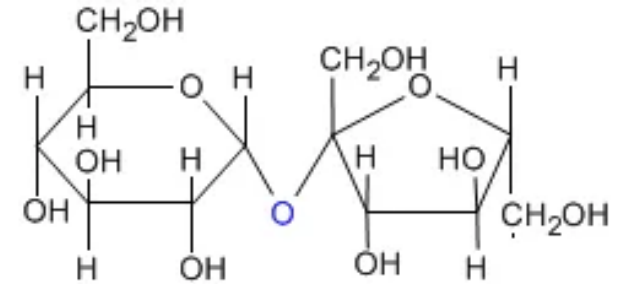
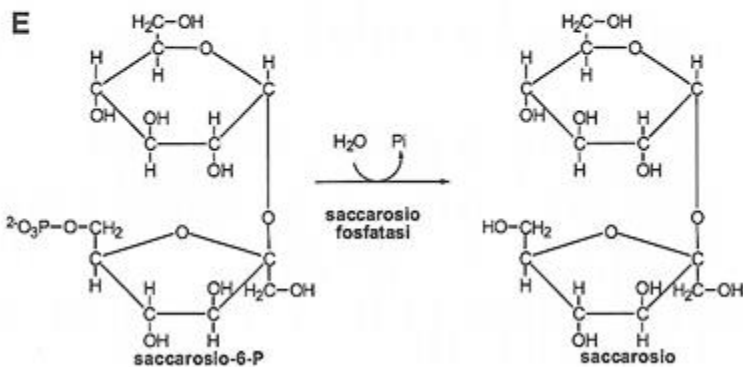
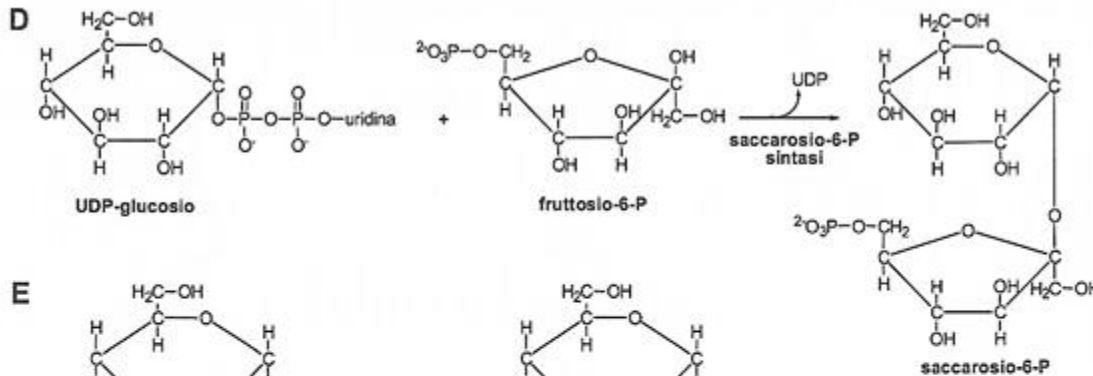
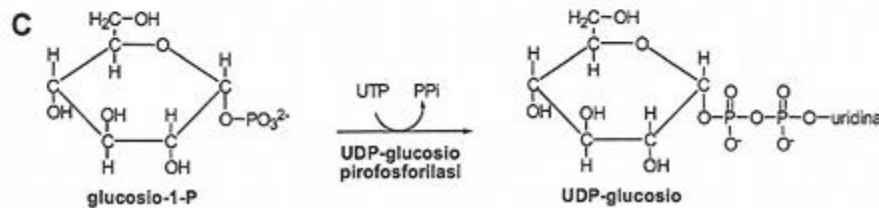
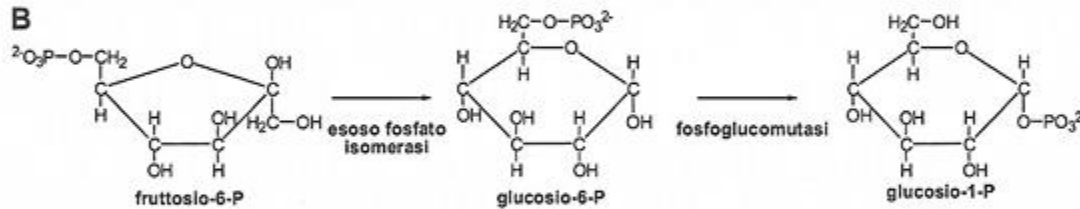
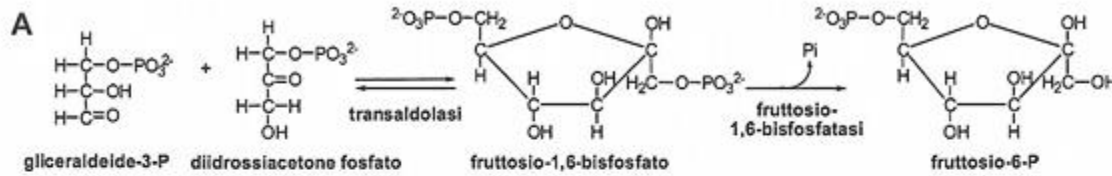




Sintesi del
saccarosio,
dell'amido e del
trealosio

Sintesi del saccarosio



Legame α 1-2

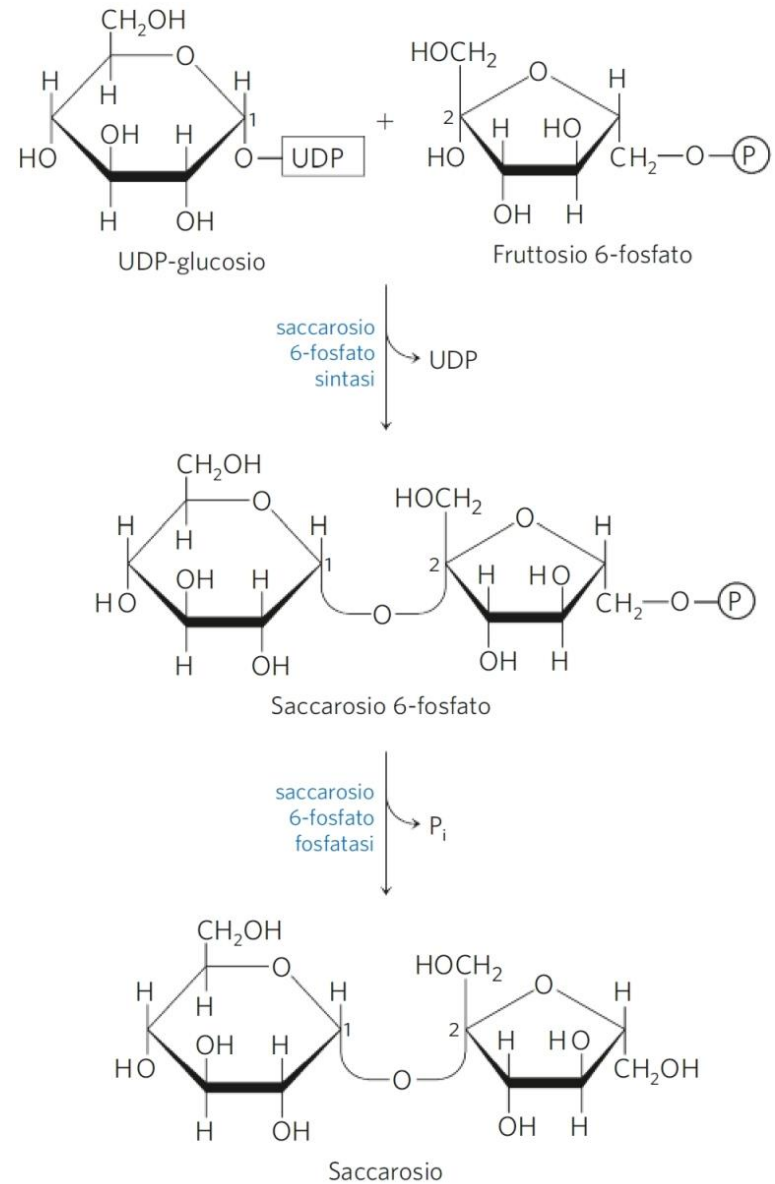
Sintetizzato nel citosol e trasportato attraverso il floema ai diversi tessuti che necessitano di energia e scheletri carboniosi.

La maggior parte dei triosi fosfato che si formano nelle piante mediante il processo di fissazione della CO_2 viene convertita in saccarosio o amido.

Sintesi del saccarosio

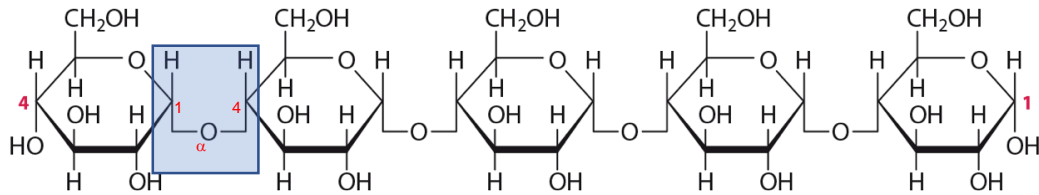
Il saccarosio viene sintetizzato dal glucosio attivato (UDP-glucosio) e dal fruttosio 6-fosfato, che si formano dai triosi fosfato nel citosol delle cellule delle piante.

Nella maggior parte delle piante la saccarosio 6-fosfato sintasi viene regolata allostericamente dal glucosio 6-fosfato e dal P_i



