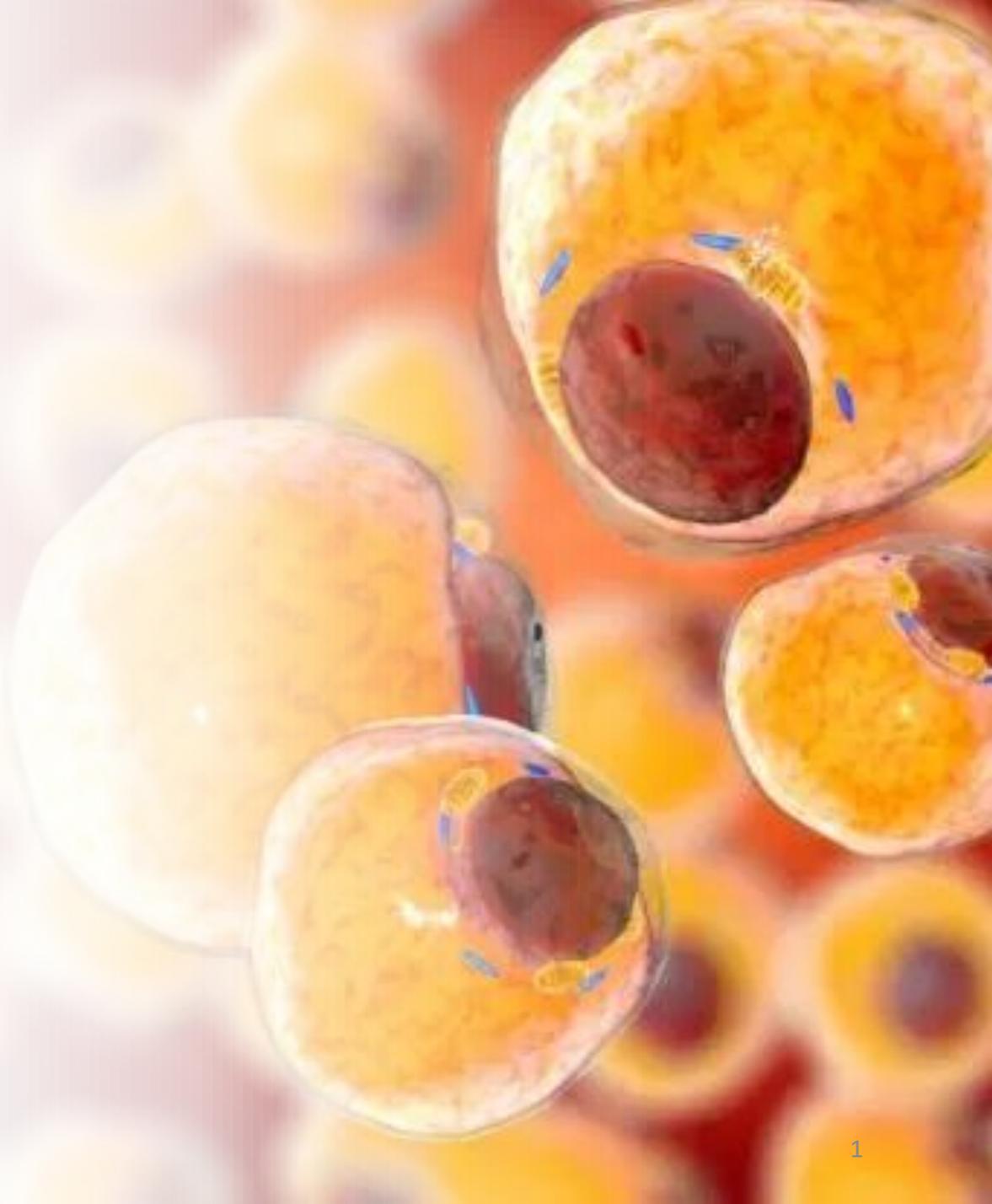




Metabolismo dei lipidi

I lipidi sono coinvolti nella
produzione e nella
conservazione dell'energia



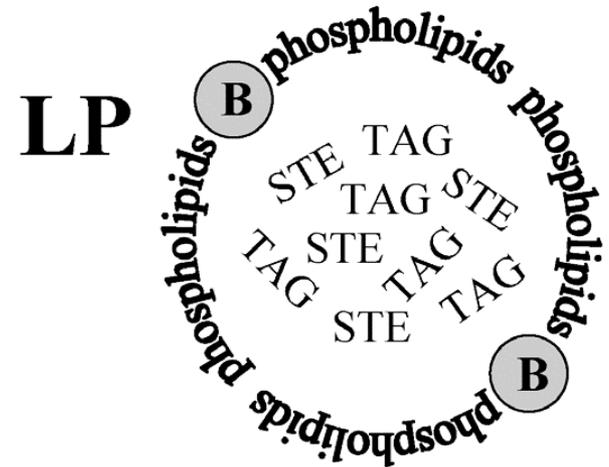
Particelle lipidiche nei lieviti:

Una volta che i TAG e gli STE sono sintetizzati si accumulano in organelli noti come particelle lipidiche.

Queste particelle sono caratterizzate da una struttura semplice costituita da un nucleo altamente idrofobico di lipidi neutri circondato da un monostrato fosfolipidico con una piccola quantità di proteine incorporate (enzimi delle vie metaboliche dei lipidi).

Il rapporto tra TAG e STE è di circa 1:1

Nel *S. cerevisiae* il 70% del contenuto lipidico totale della cellula si accumula nelle goccioline lipidiche all'inizio della fase stazionaria. Questi organelli sono importanti per la biosintesi, il metabolismo, la degradazione e il traffico dei lipidi all'interno della cellula.



A, proteina di transmembrana; B, proteina senza il dominio di transmembrana; ER, reticolo endoplasmatico; LP, particella lipidica; TAG, trigliceridi; STE, steroli sterificati

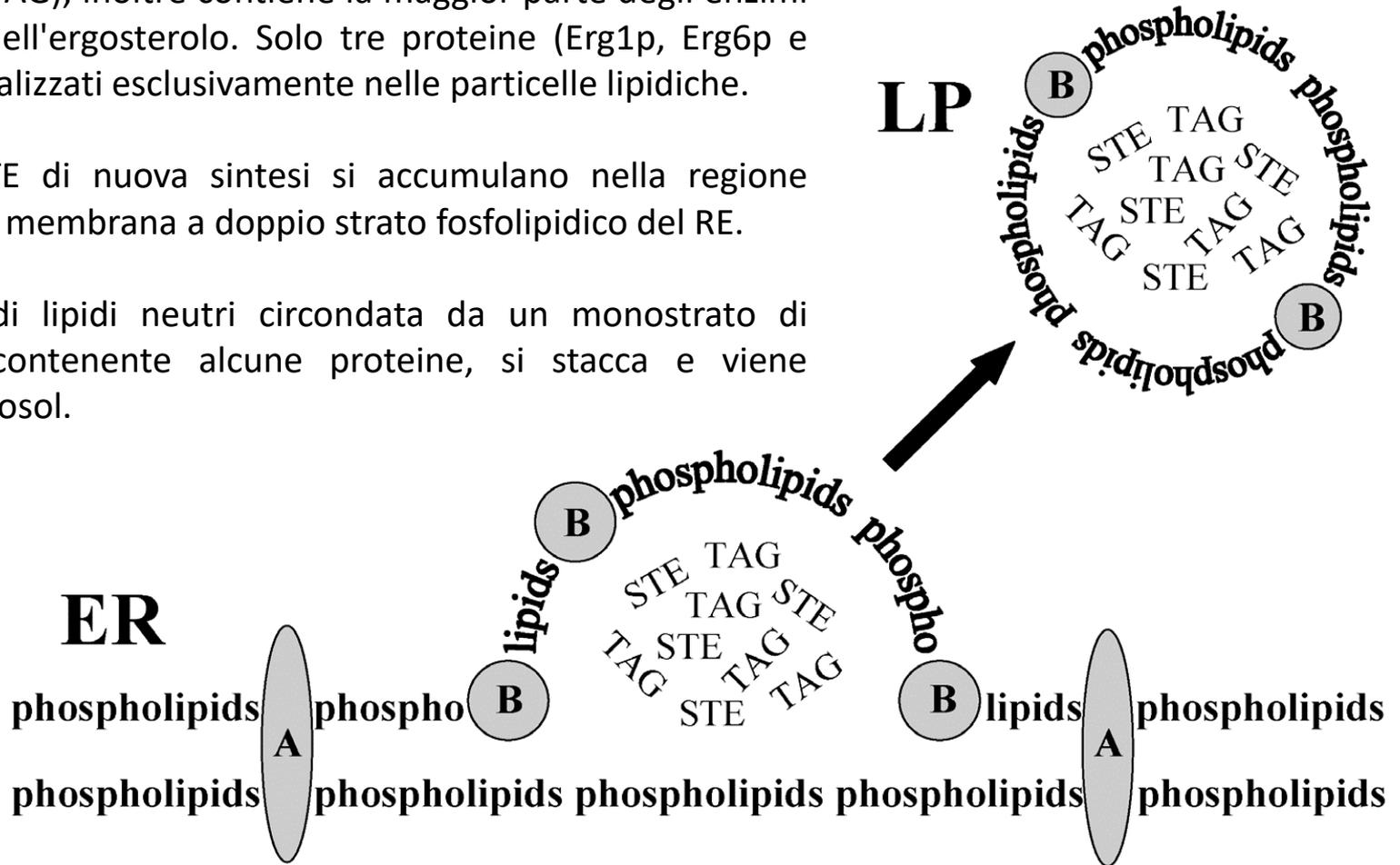
H. Müllner and G. Daum, Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochimica Polonia*. Vol. 51 No. 2/2004 323–347

Sintesi delle goccioline lipidiche nel lievito e interazione con il RE:

La regione della membrana contenente alcune delle proteine del metabolismo lipidico (senza domini transmembrana, nel grafico B) possono essere incorporate nelle particelle lipidiche nascenti. Il RE contiene tutti gli enzimi che sintetizzano per i TAG (sito principale di sintesi degli TAG), inoltre contiene la maggior parte degli enzimi per la sintesi dell'ergosterolo. Solo tre proteine (Erg1p, Erg6p e Erg7p) sono localizzati esclusivamente nelle particelle lipidiche.

I TAG e gli STE di nuova sintesi si accumulano nella regione idrofobica della membrana a doppio strato fosfolipidico del RE.

La gocciolina di lipidi neutri circondata da un monostrato di fosfolipide e contenente alcune proteine, si stacca e viene rilasciata nel citosol.



Particelle lipidiche nei lieviti

- Tutte le proteine identificate nelle particelle lipidiche e nel RE sono enzimi delle vie metaboliche dei lipidi.
- Il RE contiene tutti gli enzimi che sintetizzano per i TAG e gli enzimi di sintesi dell'ergosterolo, solo tre di questi enzimi sono localizzati nelle particelle lipidiche.
- Un altro ruolo delle particelle lipidiche è il trasporto dell'ergosterolo alla membrana plasmatica.
- Le particelle lipidiche del lievito possono svolgere un ruolo regolatorio nell'omeostasi degli steroli attraverso un meccanismo di esterificazione/idrolisi.



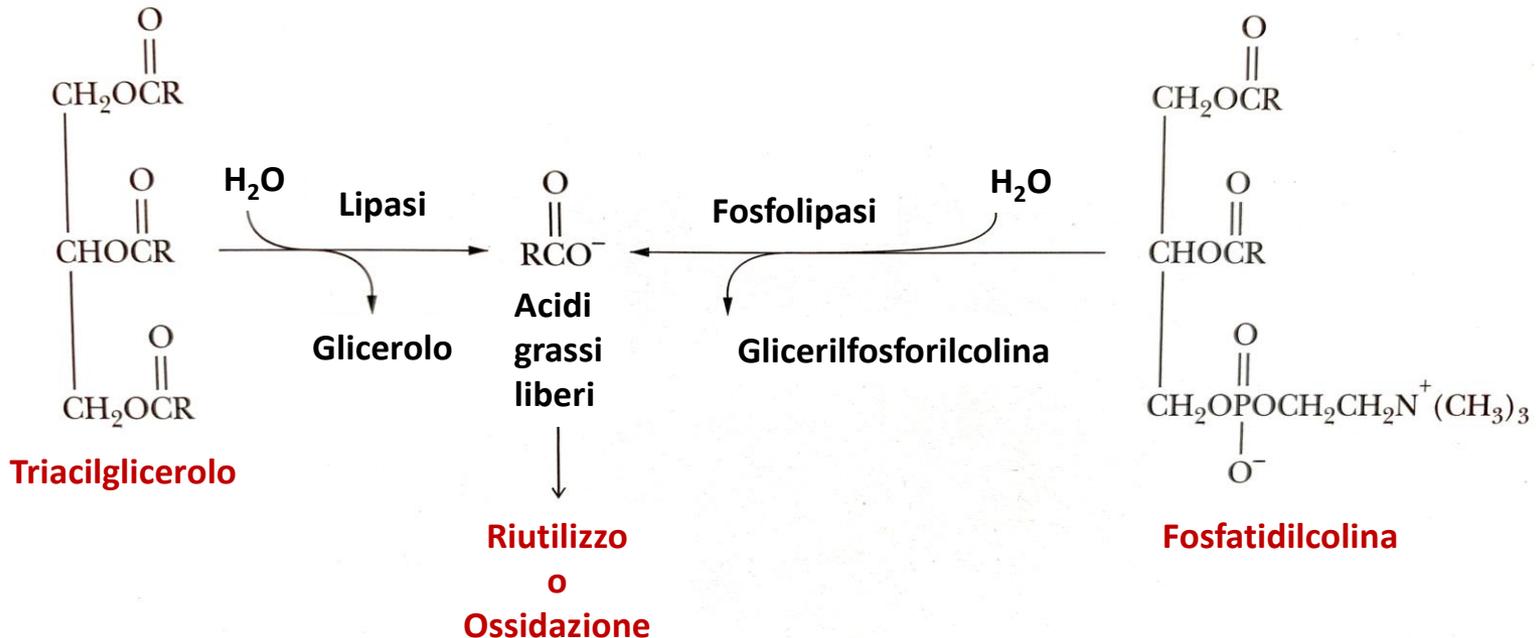
Catabolismo degli acidi grassi



Il catabolismo dei lipidi

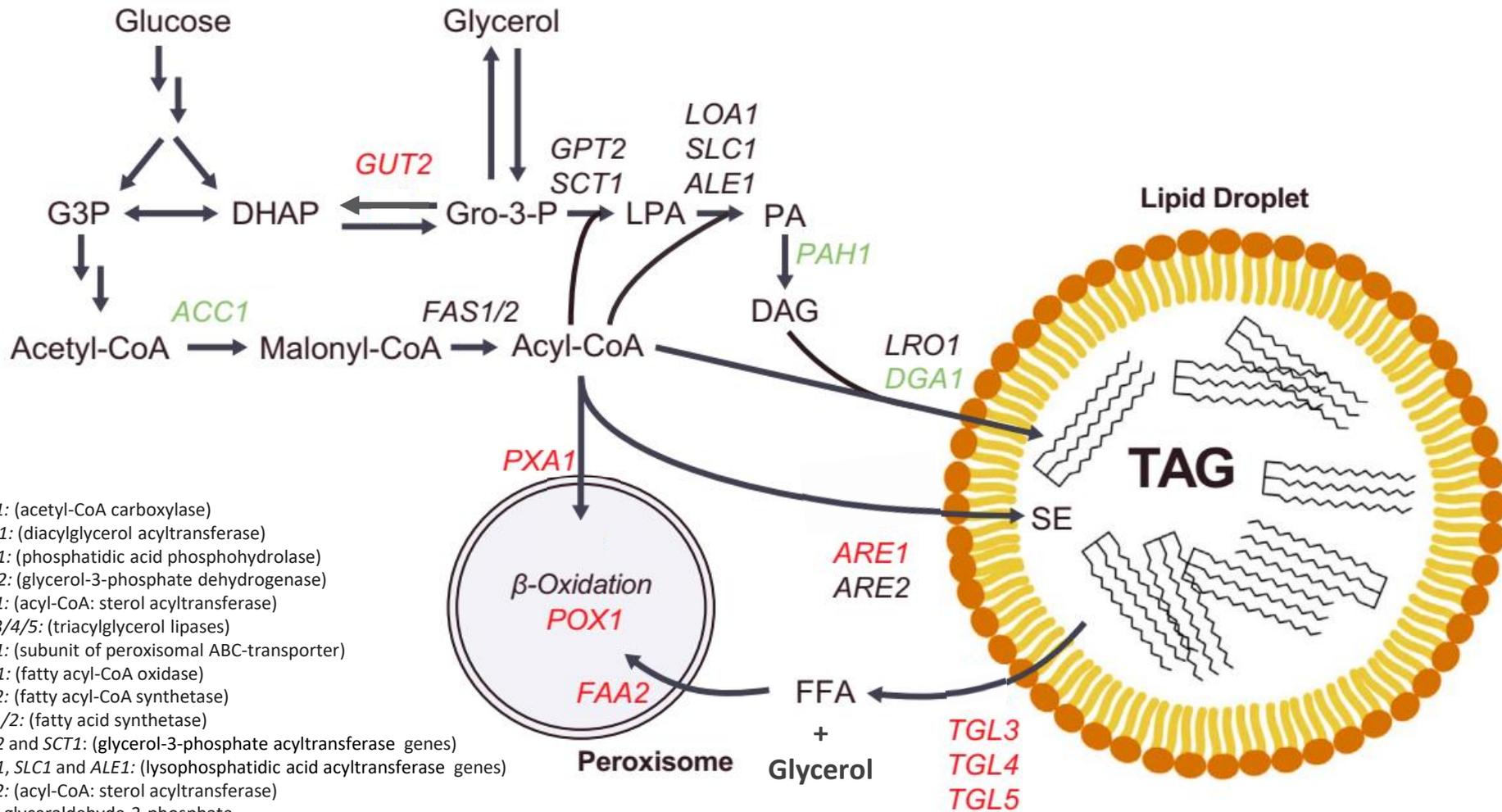
I triacilgliceroli sono la principale forma di deposito dell'energia chimica dei lipidi e di fosfoacilgliceroli che sono componenti importanti nelle membrane biologiche.

In entrambi i tipi di composti, il legame tra l'acido grasso e il resto della molecola può essere idrolizzato.



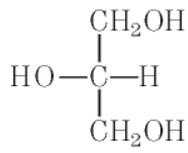
La reazione è catalizzata dalle lipasi nel caso dei triacilgliceroli e dalle fosfolipasi nel caso dei fosfoacilgliceroli

Il *S. cerevisiae* ha tre TAG lipasi, (Tgl3, Tgl4 e Tgl5) responsabili della lisi dei TAG

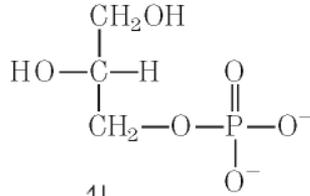


- ACC1: (acetyl-CoA carboxylase)
- DGA1: (diacylglycerol acyltransferase)
- PAH1: (phosphatidic acid phosphohydrolase)
- GUT2: (glycerol-3-phosphate dehydrogenase)
- ARE1: (acyl-CoA: sterol acyltransferase)
- TGL3/4/5: (triacylglycerol lipases)
- PXA1: (subunit of peroxisomal ABC-transporter)
- POX1: (fatty acyl-CoA oxidase)
- FAA2: (fatty acyl-CoA synthetase)
- FAS1/2: (fatty acid synthetase)
- GPT2 and SCT1: (glycerol-3-phosphate acyltransferase genes)
- LOA1, SLC1 and ALE1: (lysophosphatidic acid acyltransferase genes)
- ARE2: (acyl-CoA: sterol acyltransferase)
- G3P: glyceraldehyde-3-phosphate
- DHAP: dihydroxyacetone phosphate
- Gro-3-P: glycerol-3-phosphate
- LPA: Lysophosphatidic acid
- PA: Phosphatidic acid
- DAG: diacylglycerol
- SE: sterol ester
- TAG: triacylglycerol
- FFA: free fatty acid

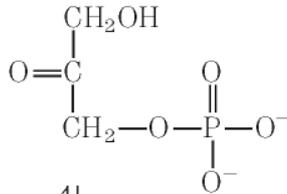
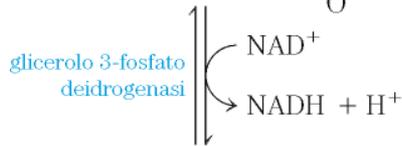
Modificato da: Ferreira et al., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols. *Metabolic Engineering Communications* 6 (2018) 22–27



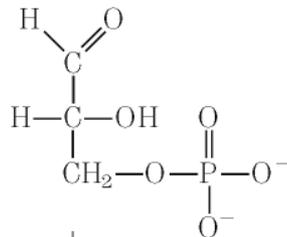
Glicerolo



L-Glicerolo 3-fosfato



Diidrossiacetone fosfato



D-Gliceraldeide 3-fosfato

Glicolisi

La via di ingresso nella glicolisi del glicerolo prodotto dalla demolizione dei triacilgliceroli

Il glicerolo rilasciato dalla lipasi viene fosforilato dalla glicerolo chinasi e il glicerolo 3 fosfato così prodotto viene ossidato a diidrossiacetone fosfato.

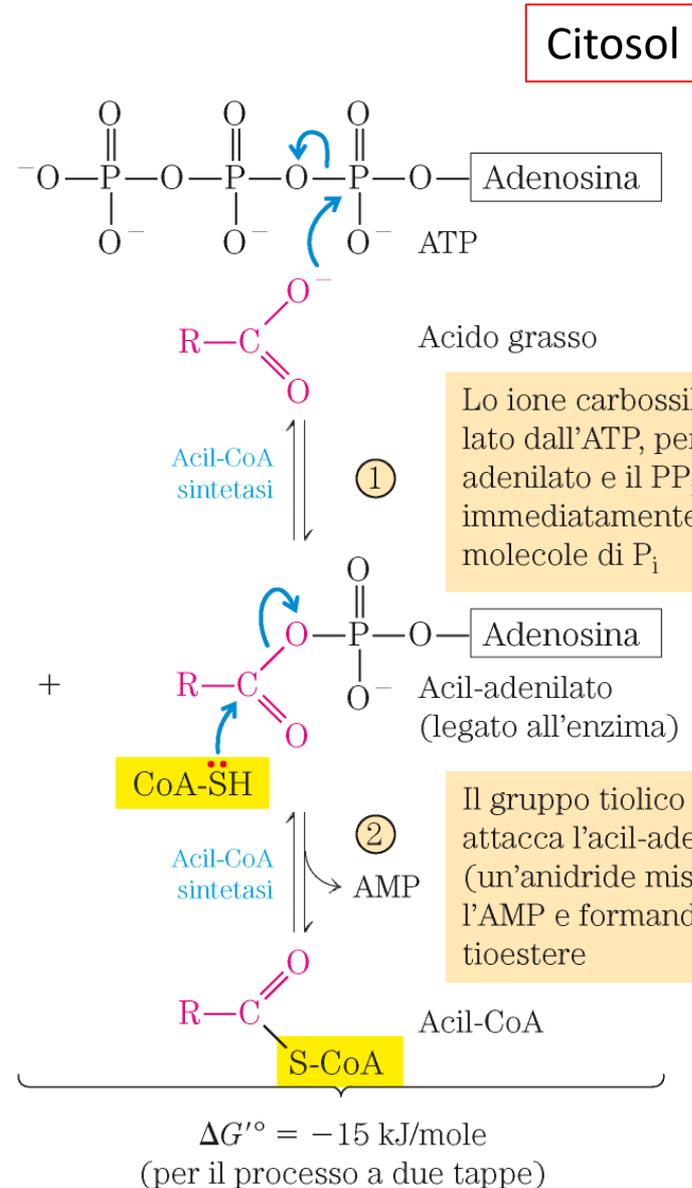
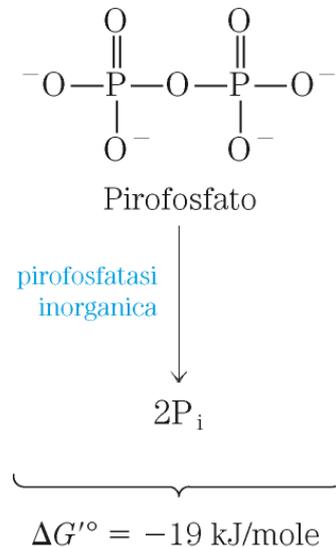
L'enzima glicolitico triosio fosfato isomerasi converte questo composto in gliceraldeide 3 fosfato che entra nella via glicolitica.

Trasporto degli acidi grassi nei perossisomi: attivazione nel metabolismo lipidico

Conversione di un acido grasso in acetil-CoA è catalizzata dalla acil-CoA sintetasi e dalla pirofosfatasi inorganica. L'attivazione avviene in due stadi ed è una reazione esoergonica.

