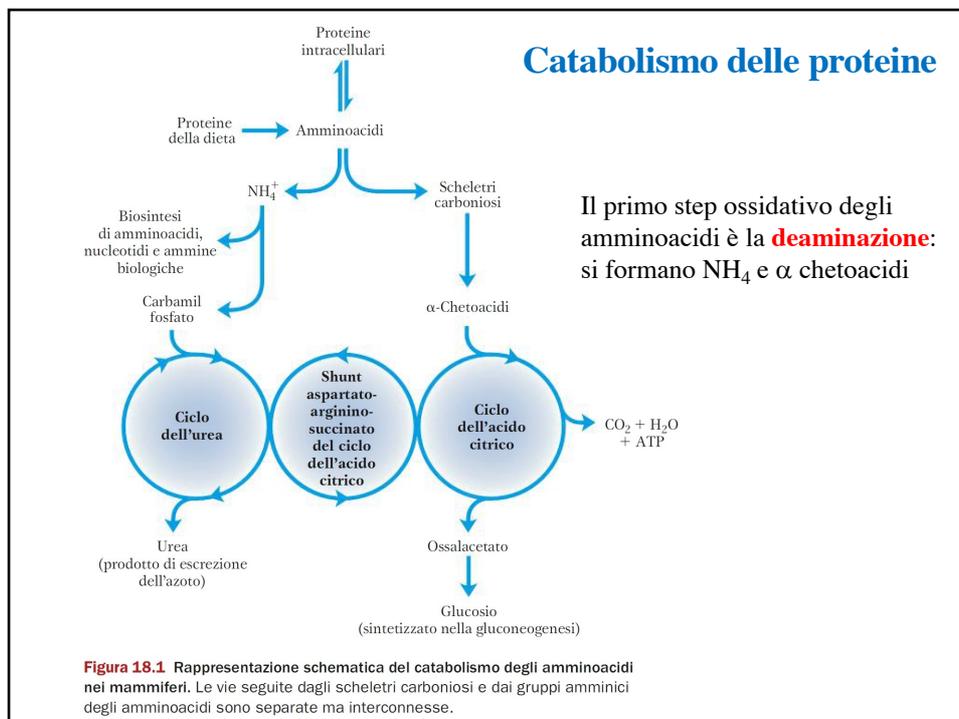


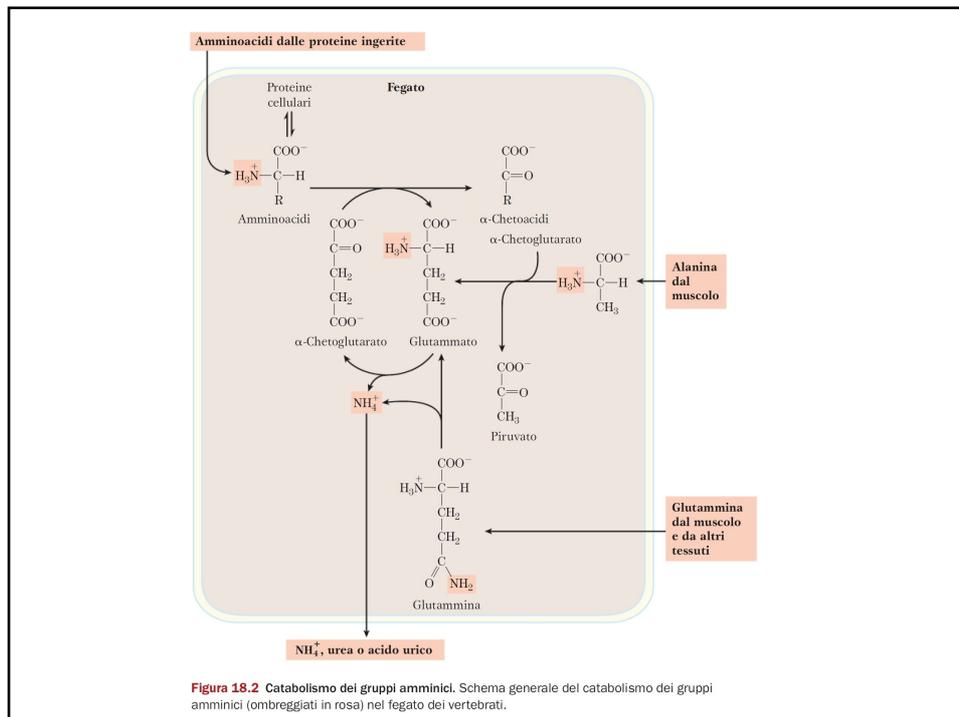
METABOLISMO DELL'AZOTO E PROTEINE

Ossidazione degli amminoacidi e produzione dell'urea

1



2



3

N_2 : ABBONDANTE NELL'ATMOSFERA MA INERTE

L'uomo non è in grado di utilizzare N_2 .

L' **NH_3** è il substrato di base per la sintesi dei composti azotati complessi negli organismi superiori (uomo)

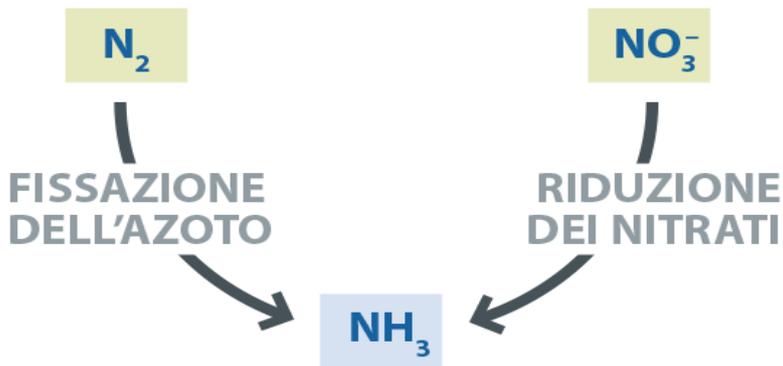
Batteri e piante trasformano l'azoto inorganico in NH_3

Esistono due vie:

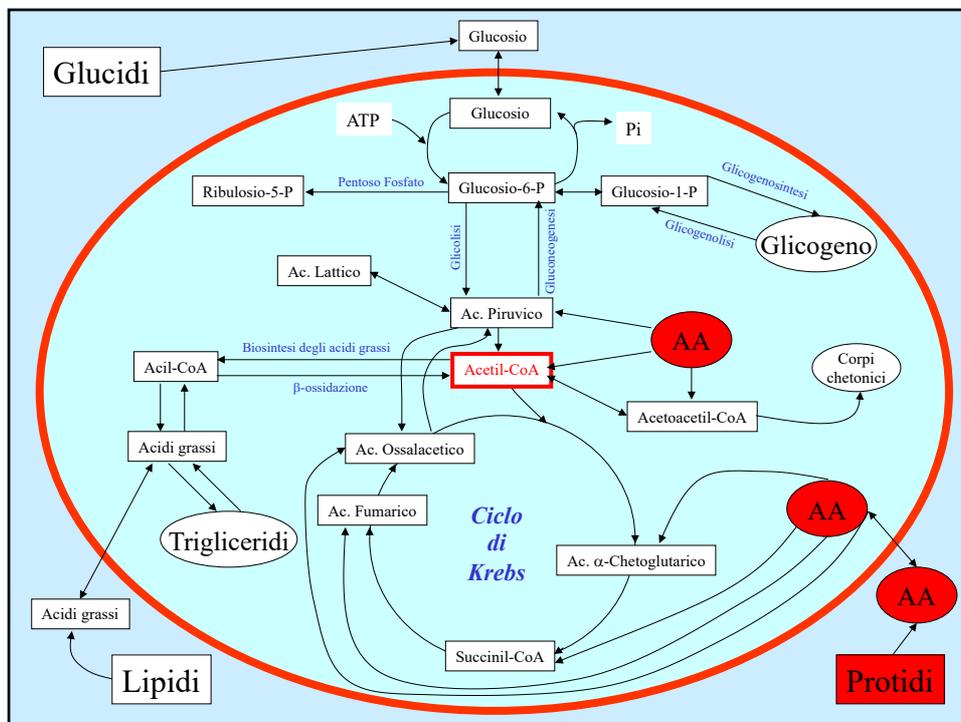
- 1 **Fissazione** dell' N_2 atmosferico (diazotrofi)
- 2 **Riduzione dei nitrati** del suolo (batteri e piante)

