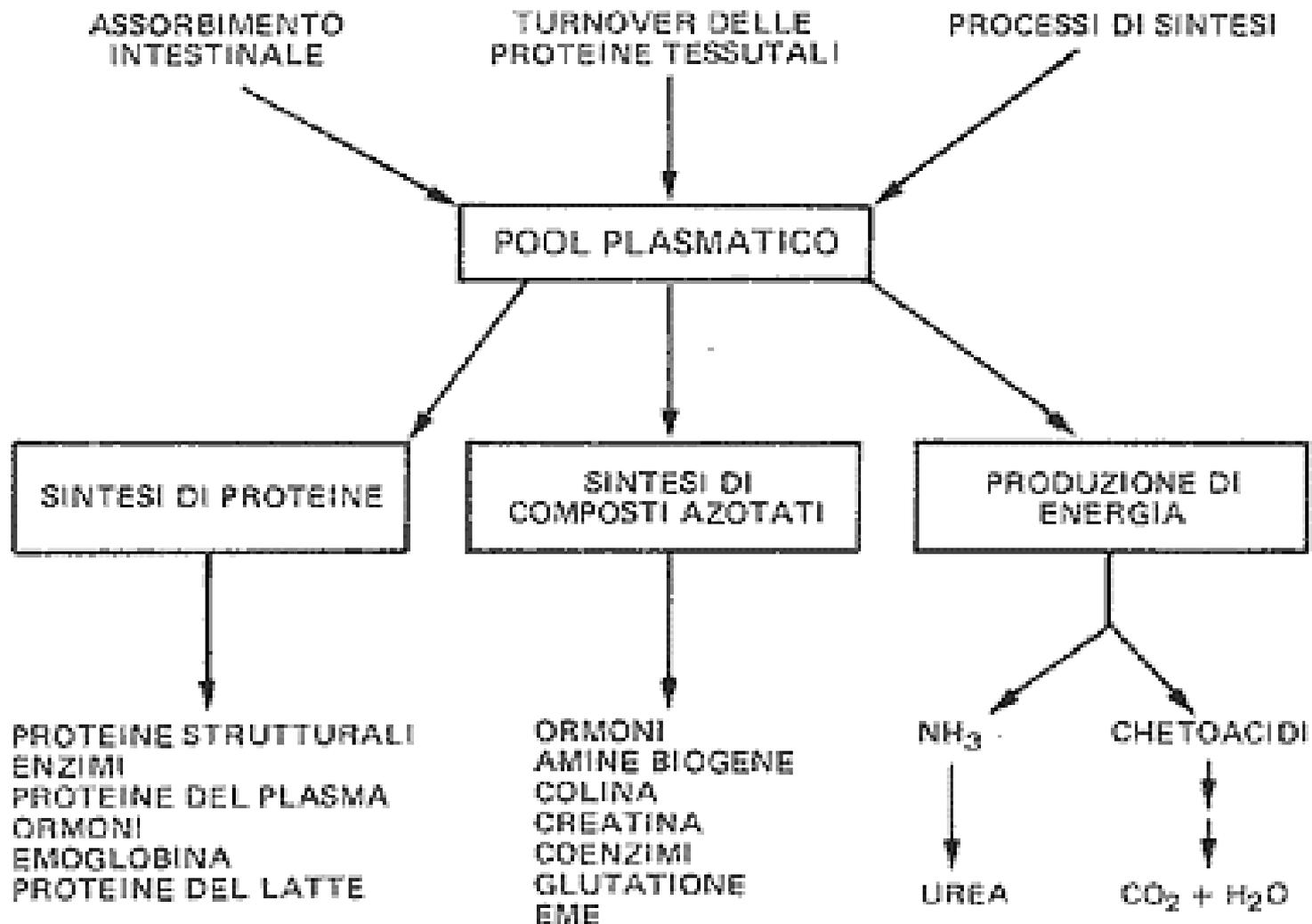
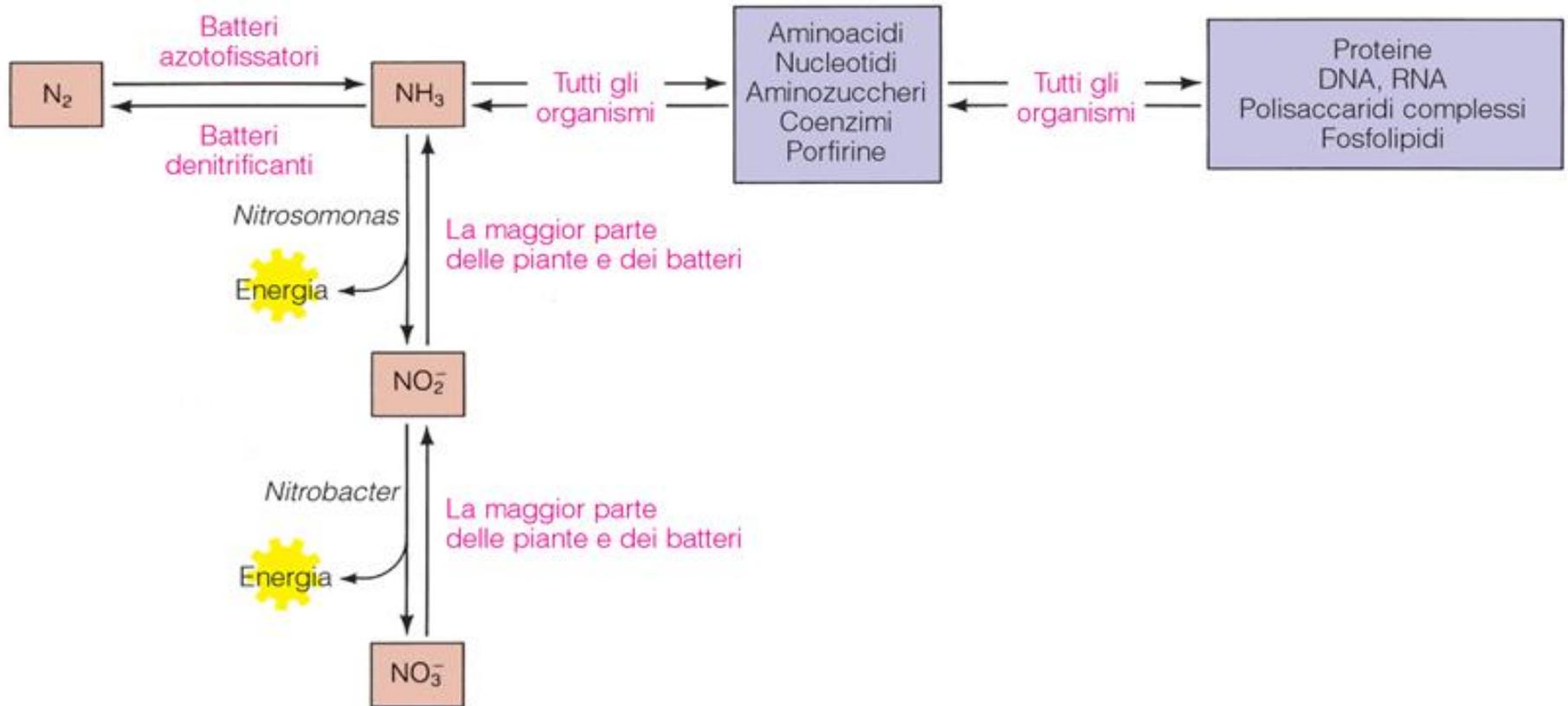


# Il metabolismo degli amminoacidi



# Da dove provengono gli amminoacidi della dieta?



# Il metabolismo dell'azoto

- L'azoto è presente nei composti organici in forma ridotta.



- Nell'ambiente l'azoto è presente in forma ossidata



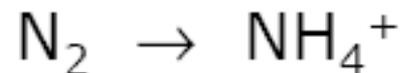
# Il metabolismo dell'azoto

- Le specie ossidate vengono convertite nella specie ridotta da due diversi processi:

- Assimilazione del nitrato (avviene negli eucarioti fototrofi, piante verdi)



- Fissazione dell'azoto (avviene nei procarioti sia autonomi che simbionti di eucarioti)

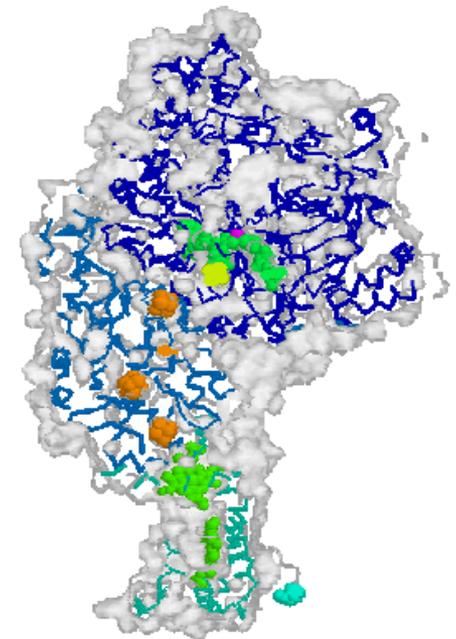
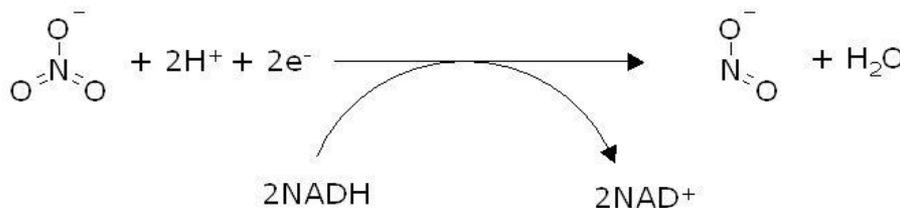
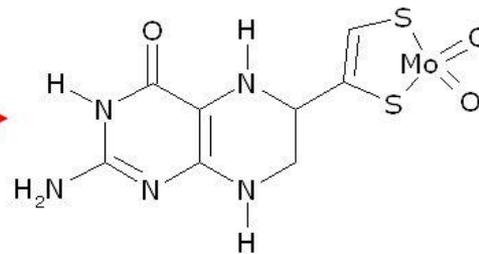


# L'assimilazione dell'azoto

- Nelle piante **verdi** (eucarioti) l'assimilazione del nitrato avviene in due successivi passaggi:

## Mediante l'enzima nitrato reduttasi

- La nitrato reduttasi citosolica trasferisce due elettroni dal NADH al nitrato.
- Contiene come cofattori:
  - FAD
  - Cofattore molibdeno
  - Citocromo b<sub>577</sub>



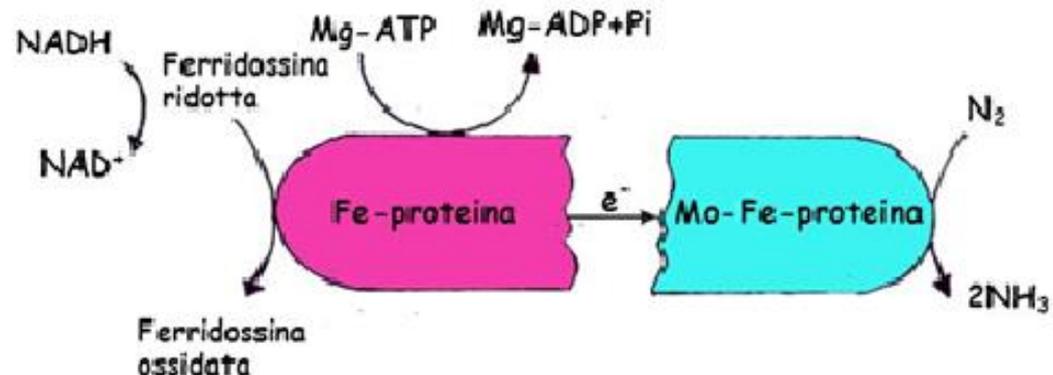
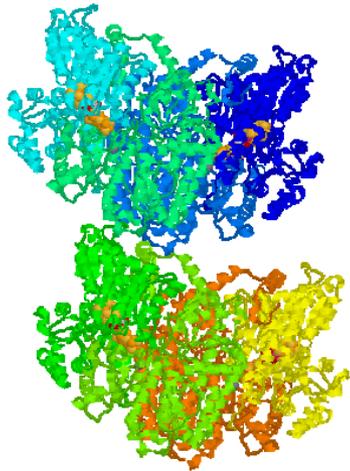
# La fissazione dell'azoto

- Avviene nei procarioti che possono essere sia simbionti di piante superiori che avere vita autonoma



## Il complesso enzimatico della nitrogenasi

- La nitrogenasi riduce l'azoto a ione ammonio attraverso tre riduzioni successive nella quale utilizza due elettroni per volta.

