

Metabolismo dei lipidi

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



Particelle lipidiche nei lieviti:

Le particelle lipidiche sono organelli sferici composti da:

- Un Core idrofobico: triacilgliceroli (TAG) e steroli esteri (STE)
- Un Monostrato fosfolipidico: che circonda il core Proteine associate: che regolano metabolismo lipidico, crescita, mobilizzazione.

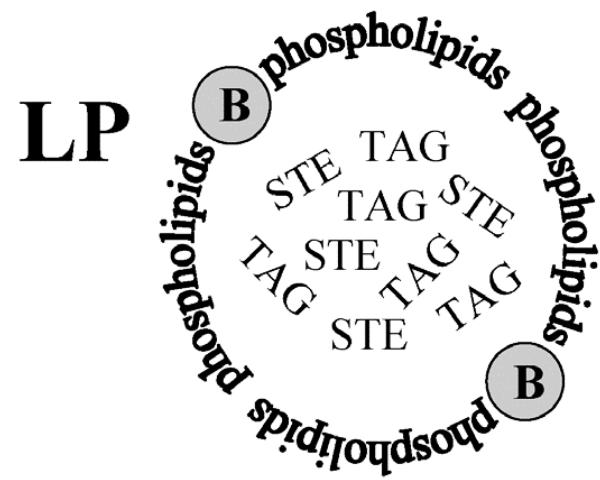
Esse si formano nel reticolo endoplasmatico (ER) e si distaccano come goccioline.

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

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

Hanno funzione di riserva energetica perché i TAG immagazzinati possono essere mobilizzati durante carenza di nutrienti o stress. E nell'omeostasi lipidica perché regolano gli equilibri tra lipidi di membrana e lipidi di riserva.

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

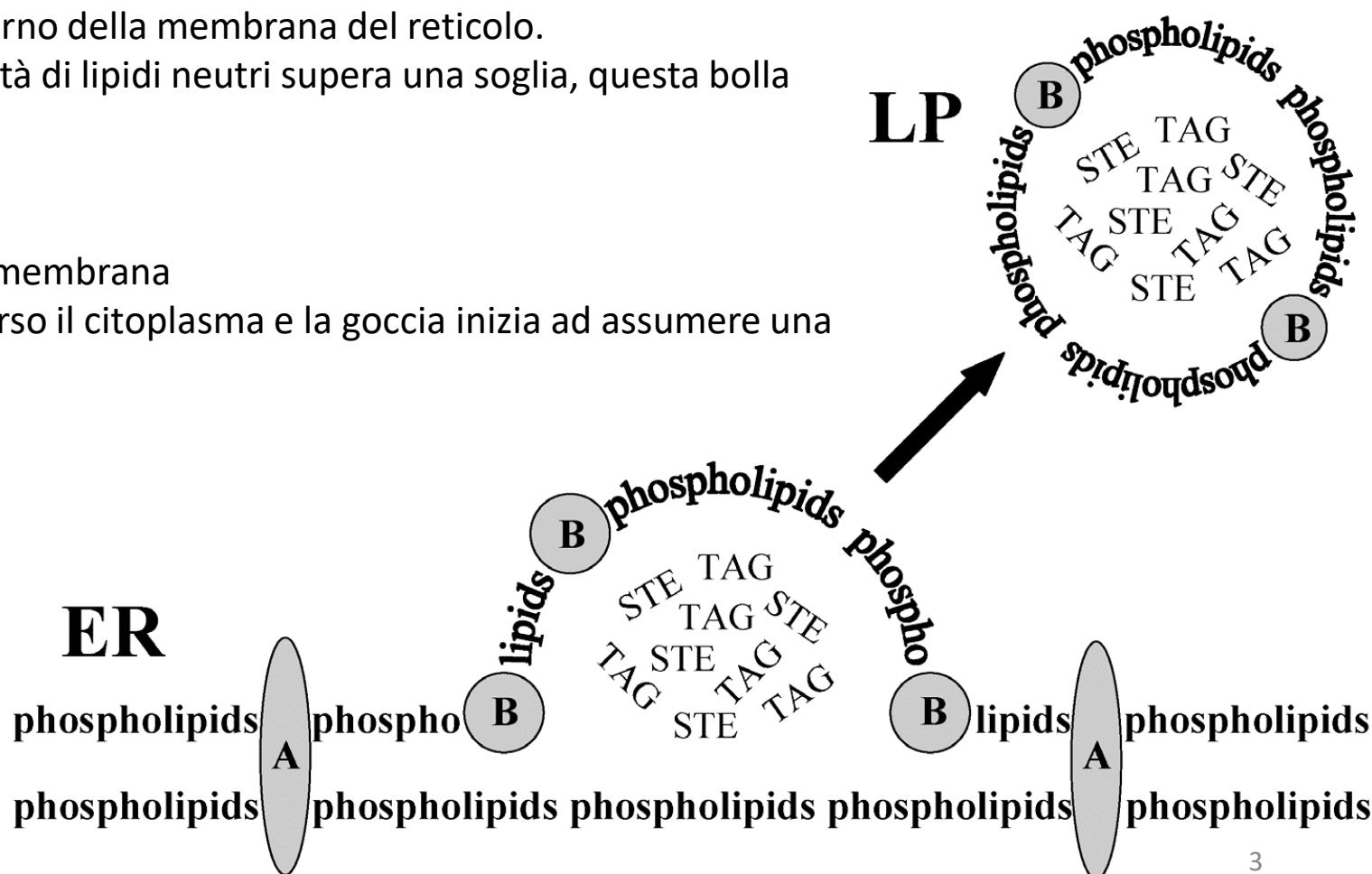
Inizia nella membrana del reticolo endoplasmatico, dove vengono sintetizzati i triacilgliceroli (TAG) e gli sterol esteri (STE)

Questi lipidi sono fortemente idrofobici, quindi non possono restare dispersi nel doppio strato: tendono a unirsi per formare un'unica massa tra i due foglietti della membrana.

Man mano che TAG e STE si accumulano, si crea una sorta di bolla idrofobica all'interno della membrana del reticolo.

Quando la quantità di lipidi neutri supera una soglia, questa bolla comincia a:

- espandersi
- deformare la membrana
- protrudere verso il citoplasma e la goccia inizia ad assumere una forma sferica.



Gemmazione dalla membrana dell'ER:

La protuberanza si stacca parzialmente dalla membrana formando una goccia lipidica vera e propria dove il core idrofobico (TAG e STE) è circondato da un monostrato fosfolipidico.

Alcune proteine dell'ER rimangono associate alla goccia perché la sua superficie deriva direttamente da uno dei foglietti fosfolipidici del reticolo.

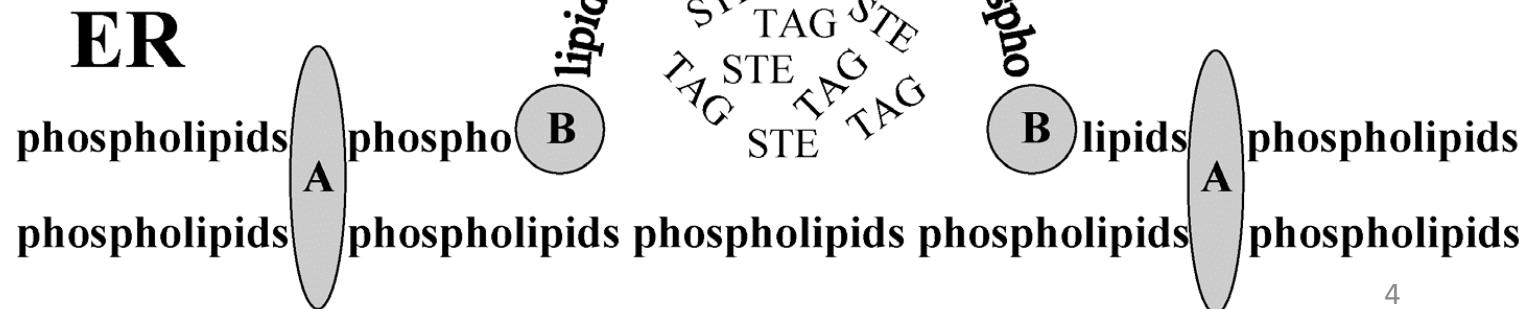
Una volta libera nel citoplasma, la particella lipidica può:

- crescere incorporando nuovi lipidi
- fondersi con altre gocce
- reclutare proteine specifiche

Anche se rilasciate nel citoplasma, le LP restano spesso collegate all'ER attraverso contatti proteici.

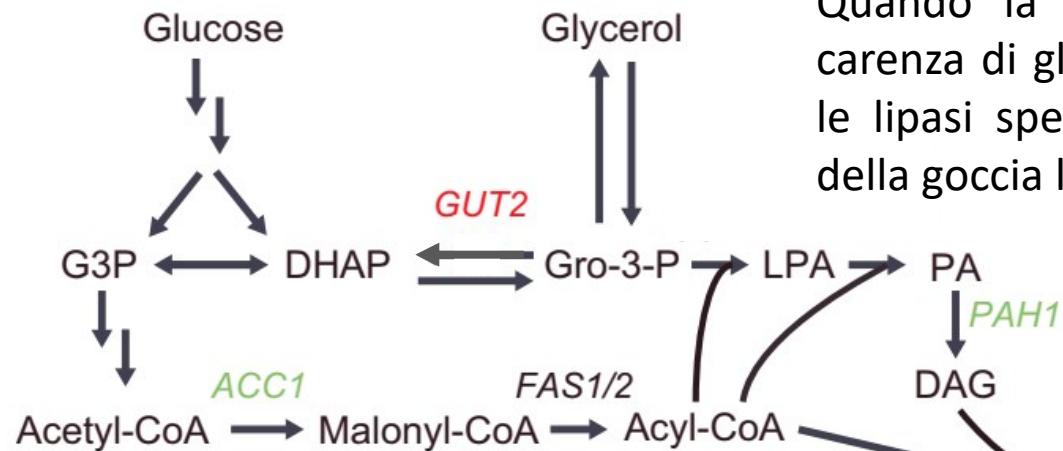
Possono anche interagire con:

- Il vacuolo (per degradazione via lipofagia)
- I mitocondri (per fornire acidi grassi)
- I perossisomi (per β -ossalidazione)

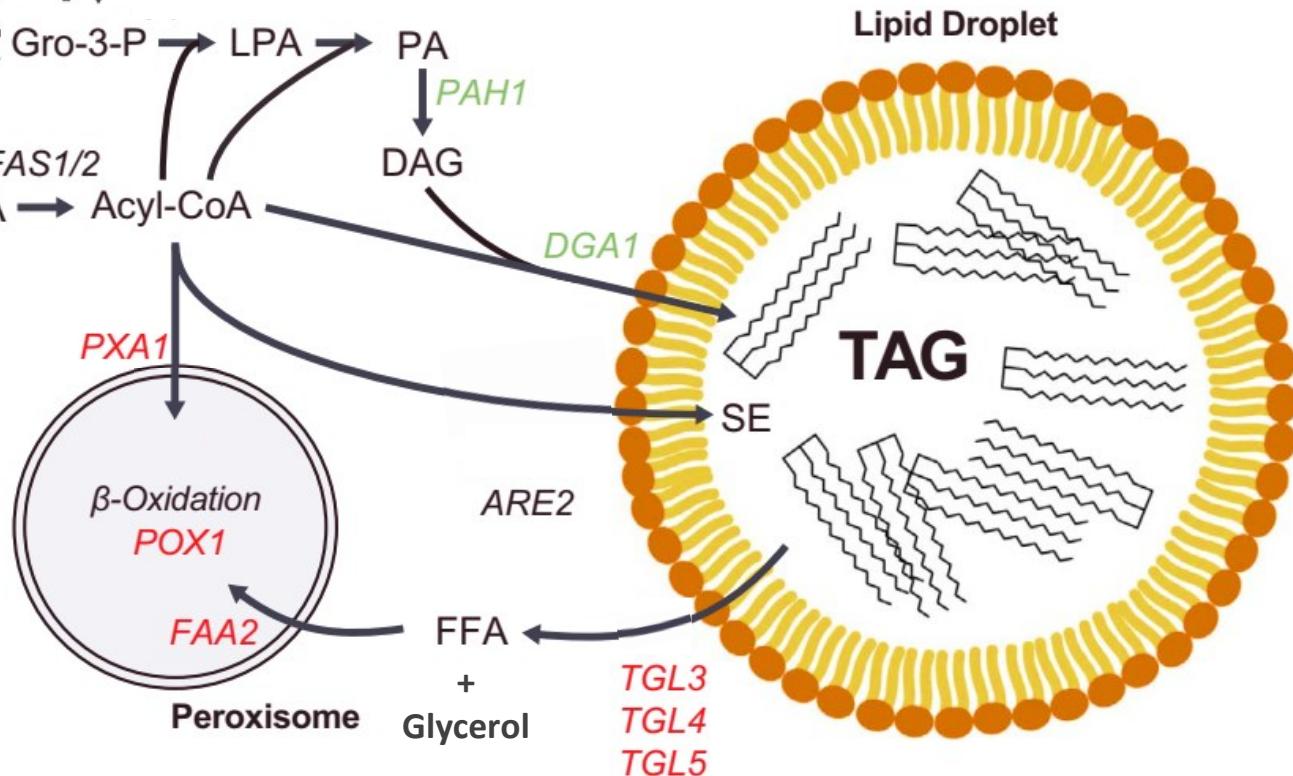


Catabolismo degli acidi grassi





La lipolisi è la degradazione enzimatica dei TAG:
Quando la cellula ha bisogno di energia (es. carenza di glucosio o azoto), il *S. cerevisiae* attiva le lipasi specifiche che “attaccano” la superficie della goccia lipidica.



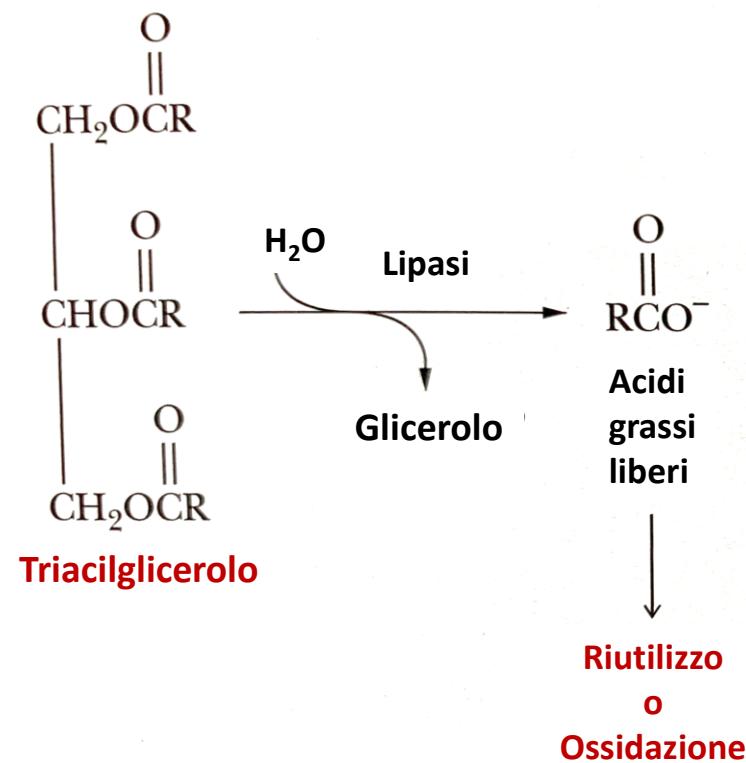
Modificato da: Ferreira et al., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols. *Metabolic Engineering Communications* 6 (2018) 22–27

Le lipasi principali sono:

- *Tgl3* – è la lipasi più importante per i TAG
- *Tgl4* – è una lipasi regolata da fosforilazione e è attiva durante il digiuno
- *Tgl5* – è una lipasi coinvolta nelle vie secondarie

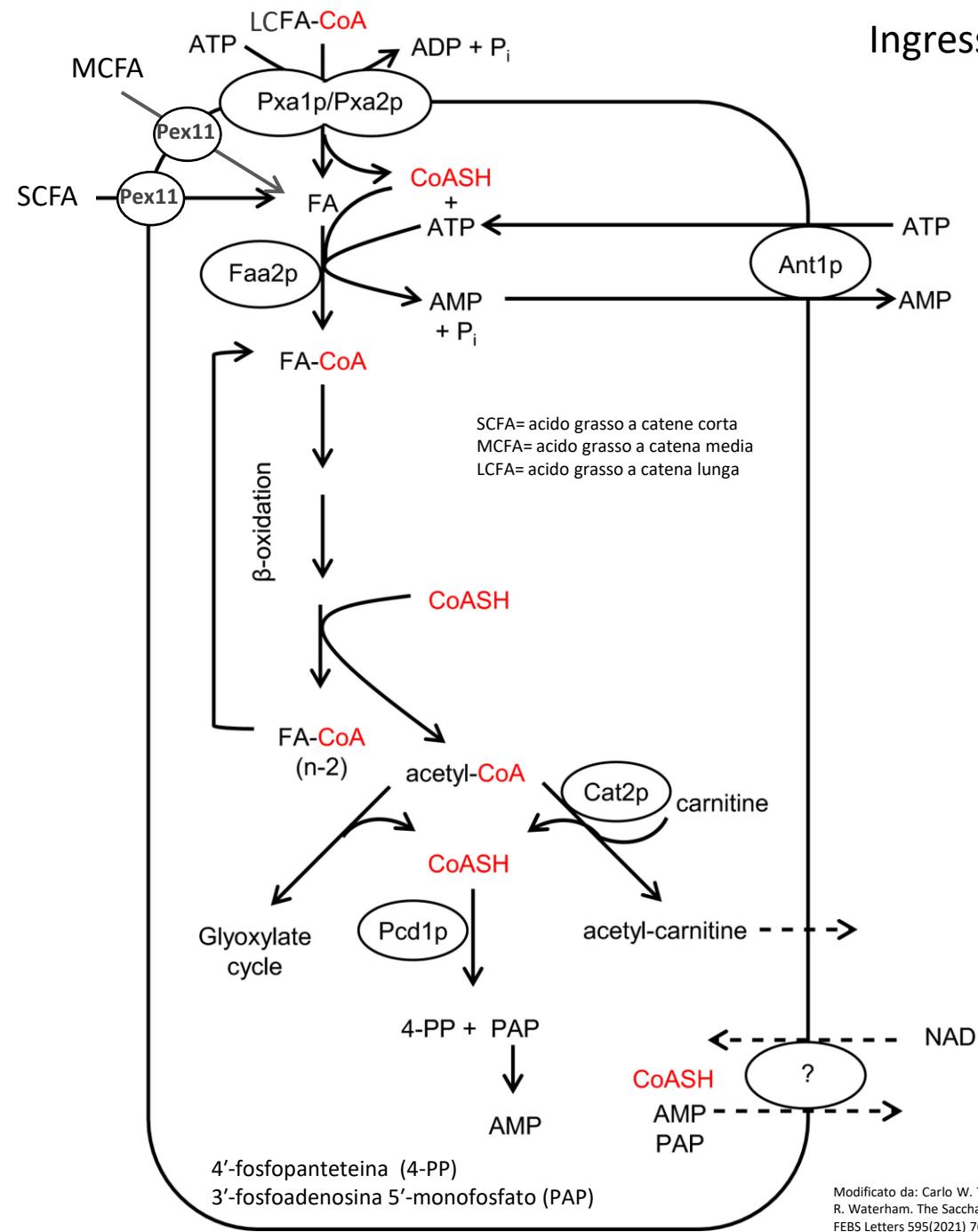
Il catabolismo dei lipidi

I triacilgliceroli sono la principale forma di deposito dell'energia chimica de lipidi. Il ciclo della β -ossalidazione può lavorare solo con acidi grassi liberi attivati i fosfolipidi devono prima essere idrolizzati acidi grassi + glicerofosfati.