4

RIDUZIONE DELL'AZOTO INORGANICO IN AMMONIACA



5

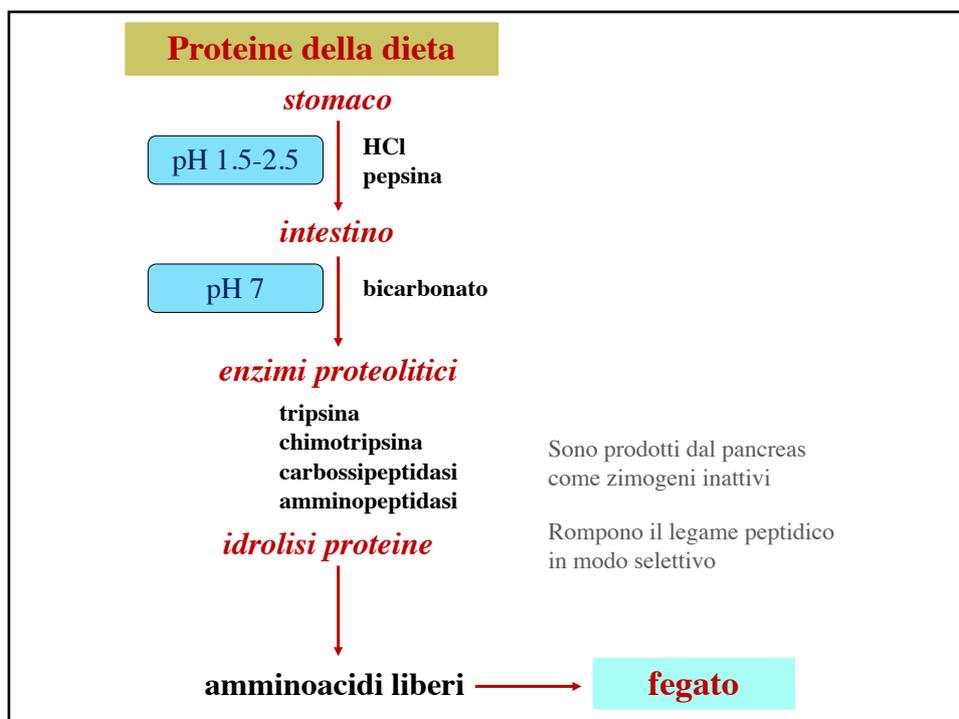


6

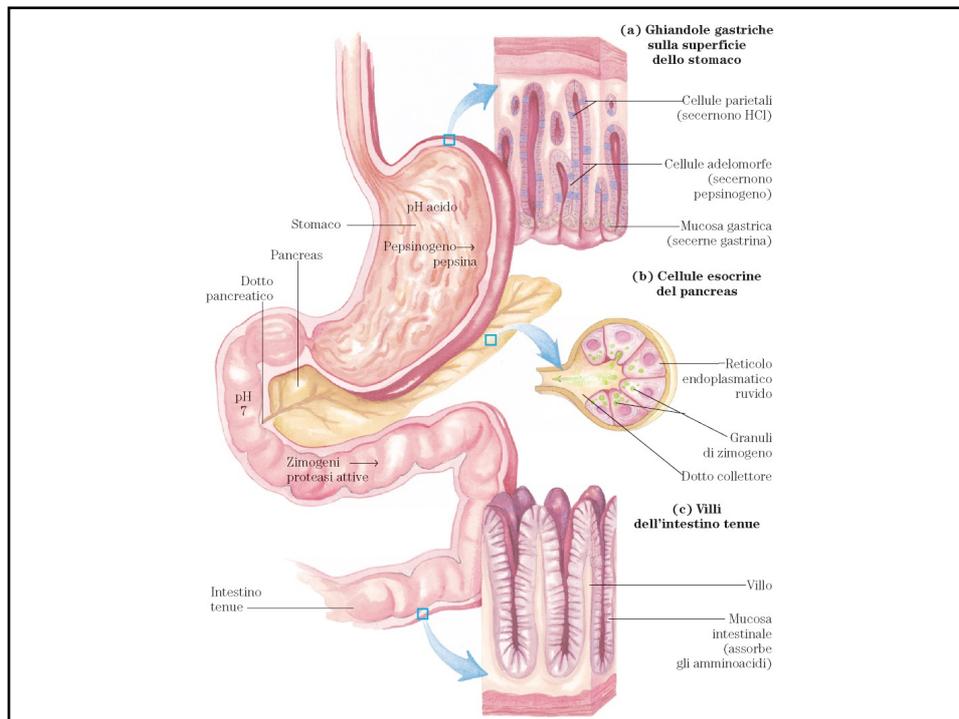
DIGESTIONE DELLE PROTEINE ALIMENTARI

- La degradazione delle proteine della dieta avviene nel tratto gastrointestinale
- Inizia nello stomaco, dove la secrezione di HCl favorisce la denaturazione delle proteine. Sulle proteine denaturate agiscono gli **enzimi proteolitici** (peptidasi o proteasi) che idrolizzano il legame peptidico. Vi sono vari tipi di peptidasi con diversa specificità
 - **carbossipeptidasi;**
 - **amminopeptidasi;**
 - **pepsina;**
 - **tripsina;**
 - **chimotripsina.**
- Il principale enzima proteolitico dello stomaco è la pepsina
- La degradazione delle proteine prosegue ad opera di altri enzimi proteolitici nel lume intestinale, dove la secrezione di bicarbonato riporta il pH alla neutralità.

7



8



9

DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE CELLULARI

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

L'emivita delle proteine è estremamente variabile (da qualche ora ad alcuni giorni). Alcune, come le proteine strutturali e l'emoglobina sono proteine a lunga vita ($t_{1/2} > 200$ ore)

Altre come gli enzimi, gli ormoni e gli anticorpi sono proteine a breve vita ($t_{1/2} < 2$ ore). Di solito, le proteine difettose sono degradate più rapidamente

Negli eucarioti la degradazione delle proteine endogene avviene:

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

10

Negli eucarioti la degradazione delle proteine cellulari è spesso segnalata dall'UBIQUITINA. L'ubiquitina è una piccola proteina (76 aa) altamente conservata che etichetta le proteine che devono essere degradate. Il residuo di glicina carbossiterminale dell'ubiquitina lega covalentemente i residui di lisina della proteina da degradare. L'idrolisi dell'ATP fornisce l'energia per la formazione di questi legami.

Molte molecole di ubiquitina si legano alla proteina da degradare. Il legame dell'ubiquitina alla proteina richiede l'intervento di tre enzimi (E1, E2, E3).

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

Difetti nel meccanismo di ubiquitinazione sono implicati in un gran numero di malattie (tumori, fibrosi cistica, malattie neurodegenerative). Lo sviluppo di farmaci in grado di inibire la funzione del proteasoma può creare le potenzialità di trattamento per alcune di queste patologie

Le proteine si possono anche riparare (heat shock protein).

11

CATABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI

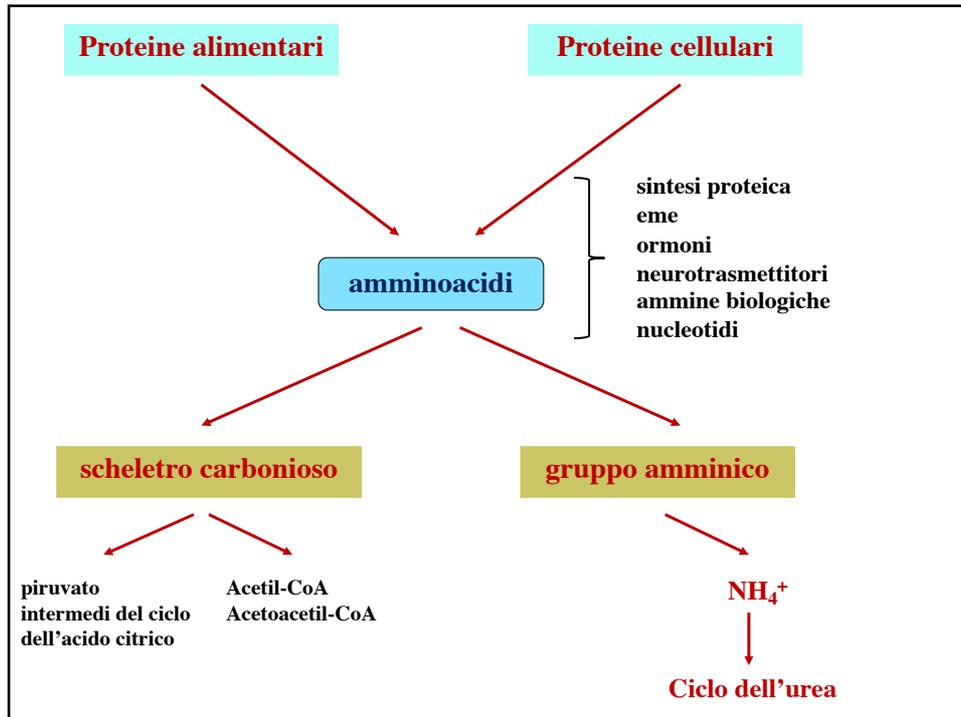
Gli amminoacidi liberi, derivanti dalla degradazione delle proteine sono utilizzati principalmente come precursori nella sintesi proteica. Inoltre, alcuni amminoacidi sono utilizzati per la sintesi di importanti molecole, come nucleotidi, gruppo eme, ormoni, ammine biologiche.

Gli amminoacidi in eccesso vengono metabolizzati. In questo caso viene rimosso dapprima il gruppo amminico, che viene convertito in ione ammonio che successivamente entra nel ciclo dell'urea.

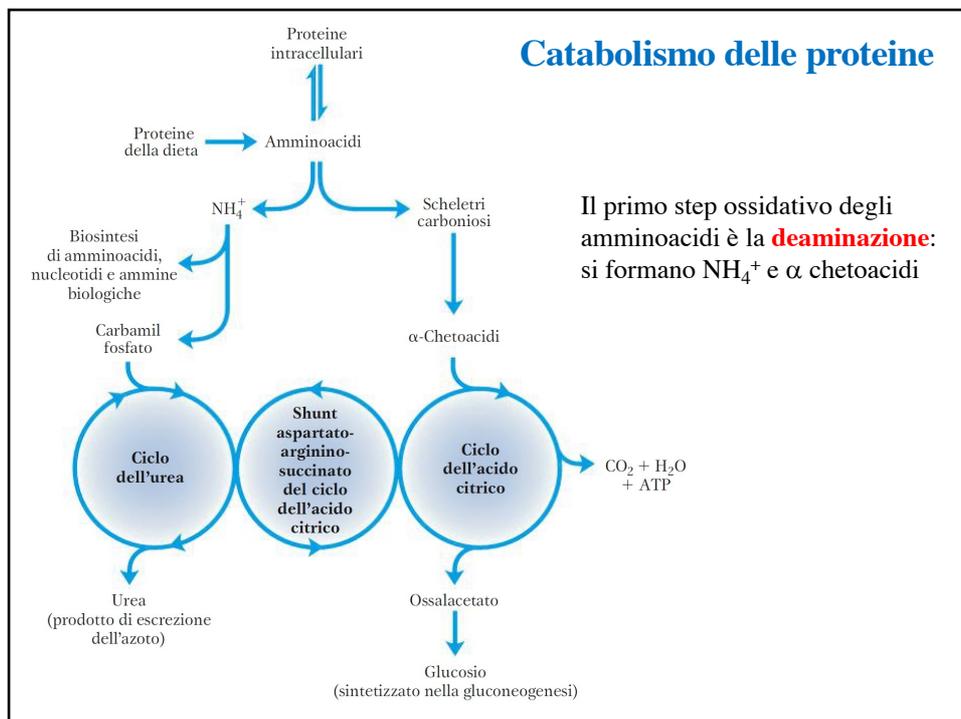
Lo scheletro carbonioso dell'amminoacido, in funzione del gruppo R, viene opportunamente trasformato in:

- piruvato;
- intermedi del ciclo dell'acido citrico;
- Acetil-CoA;
- Acetoacetil-CoA.

12

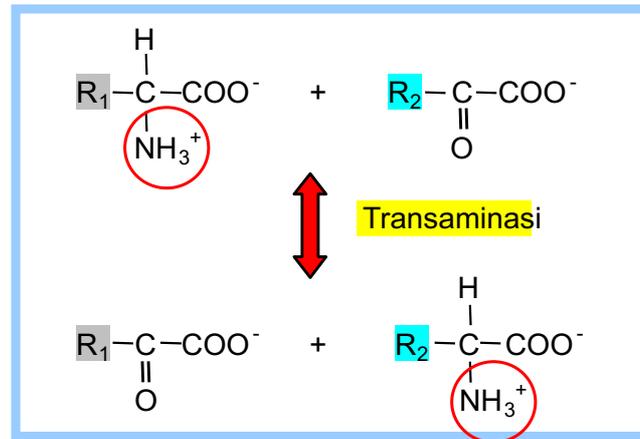


13



14

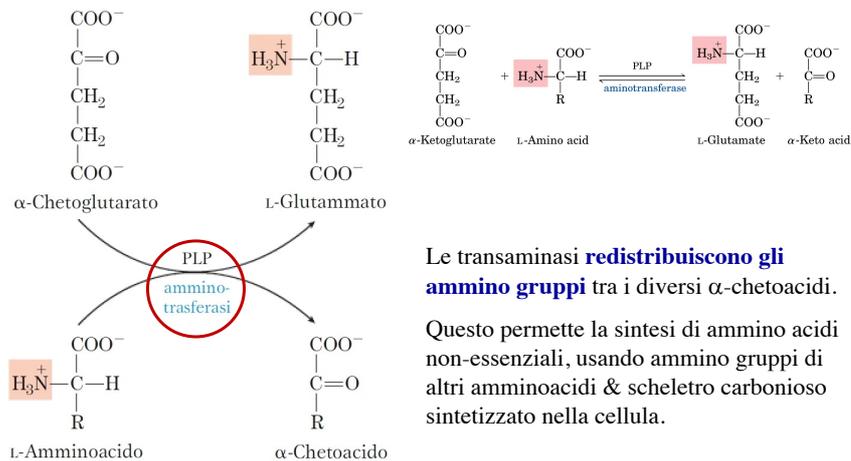
Transaminasi o Amminotransferasi



Transaminasi (amminotransferasi) catalizza il trasferimento reversibile di un ammino gruppo tra due α -chetoacidi.