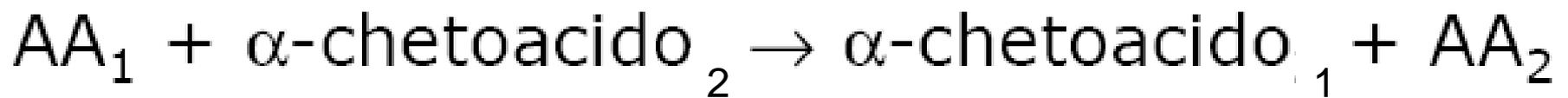


# L'assimilazione dell'azoto

- Nei mammiferi la via principale di assunzione di azoto è l'ingestione di proteine con la dieta.
- Le proteine assunte con la dieta sono fondamentale fonte di aminoacidi e di azoto
- Sono indispensabili
  - per il ricambio del patrimonio proteico endogeno
  - Come fonte di amminoacidi essenziali (**Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Triptofano, Treonina, Lisina, Metionina**)

# La biosintesi degli amminoacidi

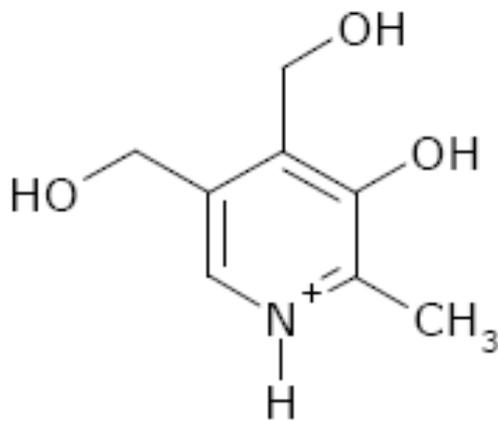
- Gli amminoacidi vengono, nella maggior parte dei casi, sintetizzati a partire dall' $\alpha$ -chetoacido corrispondente attraverso una specifica aminotransferasi (transaminasi):



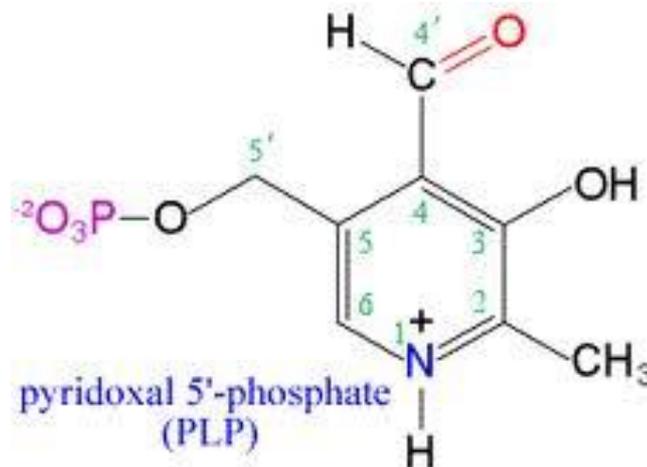
- Le transaminasi trasferiscono un gruppo aminico da un AA ad un  $\alpha$ -chetoacido

# La biosintesi degli amminoacidi

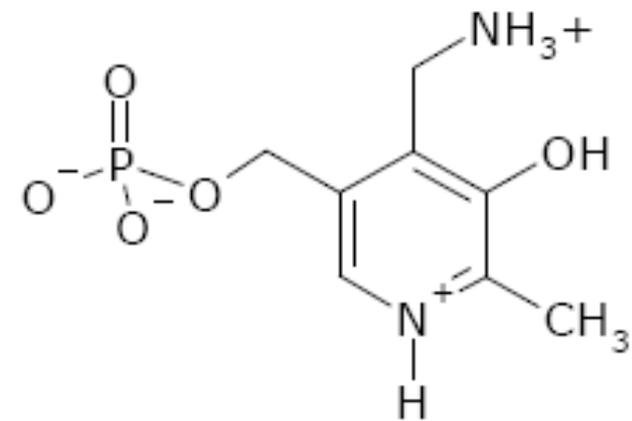
- Le reazioni di transaminazione usano come coenzima il piridossal fosfato.
- Il piridossal fosfato forma una base di Schiff con un residuo di Lys della transaminasi



Piridossina  
(Vit B<sub>6</sub>)

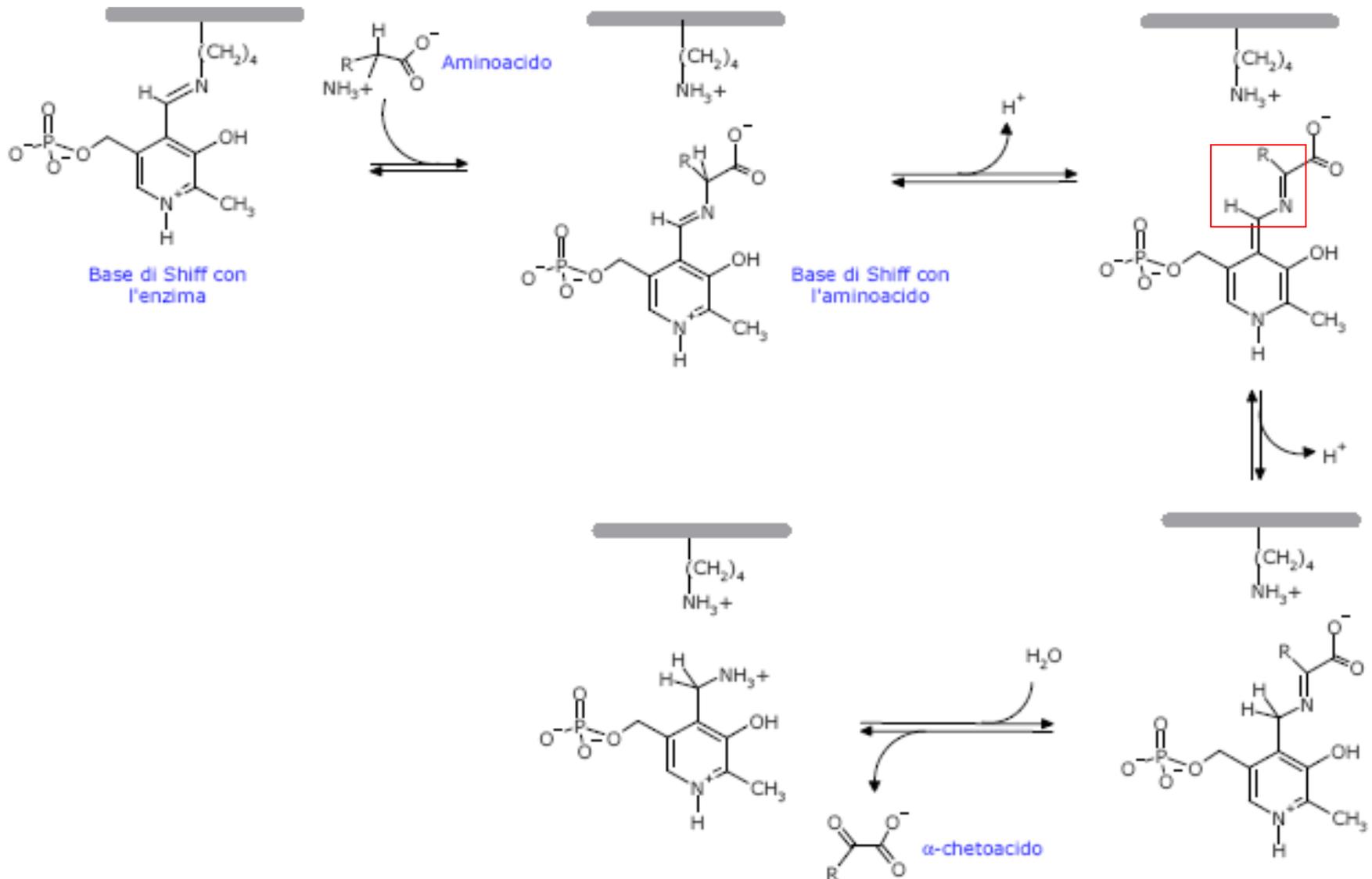


Piridossal fosfato  
(PLP)

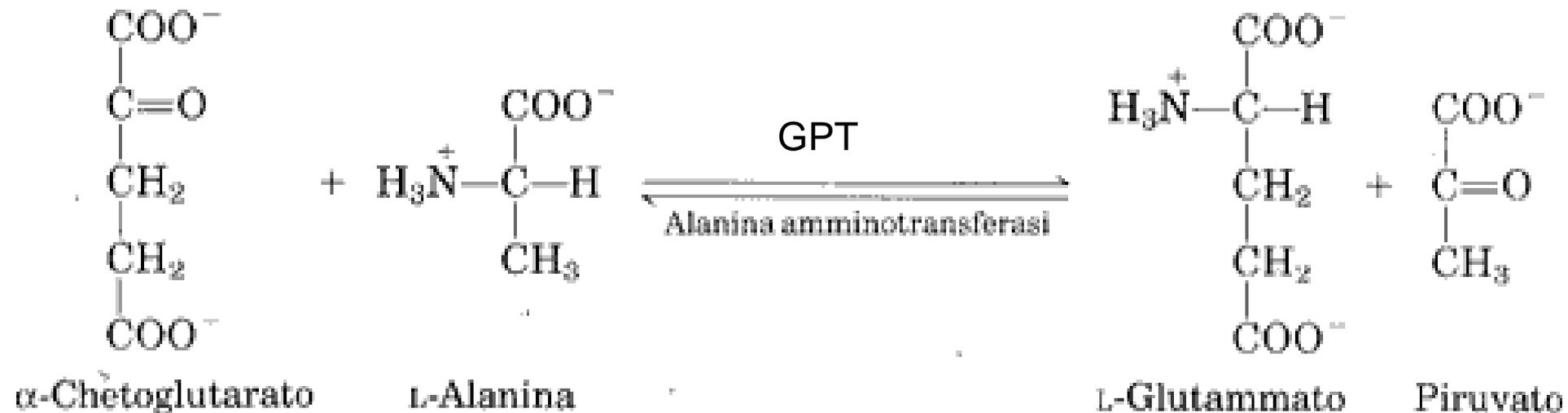


Piridossamina fosfato  
(PMP)

# Il meccanismo della transaminazione

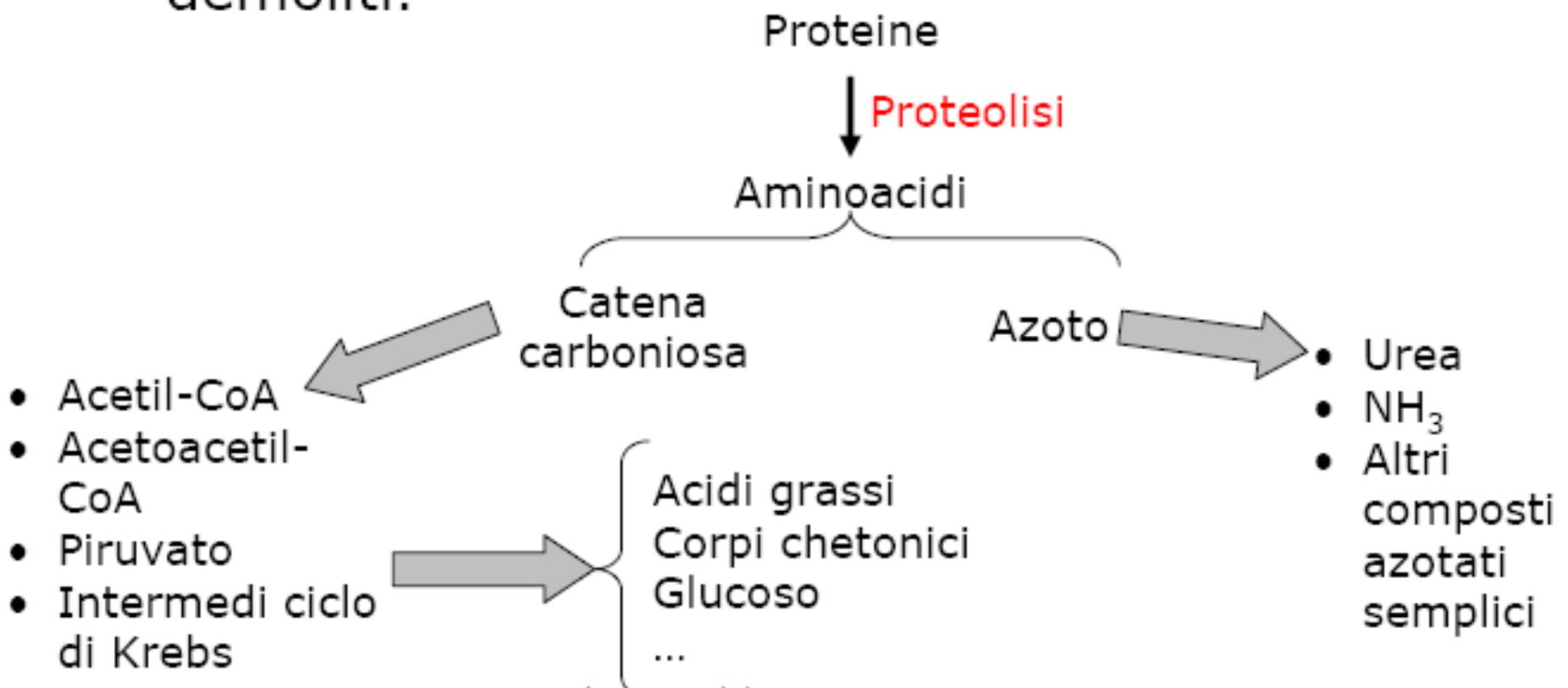


# La glutammico-piruvico trasferasi (GPT) detta anche, alanina aminotransferasi (ALT)



# Degradazione degli aminoacidi

- A differenza degli acidi e grassi e dei glucidi gli aminoacidi in eccesso non possono né essere immagazzinati in macromolecole di deposito né essere escreti come tali, vengono quindi demoliti.



# Turn-over delle proteine

- Le proteine cellulari vengono regolarmente degradate e risintetizzate.
- Il tempo di semi-vita di un enzima nel fegato varia da 10 minuti a una settimana.
- In media il tempo di semi-vita di una proteina è correlato con il residue N-terminale:
  - Proteine con N-terminale come Met, Ser, Ala, Thr, Val, o Gly hanno un tempo di semi-vita maggiore di 20 ore.
  - Proteine con N-terminale Phe, Leu, Asp, Lys, o Arg hanno un tempo di semi-vita di 3 minuti o meno.

