

*L'insulina blocca l'espressione della **PEPcarbossichinasi** tramite fosforilazione di FOXO1 da parte di PKB oppure tramite una via iniziata dalla PPP1, oppure in una via attivata dalle MAPchinasi? E agisce nello stesso modo anche per inibire l'espressione degli altri geni CRE (es: lipasi OS)?*

La regolazione della PEP carbossichinasi è piuttosto complessa. È regolata da segnali derivanti sia dalla dieta (livelli di carboidrati) sia ormonali (cAMP, glucocorticoidi, insulina). Quindi, oltre ad aumentare i livelli di insulina, elevati livelli di glucosio agiscono indipendentemente per sopprimere la trascrizione del gene per l'enzima citosolico. La regolazione dipende dalla presenza di almeno una dozzina di siti regolatori a monte del gene (vedi Stryer pag. 428), la cui attività varia a seconda del tessuto e dello stadio di crescita. Fra questi ci sono siti CRE (cAMP response element per la regolazione induttiva da parte di cAMP, GRE per glucocorticoidi e IRE (Insuline response element)). Per quanto riguarda l'insulina, la via regolatoria è complessa (come solito per l'ormone), e dominante, in quanto sopprime gli effetti di cAMP e glucocorticoidi. Non è ben definito come avvenga la regolazione ma è implicata anche la proteina FOXO1. Questa lega al sito IRE e 'stimola' l'espressione del gene. La cascata innescata dall'insulina porta all'attivazione della chinasi Akt (nota anche come PKB), che fosforila FOXO e ne causa la rimozione. Quindi cessa l'attivazione del gene. Altri fattori però concorrono nella repressione. L'espressione della lipasi è diversamente regolata.

*- La **piruvato chinasi** è regolata per fosforilazione solo nel fegato o anche nel tessuto adiposo (quindi dove giunge il segnale del glucagone)?*

Come al solito nella biochimica la risposta non è semplice. L'isoforma L della Chinasi nel fegato è regolata dalla PKA cAMP dipendente. Quella M1 nel muscolo e cervello è costitutivamente attiva e non è regolata. Quella presente nella maggior parte delle cellule è la isoforma M2, prodotto di splicing alternativo dello stesso gene che codifica anche per M1. A differenza dell'isoforma M1, quella M2 è regolata in maniera complessa. Lo scopo è di dirigere alternativamente la glicolisi a produrre piruvato a scopi bioenergetici (ATP), o ad intermedi per la biosintesi di trigliceridi (Glicerolo, NADPH). Per rispondere direttamente alla sua domanda, il glucagone non sembra avere un ruolo importante nella regolazione. Piuttosto, sembra rispondere direttamente al carico energetico ed in particolare i livelli di AMP.

*- La proteina adattatrice **IRS1** è coinvolta sia nell'interazione della PI3K che della Grb2 (via delle map chinasi) nell'interazione con i domini fosforilati del recettore tirosin-chinasico?*

Se questa proteina adattatrice lega a siti fosforilati nel recettore attivato, e sua volta viene fosforilata in diversi siti, e poi partecipa nell'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale, incluse quelle PI3K/Akt e Map K. Attenzione però, Grb2 è un'altra proteina adattatrice che agisce tramite un altro recettore e partecipa in una via di trasduzione che opera mediante RAS.

*- La fosforilazione della **PFK2** nel muscolo (stimolata dal segnale dell'adrenalina) porta ad un aumento della sua attività (ovvero: sarebbe già attiva nella forma non fosforilata, ma non ancora al massimo dell'efficienza) oppure determina proprio la sua attivazione (switch da inattivo ad attivo)?*

Raramente nella regolazione degli enzimi si hanno effetti "all-or-nothing". Questo vale anche per enzimi monofunzionali, dove piuttosto che "On-Off" si hanno effetti "Less-More". Nel caso della PFK2, questa fa parte di un enzima bifunzionale con la fruttosio-2,6-bisfosfatasi (FBPase). La fosforilazione riduce l'attività chinasi nel fegato, contemporaneamente attivando l'attività fosfatasi, e vice versa nel muscolo. Però si tratta di un'alterazione del bilancio fra fosforilazione/defosforilazione, piuttosto che solo una o l'altra attività. Si deve

anche considerare che oltre alla regolazione (e già il termine indica un controllo graduale) per fosforilazione vi è anche quella allosterica.

- La **fruttosio-1,6-bisfosfatasi** può essere regolata mediante fosforilazione? Parlandone in modo specifico, in classe ci siamo soffermati sui suoi controlli allosterici. Nei miei appunti e nelle slide, però, in alcuni punti ho trovato scritto che viene controllata mediante fosforilazione (es: modulo 12 slide 18). Ho pensato che potesse trattarsi di un errore e che si stesse parlando della fosforilazione dell'enzima di controllo fruttosio-2,6-bisfosfatasi che indirettamente porterà ad un aumento dell'attività del F16BPase...

Sì, si tratta di un errore nella slide 17 del modulo 12. Dovrebbe leggere F-2,6-BP. La ringrazio per avermelo indicato.

- Parlando della sintesi dei trigliceridi, abbiamo detto che il glicerolo-3-P si può ottenere da varie fonti a seconda del tessuto. Tra le varie possibilità, abbiamo detto che potrebbe derivare dal piruvato. Per fare questo dovranno essere attive le prime reazioni della gluconeogenesi?

In effetti, oltre al fegato e al rene, un basso livello di espressione della PEP carbossichinasi è anche stato rilevato in tessuti non-gluconeogenici quali i tessuti adiposi bianco e bruno, e si pensa che sia necessario per la biosintesi di glicerolo quando sono scarsi i livelli di glucosio.