L'amido

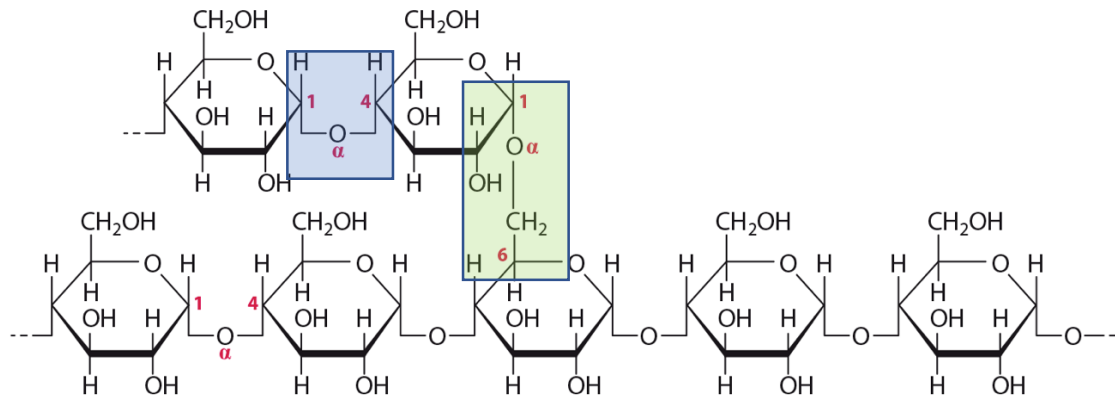
amilosio



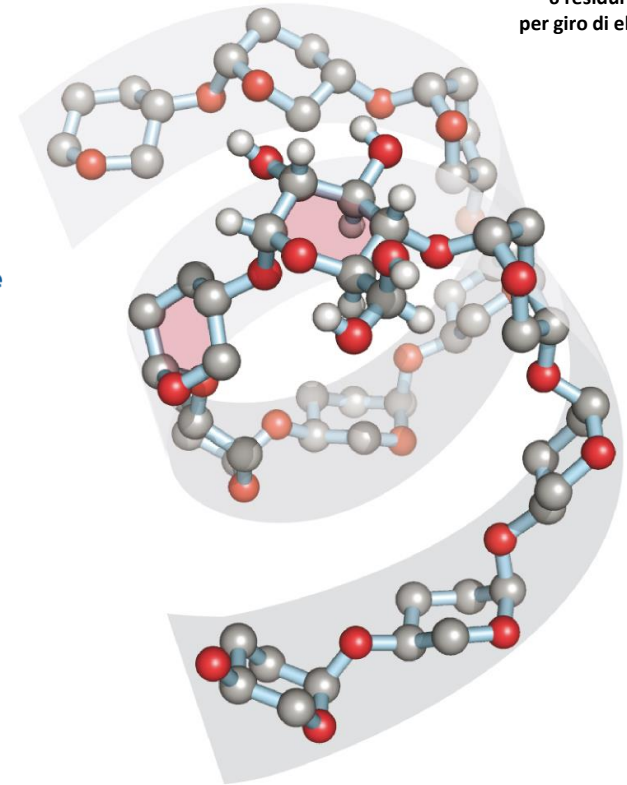
estremità non riducente

estremità riducente

amilopectina

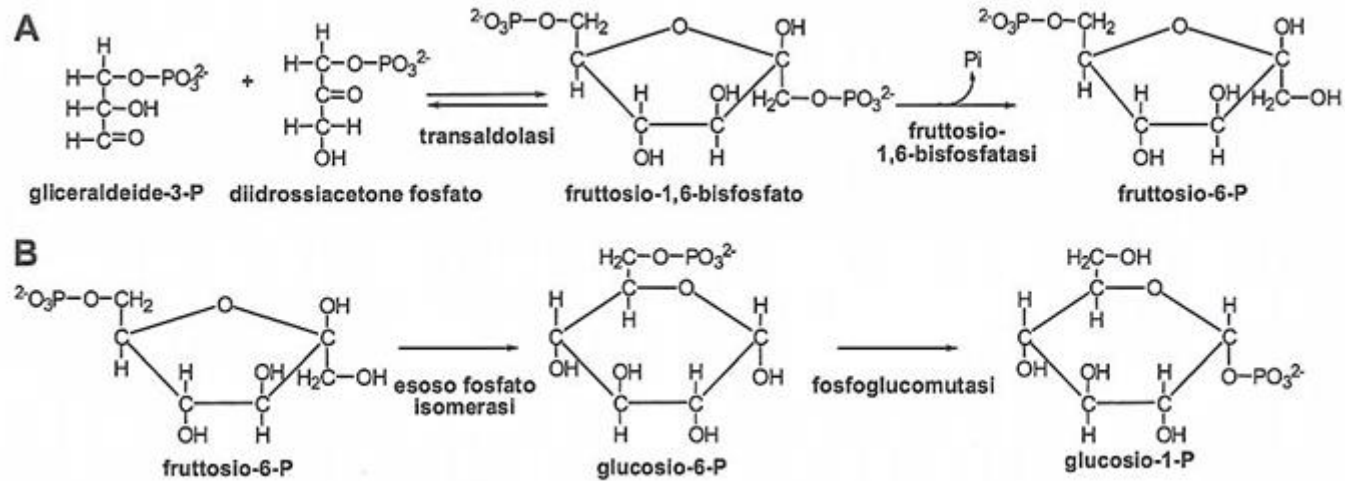


6 residui
per giro di elica



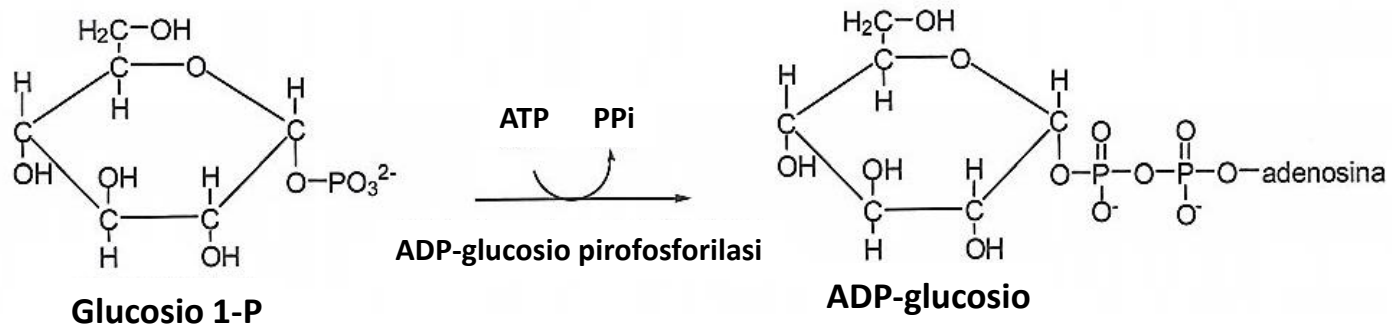
I due tipi di legami presenti nella molecola di amido: il legame α 1-4, presente nelle catene di amilosio, e il legame α 1-6, che permette le ramificazioni che caratterizzano le molecole di amilopectina.

Sintesi dell'amido

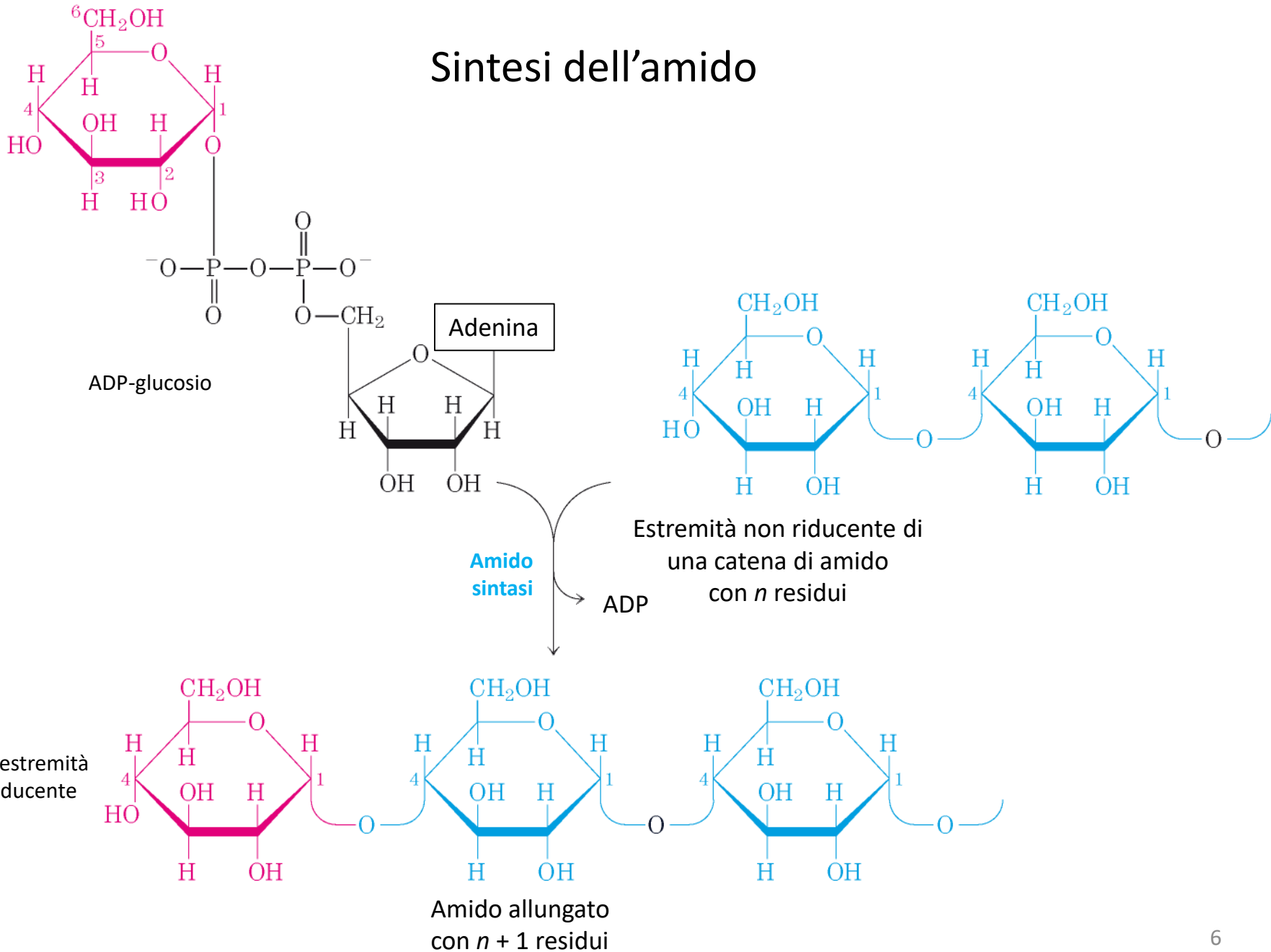


La sintesi dell'amido avviene nei plastidi a partire dal fruttosio 1,6 bisfosfato

Sintesi dell'ADP-glucosio



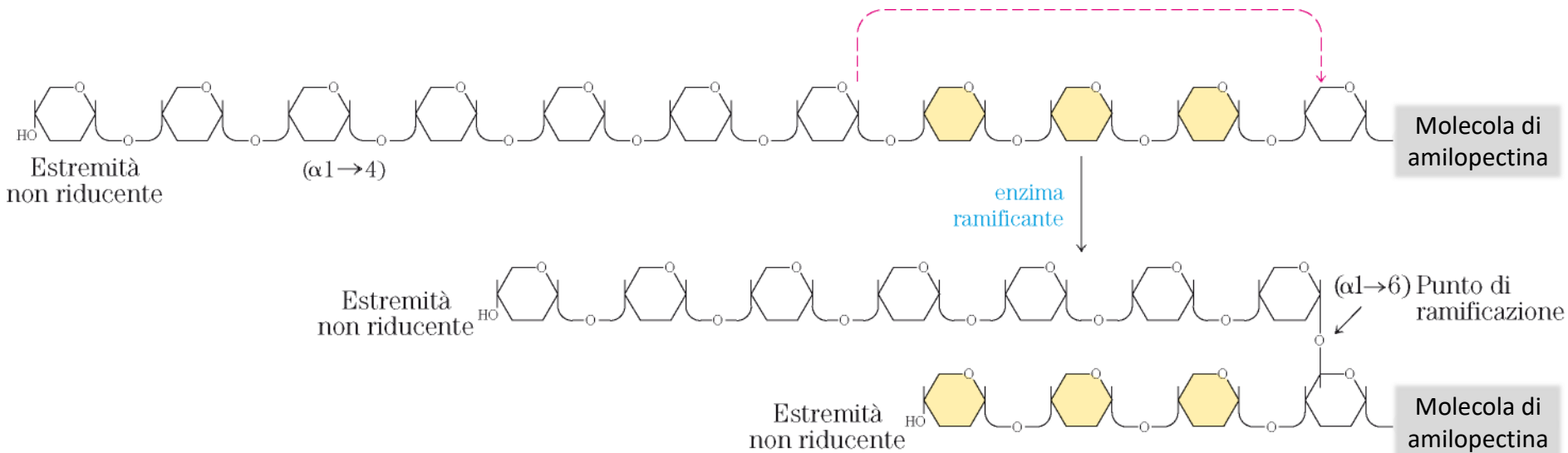
Sintesi dell'amido



Formazione delle ramificazioni nella molecola di amido

L'enzima ramificante introduce le ramificazioni α 1,6 nella molecola di amilopectina.

Catalizza il trasferimento di un segmento terminale di 6 o 7 residui glucosidici dall'estremità non riducente di una catena lineare di amilopectina.

