

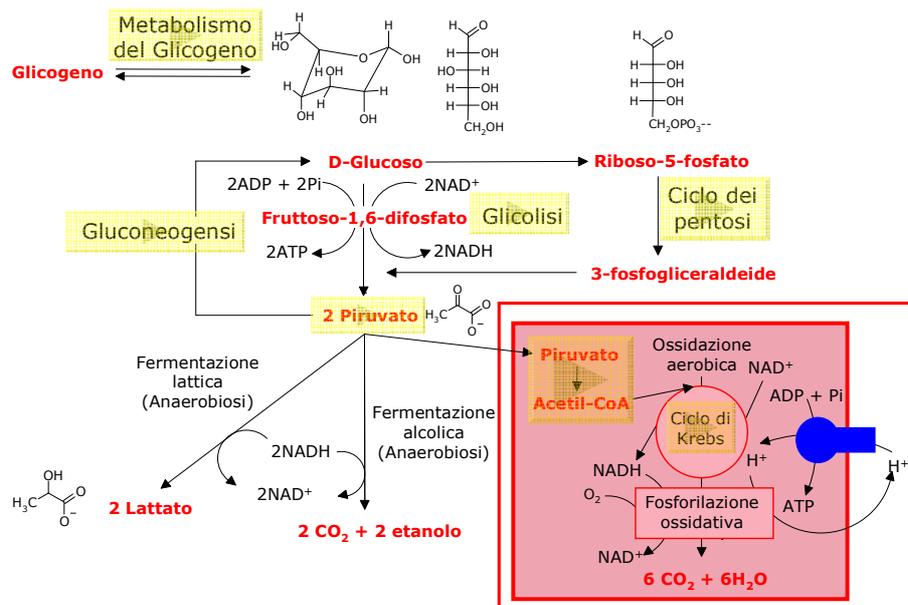
Prof. Giorgio Sartor

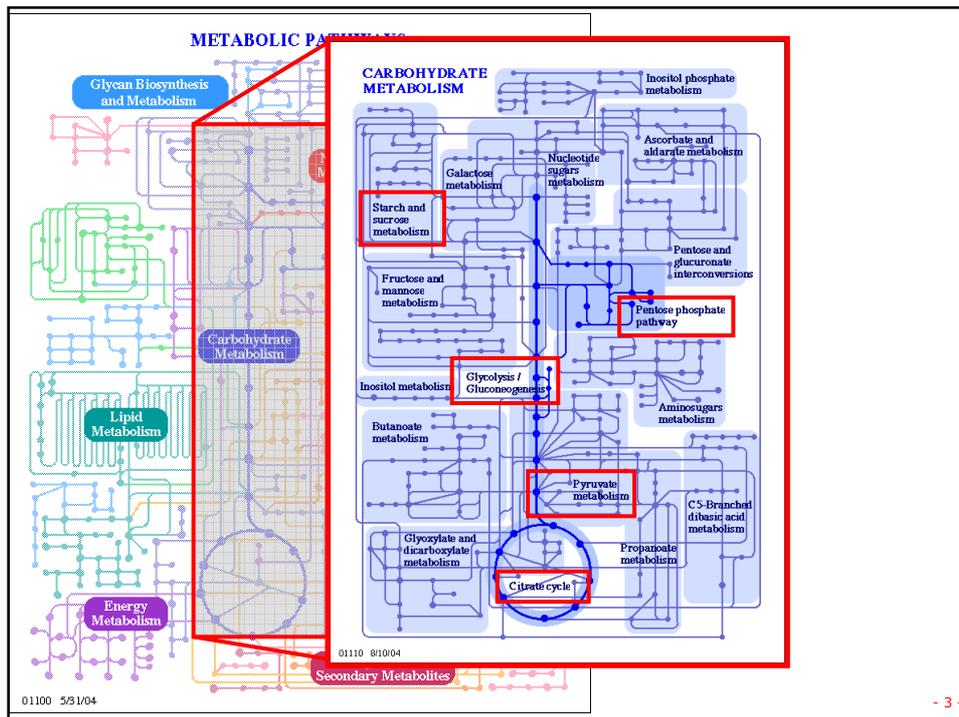
Metabolismo dei carboidrati

Copyright © 2001-2015 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 1.9.3 – apr 2015

Indice



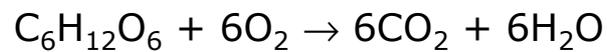


I glucidi

- I glucidi sono tra i maggiori fornitori di energia degli organismi.
- Sono introdotti con la dieta e prodotti dalle cellule.
- Sono in genere dei polisaccaridi.
 - Attraverso la digestione vengono degradati a monosaccaridi (glucosio, fruttosio, galattosio, ...)

I glucidi

- I monosaccaridi vengono demoliti per produrre energia a spesa dei legami chimici.
- In presenza di ossigeno si ha la "combustione" completa del monosaccaride:



- L'energia prodotta viene immagazzinata sottoforma di nucleotidi trifosfati (ATP).

I glucidi

- Una cellula in condizioni ottimali tende ad accumulare polisaccaridi come:
 - glucidi di riserva (amidi, glicogeno)
 - glucidi strutturali (cellulosa).

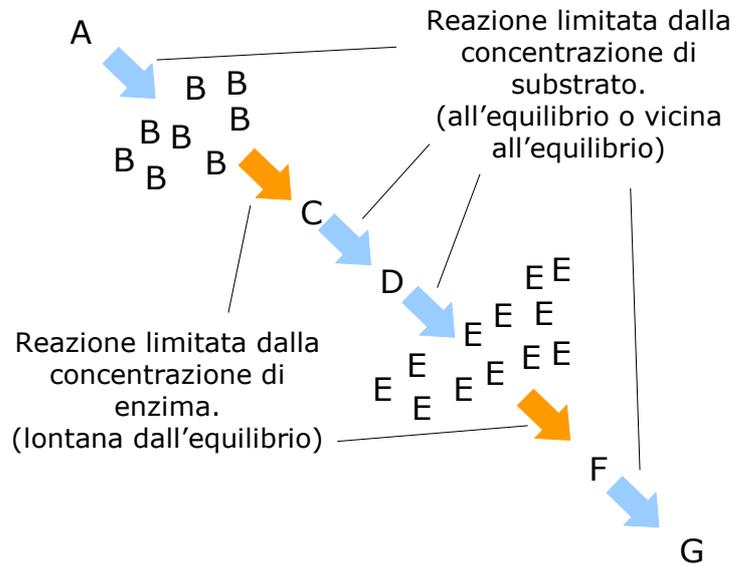
Vie metaboliche

- Tutte le operazioni di degradazione dei monosaccaridi e di sintesi dei monosaccaridi e polisaccaridi sono gestite da vie metaboliche che mantengono l'omeostasi dell'organismo.
- Quando il bilancio si altera si ha la regolazione del metabolismo
- La velocità con la quale avviene una via metabolica è regolata.

Regolazione delle vie metaboliche

- La velocità di una via metabolica
 - può essere regolata sia dalla disponibilità del substrato che dalla disponibilità dell'enzima.
 - È controllata a livello della reazione più lenta della via metabolica
 - Termodinamicamente molto favorito
 - Catalizzato da un enzima estremamente regolato
 - Spesso in una biforcazione della via metabolica
- Le vie cataboliche (demolizione) ed anaboliche (sintesi) usano spesso gli stessi enzimi, ma hanno almeno una reazione catalizzata da un enzima diverso

Regolazione delle vie metaboliche



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 9 -

Glicolisi

La via di Embden-Meyerhof (Warburg)

◀ Indice

Glicolisi

- In tutte le cellule avviene la glicolisi
- Dieci reazioni, le stesse in tutte le cellule, ma con diversa cinetica
- Tre fasi:
 - La prima fase converte il glucosio in fruttosio-1,6-difosfato,
 - La seconda fase scinde il fruttosio-1,6-difosfato in due triosi,
 - La terza fase produce due molecole di piruvato.
- I prodotti sono: piruvato, ATP e NADH.
- Esistono tre diversi destini possibili del piruvato.

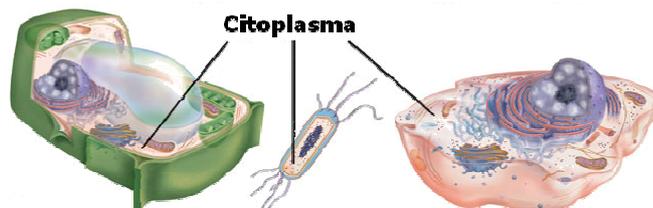
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 13 -

Glicolisi

- Gli enzimi sono confinati nel citoplasma della cellula.
- Gli intermedi sono tutti fosforilati.
 - Non passano attraverso le membrane.
 - Vengono riconosciuti dagli enzimi.
 - Sono convertiti in intermedi ad alto potenziale di trasferimento del fosfato che sono in grado di fosforilare l'ADP ad ATP.

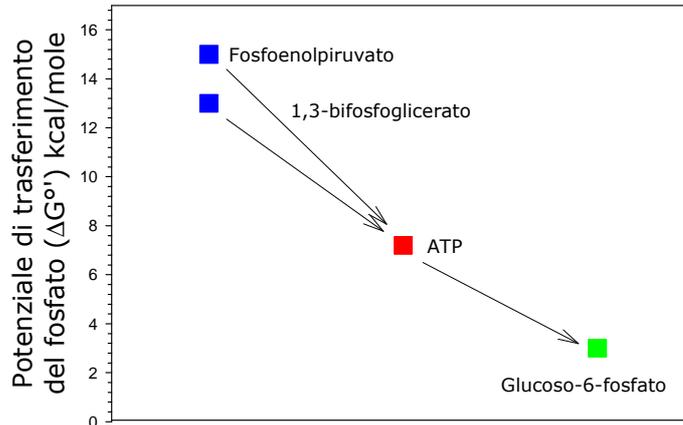


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 14 -

Intermedi fosforilati



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 15 -

Fasi della glicolisi

1. Fosforilazione del substrato ed attivazione,
2. Scissione dello zucchero a sei atomi di carbonio,
3. Recupero dell'energia nella fosforilazione dell'ADP.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 16 -

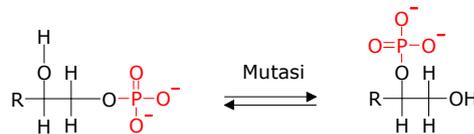
Reazioni della glicolisi

- Cinque tipi di reazioni:

1. Trasferimento del fosfato



2. Spostamento del fosfato



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

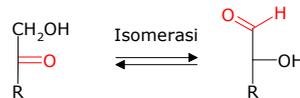
Metabolismo dei carboidrati

- 17 -

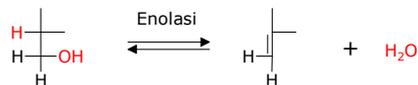
Reazioni della glicolisi

- Cinque tipi di reazioni:

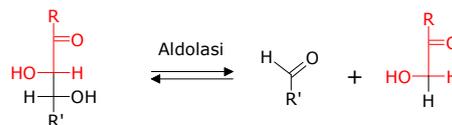
3. Isomerizzazione



4. Deidratazione



5. Scissione aldolica



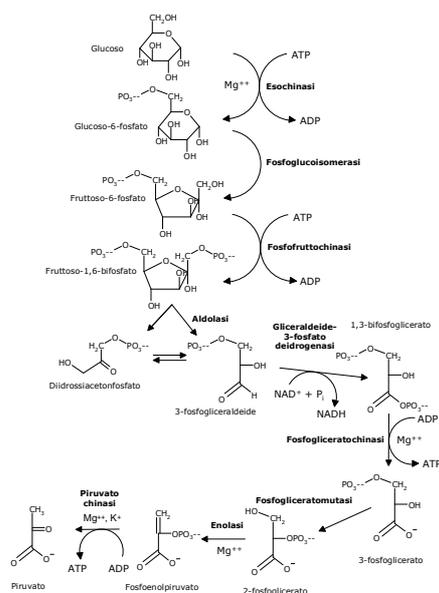
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 18 -

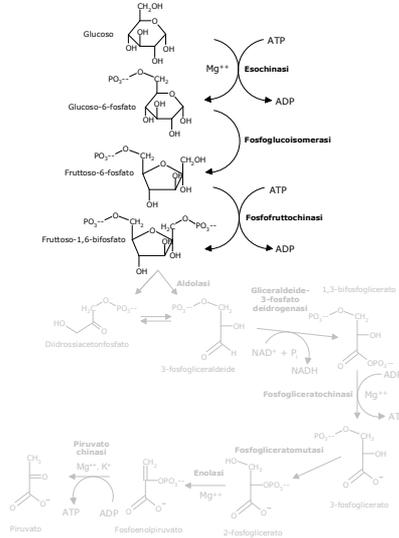
Fosforilazione

- La prima fase della glicolisi consiste nella **fosforilazione** del glucosio per arrivare a fruttosio-1,6-difosfato attraverso il glucosio-6-fosfato che viene isomerizzato a fruttosio-6-fosfato.
- Vengono consumate due molecole di ATP per ottenere lo zucchero difosfato.



Fase 1

Formazione di fruttosio-1,6-bifosfato



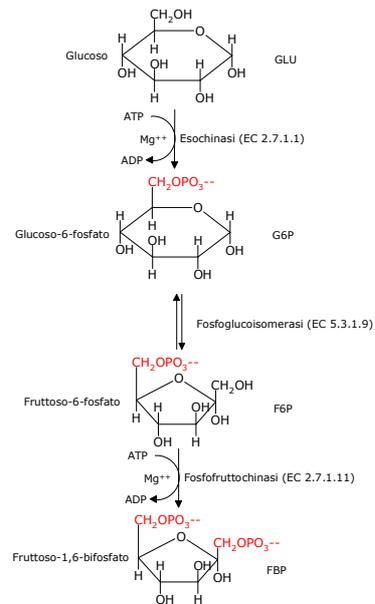
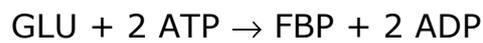
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 21 -

Formazione del fruttosio-1,6-difosfato

- Gli enzimi coinvolti sono due chinasi (la esochinasi e la fosfofruttochinasi) ed una isomerasi
- Risultato netto:



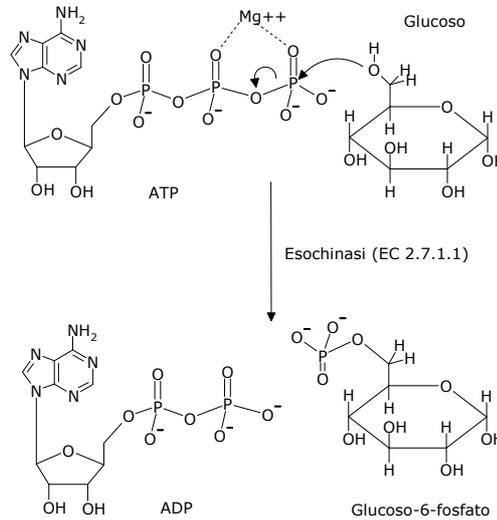
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 22 -

Esochinasi

- Fosforilazione del glucoso
- Consumo di ATP
- Fosforilazione spontanea a causa dell'idrolisi dell'ATP

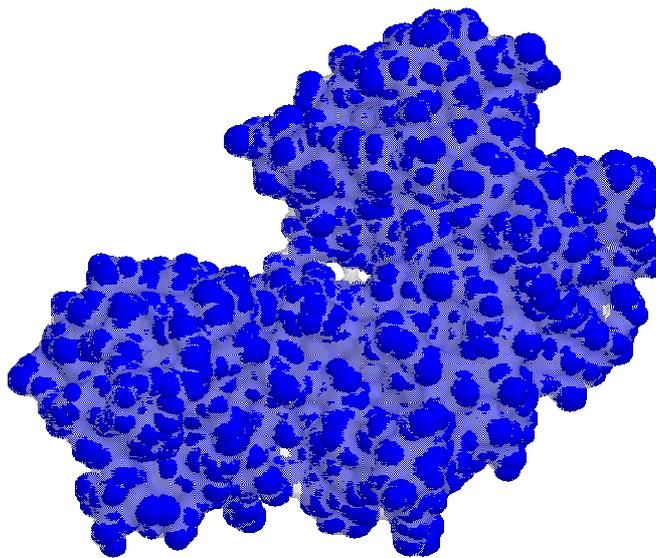


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 23 -

Esochinasi EC 2.7.1.1

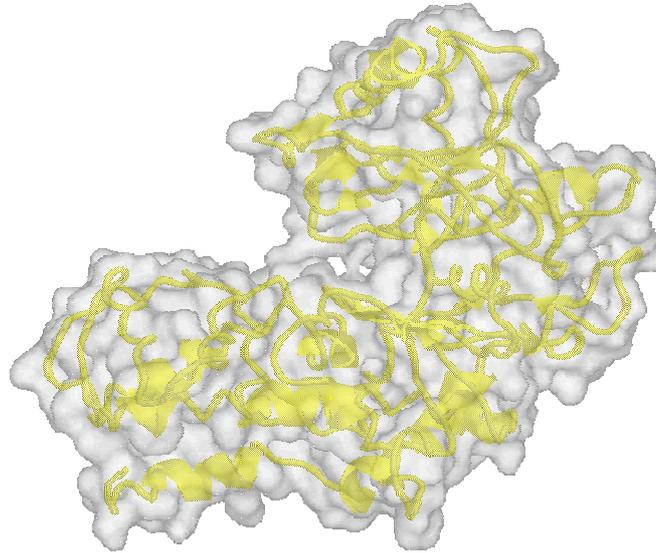


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 24 -

Esochinasi EC 2.7.1.1

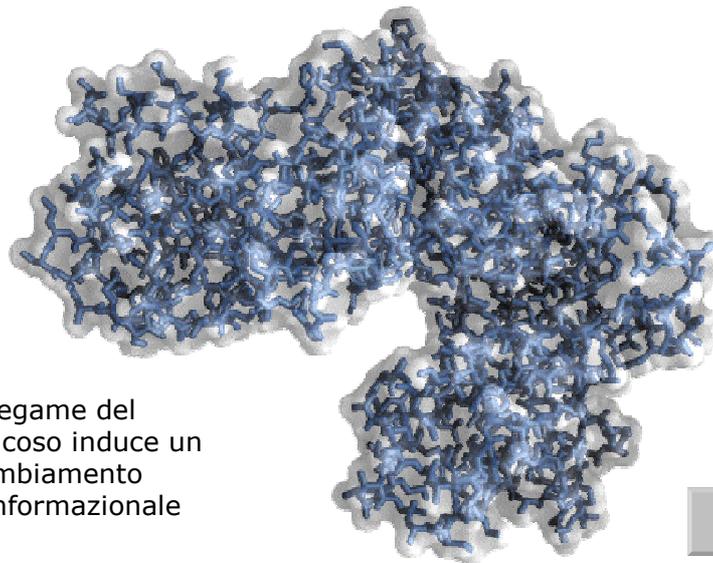


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 25 -

Esochinasi inattiva



- Il legame del glucosio induce un cambiamento conformazionale

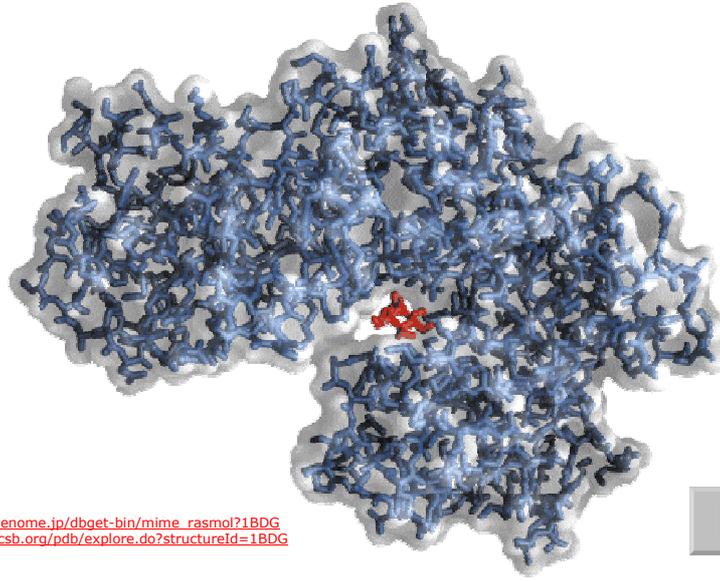


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 26 -

Esochinasi attiva



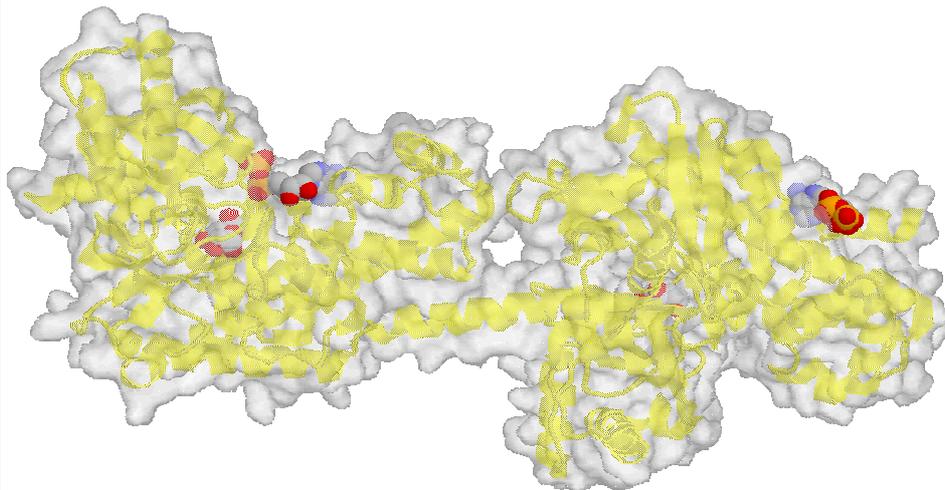
http://www.genome.jp/dbget-bin/mime_rasmol?1BDG
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1BDG>

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 27 -

Esochinasi EC 2.7.1.1

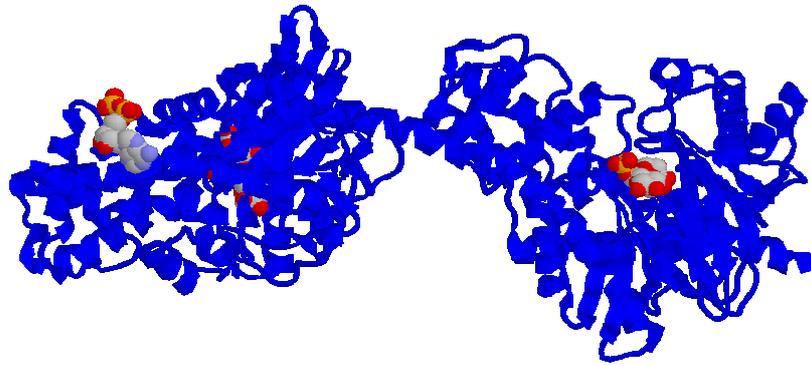


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 28 -

Esochinasi EC 2.7.1.1

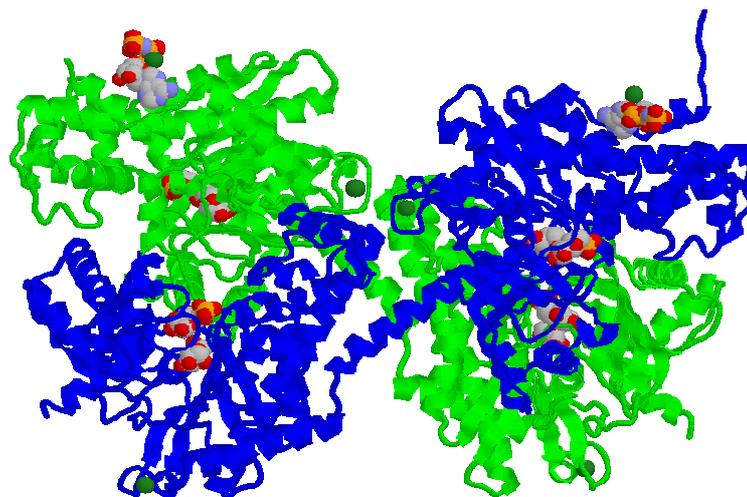


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 29 -

Esochinasi EC 2.7.1.1

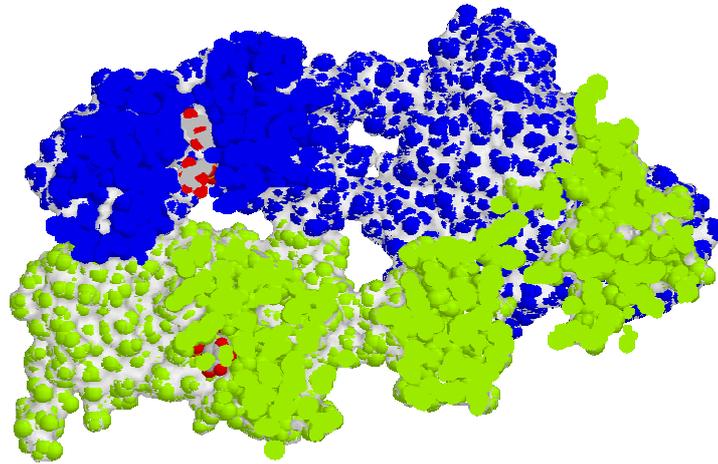


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 30 -

Esochinasi EC 2.7.1.1



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 31 -

Esochinasi EC 2.7.1.1

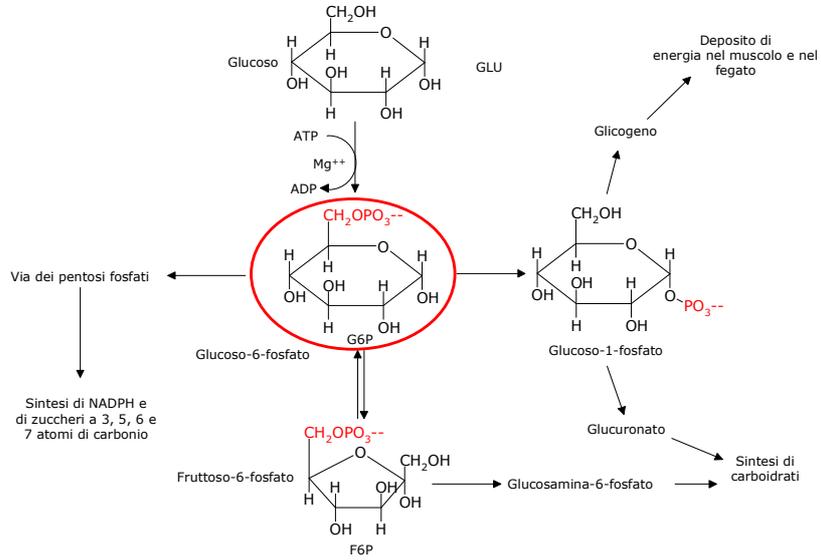
- La fosforilazione confina il glucosio nella cellula
- La K_m per il glucosio è 0.1 mM; nella cellula il glucosio è 4 mM
- La glucochinasi ha una $K_m^{\text{glucosio}} = 10$ mM, si attiva solo quando la cellula si arricchisce in glucosio
- La esochinasi è regolata allostericamente, viene inibita dal glucosio-6-fosfato ma non è il principale sito di regolazione della glicolisi

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 32 -

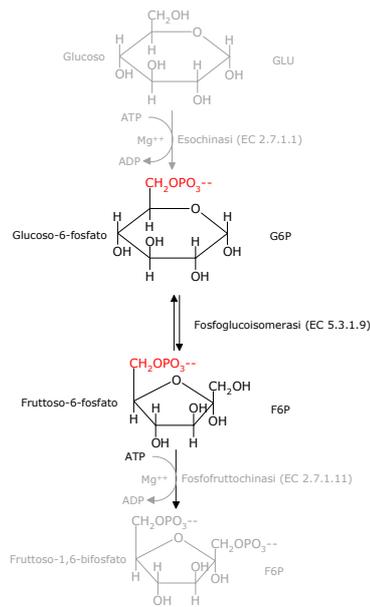
Formazione del fruttosio-6-difosfato



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 33 -

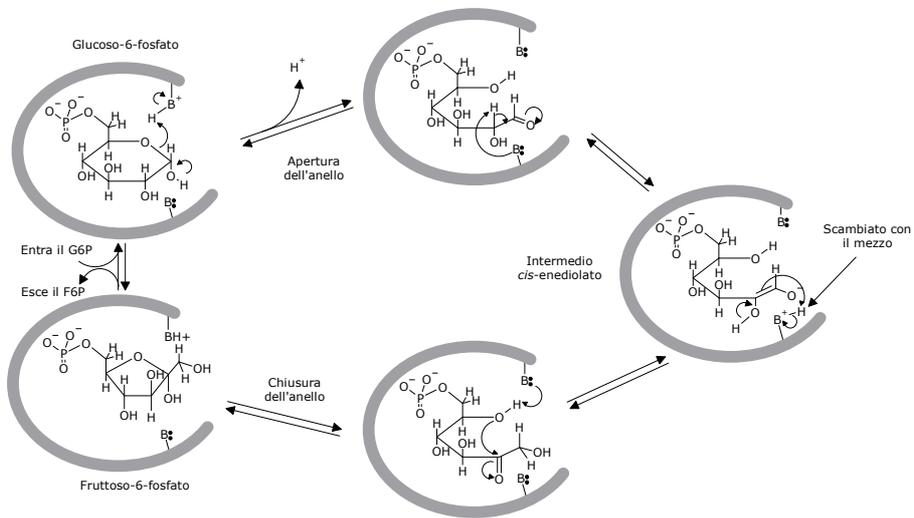


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 34 -

Fosfoglucoisomerasi EC 5.3.1.9

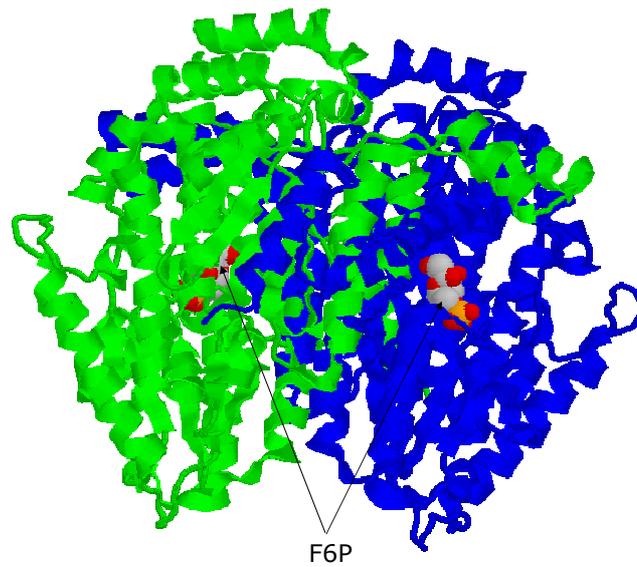


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 35 -

Fosfoglucoisomerasi EC 5.3.1.9

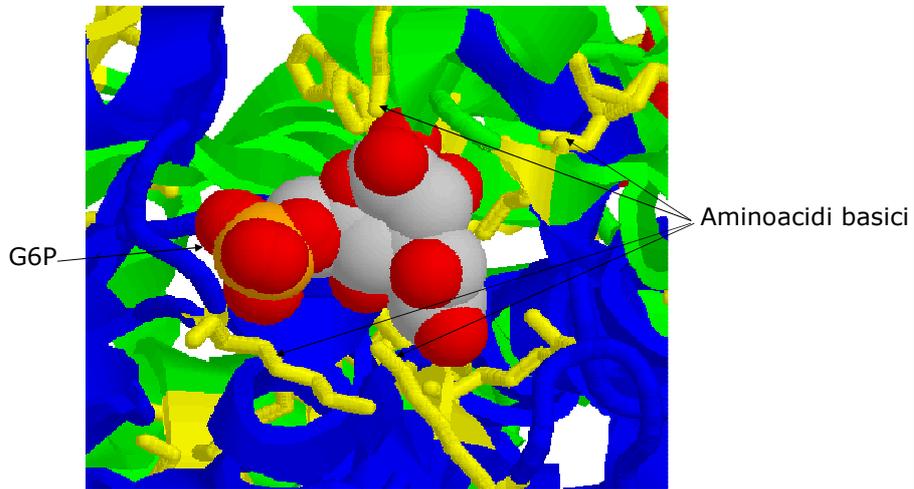


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 36 -

Fosfoglucoisomerasi EC 5.3.1.9

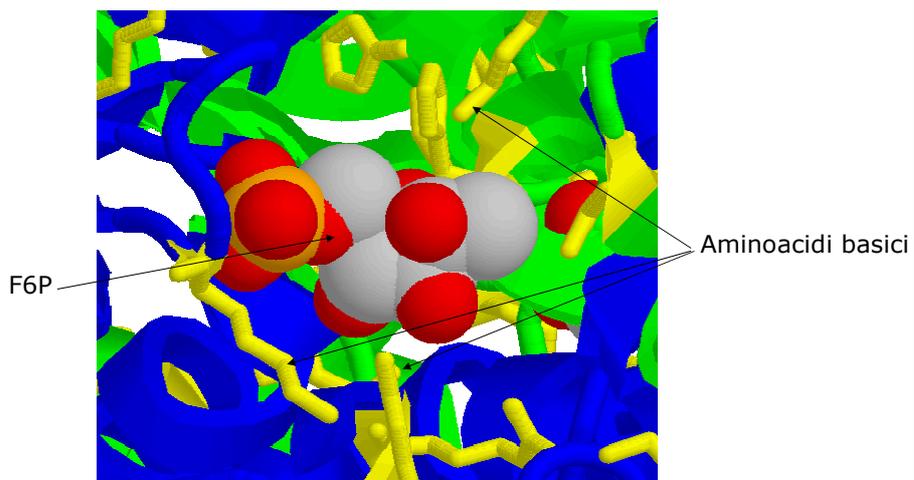


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 37 -

Fosfoglucoisomerasi EC 5.3.1.9

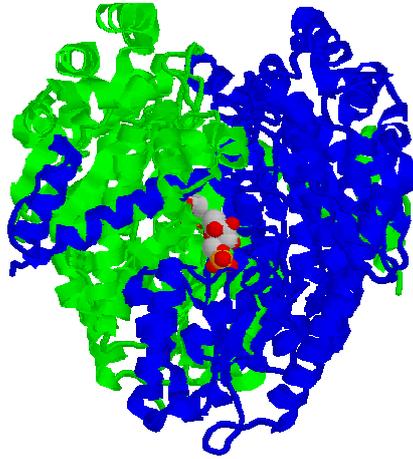


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 38 -

Fosfoglucoisomerasi EC 5.3.1.9

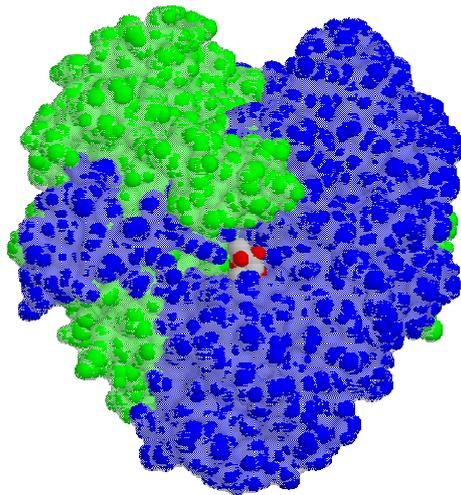


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 39 -

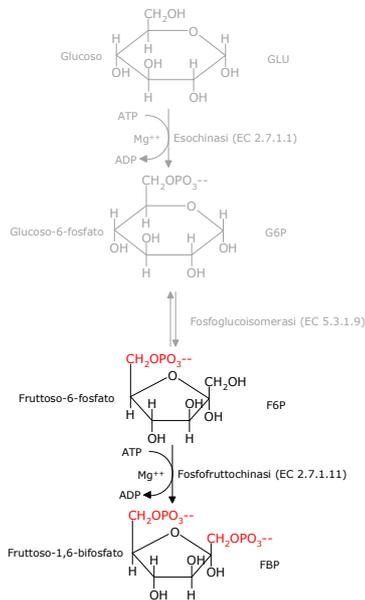
Fosfoglucoisomerasi EC 5.3.1.9



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

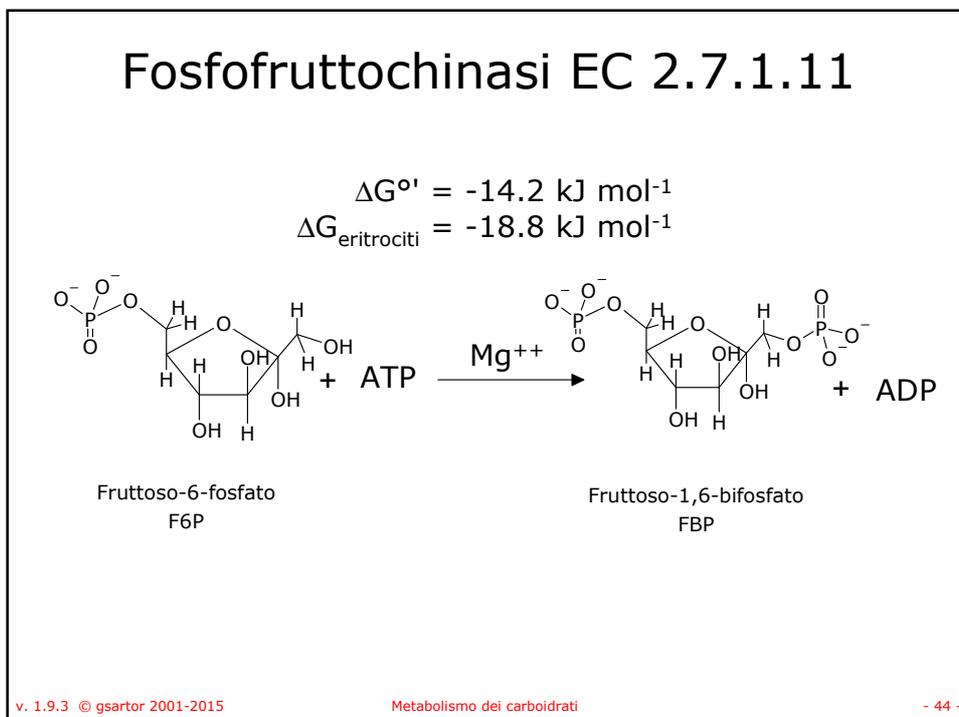
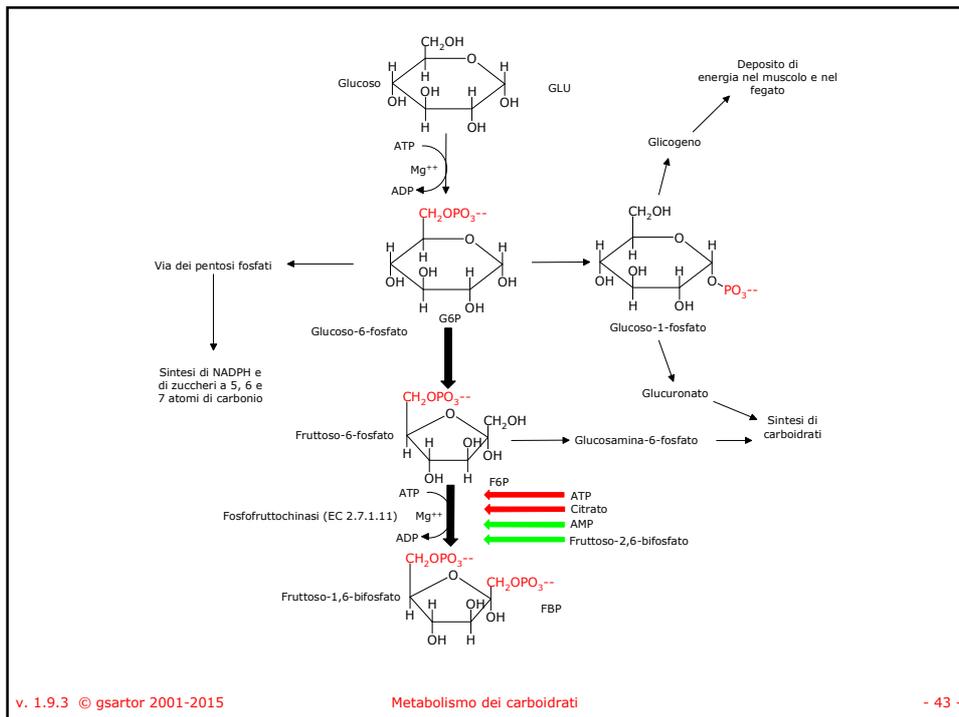
- 40 -



Fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11

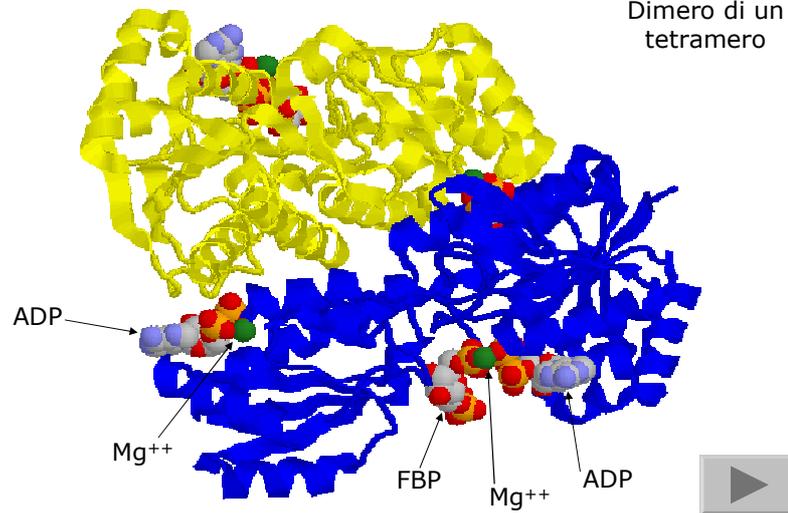
È la reazione che controlla la glicolisi

- È la seconda reazione di fosforilazione
- Valore di ΔG grande e negativo,
 - La PFK è altamente regolata
 - ATP inibisce, AMP elimina l'inibizione
 - Il citrato è un inibitore allosterico
 - Il fruttosio-2,6-bisfosfato è un attivatore allosterico
 - L'attività della PFK aumenta quando lo stato energetico della cellula è basso.
 - L'attività della PFK diminuisce quando lo stato energetico della cellula è alto.
- Spinge la reazione verso la glicolisi e non verso il ciclo dei pentosi



Fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11

Dimero di un tetramero



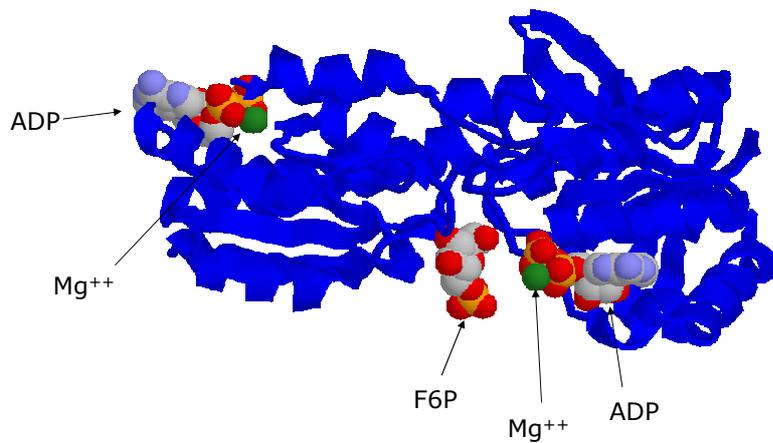
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 45 -

<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1PFK>

Fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11

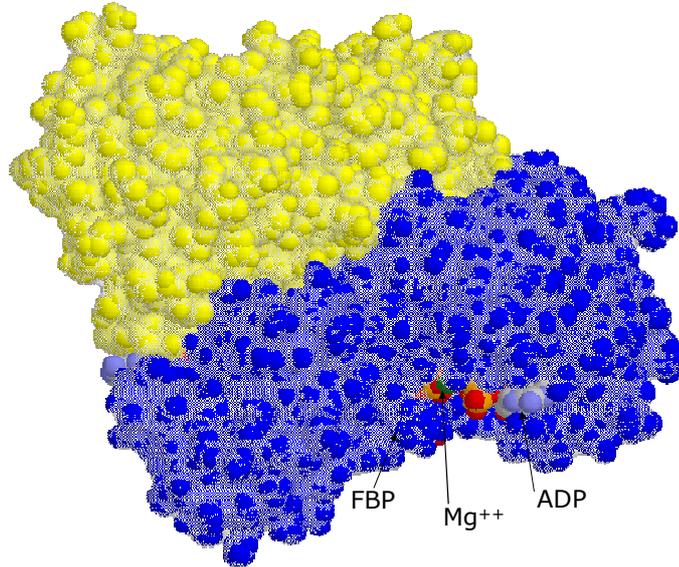


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 46 -

Fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11

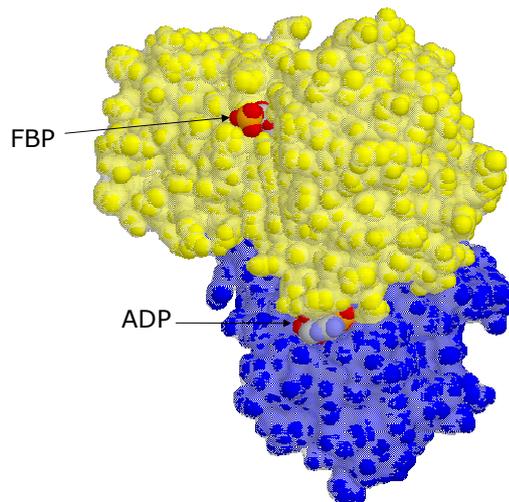


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 47 -

Fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 48 -

Fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11



<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MTO>



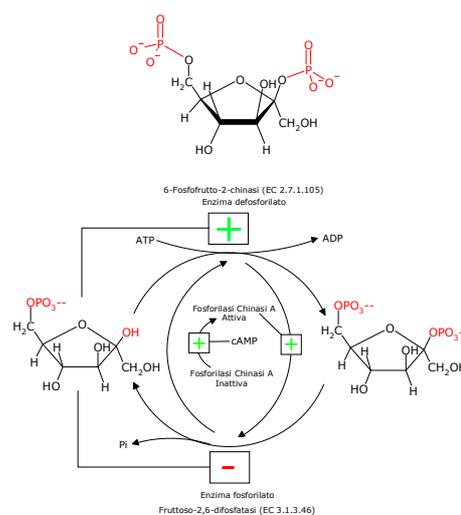
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 49 -

Enzima tandem

- La regolazione della PFK coinvolge un'altra molecola fosforilata: il fruttosio-2,6-bisfosfato, che funziona da attivatore allosterico della PFK.
- La sintesi di questa molecola è regolata da una proteina che, su singolo polipeptide, svolge due attività enzimatiche diverse a secondo se è o non è fosforilata: l'enzima tandem.
- L'enzima tandem è finemente regolato.