L'attivazione nel metabolismo lipidico prevede la formazione di un legame tioestereo tra il gruppo carbossilico dell'acido grasso ed il gruppo tiolico del coenzima A (CoA-SH)

Il PP_i è idrolizzato a 2 P_i , l'idrolisi di due legami fosfato ad alta energia fornisce l'energia per l'attivazione dell'acido grasso ed è equivalente a 2 ATP



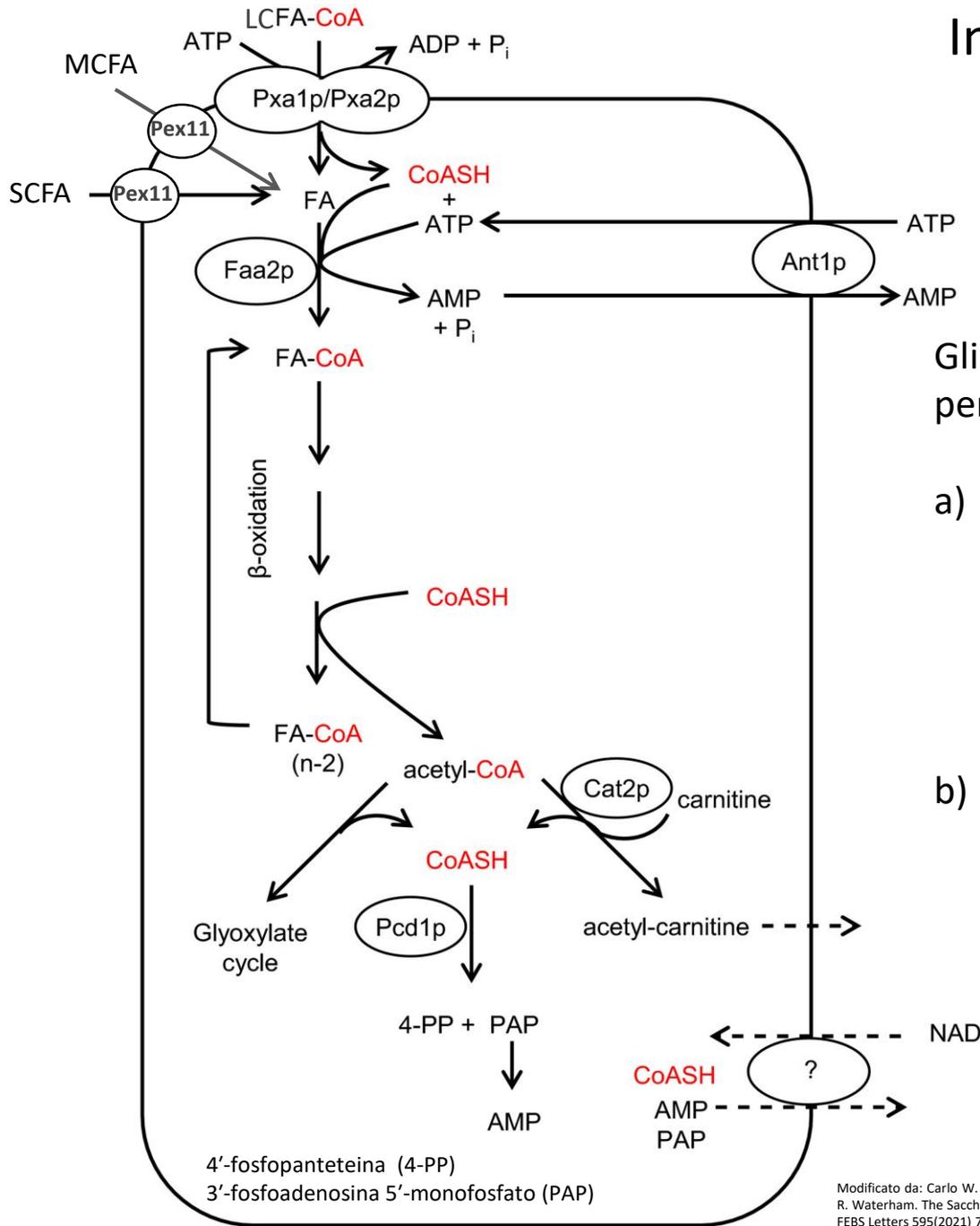
Lo ione carbossilato viene adenilato dall'ATP, per formare un acil-adenilato e il PP_i . Il PP_i viene immediatamente idrolizzato a due molecole di P_i

Il gruppo tiolico del coenzima A attacca l'acil-adenilato (un'anidride mista), spiazzando l'AMP e formando l'acil-CoA, un tioestere

Ingresso degli acidi grassi nei perossisomi del *Saccharomyces cerevisiae*

Gli acidi grassi vengono importati nel perossisoma attraverso due percorsi:

- Il trasportatore Pxa1p/Pxa2p con attività tioesterasica che scinde il CoA dall'acido grasso e lo rilascia nel lume del perossisoma. Gli acidi grassi a catena media vengono trasportati tramite la proteina Pex11.
- Gli acidi grassi liberi vengono importati indipendentemente dal trasportatore Pxa1/2p e gli esteri di CoA si formano nel perossisoma tramite l'azione dell'acil-CoA sintetasi (Faa2p).



SCFA= acido grasso a catene corta
 MCFA= acido grasso a catena media
 LCFA= acido grasso a catena lunga

La β -ossidazione degli acidi grassi

Prima fase

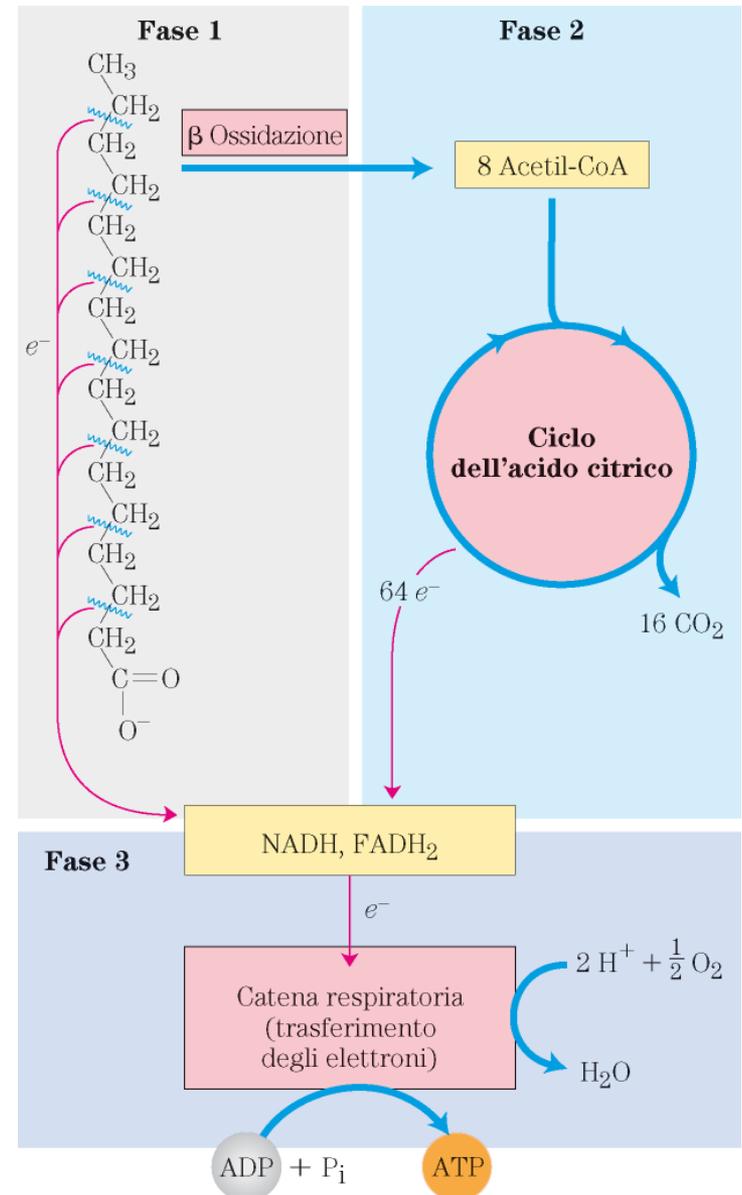
Gli acidi grassi vanno incontro al distacco ossidativo di unità bicarboniose nella forma di acetil-CoA, iniziando dall'estremità carbossilica della catena idrocarburica.

Seconda fase

L'unità acetilica dell'acetil-CoA viene ossidata a CO_2 nel ciclo dell'acido citrico localizzato nella matrice dei mitocondri, le prime fasi della β -ossidazione degli acidi grassi riducono i trasportatori di elettroni NAD^+ e FAD^+ a NADH e FADH_2

Terza fase

I coenzimi donano alla catena respiratoria dei mitocondri gli elettroni che hanno ricevuto; attraverso questa via gli elettroni arrivano all' O_2 con la concomitante fosforilazione di ADP in ATP.



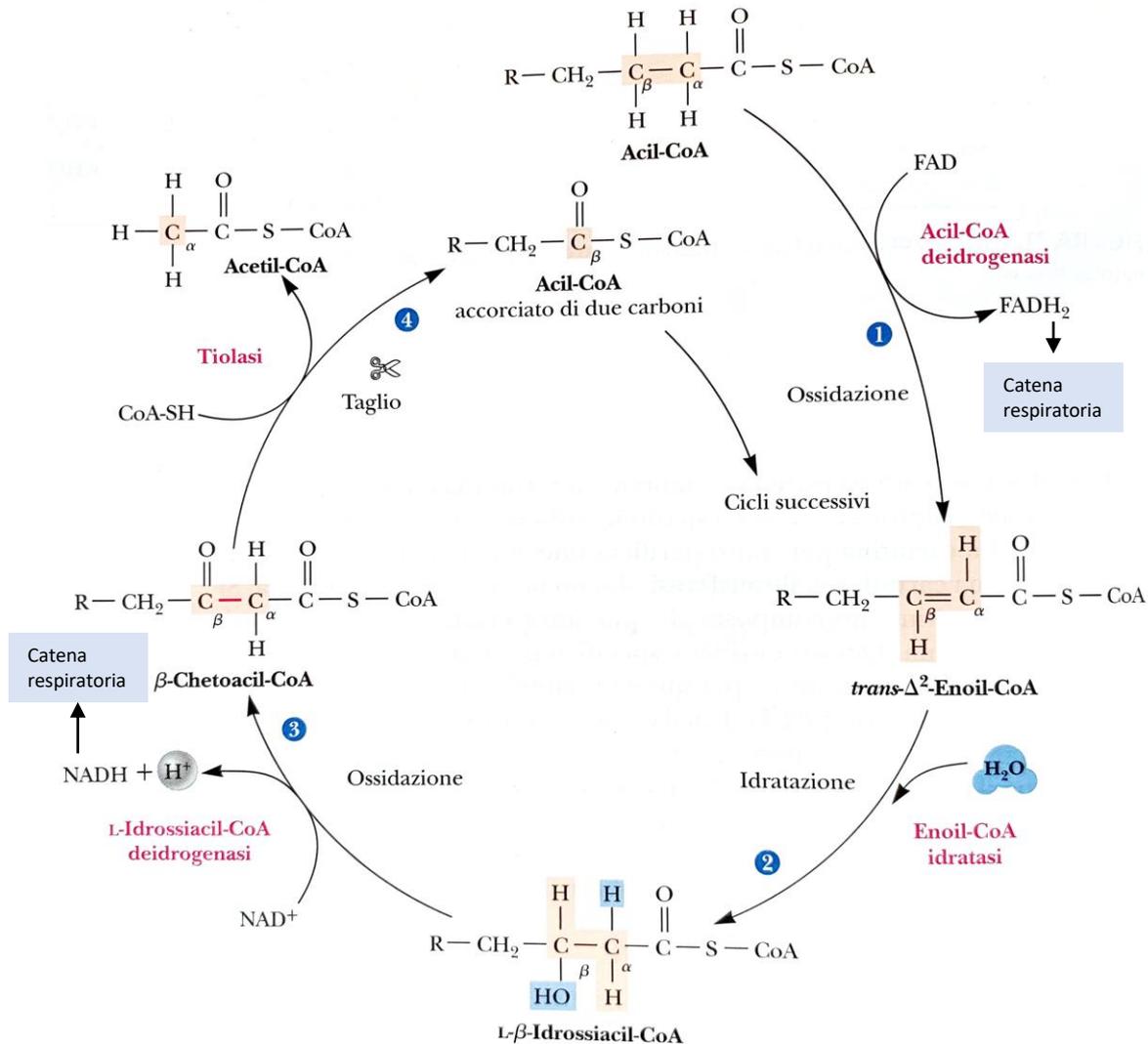
La β -ossidazione degli **acidi grassi saturi** consiste in un ciclo di 4 reazioni enzimatiche e inizia a partire dall'estremità carbossilica

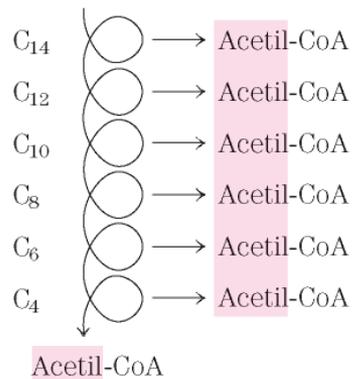
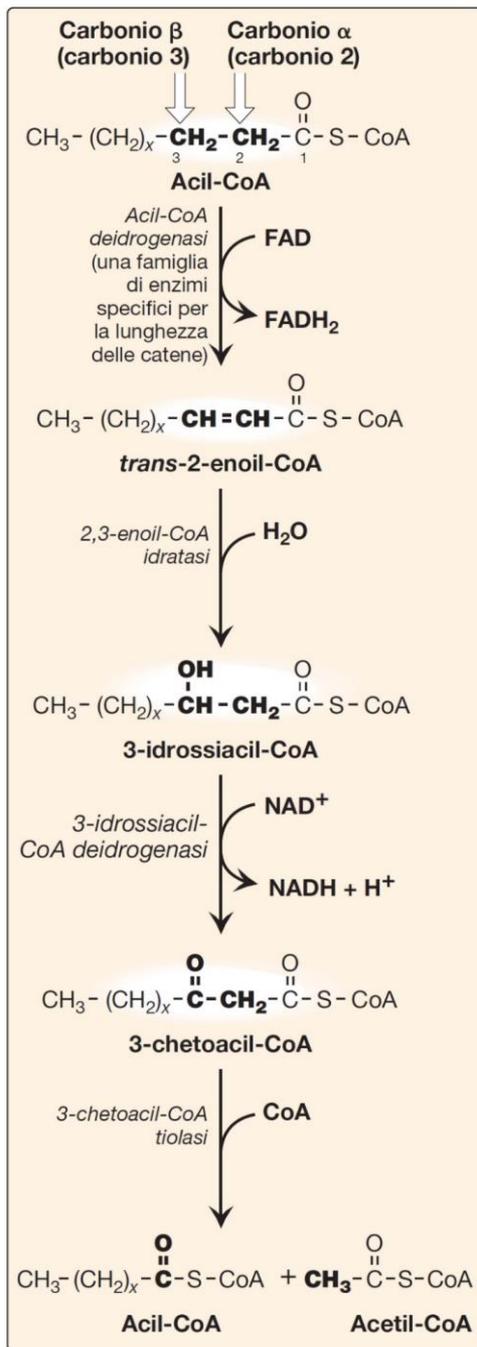
1) L'acil-CoA è ossidato ad un acil-CoA α , β insaturo (chiamato anche β enoil-CoA) Questa reazione è catalizzata da un acil-CoA deidrogenasi FAD dipendente

2) l'acil -CoA insaturo è idratato per produrre un β -idrossiacil-CoA. Questa reazione è catalizzata dall'enzima enoil-CoA idratasi

3) Una seconda reazione di ossidazione è catalizzata dalla β -idrossiacil-CoA deidrogenasi un enzima NAD dipendente. Il prodotto è un β -chetoacil-CoA

4) l'enzima tiolasi catalizza la scissione del β -chetoacil-CoA, la reazione richiede una molecola di CoA. I prodotti sono acetil-CoA ed un acil-CoA più corto di due atomi di carbonio rispetto alla molecola originariamente entrata nel ciclo della β -ossidazione



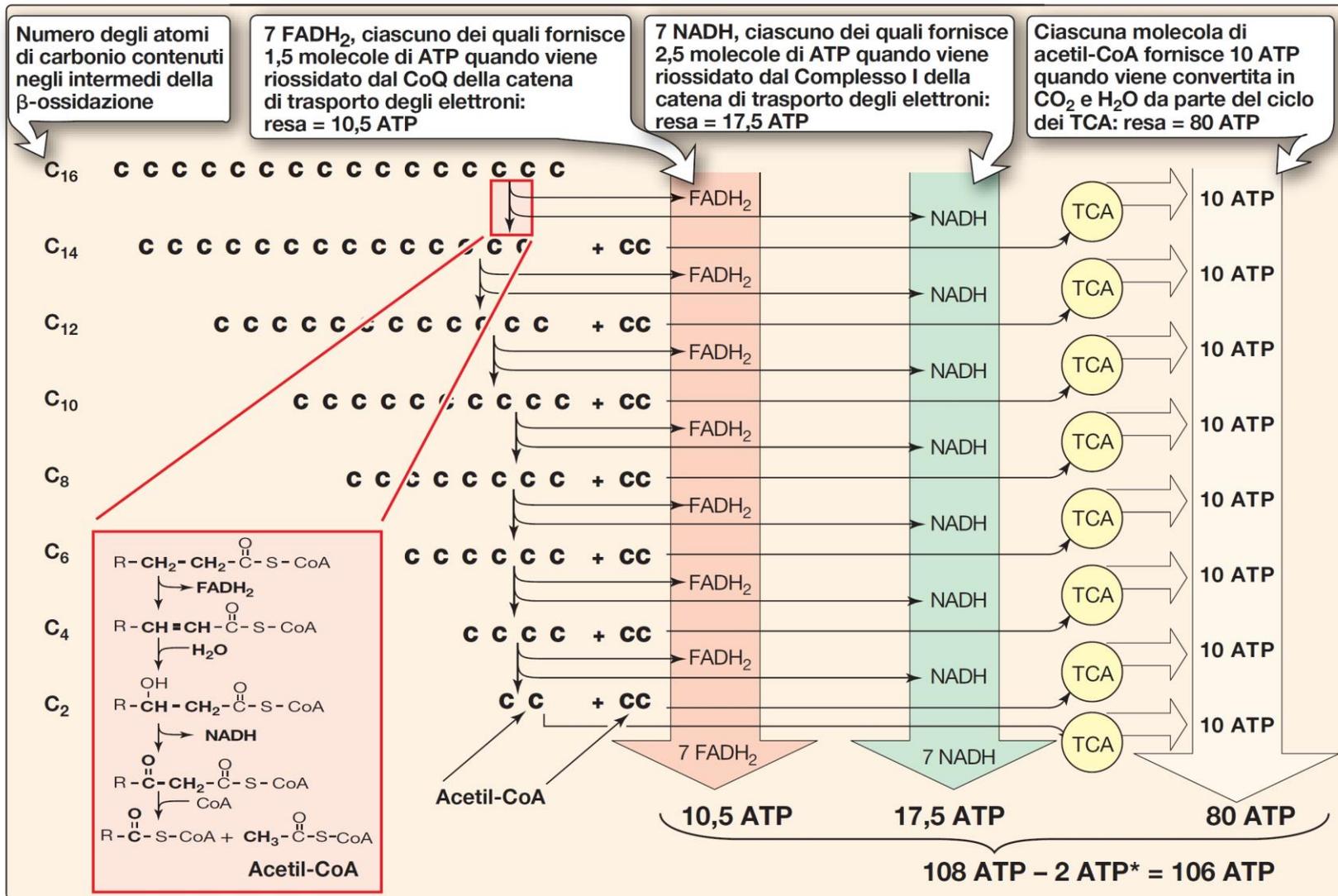


Resa di ATP durante l'ossidazione del Palmitato (C16) a CO_2 e H_2O

Enzima che catalizza la tappa ossidativa	Numero di molecole di NADH o FADH_2 formate	Numero di molecole di ATP prodotte ^a
β-ossidazione		
Acil-CoA deidrogenasi	7 FADH_2	10,5
β-idrossiacil-CoA deidrogenasi	7 NADH	17,5
Ciclo dell'acido citrico		
Isocitrato deidrogenasi	8 NADH	20
α-chetoglutarato deidrogenasi	8 NADH	20
Succinil-CoA sintetasi		8 ^b
Succinato deidrogenasi	8 FADH_2	12
Malato deidrogenasi	8 NADH	20
Totale		108

^a valori calcolati considerando 1,5 molecole di ATP per ogni FADH_2 ossidato e 2,5 per ogni NADH ossidato

^b il GTP che si forma produrrà 1 molecola di ATP



Riassunto dell'energia che si ottiene dall'ossidazione del palmitoil coenzima A (CoA; 16 atomi di carbonio)
 [nota: *l'attivazione del palmitato a palmitoil-CoA richiede l'equivalente di 2 ATP (ATP \rightarrow AMP + PP_i)]. $FADH_2$ = flavina adenina dinucleotide ridotto; $NADH$ = nicotinammide adenina dinucleotide ridotto; TCA = acidi tricarbossilici; CoQ = coenzima Q; CO_2 = diossido di carbonio.

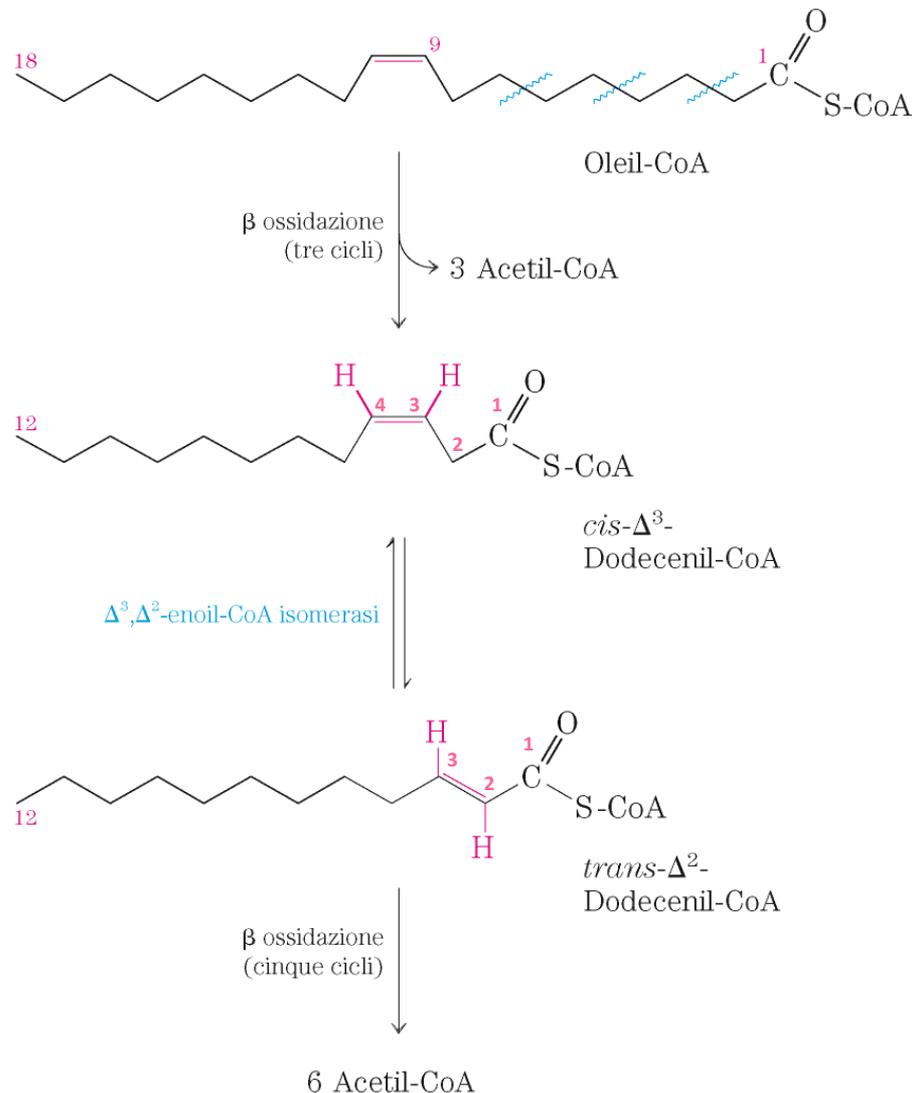
Ossidazione degli acidi grassi monoinsaturi

La conversione di un acido grasso monoinsaturo in acetil-CoA richiede una isomerizzazione *cis-trans*

L'enzima l'enoli-CoA idratasi riconosce solo doppi legami trans. Nell'acido oleico il doppio legame cis è tra gli atomi di carbonio 9 e 10.

Una *cis-trans* isomerasi produce un doppio legame trans tra gli atomi di carbonio 2 e 3 a partire dal doppio legame cis tra gli atomi di carbonio 3 e 4.