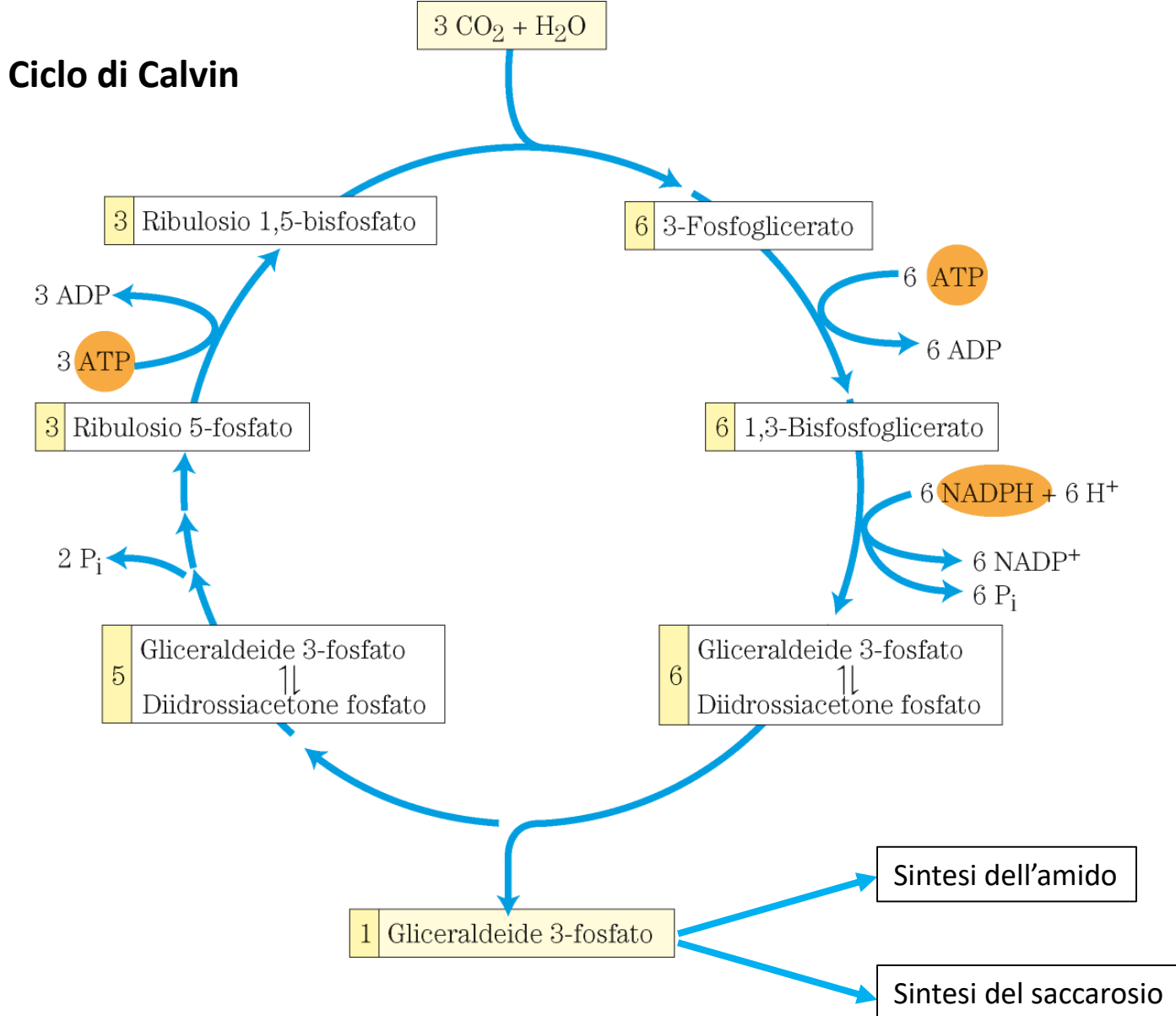


La reazione complessiva della sintesi dell'amido a partire da glucosio 1-fosfato è:



$$\Delta G'^{\circ} = -50 \text{ kJ/mole}$$

Regolazione della sintesi di amido e saccarosio: la loro sintesi è finemente regolata e coordinata con la fissazione della CO₂

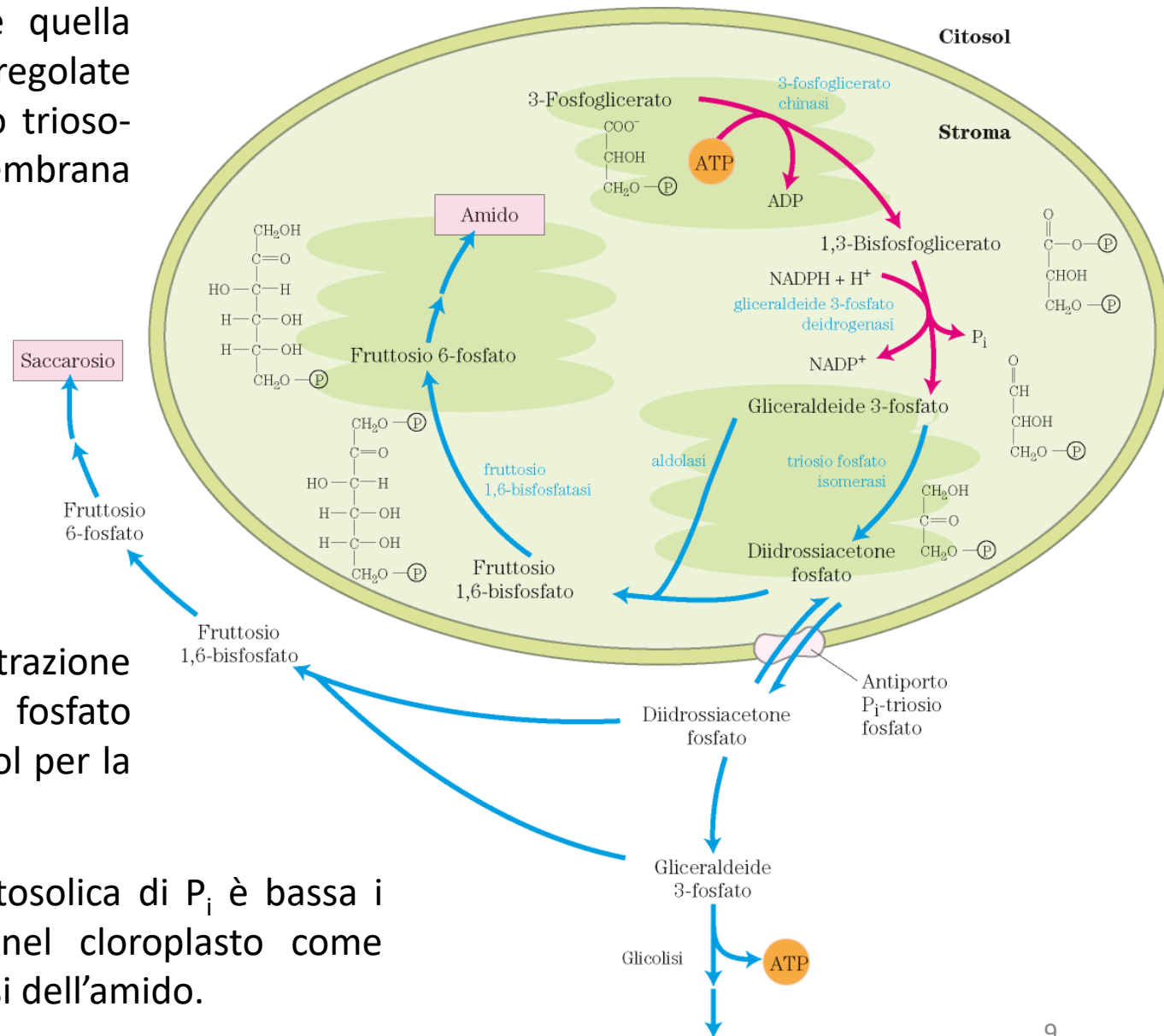


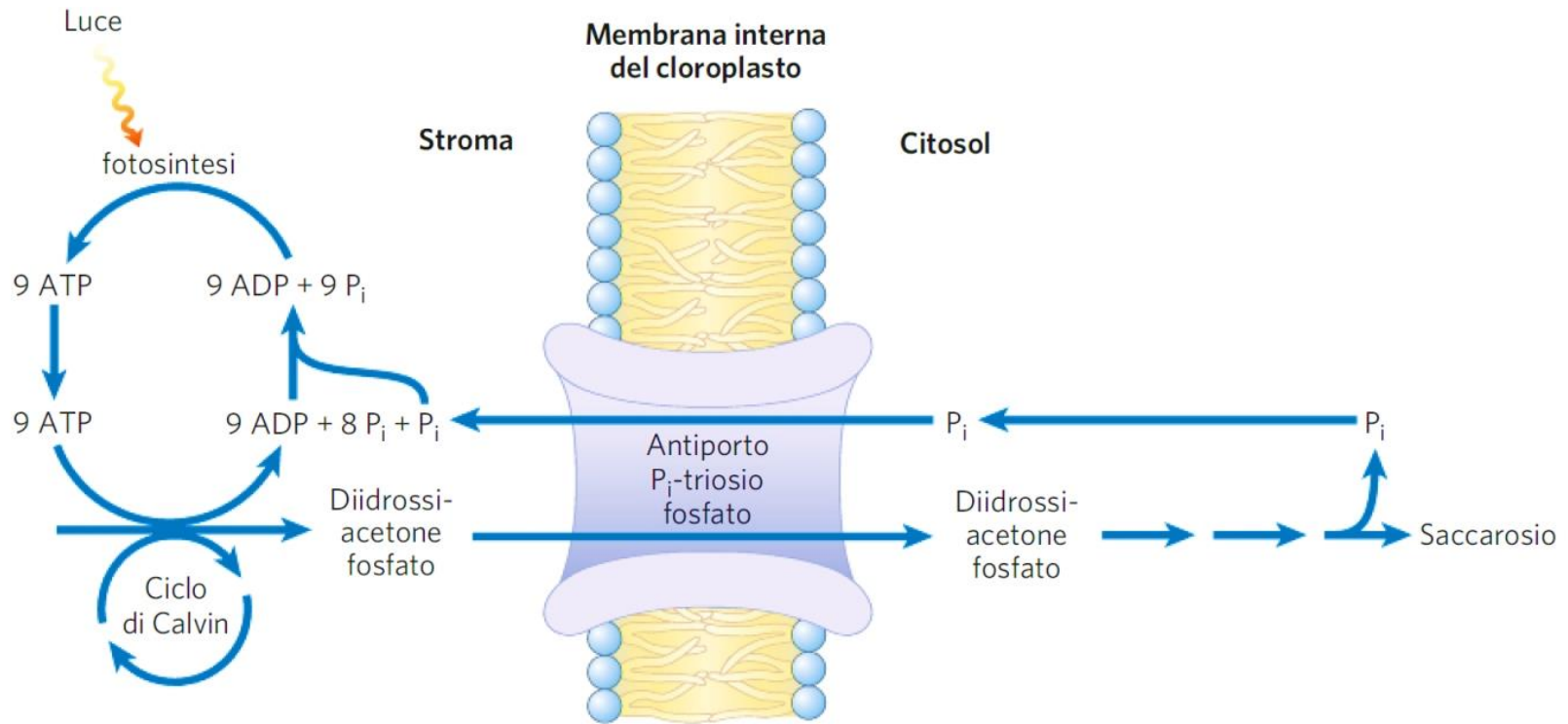
Regolazione della sintesi di amido e saccarosio

La sintesi dell'amido e quella del saccarosio, sono regolate dal sistema di antiporto trioso-P/Pi presente sulla membrana del cloroplasto.

Se nel citosol la concentrazione di P_i è elevata i triosi fosfato sono esportati nel citosol per la sintesi del saccarosio.

Se la concentrazione citosolica di P_i è bassa i triosi fosfato restano nel cloroplasto come substrati per la biosintesi dell'amido.

