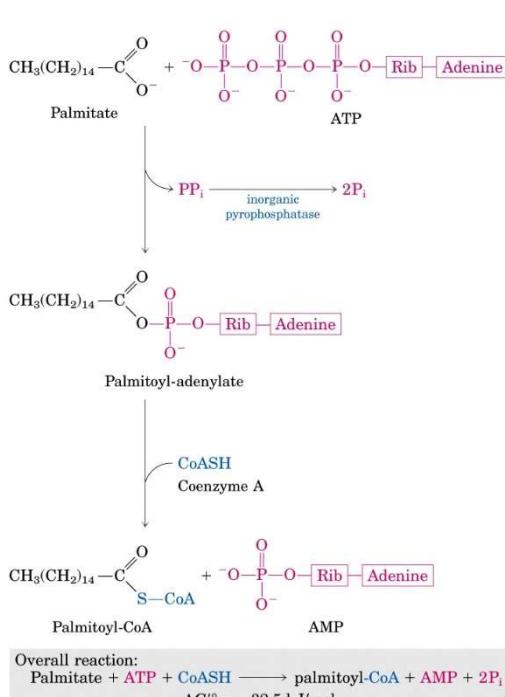
e il gruppo fosforilato. Il glucosio se attacca il fosfato β, rompe il legame fra α e β: si rompe il meno stabile, il più energetico. In questo caso abbiamo un nucleofilo adenolitato e si libera il pirofosfato.

Se viene attaccato il fosfato α, si rompe il legame fra α e β: si rompe il meno stabile, il più energetico. In questo caso abbiamo un nucleofilo adenolitato e si libera il pirofosfato.

Gli zuccheri attaccano γ, gli acidi grassi α.

Abbiamo diversi prodotti di reazione a seconda del nucleofilo ma l'importante è la liberazione del pirofosfato, un'anidride fosforica.

L'ATP e l'attivazione degli acidi grassi



L'acido palmitico è un acido grasso saturo con 16 atomi di carbonio. Può attaccare il fosfato in α: l'AMP si lega al palmitoato più il pirofosfato, si rompe il legame anidridico fra α e β e si forma un legame anidridico per formare il palmitoil-adenilato.

Da un punto di vista energetico, la variazione di energia libera sarà uguale a 0, quindi la reazione è all'equilibrio e si ferma.

Tutto l'acido palmitico non viene consumato ma è importante che la reazione vada a completamento.

Si forma anche il pirofosfato.

Si rompe il legame anidridico del pirofosfato liberando energia che si somma a quella del pamitoil.

Complessivamente ΔG è negativo.

L'ATP è usata per dare energia.

Al coenzima A va legato il palmitoil-adenilato.

Il ΔG complessivo è -32.5 KJ/mol

Idrolizzare un legame significa romperlo tramite acqua. In questo modo otteniamo ADP, fosfato inorganico mentre l'energia del legame si libera nell'ambiente.

Il glucosio attacca il fosfato, si forma il legame e si rompe quello con l'ATP. Il fosfato è povero di elettroni perché circondato da ossigeno e può essere attaccato da molecole nucleofile ovvero molecole e atomi con doppietti liberi che hanno affinità per i nuclei in quanto hanno molti elettroni. L'ossigeno del glucosio attacca il fosfato γ formando un legame con il fosforo e rompendo quello fra il fosforo γ e β. Si forma ADP

Le reazioni di ossidriduzione

I trasportatori di elettroni NAD⁺ e FAD accettano elettroni dai metaboliti ridotti e li trasferiscono ad altri composti.

Attraverso l'equazione di Nerst possiamo capire dove vanno gli elettroni in riduzione e ossidazione. Il potenziale di riduzione è la tendenza del composto ad acquistare elettroni.

Con la riduzione si acquistano elettroni, con l'ossidazione si perdono.

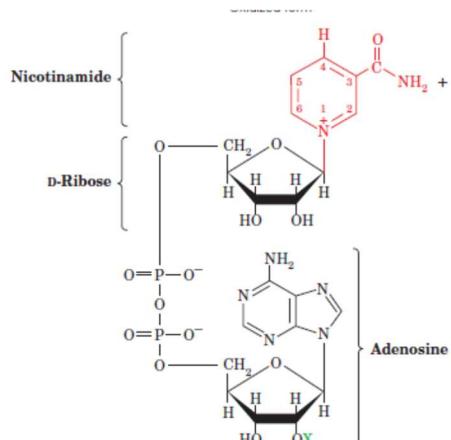
Se il potenziale è molto alto, c'è una grande affinità per gli elettroni. Se è basso o è negativo, c'è una grande affinità a donare elettroni.

L'energia libera e il potenziale di riduzione sono negativamente correlati: più è elevato il potenziale di riduzione, più negativa è l'energia libera e più favorita è la reazione.

Riduzione del NAD⁺ a NADH

X = H Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)

X = PO₃²⁻ Nicotinamide adenine dinucleotide fosfato (NADP⁺)

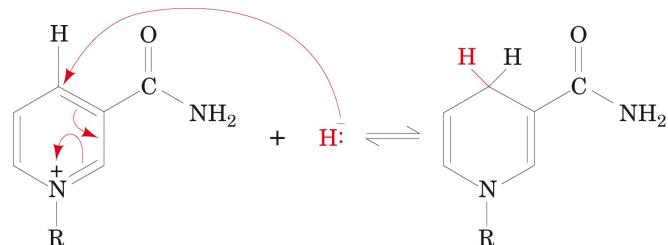


La parte attiva del nicotinamide è presente in forma ossidata, quindi con carica positiva, come NAD⁺ o con l'acquisto di uno ione idruro, quindi H con una carica negativa. Il NAD⁺ può ridursi acquistando due elettroni e diventando NADH.

Meccanismo di riduzione del NAD⁺

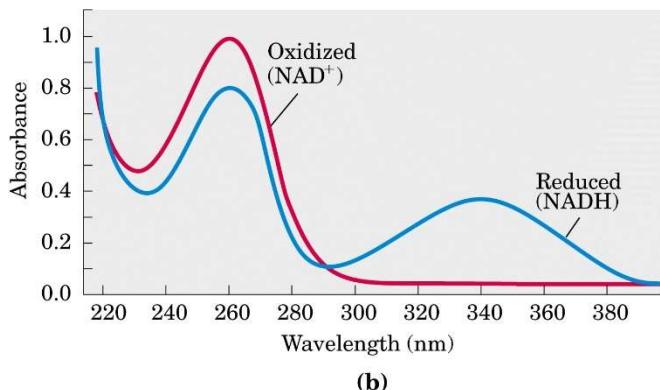
Esistono due tipi di NAD: X può essere H (quindi NAD⁺ o NADH). Il NADH è un trasportatore di elettroni nelle reazioni di ossidazione. X può essere anche un fosfato e in questo caso parliamo di NADP⁺ e NADPH. Quest'ultima è la forma che prevale ed è un donatore di elettroni nelle reazioni di riduzione.

La presenza del fosfato non



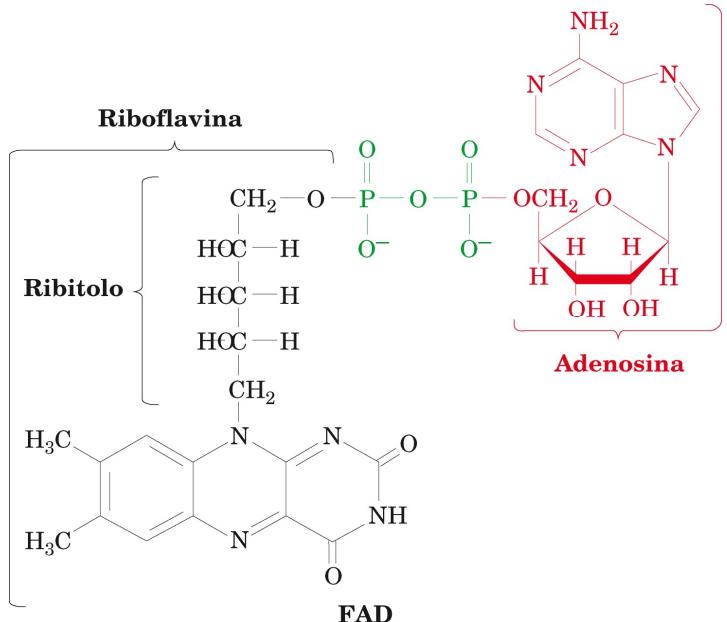
modifica le caratteristiche redox, quindi il potenziale.

Usando lo spettro di assorbimento possiamo identificare le molecole in condizioni che non conosciamo.



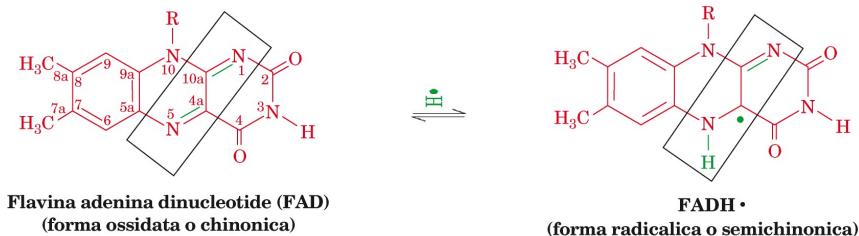
Entrambi hanno un massimo di assorbimento a 260 nm. A 340 nm il massimo è solo per la forma ridotta: possiamo vedere la reazione di riduzione del NAD a questa lunghezza d'onda. Il NAD⁺ comincia a diventare NADH e la velocità di reazione aumenta proporzionalmente alla velocità con cui il NAD⁺ diventa NADH.

Flavin adenina dinucleotide (FAD)

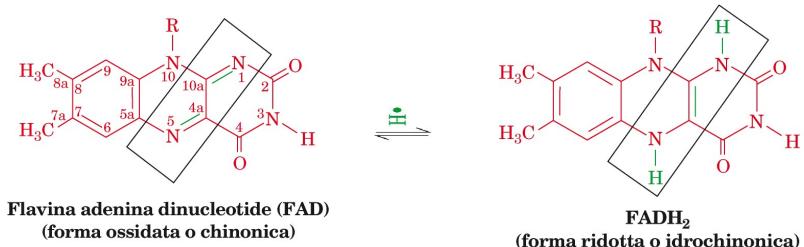


La parte attiva del FAD è l'anello isoallossazinico. Il FAD si riduce acquistando 2 protoni e 2 elettronni (un atomo di H): si forma prima un FAD semiridotto o chinonico, una forma radicalica che può acquistare un altro elettrone e protone (un altro H) e si forma il FADH_2

Riduzione del FAD a semichinone



Riduzione della forma semichinonica a FADH_2



NAD acquista subito 2 elettronni e un protone.

L'ossigeno ha un potenziale di riduzione di +0.8 V quindi è molto affine con gli elettroni.

NADH e NADPH hanno un potenziale di riduzione di -0.32 V.

Gli elettroni vanno verso composti con un potenziale positivo ad uno negativo. Bisogna confrontare il potenziale fra le coppie. I valori dipendono dall'ambiente.

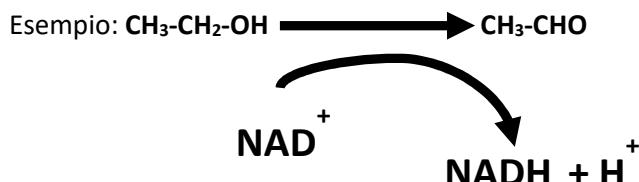
Il FAD libero non esiste, si trova sempre in enzimi, associato alle proteine. L'ambiente in cui si trova modifica il potenziale della molecola.

Il NADH si associa e si dissocia, può essere presente libero.

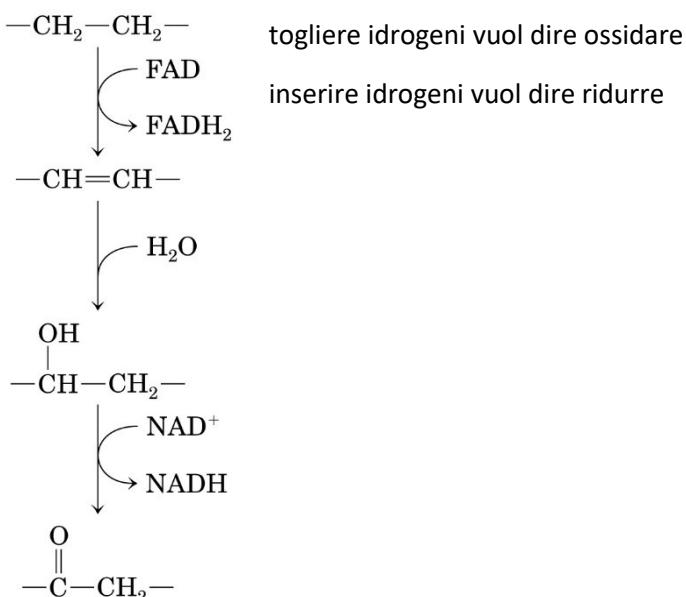
Il FAD in reazioni di ossidazione ha carboni molto ridotti (la forma del carbonio più ridotta è $-\text{CH}_2-$): è spesso coinvolto in reazioni nelle quali una porzione del tipo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ è ossidata con formazione di doppio legame.



Il NAD⁺ è coinvolto nelle reazioni di ossidazione di atomi di carbonio già un po' ossidati del tipo -CH₂-OH o -CHO (alcoli e aldeidi) la cui ossidazione porta rispettivamente ad aldeidi o acidi carbossilici.



Esempi di ossidazione che coinvolgono NAD⁺ o FAD



Potenziali di riduzione e trasferimento di elettroni

Nel ciclo degli acidi tricarbossilici una molecola di Acetil-CoA viene ossidata completamente a due molecole di CO_2 e durante questo processo si ha la formazione di un legame ad alta energia (come GTP) e di quattro equivalenti riducenti: 3 $\text{NADH} + \text{H}^+$ ed 1 FADH_2 .

Questi composti ridotti contengono elettroni ad elevato potenziale di trasferimento, in quanto possiedono parziali redox altamente negativi. Il NADH ha un potenziale redox di -0.32 V mentre il FADH₂ ha potenziali variabili fra -0.2 e 0 V. Questo fa sì che siano in grado di cedere facilmente i loro elettroni a molecole con potenziali redox più positivi. Negli organismi aerobi, l'ossidante più comune è l'O₂ il cui potenziale redox standard è di 0.84 V.



$$\Delta E^\circ = E^\circ_{\text{accettore}} - E^\circ_{\text{donatore}}$$

$$\Delta E^\circ = +0.84 \text{ V} - (-0.32 \text{ V}) = +1.16 \text{ V}$$

Gli elettroni vanno dal NADH all'ossigeno. Il ΔE° dell'accettore è pari a 0. Il donatore è NADH.

L'energia libera corrispondente a questa differenza di potenziale può essere calcolata dalla relazione

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ \text{ Cioè: } \Delta G^\circ = -2 \times 96500 \times 1.16 = -224 \text{ KJ/mole (53.6 Kcal/mole)}$$

Dove F è la costante di Faraday che vale 96500.

La reazione è fortemente energetica: si libera molta energia. Ossidando il NADH si libera molta energia rendendo disponibile ATP per le cellule. Ma ne vengono prodotti solo 3 per dissipazione di energia.

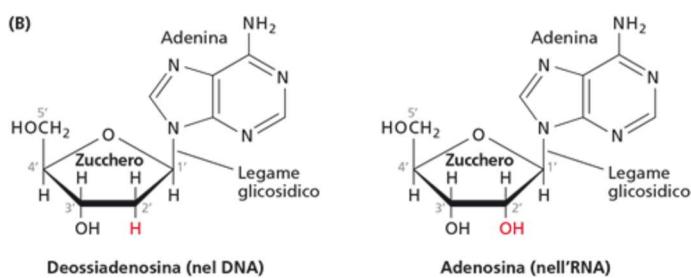
Abbiamo un processo che libera energia-> ossidazione del NADH

E un processo che richiede energia-> sintesi dell'ATP

All'equilibrio, $\Delta G=0$ quindi non tutto il NADH viene usato per fare ATP, il processo si ferma prima. Vengono prodotte 3 molecole di ATP e non 7 perché il resto viene dissipato in calore e quindi la reazione diventa esoergonica usando tutto il NADH.

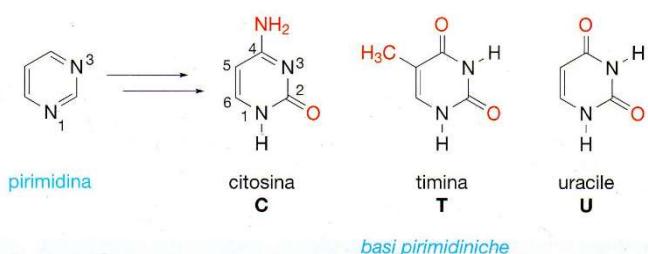
DNA, doppia elica e cromosomi

I nucleotidi: sono gli elementi costituenti fatti da uno zucchero a 5 atomi di carbonio (ribosio nell'RNA e deossiribosio nel DNA) e una base azotata che può essere una purina o una pirimidina.



Nel ribosio è presente il gruppo ossidrilico in 2' che invece è assente nel deossiribosio. L'RNA è molto meno stabile del DNA e favorisce l'idrolisi della catena polinucleotidica, cosa che non può avvenire nel DNA per l'assenza dell'OH.

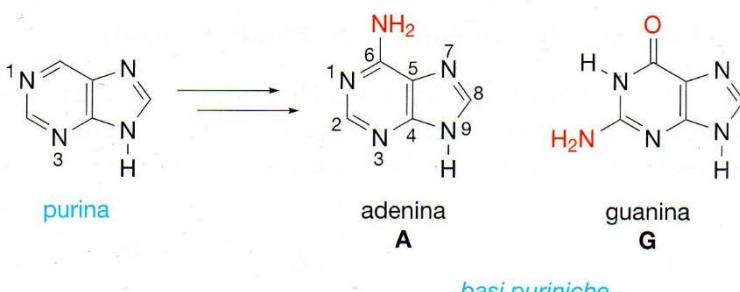
Le basi azotate



Le pirimidine sono eterocicli a 6 termini.

Le pirimidine sono 3: citosina, timina e uracile.

La timina è presente solo nel DNA mentre l'uracile sono nell'RNA. Questo perché per ossidazione, la citosina potrebbe trasformarsi spontaneamente in uracile e infatti quest'ultima nel DNA è assente. Il DNA deve mantenere le informazioni contenute nella sequenza di basi ed eventuali mutazioni sono segnalate da sistemi e corrette da enzimi.



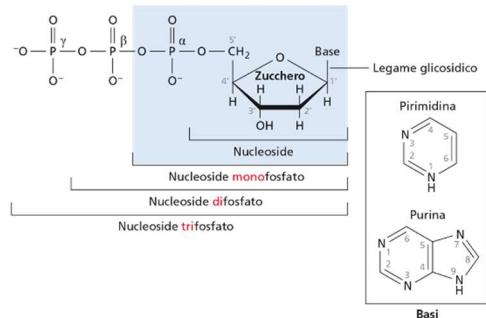
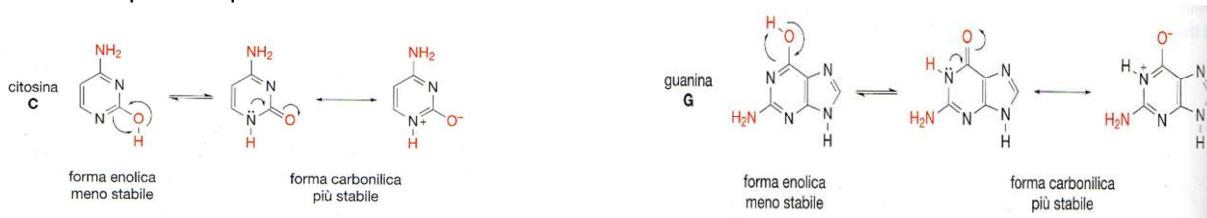
Le purine sono due eterocicli a 5 e 6 termini.

Le purine sono 2: guanina e adenina

Tautomerie cheto-enoliche

Possono esserci errori in fase di replicazione del DNA nel caso in cui una base venisse scambiata con un'altra.

La presenza di funzioni carboniliche sui nuclei pirimidinici o purinici comporta la possibilità di formare strutture di risonanza dovute alla tautomeria cheto-enolica. A pH fisiologico il tautomero carbonilico è favorito rispetto a quello enolico.



La base azotata è legata al carbonio 1 con un legame glicosidico. In 5' è presente o un solo gruppo fosforico o una catena.

Con **nucleoside** intendiamo lo zucchero insieme alla base senza fosfato.

Nucleoside monofosfato è formato da un gruppo fosfato.

Nucleoside difosfato è formato da due gruppi fosfati.

Nucleoside **trifosfato** è formato da tre gruppi fosfato.

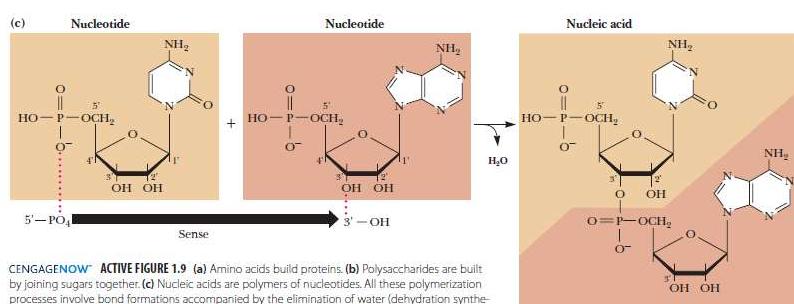
Con **nucleotide** intendiamo l'unità strutturale degli acidi nucleici, quindi è presente il fosfato in 5'.

Sono ad alta energia tutti quelli con tre gruppi fosforici al C5.

I nucleotidi possono diventare mediatori di processi cellulari, possono essere parte di enzimi o intermedi di reazione.

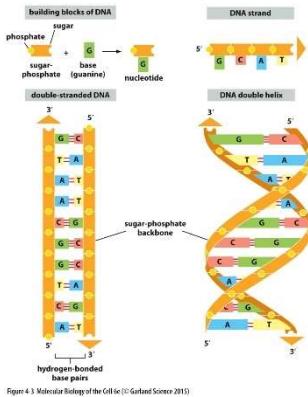
ACIDI NUCLEICI

Sono dei polinucleotidi, polimeri legati fra di loro con OH in 3' e il fosfato in 5' mediante ponti fosfodiesteri. Sono due, l'acido ribonucleico e l'acido deossiribonucleico. La sequenza è sempre letta in direzione 5'-3': l'amminoacido iniziale è sempre il gruppo amminico libero e l'amminoacido terminale è sempre il gruppo fosfato libero.



Il DNA è una doppia elica, l'RNA è un filamento singolo.

Le molecole di DNA sono costituite da due catene complementari di deossiribonucleotidi.



L'adenina si lega sempre con la timina attraverso due ponti idrogeno.

La guanina si lega sempre con la citosina con tre ponti idrogeno. È un legame più forte e più difficile da rompere.

Si legano sempre una purina con una pirimidina perché se si legassero due purine sarebbero più lontani i filamenti e se si unissero due pirimidine sarebbero più vicini. In questo modo si mantiene costante la distanza fra i filamenti lungo tutta la molecola. La complementarità fra le basi genera un accoppiamento antiparallelo. L'accoppiamento è stabilizzato da fattori entropici, impilamento delle basi e legami a idrogeno.

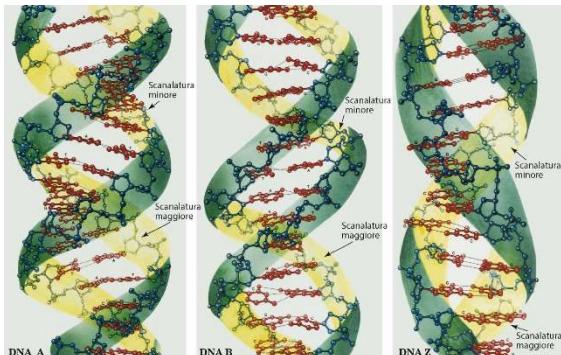
I due filamenti del DNA sono antiparalleli. Il diametro del DNA è di 2 nm e la sua lunghezza è di 1.6 milioni di nm. Il DNA compattato e ripiegato diventa di 2 μm. Il DNA degli eucarioti ha un compattamento maggiore essendo avvolto attorno a proteine istoniche per formare nucleosomi.

La struttura si avvolge per formare una spirale destrorsa, che ha un senso antiorario.

Il solco maggiore e il solco minore sono delle scanalature che si formano a seguito del ripiegamento. La doppia elica ha una simmetria cilindrica dove all'esterno c'è lo scheletro stesso in qualunque punto. Cambia solo la sequenza delle basi nella doppia elica.

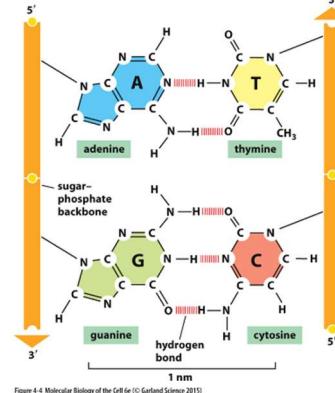
Tutte le cellule hanno lo stesso DNA ma le varie cellule hanno funzioni diverse perché contengono diverse proteine. La trascrizione degli aminoacidi riguarda solo una precisa parte, quella corrispondente al tipo di cellula. Le proteine che regolano la trascrizione devono riconoscere i segnali, ovvero le sequenze di nucleotidi del DNA. La proteina deve poter formare dei legami quindi interagire e attraverso il solco maggiore può vedere cosa c'è nel DNA. La parte della proteina α -elica ha sempre una sequenza di aminoacidi complementare alla sequenza di basi del DNA e la dimensione dell' α -elica è tale per cui sia la stessa del solco maggiore.

Un gene codifica una catena polipeptidica.



Distinguiamo tre tipi di DNA A, B, Z in cui cambia il numero di coppie di basi per ciascun giro d'elica. Il DNA A è destrorso, corto e allargato con 11 paia di basi per giro; il B è destrorso, lungo e sottile con 10 paia di basi per giro; il Z è sinistrorso, più lungo e più sottile con 12 paia di basi per giro.

Il DNA Z è presente durante la trascrizione o alcuni processi, non in condizioni normali e dipende da come sono orientate le basi. Queste possono essere anti o syn, la base anti è più stabile della syn, che è quella che invece troviamo in Z. La formazione A si trova in condizioni



artificiali di bassa umidità ma si può osservare anche in condizioni normali in vivo. Il DNA che va considerato è il B.

Il DNA è di solo un tipo e ha una sola funzione che è quella di mantenere l'informazione genetica.

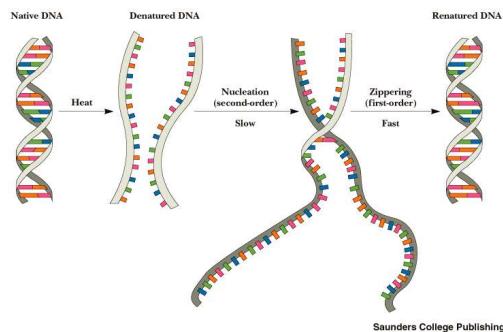
Dell'RNA esistono 3/4 tipi con altrettante funzioni:

- RNA ribosomiale: è alla base della struttura e della funzione dei ribosomi.
- RNA messaggero: trasporta il messaggio
- RNA transfer: trasporta gli amminoacidi
- microRNA: una classe di piccoli RNA (circa 21 nucleotidi), non codificanti che legandosi a sequenze complementari dell'mRNA ne inibiscono la traduzione. Variano nelle varie cellule e sono correlati a particolari condizioni patologiche
- small nuclear RNA: molecole usate per silenziare i geni.
- small interfering RNA: sono piccoli RNA complementari all'mRNA causandone la degradazione. In questo modo la proteina non si deforma e si può studiare la sua funzione proteica nella cellula.

L'RNA viene sintetizzato sullo stampo del DNA dall'mRNA, poi viene degradato. Il DNA è stato stimato essere di circa 200 milioni di anni. La presenza dell'RNA all'inizio era stata solo ipotizzata: sono state studiate le cellule dei batteri in quanto più semplici. Il DNA era presente nel citosol dell'escherichia coli ma non si capiva come poteva passare sui ribosomi. Non si riusciva a isolare l'mRNA perché la sua formazione è quasi contemporanea alla sintesi della proteina stessa, avendo quindi un breve periodo di vita.

Negli eucarioti il processo di trascrizione avviene all'interno del nucleo.

La denaturazione del DNA



La denaturazione è l'apertura della catena attraverso la rottura dei legami idrogeno. Quando il DNA è riscaldato a 80°C, la sua assorbanza dei raggi UV aumenta del 30-40% (le basi azotate assorbono sull'ultravioletto). Rompendo la doppia elica, le basi si allontanano e possono assorbire più luce (260 nm). Questo shift ipercromico riflette lo svolgimento della doppia elica del DNA. Le coppie di basi impaccate nel DNA nativo assorbono meno. Quando la temperatura è abbassata, l'assorbanza diminuisce riflettendo il ristabilirsi dell'impaccamento (shift ipocromico).

Le proteine e il DNA possono essere rinaturati.

La temperatura di denaturazione dipende dalle sequenze di basi azotate.

Superavvolgimento del DNA

Il DNA è una molecola flessibile la cui struttura e dinamica dipende molto dalla forza ionica e dalla natura delle proteine con cui interagisce. Il superavvolgimento si forma solo in molecole di DNA "chiuse" perché se la molecola è lineare e con terminali non vincolati, il numero di avvolgimenti di un filamento attorno all'altro può variare per rotazione reciproca. Se però la molecola circolare è chiusa o le estremità sono vincolate per esempio, da interazioni con proteine, il numero di giri di un filamento attorno all'altro non può variare, avendo quindi una topologia ben definita.

I topoisomeri del DNA sono DNA con forme diverse. Esistono in diversi stadi topologici e si passa da uno all'altro con enzimi chiamati topoisomerasi/girasi che possono introdurre o rimuovere superavvolgimenti.

Normalmente il DNA è sempre un po' superavvolto, favorendo la funzione del DNA: lo stato instabile è più facile da aprire (per esempio se è troppo superavvolto) mentre se fosse totalmente rilassato, sarebbe più difficile.

Servono enzimi per mantenere lo stato di superavvolgimento costante.

La densità della super elica va da 5 a 7%.

Il superavvolgimento può essere negativo o positivo.

- Superavvolgimento negativo: rotazioni del DNA in senso opposto a quello in cui si avvolgono le catene della doppia elica destrorsa. Questo tipo di superavvolgimento diminuisce la tensione per cui il DNA con superavvolgimenti negativi viene indicato come SOTTOSPIRALIZZATO
- Superavvolgimenti positivi: rotazioni del DNA nello stesso senso di rotazione della doppia elica. Comporta un aumento della tensione per cui si indica il DNA come SUPERSPIRALIZZATO.

Densità di superelica: ovvero il numero di giri di superelica per giro di doppia elica

$$\sigma = \frac{\tau}{\beta} \text{ dove } \sigma \text{ indica la densità di superelica; } \tau \text{ il numero di giri di supererlica; } \beta \text{ il numero di giri di doppia elica}$$

Il numero di legame esprime il numero di volte in cui un filamento si incrocia sull'altro in una doppia elica chiusa. Ha due componenti: l'avvolgimento (twist) e il superavvolgimento (writhe).

$L=T+W$ dove T è il numero totale di giri d'elica, è determinato dal numero di coppie di basi per giro. Per un DNA completamente rilassato con 200 coppie di basi in struttura B (10 coppie di basi per giro) $T=200/10=20$. W è il numero di rivoluzioni dell'asse del duplex nello spazio. Per un DNA completamente rilassato è uguale a 0.

Il numero di legame è una proprietà invariante di ogni molecola chiusa di DNA: non può cambiare a meno che non si verifichi una rottura ed una riunione dei filamenti.

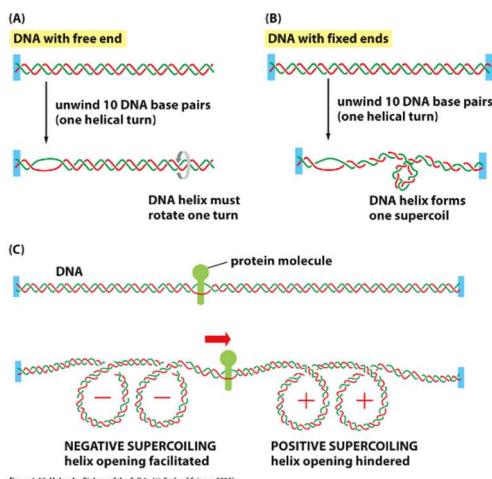
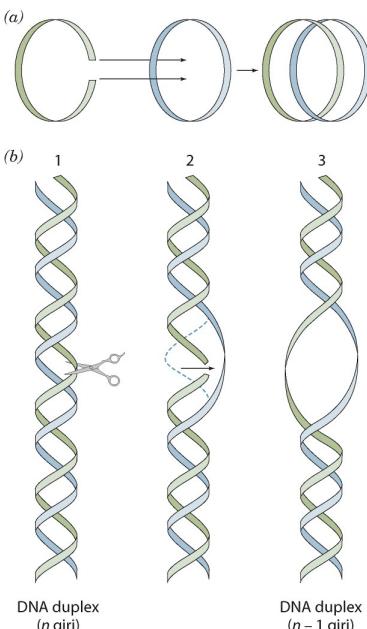
Per togliere un superavvolgimento si deve tagliare la molecola. In fase di duplicazione non sarebbe più possibile aprire il DNA e, per questo motivo, entrano in gioco degli enzimi.

Prendiamo per esempio una molecola di DNA circolare e consideriamo quello che succede se ruotiamo la molecola nella direzione opposta rispetto a quella della doppia elica prima di unire le estremità: la molecola tenderà a disavvolgersi. In un DNA parzialmente disavvolto, il numero di basi per giro d'elica aumenta e poiché la forma stabile del DNA è quella con 10 coppie di basi per giro d'elica, la molecola tenderà ad opporsi al disavvolgimento avvolgendosi su sé stessa, cioè assumendo una conformazione superavvolta.

Da un punto di vista termodinamico: la molecola superavvolta ha maggior energia di quella rilassata, il superavvolgimento consente di immagazzinare energia che può essere usata per denaturare brevi tratti di DNA. Il superavvolgimento rende il DNA più compatto e reattivo.

Esistono due tipi di topoisomerasi

1. Taglia un solo filamento, l'altro può passare attraverso esso. Ruotano attorno a quello integro e alla fine riuniscono le estremità, modificano il numero di legame con incrementi positivi di +1. Poiché il DNA è avvolto in senso destrogiro, un incremento positivo del numero di legami porta ad un rilassamento della doppia elica, un processo termodinamicamente favorito.
2. Taglia due filamenti, una molecola passa attraverso l'altra. Modificano il numero di legame con un incremento negativo di -2. Questo induce un ulteriore stress topologico e quindi la reazione ha bisogno di energia fornita attraverso l'idrolisi dell'ATP.



superavvolgimento.

Il numero di legami esiste solo in DNA circolari e in quelli legati alle estremità.

Gli inibitori delle topoisomerasi sono antibiotici e agenti chemioterapici antitumorali.

Struttura e funzione del DNA

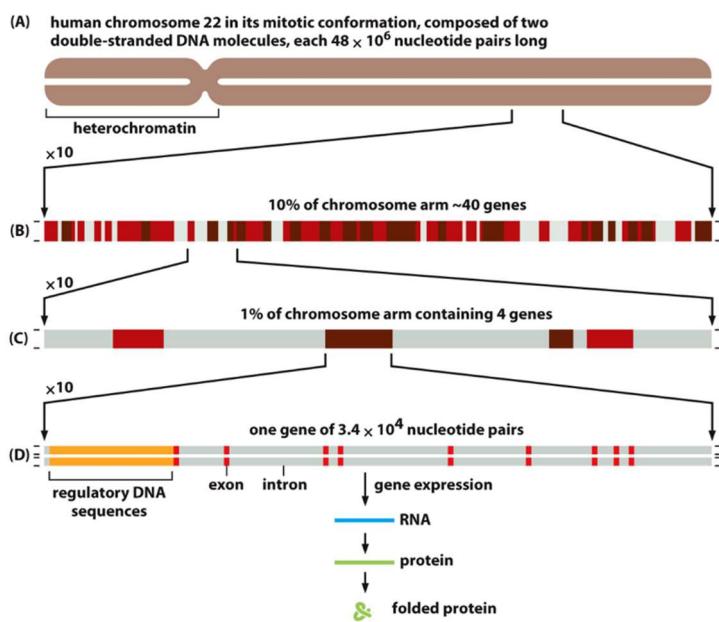
Negli eucarioti il DNA è localizzato nel nucleo ed è compattato in una serie di strutture chiamate cromosomi. In questi sono presenti i geni. Il grado di compattamento del DNA nei cromosomi è molto elevato ed è dovuto alla presenza di proteine che legano il DNA in livelli successivi di organizzazione.

Nei procarioti il DNA è circolare con le estremità legate fra di loro.

Abbiamo superavvolgimento anche nelle proteine lineari.

Se cerchiamo di aprire la doppia elica, togliamo dei giri d'elica e dovrebbe quindi cambiare il numero di legame in quanto si aggiunge il superavvolgimento.

I cromosomi si formano quando la cellula deve dividersi, si “appaiono” all'inizio della mitosi e “scompaiono” quando la divisione cellulare è completata.



Un gene è formato da diverse parti. Gli esoni codificano per il prodotto finale, gli introni non codificano e la sequenza regolatrice identifica.

Il DNA del gene non codifica per una catena polipeptidica ma abbiamo dei pezzi che codificano e dei pezzi che non codificano.

Il gene degli eucarioti ha delle dimensioni notevolmente superiori alla quantità di DNA che serve per il prodotto finale.

Nei procarioti non c'è distinzione fra esoni e introni.

Gli introni vengono poi eliminati con un processo chiamato splicing: in questo modo

Durante la replicazione, la doppia elica deve svolgersi. Le topoisomerasi sono enzimi che convertono il DNA da una forma topologica all'altra, cioè da una forma superavvolta ad una rilassata e viceversa.

Se c'è una proteina che si muove nel DNA, questa genera superavvolgimento. Se le estremità fossero libere di ruotare, non ci sarebbe

l'RNA contiene solo gli esoni e codificherà per la catena polipeptidica.

La cellula può dare prodotti diversi a partire dalla stessa sequenza. Se parti di un introne rimangono sull'mRNA, codificherà una catena polipeptidica diversa.

Avere grandi quantità di DNA può essere utile per evitare mutazioni da agenti esterni così da permettere errori senza modificare la vitalità della cellula. Gli errori sono fondamentalmente modificazioni delle basi, hanno pesi diversi e avvengono in tratti che possono codificare o meno. Se avvengono in tratti codificanti, la proteina cambia.

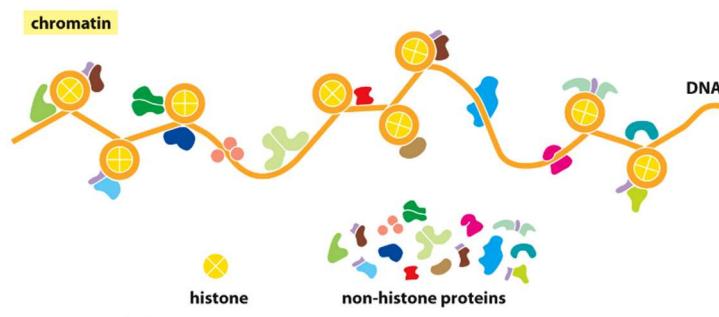


Figure 4-20 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

I nucleosomi sono le unità di base della struttura dei cromosomi. Le proteine che legano il DNA sono di due tipi: istoni (un ottamero istonico) e proteine non istoniche. Il complesso DNA istoni e proteine non istoniche è noto come cromatina. Nel nucleo la chromatina appare come una struttura filamentosa. È sostanzialmente una molecola di DNA avvolta attorno a proteine istoniche.

Quando la cellula non si sta replicando, il DNA è ripiegato in chromatina e questo ripiegamento è importante per l'attivazione delle specifiche proteine.

Gli istoni si uniscono stando sempre più vicini fino a formare la struttura del cromosoma.

Il fosfato a pH fisiologico è carico negativamente quindi le proteine istoniche sono caricate positivamente avendo amminoacidi basici.

L'istone H1 interagisce con le proteine e con il DNA che esce dal nucleosoma aiutando a compattare i nucleosomi. Si ripiegano poi ulteriormente dando una struttura di livello superiore: si formano delle fibre.

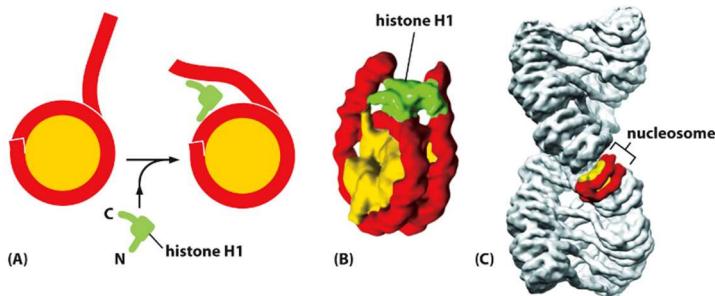


Figure 4-30 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Se non siamo in fase di duplicazione, le strutture sono meno compatte.

Il DNA nel cromosoma è compattato di 10000 volte.

Il DNA avvolto nella struttura non è facilmente accessibile alle strutture, quindi, bisogna rompere i legami ionici per permettere all'istone di staccarlo. I legami ionici modificano la carica con il pH ma, dato che vanno tolti solo alcuni istoni, si fa reagire il gruppo amminico che perdendo la carica, modifica l'amminoacido. In

questo modo viene modificata anche la capacità di attaccare il DNA.

Le modificazioni covalenti degli istoni regolano lo stato della chromatina.

L'istone acetilasi è un enzima che trasferisce i gruppi acetilici sull'istone: in questo modo il DNA è più libero rispetto ad un DNA non acetilato.

Successivamente altri enzimi deacetilano compattando il DNA.

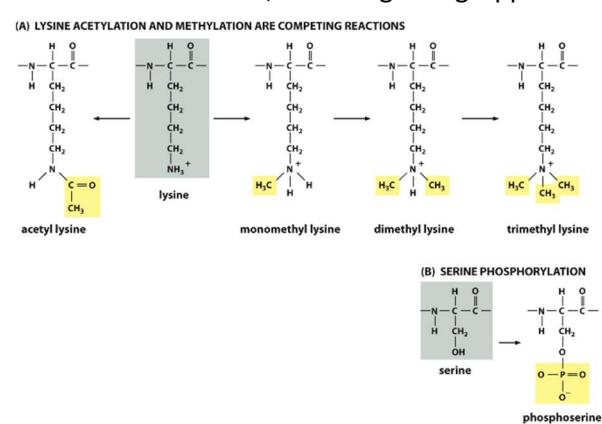


Figure 4-33 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Modificando gli amminoacidi sulle proteine istoniche, cambia la forza con cui queste tengono il DNA legato rendendolo più disponibile per la trascrizione. I siti modificati richiamano altre proteine specifiche che agiscono sugli istoni modificati per determinare come e quando i geni saranno espressi.

Esempi del significato di alcune modificazioni sulla cosa dell'istone H3

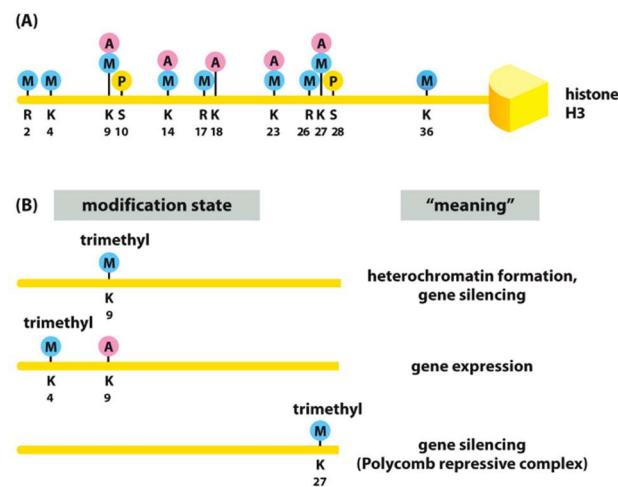


Figure 4-39 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Senza mRNA non può avvenire la sintesi delle proteine quindi il DNA non deve essere fortemente trattenuto dalle proteine.

In base ai geni che sono stati attivati, abbiamo diversi tipi di proteine che andranno poi a modificare gli istoni che hanno più o meno affinità con il DNA.

Decidendo quale gene è o non è trascritto, viene modificato il corredo genetico. Si parla di modificazioni epigenetiche quando possono essere trasmesse anche alla progenie.

Esistono dei sistemi di modificazioni di istoni.

Se il gene finisce in una zona di eterocromatina, non viene trascritto. Se si trova nell'eucromatina, che è meno compatta, viene trascritto. Lo spostamento stesso è una modifica epigenica.

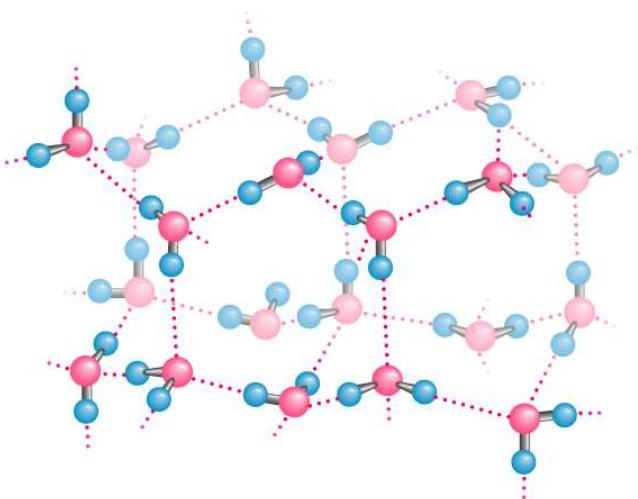
L'eterocromatina è altamente condensata al contrario dell'eucromatina.

LIPIDI E MEMBRANE

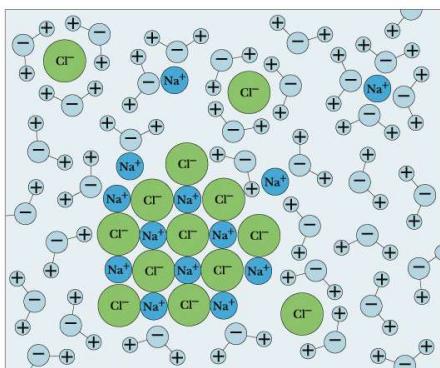
Proprietà dell'acqua

L'acqua ha una struttura ripiegata che la rende polare con una parziale carica negativa ($\delta-$) localizzata sull'atomo di ossigeno ed una parziale carica positiva localizzata sugli atomi di idrogeno ($\delta+$). La presenza di queste cariche permette la formazione di interazioni intermolecolari note come **interazioni dipolo-dipolo**. L'elevata elettronegatività dell'ossigeno, insieme con l'osservazione che l'atomo di idrogeno ha un solo elettrone fa sì che la differenza di carica sia molto più grande di quanto normalmente ci si aspetti. Ciò porta alla formazione di interazioni intermolecolari molto forti: i **legami idrogeno**. I legami idrogeno in biochimica sono molto importanti perché influenzano le reazioni di molte biomolecole contenenti ossigeno, azoto. I legami idrogeno sono responsabili delle particolari caratteristiche dell'acqua, come ad esempio, la minore densità del ghiaccio rispetto all'acqua liquida.

Le molecole d'acqua possono anche formare legami idrogeno fra di loro. Ricordiamo che per formare un legame ad idrogeno occorre un “donatore” di idrogeno (generalmente si tratta di un idrogeno legato ad un atomo elettronegativo come l'ossigeno o l'azoto) ed un “accettore” di idrogeno (un atomo avente un doppietto elettronico libero che può accettare l'atomo di idrogeno). È un legame debole e come tutti i legami, richiede che gli atomi interessati siano nella giusta orientazione ed alla giusta distanza (lunghezza media di un ponte idrogeno = 1.7-2 Å). Nella molecola di acqua sono presenti due atomi di idrogeno ed un atomo di ossigeno su cui sono presenti due doppietti elettronici liberi: ogni molecola d'acqua può donare due idrogeni e può accettare altri due idrogeni per la formazione di un numero massimo di 4 ponti idrogeno. L'elevato numero di ponti idrogeno che ogni molecola d'acqua può formare con altre molecole d'acqua è alla base delle caratteristiche chimico-fisiche peculiari dell'acqua. Infatti, l'acqua, nonostante sia costituita da molecole piccole, ha una elevata tensione superficiale, un elevato punto di ebollizione ed una elevata tensione di vapore, tutte queste caratteristiche le permettono di essere il solvente ideale per tutti i composti biologici.



L'acqua può formare 4 legami idrogeno per ogni molecola d'acqua ma solo quando è allo stato solido. Per lo stato liquido, può formarne 2.3 perché le molecole sono più libere. Il ghiaccio non ha ponti idrogeno permanenti e le molecole possono scambiare ponti idrogeno con altre molecole di acqua ogni circa 10 psec.



L'acqua è un ottimo solvente per ioni e sostanze polari. I soluti non polari organizzano l'acqua: in un solido ionico ogni ione con carica positiva è circondato da ioni di carica opposta ed il tutto è organizzato in una struttura cristallina tenuta insieme dalle interazioni elettrostatiche tra gli ioni di segno opposto (legame ionico). Grazie alla sua elevata costante dielettrica, le molecole di acqua sono in grado di rompere le interazioni ioniche del solido e, grazie alla presenza di un polo positivo ed un polo negativo, sono in grado di circondare sia gli ioni positivi sia quelli negativi.

L'acqua libera è più disordinata allo stato solido: se abbiamo una sostanza apolare in acqua, queste non hanno affinità le une per le altre. Le molecole di acqua, per non interagire con la sostanza, la circondano, interagendo fra di loro e creando uno strato molto ordinato.

Le molecole d'acqua liberate aumentano l'entropia del sistema, quindi si parla di un processo spontaneo.

Se c'è un acido grasso in acqua, le molecole di acqua si dispongono in modo ordinato attorno alla catena. Le molecole dell'acido grasso si uniscono per formare una micella. La micella è molto ordinata e si forma perché l'acqua agisce come solvente e perché si liberano molte molecole d'acqua unendo l'acido grasso. La micella è tenuta insieme dalle interazioni idrofobiche.

I **triacilgliceroli** sono acidi grassi esterificati al glicerolo.

Con **glicerofosfolipidi** intendiamo un glicerolo, quindi un poliacol a 3 funzioni alcoliche di cui 2 (1 e 2) esterificate ad acidi grassi. Il terzo idrogeno è esterificato con fosfato a sua volta legato a varie molecole come etanolamina, colina, serina, glicerolo, inositolo. In base alla molecola abbiamo un diverso glicerofosfolipide.