Da questo punto in poi l'acido grasso è metabolizzato alla stesa maniera degli acidi grassi saturi



β -ossidazione dell'acido oleico

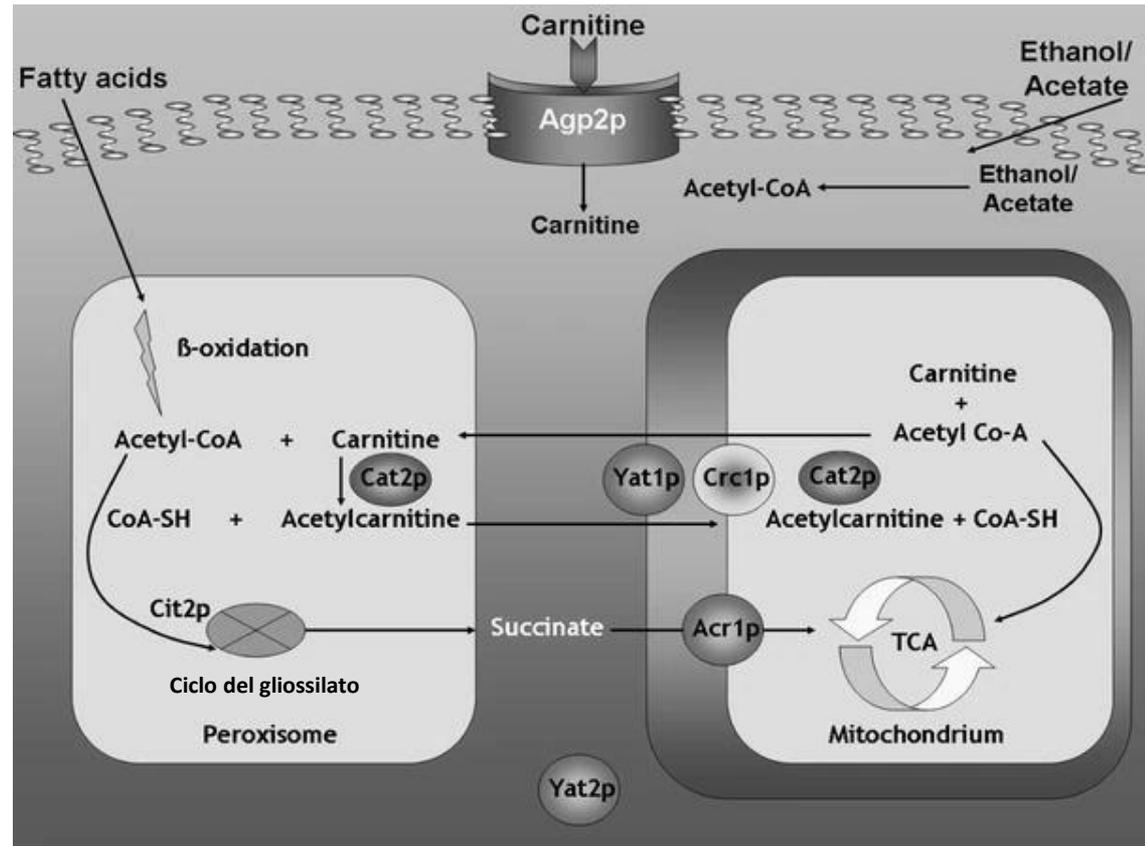
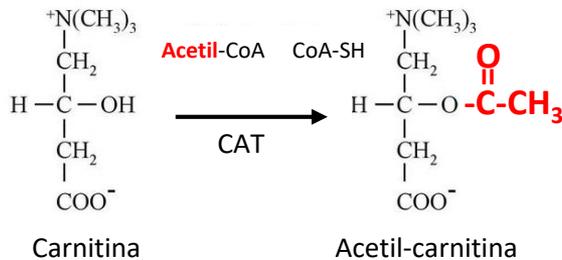
Sistema navetta della carnitina aciltrasferasi nel *Saccharomyces cerevisiae*

Nella prima via, nel perossisoma, l'acetil-CoA entra nel ciclo del glicosilato, dove produce succinato che, successivamente viene trasportato ai mitocondri, probabilmente tramite una proteina decarbossilata, Acr1p.

Nella seconda via, il sistema navetta della carnitina, prevede il trasferimento dell'acetil-CoA alla carnitina, reazione catalizzata dalla carnitina acetiltrasferasi (CAT) del perossisoma.

L'acetylarnitina viene trasportata al mitocondrio attraverso la carnitina acetylarnitina traslocasi (Crc1p).

La CAT mitocondriale catalizza la reazione inversa per formare carnitina e acetil-CoA, dove quest'ultimo entrerà nel ciclo di Krebs (TCA).



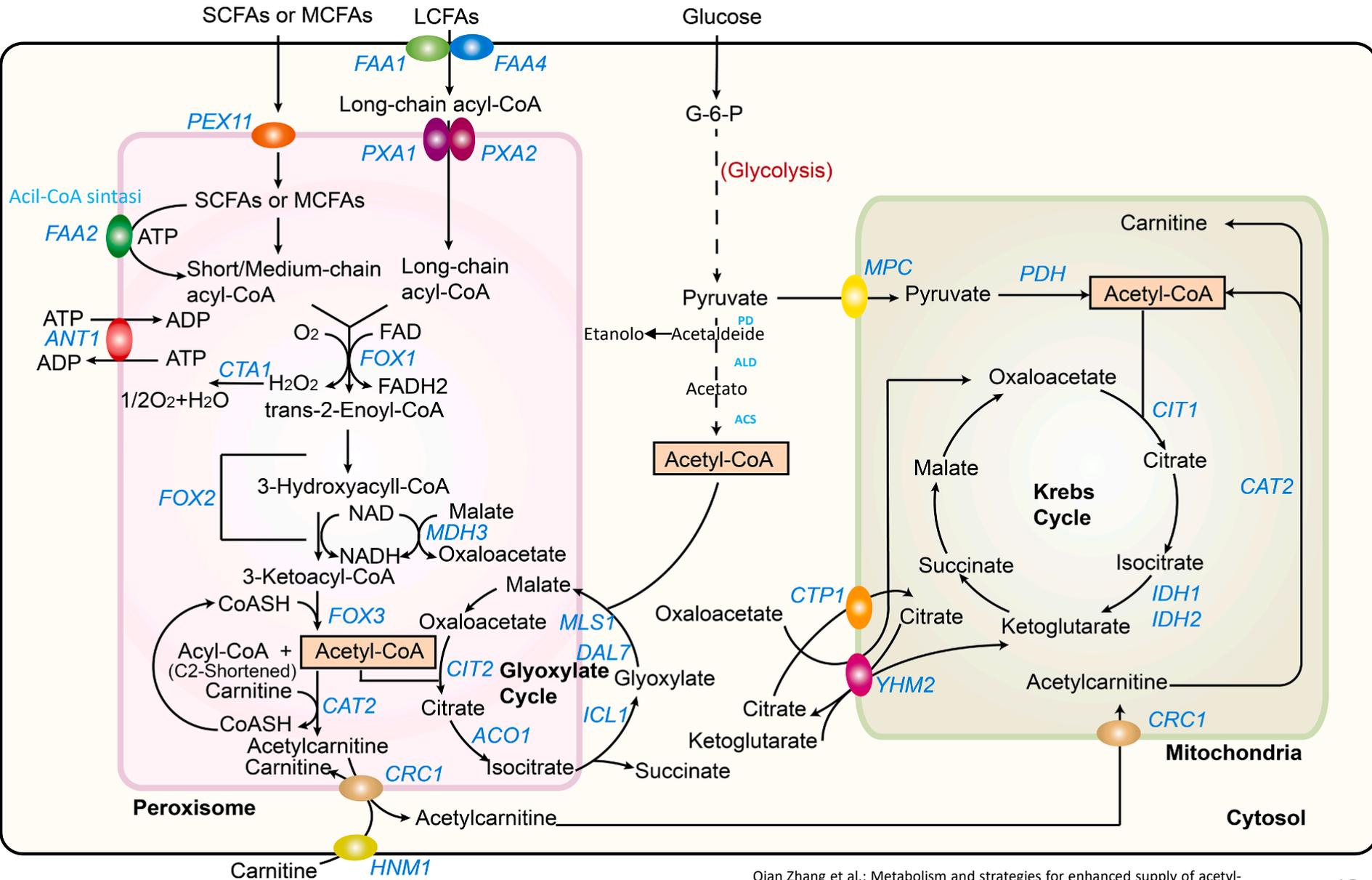
Il *S. cerevisiae* contiene tutti i componenti per questo sistema navetta ma non può sintetizzare la carnitina e l'uso di questo sistema navetta richiede l'aggiunta di carnitina al mezzo.

Regolazione della β -ossidazione degli acidi grassi:

Si basa sulla disponibilità di queste molecole, se un acido grasso è trasferito dal citosol al perossisoma viene degradato in modo controllato soltanto dalla disponibilità di coenzimi ossidati (NAD^+ e FAD).

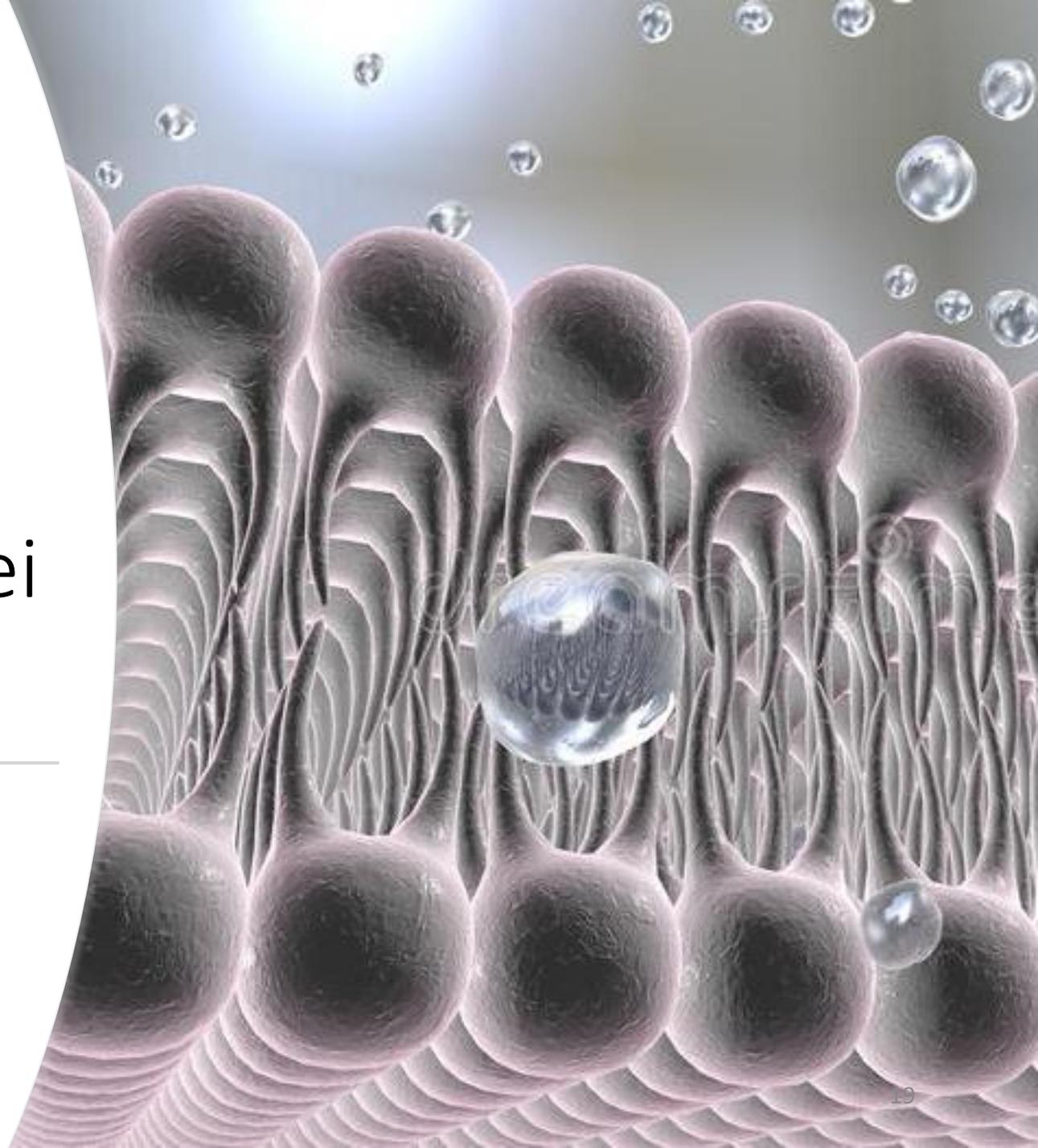
- L'enzima β -idrossiacil-CoA deidrogenasi è inibito da un elevato rapporto $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$.
- Alte concentrazioni di acetil-CoA inibiscono l'enzima tiolasi.

Metabolismo degli acidi grassi saturi ed esportazione dell'acetil-CoA generato dalla β -ossidazione nei perossisomi del *Saccharomyces cerevisiae*





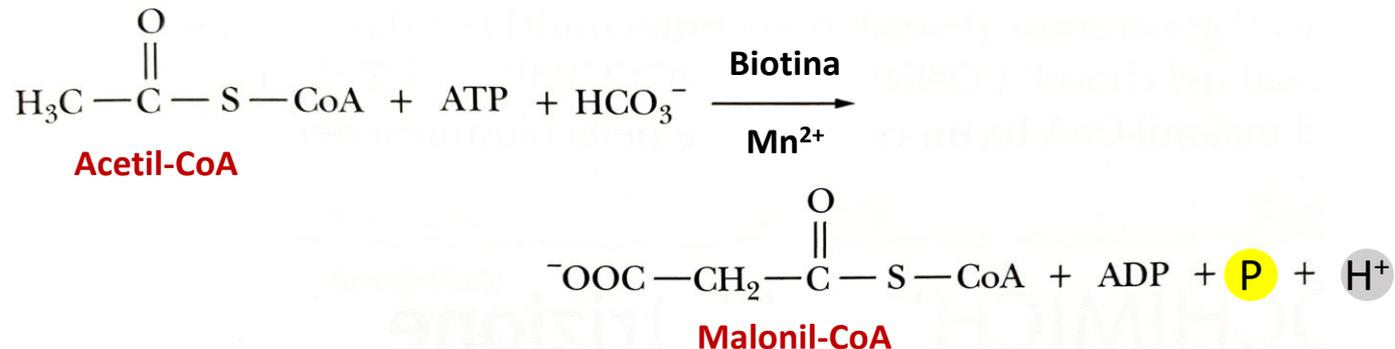
Biosintesi dei lipidi



Il malonil-CoA si forma dall'acetil-CoA e dal bicarbonato

Reazione dell'acetil-CoA carbossilasi: la reazione dell'acetil-CoA carbossilasi produce malonil-CoA per la sintesi degli acidi grassi.

La acetil CoA carbossilasi è costituita da tre proteine: la biotina carbossilasi (gruppo prostetico), la proteina trasportatrice di biotina e la transcarbossilasi.



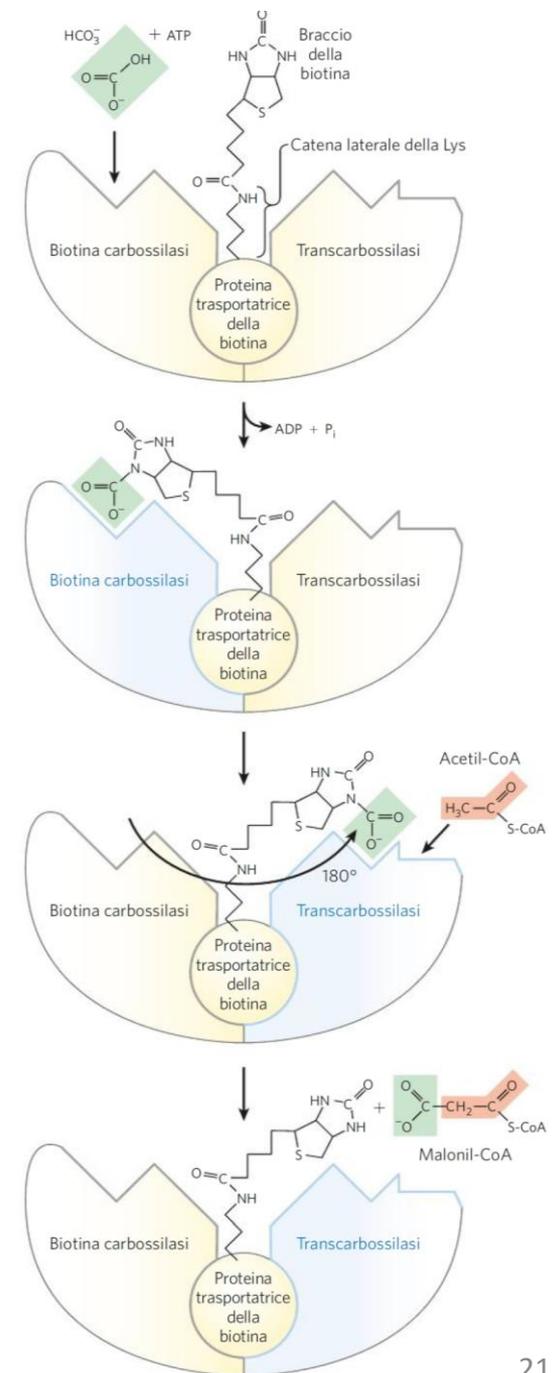
La reazione dall'acetil-CoA carbossilasi è la tappa che controlla la biosintesi

La reazione dell'acetil-CoA carbossilasi

L'aceti CoA carbossilasi ha tre domini funzionali:

- La proteina trasportatrice della biotina,
- La biotina carbossilasi, che attiva il CO_2 legandolo a uno degli atomi di azoto dell'anello della biotina in una reazione dipendente dall'ATP,
- La transcarbossilasi, che trasferisce il CO_2 attivato dalla biotina all'acetil-CoA con formazione di malonil CoA.

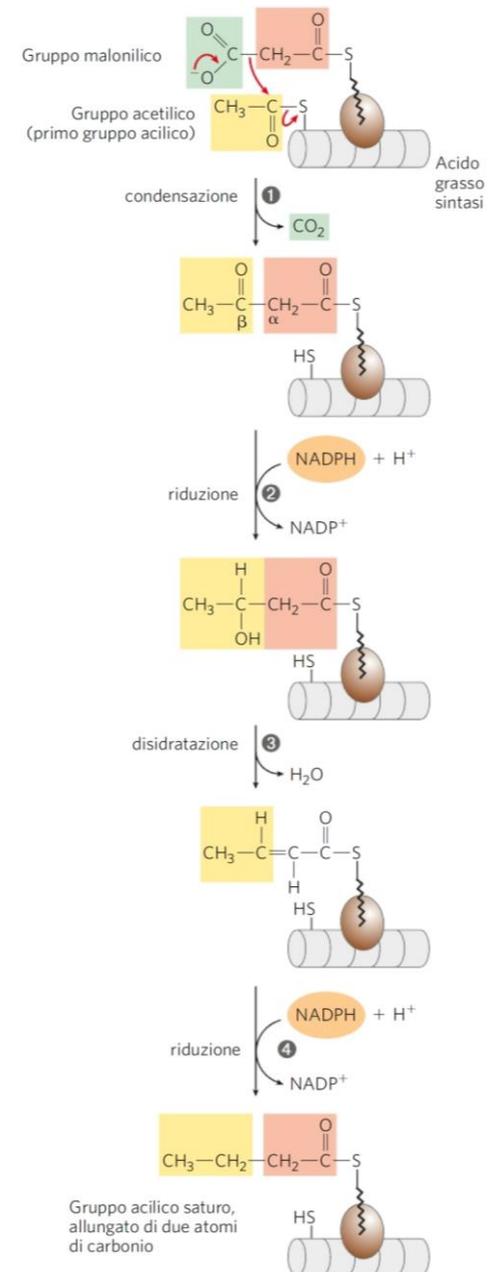
Parte della proteina trasportatrice della biotina e il lungo braccio flessibile della biotina ruotano, per trasportare il CO_2 attivato dal sito attivo della biotina carbossilasi al sito attivo della transcarbossilasi.



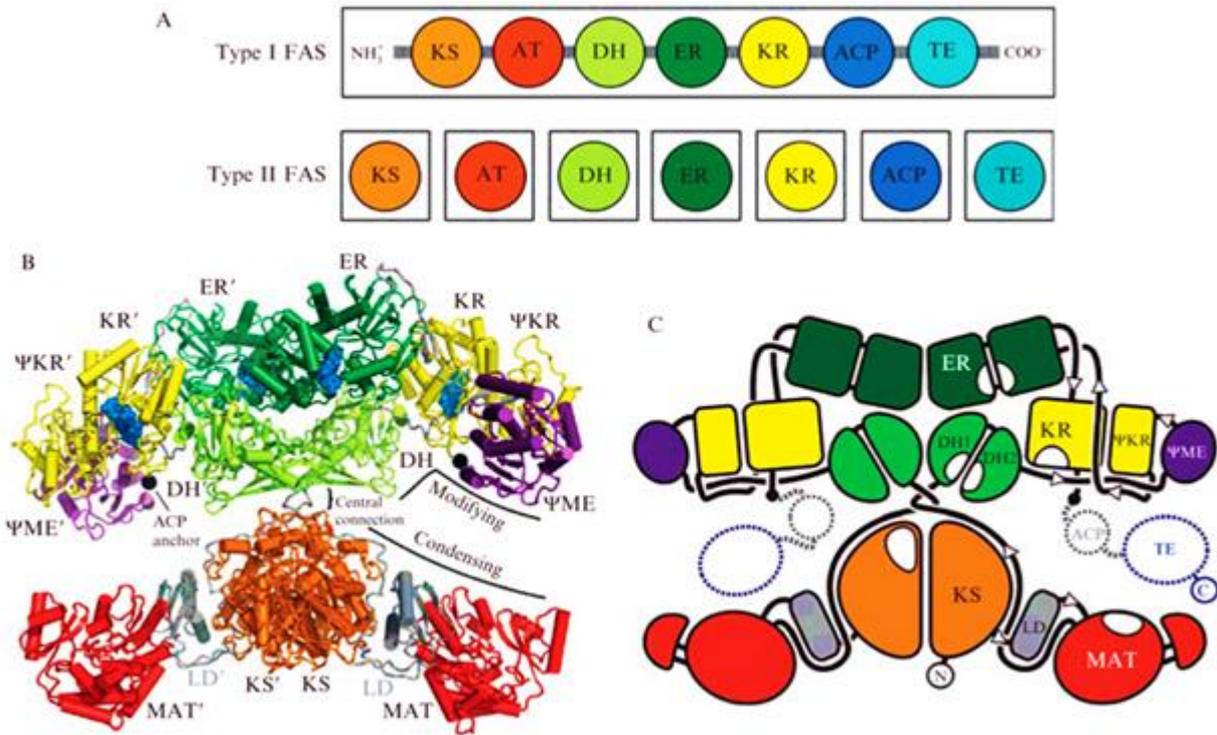
Gli acidi grassi vengono sintetizzati mediante una sequenza di reazioni ripetute

Le catene carboniose degli acidi grassi vengono assemblate nel citosol mediante una sequenza di quattro tappe che si ripetono, catalizzate da un sistema multienzimatico, l'acido grasso sintasi. Ciascun gruppo malonilico e acetilico è attivato come tioestere legato all'enzima:

1. la condensazione di un gruppo acilico attivato e di un frammento a due atomi di carbonio derivato dal malonil-CoA con eliminazione di CO_2 dal gruppo malonilico, allunga la catena acilica di due atomi di carbonio.
2. il gruppo β -chetonico viene ridotto ad alcol
3. l'eliminazione di H_2O crea un doppio legame
4. il doppio legame viene ridotto per formare il corrispondente gruppo acilico saturo.