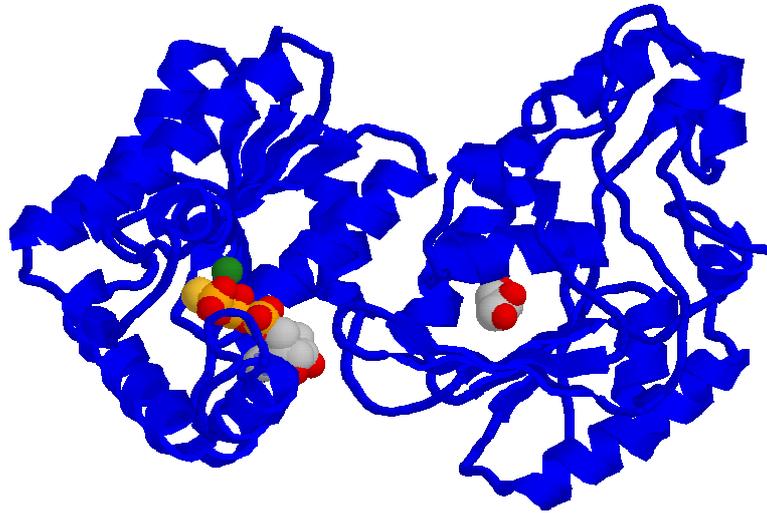


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 50 -

Enzima tandem

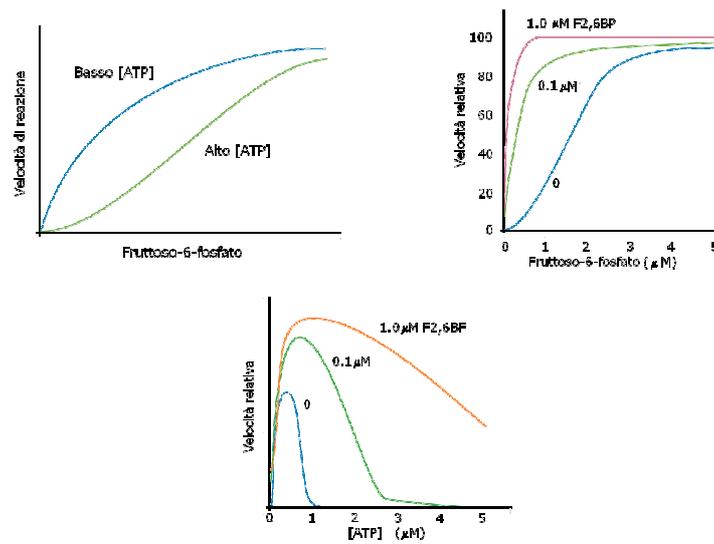


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 51 -

Regolazione PFK

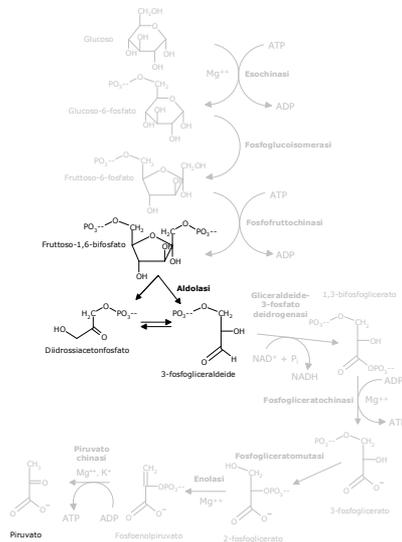


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 52 -

Fase 2 Scissione del fruttosio-1,6-bifosfato



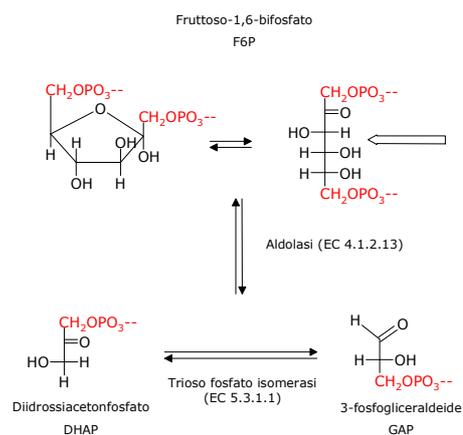
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 53 -

Scissione del fruttosio-1,6-difosfato

- La scissione del fruttosio-1,6-difosfato attraverso l'aldolasi porta alla formazione di due triosi, diidrossiacetonfosfato e 3-fosfogliceraleide.
- I due triosi sono tra loro in equilibrio attraverso la trioso fosfato isomerasi

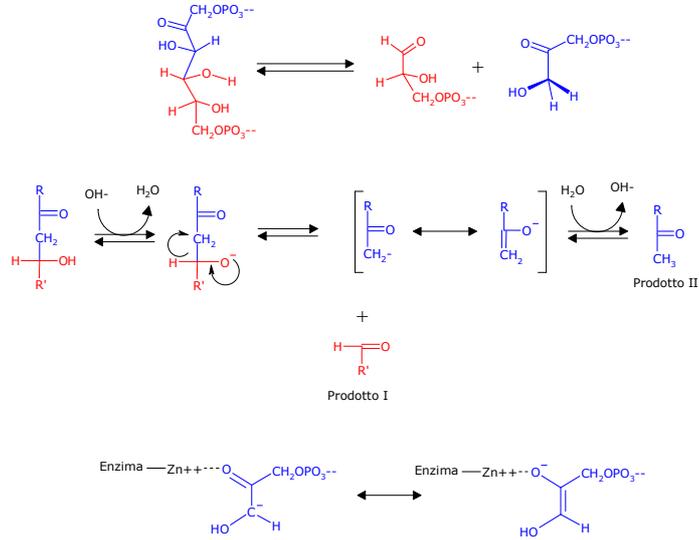


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 54 -

Aldolasi: meccanismo generale

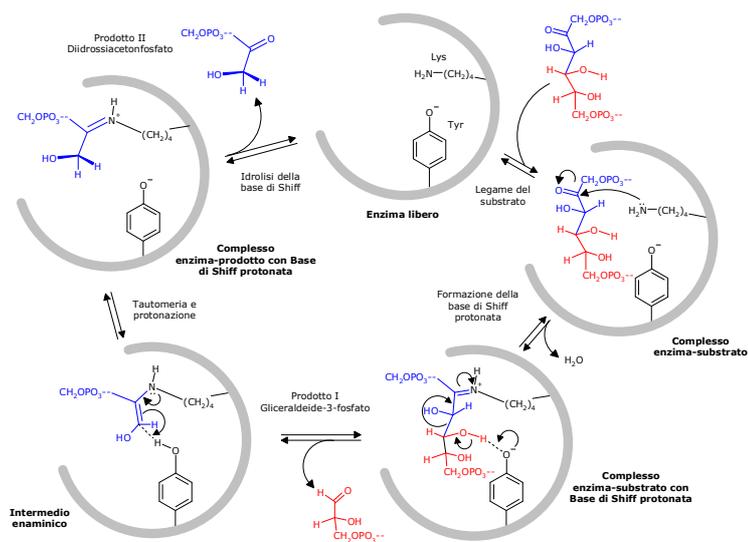


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 55 -

Aldolasi EC 4.2.1.13

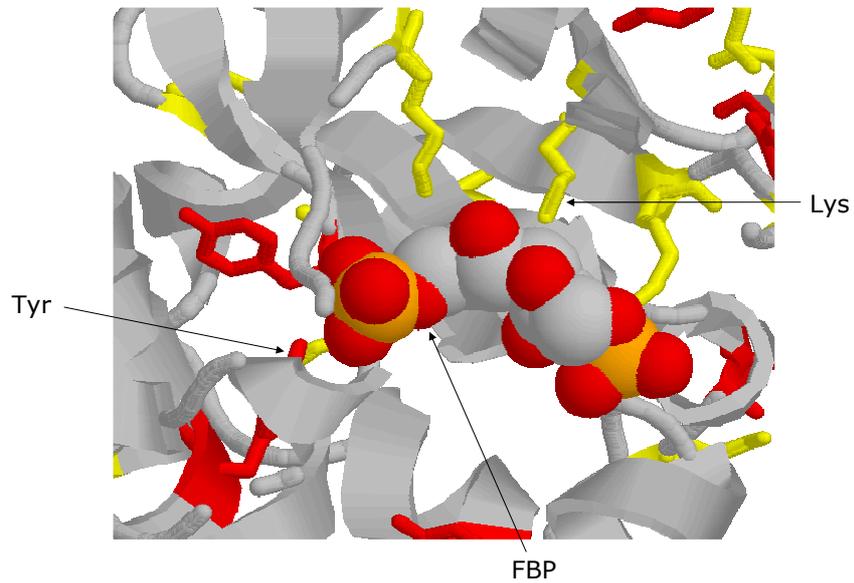


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 56 -

Aldolasi EC 4.2.1.13

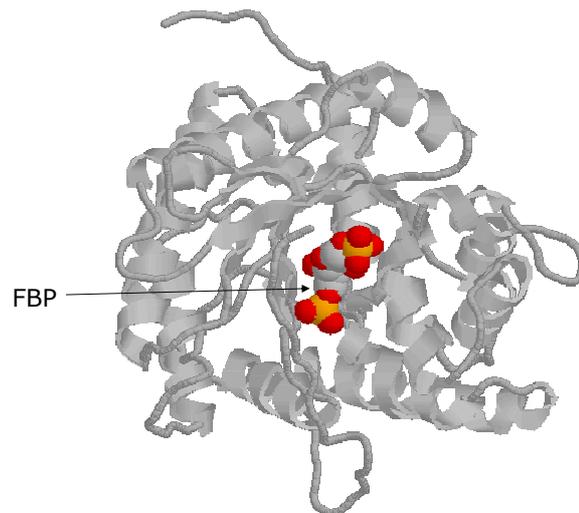


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 57 -

Aldolasi EC 4.2.1.13



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 58 -

Trioso-fosfato isomerasi EC 5.3.1.1

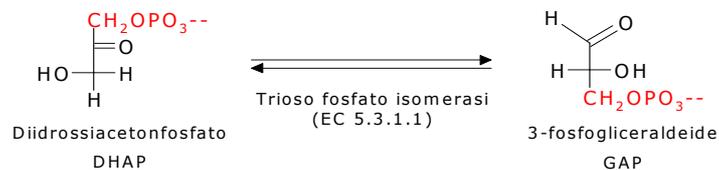
Converte DHAP in GAP

- Il meccanismo coinvolge la formazione di enediolo
- Il sito attivo contiene un Glu che agisce come base

Trioso-fosfato isomerasi EC 5.3.1.1

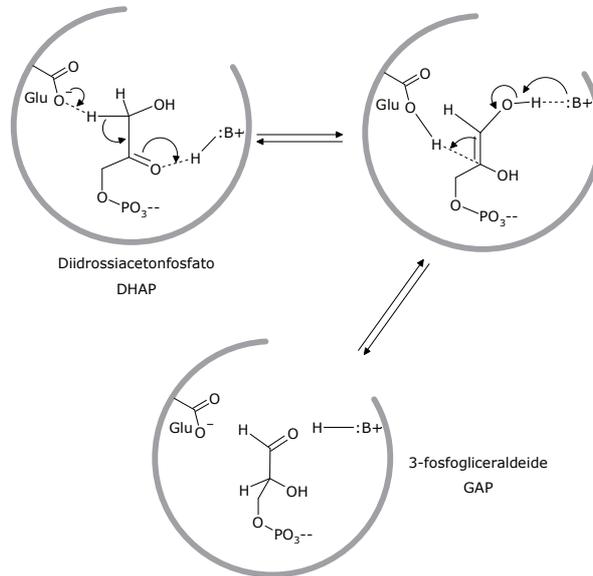
- Catalizza l'equilibrio:

$$\Delta G^{\circ'} = +7.56 \text{ kJ mol}^{-1}$$



- L'equilibrio è spostato verso sinistra ($\cong 96\%$ DHAP, $\cong 4\%$ GAP), nel procedere della glicolisi viene consumata solo GAP e l'equilibrio si sposta verso destra.

Trioso-fosfato isomerasi EC 5.3.1.1

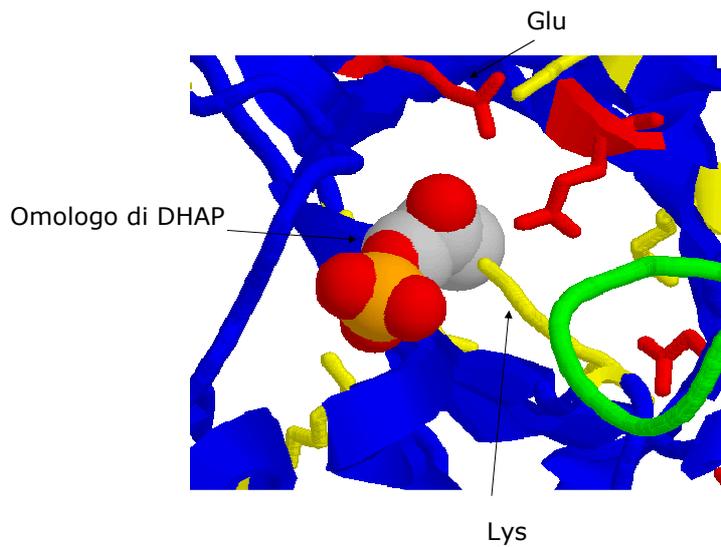


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 61 -

Trioso-fosfato isomerasi EC 5.3.1.1

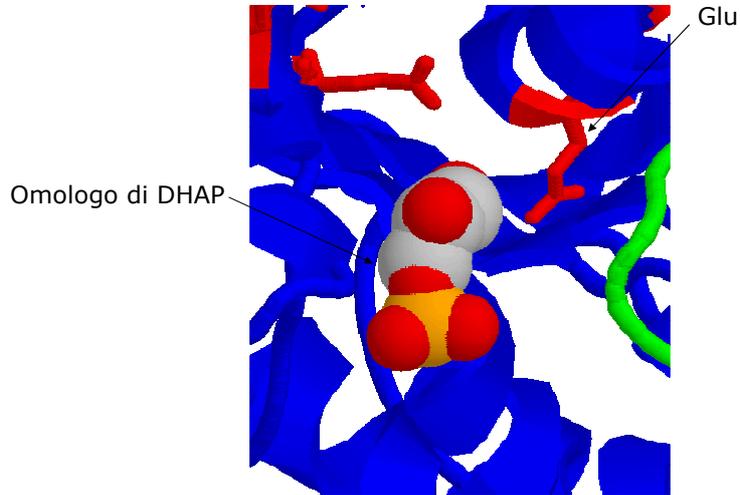


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 62 -

Trioso-fosfato isomerasi EC 5.3.1.1

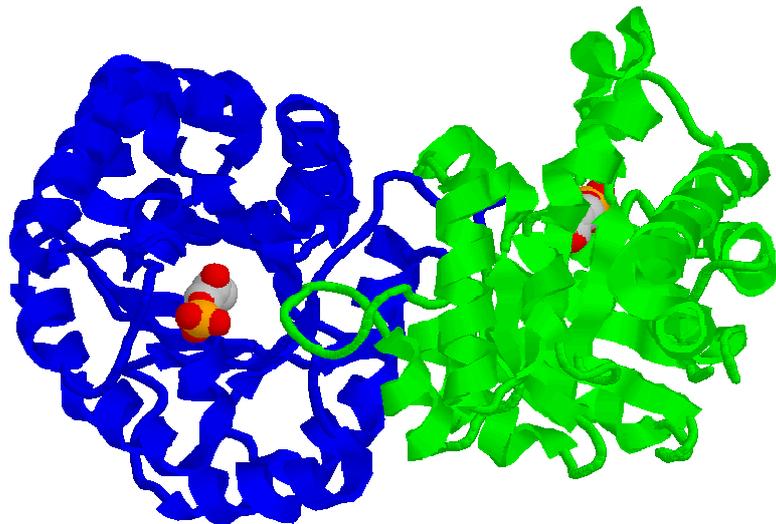


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 63 -

Trioso-fosfato isomerasi EC 5.3.1.1

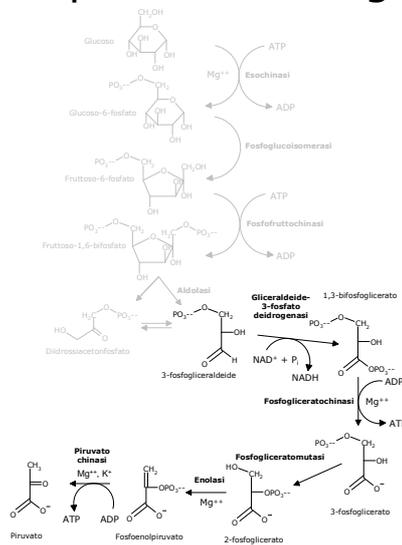


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 64 -

Fase 3 Recupero dell'energia



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 65 -

Recupero dell'energia

- La formazione di GAP permette il recupero dell'energia attraverso il suo metabolismo con formazione di una serie di intermedi fosforilati:
 - 1,3-bisfosfoglicerato,
 - 3-fosfoglicerato,
 - 2-fosfoglicerato,
 - fosfoenolpiruvato ed infine
 - piruvato.
- Il destino del piruvato dipende dalla presenza di ossigeno e può essere diverso in cellule diverse (lievito, muscolo...)

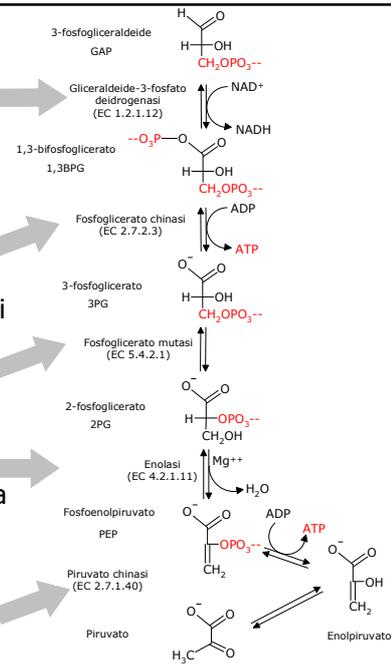
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 66 -

Recupero dell'energia

- La 3-fosfoglicerato prodotta viene ossidata e fosforilata 1,3-bifosfoglicerato da una deidrogenasi, con produzione di NADH
- il 1,3-bifosfoglicerato viene utilizzato per fosforilare l'ADP ad opera di una fosfogliceratochinasi e si forma 3-fosfoglicerato,
- che viene isomerizzato a 2-fosfoglicerato ad opera di una mutasi,
- il 2-fosfoglicerato perde una molecola d'acqua ad opera di una enolasi e si forma il fosfoenolpiruvato che
- viene trasformato in piruvato ad opera della piruvato chinasi con formazione di ATP.



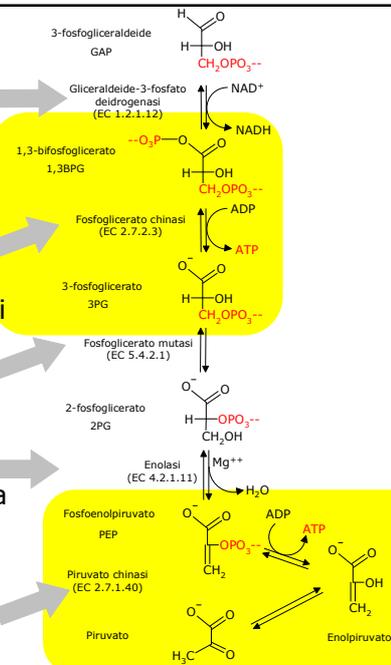
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 67 -

Recupero dell'energia

- La 3-fosfoglicerato prodotta viene ossidata e fosforilata 1,3-bifosfoglicerato da una deidrogenasi, con produzione di NADH
- il 1,3-bifosfoglicerato viene utilizzato per fosforilare l'ADP ad opera di una fosfogliceratochinasi e si forma 3-fosfoglicerato,
- che viene isomerizzato a 2-fosfoglicerato ad opera di una mutasi,
- il 2-fosfoglicerato perde una molecola d'acqua ad opera di una enolasi e si forma il fosfoenolpiruvato che
- viene trasformato in piruvato ad opera della piruvato chinasi con formazione di ATP.



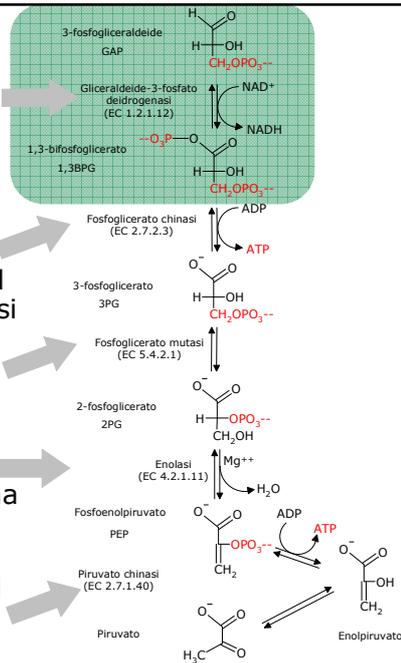
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 68 -

Recupero dell'energia

- La 3-fosfogliceraldeide prodotta viene ossidata e fosforilata 1,3-bifosfoglicerato da una deidrogenasi, con produzione di NADH
- il 1,3-bifosfoglicerato viene utilizzato per fosforilare l'ADP ad opera di una fosfogliceratochinasi e si forma 3-fosfoglicerato,
- che viene isomerizzato a 2-fosfoglicerato ad opera di una mutasi,
- il 2-fosfoglicerato perde una molecola d'acqua ad opera di una enolasi e si forma il fosfoenolpiruvato che
- viene trasformato in piruvato ad opera della piruvato chinasi con formazione di ATP.



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 69 -

Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi EC 1.2.1.12

GAP è ossidata a 1,3BPG

- L'energia ottenuta dalla conversione di un'aldeide ad acido carbossilico è usata per la fosforilazione a 1,3BPG e per la riduzione del NAD⁺ a NADH

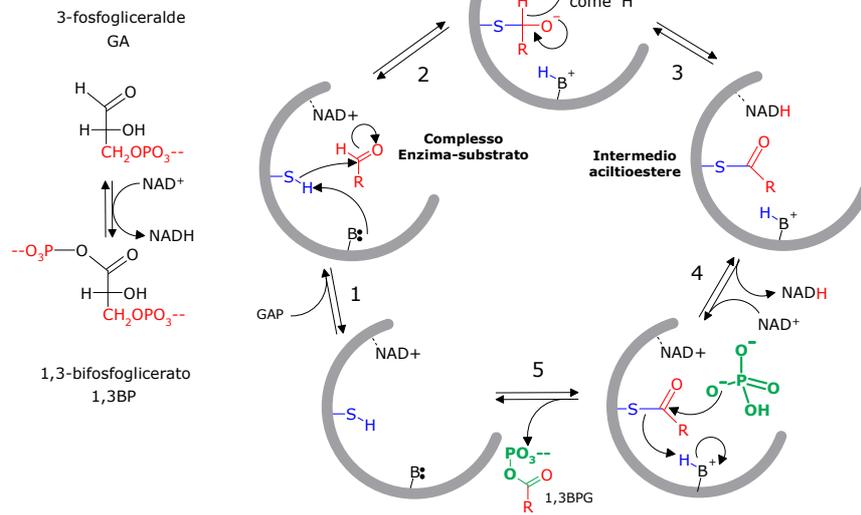
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 70 -

Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi EC 1.2.1.12

$$\Delta G^{\circ} = +6.3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

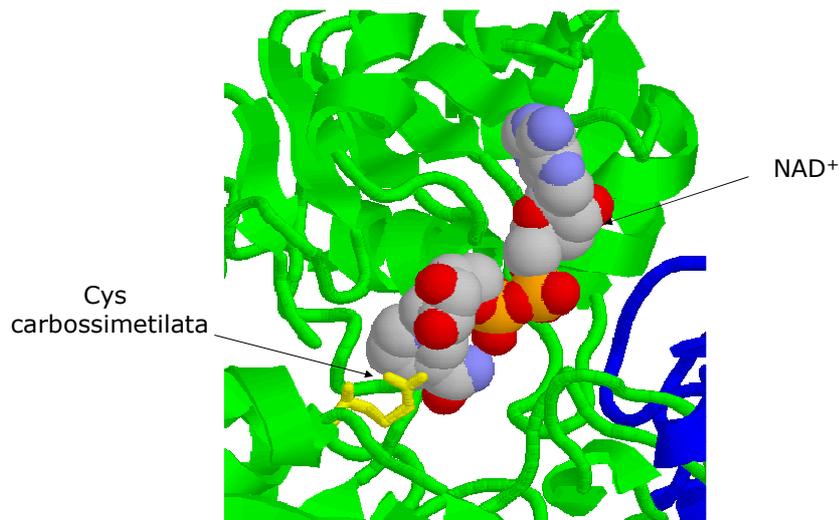


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 71 -

Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi EC 1.2.1.12

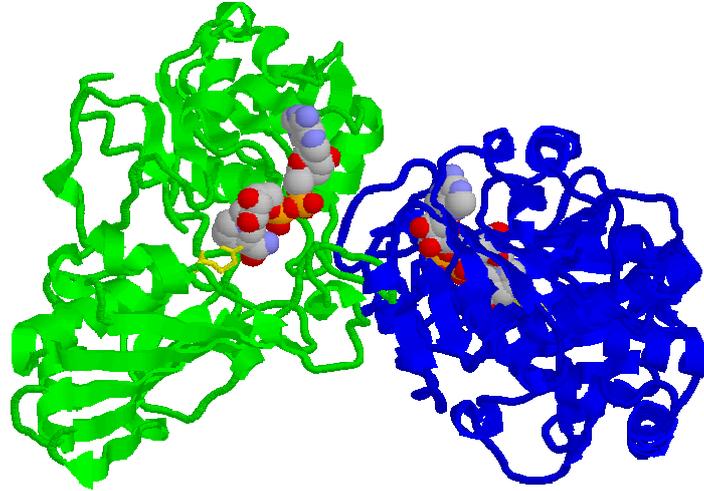


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 72 -

Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi EC 1.2.1.12

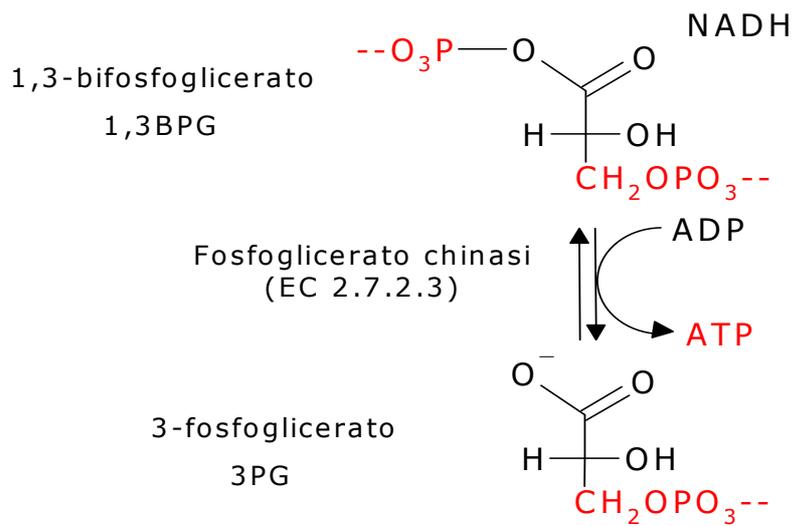


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 73 -

Fosfoglicerato chinasi EC 2.7.2.3



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

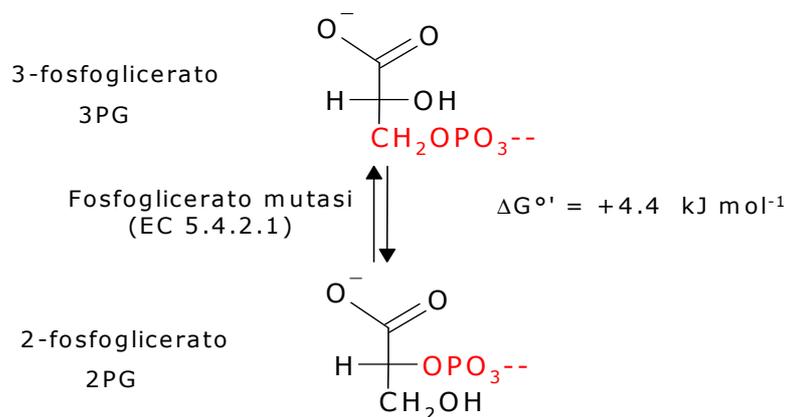
- 74 -

Fosfoglicerato mutasi EC 5.4.2.1

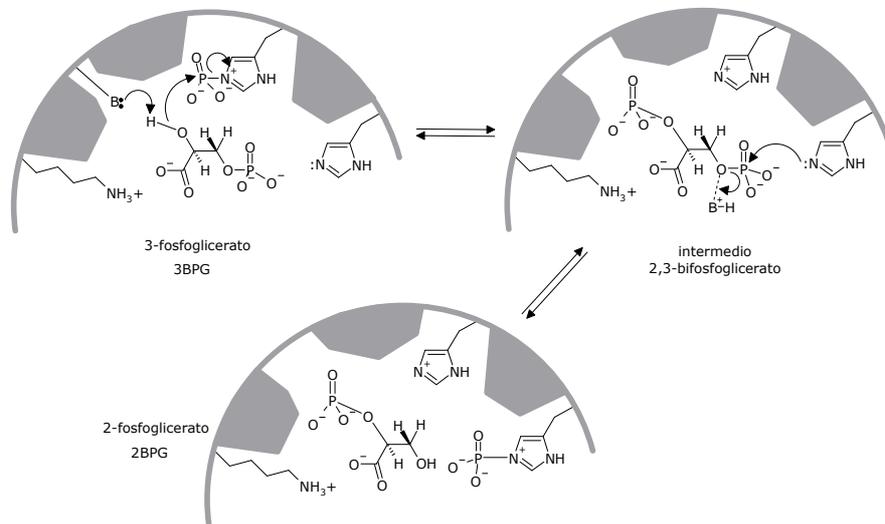
Il gruppo fosfato passa da C-3 a C-2

- Spostamento di fosfato per la formazione di PEP
- Si forma un intermedio fosfo-istidina
- È stato dimostrato che del 2,3BPG è richiesto per la fosforilazione di His.

Fosfoglicerato mutasi EC 5.4.2.1



Fosfoglicerato mutasi EC 5.4.2.1

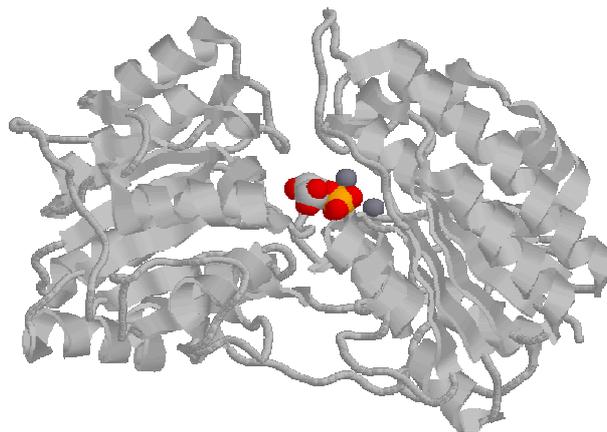


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 77 -

3-fosfoglicerato

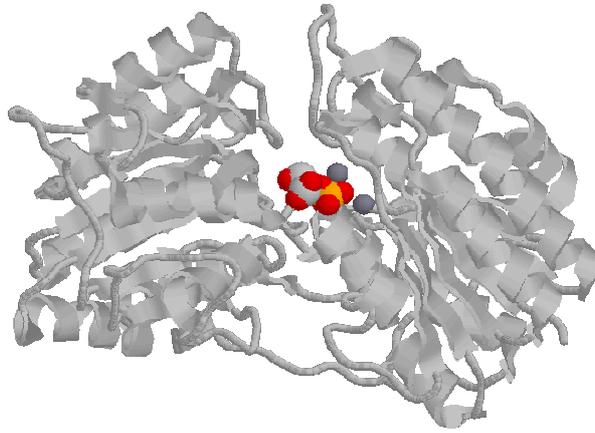


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 78 -

2-fosfoglicerato

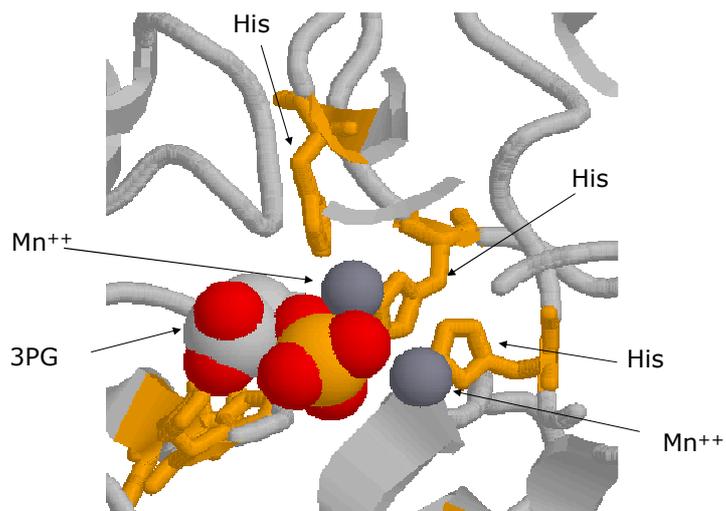


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 79 -

Fosfoglicerato mutasi EC 5.4.2.1

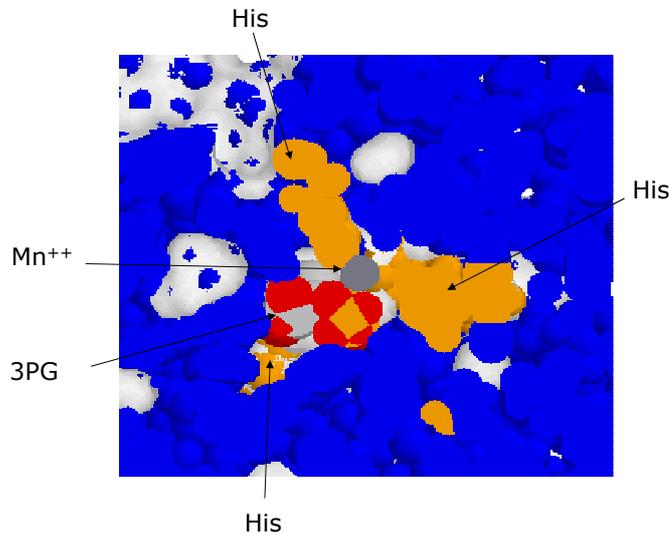


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 80 -

Fosfoglicerato mutasi EC 5.4.2.1



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 81 -

Enolasi EC 4.2.1.11

Da 2PG a PEP

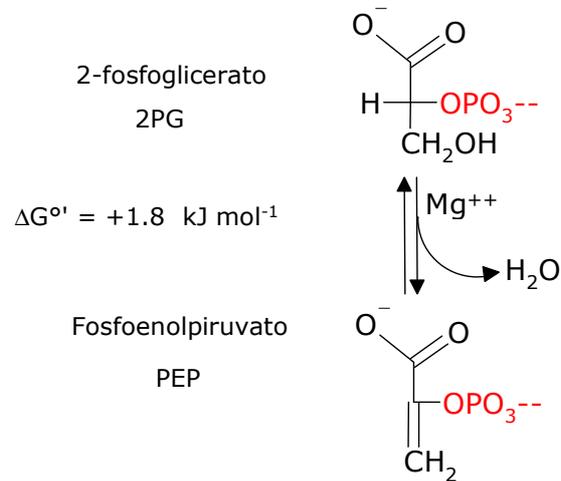
- Il ΔG globale è 1.8 kJ/mol
- Il contenuto in energia di 2PG e PEP è simile.
- L'enolasi riarrangia la molecola in modo tale che possa fornire più energia nell'idrolisi.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 82 -

Enolasi EC 4.2.1.11

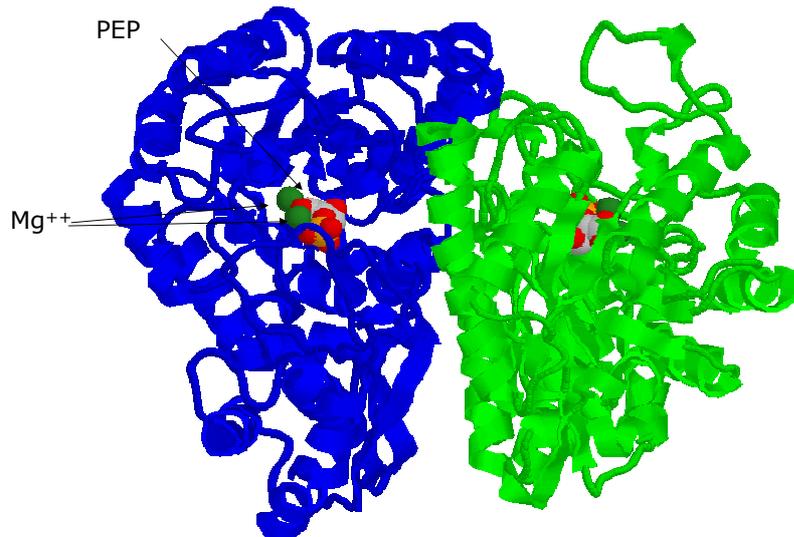


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 83 -

Enolasi EC 4.2.1.11

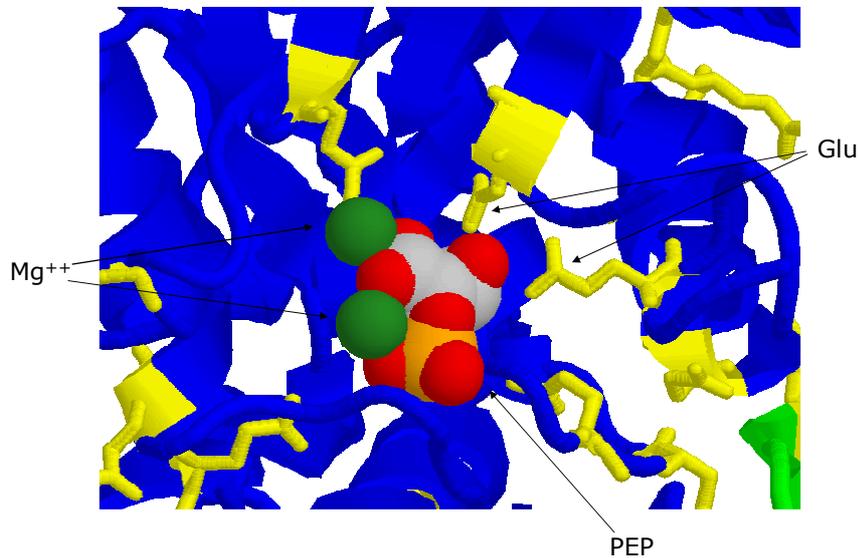


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 84 -

Enolasi EC 4.2.1.11



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 85 -

Piruvato Chinasi EC 2.7.1.40

Da PEP a piruvato viene prodotto ATP

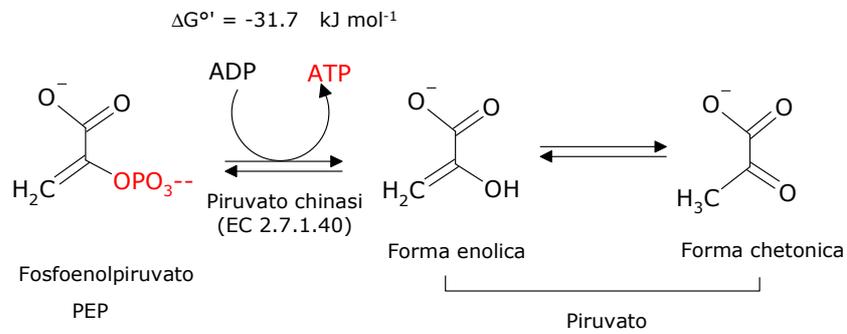
- Valore di ΔG grande e negativo.
- Punto di regolazione
- Attivata allostericamente da AMP, F1,6BP
- Inibita allostericamente da ATP e acetil-CoA
- Tautomeria chetoenolica del piruvato.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

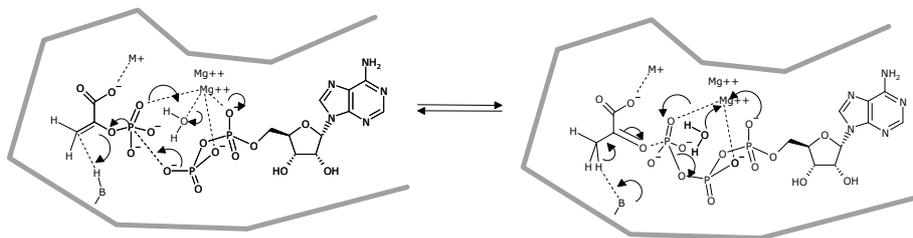
Metabolismo dei carboidrati

- 86 -

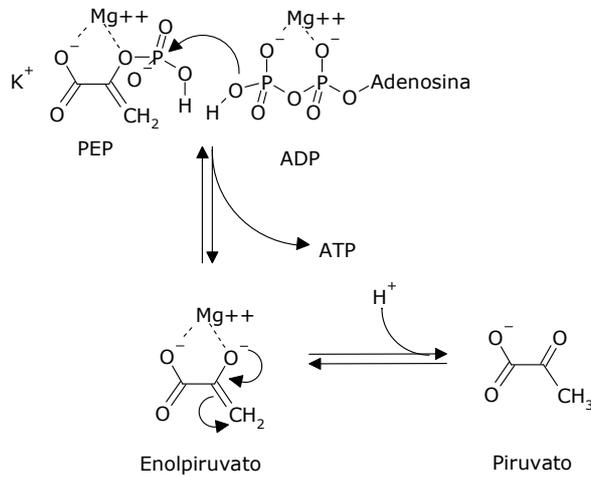
Piruvato Chinasi EC 2.7.1.40



Piruvato Chinasi EC 2.7.1.40



Piruvato Chinasi EC 2.7.1.40

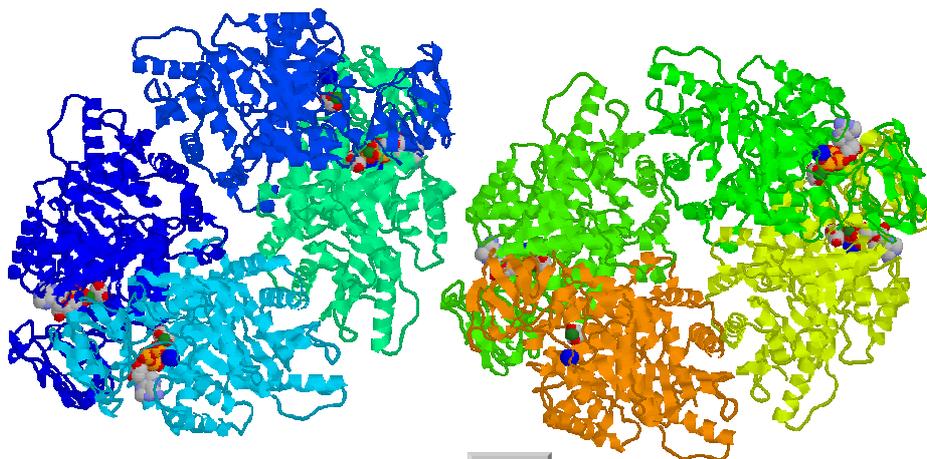


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 89 -

Piruvato Chinasi EC 2.7.1.40



<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1PYK>

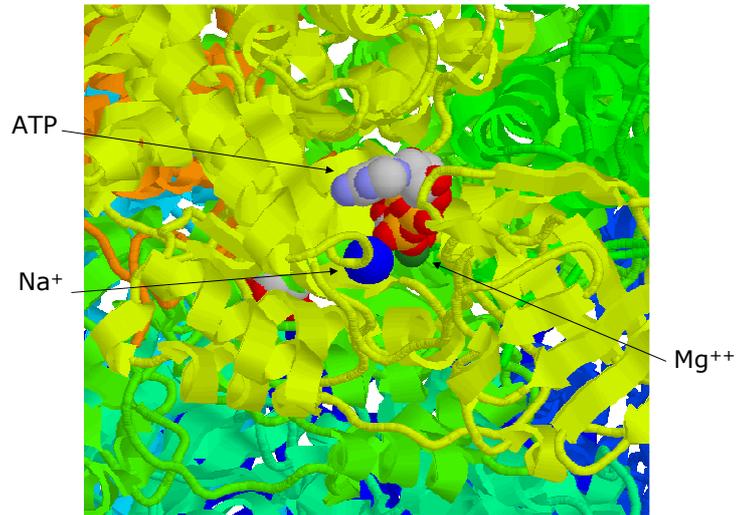


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 90 -

Piruvato Chinasi EC 2.7.1.40

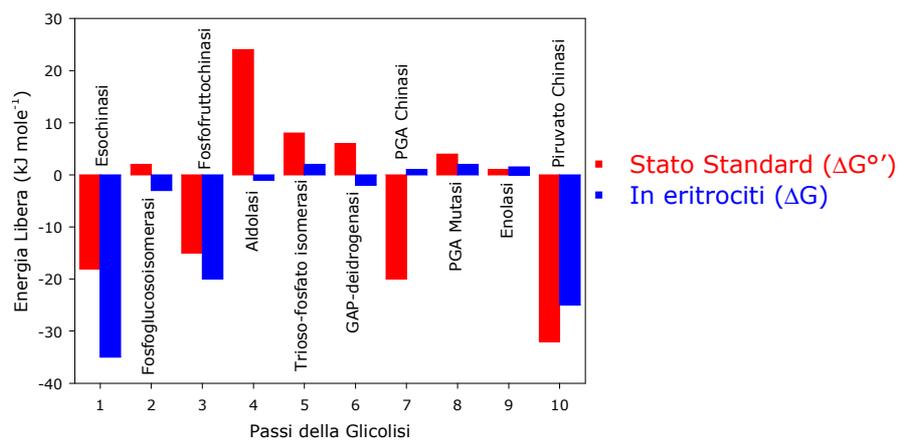


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 91 -

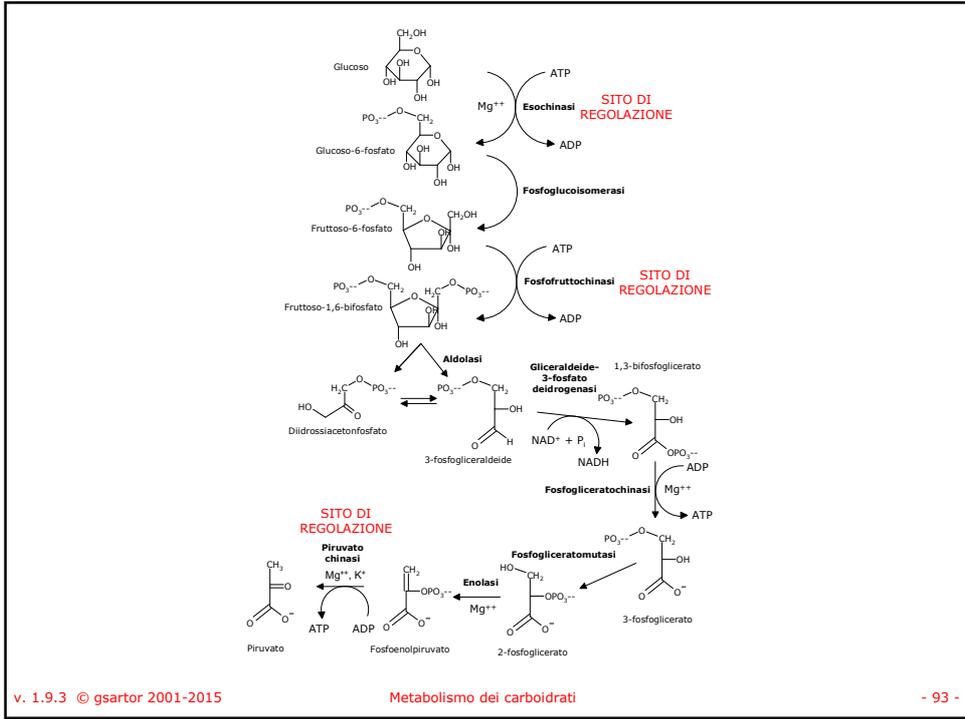
Energia



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 92 -



Ossigeno

Aerobiosi e **anaerobiosi**

[◀ Indice](#)

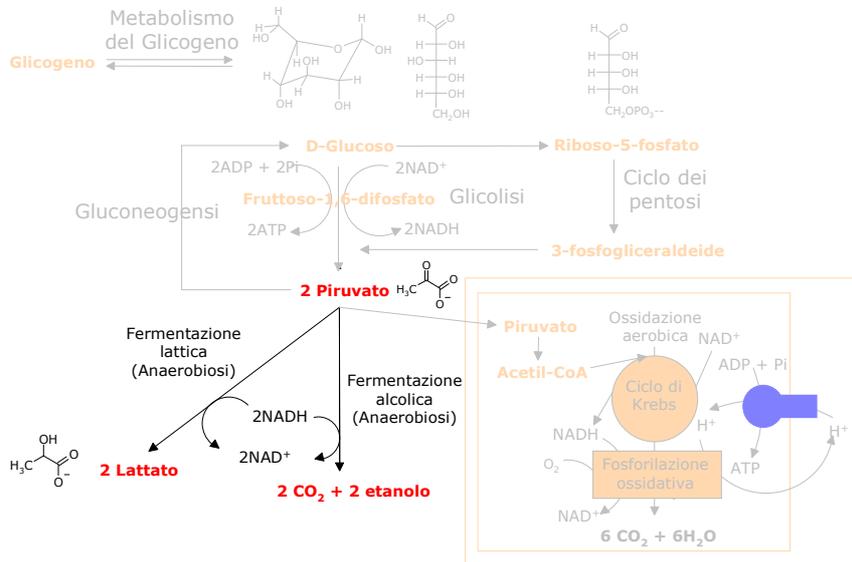
Destino del piruvato

- In assenza di ossigeno
 - Riduzione a lattato
 - Prima riduzione a lattato poi decarbossilazione ad acetato
 - Prima decarbossilazione ad aldeide poi riduzione ad etanolo
 - In presenza di ossigeno
 - Decarbossilazione,
 - Ciclo di Krebs,
 - Respirazione cellulare
- Ripristino di NAD⁺ per continuare la glicolisi