15

Transaminasi o Amminotransferasi



Le transaminasi **redistribuiscono gli ammino gruppi** tra i diversi α -chetoacidi.

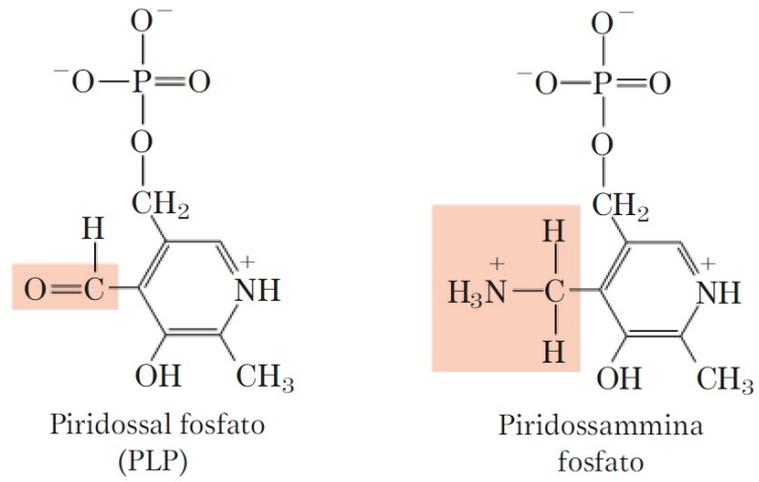
Questo permette la sintesi di ammino acidi non-essenziali, usando ammino gruppi di altri amminoacidi & scheletro carbonioso sintetizzato nella cellula.

Figura 18.3 La reazione catalizzata dalle transaminasi.

In molte reazioni amminotrasferasiche, l' α -chetoglutarato è l'accettore del gruppo amminico. Tutte le amminotrasferasi utilizzano il piridossal fosfato (PLP) come cofattore. Anche se la reazione è mostrata nella direzione del trasferimento del gruppo amminico sull' α -chetoglutarato, è reversibile.

16

**Piridossal fosfato (PLP),
gruppo prostetico delle amminotransferasi**



17

Glutammato deidrogenasi

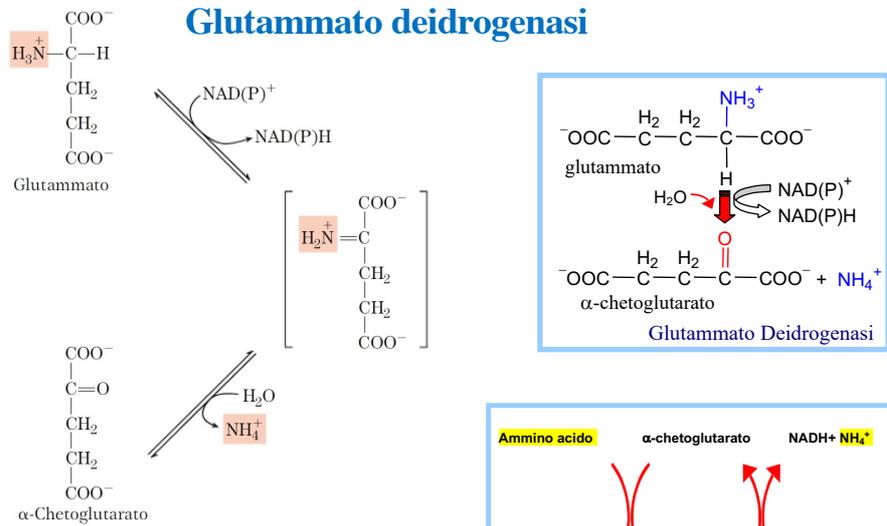
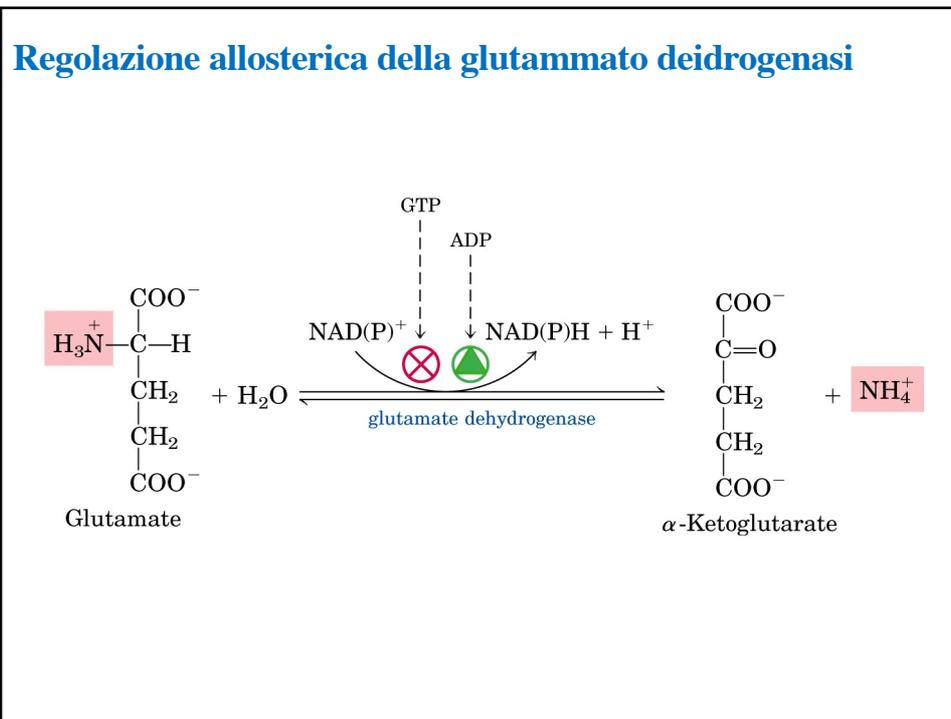
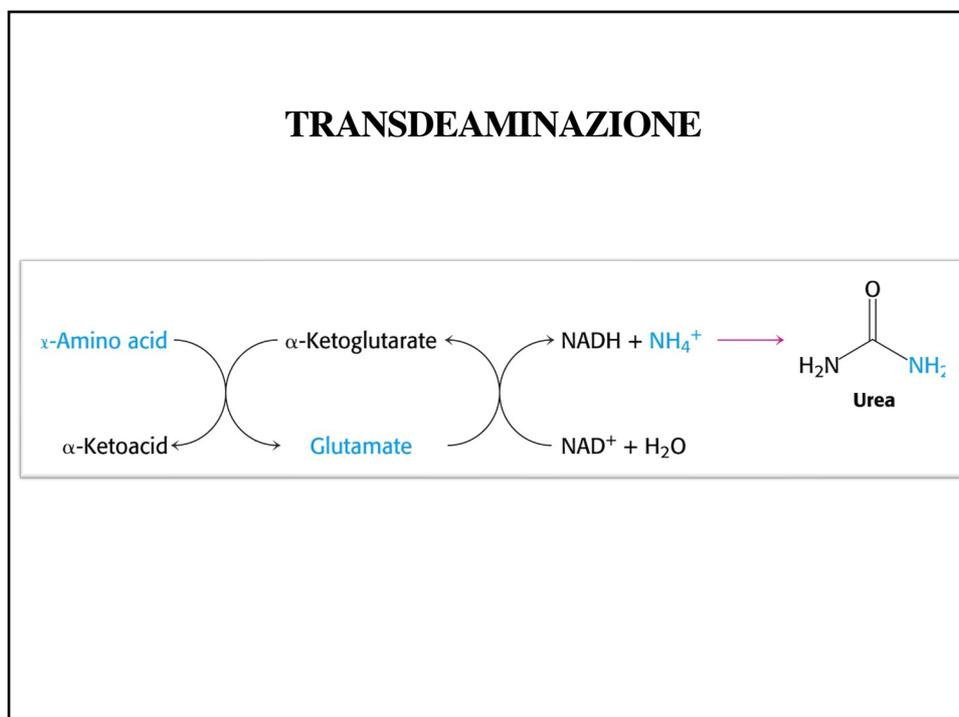


Figura 18.5 La reazione catalizzata dalla glutammato deidrogenasi. Questo enzima del fegato di mammifero può utilizzare come cofattori sia il NAD⁺ sia il NADP⁺, mentre la glutammato deidrogenasi delle piante e dei microrganismi generalmente è specifica per l'uno o per l'altro cofattore. L'enzima presente nei mammiferi è regolato allostericamente dal GTP e dall'ADP.