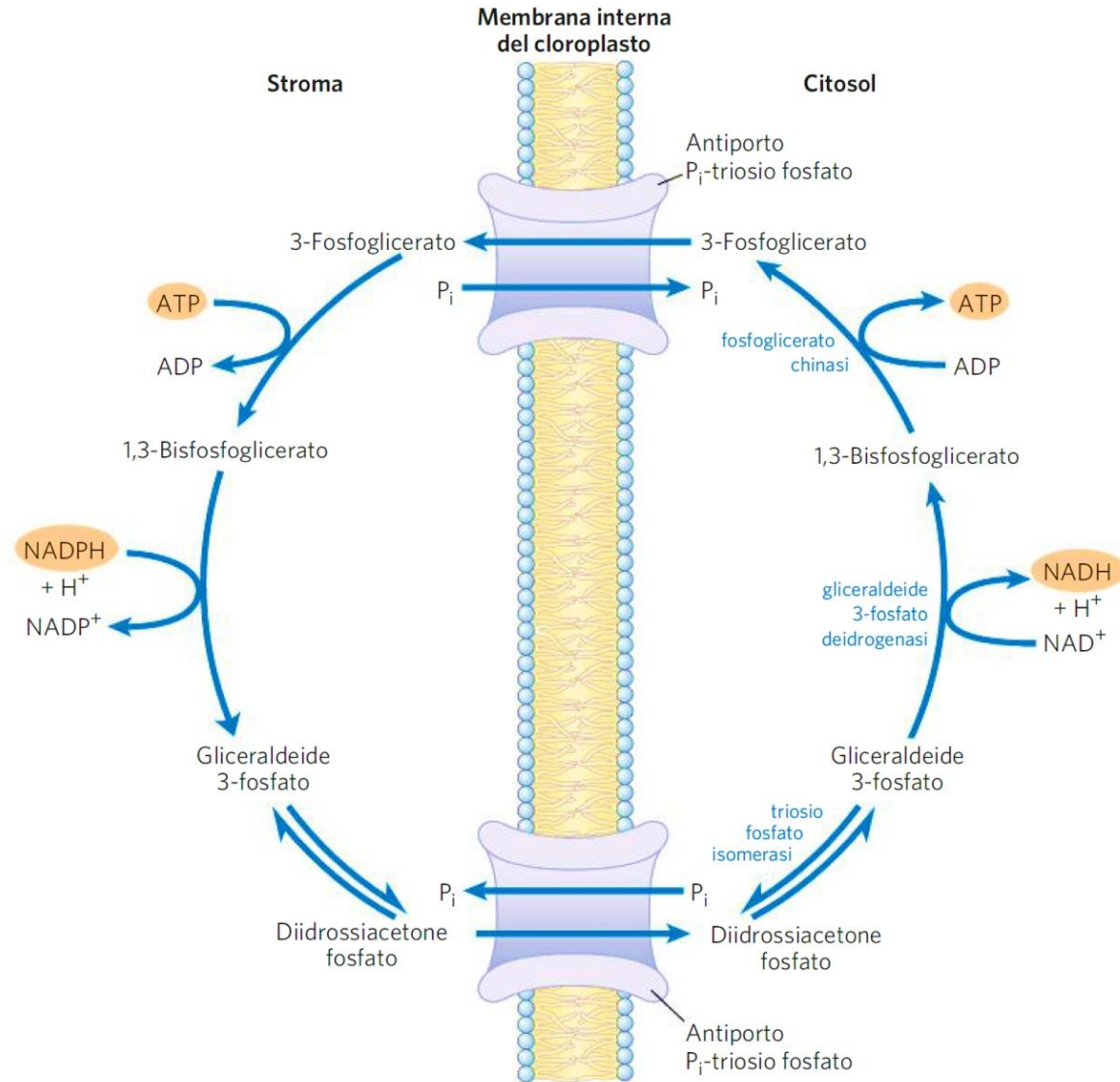




L'antiporto P_i -triosio fosfato della membrana interna del cloroplasto: questo trasportatore facilita lo scambio del P_i citosolico con il diidrossiacetone fosfato dello stroma. I prodotti dell'assimilazione fotosintetica del carbonio vengono trasferiti nel citosol, dove vengono utilizzati per la sintesi di saccarosio; contemporaneamente il P_i necessario per la fotofosforilazione entra nello stroma. Lo stesso antiporto può trasportare il 3-fosfoglicerato e agire indirettamente da sistema navetta per l'esportazione di ATP e di equivalenti riducenti.

Ruolo del antiporto P_i -triosio fosfato nel trasporto di ATP e di equivalenti riducenti.

Il diidrossiacetone fosfato esce dal cloroplasto e viene convertito nel citosol in gliceraldeide 3-fosfato. La reazione della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi citosolica e della fosfoglicerato chinasi producono NADH, ATP e 3-fosfoglicerato; quest'ultimo rientra nel cloroplasto e viene ridotto a diidrossiacetone fosfato, completando un ciclo che sposta l'ATP ed equivalenti riducenti (NADH/NADPH) dal cloroplasto al citosol.

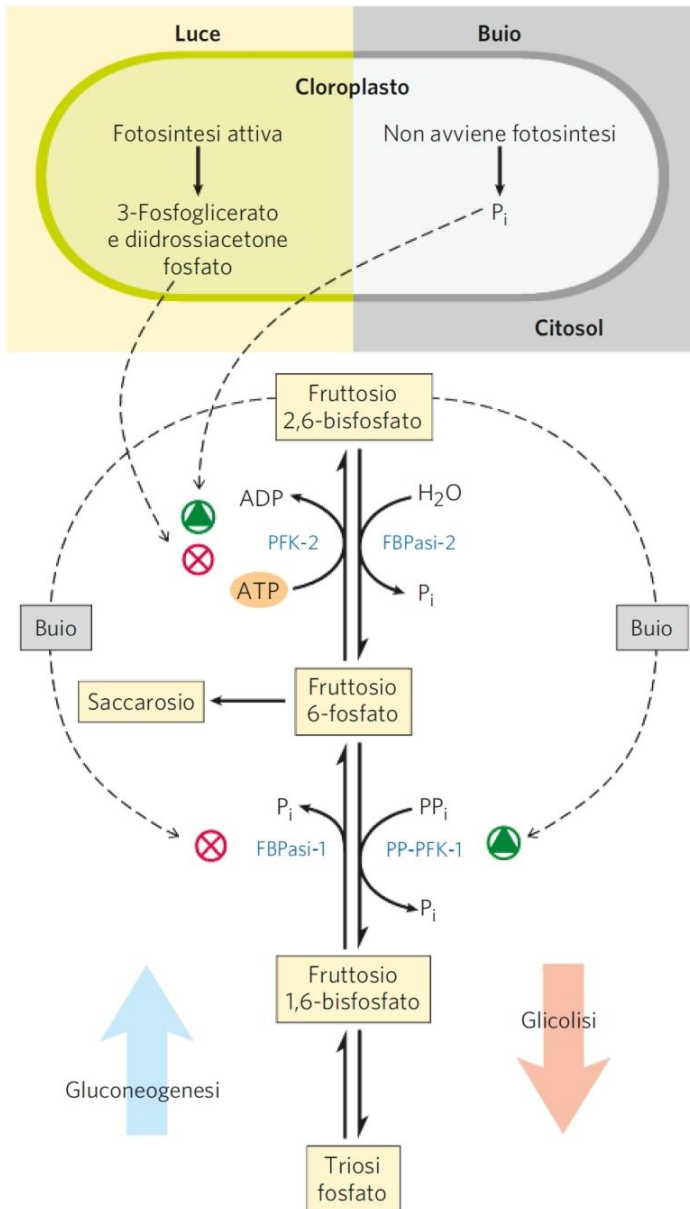


Il fruttosio 2,6-bisfosfato regola la sintesi del saccarosio

Il flusso dei triosi fosfati nella sintesi del saccarosio è regolato dall'attività della fruttosio 1,6-bisfosfatasi (FBPasi-1) e dell'enzima fosfofruttochinasi PP_i -dipendente (PP-PFK-1).

Entrambi gli enzimi sono regolati dal fruttosio 2,6-bisfosfato (F26BP) che inibisce la FBPasi-1 e stimola la PP-PFK-1. La fosfofruttochinasi-2, che sintetizza l'F2,6BP, è inibita dal diidrossiacetone fosfato o dal 3-fosfoglicerato, mentre è stimolata dal fruttosio 6-fosfato e dal P_i .

Durante la fotosintesi il diidrossiacetone fosfato viene prodotto mentre viene consumato il PP_i ; la PFK-2 è inibita e la concentrazione di F2,6BP si abbassa. Ciò favorisce un maggior flusso di triosi fosfato verso la formazione di fruttosio 6-fosfato e la sintesi di saccarosio.



La sintesi del saccarosio è regolata anche a livello della saccarosio 6-fosfato sintasi, che viene attivata allostericamente dal glucosio 6-fosfato e inibita dal P_i .

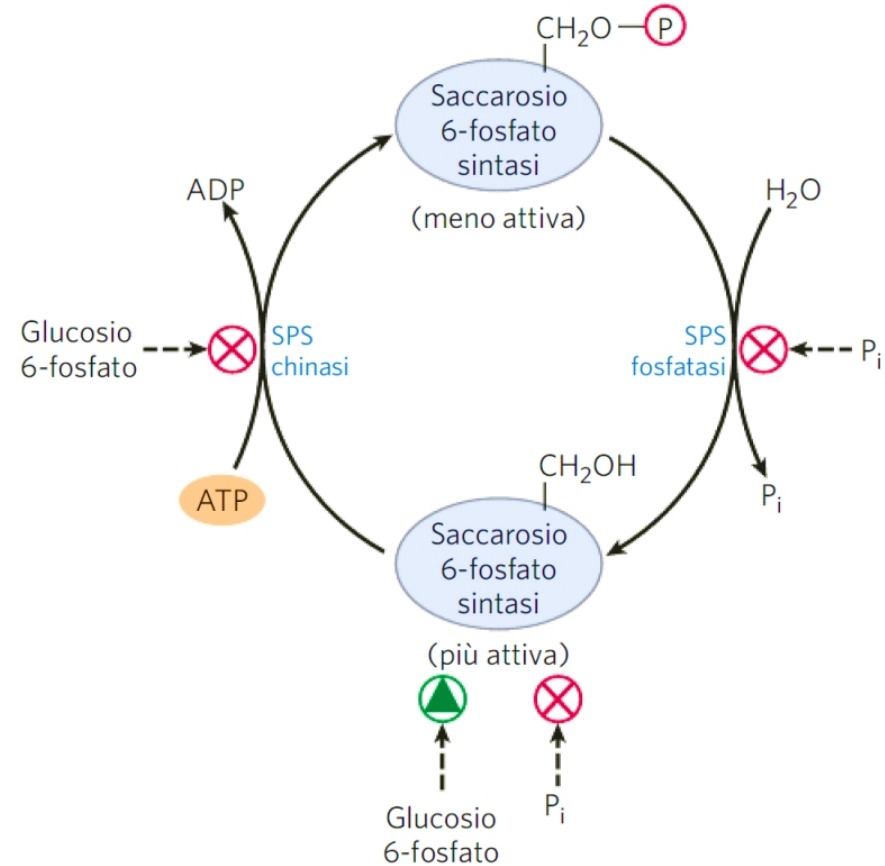
Questo enzima viene ulteriormente regolato dalla fosforilazione e defosforilazione, dove una proteina chinasi fosforila l'enzima su uno specifico residuo di Ser, rendendolo meno attivo, e una fosfatasi inverte questa inattivazione rimuovendo il gruppo fosfato.

La chinasi viene inibita allostericamente dal glucosio 6-fosfato che allo stesso tempo attiva la saccarosio 6-fosfato sintasi.