Destino del piruvato

- In assenza di ossigeno
 - Nel muscolo
 - Ridotto a Lattato
 - Nel lievito
 - Decarbossilato ad aldeide ridotta quindi ad etanolo
- Ripristino di NAD⁺ per continuare la glicolisi

Schema generale del metabolismo dei glucidi

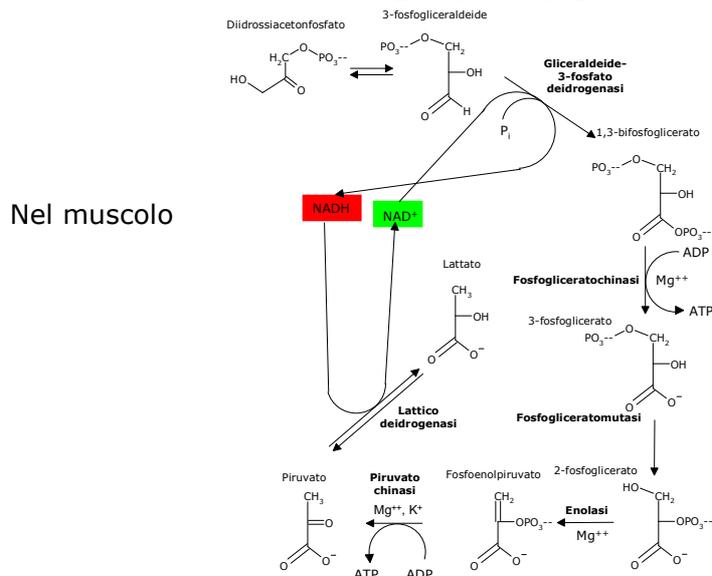


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 97 -

Anaerobiosi

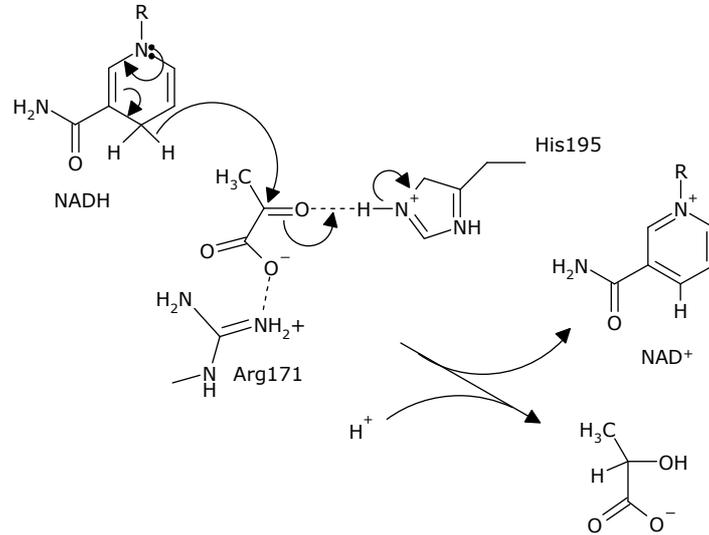


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 98 -

Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27

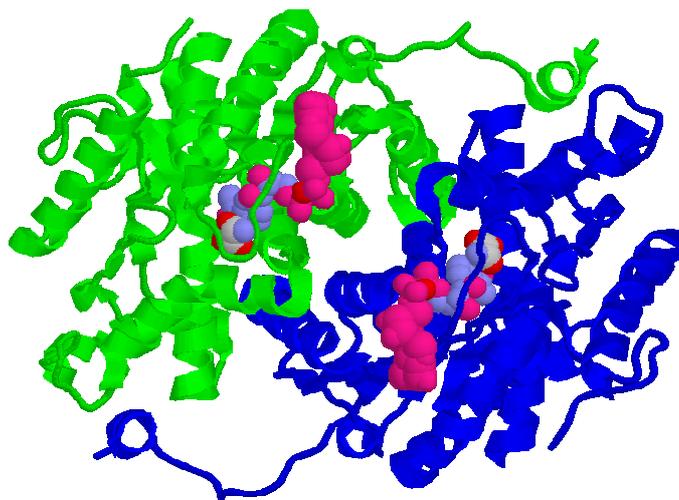


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 99 -

Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27

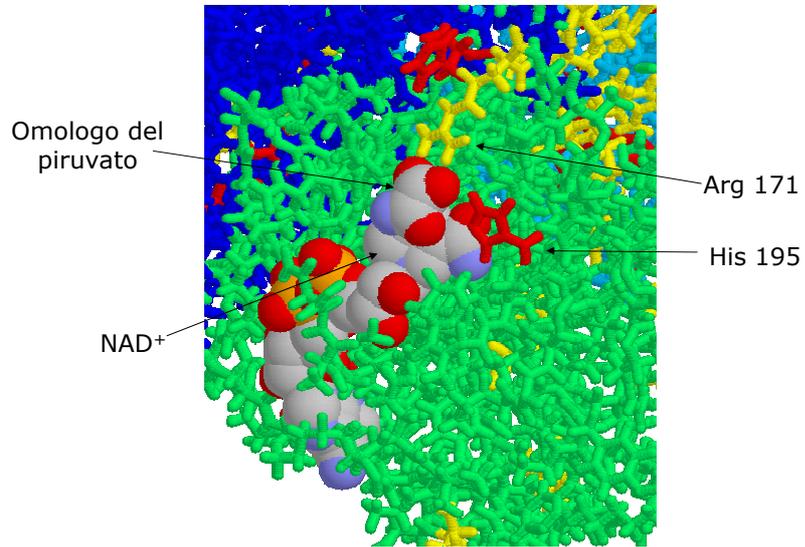


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 100 -

Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27

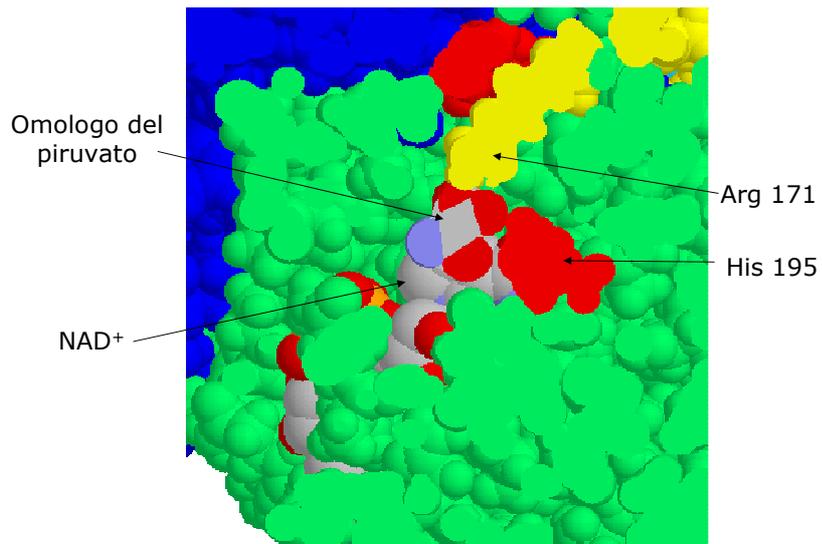


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 101 -

Lattico deidrogenasi EC 1.1.1.27



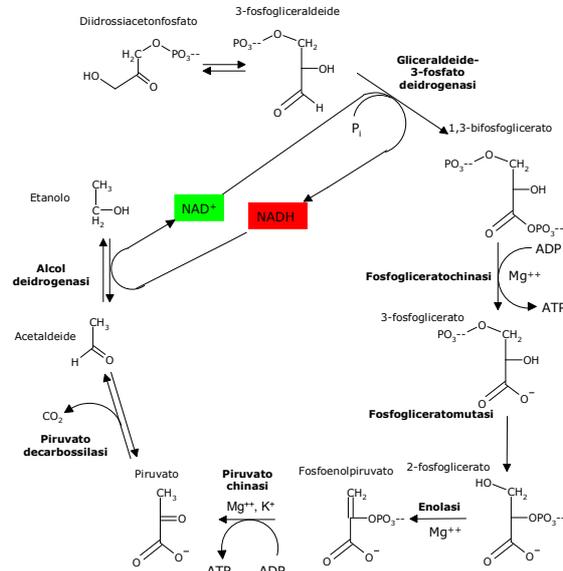
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 102 -

Anaerobiosi

Nel lievito



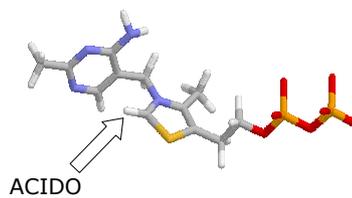
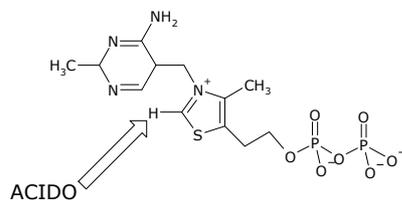
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 103 -

Piruvato decarbossilasi EC 4.1.1.1

- Catalizza la decarbossilazione del piruvato.
- Usa la tiamina pirofosfato come coenzima

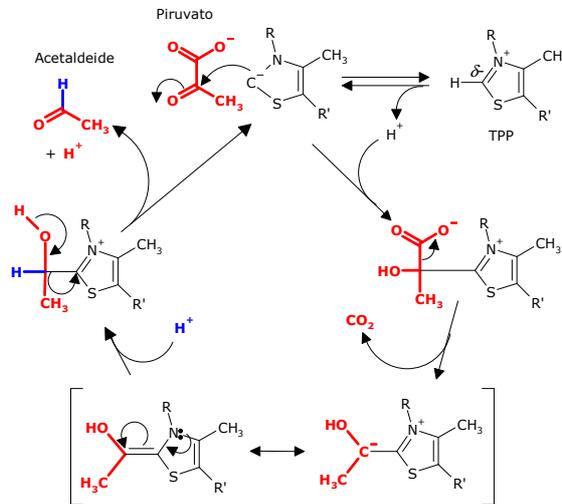


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 104 -

Piruvato decarbossilasi EC 4.1.1.1

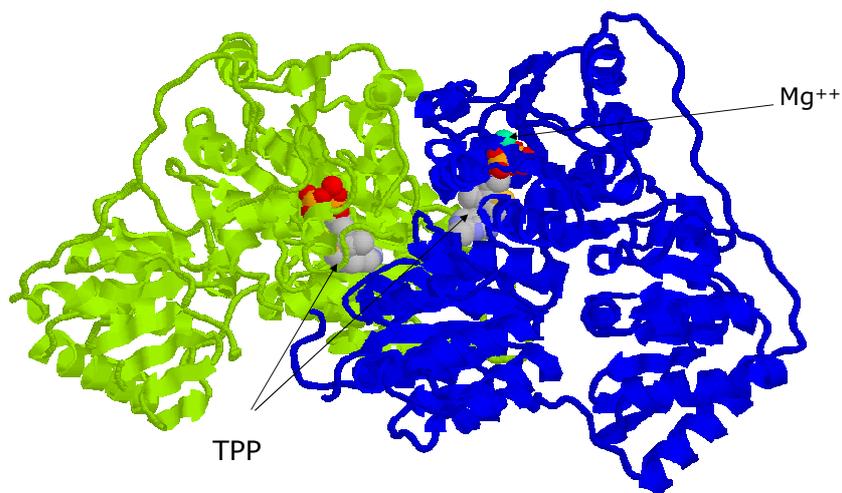


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 105 -

Piruvato decarbossilasi EC 4.1.1.1



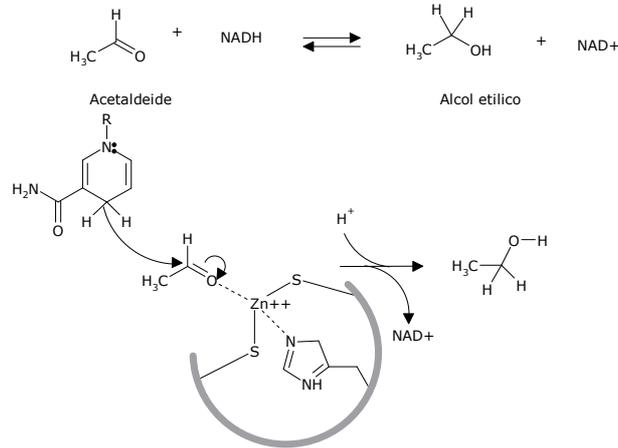
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 106 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1

- Catalizza la reazione di ossidoriduzione:

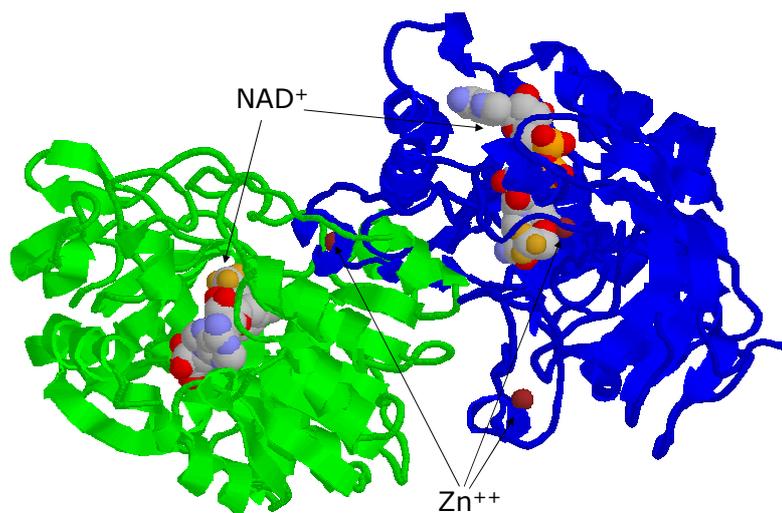


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 107 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1

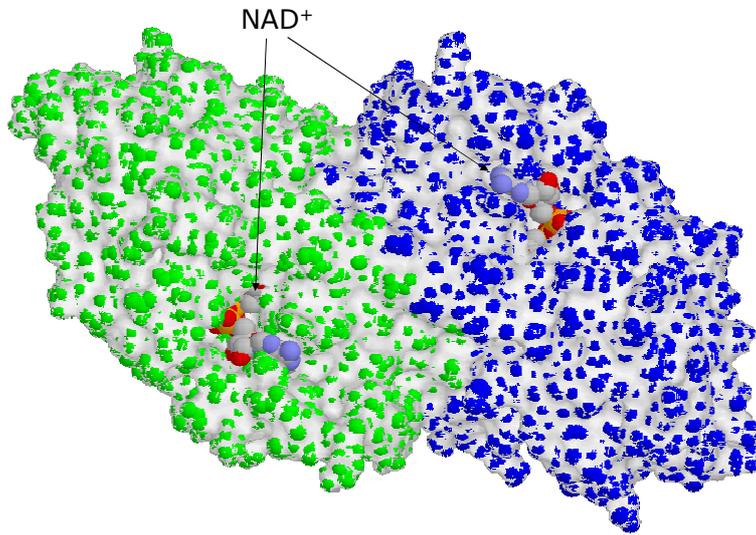


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 108 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1

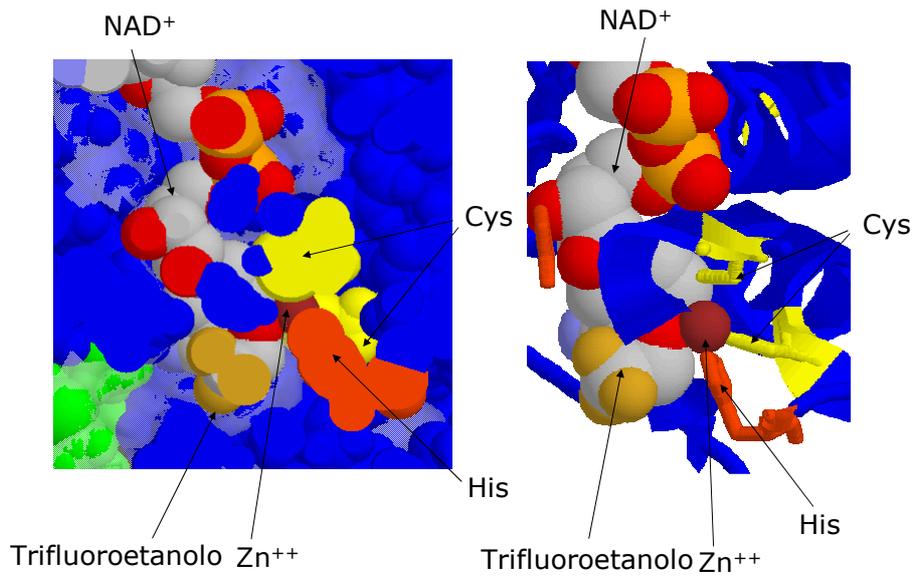


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 109 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1

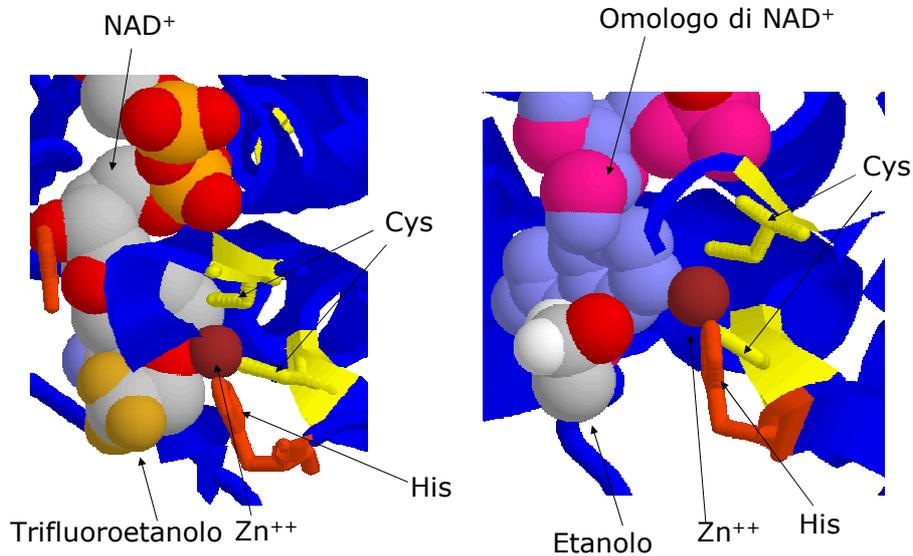


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 110 -

Alcool deidrogenasi EC 1.1.1.1



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 111 -

Energetica della Glicolisi

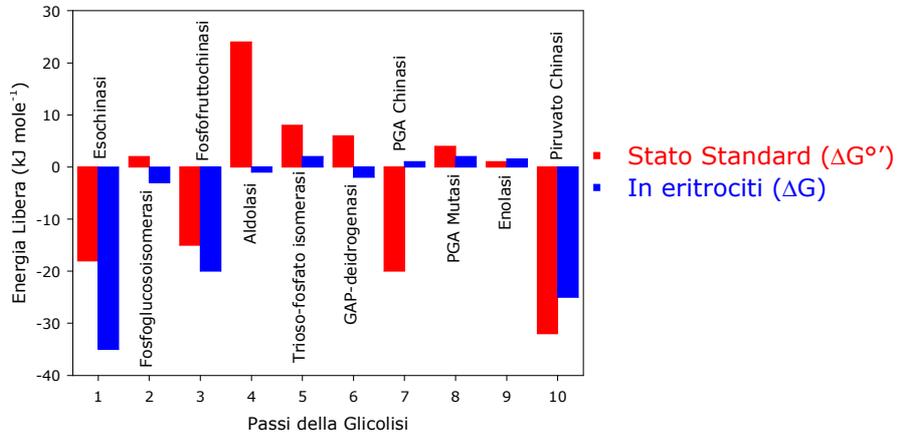
- I valori di $\Delta G^{\circ'}$ sono variabili (positivi e negativi)
 - ΔG nelle cellule ha valori vicini a zero
 - Solo tre reazioni su dieci hanno valori di ΔG negativo e grande.
- Le reazioni i cui valori di ΔG sono grandi e negativi sono punti di regolazione.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 112 -

Energia

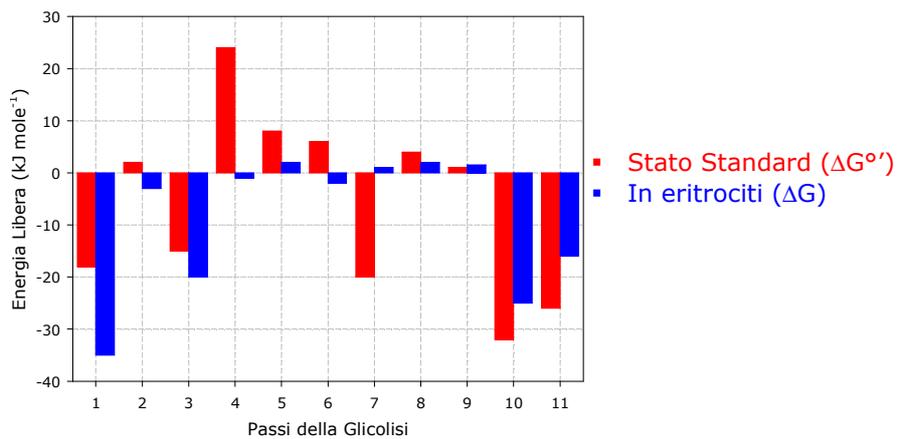


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 113 -

Energia



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 114 -

Energia dalla glicolisi

$$\Delta G = -43.4 \text{ kJ mol}^{-1}$$

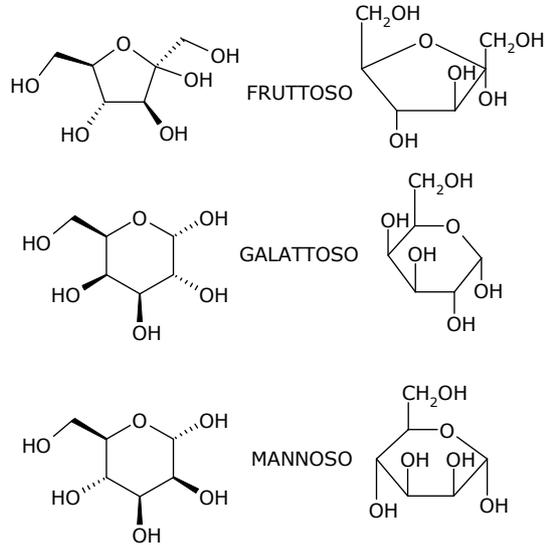


- La scissione di glucosio a piruvato utilizza solo il 1.7% del contenuto energetico del glucosio.

Gli enzimi glicolitici possono formare complessi multienzimatici

- Nella purificazione di proteine da cellule le interazioni non covalenti tra proteine viene persa
- È stato suggerito che gli enzimi glicolitici si assemblino in un complesso multienzimatico dove i substrati sono canalizzati da un enzima all'altro senza passare in soluzione.

Altri zuccheri entrano nella glicolisi:

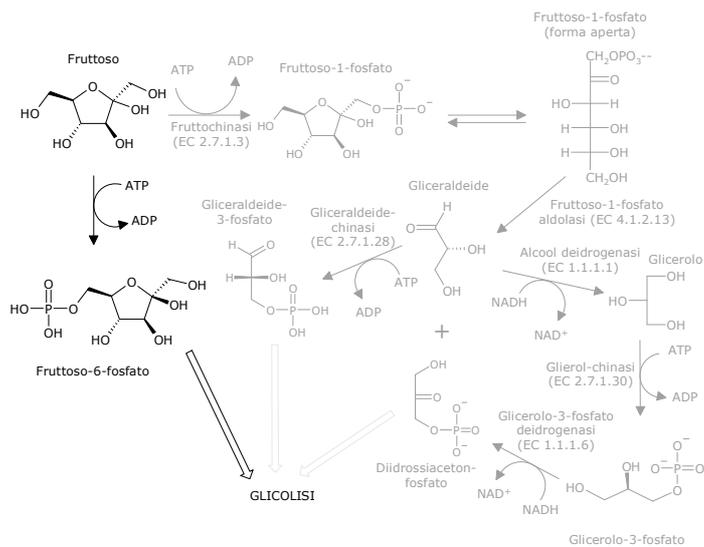


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 117 -

Metabolismo del fruttosio

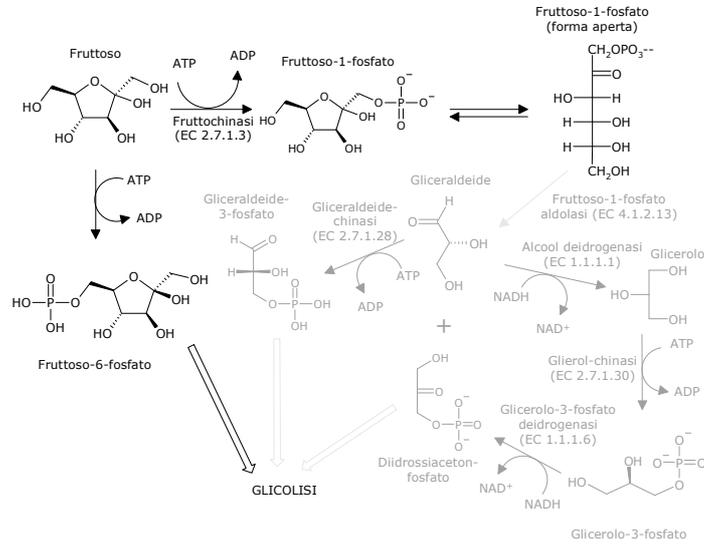


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 118 -

Metabolismo del fruttosio

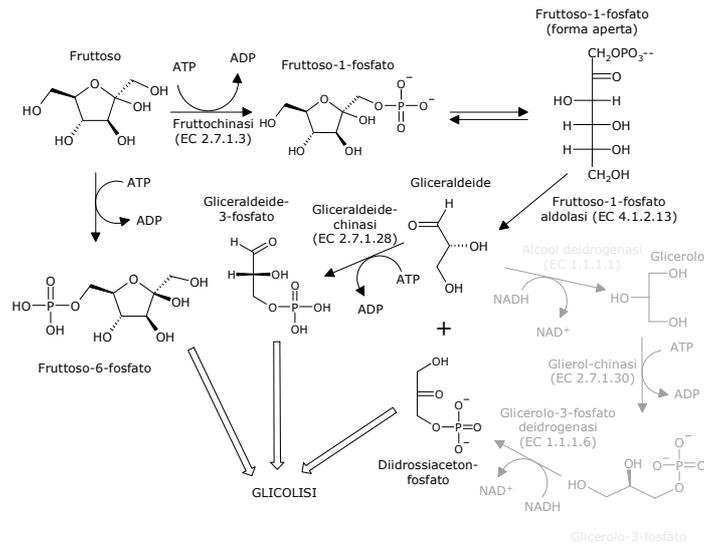


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 119 -

Metabolismo del fruttosio

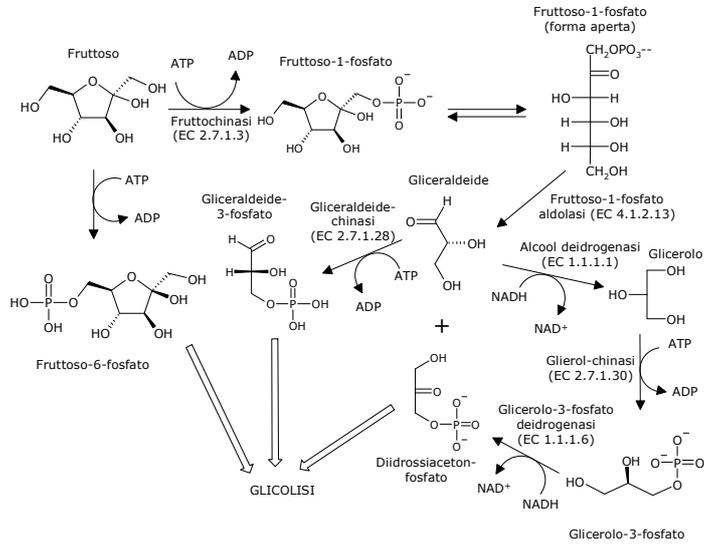


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 120 -

Metabolismo del fruttosio

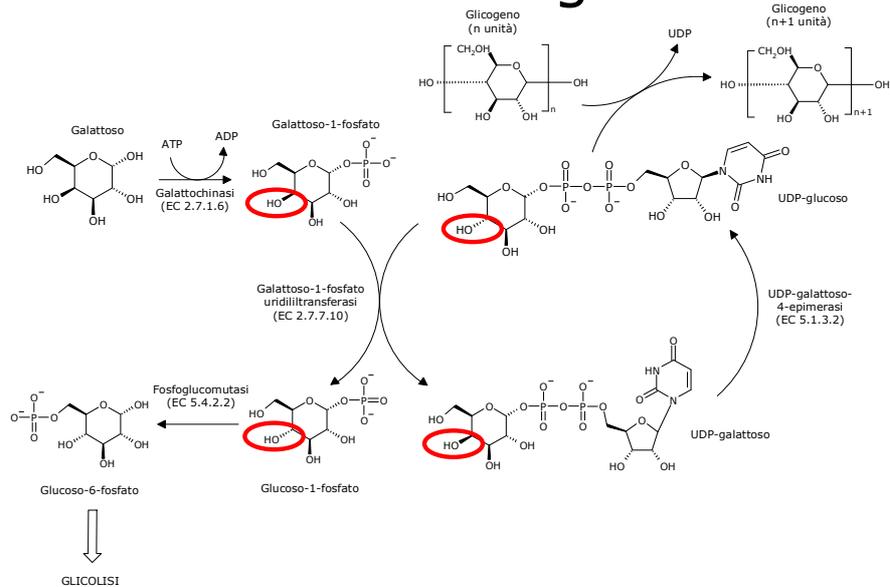


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 121 -

Metabolismo del galattoso

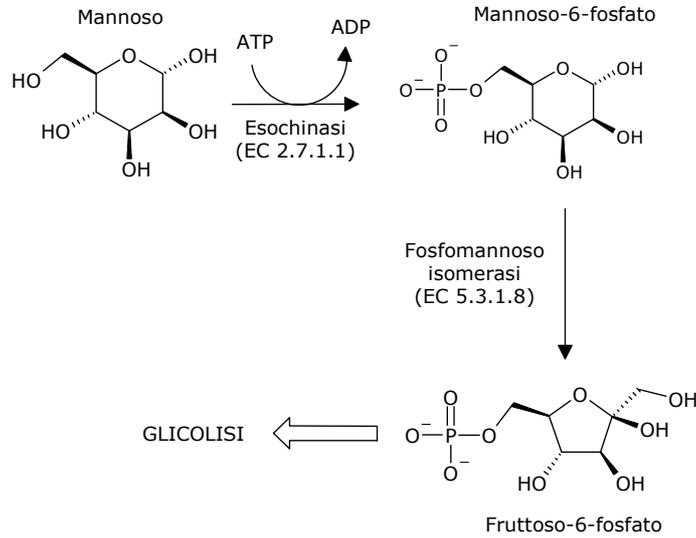


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 122 -

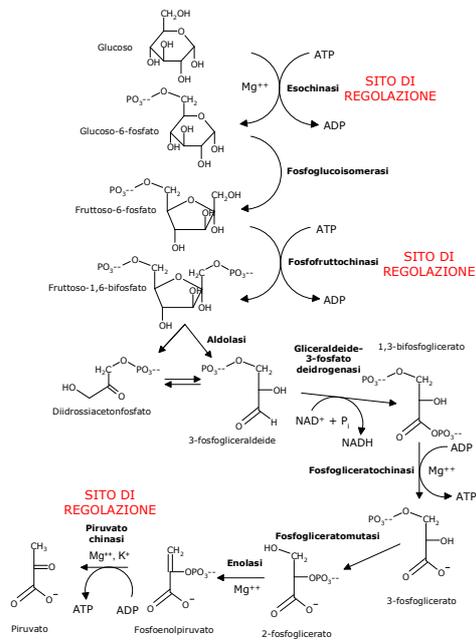
Metabolismo del mannosio



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 123 -



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

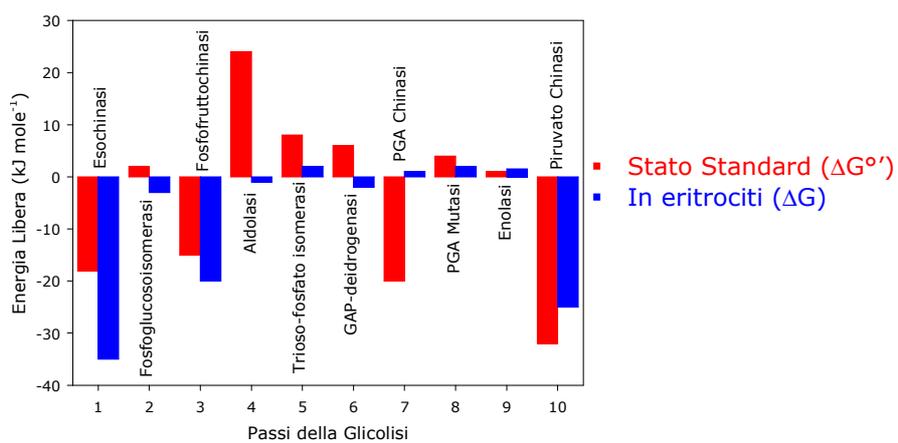
- 124 -

Gluconeogenesi

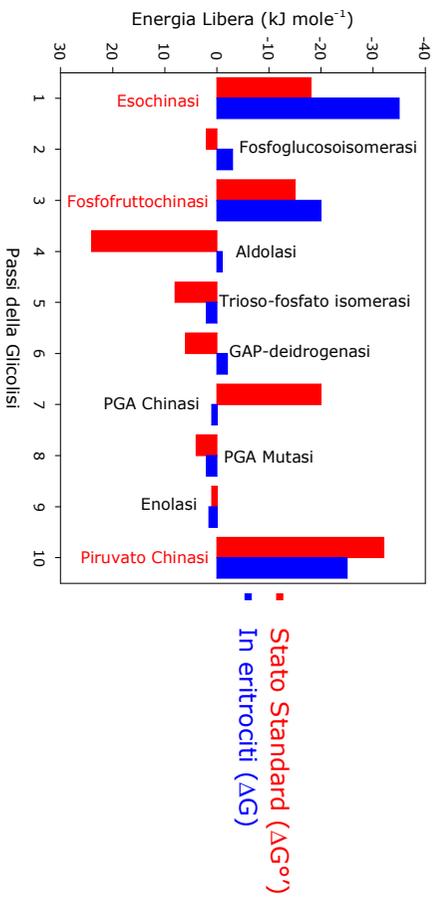
Sintesi di glucosio da piruvato

◀ Indice

Energia



Energia

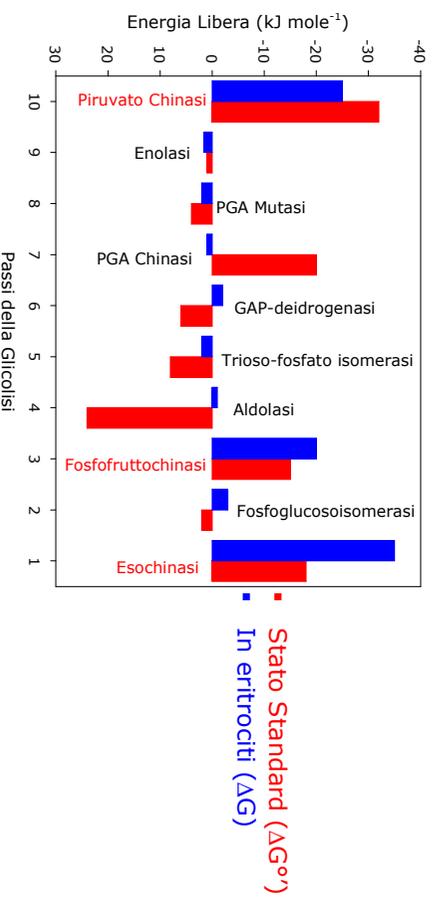


v. 1.9.3 © garitoro 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 127 -

Energia

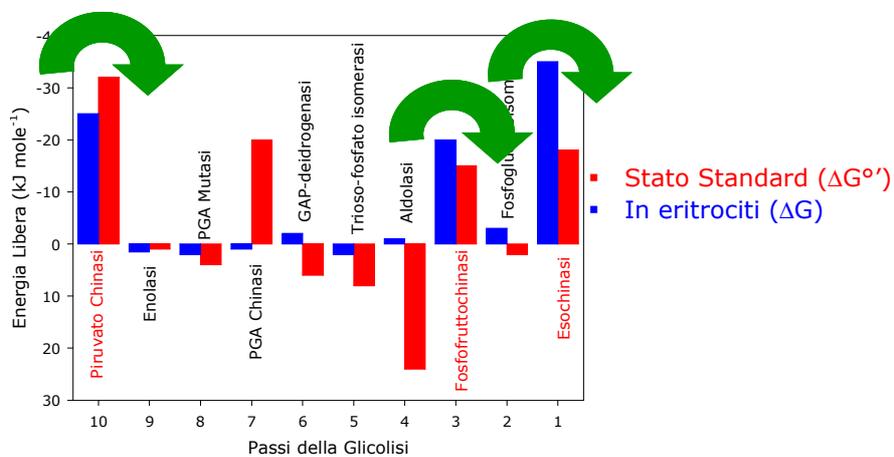


v. 1.9.3 © garitoro 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 128 -

Energia



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 129 -

Gluconeogenesi

- La gluconeogenesi avviene principalmente nel fegato.
- La sintesi di glucosio da piruvato sfrutta alcuni enzimi della glicolisi.
- Tre reazioni glicolitiche hanno un valore di ΔG talmente negativo e grande che le reazioni sono irreversibili:
 - Esochinasi
 - Fosfofruttochinasi
 - Piruvato chinasi
- Questi passaggi sono by-passati nella gluconeogenesi.

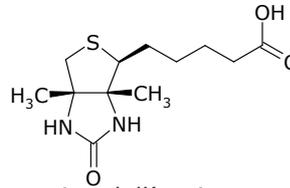
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

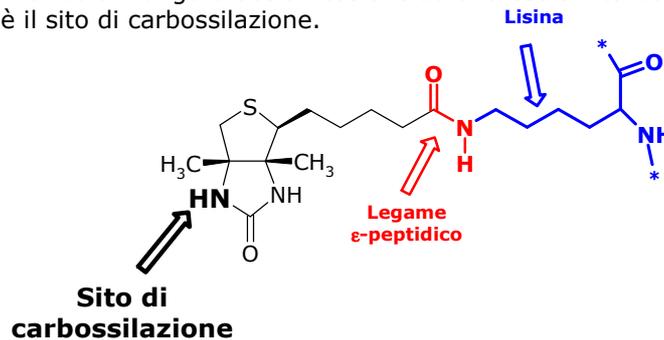
- 130 -

Piruvato carbossilasi EC 6.4.1.1

- È un enzima a biotina



- La biotina si lega ad una lisina nel sito attivo dell'enzima formando un lungo braccio flessibile ad una estremità del quale vi è il sito di carbossilazione.



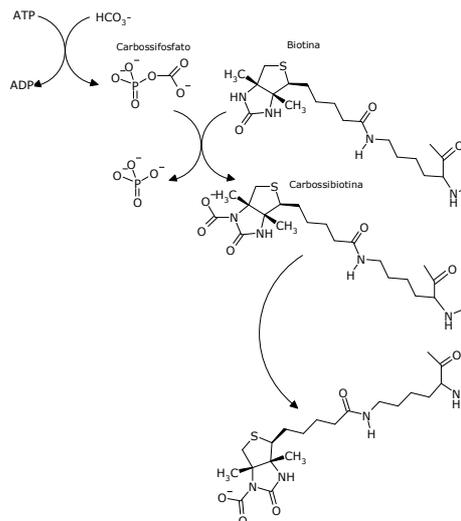
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 133 -

Piruvato carbossilasi EC 6.4.1.1

- Il lungo braccio flessibile permette il movimento della biotina tra il sito di carbossilazione e il sito di decarbossilazione e formazione dell'ossalacetato.
- La carbossilazione avviene ad opera di carbossifosfato che si forma nel sito di carbossilazione per reazione di ATP e bicarbonato.



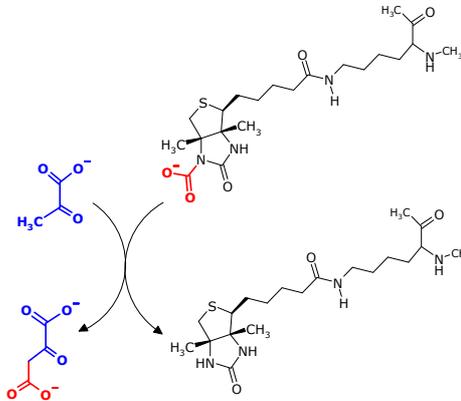
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 134 -

Piruvato carbossilasi EC 6.4.1.1

- La decarbossilazione della biotina e la formazione di ossalacetato avviene nel secondo sito della piruvato carbossilasi dove si lega il piruvato per formare ossalacetato.



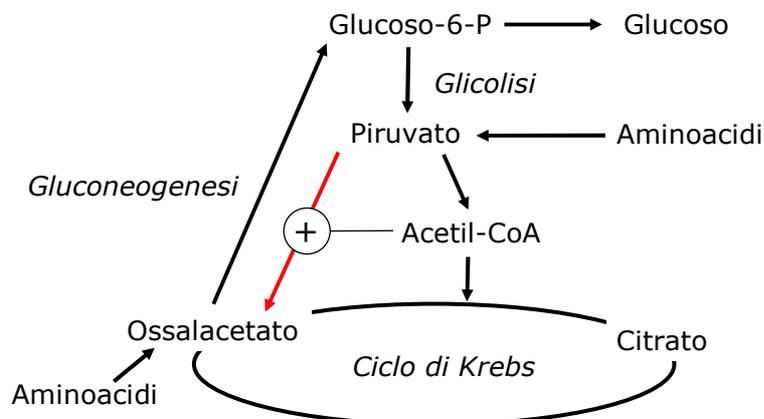
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 135 -

Piruvato carbossilasi EC 6.4.1.1

- Regola il destino del piruvato



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 136 -

Piruvato carbossilasi EC 6.4.1.1

- Quando la gluconeogenesi è attiva nel fegato l'ossalacetato va a formare glucosio.
- La diminuzione di ossalacetato causa la riduzione di AcetilCoA che entra nel ciclo di Krebs.
- L'aumento di AcetilCoA attiva, allostericamente, la piruvato carbossilasi per formare ossalacetato.
- La concentrazione di ossalacetato limita il ciclo di Krebs.

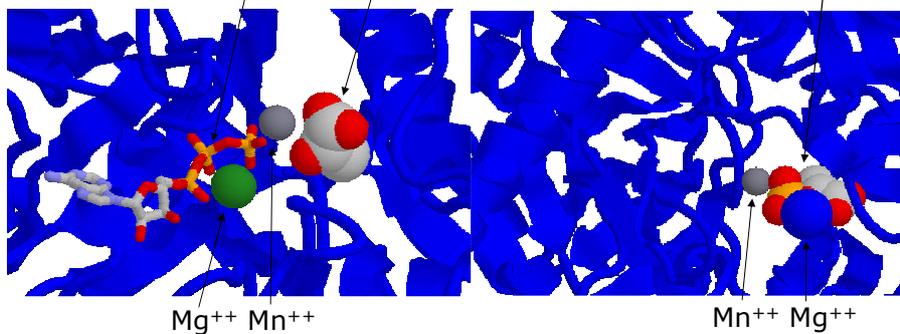
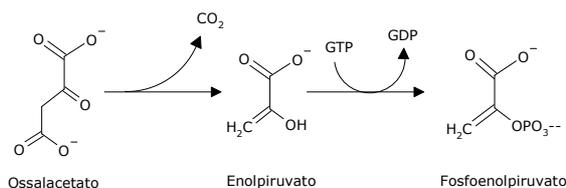
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 137 -

Piruvato carbossichinasi

- EC 4.1.1.39 (GTP)
- EC 4.1.1.38 (PPi)
- EC 4.1.1.49 (ATP) nei batteri



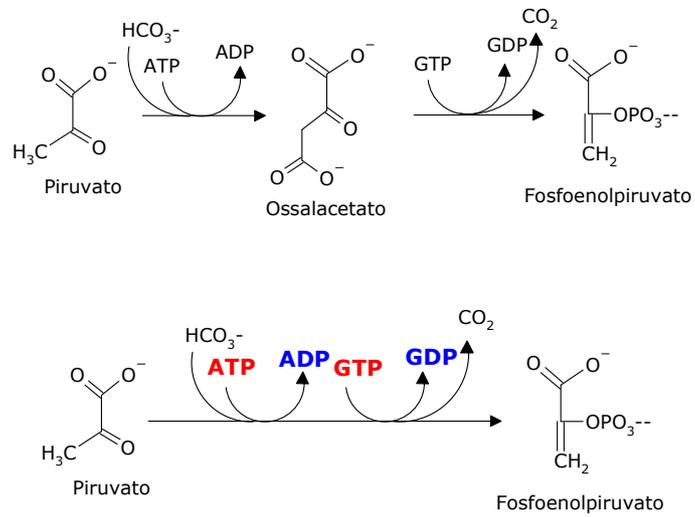
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 138 -

Bypass della piruvato chinasi

- Globalmente

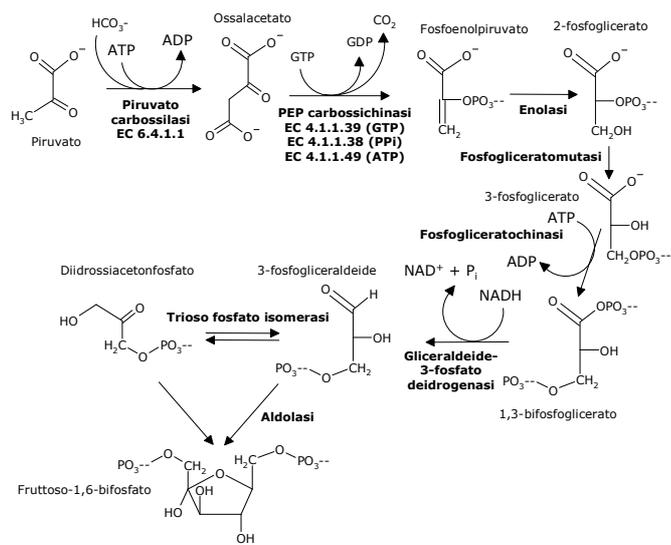


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 139 -

Gluconeogenesi



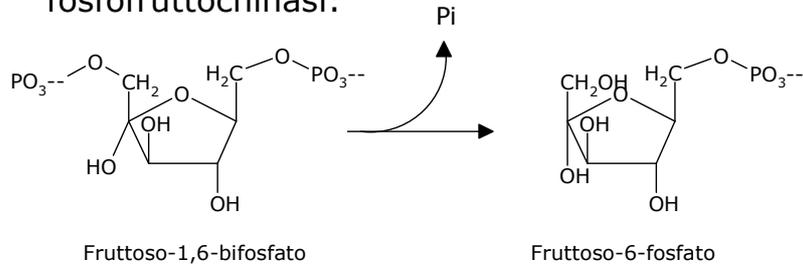
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 140 -

Fruttosio-1,6-bifosfatasi EC 3.1.3.11

- Catalizza la reazione inversa della fosfofruttochinasi:



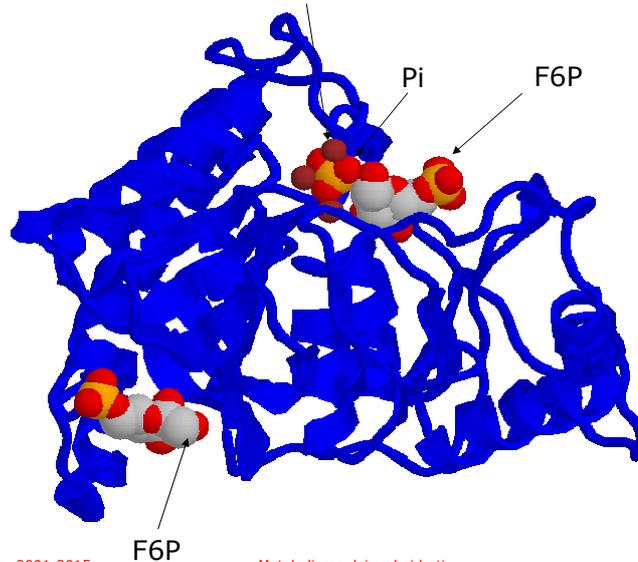
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 141 -

Fruttosio-1,6-bifosfatasi EC 3.1.3.11

Zn⁺⁺ (Mg⁺⁺)



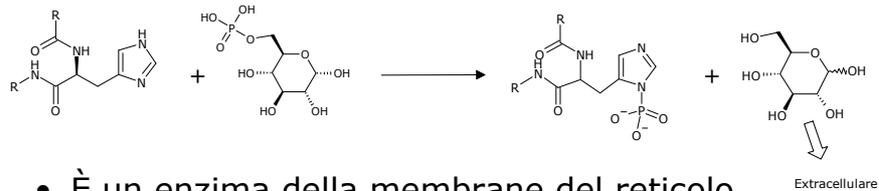
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 142 -

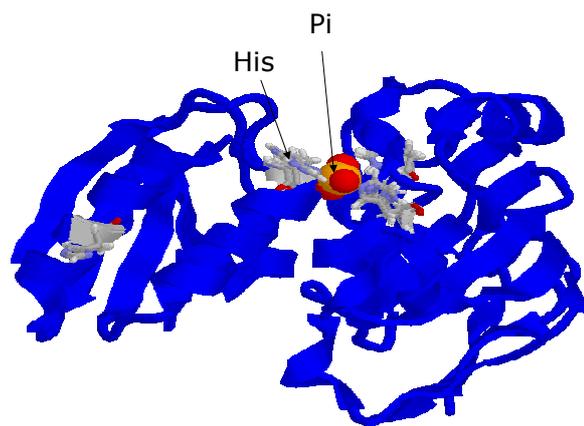
Glucoso-6-fosfatasi EC 3.1.3.9

- Catalizza la reazione inversa della esochinasi attraverso una fosfoistidina.

