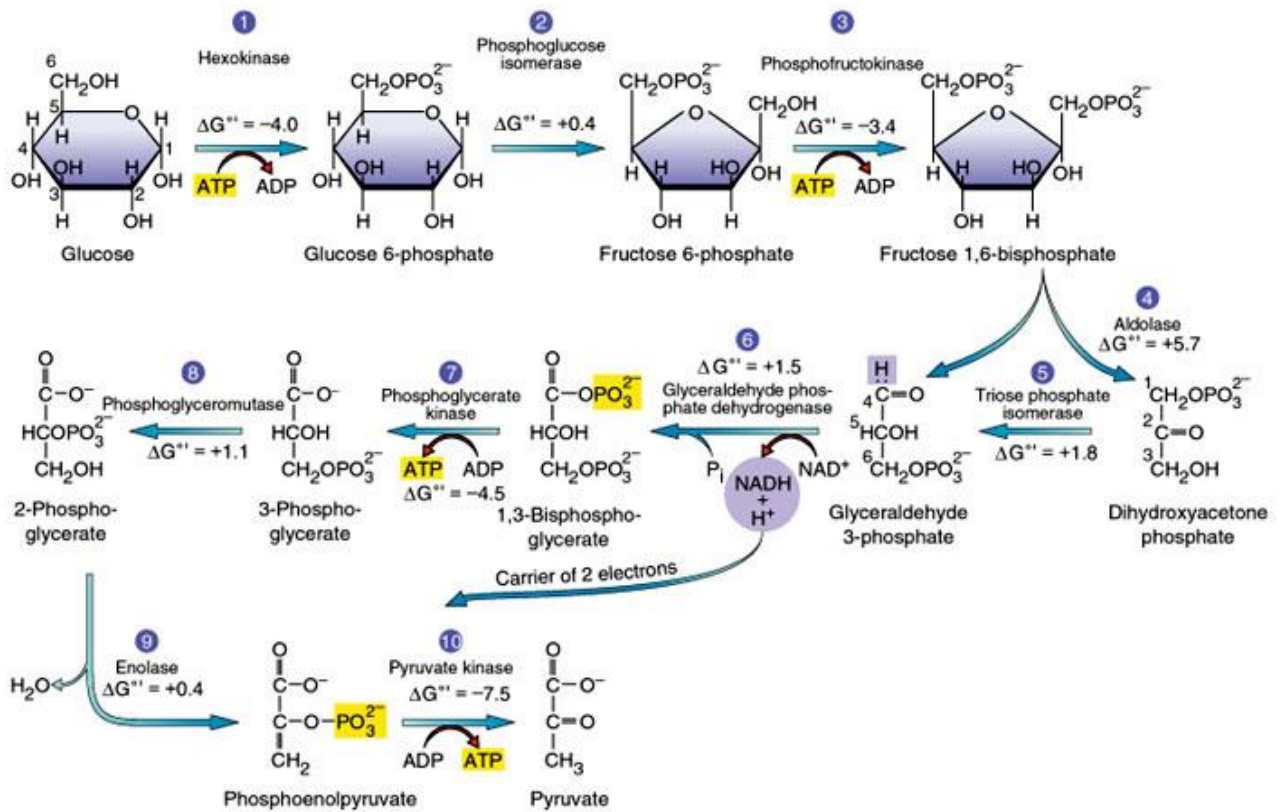


Glicolisi (via E.M.P.)



La glicolisi è la principale via catabolica nelle cellule eucariote.

In essa il glucosio viene degradato a due molecole di piruvato con la produzione di due molecole di NADH e due di ATP.

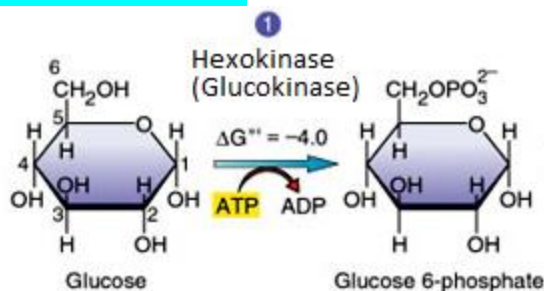
In essa confluiscono anche vie metaboliche di altri esosi e pentosi nonché di alcuni ammino acidi.