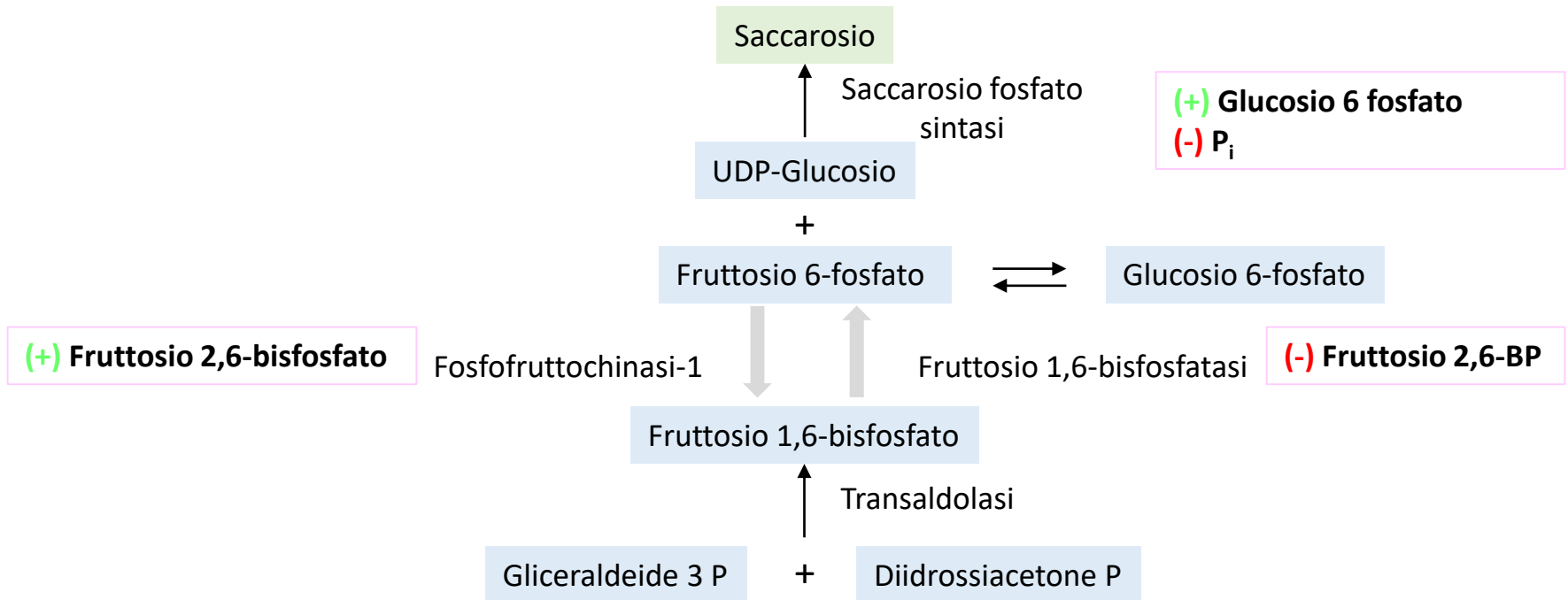
La fosfatasi è inibita dal P_i che inibisce direttamente anche la saccarosio 6-fosfato sintasi.

Quando la fotosintesi determina un'elevata concentrazione di glucosio 6-fosfato, la saccarosio 6-fosfato sintasi è attiva e produce saccarosio fosfato. Un'elevata concentrazione di P_i si ha quando la conversione fotosintetica di ADP in ATP rallenta, inibisce la sintesi del saccarosio fosfato.

Regolazione mediante fosforilazione della saccarosio fosfato sintasi



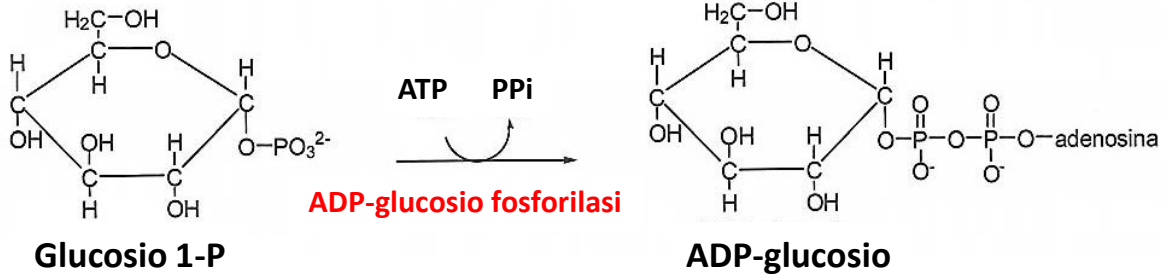
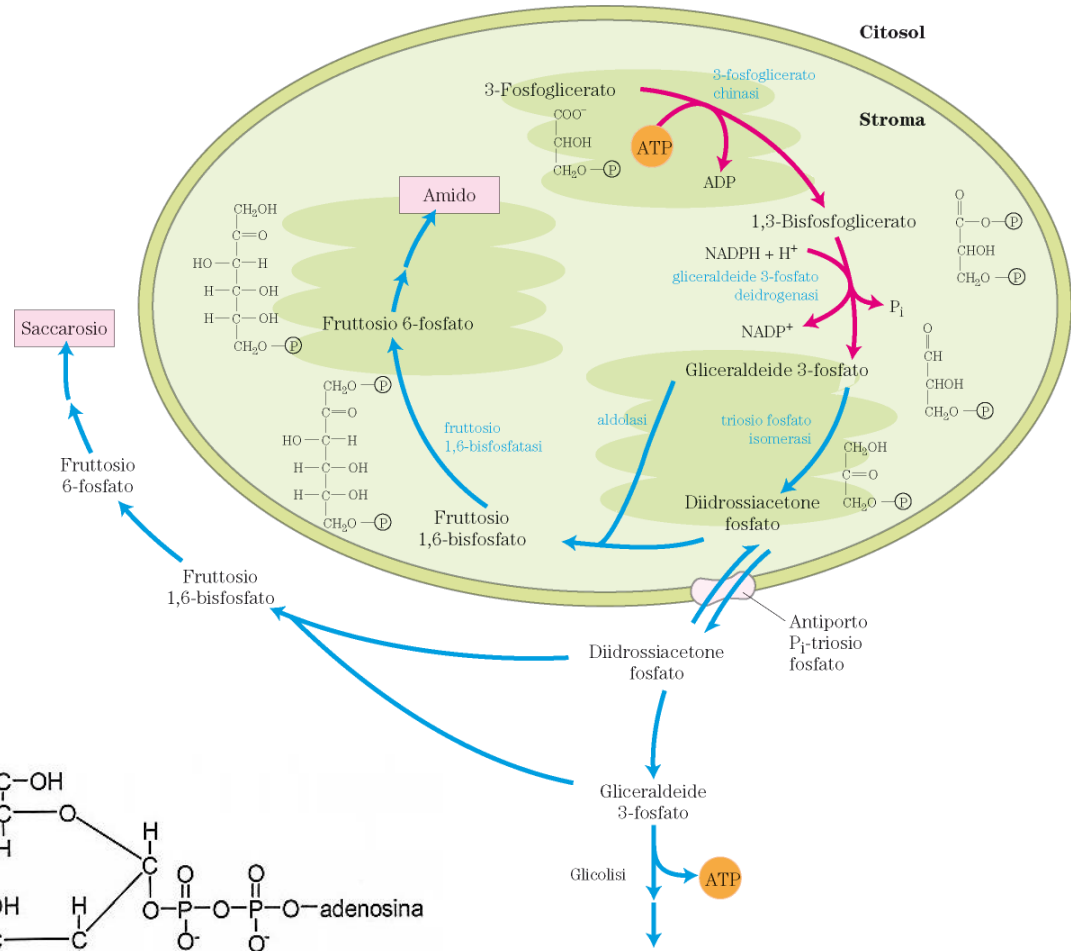
Regolazione della sintesi di saccarosio



La sintesi di saccarosio è regolata attraverso il controllo esercitato dal fruttosio 2,6 bisfosfato su due enzimi, la fruttosio 1,6 bisfosfatasi che defosforila il fruttosio 1,6 bisfosfato a fruttosio 6P e la fosfofruttochinasi che invece porta alla formazione del fruttosio 1,6 bisfosfato. L'accumulo di triosi fosfato favorisce la sintesi di fruttosio 6P che entra in equilibrio con il glucosio 6P mediante isomerizzazione, favorendo la sintesi di saccarosio. Al contrario quando la sintesi di ATP rallenta, si accumula P_i, anche la sintesi del saccarosio diminuisce.

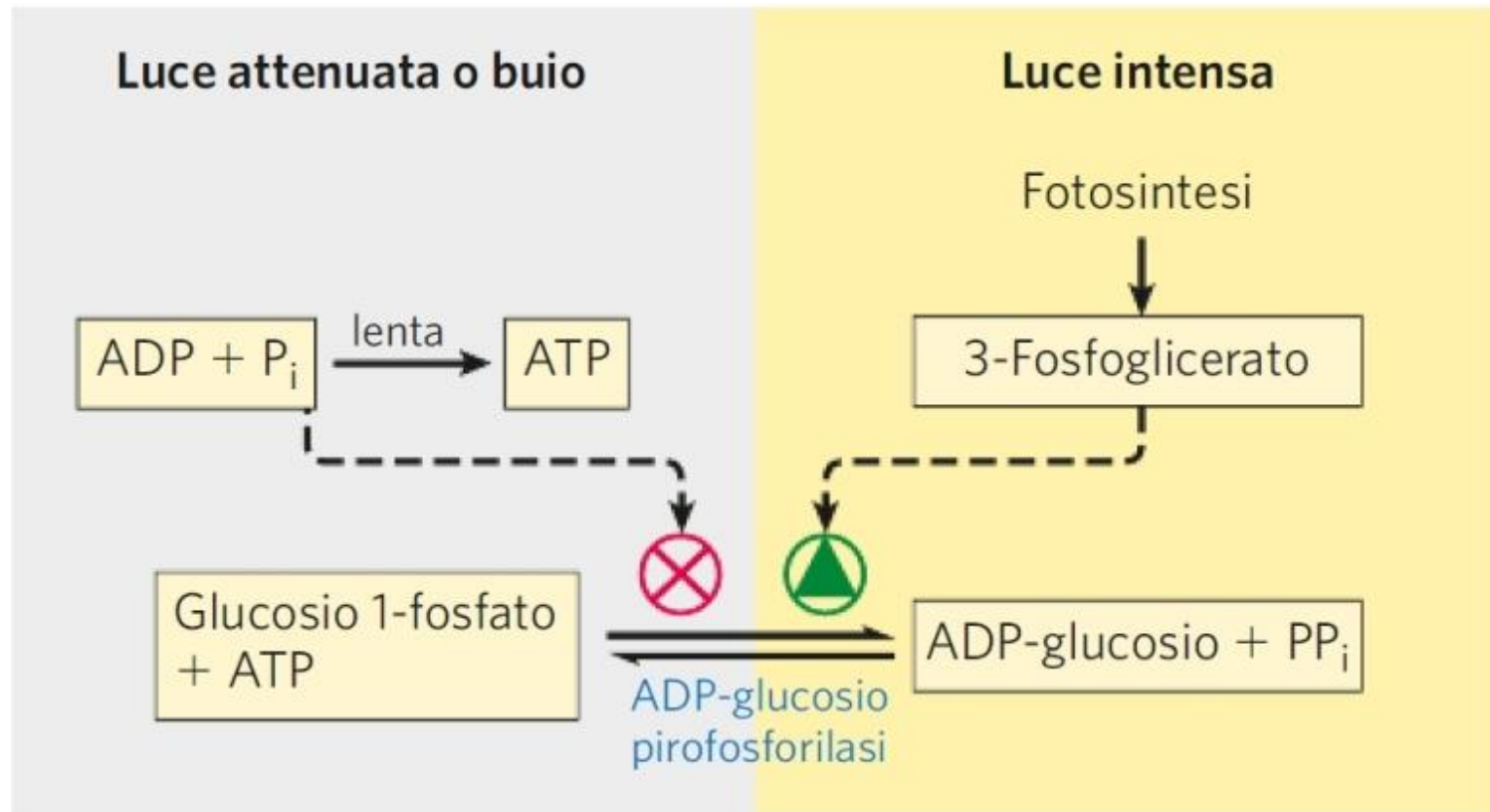
Regolazione della sintesi dell'amido

La sintesi dell'amido è favorita quando la bassa concentrazione di P_i nel citosol limita l'esportazione di triosi fosfato al di fuori del cloroplasto.