Gli acidi grassi mobilizzati vengono trasportati nei **perossisomi** per la β -ossalidazione

Ingresso degli acidi grassi nei perossisomi del *Saccharomyces cerevisiae*



Gli acidi grassi possono entrare nei perossisomi come molecole libere ma la membrana perossisomale non è completamente permeabile, quindi gli FA hanno bisogno di proteine canali.

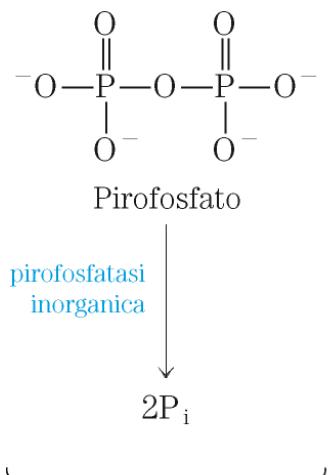
In *S. cerevisiae* sono stati identificati trasportatori della famiglia dei perossisomiali ABC (ATP-Binding Cassette come i Pxa1/Pxa2), il trasporto è attivo legato al consumo di ATP.

Queste proteine riconoscono gli acidi grassi e li trasportano nel perossisoma. Il trasportatore Pxa1p/Pxa2p con attività tioesterasica, scinde il CoA dall'acido grasso e lo rilascia nel lume del perossisoma.

Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* gli FA entrano nel perossisoma e vengono attivati. Per entrare nella β -ossalidazione, un acido grasso deve essere attivato come **acil-CoA**.

La conversione di un acido grasso in acil-CoA è catalizzata dall'enzima Faa2 – acil-CoA sintetasi perossisomale (FAA2).

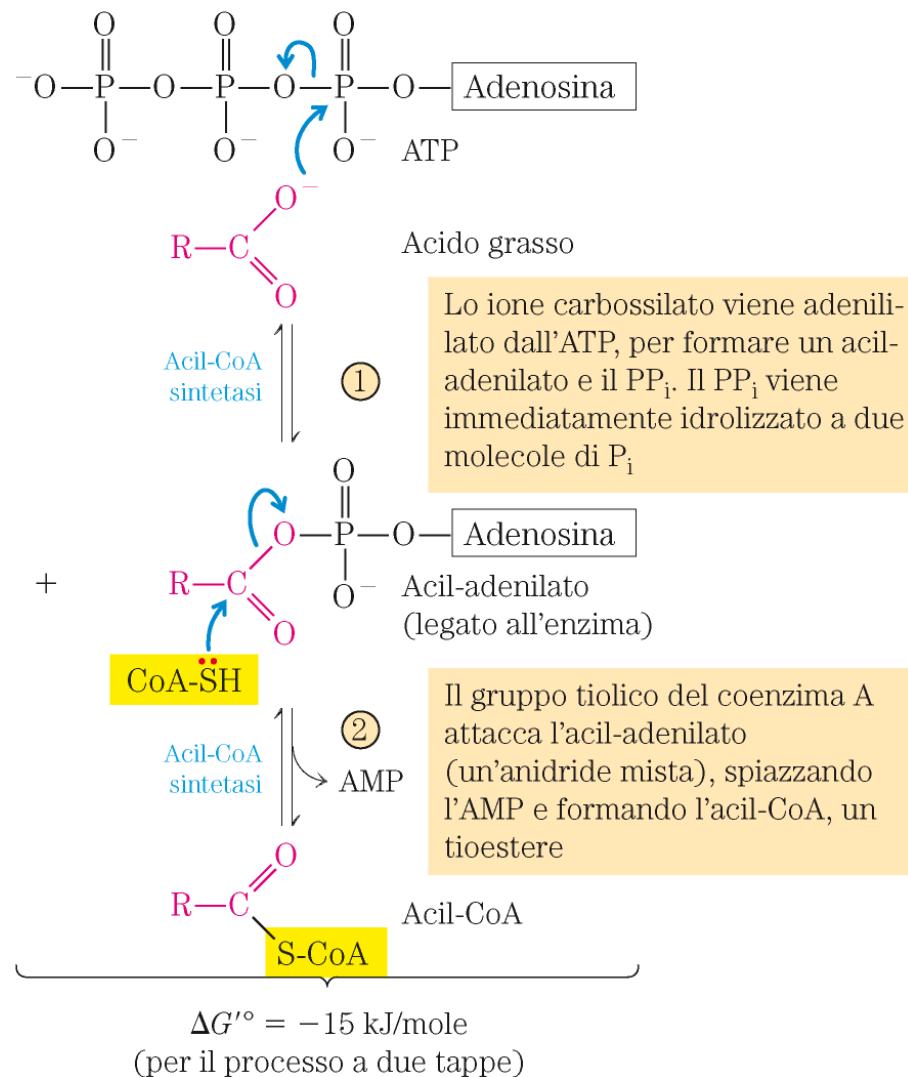
L'attivazione nel metabolismo lipidico prevede la formazione di un legame tioestere tra il gruppo carbossilico dell'acido grasso ed il gruppo tiolico del coenzima A (CoA-SH)



Questa attivazione:

- consuma ATP
- produce la forma “pronta” per la β -ossalidazione.

Attivazione degli acidi grassi nel metabolismo lipidico



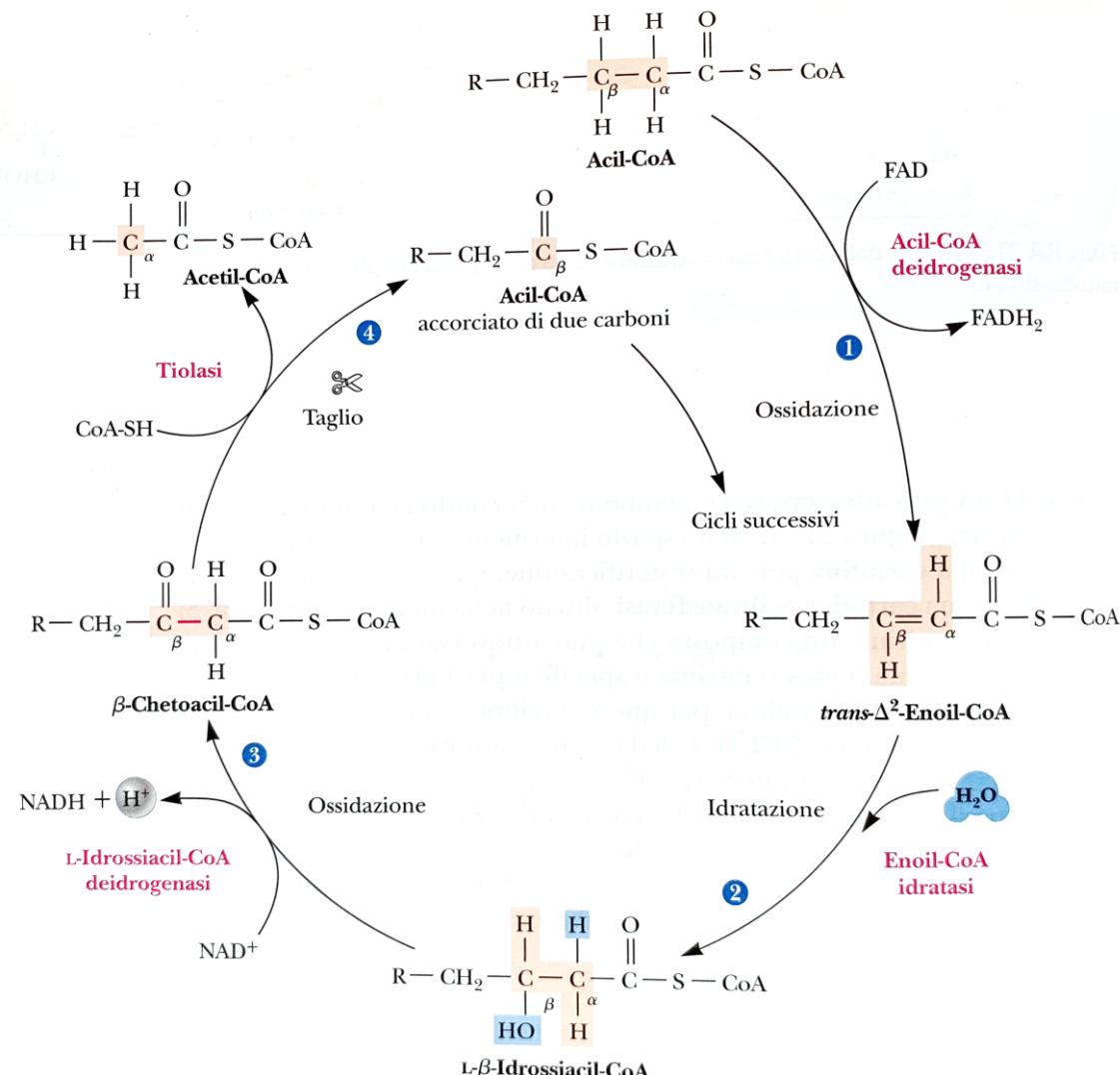
1) L'acil-CoA è ossidato ad un acil-CoA α , β insaturo (chiamato anche β enoil-CoA). Questa reazione è catalizzata da un acil-CoA deidrogenasi FAD dipendente

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

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

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



Sistema navetta della carnitina aciltrasferasi nel *Saccharomyces cerevisiae*

L'Acetil-CoA non attraversa facilmente le membrane (mitocondriale o perossisomiale). Serve un trasportatore: la carnitina può legare un gruppo acetile dell'Acetil-CoA e trasportarlo attraverso la membrana mitocondriale. La carnitina è una piccola molecola che funziona come navetta di gruppi acetile.

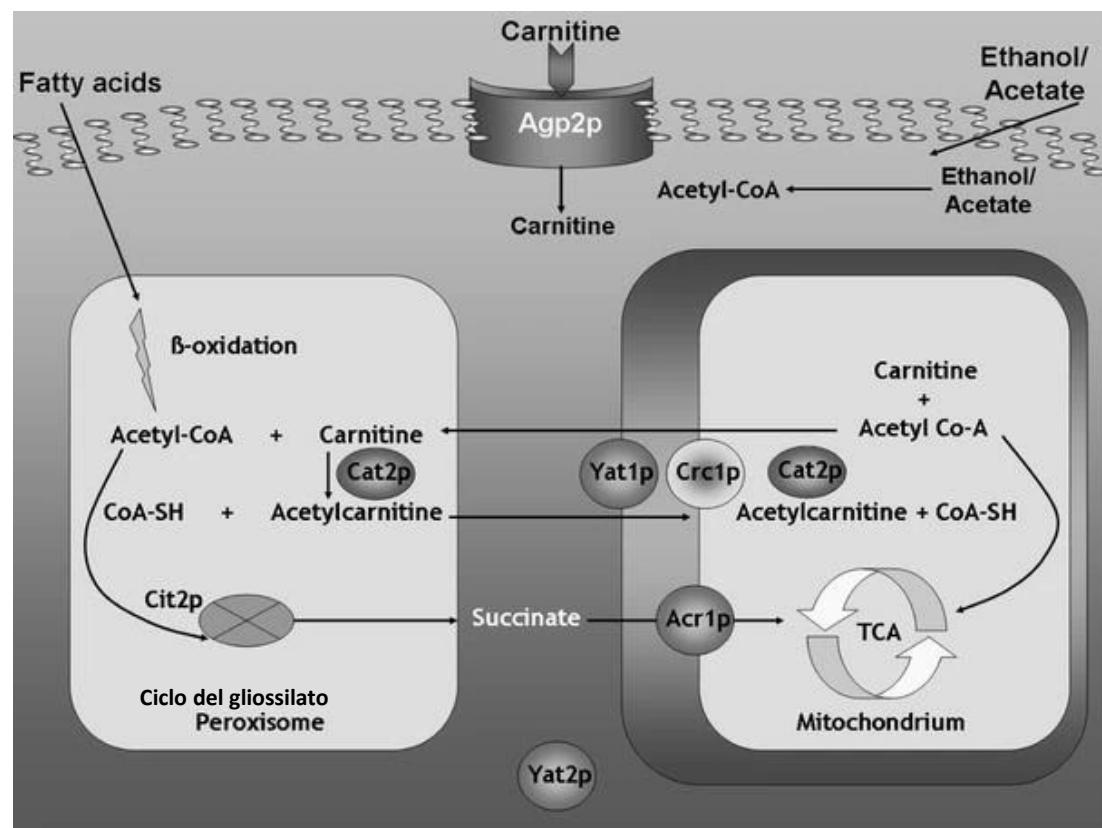
Il meccanismo della carnitina-acetyltransferasi forma acetilcarnitina nel perossisoma grazie all'enzima carnitina acetiltransferasi (CAT) che converte l'Acetil-CoA in acetilcarnitina.

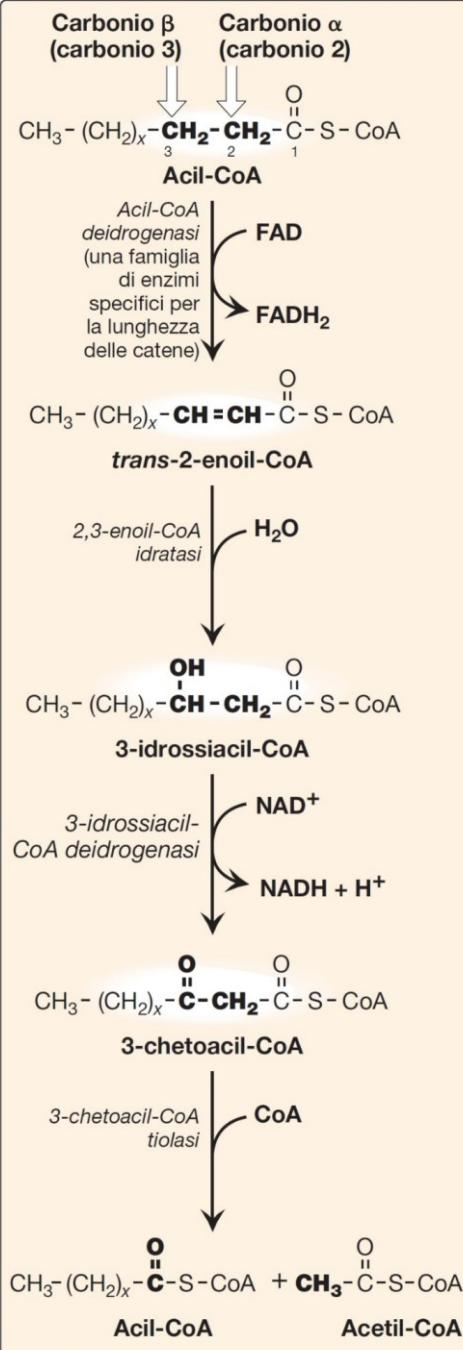


Può attraversare la membrana mitocondriale con la riconversione in Acetil-CoA nel mitocondrio.



L'Acetyl-CoA è ora disponibile nel mitocondrio per il ciclo di Krebs o altre vie.





Resa di ATP durante l'ossidazione del Palmitato (C16) a CO₂ e H₂O

1) Attivazione del FA

- $\text{FA} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightarrow \text{Acil-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$

Questo costa l'equivalente di 2 ATP

2) Ciclo della β -ossalidazione perossisomale

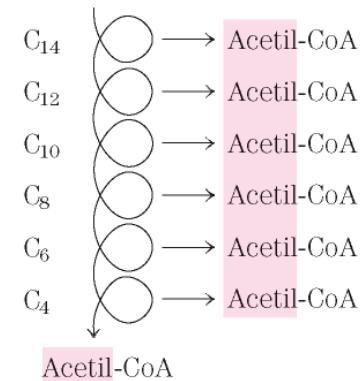
- Acetyl-CoA
- 7 cicli per un palmitato 16C
 - Ogni ciclo produce: 1 NADH, 1 FADH₂, 1 acetil-CoA (eccetto l'ultimo ciclo, che produce solo acetil-CoA)
 - Nei lieviti, NADH e FADH₂ perossisomali non vengono ossidati nel mitocondrio, quindi non contribuiscono alla produzione di ATP.