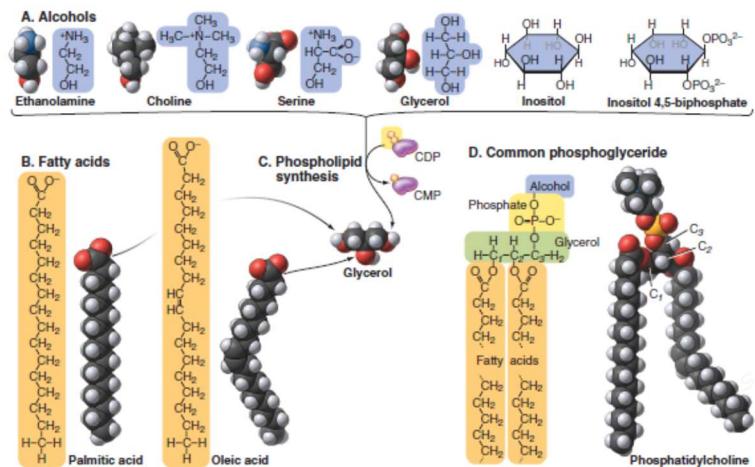
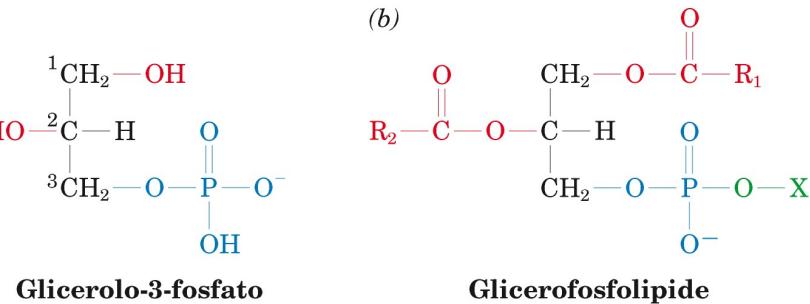
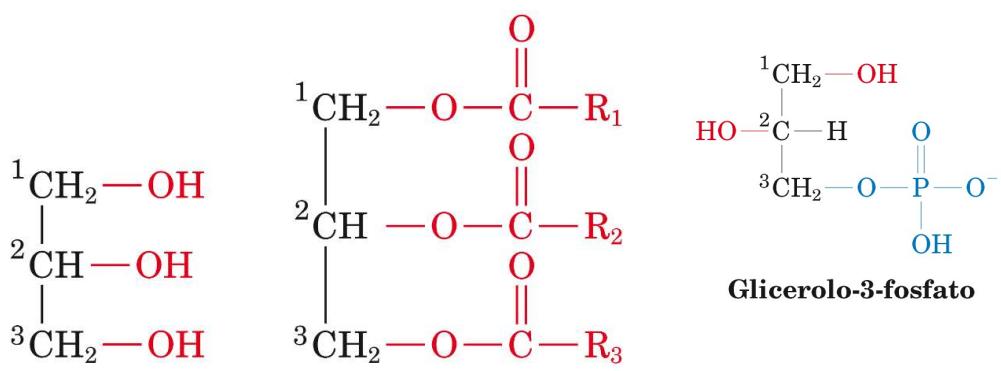


FIGURE 13.2 STRUCTURE AND SYNTHESIS OF PHOSPHOGLYCERIDES. **A.**, Stick figures and space-filling models of the alcohol head groups. **B.**, Stick figures and space-filling models of two fatty acids. **C.**, An alcohol, glycerol, and two fatty acids combine to make a phosphoglyceride. In some cases cytidine diphosphate (CDP) provides the phosphate linking glycerol to the alcohol. CMP, cytidine monophosphate. **D.**, Diagram of a phosphoglyceride and a space-filling model of phosphatidylcholine.

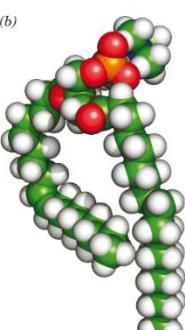
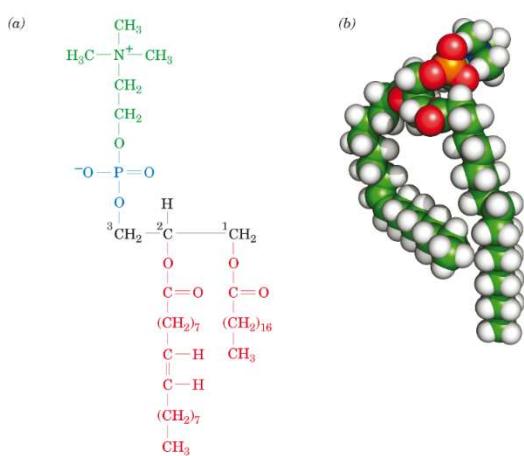


L'insaturazione degli acidi grassi naturali è sempre cis.

I grassi insaturi cambiano le dimensioni delle strutture cambiando anche quelle delle membrane.

La testa del **glicerofosfolipide** comprende alcol, fosfato e glicerolo ??

La presenza di cariche sulle molecole legate al fosfato può renderlo carico o no.



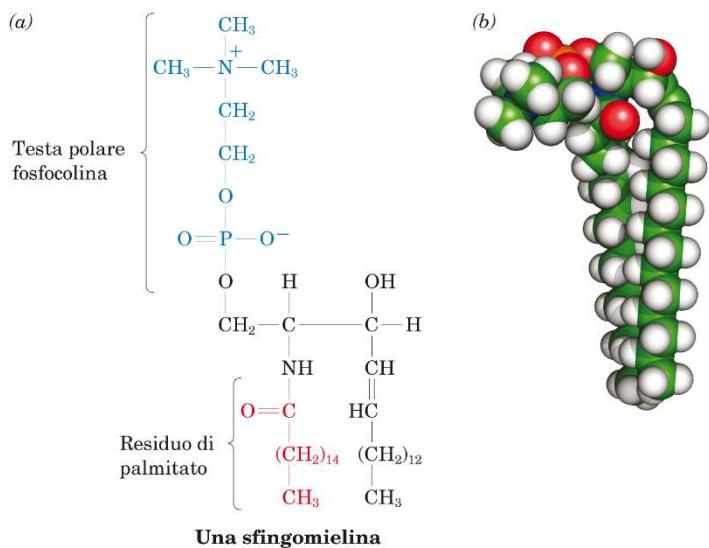
I **triacilgliceroli** sono neutri con il glicerolo esterificato con tre acidi grassi. Rappresentano i grassi di riserva negli organismi animali e sono chiamati anche lipidi neutri.

I glicerofosfolipidi compongono la membrana.

L'acido miristico ha 14 atomi di carbonio saturo.

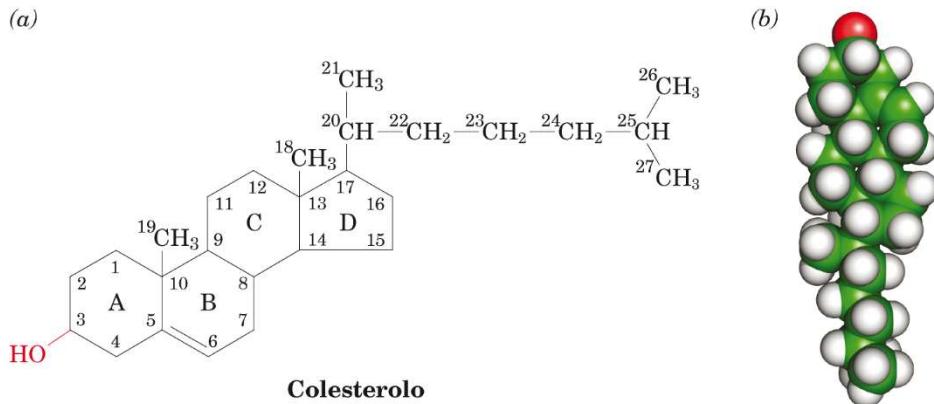
La **cardiolipina** ha 4 code: è stata trovata inizialmente nel cuore perché le cellule cardiache hanno bisogno di molta energia. Le centrali energetiche delle cellule sono i mitocondri e hanno membrane caratterizzate dalla presenza di questo lipide.

Le **sfingomieline** sono molecole di amminoalcol a lunga catena. È assente il glicerolo e la sua funzione amminica può legare un acido grasso, l'OH un fosfato e il fosfato può legare gli alcoli di prima (credo etanolamina, colina, serina, glicerolo, inositolo??).



Una sfingomielina

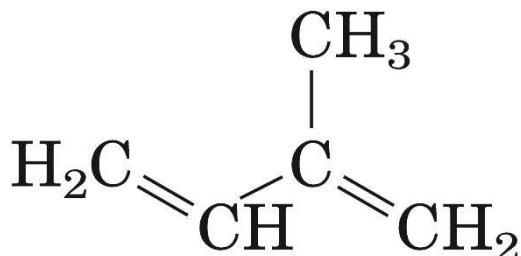
Il colesterolo è una molecola anfipatica con una parte polare e una idrofobica con anelli condensati e catena idrocarburica.



Colesterolo

Le molecole anfipatiche contengono sia un gruppo polare che uno non polare e sono attratte sia da ambienti polari che non polari.

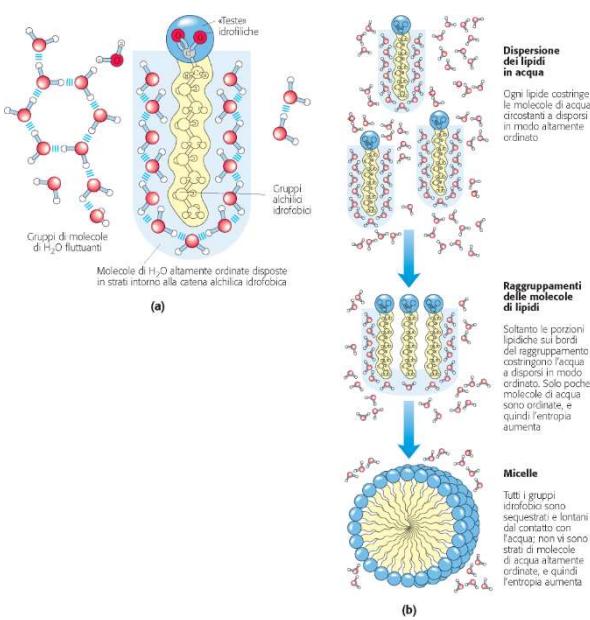
Gli **isoprenoidi** sono lipidi non strutturali con scheletro isoprenico. L'unità di base è l'isoprene, con 5 atomi di carbonio e 2 doppi legami che possono spostarsi per formare catene isoprenoidi. Si spostano grazie al coenzima Q10: il coenzima Q dei mammiferi contiene dieci unità isoprenoidi ed è solubile nelle membrane.



Il coenzima Q10 è un anello benzenico con due funzioni chetoniche e in posizione 6 una catena isoprenoica. È quindi una catena idrocarburica formata da 10 unità. È usato come antiossidante nelle creme e se la molecola è ridotta, nell'anello troviamo 2 OH.

Isoprene

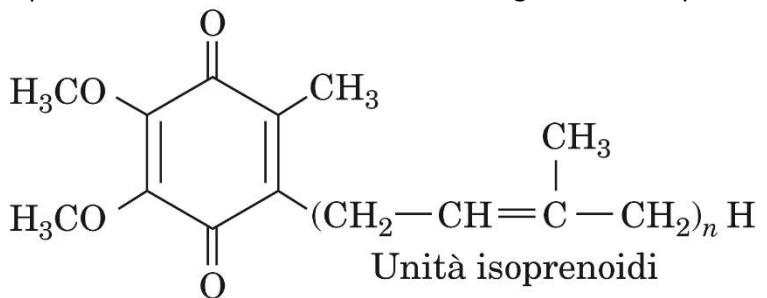
La molecola è all'interno delle membrane.



ordinati (diminuisce l'entropia dell'acqua) se il numero di molecole anfipatiche disperse nell'acqua supera un certo valore (indicato come concentrazione micellare critica) il processo energeticamente favorito. Superata entropia dovuto all'eliminazione degli strati idrofobiche supera la diminuzione di entropia micella. In altre parole, la formazione delle micelle delle molecole anfipatiche (diminuzione di entropia delle molecole d'acqua per cui il processo complessivamente comporta un aumento delle anfipatiche e delle molecole d'acqua).

Per aggregarsi c'è una quantità di molecole anfipatiche tale da formare una micella. Con concentrazione micellare critica intendiamo il limite minimo oltre il quale si forma la micella.

Se mettiamo in acqua una molecola anfipatica avremo la formazione di uno strato di molecole d'acqua altamente organizzate in corrispondenza della coda idrofobica, mentre la testa idrofilica può formare ponti idrogeno con le molecole d'acqua circostanti. Se aumentiamo il numero di molecole anfipatiche in soluzione aumentiamo anche gli strati di acqua

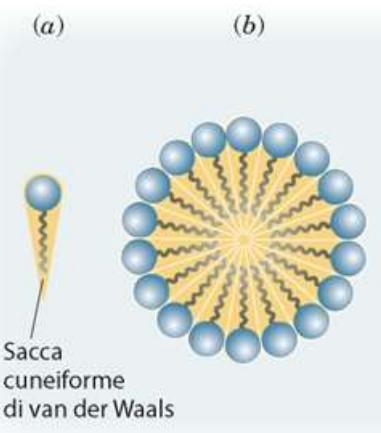
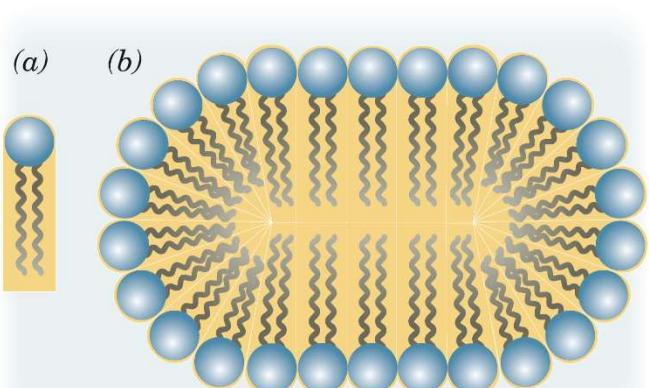


Coenzima Q (CoQ) o ubichinone

I saponi derivano da acidi grassi che formano micelle in acqua e che inglobano il grasso: la parte interna è idrofobica, quella esterna è idrofilica.

I **fosfolipidi** hanno una testa polare e una coda apolare: costituiscono le membrane disponendo un doppio strato di fosfolipidi con le catene all'interno e le teste all'esterno. Le interazioni che stabilizzano le strutture sono forti e le interazioni idrofobiche fra le code tengono le membrane.

Le proteine possono formare canali nelle molecole per scambiare i metaboliti. Le molecole trasferiscono segnali al recettore che lo comunica poi all'esterno. Le molecole idrofobiche e apolari possono attraversare la membrana passando per i fosfolipidi.



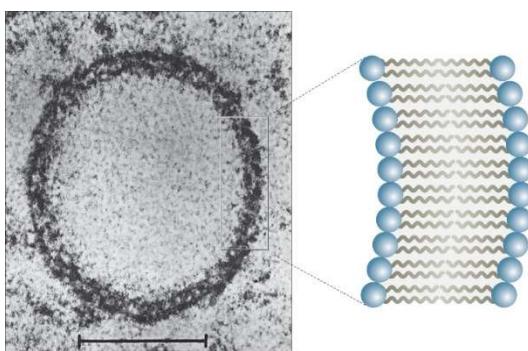
Nell'organizzazione a

micelle le catene idrocarburiche (idrofobiche) delle molecole anfipatiche sono confinate nella parte interna della micella in un ambiente dal quale viene esclusa l'acqua (ambiente idrofobico), mentre le teste polari costituiscono la parte esterna della micella e sono direttamente a contatto con la fase acquosa.

A seconda della natura della molecola anfipatica si possono ottenere organizzazioni diverse da quella a micella, in particolare molecole anfipatiche quali i fosfolipidi in soluzione acquosa si organizzano in strutture a doppio strato tipiche delle membrane biologiche.

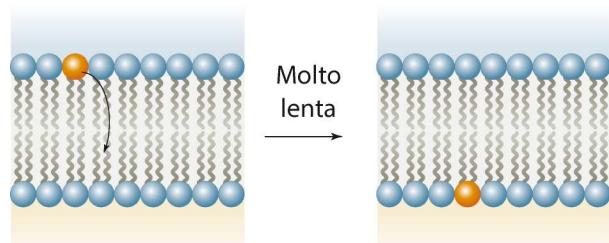
Le interazioni idrofobiche fra le code sono deboli e questo tiene insieme i fosfolipidi: il foglietto interno guarda il citosol, quello esterno l'ambiente esterno. Le interazioni idrofobiche fra le molecole idrofobiche in ambiente acquoso permettono di esporre la minor parte possibile della molecola all'acqua.

Il **liposoma** è formato da acqua e da fosfolipidi. Sono strutture, cellule vuote fatte solo dalla membrana. Si formano da un foglietto a doppio strato. Sono delle membrane che racchiudono un compartimento, possono essere usati per trasportare molecole facendole arrivare alle cellule: la membrana del liposoma si può fondere con quella della cellula facendo entrare la molecola.



Diffusione dei fosfolipidi in un doppio strato lipidico

(a) Diffusione trasversale (flip-flop)

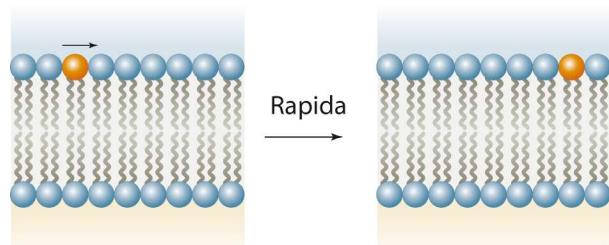


Nella diffusione trasversale, un fosfolipide passa da un foglietto all'altro. È molto lenta

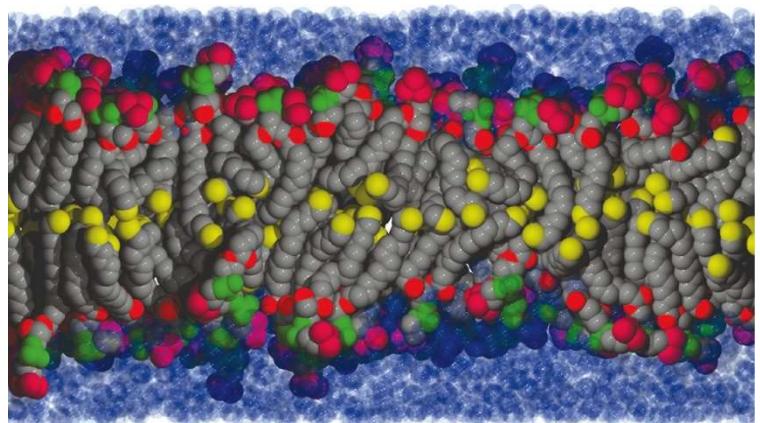
Nella diffusione laterale, il fosfolipide si muove sulla superficie del foglietto ed è più rapida.

Le teste possono interagire attraverso altri tipi di legame e sono inoltre più rigide rispetto alle code: questo rende la parte centrale più fluida.

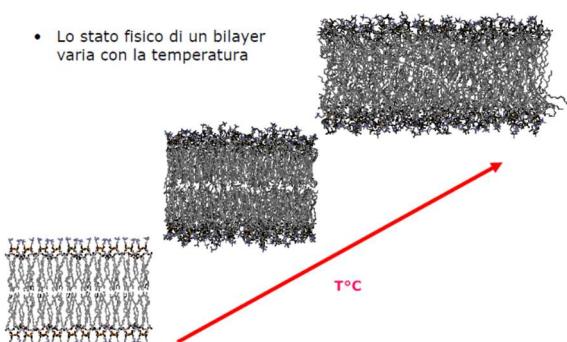
(b) Diffusione laterale



Bilayer

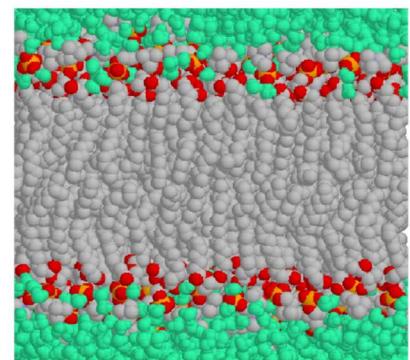


- Lo stato fisico di un bilayer varia con la temperatura



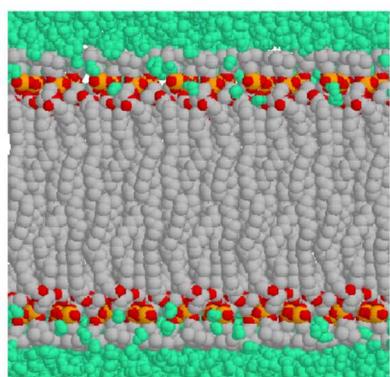
La fluidità influenza anche la mobilità e dipende fondamentalmente dalla temperatura delle membrane: se aumenta, aumenta anche la fluidità; se diminuisce, le membrane saranno più rigide.

Alla temperatura di transizione

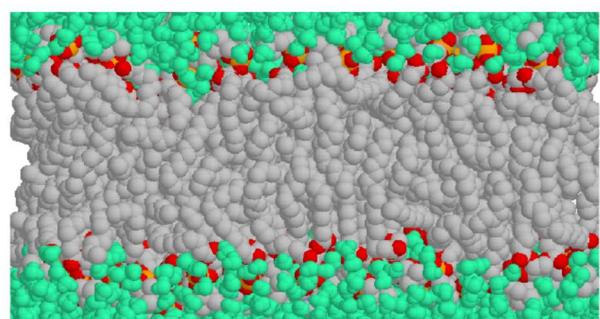


A bassa temperatura

- Quasi solido



- Struttura fluida



ad alte temperature, la membrana è più sottile.

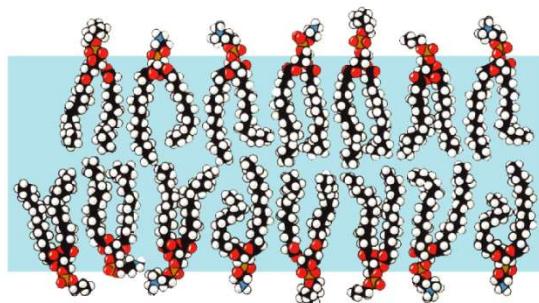
Le membrane di un organismo sono alla sua temperatura, quindi circa 36.5/37°: saranno in uno stato fluido per permettere il passaggio di proteine e molecole.

In una membrana naturale, la temperatura di transizione è sempre minore di zero. Questa aumenta anche se aumenta la lunghezza della catena e se aumenta la saturazione della catena laterale.

La membrana con doppi legami permette più spazio e quindi più fluidità.

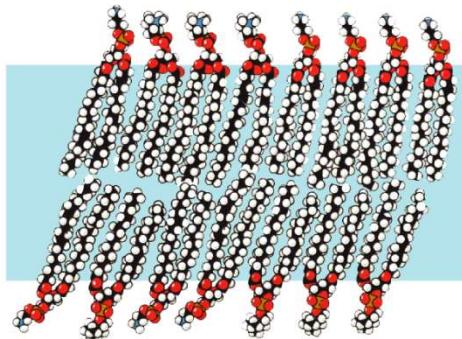
Nello stato cristallino abbiamo catene impaccate.

(a) Sopra la temperatura di transizione



Stato liquido-cristallino

(b) Sotto la temperatura di transizione



stato gel-cristallino

La fluidità della membrana è importante per la sua funzione: è determinata dalla sua composizione lipidica. Uno stretto impacchettamento delle code idrofobiche produce una minore fluidità. La lunghezza e il numero di doppi legami (quindi insaturi) determinano il grado di impacchettamento. La lunghezza varia da 14-24 atomi di carbonio: una catena corta ha una minore interazione ed un aumento della fluidità. Se una coda ha un doppio legame è insatura, se non ne ha è satura. I doppi legami causano una minore rigidità. Meno doppi legami causano un maggiore impacchettamento e una temperatura di transizione più alta.

La membrana deve essere fluida per permettere una rapida diffusione laterale delle proteine di membrana e favorire le interazioni: è quindi importante per la comunicazione cellulare. La fluidità facilita la distribuzione dei lipidi e delle proteine di membrana dal sito di intersezione ad altre regioni della cellula e permette alle membrane di fondere e mixare molecole.

Le funzioni delle membrane sono:

- Protezione
- Comunicazione
- Selettività
- Risposta a stimoli ambientali
- Riconoscimento

Il **colesterolo**, nelle cellule animali è usato per modulare la fluidità della membrana: riempie i buchi tra i nodi delle catene insature. È particolarmente usato nella membrana plasmatica causando uno stretto impacchettamento e quindi una minore fluidità/permeabilità. Se la membrana è ordinata, il suo inserimento la rende più rigida se si trova sopra la temperatura di transizione, fluido se è al di sotto.

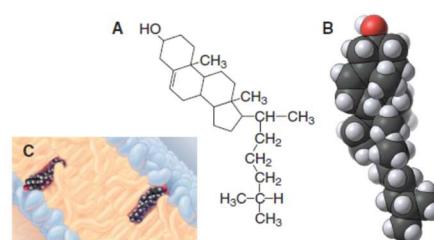
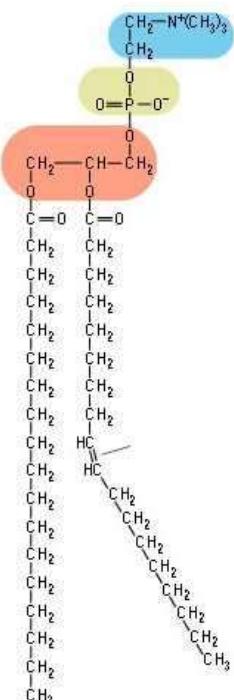
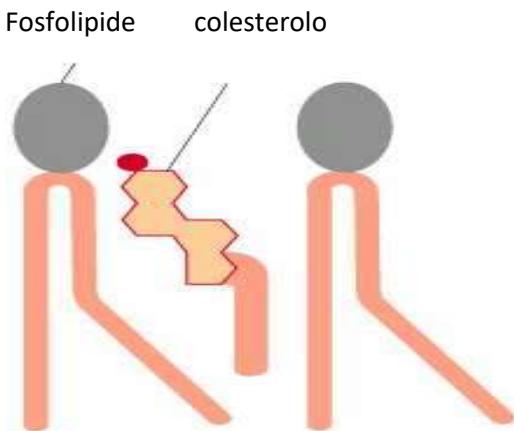


FIGURE 13.4 CHOLESTEROL. A, Stick figure. B, Space-filling model. C, Disposition of cholesterol in a lipid bilayer with the hydroxyl oriented toward the surface. The rigid sterol nucleus tends to order fluid bilayers in the region between C₁ and C₁₀ of the fatty acids but promotes motion of the fatty acyl chains deeper in the bilayer owing to its wedge shape.



Il colesterolo viene prodotto dalle cellule o viene introdotto tramite la dieta e ne troviamo due tipi: l'HDL e LDL. LDL sono lipoproteine in circolo: sono strutture come le micelle che contengono fosfolipidi, lipidi neutri, acidi grassi liberi, colesterolo e proteine. Si suddividono in base al rapporto lipidi-proteine.

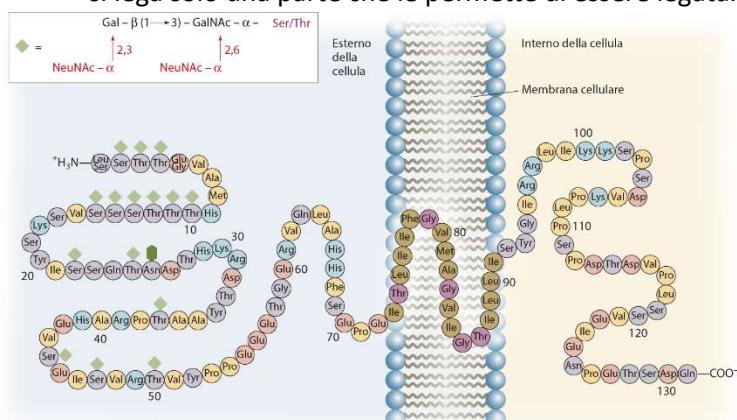
LDL sono lipoproteine che trasportano colesterolo dal fegato alla periferia; HDL sono lipoproteine con più proteine che lipidi ed è comunemente chiamato colesterolo buono. Recuperano il colesterolo perso da LDL nei vasi dato che può formare placche

arteriosclerosi che vanno poi a restringere i vasi.

Il colesterolo è anfipatico e si dispone fra le membrane. Tende a irrigidire modificandone anche la permeabilità.

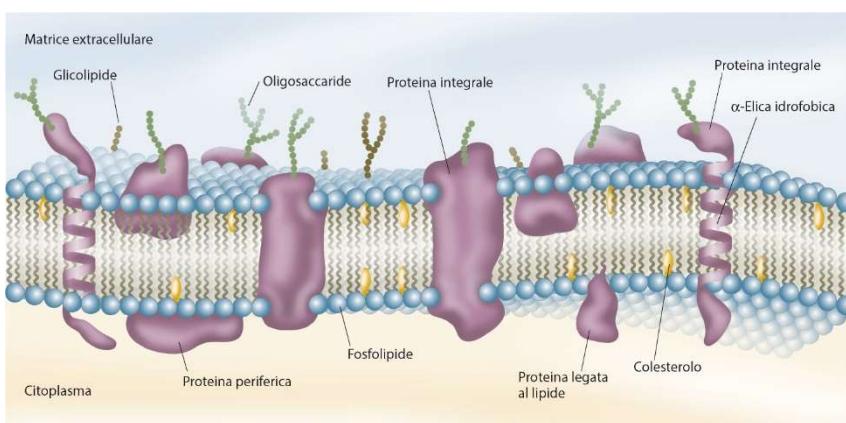
Le membrane sono fatte anche da proteine che possono essere divise in classi:

- Le proteine periferiche interagiscono solo con la regione polare della membrana mediante interazioni elettrostatiche.
 - Le proteine ancorate con catene isoprenoiche usano i residui per legare le proteine alle membrane; si lega solo una parte che le permette di essere legata.

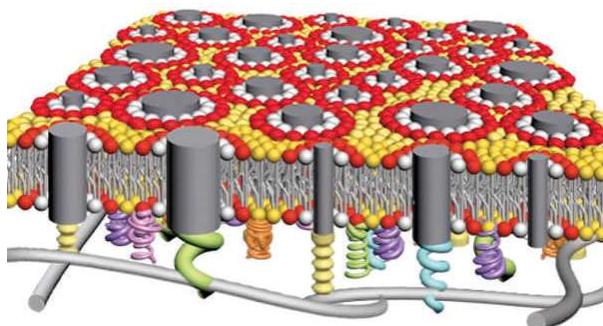


- proteine integrali: attraversano totalmente la membrana; sono molecole anfifiliche orientate asimmetricamente con le due estremità dalle due parti opposte delle membrane

Nel 1972 esisteva un modello a mosaico fluido per le membrane, viste come un mare di fosfolipidi dove erano presenti le proteine.



Nel 2001 è stato sviluppato un nuovo modello, detto lipid raft: nel mare di fosfolipidi ci sono regioni in cui troviamo le proteine. Queste regioni sono più compatte, possono servire per raccogliere le proteine e rendere più o meno attiva la proteina.

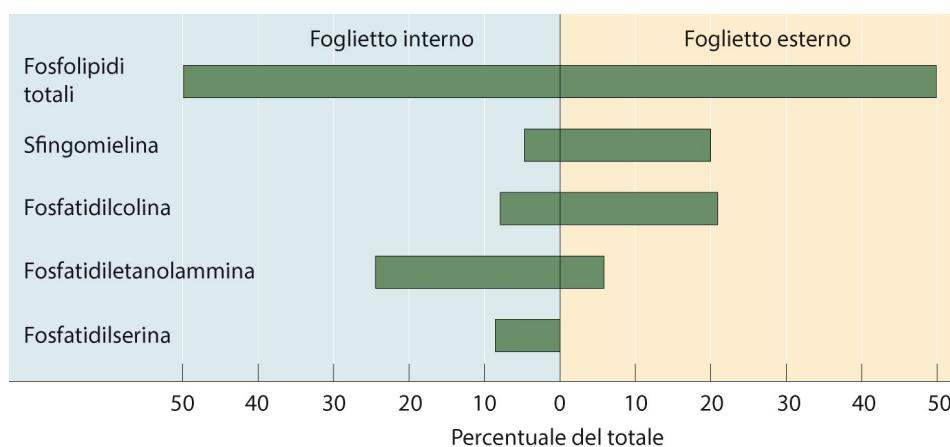


Esistono recettori che funzionano con dimeri: se possono muoversi su tutta la membrana, la probabilità di incontrare proteine è minore. Se invece sono presenti zattere, è più alta.

Un dимерo è formato da due proteine uguali che si associano quando devono funzionare i lipidi nelle zattere. Le zattere hanno un ruolo funzionale, sono strutture di transizione e sono state viste. Il colesterolo è il collante della zattera lipidica ed è molto presente.

Le membrane biologiche possono essere rotte rompendo le interazioni idrofobiche ed i legami polari fra le teste dei fosfolipidi. I detergenti possono sciogliere questi legami ed essendo anfipatici andranno ad interagire con entrambi i legami. Se le membrane vengono trattate con detergenti, restano delle regioni che sono le più resistenti alla solubilizzazione: sono le zattere.

La composizione lipidica delle membrane è asimmetrica, una parte è all'interno, un'altra è all'esterno. Hanno lipidi diversi: la fosfatidilserina si trova solo all'interno, se fuoriesce è un segnale di morte cellulare.



TRASPORTO DI MEMBRANA

Le membrane sono permeabili selettivamente permettendo la comunicazione con altre cellule, per difendersi e per evitare che entrino sostanze nocive.

Esistono due tipi di trasporto, quello attivo e quello passivo.

Il **trasporto passivo** non richiede energia, è una diffusione semplice e facilitata anche grazie all'omeostasi. Le molecole possono muoversi attraverso la doppia membrana fosfolipidica: è un meccanismo di trasporto che segue il gradiente di concentrazione, da più a meno concentrato fino a quando non sono uguali le concentrazioni.

Il **trasporto attivo** delle molecole è controgradiente, dalla più bassa alla più alta concentrazione. Richiede energia

Sia l'ossigeno che l'anidride carbonica passano attraverso le membrane. Il glucosio, essendo una molecola più grande e polare, non riesce ad attraversarle da solo: passa grazie al trasporto passivo. Servono dei trasportatori per le molecole cariche.

ISOTONICA: la concentrazione esterna è uguale a quella interna

IPOTONICA: la concentrazione dei soluti all'esterno è minore dei soluti all'interno. In questo caso l'acqua si muoverà dall'esterno all'interno: la cellula può scoppiare

IPERTONICA: la concentrazione dei soluti all'esterno è maggiore di quella dei soluti all'interno: l'acqua uscirà dalla cellula che si raggrinzirà.

Il globulo rosso contiene emoglobina e in una soluzione ipotonica, per osmosi, l'acqua entra nella cellula e scoppiano libera emoglobina. In soluzione ipertonica i globuli rossi si raggrinziscono.

Le acquaporine sono delle proteine: l'acqua è polare, non può attraversare la membrana da sola, quindi, servono delle proteine per diffonderla. Il trasporto è passivo e la diffusione è facilitata perché le proteine formano dei canali.

Anche per il glucosio ci sono delle proteine chiamate glut che lo trasportano.

Le proteine che mediano il trasporto attivo usano l'ATP per trasportare le molecole controgradiente.

Parliamo di trasporto uniporto se il sistema trasporta una molecola in una direzione; sinporto se le proteine possono lavorare su due molecole che sono trasportate nella stessa direzione; antiporto se le molecole viaggiano in direzioni opposte.

Il trasporto attivo primario dipende dall'idrolisi dell'ATP e genera un gradiente ionico trans-membrana.

Il trasporto attivo secondario usa il gradiente elettrochimico dovuto allo spostamento di ioni, è una forma di energia che può favorire altri trasporti.

La pompa sodio-potassio porta dentro due ioni sodio e fuori tre ioni potassio: crea un gradiente elettrochimico, quindi un trasporto antiporto, e rende l'interno della cellula più negativo.

RELAZIONE STRUTTURA-FUNZIONE DELLE PROTEINE: EMOGLOBINA E MIOGLOBINA

La mioglobina nei muscoli è riserva di ossigeno. Con il suo singolo gruppo prostetico eme, ha una curva di legame per l'ossigeno con andamento iperbolico.

L'emoglobina ha la funzione di trasportare l'ossigeno. Può assumere la conformazione deossi (T) o ossi (R), che differiscono per affinità di legame per l'ossigeno. Il legame con l'ossigeno induce cambiamenti conformazionali nell'emoglobina in modo tale da consentire all'ossigeno di legarsi cooperativamente, generando un andamento sigmoidale della curva di legame. Le mutazioni possono cambiare le proprietà di legame dell'ossigeno dell'emoglobina e portare allo sviluppo di patologie.

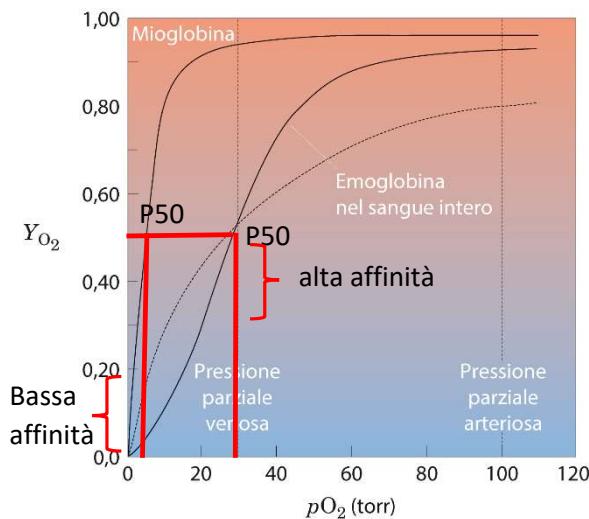
L'ossigeno è importante perché il suo ruolo come accettore in processi catabolici permette di liberare molta energia per fare ATP. Solo il glucosio può fornire energia anche in assenza di ossigeno ma si ottiene circa 20 volte più energia dalla combustione del glucosio se c'è ossigeno.

L'ossigeno è un gas poco solubile in acqua: può diffondersi dall'esterno solo fino ad 1 mm di spessore e se non ci fossero molecole trasportatrici, la diffusione sarebbe così lenta che non permetterebbe la sopravvivenza della cellula.

La circolazione sanguigna trasporta l'ossigeno a tutti i tessuti. Nel sangue la concentrazione dell'ossigeno è troppo bassa per ossigenare tutte le cellule, per questo servono molecole che lo leghino e lo trasportino: l'emoglobina ha questo compito partendo dai polmoni per arrivare ai tessuti periferici.

L'emoglobina causa un aumento della solubilità nel sangue: senza, la massima capacità di trasporto sarebbe di 5 mL/litri invece di 250 mL/litro.

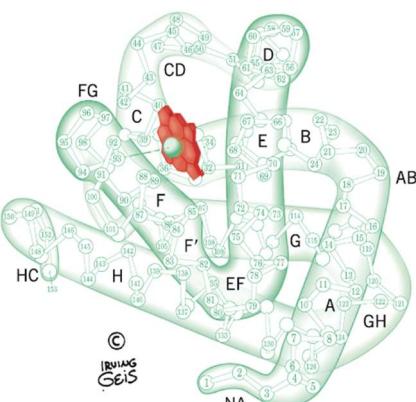
La capacità di legare l'ossigeno è più alta per la mioglobina che per l'emoglobina perché se quest'ultima avesse un legame molto forte, il rilascio dell'ossigeno sarebbe poco efficiente.



La concentrazione di ossigeno si misura in pressione parziale ed è sulle ascisse; sulle ordinate abbiamo la percentuale delle proteine che hanno legato l'ossigeno.

La quantità di ossigeno per saturare il 50% è estrapolato dalla curva: P50 è la quantità di ossigeno che satura la mioglobina al 50% e vale $\frac{1}{2}$ Torr. Con 4 Torr siamo quasi in saturazione.

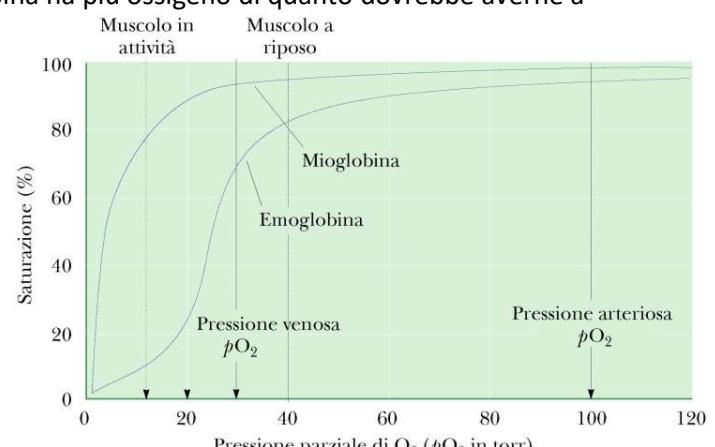
Per l'emoglobina, se aumenta l'ossigeno nell'ambiente, è legato poco, ha poca affinità all'inizio ma poi la curva cambia nel tratto ripido e bastano piccole variazioni per farlo aumentare molto: l'emoglobina è più affine all'ossigeno. L'affinità dell'emoglobina all'ossigeno si calcola sempre con P50 in 26/28 Torr. Spostandosi dai polmoni ai tessuti periferici, la mioglobina trattiene l'ossigeno maggiormente e scende la saturazione dell'emoglobina che rilascia ossigeno perché è meno presente nell'ambiente. La pressione parziale media è di circa 28 Torr; se la pressione è un po' più alta, l'emoglobina ha più ossigeno di quanto dovrebbe averne a 26 Torr. Alla pressione parziale di 28 Torr in un muscolo a riposo, l'emoglobina avrà rilasciato 40% dell'ossigeno che ha legato. Nei polmoni la pressione parziale dell'ossigeno è molto alta e l'emoglobina si carica di ossigeno; la mioglobina rilascia ossigeno quando la pressione parziale scende. In un muscolo sotto sforzo, viene consumato più ossigeno per produrre ATP facendo calare i livelli di ossigeno: il muscolo si trova in ipossia e la mioglobina rilascia ossigeno che viene consumato più velocemente di quanto l'emoglobina riesca a portarne. In condizione anaerobiche viene prodotto acido lattico.

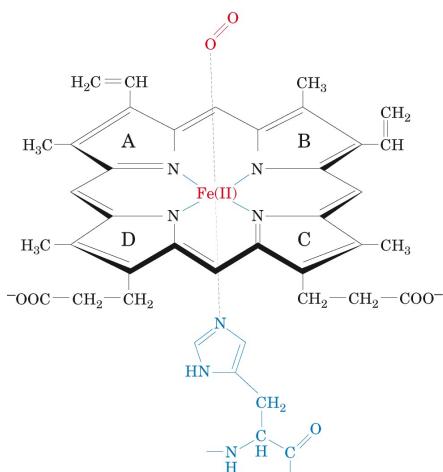


Sia la mioglobina che l'emoglobina sono proteine globulari con un'alta percentuale di struttura α -elica.

La mioglobina è formata da 8 tratti di α -elica (circa l'80%) che vengono indicati con le lettere dell'alfabeto (A-H): dove sono presenti due lettere insieme, è dove si uniscono i due tratti di α -elica.

Serve un gruppo prostetico per il legame con l'ossigeno: un gruppo prostetico è la parte non proteica che si lega alla proteina e in questo caso è il gruppo eme.





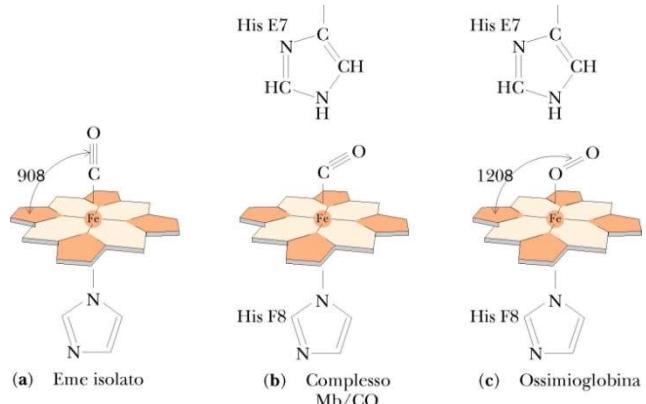
Il gruppo eme è idrofobico quindi è situato nella tasca interna della proteina; lega lo ione ferro ed è una struttura organica, un anello porfirico aromatico e planare con carboni ibridati sp^2 . È apolare e interagisce con le catene laterali apolari che la mioglobina presenta nella tasca idrofobica. È costituito da quattro anelli pirrolici (A, B, C, D) collegati da ponti metilenici. All'interno è presente un atomo di ferro, sempre e solo in forma ridotta a Fe^{2+} ossia ferro ferroso: solo questo può legare l'ossigeno in maniera reversibile formando 6 legami di coordinazione di cui 4 usati per legare gli azotini. Uno serve poi per legare il ferro all'istidina e l'altro per legare l'ossigeno.

PROTOPORFINA: struttura del gruppo eme.

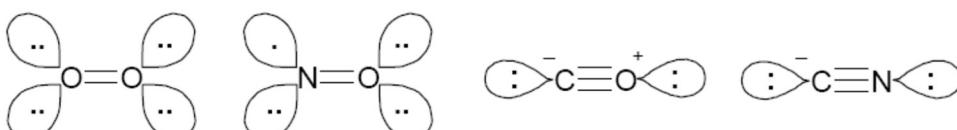
Sono presenti due gruppi etilici, 4 metilici e 2 propionici.

L'istidina con cui l'atomo di ferro forma un legame di coordinazione è l'istidina F8, o prossimale perché si trova vicino al ferro. F8 perché fa parte dell' α -elica chiamata F ed è l'ottavo residuo. Sono presenti altre istidine come la E7 che invece è distale: non si lega al ferro ma stabilizza il legame fra il ferro e l'ossigeno.

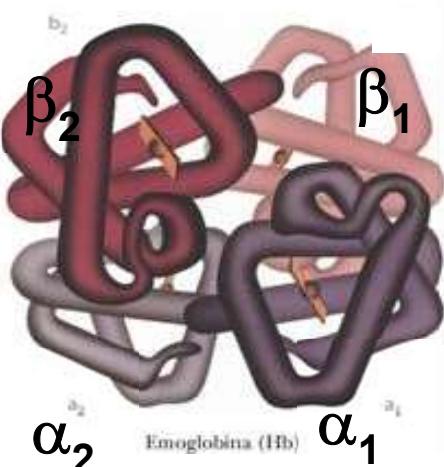
Il ferro può legare il monossido di carbonio: se il gruppo eme è fuori dalla proteina, il monossido di carbonio è ibridato sp (180°) e il legame ferro carbonio è lineare. I legami lineari sono più forti dei legami angolati. Se l'eme è nella proteina, E7 stabilizza il legame con il carbonio. Senza questa istidina, l'emoglobina e la mioglobina avrebbero affinità con il monossido di carbonio 20mila volte più forte dell'affinità che hanno con l'ossigeno.



Altre molecole possono legarsi al gruppo eme come l'ossido nitrico (NO), il cianuro (CN)



L'anidride carbonica non si lega all'emoglobina.



L'emoglobina scarica in ferro ha il gruppo eme più vicino all'elica. Il ferro tira l'ossigeno all'interno ma è legato all'istidina che a sua volta è legata all' α -elica e spostandosi cambia la forma.

L'emoglobina ha forme diverse e diverse affinità per l'ossigeno. La forma dell'emoglobina deossigenata è diversa da quella ossigenata: la prima assume la forma a T, la seconda ad R. È l'ossigeno che fa cambiare la forma. La forma a T ha una bassa affinità per l'ossigeno mentre la forma R ha un'alta affinità.

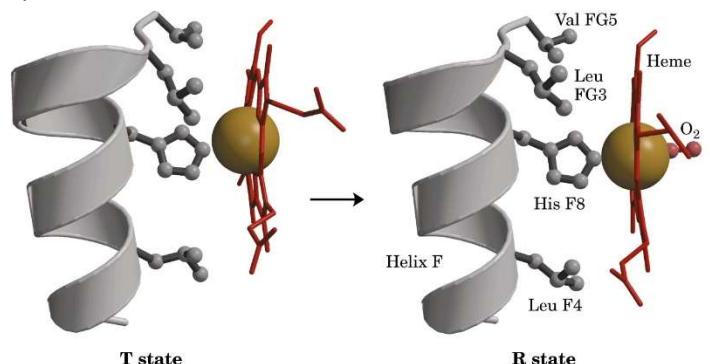
L'emoglobina è una proteina tetramerica che comunica anche con le altre proteine, formata da 4 sub-unità: 2 catene α e 2 catene β . Ogni subunità può legare l'ossigeno. L'emoglobina ha una struttura

quaternaria in cui le subunità sono tenute insieme da interazioni deboli. Il legame presente fra α e β è maggiore di quello fra α e α o fra β e β .

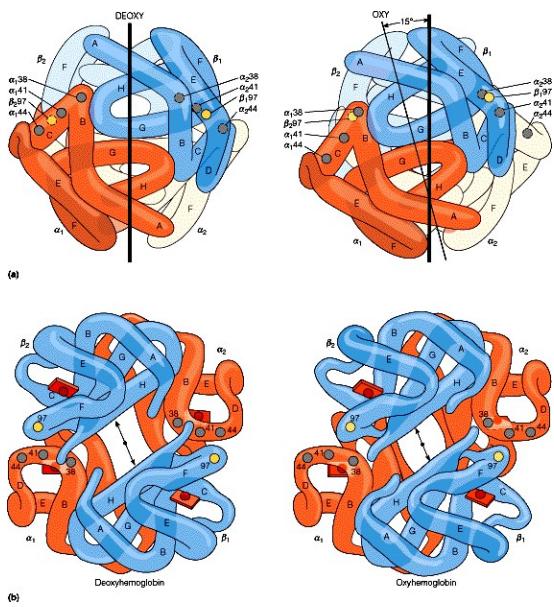
Se consideriamo α e β come unità possiamo anche vedere l'emoglobina come un dimero di dimeri.

Le interazioni che tengono unite α e β sono ponti salini (di tipo ionico).

Quando l'ossigeno si lega ad una subunità, questa cambia forma: si ha il passaggio dallo stato T allo stato R e il cambiamento viene trasmesso anche alle altre subunità che variano la loro forma anche se non hanno legato l'ossigeno. Quindi abbiamo un passaggio dallo stato T a bassa affinità allo stato R ad alta affinità. La variazione di forma facilita il legame con la seconda molecola di ossigeno. Si parla di cooperatività positiva fra le molecole di ossigeno.



La mioglobina ha una sola subunità quindi ognuna si comporta come se fosse una mioglobina deossigenata che deve legare l'ossigeno.



Cambiando le interazioni, cambia la forma complessiva dell'emoglobina. Alcune delle interazioni che tengono i dimeri si rompono e se ne formano altre ma cambiando, cambiano anche le strutture e un dimero scivola sull'altro con un'inclinazione di 15°.

Al centro si crea un vuoto. Se un dimero $\alpha\beta$ scivola sull'altro, la cavità diminuisce: nella forma ossigenata la cavità centrale è maggiore della cavità presente in quella deossigenata.

Con l'ossigeno il ferro diventa più piccolo e può entrare nel piano dell'eme: questo trascina l'istidina e l' α -elica facendo variare le interazioni.

Il numero di interazioni quando l'emoglobina passa dallo stato T ad R è minore in quanto i ponti salini allo stato T sono maggiori dei ponti salini allo stato R.

Lo stato T è lo stato teso perché troviamo più interazioni fra le subunità mentre lo stato R è lo stato più rilassato in quanto presenta meno ponti salini.

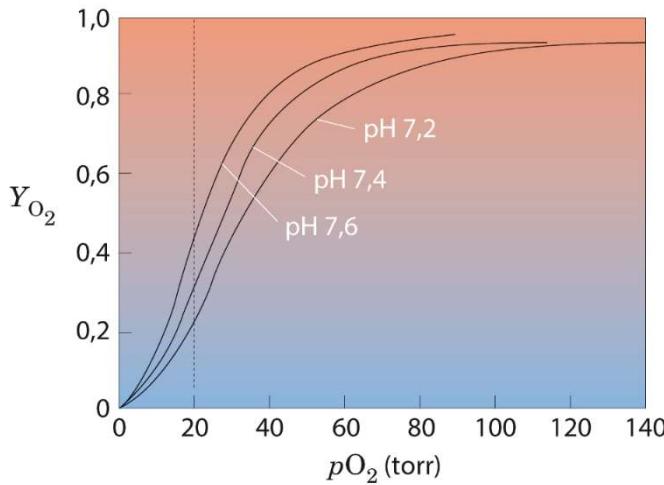
Anche altre molecole possono modificare la forma dell'emoglobina spingendola da uno stato all'altro.

L'emoglobina è una proteina allosterica: le **proteine allosteriche** sono quelle che presentano un altro sito e un'altra forma. Per poter essere definita tale, una proteina deve avere più siti di legame per il ligando. Infatti, l'emoglobina presenta 4 siti di legame per l'ossigeno e due forme, la forma T e la forma R.

Le proteine allosteriche sono sempre multimeriche, devono contenere almeno un dимерo. Possono avere anche siti per legare molecole diverse dal ligando e vengono definite modulatori allosterici della proteina. Questi si legano in siti diversi dal ligando, spostando la forma della proteina da uno stato all'altro: può aumentare lo stato T o lo stato R. Se aumenta lo stato T (lo stato meno attivo in generale), viene definito come **modulatore allosterico negativo**; se è promosso lo stato R (lo stato più attivo), si parla di **modulatori allosterici positivi**.

Queste caratteristiche valgono per tutte le proteine e tutti gli enzimi allosterici.

Un modulatore allosterico **omotropico** è sia ligando che modulatore allosterico; se il ligando differisce dal modulatore allosterico, è definito **eterotrofico**.