# Turn-over delle proteine

- È stato dimostrato che le proteine ricche in Pro (P), Glu (E), Ser (S) and Thr (T), chiamate proteine PEST, sono degradate più rapidamente che le altre proteine.
- La degradazione di specifiche proteine può essere regolata:
  - Negli eucarioti il ciclo cellulare è controllato, alcuni enzimi regolatori del ciclo sono degradati in fasi particolari del ciclo cellulare in risposta a segnali intra o extra-cellulari.

# Enzimi proteolici

- Classi di enzimi proteolitici:
  - Proteasi a serina: enzimi digestivi come tripsina, chimotripsina, elastasi...
  - Differiscono nella specificità del substrato:
    - Chimotripsina: privilegia il taglio del legame peptidico nel quale l'AA che impegna il C=O ha una catena laterale.
    - Tripsina: preferisce un AA carico positivamente (Lys o Arg) nella stessa posizione.

# Degradazione delle proteine cellulari

Il turnover delle proteine (degradazione e sintesi) è un processo che avviene continuamente nella cellula e serve per riciclare gli amminoacidi e per degradare le proteine difettose.

Le proteine difettose sono degradate più rapidamente.

Negli eucarioti la degradazione delle proteine endogene avviene:

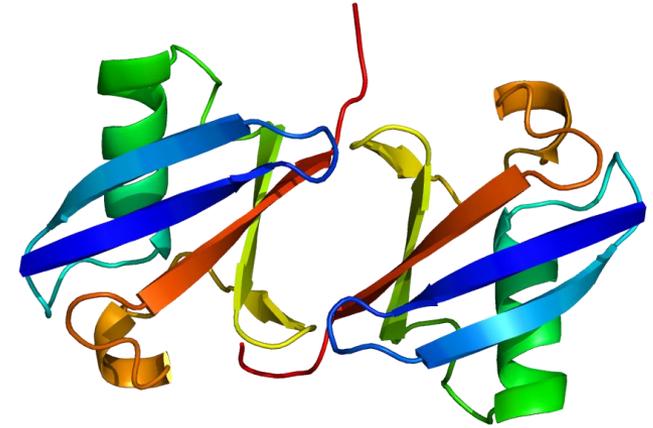
- nei lisosomi, per azione di proteasi lisosomiali (proteine cellulari a vita lunga, proteine extracellulari, proteine di membrana);
- nel citosol, per azione di proteasi ATP-dipendenti (proteine cellulari a vita breve, proteine danneggiate).

Negli eucarioti la degradazione delle proteine cellulari è spesso segnalata dalla presenza di **ubiquitina**.

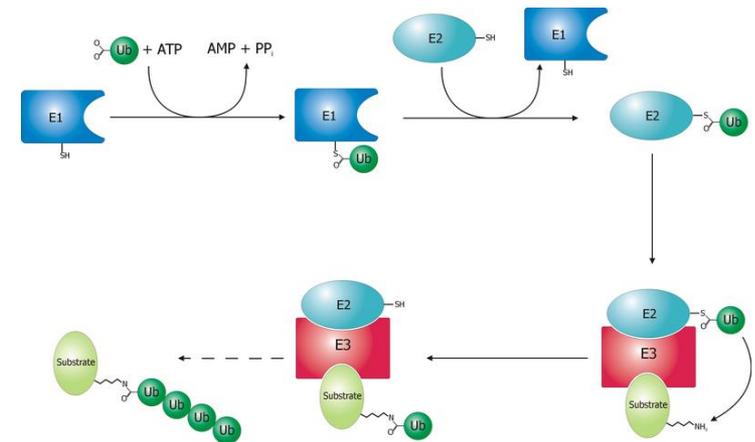
Il residuo di glicina carbossi-terminale dell'ubiquitina viene legato ad residui di lisina della proteina da degradare a spese dell'ATP. Molte molecole di ubiquitina si legano alla proteina da degradare.

Le proteine etichettate con l'ubiquitina sono successivamente degradate da proteasi specifiche in un grande complesso multiproteico, il **proteasoma 26 S**.

# L'ubiquitina



L'ubiquitina è una piccola proteina di 76 aa altamente conservata



Il legame dell'ubiquitina alla proteina richiede l'intervento di tre enzimi (E1, E2, E3)

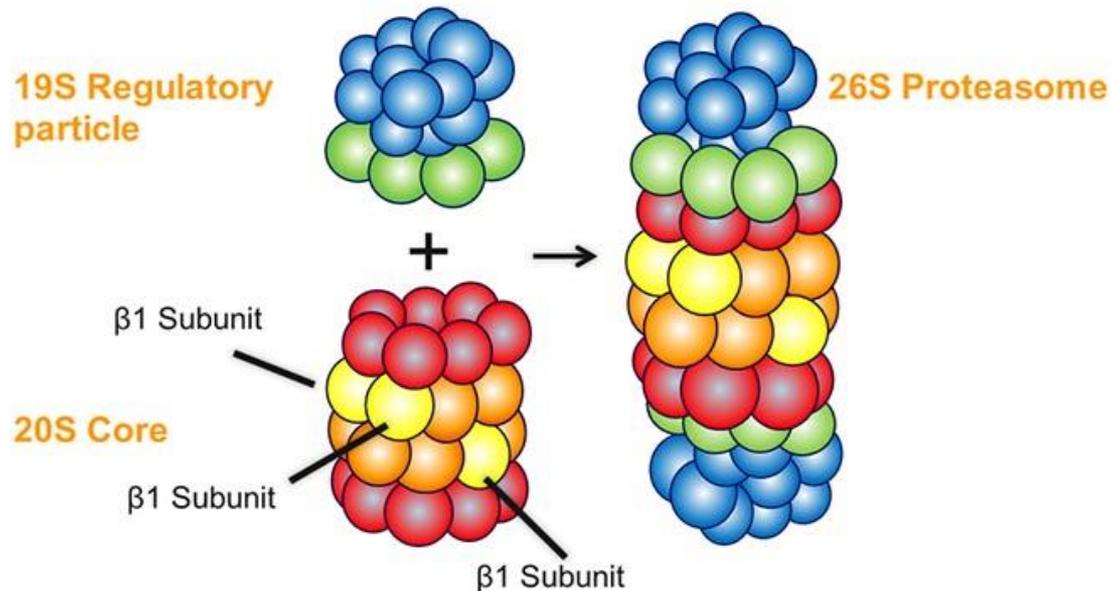
## **Macromolecular juggling by ubiquitylation enzymes:**

A hypothetical transition between distinct states in the catalytic cycle of canonical E1 enzymes

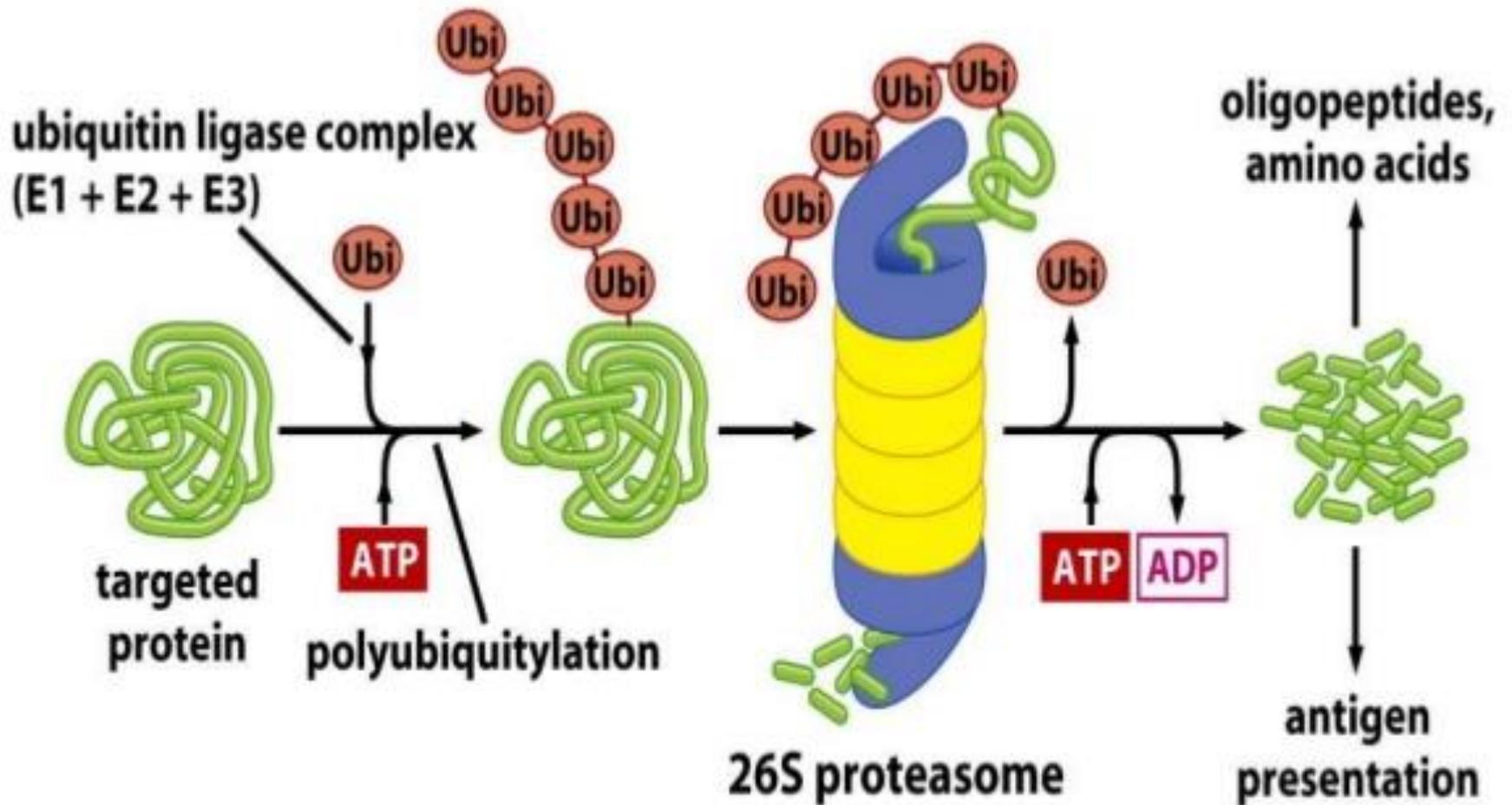
# Il proteasoma

Il **proteasoma** è un complesso multimerico presente in tutte le cellule, che ha il compito di degradare le proteine.

Ogni proteasoma è costituito da una subunità centrale chiamata **20S** che svolge l'attività proteolitica, e che può legare ad entrambe le estremità un'ulteriore subunità detta **19S** andando a formare il proteasoma 26S ad attività proteolitica più elevata.

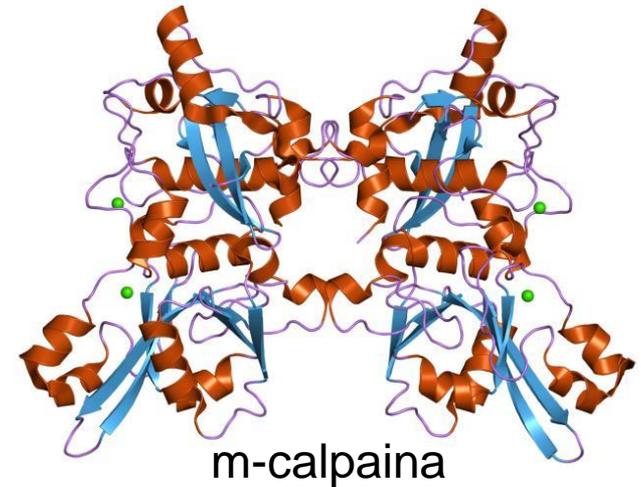


# How the proteasome acts ?



# Le calpaine

- Le **calpaine** sono enzimi che appartengono alla famiglia delle proteasi cisteiniche, calcio dipendenti e non lisosomiali. Sono espresse ubiquitariamente in molti animali (tutti i mammiferi).
- Esistono due isoforme ( $\mu$ -calpain e m-calpain), che differiscono per l'affinità al  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Sebbene il ruolo fisiologico delle calpaine sia ancora poco compreso, partecipano alla mobilità cellulare e la progressione del ciclo cellulare, nonché a funzioni specifiche del tipo cellulare come il potenziamento a lungo termine nei neuroni e la fusione cellulare dei mioblasti.



# Le calpaine

- In condizioni fisiologiche, un afflusso transitorio e localizzato di calcio attiva una piccola le calpaine, che quindi catalizzano la proteolisi controllata delle sue proteine bersaglio.
- La loro attività è controllata da fosforilazione mediante protein chinasi A.
- Le calpaine sono implicate nell'apoptosi e componente essenziale della necrosi.
- Le calpaine sono anche coinvolte nella disgregazione proteica del muscolo scheletrico dovuta all'esercizio prolungato e negli stati nutrizionali alterati o nella frollatura della carne.



# Le catepsine

- Le catepsine sono proteasi cisteiniche simili alla papaina presenti in tutti gli animali e in molti altri organismi.
- Ci sono circa 15 membri di questa famiglia, che si distinguono per la loro struttura, meccanismo catalitico e specificità di substrato.
- La maggior parte delle catepsine si attiva a basso pH nei lisosomi.