▲ 3-Fosfoglicerato
⊗ P_i

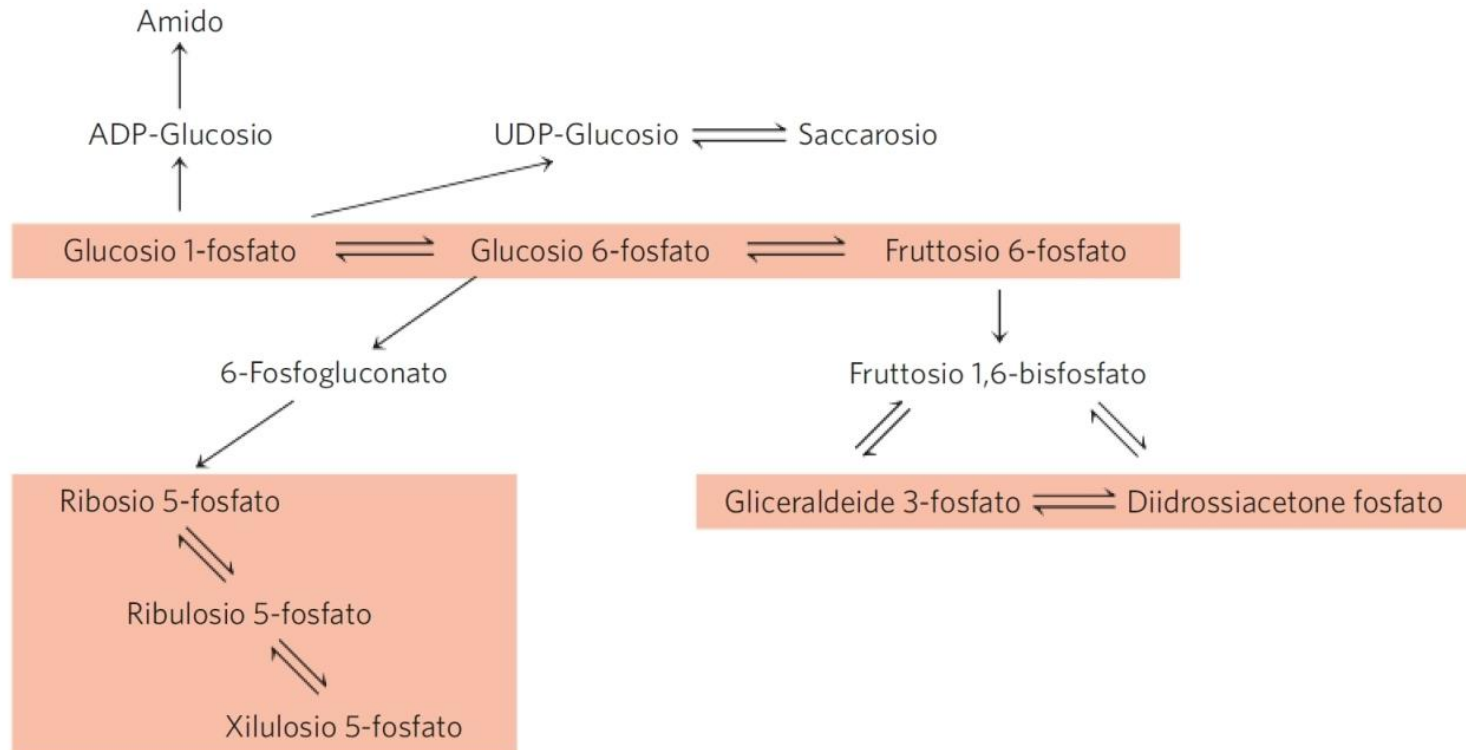
Regolazione dell'ADP-glucosio fosforilasi da parte del 3-fosfoglicerato e del P_i



L'enzima regolatore della sintesi dell'amido è l'ADP-glucosio pirofosforilasi che viene attivata dal 3-fosfoglicerato (che si accumula durante la fotosintesi) e inibita dal fosfato inorganico (che si accumula quando rallenta la condensazione di $ADP + P_i$ guidata dalla luce).

Quando la sintesi del saccarosio diminuisce, il 3-fosfoglicerato formato dalla fissazione della CO_2 si accumula, attivando questo enzima e stimolando la sintesi dell'amido.

Pool degli esosi fosfato, dei pentosi fosfato e dei triosi fosfato

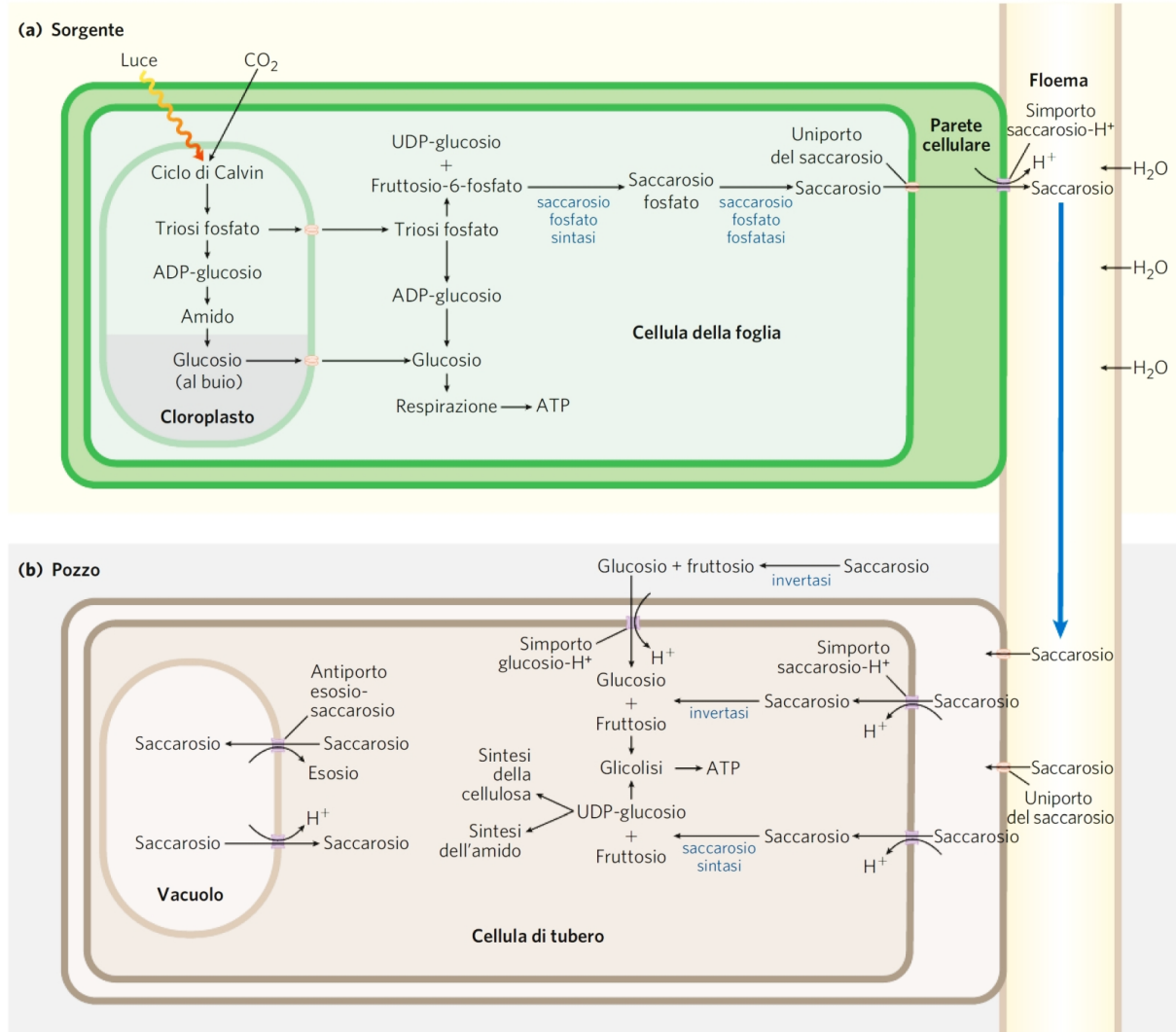


I composti di ogni singolo pool sono facilmente interconvertibili tramite reazioni le cui variazioni di energia libera standard sono basse. Quando la concentrazione del componente di un pool diminuisce momentaneamente, subito si ristabilisce un nuovo equilibrio, per rimpiazzare quello mancante. Il passaggio degli zuccheri fosforilati da un compartimento intracellulare all'altro è limitato; nelle membrane degli organelli devono essere presenti specifici trasportatori.

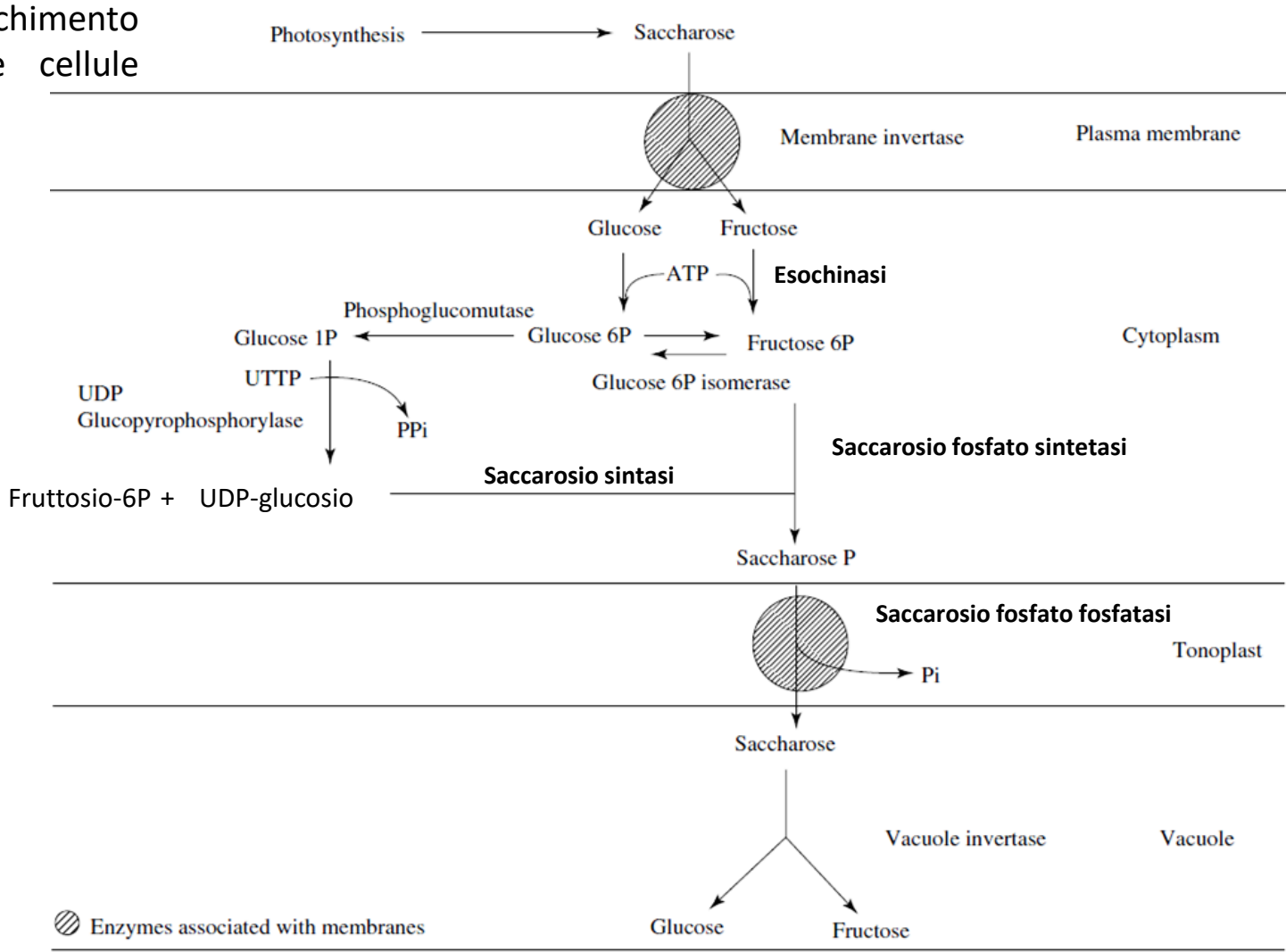
Movimento del saccarosio tra i tessuti fotosintetici e non

Durante le ore diurne i triosi fosfato prodotti nel tessuto delle foglie dal ciclo di Calvin si spostano all'esterno dei cloroplasti e passano nel pool citosolico degli esosi fosfato, dove vengono convertiti in saccarosio per essere trasportati attraverso il floema ai tessuti non fotosintetici.

In questi tessuti, il saccarosio viene trasformato in amido per essere conservato, oppure viene utilizzato come fonte di energia attraverso la glicolisi. Di notte l'amido è metabolizzato mediante glicolisi e fosforilazione ossidativa per produrre energia sia per i tessuti fonte (foglie) che per i tessuti contenitore (tessuti non fotosintetici).