I modulatori allosterici dell'emoglobina sono tutti negativi e uno di questi sono gli ioni H^+ : quando aumentano si legano all'ossigeno dell'emoglobina favorendo lo stato T. Se il pH differisce da quello fisiologico (7.2 invece di 7.4), la curva si sposta verso destra diventando sempre più sigmoide: l'emoglobina diventa meno affine all'ossigeno. Se aumenta il pH (quindi vengono rimossi ioni H^+), la P50 si riempie con meno ossigeno e l'emoglobina è più affine. Gli ioni H^+ stabilizzano lo stato T e l'emoglobina fatica maggiormente a legare ossigeno. Quando il pH si alza, la curva si avvicina alle ordinate diventando iperbolica.

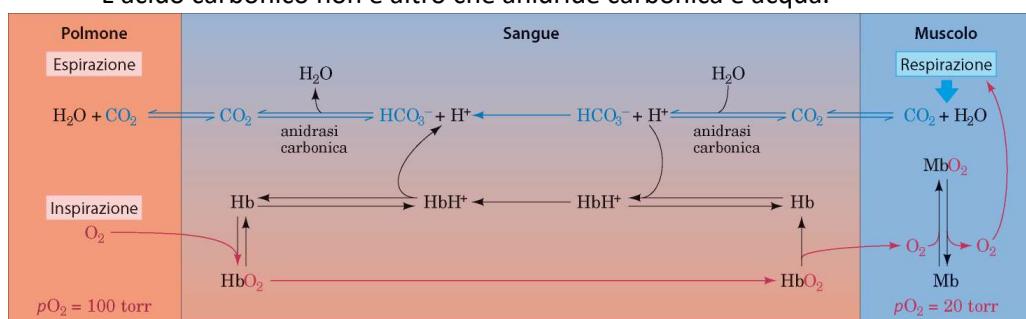
Nei tessuti periferici il pH è più acido per il metabolismo delle cellule e per una presenza minore di ossigeno: questo favorisce il rilascio di ossigeno da parte dell'emoglobina. L'ossigeno nei tessuti periferici serve principalmente per il metabolismo dei nutrienti.

$C_6H_{12}O_6$ viene degradato a 6 molecole di CO_2 e 6 di acqua. L'anidride carbonica viene eliminata attraverso la respirazione. Questa non può legarsi al ferro dell'emoglobina (se ne lega poca e da altre parti) e deve passare dai tessuti periferici ai polmoni attraverso il circolo sanguigno ma essendo un gas insolubile in acqua, crea delle bolle di gas nel sangue. L'anidride carbonica può però reagire con l'acqua nel sangue formando acido carbonico che si dissocià in HCO_3^- (forma dissociata) e H^+ aumentando l'acidità del pH. Il bicarbonato è solubile in acqua permettendo all'anidride carbonica di viaggiare nel sangue sottoforma di bicarbonato.

La reazione fra anidride carbonica e acqua è una reazione spontanea.

L'anidrasi carbonica è un enzima che velocizza questa reazione.

L'acido carbonico non è altro che anidride carbonica e acqua.



Le doppie frecce indicano che c'è un equilibrio: è sempre presente anidride carbonica gassosa, bicarbonato e acqua in equilibrio.

OSSIDI: elemento + ossigeno

OSSIDI ACIDI: danno acidi in acqua come anidride carbonica

OSSIDI BASICI: danno idrossidi in acqua

SOLUZIONI TAMPONE: soluzioni che hanno sia la forma acida che la forma basica.

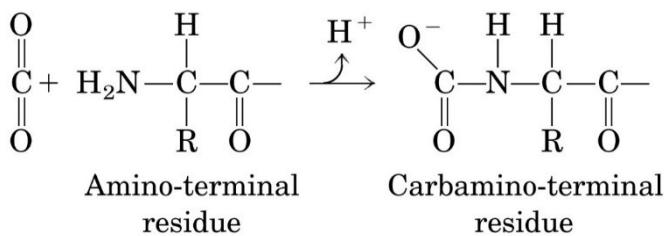
Anidride carbonica e ione bicarbonato rappresentano un sistema tampone, il principale del sangue. Questo permette di trasportare anidride carbonica ai polmoni in maniera sicura creando un tampone per mantenere il pH inalterato. La pK_a è poco più di 6 quindi il tampone funziona in un intervallo compreso fra 5 e 7 che equivale al limite del pH fisiologico.

È definito anche tampone aperto perché l'anidride carbonica viene continuamente immessa.

A livello dei polmoni il pH è un po' più alto, l'anidride carbonica viene eliminata e il bicarbonato si riassocia ai protoni.

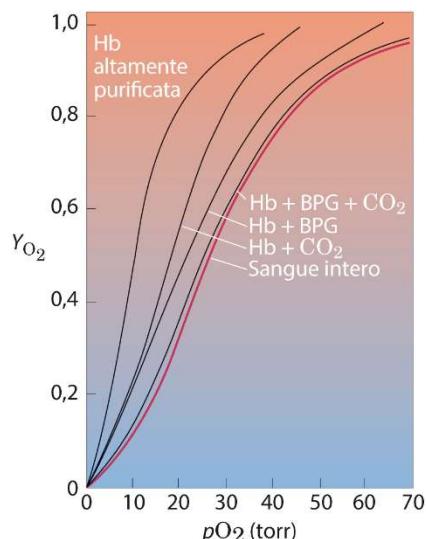
L'emoglobina deossigenata ha legato dei protoni che poi rilascia quando si lega all'ossigeno: gli ioni H^+ fanno dissociare l'ossigeno dall'emoglobina. I protoni vengono consumati e l'emoglobina lega più facilmente l'ossigeno.

Le estremità amino terminali sono 4 nell'emoglobina e possono reagire con l'anidride carbonica che può legarsi all'azoto dando un carbammato e liberando ioni H^+ : viene favorito il rilascio di ossigeno soprattutto nei tessuti periferici dove è presente maggiormente anidride carbonica.



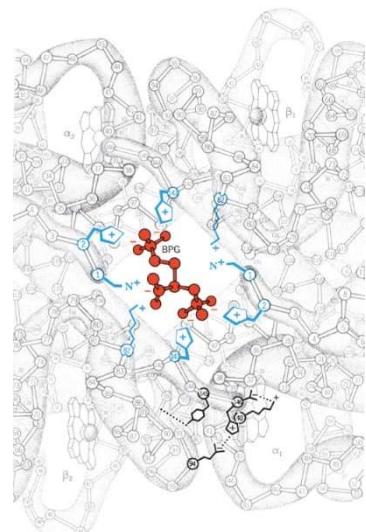
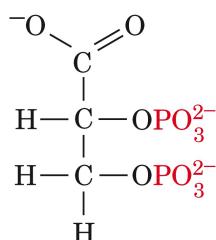
La concentrazione del bicarbonato è 20 volte superiore a quella dell'acido carbonico a condizione fisiologica. Se aumenta, ci troviamo in una condizione di alcalosi in quanto aumenta troppo la parte basica; se diminuisce siamo in una condizione di acidosi in cui aumenta la parte acida. Se viene eliminata molta anidride carbonica siamo in una situazione di alcalosi.

BPG: bisfosfoglicerato: è un acido glicericco che ha legato 2 gruppi fosfato. È un modulatore allosterico negativo.



L'emoglobina da sola è molto pura; la pressione parziale si aggira intorno ai 28 Torr. Il rilascio di ossigeno dipende anche dalla capacità dell'emoglobina di rilasciarlo. Se l'emoglobina fosse pura alla pressione parziale dei tessuti periferici, lascerebbe troppo poco ossigeno: nel sangue devono esserci BPG e anidride carbonica.

BPG ha due gruppi fosforici in 2 e 3 e 5 cariche negative. Si lega alla cavità centrale fra le 4 subunità perché sporgono amminoacidi basici dalla catena in modo tale da neutralizzare le sue cariche negative. Nello stato T la cavità è abbastanza grande perché possa entrare favorendo il rilascio di ossigeno.

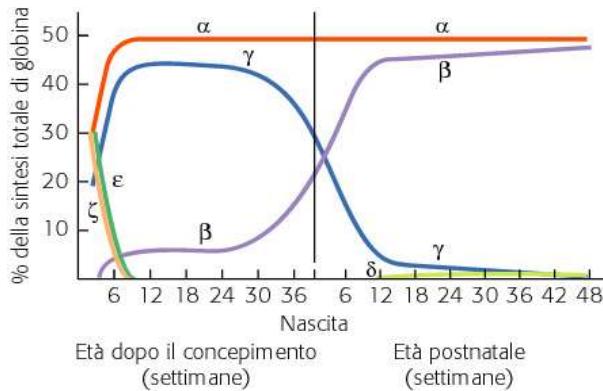


D-2,3-Bisfosfoglicerato (BPG)

ADATTAMENTO ALLE ALTE ALTITUDINI

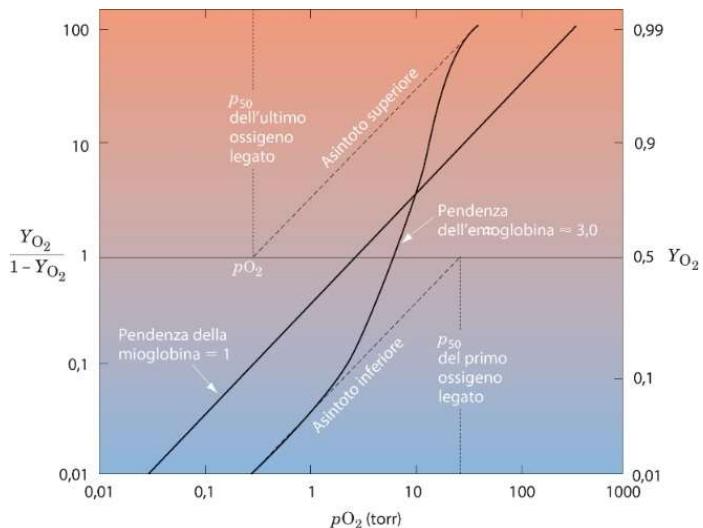
Ad alta quota non è più sufficiente l'ossigeno: cambia la quantità di BPG nell'organismo. La P50 quando si aggira intorno ai 26 Torr rilascia un 40% di ossigeno mentre ad alta quota ne rilascia meno e l'organismo produce più BPG. La curva è spostata verso destra e la P50 diventa 31 rilasciando più ossigeno ai tessuti che è circa la stessa di quella a livello del mare.

VARIANTI FISIOLOGICHE DELL'EMOGLOBINA



favorire lo scambio.

Le subunità γ legano peggio il BPG rendendo l'emoglobina F più affine all'ossigeno.

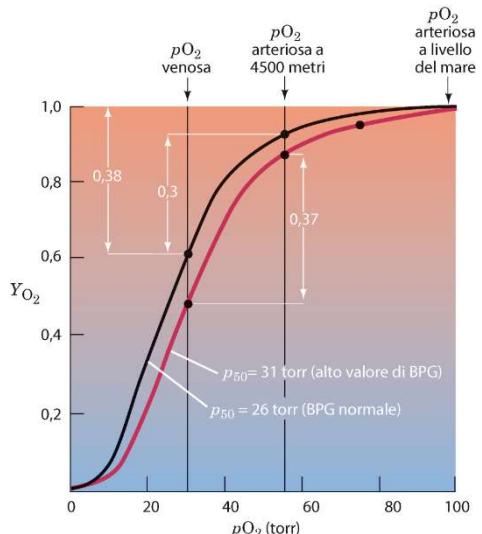


La mioglobina ha una pendenza della curva pari a 1, infatti non c'è cooperatività nella mioglobina. La curva dell'emoglobina fa capire che a concentrazioni basse di ossigeno, questa avrà un valore iniziale pari a uno poiché corrisponde alla capacità dell'emoglobina di legare l'ossigeno (inizialmente difficoltosa). Aumentando la concentrazione, salirà il valore della pendenza.

Il grafico di Hill vale per tutte le proteine allosteriche.

La mioglobina non è una proteina allosterica.

Se la cooperatività è positiva (pari a +3) sta ad indicare che il legame fra le subunità favorisce e stimola il legame delle altre subunità con l'ossigeno. Proprio per questo la prima subunità ha una P50 alta e un'affinità bassa mentre l'ultima ha un'alta affinità.



L'emoglobina A si trova soprattutto negli adulti ed è formata da due catene α e due β.

L'emoglobina F si trova nello stato fetale ed è formata da due catene α e due γ.

L'emoglobina E si trova nello stato embrionale ed è formata da due catene α e due ε. Questa prende l'ossigeno dall'emoglobina materna con un'affinità più alta di quella materna per

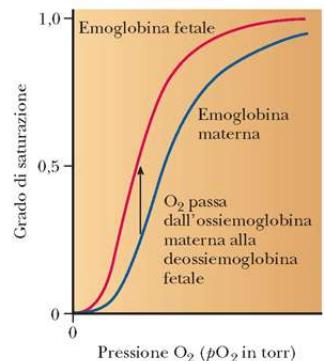


FIGURA 4.34 Un confronto della capacità di legare l'ossigeno dell'emoglobina fetale e materna. L'emoglobina fetale si lega meno facilmente al BPG e, di conseguenza, ha una maggiore affinità per l'ossigeno rispetto all'emoglobina materna.

L'emoglobina lega 4 ossigeni con diverse affinità. Si può calcolare la cooperatività fra gli ossigeni. Il coefficiente di Hill è una stima del grado di cooperatività. Per l'emoglobina il massimo è 4; se il coefficiente è tre la cooperatività è molto alta. La

Se la pendenza è negativa, il legame con il ligando è sfavorito.

T ed R sono sempre in equilibrio fra di loro e in generale, in tutte le proteine e in tutti gli enzimi allosterici, lo stato meno attivo è in equilibrio con lo stato più attivo. Non è un equilibrio al 50% e le concentrazioni di T ed R rimangono costanti. In assenza di ossigeno, lo stato T prevale su R mentre con l'ossigeno l'equilibrio è spostato verso R.

Se il modulatore allosterico è positivo, si lega alla forma R e la stabilizza: l'equazione è spostata verso R.

Se il modulatore allosterico è negativo, si lega alla forma T che viene stabilizzata e l'equazione è spostata verso T.

Il modulatore deve mantenere la forma positiva o negativa attiva, a seconda se lui stesso è positivo o negativo.

Il passaggio da T a R avviene secondo due modelli. Anche questi valgono generalmente per tutte le proteine e tutti gli enzimi allosterici.

1. Modello simmetrico dell'allosterismo

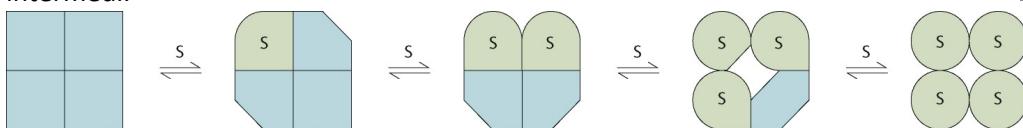
R e T sono sempre in equilibrio: la sostanza che si lega alla proteina allosterica può legarsi sia allo stato T che R.

T ed R sono sempre in equilibrio indipendentemente dalla sostanza legata.

Il legame del primo ossigeno può legarsi allo stato T e tutta la proteina resta allo stato T oppure legandosi allo stato R, tutta la proteina è allo stato R. La proteina allosterica o è tutta T o è tutta R.

2. Modello sequenziale dell'allosterismo

È permessa la coesistenza della subunità R con la subunità T. In questo modo si riesce a modulare meglio il legame dell'ossigeno con l'emoglobina. Le estremità del modello simmetrico sono contenute nel modello sequenziale che presenta più stadi intermedi.

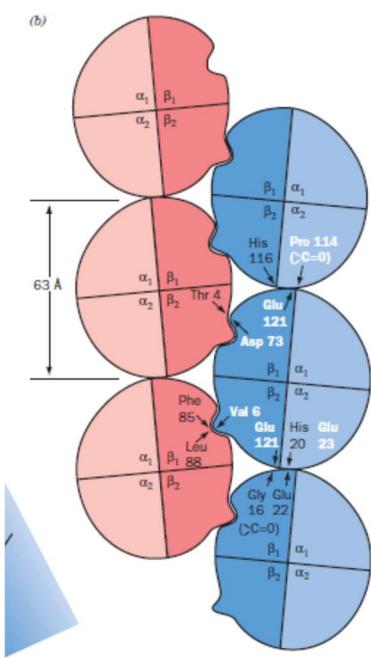


È difficile dire qual è il modello migliore.

ANEMIA FALCIFORME

Ciò che è deleterio è la forma a falce che assumono i globuli rossi. I globuli rossi sono plastici, possono cambiare forma per poter passare nei capillari e ossigenare i tessuti periferici. La forma a falce è rigida non permettendo di modificarne la forma: in questo modo non si ha un'ossigenazione dei tessuti periferici. La struttura è rigida perché le molecole di emoglobina si uniscono formando delle fibre e questi filamenti causano un irrigidimento della struttura. Le fibre si formano a causa delle mutazioni sulla subunità β dell'emoglobina: normalmente è presente un residuo dell'acido glutammico, un amminoacido acido, mentre nel globulo falciforme è presente un residuo di valina, un amminoacido idrofobico. In questo modo varia la polarità della superficie dell'emoglobina. La protuberanza idrofobica si lega con una zona concava idrofobica della subunità β modificata.





Se entrambi gli alleli dei genitori sono mutati, l'individuo è malato; se solo un allele è mutato, l'individuo è portatore ma non malato. Un eterozigote è un portatore sano, più resistente alla malaria.

ENZIMI

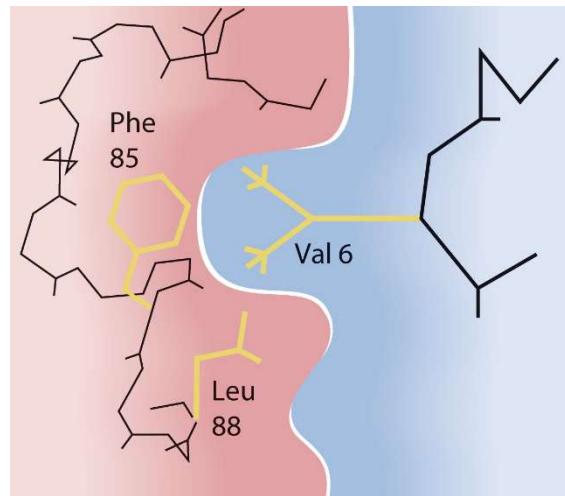
Gli enzimi forniscono alle cellule la capacità di esercitare un controllo cinetico sulla potenzialità termodinamica. Sono gli agenti delle funzioni metaboliche.

Un catalizzatore ha il compito di aumentare la velocità della reazione. Ne esistono di due tipi, biologici e chimici. Quelli biologici sono maggiormente efficienti.

È la cinetica che ci dice la velocità con cui i reagenti si trasformano in prodotti, non la termodinamica. Se la reazione fosse favorita

termodinamicamente ed anche molto veloce, non ci sarebbero mai i reagenti in quanto i prodotti sarebbero più stabili.

L'ATP è stabile da un punto di vista cinetico ma non termodinamicamente a causa dell'alta barriera da superare.



Gli enzimi abbassano la barriera permettendo di usare l'ATP come moneta di scambio.

Tutte le reazioni metaboliche sono catalizzate da enzimi.

Gli enzimi sono molto specifici, promuovendo solo una particolare reazione: sono proteine nella maggior parte dei casi. L'RNA può avere funzione enzimatica e in questo caso viene chiamato ribozima (enzima a RNA).

Il sito attivo dell'enzima è specifico per particolari reagenti che vi entrano permettendo la reazione. Gli amminoacidi nel sito attivo intervengono nella reazione.

Alcuni enzimi hanno bisogno di cofattori per funzionare.

Gli enzimi non vengono mai consumati, il prodotto finito della reazione esce dall'enzima che è poi pronto per una nuova catalisi.

I reagenti sono anche chiamati substrati dell'enzima.

TABELLA 11.1 Potere catalitico riferito ad alcuni enzimi

Enzima	Velocità della reazione non enzimatica (s ⁻¹)	Velocità della reazione enzimatica (s ⁻¹)	Accelerazione della velocità
Anidrasi carbonica	$1,3 \times 10^{-1}$	1×10^6	$7,7 \times 10^6$
Corismato mutasi	$2,6 \times 10^{-5}$	50	$1,9 \times 10^6$
Triosio fosfato isomerasi	$4,3 \times 10^{-6}$	4300	$1,0 \times 10^9$
Carbossipeptidasi A	$3,0 \times 10^{-9}$	578	$1,9 \times 10^{11}$
Nucleosidasi AMP	$1,0 \times 10^{-11}$	60	$6,0 \times 10^{12}$
Nucleosidasi di stafilococco	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$

Fonte: Radzicka, A., Wolfenden, R. (1995). *Science* 267, 91.

Un catalizzatore chimico può aumentare di 10^3 la velocità della reazione mentre quelli biologici possono anche superare 10^{14} .

Gli enzimi sono classificati in sei classi in base al tipo di reazione che catalizzano

1. Le **ossidoriduttasi** catalizzano reazioni redox come riduttasi e ossidasi
2. Le **transferasi** trasferiscono gruppi funzionali da una molecola all'altra come le transaminasi che catalizzano il trasferimento di un gruppo amminico o le chinasi che catalizzano il trasferimento di un gruppo fosfato.
3. Le **idrolasi** rompono legami addizionando una molecola d'acqua (fosfatasi, peptidasi e lipasi).
4. Le **liasi** catalizzano la rimozione di gruppi per formare doppi legami oppure possono rompere doppi legami (decarbossilasi, sintasi).
5. Le **isomerasi** catalizzano riarrangiamenti intramolecolari (epimerasi, mutasi).
6. Le **ligasi** catalizzano una reazione nella quale si forma o si rompe un legame carbonio-carbonio, carbonio-zolfo, carbonio-ossigeno o carbonio-azoto.

Nomenclatura degli enzimi

Nella maggior parte dei casi il nome dell'enzima termina in -asi che viene aggiunto al substrato (lattosio-lattasi). Altri enzimi sono chiamati con il nome del substrato e quello della reazione catalizzata (lattato deidrogenasi). Alcuni enzimi hanno nomi "storici", non direttamente correlati al substrato o alla reazione (catalasi, è un antiossidante; pepsina, si occupa della digestione delle proteine).

Per identificare in maniera univoca gli enzimi è stata istituita una commissione per identificare gli enzimi con dei numeri. Sono 4: il primo è la classe a cui appartiene; il secondo è il substrato; il terzo è il sottosubstrato; il quarto è l'enzima in particolare.

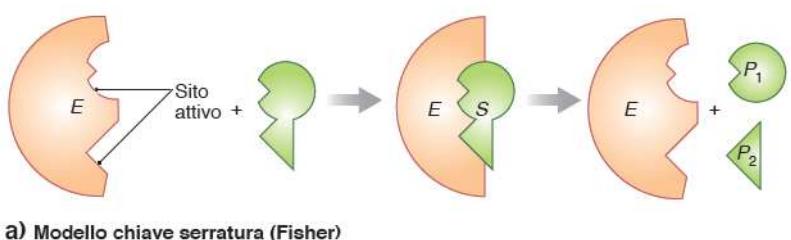
Gli enzimi riconoscono il proprio substrato in mezzo ad altre molecole, sono specifici sia per il substrato che per il prodotto. La specificità è determinata dalla struttura: ci sono due modelli.

1. Modello chiave-serratura

L'enzima è considerato come una serratura e il substrato è la chiave: l'enzima e il substrato sono esattamente complementari. Questo modello non spiega le modificazioni conformazionali che accompagnano la formazione del complesso enzima-substrato.

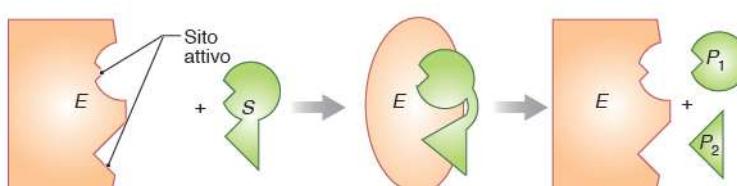
► FIGURA 8.15

Un confronto tra il modello chiave-serratura (a) e quello dell'adattamento indotto (b). Nel primo caso l'enzima è visto come una struttura rigida e immodificabile nel corso della catalisi. Nel secondo (b) l'enzima si modifica sostanzialmente quando lega il substrato e lo trasforma.



2. Adattamento indotto

Assume che il sito attivo dell'enzima non abbia una forma completamente adatta ma che è l'enzima a indurre un cambiamento per permettere il corretto posizionamento del substrato.



Questo secondo modello è il migliore perché alle proteine serve flessibilità per funzionare. Il sito attivo è in una tasca idrofobica degli enzimi: è all'interno perché serve un ambiente particolare.

Del glucosio, è solo il carbonio 6 che va modificato per trasferire il fosfato sulla molecola, quindi è la parte che deve entrare nel sito attivo. Può capitare che entri dell'acqua o del glicerolo, molecole più piccole rispetto al glucosio. Acqua e glicerolo non permettono la chiusura dell'enzima come invece accade quando il carbonio 6 è nel sito attivo e il resto della molecola del glucosio promuove la chiusura dell'enzima sul glucosio stesso. Acqua e glicerolo non sono in grado di attivare l'enzima dal punto di vista catabolico.

SPECIFICITÀ DEL COMPLESSO ENZIMA-SUBSTRATO

Perché un enzima ed un substrato reagiscano, il sito attivo deve essere complementare al substrato.

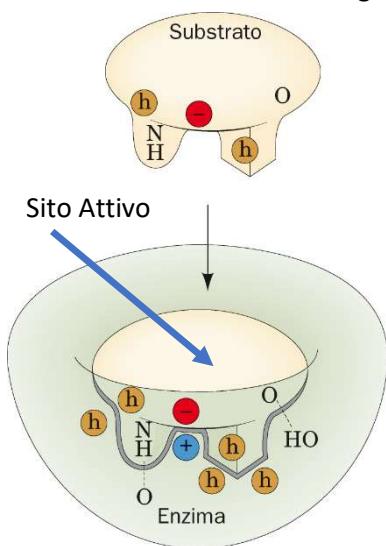
Ci sono diversi livelli di specificità del complesso: questa è la capacità di un enzima di riconoscere e di legare un solo substrato anche in mezzo ad altri composti.

ASSOLUTA: gli enzimi reagiscono solo con un substrato.

DI GRUPPO: gli enzimi catalizzano reazione coinvolgenti molecole con gli stessi gruppi funzionali.

DI LEGAME: gli enzimi catalizzano la formazione o la rottura solo di certi tipi di legame.

STEREOCHIMICA: gli enzimi riconoscono solo uno degli enantiomeri (da D a L): può interagire solo l'enantiomero L o D perché il sito attivo ha regioni messe in un determinato modo. La sintesi amminoacidica è catalizzata da enzimi che la guidano verso L amminoacidi.



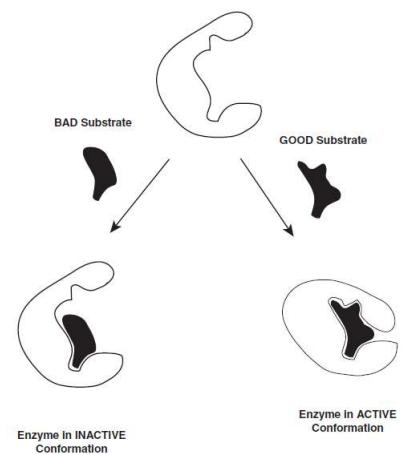
SITO ATTIVO: dove avviene la reazione, dove vanno i gruppi del substrato che devono subire la reazione.

SUBSTRATO: altri componenti che interagiscono con il sito di legame, tutta la regione che lega il substrato. Si trova all'interno nella tasca idrofobica.

Nel sito attivo ci sono dei gruppi che formano interazioni (deboli, idrofobiche, ioniche, ponti idrogeno, ma covalenti) con il substrato.

NH è un donatore di idrogeno per i ponti idrogeno mentre l'ossigeno è un accettore di idrogeno per i ponti idrogeno.

Se ci sono gruppi complementari nel sito attivo, l'interazione substrato-enzima stabilizzata.



SUBSTRATI BUONI E CATTIVI

Nel modello dell'adattamento indotto l'enzima assume conformazioni diverse a seconda che sia libero, o legato al substrato: il legame con il substrato induce il cambiamento strutturale. La conformazione assunta dall'enzima in seguito all'interazione con il substrato è quella giusta perché la reazione possa avvenire. Grazie a questo modello è possibile definire i concetti di "substrato buono" e di "substrato cattivo".

Il **substrato buono** è quello in grado di indurre il giusto cambiamento conformazionale dell'enzima rendendolo attivo, mentre il **substrato cattivo** non è in grado di indurre il cambiamento.

Come esempio possiamo prendere in considerazione la reazione catalizzata dall'Esochinasi, l'enzima che catalizza il trasferimento di un gruppo fosforico dall'ATP all' OH in posizione 6 della molecola del Glucosio:



Dal punto di vista chimico l'ossidrile del glucosio ha lo stesso tipo di reattività dell'OH dell'acqua:



Nonostante ciò, la velocità di trasferimento del fosfato sul glucosio catalizzata dall'esochinasi è 105 volte più veloce della reazione di trasferimento del fosfato sulla molecola d'acqua.

Il modello dell'adattamento indotto spiega questo comportamento indicando che la parte della molecola del glucosio non direttamente coinvolta nella reazione è comunque importante (necessaria) per indurre il cambiamento conformativo che trasforma l'enzima in un catalizzatore efficiente. Poiché la molecola dell'acqua non possiede questi requisiti strutturali non è in grado di indurre il passaggio dell'enzima dalla forma cataliticamente inattiva alla forma cataliticamente attiva. Questo esempio ci dice anche che quando l'enzima è nella conformazione inattiva la reattività dell'ATP è 105 volte minore rispetto alla velocità della conformazione attiva.

Gli enzimi sono principalmente proteine che hanno bisogno di cofattori, qualcosa di non proteico.

I **cofattori** sono molecole che si associano agli enzimi permettendo di portare avanti alcune reazioni. Li distinguiamo in **ioni metallici** e **coenzimi** a loro volta divisi in **co-substrati** e **gruppi prostetici**. Parliamo di coenzima quando la molecola si comporta come un substrato dell'enzima; di gruppo prostetico (gruppo eme per esempio) quando sono legati attraverso un legame covalente, in modo stabile. Un coenzima può essere un composto organico o organo-metallico. NAD⁺ e NADH sono coenzimi redox.

Parliamo di **apoenzima** se l'enzima non ha cofattore, quindi non è attivo (vale solo se hanno bisogno del cofattore).

Parliamo di **oloenzima** se è presente un cofattore.

Nessun amminoacido riesce a tornare allo stato ridotto dopo l'ossidazione: non possono essere donati e accettati elettroni a meno che non si abbiano coenzimi redox (non agiscono in modo reversibile).

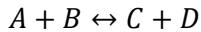
La maggior parte dei cofattori deriva dalle **vitamine**: composti che il nostro organismo non è in grado di sintetizzare e perciò devono essere introdotti con la dieta. L'anello nicotinamiddico, la parte attiva del NAD⁺ deriva dalla vitamina niacina indicata anche come vitamina PP (Pellagra-Preventing) o come vitamina B3. La sua carenza nella dieta porta alla Pellagra o malattia delle 3 D: Demenza, Diarrea e Dermatite. La Pellagra era una malattia endemica nelle regioni rurali del sud degli Stati Uniti; la maggior parte degli animali, tra cui l'uomo, sono in grado di sintetizzare la niacina a partire da un aminoacido: il triptofano, tuttavia, la dieta particolarmente ricca di derivati del mais delle popolazioni del sud degli Stati Uniti non solo non forniva un adeguato apporto di niacina, ma era anche povera di triptofano. In realtà il mais contiene grandi quantità di nicotinammide, ma in una forma che non può essere assorbita dall'intestino. In Messico dove la dieta è molto simile a quella delle zone rurali del sud degli Stati Uniti, la Pellagra era molto meno presente, questo perché la preparazione delle tortillas (il cibo caratteristico della dieta di quel paese) prevede il trattamento della farina di mais con una soluzione diluita di Ca(OH)₂ (acqua di calce), una soluzione debolmente basica che permette la liberazione della niacina che può quindi essere assorbita dall'intestino.

Le vitamine idrosolubili sono i precursori dei coenzimi, mentre quelle liposolubili come la vitamina A e la D non lo sono, anche se il loro apporto dietetico è essenziale.

L'ENERGIA DI ATTIVAZIONE E LA COORDINATA DI REAzione

Un enzima favorisce un percorso a bassa energia per convertire un substrato in prodotto ma non influenza la variazione di energia libera complessiva.

Non vengono modificate le caratteristiche termodinamiche della reazione (ΔG , ΔH , ΔS).

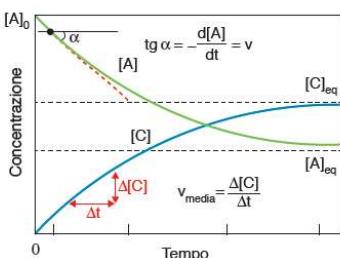


La velocità è uguale alla variazione di concentrazione nel tempo. $V = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{\Delta[C]}{\Delta t}$

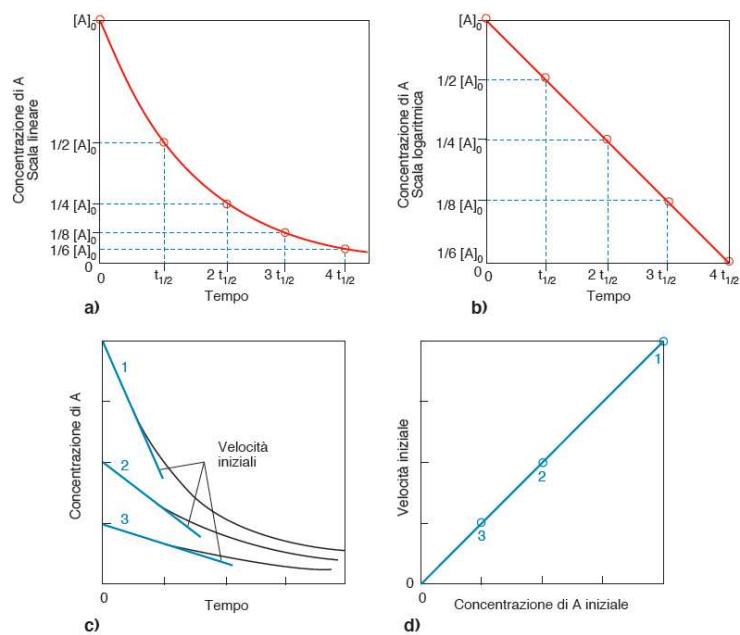
La concentrazione di A cala nel tempo mentre aumenta quella di C essendo uno dei prodotti. A decade e C aumenta in maniera lineare.

► FIGURA 8.2

Il progresso di una generica reazione chimica. Nel grafico sono mostrate la concentrazione di un reagente, [A], e quella di un prodotto, [C], in funzione del tempo. All'inizio della reazione la concentrazione di A è $[A]_0$, mentre non sono presenti prodotti di reazione. Dopo un tempo sufficientemente lungo il sistema ha raggiunto l'equilibrio, e di conseguenza la concentrazione di A e di C sono quelle di equilibrio ($[A]_{eq}$ e $[C]_{eq}$). In base a tali profili è possibile determinare la velocità istantanea di reazione a ogni tempo e la velocità media in un intervallo definito. A titolo esemplificativo nella figura viene rappresentata la misura della velocità istantanea, effettuata in base alla misura di [A], e quella media, effettuata in base alla misura di [C].



L. Polleoni



▲ FIGURA 8.3

Andamento di una reazione irreversibile del primo ordine. In (a) è dato l'andamento nel tempo della concentrazione del reagente fino quasi al suo esaurimento. La figura rappresenta molto chiaramente che in un tempo pari a $t_{1/2}$ la concentrazione dimezza, indipendentemente dallo stato di avanzamento della reazione. In (b) lo stesso profilo è rappresentato su una scala semilogaritmica e presenta un andamento lineare, come previsto dalla relativa equazione. In (c) si considerano reazioni con diverse concentrazioni iniziali di A; a ciascuna di esse corrisponde una velocità iniziale proporzionale alla concentrazione. In (d) i valori di velocità iniziale presentati in (c) sono dati in funzione della concentrazione di A; si evidenzia così la relazione di diretta proporzionalità tra v iniziale e $[A]$ che è alla base della definizione stessa di kinetica del primo ordine.

concentrazione del reagente e la proporzionalità è sempre mantenuta. Tutto ciò vale in una reazione di primo ordine, in cui si ha un aumento con un andamento lineare.

Nelle reazioni catalizzate da enzimi, l'aumento non è lineare.

Se la barriera di attivazione è alta, la reazione è lenta.

Per lunghi periodi di tempo si perde la linearità, infatti, la velocità di reazione è valutata per tempi brevi.

La velocità di reazione è la tangente alla parte iniziale del decadimento di A in rapporto con l'aumento di C.

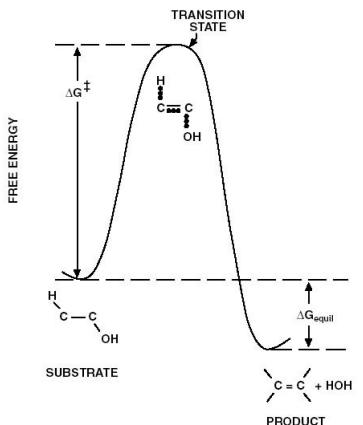
Il tempo di dimezzamento è costante.

Il tempo è in funzione della concentrazione: ci sono tre curve perché sono presenti tre concentrazioni diverse. La concentrazione del substrato cala con una certa pendenza: attraverso la tangente valuto la velocità.

Se la concentrazione è più alta, la pendenza è maggiore e di conseguenza, lo è anche la velocità. Posso metterle in relazione con la concentrazione del reagente A: la velocità iniziale è proporzionale alla

La velocità è diversa dalla termodinamica che definisce il verso della reazione ma non il tempo di trasformazione dei reagenti in prodotti.

In una reazione di disidratazione lo stato di transizione è caratterizzato dalla parziale rottura dei legami tra gli atomi di carbonio coinvolti e l'atomo di idrogeno e il gruppo OH, mentre si osserva la parziale formazione del doppio legame C-C e una molecola di acqua. Nello stato di transizione abbiamo una struttura instabile dovuta a distorsione e stiramento dei legami. Il ΔG della reazione, dato dalla differenza di ΔG fra prodotto e substrato, è alto. L'energia liberata dai prodotti è minore di quella dei reagenti, la differenza è negativa quindi la reazione è spontanea in quanto diminuisce l'energia libera.



Lo stato di transizione è all'apice del grafico, è lo stato intermedio fra substrato e prodotto, è molto instabile perché ha molta energia e ha un breve tempo di vita con la stessa probabilità di tornare verso i reagenti o andare verso i prodotti, a seconda della reazione: deve vincere un tempo necessario per rompere o formare i legami. Se così non è, torna allo stato fondamentale.

Lo stato di transizione è lo stato nel quale i vecchi legami si stanno rompendo e i nuovi si stanno formando. La molecola nello stato di transizione non è né substrato né prodotto. È un intermedio ad alta energia.

Variazione dell'energia libera di una reazione catalizzata e non catalizzata

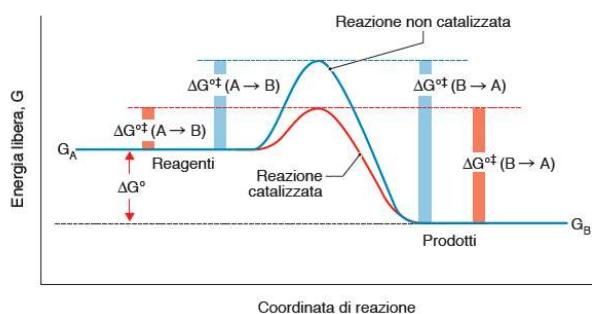
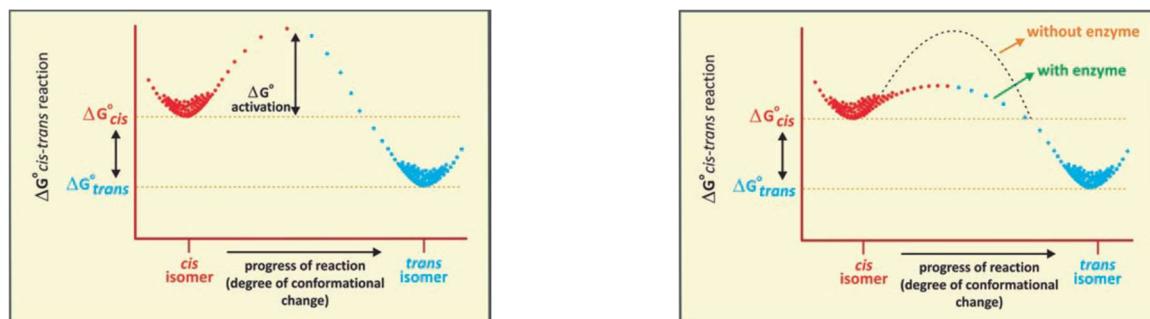


FIGURA 8.6
La variazione di energia libera nel corso di una generica reazione. L'aggiunta di un catalizzatore riduce il valore di G dello stato attivato e quindi il ΔG^{\ddagger} , ma non cambia la differenza di energia libera tra prodotti e reagenti (ΔG°).

Gli enzimi funzionano abbassando l'energia di attivazione, stabilizzando lo stato di transizione così che più molecole possano passare e diventare prodotti. Abbassando l'energia dello stato di transizione e dell'energia di attivazione, la velocità aumenta perché è richiesta meno energia per far partire la reazione. Gli enzimi non modificano l'energia dei reagenti e dei prodotti lasciando il ΔG° costante.

Gli enzimi abbassano l'energia di attivazione favorendo l'avvicinamento ed il corretto orientamento delle molecole di reagente in modo che possano reagire più facilmente. L'energia usata è quella guadagnata dal legame con il substrato.

Uno stato può essere stabilizzato formando legami: gli enzimi legano lo stato di transizione meglio del substrato.

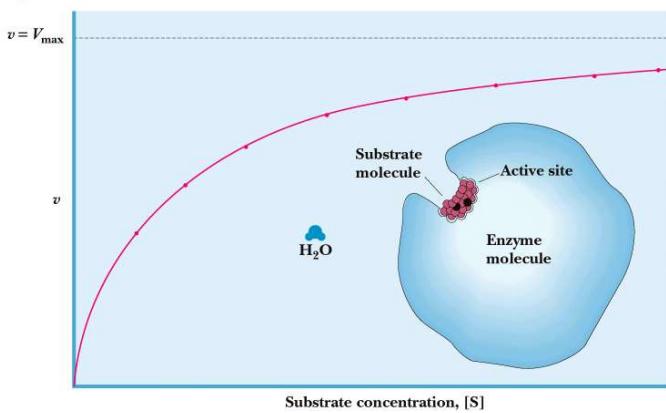
L'enzima lega (quindi stabilizza) bene il substrato formando molti legami con lo stato fondamentale: in questo modo si libera molta energia di legame e il complesso enzima-substrato è molto stabile in quanto ha meno energia del substrato libero.

Un enzima esattamente complementare al substrato nello stato fondamentale non è un buon enzima perché stabilizzando troppo il complesso enzima-substrato, aumenta la barriera dell'energia di attivazione.

Un enzima esattamente complementare allo stato di transizione è un buon enzima perché stabilizzando lo stato di transizione diminuisce la barriera dell'energia di attivazione. Per raggiungere lo stato di transizione serve molta energia ma essendo stabile, ha un breve periodo di vita. L'enzima fa più legami con lo stato di transizione abbassando l'energia.

Un buon enzima deve poter legare il substrato attraverso pochi legami. Il numero di legami aumenta nello stato di transizione rispetto allo stato fondamentale.

Le molecole che hanno una struttura simile allo stato di transizione sono dette analoghe dello stato di transizione: gli analoghi hanno una forma esattamente identica avendo più affinità all'enzima rispetto al suo substrato. Assomigliano allo stato di transizione ma sono stabili e sono degli inibitori molto potenti degli enzimi.



Se in grafico abbiamo anche la velocità in funzione della concentrazione del substrato, l'andamento è iperblico. Notiamo delle fasi: una iniziale a bassa concentrazione (abbastanza lineare) ed un secondo tratto non lineare. Alla velocità massima della reazione, la velocità è costante indipendentemente dalle quantità di substrato aggiunte.

La velocità di una reazione catalizzata da un enzima in funzione della concentrazione di substrato mostra un andamento iperblico.

Diagramma di processo del meccanismo di reazione della glicogeno fosforilasi: ipotizzo un meccanismo di reazione e la presenza di un intermedio. Se la struttura si lega all'enzima e si blocca, l'intermedio è corretto. La forma dell'1,5-gluconilattone è un inibitore della glicogeno fosforilasi.

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

Permette di determinare la velocità di reazione catalizzata da un enzima: assume che l'enzima [E] interagisca con il substrato [S] per la formazione del complesso enzima-substrato [ES]; che questo complesso sia in rapido equilibrio con l'enzima libero e che la dissociazione del complesso per formare i prodotti [E+P] sia più lenta sia della sua formazione che della dissociazione del complesso per riformare l'enzima e il substrato.

Ci sono tre costanti di equilibrio (K_1 , K_2 , K_{-1}): per vedere quale determina la trasformazione del substrato in prodotto, va misurata la velocità prima che il prodotto possa tornare indietro, quindi nei brevi tempi dopo il mescolamento dell'enzima con il substrato. Il tempo di analisi è il tempo iniziale della reazione perché il prodotto è troppo poco per poter tornare indietro. K_2 è la costante di velocità della reazione più lenta che determina la velocità.

PRINCIPI:

- L'enzima reagisce con un solo substrato

- Enzima e substrato reagiscono velocemente per dare il complesso enzima substrato: tra l'enzima, il substrato ed il complesso si instaura rapidamente una condizione di equilibrio.
- Il complesso si dissocia per dare il prodotto e l'enzima libero: è la reazione più lenta del processo.
- La velocità che viene presa in considerazione è la velocità iniziale v_0
- La cinetica di Michaelis-Menten è una cinetica dello stato stazionario, uno stato che si forma e si distrugge a velocità confrontabili. Questo concetto si applica al complesso enzima-substrato

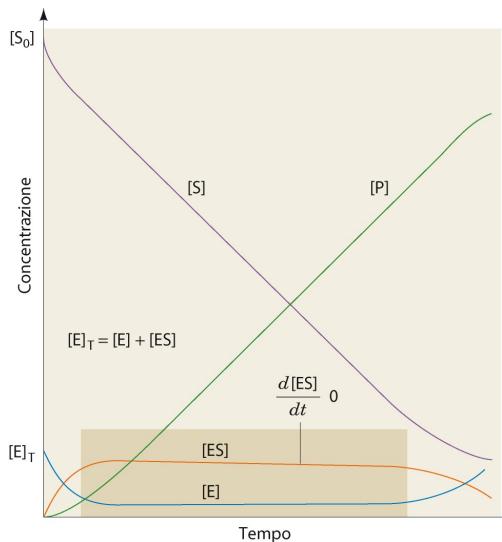


Si considera che la reazione abbia raggiunto lo stato stazionario quando la velocità di formazione di ES è uguale alla velocità di dissociazione di ES. Da ciò deriva che nella condizione di stato stazionario, la concertazione di ES è costante nel tempo.

L'ATP nelle cellule è costante per lo stato stazionario: la velocità con cui viene prodotta è uguale a quella con cui viene consumata.

Questo vale per gli enzimi allosterici.

Curva di progressione di una semplice reazione catalizzata da un enzima



Al tempo zero abbiamo l'enzima e una certa quantità di substrato: l'enzima si lega al substrato e inizia a diventare prodotto. In questo momento, la concentrazione del complesso enzima-substrato è uguale a 0.

Il prodotto aumenta nel tempo mentre diminuisce il substrato.

La concentrazione del complesso aumenta inizialmente, poi non varia più.

Le concentrazioni del complesso e dell'enzima sono costanti nel tempo (è un tempo molto breve, di qualche millisecondo) perché la reazione è entrata nello stato stazionario. Il tempo è quello di mescolamento del complesso. Lo stato prima dello stato stazionario è chiamato stato prestazionario.

La concentrazione dell'enzima diminuisce per poi non cambiare più.

Nello stato stazionario possono essere misurate le variazioni del substrato e del prodotto.

LEGGE DI LAMBERT-BEER: correla la quantità di luce assorbita da un materiale alla concentrazione e allo spessore del materiale stesso. In questo caso si parla di quanta luce ha assorbito il substrato: se il prodotto non assorbe luce, la quantità di luce assorbita diminuisce.

$$v_0 = K_2 \cdot [ES]$$

Ci interessa quanto prodotto si forma e questo dipende dalla concentrazione del complesso enzima-substrato.

K_1 e K_{-1} sono troppo veloci e si formano nello stato prestazionario, quindi le uniche informazioni che possiamo ricavare sono quelle su K_2 ma non sappiamo mai quanto vale la concentrazione del complesso.

Nello stato stazionario, la velocità di formazione del complesso enzima substrato $K_1([E]_0 - [ES])[S]$ è uguale alla velocità di dissociazione del complesso stesso $K_{-1}[ES] + K_2[ES]$ ma non sappiamo quanto enzima libero è legato al substrato. L'unico parametro che possiamo conoscere è la concentrazione totale

dell'enzima presente $[E]_t$ e quindi esprimere la quantità di enzima libero in funzione della quantità di enzima totale e di complesso enzima substrato.

Risolviamo l'equazione precedente per $[ES]$

$$K_1[ES][S] + (K_{-1} + K_2)[ES] = K_1[E_t][S]$$

Dividiamo per K_1

$$[ES][S] + \frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1}[ES] = [E_t][S]$$

Sostituendo e risolvendo abbiamo

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]}$$

K_m è la costante di attivazione cinetica di Michael-Menten e vale $\frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1}$. Deriva dalle costanti di velocità ed è una stima della costante di dissociazione di E da S. Se è piccola significa un legame forte; se è alta il legame è debole.

Questa è l'equazione di Michael-Menten in funzione di $[ES]$. Ricordando che la velocità è pari a

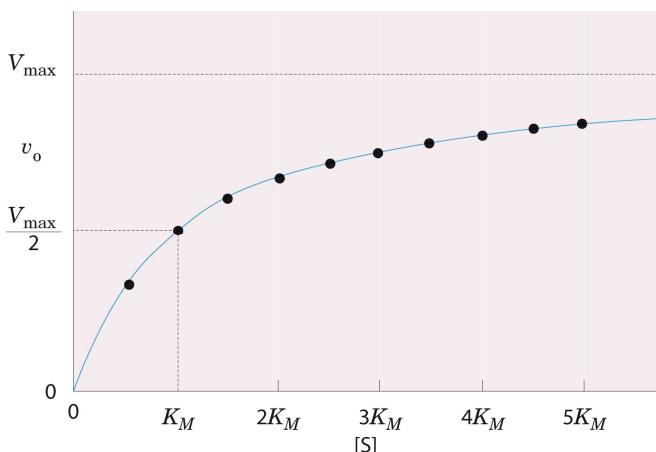
$$\begin{aligned} v_0 &= K_2 \cdot [ES] \\ K_2[ES] &= \frac{K_2[E_t][S]}{K_M + [S]} \end{aligned}$$

Ossia

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

La velocità massima corrisponde a quanto velocemente tutto l'enzima ha legato il substrato.

Quando il substrato è basso, l'equazione di velocità è di primo ordine rispetto al substrato stesso (la velocità aumenta linearmente); quando è alto, l'equazione di velocità è di ordine zero (la velocità è costante, indipendentemente dal substrato). L'equazione di Michael-Menten descrive una dipendenza della velocità rispetto al substrato a forma di iperbole rettangolare.



La velocità massima è quella in cui tutti gli enzimi sono saturati con il substrato.

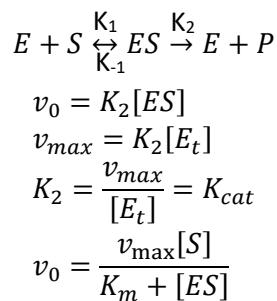
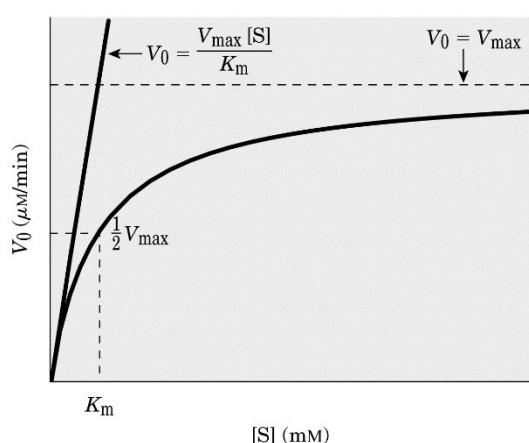
Conoscendo la velocità massima, possono ricavare la velocità massima/2 che corrisponde al punto della concentrazione del substrato. La concentrazione del substrato è necessaria per indurre una velocità all'enzima pari a velocità massima/2 = K_m, ovvero la concentrazione necessaria per saturare la metà degli enzimi.