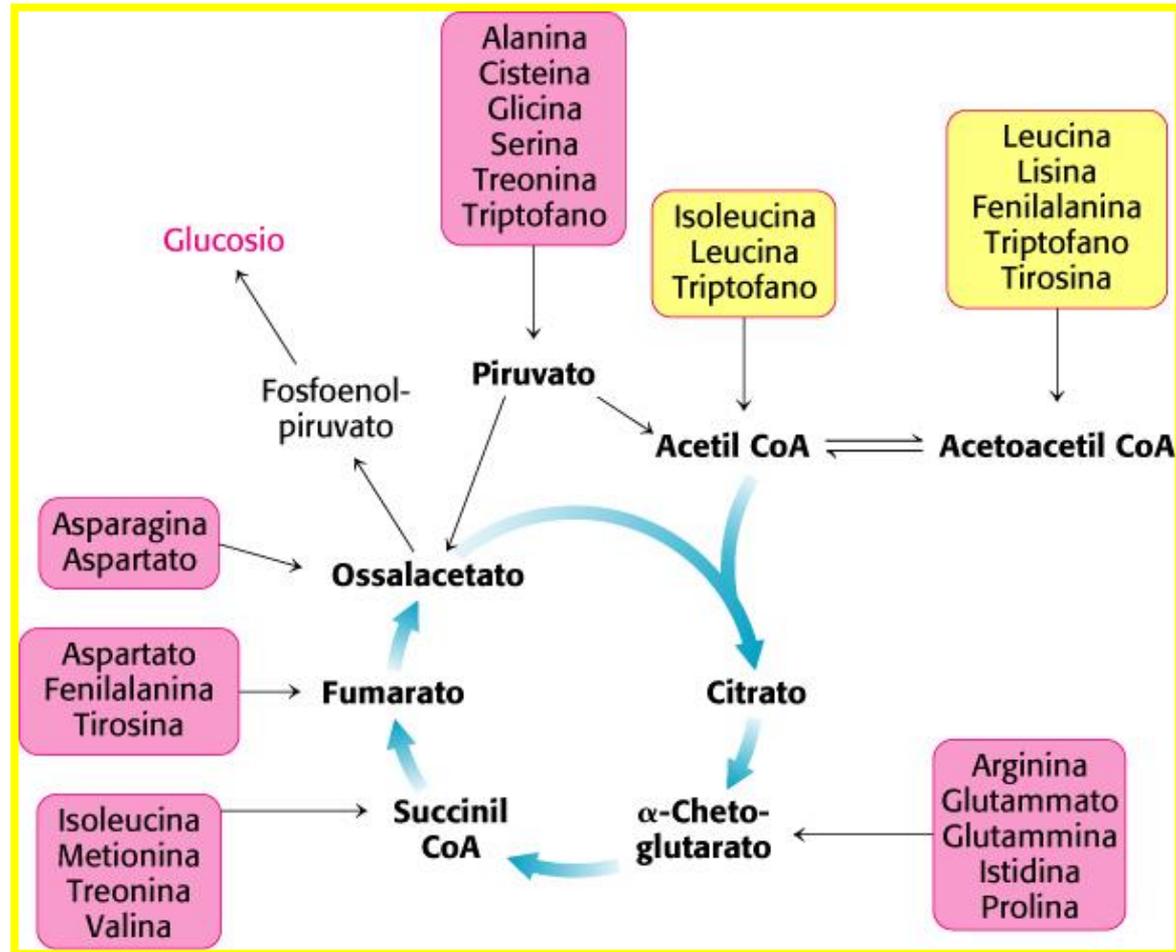
Struttura della catepsina K

# Metabolismo degli aminoacidi

- **Il destino degli aminoacidi in eccesso** è quello di essere indirizzati verso il metabolismo energetico **previa rimozione dei gruppi  $\alpha$ -amminici**.
- **Lo scheletro carbonioso** che rimane, un  **$\alpha$ -chetoacido**, entra direttamente o indirettamente **nei cicli ossidativi** (ciclo di Krebs)
- **L'utilizzazione degli aminoacidi nel catabolismo avviene ovviamente anche se le necessità energetiche non è soddisfatta da altri nutrienti ed in questo caso sono le proteine tissutali ad essere degradate per fornire aminoacidi.**
- **E' interessante sapere che il catabolismo degli aminoacidi contribuisce al fabbisogno energetico per circa il 15% del totale.**

- La rimozione del gruppo amminico mediante transaminazione porta alla sintesi di  $\alpha$ -chetoacidi
- Tali sostanze sono substrati *da ossidare* o da *trasformare in intermedi* del metabolismo glucidico o lipidico.
- A seconda del destino, l'aminoacido corrispondente può essere classificato:
  - Chetogenico: il metabolismo può fornire corpi chetonici
  - Glucogenico: il metabolismo può fornire glucosio attraverso il processo della gluconeogenesi
  - Alcuni aminoacidi possono rientrare in entrambe le categorie

# Destino dello scheletro carbonioso

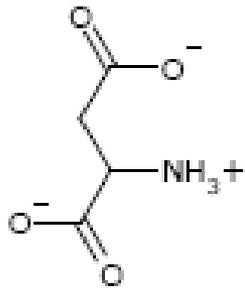


**Aminoacidi glucogenici**

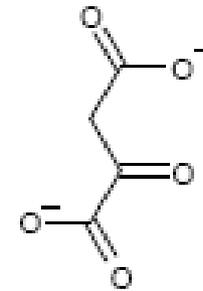
**Aminoacidi chetogenici**

# Destino dell'azoto

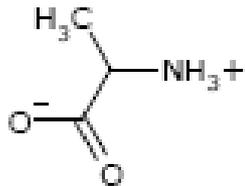
Asp



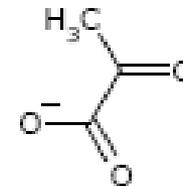
Ossalacetato



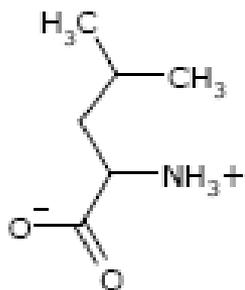
Ala



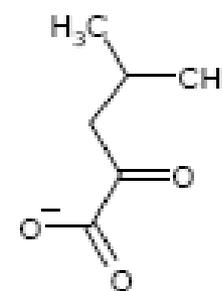
Piruvato



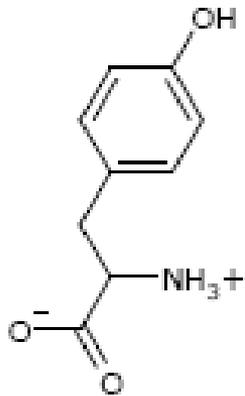
Leu



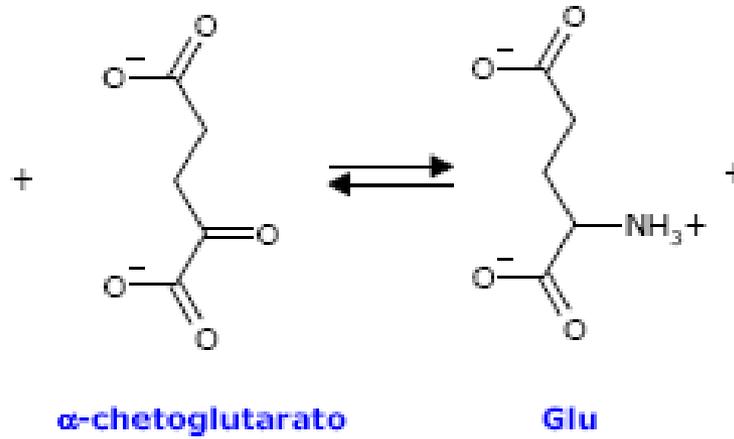
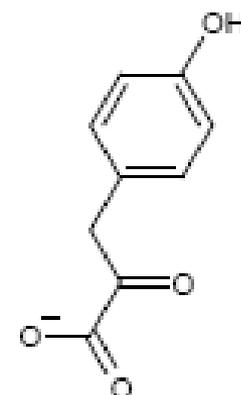
$\alpha$ -chetoisocaproato



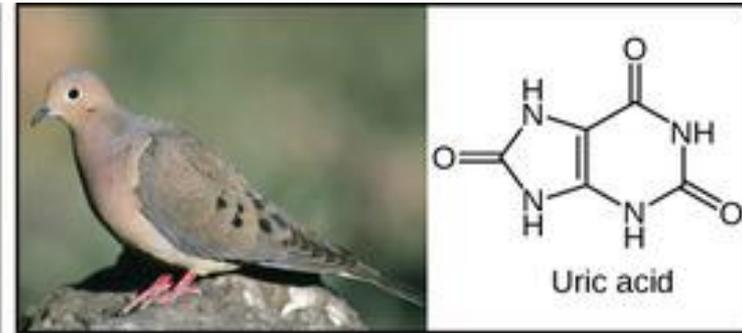
Tyr



p-idrossifenilpiruvato



# Eliminazione dell'azoto



(a) Many invertebrates and aquatic species excrete ammonia.

(b) Mammals, many adult amphibians, and some marine species excrete urea.

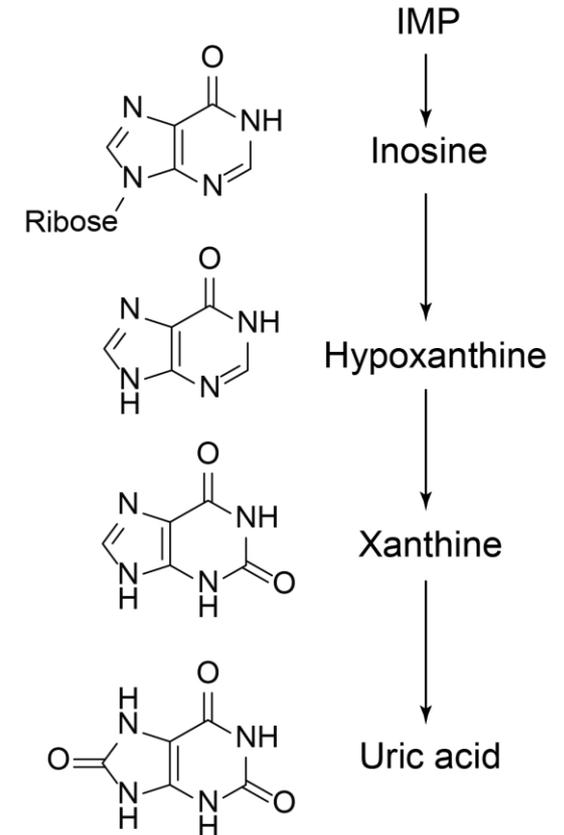
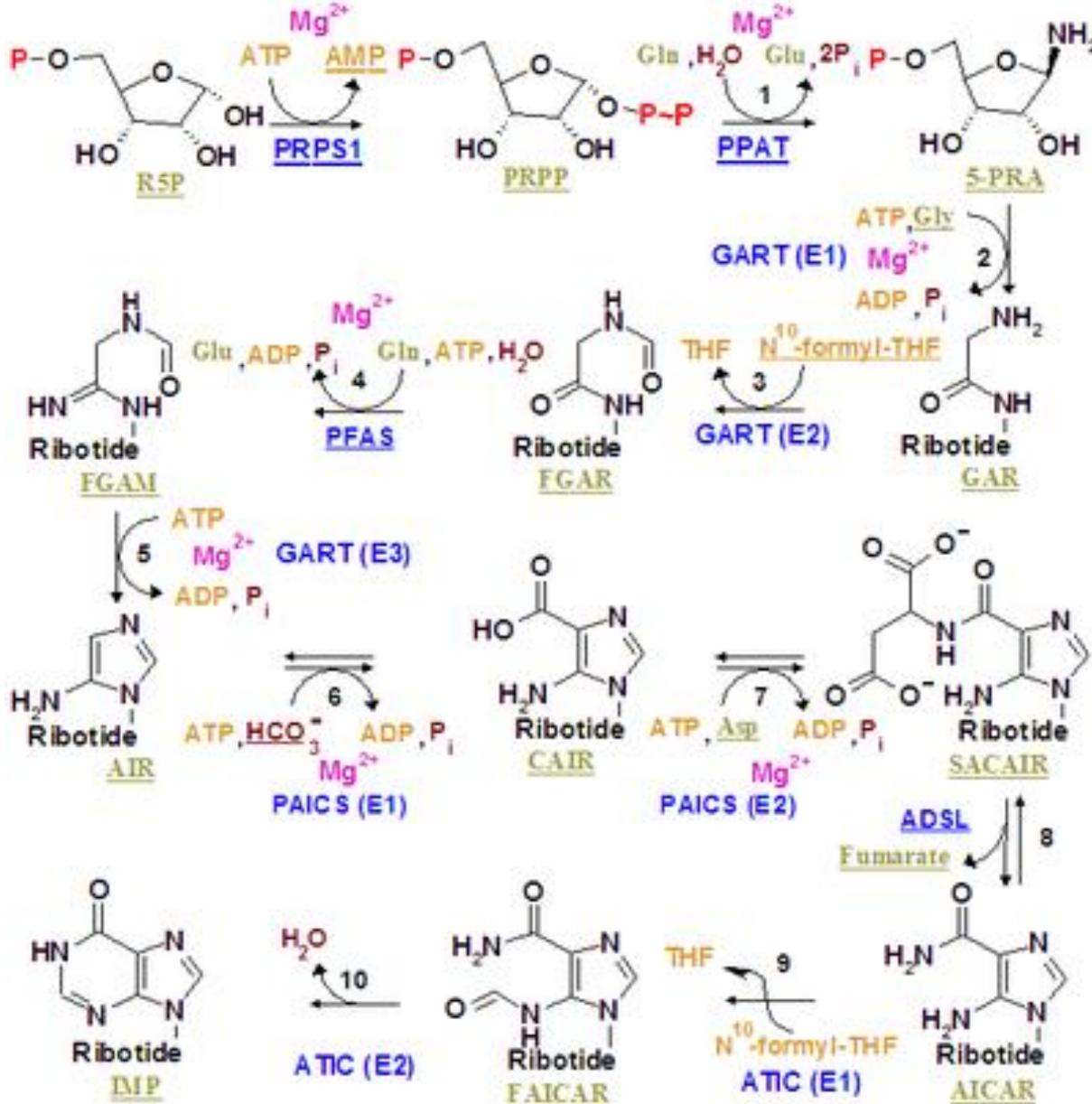
(c) Insects, land snails, birds, and many reptiles excrete uric acid.