3) Produzione di ATP dal ciclo di Krebs

- Palmitato produce 8 acetil-CoA
 - Ogni acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs (mitocondrio) e produce circa **10 ATP per acetil-CoA** ($3 \text{ NADH} \times 2.5 \text{ ATP} + 1 \text{ FADH}_2 \times 1.5 \text{ ATP} + 1 \text{ GTP} \times 1$)
 - $8 \text{ acetil-CoA} \times 10 \text{ ATP} \approx 80 \text{ ATP}$

4) Sottraendo il costo dell'attivazione

- 80 ATP – 2 ATP per l'attivazione ~ **78 ATP netti**



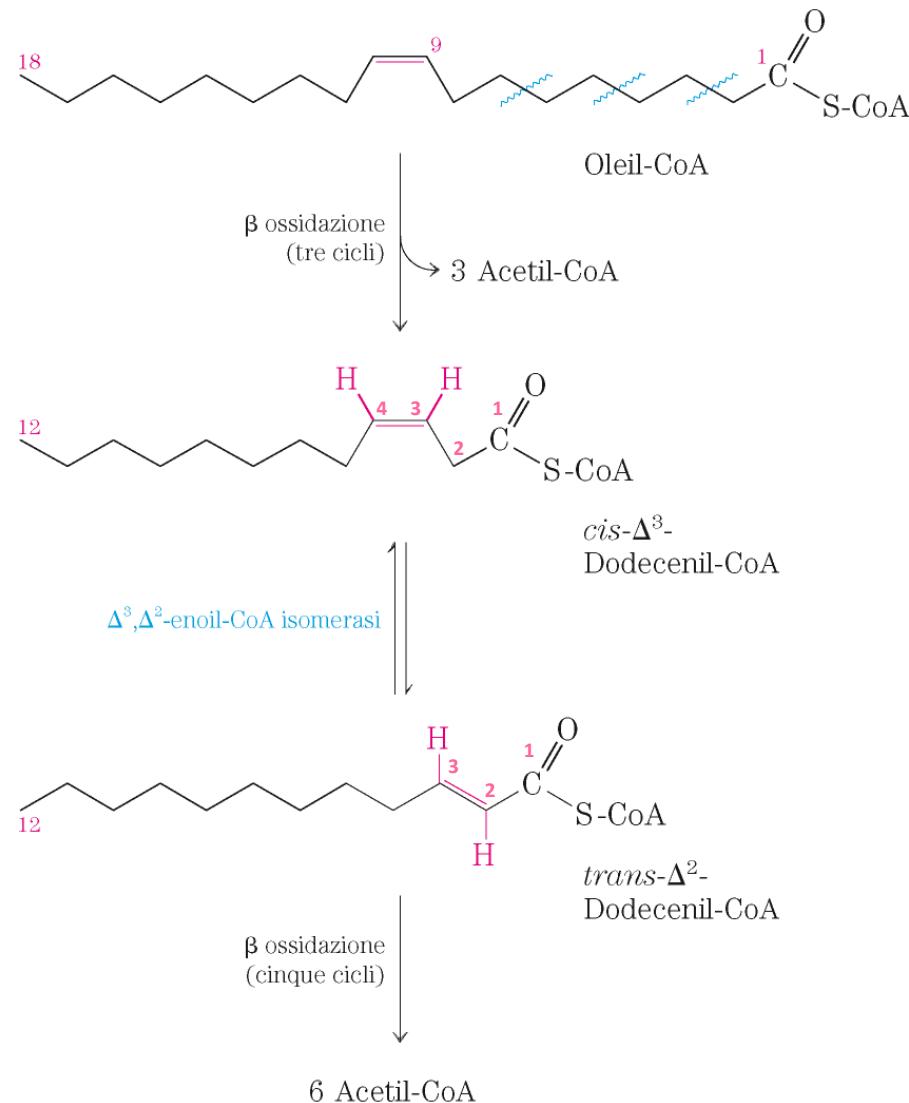
Ossidazione degli acidi grassi monoinsaturi

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 stessa maniera degli acidi grassi saturi



β-ossalidazione dell'acido oleico

Regolazione della β -ossidazione degli acidi grassi

La presenza di **acidi grassi come fonte di carbonio** induce l'espressione dei geni coinvolti nella β -ossidazione e nella formazione dei perossisomi.

Questa induzione è regolata da fattori di trascrizione specifici, tra cui:

i geni per gli enzimi della β -ossidazione in risposta alla presenza di acidi grassi e l'espressione genica in condizioni di scarsità di glucosio, promuovono l'uso di fonti alternative come i lipidi.

Regolazione della β-ossalidazione degli acidi grassi

Inibizione e controllo metabolico

Quando i lieviti hanno abbondanza di glucosio o altre fonti di carbonio facilmente utilizzabili, la β-ossalidazione è repressa (fenomeno noto come repressione da glucosio).

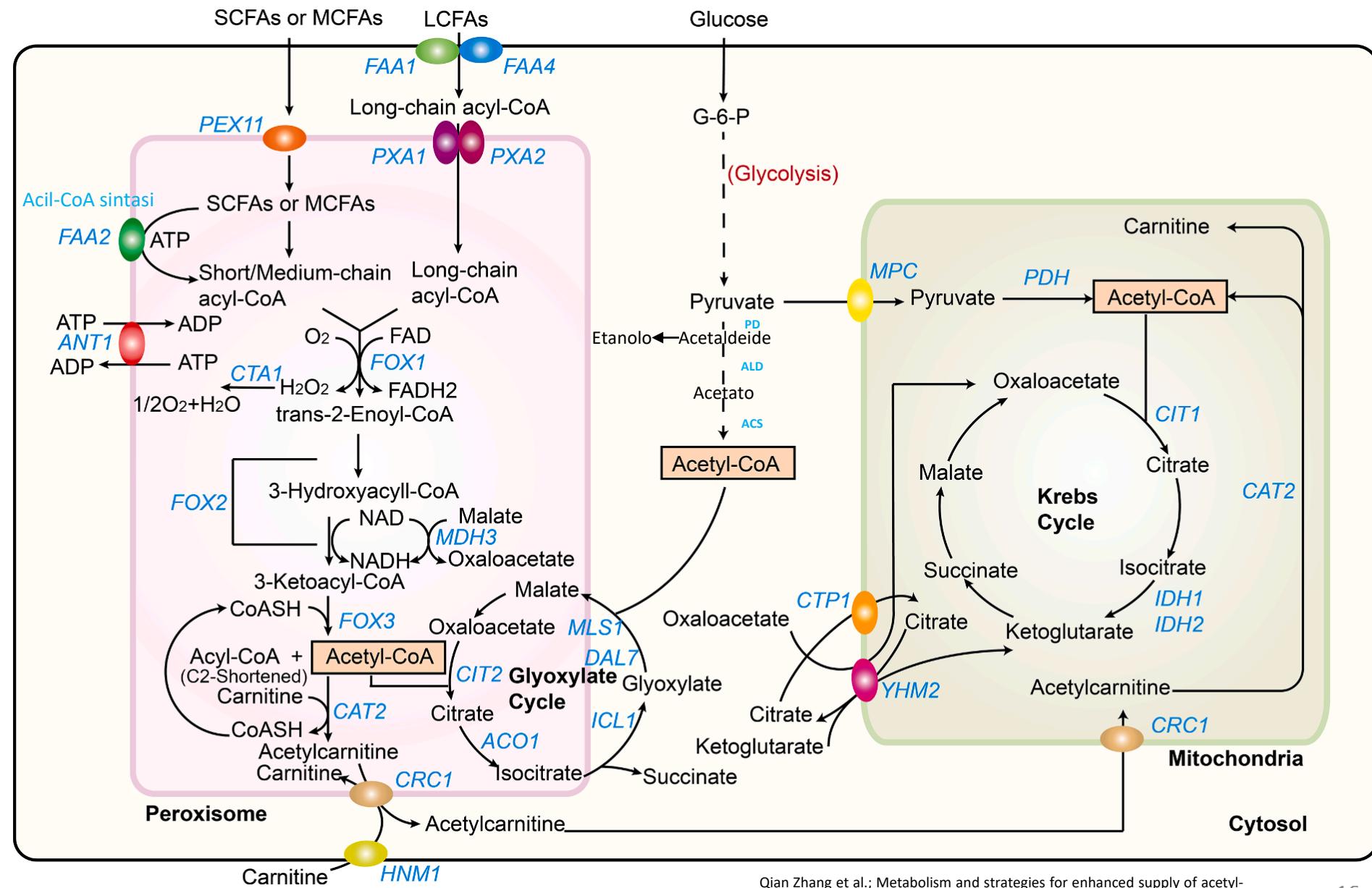
Ruolo degli acil-CoA

Gli acil-CoA prodotti dagli acidi grassi attivano la formazione delle goccioline lipidiche e stimolano l'attivazione delle vie di segnalazione che regolano la β-ossalidazione. Inoltre, l'attivazione degli acidi grassi ad acil-CoA è un punto di controllo chiave, essendo una reazione che consuma ATP e impegna risorse energetiche. Quando il glucosio è abbondante, l'espressione di FAA2-acil-CoA sintetasi perossisomale è fortemente repressa.

Altri regolatori

Alcuni segnali metabolici come livelli di NAD⁺/NADH, concentrazioni di ATP/AMP e lo stato redox cellulare influenzano indirettamente la β-ossalidazione.

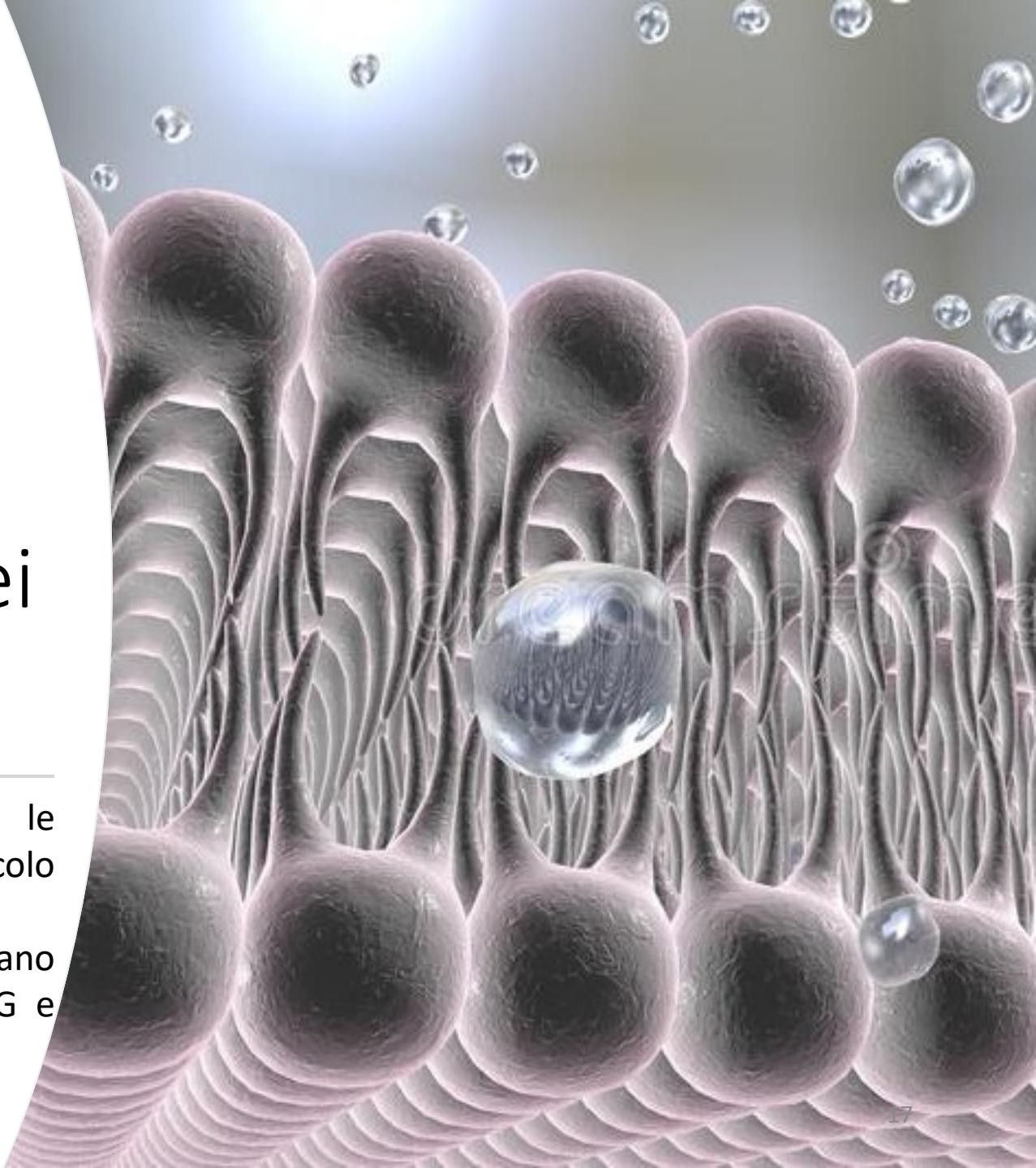
Metabolismo degli acidi grassi saturi ed esportazione dell'acetil-CoA generato dalla β-ossidazione nei perossisomi del *Saccharomyces cerevisiae*



Biosintesi dei lipidi

È citoplasmatica, mentre le insaturazioni sono del reticolo endoplasmatico.

Le goccioline lipidiche si formano nel RE come depositi di TAG e steroli.

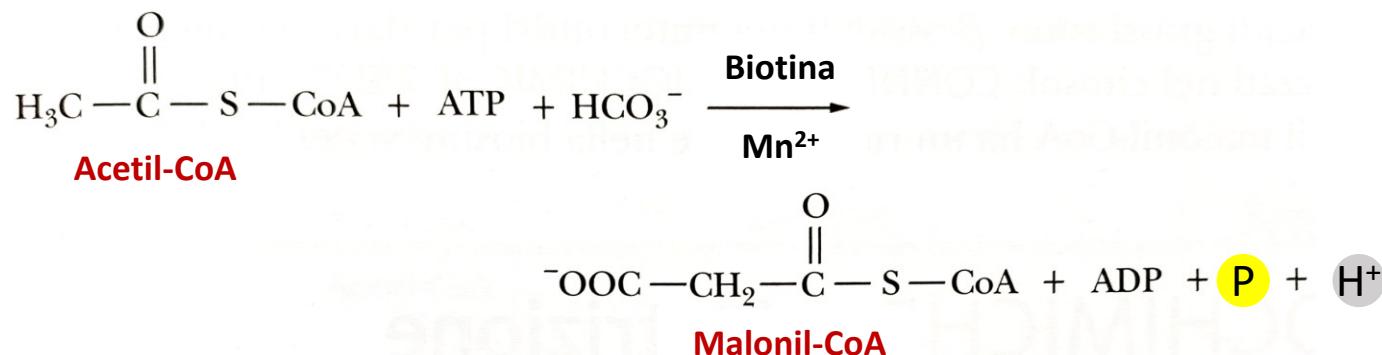


Il malonil-CoA si forma dall'acetil-CoA e dal bicarbonato

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

La acetil CoA carbossilasi (ACC) nei lieviti è una proteina multifunzionale e contiene i siti per:

- La carbossilazione di biotina (gruppo prostetico biotina legato all'enzima)
 - Il trasferimento del gruppo carbossile dall'acetil-CoA al malonil-CoA



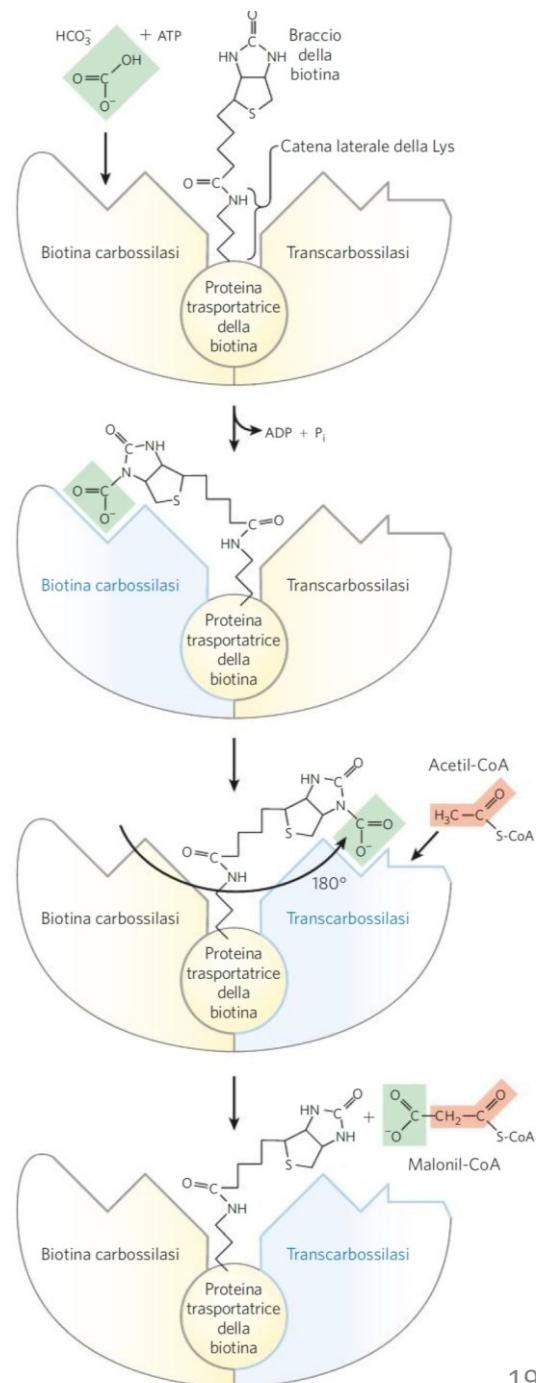
La reazione dall'acetil-CoA carbossilasi è la tappa che controlla la biosintesi

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 CO₂ legandolo a uno degli atomi di azoto dell'anello della biotina in una reazione dipendente dall'ATP,
- La transcarbossilasi, che trasferisce il CO₂ attivato dalla biotina all'acetil-CoA con formazione di malonil CoA.

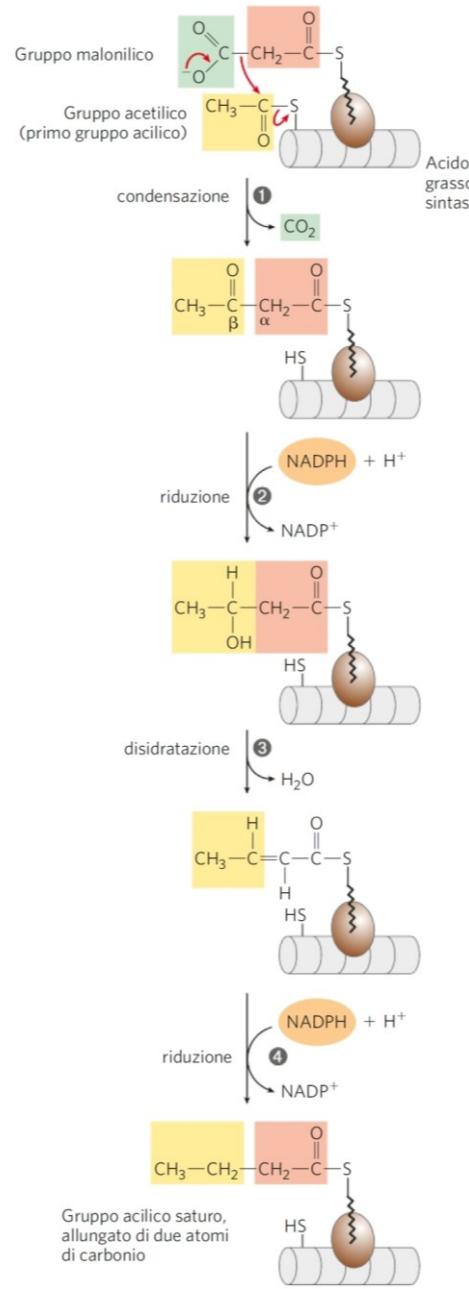
Parte della proteina trasportatrice della biotina e il lungo braccio flessibile della biotina ruotano, per trasportare il CO₂ attivato dal sito attivo della biotina carbossilasi al sito attivo della transcarbossilasi.