K_m è un indice di affinità dell'enzima per il suo substrato. Se ha un valore alto, ho bisogno di molto

substrato per arrivare alla velocità massima.

La velocità massima è un valore teorico per l'enzima e corrisponde all'asintoto al ramo piatto dell'iperbole. Può essere ricavato solo dal grafico, non sperimentalmente. In realtà non è mai raggiunta: per raggiungerla tutte le molecole di enzima devono essere saldamente legate con il substrato.

K_m è usato come riferimento per capire quanto substrato serve a saturare. (K_m va da 5 a 10)



La concentrazione del complesso enzima-substrato si misura in moli/s; la concentrazione dell'enzima si misura in moli; K_{cat} in s^{-1} ed è la misura di quante moli sono state convertite in prodotto per molecola di enzima per unità di tempo (in 1 secondo).

È il **numero di turnover** dell'enzima perché è il numero di reazioni che ciascun sito attivo può catalizzare per unità di tempo. Corrisponde alla costante di velocità minore (quella che determina il tempo impiegato per la catalisi) e se si segue il modello di Michael-Menten, $K_2 = K_{cat} = v_{max}/E_t$. Per enzimi più complicati può essere in funzione di diverse costanti di velocità. I valori di K_{cat} possono andare da meno di 1/sec a molti milioni per secondo.

Quando la concentrazione del substrato è molto minore rispetto alla K_m la concentrazione del complesso enzima substrato è così piccola che la concentrazione dell'enzima libero può essere considerata uguale a quella dell'enzima totale.

Affinché la reazione avvenga, enzima e substrato devono urtare: il substrato deve raggiungere il sito attivo e non deve dissociarsi.

Per un enzima perfetto deve essere trascurabile

$$\text{efficienza catalitica} = \frac{K_{cat}}{K_m} = \frac{K_2}{\frac{K_{-1} + K_2}{K_1}} = \frac{K_2 \cdot K_1}{K_2} = K_1$$

L'efficienza catalitica è una stima della 'perfezione' dell'enzima. Il rapporto K_{cat}/K_m è un'apparente costante di velocità di secondo ordine che misura come lavora l'enzima quando il substrato è basso.

Dall'equazione vediamo che il rapporto è massimo quando K_2 è maggiore di K_1 quindi quando la velocità di decomposizione del complesso per dare il prodotto è superiore alla velocità della reazione di ritorno del complesso per dare E+S. In questa condizione il rapporto K_{cat}/K_m corrisponde a K_1 (la costante di associazione dell'enzima-substrato per dare il complesso).

Ricordiamo che k_1 è la costante di secondo ordine per la velocità di formazione di ES. Il valore di k_1 non potrà mai superare la frequenza di collisione tra le molecole di enzima e quelle di substrato presenti in soluzione. Per questo motivo si dice che la k_1 è sotto il controllo diffusionale. Le reazioni controllate dalla diffusione hanno delle costanti di velocità dell'ordine di 10^8 - $10^9 M^{-1}s^{-1}$. Quando il rapporto k_{cat}/K_m si avvicina al valore di k_1 significa che l'enzima è in grado di catalizzare la trasformazione del reagente nel prodotto ogni volta che incontra una molecola di substrato: **ha raggiunto la perfezione catalitica**.

Esistono diverse forme del substrato che possono legarsi al substrato quindi possiamo avere più passaggi con più costanti di velocità legate ai prodotti intermedi: ci sarà sempre una che è la più lenta in assoluto che determina la velocità della reazione (non è detto che sia la K_2).

Fattori che limitano la formazione di P

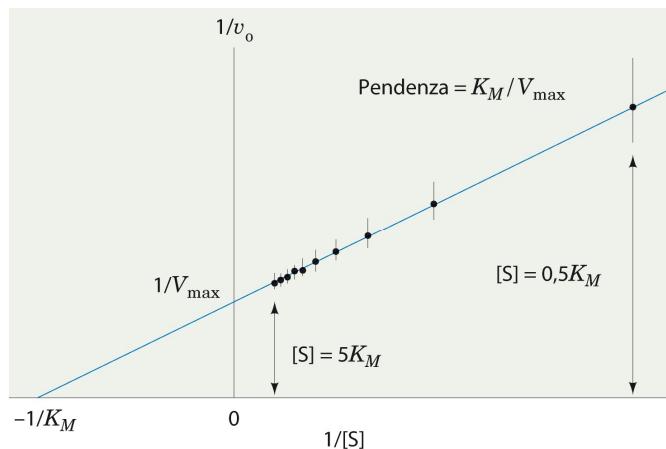
- Diffusione dei reagenti che dipende dal moto delle molecole
- Capacità di reagire dei reagenti che dipende dalle caratteristiche chimiche.

Si parla di limite diffusionale se la velocità di incontro dei reagenti è lenta, di controllo chimico quando l'urto non basta e K_1 è un po' più bassa. Le reazioni limitate solo dalla diffusione sono molto veloci perché le molecole si muovono molto rapidamente: la K_1 è molto grande, dell'ordine di 10^9 . L'enzima perfetto è quello che si avvicina di più a $10^8/10^9$.

K_{cat}/K_m permette di valutare cosa controlla la reazione.

Lineweaver e Burk hanno cercato di trasformare in una retta l'iperbole dell'equazione di Michaelis-Menten usando un'equazione che è il doppio dei reciproci.

Grafico dei doppi reciproci



$$\begin{aligned} v_0 &= \frac{v_{\max}[S]}{K_m + S} \\ \frac{1}{v_0} &= \frac{K_m + S}{v_{\max}[S]} \\ \frac{1}{v_0} &= \frac{K_m}{v_{\max}[S]} + \frac{[S]}{v_{\max}[S]} \\ \frac{1}{v_0} &= \frac{K_m}{v_{\max}[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \\ \frac{1}{v_0} &= \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \\ Y &= m \cdot x + Q \end{aligned}$$

Il grafico dei doppi reciproci o grafico di Lineweaver-Burk permette di calcolare più facilmente il valore di v_{\max} e di K_m . In questo tipo di grafico possiamo osservare una dipendenza lineare tra il reciproco della velocità di una reazione catalizzata da un enzima ($1/v_0$) ed il reciproco della concentrazione di substrato ($1/[S]$). L'intercetta della retta con l'asse delle ordinate corrisponde al reciproco di v_{\max} ($1/v_{\max}$); la pendenza della retta corrisponde al rapporto K_m/v_{\max} e l'intercetta della retta con l'asse delle ascisse corrisponde a $-1/K_m$. Lo svantaggio di questo tipo di analisi dei dati è dato dal fatto che molto spesso i punti sperimentali corrispondono a concentrazioni relativamente alte di substrato per cui sono raggruppati nella parte sinistra del grafico (a concentrazioni di substrato superiori alla K_m la dipendenza della velocità dalla concentrazione del substrato è non-lineare e per concentrazioni di substrato ancora più alte la velocità è indipendente dalla concentrazione del substrato). Inoltre, se analizziamo la distribuzione degli errori, notiamo che per i punti a bassa concentrazione (quelli sulla destra del grafico) la probabilità di errore è più alta. C'è sempre un errore sperimentale legato ad ogni misura perché ogni volta che si preleva una sostanza, possono essere commessi errori e avere valori non esatti. Facendo più prelievi, si ottiene un valore medio più vicino al valore reale. Prelevare una concentrazione molto piccola porta ad avere errori maggiori rispetto al prelievo di una concentrazione grande. Nonostante tutto se i punti sperimentali usati per il grafico dei doppi reciproci sono scelti nell'intorno della K_m (alcuni sotto, altri sopra la K_m) il grafico di Lineweaver-Burk ci permette una accurata determinazione di v_{\max} e K_m .

Le reazioni enzimatiche possono passare attraverso la formazione di diversi intermedi. La cinetica dello stato stazionario può fornire solo una descrizione fenomenologica del comportamento dell'enzima: la natura degli intermedi resta indeterminata. Non possiamo avere informazioni sul meccanismo della reazione, su come il substrato diventi prodotto ma solo sapere la velocità con cui entra ed esce.

ENZIMI: INIBITORI E MODULATORI DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

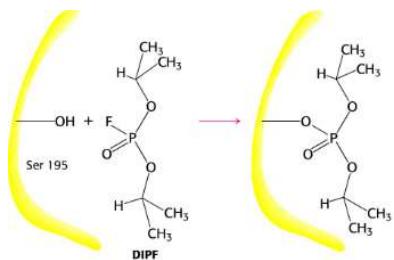
Gli enzimi possono essere inibiti da diverse sostanze in differenti modi.

Per classificare gli inibitori, si osserva l'effetto sui parametri cinetici dell'enzima, v_{\max} e K_m .

Sappiamo che il substrato entra nell'enzima ed esce come prodotto ma non con quanti passaggi avviene.

Se l'inibitore è legato in modo covalente, si parla di inibitore irreversibile; se è legato in modo non covalente, di inibitore reversibile.

Il diisopropil-fluoro-fosfato è un esempio di inibitore irreversibile.



Il gas nervino che provoca paralisi e morte è un inibitore dell'acetilcolinestasi. La funzione di questo enzima è idrolizzare l'acetilcolina scindendola in colina e acido acetico. L'acetilcolina è un neuro trasmettitore a livello di placca neuro muscolare che serve per trasferire l'impulso nervoso al muscolo; se non viene degradata, il muscolo si mantiene contratto. Il diisopropil-fluoro-fosfato può entrare nel sito attivo dell'acetilcolina e formare un legame covalente con il residuo di serina al suo interno, facendo rimanere contratto il muscolo e causando una paralisi. L'acetilcolina contrae, l'acetilcolinestasi rilassa. Se si inibisce l'enzima si rimarrà in paralisi spastica, i muscoli saranno bloccati, compresi quelli della respirazione. Il gas nervino, quindi è un inibitore enzimatico irreversibile che blocca l'acetilcolinestasi.

Negli inibitori reversibili, l'effetto cessa.

Si parla di inibizione competitiva quando l'inibitore si lega solo all'enzima impedendogli di legarsi al substrato. L'inibizione è non competitiva quando si lega sia all'enzima che al complesso enzima-substrato. È acompetitiva se si lega solo al complesso e non all'enzima: si tratta di un caso ipotetico che non è mai stato documentato ma crea un utile contrasto con l'inibizione competitiva.

Molti farmaci sono inibitori delle attività enzimatiche.

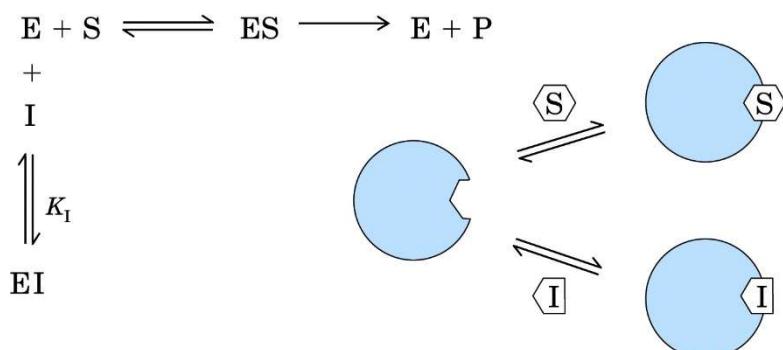
Inibizione enzimatica competitiva

Se sono presenti sia substrato che inibitore, l'enzima si lega in base alle quantità dei due: a concentrazioni molto elevate del substrato, si legherà a quello. Le concentrazioni devono essere quasi saturanti e la velocità massima dell'enzima non cambia.

L'enzima fa più fatica a legare se l'equilibrio è spostato verso l'enzima libero.

L'inibitore lavora sulla K_m diminuendo l'affinità: la K_m aumenta, non lavora sulla velocità massima.

L'inibitore è analogo al substrato



(a) Competitive inhibition

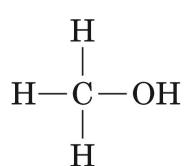
Substrate	Product	Competitive inhibitor
Succinate	Fumarate	Malonate

Chemical structures:

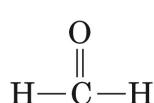
- Succinate: $\text{CH}_2\text{CH}(\text{COO}^-)\text{COO}^-$
- Fumarate: $\text{CH}_2=\text{CHCOO}^-$
- Malonate: CH_2COO^-

Reaction: Succinate $\xrightarrow[\text{2H}]{\text{SDH}}$ Fumarate

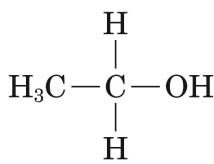
Trattamento con etanolo dell'avvelenamento da metanolo



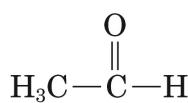
Metanolo



Formaldeide



Etanolo



Acetaldeide

L'alcol deidrogenasi trasforma l'etanolo in acetilaldeide. Può lavorare anche sul metanolo dando come prodotto la formaldeide che è molto tossica.

L'avvelenamento da metanolo è risolvibile usando l'etanolo. Posso impedire che il metanolo diventi formaldeide dando etanolo ed impedendo all'enzima di lavorare sul metanolo.

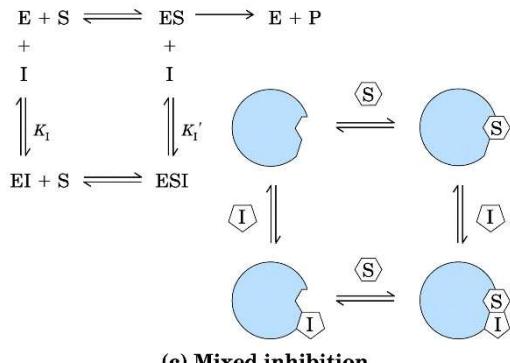
Inibizione enzimatica accompetitiva

L'enzima ha due siti, uno per il substrato, l'altro per l'inibitore che è accessibile solo quando ha legato già il substrato.

Con l'inibitore una parte dell'enzima non sarà attivata perché lega l'inibitore e la velocità massima sarà più bassa.

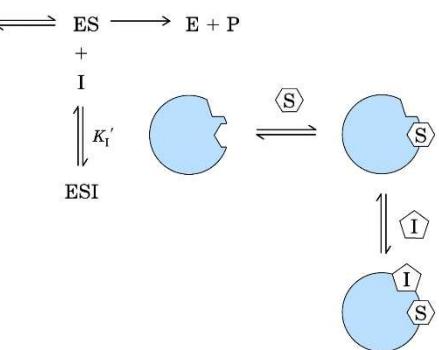
K_m diminuisce ed aumenta l'affinità con il substrato.

Inibizione enzimatica non competitiva



Anche qui sono presenti due siti: l'enzima libero può legare il substrato o l'inibitore; il complesso enzima-substrato può legarsi all'inibitore o l'enzima-inibitore può legarsi al substrato.

La velocità massima sarà più bassa, la K_m non cambia perché su di lei l'inibitore ha poco effetto.



(b) Uncompetitive inhibition

La penicillina è un esempio di inibitore suicida.

Alcuni enzimi impediscono la formazione di peptidoglicano che costituisce la parete dei batteri e che serve per mantenere la pressione osmotica al loro interno. Senza, prendono acqua dall'esterno, scoppiano e muoiono. La parete è costituita da un enzima inibito dalla penicillina perché ha una struttura simile al substrato del suo enzima e forma un legame covalente.

I primi antibiotici sono stati fatti basandosi su sulfanilammide. Questa ha attività antibatterica perché compete con l'acido p-amminobenzoico. Il paramminobenzoico è un componente dell'acido folico, un coenzima e una vitamina per gli animali. I batteri sono capaci di sintetizzare l'acido folico partendo dal PABA che è simile alla sulfanilammide: la sintesi però non va avanti se è presente quest'ultima. Il batterio muore senza acido folico.

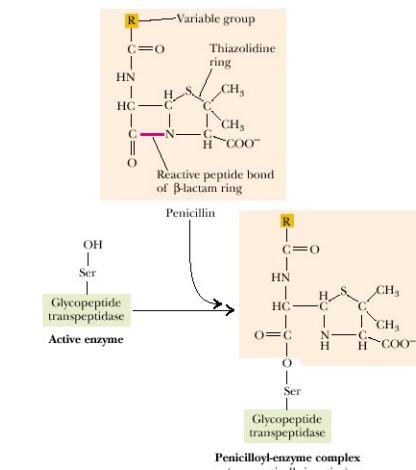


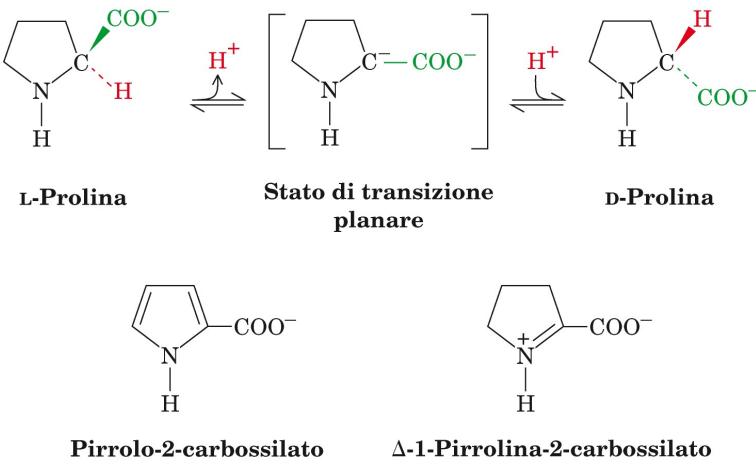
FIGURE 14.17 • Penicillin is an irreversible inhibitor of the enzyme *glycoprotein peptidase*, which catalyzes an essential step in bacterial cell wall synthesis. Penicillin consists of a thiazolidine ring fused to a β -lactam ring to which a variable group R is attached. A reactive peptide bond in the β -lactam ring covalently attaches to a serine residue in the active site of the glycoprotein transpeptidase. (The conformation of penicillin around its reactive peptide bond resembles the transition state of the normal glycoprotein peptidase substrate.) The penicilloylenzyme complex is catalytically inactive. The bond between the enzyme and penicillin is indefinitely stable; that is, penicillin binding is irreversible.

Effetti degli inibitori enzimatici

TABELLA 12.2 Effetti degli inibitori sulle reazioni di Michaelis-Menten^a

Tipo di inibizione	Equazione di Michaelis-Menten	Equazione di Lineweaver-Burk	Effetto dell'inibitore
Nessuna	$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$	Nessuno
Competitiva	$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$	Determina un aumento di K_M^{app}
Incompetitiva	$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]} = \frac{(V_{\max}/\alpha')[S]}{K_M/\alpha' + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$	Provoca una diminuzione di K_M^{app} e V_{\max}^{app}
Mista (non competitiva)	$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} = \frac{(V_{\max}/\alpha')[S]}{(\alpha/\alpha')K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$	Causa un abbassamento di V_{\max}^{app} ; può far aumentare o diminuire K_M^{app}

$$^a \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{e} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}.$$



La prolina è un amminoacido con catena laterale apolare, essa è presente nelle proteine nella configurazione L. La transizione da L prolina a D prolina avviene passando attraverso lo stato di transizione. Si ipotizza di avere una molecola stabile con la giusta forma come il pirrolo-2-carbossilato e la do all'enzima: viene bloccato se assomiglia allo stato di transizione. L'inibitore potente agisce anche a concentrazioni bassissime. Gli analoghi dello stato di transizione sono molto potenti.

IL CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

Gli enzimi allosterici hanno una forma ad alta e una a bassa affinità per il substrato. Si legano agli enzimi costituiti da diverse sub-unità inducendo cambiamento conformazionali che alterano l'attività catalitica degli enzimi. Qualunque cosa si leghi in modo covalente all'enzima, gli induce un cambiamento nella forma e nell'attività.

Un enzima può essere fosforilato.

Una delle principali caratteristiche che differenzia i catalizzatori inorganici da quelli organici è la possibilità che hanno le cellule di regolare l'attività degli enzimi. I metodi usati dagli organismi per regolare l'attività degli enzimi sono:

1. Produrre l'enzima solo quando il substrato è presente (comune nei batteri)
2. Enzimi allosterici
3. Inibizione a feedback: il prodotto della via metabolica può indebolire uno degli enzimi di un'altra via metabolica e se necessario bloccare la via.
4. Zimogeni: sono tipici delle proteasi che degradano le proteine. Le proteasi vengono sintetizzate sul citosol, sui ribosomi delle cellule. Se venissero prodotte attive, degraderebbero la cellula quindi vengono prodotti in una forma inattiva chiamata zimogeno che si attiva solo dove la proteina va degradata. Le proteine che degradano le proteine non più utili alla cellula, agiscono in un organello specifico, detto proteosoma: queste proteine vengono sintetizzate in forma inattiva e si attivano una

volta raggiunto il luogo dove devono degradare. L'attivazione consiste nell'eliminazione proteolitica di tratti di catena polipeptidica. Tale eliminazione consente all'enzima di assumere la conformazione finale. L'eliminazione proteolitica di residui amminoacidici è irreversibile per cui una volta attivati, non è più possibile riportare questi enzimi allo stato di zimogeni.

5. Modificazioni della proteina: gruppi covalenti

I meccanismi reversibili sono la modulazione allostérica, le modificazioni covalenti perché sono talmente forti che per indurle o per rimuoverle servono enzimi specifici, l'inibizione a feedback e l'aumento della concentrazione dell'enzima. Quelli irreversibili sono l'attivazione proteolitica degli zimogeni.

Il reversibile può andare in due direzioni, aumentare e diminuire l'attività dell'enzima; l'irreversibile va in un'unica direzione, un enzima disattivo che quando viene attivato rimane tale.

L'attività degli enzimi deve essere modulata: gli enzimi catalizzano tutte le reazioni di una via metabolica. Una reazione che assume un ruolo fondamentale nella via viene definita tappa di comando. L'enzima che catalizza questa reazione ha un ruolo fondamentale nel processo di attivazione o inibizione di tutta la via.

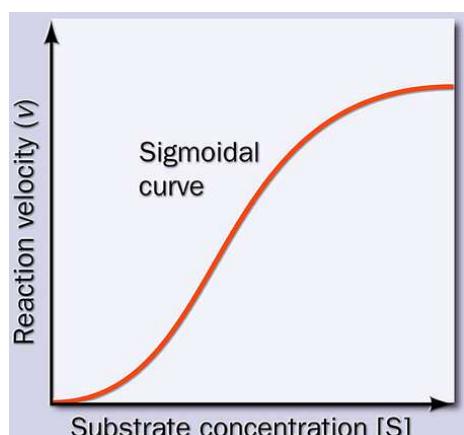
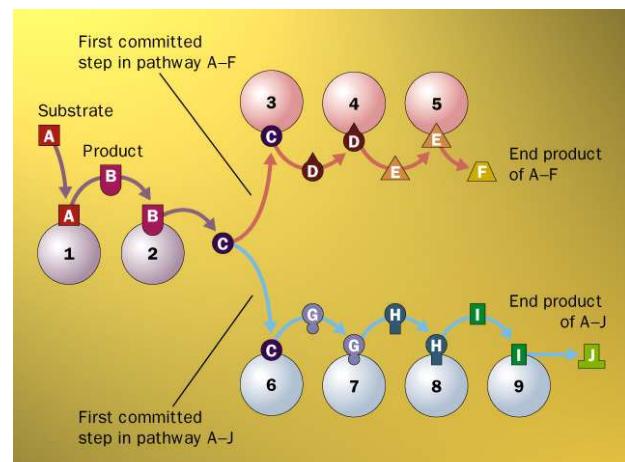
Gli enzimi sono organizzati in vie metaboliche, l'insieme di più reazioni che trasformano il substrato nel prodotto finale. Il prodotto finale della glicolisi è la produzione di due molecole di piruvato partendo dal glucosio. Ogni via metabolica è catalizzata da un enzima e deve essere spontanea, quindi avere un ΔG complessivo negativo.

Per la glicolisi servono 10 reazioni, ognuna è catalizzata da un enzima. La velocità della reazione dipende dagli enzimi presenti ma non tutti hanno la stessa importanza per la velocità complessiva, alcuni sono più importanti di altri e sono detti regolatori: agendo su questi enzimi, si regola la velocità della via stessa. Possono esserci più enzimi regolatori, il più importante è chiamato tappa di comando ed è l'enzima con il ruolo fondamentale.

Le vie metaboliche possono essere lineari se sono formate da un certo numero di reazioni di cui ogni prodotto è il substrato della reazione successiva; o ramificate in cui sono presenti intermedi comuni a più reazioni che poi si differenziano in base al prodotto necessario.

La tappa di comando deve essere su un solo ramo, dopo la ramificazione. È specifica solo per quella via, corrisponde ad una reazione irreversibile ed è posta nella fase iniziale. È catalizzata da un enzima allostérico. Nella glicolisi è la terza reazione.

Un enzima allostérico ha una cinetica sigmoidale.



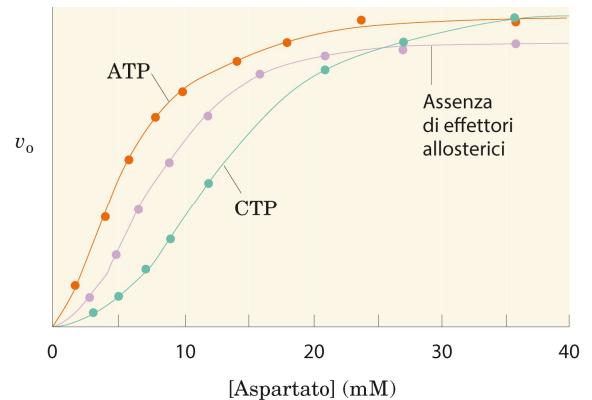
All'inizio la curva è piccola, molto distesa, la velocità è bassa anche se aggiungiamo molto substrato. Successivamente bastano piccole variazioni di substrato per aumentare di molto la velocità dato che l'enzima è passato da una forma meno a una più attiva. Nella forma meno attiva, anche con molto substrato, ne lega poco; nella forma più attiva, anche con poco substrato, la maggiore affinità permette di legare bene il substrato.

Gli enzimi allostérici hanno una curva sigmoidale perché presenti in due stati.

Il modulatore allosterico positivo sposta la curva verso sinistra, trasformando l'andamento in iperbolico. Se è negativa, la curva è spostata verso destra ed è più sigmoide.

Con un modulatore allosterico positivo, l'enzima lavora in velocità massima con la stessa quantità di substrato; con un modulatore negativo, lavora a velocità molto bassa e anche se è presente il substrato, l'enzima lavora poco.

Con un modulatore allosterico positivo, cambia la curva spostandosi verso le ordinate e avendo una concentrazione del substrato pari alla $K_{0.5}$. La velocità corrisponde alla velocità massima/2. Aggiungendo altro modulatore allosterico, la curva si sposta diventando quasi un'iperbole e assumendo una velocità massima con la stessa quantità di substrato.



Con un modulatore negativo, la curva si sposta verso destra: con la stessa quantità di substrato, la velocità è più bassa della velocità massima/2.

L'enzima allosterico si comporta da interruttore nella tappa di comando: attraverso il modulatore positivo si attiva e lavora in velocità massima.

Modificazione delle proteine

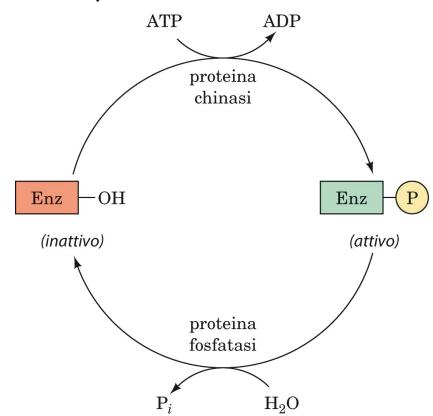
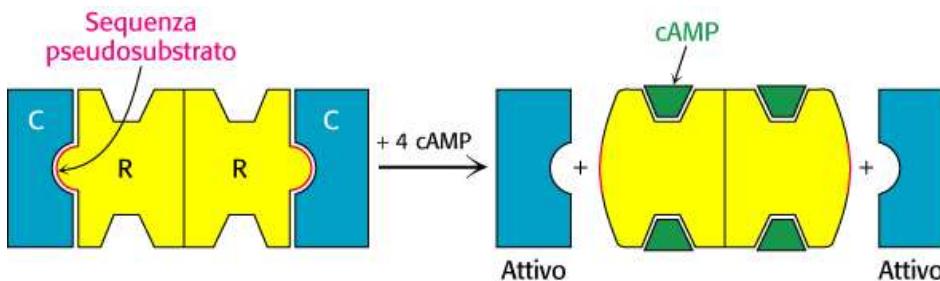
Le proteine possono essere modificate mediante l'aggiunta o la rimozione di gruppi chimici covalentemente legati che possono attivare o inattivare l'enzima. La forma più comune di modifica di una proteina è rappresentata dall'addizione (fosforilazione) o rimozione (defosforilazione) di un gruppo fosforico che può essere legato alla catena laterale di aminoacidi con un -OH libero come: serina, treonina, tirosina. L'enzima cambia forma per l'aggiunta di un gruppo carico diventando più o meno attivo.

Non possiamo dire a priori se la fosforilazione rende l'enzima più o meno attivo perché dipende dall'enzima stesso.

Le **protein chinasi** trasferiscono il gruppo fosforico su altri enzimi.

Le **protein fosfatasi** staccano il gruppo fosfato.

In alcuni casi l'enzima è inattivato dall'associazione con altre subunità proteiche: in questi casi il processo di attivazione consiste nel rilascio dell'enzima attivo in seguito a dissociazione delle subunità inibitorie.



Gli ormoni che controllano il metabolismo sono tre:

- Insulina: aumenta dopo un pasto, serve a metabolizzare lo zucchero. Viene chiamato anche ormone dell'abbondanza
- Glucagone: i suoi livelli sono alti dopo il digiuno
- Adrenalina: ormone del combatti e fuggi

Il fegato è l'unico organo che può sintetizzare il glicogeno.

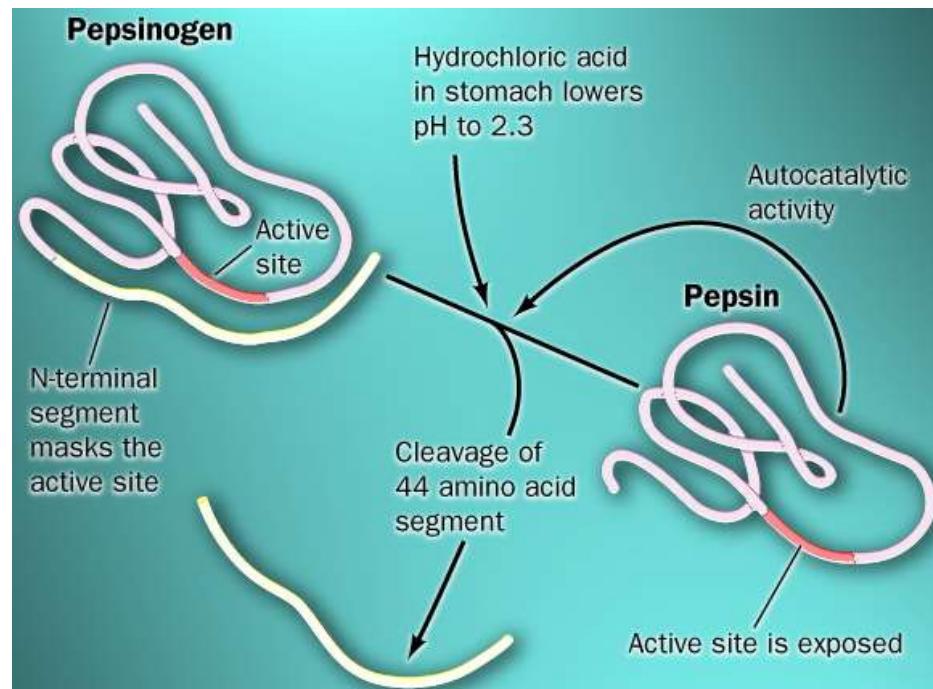
L'adrenalina ha come bersaglio il muscolo: serve energia data tramite la glicolisi per stimolarla. AMP ciclico è stimolato da adrenalina e glucagone. L'AMP ciclico stimola l'attività delle protein chinasi che fosforilano gli enzimi.

L'insulina stimola le protein fosfatasi.

L'attività degli enzimi può essere bloccata da proteine inibitorie: con l'AMP ciclico cambiano forma, si stacca il substrato inibitore e la proteina diventa attiva.

Lo zimogeno è più grande dell'enzima attivo e viene sintetizzato da più amminoacidi.

Il pepsinogeno è inattivo perché nella parte terminale è presente una catena polipeptidica che copre il sito attivo. Il pepsinogeno lavora sulle proteine introdotte dalla dieta. Nello stomaco il pH è acido, la pepsina taglia la catena e viene scoperto il sito attivo permettendo all'enzima di lavorare. Dopo il taglio l'enzima è attivo per il suo tempo di vita.



I MECCANISMI DI CATALISI

Le catene laterali degli amminoacidi in grado di donare o accettare protoni possono prendere parte alle reazioni chimiche come catalizzatori acidi o basici (i residui possono comportarsi da acido o da base).

I gruppi nucleofili possono catalizzare reazioni tramite la formazione di legami covalenti transitori con il substrato.

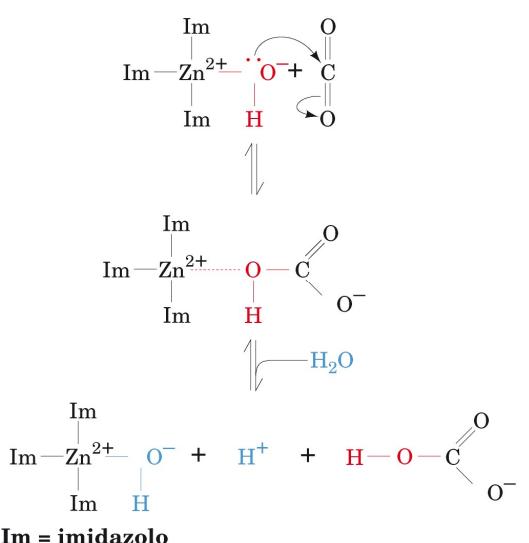
Nella catalisi da ioni metallici, le proprietà elettroniche tipiche dello ione metallico favoriscono la reazione.

Gli ioni metallici sono ioni spostati verso la zona positiva quindi si ha una distorsione della molecola che deve subire catalisi.

Gli enzimi accelerano le reazioni avvicinando i gruppi reagenti e orientandoli correttamente.

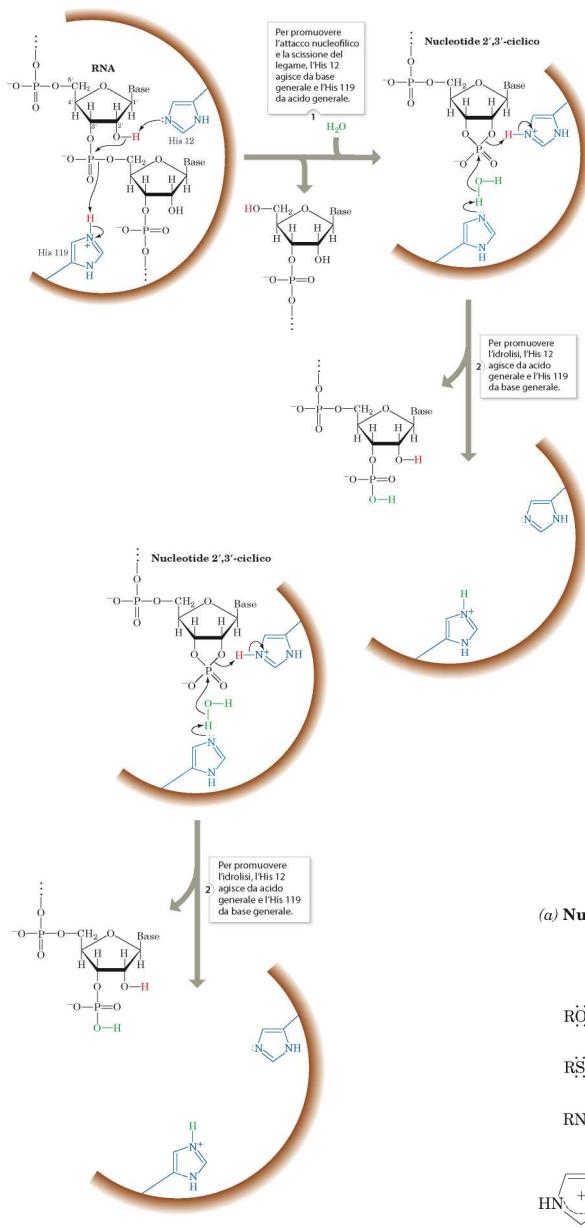
La stabilizzazione dello stato di transizione può diminuire significativamente l'energia di attivazione di una reazione.

Lo zinco polarizza il legame del gruppo OH per trasferirlo sull'anidride carbonica e formare il bicarbonato. Lo zinco nell'anidrasi carbonica deve far reagire il gruppo OH con l'anidride carbonica: reagisce con acqua e il bicarbonato va via perché arrivano altre molecole di acqua. Gli ioni metallici servono a polarizzare dei legami.



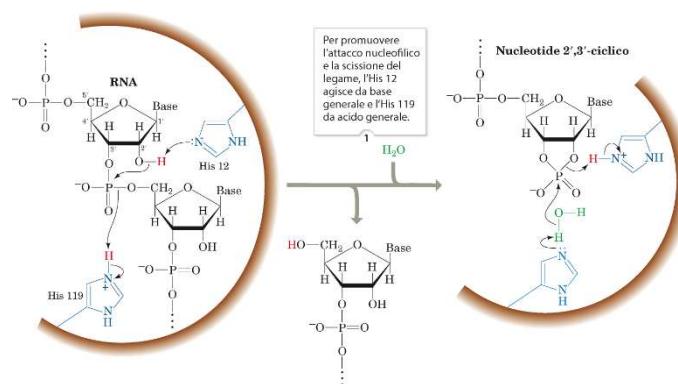
Im = imidazolo

Il meccanismo dell'RNasi A



Meccanismo catalitico a due tappe:

- Il substrato si lega in una tasca a due istidina
- L'istidina 12 si comporta da base e sottrae un protone dal 2'OH dell'RNA (attacco nucleofilo) mentre l'istidina 119 agisce da acido e scinde il legame
- Si forma un intermedio ciclico
- Si scinde il legame 2'-3' dell'intermedio ciclico
- L'istidina 12 si comporta da acido mentre l'istidina 119 agisce da base.
- L'acqua sostituisce il gruppo protonato che esce



Gruppi nucleofili ed elettrofili di rilevanza biologica

(a) Nucleofili

(b) Elettrofili

Forma nucleofila		
$\text{R}\ddot{\text{O}}\text{H}$	\rightleftharpoons	$\text{R}\ddot{\text{O}}^- + \text{H}^+$ Gruppo ossidrilico
$\text{R}\ddot{\text{S}}\text{H}$	\rightleftharpoons	$\text{R}\ddot{\text{S}}^- + \text{H}^+$ Gruppo sulfidrilico
RNH_3^+	\rightleftharpoons	$\text{RNH}_2 + \text{H}^+$ Gruppo amminico
$\text{HN}^+ - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}$	\rightleftharpoons	$\text{HN} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}^- + \text{H}^+$ Gruppo imidazolico
		H^+ Protoni
		M^{n+} Ioni metallici
		$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}'$ Atomo di carbonio carbonilico
		$\text{R}-\text{C}(=\text{N}-\text{H})-\text{R}'$ Immina cationica (base di Schiff)

Le serina proteasi

I residui cataliticamente attivi di serina, istidina e asparagina della serina a sono stati identificati tramite marcatura chimica e analisi strutturale. La tasca di legame determina la specificità del substrato delle diverse serina proteasi. Queste catalizzano l'idrolisi del legame peptidico per effetti di vicinanza e orientamento, catalisi acido-base, covalente, elettrostatica e stabilizzazione del gruppo di transizione. Gli zimogeni sono precursori inattivi degli enzimi.

Le serine proteasi sono una classe di proteasi che basano il loro meccanismo di catalisi sulla presenza della serina, particolarmente reattiva ed essenziale per la loro attività enzimatica. Questi enzimi catalizzano l'idrolisi di legami peptidici tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico presenti all'interno della struttura proteica. Sono enzimi con molteplici attività fra cui: digestione del cibo, contribuzione diretta alla formazione di coaguli, contrasto alle infezioni e facilitazione della fecondazione.

Effetti dell'ambiente

L'ambiente che circonda un enzima può avere un effetto diretto sulla funzione dell'enzima. Gli enzimi lavorano meglio in particolari intervalli di pH. A valori estremi di pH possono denaturarsi, perdendo l'attività catalitica.

Effetto della temperatura

Ad ogni enzima è associata una temperatura ottimale che permette all'enzima di funzionare al massimo. La velocità di una reazione non catalizzata aumenta proporzionalmente all'aumentare della temperatura. Quella ottimale è di solito la temperatura a cui si trova normalmente l'enzima (37° C circa per gli organismi animali). Il calore eccessivo denatura l'enzima.

IL METABOLISMO

È l'insieme di reazioni che avvengono nella cellula. Con reazioni si intendono degradazione di nutrienti (catabolismo) e biosintesi (anabolismo).

È la somma di modificazioni chimiche che trasformano i nutrienti in energia e nelle molecole complesse prodotte nelle cellule.

Con vie cataboliche intendiamo una serie di reazioni, come trasformare un reagente iniziale in un prodotto finale, catalizzate sempre da un enzima. La via è localizzata in un compartimento cellulare.

Le vie opposte, come degradazione e sintesi, non possono essere l'una l'inversa dell'altra perché sono regolate diversamente e non avvengono insieme.

Il flusso del materiale attraverso una via metabolica varia in funzione delle attività degli enzimi che catalizzano le reazioni irreversibili.

Gli enzimi che controllano il flusso delle vie metaboliche sono regolati con meccanismi di tipo allosterico, modificazioni covalenti, cicli del substrato e variazione dell'espressione genica.

Gli enzimi hanno bisogno di cofattori, sostanze non amminoacidiche che derivano da vitamine. L'organismo animale dipende dall'introduzione di questi composti tramite alimentazione.

TABELLA 14.2 I principali minerali essenziali e gli elementi presenti in tracce (oligoelementi)

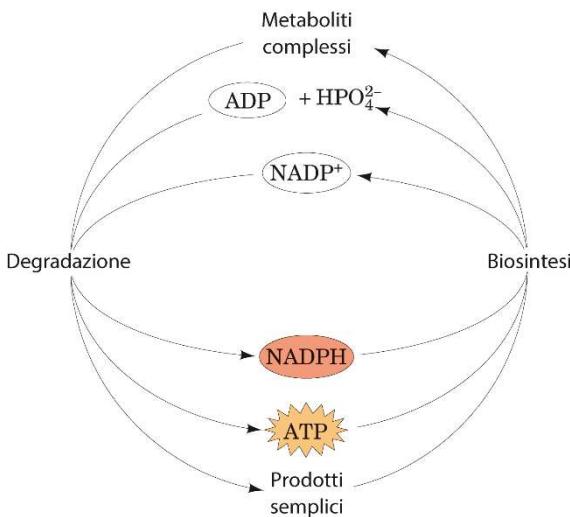
Principali minerali essenziali ed elementi presenti in traccia

Minerali principali	Elementi in tracce (oligoelementi)
Sodio	Ferro
Potassio	Rame
Cloro	Zinco
Calcio	Selenio
Fosforo	Iodio
Magnesio	Cromo
Zolfo	Fluoro

sali

I substrati sono trasformati in prodotti passando attraverso intermedi specifici, alcuni comuni a più vie metaboliche.

Gli autotrofi usano anidride carbonica e sono anche fototrofi perché usano la luce; gli eterotrofi usano il carbonio organico; i chemiotrofi usano glucosio o in generale, prendono energia da nutrienti.



Il metabolismo si divide in catabolismo, ovvero le vie degradative che servono per la produzione di energia, ed anabolismo, cioè le vie biosintetiche che richiedono energia.

Le vie degradative e quelle biosintetiche sono in relazione fra di loro

Conserviamo energia in ATP e in nucleotidi ridotti.

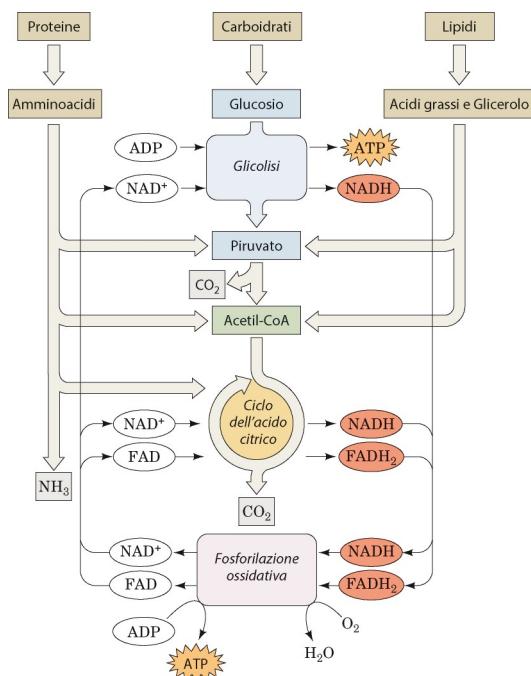
Gli enzimi della glicolisi agiscono nel citosol delle cellule.

Gli enzimi possono essere liberi oppure formare un complesso multienzimatico, dato dalle vie dove gli enzimi si uniscono. Oppure possono costituire un sistema legato ad una membrana.

Da substrato a prodotto finale, il substrato deve passare per enzimi: si parla di canalizzazione di substrati fra enzimi della via. I substrati non si perdono aumentando la velocità con cui diventano prodotti.

Le vie cataboliche convergono su pochi prodotti finali; le vie anaboliche divergono da intermedi comuni per sintetizzare molte biomolecole. Alcune vie servono sia per catabolismo che per anabolismo e sono chiamate vie anfiboliche. Ad esempio, il ciclo dell'acido citrico (ciclo di Krebs) è fase del catabolismo di carboidrati, acidi grassi e amminoacidi.

Panoramica del catabolismo



La degradazione di amminoacidi libera ammoniaca.

Le vie cataboliche producono ATP e NADH per le vie biosintetiche.

Le vie cataboliche e anaboliche non sono l'una l'inverso dell'altra anche se possono avere alcune tappe in comune, altre devono essere diverse per assicurare che siano spontanee: il ΔG deve essere sempre negativo, quello della via al rovescio sarebbe positivo e non la renderebbe spontanea. Si creerebbe un ciclo futile, senza una produzione netta. Le vie metaboliche opposte devono essere entrambe termodinamicamente favorevoli, solo così gli effettori allosterici possono controllare la direzione effettiva.

Quando una via è attiva, l'altra deve essere bloccata.

Avranno una diversa tappa di comando.

Dalla glicolisi al piruvato il ΔG è negativo, dal piruvato alla

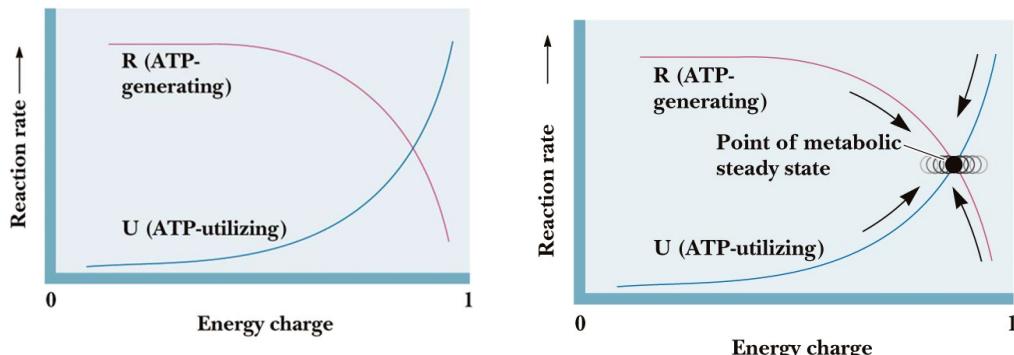
glicolisi il ΔG è negativo.

L'energia viene presa dall'ATP ed è quanta ATP si prende che fa sì che il ΔG sia negativo.

Nella gluconeogenesi si consuma più ATP di quanta ne è prodotta.

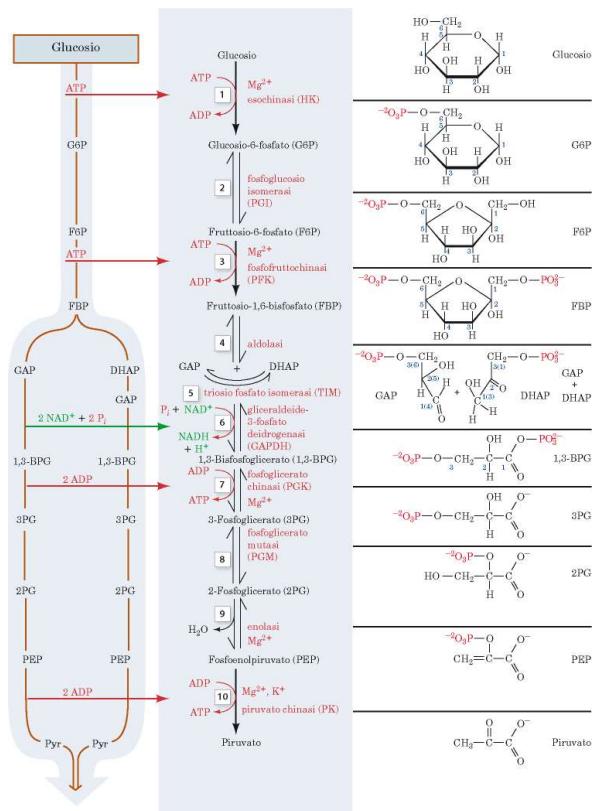
Con carica energetica intendiamo quanta ATP è presente nella cellula. L'ATP vale il doppio dell'ADP. Se la cellula ha solo ATP il rapporto è 1; se non c'è ATP il rapporto tende a 0. Non ci sarà mai una condizione di 100% ATP o 0% in quanto alcune reazioni producono ATP, altre la consumano. La carica dell'energia è mantenuta costante fra 0.85 e 0.88.

$$\text{Energy charge} = \frac{1}{2} \left(\frac{2[\text{ATP}] + [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \right)$$



IL METABOLISMO DEL GLUCOSIO: LA GLICOLISI

Gli zuccheri sono fonte di energia ma anche la base per strutture come chitina, cellulosa, ossa, cartilagine. Gli zuccheri sono coinvolti nel riconoscimento tra cellule e sono anche le basi strutturali degli acidi nucleici. L'amido e il glicogeno sono usati come riserve di energia.



La glicolisi è la via catabolica del glucosio che viene degradato per dare due molecole di piruvato quindi si spezza il composto a sei atomi di carbonio in due composti da tre.

In questo caso è usata energia per sintetizzare ATP: viene consumata energia nella prima fase composta dalle prime cinque reazioni mentre viene prodotta nella seconda fase, quindi nelle restanti cinque. L'energia prodotta è maggiore di quella consumata. Se la molecola è simmetrica è facile da spezzare a metà: le prime reazioni servono a renderla simmetrica. In alcune reazioni c'è una sola freccia (nella prima, terza e decima) perché sono irreversibili.

Nella prima e nella terza reazione si consumano due molecole di ATP mentre nella settima e nella decima vengono prodotte ma essendo reazioni doppie, si producono 4 molecole. Il guadagno netto è di due molecole.