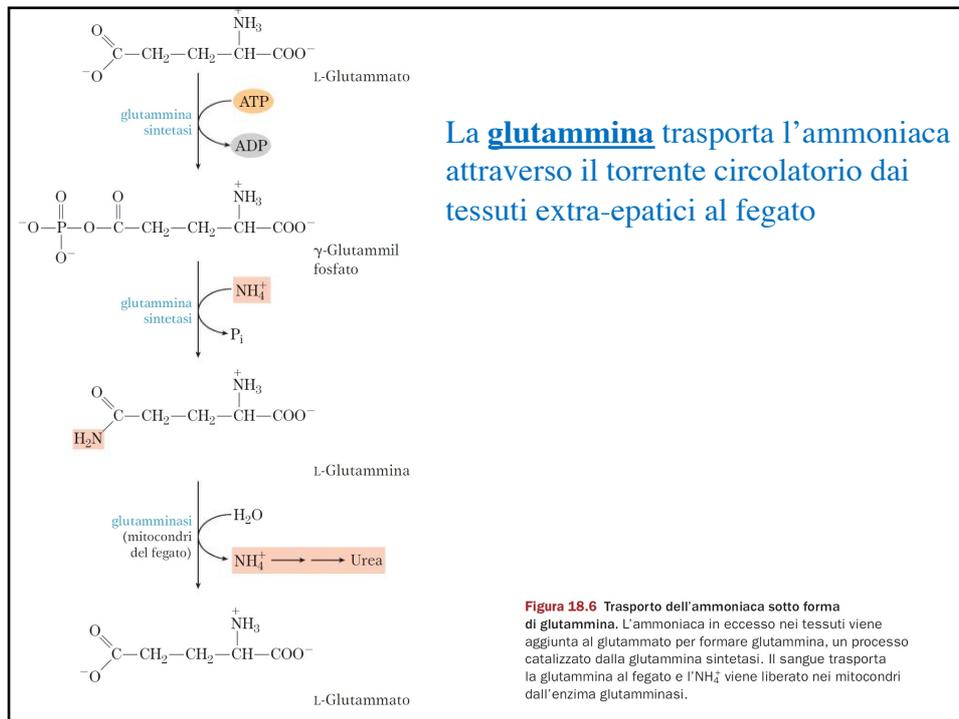
18



19



20

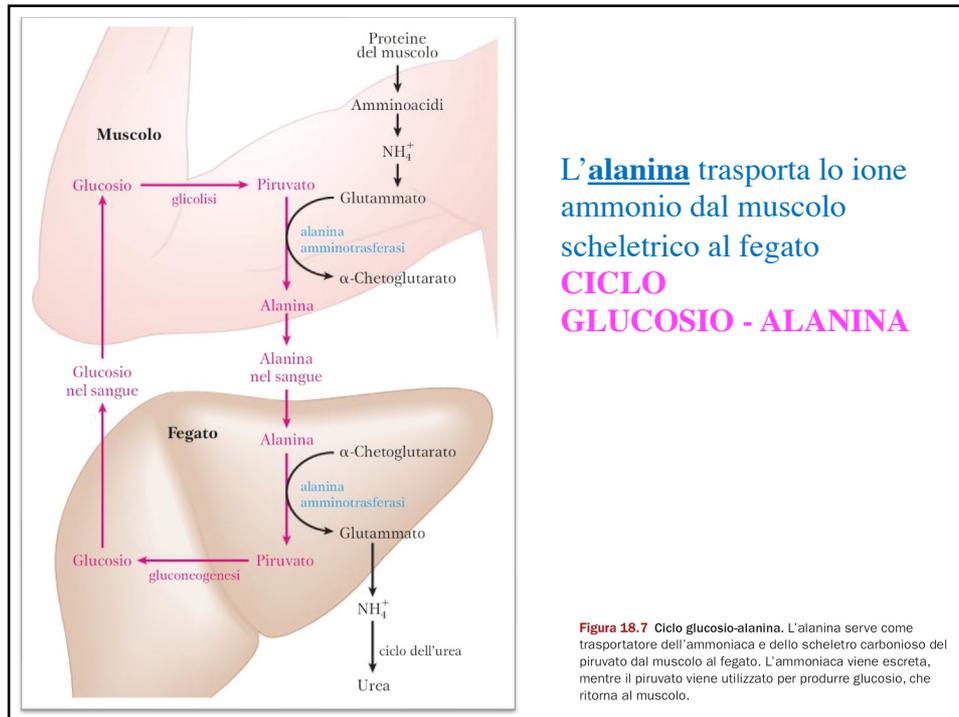


21

L' NH_4^+ E' **TOSSICA** E DEVE ESSERE TRASPORTATA ORGANICATA SU UN'ALTRA MOLECOLA:

1. LA GLUTAMMINA TRASPORTA NH_4^+ DAI TESSUTI EXTRA EPATICI AL FEGATO
2. L'ALANINA TRASPORTA L' NH_4^+ DAL MUSCOLO AL FEGATO

22



23

TOSSICITA' DELL' NH₃

Le basi della tossicità dell'ammoniaca: il cervello è particolarmente sensibile e i danni provocati dall'ammoniaca comportano problemi cognitivi, atassia e crisi epilettiche. Nei casi più gravi rigonfiamento del cervello e morte.

Nel sangue l'ammoniaca è protonata come NH₄⁺ (circa il 98%) e come tale **NON attraversa la membrana plasmatica**. La piccola quantità di NH₃ **attraversa tutte le membrane, compresa la barriera ematoencefalica**, permettendo all'ammoniaca di entrare nelle cellule. e dentro la cellula ridiventa ione ammonio.

24

TOSSICITA' DELL' NH₃

Possibili meccanismi per la tossicità di alti livelli di ammoniaca:

1. Alta [NH₃] potrebbe indirizzare la **Glutamina Sintetasi**:
glutammato + ATP + NH₃ → glutamina + ADP + P_i

Questo potrebbe sottrarre glutammato, precursore per la sintesi del neurotrasmettitore GABA.

2. Diminuzione di glutammato & alte concentrazioni di ammoniaca potrebbero spingere la reazione **inversa** della **Glutammato Deidrogenasi**:

glutammato + NAD(P)⁺ ← α-chetoglutarato + NAD(P)H + NH₄⁺

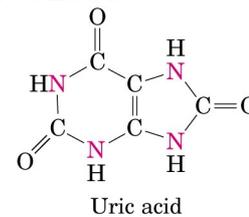
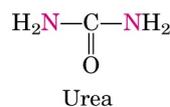
Questo comporta la perdita di α-chetoglutarato, un intermedio essenziale del Ciclo di Krebs, condizionando il metabolismo energetico nel cervello.

25

CATABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI

L'ELIMINAZIONE DELL'AZOTO IN ECCESSO

NH₄⁺
 Ammonia (as ammonium ion)

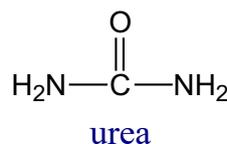


Ammonotelic animals:
 most aquatic vertebrates,
 such as bony fishes and
 the larvae of amphibia

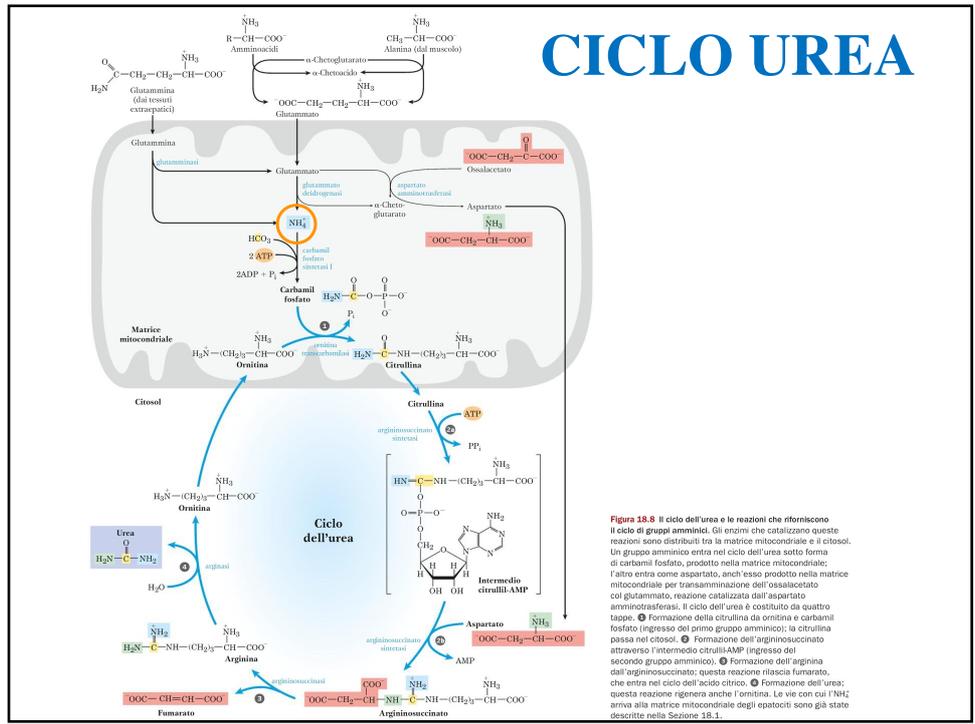
Ureotelic animals:
 many terrestrial
 vertebrates; also sharks

Uricotelic animals:
 birds, reptiles

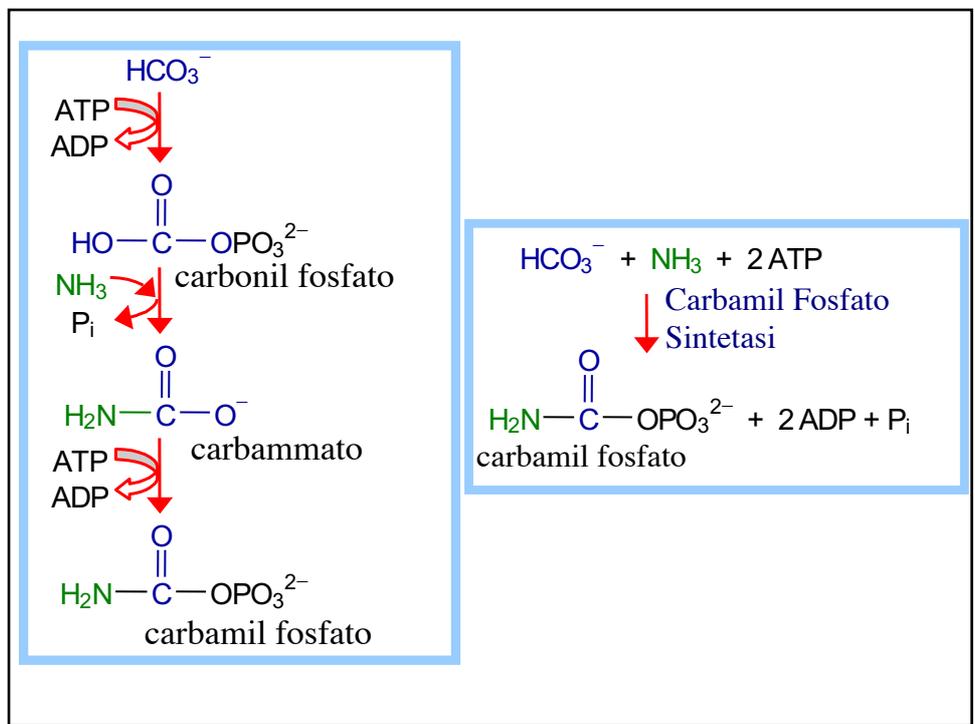
(b)