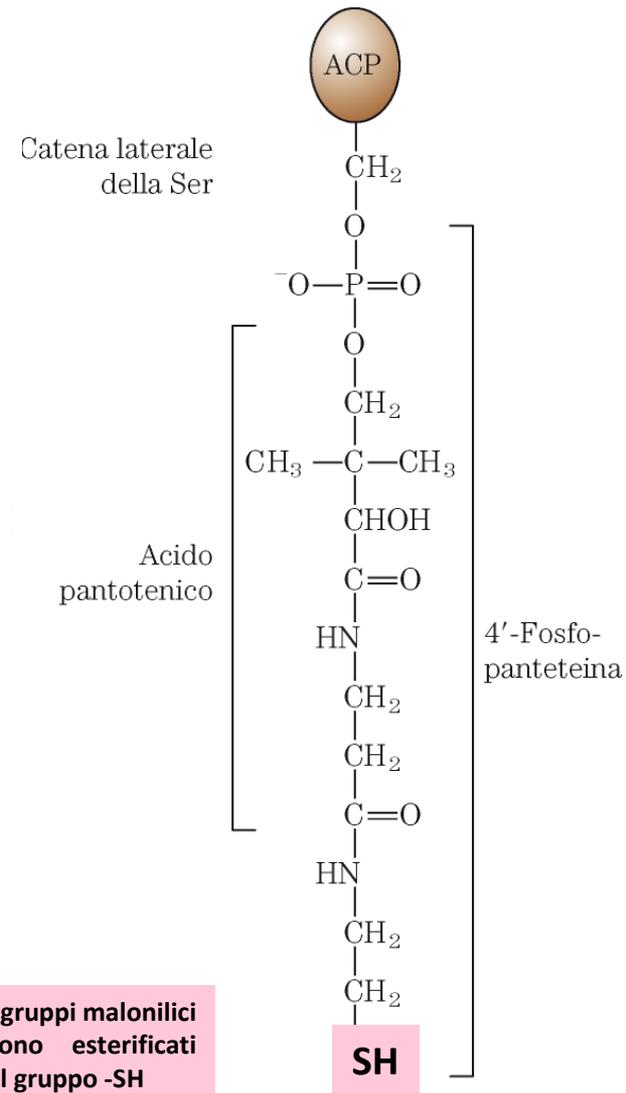


Struttura dell'acido grasso sintasi I e II (FAS I e II)

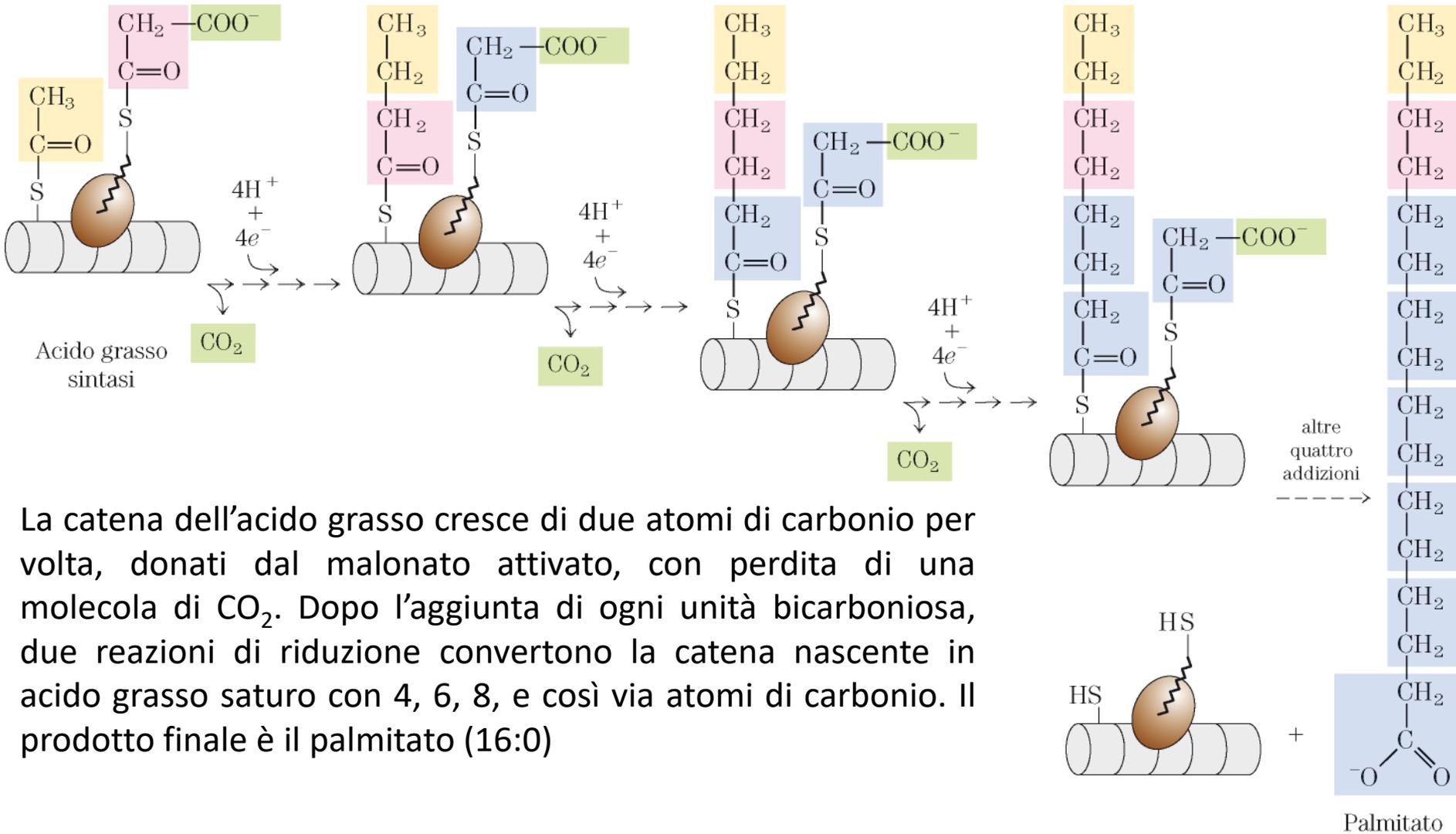


I differenti siti che hanno attività enzimatica sono: β -chetoacil-CoA sintasi (**KS**), malonil/acetil-CoA-ACP trasferasi (**MAT**), β -idrossiacil-ACP deidratasi (**DH**), enoil-ACP riduttasi (**ER**) e β -chetoacil-ACP riduttasi (**KR**). L'ACP è la proteina trasportatrice di acili.

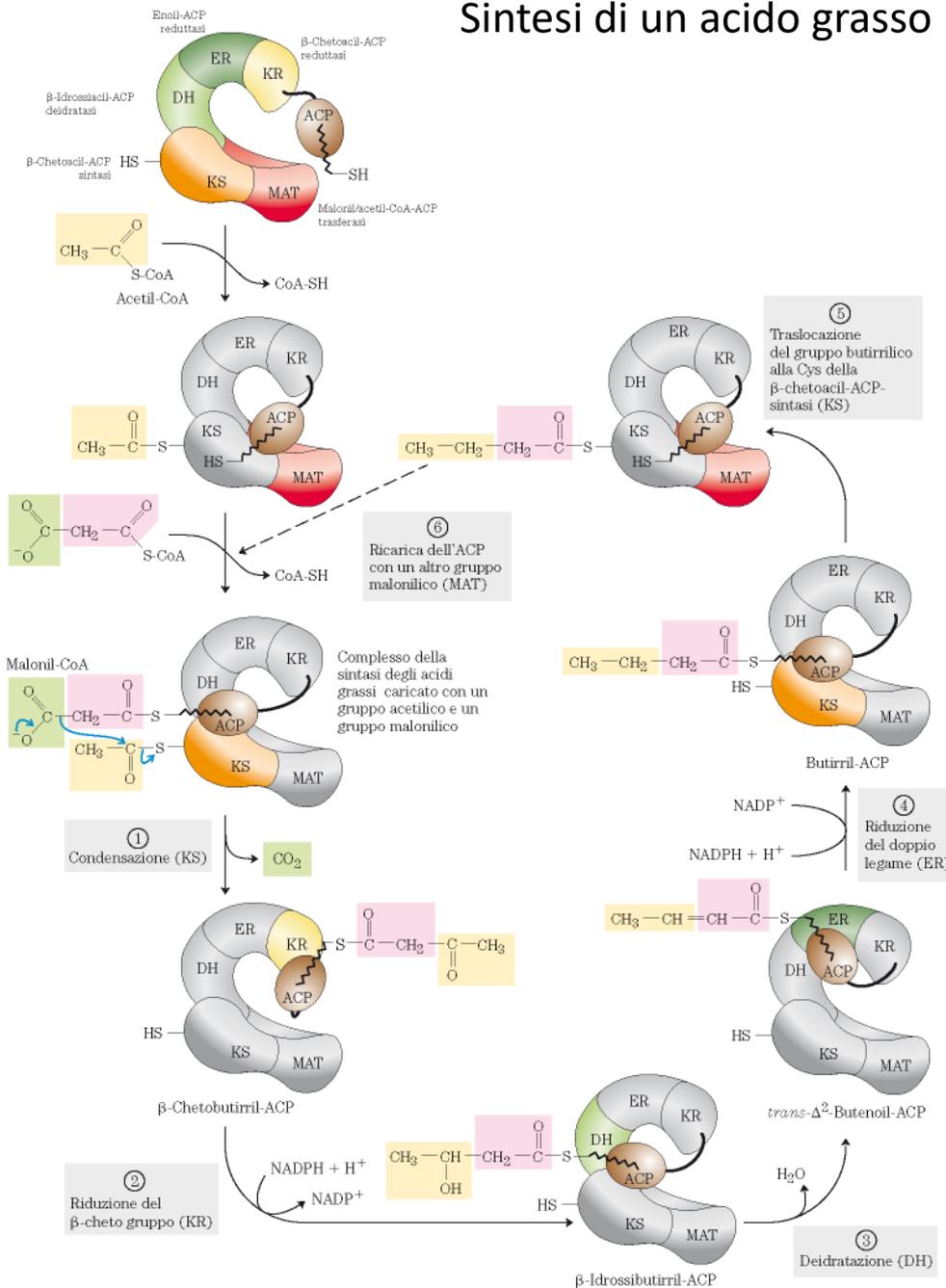
La proteina trasportatrice di acili (ACP)



La sintesi di palmitato



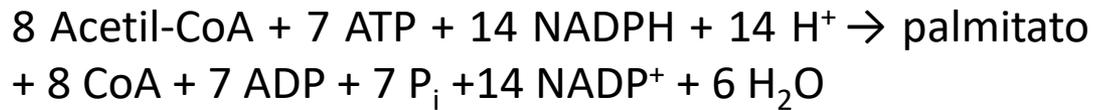
Sintesi di un acido grasso



- 1) Tappa di condensazione: coinvolge i gruppi acetilici e malonilici attivati con formazione di acetoacetil-ACP, allo stesso tempo si libera una molecola di CO_2 . reazione catalizzata dalla β- chetoacil-ACP-sintasi (KS).
- 2) Tappa di riduzione del gruppo carbonilico: l'acetoacetil-ACP formato nella tappa di condensazione subisce la riduzione del suo gruppo carbonilico presente sul C3 trasformandosi in D-β-idrossibutiril-ACP. Questa reazione è catalizzata dalla β chetoacil-ACP reductasi (KR) e il donatore di elettroni è il NADPH.
- 3) Tappa di deidratazione: dagli atomi di carbonio C2, e C3 del D-bidrossibutiril-ACP viene rimossa una molecola di H_2O per formare un doppio legame nel prodotto, il *trans* Δ^2 butenoil-ACP. L'enzima che catalizza questa reazione è la β-idrossiacil-ACP deidratasi (DH).
- 4) Tappa di riduzione del doppio legame: il doppio legame del *trans* Δ^2 butenoil-ACP viene ridotto producendo butiril-ACP da parte della enoil-ACP reductasi (ER) anche qui il donatore è il NADPH.

Le reazioni dell'acido grasso sintasi si ripetono fino alla formazione del palmitato

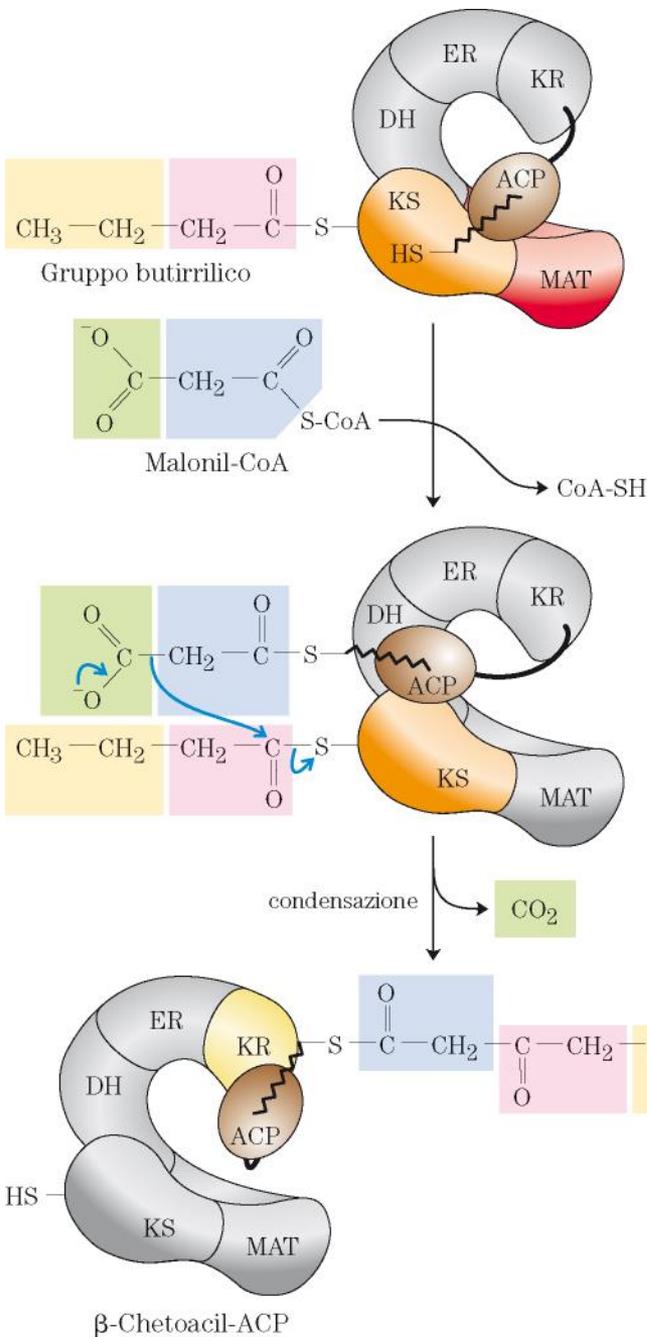
Per la sintesi del palmitato sono necessari sette cicli di reazione di condensazione e di riduzione:



La biosintesi di acidi grassi richiede acetil-CoA e un rifornimento di energia chimica in due forme: il potenziale di trasferimento del gruppo dell'ATP e il potere riducente del NADPH.

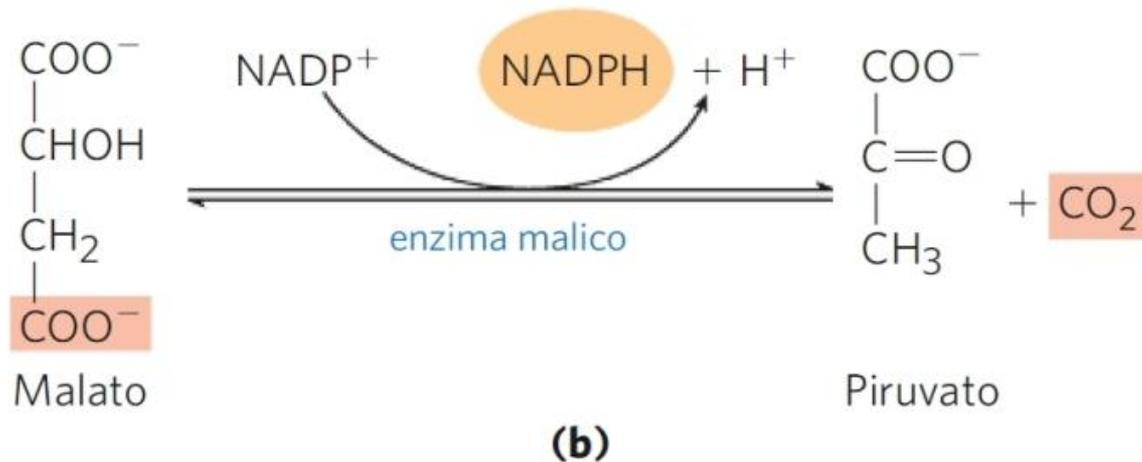
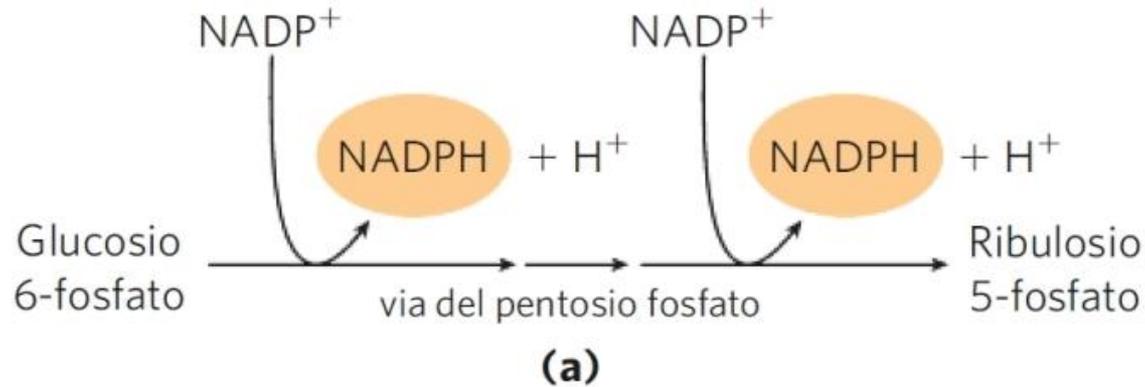
L'ATP è necessario per legare il CO₂ all'acetil-CoA e produrre malonil-CoA;

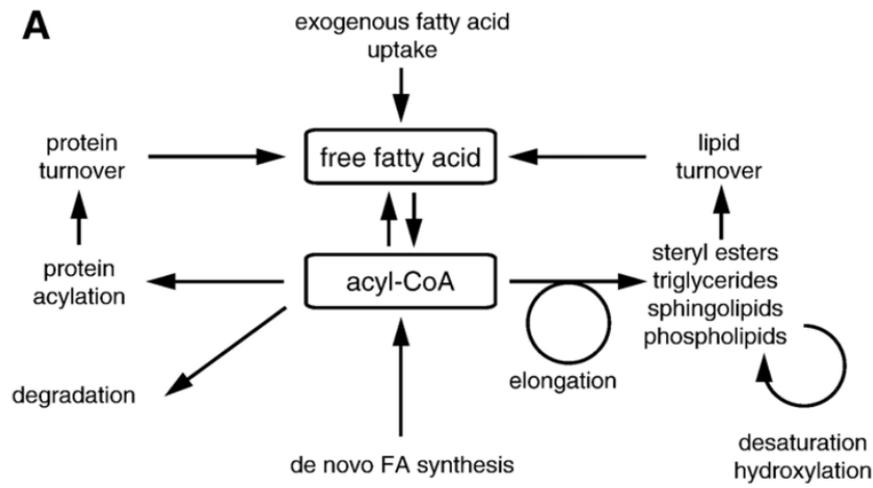
Il NADPH è necessario per ridurre il gruppo β-chetonico e i doppi legami.



Produzione di NADPH: esistono due diverse vie per la produzione di NADPH.

- una via tramite la via del pentosio fosfato (a)
- l'altra via catalizzata dal enzima malico (b)



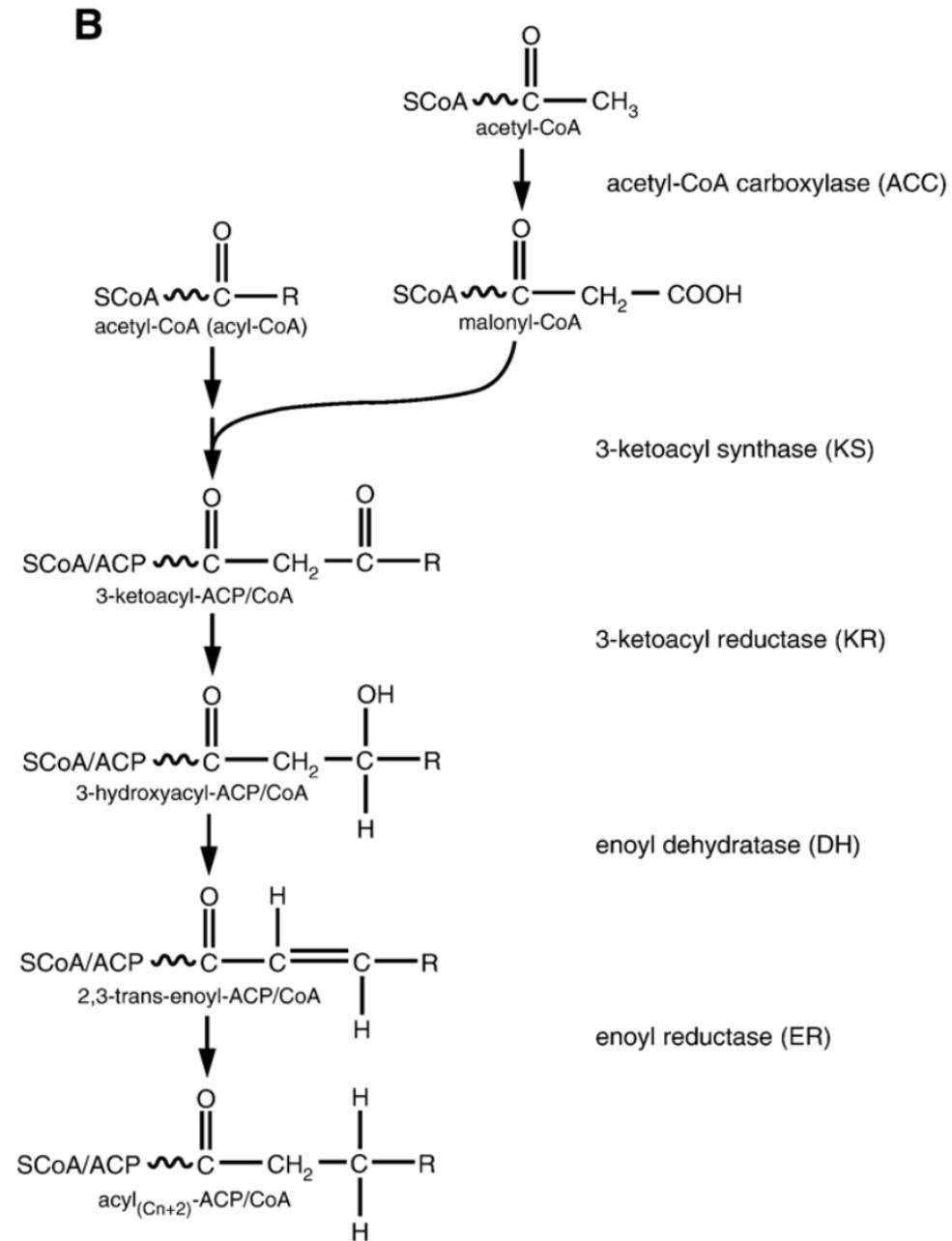


Gli acidi grassi sono essenziali per il metabolismo del *Saccharomyces cerevisiae*.

Il lievito non si nutre di acidi grassi ma utilizza la sintesi endogena dei lipidi per le funzioni cellulari e la crescita.

Per la sintesi impiega quantità sostanziali di metaboliti come l'acetil-CoA, l'ATP e il NADPH.

Quasi tutti gli organelli cellulari sono coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi. La sintesi può essere mitocondriale e citoplasmatica mentre l'allungamento fino a 26 C avviene nel RE.



(A) Schematic representation of fatty acid metabolism. (B) reaction schemes of fatty acid synthesis and elongation.

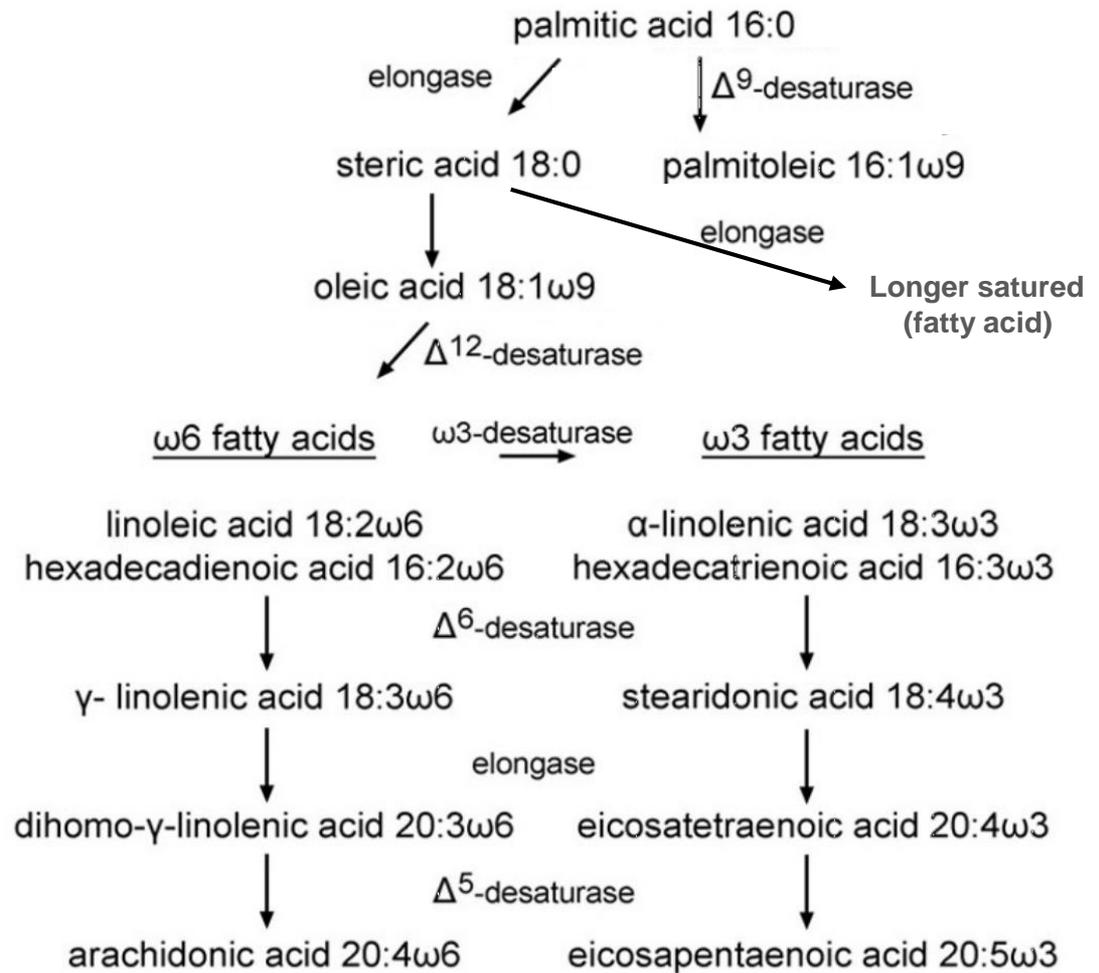
Gli PUFA sono necessari affinché il lievito, in condizioni anaerobiche, mantenga l'integrità della membrana e si adatti bene ai vari momenti di stress ambientali durante la fermentazione del vino.

Il palmitato (16:0) è il precursore dello stearato e degli altri acidi grassi saturi a catena più lunga, come pure degli acidi monoinsaturi palmitoleato 16:1 (Δ^9) e oleato 18:1 (Δ^9).