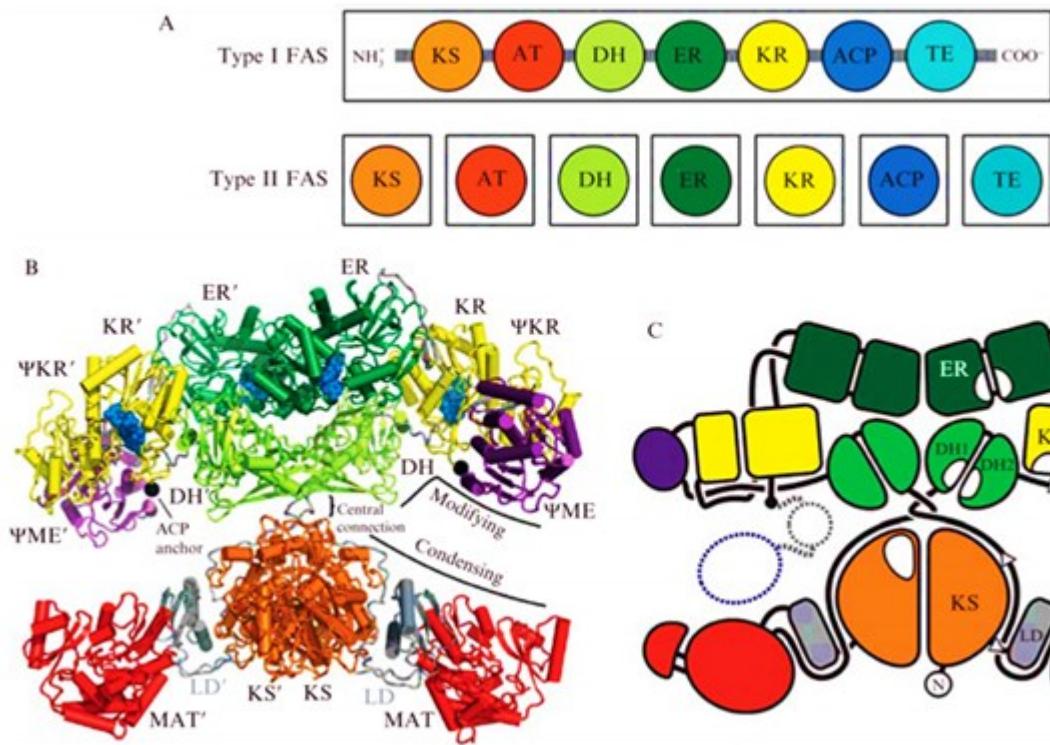
Gli acidi grassi vengono sintetizzati mediante una sequenza di reazioni ripetute

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 una 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.

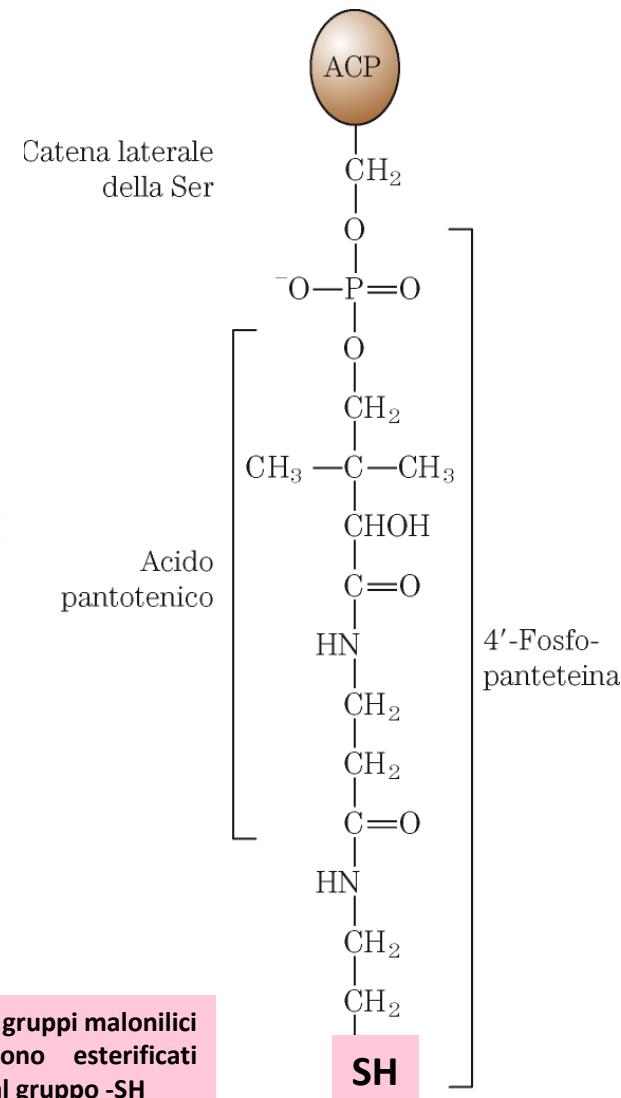


Struttura dell'acido grasso sintasi I e II (FAS I e II)



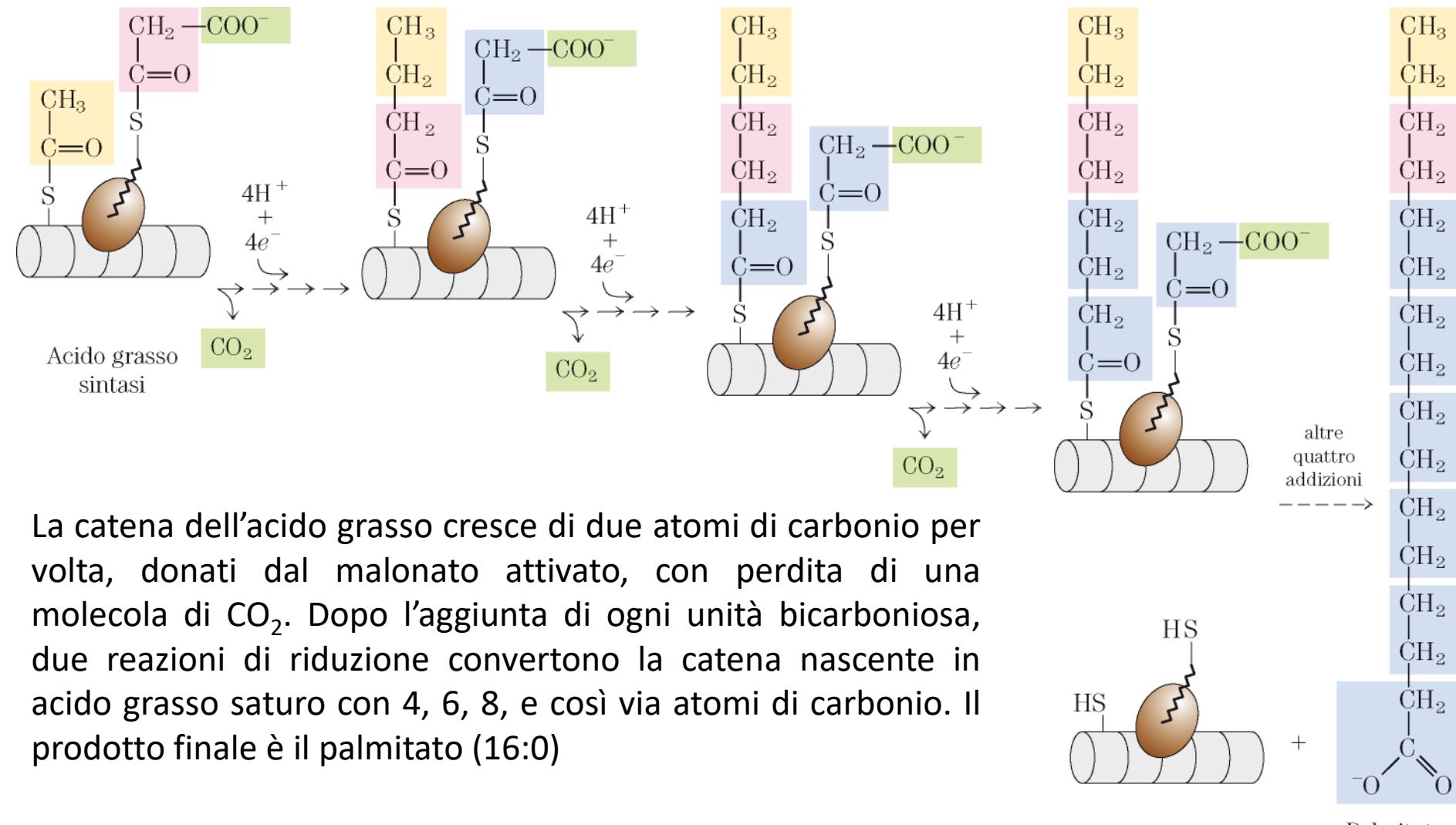
I differenti siti che hanno attività enzimatica sono: β -chetoacil-CoA sintasi (**KS**), malonil/acetil-CoA-ACP trasferasi (**MAT**), β -idrossiacil-ACP deidrataasi (**DH**), enoil-ACP reduttasi (**ER**) e β -chetoacil-ACP reduttasi (**KR**). L'ACP è la proteina trasportatrice di acili.

La proteina trasportatrice
di acili (ACP)



I gruppi malonilici
sono esterificati
al gruppo -SH

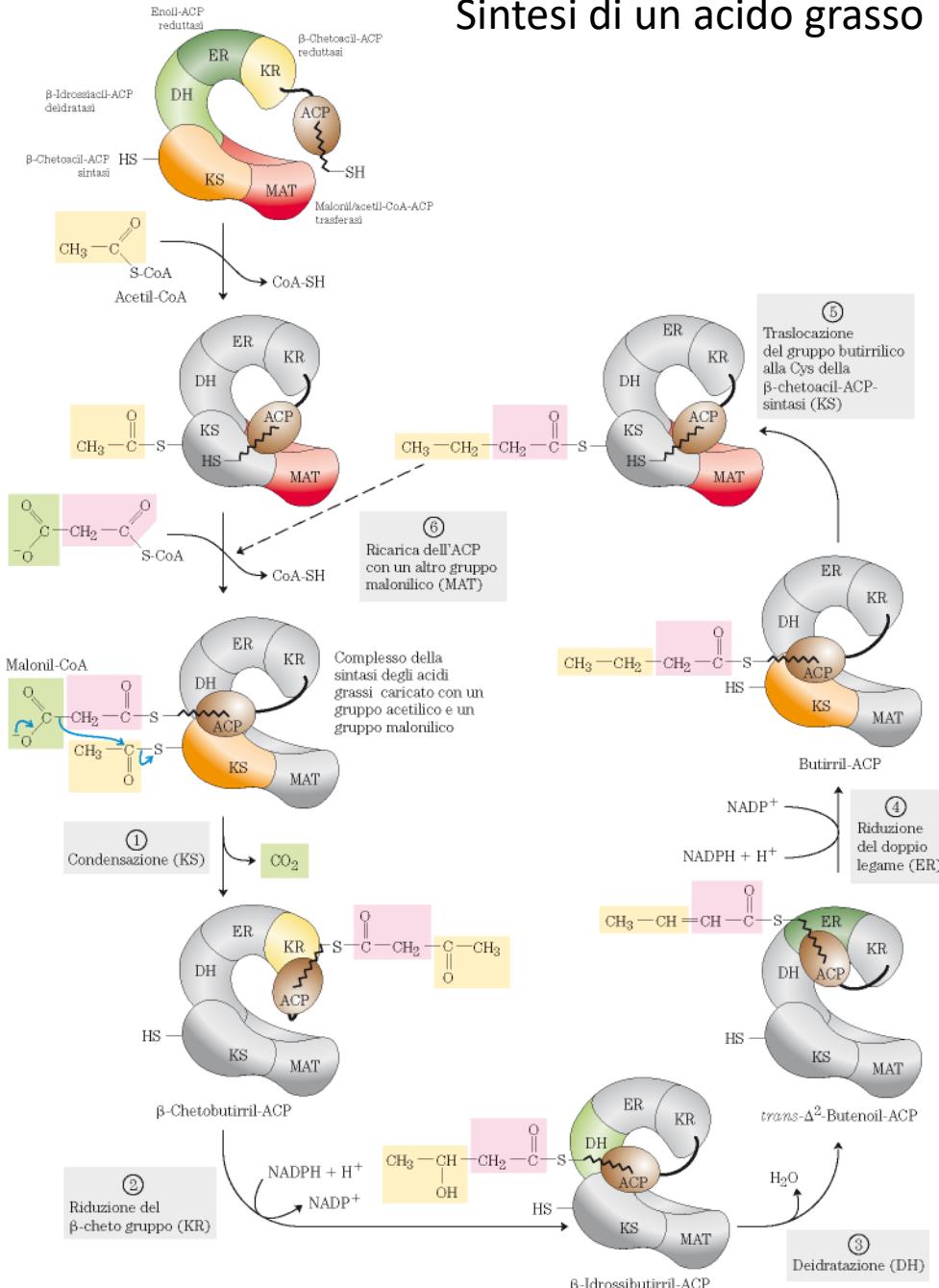
La sintesi di palmitato



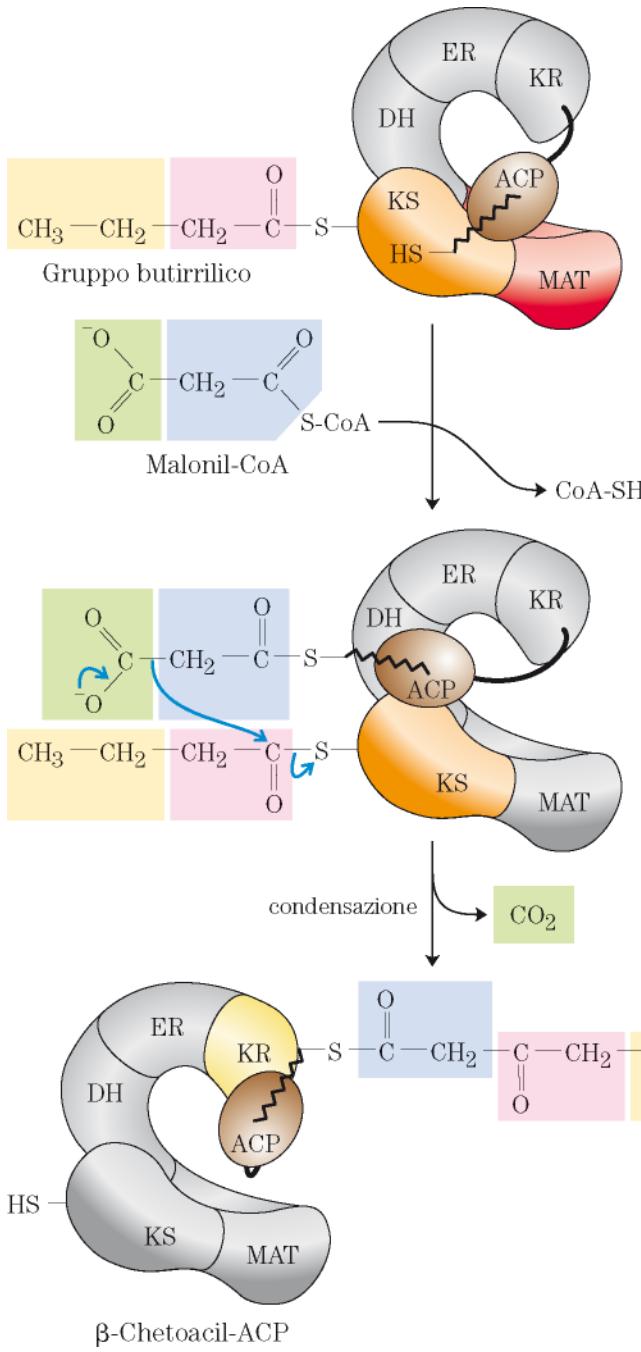
La catena dell'acido grasso cresce di due atomi di carbonio per volta, donati dal malonato attivato, con perdita di una molecola di CO_2 . Dopo l'aggiunta di ogni unità bicarboniosa, due reazioni di riduzione convertono la catena nascente in acido grasso saturo con 4, 6, 8, e così via atomi di carbonio. Il prodotto finale è il palmitato (16:0)

Il gruppo acetilico iniziale è in giallo; il C-1 e il C-2 del malonato sono in rosa e il carbonio rilasciato sotto forma di CO_2 è in verde.

Sintesi di un acido grasso

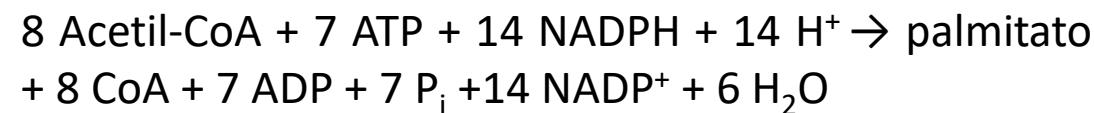


- 1) Tappa di condensazione: coinvolge i gruppi acetilici e malonilici attivati con formazione di acetoacetil-ACP, allo stesso tempo si libera una molecola di CO₂. reazione catalizzata dalla β- chetoacil-ACP- sintasi (KS).
- 2) Tappa di riduzione del gruppo carbonilico: l'acetoacetil-ACP formato nella tappa di condensazione subisce la riduzione del suo gruppo carbonilico presente sul C3 trasformandosi in D-β-idrossibutirril-ACP. Questa reazione è catalizzata dalla β chetoacil-ACP reduttasi (KR) e il donatore di elettroni è il NADPH.
- 3) Tappa di deidratazione: dagli atomi di carbonio C2, e C3 del D-bidrossibutirril-ACP viene rimossa una molecola di H₂O per formare un doppio legame nel prodotto, il *trans* Δ² 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* Δ² butenoil-ACP viene ridotto producendo butirril-ACP da parte della enoil-ACP reduttasi (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 7 cicli di reazione di condensazione e di riduzione:



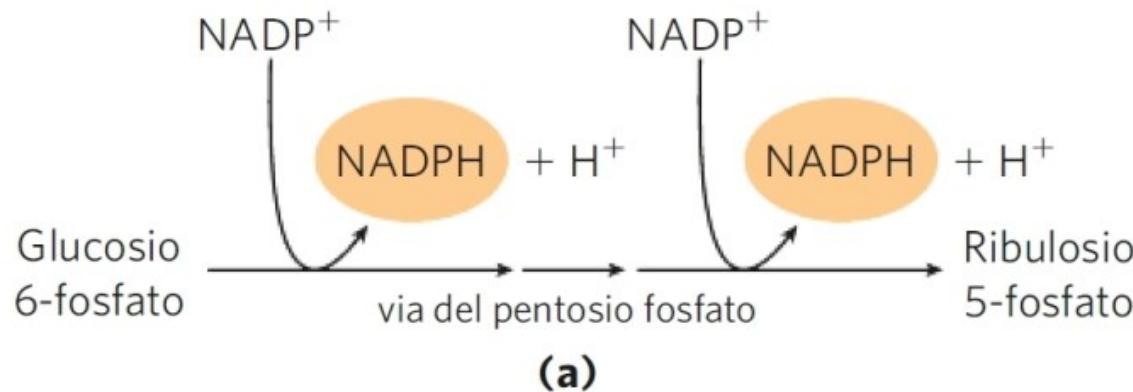
La biosintesi di acidi grassi richiede acetil-CoA e un rifornimento di energia chimica in due forme: il potenziale di trasferimento del gruppo dell'ATP e il potere riducente del NADPH.