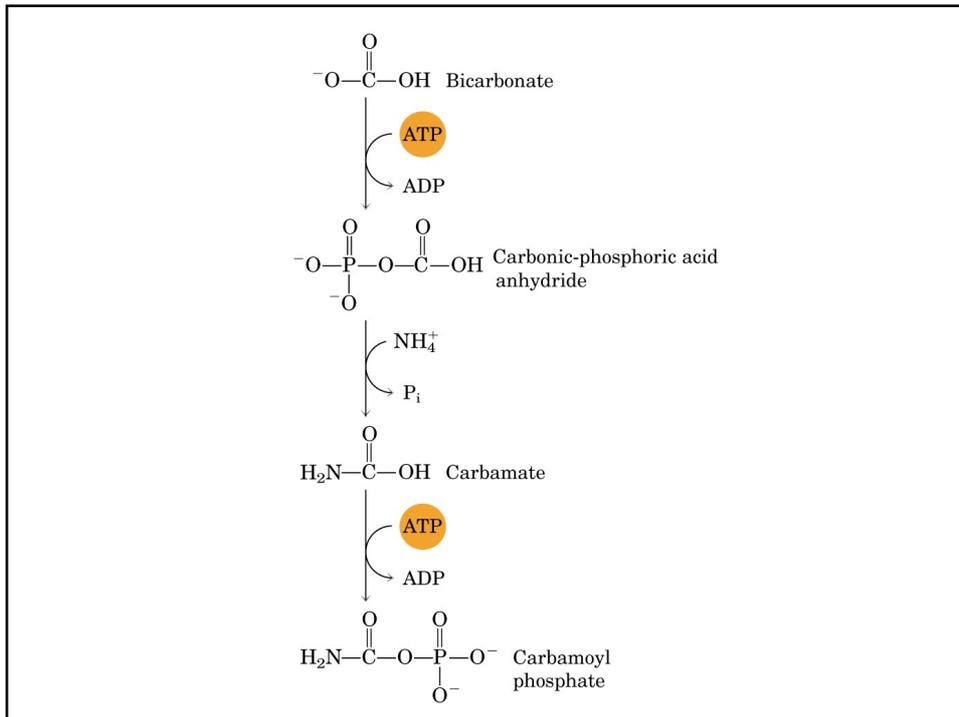
26



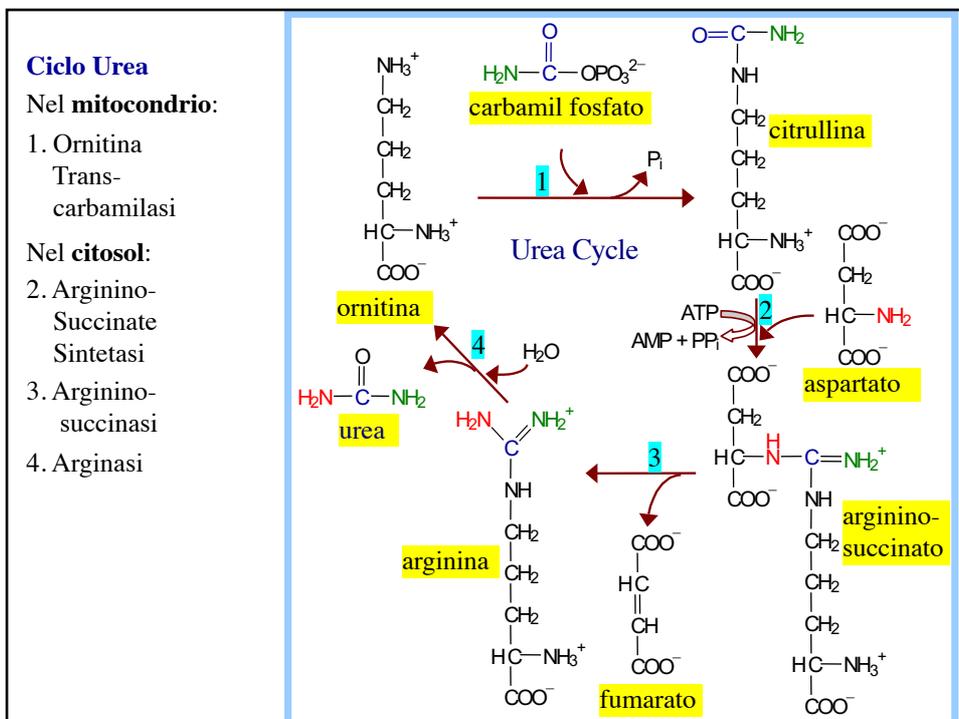
27



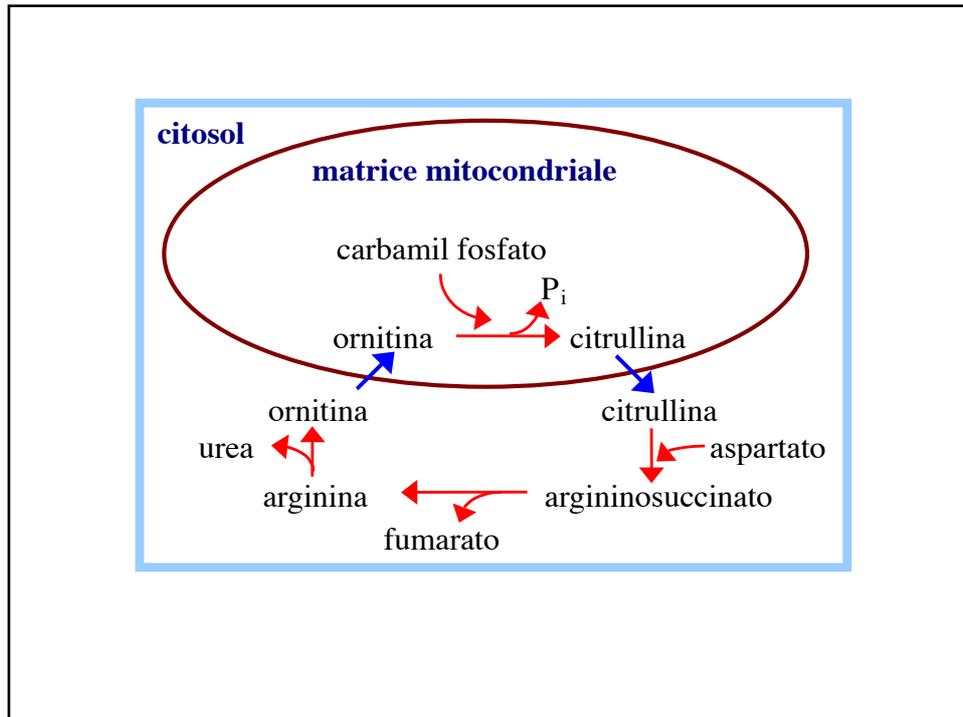
28



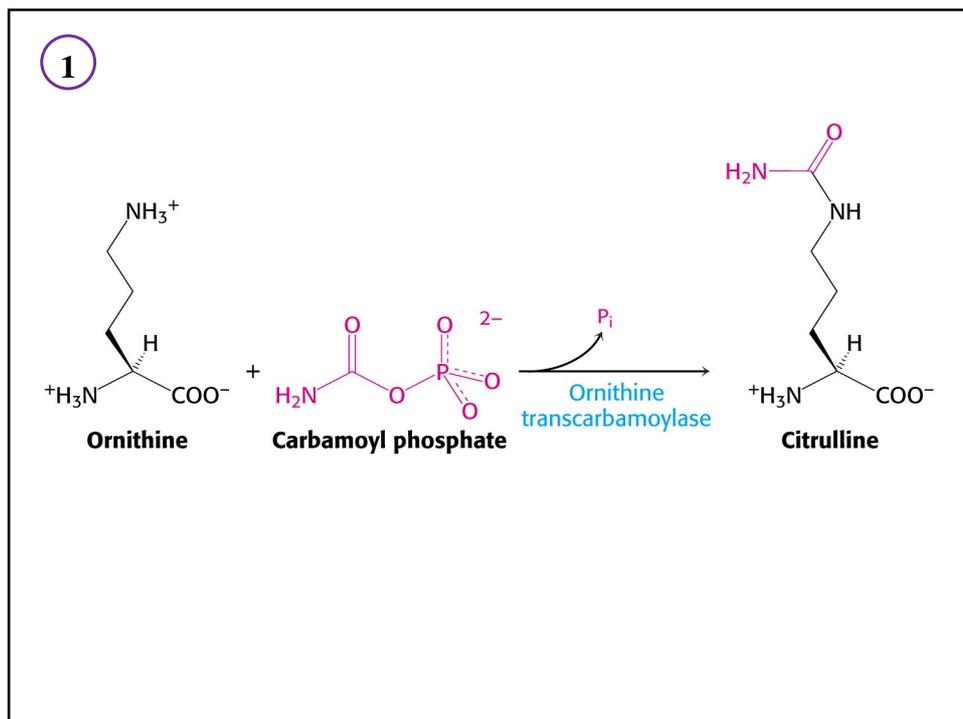
29



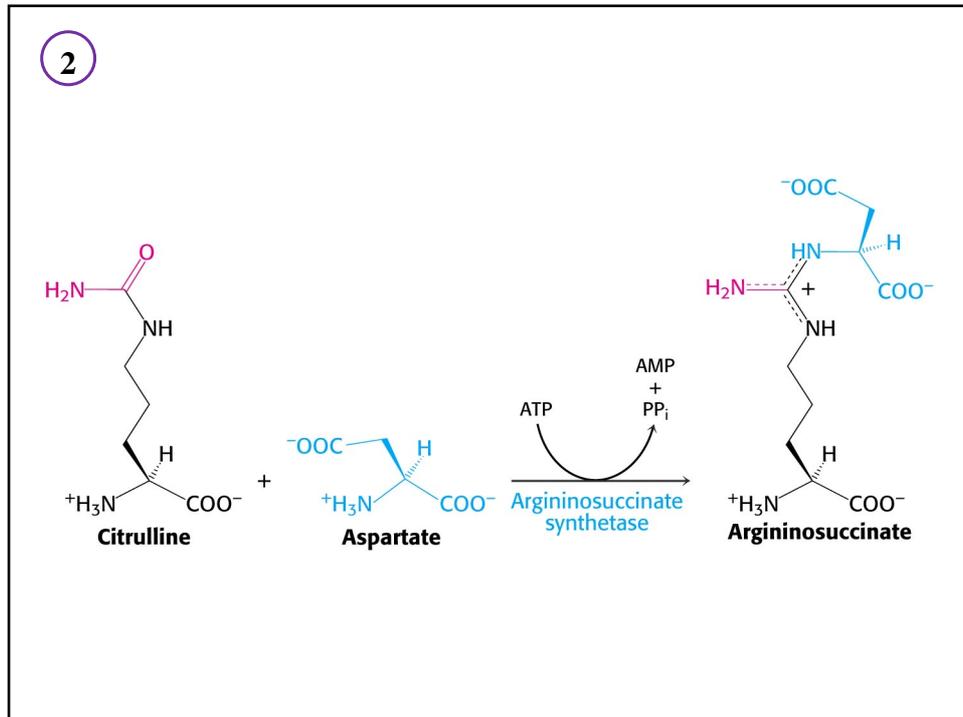
30



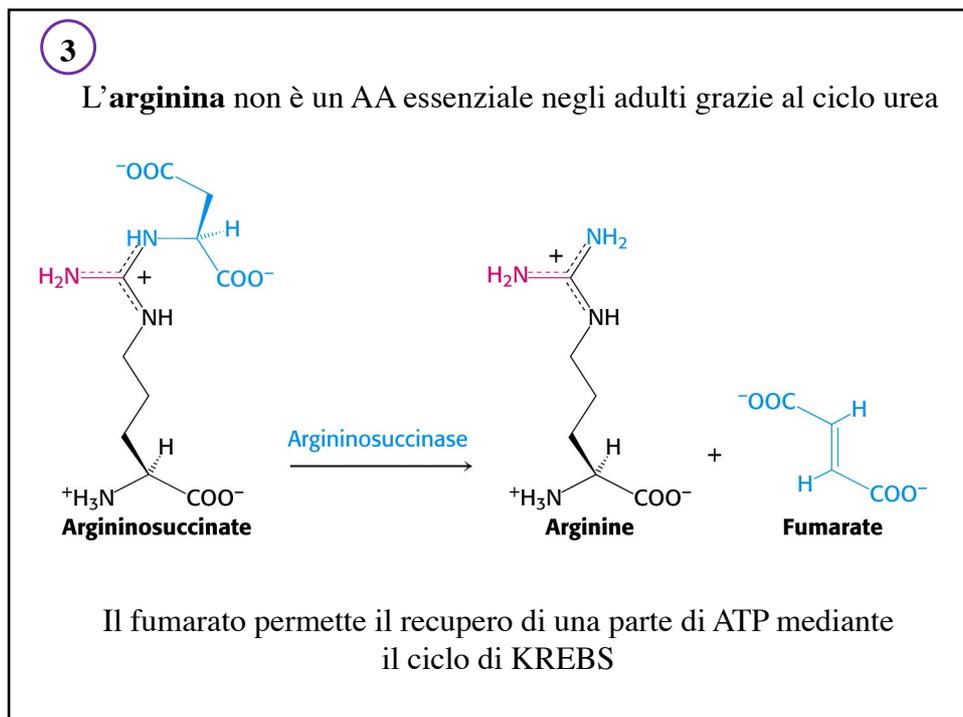
31



32

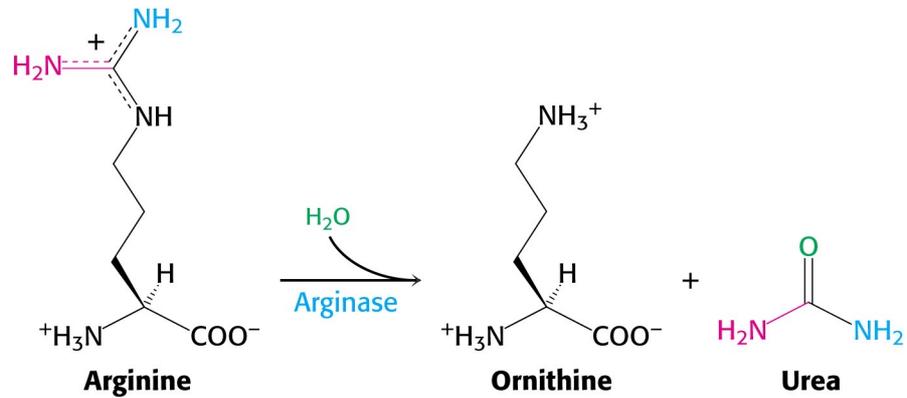


33

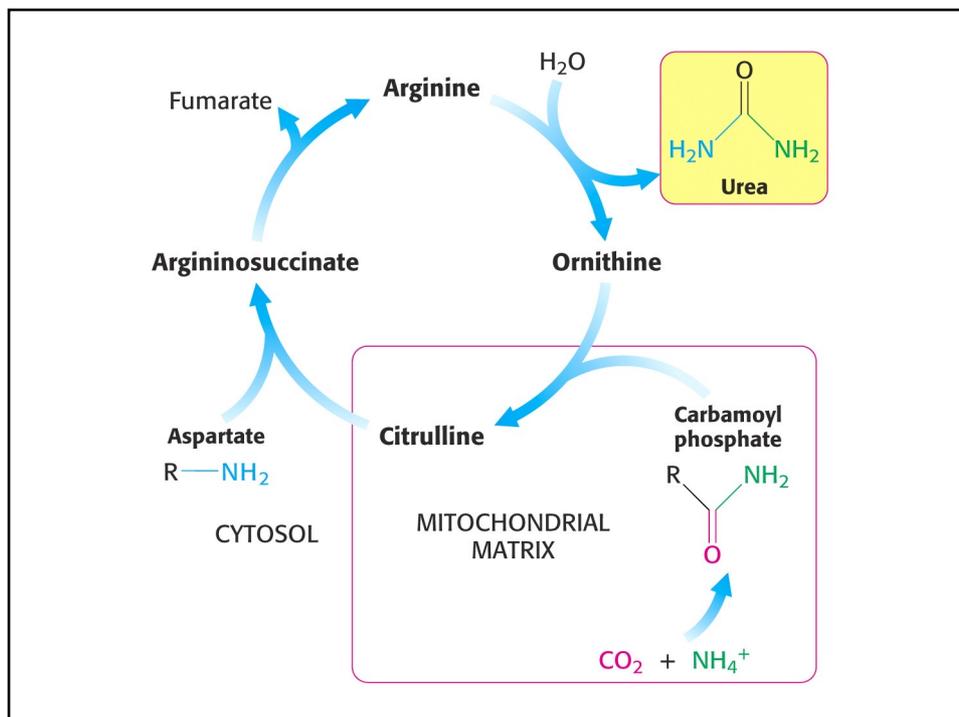


34

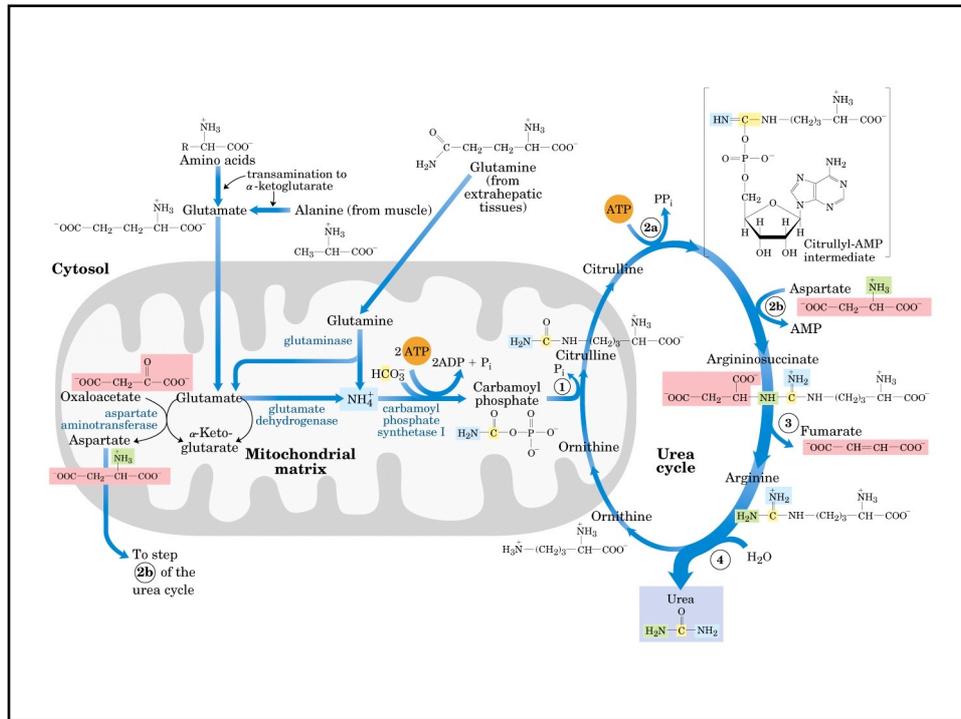
Si rigenera l'ornitina (catalizzatore del ciclo urea) che rientra nel mitocondrio per iniziare un nuovo ciclo



35



36



37

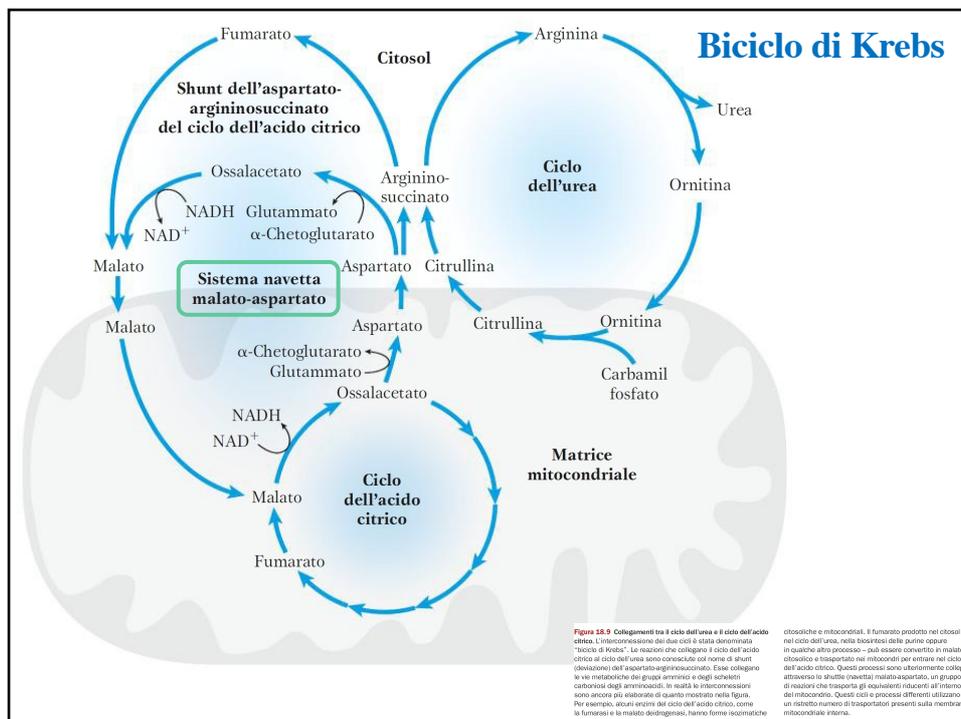
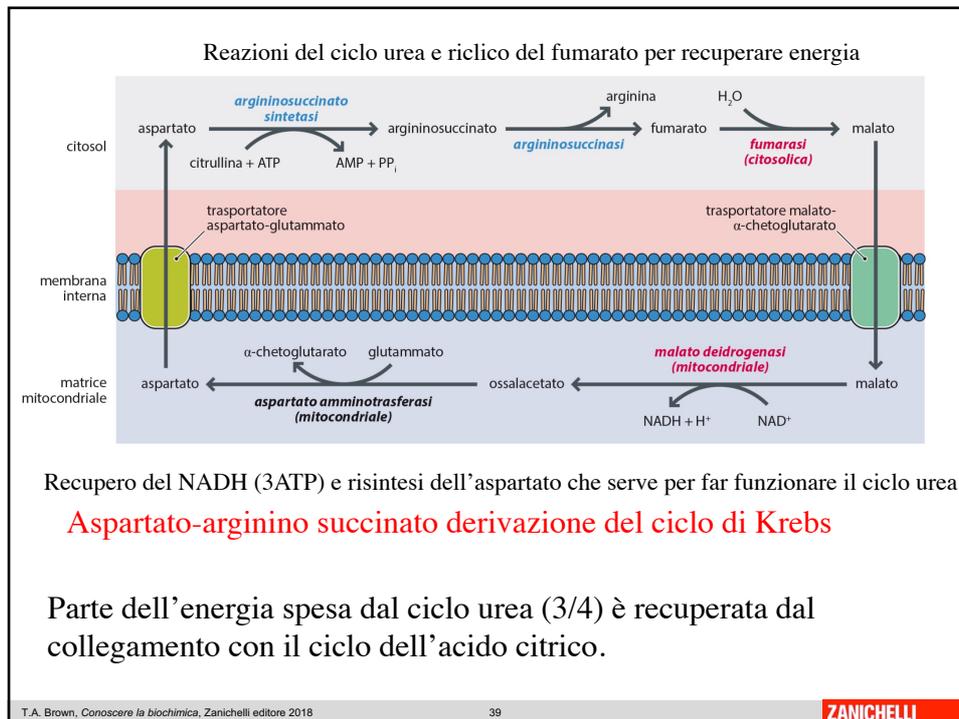


Figura 28.9 Collegamenti tra il ciclo dell'urea e il ciclo dell'acido citrico. L'interconnessione dei due cicli è stata denominata "biciclo di Krebs". Le reazioni che collegano il ciclo dell'acido citrico al ciclo dell'urea sono contrassegnate con il nome di shunt (deviazione) dell'aspartato-argininosuccinato. Esse collegano le vie metaboliche dei gruppi amminici e degli scheletri carboniosi degli amminocidi. In realtà le interconnessioni sono ancora più elaborate di quanto mostrato nella figura. Per esempio, alcune enzimi del ciclo dell'acido citrico, come la fumarasi e la malato deidrogenasi, hanno forme isoenzimatiche citosoliche e mitocondriali. Il fumarato prodotto nel citosol - nel caso dell'urea, nella biosintesi delle purine oppure in qualche altro processo - può essere convertito in malato citosolico e trasportato nei mitocondri per entrare nel ciclo dell'acido citrico. Questi processi sono ulteriormente collegati attraverso lo shunt (navetta) malato-aspartato, un gruppo di reazioni che trasporta gli equivalenti (ossicuri) al mitocondrio. Questi cicli e processi differenti utilizzano un ristretto numero di trasportatori presenti sulla membrana mitocondriale interna.