La glicolisi si divide in due parti:

- Una prima parte endoenergetica di attivazione, sino al fruttosio bifosfato. In essa si rende la molecola di glucosio instabile in modo da facilitarne la rottura.
- Una seconda parte esoenergetica (pay-off). In essa si rompe la molecola C6 e se ne riarrangiano i frammenti in modo da renderli più stabili (fino ad arrivare al piruvato) e liberare energia.

La glicolisi si suddivide in 10 passaggi. Ciascuno di essi prevede l'intervento di un enzima specifico. Alcuni di questi passaggi richiedono l'intervento di coenzimi (ATP/ADP, NAD⁺).

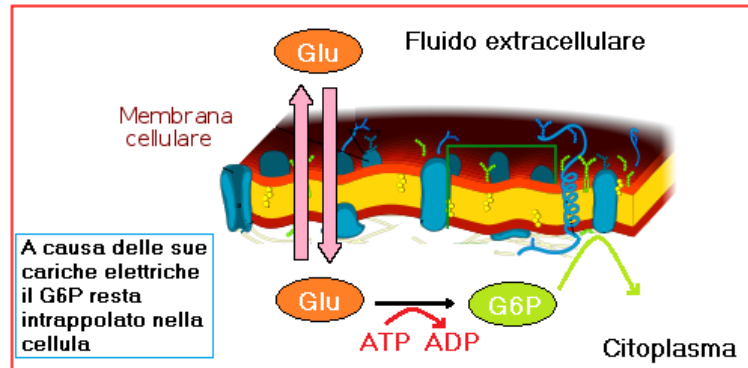
1. Glucosio → Glucosio-6-fosfato



La prima reazione della glicolisi è la fosforilazione del glucosio.

La fosforilazione consente alla cellula di trattenere la molecola di G6P al proprio interno in quanto aggiunge due cariche negative alla molecola di glucosio. In questo modo alla molecola è impedito di attraversare il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare e di disperdersi nei fluidi extracellulari.

Quindi si può dire che la fosforilazione è un modo per attirare il glucosio all'interno della cellula.



Una volta fosforilato sul carbonio 6, il G6P può essere indirizzato verso tre vie metaboliche:

- La prima, presente in tutte le cellule, è la via della glicolisi che è deputata alla produzione di ATP;
- La seconda, è la via dei pentosi (utile alla cellula per produrre il ribosio-5-fosfato ed il NADP ridotto);
- La terza, presente solo nel fegato e nei muscoli, è la via della glicogeno sintesi che porta alla formazione del glicogeno (la riserva di glucosio cellulare).

Questa prima reazione della glicolisi è un esempio classico di reazione accoppiata.

La fosforilazione del glucosio è una reazione endoenergetica (13,8 KJ/mol in condizioni standard), infatti il G6P è più instabile del glucosio e ciò è funzionale al prosieguo della glicolisi (che ricordiamo mira alla demolizione della molecola di glucosio).

Il "costo" di questa attivazione è compensato dall'esotermicità della reazione di idrolisi dell'ATP ad ADP (-30,5 KJ/mol). Per cui accoppiando le due reazioni (ovvero il glucosio lega il fosfato prendendolo all'ATP e non da quello presente in soluzione nel citoplasma) la variazione di energia libera standard risulta negativa (-16,7 kJ/mol). Questo consente alla cellula di ottenere contemporaneamente un reazione spontanea e una molecola destabilizzata.

In condizioni cellulari (negli eritrociti si ha mediamente [Glu] = 5,0 mM, [G6P] = 0,083 mM, [ATP] = 1,85 mM, [ADP] = 0,14 mM e [Pi]=1,0 mM) la reazione è ancora più favorita che in condizioni standard (-33.9 kJ/mol).

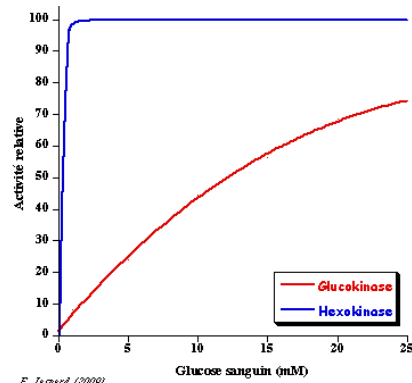
La reazione può essere catalizzata da due diversi enzimi:

- L'esochinasi, presente in tutte le cellule e in grado di reagire con tutti gli esosi,
- La glucochinasi, presente nelle cellule del fegato.