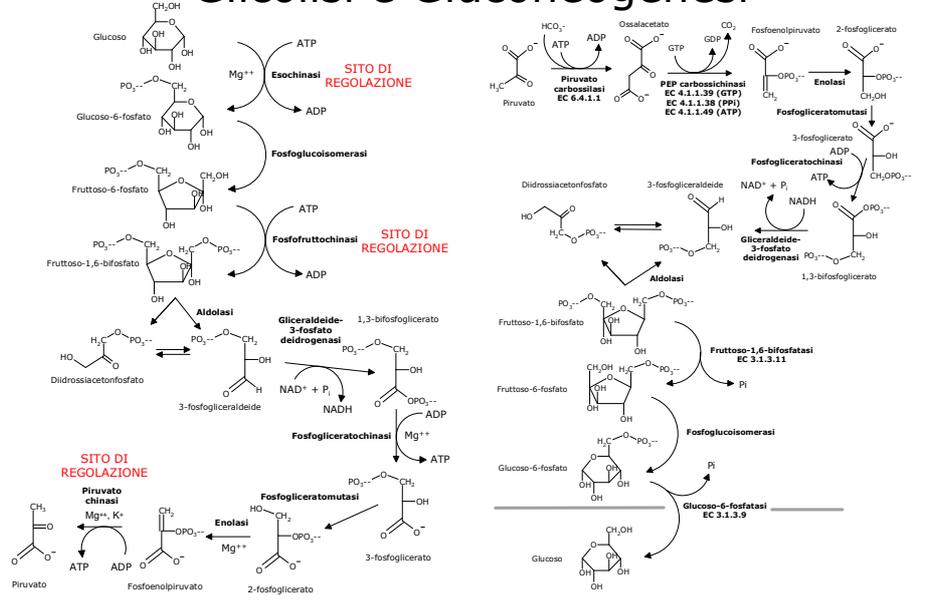


- È un enzima della membrane del reticolo endoplasmatico con funzione di traslocasi per la secrezione extracellulare del glucosio.
- È ancorato alla membrana da nove eliche transmembrana e secerne nel lume del reticolo.

Glucoso-6-fosfatasi EC 3.1.3.9



Glicolisi e Gluconeogenesi

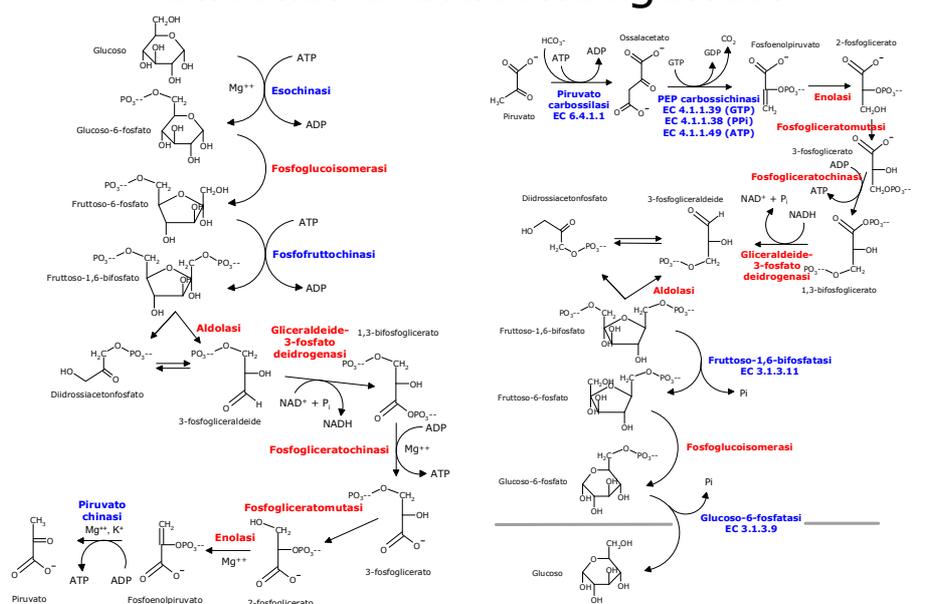


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 145 -

Glicolisi e Gluconeogenesi

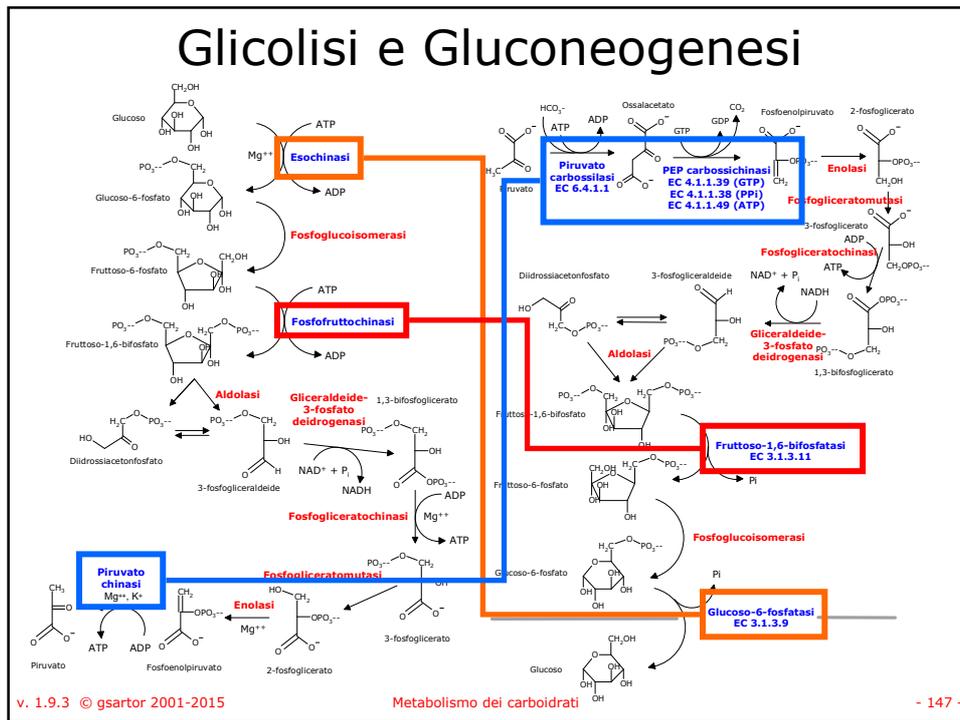


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 146 -

Glicolisi e Gluconeogenesi



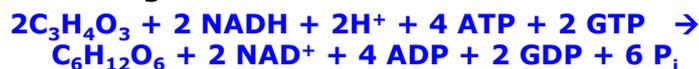
Glicolisi e gluconeogenesi

- La glicolisi e la gluconeogenesi sono vie metaboliche spontanee.
- Se fossero attive simultaneamente nella cellula si sarebbe in presenza di un "ciclo futile" con consumo di energia.

– **Glicolisi:**



– **Gluconeogenesi:**



– **Glicolisi + Gluconeogenesi:**



- Come dire: http://www.youtube.com/watch?v=Z86V_ICUCD4
- Oppure: http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=vj5kLizZHUo

Glicolisi e gluconeogenesi: Controllo Locale

- Per prevenire la perdita di energia nel ciclo futile la Glicolisi e la Gluconeogenesi sono reciprocamente regolate.
- Controllo locale:
 - Reciproco controllo allosterico ad opera dei nucleotidi adenilici:
 - La fosfofruttochinasi (Glicolisi) è inibita da ATP e stimolata da AMP.
 - La fruttosio-1,6-bisfosfatasi (Gluconeogenesi) è inibita da AMP.
- Quando la concentrazione di ATP è alta (concentrazione di AMP bassa) il glucosio NON è degradato per produrre ATP.
- In queste condizioni la cellula accumula glicogeno.
- Quando la concentrazione di ATP è bassa (concentrazione di AMP alta) la cellula NON spende energia per sintetizzare glucosio.

Glicolisi e gluconeogenesi: Controllo Globale

- Controllo globale:
 - Negli epatociti vi è l'effetto reciproco sulle due vie dell'AMP ciclico, la cui cascata è attivata dall'ormone GLUCAGONE quando il glucosio ematico è basso.
 - La Protein Chinasi A (Protein Chinasi cAMP Dipendente) provoca la fosforilazione di enzimi e proteine regolatrici il cui risultato è:
 - inibizione della glicolisi
 - stimolazione della gluconeogenesi,
 - Ciò porta alla disponibilità di glucosio nel sangue.

Glicolisi e gluconeogenesi: Controllo Globale

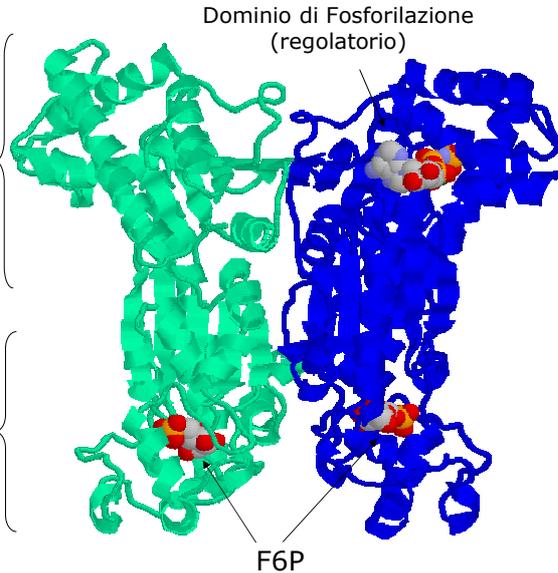
- Controllo globale:
 - Gli enzimi che sono FOSFORILATI dalla Proteina Chinasi A sono:
 - Piruvato Chinasi: enzima glicolitico che è inibito quando fosforilato.
 - CREB (cAMP response element binding protein): che attiva attraverso sistemi di trascrizione il gene della PEP Carbossichinasi, con conseguente aumento della gluconeogenesi.
 - L'enzima tandem: che regola la formazione e la degradazione del regolatore allosterico fruttosio-2,6-bifosfato.

Glicolisi e gluconeogenesi: Controllo Globale

- Controllo globale:
 - L'enzima tandem: che regola la formazione e la degradazione del regolatore allosterico fruttosio-2,6-bifosfato.
 - Il fruttosio-2,6-bifosfato attiva la Fosfofruttochinasi anche in presenza di alto ATP (che la inibisce).
 - L'attività in presenza di fruttosio-2,6-bifosfato è simile all'attività con ATP basso.
 - Il controllo attraverso fruttosio-2,6-bifosfato (la cui concentrazione viene controllata da segnali esterni: ormoni) è gerarchicamente più importante del controllo locale da ATP.
 - Il fruttosio-2,6-bifosfato inibisce l'enzima della gluconeogenesi fruttosio-1,6-bifosfatasi .

Enzima tandem

- Omodimero
- Due domini catalitici:
 - Fosfofruttochinasi (PFK2) (EC 2.7.1.105) che catalizza:
 $\text{Fruttosio-6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow \text{fruttosio-2,6-bifosfato} + \text{ADP}$
 - Fruttosio-bifosfatasi (FBPasi2) (EC 3.1.3.46) che catalizza:
 $\text{Fruttosio-2,6-bifosfato} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{fruttosio-6-fosfato} + \text{Pi}$



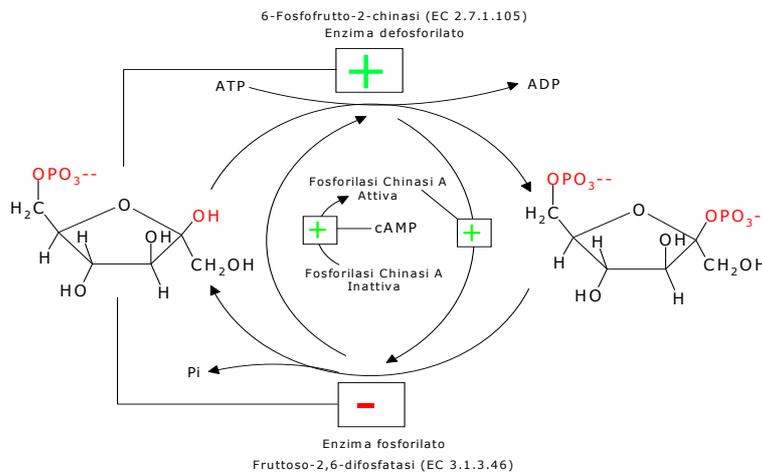
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 153 -

Enzima tandem

- L'enzima tandem è regolato dalla cascata del cAMP che a sua volta è controllato da ormoni

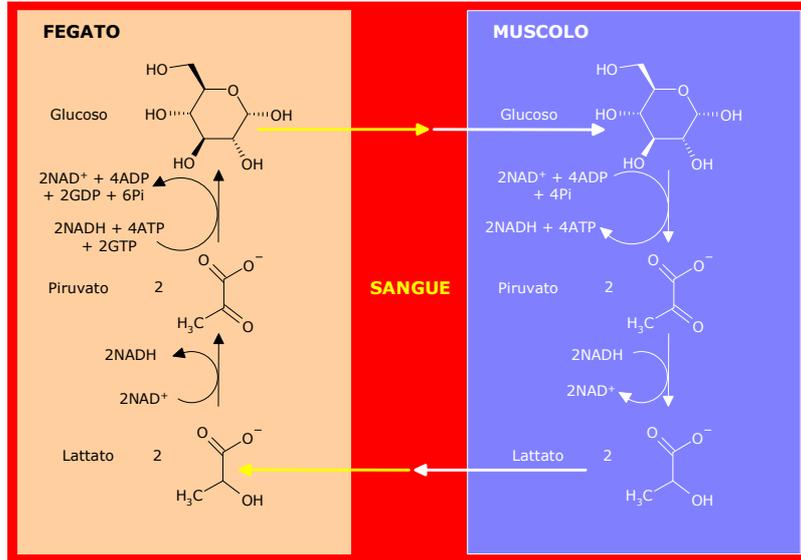


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 154 -

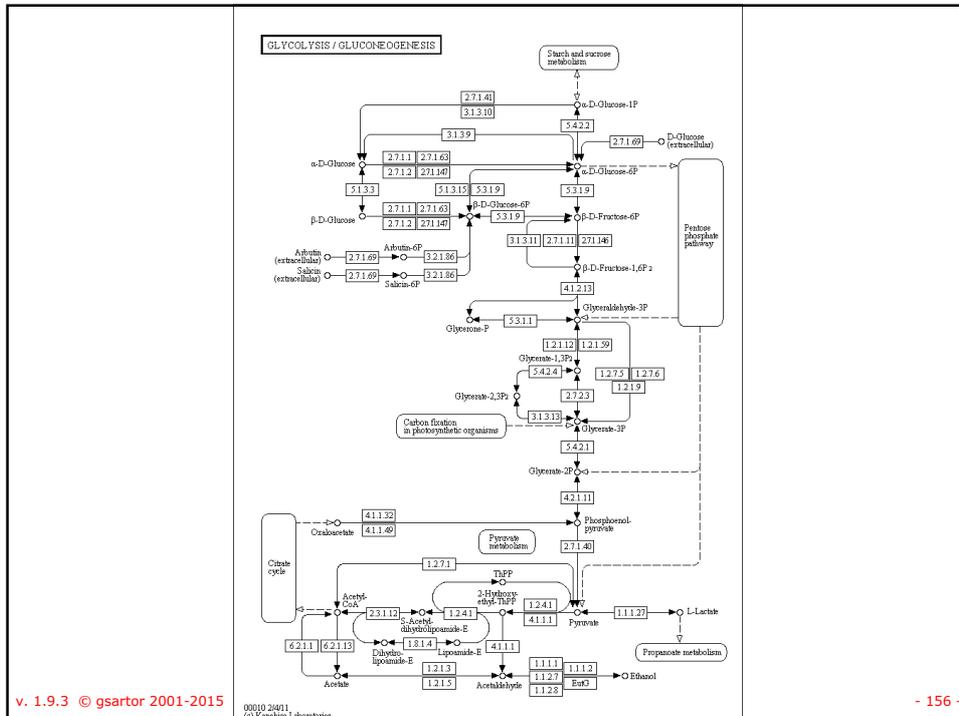
Ciclo di Cori



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 155 -



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

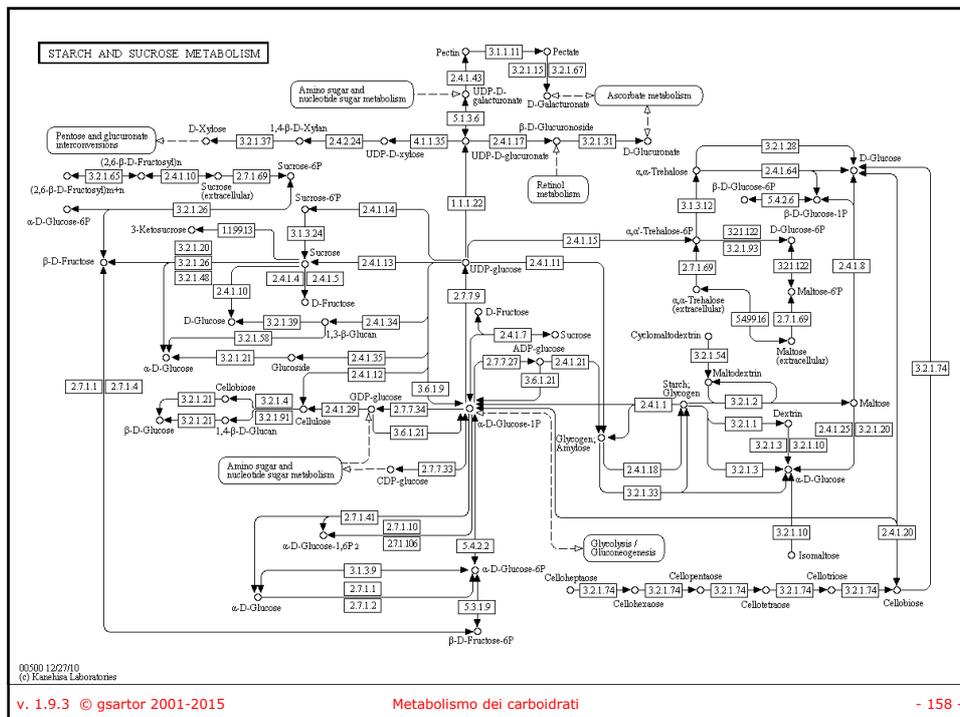
00010 24911
© E. Kasper, L. Gross, B. Müller

- 156 -

Metabolismo del Glicogeno

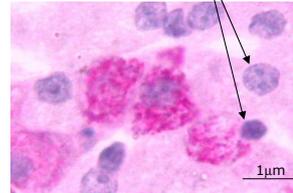
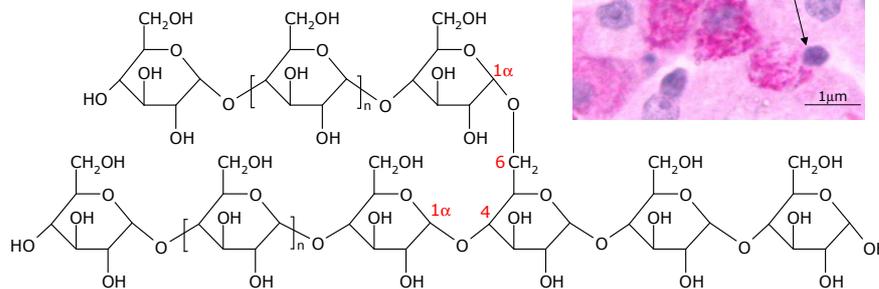
Glicogenolisi e glicogenosintesi

◀ Indice



Glicogeno (Amido)

- Il glicogeno è un polimero del glucosio,
- I monomeri sono legati con legami glicosidici $1\alpha \rightarrow 4$ nelle catene principali e $1\alpha \rightarrow 6$ nelle ramificazioni.
- È un sistema di accumulazione del glucosio sottoforma di granuli in genere nel fegato.



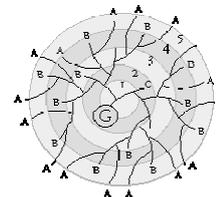
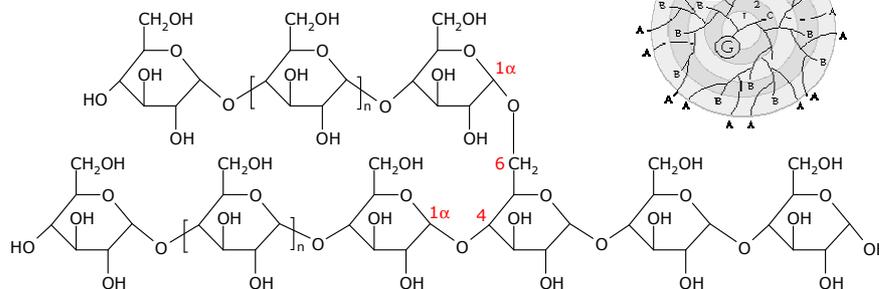
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 161 -

Glicogeno (Amido)

- Il glicogeno è un polimero del glucosio,
- I monomeri sono legati con legami glicosidici $1\alpha \rightarrow 4$ nelle catene principali e $1\alpha \rightarrow 6$ nelle ramificazioni.
- È un sistema di accumulazione del glucosio sottoforma di granuli in genere nel fegato.



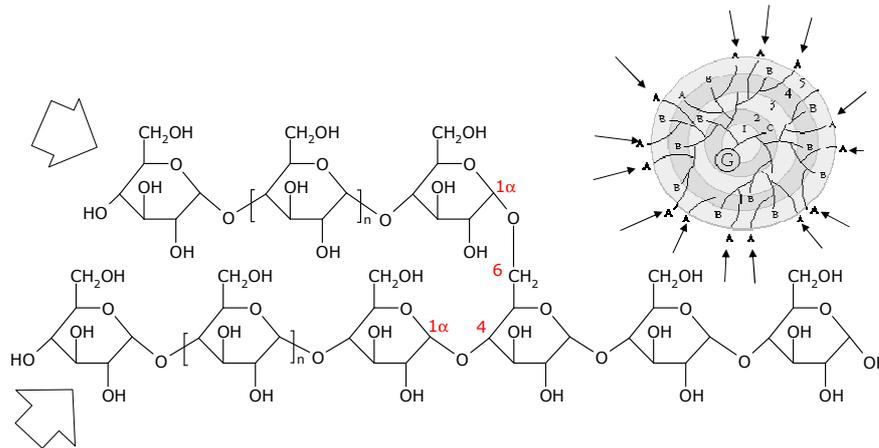
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 162 -

Glicogeno (Amido)

- La struttura dei granuli di glicogeno permette una rapida mobilitazione (scissione) delle catene polisaccaridiche poiché vi sono molte estremità diverse attaccabili.



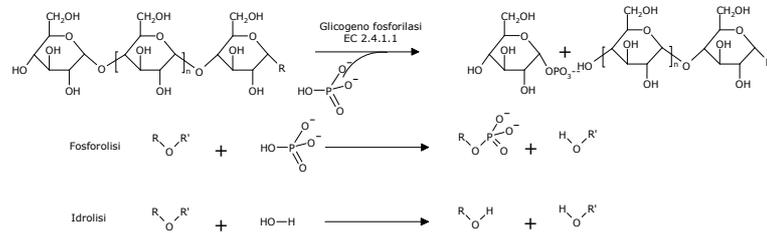
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 163 -

Catabolismo del glicogeno

- La catena lineare polisaccaridica viene scissa nei monomeri (come glucoso-1-fosfato) ad opera della glicogenofosforilasi (EC 2.4.1.1):



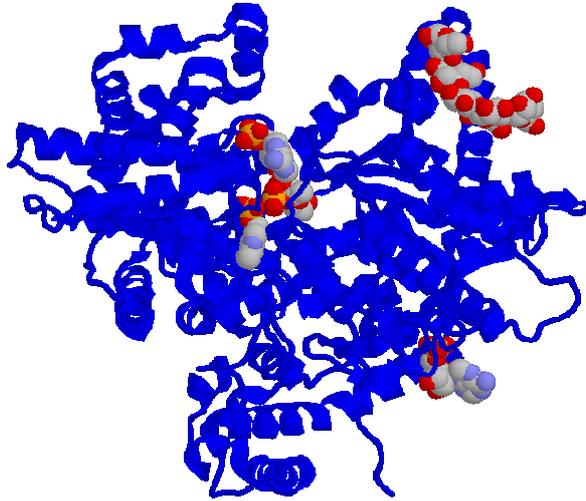
- Date le dimensioni del sito l'enzima riesce a tagliare il legame $1\alpha \rightarrow 4$ fino a quattro residui dal legame $1\alpha \rightarrow 6$.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 164 -

Glicogeno fosforilasi EC 2.4.1.1

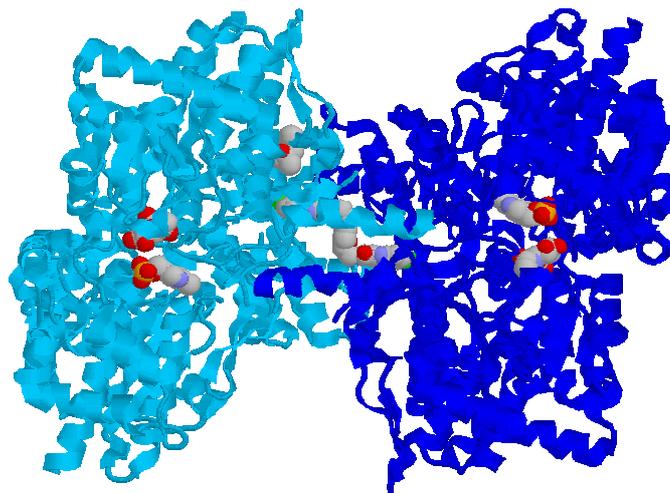


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 165 -

Glicogeno fosforilasi EC 2.4.1.1

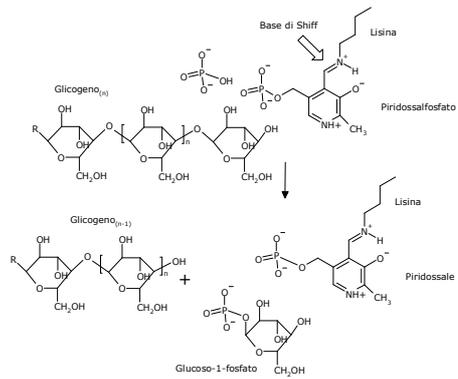
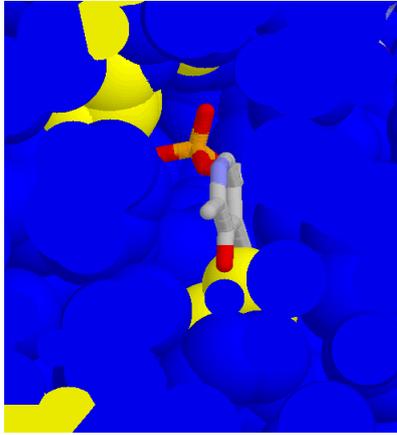


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 166 -

Glicogeno fosforilasi EC 2.4.1.1

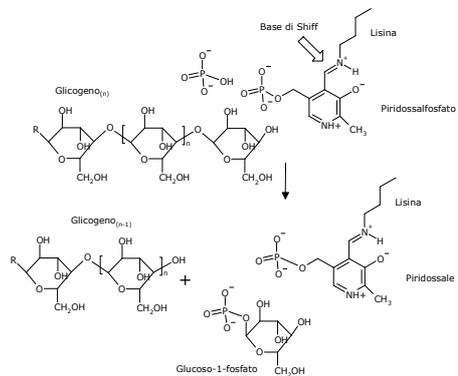
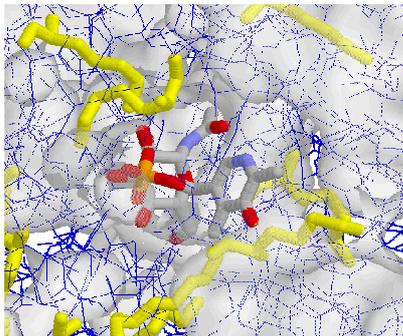


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 167 -

Glicogeno fosforilasi EC 2.4.1.1



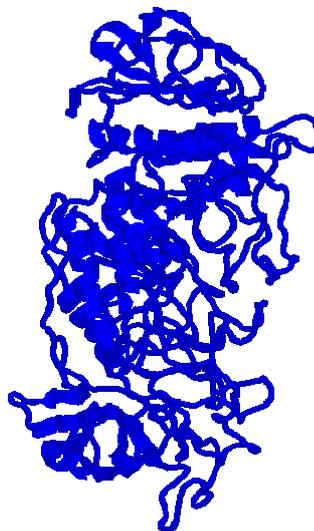
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 168 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

- Poiché la glicogeno fosforilasi non riesce a scindere tutti i legami $1\alpha\rightarrow4$ e $1\alpha\rightarrow6$ interviene l'enzima deramificante
 - con il suo dominio transferasico, scinde una catena di tre monomeri dal monomero dove vi è la ramificazione e lega i tre monomeri alla catena lineare adiacente,
 - Il residuo legato in $1\alpha\rightarrow6$ viene idrolizzato dalla funzione deramificante con produzione di glucosio.

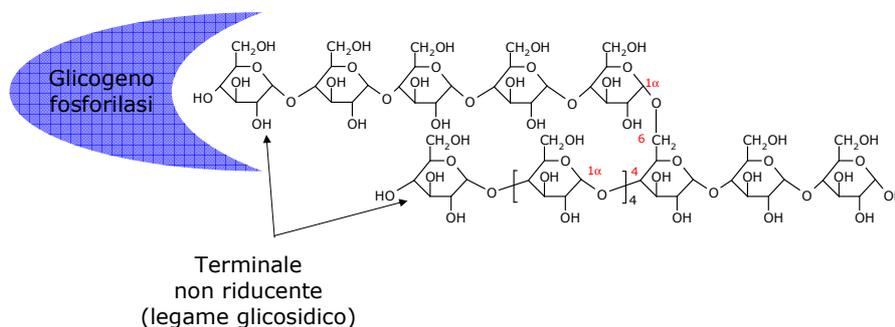


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 169 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

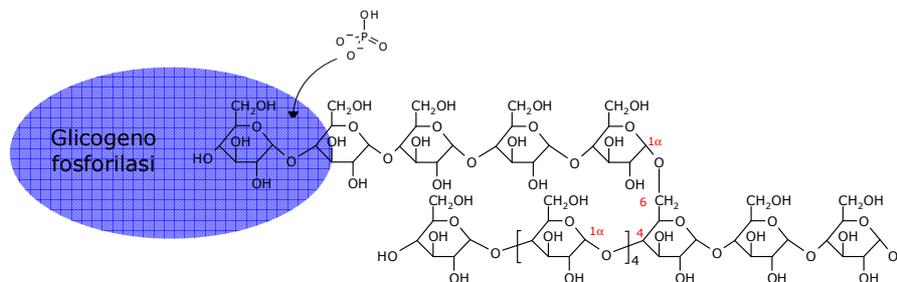


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 170 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

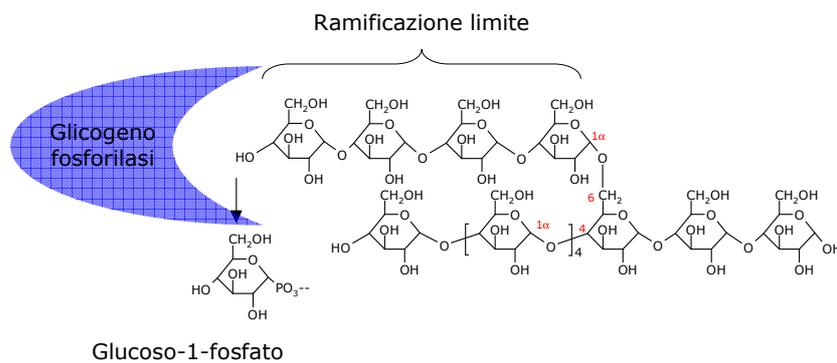


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 171 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

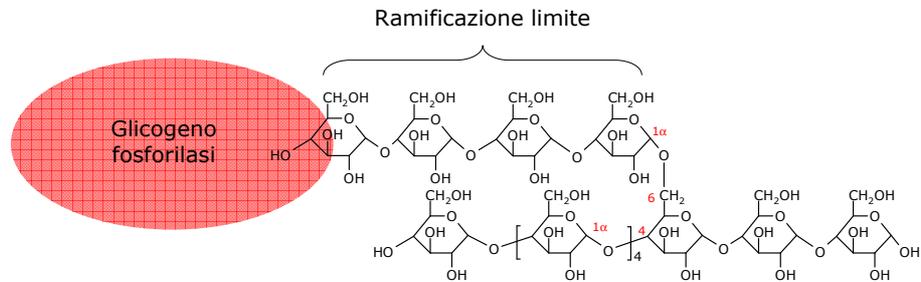


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 172 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68



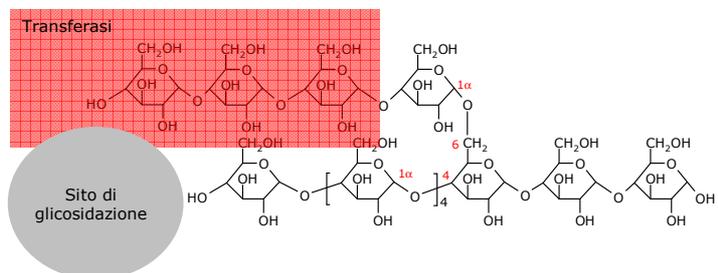
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 173 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

Enzima deramificante



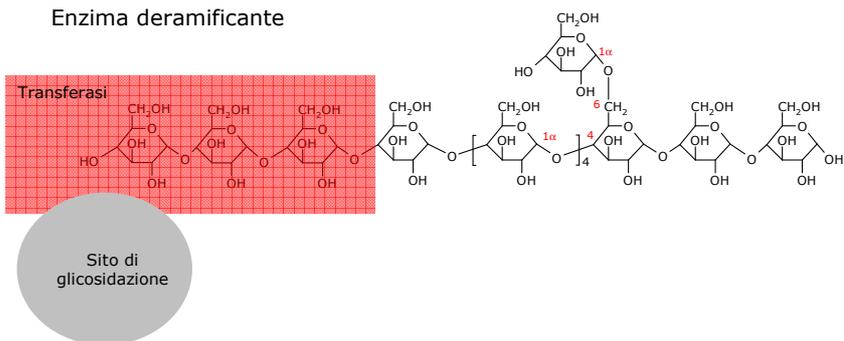
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 174 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

Enzima deramificante



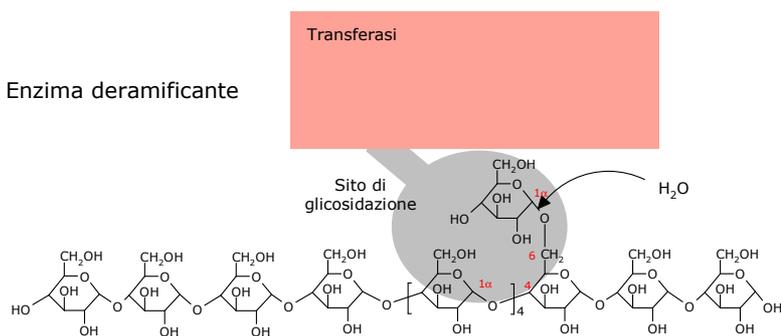
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 175 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

Enzima deramificante

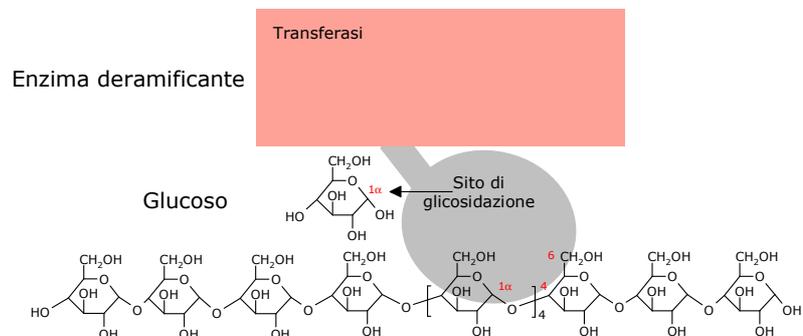


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 176 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

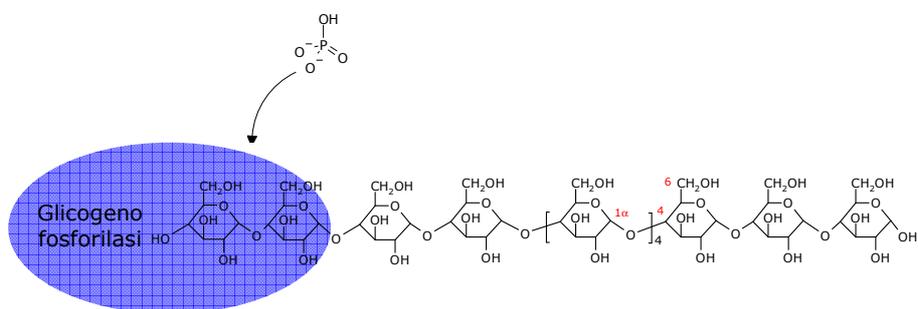


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 177 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68

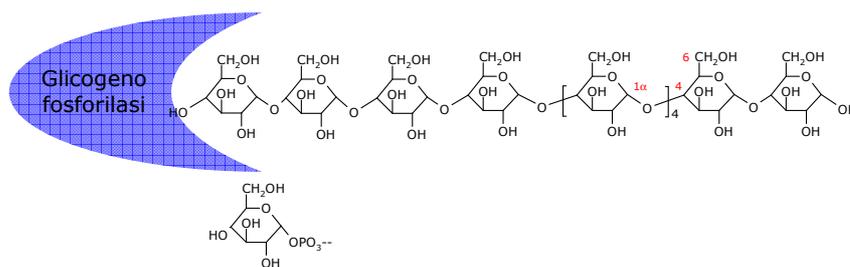


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 178 -

Enzima deramificante EC 3.2.1.68



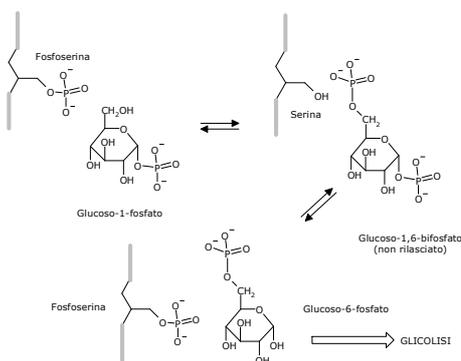
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 179 -

Glucoso-1-fosfato

- Il prodotto della glicogenolisi è principalmente glucoso-1-fosfato il quale entra nella glicolisi dopo essere stato convertito in glucoso-6-fosfato da una fosfoglucomutasi (EC 5.4.2.2) che catalizza la conversione attraverso la formazione di un intermedio glucoso-1,6-bifosfato.
- Il meccanismo è simile a quello della fosfoglicerato mutasi il quale usa, invece, un residuo di istidina.

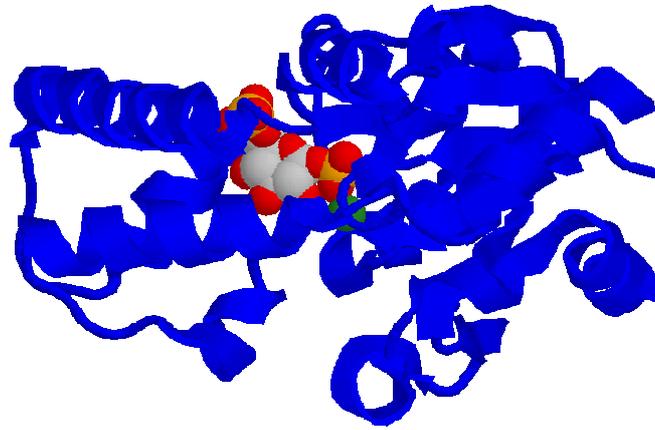


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 180 -

Fosfoglucomutasi EC 5.4.2.2

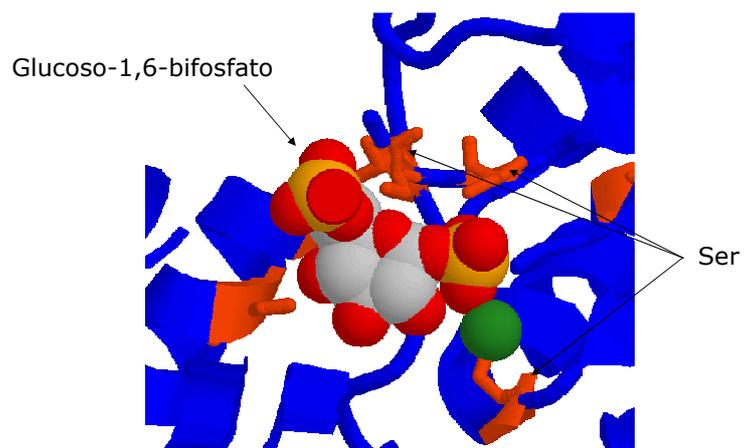


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 181 -

Fosfoglucomutasi EC 5.4.2.2



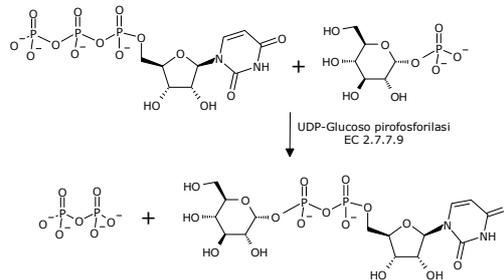
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 182 -

Glicogenosintesi

- Il glucosio uridin-difosfato (UDPg) è il precursore per la sintesi di glicogeno.
- Un residuo di glucosio è addizionato al glicogeno e viene rilasciato un UDP.
- Gli zuccheri nucleotidi difosfati sono i precursori della sintesi di carboidrati complessi, glicoproteine ecc.
- Viene sintetizzato da glucosio-1-fosfato e UTP ad opera della UDP-Glucosio pirofosforilasi (EC 2.7.7.9).



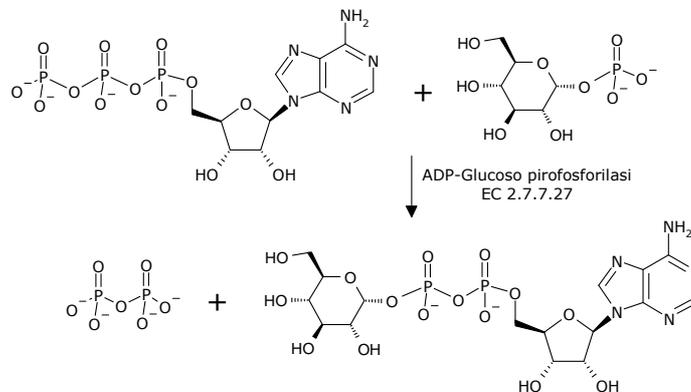
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 183 -

Amido

- Per produrre l'amido viene sintetizzato amilosio attraverso la formazione di ADP-glucosio
- Viene sintetizzato da glucosio-1-fosfato e ATP ad opera della ADP-Glucosio pirofosforilasi (EC 2.7.7.27) con meccanismo analogo al glicogeno.



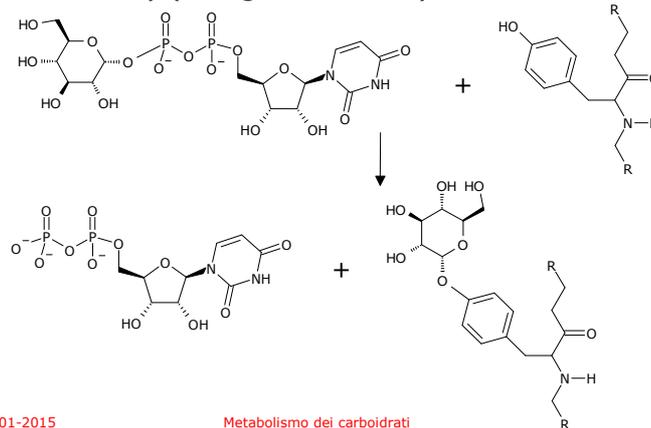
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 184 -

Glicogenosintesi

- Il glicogeno si forma a partire da una proteina primer, la glicogenina, alla quale si lega il primo residuo di glucosio attraverso un residuo di tirosina.
- L'enzima che si occupa della catalisi è la stessa glicogenina (EC 2.4.1.186) (autoglicosilazione).



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 185 -

Glicogenosintesi

- Il processo viene ripetuto fino a che si forma una corta catena di glucosio (fino a cinque residui).

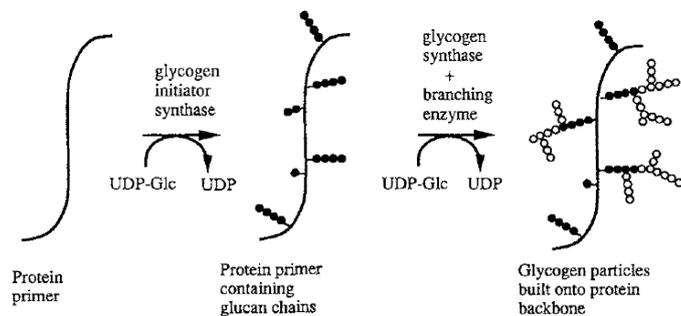


Fig. 1. *Krisman's model for the structure and biogenesis of glycogen.*

Eur. J. Biochem. 200, 625–631 (1991)

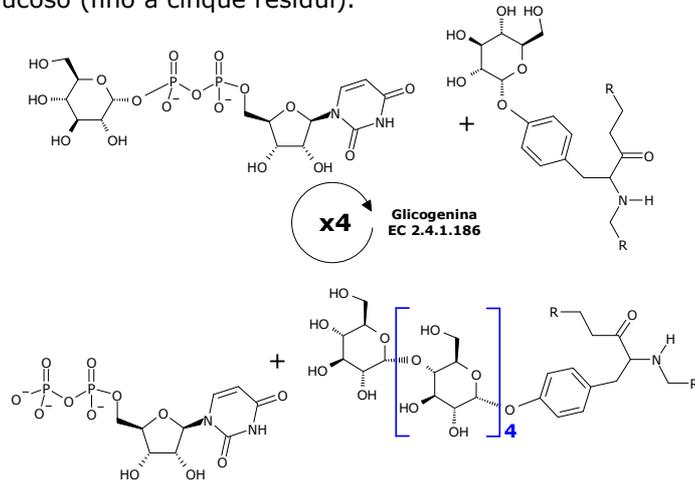
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 186 -

Glicogenosintesi

- Il processo viene ripetuto fino a che si forma una corta catena di glucoso (fino a cinque residui).

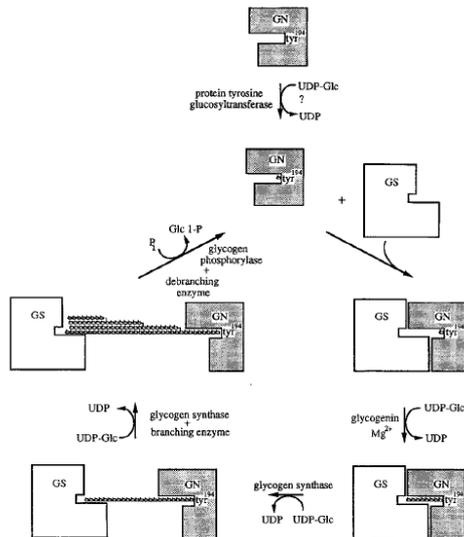


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 187 -

Glicogenosintesi



Eur. J. Biochem. 200, 625–631 (1991)

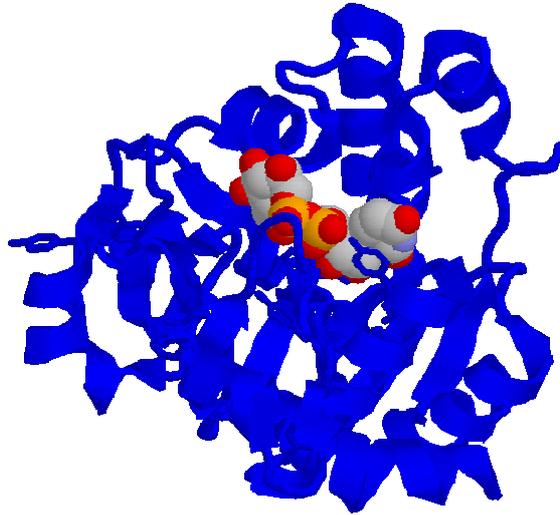
Fig. 5. The role of glycogenin in the biosynthesis of muscle glycogen.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 188 -

Glicogenina EC 2.4.1.186

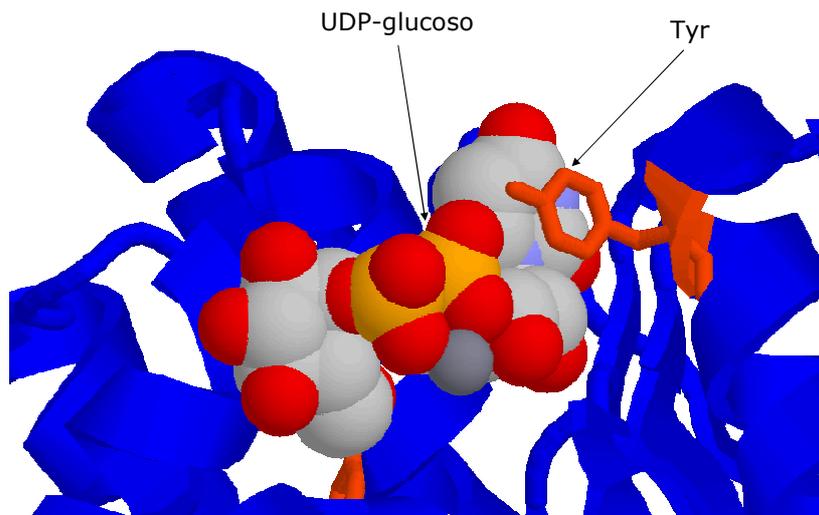


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 189 -

Glicogenina EC 2.4.1.186



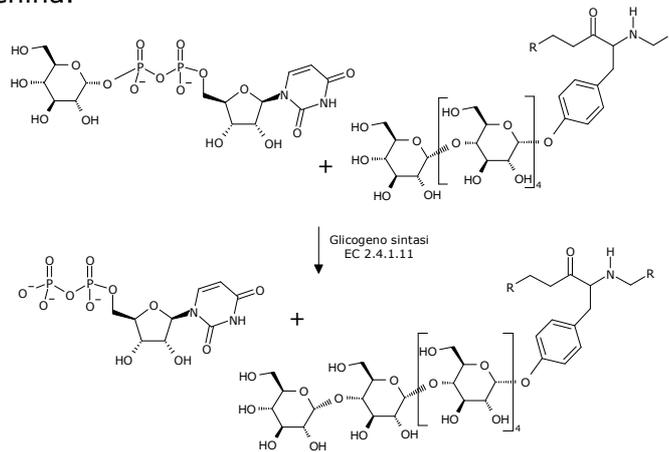
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 190 -

Glicogenosintesi

- Successivamente interviene la Glicogeno sintasi (EC 2.4.1.11) per l'allungamento della catena.
- È un complesso di una subunità catalitica e della proteina glicogenina.



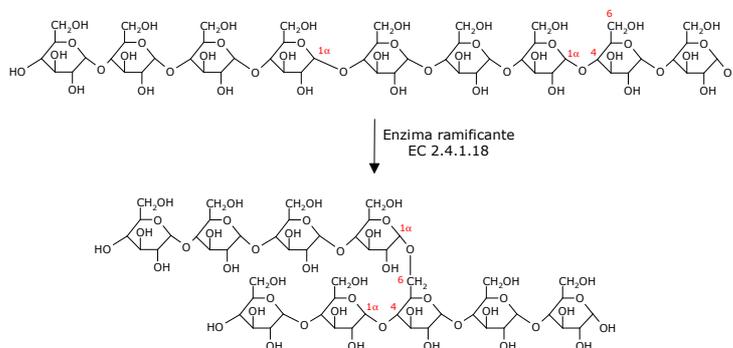
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 191 -

Glicogenosintesi

- La ramificazione $1\alpha \rightarrow 6$ viene catalizzata da un enzima ramificante (EC 2.4.1.18).
- Lo stesso enzima è responsabile della conversione di amilosio in amilopectina e dell'ulteriore ramificazione dell'amilopectina

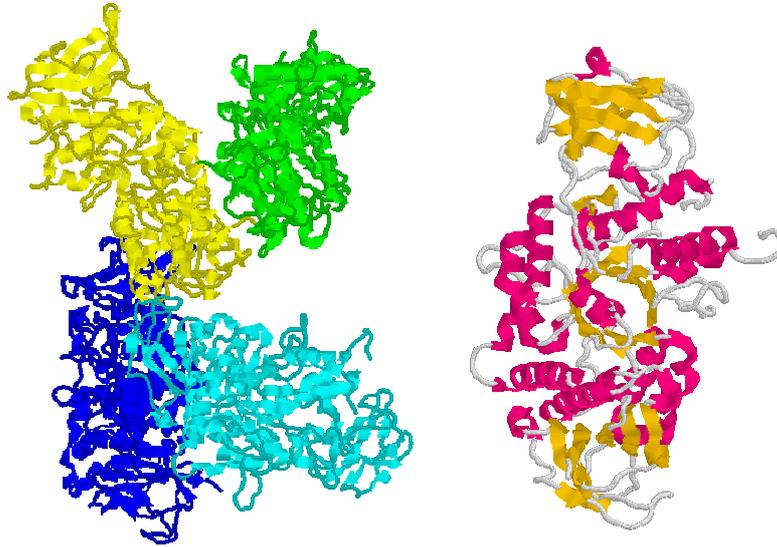


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 192 -

Enzima ramificante EC 2.4.1.18



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 193 -

Controllo

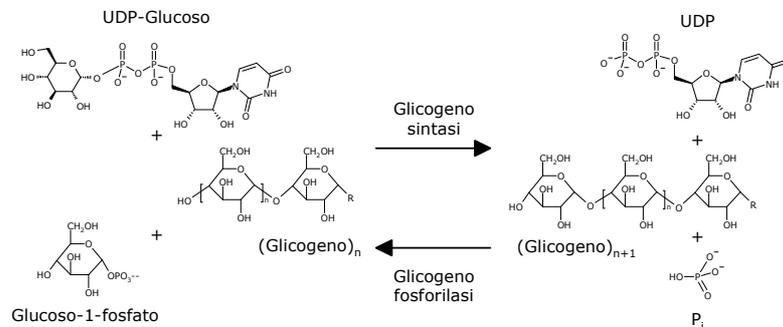
- Il metabolismo dei carboidrati ha ruoli diversi nel muscolo e nel fegato.
 - Nel muscolo: per generare ATP
 - Nel fegato: mantenere il livello ematico di glucosio (produce ed esporta glucosio o importa ed immagazzina glucosio in risposta alla glicemia).
- La sintesi e degradazione del glucosio e del glicogeno sono quindi sottoposte al controllo ormonale attraverso il sistema del cAMP.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 194 -

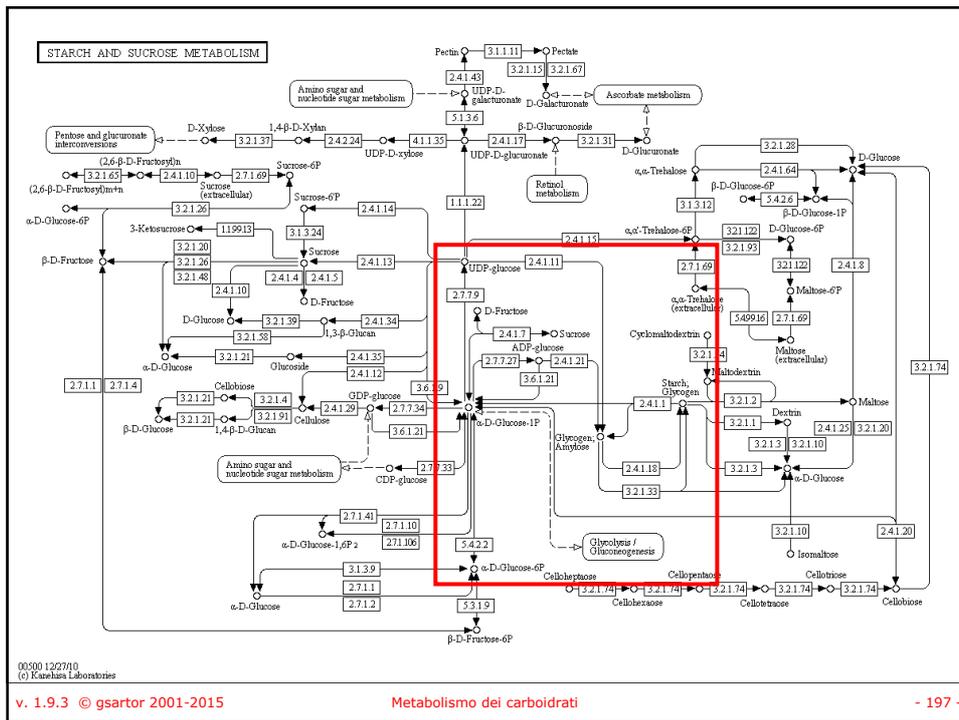
Controllo del metabolismo del glicogeno



- Sia la sintesi che la scissione del glicogeno sono processi termodinamicamente spontanei, se le due reazioni fossero attive simultaneamente si avrebbe la perdita netta di un legame ad alta energia per ciclo (si forma UDP-Glucoso).
- Per prevenire questa eventualità la glicogeno sintasi e la glicogeno fosforilasi sono regolate reciprocamente da effettori allosterici e dalla fosforilazione.

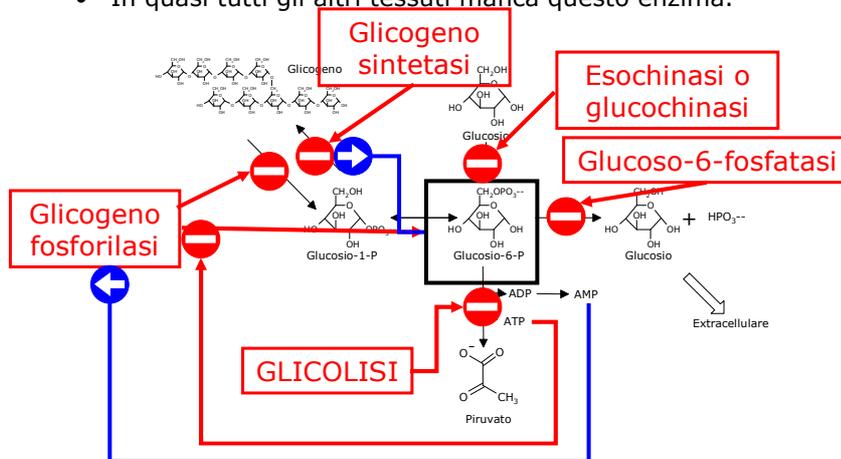
Regolazione allosterica

- La **glicogeno fosforilasi** nel muscolo è regolata da AMP, ATP e glucoso-6-fosfato. (un isoenzima diverso nel fegato è meno sensibile a questi controlli allosterici).
 - AMP (presente quando l'ATP manca) attiva la fosforilasi promuovendone la conformazione R.
 - ATP e glucoso-6-fosfato, che spiazzano l'AMP dalla fosforilasi, la inibiscono promuovendo la conformazione T.
 - Quindi la rottura del glicogeno è inibita quando sono presenti elevate concentrazioni di ATP e glucoso-6-fosfato.
- La **glicogeno sintasi** è attivata dal glucoso-6-fosfato (effetto opposto nella glicogeno fosforilasi).
- Quindi la glicogeno fosforilasi è attiva quando un alto livello ematico di glucoso porta ad un elevato livello cellulare di glucoso-6-fosfato.



Regolazione allosterica

- Il glucosio-6-fosfato può entrare nella glicolisi o (nel fegato) essere defosforilato ad opera della glucosio-6-fosfatasi e rilasciato nel sangue.
- In quasi tutti gli altri tessuti manca questo enzima.



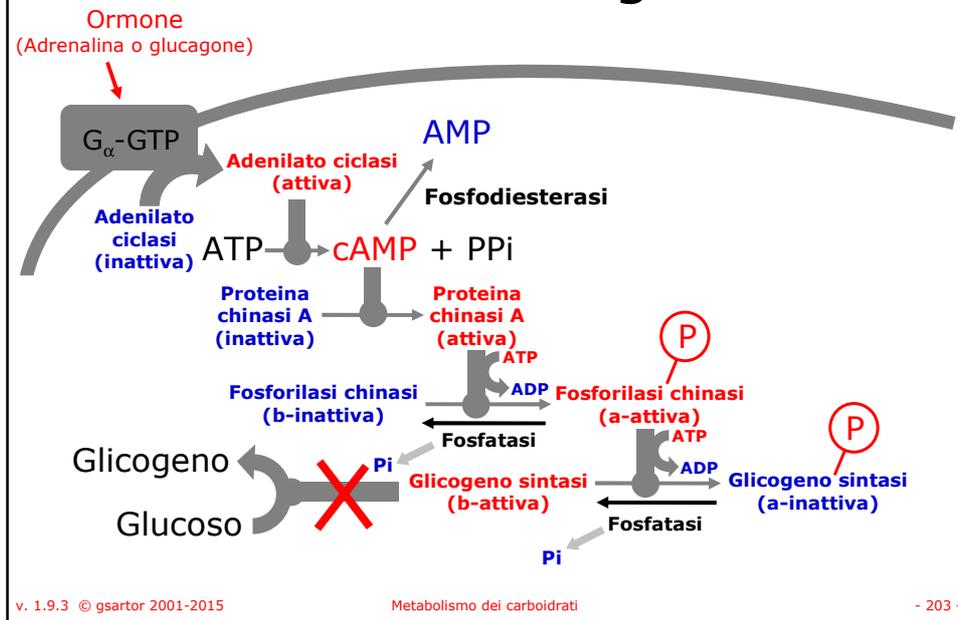
Regolazione ormonale (covalente) FOSFORILAZIONE

- Gli ormoni Glucagone e adrenalina attivano i recettori di membrana accoppiati alla proteina G (GPCR) i quali innescano la cascata del cAMP che porta alla fosforilazione di proteine bersaglio.
- Entrambi gli ormoni sono prodotti in risposta a bassi livelli ematici di glucosio.
 - Il glucagone è sintetizzato dalle cellule α del pancreas e attiva la formazione di cAMP nel fegato.
 - L'adrenalina attiva la formazione di cAMP nel muscolo.

Regolazione ormonale (covalente) FOSFORILAZIONE

- La cascata del cAMP porta alla fosforilazione di una Ser nella glicogeno fosforilasi promuovendone la forma R attiva.
- L'enzima fosforilato è meno sensibile agli inibitori allosterici.
- Quindi, anche se ATP e glucosio-6-fosfato sono a valori elevati la fosforilasi è ancora attiva.
- Il glucosio-1-fosfato prodotto dal glicogeno nel fegato può essere convertito a glucosio ematico.
- La regolazione ormonale permette alle necessità dell'organismo di prevalere sulle necessità della cellula.

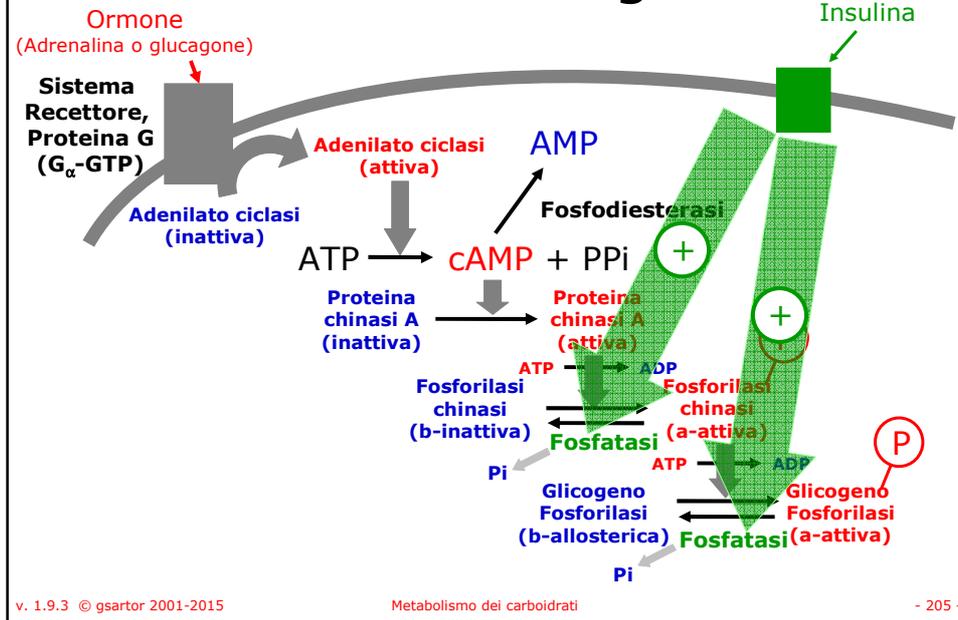
Cascata di segnali



Insulina

- L'insulina è un ormone prodotto dalle cellule β del pancreas in risposta ad alti livelli ematici di glucoso.
- Attiva una cascata di segnali separata che porta alla attivazione delle fosfoproteina fosfatasi.
- Queste fosfatasi catalizzano la rimozione del fosfato sia dalla fosforilasi chinasi che dalla glicogeno fosforilasi che dalla glicogeno sintasi.
- Quindi l'insulina antagonizza gli effetti della cascata del cAMP indotta da glucagone e adrenalina.

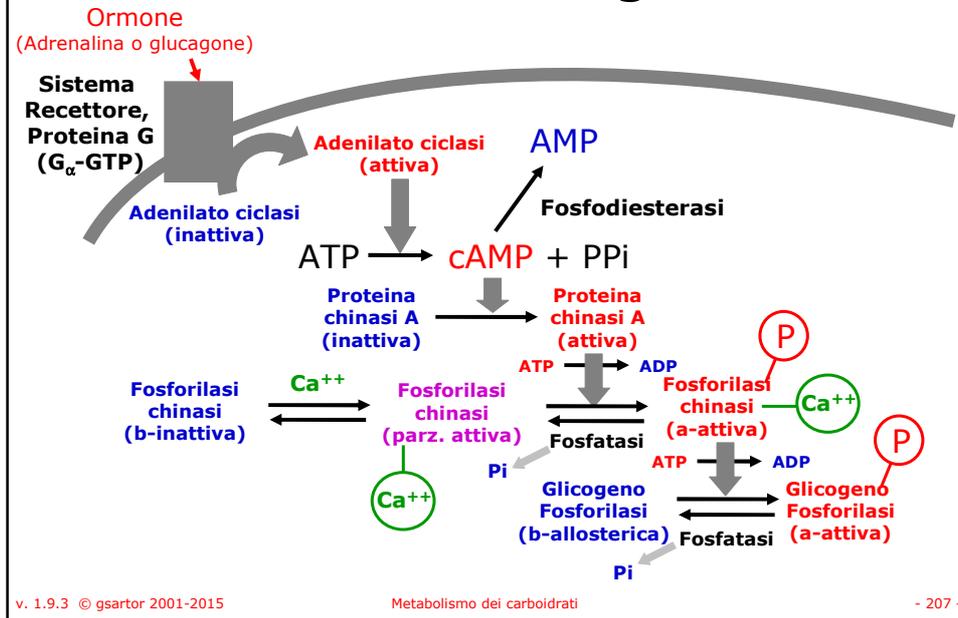
Cascata di segnali



Ca⁺⁺

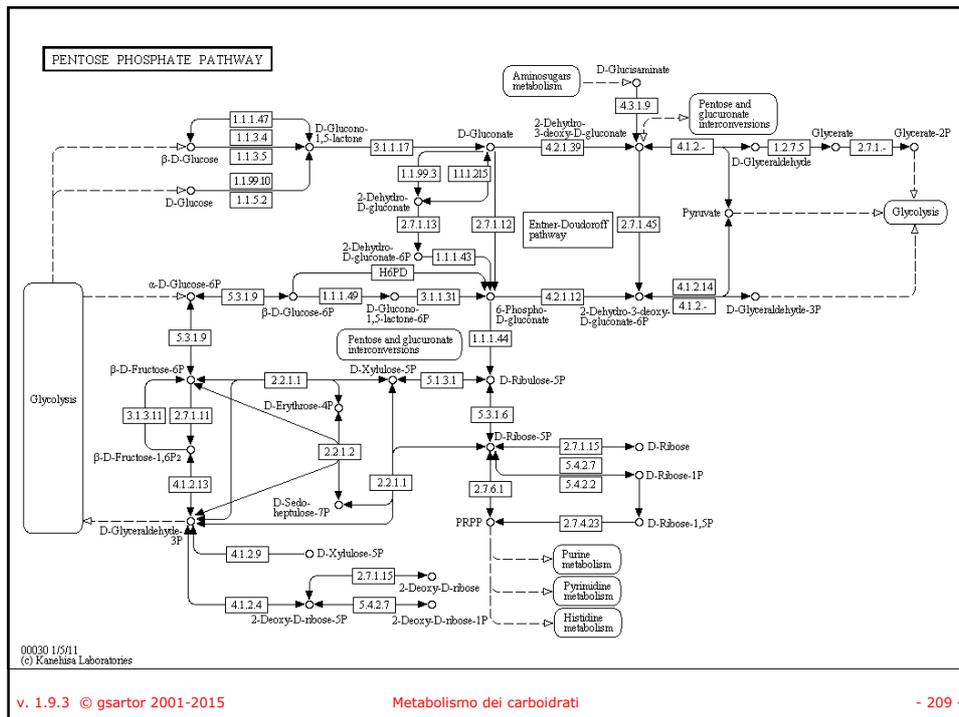
- Anche lo ione Ca⁺⁺ gioca un ruolo nel metabolismo del glicogeno nel muscolo.
- Al momento della contrazione muscolare lo ione Ca⁺⁺ viene rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico della cellula muscolare attraverso l'attivazione di un canale specifico.
- Il Ca⁺⁺ rilasciato nel citoplasma attiva l'interazione actina/miosina
- Nel muscolo la fosforilasi chinasi ha un dominio calmodulinico nella subunità δ che lega il Ca⁺⁺ e attiva parzialmente (modula) la fosforilasi chinasi.
- La fosforilazione indotta dalla cascata del cAMP innescata dall'adrenalina porta ad una ulteriore attivazione.
- Questo processo porta al rilascio di glucosio dal glicogeno che, attraverso la glicolisi, porta alla produzione di ATP.

Cascata di segnali



Via dei pentosi fosfati

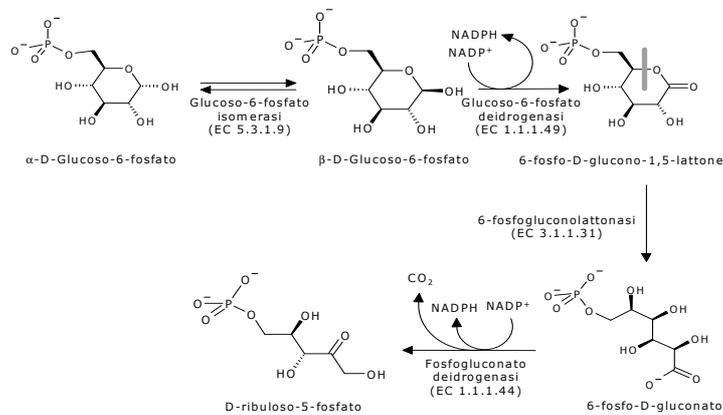
◀ Indice



Via dei pentosi fosfati

- Altri nomi:
 - Via del fosfogluconato
 - Shunt dell'esoso monofosfato
- La parte lineare della via porta alla ossidazione e decarbossilazione di
 - glucoso-6-fosfato (6C) a ribuloso-5-fosfato (5C).
- Il resto della via converte
 - ribuloso-5-fosfato a riboso-5-fosfato (5C)
- oppure a
 - gliceraldeide-3-fosfato (3C) e fruttosio-6-fosfato (6C)
- Con produzione di NADPH

Da glucoso-6-fosfato (6C) a ribuloso-5-fosfato (5C)

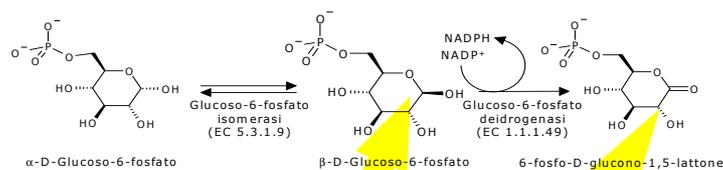


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 211 -

Da glucoso-6-fosfato (6C) a ribuloso-5-fosfato (5C)



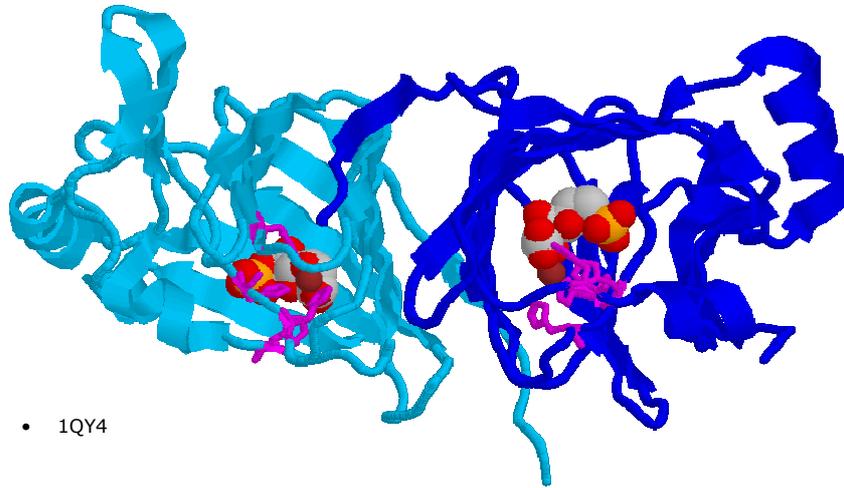
- Il glucoso-6-fosfato viene convertito dalla forma α alla forma β attraverso la glucoso-6-fosfato isomerasi
- La glucoso-6-fosfato deidrogenasi catalizza l'ossidazione del gruppo aldeidico (semiacetale) del glucoso-6-fosfato (in C1) ad acido carbossilico.
- Si forma un legame estereo (lattone).
- Il NADP⁺ serve come accettore di elettroni, viene prodotto NADPH.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 212 -

Glucoso-6-fosfato isomerasi (EC 5.3.1.9)

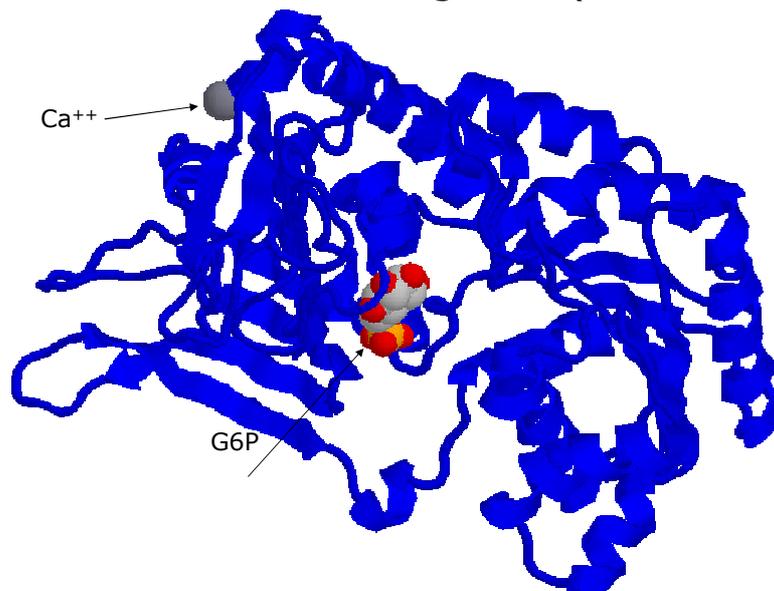


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 213 -

Glucoso-6-fosfato deidrogenasi (EC 1.1.1.49)

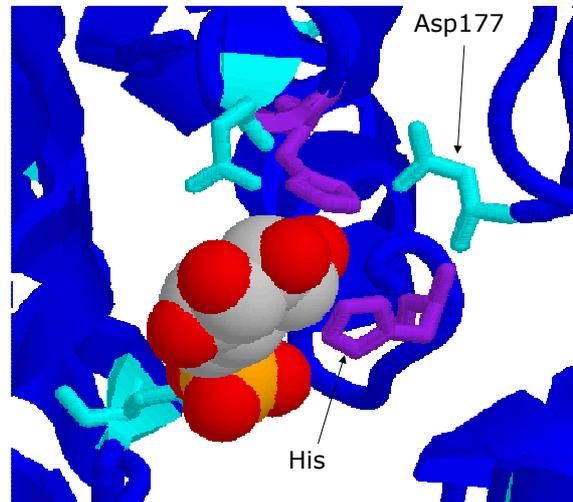


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 214 -

Glucoso-6-fosfato deidrogenasi (EC 1.1.1.49)

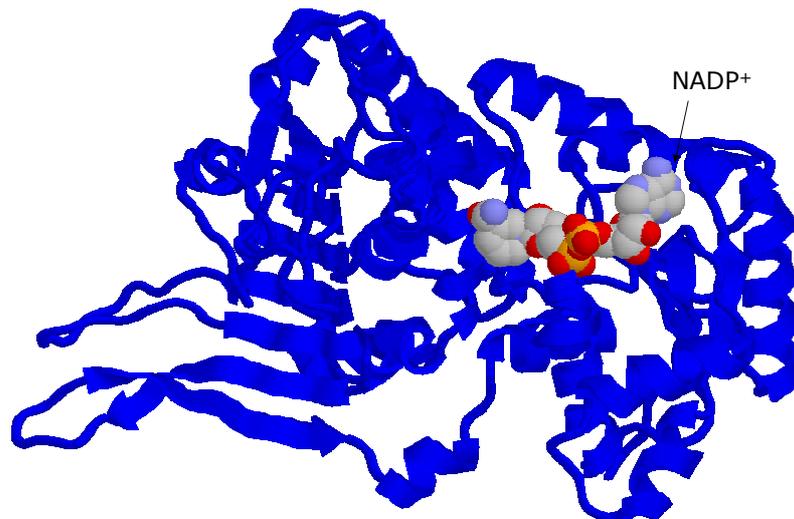


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 215 -

Glucoso-6-fosfato deidrogenasi (EC 1.1.1.49)

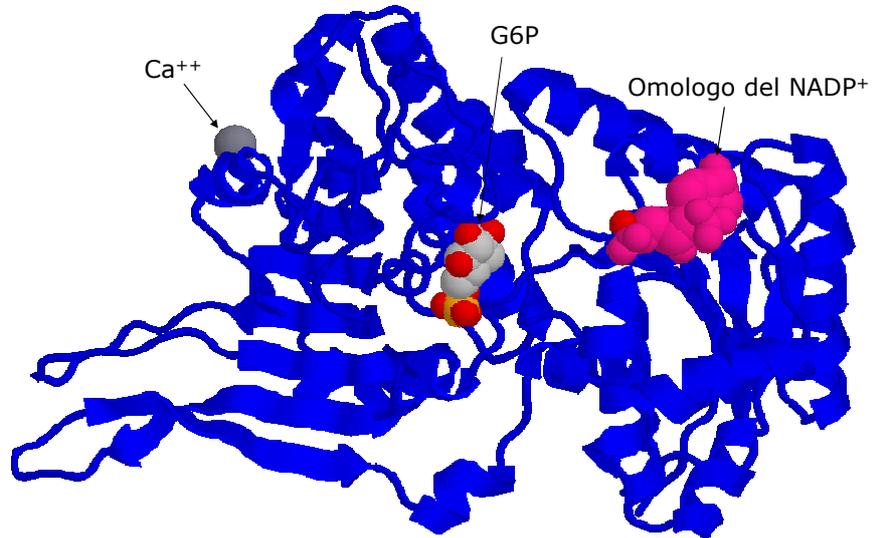


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 216 -

Glucoso-6-fosfato deidrogenasi (EC 1.1.1.49)



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 217 -

Regolazione della glucoso-6-fosfato deidrogenasi

- La reazione catalizzata dalla glucoso-6-fosfato deidrogenasi è un passo obbligatorio della via dei pentosi fosfati e la sua attività è regolata dalla presenza di NADP⁺.
- Il NADPH è utilizzato nelle vie biosintetiche e viene convertito in NADP⁺
- Il NADP⁺ stimola la via dei pentosi fosfati che porta alla formazione di NADPH.

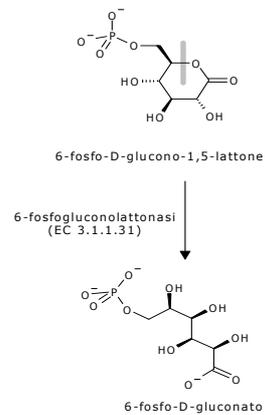
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

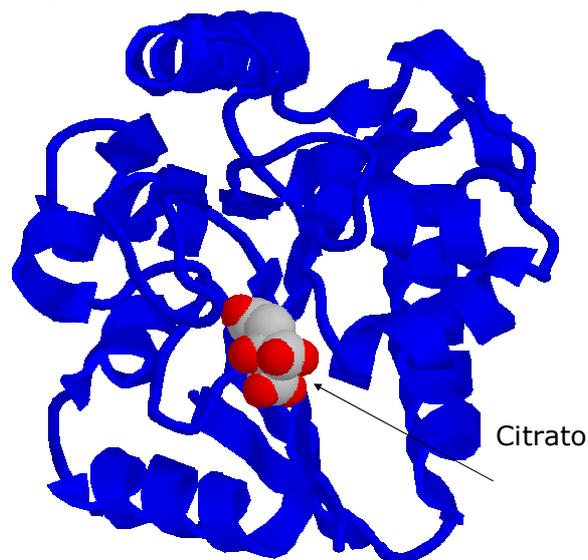
- 218 -

Da glucoso-6-fosfato (6C) a ribuloso-5-fosfato (5C)

- La 6-fosfogluconolattoneasi catalizza l'idrolisi del legame estereo con apertura dell'anello. Il prodotto è 6-fosfogluconato.
- L'apertura dell'anello avverrebbe anche in assenza di enzima.
- La lattoneasi aumenta la velocità della reazione favorendo la scomparsa del 6-fosfogluconolattone che è altamente reattivo e potenzialmente tossico.

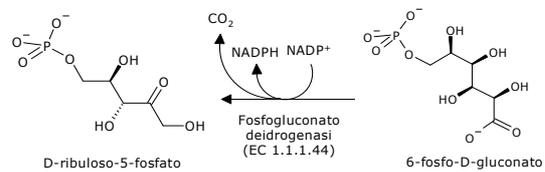


6-fosfogluconolattoneasi (EC 3.1.1.31)



Da glucoso-6-fosfato (6C) a ribuloso-5-fosfato (5C)

- La fosfogluconato deidrogenasi (EC 1.1.1.44) catalizza la decarbossilazione ossidativa del 6-fosfogluconato.
- Si forma il chetone a 5-C ribuloso-5-fosfato.
- Il gruppo OH al C3 (C2 del prodotto) è ossidato a chetone.
- Ciò promuove la perdita del carbossile dal C1 come CO₂.
- Il NADP⁺ serve da ossidante.

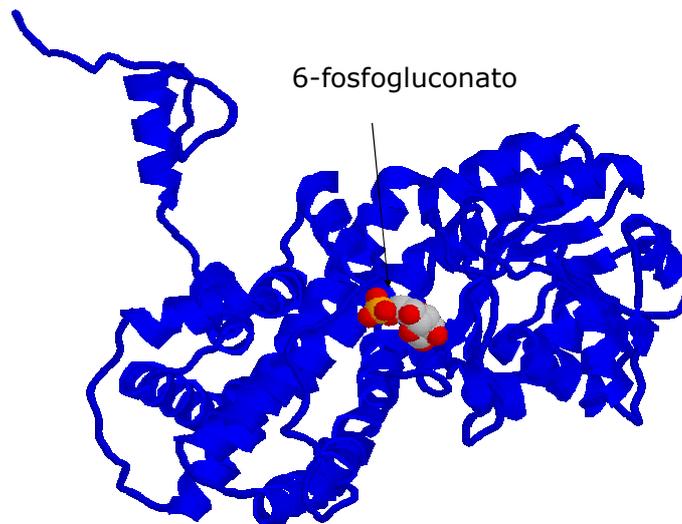


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 221 -

Fosfogluconato deidrogenasi (EC 1.1.1.44)

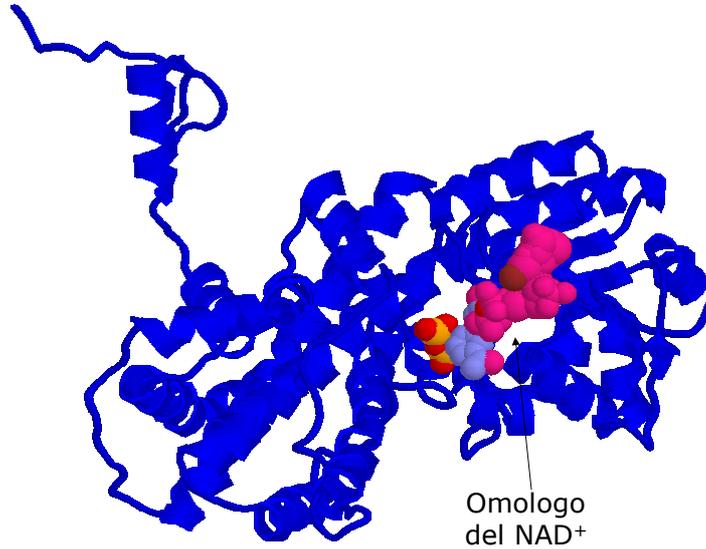


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 222 -

Fosfogluconato deidrogenasi (EC 1.1.1.44)

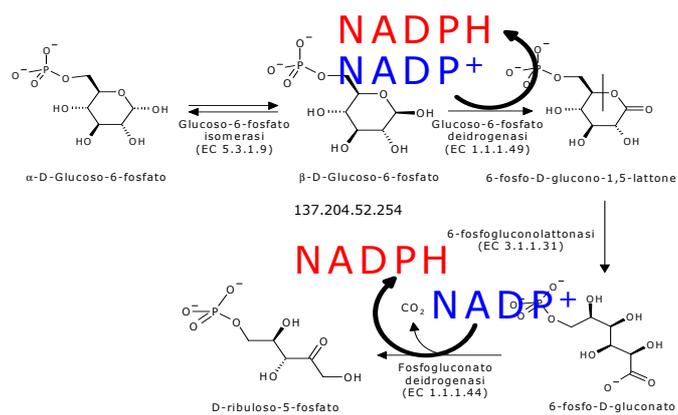


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 223 -

Da glucoso-6-fosfato (6C) a ribuloso-5-fosfato (5C)



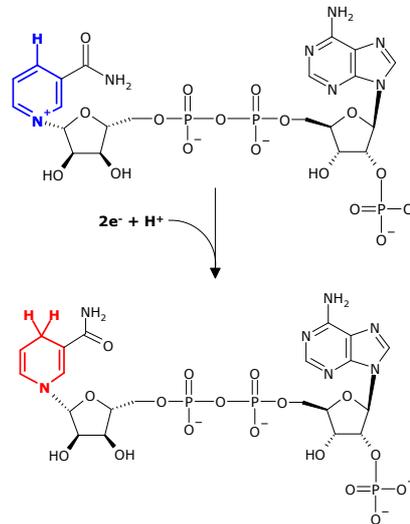
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 224 -

NADP⁺ e NADPH

- La riduzione del NADP⁺ (così come del NAD⁺) coinvolge il trasferimento di 2 e⁻ e 1 H⁺ alla porzione nicotinamica della molecola (come H⁻).
- Il NADPH, prodotto dalla via dei pentosi fosfati è la molecola riducente nelle vie sintetiche (anaboliche) della cellula.
- Il NAD⁺ serve come accettore di elettroni nelle vie cataboliche (demolizione) dove i metaboliti sono ossidati.
- Il NADH che si forma è riossidato nella catena respiratoria per la produzione di ATP.

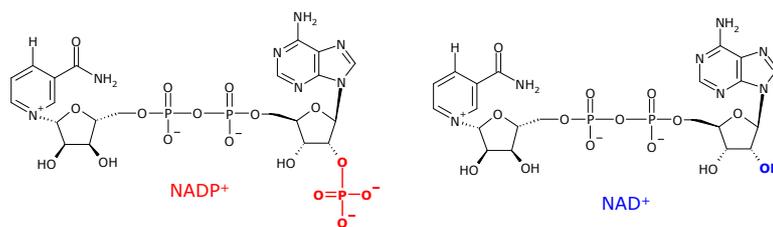


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 225 -

NADP⁺ e NAD⁺



- NAD⁺ e NADP⁺ differiscono solo per la presenza del fosfato legato al riboso nel NADP⁺.
- Per quanto riguarda l'attività redox non vi è sostanziale differenza.
- La presenza del fosfato serve per il riconoscimento di uno o dell'altro dagli enzimi. Ciò permette la separazione delle vie cataboliche e anaboliche nella cellula.

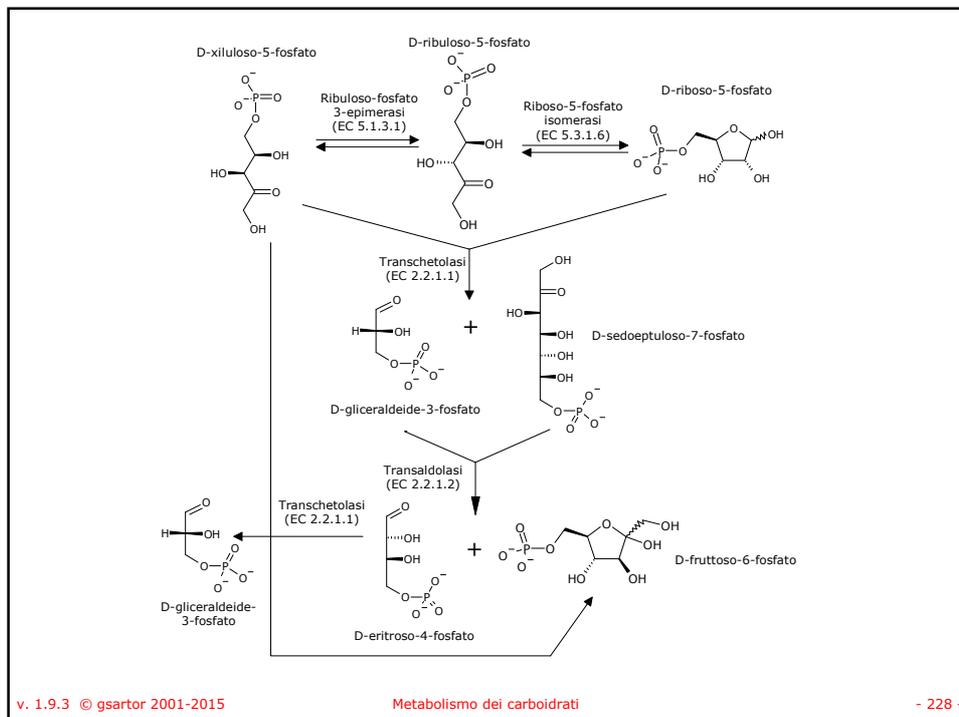
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

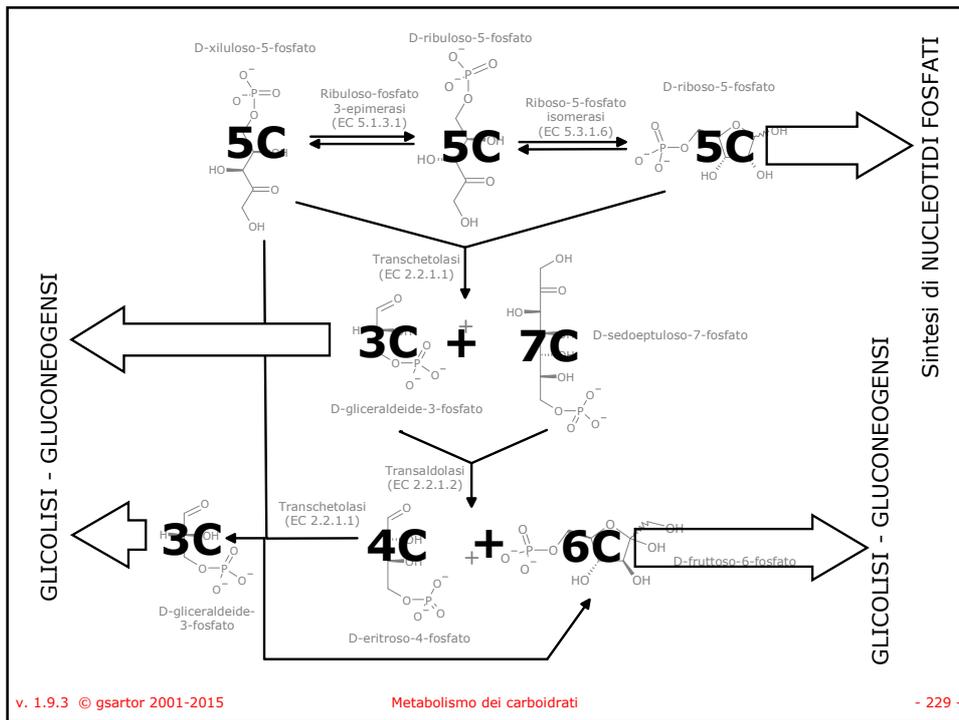
Metabolismo dei carboidrati

- 226 -

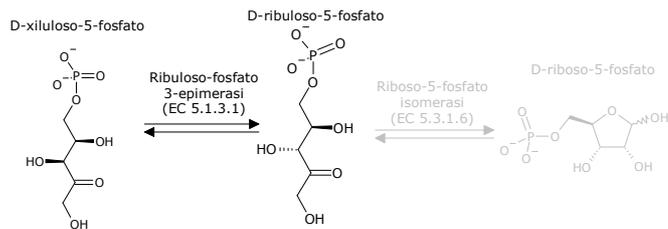
Il resto della via

- converte
 - ribuloso-5-fosfato a riboso-5-fosfato (5C) e xiluloso-5-fosfato attraverso la catalisi effettuata da epimerasi e isomerasi
- e quindi a
 - gliceraldeide-3-fosfato (3C), sedoeptuloso-7-fosfato (7C), eritroso-4-fosfato (4C) e fruttosio-6-fosfato (6C) attraverso transaldolasi e transchetolasi

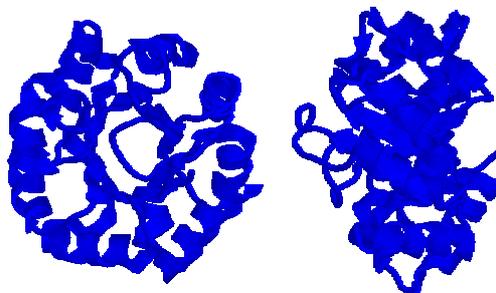




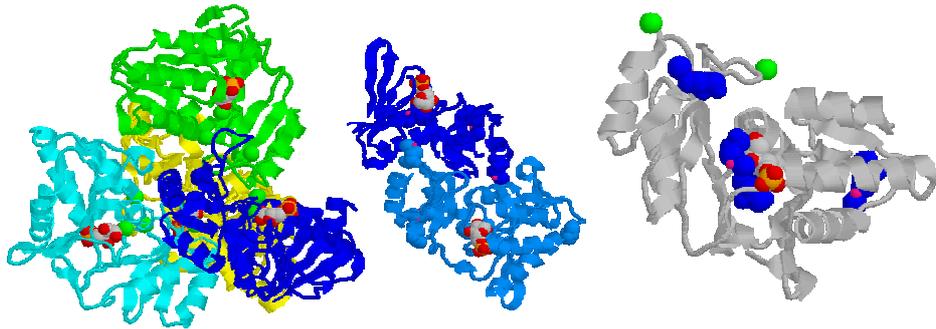
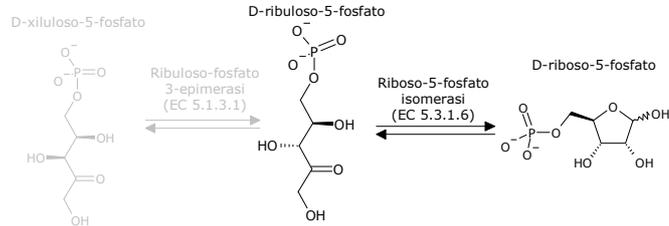
Epimerasi (EC 5.1.3.1)



Struttura ad "α-β barrel"



Isomerasi (EC 5.3.1.6)

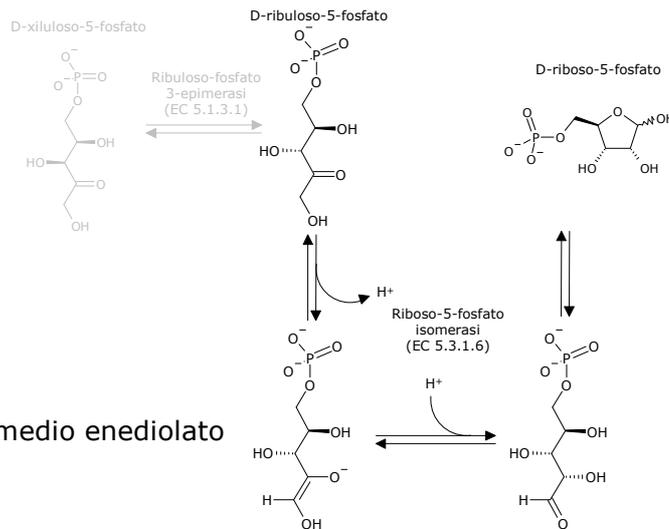


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 231 -

Isomerasi (EC 5.3.1.6)



Intermedio enediolato

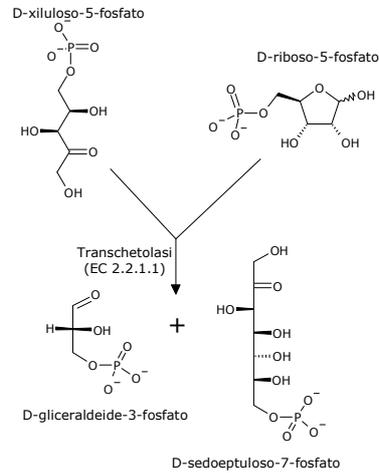
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 232 -

Transchetolasi (EC 2.2.1.1)

- Le transchetolasi e le transaldolasi catalizzano, rispettivamente, il trasferimento di frammenti di due o tre atomi di carbonio da un chetoso donatore ad un aldoso accettore.
- La transchetolasi trasferisce un frammento 2-C dal xiluloso-5-fosfato (chetoso) sia al riboso-5-fosfato che all'eritroso-4-fosfato (aldosi).