Animal	Major end product of protein metabolism	Adult habitat	Embryonic environment
Aquatic invertebrates	Ammonia	Aquatic	Aquatic
Teleost fish	Ammonia, some urea	Aquatic	Aquatic
Elasmobranchs	Urea	Aquatic	Aquatic
Crocodiles	Ammonia, some uric acid	Semiaquatic	Cleidoic egg*
Amphibians, larval	Ammonia	Aquatic	Aquatic
Amphibians, adult	Urea	Semiaquatic	Aquatic
Mammals	Urea	Terrestrial	Aquatic
Turtles	Urea and uric acid	Terrestrial	Cleidoic egg
Insects	Uric acid	Terrestrial	Cleidoic egg
Land gastropods	Uric acid	Terrestrial	Cleidoic egg
Lizards	Uric acid	Terrestrial	Cleidoic egg
Snakes	Uric acid	Terrestrial	Cleidoic egg
Birds	Uric acid	Terrestrial	Cleidoic egg

\* The role of cleidoic eggs is discussed later in this chapter.

**Table 9.4** Major nitrogen excretory products in various animal groups.

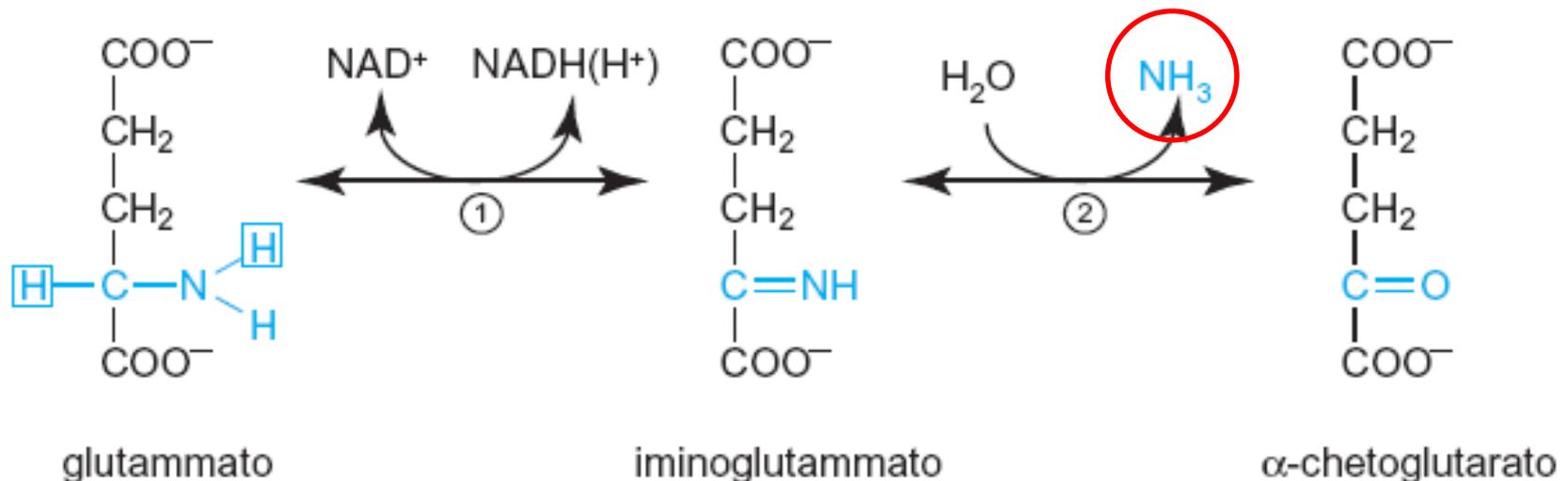
# Sintesi dell'acido urico



# Nei mammiferi

## Il gruppo amminico è rimosso dal glutammato nel fegato

- Il glutammato è l'unico aminoacido che può essere deaminato
- La reazione è catalizzata dalla glutammato deidrogenasi
- La reazione avviene nella matrice mitocondriale



# Tutti i tessuti producono ammoniaca, come ione ammonio, dal catabolismo degli aminoacidi

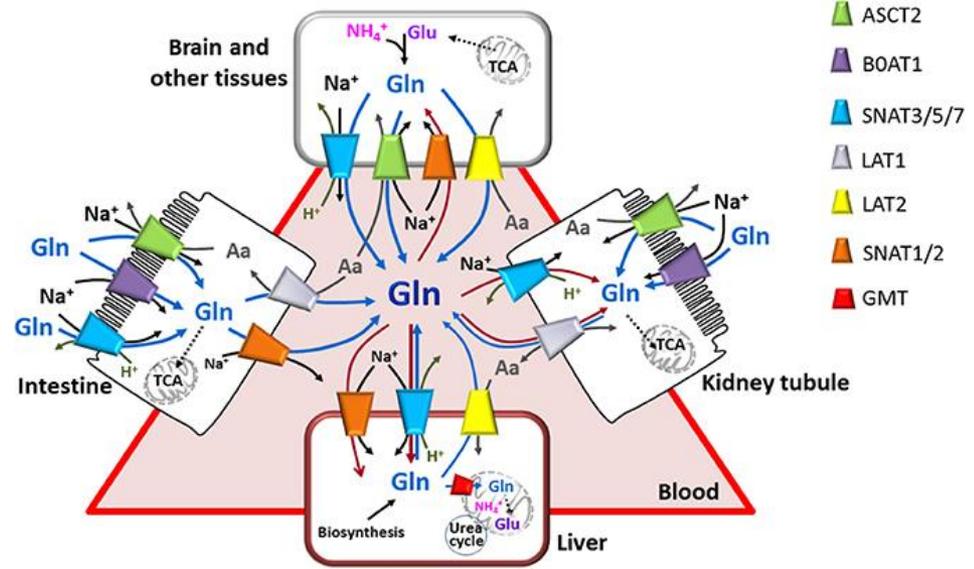
Non potendo essere esportata nel sangue, per la sua tossicità, l'ammoniaca viene, **nei tessuti extraepatici**, cervello compreso, convertita in un composto non tossico, la **glutammina**.

La glutammina, si forma per addizione enzimatica, catalizzata dalla **glutammina sintetasi**, di un gruppo amminico al glutammato. La glutammina, mediante specifici trasportatori può **attraversare le membrane cellulari e**, passata nel sangue, viene trasportata al fegato.

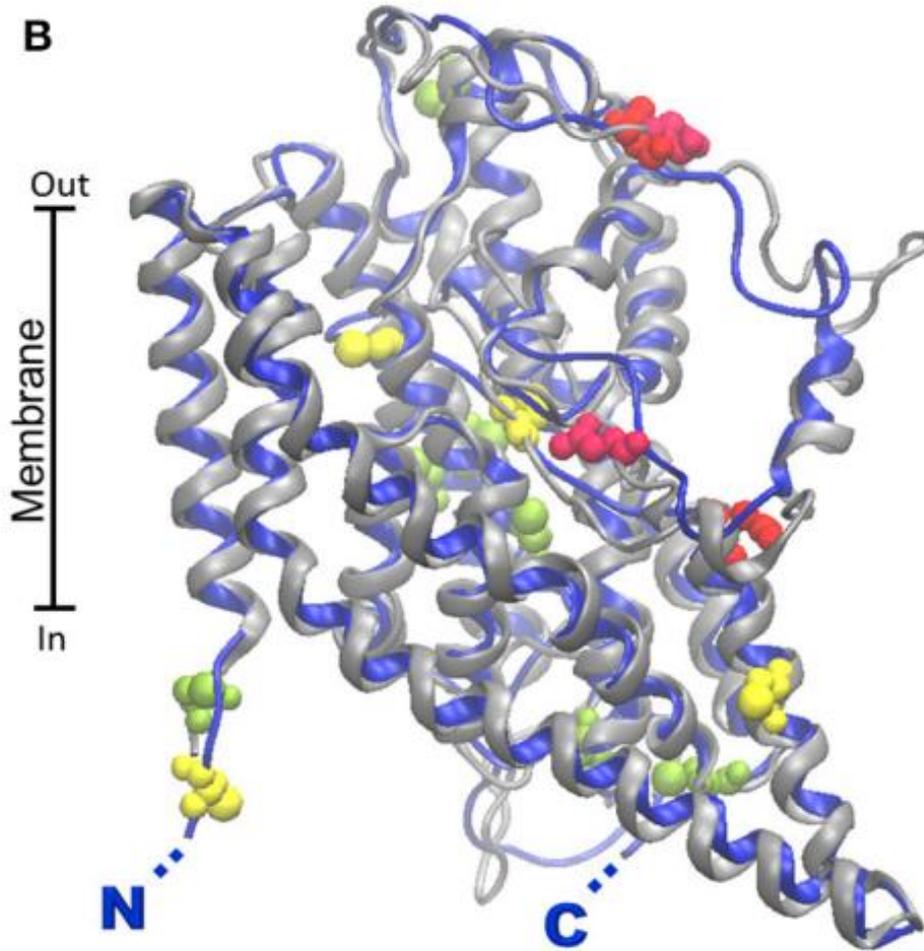
Il suo azoto ammidico verrà rilasciato sotto forma di ammoniaca solo nei **mitocondri epatici** ad opera di un enzima chiamato **glutamminasi**, ed entrerà nel **ciclo di produzione dell'urea**, molecola solubile che sarà escreta con le urine.

# I trasportatori della glutammina

- I sistemi di trasporto degli aminoacidi attraverso la membrana plasmatica delle cellule di mammifero è mediato da proteine che operano con differenti meccanismi e mostrano specificità variabile nei confronti degli aminoacidi.
- Sono stati identificati diversi geni che codificano per sistemi di trasporto specifici per la glutammina
- Sulla base della struttura, è possibile suddividere questi trasportatori in diverse famiglie:
  - **i trasportatori sodio dipendenti**, che richiedono il gradiente di  $\text{Na}^+$  come fonte di energia per il trasporto di aminoacidi (trasporti attivi secondari)
  - **i trasportatori sodio indipendenti**, che usano il gradiente di concentrazione dell'aminoacido per far avvenire il trasporto (diffusione facilitata)



# I trasportatori della glutammina

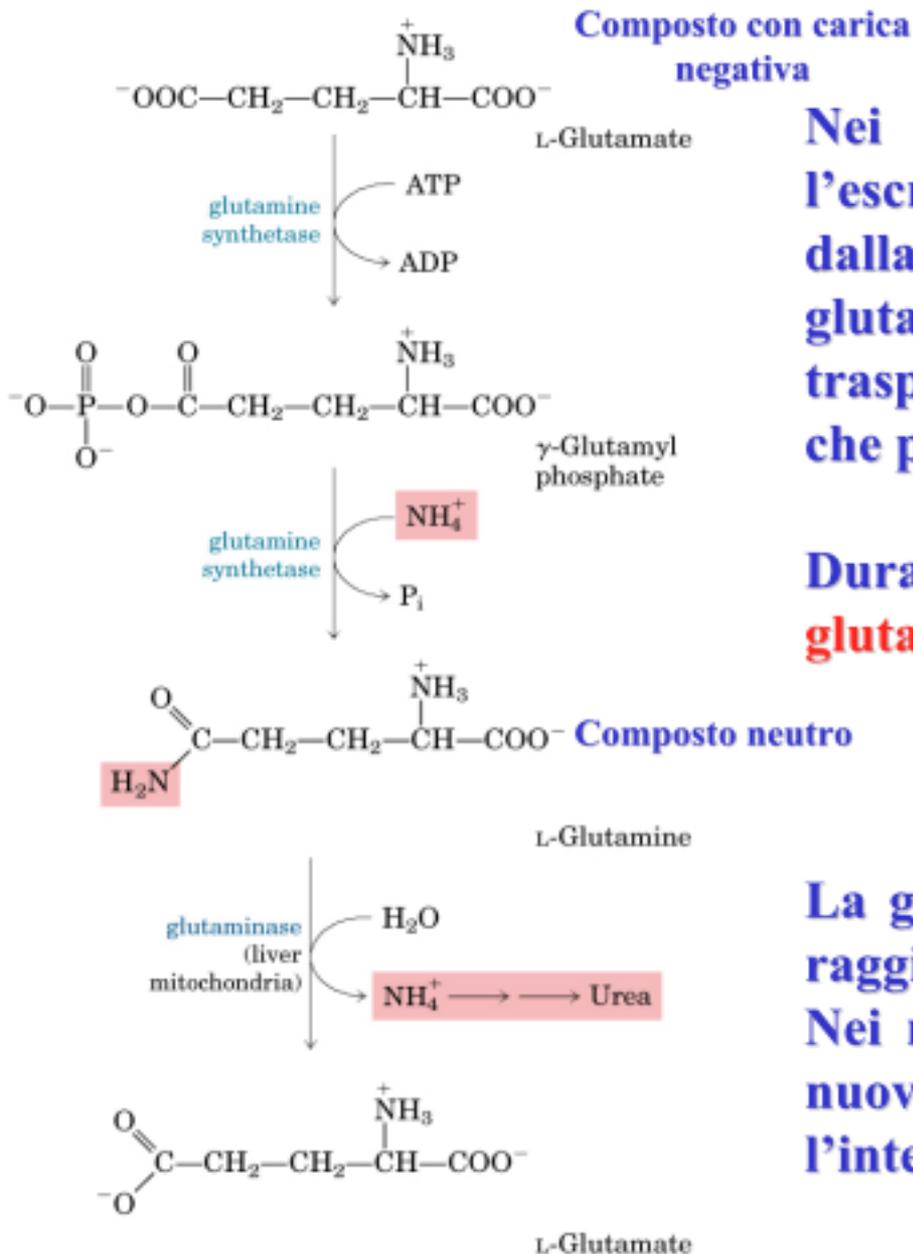


**Sovrapposizione delle strutture del trasportatore della glutamine ASCT2 umano (in grigio) e di ratto (in blu)**

I residui di cisteina sono in verde chiaro. I residui di cisteina deputati al legame con metalli (presenti solo nel ratto) sono in giallo.