38



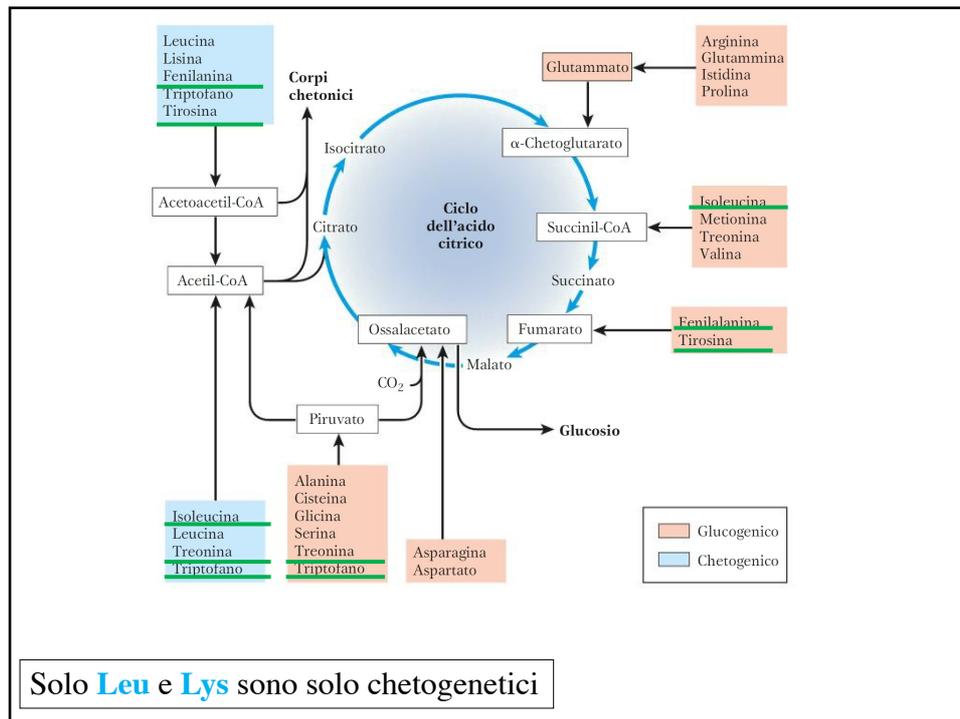
39

REGOLAZIONE CICLO UREA A TEMPI DIVERSI

A tempi lunghi, un cambiamento stabile della dieta, determina una differente sintesi degli enzimi del ciclo urea (es. una dieta a base di proteine fa aumentare la concentrazione degli enzimi del ciclo urea)

Un aumento di arginina a breve segnala la necessità di velocizzare il ciclo urea. Questo si realizza con un aumento dell' N-acetil-gluttammato che è un attivatore della carbamil fosfato sintetasi.

40



41

IN SINTESI

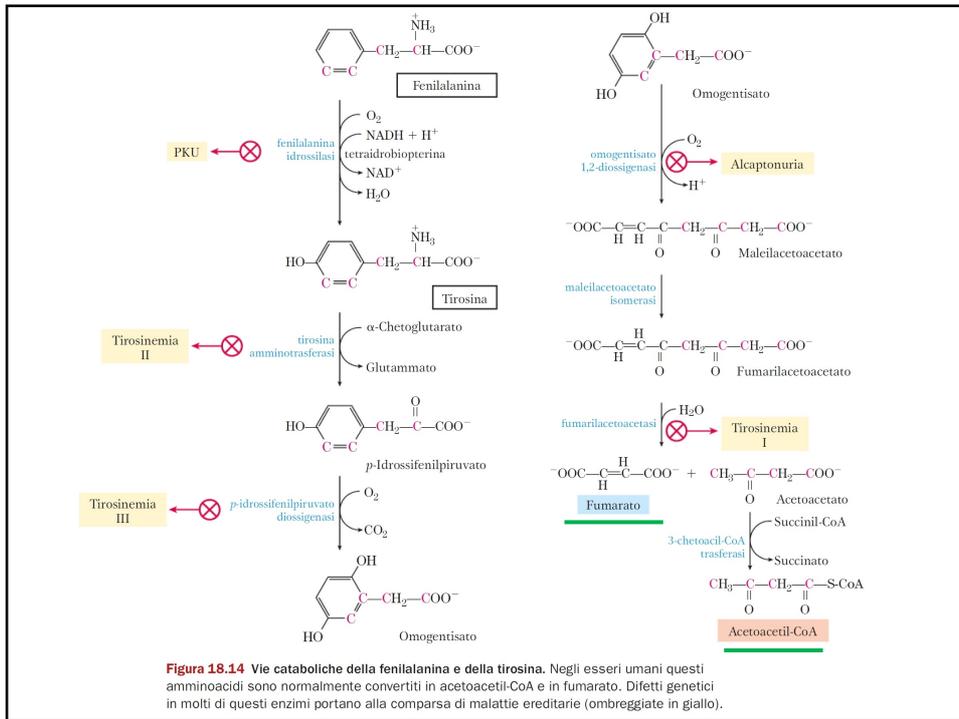
I prodotti di degradazione (in gran parte nel fegato) di tutti gli aminoacidi convergono verso sei prodotti finali: **piruvato**, **ossalacetato**, **α-chetoglutarato**, **succinil-CoA**, **fumarato** e **acetyl-CoA**

Possono produrre **energia** in quanto intermedi del ciclo di Krebs

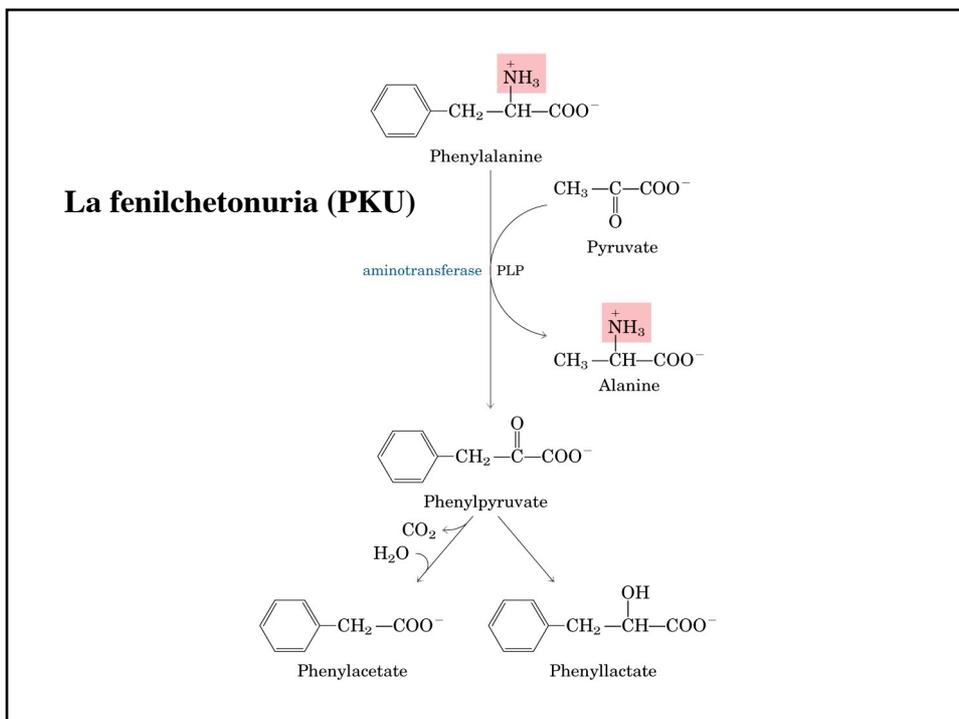
- 1) **Piruvato**, **ossalacetato**, **α-chetoglutarato**, **succinil-CoA**, **fumarato** si possono trasformare in **glucosio** (gluconeogenesi)
- 2) **L'acetyl-CoA** entra nel **krebs** o si trasforma in **corpi chetonici**
- 3) **I corpi chetonici** sono sintetizzati nel fegato (non li utilizza) che li esporta al cervello e cuore. Sono ritrasformati in acetyl-CoA e producono energia mediante Krebs.

Il **cervello** utilizza questa fonte di energia solo in caso di grave carenza di glucidi, il **cuore** li utilizza preferenzialmente al posto del glucosio.

42



43

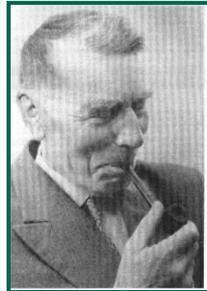


44

The Birth of Newborn Screening

How Did It All Begin?

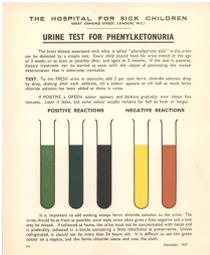
1934
Dr. Asbjorn Folling of Norway discovers PKU,
a rare hereditary disease in newborns in which
the enzyme phenylalanine hydroxylase that
processes the amino acid phenylalanine is
defective or missing, leading to its
accumulation in the child's blood which
damages the infant's developing nervous
system.



Overview of the methods for PKU screening – The Folling-test

- In the **1930s**: Asbjorn Folling: a mother noticed a strange smell of her mentally retarded child's urine → Folling analyzed the urine with various tests including the ferric chloride test (for aromatic hydroxyl groups, such as those in ketones):
 - When ketones are present, urine develops a red-brown colour.
 - This time the urine turned into dark-green.

Folling isolated a substance from the urine which was confirmed to be **phenylpyruvate**.



Phenylketonuria Screening Tests

b. Ferric chloride test:

Take 5 ml of fresh urine sample, add 3-4 drops of ferric chloride solution – phenylpyruvate gives green/blue colour



45

The Birth of Newborn Screening

How Did It All Begin?