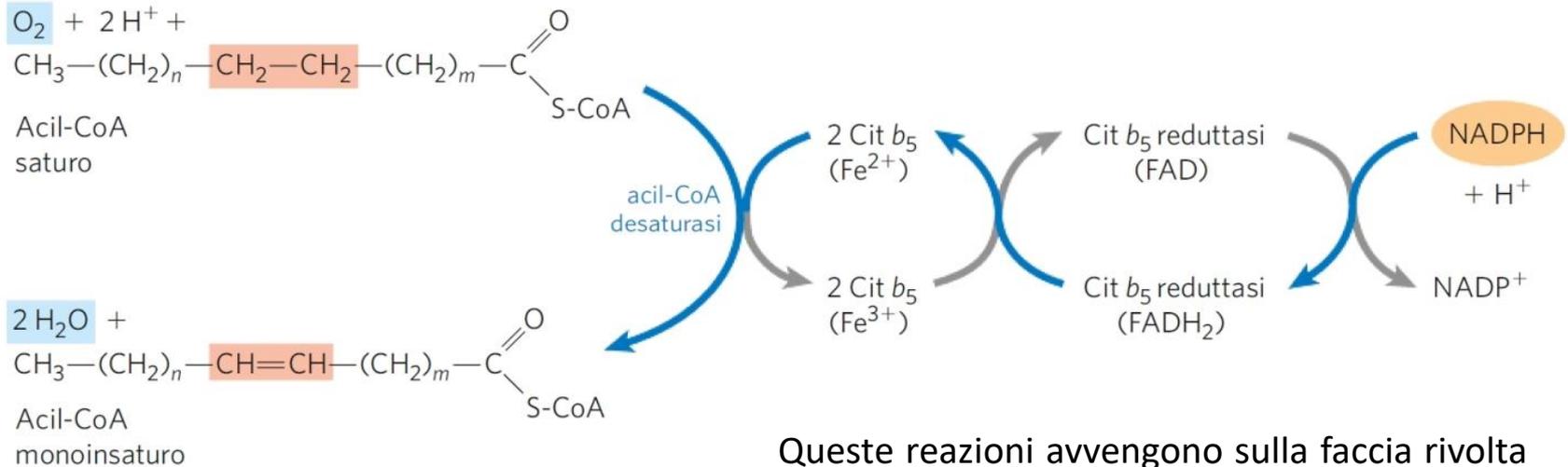
La formazione di PUFA richiede l'espressione di enzimi per introdurre un doppio legame (es. Δ^6 -/ Δ^{12} -desaturasi) ed enzimi per allungamento della catena (elongasi).

La desaturasi Δ^6 aumenta il livello dell'acido γ -linolenico (18:3 ω_6), mentre la desaturasi Δ^{12} produce acidi grassi ω_6 come l'acido linoleico (18:2) e l'acido esadecadienoico (16:2).

Vie di sintesi degli acidi grassi insaturi (PUPA) e dei loro derivati



Le desaturasi:



Queste reazioni avvengono sulla faccia rivolta verso il lume della membrana del RE liscio.

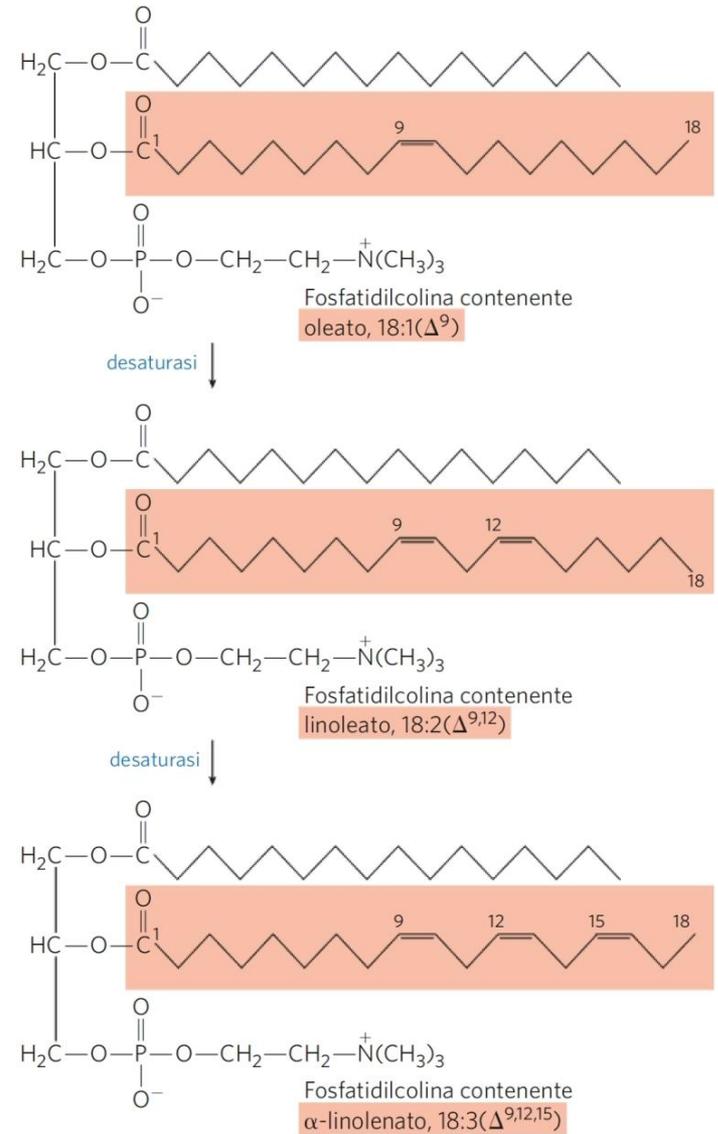
Le desaturasi, sono accoppiate a un donatore di elettroni (rispettivamente ferridossina nei cloroplasti e citocromo b5 nel reticolo endoplasmatico) il quale, dopo essere stato ridotto da NADPH/NADH ossidoriduttasi, collabora nella reazione di ossidoriduzione dove viene creato il doppio legame.

Per formare il doppio legame, il donatore di elettroni, dopo essere stato ridotto da una reductasi con l'utilizzo di NADH/NADPH, si ossida nuovamente cedendo due elettroni alla desaturasi. L'enzima viene attivato e distacca 2 atomi di idrogeno, nella posizione in cui si forma il doppio legame, e li utilizza per ridurre una molecola di O₂ ad H₂O insieme ai due elettroni acquistati precedentemente.

Le desaturasi maggiormente attive, agiscono su catene a 18 atomi di carbonio, inserendo doppi legami nelle posizioni $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$ della catena acilica, per produrre rispettivamente acido oleico (C18:1), acido linoleico (C18:2) e acido linolenico (C18:3).

Nelle piante l'oleato è prodotto da una stearil-ACP desaturasi localizzata nello stroma dei cloroplasti, usa come donatore di elettroni la ferredossina ridotta.

Le desaturasi ossidano l'oleato legato alla fosfatidilcolina formando acidi grassi polinsaturi.



I trigliceridi vengono prodotti a partire dall'acil-CoA e il glicerolo 3-fosfato mediante una serie di reazioni enzimatiche.

La prima fase della biosintesi è l'acilazione dei gruppi OH liberi del glicerolo 3-P con due molecole di acil-CoA per generare il diacilglicerolo 3-P (acido fosfatidico, PA). Tale acido viene idrolizzato dalla fosfatidato fosfatasi per formare un 1,2 diacilglicerolo. I diacilgliceroli possono essere convertiti in triacilgliceroli per transterificazione con una terza molecola di acil-CoA.

Il diidrossiacetone-P (DHAP) viene acilato in posizione 1 dalla DHAP aciltransferasi (DHAPAT) e il prodotto formato, 1-acil-DHAP, è ridotto dall'acil-DHAP reduttasi (ADR) per produrre LPA (acido lisofosfatidico), che viene ulteriormente acilato in PA dall'acil glicerolo 3-P aciltransferasi (AGAT).

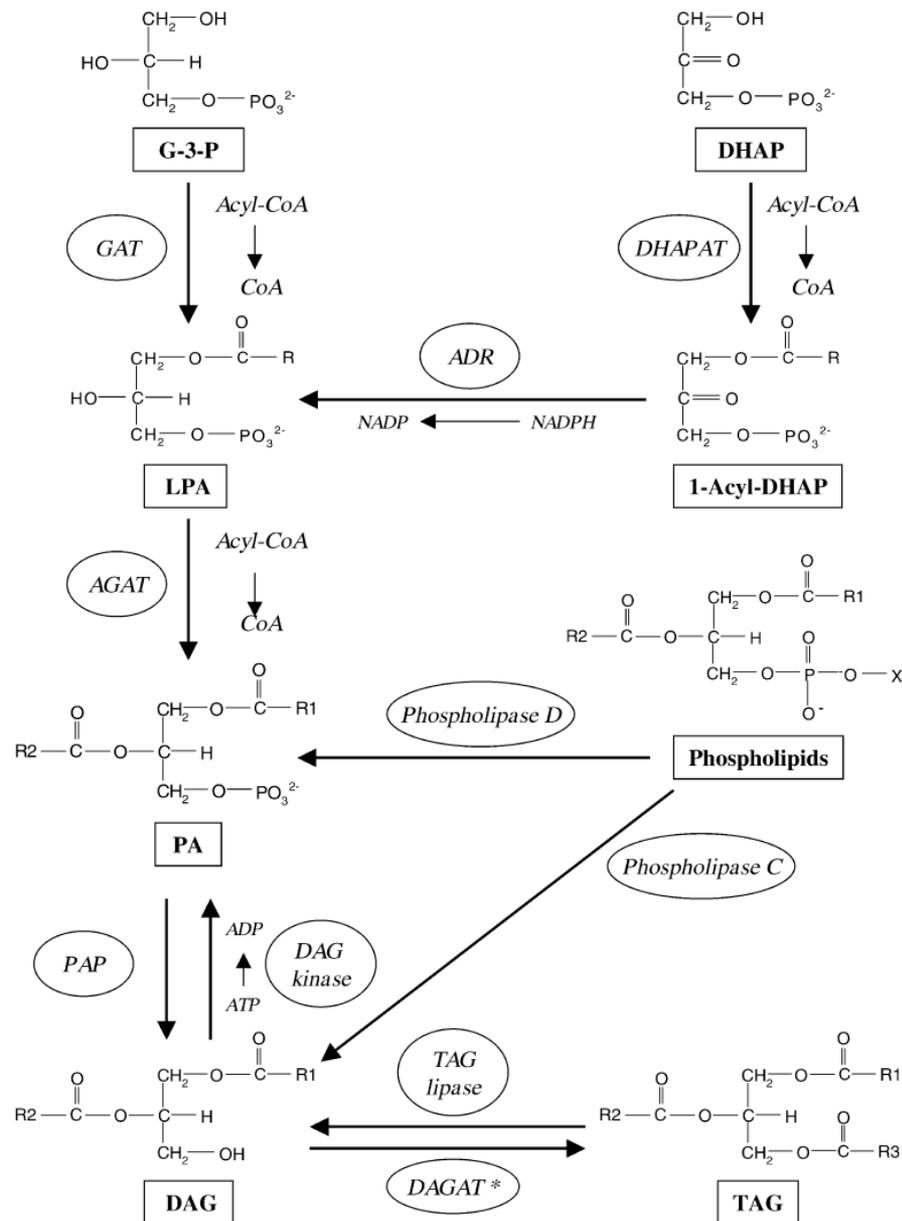
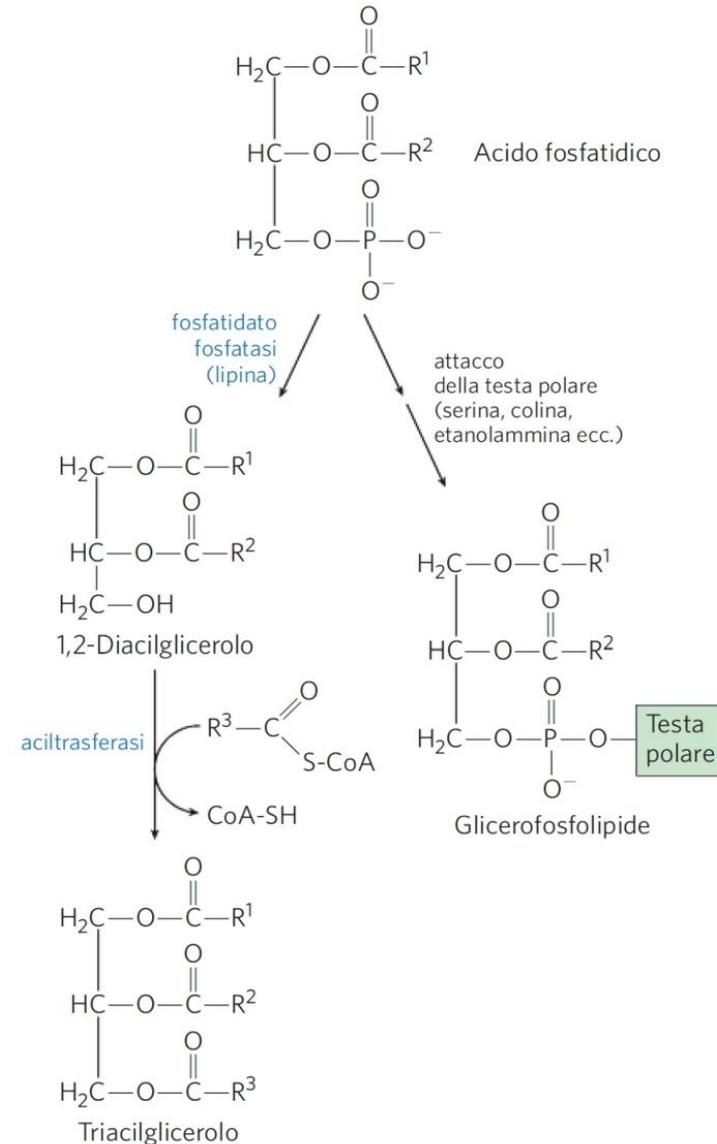


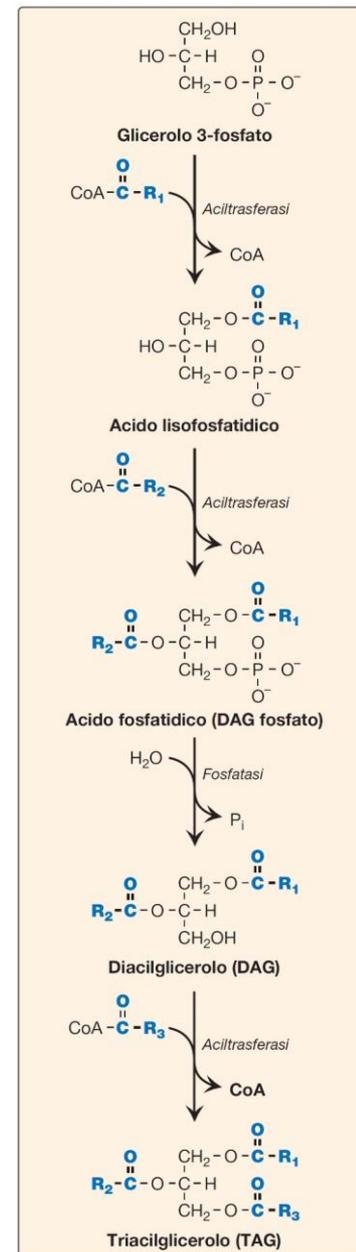
Fig. 1 Pathways for phosphatidic acid (PA) synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. AGAT 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase, ADR 1-acyl-dihydroxyacetone-phosphate reductase, DAG diacylglycerol, DAG kinase diacylglycerol kinase, DAGAT diacylglycerol acyltransferase, DHAPAT dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase, DHAP dihydroxyacetone-phosphate, 1-acyl-DHAP 1-acyl-dihydroxyacetone-phosphate, GAT glycerol-3-phosphate acyltransferase, G-3-P glycerol-3-phosphate, LPA lysophosphatidic acid, PA phosphatidic acid, PAP phosphatidate phosphatase, TAG triacylglycerol, TAG lipase triacylglycerol lipase. Metabolites are enclosed in rectangles, enzymes in ellipses.

- Nella via che porta alla formazione di triacilgliceroli, il fosfatidato viene idrolizzato dalla fosfatidato fosfatasi per formare un 1,2 diacilglicerolo.
- I diacilglicerolo possono essere convertiti in triacilgliceroli per transesterificazione con una terza molecola di acil-CoA.



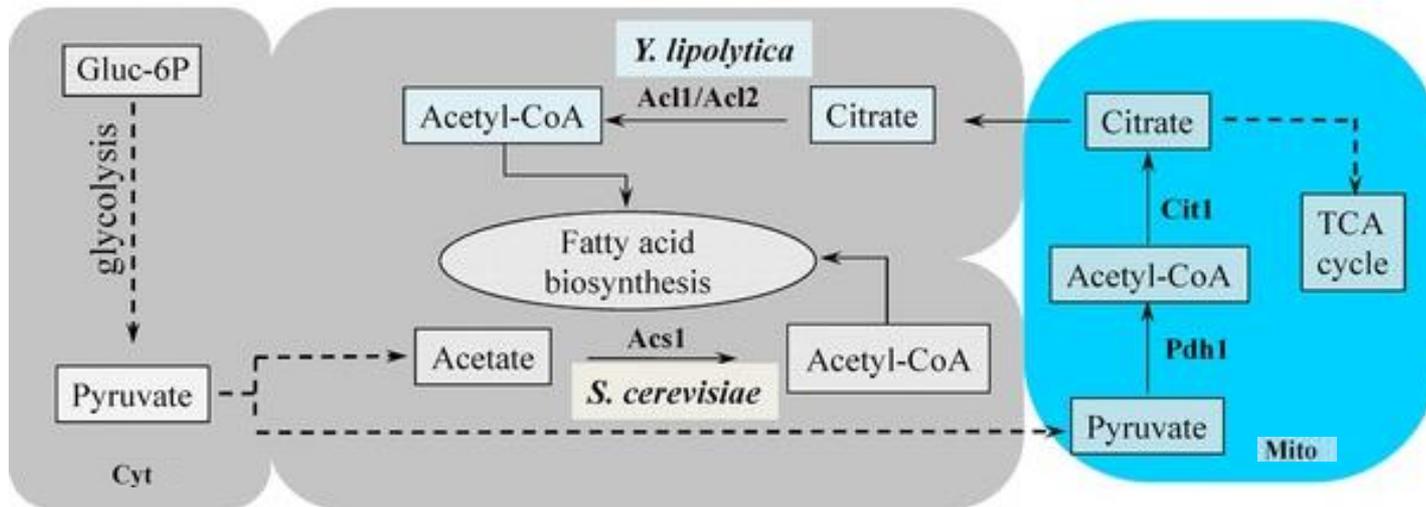
Riassunto della sintesi dei TAG:

- Questa via parte dal glicerolo 3-fosfato e comprende quattro reazioni in cui avviene l'aggiunta, in successione, di due molecole di acidi grassi fornite da due acil-CoA, l'eliminazione del gruppo fosfato e l'aggiunta del terzo acido grasso.



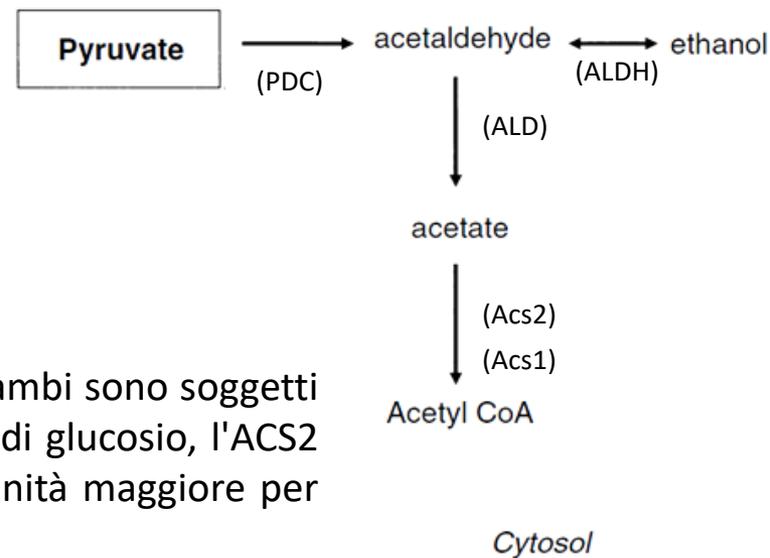
Sintesi di un TAG.

R_1-R_3 = acidi grassi attivati;
 CoA = coenzima A; P_i = fosfato inorganico.



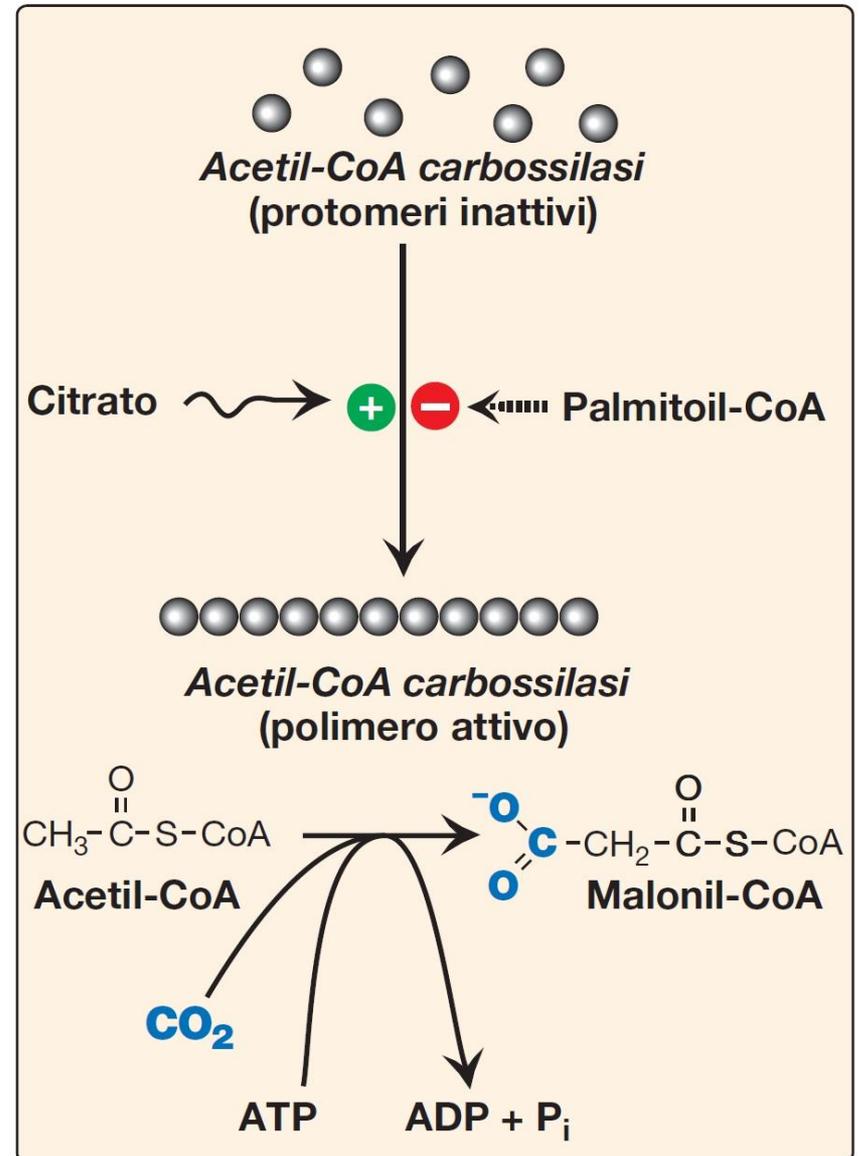
Nel *S. cerevisiae*, l'acetyl-CoA citoplasmatico è generato dall'attività dell'acetyl-CoA sintasi (Acs1) che utilizza come substrato l'acetato derivato dal piruvato. Nei lieviti oleosi, l'acetyl-CoA citoplasmatico è generato dall'enzima ATP:citrato liasi (Acl1/Acl2) che utilizza come substrato il citrato proveniente dai mitocondri, questo viene scisso in ossalacetato e acetyl-CoA.

Il *S. cerevisiae* ha due enzimi acetyl-CoA sintasi (ACS1 e 2) entrambi sono soggetti a una regolazione diversa: in presenza di alte concentrazioni di glucosio, l'ACS2 diventa essenziale mentre l'ACS1 è represso. L'Acs1 ha un'affinità maggiore per l'acetato ed è principalmente coinvolto nel ciclo del glicosilato.

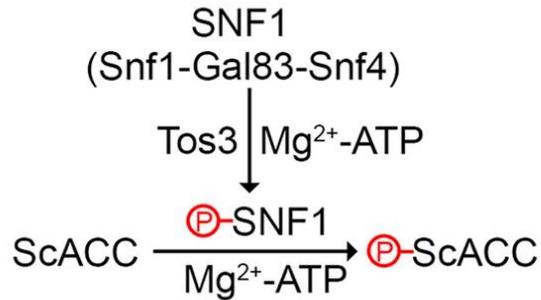


Regolazione dell'enzima acetil-CoA carbossilasi

Nella biosintesi lipidica, l'acetil-CoA viene convertito in malonil-CoA dall'acetil-CoA carbossilasi (Acc1). La prima fase della sintesi degli acidi grassi è altamente regolata. L'Acc1 è inibita dalla fosforilazione da parte della proteina chinasi chiamata Snf1, quest'ultima proteina viene attivata allostericamente dall'AMP. L'enzima Acc1, inoltre, è soggetto ad attivazione allosterica da parte del citrato ed è inibito dal palmitoil-CoA (il prodotto finale della via).