I siti di glicosilazione sono in rosso.

## La glutammina trasporta ammoniaca attraverso il sangue.



Nei tessuti extraepatici lo ione  $\text{NH}_4^{+}$  per l'escrezione prodotto dalla reazione catalizzata dalla glutammato deidrogenasi, reagisce col glutammato per formare glutammina, un trasportatore non tossico di gruppi amminici che può attraversare le membrane cellulari.

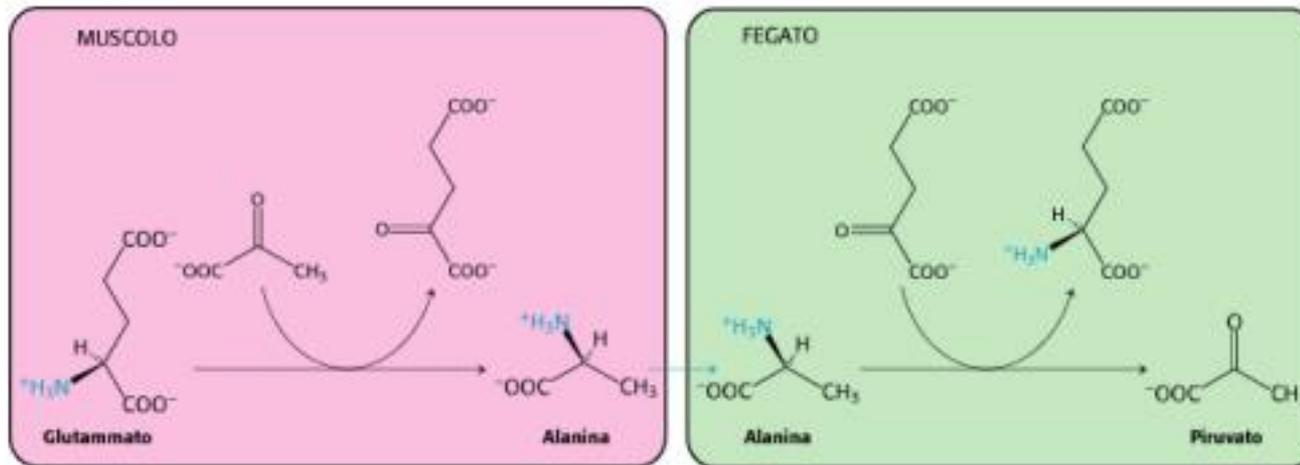
Durante questa reazione, catalizzata dalla **glutammina sintetasi** viene idrolizzato **ATP**.

La glutammina entra nel circolo sanguigno e raggiunge il **fegato**.

Nei mitocondri epatici il gruppo amminico è nuovamente convertito in  $\text{NH}_4^{+}$ , con l'intervento della **glutaminasi**.

Il principale trasportatore di ammoniaca dal muscolo al fegato è l'**alanina**.

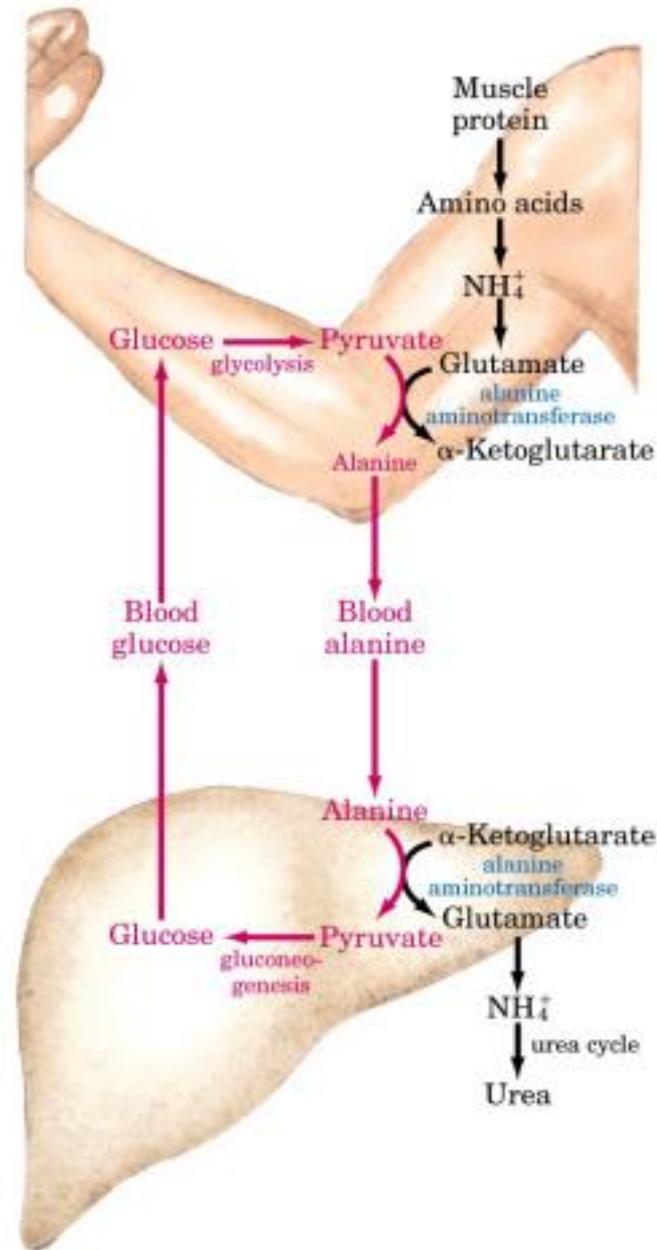
L'alanina viene prodotta quando i gruppi amminici, raccolti dal glutammato, sono trasferiti al **piruvato**. Questa reazione è catalizzata dalla **alanina transaminasi**.

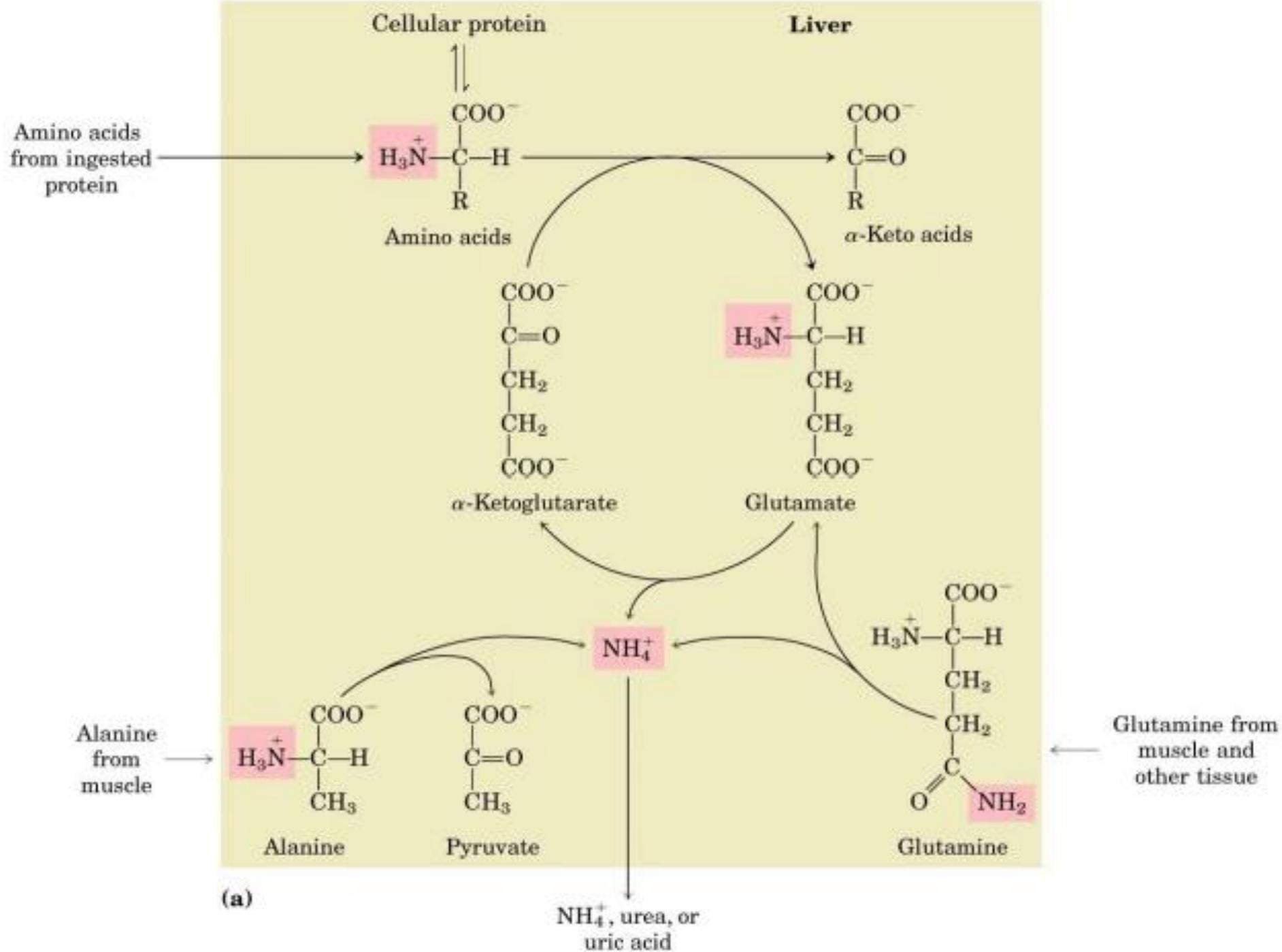


Nel fegato il gruppo amminico trasportato è trasferito dall'alanina nuovamente all' $\alpha$ -chetoglutarato generando **glutammato** e **piruvato**.

Il **piruvato** può essere utilizzato dal fegato per la **gluconeogenesi**.