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

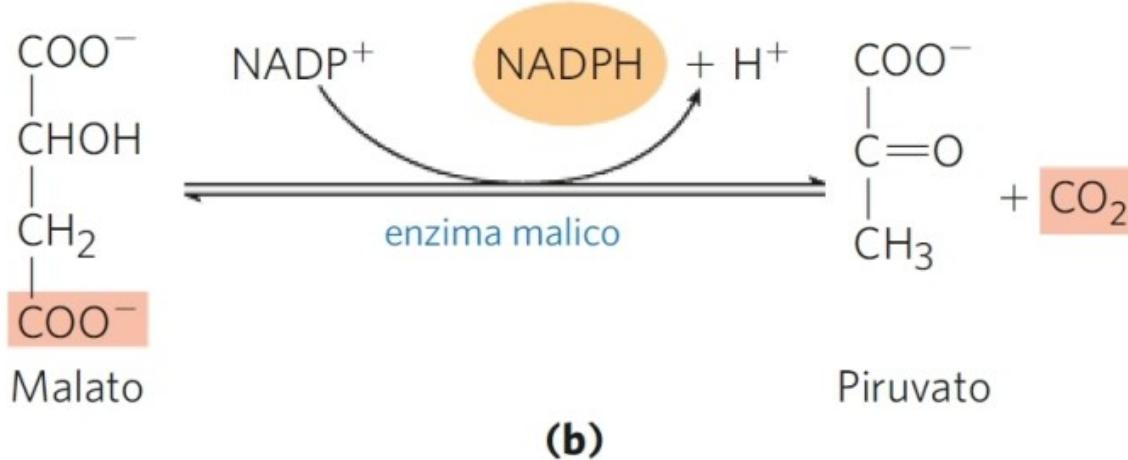
Il NADPH è necessario per ridurre il gruppo β -chetonico e i doppi legami.

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)



(a)



(b)

Nel *Saccharomyces cerevisiae*, gli acidi grassi insaturi sono prodotti principalmente a partire da acidi grassi saturi tramite desaturazione.

Gli acidi grassi saturi precursori sono:

- Palmitato (C16:0)
- Stearato (C18:0)

Questi acidi grassi vengono attivati in acil-CoA subito modificati.

La desaturazione è la formazione di doppi legami grazie agli enzimi desaturasi specifiche:

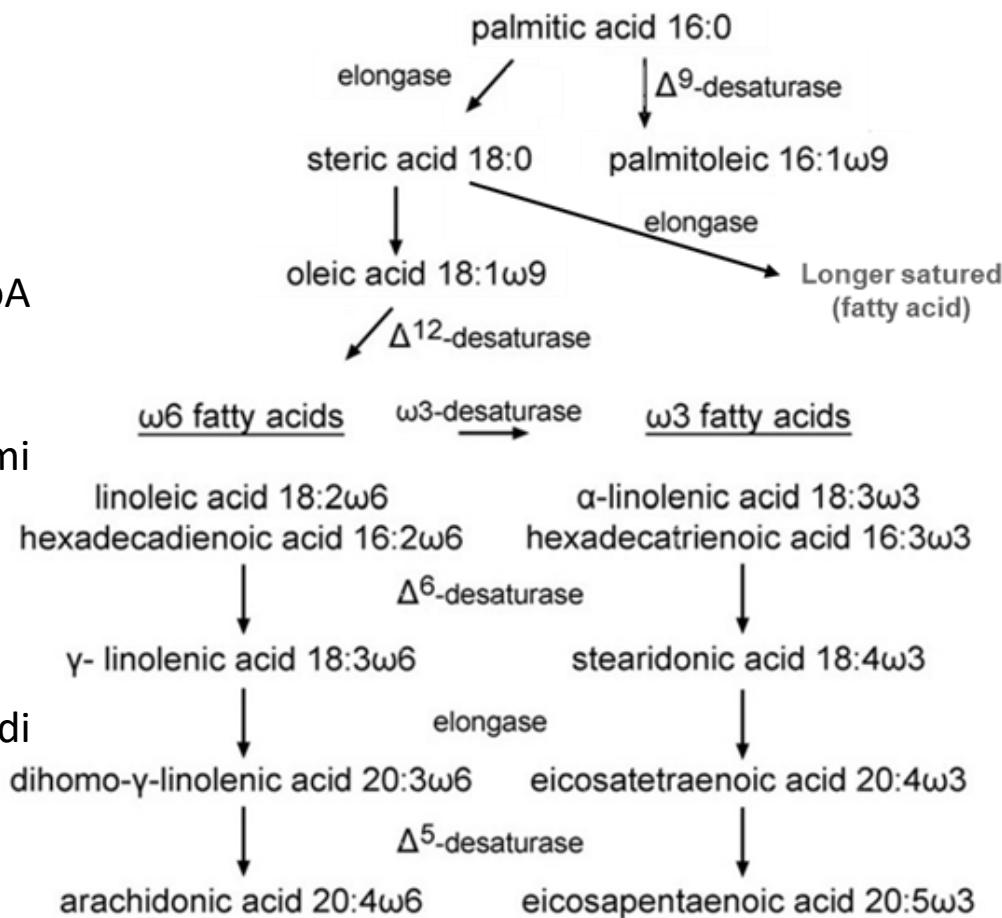
Tali reazione richiede:

- O₂ (ossigeno molecolare)
- NADH o NADPH come donatori di elettroni
- Cofattori enzimatici (ferro e citocromi)

Nei lieviti, i doppi legami sono generalmente in posizione Δ9 (tra il nono e decimo carbonio dalla estremità carbossilica).

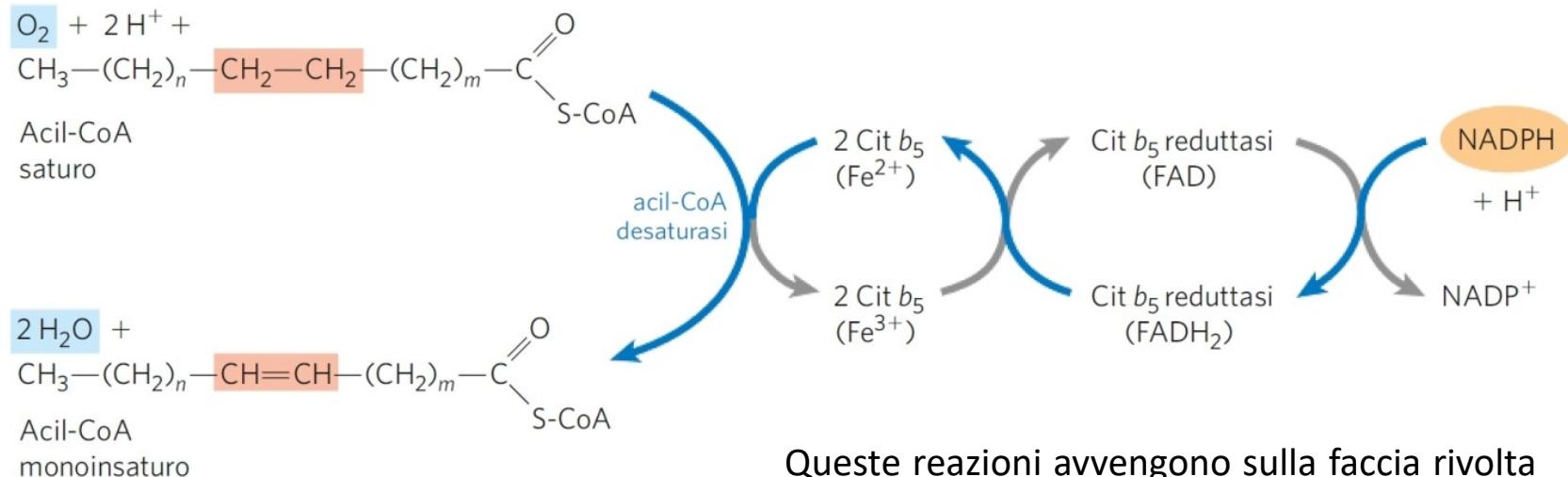
Non possono introdurre doppi legami più lontani (Δ12, Δ15) senza enzimi specifici estranei.

Vie di sintesi degli acidi grassi insaturi



Chemler et al., Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 2006, 5:20 doi:10.1186/1475-2859-5-20

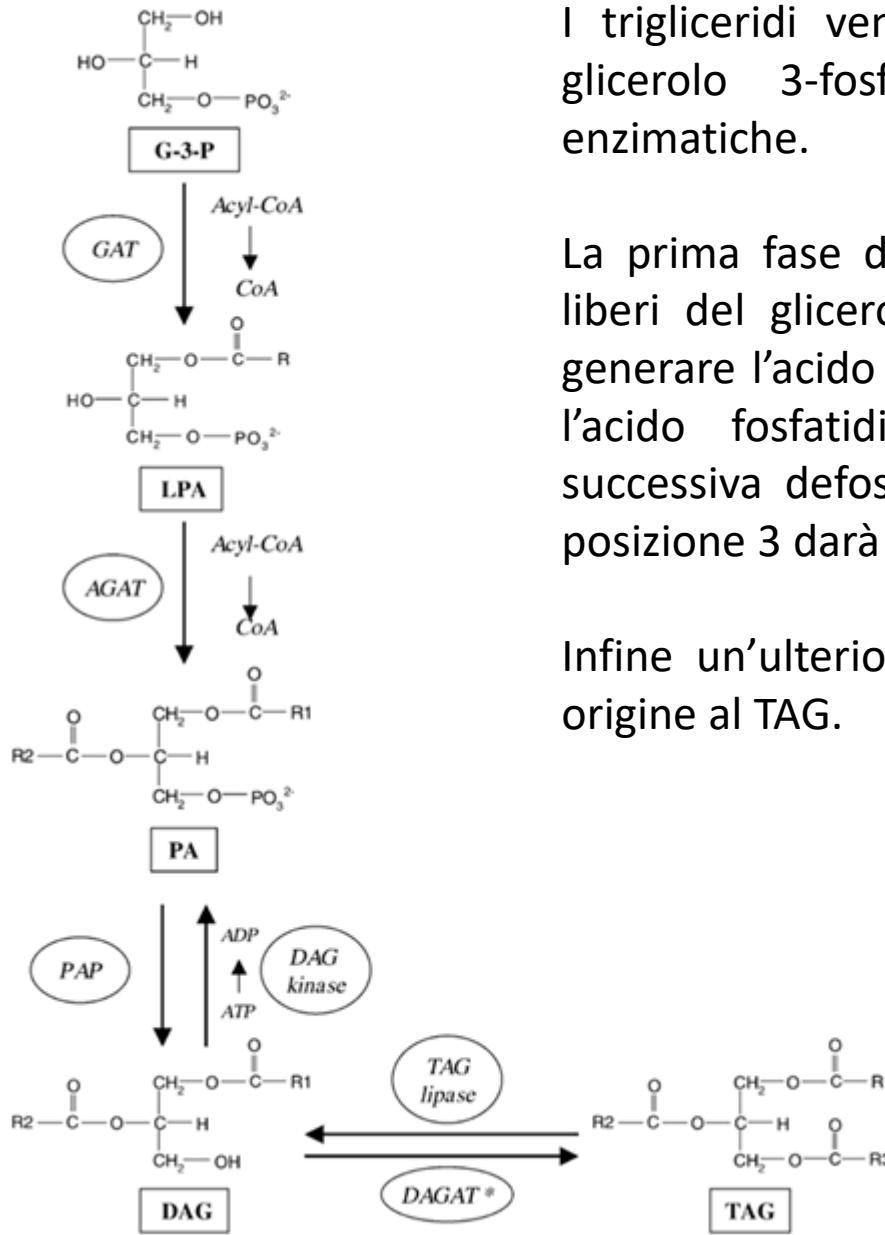
Le desaturasi:



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 nel lievito il citocromo b5 del 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 reduttasi 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.



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 l'acido lisofosfatidico, LPA, nella prima acilazione e l'acido fosfatidico, PA nella seconda acilazione. Una successiva defosforilazione con la rimozione del fosfato in posizione 3 darà origine al diacilglicerolo (DAG).

Infine un'ulteriore acilazione in posizione 3 del DAG darà origine al TAG.

GAT glycerol-3-phosphate acyltransferase

AGAT 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase

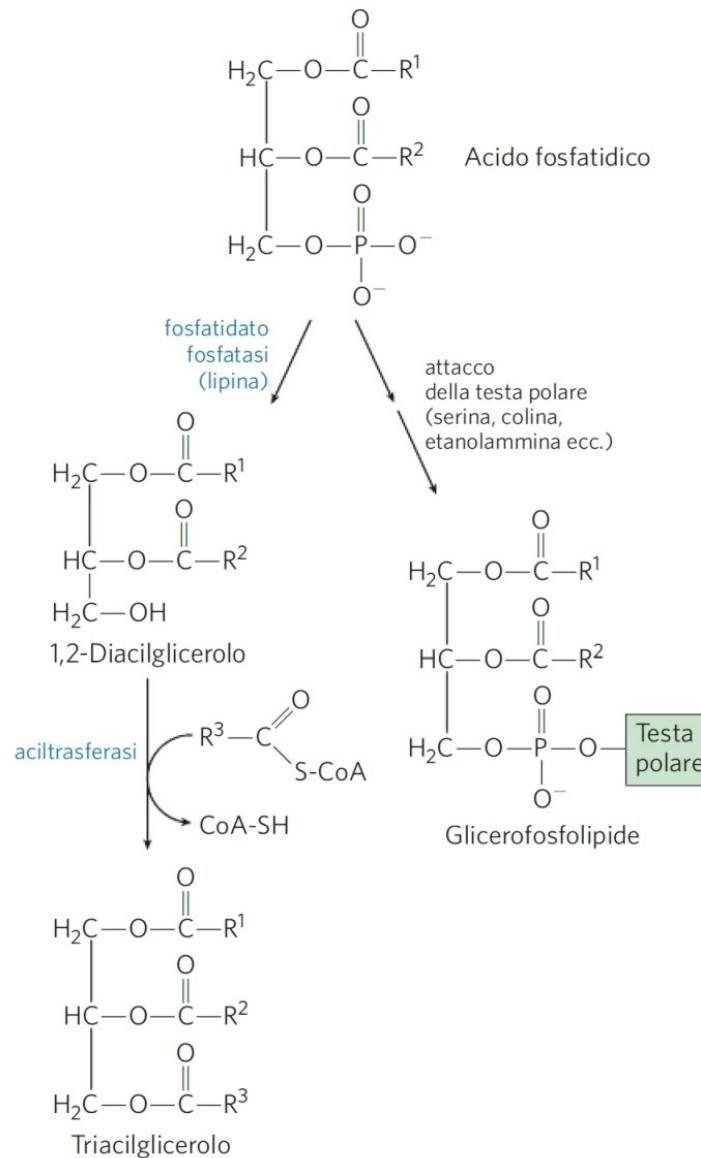
PAP phosphatidate phosphatase

DAG kinase diacylglycerol kinase

TAG lipase triacylglycerol lipase

DAGAT diacylglycerol acyltransferase

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



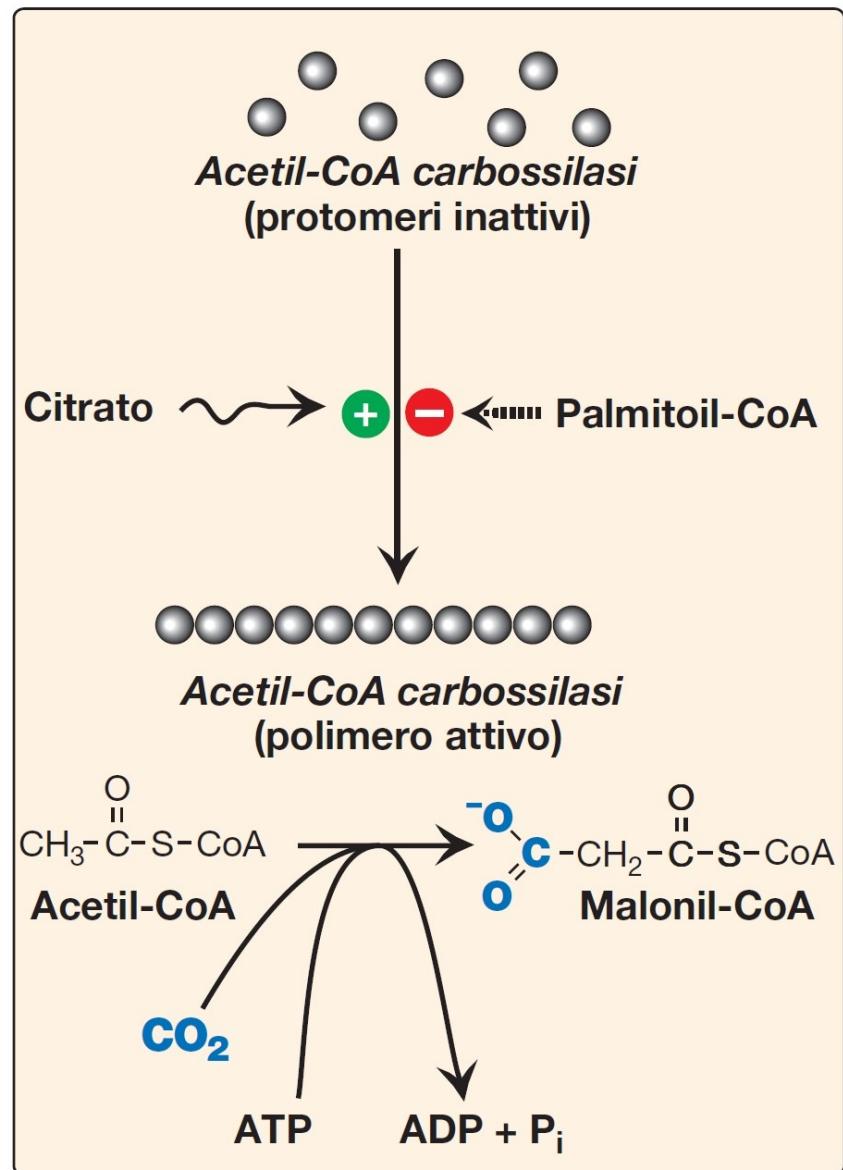
Regolazione dell'enzima acetil-CoA carbossilasi

La regolazione allosterica nei lieviti è meno prominente rispetto agli animali.