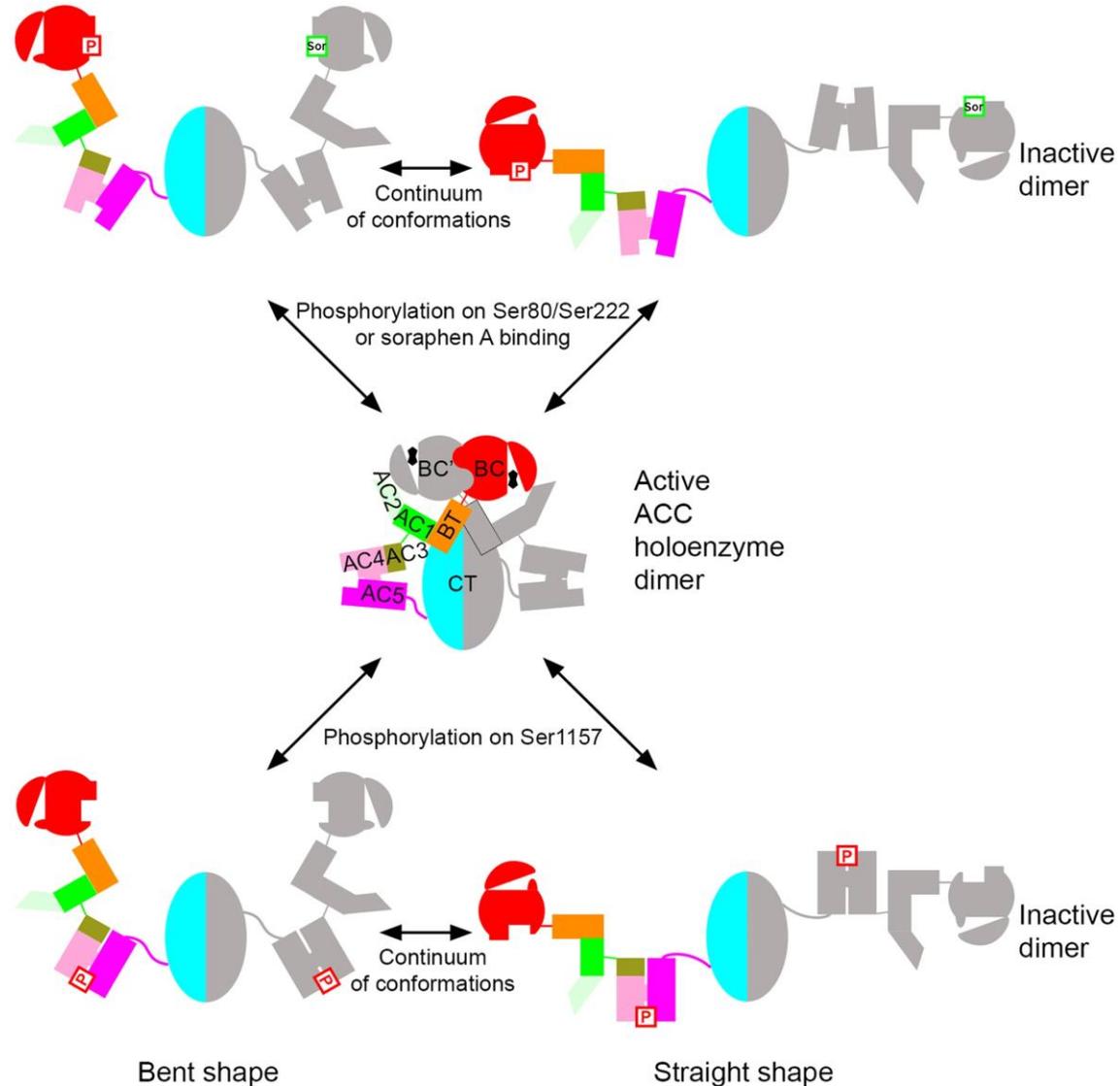


Acetil CoA carbossilasi del lievito è strettamente regolata dalla fosforilazione. La proteina chinasi (sucrose non-fermenting 1, Snf1) attivata fosforila l'OH della Ser dell'acetil-CoA carbossilasi (Acc1) inibendola.



Esempio di meccanismo molecolare mediante fosforilazione nella regione centrale (indicata con Ser1157) che stabilizza la forma monomerica del dominio biotina carbossilasi (BC) dell'Acc1.

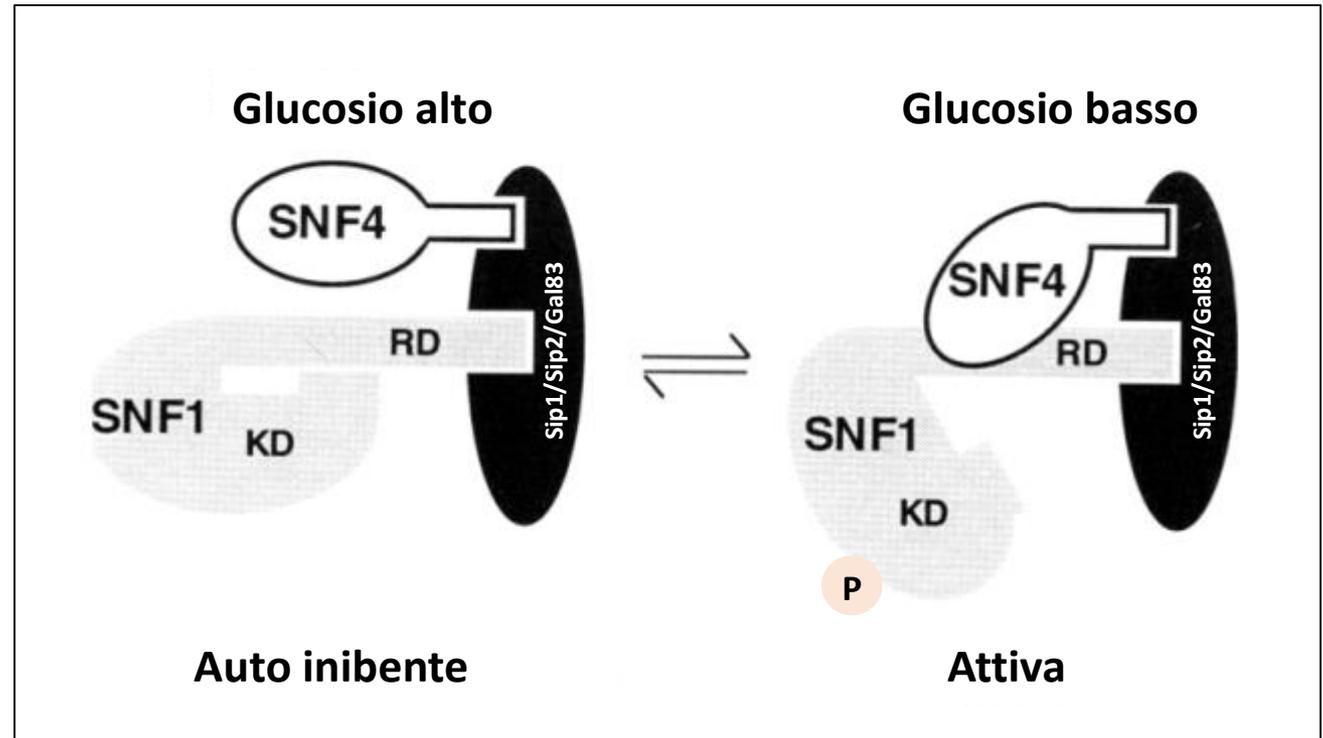
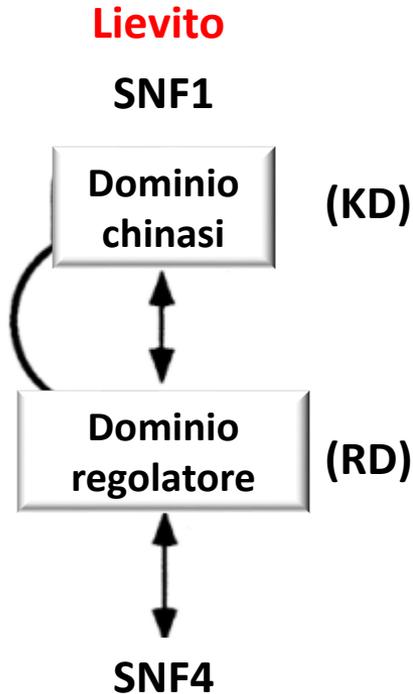
Dopo la fosforilazione, la regione del sito attivo del dominio BC è sottoposta a grandi cambiamenti conformazionali che alterano il legame della biotina e, quindi, la catalisi enzimatica.



BC: biotina carbossilasi
 BT: proteina trasportatrice della biotina
 CT: transcarbossilasi

Modello di regolazione del complesso proteico chinasi SNF1

La proteina SNF1 è associata a formare un complesso con la sua subunità attivante SNF4 e altre proteine (Sip1/Sip2/Gal83).



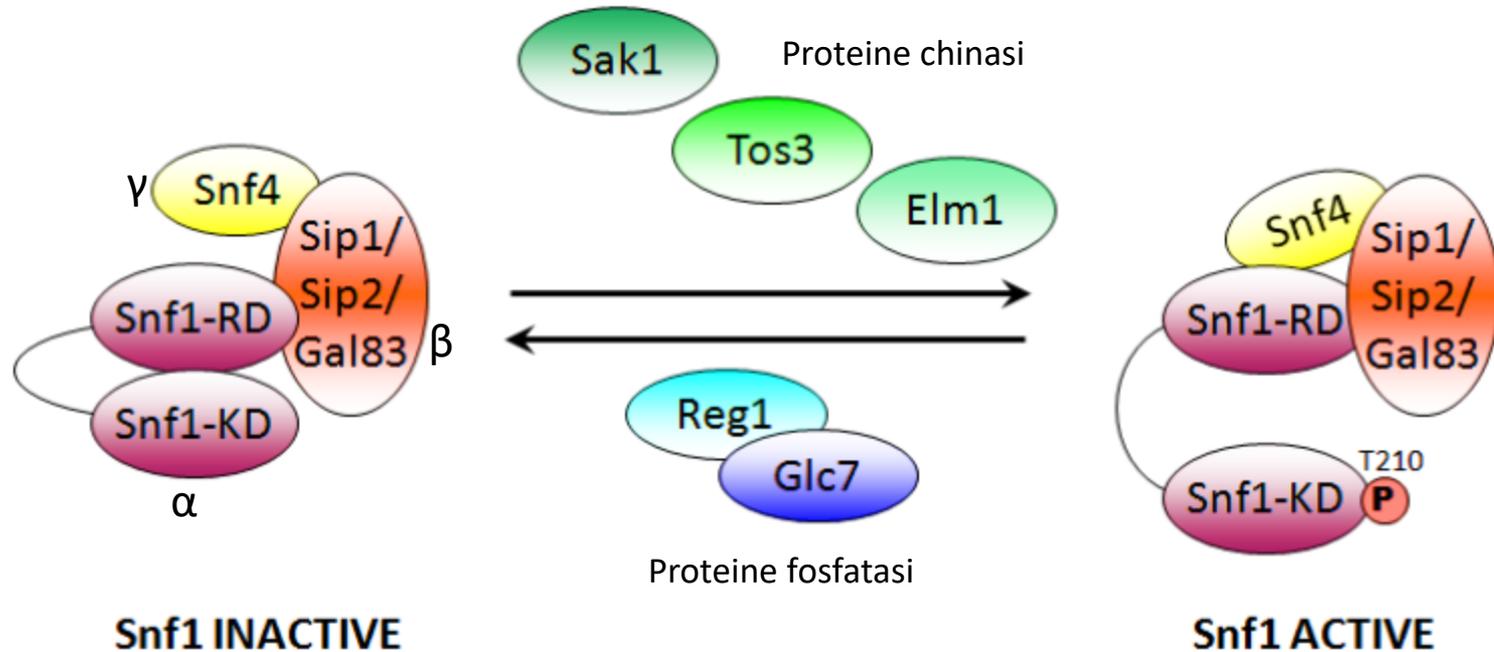
Glucosio alto: Il dominio chinasi (KD) si lega al dominio regolatore (RD) della proteina SNF1, arrecando auto inibizione dell'attività chinasica.

Glucosio basso: Quando la subunità SNF4 si lega alla regione carbossiterminale del dominio regolatore (RD) di SNF1, libera il dominio chinasico (KD) attivando la proteina.

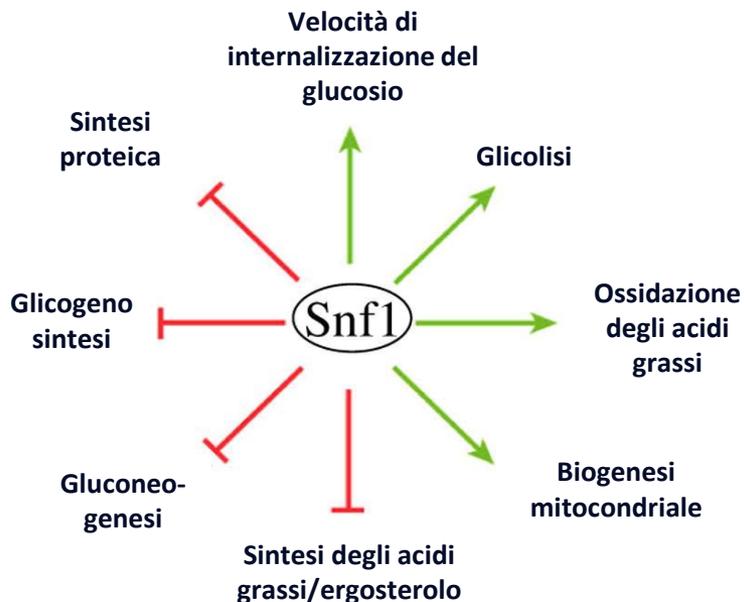
Modello di regolazione del complesso proteico chinasi Snf1

Nel lievito la proteina chinasi Snf1 esiste come complesso eterotrimerico costituito dalla subunità catalitica α (Snf1) e dalle subunità regolatrici β (Gal83, Sip1 e Sip2) e γ (Snf4).

L'attivazione della Snf1 richiede sia la fosforilazione del residuo Thr210 nel dominio chinasi (Snf1-KD) da parte delle proteine chinasi Sak1, Tos3 ed Elm1, sia l'interazione del dominio regolatorio (RD) con la subunità Snf4.



La **proteina chinasi Snf1** attiva tutte le reazioni di produzione di energia (ATP)



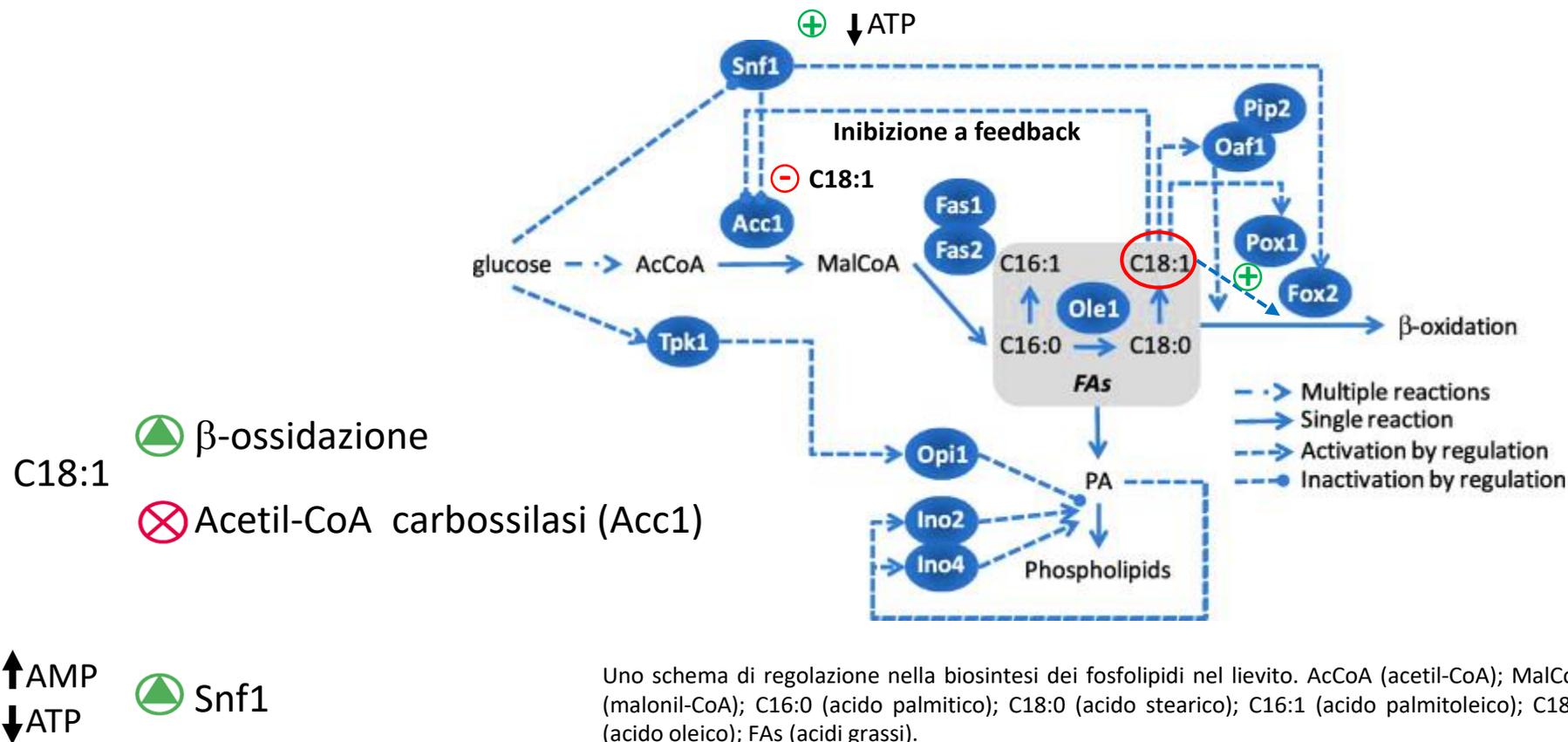
Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. *FEBS Letters* Volume 583, Issue 24, 17 December 2009, Pages 3905-3913

Nel lievito è coinvolta nella regolazione del metabolismo:

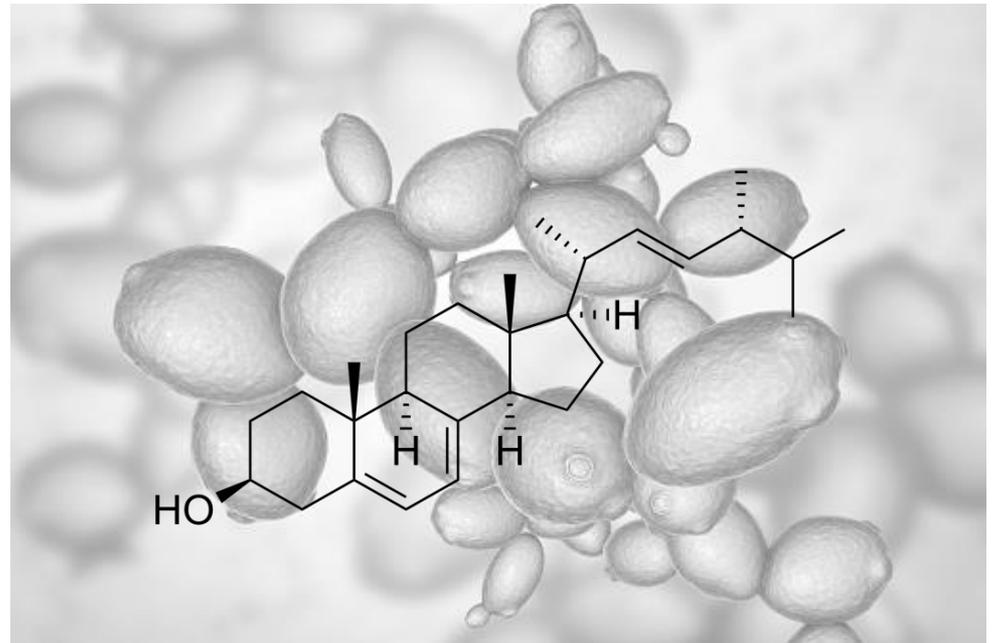
- è necessaria per l'espressione di geni che consentono la crescita cellulare in presenza di fonti di carbonio fermentabili diverse dal glucosio come, saccarosio, galattosio, maltosio o fonti di carbonio non fermentabili come, etanolo e glicerolo.
- modula l'espressione di geni gluconeogenici.
- regola l'espressione di geni biosintetici degli aminoacidi attivando e promuovendo i fattori della trascrizione.
- controlla lo stato energetico cellulare, in condizioni limitanti di glucosio, inibisce la biosintesi degli acidi grassi fosforilando e inattivando l'enzima acetil-CoA carbossilasi (Acc1).
- è coinvolta nella risposta a diversi stress cellulari come quelli causati dai metalli pesanti.
- regola anche il fattore della trascrizione delle Heat Shock protein, garantendo la resistenza cellulare alle alte temperature.
- è coinvolta nei collegamenti tra il metabolismo energetico e l'invecchiamento cellulare: la sovraespressione della Snf1 e l'assenza della proteina Sip2, della subunità regolatrice β , favorisce l'invecchiamento, mentre l'eliminazione della subunità Snf4 accresce la durata della vita cellulare.
- regola positivamente l'autofagia, un processo per il riciclaggio di organelli e di macromolecole ed è in grado di modulare la meiosi.

La **proteina Snf1** inattiva la **Acc1** mentre stimola la β -ossidazione.

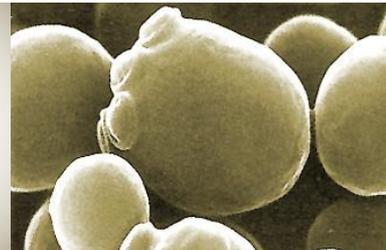
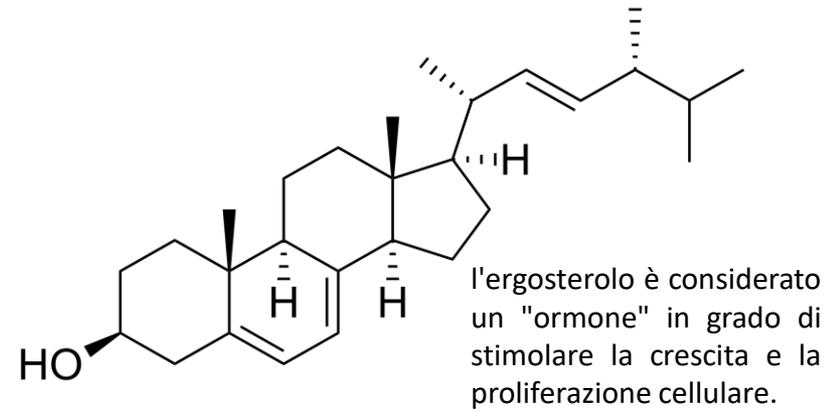
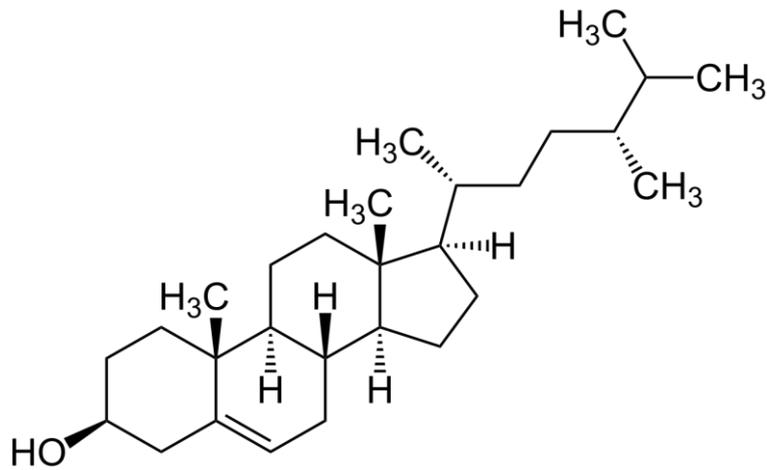
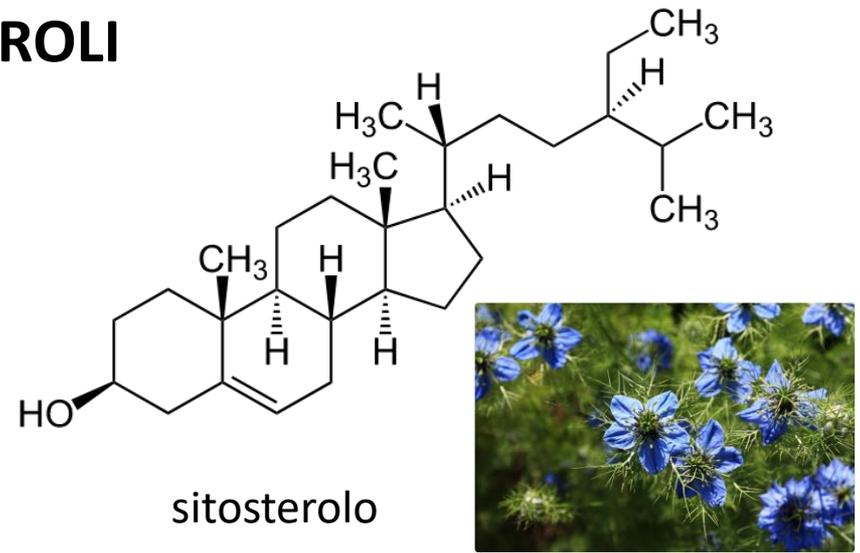
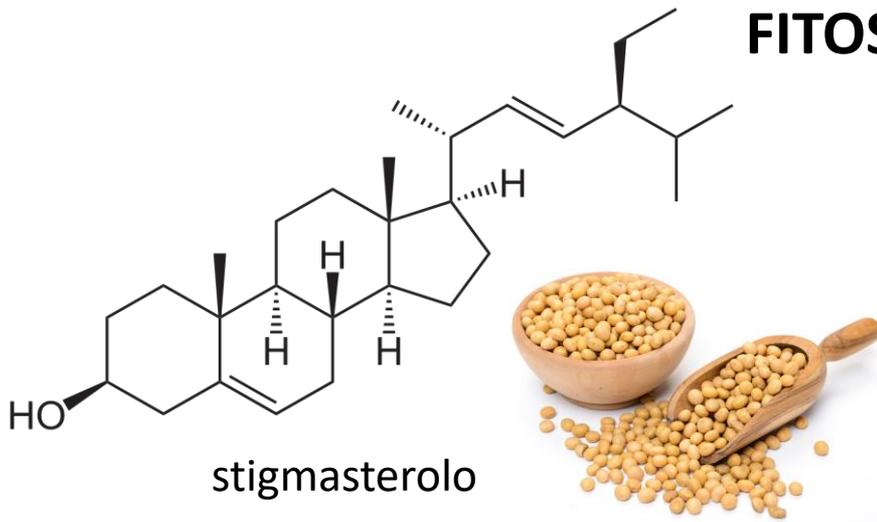
La **Snf1** viene attivata quando nella cellula il livello di **ATP** è basso (alto **AMP**; tutti i processi di consumo di **ATP** sono inattivati come la biosintesi dei lipidi, mentre si attivano i processi che generano **ATP** come la β -ossidazione). Poiché l'acido oleico (**C18:1**) svolge un ruolo chiave nella biosintesi e regolazione dei fosfolipidi, questo lipide agisce come inibitore a feedback dell'**Acc1** e come attivatore della β -ossidazione. Quindi, se c'è accumulo di acido oleico, c'è inibizione a feedback della propria biosintesi e la contemporanea attivazione della β -ossidazione.