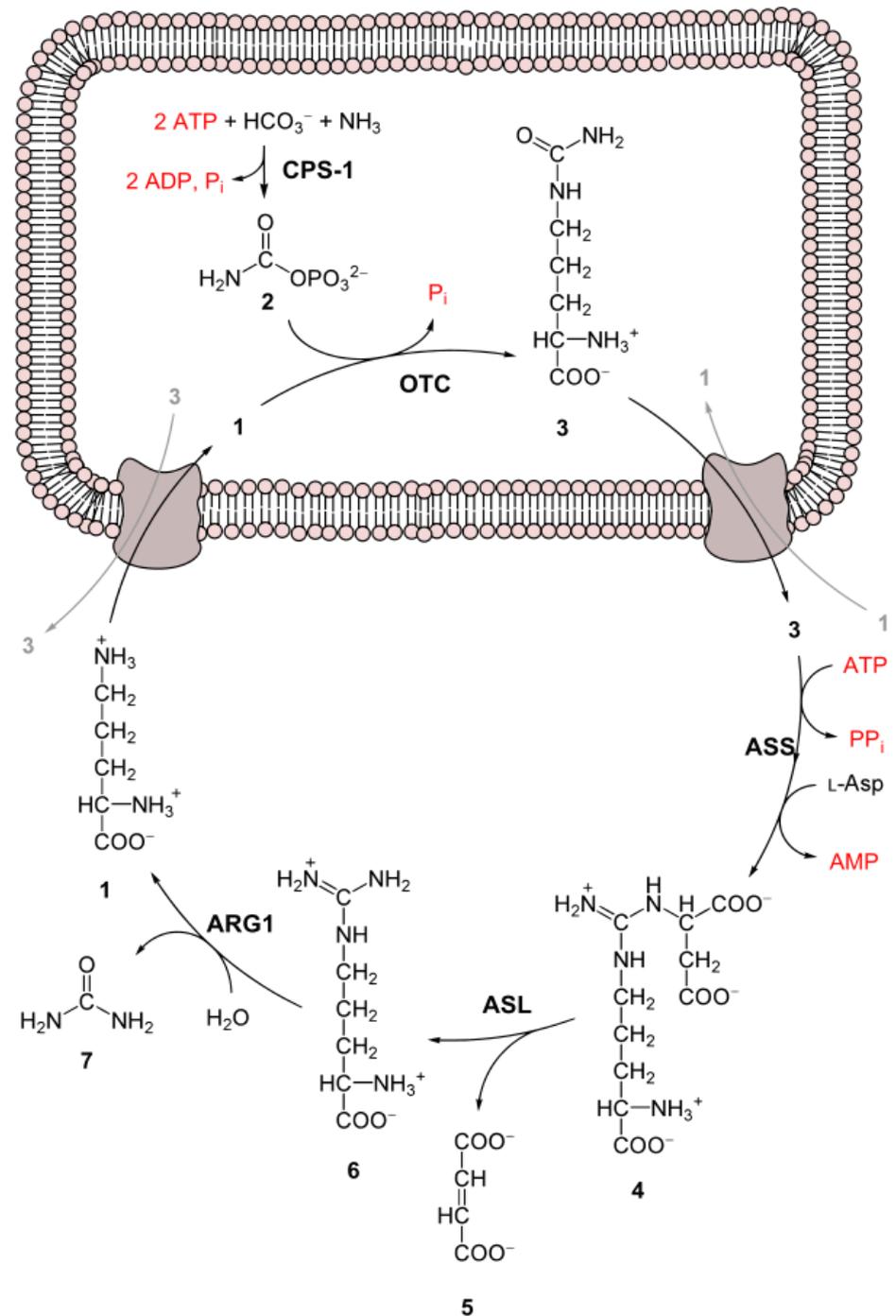
## Il ciclo del glucosio-alanina





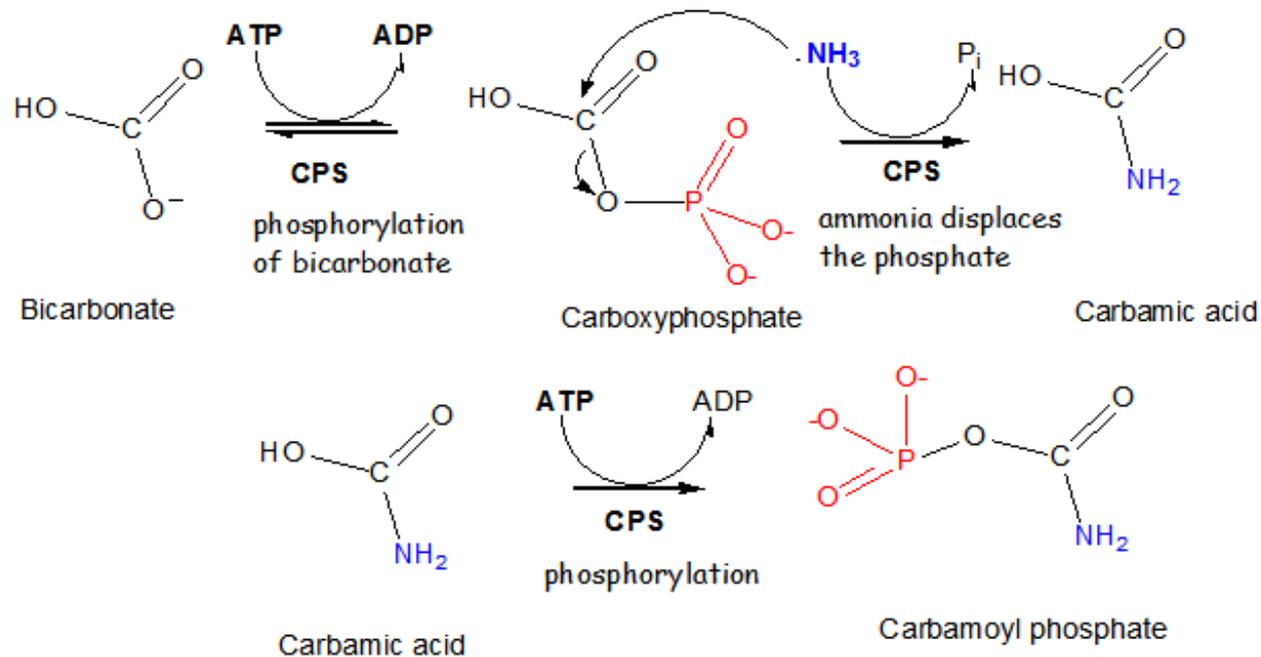
# Biosintesi dell'urea

- Avviene nel fegato per eliminare l'ammoniaca dato che oltre una certa concentrazione è tossica.
- La sintesi coinvolge 5 passaggi energeticamente favorevoli.
- Dal ciclo vengono forniti altri metaboliti importanti come l'arginina che, pur essendo un aminoacido essenziale per l'infanzia, in età adulta è prodotta dal ciclo.



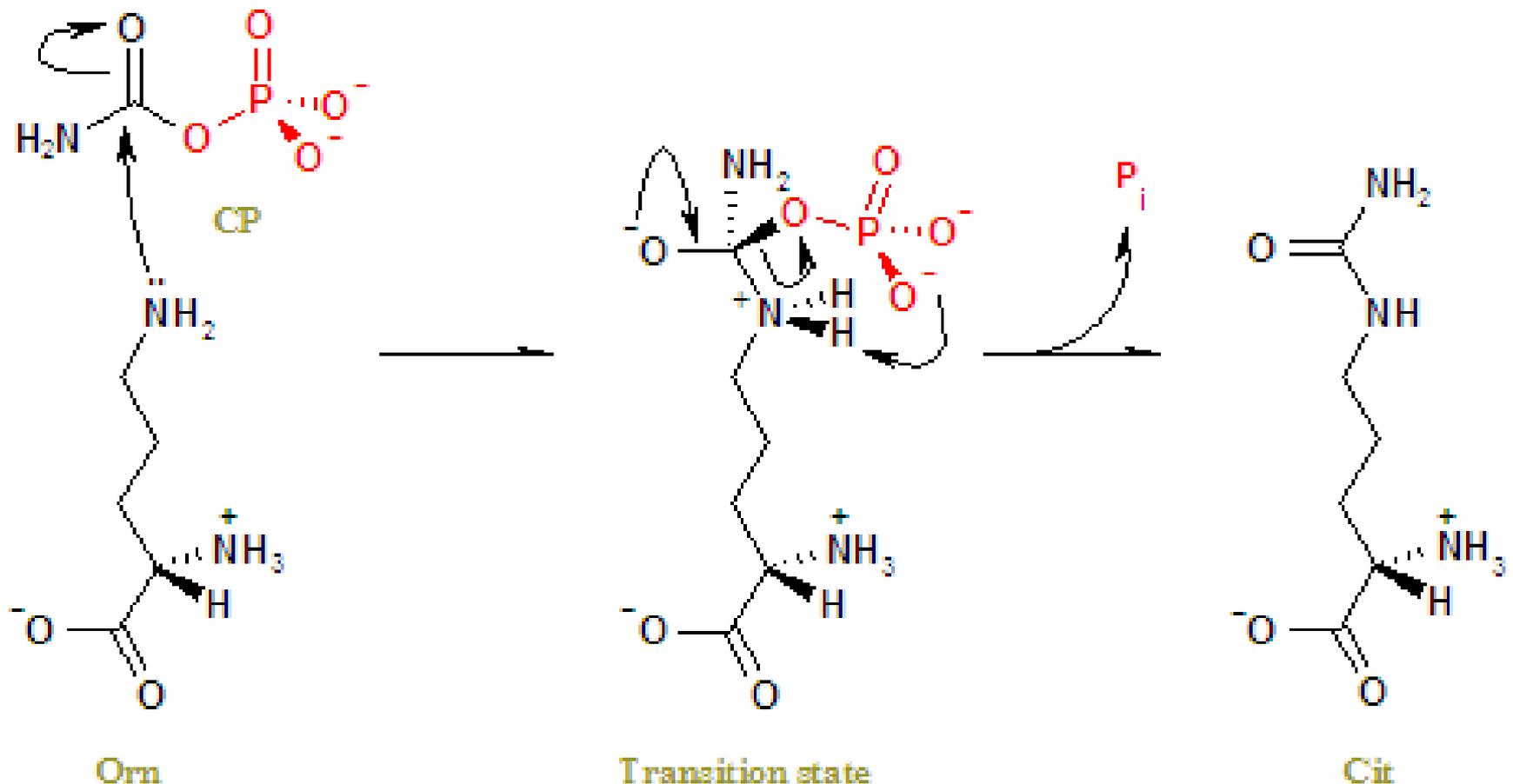
# 1-La sintesi del carbammil-fosfato

- Il **carbamilfosfato** è il prodotto delle reazioni catalizzate dall'enzima **carbamilfosfato sintetasi I** nei mitocondri delle cellule epatiche.
- La reazione avviene in tre passaggi:
  1. Lo ione bicarbonato è fosforilato dall'ATP per formare carbossi-fosfato.
  2. Il carbossi-fosfato reagisce con l'ammoniaca per dare acido carbammico e rilasciare il fosfato
  3. Una seconda molecola di ATP fosforila l'acido carbammico per dare il carbammil-fosfato



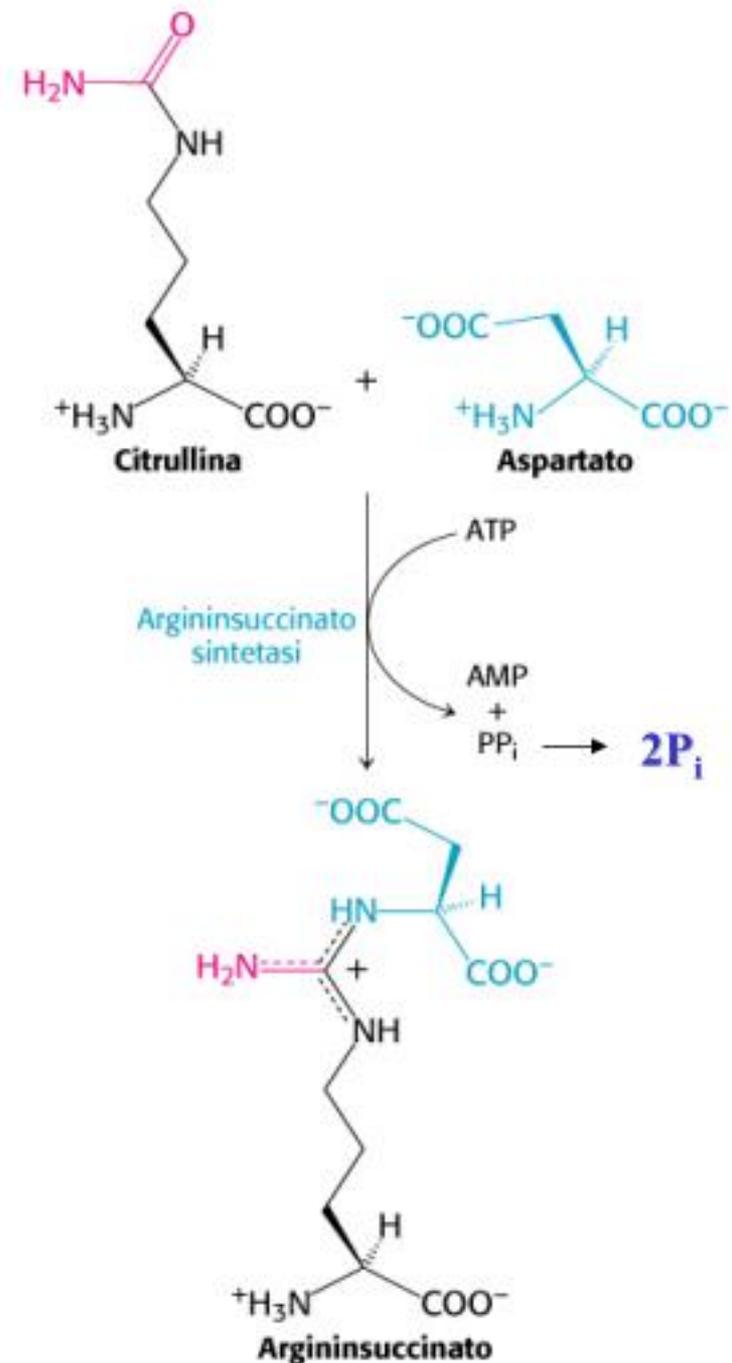
# 2-L'ornitina transcarbamilasi

L'ornitina transcarbamilasi trasferisce il carbamil-fosfato alla ornitina formando citrullina nel mitocondrio



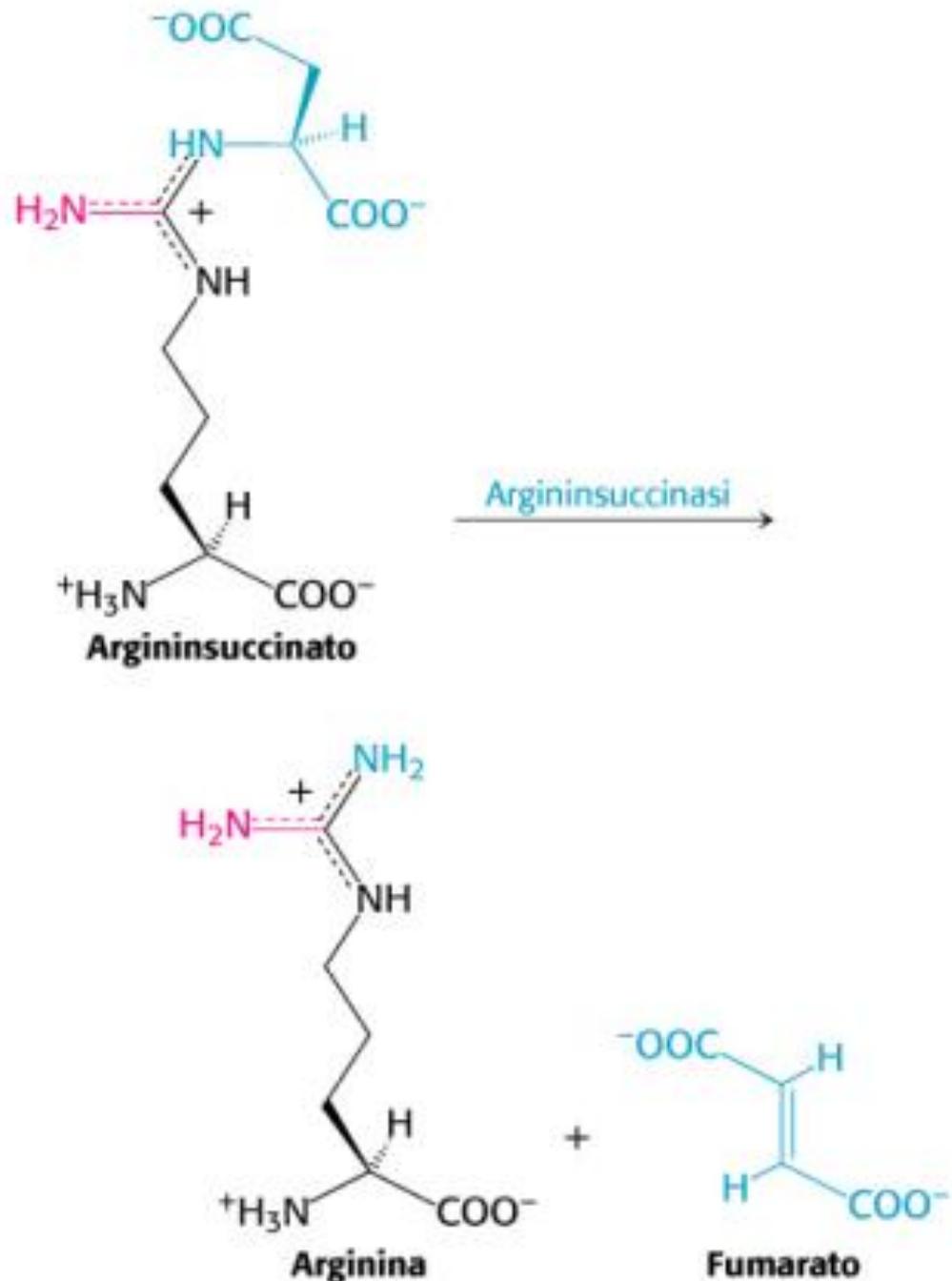
# 3-L'arginino-succinato deidrogenasi

La citrullina è trasportata dalla matrice mitocondriale nel citosol dove si condensa con l'aspartato, il donatore del secondo gruppo amminico