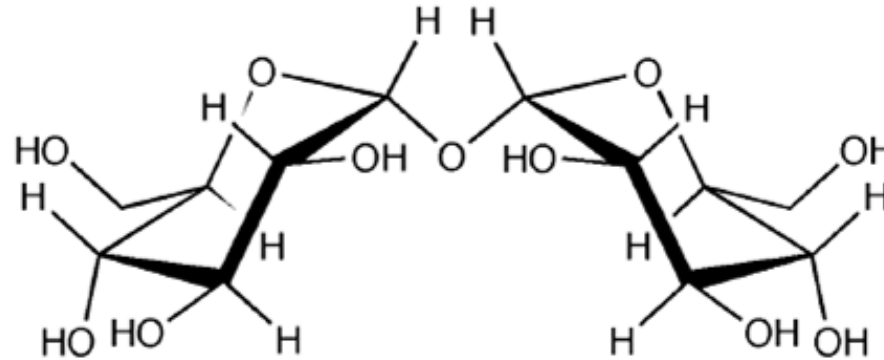


Maturazione e arricchimento di saccarosio nelle cellule della polpa dell'uva.



Meccanismo biochimico della penetrazione e dell'accumulo degli zuccheri nei vacuoli delle cellule della polpa dell'uva: la scomparsa degli ormoni della crescita, in particolare l'auxina e l'aumento del tenore in acido abscissico, corrispondono all'attivazione delle principali attività enzimatiche coinvolte nell'accumulo degli zuccheri nei vacuoli delle cellule della polpa. È il caso della saccarosio-fosfato sintetasi, della saccarosio sintetasi e dell'esochinasi.

Il trealosio:



Structure of the naturally occurring isomer of trehalose, $\alpha,\alpha,1,1$ -trehalose.

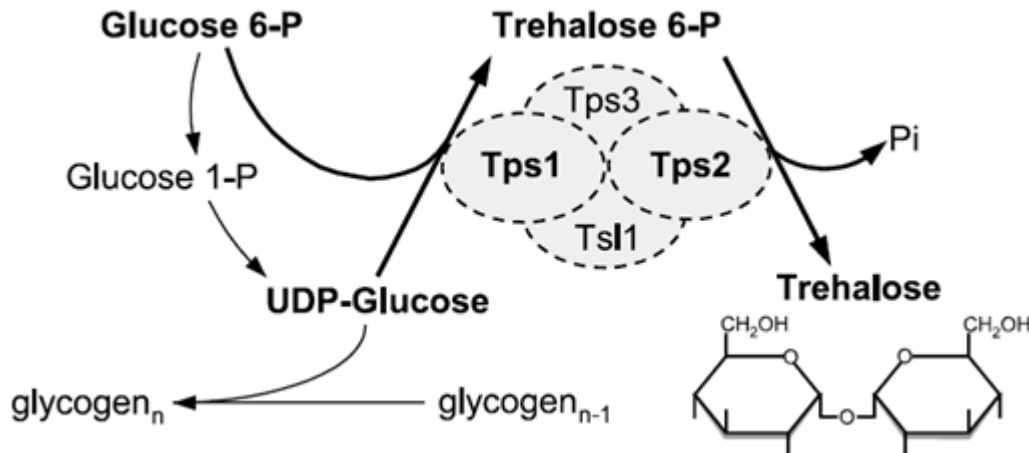
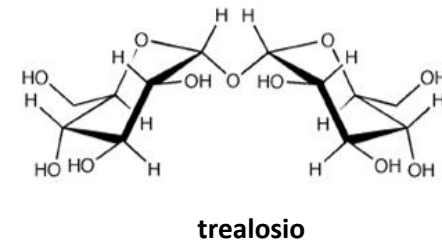
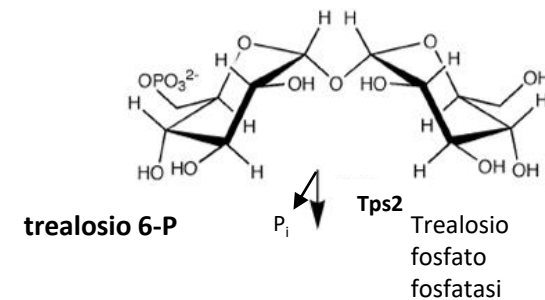
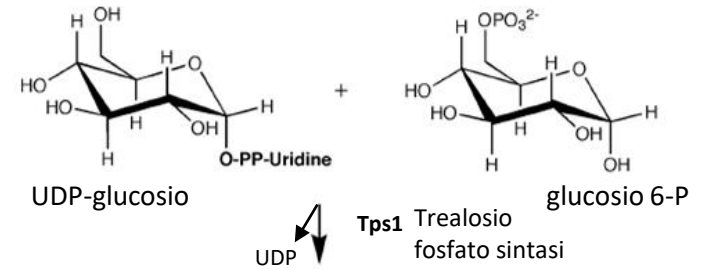
Alan D. Elbein, Y.T. Pan, Irena Pastuszak and David Carroll. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* vol. 13 no. 4 pp. 17R-27R, 2003.

Il trealosio è uno zucchero (disaccaride) non riducente dove due molecole glucosio sono legate insieme da un legame 1,1-glicosidico. Sebbene ci siano tre possibili anomeri di trealosio, cioè α,β -1,1-, β,β -1,1- e α,α -1,1-, solo l' α,α -trealosio è stato isolato e sintetizzato negli organismi viventi. Il trealosio è abbastanza comune nei lieviti e nei funghi dove è presente nelle spore, nei corpi fruttiferi e nelle cellule vegetative. Il trealosio è presente anche ad alte concentrazioni nel lievito di birra, dove la quantità dipende dall'età delle cellule e dallo stato nutrizionale.

Biosintesi del trealosio

Esistono almeno tre vie differenti per la sintesi biologica del trealosio. Queste vie portano alla produzione di trealosio-6-P o trealosio libero. L'enzima trealosio-fosfato sintasi (TPS) catalizza il trasferimento del glucosio dal UDP-glucosio a glucosio-6-fosfato per produrre trealosio-6-P più UDP.

Nel *S. cerevisiae*, la TPS è un complesso multienzimatico composto da quattro subunità. Una di queste subunità è la trealosio-P sintasi (TPS1), un'altra è la trealosio-P fosfatasi (TPS2), coinvolte rispettivamente nella sintesi e nella degradazione del trealosio. Le altre due subunità probabilmente sono implicate nella stabilità del complesso (TPS3 e TSL1).



Perché il lievito usa questo complesso enzimatico per sintetizzare il trealosio?

Ci sono alcune ipotesi possibili che spiegherebbero la relazione tra il metabolismo del trealosio e la glicolisi:

- la TPS, oltre a sintetizzare il trealosio-P, potrebbe avere una funzione regolatrice interagendo con il trasporto di glucosio e limitando il flusso di tale zucchero nella glicolisi.
- il metabolismo del trealosio può rallentare la glicolisi veicolando gli zuccheri-P nella sintesi del trealosio, questo percorso produce Pi necessario per l'attività della gliceraldeide-3-P deidrogenasi durante la formazione del 1,3-bisfosfoglicerato dal 3-fosfoglicerato.
- il trealosio-P può inibire l'attività dell'esochinasi (Hxk2) e limitare il flusso di glucosio nella via della glicolisi.

Idrolisi e trasporto del trealosio

Nel *S. cerevisiae*, lo stress o la «fame» possono portare a variazioni del contenuto di trealosio che va dall'1% al 20 % del peso secco della cellula. Si accumula nelle cellule sottoposte a limitazione di zucchero ed energia, sia durante la crescita sia durante la fase stazionaria.

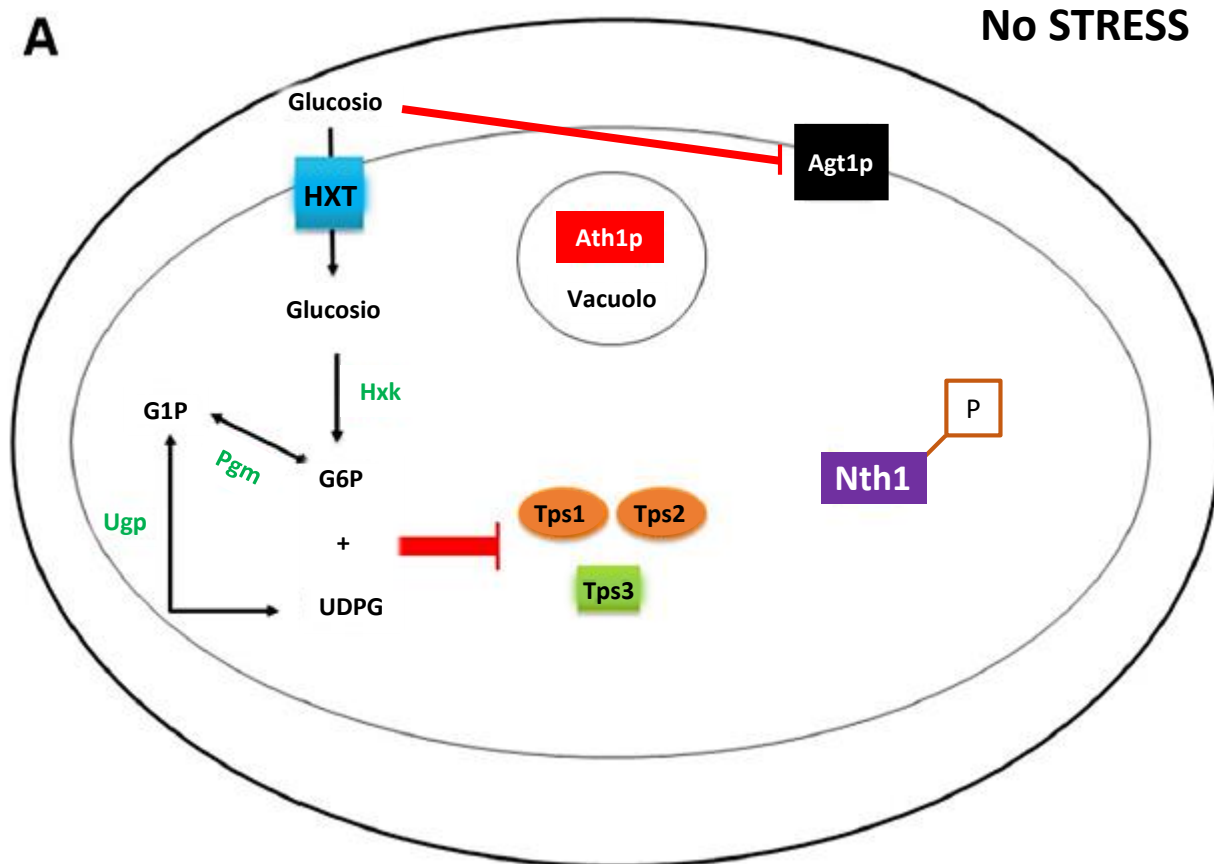
Durante la fase esponenziale il lievito non sintetizza trealosio, tuttavia, se cresce in un ambiente ricco di nutrienti si può accumulare grandi quantità di trealosio anche dopo un lieve stress, come la temperature a 37–40 °C.

Il trealosio viene degradato dalla trealasi e il *S. cerevisiae* ne ha tre differenti: Nth1p, Nth2p e Ath1p.

- La Nth1p si trova nel citoplasma e ha un pH ottimale di 7 (trealasi neutra). Ha un'attività massima nelle prime fasi di crescita; una volta che le cellule raggiungono la fase stazionaria, con l'inizio della respirazione, l'enzima è inattivato.
- La Nth2p è una seconda trealasi neutra presente anch'essa nel citoplasma. Ad oggi, non è stata attribuita alcuna attività significativa. Alcuni autori suggeriscono che la Nth2p potrebbe fungere da regolatore per l'attività della Nth1p.
- La Ath1p (forma acida) è presente nel vacuolo, ha un pH ottimale intorno a 5. È stato ipotizzato che questo enzima è essenziale per l'utilizzo di trealosio esogeno. Quando le cellule di lievito entrano nella fase di crescita, l'attività della trealasi acida aumenta gradualmente, raggiungendo un valore massimo nella fase stazionaria. Quando i lieviti devono affrontare condizioni avverse, la proteina Agt1p trasporta il trealosio al lato esterno della membrana plasmatica. Quando lo stress è finito, le molecole di trealosio esterne verrebbero degradate dall'Ath1p.