Biosintesi dell'ergosterolo



FITOSTEROLI

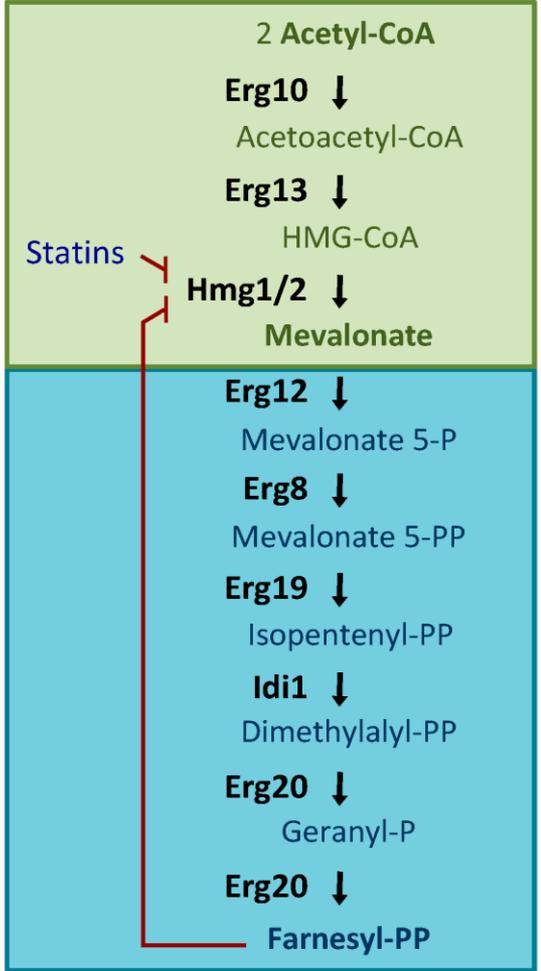


Biosintesi dell'ergosterolo in *S. cerevisiae*

La prima parte (verde): (vacuolo e mitocondri) è la formazione di mevalonato dall'acetyl-CoA. La fase limitante di questa fase è la riduzione a mevalonato da parte delle 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasi (Hmg1/2).

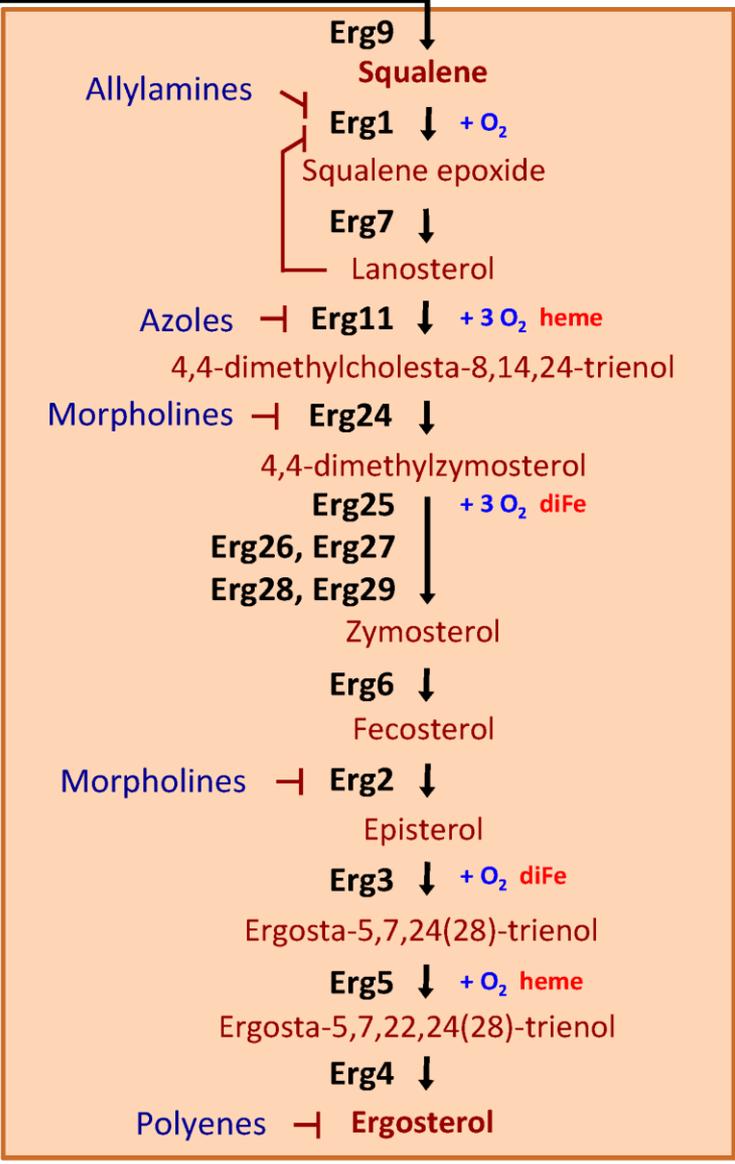
La seconda parte (blu): (vacuolo) è la formazione del farnesil-PP.

La terza parte (arancione): (reticolo endoplasmatico) o via tardiva è la sintesi dell'ergosterolo.



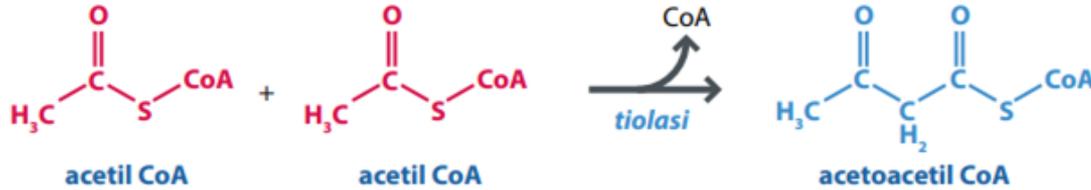
- Ubiquinone
- Dolichol
- Heme
- Prenylated proteins

x2



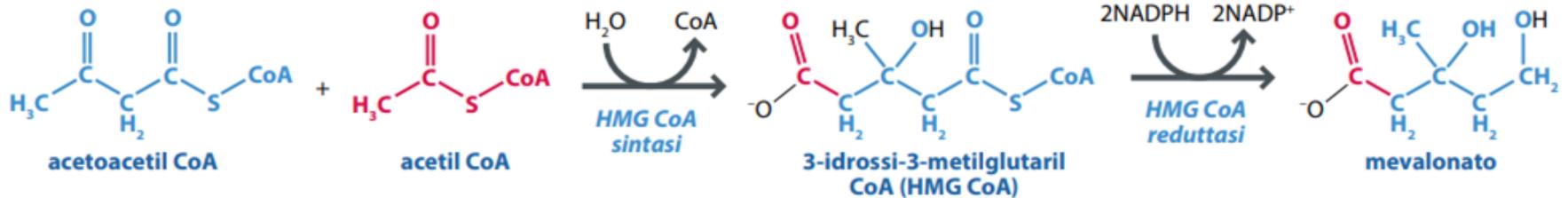
Nella prima fase della via di sintesi del ergosterolo viene sintetizzato l'isopentenil pirofosfato a partire da acetil CoA

(A) sintesi dell'acetoacetil CoA



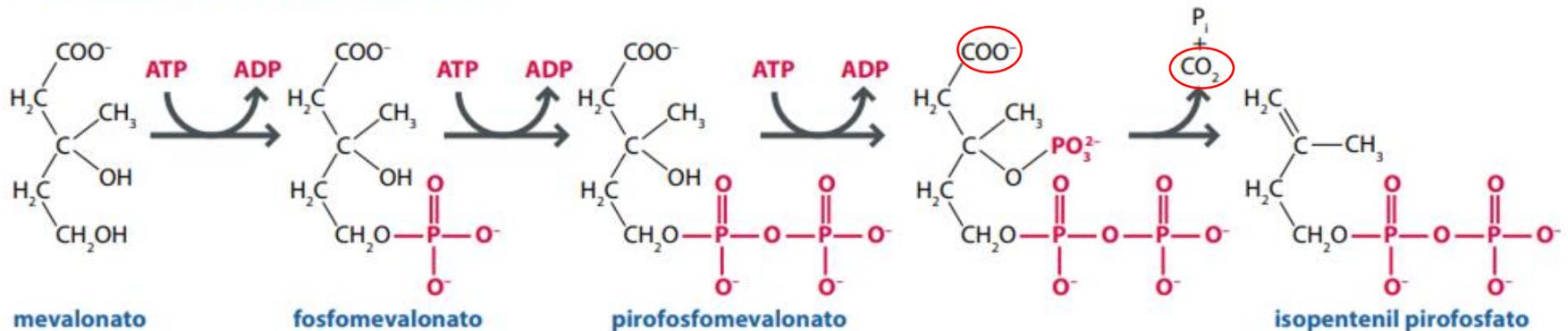
La prima fase

(B) sintesi dell'HMG CoA e del mevalonato

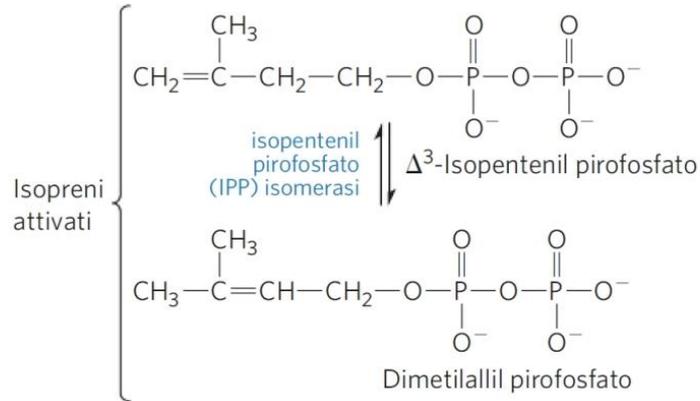


La seconda fase

(C) da mevalonato a isopentenil pirofosfato

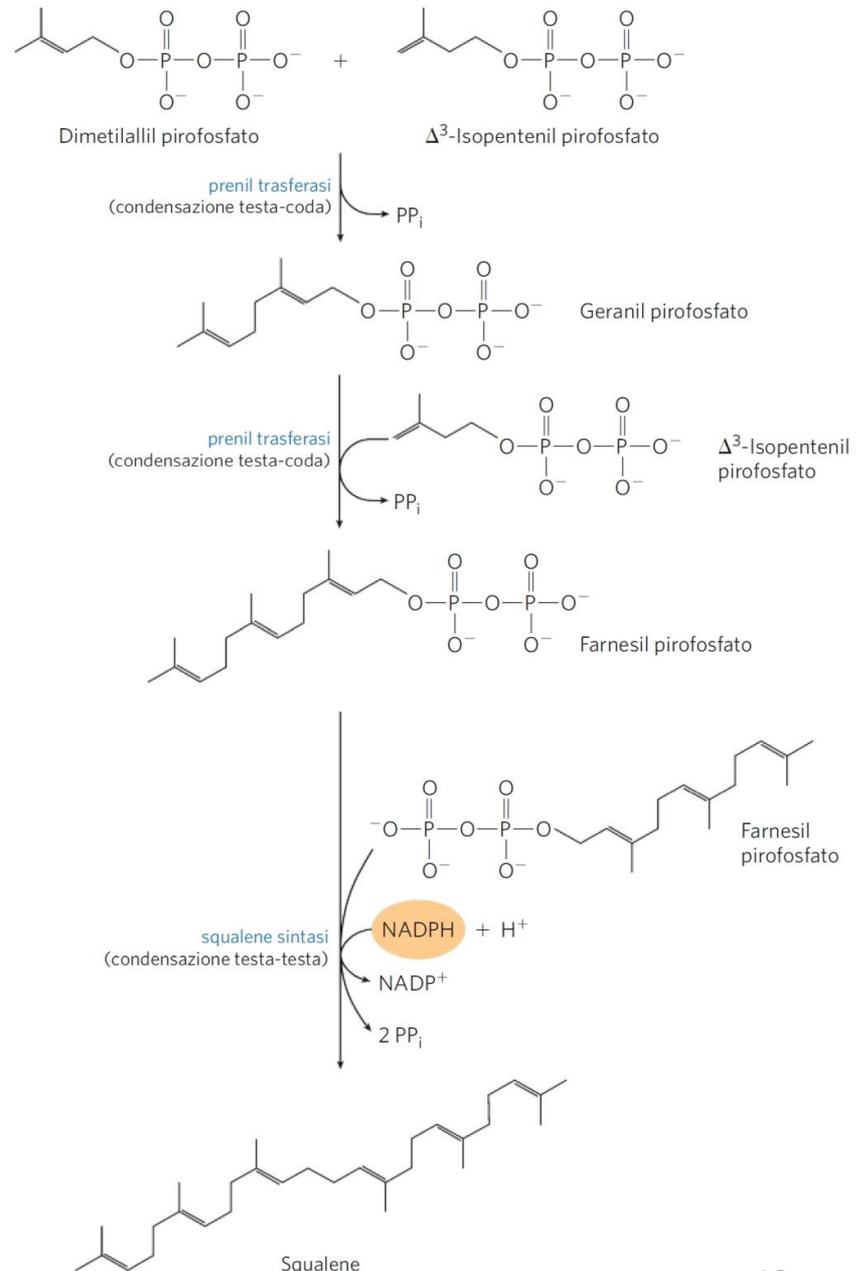


La condensazione di sei unità isopreniche attivate per formare lo squalene



L'isopentenil pirofosfato e il dimetilallil pirofosfato condensano testa-coda (liberazione di un gruppo pirofosfato) e si forma una catena a 10 atomi di carbonio: geranyl pirofosfato. Questo subisce un'altra condensazione testa-coda in cui viene prodotto un intermedio, a 15 atomi di carbonio, il farnesil pirofosfato.

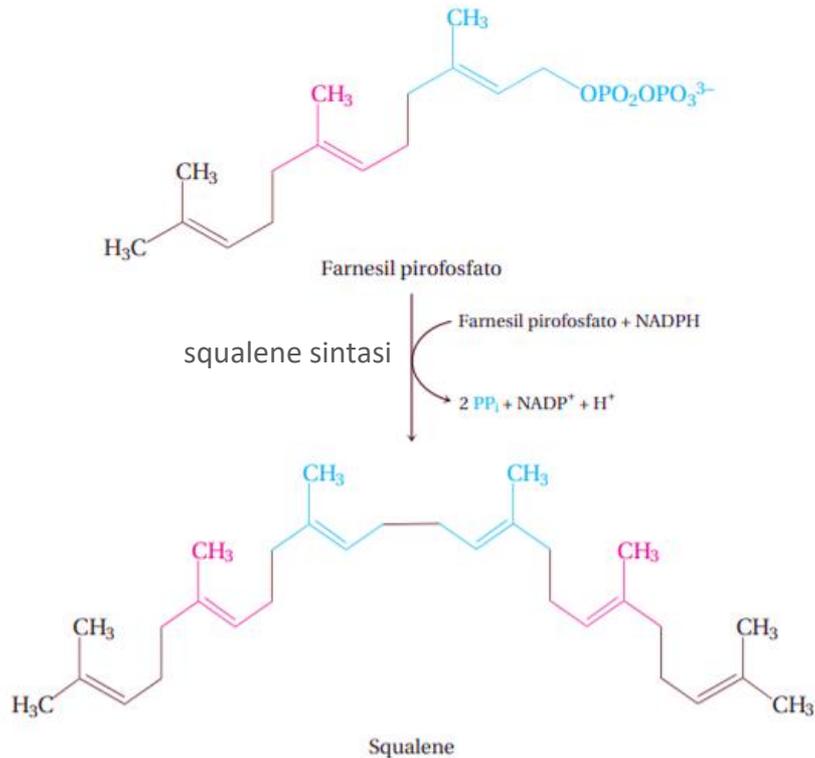
Infine due molecole di farnesil pirofosfato si uniscono testa-testa con eliminazione di entrambi i pirofosfato, formando lo squalene costituito da 30 atomi di carbonio.



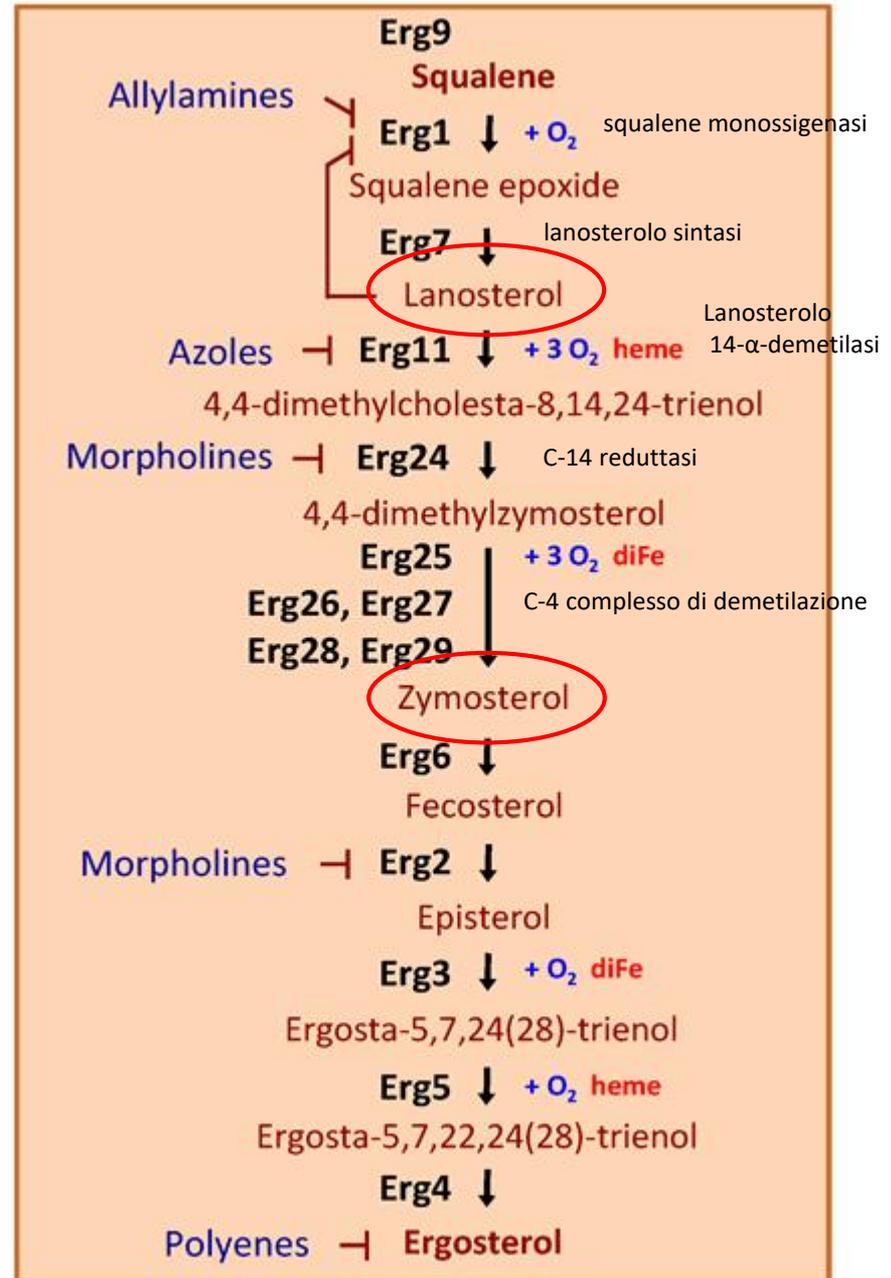
Biosintesi dell'ergosterolo in *S. cerevisiae*

La terza fase

L'ergosterolo è sintetizzato nel reticolo endoplasmatico ed è trasportato principalmente alla membrana plasmatica (PM).



Lo zimosterolo è il primo intermedio della sintesi e può essere incorporato nelle membrane cellulari. La biosintesi dell'ergosterolo dipende sia dall'ossigeno che dal ferro rappresentando i fattori limitanti della sintesi.



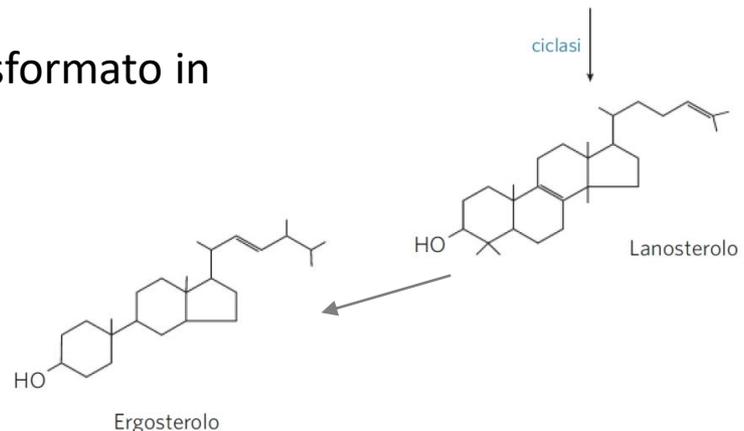
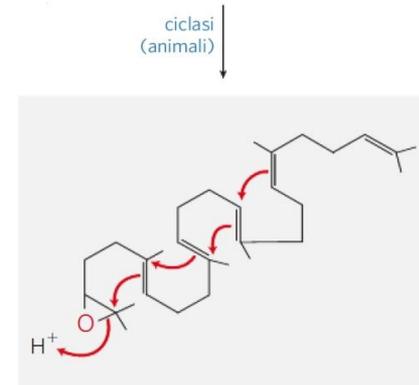
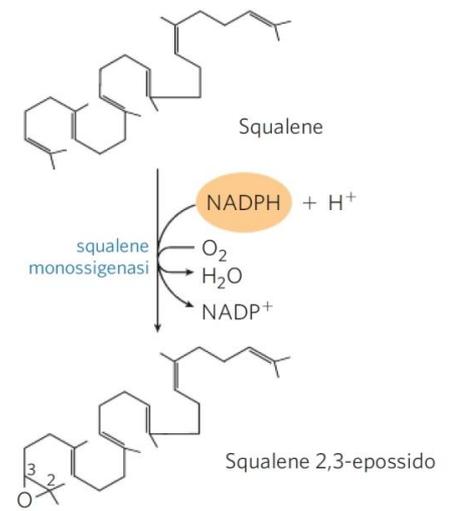
La chiusura degli anelli converte lo squalene lineare nel nucleo steroideo condensato a quattro anelli

La squalene monossigenasi aggiunge un atomo di ossigeno prelevandolo dall'O₂ all'estremità della molecola dello squalene formando un epossido, l'altro atomo della molecola di O₂ viene ossidato ad acqua dal NADPH.

I doppi legame dello squalene 2,3 epossido sono posizionali in modo tale che in una reazione la struttura lineare dello squalene epossido viene trasformata in una struttura ciclica.

La ciclizzazione porta alla formazione del lanosterolo.

Nelle fasi successive, il lanosterolo viene trasformato in zimosterolo ed infine in ergosterolo.