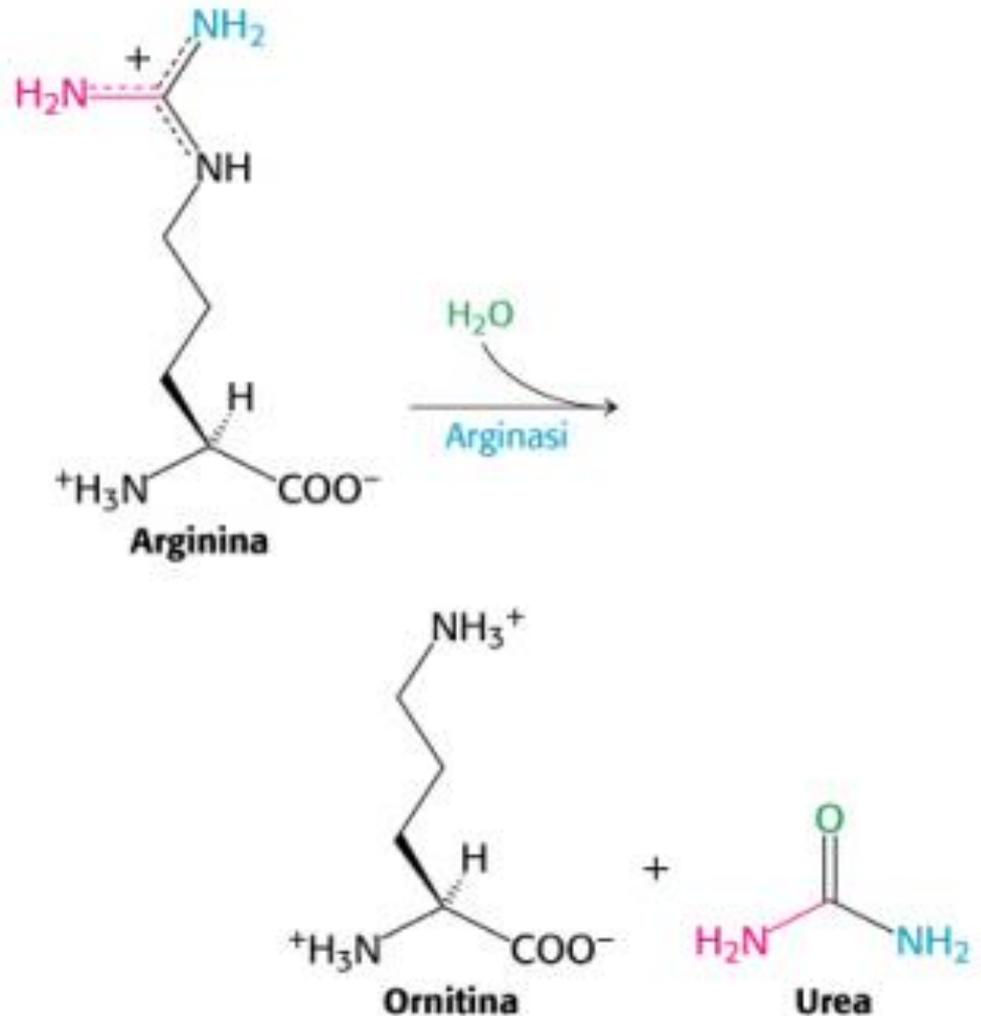
# 4-L'argininsuccinasi

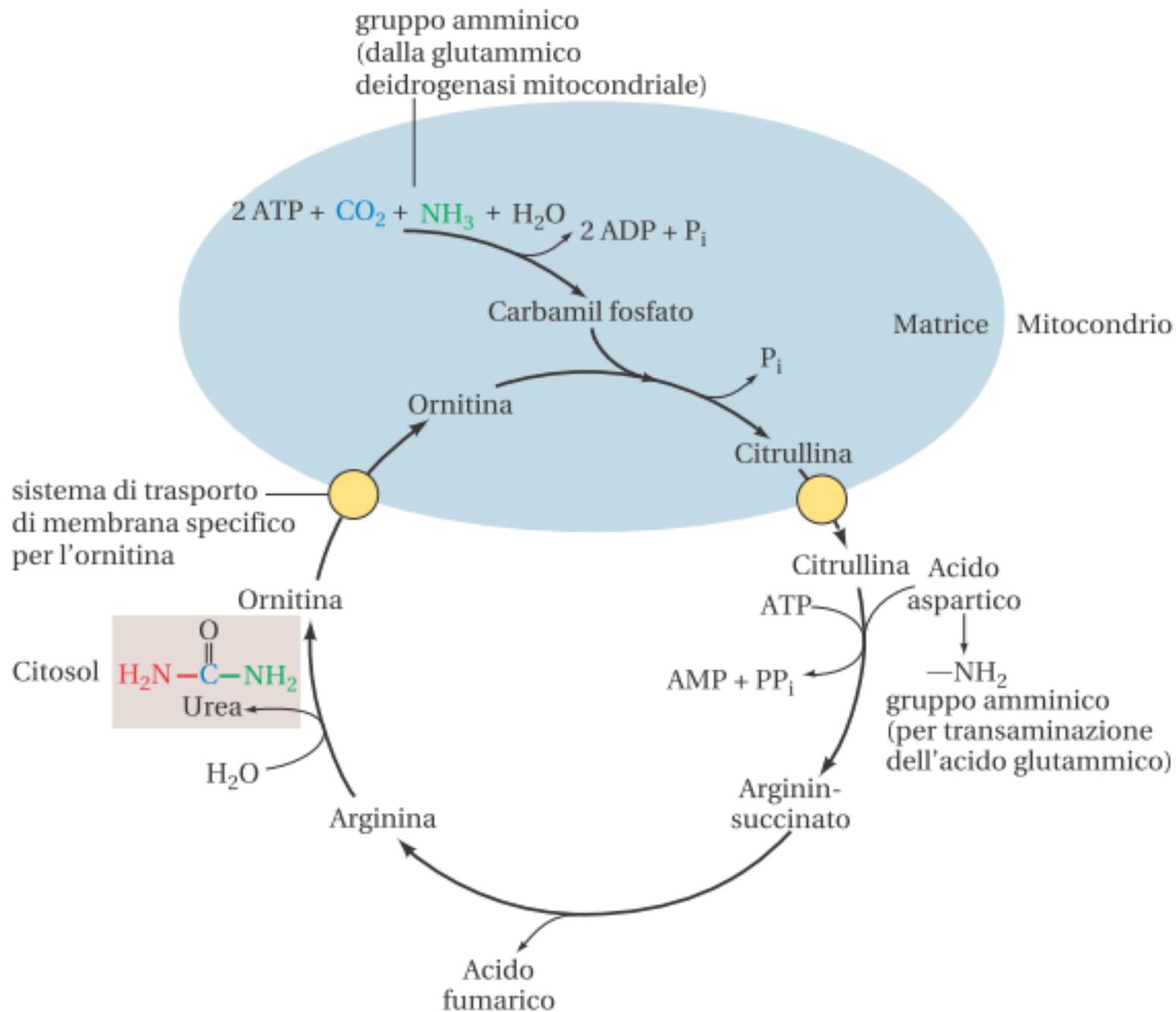
Nel citosol  
l'argininosuccinasi  
scinde  
l'argininsuccinato in  
arginina e fumarato



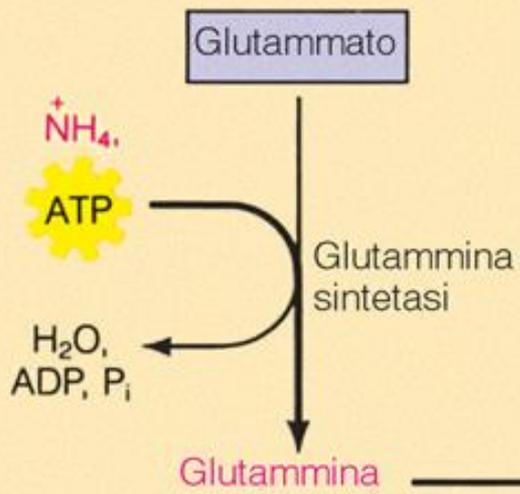
# 5-L'argininasi

L'arginina è infine idrolizzata urea e ornitina.  
L'ornitina è trasportata nuovamente nel mitocondrio per iniziare un nuovo ciclo, mentre l'urea è eliminata tramite escrezione.

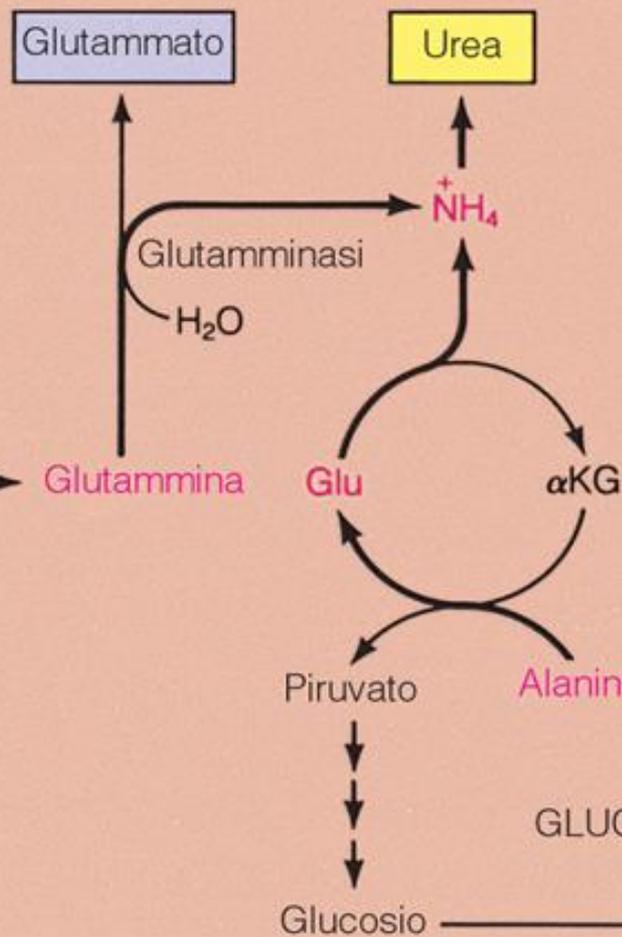




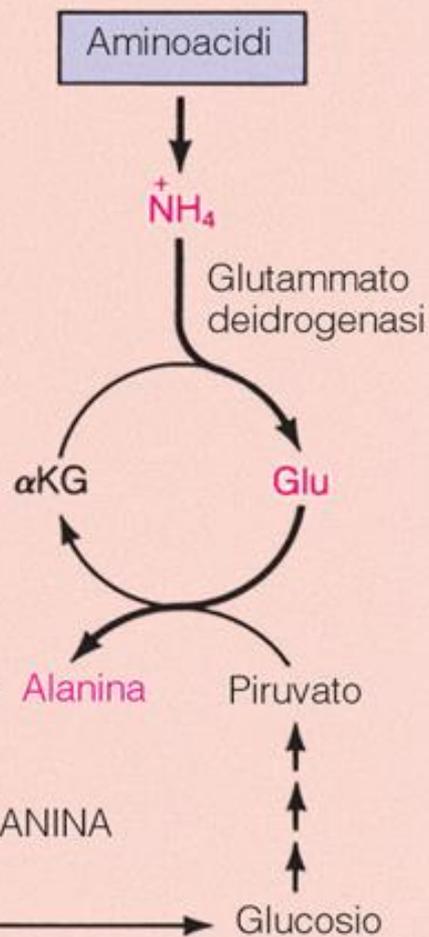
LA MAGGIOR PARTE  
DEI TESSUTI



FEGATO



MUSCOLO



# Costo energetico del ciclo dell'urea

La reazione complessiva del ciclo dell'urea è la seguente:

