

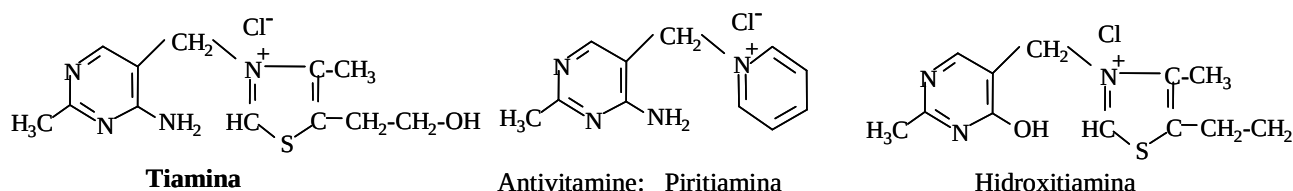
Curs nr. 1

Rolul metabolic al vitaminelor hidrosolubile

Vitaminele sunt substanțe de natură exogenă ce îndeplinesc funcții fiziologice specifice și esențiale în celula vie. Tabelul următor prezintă vitaminele hidrosolubile și vitaminele liposolubile, precum și rolul lor în organism.

Vitamina	Denumire	Rol fiziologic principal
	<i>1. Vitamine hidrosolubile:</i>	
B ₁	Vitamina antineuritică (Tiamină)	Decarboxilarea α -cetoacizilor
B ₂	Vitamina creșterii (Riboflavină)	Reacții redox
B ₃	Vitamina antipelagrosă (Niacină; Factor PP;	Reacții redox (NAD)
B ₄	amida acidului nicotinic)	Fosfolipide
B ₅	Acidul pantotenic	Transport grupe acil (CoA)
	Colina (factorul de creștere)	
B ₆	Vitamina antipelagrosă (Piridoxină)	Transport grupe amino
B ₇	Biotină (Bios II, vitamina H)	Transport CO ₂
B ₉	Acidul folic (acid pteroilglutamic)	Transport grupe C ₁
B ₁₂	Vitamina antianemică	Transport grupe alchil
—	Acidul lipoic	Transport H și grupe acil
—	Bios I (mezo-inozitol)	—
—	Carnitina	—
C	Vitamina antiscorbutică (acid ascorbic)	Cofactor în reacția de hidroxilare; tampon redox
P	Vitamina permeabilității (Rutină)	
	<i>2. Vitamine liposolubile:</i>	
A	Vitamina antixeroftalmică (Axeroftol)	Ciclul vederii
D	Vitamina antirahitică (Calciferol)	Transportă și fixează Ca ²⁺
E	Vitamina antisterilității (Tocoferol)	Antioxidant al lipidelor
K	Vitamina antihemoragică (Filochinonă)	Sinteza protrombinei

Vitamina B₁

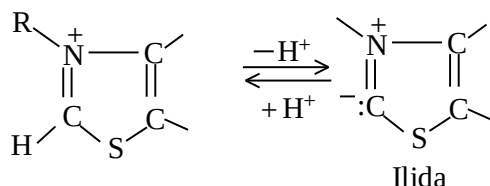


Carența de Vitamina B₁ (tiamina, vitamina antineuritică) produce o maladie numită *beri-beri*. Afecțiunea se manifestă, între altele, prin pierderea poftei de mâncare, simptome gastro-intestinale, edeme, tulburări circulatorii, simptome neurologice (somnolență, dureri de cap, nevrită periferică), degenerarea sistemului nervos periferic și paralizia membrelor, prin tulburări ale funcției inimii și prin afecțiuni ale pielii. Simptome similare pot fi produse și experimental, la animale (găini, porumbei sau șoareci), prin hrănirea lor cu orez decorticat.

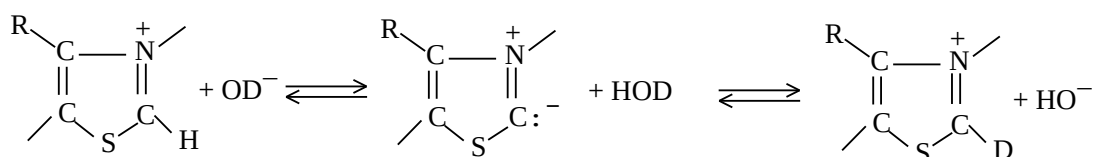
Simptomele deficienței tiaminice (beri-beri) pot fi induse de către analogii tiaminei, cu rol antivitaminic, cum ar fi piritiamina și hidroxitiamina.

Rol metabolic. Tiamina, sub formă de pirofosfat (TPP) participă la decarboxilarea acidului piruvic la acetaldehidă în procesul fermentației alcoolice și, în general, la decarboxilarea α -cetoacizilor.

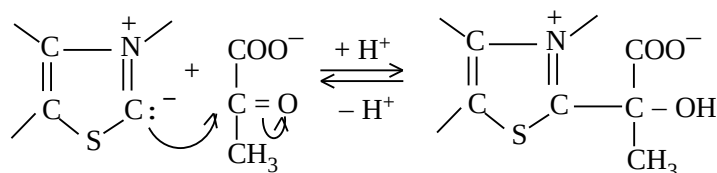
Prin reacții de schimb cu deuteriu s-a găsit că inelul de tiazoliu din tiamină trece, în soluție neutră, într-o ilidă. R. Breslow a reușit să explice mecanismul biochimic al acțiunii TPP utilizând tehnica RMN. Protonul din poziția C₂ din inelul tiazolic este ușor de înlocuit cu protonii apei sau cu ionii de deuteriu din D₂O.



Are loc o următoare reacție, catalizată de baze:



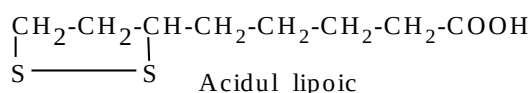
O asemenea ilidă este un agent nucleofil puternic capabil să reacționeze, ca și alte ilide, cu o grupă carbonil. Are loc așadar o reacție de adiție nucleofilă la legătura π polarizată a grupărilor carbonil ale diverselor substanțe având rol de substrat pentru a forma intermediari reactivi de tipul următor:



Acestea sunt *reacții de decarboxilare a α -ceto-acizilor* și, de asemenea, *reacții de formare sau de degradare a α -cetolilor*.

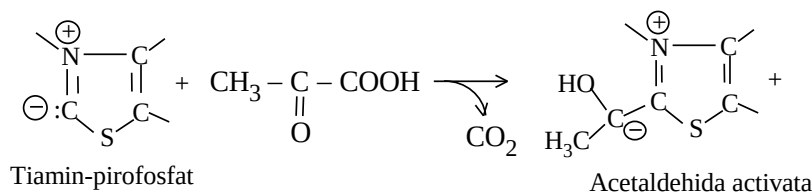
În condiții aerobe, restul de acetaldehidă este transferat pe acidul lipoic și apoi pe CoA, rezultând acetil~CoA, produs activ, capabil să participe la reacțiile ciclului Krebs.

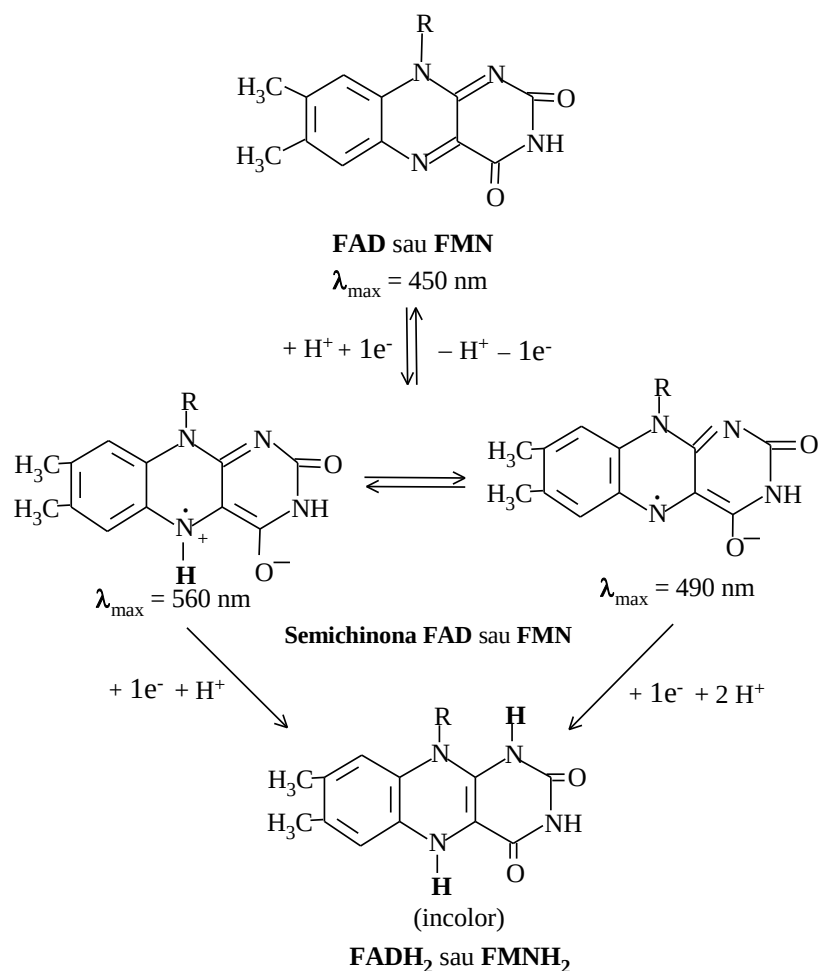
Acidul lipoic este vitamină, fiind un factor de creștere pentru un mare număr de bacterii și protozoare.



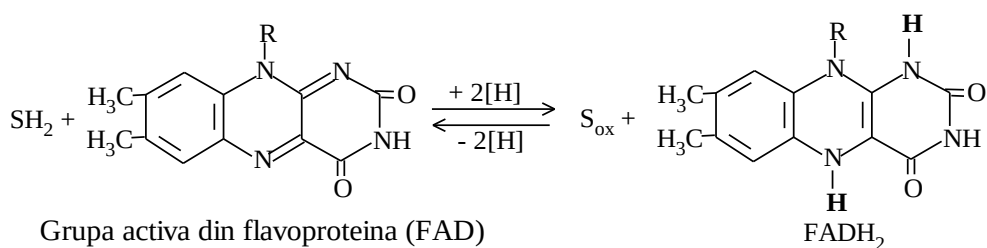
Acidul lipoic

Acidul lipoic participă și stimulează decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic (sau a celui α -cetoglutamic). Această conversie implică formarea unui complex al aldehidei cu pirofosfatul de tiamină (TPP) și reacția sa ulterioară cu acidul lipoic.



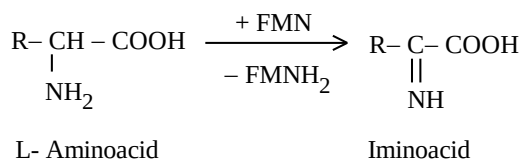


În general, dehidrogenazele sunt enzime legate de membranele celulare sau mitocondriale, iar transferul electronic se face către un acceptor de electroni, de tipul chinonelor sau citocromilor ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$). Flavinenzimele participă la reacții de oxidoreducere, deoarece ciclul izoaloxazinic poate suferi reduceri reversibile, prin fixarea temporară la N_1 și N_{10} , a doi atomi de hidrogen, cu deplasarea dublei legături.



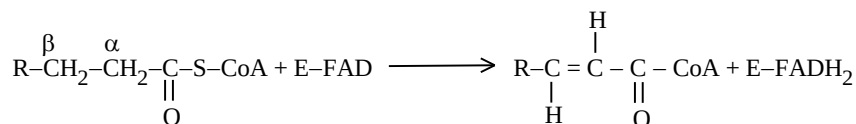
Hidrogenul se leagă de inelul izoaloxazinic al restului de riboflavină, care trece într-un dihidro-derivat. Atomii de hidrogen sunt preluați de la diferite substraturi reduse (SH_2), cu care intră în reacție și care se oxidează (S_{ox}). Reducerea flavinelor se desfășoară în mai multe etape, la care participă radicali liberi de tipul semichinonelor. Acești radicali liberi pot fi puși în evidență prin tehnica rezonanței de spin electronic (RES).

Succinat-dehidrogenaza este un exemplu de flavoenzimă; aceasta catalizează îndepărtarea a doi atomi de hidrogen din molecula acidului succinic și transferul lor pe grupa prostetică FAD. Multe din aceste flavinenzime conțin în plus un metal care este esențial pentru funcționarea enzimelor-metal-flavoproteine.

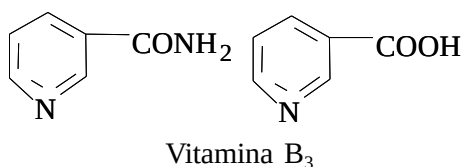


FAD intervine de asemenea în dehidrogenarea acizilor grași care este primul pas în procesul de oxidare a acestora.

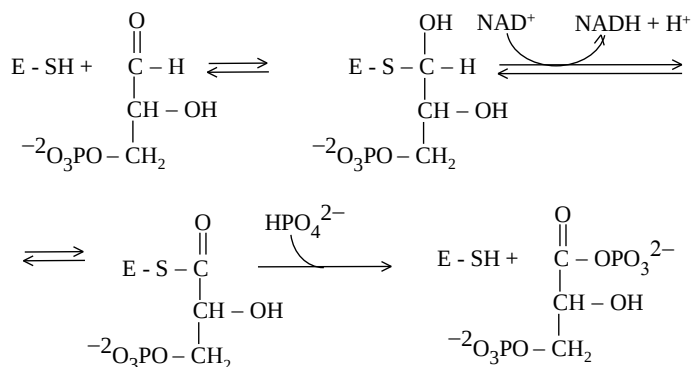
Reacția cu acești compuși poate fi folosită la determinarea activității dehidrogenazelor.



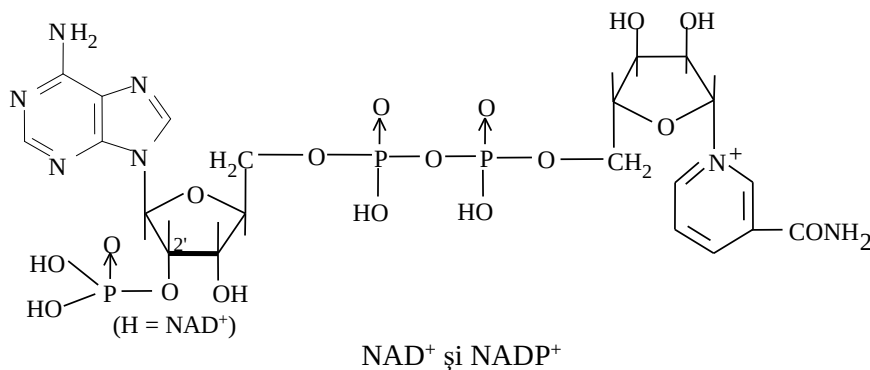
Vitamina B₃ (*niacina, vitamina PP*) este reprezentată de acidul nicotinic (niacina) și amida acidului nicotinic (niacin amida).



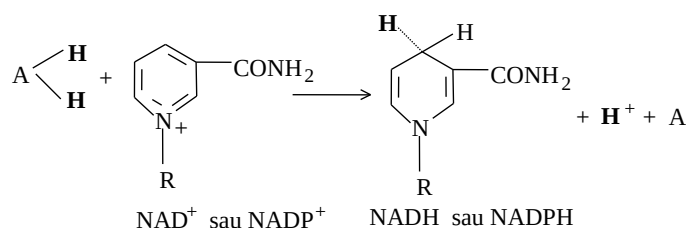
Rol metabolic. Nicotinamida acționează în reacțiile de oxidoreducere din organism sub forma a două coenzime, NAD⁺ (nicotinamid-adenin-dinucleotida) și NADP⁺ (nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfatul). Coenzimele ce provin de la nicotinamidă sunt reducători biologici și au mai degrabă rol de cosubstraturi decât de coenzime adevărate. Cea mai cunoscută funcție a NAD⁺ este aceea de a accepta doi electroni și un proton de la un substrat care se oxidează biologic, pentru a se obține NADH, forma redusă a coenzimei. Aceasta difuzează sau este transportată la capătul lanțului transportor de electroni din celulă și reoxidată de către acceptorul final de electroni din organismele aerobe, O₂, cu formarea simultană de ATP.



Un exemplu de reacție catalizată de o dehidrogenază dependentă de piridinnucleotide îl reprezintă oxidarea acidului malic la acid oxalilacetic sub influența *malat-dehidrogenazei*. Malat-dehidrogenaza din ficat funcționează cu NAD⁺ drept coenzimă, nu și cu NADP⁺. Alte piridinnucleotide leagă în mod specific NADP⁺. Un exemplu în acest sens este și *glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza*.

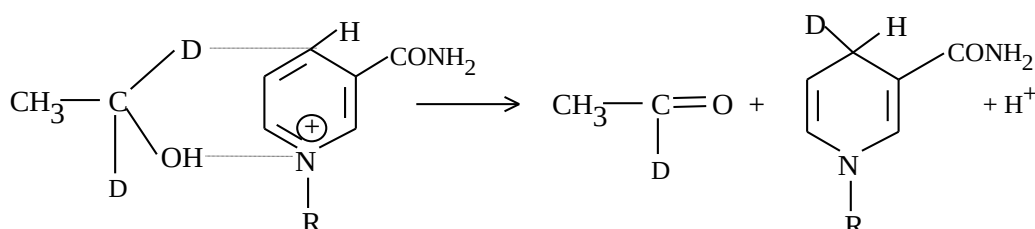


Reacția de dehidrogenare are loc printr-un transfer direct de atomi de hidrogen de la o moleculă la alta; dacă ar fi avut loc un transfer de electroni, s-ar fi format ioni de hidrogen, care ar fi ajuns pe restul de nicotinamidă. Acest mecanism a fost stabilit cu $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$ ca substrat.



Reducerea ciclului piridinic de către substrat (AH_2)

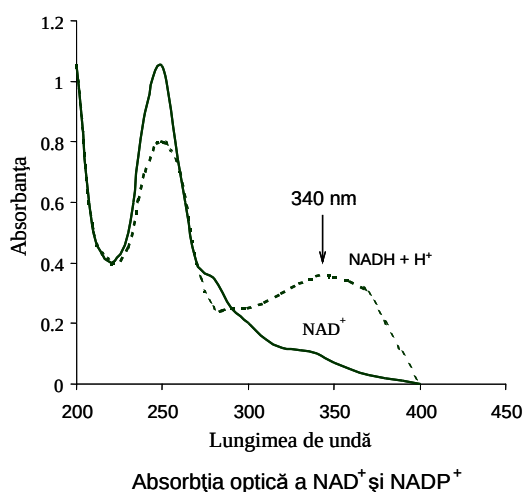
În timpul reacției de dehidrogenare, orientarea relativă a substratului și coenzimei este întotdeauna aceeași. Atomul de hidrogen este transferat numai atomului C_4 din nucleul coenzimei, iar hidrogenul hidroxic este transferat azotului. Reacția este **stereochimic specifică**, având loc numai pe o față a planului inelului.



Spectrul de absorbție în ultraviolet a codehidrazelor prezintă o bandă intensă la 260 nm; în spectrul formelor reduse (NADH și, respectiv, NADPH), această bandă este atenuată, dar apare în schimb o bandă nouă, de mai mică intensitate, **la 340 nm**:

Carența în nicotinamidă se manifestă prin pelagră (pella-agra = piele aspră, brună). Pelagra se instalează când dieta este constituită în exclusivitate din porumb, sărac în triptofan și vitamina B_6 . Semnele pelagrei sunt: oboseala, slăbiciunea, indigestia, anorexia, urmate după câteva luni de **dermatită** (mai ales la nivelul pielii expuse la soare), **diaree** și **demență** (boala celor 3D).

Dereglările metabolice din pelagră sunt greu de definit deoarece carența de vitamină PP poate fi indusă de carența B_6 , în lipsa căreia nu se mai sintetizează vitamina PP din triptofan



Bibliografie

1. A. L. Lehninger, Biochimie, vol. I and II, Edit. Tehnică, București, 1987, 1992.
2. D. Cojocaru, Biochimia vitaminelor, Edit. Gama, Iași, 1998.

3. I. F. Dumitru, Biochimie, Edit. did și ped., București, 1980.
4. E. Macovschi, Biostructura, Edit. acad. București, 1968.
5. Artenie, Vl. "Biochimie". Ed. Univ. "Al.I.Cuza", Iasi.1991.
6. Dinu V., Trutia E., Popa-Cristea, E., Popescu A. Biochimie medicala. Mic tratat. Ed. Medicala. Bucuresti. 1996.

In limba engleză găsiți, de asemenea cărți bune:

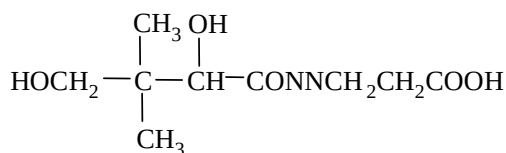
1. D. L. Nelson and M. M. Cox - *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition. W. H. Freeman & Comp., New York, 2004.(avem sub formă de fișiere pdf).
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer - *Biochemistry*, 5 ed., W. H. Freeman and Co., New York, 2002.
3. R. Kellner, F. Lottspeich, H. E. Meyer - *Microcharacterization of proteins*. Wiley - VCH, Weinheim, New York, Toronto, etc. 1999.
4. M. Devlin, *Textbook of biochemistry*, John Willey and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986.

Curs nr. 2

Rolul metabolic al vitaminelor hidrosolubile

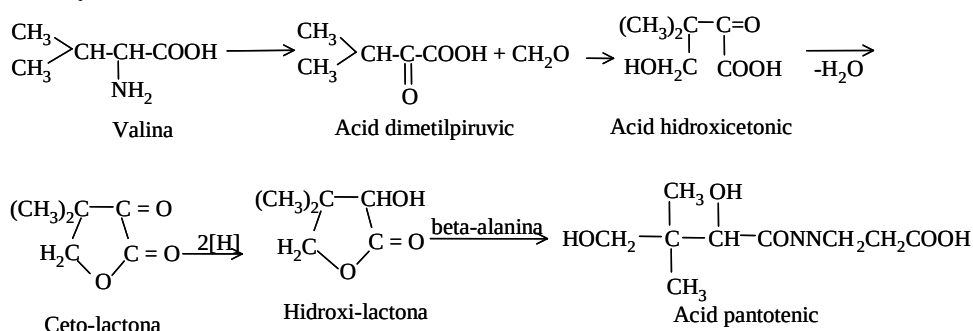
Vitamina B₅

Vitamina B₅ sau acidul pantotenic este un derivat al β-alaninei. Lipsa acestei vitamine provoacă dermatite, tulburări de creștere, albirea părului, necroza glandelor suprarenalelor, hemoragie etc.



Acid pantotenic

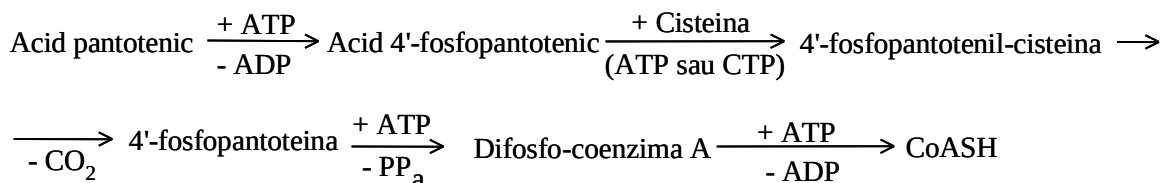
În plante și în microorganisme se formează probabil din valină și din β-alanină; sinteza "in vitro" urmează aceeași cale.



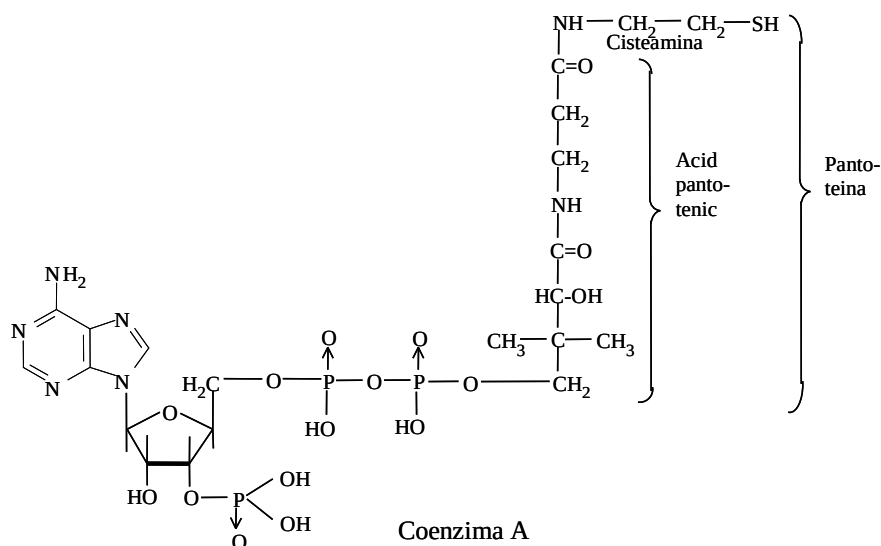
Sinteza acidului pantotenic

Formele active ale acidului pantotenic sunt 4'-fosfopantoteina și coenzima A.

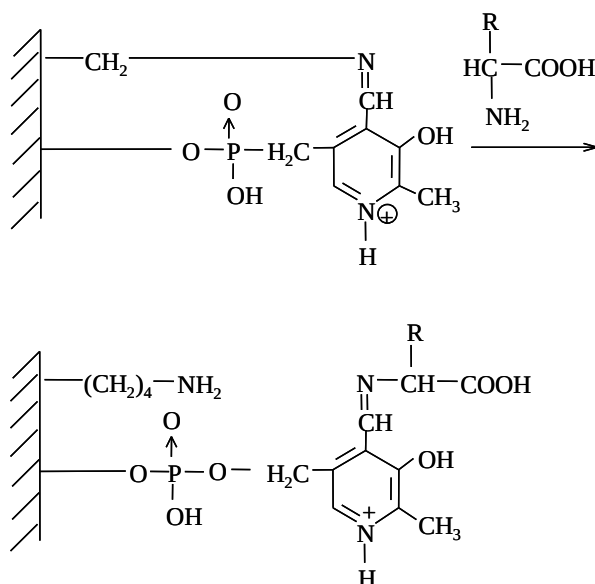
Coenzima A este sintetizată de toate viețuitoarele, inclusiv de către om, prin următorul mecanism:



Coenzima A, sub formă de acetyl-CoA, servește la acetilarea unor substraturi, fiind denumită și "acid acetic activ". Pentru detoxifierea unor substanțe străine, cum sunt anilina și sulfanilamida, acestea sunt acetilate de către acetyl-CoA înainte de a fi eliminate.

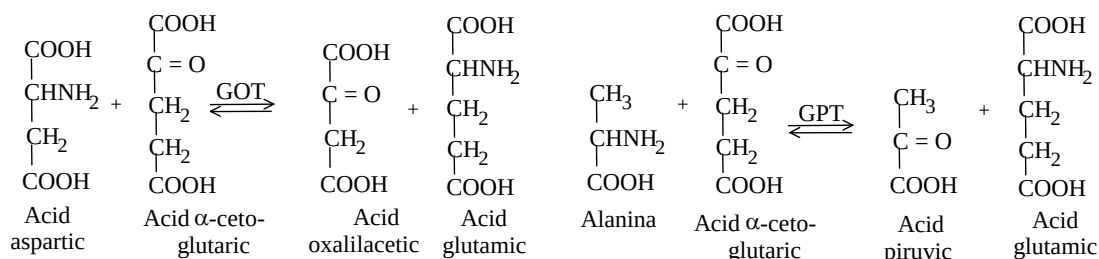


9



Legarea piridoxal-5-fosfatului la apoenzima aminotransferazelor

Piridoxal-5-fosfatul se leagă printr-un sistem de baze Schiff cu gruparea ϵ -amino a unui rest de lizină din apoenzimă. În timpul formării complexului enzimă-substrat, această grupare este eliberată. Numai piridoxalul îndeplinește funcții de coenzimă. În calitate de coenzimă a aminotransferazelor, vitamina B₆ este prezentă sub formă de fosfopiridoxamină.



Reacție de transaminare catalizată de L-aspartat aminotransferaza

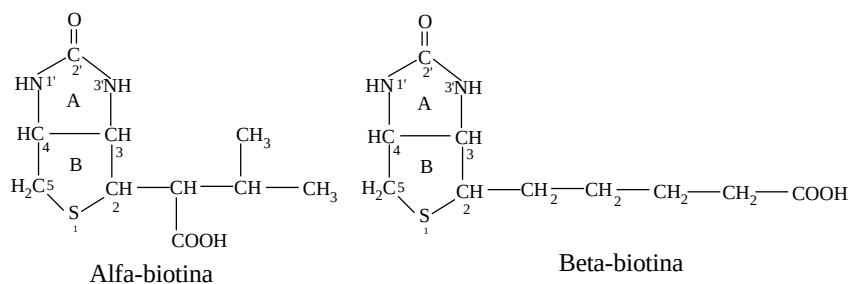
Reacție de transaminare catalizată de L-alanin: 2-oxoglutarat aminotransferaza

Funcția principală a vitaminei B₆ (sub formă de fosfopiridoxamină) este aceea de coenzimă a aminotransferazelor, enzime care transportă grupa NH₂ de la un substrat la altul. Se cunosc 19 aminotransferaze, dintre care cele mai studiate sunt *L-aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.1.1) sau GOT și *L-alanin: 2-oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.1.2) sau GPT.

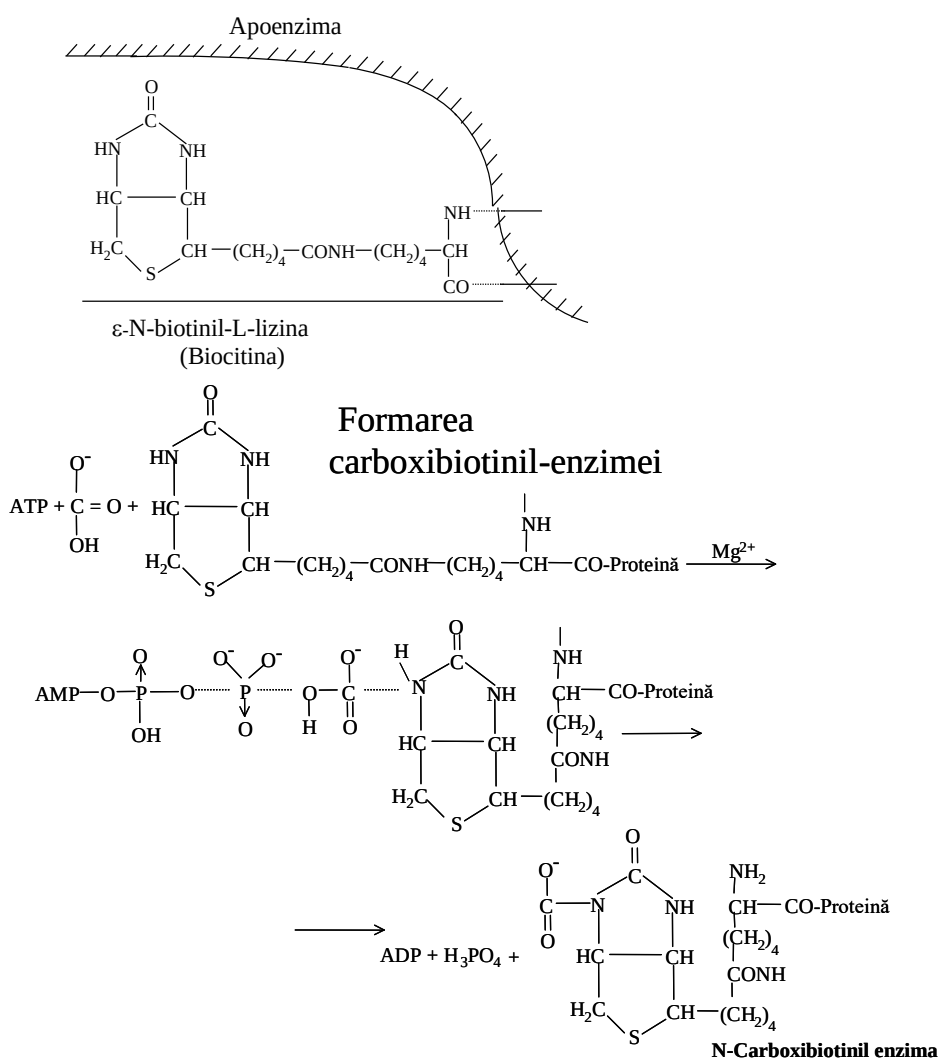
Tulburările de aport vitaminic conduc la stări de nervozitate, insomnie, tulburări de mers, afecțiuni cutanate în jurul nasului, ochilor, gurii, limfocitopenie, edeme. Aceste tulburări ale pielii seamănă cu pelagra, însă nu se pot vindeca cu acid nicotinic.

Vitamina B₇

Vitamina B₇ (biotina, vitamina H) controlează diviziunea celulară. Biotina se află în gălbenușul de ou legată de proteină prin intermediul unui rest de lizină. A fost izolată în stare cristalizată de Kögl (1936) din gălbenuș de ou, apoi din ficat de către Vigneaud, care i-a determinat structura:

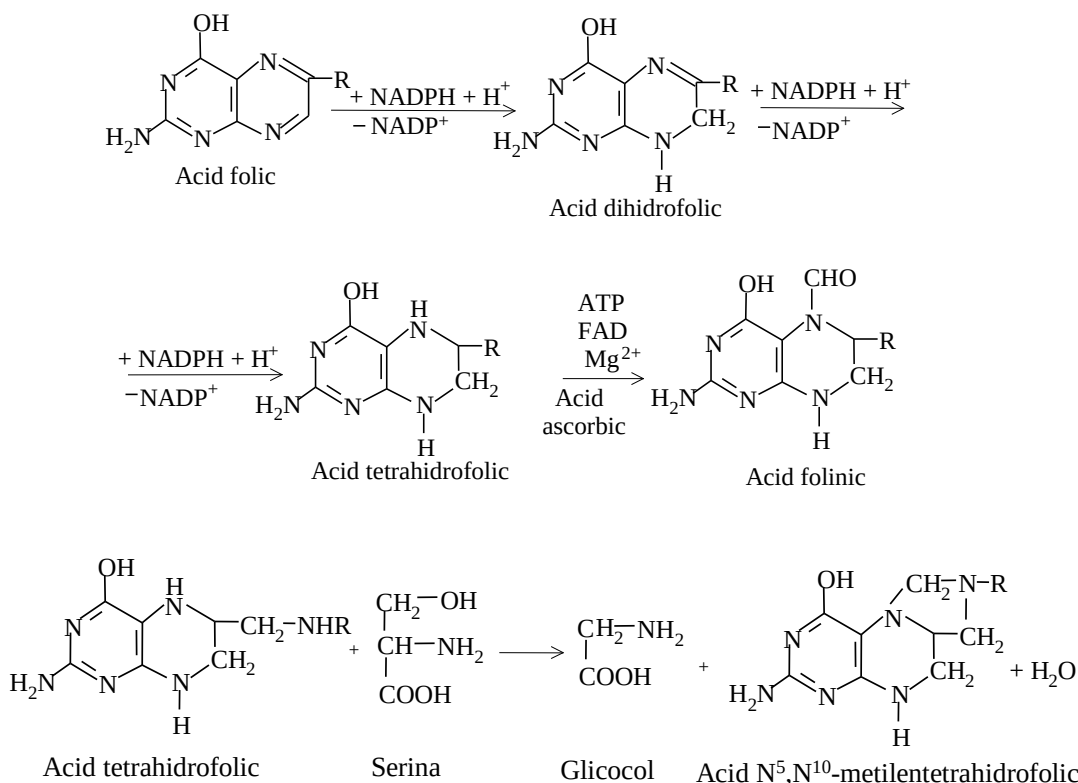


Rol metabolic. Biotina este cofactorul reacțiilor enzimatice în care are loc o activare, urmată de un transfer de CO_2 , participând astfel la reacțiile de carboxilare și decarboxilare. În reacțiile de carboxilare, CO_2 activat de către ATP, participă sub formă de carboxi-biotin-enzimă. Formarea complexului **macroergic** dintre CO_2 și biotină, cu $\text{DG} = -4,74 \text{ kcal/mol}$, arată că biotinil enzimele sunt substanțe bogate în energie. Biocitinaza, enzimă prezentă în plasmă, ficat, pancreas, hidrolizează biocitina, cu eliberarea biotinei. În produsele naturale apare combinată cu lizina, sub formă de biocitină:



Dintre reacțiile enzimatice catalizate de carboxilaze-biotin-dependente pot fi menționate:

Reacția de carboxilare a acidului propionic (catalizată de propionil-CoA-carboxilaza, care conține 4 moli de biotină la un mol de proteină):

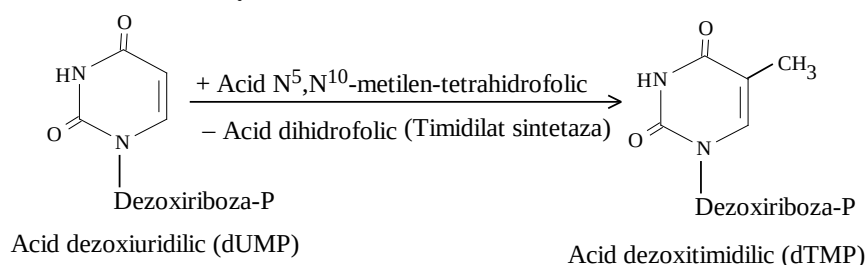


Biosinteza acidului N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofolic

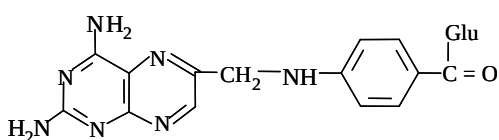
Rol metabolic: coenzime care participă la transferul unui atom de carbon în diferite stări de oxidare: -CH₃, -CH₂-, -CH=, -CHO, -CH=NH. Aceste fragmente pot trece unul în altul pe cale metabolică. Coenzimele acidului folic participă la sinteza metioninei din homoserină (N₅ = CH₃), sinteza acidului timidilic din acid uridilic (N₅, N₁₀ = metilen), în sinteza nucleului de purină. Sursa atomului de carbon pentru formarea acidului folinic este serina. Reacția este catalizată de o enzimă care conține fosfopiridoxal.

ADN conține timidină (5-metiluracil) în loc de uracil, care este prezent în ARN. Acidul dezoxitimidilic (dTMP) este format din acid dezoxiuridilic (dUMP) cu ajutorul timidilat sintetazei, care catalizează metilarea uracilului într-o reacție în care acidul N⁵, N¹⁰-metilentetrahidrofolic este donatorul unei grupe CH₃.

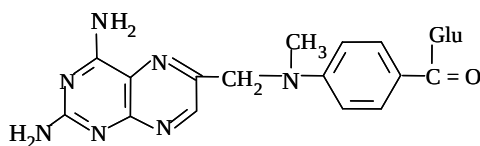
Formarea timidilatului depinde de cantitatea de acid folinic prezent în celulă. În cazul unor cantități reduse de acid folinic are loc inhibiția sintezei de ADN și oprirea multiplicării celulare. Unele medicamente, de tipul aminopterinei și ametopterinei, se comportă ca antivitamine, încetinesc mult ritmul de creștere în special al unor tumori și se mai numesc medicamente antifolice.



Datorită asemănării lor structurale cu acidul folic, acestea se reduc la acid dihidrofolic, dar conversia dihidrofolatului în tetrahidrofolat este inhibată competitiv.



Aminopterina

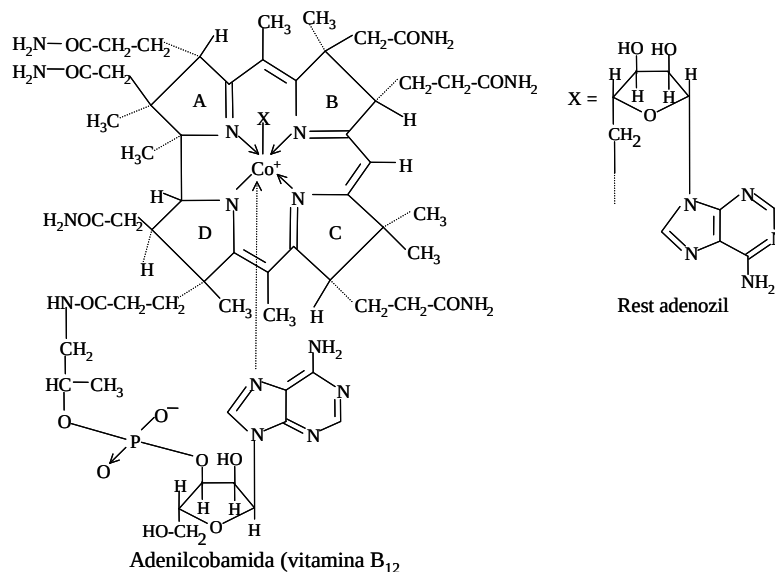


Ametopterina

Medicamente antitumorale, antimetaboliți ai acidului folic

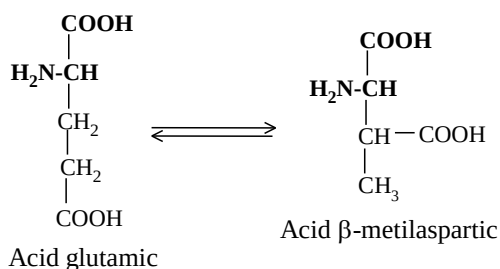
Carența apare din cauza unui aport alimentar scăzut, stres (sarcină), tulburări de absorbție, deficit de enzime implicate în sistemul de transport sau terapia cu unele medicamente. Carența se manifestă exclusiv prin perturbarea hematopoiezei, simptomul fiind anemie megaloblastică.

Vitamina B₁₂



Vitamina B₁₂ derivă de la un sistem macrociclic numit *corină*, care conține patru atomi de azot. Lipsa vitaminei B₁₂ din organism produce anemie pernicioasă, o maladie a sângelui însoțită de tulburări nervoase. Injecțiile cu vitamina B₁₂ restabilesc numărul de celule (globule) roșii și reechilibrează sistemul nervos central în anemia pernicioasă. Din *Clostridium tetanomorphum* a fost izolată adenilcobamida (formula mai sus).

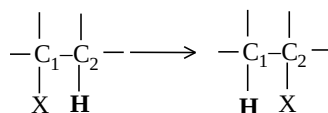
Pseudovitamina B₁₂ este cofactor în conversia enzimatică a acidului glutamic în acid β-metil-aspartic în bacteriile *Clostridium tetanomorphum*:



Pseudovitamina B₁₂ conține adenină în loc de 5,6-dimetilbenzimidazol în ribonucleotidă, deoarece *C. tetanomorphum* și alte microorganisme nu pot sintetiza derivatul benzimidazolic, ci adenina.

Vitamina B₁₂ pătrunde în celulă sub formă de HO-cobalamină, metilându-se apoi la CH₃-cobalamină. O cantitate importantă de vitamină intră în mitocondrii și se transformă în 5'-deoxiadenozil-cobalamină.

Rol coenzimatic. Vitamina B₁₂ are un rol în maturarea și dezvoltarea eritrocitelor, celulele roșii ale sângelui. La om s-au identificat două forme coenzimatice ale cobalaminei, după gruparea alchil atașată în poziția 6 de coordonare a cobaltului: 5'-deoxiadenozil-cobalamina și CH₃-cobalamina (Co⁺).



Schimarea poziției atomului de hidrogen
sub acțiunea enzimelor dependente de B₁

Aceste coenzime sunt în mod normal sintetizate din ciancobalamină sau din aquocobalamină, din alimente. Cele două forme sunt implicate în funcționarea a două sisteme enzimatic: metilmalonil-CoA-izomeraza și, respectiv, homocistein-CH₃-transferaza (sau metionin-sintetaza).

În absența cobalaminei, prima reacție se blochează, se acumulează N⁵-CH₃-FH₄ (FH₄ = acid tetrahidrofolic), deturnând folatul de la rolul său de transportor de grupe "1C", constituind așa-numita "capcană a folatului sau capcana metilului". Homocisteina rămâne nemetilată și se elimină prin urină (homocistinurie), iar în al doilea caz se poate acumula și elimina prin urină acidul L-metil-malonic (acidurie metilmalonică).

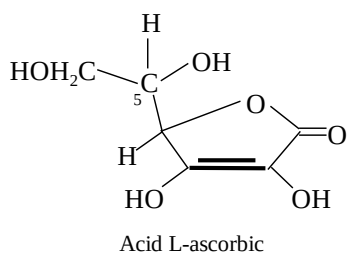
Cobalamina și acidul folic sunt implicate în metilarea histonelor, în timpul replicării ADN-ului. Pe cale neenzimatică, vitamina B₁₂ intervine în oxidarea tiolilor.

Tulburări de aport vitaminic. Vitamina B₁₂ acționează în organism ca *factor de creștere* și ca *factor cu acțiune antipernicioasă*, participând totodată la menținerea integrității celulei nervoase.

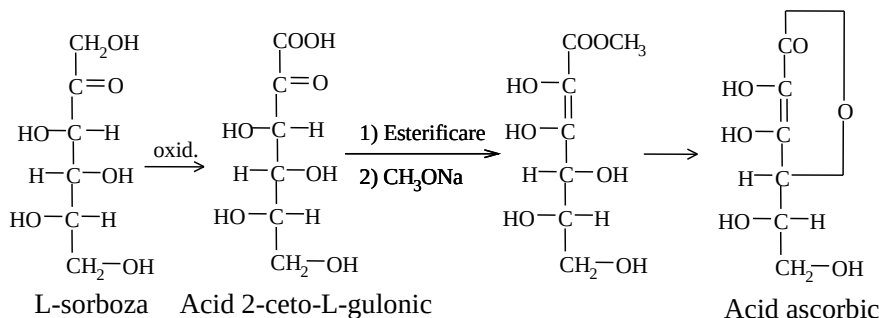
Anemia pernicioasă se caracterizează prin eritropoeză megaloblastică, cu modificări ale leucopoeziei și formării de trombocite.

Carența de cobalamină este adesea corelată cu cea de acid folic și, din această cauză, diferențierea celor două este dificilă.

Vitamina C (acidul ascorbic) formează cristale incolor, cu p.t. 192 °C, dextrogire, sensibile la oxidare și încălzire, care le anihilează acțiunea fiziologică. Acidul ascorbic este un acid de tăria acizilor carboxilici: el poate fi titrat cu hidroxizi alcalini, descompune carbonații și formează săruri. Aciditatea sa este conferită de una din grupele OH enolice. Acidul dehidroascorbic nu are caracter acid.



Acidul ascorbic dă o colorație intensă cu clorura ferică datorită unei grupe endiolice —C(OH)=C(OH)—, ceea ce explică puterea reducătoare și marea sensibilitate la reactivii bazici.



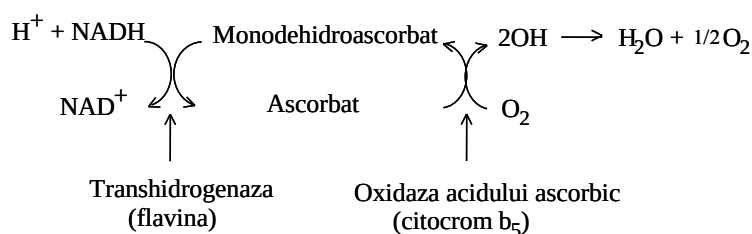
Rol metabolic. Acidul ascorbic se comportă în celulele vii ca un reducător, în timp ce forma sa oxidată, acidul dehidroascorbic, ca un oxidant. De aceea, amestecul celor doi reprezintă un **tampon redox**. Fiind un agent reducător puternic, acesta are rol de transportor biologic de hidrogen. Activitatea vitaminică se menține și sub formă oxidată, ca acid dehidroascorbic. Potențialul redox al acidului L-ascorbic, comparabil cu cel al piridin-nucleotidelor, citocromului c și glutatationului, confirmă acest lucru. Fiind reducător, are rol în menținerea activității SH-enzimelor.

Acidul ascorbic este necesar în calitate de cofactor în anumite **reacții de hidroxilare**.

Acidul ascorbic poate fi oxidat la acidul monohidroascorbic sub influența unei NAD^+ - oxidaze. Monodehidroascorbatul acționează ca purtător de hidrogen între nucleotidele reduse și oxigen.

Principalele reacții la care participă vitamina C sunt: hidroxilarea prolinei și lizinei pentru sinteza **colagenului**, hidroxilarea fenilalaninei, sinteza catecolaminelor, hidroxilarea sterolilor, desaturarea acizilor grași, absorbția fierului, metabolizarea xenobioticelor, etc.

Carența în vitamina C sau aportul alimentar redus poate conduce la tulburări gastro-intestinale, boli infecțioase, neoplazii, afecțiuni metabolice cașectizante (topirea de pe picioare) și la apariția scorbutului.



Rolul acidului monohidroascorbic în fracția microzomală

Apariția scorbutului este precedată de anemie, inapetență, scăderea rezistenței la efort, infecții, dureri articulare, uscăciunea tegumentelor.

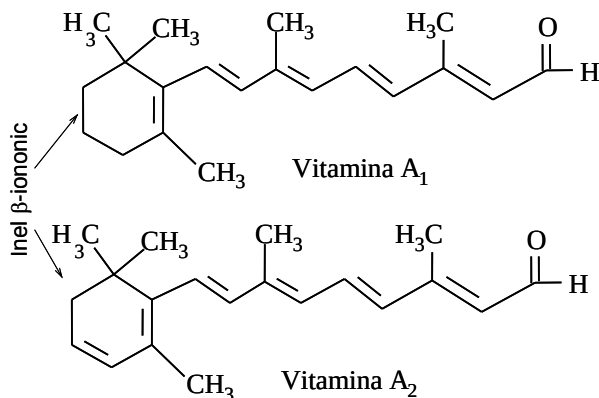
Curs nr. 3

Rolul metabolic al vitaminelor hidrosolubile

Vitaminele liposolubile (A, D, E, K) fac parte din clasa terpenelor, fiind formate din resturi de izopren, unite cap la coadă. Absorbția lor se face în prezența grăsimilor, a bilei și a sucului pancreatic. După absorbție, vitaminele liposolubile sunt transportate în sânge și apoi depozitate în ficat (A, D, K) sau în țesutul adipos (vitamina E) pentru diferite perioade de timp. Supradozarea vitaminelor liposolubile conduce la instalarea unor stări toxice (hipervitaminoză), mai ales în cazul vitaminelor A și D. Nu sunt excretate în urină; în cea mai mare parte sunt eliminate pe cale biliară în fecale. Ele pot fi extrase din țesuturi cu solvenți organici nepolari (cloroform, eter). În sânge, vitaminele liposolubile sunt transportate de lipoproteine sau proteine specifice, nefiind solubile în plasmă.

Vitamina A este reprezentată de retinol, retinal și acid retinoic. Acestea sunt sintetizate de plante ca retinoide. Lipsa sa determină la om hipercheratoză, descuamarea pielii și hemeralopie (orbul găinilor); animalele tinere se opresc din creștere, oasele și sistemul nervos nu se mai dezvoltă normal, rinichii și glandele degenerază, iar atât femelele cât și masculii devin sterili. Ochii sunt cei mai afectați. Bogate în vitamina A sunt ficatul, laptele, untul și albușul din ouă. Vitamina A nu se găsește ca atare în plante.

Mecanismul formării vitaminei A₁, la nivelul mucoasei intestinale, presupune oxidarea β-carotenului în prezența carotenoxigenazei, la retinal, care este redus sub acțiunea NADPH la retinol și, respectiv, oxidat la acid retinoic. Grupa de alcool primar din poziția 15 se poate oxida în organism reversibil la aldehydă și ireversibil la acid retinoic. Activitatea le este conferită de inelul β-iononic.



Absorbția vitaminei A se face ca atare la nivelul intestinului subțire unde este esterificată cu acizi grași cu număr mare de atomi de C și încorporată astfel în chilomicronii limfatici. De aici, esterii trec în curentul sanguin, apoi în ficat unde sunt hidrolizați, iar retinolul este reesterificat cu acid palmitic și depozitat în picăturile lipidice hepatice (95% din totalul vitaminei A).

β-Carotenul este un puternic antioxidant ce poate reduce riscul cancerelor provocate de radicalii liberi, precum și de către alți oxidanți. β-Carotenul reduce riscul de cancer pulmonar, mai ales la fumatori.

Transportul. După hidroliza esterilor la nivelul ficatului, **retinolul liber** este preluat de o proteină de transport — RBP (Retinol Binding Protein) aproximativ 70% și de lipoproteine, 20%. RBP mobilizează vitamina A din ficat și o solubilizează în mediu apos, transportând-o la celula țintă, cu protejarea retinolului de acțiunea oxidanților. În corp, retinolul poate fi convertit în retinol-fosfat. Retinol-fosfatul este necesar pentru sinteza anumitor glicoproteine necesare reglării creșterii normale și pentru secreția

mucusului. Atât retinolul, cât și acidul retinoic se leagă de proteinele specifice din citoplasmă care transportă acești compuși la nucleu unde se leagă de cromatină și determină sinteza proteinelor specifice implicate în creșterea și diferențierea celulară. Astfel, se poate considera că atât retinolul cât și acidul retinoic acționează ca *hormoni steroizi* ce reglează creșterea și diferențierea.

Dacă se depășește capacitatea de legare a RBP, vitamina A devine toxică. Retinalul (R-CHO) și acidul retinoic sunt transportați mai ales de către albumine.

Rolul vitaminei A:

- În absența vitaminei A, creșterea animalelor este oprită și, cu timpul, acestea mor.
- Exerciță o acțiune protectoare asupra epitelilor, asupra mucoaselor, împiedicând pătrunderea microorganismelor (acțiune antiinfecțioasă).

- Retinolul ($-\text{CH}_2\text{OH}$) este implicat în funcționarea aparatului genital și de reproducere (spermatogeneză). În acest caz, acționează în calitate de hormoni, printr-un mecanism asemănător cu al hormonilor steroizi.

- Acidul retinoic poate înlocui retinolul în creșterea și diferențierea epitelilor, fiind considerat chiar mai activ, dar nu poate substitui retinolul sau retinalul în procesul vederii.

- Are rolul cel mai important în procesul vederii, unde acționează sub formă de 11-cis-retinal (-CHO), în calitate de grupare prostetică a tuturor pigmentilor fotosensibili din retină.

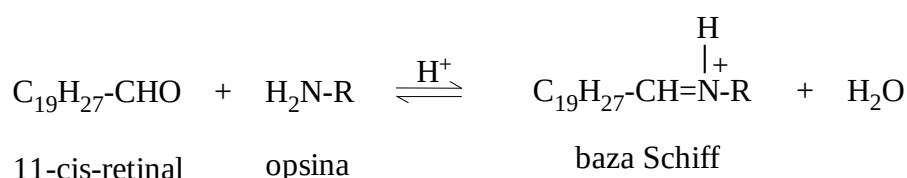
În partea posterioară a retinei se găsesc două tipuri de celule fotoreceptoare:

- a) conurile, de mici dimensiuni, situate în partea centrală a retinei vizuale (aproximativ 3 milioane), asigură adaptarea la lumină puternică și colorată;

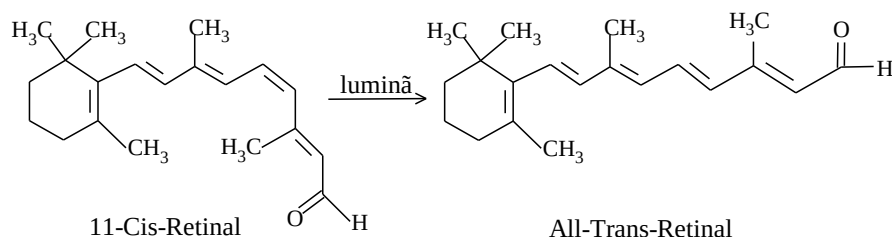
- b) bastonașele (aproximativ 1 miliard) situate în partea periferică a retinei vizuale, care asigură perceperea culorilor și adaptarea la lumină slabă, crepusculară sau nocturnă.

În bastonașe se găsesc lipide (20 – 40%) și proteine (40 – 50%) dintre care rodopsina sau purpura vizuală deține 4-10 %. Rodopsina este o substanță roșie, formată dintr-o proteină, opsina, legată strâns de 11-cis-retinal. Aceasta absoarbe o cantitate de lumină, trece într-un compus cu caracter radical-ion, numit "portocaliu-trecător", din care, după puțin timp, se regenerează rodopsina.

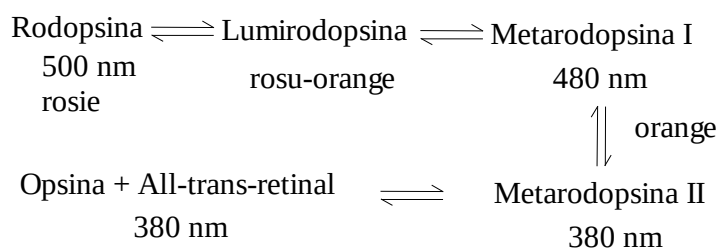
11-Cis-retinalul se leagă prin gruparea aldehydică de grupa NH_2 a unui rest de lizină din opsină (partea proteică) sub forma unei baze Schiff protonate:



În procesul vederii, izomerizarea retinalului din *cis* în *trans* se realizează cu mare intensitate la lumină și neglijabilă la întuneric. Când rodopsina este expusă la lumină, 11-cis-retinalul se transformă în *all-trans-retinal* numit și *total trans retinal* și se disociază de opsină-pigmentul vizual. Izomerizarea retinalului este urmată de alte schimbări moleculare, culminând cu disocierea rodopsinei, care devine astfel albă, în opsină liberă și *all-trans-retinal*. Acest mecanism funcționează ca un declanșator al impulsului nervos și permite perceperea luminii de către creier. Absorbția luminii determină schimbarea conformației moleculelor de rodopsină, concomitent cu conversia *11-cis-retinal* în *all-trans-retinal*. Această schimbare modifică permeabilitatea membranei veziculelor și a potențialul de membrană, așa încât ionii de Ca^{2+} ies din vezicule, declanșând impulsul nervos. Ca^{2+} servește ca un mesager sau mediator prin care stimulul luminos este cuplat cu sistemul receptor din creier, așa cum se întâmplă în cazul mușchiului, când calciul face legătura între impulsul nervos și sistemul contractil al mușchiului.



— Rodopsina are o structură helicoidală în proporție de 60% și pierde aproximativ 1/5 din această structură prin deplasarea cu aproximativ 7 Å a legăturii Schiff față de ciclul grupei cromofore sub acțiunea luminii, când are loc "decolorarea" rodopsinei. Maximul de absorbție al rodopsinei se deplasează de la 500 nm (roșu) spre spectrul retinalului liber (380 nm) cu formarea unor intermediari cu maxim de absorbție și culori diferite.



La întuneric au loc reacțiile de refacere a rodopsinei, adică transformarea all-trans-retinalului în 11-cis-retinal și legarea lui de opsină. Refacerea 11-cis-retinalului se realizează astfel:

a) *Calea minoră*: all-trans-retinalul se transformă în 11-cis-retinal direct, sub influența trans-retinal-izomerazei (opsina ar funcționa ca o fotoizomerază, activată de lumină, care acționează asupra 11-cis-retinalului ca substrat);

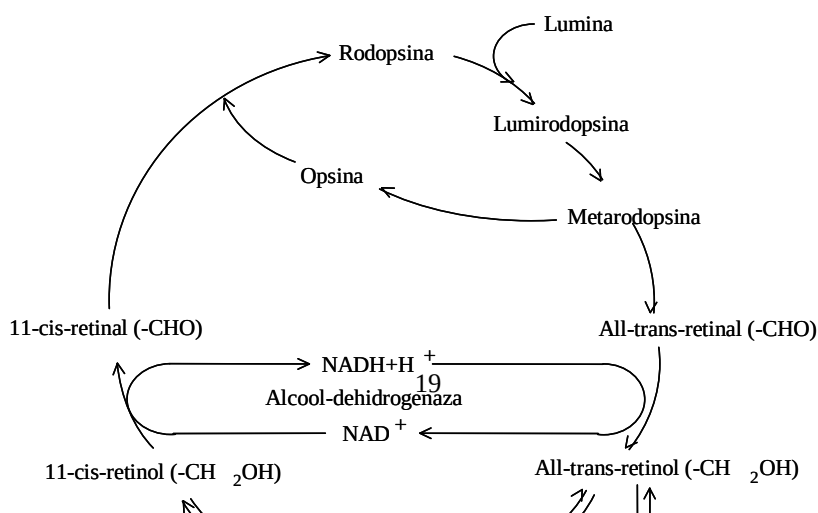
b) *Calea majoră*: o mare parte din all-trans-retinal se reduce la all-trans-retinol ($-\text{CH}_2\text{OH}$) și acesta izomerizează la 11-cis-retinol, urmată de oxidarea la 11-cis-retinal ($-\text{CHO}$).

În reacțiile de reducere și oxidare participă în calitate de acceptor și respectiv donor de hidrogen sistemul $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$, în calitate de coenzimă a alcool dehidrogenazei (retinol dehidrogenaza).

Instalarea tulburărilor vizuale (hemeralopie) datorită carenței în vitamina A se explică prin scăderea refacerii rodopsinei din cauza aportului insuficient de precursori. Existența hemeralopiei independente de carența de vitamină A (glaucom, la bătrâni, diabet, graviditate, boli hepatice, intoxicații cu alcool, Pb, As, etc.) s-ar datora alterării echilibrului "retinal — retinol" și faptului că în procesul vederii participă și alte vitamine (B_1 și B_2) și alți factori, cum ar fi unii hormoni. Vitamina B_2 , de exemplu, se comportă ca un modulator al lungimilor de undă.

Vederea colorată este mediată de trei receptori, aflați în cele trei tipuri de celule conice, fiecare având pigmenți vizuali cu maxime de absorbție diferite: cianopsina la 455 nm (roșu), iodopsina la 530 nm (verde) și porfirodopsina la 625 nm (albastru) .

Grua cromoforă a acestor pigmenți este tot 11-cis-retinolul, proprietățile fiind conferite de interacțiunea cu opsina, care este diferită la cei trei pigmenți.

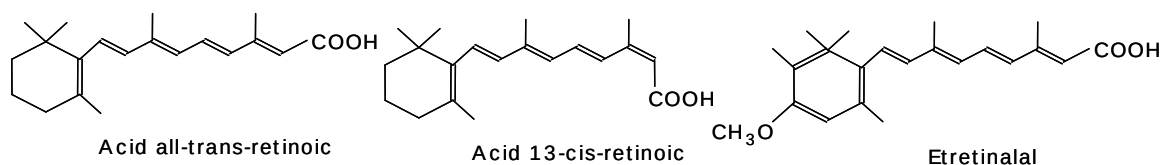


Retinolul și/sau acidul retinoic sunt necesare prevenirii sintezei formelor cu masă moleculară mare ale cheratinei, iar retinil fosfatul este necesar sintezei mucopolizaharidelor (componentă a mucusului secretat de multe țesuturi epiteliale). Lipsa secreției mucusului conduce la uscarea acestor celule, iar sinteza exagerată a cheratinei determină apariția unor suprafețe cornoase în locul epiteliului pliabil și cu umiditate normală.

Animalele cu carență în vitamina A sunt susceptibile la infecții și cancer. Scăderea rezistenței la infecții s-ar datora keratinizării celulelor generatoare de mucus din tractul respirator, gastrointestinal sau urogenital. În aceste condiții pot apărea fisuri în membranele mucoale, ce permit microorganismelor să pătrundă. O deficiență ar putea perturba chiar sistemul imunitar. Efectul anticancerigen s-ar datora rolului antioxidant al β -carotenului și efectelor retinolului și acidului retinoic în reglarea creșterii celulare.

Vitamina A este depozitată în ficat și deficiența sa se observă după o lungă perioadă în care aportul este scăzut. Deficiența redusă este caracterizată prin hipercheratoză, anemie (echivalentul anemiei prin deficiență de fier, dar în prezența acestuia) și printr-o susceptibilitate crescută la *infecții și cancer*. “Orbul găinilor” este primul simptom al deficienței în vitamina A. “Orbul găinilor” se întâlnește la majoritatea populației și se datorează malabsorbției grăsimilor.

Deficiența severă determină keratinizarea progresivă a corneei ochiului (xeroftalmie). În stadiul final, au loc infecții ce determină hemoragii ale ochilor și pierderea definitivă a vederii.



Doza de vitamina A se exprimă în echivalenți de retinol (1 echivalent = 1 RE = 1 μ g retinol = 6 μ g β -caroten = 12 μ g alți caroteni). Dozele de 15.000 – 50000 RE/zi timp de luni de zile sunt toxice. Simptomele sunt: dureri ale oaselor, dermatite, mărirea ficatului și a splinei, amețeli, diaree. Doze masive s-au folosit la tratarea acneei și în prevenirea răcelilor. Vitamina A este totuși prea toxică pentru a fi utilizată clinic. De aceea, se folosesc derivați chimici ai acidului retinoic având o toxicitate mai redusă. De exemplu, acidul 13-cis retinoic este larg folosit la tratarea acneei, iar etretinalul (analog aromatic al acidului total trans retinoic) la tratamentul psoriazisului și a bolilor înrudite. Unii retinoizi sintetici sunt utili în prevenirea și tratarea cancerelor la animalele de laborator.

Hipervitaminoza A determină o intoxicație acută manifestată prin amețeli, cefalee, somnolență sau o intoxicație cronică (anorexie, tegumente uscate, buze uscate, ragade comisurale).

Consumul exagerat de caroteni determină "icterul carotenic", caracterizat prin depășirea capacității de legare a RBP, cu efecte litice asupra membranelor biologice. Lezarea membranelor eritrocitare de către retinol este inhibată de vitamina E.

Vitaminele D

Se cunosc 5 vitamine D, numerotate de la 2 la 6, cu structură chimică și acțiune fiziologică asemănătoare. Dintre acestea, vitamina D₂ (ergocalciferolul) și vitamina D₃ (colecalfiferolul) sunt formele active pentru

mamifere. Lipsa vitaminei D conduce la tulburări în metabolismul calciului și fosforului, iar la copii determină rahitismul. Lipsa sa determină fragilitatea oaselor. Vitamina D acționează prin stimularea formării unei **proteine transportoare de calciu** în celula mucoasei intestinului subțire, care mijlocește absorbția Ca^{2+} . În organismul animal apare o anumită cantitate de vitamina D_2 (ergocalciferol) în piele prin iradierea cu UV a ergosterolului introdus prin alimentație. Vitamina D_3 (colecalfiferol) se poate forma în ficat din 7-dehidrocolesterol

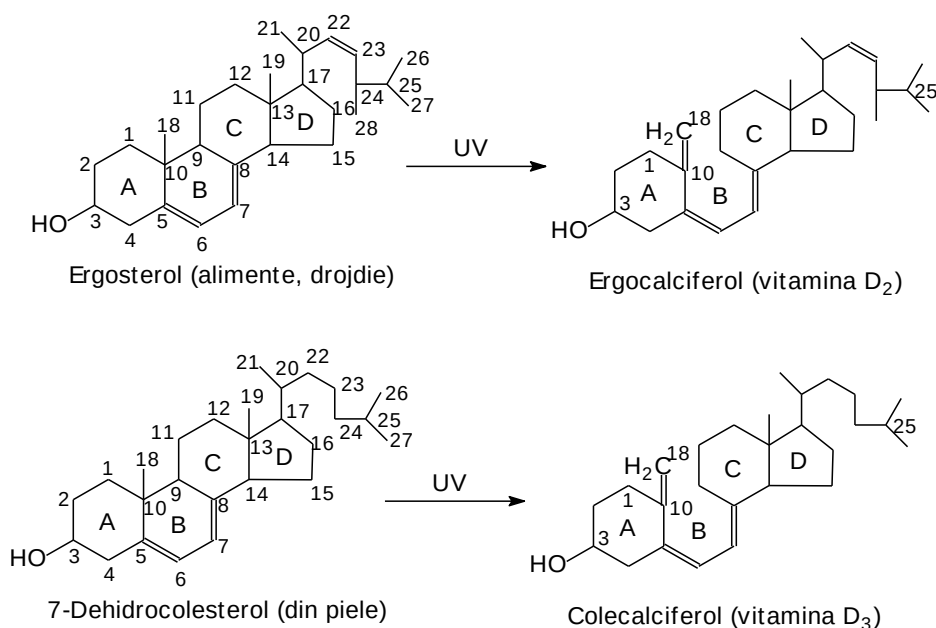
Activarea primară. Ergosterolul este convertit prin iradiere UV în ergocalciferol. Cu acestea se fac adaosuri la lapte, unt, alimente. Omul necesită aproximativ 20 μg de vitamină D pe zi. Ergosterolul, provitamina D_2 și 7-dehidrocolesterolul (provitamina D_3) nu prezintă activitate vitaminică. D_3 (colecalfiferolul) se produce în piele prin iradierea UV din 7-dehidrocolesterol.

Atât colecalfiferolul cât și ergocalciferolul sunt metabolizați identic, fiind hidroxilați în ficat, în poziția 25 a catenei laterale, formându-se 25-hidroxi-D. Enzima de hidroxilare este localizată în fracțiunea microzomală, mai precis în reticulul endoplasmatic neted și necesită NADPH, O_2 și Mg^{2+} .

Activarea secundară. Forma hidroxilată în poziția 25 nu acționează asupra țesuturilor și este necesară o nouă hidroxilare. Această reacție are loc la nivelul rinichiului. Sistemul enzimatic este localizat în membrana internă a mitocondriei și necesită pe lângă NADPH, O_2 și citocromul P_{450} . Rezultă 1,25-dihidroxi-colecalfiferolul sau 1,25-dihidroxi- D_3 care este transportat de o proteină specifică la intestin unde declanșează procesele implicate în absorbția calciului. Sinteza 1,25-dihidroxi-D este stimulată de nivelele scăzute de Ca și fosfat. Nivelele ridicate determină sinteza unui derivat 24,25-(OH) $_2$ D, inactiv.

Rol metabolic. 1,25-(OH) $_2$ -D sau calcitriolul (C) acționează împreună cu PTH, hormonul paratiroidei și reglează metabolismul fosfo-calcic prin acțiunile exercitate asupra țesuturilor țintă: intestin, os, rinichi. În acest caz se comportă ca un hormon steroidic tipic ce acționează singur în celulele mucoasei intestinale, unde induce sinteza proteinei necesară transportului calciului.

La nivelul intestinului, calcitriolul este transportat la locul de acțiune unde se fixează pe proteine receptoare citoplasmice și apoi este translocat la nucleu unde, printr-un mecanism mai puțin cunoscut, induce sinteza proteinei transportoare de calciu (Calcium Binding Protein — CaBP) care favorizează absorbția Ca^{2+} contra gradientului de concentrație, mecanism de acțiune similar acțiunii unui hormon steroid. În os, calcitriolul (1,25-dihidroxi-D) și PTH acționează sinergic. PTH inhibă excreția calciului la nivelul rinichilor. Dacă nivelul calciului seric este scăzut, crește nivelul PTH și 1,25-(OH) $_2$ D, se mărește absorbția calciului și resorbția osului și se inhibă excreția Ca la rinichi.



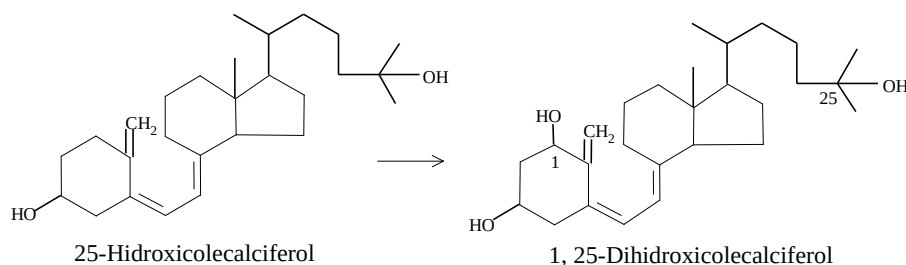
Nivelele ridicate de Ca seric determină secreția hormonului calcitonină, care inhibă resorbția osului (demineralizarea osului) și mărește excreția Ca. Nivelele înalte de Ca și fosfat cresc viteza de mineralizare a oaselor. Oasele servesc ca rezervor de Ca și fosfat pentru menținerea homeostaziei nivelului seric.

Dacă dieta este săracă în Ca, PTH și 1,25-(OH)₂D are loc demineralizarea oaselor pentru menținerea nivelurilor normale ale calciului seric.

Hipovitaminoza D. Oricând concentrația Ca²⁺ din sânge scade față de normal, glandele paratiroide secretă cantități mărite de parathormon, un polipeptid ce conține 84 resturi aminoacide. Acest hormon acționează asupra rinichilor, stimulându-i să secrete cantități mai mari de fosfat în urină și să producă o cantitate mai mare de 1,25-dihidroxicolecalciferol din precursorul său, 25-hidroxicolecalciferol. Deficiența D determină demineralizarea oaselor datorită PTH ridicat.

Simptome ale deficienței D: rahitism la copii, osteomalacie la adulți. Rahitismul înseamnă continua formare a matricei osteoide și a cartilagiului, care sunt nepotrivit mineralizate rezultând oase moi, fragile.

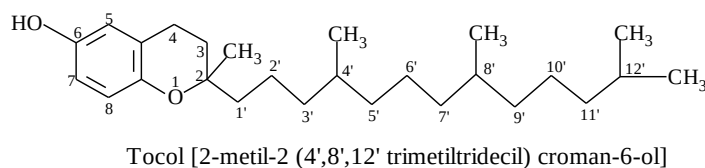
La nivel osos, acțiunea calcitriolului este mai complicată și mai puțin clară. Vitamina D asigură fixarea Ca²⁺ și a PO₄³⁻ în spațiile libere dintre capetele nespiralate ale moleculelor de collagen și stimulează sinteza unei proteine specifice care leagă Ca²⁺, osteocalcina. Calciul se fixează în zona minerală a osului, sub formă de hidroxiapatită, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, alături de mici cantități de citrat, Na⁺, Mg²⁺ și CO₃²⁻.



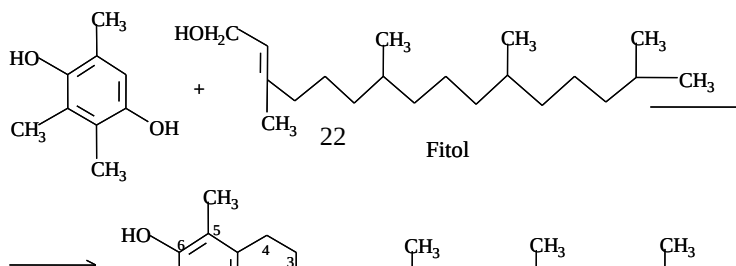
Hipovitaminoza D se caracterizează prin hipocalcemie moderată normocalcemie, hipofosfatemie, activitatea crescută a fosfatazei alcaline, nivele crescute de parathormon și scăzute de calcitriol. Glucocorticoizii inhibă absorbția intestinală de calciu și mineralizarea osului.

Hipervitaminoza D. Intoxicațiile cu vitamina D se caracterizează prin anorexie, vărsături, diaree, astenie, mialgie, pierdere în greutate, hipercalcemie, hipercalcimie. Are loc o tendință de calcifiere a țesuturilor moi. Aceasta se combate prin regim sărac în Ca și fosfați care conduce la mobilizarea lentă a Ca din țesuturi și revenirea la normal a calcemiei.

Vitaminele E sunt reprezentate de un grup de 7 vitamine E cu o structură chimică analogă: α, β, γ, δ, ε, ζ, și η-tocoferoli. Vitamina E se numește tocoferol sau vitamina antisterilității (tokos = progenitură; pherein = a naște; ol = alcool). Proprietățile vitaminice sunt proporționale cu numărul grupelor —CH₃, deci α-tocoferolul va fi cel mai activ biologic. Lipsa acestei vitamine produce degenerarea mușchilor. Se exprimă în echivalenți tocoferol: 1 echivalent tocoferol = 1 mg α-tocoferol. Ea intervine în procesele de oxidare celulară, în metabolismul creatininei din mușchi și în metabolismul hidraților de carbon favorizând depunerea glicogenului în țesuturi.



O sinteză a fost realizată prin condensarea trimetil-hidrochinonei cu fitol, în prezență de acizi (Isler).

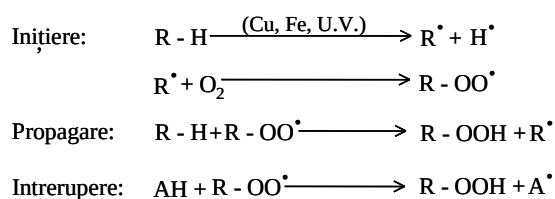


De la intestin, pe cale limfatică, tocoferolii trec în sânge unde sunt vehiculați de β -lipoproteinele plasmatiche, apoi sunt repartizați în toate organele, depozitele făcându-se în țesutul adipos. Tocoferolii sunt transformați, în procesele metabolice, în compuși chinonici, hidrochinonici care se elimină prin bilă, 80%, iar restul prin urină, sub formă conjugată cu acidul glicuronic.

Rol biochimic. Vitamina E este cel mai eficace antioxidant liposolubil natural. Substanțele cele mai sensibile la peroxidare sunt lipidele celulare și lipidele din membranele organitelor subcelulare și, mai ales, lipidele nesaturate.

Sub acțiunea oxigenului molecular, acizii polinesaturați formează peroxizi lipidici prin peroxidare, proces autocatalitic, care se desfășoară după un mecanism radicalic, prin reacții în lanțuite. Hidroperoxidul instabil format se poate scinda în dialdehide, malondialdehidă etc. ducând la distrugerea membranelor celulare. $A\cdot$ este un radical stabil (de exemplu, provenit din tocoferol), capabil să inhibe propagarea reacțiilor radicalice în lanț din peroxidarea lipidică. Vitaminele E acționează în sensul protejării acizilor grași polinesaturați de reacțiile de peroxidare. Vitaminele E joacă un rol în respirația celulară fie prin stabilizarea coenzimei Q, fie prin favorizarea transferului electronic la coenzima Q. Ea mărește sinteza hemului prin creșterea nivelului de sintetază (ALA) a acidului γ -aminolevulinic și a deshidratazei ALA. Multe acțiuni sunt legate de puterea antioxidantă a vitaminei E și mai puțin de participarea sa la reacțiile biochimice ca și coenzimă.

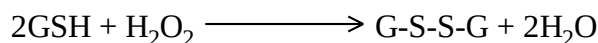
Pentru împiedicarea acestui proces, asupra radicalului peroxid intervine vitamina E care, cedând hidrogenul de la grupa $-\text{OH}$, formează un radical puțin reactiv care se stabilizează la tocoferilchinonă.



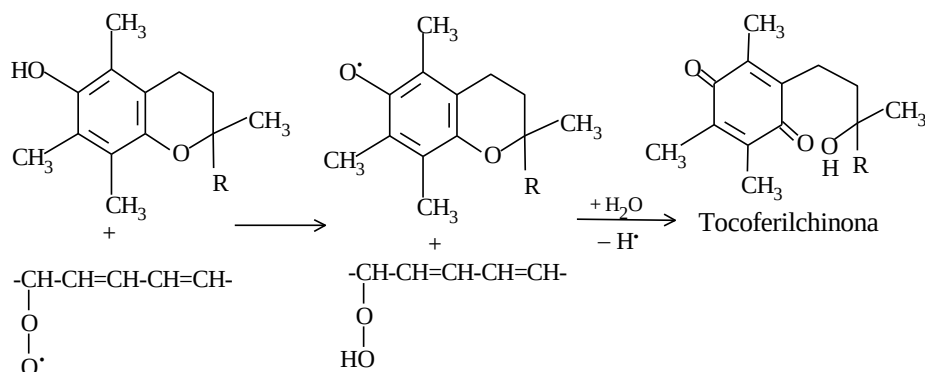
Peroxidarea și rolul vitaminei E

Acțiunea antioxidantă a vitaminei E permite protejarea căilor respiratorii și, mai ales, a țesutului pulmonar de acțiunea nocivă a aerului poluat (O_3 , N_2O). Rolul antioxidant al tocoferolilor este conferit de gruparea hidroxil în poziția C_6 . Esterificarea acestuia cu acid acetic, butiric sau fosforic conduce la derivați cu o activitate antioxidantă mai intensă. Amputarea catenei laterale sau reducerea mărimii sale micșorează activitatea vitaminică până la dispariție. Este posibil ca vitaminele E să joace și rolul de cofactori în sistemul de transport al electronilor. Catena laterală poate juca un rol de stabilizare a stărilor radicalice ale vitaminei E.

Peroxidarea lipidelor se înregistrează chiar în prezența concentrației fiziologice de vitamină E. Organismul dispune și de un alt sistem antioxidant reprezentat de o Se-enzimă, glutathion-peroxidaza, care catalizează reacția:



Vitamina E scade necesarul de seleniu, prevenind pierderea sa sau transformându-l într-o formă biologic activă, forma selenit este centrul activ al enzimei. Vitamina E reduce cantitatea de GSH-peroxidază necesară descompunerii peroxizilor formați, iar seleniul scade necesarul de vitamina E, prin asigurarea funcției normale a pancreasului și, prin aceasta, a digestiei și absorbției lipidelor, implicit a vitaminei E.



Seleniul, cofactor al GSH-peroxidazei (4 atomi Se / moleculă) contribuie la distrugerea peroxizilor, reducând necesarul de vitamina E pentru menținerea integrității membranelor.

Vitamina E și seleniul au acțiune sinergică în menținerea nivelului ridicat de CoQ (coenzima Q, component al lanțului respirator). Vitamina E are rol în hematopoieză și în stabilitatea eritrocitelor; prematurii și sugarii alimentați artificial dezvoltă anemie prin deficit alimentar.

Hipovitaminoza E se manifestă gradat și progresiv în funcție de perioada de deficit vitaminic. Lipsa vitaminei E conduce la:

1. Pierderea integrității membranelor;
2. Hemoliza celulelor roșii;
3. Scăderea fosforilării oxidative;
4. Scăderea formării lipidelor;
5. Scăderea respirației la nivelul ficatului;
6. Modificarea raportului ADN/ARN;
7. Diminuarea depozitului de vitamina A;
8. Tulburări în transportul de electroni în mitocondrii, înaintea *citocromului c*.

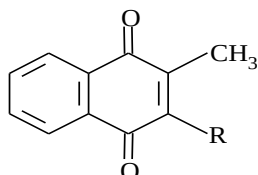
Independent de gradul de alterare a lipidelor, la animale, s-au evidențiat tulburări ale aparatului genital și a capacității de reproducere la ambele sexe. Deficiența E este asociată cu sterilitatea, distrofia musculară, modificări în SNC și anemie megaloblastică. La om se manifestă de regulă ca fragilitate a membranelor celulare (peroxidarea lipidelor) și afecțiuni neurologice asociate cu boli ce provoacă malabsorbția.

Hipervitaminoza E apare după administrare îndelungată de vitamina E și se manifestă prin involuția oaselor, tulburări nervoase și dureri ale membrelor inferioare. Dozele de până la 100-500 mg/zi nu sunt toxice. Este totuși cea mai puțin toxică dintre vitaminele liposolubile. La 800 mg/zi se observă discomfort și oboseală.

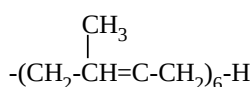
Vitaminele K

Vitaminele K (filochinona, farnochinona, menachinonele, menadiona, numite generic vitamina coagulării, vitamina antihemoragică, factor protrombinic) sunt derivați de naftochinonă care conțin sau nu un radical la C₃ cu un număr variabil de atomi de carbon.

În procesul de vindecare a rănilor, tromboplastina eliberată de țesutul rănit, împreună cu ionii de calciu, transformă protrombina în trombină. Odată formată, trombina convertește fibrinogenul din plasmă în fibrină insolubilă (cheag). Vitamina K este necesară formării protrombinei, un proces ce are loc în ficat.



Vitamina K₁ (filochinona) are la C₃ un lanț lateral de fitil cu 20 atomi de carbon). *Vitamina K₂* (farnochinona) conține un radical difernesil (30 atomi de carbon).



Vitamina K₃ (menadiona), nu are radicalul lateral (R = H), este sintetică și este solubilă în apă spre deosebire de K₁ și K₂.

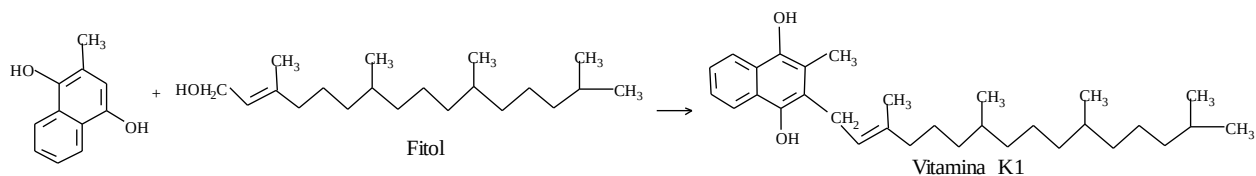
Vitamina K₁ a fost descoperită de Dam (1929) în plantele verzi. Structura sa a fost stabilită prin degradare oxidativă și prin sinteză. Sinteza a fost realizată prin condensarea 2-metil-naftohidrochinonei cu fitol în prezență de acid oxalic.

Vitamina K₂ a fost obținută din făina de pește intrată în putrefacție și este produsă de fapt de către bacteriile de putrefacție. De asemenea, *Bacterium coli* din flora intestinală a omului sintetizează importante cantități de vitamina K₂.

Pentru a avea activitate fiziologică, vitaminele K trebuie să posede un nucleu naftochinonic substituit cu un radical metil. *Vitamina K₁* este levogiră și prezintă o fluorescență roșie caracteristică care, sub acțiunea razelor ultraviolete, trece ireversibil în verde intens. Vitaminele K se descompun, de asemenea, la cald, în soluții alcaline.

În organismul mamiferelor, vitamina K este produsă de flora intestinală. Astfel, organismul este permanent aprovizionat cu vitamina K.

Absorbția vitaminelor K₁ și K₂ naturale se face împreună cu lipidele, după care acestea trec în sânge pe cale limfatică și, de aici, în ficat. Vitaminele K sintetice sunt solubile în apă și, de aceea, se absorb în absența sărurilor biliare.



Cea mai mare cantitate de vitamină K se depozitează temporar în ficat; vitamina K₃ nu se acumulează, excesul fiind eliminat prin glucurono- sau sulfo-conjugare. Menadiona (K₃) este alchilată trecând în K₂ și sub această formă își exercită funcțiile metabolice.

Rol metabolic. Vitamina K este un component al sistemului microzomial de transport de electroni cuplat cu gama-carboxilarea post tranzițională a restului glutamil din unele proteine din plasmă, os (osteocalcina), rinichi, splină, inclusiv a proteinelor precursorare pentru factorul coagulării - protrombina

Proteinele coagulării sunt sintetizate în ficat sub formă de precursori inactivi.

[O-]C(=O)CC[C@@H](C(=O)O)NC(=O)R + CO2 >> [O-]C(=O)C(CC[C@@H](C(=O)O)NC(=O)R)C(=O)[O-]

Glu
 Acid glutamic

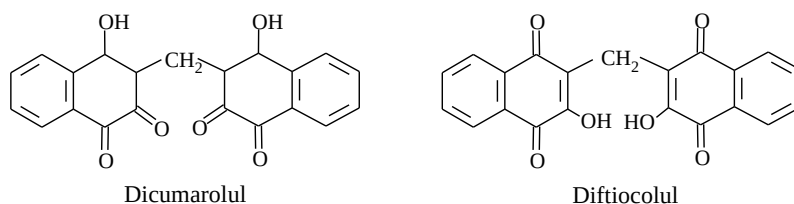
+ CO₂
 Vitamina K

[O-]C(=O)C(CC[C@@H](C(=O)O)NC(=O)R)C(=O)[O-]

Gla
 Acid γ-carboxi glutamic

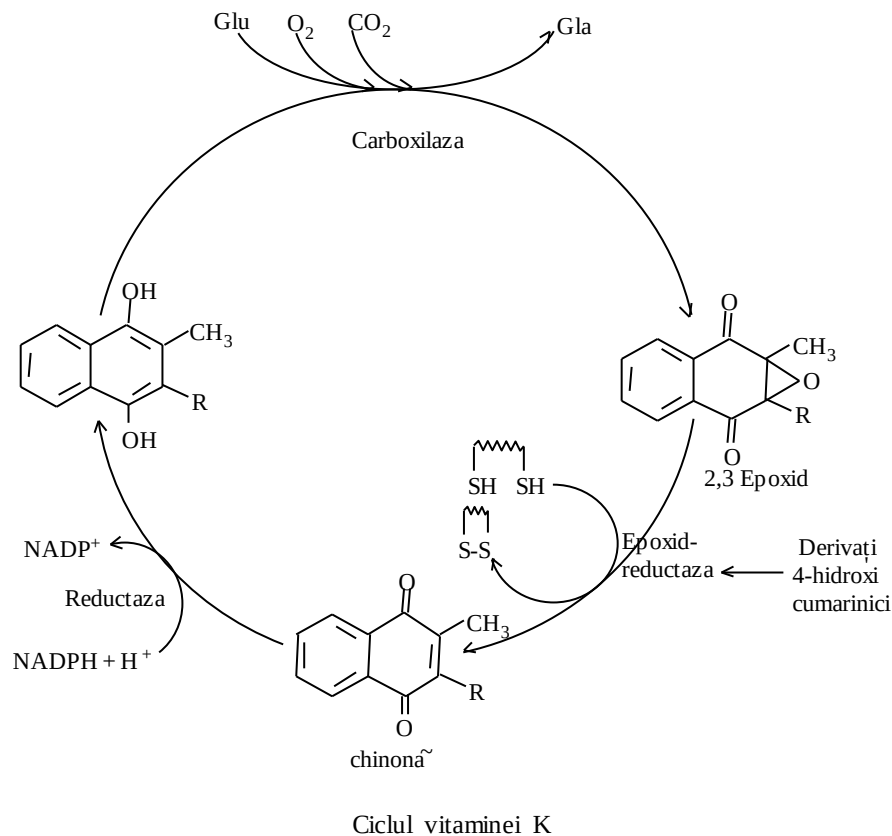
Vitamina K are rol catalitic în carboxilarea restului de acid glutamic la acidul γ -carboxi-glutamic. Protrombina are 10 resturi de acid γ -carboxi-glutamic grupate la extremitatea N-terminală. Resturile de carboxil au o mare afinitate de chelatare a ionilor de calciu care servesc la legarea fosfolipidelor cu protrombina, interacțiune specifică pentru activarea protrombinei la trombină (factorul activ al coagulării).

Funcția principală a vitaminei K este de coenzimă pentru carboxilaze, enzimele care formează acidul γ -carboxi-glutamic din acidul glutamic. Reacțiile de carboxilare au loc în microzomii multor țesuturi în prezența O_2 , CO_2 și formei de hidrochinonă a vitaminei K. În microzomii hepatici are loc "ciclul vitaminei K" (fig. 2.7). 2,3-Epoxidul format constituie substratul și sub acțiunea epoxid reductazei, care utilizează drept reducător un compus endogen cu grupe $-SH$, este transformat în chinonă.



Antivitaminele K, anticoagulante, se pot administra atunci când există pericolul coagulării sângelui în vasele sanguine (tromboze). Carența de vitamina K se instalează în cazul tulburărilor de absorbție de lipide (deficit de bilă), afecțiuni intestinale, alterarea florei intestinale, afecțiuni hepatice, boli infecțioase.

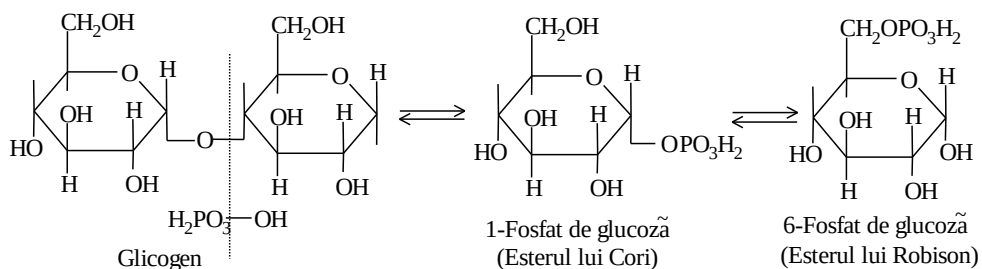
Carența de vitamina K determină scăderea protrombinei, prelungirea timpului de coagulare și apariția de fenomene hemoragice spontane. În perioada imediat postnatală, nou născuții sunt predispuși la hemoragii deoarece se nasc fără rezerve de vitamina K, având intestinul steril.



Curs nr. 4

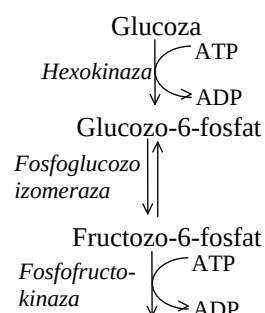
Glicoliza și fermentația alcoolică

Glicoliza reprezintă degradarea anaerobă a hidraților de carbon în mușchi și în alte țesuturi. **Fermentația alcoolică** reprezintă degradarea enzimatică a glucozei, în lipsa oxigenului, cu formare de alcool etilic. Intermediar apare acidul piruvic CH_3COCOOH , care se decarboxilează la acetaldehidă, iar aceasta se reduce cu $\text{NADH} + \text{H}^+$ la alcool. **Glicoliza** se deosebește de fermentația alcoolică prin faptul că nu utilizează direct glucoză (sau alte monozaharide) în metabolismul lor, ci numai glicogen din mușchi și alte țesuturi animale.

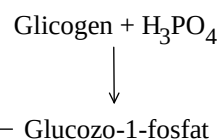


DEGRADAREA ANAEROBA A ZAHARURILOR

FERMENTATIA ALCOOLICA

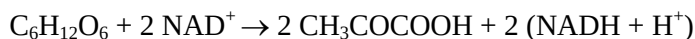


GLICOLIZA

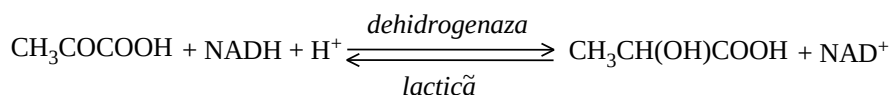


Glicoliza care are loc la nivelul mușchiului începe prin detașarea unui rest de glucoză de la o margine a macromoleculei de glicogen sub acțiunea *fosforilazei din mușchi* și a fosfatului anorganic. Restul de glucoză este astfel transformat în *1-fosfat de glucoză* (esterul lui Cori). Amintim că „ază” înseamnă schidare, rupere, deci fosforilaza va îndepărta o moleculă de glucoză cu ajutorul unei molecule de acid fosforic.

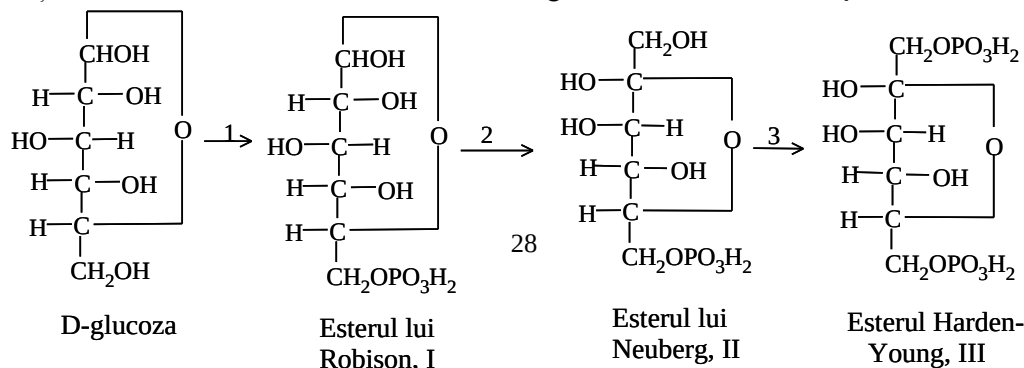
Sub acțiunea enzimei *fosfo-glucomutază*, 1-fosfatul este izomerizat în 6-fosfat de glucoză, care suferă în continuare aceleași transformări ca în fermentația alcoolică până se ajunge la acidul piruvic. De aici, reacția decurge diferit în țesuturile animale, deoarece acestea nu conțin *carboxilază*.



Deoarece nu se formează acetaldehidă ca în plante sau drojdii, rolul de acceptor pentru hidrogenul din $\text{NADH} + \text{H}^+$ îl poate prelua acidul piruvic, care este transformat în acid L(+)-lactic:



Asemănarea cu fermentația alcoolică. Odată format 6-fosfatul de glucoză, acesta este izomerizat la fosfat de fructoză care, la rândul său este fosforilat cu formare de 1,6-bifosfat de fructoză. Acest compus va suferi o reacție de decondensare aldolică cu formare de glicerin-aldehid-3-fosfat și dihidroxiaceton-fosfat.



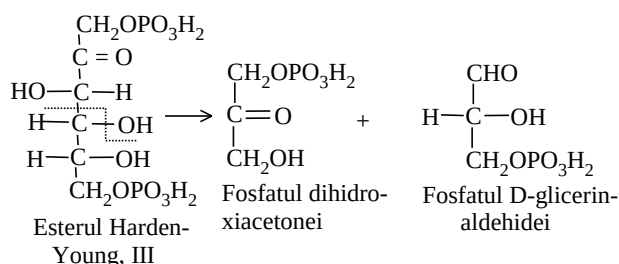
Primele reacții biochimice din procesul de glicoliză sunt asemănătoare cu cele ale fermentației alcoolice. În ambele cazuri, *reacția 2* este catalizată de o *oxo-izomerază*, numită *fosfogluco-izomerază*. Mecanismul reacției presupune formarea unui intermediar endiol legat de enzimă ce poate fi convertit rapid la forma *ceto* sau *aldo* a zahărului respectiv. Izomerizarea nu implică un schimb important de energie liberă, astfel încât reacția este practic reversibilă $\Delta G^{o'} = + 0,4 \text{ kcal/mol}$.

În *reacția 3* are loc transferul unui rest de fosfat, de la o a doua moleculă de ATP la compusul II, sub acțiunea enzimei *fosfofructo-kinazei*. Enzima necesită magneziu în această reacție și este reglată alosteric, fiind încetinită de către ADP și AMP. Din nou, diferența de energie liberă, $\Delta G^{o'} = - 3,4 \text{ kcal/mol}$, face ca reacția spre dreapta să fie ireversibilă.

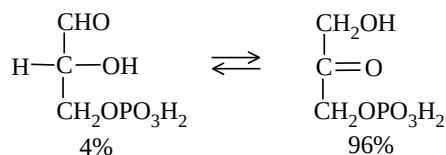
Decondensarea aldolică. 1,6-Difosfatul de fructofuranoză suferă, sub acțiunea enzimei *aldolază*, o rupere a moleculei prin care se formează esterii fosforici ai celor două trioze: *fosfatul D-glicerinaldehidei* și *fosfatul dihidroxiacetonei*.

Reacția nu este favorabilă termodinamic având $\Delta G^{o'} = + 5,7 \text{ kcal/mol}$, dar este deplasată în direcția formării triozelor datorită atât naturii exergonice a formării fructozo-1,6-difosfatului, cât și a oxidării ulterioare a fosfatului de glicerinaldehidă (glicerinaldehid-3-fosfat) într-o reacție cu o energie liberă negativă.

În continuare, participă în reacție numai fosfatul glicerinaldehidei. Fosfatul dihidroxiacetonei este însă izomerizat la fosfatul glicerinaldehidei, sub acțiunea *izomerazei fosfaților de trioze*.



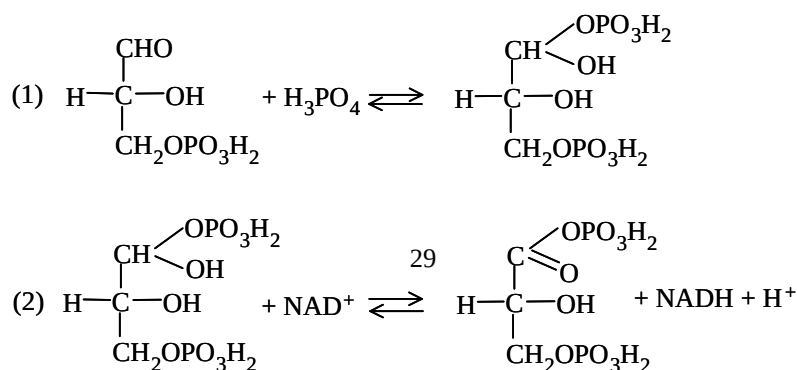
Aceste două substanțe pot fi izolate, când se lucrează în anumite condiții.



Echilibrul este deplasat spre dreapta, deoarece $\Delta G^{o'} = - 1,8 \text{ kcal/mol}$. Intermediar se formează un endiol.

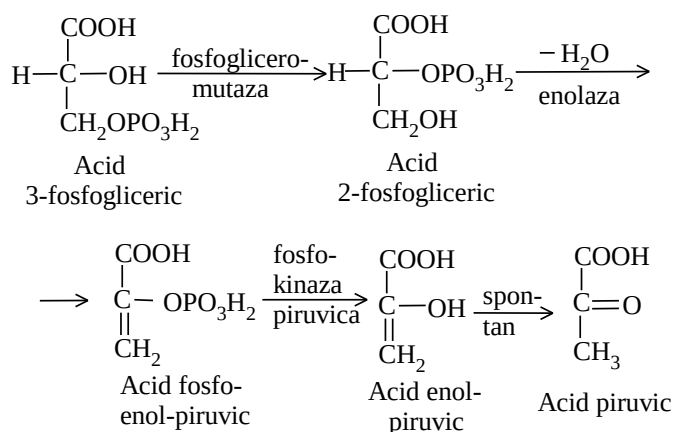
c) *Formarea acidului D-fosfoglicerice.* Fosfatul glicerinaldehidei este oxidat în continuare la *D-3-fosfoglicerice*. Reacția este catalizată de *dehidrogenaza fosfatului de trioză*, o enzimă care necesită nicotinamid-dinucleotida, NAD^+ (numită în trecut *codehidrază I*). Această coenzimă extrage doi atomi de hidrogen din aldehydă și trece în $\text{NADH} + \text{H}^+$ (*hidrocodehidrază I*).

d) *Formarea acidului piruvic.*



Formarea acidului fosfoglicerice în procesul fermentației alcoolice.

În continuare, au loc următoarele reacții biochimice cu formare de acid piruvic.



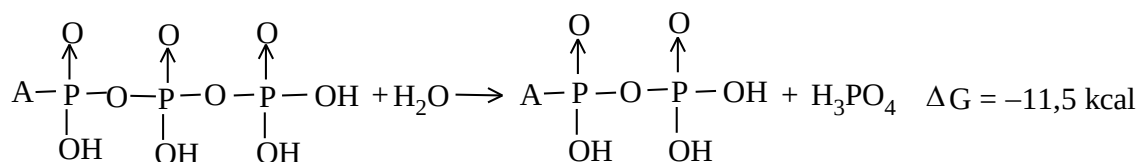
În continuare, acidul 3-fosfoglicerice suferă o serie de transformări, trecând în acid piruvic. Defosforilarea acidului fosfo-enol-piruvic, are loc prin intervenția (alături de fosfokinaza piruvică) a acidului adenzin-difosforic, ADP, care trece în acid adenzin-trifosforic. Se regenerează astfel cele două molecule de ATP consumate la sinteza esterului Harden-Young.

3. Bilanțul întregului proces este următorul: dintr-un rest de glucoză, desprins de la marginea macromoleculei de glicogen, se formează două molecule de acid lactic:

NAD^+ (Codehidraza I) este succesiv redusă și apoi oxidată, la fel ca în fermentație.

Se sintetizează în total patru moli de ATP, ca în fermentație, dar se consumă numai unul, deoarece formarea 1-fosfatului de glucoză, pornind de la glicogenul bogat în energie, utilizează acid fosforic anorganic. Trecerea glucozei în acid lactic aduce celulei trei molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză consumată. În aceste molecule rămâne înmagazinată o energie de 34,5 kcal, care servește organismului pentru funcțiile sale vitale, între altele pentru producere de lucru mecanic.

Acidul adenzin-trifosforic poate transfera altor molecule resturi de fosfat, datorită caracterului energetic deosebit al legăturii dintre grupa $-\text{PO}_3\text{H}_2$ marginală și restul moleculei. Entalpia liberă de reacție, la hidroliza acidului adenzin-trifosforic, are o valoare negativă deosebit de mare:

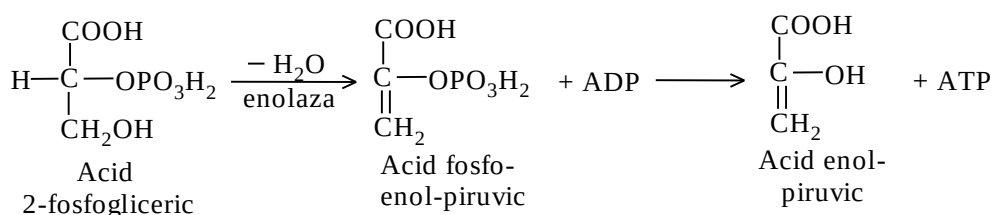


Reacțiile de hidroliză ale altor esteri de acid fosforic decurg cu degajare de energie mult mai mică: hidroliza 1-fosfatului de glicerină — 2,2 kcal, a fosfatului de D-glucoză — 3,0 kcal, a 6-fosfatului de fructoză — 3,5 kcal, a 1-fosfatului de D-glucoză — 4,7 kcal.

Acidul adenzin-trifosforic joacă un rol esențial în schimburile energetice din toate țesuturile vii. Sintezele fosfaților ce apar ca intermediari în fermentații sunt reacții consumatoare de entalpie liberă (reacții endoergice; $\Delta G > 0$); acestea sunt posibile datorită energiei care se eliberează la desfacerea legăturii bogate în energie a acidului adenzin-trifosforic. De pildă, la formarea 6-fosfatului de D-glucoză prin transferul unui rest de fosfat de la ATP se consumă 3 kcal, dar se eliberează 11,5 kcal; reacția este exoergică, însă diferența de 8,5 kcal se disipează sub formă de căldură.

ATP se regenerează neconținut. Pentru a înțelege acest lucru, s-a studiat oxidarea fosfatului de glicerinaldehidă, la acid fosfoglicerice. Reacția aceasta decurge în trei stadii consecutive, dintre care primul constă în adăptia unui rest de fosfat anorganic la grupa aldehidică.

În cel de-al doilea stadiu (reacția puternic exoergică de transfer de hidrogen de la substrat la NAD^+), o parte din energia degajată rămâne înmagazinată în molecula acidului 1,3-difosfoglicerice, sub forma unei legături de fosfat foarte bogată în energie ($\Delta G^\circ = -16,2$ kcal). Prin aceasta devine posibil transferul restului de fosfat, în stadiul al treilea al reacției și regenerarea unei molecule de ATP.

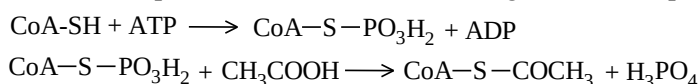


4. *Acidul lactic*, format în mușchii mamiferelor, este transportat pe calea sângelui în ficat, unde este retransformat în glicogen, prin parcurgerea tuturor reacțiilor glicolizei în sens invers și, desigur, cu un consum corespunzător de ATP (Cori).

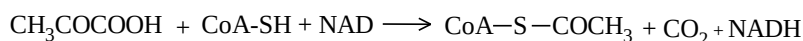
În absența oxigenului, acidul piruvic, singurul acceptor posibil pentru hidrogenul nicotinamidnucleotidei reduse, NADH^+ (hidrocodehidrazei I), trece în acid lactic regenerându-se molecula de NAD^+ . Această reacție este însă numai o resursă excepțională a organismului atunci când, în urma unui efort prelungit, mușchiul nu mai este alimentat cu suficient oxigen, dar mai dispune de rezerve de glicogen.

În prezența oxigenului, $\text{NADH}+\text{H}^+$ transferă hidrogenul său oxigenului, servindu-se pentru aceasta de sistemul enzimelor și coenzimelor de respirație: diaforaze (NADH dehidrogenaze), citocrom și citocrom-oxidază. În prezența oxigenului, acidul piruvic este oxidat complet la CO_2 și H_2O .

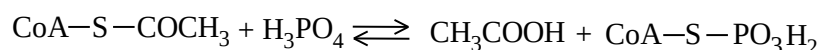
Reacția se desfășoară astfel: coenzima A, care conține o grupă SH, nu reacționează direct cu ionul acetat, deoarece grupa acetyl este legată în acetyl-coenzima A printr-o legătură bogată în energie. Coenzima A se combină însă cu ionul acetat în prezența ATP. Procesul decurge în două etape:



Acetyl-coenzima A se formează și din acid piruvic, la decarboxilarea acestuia în țesuturilor animale.

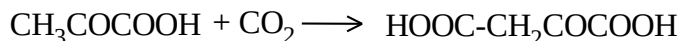


Acetyl-coenzima A formată astfel poate pune în libertate acetat, folosind totodată energia înmagazinată în legătura sa pentru a sintetiza acid adenzin-trifosforic:



Decarboxilarea oxidativă este așadar un proces complex, în care se câștigă energie sub formă de ATP și NADH .

3. A doua reacție esențială a acidului piruvic în țesuturile vii este *reacția de carboxilare*, cu formare de acid oxalilacetic:



Producerea acestuia în bacterii și în ficatul mamiferelor a fost dovedită prin utilizarea de $^{14}\text{CO}_2$.

Glicoliza anaerobă din corpul omului și mamiferelor scade producția de ATP și crește concentrația de acid lactic și raportul lactat/acetat din circulația sanguină. Acidoza metabolică (prin hipoxie) este accentuată de eliminarea renală diminuată. Creșterea concentrației de acetati (de la 2 mmol/L la 8 mmol/L) are efecte negative importante: scăderea speranței de supraviețuire și acțiune depresivă cardiacă.

Curs nr. 5

Gluconeogeneza

Acest proces reprezintă calea metabolică principală de biosinteză a monozaharidelor și polizaharidelor atât în plante cât și în animale. Formarea hidraților de carbon din aminoacizi, acid lactic etc. se numește gluconeogeneză și este o reacție endergonică. Un exemplu în acest sens îl constituie sinteza glucozei în ficat din acidul lactic adus de către sânge, în faza de repaos, după o activitate musculară intensă care conduce la acumularea acidului lactic format din glucoză.

1. Prima limitare se întâlnește la transformarea piruvatului în fosfoenolpiruvat, unde $\Delta G^\circ > 0$, așadar următoarea reacție nu este posibilă:



În locul acestei reacții, are loc o altă reacție catalizată de piruvat carboxilază la nivelul mitocondriilor:



Piruvat-carboxilaza este o enzimă alosterică care devine complet inactivă în absența activatorului său, acetyl CoA.

Aceasta transformă piruvatul în oxalacetat în mitocondrie care este redus printr-o reacție dependentă de NADH, la malat:



Numai malatul poate difuza în citoplasmă. Aici, în prezența formei citoplasmice a *malat-dehidrogenazei* dependente de NAD^+ , malatul este reoxidat la oxaloacetat extramitocondrial:



În continuare, oxaloacetatul sau acidul oxalilacetic, sub acțiunea *fosfoenol-piruvat-carboxikinazei*, este transformat în fosfoenolpiruvat. Reacția utilizează guanozin-trifosfatul (GTP) ca sursă de fosfat:



În acest caz se poate rescrie transformarea piruvatului în fosfoenolpiruvat:



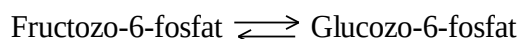
Se consumă astfel, în reacția globală, două molecule bogate în energie, una de ATP și alta de GTP, care însumează $-30,5 \text{ kJ}$, energie suficientă transformării piruvatului în fosfoenolpiruvat.

2. Cea de-a doua reacție din secvența glicolitică, în direcția gluconeogenezei ce trebuie ocolită este fosforilarea fructozo-6-fosfatului sub acțiunea *fosfofructokinazei*. La sinteza glucozei, această reacție

ireversibilă este înlocuită cu difosfofructozo-fosfataza, cunoscută și ca fructozo-bifosfatază. Ea catalizează hidroliza completă a grupei 1-fosfat cu formarea de fructozo-6-fosfatului:



Urmează o reacție reversibilă catalizată de fosfohexoizomerază:

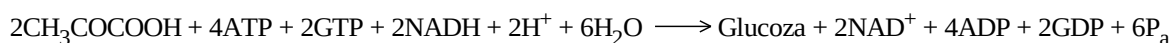


Glucozo-6-fosfatul poate lua parte la numeroase reacții în organism. În ficat se transformă în glucoză liberă care ajunge în sânge. Nu participă însă o hexokinază, ci glucozo-6-fosfataza, care catalizează următoarea reacție hidrolitică ireversibilă:

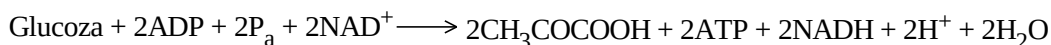


Aceste enzime se află în reticulul endoplasmatic din celulele ficatului vertebratelor și servesc în biochimie drept enzime conducătoare pentru astfel de structuri. *Glucozo-6-fosfataza* nu se găsește în mușchi și creier, *de aceea aceste organe nu pot elibera în sânge glucoză liberă.*

Reacția globală de formare a glucozei din piruvat este următoarea:

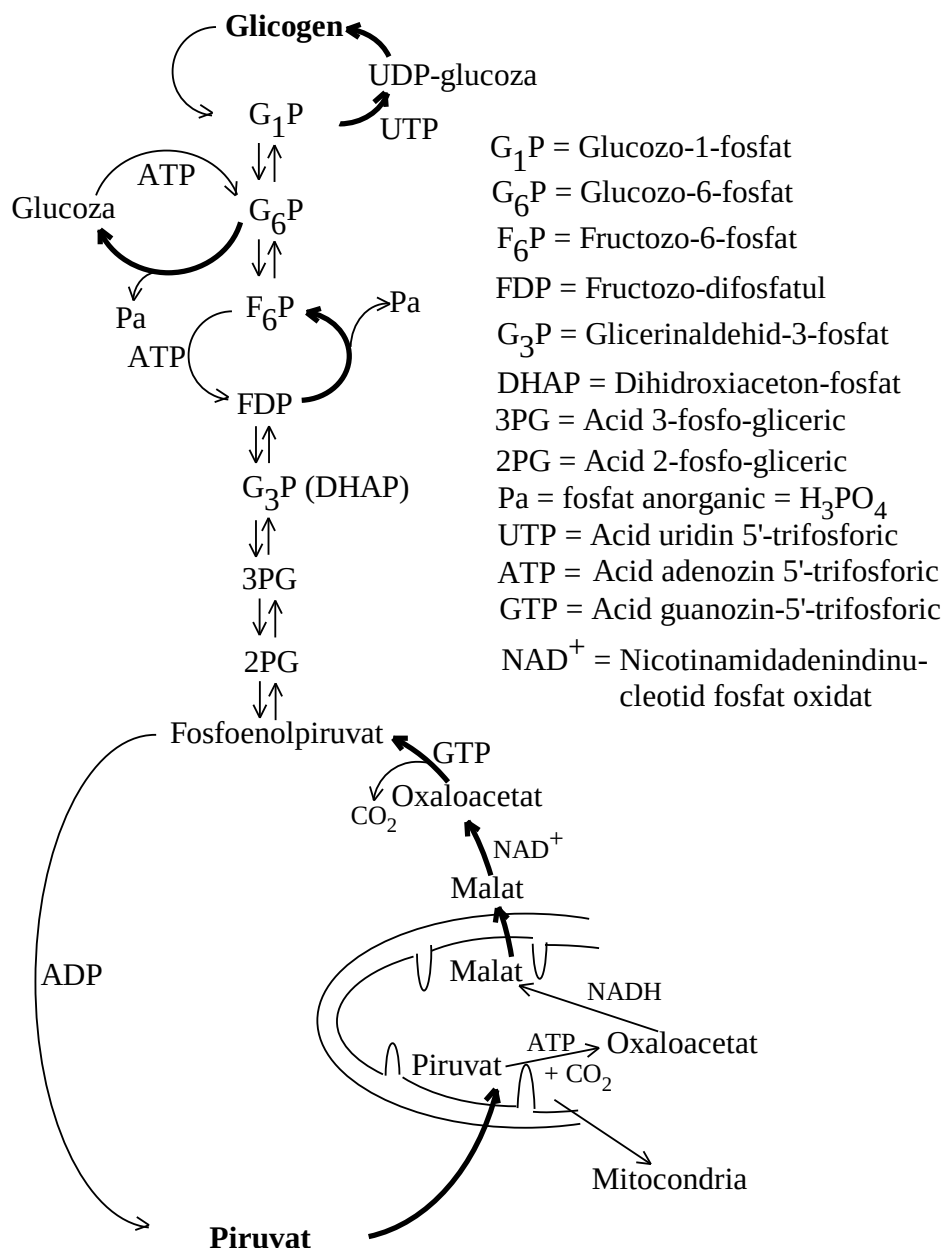


Pentru fiecare moleculă de glucoză se utilizează 6 legături fosfat bogate în energie și 2 molecule de NADH ca reducători. Este limpede că această serie de reacții nu reprezintă pur și simplu opusul reacției de formare a piruvatului din glucoză:



Reglarea formării din piruvat a glucozo-6-fosfatului Prima treaptă este catalizată de piruvat-carboxilază, o enzimă alosterică, ce este catalizată de acetil CoA. Reacția va fi deci favorizată de un exces mitocondrial de acetil CoA.

Al doilea punct de control al acestei căi metabolice îl constituie reacția catalizată de difosfofructozo-fosfatază, ce este împiedicată de AMP și stimulată de ATP. Se face deci un control prin combustibilul acetil CoA și de asemenea prin ATP.



Reactia ocolitoare in sinteza glucozei si glicogenului din piruvat

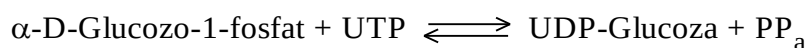
Sinteza glicogenului și a amidonului

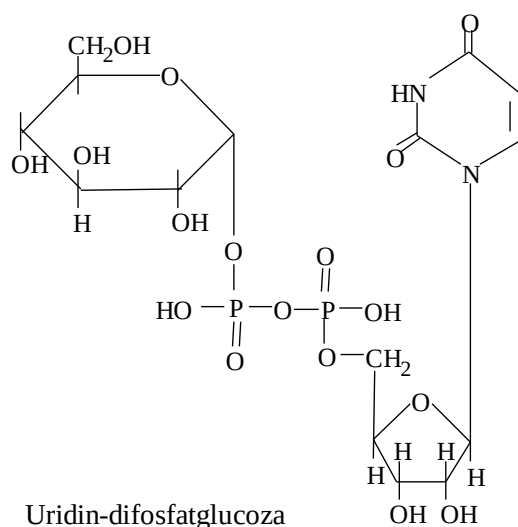
Glucozo-6-fosfatul este utilizat atât la obținerea glucozei libere din sânge cât și la sinteza glicogenului și a amidonului. Sub influența fosfoglucomutazei, acest compus se transformă în glucozo-1-fosfat:



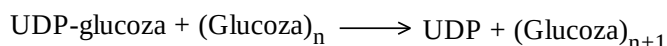
Deși glicogenfosforilaza “in vitro” transformă glucozo-1-fosfatul în glicogen, în celulă, aceasta catalizează numai scindarea glicogenului la glucozo-1-fosfat.

Aceasta servește ca purtător de molecule de zaharid. La sinteza glicogenului în organismul animal, glucozo-1-fosfatul reacționează cu uridintrifosfatul (UTP) cu formarea uridin-difosfat-glucozei (UDP-glucoză) sub influența enzimei UDP-glucozo-pirofosforilazei :





În a doua etapă, UDP-glucoza este transportată la capătul reducător al unui rest de glucoză din lanțul amilazei. Se formează astfel o legătură $\alpha(1\rightarrow4)$ glicozidică între atomul C_1 al restului glicozil transportat și grupa hidroxil din poziția 4 a restului terminal al lanțului amilazic. Reacția este catalizată de glicogen-sintetază:



Echilibrul acestor ultime trei reacții este puternic favorizat în direcția sintezei glicogenului. Sinteza glicogenului necesită însă ca “starter” un lanț de cel puțin 4 resturi de glucoză. Enzima devine mai activă atunci când lanțul de plecare este mai lung. Formarea și descompunerea glicogenului este reglată și coordonată hormonal.

Glicogen-sintetaza nu poate realiza legături $\alpha(1\rightarrow6)$ în punctele nodale ale glicogenului. În celulele animalelor se află enzima amilo(1,4 $\rightarrow$ 1,6)transglicolaza (“glycogen-branching enzyme”) capabilă să catalizeze transferul unui fragment terminal de oligozaharid cu 6-7 resturi de glucoză de la un capăt al lanțului principal la grupa 6-hidroxil al altui rest de glucoză al aceluiași lanț de glicogen sau al altuia.

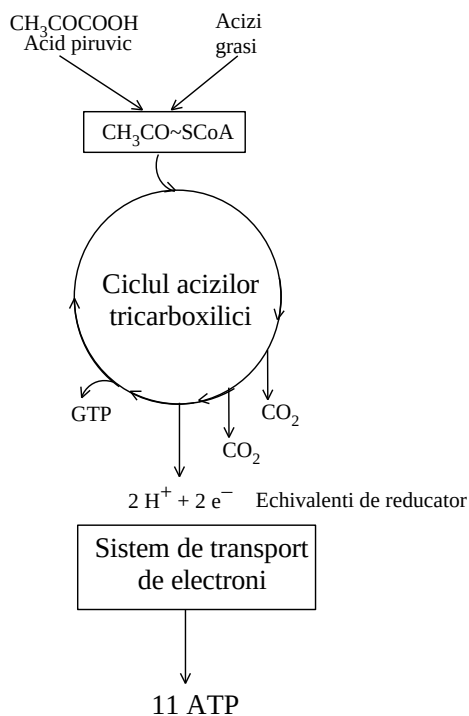
În plante, sub acțiunea amilaz-sintetazei are loc sinteza amidonului printr-un proces metabolic similar. Totuși, în cele mai multe plante, donorul de glucoză este ADP-glucoza (ADPG) în locul UDP-glucozei (UDPG).

Curs nr. 6

Ciclul acidului tricarboxilic (ciclul Krebs)

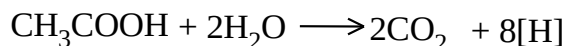
Rolul ciclului acidului citric (ciclul Krebs, ciclul acizilor tricarboxilici) în metabolismul eucariotelor (plante și animale) este acela de a furniza *combustibilul* necesar respirației, adică atomi de hidrogen sub formă de $\text{NADH} + \text{H}^+$ și FADH_2 . Acesta, la rândul său, sub formă de nucleotide reduse (NADH și FADH_2) este consumat (“ars”) în prezența oxigenului molecular, la nivelul citocromilor, cu eliberare de energie care se înmagazinează sub formă de molecule de ATP.

Într-o primă etapă, între acidul oxalilacetic și acetil-coenzima A are loc o reacție de condensare la care participă grupa CH_3 a acetilului și în care se formează acid citric.



Sinteza de ATP in mitocondrie

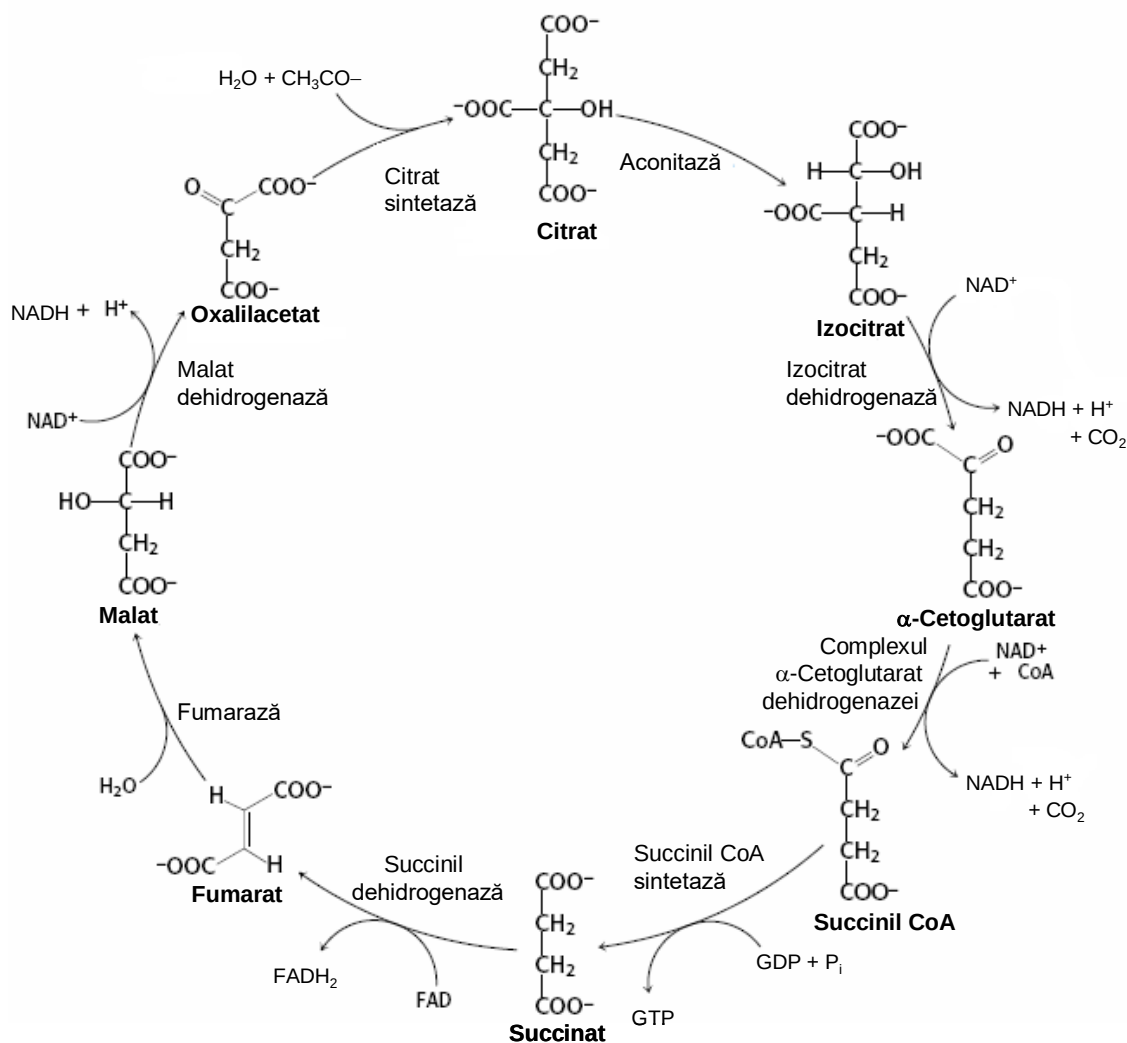
Succesiunea de reacții începe cu formarea acidului citric din acetil coenzima A și acidul oxalilacetic și se termină cu acidul oxalilacetic. În ciclul Krebs sau ciclul acidului tricarboxilic se eliberează 2CO_2 și $8[\text{H}]$ și se consumă $2\text{H}_2\text{O}$. Reacția globală simplificată a ciclului ar putea fi scrisă astfel:



Deoarece dintr-o moleculă de glucoză rezultă două molecule de acid piruvic, din ciclul acidului citric rezultă 32 legături bogate în energie. În plus, din prima fază a procesului oxidativ mai rezultă alte opt legături bogate în energie. Întregul proces de oxidare a unei molecule de glucoză (sub formă de glicogen) dă naștere la 40 legături bogate în energie, cu un conținut de 460 kcal, utilizabile pentru sinteze. În procesul oxidativ se produce deci incomparabil mai multă energie decât în procesul anaerob.

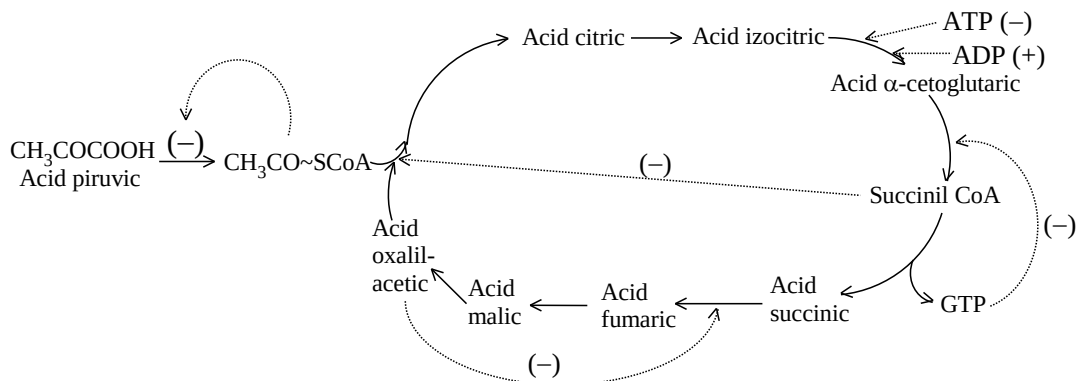
În ciclul acizilor tricarboxilici are loc oxidarea completă a acetil coenzimei A. Reacțiile au loc în mitocondrii, unde se mai găsesc complexul multienzimatic de dehidrogenare a piruvatului și cel de β -oxidare a acizilor grași, care produc acetil coenzimă A. Rolul principal al ciclului Krebs este producerea echivalenților de FADH_2 și $\text{NADH} + \text{H}^+$, deci a combustibilului pentru formarea de ATP prin oxidare lor în lanțul transportor de electroni. Și acest transport de electroni are loc numai în mitocondrie.

Prin arderea completă a glucozei în bomba calorimetrică se degajă ($-\Delta\text{H}$) 674 kcal/mol. Variația entropiei ($T\Delta\text{S}$ din ecuația: $\Delta\text{G} = \Delta\text{H} - T\Delta\text{S}$) este de circa 12 kcal, așa încât descreșterea totală a entalpiei libere ($-\Delta\text{G}$) este de 686 kcal. Dintre acestea se pot recupera, în oxidarea biochimică a glucozei, circa 67%, într-o formă utilizabilă pentru a produce un lucru mecanic sau sinteze chimice endoergice.



Ciclu acidului citric (ciclu Krebs)

Enzimele implicate sunt influențate de către produșii care se formează (feed back negativ) sau de către reactanții care participă la întregul ciclu de reacții. Astfel, existența în mitocondrie, a unei cantități sporite de acetilcoenzimă A, va determina inhibarea transformării acidului piruvic în acetilcoenzimă A (schema următoare). Există un raport molar între ATP și ADP. Când crește concentrația de ADP, se consumă acid izocitric în proporție mai mare, astfel încât feed back-ul este pozitiv. Totuși, prezența ATP sau a GTP, molecule macroergice, determină scăderea vitezei de reacție în ciclu Krebs. La fel, dacă există în mitocondrie suficient acid oxalilactic, acidul succinic nu va trece în acid fumaric, reacția fiind inhibată.



Reglaje in ciclu Krebs

Interesant este să se urmărească energetică întregului proces. Astfel, prima reacție este exergonică, cu $\Delta G^\circ = -7,5$ kcal/mol, ceea ce determină deplasarea echilibrului spre dreapta. Dar dacă se adună toate efectele energetice se observă o valoare totală a $\Delta G^\circ = -9,0$ kcal/mol, ceea ce permite desfășurarea întregului proces (ciclu de reacții termodinamic posibil).

Etapa	Reacția	Enzima	ΔG° kcal/mol
1.	Acetil CoA + oxaloacetat + $H_2O \rightarrow$ Citrat + CoA + H^+	Citrat sintetază	-7,5
2.	Citrat $\rightarrow$ cis-aconitat + H_2O	Aconitază	+ 2,0
3.	cis-Aconitat + $H_2O \rightarrow$ izocitrat	Aconitază	- 0,5
4.	Izocitrat + $NAD^+ \rightarrow \alpha$ -cetoglutarat + CO_2 + NADH	Izocitrat dehidrogenaza	- 2,0
5.	α -Cetoglutarat + NAD^+ + CoA $\rightarrow$ Succinil CoA + CO_2 + NADH	Complexul α -cetoglutarat dehidrogenazei	- 7,2
6.	Succinil CoA + H_3PO_4 + GDP $\rightarrow$ Succinat + CoA + GTP	Succinil CoA sintetază	- 0,8
7.	Succinat + FAD $\rightarrow$ Fumarat + $FADH_2$	Succinat dehidrogenaza	0
8.	Fumarat + $H_2O \rightarrow$ L-Malat	Fumarază	- 0,9
9.	L -Malat + $NAD^+ \rightarrow$ Oxaloacetat + NADH + H^+	Malat dehidrogenază	+ 7,1

Notă : Toate reacțiile sunt reversibile.

Acizii citric, α -cetoglutaric, fumaric și malic sunt componentele normale ale tuturor celulelor vii. Oxidarea finală a hidraților de carbon, în toate celulele vii, decurge prin acest mecanism. Unii dintre intermediarii ciclului lui Krebs se transformă în grăsimi și în aminoacizi sau se formează din aminoacizi naturali, ca alanina, acidul asparagic și acidul glutamic.

Lanțul respirator

H. Wieland a postulat că activarea atomilor de hidrogen este procesul de bază implicat în oxidarea biologică și că nu este nevoie de oxigen molecular să fie activat pentru a reacționa cu hidrogenii activați de către dehidrogenaze. În 1913, Otto Warburg a descoperit că anionul CN^- în concentrații reduse inhibă aproape total consumul de oxigen al țesuturilor, deoarece acesta nu inhibă dehidrogenazele, însă formează complecși foarte stabili cu fierul, de tipul fericianurii. Szent-Györgyi a postulat că flavoproteinele au rol de transport de electroni între dehidrogenaze și citocromii care conțin fier. S-a reconstituit in vitro segmentele lanțului transportor de electroni cu ajutorul componentelor purificate.

Secvența de reacții este bine precizată. $NADH+H^+$ este forma sub care electronii sunt colectați de la diferitele substraturi, cu ajutorul dehidrogenazelor NAD^+ -dependente. Acești electroni sunt trecuți pe lanțul respirator prin intermediul flavoproteinelor ($NADH$ -dehidrogenaze). Pe de altă parte, alte substraturi ale respirației sunt dehidrogenate de dehidrogenazele flavin-dependente, cum sunt succinat dehidrogenaza și acil-CoA dehidrogenaza, care trimit electroni în lanț prin intermediul ubiquinonei (chinone care se găsesc în toate celulele vii, cum ar fi coenzima Q10, necesară bunei funcționări a organismului nostru).

Astfel, NAD^+ și ubiquinona servesc la colectarea echivalenților reducători de la substraturi ale respirației, oxidate de dehidrogenaze piridin- și, respectiv, flavin-dependente.

Dovezi experimentale cum ar fi concordanța cu valorile potențialelor standard de oxido-reducere ale diferiților transportori de electroni, care devin mai pozitive pe măsură ce electronii trec de la substrat la oxigen confirmă secvența de reacții de la NAD la oxigen. De asemenea, in vitro s-a arătat că NADH poate reduce $NADH$ -dehidrogenaza, dar nu poate reduce direct citocromii b și c sau citocromul aa_3 . În mod asemănător, $NADH$ -dehidrogenaza redusă nu poate reacționa.

Fotosinteza**Reacții la lumină și la întuneric**

Fotosinteza în plantele verzi se petrece în 2 etape: *la lumină*, dependentă de energia luminoasă și *la întuneric*. În prima fază, energia luminoasă este absorbită de către clorofilă. În această fază se produce O_2 și două produse bogate în energie: ATP și reducătorul NADPH. În faza de întuneric, moleculele de ATP și NADPH sunt utilizate pentru obținerea glucozei și a altor produși organici. Formarea O_2 și reducerea CO_2 sunt deci două procese diferite și bine delimitate.

Fotosinteza – faza la lumină

Asimilația bioxidului de carbon realizată de către plantele verzi, sub influența luminii, este singura reacție din natură în care iau naștere substanțe organice din cele anorganice. Produsul principal al fotosintezei este glucoza din care se formează amidonul, alături de grăsimi și de proteine.

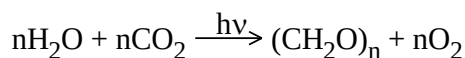
Atât procariotele, cât și eucariotele sunt capabile să realizeze fotosinteza. Plantele verzi superioare, algele verzi, brune sau roșii multicelulare, precum și unele organisme unicelulare cum ar fi euglenoidele sunt fotosintetizante. Dintre procariote, algele verzi-albastre, bacteriile verzi și cele purpurii realizează fotosinteza. Mai mult de jumătate din reacțiile fotosintetice se petrec în organismele unicelulare, în special în alge.

Fotosinteza decurge prin intermediul pigmentilor clorofila *a* (albastră-verde), clorofila *b* (galben-verde) și carotinoidele (carotine portocalii și xantofile galbene). Acest sistem de pigmenți se află în cloroplaste, care sunt niște corpusculi de formă alungită din celulele frunzelor verzi. Energia luminoasă absorbită de un pigment poate fi transmisă altui pigment din cloroplastă. Prin acest mecanism se lărgțește regiunea spectrală utilizabilă în fotosinteză. Clorofila *a* transmite apoi energia radiantă absorbită, sistemului chimic.

Algele și bacteriile fotosintetizante conțin însă coloranți purpurii, roșii sau bruni. În celulele organismelor fotosintetizante se mai pot găsi și alte clase de coloranți capabili să absoarbă lumina. Dintre acești pigmenți auxiliari pot fi amintite carotinoidele galbene și ficobilinele roșii sau albastre.

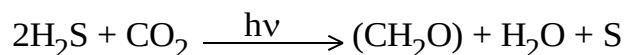
Ecuația fotosintezei

În afara bacteriilor, organismele fotosintetizante utilizează apa ca donor de electroni, respectiv de hidrogen. CO_2 sau alt acceptor de electroni se vor reduce. Ca urmare, se produce O_2 molecular (ce provine din apă). Reacția globală ar fi:

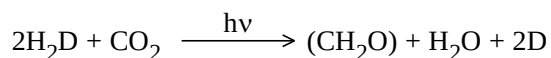


unde, cel mai adesea, $n = 6$, produsul fotosintezei fiind o hexoză.

Bacteriile fotosintetizante nu produc și nu consumă O_2 , deoarece sunt strict anaerobe, pentru care O_2 este toxic. În locul apei, folosesc ca donori de electroni compuși anorganici de tipul H_2S sau organici, cum ar fi acidul lactic și izopropanolul. Astfel, bacteriile sulfuroase verzi folosesc H_2S conform ecuației:

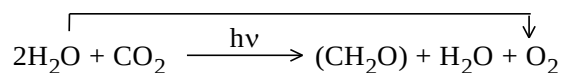


Procesul fotosintetic este asemănător la plante și la bacterii, în ciuda deosebirii în ceea ce privește donorul de electroni:



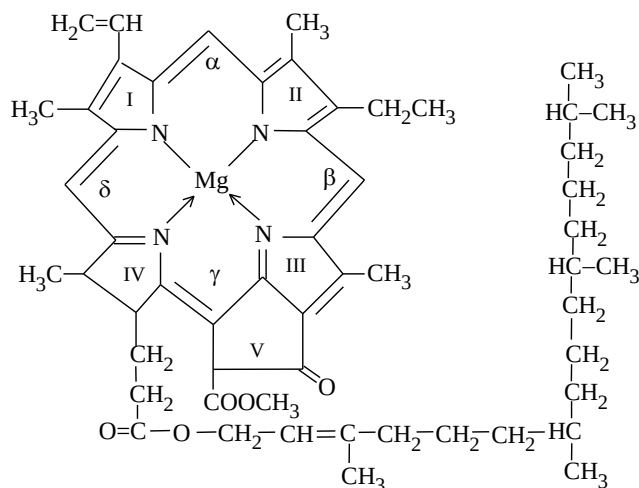
în care H_2D este donorul de hidrogen, iar D este forma sa oxidată. $H_2D = H_2O$; H_2S ; izopropanol etc.

Cu H_2O având oxigenul marcat, s-a demonstrat că oxigenul eliberat provine din apă.



Fotosinteza la plantele verzi superioare; sistemul fotosintetic intracelular.

Aparatul fotosintetizator din plantele verzi superioare este localizat în cloroplaste. Acestea sunt de obicei mult mai mari decât mitocondriile (1-10 μm diametru). Au formă sferică sau lenticulară și sunt înconjurare de o membrană simplă, continuă și fragilă la partea exterioară. Membrana interioară formează vezicule care sunt stivuite în cloroplaste. Aceste stive se numesc *grana*. *Grana* conțin pigmenții cloroplastelor și enzimele pentru reacțiile primare dependente de lumină.



Clorofila a

Obținerea moleculelor în stare excitată. Lumina albă conține radiațiile electromagnetice cu lungimea de undă λ cuprinsă între 400 și 700 nm. $h\nu$ se numește cuantă, fiind cea mai mică particulă de energie luminoasă; h este constanta lui Plank ($h = 6,6262 \times 10^{-34}$ Js) și ν = frecvența radiației. 1 Echivalent de substanță corespunde la $E = L \cdot h \cdot \nu = 1$ einstein ($L = N = \text{nr. Avogadro} = 6,023 \cdot 10^{23}$).

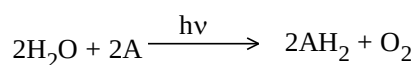
Capacitatea unei substanțe de a absorbi lumina depinde de structura sa atomică, în special de aranjarea electronilor în jurul nucleului. Electronii care primesc energie luminoasă trec într-o stare excitată, fiind promovați pe un nivel energetic superior. Sunt absorbiți numai fotonii cu o anumită lungime de undă. Absorbția se face pe principiul “totul sau nimic”, de unde și denumirea de cuantă pentru energia fonică.

Clorofila

Se cunosc două tipuri de clorofilă: *clorofila a* pe de o parte și *clorofilele b, c, d* pe de altă parte. Clorofila a se găsește în toate celulele plantelor superioare. Cel de-al doilea tip de clorofilă, clorofila b,c sau d se află, alături de clorofila a, numai în celulele capabile să elibereze oxigen. Astfel, clorofila b se găsește în plantele verzi, clorofila c în algele brune, diatomee și dinoflagelate, clorofila d în algele roșii.

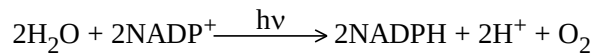
Molecula de clorofilă conține 4 inele pirolice substituie, ordonate într-o structură macrociclică, în care cei 4 atomi de azot leagă un atom de magneziu la mijlocul lor. Este un complex planar extrem de stabil. Molecula mai posedă o catenă laterală terpenoidă, hidrofobă, ce constă dintr-un rest alcoolic numit fitol esterificat cu restul de acid propionic de la inelul IV.

Reacția Hill și transportul de electroni fotoindus În 1937, R. Hill a făcut legătura dintre absorbția luminii și fluxul de electroni. Acesta a arătat că formarea oxigenului sub influența luminii are loc chiar și în preparatele aceluare. Iluminarea anumitor cloroplaste conduce la eliberarea O_2 cu reducerea concomitentă a receptorului de electroni:



Drept acceptori de electroni pot fi și unii coloranți artificiali. S-a mai descoperit că CO_2 nici nu este necesar, nici nu se acumulează într-o formă stabilă, în această fază. Reducerea CO_2 și formarea O_2 sunt independente. Ecuația de mai sus se mai numește și reacția Hill, iar acceptorul A sintetic, reactiv Hill.

Mai târziu s-a găsit că NADP joacă rolul de acceptor biologic de electroni în plantele verzi:

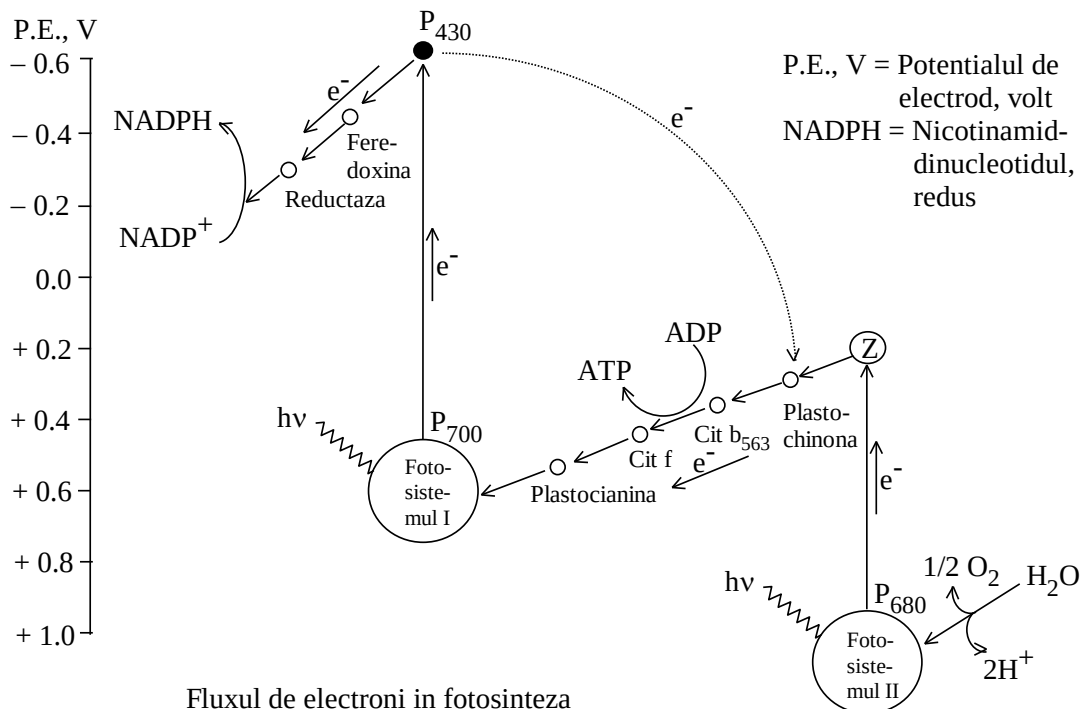


Aceasta înseamnă că energia luminoasă provoacă un flux de electroni de la apă la NADP^+ , cu formarea simultană a oxigenului.

Când o moleculă de clorofilă absoarbe energia luminoasă, o parte din electronii săi ajung pe un nivel energetic foarte înalt în așa fel încât se atinge un potențial reducător negativ mare, mai mare decât cel al NADPH . Acești electroni energizați nu mai revin în starea fundamentală. Ei părăsesc mai degrabă molecula de clorofilă și trec în componentele lanțului transportor de electroni.

Acest lanț servește la dirijarea electronilor bogați în energie de la clorofilă spre NADP^+ care este astfel redus la NADPH . Acest flux de electroni de la clorofilă la acceptor se numește transportul electronic al fotosintezei. Reducerea acceptorului se numește și fotoreducere.

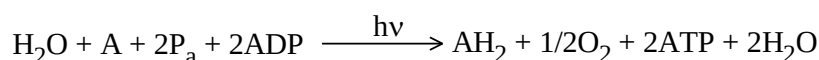
Pe măsură ce electronii apei sunt trimiși prin “golurile” electronice ale clorofilei până la NADP^+ , alte molecule de apă sunt introduse în reacție.



Pe măsură ce electronii din apă sunt activați pentru reducerea NADP^+ la NADPH , alți electroni vor fi “ciocniți” de către fotonii care sunt absorbiți de sistem. Fotofosforilarea ADP la ATP este legată de transportul de electroni, care, la rândul său, este cuplat cu ambele fotosisteme.

Fluxul electronic și fosforilarea

În 1957, Arnon D. și colab. au descoperit că fluxul de electroni din preparatele din cloroplaste izolate este cuplat cu formarea de ATP din ADP și fosfat. Ei au arătat că această fotofosforilare utilizează energia luminoasă absorbită de clorofilă. Fiecare pereche de electroni care trec de la H_2O la NADP^+ conduce la formarea a două molecule de ATP .



în care A este acceptorul de electroni și AH_2 forma sa redusă.

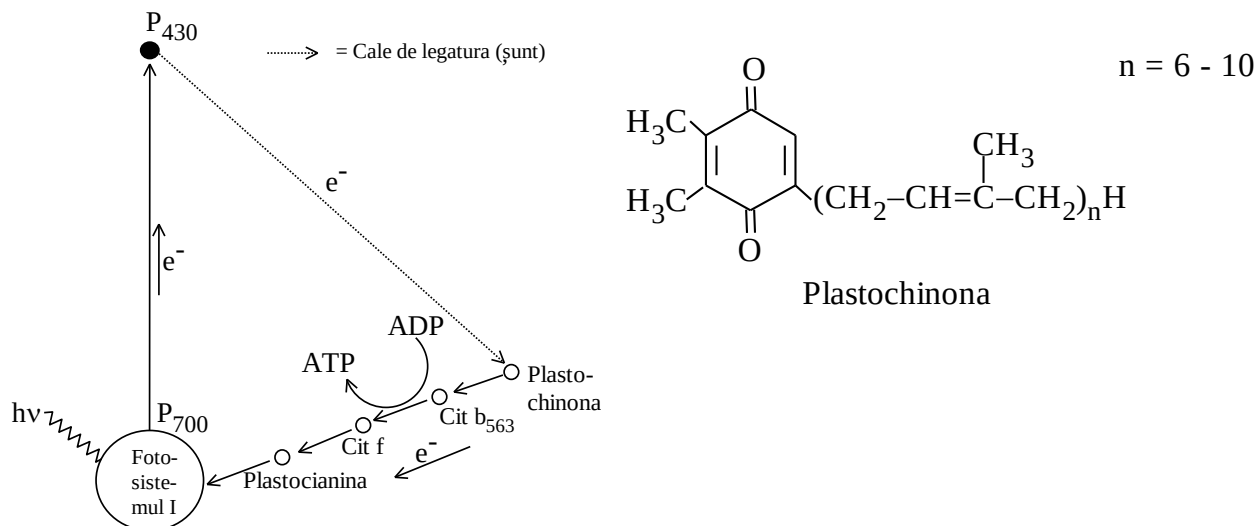
Fotoreacții în fotosinteză

Cloroplastele conțin două tipuri de clorofilă. În fotosinteza realizată de unele bacterii participă numai un tip de clorofilă, însă nu se eliberează oxigen. Plantele verzi au o mai mare eficiență fotosintetică deoarece

utilizează diferite lungimi de undă, între 600 și 700 nm. S-a constatat că plantele verzi posedă două fotosisteme. Fotosistemul I este activat de lumina cu lungimea de undă de 700 nm face parte dintr-un centru de reacție ce conține mai multă clorofilă a decât b și care nu dezvoltă O₂. Fotosistemul II este activat de lungimi de undă mai mici este responsabil de producerea O₂. El utilizează clorofila b,c,d și pigmenții auxiliari. Celulele producătoare de O₂ posedă ambele sisteme, în timp ce bacteriile ce nu pot elibera O₂ au numai fotosistemul I.

Legătura dintre cele două fotosisteme

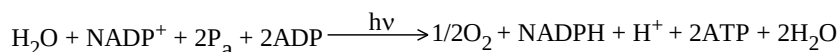
Cele două fotosisteme (I și II) sunt legate între ele.



Transport de electroni fotoindus, ciclic,
la care este cuplata fosforilarea

Fotosistemul I oferă electronii săi în stare excitată care, prin intermediul unui lanț de purtători de electroni, ajung la NADP⁺ care va fi redus. Fotosistemul I va fi astfel golit de electroni și trebuie reîncărcat. Acești electroni pot fi luați de la apă prin intermediul fotosistemului II și lanțului transportor de electroni.

La iluminarea fotosistemului II unii dintre electronii săi vor fi ridicați pe un nivel bogat în energie și vor “zbura” prin lanțul de transportori de electroni până la fotosistemul I. Se reface astfel starea reducătoare a acestui sistem. Refacerea stării reduse a fotosistemului II se realizează prin eliberarea O₂ din apă. Aceste reacții pot fi redate astfel:

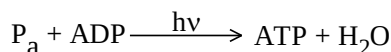


Molecula de H₂O din stânga funcționează ca donator de electroni. Cele două molecule din membrul drept provin din ADP și fosfat.

Fluxul ciclic de electroni și fotofosforilarea ciclică

Acest flux ciclic de electroni a fost pus în evidență prin fosforilarea ADP la ATP, în absența acceptorilor de electroni. Pentru fosforilarea ADP este necesară energia luminoasă. Dacă această energie este înmagazinată în NADP⁺, atunci electronii fotosistemului I se transformă în ATP. Acesta este un flux ciclic fotoindus.

Deși nu este posibil să se măsoare direct fluxul de electroni, se poate măsura ATP format și, prin aceasta, fotofosforilarea ciclică. Procesul poate fi inhibat de către inhibitori ai transferului de electroni. Se poate astfel scrie:

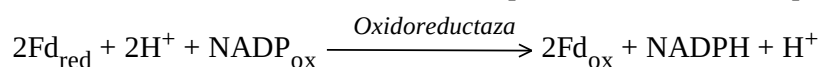


Se acceptă că fluxul ciclic de electroni și fotofosforilarea ciclică au loc atunci când celulele vegetale sunt bogate în forme reduse de substanțe, de tipul NADPH, dar au încă nevoie de ATP pentru metabolism. Procesul se aseamănă cu fosforilarea oxidativă (Formarea de ATP în țesuturile animale).

Transportori de electroni

La transportul electronilor de la fotosistemul I la $NADP^+$ iau parte cel puțin trei purtători de electroni. Primul este colorantul numit P_{700} care posedă o bandă de absorbție la 700 nm.

Cel de-al doilea transportor este feredoxina, o proteină neheminică, asemănătoare cu proteina neheminică din mitocondrii. Feredoxina din spanac are $M \approx 10\,700$. Conține 2 atomi de fier, legați specific de 2 atomi de sulf. Prin acidularea feredoxinei se eliberează H_2S . Feredoxina se poate reduce printr-o reacție unielectronică și se reoxidează din nou. Feredoxina nu poate reduce direct $NADP^+$. Fără acțiunea unei flavoproteine, *Feredoxin-NADP-Oxidoreductaza*, care a putut fi izolată din cloroplastele de spanac.



Prin Fd a fost simbolizată feredoxina.

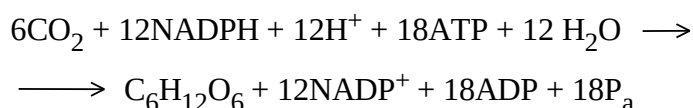
La transportul electronilor de la fotosistemul II la fotosistemul I participă mai mulți transportori de electroni. Primul este o moleculă puțin cercetată, numită "Z". Forma redusă a moleculei Z trimite electronii mai departe la plastochinonă, asemănătoare ca structură cu ubiquinona mitocondrială.

De la plastochinonă, electronii sunt transportați la un citocrom de tip b și, mai departe la unul de tip f (f de la frunză) care este asemănător cu citocromul c din mitocondrie. În continuare, electronii ajung la plastocianină, o cupru-proteină de culoare albastră. În sfârșit, plastocianina umple golurile de electroni din P_{700} .

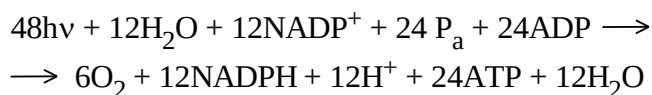
Curs nr. 8

Fotosinteza – faza la întuneric

Reducerea CO_2 are loc la întuneric, după ecuația:

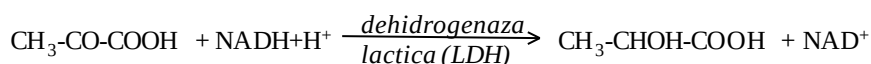
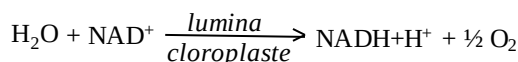


Sunt necesare 18 molecule de ATP și 12 de NADPH pentru a reduce 6 molecule de CO_2 . În timpul transportului de electroni, se formează însă 24 molecule de ATP și 12 de $NADPH+H^+$:

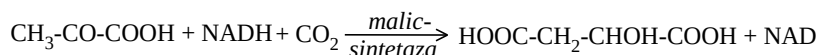
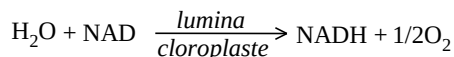


Se formează o cantitate mai mare de ATP decât este necesar reducerii CO_2 în faza de întuneric.

Cloroplastele sau fragmentele de cloroplaste, suspendate în apă și expuse luminii, nu reduc bioxidul de carbon, ci numai substanțe mai ușor reductibile, cum sunt ionul feric, chinona și unii coloranți; se degajă cu această ocazie o cantitate echivalentă de oxigen. S-a dovedit cu ^{18}O că oxigenul degajat provine din apă.

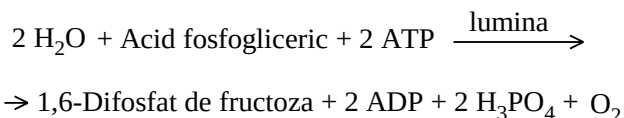


Acidul piruvic poate suferi și o *carboxilare hidrogenantă* fotochimică, cu formare de acid malic:

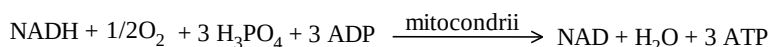
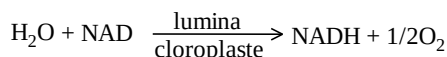


Din aceste ecuații se observă că, în cloroplaste, pe lângă clorofile și sensibilizatori fotochimici, se află și sistemul enzimatic al dehidrogenazelor, care pot realiza reacții de reducere complexe.

In vitro s-a realizat sinteza unei hexoze, din acid fosfoglicerit cu sistemul cloroplaste-NADPH. Pentru realizarea acestei sinteze nu a fost suficientă prezența hidrogenului la un potențial chimic ridicat (sub formă de NADPH, format fotochimic), ci de energia din două legături bogate în energie ale acidului adenozin-trifosforic:



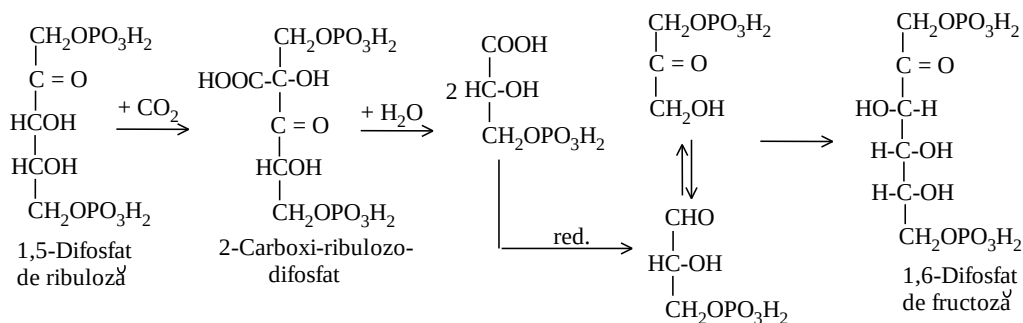
Acidul adenozin-trifosforic se regenerează în cursul fotosintezei, printr-o reacție de oxidare, ce decurge paralel cu reducerile. Prin aceasta, se pierde aproximativ 2/3 din hidrogenul legat ca NADH în cursul reacției fotochimice, însă se formează, printr-o reacție la întuneric, două legături de fosfat bogate în energie, ce servesc în sinteze ulterioare. Reacția de formare a acidului adenozin-trifosforic ATP are loc numai în prezența unor enzime conținute în mitocondriile celulelor din frunzele verzi. Prin incubarea de cloroplaste, mitocondrii, NAD^+ , fosfat anorganic și ADP s-a realizat sinteza fotochimică a molecule de ATP.



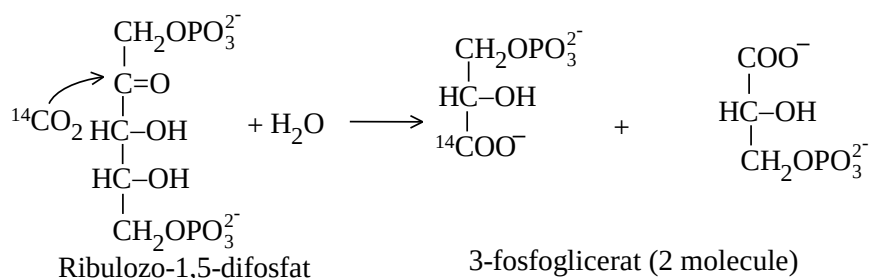
Un terci de frunze de spanac poate cataliza, la întuneric, transformarea bioxidului de carbon în hidrați de carbon, dacă sunt prezenți fosfatul de riboză, acidul adenozin-trifosforic și $\text{NADH} + \text{H}^+$. Lumina are rolul de a produce NADH și ATP (acid adenozin-trifosforic). Sinteza unui hidrat de carbon din bioxid de carbon și apă este o reacție endoergică. Energia necesară este furnizată de lumină. Energia ce se eliberează la arderea completă a unui mol de glucoză este de 686 kcal. Rezultă deci că pentru asimilarea unui mol de bioxid de carbon ar fi de $686/6 = 114,3$ kcal.

Prima reacție în sinteza glucozei la întuneric este **carboxilarea difosfatului de ribuloză**, reacție catalizată de carboxidismutază, care conduce la un acid β -cetonit ramificat, 2-carboxi-3-cetopentozodifosfat. Acesta se rupe hidrolitic în două molecule de acid 3-fosfo-D-glicerit, un intermediar al fermentației și glicolizei. Acest compus suferă în continuare transformări în sens invers celor urmate în fermentație și glicoliză, ajungând la 1,6-difosfatul de fructoză. Procesele menționate sunt consumatoare de energie și au nevoie de hidrogenul provenit din descompunerea fotochimică a apei, de NADP^+ (codehidrază II) și acid adenozin-trifosforic (ATP).

În continuare, acidul 3-fosfoglicerit se transformă în 1,6-fructozodifosfat pe cale asemănătoare cu gluconeogeneza.



Mecanismul sintezei glucozei la algele verzi a fost stabilit de M. Calvin și colab., prin utilizarea $^{14}\text{CO}_2$. Iluminarea scurtă, de câteva secunde, a algelor folosite în experimente a fost urmată de uciderea plantelor, extragerea produșilor rezultați și separarea lor cromatografică. Primul compus marcat care apare în procesul fotosintezei este **acidul 3-fosfoglicerice**. Reacția este catalizată de ribulozo-difosfat-carboxilază.



Prima reacție chimică la întuneric din ciclul fotosintezei

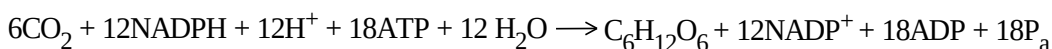
Enzima are $M = 550.000$ și se găsește în cantitate mare în celule, reprezentând aprox 15 % din proteina totală a cloroplastelor.

În ciclul de reacții de fotosinteză faza la întuneric, importanți sunt difosfatul de ribuloză și cel de sedoheptuloză. Acești difosfați de aldaze și cetoză se condensează și se decondensează aldolic prin echilibre de tipul $\text{C}_7 + \text{C}_3 = 2\text{C}_5$ sau $\text{C}_3 + \text{C}_6 = \text{C}_4 + \text{C}_5$ (cf. Schemei Reacțiile fotosintezei).

1. $6\text{CO}_2 + 6 \text{ Ribulozo-1,5-difosfat} \longrightarrow 12 \times 3\text{-Fosfoglicerat}$
2. $12 \times 3\text{-fosfoglicerat} + 12\text{ATP} \longrightarrow 12 \times 1,3\text{-difosfoglicerat}$
3. $12 \times 1,3\text{-difosfoglicerat} + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ \longrightarrow 12\text{Glicerinaldehid-3-fosfat} + 12\text{NADP}^+$
4. $5\text{Glicerinaldehid-3-fosfat} \longrightarrow 5\text{Dihidroxiacetonfosfat}$
5. $3\text{Glicerinaldehid-3-fosfat} + 3\text{Dihidroxiacetonfosfat} \longrightarrow 3\text{Fructozo-1,6-difosfat}$
6. $3\text{Fructozo-1,6-difosfat} \longrightarrow 3\text{Fructozo-6-fosfat} + 3\text{Pa}$
7. $\text{Fructozo-6-fosfat} \longrightarrow \text{Glucozo-6-fosfat}$
8. $\text{Glucozo-6-fosfat} \longrightarrow \text{Glucoza} + \text{Pa}$
9. $2\text{Fructozo-6-fosfat} + 2\text{Glicerinaldehid-3-fosfat} \xrightarrow{\text{transcetolaza}} \text{Xilulozo-5-fosfat} + 2\text{Eritrozo-4-fosfat}$
10. $2\text{Eritrozo-4-fosfat} + 2\text{Dihidroxiacetonfosfat} \xrightarrow{\text{aldolaza}} 2 \text{ Sedoheptulozo-1,7-difosfat}$
11. $2\text{Sedoheptulozo-1,7-difosfat} \xrightarrow{\text{fosfataza}} 2\text{Sedoheptulozo-7-fosfat} + 2\text{Pa}$
12. $2\text{Sedoheptulozo-7-fosfat} + 2\text{Glicerinaldehid-3-fosfat} \xrightarrow{\text{transcetolaza}} 2\text{Ribozo-5-fosfat} + 2\text{Xilulozo-5-fosfat}$
13. $2\text{Ribozo-5-fosfat} \xrightarrow{\text{izomeraza}} 2\text{Ribulozo-5-fosfat}$
14. $4\text{Xilulozo-5-fosfat} \xrightarrow{\text{epimeraza}} 4\text{Ribulozo-5-fosfat}$
15. $6\text{Ribulozo-5-fosfat} + 6\text{ATP} \xrightarrow{\text{fosforibulokinaza}} 6\text{Ribulozo-1,5-difosfat} + 6\text{ADP}$

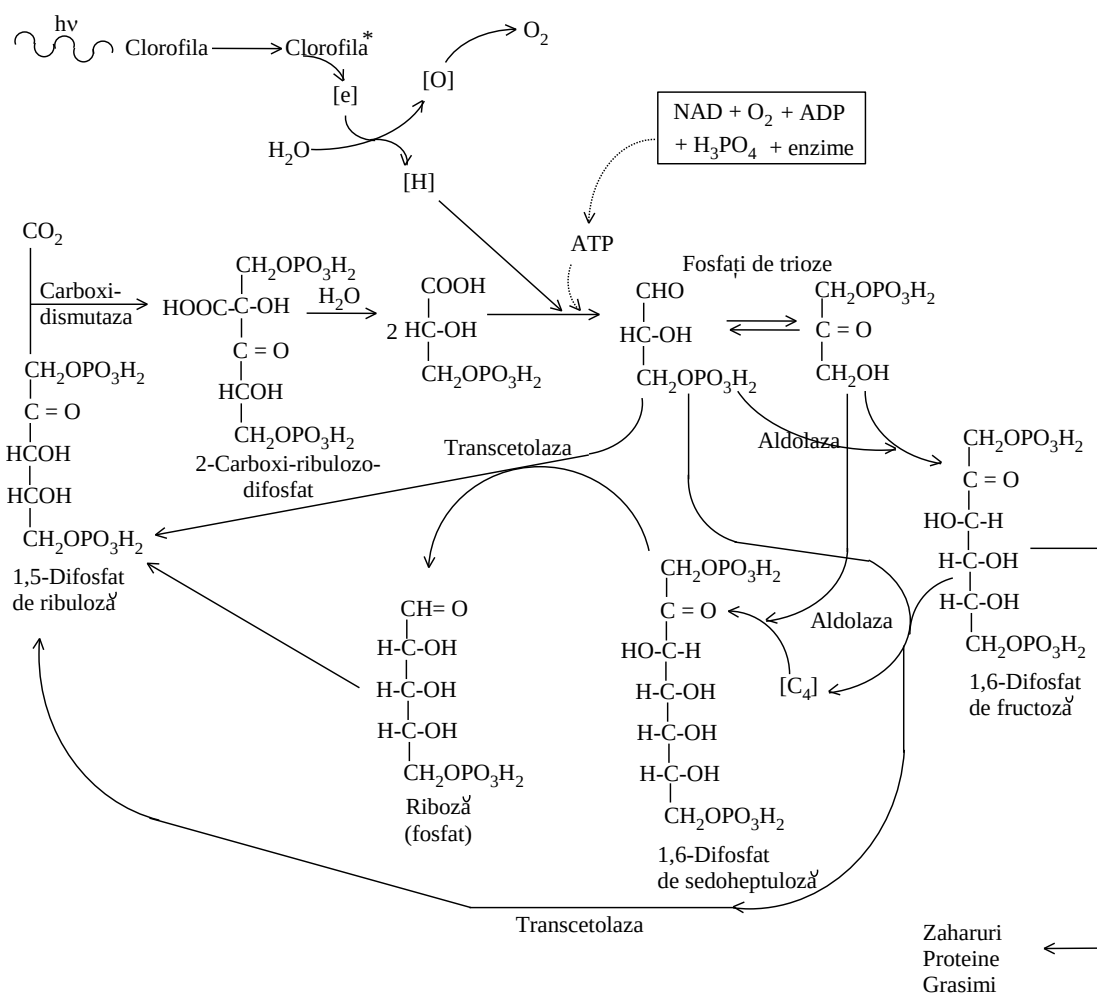
Reacțiile fotosintezei

Dacă se consideră cea de-a doua fază, a reducerii CO_2 la întuneric, se poate scrie ecuația:



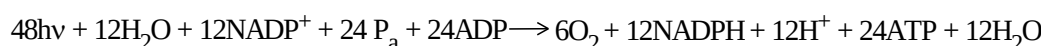
Sunt așadar necesare 18 molecule de ATP și 12 de NADPH pentru a reduce 6 molecule de CO_2 .

Redăm și schema furnizată de CD Nenițescu, cel care privește aspectele sintezei chimice a glucozei.



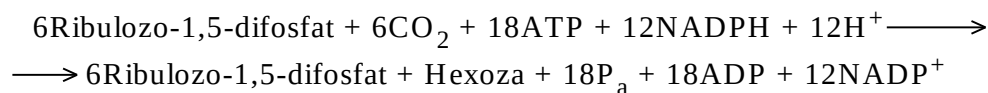
Schema generală a fotosintezei

În timpul transportului de electroni, se formează însă 24 molecule de ATP și 12 de NADPH:

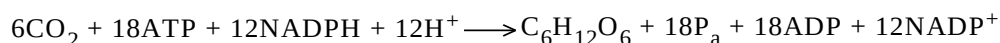


Se formează o cantitate mai mare de ATP decât este necesar reducerii CO_2 în faza de întuneric.

Întregul șir de reacții poate fi prezentat global prin ecuația generală:



Ribulozo-1,5-difosfatul este necesar procesului metabolic, însă el se regenerează. Reacția poate fi:



Reacțiile 1-8 de formare a glucozei sunt cunoscute. Reacțiile 9-15 presupun regenerarea ribulozo-1,5-difosfatului. Produsul final este *glucoza* ce rezultă conform reacției 8.

Sedoheptulozo-1,7-difosfatul este un compus intermediar în acest proces metabolic. Aceasta este calea metabolică principală de formare a hexozelor prin fotosinteză în multe plante.

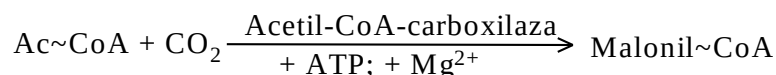
Curs nr. 9

Biosinteza acizilor grași

Se realizează cel puțin pe două căi diferite, în citoplasma celulară (*sistemul citoplasmatic sau amitocondrial*) și la nivelul mitocondriilor (*sistemul mitocondrial al sintezei acizilor grași*). Raper, în 1907, a arătat că, deoarece acizii grași sunt compuși din 4 – 20 atomi de carbon, aceștia ar trebui să fie biosintetizați plecând de la compuși foarte reactivi cu câte doi atomi de carbon. După introducerea izotopilor radioactivi în anii 1930 – 1940, s-a putut demonstra participarea la sinteza acizilor grași a unor derivați de acid acetic. Astfel, David Rittenberg și Konrad Bloch, în 1944 și 1945, hrănind șoarecii cu acid acetic marcat cu deuteriu și ^{13}C ($\text{C}^2\text{H}_3^{13}\text{COOH}$) au găsit că ambii izotopi au fost încorporați în moleculele de acid gras sintetizate. După ce Lynen a descoperit că “acetatul activ” nu este altul decât acetyl-CoA, s-a stabilit rolul principal jucat în biosinteza acizilor grași de către aceasta.

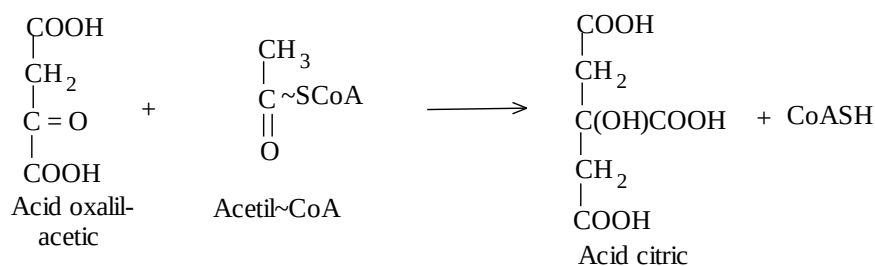
Sistemul citoplasmatic al sintezei acizilor grași. Toate celulele vii sintetizează acizii grași prin același lanț de reacții chimice. Există însă o diferență substanțială între enzimele care catalizează aceste reacții. Așadar, a fost identificat în țesuturile organismelor mamiferelor (ficat, rinichi, etc.), precum și la levuri un sistem citoplasmatic al sintezei acizilor grași care are ca produs final un acid gras saturat — *acidul palmitic*.

În prima fază, acetyl-CoA, unitatea de bază a acizilor grași pentru sinteza acestora în citoplasmă, este carboxilată, cu formare de malonil-CoA:



Reacția este catalizată de acetyl-CoA-carboxilaza, în prezența ATP, Mg^{2+} , CO_2 și a biotinei, în calitate de grupare prostetică a enzimei.

Biotina limitează viteza cu care sunt sintetizați acizii grași în citoplasma eucariotelor și procariotelor. Reamintim că eucariotele sunt plante sau animale evoluate care au în celulă un nucleu tipic, separat prin membrană. Procariotele sunt organisme primitive (virusi, bacterii, alge albastre), unicelulare, cu structură simplă.

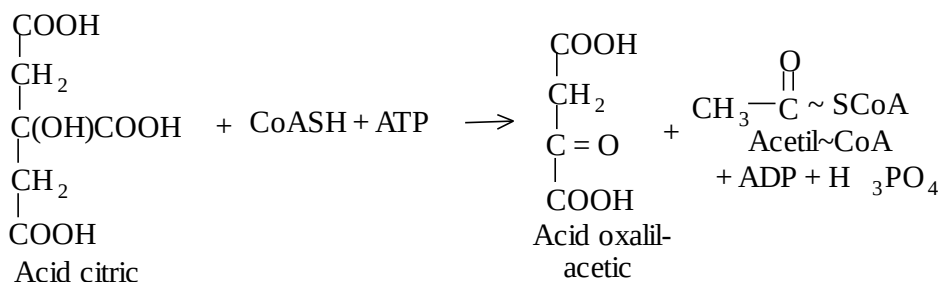


Formarea acidului citric din acetyl-CoA, necesar transportului acestuia în citoplasma, în vederea sintezei acidului palmitic

Sursa de acetyl-CoA: decarboxilarea oxidativă a piruvatului și β -oxidarea acizilor grași superiori (în mitocondrie).

Deoarece membrana mitocondrială este impermeabilă pentru acetyl-CoA, aceasta este transportată sub forma acidului citric (fig. 5.1).

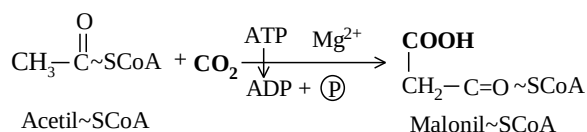
Acidul citric trece din mitocondrie în citoplasmă unde este scindat, în prezența unei enzime ATP-dependente (Fig. 5.2).



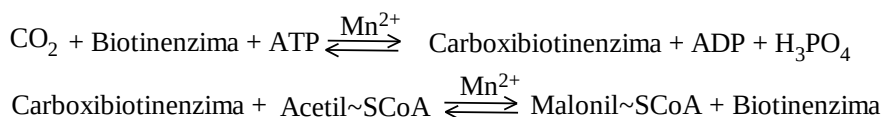
Refacerea acetilcoenzimei A în citoplasma din acid citric

Așa se explică acțiunea stimulatorie a acidului citric asupra biogenezei acizilor grași superiori. Formarea malonil~CoA are loc în citoplasmă din acetil ~SCoA și CO₂ în prezența biocitinei (fig.

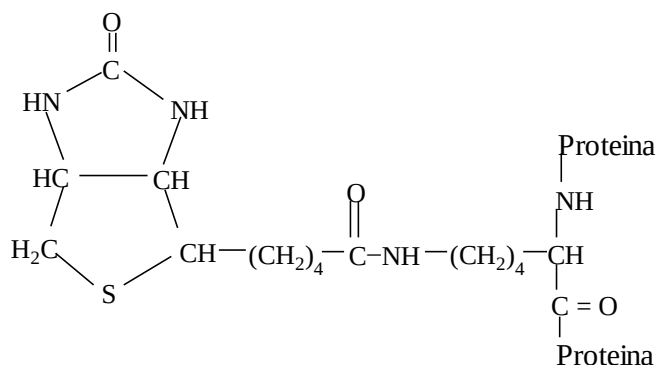
5.3):



Reacția globală poate fi scrisă astfel:

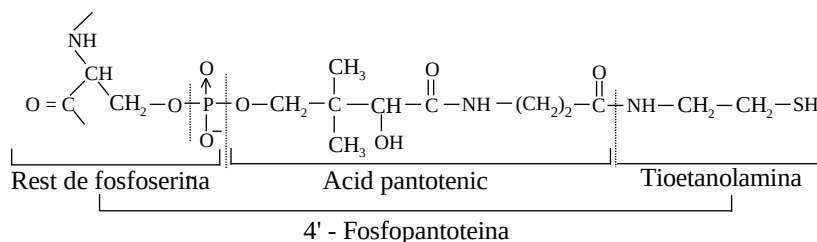


În etapa următoare intervine o proteină solubilă, cu M=10⁴ daltoni și care are ca grupare prostetică 4'-fosfopantoteina, legată covalent de un rest de fosfoserină. Se numește proteină purtătoare de acil ("acyl carrier protein" = ACP).

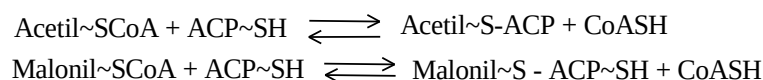


Structura biotinei în proteina purtătoare de grupe carboxil (biotin carboxyl carrier protein - BCCP)

Gruparea funcțională a ACP este grupa SH liberă care poate forma esteri cu diferiți radicali acil (acetil sau malonil).

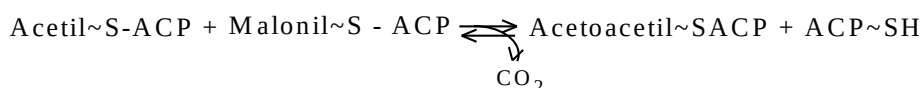


Două enzime diferite, malonil~CoA:ACP-transacilaza și acetil~CoA:ACP-transacilaza, care sunt sulfhidrilenzime, catalizează formarea de tioesteri ai ACP și eliberarea de CoASH:



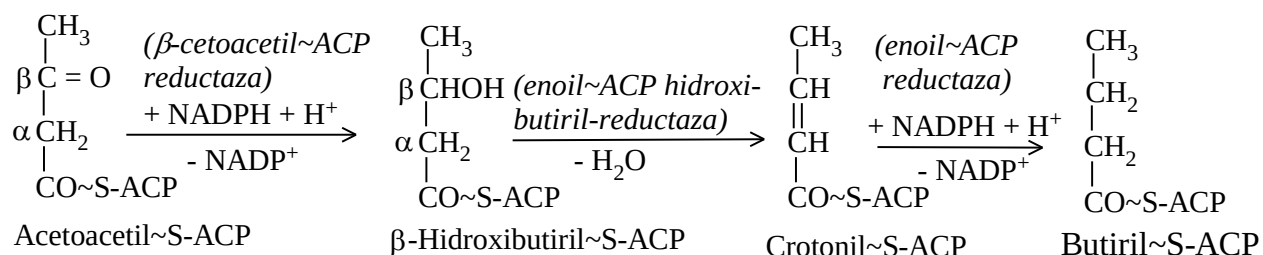
Cele două enzime fac parte din *complexul multienzimatic al sintetazei acizilor grași*, din care ACP nu poate fi izolată.

O enzimă de condensare catalizează condensarea acetil~S-ACP și malonil~SACP cu formare de acetoacetil~SACP și ACP~SH:

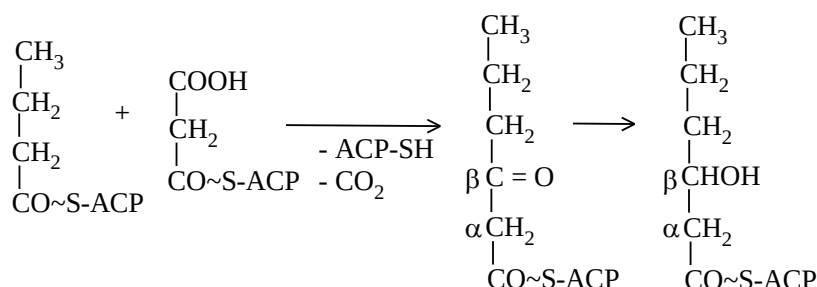


Bioxidul de carbon provine din cel fixat de către molecula de acetil~CoA. Reacția este puternic exergonică și deplasată spre dreapta, în sensul biosintezei acizilor grași.

Următoarele etape sunt catalizate de enzimele complexului sintetazei acizilor grași:

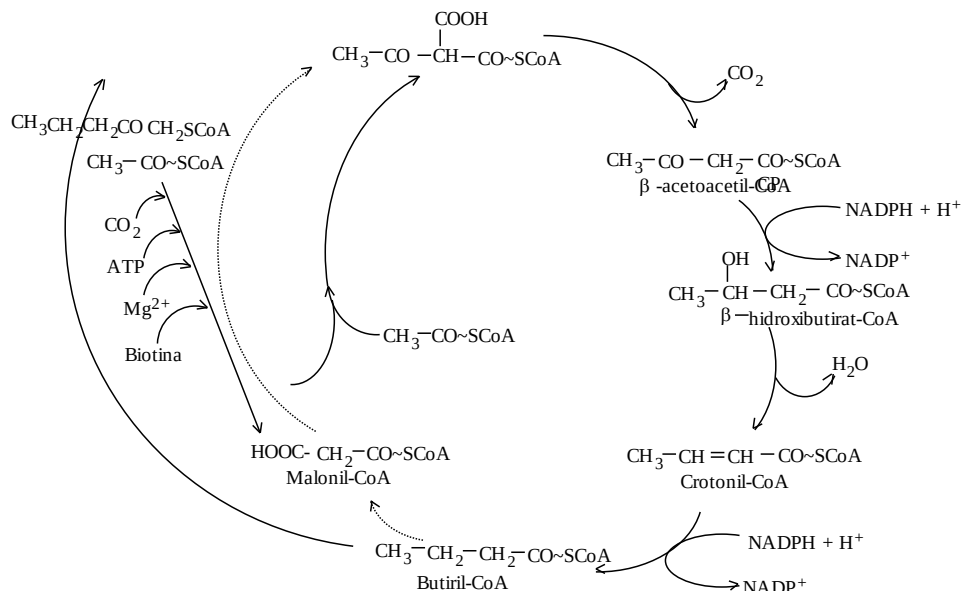


Pentru sinteza unui mol de acid palmitic sunt necesare 7 asemenea cicluri și repetarea în fiecare ciclu a următorului proces: metil-malonil~SACP se cuplează la extremitatea carboxil terminală a catenei acil în curs de sinteză cu eliberarea unui ACP-SH, pierderea grupei carboxil a malonilului și eliminarea ei sub formă de CO₂ și condensarea acil~SACP cu malonil~SACP cu formarea unui cetoacil~SACP cu doi atomi de carbon mai mult decât precedentul (fig. 5.4). Acidul rezultat este transformat de complexul multienzimatic al sintetazei acizilor grași după același mecanism: butiril~SACP rezultat cu malonil~SACP se condensează după reacția:



Rezultat final: *acidul palmitic*.

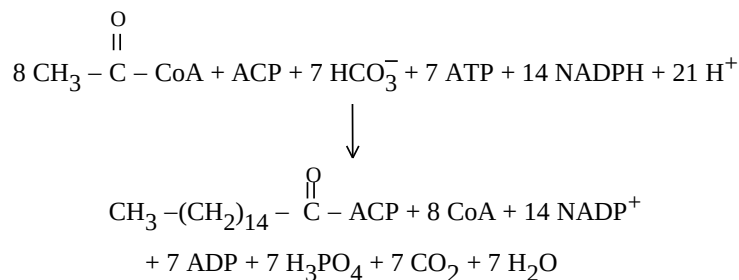
Sursa fragmentelor de carbon: malonil~SCoA care provine din acetil~SCoA. Bilanț: 1 mol acetil~CoA; 14 moli NADPH + H⁺; 7 moli malonil~SCoA conduc la 14 moli NADP⁺; 7 moli CO₂; 7 CoA~SH și 6 H₂O.



Schema biosintezei acizilor grași

NADPH se formează prin oxidarea glucozo-6-fosfatului la ribulozo-5-fosfat, prin oxidarea acidului malic la acid piruvic, iar în plantele verzi prin fotoreducerea NADP^+ la $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Reacția de formare citoplasmatică a acidului palmitic s-ar mai putea scrie astfel:



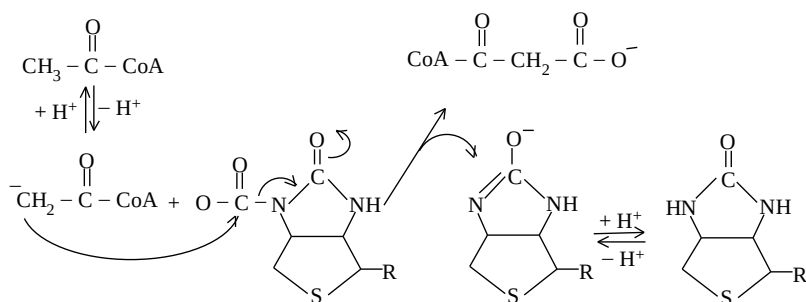
Sinteza este stopată după obținerea unei catene formată din 16 atomi de carbon deoarece *deacilaza*, enzimă hidrolitică ce îndepărtează grupele acil de pe ACP are o activitate maximă pentru acizi grași cu catena compusă din 16 atomi de carbon.

Prima reacție din procesul biosintezei acidului palmitic este catalizată de *acetil-CoA carboxilază*, enzimă cu rol important în reglarea biosintezei acizilor grași din celulele mamiferelor, drojdiilor și a majorității organismelor. Enzima conține vitamina B₇ (biotina) legată covalent de un rest ε al lizinei din apoproteina acesteia. Gruparea carboxil este inițial transferată pe centrul biotinic într-o etapă ce necesită ATP. Într-o a doua etapă, carboxilul este transferat carbonului din gruparea metilică a acetil-CoA. Cea mai studiată este acetil-CoA carboxilaza din *Escherichia coli*. Enzima conține trei proteine diferite: *proteina biotinică purtătoare de grupe carboxil*, (biotin carboxyl carrier protein – BCCP, cu M = 22.500), *carboxilaza biotinică* (M = 98.000) și *carboxiltransferaza* (M = 130.000). Mecanismul probabil de transfer al grupării carboxil este redat în fig. 5.5).

Sistemul mitocondrial al sintezei acizilor grași. Mitocondriile sintetizează acizi grași din lanțurile acil existente și din acetil~ScoA prin adăugarea acesteia la extremitatea carboxil terminală. Acizii grași saturați cu C₁₂ și C₁₆ sintetizați în citoplasmă sunt utilizați pentru alungirea lanțului atomilor de C sub formă de acil~ScoA. Mitocondriile pot utiliza și malonil~ScoA pentru alungirea acil~ScoA prin adăugări succesive de resturi alcătuite din 2 atomi de carbon.

La nivelul microzomilor, deci pe reticulul endoplasmatic, alungirea lanțului de carbon se face utilizând cu precădere malonil~ScoA. Sistemul microsomal nu utilizează în această sinteză ACP.

Atât în mitocondrii cât și în microzomi, drept sursă a atomilor de hidrogen necesari pentru reducerea dublelor legături din cetoacil~SCoA servește NADPH + H⁺.



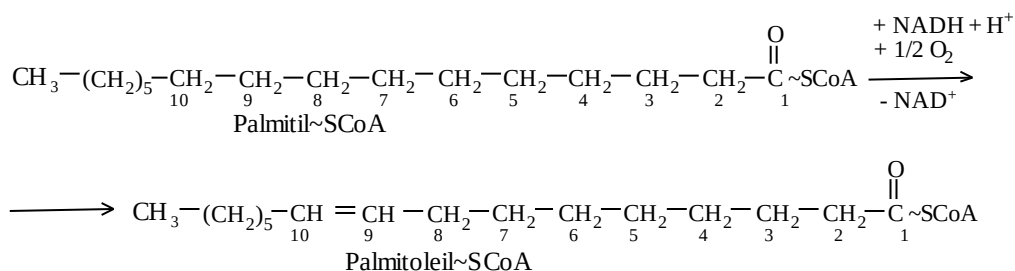
Mecanismul carbanionic de carboxilare a acetil-CoA

Biosinteza acizilor grași nesaturați

Acizii grași nesaturați se obțin prin dehidrogenarea acizilor grași saturați la nivelul microzomilor din ficat și din țesutul adipos, în prezența unui sistem enzimatic care necesită NADH + H⁺ și oxigen. Dubla legătură se introduce în poziția C₉.

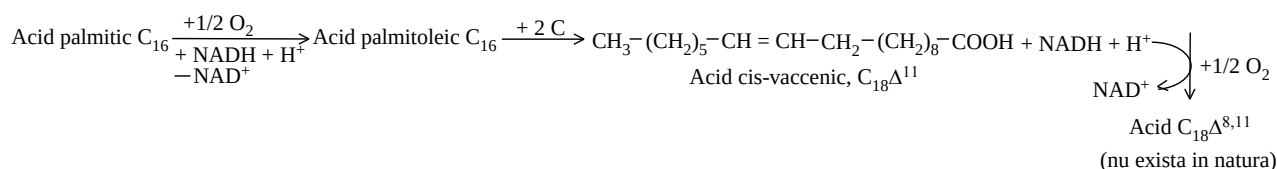
Din acizii palmitic și stearic se formează acizii nesaturați superiori cu o dublă legătură, acidul palmitoleic și acidul oleic.

Oxigenaza localizată în fracția microzomală a mamiferelor are o acțiune specifică și determină dehidrogenarea în poziția 9 față de grupa carboxil (Fig. 5.6). Pentru a se introduce o a doua dublă legătură, acidul palmitoleic format primește încă doi atomi de C la extremitatea carboxilică, prin condensarea palmitoleil~SACP cu malonil~SACP.



Biosinteza acizilor grași nesaturați

Deoarece, în acidul linolic, poziția dublelor legături este C₁₈Δ^{9,12}, acest acid nu poate fi sintetizat prin următorul mecanism:



De asemenea, prin acest mecanism nu pot fi sintetizați acizii linolic (C₁₈Δ^{9,12}), linolenic (C₁₈Δ^{9,12,15}) și arachidonic (C₂₀Δ^{5,8,11,14}) care sunt acizi grași superiori esențiali și pe care organismele animale și-l procură exclusiv din hrana de origine vegetală.

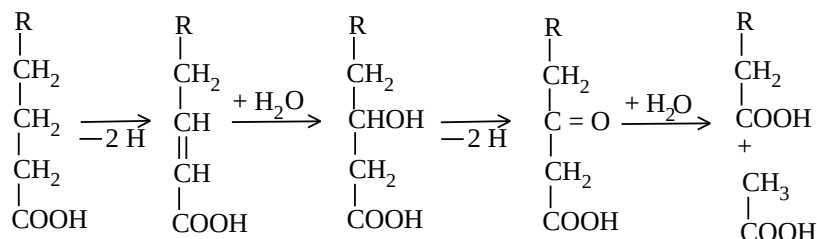
Catabolismul (β -oxidarea) acizilor grași

Sursa principală a acizilor grași liberi din plasmă o constituie trigliceridele țesutului adipos care sunt hidrolizate de o lipază hormonosensibilă, enzimă intracelulară localizată în microzomii celulei adipoase (hidrolizează acizii grași din pozițiile α, α' ale trigliceridelor) și de o monoglicerid lipază (hidrolizează acidul gras din poziția β). Acizii grași liberi o dată pătrunși în circuitul sanguin sunt "captați" de ficat, de mușchii striati și de țesutul adipos.

Majoritatea Țesuturilor sunt capabile să oxideze acizii grași cu formare de CO_2 și H_2O , din care cauză acizii grași sunt considerați forma cea mai activă metabolic a lipidelor.

Teoria β -oxidării a fost elaborată de Knoop (1904) care a observat că prin hrănirea câinilor cu acizii grași având o grupă fenil în poziția ω se elimină prin urină următorii produși de degradare: acid hipuric sau acid fenacetinic, în funcție de numărul de atomi de carbon al acidului gras. Pe baza acestor rezultate, Knoop ajunge la concluzia că, lanțul atomilor de carbon ai acidului gras transformat are de fiecare dată cu doi atomi de carbon mai puțin și prin urmare, procesul de oxidare are loc la grupa $-\text{CH}_2-$ care se găsește întotdeauna în poziția β - față de carboxil.

Reprezentarea schematică a mecanismului degradării acizilor grași după Knoop poate fi redată astfel:

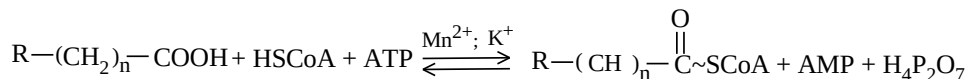


În felul acesta, din acidul stearic (C_{18}) se formează acidul palmitic (C_{16}), apoi acidul miristic (C_{14}) etc. până la formarea CO_2 și H_2O .

Degradarea acizilor grași prin mecanismul β -oxidării

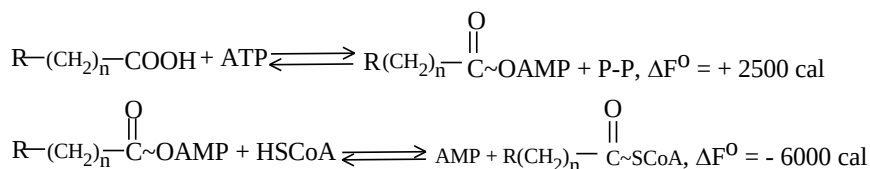
S-a demonstrat că toți produșii intermediari ai β -oxidării acizilor grași sunt derivați ai CoASH și rolul acestei coenzime în metabolismul acizilor grași poate fi comparat cu rolul îndeplinit de gruparea fosfat în metabolismul glucidelor.

1. *Etapa inițială* în oxidarea acizilor grași constă în activarea lor prin formarea de acil derivați ai CoASH:



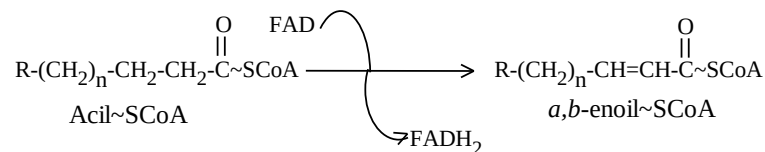
Reacția este catalizată de acil CoA sintetaze. Dintre aceste sintetaze, acetil CoA sintetaza activează acizii grași cu C_2 și C_3 , octanoil CoA sintetaza activează acizii grași cu C_4 - C_{12} , iar dodecanoil CoA sintetaza activează acizii grași care conțin C_{10} - C_{18} . Acil~CoA sintetazele sunt localizate în membrana mitocondrială externă și în reticulul endoplasmatic.

Reacția de activare a acizilor grași decurge în două etape, cu formarea unui produs intermediar *acil adenilat*, care este un compus macroergic:



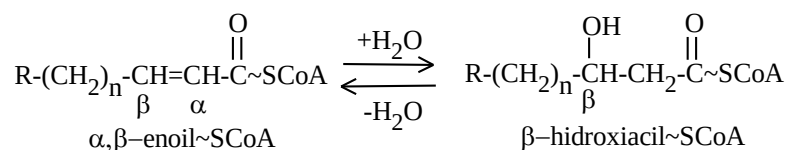
Acil~CoA sintetazele au nevoie pentru manifestarea activității lor de prezența Mg^{2+} și K^+ și sunt inhibate de ioni de Li^+ și Na^+ .

2. *Derivatul acil~SCoA* este dehidrogenat enzimatic în prezența acil CoA dehidrogenazelor, care conțin FAD drept coenzimă, cu formarea unui derivat α,β nesaturat:

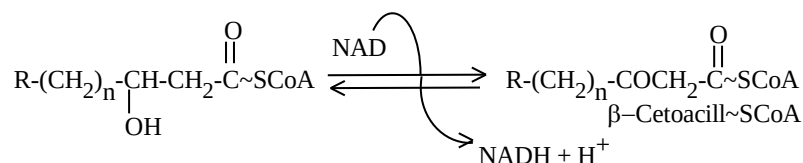


Dintre acil CoA s-au identificat: butiril-, octanoil- și hexadecanoil-CoA dehidrogenaze, cu specificități de substrat deosebite.

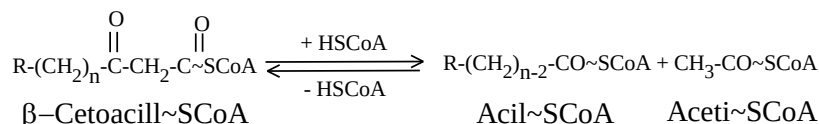
3. α,β -Enoil-CoA hidrazei (Enoil CoA hidratata sau crotonaza = 3 hidroxiacil CoA hidrolaza) într-un β -hidroxiacil~SCoA, în cursul reacției:



4. β -Hidroxiacil-CoA este dehidrogenat de către β -hidroxiacil~SCoA dehidrogenază, cu formare de β -ceto acil~SCoA.



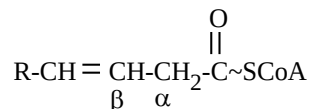
5. β -Ceto acil~SCoA este scindată de enzimele β -ceto acil-tiolaze cu formare de acetil~SCoA și acil~SCoA cu doi atomi de carbon mai scurt:



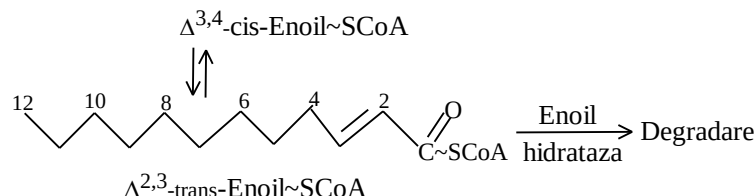
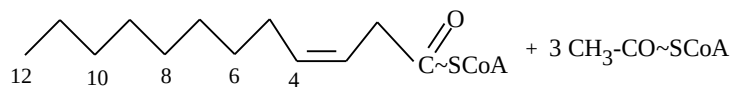
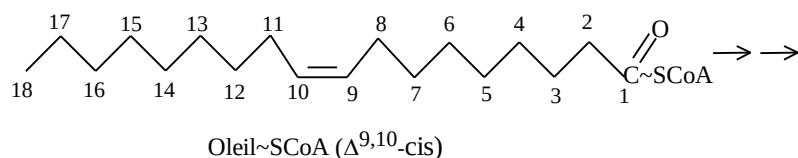
Echilibrele sunt deplasate spre dreapta.

Formarea stereoizomerilor. Din reacție rezultă acilderivați α,β -nesaturați cu configurație trans. Prin hidratare se formează L(+) β -oxiacil~SCoA.

Acizii grași superiori nesaturați cu număr par de atomi de C sunt degradați după mecanismul β -oxidării până în faza când dubla legătură din structura lor este situată între doi atomi de carbon vecini atomului de C la nivelul căruia urmează să fie scindată legătura covalentă:



Dubla legătură în acizii grași superiori naturali are însă o configurație *cis* și după acțiunea enoil hidrazei se obține Δ^3 -cis-enoil~SCoA. În procesul β -oxidării poziția dublei legături este întotdeauna Δ^2 -trans-Enoil~SCoA. Din această cauză Δ^3 -cis-enoil~SCoA este

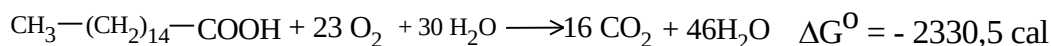


izomerizat de către Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-enoil~SCoA izomerază cu formarea izomerului Δ^2 -trans-Enoil~SCoA care este degradat prin β -oxidare.

Ciclul Krebs și β -oxidarea acizilor grași

Mitocondriile sunt formațiuni intracelulare care posedă echipamentele enzimatice necesare β -oxidării acizilor grași și ciclului lui Krebs.

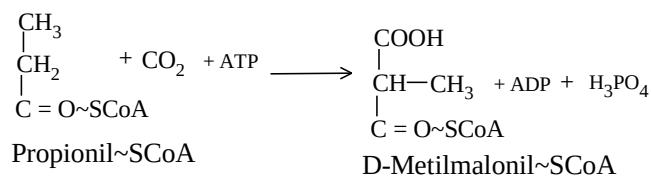
Acetil~SCoA este metabolizată în ciclul Krebs cu formare de CO_2 și H_2O . Rezultă și o mare cantitate de energie prin oxidarea unei molecule de $\text{NADH} + \text{H}^+$ și a unei molecule de FADH_2 în lanțul respirator. 1 mol NADH generează 3 moli ATP, iar unul FAD – 2 moli ATP. Prin urmare pentru fiecare mol de acetil~SCoA se formează 5 moli ATP. În cursul oxidării acidului palmitic, procesul se repetă de 7 ori, deci se vor forma 35 moli ATP, din care 1 mol s-a consumat în etapa inițială a β -oxidării.



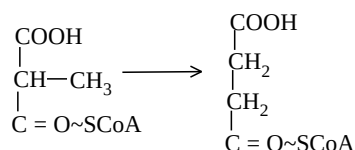
Cei 8 moli de acetil~SCoA rezultați din degradarea acidului palmitic sunt oxidați în ciclul Krebs cu formare de $8 \times 12 = 96$ moli ATP. Bilanțul final este de $96 + 34 = 130$ moli ATP, iar randamentul de $1308/2330 = 56\%$. Acetil~SCoA este utilizată și pentru biosinteze.

Degradarea acizilor grași cu număr impar de atomi de carbon

Produsul final în acest caz este propionil~SCoA, care nu se întâlnește în stare liberă deoarece este oxidat în continuare:



D-metilmalonil~SCoA sub acțiunea metilmalonil~SCoA racemazei este transformat în L-metil-malonil~SCoA mutază, enzimă care conține cobamidă în calitate de coenzimă, în succinil~SCoA:



Geneza acetoacetatului, cetoza și echilibrul acido-bazic

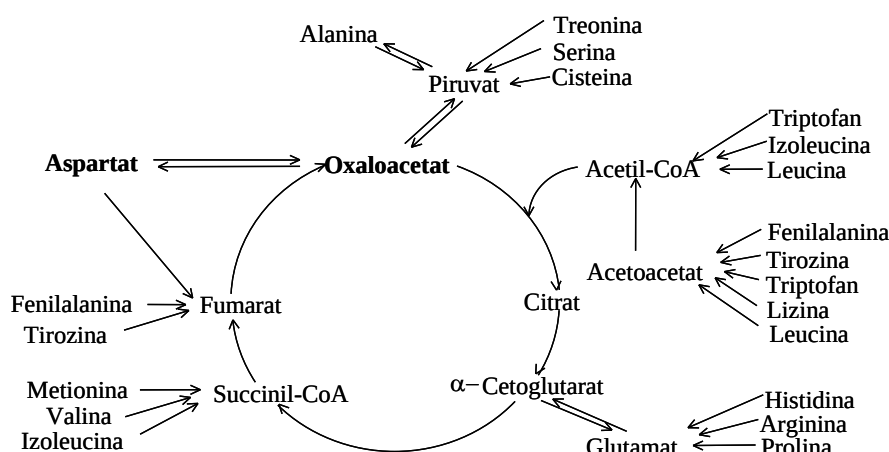
S-a emis teoria oxidării alternative multiple pentru a explica prezența corpurilor cetonice.

În general, acizii grași oferă protecție organismului și o balanță optimă pentru buna funcționare a corpului uman.

Curs nr. 11

Metabolismul aminoacizilor

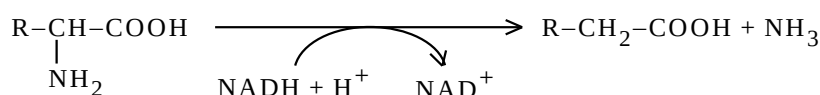
Aminoacizii sunt utilizați pentru sinteza de proteine specifice, de enzime și de hormoni de natură polipeptidică sau proteică sau pot fi metabolizați cu formarea unor compuși intermediari folosiți în sinteza bazelor azotate sau a altor compuși. De asemenea, pot suferi o degradare oxidativă completă servind astfel ca sursă energetică. Aminoacizii metabolizați la acetat și acetoacetat sunt considerați *cetogenici*. Conversia oxaloacetatului la fosfoenolpiruvat conduce în final la obținerea de glucoză atunci când hidrații de carbon sunt deficitari. Din acest motiv, unii aminoacizi se numesc *glicogenici*.



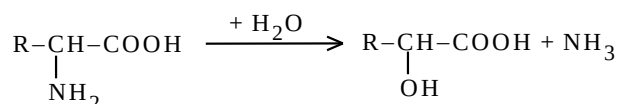
Relatia aminoacizilor cu ciclul Krebs.

Dezaminarea aminoacizilor reprezintă o degradare a aminoacizilor cu formare de amoniac și acizii corespunzători (α -cetoacizi, hidroxiacizi, acizi carboxilici saturați, acizi carboxilici nesaturați).

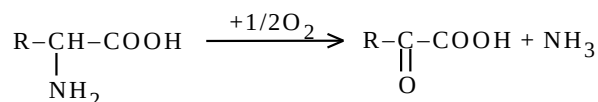
Dezaminarea reductivă conduce la formarea NH_3 și a acidului corespunzător, iar donorul de electroni necesari reducerii este $\text{NADH} + \text{H}^+$:



Dezaminarea hidrolitică are loc cu formare de amoniac și un hidroxiacid:

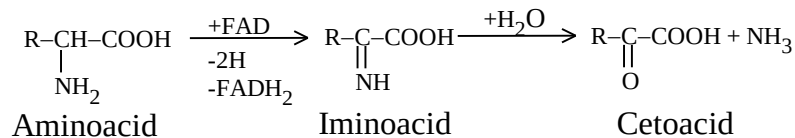


Dezaminarea oxidativă conduce la amoniac și cetoacidul corespunzător:



Această reacție este catalizată de *oxidazele aminoacizilor*, care conțin în calitate de coenzimă FAD și posedă o înaltă specificitate de acțiune. Este cea mai importantă reacție de dezaminare atât pentru animale, cât și pentru plante.

Reacția de dezaminare oxidativă decurge în două etape: în prima etapă are loc un proces de dehidrogenare cu formarea iminoacidului corespunzător, iar în faza a doua are loc adiția apei, cu formare de amoniac și cetoacidul corespunzător.



Există două tipuri de flavoproteine cu activitate dehidrogenazică. În reticulul endoplasmatic este localizată *L-aminoacid oxidaza*, iar în microzomii celulelor hepatice se află *D-aminoacid oxidaza*.

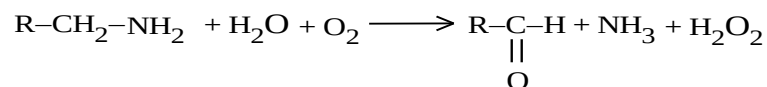
Flavinnucleotidele acestor oxidaze (FADH_2 și FMNH_2) reacționează direct cu oxigenul molecular, generând H_2O_2 care este la rândul său descompusă în apă și oxigen sub influența catalazei. Acest proces enzimatic are loc în peroxizomii celulelor hepatice.

Decarboxilarea aminoacizilor Procesul este catalizat de *decarboxilazele aminoacizilor* care conțin în calitate de coenzimă *piridoxal fosfat* (fosfopiridoxal).

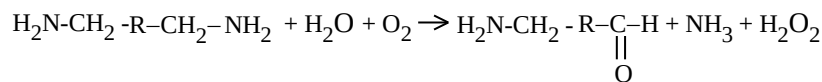
Aminele formate prin decarboxilare posedă importante proprietăți farmacodinamice (histamina, tiramina) și fiziologice sau sunt chiar otrăvuri deosebit de puternice.

În procesul de putrefacție se formează numeroase amine, numite ptomaine, prin decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme. Procesele de intoxicare în cazul consumului unor alimente alterate se explică prin prezența aminelor toxice.

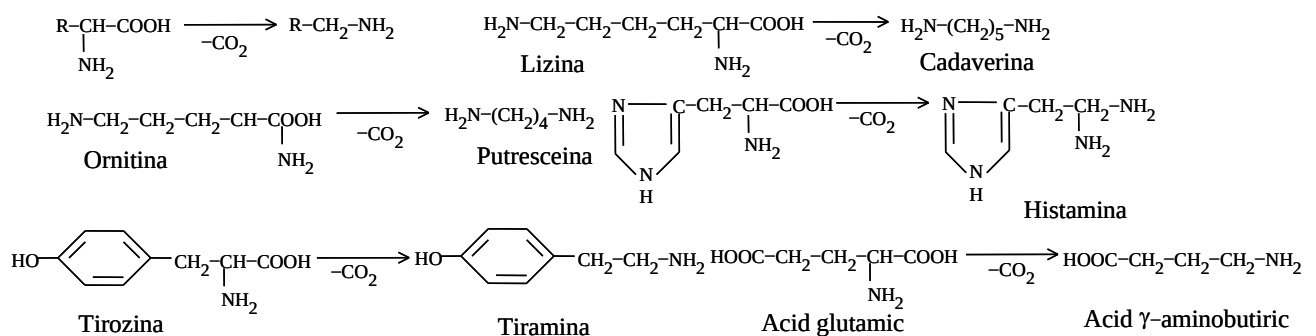
Monoaminele sunt degradate de *monoaminoxidaze* cu formare de aldehide, amoniac și apă oxigenată:



Diaminele de tipul cadaverinei și putresceinei sunt oxidate de diaminoxidaze cu formare de aminoaldehide, amoniac și apă oxigenată, conform ecuației generale:



Aminele formate prin decarboxilarea aminoacizilor în plante sunt utilizate pentru biosinteza alcaloizilor, iar aldehidele rezultate prin oxidarea aminelor pot fi oxidate în continuare până la formarea acizilor corespunzători.



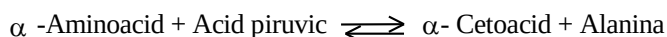
Decarboxilarea aminoacizilor

Transaminarea aminoacizilor

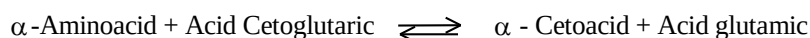
Reacțiile de transaminare sunt larg răspândite în celulele plantelor și animalelor. Din cei 22 de aminoacizi frecvent întâlniți în celulă, un număr de 11 (Ala, Phe, Trp, Tyr, Val, Arg, Asn, Cys, Ile, Lys) sunt în mod obișnuit transaminați enzimatic.

Reacțiile de transaminare sunt catalizate de *aminotransferaze* care conțin fosfopiridoxal și sunt reacții reversibile a căror constantă de echilibru este aproximativ 1.

Cele mai importante sunt: *alanin transaminaza* care catalizează reacții de tipul:

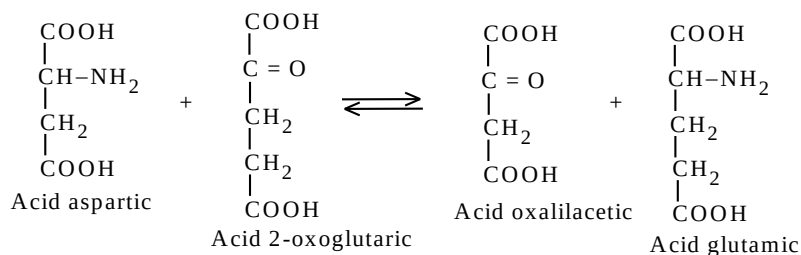


și *glutamat transaminaza*:

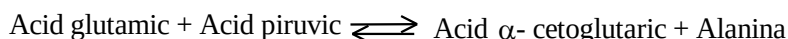


Acceptor al grupării amino a aminoacizilor poate servi și acidul oxalilacetic.

Transaminazele sunt localizate în mitocondrii și în partea solubilă a celulelor eucariote și rolul lor fiziologic este diferit.



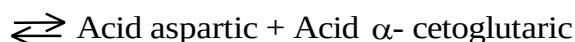
Enzima *L-aspartat : 2 oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.11.) cu denumirea veche de *glutamat oxaloacetat transaminaza* (GOT) catalizează reacția următoare. Enzima poate fi denumită și *L-aspartat aminotransferaza*.



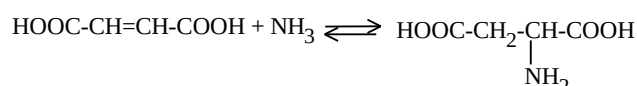
β -Alanina este utilizată în sinteza *coenzimei A* și a *acidului pantotenic*.

Metabolismul acidului aspartic realizează legătura între metabolismul proteinelor și cel al glucidelor.

Acidul aspartic este sintetizat prin reacția:



La plante, acidul aspartic poate rezulta și din aminarea reductivă catalizată de *aspartat-amoniac liaza*:

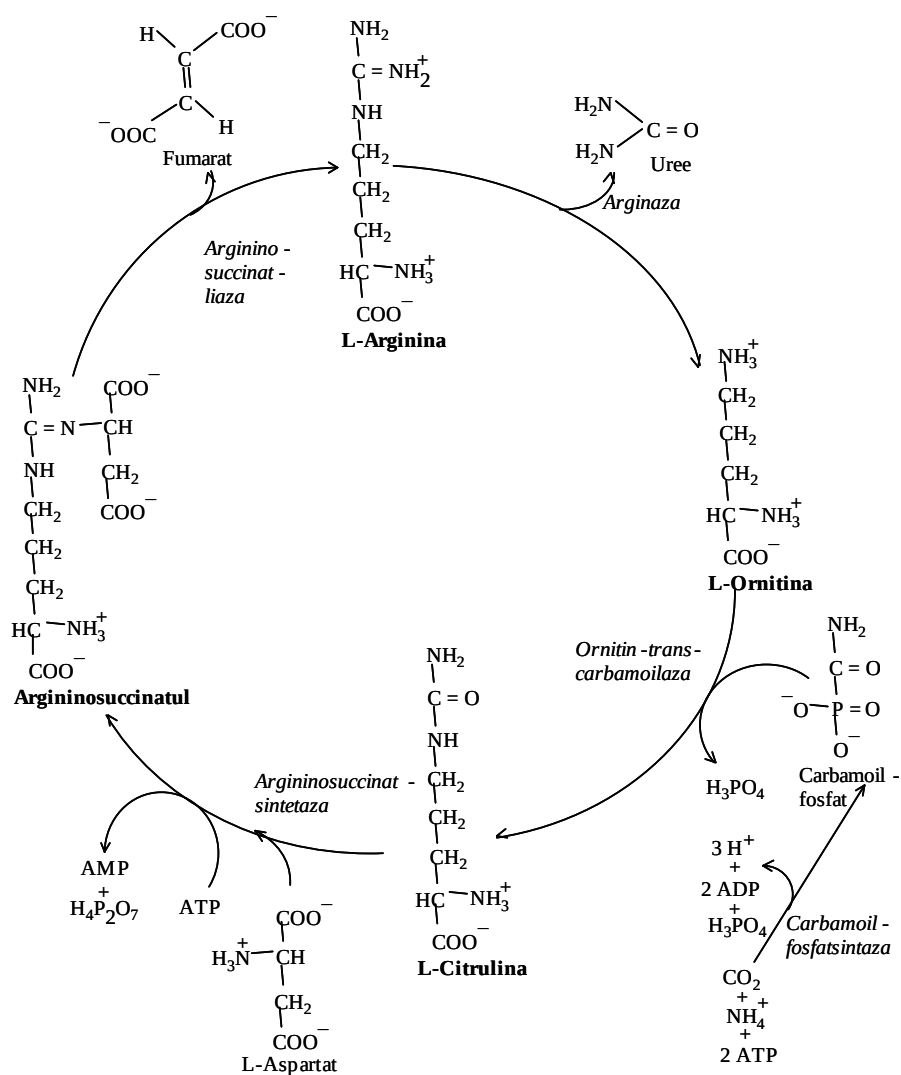


Amoniacul, toxic pentru plante, este făcut inofensiv și utilizat în sinteza aminoacizilor. Dacă acesta nu poate fi în totalitate neutralizat, excesul de amoniac este legat sub formă de amide ale acizilor glutamic și aspartic. În unele plante predomină asparagina (Asn), în altele glutamina (Gln).

Formarea creatinei. În mușchii scheletici ai vertebratelor se găsește creatină (α -metilguanidinoacetat) care reprezintă o sursă de grupări fosfat bogate în energie. Creatina este sintetizată plecând de la arginină, aminoacid ce transferă gruparea amidinică glicocolului. Fosforilarea reversibilă a grupării aminice terminale conduce la compusul fosfocreatină, bogat în energie. Creatina este pierdută din corp prin ciclizare spontană la creatinină, care este excretată prin urină.

Ciclul ureogenetic. În procesele de dezaminare a aminoacizilor, precum și în alte reacții metabolice, apare amoniac, un compus extrem de toxic pentru celula vie și care este eliminat din corp sub formă de uree. Arginina constituie sursa de formare a ureei. Procesul are loc numai în ficat unde se află *arginaza*, o enzimă cu $M = 120.000$ și care conține două subunități identice legate între ele prin intermediul ionilor de mangan. În cursul hidrolizei argininei se eliberează uree și ornitină, aceasta participând la fixarea carbamilfosfatului. Acesta din urmă este sintetizat din amoniac și bioxid de carbon,

în prezența *carbamilfosfat sintetazei* și a unei molecule de ATP. Ureea astfel formată este transportată de sânge la rinichi și eliminată prin urină.

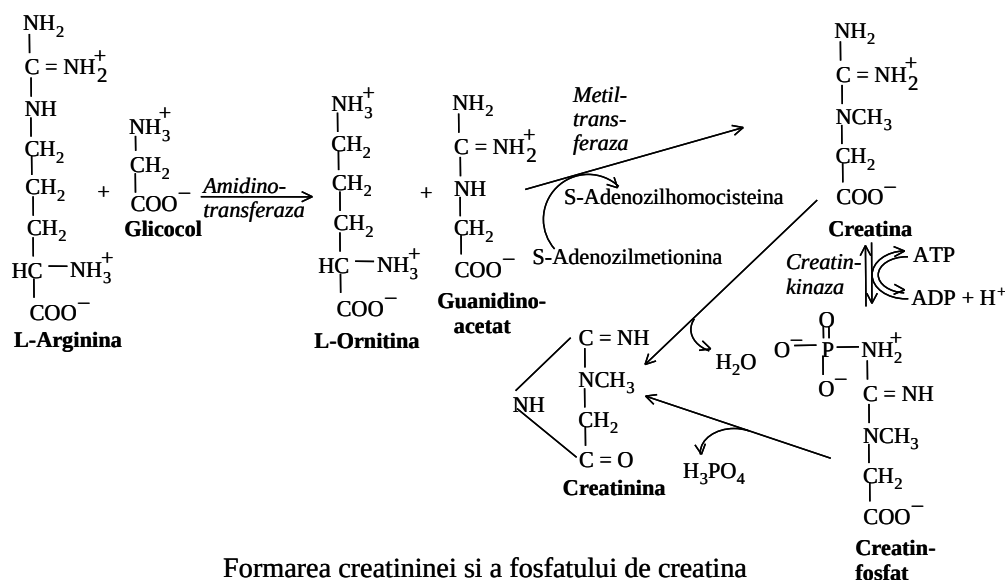


Ciclul ureei: mecanismul îndepărtării azotului nedorit.

Biosinteza aminoacizilor

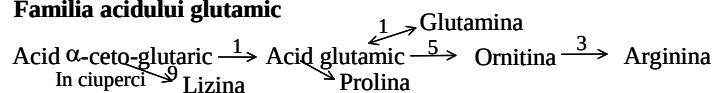
Sinteza aminoacizilor în organisme vii pleacă, de regulă, de la intermediarii care apar în metabolismul glucidelor. În funcție de aminoacidul principal rezultat în acest proces, aminoacizii pot fi grupați în șase familii. Astfel, întreaga familie a acidului glutamic provine de la *acidul α -cetoglutaric*, iar acesta rezultă din reacțiile ciclului Krebs (ciclul acizilor tricarboxilici). Această familie cuprinde acidul L-glutamic, L-glutamina, L-prolina și L-arginina.

În ciuperci și în *Euglena*, din acid α -cetoglutaric se obține lizină într-un număr de nouă etape de reacție. Un alt intermediar al ciclului Krebs, acidul oxalilacetic, servește ca punct de plecare în sinteza acidului L-aspartic și a membrilor familiei sale. Acidul 3-fosfoglicerice, ce apare în glicoliză, este intermediarul L-serinei, L-cisteinei și glicocolului. De asemenea, acidul piruvic este substanța de plecare în biosinteza alaninei, valinei și leucinei. Totodată, acidul piruvic reprezintă o sursă de atomi de carbon în biosinteza lizinei plecând de la acid aspartic.

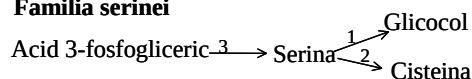


În acest fel, atât lizina cât și izoleucina pot fi considerați membri ai familiei acidului piruvic.

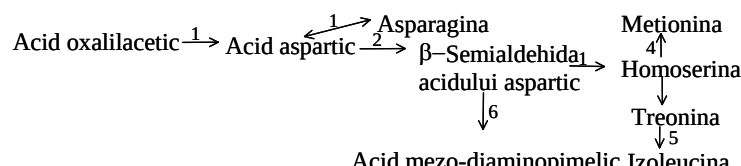
Familia acidului glutamic



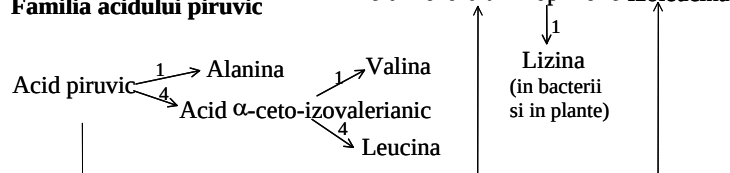
Familia serinei



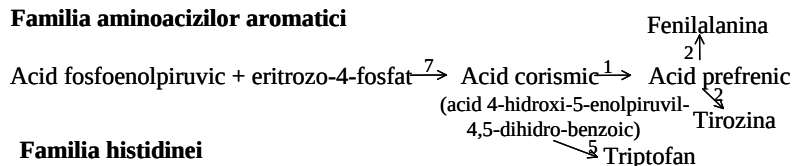
Familia acidului aspartic



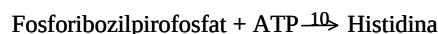
Familia acidului piruvic



Familia aminoacizilor aromatici



Familia histidinei



Familii de aminoacizi formate in functie de metabolitul de plecare din biosinteza lor

Aminoacizii aromatici provin din intermediarii cei mai importanți ai glicolizei (acidul fosfoenolpiruvic) și ai ciclului pentozelor (eritrozo-4-fosfatul). Triptofanul necesită de asemenea fosforibozilpirofosfat pentru sinteza sa, iar acesta derivă de la monofosfații de hexoze.

O parte din transformările precursorilor în aminoacizi sunt ireversibile; alte căi metabolice sunt astfel reglate, încât celula poate sintetiza numai cantitatea strict necesară dintr-un aminoacid anume. Mecanismele de reglare, deși simple, sunt deosebit de eficiente.

Plantele pot utiliza atât NADH, cât și NADPH ca sursă de atomi de hidrogen. Este posibil însă ca, atunci când nu sunt crescute pe NH_4^+ , plantele, ciupercile și chiar bacteriile să-și sintetizeze grupările amino plecând nu de la amoniac, ci de la gruparea amidică a glutaminei. În astfel de cazuri, conversia primară a NH_4^+ la azot organic să fie catalizată de *glutamin sintetază*.

Acid L-glutamic

Kinaza $\downarrow$ **ATP** $\rightarrow$ **ADP**

$$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\ | \quad \parallel \quad \quad \quad | \\ \text{O}^- \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{CO}- \\ \quad \quad \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad \quad \quad \text{H} \end{array} \right]^-$$

L-glutamilfosfat

γ -Semialdehida acidului L-

Spontan $\downarrow \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$

$\text{CH}_2 - \text{CH}_2$

$\diagup \quad \diagdown \quad \text{H}$

$$\text{Reductaza} \quad \begin{array}{c} \curvearrowright \text{NADPH} + \text{H}^+ \\ \downarrow \\ \text{NADP}^+ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{C} < \text{H} \end{array}$$

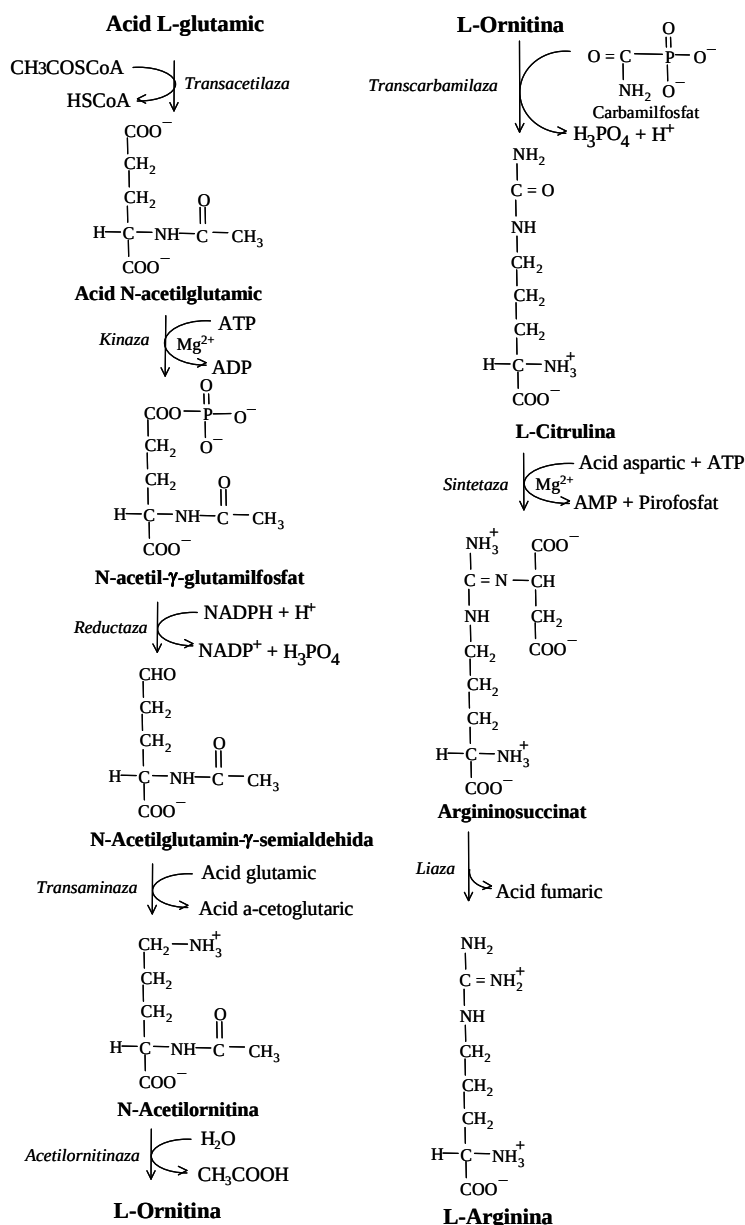
Mo-Fe-proteina este mult mai complexă și mai puțin studiată. În bacteria *Clostridium pasteurianum* se găsește un tetramer de 220.000 daltoni conținând 2 atomi de molibden, aproximativ 30 de fier și tot atâția de sulf care pot fi îndepărtați în mediu acid.

În procesul de fixare a N_2 , are loc reducerea feroproteinei de către feredoxină sau flavodoxină, obținute în procesul de fermentație a glucidelor în *C. pasteurianum* sau în prezența unui raport ridicat de $[NADPH]/[NADP]$. Electronii sunt transferați de pe feroproteină pe Mo-Fe-proteină. Acest transfer este cuplat cu hidroliza a patru molecule de ATP la patru de ADP pentru fiecare pereche de electroni. Mo-Fe-proteina redusă va reduce mai departe N_2 la NH_4^+ .

Nitrogenaza poate fi studiată ușor deoarece ea poate reduce și acetilena la etilenă care poate fi decelată gaz cromatografic. Totodată, nitrogenaza mai poate cataliza următoarele reacții: transformarea CN^- în CH_4 și NH_4^+ , a N_2O la N_2 și H_2O și a H^+ la H_2 .

Reducerea nitraților și a nitriților În procesul de reducere a nitriților și a nitraților, aceștia joacă rolul de acceptori finali de electroni. Totodată, ei au un rol important și în asimilație, în sensul că, în plante, bacterii și ciuperci, nitritul obținut din nitrat este redus la NH_4^+ cu o viteză aproximativ egală cu aceea cerută pentru sinteza compușilor azotați în timpul creșterii. Reacțiile sunt catalizate de *nitrit și nitrat reductaze* care sunt enzime solubile ce folosesc nucleotide piridinice reduse sau feredoxină redusă. Ionul de amoniu produs de bacteriile fermentative care utilizează nitrit ca oxidant sau acela produs prin descompunerea materialelor organice este utilizat de plante și bacterii pentru sintezele proprii de aminoacizi.

Biosinteze în familia acidului glutamic



a) Prolina

Acidul glutamic este fosforilat și redus în continuare la semialdehida sa. Aceasta ciclizează spontan la acidul D¹-pirolin-5-carboxilic, care se reduce la prolină. În collagen se găsește însă 4-hidroxiprolina, care nu poate fi sintetizată *ca atare*, ci provine dintr-o modificare posttranslațională a resturilor de prolină din proteina precursor, protocologenul. Enzima *prolin-hidroxilaza* este o oxidază cu funcții mixte care necesită Fe²⁺ și un agent reducător, cum ar fi acidul ascorbic. La reacție mai participă și acidul α-cetoglutaric care este decarboxilat oxidativ la acidul succinic, în proporție echimoleculară cu resturile de prolină.

b) Biosinteza argininei

Dacă însă gruparea amino a acidului glutamic este acetilată, reacția decurge cu formare de ornitină și nu de prolină. Ornitina este convertită în arginină prin același ciclu de reacții întâlnit la formarea ureei.

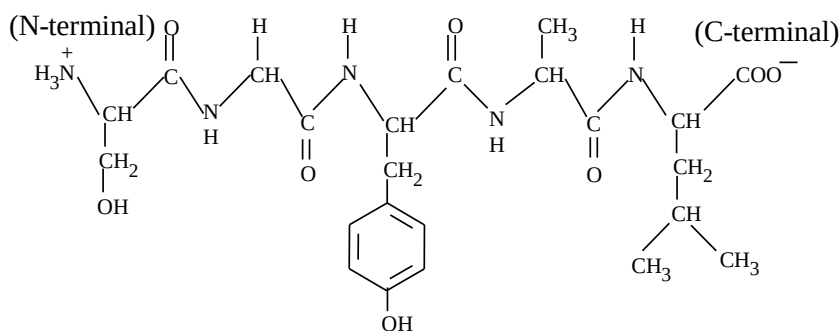
Curs nr. 12

Peptide și hormoni peptidici: rol metabolic

Peptidele sunt compuși rezultați din unirea mai multor molecule de aminoacizi prin legături peptidice (–NH–CO–) și pot fi obținute din proteine prin hidroliză parțială (chimică sau enzimatică).

Distingem *oligopeptide* (cu până la 10 aminoacizi în moleculă: dipeptide, tripeptide etc.), *polipeptide* (conțin între 10 și 50 aminoacizi), iar polipeptidele cu mai mult de 50 de resturi de aminoacizi în moleculă se numesc *proteine*.

Denumirea lor se face în ordinea în care se găsesc în moleculă, începând de la aminoacidul care conține grupa amino terminală. Sunt totodată uzuale unele denumiri specifice pentru peptidele cu număr mic de aminoacizi (carnozina, anserina, vasopresina etc.).



Seril-glicil-tirozil-alanil-leucina

Peptidele, în special cele cu masă moleculară mică, sunt solubile în apă, insolubile în alcool absolut și au caracter amfoter ca și aminoacizii constituenți.

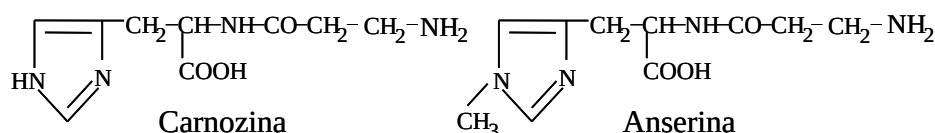
Grupele –NH₂ și –COOH fiind mai îndepărtate decât în aminoacizi se vor influența mai puțin, ceea ce determină o aciditate mai slabă a grupei –COOH, în timp ce grupa NH₂ devine mai bazică.

Grupele amino N–terminale prezintă toate reacțiile caracteristice grupelor NH₂ din aminoacizi, inclusiv reacția cu ninhidrină, care servește la detectarea și evaluarea cantitativă a peptidelor în metodele electroforetice și cromatografice. Totodată, grupa C–terminală poate fi esterificată sau redusă. Grupele R laterale din peptide dau aceleași reacții caracteristice ca și cele din aminoacizii liberi. O reacție specifică este reacția biuretelui care constă în formarea unui complex colorat violet, la tratarea peptidelor cu soluții alcaline de Cu²⁺. Aminoacizii liberi nu dau reacția biuretelui.

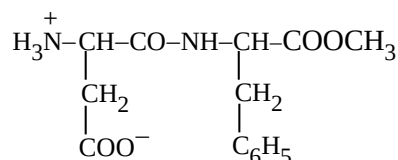
Dipeptide

Carnozina (β-alanil–histidina) este prezentă în mușchiul mamiferelor, iar *anserina* (β-alanil–N–metil–histidina) este prezentă în mușchiul păsărilor.

Carnozina are acțiune hipertensivă și, sub formă de carnozinofosfat, intervine în procesele de contracție musculară.

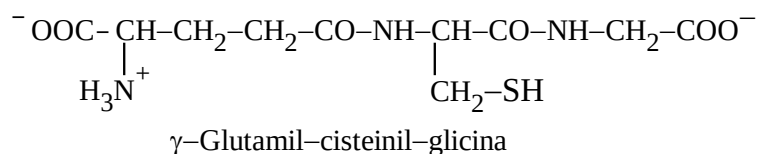


Aspartamul (NutraSweet) este un produs sintetic, esterul metilic al L-Aspartil-L-Phenilalanina, de 200 ori mai dulce decât zahărul pe care îl înlocuiește uneori.



Tripeptide

Glutationul (γ -glutamil-cisteinil-glicocol) este prezent în toate țesuturile vii. Se găsește în organism sub formă redusă (GSH) în care gruparea tiolică este liberă și sub formă oxidată (GSSG), formă de disulfură. Glutationul este socotit drept sistem oxidoreducător celular, participând la transferul de electroni. De asemenea, prin gruparea SH acesta leagă metalele grele toxice sau compuși organici don corp, cum ar fi dinitroclorbenzenul, compușii organoclorurați sau fluorurați, etc, pe care îl elimină sub formă de conjugati ai GSH.

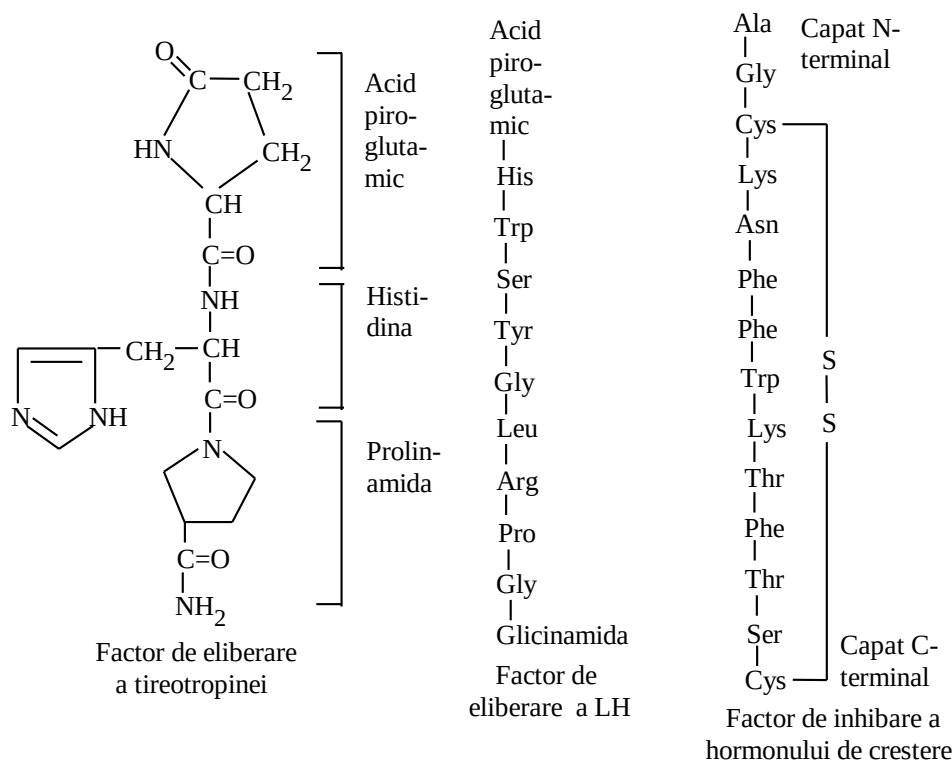


Cantitatea de glutation sanguin descrește cu vârsta, în special la nivel pupilar (cataractă senilă). În diabet, concentrația glutationului este, de asemenea, scăzută.

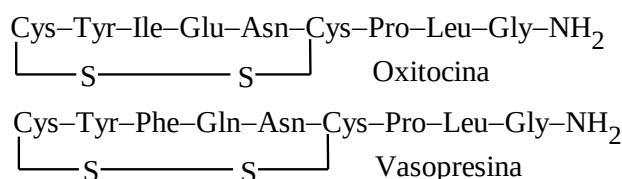
Unii hormoni hipofizari și pancreatici au o structură polipeptidică: oxitocina, vasopresina, insulina, glucagonul și hormonul adrenocorticotrop (ACTH).

Sinteza și eliberarea hormonilor este controlată în mod ierarhic, implicând trei etape succesive ale interacției hormon-celulă țintă.

1. *Hipotalamusul* (situat la baza creierului) primește mesaje nervoase specifice și secretă hormoni numiți *factors de eliberare* (releasing factors), care trec prin vasele de sânge până la glanda hipofiză anterioară.



Hipofiza este o glandă cu greutate de cca. 0,7 g, situată la baza creierului și care produce, în cele trei regiuni ale ei, un număr de hormoni de importanță vitală.

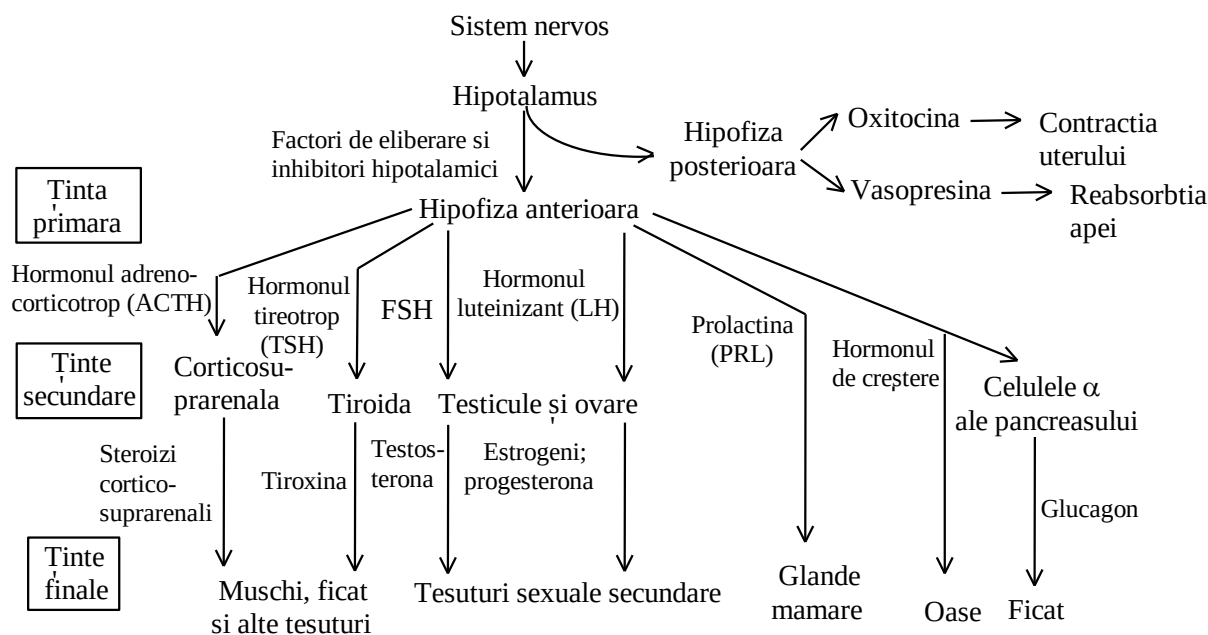


Lobul anterior al hipofizei eliberează *hormonul tireotrop*, care stimulează secreția glandei tiroide, *hormonul adrenocorticotrop* (ACTH), care stimulează secreția hormonilor produși de cortexul glandelor suprarenale, *hormonul luteotrop* sau *lactogen* (prolactina), care provoacă secreția laptelui în glanda mamară și *hormonul somatotrop* sau hormonul creșterii, care reglează dimensiunile corpului. De asemenea, în lobul anterior al hipofizei se produc cei 2 hormoni *gonadotropi* (hormonul care stimulează dezvoltarea foliculului în ovar și hormonul luteinizării, care reglează formarea carotinoizilor în ovar și producerea hormonilor sexuali masculini). Lobul posterior al hipofizei secretă *oxitocina*, cu rol în contracția uterului la naștere și *vasopresina*, hormonul *antidiuretic*, capabil să provoace creșterea presiunii arteriale.

2. *Hipofiza* este stimulată să secrete un hormon specific. Astfel, factorul de eliberare al tireotropinei (TRF) stimulează eliberarea hormonului tireotrop (TSH), iar factorul de eliberare al corticotropinei (CRF) produce eliberarea hormonului adrenocorticotrop (ACTH).

Hormonii hipofizari trec prin sistemul sanguin la glandele țintă specifice. Ținta ACTH-ului este cortexul suprarenal, iar cea a hormonului tireotrop este glanda tiroidă.

Hipotalamusul mai secretă și *factori inhibitori*, care inhibă eliberarea unor hormoni hipofizari.



FSH = Hormonul de stimulare a foliculilor

Organizarea ierarhica a reglării endocrine

Glandele țintă, mai ales gonadele sunt stimulate pentru a produce hormoni proprii, care acționează asupra unor ținte finale.

Hipotalamusul eliberează *oxitocină* și *vasopresină*, importanți pentru reglarea lactației, respectiv pt. echilibrul apei. Acești hormoni trec în hipofiza posterioară, se leagă de *neurofizine* (proteine mici), de unde sunt eliberați în sânge.

Secreția hormonilor tropi din hipofiza anterioară este reglată printr-o relație feed-back de către secrețiile caracteristice ale glandelor țintă. De pildă, o concentrație crescută în sânge a hormonilor glucocorticoizi secretați de corticosuprarenală induce inhibarea secreției ACTH-ului de către hipofiză.

Secreția unor hormoni este modulată de către concentrația metaboliților specifici în sânge; insulina este stimulată când crește concentrația de glucoză din sânge.

Unii factori hipotalamici (inhibitori + eliberatori) au fost izolați și identificați. Din câteva tone de țesut hipotalamic procurat de la abatoare s-a obținut 1 mg factor eliberator de hormon tireotrop (TRF).

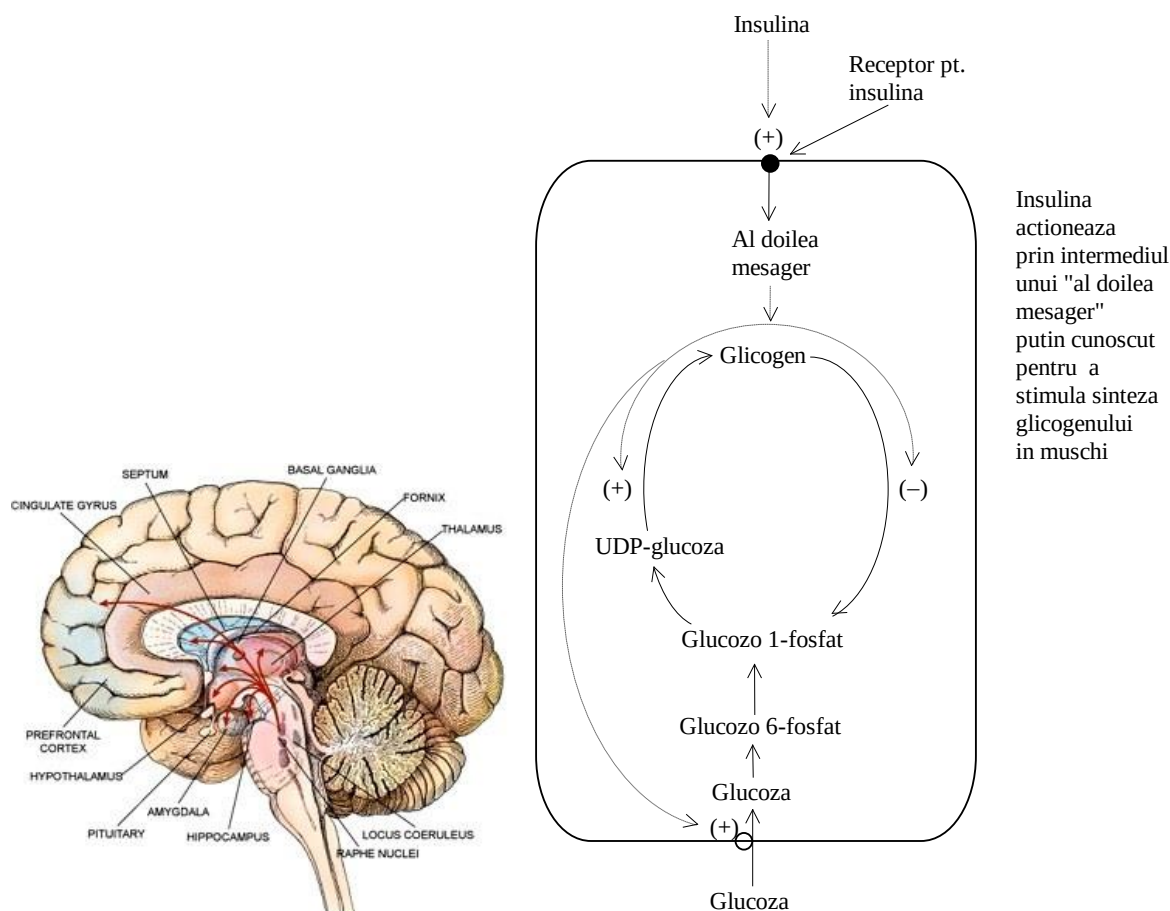
Hormonul adrenocorticotrop (ACTH), numit și *corticotropină*, a fost separat în două componente numite *corticotropine A* și *B*. Corticotropina A are greutate moleculară 4567 și este compusă dintr-o singură catenă polipeptidică de 39 resturi de aminoacizi, cu serină la marginea aminică și fenilalanină la marginea carboxilică. Corticotropina B provine din corticotropina A prin pierderea a 11 resturi de aminoacizi de la marginea carboxilică; ea posedă numai 28 aminoacizi în catena ei. ACTH se izolează din glandele de animale, iar oxitocina se obține sintetic pentru scopuri terapeutice.

Insulina

Este produsă de insulele Langerhans (celulele β) sub formă de preproinsulină prin translația ARNm pe ribozomi. Prefixul “pre” indică peptida semnal, iar “pro” înseamnă un precursor al insulinei conținând atât peptidele A și B, precum o peptida C, care va fi îndepărtată.

Sub influența acizilor, insulina suferă denaturare, dar bazele regenerează forma inițială, fiziologic activă. Agenții care desfac legăturile S–S denaturează ireversibil insulina. Insulina formează compuși cu metalele bivalente; din pancreas se izolează de obicei compusul cu ioni de zinc, frumos cristalizat. Insulina este digerată de pepsină și chimotripsină, dar slab atacată de tripsină.

Proteaze specifice din reticulul endoplasmatic sau aparatul Golgi sau din reticulul endoplasmatic sau aparatul Golgi din veziculele asociate scindează proinsulina la insulină și peptida C. Acestea sunt eliberate în curentul sanguin împreună cu o mică cantitate de proinsulină.



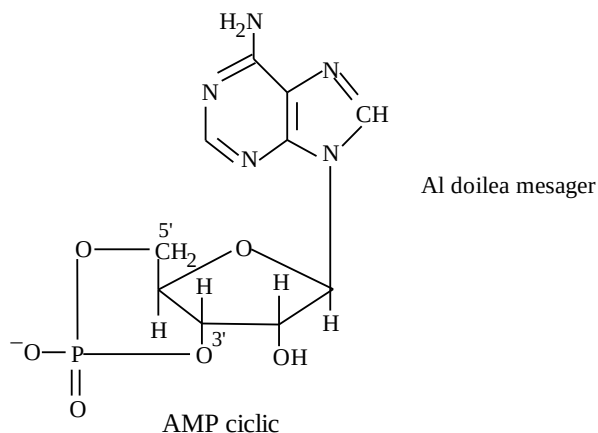
Probabil că importanța sintezei proinsulinei constă în formarea corectă a legăturilor disulfidice în proinsulină. Peptidele A și B din insulină se mențin unite prin legături disulfidice. Deși formarea legăturilor disulfidice în peptide poate fi spontană, structura terțiară corectă se formează plecând de la o structură primară dată, conform ipotezei termodinamice. Astfel, structura și funcțiile insulinei native se obțin numai dacă legăturile disulfidice se formează în proinsulină, nu în mod întâmplător cum ar fi dacă cele două peptide ar fi ansamblate separat. Proinsulina însă este scindată la insulina activă, matură.

După clivarea proinsulinei, resturile de arginină, Arg (31, 32, 65), și lizină, Lys (64), sunt îndepărtate cu formare de insulină și peptidă C.

Concentrația insulinei în sânge este de 1nM. După o masă bogată în glucide concentrația poate crește de 3-4 ori. Concentrația sa revine la normal după 1-2 ore după masă. Insulina se leagă de receptori specifici din membranele plasmatice producând un al doilea mesager intracelular. Insulina se leagă de o proteină receptoare cu $M \approx 300.000$, cu mare afinitate pentru insulină. Legarea este însoțită de efecte metabolice caracteristice asupra celulelor grase, în special creșterea sintezei triacilglicerolilor din glucoză și scăderea hidrolizei enzimatică a lipidelor. Insulina crește viteza de utilizare a glucozei și inhibă glicogenoliza din celule musculare și ficat. De asemenea, stimulează transportul glucozei prin membrană.

Insulina produce o scădere a AMP ciclic. Se pare că acționează asupra GMP ciclic, ce este în interdependență reciprocă cu AMP ciclic. Se pare că al doilea mesager este o peptidă.

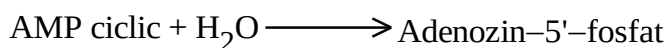
Insulina este în relație de interdependență cu alți patru hormoni: 1.glucagonul; 2.hormonul de creștere hipofizar; 3.hormonii glucocorticoizi; 4.adrenalina (epinefrina).



S-a găsit o enzimă *fosforilaz-kinaz-kinază*, numită simplu *protein-kinază* care are o formă inactivă și una activă. Forma sa activă catalizează fosforilarea fosforilaz-kinazei inactive de către ATP, dând forma fosforilată activă.

Protein-kinaza poate fosforila și alte proteine, cum sunt proteinele din membrane.

Concentrația AMP ciclic crește rapid și semnificativ în ficat după legarea adrenalinei, în timp ce, după îndepărtarea sau distrugerea sa, AMP ciclic din ficat scade brusc la valori foarte mici. Enzima răspunzătoare de distrugerea AMP ciclic este *fosfodiesteraza*, care catalizează reacția:



Aceasta este stimulată de Mg^{2+} și inhibată specific de cafeină și teofilină, alcaloizi prezenți în cafea și ceai. Adrenalina, ajungând la suprafața celulei hepatice în conc. de 10^{-8} – 10^{-10}M se leagă de receptorii specifici ai adrenalinei de pe suprafața exterioară a membranelor celulelor hepatice. Legarea lor produce o modificare conformațională locală în membrană, care are ca urmare activarea *adenilat-ciclazei*, localizată pe suprafața internă a membranei celulare.

Forma activă a adenilat ciclazei transformă ATP în AMP ciclic, cu o concentrație maximă de 10^{-6}M în celulă.

AMP ciclic astfel format se leagă de subunitatea reglatoare a protein kinazei, eliberând subunitatea catalitică în forma ei activă. Aceasta catalizează fosforilarea formei inactive a fosforilaz -kinazei pe seama consumului de ATP, cu formarea fosforilaz kinazei active.

Această enzimă catalizează fosforilarea fosforilazei *b* inactive pe seama ATP, cu formarea fosforilazei *a* active, care, la rândul ei, catalizează scindarea glicogenului până la glucozo-1-fosfat; această se transformă în glucozo-6-fosfat și apoi în glucoza liberă din sânge.

Fiecare etapă este catalitică ceea ce conduce la o amplificare semnificativă a semnalului inițial și anume legarea unui număr relativ mic de molecule de adrenalină pe suprafața celulelor hepatice. Activitatea maximă se atinge în câteva secunde.

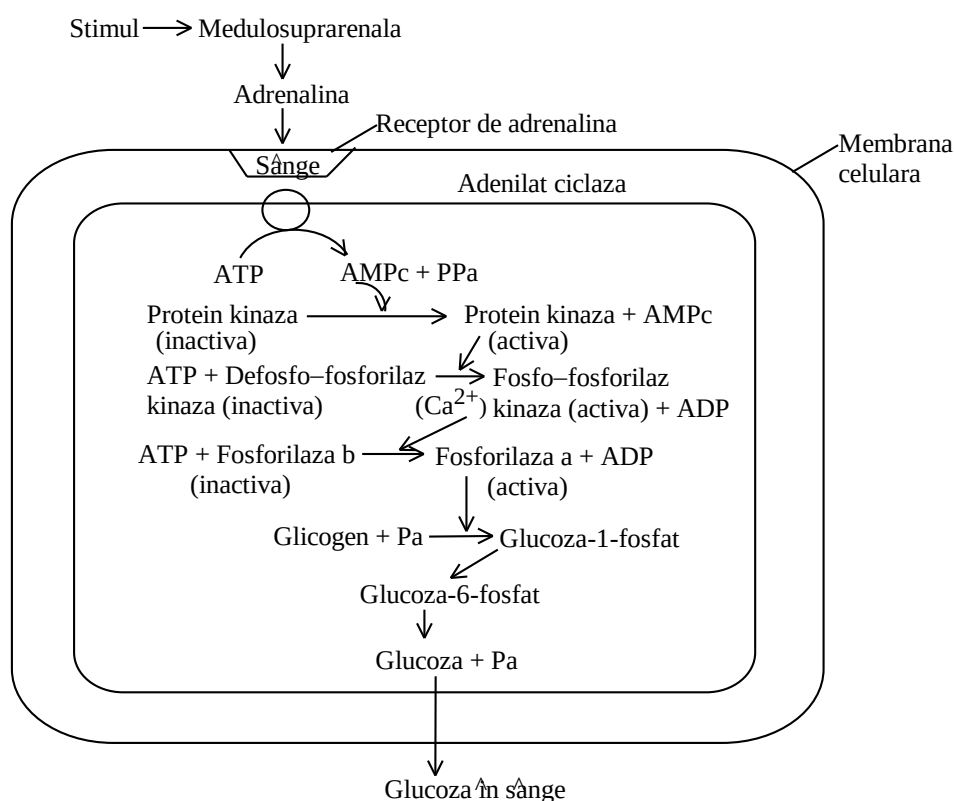
Adrenalina stimulează scindarea glicogenului. Totodată inhibă sinteza acestuia în ficat, deoarece formarea de AMP ciclic stimulează fosforilarea de către protein kinază a *glicogen sintetazei*, când se produce forma sa inactivă.

Șase resturi de serină din molecula glicogen sintetazei sunt fosforilate pe seama ATP.

Oprirea secreției adrenalinei conduce la sistarea sintezei de AMP ciclic, iar cel rămas este distrus de fosfodiesterază. Subunitățile protein kinazei se reasociază într-un complex fără activitate catalitică. Forma fosforilată a fosforilaz kinazei suferă o defosforilare, ca și fosforilaza *a* însăși, prin acțiunea fosforilaz-fosfatazei. În acest fel, sistemul glicogenolitic este readus la starea normală de repaos.

Adrenalina influențează, de asemenea, scindarea glicogenului în mușchiul scheletic cu formarea acidului lactic, prin stimularea fosforilazei pe calea AMP ciclic.

Adrenalina stimulează și o lipază din celulele adipoase, care scindează triacilglicerolii la acizi grași legați de albumina serică.



Cascada de amplificare în stimularea glicogenolizei de către adrenalina în celula hepatică, cu formarea glucozei sanguine.

Glucagonul

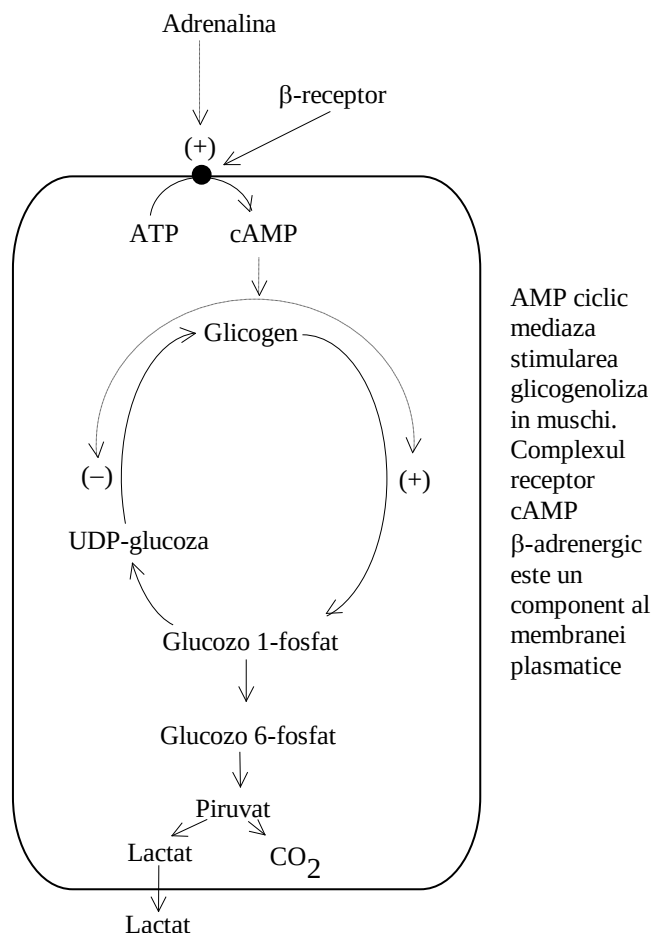
Numit și *hormonul hiperglicemic-glicogenolitic*, produce creșterea concentrației de AMP ciclic. Glucagonul este un polipeptid cu 29 resturi de aminoacizi. Acesta este sintetizat ca precursor inactiv cu o masă moleculară mai mare, *proglucagon*, care conține aminoacizi suplimentari la capătul C-terminal al glucagonului.

Este un hormon polipeptidic al pancreasului, secretat de celulele α ale insulelor Langerhans de câte ori scade concentrația glucozei sanguine.

Glucagonul secretat stimulează scindarea glicogenului hepatic restabilind valoarea normală a glucozei în sânge. Contracarează astfel acțiunea insulinei, care este secretată numai atunci când valoarea glucozei sanguine este crescută.

Glucagonul acționează preponderent la nivelul ficatului fără a afecta scindarea glicogenului muscular, în timp ce adrenalina stimulează scindarea glicogenului în ambele țesuturi.

Ca și adrenalina, glucagonul își exercită acțiunea prin legarea sa de receptori specifici de pe membrana celulelor hepatice, stimulând *adenilat-ciclaza*. Creșterea în consecință a AMP ciclic produce creșterea concentrației fosforilazei *a* în ficat, prin aceeași secvență de reacții de amplificare ca și în cazul adrenalinei.



Curs nr. 13

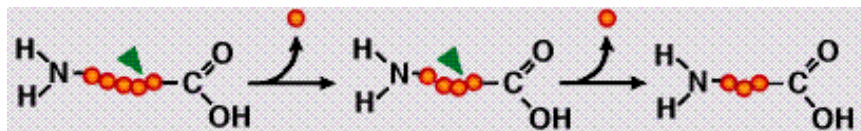
Biosinteza proteinelor la nivelul ribozomilor

Digestia și absorbția proteinelor alimentare începe în stomac și este realizată de către proteinaze, localizate în tractul gastro-intestinal. Aici, pepsina din stomac rezultată din pepsinogen, la pH 1,5 – 2,5, scindează proteinele alimentare cu formare de proteoze și peptone, cu mase moleculare mai mici, solubile în apă. Alături de pepsină, o altă enzimă proteolitică, gastricsina a fost evidențiată în suc gastric la om, porc și câine (pH optim este 3.2)

Produsul semilichid rezultat trece în duoden unde, datorită acidității sale, determină secreția de către *mucoasa duodenală* a unui hormon, *secretina*. Concomitent, sub influența proteozelor și aminoacizilor liberi, este secretat un alt hormon, *pancreozimina*. Acești hormoni stimulează de asemenea secreția pancreasului: secretina determină eliberarea apei și sărurilor minerale, iar pancreozimina secreția enzimelor pancreatice.

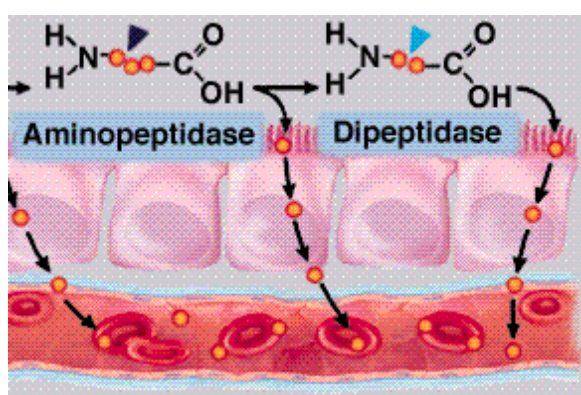
Sucul pancreatic conține *zimogenproenzime*. Sub acțiunea *enterokinazei* sau a *tripsinei* trec în formă activă: *tripsina* și *chimotripsina* (endopeptidaze) degradează hidrolitic (la pH 6,0 – 6,5) proteozele și peptonele cu formare de peptide, alcătuite din 6 – 9 aminoacizi, dipeptide, și într-o măsură mai mică, din aminoacizi liberi. Carboxipeptidazele (A și B) sunt metaloenzyme (conțin ioni de Zn^{2+}) hidrolizează

legătura peptidică dintr-o moleculă de peptidă care se găsește în vecinătatea unei grupe carboxil libere, dând naștere la aminoacizi liberi.



Carboxipeptidaza (σ) hidrolizează legătura peptidică de la capătul carboxil al oligopeptidelor

După acțiunea sucului pancreatic în duoden, degradarea produșilor de hidroliză este continuată în intestinul subțire (pH 8,0) sub acțiunea enzimelor pe care le conține sucul intestinal (aminopeptidaze și dipeptidaze-exopeptidaze). Transportul aminoacizilor în celulele mucoasei intestinale este un proces activ, diferit ca mecanism pentru diverse grupe de aminoacizi. După absorbție, aminoacizii sunt transportați de curentul sanguin către țesuturi. În primele ore după digestie concentrația aminoacizilor în sânge, ficat, intestin și rinichi. La nivel tisular, aminoacizii sunt degradați în continuare sau sunt utilizați pentru sinteza noilor proteine.



Aminopeptidazele și dipeptidazele hidrolizează legătura peptidică de la capătul amino al oligopeptidelor respectiv dipeptidelor.

Biosinteza proteinelor

Sinteza proteinelor necesită o sursă de energie metabolică (ATP, GTP) iar aminoacizi sunt precursorii intermediari ai proteinelor.

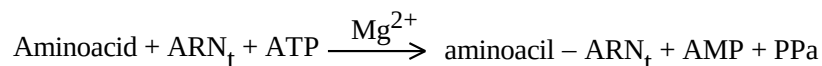
Proteinele sunt mai întâi sintetizate în microzomi, după care sunt transferate către alte componente celulare. Nu este necesară întreaga celulă atunci când se studiază biosinteza proteinelor *in vitro*, ci numai fragmente de microzomi.

Sinteza lanțului polipeptidic are loc în patru etape principale:

1. **Activarea** în citoplasma solubilă unde aminoacizii sunt esterificați cu ARN_t corespunzător, pe seama energiei furnizate de molecula de ATP.
2. **Inițierea.** ARN mesager, purtător al informației genetice specificând secvența de aminoacizi și aminoacil- ARN_t de inițiere sunt legați de subunitatea mică a ribozomului, proces care necesită prezența a trei proteine specifice numite *factori de inițiere*, cât și GTP și Mg^{2+} . Subunitatea mare a ribozomului se leagă apoi de acest complex pentru a forma ribozomul funcțional, pregătit pentru următoarea etapă.
3. **Elongarea** sau **alungirea** presupune adăugarea secvențială de noi resturi de aminoacil transferați enzimatic de pe esterii aminoacil- ARN_t , fiecare dintre ei fiind legați de ribozom ca răspuns la un codon specific sau triplet de baze din molecula ARN_m .
4. **Terminarea.** Lanțul polipeptidic este complet când se ating semnalele codon de întrerupere a lanțului de pe ARN_m .
5. **Prelucrarea post-translațională.** Proteinele devin biologic active numai după ce adoptă o structură tridimensională corespunzătoare.

La 37 °C, un singur ribozom poate sintetiza un întreg lanț α de hemoglobină (146 resturi de aminoacid) în aproximativ 3 minute, adică în mai puțin de o secundă pentru un rest de aminoacid încorporat. În *E. coli* și în alte bacterii, crescând în condiții optime, un ribozom funcțional poate însera în lanț aproximativ 20 aminoacizi pe secundă.

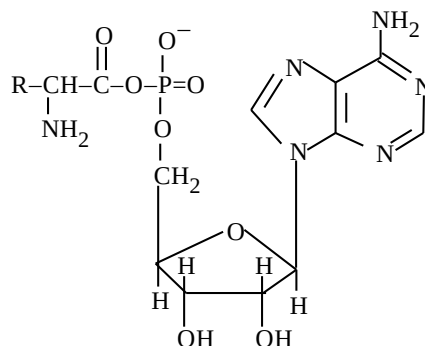
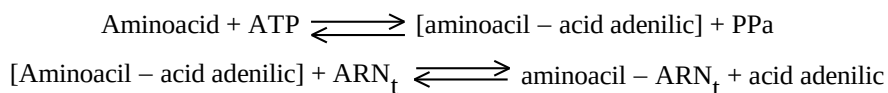
Reacția de activare: Cei douăzeci de aminoacizi din citosol sunt esterificați cu ARN_t sub acțiunea aminoacil- ARN_t sintetazelor, fiecare dintre ele fiind înalt specifică pentru un anumit aminoacid și pentru ARN_t -ul său corespunzător. Celor 20 de aminoacizi le corespund 32 de codoni, respectiv 32 de aminoacil- ARN_t ase.



Enzimele de activare, obținute în stare purificată, cristalizate, au $M = 100.000 - 240.000$. Unele au numai un singur lanț polipeptidic cu $M = 100.000$ (leucina), altele 2 sau mai multe unități diferite sau identice. Glicil- ARN_t sintetaza are două subunități cu $M = 35.000$ și alte două cu $M = 80.000$.

Transferul unui aminoacid pe ARN_t respectiv se realizează în două etape distincte. În prima etapă, ATP reacționează cu aminoacidul formându-se un intermediar legat de enzimă, *aminoacil-adenilat*. La acest intermediar, grupa COOH a aminoacidului este legată, printr-o legătură macroergică de grupa 5'-fosfat din AMP.

În a doua etapă, grupa acil este transferată de pe AMP la capătul 3' al ARN_t corespunzător aminoacidului, urmată de eliberarea produșilor, un aminoacil- ARN_t și acidul adenilic:

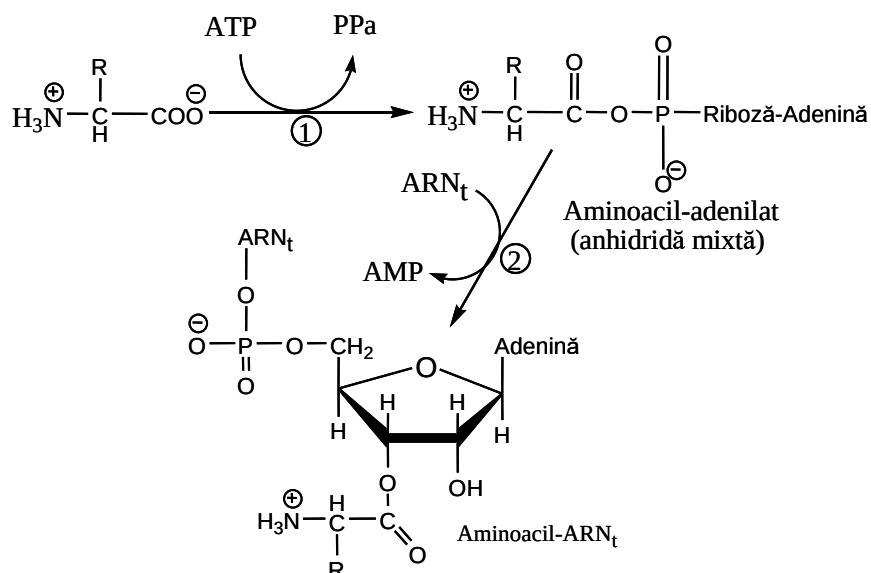


Aminoacil-adenilat (aminoacil-acid adenilic)

Aminoacil - ARN_t sintetazele sunt înalt specifice atât față de aminoacid, cât și față de ARN_t corespunzător. Ele au o mare capacitate de a deosebi diferiți aminoacizi naturali între ei, încât șansa unei erori este de 1/10.000.

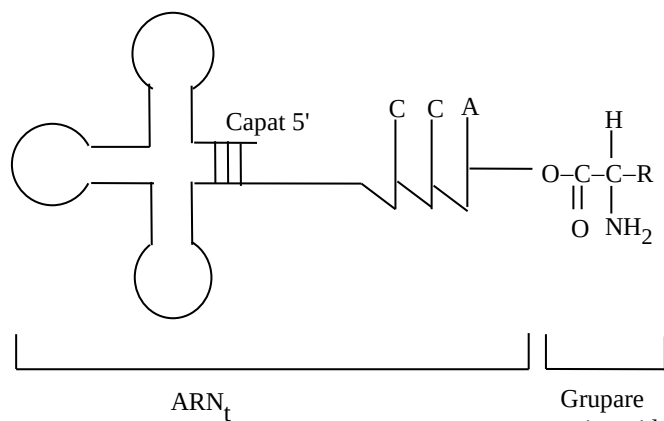
Există două clase de aminoacil - ARN_t sintetaze: prima clasă catalizează esterificarea grupei 2'-OH după care are loc o reacție de transesterificare la 3'-OH; cea de-a doua clasă catalizează esterificarea directă a grupei 3'-OH.

Moleculele de ARN_t posedă 73-93 de resturi nucleotidice și $M \sim 25.000$ și o structură secundară specifică (un trifoi cu patru foi). Unii ARN_t , cu catene mai lungi, pot forma și al cincilea braț, mai scurt. Structura cuaternară a ARN_t -ului are forma literei "L" răsucite.



Toate moleculele de ARN_t au aceeași secvență terminală Pu-C-C-A la capătul 3' al brațului pentru aminoacid. În capătul opus se află *anticodonul*, care este complementar codonului corespunzător din molecula de ARN_m.

Tripletul anticodon al aminoacil-ARN_t are o secvență de baze care permite formarea de legături de hidrogen specifice cu bazele codonului corespunzător de pe ARN_m. Astfel, aminoacidul necesar este selectat și corect poziționat pentru a fi transferat pe lanțul polipeptidic în creștere.



Structura secundară a aminoacil-ARN_t

Molecula de ARN_t mai conține *locul de recunoaștere al enzimei*, prin care ARN_t se leagă de enzima de activare corespunzătoare, și *locul de atașare de ribozom*.

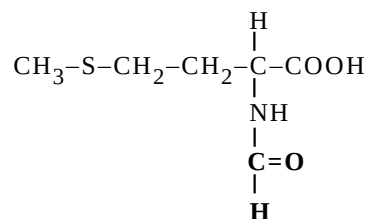
În molecula de ARN_t sunt prezente unele baze rare, pe lângă bazele normale A, U, G și C. Ele sunt în general derivați metilați ai bazelor normale. Acestea au următoarele funcții:

- să împiedice formarea de legături, în anumite puncte, între bazele aceleiași molecule de ARN_t în așa fel încât să rezulte structura caracteristică brațului;
- să nu permită formarea de legături între bazele perechi rămase din ARN_t și ARN_m;
- să reducă susceptibilitatea ARN_t la atacul hidrolitic al nucleazelor.

Pentru fiecare aminoacid există mai mult de un ARN_t specific. La sinteza proteică mitocondrială și la cea citoplasmatică se utilizează tipuri diferite de ARN_t. Sintetazele corespunzătoare sunt și ele specifice pentru ARN_t mitocondrial sau citoplasmatic.

Inițierea lanțului polipeptidic: Sinteza tuturor proteinelor începe cu aminoacidul metionină, codificat de codonul de inițiere AUG. Metionina de inițiere nu intră ca metionil-ARN_t, ci ca N-formilmetionil-ARN_t.

(fMet-ARN_t). Metioninele din interiorul lanțului peptidic nu sunt formilate, ci se leagă sub forma metionil-ARN_t ului.



Formilarea se realizează cu N¹⁰-formiltetrahidrofolat la gruparea α-amino a metionil-ARN_t. Enzima care catalizează această reacție nu formilează metionina liberă.



În timpul sintezei proteice are loc o continuă disociere a ribozomilor 70S (datorată grupelor fosfat încarcate negativ) în subunitățile 50S și 30S și o continuă reasociere a subunităților pentru a forma din nou ribozomii intacti. ARN_m și aminoacil-ARN_t de inițiere nu se pot lega direct de ribozomul 70S, ci sunt mai întâi legați de subunitatea 30S care se combină apoi cu subunitatea 50S.

La acest proces participă trei proteine specifice, numite factori de inițiere. Sunt proteine solubile, cu M = 9.000; 65.000 și, respectiv, 21.000. Acești factori se atașează și se desprind continuu de pe ribozom.

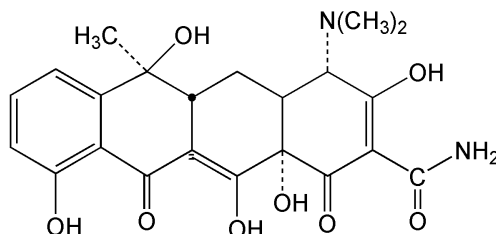
Subunitatea 30S formează un complex cu unul din factori, care se leagă apoi de ARN_m. La acest complex se adaugă alt factor. După aceasta, fMet-ARN_t și GPT se leagă cea de-a treia proteină, iar complexul rezultat se combină cu complexul format de subunitatea 30S, cu ARN_m și ceilalți factori. Rezultă astfel *complexul de inițiere*.

Complexul de inițiere se combină cu subunitatea 50S pentru a forma ribozomul 70S funcțional.

Ciclul de elongație: Acest proces decurge în trei etape:

1. *Legarea noului aminoacil-ARN_t*. Acesta este așezat pe situsul aminoacil (A) al complexului ribozomal 70S și se leagă de un *factor de elongație T*. FE-T se combină cu GTP pentru a forma un complex. Acesta se leagă apoi de aminoacil-ARN_t pentru a forma complexul ternar FE-T-GTP-aminoacil-ARN_t. Acest complex se leagă de ribozom astfel încât aminoacil-ARN_t să fie așezat pe situsul A, cu anticodonul său legat prin legături de hidrogen de codonul corespunzător din ARN_m. Concomitent GTP este hidrolizat la GDP și H₃PO₄. GDP părăsește ribozomul sub formă de complex FE-T-GDP. Energia eliberată la hidroliza GTP servește la poziționarea corectă a aminoacil-ARN_t pe situsul A.

Legarea aminoacil-ARN_t de situsul A poate fi blocată de unele antibiotice, în special de tetracicline.



2. Formarea legăturii peptidice

Prima legătură peptidică se formează printr-un atac nucleofil al grupei NH₂ a aminoacil-ARN_t asupra carbonului carboxilic esterificat al fMet-ARN_t. Rezultă un dipeptidil-ARN_t legat de situsul A. Situsul E este acela de pe care ARN_t așele părăsesc ribozomul în timpul elongației.

Un proces identic are loc la fiecare ciclu de elongație. Gruparea NH₂ liberă a noului aminoacil-ARN_t legat de situsul A deplasează ARN_t din peptidil-ARN_t pentru a forma o nouă legătură peptidică.

3. *Translocarea* are loc după formarea legăturii peptidice.

Ribozomul se deplasează la următorul codon de pe ARN_m și mută, în același timp, peptidil- ARN_t de pe situsul A pe situsul P. Pentru aceasta sunt necesare o proteină specifică, numită *factor de elongație G* (FE-G), cât și GTP.

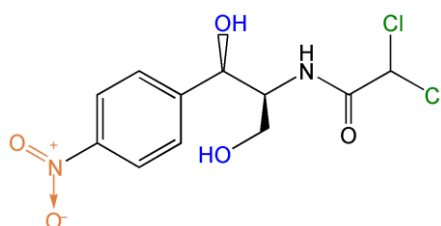
La început GTP se leagă de FE-G și complexul rezultat se leagă de ribozom. GTP este apoi hidrolizat la GDP și H_3PO_4 . Această hidroliză pune la dispoziție energia necesară pentru realizarea unei modificări conformaționale care deplasează ribozomul la următorul codon de pe ARN_m și trece peptidil- ARN_t de pe situsul A pe situsul P.

Situsul A devine liber, cu un nou codon în poziție, pregătit să primească un nou aminoacil- ARN_t , declanșându-se astfel un nou ciclu de elongație. După translocare, FE-G se disociază de pe ribozom. Pare ca și cum ARN_m ar aluneca printr-un șanț, deoarece o parte apreciabilă a lanțului de ARN_m nu este atacată de ribonuclează.

Terminarea sintezei lanțului polipeptidic este semnalată de unul din cei trei codoni de stop de pe ARN_m (UAA, UAG, UGA). Desprinderea polipeptidil- ARN_t de pe ribozom este inițiată de trei proteine specifice, numite factori de desprindere. Aceștia se leagă de ribozom pentru a permite trecerea polipeptidil- ARN_t de pe situsul A pe situsul P.

Legătura esterică dintre lanțul polipeptidic și ultimul ARN_t este apoi hidrolizată, prin acțiunea unei *peptidiltransferaze*. Odată ce polipeptidul este desprins, sunt eliberați și ultimul ARN_t și ARN_m . Ribozomul liber 70S se disociază în subunitățile sale 50S și 30S, proces care necesită prezența unuia dintre factorii specifici de inițiere și sinteza unui nou lanț polipeptidic poate începe.

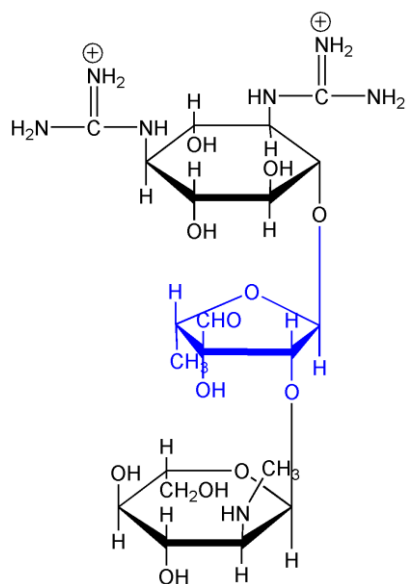
Inhibitori ai sintezei proteice



Cloramfenicolul

Cloramfenicolul inhibă sinteza proteică pe ribozomul 70S al celulelor procariote (și al mitocondriilor celulelor eucariote) prin blocarea transferului de peptidil- ARN_t , dar nu inhibă sinteza proteică pe ribozomul 80S al celulelor eucariote. Cloramfenicolul a fost utilizat în tratamentul unor infecții în

patologia umană, însă este relativ toxic, deoarece este posibil ca el să inhibe și sinteza proteică în ribozomii mitocondriali.



Streptomicina și antibioticele înrudite (neomicina, canamicina) se leagă de subunitatea mică a ribozomilor celulelor procariote. Ele inhibă sinteza proteică și produc citirea greșită a codului genetic, probabil prin modificarea conformației ribozomului astfel încât aminoacil- ARN -urile de transfer sunt mai puțin strâns legate de ARN_m .

Un alt inhibitor al sintezei proteice este puromicina, a cărei structură este similară cu cea a tirozinil- ARN_t ului. În locul legăturii esterice normale între gruparea 3'-OH a ribozei și gruparea carboxyl a aminoacidului, puromicina posedă o legătură amidică între componentul său glucidic și gruparea carboxil a 4-metoxifenilalaninei. Puromicina se leagă de situsul A în timpul sintezei

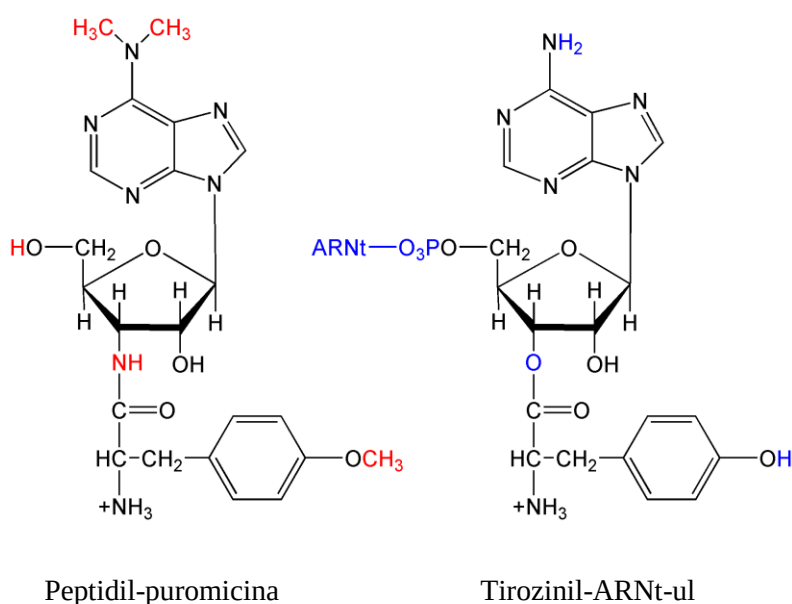
peptidice cu formarea ulterioara a unui derivat covalent
Streptomicina peptidil-puomicină. Complexul format se desprinde de ribozom

deoarece nu are structura exacta care să permită translocarea și este mutat pe situsul P.

Toxina (M = 58 KDa), o proteină produsă de *Corynebacterium difteria* catalizează ribozilarea ADP-ului unei distamine (o histidina modificată) din factorul de elongatie 2 al eucariotelor pe care il inactiveaza.

Ricina (M = 30 KDa) este o proteină toxică aflată în semințele de ricin, o plantă consumată însă de castori. Aceasta inactivează componenta 60S (mai precis subunitatea acesteia 23S) a ribozomilor eucariotelor prin depurinarea unui rest de adenina din ARN ribozomal.

Prelucrarea post-translațională: Înainte și după formarea structurii cuaternare, polipeptida poate suferi modificări enzimatice incluzând îndepărtarea unuia sau mai multor aminoacizi, adăugarea grupelor acil, fosforil, metil carboxil sau a altor grupări; clivarea proteolitică; sau atașarea unor zaharuri sau a altor grupe prostetice.



Grupele N-formil ale resturilor de metionină (fMet) nu apar în proteina finită a procariotelor; ea este îndepărtată prin acțiunea unei deformilaze, *metionin-amino-peptidază*. Unele proteine sunt acetilate la grupa α -amino-terminală. Aceste acilări decurg în special în citoplasma celulei.

Compartmentul din celula	Modificari
<i>citoplasma</i>	Indepartarea Met (AA1) Acetilarea sau mistoilarea α -NH ₂ Glicozilarea cu GlcNAc
<i>Mitocondrii si cloroplaste</i>	Clivarea semnalului peptidic pentru import (--R---R---K---R-----R-)
<i>Reticulul endoplasmatic</i>	Semnal de retinere (XDEL) Glicozilarea rezidurilor Asn Hidroxilarea Pro si Lis din procologen Formarea punctelor disulfidice
<i>Aparatul Golgi</i>	Modificarea grupelor N-glicozil
<i>Vesicule si granule</i>	Amidarea gruparii α -COOH SKL (import in peroxizomi)

Legăturile disulfurice încrucișate dintre lanțuri se formează pe cale enzimatică după ce lanțul polipeptidic a fost deja construit.

Necesarul energetic al sintezei proteice: Un număr total de 4 grupe fosfat macroergice sunt necesare pentru sinteza fiecărei legături peptidice din lanțul polipeptidic complet. Astfel, 2 legături fosfat macroergice sunt utilizate pentru formarea fiecărei molecule de aminoacid-ARN_t în timpul reacției de activare a aminoacidului. O moleculă de GTP este scindată în GDP și P_i în timpul legării fiecărui aminoacid-ARN_t de situsul A de pe ribozom, iar o altă moleculă de GTP este hidrolizată în timpul translocării ribozomului de-a lungul ARN_m.

Sunt astfel investite $7,3 \cdot 4 = 29,2$ kcal pentru a se obține o legătură peptidică a cărei energie liberă este de aproximativ $-5,0$ kcal. Deci, ΔG° a sintezei legăturii peptidice este de $-24,2$ kcal, făcând astfel sinteza acestei legături un proces exergonic și ireversibil.

Sinteza proteică, la cele mai multe organisme, consumă mai multă energie decât oricare alt proces biosintetic; în celulele de *E. coli*, până la 90% din energia celulară este utilizată pentru sinteza proteică.

Curs nr. 14

Elemente de bioenergetică: producerea energiei metabolice și înmagazinarea sub formă de acid adenozintrifosforic

Oamenii și animalele își procură combustibilul necesar activităților fiziologice în primul rând din zaharuri, grăsimi și proteine din dietă. Alimentele sunt digerate și absorbite. Produsele digestiei circulă prin sânge, intră în diferite țesuturi și sunt preluate de celule unde sunt oxidate pentru a produce energie. Transformarea completă în bioxid de carbon (CO₂) și apă (H₂O), necesită oxigen. Dacă combustibilii alimentari sunt în exces, atunci o parte dintre aceștia se transformă în **triacilglicerol** în țesutul adipos (grăsimi, trigliceride!), în **glicogen** ce se depozitează în mușchi, ficat sau în alte celule și într-o oarecare măsură în proteine musculare. În cazul postului alimentar, între mese sau peste noapte când dormim, combustibilul din aceste depozite este oxidat pentru a elibera energie.

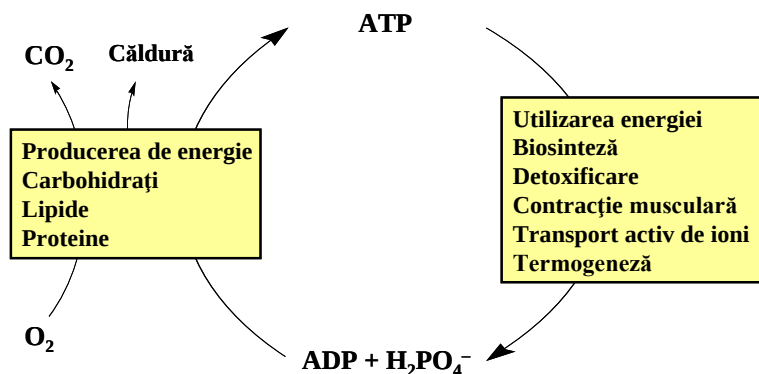


Fig. 1. Ciclul ATP-ADP.

Este nevoie de o cantitate mare de energie pentru realizarea **funcțiilor de bază** ale corpului și pentru **activitățile fizice**. Dacă nu se consumă cantități suficiente de alimente, atunci se face apel la rezervele de combustibil ale corpului (grăsimi, glicogen) și are loc scăderea în greutate. Dimpotrivă, un consum mai mare de alimente decât este necesar va conduce la acumulare de combustibil și la îngrășare. Dieta trebuie să ofere precursori pentru biosinteza compușilor necesari structurilor și funcțiilor celulare și tisulare, dar și supraviețuirii. Printre astfel de precursori se numără **acizii grași esențiali** și **aminoacizii esențiali** (ce nu pot fi sintetizați în corp). Dieta trebuie totodată suplimentată cu **vitamine**, **minerale**, **micro** și **macroelemente**, precum și **apă**. Componentii dietei se mai numesc nutrienți. Din alimente și din

aer provin și compuși xenobiotici, ce nu au valoare alimentară, sunt nefolositori sau chiar toxici. Acești compuși sunt excretați prin urină sau fecale împreună cu produșii de degradare metabolică.

Oxidarea combustibililor celulari la CO_2 și H_2O în celule conduce la eliberarea de energie prin transferul electronilor de la moleculele în formă redusă la moleculele de O_2 . Energia provenită din procesele de oxidare generează căldură și adenzin-trifosfat (ATP) (Fig 1). Dioxidul de carbon circulă prin sânge de la celulele corpului la plămâni, fiind apoi expirat, iar apa este excretată în urină, transpirație și în alte secreții.

Deși căldura generată de oxidarea combustibililor celulari este folosită mai ales pentru menținerea temperaturii corpului, scopul principal al acestei oxidări este producerea de ATP. ATP-ul produs astfel reprezintă energia necesară proceselor din celulă care consumă energie, în scopul realizării reacțiilor de biosinteză, contracție musculară și transport activ prin membrane. Prin folosirea ATP-ului ca sursă de energie, acesta este convertit înapoi la adenzin-difosfat (ADP) și fosfat anorganic (H_2PO_4^- sau P_i). Producerea și utilizarea ATP-ului reprezintă ciclul ATP-ADP.

Oxidarea combustibilului celular pentru a genera ATP se numește respirație (Fig. 2). Înainte de a fi oxidați, carbohidrații sunt convertiți în principal în glucoză, grăsimea în acizi grași, iar proteinele în aminoacizi. Căile de reacție de oxidare a glucozei, a acizilor grași și aminoacizilor au multe elemente în comun. Aceștia se oxidează mai întâi la acetil-CoA, un precursor al ciclului acidului tricarboxilic (TCA). Ciclul TCA sau ciclul Krebs reprezintă o serie de reacții ce realizează oxidarea completă a combustibililor la CO_2 . Electronii sunt luați de la combustibili în timpul reacțiilor de oxidare și transferați oxigenului (O_2) prin intermediul unor proteine din așa-numitul lanț transportor de electroni. Energia acestui transfer de electroni este folosită pentru a converti ADP și P_i (fosfat anorganic) la ATP (substanță macroergică) printr-un proces cunoscut sub denumirea de fosforilare oxidativă.

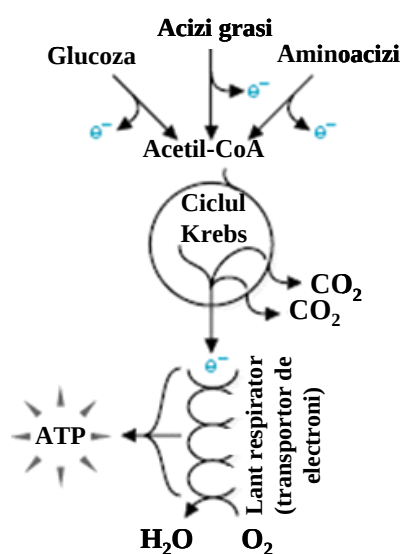


Fig. 2. Producerea de ATP din combustibilii celulari în procesul respirator.

Glicoliza anaerobă. Nu tot ATP-ul este obținut prin oxidarea combustibilului celular. Astfel,

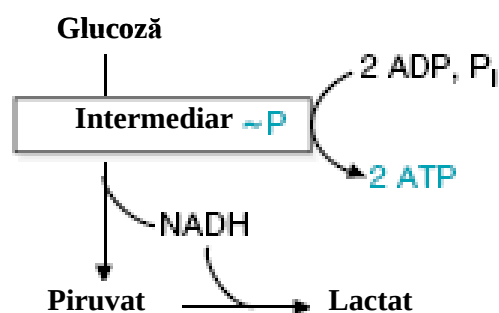


Fig. 3. Glicoliza anaerobă. Nu necesită oxigen deoarece NADH este reoxidată prin reducerea piruvatului la lactat. Gruparea fosfat este direct transferată de la intermediarul cu înaltă energie la ADP.

în glicoliza anaerobă glucoza este degradată în reacții ce formează intermediari fosforilați cu înaltă energie (Fig. 3). Aceștia furnizează energia necesară transformării ADP în ATP, fără a implica transferul electronilor la molecula de oxigen molecular (O_2). Glicoliza anaerobă este sursa limită de ATP pentru celulele care dispun de concentrații reduse de oxigen, fie pentru că acestea folosesc în mod normal această cale (de pildă anumite celule din rinichi), fie datorită scăderii temporare a aportului de oxigen (boli artero-coronariene).

Fosforilarea oxidativă, la nivelul mitocondriei. Energia provenită din oxidarea combustibilului celular este convertită în legături fosfat bogate în energie aflate în acidul adenzin trifosforic (ATP) printr-un proces de **fosforilare oxidativă** ce se petrece la nivelul lanțului transportor de electroni. Cea mai mare parte din energia provenită prin oxidarea acetil-coenzimei A în ciclul TCA și în alte căi de reacție este conservat sub formă de coenzime acceptoare de electroni, $\text{NADH} + \text{H}^+$ și FADH_2 . **Lanțul transportor de electroni** oxidează NADH și FADH_2 , pentru a da electronii moleculei de O_2 , care este redusă la H_2O (Fig. 4). Energia din reducerea O_2 este utilizată pentru fosforilarea adenzin-difosfatului (ADP) la ATP cu ajutorul **ATP sintetazei** ($\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$). Prin fosforilare oxidativă se produc aproximativ 2.5 moli de ATP per mol de NADH oxidat sau 1.5 moli de ATP pe mol de FADH_2 oxidat. Alți cercetători au calculat 3 moli de ATP pentru un mol de NADH și 2 moli de ATP pentru unul de FADH_2 , pentru că au ținut cont de eventualele pierderi de ATP din timpul proceselor bioenergetice.

Ipoteza chemiosmotică a sintezei de ATP. Prin ipoteza **chemiosmotică** elaborată de **Peter Mitchell** după 1961, s-a explicat teoretic cum are loc transformarea energiei din transportul de electroni la O_2 în legături fosfat macroergice din moleculele de ATP (Fig. 4). Această ipoteză a fost amplu combătută de van Slater și de Eugen Macovschi și nu a fost pe deplin demonstrată nici până acum. Totuși, faptul că Racker a demonstrat apariția unui flux de protoni a determinat Academia Suedeză să-i acorde Premiul Nobel lui Peter Mitchell în 1978. De atunci controversele au încetat practic, această ipoteză fiind luată ca axiomă. Este de recunoscut că în procesul de transfer al energiei de la alimente, prin intermediul NADH și FADH_2 la molecula de ATP pot apare protoni care sunt puși în evidență în exteriorul mitocondriilor, însă acesta poate fi considerat un proces secundar. Astfel, prin excitare în stări tripletice sau singletice, moleculele substanțelor organice își modifică mult pK_a -ul, implicit aciditatea și pot deveni acizi foarte tari care disociază în protoni și molecule excitate încărcate negativ. De asemenea, ATP-sintetaza, citocromii, precum și toate celelalte componente ale lanțului transportor de electroni au fost evidențiate, însă fosforilarea oxidativă poate fi explicată și prin alte mecanisme, cum ar fi unul de transfer energetic direct, de la moleculele excitate la ATP-sintetază. În principiu, lanțul transportor de electroni conține trei **complecși proteici (I, III, și IV)** ce străpung membrana mitocondrială internă. Ipoteza chemiosmotică presupune că electronii trec prin acești trei complecși proteici printr-o serie de reacții de oxido-reducere, iar protonii sunt transferați din matricea mitocondrială către partea citoplasmatică a membranei mitocondriale interne. Pomparea protonilor generează un **gradient electrochimic** (Δp) prin membrană

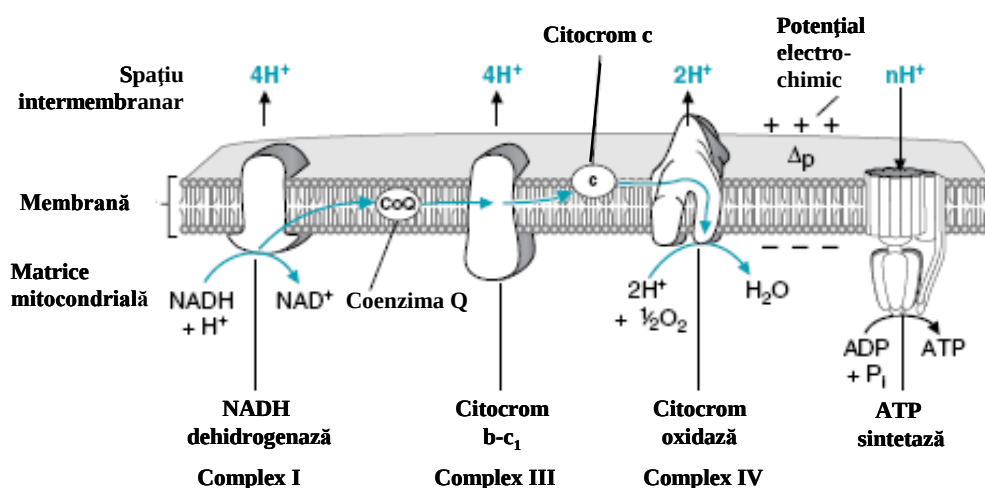


Fig. 4. Modelul chemiosmotic al sintezei de ATP prin fosforilare oxidativă.

format dintr-un potențial de membrană și un gradient de protoni. ATP sintetaza ar conține un por pentru protoni prin membrana mitocondrială internă și o parte catalitică protuberantă ce pătrunde în matrice. Pe

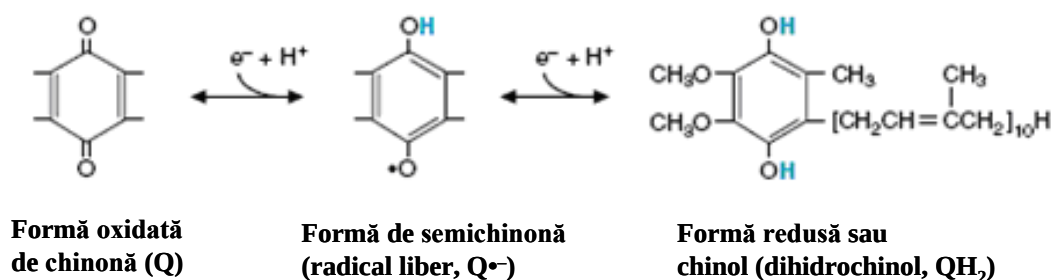
măsură ce protonii ar fi conduși prin por în matrice, aceștia ar modifica conformația părții protuberante care pot îndepărta ATP pe o parte și ar cataliza formarea de ATP pe partea opusă .

Reglarea fosforilării oxidative. Viteza transportului de electroni este **cuplat** cu viteza sintezei de ATP datorită gradientului electrochimic prin membrană. Pe măsură ce ATP este utilizat în procese ce necesită energie, concentrația de ADP crește, influxul de protoni prin porul ATP sintetazei generează mai mult ATP, iar lanțul de transport al electronilor răspunde pentru a restabili gradientul electrochimic (Δp). După părerea lui Peter Mitchell și a adepților ipotezei chemiosmotice, protonii se pot reîntoarce în matricea mitocondrială prin **uncoupling** (decuplarea respirației de fosforilare oxidativă), printr-un mecanism de bypass a porului ATP sintetazei, iar energia este eliberată sub formă de căldură. **Proton leakage** (scurgerea de protoni), **chemical uncouplers** (decuplanții chimici ai fosforilării) și proteinele pentru reglarea decuplării cresc viteza (rata) metabolismului și generează căldură.

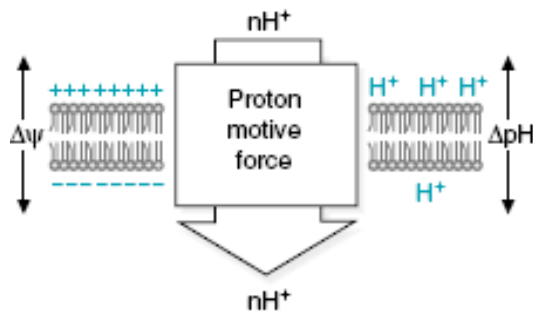
Transferul electronilor de la NADH la O_2 . În lanțul transportor de electroni, electronii cedați de $NADH+H^+$ sau $FADH_2$ sunt transferați secvențial prin seria de transportori de electroni care sunt înglobați în membrana mitocondrială internă. Fiecare dintre componenții lanțului este oxidat și apoi redus pe măsură ce trece electronii mai departe spre oxigenul de la capătul lanțului transportor de electroni. De la NADH, electronii sunt transferați secvențial prin NADH dehidrogenază (complex I), CoQ (coenzima Q), complexul de citocromi b- c_1 (complex III), citocromul c, și în final prin citocrom c oxidază (complex IV). NADH dehidrogenaza, complexul de citocromi b- c_1 și citocrom c oxidaza constituie fiecare complexe proteinice cu mai multe subunități ce se află în membrana mitocondrială internă.

CoQ este o chinonă solubilă în lipide și care nu este legată de vreo proteină, fiind liberă să difuzeze în membrana lipidică. Aceasta transportă electronii de la complexul I la complexul III și a fost considerată o parte intrinsecă a pompei de protoni pentru fiecare dintre acești complecși. Citocromul c este o mică proteină din membrana mitocondrială internă ce transferă electroni de la complexul b- c_1 la citocrom oxidază. Complexul terminal, citocrom c oxidaza, conține locul de legare pentru O_2 . Iar acesta (O_2) acceptă electronii de la lanțul transportor și se reduce la H_2O .

Coenzima Q. Coenzima Q se prezintă sub formă de chinonă oxidată care acceptă un singur electron și formează un radical liber (compus cu un singur electron într-o orbitală). Transferul unui singur electron face ca aceasta chinonă să fie sediul producerii radicalilor liberi de oxigen care sunt toxici în corp:



Gradientul de potențial electrochimic. Se consideră că are loc o cădere de energie de aproximativ 16 kcal prin trecerea electronilor prin complexe proteinice, care furnizează energie suficientă pentru deplasarea protonilor împotriva gradientului de concentrație.



Gradientul de potențial electrochimic și ipotetica forță de deplasare a protonilor.

Deoarece membrana este impermeabilă pentru protoni, aceștia nu ar putea difuza prin stratul dublu lipidic înapoi în matrice. Astfel, în mitocondriile cu respirație activă, spațiul intermembranar și citoplasma sunt cu aproximativ 0.75 unități de pH sub nivelul mitocondrial. Conform teoriei chemiosmotice mișcarea protonilor prin membrană generează un gradient electrochimic cu două componente: potențialul de membrană (fața externă a membranei este pozitiv încărcată în raport cu partea matricială) și gradient de protoni (spațiul din exteriorul membranei interne are o concentrație mai mare în protoni și, deci, este mai acidă decât cel al matricei). Acest gradient electrochimic se numește uneori proton motive force (forță de mișcare a protonilor) deoarece este energia de împingere a protonilor în matrice pentru a echilibra concentrația pe ambele fețe ale membranei. Protonii sunt atrași spre matricea încărcată mult mai negativ, unde pH-ul este mai alcalin.

ATP sintetaza (F₀F₁ATPase) este enzima care produce ATP; este o enzimă compusă din mai multe subunități și care conține o porțiune aflată în membrana internă (F₀) și o tijă (tulpină) cu un cap (F₁) ce se proiectează în matrice (Fig. 4). Cele 12 subunități notate cu **c** din membrană formează un rotor care este atașat la un ax (tijă) central asimetric compus din subunități ϵ și γ . Capul acestei structuri este format din trei perechi de subunități $\alpha\beta$. Fiecare subunitate β conține un site catalitic pentru sinteza ATP. Capul este menținut de către o subunitate δ atașată la o subunitate lungă **b** ce este conectată la subunitatea **a** din membrană. Se crede că influxul de protoni prin canalul de protoni channel rotește rotorul. Canalul de protoni este format de către subunități **c** pe de o parte și cele de tip **a** pe de altă parte. Canalul are două porțiuni prin care se deschide; una se deschide direct în spațiul dintre membranele mitocondriale și alta în matrice. În modelul acesta, fiecare subunitate **c** conține o grupare carboxil de la acidul glutamic ce se extinde în canalul de protoni.

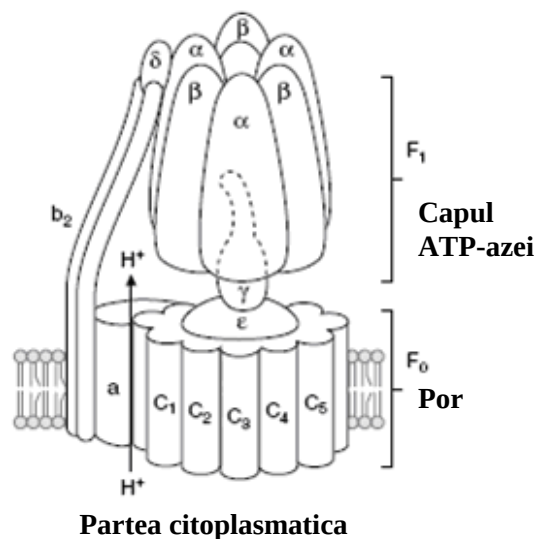


Fig. 4. ATP sintetaza

Gruparea carboxil acceptă un proton din spațiul intermembranar, iar subunitatea **c** se rotește în membrana lipidică hidrofobă. Deoarece matricea are o concentrație mai scăzută în protoni, grupările carboxil glutamice îndepărtează un proton partea dinspre matrice a canalului. Rotația este completată printr-o atracție între resturile glutamice încărcate negativ și o grupare arginil cu sarcină pozitivă ce aparține subunității **a**. Conform acestui mecanism, axul asimetric se rotește spre o nouă poziție unde formează diferite legături cu subunitățile $\alpha\beta$ (Fig. 5).

Noua poziție a axului (tije) modifică conformația unei subunități β ce îndepărtează o moleculă de ATP, iar o altă subunitate catalizează sinteza spontană a ATP din fosfat anorganic, ADP și un proton.

Așadar, energia gradientului electrochimic este folosită la modificarea conformației subunităților ATP sintetazei astfel încât ATP nou sintetizat este îndepărtat. Se presupune existența a 12 subunități c, iar pentru sinteza completă a trei molecule de ATP ar fi necesari 12 protoni.

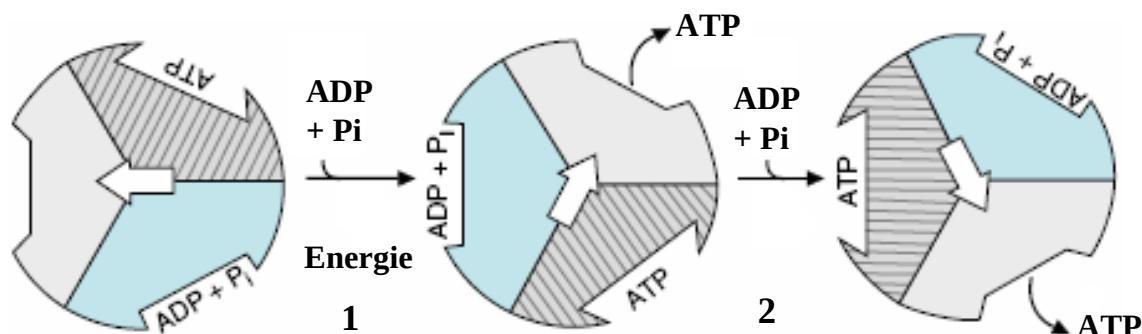


Fig. 5. Mecanismul ipotetic al formării ATP la nivelul ATP sintetazei

Decuplarea sintezei de ATP de transportul de electroni. Dacă protonii se scurg înapoi în matricea mitocondrială, fără a trece prin porul ATP sintetazei, aceștia vor disipa gradientul electrochimic de o parte și de alta a membranei fără a genera ATP. Fenomenul se numește decuplarea fosforilării oxidative. Ea se realizează cu ajutorul unor compuși chimici, denumiți decuplanți (uncouplers), iar în organism fenomenul fiziologic normal este realizat cu ajutorul unor proteine ce formează canale de scurgere a protonilor prin membrane. Decuplarea fosforilării oxidative conduce la creșterea consumului de oxigen și la producerea de căldură.

Mecanisme alternative ale producerii de ATP. Ipoteza lui Mitchell are numeroase dezavantaje, printre care acela de a nu fi fost demonstrată nici până acum, datele experimentale sunt în general împotriva acestei ipoteze. De pildă, ipoteza contrazice legile mecanicii cuantice. Astfel, s-a calculat că sunt necesari 2,5-3,4 protoni pentru a produce o singură moleculă de ATP. Or, energia unei molecule de ATP este egală cu 7,3 kcal/mol după unele calcule și cu aproximativ 12-14 kcal/mol după altele. Ar trebui, dacă ipoteza este adevărată, să identificăm stări energetice intermediare în sinteza ATP, ceea ce nu se întâmplă în fapt. Această ipoteză rezistă deoarece este singura explicație de natură moleculară și deoarece Peter Mitchell a primit Premiul Nobel, ceea ce i-a făcut pe detractorii acestei teorii să renunțe la critici. De asemenea, principalele reviste din domeniul științelor vieții, fizico-chimiei și biologiei refuză să ia în considerare și alte explicații pentru producerea de energie în organismul viu. Ipoteza lui Mitchell a devenit astfel o dogmă și majoritatea experimentelor în domeniul bioenergeticii se realizează considerând-o ca fiind adevărată. Evident, rezultatele sunt interpretate în sensul aceleiași teorii.

Dinitrofenolii-călcâiul lui Achile în bioenergetică. Peter Mitchell și adepții săi au arătat că 2,4-dinitrofenolul și compuși asemănători structural sunt decuplanți ai fosforilării oxidative de respirație datorită liposolubilității lor în membrana mitocondrială și, mai ales, protonului grupării OH care poate trece pe lângă porul ATP sintetazei. Blocarea grupării OH prin alchilare nu conduce la dispariția efectului decuplant al compusului. Este mult mai probabil ca dinitrofenolii și alți decuplanți să absoarbă radiația electromagnetică cu valoare comparabilă cu energia unei molecule de ATP, care este cuantificată și să împiedice transferul acesteia către ATP sintetază. Aceasta din urmă își modifică conformația odată cu absorbția acestei cuante de energie și eliberează o moleculă de ATP. Molecula de ADP și una de fosfat pătrund ușor în capul ATP sintetazei (F1 sau ATP azei) și se transformă în ATP. Energia este furnizată de afinitatea mare a ATP-azei față de ATP. Reacția este reversibilă, după cum a demonstrat Paul Boyer, laureat Nobel 1997, în așa fel încât ATP poate fi ușor hidrolizat la ADP. Eliberarea moleculei de ATP necesită însă energie.

Pe de altă parte, oxigenul contribuie la realizarea unor stări excitate ale unor molecule din lanțul respirator, iar în aceste stări moleculele devin acizi tari ce eliberează protoni în exterior. Așa s-ar explica prezența ionilor de hidrogen în procesul formării de ATP.

Lanțul transportor de electroni

În principiu, putem considera că electronii conțin o energie pe care o transferă în reacțiile chimice. Pentru un transfer de electroni:

$$\Delta E^{\circ} = E^{\circ}(\text{oxidant}) - E^{\circ}(\text{reducător}) = E^{\circ}(\text{acceptor de electroni}) - E^{\circ}(\text{donator de e})$$

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$$

Dacă ΔG° este negativă, atunci reacția are loc, cu deplasare spre dreapta, adică cu producerea de produși de reacție.

Nicotinamid din nucleotida $\text{NADH} + \text{H}^+$, produsă în ciclul Krebs sau ciclul acidului tricarboxilic, conține doi electroni care sunt transferați oxigenului în procesul respirației. Transferul este realizat în mai multe etape care însumate formează lanțul respirator.

Un transfer de electroni este spontan (ΔG negativ) dacă E° (potențial punctul median) a donatorului de electroni este mai negativă decât E° a acceptorului de electroni, de exemplu, atunci când există un ΔE° pozitiv.

Să considerăm, de exemplu, transferul a 2 electroni de la NADH la oxigen:



$$E^{\circ} = + 0.815 \text{ V}$$



$$E^{\circ} = - 0.315 \text{ V}$$

Scăzând reacția b din reacția a:



$$\Delta E^{\circ} = + 1.13 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ} = -2(96485 \text{ Jouli/Volt} \cdot \text{mol}) \cdot (1.13 \text{ V}) = -218 \text{ kJ/mol (52.15 kcal/mol; 3 ATP} = -17.38 \text{ kcal/mol)}$$

Am împărțit energia conținută în $\text{NADH} + \text{H}^+$ la trei, deoarece în lanțul respirator, numit și lanțul transportor de electroni, se formează trei moli de ATP (acid adenozintrifosforic) dintr-un mol de $\text{NADH} + \text{H}^+$.

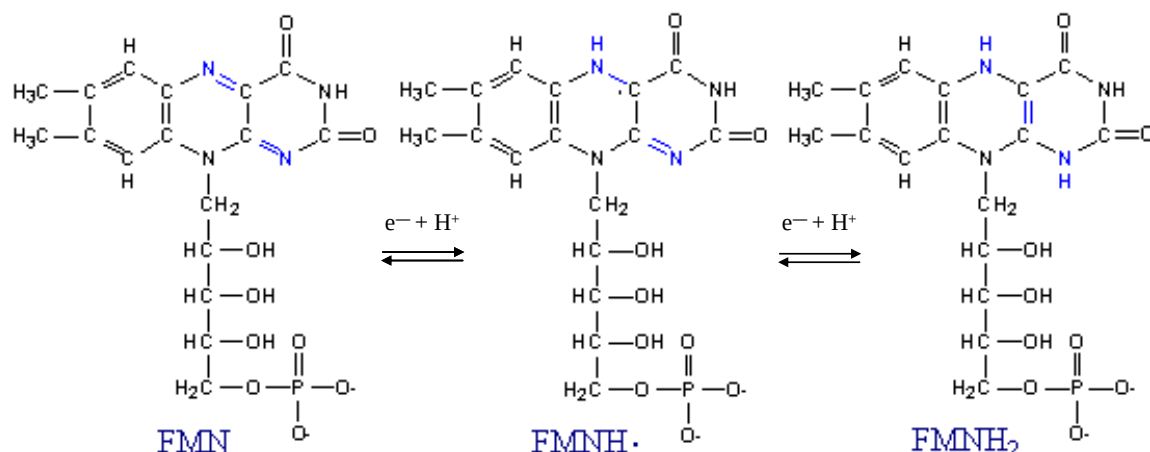
Purtători de electroni:

NAD^+/NADH și FAD/FADH_2 au fost introduse în clasa compușilor bioenergetici.

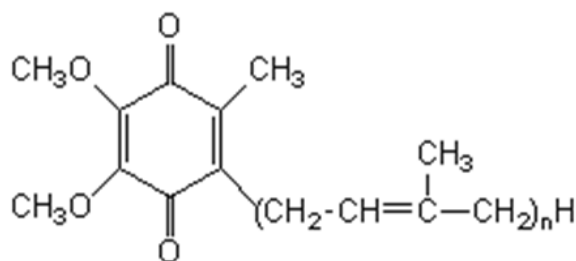
FMN (Flavin mononucleotid) este o grupare prostetică (de protezare) a unor flavoproteinelor.

Are o structură similară cu FAD (Flavin adenin dinucleotida), dar nu are adenină ca nucleotidă.

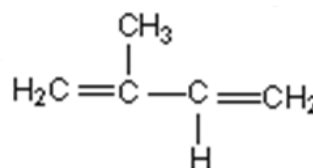
FMN (ca și FAD) poate accepta $2\text{e}^- + 2\text{H}^+$ pentru a se obține FMNH_2 . Atunci când este legată la locul activ al unor enzime, FMN poate accepta e^- , trecând într-un radical de semichinonă. Aceasta poate accepta un al doilea e^- pentru a da FMNH_2 .



Rolul FMN: Deoarece poate accepta sau dona 1 sau 2 e⁻, FMN are un rol important în medierea transferului de electroni între operatorii de transport care transferă 2 e⁻ (de exemplu, NADH) și transportatorii care pot accepta doar 1 e⁻ (de exemplu, Fe³⁺). A se vedea discuția de la complex I.



Coenzima Q



Izopren

Coenzima Q (numită, de asemenea, CoQ, Q sau ubiquinonă) este foarte hidrofobă. Aceasta se dizolvă în partea hidrofobă (cozile hidrocarbonate ale acizilor grași din membrane) a unei membrane mitocondriale. Structura CoQ include o coadă izoprenoidă lungă. În celulele umane, cel mai adesea numărul de unități de izopren (n) este de 10.

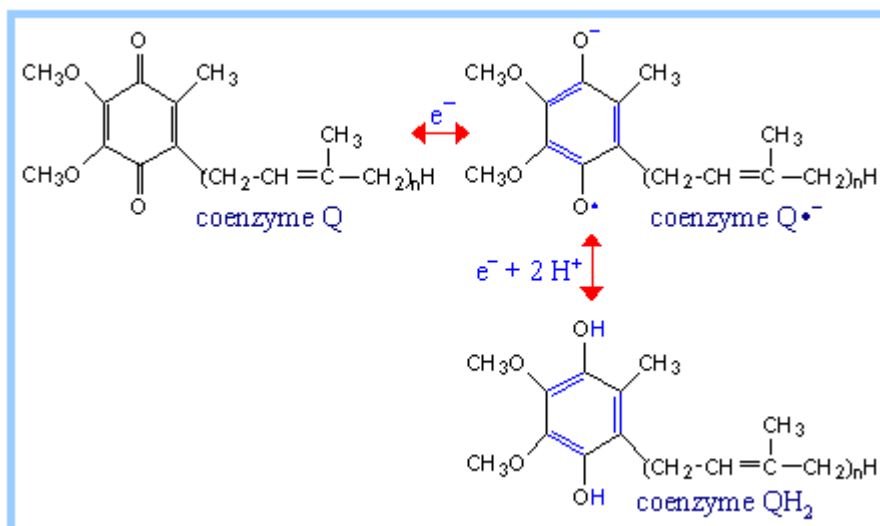
Catena izoprenoidă a Q10 este mai lungă decât lățimea unui strat dublu lipidic. Radicalul izoprenoid de CoQ poate fi pliat pentru a se obține o structură mai compactă. Este astfel postulată o dispunere centrală în zona hidrofobă a membranei, între cele două monostraturi de lipide.

Inelul **chinonic** al coenzimei Q poate fi redus **chinol** într-o reacție cu 2e⁻:



Atunci când este legată la site-uri speciale din complexul lanțului respirator, CoQ poate accepta un singur electron pentru a forma un radical semiquinonic (Q^{•-}). Astfel CoQ, ca și FMN, poate media între donatori / acceptori cu un electron sau doi electroni.

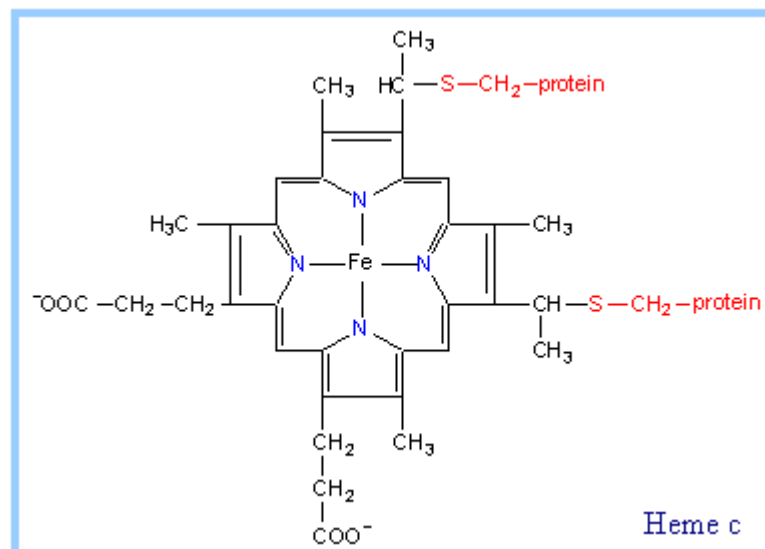
Coenzima Q funcționează ca transportor de electroni mobili în cadrul membranei mitocondriale.



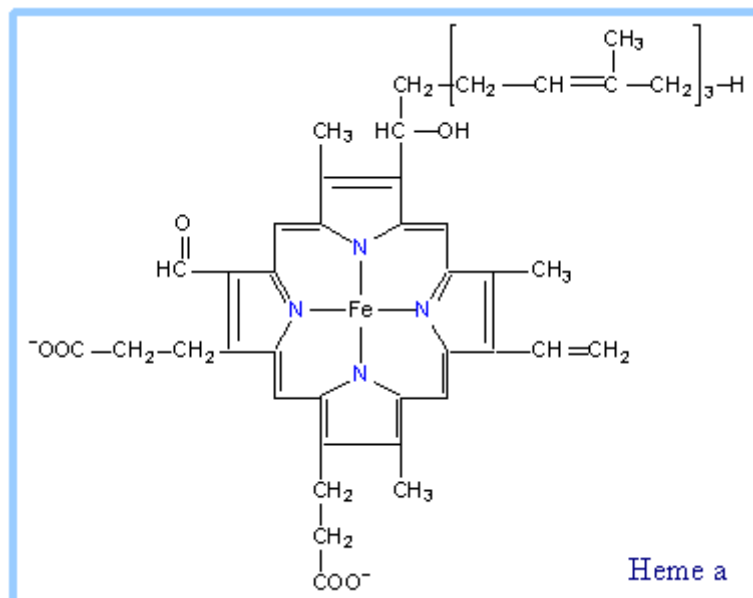
Hemul este un grupă prostetică (de protezare) a citocromilor. Hem conține un atom de fier încorporat într-un inel porfirinic. Fe este legat la 4 atomi de N ale inelului porfirinic.

Hemul din cele trei clase de citocromi (a, b, c) diferă ușor în substituenți pe sistemul ciclul porfirinic. O trăsătură comună este de două catene laterale propionat.

Numai **hemul c** este legat covalent la proteina prin legături tioeter de cisteină, așa cum se arată în partea dreaptă.



Hemul a este unic deoarece are o catenă laterală lungă **farnesil**, care include trei unități izoprenoide.



Bibliografie

Smith, C., Marks, A. D., Lieberman, M. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Lehninger, A. Biochimie, vol. I și II, Edit. Tehnică, București, 1987 și 1992.

Drochioiu, G. Dinitrophenols: An alternative mechanism of toxicity and the pathophysiological implications. *Med. Hypotheses*, 84, 262–267, 2015.

Voet & Voet. Biochemistry, 3rd Ed., p. 555-556, 571-574 și 802-820