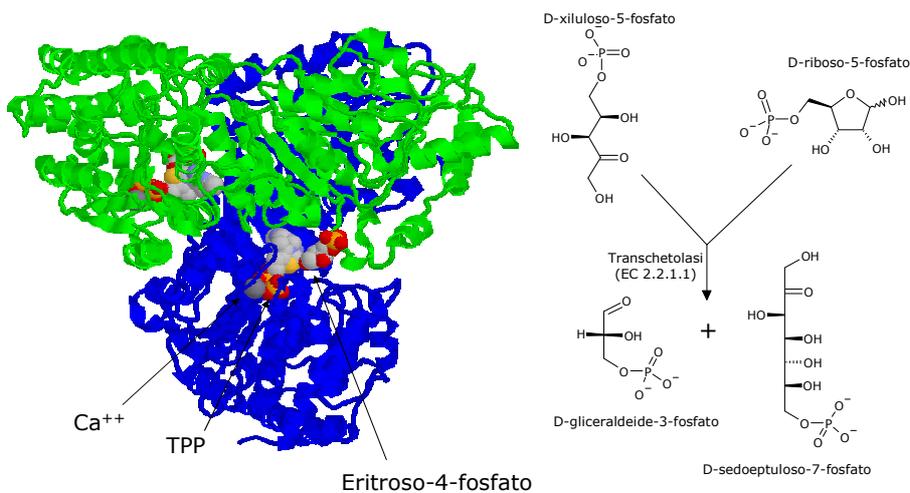


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 233 -

Transchetolasi (EC 2.2.1.1)

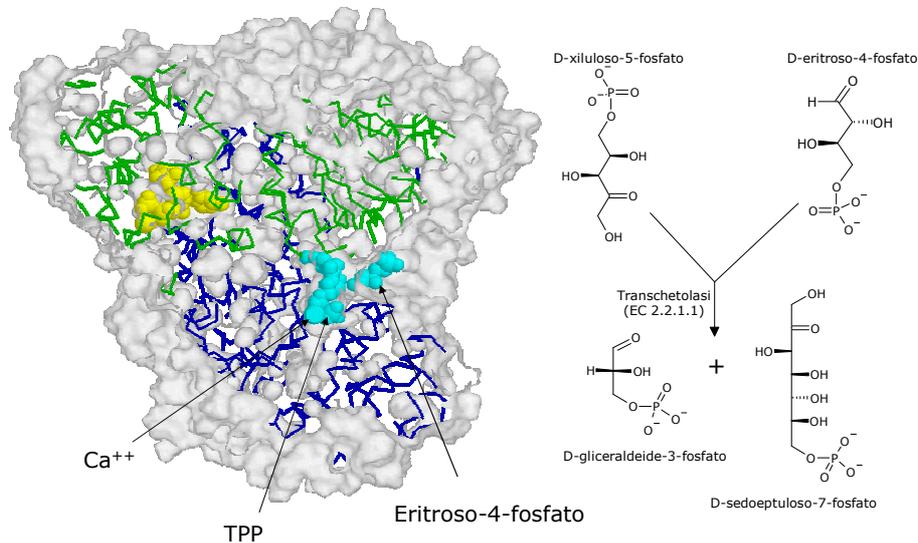


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 234 -

Transchetolasi (EC 2.2.1.1)



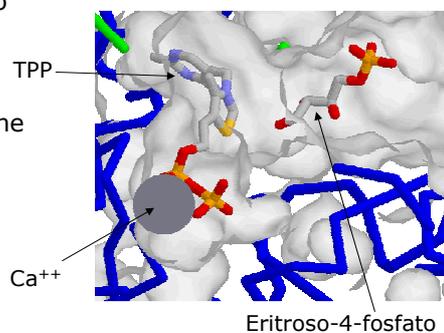
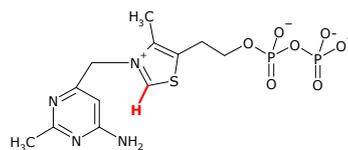
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 235 -

Tiaminapirofosfato

- La transchetolasi utilizza come gruppo prostetico il TPP (tiaminapirofosfato) derivato dalla vitamina B₁.
- Il TPP si lega nel sito attivo piegato a "V".
- Il protone tra gli atomi di azoto e zolfo nell'anello tiazolico è acido e dissocia.
- Il gruppo aminico dell'anello aminopiridino è vicino al protone dissociabile e serve come accettore (base).
- Il trasferimento del protone è favorito dalla presenza di un residuo di Glu adiacente all'anello pirimidinico.



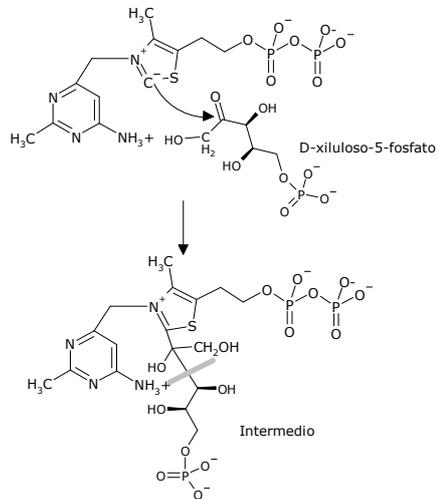
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 236 -

Tiaminapirofosfato

- Il carbanione attacca il carbonile del xiluloso-5-P per formare un intermedio di addizione.
- Il N⁺ nell'anillo tiazolico agisce come un accettore di elettroni favorendo la rottura del legame C-C.



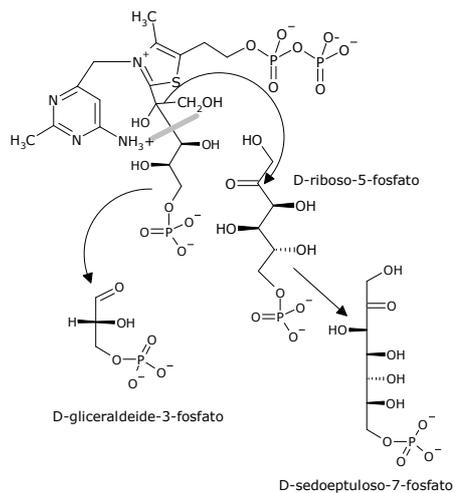
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 237 -

Tiaminapirofosfato

- Si forma l'aldoso a tre atomi di carbonio gliceraldeide-3-P che viene rilasciato, il frammento a 2-C rimane legato al TPP.
- Il frammento 2-C condensa con un aldoso (eritroso-4-P o riboso-5-P) per formare un chetoso-P.
 - Il trasferimento del frammento 2-C sul riboso-5-P forma il sedoepuloso-7-fosfato.



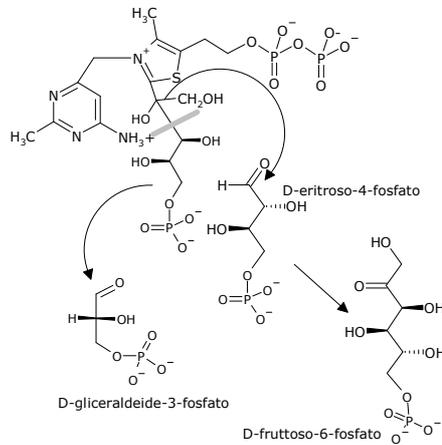
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 238 -

Tiaminapirofosfato

- Si forma l'aldoso a tre atomi di carbonio gliceraldeide-3-P che viene rilasciato, il frammento a 2-C rimane legato al TPP.
- Il frammento 2-C condensa con un aldoso (eritroso-4-P o riboso-5-P) per formare un chetoso-P.
 - Il trasferimento del frammento 2-C sul eritroso-4-P forma il fruttosio-6-7-fosfato.



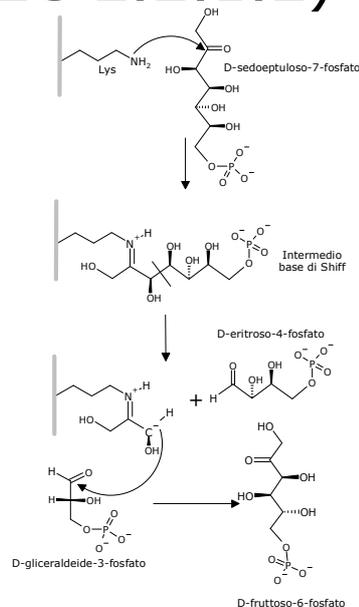
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 239 -

Transaldolasi (EC 2.2.1.2)

- La transaldolasi trasferisce la porzione 3-C (diidrossiacetone) dal sedoeptuloso-7-fosfato alla gliceraldeide-3-fosfato.
- Il gruppo ϵ -aminico della transaldolasi reagisce con il carbonile del sedoeptuloso-7-fosfato.
- Si forma la base di Schiff protonata.
- Si libera l'eritroso-4-fosfato. La base di Schiff stabilizza il carbanione in C3.
- La reazione prosegue con l'attacco del carbanione al carbonile della gliceraldeide-3-fosfato per formare fruttosio-6-fosfato.



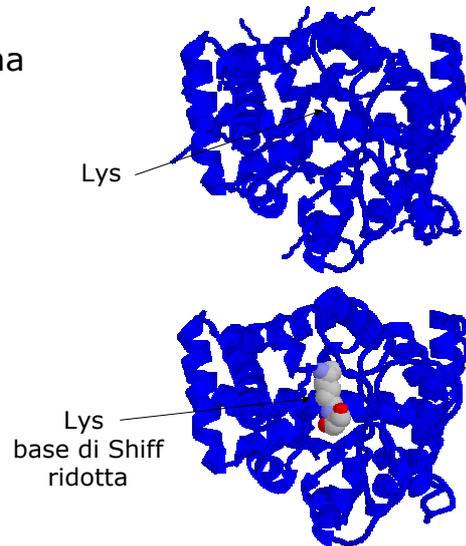
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 240 -

Transaldolasi (EC 2.2.1.2)

- La transaldolasi ha una struttura α,β barrel.



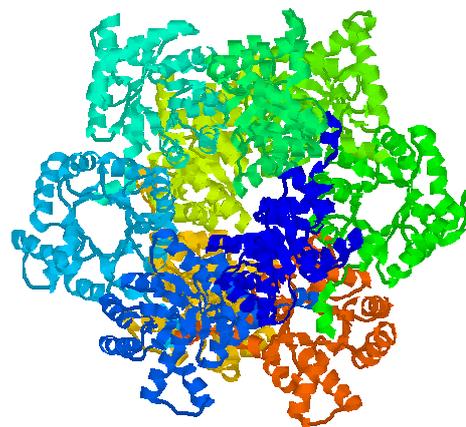
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 241 -

Transaldolasi (EC 2.2.1.2)

- La transaldolasi ha una struttura α,β barrel.



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

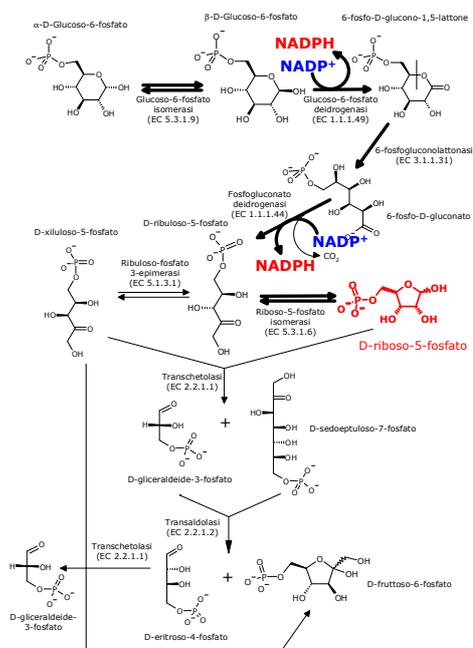
- 242 -

Strategia

- A secondo dei bisogni della cellula per riboso-5-fosfato, NADPH, e ATP, la via dei Pentosi fosfati opera in vari modi per massimizzare la concentrazione dei diversi prodotti.

Sintesi di riboso-5-P e NADPH

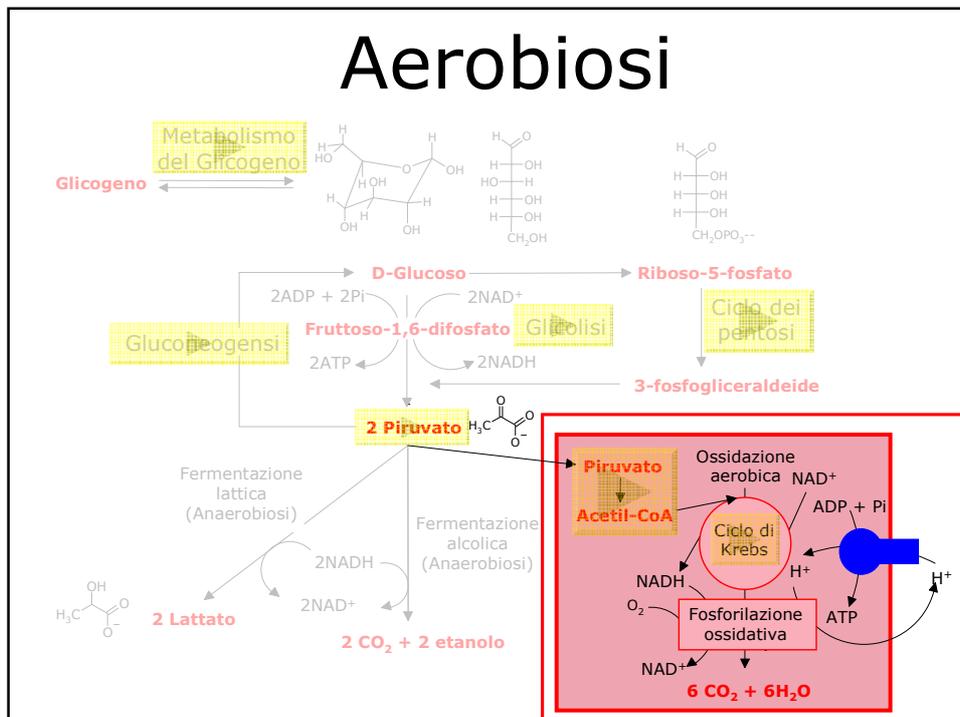
- Duplicazione cellulare.
 - Il ribuloso-5-fosfato viene convertito in riboso-5-fosfato, necessario per la sintesi di nucleotidi e acidi nucleici.
 - Viene anche prodotto del NADPH.



Ossigeno

Aerobiosi e anaerobiosi

◀ Indice



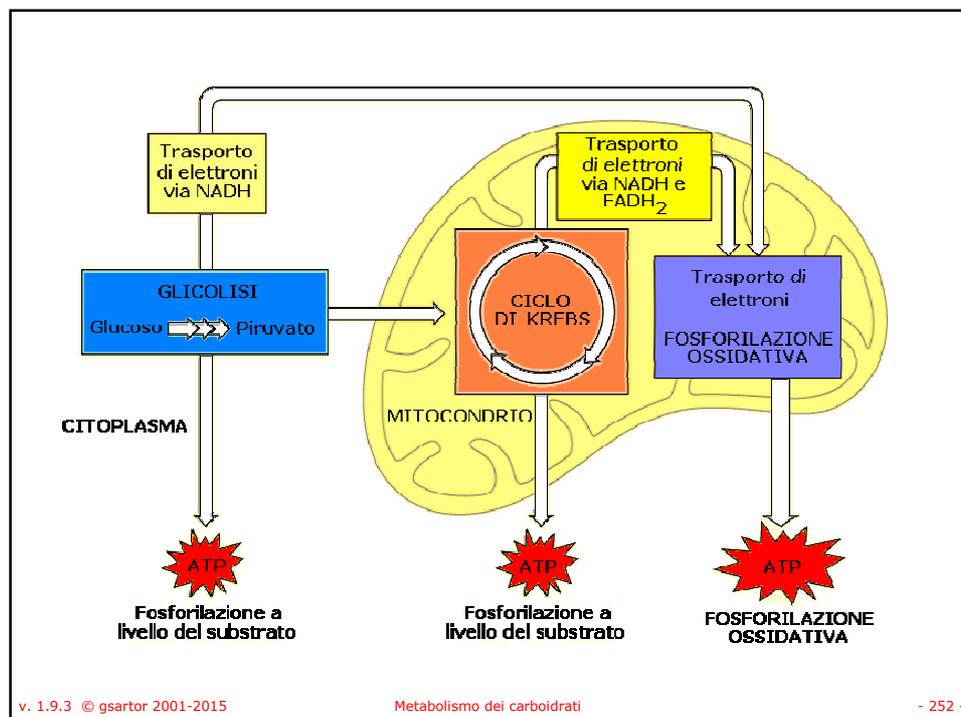
Aerobiosi

- In condizioni aerobiche il piruvato prodotto dalla glicolisi e dalla degradazione degli aminoacidi è ossidato a H_2O e CO_2 nella respirazione cellulare.
- Ciò avviene in tre stadi
 - Produzione di acetil-CoA (decarbossilazione del piruvato)
 - Ossidazione dell'acetil-CoA a CO_2 (Ciclo di Krebs)
 - Trasferimento di elettroni e fosforilazione ossidativa (produzione di H_2O e ATP con consumo di O_2).

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 251 -



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 252 -

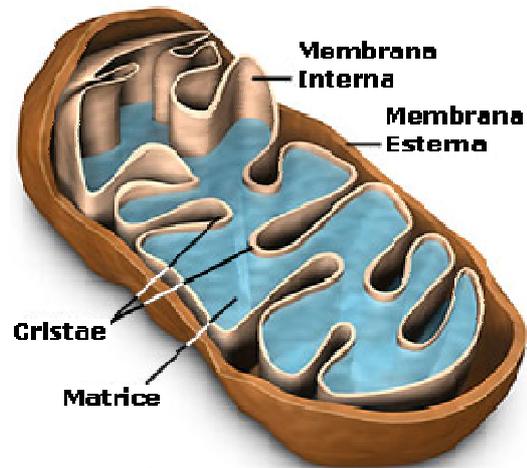
Piruvato deidrogenasi

Produzione di acetil-CoA
(decarbossilazione del piruvato)

Trasporto del piruvato

- Il piruvato è trasportato all'interno della matrice mitocondriale dove viene ossidato ad acetilCoA dal complesso enzimatico piruvato deidrogenasi.
- Il piruvato viene trasportato attraverso la membrana mitocondriale attraverso un trasportatore specifico che lo scambia con ioni OH^- .
- La membrana esterna mitocondriale permette il passaggio a ioni e piccole molecole e contiene canali anionici voltaggio dipendenti (VDAC: voltage dependent anion channels).

Mitocondrio

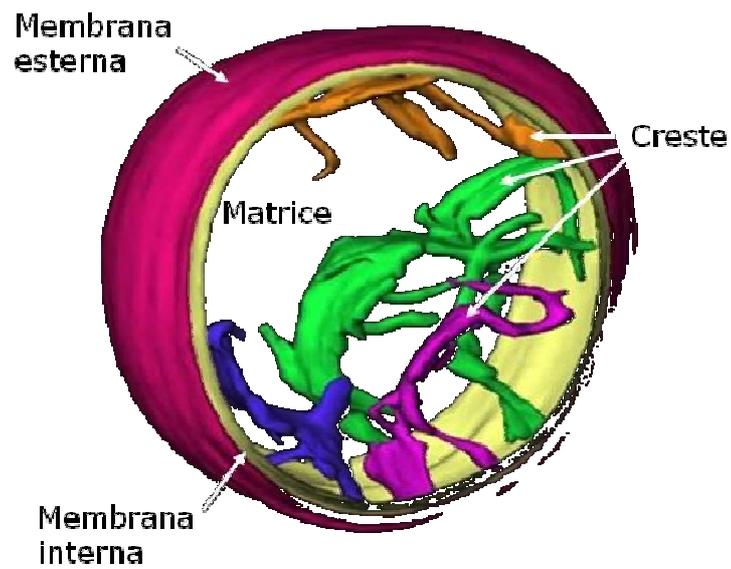


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 255 -

Mitocondrio

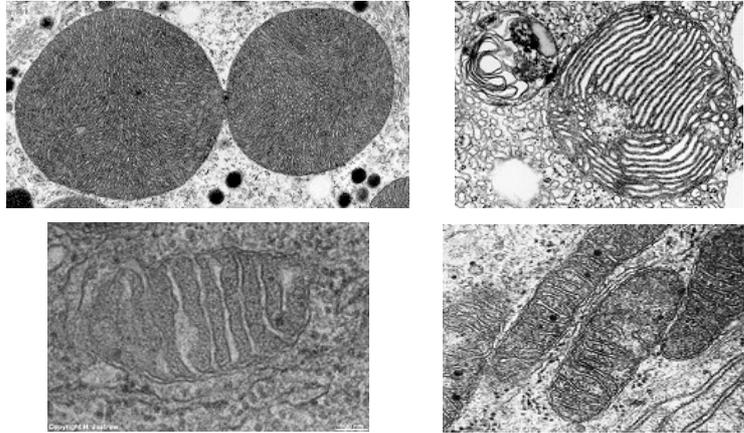


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 256 -

I mitocondri

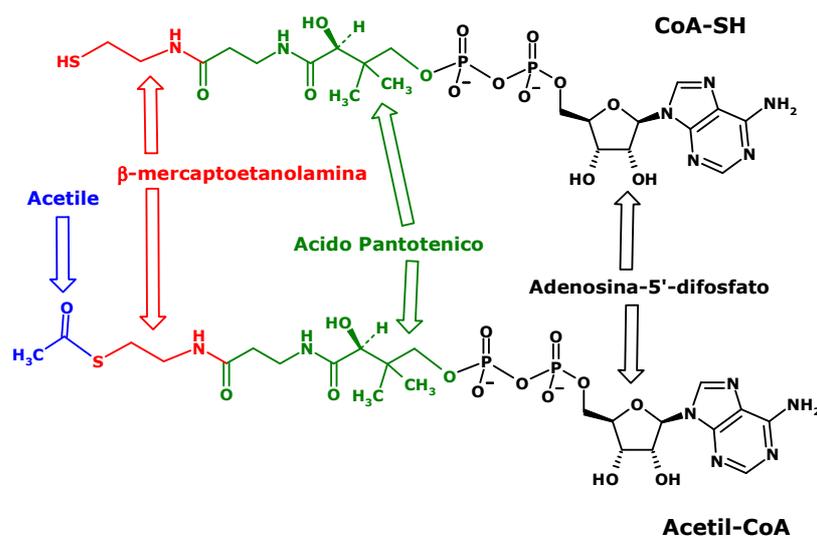


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 257 -

Acetil-CoA

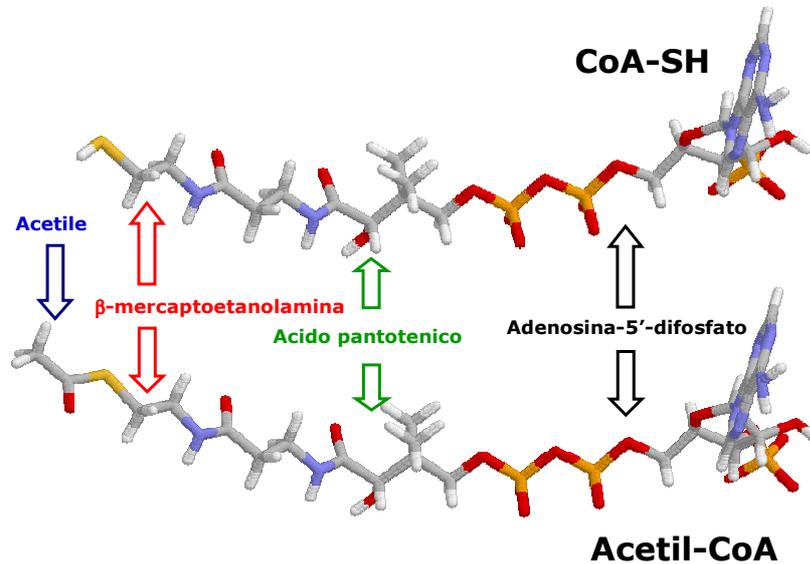


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 258 -

Acetil-CoA



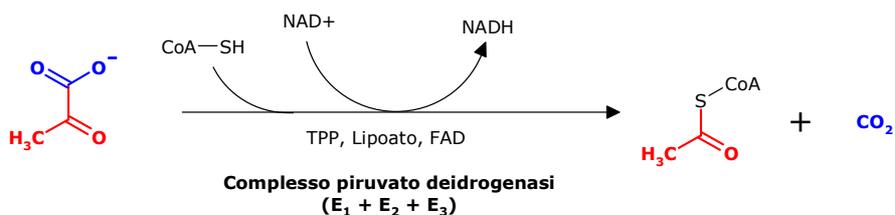
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 259 -

Complesso piruvato deidrogenasi

- Il complesso piruvato deidrogenasi è un gruppo di enzimi associati non covalentemente che catalizzano la decarbossilazione del piruvato e formazione di Acetil-CoA.
- La reazione forma contemporaneamente NADH trasferendo uno ione H^- al NAD^+ .
- Il NADH passa gli elettroni alla catena respiratoria
- La reazione ha un $\Delta G^{\circ'} = -33.4 \text{ kJ/mol}$ (essenzialmente irreversibile).



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 260 -

Complesso piruvato deidrogenasi

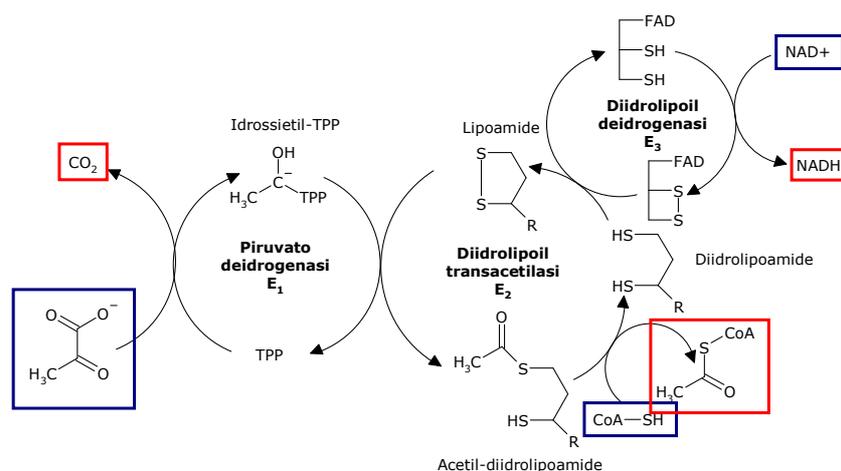
- Il complesso piruvato deidrogenasi catalizza **cinque reazioni** sequenziali, richiede **tre enzimi** e **cinque coenzimi**.
- I cinque coenzimi sono:
 - Il **FAD** e il **NAD⁺** sono trasportatori di elettroni.
 - La **TPP** trasferisce il gruppo acetile al lipoato.
 - Il **lipoato** è trasportatore di elettroni e di acili.
 - Il **CoA** è il trasportatore di acili, lega in modo covalente il gruppo acilico attraverso un legame tioestere ad alta energia.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 261 -

I reagenti e i prodotti

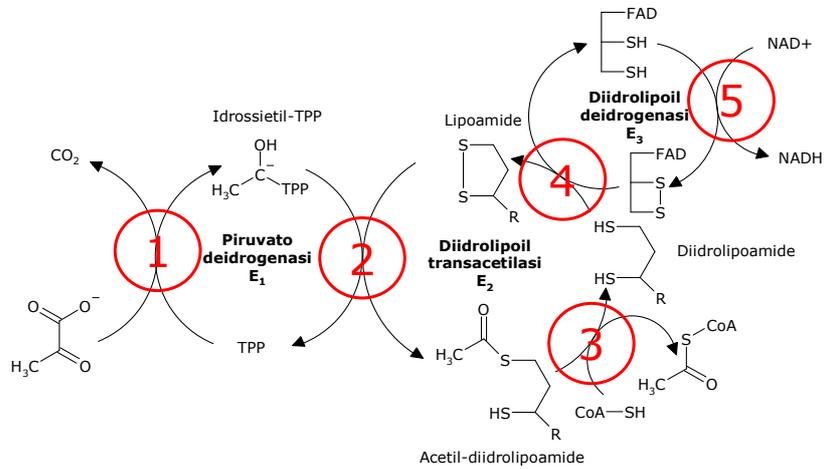


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 262 -

Le cinque reazioni nel **complesso**

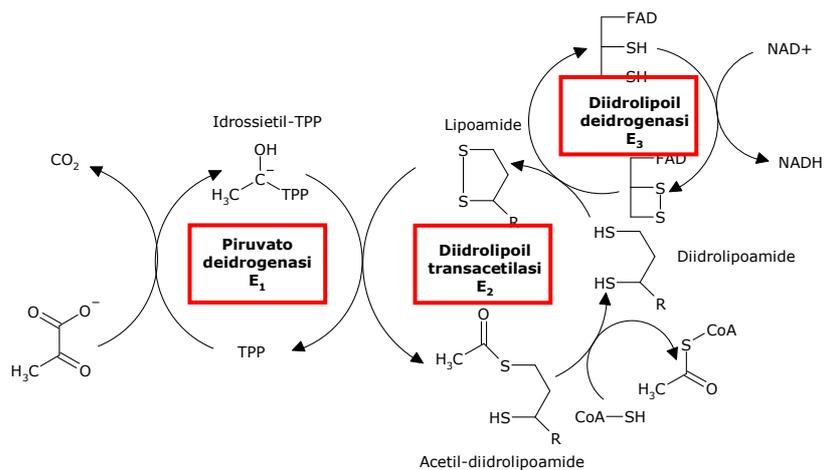


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 263 -

I tre enzimi del **complesso**

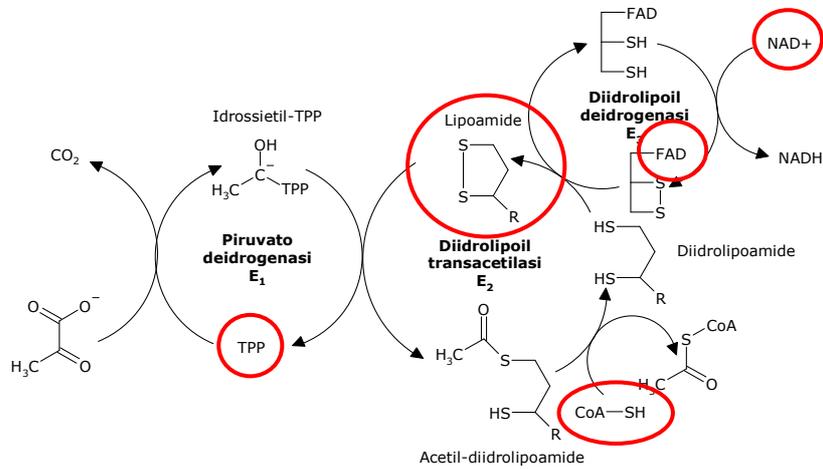


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 264 -

I cinque coenzimi

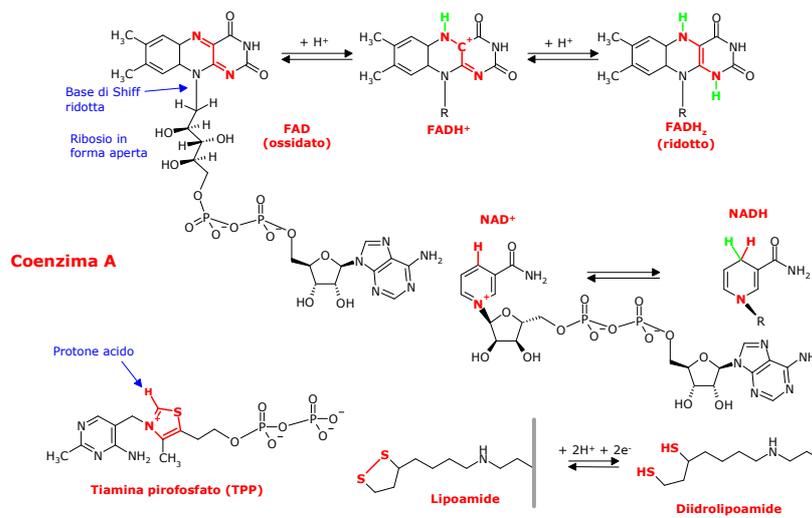


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 265 -

I cinque coenzimi



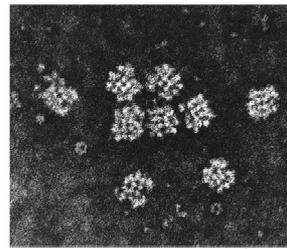
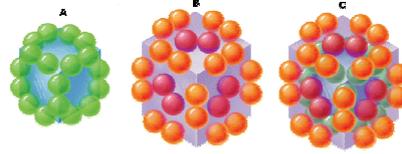
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 266 -

I tre enzimi

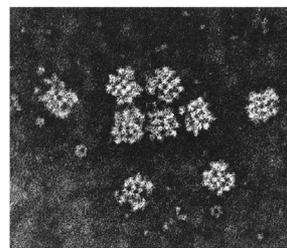
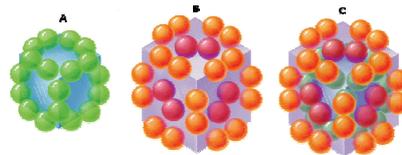
- Il complesso piruvato deidrogenasi PDC consiste in tre enzimi:
 - piruvato deidrogenasi EC 1.2.4.1
 - (E_1 , arancio) (B),
 - diidrolipoil transacetilasi EC 2.3.1.12
 - (E_2 , verde) (A),
 - diidrolipoil deidrogenasi EC 1.8.1.4
 - (E_3 , violetto) (B).
- In *E. coli* il complesso consiste in 24 coppie di E_1 , 24 coppie di E_2 e di 12 coppie di E_3 .
- E_2 funziona come “core” del complesso (C).



0,05 μm

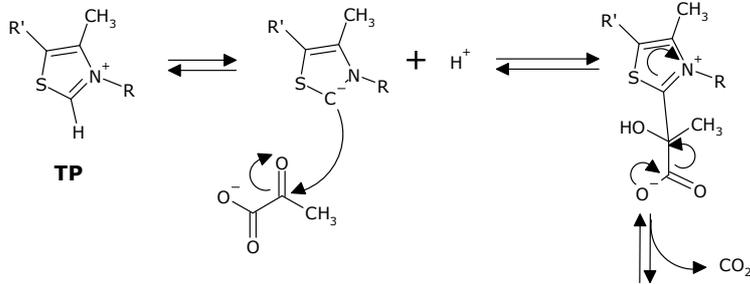
I tre enzimi

- Ogni coppia di E_2 contiene tre molecole di lipoato legate covalentemente.
- Il lipoato ha un braccio flessibile che trasporta le molecole di acetile da un sito attivo ad un altro.
- E_1 ha come coenzima il molecola di TPP ed E_3 ha come coenzima il FAD.

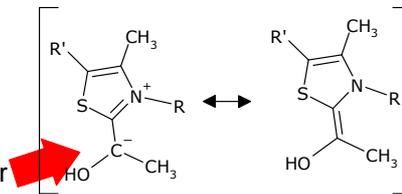


0,05 μm

Piruvato deidrogenasi (E₁)



- Gli intermedi rimangono legati al complesso.
- Il piruvato reagisce con il TPP legato a E₁ e viene decarbossilato al derivato idrossietil-TPP (carbanione reattivo stabilizzato per risonanza).

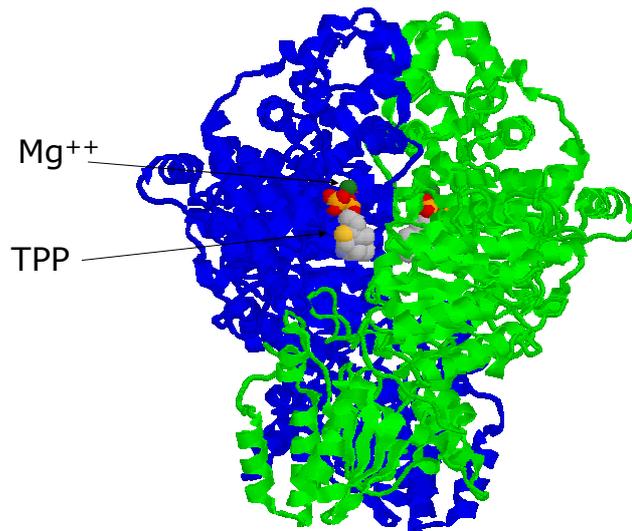


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 269 -

Piruvato deidrogenasi (E₁) EC 1.2.4.1



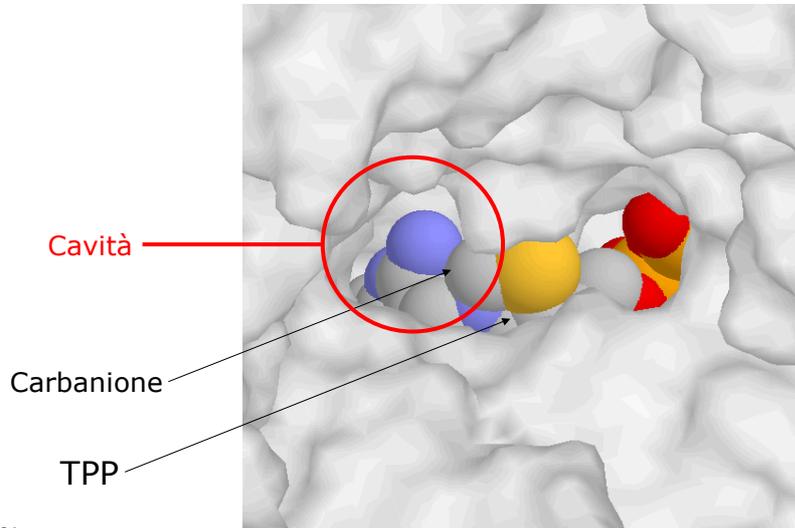
1L8A

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 270 -

Piruvato deidrogenasi (E₁) EC 1.2.4.1



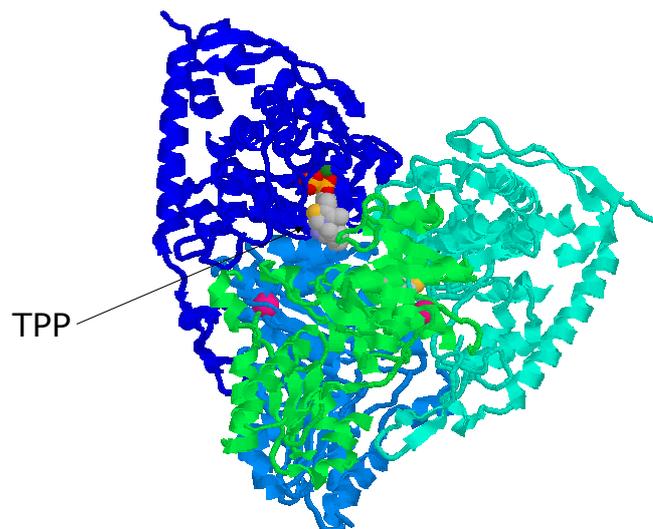
1L8A

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 271 -

Piruvato deidrogenasi (E₁) EC 1.2.4.1



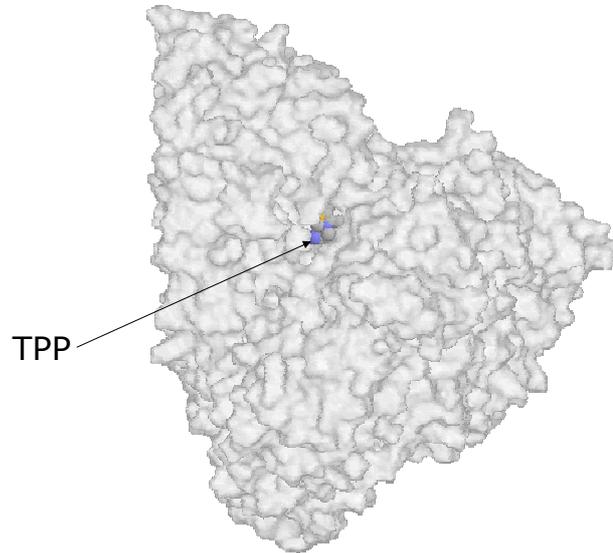
1NI4

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 272 -

Piruvato deidrogenasi (E₁) EC 1.2.4.1



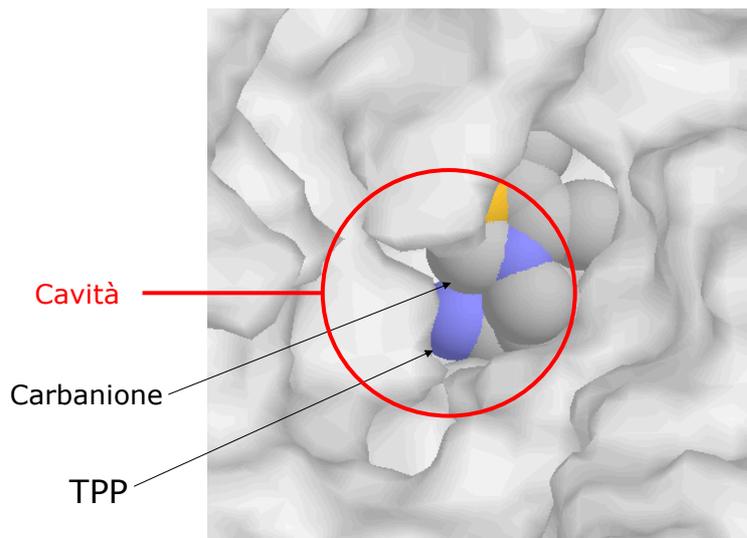
1NI4

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 273 -

Piruvato deidrogenasi (E₁) EC 1.2.4.1



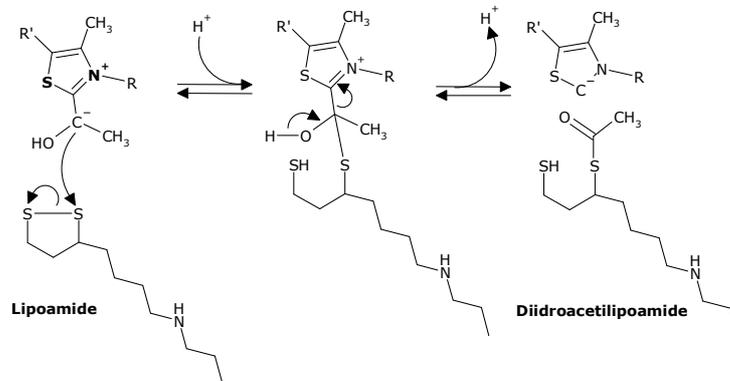
1NI4

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 274 -

Diidrolipoil transacetilasi (E₂)



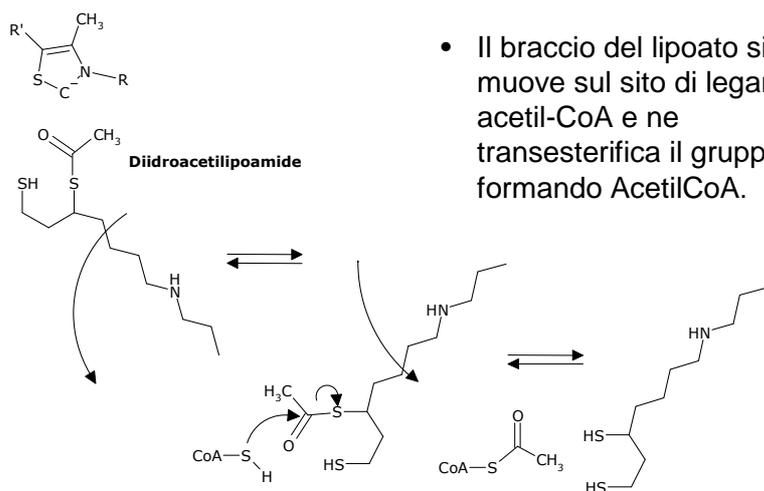
- Il gruppo idrossietile derivato da idrossietil-TPP è trasferito al lipoato (legato ad una His di E₂) come acetile, attraverso l'attacco nucleofilo del carbanione sull'atomo di zolfo della lipoamide.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 275 -

Diidrolipoil transacetilasi (E₂)



- Il braccio del lipoato si muove sul sito di legame del acetil-CoA e ne transesterifica il gruppo SH formando AcetilCoA.