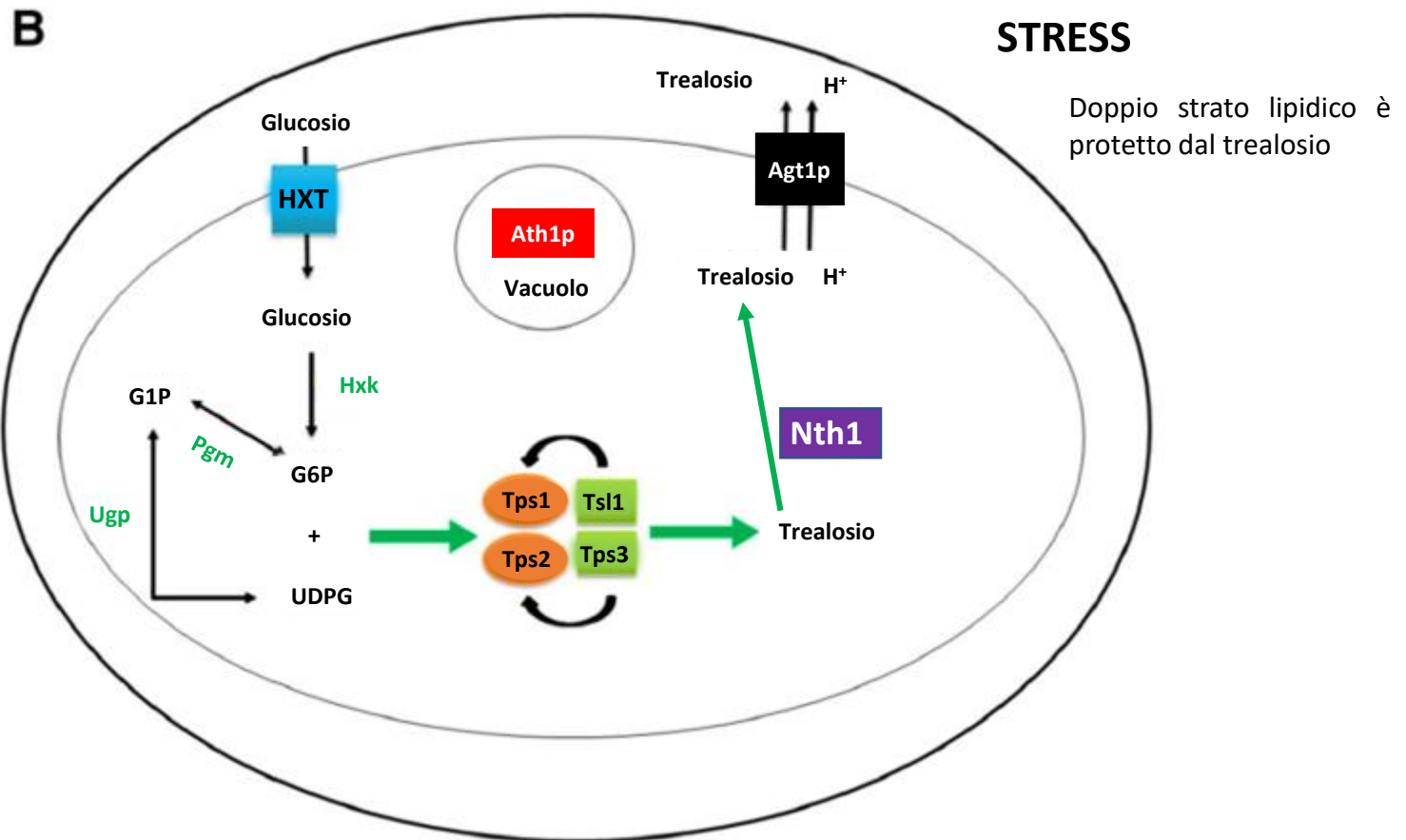
Modello di regolazione del metabolismo del trealosio in *S. cerevisiae*

In condizioni di non stress (A), le cellule non sintetizzano trealosio. Il complesso TPS non è completo e il livello di attività della subunità Tps1 è basso. Il glucosio reprime l'espressione della proteina di membrana Agt1p.



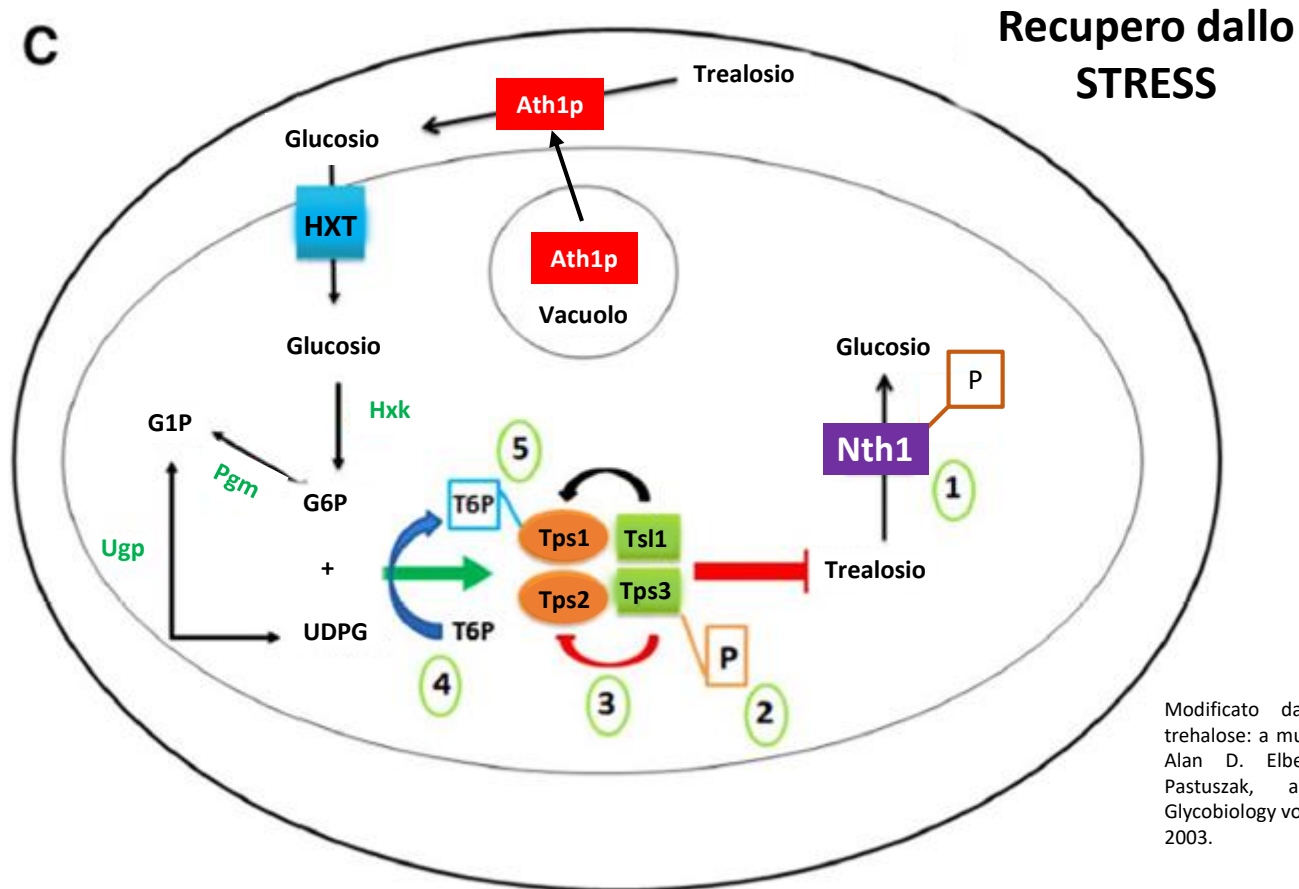
Modello di regolazione del metabolismo del trealosio in *S. cerevisiae*

In condizione di stress (B), TSL1 è fortemente indotto, attivando il complesso TPS. La trealasi neutra non è fosforilata, quindi non è attiva consentendo un forte incremento del livello di trealosio.



Modello di regolazione del metabolismo del trealosio in *S. cerevisiae*

Recupero dallo stress: il trealosio non è più richiesto e deve essere degradato. L'idrolisi del trealosio fornisce l'energia necessaria per il recupero dallo stress. Inoltre, la sua presenza è dannosa perché interferisce con la riattivazione di proteine denaturate dallo shock termico.



Modificato da: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Alan D. Elbein Y.T. Pan, Irena Pastuszak, and David Carroll. Glycobiology vol. 13 no. 4 pp. 17R-27R, 2003.

Quando la condizione di stress finisce la subunità Tps3p del complesso è fosforilata (2) ciò porta all'inibizione dell'attività della subunità Tps2 (3) che, a sua volta, aumenta i livelli di T6P (4). L'accumulo di T6P inibisce la subunità Tps1p (5) interrompendo la sintesi del trealosio.

Importanza del trealosio nei lieviti

Il trealosio è coinvolto nella tolleranza all'anidrobiosi (resistenza all'essiccamento). Questi organismi sono in grado di far fronte all'essiccazione quasi completa e mostrano grande tolleranza alle condizioni estreme, come all'esposizione prolungata ad alta energia (radiazioni e temperatura). Il trealosio è lo zucchero più efficace per stabilizzare le cellule durante la liofilizzazione.

Il trealosio è necessario per prevenire la transizione di fase dei lipidi abbassando la temperatura di transizione (T_m) che, in assenza di acqua, li mantiene nella fase liquido-cristallina. Il trealosio si adatta bene tra la testa polare dei lipidi formando legami a idrogeno, ciò suggerisce che il forte effetto stabilizzante sia legato alla sua stereochimica. Inoltre, previene i danni alle membrane durante l'essiccazione perché sostituisce le molecole d'acqua che sono normalmente legate sulla superficie esterna e interna del doppio strato lipidico.

Il trealosio preserva anche le proteine labili durante l'essiccazione. Ad esempio, la fosfofruttochinasi 1 è un ottamero che durante il processo di essiccazione si dissocia irreversibilmente in dimeri inattivi. Nelle membrane, il trealosio interagisce direttamente con la proteina attraverso legami a idrogeno con i suoi gruppi ossidrilici e i residui polari della proteina. Non è chiaro come questo tipo d'interazione si traduca in stabilizzazione, ma il fatto che il trealosio sia uno zucchero non riducente significa che non può subire la tipica reazione di imbrunimento tra il suo gruppo aldeidico e i gruppi amminici delle proteine. La reazione di imbrunimento di solito porta alla denaturazione delle proteine.

Importanza del trealosio nei lieviti

Il meccanismo con cui il trealosio protegge i lieviti sembra essere legato alla sua capacità di formare strati vetrosi che possono contenere biomolecole nella loro conformazione nativa anche in assenza dell'acqua di idratazione.

Il trealosio migliora la capacità di fermentazione dei lieviti, fornendo una protezione contro l'ossidazione e il danno alle proteine e lipidi, allunga la vita della cellula e aumenta la produzione di etanolo:

- Nelle proteine agisce come antiossidante, è in grado di ridurre l'ossidazione del C α dello scheletro proteico da parte dei radicali liberi durante lo stress.
- Il trealosio ha la capacità di ridurre la perossidazione lipidica durante la disidratazione, specialmente nelle cellule di lievito carenti di enzima antiossidante superossido dismutasi. Nel ruolo di protezione dai danni dei radicali dell'ossigeno, sembra agisca come spazzino di radicali liberi.

La risposta allo shock termico causa l'accumulo di trealosio. Infatti, almeno due subunità del complesso trealosio-6-P sintasi del *S. cerevesiae* è attivo durante lo shock termico e la concentrazione fisiologica del trealosio può arrivare fino a 0,5 M.