La esochinasi è l'enzima che lavora in condizioni cellulari normali, ovvero con le concentrazioni di glucosio generalmente presenti nella cellula. Ha una Km molto bassa [0,1 mM] per cui nei muscoli, dove [Glu] = 0,4 mM, l'enzima lavora in modo efficace. Tessuti differenti presentano isoenzimi differenti, ma con poche differenze cinetiche.

Ricordiamo che, come sempre, il vero substrato non è ATP, ma $MgATP^{2-}$, quindi la presenza dello ione magnesio è fondamentale.

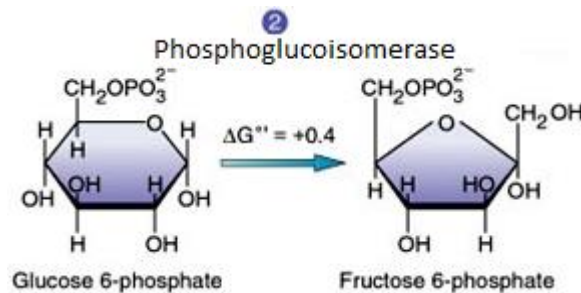
Questa prima reazione è uno dei tre punti di regolazione della glicolisi. L'esochinasi è inibita allostericamente dal suo stesso prodotto G6P. Elevati livelli di G6P rallentano l'attività dell'enzima fino a quando i livelli non sono ridotti dai successivi passaggi della glicolisi.



La glucochinasi è invece un enzima altamente specifico per il D-glucosio, con una Km piuttosto elevata (10 mM). Quindi la glucochinasi diventa metabolicamente importante quando i livelli di glucosio presenti nel fegato sono elevati, ad esempio dopo un pasto abbondante. Parte del G6P viene canalizzato nella via che porta alla produzione di glicogeno.

La glucochinasi è un enzima inducibile; la quantità presente nel fegato è controllata dall'ormone insulina secreto dal pancreas. I pazienti affetti da diabete mellito producono quantità insufficienti di insulina, di conseguenza posseggono bassi livelli di glucochinasi. Quindi non possono tollerare elevate concentrazioni di glucosio ematico e producono poco glicogeno epatico.

2. Glucosio-6-Fosfato → Fruttosio-6-fosfato

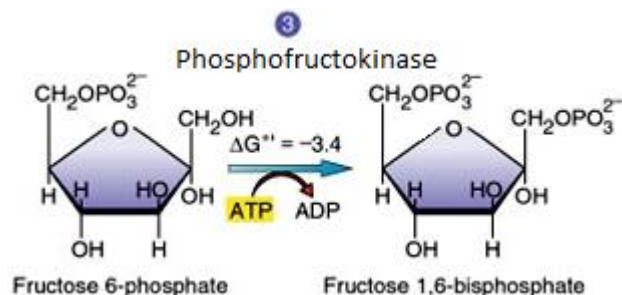


Questa reazione è una isomerizzazione: il gruppo carbonile viene spostato dalla posizione C1 alla posizione C2. In questo modo si libera la posizione C1 (che ora porta un gruppo OH) a cui si potrà nel passaggio successivo legare un secondo gruppo fosfato.

Secondo vantaggio dello spostamento del C=O in C2 è che in questo modo si destabilizza il carbonio C3, dove in seguito si avrà la rottura della molecola.

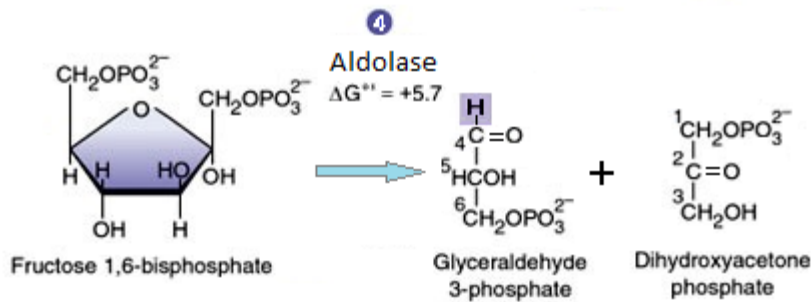
L'enzima lavora sulla catena aperta passando attraverso l'intermedio endiolico.

3. Fruttosio-6-Fosfato → Fruttosio-1,6-bifosfato



(vedi apposito file)

4. Fruttosio-1,6-bifosfato → Gliceraldeide-3-fosfato + Diidrossiacetonefosfato



In questa fase si rompe la molecola. Da una molecola C6 si passa a due molecole C3, per cui tutti i coenzimi energetici coinvolti da qui in avanti vanno moltiplicati per due.

La reazione è in condizioni cellulari molto vicina a $\Delta G = 0$ ed ha $K_{eq} = 10^{-4}$.

La reazione è comunque spostata a destra a causa della bassa concentrazione di G3P e DHAP nelle cellule.

Ci sono due diversi tipi di aldolasi:

- Classe I (in animali) – inibita da NaBH₄ ma non da EDTA
- Classe II (in batteri e funghi) – inibita da EDTA ma non da NaBH₄.

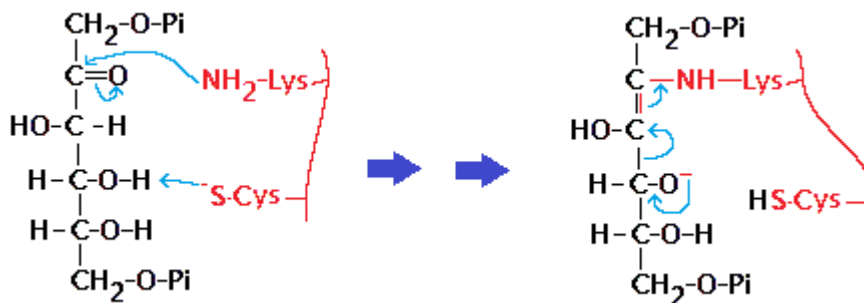
Sono dunque due i diversi meccanismi con cui si può realizzare l'isomerizzazione.

Negli enzimi di classe I si forma una base di Schiff fra il gruppo NH₂ della lisina del sito attivo con il carbonile in C2 (ricordiamo che le forme aperte e cicliche degli zuccheri esistono sempre entrambe, in equilibrio).

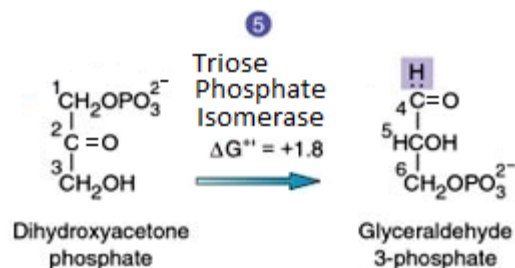
NaBH₄ idrogena il doppio legame C=N bloccando la reazione.

Negli enzimi di classe II è lo ione Zn⁺⁺ a interagire con il carbonile per dare inizio alla reazione. L'EDTA complessa Zn⁺⁺ e blocca la reazione.

La reazione in sé è l'inverso di una condensazione aldolica. (Meccanismo tipo I)



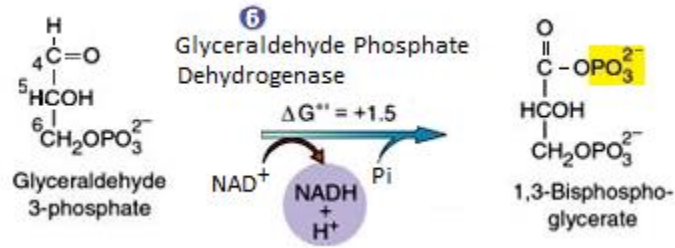
5. Diidrossiacetonefosfato → Gliceraldeide-3-fosfato



L'isomerizzazione avviene via endiolo.

A questo punto della glicolisi da una molecola di glucosio abbiamo ottenuto due molecole di gliceraldeide-3-fosfato

6. Gliceraldeide-3-fosfato → 1,3-Bifosfoglicerato



Da questa reazione ha inizio la fase di pay-off della glicolisi, ovvero quella in cui si ha il rendimento energetico favorevole.