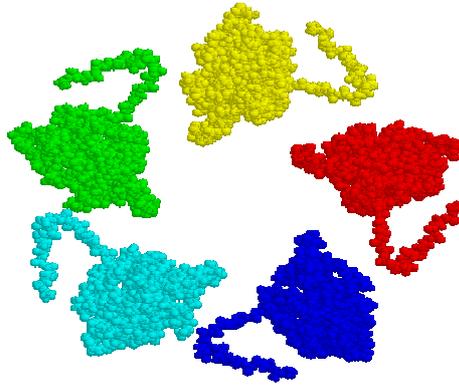
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 276 -

Diidrolipoil transacetilasi (E₂) EC 2.3.1.12

Dominio catalitico



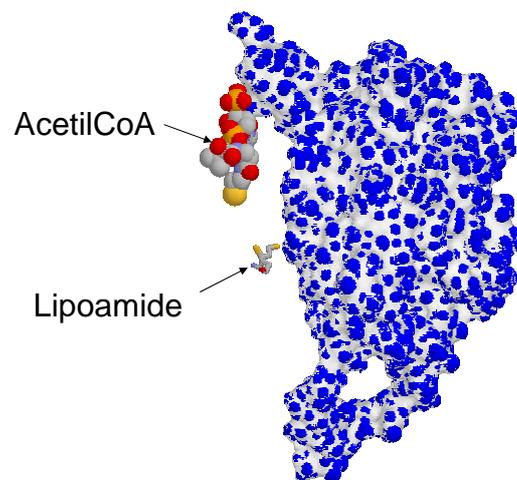
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 277 -

Diidrolipoil transacetilasi (E₂) EC 2.3.1.12

Dominio catalitico

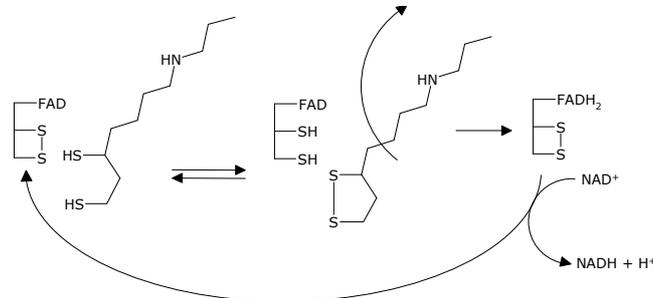


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 278 -

Diidrolipoil deidrogenasi (E₃)



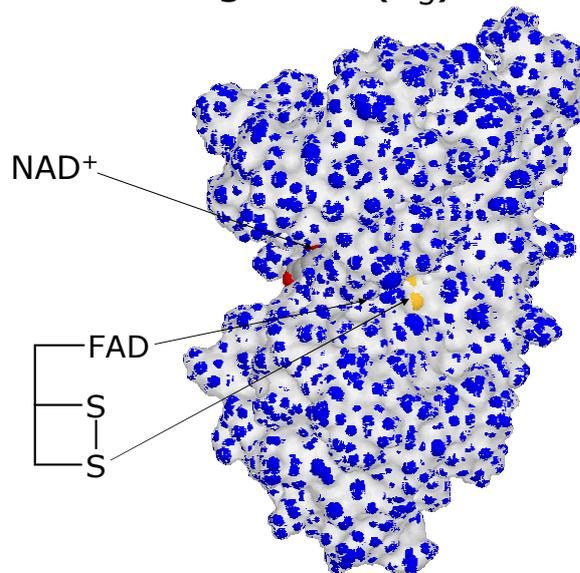
- Il lipoato ridotto viene riossidato dall'E₃ utilizzando il FAD che si riduce a FADH₂.
- Il FADH₂ viene riossidato dal NAD⁺ che si riduce a NADH e H⁺
- Si rigenera la piruvato deidrogenasi

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 279 -

Diidrolipoil deidrogenasi (E₃) EC 1.8.1.4



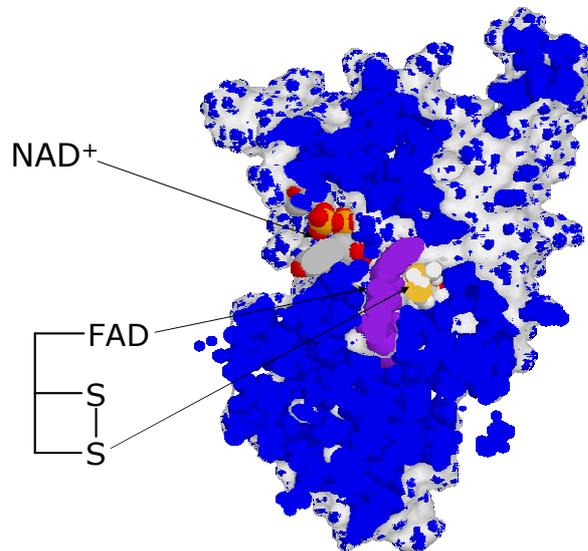
1LPV

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 280 -

Diidrolipoil deidrogenasi (E_3) EC 1.8.1.4



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 281 -

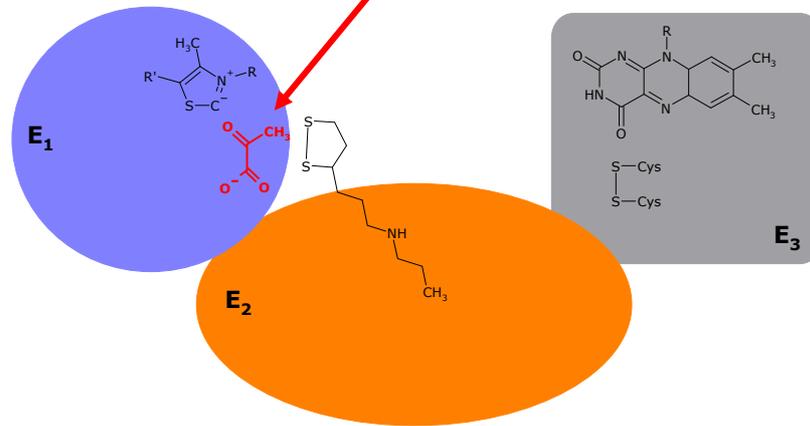
- La diidrolipoil transacetilasi (E_2) è centrale in questo meccanismo.
- Il braccio flessibile del lipoato:
 - lega il gruppo acetile e lo trasferisce al CoA e
 - accetta due elettroni dalla piruvato deidrogenasi (E_1) e li trasferisce al diidrolipoil deidrogenasi (E_3).

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 282 -

Legame del piruvato

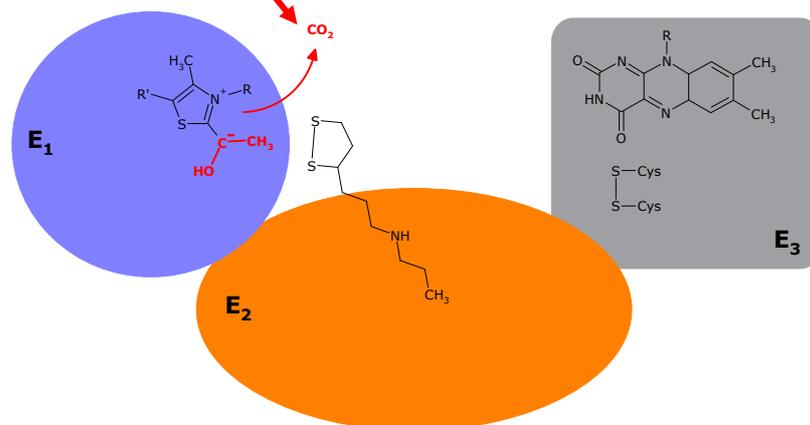


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 283 -

Decarbossilazione del piruvato

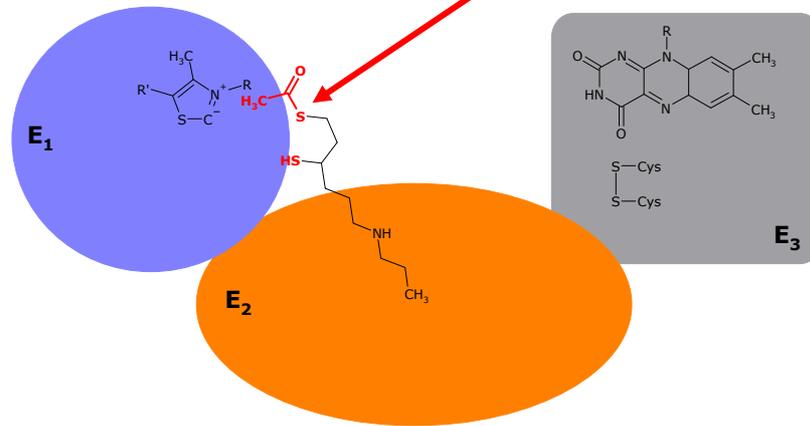


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 284 -

Formazione di diidroacetillipoamide

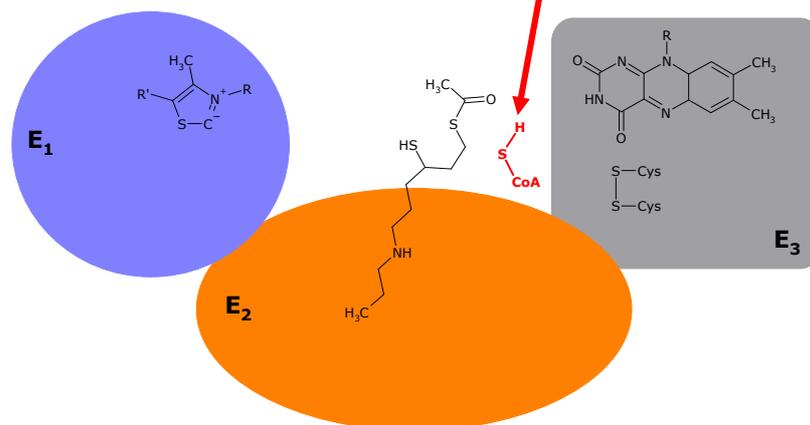


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 285 -

Legame del Coenzima A

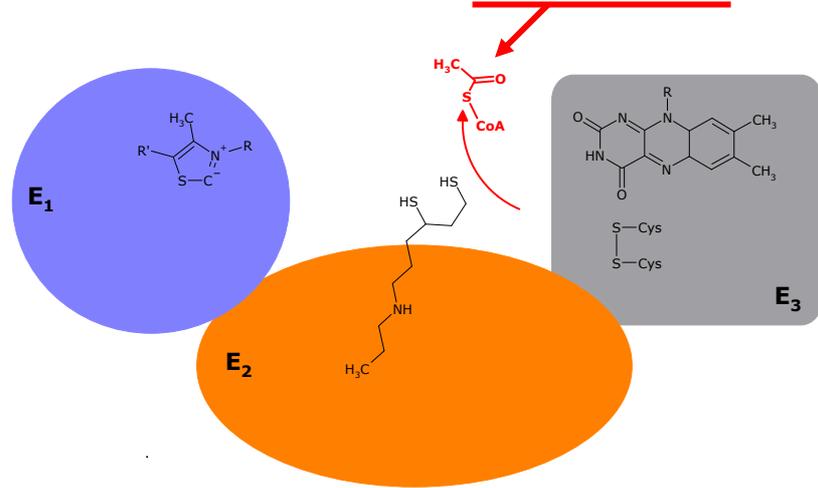


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 286 -

Formazione di Acetil-CoA

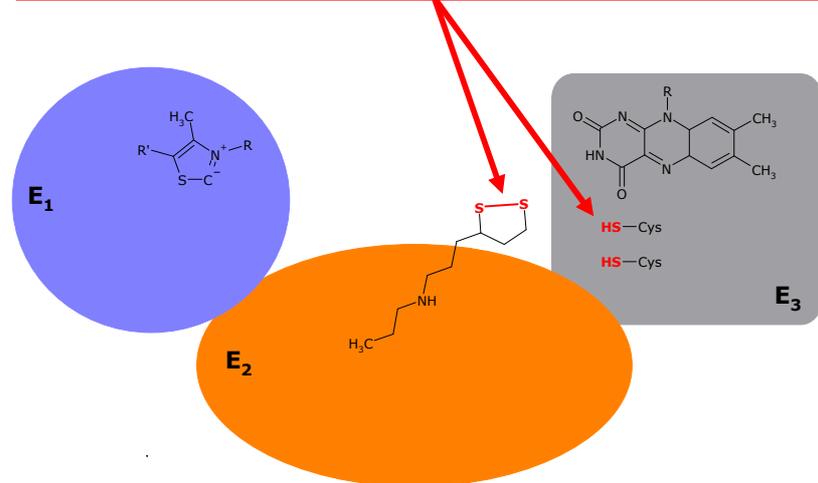


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 287 -

Ossidazione della diidrolipoamide

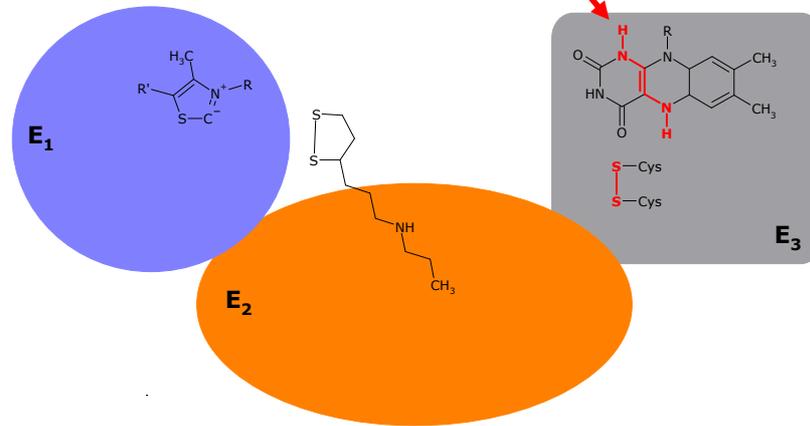


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 288 -

Riduzione del FAD

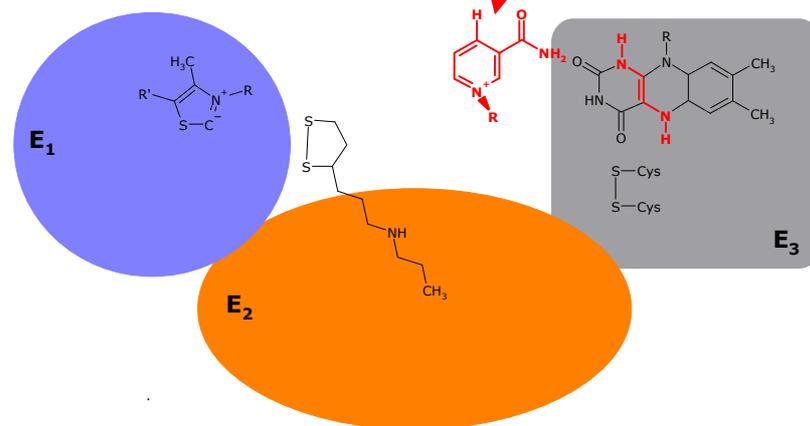


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 289 -

Legame del NAD⁺

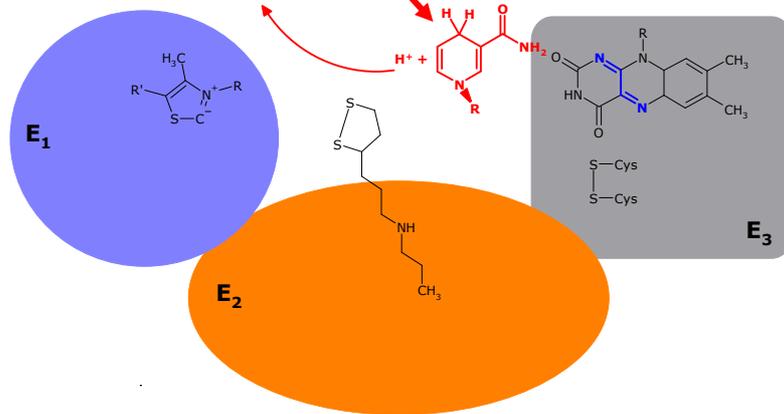


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 290 -

Riduzione del NAD⁺

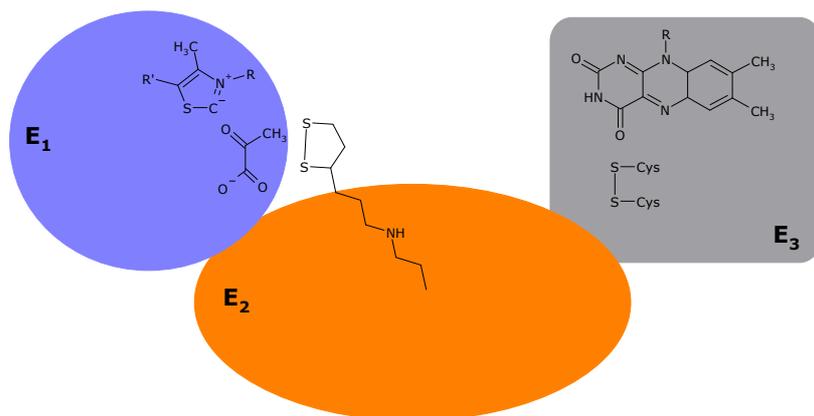


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 291 -

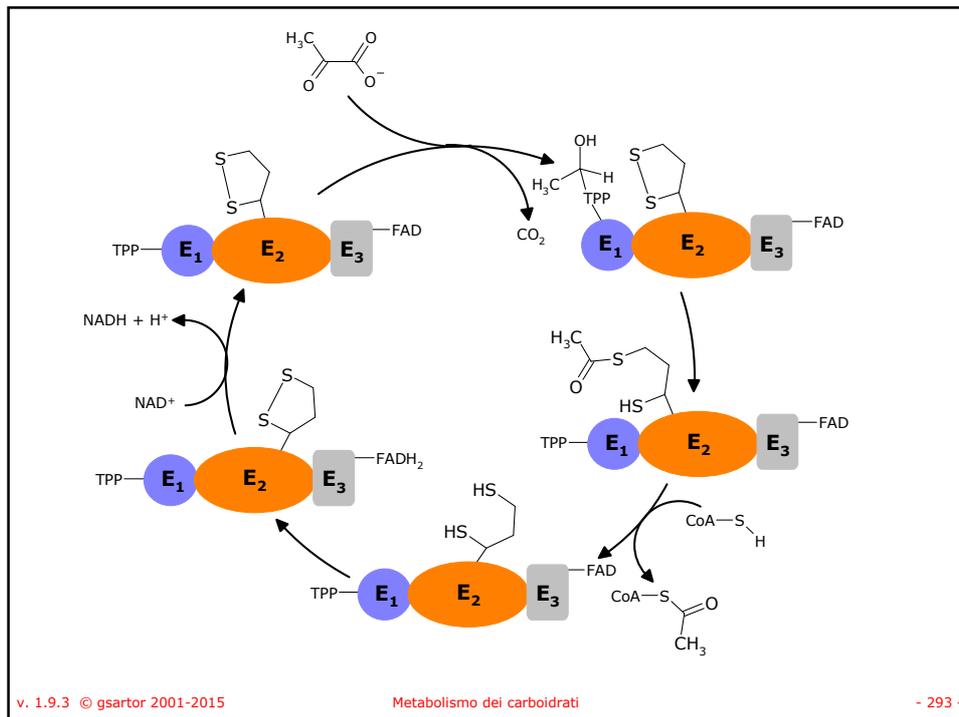
Ritorno al punto di partenza



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

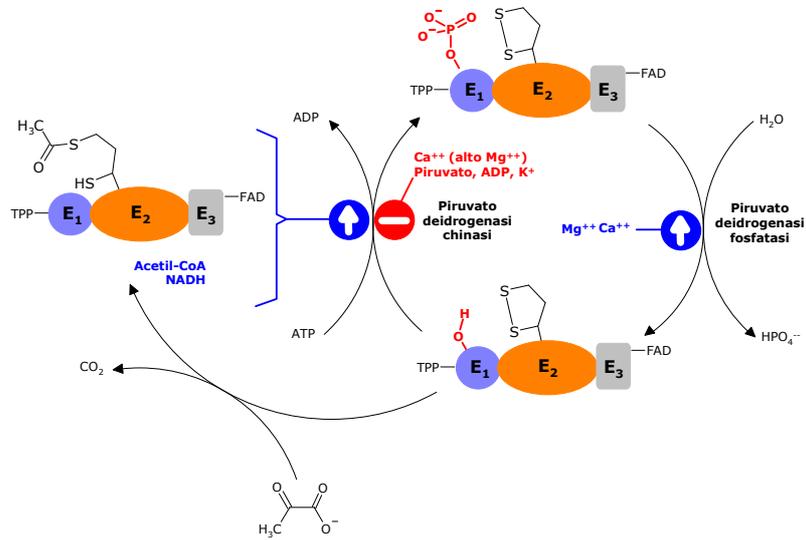
- 292 -



Controllo della piruvato deidrogenasi

- Inibizione competitiva da prodotti
 - NADH compete con NAD⁺ in E₃
 - Acetil-CoA compete con CoA-SH in E₂
- La concentrazione dei due coenzimi regola anche la direzione della catalisi di E₂ e E₃.
- Negli eucarioti E₁ può essere fosforilato da una chinasi attivata dalla forma acetilata di E₂
- La forma fosforilata di E₁ è inattiva mentre la forma defosforilata è attiva.

Controllo della piruvato deidrogenasi

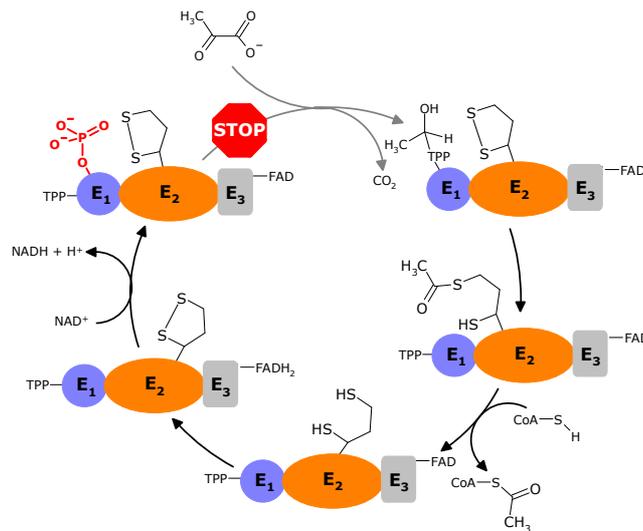


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 295 -

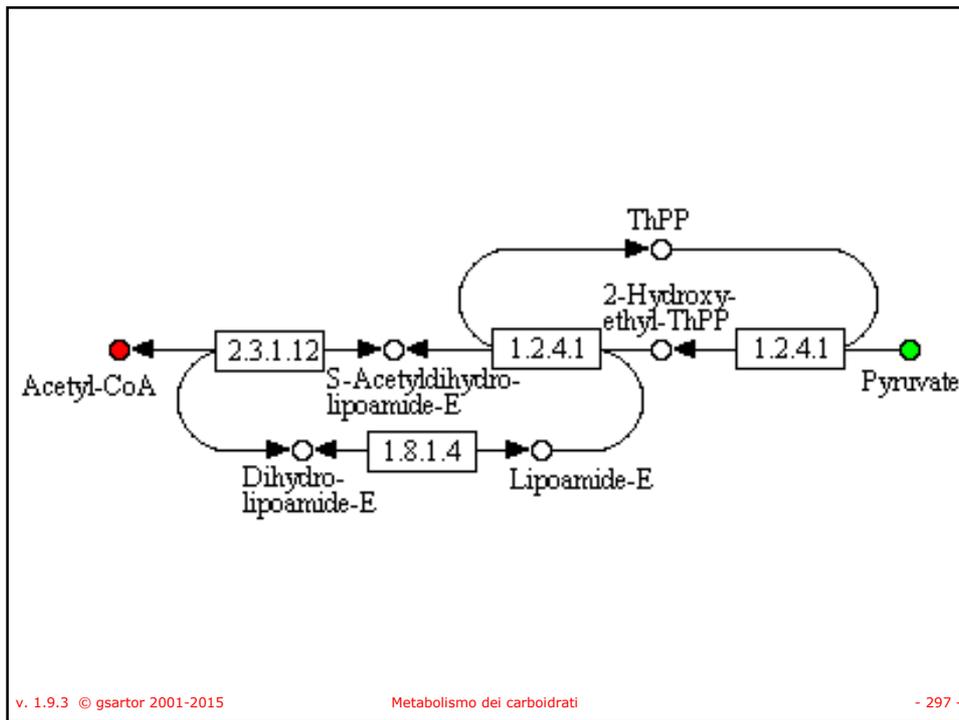
Controllo della piruvato deidrogenasi



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 296 -



Ciclo di Krebs

Ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)

Ciclo dell'acido citrico

Ossidazione dell'acetyl-CoA a CO₂

[Indice](#)

Krebs e Lipmann

Premio Nobel per la Medicina 1953

"for his discovery of the citric acid cycle"

"for his discovery of co-enzyme A and its importance for intermediary metabolism"



Hans Adolf Krebs



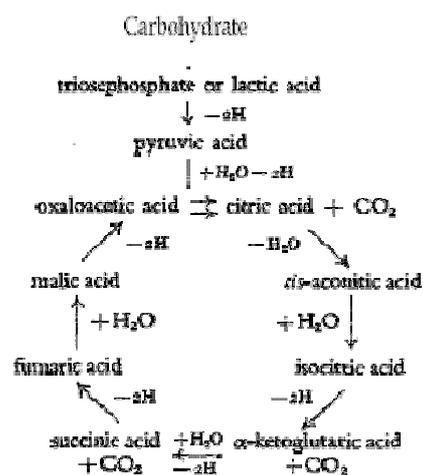
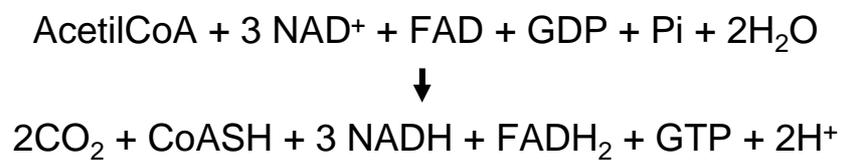
Fritz Albert Lipmann

Ciclo di Krebs

- Il ciclo di Krebs è al centro del metabolismo.
- Le vie degradative (catabolismo) lo alimentano, le vie sintetiche (anabolismo) ne usano i componenti.
- È una via "**ANFIBOLICA**", opera infatti sia nel catabolismo che nell'anabolismo cellulare.

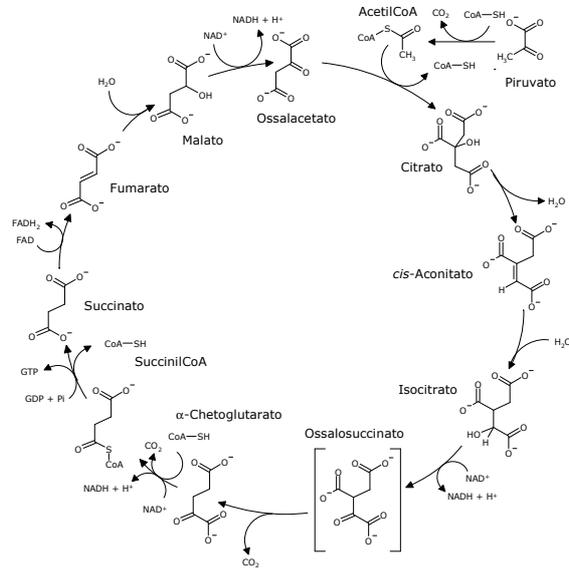
Ciclo di Krebs

- Tutte le reazioni avvengono nella matrice mitocondriale.
- Nei mitocondri vi sono anche gli enzimi della fosforilazione ossidativa e quelli della ossidazione degli acidi grassi e degli aminoacidi.



Krebs and Johnson (1937) "The role of citric acid in the intermediate metabolism in animal tissues".
Enzymologica 4:148-156.

Ciclo di Krebs

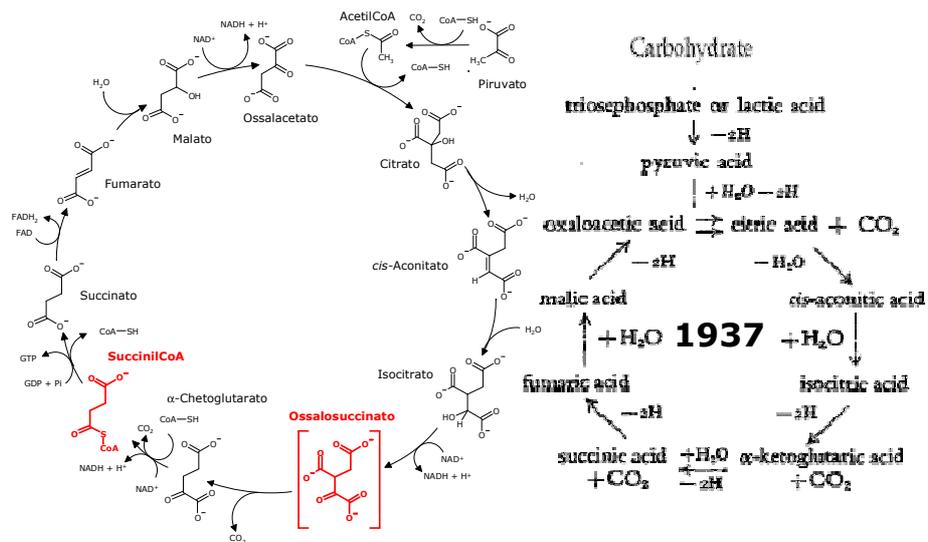


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 303 -

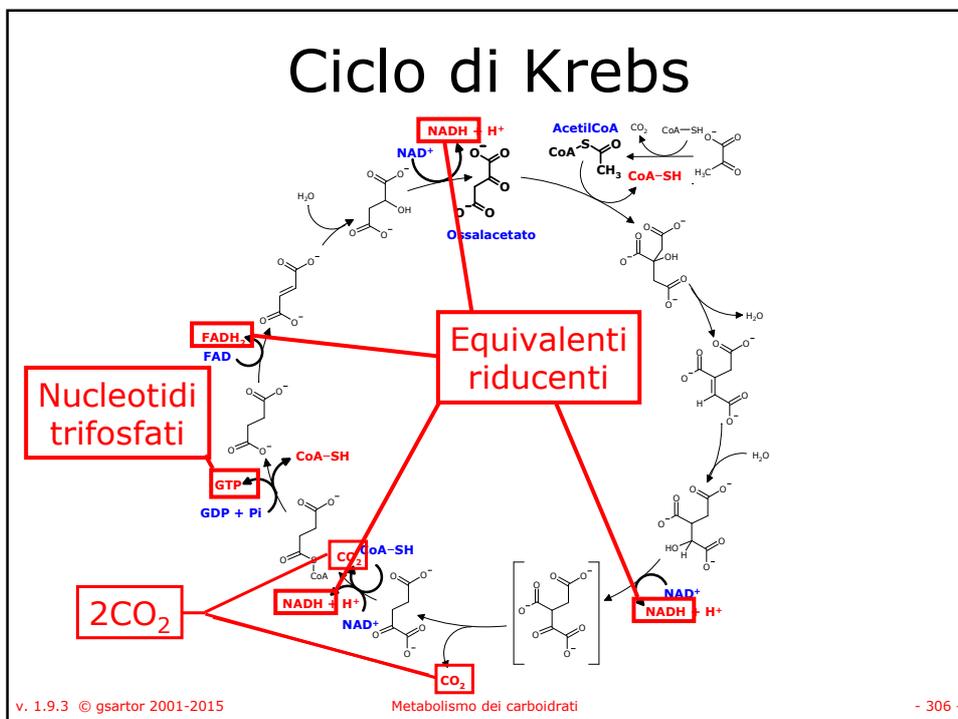
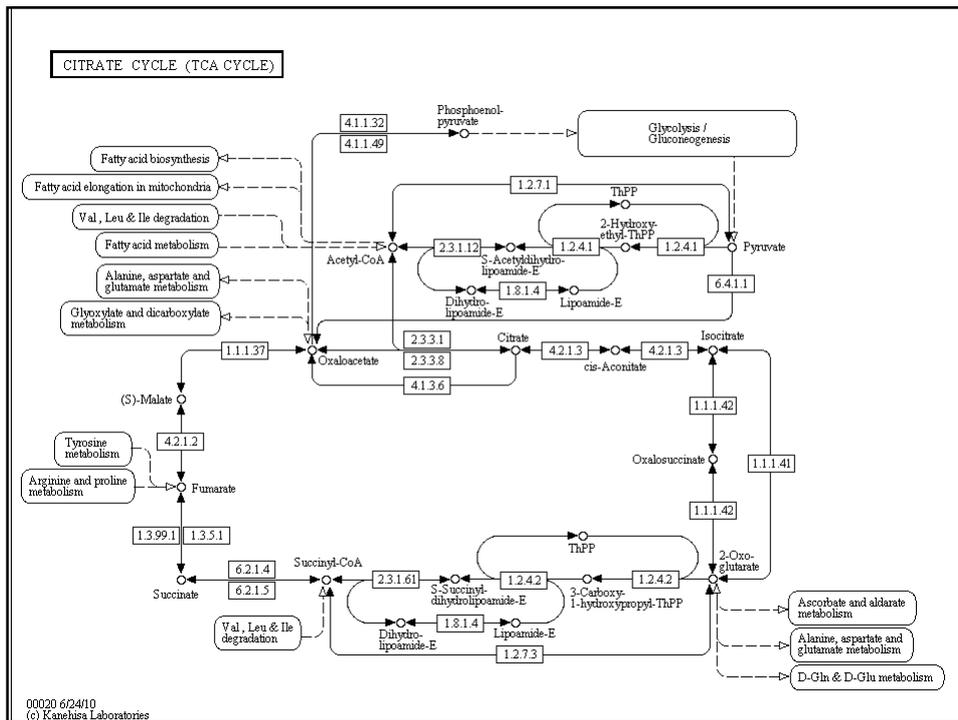
Ciclo di Krebs



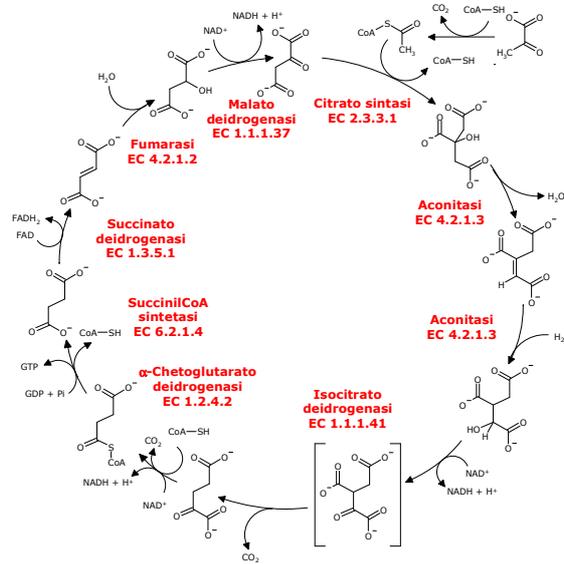
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 304 -



Ciclo di Krebs

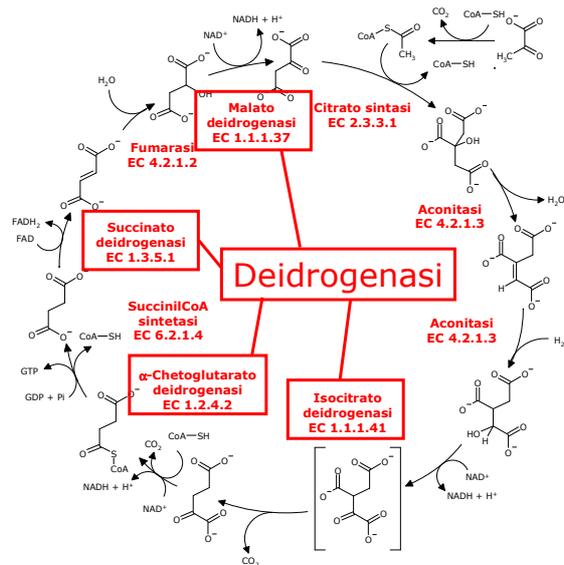


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 307 -

Ciclo di Krebs

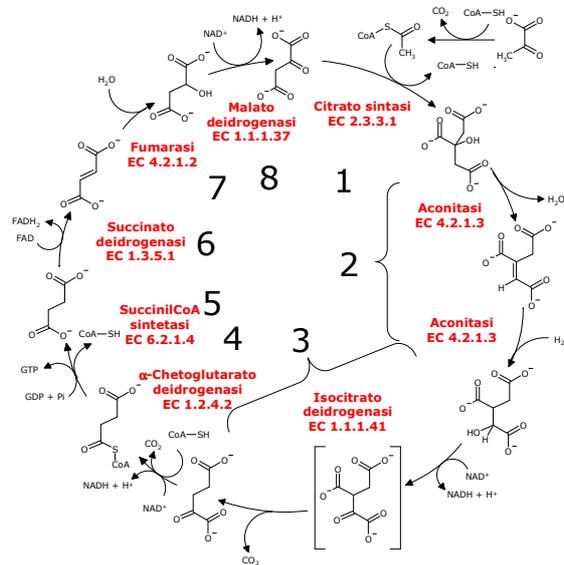


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 308 -

Ciclo di Krebs

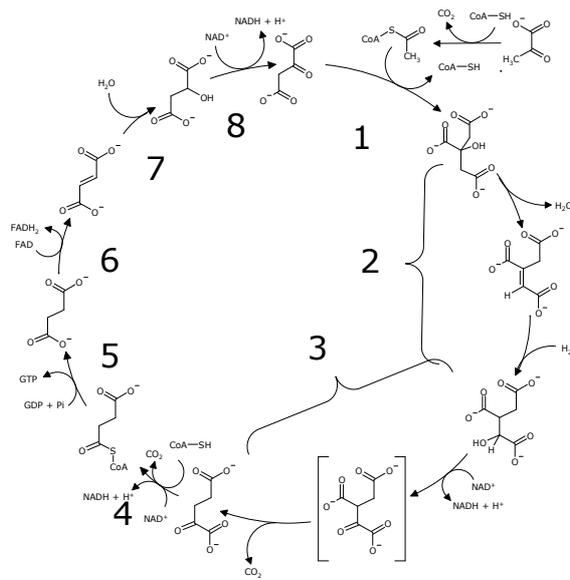


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 309 -

Ciclo di Krebs

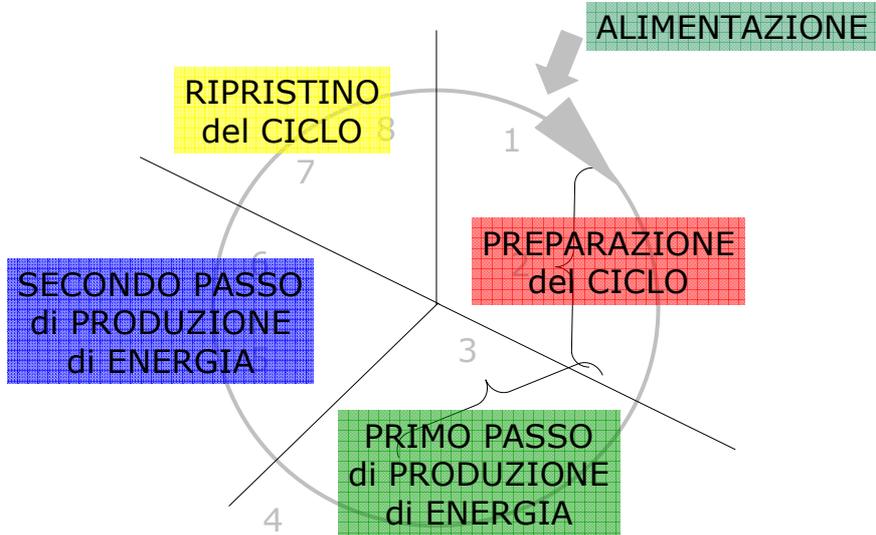


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 310 -

Ciclo di Krebs

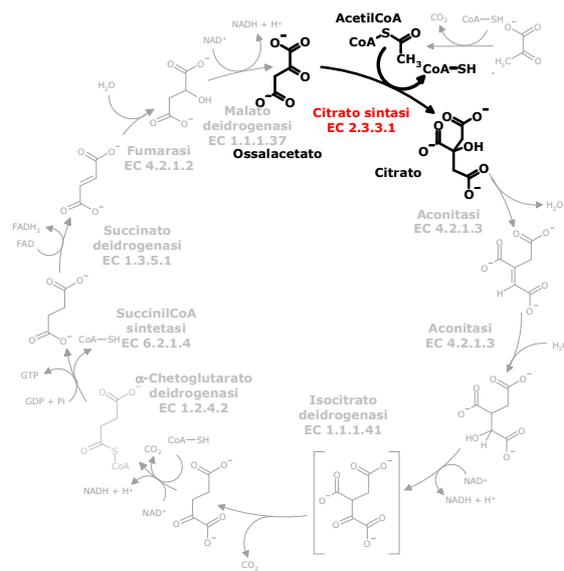


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 311 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)

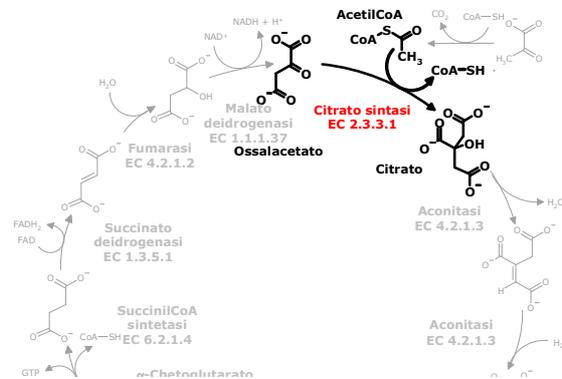


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 312 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)



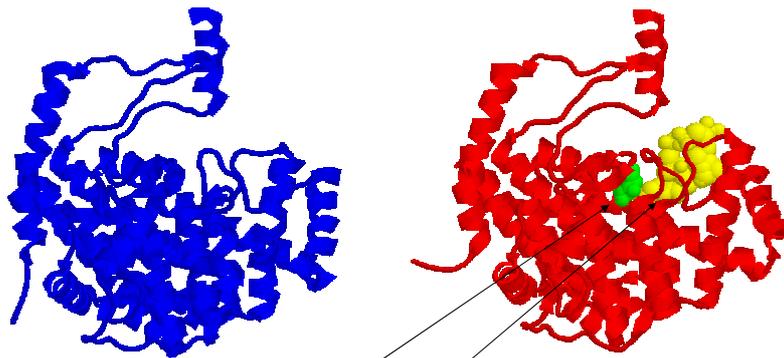
- Quando lega ossalacetato cambia conformazione,
- Si crea il sito per acetil-CoA,
- L'ossalacetato non è più accessibile all'acqua.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 313 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)



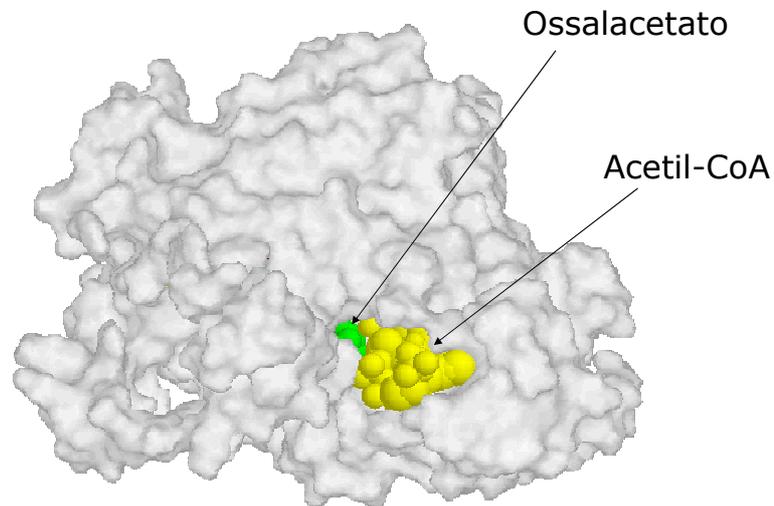
- Quando lega ossalacetato cambia conformazione,
- Ci crea il sito per acetil-CoA,
- L'ossalacetato non è più accessibile all'acqua.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 314 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)



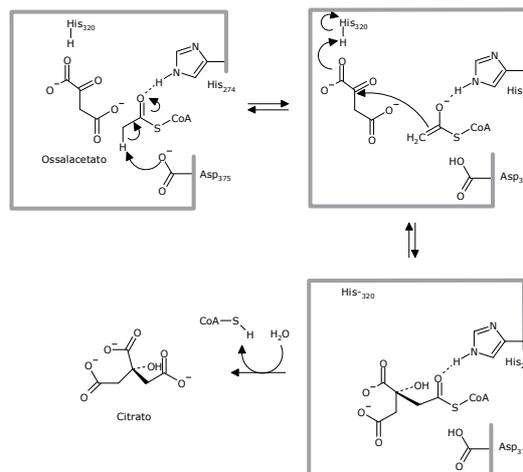
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 315 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)

- La condensazione del ossalacetato con acetil-CoA porta alla formazione di citril-CoA
- È una catalisi acido base che coinvolge His274 e Asp375.
- L'idrolisi del legame tioestere nel citril-CoA porta alla formazione di citrato e CoA-SH.
- La reazione è spontanea a causa dell'idrolisi del legame tioestere (-31.5 kJ/mol) che coinvolge His-320.



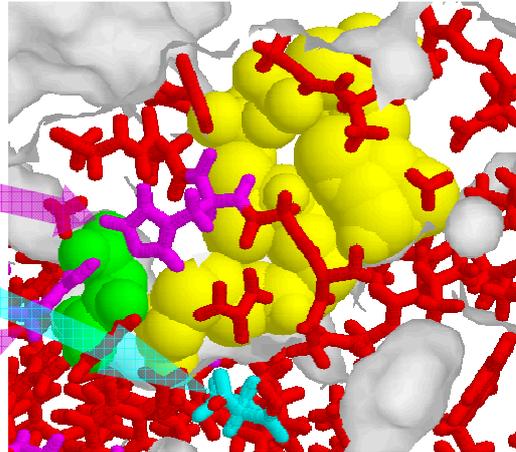
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 316 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)

- La condensazione del ossalacetato con acetil-CoA porta alla formazione di citril-CoA
- È una catalisi acido base che coinvolge His274 e Asp375.
- L'idrolisi del legame tioestere nel citril-CoA porta alla formazione di citrato e CoA-SH.
- La reazione è spontanea a causa dell'idrolisi del legame tioestere (-31.5 kJ/mol) che coinvolge His-320.

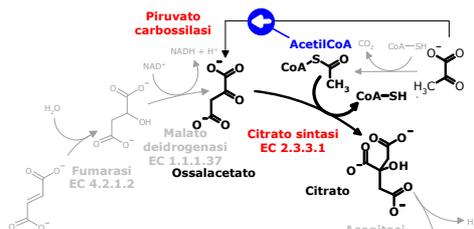


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 317 -

Citrato sintasi (EC 2.3.3.1)



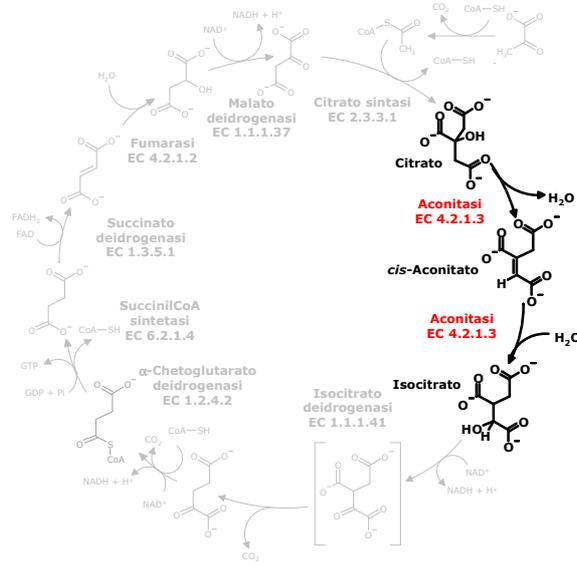
- La regolazione della citrato sintasi è data dalla disponibilità di substrati,
- La concentrazione di ossalacetato è limitante,
- L'ossalacetato è anche substrato della gluconeogenesi,
- In mancanza di ossalacetato si accumula Acetil-CoA,
- La presenza di Acetil-CoA stimola la piruvato carbossilasi a produrre ossalacetato.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 318 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)



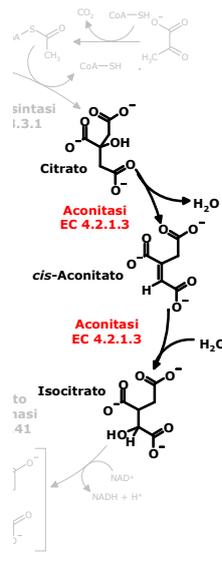
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 319 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

- Catalizza la conversione stereospecifica del citrato in isocitrato attraverso una deidratazione e una reidratazione,
 - L'intermedio cis-aconitato non è rilasciato dal sito attivo,
 - Nel sito attivo vi è un cluster FeS (Fe_4S_4)
 - Tre degli ioni Fe sono complessati da un S di tre Cys, il quarto è il sito che lega il substrato.
- Il ΔG della reazione è positivo, il prodotto viene rimosso, il ΔG si avvicina a zero a concentrazioni reali.