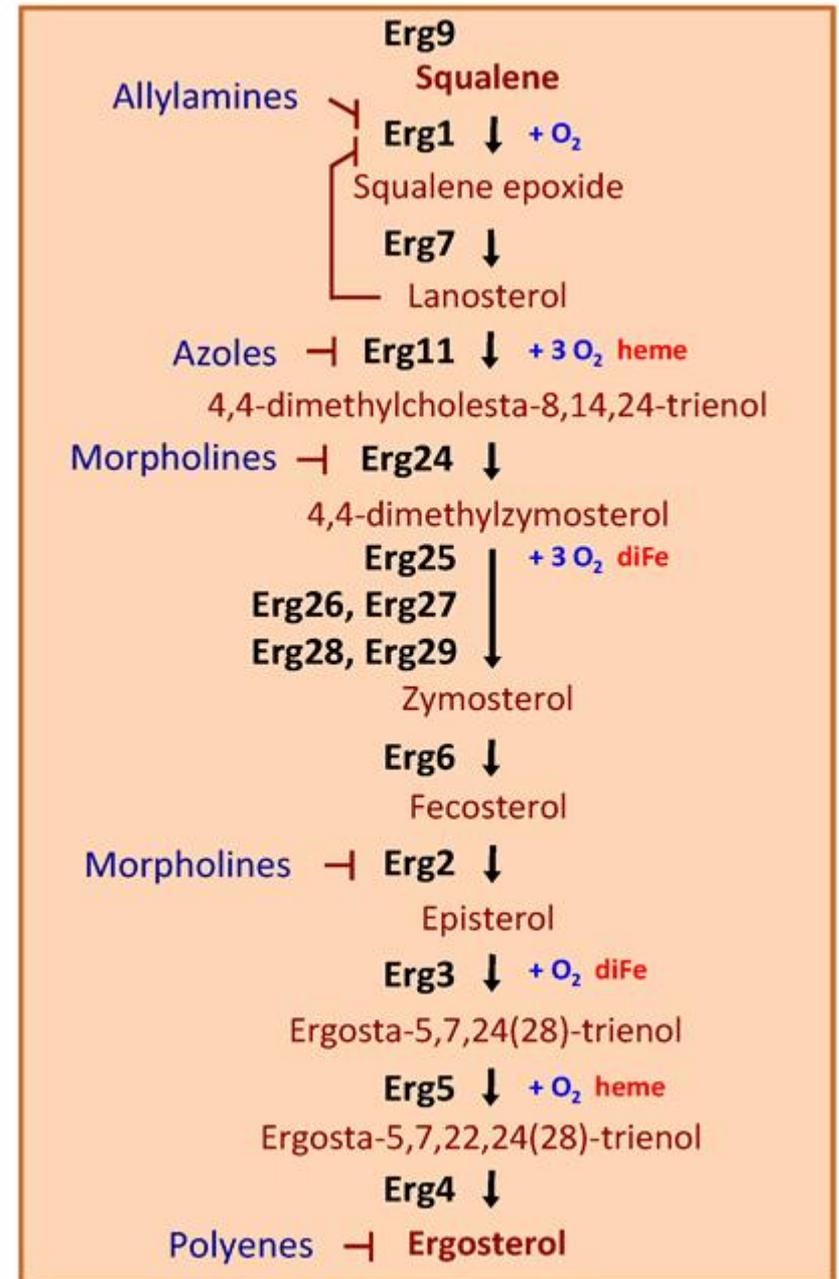
Localizzazione subcellulare degli enzimi di biosintesi dell'ergosterolo:

Gli enzimi che partecipano alla biosintesi dell'ergosterolo sono proteine di transmembrana che si associano a formare un complesso funzionale, denominato Ergosoma (Erg), per facilitare la catalisi.

Erg11, Erg25, Erg27 ed Erg28 rappresentano il nucleo centrale del complesso.

Sebbene la sintesi degli steroli avvenga nell'ER, vari enzimi Erg (Erg1, Erg7, Erg27 ed Erg6) possono anche localizzarsi negli particelle lipidiche.

L'associazione e la localizzazione subcellulare degli enzimi Erg sembra determinarne la funzionalità del complesso, sebbene la sua regolazione sia ancora poco chiara.



La biosintesi dell'ergosterolo è un processo ad alto consumo energetico, per ottenere una singola molecola di ergosterolo sono necessarie 24 molecole di ATP e 16 molecole di NADPH.

In presenza di ossigeno il *S. cerevisiae* preferisce sintetizzare l'ergosterolo piuttosto che assorbire quantità significative extracellulari di lipide, questo fenomeno potrebbe essere una strategia per garantire agli steroidi «più adeguati» di essere incorporati nelle membrane. In condizione aerobiche, è probabile che l'ergosterolo di nuova sintesi sposti gli steroli esogeni nella PM.

La ridotta capacità di sintetizzare steroli **in condizioni ipossiche o anaerobiche** è compensata dall'incorporazione di steroli dall'esterno, si formano microdomini arricchiti da sfingolipidi e steroli ovvero i *lipid rafts* che vengono progressivamente trasportati dalla superficie cellulare al RE attraverso le proteine trasportatrici. Nel *S. cerevisiae*, l'assorbimento dello sterolo e l'incorporazione nella PM è un meccanismo ATP-dipendente.

Nonostante l'ER sia il sito di biosintesi degli steroli, contiene pochissimo ergosterolo, perché viene principalmente trasportato alle membrane cellulari, in particolare alla PM. Nell'ER, gli steroli sono parzialmente esterificati e successivamente immagazzinati come riserva lipidica nelle particelle lipidiche (LP) mentre, gli steroli non esterificati vanno direttamente alla PM.

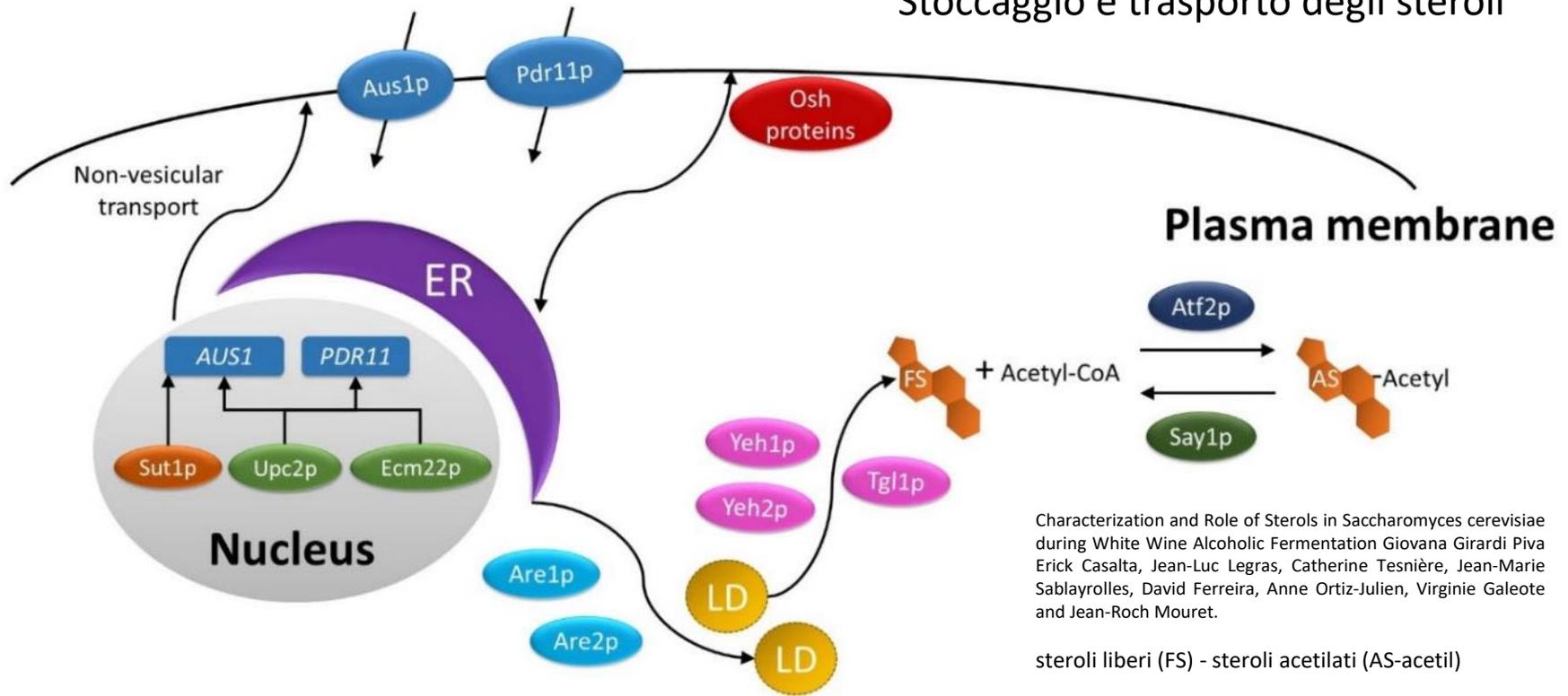
Disintossicazione da steroli: Le cellule di lievito possono produrre in eccesso l'ergosterolo o steroli intermedi che possono essere incorporati, in una certa misura, nelle membrane cellulari per modulare le loro proprietà fisico-chimiche.

L'accumulo di intermedi di steroli liberi può diventare tossico per le cellule poiché alterano la respirazione mitocondriale, con conseguente generazione di intermedi tossici di metilsterolo, che diminuiscono la capacità di sintetizzare il centro ferro-zolfo (Fe-S) delle proteine.

Per prevenire questi effetti dannosi, le cellule di lievito utilizzano molteplici meccanismi di disintossicazione:

- Gli steroli non possono essere degradati, ma solo conservati sotto forma di esteri nelle LP o secreti nel mezzo come acetati di sterolo.
- Con un altro meccanismo di disintossicazione, gli steroli vengono acetilati e trasportati alla PM, dove vengono secreti tramite alcune proteine del lievito correlate agli agenti patogeni. In condizioni normali, l'ergosterolo appena sintetizzato viene acetilato e rapidamente deacetilato nel RE. Oltre alla disintossicazione, l'acetilazione degli steroli contribuisce anche all'eliminazione dei lipidi danneggiati.

Stoccaggio e trasporto degli steroli

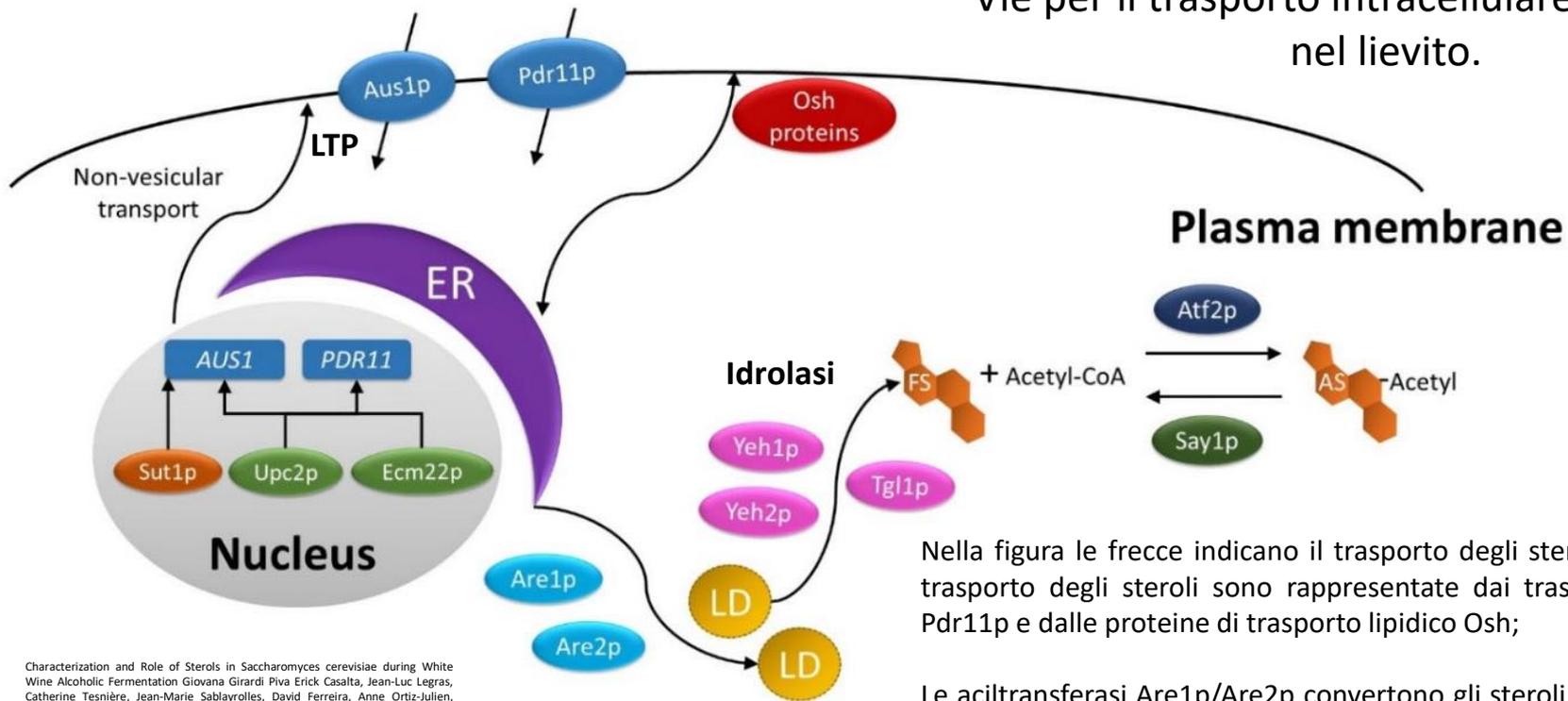


Un eccesso di steroli liberi nella cellula può essere tossico, così, gli steroli in eccesso vengono immagazzinati come esteri sotto forma di goccioline lipidiche (LD) o secreti nel citoplasma come acetato di sterolo.

Nel rilascio sono coinvolte lipasi specifiche, a seconda dell'equilibrio tra sintesi, trasporto ed esterificazione di steroli liberi, essenziali per il mantenimento dell'omeostasi degli steroli.

Un altro meccanismo consiste nell'acetilazione e deacetilazione degli acetati di steroli rispettivamente dall'alcool acetiltransferasi (**Atf2p**) e dalla sterolo deacetilasi (**Say1p**). Gli steroli acetilati vengono trasportati dalle proteine del lievito alla membrana plasmatica; questo meccanismo è sempre correlato alla presenza di agenti patogeni.

Vie per il trasporto intracellulare degli steroli nel lievito.



Characterization and Role of Sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during White Wine Alcoholic Fermentation Giovana Girardi Piva Erick Casalta, Jean-Luc Legras, Catherine Tesnière, Jean-Marie Sablayrolles, David Ferreira, Anne Ortiz-Julien, Virginie Galeote and Jean-Roch Mouret.

Nella figura le frecce indicano il trasporto degli steroli. Le proteine di trasporto degli steroli sono rappresentate dai trasportatori Aus1p e Pdr11p e dalle proteine di trasporto lipidico Osh;

Le aciltransferasi Are1p/Are2p convertono gli steroli liberi (FS) in esteri da immagazzinare nelle LD; Le idrolasi Yeh1p/Yeh2p/Tgl1p controllano il rilascio degli steroli dalle LD; l'Atf2p acetiltransferasi va ad acetilare gli FS; Say1p deacetilasi per la deacetilazione degli steroli acetilati (AS-acetil)

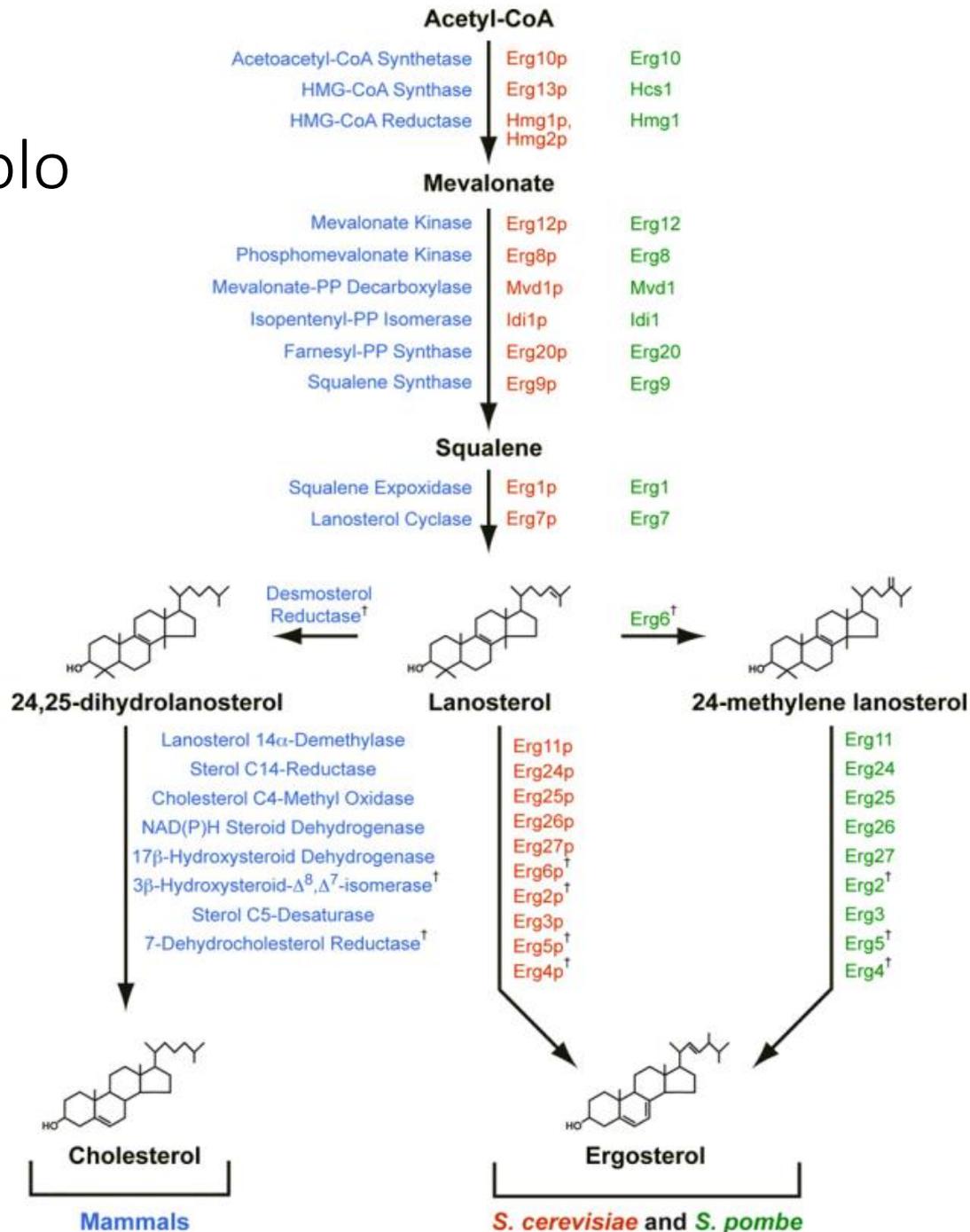
Le vie di trasporto vescicolari e non vescicolari ATP-dipendenti trasportano gli steroli sintetizzati nel reticolo endoplasmatico fino alla membrana plasmatica.

Nel lievito esistono sette proteine di trasporto chiamate Osh che hanno la funzione di trasportare all'interno della cellula gli steroli localizzati nella membrana plasmatica.

Il trasporto non vescicolare degli steroli alle membrane avviene attraverso le proteine di trasferimento dei lipidi (LTP), queste sono in grado di facilitare lo scambio di steroli tra la membrana plasmatica e il RE. La proteina Aus1p è in grado di catturare gli steroli trasportati dalle LTP.

Le idrolasi Yeh1p, Yeh2p e Tgl1p sono coinvolte nel rilascio degli steroli situati nelle LD e sono responsabili della regolazione dei livelli di ergosterolo libero nella cellula.

Biosintesi dell'ergosterolo



John S. Burg, Peter J. Espenshade. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. Progress in Lipid Research 50 (2011) 403-410



- *Regolazione*

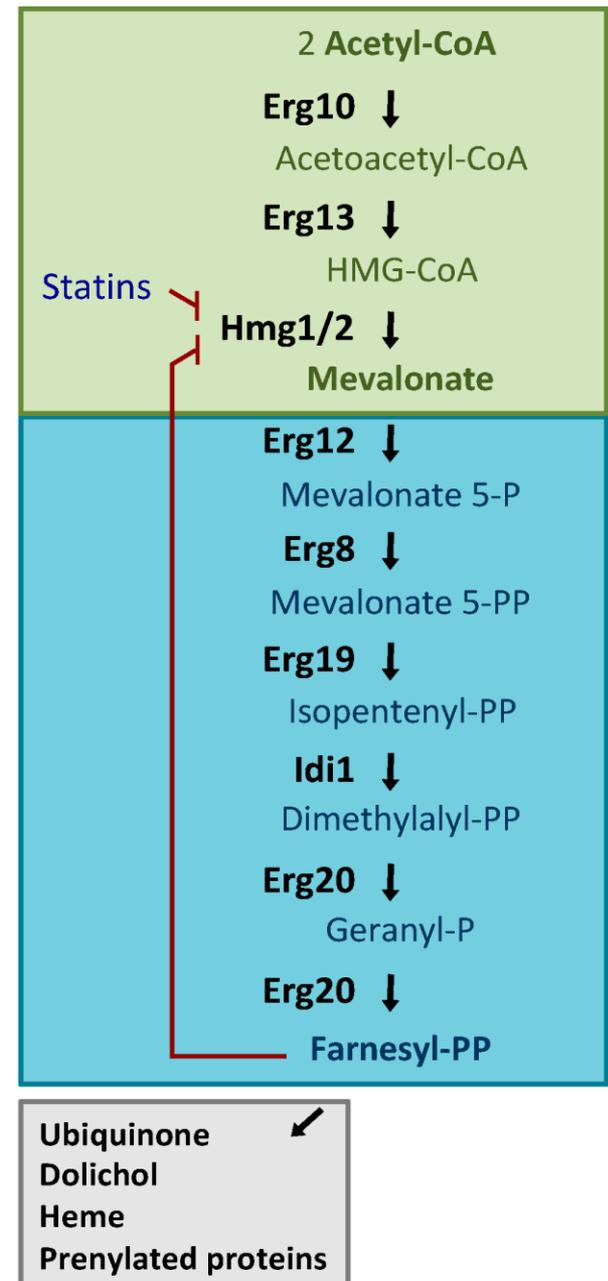
Regolazione della biosintesi dell'ergosterolo:

Il mantenimento di appropriate concentrazioni di ergosterolo è ottenuto mediante in meccanismi a feedback

Regolazione a feedback: Un punto di controllo chiave per la biosintesi dell'ergosterolo è la prima tappa con la riduzione del 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato da parte della 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasi (Hmg1/2), una concentrazione elevata del farnesil-PP inibisce l'enzima reductasi.

Nel *S. cerevisiae*, l'enzima Hmg1 è molto più stabile del Hmg2 convertendolo nell'enzima regolatore chiave dell'intero processo di produzione dell'ergosterolo.

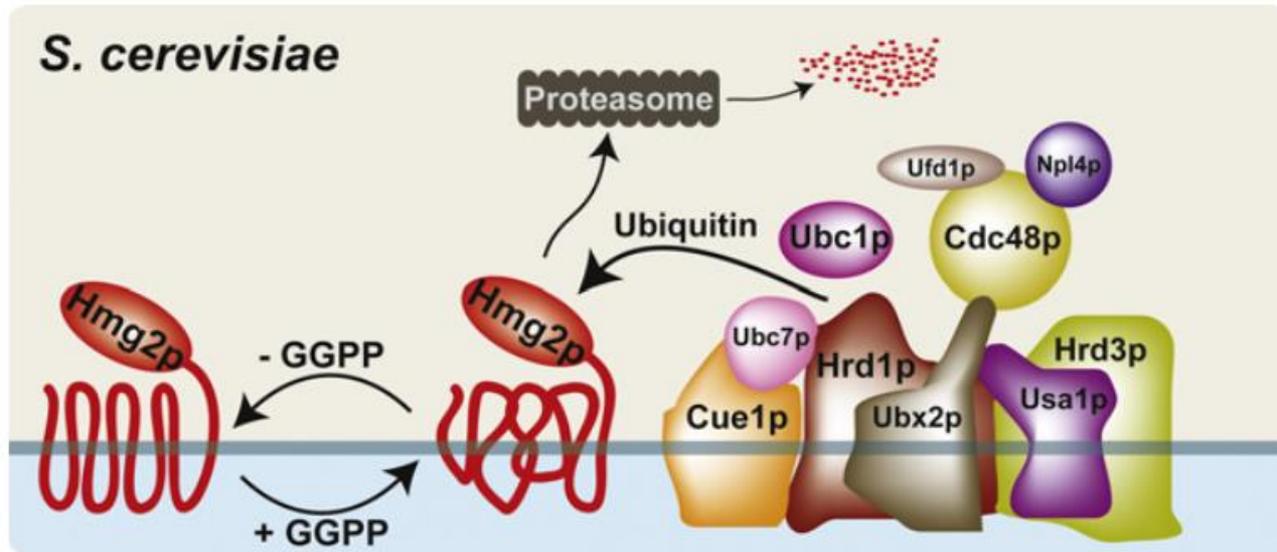
Durante la fermentazione, la glicolisi rende sbilanciato lo stato redox così il lievito utilizza la fermentazione per mantenere l'equilibrio ossidoriduttivo con produzione di etanolo e solo una piccola parte dell'acetilCoA prodotto nel citoplasma potrà essere convertito in squalene.



Regolazione degli steroli: nella sintesi del farnesil pirofosfato (FPP), metabolita della via del mevalonato, il passaggio chiave è la conversione del 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) in mevalonato da parte dell'HMG-CoA reductasi (HMGR). Nel lievito ci sono due HMGR, Hmg1 e Hmg2.

Nel *S. cerevisiae* la Hmg1 ha la massima attività HMGR durante crescita aerobica.

La crescita aerobica promuove la sintesi dell'eme che, a sua volta, attiva il fattore di trascrizione per la sintesi della Hmg1. La Hmg1 è anche regolata da un sistema a feedback e il segnale molecolare che regola il controllo è il farnesil-PP.



La crescita aerobica reprime l'espressione di Hmg2.

La proteina Hmg2 è regolata da un turnover proteico attraverso un meccanismo di degradazione da parte di un complesso multiproteico associato alla membrana del reticolo endoplasmatico.

Il segnale lipidico che controlla la velocità di degradazione della Hmg2 è il geranilgeranil pirofosfato (GGPP). L'elevata attività HMGR aumenta la sintesi del GGPP, che a sua volta altera il ripiegamento della Hmg2 stimolando la degradazione. Con questo meccanismo il lievito mantiene l'omeostasi dei lipidi.