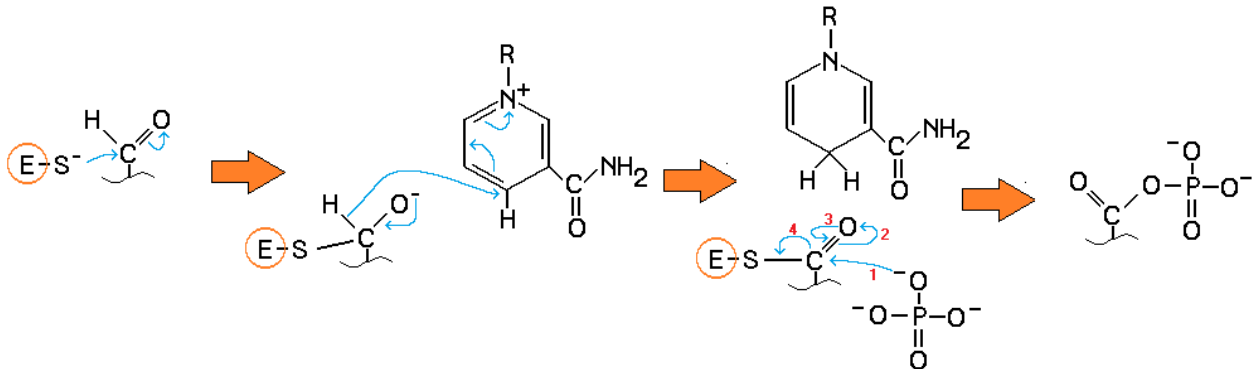
Come tutte le reazioni di deidrogenazione anche questa è piuttosto esotermica.

L'energia viene utilizzata sia per legare un secondo gruppo fosfato (che verrà adoperato nelle reazioni successive per produrre ATP) sia per produrre una molecola di coenzima ridotto (NADH).

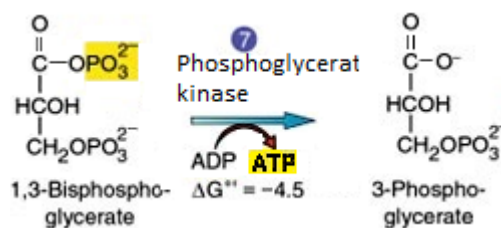
Quest'ultima molecola (riossidata poi nella fosforilazione ossidativa producendo 3 molecole di ATP) è piuttosto instabile e si forma grazie ad un trasferimento di ione idruro dal C carbonilico della G3P al carbonio 4 dell'anello piridinico della nicotinamide.

L'arsenico deve una delle sue diverse azioni tossiche sull'organismo a questa reazione. Infatti se nella cellula è presente lo ione arseniato AsO_4^{3-} , questo si può legare alla G3P in luogo del fosfato (ricordiamo che As e P sono nello stesso gruppo del sistema periodico). L'arseno-glicerato è instabile e si decompone a 3-fosfoglicerato. In questo modo la molecola "salta" il passaggio 7 della glicolisi in cui si produce una molecola di ATP e di conseguenza si riduce l'efficienza energetica della glicolisi.

Meccanismo della deidrogenazione e fosfatizzazione



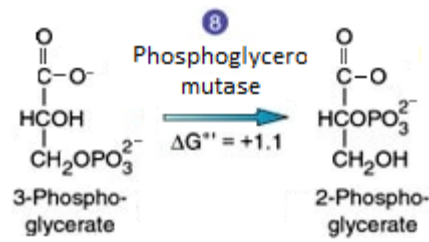
7. 1,3-Bifosfoglicerato → 3-Fosfoglicerato



Questa reazione è un'idrolisi.

È molto esoenergetica ed è un classico esempio di reazione accoppiata. Buona parte dell'energia è recuperata formando la molecola di ATP. La sua "spontaneità" trascina verso destra anche la reazione precedente (il prodotto della reazione 6 reagisce non appena si è formato).

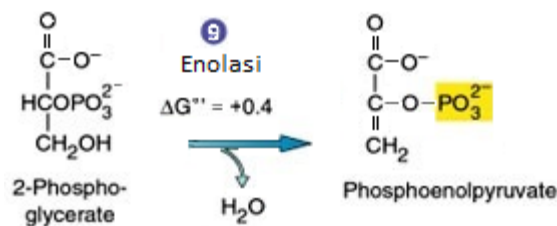
8. 3-Fosfoglicerato → 2-Fosfoglicerato



Questa reazione consiste nel trasferimento del gruppo fosfato dall'ossidrilico in C3 a quello in C2.

Esistono in natura mutasi che manifestano meccanismi di reazione diversi. Alcuni (es. nei lieviti) prevedono il passaggio attraverso il 2,3 di-fosfoglicerato, altri (es. germe di grano) invece prevedono il passaggio intramolecolare del fosfato.