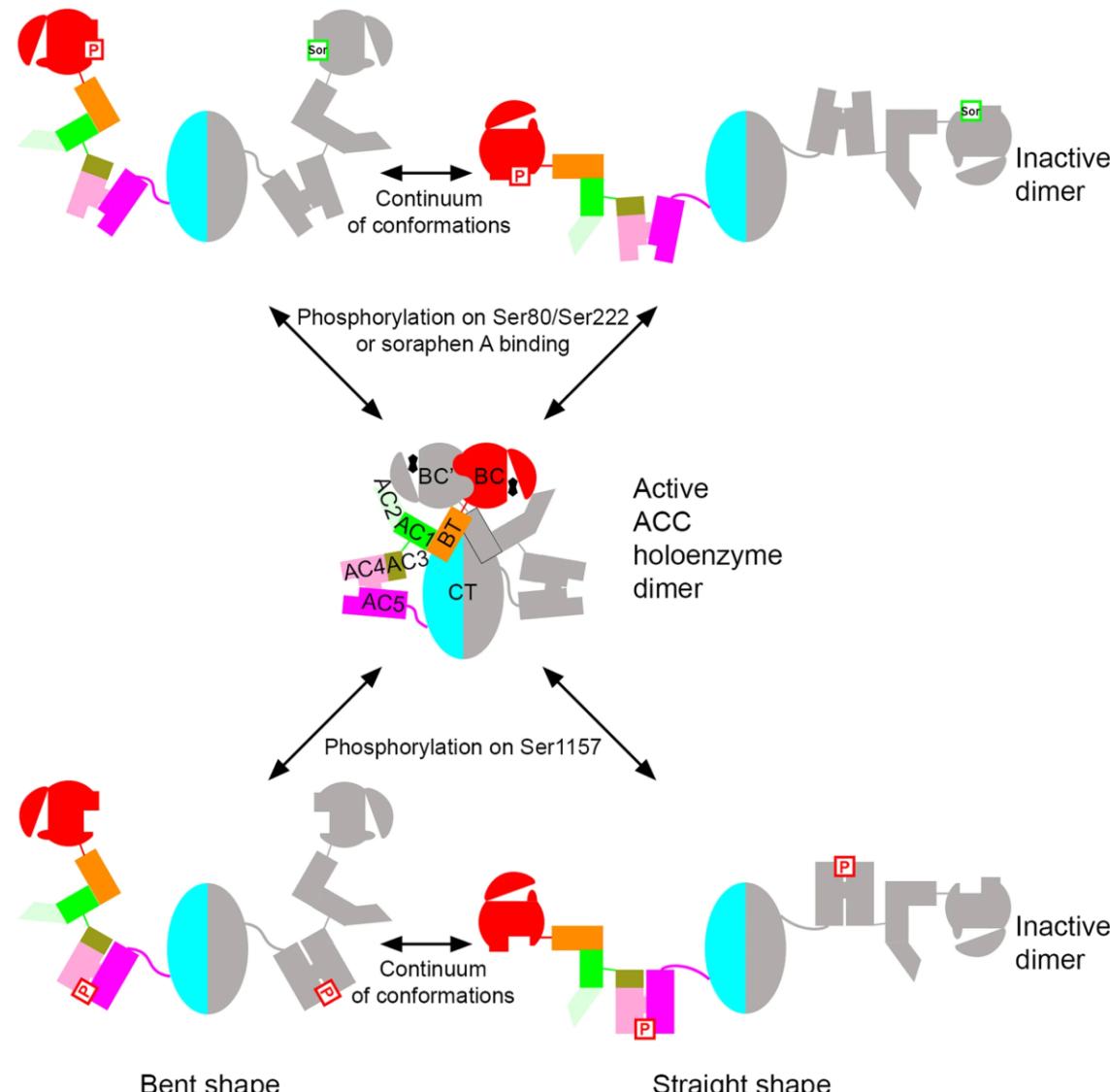
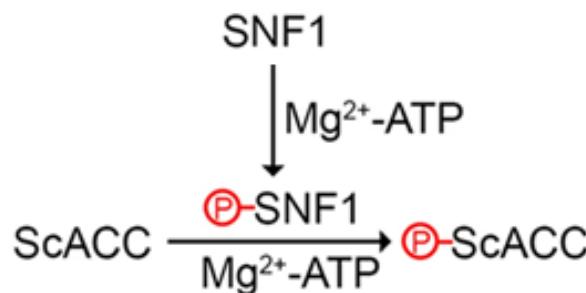
Tuttavia, la concentrazione di citrato può attivare indirettamente la sintesi lipidica. Il citrato è un segnale di abbondanza energetica.

Nella regolazione tramite feedback metabolico:

- gli acidi grassi a catena lunga (C16, C18) possono inibire indirettamente la sintesi attivando segnali che riducono ACC o la sintesi di malonil-CoA.
- Il **malonil-CoA** stesso può avere un ruolo limitato come segnale allosterico, ma nei lieviti la fosforilazione tramite **Snf1** è dominante.



Acetyl 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.

Malonil-CoA è il precursore essenziale per la sintesi di **acidi grassi**
Controlla tutto il flusso verso la sintesi dei **trigliceridi, fosfolipidi e steroli**

Snf1 attiva fosforila l'enzima acetil CoA carbossilasi (ACC) e diventa inattivo:

Diminuisce il Malonil-CoA

Diminuisce la sintesi degli acidi grassi

Diminuiscono i DAG e TAG con conseguente diminuzione della formazione di goccioline lipidiche.

Snf1 inattiva defosforila l'enzima acetil CoA carbossilasi (ACC) e diventa attivo

Aumento di Malonil-CoA

Aumento della sintesi acidi grassi e trigliceridi

Formazione e accumulo di goccioline lipidiche

Condizione metabolica	Snf1	Effetto sull'ACC	Lipogenesi
Glucosio alto	inattiva	ACC defosforilata: attiva	↑ lipidi, ↑ TAG ↑ goccioline lipidiche
Glucosio basso (poca energia)	Attiva	Acc fosforilata: inattiva	↓ lipidi, ↓ TAG, ↓ goccioline lipidiche
Stress energetico generale (es. AMP/ATP alto)	Attiva	ACC fosforilata: inattiva	↓ lipidi, riserva carbonio per la respirazione

Snf1 è un sensore di energia: attiva quando il glucosio è basso e inattiva quando il glucosio è alto.

Quando il glucosio è alto si ha la lipogenesi che è la produzione di acidi grassi, fosfolipidi e trigliceridi insieme alla formazione di goccioline lipidiche ciò avviene soprattutto in abbondanza di nutrienti.

Quando il glucosio è basso la proteina Snf1, quando è attiva, tende a inibire la lipogenesi e a ridurre l'accumulo di trigliceridi.

Snf1 modula il flusso verso TAG regolando l'enzima fosfatidato fosfatasi (PAP) che catalizza la formazione di acido fosfatidico, in diacilglicerolo ed è la reazione che controlla la via per la formazione di TAG e la formazione delle goccioline lipidiche.

Snf1 non fosforila direttamente PAP, ma attiva un'altra proteina chinasi che la mantiene la PAP fosforilata e inattiva.

La PAP fosforilata non entra facilmente nel nucleo o ER e funziona meno:

Meno DAG

Meno TAG

Minor riempimento delle goccioline lipidiche con TAG.

In condizioni di bassa energia, la cellula privilegia la formazione di fosfolipidi (importantissimi per la respirazione) rispetto ai trigliceridi perché i fosfolipidi servono a costruire membrane mentre i trigliceridi NON servono alla respirazione ma solo a **immagazzinare energia** in goccioline lipidiche.

CONCLUSIONI:

Quando il glucosio è basso, Snf1 accende tutti i percorsi alternativi utili a generare ATP.

Nella forma attiva:

Aumenta la β -ossalidazione degli acidi grassi nella perossisoma

Aumenta la gluconeogenesi (via del fruttosio-1,6-bisfosfatasi)

Utilizzo di fonti alternative di carbonio: etanolo, lattato, glicerolo

Reprime:

Sintesi dei lipidi (attraverso regolazione di Acc1 e della sintesi di acidi grassi)

Crescita e biosintesi in condizioni di energia insufficiente.

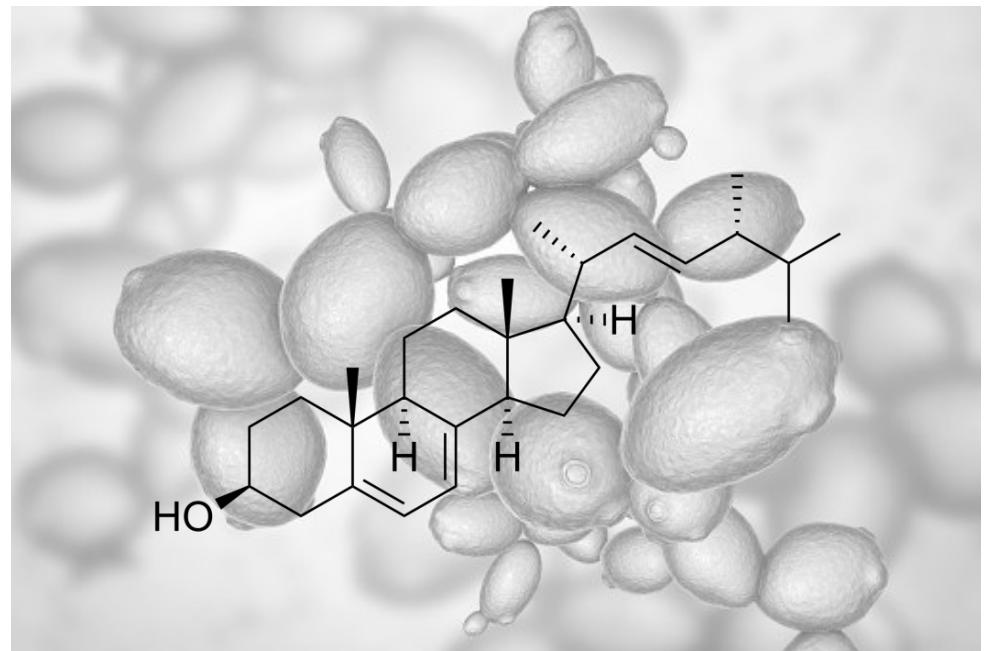
La Snf1 è un sensore globale dell'energia coordina:

- Il metabolismo del carbonio
- L'espressione genica
- Crescita/riproduzione
- Rimodellamento lipidico
- L'uso di fonti alternative di energia

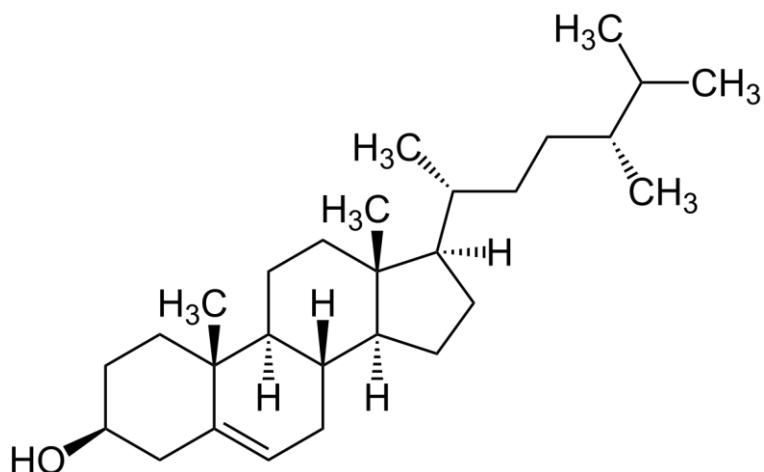
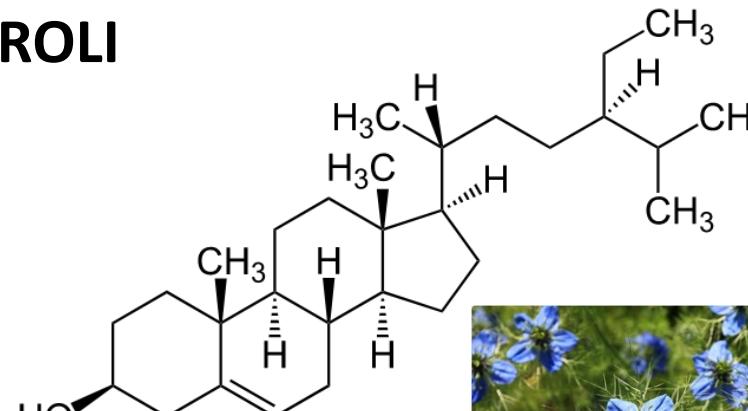
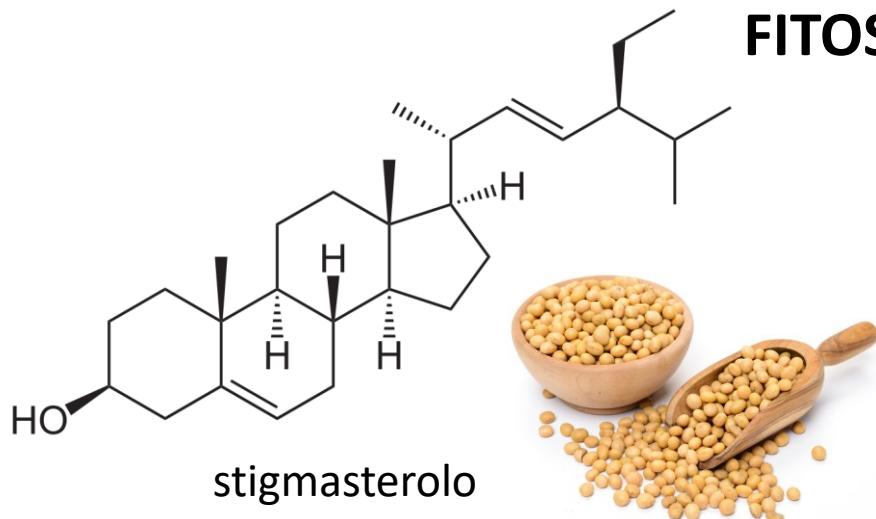
Regola il metabolismo mediante fosforilazioni chiave e (de)repressioni trascrizionali, soprattutto tramite Mig1.

Snf1 attiva sposta il metabolismo dalla fermentazione alla respirazione, usando acidi grassi e altri precursori per produrre energia nei mitocondri e sostenere la sopravvivenza a basso glucosio.

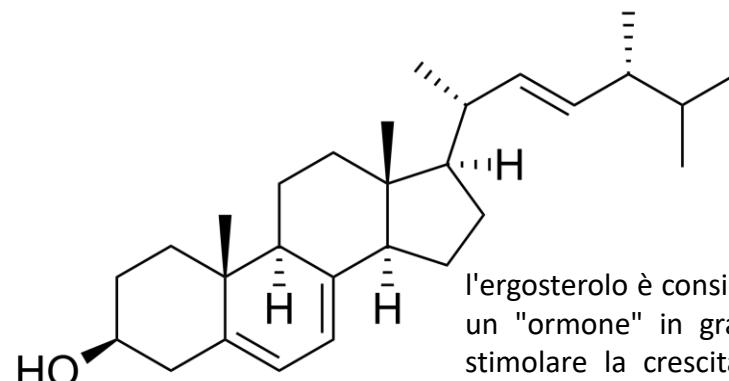
Biosintesi dell'ergosterolo



FITOSTEROLI



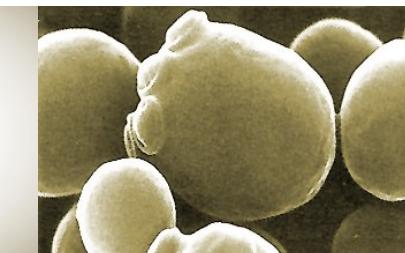
campesterolo



ergosterolo



I'ergosterolo è considerato un "ormone" in grado di stimolare la crescita e la proliferazione cellulare.



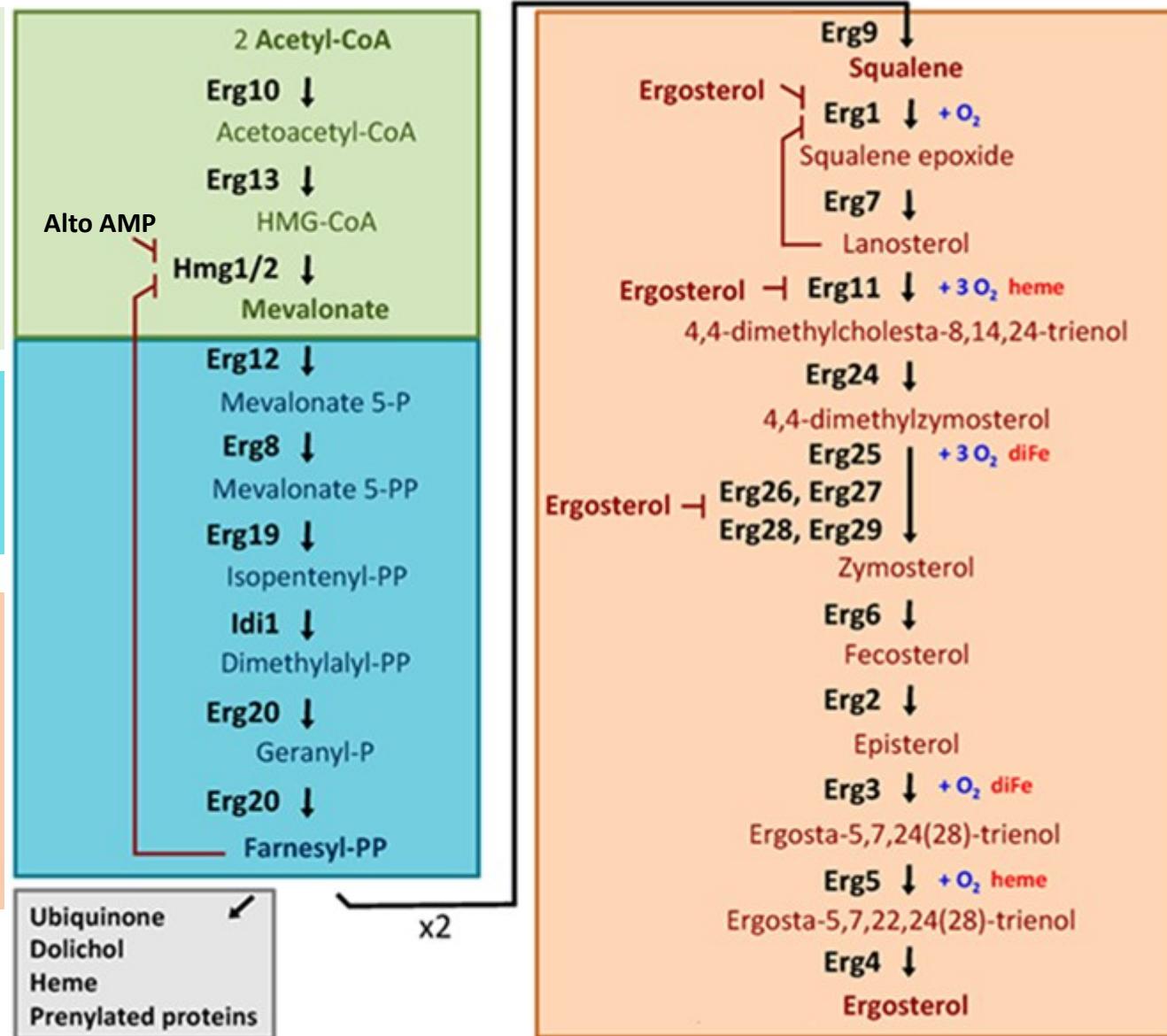
Biosintesi dell'ergosterolo in *S. cerevisiae*

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

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

La terza parte (arancione): (reticolo endoplasmatico) è la via di sintesi dello squalene e lanosterolo insieme alle modificazioni finali di desaturazione e metilazioni.