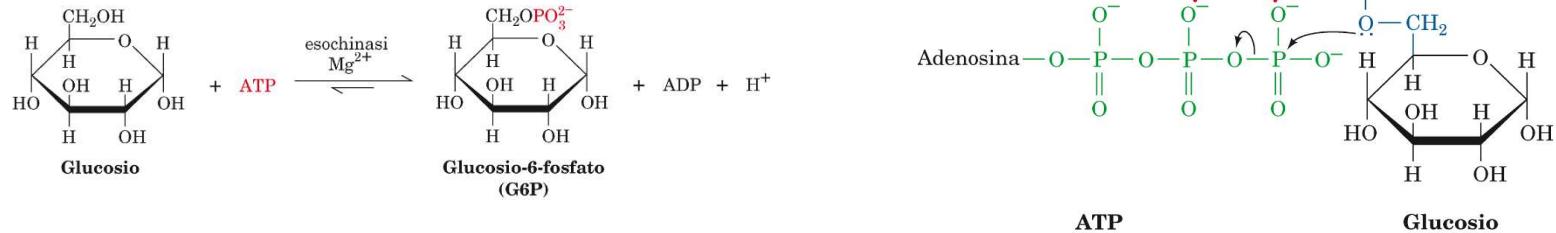
Tutte le cellule possono fare glicolisi e gli enzimi si trovano nel citosol. Il glucosio entra nelle cellule attraverso la membrana: si ha un trasporto facilitato passivo contro gradiente attraverso delle proteine chiamate glut. Il glucosio nella cellula può andare in glicolisi. Il glucosio entra nella cellula secondo la concentrazione: si arriva poi all'equilibrio fra il glucosio nella cellula e quello fuori ma se quello presente all'interno diventa glucosio 6 fosfato, non è più glucosio che può essere accumulato e quindi viene spostato l'equilibrio.

Avviene in 10 reazioni.

1. **Fosforilazione:** si aggiunge un fosfato sul carbonio 6. È una reazione di regolazione della via, è **irreversibile** in quanto il **glucosio 6 fosfato** può essere usato anche per altre vie metaboliche. La reazione catalizzata dall'**esochinasi** consiste nell'**attacco nucleofilo** dell'ossigeno del gruppo OH legato al carbonio 6 del glucosio sul fosforo terminale dell'ATP. L'ATP si lega all'enzima sottoforma di complesso con lo ione **Mg²⁺**.

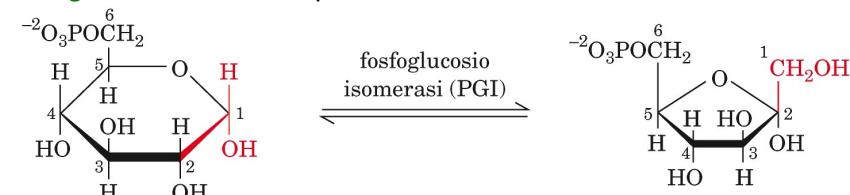
È una reazione **esoergonica** e fortemente **spontanea** in cui serve anche il magnesio per stabilizzare le molecole, favorendo in questo modo il trasferimento del fosfato. La fosforilazione serve ad aumentare l'energia del glucosio in quanto il glucosio 6 fosfato ha più energia del glucosio: il ΔG deve essere negativo quindi se aumenta l'energia del substrato, aumenta anche il ΔG negativo e la reazione è più spontanea. Uno dei due legami fosforo-anidridici dell'ATP si rompe per formare un estere del fosfato (il glucosio 6 fosfato) che ha un ΔG di idrolisi inferiore.

Non è vantaggioso che il glucosio esca dalla molecola: il fosfato impedisce che possa uscire inserendo cariche negative che non possono attraversare la membrana.

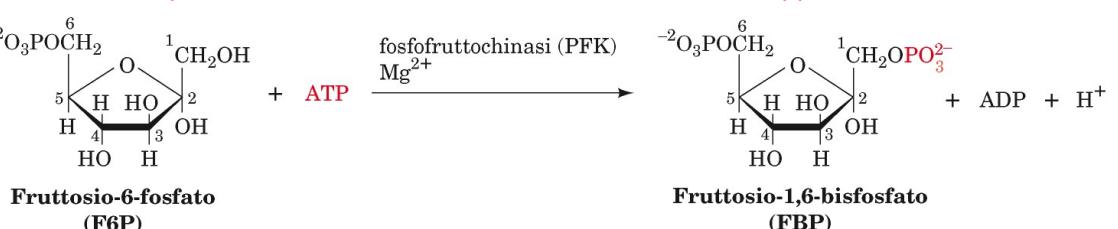


Si ha un cambio conformazionale sull'esochinasi indotto dal substrato.

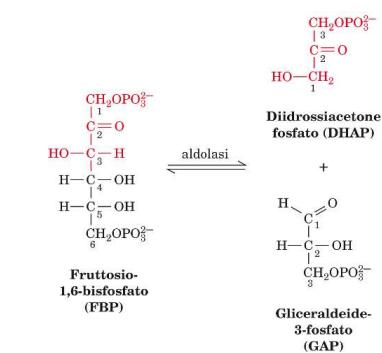
2. **Isomerizzazione** da aldoesoso a chetoso: il glucosio viene trasformato in fruttosio 6 fosfato da **fosfoglucosio isomerasi** e può essere **fosforilata** la funzione alcolica sul primo carbonio.



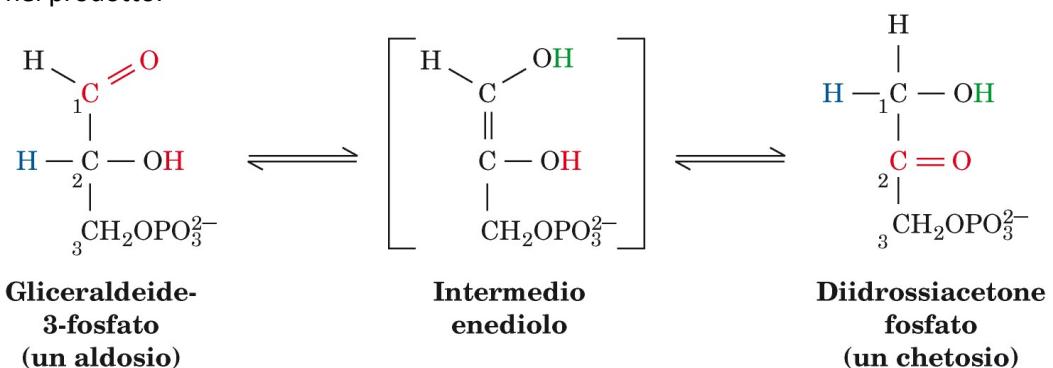
3. L'enzima **fosfofruttochinasi** usa la seconda molecola di ATP: **trasferisce** un gruppo **fosfato** dell'ATP a una molecola e si occupa della **fosforilazione** sulla funzione alcolica del carbonio uno. La reazione è **irreversibile**, fortemente **spontanea** e si forma **fruttosio 1,6-bifosfato**. È la **tappa di comando** della glicolisi.



4. L'**aldolasi** converte il FBP in forma aperta a 6 atomi di carbonio in **diidrossiacetone fosfato** (chetoso) e **gliceraldeide 3 fosfato** (aldoso), due molecole a 3 atomi di carbonio. L'aldolasi **taglia** fra il carbonio 3 e il carbonio 4. La glicolisi continua solo sulla gliceraldeide.

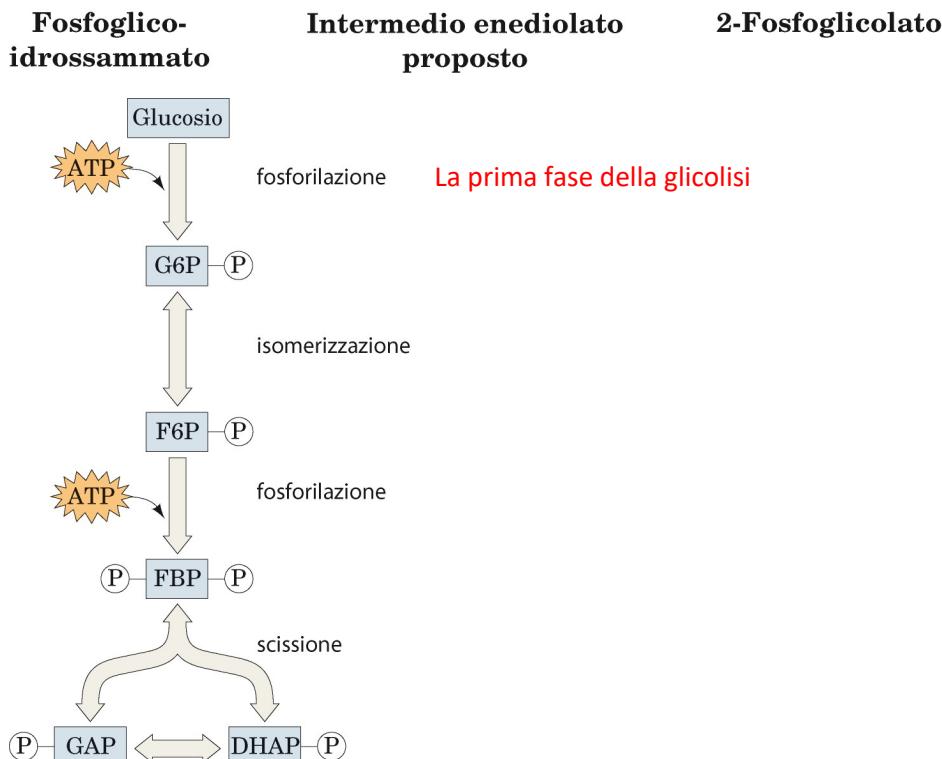
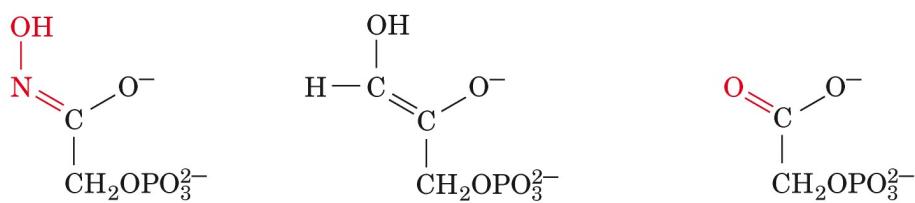


5. La **trioso fosfato isomerasi** catalizza la reazione. Viene **trasformato** in maniera **reversibile** il diidrossiacetone in gliceraldeide avendo alla fine **due molecole di gliceraldeide trifosfato**. Questa conversione coinvolge un meccanismo di **catalisi acido/base** e procede passando attraverso la formazione di un **intermedio enediolo**. Nel sito attivo di questo enzimi sono presenti un residuo di acido glutammico e uno di istidina in grado di prelevare e donare un protone durante la catalisi. La velocità di formazione del prodotto è rapida quanto la reazione molecolare fra l'enzima e il substrato: tutte le volte che un enzima incontra una molecola di substrato questa viene trasformata nel prodotto.



FINE PRIMA FASE

Sono stati usati degli analoghi per vedere se l'enzima della quinta reazione fosse quello giusto. Gli analoghi sono simili allo stato di transizione e lo bloccano.



6. È l'unica reazione di **ossidazione** della glicolisi catalizzata da una **deidrogenasi** in cui viene ossidato il carbonio 1 e poi **fosforilato**. La gliceraldeide 3 fosfato (un'aldeide) diventa **1,3-bisfosfoglicerato**, un composto ad **alta energia** (un acido) (quindi abbiamo due molecole). Il fosfato sul carbonio 1 deriva da un fosfato inorganico perché l'ossidazione è una reazione esoergonica che libera energia quindi usiamo l'energia di ossidazione per legare un fosfato inorganico.

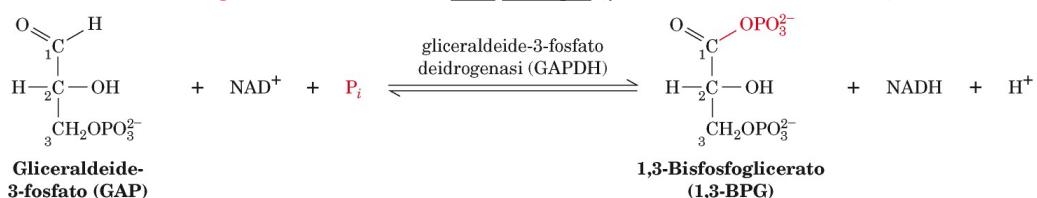
Con l'ossidazione **si libera molta energia** usata per legare il fosfato, quindi, non serve consumare ATP.

Il NAD⁺ si riduce in NADH (abbiamo due molecole).

1,3-bisfosfoglicerato è un composto ad alta energia che può essere usato per fare ATP.

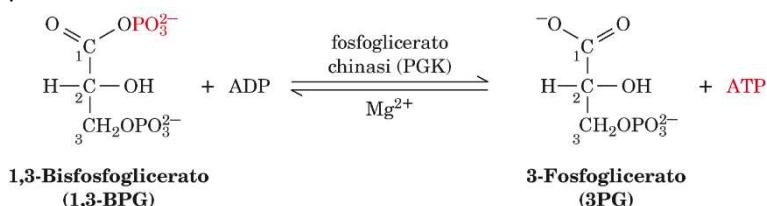
È diverso il legame del fosfato 1 rispetto a quello in posizione 3.

Un alcol + un acido forma un **estere** che è a **bassa energia** (presente sul carbonio 3); un acido + un acido forma un **legame anidridico** ad **alta energia** (presente sul carbonio 1).

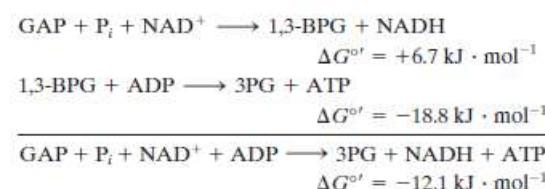


7. La **fosfoglicerato chinasi** produce la prima molecola di ATP.

Il fosfato sul carbonio 1 del BPG viene trasferito su una molecola di ADP che diventa ATP e la formazione di **3 fosfoglicerato**. È una reazione **reversibile** in cui abbiamo due unità di BPG che producono due molecole di ATP.



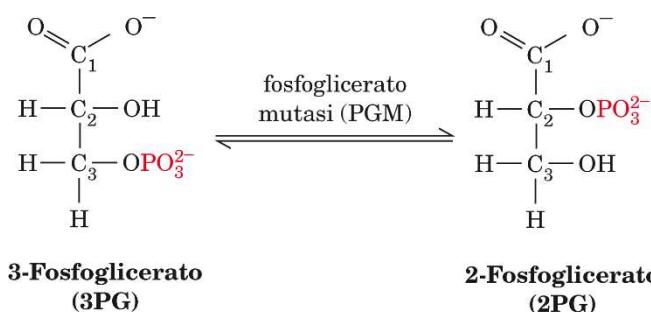
Nelle reazioni di **fosforilazione a livello del substrato**, la produzione di ATP avviene a spese del BPG: il substrato fosforilato ha un'energia più alta quindi il fosfato passa sull'ADP. Nella fosforilazione ossidativa, che avviene nei mitocondri, serve ossigeno. Nella glicolisi abbiamo due reazioni di fosforilazione a livello del substrato.



Variazioni energetiche complessive della reazione 6 e 7 della glicolisi.

La reazione sei e la reazione sette si compensano.

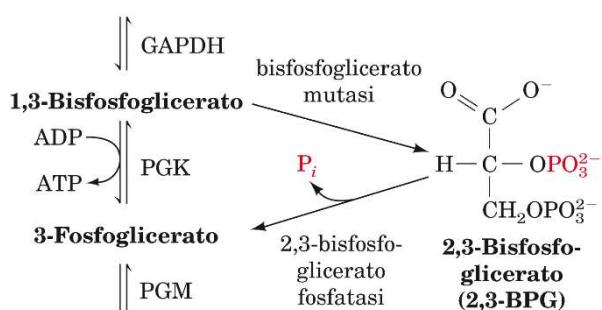
8. La **fosfoglicerato mutasi** riarrangia il 3-fosfoglicerato (che ha un solo fosfato in posizione 3) spostando il fosfato dalla posizione 3 alla due, ottenendo in questo modo il **2-fosfoglicerato** per preparare il **fosfoenolpiruvato**. Anche questa è una reazione **reversibile**, necessaria per la successiva reazione che genererà un composto ad alta energia usato per la sintesi di ATP.



Nel sito attivo dell'enzima è presente un gruppo fosforico che viene ceduto al composto con formazione di un intermedio bifosfato, il **2,3-bisfosfoglicerato** che **rifosforilerà** l'enzima con formazione del **3-fosfoglicerato**. Occasionalmente l'intermedio potrà dissociarsi dall'enzima lasciandolo defosforilato e inattivo. Il 2,3-bisfosfoglicerato si può ottenere da intermedi della glicolisi ed è anche un modulatore allosterico dell'emoglobina. L'1,3-bisfosfoglicerato può essere trasformato in 2,3-bisfosfoglicerato che, a sua volta, può essere trasformato in 3 fosfato. Se viene portato via, si ha meno glicolisi.

Se l'esochinasi non funziona bene, si forma poco 2,3-bisfosfoglicerato e aumenta l'affinità dell'emoglobina con l'ossigeno. Un difetto nella piruvato chinasi porta ad un accumulo di intermedi e di 2,3-bisfosfoglicerato causando una diminuzione della sua affinità con l'emoglobina.

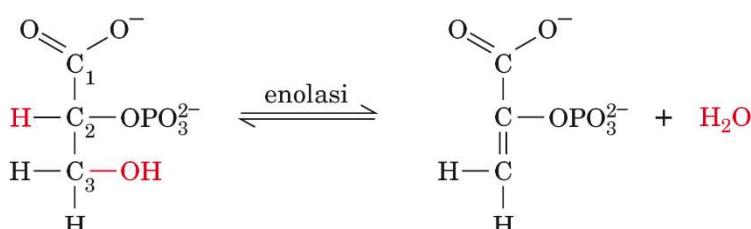
Gliceraldeide-3-fosfato



il 2,3-bisfosfoglicerato influenza la capacità di trasportare l'ossigeno negli eritrociti.

2-Fosfoglicerato

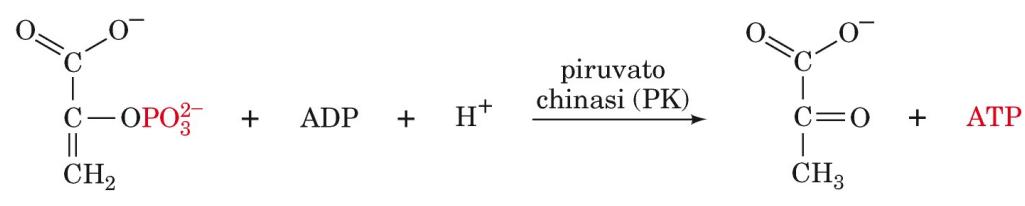
- Disidratazione:** l'**enolasi** forma il secondo intermedio ad alta energia: viene liberato un H^+ in posizione 2 e un OH^- in posizione 3 (viene liberata una molecola d'acqua) dal 2-fosfoglicerato (quindi viene tagliata una molecola di acqua) e si instaura un **doppio legame** fra i carboni dando il **fosfoenolpiruvato**, un composto fosforilato ad alta energia che verrà usato per fare ATP.



2-Fosfoglicerato (2PG)

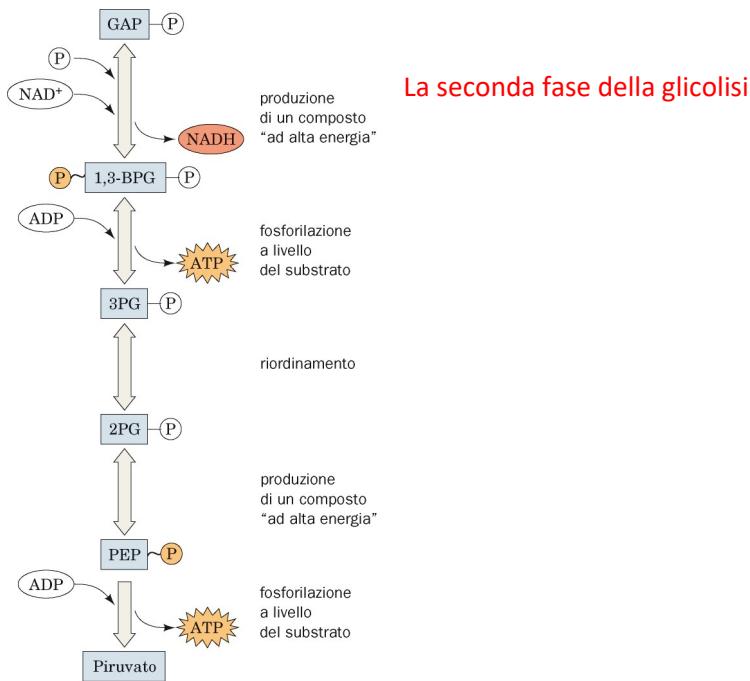
Fosfoenolpiruvato (PEP)

- La **piruvato chinasi** produce la seconda molecola di ATP: è un **enzima regolatore** che controlla la velocità della glicolisi. Il gruppo fosforico del fosfoenolpiruvato viene utilizzato per la sintesi di ATP: viene trasferito il suo gruppo fosforico su una molecola di ADP formando piruvato e ATP. Si producono due molecole di ATP ed è in questa reazione che si ha la **seconda fosforilazione a livello del substrato**.



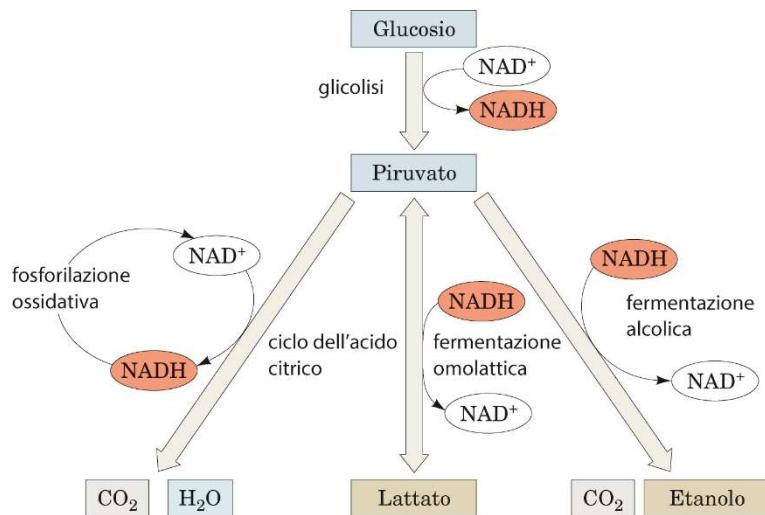
Fosfoenolpiruvato (PEP)

Piruvato



Le tre reazioni irreversibili vengono catalizzate da enzimi allosterici ma la tappa di comando è la terza perché il prodotto può essere usato solo in glicolisi.

Destino metabolico del piruvato

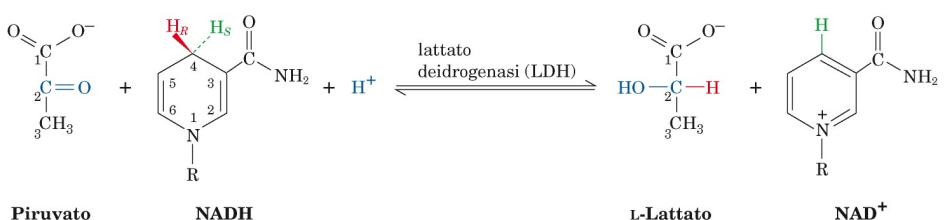


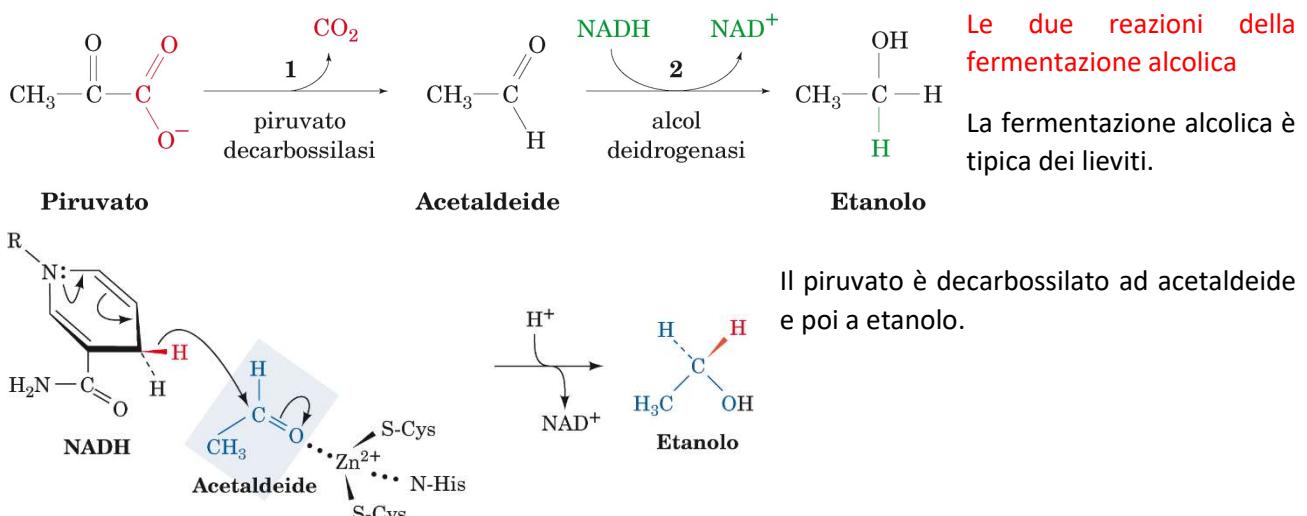
Se è presente ossigeno, il piruvato può essere degradato nei mitocondri ad anidride carbonica e acqua, liberando molta energia ed entrando così nel ciclo dell'acido citrico. Senza ossigeno si può avere **fermentazione lattica o alcolica**. La fermentazione serve a **rigenerare NAD⁺** consumato nella sesta reazione della glicolisi (diventando NADH). La fermentazione è **lattica** quando viene ridotto ad **acido lattico** e il NADH si ossida in NAD⁺; **alcolica** quando prima viene **decarbossilato** ad **acetaleide** e poi **ridotto** a **etanolo**. NADH si ossida diventando

NAD⁺. Se tutto il NAD⁺ diventa NADH, la glicolisi si ferma alla sesta reazione per l'assenza del NAD⁺ stesso. Un muscolo sotto sforzo produce molto acido lattico consumando rapidamente ATP per produrre glicolisi andando in carenza di ossigeno e facendo fermentazione. Il piruvato può essere trasformato in acido lattico per far contrarre il muscolo e far andare avanti la glicolisi. Senza ossigeno serve un'altra via per la rigenerazione del NAD⁺ per permettere alla glicolisi di continuare anche in assenza di ossigeno.

La glicolisi è l'unica via metabolica che produce ATP anche senza ossigeno.

Fermentazione omolattica





Valori di energia libera standard e reali delle reazioni glicolitiche

TABELLA 15.1 Valori di ΔG° e ΔG per le reazioni della glicolisi nel muscolo cardiaco^a

Reazione	Enzima	ΔG° (kJ · mol ⁻¹)	ΔG (kJ · mol ⁻¹)
1	Esochinasi	-20,9	-27,2
2	PGI	+2,2	-1,4
3	PFK	-17,2	-25,9
4	Aldolasì	+22,8	-5,9
5	TIM	+7,9	~0
6 + 7	GAPDH + PGK	-16,7	-1,1
8	PGM	+4,7	-0,6
9	Enolasi	-3,2	-2,4
10	PK	-23,0	-13,9

^aValori calcolati dai dati di Newsholme, E.A. e Start, C. (1973). *Regulation in Metabolism*. Wiley, p. 97

Diagramma delle variazioni di energia libera

Le tre reazioni irreversibili sono quelle con maggiore salto di energia.

Composti implicati nella regolazione della glicolisi

Table 17-2 Some Effectors of the Nonequilibrium Enzymes of Glycolysis

Enzyme	Inhibitors	Activators ^a
HK	G6P	—
PFK	ATP, citrate, PEP	ADP, AMP, cAMP, FBP, F2,6P, F6P, NH ₄ ⁺ , P _i
PK (muscle)	ATP	AMP, PEP, FBP

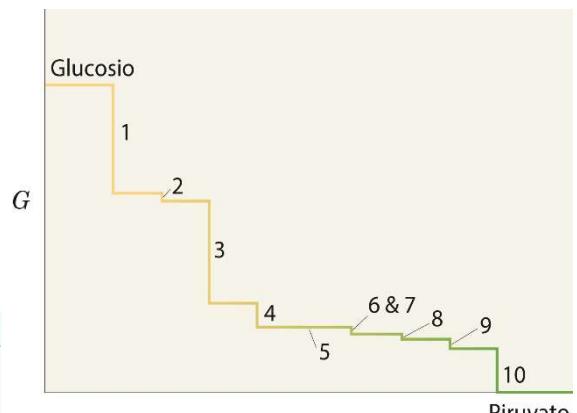
^aThe activators for PFK are better described as deinhibitors of ATP because they reverse the effect of inhibitory concentrations of ATP.

L'esochinasi è **inibita** da glucosio 6 fosfato se si accumula; la **fosfofruttochinasi** ha diversi inibitori e attivatori e, come anche la **piruvato chinasi**, ha come modulatori ATP, ADP, AMP (che possono essere attivatori o inibitori): se c'è molta ATP, non serve far andare velocemente la glicolisi comportandosi come modulatore allosterico negativo. Se sono molto presenti ADP e AMP serve energia che viene ottenuta stimolando la glicolisi. Quindi si tratta di modulatori positivi che attivano la glicolisi.

Il citrato indica un'alta carica di energia e si forma nei mitocondri. Se il ciclo dell'acido citrico funziona, i livelli dell'acido sono bassi. Se c'è molta energia, il ciclo rallenta e aumenta il citrato che può anche uscire dal mitocondrio. Non serve in questo caso fare glicolisi.

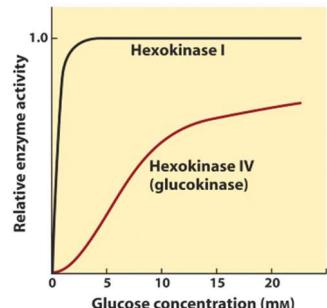
Il **fruttosio 2,6 bifosfato** è un modulatore **positivo** della glicolisi: **aumenta** l'attività della **fosfofruttochinasi** se è molto presente. Se i livelli sono bassi, la glicolisi va piano e l'enzima ha bisogno di molto più substrato.

I ΔG nella cellula sono tutti negativi, alcuni ΔG° sono positivi. I prodotti delle reazioni sono i substrati delle reazioni successive: portare via dall'equilibrio qualcosa vuol dire spostare l'equilibrio stesso e rendere la reazione più spontanea.

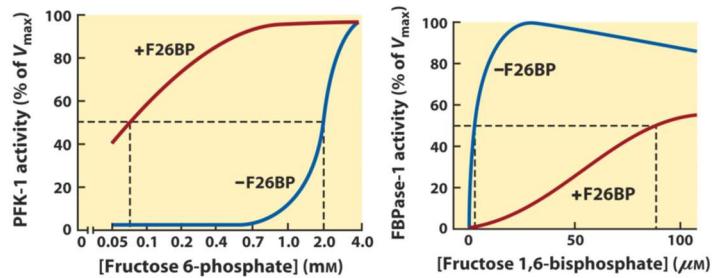


L'esochinasi 4 (chiamata anche **glucochinasi**) svolge lo stesso lavoro dell'esochinasi ma è più specifica per il glucosio. L'esochinasi 1 lavora sul muscolo, l'esochinasi 4 agisce sul **fegato**.

ISOENZIMI: due enzimi diversi che fanno lo stesso lavoro. Hanno un'affinità diversa con il glucosio. La glucochinasi si trova nel fegato che regola la glicemia prendendo glucosio dal circolo quando è molto in giro. La glucochinasi lavora poco, attorno al 4-5 mm.

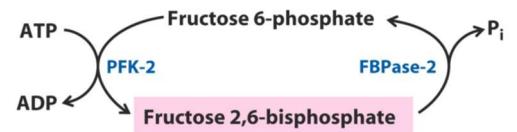
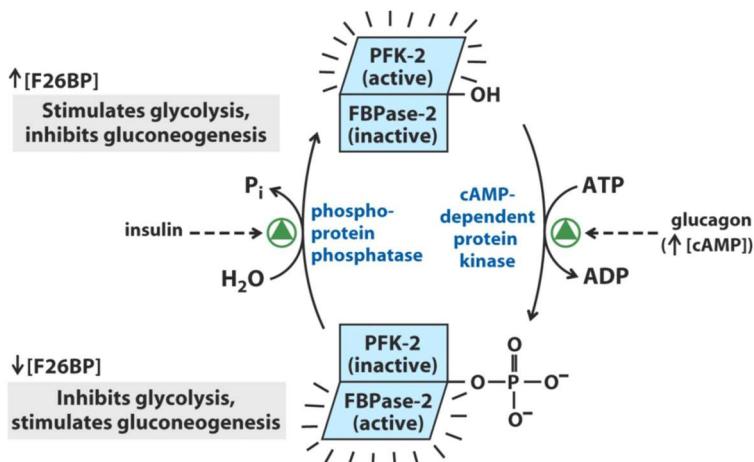


Dal **fruttosio 6 fosfato** deriva il **fruttosio 2,6 bisfosfato** dovuto alla **fosfofruttochinasi 2**. Il fruttosio 2,6 bisfosfato è degradato dalla **fruttosiofotofatasi 2**. Quest'ultima e la fosfofruttochinasi regolano i livelli di fruttosio 2,6 bisfosfato: si tratta di due attività enzimatiche sulla stessa proteina quindi di un **enzima bifunzionale o tandem**, che può funzionare come **chinasi** o come **fosfatasi**. La concentrazione dell'una o dell'altra dipende dal **bilancio** fra la **velocità di formazione** e quella di **demolizione**. L'enzima deve essere regolato per dire quando funzionare come chinasi o come fosfatasi. Può essere regolato anche dalla fosforilazione quindi attivando una delle due attività: se è presente OH vuol dire che c'è un amminoacido che può essere fosforilato. F26BP non è un intermedio della glicolisi ma un modulatore il cui livello intracellulare è regolato dalla presenza di ormoni come il glucagone che viene a sua volta secreto quando i livelli di glucosio sono bassi. Le due attività enzimatiche della proteina bifunzionale sono controllate nel fegato da glucagone e insulina.



PFK-1 è inattiva se è assente F2,6BP

FBPasi-1 è attiva se assente F2,6BP



La gluconeogenesi è presente solo nel fegato (anche nel rene ma ne fa poco). Nel muscolo può essere attiva ma non porta a gluconeogenesi. Il fegato deve stimolare la glicolisi quando c'è molto glucosio. Gli ormoni del metabolismo sono il glucagone, che indica poco glucosio e attiva la gluconeogenesi, e l'insulina, che dice che c'è molto glucosio e attiva la glicolisi.

Con il **glucagone** abbiamo **alti livelli di AMP ciclico** in quanto attiva la via di segnalazione che passa per l'AMP ciclico e **attiva** le **protein chinasi**, enzimi che trasferiscono un gruppo fosforico dall'ATP ad un'altra molecola. Viene **fosforilato** l'enzima tandem e viene **attivata** la **fruttosiofotofatasi 2**: viene degradato il fruttosio 2,6 bisfosfato che diminuisce e fa diminuire anche la glicolisi. Viene stimolata la gluconeogenesi.

L'**insulina** stimola le **protein fosfatasi** e l'enzima viene **defosforilato** diventando attivo come **chinasi**: il fruttosio 6 fosfato diventa **fruttosio 2,6 bifosfato**, si ha un aumento di glicolisi e viene inibita la gluconeogenesi.

Le protein chinasi sono stimolate da AMP ciclico. La proteina fosforilata è meno attiva (dipende dalla proteina ma in questo caso un'attività è inibita e l'altra è favorita). La **protein chinasi fosforila** l'**enzima bifunzionale** che diventa **attivo** come **fosfatasi inibendo** la **glicolisi**. Il glucagone diminuisce e **aumenta** l'**insulina** che attiva la **protein fosfatasi**. Senza fosfato è attiva l'attività chinasi, aumenta il fruttosio 2,6 bisfosfato e quindi si ha gluconeogenesi.

Nel muscolo abbiamo **adrenalina** che attiva la **protein chinasi** e che deve **stimolare** la **glicolisi**. Ha la stessa via di segnalazione del glucagone. Se l'enzima bifunzionale è fosforilato è attivo come chinasi, quindi, aumentano i livelli di fruttosio e si ha un aumento di glicolisi.

L'adrenalina **aumenta** l'attività dell'enzima tandem nel muscolo dove **aumenta** il **fruttosio 2,6 fosfato** facendo **aumentare** la **glicolisi**.

Il glucagone ha come bersaglio il fegato, l'adrenalina i muscoli.

Gli esosi fruttosio, galattosio e mannosio sono convertiti in intermedi glicolitici per essere metabolizzati ulteriormente.

Ingresso di altri esosi nella glicolisi

Il fruttosio è un dolcificante con potere maggiore rispetto al glucosio: l'**esochinasi** trasforma il fruttosio in **fruttosio 6 fosfato**. Nell'egato è presente **glucochinasi**: la **fruttochinasi** trasforma in **fruttosio 1 fosfato** che non è un intermedio della glicolisi.

Nel fegato è presente anche aldolasi (aldolasi B, un isoenzima) che può usare il fruttosio 1-fosfato tagliandolo in gliceraldeide e diidrossiacetone fosfato. La gliceraldeide può diventare glicerolo o gliceraldeide-3-fosfato passando per una via più lunga.

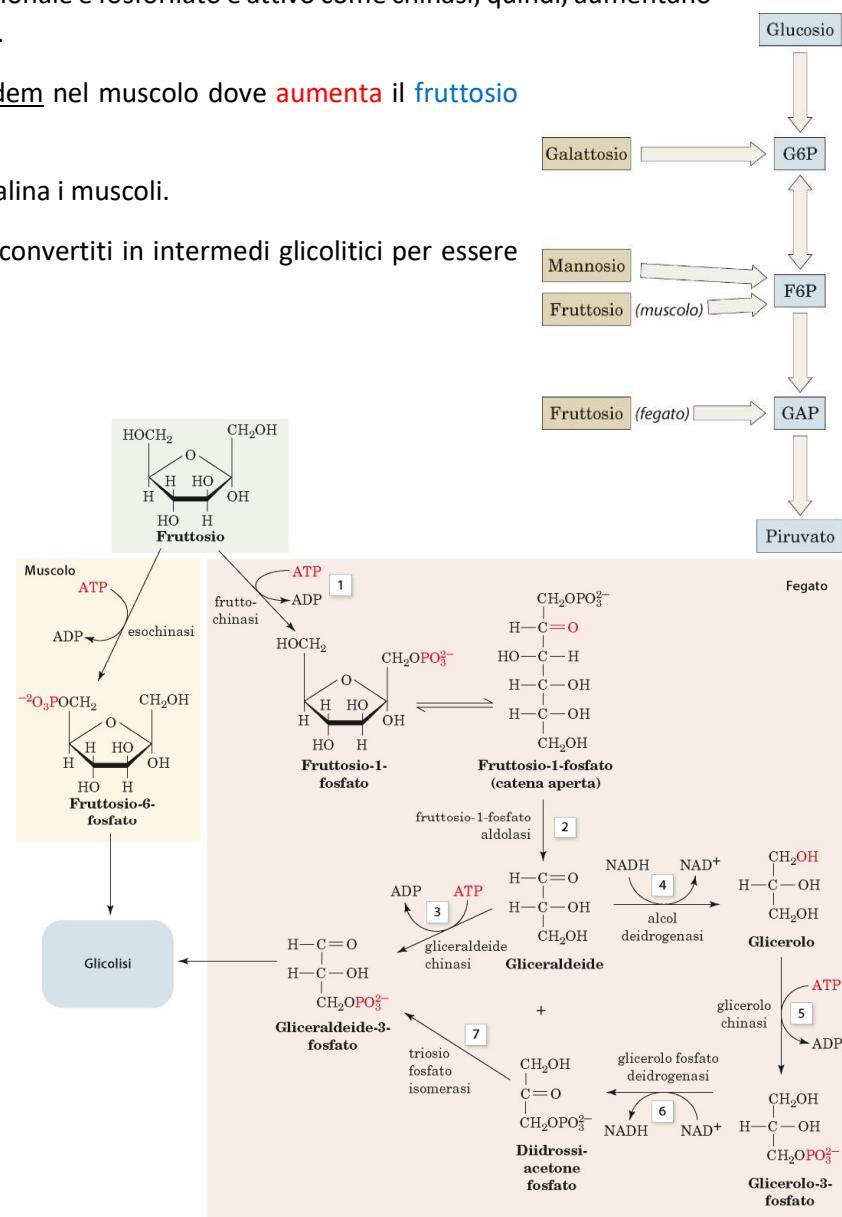
I prodotti entrano nella glicolisi dopo la tappa di comando, nella sesta reazione, andando avanti anche se c'è molta ATP, si accumula piruvato che può essere trasformata in acetil CoA che può essere accumulato in acidi grassi e portare all'obesità.

Alcuni hanno una carenza di aldolasi B con un problema di accumulo di fruttosio 1 fosfato autoregolandosi e sviluppando avversione verso saperi dolci.

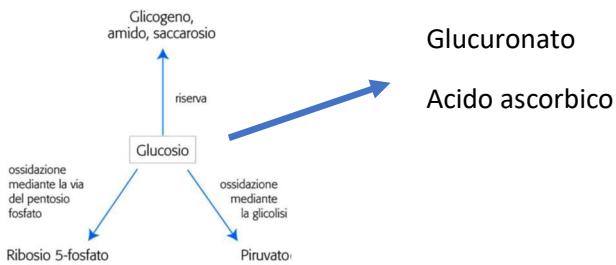
VIA DEL PENTOSO FOSFATO

È costituita da tre fasi in cui viene prodotto NADPH, i pentosi vengono isomerizzati e gli intermedi glicolitici sono recuperati. Questa via fornisce **NADPH** per le **biosintesi riduttive** e **ribosio-5-fosfato** per la **biosintesi dei nucleotidi** nella quantità richiesta dalla cellula. Il NADPH è un donatore di elettroni e il catabolismo ha bisogno di donatori (l'anabolismo di accettori).

La via del pentoso fosfato è una via metabolica per il **metabolismo ossidativo del glucosio** alternativa alla glicolisi da cui si ramifica a livello del glucosio 6 fosfato.



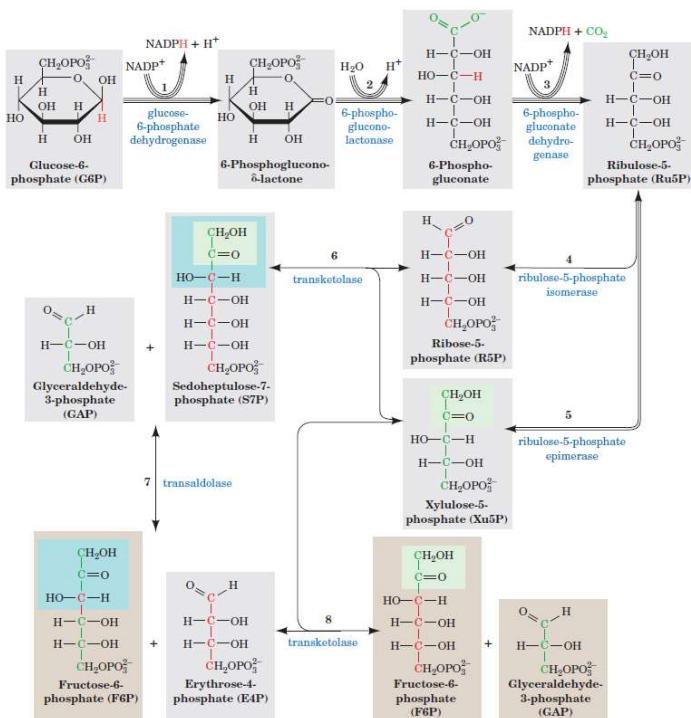
Nel fegato la metà del glucosio viene indirizzato verso questa via, via attiva soprattutto nei tessuti che fanno biosintesi. Nel muscolo è assente.



La funzione principale è la produzione di NADPH e di potere riducente per le biosintesi di acidi grassi e steroidi. Nelle cellule il rapporto $[NAD^+]/[NADH]=1000$ mentre il rapporto $[NADP^+]/[NADPH]=0.01$. Altre funzioni sono la produzione di pentosi, tra cui il ribosio per la sintesi dei nucleotidi e la degradazione ossidativa dei pentosi in esosi che entrano nella glicolisi.

Può essere suddivisa in tre stadi:

- OSSIDATIVO** che permette di formare **NADPH** e **ribulosio-5-fosfato** mentre esce anidride carbonica
- ISOMERIZZAZIONE ED EPIMERIZZAZIONE** per trasformare il ribulosio-5-fosfato in **ribosio-5-fosfato** o in **xylulosio-5-fosfato**.
- TAGLI DI LEGAMI C-C E REAZIONI DI CONDENSAZIONE** che convertono due molecole di xylulosio-5-fosfato ed una molecola di ribosio-5-fosfato in **due di fruttosio-6-fosfato** e **una di digliceraldeide-3-fosfato**. Si ha lo spostamento di gruppi a 2/3 atomi di carbonio per riciclare composti a 5 atomi di carbonio.



Nella prima reazione, il glucosio-6-fosfato diventa **6-fosfogluconolattone** e con l'ossidazione vengono persi due idrogeni. Il NADP^+ si riduce a NADPH . L'enzima che agisce è la **glucosio 6 fosfato idrogenasi**.

Nella seconda reazione si ha l'apertura della molecola ciclica che diventa quindi lineare: la **fosfogluconolattasi** taglia il composto ottenendo il **6-fosfogluconato**.

La terza reazione è di **deidrogenazione** in cui viene prodotta la seconda molecola di NADPH . Si tratta di una **decarbossilazione ossidativa** in cui viene rimossa anidride carbonica e si ha l'ossidazione di un atomo di carbonio con l'eliminazione di due idrogeni. Il NADP^+ si riduce a NADPH . Otteniamo **ribulosio-5-fosfato** che può essere **isomerizzato** a **ribosio-5-fosfato** (un aldoso) o **epimerizzato** a **xylulosio-5-fosfato** (un chetoso).

Se la cellula non ha bisogno di zuccheri a 5 atomi di carbonio, li riorganizza con le **transchetolasi** trasferendo un gruppo chetonico dallo xylulosio sul ribosio che acquista quindi due atomi di carbonio diventando un composto a 7 atomi di carbonio, il **sedozeptuloso-7-fosfato**. Lo xylulosio che ha perso i due atomi di carbonio diventa **gliceraldeide-3-fosfato**. Se dal sedozeptuloso-7-fosfato vengono rimossi 3 atomi di carbonio grazie alla **transaldolasi**, ne restano 4 formando l'**eritrosio-4-fosfato** e, se vengono spostati sulla gliceraldeide, diventa un composto a 6 atomi, il **fruttosio-6-fosfato**. L'eritrosio-4-fosfato non serve ma se vengono aggiunti due atomi di carbonio, diventa **fruttosio-6-fosfato**.

Le prime 4 reazioni servono per produrre ribosio-5-fosfato per la sintesi dei nucleotidi e NADPH per biosintesi. Per evitare di produrre un eccesso di NADPH si può partire dal fruttosio e dalla gliceraldeide e andare a ritroso fino ad arrivare al ribosio-5-fosfato.

La glicolisi e la via del pentoso sono correlate: con la via del pentoso mando in glicolisi zuccheri a 5 atomi di carbonio sottoforma di gliceraldeide o fruttosio-6-fosfato.

Se serve più NADPH ricicliamo zuccheri a 5 atomi di carbonio per riottenere degli intermedi della glicolisi.

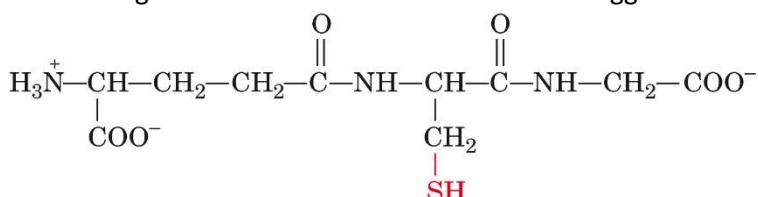
Da un glucosio otteniamo NADPH e anidride carbonica.

Per trasformare un'intera molecola di glucosio va ripetuta 6 volte la via producendo 6 molecole di anidride carbonica e degradando completamente una molecola di glucosio. Otteniamo 12 molecole di NADPH.

La reazione netta è

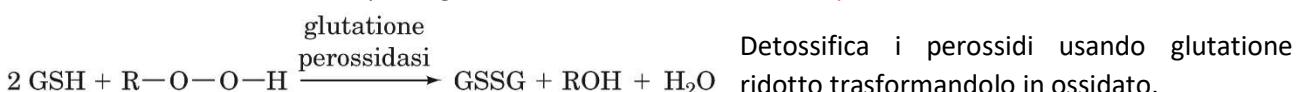


NADPH serve a mantenere una molecola antiossidante delle cellule, il **glutatione**, un tripeptide con tre amminoacidi e un residuo di cisteina. È un antiossidante perché è in grado di ossidare molecole biologiche dando come prodotti idroperossidi se ossidate ad acidi grassi. Un idroperossido può spezzare in maniera analitica il legame fra due atomi di ossigeno formando due radicali che possono reagire con altre molecole dando origine ad una catena radicalica che danneggia altre molecole biologiche.



Glutatione (GSH)
(γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina)

La cellula si protegge con sistemi enzimatici come la **glutatione perossidasi** usando due molecole di glutatione e trasformandole in alcol e acqua. Il glutatione si ossida formando un **ponte disolfuro** fra le due.



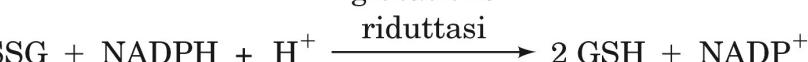
Idroperossido organico

La forma ridotta è un antiossidante che blocca

gli idroperossidi e usando **glutatione riduttasi** e

(GSSG è glutatione disolfuro)

glutatione riduttasi



Un difetto genetico comune nelle popolazioni africane, asiatiche e mediterranee è legato alla carenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Questo difetto comporta una severa anemia emolitica soprattutto in presenza di un farmaco antimalarico, la primachina: è un composto pro-ossidante che induce nella cellula uno stress ossidativo. Individui carenti di G6PD sono sensibili anche ad un glicoside tossico contenuto nelle fave (Favismo). Sia la primachina che il glicoside tossico delle fave stimolano la produzione di perossidi che in una cellula carente di G6PD non possono essere detossificati perché questa carenza comporta una diminuzione dei livelli di NADPH.

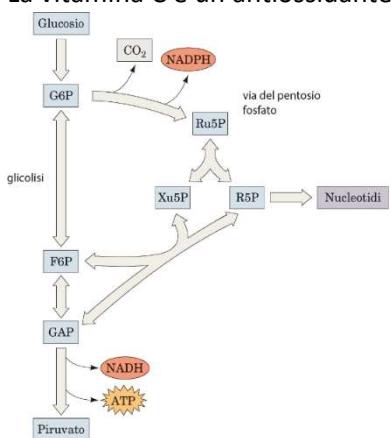
Se vengono degradate le membrane, le cellule si rompono e fuoriesce emoglobina dai globuli rossi.

Relazione tra glicolisi e via del pentoso fosfato

Si parte dal glucosio 6 fosfato.

Il NADPH serve per mantenere il glutathione in forma ridotta.

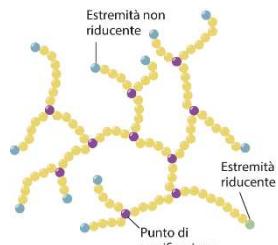
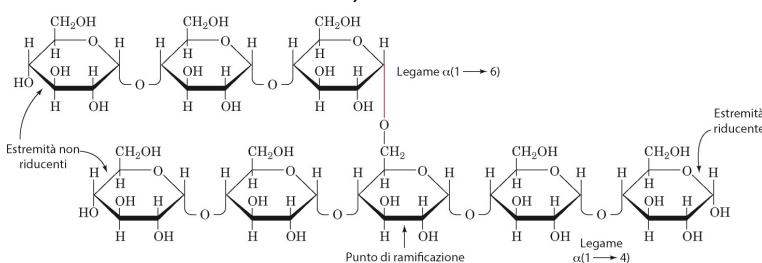
La vitamina C è un antiossidante: gli antiossidanti disattivano i radicali con elettroni spaiati e sono più stabili dei radicali. I radicali hanno un tempo di vita breve che interagisce velocemente.