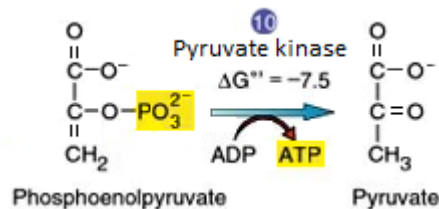
9. 2-Fosfoglicerato → Fosfoenolpiruvato



Questa è una reazione di de-idratazione. Trasforma un substrato a bassa energia in uno ad alta energia, il PEP. O meglio in un substrato in grado di liberare più energia durante l'idrolisi del gruppo fosfato.

L'enzima richiede lo ione Mg^{++} come cofattore.

10. Fosfoenolpiruvato → Piruvato



In questa reazione si sintetizza l'ultima molecola di ATP. È molto esoenergetica ($\Delta G = -23 \text{ KJ/mol}$ in condizioni cellulari)

È quindi sottoposta alla azione di molteplici regolatori, che si legano ai diversi siti allosterici della chinasi. L'AMP e l'1,6 fruttosio bis-fosfato sono attivatori dell'enzima. L'ATP è un inibitore, così come l'alanina (che è l'amminoacido corrispondente al α -chetoacido piruvato).

Inoltre la piruvato chinasi è inibita dall'ormone glucagone.

Questo ormone stimola la produzione di un'altra chinasi, una proteina che trasferisce un gruppo fosfato dall'ATP alla piruvato chinasi dando origine a una forma fosforilata dell'enzima. Questa piruvato chinasi fosforilata è inibita in modo più efficace dall'ATP e dall'alanina ed ha una K_m più alta per il PEP. In questo modo, con i livelli cellulari fisiologici di PEP, l'enzima è inattivo.

Di conseguenza il PEP, piuttosto che continuare la glicolisi ed alimentare il ciclo di Krebs, viene utilizzato per la sintesi del glucosio (gluconeogenesi).

Possiamo quindi dire che il glucagone nell'organismo svolge una funzione opposta a quella dell'insulina, ovvero tende ad aumentare la concentrazione del glucosio.

Il destino del Piruvato

Il modo in cui la cellula utilizza il piruvato prodotto dalla glicolisi dipende in gran parte dalla disponibilità di ossigeno.

In condizioni aerobe il piruvato può entrare nel ciclo di Krebs (vedi in seguito) ed essere ossidato a CO₂, con ulteriore produzione di NADH, FADH₂ e ATP. I coenzimi ridotti verranno poi riossidati nella fosforilazione ossidativa con ulteriore produzione di ATP. Al termine di tutti questi processi (glicolisi, TCA cycle, fosforilazione ossidativa) da una molecola di glucosio si saranno prodotte 38 molecole di ATP.

In condizione anaerobe il piruvato non viene ossidato completamente e si parla dunque di fermentazioni. I lieviti sono in grado di ridurre il piruvato ad etanolo.

Altri microorganismi e animali dispongono di una via metabolica che consente la produzione di acido lattico.

In entrambi i casi le fermentazioni forniscono un modo per riossidare il NADH prodotto nella glicolisi.

Fermentazione Lattica



La riduzione a lattato si ha normalmente in quei tessuti con scarsa irrorazione sanguigna (es. la cornea dell'occhio) e nei muscoli scheletrici a contrazione rapida.

Quando i muscoli sono sollecitati con le loro rapide contrazioni consumano rapidamente il poco O₂ presente. Il piruvato presente non può quindi più essere ossidato via ciclo di Krebs e subisce l'azione della lattato deidrogenasi. Questa via è più breve ma produce meno energia, l'organismo non è quindi in grado di sopportarla a lungo. Il lattato si accumula nei muscoli (normalmente viene smaltito dal sangue che lo trasporta al fegato dove viene ritrasformato in glucosio via gluconeogenesi) provocando crampi e affaticamento. Potremmo definire questi ultimi una sorta di segnale di "energia in riserva" segnali per l'organismo.

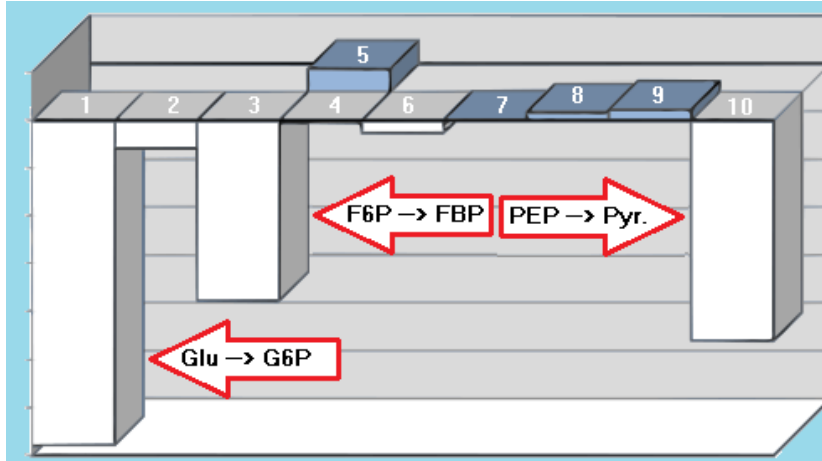
Schema Energetico della Glicolisi

Delle 10 reazioni che costituiscono la glicolisi, tre sono molto esoenergetiche (quindi sono molto spostate a destra).

Sette reazioni invece hanno un ΔG prossimo allo zero, ovvero hanno una situazione di equilibrio non spostato decisamente a destra o a sinistra e quindi facilmente influenzato dalle concentrazioni dei reagenti e dei prodotti.

Queste sette reazioni, e i loro rispettivi enzimi, sono in comune tra la glicolisi e la gluconeogenesi.

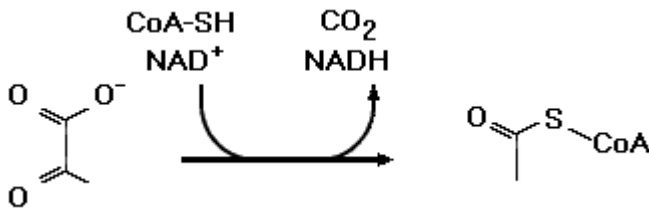
Ovviamente i tre passaggi fortemente esoenergetici sono invece caratteristici della glicolisi. Nella gluconeogenesi le corrispondenti reazioni inverse sono catalizzate da enzimi completamente diversi.



Decarbossilazione del piruvato

Pyruvate dehydrogenase complex (PDC) is a complex of three enzymes that convert pyruvate into acetyl-CoA by a process called pyruvate decarboxylation. This complex links the glycolysis metabolic pathway to the citric acid cycle.

The reaction catalysed by pyruvate dehydrogenase complex is:



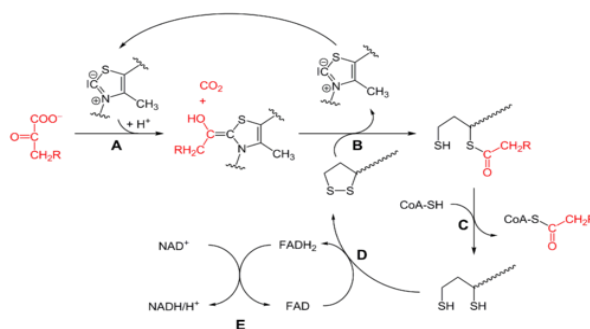
The three enzymes the complex is composed of are:

- pyruvate dehydrogenase
- dihydrolipoyl transacetylase
- dihydrolipoyl dehydrogenase.

Five co-enzymes are required to complete the reaction:

- TPP (thiamine pyrophosphate – vitamine B1)
- Lipoate
- Coenzyme A
- NAD⁺
- FAD

The mechanism is as follows:



PDC is a large complex composed of multiple copies of 3 or 4 subunits depending on species. In eukaryotes PDC consists of a central core made up from 60 molecules of dihydrolipoyl transacetylase (E2) arranged into an icosahedron. Up to 24 copies of Pyruvate dehydrogenase (E1) and 12 molecules of dihydrolipoyl dehydrogenase (E3) bind to the outside of the E2 core.

Pyruvate dehydrogenase is inhibited when one or more of the three following ratios are increased: ATP/ADP, NADH/NAD⁺ and acetyl-CoA/CoA.

In eukaryotes PDC is tightly regulated by its own specific pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) and pyruvate dehydrogenase phosphatase (PDP), deactivating and activating it respectively.

During starvation, PDK increases in amount in most tissues, including skeletal muscle, via increased gene transcription. Under the same conditions, the amount of PDP decreases. The resulting inhibition of PDC prevents muscle and other tissues from catabolizing glucose and gluconeogenesis precursors. Metabolism shifts toward fat utilization, while muscle protein breakdown to supply gluconeogenesis precursors is minimized, and available glucose is spared for use by the brain.