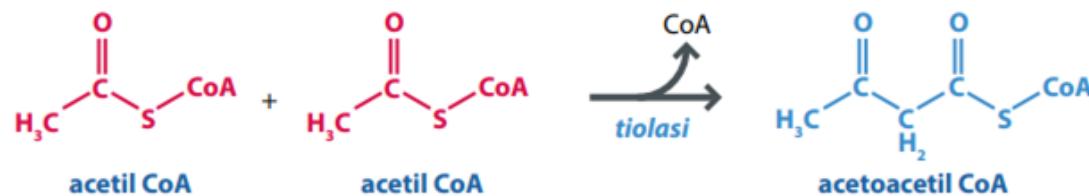
Trasporto finale: l'ergosterolo incorporato nelle membrane plasmatiche e vacuoli.



Modificato da Jordà T. and Puig. Regulation of ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* 2020, 11, 795

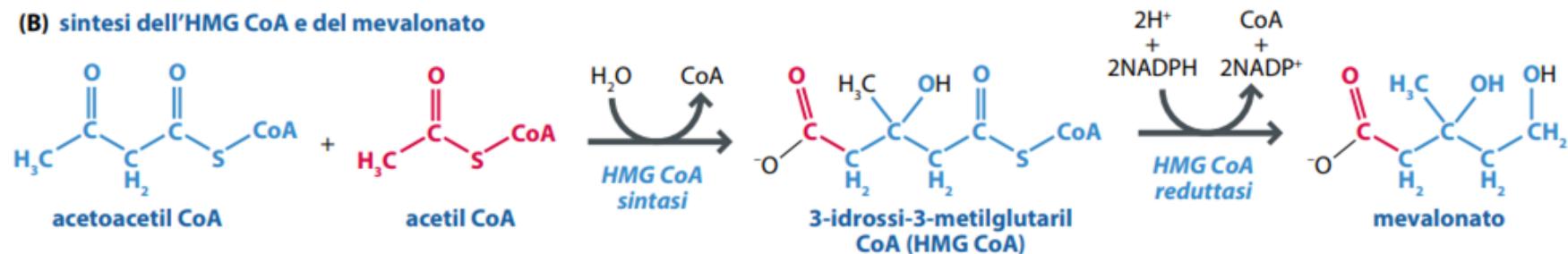
Nella prima fase della via di sintesi del ergosterolo viene sintetizzato l'isopentenil pirofosfato a partire da acetil CoA

(A) sintesi dell'acetoacetil CoA



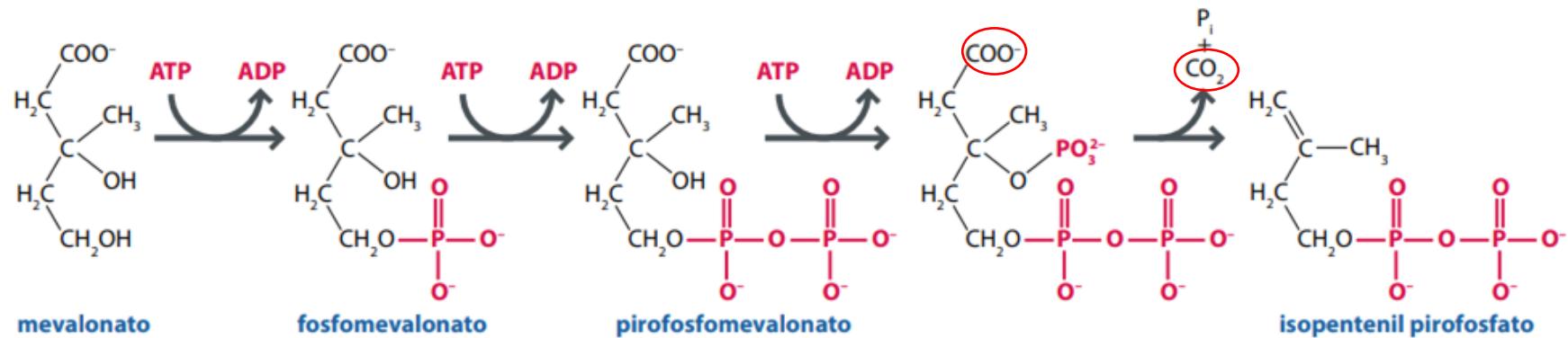
La prima fase

(B) sintesi dell'HMG CoA e del mevalonato

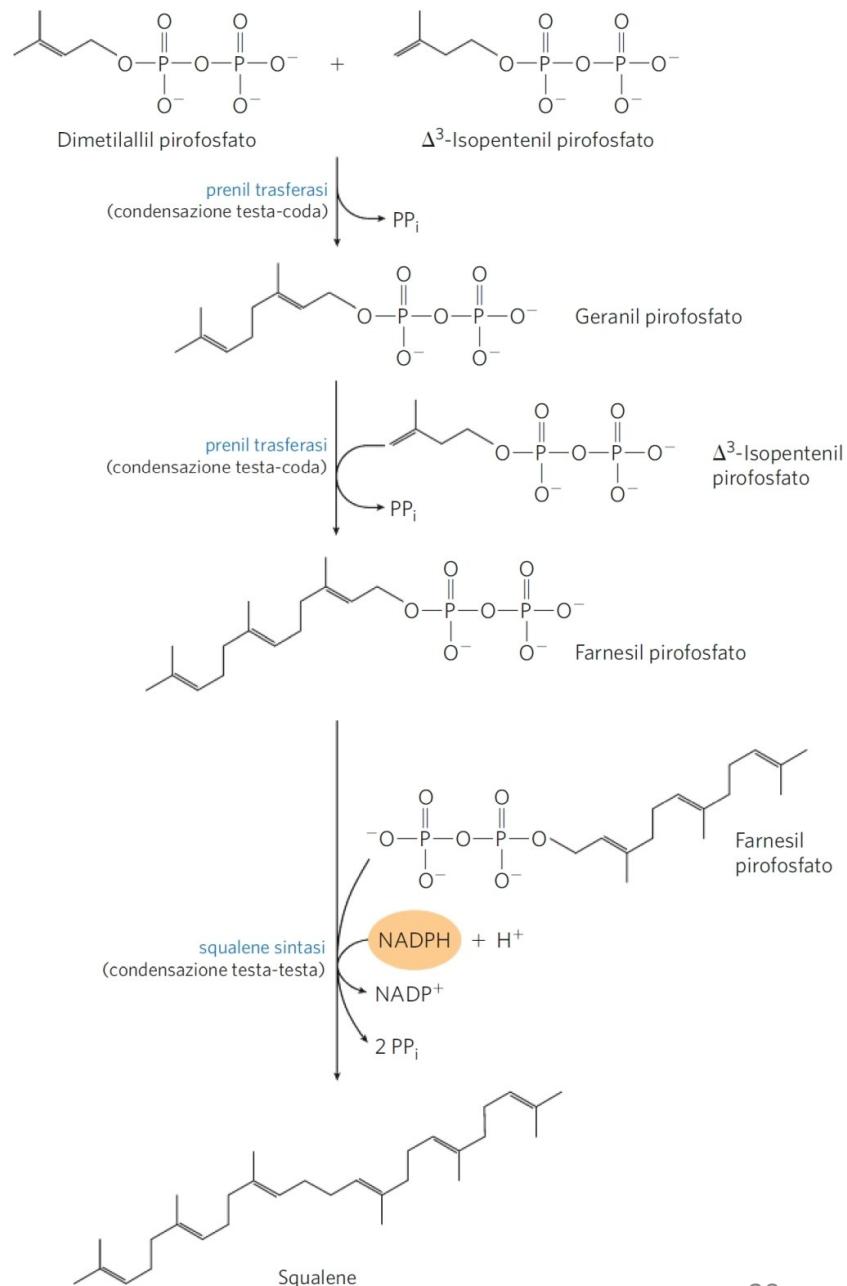
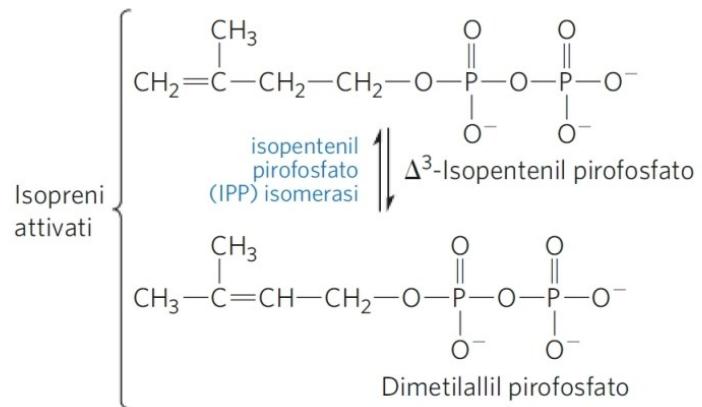


La seconda fase

(C) da mevalonato a isopentenil pirofosfato



La condensazione di sei unità isopreniche attivate per formare lo squalene

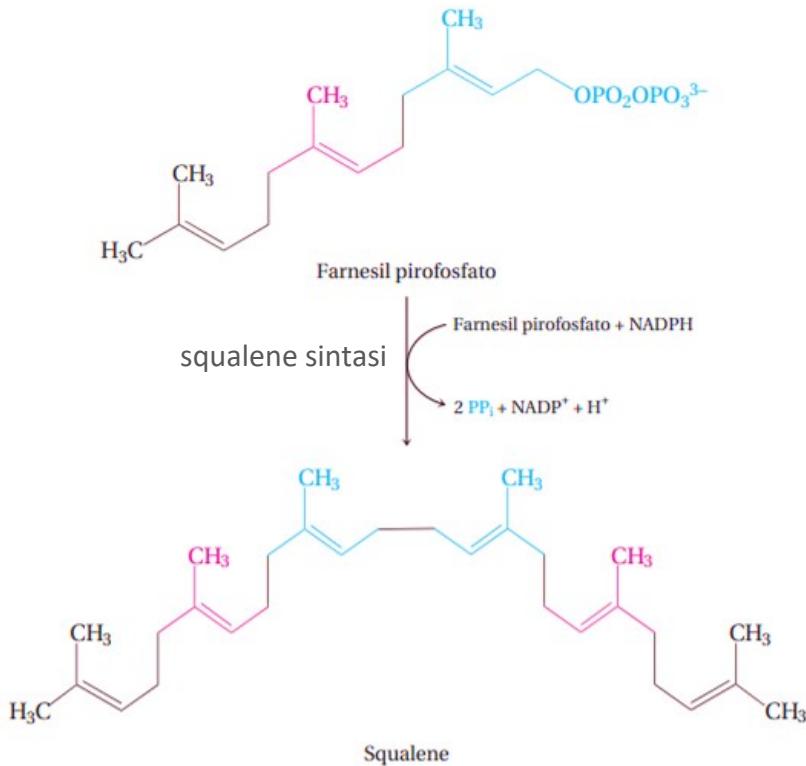


L'isopentenil pirofosfato e il dimetilallil pirofosfato condensano testa-coda (liberazione di un gruppo pirofosfato) e si forma una catena a 10 atomi di carbonio: geranil pirofosfato. Questo subisce un'altra condensazione testa-coda in cui viene prodotto un intermedio, a 15 atomi di carbonio, il farnesil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

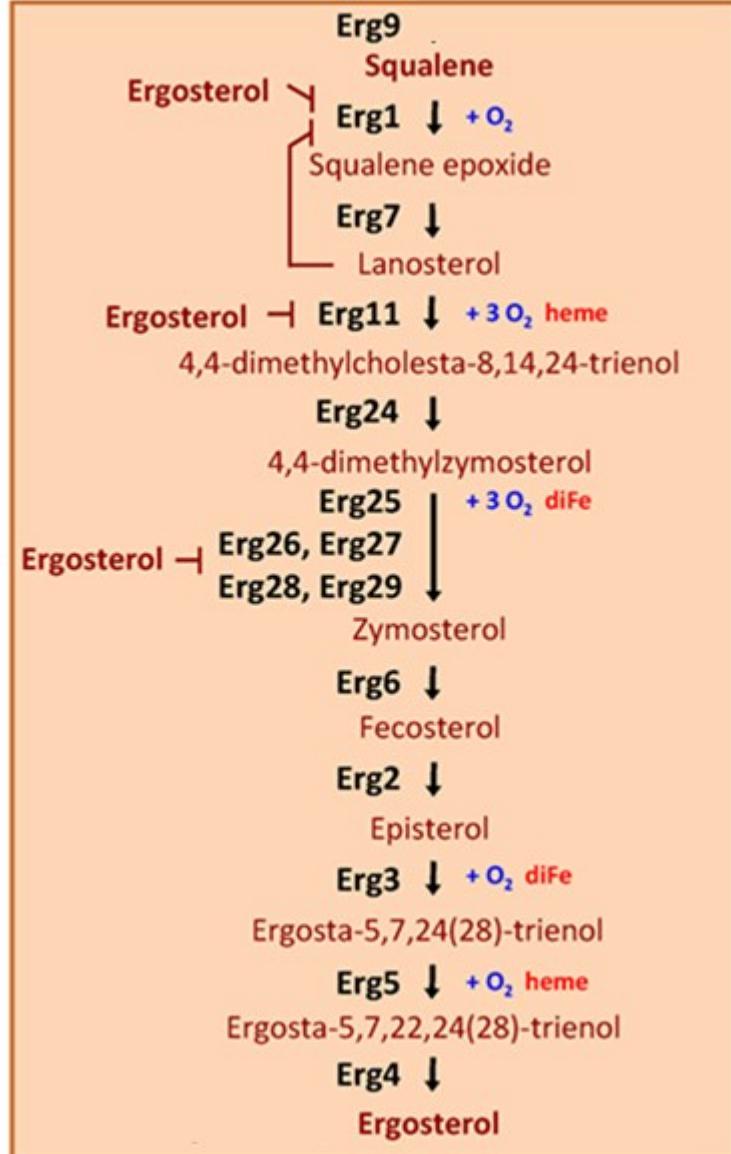
Infine due molecole di farnesil pirofosfato si uniscono testa-testa con eliminazione di entrambi i pirofosfato, formando lo squalene costituito da 30 atomi di carbonio.

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.



Modificato da Jordà T. and Puig. Regulation of ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes 2020, 11. 795

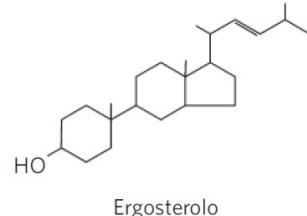
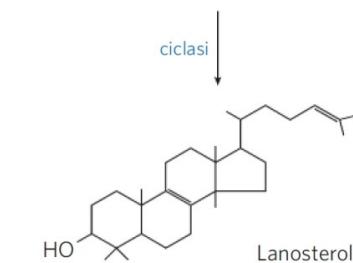
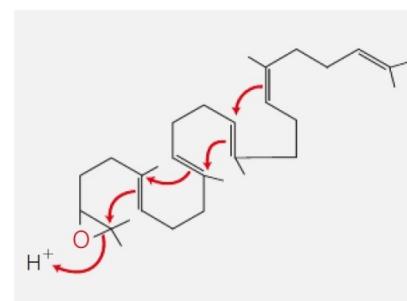
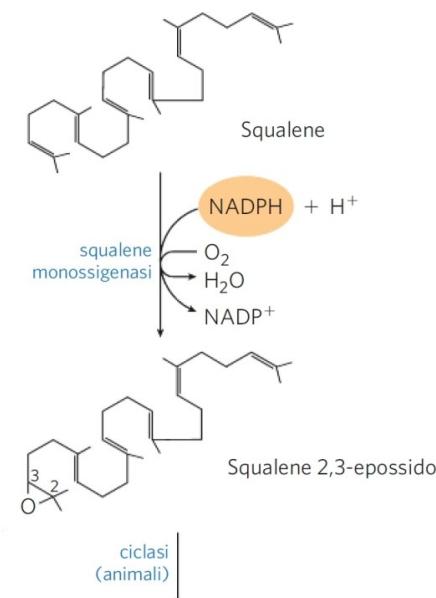
La chiusura degli anelli converte lo squalene lineare nel nucleo steroideo condensato a quattro anelli

La squalene monossigenasi aggiunge un atomo di ossigeno prelevandolo dall' O_2 all'estremità della molecola dello squalene formando un epossido, l'altro atomo della molecola di O_2 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.