INBORN ERRORS OF METABOLISM
 The Croonian Lectures delivered before the Royal College of Physicians of London, in June, 1909
 by
ARCHIBALD E. GARROD
 Lecturer at the Royal College of Physicians, Assistant Physician, and Lecturer in Pathology at St. Bartholomew's Hospital, Physician to the Hospital for Sick Children, Great Ormond Street

"Who will prevent death or disease?"
 Aristotle, *Nicomachean Ethics*, 1.10

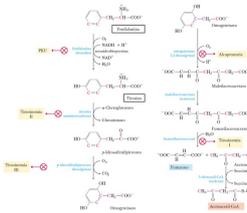
LONDON
 HENRY FROWDE HOODER & STOUTON
 Old Bailey Printing Works 25, WARREN STREET, E.C.4
 1909



Archibald E. Garrod

1909 Archibald Garrod

- Genes control enzymes that catalyze chemical processes in cells
- Inherited diseases "Inborn errors of metabolism" where a person can't make an enzyme
- Alkaptonuria: urine gets dark upon exposure to air, lack of enzyme that oxidizes homogentisic acid





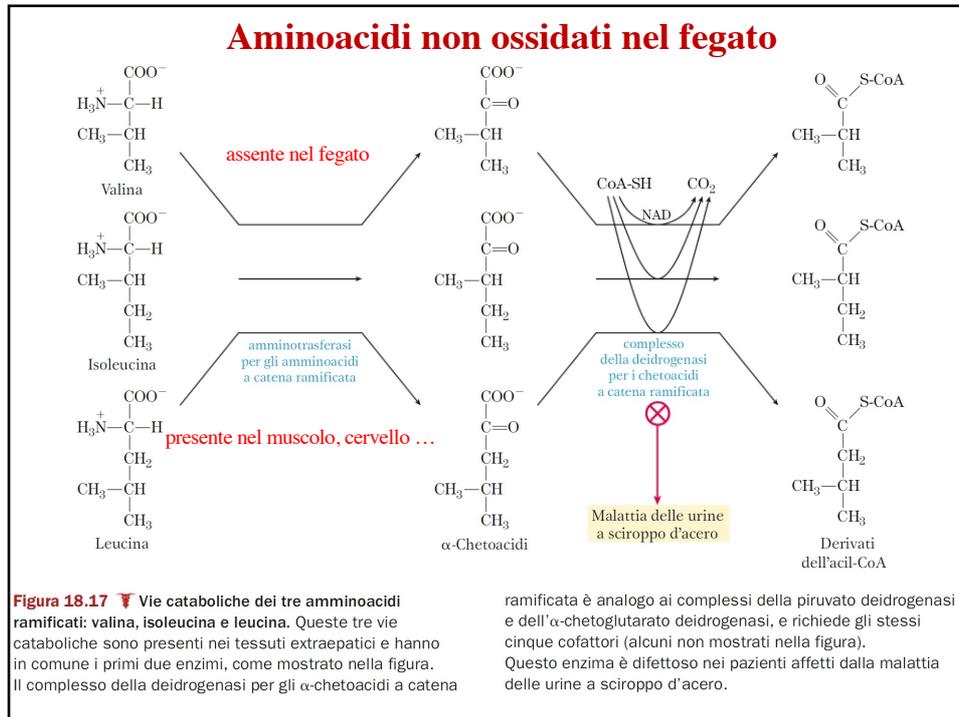
THE INCIDENCE OF ALKAPTONURIA: A STUDY IN CHEMICAL INDIVIDUALITY
 ARCHIBALD E. GARROD

Physician to the Hospital for Sick Children, Great Ormond Street, Demonstrator of Chemical Pathology at St. Bartholomew's Hospital

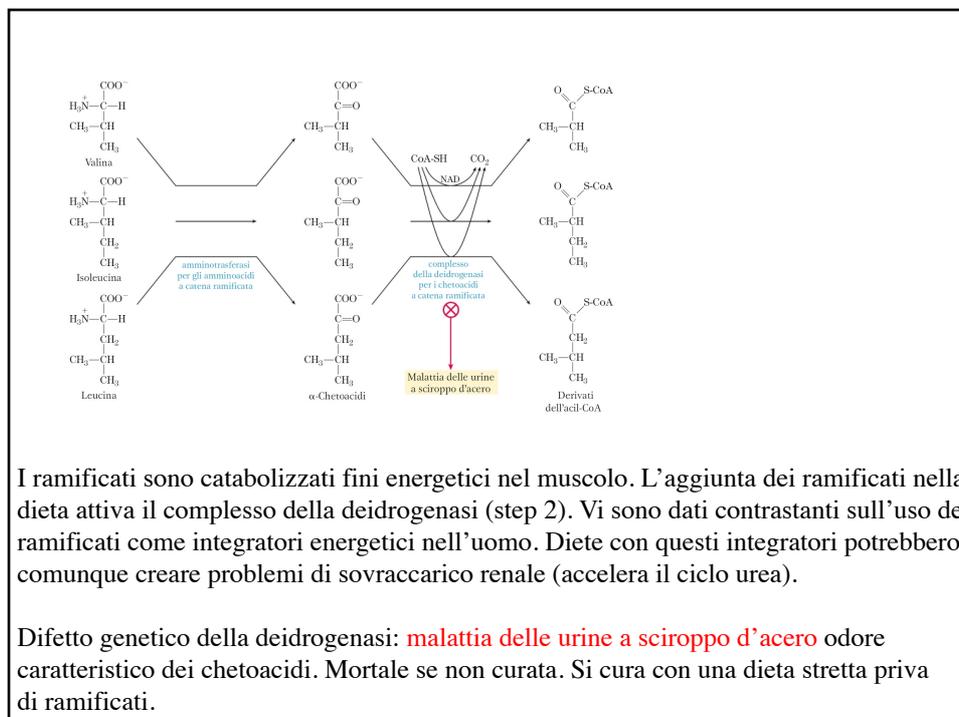
Garrod, Archibald E. 1902. The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality. *Lancet*, vol. ii, pp. 1616-1620.

46

23



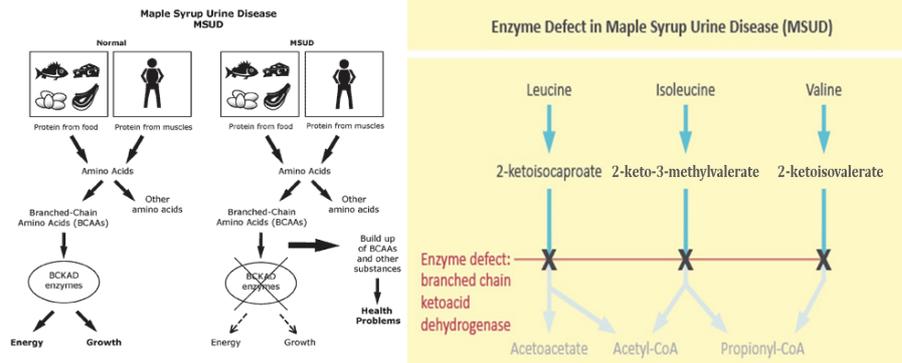
47



48

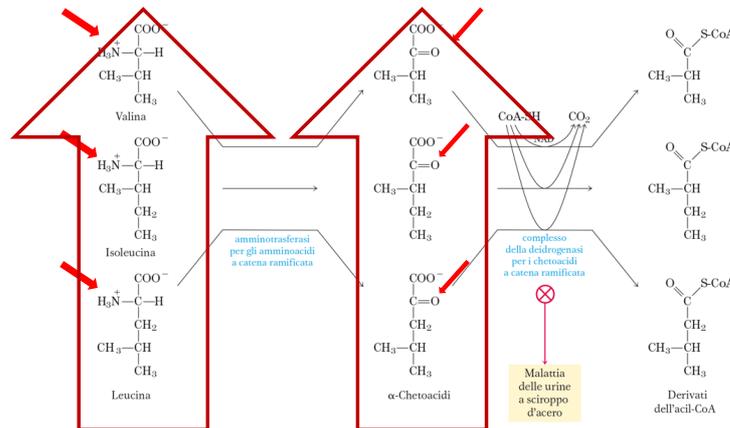
Maple syrup urine disease MSUD

Maple syrup urine disease (MSUD), also known as branched-chain ketoaciduria, is an aminoacidopathy due to an enzyme defect in the catabolic pathway of the branched-chain amino acids leucine, isoleucine, and valine. The result of this metabolic failure is that all three BCAAs, along with their various byproducts, accumulate abnormally throughout the body. The estimated prevalence is around 1/150,000 live births, from published and unpublished newborn screening data.



49

Maple syrup urine disease MSUD: Metabolic Pathway



MSUD is due to mutations in the genes encoding subunits E1a, E1b, and E2 of the **branched chain α-ketoacid dehydrogenase (BCKAD) complex**, involved in the second enzymatic step in the degradation of the branched chain amino acids (BCAAs): leucine, isoleucine and valine. Mutations in these genes lead to the accumulation of BCAAs (especially Leu) and their branched-chain alpha-ketoacids.

50

Attività Fisica e Metabolismo Proteico

Dopo l'attività fisica, nel muscolo aumenta la concentrazione di proteasi ed a fine esercizio, proporzionalmente alla sua intensità, si ha un aumento di Ala e Gln in circolo. Nel fegato tali AA possono contribuire alla sintesi di glucosio e partecipare così alla resa energetica complessiva. È quindi importante assumere glucidi prima dell'esercizio fisico così da ridurre la proteolisi muscolare.

Nell'esercizio muscolare nell'allenamento di resistenza, il muscolo stimola il metabolismo aerobico a carico di acidi grassi e carboidrati, aumentando la capacità di incorporare BCAA, i cui scheletri carboniosi possono essere ossidati e usati come substrato energetico. Sia nell'esercizio di potenza come anche in quello di resistenza gli AA partecipano al bilancio energetico nei muscoli. Nell'attività fisica si stimola l'ossidazione di BCAA, degradati per ottenere energia (*l'assunzione di BCAA prima dell'allenamento riduce la proteolisi muscolare e la sensazione di affaticamento*).

Nel periodo di recupero si ha una fase di sintesi proteica, forse la via metabolica più rappresentata nel muscolo, ma non è chiaro se una dieta iperproteica possa facilitare i processi di sintesi delle strutture muscolari danneggiate dall'attività contrattile.

51

table 18-1

Nonessential and Essential Amino Acids for Humans and the Albino Rat

Nonessential	Essential
Alanine	Arginine*
Asparagine	Histidine
Aspartate	Isoleucine
Cysteine	Leucine
Glutamate	Lysine
Glutamine	Methionine
Glycine	Phenylalanine
Proline	Threonine
Serine	Tryptophan
Tyrosine	Valine

*Essential in young, growing animals but not in adults.

52

Origine degli aminoacidi non-essenziali	
Aminoacido	Origine metabolica
alanina	dal piruvato per transaminazione
acido aspartico, asparagina, arginina, acido glutamico, glutamina, prolina	dagli intermedi del ciclo dell'acido citrico
serina	dal 3-fosfoglicerato (glicolisi)
glicina	dalla serina
cisteina*	dalla serina; richiede zolfo derivato dalla metionina
tirosina*	derivata dalla fenilalanina per idrossilazione

53

Gli aminoacidi essenziali		
Mnemonico	Aminoacido*	Note o commenti
P	fenilalanina	deve esser presente nella dieta anche come precursore della tirosina
V	valina	uno dei tre aminoacidi a catena laterale ramificata
T	treonina	metabolizzata come un aminoacido a catena laterale ramificata
T	triptofano	la sua catena laterale eterociclica complessa non viene sintetizzata nell'uomo
I	isoleucina	uno dei tre aminoacidi a catena laterale ramificata
M	metionina	fornisce lo zolfo per la cisteina e interviene nel metabolismo come donatore di metili; l'omocisteina viene riciclata
H	istidina	la sua catena laterale eterociclica non viene sintetizzata nell'uomo
A	arginina	anche se l'arginina può derivare dall'ornitina nel ciclo dell'urea in quantità sufficiente al fabbisogno di un adulto, gli animali in crescita la richiedono nella dieta
L	leucina	un aminoacido chetogenico puro. Uno dei tre aminoacidi a catena laterale ramificata
L	lisina	nessuno dei gruppi amminici della lisina può subire transaminazione

54