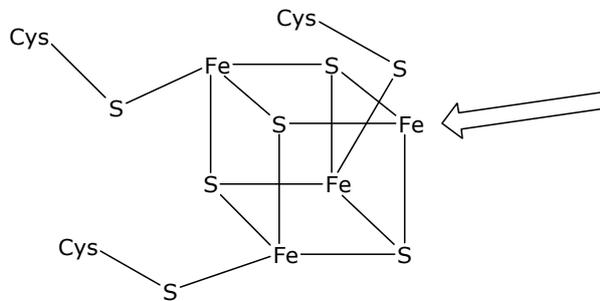


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 320 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

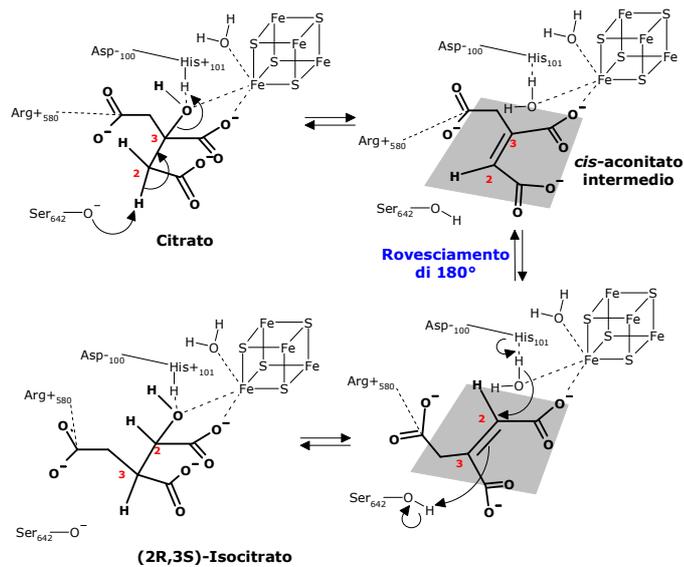


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 321 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

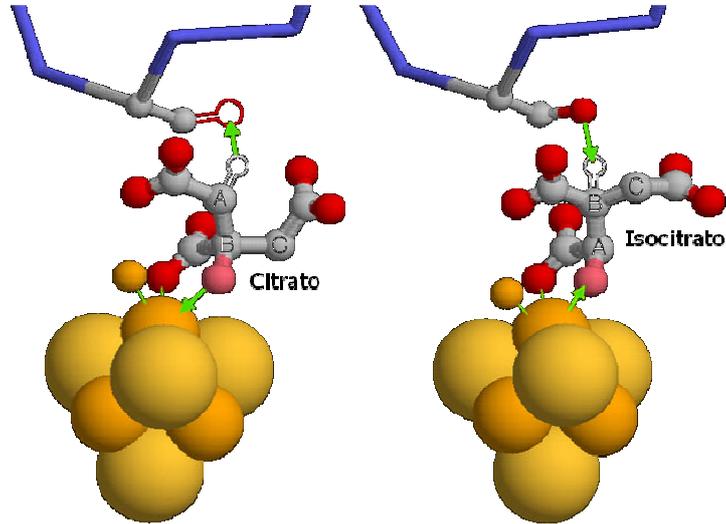


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 322 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

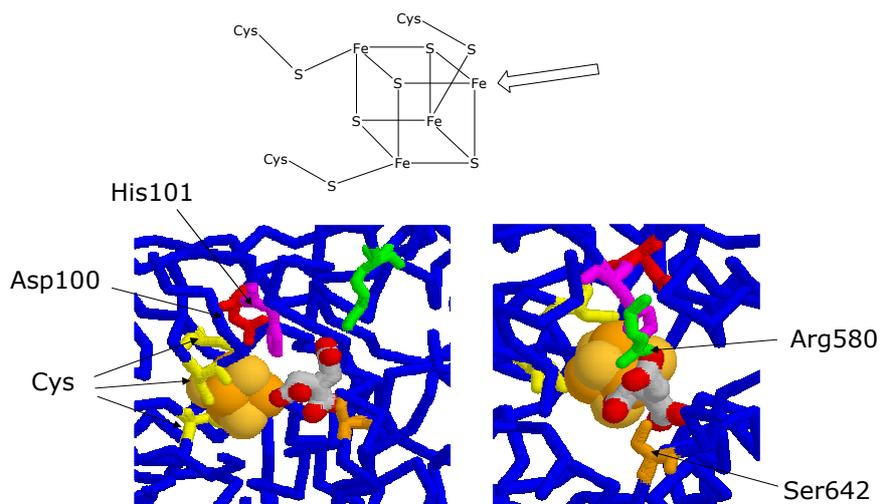


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 323 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

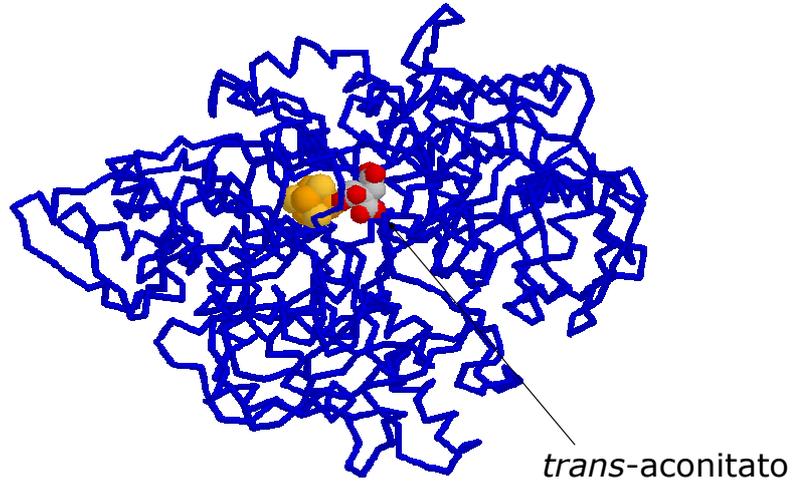


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 324 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

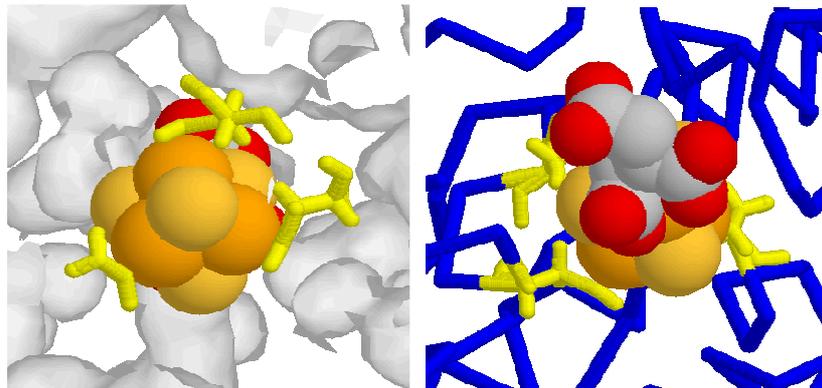


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 325 -

Aconitasi (EC 4.2.1.3)

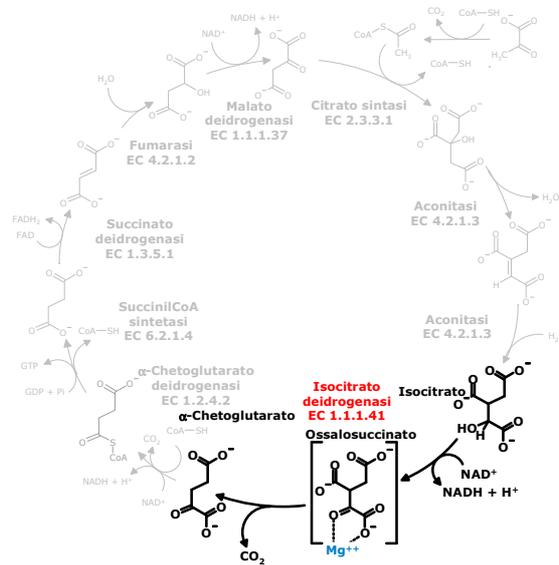


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 326 -

Isocitrato deidrogenasi (EC 1.1.1.41)



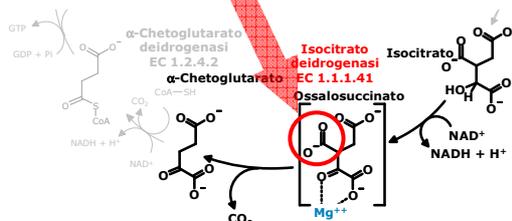
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 327 -

Isocitrato deidrogenasi (EC 1.1.1.41)

- Catalizza la decarbossilazione ossidativa del isocitrato,
- La porzione nicotinamidica del NAD⁺ (o del NADP⁺ in un isoenzima) ossida il gruppo OH a carbonile,
- Si forma l'intermedio ossalosuccinato nel quale vi è l'interazione con lo ione Mg⁺⁺ (Mn⁺⁺),
- Il gruppo COO⁻ non interessato nella formazione del complesso esce come CO₂,
- Si forma α-chetoglutarato.



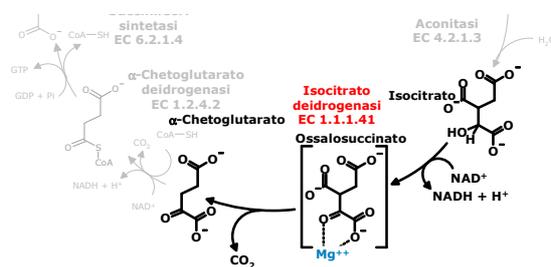
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 328 -

Isocitrato deidrogenasi (EC 1.1.1.41)

- La reazione è altamente spontanea, sia il processo di decarbossilazione che quello di ossidazione sono spontanei ($\Delta G^{o'} = -20.9 \text{ kJ/mol}$).
- L'isocitrato deidrogenasi è regolata:
 - Attivata allostericamente da ADP (ATP antagonista)
 - Attivata da Ca^{++} e NAD^+ (NADH antagonista)
 - Quando il rapporto ATP/ADP è basso il ciclo di Krebs è attivo.

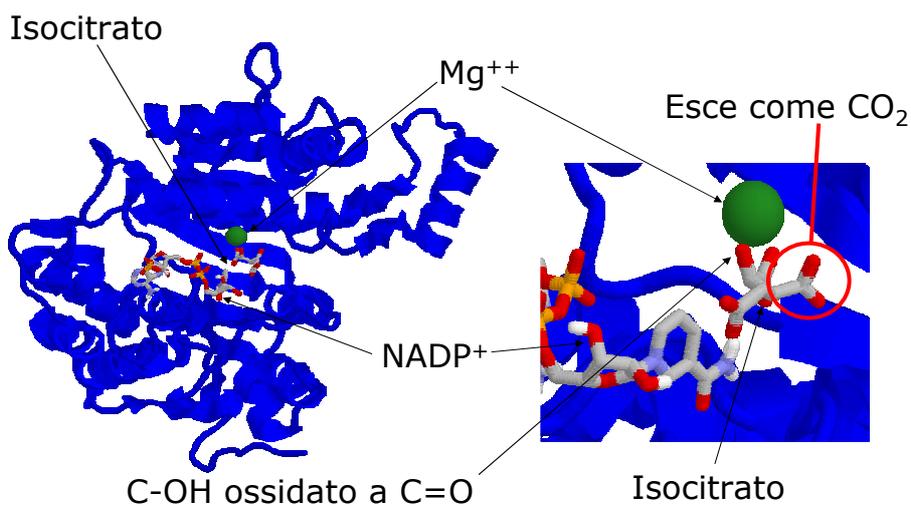


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 329 -

Isocitrato deidrogenasi (EC 1.1.1.41)

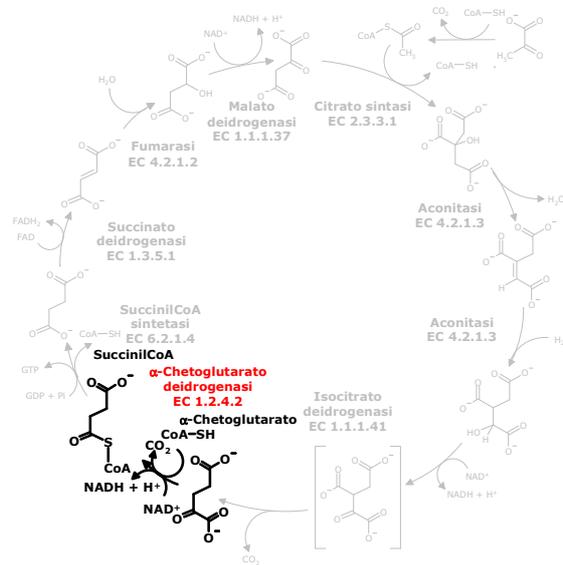


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 330 -

α -chetogluturato deidrogenasi (EC 1.2.4.2)



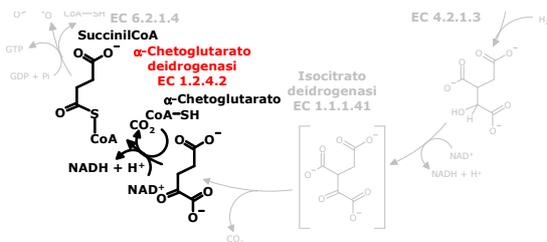
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 331 -

α -chetogluturato deidrogenasi (EC 1.2.4.2)

- È un complesso enzimatico che converte l' α -chetogluturato a succinil-CoA e CO_2 .
- La reazione produce NADH e conserva l'energia nel legame tioestere
- La reazione è spontanea ($\Delta G^{\circ'} = -33.5 \text{ kJ/mol}$).
- Meccanismo quasi identico a quello del complesso piruvato deidrogenasi (E_1, E_2, E_3)
 - E_2 ed E_3 sono conservati nei due complessi enzimatici,
 - E_1 ha diversa specificità di substrato.

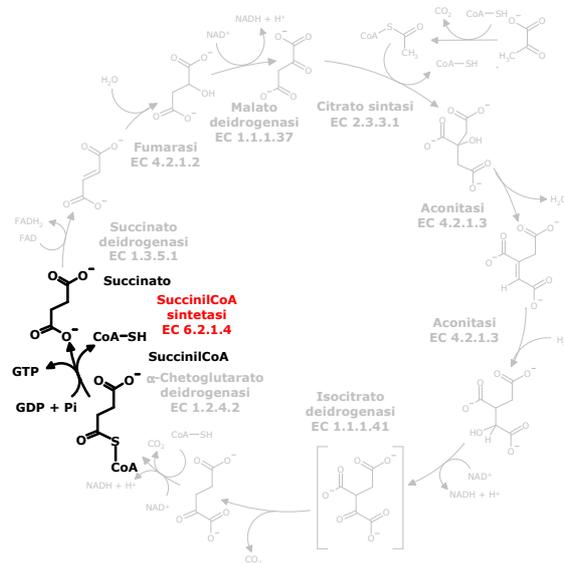


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 332 -

SuccinilCoA sintetasi (EC 6.2.1.4)

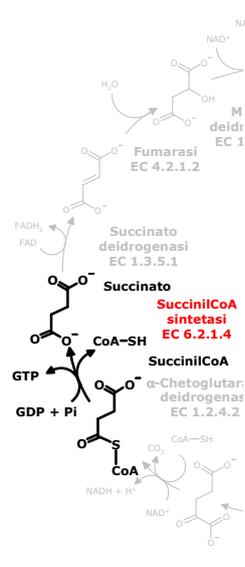


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 333 -

SuccinilCoA sintetasi (EC 6.2.1.4)



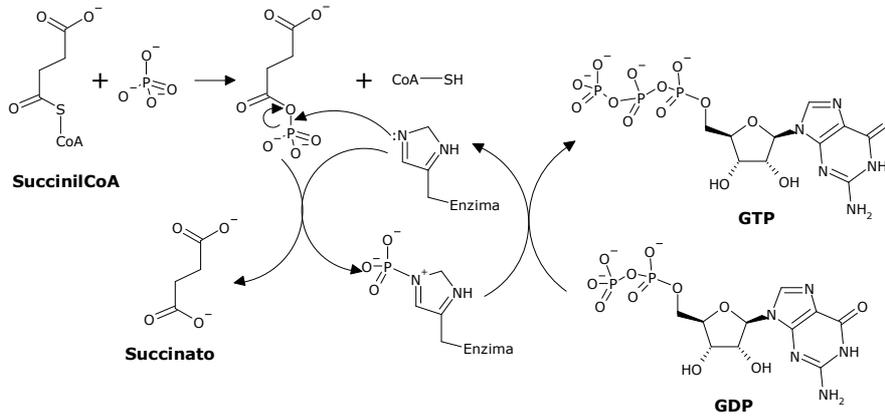
- Converte il succinil-CoA in succinato e produce GTP (ATP) da GDP (ADP) e Pi.
- L'enzima è fosforilato in una His.
- È un eterodimero:
 - La subunità α contiene il sito di fosforilazione (His) e lega CoA.
 - La subunità β dà la specificità per ATP o GTP.
- La reazione è vicina all'equilibrio ($\Delta G^{\circ} = -2.9$ kJ/mol).

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 334 -

Meccanismo

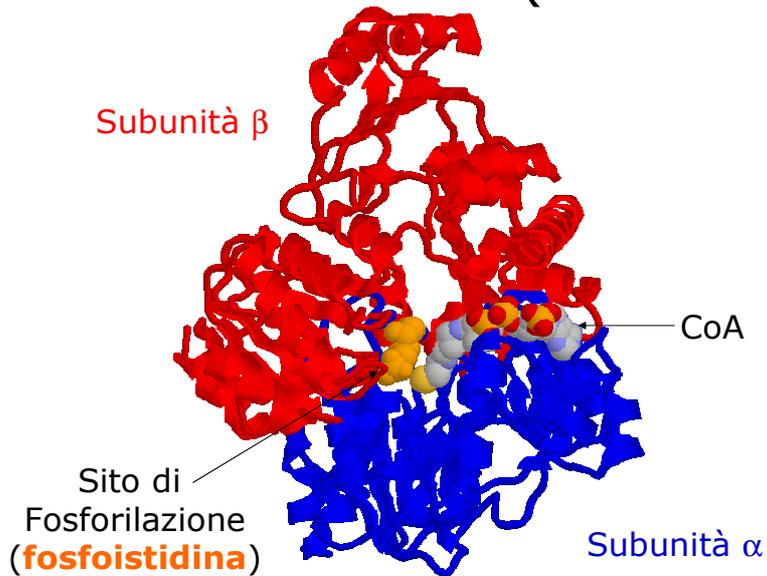


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 335 -

SuccinilCoA sintetasi (EC 6.2.1.4)

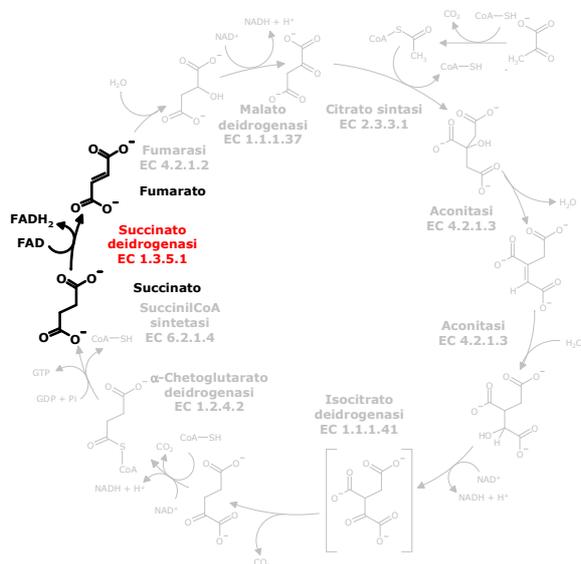


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 336 -

Succinato deidrogenasi (EC 1.3.5.1)



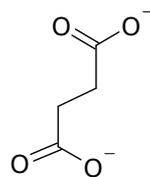
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

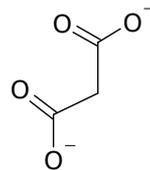
- 337 -

Succinato deidrogenasi (EC 1.3.5.1)

- Per completare il ciclo il succinato deve venire convertito in ossalacetato.
- Il succinato è deidrogenato a fumarato stereospecificamente dalla flavoproteina succinato deidrogenasi con produzione di FADH_2 .
- La succinato deidrogenasi è il solo enzima di membrana del ciclo di Krebs.
- Gli elettroni passano dal succinato al FAD, che è legato covalentemente alla proteina attraverso un residuo di His.
- Il FADH_2 è riossidato a FAD dal Coenzima Q nella catena di trasporto degli elettroni.
- Il malonato, strutturalmente analogo al succinato, è un forte inibitore competitivo e blocca il ciclo.



Succinato



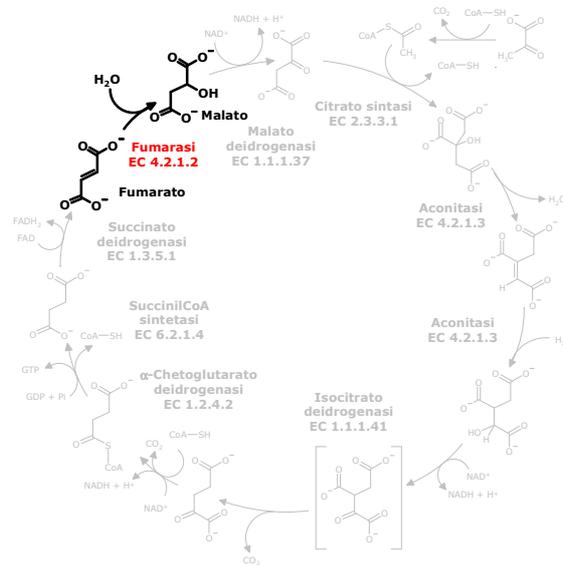
Malonato

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 338 -

Fumarasi (EC 4.2.1.2)

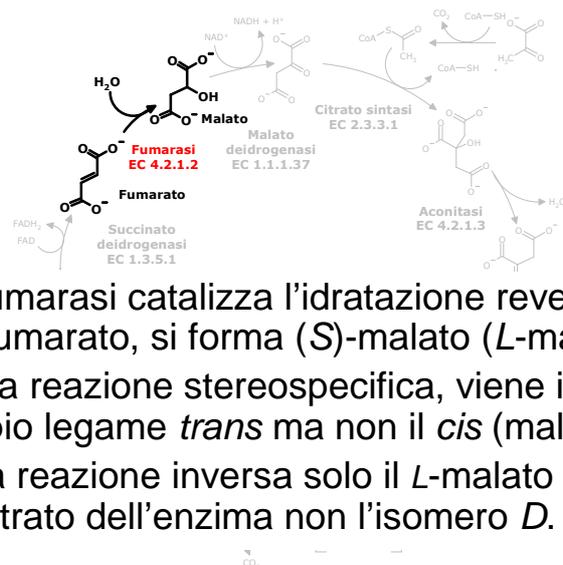


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 339 -

Fumarasi (EC 4.2.1.2)



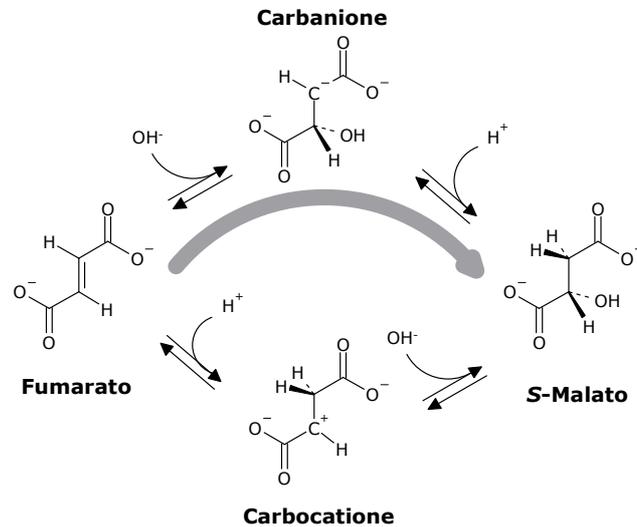
- La fumarasi catalizza l'idratazione reversibile del fumarato, si forma (S)-malato (L-malato).
- È una reazione stereospecifica, viene idratato il doppio legame *trans* ma non il *cis* (maleato).
- Nella reazione inversa solo il L-malato è substrato dell'enzima non l'isomero D.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 340 -

Meccanismo

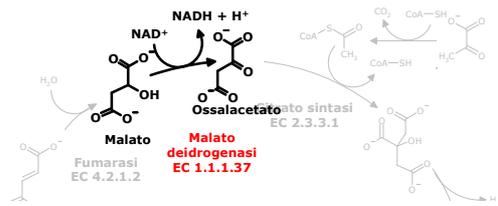


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 341 -

Malato deidrogenasi (EC 1.1.1.37)



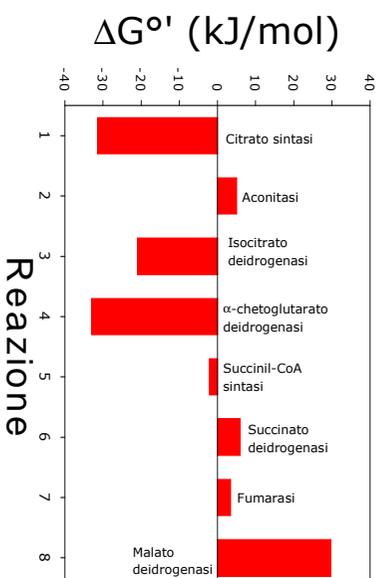
- La L-malato deidrogenasi ossida il malato a ossalacetato rigenerando il composto di partenza del ciclo e producendo NADH.
- La reazione è sfavorita ($\Delta G^{\circ'} = 29.7 \text{ kJ/mol}$), ma la concentrazione di ossalacetato è bassa ($< 10^{-6} \text{ M}$), il che spinge la reazione in avanti.
- Inoltre la reazione successiva catalizzata dalla citrato sintasi è altamente favorita ($\Delta G^{\circ'} = -31.5 \text{ kJ/mole}$) e sottrae ulteriormente l'ossalacetato dal mezzo.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 342 -

Energia

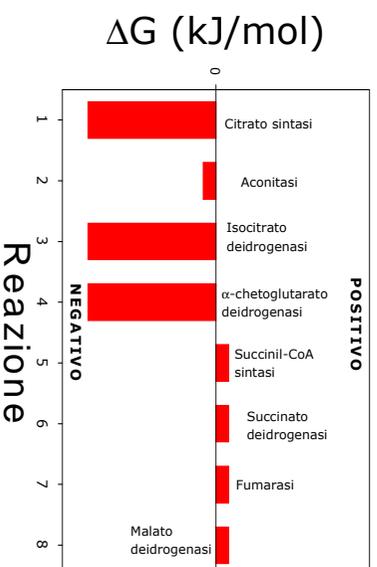


v. 1.9.3 © gsantor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 343 -

Energia

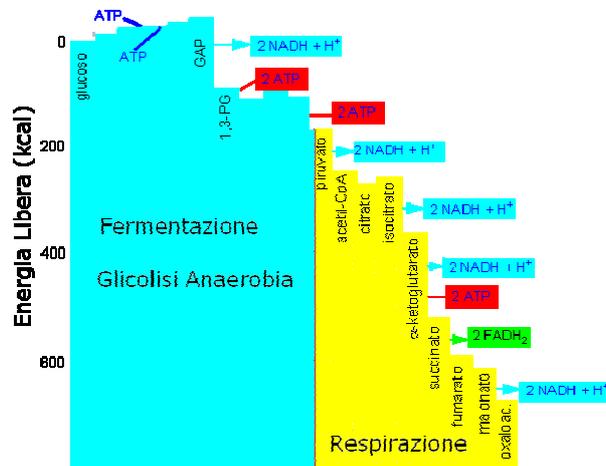


v. 1.9.3 © gsantor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

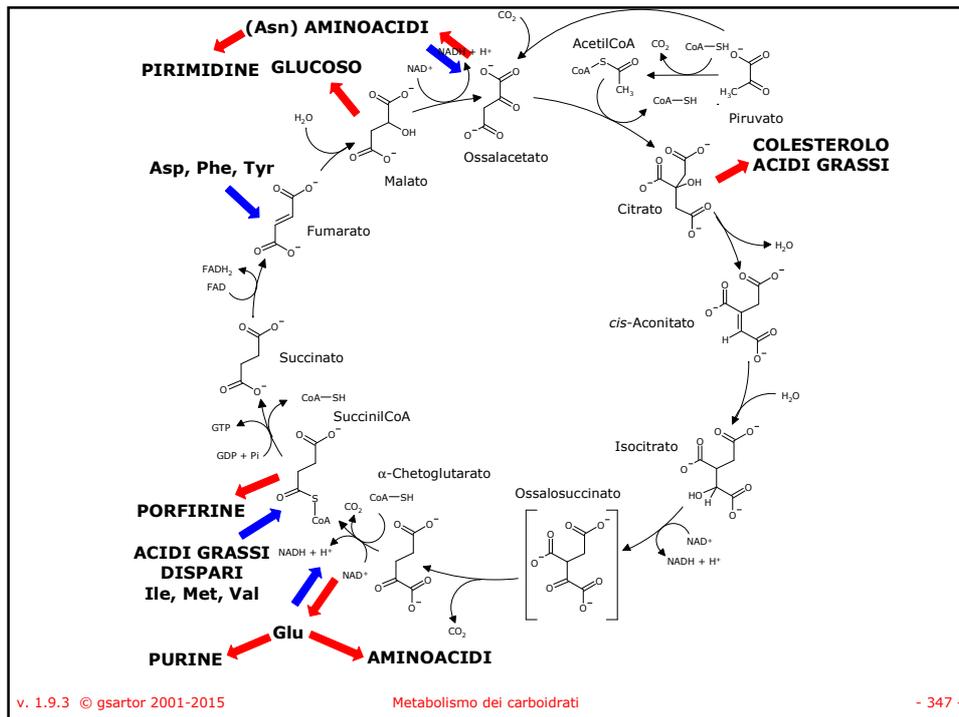
- 344 -

Energia



Ciclo di Krebs

- Il ciclo di Krebs è al centro del metabolismo.
- Le vie degradative (catabolismo) lo alimentano, le vie sintetiche (anabolismo) ne usano i componenti.
- È una via “**ANFIBOLICA**”, opera infatti sia nel catabolismo che nell’anabolismo cellulare.
- Tutte le reazioni avvengono nella matrice mitocondriale.
- Nei mitocondri vi sono anche gli enzimi della fosforilazione ossidativa e quelli della ossidazione degli acidi grassi e degli aminoacidi.



Reazioni anaplerotiche

- Gli intermedi del ciclo di Krebs sono risintetizzati dalle reazioni anaplerotiche.
- La concentrazione degli intermedi nel ciclo rimane pressoché costante.
- La principale reazione anaplerotica è quella che porta alla produzione di ossalacetato da CO_2 e piruvato. La reazione è catalizzata dalla piruvato carbossilasi.
- La produzione di ossalacetato avviene principalmente nel rene e nel fegato.
- La piruvato carbossilasi è fortemente stimolata da acetil-CoA.

- Ci sono prove che suggeriscono la formazione di complessi multienzimatici per il ciclo di Krebs.
- Ciò potrebbe facilitare la canalizzazione dei substrati tra i siti attivi.

Controllo

- I fattori che controllano il flusso del ciclo sono:
 - Disponibilità dei substrati
 - Inibizione da prodotti
 - Inibizione allosterica nei primi passaggi
- La citrato sintasi, la isocitrato deidrogenasi e la α -chetoglutarato deidrogenasi possono essere tutti punti di regolazione:
 - La disponibilità di acetil-CoA e ossalacetato regolano l'attività della citrato sintasi.
 - L'accumulo di NADH inibisce le due deidrogenasi.
- L'accumulo di prodotto inibisce gli altri passaggi.

Controllo

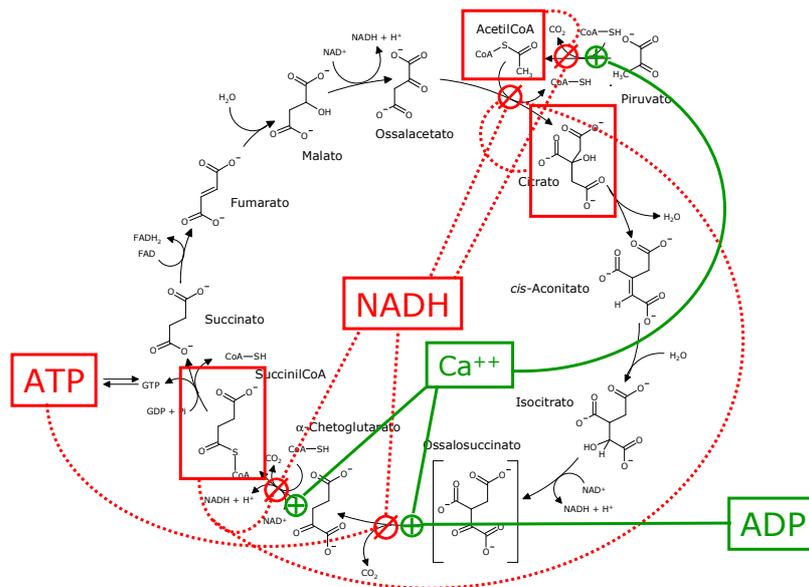
- L'inibizione della citrato sintasi da ATP è eliminata da ADP.
- Nei muscoli di vertebrato lo ione Ca^{++} attiva la isocitrato deidrogenasi e la α -chetoglutarato deidrogenasi.
- Le velocità della glicolisi e del ciclo di Krebs sono integrate.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 351 -

Controllo



v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 352 -

Varianti al ciclo di Krebs

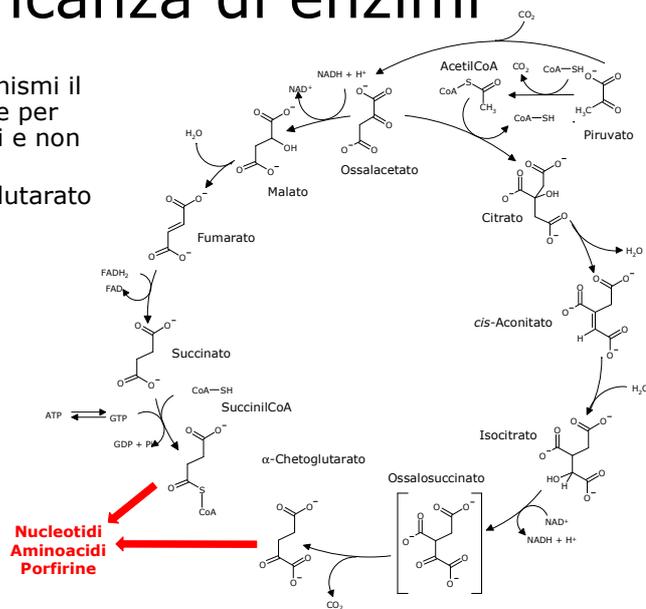
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 353 -

Mancanza di enzimi

- In alcuni microrganismi il ciclo di Krebs serve per produrre intermedi e non energia.
- Manca la α -chetoglutarato deidrogenasi.

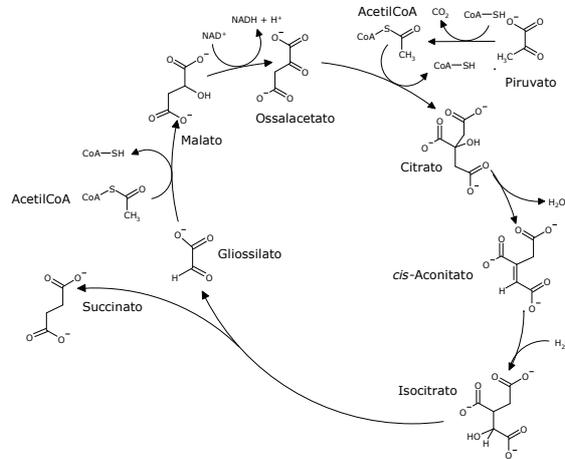


v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 354 -

Ciclo del glicosilato



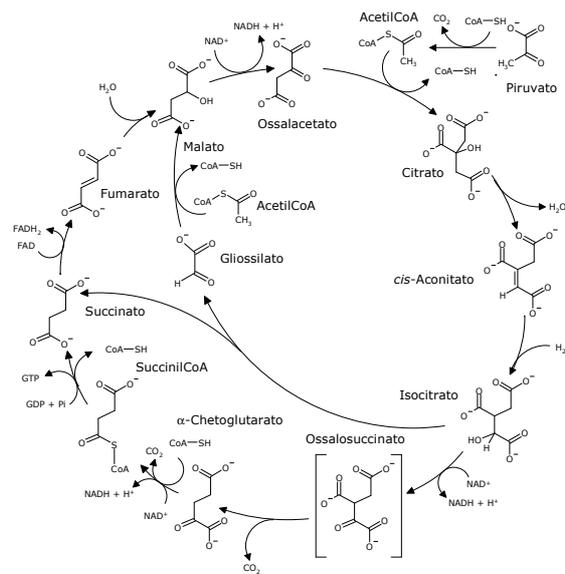
- In alcuni organismi (piante, microrganismi ...) vi è la conversione di acetato (acetil-CoA) a carboidrati attraverso il ciclo del glicosilato.

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 355 -

Ciclo del glicosilato e ciclo di Krebs



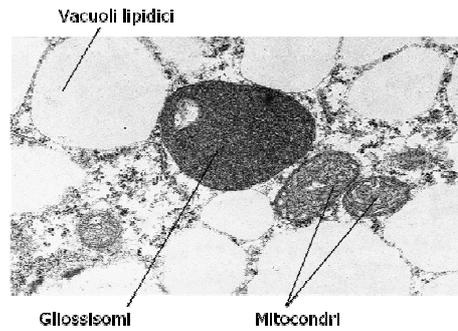
v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 356 -

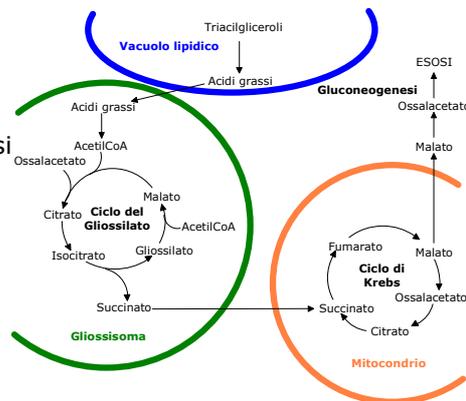
Da grassi a zuccheri

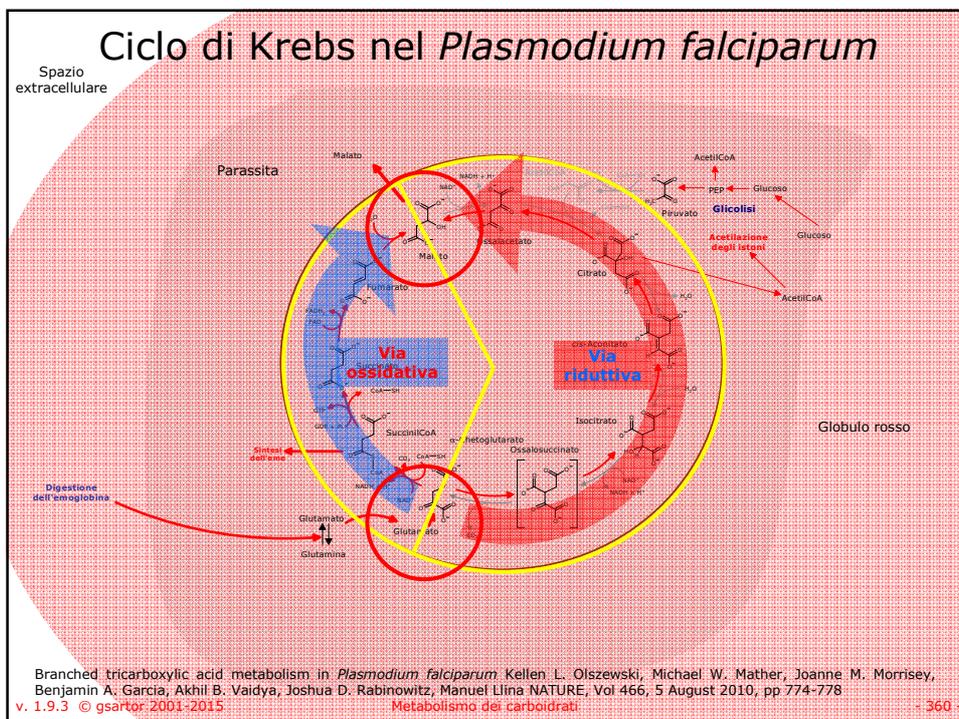
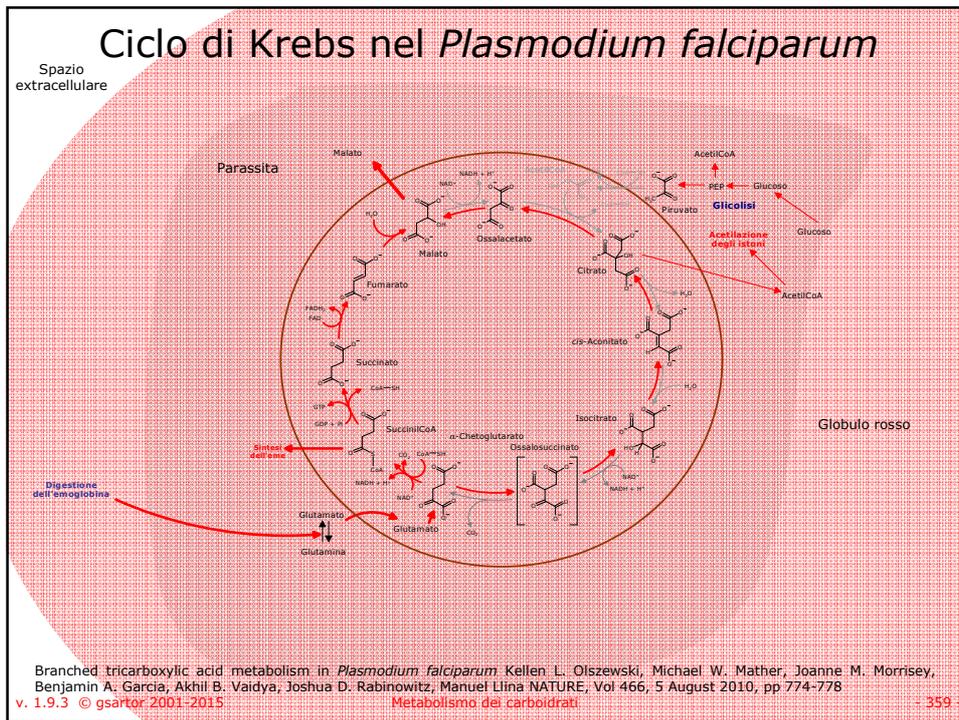
- Nei semi in germinazione avviene la conversione di acidi grassi in glucosio.
- Ciò avviene in tre compartimenti diversi:
- I **vacuoli lipidici**, dove i grassi vengono idrolizzati in acidi grassi e glicerolo
- I **gliossisomi**, dove gli acidi grassi vengono β -ossidati a AcetilCoA e si forma succinato dal ciclo del gliossilato
- Nei **mitocondri** dove il succinato entra per formare malato che va a formare carboidrati.



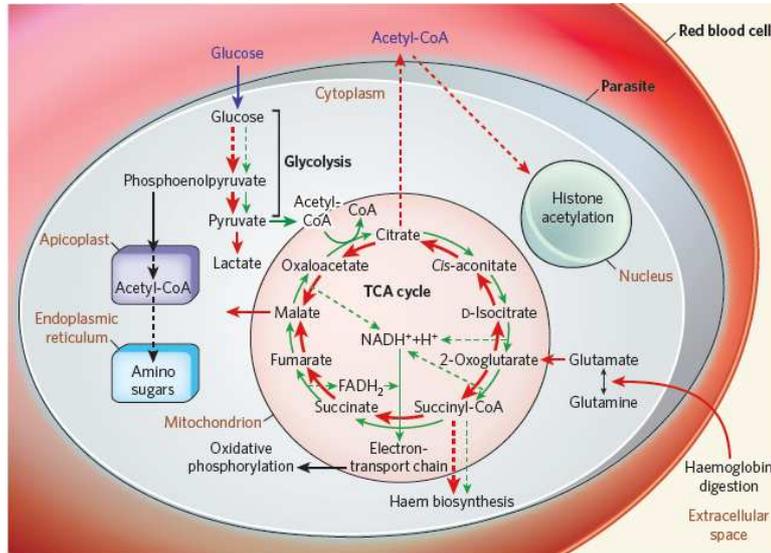
Da grassi a zuccheri

- Nei semi in germinazione avviene la conversione di acidi grassi in glucosio.
- Ciò avviene in tre compartimenti diversi:
- I **vacuoli lipidici**, dove i grassi vengono idrolizzati in acidi grassi e glicerolo
- I **gliossisomi**, dove gli acidi grassi vengono β -ossidati a AcetilCoA e si forma succinato dal ciclo del gliossilato
- Nei **mitocondri** dove il succinato entra per formare malato che va a formare carboidrati.





Ciclo di Krebs nel *Plasmodium falciparum*



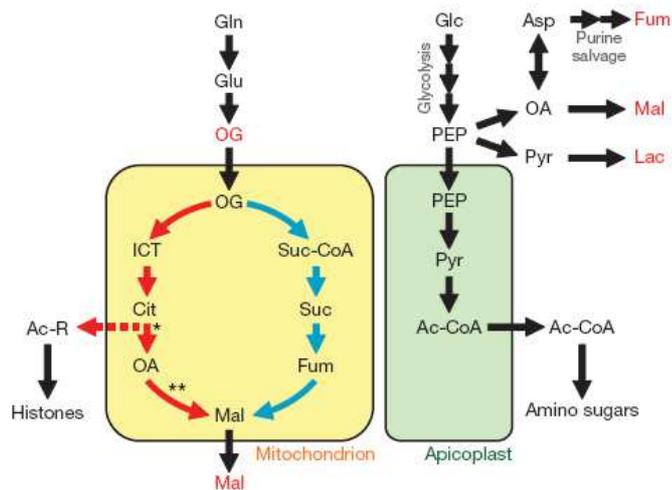
Branched tricarboxylic acid metabolism in *Plasmodium falciparum* Kellen L. Olszewski, Michael W. Mather, Joanne M. Morrissey, Benjamin A. Garcia, Akhil B. Vaidya, Joshua D. Rabinowitz, Manuel Lina NATURE, Vol 466, 5 August 2010, pp 774-778

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 361 -

Ciclo di Krebs nel *Plasmodium falciparum*



Branched tricarboxylic acid metabolism in *Plasmodium falciparum* Kellen L. Olszewski, Michael W. Mather, Joanne M. Morrissey, Benjamin A. Garcia, Akhil B. Vaidya, Joshua D. Rabinowitz, Manuel Lina NATURE, Vol 466, 5 August 2010, pp 774-778

v. 1.9.3 © gsartor 2001-2015

Metabolismo dei carboidrati

- 362 -

Sommario

- Il piruvato è convertito in acetilCoA dalla piruvato deidrogenasi ($E_1 + E_2 + E_3$).
- L'acetilCoA è convertito in CO_2 attraverso il ciclo di Krebs, si generano: tre NADH, un $FADH_2$, e un ATP (per fosforilazione a livello del substrato).
- Gli intermedi del ciclo di Krebs sono anche precursori per la sintesi di altre biomolecole (acidi grassi, steroidi, aminoacidi, porfirine purine, pirimidine e glucoso).
- L'ossalacetato è riformato dal piruvato attraverso la carbossilazione catalizzata dalla piruvato carbossilasi.

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Rensselaer Polytechnic Institute: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:

<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/> oppure da <http://www.gsartor.org/>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor

Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it