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:

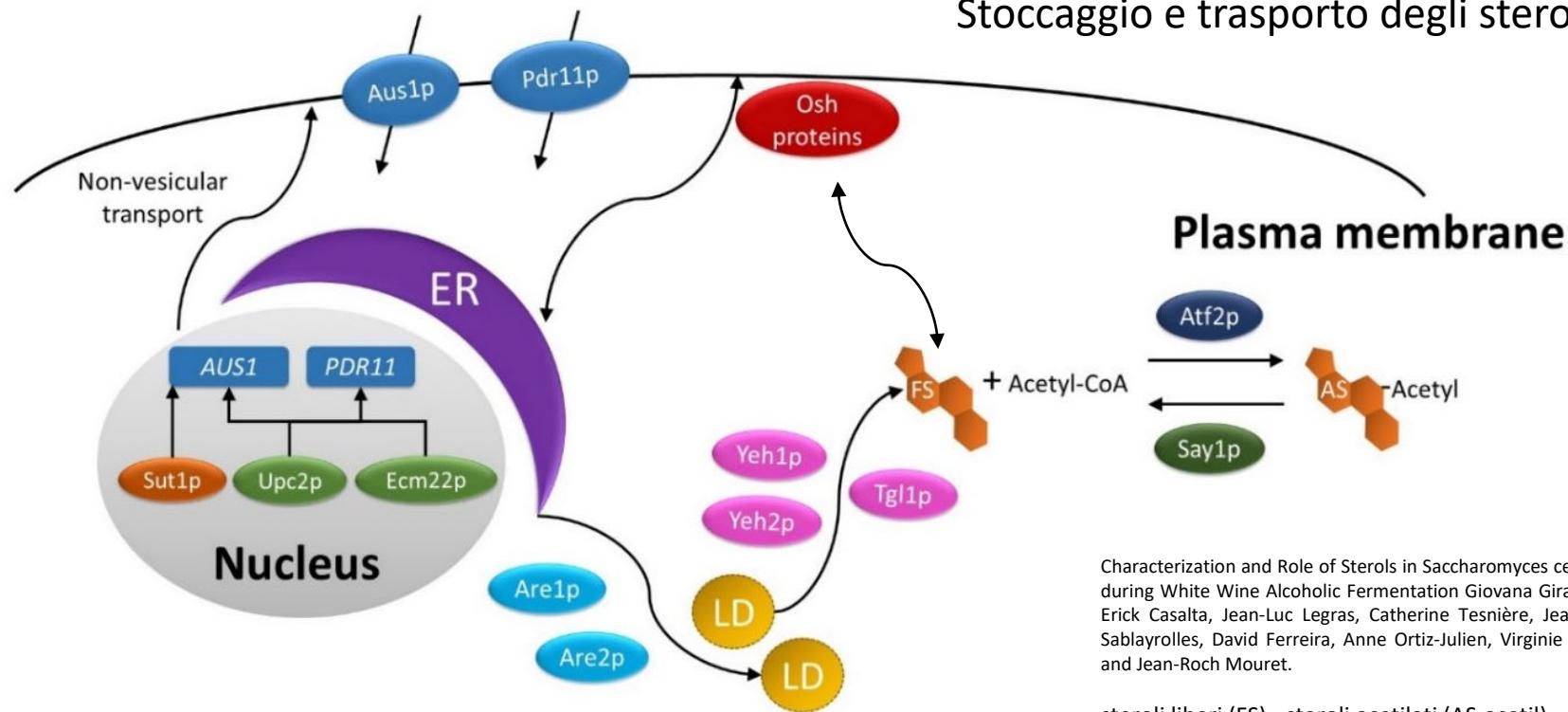
L'enzima Erg11 rimuove un gruppo metile dal lanosterolo; se l'enzima non funziona bene (assenza di O₂) si accumulano prodotti ancora metilati come il metilsterolo.

L'accumulo di questi intermedi di steroli può diventare tossico per le cellule poiché alterano la struttura della membrana, la rendono rigida, poco funzionale e permeabile.

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

- Enzimi nella via dell'ossalidazione degli steroli degradano o modificano i metilsteroli rendendoli meno tossici.
- I metilsteroli vengono esterificati e stoccati nei LP, per tenerli lontani dalla membrana.

Stoccaggio e trasporto degli steroli



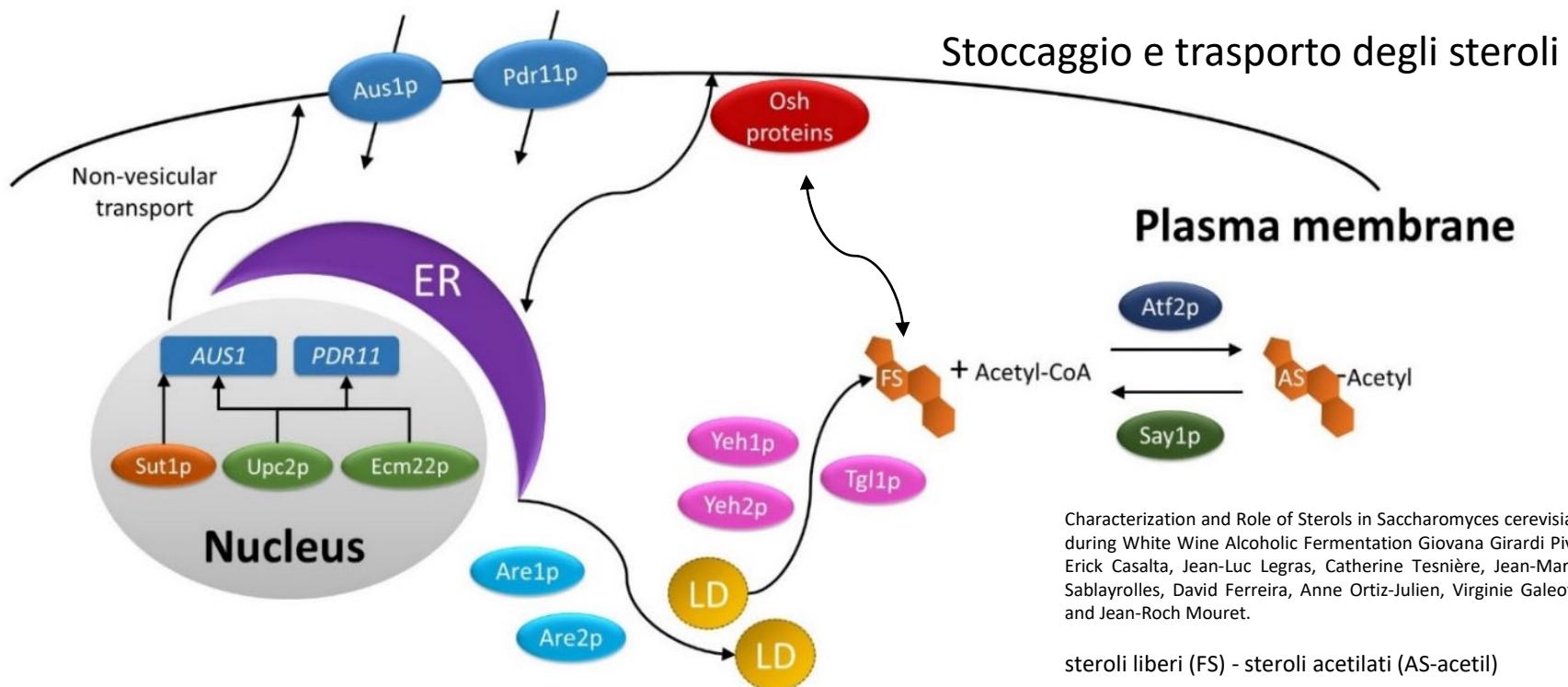
Characterization and Role of Sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during White Wine Alcoholic Fermentation Giovana Girardi Piva Erick Casalta, Jean-Luc Legras, Catherine Tesnière, Jean-Marie Sablayrolles, David Ferreira, Anne Ortiz-Julien, Virginie Galeote and Jean-Roch Mouret.

steroli liberi (FS) - steroli acetilati (AS-acetyl)

Trasporto è mediato da proteine lipid-transfer

Proteine specifiche (es. **Aus1p, Pdr11p**) trasportano steroli dall'ambiente esterno all'interno della cellula, mentre le **Osh proteins** sono coinvolte nel trasporto e scambio di steroli tra membrane cellulari, spostano gli steroli tra ER, vacuolo e membrana plasmatica. Non richiede vescicole, funziona per contatto diretto tra membrane.

Gli steroli vengono **esterificati** tramite **Are1** e **Are2** (sterolo O-aciltransferasi), formando **esteri di sterolo**. La reazione di esterificazione avviene nel ER e sono diretti alla goccioline lipidiche.



L'idrolisi degli esteri avviene principalmente tramite lipasi specifiche per steroli esterificati, nel *Saccharomyces cerevisiae*, i principali enzimi sono la **Tgl1p** lipasi che idrolizza esteri sterolici nelle goccioline lipidiche e le **Yeh1p** e **Yeh2p** lipasi che partecipano alla mobilizzazione dei steroli.

Una volta liberato nello spazio citoplasmatico, lo sterolo deve raggiungere la membrana, può avvenire tramite trasporto spontaneo tra le goccioline lipidiche e la membrana (il trasporto è lento a causa dell'idrofobicità dei lipidi).

Proteine trasportatrici di steroli che facilitano il trasferimento rapido verso la membrana plasmatica o altri compartimenti.

La proteina Atf2 catalizza la formazione di esteri sterolici a partire da steroli liberi e acil-CoA.

Say1 catalizza la deacetilazione degli steroli acetilati, producendo steroli liberi (aiuta a mantenere un pool di steroli libri disponibile per la membrana e altre funzioni cellulari).

Regolazione dello stoccaggio e trasporto degli steroli:

Quando la membrana ha bisogno di steroli le lipasi liberano steroli dalle goccioline lipidiche con trasferimento dello sterolo verso la membrana tramite le Proteine trasportatrici di steroli.

Quando c'è eccesso di steroli l'enzima Atf2 esterifica steroli e vengono stoccati nelle goccioline lipidiche.

CONCLUSIONE:

Quando il glucosio è abbondante:

la cellula tende a esterificare steroli. Attiva gli enzimi chiave: Atf1 e Atf2 e il risultato è un aumento degli esteri sterolici nelle goccioline lipidiche.

Quando il glucosio scarseggia:

La cellula deve mobilizzare riserve energetiche e componenti di membrana, gli esteri sterolici vengono idrolizzati. Sono attivati gli enzimi lipasi chiave: Tgl1, Yeh1, Yeh2

Gli steroli liberi vengono trasferiti alle membrane tramite Osh proteins, perché la cellula ha bisogno di mantenere l'integrità delle membrane e i processi vitali (trasporto, respirazione, divisione minima). Lo spostamento degli steroli verso la membrana è un meccanismo di emergenza per mantenere la funzionalità cellulare.

- *Regolazione*
della biosintesi
dell'ergosterolo



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

Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, la HMG-CoA reduttasi è codificata da due geni: HMG1 e HMG2, il lievito ha due enzimi **Hmg1** e **Hmg2**.

I livelli alti di ergosterolo o intermedi sterolici riducono la trascrizione di HMG1/HMG2 (Feedback negativo).

L'effetto è il controllo della quantità di enzima prodotto, adattando la sintesi sterolica ai bisogni della cellula.

2) Regolazione metabolica:

Il NADPH necessario per ridurre HMG-CoA a mevalonato.

Il NADPH basso riduce la velocità di sintesi del mevalonato e rallenta la sintesi di ergosterolo.

3) Regolazione post-traduzionale:

a) Fosforilazione/inattivazione

La proteina chinasi Snf1p fosforila HMG-CoA reduttasi in risposta alla bassa energia cellulare (alto AMP, basso ATP). L'effetto è la riduzione dell'attività enzimatica ciò porta a riduce la produzione di steroli quando l'energia è limitata.

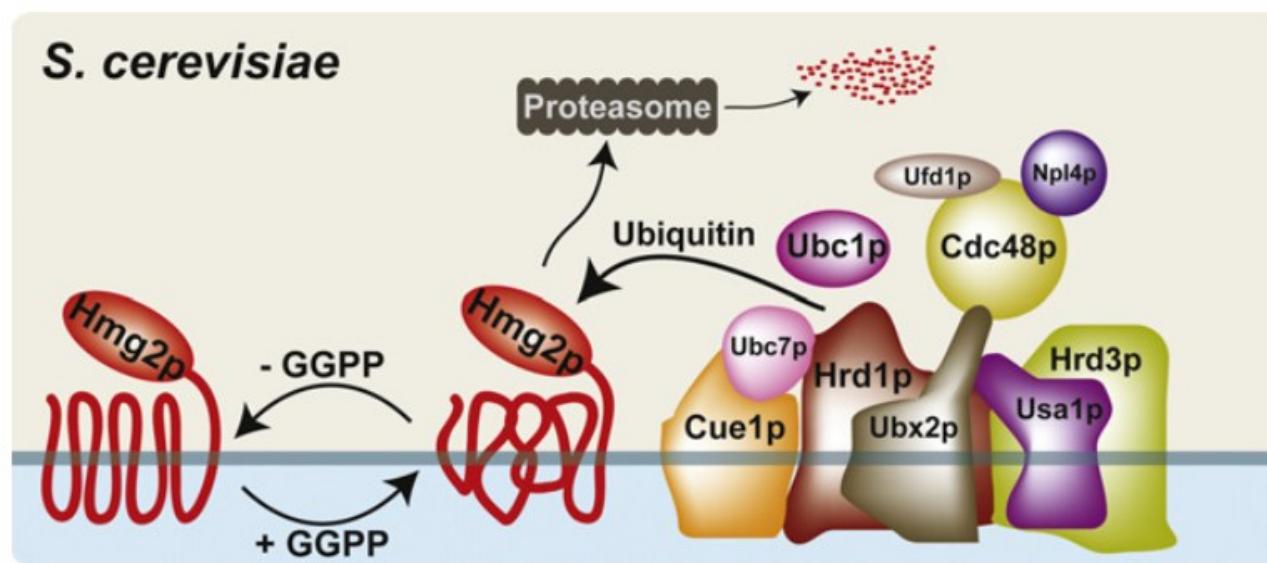
2) Regolazione post-traduzionale:

- b) La degradazione mediata da ubiquitina (proteina che marca le proteine per la degradazione proteasomale)

La proteina Hmg2p viene degradato principalmente dal proteasoma se ci sono alti livelli di steroli o intermedi ossidati (geranylgeranyl pirofosfato, GGPP).

La proteina Hmg1p è più stabile ed è regolata soprattutto a livello trascrizionale. Quando i livelli di steroli sono bassi aumenta la trascrizione dei geni HMG1.

Questo meccanismo permette una risposta rapida ai cambiamenti nei livelli di steroli senza aspettare la nuova sintesi dell'enzima.



L'enzima chiave per il controllo della sintesi dell'ergosterolo è l'Erg1 (squalene epossido sintasi), catalizza la fase limitante della via: Squalene → Squalene epossido

Quando i livelli di lanosterolo ed ergosterolo aumentano l'enzima Erg1 viene inibito.

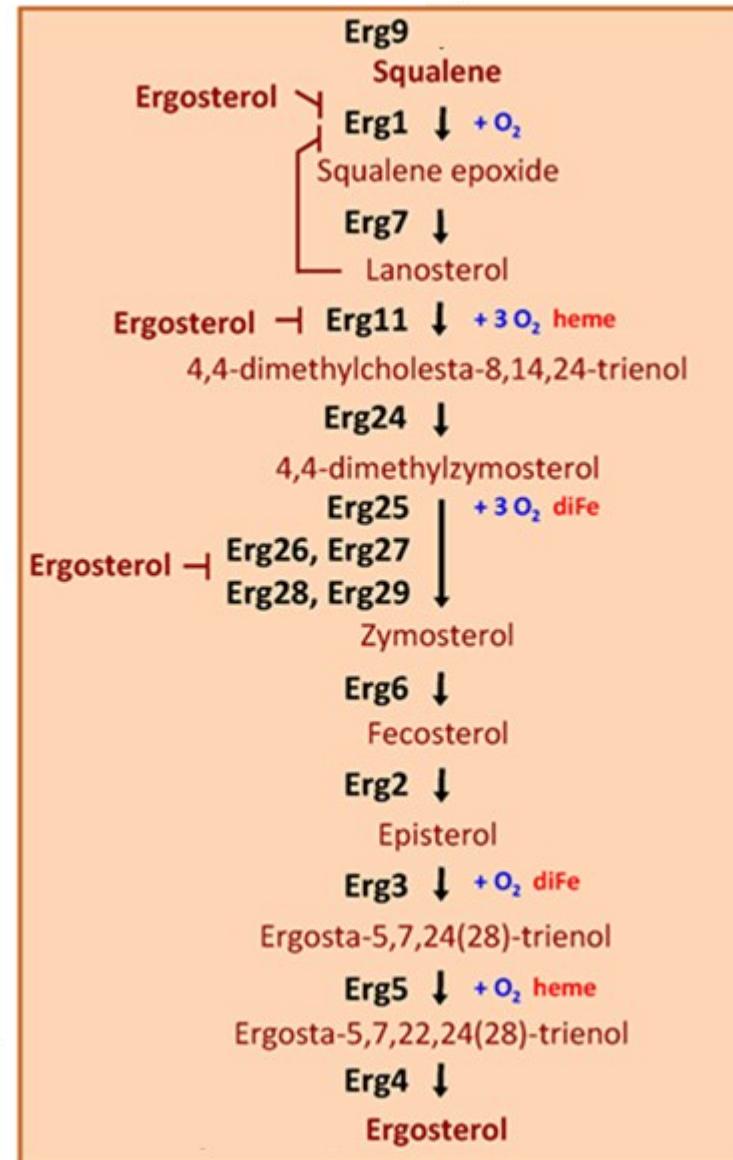
Il controllo sugli enzimi ERG11, ERG25, ERG26, ERG27 dipende dalla quantità di ergosterolo, se aumenta gli enzimi vengono repressi.

L'enzima Erg11 (lanosterolo demetilasi) viene regolato con un meccanismo a feedback dall'ergosterolo, se aumenta viene represso.

Il controllo della via dipende anche dalla disponibilità di ossigeno.

Quando l'ossigeno è basso:

L'enzima Erg1 e gli altri enzimi ossigenasi rallentano e la via si blocca.



Modificato da Jordà T. and Puig. Regulation of ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* 2020, 11, 795

Nei lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*), il glucosio influenza la sintesi di ergosterolo attraverso diversi meccanismi metabolici e di segnalazione

Effetto del glucosio sul metabolismo lipidico:

- Glucosio abbondante segue la via della fermentazione con alta disponibilità di ATP e NADPH.
- ATP elevato e basso AMP inattivano la proteina Snf1, quindi non fosforila la proteina HMG-CoA reduttasi, rimanendo attiva.
- Questo favorisce la sintesi di steroli perché la cellula ha energia e riducente disponibili.

A livello trascrizionale

- La presenza di glucosio stimola fattori di trascrizione legati alla via della glicolisi e biosintesi lipidica, che aumentano l'espressione dei geni della biosintesi degli steroli (HMG1/HMG2).
- In condizioni di pochi zuccheri, la trascrizione di HMG1/HMG2 diminuisce, riducendo la sintesi di ergosterolo.

La regolazione post-traduzionale

La proteina Snf1p (fosforila e inattiva l'enzima HMG-CoA reduttasi (HMG1p/HMG2p)) è attiva quando il glucosio è scarso.

- Con scarso glucosio e AMP alto la proteina Snf1 è attiva, fosforila la HMG-CoA reduttasi e diminuisce la sintesi degli steroli.
- Con abbondante glucosio la proteina Snf1 è inattivo, la HMG-CoA reduttasi è attiva e la sintesi degli steroli è attiva.

La biosintesi di ergosterolo richiede NADPH e acetil-CoA e il glucosio fornisce i precursori:

- L'acetil-CoA citoplasmatico (tramite piruvato che diventa acetil-CoA e nel mitocondrio insieme all'ossalacetato forma citrato, questo esce dal mitocondrio e nel citoplasma si scindi in acetil-CoA citosolico + ossalacetato).
- NADPH (da via dei pentoso fosfati e dal malato che diventa piruvato)

CONCLUSIONI:

Lo zucchero regola la sintesi dell'ergosterolo nei lieviti sia:

- Indirettamente tramite la proteina Snf1 e lo stato energetico (fosforilazione post-traduzionale della HMG-CoA reduttasi)
- Direttamente tramite trascrizione dei geni della via sterolica e disponibilità di precursori (acetil-CoA, NADPH).