- L'inibizione della PPP1 per segnale da parte della PKA/CamK è data per fosforilazione della PPP1 e poi legame con una proteina inibitrice, oppure per fosforilazione della proteina inibitrice che poi sarà riconosciuta dalla PPP1?

Per fosforilazione della proteina regolatrice, ma anche qui il meccanismo è un po' più complesso. PKA può anche fosforilare una regione non catalitica della PPP1 che media l'interazione con il glicogeno, e la fa staccare da questo, portando ad una notevole diminuzione dell'attività fosfatasi. Inoltre, attiva la proteina inibitrice che lega alla subunità catalitica, diminuendo ulteriormente l'attività

- Le vorrei fare la seguente domanda di teoria: se i vari NTP sono equivalenti energeticamente all'ATP, perché in alcune reazioni, come nel caso del ciclo dell'acido citrico, si ottiene GTP (e non direttamente ATP)?

ATP e GTP sono equivalenti poiché ci sono le nucleoside difosfato chinasi che trasferiscono gruppi fosfato da GTP ad ADP per formare ATP e vice versa. Inoltre, studi recenti hanno constatato che negli animali ci sono due isoforme della Succinato CoA sintetasi o tiochinasi. Una forma GTP, l'altra direttamente ATP.

Quali di queste isoforme è più attiva dipende dai fabbisogni energetici della particolare cellula. Quelle muscolari favoriscono l'isoforma ATP, quelle epatiche quella GTP.

Può trovare ulteriori informazioni a p.660 dei Principi della Biochimica di Lehninger (testo grande)

- Vorrei informazioni sul colorante D&C red 27, indicato anche con il nome di Phloxine O. Viene utilizzato per creare i cosiddetti "rossetti magici" in cosmetica, ovvero quei rossetti che a contatto con la pelle passano da un colore neutro ad un rosa brillante fluorescente. Ho visto che deriva dalla fluoresceina e che si utilizza spesso come colorante in biochimica per visualizzare le cellule batteriche. Sto cercando di comprendere come sia possibile che in un ambiente anidro la sostanza non presenti alcuna colorazione, mentre invece a contatto con un'ambiente acquoso o umido, come la superficie delle labbra, prenda una colorazione addirittura fluorescente. Su internet ho trovato alcune informazioni che indicano che il cambiamento nel colore della sostanza sia dipendente dal pH dell'ambiente circostante. Il cambiamento di colore può derivare dal pH della pelle?

- 1) Una domanda interessante. Se si tratta di un derivato della fluoresceina, confermo che questi sono utilizzati in biochimica, e anche che la fluorescenza è sensibile al pH. Infatti sono utilizzati per seguire processi di endocitosi, poiché gli endosomi veicolano il materiale internalizzato verso i lisosomi che hanno lumen piuttosto acidi. Per avere più informazioni consulterò la dott.ssa Pacor, che è più esperta di me sui cromofori e fluorofori utilizzati nello studio delle cellule.
- 2) La dott.ssa Pacor mi ha fornito alcune informazioni ulteriori sulla filossina. Questa classe di coloranti ha una fluorescenza che dipende dal pH ma oltre a questo subisce un forte aumento della fluorescenza quando si lega a proteine. Infatti la filossina B è suggerita come marker per le proteine in fluidi biologici. Per quanto riguarda l'utilizzo nei rossetti, la filossina O forse diventa fluorescente quando entra a contatto con le proteine nella cute o mucose.

- Da ciò che sono riuscita a comprendere, con il termine liponeogenesi si indica il processo biosintetico con cui vengono prodotti TAG a partire da precursori non lipidici. Comprenderebbe quindi sia la sintesi di acidi grassi a partire da Acetil-CoA (quindi utilizzo di citrato liasi e Acetil-CoA carbossilasi), che anche successivamente la sintesi di TAG legando il prodotto al glicerolo 3P. Non comprendo invece se ci sia differenza tra liponeogenesi e lipogenesi; se siano termini diversi per identificare lo stesso processo oppure se indichino due processi distinti.

Il termine liponeogenesi è utilizzato in italiano ma poco utilizzato in inglese dove si utilizza semplicemente il termine lipogenesi. Liponeogenesi serve per distinguere la sintesi di grassi a partire da acetile o suoi precursori (carboidrati, amminoacidi, ecc.) da quella a partire da acidi grassi assunti con la dieta. A questo scopo in inglese si usa anche *de novo lipogenesis* DNL.

- Premesso questo, nelle slides del modulo 11 relativo all'anabolismo lipidico è indicato che "la liponeogenesi ha luogo soprattutto nel fegato, nel rene, nelle surreni, nel cervello e nella ghiandola mammaria. Nel tessuto adiposo i TAG sono formati usando AG inviati dal fegato o di origine esogena. Nella slide 4 del modulo 14 invece, relativo al metabolismo del tessuto adiposo, è indicato che in seguito al segnale dell'insulina negli adipociti avviene la sintesi degli acidi grassi endogeni. Quindi anche nel tessuto adiposo avviene la liponeogenesi, o avviene solamente la biosintesi dei TAG?"

Sì, sembrerebbe una contraddizione. Sia il fegato che il tessuto adiposo sono ben adattati alla DNL (come indicato nel Modulo 14, slide 4), anche se la gran parte degli AG per gli adipociti provengono da fonti esogene (come indicato nel modulo 11). Anzi, si considera la DNL da parte del tessuto adiposo come più “benefica” rispetto a quella epatica, in quanto non comporta la messa in circolo di grassi (trasporto fegato – adipociti), migliora la sensibilità all’insulina e anche la tolleranza al glucosio. Tant’è che strategie per ridurre il DNL epatico a favore di quello negli adipociti sono considerate interessanti dal punto di vista terapeutico.