IL METABOLISMO DEL GLUCOSIO: GLICOGENO E GLUCONEOGENESI

Il glicogeno, la forma di immagazzinamento del glucosio, è un polimero ramificato. È unito da legami glucosidici α 1,4. I legami glicosidici in α 1,6 generano ramificazioni.

Negli zuccheri la forma ciclica è data dal **carbonio 1** che porta un **gruppo aldeidico** con il quale forma un **legame acetalico** con il **carbonio 4**. Il carbonio 4 ha un'estremità non riducente se impegnata nel legame acetalico. Il primo glucosio avrà come estremità non riducente il carbonio 4 libero e come estremità riducente il carbonio 1. Le ramificazioni hanno solo estremità non riducenti infatti, aumentando le ramificazioni, aumentano anche le estremità non riducenti.



Le unità di glucosio vengono rimosse in modo sequenziale dal glicogeno a partire dall'estremità non riducente. L'elevato grado di ramificazione del glicogeno è fisiologicamente importante perché permette una rapida degradazione mediata dall'attacco simultaneo degli enzimi di degradazione sulle molteplici estremità non riducenti della molecola quindi una velocizzata degradazione di glicogeno. La ramificazione rende anche più solubile il glicogeno in acqua. I polimeri del glucosio sono insolubili in acqua. Il glicogeno deve stare nel citosol quindi venendo compattato, espone meno parti all'acqua.

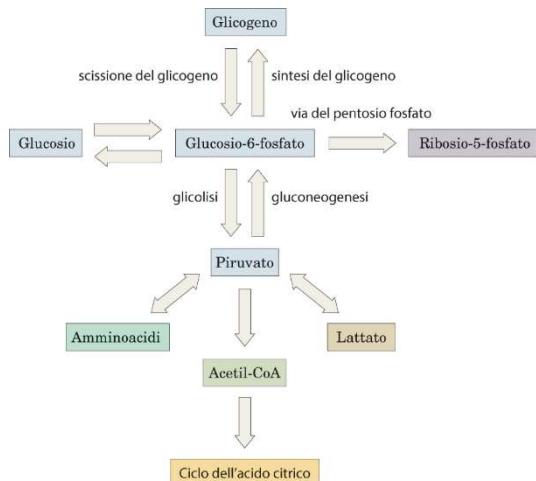
L'organismo usa il glicogeno come riserva di energia invece dei grassi anche se sono più abbondanti per tre motivi:

1. I muscoli non possono mobilizzare i grassi così velocemente come invece riescono a fare con il glicogeno.
2. Gli acidi grassi non possono essere metabolizzati in condizioni anaerobiche
3. Gli animali non possono convertire acidi grassi in glucosio, perciò, il metabolismo dei grassi da solo non è sufficiente a mantenere un adeguato livello plasmatico di glucosio.

La mobilizzazione del glicogeno nel fegato coinvolge una serie di reazioni che dal glicogeno portano a **glucosio-1-fosfato**, **glucosio-6-fosfato** e infine a **glucosio**.

La gluconeogenesi è la via metabolica per formare il glucosio-6-fosfato.

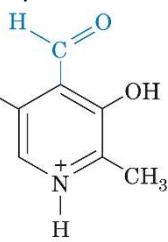
Schema generale del metabolismo del glucosio



Il fegato ed il muscolo sono i due tessuti che contengono glicogeno. Nel muscolo la richiesta di ATP comporta la conversione del glicogeno in glucosio-6-fosfato che entrerà poi in glicolisi. Nel fegato, una bassa concentrazione plasmatica di glucosio innescherà la degradazione del glicogeno. Anche in questo caso si formerà glucosio-6-fosfato che sarà idrolizzato a glucosio per essere rilasciato nel sangue.

La degradazione del glicogeno richiede la presenza di tre enzimi:

1. La **glicogeno fosforilasi** che catalizza la **fosforolisi**, reazione mediante la quale si realizza la demolizione del glicogeno in unità di glucosio (**glucosio-1-fosfato**). Questo enzima può staccare unità di glucosio solo fino a cinque unità di distanza da un punto di ramificazione.
2. L'**enzima deramificante** **rimuove le ramificazioni** liberando glucosio e permettendo alla glicogeno fosforilasi di completare la degradazione del glicogeno: idrolizza il legame glicosidico 1,6 liberando un'unità di glucosio. Di conseguenza circa il 10% del glicogeno viene trasformato in **glucosio** mentre il 90% diventa **glucosio-1-fosfato**. Ogni 10 unità di glucosio c'è una ramificazione.
3. La **fosfoglucomutasi** converte il glucosio-1-fosfato in **glucosio-6-fosfato** che può continuare in glicolisi nel muscolo oppure essere idrolizzato per diventare glucosio che, una volta rilasciato in circolo, serve per aumentare la glicemia a livello del fegato.



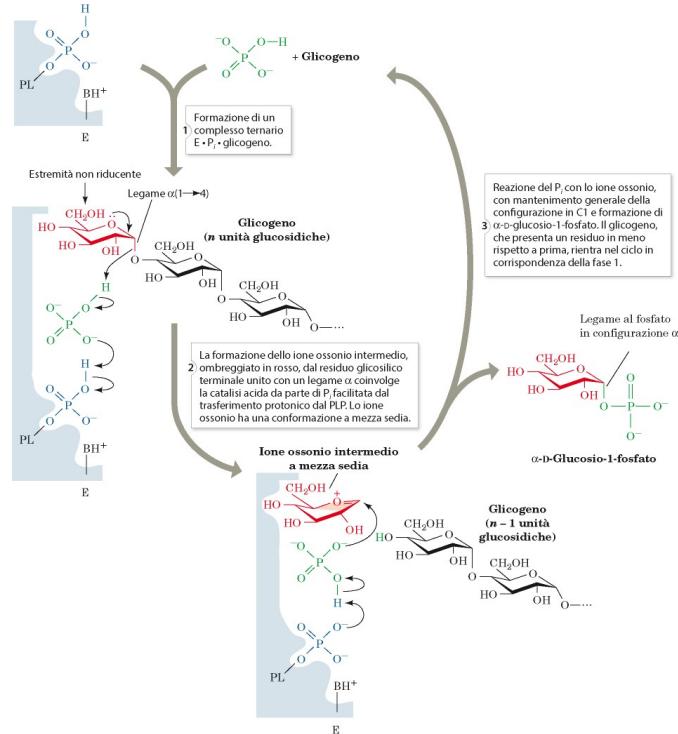
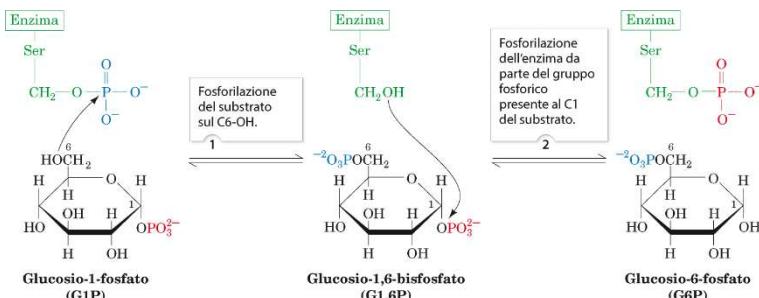
La glicogeno fosforilasi ha bisogno di un **cofattore**, il **piridossal-5'-fosfato**. Deve rompere il legame glicosidico α 1,4. Il cofattore **stabilizza il fosfato inorganico** per poter rompere il legame: rimane un intermedio con una carica positiva sull'ossigeno e il carbonio che si legherà al gruppo fosforico formando il glucosio-1-fosfato. Lo ione ossonio è uno stato di transizione attraverso cui avviene il distacco di glucosio da glicogeno.

Piridossal-5'-fosfato (PLP)

(idrolasi-> idrolizza usando acqua; fosforilasi-> rompono legami usando fosfato inorganico).

Diagramma di processo del meccanismo di reazione della glicogeno fosforilasi

Un enzima agisce sul glucosio-1-fosfato spostando il gruppo fosfato sul carbonio 6 per ottenere il glucosio-6-fosfato usato poi per idrolisi. L'enzima può agire solo su legami α 1,4: quando è a 4 unità dal punto di ramificazione si stacca e non agisce più.



L'enzima deramificante elimina la ramificazione prendendo 3 delle 4 unità di glucosio e spostandole sulla catena principale lineare in modo da far rimanere 1 unità di glucosio sulla ramificazione in posizione 6 staccata dalla glicosidasi che libera solo glucosio. La **glicosidasi** idrolizza **legami glicosidici α 1,6**.

LA SINTESI DEL GLICOGENO

Viene fatta da un **enzima ramificante** che **introduce** le **ramificazioni** e dalla **glicogeno sintasi** che **sintetizza** legami glicosidici in α 1,4.

L'UTP serve per fare glicogeno. L'UDP-glucosio si forma dal **glucosio-1-fosfato** che reagisce con **UTP** grazie all'enzima **UDP-glucosio pirofosforilasi**, si forma **UDP** e si libera **pirofosfato**.

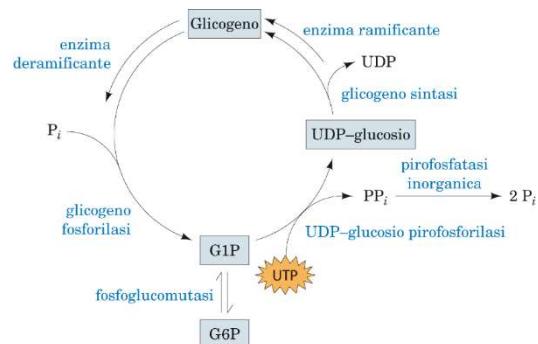
L'enzima ramificante sposta catene per ottenere ramificazioni.

L'UDP-glucosio può dare UDP (che è il substrato della glicogeno sintasi) mentre **glucosio-1-fosfato** subisce un **attacco nucleofilo** con il fosfato in alpha, si libera **pirofosfato** e si forma **UDP**. È il glucosio attivato che formerà glicogeno.

L'UDP si libera dal legame formando uno ione caricato positivamente, l'**intermedio ossonio** che è attaccato dall'OH in 4 di una catena di glicogeno già formata. Il glicogeno aumenta la sua catena di una unità. Però non riesce ad attaccare le prime due unità quindi la reazione viene innescata dalla **glicogenina**, una proteina che ha nel **sito attivo** un **OH di una tirosina**. Questo funziona come OH di un residuo di glucosio. La **glicogeno sintasi** attacca la prima unità di glucosio all'OH della glicogenina e dopo 7/8 unità si stacca dalla proteina. L'**enzima ramificante** prende le 7 unità di glucosio dalla catena lineare e le sposta su un ossidrile in 6 introducendo la ramificazione. Il nuovo punto di ramificazione deve distare almeno 4 residui da quello precedente.

La **glicogeno fosforilasi taglia** il legame con un gruppo fosfato in α 1,4. La **glucosidasi toglie** l'unità di glucosio nel punto di ramificazione.

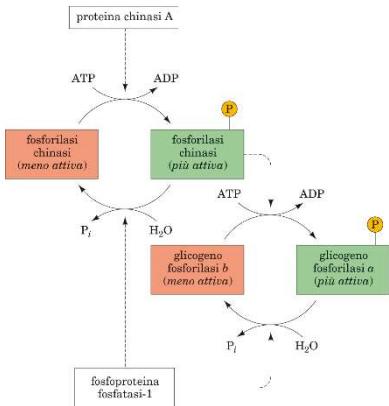
Le vie opposte non sono attive contemporaneamente.



La glicogenolisi ha come enzima la glicogeno fosforilasi; la glicogenosintesi ha come enzima la glicogeno sintasi.

Gli enzimi allosterici nelle tappe di comando sono sottoposti a più tipi di **modulazioni**, come per esempio, di tipo **covalente** in cui vengono attaccati covalentemente da gruppi di enzimi e cambia la funzione: il gruppo fosfato è attaccato covalentemente alle proteine ma il legame è reversibile.

Ci sono enzimi che attaccano come le chinasi che attaccano il fosfato sulle proteine, o enzimi che staccano i gruppi fosfato come le fosfatasi che idrolizzano gruppi fosfato. L'attività di una proteina è diversa se presente enzimi attaccati o staccati.



Le protein fosfatasi e chinasi devono essere attivate o disattivate da insulina, glucagone e adrenalina. Il **glucagone** e l'**adrenalina** attivano le **protein chinasi**, l'**insulina** attiva le **protein fosfatasi**. La fosforilazione della **glicogeno fosforilasi** è catalizzata dalla **glicogeno fosforilasi chinasi** che a sua volta è **attivata** dalla **protein chinasi A**. La **glicogeno fosforilasi chinasi** e la **glicogeno sintasi** contengono entrambe le sequenze di riconoscimento della protein chinasi A. L'adrenalina e il glucagone attivano l'AMP-ciclico i cui livelli determinano l'attività della protein chinasi A e di conseguenza il grado di fosforilazione della glicogeno fosforilasi chinasi e della glicogeno sintasi. Inoltre, la **fosforilasi chinasi** è attivata dal **calcio**: il calcio viene rilasciato per la contrazione muscolare per cui nel muscolo in attività i livelli di calcio sono più alti. Questi attivano la fosforilasi chinasi, stimolano l'attività della **glicogeno fosforilasi** e quindi la degradazione del glicogeno per fornire glucosio ai muscoli.

A digiuno vengono prese le riserve attivando la glicogeno fosforilasi e disattivando la glicogeno sintasi.

L'adrenalina è in circolo se c'è bisogno di energia.

L'insulina va ad attivare le protein fosfatasi che staccano il gruppo fosforico facendo diventare meno attiva la glicogeno sintasi mentre la sintasi diventa attiva sintetizzando il glicogeno (deforosilata è attiva).

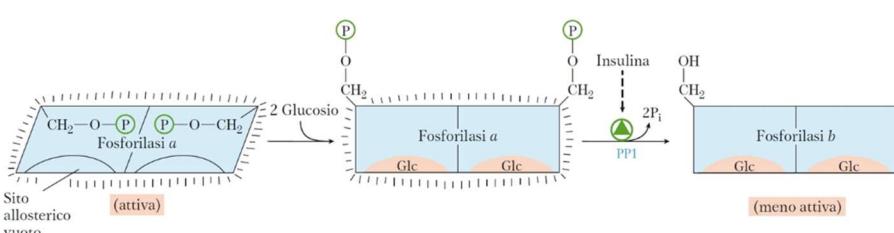


Figura 15.38 La glicogeno fosforilasi del fegato come sensore di glucosio. Il legame del glucosio a un sito allosterico dell'isoizoma fosforilasi a del fegato induce una modifica conformativa che espone il suo residuo di Ser fosforilato all'azione della fosfoproteina fosfatasi (PP1). Questa fosfatasi

converte la fosforilasi a in fosforilasi b, riducendo drasticamente l'attività dell'enzima e rallentando la degradazione del glicogeno in risposta a un'elevata concentrazione di glucosio nel sangue. L'insulina agisce anche indirettamente stimolando la PP1 e rallentando la demolizione del glicogeno.

Il **modulatore allosterico** della glicogeno fosforilasi è il **glucosio** stesso: senza glucosio, i siti allosterici sarebbero vuoti e la fosforilasi sarebbe attiva. L'enzima cambia forma quando si lega con il glucosio, i gruppi fosforici sono più disponibili e vengono staccati dalle fosfatasi (fosforilasi b meno attiva). Il glucosio è sottoposto ad un trasporto facilitato ma passivo.

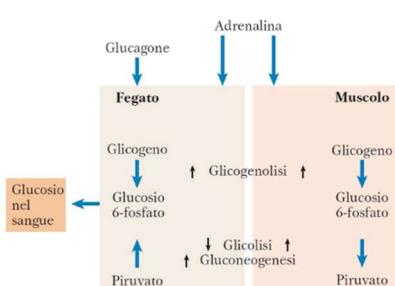


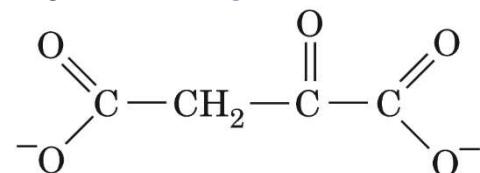
Figura 15.44 Differenze tra la regolazione del metabolismo dei carboidrati nel fegato e nel muscolo. Nel fegato il glucagone (che segnala una ridotta concentrazione di glucosio nel sangue) o l'adrenalina (che segnala una condizione di "combatti o fuggi") hanno l'effetto di favorire il trasferimento di glucosio al flusso ematico. Nel muscolo, l'adrenalina aumenta la demolizione del glicogeno e la velocità della glicolisi, che insieme forniscono il combustibile per la produzione dell'ATP necessaria alla contrazione muscolare.

GLUCONEOGENESI

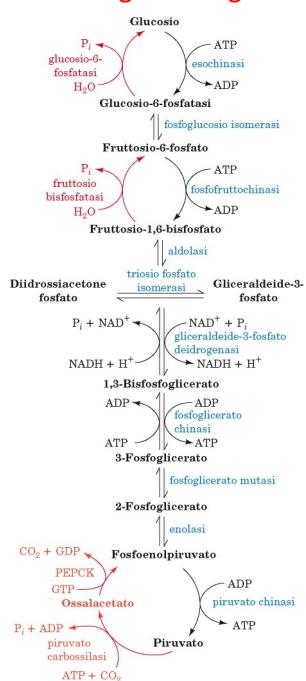
Il fegato e il rene possono **sintetizzare glucosio** da **lattato, piruvato e amminoacidi**, quindi fare gluconeogenesi. Il rene essendo piccolo ha meno importanza. La **gluconeogenesi** è la **via anabolica** della glicolisi, si usano le sue sette reazioni reversibili ma non le tre irreversibili: la reazione della piruvato chinasi è sostituita dalle reazioni della piruvato carbossilasi e della fosfoenolpiruvato carbossichinasi. Le reazioni della fosfofruttochinasi e dell'esochinasi sono sostituite da reazioni catalizzate da fosfatasi. La glicolisi e la gluconeogenesi sono reciprocamente regolate da effetti allosterici, fosforilazioni e cambiamenti della velocità di sintesi degli enzimi. Devono esserci differenze nelle due vie per poterle regolare separatamente.

Gluconeogenesi significa sintesi del glucosio ex novo partendo da composti non glucidici come glicerolo, lattato, piruvato e amminoacidi (non leucina e lisina). Avviene nel **citosol**.

La prima reazione che subisce il **piruvato** è la conversione in **ossalacetato** tramite l'**aggiunta** di una molecola di **anidride carbonica** sul piruvato. L'enzima che opera è la **piruvato carbossilasi**.



Glicolisi e gluconeogenesi a confronto



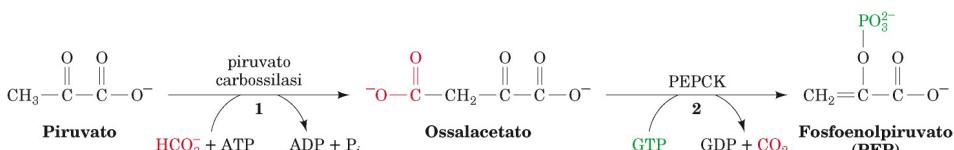
Ossalacetato

Consumando 1 ATP dall'ossalacetato si forma il **fosfoenolpiruvato** da cui si forma piruvato consumando 1 ATP.

La **glucosio-6-fosfatasi** è presente solo nei reni e nel fegato, per questo motivo solo loro possono fare gluconeogenesi.

Il piruvato è presente nella cellula e può derivare da amminoacidi come l'alanina o dall'acido lattico che esce dalla cellula muscolare, va nel fegato ed è ritrasformato in piruvato.

La prima reazione è la conversione del piruvato in fosfoenolpiruvato passando per l'ossalacetato.



Si ha la **carbossilazione** del piruvato ad opera della **piruvato carbossilasi** e viene liberata **ADP** e **fosfato inorganico**: l'ossalacetato è il substrato della **fosfoenolpiruvato carbossichinasi** che ha come **cofattore** la **biotina**. Il gruppo fosforico viene preso da **GTP** (guanosintrifosfato) ed esce **GDP** e **anidride carbonica** con la formazione di **fosfoenolpiruvato**.

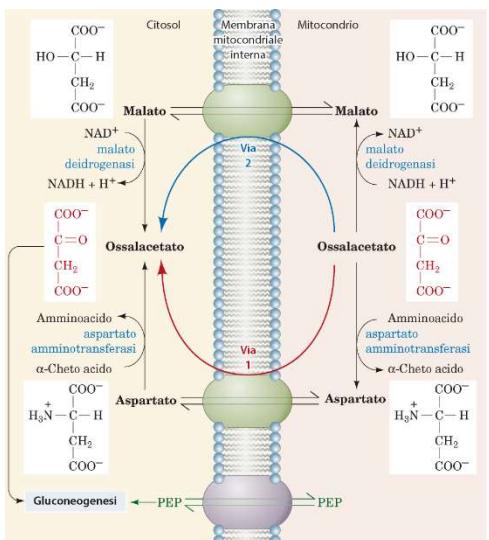
Come substrati possono essere usati piruvato, lattato, glicerolo, amminoacidi e tutti gli intermedi del ciclo di Krebs, non gli acidi grassi.

Il glicerolo come substrato deriva dalla degradazione dei trigliceridi. Negli animali degradando acidi grassi abbiamo acetilcoenzima A. Il piruvato è trasformato in acetilcoenzima A attraverso una reazione irreversibile, quindi, non può più tornare a piruvato e non può fare glucosio.

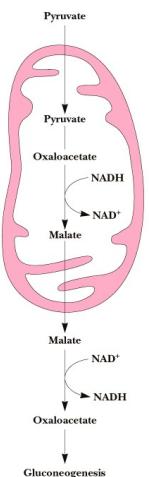
Possiamo usare zuccheri per fare acidi grassi.

A digiuno non si perde massa grassa ma magra perché si abbassa la glicemia e il fegato va in gluconeogenesi. Vengono usati glicerolo e amminoacidi. Negli animali non ci sono proteine di riserva, il muscolo è il tessuto ricco di proteine.

Parte della gluconeogenesi può passare nei **mitochondri**, dove avviene la trasformazione del piruvato.



La sesta reazione della glicolisi è l'unica di ossidazione in cui l'aldeide si ossida e **NAD⁺** si riduce producendo **NADH**. Nella gluconeogenesi **consumiamo NADH** che diventa **NAD⁺**. Da lattato a piruvato si **ossida l'acido lattico** e si **riduce NAD⁺** diventando **NADH**. L'acido lattico libera NADH se diventa piruvato. Se viene usato il piruvato di amminoacidi acidi, serve NADH ma nel citosol non è molto presente mentre lo è nei mitochontri. Non c'è scambio fra **NAD⁺** e **NADH** del citosol con quello mitocondriale: bisogna spostare fuori gli elettroni del NADH senza spostare le molecole e facendo entrare e uscire il **piruvato** dai **mitochondri**. Qui diventa **ossalacetato**, **ridotto** da NADH a **malato** che può **uscire** dai mitochontri e tornare a essere **ossalacetato** liberando NADH nel citosol. Malato e aspartato possono attraversare la membrana.



NADH è presente nel citosol grazie al **sistema navetta malato-aspartato**.

L'**acido aspartico** nel citosol è **deaminato** (deaminazione: fuoriuscita da una molecola di un gruppo amminico con conseguente produzione di una molecola di ammoniaca) a **ossalacetato** o **trasformato** in **malato** per tornare nel mitochonrio.

Ciclo di cori

È la via che permette di **riusare acido lattico nei muscoli sottosforzo**. La regolazione avviene in maniera opposta alla glicolisi. Il **lattato** dai **muscoli scheletrici** è trasferito al **fegato** dove è convertito in **piruvato** e quindi in **glucosio** che può **tornare** poi nei **muscoli**.

Regolazione della gluconeogenesi

ATP, ADP, AMP indicano lo stato di energia di una cellula. L'**ATP** **stimola** le **vie anaboliche** e **inibisce** le **cataboliche**. **AMP** e **ADP** le troviamo quando c'è poca energia e **stimolano** le attività **catalitiche** **inibendo** le **analitiche**. La **fosfofruttochinasi** è **inibita** dall'**ATP** mentre la **fruttosio-1,6-bifosfatasi** è **stimolata**: è la tappa di comando della gluconeogenesi. Se è presente **molta** fruttosio-1,6-bifosfatasi è favorita la **glicolisi**, quando è **poca**, la **gluconeogenesi**.

Se l'alanina perde un gruppo amminico, diventa piruvato. Gli zuccheri si attivano con UDP.

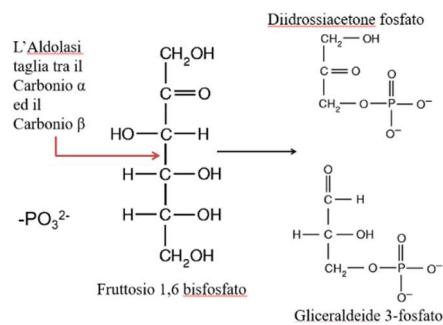
IL CICLO DI KREBS (ciclo dell'acido citrico, ciclo degli acidi tricarbossilici)

È un processo **catalitico** a molte tappe che **converte** i gruppi **acetile** derivati dai carboidrati, dagli **acidi grassi** e dagli **amminoacidi** in **anidride carbonica** (prodotto di scarto) producendo **NADH**, **FADH₂**, e **GTP**.

È la **tappa finale** della degradazione di tutti i nutrienti: solo in condizioni **aerobiche** possiamo ossidare il piruvato nei mitocondri dove viene portato ossigeno dall'emoglobina. Alla fine del ciclo si forma **citrato**.

L'**acetil CoA** viene convertita in **anidride carbonica** che alimenta il ciclo insieme all'**ossalato**. Il gruppo acetilico è ossidato a due molecole di anidride carbonica ed elettroni ad alta energia sono trasferiti al NAD⁺ e FAD.

Il ciclo comprende 8 tappe enzimatiche molte delle quali controllate allostericamente: l'**ossidazione** del **gruppo acetilico** per dare **due molecole di anidride carbonica**, comporta il **taglio** del legame carbonio carbonio dell'acido acetico e, dato che nessun enzima è in grado, servono le 8 reazioni.



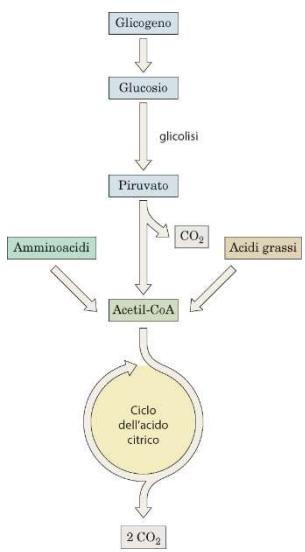
In molti casi il taglio avviene tra gli atomi di **carbonio α e β** rispetto ad un gruppo carbonilico.

Le **aldolasi** tagliano tra il carbonio α e il carbonio β ma se abbiamo solo due carboni non abbiamo questa struttura.

All'**ossalato** (che ha quattro atomi di carbonio) si attaccano **due carboni** per dare una molecola a sei atomi di carbonio a cui possiamo togliere due carboni.

Schema generale del metabolismo ossidativo dei carburanti metabolici

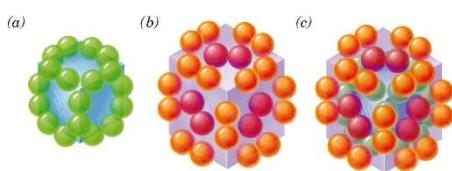
Il piruvato nei mitocondri da Acetyl CoA deriva da acidi grassi o da aminoacidi ed entra poi nel ciclo dell'acido citrico.



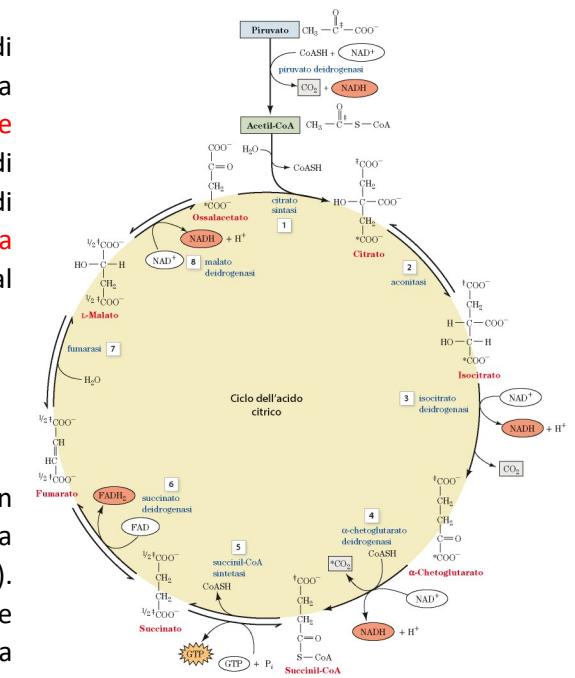
La sintesi dell'acetil CoA

La **piruvato deidrogenasi** (tappa di comando del ciclo di Krebs) è un **complesso multienzimatico** ovvero 3 enzimi uniti fra di loro con una simmetria cubica: E1, E2, E3 (abbiamo più unità di ciascun enzima). Catalizza una reazione in cinque fasi in cui il piruvato rilascia anidride carbonica e il rimanente gruppo acetile viene legato al coenzima A. La disponibilità di Acetyl CoA ne determina il funzionamento.

- E2 ha 24 subunità organizzate in trimeri. Trasferisce il gruppo acetilico su CoA.
- E1 ha 24 subunità organizzate in dimeri
- E3 ha 12 subunità



Le reazioni del ciclo dell'acido citrico



Gli enzimi si organizzano in un cubo. L'anidride carbonica viene rimossa e gli elettronni trasferiti sul NAD⁺ dai tre enzimi che hanno 5 cofattori.

TPP legato a E1 provoca la decarbossilazione ossidativa del piruvato producendo un idrossietil. L'ossidazione viene fatta dall'acido lipoico che è un cofattore redox. Gli elettoni passano dall'acido lipoico a E3, a FAD e a NAD⁺.

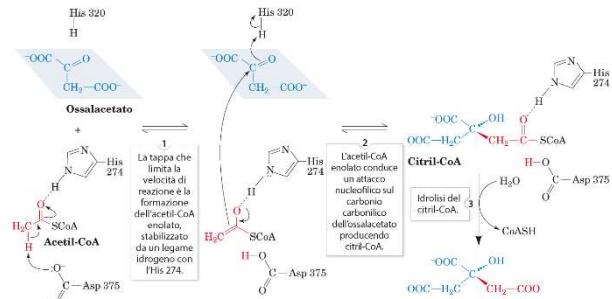
TABELLA 17.1 I coenzimi e i gruppi prostetici della piruvato deidrogenasi

Cofattore	Posizione	Funzione
Tiamina pirofosfato (TPP)	Legato a E ₁	Decarbossilà il piruvato, producendo un idrossietil-TPP carbanione
Acido lipoico	Legato covalentemente a un residuo di Lys di E ₂ (lipoamide)	Accetta l'idrossietil carbanione dal TPP sotto forma di gruppo acetilico
Coenzima A (CoA)	Substrato per E ₂	Accetta il gruppo acetilico dalla lipoamide
Flavina adenina dinucleotide (FAD)	Legato a E ₃	Ridotto dalla lipoamide
Nicotinamide adenina dinucleotide (NAD ⁺)	Substrato per E ₃	Ridotto dal FADH ₂

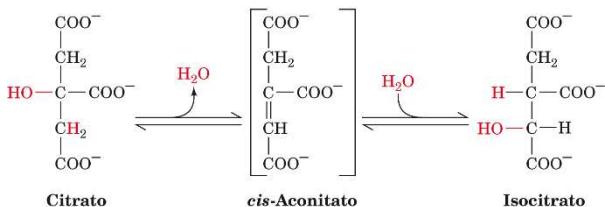
Il gruppo idrossietilico viene trasferito su lipoammide ossidandosi e riducendo la lipoammide. FAD diventa FADH₂ e dà gli elettoni al NAD⁺ che diventa NADH. Il gruppo idrossietile arriva fino al coenzima A che accetta il gruppo acetilico.

REAZIONE 1: CITRATO SINTASI

Il gruppo acetil-CoA si lega all'ossalacetato. La **citrato sintasi condensa** il gruppo acetilico legato all'ossalacetato. Si forma il **Citril-CoA** che diventa **citrato**, un composto a 6 termini.



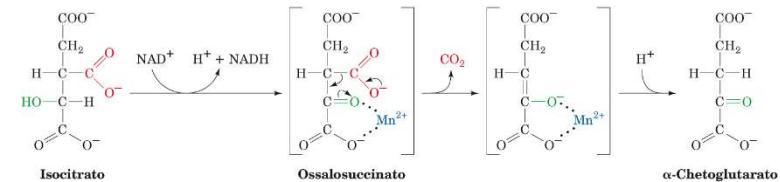
REAZIONE 2: L'ACONITASI



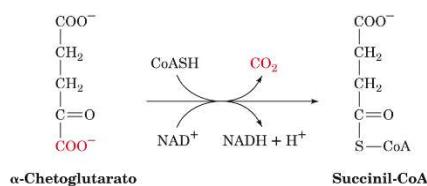
La molecola di citrato viene riarrangiata in **isocitrato** da cui **togliamo** la prima unità di **anidride carbonica**.

REAZIONE 3: L'ISOCITRATO DEIDROGENASI RILASCA LA PRIMA MOLECOLA DI ANIDRIDE CARBONICA

Abbiamo la prima **decarbossilazione ossidativa** ad opera dell'**isocitrato deidrogenasi**. Si **ossida** il composto e il NAD⁺ diventa **NADH**. Si forma **α-Chetoglutarato** a 5 termini.



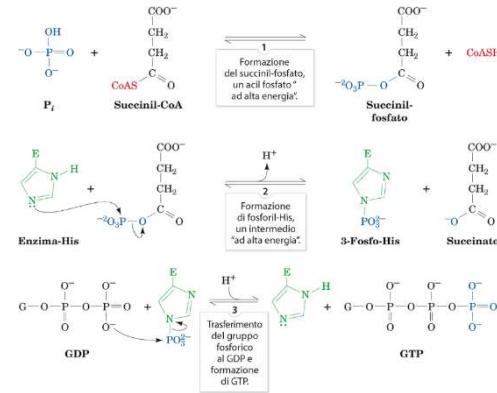
REAZIONE 4: L' α-CHETOGLUTARATO DEIDROGENASI È SIMILE AL COMPLESSO DELLA PDH-PRODUZIONE DELLA SECONDA MOLECOLA DI ANIDRIDE CARBONICA



Abbiamo una **decarbossilazione ossidativa** il cui prodotto è il **succinil-CoA**, a 4 atomi di carbonio, **NADH** e una seconda molecola di **anidride carbonica**. Il succinil-CoA è un tioestere, un composto ad alta energia.

REAZIONE 5: SUCCINIL-COA SINTETASI

Il rilascio del CoA permette la **sintesi del GTP**. Il **succinil-CoA** reagisce con un **fosfato inorganico** e da un **succinil-fosfato** (anche questo ad alta energia) rilasciando **CoASH** e sostituendo il CoA con un fosfato inorganico. Siamo ancora dentro l'enzima che trasforma l' **α -chetoglutarato** in **succinato**.



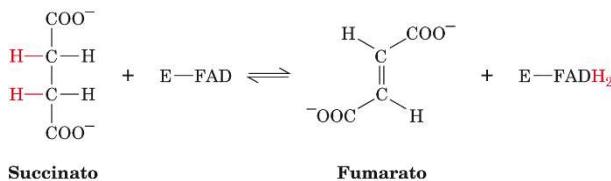
Si libera il CoA e il **succinil-fosfato** diventa **succinato** che esce dall'enzima. Resta un **fosfato** sull'**enzima** con un **residuo di istidina** che lo **trasferisce** ad un **residuo di GDP** che diventa **GTP**.

Dal succinil-fosfato si forma succinato con 4 atomi di carbonio.

Si ha una fosforilazione a livello del substrato.

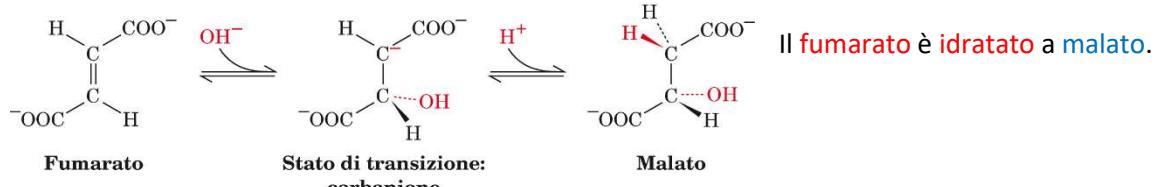
REAZIONE 6: LA SUCCINATO DEIDROGENASI PRODUCE FADH₂

Il succinato viene **ossidato** a **fumarato** usando il **FAD** perché ci sono molti carboni ridotti. Viene prodotto **FADH₂**.

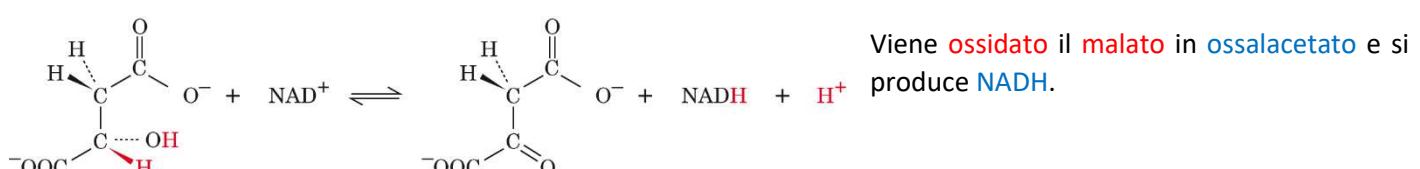


Il **malonato** è un **inibitore competitivo** della succinato deidrogenasi.

REAZIONE 7: LA FUMARASI



REAZIONE 8: LA MALATO DEIDROGENASI PRODUCE LA TERZA MOLECOLA DI NADH



Viene **ossidato** il **malato** in **ossalacetato** e si produce **NADH**.

Il fabbisogno energetico regola il ciclo dell'acido citrico agendo a livello della tappa catalizzata dalla piruvato deidrogenasi e delle tre tappe che controllano la velocità del ciclo. I meccanismi di controllo dipendono dalla disponibilità dei substrati, dall'inibizione da parte dei prodotti, dalle modificazioni covalenti e dagli effetti allosterici.

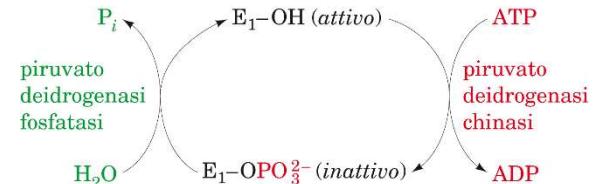
Da una molecola di glucosio ne otteniamo due di Acetyl-CoA e, dato che il ciclo si ripete due volte, otteniamo il doppio dei prodotti quindi **6 molecole di NADH**, **2 di FADH₂** e **2 di GTP**.

Le due molecole di anidride carbonica che escono non sono necessariamente i due atomi di carbonio che sono entrati.

Da ogni molecola di NADH possiamo ottenere 2,5 molecole di ATP (anche 3) mentre per ogni FADH₂ 1,5. Si possono ottenere fino a 32 molecole di ATP.

Tutte le reazioni del ciclo sono **reversibili**: la **prima**, la **terza** e la **quarta** sono quelle che lo **regolano**. La **tappa di comando** è quella che trasforma il piruvato in Acetyl-CoA ed è irreversibile ma si trova **fuori dal ciclo**.

La trasformazione del piruvato in Acetyl-CoA regola l'ingresso dell'acetil-CoA nel ciclo e quindi il ciclo stesso. La **piruvato deidrogenasi** è regolata dalla **fosforilazione** e dalla **defosforilazione**: se **defosforilata** è più attiva della forma fosforilata. La **piruvato deidrogenasi chinasi** **fosforila** la piruvato deidrogenasi.



Senza ossigeno non serve accumulare i riducenti. Se abbiamo scarsa ossigenazione, la piruvato deidrogenasi chinasi rallenta l'attività della piruvato deidrogenasi.

I mitocondri trasferiscono gli elettroni del NADH e del FADH₂ all'ossigeno in modo sicuro facendolo diventare acqua, ma se qualche elettrone scappa si formano dei radicali liberi che sono tossici per la cellula. Meno elettroni ci sono, meno probabilità di creare specie tossiche ci sono.

NADH in eccesso **blocca** la **piruvato deidrogenasi** e il ciclo stimola tre reazioni regolatrici di ATP. Il **calcio** è un **modulatore allosterico** di molte proteine del ciclo, da lui stimolato.

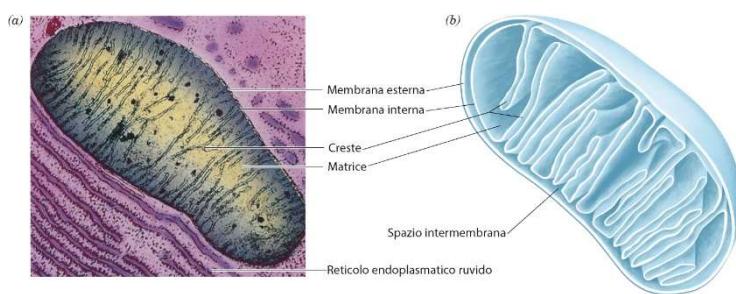
Il ciclo di Krebs è una **VIA ANFIBOLICA**: è un ciclo con **intermedi** che possono essere usati come **precursori** di altre molecole come **substrati** per la **biosintesi**.

- L'ossalacetato viene usato per fare aminoacidi o per gluconeogenesi
- Il citrato serve per la sintesi degli acidi grassi per il glicerolo
- Il malato serve per far entrare e uscire l'ossalacetato dai mitocondri

IL TRASPORTO DI ELETTRONI E LA FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

L'**ossigeno** molecolare è l'**accettore** di **elettroni** liberati nel catabolismo ed è usato a livello dei **mitocondri**. Gli elettroni vengono dal catabolismo, dalle reazioni di **ossido riduzione**: nella glicolisi è la sesta reazione a produrli. Il piruvato nei mitocondri diventa acetil-CoA: in questo caso si tratta di una decarbossilazione ossidativa. L'Acetyl-CoA entra nel ciclo dell'acido citrico e da **tre molecole NADH e 1 FADH₂**: questi due devono essere **trasportati all'ossigeno** e questo avviene nei mitocondri con la **catena di trasporto degli elettroni**.

MITOCONDRI



Sono degli organelli nelle cellule eucariote separati dal resto del citosol da un **doppio sistema di membrane**: una **esterna liscia** che è **permeabile** in quanto presenta molte unità di **porina**, un **canale** che serve a far passare **metaboliti** o **acqua** (acquaporine) e una membrana **interna** con **invaginazioni** o **creste (criste)** mitocondriali, molto **ripiogata** per aumentarne la superficie dato che qui troviamo

tutto **il sistema di trasporto degli elettroni all'ossigeno** oltre ad **ATPas** che usa energia per fare ATP. Tra le due membrane troviamo lo **spazio intermembrana** mentre nella membrana interna la **matrice mitocondriale**.

I mitocondri sembrano avere origine **endosimbiontica**: erano batteri e con il passaggio da un'atmosfera priva di ossigeno a una con, gli organismi che erano in grado di usare ossigeno come accettore finale di elettroni hanno avuto vantaggio evolutivo. L'incorporazione di batteri in altre cellule dava possibilità di usare l'ossigeno come accettore di elettroni e di sopravvivere in un ambiente con ossigeno.

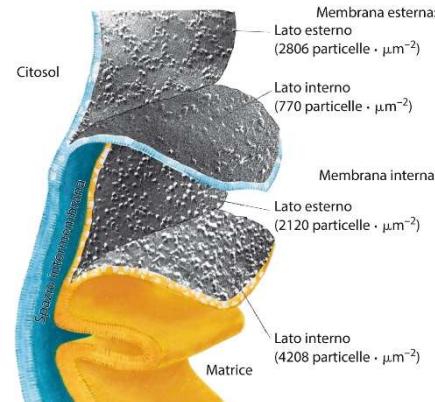
L'uso dell'ossigeno come accettore finale di elettroni ha dato un vantaggio evolutivo ad organismi, che erano solo unicellulari, con la possibilità di generare organismi pluricellulari.

Il trasferimento di energia genera energia e la quantità dipende dal potenziale di riduzione della coppia redox. L'energia in gioco è data dalla differenza di potenziale fra le due coppie: più differenza di potenziale c'è e più

energia si libera. L'ossigeno ha un potenziale redox molto positivo, recuperando molta energia nel trasferimento da usare per creare organismi pluricellulari.

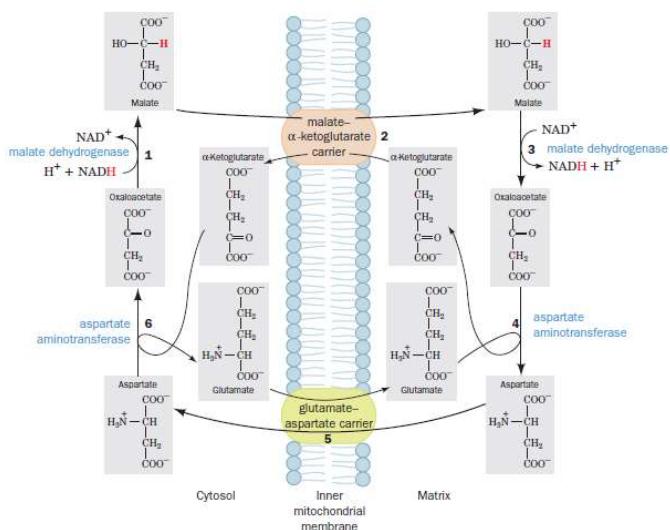
Il fatto che i mitocondri fossero batteri è stato dimostrato dalla presenza di **un loro genoma circolare**, diverso da quello della cellula, con un **DNA mitocondriale** che **codifica per alcune funzioni del mitocondrio**, solo per alcune proteine dato che gran parte del genoma mitocondriale originale si è spostato nel genoma nucleare.

La struttura del mitocondrio era inizialmente considerata rigida ma in realtà sono **strutture flessibili e dinamiche** che possono andare in contro a **fusione e fissione**: più mitocondri possono unirsi per formare una struttura quasi filamentosa, dei **network mitocondriali**. Si possono anche **scindere**. Si pensava ci fossero solo due compartimenti acquosi, lo spazio intermembrana e la matrice. In realtà alcune delle criste sembrano saldate fra di loro avendo dei compartimenti anche al loro interno: quindi sono 3 non due. Erano visti come indipendenti dalle strutture circostanti ma sono stati evidenziati dei **punti di giunzione** con queste per lo scambio di metaboliti.



La membrana esterna è come la membrana plasmatica, ricca di porine per far passare metaboliti ed è permeabile. Per vedere le proteine nella membrana viene usata la tecnica del freeze etching in cui si congelano, si tagliano lungo l'asse mediale della membrana e si fa un calcolo. Se guardiamo la densità delle proteine, si nota che la membrana interna è più ricca di proteine rispetto all'esterna.

I sistemi navetta assicurano il trasporto di NADH e NAD⁺



Sistema navetta: i **nucleotidi redox** raccolgono **elettroni**. Il FAD è sempre parte integrante degli enzimi che lo usano, e può essere legato covalentemente o non. Il NAD⁺ può portare elettroni come NADH o perderne come NAD⁺. La membrana mitocondriale interna è impermeabile al NADH e al NAD⁺. La membrana interna è molto selettiva, lasciando passare pochi metaboliti che devono avere specifici trasportatori.

Il NADH da glicolisi è prodotto nel citosol e non può andare nei mitocondri ma gli elettroni sul NADH possono essere trasportati attraverso il sistema navetta nei mitocondri.

Il **NADH citosolico** può essere usato nel citosol per **trasformare l'ossalacetato in malato** che ha un trasportatore sulla membrana interna potendo quindi entrare nei mitocondri dove può essere **ritrasformato in ossalacetato**. Gli **elettroni** tornano su **NAD⁺** che è dentro i mitocondri per diventare NADH: il NADH che era fuori è diventato NADH nei mitocondri. Gli elettroni hanno ridotto il NAD⁺ presente nel mitocondrio. Il malato può essere trasportato attraverso la membrana mitocondriale tramite un **carrier**, un **malato α-chetoglutarato**. Il malato è portato nei mitocondri e **trasporta fuori** l'α-chetoglutarato dai mitocondri.

L'α-chetoglutarato può derivare dal **glutammato**, un amminoacido, attraverso una **transaminazione**, una reazione in cui il **gruppo amminoacidico** del glutammato può essere **trasferito** all'**ossalacetato** che diventa **aspartato** mentre il **glutammato** diventa **α-chetoglutarato**.

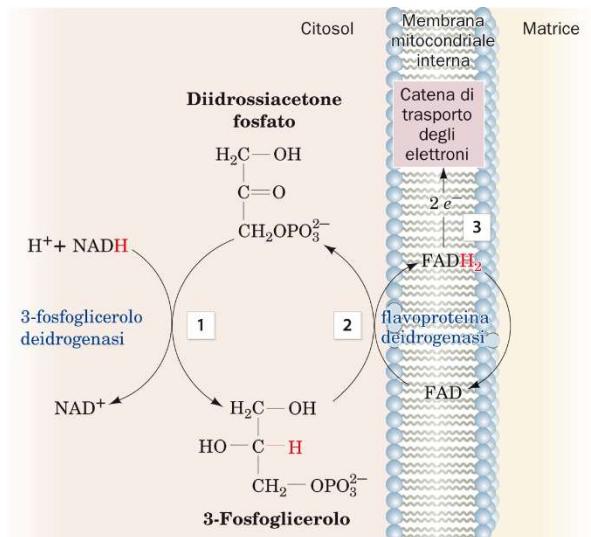
Le transaminasi trasferiscono un gruppo amminoacidico dall'amminoacido ad un α-cheto acido. Questo diventa un amminoacido mentre l'amminoacido diventa α-cheto acido.

L'aspartato esce con il carrier glutammato aspartato dove diventa ossalacetato che può diventare malato. Una volta entrato nel mitocondrio, il malato diventa ossalacetato che può tornare aspartato. Il glutammato può diventare α -chetoglutarato e uscire con il carrier malato α -chetoglutarato: fuori può diventare glutammato e rientrare nei mitocondri.

Sistema navetta del glicerofosfato

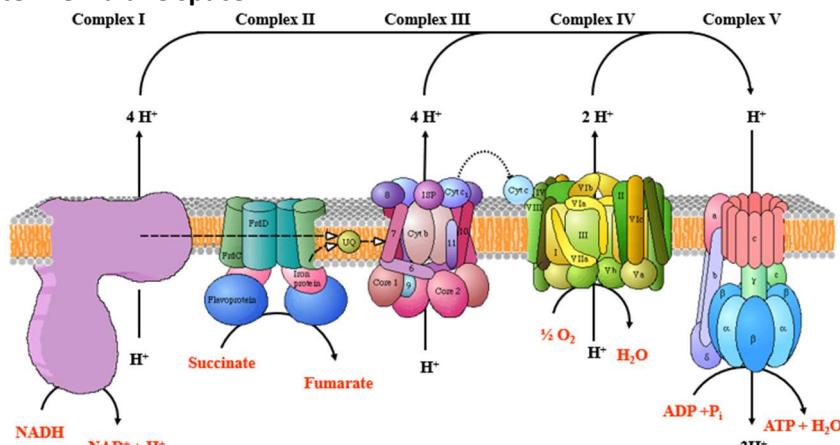
Il diidrossiacetone fosfato nel citosol può essere ridotto usando NADH citosolico e trasformato in glicerolo-3-fosfato. Il glicerolo-3-fosfato trova sulla membrana una flavoproteina deidrogenasi che contiene FAD ed è quindi ossidato: i suoi elettronni vanno sul FAD che diventa FADH_2 e gli elettoni del FADH_2 vanno direttamente alla catena di trasporto degli elettronni. Il potenziale redox FAD FADH_2 rispetto a NAD^+ NADH è più positivo quindi gli elettoni del NADH sono trasportati dal FAD che entra più a valle nella catena di trasporto rispetto al NADH. Si produce meno ATP se la differenza di energia è più piccola.

I sistemi navetta servono a portare nel mitocondrio gli elettronni del NADH che possono entrarci usando due sistemi navetta: uno del malato aspartato che ossida NADH citosolico e riduce NADH nei mitocondri; un altro che usa NADH per ridurre il diidrossi acetone fosfato e il prodotto che si forma è il glicerolo-3-fosfato, il substrato di un enzima che contiene FAD che diventa FADH_2 che troviamo poi nei mitocondri.



La catena respiratoria mitocondriale

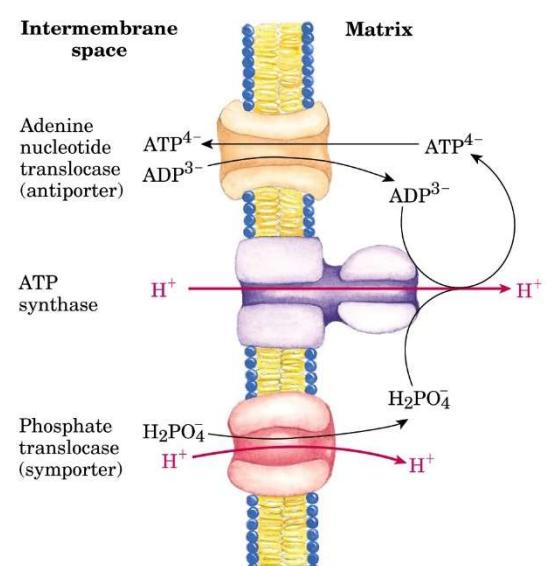
Intermembrane space



Gli elettronî sono usati nella catena respiratoria mitocondriale dove l'accettore finale è l'ossigeno trasportato dall'emoglobina. La catena respiratoria mitocondriale è costituita da 4 complessi multienzimatici (proteine multimeriche) e sono il complesso 1°, 2°, 3° e 4°. L'energia liberata durante il trasporto degli elettronî viene usata dai complessi 1, 3 e 4 per trasportare protoni dal lato della matrice

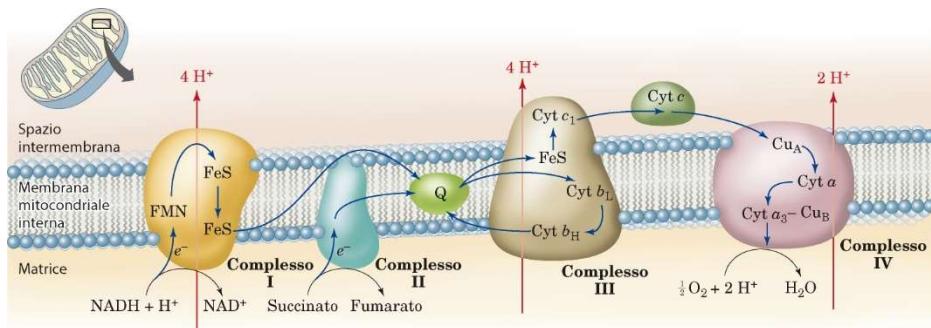
Matrix

nello spazio intermembrana. Questi tre complessi sono anche pompe protoniche, sistemi attivi che consumano energia per trasportare molecole contro gradiente. Si parla quindi di trasporto attivo. I protoni vengono presi dalla matrice e si accumulano nello spazio intermembrana dove si forma un gradiente protonico transmembrana, una forma di energia, usata dal complesso quinto ovvero ATP sintetasi, l'ATPasico mitocondriale che usa energia generata dal trasporto di elettronî all'ossigeno per fare ATP. Non trasporta elettronî, usa il gradiente per generare ATP. La sua attività è strettamente legata al trasporto di elettronî, se non funziona uno non funziona l'altro e viceversa, è un sistema accoppiato.



L'ATPasi sintetizza ATP da ADP e fosfato inorganico. ATP e ADP sono presenti in tutta la cellula ma vanno rigenerati. ATP si rigenera nel mitocondrio, un po' anche dalla glicolisi ma soprattutto a livello mitocondriale. Per ogni glucosio che diventa piruvato abbiamo un guadagno netto di 2 molecole di ATP anche in assenza di ossigeno. Per tutti gli altri metaboliti serve ossigeno quindi si deve entrare nei mitocondri, produrre NADH e FADH₂ e portare elettroni all'ossigeno, generare il gradiente per sintetizzare ATP. Nel citosol si può usare ATP, quindi, deve essere trasportato all'interno del citosol e l'ADP dal citosol ai mitocondri. Serve un trasportatore nucleotidi, uno scambiatore di ATP e ADP che porta ATP fuori dai mitocondri e ADP al loro interno in modo che l'ATPasi trasformi ADP in ATP. Il fosfato inorganico ha un traslocatore per essere portato nei mitocondri. Si parla di trasporto sinporto quello del fosfato perché protoni e fosfato vanno nella stessa direzione, mentre trasporto antiporto quello dei nucleotidi adenilici in quanto entra ADP ed esce ATP.

Con l'ossidazione del NADH si ottengono fino a 3 molecole di ATP.



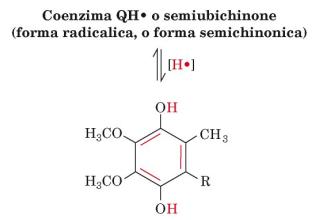
Gli elettroni devono essere sempre accompagnati quindi, perché si spostino dal NADH all'ossigeno molecolare devono avere dei trasportatori. Gli enzimi sono separati fra di loro quindi qualcuno deve prendere gli elettroni che passano fra enzimi e portarli all'enzima successivo. Il complesso 1

e 2 sono due punti di ingresso degli elettroni che possono entrare nella catena. Il primo ha come donatore di elettroni il NADH, il secondo come donatore di elettroni il succinato che, una volta donati gli elettroni, diventa fumarato. Nel ciclo di Krebs la succinato deidrogenasi è l'unico enzima sulla membrana mitocondriale interna, gli altri sono di matrice. Gli elettroni entrano come FADH₂ nel complesso 2 che lavora in parallelo con il complesso 1.

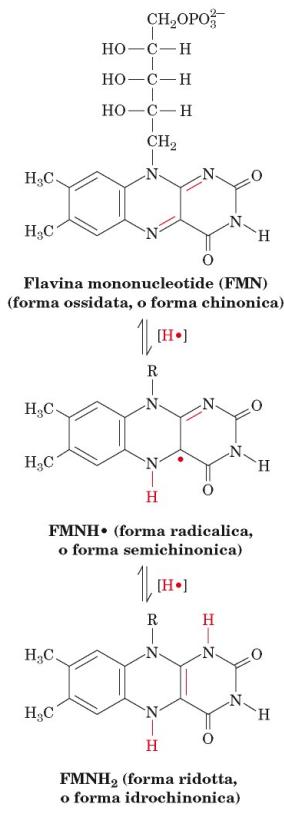
Coenzima Q e citocromo C sono due trasportatori mobili di elettroni. Gli elettroni del NADH vanno sul complesso 1° dove ci sono trasportatori che danno elettroni all'ubichinone o coenzima Q10 che li prende riducendosi a ubichinolo e dando elettroni al complesso 3°. Gli elettroni del succinato entrano nel complesso 2° e riducono il FAD dentro il complesso 2, il FADH₂ da elettroni al coenzima Q10 che diventa ubichinolo e dona elettroni al complesso 3°. Dal complesso terzo in poi la catena è lineare: gli elettroni vengono trasferiti dal citocromo C che li trasporta dal terzo al quarto. Il quarto da elettroni all'ossigeno che diventa acqua.

Il coenzima Q

Nella forma ossidata o ridotta deve poter sottostare ad un equilibrio redox: si passa dalla forma completamente ossidata a quella completamente ridotta con l'acquisto di un atomo di H quindi di un elettrone e di un protone. Passa così dalla forma ossidata a una semichinonica o semi ridotta e con l'acquisto di un secondo elettrone e un secondo protone, passa alla forma chinolica, completamente ridotta. È formato da un anello benzenico a cui è attaccata una catena isoprenica a 5 atomi di carbonio che possono polimerizzare. Nel coenzima Q10 sono presenti 10 unità isopreniche attaccate all'anello. Il Q10 è quello più presente nei mammiferi superiori. La lunghezza della catena varia da 6 a 10 unità, non sono state trovate catene con meno di 6 unità (nei lieviti sono 6, nei roditori è prevalente il Q9, nello squalo Q8). La catena deve essere lunga permettendo alla molecola liposolubile di stare nella membrana. Il citocromo C è una proteina periferica mentre le altre sono transmembrana, muovendosi lungo la membrana dalla parte esterna. Il coenzima Q prende elettroni dal complesso 1° e 2° trasportandoli al terzo, il citocromo C li trasporta dal 3° al 4° che



dà elettroni all'ossigeno trasformandolo in acqua. Non esiste nessun amminoacido che possa sottostare ad un equilibrio redox reversibile, se ossidati non possono essere ridotti quindi non possono trasportare elettroni: perché una proteina trasporti elettroni ha bisogno di gruppi prostetici e cofattori.

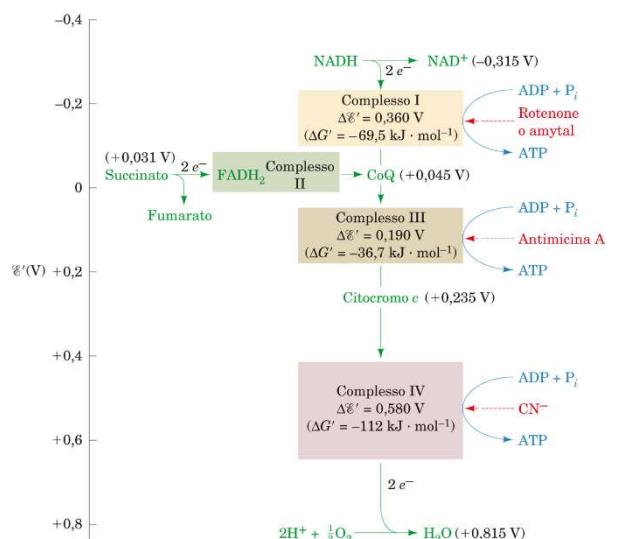


Nel complesso 1° gli elettroni del NADH devono andare su una molecola che accetti elettroni: questa molecola è il **flavin mononucleotide (FMN)**, l'accettore iniziale di elettroni. È una flavoproteina simile al FAD che può prendere elettroni. Il sito di ossidazione del NADH è sulla punta ma gli elettron devono arrivare sul coenzima Q, dentro la membrana, e quindi servono cofattori per trasportarli fino al coenzima. Sono presenti anche dei **centri ferro zolfo**, circa 7/8. Quindi prima passano sul flavin mononucleotide e poi sui centri ferro zolfo. Anche negli altri complessi c'è un accettore iniziale, una serie di centri per trasportare elettroni e poi il coenzima Q che deve dare elettroni al **complesso 3°** dove abbiamo **citocromi**, **centri ferro zolfo** e **citocromo C come trasportatore**. Nel **quarto** abbiamo **ioni rame** che trasportano elettroni nei citocromi. Il trasporto di elettroni libera energia per trasferire protoni dalla matrice allo spazio intermembrana. Per ogni coppia di elettroni che passa nel primo complesso, vengono trasferiti 4 protoni nello spazio intermembrana, la stessa coppia che passa al terzo complesso ne libera altri 4 e la stessa coppia al quarto altri 2. In totale **gli elettroni del NADH provocano il trasferimento di 10 atomi di idrogeno**.

Il complesso due non è una pompa protonica. Usando succinato come donatore di elettroni alla catena, gli elettroni entrano nel complesso due e dal terzo portano fuori 4 protoni e due dal quarto. Mancano i 4 del primo complesso quindi portiamo fuori **6 protoni** e non 10 perché entrano più a valle, perdendo il primo sito e di conseguenza abbiamo meno energia.

Panoramica del trasporto degli elettroni

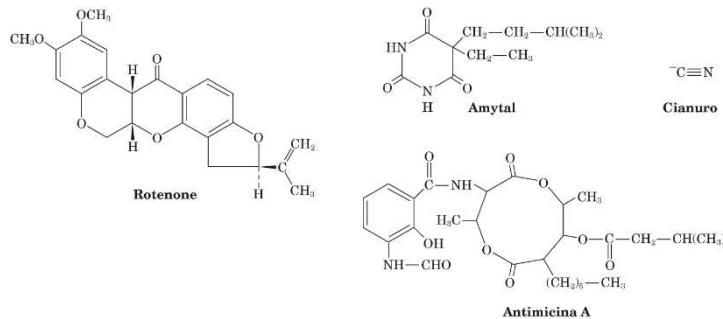
Gli elettroni vanno dal NADH all'ossigeno per la differenza di potenziale redox. Qui abbiamo una scala del potenziale redox dove ci sono tutti i componenti della catena di trasporto. Il complesso primo prende elettroni dal NADH e li dà al coenzima Q. La differenza di potenziale è di 0.360 V che corrisponde ad un ΔG di -69 kJ. Se prendiamo i due elettroni del NADH e li portiamo sul coenzima Q, liberiamo energia pari a 69 kJ per mole ed essendo un valore negativo, è un processo **esoergonico**. 69 in valore assoluto è maggiore di +30 kJ di energia libera usata per sintesi molecola di ATP, quindi, significa che **l'energia liberata può essere usata per la sintesi di ATP**. Si ha un trasferimento di elettroni a livello del complesso 1 che è il primo sito di accoppiamento del sistema. Il **processo di accoppiamento** libera energia e la reazione **esoergonica** è accoppiata alla **sintesi dell'ATP** che è **endoergonica**. Possiamo fare circa 3 molecole di ATP dal trasporto di elettroni dal NADH all'ossigeno: dividendo in pacchetti il trasporto di energia, il primo pacchetto che liberiamo serve per la sintesi dell'ATP ed è quello che abbiamo quando ossidiamo NADH e riduciamo il chinone. La differenza di potenziale fra i due permette di avere energia sufficiente per sintetizzare la prima molecola di ATP rendendo il complesso 1 il primo sito di accoppiamento. Il coenzima Q da elettroni al complesso terzo e il ΔG è -36 kJ per mole, energia sufficiente per la sintesi di una seconda molecola di ATP. Il complesso terzo è il secondo sito accoppiamento. Il citocromo c trasferisce elettroni dal complesso terzo al quarto e il ΔG è -112 kJ. Il complesso quarto è il terzo sito di accoppiamento.



Dividendo l'energia in step, la possiamo usare per sintetizzare più molecole di ATP (cioè 3) dato che la differenza di potenziale degli step è sufficiente per sintetizzare ATP.

Il complesso 2 prende elettroni dal succinato e il potenziale redox della coppia succinato-fumarato e del coenzima Q sono molto simili quindi la differenza di potenziale è molto vicina allo zero. Se il trasferimento di elettroni è vicino a 0, non c'è energia sufficiente per sintesi ATP e il trasferimento di elettroni da succinato a coenzima Q non è sufficiente per la sintesi di una molecola di ATP. Dal coenzima Q procedono nella catena andando al complesso terzo e quarto dove la differenza di potenziale è sufficiente. Se gli elettroni vengono dal succinato, la sua ossidazione porta a 2 molecole di ATP.

La sequenza degli eventi lungo la catena di trasporto degli elettronni è stata chiarita usando inibitori specifici

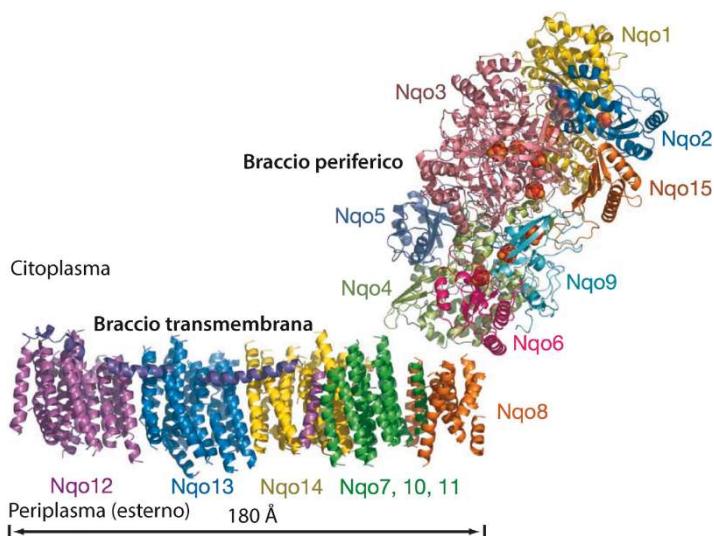


Usando inibitori specifici è stato possibile stabilire l'ordine del percorso degli elettronni dal NADH all'ossigeno. Il rotenone è un inibitore del complesso 1°. È un veleno. Anche l'amitale è un inibitore. Se trattiamo i mitocondri con rotenone gli elettroni dal NADH non vanno all'ossigeno. Se diamo succinato il trasporto c'è quindi vuol dire che entra dopo il blocco del rotenone. Il succinato diventa complesso secondo.

L'antimicicina A è un veleno di serpente, inibitore del

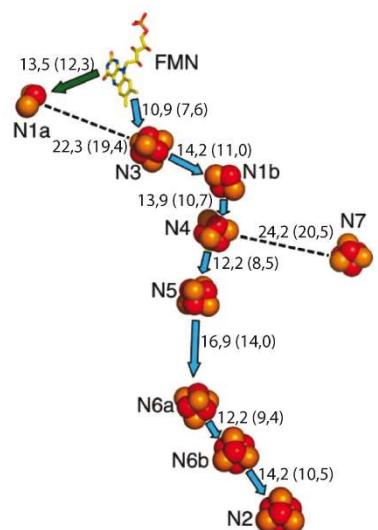
complesso terzo. Non respirano i mitocondri neanche se metto NADH e succinato quindi l'antimicicina A agisce dopo il NADH e il succinato ed è quindi il complesso terzo. Se entrano elettroni dopo il complesso terzo, posso darli direttamente sul citocromo C e consumare ossigeno. Se metto cianuro non si consuma più ossigeno, indipendentemente da qualsiasi subunità dia ai mitocondri. Blocca l'ultima tappa di controllo, quindi il complesso quarto. L'ordine dei vari complessi è stato scoperto per inibitori specifici.

Il complesso 1°



chinone il cui potenziale è ancora più positivo.

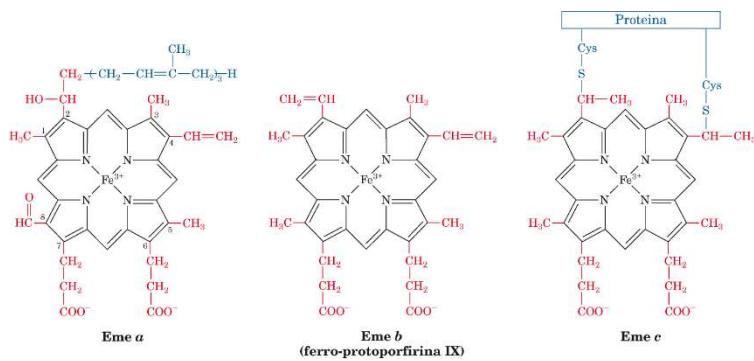
Il complesso primo ha una parte dentro la membrana e una che sporge nella matrice: gli elettroni partono da dove viene ossidato il NADH e arrivano nella regione dell'interfaccia matrice membrana dove viene ridotto il chinone. Percorrono la strada non da soli, tramite i centri ferro zolfo che trasferiscono elettroni al coenzima Q mentre il flavin mononucleotide li prende dal NADH. Sono centri fondamentali per il trasporto di elettroni da NADH a coenzima Q. Il potenziale dei centri è sempre più positivo per permettere agli elettroni di arrivare sul



N1a non è in catena, è troppo lontano da N3 quindi gli elettroni non possono andare da N1a a N3. È vicino al flavin mononucleotide. I centri ferro zolfo funzionano per la presenza del ferro che può avere due stati redox, 2+ e 3+. Ogni centro può portare 1 elettrone per volta ma il NAD^+ come il FAD, trasporta due elettroni per volta. Gli elettroni del NADH vanno sull'flavin mononucleotide ma darà un solo elettrone mentre l'altro rimarrà sul flavin mononucleotide che diventa semichinone, un radicale. Se l'elettrone fosse

dato all'ossigeno potrebbe formare una specie reattiva radicalica, l'anione superossido e causare stress ossidativo. Per evitare che l'elettrone dia stress ossidativo, viene spostato sul centro N1a, evitando che si formi il semichinone flavina che potrebbe formare altri radicali liberi. Gli elettroni devono essere trasportati in maniera sicura all'ossigeno, senza allontanarsi dalla catena di trasporto e senza formare una specie reattiva dannosa per le cellule nel caso in cui interagissero con l'ossigeno. Devono essere sempre legati alle strutture. I mitocondri sono sia centrali energetiche che i maggiori produttori di specie reattive perché gli elettroni, anche se pochi, sfuggono al sistema formando radicali liberi.

I centri ferro zolfo sono cofattori. Il coenzima Q non è una vitamina, può essere sintetizzato dalle cellule, è un lipide. È chiamato anche ubichinone, si trova in tutte le membrane cellulari con funzione antiossidante.



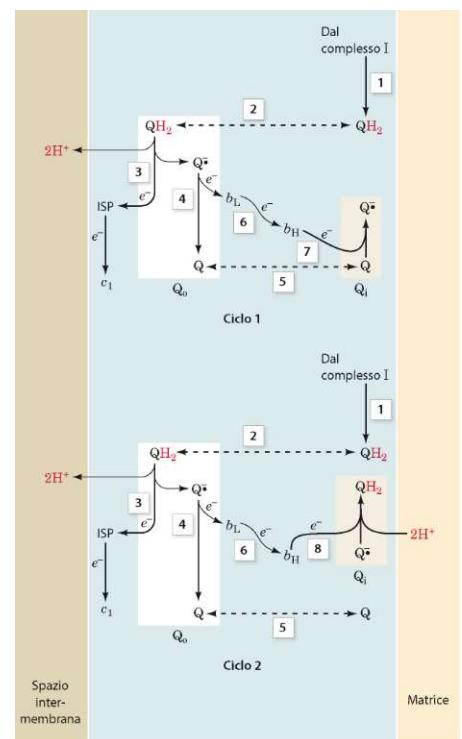
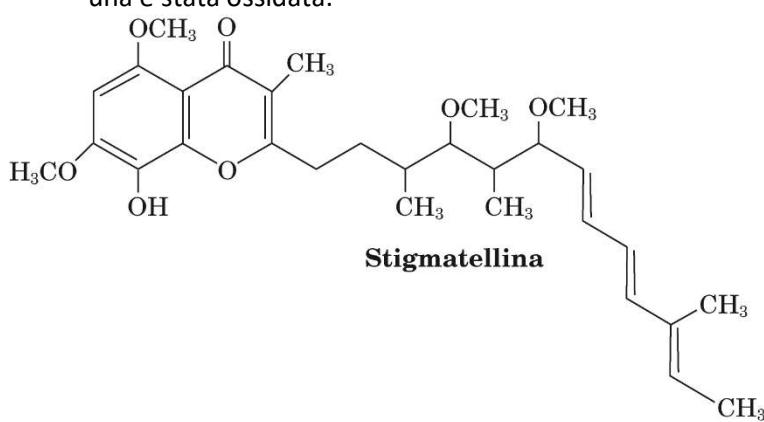
I citocromi sono proteine che hanno legato un gruppo eme. Nei citocromi c'è sempre il ferro al centro della struttura che può passare da 2+ a 3+ e funziona come trasportatore di elettroni.

Complicazione a livello del complesso terzo: NADH e FADH₂ e coenzima Q, trasportano e cedono due elettroni per volta. I citocromi possono accettare 1 elettrone per volta quindi sul complesso terzo solo uno dei due elettroni del coenzima Q va sul complesso terzo.

L'altro deve girare fino a quando non può prendere la strada diretta: l'elettrone è parcheggiato in un sistema per essere riciclato e passare in un secondo momento. Viene chiamato ciclo Q.

Il ciclo Q

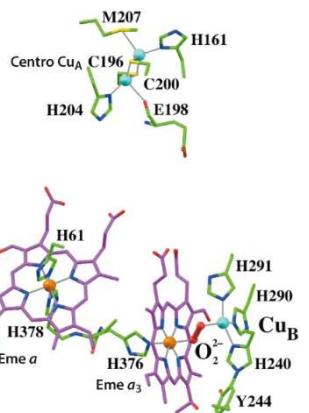
Nel complesso terzo troviamo due siti per l'interazione con il coenzima Q: il centro di ossidazione (centro o) è verso l'esterno mentre il centro di riduzione è verso il centro (centro i), verso la matrice. Il centro i lega in forma ossidata. Il primo ubichinolo deve essere ossidato al centro o del complesso terzo e ha due elettroni da dar via: un elettrone prende la via del citocromo c, il secondo se rimane sul semichinone può generare radicali dell'ossigeno e quindi torna verso il centro i oppure viene trasferito su una molecola di chinone legata al centro i che diventa semichinone avendo preso un elettrone dal chinolo: questo centro lega la specie fortemente evitando che si formino radicali liberi. Una seconda molecola di chinolo arriva sul centro o e da due elettroni: uno segue la via dei centri ferro zolfo e del citocromo c e l'altro va sul centro i riducendo il semichinone che diventa chinolo. Abbiamo usato due molecole di chinolo ma una è stata ossidata.



L'antimicina blocca il centro i e gli elettroni rimangono sul centro o formando radicali. La stigmatellina agisce sul centro o.

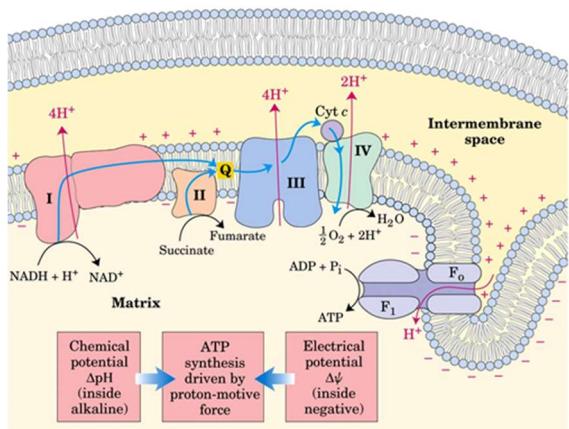
Il citocromo c

Il citocromo C porta gli elettronni al complesso quarto. Il primo **accettore** è un **atomo di rame Cu_A**, gli elettroni vanno poi **all'eme a** e al **centro binucleare** che mantiene saldamente le specie parzialmente ridotte dell'ossigeno come arrivano elettroni. Il centro binucleare contiene sia **eme a₃** che **Cu_B**, la seconda molecola di rame. Per ridurre una molecola di ossigeno serve acquistare quattro elettroni, diventando acqua che esce e non è dannosa.



La fosforilazione ossidativa

Grazie al trasporto di protoni si crea un **gradiente elettrochimico**, dato dalla **differenza di cariche** tra l'**interno** e l'**esterno della membrana interna del mitocondrio**, e l'energia conservata da questo gradiente è chiamata **forza proton-motrice** e sarà usata per **sintetizzare ATP** dalla proteina **ATP sintasi**. La teoria chemiosmotica spiega come un gradiente protonico possa collegare il trasporto di elettroni alla sintesi di ATP. La sintesi di ATP è strettamente associata ad uno stato energizzato della membrana e infatti l'ATPas usa il gradiente elettrochimico. L'ATP sintasi è costituita da un **componente F₁** che sorge nella matrice mitocondriale e **catalizza la sintesi dell'ATP** tramite un meccanismo di **variazione della propria capacità di legame**. È mosso dal flusso di protoni che attraversano la membrana. I protoni rientrando perdono l'energia usata dall'ATPas per fare ATP. Il **componente F₀** dell'ATP sintasi è un **canale di membrana** e contiene un **anello c** la cui **rotazione** è alimentata dalla dissipazione del gradiente protonico che, a sua volta, **determina i cambiamenti conformazionali nel componente F₁**. Gli agenti che dissipano il gradiente protonico sono in grado di disaccoppiare il trasporto degli elettroni dalla sintesi dell'ATP.

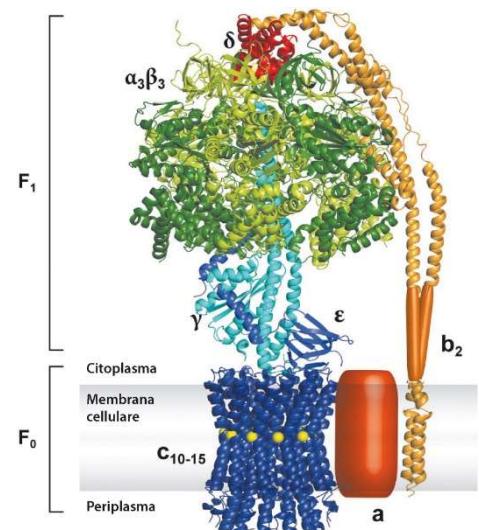


L'ATPas è un meccanismo di catalisi rotatorio in cui ruota generando un cambio di struttura nella parte catalitica e i protoni rientrano.

Le reazioni di ossidazione liberano energia usata per fare ATP. Ci sono tre siti di accoppiamento: per ogni coppia di elettroni che passano possiamo sintetizzare tre molecole di ATP dall'ossidazione del NADH. In realtà il valore va da 2.5 a 2.8, 3 è la quantità massima. Otteniamo 2 molecole (1.5/1.8) se partiamo dal succinato. La quantità dipende dal funzionamento delle pompe che possono fare giri a vuoto e non far uscire i 10 protoni.

Il **rotore** dell'ATPas ha dalle 12 alle 15 subunità di proteine. Un **colletto** collega il rotore alla **testa**, fatta da 3 subunità α e 3 β . Le α sono subunità **accessorie**, le β sono le **catalitiche**. Il **sistema allostatore** connette il rotore alla parte catalitica. Il **canale protonico** è fatto da **due semi canali**, uno che connette la parte **esterna** con la parte **centrale** del rotore e l'altro che collega la parte **centrale** con la **matrice**. È presente un amminoacido **acido** (**acido glutammico**) che diventa **neutro** quando prende il protone e provoca un **cambiamento** nelle connessioni con **le altre subunità che si spostano**. Il protone si dissocia quando la subunità a cui era legato incontra anche l'altro semi canale.

Il protone va verso la matrice dove ce ne sono pochi ma esce sfalsato e questo permette al sistema di ruotare. Anche la testa ruota. La **subunità γ** ruotando **fa variare** la forma anche alle **altre** e questo induce la **sintesi di ATP**. Le

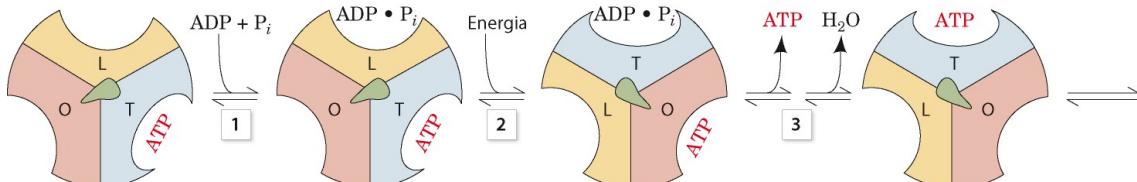


subunità β vengono toccate come ruota la subunità γ e le subunità β toccate assumono un'altra forma.

Senza membrana o se la membrana presenta dei buchi, non c'è il gradiente protonico.

L'ATPasi può idrolizzare ATP: lavorando a rovescio consuma energia e ruota. La proteina si ruota emette luce e può essere vista al microscopio.

Le subunità β esistono in forma **O**, **L** e **T**. Al centro è presente la subunità γ (verde in figura) che ruotando colpisce in modo diverso le subunità **O** (sito aperto, vuoto). **L** invece è il sito che lega ADP e fosfato inorganico mentre **T** sono le subunità β che una volta chiuse, spostano ADP e fosfato inorganico nella tasca chiusa dove l'ambiente è diverso da quello di fuori, molto idrofobico, e il fosfato si lega all'ADP spontaneamente.

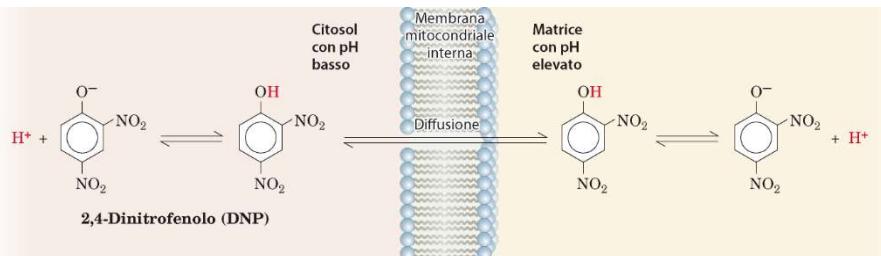


La subunità β si apre dopo un altro giro e si libera ATP perché la subunità diventa O.

La batteriorodopsina usa l'energia luminosa per trasportare protoni. Il gradiente protonico diventa l'unica fonte di energia: l'ATPasi usa quest'energia per fare ATP.

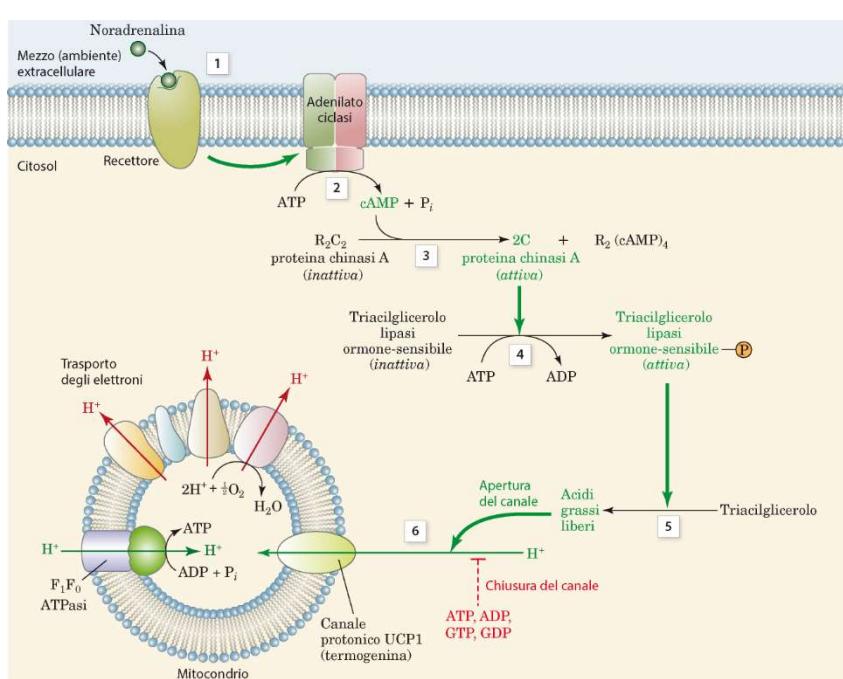
È un sistema accoppiato: se funziona il trasporto di elettroni, funziona anche la sintesi dell'ATP. Un blocco dell'ATPasi causa un blocco della respirazione cellulare.

I **disaccoppianti** eliminano l'accoppiamento tra trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa **annullando il gradiente protonico transmembrana**. I disaccoppianti sono molecole idrofobiche con un protone dissociabile e trasportano protoni attraverso la membrana dissipando il gradiente protonico. Il **2,4-dinitrofenolo** è un fenolo, un alcol aromatico. È un **acido debole** che può trovarsi in equazione in forma **associata e dissociata**. Se sul lato esterno ci sono molti protoni, sarà favorita la forma **indissociata**, e non essendo carico, può **diffondersi** nella membrana.



processo di trasferimento di elettroni può continuare. Il 2,4-dinitrofenolo disaccoppia il processo, li scinde, non crea il gradiente, quindi, non c'è sintesi di ATP.

Il tessuto adiposo bruno è ricco di mitocondri: si trova negli animali che vanno in letargo e nei neonati. La **termogenina** è una proteina disaccoppiante che prende protoni all'esterno e li porta dentro mantenendo il trasferimento di elettroni ma non l'ATP: l'energia liberata viene usata sottoforma di calore per mantenere la temperatura corporea degli animali ibernati.



La fotosintesi

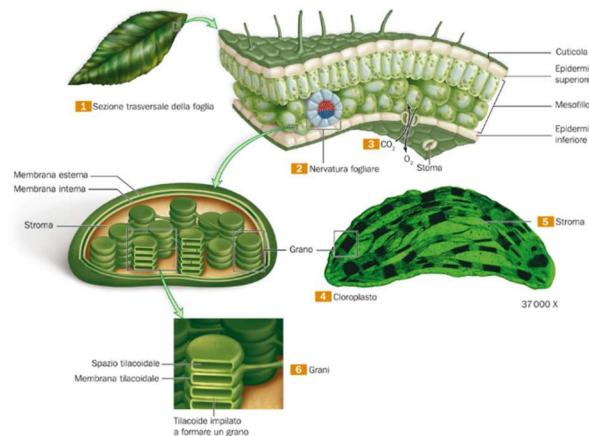
L'energia del Sole

1.5×10^{22} kJ di energia solare arrivano ogni giorno sulla Terra. L'1% è assorbito dagli organismi fotosintetici e trasformato in energia chimica (glucosio). L'**ossigeno** è un sottoprodotto della fissazione dell'anidride carbonica.



10^{11} tonnellate di anidride carbonica sono fissate per anno sul globo terrestre. La formazione di zuccheri da anidride carbonica ed acqua richiede energia. La **luce del Sole** è la sorgente di energia.

La fotosintesi è la via metabolica in cui l'anidride carbonica viene dapprima legata ad un composto organico, quindi convertita in un carboidrato: avviene nelle **membrane tilacoidali** dei **cloroplasti**, strutture con una **doppia membrana** che formano dei ripiegamenti (**lamelle**) che si **impilano** per formare dei **grana**. La parte **solubile** dei cloroplasti è lo **stroma**, dove avviene la fotosintesi mentre la **parte interna** delle vescicole è lo **spazio tilacoidale** o lume tilacoidale. I cloroplasti possiedono **DNA, RNA e ribosomi**. Anche il loro DNA deriva dai batteri che hanno inglobato. Trasformano l'energia luminosa in chimica.



Le piante sono verdi per la **clorofilla**, localizzata nelle **membrane tilacoidali**, che presenta uno **ione magnesio** al centro: hanno delle strutture aromatiche che assorbono la luce da 420 nm a 660 nm. Non assorbono il verde ma lo riflettono ed è il colore che noi vediamo.

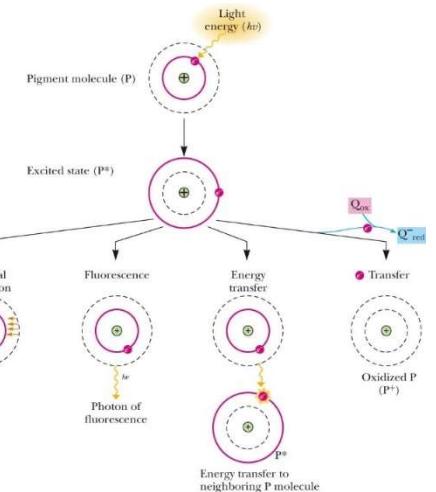
L'**anidride carbonica** e l'**acqua** vengono assorbite attraverso delle piccole aperture dell'epidermide chiamate **stomi**. Una volta nella foglia, diffondono nei cloroplasti. La membrana tilacoidale contiene clorofilla e altri pigmenti che assorbono la luce solare utile alla fotosintesi.

L'intero processo fotosintetico viene diviso in due fasi distinte: **la fase luminosa** (che può avvenire solo in presenza di luce) e **la fase oscura** (che non necessita di luce e può avvenire indifferentemente in presenza o in assenza di luce).

Nella **fase luminosa** le reazioni avvengono nelle **membrane tilacoidali**: i pigmenti fotosintetici assorbono **l'energia** radiata dal **Sole** e la trasformano in **energia chimica** (sottoforma di **legami fosfato** nelle molecole di **ATP** e come **potere riducente** nel **NADPH**). Va **ridato un elettrone** alla **clorofilla** essendo ossidata e viene utilizzato **l'idrogeno dell'acqua** rilasciando **ossigeno** come **sottoprodotto**. Se un **fotone** arriva sulla molecola di **clorofilla**, questa passa da uno **statuto energetico basso** ad uno **statuto eccitato**, ad **alta energia** e tenderà a tornare allo **statuto fondamentale**. Nello **statuto ad alta energia** le molecole vicine possono allontanarsi portando con sé gli **elettroni eccitati**. Questi elettroni saranno usati per **produrre potere riducente** indirettamente attraverso una catena di trasporto degli elettroni che genera una **forza motrice protonica** attraverso la **membrana** per alimentare la **sintesi dell'ATP**.

Ciascun fotone è un quanto di energia e ha 4 possibili destini:

1. Se perde energia termica, è disperso come **calore**.
2. Disperso come **luce** se un elettrone eccitato in seguito all'assorbimento di una radiazione luminosa torna al livello energetico di partenza emettendo un fotone (**fluorescenza**)
3. Trasferimento di energia per **risonanza**: l'energia di eccitazione può essere trasferita ad una molecola vicina che a sua volta passa in uno stato eccitato.
4. **Trasduzione** dell'energia: l'energia di eccitazione modifica il potenziale di riduzione del pigmento rendendolo un donatore di elettroni.



FLUORESCENZA: emissione di un fotone tornando allo stato fondamentale (S_0)

(S_0). La luce emessa ha meno energia della luce assorbita. Se l'energia della radiazione luminosa è uguale alla differenza fra lo stato fondamentale e il primo stato eccitato (S_1), l'elettrone si sposta al livello superiore e può tornare al S_0 perdendo energia sottoforma di calore. Si può trasferire l'energia persa ad un'altra molecola che si eccita. Il trasferimento di un elettrone ad un orbitale a più alta energia dovuto all'assorbimento dell'energia luminosa aumenta il potenziale di trasferimento di questo elettrone ad un accettore opportuno.

TRASDUZIONE ENERGIA: cambia il potenziale redox e può diventare un donatore di elettroni instaurando una reazione redox.

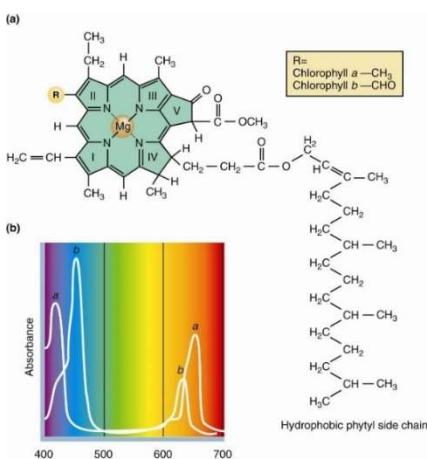
Nella **fase oscura** l'ATP e il NADPH formati nella prima fase **riducono l'anidride carbonica**, utilizzandola per **sintetizzare i carboidrati** nello **stroma** dei cloroplasti: si ha la fissazione dell'anidride carbonica in zuccheri ed è anche chiamata ciclo di Calvin.

Struttura e spettro di assorbimento della clorofilla a e b

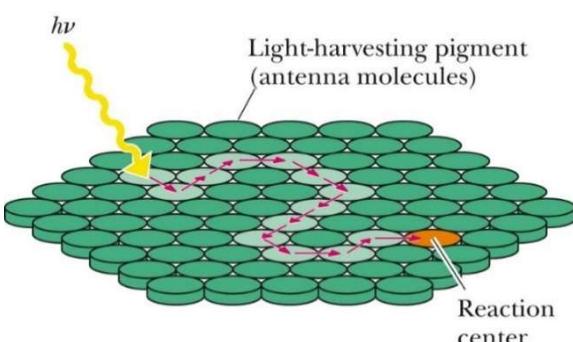
La fotosintesi si basa sulla **trasduzione di energia luminosa in chimica (ossido-riduzione)**. L'assorbimento di un fotone porta la clorofilla da uno stato fondamentale ad uno eccitato e gli elettroni nello stato eccitato vengono trasferiti ad una molecola vicina A producendo una clorofilla ossidata e una specie A ridotta. **L'ossidazione di A porta alla riduzione di NADP⁺ a NADPH** mentre le altre molecole raccolgono l'energia luminosa. Il sistema ripristina il suo stato originale **ossidando una molecola di acqua**.

Gli spettri di assorbimento delle clorofille a e b sono diversi per cui la loro presenza permette alle piante di assorbire uno spettro più ampio di radiazioni luminose.

L'unità fotosintetica è costituita da **centinaia di molecole di clorofilla** in grado di catturare l'energia luminosa e **da una coppia speciale di clorofille** che formano il **centro di reazione**. La luce è catturata da una **clorofilla antenna** ed è **trasferita** mediante diverse unità di



clorofilla al dimero di clorofilla fotochimicamente attive del **centro di reazione**. Le molecole di clorofilla del centro di reazione permettono il trasporto degli elettroni. Le altre molecole si occupano di recepire l'energia luminosa e, attraverso l'eccitazione di elettroni, convogliarla al centro di reazione che dà gli elettroni all'accettore. L'ossidazione della clorofilla porta alla formazione di un radicale cationico le cui proprietà come accettore di elettroni sono importanti per la fotosintesi.



I fototrofi ossigenici hanno due distinti fotosistemi: PSI (P700) e PSII (P680)

I **fotosistemi** sono dei **complessi multienzimatici** che trasferiscono gli elettroni da un donatore ad un accettore. Usano l'**energia luminosa** per aumentare l'energia di questi elettroni. Avere **due fotosistemi** rende il sistema stesso più efficiente. I **cloroplasti** che usano contemporaneamente la luce a **680 e 700 nm** producono **più ossigeno** della somma della quantità prodotte da ciascun fotosistema. Gli **elettroni** trasferiti arrivano dalla **clorofilla**: alcune molecole sono parte integrante dei fotosistemi, altre appartengono al complesso antenna. Il **complesso antenna** prende **energia** e la **convoglia** sui **due sistemi**. Nel centro di reazione la clorofilla in stato eccitato trasferisce elettroni dal fotosistema 2 al 1. Dal centro di reazione le cariche vengono separate e gli elettroni sono prelevati da accettori (che si riducono) mentre le molecole di clorofilla si ossidano.

La fotosintesi è una reazione redox in cui il diossido di carbonio viene ridotto e l'acqua viene ossidata, con liberazione di ossigeno e formazione di glucosio.

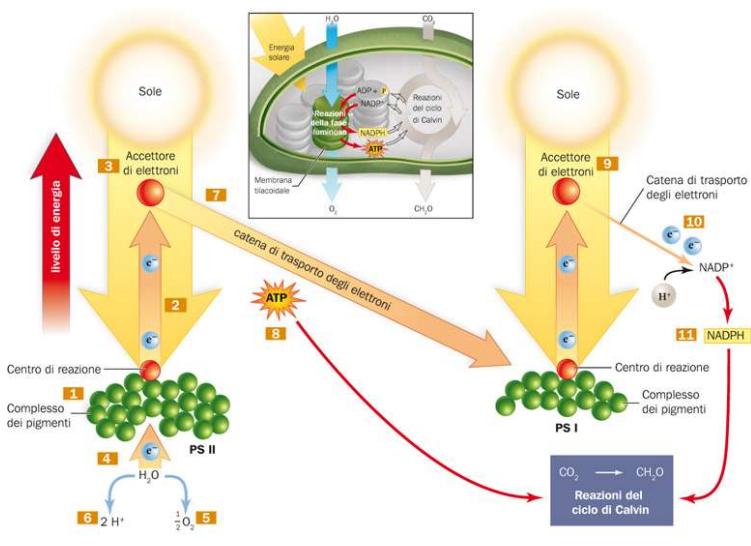


Durante la fotosintesi è attivo un coenzima di ossidoriduzione chiamato NADP⁺ che accetta elettroni riducendosi secondo $\text{NADP}^+ + 2e^- + H^+ \rightarrow \text{NADPH}$

Durante la fase luminosa gli elettroni si spostano dall'acqua al NADP⁺ seguendo un percorso non ciclico che ha inizio nel fotosistema 2 e si conclude nel fotosistema 1 attraverso una catena di trasporto di elettroni. Il fotosistema 1 ha ancora molecole di clorofilla che trasferiscono energia sugli elettroni nel centro di reazione che userà l'energia presa per ridurre NADP⁺ a NADPH. Gli elettroni trasferiti dal fotosistema 2 all'1 pompano protoni per la sintesi chemiosmotica di ATP.

Il fotosistema 2 si occupa del trasporto di elettroni e del ripristino degli elettroni stessi usati nella catena di trasporto attraverso l'ossidazione dell'acqua. Il fotosistema 1 produce ossigeno. Perché il sistema continui bisogna rispristinare il fotosistema 2 ridando elettroni alla clorofilla. Il fotosistema 2 scinde una molecola di acqua che, ossidandosi, porta alla formazione di ossigeno portando ad una produzione organica. L'ossigeno formato rifornisce gli elettroni trasferiti tramite la catena di trasporto degli elettroni che accoppia il fotosistema 2 all'1 mediante citocromo b_6f .

Nei batteri con un solo fotosistema, vengono usate altre sostanze invece dell'acqua e in questo caso si parla di fotosintesi non ossigenica.

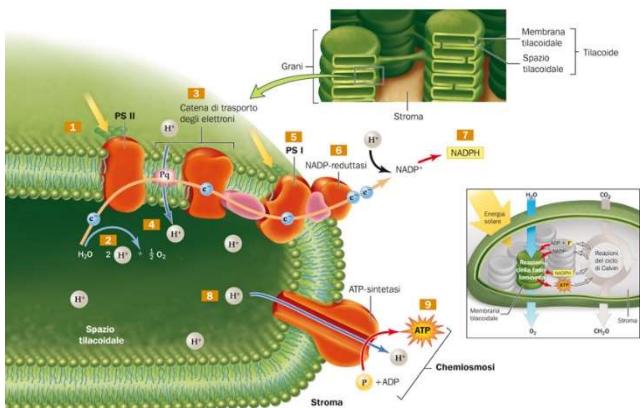


I trasportatori di elettroni sono organizzati in una catena secondo il loro potenziale standard di riduzione. Questo schema è anche detto schema Z. I suoi componenti sono il plastochinone, la plastocianina, la ferredoxina, una clorofilla a speciale, un chinone speciale a livello del fotosistema 1 e il complesso citocormo b_6f .

Le **plastochinone** sono simili all'ubichinone, cambia la testa: sono presenti due anelli aromatici condensati a naftalene e uno dei due ha i gruppi chinonici. **Trasferiscono gli elettroni alle plastocianine**, proteine che **trasportano elettroni**. Si trovano nel fotosistema 1. Le molecole di **clorofilla** dal **sistema antenna** raccolgono la luce per passare

allo stato eccitato e l'energia viene trasferita fino alla clorofilla che trasferisce gli elettroni al plastochinone. La clorofilla riprende gli elettroni dall'acqua con la produzione di ossigeno. Il plastochinone trasferisce ai citocromo b_6f che trasferisce elettroni al fotosistema 1 e attraverso la luce restituisce energia agli elettroni che trasferiti sul NADP⁺ lo riducono a NADPH.

Il citocromo b_6f è simile al complesso terzo: è una pompa protonica generando un gradiente usato dall'ATPas sulla membrana per produrre ATP. Crea un gradiente protonico transmembrana nella membrana tilacoidale. I protoni sono trasferiti dallo spazio tilacoidale allo stroma e l'energia liberata viene usata dall'ATPas per la sintesi dell'ATP. Il metodo sfruttato per la produzione di ATP si chiama chemiosmosi perché la sintesi è innescata dal gradiente di ioni H⁺ che si stabilisce tra i due lati di una membrana.

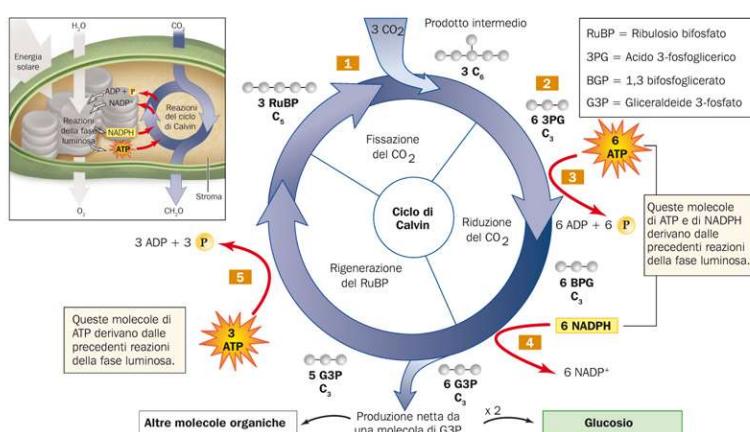


Il ciclo di Calvin produce carboidrati

Durante le reazioni indipendenti dalla luce, il ciclo di Calvin consuma ATP e NADPH per produrre carboidrati. Nel corso di questo processo ha luogo la **fissazione e la riduzione dell'anidride carbonica**.

3 molecole di **ribulosio bifosfato** reagiscono con **anidride carbonica** per dare un composto a sei atomi di carbonio, poi scisso in **due** molecole di **acido 3-fosfoglicerico** (quindi due molecole a 3 atomi di carbonio). L'acido viene ridotto a **gliceraldeide 3-fosfato** dal NADPH. La reazione avviene in **due tappe**: attivazione dall'ATP tramite il trasferimento di un gruppo fosfato generando l'**1,3-bifosfoglicerato** ridotto dal NADPH e perdendo un fosfato, si trasforma nel prodotto finale, **gliceraldeide 3-fosfato**. Una delle due gliceraldeidi 3-fosfato, essendo un **intermedio della glicolisi**, esce dal ciclo e viene usata per la **sintesi** di **fruttosio 6-fosfato** e successivamente di **glucosio 6-fosfato**.

Dato che nel ciclo entrano 3 molecole di ribulosio bifosfato, avremo **tre composti a sei atomi di carbonio, 6 acidi, 6 molecole di 1,3 bifosfoglicerato e 6 di gliceraldeide 3-fosfato**. Una di queste ultime esce dal ciclo per formare glucosio mentre le altre 5 vengono rimesse insieme per **riformare le tre molecole di partenza di ribulosio**. Servono 15 atomi di carbonio per produrre le tre molecole iniziali di ribulosio.



Il ciclo di Calvin prevede tre fasi:

1. La fissazione dell'anidride carbonica: l'anidride carbonica atmosferica si combina con il ribulosio bifosfato producendo una molecola a sei atomi di carbonio che si scinde immediatamente in due molecole da tre.
2. La riduzione dell'anidride carbonica a gliceraldeide 3-fosfato a partire da 1,3 bifosfoglicerato che viene ridotto da NADPH prodotto dalla clorofilla.
3. Fase di rigenerazione del ribulosio attraverso la gliceraldeide 3-fosfato.

La luce trasferisce gli elettroni oltre ai protoni creando un gradiente transmembrana per la sintesi dell'ATP.

METABOLISMO LIPIDICO

Il glicogeno non è una riserva di energia perché le sue riserve possono bastare per 1 giorno di digiuno mentre gli acidi grassi possono essere messi da parte per un tempo maggiore e infatti sono la principale riserva energetica negli animali. Il glicogeno **muscolare** serve per sostenere il **metabolismo muscolare** mentre quello **epatico** per controllare la **glicemia**.

Gli acidi grassi hanno **atomi di carbonio completamente ridotti** così la loro **ossidazione** può liberare la **massima quantità di energia** possibile. Hanno un gruppo carbossilico iniziale e una catena idrocarburica. Inoltre, gli acidi grassi **non sono idratati** (lo sono i mono e i poli) e possono essere **immagazzinati in maniera più compatta** nei tessuti. Gli zuccheri sono idratati.

1 gr di glicogeno non corrisponde ad 1 grammo di glucosio ma a circa 0.7 perché il 30% di glucosio è acqua.

1 gr di acidi grassi corrisponde ad 1 gr di acidi grassi senza acqua e infatti possono essere immagazzinati in forma più compatta.

Possiamo scindere gli acidi grassi dal glicerolo per usarli come fonte di energia.

Il tessuto adiposo è una riserva di trigliceridi che possono esservi depositati in forma anidra.

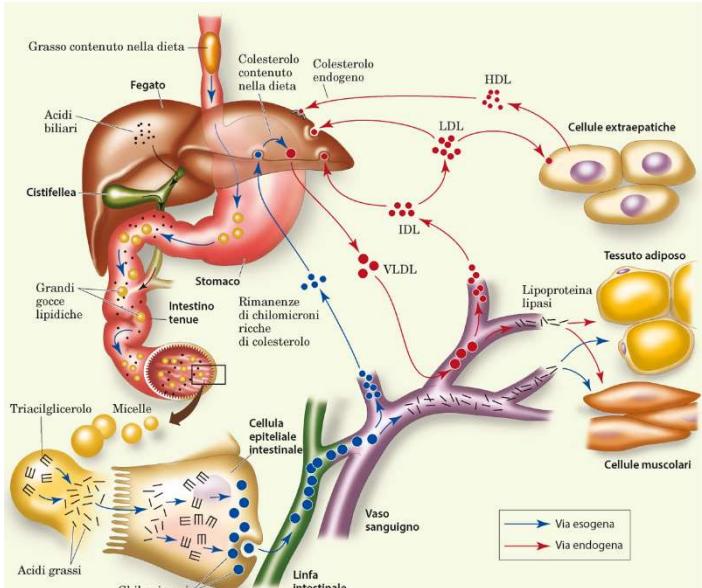
Gli ormoni **glucagone, adrenalina, adrenocorticotropo** stimolano il rilascio di acidi grassi dal tessuto adiposo.

La **lipasi** agisce con un pH ottimale fra 6 e 8, molto più alto di quello dello stomaco (circa 1/2) e per questo i trigliceridi vengono assorbiti a livelli **dell'intestino**: vengono **scissi** nei loro costituenti e le cellule intestinali **risintetizzano i trigliceridi** raggruppati in micelle dette **chilomicroni**. Sono **lipoproteine** di origine **animale**, prodotte nell'intestino. Sono delle **micelle** con acidi grassi, colesterolo, quello che viene introdotto con la dieta, e sono **riversati nei dotti linfatici** arrivando al circolo sanguigno. Vengono portati soprattutto al fegato.

La **lipasi pancreatico** scinde soprattutto i trigliceridi in **monogliceridi ed acidi grassi**.

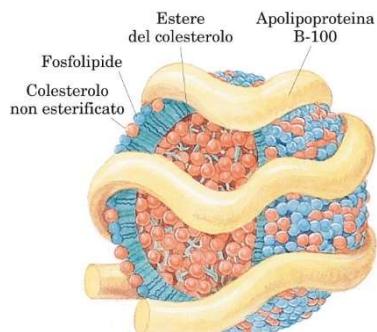
I trigliceridi nell'intestino sono emulsionati da **sali biliari** per formare le strutture micellari. Sulle micelle agisce la lipasi pancreatico. Gli acidi biliari hanno una struttura come il colesterolo.

Il **colesterolo e i trigliceridi** prodotti dal fegato o introdotti con la dieta sono usati per formare **lipoproteine**, micelle fatte da acidi grassi liberi, trigliceridi, colesterolo e proteine. Le dividiamo in



- VLDL: very low density lipoprotein
- IDL: intermedia
- LDL: bassa
- HDL: alta. Più proteine rispetto ai grassi

Sono tutte **prodotte dal fegato** e vanno **dal fegato alla periferia e viceversa**. La **densità** delle lipoproteine dipende dal **rapporto lipidi-proteine**. I grassi hanno una densità simile a quella dell'acqua mentre quella delle proteine è più alta. Se **prevolgono i lipidi** la densità è più **bassa**, se prevolgono le **proteine** è più **alta**. Le lipoproteine trasportano acidi grassi a tutte le cellule dell'organismo perdendo grassi e trasformandosi le une nelle altre.



HDL recupera gli acidi grassi persi da LDL nei vasi e li riporta al fegato.

La **B-100** è la **proteina** che permette all'**LDL** di essere **internalizzato** nelle cellule: viene riconosciuta da un **recettore** che si trova sulle cellule bersaglio. Con l'**endocitosi** le **LDL** entrano nella cellula per essere **degradate**.

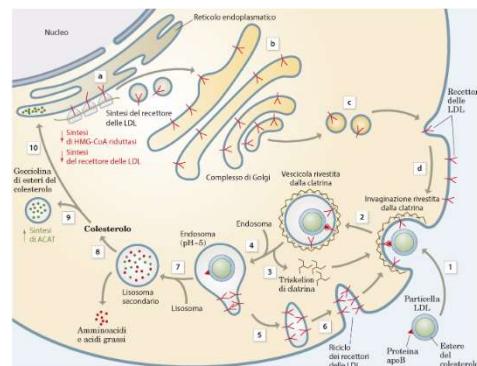


TABELLA 20.1 Caratteristiche delle principali classi di lipoproteine del plasma umano

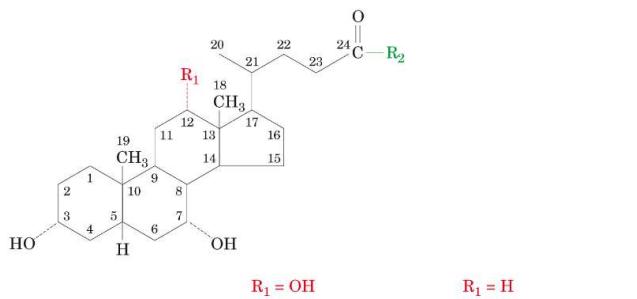
	Chilomicroni	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densità ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	<0,95	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Diametro delle particelle (\AA)	750-12 000	300-800	250-350	180-250	50-120
Massa delle particelle (kD)	400 000	10 000-80 000	5000-10 000	2300	175-360
% Proteine ^a	1,5-2,5	5-10	15-20	20-25	40-55
% Fosfolipidi ^a	7-9	15-20	22	15-20	20-35
% Colesterolo libero ^a	1-3	5-10	8	7-10	3-4
% Triacilgliceroli ^b	84-89	50-65	22	7-10	3-5
% Esteri del colesterolo ^b	3-5	10-15	30	35-40	12
Principali apolipoproteine	A-I, A-II, B-48, B-100, C-I, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E	

^a Componenti di superficie.

^b Lipidi della regione centrale.

Se le lipoproteine non vengono assorbite, le cellule sintetizzano il colesterolo perché non percepiscono quello presente in circolo. Per produrre il colesterolo vengono usate resine che legano permanentemente gli acidi biliari. Il colesterolo può essere sintetizzato ma non ha un vero catabolismo.

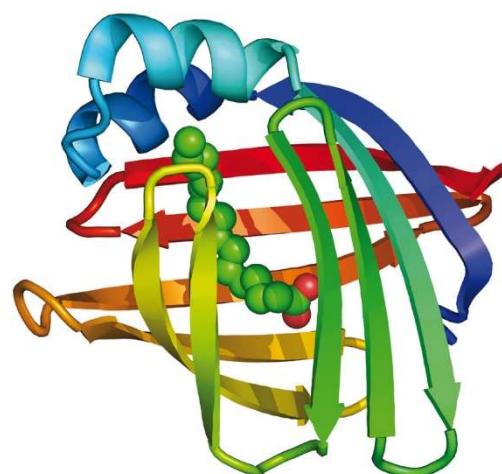
I principali acidi biliari e i loro coniugati



$R_2 = \text{OH}$ Acido colico Acido chenodeossicolo
 $R_2 = \text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ Acido glicocolico Acido glicochenodeossicolo
 $R_2 = \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ Acido taurocolico Acido taurochenodeossicolo

I grassi si organizzano in **micelle** così che gli **enzimi** possano attaccare meglio gli acidi grassi **agendo sulla superficie** della micella stessa e **idrolizzandoli**.

Perché le cellule possano assorbireli, devono essere trattati da **lipasi extracellulari** che **assorbono acidi grassi e glicerolo**. Gli acidi grassi sono molecole **idrofobiche**, non sono mai liberi da soli ma **si legano a proteine** chiamate a bivalva. L'albumina può legare fino a 7 molecole di acidi grassi.

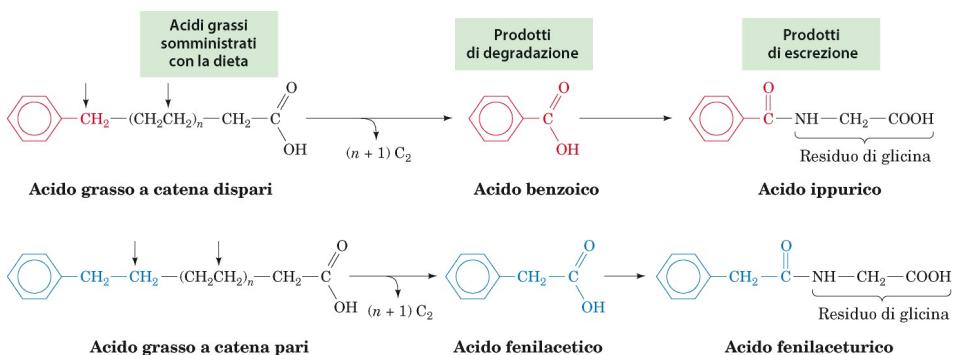


L'ossidazione degli acidi grassi

Gli **acidi grassi** da degradare sono legati al **CoA** tramite una **reazione dipendente dall'ATP**. I gruppi acilici grassi sono trasportati nei mitocondri tramite il **sistema navetta della carnitina** per essere ossidati. Ad ogni giro della β -ossidazione mitocondriale, sono prodotti **$FADH_2$, $NADH$ e acetil-CoA**. Per ossidare gli acidi grassi insaturi sono necessari ulteriori enzimi. Il **propionil-CoA** prodotto dall'ossidazione degli acidi grassi a catena **dispari** di atomi di carbonio è **convertito** a **succinil-CoA**. I **perossisomi** **ossidano** gli acidi grassi a **lunga catena** producendo **H_2O_2** .

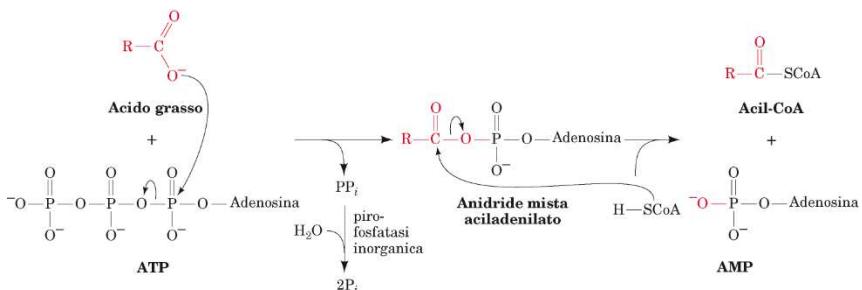
La β -ossidazione è il processo di degradazione degli acidi grassi, **degradati per rimozione di due atomi di carbonio per ogni giro di β -ossidazione**. Una unità di due atomi di carbonio è un **acetile** che, come prodotto di degradazione legandosi al **CoA**, da **acetil-CoA**. È l'unico prodotto ottenuto, entra poi nel **ciclo di Krebs** ma non viene trasformato in piruvato, quindi, non può essere usato per fare zuccheri.

La dimostrazione della via dell'ossidazione degli acidi grassi



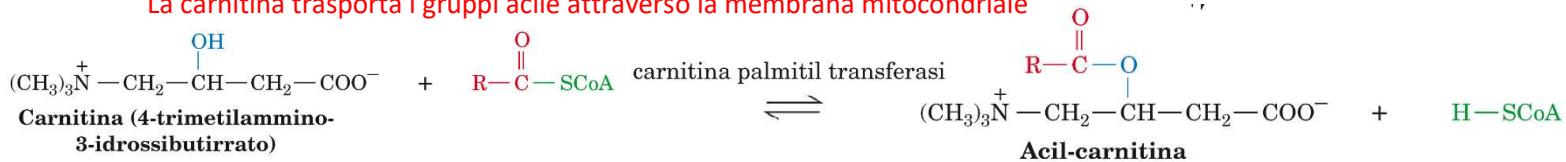
Sono stati presi acidi grassi a catena pari e dispari, poi modificati per avere l'anello aromatico nella parte finale. Se erano a catena dispari, si otteneva un acido benzoico mentre se pari, fenilacetico.

Attivazione degli acidi grassi: meccanismo di reazione dell'acil-CoA sintetasi

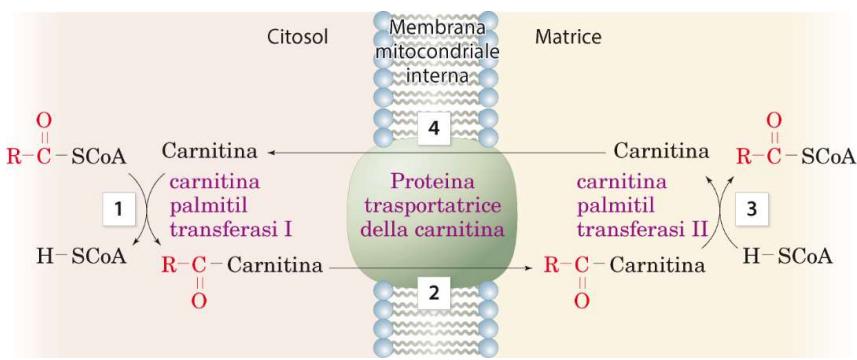


Gli acidi grassi sono nel **citosol** quindi vanno ossidati e trasportati perché la loro **degradazione** avviene nei **mitocondri**. Gli acidi grassi **attaccano** il **fosfato dell'ATP** in α formando **l'aciladenilato** e liberando **pirofosfato**. L'aciladenilato si lega al **CoA**, si libera **AMP** e si produce **acil-CoA**, un **tioestere** che si forma per la presenza del gruppo SH.

La carnitina trasporta i gruppi acile attraverso la membrana mitocondriale



Il mitocondrio non fa passare l'Acil-CoA, serve la **carnitina** come **trasportatore**. Si forma un **estere** con l'acido grasso tramite il gruppo OH così che l'acido grasso può essere trasferito dall'enzima **carnitina acil transferasi** dal **coenzima A alla carnitina**, formando **l'acil-carnitina** e liberando **CoA**.



L'acido grasso viene trasferito dalla carnitina citosolica a quella mitocondriale da un'altra transferasi. Troviamo due enzimi, la carnitina acetil transferasi 1 che agisce lato **citosolico** e la carnitina acetil transferasi 2 dal lato della **matrice**. Il traslocatore è una proteina che porta dal citosol alla matrice la carnitina e dalla matrice al citosol la carnitina libera.

Per attivare gli acidi grassi vengono rotti due legami ad alta energia di ATP, come se usassimo 2 molecole di ATP che diventano 2 di ADP.

La β -ossidazione degli acil-CoA

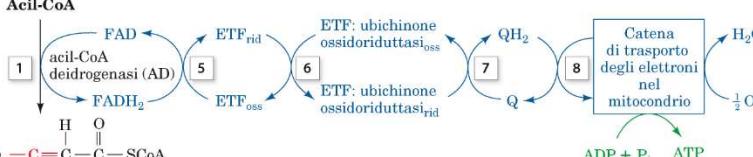
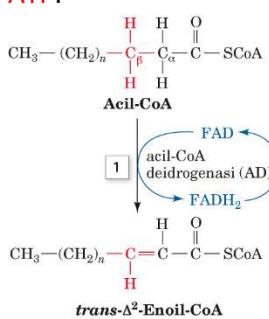
La β -ossidazione è una serie di reazioni per staccare un gruppo acetilico da un acido grasso principale. Vale per i saturi e gli insaturi in cui viene generata un'insaturazione trans mentre quella naturale è cis.

Va ossidato un carbonio β che da CH_2 deve diventare CO (un chetone).

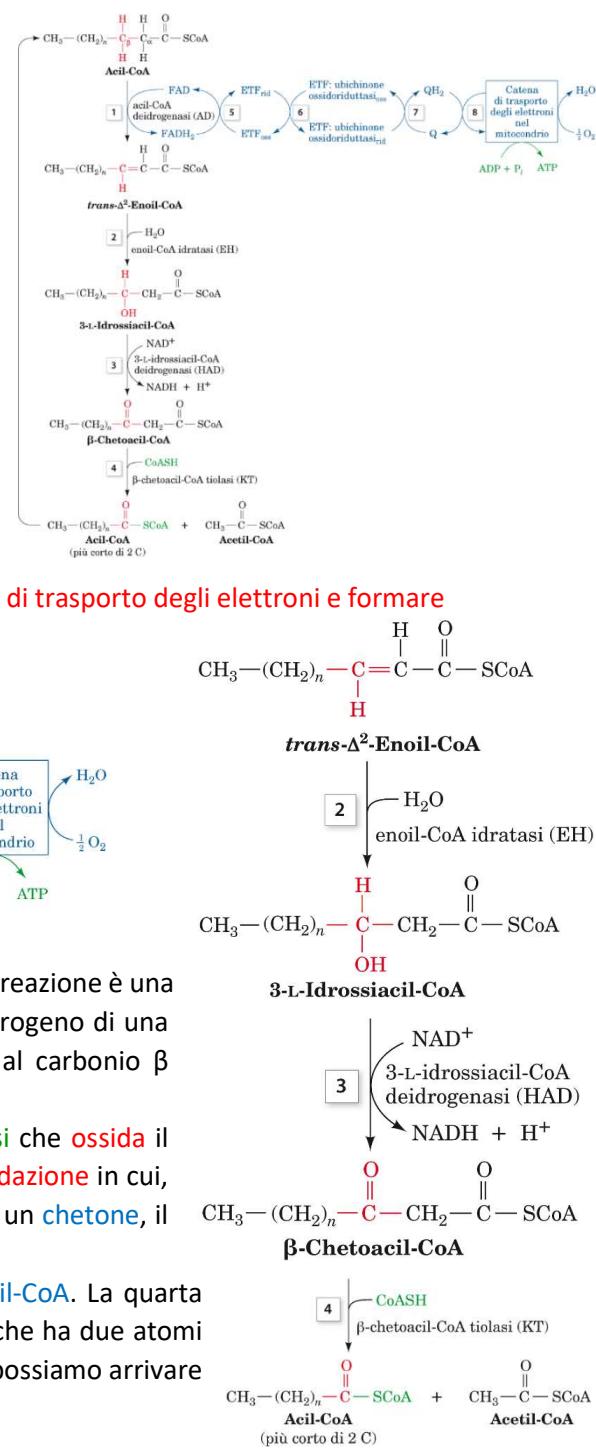
- La prima reazione è un'ossidazione catalizzata da **acetil-CoA deidrogenasi** ossidando un FAD in **FADH_2** . I carboni sono molto ridotti e si forma un **doppio legame trans carbonio-carbonio fra C α e C β** attraverso l'eliminazione di un atomo **idrogeno**, accettato dal FAD. Si forma il **$\text{trans-}\Delta^2\text{-Enoil-CoA}$** .

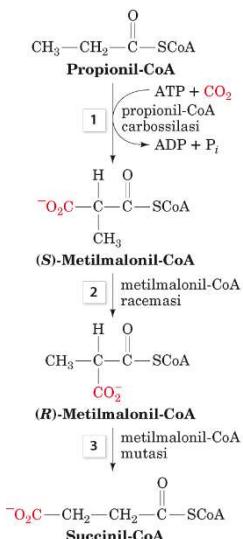
Legame fra il C2 e il C3 ← → È un enolo

Gli elettroni sul FADH_2 vengono trasferiti attraverso una **proteina ETF**: ha sulla membrana mitocondriale una proteina che **ossida** e dà gli **elettroni** al **CoQ** per entrare poi nella **catena di trasporto degli elettronni e formare ATP**.



- Possiamo addizionare dell'acqua al doppio legame: la seconda reazione è una di **idratazione** in cui agisce il **coenzima enoil-CoA idratasi**. L'idrogeno di una molecola di acqua si attacca al carbonio α e il gruppo OH al carbonio β formando il **3-L-idrossiacil-CoA**.
- Il 3-L-idrossiacil-CoA è il substrato dell'**idrossiacil deidrogenasi** che **ossida** il carbonio e **riduce** il **NAD⁺** in **NADH**. La terza reazione è un'ossidazione in cui, per l'ossidazione di un alcol secondario, si ha la formazione di un **chetone**, il **β -chetoacil CoA**.
- La **tiolasi taglia** il legame fra il **carbonio α e il β** usando **acetil-CoA**. La quarta reazione è una **tiolisi**. Otteniamo un **acetil-CoA** e un **acil-CoA** che ha due atomi di carbonio in meno. Continuando con i cicli di β -ossidazione, possiamo arrivare ad **acetil-CoA dall'acil-CoA**.

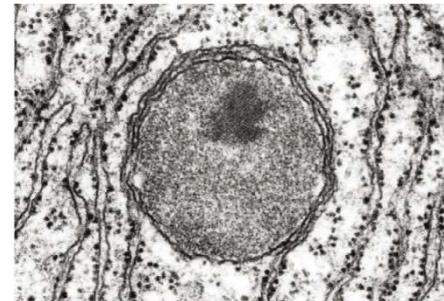




Se la catena ha un **numero dispari** di atomi di carbonio, alla fine avremo un composto a due e uno a tre atomi di carbonio: il **propionil-CoA** non può essere ossidato ma viene **trasformato** in **succinil-CoA** tramite il **ciclo di Krebs** da cui può essere fatto **glucosio**. Il **metilmalonil-CoA** si forma dagli acidi grassi dispari che danno origine al propionil-CoA trasformato in succinil-CoA passando per il metilmalonil-CoA. Gli intermedi del ciclo di Krebs possono essere usati per fare zuccheri.

Le insaturazioni naturali sono tutte **cis** ma durante la β -ossalidazione si formano insaturazioni **trans**. Servono enzimi (**isomerasi**) per **spostare o ridurre i doppi legami** naturalmente presenti per poter andare avanti con l'ossalidazione. I primi cicli sono uguali, cambia solo l'insaturazione.

Gli acidi grassi insaturi sono mono o poli insaturati con il primo doppio legame fra il carbonio 9 e 10.



Nei **perossisomi** avviene la β -ossalidazione perossisomiale: i perossisomi negli animali si occupano dell'ossalidazione di acidi grassi a catena molto lunga. Questi acidi grassi vengono **accorciati** in modo da renderne più semplice la degradazione. Sono degli organelli nelle cellule che servono per le prime tappe della β -ossalidazione. Si accorciano di due giri di acidi grassi e poi entrano nel mitocondrio.

Per esempio, alla fine della β -ossalidazione del palmitoil-CoA, avremo 8 Acetil-CoA + 7 FADH₂ + 7 NADH

Gli 8 Acetil-CoA danno 8 x (3 NADH + 1 FADH₂ + 1 GTP)

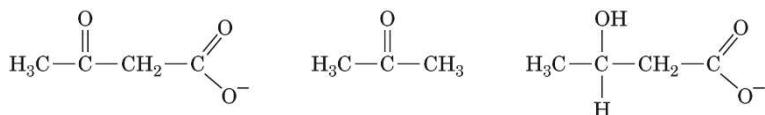
Alla fine, avremo 31 NADH + 15 FADH₂ + 8 GTP

Per l'ossalidazione di un palmitico a 16 atomi di carbonio avremo 93 ATP dal NADH, 30 ATP dal FADH₂ e 8 ATP dal GTP per un bilancio netto di 131-2 = 129 ATP.

I corpi chetonici

Nel fegato l'**acetil-CoA** può essere convertito reversibilmente a **corpi chetonici** che saranno usati come **fondi di energia** dagli altri tessuti. Si formano a **digiuno** nel fegato perché l'organismo va in **gliconeogenesi**. Il fegato sintetizza glucosio tramite il piruvato che viene dalle proteine. Se la glicolisi avviene in condizioni anaerobiche, il piruvato diventa acido lattico, esce dal muscolo e va nel fegato dove è trasformato in piruvato per fare glucosio (ciclo di Cori).

I corpi chetonici sono

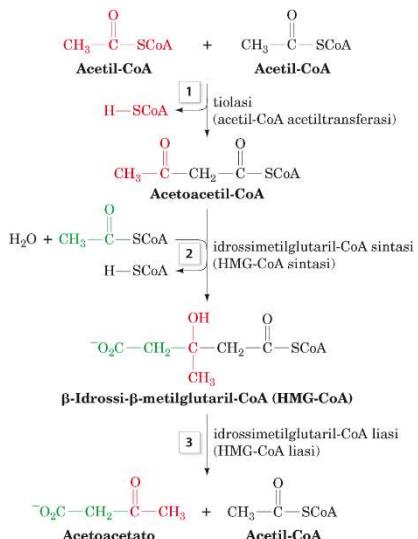


Acetoacetato

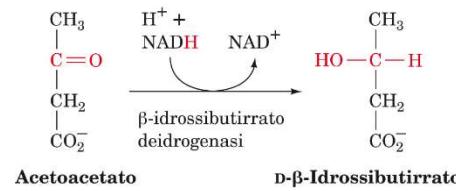
Acetone

D- β -Idrossibutirrato

L'**acetoacetato** e il **D- β -Idrossibutirrato** sono **piccoli lipidi** che possono attraversare la barriera encefalica e arrivare al cervello per essere usati come **nutrienti**. L'**acetone** viene invece eliminato perché **volatile**. Possiamo anche usare l'**ossalacetato**, intermedio del ciclo di Krebs: deriva dall'ossalidazione del malato che può essere portato fuori. La **velocità** del ciclo di Krebs dipende dalla **quantità** di **intermedi**: se diminuiscono, cala la velocità. Si accumula in questo modo acetil-CoA che non va nel ciclo di Krebs, dando origine ai corpi chetonici. In questo modo viene risparmiata massa muscolare che altrimenti verrebbe intaccata in quanto il piruvato arriva dagli aminoacidi, presenti soprattutto nel muscolo.



2 molecole di acetil-CoA possono essere condensate tramite una catalisi ad opera di tiolasi dando origine all'acetoacetil-CoA che reagisce con l'acetil-CoA per formare HMG-CoA grazie all'enzima HMG-CoA sintasi. Il composto è tagliato dalla liasi in acetoacetato e acetil-CoA. L'acetoacetato è un precursore della β -idrossibutirrato se l'acetone viene ridotto per decarbossilazione.



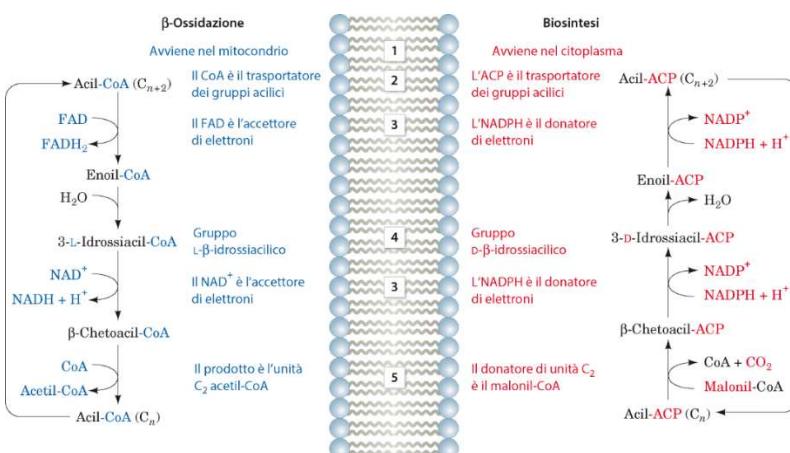
L'acetoacetato, l'acetone e il β -idrossibutirrato possono uscire dal circolo e andare in tutti i tessuti dove vengono usati come fonte di energia. L'acetoacetato può diventare acetoacetil-CoA attraverso il succinil-CoA che dona il suo coenzima tornando ad essere ossidato.

Per ogni acetil-CoA vengono prodotte 12 molecole di ATP.

Una dieta iperproteica prevede l'assunzione di pochi carboidrati con un abbassamento della glicemia. In questo modo è stimolato il glucagone e la gluconeogenesi nel fegato. La gluconeogenesi è sempre associata alla chetogenesi. I corpi chetonici sono acidi che vengono riversati nel sangue rischiano l'acidosi e creando problemi alle cellule e ai tessuti. Il pH nel sangue si abbassa. È utile in alcune forme di epilessia nei bambini che non rispondono ai farmaci tradizionali.

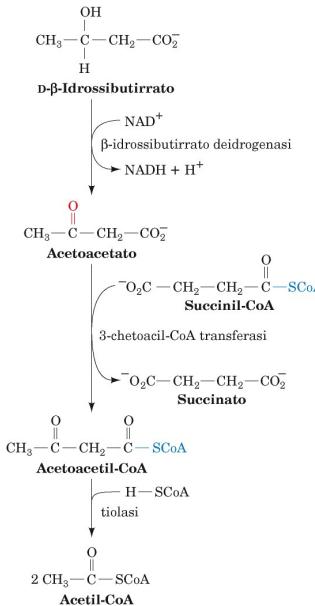
LA BIOSINTESI DEGLI ACIDI GRASSI

La biosintesi degli acidi grassi differisce dall'ossidazione perché avviene nel **citoplasma** invece che nella matrice mitocondriale; gli acidi grassi sono legati ad una **proteina trasportatrice di acili** mentre nella degradazione al Coenzima A; è presente il **complesso dell'acido grasso sintasi** (un dimerico) ovvero dove sono **associati tutti gli enzimi** che partecipano mentre è assente nell'ossidazione; è il **NADPH** a trasportare elettroni e non il **NADH** e il **FADH₂**.



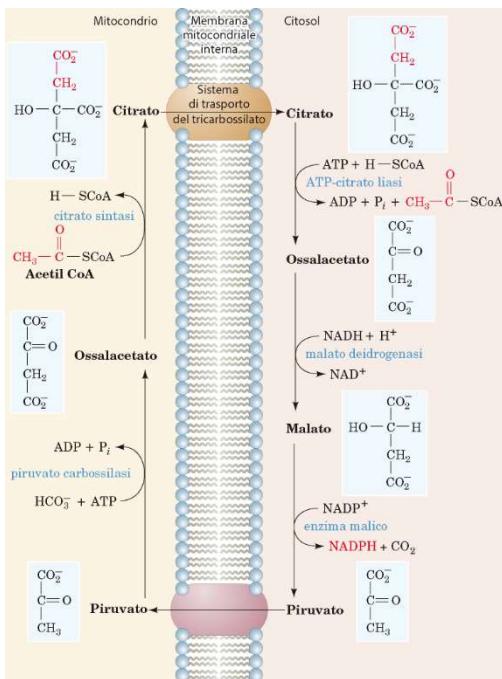
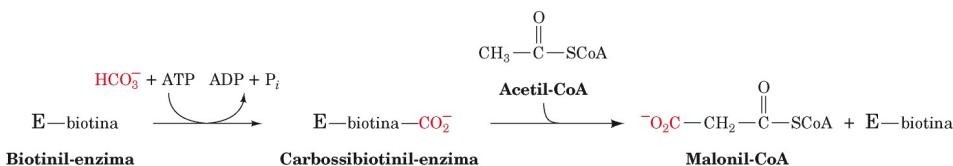
Alla fine si arriva ad un **acido con due atomi di carbonio in più**.

L'acetil-CoA si forma nei **mitocondri** e va trasportato fuori grazie al **trasportatore di citrato**. Se l'isocitrato e l' α -chetoglutarato vengono bloccati nel ciclo di Krebs, se è presente molta energia, si accumula il citrato nel mitocondrio. Il **citrato** accumulato può essere portato nel **citosol** dal suo **trasportatore**. Il citrato è un

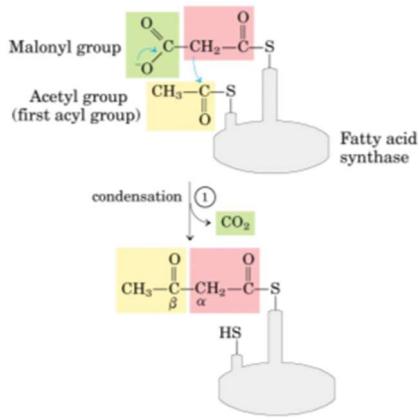


modulatore allosterico negativo della glicolisi perché è un segnale di molta energia. La **citrato liasi** è ATP dipendente e taglia il citrato in Acetyl-CoA e **ossalacetato** che può diventare **malato** grazie alla **malato deidrogenasi**. Il malato può essere substrato dell'**enzima malico** che opera una **decarbossilazione ossidativa** del malato per trasformarlo in **piruvato**. Il piruvato può tornare nei **mitocondri** per essere trasformato in **ossalacetato**. Gli elettroni vengono dati al NADP⁺ che diventa **NADPH**.

L'acetyl-CoA deve essere **attivato**: richiede ATP e **anidride carbonica** sottoforma di bicarbonato. Attraverso ATP e **acetyl-CoA carbossilato** che usa **biotina** da cui prende **anidride carbonica**, attacca questa molecola sull'acetyl-CoA per formare il **malonil-CoA**. È la tappa di comando.



Il malonil ha tre atomi di carbonio: verrà staccata la molecola di anidride carbonica che serve solo per attivare il composto. Il malonil-CoA viene attaccato alla proteina trasportatrice di acile.

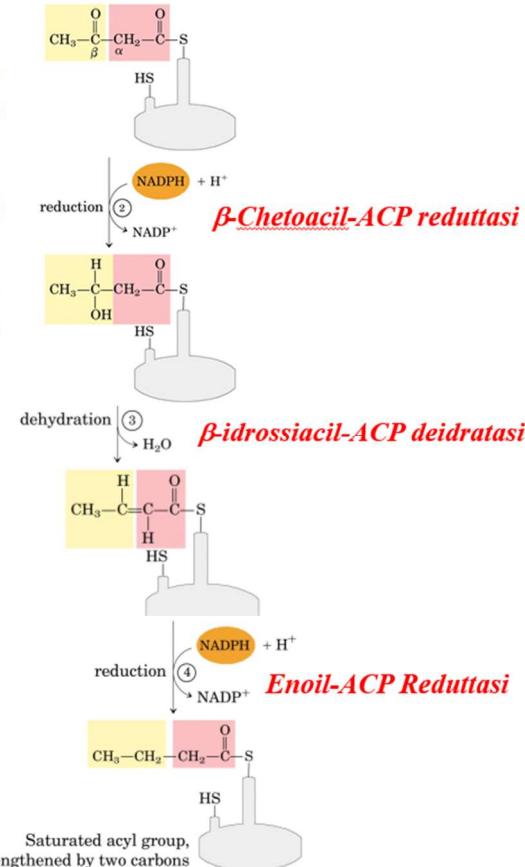


Devono essere aggiunti atomi di carbonio: l'acetyl-CoA viene **legato** all'**enzima condensante**. La reazione è catalizzata dalla **condensazione degli atomi di carbonio** (rosa e giallo in figura) con l'**uscita dell'anidride carbonica** che ha una carica negativa.

Sulla proteina si ha un composto a 4 atomi di carbonio, un **acido grasso esterificato** con un gruppo SH, il **β -chetoacil-ACP**.

una molecola di acqua. Si ottiene **trans- Δ^2 -enoil-ACP**.

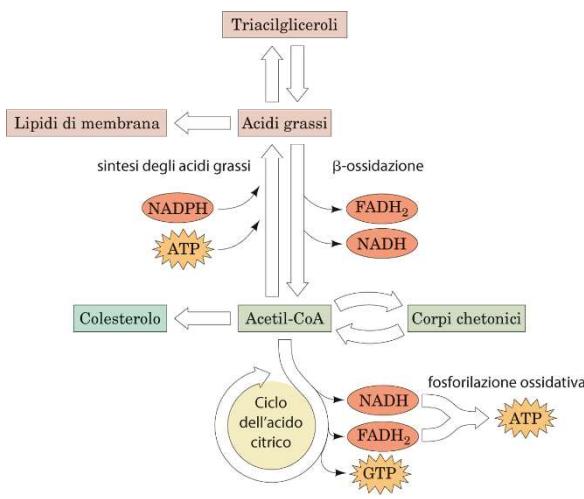
Deve essere ridotto il **carbonio β** grazie ad una **riduttasi** che usa NADPH. Da β -chetoacil-ACP si forma β -idrossi-ACP. Successivamente una **deidrataasi** elimina



L'enoil-ACP **reduittasi** ride **ulteriormente** usando **NADPH** e riducendo il **doppio legame**: abbiamo **Acil-ACP** (è un acido butirrico, possiamo anche chiamarlo butirr-ACP).

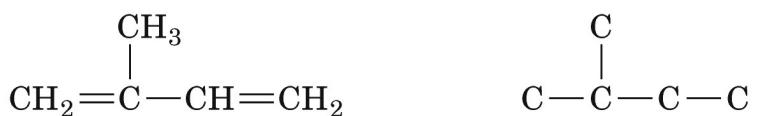
L'acetile viene spostato dalla proteina all'**enzima condensante**. Alla **proteina** è attaccato un altro **malonil** per poter riprendere il giro. Il prodotto finale è **l'acido palmitico** che si stacca dal complesso una volta formato.

La biosintesi degli acidi grassi produce solo acido palmitico (16 atomi di carbonio) che può essere allungato o possono essere introdotti insaturazioni per avere altri acidi grassi. L'**allungamento** avviene nei **mitocondri** grazie alla **tiolasi**.



Dagli acidi grassi liberi si possono ottenere **fosfolipidi**, possono essere β -ossalati producendo **acetil-CoA** che può entrare nel ciclo di Krebs, può tornare ad essere **acido grasso** (serve energia e NADPH) o **colesterolo** (per produrlo serve energia).

Nel colesterolo l'acetil-CoA è convertito in unità isopreniche: l'isoprene è fatto da 5 atomi di carbonio con due doppi legami.



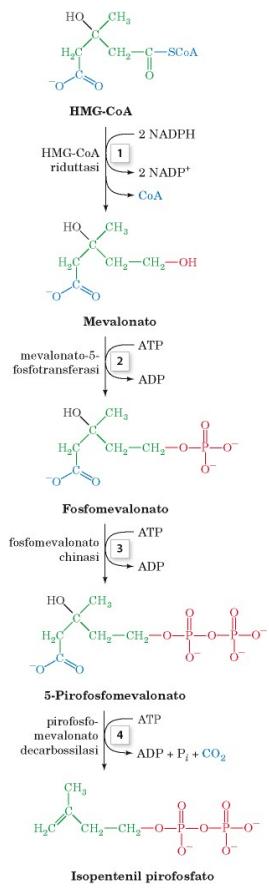
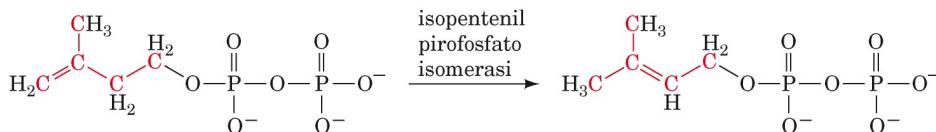
Isoprene (2-metil-1,3-butadiene)

Una unità isoprenica

L'HMG-CoA viene **prodotto** nel **citosol** mentre viene **tagliato** nel **mitocondrio** dove il substrato è l'**HMG riduttasi** che usa **NADPH** riducendolo in **mevalonato**. È la tappa di comando, infatti i farmaci contro il colesterolo bloccano questo enzima.

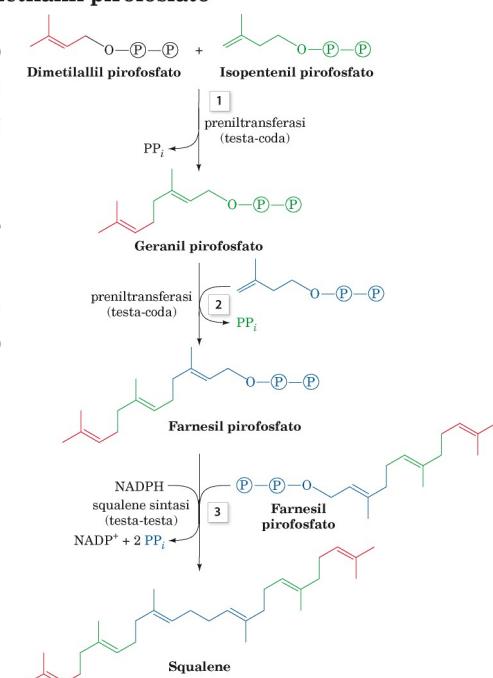
Se viene aggiunto sul mevalonato un gruppo **fosfato**, diventa **fosfomevalonato** e con laggiunta di un **secondo** gruppo fosfato diventa **pirofosfomevalonato**.

Lo **decarbossiliamo** ottenendo il **pentenil pirofosfato**, substrato di un'**isomerasi** che lo trasforma in **dimetilallil pirofosfato**. Sono due isomeri.

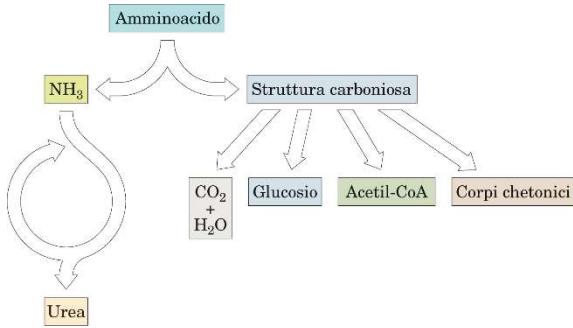


Possiamo unire le unità isopreniche che andranno incontro a **condensazione testa coda** (la testa del pirofosfato si lega alla coda dell'altro pirofosfato) e si ottiene il **geranyl pirofosfato**.

Si ha un'ulteriore **condensazione testa coda** per formare il **farnesil pirofosfato** e si ha una **condensazione testa testa** per dare lo **squalene** con la rimozione di un pirofosfato. Lo squalene è il precursore del colesterolo che subisce poi ulteriori reazioni per diventare colesterolo vero e proprio.



IL METABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI



Gli amminoacidici derivano dalle **proteine** o vengono assunti tramite la **dieta**. Possono formare proteine o produrre **energia** rimuovendo il **gruppo amminico** ma, in questo modo, si produce **ammoniaca** che è **tossica** e va trasformata in **urea**. Il resto della catena può essere usato per fare **glucosio**, **glicogeno** o **Acetil-CoA**. Gli amminoacidi possono dare sia acidi grassi che zuccheri o solo zuccheri.

Le proteine vengono degradate nello stomaco dalle **proteasi** che **tagliono** i legami peptidici a livello degli amminoacidi. La pepsina taglia a livello di tirosina, fenilalanina e leucina; la tripsina taglia a livello di arginina e lisina; la chimotripsina taglia triptofano, tirosina, fenilalanina, leucina e metionina; l'elastasi taglia serina, glicina e alanina (amminoacidi piccoli). Sono prodotte inattive, come **zimogeni** perché devono lavorare solo in un punto specifico degli amminoacidi: se venissero prodotte attive, degraderebbero la cellula.

Le proteine della cellula invecchiano e vengono degradate nel **proteosoma**, un organello dove agiscono le proteasi. Le proteine vengono prodotte nella cellula **dall'ubiquitina** che si lega alle proteine vecchie e le manda al proteosoma.

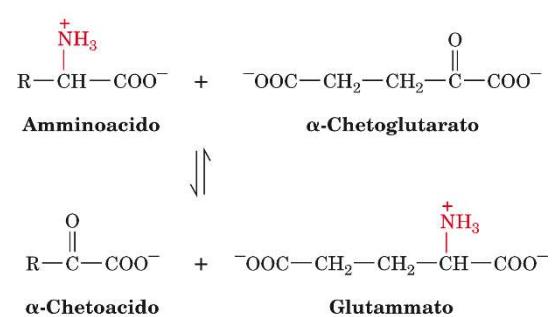
La degradazione delle proteine è un processo che **richiede ATP**, infatti è **inibita** da condizioni **anaerobiche**. Per la degradazione ATP dipendente delle proteine è richiesta l'**ubiquitina**, una proteina monomerica presente in tutte le cellule.

Gli amminoacidi sono definiti **glucogenici** se fanno **glucosio**, **chetogenici** se fanno **acidi grassi, acetil-CoA o corpi chetonici**, anche se la maggior parte riesce a produrre entrambi.

Quando l'organismo ha consumato tutte le riserve di glicogeno, gli amminoacidi possono essere usati come carburante. La degradazione ha luogo nel **fegato** ed avviene in due stadi: **rimozione del gruppo α-amino** attraverso le urine e **degradazione dello scheletro carbonioso** che porta alla formazione di numerosi composti come piruvato e Acetil-CoA.

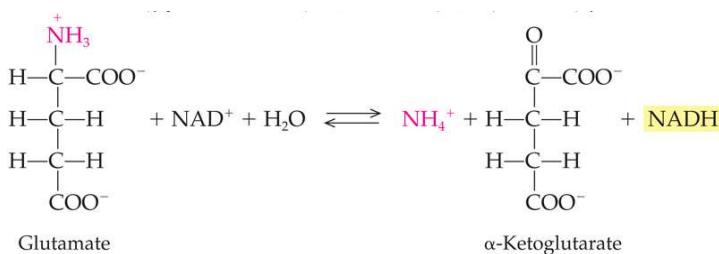
La detossificazione dell'ammoniaca può avvenire solo nel fegato diventando urea.

Gli amminoacidi possono essere usati in altri tessuti sottoforma di energia se viene rimossa l'ammoniaca: il **gruppo amminico** può essere **trasferito** sugli **accettori** del gruppo amminico che si **trasformano** spostando il gruppo amminico su un **α-chetoacido** (**α-chetoglutarato**) che diventa **glutammato**. Sono le **transaminasi** a catalizzare il trasferimento del gruppo α-amino da un α-amino acido ad un α-cheto acido. Il **glutammato** è un trasportatore che va dalla **periferia** al **fegato**, può uscire dalla cellula e arrivare nel fegato dove viene **deaminato** dalla **glutammato deidrogenasi**.



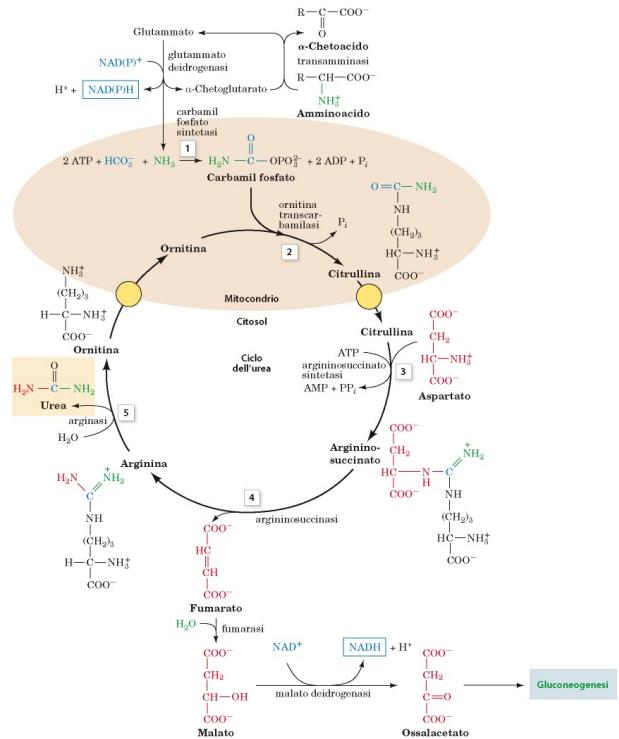
L'alanina transaminasi catalizza il trasferimento del gruppo α -amino dell'alanina a α -chetoglutarato producendo **piruvato e glutammato**. Il piruvato come accettore è usato principalmente a livello muscolare.

Anche le **basi azotate** hanno azoto e liberano ammoniaca se sono degradate: è trasportata da **glutammmina** (trasporta in generale composti non amminoacidici) che è prodotta da **glutammato** tramite **glutammmina sintetasi**. Per questo processo serve **ATP** e ne è usato **molto** perché la **reazione** deve andare a **completamento**. La glutammmina arriva nel fegato dove viene **idrolizzata**, lascia l'ammoniaca riformando il **glutammato**. La **glutammato deidrogenasi** trasforma il **glutammato in ammoniaca, α -chetoglutarato e NADH**.



Il ciclo dell'urea

La **deaminazione ossidativa** produce grandi quantità di **ioni ammonio** che, essendo **tossici**, devono essere **rimossi velocemente** dall'organismo indipendentemente dall'energia richiesta. Lo ione ammonio viene eliminato mediante il **ciclo dell'urea** attraverso le **urine**. Alterazioni degli enzimi del ciclo dell'urea possono essere dovute a cause genetiche.



Il ciclo dell'urea si compone di **5 reazioni**, due che avvengono nei **mitocondri** e tre nel **citoplasma**.

In presenza di **ATP** l'**ammoniaca** si lega all'**anidride carbonica**. Nei mitocondri si ha la formazione del **carbamilfosfato** che richiede ATP. Questa reazione avviene **fuori** dal ciclo, è il carbamilfosfato a entrare nel ciclo e ad essere **condensato** con **ornitina**. Il carbamilfosfato insieme all'ornitina formano la **citrullina** che è trasportata nel citoplasma.

L'**aspartato** reagisce con la **citrullina** per formare **argininosuccinato** (condensa l'aspartato) che esce dal mitocondrio e diventa substrato per la **liasi** che **taglia** la molecola in due parti, **fumarato** e **arginina**. L'**arginina** è il substrato **dell'arginasi** che **taglia** l'**urea** usando **l'acqua** (idrolisi) per riformare **ornitina**. Il **fumarato** entra nel **ciclo dell'acido citrico**.

